(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 970957 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 970957

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
G01N 35/00
G01N 33/543

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **06.09.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **06.03.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **07.05.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **06.09.1995 PCT/US1995/011333**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

09.09.1994 US 304657

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Nanogen Inc.,** 10398 Pacific Center Court San Diego, CA 92121, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Heller, Michael J.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Tu, Eugene,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Montgomery, Donald D.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • **Butler, William F.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Automaattinen molekyyli-biologinen diagnostiikkajärjestelmä
Automatiskt molekyl-biologiskt diagnostiksystem

Automaattinen molekyylibiologinen diagnostiikkajärjestelmä

Keksinnön ala

Esillä oleva keksintö koskee laitteita ja systeemejä monivaiheisten molekyylibiologistyyppisten diagnostiikka-analyysien suorittamiseksi monikertaformaateissa. Erikoisemmin molekyylibiologistyyppiset analyysit sisältävät erilaiset nukleiinihappohybridisaatioreaktiot ja niihin assosioituneet biopolymeerisynteesit. Lisäksi vasta-aine/antigeenireaktiot ja muut kliiniset diagnosoinnit voidaan suorittaa.

Liittyvän patenttihakemuksen tiedot

Tämä patenttihakemus on jatko-osa patenttihakemukselle, jonka sarjanumero on 08/271 882, joka on rekisteröity 7.7.1994, joka on jatko-osa sarjanumerolle 07/146 504, joka on rekisteröity 1.11.1993, joiden molempien otsikko on "SELF-ADDRESSABLE SELF-ASSEMBLING MICTOELECTRIC SYSTEMS AND DEVICES FOR MOLECULAR BIOLOGICAL ANALYSIS AND DIAGNOSTICS".

Keksinnön tausta

Molekyylibiologia sisältää suuren määrän erilaisia menetelmiä nukleiinihapon ja proteiinin analysoimiseksi. Monet näistä tekniikoista ja menetelmistä muodostavat perustan kliinisille diagnostiikkakokeille ja testeille. Nämä menetelmät sisältävät nukleiinihappohybridisaatioanalyysin, restriktioentsyymianalyysin, geneettisen sekvenssianalyysin ja nukleiinihappojen ja proteiinien erotuksen ja puhdistuksen (katso esim. J. Sambrook, E.F. Fritsch ja T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. painos, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

Useimmat näistä menetelmistä sisältävät useiden vaiheiden (esim. pipetoinnin, sentrifugaatiot, elektroforeesin) suorittamisen suurella näytemäärällä. Ne ovat usein monimutkaisia ja aikaa vieviä ja yleensä vaativat

korkean tarkkuustason. Monen menetelmän sovellusta rajoittaa sen herkkyyden, spesifisyyden tai toistettavuuden puute. Nämä ongelmat ovat esimerkiksi rajoittaneet monia nukleiinihappohybridisaatioanalyysien diagnostisia sovelluksia.

Täydellinen menetelmä DNA-hybridisaatioanalyysien suorittamiseksi geneettistä tai infektiivistä tautia varten on hyvin mutkikas. Laajasti puhuen täydellinen menetelmä voidaan jakaa useisiin vaiheisiin ja osavaiheisiin (katso kuvio 1). Geneettisen taudin diagnosoinnin tapauksessa ensimmäinen vaihe sisältää näytteen ottamisen (veri tai kudos). Riippuen näytteen tyypistä täytyy suorittaa erilaisia esikäsittelyitä. Toinen vaihe sisältää solujen hajottamisen tai lyysin, joka sitten vapauttaa raa'an DNA-materiaalin yhdessä muiden solunosasten kanssa. Yleisesti useat osavaiheet ovat tarpeen soluroskien poistamiseksi ja raa'an DNA:n lisäpuhdistamiseksi. Tässä vaiheessa on olemassa useita vaihtoehtoja lisäprosessoimiseksi ja analysoimiseksi. Yksi vaihtoehto sisältää puhdistetun näyte-DNA:n denaturoimisen ja suoran hybridisaatioanalyysin suorittamisen yhdellä monista formaateista (dot blot, mikrokantaja, mikrotiitterilevy jne.). Toinen vaihtoehto, jota kutsutaan Southern blot -hybridisaatioksi, sisältää DNA:n katkaisun restriktioentsyymeillä, DNA-fragmenttien erottamisen elektroforeesigeelissä, blottauksen membraanisuodattimelle ja sitten blotin hybridisoimisen spesifisillä DNA-koetinsekvensseillä. Tämä menetelmä alentaa tehokkaasti genomisen DNA-näytteen kompleksisuutta ja auttaa näin parantamaan hybridisaation spesifisyyttä ja herkkyyttä. Valitettavasti tämä menetelmä on pitkä ja vaikea. Kolmas vaihtoehto on polymeraasiketjureaktion (PCR) tai muun amplifikaatiomenetelmän suorittaminen. PCR-menetelmässä monistetaan (kohotetaan) kohde-DNA-sekvenssien määrää. Kohde-DNA:n amplifikaatio auttaa niiden ongelmien ratkaisussa, jotka liittyvät genomisen DNA:n analyysin kompleksi-

suuteen ja herkkyyteen. Kaikki nämä menetelmät ovat aikaa vieviä, suhteellisen monimutkaisia ja lisäävät merkittävästi diagnostisen testin hintaa. Näiden näyte-erotus- ja DNA-prosessointivaiheiden jälkeen suoritetaan varsinainen hybridisaatioreaktio. Lopuksi tunnistus- ja tulosanalyysi muuttaa hybridisaatiotapahtuman analyyttiseksi tulokseksi.

Näytteen valmistus- ja prosessointivaiheet on tyypillisesti suoritettu erikseen ja erossa muista hybridisaation ja tunnistuksen ja analyysin päävaiheista. Todellakin, eri osavaiheet, jotka sisältyvät näytteen valmistukseen ja DNA-prosessointiin, on usein suoritettu erillisenä toimenpiteenä erikseen ja erossa muista osavaiheista. Tarkasteltaessa näitä osavaiheita yksityiskohtaisemmin näytteet otetaan millä tahansa useista tavoista, kuten kokoveren, kudoksen tai muiden biologisten nestenäytteiden ottamisella. Veren tapauksessa näytettä prosessoidaan, niin että poistetaan punaiset verisolut ja jätetään jäljelle halutut tumalliset (valko)solut. Tämä menetelmä suoritetaan tavallisesti tiheysgradienttisentrifugaatiolla. Sitten suoritetaan soluhajotus tai lyysi suositeltavasti sonikaatiomenetelmällä, jäädytys/sulatusmenetelmällä tai lisäämällä lyysireagensseja. Sitten raaka DNA erotetaan soluroskista sentrifugaatiovaiheella. Ennen hybridisaatiota kaksijuosteinen DNA denaturoidaan yksijuosteiseksi muodoksi. Kaksijuosteisen DNA:n denaturaatio on yleensä suoritettu menetelmällä, joka sisältää kuumennuksen (> Tm), suolakonsentraation muutoksen, emäksen (NaOH) tai denaturoivien aineiden (urea, formamidi jne.) lisäyksen. Keksijät ovat ehdottaneet DNA:n denaturoimisen yksijuosteiseen muotoonsa elektrokemiallisessa kammiossa. Teorian selitetään olevan se, että DNA:han tapahtuu elektronin siirtoa elektrodin pinnassa, joka tehokkaasti heikentää kaksijuosteista rakennetta ja johtaa juosteiden eroamiseen. Katso yleisesti Stanley "DNA Denaturation by an Electric Potential", GB-patenttihakemus 2 247 889, julkaistu 18.3.1992.

Nukleiinihappohybridisaatioanalyysi sisältää yleensä spesifisten kohdenukleiinihappojen (DNA tai RNA) hyvin pienen määrän tunnistuksen ylimäärällä koetin-DNA:ta suhteellisen suuren määrän joukossa kompleksisia ei-kohdenukleiinihappoja. Osavaiheita, joilla vähennetään näytevalmisteen DNA-kompleksisuutta, on käytetty auttamaan matalan kopiomäärän (se on, 10 000 - 100 000 kopiota) nukleiinihappokohteiden tunnistusta. DNA-kompleksisuudesta päästään eroon jossain määrin kohdenukleiinihapposekvenssien amplifioimisella käyttäen polymeraasiketjureaktiota (PCR). (Ks. M. A. Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, 1990.) Samalla kun amplifikaatio johtaa erittäin suureen määrään kohdenukleiinihapposekvenssejä, joka parantaa seuraavaa suoraa koetinhybridisaatiovaihetta, amplifikaatio sisältää pitkät ja työläät menetelmät, jotka täytyy tyypillisesti suorittaa erillään muista osavaiheista. Amplifikaatiovaiheen suorittamiseksi vaaditaan oleellisesti monimutkaiset ja suhteellisen suuret laitteet.

