

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-518655

(P2018-518655A)

(43) 公表日 平成30年7月12日 (2018.7.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 35/08 (2006.01)	G O 1 N 35/08 A	2 G O 5 8
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 37/00 1 O 1	3 C O 8 1
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 O 1 A	4 B O 2 9
B 8 1 C 3/00 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 4 1 A	4 B O 3 3
C 1 2 N 11/00 (2006.01)	B 8 1 C 3/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 135 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-551668 (P2017-551668)	(71) 出願人	391008788 アボット・ラボラトリーズ ABBOTT LABORATORIES アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット パーク アボット パーク ロード 1 O O
(86) (22) 出願日	平成28年4月2日 (2016.4.2)	(74) 代理人	100094569 弁理士 田中 伸一郎
(85) 翻訳文提出日	平成29年12月1日 (2017.12.1)	(74) 代理人	100088694 弁理士 弟子丸 健
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/025785	(74) 代理人	100103610 弁理士 ▲吉▼田 和彦
(87) 国際公開番号	W02016/161400	(74) 代理人	100095898 弁理士 松下 満
(87) 国際公開日	平成28年10月6日 (2016.10.6)		
(31) 優先権主張番号	62/142, 858		
(32) 優先日	平成27年4月3日 (2015.4.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サンプル分析用デバイス及び方法

(57) 【要約】

検出構成要素と統合されたサンプル調製構成要素を含む集積デバイスが開示される。サンプル調製構成要素は、デジタルマイクロ流体モジュール又は表面弾性波モジュールであり得、これらモジュールは、サンプル小滴を試薬小滴と組み合わせるため、及び、サンプル中の対象検体の存在又は非存在を示すビーズ／粒子／標識を含有する小滴をもたらす更なるサンプル調製ステップを行うために用いられる。ビーズ／粒子／標識は、小滴をデバイスの検出構成要素へ移動させることによって検出することができ、この検出構成要素は、ウェルのアレイを含む。

【選択図】 図 1 A

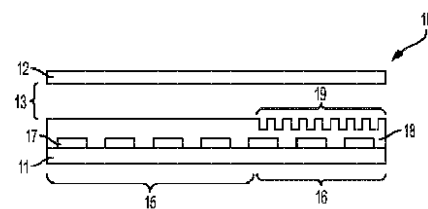


FIG. 1A

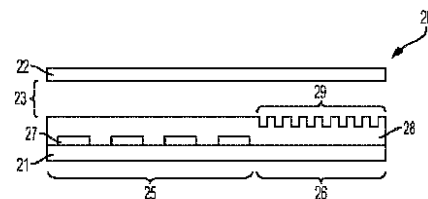


FIG. 1B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスであって、

第 1 の基板及び第 2 の基板を備え、前記第 2 の基板は前記第 1 の基板から間隙によって分離されており、前記第 1 の基板は液滴上に電気的アクチュエーション力を発生させる複数の電極を備え、

前記液滴の一部を保持する寸法のウェルのアレイを備え、前記ウェルのアレイの少なくとも一部は、前記複数の電極のうちの 1 つ又はそれより多くと前記間隙との間に位置決めされる、

ことを特徴とする、デバイス。

10

【請求項 2】

前記複数の電極は、前記第 1 の基板の表面上に位置決めされることを特徴とする、請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 3】

前記第 1 の基板の前記表面上に配置された、前記複数の電極を覆う第 1 の層をさらに備えることを特徴とする、請求項 1 ～請求項 2 のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 4】

前記第 1 の基板は、前記液滴が導入される第 1 の部分と、液滴がそこへ向かって移動する第 2 の部分とを備えることを特徴とする、請求項 1 ～請求項 3 のいずれかに記載のデバイス。

20

【請求項 5】

前記複数の電極及び前記第 1 の層は、前記第 1 の基板の前記第 1 の部分から前記第 2 の部分へ延びることを特徴とする、請求項 4 に記載のデバイス。

【請求項 6】

前記ウェルのアレイは、前記第 1 の基板の前記第 2 の部分内に位置決めされることを特徴とする、請求項 5 に記載のデバイス。

【請求項 7】

前記第 2 の基板は、第 1 の部分及び第 2 の部分を備え、前記第 1 の部分は、前記第 1 の基板の前記第 1 の部分に面した配置にあり、前記第 2 の部分は、前記ウェルのアレイに面した配置にあることを特徴とする、請求項 4 に記載のデバイス。

30

【請求項 8】

前記第 2 の基板の前記第 2 の部分は、実質的に透明であり、前記ウェルのアレイの光学的照合を容易にすることを特徴とする、請求項 7 に記載のデバイス。

【請求項 9】

前記第 1 の層の表面上に配置された第 2 の層をさらに備えることを特徴とする、請求項 3 に記載のデバイス。

【請求項 10】

第 2 の層は、前記第 1 の基板の前記第 1 及び第 2 の部分の上に延びることを特徴とする、請求項 9 に記載のデバイス。

【請求項 11】

前記第 1 の層は誘電性層であり、前記第 2 の層は疎水性層であることを特徴とする、請求項 9 ～請求項 10 のいずれかに記載のデバイス。

40

【請求項 12】

前記ウェルのアレイは、前記第 2 の層内に位置決めされることを特徴とする、請求項 9 ～請求項 11 のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 13】

前記ウェルのアレイは、前記第 1 の層内に位置決めされることを特徴とする、請求項 3 に記載のデバイス。

【請求項 14】

前記ウェルのアレイは、親水性表面を有することを特徴とする、請求項 1 ～請求項 13

50

のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 15】

前記ウェルのアレイは、前記ウェルのアレイの上を移動する小滴中に存在するビーズ又は粒子の受入れ及び保持を促進するように配向された側壁を備えることを特徴とする、請求項 1～請求項 14 のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 16】

前記ウェルのアレイは、第 2 の側壁に対向した第 1 の側壁を備え、前記第 1 の側壁は、前記ウェルの底部に対して鈍角に配向され、前記第 2 の側壁は、前記ウェルの前記底部に対して鋭角で配向され、小滴の移動は、前記ウェルの前記底部に対して平行に前記第 1 の側壁から前記第 2 の側壁へ向かう方向であることを特徴とする、請求項 16 に記載のデバイス。

10

【請求項 17】

前記ウェルのアレイは、切頭円錐形を有し、前記切頭円錐形の狭い方の部分が前記ウェルのアレイの開口部を与えることを特徴とする、請求項 15 に記載のデバイス。

【請求項 18】

前記ウェルのアレイは、第 2 の側壁に対向した第 1 の側壁を備え、前記第 1 の側壁の上部分は、前記ウェルの底部に対して鈍角に配向され、前記側壁の下部分は、前記ウェルの前記底部に対して垂直に配向され、前記第 2 の側壁は、前記ウェルの前記底部に対して垂直に配向され、前記小滴の移動は、前記ウェルの前記底部に対して平行に前記第 1 の側壁から前記第 2 の側壁へ向かう方向であり、前記第 1 の側壁の前記上部分は、前記ウェルの開口部にあることを特徴とする、請求項 15 に記載のデバイス。

20

【請求項 19】

デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスであって、

前記デバイスを定める第 1 の基板及び第 2 の基板を備え、前記第 2 の基板は前記第 1 の基板から間隙によって分離されており、前記デバイスは、第 1 の部分及び第 2 の部分を備え、

前記第 1 の部分は、複数の電極を備えており、生物学的サンプル由来の対象検体を含有する第 1 の液滴と、少なくとも 1 つのビーズを含有する第 2 の液滴とを組み合わせることをアクチュエーションし、

前記第 2 の部分は、前記液滴の一部を保持する寸法のウェルのアレイを備えることを特徴とする、デバイス。

30

【請求項 20】

前記複数の電極は、前記デバイスの前記第 1 の部分内にのみ位置決めされることを特徴とする、請求項 19 に記載のデバイス。

【請求項 21】

前記複数の電極は、前記第 1 の基板の表面上に位置決めされることを特徴とする、請求項 19～請求項 20 のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 22】

前記第 1 の基板の前記表面上に配置された、前記複数の電極を覆う第 1 の層をさらに備えることを特徴とする、請求項 19～請求項 21 のいずれかに記載のデバイス。

40

【請求項 23】

前記第 1 の基板は、前記液滴が導入される第 1 の部分と、液滴がそこへ向かって移動する第 2 の部分とを備えることを特徴とする、請求項 19～請求項 22 のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 24】

前記複数の電極及び前記第 1 の層は、前記第 1 の基板の前記第 1 の部分から前記第 2 の部分へ延びることを特徴とする、請求項 23 に記載のデバイス。

【請求項 25】

前記ウェルのアレイは、前記第 1 の基板の前記第 2 の部分内に位置決めされることを特徴とする、請求項 24 に記載のデバイス。

50

【請求項 26】

前記第2の基板は、第1の部分及び第2の部分の備え、前記第1の部分は、前記第1の基板の前記第1の部分に面した配置にあり、前記第2の部分は、前記ウェルのアレイに面した配置にあることを特徴とする、請求項23に記載のデバイス。

【請求項 27】

前記第2の基板の前記第2の部分は、実質的に透明であり、前記ウェルのアレイの光学的照合を容易にすることを特徴とする、請求項26に記載のデバイス。

【請求項 28】

前記複数の電極は、前記間隙内に置かれた小滴を前記デバイスの前記第2の部分へ向かって移動させるように構成され、前記デバイスは、前記第1の部分を前記第2の部分へ流体的に接続する毛管部分を備え、前記毛管は、親水性材料を含んでおり、電気的力の非存在下で前記毛管部分を介して前記第1の部分から前記第2の部分への前記小滴の移動を促進することを特徴とする、請求項19～請求項27のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 29】

第2の層が前記第1の層の上面上に配置されることを特徴とする、請求項22に記載のデバイス。

【請求項 30】

第2の層は、前記第1の基板の上に延びることを特徴とする、請求項29に記載のデバイス。

【請求項 31】

前記第1の層は誘電性層であり、前記第2の層は疎水性層であることを特徴とする、請求項29～請求項30のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 32】

複数のウェルが前記第2の層内に位置決めされることを特徴とする、請求項29～請求項31のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 33】

前記ウェルのアレイは、前記第1の層内に位置決めされることを特徴とする、請求項22に記載のデバイス。

【請求項 34】

前記ウェルのアレイは、親水性表面を有することを特徴とする、請求項19～請求項33のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 35】

前記ウェルは、前記ウェルのアレイの上を移動する小滴中に存在するナノビーズ又はナノ粒子の受入れ及び保持を促進するように配向された側壁を備えることを特徴とする、請求項19～請求項34のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 36】

前記ウェルは、第2の側壁に対向した第1の側壁を備え、前記第1の側壁は、前記ウェルの底部に対して鈍角に配向され、前記第2の側壁は、前記ウェルの前記底部に対して鋭角に配向され、小滴の移動は、前記ウェルの前記底部に対して平行に前記第1の側壁から前記第2の側壁へ向かう方向であることを特徴とする、請求項35に記載のデバイス。

【請求項 37】

前記ウェルは、切頭円錐形を有し、前記切頭円錐形の狭い方の部分が前記ウェルの開口部を与えることを特徴とする、請求項36に記載のデバイス。

【請求項 38】

前記ウェルは、第2の側壁に対向した第1の側壁を備え、前記第1の側壁の上部分は、前記ウェルの底部に対して鈍角に配向され、前記側壁の下部分は、前記ウェルの前記底部に対して垂直に配向され、前記第2の側壁は、前記ウェルの前記底部に対して垂直に配向され、前記小滴の移動は、前記ウェルの前記底部に対して平行に前記第1の側壁から前記第2の側壁へ向かう方向であり、前記第1の側壁の前記上部分は、前記ウェルの開口部にあることを特徴とする、請求項35に記載のデバイス。

【請求項 39】

表面弾性波マイクロ流体及び検体検出デバイスであって、

第1の基板及び第2の基板を備え、前記第2の基板は前記第1の基板から間隙によって分離されており、前記デバイスは、第1の部分及び第2の部分を備え、

前記第1の部分は、表面弾性波発生構成要素に連結された上層を備え、

前記第2の部分は、前記第1の基板又は前記第2の基板上に位置決めされた複数のウェルを備える

ことを特徴とする、デバイス。

【請求項 40】

前記上層は、該上層の上面上にフォノン構造を含むことを特徴とする、請求項39に記載のデバイス。 10

【請求項 41】

前記上層は、圧電結晶層の上に重なることを特徴とする、請求項39～請求項40のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 42】

前記第2の基板は、実質的に透明であることを特徴とする、請求項39～請求項40のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 43】

表面弾性波マイクロ流体及び検体検出デバイスであって、

第1の基板及び第2の基板を備え、前記第2の基板は前記第1の基板から間隙によって分離されており、 20

前記第1の基板は、複数のウェルを備え、

前記第2の基板は、フォノン構造を備え、前記複数のウェル及び前記フォノン構造は、互いにわたって位置する

ことを特徴とする、デバイス。

【請求項 44】

前記第2の基板は、上層であることを特徴とする、請求項43に記載のデバイス。

【請求項 45】

前記上層は、前記第2の基板上に配置され、前記フォノン構造は、前記上層上に位置することを特徴とする、請求項43に記載のデバイス。 30

【請求項 46】

前記第1の基板、第2の基板及び上層は、実質的に透明であることを特徴とする、請求項43～請求項45のいずれかに記載のデバイス。

【請求項 47】

液滴中の対象検体を検出する方法であって、

(a) 対象検体を含有する第1の液滴を準備するステップと、

(b) 前記対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する少なくとも1つの固体支持体を含有する第2の液滴を準備するステップと、

(c) 力を及ぼすエネルギーを用いて、前記第1の液滴を前記第2の液滴と共に操作して混合物を作製する、ステップと、 40

(d) 前記混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させるステップであって、前記アレイの1つ又はそれより多くのウェルは、前記少なくとも1つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ステップと、

(e) 前記混合物の一部をウェルのアレイへ移動させるステップの前又は後のいずれかに、前記混合物に検出可能標識を添加するステップと、

(f) 前記ウェル内の前記対象検体を検出するステップと、

を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 48】

前記少なくとも1つの固体支持体は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも1つの結合メンバーを含むことを特徴とする、請求項47に記載の方法。 50

【請求項 49】

前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの前に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 47～請求項 48 のいずれかに記載の方法。

【請求項 50】

前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの後に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 47～請求項 48 のいずれかに記載の方法。

【請求項 51】

前記検出可能標識は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも 1 つの結合メンバーを含むことを特徴とする、請求項 47～請求項 50 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 52】

前記検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含むことを特徴とする、請求項 47～請求項 51 のいずれかに記載の方法。

【請求項 53】

前記結合メンバーは、受容体又は抗体であることを特徴とする、請求項 47～請求項 52 のいずれかに記載の方法。

【請求項 54】

前記エネルギーは、電気的アクチュエーション力又は音響力であることを特徴とする、請求項 47～請求項 53 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 55】

前記電気的アクチュエーション力は、小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェットティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離又は吸引であることを特徴とする、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記音響力は、表面弾性波であることを特徴とする、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 57】

前記第 1 の液滴が分極可能な不混和性液体であるか、前記第 2 の液滴が分極可能な液体であるか、前記混合物が分極可能な液体であるか、又は前記第 1 の液滴及び前記第 2 の液滴の両方が各々分極可能な液体であることを特徴とする、請求項 47～請求項 56 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 58】

電気的アクチュエーション力を用いて前記混合物を前記ウェルのアレイの上で操作するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 47～請求項 55 のいずれかに記載の方法。

【請求項 59】

前記ウェルのアレイへの前記混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、前記ウェルのアレイの上で前記混合物を操作するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 47～請求項 58 のいずれかに記載の方法。

【請求項 60】

前記固体支持体は、磁性固体支持体であることを特徴とする、請求項 47～請求項 59 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 61】

電気的アクチュエーション力及び磁場が、前記混合物の少なくとも一部に対して反対方向から印加されることを特徴とする、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

前記混合物を前後に動かすこと、前記混合物を円形パターンで動かすこと、前記混合物を 2 つ以上のサブ混合物に分割し且つ前記サブ混合物を併合することによって、前記混合物を混合するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 47～請求項 61 のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 6 3】

前記混合物は、水性液体であることを特徴とする、請求項 4 7～請求項 6 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 4】

前記混合物は、不混和性液体であることを特徴とする、請求項 4 7～請求項 6 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 5】

前記液滴は、疎水性液滴であることを特徴とする、請求項 4 7～請求項 6 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 6】

前記ウェルのアレイは、親水性表面を有することを特徴とする、請求項 4 7～請求項 6 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 7】

前記ウェルのアレイは、疎水性表面を有することを特徴とする、請求項 4 7～請求項 6 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 8】

前記方法は、第 1 及び第 2 の基板を備え、少なくとも 1 つの基板が親水性表面を備えたデバイス内で行われることを特徴とする、請求項 4 7～請求項 6 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 9】

前記方法は、第 1 及び第 2 の基板を備え、少なくとも 1 つの基板が疎水性表面を備えたデバイス内で行われることを特徴とする、請求項 4 7～請求項 6 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 0】

複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、前記混合物を前記ウェルのアレイへ移動させて前記ウェルを装填するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 4 7～請求項 6 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 1】

前記アレイの 1 つ又はそれより多くのウェルに少なくとも 1 つの固体支持体が装填されることを特徴とする、請求項 4 7～請求項 7 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 2】

前記装填することは、磁場を印加して、前記アレイの前記 1 つ又はそれより多くのウェル内への少なくとも 1 つの固体支持体の移動を促進することを含むことを特徴とする、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記装填後に、前記アレイのウェル内に装填されなかった固体支持体があればこれを除去することをさらに含むことを特徴とする、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記除去することは、複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、分極可能な流体小滴を前記ウェルのアレイへ移動させ、前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイから所定距離まで移動させることを含むことを特徴とする、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記除去することは、複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、水性洗浄用小滴を前記ウェルのアレイにわたって移動させることを含むことを特徴とする、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記電気的アクチュエーション力を発生させることは、交流電流を発生させることを含むことを特徴とする、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

10

20

30

40

50

前記交流電流は、10 V以上の二乗平均平方根（r m s）電圧を有することを特徴とする、請求項75に記載の方法。

【請求項78】

前記交流電流は、無線周波数範囲内の周波数を有することを特徴とする、請求項75～請求項76のいずれかに記載の方法。

【請求項79】

前記方法は、マイクロ流体デバイス、デジタルマイクロ流体デバイス（DMF）、表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス（SAW）、集積されたDMF及び検体検出デバイス、集積されたSAW及び検体検出デバイス、又はロボット工学ベースのアッセイ処理ユニットを用いて行われることを特徴とする、請求項47～請求項78のいずれかに記載の方法。

10

【請求項80】

液滴中の対象検体を検出する方法であって、

（a）対象検体を含有する第1の液滴を準備するステップと、

（b）前記対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する検出可能標識を含有する第2の液滴を準備するステップと、

（c）力を及ぼすエネルギーを用いて、前記第1の液滴及び前記第2の液滴を操作して混合物を作製する、ステップと、

（d）前記混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させるステップと、

（e）前記ウェル内の前記対象検体を検出するステップと、

を含むことを特徴とする、方法。

20

【請求項81】

前記検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含むことを特徴とする、請求項80に記載の方法。

【請求項82】

前記エネルギーは、電気的アクチュエーション力又は音響力であることを特徴とする、請求項80～請求項81のいずれかに記載の方法。

【請求項83】

前記電気的アクチュエーション力は、小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェットティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離又は吸引であることを特徴とする、請求項82に記載の方法。

30

【請求項84】

前記音響力は、表面弾性波であることを特徴とする、請求項83に記載の方法。

【請求項85】

前記第1の液滴が分極可能な液体であるか、前記第2の液滴が分極可能な液体であるか、前記混合物が分極可能な液体であるか、又は前記第1の液滴及び前記第2の液滴の両方が各々分極可能な液体であることを特徴とする、請求項80～請求項83のいずれかに記載の方法。

【請求項86】

電気的アクチュエーション力を用いて前記混合物を前記ウェルのアレイの上で操作するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項80～請求項83及び請求項85のいずれかに記載の方法。

40

【請求項87】

前記ウェルのアレイへの前記混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、前記混合物を前記ウェルのアレイの上で操作するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項80～請求項86のいずれかに記載の方法。

【請求項88】

前記混合物を前後に動かすこと、前記混合物を円形パターンで動かすこと、前記混合物を2つ以上のサブ混合物に分割し且つ前記サブ混合物を併合することによって、前記混合物を混合するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項80～請求項87のいずれ

50

かに記載の方法。

【請求項 89】

前記混合物は、水性液体であることを特徴とする、請求項 80～請求項 88 のいずれかに記載の方法。

【請求項 90】

前記混合物は、不混和性液体であることを特徴とする、請求項 80～請求項 88 のいずれかに記載の方法。

【請求項 91】

前記液滴は、疎水性液滴であることを特徴とする、請求項 80～請求項 90 のいずれかに記載の方法。

【請求項 92】

前記ウェルのアレイは、親水性表面を有することを特徴とする、請求項 80～請求項 91 のいずれかに記載の方法。

【請求項 93】

前記ウェルのアレイは、疎水性表面を有することを特徴とする、請求項 80～請求項 91 のいずれかに記載の方法。

【請求項 94】

前記方法は、第 1 及び第 2 の基板を備え、少なくとも 1 つの基板が親水性表面を備えたデバイス内で行われることを特徴とする、請求項 80～請求項 93 のいずれかに記載の方法。

【請求項 95】

前記方法は、第 1 及び第 2 の基板を備え、少なくとも 1 つの基板が疎水性表面を備えたデバイス内で行われることを特徴とする、請求項 80～請求項 93 のいずれかに記載の方法。

【請求項 96】

複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、前記混合物を前記ウェルのアレイへ移動させて前記ウェルを装填するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 80～請求項 95 のいずれかに記載の方法。

【請求項 97】

前記アレイの 1 つ又はそれより多くのウェルに少なくとも 1 つの検出可能標識が装填されることを特徴とする、請求項 80～請求項 96 のいずれかに記載の方法。

【請求項 98】

前記装填後に、前記アレイのウェル内に装填されなかった検出可能標識があればこれを除去することをさらに含むことを特徴とする、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 99】

前記除去することは、複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、分極可能な流体小滴を前記ウェルのアレイへ移動させ、前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイから所定距離まで移動させることを含むことを特徴とする、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 100】

前記除去することは、複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、水性洗浄用小滴を前記ウェルのアレイにわたって移動させることを含むことを特徴とする、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

前記電気的アクチュエーション力を発生させることは、交流電流を発生させることを含むことを特徴とする、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 102】

前記交流電流は、10 V 以上の二乗平均平方根 (rms) 電圧を有することを特徴とする、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 103】

10

20

30

40

50

前記交流電流は、無線周波数範囲内の周波数を有することを特徴とする、請求項 100～請求項 101 のいずれかに記載の方法。

【請求項 104】

前記方法は、マイクロ流体デバイス、デジタルマイクロ流体デバイス（DMF）、表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス（SAW）、集積された DMF 及び検体検出デバイス、集積された SAW 及び検体検出デバイス、又はロボット工学ベースのアッセイ処理ユニットを用いて行われることを特徴とする、請求項 80～請求項 103 のいずれかに記載の方法。

【請求項 105】

液滴中の対象検体を測定する方法であって、

- (a) 対象検体を含有する第 1 の液滴を準備するステップと、
 - (b) 前記対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する少なくとも 1 つの固体支持体を含有する第 2 の液滴を準備するステップと、
 - (c) 力を及ぼすエネルギーを用いて、前記第 1 の液滴を前記第 2 の液滴と共に操作して混合物を作製する、ステップと、
 - (d) 前記混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させるステップであって、前記アレイの 1 つ又はそれより多くのウェルは、前記少なくとも 1 つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ステップと、
 - (e) 前記混合物の一部をウェルのアレイへ移動させるステップの前又は後のいずれかに、前記混合物に検出可能標識を添加するステップと、
 - (f) 前記ウェル内の前記検出可能標識を測定するステップと、
- を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 106】

前記少なくとも 1 つの固体支持体は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも 1 つの結合メンバーを含むことを特徴とする、請求項 105 に記載の方法。

【請求項 107】

前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの前に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 105～請求項 106 のいずれかに記載の方法。

【請求項 108】

前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの後に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 105～請求項 106 のいずれかに記載の方法。

【請求項 109】

前記検出可能標識は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも 1 つの結合メンバーを含むことを特徴とする、請求項 105～請求項 108 のいずれかに記載の方法。

【請求項 110】

前記検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含むことを特徴とする、請求項 105～請求項 109 のいずれかに記載の方法。

【請求項 111】

前記結合メンバーは、受容体又は抗体であることを特徴とする、請求項 105～請求項 109 のいずれかに記載の方法。

【請求項 112】

前記エネルギーは、電気的アクチュエーション力又は音響力であることを特徴とする、請求項 105～請求項 109 のいずれかに記載の方法。

【請求項 113】

前記電気的アクチュエーション力は、小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェットティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離又は吸引であることを特徴とする、請求項 112 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1 4】

前記音響力は、表面弾性波であることを特徴とする、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

前記第 1 の液滴が分極可能な液体であるか、前記第 2 の液滴が分極可能な液体であるか、前記混合物が分極可能な液体であるか、又は前記第 1 の液滴及び前記第 2 の液滴の両方が各々分極可能な液体であることを特徴とする、請求項 1 0 5～請求項 1 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1 6】

電氣的アクチュエーション力を用いて前記混合物を前記ウェルのアレイの上で操作するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 0 5～請求項 1 1 2 及び請求項 1 1 5 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 1 1 7】

前記ウェルのアレイへの前記混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、前記混合物を前記ウェルのアレイの上で操作するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 0 5～請求項 1 1 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記固体支持体は、磁性固体支持体であることを特徴とする、請求項 1 0 5～請求項 1 1 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1 9】

電氣的アクチュエーション力及び磁場が、前記混合物の少なくとも一部に対して反対方向から印加されることを特徴とする、請求項 1 1 8 に記載の方法。

20

【請求項 1 2 0】

前記混合物を前後に動かすこと、前記混合物を円形パターンで動かすこと、前記混合物を 2 つ以上のサブ混合物に分割し且つ前記サブ混合物を併合することによって、前記混合物を混合するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 0 5～請求項 1 1 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記混合物は、水性液体であることを特徴とする、請求項 1 0 5～請求項 1 2 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記混合物は、不混和性液体であることを特徴とする、請求項 1 0 5～請求項 1 2 1 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 1 2 3】

前記液滴は、疎水性液滴であることを特徴とする、請求項 1 0 5～請求項 1 2 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記ウェルのアレイは、親水性表面を有することを特徴とする、請求項 1 0 5～請求項 1 2 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記ウェルのアレイは、疎水性表面を有することを特徴とする、請求項 1 0 5～請求項 1 2 3 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 1 2 6】

前記方法は、第 1 及び第 2 の基板を備え、少なくとも 1 つの基板が親水性表面を備えたデバイス内で行われることを特徴とする、請求項 1 0 5～請求項 1 2 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記方法は、第 1 及び第 2 の基板を備え、少なくとも 1 つの基板が疎水性表面を備えたデバイス内で行われることを特徴とする、請求項 1 0 5～請求項 1 2 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 8】

50

複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、前記混合物を前記ウェルのアレイへ移動させて前記ウェルを装填するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 105～請求項 128 のいずれかに記載の方法。

【請求項 129】

前記アレイの 1 つ又はそれより多くのウェルに少なくとも 1 つの固体支持体が装填されることを特徴とする、請求項 105～請求項 128 のいずれかに記載の方法。

【請求項 130】

前記装填することは、磁場を印加して、前記アレイの前記 1 つ又はそれより多くのウェルへの少なくとも 1 つの固体支持体の移動を促進することを含むことを特徴とする、請求項 129 に記載の方法。

【請求項 131】

前記装填後に、前記アレイのウェル内に装填されなかった固体支持体があればこれを除去することをさらに含むことを特徴とする、請求項 130 に記載の方法。

【請求項 132】

前記除去することは、複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、分極可能な流体小滴を前記ウェルのアレイまで移動させ、前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイから所定距離まで移動させることを含むことを特徴とする、請求項 131 に記載の方法。

【請求項 133】

前記除去することは、複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、水性洗浄用小滴を前記ウェルのアレイにわたって移動させることを含むことを特徴とする、請求項 132 に記載の方法。

【請求項 134】

前記電気的アクチュエーション力を発生させることは、交流電流を発生させることを含むことを特徴とする、請求項 133 に記載の方法。

【請求項 135】

前記交流電流は、10 V 以上の二乗平均平方根 (rms) 電圧を有することを特徴とする、請求項 134 に記載の方法。

【請求項 136】

前記交流電流は、無線周波数範囲内の周波数を有することを特徴とする、請求項 134～請求項 135 のいずれかに記載の方法。

【請求項 137】

前記方法は、マイクロ流体デバイス、デジタルマイクロ流体デバイス (DMF)、表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス (SAW)、集積された DMF 及び検体検出デバイス、集積された SAW 及び検体検出デバイス、又はロボット工学ベースのアッセイ処理ユニットを用いて行われることを特徴とする、請求項 105～請求項 136 のいずれかに記載の方法。

【請求項 138】

前記測定するステップは、前記ウェルのアレイ内の固体支持体の総数を求めることを伴うことを特徴とする、請求項 105～請求項 137 のいずれかに記載の方法。

【請求項 139】

前記測定するステップは、前記検出可能標識を含有する前記アレイのウェル内の固体支持体の数を求めることを伴うことを特徴とする、請求項 138 に記載の方法。

【請求項 140】

前記測定するステップは、検出可能標識を含有する固体支持体の数を前記ウェルのアレイ内の固体支持体の総数から差し引いて、検出可能標識を含有しない前記ウェルのアレイ内の固体支持体の数を求めることを伴うことを特徴とする、請求項 139 に記載の方法。

【請求項 141】

検出可能標識を含有しない固体支持体の数に対する検出可能標識を含有する固体支持体の比を求めることを特徴とする、請求項 140 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 4 2】

ウェルに粒子を装填する方法であって、

(a) 複数の電極で電場を発生させて、マイクロ粒子を含有する液滴をウェルのアレイへ移動させるステップであって、前記ウェルのアレイの 1 つ又はそれより多くのウェルはその中に装填された粒子を有するのに十分なサイズのものである、ステップと、

(b) 1 つ又はそれより多くのウェルに粒子を装填するステップと、

(c) 前記複数の電極で電場を発生させて、分極可能な流体小滴を前記ウェルのアレイへ移動させて前記ウェルのアレイをシールするステップと、
を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 1 4 3】

10

前記電場を用いて前記液滴を前記ウェルのアレイの上で操作するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記ウェルのアレイへの前記液滴の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、前記ウェルのアレイの上で前記液滴を操作するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 4 2 ～請求項 1 4 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記粒子が磁気ビーズであることを特徴とする、請求項 1 4 2 ～請求項 1 4 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 4 6】

20

前記装填するステップは、磁場を印加して、前記アレイの前記 1 つ又はそれより多くのウェル内への前記 1 つ又はそれより多くの磁気ビーズの移動を促進することを含むことを特徴とする、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記ウェルのアレイは、親水性表面を有することを特徴とする、請求項 1 4 2 ～請求項 1 4 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 4 8】

前記ウェルのアレイは、疎水性表面を有することを特徴とする、請求項 1 4 2 ～請求項 1 4 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 4 9】

30

前記電場を発生させるステップは、交流電流を発生させることを含むことを特徴とする、請求項 1 4 2 ～請求項 1 4 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5 0】

前記交流電流は、10 V 以上の二乗平均平方根 (rms) 電圧を有することを特徴とする、請求項 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

前記交流電流は、無線周波数範囲内の周波数を有することを特徴とする、請求項 1 4 9 ～請求項 1 5 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5 2】

40

デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスを形成する方法であって、

第 1 の基板を含む第 1 のロールの巻きを解いて、前記第 1 の基板の第 1 の部分を第 1 の位置に位置決めするステップと、

前記第 1 の位置において、前記第 1 の基板の前記第 1 の部分に複数の電極を形成するステップと、

第 2 の位置において、前記第 1 の基板の第 2 の部分にウェルのアレイを形成するステップと、

を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 1 5 3】

前記ウェルのアレイを形成する前に、前記第 1 のロールの巻を解いて、前記第 1 の基板の前記第 1 の部分に隣接した前記第 2 の部分を前記第 2 の位置に位置決めするステップを

50

さらに含むことを特徴とする、請求項 1 5 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

第 2 の基板を含む第 2 のロールの巻きを解いて、前記第 3 の基板の第 3 の部分を第 3 の位置に位置決めするステップと、

前記第 3 の位置において、前記第 2 の基板を前記第 1 の基板から離間させて位置決めするのに十分な様式で前記第 2 の基板を前記第 1 の基板に貼り合わせるステップと、
をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 5 3 の請求項 1 5 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスを形成する方法であって、

第 1 の基板を含む第 1 のロールの巻きを解いて、前記第 1 の基板の第 1 の部分を第 1 の位置に位置決めするステップと、

前記第 1 の位置において、前記第 1 の基板の前記第 1 の部分に複数の電極を形成するステップと、

第 2 の基板を含む第 2 のロールの巻きを解いて、前記第 2 の基板の第 2 の部分を第 2 の位置に位置決めするステップと、

前記第 2 の位置において、前記第 2 の部分にウェルのアレイを形成するステップと、

前記第 2 の基板を前記第 1 の基板から離間させて位置決めし、且つ

前記第 2 の部分を前記第 1 の部分の上方に位置決めするか又は前記第 1 の基板の前記第 1 の部分に隣接する第 3 の部分の上方に位置決めし、

前記ウェルのアレイが前記第 1 の基板に面するようにする
のに十分な様式で、前記第 2 の基板を前記第 1 の基板に貼り合わせるステップと、
を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 1 5 6】

前記ウェルのアレイを形成するステップは、熱若しくは紫外線ナノインプリントリソグラフィ、ナノインプリントローラ、レーザアブレーションを使用することを含むか、又はウェルのアレイを備えたあらかじめ製作された基板を前記第 1 の基板の前記第 1 の部分へ貼り合わせることに由来するものであることを特徴とする、請求項 1 5 2 ～請求項 1 5 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5 7】

前記第 1 の基板に強い熱、圧力、又は紫外線をかけて、型を用いて前記第 1 の基板上又は基板内にフォノン構造を形成するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 5 2 ～請求項 1 5 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5 8】

プリンタデバイスを用いて、一連の電極上に疎水性及び／又は誘電性材料を塗工するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 5 2 ～請求項 1 5 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5 9】

前記疎水性及び／又は誘電性材料は、硬化材料を含むことを特徴とする、請求項 1 5 8 に記載の方法。

【請求項 1 6 0】

熱又は紫外線を印加して、前記塗工された疎水性及び／又は誘電性材料を硬化するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 5 9 に記載の方法。

【請求項 1 6 1】

前記第 1 及び第 2 の基板をダイシングして、前記第 1 及び第 2 の部分を含む貼り合わされた基板を生成するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 5 2 ～請求項 1 6 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6 2】

液滴中の対象検体を検出する方法であって、

(a) 対象検体を含む第 1 の液滴を準備するステップと、

(b) 特異的結合メンバー及び標識化検体を含む第 2 の液滴を準備するステップであって

10

20

30

40

50

、前記結合メンバーは、少なくとも1つの固体支持体上に固定化されており、前記特異的結合メンバーは、前記対象検体に特異的に結合するものであり、前記標識化検体は、検出可能標識で標識された対象検体である、ステップと、

(c) 力を及ぼすエネルギーを用いて、前記第1の液滴を前記第2の液滴と共に操作して混合物を作製するステップと、

(d) 前記混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させるステップであって、前記アレイの1つ又はそれより多くのウェルは、前記少なくとも1つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ステップと、
を含むことを特徴とする、方法。

【請求項163】

液滴中の対象検体を検出する方法であって、

(a) 対象検体を含む第1の液滴を準備するステップと、

(b) 固定化検体及び少なくとも1つの特異的結合メンバーを含む第2の液滴を準備するステップであって、前記固定化検体は、少なくとも1つの固体支持体上に固定化された対象検体であり、前記少なくとも1つの特異的結合メンバーは、前記対象検体に特異的に結合するものであり、前記少なくとも1つの特異的結合メンバーは、検出可能標識で標識されている、ステップと、

(c) 力を及ぼすエネルギーを用いて、前記第1の液滴を前記第2の液滴と共に操作して混合物を作製するステップと、

(d) 前記混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させるステップであって、前記アレイの1つ又はそれより多くのウェルは、前記少なくとも1つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ステップと、

(e) 前記ウェル内の前記対象検体を検出するステップと、
を含むことを特徴とする、方法。

【請求項164】

液滴中の対象検体を検出する方法であって、

(a) 対象検体を含有する第1の液滴を準備するステップと、

(b) 前記対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する少なくとも1つの固体支持体を含有する第2の液滴を準備するステップと、
を含み、

ここで前記第1及び第2の液滴は、

第1の基板及び第2の基板を備え、前記第2の基板は前記第1の基板から間隙によって分離されており、前記第1の基板は液滴上に電気的アクチュエーション力を発生させる複数の電極を備え、

前記液滴の一部を保持する寸法のウェルのアレイを備え、前記ウェルのアレイの少なくとも一部は、前記複数の電極のうちの1つ又はそれより多くと前記間隙との間に位置決めされる、

デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスの中へ供給され、

(c) 電気的アクチュエーション力を用いて、前記第1の液滴を前記第2の液滴と共に操作して混合物を作製するステップと、

(d) 前記混合物の全部又は少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップであって、前記アレイの1つ又はそれより多くのウェルは、前記少なくとも1つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ステップと、

(e) 前記混合物の一部をウェルのアレイへ移動させるステップの前又は後のいずれかに、前記混合物に検出可能標識を添加するステップと、

(f) 前記ウェル内の前記対象検体を検出するステップと、
を含むことを特徴とする、方法。

【請求項165】

前記少なくとも1つの固体支持体は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも1つの結合メンバーを含むことを特徴とする、請求項164に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 6 6】

前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの前に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 6 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6 7】

前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの後に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 6 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6 8】

前記検出可能標識は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも 1 つの結合メンバーを含むことを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 6 7 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 1 6 9】

前記検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含むことを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 6 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 0】

前記結合メンバーは、受容体又は抗体であることを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 6 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 1】

前記電氣的アクチュエーション力は、小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェットティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離又は吸引であることを特徴とする、請求項 1 6 4～1 7 0 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 1 7 2】

前記第 1 の液滴が分極可能な液体であるか、前記第 2 の液滴が分極可能な液体であるか、前記混合物が分極可能な液体であるか、又は前記第 1 の液滴及び前記第 2 の液滴の両方が各々分極可能な液体であることを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 7 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 3】

電氣的アクチュエーション力を用いて前記混合物を前記ウェルのアレイの上で操作するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 7 1 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 1 7 4】

前記ウェルのアレイへの前記混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、前記ウェルのアレイの上で前記混合物を操作するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 7 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 5】

前記固体支持体は、磁性固体支持体であることを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 7 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 6】

前記電氣的アクチュエーション力及び磁場が、前記混合物の少なくとも一部に対して反対方向から印加されることを特徴とする、請求項 1 7 5 に記載の方法。

40

【請求項 1 7 7】

前記混合物を前後に動かすこと、前記混合物を円形パターンで動かすこと、前記混合物を 2 つ以上のサブ混合物に分割し且つ前記サブ混合物を併合することによって、前記混合物を混合するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 7 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 8】

前記混合物は、水性液体であることを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 7 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7 9】

50

前記混合物は、不混和性液体であることを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 7 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 8 0】

前記液滴は、疎水性液滴であることを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 7 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 8 1】

前記ウェルのアレイは、親水性表面を有することを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 8 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 8 2】

前記ウェルのアレイは、疎水性表面を有することを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 8 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 8 3】

前記基板は、親水性表面を有することを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 8 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 8 4】

前記基板は、疎水性表面を有することを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 8 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 8 5】

複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、前記混合物を前記ウェルのアレイへ移動させて前記ウェルを装填するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 8 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 8 6】

前記アレイの 1 つ又はそれより多くのウェルに少なくとも 1 つの固体支持体が装填されることを特徴とする、請求項 1 6 4～請求項 1 8 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 8 7】

前記装填することは、磁場を印加して、前記アレイの前記 1 つ又はそれより多くのウェル内への少なくとも 1 つの固体支持体の移動を促進することを含むことを特徴とする、請求項 1 8 6 に記載の方法。

【請求項 1 8 8】

前記装填後に、前記アレイのウェル内に装填されなかった固体支持体があればこれを除去することをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 8 7 に記載の方法。

【請求項 1 8 9】

前記除去することは、複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、分極可能な流体小滴を前記ウェルのアレイへ移動させ、前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイから所定距離まで移動させることを含むことを特徴とする、請求項 1 8 8 に記載の方法。

【請求項 1 9 0】

前記除去することは、前記電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、水性洗浄用小滴を前記ウェルのアレイにわたって移動させることを含むことを特徴とする、請求項 1 8 9 に記載の方法。

【請求項 1 9 1】

前記電気的アクチュエーション力を発生させることは、交流電流を発生させることを含むことを特徴とする、請求項 1 9 0 に記載の方法。

【請求項 1 9 2】

前記交流電流は、10 V 以上の二乗平均平方根 (r m s) 電圧を有することを特徴とする、請求項 1 9 1 に記載の方法。

【請求項 1 9 3】

前記交流電流は、無線周波数範囲内の周波数を有することを特徴とする、請求項 1 9 1～請求項 1 9 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 9 4】

10

20

30

40

50

液滴中の対象検体を検出する方法であって、

(a) 対象検体を含有する第1の液滴を準備するステップと、

(b) 前記対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する少なくとも1つの固体支持体を含有する第2の液滴を準備するステップとを含み、

ここで前記第1及び第2の液滴は、

第1の基板及び第2の基板を備え、前記第2の基板は前記第1の基板から間隙によって分離されており、前記デバイスは、第1の部分及び第2の部分を備え、

前記第1の部分は、表面弾性波発生構成要素に連結された上層を備え、

前記第2の部分は、前記第1の基板又は前記第2の基板上に位置決めされた複数のウェルを備える、

表面弾性波マイクロ流体及び検体検出デバイス内へ供給され、

(c) 表面音響力を用いて、前記第1の液滴を前記第2の液滴と共に操作して混合物を作製するステップと、

(d) 前記混合物の全部又は少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップであって、前記アレイの1つ又はそれより多くのウェルは、前記少なくとも1つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ステップと、

(e) 前記混合物の一部をウェルのアレイへ移動させるステップの前又は後のいずれかに、前記混合物に検出可能標識を添加するステップと、

(f) 前記ウェル内の前記対象検体を検出するステップと、

を含むことを特徴とする、方法。

【請求項195】

前記少なくとも1つの固体支持体は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも1つの結合メンバーを含むことを特徴とする、請求項194に記載の方法。

【請求項196】

前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの前に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項194～請求項195のいずれかに記載の方法。

【請求項197】

前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの後に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項194～請求項196のいずれかに記載の方法。

【請求項198】

前記検出可能標識は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも1つの結合メンバーを含むことを特徴とする、請求項194～請求項197のいずれかに記載の方法。

【請求項199】

前記検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含むことを特徴とする、請求項194～請求項198のいずれかに記載の方法。

【請求項200】

前記結合メンバーは、受容体又は抗体であることを特徴とする、請求項194～請求項199のいずれかに記載の方法。

【請求項201】

前記第1の液滴が分極可能な液体であるか、前記第2の液滴が分極可能な液体であるか、前記混合物が分極可能な液体であるか、又は前記第1の液滴及び前記第2の液滴の両方が各々分極可能な液体であることを特徴とする、請求項194～請求項200のいずれかに記載の方法。

【請求項202】

前記ウェルのアレイへの前記混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、前記ウェルのアレイの上で前記混合物を操作するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項194～請求項201のいずれかに記載の方法。

【請求項 203】

前記固体支持体は、磁性固体支持体であることを特徴とする、請求項 194～請求項 202 のいずれかに記載の方法。

【請求項 204】

前記ウェルのアレイを疎水性液体でシールするステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 205】

前記ウェルのアレイを疎水性液体でシールするステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 206】

前記ウェルのアレイを疎水性液体でシールするステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 185 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、引用によりその全体が本明細書に組み入れられる、2015年4月3日に出版された米国特許仮出願番号第62/142,858号の利益を主張する。

【背景技術】

【0002】

検体分析は、通常、手動又は複雑なロボットの使用のいずれかで行われるサンプル調製ステップを実行することによって行われる。サンプル調製後、調製されたサンプル中の検体をアッセイすることは、調製されたサンプルを、その後に、調製されたサンプル中の検体の分析を行う機械へ輸送するための高価で複雑なシステムの使用をさらに伴う。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】米国特許出願公開第20120141997号明細書

【特許文献2】米国特許第6,013,785号明細書

【特許文献3】米国特許第5,696,253号明細書

【特許文献4】米国特許第7,070,921号明細書

【特許文献5】米国特許出願公開第20060121544号明細書

【特許文献6】米国特許第5,270,163号明細書

【特許文献7】米国特許第5,475,096号明細書

【特許文献8】米国特許第5,567,588号明細書

【特許文献9】米国特許第5,595,877号明細書

【特許文献10】米国特許第5,637,459号明細書

【特許文献11】米国特許第5,683,867号明細書

【特許文献12】米国特許第5,705,337号明細書

【特許文献13】米国特許第5,620,850号明細書

【特許文献14】米国特許第5,593,896号明細書

【特許文献15】米国特許第5,573,904号明細書

【特許文献16】米国特許第5,496,925号明細書

【特許文献17】米国特許第5,359,093号明細書

【特許文献18】米国特許第5,352,803号明細書

【特許文献19】米国特許第5,468,646号明細書

【特許文献20】米国特許第5,543,524号明細書

【特許文献21】米国特許第5,783,699号明細書

【特許文献22】米国特許第5,241,070号明細書

【非特許文献】

10

20

30

40

50

【0004】

- 【非特許文献1】Gottlin et al., Journal of Biomolecular Screening, 14:77-85 (2009)
- 【非特許文献2】Heller, Acc. Chem. Res. 23:128 (1990)
- 【非特許文献3】Holt et al. (2014) Trends in Biotechnology 21:484-490
- 【非特許文献4】Rader (2014) Trends in Biotechnology 32:186-197
- 【非特許文献5】McEnaney et al. (2012) ACS Chem. Biol. 7:1139-1151 10
- 【非特許文献6】Millward et al. (2011) J. Am. Chem. Soc. 133:18280-18288
- 【非特許文献7】Gilbreth and Koide, (2012) Current Opinion in Structural Biology 22:1-8
- 【非特許文献8】Banta et al. (2013) Annu. Rev. Biomed. Eng. 15:93-113
- 【非特許文献9】Patel et al. (2013) Protein Engineering, Design&Selection 26(4):307-314
- 【非特許文献10】Behar et al. (2013) 26:267-275
- 【非特許文献11】Tiede et al. (2014) Protein Engineering, Design&Selection 27:145-155 20
- 【非特許文献12】Polak and Van Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2nd ed., Springer Verlag, N. Y. (1997)
- 【非特許文献13】Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1996) published by Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon
- 【非特許文献14】Adamczyk et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 16. 1324-1328 (2006) 30
- 【非特許文献15】Adamczyk et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 4. 2313-2317 (2004)
- 【非特許文献16】Adamczyk et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 14. 3917-3921 (2004)
- 【非特許文献17】Adamczyk et al., Org. Lett. 5. 3779-3782 (2003)
- 【非特許文献18】Mattingly, J. Biolumin. Chemilumin. 6. 107-114 (1991)
- 【非特許文献19】Adamczyk et al., J. Org. Chem. 63. 5636-5639 (1998) 40
- 【非特許文献20】Adamczyk et al., Tetrahedron 55. 10899-10914 (1999)
- 【非特許文献21】Adamczyk et al., Org. Lett. 1. 779-781 (1999)
- 【非特許文献22】Adamczyk et al., Bioconjugate Chem. 11. 714-724 (2000)
- 【非特許文献23】Mattingly et al., In Luminescence Biotechnology. Instruments and Applications
- 【非特許文献24】Dyke, K. V. Ed.; CRC Press. Boca Ra 50

ton, pp. 77-105 (2002)

【非特許文献25】McCapra et al., Photochem. Photobiol. 4. 1111-21 (1965)

【非特許文献26】Razavi et al., Luminescence 15. 245-249 (2000)

【非特許文献27】Razavi et al., Luminescence 15. 239-244 (2000)

【非特許文献28】Wells, High Throughput Bioanalytical Sample Preparation. Methods and Automation Strategies, Elsevier (2003)

【非特許文献29】Greene&Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons

【非特許文献30】Guillier et al. (Chem. Rev. 100:2092-2157, 2000)

【非特許文献31】Lee et al., J. Org. Chem. 64:3454-3460, 1999)

【非特許文献32】Burgess et al., J. Org. Chem. 62:5165-5168, 1997

【非特許文献33】Chatterjee, et al. Lab on Chip, 6, 199-206 (2006)

【非特許文献34】S. Fan, et al., Lab On Chip, 9, 1236, 2009;

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

サンプルを調製するとともに調製されたサンプルをアッセイするために用いることができる集積デバイスは、検体分析の分野で極めて望ましい。かかる集積デバイスは、低コストの選択肢を提供することになり、特にポイント・オブ・ケア用途のような臨床的用途において、検体分析の実行の容易さをかなり高めることになるであろう。

【0006】

そのため検体分析を行うための集積デバイスが注目されている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

集積されたマイクロ流体及び検体検出デバイスが開示される。また、本明細書において、集積されたマイクロ流体及び検体検出デバイスを使用するための方法並びに関連のシステムが提供される。

【0008】

デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスが開示され、該デバイスは、第1の基板及び第2の基板を含み、第2の基板は第1の基板から間隙によって分離されており、第1の基板は液滴上に電気的アクチュエーション力を発生させる複数の電極を含み；液滴の一部を保持する寸法のウェルのアレイを含み、ウェルのアレイの少なくとも一部は、複数の電極のうちの1つ又はそれより多くと間隙との間に位置決めされる。

【0009】

いくつかの実施形態において、上記複数の電極は、第1の基板の表面上に位置決めされる。特定の実施形態において、デバイスは、第1の基板の表面上に配置された、複数の電極を覆う第1の層をさらに含む。いくつかの実施形態において、第1の基板は、液滴が導入される第1の部分と、液滴がそこへ向かって移動する第2の部分とを含む。特定の実施形態において、複数の電極及び第1の層は、第1の基板の第1の部分から第2の部分へ延びる。特定の実施形態において、ウェルのアレイは、第1の基板の第2の部分内に位置決めされる。特定の実施形態において、第2の基板は、第1の部分及び第2の部分を含み、

10

20

30

40

50

第 1 の部分は、第 1 の基板の第 1 の部分に面した配置にあり、第 2 の部分は、ウェルのアレイに面した配置にある。特定の実施形態において、第 2 の基板の第 2 の部分は、実質的に透明であり、ウェルのアレイの光学的照合を容易にする。

【0010】

いくつかの実施形態において、デバイスは、第 1 の層の表面上に配置された第 2 の層をさらに含む。特定の実施形態において、第 2 の層は、第 1 の基板の第 1 及び第 2 の部分の上に延びる。特定の実施形態において、第 1 の層は誘電性層であり、第 2 の層は疎水性層である。特定の実施形態において、ウェルのアレイは、第 2 の層内に位置決めされる。特定の実施形態において、ウェルのアレイは、前記第 1 の層内に位置決めされる。特定の実施形態において、ウェルのアレイは、親水性表面を有する。

10

【0011】

いくつかの実施形態において、ウェルのアレイは、ウェルのアレイの上を移動する小滴中に存在するビーズ又は粒子の受入れ及び保持を促進するように配向された側壁を含む。特定の実施形態において、ウェルのアレイは、第 2 の側壁に対向した第 1 の側壁を含み、第 1 の側壁は、ウェルの底部に対して鈍角に配向され、第 2 の側壁は、ウェルの底部に対して鋭角で配向され、小滴の移動は、ウェルの底部に対して平行に第 1 の側壁から第 2 の側壁へ向かう方向である。特定の実施形態において、ウェルのアレイは、切頭円錐形を有し、切頭円錐形の狭い方の部分がウェルのアレイの開口部を与える。特定の実施形態において、ウェルのアレイは、第 2 の側壁に対向した第 1 の側壁を含み、第 1 の側壁の上部分は、ウェルの底部に対して鈍角に配向され、側壁の下部分は、ウェルの底部に対して垂直に配向され、第 2 の側壁は、ウェルの底部に対して垂直に配向され、小滴の移動は、ウェルの底部に対して平行に第 1 の側壁から第 2 の側壁へ向かう方向であり、第 1 の側壁の上部分は、ウェルの開口部にある。

20

【0012】

また、デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスが開示され、該デバイスは、デバイスを定める第 1 の基板及び第 2 の基板を含み、第 2 の基板は第 1 の基板から間隙によって分離されており、デバイスは、第 1 の部分及び第 2 の部分を含み；第 1 の部分は、複数の電極を備えており、生物学的サンプル由来の対象検体を含有する第 1 の液滴と、少なくとも 1 つのビーズを含有する第 2 の液滴とを組み合わせることをアクチュエーションし；第 2 の部分は、液滴の一部を保持する寸法のウェルのアレイを含む。

