

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12M 3/00

C12Q 1/02



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03803770.X

[43] 公开日 2005 年 6 月 22 日

[11] 公开号 CN 1630707A

[22] 申请日 2003.1.14 [21] 申请号 03803770.X

[30] 优先权

[32] 2002. 2. 12 [33] US [31] 60/356,377

[86] 国际申请 PCT/US2003/001027 2003. 1. 14

[87] 国际公布 WO2003/068906 英 2003. 8. 21

[85] 进入国家阶段日期 2004. 8. 12

[71] 申请人 色雷特康公司

地址 瑞典哥德堡

[72] 发明人 O·奥尔瓦 D·基乌 J·皮尔

J·辛克莱 J·奥洛夫松

M·卡尔松 K·加德马科

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

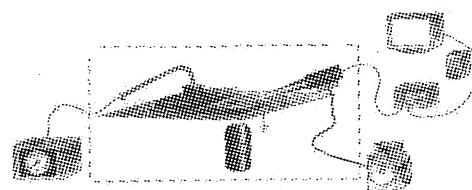
代理人 戈泊程伟

权利要求书 19 页 说明书 63 页 附图 33 页

[54] 发明名称 用于快速改变传感器周围溶液环境的系统与方法

[57] 摘要

本发明提供一种改变诸如传感器的纳米或微米级对象的溶液环境的微流体系统，以及使用该系统的方法。本发明可以应用到任何传感器技术，其中的感应组件需要快速地、连续地和可控地暴露到大量的不同溶液环境，该溶液环境的特性可以是可知的或不可知的。



ISSN 1008-4274

1. 一种系统，其包括：
一基板，用于改变一传感器周围的溶液环境，该基板包括多个通道，
5 每一通道包括一出口；以及
一扫描机制，用于选择性暴露一传感器至一流出一出口的流体流。
2. 一种系统，包括一用于改变一传感器周围的溶液环境的基板，
该基板包括：
10 一开放体积室，用于接收一传感器；以及
多个通道，每一通道包括一用于传送一大体分开的流体流至该室的
出口。
3. 一种系统，其包括：
15 一基板，用于改变一传感器周围的溶液环境，该基板包括多个通道，
每一通道包括一用于传送一大体分开的流体流至该室的出口；以及
一处理器，用于控制流体由每一通道传送至该传感器。
4. 如权利要求 2 所述的系统，其中该室能够传送一电流至一置于
20 该室内的传感器。
5. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，其中至少一通道与一贮存器
通信。
- 25 6. 如权利要求 5 所述的系统，其中该贮存器为一缓冲溶液贮存器。
7. 如权利要求 5 所述的系统，其中该贮存器为一样本贮存器。
8. 如权利要求 5 所述的系统，其包括多个缓冲溶液贮存器与样本
30 贮存器。

9. 如权利要求 7 所述的系统，其中该每一贮存器与一不同的通道通信。

10. 如权利要求 9 所述的系统，其包括交替的样本与缓冲溶液贮存器。

11. 如权利要求 5 所述的系统，其进一步包括一用于施加正压或负压至该贮存器的机制。

12. 如权利要求 1 所述的系统，其中该扫描机制包括一用于移动该传感器接近一出口的机制。

13. 如权利要求 1 所述的系统，其中该扫描机制包括一用于改变横越一个或更多通道的压力的机制。

14. 如权利要求 2 所述的系统，其进一步包括至少一与该室通信的流出通道。

15. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，其中该系统进一步包括一用于固定一传感器之机制，该传感器系连接或连接至一定位器，其系用于将传感器定位于一通道之一出口附近。

16. 如权利要求 15 所述的系统，其系进一步包括一毛细管，其系充分邻近于该用于固定该传感器之机制，或者是它可被移动以充分接近该用于固定该传感器之机制，其中该毛细管能够传送一流体至一被该定位器所定位之传感器。

17. 如权利要求 15 或 16 所述的系统，其中该用于固定该传感器之机制系包括一用于固定一细胞之机制。

18. 如权利要求 16 所述的系统，其中流出该毛细管之流体为一缓

冲溶液。

19. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，其系进一步包括一传感器。

5 20. 如权利要求 19 所述的系统，其中该传感器包括一细胞或一细胞的一部份。

21. 如权利要求 20 所述的系统，其中该细胞是一膜片箝制细胞或膜片箝制细胞膜片段。

10

22. 如权利要求 20 所述的系统，其中该细胞或该细胞的部份包括一离子通道。

23. 如权利要求 20 所述的系统，其中该细胞或该细胞的部份包括
15 一 G 蛋白偶合受体。

24. 如权利要求 20 所述的系统，其中该细胞或该细胞的部份包括一活性化的受体。

20 25. 如权利要求 20 所述的系统，其中该细胞或该细胞的部份由下列各物组成的组中选出：人工培养细胞、细菌细胞、单细胞生物细胞、酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞、鸟类细胞、两栖动物细胞、鱼类细胞、哺乳类动物细胞、卵母细胞、表达一重组核酸的细胞以及来自有病理症状患者的细胞。

25

26. 如权利要求 20 所述的系统，其中使用一定位器将该细胞或该细胞的部份定位于一通道的出口附近。

27. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，其中该系统进一步包括一
30 传感器，且其中该传感器由下列各物组成的组中选出：表面离子能源传感器；FET 传感器；ISFET；电化学传感器；光学传感器；声波生物

传感器；包括一与量子点粒子有关的感测组件的传感器；聚合物造成的生物传感器；以及固定在一基板上的一生物分子数组。

28. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，其中该系统包括多个传
5 感器。

29. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，其中这些多个通道的每一
流体流大体上平行。

10 30. 如权利要求 2 所述的系统，其中该室的至少一部份是光学全透
的。

31. 如权利要求 2 所述的系统，其中该室包括多个孔，每一孔用于
接收一细胞。

15 32. 如权利要求 2 所述的系统，其中该室包括至少一电子组件，其
用于改变该室中的一溶液的电子性质。

33. 如权利要求 31 所述的系统，其中每一孔包括一用于与一细胞
20 电子接触的电子组件。

34. 如权利要求 31 所述的系统，其进一步包括一机制，用于改变
横越在该基板内一个或更多通道的压力，以选择性地将一孔内的细胞
暴露于一来自一选定通道的流体流。

25 35. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，其中每一通道出口的直径
至少约为该传感器的直径。

36. 如权利要求 35 所述的系统，其中该传感器包括一细胞。

30 37. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，其中每一通道包括至少一

入口，用于接收流出一贮存器的溶液，且其中每一贮存器的中心点至中心点的距离对应于一多孔盘内各孔的中心点至中心点的距离。。

38. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，其中该基板进一步包括一个或更多治疗室，用于传送一电流至一置于该治疗室内的细胞。

39. 如权利要求 15 所述的系统，其中该用于固定该传感器的机制由下列各物组成的组中选出：移液管或毛细管，其连接到一定位器以及一光学镊子。

10

40. 如权利要求 16 所述的系统，其中该用于固定该传感器的机制是一移液管且该毛细管与该移液管同轴。

41. 如权利要求 39 所述的系统，其中该移液管是一膜片箝制移液管。

42. 如权利要求 15 所述的系统，其中该用于固定该传感器的机制包括一电极。

43. 如权利要求 2 或 3 所述的系统，其进一步包括一扫描机制，其用于选择性地将一传感器暴露于一流出一出口的流体流。

44. 如权利要求 43 所述的系统，其中该扫描机制包括一机制，其用于横越这些多个通道出口扫描该传感器。

25

45. 如权利要求 43 所述的系统，其中该扫描机制包括一机制，其用于改变横越在该基板内一个或更多通道的压力。

46. 如权利要求 1 所述的系统，其中该扫描机制能够移动该基板或该传感器，或者是该基板与传感器两者。

30

47. 如权利要求 43 所述的系统，其中当该扫描机制能够移动该基板以及该传感器时，该传感器与基板能够相互独立移动。

48. 如权利要求 43 所述的系统，其中该传感器或基板或该基板与
5 传感器两者根据该传感器对流出一通道出口的流体的预定响应而移动。

49. 如权利要求 1 所述的系统，其进一步包括一与该扫描机制通信的处理器。

10

50. 如权利要求 43 所述的系统，其进一步包括一与该扫描机制通信的处理器。

51. 如权利要求 1 所述的系统，其中该处理器控制下列各项中的一
15 项或更多：扫描频率、扫描方向、扫描加速度、扫描次数、在一通道的暂停时间以及横越一个或更多通道的压力变化。

52. 如权利要求 43 所述的系统，其中该处理器控制下列各项中的一
20 项或更多：扫描频率、扫描方向、扫描加速度、扫描次数、在一通道的暂停时间以及横越一个或更多通道的压力变化。

53. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，进一步包括一与该传感器通信的侦测器，其用于侦测该室内一传感器的响应。

25 54. 如权利要求 53 所述的系统，其中该传感器与一包括一数据获取系统的处理器通信。

55. 如权利要求 49 所述的系统，其中该处理器进一步包括一数据分析系统或者与一数据分析系统通信。

30

56. 如权利要求 53 所述的系统，其中该处理器与一用户接口通信，

该接口用于显示与这些响应有关的数据。

57. 如权利要求 56 所述的系统，其中该用户接口是一计算机或一无线装置。

5

58. 如权利要求 49 所述的系统，其中为了响应来自该探测器的信号，该处理器改变下列各项中的一项或更多：扫描频率、扫描方向、扫描加速度、扫描次数、在一通道的暂停时间以及横越一个或更多通道的压力变化。

10

59. 如权利要求 1 或 3 所述的系统，其中至少一通道出口向一用于接收该传感器的室打开。

60. 如权利要求 2 所述的系统，其中这些通道中的每一个同时传送一流体流进入该开放体积室。

15

61. 如权利要求 60 所述的系统，其中这些通道中的每一个同时传送一流体流进入该开放体积室。

62. 如权利要求 5 所述的系统，其中该系统接合于一流体传送系统，其可操作连接至一微米泵，该微米泵用于从该流体传送系统将流体灌注到该基板的一个或更多贮存器。

20

63. 如权利要求 62 所述的系统，其中该流体传送系统包括一个或更多微量滴定盘。

25

64. 如权利要求 62 所述的系统，其中该流体传送系统能够可编程传送不同类型的样本及/或缓冲溶液到至少一贮存器。

65. 如权利要求 62 所述的系统，其中该流体传送系统能够可编程传送缓冲溶液到至少一贮存器。

30

66. 如权利要求 10 所述的系统，其中该系统传送数道样本与缓冲溶液的流通过该基板的呈两手手指交叉状的各通道。

- 5 67. 如权利要求 20 所述的系统，其中该细胞包括一受体，且该系统传送一缓冲溶液；至少一作用剂；至少一作用剂与一缓冲溶液；至少一拮抗剂；或通过该基板的各通道的至少一拮抗剂与一缓冲溶液。

- 10 68. 如权利要求 20 或 67 所述的系统，其中该系统包括一用于接收该细胞或它的一部份的室，其与这些通道通信且其中该室包括一缓冲溶液，至少一作用剂；至少一作用剂与一缓冲溶液；至少一拮抗剂；至少一拮抗剂与一缓冲溶液；或至少一拮抗剂，至少一作用剂与一缓冲溶液。

- 15 69. 如权利要求 67 所述的系统，其中该至少一作用剂与缓冲溶液；该至少一拮抗剂与缓冲溶液；或该至少一拮抗剂，至少一作用剂，以及缓冲溶液，通过该基板的呈两手手指交叉状的各通道，传送至该细胞。

- 20 70. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，其进一步包括至少一输出通道，该通道用于移除该系统的流体。

71. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，进一步包括一机制，该机制用于传送正压或负压到这些通道中的至少一个。

25

72. 如权利要求 71 所述的系统，其中该用于传送压力的机制与一处理器通信。

73. 如权利要求 72 所述的系统，其中该处理器提供指令到该用于传送压力至一个或更多选定通道的机制。

30

74. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，其中该基板与一多孔盘接

合，且其中每一孔与该基板上的一不同的通道有流体通信。

75. 如权利要求 74 所述的系统，其中数孔通过一个或更多用于传送该流体至这些通道的外部管子或毛细管而与这些通道有通信。

5

76. 如权利要求 74 所述的系统，其中该一个或更多管子或毛细管包括一个或更多外部阀，用于控制通过这些管子或毛细管的流体流。

77. 如权利要求 5 所述的系统，其中至少一贮存器被一隔膜封闭。

10

78. 如权利要求 74 所述的系统，其中一管或针插入该隔膜。

79. 如权利要求 16 所述的系统，其中该毛细管连接到一泵机制以将缓冲溶液的脉动传送提供给该传感器。

15

80. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，其中该基板包括一由下列各物组成的组中选出的材料：一结晶半导体材料；硅；氮化硅；锗，镓化砷；金属；铝，镍；玻璃；石英；结晶状绝缘体；陶瓷；塑料；一弹性体材料；硅氧烷；EPDM；Hostaflon；一聚合物；一含氟高分子；
20 Teflon®；聚甲基丙烯酸甲酯；聚双甲基硅氧烷；聚乙烯；聚丙烯；聚丁烯；聚甲基戊烯；聚丙乙烯；聚胺甲酸酯；聚氯乙烯；聚芳酯化合物；聚芳砜；聚己内酯多元醇；聚酯碳酸；聚亚酰胺；聚酮；聚亚苯基；邻苯二甲酰胺；聚砜；聚酰胺；聚酯；环氧聚合物；热塑性塑料；有机材料；无机材料；它们的组合。

25

81. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，其中该基板为三维且这些通道中的至少二个至少部分地处于不同的平面。

82. 如权利要求 81 所述的系统，其包括第一组通道与第二组通道，
30 且其中该第一组通道压在该第二组通道上面。

83. 如权利要求 1、2 或 3 所述的系统，其中至少一通道为一混合通道，其用于混合来自至少两个通道的流体流。

84. 如权利要求 84 所述的系统，其中该混合通道提供一包括一变动浓度物质的流体。

85. 一种用于产生一活化受体的方法，其包括：

a) 提供一基板，该基板包括：

一室，其包括一基于细胞的生物传感器，其包括被一作用剂活化的受体；以及

多个传送通道，用于传送作用剂、拮抗剂或作用剂与拮抗剂两者，每一通道包括一出口，其用于传送一大体分开的水流进入该室；以及

b) 选择性地将该生物传感器暴露到一流出一个或更多出口的流体流。

86. 如权利要求 85 所述的方法，其中该室包括一缓冲溶液、至少一作用剂、至少一拮抗剂或它们的组合。

87. 一种用于侦测一受体的一调节剂的方法，其包括：

a) 提供一基板，该基板包括：

一包括一基于细胞的生物传感器的室，该生物传感器包括该受体；以及

多个传送通道，每一通道包括一用于传送一大体分开的流体流进入该室的出口；以及

一扫描机制，其用于选择性地将该生物传感器暴露到流出一个或更多出口的流体流，

b) 提供一怀疑含有一调节剂的样本到这些通道中的至少一个；

c) 当它被选择性暴露至一包括该样本的流体流时，测量该生物传感器的响应，其中该生物传感器的响应变化表示该样本中有一调节剂。

88. 如权利要求 85 或 87 所述的方法，其中该暴露步骤的实施通过

相对于至少一通道出口移动该基板或该传感器或该基板与该传感器两者。

89. 如权利要求 88 所述的方法，其中该基板与传感器两者被相互
5 独立地移动。

90. 如权利要求 85 或 87 所述的方法，其中该暴露步骤进一步包括产生横越一个或更多通道的压力落差。

10 91. 如权利要求 87 所述的方法，其中该同样有嫌疑的调节剂被提供到多个通道。

92. 如权利要求 87 所述的方法，其中这些不同浓度的调节剂被提供到这些多个通道。

15

93. 如权利要求 87 所述的方法，其中该调节剂在至少一通道中浓度有变化，在该至少一通道中形成调节剂的一梯度。

94. 如权利要求 87 所述的方法，其进一步包括产生该调节剂的一
20 剂量-响应曲线。

95. 如权利要求 87 所述的方法，其包括将该生物传感器暴露于至少一通道所传送的缓冲溶液。

25 96. 如权利要求 95 所述的方法，其包括选择性地将该生物传感器暴露到缓冲溶液与样本的流。

97. 如权利要求 96 所述的方法，其包括选择性地将该生物传感器暴露到缓冲溶液与样本的交替流。

30

98. 如权利要求 85 或 87 所述的方法，其中该基于细胞的生物传感

器包括一膜片箝制的细胞或膜片箝制的细胞膜片段。

5 99. 如权利要求 98 所述的方法，其中使用一连接或连接至一定位器的膜片箝制移液管，相对于这些出口，将该膜片箝制的细胞予以定位。

100. 如权利要求 98 所述的方法，其中将该膜片箝制的细胞或膜片箝制的膜片段沉降定位在该室的底。

10 101. 如权利要求 87 所述的方法，其中该受体用一作用剂活化，该作用剂在结合至该受体时即通过该生物传感器产生一可测量响应，且其中该调节剂调节该作用剂的活性。

15 102. 如权利要求 87 所述的方法，其中该受体用一拮抗剂活化，该拮抗剂在结合至该受体时即通过该生物传感器去除或减少一可测量响应，且其中该调节剂调节该拮抗剂的活性。

103. 如权利要求 87 所述的方法，其中该调节剂为一作用剂。

20 104. 如权利要求 87 所述的方法，其中该调节剂为一拮抗剂。

25 105. 如权利要求 87 所述的方法，其中这些通道传送一缓冲溶液，至少一作用剂；至少一拮抗剂；至少一作用剂与一缓冲溶液；至少一拮抗剂与一缓冲溶液；或至少一拮抗剂、至少一作用剂以及一缓冲溶液。

106. 如权利要求 87 或 105 所述的方法，其中该室包括一缓冲溶液、至少一作用剂或至少一拮抗剂。

30 107. 如权利要求 85 或 87 所述的方法，其中该基于细胞的生物传感器包括一离子通道。

108. 如权利要求 85 或 87 所述的方法，其中该受体包括一 G 蛋白偶合受体。

5 109. 如权利要求 85 或 87 所述的方法，其中该基于细胞的生物传感器包括一重组表达受体。

110. 如权利要求 109 所述的方法，其中该重组表达的受体为一孤儿受体。

10

111. 如权利要求 87 所述的方法，其中该响应取决于测量细胞表面积。

112. 如权利要求 87 所述的方法，其中该响应取决于测量该基于细
15 胞的生物传感器的一电子性质。

113. 如权利要求 87 所述的方法，其中该调节剂是神经传导物质释出的一调节剂。

20 114. 如权利要求 87 所述的方法，其中该响应取决于测量离子通道渗透性质。

115. 一种用于局部改变一纳米等级或微米等级对象周围的溶液环境的方法，其包括：

25

a) 提供一基板，该基板包括：

一室，其包括该纳米等级或微米等级对象与一流体；以及
多个通道，每一通道包括一与该室相交的出口；

b) 传送大体分开的流体流进入该室，这些流中的至少二道包括不同的流体；

30

c) 横越该至少两道流连续扫描该对象，从而改变该对象周围的水溶液环境。

116. 如权利要求 115 所述的方法，其中扫描通过移动该基板、该对象或该基板与对象两者实现。

5 117. 如权利要求 115 所述的方法，其中扫描通过改变横越一个或更多通道的压力实现。

118. 如权利要求 115 所述的方法，其中该室包括多个纳米等级或微米等级对象。

10

119. 如权利要求 118 所述的方法，其中每一对象横越至少两道流被扫描。

120. 如权利要求 115 所述的方法，其中扫描通过一被一处理器控制的扫描机制实现。

15

121. 如权利要求 120 所述的方法，其中该处理器控制该对象相对于这些通道的定位。

20 122. 如权利要求 120 所述的方法，其中该处理器控制一扫描参数，该参数由下列各项目组成的组中选出：扫描方向、扫描加速度、扫描次数、在一通道的暂停时间以及横越一个或更多通道的压力变化。

123. 如权利要求 122 所述的方法，其中扫描参数通过该处理器响应一反馈信号修改。

25

124. 如权利要求 123 所述的方法，其中该反馈信号为该对象对该一或更多流的响应。

30 125. 如权利要求 115 所述的方法，其中该基板进一步包括至少两个通道，其包括与该室相交的出口，且其中由至少两个通道流出的水

流在该室内的流体体积内是准直且片流的。

126. 如权利要求 79、80 或 105 所述的方法，其中在这些多个通道中的每一个处的水压力是不同的。

5

127. 如权利要求 85、87 或 115 所述的方法，其中在这些通道中的至少两处，流体的粘度是不同的。

128. 如权利要求 85、87 或 105 所述的方法，其中每一通道包括有
10 不同粘度的流体。

129. 如权利要求 85、87 或 115 所述的方法，其中在这些通道中的至少两处流体的温度都不同。

15 130. 如权利要求 85、87 或 115 所述的方法，其中在这些多个通道中的每一个内流体温度是不同的。

131. 如权利要求 85、87 或 115 所述的方法，其中在这些通道中的至少两个内流体的渗透压是不同的。

20

132. 如权利要求 131 所述的方法，其中在这些多个通道中的每一个内流体的渗透压是不同的。

133. 如权利要求 85、87 或 105 所述的方法，其中在这些通道中的
25 至少两个内流体的离子强度是不同的。

134. 如权利要求 85、87 或 115 所述的方法，其中流以不同速度在两个通道中流动。

30 135. 如权利要求 85、87 或 115 所述的方法，其中流进该室的流体由该室收回。

136. 如权利要求 135 所述的方法，其中流体通过原先进入该室所通过的通道回收。

5 137. 如权利要求 135 所述的方法，其中流体通过与原先进入该室所通过的通道不同的通道回收。

138. 如权利要求 115 所述的方法，其中该对象为一传感器，且该方法进一步包括测量该传感器对一个或更多流体流的响应。

10

139. 如权利要求 138 所述的方法，其中该传感器包括一细胞膜，且该方法进一步包括将该细胞膜暴露于一电场的步骤。

140. 如权利要求 139 所述的方法，其中该电场诱发孔形成于该细
15 胞膜中。

141. 如权利要求 139 所述的方法，其中该响应取决于测量离子电流。

20 142. 如权利要求 139 所述的方法，其中该响应取决于测量电压。

143. 如权利要求 139 所述的方法，其中该响应取决于测量细胞内的钙。

25 144. 如权利要求 139 所述的方法，其中该响应取决于测量膜伸展。

145. 如权利要求 139 所述的方法，其中该响应为内部水泡的释出。

30 146. 如权利要求 139 所述的方法，其中该响应是该膜所取得的水泡。

147. 如权利要求 139 所述的方法，其中该对象平稳联系在该室的底。

148. 如权利要求 85、87 或 115 所述的方法，其中这些通道中的至少一个内的流体以电泳传送至该室。

149. 如权利要求 85、87 或 115 所述的方法，其中这些通道中的至少一个内的流体以泵传送至该室。

150. 如权利要求 85、87 或 115 所述的方法，其中该方法进一步包括连续式或间歇式将该对象暴露于不同波长的光线。

151. 如权利要求 115 所述的方法，其中该对象是一微米或纳米电极。

152. 如权利要求 115 所述的方法，其中该对象由下列各物组成的组中选出：表面离子能源传感器；FET 传感器；ISFET；电化学传感器；光学传感器；声波生物传感器；包括一与量子点粒子有关的感测组件的传感器；聚合物造成的生物传感器；以及固定在一基板上的一生物分子数组。

153. 如权利要求 115 所述的方法，其中该对象由下列各物组成的组中选出：真核细胞、原核细胞、细胞核、受感染细胞、转染细胞、细菌、胞器、胞器类似物、配子、电穿孔处理的细胞、突触体、蛋白质体、微脂体以及它们的各种组合。

154. 如权利要求 115 所述的方法，其进一步包括用由一流体源流出的液体，以高于或低于这些通道内流体的流动速率的速率，连续式或间歇式灌流该对象。

155. 如权利要求 115 所述的方法，其中该对象为一细胞，且连续

式或间歇式灌流该细胞的表面以重新敏感化一离子通道及/或受体。

156. 如权利要求 115 所述的方法，其中该对象为一细胞，且连续式或间歇式灌流该细胞的表面以去敏感化一离子通道及/或受体。

5

157. 如权利要求 115 所述的方法，其中该对象为一细胞，且连续式或间歇式灌流该细胞的表面以阻断各离子通道及/或受体。

158. 如权利要求 115 所述的方法，其中将一个或更多微米或纳米电极置于该对象附近。

10

159. 如权利要求 158 所述的方法，其中该一个或更多微米或纳米电极被用来连续式或间歇式将该对象暴露于一电场。

160. 如权利要求 159 所述的方法，其中该暴露导致该纳米等级或微米等级对象的电化学变化。

15

161. 如权利要求 160 所述的方法，其中该电化学变化是氧化作用或还原作用。

20

162. 如权利要求 115 所述的方法，其中该室包括多个孔，每一孔用于接收一细胞。

163. 如权利要求 162 所述的方法，其中每一孔包括一电子组件，其用于与该细胞电子接触。

25

164. 如权利要求 115 所述的方法，进一步包括运送一微米等级或纳米等级对象通过至少一通道进入该室。

165. 如权利要求 115 所述的方法，其中通过这些多个通道传送一个或更多药剂。

30

166. 如权利要求 115 所述的方法，其中将该对象暴露于呈两手手指交叉状的药剂与缓冲溶液流。

- 5 167. 如权利要求 165 所述的方法，其中该药剂由下列各物组成的组中选出：候选药物；已知药物；有嫌疑的致癌物；已知致癌物；候选有毒药剂；已知有毒药剂；以及直接或间接作用于离子通道的药剂。

- 10 168. 如权利要求 115 所述的方法，其中该对象为一细胞，且其中该细胞对一流体流的响应被用来监视该细胞的生理响应的变化。

169. 如权利要求 115 所述的方法，其中该生理响应为一与一疾病状态有关的异常的生理响应。

- 15 170. 如权利要求 115 所述的方法，其中将该基板植入一有机组织的本体。

用于快速改变传感器周围溶液环境的系统与方法

5 技术领域

本发明关于多种系统与方法，用于快速且可编程传送水流至一传感器，例如基于细胞的生物传感器。特别是，本发明提供多种系统与方法，用于高通量膜片箝制分析 (patch clamp analysis)。

10 背景技术

离子通道 (ion-channel) 为重要的治疗学靶标。神经元通信、心功能、以及记忆全都非常依靠配体门 (ligand-gated) 与电位门 (voltage-gated) 离子通道的功能。此外，许多器官例如心脏、胃肠道、以脑中慢性与急性病理生理状况很多范围是涉及离子通道的。事实上，许多现存药物结合受体 (drugs bind receptor) 直接或间接有关于离子通道。例如，抗精神病的药物 (anti-psychotic drug) 与涉及多巴胺能的能的、含血清素的、类胆碱能的、以及谷氨酸能的 (dopaminergic, serotonergic, cholinergic and glutamatergic) 神经传导的受体有相互作用。

20 因为当作药靶 (drug target) 的离子通道有其重要性，所以需要方法能将化合物的高通量筛选 (high throughput screening, HTS) 作用于配体门与电位门通道 (参考，例如，Sinclair 等人，2002, Anal Chem. 74: 6133-6138)。不过，现存以离子通道为靶靶标 HTS 药物发现系统通常遗漏显著的药物活动，因为他们用间接的方法，例如未加工的结合实验 (binding assay) 或基于萤光的读出 (fluorescence-based readout)。尽管可由百万种化合物的筛选中识别上万种先导药物 (drug lead)，假阳性与假阴性药物的识别仍可导致忽略了有高度治疗破坏性的药物，且造成在假先导药物上不必要又高成本的投资。

30 膜片箝制法优于任何其它用于测量细胞内离子通道活动的技术，且可测量横越细胞膜的电流，范围可低到皮安皮安 (参考，例如，Neher

and Sakmann, 1976, Nature 260: 799-802; Hamill, et al, 1981, Pflugers Arch 391: 85-100; Sakmann and Neher, 1983, In Single-Channel Recording pp. 37-52, Eds. B. Sakmann and E. Neher. New York and London, Plenum Press, 1983)。不过，膜片箝制法通常没有开发 HTS 平台用的方法。

发明内容

本发明提供数种微流体系统 (microfluidic system)，用于改变一纳米等级或微米等级对象诸如传感器的周围的溶液环境，以及提供数种使用这些系统的方法。本发明可能用于任何传感器技术，其中需要将该感测组件以快速、顺序且可控制的方式暴露于大量不同的且其特征为已知或未知的溶液环境（例如，大于 10 且优选的，约大于 96 种不同的环境）。与先前技术的微流体系统相反，样本传送的时间间隔是最小化的，例如，等级为毫秒以及秒，因此得以快速分析化合物（例如，药物）。

在一方面，本发明提供一种系统，其包括一基板，用于改变一纳米等级或微米等级对象诸如传感器的周围的溶液环境。该基板包括一用于该传感器的开放体积的室，以及多个通道。每一通道包括一用于传送大体分开的水流至该室的出口。在一方面，这些出口大体平行，即，线性排列于单一平面。可改变这些出口的尺度。不过，在一方面，当该传感器为一生物细胞时，这些出口中的每一个的直径至少等于该细胞的直径优选。优选多个通道，不必所有的，可编程传送一流体至该室。

在优选的一方面，该基板的每一通道包括至少一入口，用于由一贮存器接收溶液，在该基板上其形状与排列与多孔盘中的孔是一致的。例如，该基板可包括 96-1024 个贮存器，每一个连接该基板上的一独立的通道。优选地，每一贮存器的中心点至中心点的距离对应于微量滴定盘或多孔盘的中心点至中心点的距离。