Todellinen hybridisaatioreaktio edustaa tärkeintä ja keskeisintä vaihetta koko prosessissa. Hybridisaatiovaihe sisältää valmistetun DNA-näytteen sijoittamisen kosketukseen spesifisen reportterikoettimen kanssa optimaalisissa olosuhteissa niin, että tapahtuu hybridisaatio kohde-DNA-sekvenssin kanssa. Hybridisaatio voidaan suorittaa millä tahansa useista formaateista. Esimerkiksi usean näytteen sisältävä nukleiinihappohybridisaatioanalyysi on suoritettu erilaisissa suodatin- ja kiinteäkantajaformaateissa (ks. G. A. Beltz et al., teoksessa Methods in Enzymology, osa 100, osa B, R. Wu, L. Grossman, K. Moldave, toim., Academic Press, New York, kappale 19, sivut 266 - 308, 1985). Yksi formaatti, nk. "dot-blot"-hybridisaatio, sisältää kohde-DNA-molekyylien ei-kovalenttisen kiinnityksen suodattimelle, jotka hybridisoidaan sen jälkeen radioaktiivisella isotoopilla leimatun (leimattujen) koettimen

(koettimien) kanssa. "Dot-blot"-hybridisaatiota on käytetty laajasti ja monia versioita on kehitetty (ks. M. L. M. Anderson ja B.D. Young, teoksessa Nucleic Acid Hybridization - A Practical Approach, B.D. Hames ja S.J. Higgind, toim., IRL Press, Washington, D.C., kappale 4, sivut 73 - 111, 1985). Se on kehitetty monien genomisten mutaatioiden yhtäaikaiseen analyysiin (D. Nanibhushan ja D. Rabin, julkaisussa EPA 0 228 075, 8.7.1987) ja päällekkäin menevien kloonien tunnistukseen ja genomisten karttojen rakentamiseen (G. A. Evans, US-patenttijulkaisussa nro 5 219 726, 15.6.1993).

Uusia menetelmiä kehitetään useiden nukleiinihappohybridisaatioanalyysien suorittamiseksi mikroformaatissa monikerta- tai matriisilaitteissa (esim. DNA-sirut) (ks. M. Barinaga, 253 Science, sivu 1489, 1991; W. Bains, 10 Bio/Technology, sivut 757 - 758, 1992). Näissä menetelmissä yleensä kiinnitetään spesifiset DNA-sekvenssit hyvin pieniin spesifisiin alueisiin kiinteällä kantajalla, kuten DNA-sirun mikrokuoppiin. Nämä hybridisaatioformaatit ovat tavanomaisten "dot-blot"- ja "kerros"-hybridisaatiosysteemien mikroskaalaversioita.

Mikroformaatissa olevaa hybridisaatiota voidaan käyttää suoritettaessa "sekvensointi hybridisaatiolla" (SBH) (ks. M. Barinaga, 253 Science, sivu 1489, 1991; W. Bains, 10 Bio/Technology, sivut 757 - 758, 1992). SBH-menetelmässä käytetään kaikkia mahdollisia n-nukleotidioligomeerejä (n-meerit) tunnistamaan n-meerit tuntemattomassa DNA-näytteessä, joita sen jälkeen verrataan alekkain algoritmianalyysillä niin, että tuotetaan DNA-sekvenssi (R. Drmanac ja R. Crkvenjakov, jugoslavialainen patenttihakemus 570/87, 1987; R. Drmanac et al., 4 Genomics, 114, 1989; Strezoska et al., 88 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10089, 1992; ja R. Drmanac ja R.B. Crkvenjakov, US-patentti 5 202 231, 13.4.1993).

SBH-menetelmän suorittamiseksi on kaksi formaattia. Ensimmäinen formaatti sisältää kaikkien mahdollisten n-meerien suuren joukon muodostamisen kantajalle, joka sitten hybridisoidaan kohdesekvenssin kanssa. Toinen formaatti sisältää kohdesekvenssin kiinnittämisen kantajaan, joka sitten sen jälkeen hybridisoidaan kaikilla mahdollisilla n-meereillä. Molemmissa formaateissa on suorien koetinhybridisaatioiden perusongelma ja lisäksi vaikeuksia, jotka liittyvät monikertahybridisaatioihin.

Southern, GB-patenttihakemus 88 10 400, 1988; E. M. Southern et al., 13 Genomics 1008, 1992, ehdotti ensimmäisen formaatin käyttöä DNA:n analysoimiseksi tai sekvensoimiseksi. Southern tunnisti tunnetun yksittäisen pistemutaation käyttäen PCR-amplifioitua genomista DNA:ta. Southern kuvasi myös menetelmän oligonukleotidien suuren joukon syntetisoimiseksi kiinteälle kantajalle SBH-menetelmää varten. Southern ei kuitenkaan osoittanut, kuinka saada aikaan optimaalisen vahvuuden sisältävät olosuhteet kullekin suuressa joukossa olevalle oligonukleotidille.

Samanaikaisesti Drmanac et al., 260 Science 1649 - 1652, 1993, käyttivät toista formaattia sekvensoidessaan useita lyhyitä (116 bp) DNA-sekvenssejä. Kohde-DNA:t kiinnitettiin membraanikantajille ("dot-blot"-formaatti). Sen jälkeen kukin suodatin hybridisoitiin 272 leimatulla 10-mer- ja 11-mer-oligonukleotidilla. Olosuhteita, joissa oli laaja vahvuusvaihtelu, käytettiin saamaan aikaan spesifinen hybridisaatio kullekin n-mer-koettimelle; pesuajat vaihtelivat 5 minuutista yli yön pesuihin ja lämpötilat vaihtelivat välillä 0 - 16 °C. Useimmat koettimet vaativat 3 tunnin pesun 16 °C:ssa. Suodattimia oli valotettava 2 - 18 tuntia hybridisaatiosignaalien tunnistamiseksi. Väärien positiivisten hybridisaatioiden kokonaismäärä oli 5 % huolimatta yksinkertaisista kohdesekvensseistä, alennetusta määrästä oligomeerikoettimia ja vahvimpien mahdollisten olosuhteiden käytöstä.

Useita erilaisia menetelmiä on olemassa hybridisaatiotapahtumien tunnistamiseksi ja analysoimiseksi. Riippuen reportteriryhmästä (fluorofori, entsyymi, radioaktiivinen isotooppi jne.), jota käytetään DNA-koettimen leimaamiseksi, tunnistus ja analysointi suoritetaan fluorometrisesti, kolorimetrisesti tai autoradiografialla. Tarkastelemalla ja mittamalla emittoitunutta säteilyä, kuten fluoresenssia tai partikkeliemissiota, voidaan saada informaatiota hybridisaatiotapahtumista. Jopa silloin kun tunnistusmenetelmillä on hyvin korkea sisäinen herkkyys, hybridisaatiotapahtumien tunnistus on vaikeaa johtuen epäspesifisesti sitoutuneiden materiaalien aiheuttamasta taustasta. Useat muut tekijät alentavat myös DNA-hybridisaatiotestien herkkyyttä ja selektiivisyyttä.

On tehty yrityksiä tiettyjen prosessointivaiheiden tai osavaiheiden yhdistämisestä. Esimerkiksi erilaisia mikrorobotiikkasysteemejä on ehdotettu suuren DNA-koetinjoukon valmistamiseksi kantajamateriaalille. Esimerkiksi Beattie et al., kokouksessa The 1992 San Diego Conference: Genetic Recognition, marraskuu, 1992, käyttivät mikrorobotiikkasysteemiä spesifisiä DNA-sekvenssejä sisältävien mikrotippojen laittamiseksi yksittäisiin lasisubstraatilla oleviin mikrotekniikalla tuotettuihin näytekuoppiin.

Yleisesti alan aiemmat prosessit ovat olleet erittäin työläitä ja aikaa vieviä. Esimerkiksi PCR-amplifikaatiomenetelmä on aikaa vievä ja se lisää diagnostisen testin hintaa. Useiden sellaisten vaiheiden läsnäolo, jotka vaativat ihmistyön suorittamista joko prosessin aikana tai prosessien välissä, ei ole optimaalista siinä mielessä, että on mahdollisuus kontaminaatioon ja käyttäjävirheeseen. Lisäksi useiden koneiden tai monimutkaisten robotiikkasysteemien käyttö yksittäisten prosessien suorittamiseksi on usein käyttöä ehkäisevää lukuun ottamatta suurimpia laboratorioita, mitä tulee hintaan ja fyysisiin tilavaatimuksiin.

Edellä olevan keskustelun pohjalta on ilmeistä, että useita yrityksiä on tehty tehokkaiden menetelmien esittämiseksi monivaiheisten molekyylibiologisten monikertareaktioiden suorittamiseksi. Kuitenkin yllä ilmoitettujen syiden johdosta nämä menetelmät ovat "paloista koostuvia" ja rajoittuneita. Näitä erilaisia lähestymistapoja ei voida helposti yhdistää sellaisen systeemin muodostamiseksi, jolla voidaan suorittaa täydellinen DNA-diagnostiikkatesti. Huolimatta sellaisen systeemin kauan tunnetusta tarpeesta, mitään tyydyttävää ratkaisua ei ole ehdotettu aiemmin.

