



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년09월01일

(11) 등록번호 10-2438312

(24) 등록일자 2022년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01L 3/00 (2006.01) *B01L 7/00* (2006.01)
C12Q 1/686 (2018.01)

(52) CPC특허분류
B01L 3/50273 (2013.01)
B01L 7/52 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7031928

(22) 출원일자(국제) 2017년04월04일

심사청구일자 2020년03월25일

(85) 번역문제출일자 2018년11월02일

(65) 공개번호 10-2018-0131601

(43) 공개일자 2018년12월10일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/025873

(87) 국제공개번호 WO 2017/176699

국제공개일자 2017년10월12일

(30) 우선권주장

62/317,993 2016년04월04일 미국(US)

15/363,896 2016년11월29일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

JP2004532003 A*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 30 항

심사관 : 조상진

(73) 특허권자

콤비네티 인코포레이티드

미국 캘리포니아 94306, 팔로알토, 램보우 드라이브 3436

(72) 발명자

형 주-성

미국 94306 캘리포니아주 팔로 알토 램보우 드라이브 3436

자약 앤드류

미국 94579 캘리포니아주 산 리안드로 버크하트 애비뉴 908

듀크 메간

미국 94005 캘리포니아주 브리즈번 스윗 #에이 산 베니토 로드 245

(74) 대리인

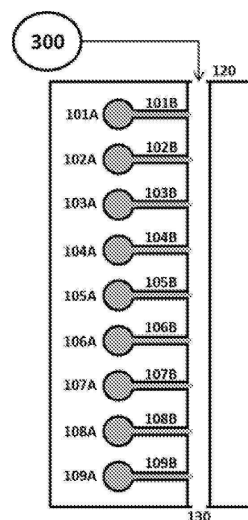
김진희, 김태홍

(54) 발명의 명칭 핵산 정량을 위한 미세유체 사이퍼닝 어레이

(57) 요약

몇몇 양상에서, 본 개시내용은 핵산의 증폭 및 정량 방법을 제공한다. 핵산의 증폭 및 정량 방법은 핵산 분자를 포함하는 샘플을 복수의 마이크로챔버 내로 단리시키는 단계, 복수의 마이크로챔버에서 증합효소 연쇄 반응을 수행하는 단계, 및 증합효소 연쇄 반응의 결과를 분석하는 단계를 포함한다. 몇몇 양상에 있어서, 본 개시내용은 본원에 기재된 방법과 일치하는 장치를 제공한다.

대표도 - 도3c



(52) CPC특허분류

C12Q 1/686 (2018.05)

B01L 2200/0605 (2013.01)

B01L 2200/0663 (2013.01)

B01L 2300/0609 (2013.01)

B01L 2300/0851 (2013.01)

B01L 2300/0864 (2013.01)

B01L 2300/18 (2013.01)

B01L 2400/0487 (2013.01)

B01L 2400/049 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR101486413 B1

US20050009101 A1

US20090250347 A1

US20140323358 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

미세유체 장치로서,

하나 이상의 입구 및 하나 이상의 출구를 포함하는 하나 이상의 마이크로채널;

복수의 마이크로챔버 및 복수의 사이펀 애퍼처(siphon aperture)로서, 상기 복수의 마이크로챔버가 상기 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 상기 하나 이상의 마이크로채널과 유체 연통되는, 복수의 마이크로챔버 및 복수의 사이펀 애퍼처; 및

상기 복수의 마이크로챔버를 덮도록 상기 미세유체 장치의 표면에 인접하게 배치된 열가소성 박막으로서, 상기 열가소성 박막을 가로질러 적용된 제1 압력차하에서 기체 불투과성이고, 상기 열가소성 박막을 가로질러 적용된 제2 압력차하에서 적어도 부분적으로 기체 투과성인 열가소성 박막

을 포함하는 미세유체 장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 마이크로채널이 교차채널(cross-channel)과 유체 연통되는 복수의 서브채널을 추가로 포함하고, 상기 복수의 마이크로챔버가 상기 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 상기 복수의 서브채널과 유체 연통되는 것인 미세유체 장치.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 복수의 마이크로챔버가 그리드(grid) 배열이 되도록 상기 복수의 서브채널의 서브채널들이 서로 평행한 것인 미세유체 장치.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 열가소성 박막이 상기 하나 이상의 마이크로채널 및/또는 상기 복수의 사이펀 애퍼처를 덮는 것인 미세유체 장치.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 복수의 사이펀 애퍼처가 10 μm 내지 20 μm , 또는 10 μm 미만의 깊이를 갖는 것인 미세유체 장치.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 복수의 마이크로챔버가 25 μm 내지 75 μm , 또는 25 μm 미만의 깊이를 갖는 것인 미세유체 장치.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 열가소성 박막이 50 μm 내지 200 μm 의 두께를 갖는 것인 미세유체 장치.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 복수의 마이크로챔버가 1,000 내지 20,000개의 마이크로챔버를 포함하는 것인 미세유체 장치.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 복수의 마이크로챔버가 원통형 형상 또는 반구형 형상인 미세유체 장치.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 미세유체 장치 또는 상기 열가소성 박막이 사출 성형에 의해 형성되는 것인 미세유체 장치.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 열가소성 박막이 열 결합에 의해 상기 미세유체 장치에 적용되는 것인 미세유체 장치.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 열가소성 박막이 사이클로-올레핀 중합체를 포함하는 것인 미세유체 장치.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 입구 또는 상기 하나 이상의 출구와 유체 연통되는 공압 펌프를 추가로 포함하는 것인 미세유체 장치.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 미세유체 장치가 상기 하나 이상의 마이크로채널과 상기 복수의 마이크로챔버 사이에 밸브를 포함하지 않는 것인 미세유체 장치.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 제2 압력차가 상기 제1 압력차보다 큰 것인 미세유체 장치.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 열가소성 박막을 가로질러 적용된 상기 제1 압력차가 8 psi(pound per square inch; 제곱인치당 파운드) 미만이고, 상기 열가소성 박막을 가로질러 적용된 상기 제2 압력차가 8 psi 내지 16 psi인 미세유체 장치.

청구항 17

미세유체 장치의 사용 방법으로서,

(a) 하나 이상의 입구 및 하나 이상의 출구를 포함하는 하나 이상의 마이크로채널을 포함하는 상기 미세유체 장치를 제공하는 단계로서, 상기 미세유체 장치가, 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 상기 하나 이상의 마이크로채널과 유체 연통되는 복수의 마이크로챔버, 및 상기 복수의 마이크로챔버를 덮도록 상기 미세유체 장치의 표면에 인접하게 배치된 열가소성 박막을 추가로 포함하는 것인 단계;

(b) 제1 압력차하에 시약을 상기 하나 이상의 입구 또는 상기 하나 이상의 출구로부터 상기 하나 이상의 마이크로채널 및 상기 복수의 마이크로챔버로 이동시키는 단계로서, 상기 열가소성 박막이 제1 압력차하에서 기체 불투과성인 단계;

(c) 상기 하나 이상의 마이크로채널과 상기 복수의 마이크로챔버 사이의 제2 압력차하에 상기 시약을 상기 복수의 마이크로챔버 내로 이동시키는 단계로서, 상기 열가소성 박막이 제2 압력차하에서 적어도 부분적으로 기체 투과성이고, 상기 시약을 상기 복수의 마이크로챔버 내로 이동시킬 때, 상기 복수의 마이크로챔버 내의 기체가 상기 복수의 마이크로챔버를 덮고 있는 상기 열가소성 박막을 통해 흐르게 되는 것인 단계; 및

(d) 유체를 상기 복수의 마이크로챔버 내로 도입하지 않으면서 상기 하나 이상의 입구와 상기 하나 이상의 출구 사이의 제3 압력차하에 상기 유체를 상기 하나 이상의 마이크로채널 내로 이동시키는 단계

를 포함하는, 미세유체 장치의 사용 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 열가소성 박막이 상기 하나 이상의 마이크로채널 및/또는 상기 복수의 사이펀 애퍼처를 덮는 것인 사용 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 제2 압력차가 상기 제1 압력차보다 크거나 또는 상기 제3 압력차가 상기 제2 압력차보다 작은 것인 사용 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 핵산 분자를 포함하는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 시약을 각각의 복수의 마이크로챔버에 제공하는 단계를 추가로 포함하는 것인 사용 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 복수의 마이크로챔버에서 열 순환(thermal cycling)시킴으로써 PCR을 수행하는 단계를 추가로 포함하는 것인 사용 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 복수의 마이크로챔버의 이미지를 획득하는 단계를 추가로 포함하는 것인 사용 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 PCR이 상기 핵산 분자를 성공적으로 증폭시킨 상기 복수의 마이크로챔버의 수를 계수하는 단계를 추가로 포함하는 것인 사용 방법.

청구항 24

미세유체 장치의 사용을 위한 시스템으로서,

(i) 하나 이상의 입구 및 하나 이상의 출구를 포함하는 하나 이상의 마이크로채널, (ii) 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 상기 하나 이상의 마이크로채널과 유체 연통되는 복수의 마이크로챔버, 및 (iii) 상기 복수의 마이크로챔버를 덮는 열가소성 박막으로서, 상기 열가소성 박막을 가로질러 적용된 제1 압력차하에서 기체 불투과성이고, 상기 열가소성 박막을 가로질러 적용된 제2 압력차하에서 적어도 부분적으로 기체 투과성인 열가소성 박막을 포함하는 하나 이상의 미세유체 장치를 홀딩하도록 구성된 이송 스테이지;

상기 하나 이상의 미세유체 장치와 유체 연통되는 공압 모듈로서, 상기 복수의 마이크로챔버로의 분할을 위하여 시약을 상기 미세유체 장치 내로 로딩하도록 구성된 공압 모듈;

상기 복수의 마이크로챔버와 열 연통되는 열 모듈로서, 상기 복수의 마이크로챔버의 온도를 제어하고 이를 열 순환시키도록 구성된 열 모듈;

상기 미세유체 장치의 상기 복수의 마이크로챔버를 이미징하도록 구성된 광학 모듈; 및

상기 이송 스테이지, 상기 공압 모듈, 상기 열 모듈, 및 상기 광학 모듈과 커플링된 하나 이상의 컴퓨터 프로세서로서, (i) 상기 공압 모듈에, 상기 복수의 마이크로챔버로의 분할을 위하여 상기 시약을 상기 미세유체 장치 내로 로딩하는 것을 지시하고, (ii) 상기 열 모듈에 상기 복수의 마이크로챔버를 열 순환시키는 것을 지시하고, (iii) 상기 광학 모듈에 상기 복수의 마이크로챔버를 이미징하는 것을 지시하도록 개별적으로 또는 총괄적으로 프로그래밍된 하나 이상의 컴퓨터 프로세서

를 포함하는, 미세유체 장치의 사용을 위한 시스템.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 열가소성 박막이 상기 하나 이상의 마이크로채널 및/또는 상기 복수의 사이펀 애퍼처를 덮는 것인 시스템.

청구항 26

제24항에 있어서, 상기 공압 모듈은 추가로 (1) 상기 제1 압력차를 적용하여 상기 시약을 상기 하나 이상의 마이크로채널 내로 로딩하도록 또는 (2) 상기 하나 이상의 마이크로채널과 상기 복수의 마이크로챔버 사이에 상기 제2 압력차를 적용하여 상기 시약을 상기 복수의 마이크로챔버 내로 분할하도록 구성되는 것인 시스템.

청구항 27

제24항에 있어서, 상기 공압 모듈은 상기 하나 이상의 입구 및 상기 하나 이상의 출구 사이에 제3 압력차를 적용하여 유체가 상기 하나 이상의 마이크로채널 내로 흐르도록 추가로 구성되는 것인 시스템.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 열가소성 박막을 가로질러 적용된 상기 제1 압력차가 8 psi(pound per square inch; 제곱인치당 파운드) 미만이고, 상기 제2 압력차가 8 psi 내지 16 psi인 시스템.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 제3 압력차가 1 psi 내지 4 psi인 시스템.

청구항 30

제24항에 있어서, 상기 광학 모듈이 상기 시약 분할을 입증하도록 구성된 2개 이상의 상이한 파장 범위를 이미징하도록 구성되고, 임의로 상기 2개 이상의 상이한 파장 범위 중 두번째 것이 상기 복수의 마이크로챔버 내에서 반응을 검출하는데 사용되는 것인 시스템.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 상호 참조

[0002] 본 출원은 각각이 본원에 전문이 참조로서 포함되는 2016년 4월 4일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/317,993호, 및 2016년 11월 29일에 출원된 미국 특허 출원 제15/363,896호의 이득을 청구한다.

[0003] 정부 지분 설명

[0004] 본 발명은 국립보건원에 의해 수여된 소기업 혁신 연구(Small Business Innovation Research) 허가 번호 1R43D023028-01하에 정부 기원으로 만들어졌다. 미국 정부는 본 발명에 특정한 권리를 갖는다.

배경 기술

[0005] 미세유체 장치는 소규모의 유체를 취급하는 구조를 함유하는 장치이다. 전형적으로, 미세유체 장치는 서브밀리미터 규모에서 작동하고, 마이크로리터, 나노리터, 또는 더 작은 양의 유체를 취급한다. 미세유체 장치에서, 주요 파울링 메커니즘은 미세구조 내부에 갇힌 공기, 또는 거품이다. 이는 열가소성 수지의 기체 투과도가 매우 낮기 때문에 미세유체 구조를 생성하는 열가소성 물질을 사용하는 경우에 특히 문제가 될 수 있다.

[0006] 갇힌 공기에 의한 파울링을 피하기 위하여, 이전 미세유체 구조는 열가소성 물질로 된 단순한 직선형 채널 또는 분지형 채널 디자인을 사용하거나 높은 기체 투과도 물질, 예를 들면, 엘라스토머를 사용하여 장치를 제조한다. 그러나, 단순한 디자인은 미세유체 장치의 가능한 기능성을 제한하고, 엘라스토머 물질은, 특히 규모 면에서, 제작이 어려울 뿐만 아니라 비싸다.

[0007] 미세유체 구조의 하나의 응용은 디지털 중합효소 연쇄 반응(dPCR: digital polymerase chain reaction)이다. dPCR은 핵산 샘플을 많은 구획의 어레이를 제공하는 미세유체 구조의 각각의 구획에서 1개 이하의 핵산 주형으로 희석하고, 어레이를 가로질러 PCR 반응을 수행한다. 주형이 성공적으로 PCR 증폭되는 구획을 계수하고 푸아송 통계를 결과에 적용함으로써, 목표 핵산을 정량한다. 미확인 샘플의 PCR 증폭 속도를 한 세트의 확인 qPCR 표준에 대한 속도와 비교함으로써 주형이 정량되는 인기 있는 정량적 실시간 PCR(qPCR: quantitative real-time PCR)과 달리, dPCR은 더 높은 민감성, 더 우수한 정밀성 및 더 큰 재현성을 나타내는 것으로 증명되었다.

[0008] 계놈 연구자 및 임상외에 있어서, dPCR은 복제수 변이체를 정량하는 희귀한 돌연변이 검출, 및 차세대 시퀀싱 라이브러리 정량에서 특히 강력하다. 세포 유리형 DNA에 의한 액체 생검 및 바이러스 부하 정량에 대한 임상 환경에서의 잠재적인 용도는 추가로 dPCR 기술의 가치를 증가시킨다. 기존의 dPCR 해법은 엘라스토머 밸브 어레이, 규소 관통 홀 접근, 및 미세유체 오일 중의 액적의 캡슐화를 사용하였다. 이용 가능한 dPCR 플랫폼의 수가 증가하고 있음에도 불구하고, dPCR은 오래된 qPCR 기술과 비교할 때 PCR 증폭 사이클의 수의 계수에 의존한다는 단점이 있었다. 처리량, 사용의 용이성, 성능 및 비용의 조합은 dPCR이 시장에서 채택되는데 있어서 주요 장벽이다.

선행기술문헌

특허문헌

(특허문헌 0001) WO 2015085181 A1 (공개일: 2015.06.11)

발명의 내용

- [0009] 핵산을 증폭하고 정량하는데 유용할 수 있는 방법 및 장치가 본원에서 제공된다. 본 개시내용은 dPCR의 사용을 통하여 샘플 제조, 샘플 증폭, 및 샘플 분석을 가능하게 할 수 있는 방법, 시스템, 및 장치를 제공한다. 이는 다른 시스템 및 방법과 비교하여 핵산이 감소된 비용 및 복잡성으로 증폭되고 정량될 수 있도록 한다.
- [0010] 양상에 있어서, 본 개시내용은 하나 이상의 입구 및 하나 이상의 출구를 포함하는 하나 이상의 마이크로채널; 복수의 마이크로챔버 및 복수의 사이펀 애퍼처로서, 복수의 마이크로챔버가 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 하나 이상의 마이크로채널과 유체 연통되는 것인 복수의 마이크로챔버 및 복수의 사이펀 애퍼처; 및 미세유체 장치의 표면에 인접하게 배치된 열가소성 박막으로서, 열가소성 박막이 복수의 마이크로챔버를 덮도록 하고, 열가소성 박막이 열가소성 박막을 가로질러 적용된 압력차하에 적어도 부분적으로 기체 투과성인 열가소성 박막을 포함하는 미세유체 장치를 제공한다.
- [0011] 몇몇 실시양태에서, 하나 이상의 마이크로채널은 교차채널과 유체 연통되는 복수의 서브채널을 추가로 포함하고, 여기서 복수의 마이크로챔버는 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 복수의 서브채널과 유체 연통된다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 서브채널은 복수의 마이크로챔버가 그리드 배열이 되도록 실질적으로 서로 평행하다.
- [0012] 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 하나 이상의 마이크로채널 및/또는 복수의 사이펀 애퍼처를 덮는다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 사이펀 애퍼처는 약 10 마이크로미터(μm) 내지 약 20 μm 의 깊이를 갖는다.
- [0013] 몇몇 실시양태에서, 복수의 사이펀 애퍼처는 약 10 μm 미만인 깊이를 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 약 25 μm 내지 약 75 μm 의 깊이를 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 약 25 μm 미만인 깊이를 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 약 50 μm 내지 약 200 μm 의 깊이를 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 약 1,000 내지 약 20,000개의 마이크로챔버를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 원통형 형상이다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 반구형 형상이다.
- [0014] 몇몇 실시양태에서, 미세유체 장치는 사출 성형에 의해 형성된다. 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 사출 성형에 의해 형성된다. 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 열 결합에 의해 미세유체 장치에 적용된다. 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 사이클로-올레핀 중합체를 포함한다.
- [0015] 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막을 가로질러 적용된 압력차는 약 8 체급 인치당 파운드(psi) 내지 약 16 psi이다. 몇몇 실시양태에서, 공압 펌프는 하나 이상의 입구 또는 하나 이상의 출구와 유체 연통된다. 몇몇 실시양태에서, 미세유체 장치는 하나 이상의 마이크로채널과 복수의 마이크로챔버 사이에 밸브를 포함하지 않는다.
- [0016] 양상에 있어서, 본 개시내용은 미세유체 장치의 형성 방법으로서, 열가소성 수지를 사출 성형하여 하나 이상의 마이크로채널, 복수의 마이크로챔버, 및 복수의 사이펀 애퍼처를 포함하는 미세유체 구조를 생성하는 단계로서, 복수의 마이크로챔버가 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 하나 이상의 마이크로채널과 유체 연통되는 것인 단계; 하나 이상의 마이크로채널과 유체 연통되는 하나 이상의 입구 및 하나 이상의 출구를 형성하는 단계; 및 열가소성 박막을 적용하여 복수의 마이크로챔버를 덮는 단계로서, 열가소성 박막이 열가소성 박막을 가로질러 적용된 압력차하에 적어도 부분적으로 기체에 투과성인 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0017] 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 사출 성형에 의해 형성된다. 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 열 결합에 의해 미세유체 구조에 적용된다. 몇몇 실시양태에서, 하나 이상의 입구 및 하나 이상의 출구는 기계적 천공에 의해 형성된다.
- [0018] 몇몇 실시양태에서, 하나 이상의 마이크로채널은 교차채널과 유체 연통되는 복수의 서브채널을 추가로 포함하고, 여기서 복수의 마이크로챔버는 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 복수의 서브채널과 유체 연통된다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 서브채널은 복수의 마이크로챔버가 그리드 배열이 되도록 실질적으로 서로 평행하다.
- [0019] 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 하나 이상의 마이크로채널 및/또는 복수의 사이펀 애퍼처를 덮는다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 사이펀 애퍼처는 약 10 μm 내지 약 20 μm 의 깊이를 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 사이펀 애퍼처는 약 10 μm 미만인 깊이를 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 약 25 μm 내지 약 75 μm 의 깊이를 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 약 25 μm 미만인 깊이를 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 약 50 μm 내지 약 200 μm 의 두께를 갖는다.
- [0020] 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 원통형 형상이다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 반구형 형상이다.
- [0021] 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 사이클로-올레핀 중합체를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막을

가로질러 적용된 압력차는 약 8 psi 내지 약 16 psi이다.