30

【0013】

いくつかの実施形態において、上記複数の電極は、デバイスの第 1 の部分内にのみ位置決めされる。特定の実施形態において、複数の電極は、第 1 の基板の表面上に位置決めされる。いくつかの実施形態において、デバイスは、第 1 の基板の表面上に配置された、複数の電極を覆う第 1 の層をさらに含む。特定の実施形態において、第 1 の基板は、液滴が導入される第 1 の部分と、液滴がそこへ向かって移動する第 2 の部分とを含む。特定の実施形態において、複数の電極及び第 1 の層は、第 1 の基板の第 1 の部分から第 2 の部分へ延びる。特定の実施形態において、ウェルのアレイは、第 1 の基板の第 2 の部分内に位置決めされる。

【0014】

特定の実施形態において、第 2 の基板は、第 1 の部分及び第 2 の部分を含み、第 1 の部分は、第 1 の基板の第 1 の部分に面した配置にあり、第 2 の部分は、ウェルのアレイに面した配置にある。

40

【0015】

特定の実施形態において、第 2 の基板の第 2 の部分は、実質的に透明であり、ウェルのアレイの光学的照合を容易にする。特定の実施形態において、複数の電極は、間隙内に置かれた小滴をデバイスの第 2 の部分へ向かって移動させるように構成され、デバイスは、第 1 の部分を第 2 の部分へ流体的に接続する毛管部分を含み、毛管は、親水性材料を含んでおり、電気的力の非存在下で毛管部分を介して第 1 の部分から第 2 の部分への小滴の移動を促進する。

50

【0016】

いくつかの実施形態において、デバイスは、第1の層の上面上に配置された第2の層をさらに含む。特定の実施形態において、第2の層は、第1の基板の上に延びる。特定の実施形態において、第1の層は誘電性層であり、第2の層は疎水性層である。

【0017】

いくつかの実施形態において、複数のウェルが第2の層内に位置決めされる。特定の実施形態において、ウェルのアレイは、第1の層内に位置決めされる。特定の実施形態において、ウェルのアレイは、親水性表面を有する。特定の実施形態において、ウェルは、ウェルのアレイの上を移動する小滴中に存在するナノビーズ又はナノ粒子の受入れ及び保持を促進するように配向された側壁を含む。特定の実施形態において、ウェルは、第2の側壁10
10
側壁に対向した第1の側壁を含み、第1の側壁は、ウェルの底部に対して鈍角に配向され、第2の側壁は、ウェルの底部に対して鋭角で配向され、小滴の移動は、ウェルの底部に対して平行に第1の側壁から第2の側壁へ向かう方向である。特定の実施形態において、ウェルは、切頭円錐形を有し、切頭円錐形の狭い方の部分がウェルの開口部を与える。特定の実施形態において、ウェルは、第2の側壁に対向した第1の側壁を含み、第1の側壁の上部分は、ウェルの底部に対して鈍角に配向され、側壁の下部分は、ウェルの底部に対して垂直に配向され、第2の側壁は、ウェルの底部に対して垂直に配向され、小滴の移動は、ウェルの底部に対して平行に第1の側壁から第2の側壁へ向かう方向であり、第1の側壁の上部分は、ウェルの開口部にある。

【0018】

また、本明細書において表面弾性波マイクロ流体及び検体検出デバイスが開示され、該デバイスは、第1の基板及び第2の基板を含み、第2の基板は第1の基板から間隙によって分離されており、デバイスは、第1の部分及び第2の部分を含み、第1の部分は、表面弾性波発生構成要素に連結された上層を含み；第2の部分は、第1の基板又は第2の基板上に位置決めされた複数のウェルを含む。

【0019】

いくつかの実施形態において、上層は、該上層の上面上にフォノン構造を含む。特定の実施形態において、上層は、圧電結晶層の上に重なる。特定の実施形態において、第2の基板は、実質的に透明である。

【0020】

また、本明細書において、表面弾性波マイクロ流体及び検体検出デバイスが開示され、該デバイスは、第1の基板及び第2の基板を含み、第2の基板は第1の基板から間隙によって分離されており、第1の基板は、複数のウェルを含み、第2の基板は、フォノン構造を含み、複数のウェル及びフォノン構造は、互いにわたって位置する。

【0021】

いくつかの実施形態において、第2の基板は、上層である。特定の実施形態において、上層は、第2の基板上に配置され、フォノン構造は、上層上に位置する。特定の実施形態において、第1の基板、第2の基板及び上層は、実質的に透明である。

【0022】

また、液滴中の対象検体を検出する方法も開示される。特定の実施形態において、上記方法は、対象検体を含有する第1の液滴を準備するステップと、対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する少なくとも1つの固体支持体を含有する第2の液滴を準備するステップと、力を及ぼすエネルギーを用いて、第1の液滴を第2の液滴と共に操作して混合物を作製するステップと、混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させるステップであって、アレイの1つ又はそれより多くのウェルは、少なくとも1つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ステップと、混合物の一部をウェルのアレイへ移動させるステップの前又は後のいずれかに、混合物に検出可能標識を添加するステップと、ウェル内の対象検体を検出するステップと、を含む。

【0023】

特定の実施形態において、少なくとも1つの固体支持体は、対象検体に特異的に結合す

10

20

30

40

50

る少なくとも1つの結合メンバーを含む。特定の実施形態において、上記方法は、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させることの前に、混合物に検出可能標識を添加することをさらに含む。特定の実施形態において、上記方法は、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させることの後に、混合物に検出可能標識を添加することをさらに含む。特定の実施形態において、検出可能標識は、対象検体に特異的に結合する少なくとも1つの結合メンバーを含む。特定の実施形態において、検出可能標識は、色原体 (chromagen)、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含む。特定の実施形態において、結合メンバーは、受容体又は抗体である。

【0024】

特定の実施形態において、エネルギーは、電気的アクチュエーション力又は音響力である。特定の実施形態において、電気的アクチュエーション力は、小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェットティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離又は吸引である。特定の実施形態において、音響力は、表面弾性波である。

【0025】

特定の実施形態において、電気的アクチュエーション力を発生させることは、交流電流を発生させることを含む。特定の実施形態において、交流電流は、10 V以上の二乗平均平方根 (rms) 電圧を有する。特定の他の実施形態において、交流電流は、無線周波数範囲内の周波数を有する。

【0026】

特定の実施形態において、第1の液滴が分極可能な液体であるか、第2の液滴が分極可能な液体であるか、混合物が分極可能な液体であるか、又は第1の液滴及び第2の液滴の両方が各々分極可能な液体である。

【0027】

特定の実施形態において、上記方法は、電気的アクチュエーション力を用いて混合物の少なくとも一部をウェルのアレイの上で位置決めすることをさらに含む。特定の他の実施形態において、上記方法は、ウェルのアレイへの混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、ウェルのアレイの上で混合物を位置決めすることをさらに含む。

【0028】

特定の実施形態において、支持体は、磁性固体支持体である。特定の他の実施形態において、磁性固体支持体が使用されるとき、電気的アクチュエーション力及び磁場が混合物の少なくとも一部に対して反対方向から印加される。特定の実施形態において、上記方法は、混合物を前後に動かすこと、混合物を円形パターンで動かすこと、混合物を2つ以上のサブ混合物に分割し且つサブ混合物を併合することによって、混合物を混合することをさらに含む。特定の実施形態において、混合物は、水性液体である。特定の他の実施形態において、混合物は、不混和性液体である。特定の他の実施形態において、液滴は、疎水性液滴である。特定の実施形態において、ウェルのアレイは、親水性表面を有する。特定の他の実施形態において、ウェルのアレイは、疎水性表面を有する。特定の実施形態において、基板は、親水性表面を有する。特定の他の実施形態において、基板は、疎水性表面を有する。特定の実施形態において、上記方法は、一連の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、混合物をウェルのアレイへ移動させ、装填されたウェルをシールすることをさらに含む。

【0029】

特定の実施形態において、アレイの1つ又はそれより多くのウェルに少なくとも1つの固体支持体が装填される。特定の他の実施形態において、装填することは、磁場を印加して、アレイの1つ又はそれより多くのウェル内への少なくとも1つの固体支持体の移動を促進することを含む。特定の他の実施形態において、上記方法は、装填後に、アレイのウェル内に装填されなかった固体支持体があればこれを除去することをさらに含む。特定の他の実施形態において、除去することは、一連の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、分極可能な流体小滴をウェルのアレイへ移動させ、混合物の少なくとも一部を

ウェルのアレイから所定距離まで移動させることを含む。特定の他の実施形態において、除去することは、一連の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、水性洗浄用小滴を前記ウェルのアレイにわたって移動させることを含む。

【0030】

特定の実施形態において、上記方法は、マイクロ流体デバイス、デジタルマイクロ流体デバイス（DMF）、表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス（SAW）、集積DMF及び検体検出デバイス、集積されたSAW及び検体検出デバイス、又はロボット工学ベースのアッセイ処理ユニットを用いて行われる。

【0031】

他の実施形態において、上記方法は、対象検体を含有する第1の液滴を準備するステップと、対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する検出可能標識を含有する第2の液滴を準備するステップと、力を及ぼすエネルギーを用いて、第1の液滴及び第2の液滴を操作して混合物を作製するステップと、混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させるステップと、ウェル内の対象検体を検出するステップと、を含む。

【0032】

特定の実施形態において、検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含む。特定の実施形態において、結合メンバーは、受容体又は抗体である。

【0033】

特定の実施形態において、エネルギーは、電気的アクチュエーション力又は音響力である。特定の実施形態において、電気的アクチュエーション力は、小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェットティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離又は吸引である。特定の実施形態において、音響力は、表面弾性波である。

【0034】

特定の実施形態において、電気的アクチュエーション力を発生させることは、交流電流を発生させることを含む。特定の実施形態において、交流電流は、10V以上の二乗平均平方根（rms）電圧を有する。特定の他の実施形態において、交流電流は、無線周波数範囲内の周波数を有する。

【0035】

特定の実施形態において、第1の液滴が分極可能な液体であるか、第2の液滴が分極可能な液体であるか、混合物が分極可能な液体であるか、又は第1の液滴及び第2の液滴の両方が各々分極可能な液体である。

【0036】

特定の実施形態において、上記方法は、電気的アクチュエーション力を用いて、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイの上で位置決めすることをさらに含む。特定の他の実施形態において、上記方法は、ウェルのアレイへの混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイの上で位置決めすることをさらに含む。

【0037】

特定の実施形態において、上記方法は、混合物を前後に動かすこと、混合物を円形パターンで動かすこと、混合物を2つ以上のサブ混合物に分割し且つサブ混合物を併合することによって、混合物を混合することをさらに含む。特定の実施形態において、混合物は、水性液体である。特定の他の実施形態において、混合物は、不混和性液体である。特定の他の実施形態において、液滴は、疎水性液滴である。特定の他の実施形態において、ウェルのアレイは、親水性表面を有する。特定の他の実施形態において、ウェルのアレイは、疎水性表面を有する。特定の実施形態において、基板は、親水性表面を含む。特定の他の実施形態において、基板は、疎水性表面を含む。特定の実施形態において、上記方法は、一連の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、混合物をウェルのアレイへ移動させ、装填されたウェルをシールすることをさらに含む。

10

20

30

40

50

【0038】

特定の実施形態において、アレイの1つ又はそれより多くのウェルに、少なくとも1つの検出可能標識が装填される。特定の実施形態において、除去することは、一連の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、分極可能な流体小滴をウェルのアレイへ移動させ、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイから所定距離まで移動させることを含む。特定の他の実施形態において、除去することは、一連電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、水性洗浄用小滴をウェルのアレイにわたって移動させることを含む。

【0039】

特定の実施形態において、上記方法は、マイクロ流体デバイス、デジタルマイクロ流体デバイス（DMF）、表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス（SAW）、集積されたDMF及び検体検出デバイス、集積されたSAW及び検体検出デバイス、又はロボット工学ベースのアクセシ処理ユニットを用いて行われる。

10

【0040】

他の実施形態において、上記方法は、液滴中の対象検体を測定するステップを含み、上記方法は、対象検体を含有する第1の液滴を準備することと、対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する少なくとも1つの固体支持体を含有する第2の液滴を準備することと、力を及ぼすエネルギーを用いて、第1の液滴を第2の液滴と共に操作して混合物を作製することと、混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイまで移動させることであって、アレイの1つ又はそれより多くのウェルは、少なくとも1つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ことと、混合物の一部をウェルのアレイへ移動させることの前又は後のいずれかに、混合物に検出可能標識を添加することと、ウェル内の検出可能標識を測定することと、を含む。

20

【0041】

特定の実施形態において、少なくとも1つの固体支持体は、対象検体に特異的に結合する少なくとも1つの結合メンバーを含む。特定の実施形態において、上記方法は、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させることの前に、混合物に検出可能標識を添加することをさらに伴う。特定の実施形態において、上記方法は、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させることの後に、混合物に検出可能標識を添加することをさらに含む。特定の実施形態において、検出可能標識は、対象検体に特異的に結合する少なくとも1つの結合メンバーを含む。特定の実施形態において、検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含む。特定の実施形態において、合メンバーは、受容体又は抗体である。

30

【0042】

特定の実施形態において、エネルギーは、電気的アクチュエーション力又は音響力である。特定の実施形態において、電気的アクチュエーション力は、小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェットティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離又は吸引である。特定の実施形態において、音響力は、表面弾性波である。

【0043】

特定の実施形態において、電気的アクチュエーション力を発生させることは、交流電流を発生させることを含む。特定の実施形態において、交流電流は、10V以上の二乗平均平方根（rms）電圧を有する。特定の実施形態において、交流電流は、無線周波数範囲内の周波数を有する。

40

【0044】

特定の実施形態において、第1の液滴が分極可能な液体であるか、第2の液滴が分極可能な液体であるか、混合物が分極可能な液体であるか、又は第1の液滴及び第2の液滴の両方が各々分極可能な液体である。

【0045】

特定の実施形態において、上記方法は、電気的アクチュエーション力を用いて、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイの上で位置決めすることをさらに含む。特定の実施形

50

態において、上記方法は、ウェルのアレイへの混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイの上で位置決めすることをさらに含む。

【0046】

特定の実施形態において、支持体は、磁性固体支持体である。特定の他の実施形態において、磁性固体支持体が用いられるとき、電気的アクチュエーション力及び磁場が混合物の少なくとも一部に対して反対方向から印加される。

【0047】

特定の実施形態において、上記方法は、混合物を前後に動かすこと、混合物を円形パターンで動かすこと、混合物を2つ以上のサブ混合物に分割し且つサブ混合物を併合することによって、混合物を混合することをさらに含む。

10

【0048】

特定の実施形態において、混合物は、水性液体である。特定の他の実施形態において、混合物は、不混和性液体である。特定の他の実施形態において、液滴は、疎水性液滴である。特定の実施形態において、ウェルのアレイは、親水性表面を有する。特定の他の実施形態において、ウェルのアレイは、疎水性表面を有する。特定の他の実施形態において、基板は、親水性表面を含む。特定の他の実施形態において、基板は、疎水性表面を含む。特定の実施形態において、上記方法は、一連の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、混合物をウェルのアレイへ移動させてウェルをシールすることをさらに含む。

【0049】

20

特定の実施形態において、アレイの1つ又はそれより多くのウェルに少なくとも1つの固体支持体が装填される。特定の他の実施形態において、装填することは、磁場を印加して、アレイの1つ又はそれより多くのウェルへの少なくとも1つの固体支持体の移動を促進することを含む。特定の他の実施形態において、上記方法は、装填後に、アレイのウェル内に装填されなかった固体支持体があればこれを除去することをさらに含む。特定の他の実施形態において、除去することは、一連の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、分極可能な流体小滴をウェルのアレイまで移動させ、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイから所定距離まで移動させることを含む。特定の他の実施形態において、除去することは、一連の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、水性洗浄用小滴をウェルのアレイにわたって移動させることを含む。

30

【0050】

特定の他の実施形態において、上記方法は、マイクロ流体デバイス、デジタルマイクロ流体デバイス(DMF)、表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス(SAW)、集積されたDMF及び検体検出デバイス、集積されたSAW及び検体検出デバイス、又はロボット工学ベースのアッセイ処理ユニットを用いて行われる。

【0051】

特定の実施形態において、測定することは、ウェルのアレイ内の固体支持体の総数を求めることを伴う。特定の実施形態において、測定することは、検出可能標識を含有するアレイのウェル内の固体支持体の数を求めることを伴う。特定の実施形態において、測定することは、検出可能標識を含有する固体支持体の数をウェルのアレイ内の固体支持体の総数から差し引いて、検出可能標識を含有しないウェルのアレイ内の固体支持体の数を求めることを伴う。特定の実施形態において、測定することは、検出可能標識を含有しない固体支持体の数に対する検出可能標識を含有する固体支持体の比を求めることを伴う。

40

【0052】

また、本明細書において、ウェルに粒子を装填する方法が開示され、上記方法は、複数の電極で電場を発生させて、マイクロ粒子を含有する液滴をウェルのアレイへ移動させることであって、ウェルのアレイの1つ又はそれより多くのウェルはその中に装填された粒子を有するのに十分なサイズのものである、ことと；1つ又はそれより多くのウェルに粒子を装填することと；複数の電極で電場を発生させて、分極可能な流体小滴をウェルのアレイへ移動させてウェルのアレイをシールすることと、を含む。

50

【0053】

いくつかの実施形態において、上記方法は、電場を用いてウェルのアレイの上で液滴を位置決めすることをさらに含む。いくつかの実施形態において、上記方法は、ウェルのアレイへの液滴の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、ウェルのアレイの上で液滴を位置決めすることをさらに含む。いくつかの実施形態において、粒子は、磁気ビーズである。いくつかの実施形態において、装填することは、磁場を印加して、アレイの1つ又はそれより多くのウェル内への1つ又はそれより多くの磁気ビーズの移動を促進することを含む。いくつかの実施形態において、ウェルのアレイは、親水性表面を有する。いくつかの実施形態において、ウェルのアレイは、疎水性表面を有する。いくつかの実施形態において、電場を発生させることは、交流電流を発生させることを含む。特定の実施形態において、交流電流は、10 V以上の二乗平均平方根（ rms ）電圧を有する。特定の

10

【0054】

また、本明細書において、デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスを形成する方法が開示され、上記方法は、第1の基板を含む第1のロールの巻きを解いて、第1の基板の第1の部分を第1の位置に位置決めすることと；第1の位置において、第1の基板の第1の部分に複数の電極を形成することと；第2の位置において、第1の基板の第2の部分にウェルのアレイを形成することと、を含む。

【0055】

いくつかの実施形態において、上記方法は、ウェルのアレイを形成する前に、第1のロールの巻きを解いて、第1の基板の第1の部分に隣接した第2の部分を第2の位置に位置決めすることをさらに含む。いくつかの実施形態において、上記方法は、第2の基板を含む第2のロールの巻きを解いて、第3の基板の第3の部分を第3の位置に位置決めすることと；第3の位置において、第2の基板を第1の基板から離間させて位置決めするのに十分な様式で第2の基板を第1の基板に貼り合わせることに、をさらに含む。

20

【0056】

また、本明細書において、集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスを形成する方法が開示され、上記方法は、第1の基板を含む第1のロールの巻きを解いて、第1の基板の第1の部分を第1の位置に位置決めすることと；第1の位置において、第1の基板の第1の部分に複数の電極を形成することと；第2の基板を含む第2のロールの巻きを解いて、第2の基板の第2の部分を第2の位置に位置決めすることと；第2の位置において、第2の部分にウェルのアレイを形成することと；第2の基板を第1の基板から離間させて位置決めし、且つ第2の部分を第1の部分の上方に位置決めするか又は第1の基板の第1の部分に隣接する第3の部分の上方に位置決めし、ウェルのアレイが第1の基板に面するようにするのに十分な様式で、第2の基板を第1の基板に貼り合わせることに、を含む。

30

【0057】

いくつかの実施形態において、ウェルのアレイを形成することは、熱若しくは紫外線ナノインプリントリソグラフィ、ナノインプリントローラ、レーザアブレーションを使用することを含むか、又はウェルのアレイを含むあらかじめ製作された基板を第1の基板の第1の部分へ貼り合わせることにによる。いくつかの実施形態において、上記方法は、第1の基板に強い熱、圧力、又は紫外線をかけて、型を用いて第1の基板上又は基板内にフォノン構造を形成することをさらに含む。

40

【0058】

いくつかの実施形態において、上記方法は、プリンタデバイスを用いて、一連の電極上に疎水性及び／又は誘電性材料を塗工することをさらに含む。いくつかの実施形態において、疎水性及び／又は誘電性材料は、硬化材料を含む。いくつかの実施形態において、上記方法は、熱又は紫外線を印加して、前記塗工された疎水性及び／又は誘電性材料を硬化することをさらに含む。いくつかの実施形態において、上記方法は、第1及び第2の基板をダイシングして、第1及び第2の部分を含む貼り合わされた基板を生成することをさらに含む。

50

【0059】

また、本明細書において、液滴中の対象検体を検出する方法が開示され、上記方法は、対象検体を含む第1の液滴を準備することと；特異的結合メンバー及び標識化検体を含む第2の液滴を準備することであって、結合メンバーは少なくとも1つの固体支持体上に固定化されており、特異的結合メンバーは対象検体に特異的に結合するものであり、標識化検体は検出可能標識で標識された対象検体である、ことと；力を及ぼすエネルギーを用いて、第1の液滴を第2の液滴と共に操作して混合物を作製することと；混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させることであって、アレイの1つ又はそれより多くのウェルは、少なくとも1つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ことと、を含む。

10

【0060】

また、本明細書において、液滴中の対象検体を検出する方法が開示され、上記方法は、対象検体を含む第1の液滴を準備することと；固定化検体及び少なくとも1つの特異的結合メンバーを含む第2の液滴を準備することであって、固定化検体は、少なくとも1つの固体支持体上に固定化された対象検体であり、少なくとも1つの特異的結合メンバーは、対象検体に特異的に結合するものであり、少なくとも1つの特異的結合メンバーは、検出可能標識で標識されている、ことと；力を及ぼすエネルギーを用いて、第1の液滴を第2の液滴と共に操作して混合物を作製することと；混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させることであって、アレイの1つ又はそれより多くのウェルは、少なくとも1つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ことと；ウェル内の対象検体を検出することと、を含む。

20

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1A】一実施形態による集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスの側面図を示す。

【図1B】別の実施形態による集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスの側面図を示す。

【図2A】一実施形態による集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスの側面図を示す。

【図2B】別の実施形態による集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスの側面図を示す。

30

【図3A】図2Aのデバイスの側面図をデバイス内で移動している液滴と共に示す。

【図3B】図2Bのデバイスの側面図をデバイス内で移動している小滴と共に示す。

【図4A】図2Aの側面図を、ウェルのアレイの上へ移動している粒子／ビーズを含有する小滴と共に示す。

【図4B】図2Bのデバイスの側面図を、不混和性流体と共にウェルのアレイの上へ移動している粒子／ビーズを含有する小滴と共に示す。

【図5】デバイスの親水性毛管領域を用いてウェルのアレイの上を移動している水滴を示す。

【図6】ウェルのアレイの上を移動している水滴を示す。

40

【図7A】ウェルの側壁の例示的な配向を示す。

【図7B】ウェルの側壁の例示的な配向を示す。

【図8】デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスの第2の（例えば下部）基板の製作の一例を示す。

【図9】デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスの第1の（例えば上部）基板の製作の一例を示す。

【図10】上部基板及び下部基板を組立てて複数のデジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスを製造する一例を示す。

【図11A】本開示の例示的なデジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスの下部基板を上から見た平面図を示す。

50

【図 1 1 B】本開示の例示的なデジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスの下部基板を上から見た平面図を示す。

【図 1 2 A】ウェルのアレイを製作して、集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスにする例を示す。

【図 1 2 B】ウェルのアレイを製作して、集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスにする例を示す。

【図 1 2 C】ウェルのアレイを製作して、集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスにする例を示す。

【図 1 2 D】ウェルのアレイを製作して、集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスにする例を示す。

【図 1 3 A】集積マイクロ流体及び検体デバイスの表面弾性波構成要素並びにウェルのアレイの一実施形態の側面図を示す。

【図 1 3 B】集積マイクロ流体及び検体デバイスの表面弾性波構成要素並びにウェルのアレイの別の実施形態の側面図を示す。

【図 1 4 A】サンプル調製構成要素及びウェルアレイ構成要素の製作の一例を示す。

【図 1 4 B】サンプル調製構成要素及びウェルアレイ構成要素の製作の一例を示す。

【図 1 5】本開示の例示的な方法を示す。

【図 1 6】図示したデバイスのウェル内に位置していないビーズを除去するための例示的な方法を示す。

【図 1 7】図示したデバイスのウェル内に位置していないビーズを除去するための別の例示的な方法を示す。

【図 1 8】低コスト DMF チップの製作プロセスの概略図を示す。

【図 1 9】図 1 8 の概略図に従って製作される単一の可撓性チップを示す。

【図 2 0】本開示の実施形態による、DMF チップにおける小滴のアクチュエーションを示す。

【図 2 1 A】本開示の実施形態による、DMF チップにおけるイムノアッセイの遂行を示す。

【図 2 1 B】本開示の実施形態による、DMF チップにおけるイムノアッセイの遂行を示す。

【図 2 1 C】本開示の実施形態による、DMF チップにおけるイムノアッセイの遂行を示す。

【図 2 1 D】本開示の実施形態による、DMF チップにおけるイムノアッセイの遂行を示す。

【図 2 1 E】本開示の実施形態による、DMF チップにおけるイムノアッセイの遂行を示す。

【図 2 2 A】本開示の実施形態による、DMF 上部電極チップ及びウェルアレイの設計及び製作方法を示す概略図である。

【図 2 2 B】本開示の実施形態による、DMF 上部電極チップ及びウェルアレイの設計及び製作方法を示す概略図である。

【図 2 3】本開示の実施形態による、ウェル設計の概略図を示す。

【図 2 4 A】本開示の実施形態による、ウェル間隔形式を示す概略図である。

【図 2 4 B】本開示の実施形態による、ウェル間隔形式を示す概略図である。

【図 2 5】本開示の実施形態による、ウェルのアレイの拡大された光学像の集合である。

【図 2 6】本開示の実施形態による、DMF 上部電極チップ及びウェルアレイからの集積 DMF ウェルデバイスの組立てを示す概略図である。

【図 2 7 A】本開示の実施形態による、集積 DMF ウェルデバイス上で行われるイムノアッセイを示す概略図である。

【図 2 7 B】本開示の実施形態による、集積 DMF ウェルデバイス上で行われるイムノアッセイを示す概略図である。

【図 2 7 C】本開示の実施形態による、集積 DMF ウェルデバイス上で行われるイムノア

10

20

30

40

50

ッセイを示す概略図である。

【図 2 7 D】本開示の実施形態による、集積 D M F ウェルデバイス上で行われるイムノアッセイを示す概略図である。

【図 2 7 E】本開示の実施形態による、集積 D M F ウェルデバイス上で行われるイムノアッセイを示す概略図である。

【図 2 7 F】本開示の実施形態による、集積 D M F ウェルデバイス上で行われるイムノアッセイを示す概略図である。

【図 2 7 G】本開示の実施形態による、集積 D M F ウェルデバイス上で行われるイムノアッセイを示す概略図である。

【図 2 8】本開示の実施形態による、ウェルアレイにおけるデジタル蛍光検出と連結された、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）ベースのサンドイッチイムノアッセイの概略図である。

10

【図 2 9】本開示の実施形態による、D M F で導かれるウェルアレイへのマイクロ粒子の上部装填のための構成要素を模式的に示す。

【図 3 0 A】本開示の実施形態による、集積 D M F ウェルデバイスを用いた甲状腺刺激ホルモン（T S H）イムノアッセイのステップを示す概略図である。

【図 3 0 B】本開示の実施形態による、集積 D M F ウェルデバイスを用いた甲状腺刺激ホルモン（T S H）イムノアッセイのステップを示す概略図である。

【図 3 0 C】本開示の実施形態による、集積 D M F ウェルデバイスを用いた甲状腺刺激ホルモン（T S H）イムノアッセイのステップを示す概略図である。

20

【図 3 0 D】本開示の実施形態による、集積 D M F ウェルデバイスを用いた甲状腺刺激ホルモン（T S H）イムノアッセイのステップを示す概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 6 2】

集積マイクロ流体及び検体検出デバイスが開示される。また、本明細書において、集積マイクロ流体及び検体検出デバイスを使用するための方法並びに関連のシステムが提供される。

【0 0 6 3】

本発明をより詳細に記載する前に、記載する特定の実施形態は当然変動し得るので、本発明はかかるものに限定されないことを理解されたい。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるので、本明細書において使用する用語は、特定の実施形態を記述することのみを目的としたものであり、限定を意図したものではないこともまた理解されたい。

30

【0 0 6 4】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が明らかに別様に規定しない限り、複数の指示物を包含することに留意されたい。それゆえ、例えば、「(an) 電極」に言及することは、複数のかかる電極を包含し、「(the) ウェル」への言及は、1 つ又はそれより多くのウェル及び当業者に公知のその均等物への言及を包含し、以下同様である。

【0 0 6 5】

本明細書において言及されるすべての刊行物は、それら刊行物が引用された事項に関連して、方法及び／又は材料を開示し及び記載するために、引用により本明細書に組み入れられる。本開示は、本開示と参照により組み入れられた刊行物との間に矛盾が存在する限度まで優先する。

40

【0 0 6 6】

詳細な説明

本開示の実施形態は、サンプル中の検体の分析のための方法、システム、及びデバイスに関する。特定の実施形態において、サンプルは生物学的サンプルであり得る。

【0 0 6 7】

定義

50

本開示の実施形態を記載する前に、記載する特定の実施形態は当然変動し得るので、本発明はかかるものに限定されないことを理解すべきである。本明細書において使用される用語は特定の実施形態を記述するのみの目的のためのものであり、限定するとは意図されないことも理解すべきである。

【0068】

本明細書において使用されるとき、「含む、備える (comprise(s))」、「含む (include(s))」、「有している (having)」、「有する (has)」、「できる (can)」、「含有する (contain(s))」、及びそれらの変形は、付加的な動作又は構造の可能性を除外しないオープンエンドの移行句、用語、又は単語であることが意図される。単数形「a」、「an」及び「the」には、文脈が明らかに別様に規定しない限り複数の指示物が包含される。本開示は、明瞭に説明されているか否かに関わらず、本明細書において提示される実施形態又は要素を、「含む」、「からなる」、及び「から本質的になる」他の実施形態も企図する。

10

【0069】

本明細書における数値範囲の列挙に関して、同程度の精度でその間に介在する各々の数が明示的に企図される。例えば、6～9の範囲については、数7及び8が、6及び9に加えて企図され、6.0～7.0の範囲については、数6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9及び7.0が明示的に企図される。

【0070】

「親和性」及び「結合親和性」は、本明細書において互換的に使用されるとき、検体に対する結合メンバーの結合の傾向又は強さを指す。例えば、結合親和性は、平衡解離定数 (K_D)、解離速度 (k_d)、又は会合速度 (k_a) によって表わすことができる。

20

【0071】

「類似体」は、本明細書において使用されるとき、対象となる分子に類似する構造を有する分子（例えばヌクレオシド類似体、ヌクレオチド類似体、糖リン酸塩類似体、検体類似体等）を指す。検体類似体は、ある検体に構造的に類似するが、結合メンバーがそれに対する異なる親和性を有する分子である。

【0072】

「アプタマー」は、本明細書において使用されるとき、小分子、タンパク質及びとりわけペプチドを含む予め選択された標的に対して高い親和性及び特異性で結合することができる、オリゴヌクレオチド又はペプチド分子を指す。アプタマーは、ヘリックス及び一本鎖ループを形成するその傾向に起因して、様々な形を呈することができる。オリゴヌクレオチド又は核酸のアプタマーは、一本鎖のDNA又はRNA (ssDNA又はssRNA) 分子であり得る。ペプチドアプタマーは、両方の端部でタンパク質スキャフォールドに付着する、短い可変ペプチドドメインを含むことができる。

30

【0073】

「ビーズ」及び「粒子」は、本明細書において互換的に使用され、実質的に球状の固体支持体を指す。

【0074】

「構成要素」、「構成要素（複数）」、又は「少なくとも1つの構成要素」は、一般に、捕捉抗体、検出試薬又はコンジュゲート、キャリブレータ、対照、感受性パネル、容器、バッファー、希釈液、塩、酵素、酵素に対する補因子、検出試薬、前処理試薬／溶液、基質（例えば溶液として）、停止溶液及びこれらに類するものを指し、それらは、患者の尿、血清、全血、組織吸引物、又は血漿サンプルなどの試験サンプルを本明細書において記載される方法及び当技術分野において公知の他の方法に従ってアッセイするためのキット中に含まれ得る。いくつかの構成要素は、溶液中にあるか、又はアッセイにおける使用のための再構成用に凍結乾燥され得る。

40

【0075】

「デジタルマイクロ流体 (DMF)」、「デジタルマイクロ流体モジュール (DMFモジュール)」、又は「デジタルマイクロ流体デバイス (DMFデバイス)」は、本明細書

50

において互換的に使用されるとき、デジタル又は小滴ベースのマイクロ流体技法を利用して、小滴の形状の離散的な小体積の液体の操作を提供するモジュール又はデバイスを指す。デジタルマイクロ流体は、エマルション科学の原理を使用して、チャンネル内へ流体分散（主に油中水滴型エマルション）を作り出す。それは、単分散の又は非常に低い多分散性の滴／泡の生成を可能にする。デジタルマイクロ流体は、再構成可能なネットワーク内での不連続な流体小滴の顕微操作に基づく。複雑な指示を、小滴の形成、移動、分割、及び併合という基本動作を組み合わせることによってプログラムすることができる。

【0076】

デジタルマイクロ流体は、二進電気シグナルによって操作することができる流体の離散的体積上で動作する。離散的な単位体積小滴を使用することによって、マイクロ流体動作は、繰り返される基本動作（すなわち1単位の流体が1単位の距離にわたって移動すること）のセットとして定義することができる。小滴は、液体の表面張力特性を用いて形成され得る。小滴のアクチュエーションは、小滴がその上に位置する底面の下方に設置された電極によって発生される静電力の存在に基づく。異なるタイプの静電力を使用して、小滴の形及び動きを制御することができる。前述の静電力を生ずるのに使用することができる1つの技法は、小滴と周囲媒質との間の誘電率の差による誘電泳動に基づくものであり、高周波AC電場を利用することができる。前述の静電力を生ずるのに使用することができる別の技法は、エレクトロウェットティングに基づくものであり、これは、表面上に存在する液滴と該表面との間の表面張力の、該表面に印加された電場に対する依存性によるものである。

【0077】

「抗力タグ（drag-tag）」は移動度改質剤を指す。抗力タグは、大型、水溶性、且つ完全単分散となるように設計された、遺伝子工学によって合成された高度に反復的なポリペプチド（「タンパク質ポリマー」）であり得る。正に荷電したアルギニンをアミノ酸配列内へ規則的間隔で故意に導入して、抗力タグの長さを増大させることなく流体力学的抗力を増大させることができる。抗力タグは、特許文献1（米国特許出願公開第20120141997号）に記載されており、これは引用により本明細書に組み入れられる。

【0078】

「酵素切断可能な配列」は、本明細書において使用されるとき、酵素によって切断することができる任意の核酸配列を指す。例えば、この酵素は、プロテアーゼ、又は制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素とも呼ばれる）などのエンドヌクレアーゼであり得る。制限エンドヌクレアーゼは、所定のヌクレオチド間の特異的なDNA切断部位においてDNA分子を認識し切断することができる。例えばFokIなどのいくつかのエンドヌクレアーゼは、DNAを特定の位置で、この位置に存在するヌクレオチドにかかわらず非特異的に切断する、切断ドメインを含む。いくつかの実施形態において、制限エンドヌクレアーゼの特異的なDNA切断部位とDNA認識部位とは同一である。

【0079】

「球状タンパク質」は、大まかに球状の形を有する水溶性タンパク質を指す。球状タンパク質の例には、オボアルブミン、ベータグロブリン、C反応性タンパク質、フィブリン、ヘモグロビン、IgG及びIgM、及びトロニンが含まれるが、これらに限定されない。

【0080】

「標識」又は「検出可能標識」は、本明細書において互換的に使用されるとき、特異的結合メンバー又は検体に付着して、特異的結合メンバーと検体との間の反応を検出可能にする部分を指し、そのように標識された特異的結合メンバー又は検体は、「検出可能に標識された」と称される。標識は、目視又は機器的手段によって検出可能なシグナルを生成することができる。種々の標識には、（i）切断可能なリンカーによって特異的結合メンバー又は検体に付着するタグ、又は（ii）色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物、放射性化合物及びそれに類するようなシグナル生成物質が含まれる。標識の代表例は、

光を発生する部分、例えばアクリジニウム化合物、及び蛍光を発生する部分、例えばフルオレセインを含む。他の標識は、本明細書に記載されている。この点に関して、部分は、それ自体が検出可能でなくてもよいが、さらに別の部分と反応すると検出可能になるものであってもよい。「検出可能に標識された」という用語の使用は、かかる標識化を包含することが意図される。

【0081】

「マイクロ粒子」及び「マイクロビーズ」は、本明細書において互換的に用いられ、ウェルのアレイ内、例えば検出モジュールのウェルのアレイ内などを占有し又はその中に沈降することが可能なマイクロビーズ又はマイクロ粒子を意味する。マイクロ粒子及びマイクロビーズは、対象検体と、少なくとも1つの検出可能標識に結合する、少なくとも1つの特異的結合メンバーを含有することができる。あるいは、マイクロ粒子及びマイクロビーズは、検体に結合する第1の特異的結合メンバーと、検体に結合するとともに少なくとも1つの検出可能標識を含有する第2の特異的結合メンバーとを含有することができる。

【0082】

「核酸塩基」又は「塩基」は、ポリマーの生成ための、核酸若しくはポリヌクレオチド技術又はペプチド核酸技術の技術分野において一般的に公知の、天然に存在する複素環部分及び合成の複素環部分を意味する。好適な核酸塩基の非限定例には、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシル、5-プロピニル-ウラシル、2-チオ-5-プロピニル-ウラシル、5-メチルシトシン、シュードイソシトシン、2-チオウラシル及び2-チオチミン、2-アミノプリン、N9-(2-アミノ-6-クロロプリン)、N9-(2, 6-ジアミノプリン)、ヒポキサンチン、N9-(7-デアザ-グアニン)、N9-(7-デアザ-8-アザ-グアニン) 及びN8-(7-デアザ-8-アザ-アデニン) が含まれる。核酸塩基を他の部分に連結して、ヌクレオシド、ヌクレオチド、及びヌクレオシド/ヌクレオチド類似体を形成することができる。

【0083】

「ヌクレオシド」は、プリン核酸塩基、デアザプリン核酸塩基、又はピリミジン核酸塩基、例えばアデニン、グアニン、シトシン、ウラシル、チミン、7-デアザアデニン、7-デアザグアニンが、リボース、2'-デオキシリボース、又は2', 3'-ジデオキシリボースなどのペントース糖の1'位のアノマー炭素に連結されたものからなる化合物を指す。

【0084】

「ヌクレオチド」は、本明細書において使用されるとき、ヌクレオシドのリン酸エステル、例えば一リン酸エステル、二リン酸エステル、又は三リン酸エステルを指し、ここでエステル化の最も一般的な部位は、ペントースのC-5位に付いているヒドロキシル基である。

【0085】

「核酸塩基ポリマー」又は「核酸塩基オリゴマー」は、リンケージによって接続されてオリゴマーを形成した2つ以上の核酸塩基を指す。核酸塩基ポリマー又はオリゴマーには、ポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド（例えばDNA及びRNAポリマー及びオリゴマー）、ポリヌクレオチド類似体及びオリゴヌクレオチド類似体並びにポリヌクレオチド模倣体及びオリゴヌクレオチド模倣体（ポリアミド又はペプチド核酸など）が含まれるが、これらに限定されない。核酸塩基ポリマー又はオリゴマーのサイズは、数個の核酸塩基から数百の核酸塩基まで又は数千の核酸塩基まで変動することができる。核酸塩基ポリマー又はオリゴマーは、約2から100までの核酸塩基又は約8000から10000までの核酸塩基を含み得る。例えば、核酸塩基ポリマー又はオリゴマーは、少なくとも約2つの核酸塩基、少なくとも約5つの核酸塩基、少なくとも約10の核酸塩基、少なくとも約20の核酸塩基、少なくとも約30の核酸塩基、少なくとも約40の核酸塩基、少なくとも約50の核酸塩基、少なくとも約60の核酸塩基、少なくとも約70の核酸塩基、少なくとも約80の核酸塩基、少なくとも約90の核酸塩基、少なくとも約100の核酸塩基、少なくとも約200の核酸塩基、少なくとも約300の核酸塩基、少なくとも約40

0の核酸塩基、少なくとも約500の核酸塩基、少なくとも約600の核酸塩基、少なくとも約700の核酸塩基、少なくとも約800の核酸塩基、少なくとも約900の核酸塩基、少なくとも約1000の核酸塩基、少なくとも約2000の核酸塩基、少なくとも約3000の核酸塩基、少なくとも約4000の核酸塩基、少なくとも約5000の核酸塩基、少なくとも約6000の核酸塩基、少なくとも約7000の核酸塩基、少なくとも約8000の核酸塩基、少なくとも約9000の核酸塩基、又は少なくとも約10000の核酸塩基を有することができる。

【0086】

「ポリマーブラシ」は、1つの端部により表面に付着したポリマーの層を指す。ポリマーは互いに近接して、それ自体の環境を形成する層又はコーティングを形成する。ブラシは、ダングリング鎖が溶媒の中に沈められているときには溶媒状態、又はダングリング鎖が利用可能な空間を完全に満たしているときには溶融状態、そのどちらかであり得る。加えて、ポリマー鎖それ自体が静電荷を持っている場合、別個のクラスの高分子電解質ブラシが存在する。ブラシは、高密度のグラフト鎖によって特徴づけることができる。このとき、限られた空間は、鎖の強い伸長及び系の独特の性質をもたらす。ブラシは、コロイドを安定化し、表面間の摩擦を低減させ、人工関節における潤滑を提供するために用いることができる。

【0087】

「ポリヌクレオチド」又は「オリゴヌクレオチド」は、核酸塩基が糖リン酸リンケージ（糖—リン酸バックボーン）によって接続された、核酸塩基ポリマー又はオリゴマーを指す。例示的なポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドには、2'-デオキシリボヌクレオチドのポリマー（DNA）及びリボヌクレオチドのポリマー（RNA）が含まれる。ポリヌクレオチドは、完全にリボヌクレオチドのもの、完全に2'-デオキシリボヌクレオチドのもの、又はその組み合わせから構成され得る。核酸という用語は、ポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドという用語を包含し、ヌクレオチドモノマーの一本鎖ポリマー及び二本鎖ポリマーを含む。

【0088】

「ポリヌクレオチド類似体」又は「オリゴヌクレオチド類似体」は、核酸塩基が1つ又はそれより多くの糖リン酸類似体を含む糖リン酸バックボーンによって接続された、核酸塩基ポリマー又はオリゴマーを指す。典型的な糖リン酸類似体には、糖アルキルホスホネート、糖ホスホロアミダイト、糖アルキル—又は置換アルキルホスホトリエステル、糖ホスホロチオエート、糖ホスホロジチオエート、糖が2'-デオキシリボース又はリボース以外である糖リン酸及び糖リン酸類似体、特許文献2（米国特許第6,013,785号）及び特許文献3（米国特許第5,696,253号）に記載されているような正に荷電した糖グアニジルインターリンケージを有する核酸塩基ポリマーが含まれるが、これらに限定されない。

【0089】

「受容体」は、本明細書において使用されるとき、内在性化学シグナルを認識し、それに応答するタンパク質分子を指す。かかる内在性化学シグナルが受容体へ結合したとき、それらは、いくつかの形態の細胞応答／組織応答を引き起こす。受容体の例には、神経受容体、ホルモン受容体、栄養受容体、及び細胞表面受容体が含まれるが、これらに限定されない。

【0090】

本明細書において使用されるとき、「スペーサー」は、特異的結合メンバーから切断可能な基を延長する化学的部分、又は結合メンバーと支持体との間のリンケージを提供する化学的部分、又は光切断可能な部分から標識／タグを延長する化学的部分を指す。いくつかの実施形態において、特異的結合メンバーから配列を至適に引き離すために、1つ又はそれより多くのスペーサーを、ポリペプチド又はヌクレオチドベースのタグ又は標識のN末端又はC末端に含めることができる。スペーサーには、6-アミノカプロン酸、6-アミノヘキサン酸；1,3-ジアミノプロパン；1,3-ジアミノエタン；ポリエチレング

10

20

30

40

50

リコール（PEG）ポリマー基、及びポリグリシン配列のような1から5までのアミノ酸の短いアミノ酸配列が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0091】

「特異的結合パートナー」又は「特異的結合メンバー」は、本明細書において互換的に使用されるとき、一方の分子が他方の分子を、それ以外の実質的に認識がより弱い分子と比べて特異的に認識する、2つの異なる分子のうちの一方を指す。2つの異なる分子のうちの一方は、表面上に又は空洞内にある領域を有し、この領域は、他方の分子と特異的に結合し、それにより他方の分子の特定の空間的及び極性構成に対して相補的であると定義される。分子は、特異的結合ペアのメンバーであり得る。例えば、特異的結合メンバーには、受容体、酵素、抗体及びアプタマーなどのタンパク質、ペプチド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド及びこれらの組合せが含まれ得るが、これらに限定されない。

10

【0092】

本明細書において使用されるとき、「タグ（単数）」又は「タグ分子」は両方とも、サンプル中の検体のレベルの指標を提供するために使用される分子（例えば、標的検体から解離される第2の結合メンバーから切断される）を指す。これらの用語は、単一のタグ分子又は複数の同じタグ分子を指す。同様に、「タグ（複数）」は、特に指示がない限り、1つのタグ、又は1つ又はそれより多くのタグを指す。

【0093】

「トレーサー」は、本明細書において使用されるとき、タグ又は標識ヘコンジュゲートされた検体又は検体断片を指し、ここでタグ又は標識ヘコンジュゲートされた検体は、その検体に対して特異的な抗体上の部位に関して、検体と有効に競合することができる。例えば、トレーサーは、シクロスポリン又はその類似体ISA247、ビタミンD及びその類似体、性ホルモン及びそれらの類似体、等のように、検体又は検体の類似体とすることができる。

20

【0094】

特段の定めのない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語及び科学用語は、当業者が通常理解しているのと同じ意味を有する。矛盾する場合は、本文書が、定義を含めて、優先されるものとする。本発明の実践又は試験において、本明細書に記載される方法及び材料に類似の又は均等な方法及び材料を使用することができるが、好ましい方法及び材料を後述する。本明細書において言及されるすべての刊行物、特許出願、特許及び他の参照は、それら刊行物が引用された事項に関連して、方法及び／又は材料を開示し及び記載するために、引用によりその全体が本明細書に組み入れられる。本明細書において開示される材料、方法、及び実施例は、単に説明的なものであり、限定を意図したものではない。

30

【0095】

検体分析のための方法

検体分析のための方法が本明細書において提供される。本方法は、単一分子をカウントすることを伴い得る。特定の実施形態において、検体分析のための方法は、サンプル中に存在する検体を評価することを伴い得る。特定の実施形態において、評価は、サンプル中の検体の存在及び／又は濃度を判定するために使用することができる。特定の実施形態において、本方法は、サンプル中に存在する複数の異なる検体の存在及び／又は濃度を判定するために使用することもできる。

40

【0096】

本明細書において、液滴中の対象検体を検出するための方法が提供される（ここで対象検体は、試験サンプル又は生物学的サンプル由来のものである）。この方法は、対象検体を含有する第1の液滴を準備することと、対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する少なくとも1つの固体支持体（例えば磁性固体支持体（ビーズなど）など）を含有する第2の液滴を準備することと、力を及ぼすエネルギーを用いて、第1の液滴（これは対象検体を含有する）を第2の液体（少なくとも1つの固体支持体を含有する）と共に操作

50

して混合物を作製することと、該混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させることと（ここでアレイの1つ又はそれより多くのウェルは、少なくとも1つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである）、混合物の一部をウェルのアレイへ移動させる前、後又は前後両方に、混合物に少なくとも1つの検出可能標識を添加することと、ウェル内の対象検体を検出することと、を含む。特定の実施形態において、「力を及ぼすエネルギーを用いて、第1の液滴を第2の液滴と共に操作すること」は、少なくとも第1及び第2の液滴（及び随意に付加的な小滴）を操作（併合する又は組み合わせるなど）して混合物にする力を提供する又は及ぼすための、非機械的な力（すなわち、例えば、ポンプ及び／又は弁を使用せずに作り出されるエネルギー）の使用を意味する。本明細書で記載する方法で 사용할 ことができる非機械的な力の例には、電気的アクチュエーション力（小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェットティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離又は吸引など）及び／又は音響力（表面弾性波（又は「SAW」）など）が含まれる。特定の実施形態において、発生される電気的アクチュエーション力は、交流電流である。例えば、交流電流は、10 V、15 V、20 V、25 V、30 V、35 V以上の二乗平均平方根（rms）電圧を有し得る。例えば、かかる交流電流は、10 V以上、15 V以上、20 V以上、25 V以上、30 V以上、又は35 V以上のrms電圧を有し得る。あるいは、交流電流は、無線周波数範囲の周波数を有し得る。

【0097】

特定の実施形態において、磁性固体支持体を用いられる場合、電気的アクチュエーション力及び磁場を印加することができ、混合物の少なくとも一部に対して反対方向から印加される。特定の他の実施形態において、混合物は、これを前後に、円形パターンに動かすことによって、又はこれを2つ以上のサブ混合物に分割し、次いでサブ混合物を併合することによって混合される。特定の他の実施形態によって、電気的アクチュエーション力は、一連の又は複数の電極（すなわち、少なくとも2以上、少なくとも3以上、少なくとも4以上、少なくとも5以上、少なくとも6以上、少なくとも7以上、少なくとも8以上、少なくとも9以上、少なくとも10以上、少なくとも11以上、少なくとも12以上、少なくとも13以上、少なくとも14以上、少なくとも15以上、等）を用いて発生させることができ、ウェル（これらには少なくとも1つの固体支持体が装填される）をシールするために混合物をウェルのアレイへ移動させる。

【0098】

特定の実施形態において、混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させると、その結果、少なくとも1つの固体支持体がウェルのアレイ内に装填（充填及び／又は配置）される。特定の実施形態において、磁場を使用して、混合物の、それゆえ少なくとも1つの固体支持体の、アレイの1つ又はそれより多くのウェルへの移動が促進される。特定の実施形態において、少なくとも1つの固体支持体がウェル内に装填された後、ウェル内に装填されなかった固体支持体があれば、当技術分野で知られた慣例的な技術を用いてこれを除去することができる。例えば、かかる除去は、一連の又は複数の電極により電気的アクチュエーション力（本明細書で前述したようなもの）を発生させて、流体小滴（分極可能な流体小滴など）をウェルのアレイまで移動させて、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイから所定距離（その長さは重要ではない）まで移動させることを伴い得る。特定の実施形態において、水性洗浄用液体を用いて、対象検体に結合していない固体支持体を除去することができる。かかる実施形態において、除去は、一連の又は複数の電極により電気的アクチュエーション力を発生させて、水性洗浄（又は洗浄用）小滴（第3の小滴）を、ウェルのアレイにわたって移動させることを伴う。この洗浄用に用いられる水性液体の量及びタイプは重要ではない。

【0099】

特定の実施形態において、上記方法における混合物は、水性液体である。他の実施形態において、混合物は、不混和性液体である。他の実施形態において、液滴は、疎水性液滴である。他の実施形態において、液滴は、親水性液滴である。特定の実施形態において、

上記方法において使用されるウェルのアレイは、疎水性表面を有する。他の実施形態において、ウェルのアレイは、親水性表面を有する。

【0100】

特定の実施形態において、上記方法において用いられる第1の液滴は、分極可能な液体である。特定の実施形態において、上記方法において用いられる第2の液滴は、分極可能な液体である。特定の実施形態において、上記方法において用いられる第1及び第2の液滴は、分極可能な液体である。特定の実施形態において、混合物は、分極可能な液体である。特定の実施形態において、第1の小滴、第2の小滴及び混合物のうちの1つ又はそれより多くが分極可能な液体である。

【0101】

特定の実施形態において、少なくとも1つの固体支持体は、対象検体に特異的に結合する少なくとも1つの結合メンバーを含む。特定の実施形態において、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させる前に、検出可能標識が混合物に添加される。特定の他の実施形態において、対象検体の少なくとも一部を移動させた後に、検出可能標識が混合物に添加される。特定の実施形態において、検出可能標識は、対象検体に特異的に結合する少なくとも1つの結合メンバーを含む。特定の実施形態において、検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含む。特定の実施形態において、結合メンバーは、受容体、アプタマー又は抗体である。特定の実施形態において、上記方法は、ウェルのアレイへの混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイの上に位置決めすることをさらに含む。

【0102】

特定の実施形態において、本明細書に記載する方法は、マイクロ流体デバイスを用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書に記載する方法は、デジタルマイクロ流体デバイス(DMF)を用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書に記載する方法は、表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス(SAW)を用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書に記載する方法は、集積されたDMF及び検体検出デバイスを用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書に記載する方法は、集積された表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス及び検体検出デバイスを用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書に記載する方法は、ロボット工学ベースのアッセイ処理ユニットを用いて行われる。