Keksinnön yhteenveto

Esillä oleva keksintö koskee sellaisten itsekohdentavien itsekeräävien mikroelektronisten laitteiden ja systeemien suunnittelua, tuotantoa ja käyttöjä, jotka voivat aktiivisesti suorittaa kontrolloidun monivaiheisen prosessoinnin ja monikertareaktiot mikroskooppisissa formaateissa. Nämä reaktiot sisältävät, mutta eivät ole rajoittuneet, useimmat molekyylibiologiset menetelmät, kuten nukleiinihappohybridisaation, vasta-aine/antigeenireaktion ja niille sukua olevat kliiniset diagnostiset menetelmät. Lisäksi vaaditut laitteet ja systeemit kykenevät suorittamaan monivaiheisen biopolymeerien yhdistelmäsynteesin sisältäen, mutta ei rajoittuen, erilaisten oligonukleotidien tai peptidien synteesin annetun laitteen tietyissä mikroosastoissa.

Vaaditut laitteet ja systeemit tuotetaan käyttäen sekä mikrolitografisia että mikrotuotantotekniikoita. Peruslaitteessa on pinnallaan matriisi, jossa on kohdentavia mikroskooppisia osastoja; kukin yksittäinen mikro-osasto kykenee kontrolloimaan elektronisesti ja ohjaamaan spesifisesti sitoutuvien kokonaisuuksien (esim. nukleiinihapot, entsyymit, vasta-aineet) kuljetusta ja kiinnittymistä itseensä. Kaikki mikro-osastot voidaan kohdentaa niiden spesifisesti sitoutuvilla kokonaisuuksilla. Itsekohdentuva

prosessi vaatii minimaalisen ulkopuolisen väliintulon, mitä tulee fluidiikkeihin tai mekaanisiin osiin.

Laite kykenee kontrolloimaan ja aktiivisesti suorittamaan erilaisia testejä ja reaktioita. Analyytit tai reaktantit voidaan kuljettaa vapaakenttäelektroforeesilla mihin tahansa spesifiseen mikro-osastoon, jossa analyytit tai reaktantit konsentroituvat tehokkaasti ja reagoivat spesifisesti sitoutuvien kokonaisuuksien kanssa siinä mikro-osastossa. Hybridisaatioanalyysin tapauksessa spesifisen analyytin tai reaktantin tunnistuksen herkkyys paranee, koska hybridisaatioreaktantit konsentroituvat spesifiseen mikroskooppiseen osastoon. Mitkä tahansa sitoutumattomat analyytit tai reaktantit voidaan poistaa kääntämällä mikro-osaston polaarisuus. Näin ollen laite parantaa myös reaktoiden spesifisyyttä. Peruslaitteita nukleiinihappohybridisaatio- ja muita analyysejä varten nimitetään vaihtoehtoisesti APEX-laitteiksi, joka tarkoittaa kohdentavaa ohjelmoitavaa elektronista matriisia.

Eräässä keksinnön näkökohdassa voidaan suorittaa lisäprosessointivaiheita tai -osavaiheita "systeemin" järjestyksessä. Systeemi on integroitu komponenttilaitteiden järjestys. Kukin komponenttilaite on suunniteltu sopivasti ja on mitoitettu suorittamaan tietty toiminto. Täydellisimmässä suoritustavassaan systeemi voi suorittaa kaikki näytevalmistuksen, hybridisaation ja tunnistuksen ja analysoinnin näkökohdat. Täydellisimmässä muodossa näyte valmistetaan ensin esimerkiksi elektronisella solulajittelijakomponentilla. Yleisesti termi elektroninen viittaa spesifisemmin komponenttilaitteen kykyyn kuljettaa varautuneet kokonaisuudet elektroforeettisesti itseensä tai pois itsestä. DNA:n lisäprosessointi ja kompleksisuuden vähentäminen voidaan vaihtoehtoisesti suorittaa raaka-DNA-selektorikomponentilla ja restriktiofragmenttiselektorikomponentilla. Lopullinen prosessoitu kohde-DNA kuljetetaan analyyttiseen komponenttiin, jossa suoritetaan elektroni-

nen hybridisaatioanalyysi mikroskooppisessa monikertaformaatissa. Tätä analyyttistä komponenttilaitetta nimitetään myös APEX-siruksi tai analyyttiseksi siruksi. Assosioidut tunnistus- ja kuvantamisanalyysikomponentit esittävät tulokset.

Systeemin sisällä materiaalit voidaan vaihtoehtoisesti kuljettaa komponenttien (laitteiden) välillä vapaakenttäelektroforeesilla, kanavoimalla, fluidiikeilla tai muilla tekniikoilla. Vaihtoehtoisesti elektroniset reagenssijakokomponentit voivat saada aikaan reagenssien elektroforeettisen kuljetuksen systeemin eri prosessointikomponentteihin. Vaihtoehtoisesti voidaan muodostaa elektroninen jätteenhävityssysteemi, joka sisältää elektrodin ja varatun matriisimateriaalin, joka sitoo ja pidättää varatut jätetuotteet. Vaihtoehtoisesti elektroninen DNA-fragmentin varastosysteemi voi toimia väliaikaisesti pidättäen muita DNA-fragmentteja myöhempää hybridisaatioanalyysiä varten.

Eräässä tämän keksinnön näkökohdassa genomisen DNA:n kompleksisuuden vähentäminen suoritetaan prosesseilla, joissa eristetään ne spesifiset DNA-fragmentit, jotka sisältävät halutun kohdesekvenssin, DNA-kokonaismateriaalista, josta puuttuu haluttu kohdesekvenssi. Raaka DNA voidaan kuljettaa ja napata kantajamateriaalille. Sitten sidottu DNA voidaan irrottaa käyttäen sopivia restriktioentsyymeitä. Irrotuksen jälkeen DNA-fragmentit voidaan kuljettaa komponenttilaitteeseen, joka selektiivisesti hybridisoi spesifiset DNA-fragmentit. Ne fragmentit, jotka sisältävät todelliset analysoitavat kohdesekvenssit, voidaan vapauttaa selektiivisesti lisärestriktioentsyymikatkaisulla ja kuljettaa systeemin analyyttiseen komponenttiin (APEX-siru). Vaihtoehtoisesti tämä menetelmä voidaan toistaa muille fragmenteille, jotka sisältävät muita kohdesekvenssejä.

Laitteen (tai systeemin) säätelijä saa aikaan laitteen eri näkökohtien erillisen säätelyn. Kun käytetään APEX-laitetta tai -sirua, joka sisältää kohdentuvat mikroskooppiset osastot, säätelijä sallii erillisten mikro-osastojen säätelyn elektronisesti niin, että spesifisesti sitoutuvien kokonaisuuksien kuljetus ja kiinnitys ohjautuu siihen osastoon. Laite voi suorittaa monivaiheiset ja monikertareaktiot täydellisellä ja tarkalla elektronisella kontrollilla, suositeltavasti mikroprosessoriin perustuvan komponentin säätelyn alaisuudessa. Monivaiheisten ja monikertareaktioiden nopeus, spesifisyys ja herkkyys paranevat suuresti laitteen spesifisissä mikro-osastoissa. Säätelijä kytkeytyy käyttäjään sisääntulo/ulostulolaitteiden kautta, kuten näytön ja näppäimistön sisääntulon kautta. Suositeltavasti käytetään graafista käyttöpintaa käytön helpottamiseksi. Sisääntulo/ulostulolaitteet liitetään säätelijään, joka puolestaan säätelee kohdentuvien elektronisten osastojen elektristä tilaa systeemissä. Spesifisesti säätelijä ohjaa voimanlähdettä/aaltogeneraattoria niin, että se muodostaa eri mikro-osastojen elektrisen tilan. Vaihtoehtoisesti voimanlähteen/aaltogeneraattorin ja systeemin APEX-laitteen välissä käytetään jakopintaa. Jakopinta sisältää suositeltavasti relesarjan säätelijän alaisuudessa monitoimisen sisääntulo/ulostuloliitoksen kautta. Releet toimivat suositeltavasti yhdistäen voimanlähteen/aaltogeneraattorin APEX-laitteeseen säätelemällä liitosta, mitä tulee sen polaarisuuteen, liitoksen läsnä- tai poissaoloon ja jännitteen ja virran määrään, joka menee yksittäiseen osastoon. Säätelijä säätelee suositeltavasti valolähdettä, joka on suunnattu hybridisaatiosysteemiin. Tunnistin-, kuvantamisprosessointi- ja tulosanalyysisysteemi ovat vaihtoehtoisesti liitetty APEX-laitteeseen. Suositeltavassa suoritustavassa fluoresenssimikroskooppi ottaa vastaan ja vahvistaa kuvan hybridisaatiotapahtumista, jotka tapahtuvat laitteen eri mikro-osastoissa. Emissiot suodatetaan

optisesti ja ne tunnistetaan sarjalla varaukseen kytkettyjä laitteita (CCD) tai mikrokanavalevytunnistimella. Sitten kuva varastoidaan ja analysoidaan. Suositeltavasti tulokset esitetään käyttäjälle monitorissa.