- [0022] 몇몇 실시양태에서, 미세유체 장치는 하나 이상의 마이크로채널과 복수의 마이크로챔버 사이에 밸브를 포함하지 않는다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 약 1,000 내지 약 20,000개의 마이크로챔버를 포함한다.
- [0023] 양상에서, 본 개시내용은 미세유체 장치의 사용 방법으로서, (a) 하나 이상의 마이크로채널이 하나 이상의 입구 및 하나 이상의 출구를 포함하는 미세유체 장치를 제공하는 단계로서, 미세유체 장치가 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 하나 이상의 마이크로채널과 유체 연통되는 복수의 마이크로챔버, 및 미세유체 장치의 표면 위에 인접하게 배치된 열가소성 박막으로서, 열가소성 박막이 복수의 마이크로챔버를 덮도록 하는 것인 열가소성 박막을 추가로 포함하는 것인 단계; (b) 제1 압력차하에 시약을 하나 이상의 입구 또는 하나 이상의 출구로부터 하나 이상의 마이크로채널로 이동시키는 단계; (c) 하나 이상의 마이크로채널과 복수의 마이크로챔버 사이의 제2 압력차하에 시약을 복수의 마이크로챔버 내로 이동시키는 단계로서, 시약을 복수의 마이크로챔버 내로 이동시키면, 복수의 마이크로챔버 내의 기체는 복수의 마이크로챔버를 덮은 열가소성 박막을 통해 흐르게 되는 것인 단계; 및 (d) 유체를 복수의 마이크로챔버 내로 도입시키지 않으면서 하나 이상의 입구와 하나 이상의 출구 사이의 제3 압력차하에 유체를 하나 이상의 마이크로채널로 이동시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0024] 몇몇 실시양태에서, (a)-(d)는 단일 일체형 기체를 사용하여 수행된다.
- [0025] 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 하나 이상의 마이크로채널 및/또는 복수의 사이펀 애퍼처를 덮는다.
- [0026] 몇몇 실시양태에서, 제2 압력차는 제1 압력차보다 크다. 몇몇 실시양태에서, 제3 압력차는 제2 압력차보다 작다.
- [0027] 몇몇 실시양태에서, 방법은 핵산 분자를 포함하는 중합효소 연쇄 반응(PCR: polymerase chain reaction) 시약을 각각의 복수의 마이크로챔버에 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 방법은 복수의 마이크로챔버를 열 순환시켜 PCR을 수행하는 단계를 추가로 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 방법은 복수의 마이크로챔버의 이미지를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 방법은 그 안에서 PCR이 성공적으로 핵산 분자를 증폭시키는 복수의 마이크로챔버의 수를 계수하는 단계를 추가로 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 방법은 그 안에서 PCR이 성공적으로 PCR 시약을 증폭시키는 복수의 마이크로챔버의 수에 푸아송 통계를 적용하여 PCR 시약 내의 핵산을 정량하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0028] 몇몇 실시양태에서, 하나 이상의 마이크로채널은 교차채널과 유체 연통되는 복수의 서브채널을 추가로 포함하고, 여기서 복수의 마이크로챔버는 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 복수의 서브채널과 유체 연통된다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 서브채널은 복수의 마이크로챔버가 그리드 배열이 되도록 실질적으로 서로 평행하다.
- [0029] 몇몇 실시양태에서, 제3 압력차는 약 1 psi 내지 약 4 psi이다. 몇몇 실시양태에서, 제2 압력차는 약 8 psi 내지 약 16 psi이다. 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 사이클로-올레핀 중합체를 포함한다.
- [0030] 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 약 1,000 내지 약 20,000개의 마이크로챔버를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 원통형 형상이다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 반구형 형상이다. 몇몇 실시양태에서, 미세유체 장치는 하나 이상의 마이크로채널과 복수의 마이크로챔버 사이에 밸브를 포함하지 않는다.
- [0031] 몇몇 실시양태에서, 복수의 사이펀 애퍼처는 약 10 μm 내지 약 20 μm 의 깊이를 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 사이펀 애퍼처는 약 10 μm 미만인 깊이를 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 약 25 μm 내지 약 75 μm 의 깊이를 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 약 25 μm 미만인 깊이를 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 약 50 μm 내지 약 200 μm 의 두께를 갖는다.
- [0032] 몇몇 실시양태에서, 유체는 공기, 질소, 이산화탄소, 비활성 기체, 또는 이의 임의의 조합이다.
- [0033] 양상에 있어서, 본 개시내용은 미세유체 장치를 사용하기 위한 시스템으로서, (i) 하나 이상의 입구 및 하나 이상의 출구를 포함하는 하나 이상의 마이크로채널, (ii) 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 하나 이상의 마이크로채널과 유체 연통되는 복수의 마이크로챔버, 및 (ii) 복수의 마이크로챔버를 덮는 열가소성 박막을 포함하는 하나 이상의 미세유체 장치를 유지하도록 구성된 이송 스테이지; 하나 이상의 미세유체 장치와 유체 연통되는 공압 모듈로서, 복수의 마이크로챔버로의 분할을 위하여 시약을 미세유체 장치 내로 로딩하도록 구성된 공압 모듈; 복수의 마이크로챔버와 열 연통되는 열 모듈로서, 복수의 마이크로챔버의 온도를 제어하고 이를 열 순환시키도록 구성된 열 모듈; 미세유체 장치의 복수의 마이크로챔버를 이미징하도록 구성된 광학 모듈; 및 이송 스테이지, 공압 모듈, 열 모듈, 및 광학 모듈에 커플링되는 하나 이상의 컴퓨터 프로세서로서, (i) 공압

모듈에, 복수의 마이크로챔버로의 분할을 위하여 시약을 미세유체 장치 내로 로딩하는 것을 지시하고, (ii) 열 모듈에 복수의 마이크로챔버를 열 순환시키는 것을 지시하고, (iii) 광학 모듈에 복수의 마이크로챔버를 이미징 하는 것을 지시하도록 개별적으로 또는 총괄적으로 프로그래밍된 하나 이상의 컴퓨터 프로세서를 포함하는 시스템을 제공한다.

- [0034] 몇몇 실시양태에서, 하나 이상의 미세유체 장치는 하나 이상의 마이크로채널과 복수의 마이크로챔버 사이에 밸브를 포함하지 않는다. 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 하나 이상의 마이크로채널 및/또는 복수의 사이펀 애퍼처를 덮는다.
- [0035] 몇몇 실시양태에서, 공압 모듈은 추가로 제1 압력차를 적용하여 시약을 하나 이상의 마이크로채널 내로 로딩하도록 구성된다. 몇몇 실시양태에서, 공압 모듈은 추가로 하나 이상의 마이크로채널과 복수의 마이크로챔버 사이의 제2 압력차를 적용하여 시약을 복수의 마이크로챔버 내로 분할하도록 구성된다. 몇몇 실시양태에서, 공압 모듈은 추가로 하나 이상의 입구와 하나 이상의 출구 사이의 제3 압력차를 적용하여 유체가 하나 이상의 마이크로채널 내로 흐르도록 구성된다. 몇몇 실시양태에서, 제2 압력차는 약 8 psi 내지 약 16 psi이다. 몇몇 실시양태에서, 제3 압력차는 약 1 psi 내지 약 4 psi이다.
- [0036] 몇몇 실시양태에서, 광학 모듈은 2개 이상의 상이한 과장 범위를 이미징하도록 구성된다. 몇몇 실시양태에서, 2개 이상의 상이한 과장 범위 중 첫번째 것은 시약 분할을 입증하는데 사용된다. 몇몇 실시양태에서, 2개의 상이한 과장 범위 중 두번째 것은 복수의 마이크로챔버 내의 반응을 검출하는데 사용된다.
- [0037] 양상에 있어서, 본 개시내용은 미세유체 장치의 사용 방법으로서, 하나 이상의 입구 및 하나 이상의 출구를 포함하는 마이크로채널을 포함하는 미세유체 장치를 제공하는 단계로서, 미세유체 장치가 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 마이크로채널에 연결된 복수의 마이크로챔버, 및 열가소성 박막이 마이크로채널, 복수의 마이크로챔버, 및 복수의 사이펀 애퍼처를 캡핑하도록 미세유체 장치에 인접하게 배치된 열가소성 박막을 추가로 포함하는 것인 단계; 시약을 제1 압력에서 하나 이상의 입구에 적용하여 시약으로 미세유체 장치의 복수의 마이크로챔버를 충전하는 단계; 고압 기체를 제2 압력(예를 들면, 8 psi 내지 16 psi)에서 하나 이상의 입구 또는 하나 이상의 출구에서 적용하여 기체를 복수의 마이크로챔버, 복수의 사이펀 애퍼처, 및 마이크로채널 내로 들어가게 하는 단계로서, 제2 압력이 제1 압력보다 큰 것인 단계; 및 저압 기체(예를 들면, 고압 기체보다 작은 압력)를 제3 압력(예를 들면, 1 psi 내지 4 psi)에서 하나 이상의 입구에서 적용하여 저압 기체를 복수의 마이크로챔버 내로 도입하지 않으면서 저압 기체를 마이크로채널 내로 도입시키는 단계로서, 제3 압력이 제2 압력보다 작은 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0038] 몇몇 실시양태에서, 방법은 단일 일체형 기체를 사용하여 수행된다. 몇몇 실시양태에서, 방법은 핵산 분자를 포함하는 PCR 시약을 각각의 복수의 마이크로챔버에 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 방법은 복수의 마이크로챔버를 열 순환시켜 PCR을 수행하는 단계를 추가로 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 방법은 복수의 마이크로챔버의 이미지를 획득하는 단계를 추가로 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 방법은 그 안에서 PCR이 성공적으로 핵산 분자를 증폭시키는 복수의 마이크로챔버의 수를 계수하는 단계를 추가로 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 방법은 푸아송 통계를 그 안에서 PCR이 성공적으로 PCR 시약을 증폭시키는 복수의 마이크로챔버의 수에 적용하여 PCR 시약 내의 핵산을 정량하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0039] 몇몇 실시양태에서, 마이크로채널은 교차채널을 통해 연결된 복수의 서브채널을 포함하고, 여기서 복수의 마이크로챔버는 복수의 서브채널에 연결된다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 서브채널은 복수의 마이크로챔버가 그리드 배열이 되도록 실질적으로 서로 평행하다.
- [0040] 몇몇 실시양태에서, 제3 압력은 약 1 psi 내지 4 psi이다. 몇몇 실시양태에서, 제2 압력은 약 8 psi 내지 16 psi이다. 몇몇 실시양태에서, 고압 기체는 공기, 질소, 이산화탄소, 비활성 기체, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 사이클로-올레핀 중합체를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 공압 펌프는 하나 이상의 입구 또는 하나 이상의 출구와 유체 연통된다.
- [0041] 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 1,000 내지 20,000개의 마이크로챔버를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 마이크로챔버는 원통형 형상이다. 몇몇 실시양태에서, 미세유체 장치는 사출 성형에 의해 형성된다.
- [0042] 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 사출 성형에 의해 형성된다.
- [0043] 본 개시내용의 추가의 양상 및 이점은 본 개시내용의 오직 예시적인 실시양태가 보여지고 기재되는 하기 상세한 설명으로부터 당해 분야의 숙련자에게 용이하게 자명해질 것이다. 인식될 바와 같이, 본 개시내용은 기타 및 상이한 실시양태가 가능하고, 이의 몇몇 세부사항은 다양한 명백한 면에서 변형이 가능하며, 이들 모두는 모두 개

시내용을 벗어나지 않는다. 따라서, 도면 및 설명은 사실상 예시로 간주되며 제한적인 것으로 간주되지 않는다.

[0044] **참조 포함**

[0045] 본 명세서에서 언급된 모든 문헌, 특허, 및 특허 출원은 각각의 개별적인 문헌, 특허, 또는 특허 출원이 특정하게 개별적으로 참조로서 포함되는 것으로 지시된 바와 동일한 정도로 본원에 참조로서 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0046] 본 발명의 신규한 특징은 첨부된 청구항에서 특수성과 함께 기술된다. 본 발명의 특징 및 이점의 더 우수한 이해는 본 발명의 원리가 이용되는 예시적인 실시양태를 기술하는 하기 상세한 설명, 및 하기와 같은 첨부된 도면(본원에서 또한 "도면" 및 "도")을 참조하여 수득될 것이다:

도 1A 및 **1B**는 미세유체 구조의 예를 도시하고; **도 1A**는 오버헤드 뷰로부터의 구조를 보여주고, **도 1B**는 구조의 단면도를 도시하고;

도 2A 및 **2B**는 미세유체 장치 내의 마이크로챔버, 사이펀 애퍼처, 및 마이크로채널의 예시적인 배열을 도식적으로 도시하고; **도 2A**는 평행한 서브채널 및 하나 이상의 교차채널이 사용되어 마이크로챔버의 그리드를 형성하는 실시양태를 보여주고; **도 2B**는 사행 패턴의 단일 마이크로채널이 마이크로챔버의 육각형 그리드를 형성하는 실시양태를 보여주고;

도 3A-3D는 예시적인 미세유체 장치의 사용 방법을 보여주고; **도 3A**는 시약을 저압에서 적용하는 단계를 보여주고; **도 3B**는 미세유체 장치를 가로지르는 압력차를 적용하여 분할하고 탈기하게 하는 단계를 보여주고; **도 3C**는 유체를 저압에서 적용하여 마이크로채널을 비우는 단계를 보여주고; **도 3D**는 방법의 완료 후 시스템의 상태를 보여주고;

도 4는 미세유체 장치의 제조 방법을 도식적으로 도시하고;

도 5는 미세유체 장치와 함께 사용되는 예시적인 디지털 PCR 공정을 도식적으로 도시하고;

도 6은 단일 기계에서 핵산 증폭 및 정량 방법을 수행하기 위한 기계를 도식적으로 도시하고;

도 7은 본원에 제공된 방법을 실시하도록 프로그래밍되거나 그렇지 않으면 구성된 예시적인 컴퓨터 제어 시스템을 도식적으로 도시하고;

도 8A 및 **8B**는 미세유체 장치 및 샘플 분할을 보여주고; **도 8A**는 열가소성 수지를 마이크로성형(micromolding)하여 형성된 미세유체 장치를 보여주고; **도 8B**는 샘플 분할 공정의 형광 이미지를 보여주고;

도 9는 핵산 샘플의 처리를 위한 예시적인 시스템을 보여주고;

도 10A - 10D는 평균 약 1개의 핵산 주형 카피를 함유한 분할 및 0개의 핵산 주형 카피(무주형 대조군 또는 NTC)를 함유한 분할의 핵산 증폭의 2가지 색상(한 색상은 샘플 신호를 나타내고, 다른 색상은 정규화 신호를 나타냄) 형광 검출을 보여주고; **도 10A**는 증폭 후 분할당 0개의 카피(NTC)를 보여주고; **도 10B**는 분할당 약 1개의 카피를 함유한 분할의 핵산 증폭을 보여주고; **도 10C**는 두 가지 형광 색상 모두의 NTC 형광 강도의 플롯을 보여주고; **도 10D**는 증폭된 샘플의 두 가지 형광 색상 모두의 형광 강도의 플롯을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 본 발명의 다양한 실시양태가 본원에서 보여지고 기재되지만, 이러한 실시양태는 오직 예의 방식으로 제공되다는 것이 당해 분야의 숙련가에게 자명할 것이다. 많은 변형, 변화, 및 치환이 본 발명을 벗어나지 않으면서 당해 분야의 숙련가에게 발생할 수 있다. 본원에 기재된 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 사용될 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

[0048] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "증폭" 및 "증폭하다"는 상호 교환적으로 사용되고, 일반적으로 핵산의 1개 이상의 카피 또는 "증폭된 생성물"을 생성하는 것을 지칭한다. 이러한 증폭은, 예를 들면, 증합효소 연쇄 반응(PCR) 또는 등온 증폭을 사용하는 것일 수 있다.

[0049] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "핵산"은 일반적으로 테옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드, 또는 이의 유사체인 임의의 길이(예를 들면, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 100, 500, 또는 1000개의 뉴클레오티드)의 뉴클레오티드의 중합체 형태를 지칭한다. 핵산은 아데노신(A), 시토신(C), 구아닌(G), 티민(T), 및

우라실(U), 또는 이의 변이체로부터 선택된 하나 이상의 서브유닛을 포함할 수 있다. 뉴클레오티드는 A, C, G, T, 또는 U, 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드는 성장하는 핵산 가닥으로 도입될 수 있는 임의의 서브유닛을 포함할 수 있다. 이러한 서브유닛은 A, C, G, T, 또는 U, 또는 하나 이상의 상보적 A, C, G, T, 또는 U에 특이적이거나 퓨린에 상보적(즉, A 또는 G, 또는 이의 변이체)이거나 피리미딘에 상보적(즉, C, T, 또는 U, 또는 이의 변이체)인 임의의 다른 서브유닛일 수 있다. 몇몇 예에서, 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, 일부 경우에, 핵산 분자는 원형이다. 핵산의 비제한적인 예는 DNA 및 RNA를 포함한다. 핵산은 유전자 또는 유전자 단편, 연관분석으로부터 정의된 유전자자리들(유전자자리), 엑손, 인트론, 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 짧은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 마이크로-RNA(miRNA), 리보자임, cDNA, 재조합 핵산, 분지형 핵산, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머의 코딩 또는 비코딩 영역을 포함할 수 있다. 핵산은 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드, 예를 들면, 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다.

[0050] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "중합효소 연쇄 반응 시약" 또는 "PCR 시약"은 상호 교환적으로 사용되고, 일반적으로 핵산 증폭 반응(예를 들면, DNA 증폭)을 완료하는데 필요한 시약을 포함하는 조성물을 지칭하고, 이러한 시약의 비제한적인 예는 목표 핵산에 특이성을 갖는 프라이머 세트 또는 프라이밍 부위(예를 들면, Nick(nick)), 중합효소, 적합한 버퍼, 보조인자(예를 들면, 이가 및 일가 양이온), dNTP, 및 다른 효소를 포함한다. PCR 시약은 또한 프로브, 지시제, 및 프로브와 지시제를 포함하는 분자를 포함할 수 있다.

[0051] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "프로브"는 일반적으로 이의 존재 또는 부재가 증폭된 생성물의 존재 또는 부재를 검출하는데 사용될 수 있는 검출 가능한 모이어티를 포함하는 분자를 지칭한다. 검출 가능한 모이어티의 비제한적인 예는 방사성표지, 안정한 동위원소 표지, 형광 표지, 화학발광 표지, 효소 표지, 비색 표지, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0052] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "신장(extention)"은 일반적으로 주형 지시된 방식으로 뉴클레오티드의 핵산으로의 도입을 지칭한다. 신장은 효소의 도움을 통해 발생할 수 있다. 예를 들면, 신장은 중합효소의 도움을 통해 발생할 수 있다. 신장이 발생할 수 있는 조건은 일반적으로 신장이 달성되는 온도를 지칭하는 "신장 온도" 및 일반적으로 신장이 발생하는 동안 할당된 시간의 양을 지칭하는 "신장 기간"을 포함한다.

[0053] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "지시제 분자"는 일반적으로 이의 존재 또는 부재가 샘플 분할을 지시하는데 사용될 수 있는 검출 가능한 모이어티를 포함하는 분자를 지칭한다. 검출 가능한 모이어티의 비제한적인 예는 방사성표지, 안정한 동위원소 표지, 형광 표지, 화학발광 표지, 효소 표지, 비색 표지, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0054] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "샘플"은 일반적으로 핵산 분자를 함유하거나 함유하는 것으로 의심되는 임의의 샘플을 지칭한다. 예를 들면, 샘플은 하나 이상의 핵산 분자를 함유하는 생물학적 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 혈액(예를 들면, 전혈), 혈장, 혈청, 소변, 타액, 점막 분비물, 가래, 대변 및 눈물로부터 수득(예를 들면, 추출 또는 단리)될 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 생물학적 샘플은 유체 또는 조직 샘플(예를 들면, 피부 샘플)일 수 있다. 몇몇 예에서, 샘플은 세포 무함유 체액, 예를 들면, 전혈로부터 수득된다. 이러한 예에서, 샘플은 세포 무함유 DNA 및/또는 세포 무함유 RNA를 포함할 수 있다. 몇몇 예에서, 샘플은 순환하는 종양 세포를 포함할 수 있다. 몇몇 예에서, 샘플은 환경 샘플(예를 들면, 토양, 폐기물, 주위 공기 등), 산업 샘플(예를 들면, 임의의 산업 공정으로부터의 샘플), 및 식품 샘플(예를 들면, 유제품, 채소 제품, 및 식육 제품)이다.

[0055] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유체"는 일반적으로 액체 또는 기체를 지칭한다. 유체는 정의된 형상을 유지할 수 없으며, 관찰 가능한 시간 프레임 동안 흘러 이것이 들어간 용기를 충전할 것이다. 따라서, 유체는 흐름이 허용되는 임의의 적합한 점도를 가질 수 있다. 2종 이상의 유체가 존재하는 경우, 각각의 유체는 당해 분야의 숙련가에 의해 본질적으로 임의의 유체(액체, 기체 등)으로부터 독립적으로 선택될 수 있다.

[0056] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "분할"은 일반적으로 부분 또는 몫으로의 분리 또는 분배를 지칭한다. 예를 들면, 분할된 샘플은 다른 샘플과 단리된 샘플이다. 샘플 분할을 가능하게 하는 구조의 예는 웰 및 마이크로챔버를 포함한다.

