



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103143405 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 27

(21) 申请号 201310007921. 6

CN 1301965 A, 2001. 07. 04, 全文.

(22) 申请日 2008. 09. 22

CN 1305585 A, 2001. 07. 25, 全文.

CN 1491358 A, 2004. 04. 21, 全文.

(30) 优先权数据

07380258. 9 2007. 09. 20 EP

审查员 许远平

(62) 分案原申请数据

200880117091. X 2008. 09. 22

(73) 专利权人 艾莱恩微观系统有限公司

地址 西班牙多诺斯蒂亚

(72) 发明人 艾纳其·萨达巴查姆皮蒂尔德瑞比
斯

胡安·安东尼奥·配昂埃奎厄恩

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

B01L 3/00 (2006. 01)

G01N 21/31 (2006. 01)

G01N 33/86 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2007/025559 A, 2007. 03. 08, 全文.

权利要求书1页 说明书16页 附图11页

(54) 发明名称

确定流体凝结时间的微流体装置和方法

(57) 摘要

描述了确定诸如血液的流体介质的凝结时间的方法。该方法监测具有试剂的流体介质的蔓延并将其与理论值进行比较。当监测值偏离理论值时,确定凝结时间。

1. 确定流体介质中凝结时间的方法,其包括以下步骤:
提供至少包含以下的微流体装置:
 - 用于引入流体介质样品的器件 (1),
 - 与所述用于引入样品的器件 (1) 连接的区域,其允许所述流体介质沿所述区域内含有的微通道的长度流动;所述微通道至少部分地由亲水性材料覆盖,使得所述流体介质能够仅由毛细作用力驱动而流动,
 - 在所述区域开始处的部位,其包含能够与所述流体介质反应并起始凝结级联的试剂,将所述流体介质样品引入所述用于引入流体样品的器件 (1) 中,监测流体前缘的位置作为时间的函数 $L(t)$,
 - 提供不存在凝块时所述流体介质前缘蔓延的理论值作为时间的函数,
 - 其中所述凝结时间 CT 被确定为从反应起始时的时间到监测到的凝结函数 $L(t)$ 偏离所述理论值特定阈值时的耗用时间。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述流体介质为血液或血浆。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中当 $\log L(t)$ 相对于 $\log(t)$ 改变斜率时,认为所述监测到的凝结函数 $L(t)$ 偏离所述理论值特定阈值。
4. 如权利要求 3 所述的方法,其中函数 $Y = Y(u) = \log L(t)$ 由所述监测到的凝结函数 $L(t)$ 构成,是变量 $u = \log t$ 的变型,其中如果一阶导数 dY/du 偏离恒定值 0.5 特定阈值,则 $\log L(t)$ 相对于 $\log(t)$ 改变了斜率。
5. 如权利要求 3 所述的方法,其中函数 $Y = Y(u) = \log L(t)$ 由所述监测到的凝结函数 $L(t)$ 构成,是变量 $u = \log t$ 的变型,其中如果二阶导数 d^2Y/du^2 的衰减偏离 0 特定阈值,则 $\log L(t)$ 相对于 $\log(t)$ 改变了斜率。

确定流体凝结时间的微流体装置和方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用于测定流体介质凝结时间、特别是用于测定血液凝结时间的芯片实验室型 (lab-on-a-chip) 装置和方法。它还涉及与本发明的芯片实验室联合使用的测量装置,例如凝度计。

[0002] 发明背景

[0003] 健康个体中,血液粘度和稠度由称为止血的过程所调节。这种机制阻止从血管系统失血。

[0004] 血液凝固由终止体内发生的任何出血的复杂过程所调节。稳定的凝块通过凝血蛋白因子、血管和血小板的相互作用形成。该过程在愈合后继续,这时血液凝块被溶解。

[0005] 在凝块形成的第一阶段,血小板聚集,同时激活了称为血液级联的现象。这个过程中,可溶性血浆蛋白纤维蛋白原转化为不溶性血纤维蛋白网或血凝块。这种转化由凝血酶催化,该酶通常以其非活性形式即凝血酶原存在于血液中。

[0006] 血液病症起因于止血失衡。这些可以是遗传来源的,例如血友病或 Von Willebrand 病;由其它状况如抗磷脂抗体综合征、肠易激综合征或癌症所触发;或通过外源因素获得:患者口服抗凝剂治疗或预防血栓形成病症、心脏或血管疾病。

[0007] 诸如华法林的口服抗凝疗法被广泛使用,并且由于其窄治疗指数而需要频繁监测。应定期调整剂量,以避免血栓形成或出血风险。

[0008] 对于这些以及具有诸如不活动、肥胖、干预 (mediation)、或经历手术或牙科治疗的已知诱因状态的其他患者而言,使他们能在家中定期地监测血凝的可靠检测的可用性代表了对目前可利用的临床凝血检测的方便、快捷和廉价的替代手段。这类检测也可以用作止血病症诊断中的初步辅助手段。

[0009] 世界上最常用的凝结分析为所谓的国际标准化比率 (INR)。该比率通过凝血酶原时间 (PT) 计算,凝血酶原时间为从凝血剂激活到凝血开始所经过的时间。激活剂为组织因子或促凝血酶原激酶,这种机制称为“外源性”途径。由于组织因子 (其为生物学上获得的产品) 不同批次和制造商的差异,因而想出用 INR 使结果标准化。INR 为以国际敏感度指数 (ISI) 值 (针对所用的对照样品) 为幂的患者凝血酶原时间与至少 20 健康正常人的平均凝血酶原时间 (MNPT) 的比率。每一制造商都给出用于任何商品化的组织因子的 ISI,表明与国际标准化样品相比的具体批次组织因子情况。

[0010] 还有另一种但较不经常使用的分析类型,其由经由“内源性”途径的类似凝血机制构成,称为活化部分凝血酶原时间 (APTT)。这两种分析在本申请中都看作是凝结时间。

[0011] 在欧洲,这些分析传统上在实验室内进行,其中通常在确定 PT 之前需要制备血液样品。最近几年,出现了护士或医师直接使用或患者自主使用 Point-of-Care (POC) 装置或也称为 Nearly-Patient-Testing (NPT) 的装置的趋势,并在很大程度上替代了传统方法。

[0012] 最初开发的且在本领域中已知的方法需要通过静脉穿刺提取大体积或精确体积的血液,随后在进行检测之前处理血液以及需要专业人员实施该方法并分析结果。相反,也称为便携凝度计的 Point-of-care 凝度计需要通过手指穿刺获取全血血滴,并快速提供

INR 结果。

[0013] 专利申请 W092/21028 描述了基于铁磁性的检测方法。该装置包括凝结室和对照室，每一个都配备了搅拌叶片，它们在振动磁场中旋转。随着凝血开始并对叶片移动施加阻力，凝血室中叶片的旋转变慢。凝血时间测定为小室中搅拌叶片的相对移动有变化的时间。

[0014] 其它装置，例如美国专利 US5, 110, 727 中的那些，包含在其中分散了金属颗粒的血液样品。当施加振荡磁场时，诱导颗粒前后运动，其随着血液凝结而减慢。速度的降低与血液样品粘度的增加或凝结开始相关。

[0015] 专利申请 W000/06761 和 W002/48707A2 都描述了配备有与静止血液样品接触的电极的装置，并分别测量血液粘度增加时的电导率和电流变化。

[0016] W02004/059316A1 描述了用于确定血液凝结时间的低成本、一次性装置。该装置配备了至少部分地与流体接触的微传感器并测量血液凝结和流动停止时通道中血液的阻抗和电容。

[0017] 但是，与这些装置相关的高生产成本限制了它们作为一次性部件的应用。

[0018] 因此，仍亟需用于 POC 和 / 或 NPT 凝结时间确定的精确、低成本的一次性芯片和检测方法。

[0019] 由于材料科学以及电子和光学方法的进步，已有更小体积检测方面的进展，仅需要更少的和不可测量的全血样品（微升级别）。

[0020] 专利申请 W02007/025559A1 公开了用于确定血浆或全血样品中凝结的多层装置，其包括一个或多个检测区域，它们都具有至少一种凝结刺激试剂。

[0021] 专利申请 US2007/0122849A1 公开了微流体芯片中用于定量分析和检测分析物的样品测定结构。

[0022] EP0394070B1 描述了单毛细管通道的微流体装置，其优化了对体积为 40 μ L 且停留时间为 200s 的全血样品中的 APTT 的确定。该装置将用于活化部分凝血活酶时间测量的活化剂的混合物和磷脂混合物用作试剂。通过毛细管道采用的该检测方法为视觉的或光学的，例如 LED，并在血流沿该装置停止时确定 APTT。

[0023] US6, 900, 021 描述了微流体装置，其在体外进行该反应和各种化合物对细胞的影响的研究。采用泵、压力差或电场来控制流体流动，而不是通过微流体通道中的毛细管作用。有两个相交叉并与主流路汇合的输入流路，以使得反应能发生。因此，主流路不包括含试剂的区域。另外，试剂不存在于芯片中，而是在不同点和时间加入，这使得芯片能用于具有不同试剂的不同反应测定。

[0024] 尽管有这些进展，但是当前使用的 point of care 凝度计仍具有重大缺陷：

[0025] - 尽管所使用的芯片或测试条的大多数为一次性的，但是它们包括几种组件，例如收集血液样品的器件、测量电导率变化的器件或测量粘度变化的器件。诸如电化学触体或检测条中振荡颗粒的有源组件的存在使得一次性芯片的生产复杂且昂贵。另外，不能在不损害检测条质量情况下减小尺寸。

[0026] - 尽管在检测所需的血液样品的量方面有所进展，但是最佳情况下体积仍在 10 μ l 的范围，这对于患者仍是不方便的。相比而言这不够理想，例如与用于诸如葡萄糖测量的其它检测的量相比，葡萄糖测量可用 1 μ l 或更少的血液样品来精确地完成。

[0027] - 与已知检测条或芯片一起使用的检测和测量仪器仍相当复杂。在一些情况下，它

们需要其它的器件来传送或移动血液样品,例如磁场或泵。另一些情况下,该装置需要几个检测器件;需要校准芯片的测量样品中的某些性能变化的电化学或磁性器件,以及其它的检测器件来阅读其它的板上(on-board)质量控制系统。这增加了复杂性并由此增加了便携装置的成本。

[0028] 鉴于这些缺陷,本发明的目的是提供用于确定诸如血液或血浆的流体介质中凝结时间的微流体装置和方法,其仅涉及最少的步骤,成本低,并由此可由患者自主使用。本发明的另一目的是提供与该微流体装置一起使用的测量装置如凝度计,以便检测和监测样品的凝结时间以及存在于微流体装置中的质量控制,其易于制造、紧凑且可由患者自主使用。

[0029] 发明概述

[0030] 主题 1. 用于确定诸如血液或血浆的流体介质中凝结时间的微流体装置,所述装置包含:

[0031] - 用于引入所述流体介质样品的器件(1);其连接到分配毛细管通道(2);以及

[0032] - 与用于引入样品的所述器件(1)连接的第一区域(6a),其用于允许所述流体介质沿所述第一区域的长度流动;

[0033] - 在所述第一区域开始处的第一部位(5a),其包含能够与所述流体介质反应的试剂;

[0034] 所述装置的特征在于所述装置还包含:

[0035] - 也与用于引入样品的所述器件(1)连接的第二区域(6b),其用于允许所述流体介质沿所述第二区域的长度流动;