Toisessa tämän keksinnön näkökohdassa muodostetaan hybridisaatiosysteemi, jossa on monia mikro-osastoja substraattia sisältävän kontrollielektroniikan päällä. Spesifisesti kytkentävirtapiirejä käytetään mikro-osastojen erilliseksi kohdentamiseksi. Elektriset liitokset tehdään toiselta puolelta kuin se, jossa kosketus näytteen kanssa tapahtuu. Lisäksi optinen reitti, kuten aaltoputki, on sijoitettu mikro-osaston alle niin, että sallitaan pääsy mikro-osastoon takapuolelta. Viritys optisesti, jos on tarpeen, voidaan suunnata mikro-osastoon aaltoputken kautta. Emittoituneen säteilyn tunnistus voidaan suorittaa takapuolen aaltoputkella. Vielä eräässä tämän keksinnön näkökohdassa on systeemin päälle sijoitettu näytteen sisältävä systeemi, erityisesti hybridisaatiomatriisialueen päälle. Suositeltavassa suoritustavassa matriisihybridisaatioalue (sisältäen näytteen sisältävän komponentin) on adaptoitu niin, että se voidaan poistaa muusta laitteesta, joka sisältää elektroniset säätely- ja tunnistuselementit.

Toisessa tämän keksinnön näkökohdassa on kuvattu parannetut prosessit matriisihybridisaatiosysteemin muodostamiseksi. Eräässä prosessissa substraatti, kuten silikoni, muodostetaan yhdessä eristävän kerroksen, kuten paksun oksidin, kanssa. Muodostetaan konduktiiviset mikro-osastot esimerkiksi kerrostamalla metallia (esim. alumiinia tai kultaa), joka sitten kuvioidaan esimerkiksi tavanomaisilla fotolitografisilla tekniikoilla. Muodostetaan eristävä päällys, kuten PECVD:llä muodostettu TEOS. Vaihtoehtoisesti TEOS-kerroksen päälle muodostetaan nitridipassivaatiopäällys. Nitridin ja lasin läpi muodostetaan aukot mikroelektrodille. Vaihtoehtoisesti kiinnittymistä parantavia materiaaleja, kuten titaanitungsteenia, voidaan

käyttää yhdessä metallikerroksen kanssa kiinnittymisen tehostamiseksi oksidiin ja/tai lasiin. Vielä eräässä suoritustavassa voidaan muodostaa kuopat elektrodin päälle poistamalla materiaalia nitridikerroksen alta, joka on sijoitettu oksidikerrokselle, jota tukee substraatti.

Yksittäisten mikro-osastojen elektroninen kontrolli voidaan suorittaa säädellen jännitettä tai virtaa. Kun toinen näkökohta on asetettu, toista voidaan tarkkailla. Esimerkiksi, kun jännite on asetettu, virtaa voidaan tarkkailla. Jännite ja/tai virta voidaan antaa tasavirralla tai se voi vaihdella ajan suhteen. Esimerkiksi pulssivirtoja tai DC-esimagnetointeja voidaan suositeltavasti käyttää.

Sen mukaisesti tämän keksinnön aihe on esittää systeemi biologisten materiaalien näytteiden valmistamiseksi, prosessoimiseksi, hybridisoimiseksi, tunnistamiseksi ja analysoimiseksi.

Vielä eräs tämän keksinnön aihe on esittää systeemi, joka yhdistää useat vaiheet tai osavaiheet integroituun systeemiin.

Vielä eräs tämän keksinnön mukainen aihe on esittää automatisoitu DNA-diagnostiikkasysteemi.

Piirustusten lyhyt kuvaus

Kuvio 1 esittää vaiheiden ja osavaiheiden järjestyksen näytteen valmistamiseksi, hybridisoimiseksi ja tunnistus- ja tulosanalyyseihin.

Kuviot 2A ja 2B esittävät aktiivisen ohjelmoitavan matriisisysteemin läpileikkauksen (kuvio 2A) ja perspektiivikuvan (kuvio 2B).

Kuvio 3 esittää aktiivisen ohjelmoitavan matriisisysteemin rakenteen metallipeitekerroksessa.

Kuvio 4 esittää yksityiskohdan aktiivisesta ohjelmoitavasta matriisisysteemistä pohjapiirroskuvana.

Kuvio 5 esittää perspektiivikuvan yksittäisestä mikro-osastosta ja elektrisestä liitoksesta.

Kuvio 6 esittää systeemin pohjapiirroskuvan, joka sisältää elektronisen solulajittelijamatriisin, DNA-selektorit ja restriktiofragmenttiselektorit ja hybridisaatiomatriisin.

Kuvio 7 esittää kontrollisysteemin laatikkokuvauksena.

Kuvio 8 on läpileikkauskuva aktiivisesta ohjelmoitavasta matriisisysteemistä, jossa on assosioituneet elektroniikat.

Kuvio 9 on läpileikkauskuva vaihtoehtoisesta kerroksellisesta aktiivisesta ohjelmoitavasta matriisisysteemistä, jossa on elektrinen ja optinen pääsy mikro-osastojen takapuolelle ja biologisen sisällön sisältävä kansi.

Kuvio 10 esittää perspektiivikuvan APEX-systeemistä, joka on kiinnitetty kantajaansa.

Kuviot 11A - G esittävät laitteen tuottoprosessin vaiheet.

Kuvio 12 esittää sellaisen tuotetun laitteen läpileikkauksen, jossa käytetään polysilikonirakennetta.

Kuvio 13 esittää sellaisen tuotetun laitteen läpileikkauksen, jossa käytetään kiinnittymistä tehostavia kerroksia.

Kuvio 14 esittää laitteen, jossa on elektrodin yläpuolella suurennettu säiliötila.

Kuvio 15 esittää käyttäjänäytöt eri jännite- ja virtaohjelmille.

Kuvio 16 esittää DNA-puhdistussysteemin läpileikkauksen.

Kuvio 17 esittää kapillaarijoukon tuottosysteemin ja kojeen läpileikkauskuvan.

Kuvio 18 esittää konsentrisen rakenteen mikro-osaston läpileikkauskuvan.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Kuviot 2A ja 2B kuvaavat yksinkertaistetun version aktiivisesta ohjelmoitavasta elektronisesta matriisihyb-

ridisaatiosysteemistä, jota tässä keksinnössä käytetään. Yleisesti substraatti 10 tukee matriisia tai elektronisesti ohjattavien mikro-osastojen 12 suurta joukkoa. Kuvaamisen helpottamiseksi eri mikro-osastot kuviossa 2A on merkitty merkeillä 12A, 12B, 12C ja 12D. Läpäisykerros 14 on sijoitettu yksittäisten elektrodien 12 ylle. Läpäisykerros sallii suhteellisten pienten varautuneiden kokonaisuuksien kuljetuksen lävitseen, mutta estää suurten varautuneiden kokonaisuuksien, kuten DNA:n, suoran kosketuksen elektrodien 12 kanssa. Läpäisykerroksella 14 vältetään elektrokemiallinen hajoaminen, joka voisi tapahtua DNA:ssa sen koskettaessa suoraan elektrodeja 12. Se toimii lisäksi estäen DNA:n suuren epäspesifisen adsorption elektrodeihin. Kiinnitysalueet 16 on sijoitettu läpäisykerroksen 14 ylle ja ne muodostavat spesifiset sitoutumiskohdat kohdemateriaaleille. Kiinnitysalueet 16 on merkitty merkeillä 16A, 16B, 16C ja 16C, jotka vastaavat elektrodien 12A - D merkintöjä, vastaavasti.

Toimiessaan säiliö 18 muodostaa sen tilan kiinnitysalueiden 16 yläpuolella, joka sisältää halutut, kuten myös ei-halutut, materiaalit tunnistusta, analysointia tai käyttöä varten. Varatut kokonaisuudet 20, kuten varattu DNA, sijaitsevat säiliössä 18. Erään tämän keksinnön näkökohdan mukaisesti aktiivinen ohjelmoitava matriisisysteemi sisältää menetelmän varatun materiaalin 20 kuljettamiseksi mihin tahansa spesifiseen mikro-osastoon 12. Kun aktivoidaan, mikro-osasto 12 muodostaa minkä tahansa varatun funktionalisoidun spesifisesti sitoutuvan kokonaisuuden 20 kuljetuksen elektrodille 12 vapaakenttäelektroforeesilla. Esimerkiksi, jos elektrodi 12A tehdään positiiviseksi ja elektrodi 12D negatiiviseksi, voiman 22 elektroforeettiset linjat kulkevat elektrodien 12A ja 12D välillä. Elektroforeettisen voiman 22 linjat aiheuttavat varautuneiden sitoutuvien kokonaisuuksien 20, joiden nettovaraus on negatiivinen, kulkeutumisen positiiviselle elektrodille 12A.