[0057] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "미세유체"는 일반적으로 하나 이상의 마이크로채널, 복수의 사이펀 애퍼처, 및 마이크로챔버의 어레이를 포함하는 칩, 면, 장치, 물품, 또는 시스템을 지칭한다. 마이크로채널은 약 10 밀리미터(mm) 이하, 약 5 mm 이하, 약 4 mm 이하, 약 3 mm 이하, 약 2 mm 이하, 약 1.5 mm 이하, 약 1 mm 이하, 약 750 마이크로미터(μm) 이하, 약 500 μm 이하, 약 250 μm 이하, 약 100 μm 이하, 또는 그 미만의 단

면 치수를 가질 수 있다.

- [0058] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "깊이"는 일반적으로 마이크로채널, 사이펀 애퍼처, 또는 마이크로챔버의 하부로부터 마이크로채널, 복수의 사이펀 애퍼처, 및 마이크로챔버의 어레이를 캡핑하는 박막까지 측정된 거리를 지칭한다.
- [0059] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단면" 또는 "단면의"는 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 일반적으로 특징부의 긴 치수에 실질적으로 수직인 마이크로채널 또는 사이펀 애퍼처의 치수 또는 면적을 지칭한다.
- [0060] 본 개시내용은 열가소성 수지로 형성되고, 박막을 도입하여 압력이 방출될 때 기체 장벽의 역할을 하면서 압력이 가해진 탈기를 가능하게 하는 미세유체 장치를 기재한다. 미세유체 구조를 형성하는 열가소성 수지의 사용은 비싸지 않고 확장성이 높은 사출 성형 공정의 사용을 가능하게 할 수 있고, 이러한 박막을 도입하지 않는 현재 일부 미세유체 구조에 존재할 수 있는 파울링 문제를 피하면서 각압을 통해 탈기할 수 있는 능력을 제공할 수 있다.
- [0061] 이러한 구조를 위한 하나의 사용은 열가소성 수지로 형성된, 마이크로채널에 의해 연결된 데드-엔디드(dead-ended) 마이크로챔버의 어레이를 포함한 미세유체 디자인이다. 이 디자인은 dPCR 응용에서 사용되어 시약을 마이크로챔버의 어레이로 분할하고, 이로써 dPCR에서 핵산을 정량하는데 사용될 수 있다.
- [0062] **핵산 샘플을 분석하기 위한 미세유체 장치**
- [0063] 양상에서, 본 개시내용은 핵산 샘플을 분석하기 위한 미세유체 장치를 제공한다. 장치는 입구 및 출구에 연결된 마이크로채널을 포함할 수 있다. 미세유체 장치는 또한 복수의 마이크로챔버 및 복수의 사이펀 애퍼처를 포함할 수 있다. 복수의 마이크로챔버는 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 마이크로채널에 연결될 수 있다. 미세유체 장치는 마이크로채널, 마이크로챔버, 및 사이펀 애퍼처를 캡핑하고 밀봉(예를 들면, 밀폐하여 밀봉)하는 열가소성 박막을 포함할 수 있다. 열가소성 박막은 압력차가 열가소성 박막을 가로질러 적용될 때 적어도 부분적으로 기체 투과성일 수 있다.
- [0064] **도 1A** 및 **1B**는 본 개시내용의 특정한 실시양태에 따른 미세유체 구조의 예를 도시한다. **도 1A**는 예시적인 미세유체 장치를 상면도로 보여준다. 미세유체 장치는 입구(120) 및 출구(130)를 갖는 마이크로채널(110)을 포함한다. 마이크로채널은 복수의 사이펀 애퍼처(101B - 109B)에 연결된다. 복수의 사이펀 애퍼처는 마이크로채널을 복수의 마이크로챔버(101A - 109A)에 연결한다. **도 1B**는 점선 표시된 A-A'를 따른 단일 마이크로챔버의 단면도를 보여준다. 단일 마이크로챔버(101A)는 사이펀 애퍼처(101B)에 의해 마이크로채널(110)에 연결된다. 미세유체 장치 본체(140)는 경질 플라스틱 물질로 형성될 수 있다. 미세유체 장치의 미세구조는 박막(150)에 의해 캡핑되고 밀봉될 수 있다. 박막은 작은 압력차가 막을 가로질러 적용될 때 기체 불투과성이고 큰 압력차가 막을 가로질러 적용될 때 기체 투과성일 수 있다. 이는 압력이 미세유체 장치의 내부 구조에 적용될 때 박막을 통해 탈기를 가능하게 할 수 있다. 대안적인 실시양태에서, 탈기는 진공이 미세유체 장치 외부에 적용될 때 발생할 수 있다.
- [0065] 박막의 기체 투과성은 상승된 압력에 의해 유도될 수 있다. 몇몇 실시양태에서 압력 유도된 기체 투과성 박막은 마이크로챔버의 어레이를 덮을 수 있고, 마이크로채널 및 사이펀 애퍼처는 비기체 투과성 막에 의해 덮일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 압력 유도된 기체 투과성 박막은 마이크로챔버의 어레이 및 사이펀 애퍼처를 덮을 수 있고, 마이크로채널은 비기체 투과성 막에 의해 덮일 수 있다. 대안적으로, 압력 유도된 기체 투과성 박막은 마이크로챔버의 어레이, 사이펀 애퍼처, 및 마이크로채널을 덮을 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 박막의 두께는 약 500 마이크로미터(μm) 이하, 약 250 μm 이하, 약 200 μm 이하, 약 150 μm 이하, 약 100 μm 이하, 약 75 μm 이하, 약 50 μm 이하, 약 25 μm 이하, 또는 그 미만일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 박막의 두께는 약 0.1 μm 내지 약 200 μm 또는 약 0.5 μm 내지 약 150 μm 일 수 있다. 몇몇 예에서, 박막의 두께는 약 50 μm 내지 약 200 μm 일 수 있다. 몇몇 예에서, 박막의 두께는 약 100 μm 내지 약 200 μm 일 수 있다. 몇몇 예에서, 박막의 두께는 약 100 μm 내지 약 150 μm 이다. 예에서, 박막은 약 100 μm 의 두께이다. 막의 두께는 박막의 제조 가능성, 박막의 공기 투과성, 탈기되는 각각의 분할의 부피, 이용 가능한 압력, 및/또는 사이펀닝 공정의 목적하는 완료 시간에 의해 선택될 수 있다.
- [0066] 몇몇 실시양태에서, 미세유체 장치는 마이크로챔버의 단일 어레이를 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 미세유체 장치는 마이크로챔버의 다중 어레이를 포함할 수 있고, 마이크로챔버의 각각의 어레이는 서로 단리된다. 마이크로챔버의 어레이는 일렬, 그리드 배열, 대안적인 패턴, 또는 임의의 다른 배열로 배열될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 미세유체 장치는 약 1개 이상, 약 2개 이상, 약 3개 이상, 약 4개 이상, 약 5개 이상, 약 10개

이상, 약 15개 이상, 약 20개 이상, 약 30개 이상, 약 40개 이상, 약 50개 이상, 또는 그 초과의 마이크로챔버의 어레이를 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 마이크로챔버의 어레이는 동일하다. 몇몇 실시양태에서, 미세유체 장치는 동일하지 않은 마이크로챔버의 다중 어레이를 포함할 수 있다. 마이크로챔버의 어레이는 모두 동일한 외부 치수(즉, 마이크로챔버의 어레이의 모든 특징부를 포함한 마이크로챔버의 어레이의 길이 및 폭)를 가질 수 있거나, 마이크로챔버의 어레이는 상이한 외부 치수를 가질 수 있다.

[0067] 몇몇 실시양태에서, 마이크로챔버의 어레이는 최대 약 100 mm, 약 75 mm, 약 50 mm, 약 40 mm, 약 30 mm, 약 20 mm, 약 10 mm, 약 8 mm, 약 6 mm, 약 4 mm, 약 2 mm, 약 1 mm, 또는 그 미만의 폭을 가질 수 있다. 마이크로챔버의 어레이는 최대 약 50 mm, 약 40 mm, 약 30 mm, 약 20 mm, 약 10 mm, 약 8 mm, 약 6 mm, 약 4 mm, 약 2 mm, 1 mm, 또는 그 미만의 길이를 가질 수 있다. 폭은 약 1 mm 내지 100 mm, 또는 10 mm 내지 50 mm일 수 있다. 길이는 약 1 mm 내지 50 mm, 또는 5 mm 내지 20 mm일 수 있다.

[0068] 몇몇 예에서, 마이크로챔버의 어레이는 약 100 mm의 폭 및 약 40 mm의 길이를 가질 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버의 어레이는 약 80 mm의 폭 및 약 30 mm의 길이를 가질 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버의 어레이는 약 60 mm의 폭 및 약 25 mm의 길이를 가질 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버의 어레이는 약 40 mm의 폭 및 약 15 mm의 길이를 가질 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버의 어레이는 약 30 mm의 폭 및 약 10 mm의 길이를 가질 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버의 어레이는 약 20 mm의 폭 및 약 8 mm의 길이를 가질 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버의 어레이는 약 10 mm의 폭 및 약 4 mm의 길이를 가질 수 있다. 외부 치수는 목적하는 마이크로챔버의 총 수, 각각의 마이크로챔버의 치수, 및 제조 가능성을 위한 각각의 마이크로챔버 사이의 최소 거리에 의해 결정될 수 있다.

[0069] 몇몇 실시양태에서, 마이크로채널은 미세유체 장치의 긴 수치에 실질적으로 평행하다. 몇몇 실시양태에서, 마이크로채널은 미세유체 장치의 긴 치수에 실질적으로 수직일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 마이크로채널은 미세유체 장치의 긴 치수에 실질적으로 평행하지 않거나 실질적으로 수직이 아닐 수 있다. 마이크로채널과 미세유체 장치의 긴 치수 사이의 각도는 약 5° 이상, 약 10° 이상, 약 15° 이상, 약 20° 이상, 약 30° 이상, 약 40° 이상, 약 50° 이상, 약 60° 이상, 약 70° 이상, 약 90° 이상, 약 100° 이상, 약 110° 이상, 약 120° 이상, 약 130° 이상, 약 140° 이상, 약 150° 이상, 약 160° 이상, 또는 약 170° 이상일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 마이크로채널은 단일 긴 채널일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 마이크로채널은 만곡부, 곡선부, 또는 각을 가질 수 있다. 마이크로채널은 100 mm 이하, 약 75 mm 이하, 약 50 mm 이하, 약 40 mm 이하, 약 30 mm 이하, 약 20 mm 이하, 약 10 mm 이하, 약 8 mm 이하, 약 6 mm 이하, 약 4 mm 이하, 약 2 mm 이하, 또는 그 미만인 긴 치수를 가질 수 있다. 마이크로채널의 길이는 미세유체 장치의 외부 길이 또는 폭에 의해 경계 지어질 수 있다. 마이크로채널은 약 500 μm 이하, 약 250 μm 이하, 약 100 μm 이하, 약 80 μm 이하, 약 60 μm 이하, 약 30 μm 이하, 약 20 μm 이하, 약 10 μm 이하, 또는 그 미만의 깊이를 가질 수 있다. 마이크로채널은 약 500 μm 이하, 약 250 μm 이하, 약 100 μm 이하, 약 75 μm 이하, 약 50 μm 이하, 약 40 μm 이하, 약 30 μm 이하, 약 20 μm 이하, 약 10 μm 이하, 또는 그 미만의 단면 치수(예를 들면, 폭)를 가질 수 있다.

[0070] 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 100 μm 폭 $\times$ 약 100 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 100 μm 폭 $\times$ 약 80 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 100 μm 폭 $\times$ 약 60 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 100 μm 폭 $\times$ 약 40 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 100 μm 폭 $\times$ 약 20 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 100 μm 폭 $\times$ 약 10 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 80 μm 폭 $\times$ 약 100 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 60 μm 폭 $\times$ 약 100 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 40 μm 폭 $\times$ 약 100 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 20 μm 폭 $\times$ 약 100 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 10 μm 폭 $\times$ 약 100 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 80 μm 폭 $\times$ 약 80 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 60 μm 폭 $\times$ 약 60 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 40 μm 폭 $\times$ 약 40 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 20 μm 폭 $\times$ 약 20 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로채널의 단면 치수는 약 10 μm 폭 $\times$ 약 10 μm 깊이일 수 있다. 마이크로채널의 단면 형상은 원형, 타원형, 삼각형, 사각형, 또는 직사각형을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 적합한 단면 형상일 수 있다. 마이크로채널의 단면 면적은 마이크로채널의 길이에 따라 일정할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 마이크로채널의 단면 면적은 마이크로채널의 길이에 따라 다양할 수 있다. 마이크로채널의 단면 면적은 약 50% 내지 150%, 약 60% 내지 125%, 약 70% 내지 120%, 약 80% 내지 115%, 약 90% 내지 110%, 약 95% 내지 100%, 또는 약 98% 내지 102%로 다양할

수 있다. 마이크로채널의 단면 면적은 약 $10,000 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $7,500 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $5,000 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $2,500 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $1,000 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $750 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $500 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $400 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $300 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $200 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $100 \mu\text{m}^2$ 이하, 또는 그 미만일 수 있다.

[0071] 몇몇 실시양태에서, 마이크로채널은 단일 입구 및 단일 출구를 가질 수 있다. 대안적으로, 마이크로채널은 다중 입구, 다중 출구, 또는 다중 입구 및 다중 출구를 가질 수 있다. 입구 및 출구는 동일한 직경을 가질 수 있거나, 이들은 상이한 상이한 직경을 가질 수 있다. 입구 및 출구는 약 2.5 밀리미터(mm) 이하, 약 2 mm 이하, 약 1.5 mm 이하, 약 1 mm 이하, 약 0.5 mm 미만, 또는 그 미만의 직경을 가질 수 있다.

[0072] 몇몇 실시양태에서, 마이크로챔버의 어레이는 약 1,000개 이상의 마이크로챔버, 약 5,000개 이상의 마이크로챔버, 약 10,000개 이상의 마이크로챔버, 약 20,000개 이상의 마이크로챔버, 약 30,000개 이상의 마이크로챔버, 약 40,000개 이상의 마이크로챔버, 약 50,000개 이상의 마이크로챔버, 약 100,000개 이상의 마이크로챔버, 또는 그 초과를 가질 수 있다. 몇몇 예에서, 미세유체 장치는 약 10,000 내지 약 30,000개의 마이크로챔버를 가질 수 있다. 몇몇 예에서, 미세유체 장치는 약 15,000 내지 약 25,000개의 마이크로챔버를 가질 수 있다. 마이크로챔버는 원통형 형상, 반구형 형상, 또는 원통형과 반구형의 조합인 형상일 수 있다. 마이크로챔버는 약 $500 \mu\text{m}$ 이하, 약 $250 \mu\text{m}$ 이하, 약 $100 \mu\text{m}$ 이하, 약 $80 \mu\text{m}$ 이하, 약 $60 \mu\text{m}$ 이하, 약 $30 \mu\text{m}$ 이하, 약 $15 \mu\text{m}$ 이하, 또는 그 미만의 직경을 가질 수 있다. 마이크로챔버의 깊이는 약 $500 \mu\text{m}$ 이하, 약 $250 \mu\text{m}$ 이하, 약 $100 \mu\text{m}$ 이하, 약 $80 \mu\text{m}$ 이하, 약 $60 \mu\text{m}$ 이하, 약 $30 \mu\text{m}$ 이하, 약 $15 \mu\text{m}$ 이하, 또는 그 미만일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버는 약 $30 \mu\text{m}$ 의 직경 및 약 $100 \mu\text{m}$ 의 깊이를 가질 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버는 약 $35 \mu\text{m}$ 의 직경 및 약 $80 \mu\text{m}$ 의 깊이를 가질 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버는 약 $40 \mu\text{m}$ 의 직경 및 약 $70 \mu\text{m}$ 의 깊이를 가질 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버는 약 $50 \mu\text{m}$ 의 직경 및 약 $60 \mu\text{m}$ 의 깊이를 가질 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버는 약 $60 \mu\text{m}$ 의 직경 및 약 $40 \mu\text{m}$ 의 깊이를 가질 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버는 약 $80 \mu\text{m}$ 의 직경 및 약 $35 \mu\text{m}$ 의 깊이를 가질 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버는 약 $100 \mu\text{m}$ 의 직경 및 약 $30 \mu\text{m}$ 의 깊이를 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 마이크로챔버 및 마이크로채널은 동일한 깊이를 갖는다. 대안적인 실시양태에서, 마이크로챔버 및 마이크로채널은 상이한 깊이를 갖는다.

[0073] 몇몇 실시양태에서, 사이펀 애퍼처의 길이는 일정하다. 몇몇 실시양태에서, 사이펀 애퍼처의 길이는 다양하다. 사이펀 애퍼처는 약 $150 \mu\text{m}$ 이하, 약 $100 \mu\text{m}$ 이하, 약 $50 \mu\text{m}$ 이하, 약 $25 \mu\text{m}$ 이하, 약 $10 \mu\text{m}$ 이하, 약 $5 \mu\text{m}$ 이하, 또는 그 미만인 긴 치수를 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 사이펀 애퍼처의 깊이는 약 $50 \mu\text{m}$ 이하, 약 $25 \mu\text{m}$ 이하, 약 $10 \mu\text{m}$ 이하, 약 $5 \mu\text{m}$ 이하 또는 그 미만일 수 있다. 사이펀 애퍼처는 약 $50 \mu\text{m}$ 이하, 약 $40 \mu\text{m}$ 이하, 약 $30 \mu\text{m}$ 이하, 약 $20 \mu\text{m}$ 이하, 약 $10 \mu\text{m}$ 이하, 약 $5 \mu\text{m}$ 이하, 또는 그 미만인 단면 폭을 가질 수 있다.

[0074] 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $50 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $50 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $50 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $40 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $50 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $30 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $50 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $20 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $50 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $10 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $50 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $5 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $40 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $50 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $30 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $50 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $20 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $50 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $10 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $50 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $5 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $50 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $40 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $40 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $30 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $30 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $20 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $20 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $10 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $10 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 사이펀 애퍼처의 단면 치수는 약 $5 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $5 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 사이펀 애퍼처의 단면 형상은 원형, 타원형, 삼각형, 사각형, 또는 직사각형을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 적합한 단면 형상일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 사이펀 애퍼처의 단면 면적은 사이펀 애퍼처의 길이에 따라 일정할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 사이펀 애퍼처의 단면 면적은 사이펀 애퍼처의 길이에 따라 다양할 수 있다. 사이펀 애퍼처의 단면 면적은 마이크로챔버와의 연결 지점에서 사이펀 애퍼처의 단면 면적보다 마이크로채널과의 연결 지점에서 더 클 수 있다. 대안적으로, 마이크로챔버와의 연결 지점에서 사이펀 애퍼처의 단면 면적은 마이크로채널과의 연결 지점에서 사이펀 애퍼처의 단면 면적보다 클 수 있다. 사이펀 애퍼처의 단면 면적은 약 50% 내지 150%, 약 60% 내지 125%, 약 70% 내지 120%, 약 80% 내지 115%, 약 90% 내지 110%, 약 95% 내지 100%, 또는 약 98% 내지 102%로 다양할 수

있다. 사이펀 애퍼처의 단면 면적은 약 $2,500 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $1,000 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $750 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $500 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $250 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $100 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $75 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $50 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $25 \mu\text{m}^2$ 이하, 또는 그 미만일 수 있다. 마이크로채널과의 연결 지점에서 사이펀 애퍼처의 단면 면적은 마이크로채널의 단면 면적 이하일 수 있다. 마이크로채널과의 연결 지점에서 사이펀 애퍼처의 단면 면적은 마이크로채널의 단면 면적의 약 98% 이하, 약 95% 이하, 약 90% 이하, 약 85% 이하, 약 80% 이하, 약 75% 이하, 약 70% 이하, 약 60% 이하, 약 50% 이하, 약 40% 이하, 약 30% 이하, 약 20% 이하, 약 10% 이하, 약 5% 이하, 약 1% 이하, 또는 약 0.5% 이하일 수 있다.

[0075] 몇몇 실시양태에서, 사이펀 애퍼처는 마이크로채널에 실질적으로 수직이다. 몇몇 실시양태에서, 사이펀 애퍼처는 마이크로채널에 실질적으로 수직이 아니다. 몇몇 실시양태에서, 사이펀 애퍼처와 마이크로채널 사이의 각도는 약 5° 이상, 약 10° 이상, 약 15° 이상, 약 20° 이상, 약 30° 이상, 약 40° 이상, 약 50° 이상, 약 60° 이상, 약 70° 이상, 약 90° 이상, 약 100° 이상, 약 110° 이상, 약 120° 이상, 약 130° 이상, 약 140° 이상, 약 150° 이상, 약 160° 이상, 또는 약 170° 이상일 수 있다.

[0076] 마이크로챔버는 다양한 패턴으로 배열될 수 있다. 도 2A 및 2B는 마이크로챔버, 사이펀 애퍼처, 및 마이크로채널 배열의 예시적인 패턴을 도시한다. 몇몇 실시양태에서, 다중 마이크로채널이 사용되고, 몇몇 실시양태에서, 단일 마이크로채널이 사용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 마이크로채널은 하나의 균의 서브채널을 포함할 수 있다. 서브채널의 균은 하나 이상의 교차채널에 의해 연결될 수 있다. 이들 실시양태 중 몇몇에서, 서브채널은 마이크로챔버의 어레이가 마이크로챔버의 그리드를 형성하도록 실질적으로 서로 평행하다. 도 2A는 평행한 서브채널(230) 및 하나 이상의 교차채널(220)을 사용하여 마이크로챔버의 그리드를 형성하는 실시형태를 도시한다.