在另一方面，该基板包括一个或更多治疗室或微型室，其用于将治疗送至一置于该治疗室内的细胞。该治疗可包括暴露该细胞至一化学物或化合物（例如药物或染料，如钙离子螯合的荧光染料），暴露该

细胞至一电流（例如，电穿孔法（electroporation），电融合（electrofusion）及其类似者），或暴露该细胞至光线（例如，暴露于一特殊波长的光线）。一治疗室可用于多种类型的治疗（可能被顺序或同时传送）。例如，一电子治疗细胞也可暴露于一化学物或化合物及/或暴露于光线。治疗可持续一断时间或是间歇性的（例如，间隔时间为规则或不规则）。该细胞治疗室可包括一有一出口的通道，用于传送一已治疗细胞至该传感器室或直接至一固定该细胞连接至一用于将该细胞定位于该室的定位器（例如，微米定位器或纳米定位器）的机制。

该传感器室的底视优选全透式，且在一方面，该系统进一步包括一光源（例如，激光），与该开放体积室有光学通信。该光源可用来持续或间歇暴露该传感器至相同或不同波长的光线。该传感器室及/或通道可额外装置控制装置。例如，该传感器室及/或通道可包括温度传感器、酸碱值传感器及其类似物，用于提供与室及/或通道状况有关的信号至一系统处理器。

可改造该传感器室用于接收各种不同传感器。在一方面，该传感器包括一细胞或一细胞的一部份（例如，细胞膜片段）。另一方面，该细胞或细胞膜片段包括一离子通道，其包括，但不受限于，一预突触表达的（presynaptically-expressed）离子通道、一配体门通道、一电位门通道及其类似物。在另一方面，该细胞包括一受体，例如 G 蛋白偶合受体（GPCR）、或一已知无配合基的孤儿受体（orphan receptor）或一包括一已知配合基的受体。

一人工培养的细胞可用来当作传感器且可包含下列各物的组中选出：CHO 细胞、NIH-3T3 细胞以及 HEK-293 细胞，且可重组加工（recombinantly engineered）为可表达一感测分子，例如离子通道或受体。许多其它不同的细胞类型也可使用，其由下列各物组成的组中选出：哺乳动物的细胞（例如，包括，但不受限于人类细胞、灵长类动物细胞、牛科动物细胞、猪细胞、其它家畜动物及其类似物）；细菌细胞；单细胞生物细胞；酵母细胞；植物细胞；无脊椎动物细胞，其包括昆虫细胞；两栖动物细胞；鸟类细胞；鱼类；及其类似物。

使用本领域常用方法，一细胞膜片段可由上述任一细胞分离出来，或可通过将一微脂体（liposome）或其它以脂质为基础的粒子与一感

测分子，例如离子通道或受体聚集来产生。

该细胞或该细胞的一部份，使用一固定该细胞或细胞部份的机制，例如移液管（例如膜片箝制移液管），或连接至定位器（例如微米定位器或纳米定位器）的毛细管，或一光学镊子可被定位于该室。优选地，
5 该定位器至少在 x-、y-和 z-方向移动该移液管。另外或额外的，该定位器可转动该移液管。同样，可选地，该定位器连接至一与一处理器通信的驱动单元，让该移液管的移动可被该处理器所控制。

在一方面，该室的底包括一个或更多凹处且该细胞或该细胞的部份置于一凹处内，该凹处可与一个或更多电极（例如，该传感器可包
10 括一平面膜片箝制芯片）通信。

非基于细胞的传感器也可于该系统。合适的非细胞为基础的传感器包括，但不受限于：一表面离子能源传感器；一 FET 传感器；一 ISFET；一电化学传感器；一光学传感器；一声波传感器；一包括一与量字点粒子有关的感测组件的传感器；一基于聚合物的传感器；固定在一基
15 板上的单一分子或一分子序列（例如，核酸、缩氨酸、多肽、小型分子及其类似物）。该传感器室也可包括多个不同类型的传感器（非细胞为基础的及/或细胞为基础的）。一传感器基板可固定在该室的底，或简单将该基板置于该室的底上面。另外，该室的底本身也可当作该传感器基板且使用本领域常用方法可将一个或更多感测组件与该底平稳
20 联系起来。在一方面，感测组件联系在一基板或该传感器室的底上的已知位置处。

然而，置于一室内的一对象不一定是一传感器。例如，该对象可为一胶粒、珠子（beads）、纳米管、非感测分子、硅晶圆或其它的微小组件。

25 本发明也提供一种系统，其包括一基板，该基板包括至少一室，用于接收一基于细胞的生物传感器、多个通道、至少一细胞储存室以及至少一细胞治疗室。优选地，每一通道包括一出口，用于传一流体流进入该室，且改造该细胞治疗室用来传送一电流至一置于该细胞治疗室内的细胞。在一方面，该细胞治疗室进一步包括一有一出口的
30 通道，用于传送一细胞至该传感器室（用于接收该基于细胞的生物传感器）。该系统可用来快速且可编程改变一细胞周围的溶液环境，该细

胞已被电穿孔处理的及/或电融合及/或其它的细胞治疗室内处理。另外或额外的，该传感器室也可用作一治疗室且在一方面，该传感器室与一个或更多电极有电子通信，用于持续或间歇暴露一传感器至一电场。

5 在一方面，根据本发明的一系统进一步包括一扫描机制，用于扫描一传感器相对于这些通道的位置。该扫描机制可相对于一静止传感器调动该基板，或可相对于一静止基板调动该传感器，或可用不同的相对速率与方向同时移动传感器与基板。在一方面，该传感器相对于一出口的定位使用一用于固定该传感器的机制（例如，移液管或毛细管），该传感器连接于一定位器（例如，微米定位器或纳米定位器或显微操作仪（micromanipulator））。因此，该定位器可用来通过移动用于固定该传感器的机制移动该传感器横越由这些通道出口出来的多个流体流。另外或额外的，也可通过产生压力落差调整扫描顺序横越邻近的微通道。

15 优选地，该扫描机制与一处理器通信且响应该处理器的指令（例如，程序指令或响应反馈信号所产生的指令）而调动。在一方面，该处理器控制一个或更多：扫描频率、扫描方向、扫描加速度、扫描次数。因此，该系统可用来在一室内移动纳米等级与微米等级对象至用户选定的或系统选定的坐标，在指定的时间长度内（例如，可编程的）。
20 优选地，例如，响应先前的扫描动作及/或响应被该系统侦测器侦测的对象的光学信号，该系统处理器也可用来确定该室内的一个或更多对象的位置。在一方面，该系统进一步系包括一用户装置，其与该处理器通信，它包括一与用户接口的图形用户显示器。例如，该显示器可用来显示该室内诸对象的坐标、或光学数据或得自该室的其它数据。

25 此外，本发明提供一种基板包括一室，用于接收一基于细胞的生物传感器，其包括一受体或离子通道。在一方面，该系统短时间内顺序暴露一基于细胞的生物传感器至一个或数个配合基（结合至该受体/离子通道）且通过该基板的呈两手手指交叉状的通道至无配合基的缓冲溶液一段短时间。例如，选择性暴露一细胞生物传感器至不同溶液
30 条件一段时间可通过扫描该基于细胞的生物传感器横越呈两手手指交叉状的通道（交替传送一个或数个配合基与缓冲物）来实现。在每一

微流体通道中流动的缓冲与样本溶液优选以恒定速度稳定状态流动。

不过,另一方面,该系统通过一灌流液(superfusion)毛细管(定位该基于细胞的生物传感器或其它类型的传感器附近)至通过有流动流体的出口传送(例如,脉动开/关流)缓冲溶液的脉冲至一受体。例如,该系统可包括用于固定该传感器的机制,该传感器连接至一定位器(例如,微米定位器、纳米定位器和显微操作仪等等),用于将该传感器定位于该出口附近,以及一毛细管,包括一在该用于固定该传感器的机制附近的出口,以将一缓冲溶液从该毛细管传送至传感器。一扫描机制可用来同时移动该毛细管与传感器,以保持该毛细管足够靠近该传感器。该毛细管也可连接至一泵机制以提供缓冲溶液的脉冲传送到该传感器。另一方面,来自接近于一个或更多传感器的一个或更多灌流液毛细管的缓冲溶液的流动速率可高于或低于来自这些通道的流体的流动速率。

本发明进一步提供一基板,其包括一圆形室,用于接收一传感器,其包括一圆柱形墙与底。在一方面,该基板包括多个通道,包括开口辐射状分布于该室墙的周围(例如,辐条轮配置)的出口,用于传送样本至该室。优选地,该基板也包括至少一输出通道,用于排出该室的废弃物。在一方面,至少一额外的通道传送缓冲溶液至该室。优选地,该传送缓冲溶液的至少一额外通道与输出通道间的角度大于 10° 。更佳地,该角度大于 90° 。该通道“辐条”可能全在同一平面,或至少有两个辐条是在不同平面。

该室中溶液的快速、编程交换是用来改变置于该室传感器四周的溶液环境且在此配置中可提供多个输出通道。例如,每一通道有一输出通道用来传送样本/缓冲溶液。传送用的通道数目也可改变,例如,使得该基板适用于与工业标准微量滴定盘接合。例如,有96至1024个通道用来传送样本。另一方面,可能有一额外的,相等数目的通道用于传送缓冲溶液(例如,可提供呈两手手指交叉状的样本与缓冲溶液的流体流)。

本发明也提供一多层基板,用于改变传感器周围的溶液环境,其包括:一第一基板,其包括用于传送流体至一传感器的通道;一过滤层,用于保持一个或更多传感器接近于该第一基板;以及一第二基板,

包括一用于接收来自该过滤层的流体的废弃物贮存器。一个或更多传感器可加在该第一基板与过滤层之间。在一方面，这些传感器中的至少一个是一细胞。优选地，该系统进一步包括一机制，用于建立第一与第二基板间的压力差以强迫流体由该第一基板内的通道通过该过滤层流向该废弃物贮存器，即，提供快速流体交换通过该过滤层（即，传感器）。

此外，本发明提供一基板，其包括一用于接收一传感器的室、包括一与该室相交的出口的第一通道以及多个与第一通道相交的样本传送通道。该第一通道也连接至一缓冲溶液贮存器（例如，通过连接通道）。在一方面，这些样本传送通道的纵轴是相互平行的，但与第一通道的纵轴是有角度的（例如，呈“鱼骨”状）。通过一正压机制与该缓冲溶液贮存器及/或样本通道通信来实现溶液通过该第一通道及/或样本通道的快速流动。被动单向阀可加在样本传送通道与第一通道的交界处以进一步调节流动速率。在一方面，这些样本贮存器中的至少一个被一隔膜（可包括一插于其中的针或管子）所封闭。

本发明进一步提供一基板，其包括一用于接收一传感器的室、多个传送通道，包括出口用于馈入样本或缓冲溶液进入该室以及包括在这些传送通道出口对面的出口的多个流出通道。这些传送通道的纵轴可与这些流出通道的纵轴同在或不同在一平面。在一方面，这些多个流出通道是在这些多个入口通道的上面（即，该基板是三维基板）。

上述的这些系统中的任一系统可进一步包括一压力控制装置，用来控制施加至该基板的至少一微通道的正压与负压。在其中基板包括数个传送通道与（数个）输出通道的系统中，优选地，该系统进一步包括一用于施加一正压至至少一传送通道同时施加一负压至至少一输出通道的机制。在这些通道中的至少一个处的水压力（hydrostatic pressure）可响应该处理器所收到的反馈信号而改变优选。

因此，该系统可调节何时一流体流由该室收回，通过那一个通道。例如，在一段预定时间之后，一流体流可通过同一通道、通过它进入系统的那个通道或通过不同的通道，由该室收回。当一流出通道邻近一传送通道时，该系统可产生一 U 形流体流，这可有效回收通过传送通道传送的化合物。

如上述，可提供多样传送通道配置：直线、有角度的、分叉的、鱼骨状的及其类似的配置。在一方面，每一传送通道包括一个或更多相交的通道，其纵轴垂直于这些传送通道的纵轴。另一方面，每一传送通道包括一个或更多相交的通道，其纵轴与传送通道成一角度。

5 一般而言，上述的这些通道配置中的任何一种与用于传送样本至贮存器或样本入口的容器接合（例如，通过毛细管或管子连接该容器与这些贮存器/入口）。在一方面，至少一通道是分叉的，且包括多个入口。优选地，这些多个入口与一单一容器接合。不过，多个入口也可能与数个不同的容器接合。

10 另外，上述的这些基板中的任何一个通过一个或更多外部管子或毛细管可与一多孔盘接合（例如，微量滴定盘）。该一个或更多管子或毛细管可包括一个或更多外部阀以控制流体流通过该管子或毛细管。在一方面，这些多孔盘的多个孔包括已知溶液。该系统也可与多个微量滴定盘接合；例如，这些盘可堆叠，一个叠在一个上面。优选地，
15 该系统进一步包括一微米泵（micropump），用于由一微量滴定盘或其它合适容器的孔汲取流体进入该基板的贮存器。更佳地，该系统通过这些贮存器可编程传送流体至该基板选定的通道。

在一方面，根据本发明的一系统进一步包括一侦测器，其与一传感器室通信，用于侦测传感器响应。例如，该侦测器可用来侦测该传
20 感器的一个或更多：电子、光学或化学的性质变化。在一方面，响应来自该侦测器的信号，该处理器改变一个或更多：扫描频率、扫描方向、扫描加速度、扫描次数以及一个或更多通道上的压力。

本发明也提供一种方法，其用于局部改变一纳米等级或微米等级对象（例如，传感器）周围的溶液环境。该方法包括提供一基板，其
25 包括一开放体积室，包括一纳米等级或微米等级对象以及一水流体。该基板进一步包括多个通道，每一通道包括一与该开放体积室相交的出口。大体上分开的流体的水流被传送至该开放体积室，至少有两道是包括不同的流体。

优选地，由至少两个相邻的通道出来的流体流在该开放体积内是
30 准直的且片流的。不过，该系统可包括数组通道（至少两个相邻的通道）其中至少一组传送准直片流的流，同时至少另一组传送非准直的、

非片流的流。在一方面，这些流以不同速度流动。流体可用一些不同的方法由这些通道传送至该室，包括用电泳（electrophoresis）及/或用电半透析（electroosmosis）及/或用泵。

在一方面，这些通道的纵轴大体平行。可将这些通道排列于一线性数组、一二维数组或一三维数组，可包括数个治疗室、数个传感器室、数个贮存器及/或数个废弃物通道，且可与上述（数个）容器或（数个）多孔盘接合。在一方面，数个通道可叠在数个输入通道上面（即，在一三维配置中）。优选地，至少一输出或流出通道的纵轴是平行的，不过是处在不同的平面，相对于至少一输入通道的纵轴。通过施加一正压至一输入通道同时有一负压施加于一相邻的输出或流出通道，一U形流体流可在该室内产生。以此方式，该室内的一对象可暴露于来自一入口通道的流体流内的一化合物，例如，通过相邻的输出或流出通道由该室收回可回收该流体。这些U形流体流可，优选地，用来在一大体积贮存器或开放体积中产生有特定组份的流体流的局部界限清楚的区域（local well-defined region）。

优选地，该对象经顺序扫描横越该至少两个水流体流，从而改变该对象周围的水溶液环境。可通过移动该基板及/或该对象来做扫描，或可通过施加至这些通道的压力落差来调节扫描。

该开放体积室可包括多个对象；优选地，每一对象经扫描横越至少两道流。扫描可由上述的一处理器控制的扫描机制完成。该开放体积可，额外有数个入口与出口用于添加及收回溶液。例如，新鲜的缓冲溶液可通过使用一蠕动泵（peristaltic pump）添加至该记录室。

在一方面，该方法进一步包括修改一个或更多扫描参数，例如扫描频率、扫描方向、扫描加速度、扫描次数以及横越一个或更多通道的压力。可响应一反馈信号，例如与一对象对一个或更多水流的响应有关的信号，而修改扫描参数。扫描也可与其它的系统作业协调。例如，在一包括一基于细胞的生物传感器的系统中，扫描可与暴露于一电流的生物传感器协调，即，包括在该生物传感器的一细胞膜中诱发孔形成（pore formation），当该生物传感器被扫描通过一个或更多样本出口。

根据程序指令及/或响应一反馈信号，在一个或更多通道处的水压

力也可被该处理器改变。在一方面，在这些多个通道中的每一个处的水压力是不同的。

另一方面，这些通道中的至少两个中的流体的粘度是不同的。在另一方面，这些通道中的至少两个内的流体温度是不同的。在另一方面，这些通道中的至少两个内的流体的渗透压（osmolarity）是不同的。在另一方面，这些通道中的至少两个内的流体的离子强度（ionic strength）是不同的。这些通道中的至少一个内的流体也可包括一有机溶剂。通过改变不同出口处的参数，可最佳化传感器响应以最大化侦测的敏感度以及使背景最小化。在某些方面中，也可改变参数以最佳化某些提供的细胞治疗（例如，电穿孔法或电融合法）。

本发明也提供一种方法，用于快速改变一纳米等级或微米等级对象周围的溶液环境，其包括快速交换一包括该纳米等级或微米等级对象的传感器室内的流体。在一方面，在该室内流体的交换是少于约 1 分钟，优选地，少于约 30 秒，少于约 20 秒，少于约 10 秒，少于约 5 秒，少于约 1 秒。另一方面，流体交换是在毫秒内。另一方面，流体交换是在纳秒内

在一方面，该方法包括提供一室，包括该对象（它可能为一传感器或只是一单一分子），其中该室包括用于传送一流体进入该室的多个入口通道，以及用于由该室排出流体的多个出口通道。优选地，这些流出通道的纵轴与这些传送通道的纵轴有一角度。在一方面，至少一流出通道的纵轴与一传送通道的纵轴呈大于等于 90° 的角度。优选地，该角度为 180° 。在一预定时段或响应一反馈信号之后，进入该室的流体由该室回收。通过控制流体流通过这些入口通道与输出或流出通道的速度，在该室中流体的完全交换可少于约 30 秒，且优选地，是在毫秒内。

优选地，互成一角度的这些通道中的流体的速度是不同的。在一方面，互成一角度的这些通道中的流体的水压力是不同的。另一方面，互成一角度的这些通道中的流体的粘度是不同的。另一方面，互成一角度的这些通道中的流体的渗透压是不同的。在另一方面，互成一角度的这些通道中的流体的离子强度是不同的。在另一方面，互成一角度的这些通道包括不同的有机溶剂。

该室可为圆形的，包括一圆柱形墙且底与出口可放射状布置于该墙的四周，即，呈二维或三维轮辐条配置。其它配置也是有可能的。例如，每一传送通道可包括一相交的入口通道，其纵轴与该传送通道垂直。

- 5 该方法一般可用来测量一细胞或其部份对水环境中的一情况的响应，通过提供上述这些基板中的任一的该室内一细胞或其部份，将该细胞或其部份暴露于一个或更多水流以制造该情况，以及侦测及/或测量该细胞或其部份对该情况的响应。例如，该情况可能为一该细胞或其部份所暴露的化学物或化合物，及/或可为该细胞或其部份所浸入的
- 10 溶液的渗透压，及/或离子强度，及/或温度及/或黏度。

可控制上述这些基板中的任一种的大块溶液的组份，例如，以改变该传感器室的离子组份或可提供化学物或化合物至该溶液。例如，通过提供一邻近于该传感器室的灌流液系统，一诸如药物的化学物或化合物在实验期间可添加至该传感器室。

- 15 在一方面，可在该传感器室内将该细胞或其部份暴露于该情况。然而，另外或额外的，可在一微米室将该细胞或其部份暴露于该情况，该微米室通过一个或更多通道连接至该传感器室。该细胞或其部份可转移至该传感器室以测量通过改变该细胞周围的情况所诱发的响应。

- 在一方面，本发明也提供一种方法，用于产生一活化受体或离子
- 20 通道以侦测或筛选拮抗剂。该方法包括通过馈入该传感器室的多个微通道传送一作用剂的一恒常流至一传感器室内之一基于细胞的生物传感器（例如，使用上述这些基板中的任何一个）。优选地，该基于细胞的生物传感器表达受体/离子通道复合体不去敏感化或去敏感化很慢。将该生物传感器暴露于作用剂产生一可测量响应，使得该受体每次通
- 25 过一微通道传送作用剂时被活化。优选地，多个作用剂传送微通道也包括拮抗剂，在该基于细胞的生物传感器通过这些微通道的时候，其可与该可测量响应（例如，拮抗作用）的下降关联。在一方面，多个微通道包括等量的作用剂但不同浓度的拮抗剂。因此该可测量响应的抑制可与特定剂量的拮抗剂相关联。另一方面，多个微通道包括等量
- 30 作用剂，但一个或更多，优选全部的多个微通道，包括不同种类的拮抗剂。以此方式，可监视特殊类型的拮抗剂（或有拮抗剂嫌疑的化合

物)的活动。

在一方面,使用上述灌流液系统提供一周期性重新敏感化的受体以传送缓冲溶液的脉冲至该基于细胞的生物传感器,从而在该受体暴露于下一个含数个作用剂或受体调节剂的通道出口之前,去除会约束该受体去敏感化的任何绑住作用剂或调节剂(modulator)。在侦测拮抗剂时,该脉动式灌流液系统也可周期性去除该固定施加的作用剂。当该重新敏感化的生物传感器暴露于该作用剂时,产生一瞬间尖峰响应(被去敏感化为一平稳状态响应)。此尖峰响应的产生在拮抗剂的侦测中可提供一优选的信噪比。

10 另一方面,在一基于细胞的生物传感器内的离子通道通过改变横越细胞膜的电位被连续活化或周期性活化。这提供一传感器用于侦测调节电位调控型(voltage-dependent)的离子通道的化合物或药物。

该系统或方法所测量的响应会随着所用传感器的类型而改变。当使用一基于细胞的生物传感器时,可测量以下参数或细胞性质的作用剂、拮抗剂或调节剂所诱发的变化:细胞表面面积、细胞膜伸展、离子通道渗透率、由一细胞释出的内部水泡、由一细胞膜取回的水泡、细胞内钙的水平、离子通道诱发的电子性质(例如,电流、电压、膜电容及其类似物)、光学性质或发育能力。

在一方面,该传感器包括至少一膜片箝制的细胞。例如,该方法20 可通过组合该系统与一传统的膜片箝制方案来完成。因此,使用一连接至一定位器(例如微米定位器或纳米定位器)的膜片箝制移液管可将一细胞或细胞膜片段相对于通道出口适当定位。

另外,膜片箝制的细胞或膜片箝制的细胞膜片段可定位于该室的底的一凹处,其为一个或更多电极相通信(例如,提供一膜片箝制芯25 片)。

根据本发明的这些系统与方法可用来完成:高通量筛选离子通道配合基以及直接或间接作用于离子通道的药物或配合基。不过,更一般而言,这些系统与方法可用来筛选会影响任一细胞间、细胞内或膜结合靶标的化合物/情况。因此,这些系统与方法可用来特征化,例如,30 药物在细胞上的效果。根据本发明对此类目标可获得的数据的实施例包括,但不受限于:剂量响应曲线、IC₅₀与EC₅₀数值、电压-电流曲

线、开/关比率、运动学信息和热力学信息等等。

因此，例如，如果一离子通道或受体拮抗剂是竞争性的或非竞争性的抑制剂，该系统可用于特征化。本发明的这些系统与方法也可用于毒物筛选 (toxicology screen)，例如，通过响应化合物改变的种类或剂量，或诊断筛选，监视细胞发育能力。该方法也可用来在该细胞的细胞质 (cytoplasm) 内使药物内在化，例如，使用电穿孔法检查药效是否是来自细胞膜与结合于外表面的受体或靶标的相互作用或通过细胞内的受体或靶标。显然对本领域技术人员，本发明的系统可使用于任一方法，其中一对象会受益于溶液环境的变化，且此类方法涵盖于本发明的范畴内。

附图说明

由以下详细说明及附图可更了解本发明的目标与特性。各图不是以实际尺寸表示。

图 1A 与图 1B 为本发明的一方面的系统的示意图，显示一微流体芯片 (microfluidic chip) 与离子通道活性的膜片箝制记录 (patch clamp recording) 的整合。图 1A 为一微流体芯片的透视图，其中一细胞被定位在邻近该芯片的微通道出口处，该芯片使用连接至一定位器的膜片箝制微量吸管。图 1B 为图 1A 的部份剖面的侧视图。图 1C 为一基于芯片的膜片箝制系统的部份剖面的侧视图。在操作上，该芯片优选覆盖。

图 2A-C 显示本发明数方面的微流体芯片的不同具体实施例的各上视图，图示用于与 96 孔盘接口的数个贮存器的示范性布置。图 2A 显示一包括数个配合基贮存器的芯片 (例如，这些贮存器接收来自 96 孔盘的配合基样本)。图 2B 显示一芯片，其包括交替的或呈两手手指交叉状的配合基以及缓冲溶液贮存器 (例如，每隔一个贮存器由一 96 孔盘接收配合基样本，同时其余的贮存器由另一 96 孔盘接收缓冲溶液样本)。如图 2C 所示，可置额外的贮存器在芯片内，用于储存与传送相关的细胞或其它样本。

图 3 为根据本发明的一方面的套件的透视图，图示一种用于由一包括呈两手手指交叉状的贮存器 (其使用数个自动数组移液器

(automated array pipettor)) 以及使用移液管的细胞传递的微流体芯片内的 96 孔盘分配流体的方法。

图 4A-C 根据本发明的一方面, 显示药物的一高通量药物筛选(HTS)的微流体芯片结构的上视图, 用于扫描穿过呈两手手指交叉状的配合基与缓冲溶液流的传感器, 例如一膜片箝制的细胞或数个细胞。图 4A
5 显示两微流体系统的整体芯片结构。图 4B 显示该芯片的贮存器与分别接上的诸通道的放大视图。图 4C 为呈两手手指交叉状的微通道的放大视图, 这些微通道的出口均与该芯片的传感器室相交。

图 5A 示意性显示一微流体芯片的呈两手手指交叉状的通道与一被
10 移动通过通道出口膜片箝制的细胞的上视图。图 5B 与图 5C 为这些出口与微通道的另一具体实施例的侧视图。图 5B 与图 5C 分别为 2D 与 3D 微流体芯片设计的侧视图。图 5D 为本发明的一方面的 3D 芯片设计的透视图, 其中该芯片包括上通道集与下通道集。图 5E 为图 5D 的侧视图, 显示通过压力差可控制流体流动使得流体流出下通道集
15 的通道造成“U 形转弯”进入上方的通道。图 5F 为图 5D 的上视图且显示穿过“U 形转弯”流体流的细胞扫描。

图 6A 显示用于在 HTS 应用中增加通量的微通道出口排列的三维数组的透视图。图 6B 说明显示图 6A 的微通道数组但是有多个膜片箝制的细胞的使用。图中的箭头表示可扫描(数个)膜片箝制的细胞的方向。
20

图 7A-N 示意显示各芯片设计, 其用于使用缓冲溶液灌流液完成扫描细胞横越配合基流以提供一个周期性重新敏感化的 (periodically resensitized) 传感器。图 7A 为该整体芯片设计与微流体系统的透视图。图 7B-G 为一放大视图, 显示诸微通道的出口以及它们与一灌流液
25 毛细管与一膜片箝制移液管有关的位置, 以及一用于完成细胞灌流同时扫描膜片箝制的细胞横越不同流体流的步骤。“P”表示微通道或毛细管中流体上的压力来源。粗箭头表示移动方向。图 7H-7N 显示诸灌流细胞的不同具体实施例。如图 7H 的透视图所示, 不提供传送缓冲溶液用的毛细管, 而提供一些放在配合基传送通道的每出口的微小微通道
30 用来传送缓冲溶液。当一膜片箝制的细胞被移到一配合基通道且该系统侦测一响应, 缓冲溶液的脉冲可通过这些微小微通道传送至细胞

用以灌流。使用此系统的优点为可通过改变信号侦测与缓冲溶液灌流之间的延迟时间精确控制膜片箝制的细胞对配合基的暴露时间。图 7I 为以此方式使用的微流体系统侧面的剖面图，该微流体系统显示膜片箝制的细胞邻近配合基与缓冲溶液出口。图 7J 为该系统前方的剖面图，显示缓冲溶液流的流动。图 7K 为该装置上方的剖面图，显示配合基流的流动以及这些缓冲溶液微通道的布置。图 7L-7M 显示使用压力施加至一配合基及/或缓冲溶液通道以暴露一膜片箝制细胞至配合基以及随后至缓冲溶液。

图 8A-I 为与一膜片箝制的细胞相关联的各微通道出口的上视图，共同显示不同的方法，用来以流体流移动膜片箝制的细胞。图 8A-C 显示穿过静止微通道出口的膜片细胞 (patched cell) 的机械扫描。图 8D-F 显示相对于静止膜片箝制的细胞的微通道出口的机械扫描。图 8G-I 显示一用于通过控制穿过各个微通道的压力变动以及通过的流动速率将流体流扫过一固定的膜片细胞。

图 9A-C 为微流体芯片之一设计的上视图，该微流体芯片用于完成快速传送的周期以及回收进出储存膜片箝制的细胞的细胞室的化合物。图 9A 显示馈入该细胞室的这些微通道的整个布置。图 9B 为各贮存器以及通过它们存取的通道的放大视图。图 9C 显示馈入该细胞室的微通道出口的放大视图。

图 10 为图 9A 的该细胞室的放大上视图，显示在包括一膜片箝制的细胞的细胞室四周的诸微通道的排列。

图 11A-C 均为上视图，显示一微流体芯片，用于完成在膜片箝制的细胞的细胞室四周的快速且连续的流体交换。图 11A 显示馈入，流出该细胞室的诸通道的整体布置。这些流出通道馈入多个贮存器使得可独立控制每一通道的压力落差。图 11B 为各贮存器以及它们所连接的通道的放大视图。图 11C 显示馈入该细胞室的微通道出口的放大视图。