Varautuneet materiaalit 20, joilla on positiivinen nettovaraus, kulkevat elektroforeettisessa voimassa negatiivisesti varatulle elektrodille 12D. Kun negatiivisesti nettovarattu sitoutuva kokonaisuus 20, joka on funktionalisoitu, koskettaa kiinnityskerrosta 16A johtuen sen liikkeestä elektroforeettisen voiman alaisuudessa, funktionalisoitu spesifisesti sitoutuva kokonaisuus 20 kiinnittyy kovalenttisesti kiinnityskerrokseen 16A.

Kiinnityskerrokset, joiden ei tarkoiteta reagoivan, kuten 16B ja 16C, on mahdollista suojata tekemällä niiden vastaavat elektrodit 12B ja 12C negatiivisiksi. Tämä johtaa siihen, että elektroforeettiset voimalinjat virtaavat kiinnitysalueelta 16B (ainoastaan 16B alueesta keskustellaan yksinkertaisuuden vuoksi tulosten ollessa samanlaisia alueelle 16C). Elektroforeettiset voimalinjat 24 toimivat kuljettaen negatiivisesti varautuneet sitoutuvat kokonaisuudet 20 pois kiinnityskerroksesta 16B ja kohti kiinnityskerrosta 16A. Tällä tavalla muodostetaan "voimakenttäsuojaus" sellaisten kiinnityskerrosten 16 ympärille, joiden halutaan olevan reagoimattomia varautuneiden molekyylien 20 kanssa sillä hetkellä.

Yksi tämän systeemin erittäin edullinen tulos on se, että varautuneet sitojamateriaalit 20 voidaan suuresti konsentroida alueille, jotka ovat signaalikiinnityskerrosten 16 vieressä. Kuten voidaan nähdä perspektiivipiirroksesta 2B, jos yksittäinen mikro-osasto 26A on varautunut positiivisesti ja jäljelle jäävät mikro-osastot ovat varautuneet negatiivisesti, elektroforeettiset voimalinjat aiheuttavat negatiivisesti nettovarautuneiden sitoutuvien kokonaisuuksien 20 kuljetuksen kohti mikro-osastoa 26A. Mikro-osaston 26A on kuvassa 2A tarkoitettu kuvaavan kiinnityskerroksen 16, läpäisykerroksen 14 ja sen alla olevan assosioituneen elektrodin 12 yhdistelmää. Tällä tavalla voidaan saada aikaan menetelmä analyyttien tai reaktanttien konsentroimiseksi ja reagoimiseksi laitteen missä

tahansa spesifisessä mikro-osastossa. Kun spesifiset sitoutuvat kokonaisuudet 20 ovat kiinnittyneet kiinnityskerrokseen 16, alla oleva mikroelektrodi 12 voi jatkaa toimintaansa tasavirtamuodolla (DC). Tämä ainutlaatuinen ominaisuus sallii vapaana liuoksessa olevien suhteellisen laimeiden varautuneiden analyytti- tai reaktanttimolekyylien nopean kuljetuksen, konsentroinnin ja reagoimisen peräkkäisellä tai rinnakkaisella tavalla missä tahansa spesifisessä mikro-osastossa, jossa pidetään yllä päinvastaista varausta kuin on analyytti- tai reaktanttimolekyyleillä. Tämä kyky konsentroida laimeat analyytti- tai reaktanttimolekyylit valituissa mikro-osastoissa 26 nopeuttaa suuresti reaktionopeuksia näissä mikro-osastoissa 26.

Kun haluttu reaktio on mennyt loppuun, elektrodin 12 jännite voidaan vaihtaa päinvastaiseksi muodostaen näin elektroforeettisen voiman, jonka suunta on päinvastainen aiempaan voimaan nähden. Tällä tavalla epäspesifiset analyytit tai reagoimattomat reaktanttimolekyylit voidaan poistaa mikro-osastosta 26. Spesifiset analyytit tai reaktiotuotteet voidaan vapauttaa mistä tahansa mikro-osastosta 26 ja kuljettaa muihin osastoihin lisäanalyysejä varten; tai ne voidaan varastoida muissa kohdentuvissa osastoissa; tai ne voidaan poistaa täydellisesti systeemistä. Tämä materiaalien poisto tai dekonsentrointi kentän kääntämisellä tehostaa systeemin erotuskykyä johtaen epäspesifisesti sitoutuneiden materiaalien poistoon. Säätelemällä nyt hylkivän elektroforeettisen voiman määrää, joka vaikuttaa kiinnityskerrokseen 16 epäspesifisesti kiinnittyneisiin materiaaleihin, voidaan saada aikaan olosuhteiden vahvuuden elektroninen kontrolli. Nostamalla sähköpotentiaalia elektrodissa 12 niin, että muodostetaan kenttä, joka on riittävä poistamaan osittain hybridisoituneet DNA-sekvenssit, joka näin sallii yksittäisen ei-yhteensopivan

kohdan sisältävien hybridisaatioiden tunnistuksen, voidaan tunnistaa pistemutaatioita.

Toimenpiteet voidaan suorittaa rinnakkain tai sarjassa eri kiinnityskerroksissa 16. Esimerkiksi viitaten kuvioon 2A, reaktio voi tapahtua ensin kiinnityskerroksessa 16A käyttäen osoitettuja potentiaaleja. Elektrodin 12A potentiaali voidaan kääntää päinvastaiseksi, se tarkoittaa, että se tehdään negatiiviseksi, ja potentiaali viereisessä elektrodissa 12B voidaan tehdä positiiviseksi. Tällä tavalla reaktiot tapahtuvat sarjassa. Materiaalit, jotka eivät sitoutuneet spesifisesti kiinnityskerrokseen 16A, kuljetetaan elektroforeettisella voimalla kiinnityskerrokseen 16B. Tällä tavalla käytetään konsentrointinäkökohtaa korkeiden konsentraatioiden saamiseksi siihen spesifiseen kiinnityskerrokseen, jossa on positiivinen elektroforeettinen voima. Seuraavaksi konsentroituneet materiaalit voidaan siirtää viereiseen tai muuhun kiinnityskerrokseen 16. Vaihtoehtoisesti useiden kiinnityskerrosten 16 suojaus voidaan poistaa siinä mielessä, että elektrodista 12 virtaa elektroforeettinen nettovoimakenttä kiinnityskerroksen 16 läpi säiliöön 18. Poistamalla suojaus useista kiinnityskerroksista 16 suoritetaan monikertareaktiot. Kukin yksittäinen kohta 26 voi toimia oleellisesti erillisenä biologisena "koeputkena" siinä mielessä, että annetun kiinnityskerroksen 16 muodostama tietty ympäristö voi erota niistä ympäristöistä, jotka ympäröivät muita kiinnityskerroksia 16.

Kuviossa 3 esitetään aktiivisen ohjelmoitavan elektronisen matriisisysteemin metallipeitekerroksen pohjapiirroskuva. Useat yksittäiset elektrodit 30 muodostetaan suositeltavasti suurena joukkona. Muodostetaan esimerkiksi yksittäisten elektrodien 30 8 x 8 -matriisi. Vaihtoehtoisesti voidaan muodostaa lisäkontrolli- tai dumppausalustat 32 auttamaan haluttujen elektroforeettisten kenttien muodostusta. Elektrodit 30 ja alusta 32 lii-

tetään kontaktialustoihin 34. On esitetty 68 kontaktialustaa 34, jotka vastaavat 64 elektrodia 30 ja 4 alustaa 32. Johdot 36 liittävät elektrodit 30 ja alustat 32 yksittäin kontakteihin 34. Kuten on esitetty, viuhkamaista kuviota käytetään sallimaan liitokset suhteellisen kondensoituneesta elektrodien 30 ja alustojen 32 alueesta peitteen 36 rajalle.

Kuvio 4 esittää kuvion 3 peitteen kuvan suurennetun yksityiskohdan. Tuloksena syntynyt metallisysteemi on oleellisesti samanlainen kuin peitekuvio. Elektrodit 30 on esitetty muodostaen oleellisesti nelikulmaiset rakenteet. Johtolinja 36 liittää elektrodin 30 kontaktialustaan 34 (kuvio 3). Johdon suositeltava paksuus on 1 - 20 μm.

Kuvio 5 esittää yksittäisen elektrodin 50 perspektiivikuvan. Elektrodi 50 on liitetty suoraan johtoon 52. Läpäisykerros 54 on sijoitettu johdon 50 ylle. Kiinnityskerros 56 on sijoitettu läpäisykerroksen 54 ylle.

Läpäisykerros mikrolitografisesti tuotetuissa laitteissa voi vaihdella paksuudeltaan välillä 1 nm - 500 μm niin, että paksuudet välillä 500 nm - 50 μm ovat suositeltavimpia. Läpäisykerroksen tulee peittää koko elektrodin pinta. Läpäisykerros voidaan muodostaa mistä tahansa sopivasta materiaalista, kuten polymeereistä, keraamisista aineista, sooligeeleistä, kerroskomposiittimateriaaleista, savesta ja kontrolloidusti huokoisesta lasista.