【0103】

本明細書において、液滴中の対象検体を検出するための方法が提供される(ここで対象検体は、試験サンプル又は生物学的サンプル由来のものである)。この方法は、対象検体を含有する第1の液滴を準備することと、対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する少なくとも1つの検出可能標識を含有する第2の液滴を準備することと、力を及ぼすエネルギーを用いて、第1の液滴(これは対象検体を含有する)を第2の液滴(少なくとも1つの固体支持体を含有する)と共に操作して混合物(すなわち、検体/検出可能標識-特異的結合メンバー複合体)を作製することと、該混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させることと(ここでアレイの1つ又はそれより多くのウェルは、少なくとも1つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである)、ウェル内の対象検体を検出することと、を含む。特定の実施形態において、「力を及ぼすエネルギーを用いて、第1の液滴を第2の液滴と共に操作すること」は、少なくとも第1及び第2の液滴(及び随意に付加的な小滴)を操作(併合する又は組み合わせるなど)して混合物にする力を提供する又は及ぼすための、非機械的な力(すなわち、例えば、ポンプ及び/又は弁を使用せずに作り出されるエネルギー)の使用を意味する。本明細書に記載する方法で使用するができる非機械的な力の例には、電氣的アクチュエーション力(小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェットティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離又は吸引など)及び/又は音響力(表面弾性波(又は「SAW」)など)が含まれる。特定の実施形態において、発生される電氣的アクチュエーション力は、交流電流である。例えば、交流電流は、10V、1

5 V、20 V、25 V、30 V、35 V以上の二乗平均平方根（r m s）電圧を有し得る。例えば、かかる交流電流は、10 V以上、15 V以上、20 V以上、25 V以上、30 V以上、又は35 V以上のr m s電圧を有し得る。あるいは、交流電流は、無線周波数範囲の周波数を有し得る。

【0104】

特定の実施形態において、混合物は、これを前後に、円形パターンに動かすことによって、又はこれを2つ以上のサブ混合物に分割し、次いでサブ混合物を併合することによって混合される。特定の他の実施形態によって、電気的アクチュエーション力は、一連の又は複数の電極（すなわち、少なくとも2以上、少なくとも3以上、少なくとも4以上、少なくとも5以上、少なくとも6以上、少なくとも7以上、少なくとも8以上、少なくとも9以上、少なくとも10以上、少なくとも11以上、少なくとも12以上、少なくとも13以上、少なくとも14以上、少なくとも15以上、等）を用いて発生させることができ、ウェル（これらには少なくとも1つの固体支持体が装填される）をシールするために混合物をウェルのアレイへ移動させる。

【0105】

特定の実施形態において、混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させると、その結果、検体／検出可能標識－特異的結合メンバー複合体がウェルのアレイ内に装填（充填及び／又は配置）される。特定の実施形態において、磁場を使用して、混合物の、それゆえ少なくとも1つの検体／検出可能標識－特異的結合メンバー複合体の、アレイの1つ又はそれより多くのウェルへの移動が促進される。例えば、かかる除去は、一連の又は複数の電極により電気的アクチュエーション力（本明細書で前述したようなもの）を発生させて、流体小滴（分極可能な流体小滴など）をウェルのアレイまで移動させて、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイから所定距離（その長さは重要ではない）まで移動させることを伴い得る。特定の実施形態において、水性洗浄用液体を用いて、対象検体に結合していない検出可能標識－特異的結合メンバーがあればこれを除去することができる。かかる実施形態において、除去は、一連の又は複数の電極により電気的アクチュエーション力を発生させて、水性洗浄（又は洗浄用）小滴（第3の小滴）を、ウェルのアレイにわたって移動させることを伴う。この洗浄用に用いられる水性液体の量及びタイプは、重要ではない。

【0106】

特定の実施形態において、上記方法における混合物は、水性液体である。他の実施形態において、混合物は、不混和性液体である。他の実施形態において、液滴は、疎水性液滴である。他の実施形態において、液滴は、親水性液滴である。特定の実施形態において、上記方法において使用されるウェルのアレイは、疎水性表面を有する。他の実施形態において、ウェルのアレイは、親水性表面を有する。

【0107】

特定の実施形態において、上記方法において用いられる第1の液滴は、分極可能な液体である。特定の実施形態において、上記方法において用いられる第2の液滴は、分極可能な液体である。特定の実施形態において、上記方法において用いられる第1及び第2の液滴は、分極可能な液体である。特定の実施形態において、混合物は、分極可能な液体である。特定の実施形態において、第1の小滴、第2の小滴及び混合物のうちの1つ又はそれより多くが分極可能な液体である。

【0108】

特定の実施形態において、検出可能標識は、少なくとも1つの固体支持体へ結合される。特定の実施形態において、検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含む。特定の実施形態において、結合メンバーは、受容体、アプタマー又は抗体である。特定の実施形態において、上記方法は、ウェルのアレイへの混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイの上に位置決めすることをさらに含む。

【0109】

特定の実施形態において、本明細書に記載する方法は、マイクロ流体デバイスを用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書に記載する方法は、デジタルマイクロ流体デバイス（DMF）を用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書に記載する方法は、表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス（SAW）を用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書に記載する方法は、集積されたDMF及び検体検出デバイスを用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書に記載する方法は、集積された表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス及び検体検出デバイスを用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書に記載する方法は、ロボット工学ベースのアッセイ処理ユニットを用いて行われる。

【0110】

本明細書において、液滴中の対象検体測定するための方法が提供される（ここで対象検体は、試験サンプル又は生物学的サンプル由来のものである）。この方法は、対象検体を含有する第1の液滴を準備することと、対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する少なくとも1つの固体支持体（例えば、磁性固体支持体（ビーズなど）など）を含有する第2の液滴を準備することと、力を及ぼすエネルギーを用いて、第1の液滴（これは対象検体を含む）を第2の液滴（少なくとも1つの固体支持体を含む）と共に操作して混合物を作製することと、該混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させることと（ここでアレイの1つ又はそれより多くのウェルは、少なくとも1つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである）、混合物の一部をウェルのアレイまで移動させる前、後又は前後両方に、少なくとも1つの検出可能標識を混合物に添加することと、ウェル内の対象検体を測定することと、を含む。特定の実施形態において、「力を及ぼすエネルギーを用いて、第1の液滴を第2の液滴と共に操作すること」は、少なくとも第1及び第2の液滴（及び随意に付加的な小滴）を操作（併合する又は組み合わせるなど）して混合物にする力を提供する又は及ぼすための、非機械的な力（すなわち、例えば、ポンプ及び／又は弁を使用せずに作り出されるエネルギー）の使用を意味する。本明細書に記載する方法で 사용할 ことができる非機械的な力の例には、電気的アクチュエーション力（小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェットティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離又は吸引など）及び／又は音響力（表面弾性波（又は「SAW」）など）が含まれる。特定の実施形態において、発生される電気的アクチュエーション力は、交流電流である。例えば、交流電流は、10V、15V、20V、25V、30V、35V以上の二乗平均平方根（rms）電圧を有し得る。例えば、かかる交流電流は、10V以上、15V以上、20V以上、25V以上、30V以上、又は35V以上のrms電圧を有し得る。あるいは、交流電流は、無線周波数範囲の周波数を有し得る。

【0111】

特定の実施形態において、磁性固体支持体がいられる場合、電気的アクチュエーション力及び磁場を印加することができ、混合の少なくとも一部に対して反対方向から印加される。特定の他の実施形態において、混合物は、これを前後に、円形パターンに動かすことによって、又はこれを2つ以上のサブ混合物に分割し、次いでサブ混合物を併合することによって混合される。特定の他の実施形態によって、電気的アクチュエーション力は、一連の又は複数の電極（すなわち、少なくとも2以上、少なくとも3以上、少なくとも4以上、少なくとも5以上、少なくとも6以上、少なくとも7以上、少なくとも8以上、少なくとも9以上、少なくとも10以上、少なくとも11以上、少なくとも12以上、少なくとも13以上、少なくとも14以上、少なくとも15以上、等）を用いて発生させることができ、ウェル（これらには少なくとも1つの固体支持体が装填される）をシールするために混合物をウェルのアレイへ移動させる。

【0112】

特定の実施形態において、混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイまで移動させると、その結果、少なくとも1つの固体支持体がウェルのアレイ内に装填（充填及び／又は配置）される。特定の実施形態において、磁場を使用して、混合物の、それゆえ少

なくとも1つの固体支持体の、アレイの1つ又はそれより多くのウェルへの移動が促進される。特定の実施形態において、少なくとも1つの固体支持体がウェル内に装填された後、ウェル内に装填されなかった固体支持体があれば、当技術分野で知られた慣例的な技術を用いてこれを除去することができる。例えば、かかる除去は、一連の又は複数の電極により電氣的アクチュエーション力（本明細書で前述したようなもの）を発生させて、流体小滴（分極可能な流体小滴など）をウェルのアレイまで移動させて、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイから所定距離（その長さは重要ではない）まで移動させることを伴い得る。特定の実施形態において、水性洗浄用液体を用いて、対象検体に結合していない固体支持体を除去することができる。かかる実施形態において、除去は、一連の又は複数の電極により電氣的アクチュエーション力を発生させて、水性洗浄（又は洗浄用）小滴（第3の小滴）を、ウェルのアレイにわたって移動させることを伴う。この洗浄用に用いられる水性液体の量及びタイプは重要ではない。

【0113】

特定の実施形態において、上記方法における混合物は、水性液体である。他の実施形態において、混合物は、不混和性液体である。他の実施形態において、液滴は、疎水性液滴である。他の実施形態において、液滴は、親水性液滴である。特定の実施形態において、上記方法において使用されるウェルのアレイは、疎水性表面を有する。他の実施形態において、ウェルのアレイは、親水性表面を有する。

【0114】

特定の実施形態において、上記方法において用いられる第1の液滴は、分極可能な液体である。特定の実施形態において、上記方法において用いられる第2の液滴は、分極可能な液体である。特定の実施形態において、上記方法において用いられる第1及び第2の液滴は、分極可能な液体である。特定の実施形態において、混合物は、分極可能な液体である。特定の実施形態において、第1の小滴、第2の小滴及び混合物のうちの1つ又はそれより多くが分極可能な液体である。

【0115】

特定の実施形態において、少なくとも1つの固体支持体は、対象検体の特異的に結合する少なくとも1つの結合メンバーを含む。特定の実施形態において、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させる前に、検出可能標識が混合物に添加される。特定の他の実施形態において、対象検体の少なくとも一部をウェルのアレイまで移動させた後に、検出可能標識が混合物に添加される。特定の実施形態において、検出可能標識は、対象検体の特異的に結合する少なくとも1つの結合メンバーを含む。特定の実施形態において、検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含む。特定の実施形態において、結合メンバーは、受容体、アプタマー又は抗体である。特定の実施形態において、上記方法は、ウェルのアレイへの混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、混合物の少なくとも一部をウェルのアレイの上に位置決めすることをさらに含む。

【0116】

特定の実施形態において、本明細書で記載する方法は、マイクロ流体デバイスを用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書で記載する方法は、デジタルマイクロ流体デバイス（DMF）を用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書で記載する方法は、表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス（SAW）を用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書で記載する方法は、集積されたDMF及び検体検出デバイスを用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書で記載する方法は、集積された表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス及び検体検出デバイスを用いて行われる。特定の実施形態において、本明細書で記載する方法は、ロボット工学ベースのアッセイ処理ユニットを用いて行われる。

【0117】

特定の実施形態において、測定することは、最初に、ウェルのアレイ内の固体支持体の総数（「総固体支持体数」）を求めることを伴う。次に、検出可能標識を含有するウェル

のアレイ内の固体支持体の数が、例えば検出可能標識によって生成されるシグナルの強度を判定することなどによって判定される（「陽性」）。陽性を総固体支持体数から差し引くと、検出可能標識を含有する又は検出されないウェルのアレイ内の固体支持体の数が得られる（「陰性」）。次いで、ウェルのアレイ内の陰性に対する陽性の比を求め、次いで検量線と比較することができる。あるいは、以下に示すようなポアソン（P o i s s i o n）方程式 $P(x; \mu)$ を用いたデジタル定量化：

$$P(x; \mu) = (e^{-\mu}) (\mu^x) / x!$$

ここで、

e : A は、約 2. 7 1 8 2 8 に等しい定数であり、

μ : $i \times g \times h \times d$ 指定された領域内で生じる成功の平均数であり、

x : 指定された領域内で生じる成功の実際の（t a c t u a l）数である。

10

【0118】

サンプルは、対象検体を含有するか又は含有する疑いのある任意の試験サンプルであり得る。本明細書において使用されるとき、「検体」、「標的検体」、「対象検体」は互換的に使用され、本明細書において開示される方法及びデバイスにおいて測定される検体を指す。対象検体は、更に後述される。

【0119】

「接触させること」及び文法的なその同義語は、本明細書において使用されるとき、結合メンバーに対して特異的な対象検体がサンプル中に存在するならば結合相互作用が生じるように、結合メンバーをサンプル中の対象検体に十分に近接させる、任意のタイプの組み合わせる動作を指す。接触させることは、サンプルを結合メンバーと組み合わせること、結合メンバーを検体の近傍に導入することによって標的検体を結合メンバーへ曝露すること、及びこれらに類することを包含する、様々な異なる手法で達成することができる。

20

【0120】

特定の事例において、第1の結合メンバーは、固体支持体上に固定化されることができる。本明細書において使用されるとき、「固定化される」は、第1の結合メンバーと固体支持体の表面との安定的な会合を指す。「安定的な会合」によって意味されるのは、会合の平均半減期が例えば生理学的条件下で1日以上である、2つの実体の間の物理的会合である。特定の態様において、2つの実体の間の物理的会合は、4℃のPBS中で、2日以上、1週間以上、1か月以上（6か月以上、例えば1年以上が含まれる）の平均半減期を有する。特定の実施形態によれば、安定的な会合は、2つの実体間の共有結合、2つの実体間の非共有結合（例えばイオン結合又は金属結合）、又はその他の形態の化学的引力（水素結合、ファンデルワールス力、及びそれらに類したもの）から生じる。

30

【0121】

結合試薬が固定化される表面を有する固体支持体は、マイクロ流体チップの表面、チャンバの内面、（本明細書において定義されるような）ビーズの外表面、又は多孔性ビーズの内面及び／若しくは外表面などの、平面又は非平面の立体構造の任意の好都合な表面であり得る。例えば、第1の結合メンバーは、ビーズ、例えばラテックス、アガロース、セファロース、ストレプトアビジン、トシル活性化、エポキシ、ポリスチレン、アミノビーズ、アミンビーズ、カルボキシルビーズ、又はこれらに類するものへ、共有結合又は非共有結合で付着させることができる。特定の実施形態において、ビーズは粒子（例えばマイクロ粒子）であり得る。いくつかの実施形態において、マイクロ粒子は、約0. 1 nmと約10 ミクロンの間、約50 nmと約5 ミクロンの間、約100 nmと約1 ミクロンの間、約0. 1 nmと約700 nmとの間、約500 nmと約10 ミクロンとの間、約500 nmと約5 ミクロンとの間、約500 nmと約3 ミクロンとの間、約100 nmと700 nmとの間、又は約500 nmと700 nmとの間であり得る。例えば、マイクロ粒子は、約4～6 ミクロン、約2～3 ミクロン、又は約0. 5～1. 5 ミクロンであり得る。約500 nm未満の粒子は、時にはナノ粒子とみなされる。したがって、マイクロ粒子は、随意に、約0. 1 nmと約500 nmとの間、約10 nmと約500 nmとの間、約50 nmと約500 nmとの間、約100 nmと約500 nmとの間、約100 nm、約150 n

40

50

m、約200nm、約250nm、約300nm、約350nm、約400nm、約450nm、又は約500nmのナノ粒子であり得る。

【0122】

特定の実施形態において、ビーズは磁気ビーズ又は磁気粒子であり得る。特定の実施形態において、ビーズは、磁性のナノビーズ、ナノ粒子、マイクロビーズ又はマイクロ粒子であり得る。磁気ビーズ／粒子は、強磁性、フェリ磁性、常磁性、超常磁性、又は磁性流体性であり得る。例示的な強磁性材には、Fe、Co、Ni、Gd、Dy、CrO₂、MnAs、MnBi、EuO、NiO／Feが含まれる。フェリ磁性体の例には、NiFe₂O₄、CoFe₂O₄、Fe₃O₄（又はFeO・Fe₂O₃）が含まれる。ビーズは、1つ又はそれより多くの非磁性層によって囲まれた磁性の固体コア部分を有することができる。あるいは、磁性部分は、非磁性コアのまわりの層であってもよい。第1の結合メンバーが固定化される固体支持体は、乾燥形状で又は液体中で保存することができる。磁気ビーズは、第1の結合メンバーが固定化される磁気ビーズとサンプルとを接触させる前又は後に、磁場に曝露され得る。

【0123】

接触ステップ後に、サンプル及び第1の結合メンバーは、結合メンバーと検体との間の結合相互作用が生じることを可能にする十分な期間にわたってインキュベーションされ得る。加えて、インキュベーションは、特異的結合相互作用を促進する結合バッファーの中で行うことができる。第1の結合メンバー及び／又は第2の結合メンバーの結合親和性及び／又は特異性は、結合バッファーを変えることによって、アッセイにおいて操作又は変更することができる。いくつかの実施形態において、結合親和性及び／又は特異性は、結合バッファーを変えることによって増大させることができる。いくつかの実施形態において、結合親和性及び／又は特異性は、結合バッファーを変えることによって低減させることができる。

【0124】

第1の結合メンバー及び／又は第2の結合メンバーの結合親和性及び／又は特異性は、後述の開示される方法及びデバイスを使用して測定することができる。いくつかの実施形態において、サンプルの1つのアリコートは、1セットの条件を使用してアッセイされ、異なる条件のセットを使用してアッセイされたサンプルの別のアリコートと比較され、それによって結合親和性及び／又は特異性に対する条件の影響が判定される。例えば、条件を変化させる又は変更することは、サンプルから標的検体を除去すること、結合に関して標的検体又はリガンドと競合する分子を添加すること、及びpH、塩濃度、又は温度を変化させること、のうちの1つ又はそれより多くであり得る。付加的に又は代替的に、継続時間を変数とすることができ、条件を変化させることは、検出方法を再び実行する前に継続時間にわたって待機することを含み得る。

【0125】

結合バッファーは、アルブミン（例えばBSA）などの抗原-抗体結合バッファー用分子標準、非イオン性界面活性剤（Tween-20、Triton X-100）、及び／又はプロテアーゼ阻害因子（例えばPMSE）を含み得る。特定の事例において、結合バッファーは、サンプルの添加の前又は後で、マイクロ流体チップ、チャンバ等へ添加することができる。特定の事例において、第1の結合メンバーは、サンプルと接触する前に結合バッファー中に存在し得る。結合メンバーと検体との間の結合相互作用が生じるための時間の長さは、経験的に決定することができ、結合メンバーと検体との間の結合親和性及び結合能に依存し得る。特定の実施形態において、接触又はインキュベーションは、5秒から1時間までの期間（10秒間～30分間、又は1分間～15分間、又は5分間～10分間など、例えば10秒間、15秒間、30秒間、1分間、5分間、10分間、15分間、30分間、45分間、1時間、又は2時間）にわたり得る。結合相互作用のための温度、塩濃度といった他の条件も、経験的に決定することができ、又は製造者の指示に基づき得る。例えば、接触は、室温（21℃～28℃、例えば23℃～25℃）、37℃、又は4℃で実行することができる。特定の実施形態において、第1の結合メンバーとサンプル

との随意の混合を接触ステップの間に実行することができる。

【0126】

固定化された第1の結合メンバーと検体との間での複合体形成に続いて、未結合の検体があればこれをサンプルと一緒に第1の結合メンバーの周辺から除去することができ、その一方で、第1の結合メンバーと検体との複合体は固体支持体との会合に起因して保持され得る。随意に、固体支持体を洗浄バッファと接触させて、固体支持体へ非特異的に結合されている分子があればこれを除去することができる。

【0127】

第1の接触ステップ、並びに随意のサンプル除去ステップ及び／又は随意の洗浄ステップ後に、第1の結合メンバーと検体との複合体を第2の結合メンバーと接触させることができ、それによって検体が2つの結合メンバーによって結合されたサンドイッチ複合体の形成がもたらされる。第2のメンバーと第1の結合メンバー-検体複合体との随意の混合は、第2の接触ステップの間に実行することができる。いくつかの実施形態において、検体分子を表面に対して固定化することで、表面から検体分子を追い出してしまうことを懸念せずに、過剰な第2の結合メンバーがあればそれを溶液から除去することを支援することができる。いくつかの実施形態において、第2の結合メンバーは、色原体、蛍光化合物、化学発光化合物、酵素、放射性化合物及びこれらに類するような、1つ又はそれより多くのシグナル生成物質を含む検出可能標識を含むことができる。

【0128】

上述のように、第2の接触ステップは、検体と第2の結合メンバーとの間の結合相互作用のために十分な条件において実行することができる。第2の接触ステップに続いて、未結合の第2の結合メンバーがあればこれを除去することができ、続いて随意の洗浄ステップを行うことができる。未結合の第2の結合メンバーがあれば、それを小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェットティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離、吸引又はSAWなどの好適な手段によって第1の結合メンバー-検体-第2の結合メンバーの複合体から分離することができる。第1の結合メンバー-検体-第2の結合メンバーの複合体の周辺から未結合の第2の結合メンバーを除去すると、第1の結合メンバー-検体-第2の結合メンバー複合体中に存在する、第2の結合メンバーに付着した検出可能標識を、好適な手段によって分離することができ、又は当技術分野で公知の技法を用いて検出することができる。いくつかの実施形態において、検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物、放射性化合物、及びこれらに類するような1つ又はそれより多くのシグナル生成物質を含んだ検出可能標識を含む。あるいは、いくつかの実施形態において、検出可能標識は、タグを含み、タグは、未結合試薬の除去後に残った複合体から切断又は解離することができる。例えば、タグは、切断可能なリンカー（本明細書において記載されるような「切断可能なリンカー」）を介して第2の結合メンバーに付着し得る。第1の結合メンバー-検体-第2の結合メンバーの複合体を、切断可能なリンカーの切断を媒介する切断剤に曝露することができる。

【0129】

本明細書において述べるように、タグは、核酸を含むことができる。特定の実施形態において、検体の定量化は、タグ中に存在する核酸配列の少なくとも一部分の同一性を決定することによってタグの同一性を決定することを含まない。例えば、カウントするステップは、タグの配列を決定することを含まなくてもよい。他の実施形態において、タグは配列決定されなくてもよいが、タグの同一性は、そのサイズ、立体構造、電荷、電荷量、及びこれに類したものに起因するタグに関連付けられた区別可能なシグナルに基づいて、1つのタグを別のタグと識別することができる程度まで決定することができる。タグの同定は、サンプル中の複数の異なる検体、例えばサンプル中の2、3、4又はそれより多くの異なる検体の同時分析を伴う方法において有用であり得る。

【0130】

特定の実施形態において、単一のサンプル中の複数の検体の同時分析は、第1の結合メ

ンバー及び第2の結合メンバーのペアがサンプル中の単一の検体に対して特異的であるような複数の異なる第1の結合メンバー及び第2の結合メンバーを使用することによって行うことができる。これらの実施形態において、単一の検体に対して特異的な第1の結合メンバー及び第2の結合メンバーの第1のペアのうちの第2の結合メンバーに関連付けられた検出可能標識は、異なる検体に対して特異的な第1の結合メンバー及び第2の結合メンバーの第2のペアのうちの第2の結合メンバーに関連付けられた検出可能標識から識別可能であり得る。上述のように、第1の検出可能標識は、シグナル生成物質の違い等に基づいて、第2の検出可能標識から識別可能であり得る。

【0131】

いくつかの実施形態において、実質的に正確に決定することができる流体サンプル中の検体の濃度は、約5000 fM（フェムトモル）未満、約3000 fM未満、約2000 fM未満、約1000 fM未満、約500 fM未満、約300 fM未満、約200 fM未満、約100 fM未満、約50 fM未満、約25 fM未満、約10 fM未満、約5 fM未満、約2 fM未満、約1 fM未満、約500 aM（アトモル）未満、約100 aM未満、約10 aM未満、約5 aM未満、約1 aM未満、約0.1 aM未満、約500 zM（zeptomol）未満、約100 zM未満、約10 zM未満、約5 zM未満、約1 zM未満、約0.1 zM未満、又はそれ未満である。

【0132】

いくつかの事例において、検出限界（例えば溶液中で決定することができる検体の最低濃度）は、約100 fM、約50 fM、約25 fM、約10 fM、約5 fM、約2 fM、約1 fM、約500 aM（アトモル）、約100 aM、約50 aM、約10 aM、約5 aM、約1 aM、約0.1 aM、約500 zM（zeptomol）、約100 zM、約50 zM、約10 zM、約5 zM、約1 zM、約0.1 zM、又はそれ未満である。いくつかの実施形態において、実質的に正確に決定することができる流体サンプル中の検体の濃度は、約5000 fMと約0.1 fMとの間、約3000 fMと約0.1 fMとの間、約1000 fMと約0.1 fMとの間、約1000 fMと約0.1 zMの間、約100 fMと約1 zMの間、約100 aMと約0.1 zMとの間、又はそれ未満である。

【0133】

検出の上限（例えば溶液中で決定することができる検体の上限濃度）は、少なくとも約100 fM、少なくとも約1000 fM、少なくとも約10 pM（ピコモル）、少なくとも約100 pM、少なくとも約100 pM、少なくとも約10 nM（ナノモル）、少なくとも約100 nM、少なくとも約1000 nM、少なくとも約10 μM、少なくとも約100 μM、少なくとも約1000 μM、少なくとも約10 mM、少なくとも約100 mM、少なくとも約1000 mM、又はそれより大きい。

【0134】

いくつかの事例において、サンプル中の検体の存在及び／又は濃度は、通常約1時間未満、例えば45分間、30分間、15分間、10分間、5分間、1分間、又は30秒間で、迅速に検出することができる。

【0135】

特定の実施形態において、本明細書において記載される方法の少なくともいくつかのステップは、本明細書で記載されるデバイスのようなデジタル集積マイクロ流体及び検体検出デバイス上で実行することができる。特定の実施形態において、本開示の方法は、検体検出デバイスと共にデジタル集積マイクロ流体デバイスを使用して実行される。例えば、デジタル集積マイクロ流体デバイス及び検体検出デバイスは、分離したデバイスとすることができ、検出可能標識を含有する小滴をマイクロ流体デバイス中で生成して、検体検出デバイスへ輸送することができる。

【0136】

特定の実施形態において、本開示の方法は、デジタルマイクロ流体モジュールが後述されるデバイスのような検体検出モジュールと共に集積化されたデバイスを使用して実行される。特定の実施形態において、デジタル集積マイクロ流体モジュール及び検体検出モジ

10

20

30

40

50

ュールは、可逆的に集積化することができる。例えば、2つのモジュールを物理的に組み合わせて集積デバイスを形成することができ、次いでそのデバイスを分離して個別のモジュールにすることができるであろう。特定の実施形態において、本開示の方法は、マイクロ流体モジュールを内蔵の検体検出デバイスと共に含む使い捨てのカートリッジを使用して実行される。本明細書において提供される方法の実行のために使用されるデバイスの例示的な実施形態は、次のセクションにおいて更に説明される。

【0137】

本方法の例示的な実施形態は、対象検体を含有するサンプル小滴を、対象検体に結合するとともに固体支持体（磁気粒子又はビーズなど）上に固定化され得る第1の結合メンバーを含有する小滴と併合することを含む。単一小滴は、第1の結合メンバーを対象検体に結合させるのに十分な時間にわたってインキュベーションすることができる。随意に、単一小滴を攪拌して、サンプルと第1の結合メンバーとの混合を促進することができる。混合は、単一小滴を前後に動かすこと、単一小滴を複数の電極の上であちこち動かすこと、小滴を分割し、次いで小滴を併合すること、又はSAWを使用すること、及びそれらに類することによって達成することができる。次に、単一小滴に磁気力をかけて、ビーズをデバイス内の所定位置に保持することができ、その一方で、この小滴を移動させて遠ざけ、第2の結合メンバーを含有する小滴で置き換えることができ、この第2の結合メンバーは随意に検出可能標識を含有することができる。第2の結合メンバーの添加の前に、洗浄バッファの小滴をビーズが磁気力を用いて保持されている位置へ移動させることによって、随意的洗浄ステップを行うことができる。第1の結合メンバーに結合した検体に第2の結合メンバーが結合するのに十分な時間の後、第2の結合メンバーを含有する小滴を移動させて遠ざけることができ、その一方で、ビーズは第1の位置で保持される。ビーズは、洗浄バッファの小滴を用いて洗浄することができる。洗浄ステップの後、磁気力を除去することができ、標識されたビーズ（第1の特異的結合メンバー／検体／第2の特異的結合メンバー随意的検出可能標識を含有する）を含有する小滴は、本明細書に記載されているような検出モジュールへ移動される。標識されたビーズを検出モジュール内のウェルのアレイの中に沈降させる。ビーズは、重力によって又は電気力若しくは磁気力を印加することによって沈降することができる。ウェルの内部に位置していないビーズがあればこれを除去する洗浄ステップの後、ウェルは、疎水性液体を用いてシールされ得る。上記の実施形態において、随意に、組み合わせた後に、小滴を操作して（例えば、前後に動かす、円形方向に動かす、振動させる、分割／併合する、SAWへ曝露する等）、サンプルと、第1の結合メンバー及び第2の結合メンバー等のようなアッセイ試薬との混合を促進することができる。検出可能標識が酵素である実施形態において、複合体をウェルのアレイへ移動させる前又は後のいずれかに、基質を添加することができる。

【0138】

集積マイクロ流体及び検体検出デバイス内での小滴の移動は、電気力（例えばエレクトロウェットティング、誘電泳動、電極媒介、オプト-エレクトロウェットティング、電場媒介、及び静電的アクチュエーション）、圧力、弾性表面波及びそれらに類するものを用いて実行することができる。小滴を動かすのに使用される力は、以下のセクションに記載するデバイスの詳細に基づいて、及び本明細書において記載する具体的なデバイスに対して、決定することができる。

【0139】

マルチプレックス化

本方法は、マルチプレックス化アッセイにおけるサンプル中の1以上の（又は代替的に2以上の）標的検体を検出するための1以上の（又は代替的に2以上の）特異的結合メンバーを含み得る。1以上の（又は代替的に2以上の）特異的結合メンバーの各々は、異なる標的検体へ結合し、各々の特異的結合メンバーは、異なる検出可能標識で標識される。例えば、第1の特異的結合メンバーは第1の標的検体へ結合し、第2の特異的結合メンバーは第2の標的検体へ結合し、第3の特異的結合メンバーは第3の標的検体へ結合する、等であり、また、第1の特異的結合メンバーは検出可能標識で標識され、第2の特異的結

合メンバーは第2の検出可能標識で標識され、第3の特異的結合メンバーは第3の検出可能標識で標識される、等である。例えば、第1、第2及び第3の検出可能標識は、各々、異なる色を有し得る。あるいは、例えば第1の標識は酵素標識であり、第2の標識は色原体であり、第3の標識は化学発光化合物である、などのように異なるタイプの標識を使用することができる。

【0140】

例示的な標的検体

当業者によって認識されるように、第1の結合メンバー及び第2の結合メンバーによって特異的に結合され得る任意の検体を、本開示の方法及びデバイスを使用して検出することができ、随意に定量化することができる。

10

【0141】

いくつかの実施形態において、検体は生体分子であり得る。生体分子の非限定例には、タンパク質、脂質及び炭水化物といった高分子が含まれる。特定の実例において、検体は、ホルモン、抗体、増殖因子、サイトカイン、酵素、受容体（例えば神経受容体、ホルモン受容体、栄養受容体、及び細胞表面受容体）又はそれらのリガンド、癌マーカー（例えばPSA、TNF- α ）、心筋梗塞のマーカー（例えばトロポニン、クレアチンキナーゼ、及びそれらに類するもの）、毒素、薬物（例えば中毒の薬物）、代謝薬剤（例えばビタミンが含まれる）、及びそれらに類するものであり得る。タンパク質検体の非限定的実施形態には、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質断片、タンパク質複合体、融合タンパク質、組換えタンパク質、リンタンパク質、糖タンパク質、リボタンパク質、又はそれらに類するものが含まれる。

20

【0142】

特定の実施形態において、検体は、翻訳後修飾タンパク質（例えばリン酸化タンパク質、メチル化タンパク質、グリコシル化タンパク質）であり得、第1の結合メンバー又は第2の結合メンバーは、翻訳後修飾に対して特異的な抗体であり得る。修飾タンパク質は、固体支持体上に固定化された第1の結合メンバーに結合することができ、この場合、第1の結合メンバーは、修飾タンパク質には結合するが、非修飾タンパク質には結合しない。他の実施形態において、第1の結合メンバーは非修飾タンパク質及び修飾タンパク質の両方に結合することができ、第2の結合メンバーは、翻訳後修飾タンパク質に対して特異的であり得る。

30

【0143】

いくつかの実施形態において、検体は循環腫瘍細胞などの細胞、病原細菌、ウイルス（レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、フィロウイルス（エボラ）、肝炎ウイルス（例えばA、B、C、D、及びE）；HPV等を含む）；孢子、等であり得る。

【0144】

本明細書において提示される方法によって分析され得る検体の非限定的リストには、A β 42アミロイドベータタンパク質、フェチュイン-A、タウ、セクレトグラニンI、プリオンタンパク質、アルファシヌクレイン、タウタンパク質、ニューロフィラメント軽鎖、パーキン、PTEN誘導性推定キナーゼ1、DJ-1、ロイシンリッチリピートキナーゼ2、変異ATP13A2、アポH、セルロプラスミン、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体ガンマコアクチベーター-1アルファ（PGC-1 α ）、トランスサイレチン、ビタミンD結合タンパク質、アポトーシス促進キナーゼR（PKR）及びそのリン酸化PKR（pPKR）、CXCL13、IL-12p40、CXCL13、IL-8、Dkk-3（精液）、p14エンドカン断片、血清、ACE2、CD25への自己抗体、hTERT、CAI25（MUC16）、VEGF、sIL-2、オステオポンチン、ヒト精巢上体タンパク質4（HE4）、アルファフェトプロテイン、アルブミン、アルブミン尿、微量アルブミン尿、好中球ゼラチナーゼ結合性リボカリン（NGAL）、インターロイキン18（IL-18）、腎臓損傷分子-1（KIM-1）、肝臓脂肪酸結合タンパク質（L-FABP）、LMP1、BARF1、IL-8、癌胎児性抗原（CEA）、BR

40

50

AF、CCNI、EGRF、FGF19、FRS2、GREB1、及びLZTS1、アルファミラーゼ癌胎児性抗原、CA125、IL8、チオレドキシン、ベーター2-ミクログロブリンレベル（ウイルスの活性をモニタリングする）、腫瘍壊死因子-アルファ受容体（ウイルスの活性をモニタリングする）、CA15-3、卵胞刺激ホルモン（FSH）、黄体形成ホルモン（LH）、T細胞性リンパ腫の侵襲及び転移1（TIAM1）、N-カドヘリン、EC39、アンフィレグリン、dUTPアーゼ、分泌ゲルズリン（pGSN）、PSA（前立腺特異抗原）、チモシンβ15、インスリン、血漿Cペプチド、グリコヘモグロビン（HBA1c）、C反応性タンパク質（CRP）、インターロイキン6（IL-6）、ARHGDI B（Rho GDP解離阻害因子2）、CFL1（コフィリン-1）、PFN1（プロフィリン-1）、GSTP1（グルタチオン-S-トランスフェラーゼP）、S100A11（タンパク質S100-A11）、PRDX6（ペルオキシレドキシン-6）、HSPE1（10kDa熱ショックタンパク質、ミトコンドリアの）、LYZ（リゾチームC前駆体）、GPI（グルコース-6-リン酸イソメラーゼ）、HIST2H2AA（ヒストンH2Aタイプ2-A）、GAPDH（グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素）、HSPG2（基底膜特異的ヘパラン硫酸プロテオグリカンコアタンパク質前駆体）、LGALS3BP（ガレクチン-3-結合タンパク質前駆体）、CTSD（カテプシンD前駆体）、APOE（アポリポタンパク質E前駆体）、IQGAP1（Ras-GTPアーゼ活性化様タンパク質IQGAP1）、CP（セルロプラスミン前駆体）、及びIGLC2（IGLC1タンパク質）、PCDGF/GP88、EGFR、HER2、MUC4、IGF-IR、p27（kip1）、Akt、HER3、HER4、PTEN、PIK3CA、SHIP、Grb2、Gab2、PDK-1（3-ホスホイノシチド依存性タンパク質キナーゼ-1）、TSC1、TSC2、mTOR、MIG-6（ERBB受容体フィードバック阻害因子1）、S6K、src、KRAS、MEKマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ1、cMYC、TOPO IIトポイソメラーゼ（DNA）IIアルファ170 kDa、FRAP1、NRG1、ESR1、ESR2、PGR、CDKN1B、MAP2K1、NEDD4-1、FOXO3A、PPP1R1B、PXN、ELA2、CTNNB1、AR、EPHB2、KLF6、ANXA7、NKX3-1、PITX2、MKI67、PHLPP、アディポネクチン（ADIPOQ）、フィブリノーゲンアルファ鎖（FGA）、レプチン（LEP）、終末糖化産物特異的受容体（AGER別名RAGE）、アルファ-2-HS-糖タンパク質（AHSG）、アンジオジェニン（ANG）、CD14分子（CD14）、フェリチン（FTH1）、インスリン様増殖因子結合タンパク質1（IGFBP1）、インターロイキン2受容体アルファ（IL2RA）、血管細胞接着分子-1（VCAM1）及びフォンウィルブランド因子（VWF）、ミエロペルオキシダーゼ（MPO）、IL1α、TNFα、核周囲型抗好中球細胞質抗体（p-ANCA）、ラクトフェリン、カルプロテクチン、ウィルムス腫瘍-1タンパク質、アクアポリン-1、MLL3、AMBP、VDAC1、大腸菌腸管毒素（易熱性外毒素、耐熱性腸管毒素）、インフルエンザHA抗原、破傷風毒素、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、志賀毒素、志賀様毒素I、志賀様毒素II、クロストリジウムディフィシーレ毒素A及びB、等が含まれる。

【0145】

サンプル

本明細書において使用されるとき、「サンプル」、「試験サンプル」、「生物学的サンプル」は、対象検体を含有するか又は含有する疑いのある流体サンプルを指す。サンプルは、任意の好適な源に由来し得る。いくつかの事例において、サンプルは、液体、流動的なマイクロ粒子固体、又は固体粒子の流体懸濁物を含み得る。いくつかの事例において、サンプルは、本明細書において記載される分析の前に加工することができる。例えば、サンプルは分析前にその源から分離又は精製することができるが、特定の実施形態において、検体を含有する未加工サンプルを直接アッセイすることができる。検体分子の源は、合成（例えば、実験室中で生成されたもの）、環境（例えば、空気、土壌、流体サンプル、例えば給水等）、動物（例えば哺乳類）、植物、又はその任意の組み合わせであり得る。

特定の例示において、検体の源は、ヒトの身体の物質（例えば、体液、血液、血清、血漿、尿、唾液、汗、喀痰、精液、粘液、涙液、リンパ液、羊水、間質液、肺洗浄、脳脊髄液、糞便、組織、器官、又はそれらに類するもの）である。組織は、骨格筋組織、肝臓組織、肺組織、腎臓組織、心筋組織、脳組織、骨髄、子宮頸部組織、皮膚等を含み得るが、これらに限定されない。サンプルは、液体サンプル又は固体サンプルの液体抽出物であり得る。特定の事例において、サンプルの源は、生検サンプルのように器官又は組織であり得、それらは組織崩壊／細胞溶解によって可溶化され得る。

【0146】

広範囲の体積の流体サンプルを分析することができる。いくつかの例示的な実施形態において、サンプル体積は、約0.5 nL、約1 nL、約3 nL、約0.01 μL、約0.1 μL、約1 μL、約5 μL、約10 μL、約100 μL、約1 mL、約5 mL、約10 mL、又はそれらに類するものであり得る。いくつかの事例において、流体サンプルの体積は、約0.01 μLと約10 mLとの間、約0.01 μLと約1 mLとの間、約0.01 μLと約100 μLとの間、又は約0.1 μLと約1 μLとの間である。

【0147】

いくつかの事例において、流体サンプルは、アッセイでの使用の前に希釈することができる。例えば、検体分子の源がヒト体液（例えば血液、血清）である実施形態において、流体は、適切な溶媒（例えばPBSバッファーなどのバッファー）で希釈することができる。流体サンプルは、使用の前に、約1倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約10倍、約100倍、又はそれを超えて希釈され得る。

【0148】

いくつかの事例において、サンプルに分析前加工を行うことができる。分析前加工は、非特異的タンパク質の除去及び／又は安価であるが効果的に実施することができる混合機能といった付加的な機能を提供し得る。分析前加工の一般的な方法には、動電トラッピング、AC動電、弾性表面波、等速電気泳動、誘電泳動、電気泳動、又は当技術分野において公知の他の前濃縮技術の使用が含まれ得る。いくつかの事例において、流体サンプルは、アッセイにおける使用の前に濃縮することができる。例えば、検体分子の源がヒト体液（例えば血液、血清）である実施形態において、流体は、沈殿、蒸発、濾過、遠心分離、又はその組み合わせによって濃縮され得る。流体サンプルは、使用の前に、約1倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約10倍、約100倍、又はそれを超えて濃縮され得る。

【0149】

特定の実施形態において、検体は、検体の測定の前に増幅されない（すなわち検体のコピー数を増やさない）。例えば、検体がDNA又はRNAである事例において、検体は、検体のコピー数を増加させるように複製されない。特定の事例において、検体は、タンパク質又は小分子である。

【0150】

特異的結合メンバー

当業者によって認識されるように、結合メンバーは、分析される予定の検体によって決定されることになる。様々な標的分子のための結合メンバーは、公知であるか、又は公知の技法を使用して容易に見出されるか若しくは開発することができる。例えば、標的検体がタンパク質である場合、結合メンバーは、タンパク質、特に抗体又はその断片（例えば抗原結合断片（Fab）、Fab'断片、F(ab')₂断片、組換え抗体、キメラ抗体、一本鎖Fvs（「scFv」）、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、例えば、ラクダ科の動物に由来する可変重鎖ドメイン（「VHH」；「VHH断片」としても知られる）（VHH及びそれらを作製する方法は、非特許文献1（Gottlin et al., Journal of Biomolecular Screening, 14:77-85（2009））に記載されている）、組換えVHH単ドメイン抗体、及びV_{NAR}断片など、ジスルフィド結合Fvs（「sdFv」）、及び抗イディオタイプ（「抗Id」）抗体、及び上記の任意のものの機能的に活性なエピトープ結合断片、全長ポリクローナル抗

体又はモノクローナル抗体、抗体様断片、等)、他のタンパク質(受容体タンパク質、プロテインA、プロテインC、又はそれに類するものなど)を含み得る。検体がステロイド、ピリン、レチノイド、及び脂質のような小分子である事例において、第1の結合メンバー及び/又は第2の結合メンバーは、スキャフォールドタンパク質(例えばリポカリン)又は受容体であり得る。いくつかの事例において、タンパク質検体に対する結合メンバーは、ペプチドであり得る。例えば、標的検体が酵素である場合、好適な結合メンバーには、酵素基質及び/又は酵素阻害因子が含まれ得、これはペプチド、小分子、及びそれに類するものであり得る。いくつかの事例において、標的検体がリン酸化種である場合、結合メンバーは、リン酸結合剤を含み得る。例えば、リン酸結合剤は、特許文献4(米国特許第7,070,921号)及び特許文献5(米国特許出願第20060121544号)に記載されているような金属イオン親和性媒質を含み得る。

10

【0151】

特定の事例において、結合メンバーのうちの少なくとも1つは、特許文献6(米国特許第5,270,163号)、特許文献7(米国特許第5,475,096号)、特許文献8(米国特許第5,567,588号)、特許文献9(米国特許第5,595,877号)、特許文献10(米国特許第5,637,459号)、特許文献11(米国特許第5,683,867号)、特許文献12(米国特許第5,705,337号)に記載されているようなアプタマーであり得る。核酸アプタマー(例えば一本鎖DNA分子又は一本鎖RNA分子)は、事実上あらゆる標的分子の捕捉のために開発することができる。アプタマーは、高度に特異的な、立体構造依存性の様式で、典型的には非常に高親和性で、標的分子に結合するが、より低い結合親和性を有するアプタマーを選択することができる。アプタマーは、メチル基又はヒドロキシル基の存在又は非存在のような非常に小さな構造的な差異に基づいて、標的検体分子を識別することができ、特定のアプタマーは、D-鏡像異性体及びL-鏡像異性体並びにジアステレオ異性体を識別することができる。アプタマーは、小さな分子標的(薬物、金属イオン及び有機色素が含まれる)、ペプチド、ビオチン、及びタンパク質を結合し得る。アプタマーは、ビオチン化、フルオレセイン標識化された後、及び、ガラス表面及びマイクロスフェアに付着したときに、機能的活性を保持することができる。

20

【0152】

核酸アプタマーは、オリゴヌクレオチドであり、これは、一本鎖のオリゴデオキシヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチド、又は修飾されたオリゴデオキシヌクレオチド若しくはオリゴリボヌクレオチドであり得る。「修飾された」という用語は、共有結合で修飾された塩基及び/又は糖を伴うヌクレオチドを包含する。例えば、修飾ヌクレオチドには、3'位のヒドロキシル基及び5'位のリン酸基以外の低分子量の有機基に共有結合で付着した糖を有するヌクレオチドが含まれる。したがって、修飾ヌクレオチドは、2'置換糖(2'-O-メチル; 2'-O-アルキル; 2'-O-アリル; 2'-S-アルキル; 2'-S-アリル; 2'-フルオロ; 2'-ハロ又は2'-アジド-リボースなど)炭素環式糖類似体、α-アノマー糖; エピマー糖(アラビノース、キシロース又はリキソースなど)、ピラノース糖、フラノース糖、及びセドヘプツロースも含み得る。

30

【0153】

ペプチドアプタマーは、タンパク質相互作用を妨害するように設計され得る。ペプチドアプタマーは、タンパク質スキャフォールドに基づくものであり得、そこに可変的なペプチドループが付着して、それによってアプタマーの立体構造が拘束される。いくつかの事例において、ペプチドアプタマーのスキャフォールド部分は、細菌性チオレドキシニンA(TrxA)に由来する。

40

【0154】

標的分子が炭水化物である場合、潜在的に好適な捕捉構成要素(本明細書において定義されたような)には、例えば抗体、レクチン及びセレクチンが含まれる。当業者によって認識されるように、対象となる標的分子と特異的に会合できるあらゆる分子が結合メンバーとして潜在的に使用され得る。

50

【0155】

特定の実施形態に関して、好適な標的検体／結合メンバーの複合体には、抗体／抗原、抗原／抗体、受容体／リガンド、リガンド／受容体、タンパク質／核酸、酵素／基質及び／又は阻害因子、炭水化物（糖タンパク質及び糖脂質が含まれる）／レクチン及び／又はセレクチン、タンパク質／タンパク質、タンパク質／小分子等などが含まれ得るが、これらに限定されない。

【0156】

特定の実施形態において、第1の結合メンバーはリンケージを介して固体支持体に付着することができ、このリンケージは、支持体への結合メンバーの付着を促進する、支持体及び／又は結合メンバーの任意の部分、官能基、又は修飾を含み得る。結合メンバーと支持体との間のリンケージは、1つ又はそれより多くの化学的又は物理的（例えばファンデルワールス力を介した非特異的付着、水素結合、静電的相互作用、疎水性／親水性相互作用、等）結合及び／又はかかる結合を提供する化学的スペーサーを含み得る。

10

【0157】

特定の実施形態において、固体支持体は、アッセイ中の結合表面への非捕捉構成要素（例えば検体分子、結合メンバー）の非特異的付着（検出の間の偽陽性シグナル又はシグナル損失を引き起こし得る）を排除又は最小限にすることができる、保護層、ブロッキング層、又は不動態化層も含み得る。特定の実施形態において、不動態化層の形成に利用され得る材料の例には、タンパク質の非特異的結合を寄せつけないポリ（エチレングリコール）などのポリマー；この特性を有する血清アルブミン及びカゼインなどの天然に存在するタンパク質；界面活性剤、例えばスルホベタインなどの両性イオン性界面活性剤；天然に存在する長鎖脂質；ポリマーブラシ、及び、サケ精子DNAなどの核酸が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0158】

特定の実施形態は、タンパク質又はポリペプチドである結合メンバーを利用する。当技術分野において公知であるように、任意の多数の技法を使用して、ポリペプチドを多様な固体支持体に付着させることができる。タンパク質に反応性部分を付加する多様な技法、例えば特許文献13（米国特許第5,620,850号）中で概説されている方法が公知である。さらに、タンパク質を表面に付着させるための方法が公知であり、例えば非特許文献2（Heller, Acc. Chem. Res. 23:128（1990））を参照されたい。

30

【0159】

本明細書において説明されるように、結合メンバーと検体との間の結合は、例えば結合メンバーと検体とが結合ペアの相補的部分である場合のように、特異的である。特定の実施形態において、結合メンバーは、検体へ特異的に結合する。「特異的に結合する」又は「結合特異性」は、結合メンバーが、検体分子と試験サンプルの他の構成要素又は混入物とを区別するのに十分な特異性で検体分子を結合することを意味する。例えば、一実施形態による結合メンバーは、検体上のエピトープへ特異的に結合する抗体であり得る。一実施形態による抗体は、対象検体へ特異的に結合することができる任意の抗体であり得る。例えば、適切な抗体には、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、ミニボディ、ドメイン抗体（dAb）（例えば非特許文献3（Holt et al.（2014）Trends in Biotechnology 21:484-490）に記載されているようなもの）が含まれるが、これらに限定されず、天然に存在する（例えば軟骨魚類及びラダ科の動物でのように）又は合成の（例えばナノボディ、VHH、又は他のドメイン構造）単一ドメイン抗体sdAb、合成抗体（時には抗体模倣物と称される）、キメラ抗体、ヒト化抗体、抗体融合物（時には「抗体コンジュゲート」と称される）、及び各々の断片がそれぞれ含まれる。別の実施例として、検体分子は抗体であり得、第1の結合メンバーは抗原であり得、第2の結合メンバーは標的抗体へ特異的に結合する二次抗体であり得、又は第1の結合メンバーは標的抗体へ特異的に結合する二次抗体であり得、第2の結合メンバーは抗原であり得る。

40

50

【0160】

いくつかの実施形態において、結合メンバーは、化学的にプログラムされた抗体 (c p Abs) (非特許文献4 (Rader (2014) Trends in Biotechnology 32:186-197)に記載される)、二重特異性c p Abs、抗体動員分子 (ARM) (非特許文献5 (McEnaney et al. (2012) ACS Chem. Biol. 7:1139-1151)に記載される)、トリリガンド捕捉剤 (非特許文献6 (Millward et al. (2011) J. Am. Chem. Soc. 133:18280-18288)に記載される)のような分岐状捕捉剤、非抗体スキャフォールドに由来する操作された結合タンパク質、例えば、モノボディ (ヒトフィブロネクチンの第10のフィブロネクチンタイプIIIDメインに由来する)、アフイボディ (免疫グロブリン結合タンパク質Aに由来する)、DARPin (アンキリン反復モジュールに基づく)、アンチカリン (リボカリンのピリン結合タンパク質及びヒトリボカリン2に由来する)、及びシステインノットペプチド (ノッチン) (非特許文献7 (Gillbreth and Koide, (2012) Current Opinion in Structural Biology 22:1-8) ; 非特許文献8 (Banta et al. (2013) Annu. Rev. Biomed. Eng. 15:93-113)に記載される)、WWドメイン (非特許文献9 (Patel et al. (2013) Protein Engineering, Design & Selection 26(4):307-314)に記載される)、別の目的で使われる受容体リガンド、アフイチン (非特許文献10 (Behar et al. (2013) 26:267-275)に記載される)、並びに/又はアドヒロン (Adhiron) (非特許文献11 (Tiede et al. (2014) Protein Engineering, Design & Selection 27:145-155)に記載される)であり得る。

【0161】

検体が生物細胞 (例えば、哺乳類、鳥類、爬虫類、他の脊椎動物、昆虫、酵母、細菌、細胞等) である一実施形態によれば、結合メンバーは、細胞表面抗原 (例えば細胞表面受容体) に対して特異親和性を有するリガンドであり得る。一実施形態において、結合メンバーは、標的細胞タイプの表面上で発現される細胞接着分子に対して結合特異性を有する接着分子受容体又はその一部分であり得る。使用に際して、接着分子受容体は、標的細胞の細胞外表面上の接着分子と結合し、それによって細胞を固定化又は捕捉し、次いで結合された細胞は、第2の結合メンバーの使用によって検出することができ、この第2の結合メンバーは、第1の結合メンバーと同じであり得るか、又は細胞の表面上で発現される異なる分子と結合し得る。

【0162】

いくつかの実施形態において、検体分子と結合メンバーとの間の結合親和性は、非特異的に結合されている分子又は粒子を除去する洗浄ステップを含むアッセイの条件下で、結合されたままであるのに十分なものとすべきである。いくつかの事例において、例えば、特定の生体分子の検出において、検体分子の、その相補的な結合メンバーに対する結合定数は、少なくとも約 10^4 と約 10^6M^{-1} との間、少なくとも約 10^5 と約 10^9M^{-1} との間、少なくとも約 10^7 と約 10^9M^{-1} との間、約 10^9M^{-1} より大きい、又はそれを上回るものであり得る。

【0163】

検出可能標識：タグ及びシグナル生成物質

本明細書において記載される方法は、検体を分析するために、タグなどの検出可能標識へ結合された特異的結合メンバーを含み得る。組み込まれるタグ又は標識は、反応スキームの遂行を実質的に妨害しない。例えば、組み込まれるタグ又は標識は、検体とその相補的な結合メンバーとの結合定数又はそれらの間の相互作用を妨害しない。組み込まれるタグ又は標識のサイズ及び数は、捕捉の速さ及び読取速度に関連し得る。捕捉の速さ及び読取速度は、組み込まれるタグ又は標識のサイズ及び/又は数を増大させることによって高めることができる。組み込まれるタグ又は標識は、結合メンバーの動態 (例えば抗体の動