[0077] 몇몇 실시양태에서, 마이크로챔버는 마이크로챔버를 연결하는 곡선 또는 각진 서브채널을 갖는 마이크로챔버의 육각형 그리드를 형성하기 위하여 건설된다. 마이크로챔버의 육각형 그리드는 또한 형성되고 단일 마이크로채널에 의해, 예를 들면, 미세유체 장치를 가로질러 사행 패턴(240)을 형성하는 마이크로채널에 의해 연결될 수 있다. 도 2B는 사행 패턴의 단일 마이크로채널이 마이크로챔버의 육각형 그리드를 형성하는 실시형태를 도시한다.

[0078] 몇몇 실시양태에서, 서브채널의 길이는 일정하다. 몇몇 실시양태에서, 서브채널의 길이는 다양할 수 있다. 서브채널은 100 mm 이하, 약 75 mm 이하, 약 50 mm 이하, 약 40 mm 이하, 약 30 mm 이하, 약 20 mm 이하, 약 10 mm 이하, 약 8 mm 이하, 약 6 mm 이하, 약 4 mm 이하, 약 2 mm 이하, 또는 그 미만인 긴 치수를 가질 수 있다. 서브채널의 길이는 미세유체 장치의 외부 길이 또는 폭에 의해 경계 지어질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 서브채널은 마이크로채널과 동일한 단면 치수를 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 서브채널은 마이크로채널과 상이한 단면 치수를 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 서브채널은 마이크로채널과 동일한 깊이 및 상이한 단면 치수를 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 서브채널은 마이크로채널과 동일한 단면 치수 및 상이한 깊이를 가질 수 있다. 예를 들면, 서브채널은 약 $500 \mu\text{m}$ 이하, 약 $250 \mu\text{m}$ 이하, 약 $100 \mu\text{m}$ 이하, 약 $80 \mu\text{m}$ 이하, 약 $60 \mu\text{m}$ 이하, 약 $30 \mu\text{m}$ 이하, 약 $15 \mu\text{m}$ 이하, 또는 그 미만의 깊이를 가질 수 있다. 서브채널은 약 $500 \mu\text{m}$ 이하, 약 $250 \mu\text{m}$ 이하, 약 $100 \mu\text{m}$ 이하, 약 $75 \mu\text{m}$ 이하, 약 $50 \mu\text{m}$ 이하, 약 $40 \mu\text{m}$ 이하, 약 $30 \mu\text{m}$ 이하, 약 $20 \mu\text{m}$ 이하, 약 $10 \mu\text{m}$ 이하, 또는 그 미만의 단면 폭을 가질 수 있다.

[0079] 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $100 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $100 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $100 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $80 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $100 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $60 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $100 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $40 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $100 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $20 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $100 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $10 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $80 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $100 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $60 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $100 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $40 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $100 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $20 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $100 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $10 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $100 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $80 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $80 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $60 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $60 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $40 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $40 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $20 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $20 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 서브채널의 단면 치수는 약 $10 \mu\text{m}$ 폭 $\times$ 약 $10 \mu\text{m}$ 깊이일 수 있다. 서브채널의 단면 형상은 원형, 타원형, 삼각형, 사각형, 또는 직사각형을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 적합한 단면 형상일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 서브채널의 단면 형상은 마이크로채널의 단면 형상과 상이하다. 몇몇 실시양태에서, 서브채널의 단면 형상은 마이크로채널의 단면 형상과 동일하다. 서브채널의 단면 면적은 서브채널의 길이에 따라 일정할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 서브채널의 단면 면적은 마이크로채널의 길이에 따라 다

양할 수 있다. 서브채널의 단면 면적은 약 50% 내지 150%, 약 60% 내지 125%, 약 70% 내지 120%, 약 80% 내지 115%, 약 90% 내지 110%, 약 95% 내지 100%, 또는 약 98% 내지 102%로 다양할 수 있다. 서브채널의 단면 면적은 약 $10,000 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $7,500 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $5,000 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $2,500 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $1,000 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $750 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $500 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $400 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $300 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $200 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $100 \mu\text{m}^2$ 이하, 또는 그 미만일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 서브채널의 단면 면적은 마이크로채널의 단면 면적과 동일하다. 몇몇 실시양태에서, 서브채널의 단면 면적은 마이크로채널의 단면 면적의 면적 이하일 수 있다. 서브채널의 단면 면적은 마이크로채널의 단면 면적의 약 98% 이하, 약 95% 이하, 약 90% 이하, 약 85% 이하, 약 80% 이하, 약 75% 이하, 약 70% 이하, 약 60% 이하, 약 50% 이하, 약 40% 이하, 약 30% 이하, 약 20% 이하, 또는 그 미만일 수 있다.

[0080] 몇몇 실시양태에서, 교차채널의 길이는 일정하다. 몇몇 실시양태에서, 교차채널의 길이는 다양할 수 있다. 교차채널은 약 100 mm 이하, 약 75 mm 이하, 약 50 mm 이하, 약 40 mm 이하, 약 30 mm 이하, 약 20 mm 이하, 약 10 mm 이하, 약 8 mm 이하, 약 6 mm 이하, 약 4 mm 이하, 약 2 mm 이하, 또는 그 미만인 긴 치수를 가질 수 있다. 교차채널의 길이는 미세유체 장치의 외부 길이 또는 폭에 의해 경계 지어질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 교차채널은 마이크로채널과 동일한 단면 치수를 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 교차채널은 마이크로채널과 상이한 단면 치수를 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 교차채널은 마이크로채널과 동일한 깊이 및 상이한 단면 치수를 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 교차채널은 마이크로채널과 동일한 단면 치수 및 상이한 깊이를 가질 수 있다. 예를 들면, 교차채널은 약 500 μm 이하, 약 250 μm 이하, 약 100 μm 이하, 약 80 μm 이하, 약 60 μm 이하, 약 30 μm 이하, 약 15 μm 이하, 또는 그 미만의 깊이를 가질 수 있다. 교차채널은 약 500 μm 이하, 약 250 μm 이하, 약 100 μm 이하, 약 75 μm 이하, 약 50 μm 이하, 약 40 μm 이하, 약 30 μm 이하, 약 20 μm 이하, 약 10 μm 이하, 또는 그 미만의 단면 폭을 가질 수 있다.

[0081] 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 100 μm 폭 $\times$ 약 100 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 100 μm 폭 $\times$ 약 80 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 100 μm 폭 $\times$ 약 60 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 100 μm 폭 $\times$ 약 40 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 100 μm 폭 $\times$ 약 20 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 100 μm 폭 $\times$ 약 10 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 80 μm 폭 $\times$ 약 100 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 60 μm 폭 $\times$ 약 100 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 40 μm 폭 $\times$ 약 100 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 20 μm 폭 $\times$ 약 100 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 10 μm 폭 $\times$ 약 100 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 80 μm 폭 $\times$ 약 80 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 60 μm 폭 $\times$ 약 60 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 40 μm 폭 $\times$ 약 40 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 20 μm 폭 $\times$ 약 20 μm 깊이일 수 있다. 몇몇 예에서, 교차채널의 단면 치수는 약 10 μm 폭 $\times$ 약 10 μm 깊이일 수 있다.

[0082] 교차채널의 단면 형상은 원형, 타원형, 삼각형, 사각형, 또는 직사각형을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 적합한 단면 형상일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 교차채널의 단면 형상은 마이크로채널의 단면 형상과 상이하다. 몇몇 실시양태에서, 교차채널의 단면 형상은 마이크로채널의 단면 형상과 동일하다. 교차채널의 단면 면적은 교차채널의 길이에 따라 일정할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 교차채널의 단면 면적은 마이크로채널의 길이에 따라 다양할 수 있다. 교차채널의 단면 면적은 약 50% 내지 150%, 약 60% 내지 125%, 약 70% 내지 120%, 약 80% 내지 115%, 약 90% 내지 110%, 약 95% 내지 100%, 또는 약 98% 내지 102%로 다양할 수 있다. 교차채널의 단면 면적은 약 $10,000 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $7,500 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $5,000 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $2,500 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $1,000 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $750 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $500 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $400 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $300 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $200 \mu\text{m}^2$ 이하, 약 $100 \mu\text{m}^2$ 이하, 또는 그 미만일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 교차채널의 단면 면적은 마이크로채널의 단면 면적과 동일하다. 몇몇 실시양태에서, 교차채널의 단면 면적은 마이크로채널의 단면 면적 미만이다. 교차채널의 단면 면적은 마이크로채널의 단면 면적의 약 98% 이하, 약 95% 이하, 약 90% 이하, 약 85% 이하, 약 80% 이하, 약 75% 이하, 약 70% 이하, 약 60% 이하, 약 50% 이하, 약 40% 이하, 약 30% 이하, 약 20% 이하, 또는 그 미만일 수 있다.

[0083] **미세유체 장치의 제조 방법**

[0084] 양상에서, 본 개시내용은 미세유체 장치의 제조 방법을 제공한다. 방법은 열가소성 수지를 사출 성형하여 미세

유체 구조를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 미세유체 구조는 마이크로채널, 복수의 마이크로챔버, 및 복수의 사이펀 애퍼처를 포함할 수 있다. 복수의 마이크로챔버는 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 마이크로채널에 연결될 수 있다. 마이크로채널은 입구 및 출구를 포함할 수 있다. 열가소성 박막은 적용되어 미세유체 구조를 캡핑할 수 있다. 열가소성 박막은 열가소성 박막을 가로질러 적용될 때 적어도 부분적으로 기체 투과성일 수 있다.

[0085] 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 사출 성형에 의해 형성된다. 열가소성 박막은 열 결합에 의해 미세유체 구조에 적용될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 박막은 화학 화학 결합에 의해 적용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 열가소성 박막은 미세유체 장치를 형성하는 사출 성형 공정의 부분으로서 그리고 그 동안 형성된다.

[0086] 미세유체 장치의 본체 및 박막은 동일한 물질을 포함할 수 있다. 대안적으로, 미세유체 장치의 본체 및 박막은 상이한 물질을 포함할 수 있다. 미세유체 장치의 본체 및 박막은 열가소성 수지를 포함할 수 있다. 예시적인 열가소성 수지는 사이클로-올레핀 중합체, 아크릴, 아크릴로니트릴 부타디엔 스티렌, 나일론, 폴리락트산, 폴리벤즈이미다졸, 폴리카보네이트, 폴리에테르 설펜, 폴리 에테르 에테르 케톤, 폴리에테르이미드, 폴리에틸렌, 폴리페닐렌 옥사이드, 폴리페닐렌 설파이드, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리에스테르, 폴리우레탄 또는 이의 임의의 유도체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 미세유체 장치는 단독중합체, 공중합체, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 미세유체 장치는 비탄성 물질로 형성될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 미세유체 장치는 탄성 물질로 형성될 수 있다.

[0087] 본 개시내용의 예시적인 실시양태에서, 열가소성 수지 및 박막 둘 다는 사이클로-올레핀 중합체로 구성된다. 하나의 적합한 열가소성 수지는 제오노아(Zeonor) 1430R(Zeon Chemical, 일본 소재)이고, 하나의 적합한 박막은 제오녹스(Zeonox) 1060R(Zeon Chemical, 일본 소재)이다. 몇몇 실시양태에서, 박막은 저압에서 기체 불투과성이고 압력하에 적어도 부분적으로 기체 투과성인 물질이다.

[0088] 몇몇 실시양태에서, 입구 및 출구는 기계적 천공에 의해 형성된다. 몇몇 실시양태에서, 입구 및 출구는 열가소성 수지의 용융, 용해, 또는 에칭에 의해 형성된다.

[0089] 도 4는 본 개시내용의 실시양태의 제조 방법을 도시한다. 도 4에서, 사출 성형 공정(401)을 사용하여 미세유체 구조를 형성한다. 미세유체 구조는, 도 1A 및 1B에 도시된 바와 같이, 사이펀 애퍼처를 통해 하나 이상의 마이크로채널에 연결된 마이크로챔버의 어레이를 포함한다. 미세유체 구조는 박막에 의해 캡핑된다. 캡핑 공정에서, 미세구조의 하나 이상의 측면에서 개구는 미세구조를 폐쇄하고 밀봉하기 위하여 덮여진다. 본 개시내용의 몇몇 실시양태에서, 캡핑은 박막을 사출 성형된 미세유체 구조로 적용하는 공정(402)에 의해 수행된다. 본 개시내용의 몇몇 실시양태에서, 캡핑은 박막을 사출 성형 공정(401)의 부분으로서 형성함으로써 수행된다.

[0090] 또 다른 예에서, 사출 성형을 통해 형성되는 미세구조의 맥락에서 기재되었지만, 다른 마이크로제조 기술에 의해 형성된 미세유체 장치는 상기 기재된 바와 같이 탈기를 가능하게 하는 이러한 열가소성 박막의 사용으로부터 이익을 얻을 수 있다. 이러한 기술은 미세가공, 마이크로리소그래피, 및 핫 엠보싱뿐만 아니라 다른 미세제조 기술을 포함한다.

[0091] 핵산 샘플의 분석 방법

[0092] 양상에 있어서, 본 개시내용은 미세유체 장치를 사용하여 핵산 샘플을 분석하는 방법을 제공한다. 방법은 마이크로채널을 포함하는 미세유체 장치를 제공하는 단계를 포함할 수 있다. 마이크로채널은 입구 및 출구를 포함할 수 있다. 미세유체 장치는 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 마이크로채널에 연결된 복수의 마이크로챔버를 추가로 포함할 수 있다. 미세유체 장치는 열가소성 박막이 마이크로채널, 복수의 마이크로챔버, 및 복수의 사이펀 애퍼처를 캡핑하도록 미세유체 장치의 표면에 인접하게 배치된 열가소성 박막에 의해 밀봉될 수 있다. 시약은 입구 또는 출구에 적용될 수 있다. 미세유체 장치는 시약과 미세유체 장치 사이의 제1 압력차를 제공하고, 시약이 미세유체 장치 내로 흐르는 것을 유발함으로써 충전될 수 있다. 시약은 마이크로채널과 복수의 마이크로챔버 사이의 제2 압력차를 적용하여 시약을 복수의 마이크로챔버 내로 이동시키고, 복수의 마이크로챔버 사이의 기체를 열가소성 박막을 통과하도록 함으로써, 마이크로챔버 내로 분할될 수 있다. 제2 압력차는 제1 압력차보다 클 수 있다. 입구와 출구 사이의 제3 압력차를 적용하여 유체를 마이크로챔버 내로 도입하지 않으면서 유체를 마이크로채널 내로 도입할 수 있다. 제3 압력차는 제2 압력차보다 작을 수 있다.

[0093] 몇몇 실시양태에서, 입구 및 출구는 공압 펌프와 유체 연통된다. 몇몇 실시양태에서, 미세유체 장치는 진공 시스템과 접촉한다. 샘플의 충전 및 분할은 미세유체 장치의 다양한 특징부를 가로지르는 압력차를 적용함으로써 수행될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 샘플의 충전 및 분할은 샘플을 분리하는 마이크로챔버와 마이크로채널의 밸브의 사용 없이 수행될 수 있다. 예를 들면, 마이크로채널의 충전은 로딩되는 샘플과 마이크로채널 사이에 압

력차를 적용함으로써 수행될 수 있다. 이러한 압력차는 샘플에 압력을 가하거나 마이크로채널에 진공을 적용함으로써 달성될 수 있다. 마이크로챔버의 충전은 마이크로채널과 마이크로챔버 사이에 압력차를 적용함으로써 수행될 수 있다. 이는 마이크로채널에 압력을 가하거나 마이크로챔버에 진공을 적용함으로써 달성될 수 있다. 샘플의 분할은 유체와 마이크로채널 사이에 압력차를 적용함으로써 수행될 수 있다. 이러한 압력차는 유체에 압력을 가하거나 마이크로채널에 진공을 적용함으로써 달성될 수 있다.

[0094] 박막은 상이한 적용된 압력차하에 상이한 투과성 특성을 사용할 수 있다. 예를 들면, 박막은 더 작은 규모의 압력차일 수 있는 제1 및 제3 압력차(예를 들면, 저압)에서 기체 불투과성일 수 있다. 박막은 더 높은 규모의 압력차일 수 있는 제2 압력차(예를 들면, 고압)에서, 적어도 부분적으로 기체 투과성일 수 있다. 제1 및 제3 압력차는 동일할 수 있거나, 이들은 상이할 수 있다. 제1 압력차는 입구 또는 출구에서의 시약과 미세유체 장치 사이의 압력의 차이일 수 있다. 미세유체 장치의 충전 동안, 시약의 압력은 미세유체 장치의 압력보다 높을 수 있다. 미세유체 장치의 충전 동안, 시약과 미세유체 장치 사이의 압력차(예를 들면, 저압)는 약 8 제곱 인치당 파운드(psi) 이하, 약 6 psi 이하, 약 4 psi 이하, 약 2 psi 이하, 약 1 psi 이하, 또는 그 미만일 수 있다. 몇몇 예에서, 미세유체 장치의 충전 동안, 시약과 미세유체 장치 사이의 압력차는 약 1 psi 내지 약 8 psi일 수 있다. 몇몇 예에서, 미세유체 장치의 충전 동안, 시약과 미세유체 장치 사이의 압력차는 약 1 psi 내지 약 6 psi일 수 있다. 몇몇 예에서, 미세유체 장치의 충전 동안, 시약과 미세유체 장치 사이의 압력차는 약 1 psi 내지 약 4 psi일 수 있다. 미세유체 장치는 약 20분 이하, 약 15분 이하, 약 10분 이하, 약 5분 이하, 약 3분 이하, 약 2분 이하, 약 1분 이하, 또는 그 미만 동안 시약과 미세유체 장치 사이에 압력차를 적용함으로써 충전될 수 있다.

[0095] 충전된 미세유체 장치는 마이크로채널, 사이펀 애퍼처, 마이크로챔버, 또는 이의 임의의 조합 내에 시약을 가질 수 있다. 마이크로챔버 내로 시약의 재충전(backfilling)은 미세유체 장치의 충전 시에 발생할 수 있거나 제2 압력차의 적용 동안 발생할 수 있다. 제2 압력차(예를 들면, 고압)는 마이크로채널과 복수의 마이크로챔버 사이의 압력의 차이에 상응할 수 있다. 제2 압력차의 적용 동안, 더 높은 압력 영역의 제1 유체는 박막을 통해 미세유체 장치 외부로 더 낮은 압력 영역의 제2 유체를 밀어낼 수 있다. 제1 및 제2 유체는 액체 또는 기체를 포함할 수 있다. 액체는 수성 혼합물 또는 오일 혼합물을 포함할 수 있다. 제2 압력차는 마이크로채널에 압력을 가함으로써 달성될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 제2 압력차는 마이크로챔버에 진공을 적용함으로써 달성될 수 있다. 제2 압력차의 적용 동안, 마이크로채널 내의 시약은 마이크로챔버 내로 흐를 수 있다. 추가로, 제2 압력차의 적용 동안 사이펀 애퍼처, 마이크로챔버, 및 마이크로채널 내에 갇힌 기체는 박막을 통해 탈기될 수 있다. 마이크로챔버의 재충전 및 탈기 동안, 마이크로챔버와 마이크로채널 사이의 압력차는 약 6 psi 이상, 약 8 psi 이상, 약 10 psi 이상, 약 12 psi 이상, 약 14 psi 이상, 약 16 psi 이상, 약 18 psi 이상, 약 20 psi 이상, 또는 그 초과일 수 있다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버의 재충전 동안, 마이크로챔버와 마이크로채널 사이의 압력차는 약 8 psi 내지 약 20 psi이다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버의 재충전 동안, 마이크로챔버와 마이크로채널 사이의 압력차는 약 8 psi 내지 약 18 psi이다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버의 재충전 동안, 마이크로챔버와 마이크로채널 사이의 압력차는 약 8 psi 내지 약 16 psi이다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버의 재충전 동안, 마이크로챔버와 마이크로채널 사이의 압력차는 약 8 psi 내지 약 14 psi이다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버의 재충전 동안, 마이크로챔버와 마이크로채널 사이의 압력차는 약 8 psi 내지 약 12 psi이다. 몇몇 예에서, 마이크로챔버의 재충전 동안, 마이크로챔버와 마이크로채널 사이의 압력차는 약 8 psi 내지 약 10 psi이다. 마이크로챔버는 약 5분 초과, 약 10분 초과, 약 15분 초과, 약 20분 초과, 약 25분 초과, 약 30분 초과, 또는 또는 그 초과 동안 압력차를 적용함으로써 재충전되고 탈기될 수 있다.