图 12 为图 11A 的放大图，说明各微通道内流体的布置与流动方向，该微通道四周有一细胞室，在一本发明的一方面的平面二维微流体系统中带有一膜片箝制的细胞。

图 13 为图 11A 的系统的放大透视图，显示诸微通道的排列，以及

本发明的一方面的 3D 微流体系统的流动方向。

图 14A-C 均为上视图，显示一鱼骨图设计的芯片结构，用于根据本发明的一方面，完成在一膜片箝制的细胞（未显示）四周的流体的快速且连续的交换。在显示于图 14A 的实施例中，加上一馈入单一废弃物贮存器的单一流出通道。图 14B 显示用于提供这些微通道的样本的各贮存器的放大视图。图 14C 显示多个入口通道与一馈入样本至传感器室的中央“脊柱”通道相交的放大视图。在此放大视图中，相交的诸通道垂直于该脊柱通道而非倾斜；这两种配置是有可能的。

图 15 为图 14A 的放大视图的示意性图解，其说明各微通道的排列以及流动方向，以及一根据本发明的一方面的芯片内的膜片箝制的细胞，也有以交叉线表示的数个被动单向阀（passive one-way valve）。

图 16A 与图 B 均为显示在单一微通道的出口处流动分布的缩影照片（图 16A）以及诸微通道的数组（图 16B）。流体流是在使用荧光染料（荧光素）为流量示踪剂（flow tracer）的荧光下成像。这些通道为 100 微米宽，50 微米厚，以及通道间的间隔为 25 微米；流动速率为 4 毫米/秒。

图 17 示意性图解各微通道的呈两手手指交叉状的数组的出口的排列，其中每隔一微通道将不同稀释率的样本（例如，一药物）加上。通过扫描穿过这些通道出口的膜片箝制的细胞，可得数个剂量-响应测量值（dose-response measurement）。

图 18A-I 为各系统的示意图，是基于高频灌流以及膜片箝制的细胞的重新敏感化，得到各剂量-响应测量值。达成灌流是通过置放毛细管与有关膜片箝制的移液管同轴向，或通过置放任何毛细管相邻于适于灌流的膜片移液管附近，同时转移该膜片箝制的细胞横越由微通道出口流出的流所造成的浓度梯度。图 18A-C 显示插入微通道的配合基的扩散增宽（diffusion broadening）所产生的浓度梯度。图 18D-F 显示配合基流由微通道出来时的侧向扩散散布。图 18G-H 显示诸微通道网络的使用。“P”表示施加于这些系统的一个微通道或更多的压力来源。

图 19A-C 显示硅制微通道的扫描电子显微照片。图 19A 显示简单微通道排列，其中可扫描穿过呈两手手指交叉状的配合基与缓冲溶液

流的膜片箝制的细胞或数个。图 19B 显示较简单平面放射状辐条轮，用于完成快速传送的周期以及回收进出储存膜片箝制的细胞的细胞室的化合物。图 19C 显示微通道出口的简单鱼骨排列，用于完成在一膜片箝制的细胞四周的流体的快速且连续的交换。

5 图 20 显示通过穿过通道出口的细胞（在这它被缓冲溶液灌流至一含乙酰胆碱（acetylcholine）（1 毫摩尔）的开放贮存器）的手工重复扫描诱发的跨膜电流响应的完整细胞膜片箝制记录。通过重复人工扫描膜片细胞横越灌流产生的梯度，产生一连串的峰值。以平均扫描频率为 100 微米/秒且最大速度达 150 微米/秒，横越描绘于插图的微通道
10 的整个出口，来回扫描该细胞。

图 21A-D 显示当该膜片箝制的细胞被扫描穿过平行的 7 通道结构（与显示于图 16B 的结构相同）的出口时，一完整细胞的膜片箝制电流响应至 1 毫摩尔乙酰胆碱。通道 1、3、5 和 7 填入 PBS 缓冲溶液，同时通道 2、4 和 6 填入乙酰胆碱。通道流动速率为 6.8 毫米/秒且图
15 中该细胞扫描频率为 A) 0.61 毫米/秒，B) 1.22 毫米/秒，C) 2 毫米/秒，以及 D) 4 毫米/秒。

图 22 显示当该膜片箝制的细胞被扫描穿过平行的 7-通道结构（与显示于图 16B 的结构相同）的出口时，一完整细胞的膜片箝制电流响应至 1 毫摩尔乙酰胆碱。通道 1、3、5 和 7 填入 PBS 缓冲溶液，同时
20 通道 2、4 和 6 填入乙酰胆碱。通道流动速率为 2.7 毫米/秒且该细胞扫描频率为 6.25 微米/秒。

图 23 显示当该膜片箝制的细胞被扫描穿过平行的 7 通道结构（与显示于图 16B 的结构相同）的出口时，数个完整细胞的基于浓度的膜片箝制电流响应至 1 微摩尔、12 微摩尔以及 200 微摩尔尼古丁。通道
25 1、3、5 和 7 填入 PBS 缓冲溶液，通道 2 填入 1 微摩尔，通道 4 填入 12 微摩尔以及通道 6 填入 200 微摩尔尼古丁。流动速率为 3.24 毫米/秒且细胞扫描频率为 250 纳米/秒。

图 24A-C 显示本发明的一方法的作用剂筛选（agonist screening），使用包括 26 个馈入一传感器室的出口的微流体芯片。如图 24A 所示，线性地由通道出口位置 1 至 26 完成筛选。可重复扫描直到完成足够的扫描次数。单一向前扫描穿过微流体通道出口的仿真的
30

轨迹与分数图显示于图 24B 与图 C。由此分析， $\alpha 6$ 为有最高效力的作用剂，随后为 $\alpha 2$ 。

图 25A-C 显示一种用于拮抗剂筛选的方法，其使用包括 26 个馈入一传感器室的出口的微流体芯片。如图 25A 所示，线性地由通道出口位置 1 至 26 完成筛选。可重复扫描直到完成足够的扫描次数。单一向前扫描穿过微流体通道出口的仿真的迹与分数图显示于图 25B 与图 C。由此分析， $\zeta 3$ 为有最高效力的拮抗剂，随后为 $\zeta 5$ 。

图 26A-图 C 显示一种用于剂量响应筛选的方法，其使用包括 28 个馈入一传感器室的出口的微流体芯片。如图 26A 所示，线性地由通道出口位置 1 至 28 完成筛选。可重复扫描直到完成足够的扫描次数。单一向前扫描穿过微流体通道出口的仿真的迹与分数图显示于图 26B 与图 C。由这些数据，可为未知作用剂 α 建立一剂量响应曲线。

图 27A-图 C 显示一作用剂筛选用的方法，其使用包括 14 个馈入一传感器室的出口的微流体芯片以及使用置于膜片箝制的细胞附近的流体通道的高重复率的缓冲溶液灌流液。如图 27A 所示，线性地由通道出口位置 1 至 14 完成筛选。可重复扫描直到完成足够的扫描次数。单一向前扫描穿过微流体通道出口的仿真的迹与分数图显示于图 27B 与图 C。由此分析， $\alpha 3$ 为有最高效力的作用剂，随后为 $\alpha 5$ 。

具体实施方式

本发明提供一种系统与方法，用于快速且可编程改变传感器（例如，基于细胞的生物传感器）四周的局部溶液环境。本发明提供一种系统与方法，用于接合微流体与膜片箝制的侦测（patch-clamp detection）。

定义

以下提供用于说明书的特殊术语的定义。

如同在此所用的，“微通道”一词指基板中包括两墙、一底、至少一入口以及至少一出口的沟。在一方面，微通道上有一顶。“微”这一词并不是意谓尺寸上的较低极限，且一般是交互使用“微通道”这一词与“通道”。微通道尺寸范围优选在约 0.1 微米至约 500 纳米之间，以及范围在 1 微米至约 150 微米之间更佳。

如同在此所用的，“定位器”一词指一种能够移动一与其连接的对象或装置的机制或工具（例如，基板、传感器、细胞和用于固定传感器的机制等等）。该定位器可控制对象移动诸如数纳米的一段距离（例如，该定位器为一纳米定位器）、数微米（例如，定位器为一微米定位器）及/或优选数毫米。合适的定位器至少在 x-、y-或 z-方向中移动。在一方面，本发明的定位器也依用户界定的任何中心点转动。在优选的一方面，该定位器连接至一与一处理器通信的驱动单元，使得对象的移动可通过程序指令、使用摇杆或其它类似工具或它们的组合被该处理器控制。

如同在此所用的，“固定传感器的机制”一词指一种装置用于接收至少一部份的传感器以保持该传感器在相对于该机制的相对静止的位置。在一方面，该机制包括一开口用于接收至少一部份的传感器。例如，此类机械包括，但不受限于：膜片箝制移液管、毛细管、空心电极及其类似物。

如同在此所用的，“移动一传感器”一词指直接或通过使用固定该传感器（本身是被移动的）的机制移动该传感器。

如同在此所用的，“室”一词指由数个在底四周的墙所形成的区域，墙可能有也可能没有开口。室可能为一“开放体积”（例如，未加盖的）或“封闭体积”（例如，用如盖玻片覆盖）。“传感器室”为一接收一个或更多传感器且包括到一个或更多墙的至少两微通道的出口。不过，本发明的传感器室通常可接收一个或更多纳米等级或微米等级的对象，而对其目的没有限制。传感器室可包括多个不同、不必是平行的平面或可包括一单一的通常为圆柱状的墙（例如，当该室为“圆盘状”时）。不希望传感器室的形状为本发明的限定方面。一个或更多墙及/或底视需要可为全透式（transmissive）。一般来说，传感器室的尺寸范围至少为约 1 微米。在一方面，该室的尺度至少要够大以接收至少一个单一细胞，例如一哺乳动物的细胞。该传感器室也可与包括微通道的基板分离的实体。例如，在一方面，该传感器室为一培养皿且这些微通道由基板开口的表面延伸至该培养皿以便这些微通道与培养皿之间可通过流体。

如同在此所用的，“传感器”一词指一种包括一个或更多分子的装

置，它与在该分子所暴露的水环境中的一条件（例如，有与一个或更多分子结合的化合物）相互作用后能够产生可测量的响应。在一方面，这个/些分子在基板上是固定的，同时在另一方面，这个/些分子为细胞的一部份（例如，该传感器为一“基于细胞的生物传感器”）。

- 5 如同在此所用的，“纳米等级或微米等级的对象”是尺寸在纳米至毫米范围内的对象。

如同在此所用的，“基于细胞的生物传感器”一词指一完整的细胞或完整的细胞的一部份（例如，膜片），它在感测该细胞（或其部份）所置放的环境中的条件后能够提供可侦测的生理响应。在一方面，基
10 于细胞的生物传感器为一与导电组件（例如，膜片箝制电极或电解质溶液）有电子通信的完整细胞或细胞膜的一部份。

如同在此所用的，“受体”一词指一种大分子，它能够与配合基分子有特别的相互作用。受体可能与脂质双层膜（lipid bilayer membrane），例如细胞组成的，高尔基的（golgi），或细胞核的膜有关，
15 或呈现为与细胞质中的分子有关或无关或可能被固定在基板上。包括受体的基于细胞的生物传感器可包括通常以细胞表达的受体或可包括非天然或重组表达的受体（例如，在传递细胞（transfected）或卵母细胞（oocyte））。

如同在此所用的，“周期性重新敏感化的”或“周期性响应的”指
20 一离子通道，当它被扫描横越提供未知或已知包括一配合基的样本的微通道出口时保持在一封闭的（即，配合基响应的）位置。例如，在一方面，一受体或离子通道是周期性重新敏感化的通过扫描它穿过多个呈两手手指交叉状的通道（提供样本与缓冲溶液的交替流）。在受体/离子通道被扫描穿过这些呈两手手指交叉状的通道处的速率在它暴
25 露于一包括样本的流体流的时候，用来维持该受体/离子通道在配合基响应的状态。此外或额外的，该受体/离子通道通过提供缓冲溶液的脉冲可在该离子通道维持周期性重新敏感化的状态（例如，使用一个或更多灌流液毛细管），或通过提供在一包括该离子通道的传感器室中的溶液的快速交换。

30 如同在此所用的，“大体分开的流体流”指在一流体体积（例如，一室内的）内的流动流体，该流体体积与该体积内的流外面的流体是

物理连续的，或与该体积内的其它流是物理连续的，但是其有至少一整体特性 (bulk property)，它不同于且不平衡于与该流外面的流体或其它在流体体积内的流的整体特性。在此所用的“整体特性”指该流中一断面的一零件的特定性质的平均值（例如，剂、溶质、物质或缓冲溶液分子），与在该流的流动方向垂直。“性质”可为化学或物理的性质，例如该零件的浓度、温度、酸碱值、离子强度或速度。

如同在此所用的，“通信”一词指一系统的能力或系统的零件可由另一系统或系统零件接收输入数据且可响应输入数据而提供输出响应。“输出”可能为数据的形式，或该系统或系统零件所做的动作的形式。例如，处理器“与一扫描机制通信”送出信号形式的程序指令至该扫描机制以控制如上述不同的扫描参数。“侦测器与传感器室通信”指侦测器充分光学接近该传感器室以从该传感器室接收光学信号（例如，光）。与一室“光学通信的光源”指一光源充分接近该室以建立由该室至一系统侦测器的一光路径，使得该室或内含其中的对象的光学性质可被该侦测器侦测。

如同在此所用的，“可测量的响应”指使用适当的给定技术的控制所测量时与背景显著不同的响应。

如同在此所用的，一出口与一室或微室“相交”指一出口打开或馈入一室或底或该室或该微室的顶或进入该室或该微室所包括的流体体积。

如同在此所用的，“灌流”指冲洗一对象或传感器（例如，细胞）的外表面。

系统

在一方面，该系统提供一基板，其包括制造于其上面的多个微通道，其出口与一包括一个或更多传感器的传感器室相交或馈入。该系统进一步包括一扫描机制，用于可编程改变这些微通道的位置，相对于该一个或更多传感器以及一侦测器，用于监视暴露于不同通道的溶液的传感器的响应。在优选的一方面，该传感器室包括一基于细胞的生物传感器，与一电极有电子通信且该侦测器侦测该基于细胞的生物传感器的电子性质。

优选地，该系统也包括用于具体实现系统运算的一处理器，包括

但不受限于：通过该扫描机制控制扫描频率（例如，机械式或通过可编程的穿过微通道的压力落差）、通过该基板的一个或更多通道控制流体流动、控制用来导向流体流动的阀或开关的运作、记录该侦测器所侦测的传感器响应以及评定及显示与传感器响应有关的数据。优选地，
5 该系统也包括，与该系统处理器通信的用户装置，其包括一显示系统作业的图形接口以及改变系统参数的图形接口。

基板

在优选的一方面，该系统包括一基板，它传送溶液至一个或更多传感器，这些至少部份包含于一传感器室内。该基板可配置为一个二
10 维（2D）或三维（3D）结构，以下将进一步予以描述。该基板，2D 或者是 3D，通常包括多个微通道，它们的出口与一传感器室相交，该传感器室接收该一个或更多传感器。该传感器室的底可为光学全透以能收集置于该传感器室内的一个或更多传感器的光学数据。当该传感器室的顶被覆盖时，例如，用盖玻片或上方的基板，该室的顶优选为光
15 学全透。

每一微通道包括至少一入口（例如，用于接收一样本或缓冲溶液）。优选地，这些入口由各贮存器接收溶液（例如，在图 2A 与图 B 中是以圆圈表示），贮存器与该基板在形状与布置上是一致的，且与标准的微量滴定盘中的孔的形状与布置一致。该基板为该系统的可移除零件，
20 因此在一方面，本发明提供包括一个或更多基板用于该系统的套件，提供用户对不同通道形状的选择。

不同基板材料的非限定性的实施例包括结晶状半导体材料（例如，硅、氮化硅、锗和砷化镓）、金属（例如，铝和镍）、玻璃、石英、结晶状绝缘体、陶瓷、塑料或合成橡胶材料（例如，硅烷氧、EPDM 和
25 Hostaflon），其它的聚合物（例如，含氟高分子，例如特氟纶®、聚甲基丙烯酸甲酯、聚双甲基硅氧烷、聚乙烯、聚丙烯、聚丁烯、聚甲基戊烯、聚丙乙烯、聚胺甲酸酯、聚氯乙烯、聚芳酯化合物、聚芳砜、聚己内酯多元醇、聚酯碳酸、聚亚酰胺、聚酮、聚亚苯基、邻苯二甲酰胺、聚砜、聚酰胺、聚酯、环氧聚合物、热塑性塑料及其类似物），
30 其它的有机与无机材料，以及它们的组合。

可用本领域公知的方法在这些基板上制造微通道，例如深离子蚀

刻 (deep reactive ion etching) (将于以下的实施例 1 进一步描述)。通道宽度可根据应用来改变, 以下将进一步予以描述, 且通常其范围是在约 0.1 微米至约 10 毫米, 优选地, 范围由约 1 微米至约 150 微米, 同时该传感器室的尺度通常会根据馈入该室的通道出口的排列而改变。例如, 在出口均大体为互相平行处 (例如, 如图 2A-图 C), 该室的纵轴长度至少为馈入该室的出口宽度的总和。在一方面, 在一完整细胞生物传感器用来当作该传感器室内的传感器处, 这些微通道的一个或更多出口的宽度至少约为该细胞的直径。优选地, 每一出口的宽度至少约为该细胞的直径。

10 在一方面, 光学全透的材料的覆盖层, 例如玻璃, 可被粘接至基板 (用本领域公知方法), 当与一传统的微量吸管为底的膜片箝制侦测系统有接口时, 这些贮存器与传感器室上方优选留有开口。该传感器室的底也优选为光学全透式, 有利于由该传感器收集光学数据。

传感器

15 基于细胞的生物传感器

该系统可结合一基于细胞的生物传感器以监视各种细胞响应。该生物传感器可包括一完整细胞或它的部份 (例如, 细胞膜片), 被定位在该传感器室内, 这是用一机制用来固定一传感器 (可能是静止或可移动的), 例如一移液管、毛细管或连接至一定位器的圆柱 (例如微米定位器、纳米定位器或显微操作仪、或光学小钳子或通过控制流量或表面张力), 从而将基于细胞的生物传感器暴露至该室内的溶液。可通过移动该基板使该生物传感器被扫描穿过该基板的不同通道, 即, 改变这些通道的相对于该生物传感器的位置, 或通过移动该细胞 (例如, 通过扫描该微米定位器或通过改变流量及/或表面张力)。

25 在一方面, 该基于细胞的生物传感器包括一离子通道且该系统用来监视离子通道的活动。合适的离子通道包括用电压、配合基、内部的钙、其它蛋白质、膜拉伸 (例如, 侧向膜张力) 以及磷酸化作用 (phosphorylation) (参考例如, 描述于 Hille B., In Ion Channels of Excitable Membranes 1992, Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA) 门控的离子通道。在另一方面, 离子门控的通道为一电位门通道。30 电位门通道响应定限跨膜电压而打开。电位门钠、钾以及钙通道均为

用于传导一作用电位（或一神经脉冲）至一轴突以及至另一神经细胞（神经元）。这些离子通道通常包括一有一离氨基酸的跨膜顺序及/或富蛋白氨酸 S4 一致顺序。S4 顺序内的这些阳性氨基酸认为可“感测”穿过细胞膜的电压，造成包含该顺序的离子通道在不同的电压条件下不是打开就是关闭。

在另一方面，该基于细胞的生物传感器内的离子通道为一配体门通道。配体门通道响应配合基结合而门控（开或关）。有两种类型的配体门通道，通过细胞内的配合基结合时门控的以及通过细胞外的配合基结合时门控的。通过细胞外的配合基门控的离子通道在化学突触传播（chemical synaptic transmission）中很重要。这些类型的离子通道通过神经传送素门控，它们是实际在两神经细胞间运送信号的微小分子。由细胞内部门控的离子通道一般被第二送信者（它是细胞内微小发信分子）所控制。细胞间钙离子，cAMP 与 cGMP 为第二送信者的实施例。最常见钙门控的通道为钙门控的钾通道。在置于正反馈环境时膜电压改变后，此离子通道可产生振荡行为（例如，用于耳内毛细胞的频率调整）。

在另一方面，该离子通道为另一蛋白质所门控。某些发信蛋白质被发现可直接门控离子通道。用 G 蛋白的 beta-gamma 副单元门控的钾通道为实施例之一，其为一常见发信蛋白质，可被某些膜受体活性化。

在另一方面，该离子通道是被磷酸化作用所门控。磷酸化作用可用蛋白激酶（protein kinase）（例如，丝氨酸、羟丁氨酸或酪氨酸激酶（tyrosine kinase））调解，例如，当作信号转导串联的一部份。

在另一方面，该基于细胞的生物传感器包括一机械转导（mechanotransduction）通道，它可被一机械触发器直接门控。例如，该基于细胞的生物传感器可包括内耳毛细胞的阳离子通道，其被一机械振动例如声音直接门控。毛束在特定方向的弯曲会影响通道门控的机率，因而会影响去极化受体电流的振幅。

在另一方面，该基于细胞的生物传感器包括一受体，优选涉及信号转导路径的受体。例如，该基于细胞的生物传感器可包括一 G 蛋白偶合受体或 GPCR、谷氨酸盐受体、一代谢型（metabotropic）受体、一造血受体或一血清酪氨酸激酶（tyrosine kinase）受体。表达重组

受体的生物传感器也可设计为对药物（可能用来抑制或缓和疾病的发展）是敏感的。

包括生物传感器的适当细胞包括，但不受限于：神经元；淋巴细胞；巨噬细胞；微神经胶细胞（microglia）；心脏细胞；肝脏细胞；
5 平滑肌细胞；以及骨骼肌细胞。在一方面，使用哺乳动物的细胞；这些可包括人工培养的细胞例如中国仓鼠卵巢细胞（CHO）细胞、NIH-3T3以及HEK-293细胞且可表达重组分子（例如，重组受体及/或离子通道）。不过，也可使用细菌细胞（大肠杆菌、芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌及其类似物）、单细胞生物细胞、酵母细胞、植物细胞、昆虫与其它无脊椎动物细胞、鸟类细胞、两栖动物细胞以及卵母细胞，因为这些适于
10 重组分子的表达。通常是用本领域公知的细胞培养技术制备细胞，由细胞培养或由切开的组织，是在纯化一回或更多回之后（例如，通过流式细胞技术（flow cytometry）、淘筛（panning）和磁拣选（magnetic sorting）等等）。

15 非细胞传感器

在一方面，该传感器包括一感测组件，优选地，一个为细胞靶标（例如，细胞内受体、酶、发信蛋白质、细胞外蛋白质、膜蛋白质、核酸、脂质分子等等）的分子固定在一基板上。该基板可为该传感器室本身的底，或可为一置于该室底上的基板，或可为一平稳定位（例如，通过微米定位器）于该室且可移动或不动的基板。
20

该传感器可感由一个或数个层所组成，它可包括以下任一组合：固态基板；一个或更多结合至该基板的附着层，以及一感测分子用于由一个或更多通道出口感测进入该传感器室的化合物。本发明的适当传感器包括，但不受限于，免疫传感器、亲和传感器以及配合基结合
25 传感器，每一个可通过产生一可测量响应而响应结合伙伴（binding partner）的存在，该可测量响应例如，比质量变化、电化学响应或光信号的产生（例如，荧光或感测分子的光谱变化）。例如，此类传感器在美国专利第 6,331,244 号中有描述，此专利在此以引用的方式全部并入本文中。

30 在一方面，该传感器包括一微米电极，其修改输送电子的分子。响应与来自这些微通道中的一个的水流中的一个或更多化合物接触所

造成的化学响应, 该分子会产生在该电极表面处电子性质的变化。例如, 该分子可包括一输送电子的酶或一转导信号的分子, 通过与其相互作用的分子的还原与氧化(参考, 例如, 如描述于 Gregg, et al., J. Phys. Chem. 95: 5970-5975, 1991; Heller, Acc. Chem. Res. 23 (5): 128-134, 1990; In Diagnostic Biosensor Polymers. ACS Symposium Series. 556; Usmani, A M, Akmal, N; eds. American Chemical Society; Washington, DC; pp. 47-70, 1994; 美国专利第 5,262,035 号)。酶促响应(Enzymatic reaction)也可用场效晶体管(FETs)或离子场效晶体管(ISFETs)来完成。

10 另一方面, 该传感器包括一固定在一固态基板(例如与一电子零件通信的石英芯片)上的感测分子。可选定该电子零件测定下列任何一项为改变: 电压、电流、光、声、温度或质量, 当作在该感测组件与一个或更多传送至该传感器室的化合物之间的相互作用的测量(参考描述于 Hall, int. J. Biochem. 20 (4): 357-62, 1988; 美国专利第 4,721,677 号; 美国专利第 4,680,268 号; 美国专利第 4,614,714 号; 美国专利第 6,879,11 号)。例如, 在一方面, 该传感器包括一声波生物传感器或一石英晶体微天秤法(Quartz crystal microbalance), 结合一传感器组件。在此具体实施例中, 该系统在化合物结合在由这些微通道至该传感器组件的水流之后即侦测该传感器的共振性质的变化。

20 另一方面, 该传感器包括一光学生物传感器。光学生物传感器可用的侦测原理为: 例如表面离子共振法、全内反射荧光系统(TIRF)、临界角折射计(critical angle refractometry)、Brewster Angle 显微镜、光学波导 lightmode 光谱学(OWLS)、表面电荷测量法、渐逝波椭圆偏光法(evanescent wave ellipsometry)和与本领域技术人员所公知的(参考, 例如, 美国专利第 5,313,264 号; 欧洲专利第 EP-A1-0 067 921 号; 欧洲专利第 EP-A1-0 278 577 号; Kronick, 等人, 1975, J. Immuno. Meth. 8: 235-240)。

30 例如, 就使用渐逝波椭圆偏光法的传感器而言, 测量与化合物结合至感测分子有关的光学响应当作椭圆偏振光在反射后的状态变化。偏振状态与折射指数、厚度以及结合样本在感测表面(例如, 包括该

感测组件基板)处的表面浓度有关。关于 TIRF, 是测量由天然荧光或者是荧光类的样本分子在一传感器处射出的辐射的强度与波长。渐逝波激励溅射光技术(Evanescant wave excitation scattered light technique)依靠测量在传感器表面处因光与感测分子(与/无结合于化合物)相互作用而溅射的辐射的强度。表面离子共振(SPR)测量邻近薄金属膜基板的传感器分子的一层的折射指数变化(参考, 例如, Liedberg, 等人, 1983, Sensors and Actuators 4: 299; GB 2 197 068)。根据本发明, 这些感测方案中的每一个可用来提供有用的传感器。

10 另一方面, 该传感器包括一感测分子, 联系于一荧光半导体纳米晶体或一量子点™ 粒子。该量子点粒子具有与其成份与粒子尺寸有关的特性频谱发射光(characteristic spectral emission)。化合物对该感测组件的结合可通过监视(例如, 分光镜的方式)该量子点粒子的发射光来侦测(参考, 例如, 美国专利第 6, 306, 610 号)。

15 该传感器进一步可包括一聚合物造成的生物传感器, 其物理性质在化合物结合至聚合物上的感测组件时会有变化。例如, 结合可显示为体积的变化(例如膨胀或缩小)、电子性质的变化(例如电压、电流和共振的变化)或光学性质的变化(传输效率的变调或荧光强度的变化)。

20 显然本领域技术人员对本发明可改用各种不同类型的传感器, 应理解上述的实施例是不具限定性的。

一般而言, 一个或更多传感器的测量输出均连接至一控制与评定装置, 其为一侦测装置及/或系统处理器有电子通信。该控制与评定装置可整合于该传感器的基板及/或该感测室的底。该控制与评定装置可
25 包括不同的电子零件, 例如微处理器、多任务器、输入及输出单元等等。(参考例如, 美国专利第 6, 280, 586 号的描述)。

微流体

在优选的一方面, 本发明的基板经改造用来将样本及/或缓冲溶液微流体运送(microfluidic transport)至传感器室。

30 微流体结构与孔盘接合

容纳于样本孔盘(例如, 工业标准微量滴定盘, 例如 96 孔盘)内

的样本（即，药物等）的控制与转移优选使用本领域公知的机器人自动数组移液器（参考，例如，Beckman's Biomek 1000 & 2000 automated workstations, available from Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA）。

- 5 为平衡用来将样本排列于一孔盘的相同样本转移平台，一重要的设计参数是要确保排列于上述的芯片的贮存器能与此类数组移液器共处。例如，优选地，排列该微流体芯片内的贮存器使得每一贮存器间的中心点至中心点的距离等于每一与该芯片接合的孔盘的孔间的中心点至中心点的距离。优选地，每一贮存器有适于用来由一数组移液器接收一流体流而不显著阻碍来自该数组移液器的流体的流动的直径。

除了数组移液器，其它适于由芯片内的孔盘转移样本的自动装置有例如机器人连续移液器（robotic sequential pipettors）。应注意使用这些其它装置可能使芯片内贮存器与微通道的布置更有弹性，而在通道参数的设计上提供更多弹性。尽管适于与 96 孔数组移液器接合的基板因广泛使用这些移液器而会在以下说明中详述，显然对本领域技术人员该芯片的一般设计与贮存器的排列可改成用来与任何想要样本转移平台接合，以适应平台的演进。一般而言，不希望 96 孔盘的参考文献有限定性。

图 2A 与图 2B 显示本发明微流体芯片的实施例，其适于与一 96 孔盘接合。图 2A 图示不需缓冲溶液贮存器的贮存器的排列。图 2B 图解贮存器排列，应用于其中缓冲溶液与样本的交替（即，呈两手手指交叉状的）流提供给传感器。在此排列中，配合基与缓冲溶液贮存器两者间中心点至中心点的距离等于 96 孔盘的孔的中心点至中心点的距离。为补偿芯片内贮存器数量的加倍，所有贮存器的直径要减半。