[0036] - 其中所述第二区域(6b)不包含能够与所述流体介质反应的试剂,或

[0037] - 其中在所述第二区域(6b)的开始处存在第二部位(5b),所述第二部位(5b)包含能够与所述流体介质反应的试剂,所述试剂不同于所述第一部位(5a)的试剂;

[0038] - 以及其中以从分配通道(2)开始的顺序,所述区域(6a)和区域(6b)的每个首先包含部位(5a)和部位(5b),以及作为扫描部位(8)的至少一个微流体通道。

[0039] 主题 2. 如主题 1 所述的微流体装置,其特征在于所述区域(6a、6b)的每个由至少一个微流体通道组成。

[0040] 主题 3. 如主题 2 所述的微流体装置,其特征在于所述微流体通道(6a, 6b)为毛细管通道,其中所述通道的表面为亲水性的,并且毛细管作为移动所述流体介质的唯一作用力而起作用。

[0041] 主题 4. 如主题 1 至 3 中任一项所述的微流体装置,其特征在于所述区域的每个包含用于排出的器件(7)。

[0042] 主题 5. 如主题 4 所述的微流体装置,所述用于排出的器件由用作停止流动阀的排出口(7)构成。

[0043] 主题 6. 如主题 1 至 5 中任一项所述的装置,其特征在于所述第一区域的所述第一部位由含有能够引发所述流体介质凝结的试剂的反应单元(5a)构成。

[0044] 主题 7. 如主题 1 至 6 中任一项所述的微流体装置,其特征在于所述第二区域的所述第二部位由含有能够抑制所述流体介质凝结的试剂的反应单元(5b)构成。

[0045] 主题 8. 如主题 1 至 7 中任一项所述的微流体装置,其特征在于所述装置还包含也与用于引入样品的所述器件(1)连接的第三区域,其用于允许所述流体介质沿所述第三区

域的长度流动,其中在所述第三区域的开始处存在含有能够与所述流体介质反应的试剂的第三部位,所述试剂不同于所述第一(5a)或第二(5b)部位的试剂。

[0046] 主题 9. 如主题 1 至 8 中任一项所述的微流体装置,其特征在于所述用于引入样品的器件由入口(1)组成,所述入口(1)通过后接通道分叉(3)的分配通道(2)与所述第一和第二区域(6a,6b)以及,如果第三区域存在的话,与第三区域连接,所述通道分叉将(4)分入所述第一、第二和任选的第三区域。

[0047] 主题 10. 如主题 1 至 9 中任一项所述的微流体装置,其特征在于所述第一、第二和任选的第三区域(6a,6b)为弯曲形状。

[0048] 主题 11. 如主题 1 至 10 中任一项所述的微流体装置,其特征在于所述第一、第二和任选的第三区域(6a,6b)由具有蛇形轨迹的通道组成。

[0049] 主题 12. 如主题 1 至 11 中任一项所述的微流体装置,其特征在于所述通道具有矩形横截面。

[0050] 主题 13. 如主题 1 至 12 中任一项所述的微流体装置,其特征在于所述通道由不同横截面的节段的组合组成。

[0051] 主题 14. 如主题 1 至 13 中任一项所述的微流体装置,其特征在于所述部位(5a)中的所述试剂为促凝血酶原激酶,且所述凝结时间表示凝血酶原时间。

[0052] 主题 15. 如主题 1 至 14 中任一项所述的微流体装置,其特征在于所述第一区域用作凝结通道(6a),且所述第二区域用作对照通道(6b),并且所述两个区域的每个具有相同结构。

[0053] 主题 16. 如主题 1 至 14 中任一项所述的微流体装置,其特征在于所述第一区域用作凝结通道(6a),且所述第二和第三区域用作对照通道,以及在于所述三个区域的每个具有相同结构。

[0054] 主题 17. 如主题 1 至 16 中任一项所述的微流体装置,还包含用于质量控制的光学特征。

[0055] 主题 18. 凝度计装置,包括

[0056] - 用于引入主题 1 至 17 所述的微流体装置的槽;

[0057] - 用于连续检测和 / 或监测所述区域的每个中所述流体介质的前缘位置和 / 或其速度的光学器件;以及

[0058] - 用于处理由所述检测和 / 或监测器件传输的数据以及用于确定所述流体介质的凝结时间的器件,

[0059] 其中所述光学器件还测量或读取所述微流体装置上的质量控制特征。

[0060] 主题 19. 如主题 18 所述的凝度计装置,其特征在于所述处理器件包括用于比较所述两个或三个区域的每个中的一种或多种所述性能的器件。

[0061] 主题 20. 如主题 18 至 19 中任一项所述的凝度计装置,其特征在于所述处理器件包括用于检测第一通道(6a)中一种或多种所述性能与第二通道(6b)和 / 或第三通道中的一种或多种所述性能之间的差异达到预定阈值的时间点的器件。

[0062] 主题 21. 如主题 18 至 20 中任一项所述的凝度计装置,其特征在于所述检测和 / 或监测器件包括用于照明所述区域的每个的器件和用于分析由所述区域的每个透射或反射的光的器件。

[0063] 主题 22. 如主题 21 所述的凝度计装置,其特征在于所述照明器件至少包括 LED 且所述分析器件至少包括光学传感器。

[0064] 主题 23. 如主题 22 所述的凝度计装置,其特征在于所述分析器件至少包括透镜。

[0065] 主题 24. 确定诸如血液或血浆的流体介质中凝结时间的方法,包括以下步骤:

[0066] - 将所述流体介质的样品引入主题 1-17 所述的具有第一和第二区域 (6a、6b) 的微流体装置,在所述区域中,允许所述样品沿长度流动;

[0067] - 在所述第一区域 (6a) 的开始处在部位 (5a) 中提供能够与所述流体介质反应的第一试剂 (5a);以及

[0068] - 在所述第二区域 (6b) 中在部位 (5b) 中不提供试剂或提供不同于所述第一区域 (6a) 中所述第一试剂 (5a) 的第二试剂 (5b),

[0069] - 用光学器件连续监测所述流体介质在所述第一区域 (6a) 和所述第二区域 (6b) 中的至少一种性能,

[0070] - 将所述流体介质在所述第一区域 (6a) 内的至少一种性能与所述流体介质在所述第二区域 (6b) 的至少一种相同性能或针对这种性能的理论值进行比较。

[0071] 主题 25. 如主题 24 所述的确定诸如血液或血浆的流体介质中凝结时间的方法,其特征在于对所述流体介质在所述第一区域中的至少一种所述性能的比较是针对所述流体介质在所述第二区域 (6b) 中的至少一种性能进行的。

[0072] 主题 26. 如主题 24 所述的确定诸如血液或血浆的流体介质中凝结时间的方法,其特征在于对所述流体介质在所述第一区域中的至少一种所述性能的比较是针对所述性能的理论值进行的。

[0073] 主题 27. 如主题 24 或 25 所述的确定诸如血液或血浆的流体介质中凝结时间的方法,其特征在于所述方法包括质量控制步骤,所述质量控制步骤包括使所述监测的性能与理论曲线相关联。

[0074] 主题 28. 制造如主题 1 至 17 中任一项所述的用于确定诸如血液或血浆的流体介质中凝结时间的微流体装置的方法,包括以下步骤:

[0075] - 提供第一基板;

[0076] - 在所述第一基板中形成对应于主题 1 至 17 中任一项所述的微流体装置的显微结构;

[0077] 提供第二基板;以及

[0078] 将所述第二基板密封在所述形成显微结构的第一基板的顶部,以使所述第二基板用作覆盖件。

[0079] 主题 29. 如主题 28 所述的方法,其中所述第二基板为亲水性膜。

[0080] 在第一方面,根据主题 1,本发明提供了用于确定诸如血液或血浆的流体介质中凝结时间的低成本微流体装置。

[0081] 在第二方面,根据主题 18,本发明提供了凝度计装置,其包括用于引入微流体装置的槽,检测和 / 或监测流体介质的至少一种性能的器件以及用于处理所述检测和 / 或监测装置传送的数据以确定所述流体的凝结时间的器件。

[0082] 在第三方面,根据主题 24,本发明提供了用于确定流体介质中凝结时间的方法。

[0083] 在其它方面,根据主题 28,本发明提供了制造用于确定流体介质中凝结时间的微

流体装置的方法。

[0084] 在其他主题中定义了本发明的有利实施方案。

[0085] 这样,本发明提供了用于确定流体的凝结时间的低生产成本和易于使用的改进微流体无源装置 (passive device),其因此可为一次性的。另外,本发明的微流体装置 (检测条)、测量装置 (凝度计) 和方法提供了以最少血液样品确定凝血酶原时间的精确手段,并因此可由患者容易和自主地使用,而无需静脉穿刺。

[0086] 本发明的这些和其它方面因下文描述的实施方案而显而易见且参照这些实施方案进行阐释。

[0087] 附图简述

[0088] 通过参照以下的附图,结合所附说明书,可更好地理解本发明,并且其多个目的和优点将对本领域技术人员而言更显而易见,其中:

[0089] 图 1 显示本发明装置的实施方案的分解立体图,显示了分开的两层。

[0090] 图 2 显示图 1 实施方案的装置的俯视图 (图的左边部分) 和侧视图 (图的右边部分)。

[0091] 图 2A 显示该微流体装置的另一实施方案的俯视图。

[0092] 图 3 显示凝结和对照通道中流动前缘位置重叠的图解表示。

[0093] 图 4 显示凝结和对照通道中流动前缘速度重叠的图解表示。

[0094] 图 5 显示图 1 实施方案中凝结之前的示意性流动前缘位置。

[0095] 图 6 显示图 1 实施方案中凝结之后的示意性流动前缘位置。

[0096] 图 7 显示血液相对波长的吸收系数。

[0097] 图 8 显示 LED 的发射光谱。

[0098] 图 9 显示经优化以检测绿光波长的光电二极管的响应曲线。

[0099] 图 10 显示在对凝结和对照通道的两不同尺寸芯片中检测到的相对时间的电流强度。

[0100] 图 11 显示图 10 的电流强度曲线的导数。

[0101] 图 12 显示图 1 实施方案的蛇形部分与像素尺寸 $19 \times 19 \mu\text{m}$ 的 CCD 阵列的重叠。

[0102] 图 13 至 16 显示用于通过理论曲线确定凝结时间的方程式方程式的曲线图。

[0103] 图 17 显示来自实际凝结检测的步骤 3 的典型数据以及根据理论方法 1 或 2 确定的凝结时间。

[0104] 所有这些图中,相似的参照数字指代相似的元件。

[0105] 发明详述

[0106] 本发明提供了用于确定诸如血液和血浆的流体的凝结时间的芯片或一次性检测条形式的装置,与本发明的检测条一起用作便携凝度计的测量仪器,以及采用本发明的微流体装置确定凝结时间的方法。

[0107] 作为 Point-of-care 装置的便携凝度计为沿四条主线改进的技术:成本降低、血液样品减少、质量控制和增强的便携性。所有这四个方面对于经济且可靠地推广患者自测都是特别重要的。

[0108] 本发明相对于目前的最新便携检测条和凝度计有显著优点:

[0109] - 成本降低:该一次性微流体芯片为极其简单 (无源) 的元件,其以高容量低成本

生产技术和材料制造。

[0110] - 血液样品减少:在必要的质量控制和准确性情况下,通过该微流体芯片技术可检测远少于 5 μ L 的血液样品。

[0111] - 质量控制:多种不同的板上质量控制可整合到本发明的一次性装置上并由单一的检测器件读取。另外,该装置允许将校准的血浆用作外部质量控制。

[0112] - 增强的便携性:该检测系统极其紧凑、低成本且可被植入薄便携装置上。

[0113] 本发明基于这样的事实,即适当的微流体通道允许诸如血液或血浆的流体样品的毛细流动,使得能用简单器件以无源方式精确监测流体前缘的位置或速度,而无需与样品流体接触。凝结级联开始后(当样品与凝结试剂接触时)样品流体的流变变化,特别是凝结终点时的表观粘度变化,对监测的动力学参数有显著影响。

[0114] 这些参数可用相同的简单检测器件进行监测,并与不含凝结试剂或含不同对照试剂的对照样品比较,或可选择地与预测的理论值比较。

[0115] 不希望被理论所束缚,我们认为本发明的微流体系统以某种方式模拟了血管的微毛细管结构和流动血液的动力学。由于血液凝结阶段(起始、扩大、播散和凝块形成)的复杂性和高灵敏性,尽可能地重现体内止血环境是非常有利的。根据来自芝加哥大学的发表文章 [Kastrup, C. J. Runyon, M. K. Shen, F. Ismagilov, R. F. Modular chemical mechanism predicts spatiotemporal dynamics of initiation in the complex network of hemostasis(模块化学机制预测止血复杂网络中起始的时空动力学), Department of Chemistry and institute for Biophysical Dynamics, University of Chicago, Edited by George M. Whitesides, Harvard University.], 体外微流体环境能够模拟人毛细血管中实际的血液凝结行为,他们证实这对于确定凝结时间是至关重要的。

[0116] 另外,本发明使得能连续监测流动动力学,这样能够检测止血分子变化,提供高准确性和重复性。具体地,由于微毛细管结构的尺寸,第一不溶性血纤维蛋白的形成对流变性能有明显影响。

[0117] 如图 1 显示的,在一个实施方案中,本发明的微流体装置为两层组装件,包括下方的平面基板和覆盖层。在下方的基板上,形成了样品分布系统的图案,得到一系列的通道或导管,其通过适当的器件经由一端连接至样品引入部位。

[0118] 这些通道通过毛细管作用引起流动。技术人员能够调整下方基板上形成的通道的大小和形式以获得能够准确监测的流动位置或速度。为了产生流体样品的毛细流动,通道中需要亲水性表面,以便导致了足够的负压。这种亲水性表面可存在于下方基板上或覆盖层上。

[0119] 在一个实施方案中,该下方的基板由塑料制成。如果该塑料是疏水的,则必须通过技术人员已知的手段在通道中形成亲水性,例如化学处理、化学涂层或等离子体处理,以获得期望的表面能或接触角。

[0120] 在优选的实施方案中,通过覆盖层来带来亲水表面,该覆盖层密封在下层上形成的微流体通道。在该实施方案中,或者将亲水性材料选作覆盖层,或者使用经上文所述的亲水性处理的材料。

[0121] 可选择地,在优选的实施方案中,通过用于使形成芯片的两层结合的粘合剂赋予上层亲水性能。这种情况下,重要的是所选的粘合剂涂料不与流体样品反应或不干扰凝结

反应。

[0122] 因此,覆盖层可以由各种类型的粘合剂聚合物膜组成,例如热封和压敏粘合剂。可采用亲水性制剂,在粘合剂中添加表面活性剂。优选硬粘合剂,以防止由于密封步骤期间的粘合剂流动或由于蠕变导致的通道堵塞。

[0123] 图 2 和 2A 显示了本发明微流体装置的不同实施方案的俯视图,所述装置包括下述的组件。

[0124] 用于引入流体介质样品的器件 (1),主要由入口组成。该入口连接至分配毛细管通道 (2),接着是通道分叉 (3),其将分配通道 (2) 分成第一 (6a) 和第二区域 (6b),它们允许所述流体介质沿所述区域的长度流动。任选地,该分配通道包含细胞滤器(仅在图 1 中绘出)。

[0125] 在优选的实施方案中,所述第一 (6a) 和第二 (6b) 区域具有相同结构。

[0126] 按从分配通道开始的顺序,所述区域 (6a 和 6b) 的每个包括最先的部位 (5a, 5b) 和至少一个微流体通道,其在本文中称为扫描部位 (8)。第一部位 (5a) 包含能够与所述流体介质反应的第一试剂,并使得区域 (6a) 中的微流体通道用作反应通道,而第二部位 (5b) 或者是空的,或者含有不同试剂,这样区域 (6b) 中的微流体通道用作对照通道。优选地,所述第一试剂能够引发所述流体介质的凝结。

[0127] 在另一实施方案中,在芯片中存在两个以上的区域。所述区域之一用作以上解释的反应通道,其它两个或多个为对照通道。

[0128] 对于板上质量控制 (on-board quality control),血液样品可以沿对照通道被毛细作用驱动,对照通道中反应室具有提供已知且固定(或小范围)的凝结时间的特定试剂。例如,可以引入两种类型的此类对照,标准化对照和异常对照,为凝结时间提供较低和较高参照。

[0129] 对照通道具有与存在于反应通道中的试剂不同的试剂组成。

[0130] 因此,在一个实施方案中,存在标准化的对照通道,其中存在的试剂能够是例如至少一种维生素 K 依赖的凝结因子。这类凝结因子可来自正常患者血浆的干燥或冻干合并池(pool)。

[0131] 在另一实施方案中,存在异常对照通道,其包含凝结因子抑制剂,例如肝素、柠檬酸盐、草酸盐、EDTA 等。另外,它能够包含与标准化对照通道中相同的维生素 K 依赖的凝结因子。

[0132] 以下举例说明优选的实施方案,描述了区域数目和它们的功能:

[0133] ■ 2 个区域:相对于无凝结剂或具有凝结抑制剂的对照通道,一个反应通道用于血液样品凝结时间确定。

[0134] ■ 2 个区域:用于通过理论曲线确定血液样品凝结时间的一个反应通道,以及提供标准化凝结时间的一个对照通道。

[0135] ■ 3 个区域:相对于无凝结剂或具有凝结抑制剂的对照通道,一个反应通道用于血液样品凝结时间确定。另外,另一对照通道提供标准化的凝结时间。

[0136] ■ 3 个区域:一个反应通道用于通过理论曲线比较来确定血液样品凝结时间。另外,一个对照通道提供标准化的凝结时间,另一对照通道提供已知的异常长的凝结时间。

[0137] 所有这些实施方案和其它的对技术人员显而易见的变体都包括在本发明中。

[0138] 在本发明的装置中,流动仅由毛细作用力驱动,因此该芯片或检测条为无源装置,无需外力。亲水性通道表面使得湿弯月面沿通道移向毛细管负压,而去湿弯月面保持在入口处。通过产生疏水表面或通过设计适合的通道开口而让流动在停止阀处停止。在优选的实施方案中,每一区域(6a, 6b)含有用于排出(venting)的器件(7),最优选排出口,其还用作停止流动阀。尽管在图2中绘制在通道的末端,但是排出口(7)可以位于沿微流体通道的其它位置处。例如,在反应室出口处将排出口(7)与流动停止件连接使得毛细流动达到该点处的速度最大化,如图2A中所显示的。在其它实施方案中,每一通道具有一个以上的排出口(7),这些排出口(7)使得能控制并调节流体的速度和流动性能。

[0139] 当流体介质经过第一(6a)、第二(6b)和任选的第三区域的扫描部位(8)时,监测流体介质的至少一种性能,优选流体前缘的位置或速度。比较所述不同区域内的所述性能使得能检测到第一区域(6a)内反应发生的时刻,并确定流体样品的凝结时间。这些区域优选为毛细管通道。

[0140] 由于系统尺度缩小,这种装置的工作原理依赖于微流体学,其控制原理完全不同于传统的流动理论。

[0141] 控制原理

[0142] 等截面毛细管的牛顿行为下的动态填充可通过体积流率 Q 来确定,其依赖于粘度 η ,总流阻 R_{FR} 以及湿(前)和去湿(后)弯月面之间的压差 ΔP :

$$[0143] \quad Q = \frac{1}{\eta} \frac{\Delta P}{R_{FR}} \quad (1)$$

[0144] 对于长度“L”和矩形横截面A,宽度“a”和深度“b”的通道,流阻 R_{FR} 可表示为:

$$[0145] \quad R_{FR} = \left[\frac{1}{12} \left(1 + \frac{5a}{6b} \right) \frac{AR_H^2}{L} \right]^{-1} \quad (2)$$

[0146] 其中“ R_H ”为水力半径,定义为 $R_H = \frac{ab}{2(a+b)}$ 。

[0147] 为了确定 $L=L(t)$,即相对于时间的流动前缘位置,需要将方程式(1)对时间求积分。因此,L和计算为L对时间的导数的速度表示为:

$$[0148] \quad L(t) = \sqrt{\frac{2\Delta P \left(\frac{1}{12} \left(1 + \frac{5a}{6b} \right) \right) R_H^2 t}{\eta}} \quad (3)$$

$$[0149] \quad \frac{dL}{dt} = \sqrt{\frac{\Delta P \left(\frac{1}{12} \left(1 + \frac{5a}{6b} \right) \right) R_H^2}{2\eta t}}$$

[0150] 这些是凝结前的控制流动方程,因为粘度被认为是恒定的。当开始凝结时,粘度为时间的函数,具有指数增长,这样根据方程式(1),线性反比于粘度的流动速率将出现突然下降。基于可变的粘度在数值上确定曲线 $L(t)$ 和在其它截面中显示的导数。

[0151] 根据方程式(1)至(3),可能产生通道长度的初步设计,该长度需要允许恒流直至最高凝结时间。等截面管道的样品体积“V”可按下式估计:

$$[0152] \quad V = a b L(t) \quad (4)$$

[0153] 因此,必须根据通道的几何参数 a、b 和 L 以及所需的样品体积和最大凝结时间来设计该装置并选择通道大小。

[0154] 通过理论曲线确定凝结时间

[0155] 在本发明的一个实施方案中,利用流动动力学持续监测,可通过将测量的样品性能与理论预测值进行比较来确定或控制凝结时间。

[0156] 由于凝结前的动力学行为被很好地预测,所以凝结时间可确定为监测到的凝结曲线偏离方程式 (3) 的理论曲线特定阈值的时刻。可应用几种数学运算,使得这种偏离仅依赖于定性的流动动力学行为而不是定量的流动动力学行为。两种不同但类似的方法描述如下:

[0157] 方法 1:

[0158] 步骤 1:

[0159] 根据计算牛顿行为下毛细管长度的方程式 (3), $L(t)$ 为时间的幂函数。从 $L(t)$ 和从检测系统得到的 t 值开始,可构成以下曲线:

$$[0160] \quad L(t) = Kt^{0.5} \quad (5)$$

[0161] 该监测曲线(凝结通道)和理论曲线绘制在图 13 中显示的图中。

[0162] 步骤 2:

[0163] 对上述表达式两边取对数,得到 0,5 斜率的线性曲线(还参见图 14 的图):

$$[0164] \quad \log L(t) = \log K + 0.5 \log t \quad (6)$$

[0165] 定量项为 $\log K$, 定性项为 $0.5 \log t$ 。

[0166] 步骤 3:

[0167] 通过改变变量 ($u = \log t$), 可定义新函数 $Y = Y(u)$, 并相对 u 对其求微分(还参见图 15 的图):

$$[0168] \quad Y(u) = \log K + 0.5u \quad (7)$$

$$[0169] \quad \frac{dY}{du} = 0.5 \quad (8)$$

[0170] 步骤 4:

[0171] 进行 Y 关于 u 的二阶微分(图 16):

$$[0172] \quad \frac{d^2Y}{du^2} = 0 \quad (9)$$

[0173] 速度($\frac{dY}{du}$)或加速度($\frac{d^2Y}{du^2}$)曲线中从恒定值的衰减超过预定阈值确定凝结时间。

上述运算为允许仅通过一个独立的凝结通道确定凝结时间的算法的数学基础。

[0174] 本发明的微流体芯片的设计使得流动的血液在凝结前具有主要牛顿行为。偏离这种行为仅是由于假塑性效应,其能够在低流速时出现。如果出现这种情况,仍可应用该方法并相当有效,因为这种假塑性效应比凝结效应弱得多,在加速度曲线上能够区分开。

[0175] 方法 2:

[0176] 用于确定理论凝结时间的另一种且类似的数学方法简单描述如下。从相同的原始数据即步骤 1 获得的 $L(t)$ 和 t 值开始,可构成以下的曲线

$$[0177] \quad \eta\alpha \frac{L^2}{t} \quad (10)$$

[0178] 该曲线与粘度 (η) 成比例,这可从方程式 (3) 得到。以下的步骤 (2、3 和 4) 如同上文应用 (即取对数,一阶导数和二阶导数),这样可构建速度和加速度曲线。

[0179] 基于实际检测数据,两种方法大体上给出相同的凝结时间 (PT)。如图 17 的图中所显示的,在基本上所有监测曲线中发现的出人意料的结果是最早未预料到的行为,其与凝结效应相反,参见术语“反演”下两曲线中突出显示的部分。这种效应实际上是约 1 或 2 秒期间的瞬时粘度下降,其总是恰在凝结时间前被观察到。这种行为提供了更简单的凝结时间鉴定,因为 PT 时刻由此成为了清晰的拐点,无论是方法 1 中的最大值还是方法 2 中的最小值。尽管这种出人意料的行为的原因还是未知的,但是一些证据提示这可能是由于与 Fahraeus-Lindqvist 效应结合的纤维蛋白不溶性单体的形成,其在纤维蛋白聚合物形成之前降低表观粘度。

[0180] 除了凝结时间确定之外,以上描述的理论方法还可用于质量控制,通过将检测曲线与理论预测相关联来进行。在正规操作者 (即非患者误用) 和正确的装置条件下,凝结前的血样样品流动应接近于上述线性行为。任何与这种行为的明显偏离都可以通过流动监测系统 and 处理器进行检测并处理,提供了测试取消指令。

[0181] 根据优选的实施方案,该流体介质为血液,优选来自患者手指穿刺的毛细血管全血,并且具有已知凝结时间的已校准的血浆可被用于外部质量控制。能够与所述流体介质反应的试剂为凝结试剂,更优选组织因子或促凝血酶原激酶。

[0182] 这种情况下,本发明的装置和方法特别适合于确定凝血酶原时间,即凝结激活和开始凝结之间经过的时间。

[0183] 可根据标准 INR 值设计该装置;所建议的最高 INR 范围约为 8,这也意味着 PT 约 100 秒。达到这种最大 INR 所需的尺寸显示在表 1 中。如之前所提到的,不同管道设计所需的尺寸和总体积“ V_t ”由方程式 (3) 控制。

[0184]

	a (mm)	b (mm)	L (mm)	V_t (μ L)
微流体设计	0.08	0.08	150	1.0
微流体设计	0.125	0.125	250	3.9
居中设计	0.5	0.5	500	125
传统设计	1	1	700	700

[0185] 表 1. 不同导管设计达到这种最大 INR 范围 (100sec) 所需的长度和总体积“ V_t ”。

[0186] 该表证实,通过简单地将流体设计缩小至微尺度,可仅通过血滴就达到标准 INR 范围。

[0187] 本发明通道的形状和尺寸使得能确定不超过 15μ l 血液样品的凝结时间,并且当所有的线路都填充时所分配的总体积少于 10μ l,这允许剩余的体积在入口内,这为将去湿弯月面固定在入口处所需。该微流体通道允许连续流动,持续几秒到超过上百秒,使得能在

大时间范围进行 PT 确定。因此,本发明的芯片和方法使得能以少量血液样品(优选少于 $10 \mu\text{l}$,更优选少于 $5 \mu\text{l}$,且最优选以约 $1 \mu\text{l}$ 或更少量进行)测量精确凝结时间和进行 INR 测定。对于方便患者而言这是非常重要的。

[0188] 毛细管通道 (6a,6b) 的长度应该足够大,使得试剂与流体的反应能在流体前缘到达通道末端之前完成。在优选的实施方案中,该毛细管通道 (6a,6b) 为弯曲形状,最优选具有蛇形路线,以便在保持了通道长度的同时使该装置的面积最小。

[0189] 由于制造限制,优选的通道横截面为矩形的,允许纯粹 2D 几何形状,这简化了模塑制造工艺。具体的尺寸必须仔细计算,因为流动动力学和所采用的总体积对通道尺寸非常敏感。如本文中所显示的,远超过 $100 \mu\text{m}$ 的尺寸值需要非常大的通道长度以允许流动持续时间长至最大凝结时间,并需要更大的血液样品体积。采用微流体设计,或换言之,采用约 $100 \mu\text{m}$ 或更小的通道横截面尺寸,通道长度能够降低,并且血液用量少。另外,芯片尺寸及其成本也大大降低。

[0190] 优选地,反应和对照通道具有 $a=b$ 的横截面。这种情况下,a 和 b 优选 30 至 $125 \mu\text{m}$,更优选 50 至 $100 \mu\text{m}$,甚至更优选约 $80 \mu\text{m}$ 。

[0191] 含有试剂的部位(优选为反应单元)的尺寸也必须适合于允许足够体积来分配液体状态的试剂。另外,该设计还必须如此定义,以使得扩散时间允许达到足够的试剂浓度,以便使激活的血液体积最大化。这可通过最大化反应室内的表面积与体积的比率来实现。优选地,该足印室 (footprint chamber) 设计应为环形的,以适合于小滴分配形状,尺寸为直径 1 至 4mm,高度 40 至 $150 \mu\text{m}$ 。更优选地,该直径为约 1.5mm,高度约 $80 \mu\text{m}$ 。

[0192] 分配通道的高度尺寸优选 $150 \mu\text{m}$ 至 $350 \mu\text{m}$,更优选约 $250 \mu\text{m}$ 。

[0193] 血液入口优选是分配通道上芯片边缘处覆盖层和基础底层之间留下的间隙,因此可具有所述分配通道的高度。分给分配通道的体积应稍大于分给在随后的毛细结构中的体积,这样一旦分配通道完全填充了流体,它不会变空。该体积规定了最小监测样品体积要求。

[0194] 为了满足结构要求和尺寸限制,可通过改变微流体通道的横截面,例如通过让微流体通道的节段变窄或通过引入逐渐变细的微流体通道,通过引入无源流动控制阀来改变流动速率 Q 。

[0195] 微流体装置的操作

[0196] 本发明要求向入口添加血液或血浆样品,经该入口血液或血浆进入样品分配通道,沿该通道该相同的血液或血浆样品分流进反应/凝结通道和一个或多个对照通道。

[0197] 在血液凝结前的时间 t_m 时,通道内的流动前缘位置可表示如下,

[0198] $L=L(t_m)$

[0199] $L'=L'(t_m)$ (11)

[0200] 其中 L 和 L' 分别为凝结和对照位置。时间 $t=0$ 为流出凝结通道的反应室的时刻,因为其是为组织因子或促凝血酶原激酶溶解并启动反应机制的时刻。

[0201] 分流具有几乎相同的运动动力学,直至凝结通道中开始凝结。最早血液凝结发生时的这个时刻被鉴定为凝血酶原时间,并导致粘度的突然增加。这时,沿凝结通道的流动动力学相对于对照通道减速。通过持续监测 (8) 作为时间函数的流动前缘位置,可计算该位置对时间的导数,这可认为是流动前缘速度。

[0202] 在图 3 中,显示了如何鉴定两通道中的流动前缘位置和凝血酶原时间。采用以下的假设在数值上计算这些曲线,其中变量 a、b、 η 和 PT 具有前文指出的含义, γ 为血液表面张力:

[0203]	γ (N/m)	0,05589	接触角	35
	a (m)	0,000125	η (Pa s)	0,003
	b (m)	0,000125	PT	25s

[0204] 表 2. 用于数值计算的假设。

[0205] 在 PT 之前,通道之间的差异应极小,仅受非均一的环境条件、制造公差和检测噪声的影响。优选对时间的导数曲线,因为其对粘度变化更敏感,其可以被称为流动前缘速度。类似地,在 PT 之前的时间 t_m 时,监测的凝结 (V) 和对照 (V') 的速度将为:

$$[0206] \quad V=V(t_m)$$

$$[0207] \quad V'=V'(t_m) \quad (12)$$

[0208] 这些曲线显示在图 4 中。

[0209] 可通过定义用于速度差 $V(t_m)-V'(t_m)$ 的适当阈值“ Δ ”来确定 PT。在 PT 之前,粘度是恒定的,流动前缘位置和速度具有较小差异,如图 5 中示意性显示的。

[0210] 在时间 t_p 时,速度差刚刚超过阈值(见图 6),该时刻为 PT。

[0211] 检测器件

[0212] 对于连续检测或监测流动前缘运动,可采用 $L=L(t)$ 或 $v=v(t)$ 差异检测技术:

[0213] ●通过光电二极管检测

[0214] ●通过诸如电荷耦合器件 (CCD) 或互补金属氧化物半导体 (CMOS) 的光学传感器检测。

[0215] 在图 7 中对血液吸收系数作图。可以看出它特别地在 400nm 处吸收,也在绿色 (530nm) 附近吸收。

[0216] 通过光电二极管检测

[0217] 以 LED 照明蛇形部分,并以光电二极管检测透射光。移动的流动前缘线性地增加吸收,因此检测到的强度相应地减少。采用信号放大器,监测微小的流动位置增量是可能的。

[0218] 在下文中,进行了一些计算来评估采用标准低成本元件进行这种监测方案的可行性。

[0219] 选择容易从分销商获得的 LED 和光电二极管,二者都是低成本的。

[0220] 该 LED 具有 3mm 大小,并在 20° 角内发射。强度为 $15000\text{mcd}=0.0309\text{Watts/str}$,这样当采用完全 20° 立体角 (0.095str),总的发射功率达到 0.00294。

[0221] 该 LED 的发射光谱和光电二极管的响应曲线可显示在图 8 和图 9 中,其中该光电二极管是标准的硅光电二极管,但也能被优化以检测绿色波长。

[0222] 在这些假设下,以及通过进一步获得扫描部位 (8)、通道尺寸和来自图 3 的实际 $L(t)$ 曲线,可获得光电二极管检测到的强度信号。为了简明,还假设芯片优选为透明的并且不发生 Fresnel 反射。绘制在图 10 中的强度信号也包含 20picoA 的暗电流随机噪声模拟,如制造商所说明的。该曲线对应 $250 \times 250 \mu\text{m}$ 的通道截面。通过计算强度信号对时间的导数,可获得与流速成比例的信号,如图 11 中所显示的。