Kuvio 6 esittää täydellisen systeemin 60 automatisoidulle näytteen valmistukselle ja valmistettujen materiaalien hybridisaatiolle. Näyte 62, kuten veri tai muut biologiset materiaalit, laitetaan systeemiin 60. Yleisesti on esitetty näytteen lisäysaukko 64. Yleisesti näytteen lisäysaukkoa 64 käytetään, kun läsnä on päällä oleva biologisen sisällön sisältävä rakenne niin, että näytettä 62 ei voida laittaa suoraan systeemiin, ilman että se laitetaan portin 64 kautta.

Näytteen valmistus suoritetaan tässä systeemissä 60 elektronisen solulajittelijamatriisikomponentin 66 ja DNA-selektorikomponentin 68 ja restriktiofragmenttiselektorikomponentin 70 yhdistelmällä. Elektroninen solulajittelijamatriisikomponentti 66 sisältää alla olevat elektrodit yhdessä läpäisykerrosten ja kiinnityskerrosten kanssa. Nämä muodostavat tehokkaasti osastoista muodostuneen matriisin solujen kiinnittämiseksi. Yleisesti alue yksittäisille osastoille ja täydellisen matriisin alue ovat suurempia kuin analyyttisen laitekomponentin alueet. Näin ollen elektroninen solulajittelijamatriisi tehdään sopivan suuruiseksi niin, että se voi mukautua variaatioihin eri näytteiden ja näytekokojen solumäärissä. Kiinnityskerrokset voivat olla yleisesti selektiivisiä solujen suhteen tai yksittäisesti selektiivisiä eri solutyypeille. Vaihtoehtoisesti osastojen ryhmät tai yhdistelmät voidaan tehdä selektiivisiksi yhdentyyppisille soluille. Soluselektiivisyys voidaan muodostaa kiinnittämällä spesifiset vasta-aineet tai solukiinnitystekijät kiinnityskerrokseen. Matriisi 66 toimii vapaakenttäelektroforeesilla.

Raaka-DNA-selektori 68 ja restriktiofragmenttiselektori 70 toimivat sitoen elektronisesta solulajittelijamatriisista 66 ulostulevan raa'an DNA:n ja ne sallivat halutun DNA:n selektiivisen katkaisun sitoutuneesta materiaalista. Termiä raaka käytetään ainoastaan ilmaisemaan DNA:n eristyksen ja sen kompleksisuuden vähentämisen eilopullista vaihetta. DNA sidotaan selektoriin alueelle, jonka ei uskota sisältävän haluttua DNA-materiaalia. Sitten halutut DNA-materiaalit irrotetaan sitoutuneista materiaaleista esimerkiksi lisäämällä restriktioentsyymejä. Irrotettu sitoutumaton materiaali siirretään sitten fyysisesti raaka-DNA-selektorista 68 restriktiofragmenttiselektoriin 70. Irrotetun materiaalin poistamiseksi käytetään suositeltavasti elektroforeettista kuljetusta. Tämä prosessi voidaan toistaa sitomalla irrotetut materiaalit

selektoriin, jossa restriktioentsyymi toimii katkaisten sitoutumattoman osan, joka sisältää halutun DNA:n.

Esimerkiksi ihmisen DNA sisältää noin 100 000 geeniä. DNA-kokonaismateriaalista merkittävä osa sisältää toistosekvenssejä, jotka eivät sisällä haluttua DNA-informaatiota. DNA voidaan sitoa selektoriin näiden informaatiota sisältämättömien toistosekvenssien avulla. Sitoutunut DNA voidaan irrottaa sitoutumattomasta DNA:sta, jonka uskotaan sisältävän halutun analysoitavan DNA:n. Sitten tämä prosessi voidaan toistaa niin, että vielä spesifisemmät sekvenssit aiheuttavat materiaalin sitoutumisen selektoriin.

Restriktiofragmenttiselektorista 70 ulostullut materiaali viedään sitten APEX-sirulle 72. Toimenpiteet matriisissa 72 suoritetaan, kuten on kuvattu kuvioiden 2A ja 2B yhteydessä.

Vaihtoehtoinen menetelmä DNA:n kompleksisuuden alentamiseksi on käyttää DNA:han perustuvaa affiniteettikromatografiaa. Affiniteetti, joka yksijuosteisen DNA:n palalla on toiseen yksijuosteiseen DNA-palaan, riippuu siitä, kuinka hyvin emäsparit sopivat yhteen. Kun kromatografiasysteemin stationäärinen faasi sisältää tietyn sekvenssin tai sekvenssien yhdistelmän, mikä tahansa liikkuvassa faasissa oleva yksijuosteinen DNA sitoutuu stationääriseen faasiin enemmän tai vähemmän hyvin riippuen siitä, kuinka hyvin sekvenssi sopii yhteen stationäärisessä faasissa olevan (olevien) nappaavan sekvenssin (nappaavien sekvenssien) kanssa. Tämä sallii kromatografiset erotukset perustuen DNA:n affiniteettiin nappaaviin sekvensseihin stationäärisessä faasissa.

Yksi menetelmä DNA:han perustuvan affiniteettikromatografian toteuttamiseksi mikro-osastoja sisältävällä matriisilla on osastoryhmien modifioiminen nappaavalla koettimella, jolla on tietty sekvenssi tai sekvenssiryhmä. Tämä muodostaa stationäärisen faasin. DNA-näyte kohdenne-

taan mikro-osastoon ja se siirretään peräkkäin yhdestä mikro-osastosta seuraavaan. Elektronista olosuhteiden vahvuuden kontrollointia käytetään sellaisen DNA:n nappaamiseksi, joka sopii sekvenssiltään yhteen kussakin mikro-osaston kuopassa olevan nappaavan koettimen kanssa. Tällä tavalla DNA, joka sopii yhteen nappaavan koettimen kanssa, poistetaan nopeasti näytteestä.

Keksintö, jossa DNA-näyte puhdistetaan peräkkäisesti DNA:han perustuvalla affiniteettikromatografialla sarjassa mikro-osastoja, voidaan yleistää jatkuvatoimiseksi versioksi. Kuvio 16 esittää sellaisen systeemin läpileikkauskuvan. Tässä elektrodi 210 muodostaa pitkän liuskan ja sitä modifioidaan sopivalla stationäärifaasilla. Liikkuva faasi suljetaan kanavaan 212 stationäärifaasin yläpuolelle. Liikkuva faasi voidaan kuljettaa stationäärifaasin yli konvektiivisella massakuljetuksella. Vaihtoehtoisesti liikkuvan faasin ionit voidaan vetää pitkin stationäärifaasia elektrisellä kentällä 214, joka muodostetaan sijoittamalla erilliset ja toisistaan riippumattomat elektrodit 216 kumpaankin päähän pitkää liuskaelektrodia. Elektronista olosuhteiden vahvuuden kontrollointia voidaan käyttää muodostamalla vaihtovirta tai pulssivirta liuskaelektrodiin. Tämä kuljettaa DNA:ta pitkin stationäärifaasia ja pois siitä.

Vaihtoehtoinen lisämenetelmä näyte-DNA:n kompleksisuuden vähentämiseksi on kokoselektio suodattamalla näyte mikrohuokoisen alustan läpi. Mikrohuokoinen alusta voidaan muodostaa täyttämällä keinotekoisen geometrian sisältävät onkalot dendriiteillä. Nämä dendriitit muodostetaan kemikaalien, kuten metallisuolojen, keraamisia yhdisteitä muodostavien materiaalien, monomeerien ja polymeerien, mutta ei ainoastaan näiden, elektrokemiallisella kerrostamisella. Mikrohuokoisen alustan huokoisuutta voidaan säädellä säätämällä elektrodeihin annettua elektristä signaalia.

Dendriitit voivat muodostaa esimerkiksi säleaidan tyyppisiä rakenteita tai fraktaalin tyyppisiä rakenteita.

Menetelmä mikrohuokoisen alustan muodostamiseksi APEX-laitteeseen voi sisältää vaiheen, jossa muodostetaan pitkä kanava yhdessä vastakkaisten metallielektrodien kanssa. Kun tämä kanava täytetään sopivalla kemikaalilla ja elektrodiin lisätään sopiva elektrinen signaali, dendriitit muodostuvat mikrohuokoisen alustan muodostavien elektrodien välitilaan. Palaten kuvioon 6 voidaan muodostaa elektroninen reagenssijakosysteemi 74, joka kuljettaa reagenssit systeemiin 60. Suositeltavasti reagenssit kuljetetaan elektroforeettisella voimalla, jos ne ovat varautuneita. Vaihtoehtoisesti elektroninen jätteenpoistosysteemi 76 sisällytetään systeemiin 60. Jätteenpoistosysteemi 76 sitoo itseensä varautuneita jätepartikkeleita ja poistaa ne pitämällä itsessään varautuneet kokonaisuudet. Toinen vaihtoehtoinen systeemin 60 osa on DNA-fragmentin varastosysteemi 78. Tämä fragmentin varastosysteemi 78 toimii säilyttäen DNA-fragmentit väliaikaisesti tulevia analyysejä varten.