25 图 3 根据本发明的一方面，图解如何可利用传统的机器人自动数组移液器，由 96 孔盘的孔转移样本溶液至一芯片内的诸贮存器。对有呈两手手指交叉状的配合基与缓冲溶液贮存器（例如，如图 2B 所示）的微芯片而言；缓冲溶液可转移自一溶池（只需要一种缓冲溶液）或由一 96 孔盘（有包括相同或不同缓冲溶液的数孔）。

30 除了需要与样本及/或缓冲溶液（例如，孔盘）的来源接合的贮存器的外，可能有额外的贮存器在芯片内用来储存与转移细胞或其它有

关的样本。图 2C 根据本发明的一方面，图示额外贮存器与微通道的可能排列，用来将细胞储存与转移至贮存器或芯片的传感器室。

该细胞室可改为用于完成细胞的芯片内控制。在一方面，该芯片提供一个或更多细胞治疗室，用于执行一个或更多：电穿孔法、电注射法及/或电融合。化学物及/或分子可引进到一室内的一细胞，该室与一电流源有电子通信。例如，一个或更多电极可置于该室附近，或该室可配置成可接收一电解溶液，通过电流可传送自例如，一电极/毛细管数组，如世界专利第 WO 99/24110 号，此专利在此以引用的方式全部并入本文中。

可引进在该细胞治疗室内的细胞的合适的分子包括，但不受限于：核酸（包括基因片段、cDNA、反义（antisense）分子、核糖核酸类酶（Ribozymes）以及智能配体（aptamers））；抗体；蛋白质；多肽；缩氨酸；类似物（analog）；药物；以及它们的变化形式。在优选的一方面，该系统处理器控制分子传送该一个或更多细胞治疗室（例如，通过如上述的毛细管数组）以及培育条件（incubation condition，例如，时间、温度、等等）。例如，可培育细胞一段合适的时间直到必要的生物活动显现，例如 mRNA 的复制；蛋白质的表达；基因、mRNA 及/或蛋白质的去活化（inactivation）；核酸或蛋白质的化学标记（chemical tagging）；核酸或蛋白质的修改或处理；路径或毒素的去活化；及/或一显示型（例如，形态的变化）的表达。

该治疗细胞可用来传送有关分子至该传感器室内的传感器，例如，暴露该传感器至分泌性分子（secreted molecule）或表达于该细胞表面的分子。在此方面，该系统可编程化为可由一细胞治疗室释出细胞至该与该传感器室相交的系统的一通道，从而暴露该传感器室内的一传感器至有关分子。

另外或额外的，当该系统用来与一基于细胞的生物传感器连接时，该细胞治疗室可用来制备该生物传感器本身。在一方面，由该治疗室将细胞传送至一通道，其出口与该传感器室相交。在一方面，该系统的扫描机制用来在该出口附近置放一微米定位器，使得该微米定位器可将该细胞定位于该传感器室内。另一方面，流体流或表面张力用来将细胞定位于一适当位置。例如，该系统可用来传送该细胞至一为膜

片箝制系统的一部份的移液管的开口。

另一方面，可传送细胞至该传感器室以周期性更换该传感器室内的基于细胞的生物传感器。在此方面，该细胞可不予治疗，例如，提供大体在基因方面与药物方面相同的细胞（即，在正常的生物变异范围内）当作先前的传感器细胞。另外，可在生物化学方面与基因方面上控制该替代细胞使其不同于先前的传感器细胞，使该系统将该细胞在生物化学方面的及/或基因方面的特性差异监视与关联于传感器响应的差异。该生物化学方面的及/或基因方面的差异可为已知或未知。

该系统在选定时段可编程化为可由该细胞治疗室传送细胞（基于监视细胞摄取化学物与分子的控制实验）。另外，该系统可监视细胞的显示型且在某一显示型被表达时传送细胞。例如，在一方面，该细胞治疗室与一光学传感器通信，其提供与该细胞的光学性质有关的信息至该系统处理器，且响应表示特定显示型的表达的光学参数，该系统可触发该细胞由该细胞治疗室释出。光学参数可包括荧光报告分子的摄取或在控制实验所识别的光学参数。

将芯片内电穿孔法结合微流体与膜片箝制（或其它用于监视细胞响应的方法）有利于分子的筛选（例如，配合基或药物），这些分子调节细胞内靶标的活动。在一方面，该系统用来传送一渗入细胞分子至一细胞的内部，通过瞬间电渗透于该细胞。以这种方式，可将该分子引进细胞内受体、细胞内蛋白质、可复制调节基因以及其它的细胞内靶标。可传送该细胞至传感器室且可监视该细胞的响应（例如，通过膜片箝制或荧光，如果该分子被荧光卷标所标记）。另外，修改该传感器室为可执行治疗与响应侦测。

在另一方面，修改该系统为可通过扫描执行电穿孔法。例如，当细胞被转移或扫描横越含不同化合物的多个不同流体流时，细胞可被重复电穿孔处理。在一方面，在细孔与一样本流接触在一个或更多细胞时引进细孔，致使样本流内化合物被该细胞占用。

传感器周围的溶液环境的快速改变

本发明的核心是使用微米制造的通道的二维（2D）与三维（3D）网络，用于内含于流体的化合物或试剂的复杂控制，能将不同的溶液重复且快速传送至该传感器室内的传感器。例如，系统使用的微流体

能使该系统可编程化传送一配合基至一包括一受体的基于细胞的生物传感器。这致使该系统可用于样本的 HTS 筛选（例如，化合物馆），可基于生物传感器的响应监视化合物的效果。在一方面，可使用电压箝制或膜片箝制技术监视基于细胞的生物传感器的电子性质。

- 5 由于该系统提供用于改变通道相对于传感器的位置的扫描机制，在基于细胞的生物传感器暴露于一样本化合物之后，该系统可用来用缓冲溶液冲洗基于细胞的生物传感器，致使为生物传感器的一部份的受体或离子通道被重新敏感化在暴露于下一化合物之前。因此，该系统可提供一周期性重新敏感化的受体，用于暴露至一受体功能（例如，
10 作用剂或拮抗剂）的潜在调节剂。就未去敏感化的受体而言，该系统仍有利于提供缓冲溶液的脉冲传送至受体，例如，得从该受体去除未结合配合基，以加强信号的具体性及/或减少其背景。

微通道的不同网络结构的形状设计成可开发微米尺度的流体行为的独一无二特性。3 个示范性设计描述于下。

- 15 第一个设计依靠该系统运送一个或更多传感器的能力，快速横越不同流体流出通道出口，通过转移传感器横越这些通道或通过相对于一个或更多传感器转移包括这些通道的基板，。该系统也可扫过不同流体流横越一静止传感器，通过改变横越该基板的各个通道的压力落差。该设计衍生自新的与独一流体行为的发现；即，在流体流由一组紧邻
20 的微通道出来到一开放体积时，相邻流体流间的侧向互动与连接可大幅扩张保持准直的流上的距离。第二个设计利用流体行为在低雷诺数的可逆性而第三个设计基于快速交换流体于微通道与室内的能力。

- 这些设计中的主题是一以微流体为基础的方法用于快速且有效率改变局部的溶液微环境，其中有一个或更多生物传感器，提供完整或
25 近乎完整的溶液交换。该系统需要小样本体积（nLs 至 μ Ls）且可轻易对 HTS 应用系统自动化与编程。

（1）传感器的快速运送横越各流体的不同流

- 来自本发明的基板的多个微通道的相邻的流体流具有低雷诺数且扩散的混合最小。例如，一小分子，扩散系数约 5×10^{-6} 平方公分/秒会
30 花费大约 0.1 秒扩散 10 微米，但花 10 秒扩散 100 微米，因为扩散距离平方与扩散时间成正比（ $x^2 = 2Dt$ ，其中 D 为扩散系数）。同样，典

型的蛋白质，扩散系数 D 约 10^{-6} 平方公分/秒，要花 0.5 秒才能扩散 10 微米以及 50 秒于 100 微米。

不过，微通道内的流动速率可由每秒数米大幅改变为每秒数微米。本系统内的流动速率受限于不干扰传感器活动可使用的最大流动速率。例如，当使用一膜片箝制传感器时，对于膜片箝制的细胞，流动速率的数量级通常是数百微米/秒至毫米/秒（请参考以下描述），以防止膜片箝制的细胞由定位于通道开口处的移液管强行移出。

多重流体流至传感器室的流动分布

当使用多个微通道时，了解流体多重流在微通道出口与开放体积贮存器间接口处的流动分布是很重要的。图 16A 与图 16 B 显示出在单一通道（图 16A）与多重通道（图 16A）包括 500 微摩尔荧光染料（荧光素）的流体的流动分布的缩影照片。荧光追踪剂的刺激的实施使用外照射配置的氩离子激光的 488 纳米线且收集追踪剂的荧光及使用 CCD 照相机照像。如图 16A 所示，无相邻微通道与流体流，该流体流出单一通道且在通道出口处散开呈半圆形。图 16B 显示由多个通道出口出来的呈两手手指交叉状的缓冲溶液与荧光素流体流的流动分布。微通道的尺寸为 100 微米宽，50 微米厚，以及通道间的间隔为 25 微米。图 16A 与图 16B 中微通道内的流动速率 4 毫米/秒。

如图 16B 所示，流出多重微通道至开放体积的流体流是准直的，至少有一段距离约为微通道宽度的 4-5 倍（例如，约数百微米），流动速率约 4 毫米/秒。在此低流动速率（即，毫米/秒）范围内，流体流的速率仍快于扩散速率很多。例如，在流动速率为毫米/秒，通道宽度为 10 微米，以及通道间间隔（通道间的间隔）为 10 微米，流出不同通道出口的含小分子（ $D = 5 \times 10^{-6}$ 平方公分/秒）不同流无法完全混合直到在通道出口下游至少约 0.4 毫米处。这对置于通道出口外 10 至 20 微米处有直径约 10 至 20 微米的典型哺乳动物的细胞作测量是相当足够的。由于扩散距离平方与扩散时间成正比，宽度与微通道间间隔加倍至 20 微米可延伸置细胞于下游的距离至少约 1.6 毫米。流的平均线性速度的改变取决于应用系统，典型流动速率范围为约 100 微米至约 10 毫米/秒，对于 10 微米的细胞。因此，传感器可扫描横越大体有区别且分开的由微通道出口流出的流体的水流。

在膜片箝制测量使用的优选流动速率与细胞至出口的距离约 20 微米或更少，不同的流体流大体是有区别的且分开的且未被膜片箝制的细胞干扰。即使更低的流动速率（例如，小于 100 微米/秒）使用于膜片箝制测量，不同的流体流仍分开得很好。这种所观察到的在微通道出口进入开放体积传感器室处流体流的行为（例如，流体流的准直）利于 HTS 应用系统，关于不同流体流，其需要相对快速转移膜片细胞。可最佳化微通道出口间的间隔以最佳化流体流的分开，以及流动速率。例如，流动速率愈快，混合愈少。优选地，最佳化流动速率与通道间间隔以最小化边界区（即，混合面积）的宽度。优选地，边界区小于流体流宽度的约 50%，或小于约 40%，或小于约 30%，或小于约 20%，或小于约 10%，或小于约 5%，或小于约 1%。在一方面，边界区约为 2-3 微米。使用一个或更多如上述的追踪剂染料可很快得到最佳流体流动速率与通道间间隔。

为利用流体流进入开放体积的独特行为，施加至多个微通道中的每一个的压力可个别变更用来精确控制每一道流体流。例如，在极端的情形中，其中正压施加于一通道且负压施加于一相邻通道，可使该流体流做“U 转弯”，由正压的通道至负压的通道同时漏至缓冲溶液的护套进入有负压的通道。因此，可通过改变施加至每一通道的压力控制流体流的位置、宽度、准直性、方向以及流动速率和其组份。

如图 5D-F 所示，这可用来建立一 U 形流体流，优点为由通道传送至细胞的加了正压的样本可回收至施加负压的废弃物通道。这可使累积于有膜片箝制的细胞的开放体积内的配合基最小化。在样本（例如，药物、配合基及其类似物）浓度低及/或昂贵的情形中，该系统进一步可用来回收配合基及/或反馈配合基至该系统（即，U 形流可改成封闭回路）。

通过控制压力，该系统可控制流体流的速度（大小及方向）。也可通过控制每一通道的阻力或通过改变阻力与压力两者行使速度控制而不用改变压力。也可在这些微通道与传感器室中使用不同粘度的溶液改变流体剪力（fluid shear）（例如，增加不同数量的糖例如蔗糖至流体流）。因此，通过改变一些不同的参数，可精确微调不同流体流的流动分布。

流体流中的膜片箝制

可快速扫描膜片箝制的细胞横越受体调节剂（作用剂或拮抗剂）以及缓冲溶液的呈两手手指交叉状的流的能力取决于膜片细胞处于需要的流动条件与扫描频率之下的机械稳定性。在此，描述膜片箝制的细胞处于流动条件范围的“高阻抗封接（giga seal）”与离子通道活

5 动的稳定性。

液体流动在膜片箝制的细胞上的效果造成细胞上流体所加上的曳力（Stokes force）。此曳力可由以下公式计算：

力 = （磨擦系数） x （流动速度）

10 其中磨擦系数（f）可由以下公式计算：

$$f = 6 \pi r \mu$$

其中 r 为细胞半径，且 μ 为溶液粘度。此关系式对在低雷诺数的流体以及对球形粒子是有效的。这两条件适于本发明所利用的方法与装置。

15 就室温中的水而言， μ 约为 1 厘泊（1 厘泊=0.01 克/[公分·秒]）且对于典型哺乳动物的细胞而言， $r = 5$ 微米。使用这些数值以及流动速率为 1 毫米/秒，力 = 9.4×10^{-11} 牛顿或 94 微微牛顿。由于力线性等比于流动速率，速率为 0.1 毫米/秒，力为 9.4 微微牛顿。仔细观察此数字，微量吸管经常可施纳米-与微米-牛顿的力在小粒子例如细胞。

20 除了因由流体流作用于该细胞而产生的力，该细胞在某速度的扫描在细胞转移方向作用类似的曳力，其通常正交于流体流的方向。在无流体下以 1 毫米/秒的细胞扫描与保持该细胞静止同时以相同速率流动该流体通常有相同的效果。

对于需要很高流动速率的应用系统，其中细胞的强行移出变成问题，（数个）膜片箝制的细胞可能被推入该传感器室中的尺寸与细胞相符的凹陷区或孔。此设计能使用于高流动速率同时防止细胞的强行移出，因为通道或室内的流动分布是抛物线状，由于在流体与固态表面交界处没有滑动的边界条件（即，在流体与固态表面交界处的速度为零）。通过在有与细胞相同尺寸的（数）孔放置（数个）细胞，该细胞

25 大体“避开”高速流动区，其位在远离孔与固态表面处。因此，尽管

30 离固态表面处的平均流动速率与流动速度可以很高，有膜片细胞置于

该处的孔附近的流动速度可以很低。通过使用此一策略，可使用很高的平均流动速率。

如上述，流体流也可用来最大化膜片箝制的敏感度。如图 5D-F 所示，用两个平行的通道造成的 U 形流体流可用来建立一在细胞与膜片
5 箝制微量吸管间的最佳封条。

扫描机制

可机械式调节扫描（通过移动该基板同时该传感器是不动的，或通过移动该传感器同时该基板是静止的或以不同的速度及/或于不同的方向移动该基板与传感器）或通过横越不同微通道压力落差。图 8A-I
10 示意性显示如何实施这些方法中的每一个。可通过转移一定位该传感器的微米定位器很快完成机械移动与传感器的扫描。例如，可通过吸力将基于细胞的生物传感器物理连接于一微量吸管，然后接至显微操作仪。可人工控制与电子激活大部份的显微操作仪，以至可轻易实现编程移动。一些参数是可编程化的，包括，但不受限于，二维与三维
15 两者的固定扫描频率的线性速度；可变扫描频率的加速度；扫描路径；以及重复扫描的次数。至于基于由该传感器室内的一个或更多传感器反馈的及时信号，可编程参数包括，但不受限于，信号侦测间的时间延迟以及扫描设定的变化。可做不同的信号处理与计算函数以决定正确的反馈参数至扫描的输出。

20 平台的机械移动与扫描，其中该基板（例如，芯片）是静止的又可很快实现，从而相对于一静止生物传感器移动该基板。例如，计算机控制的显微镜台阶（例如，基于压电晶体管（piezo-electric crystal）、或电动螺纹螺钉）有不同设计且具有的所需规格是市上有售的（例如，售自 Prior Scientific Inc., 80 Reservoir Park Drive,
25 Rockland, MA）。可使用与该平台通信的系统处理器编程适当的扫描参数，例如，如上所述，响应用户指令或来自该传感器室内的一个或更多传感器的反馈信号。

在一方面，快速移动一个或更多传感器越过该传感器室内的间隔紧密的通道的出口间的距离，将该室内的一个或更多生物传感器暴露
30 于流出出口的不同流体流。例如，该传感器可为一细胞或贴上微量吸管的膜片，其编程为可移动横越这些通道的出口。另一方面，一个或

更多静止的细胞固定于该传感器室（例如，在一平面-膜片箝制格式）且使不同的流体流扫过这个/些静止细胞，例如，通过调整在每一个别通道处的压力与流动速率，通道流出不同的流。另外，如上所述，可物理移动通道出口通过一静止细胞。

- 5 由于流经这些通道的水溶液是不可压缩的（与空气不同），每一流体流的宽度与排列取决于通过每一微通道的相对流动速率。因此，也可通过每一通道的流动速率改变使来自这些微通道的流体流移动并转移。这可很容易通过控制横越每一通道的压力落差或通过改变每一通道的阻力来达成。用压力变化（或其它的手段）移动流体流的能力特别
- 10 特别有益于基于细胞的且固定于芯片内的传感器，使得细胞相对于芯片的机械移动为不可能的应用系统。如同机械扫描，可使用该系统处理器编程每一通道的压力与阻力。可编程的参数包括，但不受限于，每一通道的压力与阻力的线性变化、每一通道的压力与阻力的阶段式或定常变量差、以及不同通道间的变化序列。此外，压力与阻力的变化
- 15 可基于及时反馈信号，且在输出新的压力与阻力参数之前可处理及计算这些信号。

 可根据应用调整扫描频率。例如，当该传感器包括一在连续暴露于作用剂之后被去敏感化的受体时，可移动该传感器从含样本的流到含缓冲溶液的流以使该受体重新敏感化。通过依序用传感器扫过样本

20 流与缓冲溶液流（机械式或通过压力差），可提供作用剂与缓冲溶液的脉冲传送，从而产生一周期性重新敏感化的受体。

 在此情况下，可调整扫描频率以符合重新敏感化所需的时间，就离子通道的情形而言，数量级经常是毫秒（取决于配合基-离子通道对）。一般而言，传感器暴露在溶液的时间可控制在微秒至数小时的范

25 围。不过，对于有长平衡时间的药物-受体对，通量可能被平衡时间的长度所限制。同样，一基于细胞的生物传感器的响应可能取决于信号通过生物化学路径的转导，这可能需要毫秒至较长的时间（例如，数分钟）。因此，可调整扫描频率以适应使用的传感器类型且可由控制实验来决定，例如时程实验（time course experiment）。

30 优选地，因此，该扫描机制（不论它移动传感器，或芯片，或通过控制横越通道的压力落差而作用）是被该系统处理器所控制以移动

该传感器相对于芯片的位置，以用户选定的或系统选定的速率。例如，用户可具体实现一系统程序，其改变该扫描机制的转移参数，例如，通过选定显示于与该系统处理器通信的计算机上的图形接口上的作用按钮。另外，可用该系统处理器修改扫描频率，其响应反馈信号（例如，表示去敏感化的细胞的膜片箝制记录）。可编程该扫描机制用来作线性或步阶式扫描（例如，移动传感器至通道出口，其与该传感器所暴露的先前出口不相邻）。

传感器可能包括一未去敏感化的受体/离子通道，排除重新敏感化该受体的需要。不过，该系统仍可用来提供缓冲溶液的脉冲传送，例如，以清洗细胞的未结合化合物。在此情形，可基于响应中所观察到的“噪声”调整扫描频率。例如，可调整扫描频率以在某一浓度的样本化合物实现一线性剂量-响应。

配合基也可能不可逆地阻断传感器，使其对流体流中的其它配合基没有响应。在此情形下，缓冲溶液的脉冲会没有效果。要确定该细胞是否被周期性引进已知效果的化合物至该细胞所去活化且查核是否得到适当的响应是简单的。优选地，当传感器扫描通过一些样本流体流时该系统能够用传感器感测缺少了响应。例如，该系统可提供一反馈信号在传感器扫过一些选定的连续流体流的后膜片箝制记录中没有观察到响应的时候。

另外或额外的，可在该传感器室内提供数个装置以监视传感器功能。在一方面，提供光学传感器与该传感器室通信用来监视一基于细胞的生物传感器的发育能力。例如，可观察与细胞死亡有关的分光镜变化（例如，由核染质浓缩），或通过已死或将死的细胞可监视染料的摄取。

在一方面，当经过一些选定的扫描时段没有观察到传感器信号时该系统执行某些程序指令。例如，该系统可改变特定通道处的压力以停止这些通道的流动，从而最小化样本废弃物。另一方面，响应经过一段预定时段没有传感器的响应信号，将一个或更多置换生物传感器传送到该传感器室（例如，由上述的该细胞治疗室）。

如果以相较于通道出口的流动速率的固定速度转移传感器（例如，毫米/秒），则用于通道有宽度与间隔约 10 微米的筛选速率（例如，每

秒筛选的化合物)可约为 25 赫兹。使用约 100 微米宽的通道与通道时段约 10 微米,筛选速率会约为 4.5 赫兹。如果增加转移速度,则扫描范围可能是在数百赫兹的范围内。对于某些应用系统,例如,这些传感器包括快速去敏感化离子通道、有窄出口的流体通道是优选的,因为这些在短时间内可提供尖的浓度分布。优选地,此通道宽度范围在 1 微米至约 100 微米之间。

扫描频率可为均匀的或不均匀的。例如,横越提供样本流的通道(例如,提供作用剂)的扫描频率可不同于横越提供缓冲溶液流的通道的扫描频率。可变的扫描频率可基于预定程序或基于来自该传感器测量的反馈信号,例如,由膜片箝制测量。实际的扫描频率依照确定的筛选系统而改变,但是对于包括一直径约 10 微米的哺乳动物的细胞的传感器,典型的线性扫描频率范围由约 100 微米/秒至数百毫米/秒。

二维微流体系统显示于图 4A 与图 5A。该系统包括一基板包括多个微通道其数量对应于微通道将与其接合的工业标准微量滴定盘,例如,96 通道的孔。当该系统用来提供样本与缓冲溶液的交替流给一传感器时,提供至少 96 样本与 96 缓冲溶液微通道(总共至少 192 个通道)。一微量滴定盘或另一适当容器的孔,均连接于贮存器,其馈入样本或缓冲溶液至通道,例如,对于前述系统,该基板包括 192 贮存器,每一贮存器连接于不同的通道。可提供额外的贮存器用于细胞储存与传送,例如,以提供膜片箝制记录的细胞。

在显示于图 4A 与图 5A 的具体实施例中,微通道大体平行,宽度约 100 微米且厚度约 50 微米。通道的确实厚度可能变化的范围很大,但是优选等于或大于传感器直径,例如,膜片细胞的直径。图中,通道间间隔约为 10 微米。

可同时施加压力至所有微通道,使得溶液有一稳态流动通过所有微通道以相同速率进入该容纳传感器的开放体积。以此方式,在每一微通道出口处可建立不同含配合基或纯缓冲溶液的溶液的稳态浓度。可能调整每一微通道的宽度以实现每一微通道的想要流动速率。

尽管流出的平行的通道流体流进入一开放体积传感器室,在上述的具体实施例,可能有方便与不错的方法是,提供对应于一组样本与缓冲溶液通道的一组平行的流出通道。有适当宽度的槽(例如,约 50

微米)可置于两组通道(即, 传送通道与流出通道)之间或与之正交以配合该传感器室内传感器的扫描。为建立一适当的流动分布, 可施加负压到所有这些流出通道同时施加正压至这些传送通道。这会诱导流出这些传送通道的流体进入流出通道组。

- 5 图 5C 显示三维微流体系统。此三维结构与显示图 5B 的平面结构的主要差异是沿着在平行的数组通道(例如, 呈两手手指交叉状的样本与缓冲溶液通道)出口与废弃物通道入口之间流动的流体的 z 轴排列。在此具体实施例中, 施加正压于所有样本与缓冲溶液通道同时施加负压于所有废弃物通道。结果, 在样本/缓冲溶液通道的出口与废弃物通道的入口之间建立一稳态流动。在此配置中, 一传感器, 例如膜片箝制的细胞, 扫描横越 z 方向的流体流, 优选靠近这些样本/缓冲溶液微通道的出口。
- 10

- 尽管制造此三维结构比平面结构更复杂, z 向流动在很多情况中对扫描传感器(例如, 膜片箝制的细胞)横面提供更好的流动分布(例如, 较尖的浓度梯度)。建立的 z 向流动的长度应显著大于使用的传感器的直径/长度。例如, 一基于细胞的生物传感器(例如膜片箝制的细胞)的 z 向流动的长度应优选在 10 微米至数百微米的范围内。
- 15

- 另一提供交替样本流与缓冲溶液流的策略, 除了扫描, 显示于图 7A-N。在这个具体实施例中, 不是提供呈两手手指交叉状的出口分别
- 20 馈入样本与缓冲溶液进入该传感器室, 而是所有出口流为样本流。缓冲溶液灌流液是被带出通过一个或更多置于一个或更多传感器附近的毛细管。图 7A 中, 图示的传感器是一膜片箝制的细胞, 其定位于靠近一使用膜片箝制移液管连接至一定位器(例如微米定位器或纳米定位器或显微操作仪)的毛细管。一毛细管置于膜片箝制移液管附近且可
- 25 使用于灌流液, 例如, 以重新敏感化一已去敏感化的细胞。借此方法, 可将一包括离子通道的基于细胞的生物传感器维持在周期性响应状态, 即在配合基无响应状态(例如, 当暴露于药物时结合到作用剂)与一配合基响应状态(例如, 配合基用缓冲溶液灌流之后有响应)之间切换。

- 30 可重置通过此同轴或侧置毛细管排列的缓冲溶液的编程传送或基于该传感器的反馈信号(例如, 信号侦测段, 可响应系统处理器的指

令触发缓冲溶液灌流液以冲掉所有结合的配合基), 提供缓冲溶液的脉冲传送至传感器。相对于膜片箝制微量吸管的纵轴, 在一方面, 该毛细管的纵轴为 90° 角, 同时另一方面, 纵轴是小于 90° 。

也可能排列微通道出口本身为三维数组(例如, 图 6A-图 B 所示)。

- 5 出口的三维排列可增加通量(例如, 增加可筛选样本的数目)且因此增加该传感器可评估的生物信息量。在一方面, 该微流体系统用来取得与细胞靶标例如离子通道有关的药物信息。

以此格式执行 HTS 比描述于先前段落的扫描格式多了数个优点:

- 10 (1) 配合基暴露时间决定于灌流间时段(例如, 缓冲溶液的脉冲间的时间)而非配合基流的扫描速度与宽度;(2) 缓冲溶液灌流液与重新敏感化时间也决定于灌流液脉冲的期间而非滞留于缓冲溶液流中的时间;(3) 可提供配合基流数目的较大包装密度, 因此导致有能力在每次的实验中可扫描大量的配合基。

(2) 快速传送的循环

- 15 该本发明的系统的另一特点为可快速传送流体通过这些通道至该传感器室, 致使化合物可快速被传感器的微米环境引进和回收。

- 微米大小的通道内部的流体流是片流且可逆, 可用无维度数量测的性质, 称雷诺数(Re): 例如, 通常, 有低雷诺数的流体流是可逆的, 而高雷诺数的流体流变成乱流且不可逆。片流可逆流动与乱流的转移
20 出现在雷诺数约 2000 处, 此估计基于流过一平滑圆形通道(例如, 接近通过微通道的流动)。即使在高流动速率(米·秒), 数微米宽度的通道的雷诺数约小于 10。这意味微米大小的通道内的流体流是在片流可逆区内。在此发现的流体行为的关键行为是流体流的可逆性。

- 在一方面, 在一微通道施加正压可引进一化合物或药物至一容纳
25 生物传感器(优选膜片箝制的细胞)的传感器室。在经过一段培养时间使在化合物/药物与生物传感器之间有相互作用之后, 施加负压以由该室收回该化合物/药物。由于流体流完全可逆且也由于扩散在所使用条件下是可以忽略的(例如, 相对较快的流动), 该药物完全由该室回收至原来的微通道。以此方式, 为潜在相互作用而传送至该细胞筛选
30 的每一化合物可随后由该细胞回收, 所以该细胞可再度浸入缓冲溶液, 重新敏感化, 以及准备与通过不同的微通道传送的下一个化合物交互。

此方案特别有用，因为小通道与室尺度使用在本发明的特殊方面。一些通道形状可适用于具体实现此情形，特别是，上述以及显示于图 9A-C 与图 10 的轴条轮配置。由图可见，微通道数组排列为轴条轮格式，其中这些微通道聚集于在中心处的圆形传感器室。微通道的使用数目
5 取决于要接合微通道的样本-孔盘中的样本孔数目。例如，一 96 样本孔盘需要至少 96 个微通道。中央的传感器室可容纳一个或更多传感器，例如膜片箝制的细胞，可使用微量吸管将其膜片箝制或膜片箝制于芯片内。图 9A-图 C 显示整个芯片结构的布局，用于与一 96 样本孔盘接合，其中来自 96 孔盘的溶液可使用标准的数组移液器直接由一样本孔
10 盘移到芯片的对应的贮存器。