[0223] 通过两幅显示的图(图10和11),证实流动前缘监测是可行的,并具有足够高的灵敏度,这可从可忽略的影响该曲线的噪声推断。另外,光电二极管的时间响应非常高,其允许高至10MHz的频率取样,而放大器自身限于10KHz。这些值超出精确监测所需频率(约20Hz)几个数量级。

[0224] 通过光学传感器检测

[0225] 采用这种检测方案时,该系统使用相似的构造,但替换了检测装置。这种情况下,我们使用CCD或CMOS传感器,这样通过处理高频测绘扫描表面后获得的数据来获得流动前缘位置。

[0226] 该LED系统可与前一方案中定义的相似。有趣的是,这种情况下不需要高灵敏度,因为CCD内的每一单元或像素是用于检测该位置是否存在流动。如图12中所显示的,通过将标准的CCD有效部位与蛇形部分叠加,测绘的图像将使得能鉴定流动前缘位置,具有足够的分辨率和时间响应(>1KHz)。

[0227] 这种技术需要图像数据处理,以便从模糊图像能够鉴定弯月面位置。这增加了监测系统的复杂性,但是,与光电二极管检测方案相反,每一单元或像素的灵敏度是较不严格的,在这个意义上其有利于CCD检测方案。

[0228] 为了改善检测信号质量,可整合进诸如透镜的光学器件。现在可用非常低的成本得到商品化刚性模块(rigid blocks)、整合透镜和传感器,例如向汽车行业供应的小型照相机。这些模块测量仅数毫米,因此使得能非常紧凑且非常薄地整合进便携系统,例如便携凝度计。

[0229] 通过带有嵌入软件的微处理器处理检测的信号。生成动力学流动数据曲线,并且将算法用来确定凝结时间,以及用于各种质量控制。

[0230] 如之前所阐释的,本发明的芯片(检测条)和方法具有另一显著优点,因为该相同的检测器件可用于监测相同的流体流动和用于执行各种质量控制任务。

[0231] 当通过人工视觉系统来提供检测器件时,诸如CCD/CMOS传感器或显微照相机,一般用在用于凝度计的检测条中的三种主要质量控制可通过这种视觉系统的视野图像处理来进行:

[0232] 用于稳定性监测的板上环境条件指示剂:诸如温度和湿度的环境条件能够通过针对这些因素的颜色敏感化合物来监测。所选择的化合物遇到温度和湿度阈值时经历不可逆的颜色变化,发出缺陷芯片的信号。它们也可被直接添加至反应室上、底部基板上或覆盖层表面上,处于检测器的视野下。不同的敏感化合物组合可被用于该目的。这类化合物的实例为感觉温度化合物:隐色染料类(Leuco dyes),恶嗪类,结晶紫内酯,酚酞等。金属盐作为感觉湿度化合物:氯化钴、硫酸钙等。N氧化物或亚硝基化合物既是温度又是湿度感觉化合物。

[0233] 这将允许测量装置(例如便携凝度计)能使患者获悉该监测芯片未通过质量控制,应抛弃。

[0234] 外部质量控制:可商购的用于进行INR和PT检验校准的具有已知凝结时间的校准的血浆可被用于外部质量控制,这样可评估整个便携凝度计系统。在该实施方案中,调整人工视觉系统以便能检测流动血浆。尽管血浆为近乎透明的流体,但几乎不需要调整照明led系统和成像处理以有效跟踪血浆流动,因为流动的血浆被识别为沿明亮通道前进的灰色阴

影。

[0235] 打印的库德巴码 (Codebar) :打印的代码带有校准数据、可追溯数据和有效期限以及其它相关信息。用于这种类型检测条的数毫米大小标准数据矩阵编码可被打印在芯片的覆盖层上或透明标签上。

[0236] 以上描述的适合的检测和 / 或监测器件包括在外部装置 (凝度计) 内,该装置包括用于接收本发明的微流体装置的槽并设计为与所述微流体装置协作。

[0237] 另外,该外部装置包括用于处理由检测和 / 或监测器件输送的数据的器件,并生成信号输出至显示器件。

[0238] 制造

[0239] 本发明的微流体装置可容易地用当前的塑料复制技术和组装技术制造。该组装件由两密封的元件形成:在其上形成微流体结构的下方基板,以及上方基板或覆盖件,如图 1 中所显示的。

[0240] 同时适用于该装置的下方基板和覆盖层的材料有多种聚合物、热固性和 / 或热塑性材料,它们应具有良好的光学性能和良好的尺寸稳定性。例如,可采用 COC、PMMA、PC、PSU、SAN、PETG、PS 和 PP。

[0241] 大多数的聚合材料是疏水性的。因此,如果选择了强疏水材料作为形成微流体结构的基板,则随后赋予亲水性的某种表面的生产步骤是必要的,如之前所阐述的。为此,建议亲水性或至少不疏水 (接触角 $<90^\circ$) 的塑料。对于 PMMA、醋酸纤维素、PC、COC 和 PS 以及其它公知的材料就是如此。特别优选的一种材料是 PMMA,这是考虑到其良好的接触角、光学性能和尺寸稳定性。

[0242] 下方基板可用目前可利用的多种技术容易地复制,并且具有极高精确性,允许低的微特征公差。用于所述图案形成步骤的当前最相关技术为显微注射模制、热模压和软蚀刻印刷 (soft lithography imprinting)。

[0243] 密封步骤可采用多种公知的技术进行,例如热压粘合、粘结剂粘合、等离子体活化的粘合、超声粘合、激光焊接等。

[0244] 覆盖件优选亲水性膜。其优选透明的,以便能精确监测流体流动。如上文所阐述的,亲水性膜提供了非常有成本效益的方式,其使得能同时密封和让通道亲水化,避免了表面处理步骤。这种情况下,生产技术由标准的层压工艺组成,其可要求压力和温度控制。其它的生产技术为压花或压制工艺。

[0245] 如上文所描述的,反应室可以分配多种干 - 试剂化合物用于多种目的。主要的化合物为起始凝级联的促凝血酶原激酶。由于反应室的小尺寸,可添加高性能的化合物而不明显增加生产成本。

[0246] 由于它们的化学纯度,人促凝血酶原激酶重组蛋白在溶解性和灵敏度方面有极其有用的性能。前一性能传统上通过使用特异添加剂来增强。在本发明的设计下,可分配几分之一微升的人重组因子,在溶解性和灵敏度方面显示出极好的结果。

[0247] 多种添加剂在干燥试剂的合理功能方面起作用。它们不仅被用于快速增溶,还用于控制扩散参数,改善制造步骤和试剂稳定性,或用于解决以下问题:

[0248] a) 对摄取液体入干燥试剂进行调节:简单聚合物如羟丙基纤维素、聚乙烯醇、聚乙二醇等。

[0249] b) 快速增溶、稳定剂和缩短干燥过程：白蛋白、谷氨酸盐、糖类（例如葡萄糖、蔗糖、海藻糖等）等。

[0250] c) 可控的润湿性：Triton、Macol、Tetronic、Silwet、Zonyl、Pluronic 等。

[0251] d) 用于监测稳定性和用于分配对照的颜色指示剂：隐色染料作为感觉温度化合物（恶嗪类，结晶紫内酯、酚酞等）。金属盐作为感觉湿度化合物，如氯化钴、硫酸钙等。N 氧化物或亚硝基化合物同时作为温度和湿度感觉化合物。

[0252] e) 增强环境条件稳定性：有机汞化合物如硫汞撒（Thimerosal）等。

[0253] f) 其它用于各种功能的化合物：聚凝胺（Polybrene）（抗肝素剂）和缓冲剂。

[0254] 所述干燥试剂可通过多种公知的技术应用至反应室或应用在覆盖基质上：液滴分配、凝胶分配、喷射分配、丝网印刷、刮刀涂布、选择性喷雾和薄膜铸塑。该分配步骤之后为干燥步骤。

[0255] 优选地，干燥试剂以液体状态分配在反应室上，形成占反应室大部分的小滴，干燥后成为薄的干燥试剂层。

[0256] 有利的是，制造方法和由此形成的芯片（检测条）极其简单，无需嵌入元件，如电极或任何形式的多层结构。实际上，本制造技术允许低成本生产，这样可生产廉价的一次性装置。

[0257] 本发明通过其微流体设计提供了非常灵敏和精确的凝结时间测定手段。凝结时间（例如凝血酶原时间）涉及不溶性血纤维蛋白分子开始聚合的时刻，此后产生形成凝块的“网”。一般几微米数量级的血纤维蛋白聚合物的形成导致流动血液的表观粘度突然增加，特别是当通道横截面变得如同当前的微流体设计那样微小时。就精确性和灵敏度而言，这种装置相对于之前的用于凝结时间测定的装置提供了上述优点。

[0258] 另外，本发明芯片与测量装置的组合提供了组合的优势。使用单一的光学检测器件使得能同时检测流体流动变化和进行不同的质量控制。这意味着该便携测量装置将会是较不复杂和更紧凑的，采用标准元件。事实上，该测量装置可具有移动电话的大小。相对于之前的装置，特别是那些基于血液流动的装置，还在精确性和灵敏度方面有显著改善，因为使得流动监测以高频率取样持续进行。以此方式，可精确地确定凝块形成对血液流动有最初减速作用的时刻。

[0259] 本领域技术人员会意识到，本申请中描述的新颖概念可在多种应用中改进和变化。

[0260] 因此，授予专利权的主题的范围不应限于任何所讨论的具体示例性教导，而是由以下的权利要求书所限定。权利要求书中的任何参照标记不应认为是对其范围进行限制。