態)又は反応スキームを変更しない。例示的なタグには、アニオン性ポリマー又はカチオン性ポリマー(例えばポリヒスチジン又はポリリジンのように正味の正電荷を有するポリペプチドなどのポリマー)(ここでポリマーは、約5~1000残基の長さである);結合メンバーと交差反応しない及び/又はアッセイを妨害しないタンパク質(例えば球状タンパク質)、デンドリマー、例えばDNAデンドリマー;並びに荷電粒子、例えばビーズが含まれる。ポリマータグには、デオキシリボ核酸又はリボ核酸などの核酸が含まれ得る。ポリマータグには、核酸塩基ポリマーが含まれ得る。特定の事例において、タグは、DNA又はRNAアプタマーであり得、この場合、アプタマーは検体へ結合しない。ポリマータグ又は粒子(例えばビーズ)は、再現性のあるシグナルを生成するのに十分に大きいものとすることができる。アプタマーは、20~220塩基長、例えば20~60塩基長であり得る。粒子(例えばビーズ又はデンドリマー)のサイズは、直径で約1nmから約950nmまで、例えば、直径で10nm~900nm、20nm~800nm、30nm~700nm、50nm~600nm、80nm~500nm、100nm~500nm、200nm~500nm、300nm~500nm、又は直径で400nm~500nm、例えば10nm、20nm、30nm、50nm、100nm、200nm、300nm、400nm、500nm、600nm、700nm、800nm、又は900nmの範囲であり得る。特定の事例において、ビーズ/粒子は、正味の負電荷若しくは正電荷を有する材料から作製することができ、又は正味の負電荷若しくは正電荷を有するように処理することができる。例示的なビーズ/粒子には、有機ポリマー又は無機ポリマーから作製されたものが含まれる。有機ポリマーには、ポリスチレン、炭素、ポリアクリルアミド等のようなポリマーが含まれる。無機ポリマーには、シリコン又は金属ビーズ/粒子が含まれる。特定の事例において、ビーズ/粒子は磁性でなくてもよい。

【0164】

特定の事例において、タグは、一本鎖のDNA又はRNAであり得る。一本鎖のDNA又はRNAは、事前にプローブ分子へハイブリダイズされ得る。特定の事例において、上記方法は、単一サンプル中の複数の検体の分析を含み得る。サンプル中の異なる検体へ結合する第2の結合メンバーは、タグとしてそれへ付着した異なる一本鎖のDNA又はRNAを含むことができ、この異なる一本鎖のDNA又はRNAは、異なる一本鎖のDNA又はRNAを互いに更に識別する異なるプローブへハイブリダイズされ得る。他の実施形態において、異なる第2の結合メンバーに付着したタグは、識別可能な異なるヘアピン構造(例えばヘアピン構造の長さ)を有し得る。さらに別の実施形態において、異なる第2の結合メンバーに付着したタグは、識別可能な、異なる長さを有することができ、例えば、タグは、異なる長さ(例えば25bp、50bp、75bp、100bp、150bp、200bp、又はそれより大きい)の二本鎖DNAであり得る。特定の事例において、異なる第2の結合メンバーに付着したタグは、異なる長さのポリエチレングリコール(PEG)を有し得、又はPEGにより区別して修飾されたDNA若しくはRNAであり得る。

【0165】

タグ又はタグ分子への言及は、単一タグ又は単一タグ分子に加えて、複数のタグ(それはすべて同一であり得る)を包含することに留意されたい。タグは、任意のサイズ又は形状であり得る。いくつかの実施形態において、タグは、直径で約10及び950nm(例えば直径で20~900nm、30~800nm、40~700nm、50~600nm、60~500nm、70~400nm、80~300nm、90~200nm、100~150nm、200~600nm、400~500nm、2~10nm、2~4nm、又は3~4nm)のナノ粒子又はナノビーズであり得る。タグは、実質的に球状、例えば球状のビーズ若しくはナノビーズ、又は半球状であり得る。タグは、約0.5kDaから約50kDaまで、例えば、約0.5kDaから約400kDaまで、約0.8kDaから約400kDaまで、約1.0kDaから約400kDaまで、約1.5kDaから約400kDaまで、約2.0kDaから約400kDaまで、約5kDaから約400kDaまで、約10kDaから約400kDaまで、約50kDaから約400kDaまで、約100kDaから約400kDaまで、約150kDaから約400kDaまで、約

200 kDaから約400 kDaまで、約250 kDaから約400 kDaまで、約300 kDaから約400 kDaまで、約0.5 kDaから約300 kDaまで、約0.8 kDaから約300 kDaまで、約1.0 kDaから約300 kDaまで、約1.5 kDaから約300 kDaまで、約2.0 kDaから約300 kDaまで、約5 kDaから約300 kDaまで、約10 kDaから約300 kDaまで、約50 kDaから約300 kDaまで、約100 kDaから約300 kDaまで、約150 kDaから約300 kDaまで、約200 kDaから約300 kDaまで、約250 kDaから約300 kDaまで、約0.5 kDaから約250 kDaまで、約0.8 kDaから約250 kDaまで、約1.0 kDaから約250 kDaまで、約1.5 kDaから約250 kDaまで、約2.0 kDaから約250 kDaのサイズ、約5 kDaから約250 kDaまで、約10 kDaから約250 kDaまで、約50 kDaから約250 kDaまで、約100 kDaから約250 kDaまで、約150 kDaから約250 kDaまで、約200 kDaから約250 kDaまで、約0.5 kDaから約200 kDaまで、約0.8 kDaから約200 kDaまで、約1.0 kDaから約200 kDaまで、約1.5 kDaから約200 kDaまで、約2.0 kDaから約200 kDaのサイズ、約5 kDaから約200 kDaまで、約10 kDaから約200 kDaまで、約50 kDaから約200 kDaまで、約100 kDaから約200 kDaまで、約150 kDaから約200 kDaまで、約0.5 kDaから約100 kDaまで、約0.8 kDaから約100 kDaまで、約1.0 kDaから約100 kDaまで、約1.5 kDaから約100 kDaまで、約2.0 kDaから約100 kDaまで、約5 kDaから約100 kDaまで、約10 kDaから約100 kDaまで、約50 kDaから約100 kDaまで、約0.5 kDaから約50 kDaまで、約0.8 kDaから約50 kDaまで、約1.0 kDaから約50 kDaまで、約1.5 kDaから約50 kDaまで、約2.0 kDaから約50 kDaまで、約5 kDaから約50 kDaまで、約10 kDaから約50 kDaまで、約10 kDaから約90 kDaまで、約10 kDaから約80 kDaまで、約10 kDaから約70 kDaまで、約10 kDaから約60 kDaまで、約20 kDaから約90 kDaまで、約20 kDaから約80 kDaまで、約20 kDaから約70 kDaまで、約20 kDaから約60 kDaまで、約40 kDaから約90 kDaまで、約40 kDaから約80 kDaまで、約40 kDaから約70 kDaまで、約40 kDaから約60 kDaまでのサイズのタンパク質であり得る。

10

20

30

【0166】

特定の実施形態において、タグはナノ粒子又はナノビーズであり得る。本明細書において述べるように、ナノ粒子は、第2の結合メンバーに可逆的に（例えば切断可能に）付着することができる。特定の態様において、ナノ粒子は、定められた直径のナノビーズであり得る。特定の事例において、本開示の方法、システム、及びデバイスを使用して、サンプル中の複数の異なる検体を同時に分析することができる。かかる分析のために、各々が同族の検体へ特異的に結合する複数の第2の結合メンバーを使用することができる。異なる第2の結合メンバーの各々は、第2の結合メンバーを同定するために使用することができる異なるサイズのナノビーズに付着し得る。例えば、異なるナノビーズタグは、1 nm、2 nm、4 nm、6 nm、8 nm、10 nm、12 nm、14 nmなどの異なる直径、又はより大きな、上限で20 nm、30 nm、50 nm、100 nm、200 nm、300 nm、400 nm、500 nm、600 nm、700 nm、800 nm、900 nm、950 nm、又は990 nmなどの直径を有し得る。

40

【0167】

本方法においてタグとして使用されて得る例示的なナノ粒子には、5 nm～950 nmの範囲の直径の金ナノ粒子又はポリスチレンナノ粒子が含まれる。

【0168】

特定の事例において、タグは、核酸などのポリマーであり得る。タグの存在は、ポリマータグのサイズ又は長さに関連するシグナルといった、タグのシグナル特性の検出によって判定することができる。ポリマータグのサイズ又は長さは、それらの、ポア又はチャネ

50

ル内の滞留時間を測定することによって（例えば電流の一時的な遮断の継続時間を測定することによって）判定することができる。

【0169】

タグ又は標識の一部であり得る、全部であり得る、それらと会合し得る、又は付着し得る要素には、ナノ粒子；金粒子；銀粒子；銀、銅、亜鉛、又は他の金属のコーティング又は堆積物；ポリマー；抗力タグ（本明細書において定義されるような）；磁気粒子；浮遊性粒子；金属粒子；荷電部分；誘電泳動タグ、不純物を含む及び含まない二酸化ケイ素（例えば石英、ガラス等）；ポリ（メタクリル酸メチル）（PMMA）；ポリイミド；窒化ケイ素；金；銀；量子ドット（CdS量子ドットが含まれる）；炭素ドット；フルオロフォア；クエンチャー；ポリマー；ポリスチレン；ヤヌス粒子；散乱粒子；蛍光粒子；燐光粒子；球体；立方体；絶縁体；導電体；バーコード付き又は標識された粒子；多孔質粒子；固体粒子；ナノシェル；ナノロッド；マイクロスフェア；ウイルス、細胞、寄生生物及び生物体などの検体；核酸；タンパク質；分子認識要素；スパーサー；PEG；デンドリマー；電荷改質剤；磁性材料；酵素；アプタマー配列を含むDNA；増幅可能なDNA；DNAの反復配列；検出可能な要素と分子認識要素（例えば操作された結合メンバー）との融合物又はコンジュゲート；抗抗体アプタマー；抗体結合タンパク質への指向性があるアプタマー；吸収又は吸着される検出可能な化合物；ヘム；ルシフェリン；発光体；アジド若しくはアルキン（例えば末端アルキン又は非末端アルキン）又は他のクリックケミストリー関与物が含まれる。

10

【0170】

特定の実施形態において、タグは、サンプルの迅速な分析を可能にするのに十分に高い捕捉の速度を提供するように選択することができる。特定の実施形態において、タグの捕捉速度は、10秒あたり約1事象、5秒あたり1事象、1秒あたり1事象、又はより高速であり得る。特定の実施形態において、リボースポリマー、デオキシリボースポリマー、オリゴヌクレオチド、DNA、又はRNAなどの、線状ポリマータグを使用することができる。

20

【0171】

特定の事例において、リボースポリマー、デオキシリボースポリマー、オリゴヌクレオチド、DNA、又はRNAなどの線状ポリマータグは、これらのタグの捕捉速度が特定の用途については低すぎるゆえに使用され得ない。半球状、球状、又は実質的に球状の形の、それゆえアッセイ継続時間を短縮するタグは、より迅速なタグのカウントを必要とする用途において使用することができる。特定の事例において、球状又は半球状のタグのサイズは、アッセイのために必要とされる捕捉速度に基づいて選択することができる。例えば、より高い捕捉速度のためには、より大きなサイズの球状又は半球状のタグを選択することができる。特定の事例において、タグは、同じ測定条件下で、DNAタグのような線状タグに対する捕捉速度よりも約10倍、30倍、50倍、100倍、300倍、500倍、又は1000倍速い捕捉速度を有するナノ粒子／ナノビーズのような球状のタグであり得る。

30

【0172】

いくつかの実施形態において、タグは、抗体へコンジュゲートされ得る（例えばCSP抗体コンジュゲート）。いくつかの実施形態において、タグは、スパーサーにより抗体へコンジュゲートされ得る（例えばスパーサーを備えたCSP抗体コンジュゲート）。いくつかの実施形態において、タグは、オリゴヌクレオチド及び抗体へコンジュゲートされ得る（例えばCSPオリゴヌクレオチド-抗体コンジュゲート）。いくつかの実施形態において、タグは、スパーサーによりオリゴヌクレオチド及び抗体へコンジュゲートされ得る（例えばスパーサーを備えたCSPオリゴヌクレオチド-抗体コンジュゲート）。いくつかの実施形態において、タグは、オリゴヌクレオチドへコンジュゲートされ得る（例えばCSPオリゴヌクレオチドコンジュゲート）。

40

【0173】

特定の実施形態において、本明細書で記載する方法は、色原体、蛍光化合物、酵素、化

50

学発光化合物、放射性化合物、粒子（蛍光特性を有するという条件で）及びこれらに類するようなシグナル生成物質などの検出可能標識に結合した、特異的結合メンバーを含み得る。標識の例は、光を発生する部分、例えばアクリジニウム化合物、及び蛍光を発生する部分、例えばフルオレセインを含む。

【0174】

当技術分野で知られた任意のシグナル生成物質を検出可能標識として用いることができる。例えば、検出可能標識は、放射性標識（ ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 、及び ^{153}Sm など）、酵素標識（ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリペルオキシダーゼ、グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びそれらに類するものなど（酵素が用いられる場合、対応する酵素基質を添加しなければならない））、化学発光標識（アクリジニウムエステル、チオエステル、又はスルホンアミド；ルミノール、イソルミノール、フェナントリジニウムエステル、及びそれらに類するものなど）、蛍光標識（フルオレセインなど（例えば、5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3'-6-カルボキシフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロフルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、及びそれらに類するもの））、ローダミン、フィコビリタンパク質、R-フィコエリトリン、量子ドット（例えば、硫化亜鉛被覆セレン化カドミウム）、サーモメトリック標識、又は免疫ポリメラーゼ連鎖反応標識であり得る。標識の導入、標識化手順及び標識の検出は、非特許文献12（Polak and Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 2nd ed., Springer Verlag, N. Y. (1997)）、ハンドブックとカタログとの組合せである非特許文献13（Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996) published by Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon）に見いだされる。蛍光標識は、FPIAにおいて用いることができる（例えば、引用によりその全体が本明細書に組み入れられる特許文献14（米国特許第5, 593, 896号）、特許文献15（米国特許第5, 573, 904号）、特許文献16（米国特許第5, 496, 925号）、特許文献17（米国特許第5, 359, 093号）、及び特許文献18（米国特許第5, 352, 803号）参照）。アクリジニウム化合物は、均一系化学発光アッセイにおける検出可能標識として用いることができる（例えば、非特許文献14（Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16. 1324-1328 (2006)）；非特許文献15（Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4. 2313-2317 (2004)）；非特許文献16（Adamczyk et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14. 3917-3921 (2004)）；及び非特許文献17（Adamczyk et al., *Org. Lett.* 5. 3779-3782 (2003)）参照）。

【0175】

一態様において、アクリジニウム化合物は、アクリジニウム-9-カルボキサミドである。アクリジニウム-9-カルボキサミドを調製する方法は、非特許文献18（Mattingly, *J. Biolumin. Chemilumin.* 6. 107-114 (1991)）；非特許文献19（Adamczyk et al., *J. Org. Chem.* 63. 5636-5639 (1998)）；非特許文献20（Adamczyk et al., *Tetrahedron* 55. 10899-10914 (1999)）；非特許文献21（Adamczyk et al., *Org. Lett.* 1. 779-781 (1999)）；非特許文献22（Adamczyk et al., *Bioconjugate Chem.* 11. 714-724 (2000)）；非特許文献23（Mattingly et al., *In Luminescence Biotechnology. Instruments and Applications*）；非特許文献24

(Dyke, K. V. Ed.; CRC Press, Boca Raton, pp. 77-105 (2002)); 非特許文献17 (Adamczyk et al., Org. Lett. 5, 3779-3782 (2003)); 並びに特許文献19 (米国特許第5, 468, 646号)、特許文献20 (米国特許第5, 543, 524号) 及び特許文献21 (米国特許第5, 783, 699号) に記載されている。

【0176】

アクリジニウム化合物の別の例は、アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルの例は、式IIのアクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルの例は、10-メチル-9-(フェノキシカルボニル)アクリジニウムフルオロスルホネート(ミシガン州、アナーバーのCayman Chemical, Ann Arborから入手可能)である。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルを調製するための方法は、非特許文献25 (McCapra et al., Photochem. Photobiol. 4, 1111-21 (1965)); 非特許文献26 (Razavi et al., Luminescence 15, 245-249 (2000)); 非特許文献27 (Razavi et al., Luminescence 15, 239-244 (2000)); 及び特許文献22 (米国特許第5, 241, 070号) (これらの各々は、引用により、その全体がそれに関する教示について本明細書に組み入れられる) に記載されている。かかるアクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルは、シグナルの強度及び/又はシグナルの速さの観点から、少なくとも1つのオキシダーゼによる検体の酸化で生成される過酸化水素についての効率的な化学発光インジケータである。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルについての化学発光放出の過程は、迅速に、すなわち1秒以内に完了するが、アクリジニウム-9-カルボキサミドの化学発光放出は、2秒超に及ぶ。しかしながら、アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルは、タンパク質の存在下でその化学発光特性を失う。したがって、その使用には、シグナル生成及び検出中にタンパク質が存在しないことが必要とされる。サンプル中のタンパク質の分離又は除去のための方法は当業者に周知であり、限外濾過、抽出、沈殿、透析、クロマトグラフィ、及び/又は消化(例えば、非特許文献28 (Wells, High Throughput Bioanalytical Sample Preparation, Methods and Automation Strategies, Elsevier (2003)) 参照)を含むが、これらに限定されない。試験サンプルから除去又は分離されるタンパク質の量は、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、又は約95%であり得る。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルに関する更なる詳細は、2007年4月9日に出願された米国特許出願番号第11/697, 835号に記載されている。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルは、脱気無水N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)又は水性コール酸ナトリウムなどの任意の好適な溶媒に溶解することができる。

【0177】

切断可能なリンカー

本明細書において記載される方法において使用されるタグは、汎用リンカーによって特異的結合メンバーへ付着させることができる。切断可能なリンカーは、タグを除去できることを保証する。汎用リンカーは、切断可能なリンカーであり得る。例えば、タグは、切断可能なリンカーを介して第2の結合メンバーに付着することができる。第1の結合メンバー-検体-第2の結合メンバーの複合体を、切断可能なリンカーの切断を媒介する切断剤へ曝露することができる。リンカーは、酸、塩基、求核剤、求電子剤、ラジカル、金属、還元剤又は酸化剤、光、温度、酵素等への曝露を含む任意の好適な方法によって切断することができる。非特許文献29 (Greene & Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons) において開示されるように、好適なリンカーは、標準的な化学的ブロック基から適合させることができる。固相合成において使用される更に好適な切断可能なリンカー

が非特許文献30 (Guillier et al. (Chem. Rev. 100:2092-2157, 2000))において開示される。リンカーは、酸切断可能、塩基切断可能、又は光切断可能であり得る。レドックス反応は、切断スキームの一部であり得る。切断可能なリンカーは、荷電したポリマーであり得る。

【0178】

リンカーは、光切断可能なリンカー、化学切断可能なリンカー、又は熱切断可能なリンカーであり得る。リンカーが光切断可能な基である場合、切断剤は、光切断可能な基を破壊又は切断する適切な波長の光であり得る。多くの実施形態において、光切断可能な連結基を切断するのに使用される光の波長は、約180nmから400nmまで、例えば約250nmから400nmまで、又は約300nmから400nmまでの範囲である。切断を活性化するのに必要とされる光は、検体の他の構成要素に影響しないことが好ましい。好適なリンカーには、O-ニトロベンジル化合物及びニトロベラトリル化合物に基づくものが含まれる。ベンゾインケミストリーに基づくリンカーも使用することができる (非特許文献31 (Lee et al., J. Org. Chem. 64:3454-3460, 1999))。

【0179】

あるいは、切断リンカーが化学切断可能な基である場合、切断剤は、基を切断することが可能な化学薬剤であり得る。化学切断可能なリンカーは、酸化／還元ベースの切断、酸触媒性切断、塩基触媒性切断、又は求核置換によって切断され得る。例えば、連結基がジスルフィドである場合、ジチオスレイトール又はベータメルカプトエタノールを使用してタグを解放することができる。連結基が制限部位であるさらに他の実施形態において、薬剤は、酵素などの触媒剤であり、これは加水分解酵素、制限酵素、又は連結基を切断する別の酵素であり得る。例えば、制限酵素は、I型、II型、IIS型、III型及びIV型の制限酵素であり得る。

【0180】

いくつかの実施形態において、切断リンカーは、酵素切断可能な配列である。本明細書における任意の実施形態の一態様において、酵素切断可能な配列は、2、3、4、5、6、7、8、9又は10ヌクレオチド長の核酸配列である。一実施形態において、酵素切断可能な配列は、少なくとも10ヌクレオチドの配列を含む。一実施形態において、酵素切断可能な配列は、2と20との間のヌクレオチドの配列を含む。一実施形態において、酵素切断可能な配列は、2と15との間のヌクレオチドの配列を含む。一実施形態において、酵素切断可能な配列は、4と10との間のヌクレオチドの配列を含む。一実施形態において、酵素切断可能な配列は、4と15との間のヌクレオチドの配列を含む。

【0181】

例えば、切断可能なリンカーは、アクリジニウム、酸性条件又は穏やかな還元条件 (例えばアクリドン及びスルホンアミドを産生する過酸化水素) によって切断することができる置換ベンジルエーテル又はその誘導体のようなエーテル (例えばベンジルヒドリルエーテル及びインダニルエーテル等)、P-脱離を使用して生成される荷電ポリマー (穏やかな塩基が産物を放出する役割を果たすことができる)、そのチオ類似体を含めたアセタール (離脱は、特に捕捉カルボニル化合物の存在下において穏やかな酸によって達成される)、感光性リンケージ (例えばO-ニトロベンゾイル、7-ニトロインダニル、2-ニトロベンズヒドリルエーテル又はエステル等)、又は特に酵素が特異的な配列を認識する場合に酵素加水分解を受けるペプチドリンカー (第Xa因子又はエンテロキナーゼに対するペプチドなど) であり得る。リンカーの例には、ジスルフィドリンカー、酸不安定性リンカー (ジアルコキシベンジルリンカーが含まれる)、Sieberリンカー、インドールリンカー、t-ブチルSieberリンカー、求電子的に切断可能なリンカー、求核的に切断可能なリンカー、光切断可能なリンカー、還元条件、酸化条件下での切断、セーフティキャッチ (safet y-catch) リンカーの使用による切断、及び脱離メカニズムによる切断が含まれるが、これらに限定されない。

【0182】

求電子的に切断されるリンカーは、典型的にはプロトンによって切断され、酸に対して感受性の切断を包含する。好適なリンカーには、トリチル、p-アルコキシベンジルエステル及びp-アルコキシベンジルアミドなどの修飾ベンジル系が含まれる。他の好適なリンカーには、tert-ブチルオキシカルボニル（Boc）基及びアセタール系が含まれる。チオアセタール又は他の硫黄含有保護基の切断におけるニッケル、銀又は水銀などのチオフィリック金属の使用も、好適なリンカー分子の調製のために考慮することができる。

【0183】

求核性の切断のためには、水中で不安定な（すなわち塩基性pHで単純に切断することができる）エステルのような基、及び非水性の求核剤に対して不安定な基を使用することができる。フッ化物イオンを使用して、トリイソプロピルシラン（TIPS）又はtert-ブチルジメチルシラン（TBDMs）のような基の中のケイ素-酸素結合を切断することができる。

【0184】

還元切断に感受性のあるリンカーは、ジスルフィド結合の還元などと共に使用することができる。ベンジル基及びベンジルオキシカルボニル基を切断するために、パラジウムベースの触媒を使用した触媒的水素添加が用いられている。

【0185】

酸化ベースの手法は、当技術分野において周知である。これらには、p-アルコキシベンジル基の酸化並びに硫黄リンカー及びセレンリンカーの酸化が含まれる。ジスルフィド及び他の硫黄又はセレンベースのリンカーを切断するヨウ素水溶液も使用することができる。

【0186】

セーフティキャッチリンカーは、2ステップで切断するものである。好ましい系において、第1のステップは反応性求核中心の生成であり、切断をもたらす分子内環化を伴う第2のステップがそれに続く。例えば、レブリン酸エステルリンケージをヒドラジン又は光化学により処理して活性アミンを放出することができ、次いでそれを環化して分子中の他の場所のエステル切断することができる（非特許文献32（Burgess et al., J. Org. Chem. 62: 5165-5168, 1997））。

【0187】

脱離反応も使用することができる。例えば、Fmoc及びシアノエチルなどの基の塩基触媒性脱離、並びにアリル系のパラジウム触媒性還元的脱離を使用することができる。

【0188】

集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイス

本明細書において、集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスに関するシステム、デバイス、及び方法を記載する。

【0189】

特定の実施形態において、集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスは、サンプル調製モジュール及び検体検出モジュールという2つのモジュールを有し得る。特定の実施形態において、サンプル調製モジュール及び検体検出モジュールは、分離しているか又は分離し且つ隣接している。特定の実施形態において、サンプル調製モジュール及び検体検出モジュールは、同じ場所に置かれ（co-located）、入り交じり（comingled）、又はインターディジタル形（interdigitated）になっている。サンプル調製モジュールは、サンプル及び試薬の小滴を移動させる、併合する、希釈する、混合する、分離するための、一連の又は複数の電極を含み得る。検体検出モジュールは、検体関連シグナルがその中で検出されるウェルのアレイを含み得る。特定の事例において、検出モジュールは、調製されたサンプルの小滴をウェルのアレイまで移動させるための一連又は複数の電極も含み得る。特定の実施形態において、検出モジュールは、間隙によって分離された第2の基板（例えば下方基板）の上に配置された第1の基板（例えば上方基板）内にウェルのアレイを含み得る。これらの実施形態において、ウェルのアレ

10

20

30

40

50

イは、上下逆向きになっている。特定の実施形態において、検出モジュールは、間隙によって分離された第1の基板（例えば上方基板）の下に配置された第2の基板（例えば下方基板）内にウェルのアレイを含み得る。かかる実施形態において、第1の基板及び第2の基板は対面した配置にある。小滴を、第1の基板及び／又は第2の基板内に存在する電極を用いてウェルのアレイまで（例えば電氣的アクチュエーションにより）移動させることができる。特定の実施形態において、ウェルのアレイはウェル間の領域を含めて、疎水性とすることができる。他の実施形態において、一連の又は複数の電極は、サンプル調製モジュールに限定することができ、調製されたサンプルの小滴（及び／又は不混和性流体の小滴）は、他の手段を用いて検出モジュールへ移動させることができる。

【0190】

特定の実施形態において、サンプル調製モジュールは、イムノアッセイのステップを実行するために用いることができる。サンプル中の対象検体の存在の指標であり且つサンプル中の検体の量に比例する検出可能なシグナルを生成する、任意のイムノアッセイ形式を用いることができる。例示的なイムノアッセイを本明細書で記載する。

【0191】

特定の事例において、検出モジュールは、ウェルのアレイを含み、これを光学的に照合して、サンプル中に存在する検体の量に関連したシグナルを測定する。ウェルのアレイは、サブフェムトリットル容量、フェムトリットル容量、サブナノリットル容量、ナノリットル容量、サブマイクロリットル容量、又はマイクロリットル容量を有し得る。例えば、ウェルのアレイは、フェムトリットルウェルのアレイ、ナノリットルウェルのアレイ、又はマイクロリットルウェルのアレイであり得る。特定の実施形態において、アレイ内のウェルは、すべて実質的に同じ容量を有し得る。ウェルのアレイは、100 μ l までの容量、例えば約0.1フェムトリットル、1フェムトリットル、10フェムトリットル、25フェムトリットル、50フェムトリットル、100フェムトリットル、0.1pL、1pL、10pL、25pL、50pL、100pL、0.1nL、1nL、10nL、25nL、50nL、100nL、0.1マイクロリットル、1マイクロリットル、10マイクロリットル、25マイクロリットル、50マイクロリットル、又は100マイクロリットルの容量を有し得る。

【0192】

特定の実施形態において、サンプル調製モジュール及び検出モジュールは両方とも、単一のベース基板上に存在することができ、サンプル調製モジュール及び検出モジュールは両方とも、液滴を移動させるための一連の又は複数の電極を含み得る。特定の実施形態において、かかるデバイスは、第1の基板及び第2の基板を含むことができ、ここで第2の基板は、第1の基板の上に配置され、第1の基板から間隙によって分離されている。第1の基板は、液滴がそこでデバイスに導入される、サンプル調製モジュールが位置する第1の部分（例えば近位部分）と、液滴がそこへ向かって移動する第2の部分（例えば遠位部分）とを含むことができ、この第2の部分に検出モジュールが位置する。「遠位」に対する「近位」及び「第2」に対する「第1」の使用は、互いに互換的であることが当業者には理解されるであろう。特定の実施形態において、第1の部分及び第2の部分は、分離しており、又は分離し且つ隣接している。特定の実施形態において、第1の部分及び第2の部分は、同じ場所に置かれ（co-located）、入り交じり（comingled）され、又はインターディジタル形（interdigitated）になっている。第1の基板は、第1の基板の上面の上に重ねられた、第1の部分から第2の部分へ延びる一連の又は複数の電極を含み得る。第1の基板は、一連の又は複数の電極を覆うとともに第1の部分から第2の部分へ延びる、第1の基板の上面に配置された層を含み得る。第1の層は、誘電性且つ疎水性の材料である材料で作ることができる。誘電性且つ疎水性の材料の例には、ポリテトラフルオロエチレン材料（例えばTeflon（登録商標））又はフッ素系界面活性剤（例えば、FluoroPel（商標））が含まれる。第1の層は、実質的に平坦な表面を提供するように堆積させることができる。ウェルのアレイは、第1の基板の第2の部分内に位置決めすることができ、一連の又は複数の電極の一部の上を覆い

10

20

30

40

50

、検出モジュールを形成する。ウェルのアレイは、第1の層内に位置決めすることができる。特定の実施形態において、第1の層内にウェルのアレイを製作する前又は後に、親水性層を第1の基板の第2の部分内の第1の層の上に配置して、親水性表面を有するウェルのアレイを設けることができる。第1の基板と第2の基板との間の空間／間隙を空気又は不混和性流体で満たすことができる。特定の実施形態において、第1の基板と第2の基板との間の空間／間隙は、空気で満たすことができる。

【0193】

特定の実施形態において、サンプル調製モジュール及び検出モジュールは、単一のベース基板を用いて製作することができるが、液滴を移動させるための一連の又は複数の電極は、ただサンプル調製モジュール内にのみ存在し得る。かかる実施形態において、第1の基板は、第1の基板の第1の部分において第1の基板の上面の上に重ねられた一連の又は複数の電極を含むことができ、この場合、一連の又は複数の電極は、第1の基板の第2の部分まで延びていない。かかる実施形態において、一連の又は複数の電極は、第1の部分内にのみ位置決めされる。誘電性／疎水性材料（例えば、Teflon）の第1の層は、上述のように、第1の基板の上面に配置することができ、一連の又は複数の電極を覆うことができる。特定の実施形態において、第1の層は、第1の基板の第1の部分の上のみ配置することができる。他の実施形態において、第1の層は、第1の部分並びに第2の部分の上を覆って、第1の基板の上面の上に配置することができる。ウェルのアレイは、第1の基板の第2の部分において第1の層内に位置決めすることができ、ウェルのアレイの下に存在する一連の又は複数の電極を含まない検出モジュールが形成される。

【0194】

特定の事例において、第1の層は、誘電性層とすることができ、疎水性材料の第2の層を該誘電性層の上に配置することができる。ウェルのアレイを疎水性層内に位置決めすることができる。疎水性層内のウェルのアレイの製作の前又は後で、親水性層を、第1の基板の第2の部分内の疎水性層の上に配置することができる。

【0195】

特定の実施形態において、第2の基板は、第1の基板の第1及び第2の部分の上に延びることができる。かかる実施形態において、第2の基板は、少なくともウェルのアレイに重なった領域内で、実質的に透明なものとすることができる。他の事例において、第2の基板は、第1の基板の第1の部分の上に離間した状態で配置することができ、第1の基板の第2の部分の上には配置されなくてもよい。それゆえ、特定の実施形態において、第2の基板は、サンプル調製モジュール内には存在し得るが検出モジュール内には存在しなくてもよい。

【0196】

特定の事例において、第2の基板は、電極を形成する導電性層を含み得る。導電性層は、第2の基板の下面に配置することができる。導電性層は、上述のように、誘電性／疎水性材料で作られた第1の層によって被覆することができる。特定の事例において、導電性層は、誘電性層によって被覆することができる。誘電性層は、疎水性層によって被覆することができる。導電性層及びこれを被覆するいずれの層も、第2の基板の下面にわたって配置されてもよく、又は第2の基板の第1の部分にのみ存在してもよい。特定の実施形態において、第2の基板は、第1の基板の第1及び第2の部分の上に延びることができる。かかる実施形態において、第2の基板及びその上に配置されたいずれの層（例えば、導電性層、誘電性層等）も、少なくともウェルのアレイに重なった領域内で、実質的に透明なものとすることができる。

【0197】

他の事例において、第1の基板上の一連の又は複数の電極は、共面電極として構成することができ、第2の基板は、電極を含まなくてもよい。

【0198】

特定の事例において、第1の層及び／又は第2の層内に存在する電極は、酸化インジウムスズ、フッ素ドーパ酸化スズ（FTO）、ドーパ酸化亜鉛及びそれらに類するもののよ

10

20

30

40

50

うな実質的に透明な材料から製作することができる。

【0199】

いくつかの実施形態において、サンプル調製モジュール及び検出モジュールは、単一のベース基板上に製作することができる。他の実施形態において、サンプル調製モジュール及び検出モジュールは、別個の基板上に製作することができ、その後これらを接合して集積マイクロ流体及び検体検出デバイスを形成することができる。特定の実施形態において、第1及び第2の基板は、基板間に位置決めされ得るスペーサーを用いて離間することができる。

【0200】

本明細書で記載するデバイスは、平面状であり得、矩形又は正方形、角が丸い矩形又は正方形、円形、三角形といった任意の形状を有し得る。

【0201】

小滴ベースのマイクロ流体は、能動的又は受動的な力によって液滴を生成しアクチュエーション（例えば移動、併合、分割等、）することを意味する。能動的力の例は、電場を含むが、これに限定されない。例示的な能動的力の技法には、エレクトロウェットティング、誘電泳動、オプトエレクトロウェットティング、電極媒介、電場媒介、静電アクチュエーション、及びそれに類したもの又はこれらの組合せが含まれる。いくつかの例において、デバイスは、エレクトロウェットティングのような小滴ベースのマイクロ流体により、又はエレクトロウェットティングと液滴の連続流体流との組合せにより、液滴を、間隙内で、第1の層の上面（又は存在する場合には第2の層の上面）にわたってアクチュエーションすることができる。他の例において、デバイスは、液滴をサンプル調製モジュールから検出モジュールまで送達するためのマイクロチャネルを含み得る。他の例において、デバイスは、小滴ベースのマイクロ流体による、間隙内の疎水性層の表面にわたる液滴のアクチュエーションによるものであり得る。エレクトロウェットティングは、表面に電場を印加すること表面の濡れ特性を変化させること、及び表面上に存在する液滴と表面との間の表面張力に影響を及ぼすことを伴い得る。連続流体流を用いて、外部機械式ポンプ又は集積機械式マイクロポンプなどの外部圧力源、又は毛管力と動電学的機構との組合せにより、液滴を移動させることができる。受動的力の例には、T接合及び流れ集束法が含まれるが、これらに限定されない。受動的力の他の例は、重質油流体のようなより高密度の不混和性液体の使用を含み、これを第1の基板の表面の上で液滴へ連結させて、液滴を表面にわたって移動させることができる。より高密度の不混和性液体は、水より高密度であり、適度に水と混じり合わない任意の液体であり得る。例えば、不混和性液体は、炭化水素、ハロゲン化炭化水素、極性油、非極性油、フッ素化油、クロロホルム、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、1-ヘキサノール等であり得る。

【0202】

第1の基板と第2の基板との間の空間は、高さ約1mmまで、例えば、0.1 μm 、0.5 μm 、1 μm 、5 μm 、10 μm 、20 μm 、50 μm 、100 μm 、140 μm 、200 μm 、300 μm 、400 μm 、500 μm 、1 μm ～500 μm 、100 μm ～200 μm 、等であり得る。本明細書で記載するデバイス内で生成され移動される小滴の体積は、約10 μl から約5ピコlまでの範囲、10 μl ～1ピコl、7.5 μl ～10ピコl、5 μl ～1 nL、2.5 μl ～10 nL、又は1 μl ～100 nL、800～200 nL、10 nL～0.5 μl など、例えば10 μl 、1 μl 、800 nL、100 nL、10 nL、1 nL、0.5 nL、10ピコl又はそれ未満であり得る。

【0203】

図1Aは、例示的な集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイス10を示す。デバイス10は、第1の基板11及び第2の基板12を含み、ここで第2の基板12は、第1の基板11の上に位置決めされ、第1の基板から間隙13によって分離されている。図1Aに示すように、第2の基板12は、第1の基板11と同じ長さである。しかしながら、他の例示的なデバイスにおいて、第1の基板11及び第2の基板12は、異なる長さであってもよい。第2の基板は、電極を含んでもよく、又は含まなくてもよい。第1の基板1

1は、第1の部分15を含み、ここでサンプル小滴、試薬小滴等のような液滴が第1の基板11上に導入される。第1の基板11は、第2の部分16を含み、ここに向かって液滴が移動される。第1の部分15は、サンプル調製モジュールと称されることもあり、第2の部分16は、検体検出モジュールと称されることもある。第1の基板11は、第1の基板11の上面に位置決めされた一連の又は複数の電極17を含む。誘電性／疎水性材料（例えば、誘電性且つ疎水性の両方であるTeflon）の層18が第1の基板の上面に配置され、一連の又は複数の電極17を被覆する。ウェルのアレイ19は、第1の基板の第2の部分16上で層18内に位置決めされる。

【0204】

図1Bは、集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイス20の別の例を示し、これは、第1の基板21及び第2の基板22を含み、ここで第2の基板22は、第1の基板20の上に位置決めされ、第1の基板から間隙23によって分離されている。第1の基板21は、液体がそこで第1の基板21上に導入される第1の部分25と、検体関連シグナルの検出のために液体がそこへ向かって導かれる第2の部分26とを含む。第1の基板21は、第1の基板の上面に位置決めされた一連の又は複数の電極27を含む。誘電性材料の層28が、第1の基板21の上面に位置決めされ、一連の又は複数の電極27を被覆する。この例示的なデバイスでは、一連の又は複数の電極27は、第1の基板21の第1の部分上にのみ位置決めされる。第2の基板22は、電極を含んでもよく、又は含まなくてもよい。

【0205】

図2Aは、集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイス30の別の例を示す。デバイス30は、第1の基板31及び第2の基板32を含み、ここで第2の基板32は、第1の基板31の上に位置決めされ、第1の基板から間隙33によって分離されている。第1の基板31は、第1の部分35を含み、ここでサンプル小滴、試薬小滴等のような液滴が第1の基板31上に導入される。第1の基板31は、第2の部分36を含み、ここに向かって液滴が移動される。第1の部分はサンプル調製モジュールと称されることもあり、第2の部分は、検出モジュールと称されることもある。第1の基板31は、第1の基板の上面に位置決めされた一連の又は複数の電極37を含む。誘電性材料の層38が、第1の基板の上面に配置され、一連の又は複数の電極37を被覆する。疎水性材料の層34が、誘電性層38に重ね合わされる。ウェルのアレイ39は、第1の基板31の第2の部分上の疎水性層34内に位置決めされる。ウェルのアレイは、親水性又は疎水性の表面を有し得る。

【0206】

図2Bは、集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイス40の別の例を示し、これは、第1の基板41及び第2の基板42を含み、ここで第2の基板42は、第1の基板40の上に位置決めされ、第1の基板から間隙43によって分離されている。第1の基板は、液体がそこで第1の基板41上に導入される第1の部分45と、検体関連シグナルの検出のために液体がそこへ向かって導かれる第2の部分46とを含む。第1の基板41は、第1の基板の上面に位置決めされた一連の又は複数の電極47を含む。誘電性材料の層48が、第1の基板41の上面に位置決めされ、一連の又は複数の電極47を被覆する。この例示的なデバイスでは、一連の又は複数の電極47は、第1の基板41の第1の部分45上にのみ位置決めされる。誘電性層48は、第1の基板41の上面全体を被覆し、疎水性層44は、誘電性層の上面全体を被覆する。ウェルのアレイ49が疎水性層44内に位置決めされ、ウェルのアレイ49は、第1の基板41の第2の部分46に重なった疎水性層の部分にのみ位置決めされる。この例において、誘電性層48は、第1の基板41の上面全体の上に延びているように示されている。他の例において、誘電性層及び疎水性層は、第1の部分に限定されることができ、ウェルは、第1の基板の第2の部分に位置決めされた親水性層内に位置決めすることができる。

【0207】

いくつかの例において、液体は、小滴アクチュエータ（図示せず）によって間隙内に導

10

20

30

40

50

入され得る。他の例において、液体は、流体入口、ポート、又はチャネルによって、間隙内に入り得る。このデバイスの付加的な関連構成要素は図示していない。かかる図面は、サンプル、洗浄バッファー、結合メンバー、酵素基質、廃棄流体等を保持するためのチャンバを含み得る。アッセイ試薬は、集積装置の一部としての外部リザーバ内に収容されてもよく、この場合、特定のアッセイステップ用に必要とときに所定体積をリザーバからデバイス表面まで移動させることができる。さらに、アッセイ試薬は、乾燥された試薬、印刷された試薬、又は凍結乾燥された試薬の形態でデバイス上に堆積されてもよく、この場合、これらは活性を失わずに長期間にわたって貯蔵され得る。かかる乾燥、印刷、又は凍結乾燥試薬は、検体分析の前又は間に再水和させることができる。

【0208】

いくつかの例において、第1の基板は、紙（インクジェット印刷された電極付き）又はポリマーのような可撓性材料で作ることができる。他の例において、第1の基板は、例えば印刷回路基板、プラスチック又はガラス又はシリコンなどの非可撓性材料で作ることができる。いくつかの例において、第1の基板は、単一のシートで作られ、次いでこれをその後の加工に供して一連の又は複数の電極を作製することができる。いくつかの例において、第1の基板上に多数の一連の又は複数の電極を製作することができ、これを切断して、一連の又は複数の電極が上に重ねられた複数の第1の基板を形成することができる。いくつかの例において、電極は、一般的な接着剤又ははんだによって導電性層の表面に貼り合わせることができる。第2の基板は、紙（インクジェット印刷された電極付き又は電極無し）、ポリマー、印刷回路基板、及びそれに類するような可撓性材料を含むがこれらに

【0209】

いくつかの例において、電極は、金属、金属混合物若しくは合金、金属-半導体混合物若しくは合金、又は導電性ポリマーからなる。金属電極のいくつかの例には、銅、金、インジウム、スズ、酸化インジウムスズ、及びアルミニウムが含まれる。いくつかの例において、誘電性層は、低い導電率を有するか、又は静電場を維持することが可能な、絶縁材料を含む。いくつかの例において、誘電性層は、磁器（例えばセラミック）、ポリマー又はプラスチックで作ることができる。いくつかの例において、疎水性層は、例えばTeflon及び総称的なフルオロカーボンのような疎水性を有する材料で作ることができる。別の例において、疎水性材料は、フッ素系界面活性剤（例えば、Fluoropel）であり得る。誘電性層上に堆積された親水性層を含む実施形態において、それはガラス、石英、シリカ、金属水酸化物、又はマイカの層であり得る。

【0210】

電極のアレイ（例えば一連の）は、第1の基板の単位面積当たり所定数の電極を含むことができ、この数は、電極のサイズ及びインターディジタル形電極の有無に基づいて増減し得ることが当業者には認識されるであろう。電極は、フォトリソグラフィ、原子層堆積、レーザスクラビング又はエッチング、レーザアブレーション、電極のフレキシ印刷及びインクジェット印刷を含む、多様なプロセスを用いて製作することができる。

【0211】

いくつかの例において、第1の基板の上面に配置された導電性層に特別なマスクパターンを適用し、次いで露出した導電性層をレーザアブレーションして、第1の基板上に一連の又は複数の電極を生成することができる。

【0212】

いくつかの例において、一連の又は複数の電極によって発生した電位は、一連の又は複数の電極を被覆する第1の層（又は存在する場合は第2の層）の上面に形成された液滴を、デジタルマイクロ流体デバイスの表面にわたって移送し、ウェルのアレイによって受け入れられるようにする。各電極は、独立して、デジタルマイクロ流体デバイスの表面にわたって小滴を移動させることが可能であり得る。

【0213】

図3Aは、例示的な集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイス100の側面図を

10

20

30

40

50

、間隙 170 内を移動している液滴と共に示す。デバイス 100 は、第 1 の基板 110 及び第 2 の基板 120 を含み、ここで第 2 の基板 120 は、第 1 の基板 110 の上に位置決めされ、第 1 の基板の上面から間隙 170 によって分離されている。第 1 の基板 110 は、第 1 の部分 115 を含み、ここでサンプル小滴、試薬小滴等のような液滴が第 1 の基板 110 上に導入される。第 1 の基板 110 は、第 2 の部分 130 を含み、これに向かって液滴が移動される。第 1 の部分はサンプル調製モジュールと称されることもあり、第 2 の部分は、検出モジュールと称されることもある。第 1 の基板 110 は、第 1 の基板の上面に位置決めされた一連の又は複数の電極 145 を含む。誘電性材料の層 150 が、第 1 の基板の上面に配置され、一連の又は複数の電極 145 を被覆する。疎水性材料の層 155 が、誘電性層 150 に重ね合わされる。ウェルのアレイ 160 は、第 1 の基板 110 の第 2 の部分上の疎水性層 155 内に位置決めされる。ウェルのアレイは、親水性又は疎水性の表面を有し得る。図 3 A に示すように、液滴は、第 1 の部分 115 から、ウェルのアレイ 160 を収めた第 2 の部分 130 までアクチュエーションされているところが示されている。複数のビーズ又は粒子 190 を含有する液滴 180 は、一連の又は複数の電極 145 を用いた能動的な方向性運動により、第 1 の部分 115 をわたって第 2 の部分 130 の上へ移動されている。矢印は、液滴の移動方向を示す。ここには示されていないが、分極可能な油を用いて、小滴を移動させてウェルをシールすることができる。ここではビーズ／粒子が図示されているが、小滴は、固体支持体の代わりに又はこれに加えて検体分子を含んでもよい。

10

【0214】

20

図 3 B は、例示的な集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイス 101 の側面図を、間隙 170 内を第 1 の部分 115 からウェルのアレイ 160 を含んだ第 2 の部分 130 へ移動している小滴 180 と共に示す。デバイス 101 は、第 1 の基板 110 及び第 2 の基板 120 を含み、ここで第 2 の基板 120 は、第 1 の基板 110 の上に位置決めされ、第 1 の基板の上面から間隙 170 によって分離されている。第 1 の基板 110 は、第 1 の部分 115 を含み、ここでサンプル小滴、試薬小滴等のような液滴が第 1 の基板 110 上に導入される。第 1 の基板 110 は、第 2 の部分 130 を含み、そこに向かって液滴が移動される。第 1 の部分はサンプル調製モジュールと称されることもあり、第 2 の部分は、検出モジュールと称されることもある。第 1 の基板 110 は、第 1 の部分 115 において第 1 の基板の上面に位置決めされた一連の又は複数の電極 145 を含む。誘電性材料の層 150 が、第 1 の基板の上面に配置され、一連の又は複数の電極 145 を被覆する。疎水性材料の層 155 が、誘電性層 150 に重ね合わされる。ウェルのアレイ 160 は、第 1 の基板 110 の第 2 の部分上の疎水性層 155 内に位置決めされる。ウェルのアレイは、親水性又は疎水性の表面を有し得る。デバイスの第 1 の部分の表面にわたる移動は、電極 145 によるものであり、次いで小滴 180 は、191 及び 192 によって形成された毛管要素を通る毛管運動のような受動的な流体力を用いて、第 2 の部分へ移動される。いくつかの例において、毛管要素は、一連の又は複数の電極によって発生する印加される電場の非存在下で第 1 の部分から第 2 の部分への水滴の移動を促進するために、親水性材料を含み得る。いくつかの例において、疎水性材料のストライプ模様を親水性毛管の空間の隣に配置することができる。疎水性材料のストライプ模様を用いて、デジタルマイクロ流体の電極の非存在下でウェルのアレイの上に不混和性流体の小滴を移動させることができる。疎水性毛管要素を通して流れ得る液体のいくつかの例には、フッ素化油などの重質油流体が含まれ、ウェルのアレイの上の液滴の運動を促進するために用いることができる。他の例において、油滴は、過剰の小滴を除去するために利用することもできる。

30

40

【0215】

水性流体を移動させることに加えて、有機系不混和性流体のような不混和性流体もまた、電氣的に媒介されるアクチュエーションによって移動させることができる。小滴アクチュエーションは、導電率と相関するのみならず、相互に関連した双極子モーメント及び誘電率とも相関していることが理解される。特定の実施形態において、不混和性液体は、約 0.9 D より大きい分子双極子モーメント、約 3 より大きい誘電率、及び／又は約 10^{-9}

50

S m^{-1} より大きい導電率を有することができる。移動可能な不混和性液体の例及びその特性は、非特許文献33 (Chatterjee, et al. Lab on Chip, 6, 199-206 (2006)) において論じられている。本明細書において開示される検体分析アッセイにおける不混和性液体の使用の例は、水滴の運動を支援すること、ウェルの上に位置決めされた水性流体を置換すること、ウェルの光学的照合の前に、堆積されていないビーズ／粒子／検体分子をウェルから置換すること、ウェルをシールすること、及びそれに類したことを含む。本明細書で開示されるデバイス内で移動可能な有機系不混和性流体のいくつかの例には、1-ヘキサノール、ジクロロメタン、ジブロモメタン、THF及びクロロホルムが含まれる。上記の基準を満たす有機系油もまた同様の条件下で移動可能であることが予期される。不混和性流体小滴を用いるいくつかの実施形態において、デバイス内の間隙／空間は、空気で満たすことができる。

【0216】

図4Aは、図3Aの集積デバイスの第2の部分へ移動されてウェルのアレイ160の上に位置決めされた、ビーズ又は粒子190を含有する液滴180を示す。小滴は、ウェルのアレイの上で直線又は往復運動又は動きで連続的に移動することができ、ウェルのアレイの上で一時停止することができる。ウェルのアレイの上での小滴の移動及び／又は小滴を一時停止させることで、ウェルのアレイ160内への粒子又はビーズ190の堆積が促進される。ウェルは、1個のビーズ／粒子を含むような寸法にされる。図4Aに示すデバイスにおいて、小滴は、一連の又は複数の電極145を用いてウェルのアレイの上で移動される。ここではビーズ／粒子が描かれているが、検体分子を含有する小滴もまた、同様の様式で、不混和性流体がウェルをシールする前に検体分子を含有する小滴を検体分子がウェル内へ拡散することを可能にするのに十分な時間にわたってウェルの上で一時停止させることによって、移動させることができる。ウェルは、1個のビーズ／粒子を含むような寸法にされる。ウェルはまた、ウェル毎に1検体分子を含むような寸法にすることもできる。

【0217】

図4Bは、図3Bの集積デバイスの第2の部分へ移動されて一連の又は複数の電極を用いずにウェルのアレイの上に位置決めされた、ビーズ又は粒子190を含有する液滴185を示す。図4Bにおいて、ウェルアレイの上で液滴を移動させてウェル160内へのビーズ／粒子190の堆積を促進するために、疎水性液体195 (不混和性流体など) の小滴が用いられている。矢印の方向は、小滴185が移動されている方向を示す。

【0218】

図5は、一連の又は複数の電極57を用いて第1の部分55の上を移動されている疎水性流体小滴62 (例えば、分極可能な流体) を示す。図示したデバイス50は、第1の基板51及び第2の基板52を含み、ここで第2の基板52は、第1の基板51の上に位置決めされ、第1の基板から間隙53によって分離されている。第1の基板51は、第1の部分55を含み、ここでサンプル小滴、試薬小滴等のような液滴が第1の基板51上に導入される。第1の基板51は、第2の部分56を含み、ここに向かって液滴が移動される。第1の基板51は、第1の部分55において第1の基板の上面に位置決めされた一連の又は複数の電極57を含む。誘電性材料の層58が、第1の基板の上面に位置決めされ、一連の又は複数の電極57を被覆する。疎水性材料の層54が、誘電性層58の上に重ね合わされる。ウェルのアレイ59は、第1の基板51の第2の部分上の疎水性層54内に位置決めされる。ウェルのアレイは、親水性又は疎水性の表面を有し得る。毛管要素60が、第1の基板51及び第2の基板52の上の疎水性材料の2つのストライプの堆積によって形成される。疎水性毛管は、第2の部分56における一連の又は複数の電極の非存在下で、ウェルのアレイ59への疎水性流体小滴62の移動を促進する。他の実施形態において、毛管要素は、第1の基板51及び第2の基板52の上の親水性材料の2つのストライプの堆積によって形成することができる。親水性材料は、第2の部分56における一連の又は複数の電極の非存在下で、ウェルのアレイ59への水滴の移動を促進する。特定の実施形態において、毛管要素は、一対の親水性材料のストライプと一対の疎水性材料のス

トライブとが交互になったものを含み得る。水滴は、一对の親水性のストライプが位置決めされている領域に導かれることができ、一方、不混和性流体の小滴は、一对の疎水性ストライプが位置決めされている領域に導かれることができる。