图 10 示意性显示中央室周围的放大区域。该室的尺寸可能根据实际的应用而不同（例如，是否该传感器包括一细胞或其它类型的传感器），典型直径范围在约 10 至数百微米之间。微通道的宽度也依照该室的直径而不同，典型的宽度范围是在约 1 至约 20 微米之间。微通道
15 的厚度较不重要且在大部份的情形中范围是在约 1 至约 50 微米之间。流动速率也可改变，微通道内典型的流动速率的范围是在毫米/秒至公分/秒之间且开放室通过传感器的对应的流动速率范围是在微米/秒至毫米/秒之间。可用系统处理器分别控制施加于每一微通道的正压与负压，使得施加至一微通道的正压会造成其溶液内容可布满该传感器同
20 时负压会造成此溶液回收至各个微通道，从而留下浸入原始缓冲溶液中的生物传感器。

(3) 流体的快速交换

该设计所依照的事实为：可快速且有效率更换与交换内含于微通道与传感器室（及/或细胞治疗室）的溶液。使用各种不同微通道网络
25 形状可实现快速的溶液交换。在一方面，多个微通道聚集或馈入该传感器室，同时另一方面，多个微通道聚集至一单一通道，其本身聚集至该传感器室。多个微通道可包括用于样本与缓冲溶液的个别传送的呈两手手指交叉状的通道。在优选的一方面，该设计与一膜片箝制系统整合。下面描述 3 个示范性构造。

i). 平面放射状轴条轮格式

此构造中，大量的（例如，96-1024 个）微通道排列为放射状轴条，

聚集到一室，尺寸范围在 10 微米至约 10 毫米之间，用来容纳传感器。选定微通道的使用数目以配合一工业标准微量滴定盘的样本孔数，例如，96 至 1024 个孔。除了微通道的数目符合孔盘的输入数目，优选地，至少两个额外微通道，一个用于传送灌流用的缓冲溶液/重新敏感化以及另一个用于废弃物移除。对于使用微量吸管的膜片箝制，此构造也
5 包括一开放体积区域，用于存取（数个）细胞；不过，关于基于芯片的膜片箝制度量（例如描述于世界专利第 WO 99/31503 号与第 WO 01/25769 号），优选没有任何开放体积区域。为防止（数个）细胞被流体流从这些微通道逐出，优选将细胞置于尺寸与细胞相符的凹陷区或
10 孔。对于尺寸远小于细胞的膜片，膜片被流体流逐出不会变成问题，因为曳力与对象（如，膜片）的尺寸成反比。

为提供通过由这些通道进入的流体有效更换内含于该室的流体，将输入通道与废弃物通道间的角度最佳化。当此角度约为 180° 时流体混合与更换是最佳化的且当角度减至 0 时会渐渐变差。对于高流动速率（公分/秒至米/秒），此角度效果逐渐变成更加重要，而对于低流动
15 速率，输入通道与废弃物通道之间的角度较不重要。

为要最大化在高流动速率的流体的有效率交换，可增加放射状通道的数目使得每一输入通道会有对应的废弃物通道，而不是所有的输入通道共享一废弃物通道。在此方式下，所有输入与输出通道间的角度均约为 180° ，以确保最佳流体更换。第二个策略是组成一个三维放射状轴条轮通道网络，而第三个策略则涉及使用分叉的通道形状。
20 以下进一步说明这些策略。

用于快速溶液交换的二维放射状轴条轮格式的一优选具体实施例显示于图 11A-图 C 与图 12。此具体实施例中，一微通道数组排列成一轴条轮格式且聚集于在中心点处一圆形传感器室。微通道的使用数目
25 取决于与微通道接合的孔盘内的孔数。例如，96 样本孔盘需要至少 96 个用于配合基传送的微通道以及废弃物用的额外 96 微通道，每一废弃物微通道定向于约 180° ，相对于对应的样本传送微通道。除了这 192 个微通道，有一对用于缓冲溶液灌流液与缓冲溶液废弃物的微通道，
30 使得有 194 个通道与 96 个样本孔盘接合。一传感器，例如膜片箝制的细胞置于该室内，它可能为一开放体积，如果与传统的以微量吸管为

基础的膜片箝制系统接合，或者是它可能为一封闭体积，如果是与一基于芯片的膜片箝制系统接合。图 11A-图 C 显示此微流体系统的结构，其再度设计成与一 96 孔盘接合兼容的结构。数轴条-轮的微流体排列，每个有一膜片箝制的侦测器细胞，可用在同一芯片结构以取得平行的度量。

图 12 显示该传感器室的放大图。该室的尺寸可能依照实际应用系统而有所不同，典型的直径范围是在约 10 至 100 微米之间。微通道的宽度也会改变，取决于该室的直径，典型的宽度范围是在约 1 至 10 微米之间。微通道的厚度较不重要且在大部份的情况中范围是在约 1 至 10 微米之间。流动速率也可改变，典型的微通道内部的流动速率范围是在微米/秒至公分/秒之间，对应的流动速率在该室内的范围是在微米/秒至毫米/秒之间。

ii) . 三维放射状轴条轮格式

三维放射状轴条轮排列也可用于有效更换进入该传感器室的流体。在此构造中，一个或更多传感器（例如，细胞）置于一过滤膜，其夹在一包括放射状通道的基板与一包括一废弃物贮存器的基板之间。在此方式下，强迫流体由上层流下，放射状通道处于该上层（例如，通过馈入放射状通道的输入通道），通过（数个）传感器，然后通过这些过滤器且至该废弃物通道。因此该过滤器允许传感器与快速流体流灌流同时支持传感器（例如，细胞），以致不会被该流动带走或逐出。此外，强迫该流体流过这些传感器且可更换这些传感器周围的所有流体。

此三维设计有数个优点：（1）完全有效率、且快速交换细胞四周的流体；（2）即使处于很高的流动速度，传感器，例如细胞，被稳固置于过滤器上，且不会被流体流逐出，因为在轴向或 z 向中，该流动推细胞顶着过滤器；以及（3）相较于上述的平面放射状设计，只需要最小量的放射状通道。相较于其它的平面设计，此设计的主要缺点是增加微米制造上的复杂性。

图 13 显示了三维放射状轴条轮格式的一优选具体实施例。此三维结构与图 12 显示的平面结构的主要差异是由微通道出口至废弃物微通道的入口有流体的 z 向流动。另一差异是有传感器（例如，细胞）置

于其上的多孔膜，当 z 向流动推该细胞顶着该膜，其对传感器提供机械支持。在该具体实施例中，微通道的排列与尺度相当于二维平面格式（图 12）的。尽管三维结构的制造比平面结构更复杂，在很多情况中有 z 向流动可提供更好的流动分布，特别是对于开放体积贮存器。

- 5 由于传感器置于废弃物通道的入口外面近处（即，上方），配合基流与灌流液流两者被迫流过（数个）传感器，导致用不同流体流对（数个）传感器施药更有效且完整。此外，多孔膜的支持允许使用较高的流动速率，且因而有较高通量。

iii) 分叉的通道格式

- 10 此设计中，优选在直接邻近于一个或更多传感器（例如，膜片箝制的细胞）处只放两个通道，一个用来传送化合物而另一个用于废弃物。而不是分开所有输入通道以及聚集每一输入通道的出口使之馈入到传感器室，各通道按分叉形状排列。为与 96-1024 孔盘接合，邻近（数个）传感器的单一传送通道连接至一大群输入微通道，每一输入
- 15 通道接收该 96-1024 孔盘的不同孔的输入。该方式有一优点即，通道传送化合物通道和废弃物通道可置于（数个）传感器附近，从而确保系统的快速响应。快速连续传送大量化合物至（数个）传感器是通过控制和多任务传送含化合物的流体到直接馈入该传感器室的单一通道。

- 20 图 14A-图 C 与图 15 显示了该设计的一优选具体实施例。该具体实施例中，一“鱼骨”结构制造成每一根“骨”对应于一样本（例如，配合基）传送微通道，其相交于一主要的“脊椎”微通道，它连接到一缓冲溶液贮存器。快速与连续传送样本与缓冲溶液到一传感器室内的一个或更多传感器是通过首先施加正压给这些样本传送微通道中的一个，因此由微通道引进一样本（例如，配合基）塞子至含缓冲溶液
- 25 的主要微通道。通过施加正压至缓冲溶液贮存器（它将塞子带到传感器）引进此塞子至该细胞，然后用缓冲溶液冲洗该传感器（例如，将其重新敏感化）。用内含于不同微通道的不同样本重复样本与缓冲溶液灌流液的传送循环。图 14A-图 C 显示了此芯片设计的布局。图中的具体
- 30 实施例中，该芯片可与一 96 孔盘接合。

图 15 为主要缓冲溶液通道与传感器室周围区域的放大视图。该微

通道（用于样本传送与缓冲溶液传送）的尺寸（宽度与厚度）高度可变，典型的尺寸在约 1-100 微米，且优选在约 10-90 微米范围内。流动速率也可变，优选流动速率的范围为微米/秒至公分/秒。

压力为等向的，因此，在施加正压或负压之后，流体会沿压力落差流动而对特定方向没有偏好。因此，优选地，被动单向阀整合于样本传送微通道与主要缓冲溶液通道间的接合处。整合式单向阀的目的是要防止在施加正压至缓冲溶液贮存器后有由主要缓冲溶液通道至每一样本传送微通道的任何流动，同时使在正压施加于贮存器以提供样本到这些微通道时由每一样本传送微通道至主要缓冲溶液通道有流动。有很多适当的用于微流体阀以及泵机制的设计。

尽管以下说明强调压力驱动式流动，是因具体实现的简单性，可设计一些合适的方法用于在微通道中运送液体，包括但不限于：压力驱动式流动，电渗透流动，表面张力驱动流，移动墙驱动流，热梯度驱动流，超音波诱导流动以及剪力驱动流。这些技术为本领域所公知。

活门调节与泵送

方案 1：使用隔膜个别寻址微通道

在此方案中，用一隔膜垫片连接至每一微通道的各贮存器，例如，使用聚二甲基硅氧烷（PDMS）或另一本领域所公知的材料用于密封。由于隔膜形成气密式垫片，通过一插穿该隔膜的针或管子施加正压（例如，空气或氮气）会造成流体向下流向微通道至传感器室内的一个或更多传感器（例如，至轴条轮的中心，即辐射微通道聚集处）。通过一插穿该隔膜的针或管子用一小吸力施加负压会造成流体在相反方向被回收（例如，由在轴条轮中央处的室至馈入微通道的贮存器）。

这些针-隔膜排列的数组使得每一贮存器被分别寻址，因此，每一微通道也被分别寻址。使用此方案使得内含于每一微通道的流体同时并连续用泵吸与活门调节。通过精密控制施加到每一微通道的正压与负压，可实现控制流体流与化合物传送至一个或更多传感器。对于不需分别寻址微通道的设计（例如，设计 1- 快速运送膜片细胞横越不同流体流），有单个或一些隔膜以及单个或一些压力控制装置是足够的。

方案 2：改变通道尺寸以控制流体阻力

尽管以上使用个别隔膜的设计较有弹性及控制，对某些应用系统，其中化合物传送与流体流的顺序为预定时，简单的设计可提供简单性并易于具体实现。在此方案中，相等的正压施加到所有贮存器，例如，通过使用预压空气通过单一隔膜均匀施加到所有贮存器，或通过使用入口与出口贮存器的高度差所造成的重力流动。实现由每一微通道快速连续传送化合物到一个或更多传感器是通过改变每一微通道的流体阻力，这是很容易通过改变每一微通道的宽度与长度来达成。

流体阻力与圆形毛细管的长度与直径的 4 次方呈线性正比。通过逐渐与系统性改变每一微通道的尺寸，可控制在传送化合物至传感器室内一个或更多传感器时微通道间的时间延迟。此方案特别适于高通量药物筛选应用系统，其中大量化合物在预定的时间延迟要连续且快速传送至膜片细胞/细胞。

方案 3: 用外部阀控制流体流

在此配置中，通过连接至对应微通道的外部管子或毛细管的一组孔盘的每一孔引进化合物。装上外部管子或毛细管的外部阀可用来控制流体流。有一些合适的外部阀，包括手动、机械式、电子激活式、气动式、磁力式、液压式或用化学方法（例如，水胶）。

方案 4: 用内用阀控制流体流

不采用外部阀控制流体流，也可使用有一些基于芯片的阀。这些基于芯片的阀可基于外部阀所用的原理，或可完全不同，例如球阀、气泡阀、电动力阀、横隔膜阀以及只用一次阀。使用基于芯片的阀的优点是其天生适于与微流体系统整合。特别适用的被动单向阀，在具体实现上述设计中是优选的（例如，分叉通道格式）。

其它合适的形状可与上述任何系统整合。在一方面，上述的一微流体系统的至少一通道为一混合通道，其由两个或更多其它通道接收两道或更多流体分开流。该混合通道可用来在一单一通道混合这些分开流。这一配置可用来建立一物质的浓度梯度，该物质在两个或更多分开流中提供不同浓度，如世界专利第 WO 02/22264 号所述。

膜片箝制侦测与微流体接合

该系统可用来通过测量细胞的电子性质变化监视细胞响应。在一方面，该芯片的传感器室包括一基于细胞的生物传感器且该系统包括

一侦测器，用于监视该生物传感器对流出这些通道的溶液的响应。可监视的一响应为该生物传感器响应一离子通道的开关（gating）而有的电子性质变化。例如，可使用电压箝制技术测量流过该生物传感器的膜的电流变化。电流范围可为数皮安（pA）（例如，单一离子通道开口）至数微安（较大细胞的细胞膜，例如爪蟾（*Xenopus*）卵母细胞）。

电压箝制技术中，膜片箝制最适于测量皮安范围内的电流（参考，例如，Neher and Sakmann, 1976, *supra*; Hamill, 等人, 1981, *supra*, Sakmann and Neher, 1983, *supra*）。通过密封一玻璃微米电极或膜片箝制移液管至一完整细胞的细胞表面膜（plasma membrane）从而产生一隔离膜片，达成膜片箝制的低噪声性质。该移液管与细胞表面膜间的阻力为最小化背景噪声的关键且应超过 109 欧姆以形成一“高阻抗封接”（giga seal）。形成“高阻抗封接”的确切机制仍有争议，但是已提出各种的相互作用，例如盐桥（salt-bridge）、静电相互作用以及凡得瓦尔力调解该移液管的玻璃表面与该细胞膜的脂质层中的亲水性头部（hydrophilic head）之间的相互作用（参考，例如，Corey and Stevens, 1983, In *Single-Channel Recording*, pp. 53-68, Eds. B. Sakmann and E. Neher. New York and London, Plenum Press）。可利用不同的膜片箝制技术例如本领域公知的完整细胞记录法、里朝外记录法、外侧向外记录法（outside-out recording）以及穿孔膜片记录法。

完整细胞记录法中，覆盖电极尖端的细胞膜被吸力弄破以在该细胞内部与电极溶液之间建立一电子连接（以及一化学路径）。由于电极溶液远超过该细胞内的细胞质数量（约 10 微升：约 1 微微升），改变电极溶液内的离子种类会造成横越该细胞膜的浓度梯度，提供控制一给定受体/离子通道复合体的跨膜离子流动的方向与大小的一方法。

里朝外与外侧向外膜片箝制配置中，由整个细胞切除一膜片，细胞质环境会失去（参考，例如，Neher and Sakmann, 1976, *supra*; Sakmann and Neher, 1983, *supra*）。为在里朝外与外侧向外配置中完成切除一膜片，优选该细胞贴在该传感器室的底部。在急性分离细胞的情形中，例如，多聚左赖氨酸（poly-L-lysine）可用来将细胞固定在该室的底部。

里朝外配置使得膜的细胞质侧面暴露到该室内的溶液。因此有一方法用于在单一通道水平研究第二信差活化离子通道的开关性质。因此，可利用此配置研究细胞质发信分子或酵素活动在离子通道功能上的效果。另一方面，外侧向外配置使得膜片的细胞外侧面暴露。因此，
5 可用来监视配体门或受体操纵性离子通道（receptor-operated channel）的活动。

低噪声水平提供在调节剂（例如，作用剂或拮抗剂）的更好信噪比。在最佳条件下，可在较大的千万分之一安培（ 10^{-15} A）范围解析单一通道电流。减少噪声的策略（例如，由在电极与细胞间的不良密封所造成的）有利于各高阻抗封接的形成，包括但不受限于，玻璃电极的火抛光或处理玻璃电极的表面使用药剂，例如 Sigmacote。也可通过
10 选定权宜电极/移液管形状、使用石英玻璃以及移液管的玻璃表面涂以 Sylgard®（硅氧烷，PDMS）以减少电介质噪声与抗电容式充电噪声（capacitive-resistive charging noise），以便尽量将该移液管尖端
15 隔离。

一经常使用的完整细胞配置的修正版，穿孔膜片模式也可使用（参考，例如，描述于 Pusch and Neher, 1988, supra）。在此技术中，孔使用建孔蛋白质在该细胞膜中选择性制成，例如二性霉素（amphotericin）或制霉菌素（nystatin）（参考，例如，Akaike et al.,
20 1994, Jpn. J. Physiol. 44: 433-473; Falke, 等人, 1989, FEES Lett. 251: 167; Bolard, 等人, 1991, Biochemistry 30: 5707-5715）以引起横越膜片细胞膜的导电率增加而不损失细胞内发信分子。

除了在固定膜电位测量横越离子通道的离子电流，该膜片箝制技术
25 可用来在已知固定或时变电流测量膜电压。此膜片箝制配置，称作“电流箝制”，测量膜电位的变化（由配体门离子通道的活化或电位门离子通道所造成），且特别适用于产生一可用来监视在作用电位上（即，频率、期间、与振幅）药剂（例如，药物）效果的生物传感器。此技术也可用来研究药剂的效果以研究药剂对神经细胞的应激性的影响。
30 因此，在一方面，该系统用于当触发作用电位时，在电流箝制模式下监视一基于细胞的生物传感器的电压定限的调节（例如，过极化或去

极化)。

另一方面，该系统用来监视细胞膜内的电容变化，通过在该开放体积贮存器内提供一基于细胞的生物传感器，并测量横越该生物传感器的膜的膜阻抗于交流模式。例如，该系统可用来监视药剂对由细胞
5 (即，外释作用)释出的水泡的效果及/或对细胞(即，内噬作用)所摄取水泡的效果。

图 1A 显示了用于微流体系统与电流生理膜片箝制记录法接合的一优选具体实施例。图 1A 中，显示一单一膜片箝制的细胞；不过，数个膜片箝制的细胞可同时使用。外部泵与流体控制设备置于标准显微镜
10 附近。整个整合系统优选为计算机控制及自动化。该系统的不同零件(例如，微流体、扫描机制、膜片箝制及其类似物)可能使用分开的控制器以及分开的软件对其加以控制，但是优选所有零件全由如上述的单一系统处理器控制。

该系统可很快改造为可与传统膜片箝制移液管或微量吸管一起使用。在一方面，将一细胞或细胞的一部份(例如，一细胞膜)定位在一膜片箝制微量吸管的开口处。膜片箝制微量吸管已被本领域所公知且市上有售，例如，售自 World Precision Instruments, Inc.
(Sarasota, Florida 34240 USA; 网站为 [http://www.wpiinc.com/WPIWeb/Glass-I-Iolders/Patch Clamp Glas.html](http://www.wpiinc.com/WPIWeb/Glass-I-Iolders/Patch%20Clamp%20Glass.html))。吸力施加到该膜片
20 箝制微量吸管，直到在该微量吸管的末端与细胞的膜之间产生一高阻抗封接(十亿欧姆)。优选地，监视该细胞的一个或更多电子性质的变化作为判断配合基或其它化合物存在于一进来与该细胞接触的流体流的方法。例如，可通过在微量吸管内的电极侦测一电子信号且传输(优选将其放大)至该系统处理器。也需要在传感器室内接触溶液的一参
25 考电极。

可改造各种溶液以使用在传感器室。溶液的类型取决于传感器与要被评估的化合物。例如，一传感器溶液可为一记录溶液，其用于离子通道的传统膜片箝制分析。一般而言，用于膜片箝制记录的溶液的确切组份会根据要被评估的通道的类型而有所不同(参考，例如，美国专利第 6, 333, 337 号，关于钾通道；美国专利第 6, 323, 191 号，关于氯离子通道，以及第 PCT/US99/02008 号，关于钠通道)；此类溶液
30

是本领域所公知的。

本发明的一方面中，膜片箝制记录由该系统处理器自动化与控制。例如，该系统处理器可能直接移动一个或更多微量吸管到程序预定的位置。另一方面，该系统处理器响应该传感器室内细胞的影像分析直接移动该一个或更多微量吸管（例如，该系统监视由一个或更多治疗室传送细胞至这个/些微量吸管）。在优选的一方面，用系统处理器具体实现：获取与分析膜片箝制数据，接着反馈控制以改变微流体设定（例如，压力、阀以及开关）且控制扫描参数（例如，扫描的速度与轨迹及横越通道的压力落差）。

除了与传统膜片箝制系统整合，本发明的微流体平台也适用于与基于芯片的膜片箝制接合，例如，如下的世界专利第 WO 99/31503 号；第 WO 01/25769 号；第 WO 01/59447 号；以及第 WO 99/66329 号。该具体实施例显示于图 1C 且可省略一些系统零件，例如显微镜、微量吸管、显微操作仪及其类似物。基于芯片的膜片箝制容易与本发明的基板整合。基于芯片的膜片箝制系统也提供在单一基板一起膜片箝制数个细胞的能力。

使用系统的方法

本发明开发使用微流体系统控制大量不同的生物活性分子与化合物（例如，候选药物）传送至一包括目标分子的传感器的可能性。可被评估的合适分子/化合物包括，但不受限于，药物；刺激物；毒素；蛋白质；多肽；肽；氨基酸；类似物以及蛋白质的改质形式；多肽，肽，与氨基酸；抗体及其类似物；免疫药剂（例如，抗原及其类似物，半抗原，致热原（pyrogen）及其类似物）；细胞（例如，真核细胞，原核细胞，感染细胞，转染细胞，重组细胞，细菌，酵母，配子）及其部份（例如，细胞核，胞器，促泌素（secretagogue）；细胞膜的部份）；病毒；受体；受体的调节剂（例如，作用剂、拮抗剂、及其类似物）；酵素；酵素调节剂（例如，抗化剂，辅助因子，及其类似物）；酵素基板；荷尔蒙；代谢物及其类似物；核酸（例如，寡聚核苷酸；多核苷酸；fibrinotides；基因或片段，包括调控序列（regulatory sequence），及/或内含子，及/或译码区；对偶变体；RNA；反义分子，核糖核酸酵素，核苷酸，适合体），包括类似物及它们的改质形式；

化学与生物战药 (biological warfare agent); 金属簇 (metal cluster); 以及无机离子。

这些分子中的两个或更多的组合可被传送、依序或同时至该传感器室中的一个或更多传感器。也可由药物公司的合成图书馆得到化合物以及本领域公知的市售来源 (例如, 包括但不限于, 包括 80,000 种以上化合物的 LeadQuest® library, 可通过网站 <http://www.tripos.com/compounds/>; ChemRx Diversity Library, 包括 1000 至 5000 化合物/支架, 可通过网站 <http://www.chemrx.com>; Nanosyn Pharma library, 可通过 Nanoscale Combinatorial Synthesis Inc., Menlo Park, CA, 及其类似者) 或可使用本领域公知的方法通过组合合成产生。在分子被传送至细胞的方面中, 如上所述, 上述任一分子可被细胞占用, 暂时在一电场中暴露该细胞 (例如, 在细胞治疗室或改为电穿孔法的传感器室)。

提供周期性重新敏感化的离子通道传感器

结合化合物 (例如, 作用剂或调节剂或药物) 至大范围的离子通道不只是这些通道的形态改变, 使离子通量横越一细胞膜, 也造成离子通道去敏感化, 即处于持久、结合配合基、尚未关闭及不导电状态 (参考, 例如, Jones and Westbrook, 1996, GL Trends Neurosci. 19: 96-101)。去敏感化许多类型的离子通道通常是在数毫秒内且认为数机制中有一个是使中央神经系统中的突触信息被处理及修改。去敏感化也可能用来当作一负反馈机制, 以防止离子通道的过多活性所造成的兴奋突起 (excitotoxic process) 用神经传递物或其它神经调节剂 (参考, 例如, Nahum-Levy, 等人, 2000, Biophys J. 80: 2152-2166; Swope, 等人, 1999, Adv. SecondMessenger Phosphoprotein. Res. 55: 49-78)。

在一方面, 为在诸如 HTS 应用系统中实现高筛选率, 由一微通道的出口快速且连续移动传感器室中的膜片箝制的细胞至下一个。为达到快速重新敏感化离子通道与受体, 传送受体/离子通道的包括有嫌疑的调节剂、作用剂或药物的样本的微通道与传送用于受体/离子通道的重新敏感化的缓冲溶液 (例如, 无任何作用剂的缓冲溶液) 的微通道呈两手手指交叉状的。除了重新敏感化离子通道与受体, 传送缓冲溶

液至在配合基与药物之间的暴露细胞能冲洗出先前施加于细胞的配合基与药物。因此，在此方面，该系统通过提供一周期性响应离子通道传感器用来筛选特定离子通道用的作用剂或调节剂或药物。例如，通过提供脉冲式或稳态流动传送缓冲溶液至传感器，该系统提供一细胞，其在暴露于传送一候选作用剂或调节剂或药物的通道出口时被重新敏感化。图 24A-图 C 根据本发明的一方法，显示未知作用剂的仿真筛选，使用一包括 26 个馈入传感器室的出口的微流体芯片。图 24A 显示了每一通道的内容。有已知药理作用的作用剂（例如，已知功效或效力）已包括在某些通道内用来当作内部控制或标准。此实验的分数表，即，每一微通道所得到的膜片箝制响应显示于图 24C。

在另一具体实施例中，一邻近该膜片箝制的细胞的额外的灌流液移液管，例如排列为与膜片移液管邻近或共轴（以下将描述），是用来连续重新敏感化/清洗细胞表面的受体/离子通道。这能使细胞被快速重新敏感化以及清洗（例如，毫秒内）且当一细胞移动横越一通道出口时能够数次完成离子通道活化作用的不同读数/注册。图 27A-图 C 显示快速重新敏感化的仿真方法，用来筛选作用剂，其结合使用一包括 14 个馈入传感器室的出口的微流体芯片以及无作用剂缓冲溶液的脉冲灌流液，该缓冲溶液使用与一膜片箝制的细胞共轴或正交或其它的接近方式的一流体通道（或移液管）。图 27A 显示每一微流体通道的内容。有已知药理作用的作用剂（例如，已知功效或效力）已包括在某些通道内用来当作内部标准或试验的化合物。

图 27B 显示了一基于细胞的生物传感器横越微流体通道出口的线性、单一、向前扫描的仿真追踪显示了单一微通道出口的多个尖峰响应。该实验的分数表，即，每一微通道的膜片箝制响应显示于图 27C。在此情况下，得到高斯分布是因为流出微通道的配合基至开放体积的分布模型化为高斯分布。可得到许多其它类型的分布这要取决于基板的形状与实验参数，例如流动的准直程度。不过，这种在通过单一微通道出口期间重复灌流细胞的形式允许快速去敏感化的受体/通道可获得剂量-响应信息与高信噪比。

为得到想要的的数据，横越样本与缓冲溶液的各个流的细胞的可变的扫描频率，以及横越每一微通道的可变压力落差可由该系统予以具

体实现，不是用程序预定的指令就是用响应与膜片箝制电极有电子通信的探测器的反馈信号（例如，基于探测信号或实时）。

该系统可用来快速改变包括一受体/离子通道的细胞周围的微米环境。例如，该系统可提供一周期性响应离子通道。由于在此是使用小尺寸的基板与微通道，可作快速质量运送，该系统允许用户筛选药物，某些实例中，使用一膜片箝制传感器，速率为每秒数百个（即，百万/时），提供药物与重新敏感化溶液以可比较的速率连续传送至该传感器。如上述，可修改扫描频率以考虑基于细胞的传感器的生理响应，例如，为平衡很慢的受体提供较慢的扫描频率。

10 产生剂量-响应曲线以及离子通道药理

剂量-响应曲线提供关于药物的作用与效力的有价值的信息。使用涉及微量吸管的传统方法的剂量-响应曲线相当耗时且麻烦。本发明使用微流体用来快速又能控制地运作细胞周围的微米环境，非常适用于剂量-响应测量。剂量-响应关系在直线-对数图中经常出现Σ形曲线，且可用 Hill 逻辑函数（Hill logistic functions）加以描述：

$$I = I_{\max} / [1 + (EC_{50}/C)^n]$$

其中 I 为整体细胞电流，C 为配合基浓度， $I_{\max}$ 为最大电流（即，当所有通道是在开的状态）， EC_{50} 为半最大值（即，当受体群体的一半被活化，且经常等于 K_D ， K_D 为配合基的分离常数），且 n 为反映结合于受体的配合基的化学计量的 Hill 系数。

在一方面，为得到作用剂的剂量-响应信息，由微通道出口快速且连续移动传感器室内的（数个）膜片箝制的细胞至下一个。传送不同浓度作用剂的微通道与传送无作用剂缓冲溶液的微通道呈两手手指交叉状（例如，如上所述，以重新敏感化受体/离子通道及/或清洗出先前施加于细胞的化合物）。优选地，连续或相继稀释的作用剂装入不同的通道。图 26A 为这一装载方案在 56 通道基板的一实施例。在通道 52 的作用剂浓度为最高，然后在每一相继的通道连续稀释直到通道 6。有已知药理作用的作用剂（例如，已知功效或效力）已内含在某些通道用来当作内部标准。优选地，由最高浓度的通道至最低浓度的通道作用剂浓度涵盖许多数量等级。图 26B 显示在如上述的不同浓度的作用剂的仿真膜片箝制记录。由此仿真实验的分数表，即，每一微通道的