[0096] 샘플은 과량의 샘플을 마이크로채널로부터 제거함으로써 분할될 수 있다. 과량의 샘플을 마이크로채널로부터 제거하는 것은 하나의 마이크로챔버 내의 시약이 사이펀 애퍼처를 통해 마이크로채널 및 다른 마이크로챔버로 확산되는 것을 방지할 수 있다. 마이크로채널 내의 과량의 샘플은 유체를 마이크로채널의 입구 또는 출구로 도입함으로써 제거될 수 있다. 유체의 압력은 마이크로채널의 압력보다 크고, 이로써 유체와 마이크로채널 사이의 압력차를 생성할 수 있다. 유체는 산소, 질소, 이산화탄소, 공기, 비활성 기체, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 샘플의 분할 동안, 유체와 마이크로채널 사이의 압력차는 약 8 psi 이하, 약 6 psi 이하, 약 4 psi 이하, 약 2 psi 이하, 약 1 psi 이하, 또는 그 미만일 수 있다. 몇몇 예에서, 샘플의 분할 동안, 유체와 마이크로채널 사이의 압력차는 약 1 psi 내지 약 8 psi일 수 있다. 몇몇 예에서, 샘플의 분할 동안, 유체와 마이크로채널 사이의 압력차는 약 1 psi 내지 약 6 psi일 수 있다. 몇몇 예에서, 샘플의 분할 동안, 유체와 마이크로채널 사이의 압력차는 약 1 psi 내지 약 4 psi일 수 있다. 샘플은 약 20분 이하, 약 15분 이하, 약 10분 이하, 약 5분 이하, 약 3분 이하, 약 2분 이하, 약 1분 이하, 또는 그 미만 동안 유체와 마이크로채널 사이의 압력차를 적용하

여 분할될 수 있다.

- [0097] 도 3A-3D는 도 1A에 도시된 미세유체 장치의 사용 방법을 도시한다. 도 3A에서, 저압은 입구(120)에서 공압 펌프(300)를 통해 시약에 저압을 적용하여 시약을 마이크로채널(110) 내로 들어가게 하고, 이로써 사이펀 애퍼처를 통해 마이크로챔버를 충전한다. 압력은 시약이 마이크로채널을 통해 흐르고, 이로써 사이펀 애퍼처를 통해 마이크로챔버 내로 흐르도록 한다. 이 때, 기체 거품, 예를 들면, 거품(301)은 마이크로챔버, 사이펀 애퍼처, 또는 마이크로채널 내에 남아 있을 수 있다. 저압의 적용을 통한 충전은 마이크로챔버, 사이펀 애퍼처, 및 마이크로채널이 시약으로 실질적으로 충전될 때까지 계속될 수 있다. 시약은 중합효소 연쇄 반응에서 사용되는 시약일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 시약은 하나 이하의 PCR 주형이 미세유체 장치의 마이크로챔버당 시약 중에 존재하도록 희석된다.
- [0098] 도 3B에서, 공압 펌프(300)는 입구(120) 및 출구(130) 둘 다에 연결되고, 고압이 적용된다. 고압은 시약을 통해 전달되고, 기체 거품, 예를 들면, 거품(301)에 적용된다. 이러한 고압의 영향하에, 박막(150)은 기체 투과성이 되고, 거품(301)은 박막(150)을 통해 탈기될 수 있다. 이러한 고압을 적용함으로써, 마이크로챔버, 사이펀 애퍼처, 및 마이크로채널은 기체 거품을 실질적으로 함유하지 않게 될 수 있고, 이로써 파울링을 피할 수 있다.
- [0099] 도 3C에서, 유체는 공압 펌프(300)를 통해 입구(120)에서 기체에 저압을 적용함으로써 재도입된다. 공기 압력은 기체가 박막을 통해 탈기하는 것을 가능하게 할만큼 충분하지 않을 수 있거나, 사이펀 애퍼처 및 마이크로챔버 내로 들어가게 할만큼 충분히 높지 않을 수 있다. 실제로, 기체는 각각의 마이크로챔버 및 사이펀 애퍼처 내에 단리된 시약을 남기고 마이크로채널의 시약을 비울 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 기체는 공기이다. 몇몇 실시양태에서, 기체는 불활성 기체, 예를 들면, 질소, 이산화탄소, 또는 비활성 기체일 수 있다. 이러한 기체는 시약과 공기의 구성분 기체 사이의 반응을 피하는데 사용될 수 있다.
- [0100] 도 3D는 저압이 도 3C에서 적용된 후 시스템의 상태를 도시한다. 저압 기체의 적용 후, 마이크로챔버 및 사이펀 애퍼처는 시약으로 충전된 채로 남을 수 있고, 마이크로채널은 시약이 비워질 수 있다. 시약은 사이펀 애퍼처에 의해 형성된 모세관력 및 높은 표면 장력으로 인하여 일정하게 남아 있을 수 있다. 모세관력 및 높은 표면 장력은 시약이 마이크로채널 내로 흘러가는 것을 방지하고 시약 증발을 최소화할 수 있다.
- [0101] 샘플의 분할은 시약 내의 지시제의 존재에 의해 입증될 수 있다. 지시제는 검출 가능한 모이어티를 포함하는 분자를 포함할 수 있다. 검출 가능한 모이어티는 방사성 종, 형광 표지, 화학발광 표지, 효소 표지, 비색 표지, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 방사성 종의 비제한적인 예는 ^3H , ^{14}C , ^{22}Na , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{42}K , ^{45}Ca , ^{59}Fe , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , 또는 ^{203}Hg 를 포함한다. 형광 표지의 비제한적인 예는 형광 단백질, 광학 활성 염료(예를 들면, 형광 염료), 유기금속 형광단, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 화학발광 표지의 비제한적인 예는 루시페라제 부류의 효소, 예를 들면, 사이프리디나(Cypridina), 구아시아(Gaussia), 레닐라(Renilla), 및 파이어플라이(Firefly) 루시페라제를 포함한다. 효소 표지의 비제한적인 예는 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP), 알칼리성 포스파타제(AP), 베타 갈락토시다제, 글루코스 옥시다제, 또는 다른 잘 알려진 표지를 포함한다.
- [0102] 몇몇 실시양태에서, 지시제 분자는 형광 분자이다. 형광 분자는 형광 단백질, 형광 염료, 및 유기금속 형광단을 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 지시제 분자는 단백질 형광단이다. 단백질 형광단은 녹색 형광 단백질(GFP, 일반적으로 500-550 나노미터의 파장을 갖는 빛을 방출하는, 스펙트럼의 녹색 영역에서 형광을 내는 형광 단백질), 시안-형광 단백질(CFP, 일반적으로 450-500 나노미터의 파장을 갖는 빛을 방출하는, 스펙트럼의 시안색 영역에서 형광을 내는 형광 단백질), 적색 형광 단백질(RFP, 일반적으로 600-650 나노미터의 파장을 갖는 빛을 방출하는, 스펙트럼의 적색 영역에서 형광을 내는 형광 단백질)을 포함할 수 있다. 단백질 형광단의 비제한적인 예는 AcGFP, AcGFP1, AmCyan, AmCyan1, AQ143, AsRed2, 아자미 그린(Azami Green), 아주라이트(Azurite), BFP, 세룰리안(Cerulean), CFP, CGFP, 시트린(Citrine), copGFP, CyPet, d케이마-탠덤(dKeima-Tandem), Ds레드(DsRed), ds레드-익스프레스(dsRed-Express), Ds레드-모노머(DsRed-Monomer), Ds레드2, d토마토(dTomato), d토마토-탠덤(dTomato-Tandem), EBFP, EBFP2, ECFP, EGFP, 에메랄드(Emerald), EosFP, EYFP, GFP, Hc레드-탠덤(HcRed-Tandem), Hc레드1(HcRed1), J레드(JRed), 카투스카(Katuska), 쿠사비라 오렌지(Kusabira Orange), 쿠사비라 오렌지2, m애플(mApple), m바나나(mBanana), m세룰리안(mCerulean), mCFP, m체리(mCherry), m시트린(mCitrine), mECFP, m에메랄드(mEmerald), m그레이프1(mGrape1), m그레이프2(mGrape2), m허니듀(mHoneydew), 미도리-이시이 시안(Midori-Ishi Cyan), m케이마(mKeima), mKO, m오렌지(mOrange), m오렌지2, m플럼(mPlum), m라즈베리(mRaspberry), mRFP1, m루비(mRuby), m스트로베리(mStrawberry), mTagBFP, m탠저린(mTangerine), m틸(mTeal), m토마토(mTomato), m터퀴즈(mTurquoise), m와사비(mWasabi), PhiYFP, ReAsH, 사파이어(Sapphire), 슈퍼폴더(Superfolder) GFP, T-사파이어, TagCFP, TagGFP, TagRFP, TagRFP-T, TagYFP, td토마토(tdTomato), 토

파스(Topaz), 터보GFP(TurboGFP), 비너스(Venus), YFP, YPet, Zs그린(ZsGreen), 및 Zs옐로우1(ZsYellow1)의 돌연변이 및 스펙트럼 변이체를 포함한다.

[0103] 몇몇 실시양태에서, 지시제 분자는 형광 염료이다. 형광 염료의 비제한적인 예는 SYBR 그린, SYBR 블루, DAPI, 요오드화프로피듐, 호에스트(Hoeste), SYBR 골드, 브롬화에티듐, 아크리딘, 프로플라빈, 아크리딘 오렌지, 아크리플라빈, 플루오르코우마닌, 엘립티신, 다우노마이신, 클로로퀸, 디스타마이신 D, 클로모마이신, 호미디움, 미트라마이신, 루테튬, 폴리페리딜, 안트라마이신, 페난트리딘 및 아크리딘, 브롬화에티듐, 요오드화프로피듐, 요오드화헥시듐, 디하이드로에티듐, 에티듐 호모다이어-1 및 -2, 에티듐 모노아지드, 및 ACMA, 회호스트(Hoechst) 33258, 회호스트 33342, 회호스트 34580, DAPI, 아크리딘 오렌지, 7-AAD, 악티노마이신 D, LDS751, 하이드록시스티라비딘, SYTOX 블루, SYTOX 그린, SYTOX 오렌지, POPO-1, POPO-3, YOYO-1, YOYO-3, TOTO-1, TOTO-3, JOJO-1, LOLO-1, BOBO-1, BOBO-3, PO-PRO-1, PO-PRO-3, BO-PRO-1, BO-PRO-3, TO-PRO-1, TO-PRO-3, TO-PRO-5, JO-PRO-1, LO-PRO-1, YO-PRO-1, YO-PRO-3, 피코그린(PicoGreen), 올리그린(OliGreen), 리보그린(RiboGreen), SYBR 골드, SYBR 그린 I, SYBR 그린 II, SYBR DX, SYTO-40, -41, -42, -43, -44, -45(블루), SYTO-13, -16, -24, -21, -23, -12, -11, -20, -22, -15, -14, -25(그린), SYTO-81, -80, -82, -83, -84, -85(오렌지), SYTO-64, -17, -59, -61, -62, -60, -63(레드), 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 테트라메틸 로다민 이소티오시아네이트(TRITC), 로다민, 테트라메틸 로다민, R-파이크에리트린, Cy-2, Cy-3, Cy-3.5, Cy-5, Cy5.5, Cy-7, 텍사스 레드(Texas Red), 파-레드(Phar-Red), 알로코시아닌(APC), Sybr 그린 I, Sybr 그린 II, Sybr 골드, 셀트랙커(CellTracker) 그린, 7-AAD, 에티듐 호모다이어 I, 에티듐 호모다이어 II, 에티듐 호모다이어 III, 브롬화에티듐, 엠벨리페론, 에오신, 그린 형광 단백질, 에리트로신, 쿠마린, 메틸 쿠마린, 파이렌, 말라카이트 그린, 스틸벤, 루시페르 옐로우, 캐스케이드 블루, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단일 클로라이드, 형광 란탄족 착물, 예를 들면, 유로퓸 및 테르븀을 포함한 것들, 카복시 테트라클로로 플루오레세인, 5 및/또는 6-카복시 플루오레세인(FAM), 5-(또는 6-) 요오도아세트아미도플루오레세인, 5-[[2(및 3)-5-(아세틸머캅토)-석시닐]아미노]플루오레세인(SAMSA-플루오레세인), 리사민 로다민 B 설포닐 클로라이드, 5 및/또는 6 카복시 로다민(ROX), 7-아미노-메틸-쿠마린, 7-아미노-4-메틸쿠마린-3-아세트산(AMCA), BODIPY 형광단, 8-메톡시파이렌-1,3,6-트리설포산 트리나트륨 염, 3,6-디설포네이트-4-아미노-나프탈이미드, 파이크빌리단백질, 알렉사플루오르(AlexaFluor) 350, 405, 430, 488, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750, 및 790 염료, 다이라이트(DyLight) 350, 405, 488, 550, 594, 633, 650, 680, 755, 및 800 염료, 또는 다른 형광단을 포함한다.

[0104] 몇몇 실시양태에서, 지시제 분자는 유기금속 형광단이다. 유기금속 형광단의 비제한적인 예는 란탄족 이온 킬레이트를 포함하고, 이의 비제한적인 예는 트리스(디벤조일메탄) 모노(1,10-페난트롤린)유로퓸(III), 트리스(디벤조일메탄) 모노(5-아미노-1,10-페난트롤린)유로퓸(III), 및 Lumi4-Tb 크립테이트를 포함한다.

[0105] 몇몇 실시양태에서, 미세유체 장치로부터 이미지를 획득한다. 단일 마이크로챔버, 마이크로챔버의 어레이, 또는 마이크로챔버의 다중 어레이의 이미지를 동시에 획득할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이미지는 미세유체 장치의 본체를 통해 획득한다. 몇몇 실시양태에서, 이미지는 미세유체 장치의 박막을 통해 획득한다. 몇몇 실시양태에서, 이미지는 미세유체 장치의 본체 및 박막 둘 다를 통해 획득한다. 몇몇 실시양태에서, 미세유체 장치의 본체는 실질적으로 광학적으로 투명하다. 몇몇 실시양태에서, 미세유체 장치의 본체는 실질적으로 광학적으로 불투명하다. 몇몇 실시양태에서, 박막은 실질적으로 광학적으로 투명하다. 몇몇 실시양태에서, 이미지는 미세유체 장치를 시약으로 충전하기 전에 획득할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이미지는 미세유체 장치를 시약으로 충전한 후에 획득할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이미지는 미세유체 장치를 시약으로 충전하는 동안 획득할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이미지를 획득하여 시약의 분할을 입증한다. 몇몇 실시양태에서, 이미지를 반응 동안 획득하여 반응의 생성물을 모니터링한다. 몇몇 실시양태에서, 반응의 생성물은 증폭 생성물을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이미지는 특정된 간격으로 획득한다. 대안적으로, 또는 추가로, 미세유체 장치의 비디오를 획득할 수 있다. 특정된 간격은 반응 동안 적어도 300초 마다, 적어도 240초 마다, 적어도 180초 마다, 적어도 120초 마다, 적어도 90초 마다, 적어도 60초 마다, 적어도 30초 마다, 적어도 15초 마다, 적어도 10초 마다, 적어도 5초 마다, 적어도 4초 마다, 적어도 3초 마다, 적어도 2초 마다, 적어도 1초 마다, 또는 더 빈번하게 이미지를 획득하는 것을 포함할 수 있다.

[0106] 몇몇 실시양태에서, 미세유체 장치의 사용 방법은 핵산 샘플의 증폭을 추가로 포함할 수 있다. 미세유체 장치는 핵산 분자, 증폭 반응에 필요한 구성분, 지시제 분자, 및 증폭 프로브를 포함하는 증폭 시약으로 충전될 수 있다. 증폭은 복수의 마이크로챔버를 열 순환시킴으로써 수행될 수 있다. 핵산 증폭의 검출은 미세유체 장치의 마이크로챔버를 이미징함으로써 수행될 수 있다. 핵산 분자는 핵산 분자가 성공적으로 증폭되는 마이크로챔버를

계수하고 푸아송 통계를 적용함으로써 정량될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 핵산 증폭 및 정량은 단일 일체형 유닛에서 수행될 수 있다.

[0107] 다양한 핵산 증폭 반응을 사용하여 샘플 중의 핵산 분자를 증폭시켜 증폭된 생성물을 생성할 수 있다. 핵산 표적의 증폭은 선형, 지수형, 또는 이의 조합일 수 있다. 핵산 증폭 방법의 비제한적인 예는 프라이머 신장, 중합 효소 연쇄 반응, 역전사, 등온 증폭, 리가아제 연쇄 반응, 헬리카제 의존성 증폭, 비대칭 증폭, 회전환 증폭, 및 다중 변위 증폭을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 증폭 생성물은 DNA 또는 RNA이다. DNA 증폭에 대한 실시양태에 있어서, 임의의 DNA 증폭 방법이 사용될 수 있다. DNA 증폭 방법은 PCR, 실시간 PCR, 어셈블리 PCR, 비대칭 PCR, 디지털 PCR, 다이얼-아웃(dial-out) PCR, 헬리카아제 의존성 PCR, 네스티드(nested) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 역 PCR, 메틸화 특이적 PCR, 미니프라이머 PCR, 멀티플렉스 PCR, 오버랩-신장 PCR, 열 비대칭 인터레이스 처리된 PCR, 터치다운 PCR, 및 리가아제 연쇄 반응을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 몇몇 실시양태에서, DNA 증폭은 선형, 지수형, 또는 이의 임의의 조합이다. 몇몇 실시양태에서, DNA 증폭은 디지털 PCR(dPCR)에 의해 달성된다.

[0108] 핵산 증폭에 필요한 시약은 중합 효소, 역방향 프라이머, 정방향 프라이머, 및 증폭 프로브를 포함할 수 있다. 중합 효소의 예는, 제한 없이, 핵산 중합효소, 전사효소, 또는 리가아제(즉, 결합의 형성을 촉매하는 효소)를 포함한다. 중합 효소는 천연 발생할 수 있거나 합성될 수 있다. 중합효소의 예는 DNA 중합효소, 및 RNA 중합효소, 열안정성 중합효소, 야생형 중합효소, 변형된 중합효소, 이. 콜라이(E. coli) DNA 중합효소 I, T7 DNA 중합효소, 박테리오파지 T4 DNA 중합효소 Φ 29(파이29) DNA 중합효소, Taq 중합효소, Tth 중합효소, Tli 중합효소, Pfu 중합효소 Pwo 중합효소, VENT 중합효소, DEEPVENT 중합효소, Ex-Taq 중합효소, LA-Taw 중합효소, Sso 중합효소 Poc 중합효소, Pab 중합효소, Mth 중합효소 ES4 중합효소, Tru 중합효소, Tac 중합효소, Tne 중합효소, Tma 중합효소, Tca 중합효소, Tih 중합효소, Tfi 중합효소, 백금 Taq 중합효소, Tbr 중합효소, Tfl 중합효소, 피푸터보(Pfutubo) 중합효소, 파이로베스트(Pyrobest) 중합효소, KOD 중합효소, Bst 중합효소, Sac 중합효소, 3'에서 5'로의 엑소뉴클레아제 활성을 가진 클레노브(Klenow) 단편 중합효소, 및 이의 변이체, 변형된 생성물 및 유도체를 포함한다. 핫 스타트 중합효소의 경우, 약 2분 내지 10분의 시간 기간 동안 약 92℃ 내지 95℃에서의 변성 단계가 필요할 수 있다.

[0109] 몇몇 실시양태에서, 증폭 프로브는 서열-특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브이다. 증폭 프로브는 증폭 생성물과 혼성화될 때 광학적으로 활성일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 증폭 프로브는 오직 핵산 증폭이 진행됨에 따라 검출 가능하다. 광학 신호의 강도는 증폭된 생성물의 양에 비례할 수 있다. 프로브는 본원에 기재된 임의의 광학적으로 활성인 검출 가능한 모이어티(예를 들면, 염료)에 연결될 수 있고, 또한 연관된 염료의 광학 활성을 차단할 수 있는 켄처를 포함할 수 있다. 검출 가능한 모이어티로서 유용할 수 있는 프로브의 비제한적인 예는 TaqMan 프로브, TaqMan 타마라(Tamara) 프로브, TaqMan MGB 프로브, 라이온(Lion) 프로브, 잠금 핵산 프로브, 또는 분자 비콘을 포함한다. 프로브의 광학 활성을 차단하는데 유용할 수 있는 켄처의 비제한적인 예는 블랙 홀 켄처(BHQ: Black Hole Quencher), 아이오와 블랙(Iowa Black) FQ 및 RQ 켄처, 또는 인터널(Internal) ZEN 켄처를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 프로브 또는 켄처는 본 개시내용의 방법의 맥락에서 유용한 임의의 공지된 프로브일 수 있다.

[0110] 몇몇 실시양태에서, 증폭 프로브는 이중 표지된 형광 프로브이다. 이중 표지된 프로브는 핵산과 연결된 형광 리포터 및 형광 켄처를 포함할 수 있다. 형광 리포터 및 형광 켄처는 서로 매우 근접하게 위치할 수 있다. 형광 리포터 및 형광 켄처의 매우 근접함은 형광 리포터의 광학 활성을 차단할 수 있다. 이중 표지된 프로브는 증폭되는 핵산 분자에 결합될 수 있다. 증폭 동안, 형광 리포터 및 형광 켄처는 중합효소의 엑소뉴클레아제 활성에 의해 절단될 수 있다. 증폭 프로브로부터의 형광 리포터 및 켄처의 절단은 형광 리포터가 이의 광학 활성을 되찾고 검출을 가능하게 하는 것을 유발할 수 있다. 이중 표지된 형광 프로브는 약 450 나노미터(nm), 500 nm, 525 nm, 550 nm, 575 nm, 600 nm, 625 nm, 650 nm, 675 nm, 700 nm, 또는 그 초과와 최대 여기 파장 및 약 500 nm, 525 nm, 550 nm, 575 nm, 600 nm, 625 nm, 650 nm, 675 nm, 700 nm, 또는 그 초과와 최대 방출 파장을 갖는 5' 형광 리포터를 포함할 수 있다. 이중 표지된 형광 프로브는 또한 3' 형광 켄처를 포함할 수 있다. 형광 켄처는 약 380 nm 내지 550 nm, 390 nm 내지 625 nm, 470 nm 내지 560 nm, 480 nm 내지 580 nm, 550 nm 내지 650 nm, 550 nm 내지 750 nm, 또는 620 nm 내지 730 nm의 형광 방출 파장을 켄칭할 수 있다.