【0219】

図6は、集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスの別の実施形態を示す。デバイス600は、下部層601を含み、その上に電極607のアレイが形成されている。電極のアレイは、誘電性層608によって被覆されている。疎水性層609は、下部基板の第1の部分605にのみ配置されている。親水性層610は、下部基板601の第2の部分606上に配置されている。ウェルのアレイは、親水性層610内の第2の部分内に位置している。下部基板から間隙／空間603によって分離された上部基板602もまた描かれている。上部基板602は、下部基板の第1の部分の上で、上部基板の底面に配置された誘電性層608を含む。上部基板は、下部基板の第2の部分から、上部基板の底面にわたって配置された親水性層610を含む。水滴611は疎水性層を濡らさず、親水性の第2の部分に達すると、小滴611は、ウェルのアレイ619の上に広がり、それによって受動的毛管力による水相の移動を促進する。同様のやり方で、上記の概念を逆にして、有機系不混和性流体がウェルを濡らしてその上に広がることを促進することができる。この場合、第2の部分の上部及び下部基板を疎水性材料／コーティングでコーティングすることができ、それによって有機系不混和性流体が受動的毛管力によりウェルの上で流動することを可能にする。

【0220】

本明細書で用いるとき、デジタルマイクロ流体は、マイクロ流体デバイス内で小滴を操作するための、例えば、小さい空間内で、小滴を移動する、小滴を分割する、小滴を併合する等のための一連の電極の使用を意味する。本明細書において使用されるとき、「小滴」及び「流体小滴」は、大まかに球状の形の離散的な体積の液体であって、少なくとも1つの側面上でマイクロ流体デバイスの壁又は基板によって境界を定められているものを指すのに、互換的に使用される。小滴の文脈における大まかに球状とは、球状、部分的に平らになった球体、例えば、円盤形、ナメクジ形、切頭球体、楕円状、半球状、又は卵形などの形を指す。本明細書において開示されるデバイスにおける小滴の体積は、約 $10\mu\text{l}$ から約 5pL までの範囲、 $10\mu\text{l}\sim 1\text{pL}$ 、 $7.5\mu\text{l}\sim 10\text{pL}$ 、 $5\mu\text{l}\sim 1\text{nL}$ 、 $2.5\mu\text{l}\sim 10\text{nL}$ 、又は $1\mu\text{l}\sim 100\text{nL}$ など、例えば $10\mu\text{l}$ 、 $5\mu\text{l}$ 、 $1\mu\text{l}$ 、 800nL 、 500nL 、又はそれ未満であり得る。

【0221】

いくつかの例において、ウェルのアレイは、複数の個別のウェルを含む。ウェルのアレイは、 1mm^2 毎に個数で 10 から 10^9 までの範囲であり得る複数のウェルを含み得る。特定の事例において、およそ 12mm^2 の面積に及ぶ約 100 、 000 ウェルから 500 、 000 ウェル（例えば、フェムトリットルウェル）のアレイを製作することができる。各ウェルは、幅約 $4.2\mu\text{m}$ ×深さ $3.2\mu\text{m}$ の寸法（容量はおよそ 50 フェムトリットル）とすることができ、単一のビーズ／粒子（直径約 $3\mu\text{m}$ ）を保持することが可能であり得る。この密度において、フェムトリットルウェルは、互いにおよそ $7.4\mu\text{m}$ の距離で離間する。いくつかの例において、ウェルアレイは、直径 10nm から $10,000\text{nm}$ までの個々のウェルを有するように製作することができる。

【0222】

ウェル内に単一のビーズ／粒子／検体分子を配置することで、デジタル読出し又はアナログ読出しのいずれも可能になる。例えば、陽性ウェルの数が少ない場合（ $<\sim 70\%$ 陽性）ポアソン統計量を用いて、検体濃度をデジタル形式で定量することができ、陽性ウェルの数が多い場合（ $>\sim 70\%$ ）、シグナルを持つウェルの相対強度を、単一のビーズ／粒子／検体分子から発生するシグナル強度とそれぞれ比較し、これを用いてアナログシグナルが生成される。デジタルシグナルは、低めの検体濃度に対して用いることができ、他方、アナログシグナルは、高めの検体濃度に対して用いることができる。デジタル定量化とアナログ定量化との組合せを用いることができ、これにより線形的なダイナミックレン

ジを拡張することができる。本明細書において用いるとき、「陽性ウェル」は、ビーズ／粒子／検体分子の存在に関連したシグナルを有するウェルのことを意味し、このシグナルは閾値を上回る。本明細書において用いるとき、「陰性ウェル」は、ビーズ／粒子／検体分子の存在に関連したシグナルを有していないかもしれないウェルを意味する。特定の実施形態において、陰性ウェルからのシグナルは、バックグラウンドレベル、すなわち閾値を下回り得る。

【0223】

ウェルは、平らな底面付きの円筒形、丸い底面付きの円筒形、立方体、立方形、切頭円錐、逆切頭円錐、又は円錐などの、任意の多様な形状であり得る。特定の事例において、ウェルは、ウェルアレイの上に移動した液滴中に存在するマイクロビーズ又はマイクロ粒子の受入れ及び保持を促進するように配向され得る側壁を含むことができる。いくつかの例において、ウェルは、第1の側壁及び第2の側壁を含むことができ、ここで第1の側壁は第2の側壁と対向し得る。いくつかの例において、第1の側壁は、ウェルの底部に対して鈍角に配向され、第2の側壁は、ウェルの底部に対して鋭角に配向される。小滴の移動は、ウェルの底部に対して平行に第1の側壁から第2の側壁へ向かう方向であり得る。

【0224】

いくつかの例において、ウェルのアレイは、成形、圧力、熱、若しくはレーザのうちの1つ又はそれより多く、又はそれらの組合せにより製作することができる。いくつかの例において、ウェルのアレイは、ナノインプリント／ナノスフィアリソグラフィを用いて製作することができる。当技術分野で周知の他の製作方法を用いることもできる。

【0225】

図7A～図7Bは、いくつかの例示的なウェルの側壁配向を示す。図7A～図7Bに示すように、ウェルは、第2の側壁に対向した第1の側壁を含む。図7Aは、ウェルのアレイ内の個々のウェル460の垂直断面図を示す。図7Aは、第1の側壁401及び第2の側壁402を示す。第1の側壁は、ウェルの底面143に対して鈍角を成し、第2の側壁は、ウェルの底面143に対して鋭角を成す。矢印は、液滴がアレイを横切って移動する方向を示す。ウェルの側壁のこの配向は、ビーズ／粒子／検体分子490の受入れ及び保持を促進する。

【0226】

図7Bにおいて、第1の側壁410の上部分415はウェルの底部412に対して鈍角に配向され、第1の側壁410の下部分416はウェルの底部412に対して垂直に配向され、第2の側壁411はウェルの底部412に対して垂直に配向され、液滴の移動はウェルの底部に平行に第1の側壁から第2の側壁へ向かう方向であり、第1の側壁の上部分はウェルの開口部にある。

【0227】

本明細書で記載する集積デバイスは、多数の方法で製作することができる。特定の事例において、上記方法は、第1の基板、一連の又は複数の電極、誘電性層及び疎水性層を構築するために、レーザアブレーション、吹付け塗装、ロール・ツー・ロール、フレキシ印刷及びナノインプリントリソグラフィ（NIL）の組合せを含み得る。

【0228】

いくつかの例において、複数のローラが第1のロールの巻きを解いて、第1の基板を第1の位置まで駆動することができる。次いで導電性材料を第1の基板に塗工することができる。導電性材料をパターンニングして、一連の又は複数の電極にすることができる。いくつかの例において、印刷装置は、第1の基板上の少なくとも1つの電極パターンに疎水性材料又は誘電性材料のうちの少なくとも1つを塗工するための1つ又はそれより多くのコーティングローラを備えている。いくつかの例において、コーティングローラは、第1の基板に防汚材料を塗工するためのものである。

【0229】

いくつかの例において、システムは、第1の基板を第2の基板に整列させるためのマージ装置（merger）をさらに含む。いくつかの例において、マージ装置は、2つのロ

10

20

30

40

50

ーラを備える。また、開示される例のうちのいくつかは、疎水性材料又は誘電性材料を硬化するための硬化ステーションを含む。開示する例のいくつかはまた、第1の基板の少なくとも第1の部分を第2の基板の少なくとも第1の部分に貼り合わせるボンディング・ステーションも含む。貼り合される部分は、電極パターンを含む。上記方法はまた、第1の基板と第2の基板とを離間した距離で関連付けることも含む。第1の基板と第2の基板との間の空間は、高さ約0.01mmから1mmまで、例えば、0.1μm、0.5μm、1μm、5μm、10μm、20μm、50μm、100μm、140μm、200μm、300μm、400μm、500μm、1μm～500μm、100μm～200μm等であり得る。

【0230】

いくつかの例において、この方法は、第1の基板をエンボス加工して、第1の基板上に1つ又はそれより多くの突起を作り出すことを含む。かかる例において、突起は、第1の基板と第2の基板とを離間した距離で分離するためのものである。

【0231】

本開示のデバイスは、手動又は自動的若しくは半自動的に動作させることができる。特定の事例において、デバイスは、検体関連シグナルを生成すること及びシグナルを検出することのために必要なステップを実行するためのプログラムを実行するプロセッサによって動作させることができる。本明細書において使用する場合、「検体関連シグナル」又は「検体に関連付けられたシグナル」は、検体の存在の指標であり、サンプル中の検体の量に比例するシグナルを意味する。シグナルは、蛍光、化学発光、比色、比濁等であり得る。特定の事例において、読出しは、デジタルであり得、例えば、陽性カウント（例えばウェル）の数を陰性カウント（例えばウェル）の数と比較してデジタルカウントを得る。

【0232】

図8は、集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスのベース基板を作製するための第1の例示的なシステム又は組立体500の図である。第1の例示的な組立体500は、第1のローラ502、第2のローラ504、及び第3のローラ506を含む一連の又は複数のローラを含み、これらは同期された回転で動作して、第1の例示的な組立体500を通してベース基板508を駆動させる。第1の例示的な組立体500は、第1から第3までのローラ502、504、506に加えて、ロール・ツー・ロール技術を用いて上記組立体を通してベース基板508を移動させるためのローラを含むことができる。他の例は、コンベヤ、プーリ、及び／又は他のいずれかの好適な輸送機構を使用し得る。

【0233】

第1の例示的な組立体500において、第1のローラ502が回転して、ベース基板508の巻きを解き、これはいくつかの例においてロール構成の単一シートである。ベース基板508は、第1の層510及び第2の層512を含む。この例において、第1の層510は、例えばプラスチックなどの非導電性の可撓性基板又はウェブを含み、第2の層512は、導電性材料を含む。第2の層512の導電性材料は、例えば、金、銀又は銅などの金属、又は導電性ポリマーなどの非金属導電体であり得る。他の例において、異なる金属、又は金属及び／又は導電性ポリマーの組合せを用いることができる。いくつかの例において、ベース基板508は、非導電性の第1の層510と導電性の第2の層512との間に配置された、随意の接着層513を含む。一例として、接着層513は、クロムを含むことができ、クロム接着層513の上に配置された金の層が導電性の第2の層512を形成する。それゆえ、図8のベース基板508において、非導電性の第1の層510及び導電性の第2の層512は、第1のローラ502によって巻きが解かれる前に予め接着されてベース基板508を形成している。

【0234】

図8の例示的なベース基板508において、非導電性の第1の層510は、約500nm未満の厚さを有する。後述するように、かかる厚さは、ベース基板508が複数のローラによって例示的な第1の組立体500を通して移動することを可能にする。また、いくつかの例において、非導電性の第1の層510の厚さは、導電性の第2の層512の厚さ

を上回る。一例として、導電性の第2の層512の厚さは、およそ30nmであり得る。他の例において、導電性の第2の層512の厚さは、約500nm未満である。いくつかの例において、非導電性の第1の層510及び／又は導電性の第2の層512の厚さは、例えば、第1及び／又は第2の層510、512の材料、及び／又はベース基板508から形成される小滴アクチュエータの実用的な使用目的に基づいて選択される。

【0235】

第1のローラ502は、ベース基板508をレーザアブレーション・ステーション514へ駆動する。レーザアブレーション・ステーション514は、ベース基板508の導電性の第2の層512に投影されるマスターパターン518を収めたマスク516を含む。マスク516に関連付けられたマスターパターン518は、解像度（例えば、アブレーションされるベース基板508の面積当たりの電極の数）、電極サイズ、電極パターンを定めるラインの構成、電極のインターディジテーション、電極間の間隙又は間隔、及び／又は電極を電源などの機器に接続するための電氣的トレースといった特性に基づいて、予め定めることができる。いくつかの例において、マスターパターン518の特性は、そのベース基板508が関連付けられる小滴アクチュエータの1つ又はそれより多くの実用的用途（例えば、生物学的及び／又は化学的アッセイを伴う使用）に基づいて選択される。また、いくつかの例において、マスターパターン518は、構成可能又は再構成可能であり、レーザアブレーション・ステーション514がベース基板508上に異なるパターンを形成することを可能にする。付加的に又は代替的に、いくつかの例において、マスク516を1つ又はそれより多くの代替的マスクで置き換えることが可能である。

【0236】

レーザアブレーション・ステーション514は、レンズ520を含む。ローラ（例えば第1のローラ502）の回転の結果としてベース基板508がレーザアブレーション・ステーション514に遭遇するとき、ベース基板508の部分522は、レンズ520の下を通り又はこれを通過する。部分522は、例えば、ベース基板508の面積より小さい面積を有し且つ導電性の第2の層512を含むベース基板508の矩形又は正方形の区域であり得る。レンズ520は、部分522に関連付けられた導電性の第2の層512上にマスターパターン518の少なくとも一部を結像又は投影する。レーザビーム524は、マスク516及びレンズ520を介して部分522上に導かれ、投影されたマスターパターン518に基づいてレーザビーム524が導電性の第2の層512に選択的に浸透するようになっている。いくつかの例において、非導電性の第1の層500又は部分（例えば非導電性の第1の層510の厚さの一部）もまた、投影されたマスターパターン518に基づいてレーザビーム524によって浸透され得る。マスク516の中実部分は、レーザビーム524をブロックし、マスク516の開放部分は、レーザビーム524がマスク516を通過してベース基板508に接触することを可能にする。レーザビーム524は、例えばエキシマレーザに関連付けることができる。

【0237】

レーザビーム524への露光の結果として、照射された部分522の非導電性の第1の層510は、レーザビーム524に関連したエネルギーを吸収する。照射された非導電性の第1の層510は、光化学的解離を受け、その結果、マスターパターン518に従って、非導電性の第1の層510の構造的結合の選択的崩壊、並びに、非導電性の第1の層510及び照射された非導電性の第1の層510に重なっている導電性の第2の層512の部分のフラグメントの放出が生じる。いくつかの例において、レーザビーム524がベース基板508に浸透する深さ（例えば放射強度）は、非導電性の第1の層510及び／又は導電性の第2の層512の深さ（例えば厚さ）に基づいて予め定められる。いくつかの例において、レーザビーム524の浸透深さは調節可能であり、レーザビーム524が導電性の第2の層512を下に重なった非導電性の第1の層510のフラグメント化の結果としてアブレーションする深さを変更する。いくつかの例において、この調整は、例示的なシステム500が動作するにつれて動的である。また、いくつかの例において、ベース基板508は、レーザビーム524への露光後にクリーニングを受けて、粒子及び／又は

表面混入物が除去される。

【0238】

図8に示すように、レーザアブレーション・ステーション514への露光の後、ベース基板508の部分522は、電極アレイ526を含む。電極アレイ526は、導電性の第2の層512内に形成された複数の電極で構成される。レーザビーム524への露光及び非導電性の第1の層510のフラグメント化の結果として、導電性の第2の層512の一部がベース基板508から除去される。電極アレイ526に関連した除去部分は、マスターパターン518に基づく。いくつかの例において、除去部分はマスク516の開放部分と一致する。

【0239】

図8に戻ると、部分522がレーザアブレーション・ステーション514においてレーザアブレーションを受けて、電極アレイ526を形成した後、部分522は、第1から第3までのローラ502、504、506の回転によってプリンタ528まで移動される。第1の例示的な組立体500において、プリンタ528は、疎水性及び／又は誘電性を有する材料530の少なくとも1層を電極アレイ526に塗工することが可能な装置又は機器を含む。第1の例示的な組立体500において、プリンタ528は、疎水性及び／又は誘電性材料530を、ウェブベースのコーティング（例えば、プリンタ528に関連付けられたローラによる）、スロットーダイコーティング、スピンコーティング、化学蒸着、物理蒸着、及び／又は原子層堆積を含むがこれらに限定されない堆積技術によって堆積することができる。プリンタ528はまた、疎水性及び／又は誘電性材料530に加えて他の材料を塗工することもできる（例えば、防汚コーティング、抗凝固剤）。また、プリンタ528は、異なる厚さを有する、及び／又はベース基板508の異なる部分を被覆する材料の1つ又はそれより多くの層を塗工することもできる。

【0240】

上記のように、第1の例示的な組立体500において、第1から第3までのローラ502、504、506の少なくとも1つは、電極アレイ526への疎水性及び／又は誘電性材料530の塗工のためにベース基板508をプリンタ528まで前進させる。いくつかの例において、プリンタ528は、複数の位置合わせローラ531を含み、疎水性及び／又は誘電性材料530を例えばローラコーティング法により塗工する際のプリンタ528の動作の一部としてベース基板508の送り及び位置合わせの精度を助長する。

【0241】

第1の例示的な組立体500において、疎水性及び／又は誘電性材料530は、電極アレイ526に塗工されて、電極アレイ526を完全に又は実質的に完全に絶縁する。

【0242】

いくつかの例において、疎水性及び／又は誘電性材料530は、実質的に液体形態でプリンタ528によって堆積される。小滴を支持するための構造層又は被処理層532をベース基板508上に作り出すために、部分522は、ローラ（例えば、第1から第3までのローラ502、504、506）によって硬化ステーション534を通して移動される。硬化ステーション534において、疎水性及び／又は誘電性材料は、処理され及び／又は改質されて第1の被処理層532形成する。疎水性及び／又は誘電性材料を処理することは、材料を硬化することを含み得る。例えば、硬化ステーション534において、疎水性及び／又は誘電性材料530の硬質化を促進するために熱が印加される。いくつかの例において、部分522は、疎水性及び／又は誘電性材料530を硬化するために紫外線に露光されて、電極アレイ526を絶縁するための被処理層532を形成する。他の例において、疎水性及び／又は誘電性材料の硬化及び／又は改質は、熱及び／又は光子源を使わずに達成される。いくつかの例において、被処理層532は、小滴を操作するために（例えば電極アレイ526に関連して）電場が印加されたときに、小滴を支持する。例えば、エレクトロウェットティングプロセス中に、被処理層532上の小滴の表面張力に影響を及ぼす印加電圧の結果として、被処理層532に対する小滴の接触角が変化する。エレクトロウェットティングは、単なる例であり、小滴は他の力を用いて同様に移動され得る。

【0243】

硬化ステーション534を通過した後、部分522は、小滴アクチュエータ及び／又はデジタルマイクロ流体チップの下部基板として機能するように調製される。ベース基板508は、上記開示の通り、導電性の第2の層512に貼り合された非導電性の第1の層510を含んでいるので、例えば非導電性の第1の層510への電極アレイ526の更なる接着は必要とされない。かかる構成は、加工ステップを減らすことによって、小滴アクチュエータ用のベース基板508の調製の効率を高める。また、上記のように、部分522がレーザアブレーション・ステーション514、プリンタ528、又は硬化ステーション534のいずれか1つにあるとき、ベース基板508の他の部分は、第1の例示的な組立体500のそれぞれのステーション514、528、534のうちの他のところを通して同時に移動している。例えば、部分522が硬化ステーション534にあるとき、第1から第3までのローラ502、504、506は、ベース基板508の1つ又はそれより多くの他の部分を例えばレーザアブレーション・ステーション514及び／又はプリンタ528を通して、連続的、周期的、又は非周期的に前進させている。このようにして、小滴アクチュエータ用のベース基板508の調製が実質的に連続的な高速の自動化プロセスにより達成される。

10

【0244】

硬化ステップの後、パターンローラをベース基板の第2の部分の上で転動させて、ウェルのアレイ540が作り出される。アレイウェル540は、引き続き、親水性材料（図示せず）でコーティングされ得る。

20

【0245】

ベース基板508は、逐次的な部分を含んでいると考えることができるが、第1の例示的な組立体500のいくつかの例示的な動作の間、ベース基板508は、逐次的な部分が加工されて電極アレイ526が作られ（例えば電極パターンにより）、疎水性及び／又は誘電性材料530のコーティングを受けているとき、単一シートのままである。それゆえ、加工されたベース基板508を用いて1つ又はそれより多くの小滴アクチュエータを作るために、後でさらに開示するように、ベース基板508は、いくつかの例において、切断（例えば、ダイシング）されて、電極アレイ526を含む個々のユニットが形成される。いくつかの例において、ダイシングに先立って、部分522を含むベース基板508は、再度巻き取られて、第1のローラ502によって巻きを解かれる前のベース基板508の初期ロール構成に似たロール構成にされる。かかる再巻き取りは、ロール・ツー・ロール加工の一部として1つ又はそれより多くのローラにより達成することができる。かかる例において、ベース基板508は、後で、ダイシング又はその他の方法で切り離すことができる。他の例において、ローラ（例えば第2及び第3のローラ504、506）は、ベース基板508を上部基板との併合のために前進させる。

30

【0246】

図9は、単一電極を有する小滴アクチュエータの例示的な上部基板を作製するための第2の例示的な組立体600を示す。第2の例示的な組立体600は、第1のローラ602、第2のローラ604、及び第3のローラ606を含む一連の又は複数のローラを含み、これらは同期された回転で動作して、第2の例示的な組立体600を通して上部基板608を駆動させる。第2の例示的な組立体600は、第1から第3までのローラ602、604、606に加えて、組立体600を通して上部基板608を移動させるためのローラを含むことができる。

40

【0247】

第2の例示的な組立体600において、第1のローラ602が回転して上部基板608の巻きを解き、これはいくつかの例においてロール構成のシートである。図9の例示的な上部基板608は、第1の層610及び第2の層612を含む。例示的なベース基板508と同様に、この例において、上部基板608の例示的な第1の層610は、非導電性材料、例えばプラスチックなどを含み、例示的な第2の層612は、例えば金、クロム、銀、酸化インジウムスズ、又は銅及び／又は他の任意の好適な金属のうちの1つ又はそれよ

50

り多くを含む金属、導電性ポリマー、又は金属及び／若しくは導電性ポリマーの組合せなどの導電性材料を含む。いくつかの例において、導電性の第2の層612は、接着層（例えばクロム）を介して非導電性の第1の層に接着される。

【0248】

第2の例示的な組立体600において、第1から第3までのローラ602、604、606は、回転して、上部基板612をプリンタ614まで前進させる。プリンタ614は、導電性の第2の層612を疎水性及び／又は誘電性材料616（例えばTeflon（登録商標）若しくはパリレンC、又はセラミックなどの誘電体）でコーティングする。プリンタ614は、図8の第1の例示的な組立体500のプリンタ528と実質的に同様である。例えば、プリンタ614は、疎水性及び／又は誘電性材料616を、ウェブベースのコーティング、スロットダイコーティング、スピンコーティング、化学蒸着、物理蒸着、原子層堆積、及び／又は他の堆積技術によって上部基板608に堆積することができる。プリンタ614は、疎水性及び／又は誘電性材料616及び／又は他のコーティング材料の塗工中のプリンタ614に対する上部基板608の位置合わせを促進するために位置合わせローラ617を含み得る。

【0249】

疎水性及び／又は誘電性材料616のコーティングを受けた後、第2のローラ504及び第3のローラ506は、部分618を硬化ステーション620まで前進させる。図8の硬化ステーション534に関連して開示したように、第2の例示的な組立体600の硬化ステーション620は、疎水性材料の改質（例えば硬化）を熱により促進して、被処理層622を形成する。被処理層622は、導電性の第2の層612を完全に又は実質的に完全に被覆することによって、上部基板608の単一電極として機能する導電性の第2の層612を絶縁する。それゆえ、部分618の第2の層612のコーティングにおいて、上部基板608の電位導電部分は、この部分618を含む小滴アクチュエータに付与され得る小滴から絶縁される。

【0250】

硬化ステーション620を通過した後、部分618は、小滴アクチュエータの上部基板として機能するように調製される。上部基板608は、導電性の第2の層612に予め貼り合された非導電性の第1の層610を含んでいるので、例えば非導電性の第1の層610への電極の更なる接着は必要とされず、それにより小滴アクチュエータ用の上部基板608の調製の効率を高める。

【0251】

第2の例示的な組立体600において、第1から第3までのローラ602、604、606は、回転して、上部基板の各部分が第2の例示的な組立体600のロール・ツー・ロール動作の一部としてプリンタ614又は硬化ステーション620のうちの1つを実質的に連続的、周期的、及び／又は非周期的な継続で通過するように上部基板608を前進させる。それゆえ、第2の例示的な組立体600は部分618との関連で説明されているが、上部基板608の逐次的な部分が、第1から第3までのローラ602、604、606の回転の結果として部分618と実質的に同様の様式で調製されることを理解されたい。このようにして、上部基板308に、上部基板608の長さに沿って被処理層622が設けられる。

【0252】

例示的な上部基板608において、導電性の第2の層612は、電極として機能する。しかしながら、いくつかの例において、導電性の第2の層612は、レーザアブレーションを受けて1つ又はそれより多くの電極アレイを形成する。かかる例において、第2の例示的な組立体600は、レーザアブレーション・ステーションを含む。それゆえ、疎水性材料616を受ける前に、上部基板608は、レーザビームに露光され、それにより照射された導電性の第2の層612に電極パターンが形成される。また、いくつかの例において、電極アレイは、ベース基板上／内には形成されず、上部基板608上／内のみ形成される。

10

20

30

40

50

【0253】

第2の例示的な組立体600の動作中、上部基板608の逐次的な部分が疎水性材料616でコーティングされているとき、上部基板は単一シートのままである。1つ又はそれより多くの小滴アクチュエータの製作の一部として、上部基板608は、ベース基板と位置合わせされる。いくつかの例において、硬化ステーション620を通過した後、上部基板は、1つ又はそれより多くのローラにより再度巻き取られてロール構成にされる。かかる例において、仕上がったロールをダイシング又はその他ので切断及び／又は分離して個々のユニットにすることができ、これをベース基板の個々のユニットと離間した距離で位置合わせして貼り合わせて、小滴アクチュエータが作られる。

【0254】

他の例において、硬化ステーション620を通過した後、ローラ（例えば、第1から第3までのローラ602、604、606）は、上部基板608を前進させ続けて、自動化されたロール・ツー・ロール加工により、上部基板608をベース基板と併合する。かかる例において、上部基板608をベース基板508と位置合わせするように準備するために、第1から第3までのローラ602、604、606は、回転して、ベース基板508と上部基板608とが平行構成で位置合わせされたときにベース基板の被処理層が上部基板608の被処理層622と対面するように上部基板の向きをベース基板に対して逆向きにする。

【0255】

図10に示すように、第3の例示的な組立体650は、一对の併合ローラを形成する第3のローラ656及び第4のローラ608を含み、そこに、ベース基板508及び上部基板608がそれぞれ第3の例示的な組立体650の第1のローラ652及び第2のローラ654により送られる。併合ローラ656、658の各々が回転するにつれて、ベース基板658及び上部基板658が、所定の離間距離、又は間隙で、平行構成で位置合わせされる。

【0256】

例示的な第3の組立体650は、ボンディング・ステーション664を含む。ボンディング・ステーション664は、小滴アクチュエータの製作の一部として、ベース基板508と上部基板608とを接合し、又は貼り合わせる。例えば、ボンディング・ステーション664において、1つ又はそれより多くの接着剤をベース基板508及び／又は上部基板608の所定部分（例えば、得られる小滴アクチュエータの外周を定めるベース基板508及び／又は上部基板608の部分）に選択的に塗工して、間隙662を保ちながら、ベース基板508と上部基板608との間に結合部を作り出すことができる。いくつかの例において、ボンディング・ステーション664において基板508、608を貼り合わせることは、（例えば、接着剤の塗工に先立って）間隙662を形成することを含む。

【0257】

ボンディング・ステーション664において使用し得る接着剤の例には、エポキシ、箔、テープ、及び／又は紫外線硬化型接着剤が含まれる。いくつかの例において、SU-8及び／又はポリジメチルシロキサン（PDMS）などのポリマーの層をベース基板508及び／又は上部基板608に塗工して、基板を貼り合わせる。また、いくつかの例において、ボンディング・ステーション664は、例えば紫外線による、接着剤の硬化を提供する。ボンディング・ステーション664は、もう1つの、例えば熱（例えば、熱ボンディング）、圧力、硬化等を伴う方法を適用して、ベース基板658と上部基板608とを貼り合わせることができる。

【0258】

例示的な第3の組立体650において、図10において併合部分660によって実質的に表されているように、併合部分660を選択的に切断、ダイシング又はその他の方法で分離して、1つ又はそれより多くの小滴アクチュエータを形成することができる。例示的な第3の組立体650は、ダイシング・ステーション666を含む。ダイシング・ステーション666は、例えば、切断装置、スプリッタ、又はより一般的には、連続的な併合部

分 6 6 0 を分割して個々の小滴アクチュエータに対応する離散的なユニットにするための機器であり得る。併合部分 6 6 0 は、例えば各小滴アクチュエータが電極パターンによって形成された電極アレイのフットプリント及びその他の電極を含むように電極パターンに基づいて切断されて、個々の小滴アクチュエータにされる。

【0259】

図 1 1 A は、第 1 の部分 7 3 及び第 2 の部分 7 4 内に電極のアレイが存在する下部基板 7 0 の平面図を示す。第 2 の部分上にウェルのアレイを製作するステップ 7 1 の後の下部基板 7 2 が示されている。図 1 1 B は、電極のアレイが第 1 の部分 8 3 にのみ配置された下部基板 8 0 の平面図を示す。ウェルのアレイが第 2 の部分 8 4 内に形成されるステップ 8 1 の後の下部基板 8 2 が示されている。

10

【0260】

ウェルアレイは、誘電性／疎水性層、疎水性層（存在する場合）、又は親水性層（存在する場合）上に製作することができる。第 1 の基板の疎水性層上にウェルアレイを製作するための 1 つの例示的な方法は、熱的又は紫外線ナノインプリントリソグラフィを使用する。図 1 2 A は、平坦なナノインプリント型 7 7 0 を利用して、第 1 の基板 7 1 0 の第 2 の部分における疎水性層 7 5 0 にウェルアレイ 7 6 0 のパターンを形成するために十分な圧力をかけることによってウェルアレイを製作するための 1 つの例示的な方法を示す。この例において、ナノインプリント・スタンプは、そのスタンピング輪郭が第 2 の層の上面に対応する平坦なスタンピング要素とすることができる。

【0261】

図 1 2 B は、第 1 の基板の第 2 の部分の疎水性層にウェルアレイのパターンを施工するのにナノインプリントローラ 7 7 5 を利用し得る、別の例示的な方法を示す。ナノインプリントローラは、ローラ 7 7 5 を一方向に前進させることによって第 1 の基板 7 1 0 の疎水性層 7 5 0 上にパターンをインプリントすることができる。ローラが一方向に前進するにつれて、ローラは、ローラ上のインプリントパターンに対応するウェルアレイ 7 6 0 のパターンのインプリントを背後に残す。1 つの例において、ローラ 7 7 5 は、ローラ 7 7 5 が第 1 の基板 7 1 0 の疎水性層 7 5 0 上にパターンをインプリントするにつれて反時計回り方向に転動する。ローラ又はスタンプを変更して好適な容積のウェルを形成することができること、例えばフェムトリットルのウェルを形成するためにフェムトリットルのローラ又はスタンプを使用し得ることを理解されたい。

20

30

【0262】

図 1 2 C は、第 1 の基板の第 2 の部分の疎水性層にウェルアレイのパターンを形成する、別の例示的な方法を示す。この例において、レーザを適用して、疎水性層 7 5 0 の上面をアブレーションすることができる。レーザアブレーションステップは、第 2 の層上にウェルアレイ 7 6 0 のパターンを生成することができる。第 2 の層をアブレーションするのに適したレーザのいくつかの例は、フェムト秒及びピコ秒レーザのパラメータを含む。いくつかの例において、レーザアブレーションステップは、必要とされるウェルアレイパターンを定めるための特別なマスクの使用を含む。いくつかの例において、レーザ 7 7 5 は、合焦要素 7 7 7 （例えばレンズ）を利用して、パターンを正確に標的化してアブレーションする。いくつかの例において、レーザアブレーションステップの後で、ウェルアレイを誘電性及び／又は疎水性層でコーティングすることができる。

40

【0263】

図 1 2 D は、第 1 の基板 7 1 0 の第 2 の部分の誘電性層 7 4 0 上にウェルアレイ 7 6 0 のパターンを形成する更に別の例を示す。図 1 2 D に示すように、この方法は、ロール・ツー・ロール製作を利用して、マイクロ流体構成要素とウェルアレイとを別々に製作する。1 つの例において、第 1 のロール 7 2 5 は、マイクロ流体構成要素を収め、これは第 1 の基板 7 1 0 を含み、第 1 の基板は、一連の又は複数の電極 7 4 5 と、一連の又は複数の電極 7 4 5 を被覆する、第 1 の基板の上面の上に配置された誘電性層 7 4 0 とを含む。第 2 のロール 7 8 0 は、基板上に既に含められたウェルアレイ 7 6 0 のパターンを有する基板 7 5 0 を収める。いくつかの例において、基板 7 5 0 上に予め含められたウェルアレイ

50

760のパターンは、熱的又はUVナノインプリントリソグラフィを通じて施工され得る。他の例において、ウェルアレイのパターンは、レーザアブレーションを通じて基板上に予め含めることができる。図12Dに示すように、インプリントされた第2のロール780は、ウェルアレイの基板上にインプリントされた疎水性コーティングを含むこともできる。別々のロールは、ローラ705及び708により巻きを解かれ、次いでラミネーションプロセスに供され、ここでウェル基板をマイクロ流体構成要素の上に重ね合わせることで、2つのフィルムが互いに積層されて、ウェルアレイとマイクロ流体構成要素とのスタック構成が形成される。

【0264】

本明細書で記載する場合、「ロール・ツー・ロール」は、同義の用語「リール・ツー・リール」を包含し、種々の構成要素を通して、基板を高速（例えば、毎秒数メートルの速度を含む）で移動させることによって動作する。ロール・ツー・ロール組立体は、ロール状基板の巻きを解くこと、構成要素を通る基板の前進、及び加工された基板を再度巻き取ってロールにすることを促進する。

【0265】

前述のように、第1及び第2の基板の第2の部分によって形成された検出モジュールは、検体関連シグナルを検出するために用いられる。いくつかの例において、対象の検体又は生物学的サンプルの検出は、光学的シグナル検出を通じて行うことができる。例えば、シグナル強度結果を測定するために、励起光（例えばレーザ）を照射する。他の例において、所望の検体は、各ウェルチャンバから発する光学的シグナルを測定することによって検出することができ、結果を定量化することによって定量することができる。例えば、デジタル分析により、陽性カウント（例えばウェル）の数が陰性カウント（例えばウェル）の数と比較される。デバイスのウェルからの種々のシグナルを検出することができる。例示的なシグナルは、蛍光、化学発光、比色、比濁等を含む。

【0266】

本明細書で記載するデバイスを用いて、検体関連シグナルを生成し、シグナルを定量化することができる。例示的な方法を図15に示す。図15のデバイスは、電極のアレイ81を有する上部基板80を含む。上部基板は、デバイスの第2の部分内にウェルのアレイ83を含む下部基板82から離間するように位置決めされる。粒子若しくはビーズ又は検体分子（図示せず）を含有する小滴84を、電極81を用いてウェルのアレイ83へ移動させることができる。粒子又はビーズ又は検体分子がウェル内に移動するのに十分な時間の後で、小滴84を廃棄チャンバ／吸収パッド及びそれに類したものへ移動させることができる。次いでバッファ85の小滴をウェルのアレイへ移動させて、ウェル内に堆積されなかった粒子又はビーズがあればこれを除去することができる。いくつかの事例において、バッファ小滴は、小滴84を廃棄チャンバまで押しやることのできる。不混和性流体86の小滴をウェルのアレイの上で移動させて、ウェルをシールすることができる。ウェルの光学的照合の前に、過剰の小滴86を除去することができる。

【0267】

図16は、デジタルマイクロ流体電極（例えば電極145）が粒子／ビーズ又は検体分子190を含む小滴180をウェルのアレイ160の上に位置決めする方法を示す。粒子／ビーズ／検体分子がウェル内に堆積するのに十分な時間の後で、小滴は、不混和性液体195（又は本明細書で説明されるような不混和性液体）の小滴によって置換される。不混和性液体の小滴は、小滴180をウェル内に堆積しなかったビーズ／粒子／検体分子と共に移動させてウェルから遠ざけ、且つウェルを被覆するように機能する。

【0268】

図17は、ウェル内に堆積しなかったビーズを除去するための別の方法を示す。図17において、ビーズを含有する小滴の除去後に、多くのビーズ190がウェルの上に残っている。これらのビーズは、水滴185を用いて洗い流される。水滴の除去後、ウェルのアレイは、堆積したビーズを収容している。次いで不混和性流体195をウェルのアレイの上で移動させて、ウェルをシールする。

10

20

30

40

50

【0269】

ウェルのアレイの上に位置決めされた小滴からウェル内への粒子／ビーズの移動を促進するために多数の力を利用し得る。かかる力には、重力、電気力、磁気力等が含まれる。永久磁石又は電磁石を磁気力源として使用することができる。特定の実施形態において、磁石は、集積マイクロ流体及び検出チップ上に配置されない。検体分子は、拡散によりウェル内に堆積され得る。

【0270】

方法及びデバイスの使用についての変形

開示される、サンプル中に存在する対象検体の存在又は量を判定する方法、及びマイクロ流体デバイスの使用は、上述の通りであり得る。上記方法及び開示されるマイクロ流体デバイスの使用は、検体を分析するための他の方法を考慮して適合させることもできる。周知の変形の例には、サンドイッチイムノアッセイ（例えば、酵素検出（酵素イムノアッセイ（EIA）又は酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）を含む、モノクローナルポリクローナルサンドイッチイムノアッセイ）、競合阻害イムノアッセイ（例えば、正（forward）及び逆（reverse））、酵素増幅イムノアッセイ法（EMIT）、競合結合アッセイ、生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）、ワンステップ抗体検出アッセイ、均一アッセイ、不均一アッセイ、オンザフライ捕捉アッセイ等のようなイムノアッセイが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実例において、以下の記載は上述の方法と重複し得る。他の実例においては、以下の記載は代替法を提供し得る。

【0271】

イムノアッセイ

対象検体及び／又はペプチド又はその断片は、イムノアッセイを使用して分析することができる。任意のイムノアッセイを利用することができる。イムノアッセイは、例えば、酵素結合イムノアッセイ（ELISA）、競合阻害アッセイ（正の競合阻害アッセイ又は逆の競合阻害アッセイなど）、又は競合結合アッセイであり得る。いくつかの実施形態において、検出可能標識（例えば、1つ又はそれより多くの蛍光標識、切断可能なリンカー（化学的に又は光切断によって切断されることができる）によって付着した1つ又はそれより多くのタグ）を捕捉抗体及び／又は検出抗体へ付着させる。

【0272】

不均一形式を使用することができる。例えば、試験サンプルが被験体から得られた後、第1の混合物が調製される。上記混合物は、対象検体について評価される試験サンプルと第1の特異的結合パートナーとを含有し、第1の特異的結合パートナーと試験サンプル中に含有されている対象検体とが、第1の特異的結合パートナー-対象検体複合体を形成する。好ましくは、第1の特異的結合パートナーは、抗対象検体抗体又はその断片である。混合物を形成するために試験サンプル及び第1の特異的結合パートナーが添加される順序は重要ではない。好ましくは、第1の特異的結合パートナーは固相上に固定化される。イムノアッセイにおいて使用される固相（第1の特異的結合パートナー及び随意に第2の特異的結合パートナーのための）は、磁気粒子、ビーズ、ナノビーズ、マイクロビーズ、ナノ粒子、マイクロ粒子、膜、足場分子、フィルム、ろ紙、ディスク、又はチップ（例えばマイクロ流体チップ）などであるがこれらに限定されない、当技術分野において公知の任意の固相であり得る。

【0273】

第1の特異的結合パートナー-対象検体の複合体を含有する混合物が形成された後、未結合の対象検体があれば、これは当技術分野において公知の任意の技法を使用して複合体から除去される。例えば、未結合の対象検体は、洗浄によって除去することができる。しかしながら、望ましくは、第1の特異的結合パートナーは、試験サンプル中に存在する対象検体より過剰に存在し、その結果、試験サンプル中に存在するすべての対象検体は第1の特異的結合パートナーによって結合される。

【0274】

未結合の対象検体が除去された後、第2の特異的結合パートナーが混合物へ添加され、

第1の特異的結合パートナー対象検体—第2の特異的結合パートナーの複合体を形成する。第2の特異的結合パートナーは、好ましくは、第1の特異的結合パートナーによって結合される対象検体上のエピトープとは異なる対象検体上のエピトープへ結合する、抗対象検体（抗体など）である。更に、同様に好ましくは、第2の特異的結合パートナーは、検出可能標識（例えば、検出可能標識、切断可能なリンカーによって付着されたタグ、等）により標識されているか又は検出可能標識を含有する。

【0275】

固定化された抗体又はその断片の使用をイムノアッセイに組み込むことができる。抗体は、磁性マトリックス粒子又はクロマトグラフマトリックス粒子、ラテックス粒子又は修飾表面ラテックス粒子、ポリマー又はポリマーフィルム、プラスチック又はプラスチック

10

【0276】

サンドイッチイムノアッセイ

サンドイッチイムノアッセイは、2層の抗体（すなわち捕捉抗体（すなわち少なくとも1つの捕捉抗体）及び検出抗体（すなわち少なくとも1つの検出抗体））の間の抗原の量を測定する。捕捉抗体及び検出抗体は、抗原、例えば対象検体上の異なるエピトープへ結合する。望ましくは、捕捉抗体のエピトープへの結合は、検出抗体のエピトープへの結合を妨害しない。モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれかを、サンドイッチイムノアッセイにおける捕捉抗体及び検出抗体として使用することができる。

20

【0277】

一般に、少なくとも2つの抗体を用いて、試験サンプル中の対象検体を分離及び定量化する。より具体的には、上記少なくとも2つの抗体は、対象検体又は対象検体断片の特定のエピトープへ結合して、「サンドイッチ」と称される免疫複合体を形成する。試験サンプル中の対象検体を捕捉するために1つ又はそれより多くの抗体（これらの抗体は「捕捉」抗体（単数又は複数）と称されることが多い）を使用することができ、サンドイッチを完了するために、同様に対象検体に結合する、検出可能標識（例えば、蛍光標識、切断可能なリンカーによって付着されたタグ等）を有する1つ又はそれより多くの抗体（これらの抗体は「検出」抗体（単数又は複数）と称されることが多い）を使用することができる。いくつかの実施形態において、アプタマーを第2の結合メンバーとして使用することができる。サンドイッチアッセイにおいて、抗体のそのエピトープへの結合は、アッセイ中の他の抗体のそのそれぞれのエピトープへの結合によって低減されないことが望ましい。換言すれば、抗体は、対象検体を含有する疑いのある試験サンプルと接触させる1つ又はそれより多くの第1の抗体が、第2の抗体又は後続の抗体によって認識されるエピトープの全部又は一部へ結合することによって1つ又はそれより多くの第2の検出抗体が対象検体へ結合する能力を妨害することのないように、選択される。

30

【0278】

1つの実施形態において、対象検体を含有する疑いのある試験サンプルは、少なくとも1つの捕捉抗体及び少なくとも1つの検出抗体と、同時に又は逐次的に接触させることができる。サンドイッチアッセイ形式において、対象検体（膜結合性対象検体、可溶性対象検体、膜結合性対象検体の断片、可溶性対象検体の断片、対象検体（膜結合性又は可溶性対象検体）の変異体、又は任意のその組合せなど）を含有する疑いのある試験サンプルを、最初に、抗体—対象検体の複合体の形成を可能にする条件下で、特定のエピトープへ特異的に結合する少なくとも1つの捕捉抗体と接触させる。1つより多くの捕捉抗体が使用される場合、多重の捕捉抗体—対象検体複合体が形成される。サンドイッチアッセイにおいて、抗体、好ましくは少なくとも1つの捕捉抗体は、試験サンプル中の対象検体又は対象検体断片の予想される最大量に対してモル過剰量で使用される。

40

【0279】

随意に、試験サンプルに少なくとも1つの第1の捕捉抗体を接触させる前に、少なくとも1つの捕捉抗体を、試験サンプルからの抗体—対象検体複合体の分離を促進する固体支

50

持体へ結合させることができる。当技術分野において公知の任意の固体支持体を使用することができ、平面基板又はビーズの形状でポリマー材料から作られる固体支持体、及びそれに類したものが含まれるが、これらに限定されない。抗体（単数又は複数）は、吸着によって、化学カップリング剤を用いた共有結合によって、又は当技術分野において公知の他の手段によって、固体支持体へ結合することができるが、但し、かかる結合は、抗体が対象検体又は対象検体断片を結合する能力を妨害しないことを前提とする。更に、必要であるならば、固体支持体は、抗体上の様々な官能基との反応性を可能にするように誘導体化され得る。かかる誘導体化は、マレイン酸無水物、N-ヒドロキシスクシンイミド、アジド、アルキニル、及び1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどであるがこれらに限定されない、特定のカップリング剤の使用を必要とする。

10

【0280】

対象検体を含有する疑いのある試験サンプルを少なくとも1つの捕捉抗体と接触させた後に、試験サンプルは、捕捉抗体（単数又は複数）-対象検体複合体の形成を可能にするためにインキュベーションされる。インキュベーションは、約4.5から約10.0までのpHで、約2℃から約45℃までの温度で、少なくとも約1分から約18時間、約2～6分間、又は約3～4分間の時間にわたって行うことができる。

【0281】

捕捉抗体（単数又は複数）-対象検体複合体の形成後、次いで複合体を少なくとも1つの検出抗体と接触させる（捕捉抗体（単数又は複数）-対象検体-検出抗体（単数又は複数）複合体の形成を可能にする条件下で）。捕捉抗体-対象検体複合体を1つより多くの検出抗体と接触させる場合、捕捉抗体（単数又は複数）-対象検体-検出抗体（単数又は複数）検出複合体が形成される。捕捉抗体の場合と同様に、少なくとも1つの検出（及び後続の）抗体を捕捉抗体-対象検体複合体と接触させるとき、捕捉抗体（単数又は複数）-対象検体-検出抗体（単数又は複数）の複合体の形成のために上記と同様の条件下でインキュベーション期間が必要とされる。好ましくは、少なくとも1つの検出抗体は、検出可能標識（例えば、蛍光標識、切断可能なリンカーによって付着されたタグ等）を含有する。検出可能標識は、捕捉抗体（単数又は複数）-対象検体-検出抗体（単数又は複数）複合体の形成の前に、それと同時に、又はその後で、少なくとも1つの検出抗体へ結合され得る。当技術分野において公知の任意の検出可能標識、例えば本明細書において論じられるような蛍光標識、切断可能なリンカー、及び当技術分野において公知の他のものを使用することができる。

20

30

【0282】

アッセイ用の混合物を形成するために試験サンプル及び特異的結合パートナーが添加される順序は重要ではない。第1の特異的結合パートナーが検出可能に標識される（例えば、蛍光標識、切断可能なリンカーにより付着されたタグ等）場合、検出可能標識された第1の特異的結合パートナー-対象検体の複合体を形成する。あるいは、第2の特異的結合パートナーが使用され、第2の特異的結合パートナーが検出可能に標識される（例えば、蛍光標識、切断可能なリンカーにより付着されたタグ等）場合、第1の特異的結合パートナー-対象検体-第2の特異的結合パートナーの検出可能に標識された複合体を形成する。未結合の特異的結合パートナーがあれば、標識されている又は標識されていないにかかわらず、これを当技術分野において公知の洗浄などの任意の技法を使用して、混合物から除去することができる。

40

【0283】

次に、対象検体又はその断片の存在の指標であるシグナルが生成される。生成されたシグナルのパラメータに基づいて、サンプル中の対象検体の量を定量化することができる。随意に、対象検体の系列希釈又は既知の濃度の溶液を用いて、質量分光法、重量法、及び当技術分野において公知の他の技法によって、標準曲線を作成することができる。

【0284】

本明細書において、生物学的サンプル中に存在する対象検体を測定又は検出するための方法が提供される。かかる方法において、対象の標的検体を含有するサンプル小滴を、サ

50

ンプル中に存在する対象の標的検体と特異的に結合する第1の特異的結合パートナーが付着したビーズ（磁気ビーズなど）を含有する小滴と併合することができる。併合により単一小滴を作製し、これを、第1の特異的結合パートナーをサンプル小滴中に存在する対象検体へ結合させるのに十分な時間にわたってインキュベーションすることができる。随意に、単一小滴を攪拌して、サンプルと第1の特異的結合パートナーとの混合を促進することができる。混合は、単一小滴を前後に動かすこと、単一小滴を複数の電極の上であちこち動かすこと、小滴を分割し、次いで小滴を併合すること、又はSAWを用いること、及びそれに類することによって達成することができる。次いで、単一小滴に磁気力をかけて、ビーズをデバイス内の所定位置に保持することができる、その一方で小滴を廃棄チャンバ又はパッドへと移動させて遠ざけ、第2の結合メンバーを含有する小滴で置き換えることができる。第2の特異的結合パートナーは、検出可能に標識され得る。標識は、光学的に検出することができる任意の標識であり得る。例えば、標識は、蛍光標識であり得る。第2の結合メンバーの添加の前に、随意の洗浄ステップを、ビーズが例えば磁気などの力を用いて保持されている位置に洗浄バッファの小滴を移動させることによって行うことができる。ビーズは、洗浄バッファ内に再懸濁されてもよく、されなくてもよい。磁気ビーズが用いられている場合、磁気力を磁気ビーズに印加することができ、洗浄バッファは、廃棄位置へ輸送される。第1の結合メンバーに結合した対象検体に第2の特異的結合パートナーが結合するのに十分な時間の後で、第2の特異的結合パートナーを含有する小滴を移動させて遠ざけることができ、その間、ビーズはその位置に保持される。ビーズは、洗浄バッファの小滴を用いて洗浄され得る。洗浄ステップの後、第1の結合メンバーと対象検体と第2の結合パートナーとの複合体を有する標識されたビーズを含有する小滴を、検出モジュールの上へ移動させることができる（磁気ビーズが使用されている場合には、磁気力を除去することなどによる）。本明細書で説明されるように、イムノアッセイは、サンプル調製モジュール内で実行することができる。標識されたビーズは、検出モジュール内でウェルのアレイの中に沈降させることができる。ビーズは、重力を用いて、又は電気力若しくは磁気力を印加することによって、沈降し得る。ウェルの内部に位置していないビーズがあればそれを除去する洗浄ステップの後で、ウェルは、疎水性液体を用いてシールされ得る。

10

20

【0285】

正の競合阻害

30

正の競合形式において、既知の濃度の標識された対象検体（例えば、蛍光標識、切断可能なリンカーにより付着されたタグを有する検体等）のアリコートが用いられ、対象検体抗体への結合に関して試験サンプル中の対象検体と競合する。

【0286】

正の競合アッセイにおいて、固定化された特異的結合パートナー（抗体など）を、試験サンプルと、標識された対象検体、対象検体断片、又はその対象検体変異体とに、逐次的に又は同時に接触させることができる。対象検体ペプチド、対象検体断片、又は対象検体変異体は、任意の検出可能標識（切断可能なリンカーにより付着されたタグからなる検出可能標識が含まれる）で標識することができる。このアッセイにおいて、抗体は固体支持体上へ固定化することができる。あるいは、抗体は、マイクロ粒子又は平面基板などの固体支持体上に固定化された抗動物種抗体（*antisppecies antibody*）などの抗体ヘカップリングすることができる。

40

【0287】

本明細書において、生物学的サンプル中に存在する対象検体を測定又は検出するための方法が提供される。かかる方法において、対象の標的検体を含有するサンプル小滴を、サンプル中に存在する対象の標的検体と特異的に結合する第1の特異的結合パートナーが付着したビーズと、検出可能標識（蛍光標識など）で標識された検体とを含有する、小滴と併合することができる。随意に、単一小滴を攪拌して、サンプルと、第1の特異的結合パートナー及び標識された検体との混合を促進することができる。混合は、単一小滴を前後に動かすこと、単一小滴を複数の電極の上であちこち動かすこと、小滴を分割し、次いで

50

小滴を併合すること、又はSAWを用いること、及びそれに類することによって達成することができる。次いで、単一小滴に力（磁気力など）をかけて、ビーズをデバイス内の所定位置に保持することができ、その一方で小滴を廃棄チャンバ又はパッドへと移動させて遠ざけ、第2の結合メンバーを含有する小滴で置き換えることができる。随意的洗浄ステップを、ビーズが磁気力を用いて保持されている位置へ洗浄バッファの小滴を移動させることによって行うことができる。ビーズは、洗浄バッファ内に再懸濁されてもよく、されなくてもよい。力（磁気ビーズが用いられている場合には磁気力など）がビーズに印加され、洗浄バッファは、廃棄位置へ輸送される。第1の特異的結合パートナーが対象検体に結合するのに十分な時間の後で、小滴を移動させて遠ざけることができ、その間、ビーズはその位置に保持される。随意的洗浄ステップの後、第1の結合メンバーと対象検体との複合体を有する標識されたビーズを含有する小滴を検出モジュールの上へ移動させることができる（磁気ビーズが用いられている場合に磁気力を除去することなどによる）。本明細書で説明されるように、イムノアッセイは、サンプル調製モジュール内で実行することができる。標識されたビーズは、検出モジュール内のウェルのアレイの中に沈降させることができる。ビーズは、重力を用いて、又は、力、例えば電気力若しくは磁気力を印加することによって、沈降し得る。ウェルの内部に位置していないビーズがあればそれを除去する洗浄ステップの後で、ウェルは、疎水性液体を用いてシールされ得る。