膜片箝制响应显示于图 26C, 可构成一剂量-响应曲线。

同样, 经某些修改, 可得到拮抗剂每一剂量-响应曲线, 该拮抗剂同样使用以下将详述的系统。此外, 如上述, 结合微流体与膜片箝制可提供关于调节剂在离子通道上的作用的范围广泛的信息, 例如配合基对其受体的连结与分离常数, 以及调节剂是否为受体的一作用剂或拮抗剂。不过, 也有可能为得到剂量-响应信息由配合基的累积响应而不用缓冲溶液的呈两手手指交叉状的流动清洗或重新敏感化该受体。在此方面, 这些微通道只需要含有不同浓度的配合基溶液。

(i) 作用剂的侦测与特征化

10 部份作用剂

药物分子活化调节受体的响应为一等级性质, 而非全部或是没有的性质。如果在一细胞上试验一系列化学相关的作用剂作用在相同受体, 则最大响应 (即, 可由高浓度作用剂产生的最大响应) 通常在一作用剂至另一作用剂是不同的。某些化合物 (已知为“完全作用剂”) 可产生最大响应而其它, 称作“部份作用剂”, 只可产生次最大响应。因此, 通过以结合受体来束缚一完全作用剂, 一“部份作用剂”可当作“弱拮抗剂”。因此, 通过使用一界定好的离子通道与一已知产生最大响应的的作用剂, 可监视作用剂的活动等级 (参考, 例如图 24)。

(ii) 拮抗剂的侦测与特征化

20 在一方面, 该系统用来筛选离子通道活动的拮抗剂。可予以评估的合适离子通道包括: (i) 不会去敏感化的离子通道; (ii) 会去敏感化的离子通道 (iii) 会去敏感化但活化时会调节大电流起伏的离子通道; 以及 (iv) 离子通道, 其去敏感化性质被异位调节剂 (例如, 凝集素) 的不可逆结合所阻断。为侦测拮抗剂, 在施加拮抗剂期间、之前或之后, 以生物传感器表达的离子通道或受体需要被活化或用作用剂“测试”。例如, 可一起施加不同拮抗剂与定义明确已知药理性质的作用剂。不同浓度的拮抗剂也可与固定浓度的作用剂一起载入微通道。

为达成快速离子通道与受体的重新敏感化, 包含作用剂与拮抗剂
30 (例如, 配合基与药物) 的微通道与传送无任何作用剂或拮抗剂的缓冲溶液 (例如, 受体/离子通道重新敏感化用的缓冲溶液) 的微通道可

呈两手手指交叉状。除了重新敏感化离子通道与受体，在暴露于配合基与药物时段期间，将细胞暴露于缓冲溶液以洗出先前施加于该细胞的配合基与药物。因此，在此方面，该系统用来提供一周期性响应的离子通道传感器。在此系统中，拮抗剂是被作用剂诱导响应的抑制所
5 侦测。

另一方面，该系统用来筛选拮抗剂，其可通过衰减经常被预先活化受体/离子通道调节的信号加以侦测。在此特殊方案中，不同的通道装有不同的拮抗剂、或不同浓度的拮抗剂或两者的组合，同时包括拮抗剂的每一通道包括固定浓度的作用剂。为实现连续活化受体与离子
10 通道，包含作用剂与拮抗剂的微通道与传送缓冲溶液的微通道呈两手手指交叉状且作用剂的浓度相同于有补充拮抗剂的通道。这种在配合基与药物之间细胞暴露上补充作用剂的缓冲溶液的发送用来洗出先前施加于该细胞的配合基与药物且也可用来重新敏感化受体/离子通道。

图 25A-图 C 显示了这一实验的仿真。图 25A 显示了每一通道的内
15 容。有已知药理作用（阻断效力）的拮抗剂已内含在某些通道以当作内部标准。图 25B 显示的仿真追踪表示基于细胞的生物传感器横越微流体通道出口的一线性单一向前的扫描。如此图所示，每个单一微通道出口有多个尖峰响应。此实验的分数表，即每一微通道的膜片箝制响应显示于图 25C，可鉴定有最高阻断效力的拮抗剂。

20 竞争性拮抗作用

此类型的拮抗作用指作用剂与拮抗剂在受体上相同结合点的竞争。可逆的竞争性拮抗作用，其特征为剂量响应曲线的斜率移向较高浓度同时维持同样的最大响应以及曲线的斜率。在不可逆的竞争性拮抗作用中，当细胞暴露于作用剂时，没有观察到拮抗剂占有率的变化。

25 非竞争性拮抗作用

非竞争性拮抗作用描述的情况为：拮抗剂阻断，在同一点，一连串作用剂产生的响应所导致的事件。在这种类型的拮抗作用中，作用剂与拮抗剂不是结合到受体/离子通道上不同的点，就是拮抗剂只是阻断离子通道孔。净效果为减少作用剂的剂量-响应曲线的斜率与最大
30 值。

等排抑制作用

此类型的拮抗作用指浓度大于某一浓度的作用剂的自我抑制作用；即，作用剂在够高浓度会开始中和自己的作用。一钟形剂量-响应曲线经常表示这种拮抗作用。

预突触表达的离子通道的调节剂侦测

- 5 另一方面，该系统用来侦测预突触表达（Presynaptically Expressed）的离子通道的调节剂。研究预突触局部离子通道的策略经常包括插入蛋白脂质体或平面的磷脂双层膜（phospholipid bilayer）的突触体的膜片箝制记录（即，掐掉由均匀化脑组织产生的神经末端）（参考，描述于 Farley and Rudy, 1988, Biophys. J. 55: 919-934; 10 Hirashima and Kirino, 1988, Biochim Biophys Acta 946: 209-214, 例如）。特别优选 Hirashima 与 Kirino 的方法，因为它是一种用于产生包括预突触表达的离子通道的巨大蛋白脂质体的简单快速的技术，该离子通道可在根据本发明的系统中作为用于膜片箝制分析的生物传感器。

15 配合基作用于孤儿受体/离子通道的侦测

- 公知药物发现方法经常是由发现配合基的生物活动开始，随后用来特征化其组织药理与生理角色。通常，在特征化配合基之后，识别对应的受体当作药物筛选在 HTS 应用系统的靶标。一相对创新的策略用于特征化孤儿受体（即，有未界定生物活动的受体）经常称作“反向药理”法。 20

反向法开始是用未知功能的孤儿受体，其用来当作侦测其配合基的靶标。然后，该配合基用来探究受体的生物与病理生理角色。在配合基被生物特征化同时该受体开始作高通量筛选以便发展有助于判定受体的治疗价值的拮抗剂。

- 25 本发明对反向药理法特别有用。在一方面，该系统包括一基于细胞的生物传感器，它是一表达外生孤儿受体（例如，离子通道）的非原生细胞株。合适的原生细胞株，包括但不限于，HEK-293、CHO-KI 以及 COS-7。

- 在非原生细胞背景中连接到筛选离子通道有数项好处。首先，包含空背景的转染细胞株（例如，它通常不表达该孤儿受体）得以确定 30 响应观察到的信号的基因的分子身分。第二，可过度表达该孤儿受体，

因此改善筛选读取的信噪比。第三，可选择有低背景传导性的主细胞以对某些类型的离子通道作很敏感的化验。最后，这些细胞株相对容易培养且健壮到足以被自动筛选系统处理。

有气泡释出的神经传导物质的调节剂的侦测

- 5 十几年前发展出来的测量膜电容的膜片箝制技术（参考，例如，Neher and Marty, 1982, Proc. Natl Acad. Sci. USA 79: 6712-6716），提供一有效工具，可研究外释作用的基本机制与控制。

10 细胞的表面积取决于外释作用与内噬作用间的平衡。外释作用导致气泡内容的放电（即，例如神经传导物质）至细胞外空间以及将气泡膜并至细胞表面膜，导致细胞表面面积增加。内噬作用期间，部份的细胞表面膜被收回，导致表面面积减少。因此，可通过测量细胞表面面积的变化监视外释与内噬活动的净变化。

15 膜电容为细胞的一电子参数，其正比于细胞表面膜面积。因此，提供该电容保持固定，细胞表面膜面积的变化通过预突触定居的离子通道导致外释与内噬活动的药物诱发调节，可通过用该系统的传感器室内的膜片箝制测量膜电容而加以监视。

判定细胞的可渗透性质

20 当使用于筛选程序的细胞表达范围广泛的离子通道类型时，将细胞的活化离子通道的离子可渗透性质特征化，可用来特征化药物与细胞的相互作用。判断关于离子通道的可渗透性质的信息可通过监视反转电位，它可由评估电流至电压关系决定，由不同维持电位（holding potential）测量作用剂引起的电流产生。通过应用反转电位与细胞内外离子浓度有关的知识，由不同模式决定离子通道渗透性质。

电流追踪的噪声分析

25 由离子通道活化用作用剂的电流追踪的分析可在整套与单一通道水平执行，用来进一步特征化作用剂-离子通道相互作用。记录完整细胞膜片箝制的总电流所得的自相关函数的傅立叶变换产生的功率频谱，可用单一或双重 Lorentzian 函数修正。此修正通过分析电流响应（即，转角频率）的频率依赖性提供平均单一通道传导性与离子通道动力学有关的信息（例如，平均单一通道开放时间）。原则上，尽管为
30 一更难且麻烦的技术，也可分析由外侧向外膜片箝制配置得到的记录

以测量同一受体离子通道复合体所调节的单一通道开放时段与不同的电容水平。

各实施例

现在请参考以下实施例进一步说明本发明。应了解以下只是实施
5 例，其细节的修改仍落在本发明的范畴内。

实施例 1. 基板的微制造

图 19 显示在 SF_6 中用深离子蚀刻以硅制造的微通道的实施例。使用标准的电子束写入于 JEOL JBX-5DII 电子束光刻系统（中等反射 4” 铬屏蔽以及 Shipley UV5 光阻，50 千电子伏累积电压，剂量 15 微居里
10 /平方公分，暴露电流 5 纳安）制成光刻用的屏蔽。以每分 2000 转旋涂该光阻剂 60 秒给出 250 纳米的光阻剂且在曝光前在一热板上在 130 °C 软烘烤 10 分钟。该图样在 130°C 的炉中硬烘烤(post exposure bake) 20 分钟且在 Shipley MF24-A 中显影 60 秒，在去离子水肿润湿并在一响应型离子蚀刻机（Plasmatherm RIE m-95，30 秒，50 瓦，250 毫陶
15 尔，10 ccm O2）中蚀刻。将铬在 Balzers 铬蚀刻机#4 中蚀刻 1-2 分钟，使用 Shipley 1165 剥除机剥除屏蔽剩余的光阻剂并在丙酮、异丙酮与去离子水中润湿。— 3”，[100]，两面抛光，有 700 纳米热成长二氧化硅且总厚度 380 微米的低掺氮硅晶圆清洗于响应型离子蚀刻机 Plasmatherm RIE m-95（30 秒，50 瓦，250 毫陶尔，10 ccm O2），用
20 Shipley S-1813 光阻剂以每分 4000 转旋涂，产生 1.3 微米的光阻层，且在 Carl Suss MA6 屏蔽对准曝光机中在 400 纳米波长下曝光于 110 微焦耳/平方公分的剂量。该晶圆在 Shipley MF319 显影 45 秒、在去离子水润湿并在响应型离子蚀刻机（Plasmatherm RIE m-95，30 秒，50 瓦，250 毫陶尔，10 ccm O2）中烧成灰。在 130°C 硬烘烤该晶圆 10
25 分钟，用 SioTech 缓冲氧化蚀刻剂蚀刻该二氧化硅并用去离子水润湿。用丙酮剥除该晶圆剩余的光阻剂，润湿于异丙酮与去离子水。该晶圆的另一面用 Shipley AZ4562 光阻剂以每分 3000 转旋涂 30 秒产生约 8 微米的光阻层，在 100 °C 下在热板上软烘烤 3 分钟且在 a Carl Suss MA6 屏蔽对准曝光机中 400 纳米波长下曝光于 480 微焦耳/平方公分的剂
30 量。在 Shipley MF312 中显影该图样 200 秒并用 50:50 去离子水润湿，并在响应型离子蚀刻机（Plasmatherm RIE m-95，30 秒，50 瓦，250

毫陶尔, 10 ccm O₂) 中烧成灰。

在 600 瓦的射频功率以及 30 瓦的平台电源功率 (platen power) 下, 使用 SF₆ 为蚀刻气体以及 C₄F₈ 为钝化气体, 光阻剂 AZ4562 中界定的图样、记录室与组合存取孔与样本孔在 STS Multiplex 深离子蚀刻机中被蚀刻。该系统运作于: 74% 的固定 APC 角度以及蚀刻时间为 12 秒 (过量时间 1 秒), 钝化时间 8 秒 (过量时间 1 秒)。蚀刻速率约为 4.9 微米/分钟且蚀刻时间为 60 分钟, 导致深度约为 300 纳米。用丙酮剥除该晶圆剩余的光阻剂, 在异丙酮与去离子水润湿。

在二氧化硅中界定微通道的图样被上述同一系统蚀刻, 除了用 800 瓦射频功率, 68% 的固定 APC 角度且蚀刻时间为 7 秒 (过量时间为 0.5 秒), 钝化时间 4 秒 (过量时间为 1 秒)。蚀刻速率约为 3.3 微米/分以及蚀刻时间为 30 分钟, 导致深度为 100 纳米。完全蚀刻这些孔与记录室导致晶圆内各点的孔洞穿透。在温度 450 °C 以及电压 1000 伏下, 使用阳极接合方式 (anodic bonding) 密封这些通道至 Corning #7740 高硼硅酸盐玻璃的一 3"、1000 微米厚晶圆。接合期间最大电流通常为 500 微安。

实施例 2. 使用以微流体为基础的缓冲溶液灌流与细胞扫描重新敏感化膜片箝制的细胞

在聚合物及聚双甲基硅氧烷 (PDMS) 内建模微通道, 然后不可逆密封到一玻璃盖玻片上以形成一有四墙的密封通道。

以下为所使用的步骤:

(1) 用来铸造 PDMS 的硅主件, 制造如下: 首先, 清洗该晶圆以确保对光阻剂有良好粘着性, 随后在晶圆上旋涂一层 (约 50 微米) 的负光阻 (SU 8-50)。然后软烘烤此层负光阻以蒸发内含于光阻剂的溶剂。用屏蔽对准曝光机实施光刻, 使用有适当图样的光屏蔽 (图样使用电子束写入予以制备)。然后用烘烤曝光的晶圆且通过在适当的显影机中洗掉未曝光光阻剂而加以显影 (例如, 丙烯乙二醇甲基乙醚醋酸盐)。

(2) 表面钝化此已显影晶圆 (主件), 通过在真空中用数百微升的 tridecafluoro-1, 1, 2, 2-tetrahydrooctyl-1-trichlorosilane 硅烷化 (silanize) 数小时。

(3) 已除气的 PDMS 预聚合体倒在该硅主件上面并在 60°C 下置于炉中固化两小时

(4) 然后, 在氧气离子 (oxygen plasma) 中氧化约 1 分钟之后, 包含微通道特性的已固化 PDMS 铸模不可逆密封至一玻璃基板。此实施
5 例中使用的通道尺寸约为 100 微米宽, 50 微米深。

描述在此的实验使用一简单的单一通道结构。此微通道接合到一聚乙烯管子, 首先用一有适当尺度的尖锐的冲孔机冲出一穿过该 PDMS 的平滑孔洞。外径稍大于冲孔的聚乙烯管子插入该孔, 且该管子因 PDMS 的弹性体性质而形成一压力垫片。该聚乙烯管子连接到一有适当尺寸
10 (口径) 的注射针, 其连接到一注射器。用一高度精密注射器泵 (CMA/100, Microinjection 泵, Camegei Medicin) 实现驱动流体流用的控制压力。

在完整细胞配置中, 完成膜片箝制实验。用有外径 1.5 毫米与内径 0.86 毫米的厚墙的高硼硅酸盐玻璃毛细管 (Harvard Apparatus LTD
15 Edenbridge, Kent, UK) 制造完整细胞记录用的移液管。尖端的直径与电阻分别为约 2.5 微米与 5-15 百万欧姆。该预估串联电阻一直都是小于 50 百万欧姆且修正维持电位因串联电阻而有的电压误差。该膜片箝制电极溶液含 100 毫摩尔 KCl, 2 毫摩尔 MgCl₂, 1 毫摩尔 CaCl₂, 11 毫摩尔 EGTA, 以及 10 毫摩尔 HEPES; 用氢氧化钾酸碱值调整为 7.2。
20 所有实验均在室温 (18-22°C) 中进行。

信号的记录使用 Axopatch 200 A (Axon inc. California, U.S.A) 膜片箝制放大器, 在维持电位为 -70 毫伏, 且数字化并储存于计算机硬盘 (样本频率 10 千赫, 过滤器频率 200 赫, 使用 8 柱贝塞尔滤波器) 且使用个人计算机与 Clampfit 8.1 软件 (Axon inc.) 加以分析。包
25 括微通道结构的实验室装上一装备 40 倍与 10 倍物镜的倒立显微镜置物台, (Nikon, Japan)。装上该显微镜的为 CCD 照相机 (Hamamatsu), 其连接到一用来记录扫描频率的录像机, 录像机的取样速率为 25 赫兹。此设备与显微操作仪 (Narishigi, Japan) 一起置于法拉第屏蔽箱内的耐震桌子上。该膜片箝制放大器, 数字数据板 (Digidata board),
30 滤波器, 录像机以及个人计算机则置于箱外以最小化电线频率的干扰。

附着的 PC-12 细胞培养在培养皿内圆形的盖玻片上 2 至 6 天

(DMEM/F12 培养基, 补充抗生素与 antimyocotin (0.2%), 新生胎牛血清 (fetal calf serum) (10%), 以及 L-谷氨酸盐)。在膜片箝制实验之前, 于 HEPES-盐水中清洗与分离细胞, 该盐水包含 (单位毫摩尔): 10 HEPES、140 NaCl、5 KCl、1CaCl₂、1 MgCl₂和 10 右旋糖 (酸碱值 7.4), 且置入开放缓冲溶液贮存器的微通道出口处。

用细胞测试垫片的强度, 该细胞经膜片箝制而不进入一完整细胞配置。施加膜维持电位为-70 毫伏且将该细胞定位在通道出口 10 微米处。施加不同的流动速率 (范围在 0.3 至 21 毫米/秒之间) 同时连续地监视该垫片。在此特定实验中, 流动速率达 6.7 毫米/秒, 该修补垫片 (patched seal) 是稳定的 (电流踪迹是稳定的)。

关于重新敏感化实验, 添加作用剂至修补细胞处的开放贮存器, 同时由注射器传送缓冲溶液进入微通道且流出该微通道进入该开放贮存器。该膜片箝制的细胞置于微通道出口外 10 微米处。驻留膜片箝制的细胞的贮存器填入 1 毫摩尔乙酰胆碱 (作用剂)。缓冲溶液用注射器泵传送进入该微通道并以约 3 毫米/秒的流动速率连续流过该微通道。

当该高阻抗垫片是稳定时 (5-20 Gohm) 没有观察到电流, 当以方向为平行于该微通道, 离微通道的出口约 10 微米至约 80 微米移动该细胞。此事实表示, 流出微通道的缓冲溶液灌流该膜片箝制的细胞, 因此在该开放贮存器中不与这些作用剂接触。离微通道的出口约 80 微米处, 以 100 微米/秒重复扫描该膜片细胞, 方向为垂直于微通道, 在含作用剂的贮存器与微通道出口之间 (图 20)。

在平均完整细胞电流减少时, 暴露作用剂一段较长时间 (大于 5 秒) 之后会观察到电流响应去敏感化。只要该膜片细胞在无作用剂的缓冲溶液中在每次暴露之间被重新敏感化, 暴露于作用剂用较短的时间 (小于 5 秒) 可看到细胞没有去敏感化, 重复的短时间暴露也一样。

实施例 3. HTS 应用系统中膜片箝制的细胞快速扫描横越配合基与缓冲溶液的呈两手手指交叉状的流

使用本发明具体实现 HTS 的一优选具体实施例是要扫描一膜片箝制的细胞快速横越缓冲溶液与配合基的呈两手手指交叉状的流, 每一配合基流对应于一不同的药物。在这些应用系统中, 如上述, 流出微通道的流体的流动速率与该膜片箝制的细胞的扫描频率两者是很重要

的。图 21A-D 显示在被扫描横越 7 通道结构的出口的后膜片箝制的完整细胞的响应。每一通道的宽度为 100 微米，厚度为 50 微米，且通道间间隔为 25 微米。此 7 通道结构与显示在图 16B 的一样。用来制造微通道以及膜片箝制的步骤与实施例 2 所描述的（参考以上说明）一样。

- 5 所用的膜片箝制的细胞为一 PC-12 细胞，其置于离微通道出口外 10 至 20 微米处。通道 1、3、5 和 7 填入 PBS 缓冲溶液，同时通道 2、4 和 6 填入乙酰胆碱。流体流的流动速率为 6.8 毫米/秒。

图 21A-D 中，扫描一膜片箝制的细胞横越呈两手手指交叉状的流，用 4 种不同的扫描频率：A，0.61 毫米/秒；B，1.22 毫米/秒；C，2 毫米/秒；以及 D，4 毫米/秒。扫描频率的差异反映在完整细胞电流响应尖峰的宽度，宽度愈宽，则通过时间愈长且尖峰宽度愈宽。此外，对于缓慢扫描频率（例如，图 21A），当由一乙酰胆碱流至下一个扫描膜片箝制的细胞时，每一尖峰的最大响应会减少。膜片箝制的细胞的去敏感化是因为缓慢的扫描频率会导致细胞驻留在乙酰胆碱流的时间较长，这会造成尖峰响应的减少。

由图 21A 可见，第 2 尖峰与第 3 尖峰的高度减少量大于第 1 尖峰与第 2 尖峰的高度减少量。这与以下事实一致：该膜片箝制的细胞在第二流的驻留时间愈长（即，较宽的尖峰）造成更多去敏感化。当扫描频率增加（图 21C 与 21D），驻留在乙酰胆碱流内的时间减少且去敏感化不再是问题。对于快速扫描频率（例如，数十毫秒），例如，图 21D 所示，没有检测到去敏感化。图 22 显示相反情况，其中扫描频率很慢（数秒），且当扫描该膜片箝制的细胞横越该乙酰胆碱流的宽度时去敏感化显著。

由这些实验来看，显然控制扫描频率对达成 HTS 应用系统的最佳效能是很重要的。可用上述的任何机制或本领域公知的方法控制扫描频率。

可利用与去新敏感化及重新敏感化的动态有关的系统所得的数据以提供对说明离子通道的药理、动力学以及鉴定有用的信息。

实施例 4. 剂量-响应测量通过快速扫描膜片箝制的细胞横越有不同浓度的缓冲溶液与配合基的呈两手手指交叉状的流

使用于实施例 3 的通道结构与实验设置可用来完成剂量-响应测

量，其中每一配合基流的配合基的浓度因预定量而不同。图 23 显示此实验的一结果，其中施加尼古丁的 3 种不同浓度（1 微摩尔，12 微摩尔，以及 200 微摩尔）至一膜片箝制的细胞。于此 7 通道结构中，通道 1、3、5 和 7 填入 PBS 缓冲溶液，而通道 2、4 和 6 分别填入 1 微摩尔、12 微摩尔以及 200 微摩尔尼古丁。使用的流动速率为 3.24 毫米/秒且细胞扫描速度为 250 微米/秒。该膜片箝制的细胞置于离微通道出口外 10 至 20 微米处。

对于 1 微摩尔浓度的尼古丁，该完整细胞电流响应在膜片箝制踪迹中勉强可识别。12 微摩尔的电流尖峰经侦测有良好的信噪比，且对应于 200 微摩尔的尖峰约为 12 微摩尔的尖峰的 15 倍至 20 倍。用这些测量值，可产生一剂量-响应曲线，可提供关于药物作用与离子通道药理的信息。应强调的是，有一些用于梯度产生的芯片内技术以及用于制备不同浓度配合基的方法可加以利用（参考，例如，Dertinger, 等人, 2001, Analytical Chemistry 73: 1240-1246）。此外，组成剂量-响应曲线所使用的不同浓度的数目在大部份的情形中会大于此实施例所使用的，且会取决于所需的浓度分辨率以及特定应用系统想要的范围。

本领域技术人员可对所描述的事物变更、修改以及其它的具体实现，但是这些不会脱离本发明的精神与范畴。在此引用的出版品、专利、应用系统以及其它参考文献全部以引用的方式全部并入本文中。

图1A

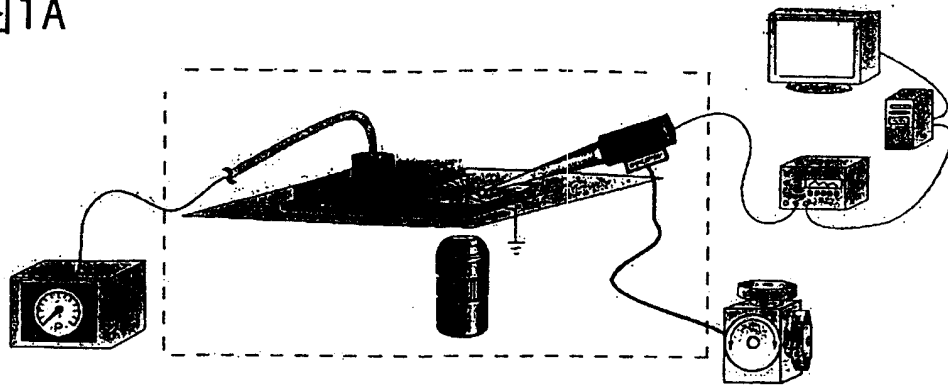


图1B

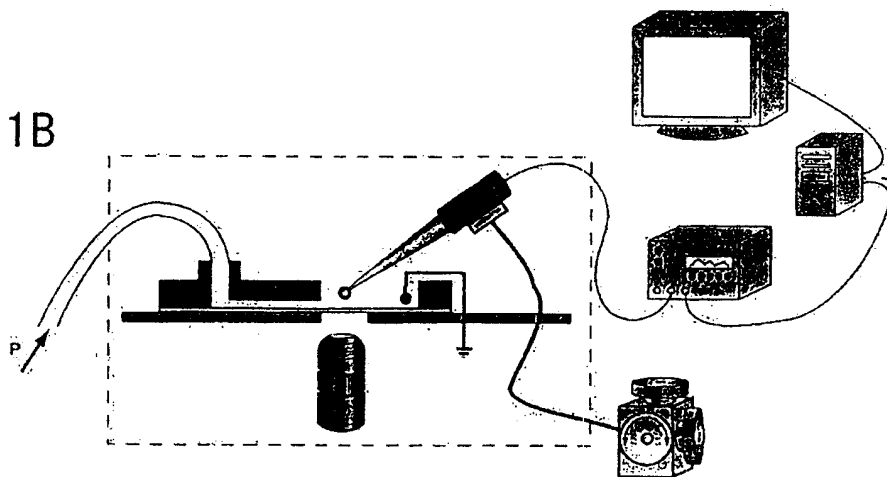


图1B

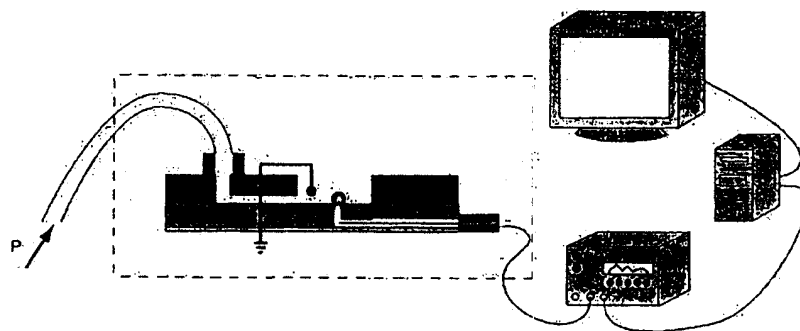


图1

图2A

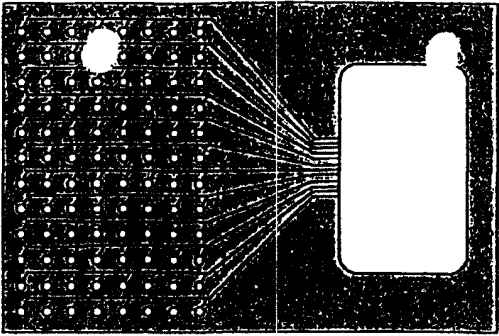


图2B

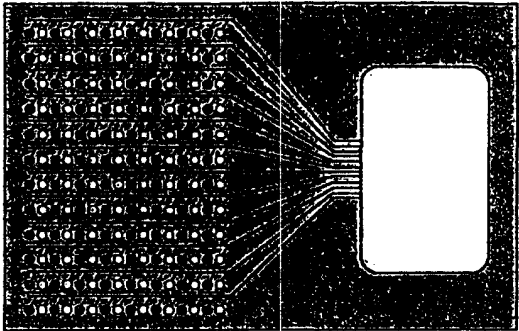
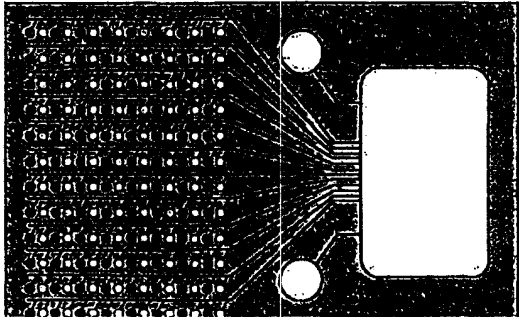