[0111] 몇몇 실시양태에서, 핵산 증폭은 미세유체 장치의 마이크로챔버를 열 순환시킴으로써 수행된다. 열 순환은 미세유체 장치에 가열 또는 냉각을 적용함으로써 미세유체 장치의 온도를 제어하는 것을 포함할 수 있다. 가열 또는 냉각 방법은 저항 가열 또는 냉각, 복사 가열 또는 냉각, 전도 가열 또는 냉각, 대류 가열 또는 냉각, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 열 순환은 기간 동안 핵산 분자를 변성시킬 만큼 충분히 높은 온도에서 마이

크로챔버를 인큐베이팅한 후, 신장 기간 동안 신장 온도에서 마이크로챔버의 인큐베이션하는 순환을 포함할 수 있다. 변성 온도는, 예를 들면, 특정한 핵산 샘플, 사용된 시약, 및 목적하는 반응 조건에 따라 다양할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 변성 온도는 약 80℃ 내지 약 110℃일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 변성 온도는 약 85℃ 내지 약 105℃일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 변성 온도는 약 90℃ 내지 약 100℃일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 변성 온도는 약 90℃ 내지 약 98℃일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 변성 온도는 약 92℃ 내지 약 95℃일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 변성 온도는 약 80℃ 이상, 약 81℃ 이상, 약 82℃ 이상, 약 83℃ 이상, 약 84℃ 이상, 약 85℃ 이상, 약 86℃ 이상, 약 87℃ 이상, 약 88℃ 이상, 약 89℃ 이상, 약 90℃ 이상, 약 91℃ 이상, 약 92℃ 이상, 약 93℃ 이상, 약 94℃ 이상, 약 95℃ 이상, 약 96℃ 이상, 약 97℃ 이상, 약 98℃ 이상, 약 99℃ 이상, 약 100℃ 이상, 또는 그 초과일 수 있다.

[0112] 변성 기간은, 예를 들면, 특정한 핵산 샘플, 사용된 시약, 및 목적하는 반응 조건에 따라 다양할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 변성 기간은 약 300초, 240초, 180초, 120초, 90초, 60초, 55초, 50초, 45초, 40초, 35초, 30초, 25초, 20초, 15초, 10초, 5초, 2초, 또는 1초 이하일 수 있다. 대안적인 실시양태에서, 변성 기간은 약 120초, 90초, 60초, 55초, 50초, 45초, 40초, 35초, 30초, 25초, 20초, 15초, 10초, 5초, 2초, 또는 1초 이하일 수 있다.

[0113] 신장 온도는, 예를 들면, 특정한 핵산 샘플, 사용된 시약, 및 목적하는 반응 조건에 따라 다양할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 신장 온도 약 30℃ 내지 약 80℃일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 신장 온도는 약 35℃ 내지 약 75℃일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 신장 온도는 약 45℃ 내지 약 65℃일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 신장 온도는 약 55℃ 내지 약 65℃일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 신장 온도는 약 40℃ 내지 약 60℃일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 신장 온도는 약 35℃ 이상, 약 36℃ 이상, 약 37℃ 이상, 약 38℃ 이상, 약 39℃ 이상, 약 40℃ 이상, 약 41℃ 이상, 약 42℃ 이상, 약 43℃ 이상, 약 44℃ 이상, 약 45℃ 이상, 약 46℃ 이상, 약 47℃ 이상, 약 48℃ 이상, 약 49℃ 이상, 약 50℃ 이상, 약 51℃ 이상, 약 52℃ 이상, 약 53℃ 이상, 약 54℃ 이상, 약 55℃ 이상, 약 56℃ 이상, 약 57℃ 이상, 약 58℃ 이상, 약 59℃ 이상, 약 60℃ 이상, 약 61℃ 이상, 약 62℃ 이상, 약 63℃ 이상, 약 64℃ 이상, 약 65℃ 이상, 약 66℃ 이상, 약 67℃ 이상, 약 68℃ 이상, 약 69℃ 이상, 약 70℃ 이상, 약 71℃ 이상, 약 72℃ 이상, 약 73℃ 이상, 약 74℃ 이상, 약 75℃ 이상, 약 76℃ 이상, 약 77℃ 이상, 약 78℃ 이상, 약 79℃ 이상, 또는 약 80℃ 이상일 수 있다.

[0114] 신장 시간은, 예를 들면, 특정한 핵산 샘플, 사용된 시약, 및 목적하는 반응 조건에 따라 다양할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 신장 기간은 약 300초, 240초, 180초, 120초, 90초, 60초, 55초, 50초, 45초, 40초, 35초, 30초, 25초, 20초, 15초, 10초, 5초, 2초, 또는 1초 이하일 수 있다. 대안적인 실시양태에서, 신장 기간은 약 120초, 90초, 60초, 55초, 50초, 45초, 40초, 35초, 30초, 25초, 20초, 15초, 10초, 5초, 2초, 또는 1초 이하일 수 있다.

[0115] 핵산 증폭은 열 순환의 다중 사이클을 포함할 수 있다. 임의의 적합한 사이클 수가 수행될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 수행되는 사이클 수는 약 5 사이클 초과, 약 10 사이클 초과, 약 15 사이클 초과, 약 20 사이클 초과, 약 30 사이클 초과, 약 40 사이클 초과, 약 50 사이클 초과, 약 60 사이클 초과, 약 70 사이클 초과, 약 80 사이클 초과, 약 90 사이클 초과, 약 100 사이클 초과, 또는 그 초과일 수 있다. 수행된 사이클 수는 검출 가능한 증폭 생성물을 수득하는데 필요한 사이클의 수에 따라 좌우될 것이다. 예를 들면, dPCR 동안 핵산 증폭을 검출하는데 필요한 사이클 수는 약 100 사이클 이하, 약 90 사이클 이하, 약 80 사이클 이하, 약 70 사이클 이하, 약 60 사이클 이하, 약 50 사이클 이하, 약 40 사이클 이하, 약 30 사이클 이하, 약 20 사이클 이하, 약 15 사이클 이하, 약 10 사이클 이하, 약 5 사이클 이하, 또는 그 미만일 수 있다.

[0116] 증폭 생성물의 검출 가능한 양에 도달하는 시간은 특정한 핵산 샘플, 사용된 시약, 사용된 증폭 반응, 사용된 증폭 사이클 수, 및 목적하는 반응 조건에 따라 다양할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 증폭 생성물의 검출 가능한 양에 도달하는 시간은 약 120분 이하, 90분 이하, 60분 이하, 50분 이하, 40분 이하, 30분 이하, 20분 이하, 10분 이하, 또는 5분 이하일 수 있다.

[0117] 몇몇 실시양태에서, 램핑 속도(ramping rate)(즉, 한 온도에서 또 다른 온도로의 마이크로챔버 전이 속도)는 증폭에 있어서 중요하다. 예를 들면, 증폭 반응이 증폭된 생성물의 검출 가능한 양을 수득하는 온도 및 시간은 램핑 속도에 따라 다양할 수 있다. 램핑 속도는 증폭 동안 사용된 시간(들), 온도(들), 또는 시간(들) 및 온도(들) 둘 다에 영향을 줄 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 램핑 속도는 사이클 간에 일정하다. 몇몇 실시양태에서, 램핑 속도는 사이클 간에 다양하다. 램핑 속도는 처리되는 샘플을 기반으로 조절될 수 있다. 예를 들면, 최적 램핑 속도(들)가 강력하고 효율적인 증폭 방법을 제공하기 위하여 선택될 수 있다.

- [0118] 도 5는 상기 기재된 미세유체 장치와 함께 사용되는 디지털 PCR 공정을 도시한다. 단계 501에서, 시약은 도 3A-3D에 도시된 바와 같이 분할된다. 단계 502에서, 시약은 열 순환을 적용하여 마이크로챔버 내의 시약에 대하여 PCR 반응을 수행한다. 이러한 단계는, 예를 들면, 평평한 블록 열 사이클러를 사용하여 수행될 수 있다. 단계 503에서, 이미지 획득은 마이크로챔버가 PCR 반응을 성공적으로 수행했는지 여부를 결정하기 위하여 수행된다. 이미지 획득은, 예를 들면, 3색 프로브 검출 유닛을 사용하여 수행될 수 있다. 단계 504에서, 푸아송 통계를 단계 503에서 결정된 마이크로챔버의 수에 적용하여 양성 챔버의 원래 숫자를 핵산 농도로 전환한다.
- [0119] **핵산 샘플을 분석하기 위한 시스템**
- [0120] 양상에서, 본 개시내용은 미세유체 장치를 사용하여 핵산 샘플을 분석하는 기구를 제공한다. 기구는 하나 이상의 미세유체 장치를 잡고 있도록 구성된 이송 스테이지를 포함할 수 있다. 미세유체 장치는 입구 및 출구를 갖는 마이크로채널, 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 마이크로채널에 연결된 복수의 마이크로챔버, 및 미세유체 장치를 캡핑하거나 덮는 박막을 포함할 수 있다. 기구는 미세유체 장치와 유체 연통되는 공압 모듈을 포함할 수 있다. 공압 모듈은 시약을 미세유체 장치 내로 로딩하고, 시약을 마이크로챔버 내로 분할할 수 있다. 기구는 복수의 마이크로챔버와 열 연통되는 열 모듈을 포함할 수 있다. 열 모듈은 마이크로챔버의 온도 및 마이크로챔버의 열 사이클을 제어할 수 있다. 기구는 복수의 마이크로챔버를 이미징할 수 있는 광학 모듈을 포함할 수 있다. 기구는 또한 이송 스테이지, 공압 모듈, 열 모듈, 및 광학 모듈에 커플링되는 컴퓨터 프로세서를 포함할 수 있다. 컴퓨터 프로세서는 (i) 공압 모듈에 시약을 미세유체 장치 내로 로딩하고 시약을 복수의 마이크로챔버 내로 분할하는 것을 지시하고, (ii) 열 모듈에 복수의 마이크로챔버를 열 순환시키는 것을 지시하고, (iii) 광학 모듈에 복수의 마이크로챔버를 이미징하는 것을 지시하도록 프로그래밍될 수 있다.
- [0121] 이송 스테이지는 미세유체 장치를 입력하고, 미세유체 장치를 잡고 있고, 미세유체 장치를 출력하도록 구성될 수 있다. 이송 스테이지는 하나 이상의 좌표로 정지될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 이송 스테이지는 X 방향, Y 방향, Z 방향, 또는 이의 임의의 조합으로 이동할 수 있다. 이송 스테이지는 단일 미세유체 장치를 잡고 있을 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 이송 스테이지는 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 또는 그 초과인 미세유체 장치를 잡고 있을 수 있다.
- [0122] 공압 모듈은 미세유체 장치의 입구 및 출구와 유체 연통되도록 구성될 수 있다. 공압 모듈은 다중 입구 및 다중 출구에 연결될 수 있는 다중 연결 지점을 가질 수 있다. 공압 모듈은 마이크로챔버의 단일 어레이를 하나씩 또는 마이크로챔버의 다중 어레이를 동시에 충전하고 재충전하고 분할할 수 있다. 공압 모듈은 진공 모듈을 추가로 포함할 수 있다. 공압 모듈은 미세유체 장치에 증가된 압력을 제공하거나 미세유체 장치에 진공을 제공할 수 있다.
- [0123] 열 모듈은 미세유체 장치의 마이크로챔버와 열 연통되도록 구성될 수 있다. 열 모듈은 마이크로챔버의 단일 어레이의 온도를 제거하거나 마이크로챔버의 다중 어레이의 온도를 제어하도록 구성될 수 있다. 열 제어 모듈은 마이크로챔버의 모든 어레이에 대하여 동일한 열 프로그램을 수행할 수 있거나, 마이크로챔버의 상이한 어레이에 대하여 상이한 열 프로그램을 수행할 수 있다.
- [0124] 광학 모듈은 빛의 다중 파장을 방출하고 검출하도록 구성될 수 있다. 방출 파장은 사용된 지시제 및 증폭 프로브의 여기 파장에 상응할 수 있다. 방출된 빛은 약 450 nm, 500 nm, 525 nm, 550 nm, 575 nm, 600 nm, 625 nm, 650 nm, 675 nm, 700 nm, 또는 이의 임의의 조합 근처의 최대 강도를 갖는 파장을 포함할 수 있다. 검출된 빛은 약 500 nm, 525 nm, 550 nm, 575 nm, 600 nm, 625 nm, 650 nm, 675 nm, 700 nm, 또는 이의 임의의 조합 근처의 최대 강도를 갖는 파장을 포함할 수 있다. 광학 모듈은 빛의 1, 2, 3, 4개, 또는 초과인 파장을 방출하도록 구성될 수 있다. 광학 모듈은 빛의 1, 2, 3, 4개, 또는 초과인 파장을 검출하도록 구성될 수 있다. 빛의 하나의 방출된 파장은 지시제 분자의 여기 파장에 상응할 수 있다. 빛의 또 다른 방출된 파장은 증폭 프로브의 여기 파장에 상응할 수 있다. 빛의 하나의 검출된 파장은 지시제 분자의 방출 파장에 상응할 수 있다. 빛의 또 다른 검출된 파장은 마이크로챔버 내의 반응을 검출하는데 사용되는 증폭 프로브에 상응할 수 있다. 광학 모듈은 마이크로챔버의 어레이의 이미지 섹션을 위하여 구성될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 광학 모듈은 단일 이미지에서 마이크로챔버의 전체 어레이를 이미징할 수 있다.
- [0125] 도 6은 단일 기계에서 도 5의 공정을 수행하기 위한 기계(600)를 도시한다. 기계(600)는 도 3A-3D에 기재된 바와 같이 압력의 적용을 수행하도록 작동 가능한, 펌프 및 매니폴드를 함유하고 Z 방향으로 이동할 수 있는 공압 모듈(601)을 포함한다. 기계(600)는 또한 미세유체 장치를 열 순환시켜 증합효소 연쇄 반응이 수행되도록 유발하는 열 모듈(602), 예를 들면, 평평한 블록 열 사이클러를 포함한다. 기계(600)는 미세유체 장치 내의 마이크로챔버가 PCR 반응을 성공적으로 수행했는지 여부를 광학적으로 결정할 수 있는 광학 모듈(603) 예를 들면, epi-

형광 광학 모듈을 추가로 포함할 수 있다. 광학 모듈(603)은 푸아송 통계를 사용하여 성공적인 마이크로캡처의 원래 수를 핵산 농도로 전환시키는 프로세서(604)에 이 정보를 공급할 수 있다. 이송 스테이지(605)는 다양한 모듈 사이에 정해진 미세유체 장치를 이동시키고 동시에 다중 미세유체 장치를 취급하는데 사용될 수 있다. 단일 기계로 이의 기능성의 포함과 조합된 상기 기재된 미세유체 장치는 비용, 작업 흐름 복잡성, 및 dPCR의 다른 실시예에 대한 dPCR의 필요 공간을 감소시킨다.

[0126] 본 개시내용은 본원에 기재된 특정한 실시양태에 의해 그 범위가 제한되지 않는다. 실제로, 본원에 기재된 것들 이외에, 본 개시내용의 다른 다양한 실시양태 및 이에 대한 변형은 상기 설명 및 첨부 도면으로부터 당해 분야의 숙련가에게 자명할 것이다.

[0127] 예를 들면, dPCR 적용의 맥락에서 기재되지만, 기체 또는 다른 유체를 통해 단리되는, 액체로 충전된 단리된 다수의 마이크로캡처를 필요로 할 수 있는 다른 미세유체 장치는 제조 가능성 및 비용 면에서 이점을 제공하면서 열가소성 박막의 사용으로부터 탈기를 가능하게 하여 기체 파울링을 피하는 이득을 얻을 수 있다. PCR 이외에, 다른 핵산 증폭 방법, 예를 들면, 루프 매개된 등온 증폭은 본 개시내용의 실시양태에 따른 특정한 핵산 서열의 디지털 검출을 수행하도록 개조될 수 있다. 마이크로캡처는 또한 단리되는 세포의 직경에 근접하게 설계된 사이퍼닝 애퍼처로 단일 세포를 단리하는데 사용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 사이퍼닝 애퍼처가 혈액 세포의 크기보다 훨씬 작은 경우, 본 개시내용의 실시양태는 전혈로부터 혈장을 분리하는데 사용될 수 있다.

[0128] 핵산 샘플을 분석하기 위한 컴퓨터 시스템

[0129] 본 개시내용은 개시내용의 방법을 실시하도록 프로그래밍된 컴퓨터 제어 시스템을 제공한다. 도 7은 샘플 분할, 증폭, 및 검출을 포함하여 핵산 샘플 처리 및 분석을 위하여 프로그래밍되거나 그렇지 않으면 구성될 수 있는 컴퓨터 시스템(701)을 보여준다. 컴퓨터 시스템(701)은 본 개시내용의 방법 및 시스템의 다양한 양상을 조절할 수 있다. 컴퓨터 시스템(701)은 사용자의 전자 장치, 또는 전자 장치에 관하여 원격으로 위치할 수 있는 컴퓨터 시스템일 수 있다. 전자 장치는 이동식 전자 장치일 수 있다.

[0130] 컴퓨터 시스템(701)은 싱글 코어 또는 멀티 코어 프로세서, 또는 병렬 처리를 위한 복수의 프로세서일 수 있는 중앙 처리 장치(CPU, 또한 본원에서 "프로세서" 및 "컴퓨터 프로세서")(705)를 포함한다. 컴퓨터 시스템(701)은 또한 메모리 또는 기억 장소(710)(예를 들면, 임의의 접근 기억, 판독 전용 기억, 플래시 메모리), 전자 저장 장치(715)(예를 들면, 하드 디스크), 하나 이상의 다른 시스템과의 통신 위한 통신 인터페이스(720)(예를 들면, 네트워크 어댑터), 및 주변 장치(725), 예를 들면, 캐시, 다른 메모리, 데이터 저장 및/또는 전자 디스플레이 어댑터를 포함한다. 메모리(710), 저장 장치(715), 인터페이스(720) 및 주변 장치(725)는 통신 버스(실선), 예를 들면, 마더보드를 통해 CPU(705)와 통신한다. 저장 장치(715)는 데이터의 저장을 위한 데이터 저장 장치(또는 데이터 저장소)일 수 있다. 컴퓨터 시스템(701)은 통신 인터페이스(720)의 도움으로 컴퓨터 네트워크("네트워크")(730)에 작동 가능하게 커플링될 수 있다. 네트워크(730)는 인터넷, 인트라넷 및/또는 엑스트라넷, 또는 인터넷과 통신될 수 있는 인트라넷 및/또는 엑스트라넷일 수 있다. 네트워크(730)는 몇몇 경우에 전기통신 및/또는 데이터 네트워크일 수 있다. 네트워크(730)는 분산 컴퓨팅, 예를 들면, 클라우드 컴퓨팅을 가능하게 할 수 있는 하나 이상의 컴퓨터 서버를 포함할 수 있다. 네트워크(730)는, 몇몇 경우에 컴퓨터 시스템(701)의 도움으로, 컴퓨터 시스템(701)에 커플링된 장치가 클라이언트 또는 서버로서 행동하는 것을 가능하게 할 수 있는 피어 투 피어(peer-to-peer) 네트워크를 실시할 수 있다.

[0131] CPU(705)는 프로그램 또는 소프트웨어에서 구현될 수 있는 일련의 기계 판독 가능한 명령어를 실행할 수 있다. 명령어는 기억 장소, 예를 들면, 메모리(710)에 저장될 수 있다. 명령어는 CPU(705)를 후속적으로 프로그래밍하거나 그렇지 않으면 구성할 수 있는 CPU(705)에 본 개시내용의 방법을 실시하도록 지시할 수 있다. CPU(705)에 의해 수행되는 작동의 예는 페치, 디코드, 실행, 및 라이트백(writeback)을 포함할 수 있다.

[0132] CPU(705)는 회로, 예를 들면, 집적 회로의 부분일 수 있다. 시스템(701)의 하나 이상의 다른 구성원이 회로에 포함될 수 있다. 몇몇 경우에, 회로는 특정 용도 집적 회로(ASIC)이다.

[0133] 저장 장치(715)는 파일, 예를 들면, 드라이버, 라이브러리 및 저장된 프로그램을 저장할 수 있다. 저장 장치(715)는 사용자 데이터, 예를 들면, 사용자 선호도 및 사용자 프로그램을 저장할 수 있다. 컴퓨터 시스템(701)은 몇몇 경우에 인트라넷 또는 인터넷을 통해 컴퓨터 시스템(701)과 통신하는 원격 서버에 위치한 것과 같은 컴퓨터 시스템(701)의 외부에 있는 하나 이상의 추가의 데이터 저장 장치를 포함할 수 있다.