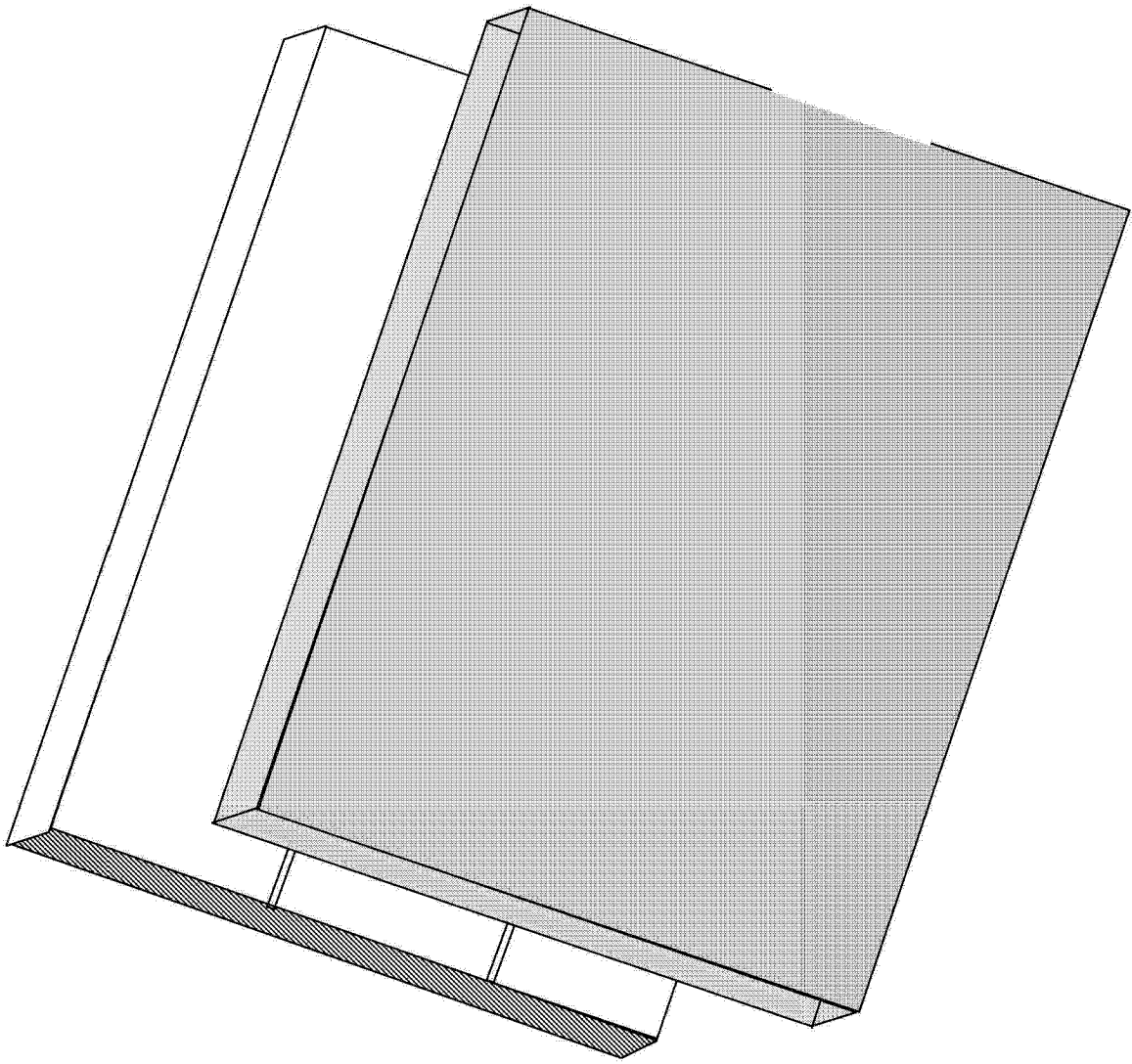


图 1

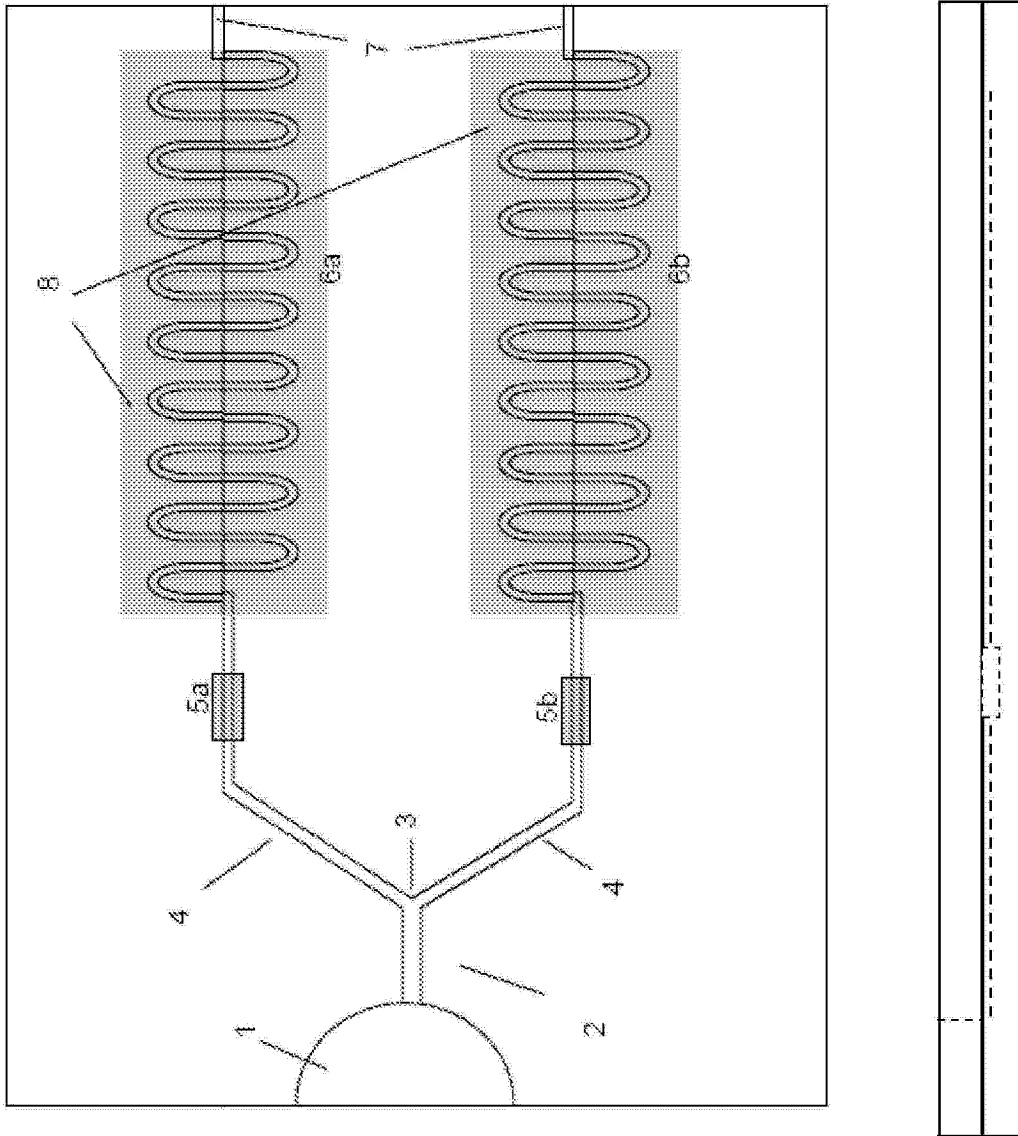


图 2

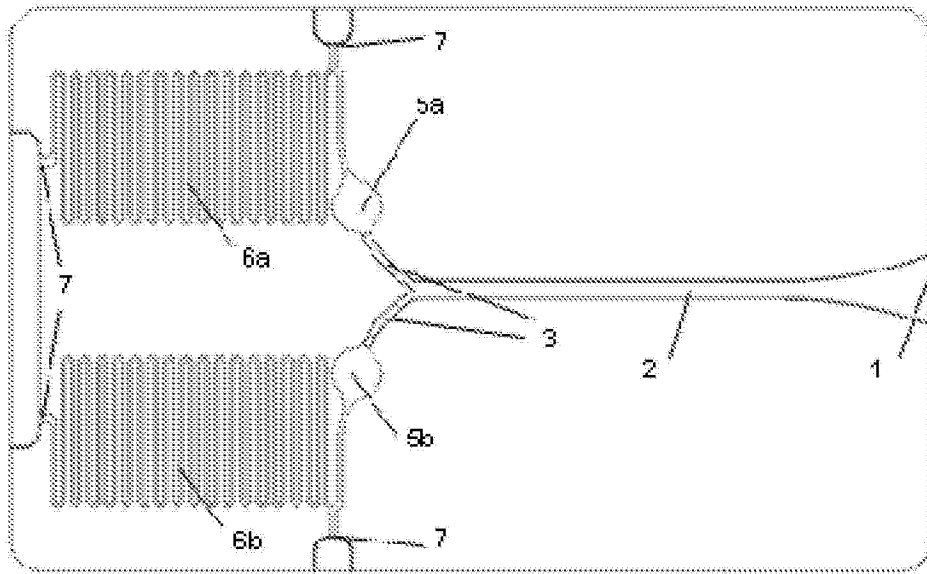


图 2A

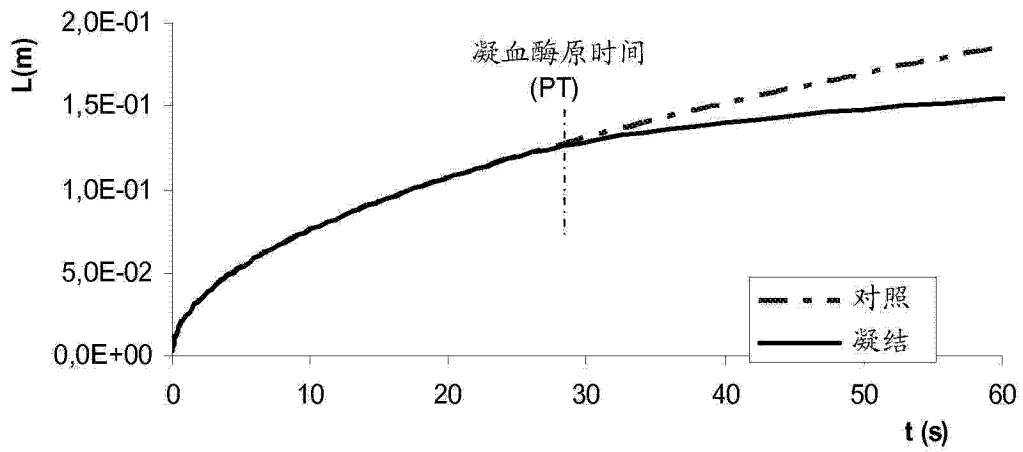


图 3

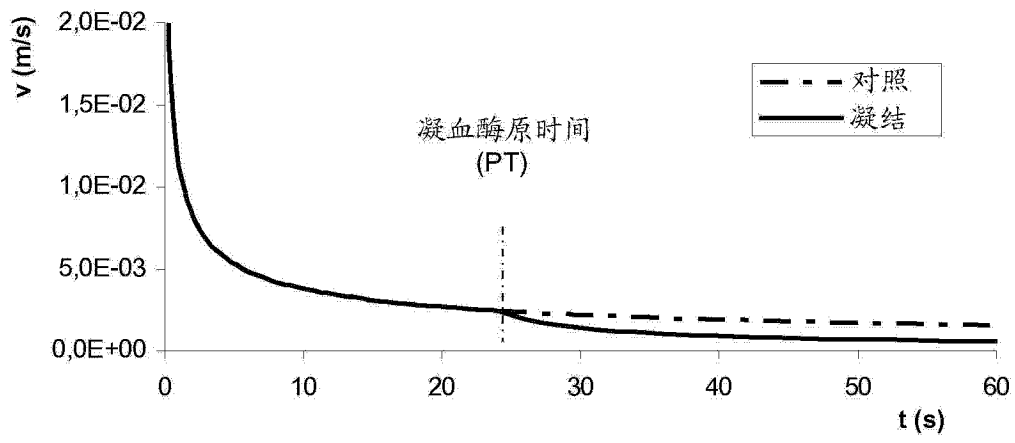