图2C



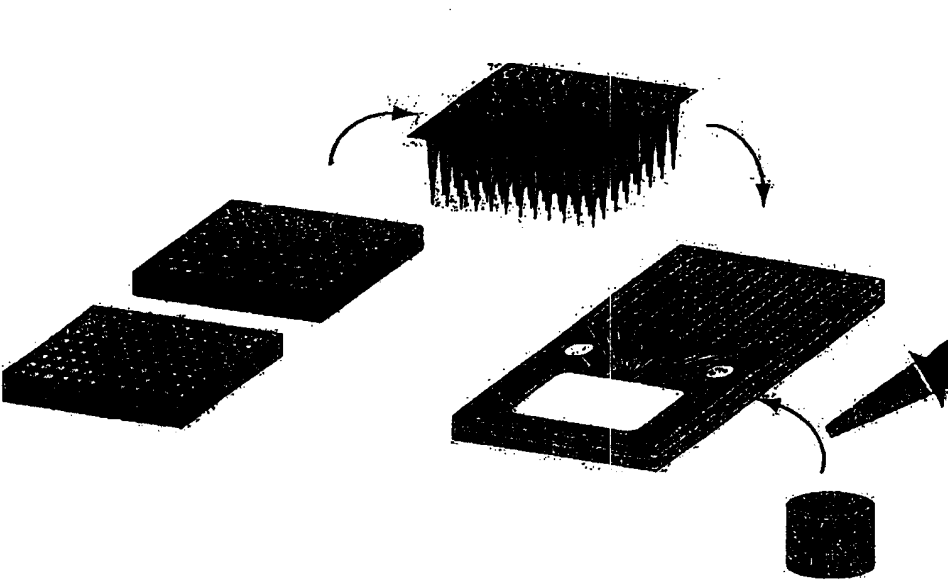


图3

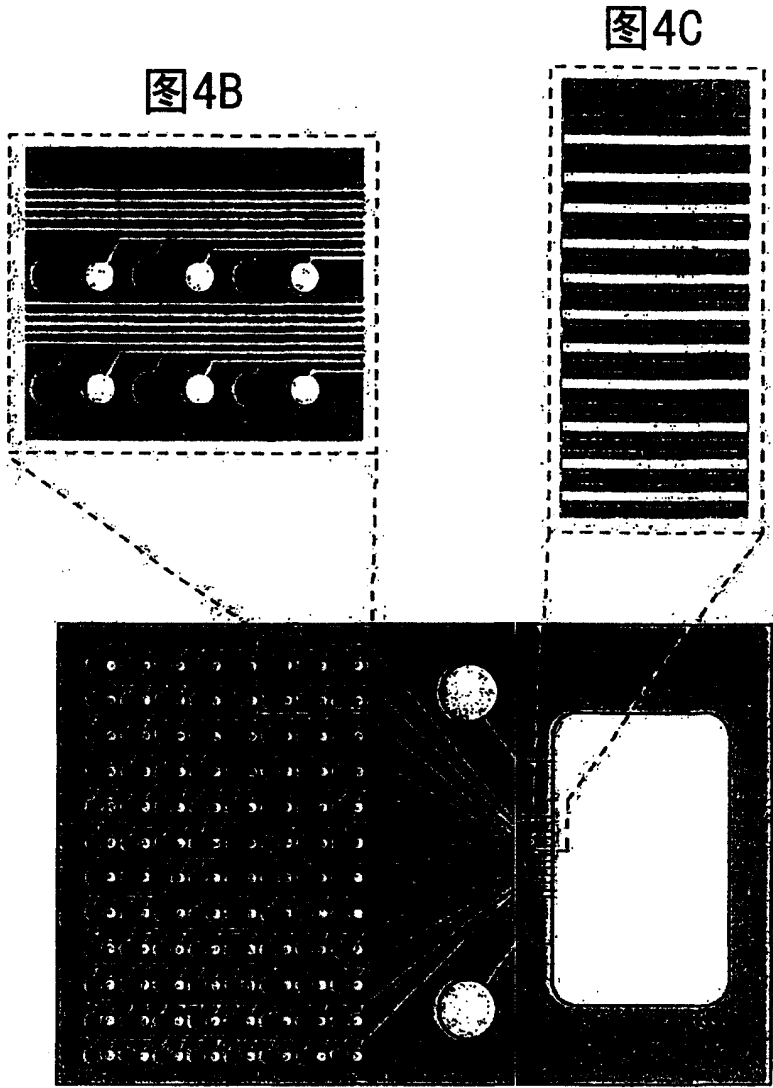
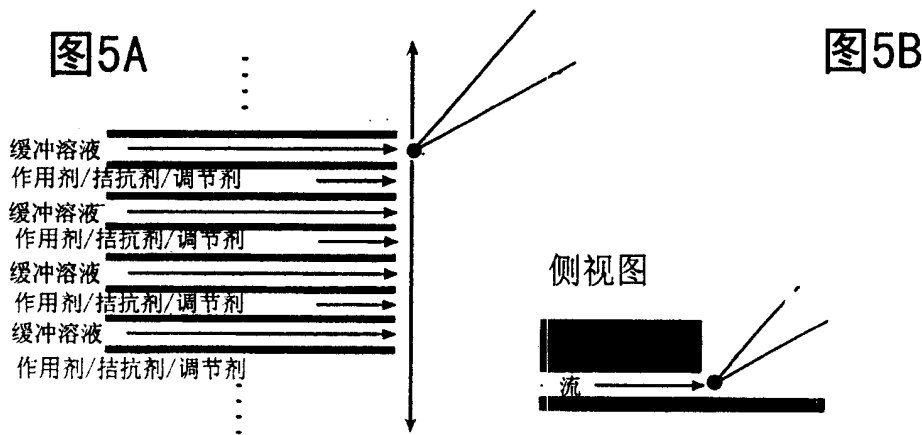


图4A

顶视图



侧视图

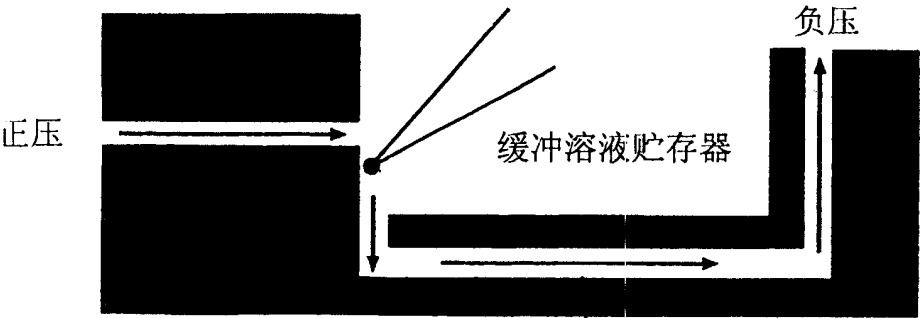


图5C

图5

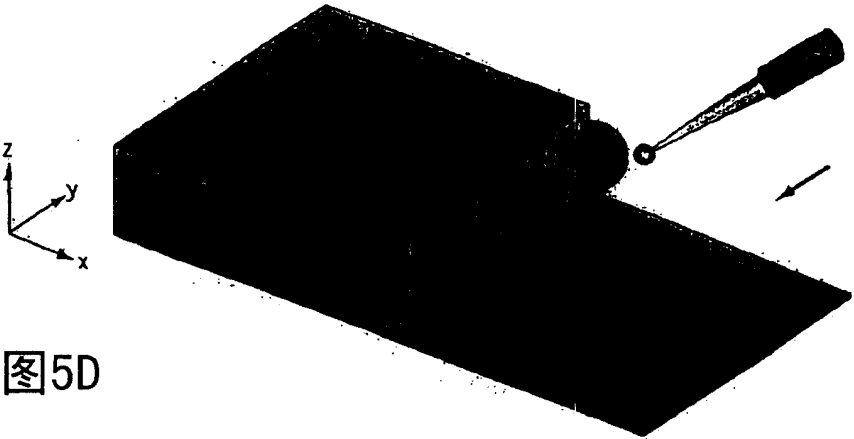


图5D

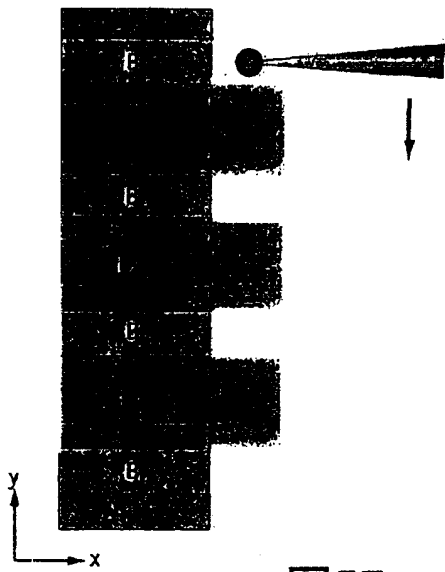
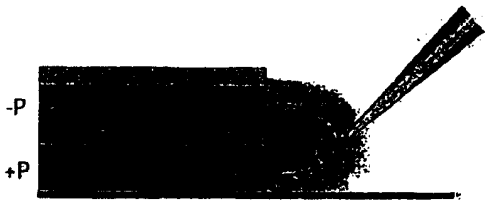


图5F

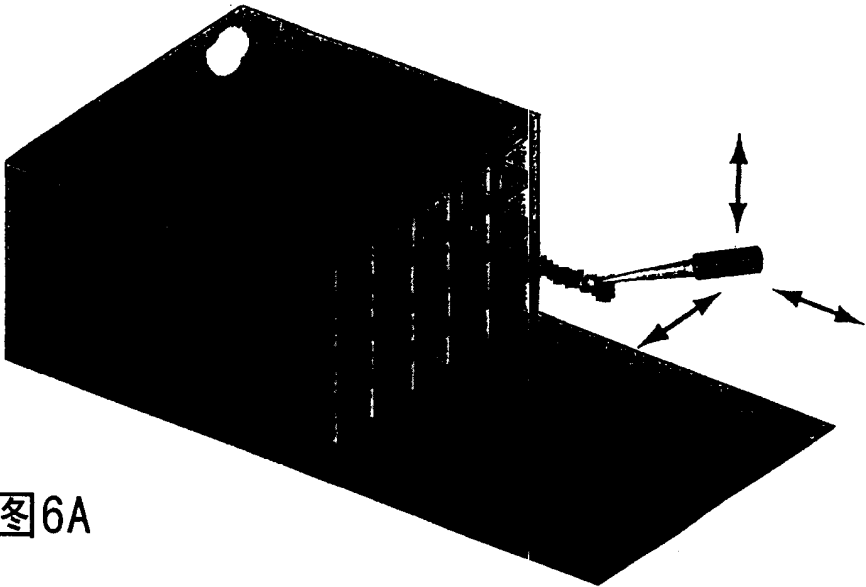


图6A

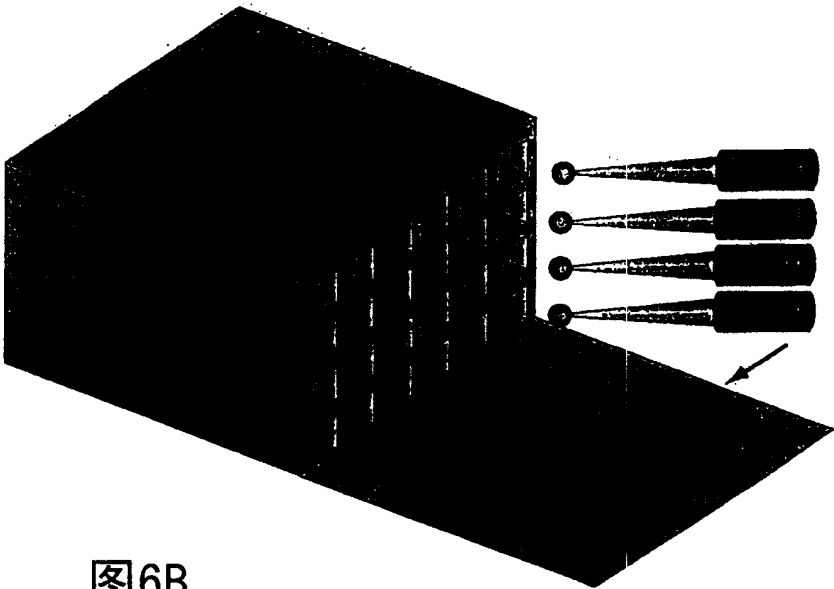


图6B

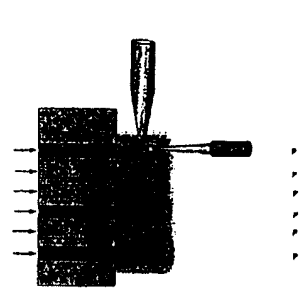
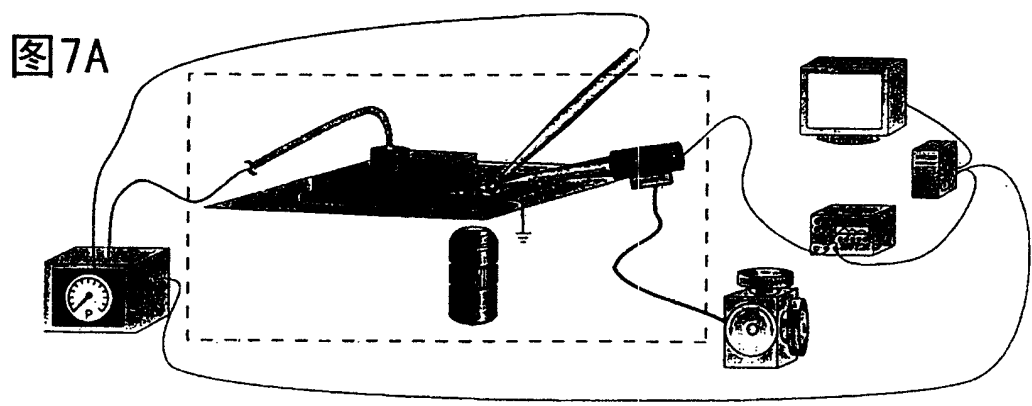


图7B

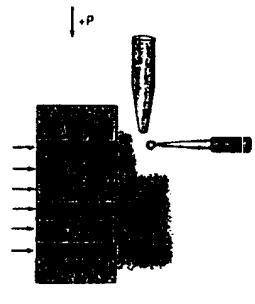


图7C

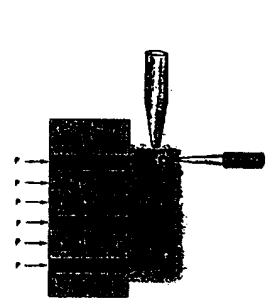


图7D

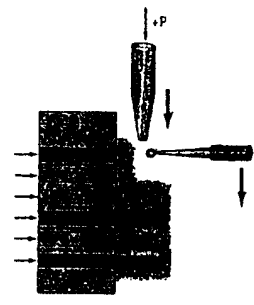


图7E

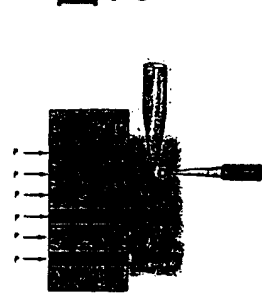


图7F

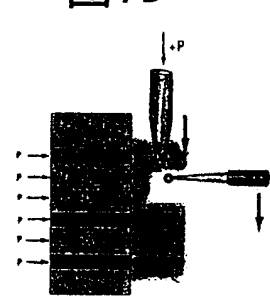


图7G

图7H

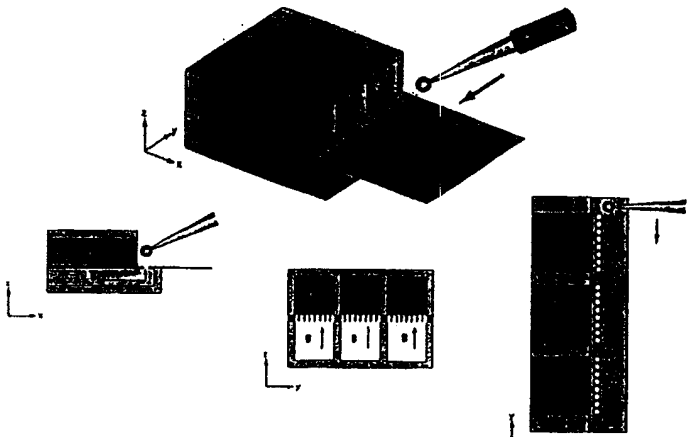


图7I

图7J

图7K



图7L

图7M

图7N

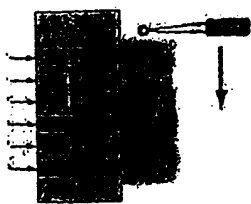


图8A

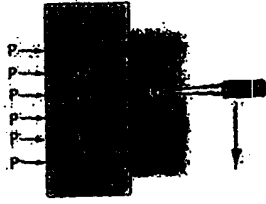


图8B

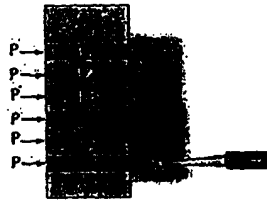


图8C

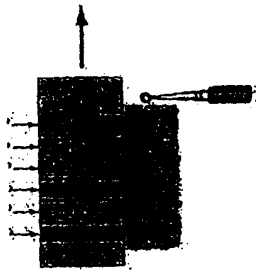


图8D

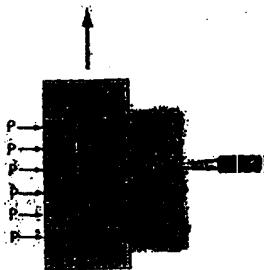


图8E



图8F



图8G

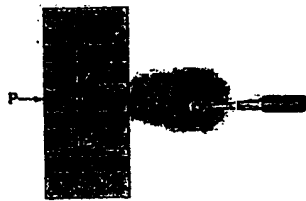
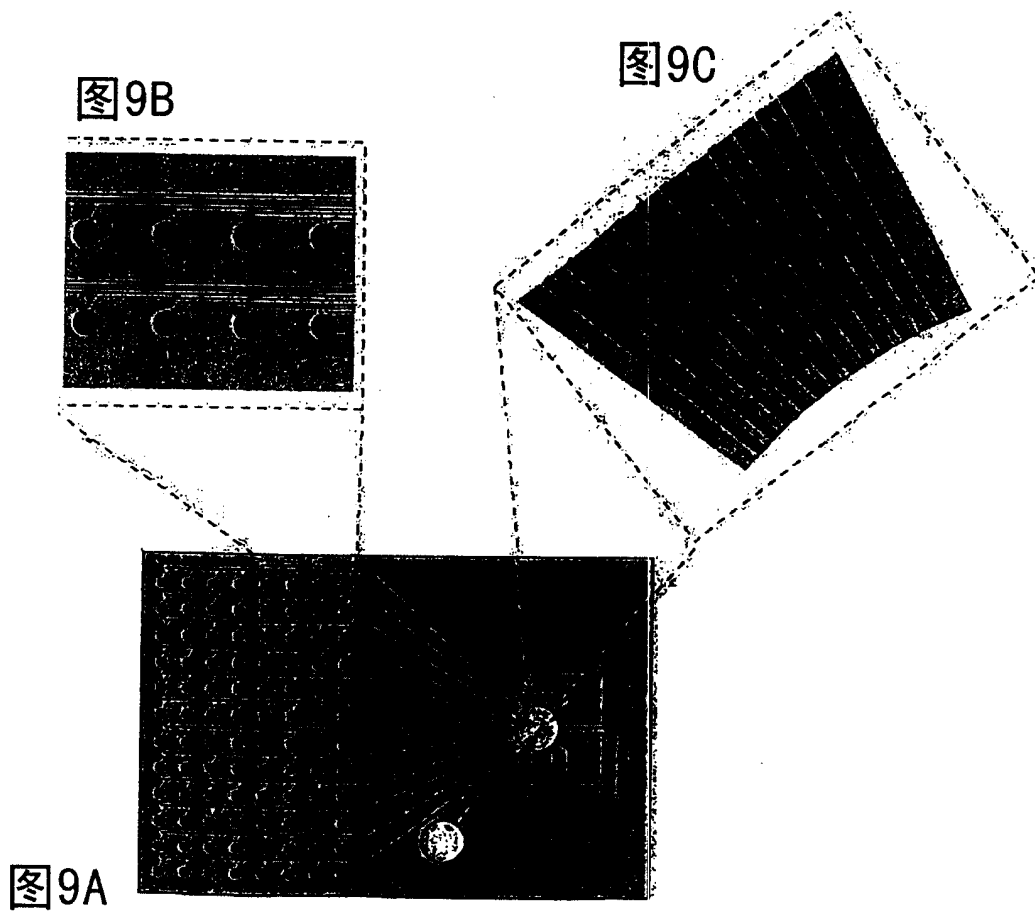


图8H



图8I



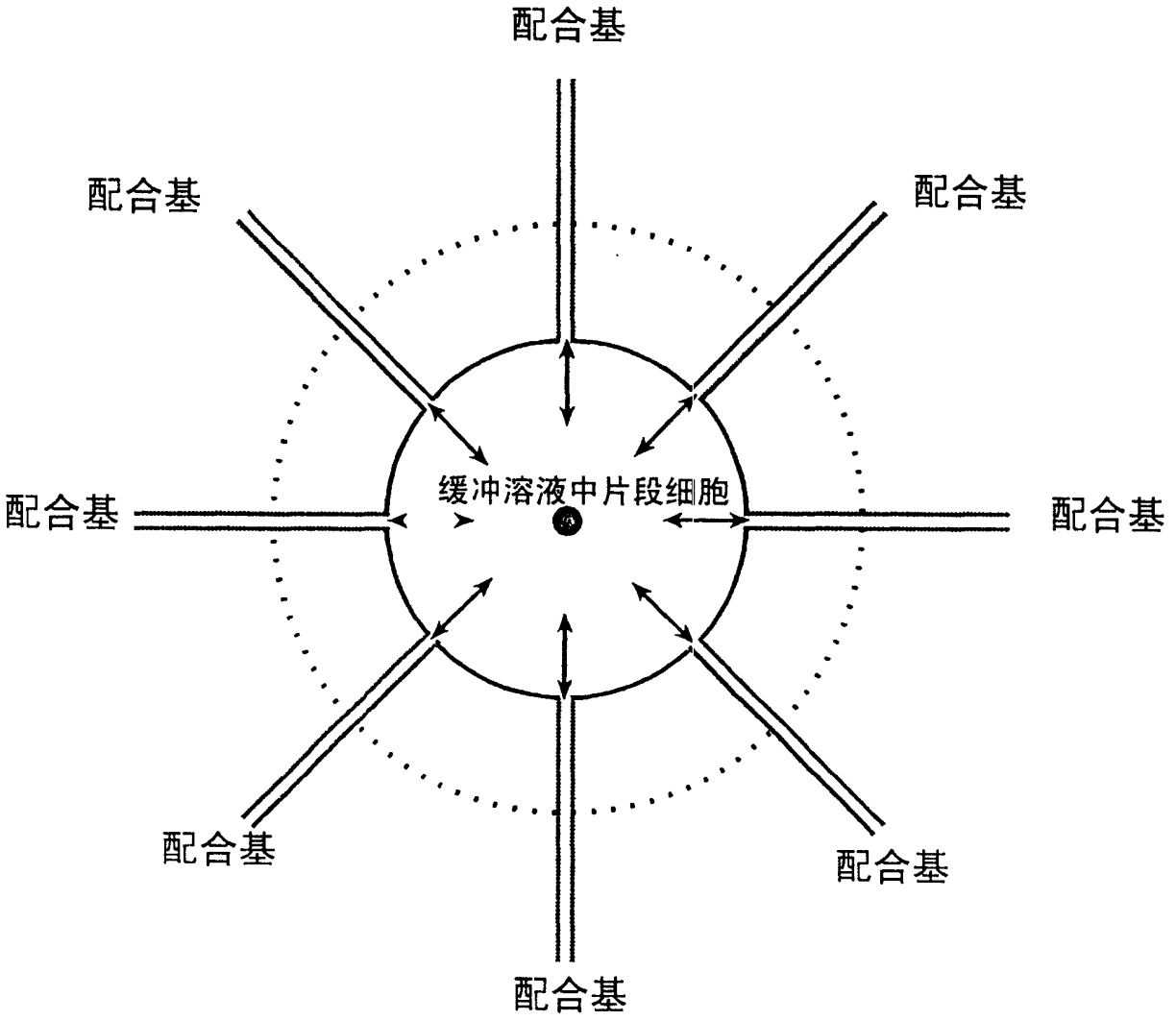


图10

图11B

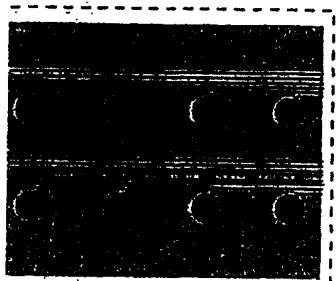


图11C

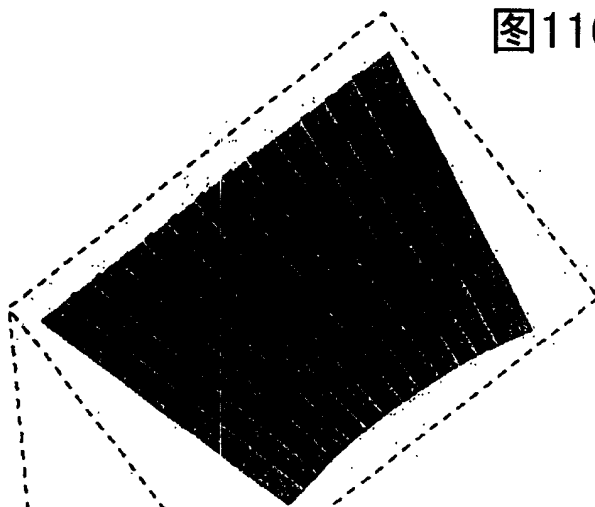
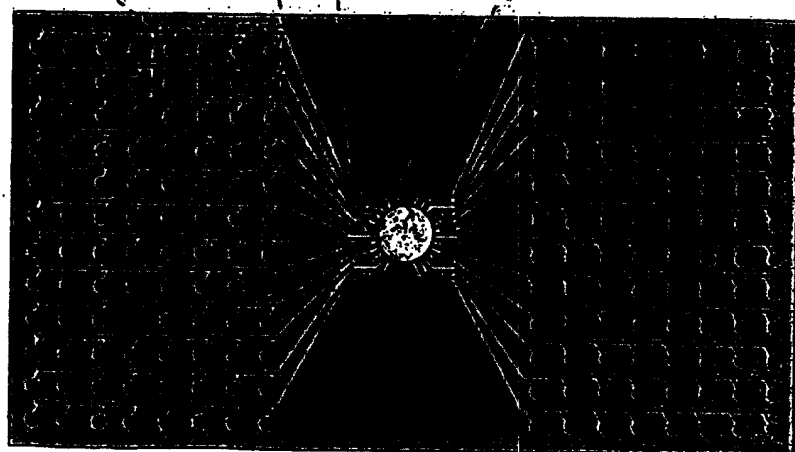