Systeemi 60 voi sisältää joitain yllä kuvattuja toimintoja tai kaikki ne. Esimerkiksi näytteen valmistus yhdistettynä kompleksisuuden alennusmuotoon, joka suoritetaan DNA-selektorilla 68 ja restriktiofragmenttiselektorilla 70, voidaan assosioida analyyttisen matriisin 72 kanssa. Kuitenkin mikä tahansa tai kaikki yllä kuvatut toiminnot voidaan yhdistellä, kuten halutaan.

Kuvio 7 esittää laatikkokuvauksen kokonaissysteemistä sisältäen säätelijän. Alla olevat elektrodit APEX-laitteessa aktivoidaan muodostamalla elektrodiin säädelty potentiaali tai kuljettamalla säädelty virta elektrodin läpi. Täysi toiminta havaitaan, kun potentiaali tai virta kussakin APEX-laitteen elektrodissa on toisistaan riippumattomasti säädelty. Tämä saadaan aikaan APEX-säätelijäsysteemillä.

Säätelijätietokone 80 on yhteydessä käyttäjään sisääntulo/ulostulolaitteiden, kuten näytön 82 ja sisääntulolaitteen 84, kanssa. Näyttö 82 voi olla minkälainen tavanomainen näyttö tahansa, kuten monitori tai tietokoneen näyttöpääte. Sisääntulo 84 voi olla mikä tahansa tavanomainen käyttäjän sisääntulolaite, kuten näppäimistö, hiiri tai kosketusnäyttöpäätelaite. Säätelijätietokone 80 liitetään yhteen voimanlähteen ja aaltogeneraattorin 86 kanssa. Säätelijä 80 asettaa voimanlähteen ja aaltogeneraattorin 86 niin, että saadaan aikaan virran tai jännitteen ulostulo jakopintaan 88. Suositeltavassa suoritustavassa voimanlähde tai aaltogeneraattori 86 kykenee muodostamaan tarkkaan säädellyn jännitteen ja virran annon. Säätelijätietokone 80 muodostaa kontrollisignaalit jakopintaan 88 monitoimisen sisääntulo/ulostulotarkkailupöydän 90 kautta. Jakopinta 88 muodostaa yksinkertaistetun liitoksen APEX-systeemin 92 kontaktien kanssa.

Jakopinta sisältää suositeltavasti releet, jotka sallivat selektiivisen liitoksen voimanlähteen ja aaltogeneraattorin 86 ja APEX-systeemin 92 spesifisten elektrodien välillä. Yhdessä suoritustavassa jakopinta 88 sisältää useita releitä, jotka liittävät voimanlähteen ja aaltogeneraattorin 86 APEX-systeemin 92 elektrodeihin. Liitokset sallivat voimanlähteen ja aaltogeneraattorin 86 välillä olevan reitin selektion APEX-systeemin 92 elektrodeihin tai ei salli selektiota. Lisäksi toinen rele sallii APEX-systeemin 92 elektrodeihin muodostettujen jännitteiden polaarisuuden selektion. Vaihtoehtoisesti, jos useita voimanlähdetasoja on saatavissa, kuten usean ulostulon sisältävällä voimanlähteellä 86, APEX-systeemin 92 elektrodiin liitettävä spesifinen taso voidaan asettaa toisten elektrodien tasosta riippumattomasti.

Näin ollen, kuten on kuvattu kuvion 2A yhteydessä, sijoittamalla tietyt elektrodit (esim. 12B ja 12C) negatiivisiksi, mutta potentiaaliltaan pienemmiksi kuin elekt-

rodi 12D, kiinnitysalueita 16B ja 16C suojaa paikallinen voimakenttä.

Jakopinta 88 voi toimia selektoiden halutun jännitteen yksittäisille elektrodeille APEX-systeemissä 92. Vaihtoehtoisesti sellainen erilainen jännitteenmuodostus voidaan saada aikaan käyttäen jännitejakajaa.

Suositeltavassa suoritustavassa säätelijätietokone 80 on Macintosh Quadra 950. National Instruments Corporation LabVIEW -ohjelmistoa käytetään muodostamaan ohjelmistoyhteys käyttäjälle niin, että hän voi ohjelmoida APEX-systeemiin liitetyt laitteet ja kerätä ja prosessoida testin tulokset. National Instruments NuBus -tarkkailupöytiä käytetään muodostamaan sellainen laiteyhteys Quadra 950 -tietokoneesta 80 voimanlähdelaitteisiin 86, joka kuljettaa potentiaalit ja virrat ja joka mittaa todelliset virrat ja potentiaalit ja testin tulokset.

Käyttäjä kontrolloi testiä Virtual Instrument -laitteella, joka luodaan LabVIEW-ohjelmistolla. Virtual Instrument antaa käyttäjäystävällisen graafisen esityksen niistä kontrolleista, joita käyttäjä voi käyttää, ja näiden kontrollien käytöstä johtuen jotkin tulokset APEX-laitteelle niin, että se voi suorittaa testin. Käyttäjä on yhteydessä Virtual Instrument -laitteen kanssa Quadra 950 -tietokoneen 80 näppäimistön ja hiiren välityksellä (yhdessä sisääntulo 84). Virtual Instrument muodostaa ohjelmistoyhteydet monitoimiseen National Instruments NB-MIO-16XL -sisääntulo/ulostulolaitteeseen 90 ja National Instruments DMA2800 -tarkkailupöytään, jotka on liitetty Quadra 950 -tietokoneen NuBus-tietoväylään.

Monitoiminen I/O-tarkkailupöytä kykenee muodostamaan digitaaliset ja/tai analogiset signaalit ulkoisille laitteille toteuttamalla ohjelmoitu sekvenssi, jonka käyttäjä on spesifioinut Virtual Instrument -laitteella. MIO-tarkkailupöytä kykenee myös digitoimaan ja varastoimaan Quadra 950 -tietokoneeseen Virtual Instrument -laitteen

säätelyn alaisuudessa signaalit, jotka APEX-laitteeseen liitetyt laitteet ovat muodostaneet. DMA2800 muodostaa kyvyn varastoida nopeasti tiedot, jotka MIO-tarkkailupöytä tarvitsee, Direct Memory Access -ohjelman kautta ohittaen Quadra 950 CPU -ohjelman. DMA2800 muodostaa myös GPIB-yhteyden (IEEE 488) sellaisten ulkoisten laitteiden kontrolloimiseksi, jotka sopivat IEEE 488 -kommunikaatio- ja tulossiirtostandardeihin, joka sisältää useimmat modernit laitteet.

Tässä sääteljän suositeltavassa suoritustavassa käytetään kahta ulkoista laitetta kuljettamaan potentiaalit tai virrat APEX-laitteelle. Keithley 236 Source/Measure Unit -voimanlähde 86 muodostaa riittävän stabiilisuuden ja joustavuuden tarkasti säädellyn potentiaalin tai virran lähteeksi. SMU 236 joko muodostaa potentiaalin ja mittaa tuloksena syntyneen virran tai muodostaa virranlähteen ja mittaa tuloksena syntyneen potentiaalin. Tätä laitetta ohjelmoidaan Virtual Instrument -laitteesta GPIB-kontrollin alaisuudessa DMA2800-tarkkailupöydän kautta virran tai potentiaalin tasojen ja aikariippuvaisuuden kontrolloimiseksi ja todellisten potentiaalien ja virtojen, jotka menevät APEX-laitteeseen, mittaamiseksi ja varastoimiseksi.

Kuljetettavat virrat tai potentiaalit viedään APEX-laitteeseen relesarjan kautta jakopinnassa 88, jotka muodostavat kunkin elektrodin toisistaan riippumattoman kytkennän ei-liitostilan, positiiviseen lähteeseen olevan liitostilan ja negatiiviseen lähteeseen olevan liitostilan välillä. Suositeltava suoritustapa esittää myös useamman kuin yhden Source/Measure-laitteen käyttämisen erilaisten positiivisten ja negatiivisten potentiaali- tai virtatasojen muodostamiseksi eri elektrodeihin. Relesarja muodostetaan National Instruments SCXI Chassis -laitteella, jossa on yhdeksän 16-kanavaista Class 3 Relay Modules -moduulia yhdistettynä runkoon, joka muodostaa yhteensä 144 relettä. Kahta relettä per elektrodi käytetään muodostamaan

elektrodi, joka on joko irtikytketty tai kytketty joko positiiviseen tai negatiiviseen lähteeseen. Suositeltavassa suoritustavassa kaapelikimppu liittää nämä releet APEX-laitteeseen Cerprobe Probe Card -kortin kautta, joka muodostaa koettimien mekaanisen kontaktin APEX-laitteen kiinnitysalustojen kanssa.

Säätelijätietokone 80 kontrolloi vaihtoehtoisesti valonlähdettä 94, jolla viritetään fluoresenssi, jolla tunntistetaan DNA-hybridisaatio. Suositeltavassa suoritustavassa valonlähde 94 on laser, joka muodostaa sopivan allonpituuksista säteilyä sellaisten fluoresenssimarkkereiden virittämiseksi, jotka sisältyvät APEX-systeemiin 92.