图 4

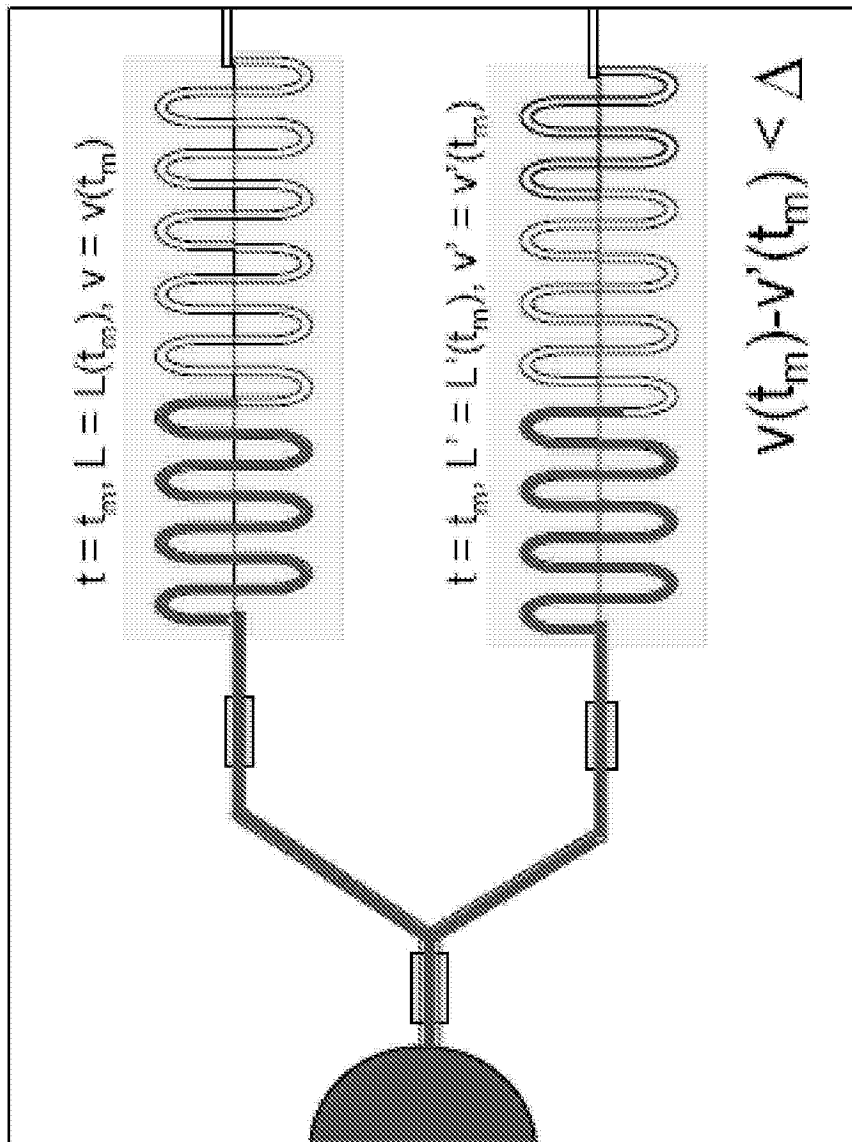


图 5

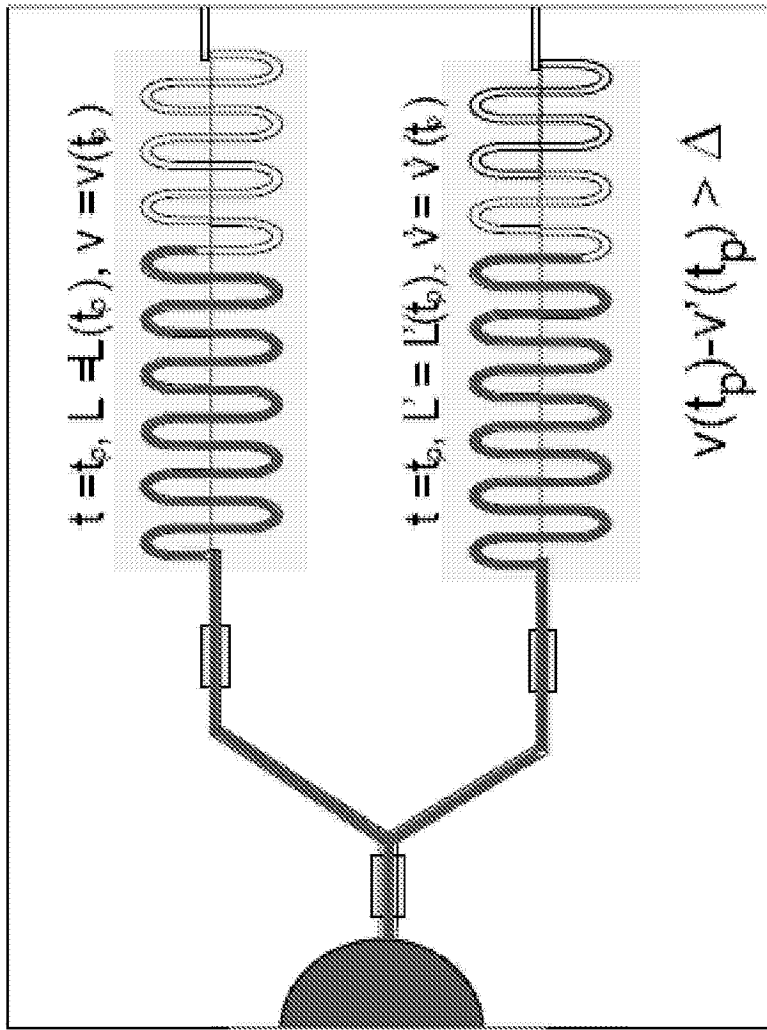


图 6

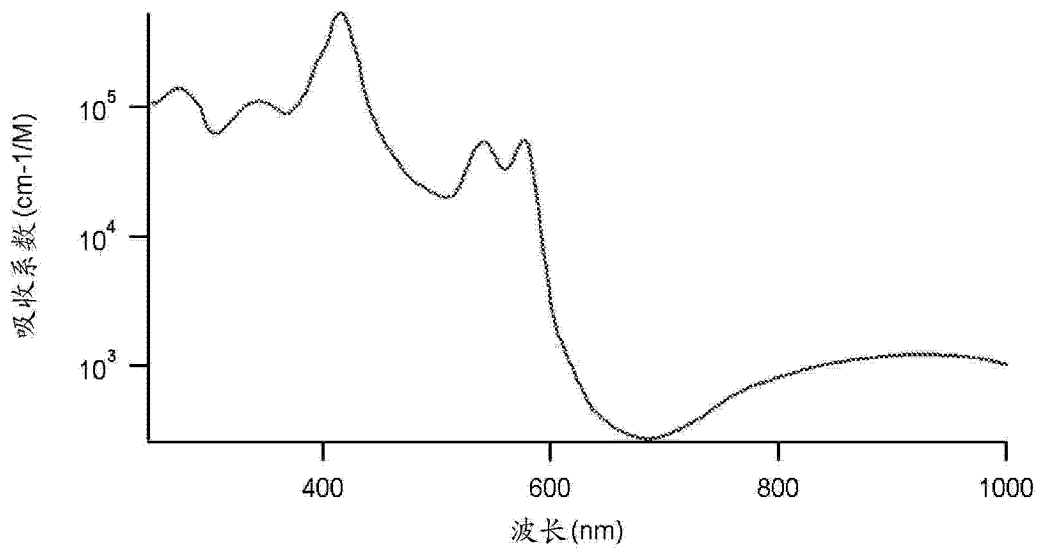


图 7

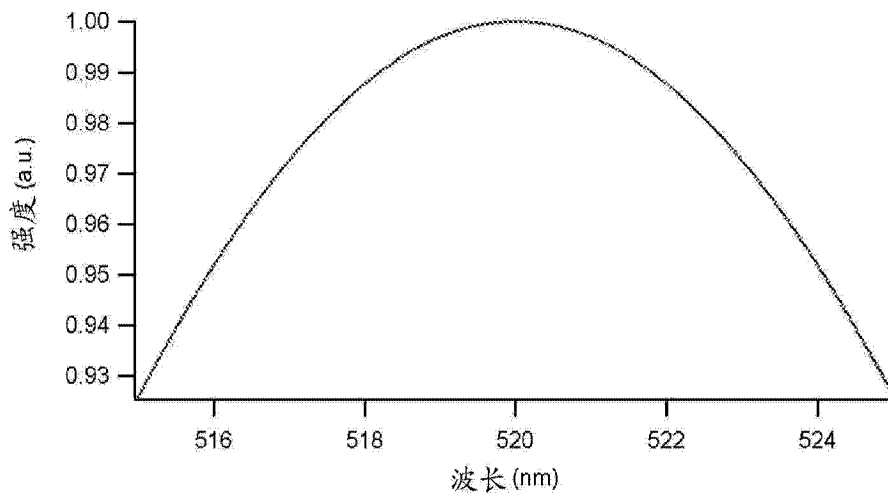


图 8

■ 光谱响应 (S6428-01, S6429-01, S6430-01)