【0288】

標識された対象検体、試験サンプル、及び抗体は、サンドイッチアッセイ形式に関して上記で説明したのと同様の条件下でインキュベーションされる。このとき抗体－対象検体複合体の2つの異なる種が生成され得る。具体的には、生成された抗体－対象検体複合体のうちの一方は検出可能標識（例えば蛍光標識等）を含有するのに対し、他方の抗体－対象検体複合体は検出可能標識を含有しない。抗体－対象検体複合体は、検出可能標識の定量化の前に試験サンプルの残りから分離することができるが、必須ではない。抗体－対象検体複合体が試験サンプルの残りから分離されるかどうかにかかわらず、次いで抗体－対象検体複合体中の検出可能標識の量が定量化される。次いで、試験サンプル中の対象検体（膜結合性対象検体、可溶性対象検体、可溶性対象検体の断片、対象検体（膜結合性又は可溶性対象検体）の変異体、又はそれらの任意の組合せなど）の濃度を、例えば上述のように求めることができる。

【0289】

逆の競合アッセイ

逆の競合アッセイにおいて、固定化された対象検体を、試験サンプル及び少なくとも1つの標識抗体と逐次的に又は同時に接触させることができる。

【0290】

本明細書において、生物学的サンプル中に存在する対象検体を測定又は検出するための方法が提供される。かかる方法において、対象の標的検体を含有する含むサンプル小滴を、サンプル中に存在する対象の標的検体と特異的に結合する、検出可能標識（例えば蛍光標識、酵素標識等）で標識された第1の特異的結合パートナーと、対象検体が付着したビーズとを含有する小滴と併合することができる。併合により単一の小滴を作製し、これを、第1の特異的結合パートナーをサンプル小滴中に存在する対象検体へ結合させるのに十分な時間にわたってインキュベーションすることができる。随意的に、単一小滴を攪拌して、サンプルと第1の特異的結合パートナーとの混合を促進することができる。混合は、単一小滴を前後に動かすこと、単一小滴を複数の電極の上であちこち動かすこと、小滴を分割し、次いで小滴を併合すること、又はSAWを用いること、及びそれに類することによって達成することができる。次いで、単一小滴に磁気力をかけて、ビーズをデバイス内の所定位置に保持することができ、その一方で小滴を廃棄チャンバ又はパッドへと移動させて遠ざけ、第2の結合メンバーを含有する小滴で置き換えることができる。随意的洗浄ステップを、ビーズが磁気力を用いて保持されている位置へ洗浄バッファの小滴を移動させることによって行うことができる。ビーズは、洗浄バッファ内に再懸濁されてもよく、されなくてもよい。磁気ビーズに磁気力が印加され、洗浄バッファは、廃棄位置へ輸

送される。結合された対象検体に第1の特異的結合パートナーが結合するのに十分な時間の後で、磁気力を除去することができ、第1の結合メンバーと対象検体との複合体を有する標識されたビーズを含有する小滴を検出モジュールの上へ移動させることができる。本明細書で説明されるように、イムノアッセイは、サンプル調製モジュール内で実行することができる。標識されたビーズは、検出モジュール内のウェルのアレイの中に沈降させることができる。ビーズは、重力を用いて、又は電気力若しくは磁気力を印加することによって、沈降し得る。ウェルの内部に位置していないビーズがあればそれを除去する洗浄ステップの後で、ウェルは、疎水性液体を用いてシールされ得る。

【0291】

対象検体は、サンドイッチアッセイ形式に関して上で論じた固体支持体のような固体支持体へ結合され得る。

【0292】

固定化された対象検体、試験サンプル、及び少なくとも1つの標識抗体は、サンドイッチアッセイ形式に関して上記で説明したのと同様の条件下でインキュベーションされる。このとき2つの異なる種の対象検体-抗体複合体が生成される。具体的には、生成された対象検体-抗体複合体のうちの一方は固定化されており、検出可能標識（例えば蛍光標識等）を含有するのに対し、他方の対象検体-抗体複合体は固定化されておらず、検出可能標識を含有する。非固定化対象検体-抗体複合体及び試験サンプルの残りは、当技術分野において公知の洗浄などの技法により、固定化対象検体-抗体複合体の存在から除去される。ひとたび非固定化対象検体-抗体複合体が除去されると、次いで固定化対象検体-抗体複合体中の検出可能標識の量が、タグの切断に続いて定量化される。次いで試験サンプル中の対象検体の濃度を、上述のように検出可能標識の量を比較することによって求めることができる。

【0293】

ワンステップイムノアッセイ又は「オンザフライ捕捉」

オンザフライ捕捉イムノアッセイにおいて、固体基板は固定化剤により事前コーティングされる。捕捉剤、検体及び検出剤を固体基板へ一緒に添加し、続いて検出に先立って洗浄ステップを行う。捕捉剤は検体を結合することができ、且つ固定化剤のためのリガンドを含む。捕捉剤及び検出剤は、本明細書において記載されるような又は当技術分野において公知の、捕捉又は検出が可能な抗体又は任意の他の部分であり得る。リガンドはペプチドタグを含むことができ、固定化剤は抗ペプチドタグ抗体を含むことができる。あるいは、リガンド及び固定化剤は、オンザフライ捕捉アッセイのために用いられるように互いに結合可能な任意のペアの薬剤（例えば特異的結合ペア、及び当技術分野において公知の他のものなど）であり得る。1つより多くの検体を測定することができる。いくつかの実施形態において、固体基板は抗原によりコーティングすることができ、分析される検体は抗体である。

【0294】

特定の実施形態において、ワンステップイムノアッセイ又は「オンザフライ捕捉」において、固定化剤（例えばビオチン、ストレプトアビジン等）によりあらかじめコーティングされた固体支持体（マイクロ粒子など）並びに少なくとも第1の特異的結合メンバー及び第2の特異的結合メンバー（これらはそれぞれ捕捉試薬及び検出試薬として機能する）が使用される。第1の特異的結合メンバーは、固定化剤に対するリガンドを含み（例えば、固体支持体上の固定化剤がストレプトアビジン（streptavidin）である場合、第1の特異的結合メンバー上のリガンドはビオチンであり得る）、且つ対象検体へも結合する。第2の特異的結合メンバーは検出可能標識を含み、対象検体へ結合する。固体支持体並びに第1の特異的結合メンバー及び第2の特異的結合メンバーは、試験サンプルへ添加され得る（逐次的に又は同時に）。第1の特異的結合メンバー上のリガンドは固体支持体上の固定化剤へ結合して、固体支持体/第1の特異的結合メンバーの複合体を形成する。サンプル中に存在する対象検体があれば、固体支持体/第1の特異的結合メンバー複合体へ結合して、固体支持体/第1の特異的結合メンバー/検体の複合体を形成する。

第2の特異的結合メンバーは、固体支持体／第1の特異的結合メンバー／検体の複合体へ結合し、検出可能標識が検出される。随意の洗浄ステップを検出の前に用いることができる。特定の実施形態において、ワンステップアッセイにおいて、1つより多くの検体を測定することができる。特定の他の実施形態において、2つより多くの特異的結合メンバーを用いることができる。特定の他の実施形態において、複数の検出可能標識を添加することができる。特定の他の実施形態において、複数の対象検体を検出することができる。

【0295】

オンザフライ捕捉アッセイの使用は、本明細書において記載されるような、及び当技術分野において公知の様々な形式で行うことができる。例えば、形式は、上述のようなサンドイッチアッセイであり得るが、代替的に競合アッセイであり得、単一の特異的結合メンバーを用いることができ、又は公知のようなその他の変形を使用することができる。

10

【0296】

組合せアッセイ（A_g／A_bによるマイクロ粒子の共コーティング）

組合せアッセイにおいて、マイクロ粒子などの固体基板は抗原及び抗体により共コーティングされて、サンプルから抗体及び抗原をそれぞれ捕捉する。固体支持体を2つ以上の異なる抗原により共コーティングして、サンプルから2つ以上の異なる抗体を捕捉することができる。固体支持体を2つ以上の異なる抗体により共コーティングして、サンプルから2つ以上の異なる抗原を捕捉することができる。

【0297】

加えて、本明細書において記載される方法は、アッセイ化合物の中での特異的又は非特異的な結合反応（例えばHAMA問題）を防止するブロッキング剤を使用することができる。ひとたび薬剤（随意に任意の対照）が支持体上に固定化されると、薬剤の残りの結合部位は支持体上でブロックされ得る。当業者へ公知の任意の好適なブロッキング試薬を使用することができる。例えば、ウシ血清アルブミン（「BSA」）、リン酸緩衝食塩水（「PBS」）中のカゼインのPBS溶液、Tween 20（商標）（Sigma Chemical Company、St. Louis、Mo.）、又は他の好適な界面活性剤、並びに他のブロッキング試薬を用いることができる。

20

【0298】

本開示から明らかなように、本明細書において開示される方法及びデバイスは、変形も含めて、疾患、障害又は症状を有する疑いのある被験体における疾患、障害又は症状を診断するために使用することができる。例えば、サンプル分析は、疾患マーカー（癌マーカー、心臓の症状についてのマーカーなど）、毒素、病原体（ウイルス、細菌又はその一部分など）の検出に有用であり得る。上記方法及びデバイスは、生物学的サンプル中に存在する検体の測定のために使用することもできる。方法及びデバイスは、血液検査アッセイにおいて標的検体を検出するために使用することもできる。血液検査アッセイは、血液供給をスクリーニングするために使用することができる。

30

【0299】

表面弾性波デバイス、システム、及び方法

集積表面弾性波（SAW）サンプル調製及び検体検出デバイスに関連したシステム、デバイス、及び方法が、本開示によって提供される。

40

【0300】

1つの例において、デバイスは、サンプル調製構成要素、例えば表面を有する基板であって、音響力による操作により、液体又は流体がその表面にわたって伝搬することを可能にする基板を含む。同じ例において、デバイスは、伝搬された液体を受け入れ、受け入れた液体に対して検体検出を行う、検体検出構成要素を含む。

【0301】

「表面弾性波（SAW）」及びその文法的な同義語は、本明細書で用いられるとき、一般に表面に沿った方向で音波を伝搬することを意味する。「トラベリング表面弾性波」（TSAW）は、液体中への表面弾性波の結合（coupling）を可能にする。いくつかの例において、結合は、液体中への表面弾性波の浸透又は漏洩の形態であり得る。いく

50

つかの例において、表面弾性波は、レイリー（R a l e i g h）波である。表面弾性波の伝搬は、液体を通して表面弾性波をストリーミングすることによって行われ得る。表面弾性波の伝搬は、変換器（一連の又は複数の電極など）によって電位を発生させることを含めて、様々な異なる様式で、異なる材料を用いることによって行うことができる。

【0302】

電極は、平面基板上へパターニングすることができる。いくつかの例において、平面基板は、圧電層であり得る。いくつかの例において、電極は、標準的なリソグラフィ及びリフトオフ／湿式エッチングプロセスを用いて圧電層上に製作することができる。電極の構造、電極間の間隔、基板上の電極の数（すなわち解像度）は、多様であり得る。いくつかの例において、インターディジタル形（I D T）変換器又は電極が用いられる。いくつかの例において、サンプル調製構成要素は、液体を含み得る。いくつかの例において、複数の層が存在し得る。異なる層は、表面弾性波を散乱させるための散乱構造の異なる配置又は構成を有し得る。結果として、異なる層にわたる液滴の運動は、多様な散乱構造が存在することに起因して変化し得る。

【0303】

いくつかの例において、S A Wは、単一の変換器又は電極が作動されたときに伝搬される。他の例において、基板表面上に製作された複数の（例えばペアの）電極は、互いに向かって伝搬する2つのトラベリングS A Wを発生し得る。いくつかの例において、S A W変位は、電極に無線周波数（R F）範囲が印加されたときに作動される。作動されると、電極又は変換器は、基板の表面にわたる電位を発生させ、基板はそこで機械的応力を受ける。機械的応力の例は、基板の表面の連続的な収縮及び膨張である。この基板の連続的な変形の結果として、表面弾性波が表面にわたって伝搬される。

【0304】

表面弾性波は、振幅及び周波数に従って測定することができる。したがって、電極によって発生された電位の周波数及び振幅が、S A Wの振幅及び周波数の原因となる。

【0305】

S A Wの伝搬は、直線方向であり得る。いくつかの例において、S A Wは、基板表面の長さ方向にわたって伝搬し得る。他の例において、S A Wは、基板表面の幅にわたって伝搬し得る。他の例において、S A Wの伝搬は、非直線的な方向及び運動であり得る。流体は散逸系であるので、S A Wによる高調波の力に対する応答は、必ずしも高調波ではない。

【0306】

T S A Wが液体を収縮させるとき、液体は、S A Wのエネルギーの一部を吸収し、これを縦波の形態で屈折させ得る。屈折した音響エネルギーの吸収は、基板表面にわたる流体の流れ又は伝搬を誘導する。表面弾性波がサンプル調製構成要素の表面に沿って伝搬するとき、S A Wは液体に接触することになり得る。液体がS A Wと相互作用した結果として、S A Wが液体内へ伝達される。S A Wは、流体を「無接触操作」によって操作し、このことは、液体が、流体内へ漏洩又は浸透した音波によって検出構成要素へ伝搬されることを意味する。結果として、生物学的サンプル又は検体の外部汚染が最小限になる。

【0307】

いくつかの例において、例示的な流体駆動動作は、ポンプ輸送、混合、噴射等を含む。結果として、液体は、サンプル調製構成要素の表面に沿って伝搬される。

【0308】

いくつかの例において、液体は、S A W電極の作動に先立って、アクチュエーションされる小滴としてサンプル調製構成要素の表面上へ分注される。小滴アクチュエーションは、サンプル調製構成要素上へ小滴を位置決めし、分注するために使用され得る。

【0309】

他の例において、液滴ベースのマイクロ流体の代わりに、S A W駆動型ポンプを使用して液体を開放表面へポンプ輸送することができる。いくつかの例において、流体は、密閉されたチャンネルを通してポンプ輸送され得る。

【0310】

液体は、対象検体を含有するか、又は含有する疑いのある任意の試験サンプルであり得る。本明細書において使用されるとき、「検体」、「標的検体」、「対象検体」は、本明細書において開示される方法及びデバイスにおいて測定される検体を指す。液滴は、水溶液中の粒子又はビーズを指すこともある。サンプルは、例えば血液、血漿、血清、唾液、汗等のような生物学的流体サンプルを含み得る。

【0311】

いくつかの例において、液体は、単一粒子として配置することができる。他の例において、液体は、粒子の群（例えば数千の粒子）として配置することができる。液滴は、広範囲の長さ、スケール、サイズ（nmからmmまで）、並びに形状に応じて多様であり得る。

10

【0312】

表面弾性波の伝搬は、サンプル調製プラットフォームの表面上にパターニングされたフォノン構造の存在によっても影響を受け得る。これらのフォノン構造は、音波の伝搬を制御し得る。例えば、フォノン構造は、SAWの方向、動き、速度を制御することができ得、それゆえ強化された機能を提供する。フォノン構造は、標準的なリソグラフィ、リフトオフ／湿式エッチングプロセス、エンボス加工／ナノインプリントリソグラフィ、並びにこれらのフォノン構造を形成するための基板の微細機械加工、圧力、熱、及びレーザ改質を用いて、基板上に製作することができる。これらのフォノン構造は、多様な形、並びにサイズを呈し得る。いくつかの例において、フォノン構造は、基板内に格子を形成する、柱、円錐、又は穴であり得る。

20

【0313】

表面弾性波サンプル調製構成要素

本明細書で使用されるとき、「サンプル調製構成要素」及びその文法的な同義語は、液滴が最初にその上に分散され、本明細書で記載されるようなイムノアッセイのステップがそこで実行され得る、概ね平らな表面を指す。いくつかの例において、基板は、高い音響反射率を有する材料で作ることができる。

【0314】

いくつかの例において、サンプル調製構成要素は、基板（*substrate*）に連結された上層（*superstrate*）を含む。いくつかの例において、上層は、基板に取外し可能に連結される。他の例において、上層は、基板に恒久的に連結される。いくつかの例は、基板をポリマーベースの材料又は紙材料から作製することを含む。基板が水性流体に対して不浸透性になるように、ポリマーベースの基板を疎水性コーティングで処理することができ、又は、製作により、疎水性層をポリマーベース基板の上に又は別の基板と共に追加することができる。

30

【0315】

いくつかの例において、サンプル調製構成要素は、上層上に含まれるアッセイ試薬も含み得る。サンプル調製構成要素は、基板に連結した上層をさらに含む。

【0316】

さらに別の例において、サンプル調製構成要素は、上層上に含まれる一連の散乱構造を含み得る。散乱構造の例は、より詳細に後述するフォノン構造を含み得る。

40

【0317】

いくつかの例において、基板は、圧電材料であり得る。圧電層は、単結晶ニオブ酸リチウム（*LiNbO₃*）などの複合層で作ることができる。上層は、一連の又は複数の電極又は変換器をさらに含み得る。いくつかの例において、電極又はIDTによって発生される表面弾性波は、上層内へと結合され得る。

【0318】

いくつかの例において、上層は、プラスチック（例えばPET、PC等）などの種々の材料で作ることができる。

【0319】

50

いくつかの例において、上層は、比較的高い電気機械的結合係数を有する材料で製作することができる。いくつかの例において、電極は、圧電材料の上に製作することができる。1つの例において、 LiNbO_3 を、SAWマイクロ流体用途において電極をパターンニングするための基板として使用することができる。別の例において、シリコンを基板材料として使用して、電極をパターンニングすることができる。SAW発生基板を製作するために適用可能な材料の他の例には、多結晶材料、微晶質材料、ナノ結晶性材料、アモルファス材料又は複合材料が含まれる。SAW生成基板を製作するために適用可能な材料の他の例には、強誘電材料、焦電気材料、圧電材料又は磁歪材料が含まれる。

【0320】

本明細書で記載されるように、基板は、表面弾性波を発生すること、及び音波を伝搬することが可能な材料である。

10

【0321】

分析される検体及び生物学的サンプルに加えて、サンプル調製構成要素は、バッファー又は洗浄流体も含み得る。いくつかの例において、これらのバッファー又は洗浄流体は、サンプル調製構成要素をわたって検出構成要素へ至る液体の伝搬を促進することができる。他の実例において、これらの流体は、液体又は生物学的サンプルがひとたびウェルアレイ内へ位置決めされると、残った液体又は生物学的サンプルを洗い流すために使用され得る。かかる流体の例には、空気、不活性ガス、疎水性液体、親水性液体、油、有機ベースの溶媒、及び高密度水溶液が含まれる。特定の事例において、デバイスをフィルター流体で満たすことができ、これは空気、不活性ガス、疎水性液体、親水性液体、油、有機ベースの溶媒、及び高密度水溶液であり得る。

20

【0322】

いくつかの例において、SAWで誘導される流体の動きは、小さい染料又は粒子を液滴内へ導入することによって可視化することができる。

【0323】

サンプル調製表面は、液滴がその上で表面に沿って伝搬され得る表面を有する。サンプル調製表面の上記表面は、平面又は非平面の立体構造の任意の好都合な表面であり得る。表面は、表面に沿った液体の動きを促進するために疎水性材料でコーティングされ得る。いくつかの例において、疎水性材料は、オクタデシルトリクロロシラン(OTS)を含み得る。他の例において、表面は、液滴の動きを促進するためにパターンニングされ得る。

30

【0324】

いくつかの例において、サンプル調製表面の基板は、弾性又は可撓性であり得る。表面がその上に形成される基板は、弾性であり得、その結果、表面は、表面にわたる表面弾性波の伝搬を促進するように変形可能になる。

【0325】

特定の実施形態において、基板の表面は、流体の伝搬を促進するためにマイクロ流体チャンネルを含み得る。他の実施形態において、マイクロ流体チャンネルは、基板の内部に含まれており、流体を基板の中へ送る。

【0326】

いくつかの例において、サンプル調製構成要素の基板の上面の上にカバーシールを設けることができる。特定の事例において、カバーシールは、表面の液体内容物の汚染を防止することができる。他の事例において、カバーシールは、液体不浸透性層であり得る。他の事例において、カバーシールは、可撓性材料製(プラスチック、シリコン、又は他のタイプのゴムなど)であり得る。他の事例において、カバーシールは、非可撓性材料製(ガラス又は他の非可撓性材料など)であり得る。いくつかの例において、カバーシールは、表面又は表面上に存在する液体内容物のいずれかの変形を防止するために、熱、紫外線、又は他の電磁放射を通さないものとして設けられることができる。

40

【0327】

いくつかの例において、好適なスペーサーを基板とカバーシールとの間に位置決めすることができる。本明細書で使用されるとき「好適なスペーサー」は、サンプル調製構成要

50

素の基板とカバーシールとの間に位置決めされる要素を指す。いくつかの例において、好適なスペーサーは、液滴が表面とカバーシールとの間を移動することを促進し得る。他の例において、好適なスペーサーは、トラベリング表面弾性波と表面との間の結合を低減し得る。

【0328】

第1の例示的なサンプル調製構成要素において、第1の基板は、比較的高い電気機械的結合係数を有するとともに可撓性且つ変形可能な表面を有する材料を組み込む。例えば、第1の基板は、圧電材料又はシリコンであり得る。

【0329】

いくつかの例において、電極は、圧電層の表面上に配置されるか又は圧電層内に埋め込まれる。「電極」という用語は、この文脈で使用されるとき、1つの電極、一連の又は複数の電極（例えば、1つより多くの）、変換器を含む電気回路を指す。電極は、また、圧電層内へパターンニングされ得る。いくつかの例において、電極は、標準的なリソグラフィ及びリフトオフ／湿式エッチングプロセスを用いて、基板上に製作することができる。電極の構造、電極間の間隔、基板上の電極の数（すなわち解像度）は、多様であり得る。いくつかの例において、インターディジタル形（IDT）変換器又は電極が用いられる。IDTは、一連の又は複数の電極と、一連の又は複数の電極がその上に含められる圧電層との組合せとして定義される。いくつかの例において、変換器電極構造は、圧電層上に形成される。他の例において、変換器電極構造は、圧電層内に埋め込まれる。

【0330】

いくつかの例において、表面弾性波は、単一の変換器又は電極が作動されたときに伝搬される。他の例において、基板表面上に製作された複数の（例えばペアの）電極は、互いに向かって伝搬する2つのトラベリング表面弾性波を発生し得る。いくつかの例において、表面弾性波の変位は、無線周波数（RF）範囲が電極に印加されたときに作動される。作動されると、電極又は変換器は、基板の表面にわたる電位を発生させ、基板はそこで機械的応力を受ける。機械的応力の例は、基板の表面の連続的な収縮及び膨張である。この基板の連続的な変形の結果として、表面弾性波は、表面にわたって伝搬される。

【0331】

いくつかの例において、表面弾性波の波長は、変換器（IDT）又は一連の若しくは複数の電極のピッチに依存する。

【0332】

1つの例において、サンプル調製構成要素表面は、上層の表面上に含められた一連のフォノン構造を含み得る。フォノン構造は、音波の伝搬を制御し得る。例えば、フォノン構造は、表面弾性波の方向、動き、速度を制御し得る。フォノン構造は、多様な形、並びにサイズを呈し得る。いくつかの例において、フォノン構造は、基板内に格子を形成する、柱、円錐、又は穴であり得る。上層の表面上のフォノン構造のパターンは、解像度（例えば、表面上の面積当たりの電極の数）、電極サイズ、電極のインターディジテーション、及び／又は電極間の間隙又は間隔といった特性に基づいて予め定めることができる。いくつかの例において、パターンの特性は、SAWサンプル調製構成要素が関連付けられる小滴アクチュエータの1つ又はそれより多くの実用的用途（例えば、生物学的アッセイ及び／又は化学的アッセイを伴う使用）に基づいて選択される。他の構成において、電極のパターンは、異なる用途に適する異なるパターンを可能にするように再構成可能であり得る。いくつかの例において、一連の又は複数の電極又は各個別の電極のサイズ又は寸法の増大は、隣接する電極間に塗工される疎水性材料の量も削減し得る。それゆえ、電極パターンの特徴は、SAWプラットフォームの表面積を最大限にし得る。さらに、一連の又は複数の電極／変換器のインターディジテーションの増大は、液体がその電位の操作により表面にわたって伝搬される容易さを促進する。

【0333】

第1の例示的なサンプル調製構成要素において、上層を水溶液に対して不浸透性にするために、疎水性材料を一連の又は複数の電極及び基板の表面に塗工することができる。疎

10

20

30

40

50

水性材料の結果として、小滴又は流体ポンプによりアクチュエーションされる液体はビーズ状構成になり、基板の表面の疎水性層との接触角を形成する。動作中、SAW音波は、例えば液体の中へ浸透又は漏洩することによって、表面結合をわたって液体へ伝搬する。SAW音波の振幅又は周波数は、結果として得られる移動液体の周波数及び運動を制御し得る。

【0334】

特定の実施形態において、表面弾性波は、基板の表面に沿って伝搬し、次いで上層内へと結合される。したがって、表面弾性波は伝搬し続け、上層に形成され得るフォノン構造によって案内される。

【0335】

いくつかの例において、SAW音波が2つ以上の電極によって発生される場合、これは、結果として得られる表面弾性波に結合される液体の方向の制御をもたらし得る。伝搬する液体の方向は、直線方向又は非直線方向であり得る。いくつかの例において、液滴の伝搬は、転がり運動であり得る。他の例において、液滴の伝搬は、表面にわたる摺動運動であり得る。いくつかの例において、表面上にフォノン構造がない場合、SAWの伝搬とその結果得られる液滴の伝搬は同じ方向である。他の例において、表面上にフォノン構造が存在する場合、SAWの伝搬とその結果得られる液滴の伝搬とは、反対方向又は異なる方向である。

【0336】

いくつかの例において、疎水性材料は、上層の表面に施工されたポリテトラフルオロエチレン材料（例えばTeflon（登録商標））又はフッ素系界面活性剤（例えばFluoropel（商標））である。

【0337】

検体検出構成要素

いくつかの実施形態において、検体検出構成要素は、その中で検体又は生物学的サンプルの検出目的で分子、粒子、ビーズ又は細胞が単離され得るウェルのアレイを含むことができる。TSAW（トラベリング表面弾性波）は、表面上に流体チャネルにわたってアコースティックストリーミングを発生させ、流体（小滴又は細胞のいずれか）をウェルアレイに向かって押す。

【0338】

ウェルの形及び幾何学的形状は、要求される手順又は用途のタイプに応じて様々であり得る。いくつかの例において、ウェルは、深いチャンバから浅いチャンバまで様々であり得る。ウェルは、平らな底面付きの円筒形、丸い底面付きの円筒形、立方体、立方形、切頭円錐、逆切頭円錐、又は円錐などの、任意の多様な形状であり得る。特定の事例において、ウェルは、ウェルアレイの上に移動した液滴中に存在するマイクロビーズ又はマイクロ粒子の受入れ及び保持を促進するように配向され得る側壁を含むことができる。いくつかの例において、ウェルは、第1の側壁及び第2の側壁を含むことができ、ここで第1の側壁は第2の側壁と対向し得る。いくつかの例において、第1の側壁は、ウェルの底部に対して鈍角に配向され、第2の側壁は、ウェルの底部に対して鋭角に配向される。小滴の移動は、ウェルの底部に対して平行に第1の側壁から第2の側壁へ向かう方向であり得る。ウェルのアレイは、サブフェムトリットル容量、フェムトリットル容量、サブナノリットル容量、ナノリットル容量、サブマイクロリットル容量、又はマイクロリットル容量を有し得る。例えば、ウェルのアレイは、フェムトリットルウェルのアレイ、ナノリットルウェルのアレイ、又はマイクロリットルウェルのアレイであり得る。特定の実施形態において、アレイ内のウェルは、すべて実質的に同じ容量を有し得る。ウェルのアレイは、100 μ l までの容量、例えば約0.1フェムトリットル、1フェムトリットル、10フェムトリットル、25フェムトリットル、50フェムトリットル、100フェムトリットル、0.5pL、1pL、10pL、25pL、50pL、100pL、0.1nL、1nL、10nL、25nL、50nL、500nL、0.1マイクロリットル、1マイクロリットル、10マイクロリットル、25マイクロリットル、50マイクロリットル、又は

10

20

30

40

50

100 マイクロリットルの容量を有し得る。

【0339】

特定の事例において、サンプル調製構成要素及び検体検出構成要素は、単一の平坦な表面から、例えば連続的なウェブ送り製造プロセスを使用して製作することができる。かかる例において、サンプル調製構成要素及びデジタル検体検出構成要素は、互いに隣接して位置決めされ得る。

【0340】

いくつかの例において、サンプル調製構成要素は、サンプル入口を含み得る。本明細書で使用されるとき「サンプル入口」は、液体をサンプル調製構成要素へ導入するための管状部材、チャンネル、又はパイプを指す。例えば、サンプル入口は、生物学的サンプルを基板の表面上へ導入し得る。他の例において、サンプル入口は、生物学的サンプルを基板の内部へ導入し得る。

【0341】

他の例において、サンプル調製構成要素及びデジタル検体検出構成要素は、小滴操作のための空間によって隔てられた、互いにスタックされた構成で位置決めされ得る。サンプル調製構成要素が検体検出構成要素の上にスタック構成で位置決めされた例又はその逆の（検体検出構成要素がサンプル調製構成要素の上に位置決めされた）例において、入口又はチャンネルは、2つの構成要素の間に位置決めすることができる。入口又はチャンネルは、サンプル又は検体を2つの構成要素の間に導くことができる。

【0342】

フォノン構造は、サンプル調製構成要素の上層上に製作され又は含まれ得る。特定の事例において、フォノン構造は、上層上にインプリントされ又はエンボス加工される。かかる例において、フォノン構造のエンボス加工又はインプリントは、単一のステップである。他の例において、これは複数のステップであり得る。フォノン構造のインプリント又はエンボス加工は、型、マスク、又はパターンの存在下での圧力、熱、又は紫外線の印加の組合せによるものであり得る。1つの例において、型から誘発されて上層へかかる圧力は、上層の表面の変形を誘導し得る。

【0343】

フォノン構造を上層に含めた後、これはフォノン構造の硬質化又は変形を可能にするのに十分な時間にわたって硬化され得る。加えて、フォノン構造は、フォノン構造の物理特性を改質する試薬に供され得る。

【0344】

いくつかの例において、検体検出のための試薬は、集積サンプル調製及び検体検出デバイスの製作中に脱水形態で印刷され得る。試薬の再水和は、サンプル又はバッファー中の使用を通じて生じる。

【0345】

いくつかの例において、ウェルのアレイは、個々のウェルチャンバを含み、各ウェルチャンバは、第1の端及び第2の端を有する。1つの例において、ウェルの第1の端は、開放端であり得、他方、ウェルの第2の端は閉鎖されている。他の例において、ウェルの第1の端及びウェルチャンバの第2の端の両方が閉鎖されている。ウェルチャンバの第1の端の閉鎖は、恒久的閉鎖機構及び一時的閉鎖機構の両方によるものであり得る。「恒久的」は、本明細書で使用されるとき、閉鎖機構がウェルのチャンバの付属品として残ることが意図されることを意味する。「一時的」は、本明細書で使用されるとき、閉鎖機構を、閉鎖機構の構造、一体性、又は剛性に影響を及ぼすことなく除去することができることを意味する。いくつかの態様において、ウェルチャンバの第1の端の閉鎖は、恒久的閉鎖機構と一時的閉鎖機構との組合せによるものであり得る。1つの例において、一時的閉鎖機構は、ウェルチャンバの第1の端を満たすことができる油流体などの液体であり得る。特定の例において、油滴は、検体、生物学的サンプル、又は検体に関連した検出可能標識があらかじめウェル内に堆積された後で、第1のウェル端を満たし得る。他の例において、油滴は、ウェル内の検体又は生物学的サンプルの存在にかかわらず、ウェルの第1の端を

10

20

30

40

50

閉鎖し得る。

【0346】

ウェルのアレイは、複数の標識、ビーズ、標識化ビーズ、タグ、及びそれに類したものを受け入れるのに適したウェルチャンバのパターン（例えばアレイ内のウェルの編成）を有する。ウェルのアレイのパターンは、解像度及びウェルチャンバ間の間隔に応じて多様であり得る。

【0347】

いくつかの例において、ウェルアレイのパターンは、ナノインプリントリソグラフィを使用して製作することができる。他の例において、ウェルアレイのパターンは、成形、圧力、熱、又はレーザの、任意のものの組合せにより、製作することができる。

10

【0348】

ウェルアレイのサイズは、多様であり得る。いくつかの例において、ウェルアレイは、直径100nmの個々のウェルチャンバを500nmの周期で有するように製作され得る。

【0349】

いくつかの例において、ウェルアレイは、実質的に、デジタルマイクロ流体及び検出モジュールに関連したセクションで記載した通りのものであり得る。

【0350】

いくつかの例において、対象の検体又は生物学的サンプルの検出は、光学的シグナル検出を通じて行うことができる。例えば、シグナル強度結果を測定するために、励起光（例えばレーザ）を照射する。他の例において、所望の検体は、各ウェルチャンバから発する光学的シグナルを測定することによって検出され、結果を定量化することによって定量され得る。例えば、デジタル分析により、陽性カウント（例えばウェル）の数が陰性カウント（例えばウェル）の数と比較される。あるいは又は加えて、検体濃度に相関するシグナルを測定することができる（アナログ定量）。デバイスのウェルからの種々のシグナルを検出することができる。例示的なシグナルは、蛍光、化学発光、比色、比濁等を含む。

20

【0351】

サンプル調製及び検体検出デバイスの隣接構成

いくつかの実施形態において、ウェルのアレイは、サンプル調製構成要素と同じ上層上に位置決めされる。いくつかの例において、上層及びウェルのアレイは、第1の基板上に位置決めされ得る。第1の基板は、分析される小滴が最初に配置される第1の部分と、検体検出のために小滴がそこに向かって移動される第2の部分とに分割することができる。上層は、第1の基板の第1の部分上に存在し得、ウェルのアレイは、第1の基板の第2の部分上に位置決めされ得る。それゆえ、サンプル調製構成要素を形成する上層と検体検出構成要素を形成するウェルのアレイとが直接的に隣接し得る。本明細書で使用するとき、「直接的に隣接」という用語は、サンプル調製構成要素とウェルのアレイとの間を分離又は分割する物体が存在しないことを指す。サンプル調製構成要素とウェルのアレイとが互いに直接的に隣接する例において、サンプル調製構成要素の表面にわたる液滴の伝搬は、ウェルのアレイの表面へとシームレスに移行する。他の例において、ウェルのアレイは、サンプル調製構成要素に間接的に隣接する。本明細書で使用するとき、「間接的に隣接」という用語は、サンプル調製構成要素を分離又は分割する物体又は要素が存在することを指す。

30

40

【0352】

いくつかの例において、液体の移動を促進し、個々のウェルチャンバへの小滴の位置精度を高めるために、サンプル調製構成要素の基板表面をパターニングされ又は親水性材料でコーティングすることができる。他の例において、ウェルアレイをシールするために油又はエマルジョンのような試薬を使用することができる。

【0353】

図13Aは、検体検出構成要素に隣接して位置決めされたサンプル調製構成要素の側面図を示す。図13Aに示すように、サンプル調製構成要素は、上層810を含む。上層8

50

10は、一連のフォノン構造830を含む。フォノン構造のサイズ、形、及び寸法は、多様であり得る。図13Aに示すように、サンプル調製構成要素は、ウェルのアレイ860を含む検体検出構成要素に直接的に隣接して位置決めされる。これらの構成要素が互いに隣接して位置決めされた場合、上層810の表面にわたって伝搬された液体は、ウェルアレイ860上の個々のウェルチャンバ内へ収集され得る。この特定の例において、サンプル入口チャンネル840は、上層810とカバー870との間に位置決めされる。上層810及びカバー870は、液滴が操作（例えば、併合、分割、攪拌等）される空間を定める空間／間隙850によって分離される。しかしながら、他の例において、サンプル入口チャンネルは含まれない。サンプル入口チャンネルのサイズ、寸法、及びバリエーションは、多様であり得る。例えば、サンプル入口チャンネルは、流体を上層810の表面上へ導入し得る。他の例において、サンプル入口チャンネルは、流体を上層810の内部へ導入し得る。

10

【0354】

いくつかの例において、サンプル調製構成要素の表面の上にカバーシールを設けることができる。特定の事例において、カバーシールは、表面の液体内容物の汚染を防止することができる。他の事例において、カバーシールは、液体不浸透性層である。他の事例において、カバーシールは、プラスチック、シリコン、又は他のタイプのゴムなどの可撓性材料で作られる。他の事例において、カバーシールは、ガラス又は他の非可撓性材料などの非可撓性材料で作られる。いくつかの例において、カバーシールは、サンプル調製構成要素の表面又は表面上に存在する液体内容物のいずれかの変形を防止するために、熱、紫外線、又は他の電磁放射を通さないものとすることができる。

20

【0355】

いくつかの例において、基板の表面にわたる表面弾性波の発生によって生じる熱を放散するために、ヒートシンクを設けることができる。

【0356】

サンプル調製及び検体検出デバイスのスタック構成

いくつかの実施形態において、ウェルのアレイ（検出構成要素）は、小滴が操作される空間によって分離されたサンプル調製構成要素の上に位置決めされる。いくつかの例において、入口又はチャンネルは、2つの構成要素間に位置決めされ得る。入口又はチャンネルは、サンプル又は検体を2つの構成要素間に導き得る。

【0357】

いくつかの例において、ウェルアレイは、第1の基板上にインプリメント又はエンボス加工することができ、フォノン構造は、第1の基板から離間した様式で位置決めされる上層上に存在し得る。上層は、第2の基板によって支持され得る。

30

【0358】

いくつかの例において、ウェルのアレイを含む第1の基板を上層と連結するステップは、ボンディング剤、接着剤、テープ、糊、はんだ付け、又はウェルのアレイを上層へ連結させることが可能な他の貼付剤の使用によって促進することができる。他の例において、ウェルのアレイをサンプル調製構成要素のフォノン構造上へ連結するステップは、機械式締結具、固定具、ボルト、及び、ラッチのような他の機械式構成要素の使用によって達成することができる。他の例において、ウェルのアレイをサンプル調製構成要素のフォノン構造上へ連結するステップは、ウェルのアレイをサンプル調製構成要素のフォノン構造の上に設置して位置決めすることにより行うことができる。他の例において、基板のフォノン構造は、ウェルアレイ構成要素に対して平行な配向であり得る。

40

【0359】

上層のフォノン構造とウェルアレイとの間の間隔は、実施される用途のタイプ、基板の表面へアクチュエーションされる液滴のサイズ、フォノン構造のサイズ、形及び配列、サンプルチャンネル／入口のサイズ、及び表面にわたって伝搬する表面弾性波の振幅に応じて多様であり得る。

【0360】

図13Bは、上層及びウェルアレイ構成要素のスタック構成の側面図を示す。図13B

50

に示すように、上層 810 は、一連のフォノン構造 830 を含む。フォノン構造 830 は、反復する構造要素のアレイとして配列される。フォノン構造のサイズ、形、及び寸法は、多様であり得る。この例において、ウェルのアレイ 860 もまた存在する。この例において、ウェルのアレイ 860 は、上層の上に直接的に位置決めされる。図 13B に示すように、ウェルの開口部は、フォノン構造に直接的に対向し得る。この特定の例において、サンプル入口チャンネル 840 は、ウェルアレイと上層との間に位置決めされる。しかしながら、他の例において、サンプル入口チャンネルは含まれない。サンプル入口チャンネルのサイズ、寸法、及びバリエーションは、多様であり得る。例えば、サンプル入口チャンネルは、流体を上層 810 の表面上へ導入し得る。他の例において、サンプル入口チャンネルは、流体を上層 810 の内部へ導入し得る。ウェルのアレイ 860 を含む基板 820 は、上層 810 から離間した様式で位置決めされ、上層 810 から間隙／空間 850 によって分離される。

10

【0361】

図 13A～図 13B に示すようなウェルのアレイは、サイズ及び／又は形状が多様であり得る。例えば、ウェルアレイは、実質的に浅くする又は深くすることができる。ウェルアレイの解像度は、各ウェルチャンバ間の間隔によって影響を受ける。例えば、ウェルチャンバ間の最小限の間隔は、より多数のウェルを可能にして、より多数の検体又は生物学的サンプルを収集する。いくつかの例において、ウェルアレイは、基板のアブレーションにより形成することができる。ウェルアレイのパターンは、特別なパターン又は特別なマスクを使用し、マスクをレーザアブレーションに供することによって形成することができる。

20

【0362】

表面弾性波サンプル調製及び検出デバイス

図 14A～図 14B は、前述のセクションにおいて開示された SAW デバイスを別々に製作するための例示的な方法を示す。図 14A は、フォノン構造及びウェルのアレイを単一のベース基板上で製作することによって、サンプル調製構成要素とウェルアレイ構成要素とが互いに隣接して位置決めされることを示す。上層（例えば、図 13A、上層 810 を参照）は、組立ライン 900 上に配置される。組立ライン 900 に沿った上層の伝搬は、一連のローラを利用したコンベヤベルト様機構によって促進される。上層のロール 914 は、スプールから巻きを解かれてエンボス加工ユニット 910 へ供され、これは、型を使用してフォノン構造を上層上に形成するか又は上層内に埋め込むために、材料に強い熱、圧力、又は紫外線をかける。ウェルのアレイは、レーザアブレーション 924 を使用して作成される。その後、上層は、複数のローラを通して、上層の性質を改質する表面処理構成要素 920 へ至る。その後、上層は、上層上にアッセイ試薬を堆積するインクジェットプリンタ 930 を通過する。いくつかの例において、得られた構造は、硬化ステップに供され得る。他の例において、得られた構造は、表面処理を受けて、その物理的性質が改質され、例えばアッセイプロトコルに必要な官能化試薬が組み込まれる。次いでカバー（例えば、図 13A、カバー 870）が上層上へ積層 940 される。カバーは、ロール 905 として準備され得、これは、スプールから巻きを解かれ、ローラを用いて移動される。カバーを上層上に配置する前に、好適なスペーサーが上層とカバーとの間に配置されて、液滴が 2 つの表面間を移動することを可能にする。組み立てられた構造は、個々のデバイスを生成するためにダイシング 950 され得る。

30

40

【0363】

図 14B は、図 13B に描いたデバイスを製作するための例示的な方法を示す。上層（例えば、図 13B、上層 810 を参照）のロール 914 は、エンボス加工ユニット 910 を使用する製作プロセスに供され、これは、型の存在下でフォノン構造の反復する構造要素を形成するために、上層に強い熱、圧力、又は紫外線をかける。その後、上層は、表面処理構成要素 920 を通過して、上層表面の性質を改質する。その後、上層は、インクジェットプリンタ 930 を通過して、原位置でアッセイ試薬を堆積する。ウェルのアレイを含む検出モジュールを形成するために、第 1 の基板（例えば、図 13B、基板 820 参照

50

）のロール 906 がレーザアブレーション 924 に供される。積層ユニット 940 において、上層、及びウェルアレイを収めた第 1 の基板の両方が一緒に組み合わせられ、次いで、離間した構成で貼り合わされる。結果として、上層及び基板は、スタック構成内で垂直方向に位置合わせされる。その後、スタックされた基板は、例えばダイシング構成要素 950 に供されて、個々のデバイスを生成する。

【0364】

小滴アクチュエーションを伝搬する本明細書に記載のデバイス及びシステム及び方法は、小滴アクチュエーションに影響を及ぼす種々の他の力も含み得る。例えば、表面にわたる小滴の移動は、電場媒介力、静電アクチュエーション（電氣的アクチュエーションなど）、エレクトロウェットティング、誘電泳動、電場勾配又は電極媒介力を含み得る。小滴操作のために表面弾性波とデジタルマイクロアレイ電極の組合せが用いられる実施形態において、本明細書に記載の SAW デバイスは、一連の又は複数の電極を含み得る。

10

【0365】

本明細書で開示される集積デバイスは、対象検体の検出のために、生物学的サンプルなどの種々のサンプルを調製するのに使用され得る。特定の事例において、デバイスは、デジタルイムノアッセイを実行するために使用され得、検体の存在又は非存在に相関する粒子／ビーズの存在又は非存在を検出する。

【0366】

キット及びカートリッジ

上述の方法を開示されるデバイスを用いて又は用いずに実行する際の使用のためのキットも本明細書において提供される。キットは、開示されるデバイスを用いて検体を分析するための指示を含むことができる。キットに含まれる指示は、パッケージ材に添付することもでき、又はパッケージ挿入物として含めることもできる。指示は、書面又は印刷物であり得るが、これらに限定されない。かかる指示を格納すること及びそれをエンドユーザーへ伝えることが可能な任意の媒体が本開示によって企図される。かかる媒体には、電子ストレージ媒体（例えば磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例えば CD ROM）、及びそれらに類するものが含まれるが、これらに限定されない。本明細書において使用されるとき、「指示」は、指示を提供するインターネットサイトのアドレスを包含し得る。

20

【0367】

キットは、上述のように内蔵の検体検出を伴うマイクロ流体モジュールを含むカートリッジを含むことができる。いくつかの実施形態において、マイクロ流体及び検体検出は、互いの可逆的な集積のための分離した構成要素であり得るか、又はカートリッジに完全に若しくは不可逆的に集積され得る。カートリッジは使い捨てであり得る。カートリッジは、上で開示された方法の実践のために有用な 1 つ又はそれより多くの試薬を含むことができる。カートリッジは、試薬を 1 つ又はそれより多くの分離した組成物として保持する、又は、随意に、試薬の適合性が許容する場合には混和物として保持する、1 つ又はそれより多くの容器を含むことができる。カートリッジは、バッファー、希釈液、標準物質（例えばキャリブレーション及び対照）、及び／又はサンプルの加工、洗浄、若しくは任意の他のアッセイのステップの遂行において有用な他の材料といった、ユーザーの観点から所望され得る他の材料も含むことができる。カートリッジは、上記の特異的結合メンバーのうちの 1 つ又はそれより多くを含むことができる。

30

40

【0368】

代替的に又は付加的に、キットは、キャリブレーション若しくは対照、例えば精製され、随意に凍結乾燥された又は液体、ゲル若しくは他の形態の対象検体をカートリッジ上に又は別々に含むことができ、並びに／又は上記のデバイス及び方法による使用のための少なくとも 1 つ容器（例えば、チューブ、マイクロタイタープレート又はストリップ）を含むことができ、並びに／又はアッセイバッファー又は洗浄バッファーなどのバッファーを含むことができ、そのうちのいずれのものも、濃縮溶液として提供され得る。いくつかの実施形態において、キットは、アッセイを実行するのに必要なすべての構成要素、すなわち試

50

薬、標準物質、バッファー、希釈液等を含む。指示は、標準曲線の生成のための指示も含むことができる。

【0369】

キットは、対象検体の定量化のための参照標準を更に含むことができる。参照標準を用いて、対象検体濃度の内挿及び／又は外挿のための標準曲線を確立することができる。キットは、濃度レベルに関して異なる参照標準を含むことができる。例えば、キットは、高濃度レベル、中間濃度レベル、又は低濃度レベルのいずれかの1つ又はそれより多くの参照標準を含むことができる。参照標準のための濃度の範囲に関しては、これをアッセイごとに最適化することができる。参照標準のための例示的な濃度範囲には、例えば、約10 fg/mL、約20 fg/mL、約50 fg/mL、約75 fg/mL、約100 fg/mL、約150 fg/mL、約200 fg/mL、約250 fg/mL、約500 fg/mL、約750 fg/mL、約1000 fg/mL、約10 pg/mL、約20 pg/mL、約50 pg/mL、約75 pg/mL、約100 pg/mL、約150 pg/mL、約200 pg/mL、約250 pg/mL、約500 pg/mL、約750 pg/mL、約1 ng/mL、約5 ng/mL、約10 ng/mL、約12.5 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約40 ng/mL、約45 ng/mL、約50 ng/mL、約55 ng/mL、約60 ng/mL、約75 ng/mL、約80 ng/mL、約85 ng/mL、約90 ng/mL、約95 ng/mL、約100 ng/mL、約125 ng/mL、約150 ng/mL、約165 ng/mL、約175 ng/mL、約200 ng/mL、約225 ng/mL、約250 ng/mL、約275 ng/mL、約300 ng/mL、約400 ng/mL、約425 ng/mL、約450 ng/mL、約465 ng/mL、約475 ng/mL、約500 ng/mL、約525 ng/mL、約550 ng/mL、約575 ng/mL、約600 ng/mL、約700 ng/mL、約725 ng/mL、約750 ng/mL、約765 ng/mL、約775 ng/mL、約800 ng/mL、約825 ng/mL、約850 ng/mL、約875 ng/mL、約900 ng/mL、約925 ng/mL、約950 ng/mL、約975 ng/mL、約1000 ng/mL、約2 µg/mL、約3 µg/mL、約4 µg/mL、約5 µg/mL、約6 µg/mL、約7 µg/mL、約8 µg/mL、約9 µg/mL、約10 µg/mL、約20 µg/mL、約30 µg/mL、約40 µg/mL、約50 µg/mL、約60 µg/mL、約70 µg/mL、約80 µg/mL、約90 µg/mL、約100 µg/mL、約200 µg/mL、約300 µg/mL、約400 µg/mL、約500 µg/mL、約600 µg/mL、約700 µg/mL、約800 µg/mL、約900 µg/mL、約1000 µg/mL、約2000 µg/mL、約3000 µg/mL、約4000 µg/mL、約5000 µg/mL、約6000 µg/mL、約7000 µg/mL、約8000 µg/mL、約9000 µg/mL、又は約10000 µg/mLが含まれるが、これらに限定されない。

【0370】

キット内で提供される任意の特異的結合メンバーは、フルオロフォア、酵素、デンドリマー、ビーズ、ナノ粒子、ナノビーズ、マイクロ粒子、マイクロビーズ、ポリマー、タンパク質、ビオチン／アビジン標識、又はそれらに類するものなどの標識を組み込むことができ、又は、キットは、特異的結合メンバーを標識するための試薬又は特異的結合メンバーを検出するため及び／若しくは検体を標識するための試薬又は検体を検出するための試薬を含むことができる。所望であれば、キットは、1つ又はそれより多くの異なるタグ又は標識を含有することができる。キットは、切断媒介試薬などの、切断を惹起する構成要素も含むことができる。例えば、切断媒介試薬は、ジチオスレイトール（DTT）又はトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン）TCEPなどの、還元剤を含むことができる。特異的結合メンバー、キャリブレータ、及び／又は対照は、別容器で提供されるか、又は適切なアッセイ形式若しくはカートリッジの中へ前もって分注され得る。

【0371】

キットは、例えば、マルチプレックス化アッセイにおいてサンプル中の1つ又はそれよ

り多くの標的検体を検出するために、1つ又はそれより多くの特異的結合メンバーを含むことができる。キット中の異なるタイプの特異的結合メンバーの数は、キットの意図された使用に広範に依存する範囲であり得る。キット中の特異的結合メンバーの数は、1から約10まで、又はそれより高い範囲であり得る。例えば、キットは、1から10までの特異的結合メンバー、1から9までの特異的結合メンバー、1から8までの特異的結合メンバー、1から7までの特異的結合メンバー、1から6までの特異的結合メンバー、1から5までの特異的結合メンバー、1から4までの特異的結合メンバー、1から3までの特異的結合メンバー、1から2までの特異的結合メンバー、2から10までの特異的結合メンバー、2から9までの特異的結合メンバー、2から8までの特異的結合メンバー、2から7までの特異的結合メンバー、2から6までの特異的結合メンバー、2から5までの特異的結合メンバー、2から4までの特異的結合メンバー、3から10までの特異的結合メンバー、3から9までの特異的結合メンバー、3から8までの特異的結合メンバー、3から7までの特異的結合メンバー、3から6までの特異的結合メンバー、3から5までの特異的結合メンバー、3から4までの特異的結合メンバー、4から10までの特異的結合メンバー、4から9までの特異的結合メンバー、4から8までの特異的結合メンバー、4から7までの特異的結合メンバー、4から6までの特異的結合メンバー、5から10までの特異的結合メンバー、5から9までの特異的結合メンバー、5から8までの特異的結合メンバー、5から7までの特異的結合メンバー、5から6までの特異的結合メンバー、6から10までの特異的結合メンバー、6から9までの特異的結合メンバー、6から8までの特異的結合メンバー、6から7までの特異的結合メンバー、7から10までの特異的結合メンバー、7から9までの特異的結合メンバー、7から8までの特異的結合メンバー、8から10までの特異的結合メンバー、又は9から10までの特異的結合メンバーを含むことができる。1つ又はそれより多くの特異的結合メンバーの各々は、異なる標的検体へ結合することができ、各々の特異的結合メンバーは、異なる検出可能標識により標識され得る。例えば、キットは、第1の標的検体へ結合する第1の特異的結合メンバー、第2の標的検体へ結合する第2の特異的結合メンバー、第3の標的検体へ結合する第3の特異的結合メンバー等を含むことができ、第1の特異的結合メンバーは第1の検出可能標識により標識される、第2の特異的結合メンバーは第2の検出可能標識により標識される、第3の特異的結合メンバーは第3の検出可能標識により標識される等である。1つ又はそれより多くの特異的結合メンバーに加えて、キットは、好適なバッファー媒質及びそれに類するような1つ又はそれより多くの追加のアッセイ構成要素を更に含むことができる。最後に、キットは、本発明による検体検出の方法において特異的結合メンバーを使用するための指示を含むことができ、使用のためのこれらの指示は、キットのパッケージ及び／又はパッケージ挿入物上に存在し得る。