[0134] 컴퓨터 시스템(701)은 네트워크(730)를 통해 하나 이상의 원격 컴퓨터 시스템과 통신할 수 있다. 예를 들면, 컴퓨터 시스템(701)은 사용자의 원격 컴퓨터 시스템(예를 들면, 서비스 제공자)과 통신할 수 있다. 원격 컴퓨터

시스템의 예는 개인용 컴퓨터(예를 들면, 휴대용 PC), 슬레이트 또는 태블릿 PC(예를 들면, 애플(Apple)® 아이패드(iPad), 삼성(Samsung)® 갤럭시 탭(Galaxy Tab)), 전화, 스마트폰(예를 들면, 애플® 아이폰(iPhone), 안드로이드 이용 장치, 블랙베리(Blackberry)®), 또는 개인용 디지털 어시스턴트를 포함한다. 사용자는 네트워크 (730)를 통해 컴퓨터 시스템(701)에 접근할 수 있다.

[0135] 본원에 기재된 바와 같은 방법은 컴퓨터 시스템(701)의 전자 저장 장소, 예를 들면, 메모리(710) 또는 전자 저장 장치(715)에 저장된 기계(예를 들면, 컴퓨터 프로세서) 실행 가능한 코드를 거쳐 실시될 수 있다. 기계 실행 가능한 코드 또는 기계 판독 가능한 코드는 소프트웨어의 형태로 제공될 수 있다. 사용 동안, 코드는 프로세서 (705)에 의해 실행될 수 있다. 몇몇 경우에, 코드는 저장 장치(715)으로부터 검색되고, 프로세서(705)에 의한 접근이 준비된 메모리(710)에 저장될 수 있다. 몇몇 상황에서, 전자 저장 장치(715)는 배제될 수 있고, 기계 실행 가능한 명령어가 메모리(710)에 저장된다.

[0136] 코드는 프리 컴파일되고 코드를 실행하는데 적합한 프로세서를 갖는 기계와 함께 사용되도록 구성될 수 있거나, 실행 시간 동안 컴파일될 수 있다. 코드는 코드가 프리 컴파일 또는 컴파일 방식으로 실행되는 것이 가능하도록 선택될 수 있는 프로그래밍 언어로 제공될 수 있다.

[0137] 하나의 양상에서, 본 개시내용은 하나 이상의 컴퓨터 프로세서에 의한 실행으로, 핵산 샘플을 증폭하고 정량하는 미세유체 장치를 형성하는 방법을 실시하는 기계 실행 가능한 코드를 포함하는 비일시적 컴퓨터 판독 가능한 매체를 제공한다. 방법은 열가소성 수지를 사출 성형하여 하나 이상의 마이크로채널, 복수의 마이크로챔버, 및 복수의 사이펀 애퍼처를 포함하는 미세유체 구조를 생성하는 단계로서, 복수의 마이크로챔버가 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 하나 이상의 마이크로채널에 연결되는 것인 단계; 하나 이상의 입구 및 하나 이상의 출구를 형성하는 단계로서, 하나 이상의 입구 및 하나 이상의 출구가 하나 이상의 마이크로채널과 유체 연통되는 것인 단계; 및 열가소성 박막을 적용하여 미세유체 구조를 캡핑하는 단계로서, 열가소성 박막이 열가소성 박막을 가로질러 적용되는 압력차에 대하여 적어도 부분적으로 기계 투과성인 단계를 포함할 수 있다.

[0138] 하나의 양상에서, 본 개시내용은 하나 이상의 컴퓨터 프로세서에 의한 실행으로, 핵산 샘플을 분석하고 정량하는 방법을 실시하는 기계 실행 가능한 코드를 포함하는 비일시적 컴퓨터 판독 가능한 매체를 제공한다. 방법은 하나 이상의 마이크로채널을 포함하는 미세유체 장치를 제공하는 단계로서, 하나 이상의 마이크로채널이 하나 이상의 입구 및 하나 이상의 출구를 포함하고, 미세유체 장치가 복수의 사이펀 애퍼처에 의해 마이크로채널에 연결된 복수의 마이크로챔버, 및 열가소성 박막이 마이크로채널, 복수의 마이크로챔버, 및 복수의 사이펀 애퍼처를 캡핑하도록 미세유체 장치의 표면에 인접하게 배치된 열가소성 박막을 추가로 포함하는 것인 단계; 시약을 하나 이상의 입구 또는 하나 이상의 출구로 제공하는 단계; 시약과 미세유체 장치 사이에 제1 압력차를 제공하여 미세유체 장치를 충전하는 단계로서, 제1 압력차가 시약이 미세유체 장치 내로 흐르는 것을 유발하는 것인 단계; 마이크로채널과 복수의 마이크로챔버 사이에 제2 압력차를 적용하여 시약을 복수의 마이크로챔버 내로 이동시키고, 복수의 마이크로챔버 내의 기계가 복수의 마이크로챔버, 복수의 사이펀 애퍼처, 및 마이크로채널을 캡핑하거나 덮고 있는 열가소성 박막을 통과하도록 하는 단계로서, 제2 압력차가 제1 압력차보다 큰 것인 단계; 및 하나 이상의 입구와 하나 이상의 출구 사이에 제3 압력차를 적용하여 유체를 마이크로챔버 내로 도입하지 않으면서 유체를 마이크로채널 내로 도입하는 단계로서, 제3 압력차가 제2 압력차보다 작은 것인 단계를 포함할 수 있다.

[0139] 본원에 제공된 시스템 및 방법의 양상, 예를 들면, 컴퓨터 시스템(701)은 프로그래밍으로 구현될 수 있다. 기술의 다양한 양상은 전형적으로 기계(또는 프로세서) 실행 가능한 코드 및/또는 일종의 기계 판독 가능한 매체로 포함되거나 구현되는 연관된 데이터의 형태인 "제품" 또는 "제조 물품"으로 생각될 수 있다. 기계 실행 가능한 코드는 전자 저장 장치, 예를 들면, 메모리(예를 들면, 판독 전용 메모리, 임의의 접근 메모리, 플래시 메모리) 또는 하드 디스크에 저장될 수 있다. "저장" 유형 매체는 컴퓨터, 프로세서 등의 임의의 또는 모든 유형의 메모리, 또는 이의 연관된 모듈, 예를 들면, 다양한 반도체 메모리, 테이프 드라이브, 디스크 드라이브 등을 포함할 수 있고, 이는 소프트웨어 프로그래밍을 위하여 언제든지 비일시적 저장을 제공할 수 있다. 소프트웨어 전체 또는 부분은 때때로 인터넷 또는 다양한 다른 전기통신 네트워크를 통해 통신할 수 있다. 이러한 통신은, 예를 들면, 하나의 컴퓨터 또는 프로세서로부터 다른 것으로, 예를 들면, 관리 서버 또는 호스트 컴퓨터로부터 응용 서버의 컴퓨터 플랫폼으로 소프트웨어의 로딩을 가능하게 할 수 있다. 따라서, 소프트웨어 요소를 보유할 수 있는 매체의 또 다른 유형은, 예를 들면, 유선 및 광학 지상선 네트워크 및 다양한 무선 통신을 통해 로컬 장치 사이의 물리적 인터페이스를 가로질러 사용되는, 광학과, 전기과 및 전자파를 포함한다. 유선 또는 무선 연결, 광학 연결 등과 같은 이러한 파동을 갖는 물리적 요소는 또한 소프트웨어를 보유한 매체로 간주될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 비일시적, 유형의 "저장" 매체로 제한되지 않는 한, 컴퓨터 또는 기계 "판독 가능한 매체"와

같은 용어는 실행을 위하여 프로세서에 명령어를 제공하는데 참여하는 임의의 매체를 지칭한다.

[0140] 따라서, 기계 판독 가능한 매체, 예를 들면, 컴퓨터 실행 가능한 코드는 유형의 저장 매체, 반송파 매체 또는 물리적 전송 매체를 포함하지만 이에 한정되지 않는 많은 형태를 취할 수 있다. 비휘발성 저장 매체는, 예를 들면, 도면에 도시된 광학 또는 자기 디스크, 예를 들면, 임의의 컴퓨터(들) 등에서의 임의의 저장 장치, 예를 들면, 데이터베이스를 실시하는데 사용될 수 있는 것 등을 포함한다. 휘발성 저장 매체는 동적 메모리, 예를 들면, 컴퓨터 플랫폼의 메인 메모리를 포함한다. 유형의 전송 매체는 동축 케이블; 컴퓨터 시스템 내에 버스를 포함하는 전선을 포함하는 구리선 및 광섬유를 포함한다. 반송파 전송 매체는 전기 또는 전자기 신호, 또는 음파 또는 광파, 예를 들면, 무선 주파수(RF) 및 적외선(IR) 데이터 통신 동안 발생된 것들의 형태를 취할 수 있다. 컴퓨터 판독 가능한 매체의 흔한 형태는 따라서, 예를 들면, 플로피 디스크, 플렉시블 디스크, 하드 디스크, 자기 테이프, 임의의 다른 자기 매체, CD-ROM, DVD 또는 DVD-ROM, 임의의 다른 광학 매체, 펀치 카드 종이 테이프, 구멍의 패턴을 갖는 임의의 다른 물리적 저장 매체, RAM, ROM, PROM 및 EPROM, FLASH-EPROM, 임의의 다른 메모리 칩 또는 카트리지, 반송파 전송 데이터 또는 명령어, 이러한 반송파를 전송하는 케이블 또는 링크, 또는 컴퓨터가 프로그래밍 코드 및/또는 데이터를 판독할 수 있는 임의의 다른 매체를 포함한다. 컴퓨터 판독 가능한 매체의 이들 형태 중 많은 것들이 실행을 위하여 프로세서에 하나 이상의 서열의 하나 이상의 명령어를 전송하는 것에 포함될 수 있다.

[0141] 컴퓨터 시스템(701)은, 예를 들면, 상위 조직의 깊이 프로파일을 제공하는 사용자 인터페이스(UI)(740)를 포함하는 전자 디스플레이(735)를 포함하거나 이와 소통될 수 있다. UI의 예는, 제한 없이, 그래픽 사용자 인터페이스(GUI) 및 웹 기반 사용자 인터페이스를 포함한다.

[0142] 본 개시내용의 방법 및 시스템은 하나 이상의 알고리즘의 방식으로 실시될 수 있다. 알고리즘은 중앙 처리 장치(705)에 의한 실행시 소프트웨어의 방식으로 실시될 수 있다. 알고리즘은, 예를 들면, 본원에 제공된 시스템 또는 실시 방법을 조절할 수 있다.

[0143] 본 발명의 바람직한 실시양태가 본원에 나타나고 기재되었지만, 이러한 실시양태는 단지 예시의 방식으로 제공된다는 것이 당해 분야의 숙련자에게 자명할 것이다. 많은 변형, 변화, 및 치환은 본 발명을 벗어나지 않으면서 이제 당해 분야의 숙련자에게 일어날 것이다. 본원에 기재된 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안은 본 발명의 실시에서 사용될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 하기 청구항은 본 발명의 범위를 정의하고 이들 청구항 및 이들의 등가물의 범위 내의 방법 및 구조는 이에 의해 포함된다는 것이 의도된다.

[0144] 실시예 1: 시약 분할의 증명

[0145] 시약 분할은 표준적인 현미경 슬라이드 치수를 사용하여 제작된 미세유체 장치를 사용하여 증명된다. 미세유체 장치의 총 치수는 폭 1 인치, 길이 3 인치, 및 두께 0.6 인치이다. 장치는 4개의 상이한 마이크로챔버 어레이 디자인 및 총 8개의 마이크로챔버의 상이한 어레이를 함유한다. 도 8A는 8-유닛 장치 및 4개의 어레이 디자인 중 하나의 확장된 투시도를 보여준다. 미세유체 장치를 사이클로-올레핀 중합체(COP), 제오노아 790R(Zeon Chemicals, 일본 소재)로부터 성형하고, 100 μ m의 COP 박막, 제오녹스 ZF14(Zeon Chemicals, 일본 소재)로 열 결합에 의해 밀봉한다. 도시된 확장된 미세유체 세그먼트는 사이펀 애퍼처에 의해 마이크로챔버에 연결된 사행 마이크로채널을 갖는다. 마이크로챔버는 그리드 구성이다. 마이크로챔버 및 마이크로채널은 40 μ m의 깊이를 갖고, 사이펀 애퍼처는 10 μ m의 깊이를 갖는다. 각각의 단리된 미세유체 세그먼트는 입구 및 출구 채널을 갖는다. 입구 및 출구 채널은 필름이 미세유체 장치의 베이스에 열 결합되기 전에 기계적으로 천공된다. 입구 및 출구 채널은 직경이 1.6 mm이다.

[0146] 도 8B는 시약 로딩, 마이크로챔버 재충전, 및 분할의 형광 이미지를 도시한다. 미세유체 장치를 로딩하기 전에 4 킬로달톤(kDa) 플루오레세인 접합된 텍스트란(Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재) 2 마이크로리터(μ L)를 입구에 피펫팅한다. 그 다음, 미세유체 장치를 공압 제어기와 접촉시킨다. 공압 제어기는 4 psi의 압력을 입구에 3분 동안 적용함으로써 미세유체 장치의 마이크로채널을 로딩한다. 20분 동안 입구 및 출구 둘다에 10 psi의 압력을 가하여 마이크로챔버를 충전한다. 그 다음, 4 psi에서 미세유체 장치의 입구로부터 공기를 흐르게 하여 마이크로채널로부터 시약을 제거함으로써 시약을 분할한다.

[0147] 실시예 2: dPCR을 위한 단일 기구 작업 흐름

[0148] 미세유체 장치에서 핵산의 증폭 및 정량 방법은 단일 기구에서 수행될 수 있다. 기구는 시약 분할, 열 순환, 이미지 획득, 및 데이터 분석을 할 수 있다. 도 9는 단일 기구 작업 흐름이 가능한 원형 기구를 보여준다. 기구는 한번에 4개 이하의 장치를 수용하고 동시적인 이미지 획득 및 열 순환을 가능하게 하도록 설계된다. 기구는 시

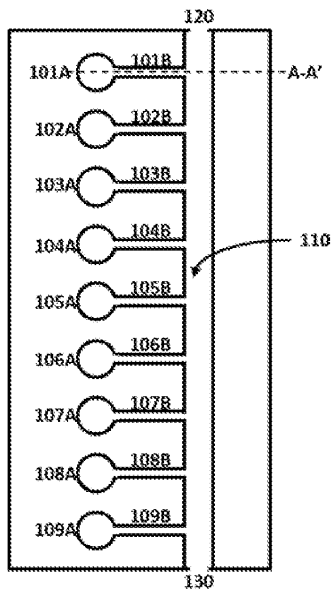
약 분할을 위한 공압 모듈, 온도 제어 및 열 순환을 위한 열 모듈, 이미징을 위한 광학 모듈, 및 스캐닝 모듈을 함유한다. 광학 모듈은 2개의 형광 이미징 능력을 갖고, 각각 FAM 및 ROX 형광단의 방출 파장에 상응하는 약 520 nm 및 600 nm의 형광 방출을 검출할 수 있다. 광학 모듈은 25 mm × 25 mm 시야 및 0.14의 수치 애퍼처 (NA: Numerical Aperture)를 갖는다.

[0149] 단일 기구 작업 흐름은 리포터로서 TaqMan 프로브를 이용하는 잘 정립된 qPCR 검정을 사용하여 시험할 수 있다. 간단하게, 핵산 샘플을 PCR 시약과 혼합한다. PCR 시약은 정방향 프라이머, 역방향 프라이머, TaqMan 프로브, 및 ROX 지시제를 포함한다. 정방향 프라이머의 서열은 5' - GCC TCA ATA AAG CTT GCC TTG A - 3'이다. 역방향 프라이머의 서열은 5' - GGG GCG CAC TGC TAG AGA - 3'이다. TaqMan 프로브의 서열은 5' - [FAM] - CCA GAG TCA CAC AAC AGA CGG GCA CA - [BHQ1] - 3'이다. 핵산 샘플 및 PCR 시약을 상기 언급된 프로토콜에 따라 로딩하고 미세유체 장치 내로 분할한다. 마이크로챔버의 온도를 95℃로 증가시키고, 온도를 10분 동안 유지한 후, 마이크로챔버의 온도를 초당 2.4℃의 속도로 95℃에서 59℃로 램핑시키고 온도를 95℃로 되돌리기 전에 59℃에서 1분 동안 유지하는 40 사이클에 의해, PCR 증폭을 수행한다. 도 10A-10D는 PCR 증폭 후, 분할당 당 약 1개의 핵산 주형 카피 및 분할당 0개의 핵산 주형 카피(무주형 대조군 또는 NTC)를 함유하는 샘플의 형광 이미지 및 PCR 증폭 후, 분할 및 NTC 분할당 약 1개의 핵산 카피를 함유하는 샘플의 형광 강도 플롯을 보여준다. 도 10A는 핵산 주형을 함유하지 않는 분할된 샘플의 형광 이미지를 보여주고, 각각의 회색 점은 PCR 시약을 함유하는 단일 마이크로챔버를 나타낸다. 각각의 마이크로챔버 내에 ROX 지시제를 약 575 nm 빛으로 여기하고, 방출 스펙트럼을 이미징함으로써 이미지를 획득하고, 이는 약 600 nm의 최대 방출을 갖는다. 도 10B는 PCR 증폭 후, 분할당 약 1개의 핵산 주형 카피를 함유하는 분할된 샘플을 보여준다. PCR 증폭 후, 이미징은 ROX 지시제를 함유하는 마이크로챔버 및 ROX 지시제 및 FAM 프로브로부터의 방출 둘 다를 함유하는 마이크로챔버를 보여준다. FAM 프로브는 약 495 nm의 여기 파장 및 약 520 nm의 최대 방출 파장을 갖는다. 개별적인 마이크로챔버는 ROX 지시제, FAM 프로브, 및 BHQ-1 퀀처를 함유한다. 도 10A와 같이, 각각의 회색 점은 핵산 주형이 없는 분할된 샘플을 함유하는 마이크로챔버를 나타낸다. 백색 점은 성공적으로 증폭된 핵산 샘플을 함유하는 마이크로챔버를 나타낸다. 성공적인 PCR 증폭시, FAM 형광단 및 BHQ-1 퀀처는 TaqMan 프로브로부터 절단될 수 있고, 이는 검출 가능한 형광 신호를 야기한다. 도 10C 및 10D는 각각 분할되고 증폭된 미세유체 장치에 있어서 각각의 마이크로챔버에 대한 ROX 형광 강도의 함수로서 FAM 형광 강도의 2차원 산점도를 보여준다. 도 10C는 분할당 0개의 핵산 주형을 함유하는 샘플을 보여주고, 이는 ROX 형광 강도의 범위에 걸쳐 대부분 일정한 FAM 형광 강도를 야기한다. 도 10D는 분할당 1개의 핵산 주형 카피를 함유하는 샘플을 보여주고, 이는 분할 내의 증폭 신호의 존재로 인하여 ROX 형광 강도의 함수로서 다양한 FAM 형광 강도를 야기한다.

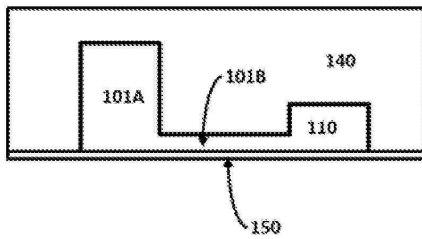
[0150] 본 발명의 바람직한 실시양태가 본원에서 나타나고 기재되었지만, 이러한 실시양태는 오직 예시의 방식으로 제공된다는 것이 당해 분야의 숙련자에게 자명할 것이다. 본 발명은 사양으로 제공된 특정한 예로 한정되는 것은 의도되지 않는다. 본 발명이 상기 사양을 참조하여 기재되었지만, 본원에서 실시양태의 설명 및 예시는 제한하는 의미로 해석되는 것을 의미하지 않는다. 많은 변형, 변화, 및 치환이 본 발명을 벗어나지 않으면서 당해 분야의 숙련자에게 이제 일어날 것이다. 추가로, 본 발명의 모든 양상은 다양한 조건 및 변수에 따라 본원에 기술된 특정한 서술, 구성 및 상대적인 비율로 제한되지 않는다는 것이 이해되어야 한다. 본원에 기재된 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 발명의 실시에서 사용될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 따라서 본 발명은 또한 임의의 이러한 대안, 변형, 변이 또는 등가물을 모두 포함할 것으로 생각된다. 하기 청구항은 본 발명의 범위를 정의하고 이들 청구항 및 이들의 등가물 범위 내의 방법 및 구조는 이에 의해 포함된다는 것이 의도된다.