图11A



顶视图

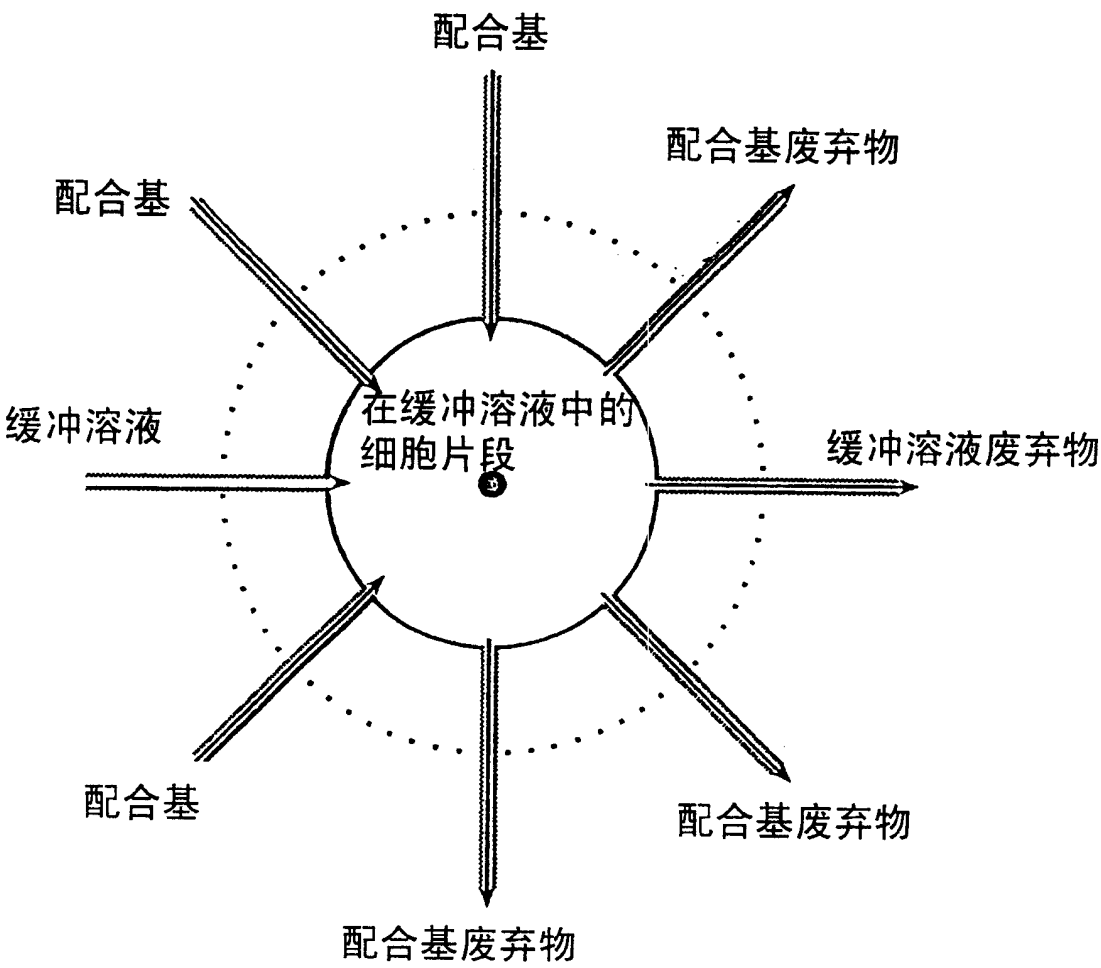


图12

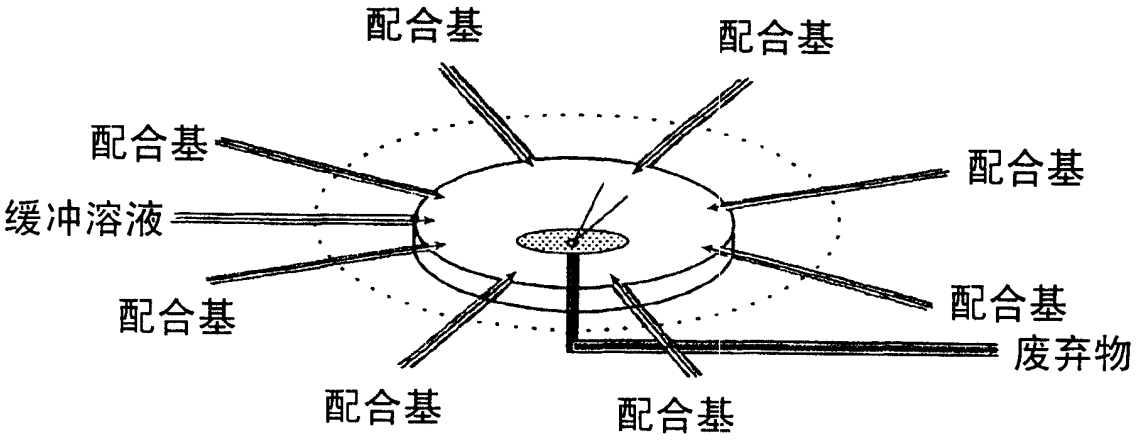


图13

图14B

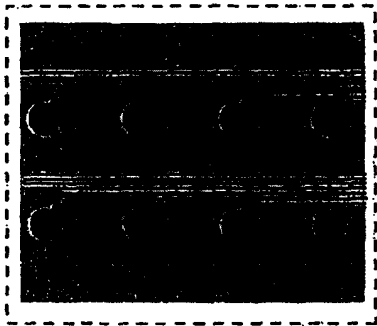


图14C

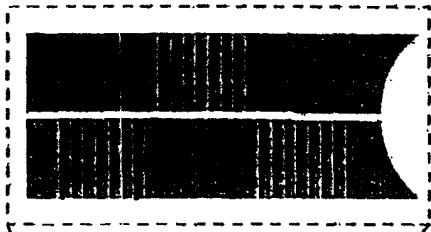


图14A

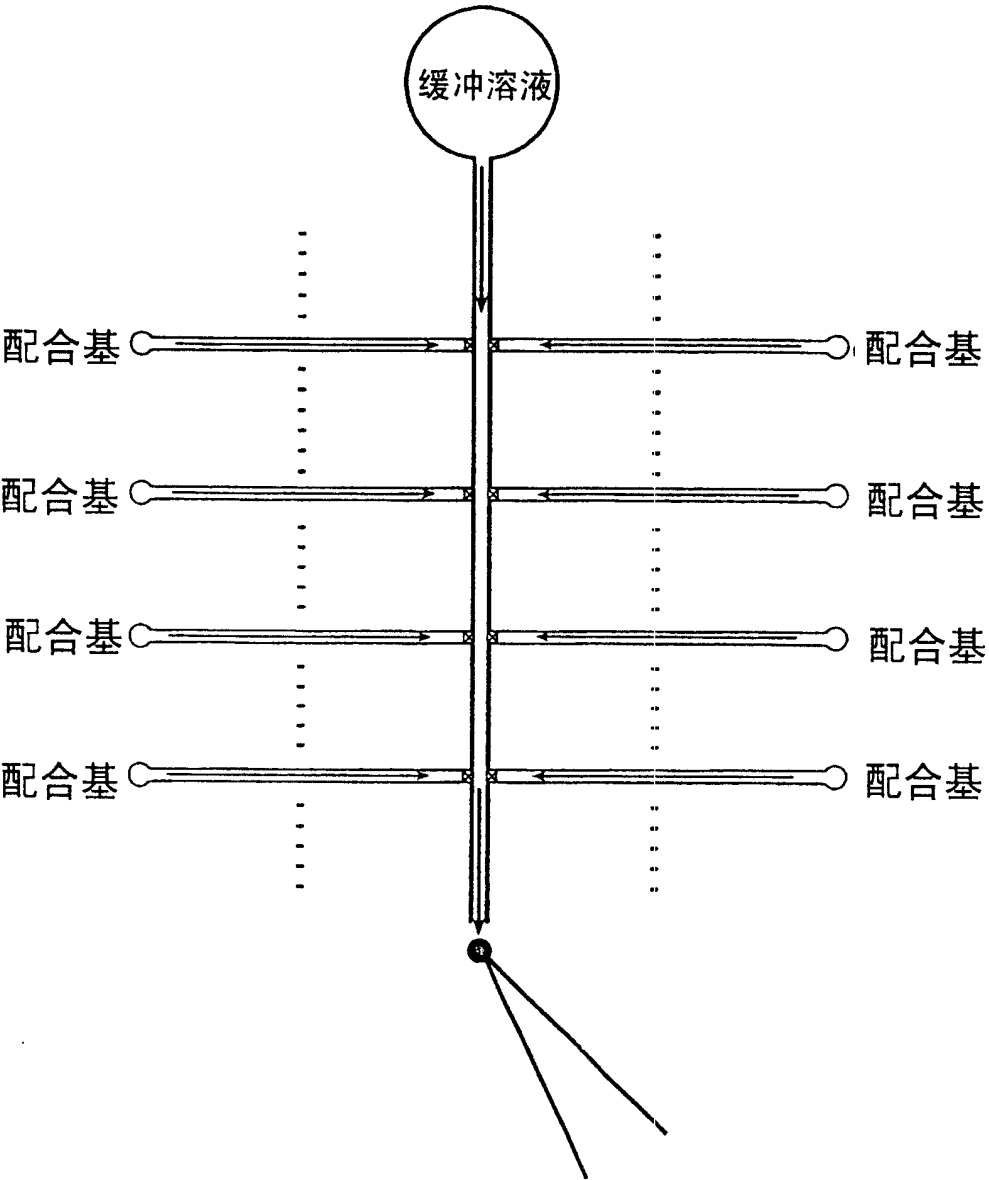


图15

图16A

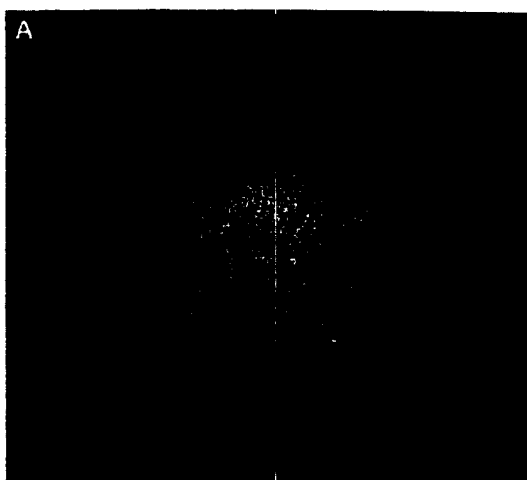
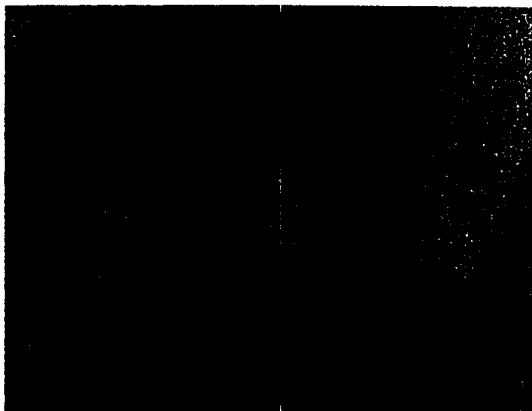


图16B



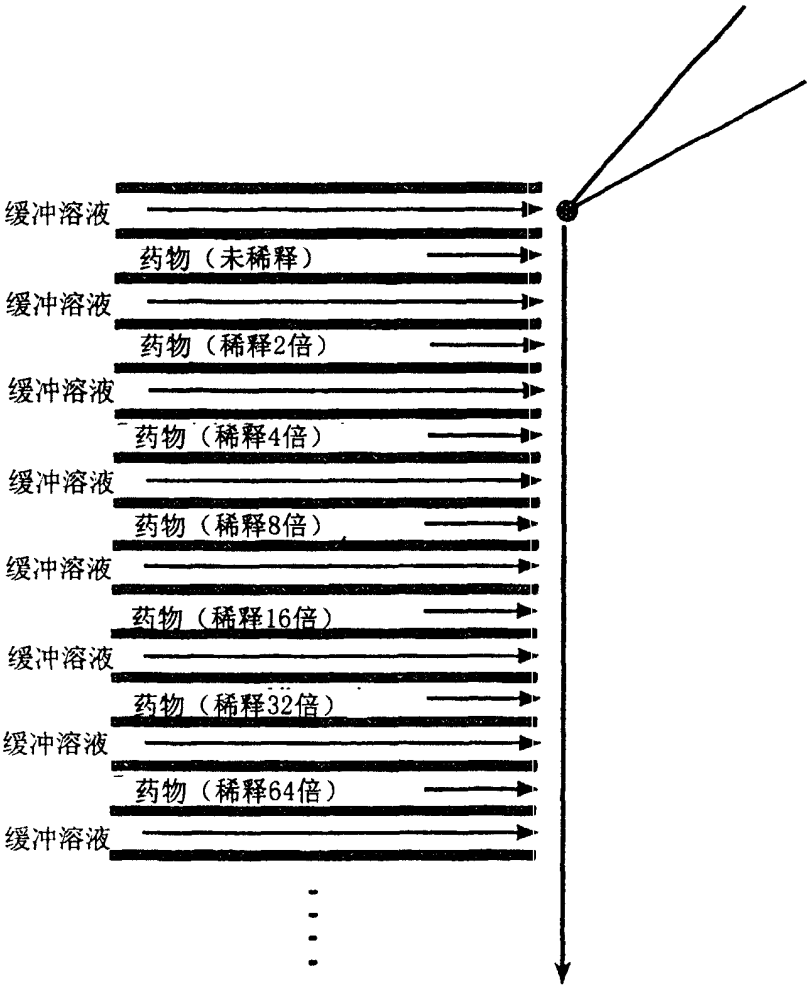


图17

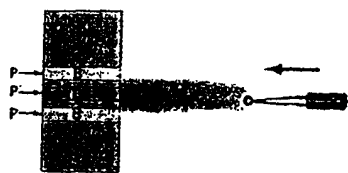


图18A

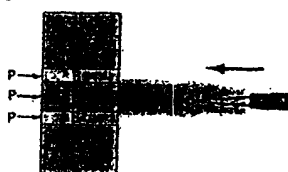


图18B

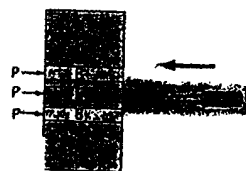


图18C

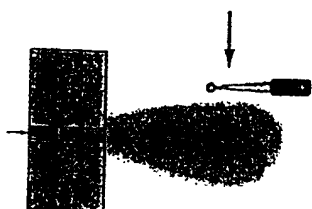


图18D



图18E



图18F

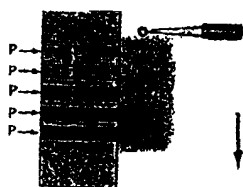


图18G

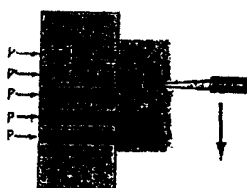


图18H

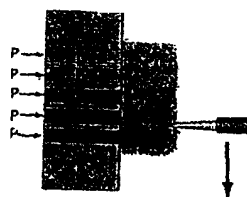


图18I

图19A

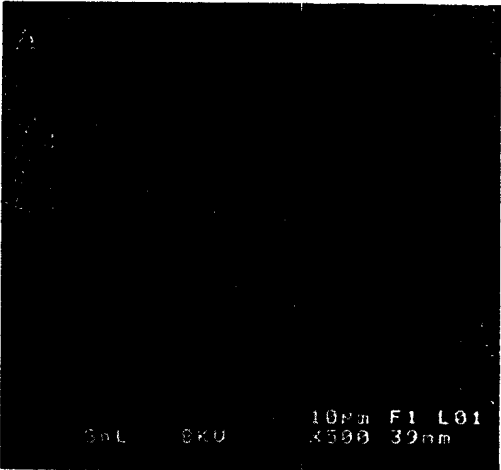


图19B

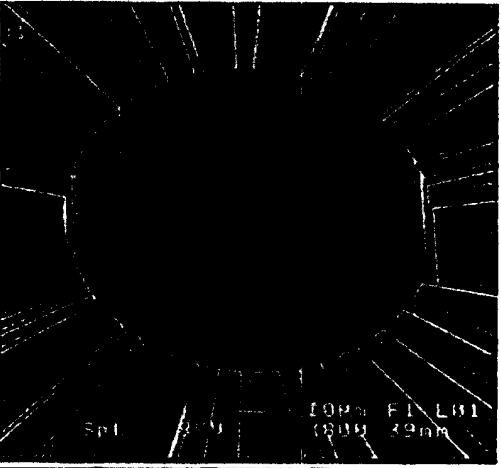
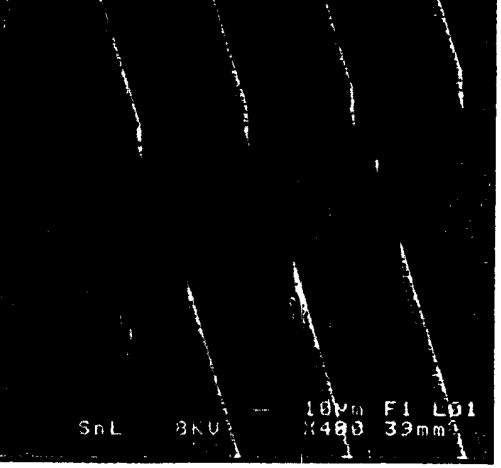


图19C



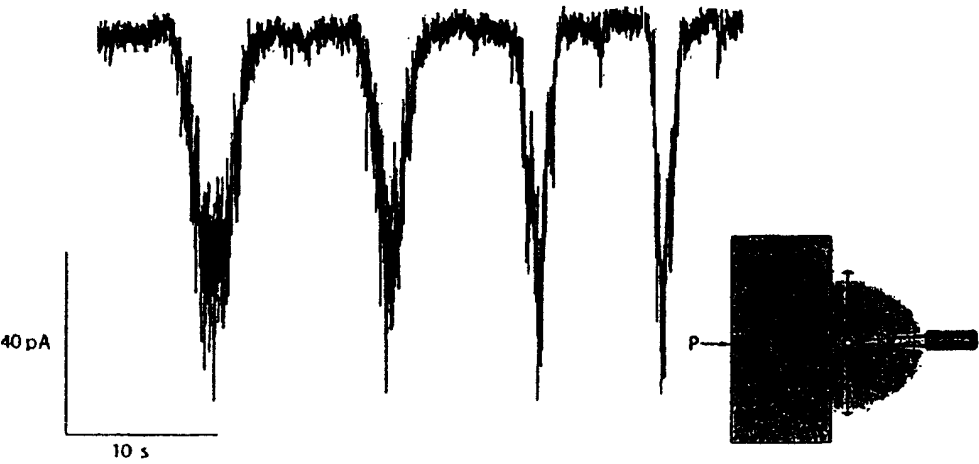
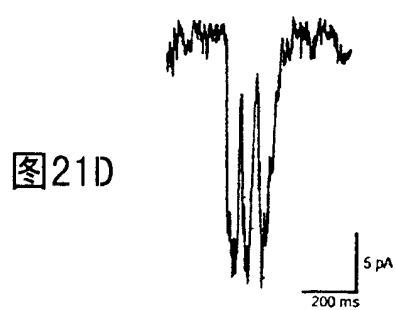
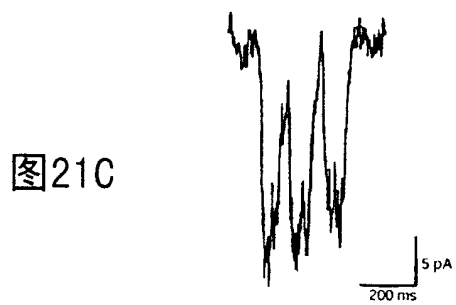
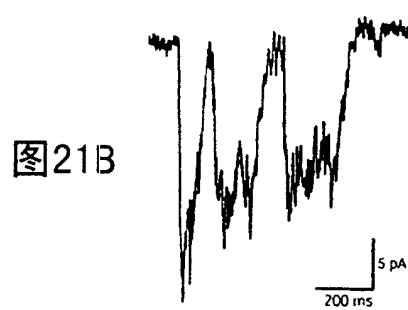
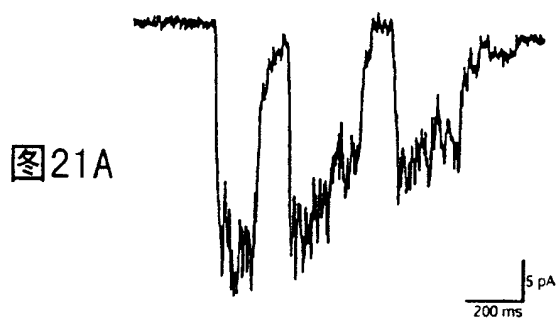


图20



扫描频率为16s/通道时1毫摩尔乙酰胆碱的电位响应

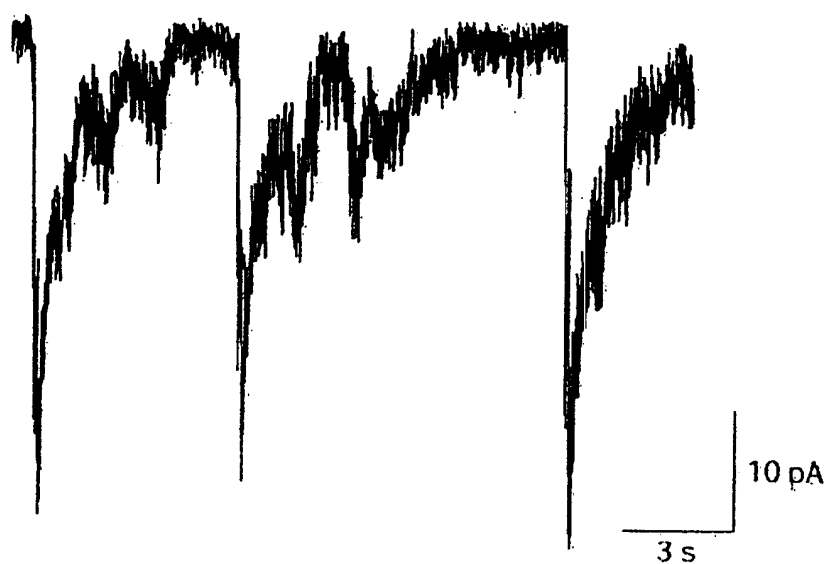


图22

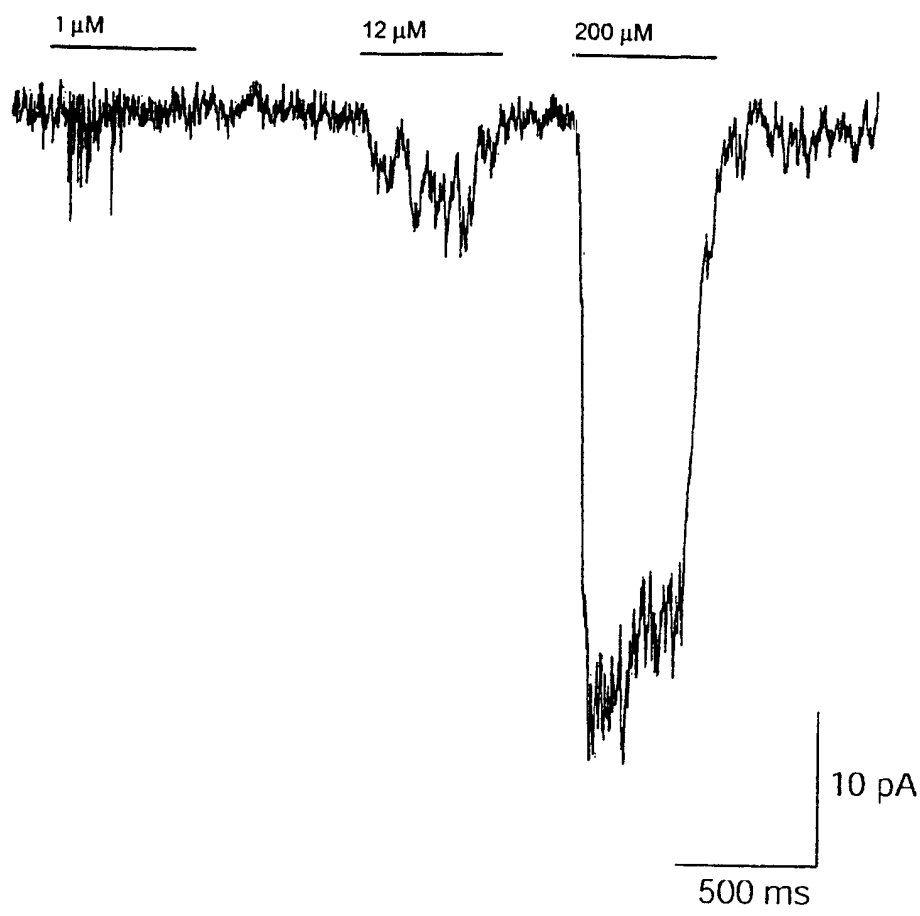


图23

通道内容	B	T1	T2	T3	B	α	B	α	B	α	B	T2	B	α	B	α	B	α	B	α	B	T1	T2	T3		
通道 #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26

图24A

用于单扫描穿过微流体通道出口的仿真的迹

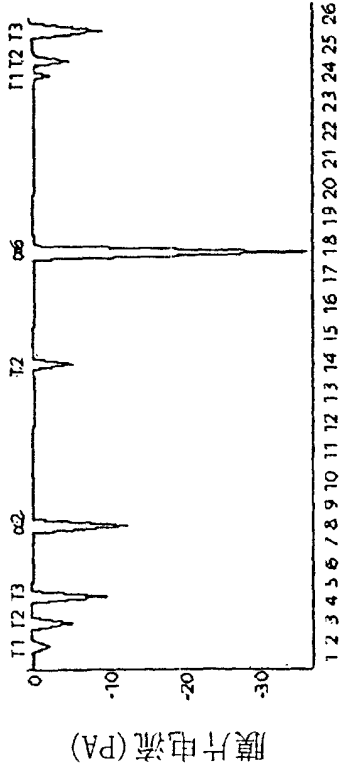


图24B

分数表（6扫描的平均峰值电流幅度）

受体响应	0	1	5	10	0	0	0	12	0	0	0	0	0	5	0	0	0	37	0	0	0	0	0	1	5	10
通道#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26

B=缓冲溶液
T1=在低浓度试验已知功效的化合物（拮抗剂）
T2=在中等浓度（接近EC₅₀值）试验已知功效的化合物（拮抗剂）
T3=在高浓度（饱和浓度）试验已知功效的化合物（拮抗剂）
α =未知功效的作用剂

图24C

通道内容	B	T	T	T	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	T1	T2	T3
	+	1+	2+	3+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
通道 #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26		

图25A
用于单一扫描穿过微流体通道出口的仿真的迹

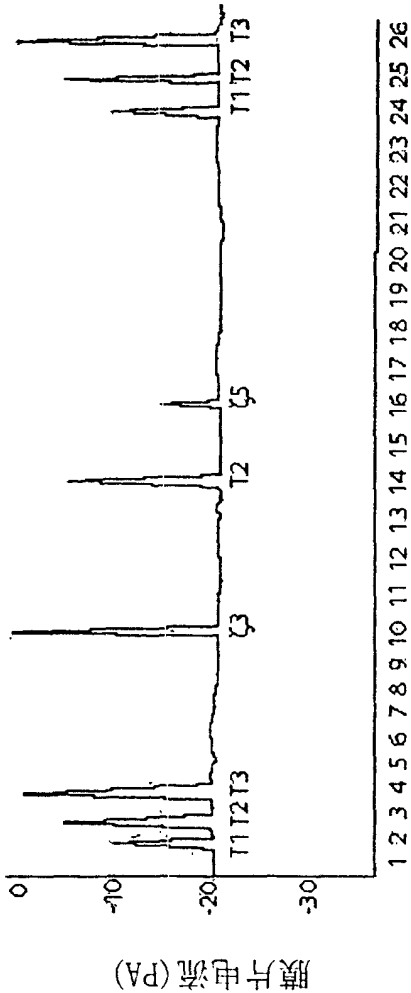


图25B

分数表（6扫描的平均峰值电流幅度）

受体响应	20	10	5	1	20	10	5	1	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
------	----	----	---	---	----	----	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

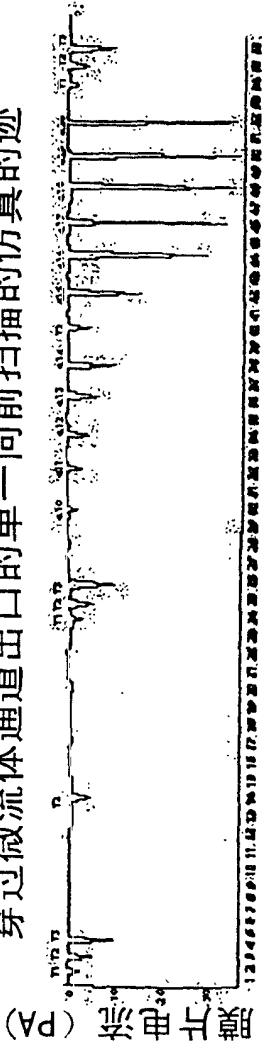
B=缓冲溶液
T1=在低浓度试验已知功效的化合物（拮抗剂）
T2=在中等浓度（接近EC₅₀值）试验已知功效的化合物（拮抗剂）
T3=在高浓度（饱和浓度）试验已知功效的化合物（拮抗剂）
ζ =未知功效的作用剂

图25C

通道内 内容	B	T1	T2	T 3	B	α 2	B	α 3	B	α 4	B	α 5	B	α 6	B	α7	B	α8	B	T1	T2	T3	B	α9				
通道#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
通道内 内容	B	T1	T2	T 3	α 20	B	α 19	B	α 18	B	α 17	B	α 16	B	α 15	B	T2	B	α 14	B	α 13	B	α 12	B	α 11	B	α 10	B
通道#	56	55	54	53	52	51	50	49	48	47	46	45	44	43	42	41	40	39	38	37	36	35	34	33	32	31	30	29

图26A

穿过微流体通道出口的单一向前扫描的仿真的迹



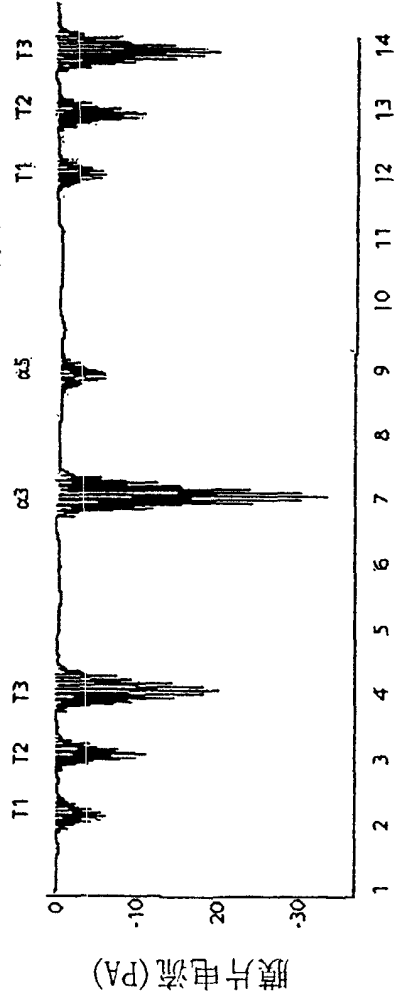
微流体通道数

图26B

通道内容	B	T1	T2	T3	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 6$	$\alpha 7$	T1	T2	T3
通道 #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

图 27A

用于单一向前扫描穿过微流体通道出口的仿真的迹



微流体通道数

图 27B

分数表（6扫描的平均峰值电流幅度）

受体响应	0	5	10	20	0	0	34	0	4	0	0	5	10	20
通道#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

B=缓冲溶液
T1=在低浓度试验已知功效的化合物（作用剂）
T2=在中等浓度（接近EC₅₀值）试验已知功效的化合物（作用剂）
T3=在高浓度（饱和浓度）试验已知功效的化合物（作用剂）
α =未知功效的作用剂

图27C