【0372】

随意に、キットは、品質管理構成要素（例えば、感受性パネル、キャリブレータ、及び陽性対照）を含む。品質管理試薬の調製は、当技術分野において周知であり、様々な免疫診断製品用の挿入シート上に記載される。感受性パネルメンバーは、アッセイ性能特性を確立するために随意に使用され、更に随意にキット試薬の完全性及びアッセイの標準化の有用な指標である。

【0373】

キットは、診断的アッセイを実施するため又は品質管理評価を促進するために必要とされる、バッファー、塩、酵素、酵素補因子、基質、検出試薬、及びそれらに類するような他の試薬も随意に含むことができる。試験サンプルの単離及び／又は処理のためのバッファー及び溶液（例えば前処理試薬）などの他の構成要素も、キット中に含めることができる。キットは、1つ又はそれより多くの他の対照を追加で含むことができる。キットの構成要素のうちの1つ又はそれより多くを凍結乾燥することができ、その場合、キットは凍結乾燥された構成要素の再構成のために好適な試薬を更に含むことができる。構成要素のうちの1つ又はそれより多くは、液体形態であり得る。

【0374】

キットの様々な構成要素は、随意に、必要に応じて好適な容器中で提供される。キットは、サンプルの保持又は保管のための容器（例えば尿、唾液、血漿、脳脊髄液、若しくは血清のサンプル用の容器若しくはカートリッジ、又は組織吸引液を作製するように組織を保管、輸送、若しくは加工するための適切な容器）を更に含むことができる。適切な場合には、キットは、随意に、反応容器、混合容器、及び、試薬又は試験サンプルの調製を促進する他の構成要素も含有することができる。キットは、試験サンプルの取得を支援する1つ又はそれより多くのサンプル採取／取得機器（様々な血液採取／移送デバイスなど（マイクロサンプリングデバイス、マイクロニードル、又は他の最小侵襲性の無痛血液採取方法；血液採取チューブ；ランセット；キャピラリー血液採取チューブ；他の単一の指先穿刺血液採取方法；頬腔スワブ、鼻／咽頭スワブ；組織サンプルを取得、保管若しくは吸引するための、16ゲージ又は他のサイズの針、パンチ生検用の円形ブレード（例えば1～8mm、又は他の適切なサイズ）、メス又はレーザー（例えば特に手持ち式）、シリンジ、滅菌容器、又はカニユーレ；又はそれらに類するものなど））も含むことができる。キットは、関節吸引、錐体生検、パンチ生検、細針吸引生検、画像誘導経皮的針吸引生検、気管支肺胞洗浄、内視鏡下生検、及び腹腔鏡下生検を支援する1つ又はそれより多くの機器を含むことができる。

10

【0375】

タグ又は検出可能標識が少なくとも1つのアクリジニウム化合物であるか又はそれを含む場合、キットは、少なくとも1つのアクリジニウム-9-カルボキサミド、少なくとも1つのアクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステル、又はその任意の組み合わせを含むことができる。タグ又は検出可能標識が少なくとも1つのアクリジニウム化合物であるか又はそれを含む場合、キットは、バッファー、溶液、及び／又は少なくとも1つの塩基性溶液といった過酸化水素源も含むことができる。所望であれば、キットは、磁気粒子、ビーズ、膜、足場分子、フィルム、ろ紙、ディスク、又はチップといった固相を含有することができる。

20

【0376】

所望されるならば、キットは、試験サンプルを別の検体についてアッセイするための1つ又はそれより多くの構成要素を、単独で、又は指示との更なる組合せで更に含むことができ、それは、感染性疾患、心臓疾患、代謝疾患、甲状腺疾患等の疾患状態又は障害のバイオマーカーのような、バイオマーカーであり得る。

30

【0377】

本発明は、以下の非限定的実施例によって例証される複数の態様を有する。

【実施例】

【0378】

実施例1

低コストDMFチップの製作

低コストの可撓性DMFチップを、電極パターニングのための湿式リフトオフプロセスと組み合わせたロール・ツー・ロール（R2R）フレキシ印刷を使用して製作した。製作プロセスの概略図を図18に示す。Melinex ST506ポリエチレンテレフタレート（PET）5.0ミルの基板（1）のロールを、DMF電極印刷のための出発原料として使用した。黄色インク（Sun Chemical）の層を、Aniloxローラ組立体上で、3.8ml/m²のインク転写体積を使用して、10m/分間の速度で、1.14mm厚の印刷版（Flint MCO3）を使用して、PET基板上にフレキシ印刷した（2）。DMF電極パターンのネガ像が、フレキシ印刷ステップから得られる（3）。金属堆積の前に、インクを熱風オーブン中で2回乾燥した（2×100℃）。EVAR2R金属エバポレーターを使用して、印刷されたPET基板の上へ銀金属の層を堆積させて、80nmの厚みで銀の様なコーティングを形成した（4）。金属化されたインクフィルム基板（5）に、1m/分間のスピードで、超音波処理槽中で超音波とアセトンの組合せを使用して、湿式リフトオフプロセスを行った（6）。この化学的／物理的处理は銀-インク層の溶解を可能にし、その一方で、銀のみの層をそのままに保持する。インク

40

50

ー銀層を除去すると、50又は140 μm のいずれかの電極ギャップの間隔を有する80個のアクチュエーション電極(2.25×2.25mm)からなるDMF印刷電極パターンが得られた(7)。品質管理(QC)チェックとして、単一のロールから得られた合計で80～90のランダムなチップを、電極ギャップの間隔及びコネクタリード幅のバラツキについて視覚的に検査した。許容されるギャップ規格を有すると判定されるチップの典型的な収率は、100%近くであった。単一の製作された可撓性チップを図19に示す。製作された可撓性チップは3インチ×2インチの測定値であり、電極、リザーバ、コンタクトパッド及びリードを含む。

【0379】

誘電体コーティングを、ロータリースクリーン印刷又はグラビア印刷のいずれかの使用によって電極及びリザーバへ塗工した。ロータリースクリーン印刷の場合、Henkel EDAC PF-455Bを、Gallus NF(400L)スクリーンにより、2m/分間の印刷速度及び50%のUV硬化率で印刷することによって、誘電性コーティングとして使用した。典型的な誘電体の厚みは10～15 μm であった。グラビア印刷の場合、シリンダーは、IPD-350(Inkron)などの高粘度誘電体インクを50ml/m²のインク体積を使用して2m/分間の速度で印刷するように設計された。グラビア印刷の場合の典型的な誘電体の厚みは7～8 μm であった。最後の疎水性層は、Millidyne Avalon 87又はCytunix Fluoropel PFC 804 UCのいずれかのコーティングを使用して、グラビアシリンダー(140～180L)及び8m/分間の印刷速度により印刷され、続いて4回の逐次的なオープン乾燥ステップ(4×140℃)を行った。典型的な疎水性の厚みは40～100nmであった。

【0380】

あるいは、個々のチップの小さなバッチの場合、誘電性コーティング及び疎水性コーティングは、それぞれ化学蒸着(CVD)及びスピコーティングを使用して施工することができる。

【0381】

実施例 2

低コストDMFチップの機能試験

上記の実施例1で略述したように製造された3インチ×2インチのPETベースのDMF下部チップをアクチュエーション能力について試験した。図20は、0.7mm厚のガラス基板(3)が上に位置決めされた3インチ×2インチのPETベースのDMFチップ(1)を示す。ガラス基板(3)は、ガラス基板の下面上の透明な酸化インジウムスズ(ITO)電極と、ITOの電極の上を覆うテフロンコーティングとを含む。DMFチップは、直線状縁部の電極設計及び電極間の50 μm ギャップを有する80個の銀のアクチュエーション電極を、8つのバッファリザーバと共に含む(上記の実施例1を参照)。

【0382】

下部電極は、誘電性パリレンCの層(6～7 μm 厚)及びテフロン(50nm厚)の最終コーティングにより、それぞれCVD及びスピコーティングによってコーティングされた。およそ50 μl の0.1%の界面活性剤を含有するPBSバッファ(2)を、底部DMFチップ上の4つの隣接するリザーバの中へピペットで移した。小滴サイズは700～1,500nl(1つ又は2つの小滴)の範囲であり、縦及び横の水平方向の動き(4)に加えて、混合のために必要な円形掃引パターンについてチェックされた。小滴アクチュエーションは、90Vrmsの電圧を使用して達成された。チップ上のアクチュエーション電極のおよそ90%を試験し、完全に機能的であることが見出された。

【0383】

実施例 3

低コストDMFチップ上でのTSHイムノアッセイ

上記の実施例2において記載したようなガラス基板を上重ねた3インチ×2インチのPETベースのDMFチップを、化学発光検出を使用して、甲状腺刺激ホルモン(TSH)イムノアッセイを行う能力について試験した。モックサンプルは、ブロッキング剤及び

界面活性剤を含有するTBSバッファの中へ少量添加されたTSHキャリブレーション物質を含んでいた。3つのサンプルを試験した(0、4、40 μ IU/ml)。2 μ lの、5 μ mの磁性マイクロ粒子(3 $\times$ 10⁸ 粒子/ml)上にコーティングされた抗ベータTSH捕捉抗体を、マイクロ粒子リザーバからDMF電極アレイの中央へ分注した。磁性マイクロ粒子は、DMFチップ(図21A)下にネオジム磁石バー(3インチ $\times$ 1/2インチ $\times$ 1/4インチ厚、比透磁率 μ_r =1.05、残留磁界の強さ B_r =1.32 T)を係合させることによってバッファから分離された。5 μ lのサンプルをマイクロ粒子スラグへ移動させ、続いてマイクロ粒子懸濁物を4つの電極の正方形構成の上で5分間混合した(図21B)。マイクロ粒子を磁石によってサンプルから分離し、上清を廃棄リザーバへ移動させた(図21C及び21D)。2 μ lの、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)へコンジュゲートされた1 μ g/mlの抗TSH検出抗体をマイクロ粒子スラグへ移動させ、2分間混合した。マイクロ粒子を磁石によって分離し、上清を廃棄リザーバへ移動させた。イムノアッセイサンドイッチ複合体を含有するマイクロ粒子を、4 $\times$ 2 μ lの0.1%の界面活性剤を含有するPBSの洗浄バッファにより合計4回洗浄した。ステップが完了した後に、各々の洗浄ステップからの洗浄バッファを廃棄へ移動させた。化学発光基質は1 μ lのSuperSignal H₂O₂及び1 μ lのルミノール(ThermoFisher Scientific)からなり、それをマイクロ粒子スラグへ移動させ、続いて6分間混合した。化学発光シグナルを、5VのDC電源を備えた集積Hamamatsu H10682-110 PMTを使用して、427 nm発光(347 nm励起)で測定した。用量-応答曲線を、相対的発光に対してプロットした(図21Eを参照)。

【0384】

実施例 4

DMF上部電極チップ及びウェルアレイの製作及び設計

上部電極設計：

ウェルアレイを収めた低コストの可撓性DMF上部電極チップを、ロール・ツー・ロール(R2R)グラビア印刷及びUVインプリンティングを用いて製作した。図22を参照すると、基本設計(1)は、DMFチップの上部電極として使用されたポリエチレンテレフタレート(PET)の可撓性基板上に印刷された2組のウェルアレイを組み入れた。設計は、Melinex ST504 PET基板(2)(Solutia、OC50 ST504)に印刷された酸化インジウムスズ(ITO)の100 nm厚の層(3)からなるものであった。PEDOT:PSSプライマー(4)のコーティングを用いて、最終ウェルアレイを収めたUVエンボス加工レジスト(5)の接着性を改善した。

【0385】

上部電極のロール・ツー・ロール製作：

図22Bは、DMF上部電極の製作プロセスの概略図を示す。グラビア印刷(8)を用いて、イソプロパノールで希釈して粘度を低減したPEDOT:PSS(Clevios VP AI4083)(7)の20 nm厚のプライマー層で、5ミルのMelinex ST504 PET基板(6)をコーティングした。ロールサイズは、250 m $\times$ 200 mm $\times$ 125 μ mであり、印刷速度は10 m/分であった。得られた、プライマーコーティングされたITO電極(9)を第2のR2R印刷ラインへ移送し、ここでUVレジスト(10)の層がグラビアコーティング(11)により塗工されて、UVエンボス加工(13)のための前駆体が形成された。ナノアレイ型と接触させ、次いでUV硬化することにより、切断の準備ができた最終R2R上部電極フィルム(14)が生成された。

【0386】

ウェル設計：

ウェル設計を図23に示す。ITO共通電極を収めた上部チップは、下部チップ(17)の2つの外部アクチュエーション電極と位置合わせされるように位置決めされた2つのナノ寸法ウェルアレイ(16)を各々が収める3インチ $\times$ 1.4インチのストリップ(15)に切断されるように設計された。上部電極を下部チップの上に配置することで、最終

DMFチップ組立体（18）がもたらされた。各アレイは、およそ60,000ウェル（ 245×245 ）を収めた。

【0387】

図24A及び図24Bを参照すると、六角形（19）及び直線列（20）の、2つの異なるウェル間隔形式が初期設計において使用された。加えて、2つのシム設計を用いて、2つの異なるウェルサイズ（21）、すなわち幅4.2 μm 幅×深さ3.0 μm 、ピッチ8.0 μm ；4.5 μm ×3.2 μm 、ピッチ8.0 μm が印刷された。続いて行われる直径2.7 μm のビーズのマイクロ粒子装填に合わせて最適化するために、ウェルサイズ及び幾何学的間隔の変更を行った。種々のR2R行程に対して製作後品質管理（Post-fab QC）を行って、適正なウェル間隔、サイズ及び一体性をチェックした。変形したウェルが観察された場合、又はウェルの間隔及び／若しくはサイズが不正確な場合、新たなシムを製造してアレイを再度印刷した。図25は、六角形（22）及び直線列（23）アレイについて、倍率200Xの光学像を示す。

【0388】

実施例5

ウェルアレイを収めたDMF上部電極チップの組立て

DMFプラスチックチップ組立体：

図26は、上記実施例4に記載するような、DMF上部電極チップ及びナノ寸法ウェルアレイからの集積DMFウェルデバイスの組立てを概略的に記載する。DMFチップは、 2×2 片の90 μm 両面テープ（24）（3M）を下部DMFチップ（25）の両側に配置することによって組み立てられる。埋め込まれたアレイを収めた上部電極（26）は、2つのアレイの位置が下に重なる2つのアクチュエーション電極と位置合わせされるように下部チップの上に中心を合わせて配置される。最終的な組み立てられたチップ（27）は、180 μm （ $2 \times 90 \mu\text{m}$ テープ）の間隙高さを有する。

【0389】

実施例6

低コストDMF－ウェル集積チップ上でのTSHイムノアッセイ

TSHに対するイムノアッセイを、DMF、マイクロ寸法ウェルアレイ及び蛍光物質のデジタル検出の組合せを用いて説明する（図27A～図27G）。DMFチップ（上部及び下部電極）に、（1）に示すように、イムノアッセイ（IA）試薬があらかじめ装填される（図27A）。アッセイは、DMFチップ上で空気をフィラー流体として用いて実行される。サンプルは、全血、血清、血漿、尿、痰、間質液又は同様のマトリックスなどの、生物学的サンプルであり得る。捕捉マイクロ粒子は、 $2 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ 粒子/ mL の密度の、抗ベータTSH抗体でコーティングされた固相磁気マイクロ粒子の懸濁物からなる。およそ1～2 μL のサンプルがDMFチップ上へ移動され、1～2 μL のマイクロ粒子と組み合わせられ、続いてDMFチップのゾーン1（2）内で混合される（図27B）。ゾーン1は、サンプルの組合せ、混合及び洗浄用に確保された16個のDMF電極からなり、磁気マイクロ粒子上にTSHの捕捉複合体を形成する。インキュベーション時間は、1～10分の範囲とすることができ、続いて洗浄バッファー1リザーバからの1～2 μL の洗浄バッファー（PBS、0.1%界面活性剤）で1～3回洗浄される。上清は、磁石をDMFチップの下に係合させて上清を廃棄リザーバ1へ移動させることによって、IA複合体から除去される。

【0390】

固相上に捕捉されたTSH抗原を含有するマイクロ粒子スラグは、1～2 μL の、ビオチンで標識された抗ベータTSH検出コンジュゲート抗体（ストレプトアビジン－ β －ガラクトシダーゼ複合体、PBS中、濃度40 pM）中で再懸濁される。混合物を、DMF電極アレイ上のゾーン2内の 4×4 電極（3）の上で混合しながら、1～10分間インキュベーションする（図27C）。磁石に係合されて磁気マイクロ粒子を捕捉し、上清は、廃棄リザーバ1へ除去される。スラグは、洗浄バッファー2リザーバからの1～2 μL の洗浄バッファー（PBS、0.1%界面活性剤）で1～3回洗浄される。上清は、磁石を

DMFチップの下に係合させて上清を廃棄リザーバ2へ移動させることによって、IA複合体から除去される。イムノアッセイサンドイッチ複合体を含有するマイクロ粒子スラグは、 $1 \sim 2 \mu\text{l}$ の $100 \mu\text{M}$ 検出基質(4)(レゾルフィン- β -D-ガラクトピラノシド、RGP)を移動させることによって再懸濁される(図27D)。混合物を1~3分間インキュベーションして、RGPの酵素ターンオーバーを可能にさせ、 β -ガラクトシダーゼによるRGPの酵素ターンオーバーから蛍光産物を生成させる。

【0391】

混合物は、図27Eに示すように、下部基板又は上部基板のいずれかの上にフェムトリットルウェル(6)のアレイを収めたDMFチップのスポットへ移動される(5)。フェムトリットルウェルサイズのサイズは、アッセイに使用されているマイクロ粒子のサイズよりわずかに大きい。ウェルの数は、1,000~2,000,000の範囲であり得る。マイクロ粒子は、重力(受動的装填)又は磁石(能動的装填)のいずれかを用いてウェル内に堆積される。過剰の上清は、廃棄3リザーバへ移動される。

【0392】

フェムトリットルウェルは、図27F及び図27Gに示すように、 $1 \sim 5 \mu\text{l}$ の分極可能な不混和性流体(すなわち、有機溶媒、油等)を、誘電体上のエレクトロウェットティング(EWOD)、誘電泳動(DEP)力、又は表面弾性波(SAW)を使用してアレイ位置(7、8)へ移動させ、それによりウェルをシールすることによって、シールされる。好適な分極可能な不混和性流体のいくつかの例は、シリコーン油、フルオロシリコーン油、鉱物油、1-ヘキサノール、THF、m-ジクロロベンゼン、クロロホルム、及びそれに類したものを含む(非特許文献34(S. Fan, et al., Lab On Chip, 9, 1236, 2009);非特許文献33(D. Chatterjee, et al., Lab On Chip, 6, 199, 2006))。アッセイ全体のためのフィルター流体は、空気である。

【0393】

ウェル内の全粒子の数は、広視野顕微鏡/CCDカメラによる白色光照明と、それに続く、検出標識を含有するビーズの数を判定するための $574 \text{ nm} / 615 \text{ nm}$ 励起/発光(露光時間=3~10秒間)での撮像によって判定される。最終TSH濃度は、TSHキヤリブレーションによる標準曲線の実行から判定される。デジタル定量化は、ポアソン方程式及び陰性ビーズに対する陽性ビーズの比を用いて決定される。

【0394】

実施例7

分極可能な流体によるナノ寸法ウェル上部の装填

概略的なイムノアッセイ形式:

3インチ×2インチのPETベースのDMFチップを用いて、ウェルアレイにおけるデジタル蛍光検出と連結されたELISAベースのサンドイッチイムノアッセイを実行することができる。図28を参照すると、分析される特定の抗原を含有するサンプル(3)は、捕捉抗体(1)でコーティングされた磁気マイクロ粒子(2)と混合され、所望の抗原のイムノキャプチャーが可能になるように混合される。洗浄後、捕捉された抗原(4)は、検出部分(6)で標識された第2の検出抗体(5)と混合される。サンドイッチイムノアッセイ複合体(7)を含有するビーズ混合物を再び洗浄して、未結合の検出抗体を除去する。マイクロ粒子は、水滴をアレイへ移動させ、磁石を適用してビーズをウェル内へ引っ張ることによって、ウェルアレイの上部基板内に装填される。ウェルは、DMF力を用いて、分極可能な不混和性流体をウェルの上に移動させることによってシールされる。CCDカメラは、アレイを撮像して、陽性及び陰性なマイクロ粒子の数を判定する。サンプルは、ポアソン統計量を用いて定量化される。すべてのイムノアッセイ処理ステップは、空気をフィルター流体として用いてDMFチップ上で実行される。

【0395】

TSHイムノアッセイ-DMF:

2. $7 \mu\text{m}$ の磁気マイクロ粒子上にコーティングされた $1 \sim 2 \mu\text{l}$ の抗TSH捕捉抗体

(3×10^8 粒子 / ml) が、DMF チップ上のマイクロ粒子リザーバから DMF 電極アレイの中央へ分注される。磁気マイクロ粒子は、DMF チップの下に位置する磁石を係合し、上清を廃棄リザーバへ移動させることによって、バッファーから分離される。1 μ l のアリコートサンプルを DMF サンプルリザーバから引き出してマイクロ粒子スラグへ移動させ、続いて混合ステップが行われ、そこで小滴は、1 ~ 5 分間にわたっていくつかの電極の上を移動される。マイクロ粒子は、下部磁石を適用し、続いて上清を廃棄リザーバへ除去することによってサンプルから分離される。1 ~ 2 μ l の、 β -ガラクトシダーゼ (β -gal) にコンジュゲートされた抗 TSH 検出抗体 (0.5 μ g / ml) が、マイクロ粒子スラグへ移動され、2 ~ 5 分間混合される。マイクロ粒子は、下部磁石を使用することによって分離され、上清が廃棄リザーバへ移動される。イムノアッセイサンドイッチ複合体を含有するマイクロ粒子は、0.1 % 界面活性剤を含有する PBS 洗浄バッファー $4 \times 2 \mu$ l で、全部で 4 回洗浄される。各洗浄ステップからの洗浄バッファーは、ステップが完了した後、移動されて廃棄される。1 μ l の 100 μ M レゾルフィン- β -D-ガラクトピラノシド (RGP) が RGP リザーバから取り出されて、マイクロ粒子スラグへ移動され、次いで 15 ~ 30 秒間混合される。ビーズは、いまやウェルアレイ内への堆積の準備ができたことになる。

【0396】

TSH イムノアッセイ-デジタルアレイ検出:

図 29 に示すように、DMF で導かれるアレイ内へのマイクロ粒子の上部装填のための基本構成要素は、80 nm 厚の銀電極 (8) (電極ギャップ < 100 μ m、2.25 mm $\times$ 2.25 mm) を有する下部 PET ベース電極チップ、5 ~ 10 μ m 厚の誘電性 / 疎水性層 (9)、ウェルのアレイ (14) (1 つを超えないマイクロ粒子を保持するように構成された) を収めた上部 PET ベース ITO 電極 (10) チップ、2.7 μ m の磁気マイクロ粒子 (12) を含有する水滴 (11) を含む。フィルター流体は、空気 (13) である。上部電極と下部電極との間の間隙高さは、およそ 180 μ m (90 μ m の両面テープ 2 片に由来)。

【0397】

輸送及びシールは、DMF 力の組合せ (EWOD、DEP、及び / 又は電気媒介力) を用いて、水性流体と、シリコン油などの不混和性流体とを移動させることによって達成される。同じ DMF チップ上で水滴及び油滴を移動させるのに異なる駆動電圧が必要とされることが以前に示されている (非特許文献 34 (S-K Fan, et al., Lab on Chip, 9, 1236, 2009))。

【0398】

蛍光基質 RGP を、イムノアッセイ複合体を含有する水滴に添加した後 (図 30A)、小滴は、20 ~ 50 V rms (1 KHz) の電圧を用いて、およそ 60,000 ウェルを収めたウェルアレイ (245 $\times$ 245 アレイ; 直径 4.2 μ m; 深さ 3.0 μ m; ピッチ 8.0 μ m) の下に位置決めされた電極へ移動される。上部磁石 (15) が係合されて、ウェル内へのマイクロ粒子の効率的な装填を促進する (図 30B)。総堆積時間は、30 ~ 60 秒間である。上部磁石が取り外されると、水滴が移動されて除去され、表面に結合した堆積されたビーズの薄層が残される (図 30C)。シリコン油の小滴は、200 ~ 300 V (DC) の電圧を用いてリザーバから移動され、アレイの下に位置決めされた電極へと移動され (図 30D)、これにより表面に結合した粒子があれば洗い流され、一方、ウェル内に収容されたマイクロ粒子はシールされる。レゾルフィンに対する RGP の酵素ターンオーバーから発生される蛍光が、CCD カメラによって 574 / 615 nm (励起 / 発光) において監視される。「オフ」マイクロ粒子に対する「オン」マイクロ粒子の比が判定される。サンプル中の TSH 濃度は、TSH 検量線からの補間によって判定される。

【0399】

最後に、本発明の様々な態様及び特色は、様々な実施形態及び具体的な実施例に関して本明細書において記載されたが、そのすべては従来通りに作製又は実行することができ、

本発明は添付の請求項の全範囲内での保護を得る権利を与えられることが理解されるだろう。

【0400】

前述の詳細な説明及び付随する実施例は単に例示的であり、もっぱら添付された請求項及びそれらの均等物によって定義される本発明の範囲に対する限定として見なすことはできないことが理解される。

【0401】

開示された実施形態への様々な変更及び修飾は当業者には明らかである。かかる変更及び修飾（化学構造、置換基、誘導体、中間体、合成、組成物、製剤、又は本発明の使用の方法に関係するものが含まれるがこれらに限定されない）は、その趣旨及び範囲から逸脱せずに行うことができる。

完璧を期して、本発明の様々な態様を以下の番号付けした条項において記述する。

【0402】

条項1．デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスであって、

第1の基板及び第2の基板を備え、前記第2の基板は前記第1の基板から間隙によって分離されており、前記第1の基板は液滴上に電気的アクチュエーション力を発生させる複数の電極を備え、

前記液滴の一部を保持する寸法のウェルのアレイを備え、前記ウェルのアレイの少なくとも一部は、前記複数の電極のうちの1つ又はそれより多くと前記間隙との間に位置決めされる、

ことを特徴とする、デバイス。

【0403】

条項2．前記複数の電極は、前記第1の基板の表面上に位置決めされることを特徴とする、条項1に記載のデバイス。

【0404】

条項3．前記第1の基板の前記表面上に配置された、前記複数の電極を覆う第1の層をさらに備えることを特徴とする、条項1～条項2のいずれかに記載のデバイス。

【0405】

条項4．前記第1の基板は、前記液滴が導入される第1の部分と、液滴がそこへ向かって移動する第2の部分とを備えることを特徴とする、条項1～条項3のいずれかに記載のデバイス。

【0406】

条項5．前記複数の電極及び前記第1の層は、前記第1の基板の前記第1の部分から前記第2の部分へ延びることを特徴とする、条項4に記載のデバイス。

【0407】

条項6．前記ウェルのアレイは、前記第1の基板の前記第2の部分内に位置決めされることを特徴とする、条項5に記載のデバイス。

【0408】

条項7．前記第2の基板は、第1の部分及び第2の部分の部分を備え、前記第1の部分は、前記第1の基板の前記第1の部分に面した配置にあり、前記第2の部分は、前記ウェルのアレイに面した配置にあることを特徴とする、条項4に記載のデバイス。

【0409】

条項8．前記第2の基板の前記第2の部分は、実質的に透明であり、前記ウェルのアレイの光学的照合を容易にすることを特徴とする、条項7に記載のデバイス。

【0410】

条項9．前記第1の層の表面上に配置された第2の層をさらに備えることを特徴とする、条項3に記載のデバイス。

【0411】

条項10．第2の層は、前記第1の基板の前記第1及び第2の部分の上に延びることを特徴とする、条項9に記載のデバイス。

10

20

30

40

50

【0412】

条項11. 前記第1の層は誘電性層であり、前記第2の層は疎水性層であることを特徴とする、条項9～条項10のいずれかに記載のデバイス。

【0413】

条項12. 前記ウェルのアレイは、前記第2の層内に位置決めされることを特徴とする、条項9～条項11のいずれかに記載のデバイス。

【0414】

条項13. 前記ウェルのアレイは、前記第1の層内に位置決めされることを特徴とする、条項3に記載のデバイス。

【0415】

条項14. 前記ウェルのアレイは、親水性表面を有することを特徴とする、条項1～条項13のいずれかに記載のデバイス。

【0416】

条項15. 前記ウェルのアレイは、前記ウェルのアレイの上を移動する小滴中に存在するビーズ又は粒子の受入れ及び保持を促進するように配向された側壁を備えることを特徴とする、条項1～条項14のいずれかに記載のデバイス。

【0417】

条項16. 前記ウェルのアレイは、第2の側壁に対向した第1の側壁を備え、前記第1の側壁は、前記ウェルの底部に対して鈍角に配向され、前記第2の側壁は、前記ウェルの前記底部に対して鋭角で配向され、小滴の移動は、前記ウェルの前記底部に対して平行に前記第1の側壁から前記第2の側壁へ向かう方向であることを特徴とする、条項16に記載のデバイス。

【0418】

条項17. 前記ウェルのアレイは、切頭円錐形を有し、前記切頭円錐形の狭い方の部分が前記ウェルのアレイの開口部を与えることを特徴とする、条項15に記載のデバイス。

【0419】

条項18. 前記ウェルのアレイは、第2の側壁に対向した第1の側壁を備え、前記第1の側壁の上部分は、前記ウェルの底部に対して鈍角に配向され、前記側壁の下部分は、前記ウェルの前記底部に対して垂直に配向され、前記第2の側壁は、前記ウェルの前記底部に対して垂直に配向され、前記小滴の移動は、前記ウェルの前記底部に対して平行に前記第1の側壁から前記第2の側壁へ向かう方向であり、前記第1の側壁の前記上部分は、前記ウェルの開口部にあることを特徴とする、条項15に記載のデバイス。

【0420】

条項19. デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスであって、

前記デバイスを定める第1の基板及び第2の基板を備え、前記第2の基板は前記第1の基板から間隙によって分離されており、前記デバイスは、第1の部分及び第2の部分を備え、

前記第1の部分は、複数の電極を備えており、生物学的サンプル由来の対象検体を含有する第1の液滴と、少なくとも1つのビーズを含有する第2の液滴とを組み合わせることをアクチュエーションし、

前記第2の部分は、前記液滴の一部を保持する寸法のウェルのアレイを備えることを特徴とする、デバイス。

【0421】

条項20. 前記複数の電極は、前記デバイスの前記第1の部分内にのみ位置決めされることを特徴とする、条項19に記載のデバイス。

【0422】

条項21. 前記複数の電極は、前記第1の基板の表面上に位置決めされることを特徴とする、条項19～条項20のいずれかに記載のデバイス。

【0423】

条項22. 前記第1の基板の前記表面上に配置された、前記複数の電極を覆う第1の層

10

20

30

40

50

をさらに備えることを特徴とする、条項 19～条項 21 のいずれかに記載のデバイス。

【0424】

条項 23. 前記第 1 の基板は、前記液滴が導入される第 1 の部分と、液滴がそこへ向かって移動する第 2 の部分とを備えることを特徴とする、条項 19～条項 22 のいずれかに記載のデバイス。

【0425】

条項 24. 前記複数の電極及び前記第 1 の層は、前記第 1 の基板の前記第 1 の部分から前記第 2 の部分へ延びることを特徴とする、条項 23 に記載のデバイス。

【0426】

条項 25. 前記ウェルのアレイは、前記第 1 の基板の前記第 2 の部分内に位置決めされることを特徴とする、条項 24 に記載のデバイス。

10

【0427】

条項 26. 前記第 2 の基板は、第 1 の部分及び第 2 の部分を備え、前記第 1 の部分は、前記第 1 の基板の前記第 1 の部分に面した配置にあり、前記第 2 の部分は、前記ウェルのアレイに面した配置にあることを特徴とする、条項 23 に記載のデバイス。

【0428】

条項 27. 前記第 2 の基板の前記第 2 の部分は、実質的に透明であり、前記ウェルのアレイの光学的照合を容易にすることを特徴とする、条項 26 に記載のデバイス。

【0429】

条項 28. 前記複数の電極は、前記間隙内に置かれた小滴を前記デバイスの前記第 2 の部分へ向かって移動させるように構成され、前記デバイスは、前記第 1 の部分を前記第 2 の部分へ流体的に接続する毛管部分を備え、前記毛管は、親水性材料を含んでおり、電気的力の非存在下で前記毛管部分を介して前記第 1 の部分から前記第 2 の部分への前記小滴の移動を促進することを特徴とする、条項 19～条項 27 のいずれかに記載のデバイス。

20

【0430】

条項 29. 第 2 の層が前記第 1 の層の上面上に配置されることを特徴とする、条項 22 に記載のデバイス。

【0431】

条項 30. 第 2 の層は、前記第 1 の基板の上に延びることを特徴とする、条項 29 に記載のデバイス。

30

【0432】

条項 31. 前記第 1 の層は誘電性層であり、前記第 2 の層は疎水性層であることを特徴とする、条項 29～条項 30 のいずれかに記載のデバイス。

【0433】

条項 32. 複数のウェルが前記第 2 の層内に位置決めされることを特徴とする、条項 29～条項 31 のいずれかに記載のデバイス。

【0434】

条項 33. 前記ウェルのアレイは、前記第 1 の層内に位置決めされることを特徴とする、条項 22 に記載のデバイス。

【0435】

条項 34. 前記ウェルのアレイは、親水性表面を有することを特徴とする、条項 19～条項 33 のいずれかに記載のデバイス。

40

【0436】

条項 35. 前記ウェルは、前記ウェルのアレイの上を移動する小滴中に存在するナノビーズ又はナノ粒子の受入れ及び保持を促進するように配向された側壁を備えることを特徴とする、条項 19～条項 34 のいずれかに記載のデバイス。

【0437】

条項 36. 前記ウェルは、第 2 の側壁に対向した第 1 の側壁を備え、前記第 1 の側壁は、前記ウェルの底部に対して鈍角に配向され、前記第 2 の側壁は、前記ウェルの前記底部に対して鋭角で配向され、小滴の移動は、前記ウェルの前記底部に対して平行に前記第 1

50

の側壁から前記第 2 の側壁へ向かう方向であることを特徴とする、条項 3 5 に記載のデバイス。

【0438】

条項 3 7. 前記ウェルは、切頭円錐形を有し、前記切頭円錐形の狭い方の部分が前記ウェルの開口部を与えることを特徴とする、条項 3 6 に記載のデバイス。

【0439】

条項 3 8. 前記ウェルは、第 2 の側壁に対向した第 1 の側壁を備え、前記第 1 の側壁の上部分は、前記ウェルの底部に対して鈍角に配向され、前記側壁の下部分は、前記ウェルの前記底部に対して垂直に配向され、前記第 2 の側壁は、前記ウェルの前記底部に対して垂直に配向され、前記小滴の移動は、前記ウェルの前記底部に対して平行に前記第 1 の側壁から前記第 2 の側壁へ向かう方向であり、前記第 1 の側壁の前記上部分は、前記ウェルの開口部にあることを特徴とする、条項 3 5 に記載のデバイス。

10

【0440】

条項 3 9. 表面弾性波マイクロ流体及び検体検出デバイスであって、

第 1 の基板及び第 2 の基板を備え、前記第 2 の基板は前記第 1 の基板から間隙によって分離されており、前記デバイスは、第 1 の部分及び第 2 の部分を備え、

前記第 1 の部分は、表面弾性波発生構成要素に連結された上層を備え、

前記第 2 の部分は、前記第 1 の基板又は前記第 2 の基板上に位置決めされた複数のウェルを備える

ことを特徴とする、デバイス。

20

【0441】

条項 4 0. 前記上層は、該上層の上面上にフォノン構造を含むことを特徴とする、条項 3 9 に記載のデバイス。

【0442】

条項 4 1. 前記上層は、圧電結晶層の上に重なることを特徴とする、条項 3 9 ～条項 4 0 のいずれかに記載のデバイス。

【0443】

条項 4 2. 前記第 2 の基板は、実質的に透明であることを特徴とする、条項 3 9 ～条項 4 0 のいずれかに記載のデバイス。

【0444】

30

条項 4 3. 表面弾性波マイクロ流体及び検体検出デバイスであって、

第 1 の基板及び第 2 の基板を備え、前記第 2 の基板は前記第 1 の基板から間隙によって分離されており、

前記第 1 の基板は、複数のウェルを備え、

前記第 2 の基板は、フォノン構造を備え、前記複数のウェル及び前記フォノン構造は、互いにわたって位置する

ことを特徴とする、デバイス。

【0445】

条項 4 4. 前記第 2 の基板は、上層であることを特徴とする、条項 4 3 に記載のデバイス。

40

【0446】

条項 4 5. 前記上層は、前記第 2 の基板上に配置され、前記フォノン構造は、前記上層上に位置することを特徴とする、条項 4 3 に記載のデバイス。

【0447】

条項 4 6. 前記第 1 の基板、第 2 の基板及び上層は、実質的に透明であることを特徴とする、条項 4 3 ～条項 4 5 のいずれかに記載のデバイス。

【0448】

条項 4 7. 液滴中の対象検体を検出する方法であって、

(a) 対象検体を含有する第 1 の液滴を準備するステップと、

(b) 前記対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する少なくとも 1 つの固体支持

50

体を含む第 2 の液滴を準備するステップと、

(c) 力を及ぼすエネルギーを用いて、前記第 1 の液滴を前記第 2 の液滴と共に操作して混合物を作製する、ステップと、

(d) 前記混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させるステップであって、前記アレイの 1 つ又はそれより多くのウェルは、前記少なくとも 1 つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ステップと、

(e) 前記混合物の一部をウェルのアレイへ移動させるステップの前又は後のいずれかに、前記混合物に検出可能標識を添加するステップと、

(f) 前記ウェル内の前記対象検体を検出するステップと、
を含むことを特徴とする、方法。

10

【0449】

条項 48. 前記少なくとも 1 つの固体支持体は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも 1 つの結合メンバーを含むことを特徴とする、条項 47 に記載の方法。

【0450】

条項 49. 前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの前に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 47～条項 48 のいずれかに記載の方法。

【0451】

条項 50. 前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの後に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 47～条項 48 のいずれかに記載の方法。

20

【0452】

条項 51. 前記検出可能標識は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも 1 つの結合メンバーを含むことを特徴とする、条項 47～条項 50 のいずれかに記載の方法。

【0453】

条項 52. 前記検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含むことを特徴とする、条項 47～条項 51 のいずれかに記載の方法。

【0454】

条項 53. 前記結合メンバーは、受容体又は抗体であることを特徴とする、条項 47～条項 52 のいずれかに記載の方法。

30

【0455】

条項 54. 前記エネルギーは、電気的アクチュエーション力又は音響力であることを特徴とする、条項 47～条項 53 のいずれかに記載の方法。

【0456】

条項 55. 前記電気的アクチュエーション力は、小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェットティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離又は吸引であることを特徴とする、条項 54 に記載の方法。

【0457】

条項 56. 前記音響力は、表面弾性波であることを特徴とする、条項 54 に記載の方法。

40

【0458】

条項 57. 前記第 1 の液滴が分極可能な不混和性液体であるか、前記第 2 の液滴が分極可能な液体であるか、前記混合物が分極可能な液体であるか、又は前記第 1 の液滴及び前記第 2 の液滴の両方が各々分極可能な液体であることを特徴とする、条項 47～条項 56 のいずれかに記載の方法。

【0459】

条項 58. 電気的アクチュエーション力を用いて前記混合物を前記ウェルのアレイの上で操作するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 47～条項 55 のいずれかに記載の方法。

50

【0460】

条項59. 前記ウェルのアレイへの前記混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、前記ウェルのアレイの上で前記混合物を操作するステップをさらに含むことを特徴とする、条項47～条項58のいずれかに記載の方法。

【0461】

条項60. 前記固体支持体は、磁性固体支持体であることを特徴とする、条項47～条項59のいずれかに記載の方法。

【0462】

条項61. 電氣的アクチュエーション力及び磁場が、前記混合物の少なくとも一部に対して反対方向から印加されることを特徴とする、条項60に記載の方法。

10

【0463】

条項62. 前記混合物を前後に動かすこと、前記混合物を円形パターンで動かすこと、前記混合物を2つ以上のサブ混合物に分割し且つ前記サブ混合物を併合することによって、前記混合物を混合するステップをさらに含むことを特徴とする、条項47～条項61のいずれかに記載の方法。

【0464】

条項63. 前記混合物は、水性液体であることを特徴とする、条項47～条項62のいずれかに記載の方法。

【0465】

条項64. 前記混合物は、不混和性液体であることを特徴とする、条項47～条項62のいずれかに記載の方法。

20

【0466】

条項65. 前記液滴は、疎水性液滴であることを特徴とする、条項47～条項64のいずれかに記載の方法。

【0467】

条項66. 前記ウェルのアレイは、親水性表面を有することを特徴とする、条項47～条項65のいずれかに記載の方法。

【0468】

条項67. 前記ウェルのアレイは、疎水性表面を有することを特徴とする、条項47～条項65のいずれかに記載の方法。

30

【0469】

条項68. 前記方法は、第1及び第2の基板を備え、少なくとも1つの基板が親水性表面を備えたデバイス内で行われることを特徴とする、条項47～条項67のいずれかに記載の方法。

【0470】

条項69. 前記方法は、第1及び第2の基板を備え、少なくとも1つの基板が疎水性表面を備えたデバイス内で行われることを特徴とする、条項47～条項67のいずれかに記載の方法。

【0471】

条項70. 複数の電極で電氣的アクチュエーション力を発生させて、前記混合物を前記ウェルのアレイへ移動させて前記ウェルを装填するステップをさらに含むことを特徴とする、条項47～条項69のいずれかに記載の方法。

40

【0472】

条項71. 前記アレイの1つ又はそれより多くのウェルに少なくとも1つの固体支持体が装填されることを特徴とする、条項47～条項70のいずれかに記載の方法。

【0473】

条項72. 前記装填することは、磁場を印加して、前記アレイの前記1つ又はそれより多くのウェル内への少なくとも1つの固体支持体の移動を促進することを含むことを特徴とする、条項71に記載の方法。

【0474】

50

条項 7 3. 前記装填後に、前記アレイのウェル内に装填されなかった固体支持体があればこれを除去することをさらに含むことを特徴とする、条項 7 2 に記載の方法。

【0475】

条項 7 4. 前記除去することは、複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、分極可能な流体小滴を前記ウェルのアレイへ移動させ、前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイから所定距離まで移動させることを含むことを特徴とする、条項 7 3 に記載の方法。

【0476】

条項 7 5. 前記除去することは、複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、水性洗浄用小滴を前記ウェルのアレイにわたって移動させることを含むことを特徴とする、条項 7 4 に記載の方法。

10

【0477】

条項 7 6. 前記電気的アクチュエーション力を発生させることは、交流電流を発生させることを含むことを特徴とする、条項 7 5 に記載の方法。

【0478】

条項 7 7. 前記交流電流は、10 V 以上の二乗平均平方根 (rms) 電圧を有することを特徴とする、条項 7 5 に記載の方法。

【0479】

条項 7 8. 前記交流電流は、無線周波数範囲内の周波数を有することを特徴とする、条項 7 5 ～条項 7 6 のいずれかに記載の方法。

20

【0480】

条項 7 9. 前記方法は、マイクロ流体デバイス、デジタルマイクロ流体デバイス (DMF)、表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス (SAW)、集積された DMF 及び検体検出デバイス、集積された SAW 及び検体検出デバイス、又はロボット工学ベースのアッセイ処理ユニットを用いて行われることを特徴とする、条項 4 7 ～条項 7 8 のいずれかに記載の方法。

【0481】

条項 8 0. 液滴中の対象検体を検出する方法であって、
(a) 対象検体を含有する第 1 の液滴を準備するステップと、
(b) 前記対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する検出可能標識を含有する第 2 の液滴を準備するステップと、
(c) 力を及ぼすエネルギーを用いて、前記第 1 の液滴及び前記第 2 の液滴を操作して混合物を作製する、ステップと、
(d) 前記混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させるステップと、
(e) 前記ウェル内の前記対象検体を検出するステップと、
を含むことを特徴とする、方法。

30

【0482】

条項 8 1. 前記検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含むことを特徴とする、条項 8 0 に記載の方法。

【0483】

条項 8 2. 前記エネルギーは、電気的アクチュエーション力又は音響力であることを特徴とする、条項 8 0 ～条項 8 1 のいずれかに記載の方法。

40

【0484】

条項 8 3. 前記電気的アクチュエーション力は、小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェットティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離又は吸引であることを特徴とする、条項 8 2 に記載の方法。

【0485】

条項 8 4. 前記音響力は、表面弾性波であることを特徴とする、条項 8 3 に記載の方法。

50

【0486】

条項85. 前記第1の液滴が分極可能な液体であるか、前記第2の液滴が分極可能な液体であるか、前記混合物が分極可能な液体であるか、又は前記第1の液滴及び前記第2の液滴の両方が各々分極可能な液体であることを特徴とする、条項80～条項83のいずれかに記載の方法。

【0487】

条項86. 電気的アクチュエーション力を用いて前記混合物を前記ウェルのアレイの上で操作するステップをさらに含むことを特徴とする、条項80～条項83及び条項85のいずれかに記載の方法。

【0488】

条項87. 前記ウェルのアレイへの前記混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、前記混合物を前記ウェルのアレイの上で操作するステップをさらに含むことを特徴とする、条項80～条項86のいずれかに記載の方法。

【0489】

条項88. 前記混合物を前後に動かすこと、前記混合物を円形パターンで動かすこと、前記混合物を2つ以上のサブ混合物に分割し且つ前記サブ混合物を併合することによって、前記混合物を混合するステップをさらに含むことを特徴とする、条項80～条項87のいずれかに記載の方法。

【0490】

条項89. 前記混合物は、水性液体であることを特徴とする、条項80～条項88のいずれかに記載の方法。

【0491】

条項90. 前記混合物は、不混和性液体であることを特徴とする、条項80～条項88のいずれかに記載の方法。

【0492】

条項91. 前記液滴は、疎水性液滴であることを特徴とする、条項80～条項90のいずれかに記載の方法。

【0493】

条項92. 前記ウェルのアレイは、親水性表面を有することを特徴とする、条項80～条項91のいずれかに記載の方法。

【0494】

条項93. 前記ウェルのアレイは、疎水性表面を有することを特徴とする、条項80～条項91のいずれかに記載の方法。

【0495】

条項94. 前記方法は、第1及び第2の基板を備え、少なくとも1つの基板が親水性表面を備えたデバイス内で行われることを特徴とする、条項80～条項93のいずれかに記載の方法。

【0496】

条項95. 前記方法は、第1及び第2の基板を備え、少なくとも1つの基板が疎水性表面を備えたデバイス内で行われることを特徴とする、条項80～条項93のいずれかに記載の方法。

【0497】

条項96. 複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、前記混合物を前記ウェルのアレイへ移動させて前記ウェルを装填するステップをさらに含むことを特徴とする、条項80～条項95のいずれかに記載の方法。

【0498】

条項97. 前記アレイの1つ又はそれより多くのウェルに少なくとも1つの検出可能標識が装填されることを特徴とする、条項80～条項96のいずれかに記載の方法。

【0499】

条項98. 前記装填後に、前記アレイのウェル内に装填されなかった検出可能標識があ

10

20

30

40

50

ればこれを除去することをさらに含むことを特徴とする、条項 97 に記載の方法。

【0500】

条項 99. 前記除去することは、複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、分極可能な流体小滴を前記ウェルのアレイへ移動させ、前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイから所定距離まで移動させることを含むことを特徴とする、条項 98 に記載の方法。

【0501】

条項 100. 前記除去することは、複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、水性洗浄用小滴を前記ウェルのアレイにわたって移動させることを含むことを特徴とする、条項 99 に記載の方法。

【0502】

条項 101. 前記電気的アクチュエーション力を発生させることは、交流電流を発生させることを含むことを特徴とする、条項 100 に記載の方法。

【0503】

条項 102. 前記交流電流は、10 V 以上の二乗平均平方根 (rms) 電圧を有することを特徴とする、条項 101 に記載の方法。

【0504】

条項 103. 前記交流電流は、無線周波数範囲内の周波数を有することを特徴とする、条項 100～条項 101 のいずれかに記載の方法。

【0505】

条項 104. 前記方法は、マイクロ流体デバイス、デジタルマイクロ流体デバイス (DMF)、表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス (SAW)、集積された DMF 及び検体検出デバイス、集積された SAW 及び検体検出デバイス、又はロボット工学ベースのアクセシ処理ユニットを用いて行われることを特徴とする、条項 80～条項 103 のいずれかに記載の方法。

【0506】

条項 105. 液滴中の対象検体を測定する方法であって、
(a) 対象検体を含有する第 1 の液滴を準備するステップと、
(b) 前記対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する少なくとも 1 つの固体支持体を含有する第 2 の液滴を準備するステップと、
(c) 力を及ぼすエネルギーを用いて、前記第 1 の液滴を前記第 2 の液滴と共に操作して混合物を作製する、ステップと、
(d) 前記混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させるステップであって、前記アレイの 1 つ又はそれより多くのウェルは、前記少なくとも 1 つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ステップと、
(e) 前記混合物の一部をウェルのアレイへ移動させるステップの前又は後のいずれかに、前記混合物に検出可能標識を添加するステップと、
(f) 前記ウェル内の前記検出可能標識を測定するステップと、
を含むことを特徴とする、方法。

【0507】

条項 106. 前記少なくとも 1 つの固体支持体は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも 1 つの結合メンバーを含むことを特徴とする、条項 105 に記載の方法。

【0508】

条項 107. 前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの前に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 105～条項 106 のいずれかに記載の方法。

【0509】

条項 108. 前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの後に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 105～条項 106 のいずれかに記載の方法。

【0510】

条項109. 前記検出可能標識は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも1つの結合メンバーを含むことを特徴とする、条項105～条項108のいずれかに記載の方法。

【0511】

条項110. 前記検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含むことを特徴とする、条項105～条項109のいずれかに記載の方法。

【0512】

条項111. 前記結合メンバーは、受容体又は抗体であることを特徴とする、条項105～条項109のいずれかに記載の方法。

10

【0513】

条項112. 前記エネルギーは、電気的アクチュエーション力又は音響力であることを特徴とする、条項105～条項109のいずれかに記載の方法。

【0514】

条項113. 前記電気的アクチュエーション力は、小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェッティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離又は吸引であることを特徴とする、条項112に記載の方法。

【0515】

条項114. 前記音響力は、表面弾性波であることを特徴とする、条項112に記載の方法。

20

【0516】

条項115. 前記第1の液滴が分極可能な液体であるか、前記第2の液滴が分極可能な液体であるか、前記混合物が分極可能な液体であるか、又は前記第1の液滴及び前記第2の液滴の両方が各々分極可能な液体であることを特徴とする、条項105～条項114のいずれかに記載の方法。

【0517】

条項116. 電気的アクチュエーション力を用いて前記混合物を前記ウェルのアレイの上で操作するステップをさらに含むことを特徴とする、条項105～条項112及び条項115のいずれかに記載の方法。

30

【0518】

条項117. 前記ウェルのアレイへの前記混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、前記混合物を前記ウェルのアレイの上で操作するステップをさらに含むことを特徴とする、条項105～条項116のいずれかに記載の方法。

【0519】

条項118. 前記固体支持体は、磁性固体支持体であることを特徴とする、条項105～条項117のいずれかに記載の方法。

【0520】

条項119. 電気的アクチュエーション力及び磁場が、前記混合物の少なくとも一部に対して反対方向から印加されることを特徴とする、条項118に記載の方法。

40

【0521】

条項120. 前記混合物を前後に動かすこと、前記混合物を円形パターンで動かすこと、前記混合物を2つ以上のサブ混合物に分割し且つ前記サブ混合物を併合することによって、前記混合物を混合するステップをさらに含むことを特徴とする、条項105～条項119のいずれかに記載の方法。

【0522】

条項121. 前記混合物は、水性液体であることを特徴とする、条項105～条項120のいずれかに記載の方法。

【0523】

条項122. 前記混合物は、不混和性液体であることを特徴とする、条項105～条項

50

1 2 1 のいずれかに記載の方法。

【0 5 2 4】

条項 1 2 3. 前記液滴は、疎水性液滴であることを特徴とする、条項 1 0 5～条項 1 2 2 のいずれかに記載の方法。

【0 5 2 5】

条項 1 2 4. 前記ウェルのアレイは、親水性表面を有することを特徴とする、条項 1 0 5～条項 1 2 3 のいずれかに記載の方法。

【0 5 2 6】

条項 1 2 5. 前記ウェルのアレイは、疎水性表面を有することを特徴とする、条項 1 0 5～条項 1 2 3 のいずれかに記載の方法。

10

【0 5 2 7】

条項 1 2 6. 前記方法は、第 1 及び第 2 の基板を備え、少なくとも 1 つの基板が親水性表面を備えたデバイス内で行われることを特徴とする、条項 1 0 5～条項 1 2 4 のいずれかに記載の方法。

【0 5 2 8】

条項 1 2 7. 前記方法は、第 1 及び第 2 の基板を備え、少なくとも 1 つの基板が疎水性表面を備えたデバイス内で行われることを特徴とする、条項 1 0 5～条項 1 2 4 のいずれかに記載の方法。