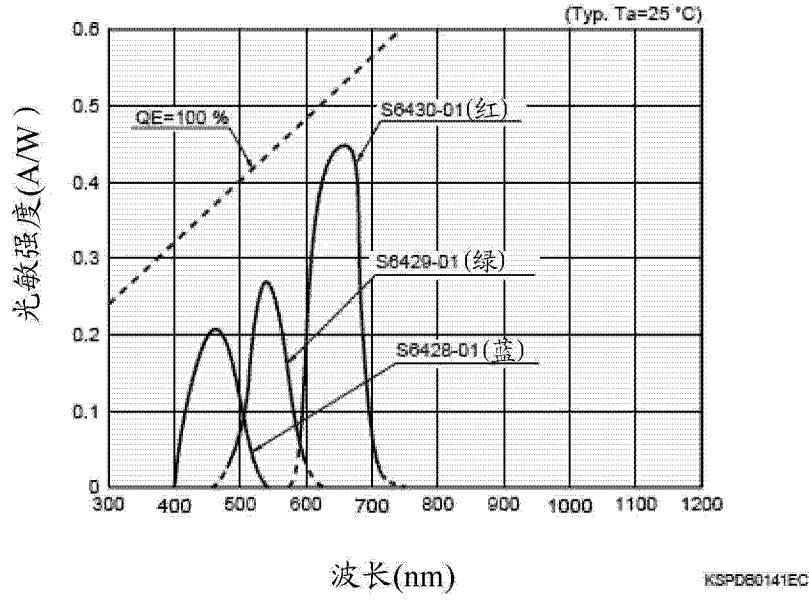


图 9

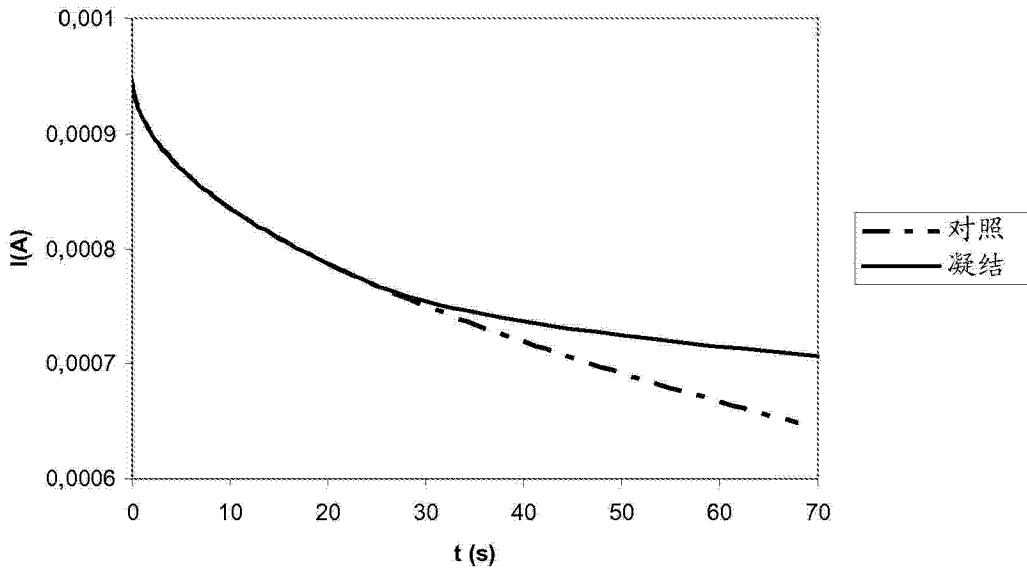


图 10

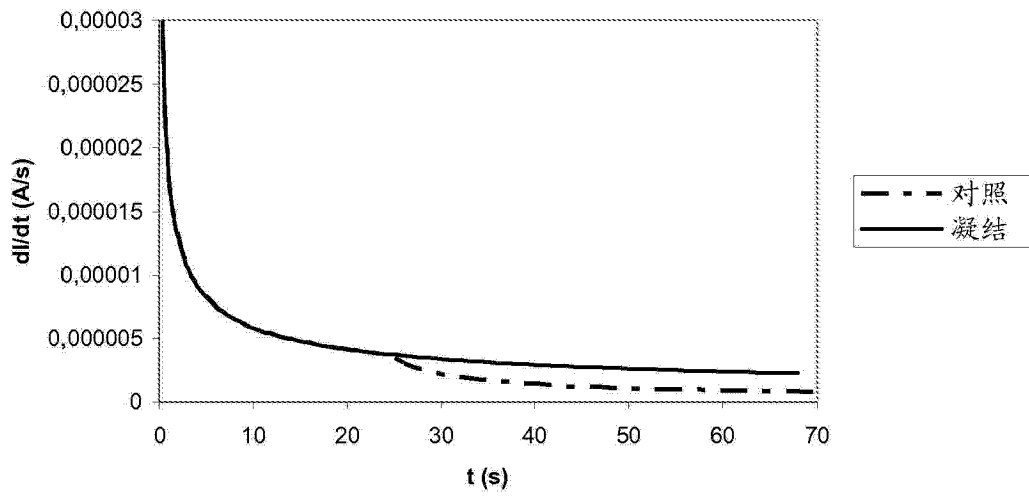


图 11

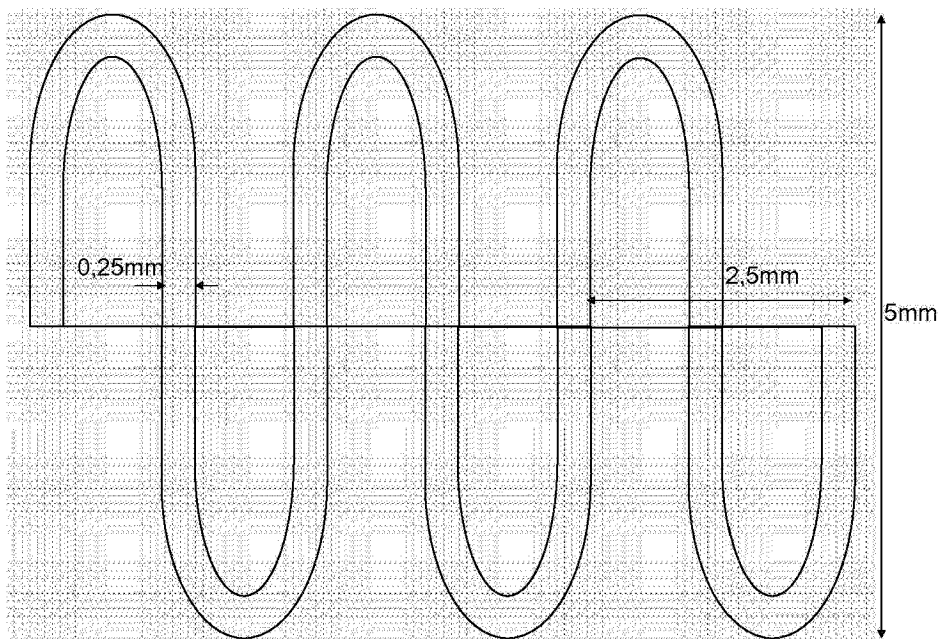


图 12

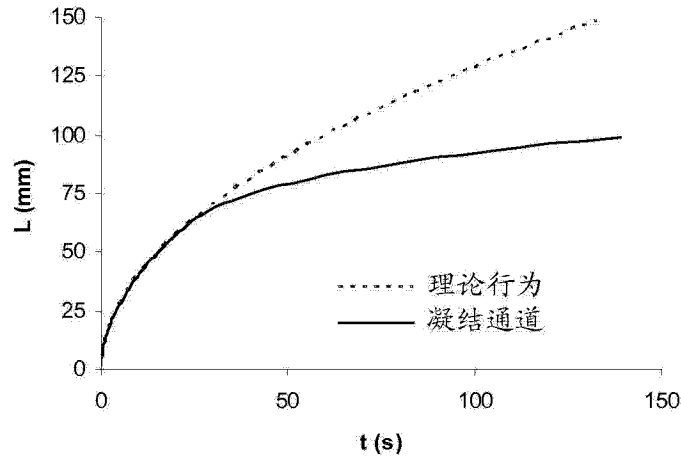


图 13

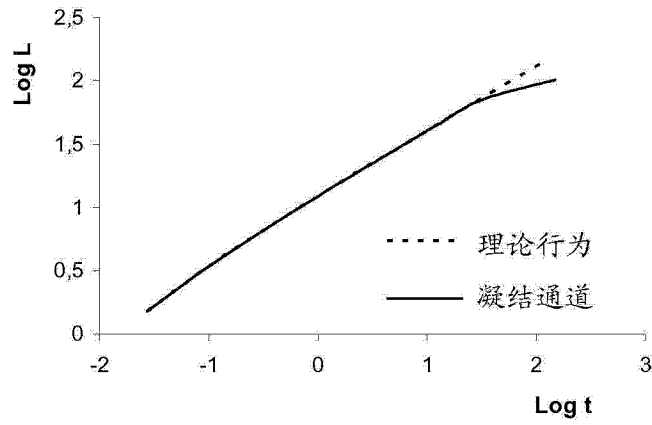


图 14

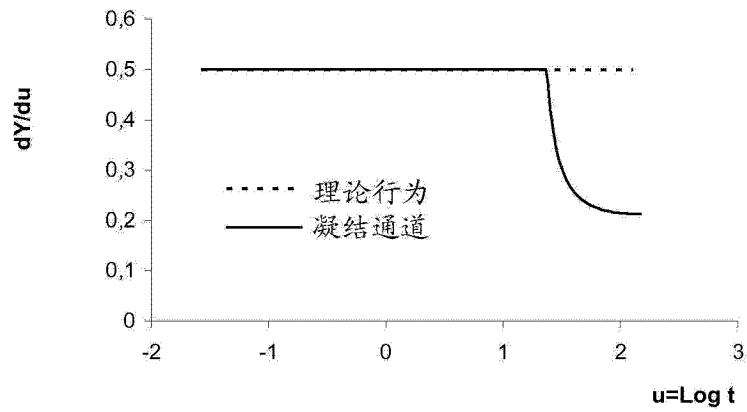


图 15

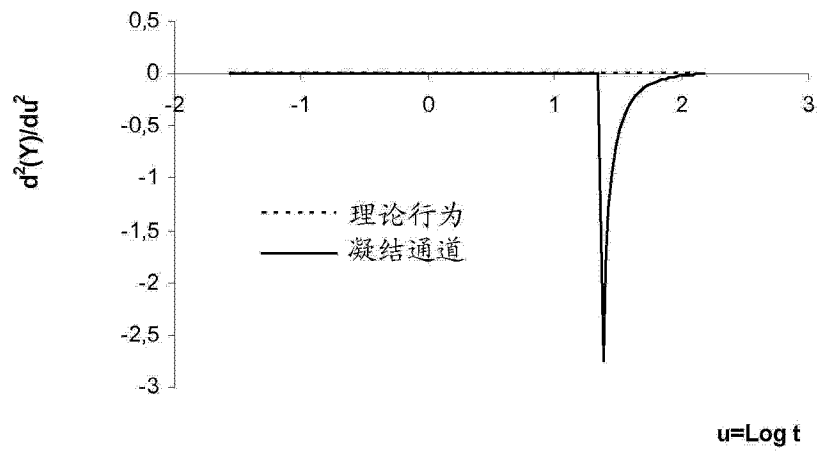


图 16

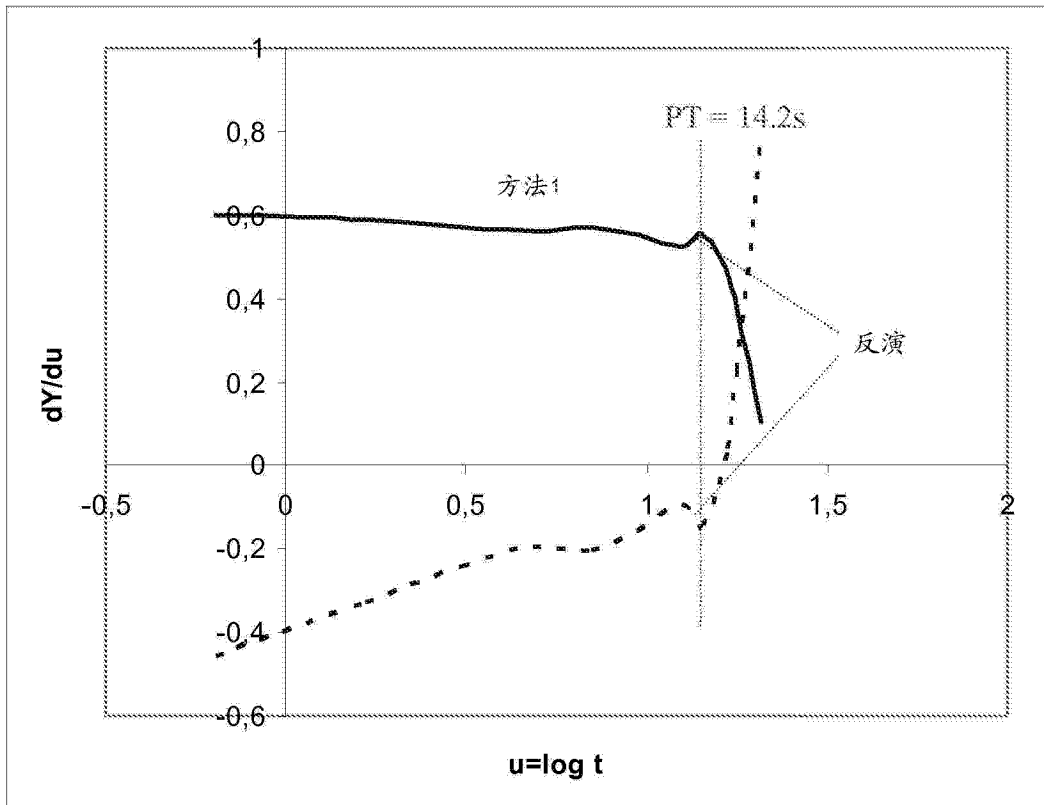


图 17