도면

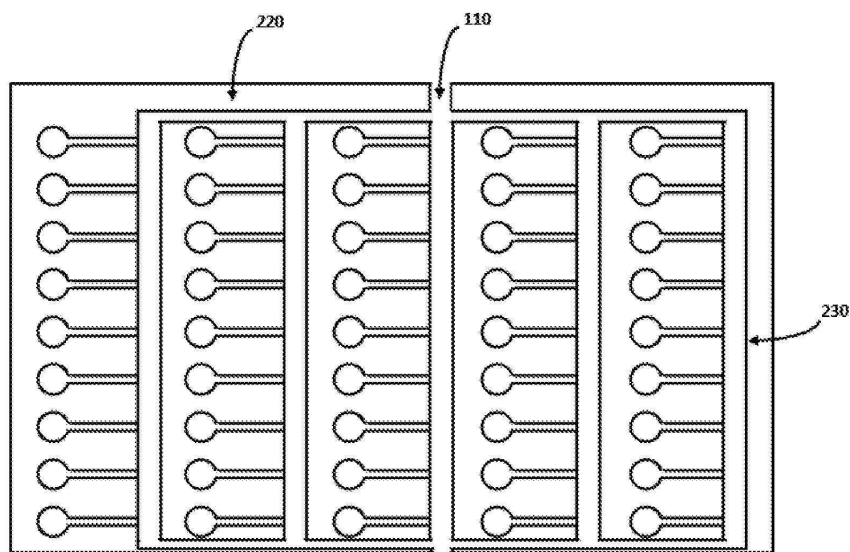
도면1a



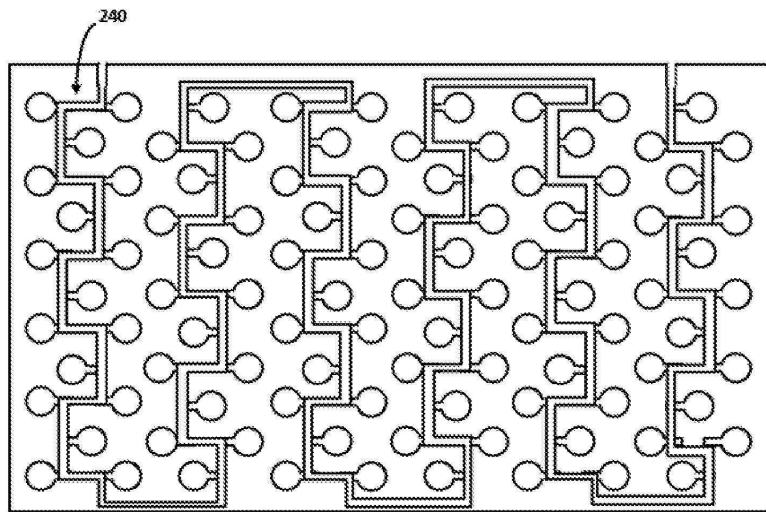
도면1b



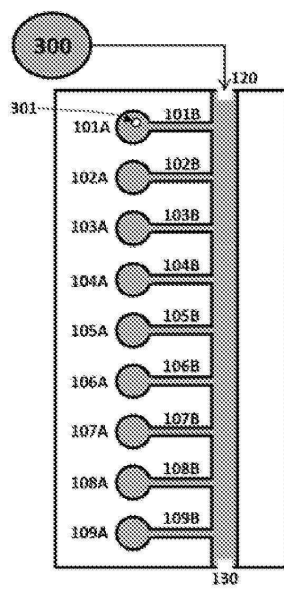
도면2a



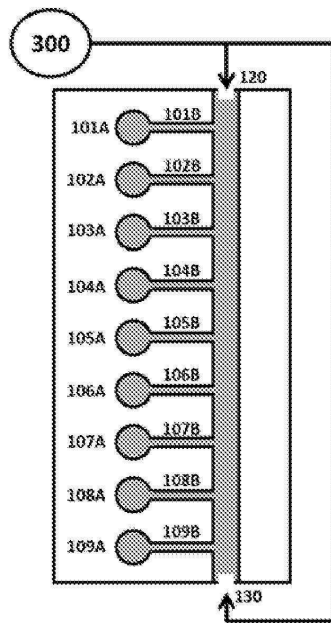
도면2b



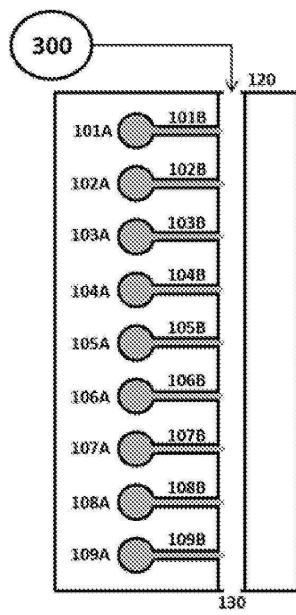
도면3a



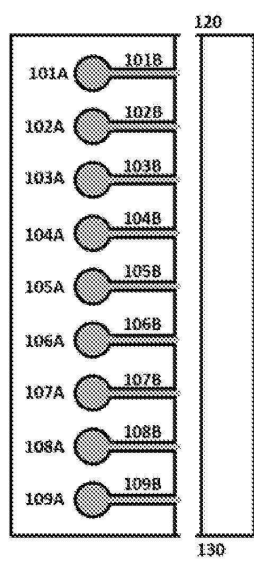
도면3b



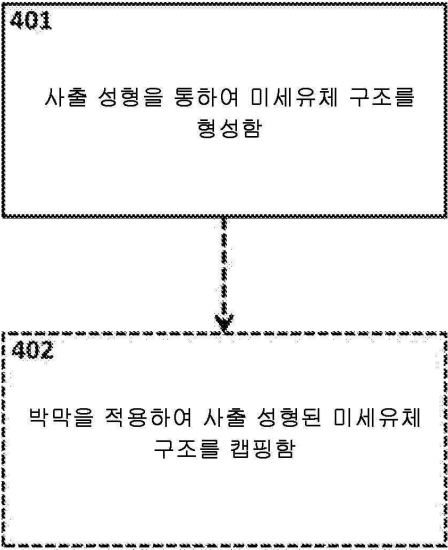
도면3c



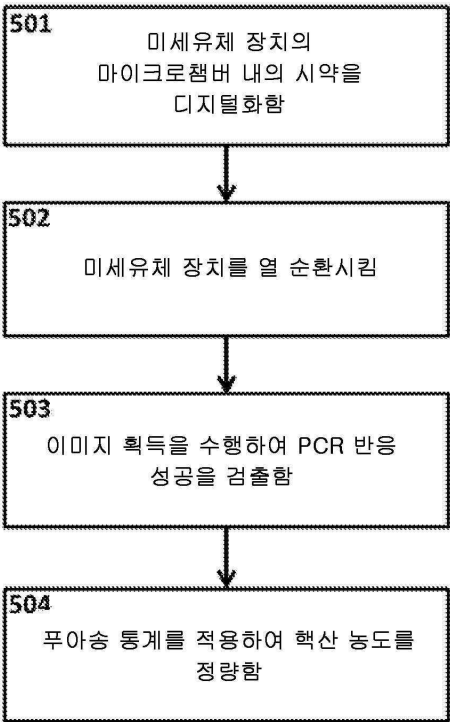
도면3d



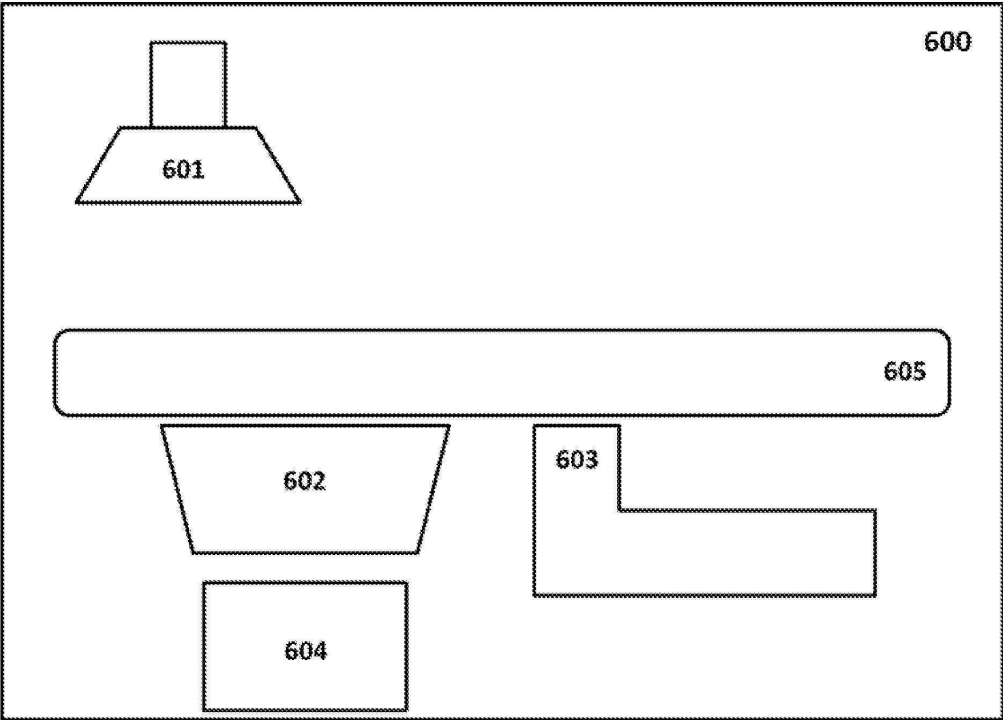
도면4



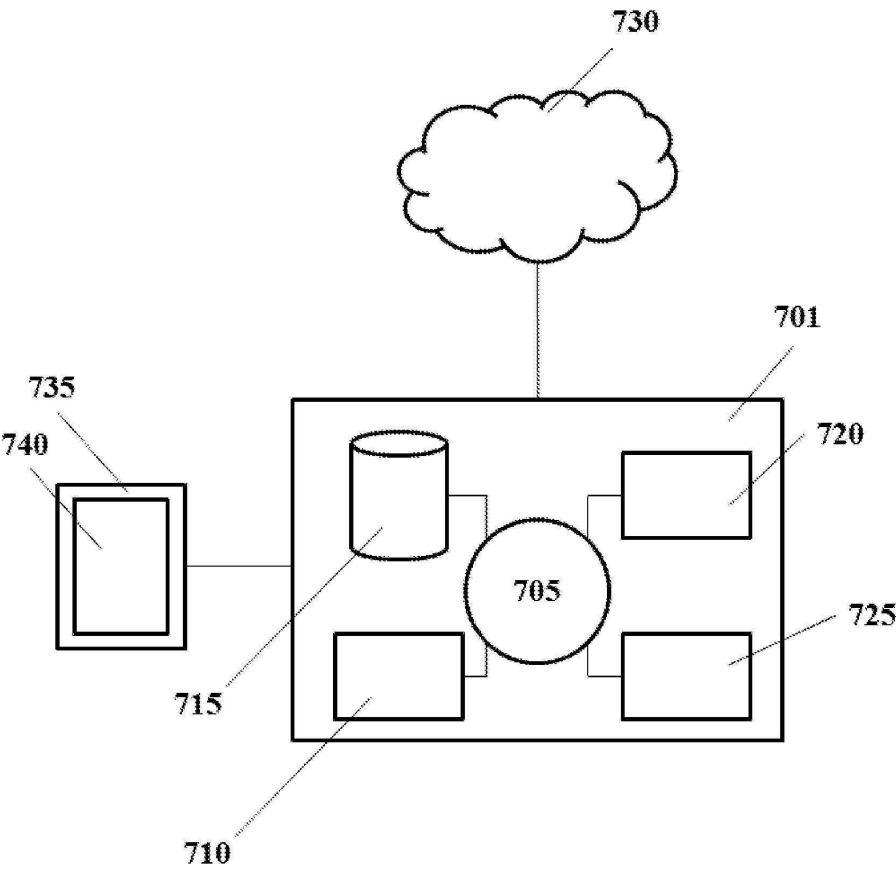
도면5



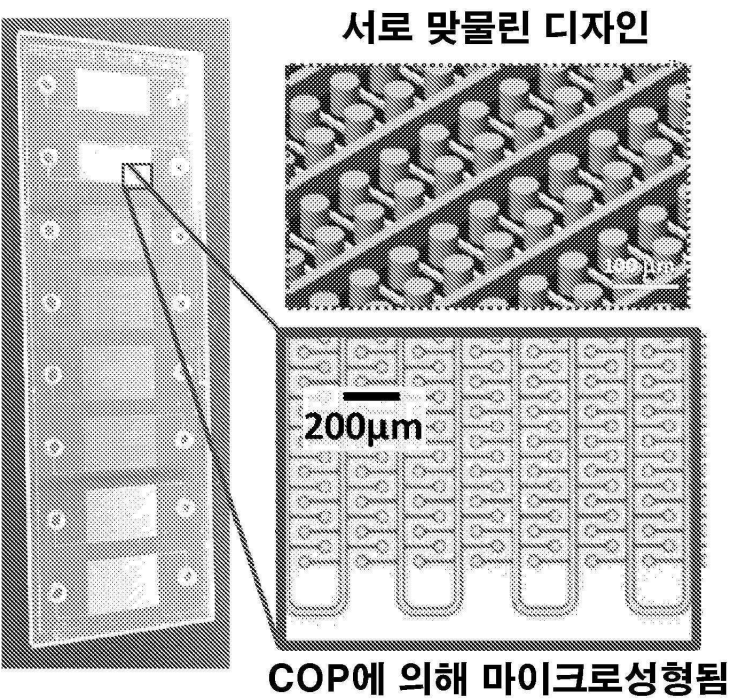
도면6



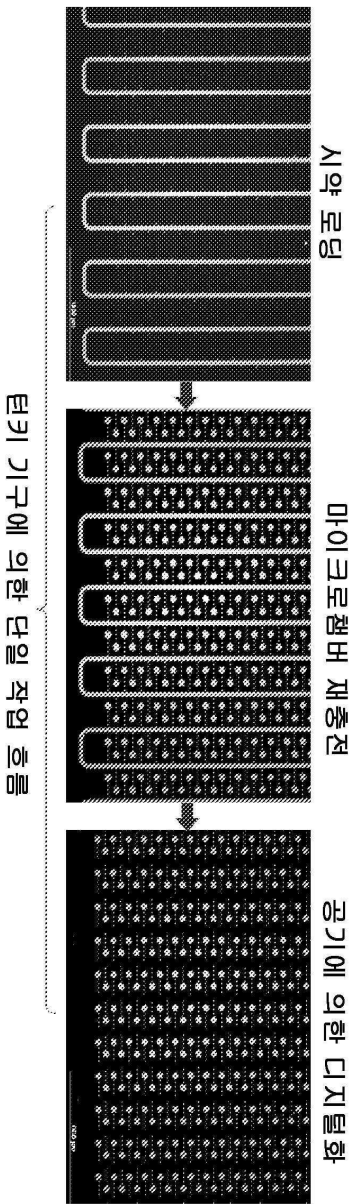
도면7



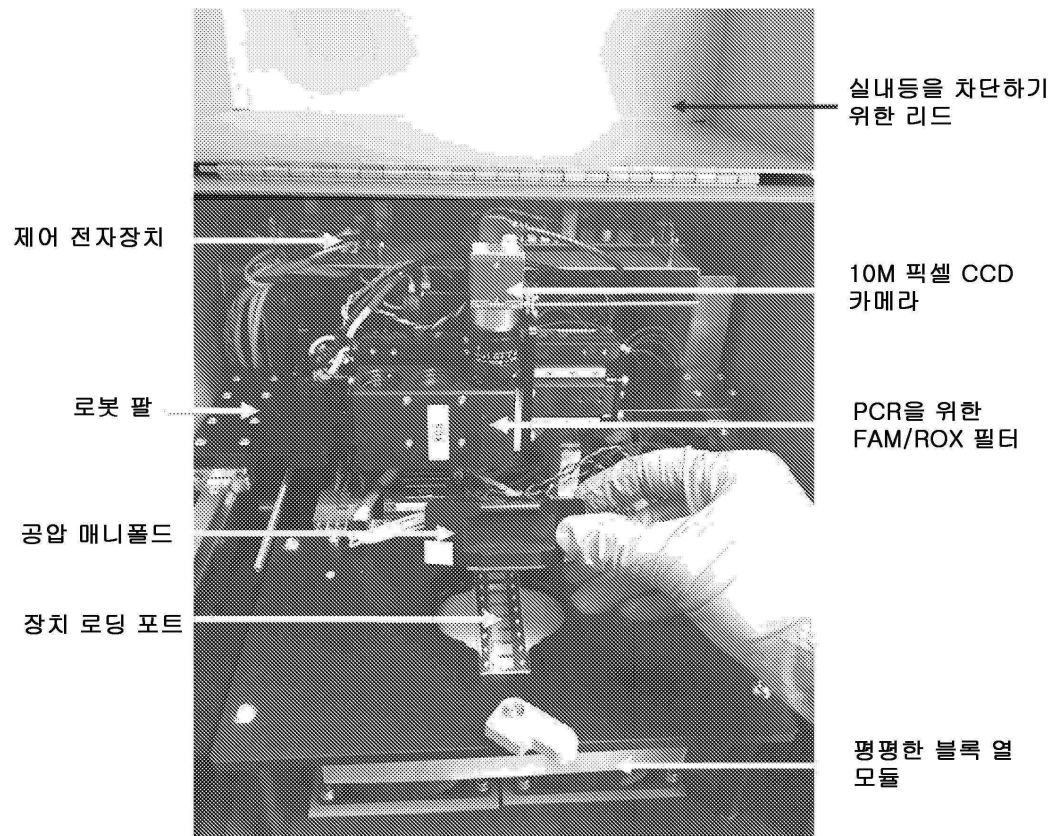
도면8a



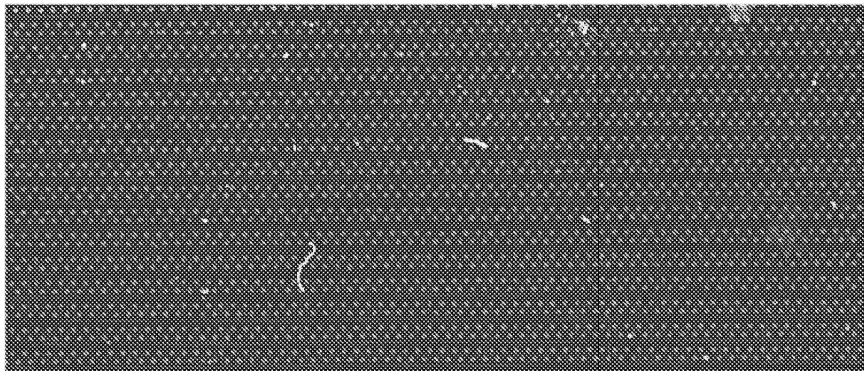
도면8b



도면9

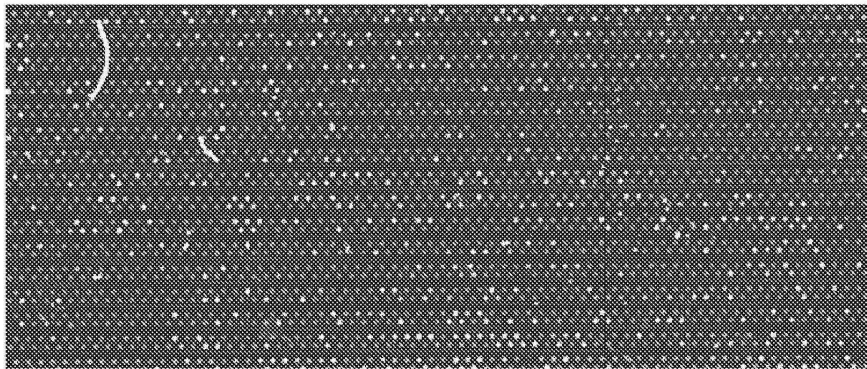


도면10a



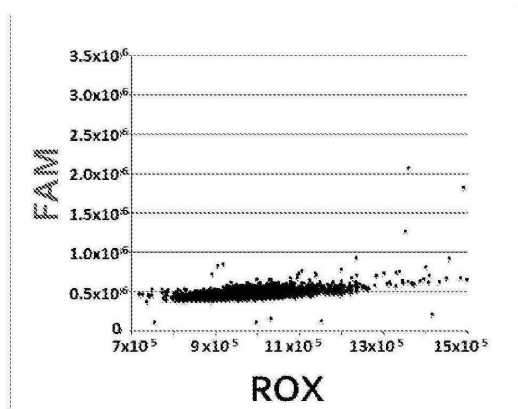
무주형 대조군

도면10b

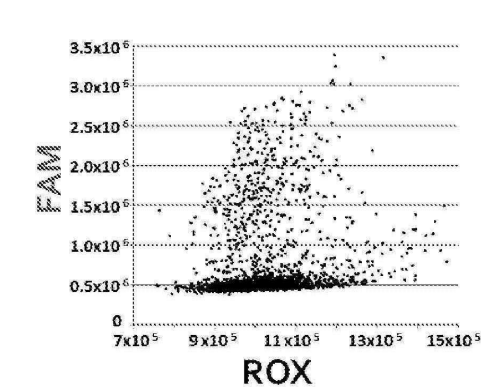


~1 카피/분할

도면10c



도면10d



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> COMBINATI, INC.

<120> MICROFLUIDIC SIPHONING ARRAY FOR NUCLEIC ACID QUANTIFICATION

<130> 51674-702.601

<140> PCT/US2017/025873

<141> 2017-04-04

<150> 15/363,896

<151> 2016-11-29

<150> 62/317,993

<151> 2016-04-04

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 1

gcctcaataa agcttgctt ga

22

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 2

ggggcgact gctagaga

18

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

probe

<400> 3

ccagagtcac acaacagacg ggcaca

26