【0 5 2 9】

条項 1 2 8. 複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、前記混合物を前記ウェルのアレイへ移動させて前記ウェルを装填するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 1 0 5～条項 1 2 8 のいずれかに記載の方法。

20

【0 5 3 0】

条項 1 2 9. 前記アレイの 1 つ又はそれより多くのウェルに少なくとも 1 つの固体支持体が装填されることを特徴とする、条項 1 0 5～条項 1 2 8 のいずれかに記載の方法。

【0 5 3 1】

条項 1 3 0. 前記装填することは、磁場を印加して、前記アレイの前記 1 つ又はそれより多くのウェルへの少なくとも 1 つの固体支持体の移動を促進することを含むことを特徴とする、条項 1 2 9 に記載の方法。

【0 5 3 2】

条項 1 3 1. 前記装填後に、前記アレイのウェル内に装填されなかった固体支持体があればこれを除去することをさらに含むことを特徴とする、条項 1 3 0 に記載の方法。

30

【0 5 3 3】

条項 1 3 2. 前記除去することは、複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、分極可能な流体小滴を前記ウェルのアレイまで移動させ、前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイから所定距離まで移動させることを含むことを特徴とする、条項 1 3 1 に記載の方法。

【0 5 3 4】

条項 1 3 3. 前記除去することは、複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、水性洗浄用小滴を前記ウェルのアレイにわたって移動させることを含むことを特徴とする、条項 1 3 2 に記載の方法。

40

【0 5 3 5】

条項 1 3 4. 前記電気的アクチュエーション力を発生させることは、交流電流を発生させることを含むことを特徴とする、条項 1 3 3 に記載の方法。

【0 5 3 6】

条項 1 3 5. 前記交流電流は、1 0 V 以上の二乗平均平方根 (r m s) 電圧を有することを特徴とする、条項 1 3 4 に記載の方法。

【0 5 3 7】

条項 1 3 6. 前記交流電流は、無線周波数範囲内の周波数を有することを特徴とする、条項 1 3 4～条項 1 3 5 のいずれかに記載の方法。

50

【0538】

条項137. 前記方法は、マイクロ流体デバイス、デジタルマイクロ流体デバイス（DMF）、表面弾性波ベースのマイクロ流体デバイス（SAW）、集積されたDMF及び検体検出デバイス、集積されたSAW及び検体検出デバイス、又はロボット工学ベースのアクセシ処理ユニットを用いて行われることを特徴とする、条項105～条項136のいずれかに記載の方法。

【0539】

条項138. 前記測定するステップは、前記ウェルのアレイ内の固体支持体の総数を求めることを伴うことを特徴とする、条項105～条項137のいずれかに記載の方法。

【0540】

条項139. 前記測定するステップは、前記検出可能標識を含有する前記アレイのウェル内の固体支持体の数を求めることを伴うことを特徴とする、条項138に記載の方法。

【0541】

条項140. 前記測定するステップは、検出可能標識を含有する固体支持体の数を前記ウェルのアレイ内の固体支持体の総数から差し引いて、検出可能標識を含有しない前記ウェルのアレイ内の固体支持体の数を求めることを伴うことを特徴とする、条項139に記載の方法。

【0542】

条項141. 検出可能標識を含有しない固体支持体の数に対する検出可能標識を含有する固体支持体の比を求めることを特徴とする、条項140に記載の方法。

【0543】

条項142. ウェルに粒子を装填する方法であって、

(a) 複数の電極で電場を発生させて、マイクロ粒子を含有する液滴をウェルのアレイへ移動させるステップであって、前記ウェルのアレイの1つ又はそれより多くのウェルはその中に装填された粒子を有するのに十分なサイズのものである、ステップと、

(b) 1つ又はそれより多くのウェルに粒子を装填するステップと、

(c) 前記複数の電極で電場を発生させて、分極可能な流体小滴を前記ウェルのアレイへ移動させて前記ウェルのアレイをシールするステップと、
を含むことを特徴とする、方法。

【0544】

条項143. 前記電場を用いて前記液滴を前記ウェルのアレイの上で操作するステップをさらに含むことを特徴とする、条項142に記載の方法。

【0545】

条項144. 前記ウェルのアレイへの前記液滴の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、前記ウェルのアレイの上で前記液滴を操作するステップをさらに含むことを特徴とする、条項142～条項143のいずれかに記載の方法。

【0546】

条項145. 前記粒子が磁気ビーズであることを特徴とする、条項142～条項144のいずれかに記載の方法。

【0547】

条項146. 前記装填するステップは、磁場を印加して、前記アレイの前記1つ又はそれより多くのウェル内への前記1つ又はそれより多くの磁気ビーズの移動を促進することを含むことを特徴とする、条項142に記載の方法。

【0548】

条項147. 前記ウェルのアレイは、親水性表面を有することを特徴とする、条項142～条項146のいずれかに記載の方法。

【0549】

条項148. 前記ウェルのアレイは、疎水性表面を有することを特徴とする、条項142～条項146のいずれかに記載の方法。

【0550】

条項 1 4 9. 前記電場を発生させるステップは、交流電流を発生させることを含むことを特徴とする、条項 1 4 2～条項 1 4 8 のいずれかに記載の方法。

【0 5 5 1】

条項 1 5 0. 前記交流電流は、1 0 V 以上の二乗平均平方根 (r m s) 電圧を有することを特徴とする、条項 1 4 9 に記載の方法。

【0 5 5 2】

条項 1 5 1. 前記交流電流は、無線周波数範囲内の周波数を有することを特徴とする、条項 1 4 9～条項 1 5 9 のいずれかに記載の方法。

【0 5 5 3】

条項 1 5 2. デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスを形成する方法であって、
第 1 の基板を含む第 1 のロールの巻きを解いて、前記第 1 の基板の第 1 の部分を第 1 の位置に位置決めするステップと、

前記第 1 の位置において、前記第 1 の基板の前記第 1 の部分に複数の電極を形成するステップと、

第 2 の位置において、前記第 1 の基板の第 2 の部分にウェルのアレイを形成するステップと、
を含むことを特徴とする、方法。

【0 5 5 4】

条項 1 5 3. 前記ウェルのアレイを形成する前に、前記第 1 のロールの巻きを解いて、前記第 1 の基板の前記第 1 の部分に隣接した前記第 2 の部分を前記第 2 の位置に位置決めするステップをさらに含むことを特徴とする、条項 1 5 2 に記載の方法。

【0 5 5 5】

条項 1 5 4. 第 2 の基板を含む第 2 のロールの巻きを解いて、前記第 3 の基板の第 3 の部分を第 3 の位置に位置決めするステップと、

前記第 3 の位置において、前記第 2 の基板を前記第 1 の基板から離間させて位置決めするのに十分な様式で前記第 2 の基板を前記第 1 の基板に貼り合わせるステップと、
をさらに含むことを特徴とする、条項 1 5 3 の条項 1 5 2 に記載の方法。

【0 5 5 6】

条項 1 5 5. 集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスを形成する方法であって、

第 1 の基板を含む第 1 のロールの巻きを解いて、前記第 1 の基板の第 1 の部分を第 1 の位置に位置決めするステップと、

前記第 1 の位置において、前記第 1 の基板の前記第 1 の部分に複数の電極を形成するステップと、

第 2 の基板を含む第 2 のロールの巻きを解いて、前記第 2 の基板の第 2 の部分を第 2 の位置に位置決めするステップと、

前記第 2 の位置において、前記第 2 の部分にウェルのアレイを形成するステップと、

前記第 2 の基板を前記第 1 の基板から離間させて位置決めし、且つ

前記第 2 の部分を前記第 1 の部分の上方に位置決めするか又は前記第 1 の基板の前記第 1 の部分に隣接する第 3 の部分の上方に位置決めし、

前記ウェルのアレイが前記第 1 の基板に面するようにする

のに十分な様式で、前記第 2 の基板を前記第 1 の基板に貼り合わせるステップと、
を含むことを特徴とする、方法。

【0 5 5 7】

条項 1 5 6. 前記ウェルのアレイを形成するステップは、熱若しくは紫外線ナノインプリントリソグラフィ、ナノインプリントローラ、レーザアブレーションを使用することを含むか、又はウェルのアレイを備えたあらかじめ製作された基板を前記第 1 の基板の前記第 1 の部分へ貼り合わせるによるものであることを特徴とする、条項 1 5 2～条項 1 5 5 のいずれかに記載の方法。

【0 5 5 8】

条項 1 5 7. 前記第 1 の基板に強い熱、圧力、又は紫外線をかけて、型を用いて前記第 1 の基板上又は基板内にフォノン構造を形成するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 1 5 2 ～条項 1 5 6 のいずれかに記載の方法。

【0 5 5 9】

条項 1 5 8. プリンタデバイスを用いて、一連の電極上に疎水性及び／又は誘電性材料を塗工するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 1 5 2 ～条項 1 5 7 のいずれかに記載の方法。

【0 5 6 0】

条項 1 5 9. 前記疎水性及び／又は誘電性材料は、硬化材料を含むことを特徴とする、条項 1 5 8 に記載の方法。

【0 5 6 1】

条項 1 6 0. 熱又は紫外線を印加して、前記塗工された疎水性及び／又は誘電性材料を硬化するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 1 5 9 に記載の方法。

【0 5 6 2】

条項 1 6 1. 前記第 1 及び第 2 の基板をダイシングして、前記第 1 及び第 2 の部分を含む貼り合わされた基板を生成するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 1 5 2 ～条項 1 6 0 のいずれかに記載の方法。

【0 5 6 3】

条項 1 6 2. 液滴中の対象検体を検出する方法であって、
(a) 対象検体を含む第 1 の液滴を準備するステップと、
(b) 特異的結合メンバー及び標識化検体を含む第 2 の液滴を準備するステップであって、前記結合メンバーは、少なくとも 1 つの固体支持体上に固定化されており、前記特異的結合メンバーは、前記対象検体に特異的に結合するものであり、前記標識化検体は、検出可能標識で標識された対象検体である、ステップと、
(c) 力を及ぼすエネルギーを用いて、前記第 1 の液滴を前記第 2 の液滴と共に操作して混合物を作製するステップと、
(d) 前記混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させるステップであって、前記アレイの 1 つ又はそれより多くのウェルは、前記少なくとも 1 つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ステップと、
を含むことを特徴とする、方法。

【0 5 6 4】

条項 1 6 3. 液滴中の対象検体を検出する方法であって、
(a) 対象検体を含む第 1 の液滴を準備するステップと、
(b) 固定化検体及び少なくとも 1 つの特異的結合メンバーを含む第 2 の液滴を準備するステップであって、前記固定化検体は、少なくとも 1 つの固体支持体上に固定化された対象検体であり、前記少なくとも 1 つの特異的結合メンバーは、前記対象検体に特異的に結合するものであり、前記少なくとも 1 つの特異的結合メンバーは、検出可能標識で標識されている、ステップと、
(c) 力を及ぼすエネルギーを用いて、前記第 1 の液滴を前記第 2 の液滴と共に操作して混合物を作製するステップと、
(d) 前記混合物の全部又は少なくとも一部をウェルのアレイへ移動させるステップであって、前記アレイの 1 つ又はそれより多くのウェルは、前記少なくとも 1 つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ステップと、
(e) 前記ウェル内の前記対象検体を検出するステップと、
を含むことを特徴とする、方法。

【0 5 6 5】

条項 1 6 4. 液滴中の対象検体を検出する方法であって、
(a) 対象検体を含有する第 1 の液滴を準備するステップと、
(b) 前記対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する少なくとも 1 つの固体支持体を含有する第 2 の液滴を準備するステップと、

を含み、

ここで前記第 1 及び第 2 の液滴は、

第 1 の基板及び第 2 の基板を備え、前記第 2 の基板は前記第 1 の基板から間隙によって分離されており、前記第 1 の基板は液滴上に電気的アクチュエーション力を発生させる複数の電極を備え、

前記液滴の一部を保持する寸法のウェルのアレイを備え、前記ウェルのアレイの少なくとも一部は、前記複数の電極のうちの 1 つ又はそれより多くと前記間隙との間に位置決めされる、

デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイスの中へ供給され、

(c) 電気的アクチュエーション力を用いて、前記第 1 の液滴を前記第 2 の液滴と共に操作して混合物を作製するステップと、

(d) 前記混合物の全部又は少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップであって、前記アレイの 1 つ又はそれより多くのウェルは、前記少なくとも 1 つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ステップと、

(e) 前記混合物の一部をウェルのアレイへ移動させるステップの前又は後のいずれかに、前記混合物に検出可能標識を添加するステップと、

(f) 前記ウェル内の前記対象検体を検出するステップと、

を含むことを特徴とする、方法。

【0566】

条項 165. 前記少なくとも 1 つの固体支持体は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも 1 つの結合メンバーを含むことを特徴とする、条項 164 に記載の方法。

【0567】

条項 166. 前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの前に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 164～条項 165 のいずれかに記載の方法。

【0568】

条項 167. 前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの後に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 164～条項 166 のいずれかに記載の方法。

【0569】

条項 168. 前記検出可能標識は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも 1 つの結合メンバーを含むことを特徴とする、条項 164～条項 167 のいずれかに記載の方法。

【0570】

条項 169. 前記検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含むことを特徴とする、条項 164～条項 168 のいずれかに記載の方法。

【0571】

条項 170. 前記結合メンバーは、受容体又は抗体であることを特徴とする、条項 164～条項 168 のいずれかに記載の方法。

【0572】

条項 171. 前記電気的アクチュエーション力は、小滴アクチュエーション、電気泳動、エレクトロウェットティング、誘電泳動、静電アクチュエーション、電場媒介、電極媒介、毛管力、クロマトグラフィ、遠心分離又は吸引であることを特徴とする、条項 164～170 のいずれかに記載の方法。

【0573】

条項 172. 前記第 1 の液滴が分極可能な液体であるか、前記第 2 の液滴が分極可能な液体であるか、前記混合物が分極可能な液体であるか、又は前記第 1 の液滴及び前記第 2 の液滴の両方が各々分極可能な液体であることを特徴とする、条項 164～条項 171 のいずれかに記載の方法。

【0574】

10

20

30

40

50

条項 1 7 3. 電気的アクチュエーション力を用いて前記混合物を前記ウェルのアレイの上で操作するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 1 6 4～条項 1 7 1 のいずれかに記載の方法。

【0 5 7 5】

条項 1 7 4. 前記ウェルのアレイへの前記混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、前記ウェルのアレイの上で前記混合物を操作するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 1 6 4～条項 1 7 3 のいずれかに記載の方法。

【0 5 7 6】

条項 1 7 5. 前記固体支持体は、磁性固体支持体であることを特徴とする、条項 1 6 4～条項 1 7 4 のいずれかに記載の方法。

【0 5 7 7】

条項 1 7 6. 前記電気的アクチュエーション力及び磁場が、前記混合物の少なくとも一部に対して反対方向から印加されることを特徴とする、条項 1 7 5 に記載の方法。

【0 5 7 8】

条項 1 7 7. 前記混合物を前後に動かすこと、前記混合物を円形パターンで動かすこと、前記混合物を 2 つ以上のサブ混合物に分割し且つ前記サブ混合物を併合することによって、前記混合物を混合するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 1 6 4～条項 1 7 6 のいずれかに記載の方法。

【0 5 7 9】

条項 1 7 8. 前記混合物は、水性液体であることを特徴とする、条項 1 6 4～条項 1 7 6 のいずれかに記載の方法。

【0 5 8 0】

条項 1 7 9. 前記混合物は、不混和性液体であることを特徴とする、条項 1 6 4～条項 1 7 6 のいずれかに記載の方法。

【0 5 8 1】

条項 1 8 0. 前記液滴は、疎水性液滴であることを特徴とする、条項 1 6 4～条項 1 7 9 のいずれかに記載の方法。

【0 5 8 2】

条項 1 8 1. 前記ウェルのアレイは、親水性表面を有することを特徴とする、条項 1 6 4～条項 1 8 0 のいずれかに記載の方法。

【0 5 8 3】

条項 1 8 2. 前記ウェルのアレイは、疎水性表面を有することを特徴とする、条項 1 6 4～条項 1 8 0 のいずれかに記載の方法。

【0 5 8 4】

条項 1 8 3. 前記基板は、親水性表面を有することを特徴とする、条項 1 6 4～条項 1 8 2 のいずれかに記載の方法。

【0 5 8 5】

条項 1 8 4. 前記基板は、疎水性表面を有することを特徴とする、条項 1 6 4～条項 1 8 2 のいずれかに記載の方法。

【0 5 8 6】

条項 1 8 5. 複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、前記混合物を前記ウェルのアレイへ移動させて前記ウェルを装填するステップをさらに含むことを特徴とする、条項 1 6 4～条項 1 8 4 のいずれかに記載の方法。

【0 5 8 7】

条項 1 8 6. 前記アレイの 1 つ又はそれより多くのウェルに少なくとも 1 つの固体支持体が装填されることを特徴とする、条項 1 6 4～条項 1 8 5 のいずれかに記載の方法。

【0 5 8 8】

条項 1 8 7. 前記装填することは、磁場を印加して、前記アレイの前記 1 つ又はそれより多くのウェル内への少なくとも 1 つの固体支持体の移動を促進することを含むことを特徴とする、条項 1 8 6 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0589】

条項188. 前記装填後に、前記アレイのウェル内に装填されなかった固体支持体があればこれを除去することをさらに含むことを特徴とする、条項187に記載の方法。

【0590】

条項189. 前記除去することは、複数の電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、分極可能な流体小滴を前記ウェルのアレイへ移動させ、前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイから所定距離まで移動させることを含むことを特徴とする、条項188に記載の方法。

【0591】

条項190. 前記除去することは、前記電極で電気的アクチュエーション力を発生させて、水性洗浄用小滴を前記ウェルのアレイにわたって移動させることを含むことを特徴とする、条項189に記載の方法。

【0592】

条項191. 前記電気的アクチュエーション力を発生させることは、交流電流を発生させることを含むことを特徴とする、条項190に記載の方法。

【0593】

条項192. 前記交流電流は、10V以上の二乗平均平方根（rms）電圧を有することを特徴とする、条項191に記載の方法。

【0594】

条項193. 前記交流電流は、無線周波数範囲内の周波数を有することを特徴とする、条項191～条項192のいずれかに記載の方法。

【0595】

条項194. 液滴中の対象検体を検出する方法であって、
(a) 対象検体を含有する第1の液滴を準備するステップと、
(b) 前記対象検体に結合する特異的結合メンバーを含有する少なくとも1つの固体支持体を含有する第2の液滴を準備するステップと
を含み、

ここで前記第1及び第2の液滴は、

第1の基板及び第2の基板を備え、前記第2の基板は前記第1の基板から間隙によって分離されており、前記デバイスは、第1の部分及び第2の部分を備え、

前記第1の部分は、表面弾性波発生構成要素に連結された上層を備え、

前記第2の部分は、前記第1の基板又は前記第2の基板上に位置決めされた複数のウェルを備える、

表面弾性波マイクロ流体及び検体検出デバイス内へ供給され、

(c) 表面音響力を用いて、前記第1の液滴を前記第2の液滴と共に操作して混合物を作製するステップと、

(d) 前記混合物の全部又は少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップであって、前記アレイの1つ又はそれより多くのウェルは、前記少なくとも1つの固体支持体を収容するのに十分なサイズである、ステップと、

(e) 前記混合物の一部をウェルのアレイへ移動させるステップの前又は後のいずれかに、前記混合物に検出可能標識を添加するステップと、

(f) 前記ウェル内の前記対象検体を検出するステップと、
を含むことを特徴とする、方法。

【0596】

条項195. 前記少なくとも1つの固体支持体は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも1つの結合メンバーを含むことを特徴とする、条項194に記載の方法。

【0597】

条項196. 前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの前に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、条項194～条項195のいずれかに記載の方法。

【0598】

条項197. 前記混合物の少なくとも一部を前記ウェルのアレイへ移動させるステップの後に、前記混合物に検出可能標識を添加するステップをさらに含むことを特徴とする、条項194～条項196のいずれかに記載の方法。

【0599】

条項198. 前記検出可能標識は、前記対象検体に特異的に結合する少なくとも1つの結合メンバーを含むことを特徴とする、条項194～条項197のいずれかに記載の方法。

【0600】

条項199. 前記検出可能標識は、色原体、蛍光化合物、酵素、化学発光化合物又は放射性化合物を含むことを特徴とする、条項194～条項198のいずれかに記載の方法。

【0601】

条項200. 前記結合メンバーは、受容体又は抗体であることを特徴とする、条項194～条項199のいずれかに記載の方法。

【0602】

条項201. 前記第1の液滴が分極可能な液体であるか、前記第2の液滴が分極可能な液体であるか、前記混合物が分極可能な液体であるか、又は前記第1の液滴及び前記第2の液滴の両方が各々分極可能な液体であることを特徴とする、条項194～条項200のいずれかに記載の方法。

【0603】

条項202. 前記ウェルのアレイへの前記混合物の移動を促進するように構成された毛管要素を用いて、前記ウェルのアレイの上で前記混合物を操作するステップをさらに含むことを特徴とする、条項194～条項201のいずれかに記載の方法。

【0604】

条項203. 前記固体支持体は、磁性固体支持体であることを特徴とする、条項194～条項202のいずれかに記載の方法。

【0605】

条項204. 前記ウェルのアレイを疎水性液体でシールするステップをさらに含むことを特徴とする、条項70に記載の方法。

【0606】

条項205. 前記ウェルのアレイを疎水性液体でシールするステップをさらに含むことを特徴とする、条項96に記載の方法。

【0607】

条項206. 前記ウェルのアレイを疎水性液体でシールするステップをさらに含むことを特徴とする、条項185に記載の方法。

【符号の説明】

【0608】

10、20、30、40、50、100、101、600：集積デジタルマイクロ流体及び検体検出デバイス

11、21、31、41、51、110：第1の基板

12、22、32、42、52、120：第2の基板

13、23、33、43、53、170、603：間隙

15、25、35、45、55、115、605：第1の部分

16、26、36、46、56、130、606：第2の部分

17、27、37、47、57、145、607：電極

18、28、38、48、58、150、608：誘電性層

19、29、39、49、59、160、619：ウェルのアレイ

34、44、54、155、609：疎水性層

60、191、192：毛管要素

62、180、185、611：液滴、水滴

10

20

30

40

50

1 9 0 : ビーズ又は粒子	
1 9 5 : 疎水性液体、不混和性流体	
6 0 1 : 下部基板	
6 0 2 : 上部基板	
6 1 0 : 親水性層	
5 0 0、6 0 0、6 5 0 : システム又は組立体	
5 0 2、5 0 4、5 0 6、6 0 2、6 0 4、6 0 6 : ローラ	
5 0 8 : ベース基板	
5 1 0、6 1 0 : 非導電性の第 1 の層	
5 1 2、6 1 2 : 導電性の第 2 の層	10
5 1 3 : 接着層	
5 1 4 : レーザアブレーション・ステーション	
5 1 6 : マスク	
5 1 8 : マスターパターン	
5 2 0 : レンズ	
5 2 2 : 部分	
5 2 4 : レーザビーム	
5 2 6 : 電極アレイ	
5 2 8、6 1 4 : プリンタ	
5 3 0 : 疎水性及び／又は誘電性材料	20
5 3 2 : 被処理層	
5 3 4、6 2 0 : 硬化ステーション	
5 4 0 : ウェルのアレイ	
6 0 8 : 上部基板	
6 6 4 : ボンディング・ステーション	
6 6 6 : ダイシング・ステーション	

【図 1 A】

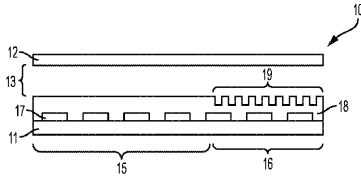


FIG. 1A

【図 1 B】

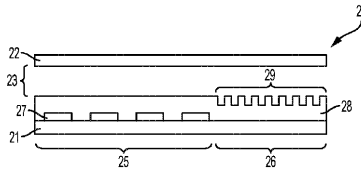


FIG. 1B

【図 2 A】

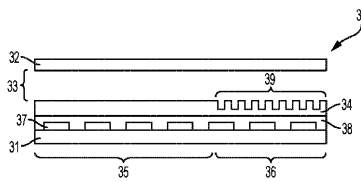


FIG. 2A

【図 4 A】

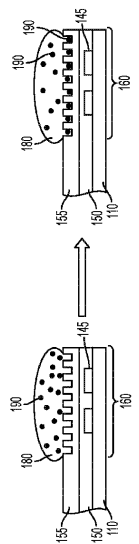


FIG. 4A

【図 2 B】

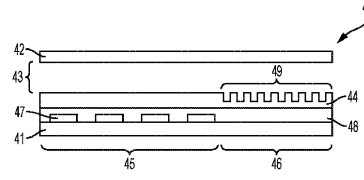


FIG. 2B

【図 3 A】

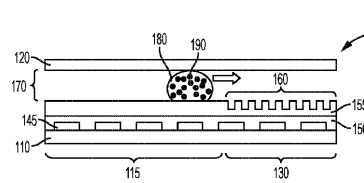


FIG. 3A

【図 3 B】

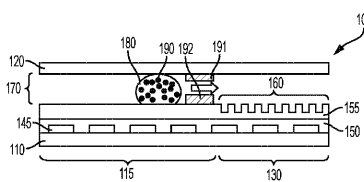


FIG. 3B

【図 4 B】

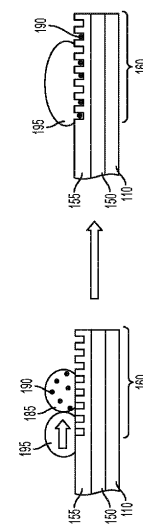


FIG. 4B

【図 5】

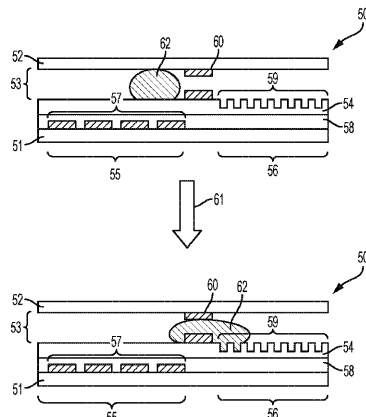


FIG. 5

【図 6】

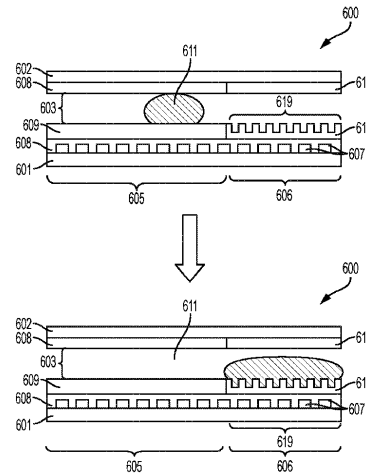


FIG. 6

【図 7 A】

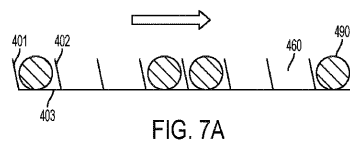


FIG. 7A

【図 7 B】

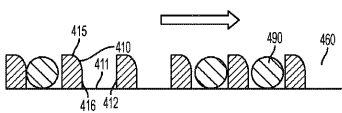


FIG. 7B

【図 8】

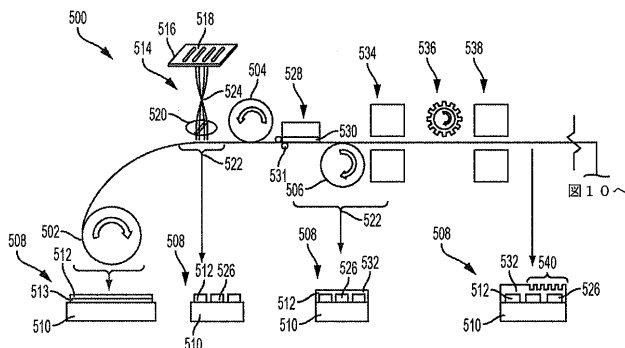


FIG. 8

【図 9】

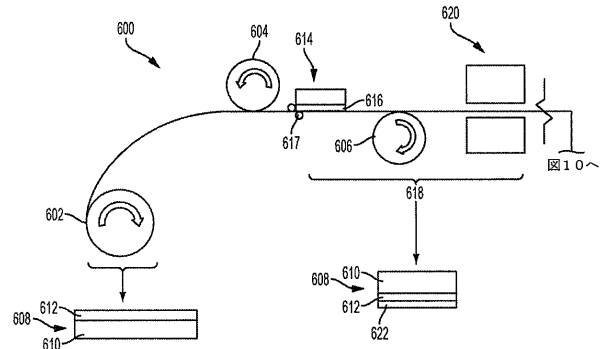


FIG. 9

【図 10】

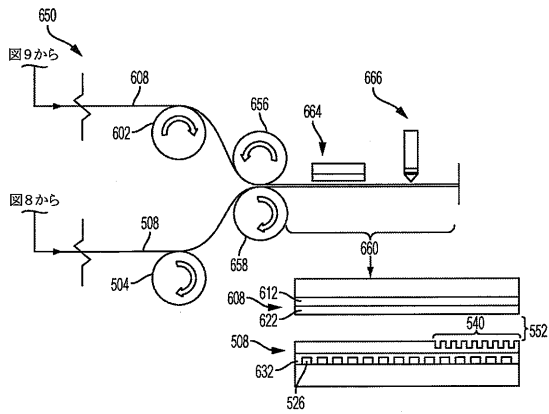


FIG. 10

【図 11A】

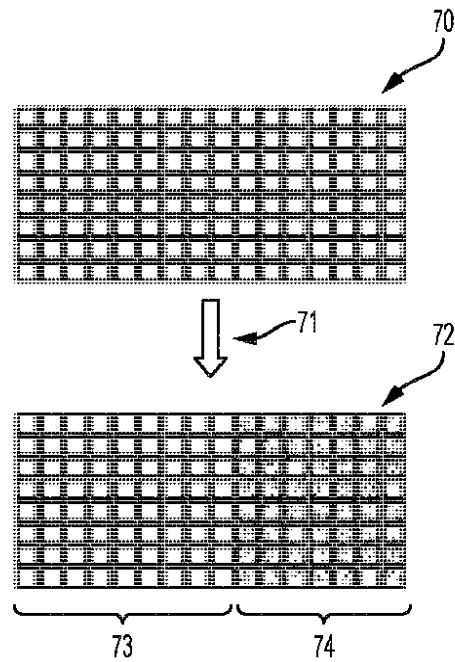


FIG. 11A

【図 11B】

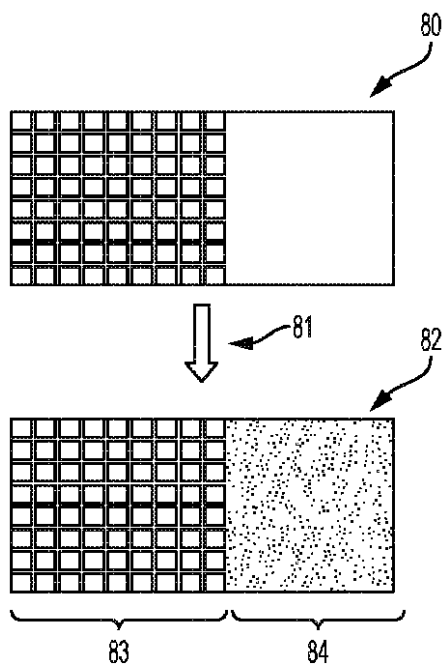


FIG. 11B

【図 12A】

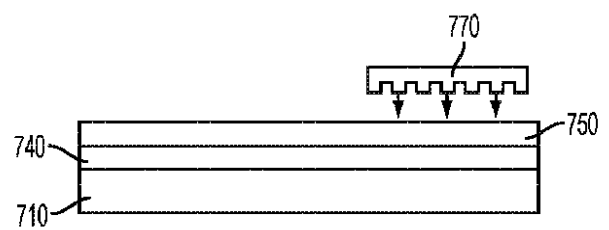


FIG. 12A

【図 12B】

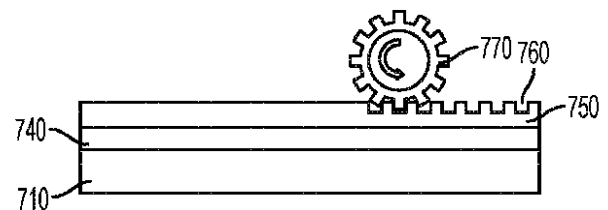


FIG. 12B

【図 16】

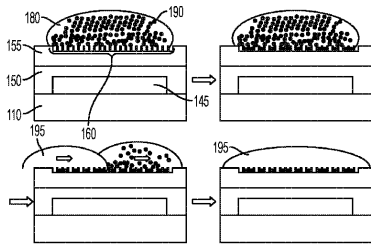


FIG. 16

【図 17】

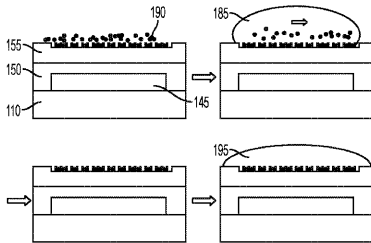


FIG. 17

【図 18】

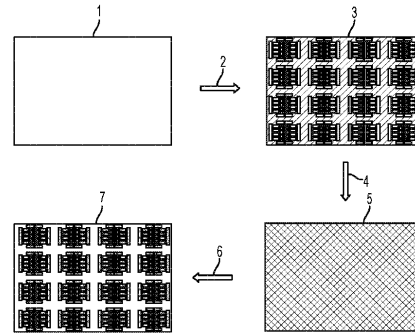


FIG. 18

【図 19】

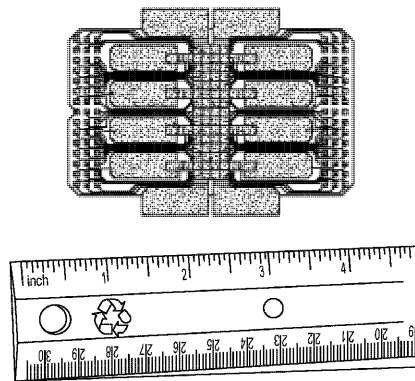


FIG. 19

【図 20】

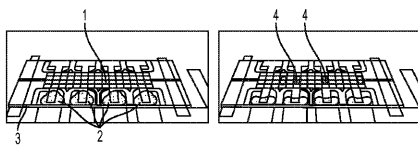


FIG. 20

【図 21 B】

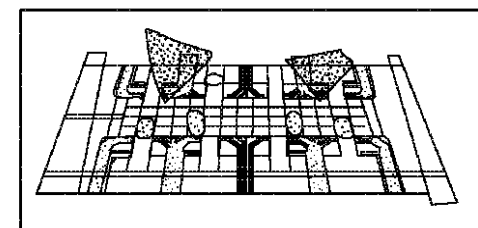


FIG. 21B

【図 21 A】

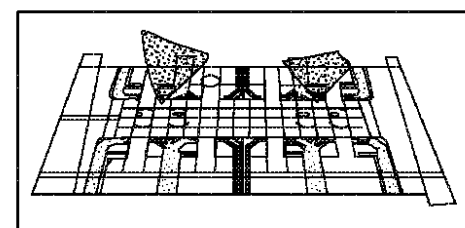


FIG. 21A

【図 21 C】

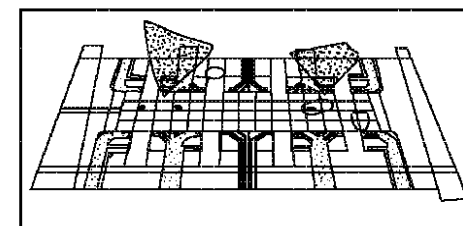


FIG. 21C

【図 2 1 D】

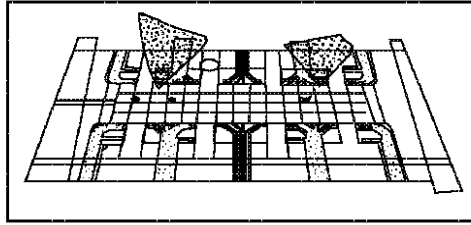
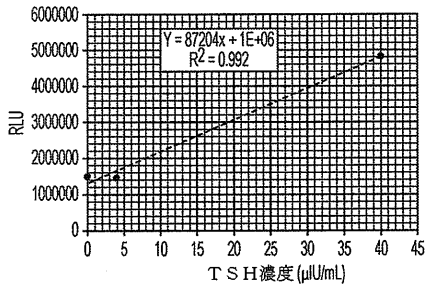


FIG. 21D

【図 2 1 E】



TSH 濃度	x1	x2	x3	x4	平均
0	1523009	1540911	1832762	1173542	1517556
4	1624957	1345836			1485397
40	5181831	4508782			4845307

FIG. 21E

【図 2 3】

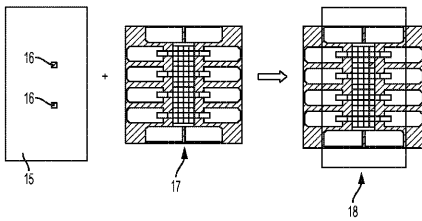


FIG. 23

【図 2 4 A】

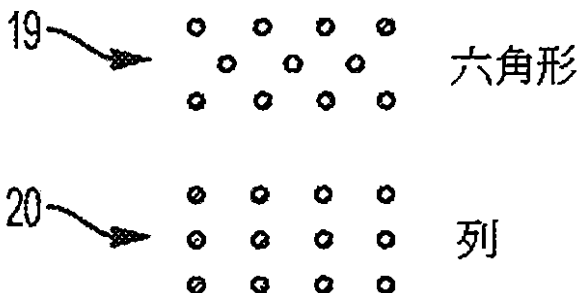


FIG. 24A

【図 2 2 A】

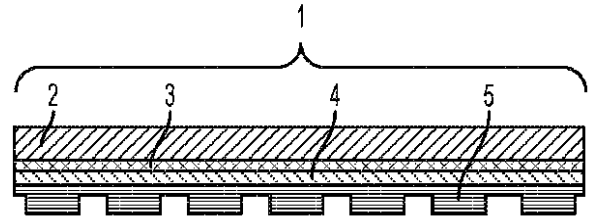


FIG. 22A

【図 2 2 B】

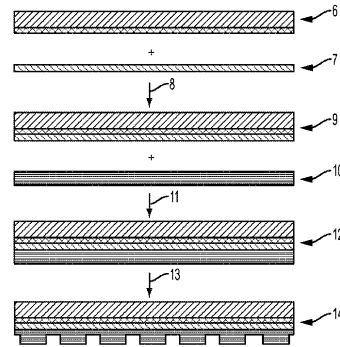


FIG. 22B

【図 2 4 B】

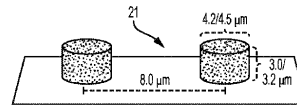


FIG. 24B

【図 2 5】

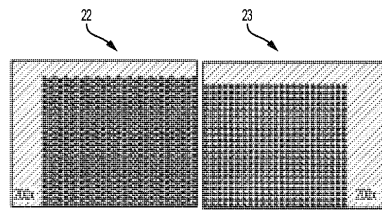


FIG. 25

【図 2 6】

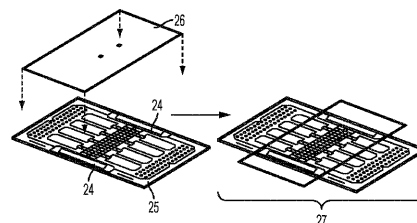


FIG. 26

【図 27 A】

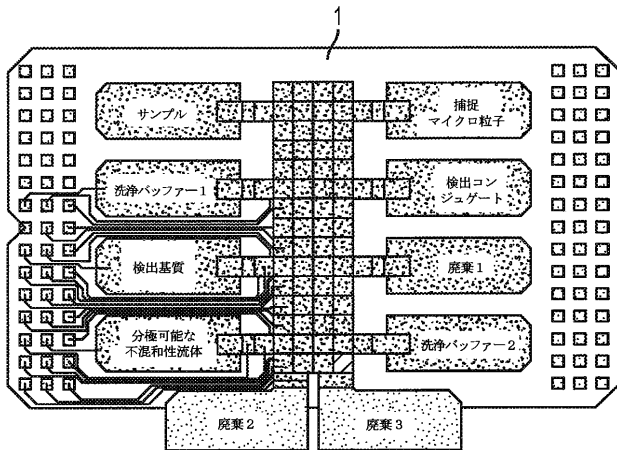


FIG. 27A

【図 27 B】

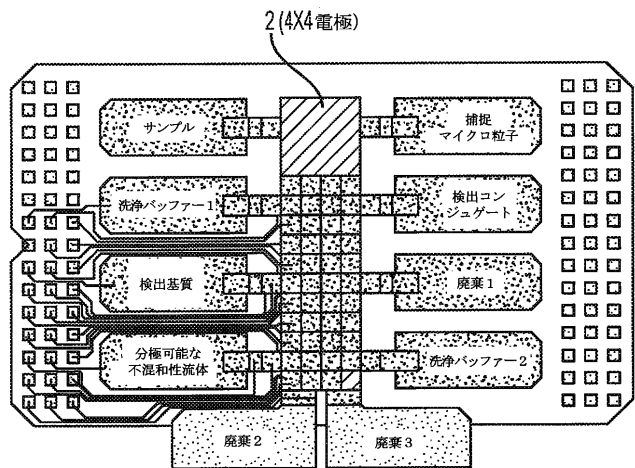


FIG. 27B

【図 27 C】

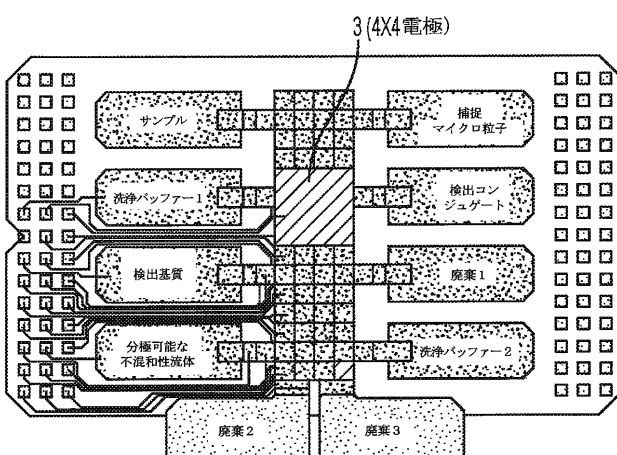


FIG. 27C

【図 27 D】

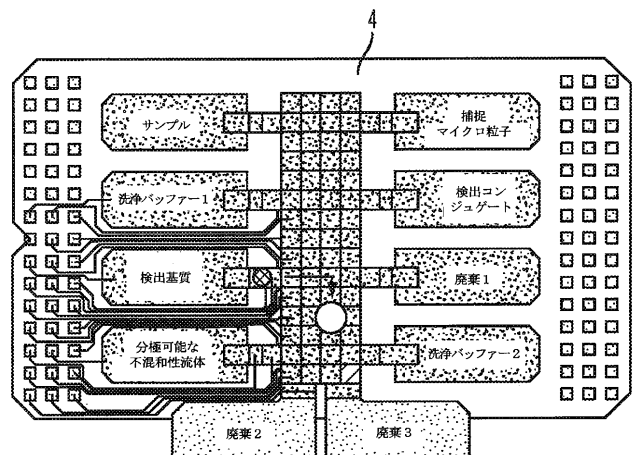


FIG. 27D

【図 27 E】

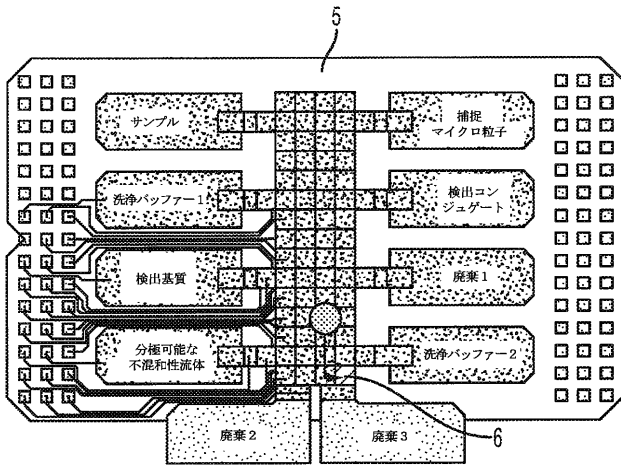


FIG. 27E

【図 27 F】

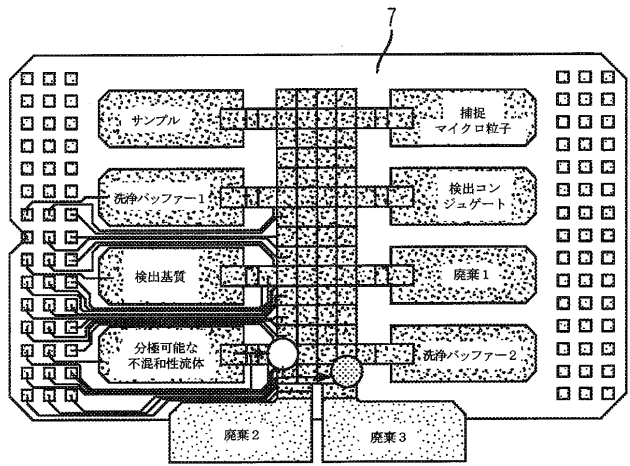


FIG. 27F

【図 27 G】

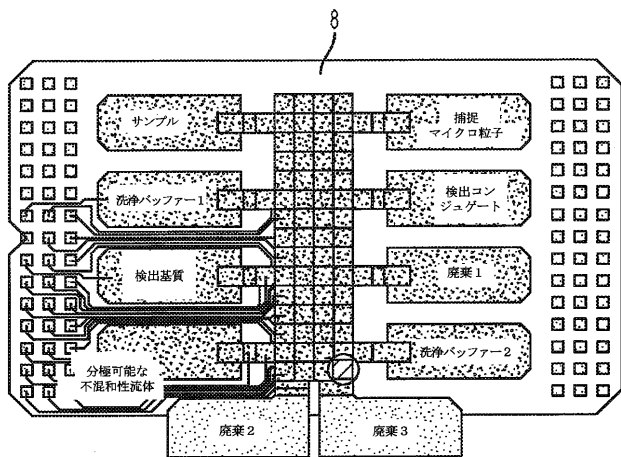


FIG. 27G

【図 28】

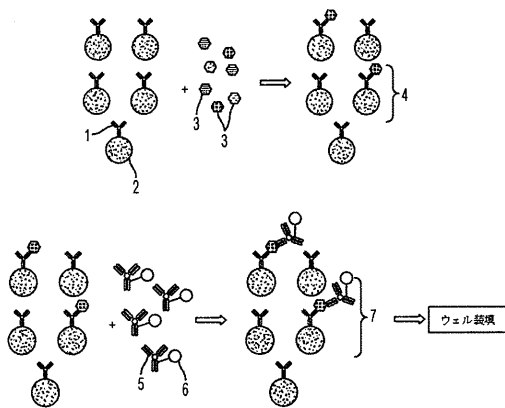


FIG. 28

【図 29】

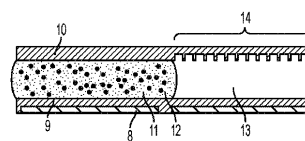


FIG. 29

【図 30 A】

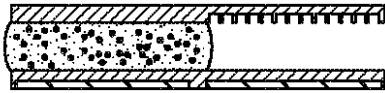


FIG. 30A

【図 30 D】

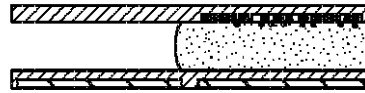


FIG. 30D

【図 30 B】

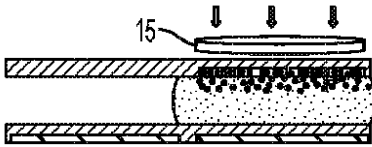


FIG. 30B

【図 30 C】

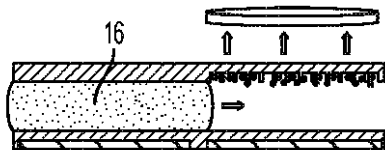


FIG. 30C

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/025785

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. B01L3/00 G01N33/48 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) B01L G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/043463 A1 (SHENDEROV ALEXANDER [US]) 18 April 2002 (2002-04-18) abstract paragraphs [0007] - [0010], [0020] - [0024]; figures 1a, 1b	1-18
X	US 2014/291152 A1 (CONOCI SABRINA [IT] ET AL) 2 October 2014 (2014-10-02) abstract paragraphs [0013], [0044] - [0055]; figure 7	1-18
A	US 5 187 096 A (GIAEVER IVAR [US] ET AL) 16 February 1993 (1993-02-16) the whole document	1-18
A	US 2013/126358 A1 (LEE TRAVIS [US] ET AL) 23 May 2013 (2013-05-23) the whole document	1-18
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
15 June 2016		26/08/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Sinn, Cornelia

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/025785**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-18

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2016/025785

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-18

A digital microfluidic and analyte detection device, comprising: a first substrate and a second substrate, wherein the second substrate is separated from the first substrate by a gap, the first substrate comprising a plurality of electrodes to generate electrical actuation forces on a liquid droplet; and an array of wells dimensioned to hold a portion of the liquid droplet, wherein at least a portion of the array of wells is positioned between one or more of the plurality of electrodes and the gap.

2. claims: 19-38

A digital microfluidic and analyte detection device, comprising: a first substrate and a second substrate defining the device, wherein the second substrate is separated from the first substrate by a gap, wherein the device comprises a first portion and a second portion; and the first portion comprising a plurality of electrodes to actuate combining of a first liquid droplet containing an analyte of interest from a biological sample and a second liquid droplet containing at least one bead; and the second portion comprising an array of wells dimensioned to hold a portion of the liquid droplet.

3. claims: 39-46

A surface acoustic wave microfluidic and analyte detection device, comprising: a first substrate and a second substrate, wherein the second substrate is separated from the first substrate by a gap, wherein the device comprises a first portion and a second portion, the first portion comprising a superstrate coupled to a surface acoustic wave generating component; and the second portion comprising a plurality of wells positioned on the first substrate or the second substrate.

4. claims: 47-141, 162-206

A method of detecting or measuring an analyte of interest in a liquid droplet, the method comprising: (a) providing a first liquid droplet containing an analyte of interest; (b) providing a second liquid droplet containing a specific binding member that binds to the analyte of interest; (c) using energy to exert a force to manipulate the first liquid droplet with the second liquid droplet to create a mixture; (d) moving all or at least a portion of the mixture to an

International Application No. PCT/US2016/025785

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

array of wells; and (f) detecting the analyte of interest in the wells or measuring the detectable label in the wells.

5. claims: 142-151

A method of loading wells with particles, comprising: (a) generating an electric field with a plurality of electrodes to move a liquid droplet containing microparticles to an array of wells, wherein one or more wells of the array of wells is of sufficient size to have loaded therein a particle; (b) loading one or more wells with a particle; and (c) generating an electric field with the plurality of electrodes to move a polarizable fluid droplet to the array of wells to seal the array of wells.

6. claims: 152-161

A method of forming a digital microfluidic and analyte detection device, comprising: unwinding a first roll comprising a first substrate to position a first portion of the first substrate at a first position; forming a plurality of electrodes on the first portion of the first substrate at the first position; and forming an array of wells on a second portion of the first substrate at a second position; and a method of forming an integrated digital microfluidic and analyte detection device, comprising: unwinding a first roll comprising a first substrate to position a first portion of the first substrate at a first position; forming a plurality of electrodes on the first portion of the first substrate at the first position; unwinding a second roll comprising a second substrate to position a second portion of the second substrate at a second position; forming an array of wells on the second portion at the second position; and bonding the second substrate with the first substrate in a manner sufficient to: position the second substrate spaced apart from the first substrate; and position the second portion above the first portion, or above a third portion adjacent the first portion of the first substrate, wherein the array of wells faces the first substrate.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/025785

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002043463	A1	18-04-2002	NONE
US 2014291152	A1	02-10-2014	NONE
US 5187096	A	16-02-1993	NONE
US 2013126358	A1	23-05-2013	NONE

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
 C 1 2 M 1/00 (2006.01) C 1 2 N 11/00
 C 1 2 M 1/00 A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

(74)代理人 100098475
 弁理士 倉澤 伊知郎
 (74)代理人 100130937
 弁理士 山本 泰史
 (72)発明者 ハフ ジェフリー ビー
 アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 0 6 9 リンカーンシャー シャーウッド ドライヴ 2 5
 (72)発明者 ハイデン マーク エイ
 アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 0 4 1 イングルサイド ウェスト シダーウッド 2 5 0 5
 9
 (72)発明者 カラバツォス ピーター ジェイ
 アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 0 2 2 グレンコー グリーンリーフ アベニュー 5 0 1
 (72)発明者 フィッシャー アンドリュー ティー
 アメリカ合衆国 テキサス州 7 6 0 3 9 ユーレス ウィンストン ドライヴ 1 0 1 0
 (72)発明者 ロビンソン ジョン エム
 アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 0 3 1 ガーニー ハーパー アベニュー 3 9 3 5
 (72)発明者 ホレッツーマコーマック シェリー アール
 アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 0 8 7 ウォキーガン バー オーク ドライヴ 3 2 1 6
 (72)発明者 ローレンソン ソフィー
 スイス 4 1 2 3 パーゼルーラント アルシュヴィル アドレス ヘーゲンハイマーマットヴェ
 ーク 1 2 7 サードー 3-5

Fターム(参考) 2G058 DA01 EA14
 3C081 BA22 BA23 BA32 BA52 BA72 CA02 CA05 CA13 CA17 CA29
 CA32 CA37 DA03 DA06 DA10 DA22 DA25 DA27 DA29 DA30
 EA27 EA29
 4B029 AA07 BB15 CC01 DG08 HA05
 4B033 NA42 NA43 ND05 ND06 ND16 NE02