APEX-systeemin 92 ulostulo viedään havaintoreitin 96 kautta tunnistimeen 98. Havaintoreitti 96 voi olla fyysinen liitos, kuten kuituoptiikka, tai se voi sisältää optisen reitin, kuten mikroskoopin. Optisia kuituja voidaan käyttää havaintoreitillä alentamaan valomäärää tunnistimessa sellaisilla allonpituuksilla, jotka eivät vastaa APEX-systeemin 92 fluoresenssimarkkereiden emissiospektriä. Lisäksi uurrossuodattimia voidaan käyttää tarpeen mukaan alentamaan valomäärää tunnistimessa 98 laservalonlähteen 94 viritysaallonpituudella. Tunnistin 98 voi vaihtoehtoisesti muodostaa APEX-systeemin 92 kuvan esimerkiksi käyttäen jäähdytettyä CCD-kameraa. Optisen kuvan muodostuksen lisäksi, tai sille vaihtoehtoisesti, APEX-systeemistä 92 emittoitunut fluoresenssisäteily voidaan tunnistaa tavanomaisin keinoin, kuten valodiodeilla tai valomonistinputkilla. Tunnistimen 98 ulostulo viedään tulosprosessointi/analyysisysteemiin 100. Tämä systeemi havainnoi tunnistetun koetinmateriaalin tasoa APEX-systeemissä 92. Vaihtoehtoisesti asiantuntijasysteemiä voidaan käyttää analyysisysteemissä 100.

Suositeltavassa suoritustavassa Data Translation Frame Grabber -tarkkailupöytä on yhdistetty Quadra 950

NuBus -tietoväylään niin, että ne kuvat, jotka on tallennettu videokameroilla, kuten suositeltavassa suoritustavassa käytetyllä jäähdytetyllä Optronics CCD -värikameralla, voidaan tallentaa muistiin. Tämä CCD-kamera havainnoi APEX-laitetta mikroskoopin kautta, jossa on sopivat suodattimet niin, että APEX-ryhmän fluoresenssi tehdään silmin nähtäväksi.

Vaihtoehtoiset systeemit voivat toteuttaa kaikki kuvatut sääteliján toiminnat, mutta niissä voidaan käyttää tilaustyönä tehtyjä laitteita, jotka on inkorporoitu painettuihin virtapiirilevyihin ja tilaustyönä tehtyjä ohjelmia tarkkailupöydän kontrolloimiseksi samanlaisella käyttäjäystävällisellä yhteydellä laitteen ohjelmoimiseksi. Nämä vaihtoehtoiset systeemit voivat myös sisältää elementit relesarjan kytkemiseksi puolijohdelaitteeseen, joka on aktiivisen ohjelmoitavan matriisisysteemin alla. Kuvio 8 esittää läpileikkauskuvan vaihtoehtoisesta suoritustavasta aktiiviselle ohjelmoitavalle matriisisysteemille. Erilliset kohdennettavat elektrodit 102 muodostetaan kantajakerroksen 104 päälle. Kantajakerros 104 on suositeltavasti eristäjä. Elektrodien 102 yläpuolelle on suositeltavasti sijoitettu läpäisykerros 106 ja yksittäiset kiinnityskerrokset 108, jotka vastaavat yksittäisiä elektrodeja 102. Elektriset liitokset 110 muodostetaan elektrodien 102 takapuolelta kantajan 104 läpi. Lisäksi puolijohdekantaja 112 sisältää virtapiirielemetit 114, jotka on liitetty konduktoriin 110. Virtapiirielementit 114 voidaan muodostaa puolijohteen 112 päälle tai sisälle. Virtapiirielementit 114 voivat muodostaa jännitteen ja/tai virran erillisen kontrollin, joka muodostetaan konduktorin 110 kautta elektrodiin 102. Erityisesti virtapiirielementit 114 voivat sisältää relesarjan kytkentäelementit, jotka on kuvattu suositeltavassa suoritustavassa. Useat virta/jännitelähdejohdot 116 kuhunkin virtapiirielementtiin 114 muodostavat mahdollisuuden erilaisten tasojen lähettämiseksi eri

elektrodeihin 102. Muistityyppiset kohdennusjohdot 118 muodostavat mukavat aktivaatioreitit yksittäisille virtapiirielementeille 114.

Aaltoputkia voidaan käyttää johtamaan viritysvalo mikro-osastoihin ja johtamaan fluoresenssisignaalit tunnistimiin. Aaltoputket voivat olla vapaana, kuten optisissa kuiduissa, tai ne voidaan integroida yhtenäiseen puolijohdelaitteeseen. Aaltoputket voidaan tuottaa sellaisista materiaaleista, kuten sinkkioksidista tai indiumtinaoksidista, jotka ovat myös sähkönjohtavia. Sitten aaltoputki voi toimia sekä elektrodina että keinona kuljettaa optista säteilyä. Aaltoputket voivat sijaita nappaavan koettimen tasossa tai sen ympärillä niin, että minimoidaan epäspesifinen taustafluoresenssi. Aaltoputket voivat sisältää holografisia optisia elementtejä. Näiden holografisten optisten elementtien toiminta sisältää, mutta ei ole rajoittunut, uurrossuodattimet, dikroidit peilit, kaistanpäästösuodattimet, säteenjakajat, neutraalitiheyssuodattimet, puoliaaltolevyt, neljännesaaltolevyt, polarisoijat ja linssit.

Kuvio 9 esittää kerroksellisen rakenteen läpileikkauksen, joka on vaihtoehto aktiiviselle ohjelmoitavalle matriisisysteemille. Ensimmäisessä kerroksessa yksittäiset elektrodit 120 muodostetaan kantajan 122 päälle. Kantaja 122 on suositeltavasti eristävä. Elektrodien 120 yläpuolelle muodostetaan suositeltavasti läpäisykerros 124 ja yksittäiset kiinnityskerrokset 126, jotka vastaavat yksittäisiä elektrodeja 120. Optiset reitit 128 muodostetaan kantajan 122 läpi niin, että niillä on pääsy elektrodiin 120. Optinen reitti 128 sisältää suositeltavasti kuituoptiikan tai valoa johtavan putken tai rakenteen. Vaihtoehtoisesti elektroninen liitos 130 kulkee kantajan 122 läpi niin, että sillä on pääsy elektrodeihin 120 takakautta. Termiä takakautta käytetään tässä ilmaisemaan sitä elektrodin 120 sivua, joka koskettaa kantajaan 122. Toisessa

kerroksessa puolijohdekantaja 132 sisältää virtapiirielementit 133, jotka on liitetty konduktoriin 131. Konduktori 131 suunnitellaan niin, että sen yläpinta yhdistyy ja muodostaa hyvän elektrisen kosketuksen konduktorin 130 pohjan kanssa ensimmäisen kerroksen takapuolella. Virtapiirielementit 133 voidaan muodostaa puolijohteen 132 päälle tai sen sisälle. Virtapiirielementit 133 voivat muodostaa jännitteen ja/tai virran erillisen kontrollin, joka muodostetaan yhdistyneiden konduktorien 131 ja 130 kautta elektrodiin 120. Erityisesti virtapiirielementit 133 voivat sisältää relesarjan kytkentäelementit, jotka on kuvattu suositeltavassa suoritustavassa. Nämä virtapiirielementit voidaan muodostaa useilla virta/jännitelähdejohdoilla ja ne voidaan aktivoida muistityyppisillä kohdennusjohdoilla. Vaihtoehtoisesti tunnistuselementit 134, kuten valodiodit, voidaan sisällyttää puolijohdekerrokseen 132 ja koplata optisten reittien 135 kautta ensimmäisen kerroksen optisten reittien 128 kanssa niin, että tunnistuselementit havainnoivat DNA-hybridisaation ensimmäisen kerroksen kiinnityskohdilla 126. Nämä optiset reitit voidaan toteuttaa kuituoptisina reitteinä tai aaltoputkina ja ne voivat sisältää erilaisia yllä kuvattuja optisia elementtejä. Vaihtoehtoisesti näytesisältöastia 136 voidaan sijoittaa rakenteen ympärille niin, että se sisältää analysoitavan tai testattavan biologisen materiaalin. Vaihtoehtoisesti voidaan muodostaa nesteen sisääntuloaukot 137 tai optiset tarkasteluaukot 138. Biologisen materiaalin sisältörakennetta 136 ja vaihtoehtoisia aukkoja 137 ja 138 voidaan käyttää yhdessä minkä tahansa tässä kuvatun aktiivisen ohjelmoitavan matriisisysteemin kanssa.

Kuvio 10 esittää kiinnityssysteemin läpileikkauskuvan aktiiviselle ohjelmoitavalle matriisisysteemille. Systeemi 140 voidaan muodostaa sirulle käyttäen sellaista rakennetta, joka on esitetty kuvioissa 3 ja 4. Siru 140 liitetään liitosjohtojen 146 välityksellä kontaktialusto-

jen (kuvio 3) ja sirukantajan 144 kontaktialustojen 142 väliin. Sirukantaja 144 sisältää suositeltavasti yksittäiset tapit 147, jotka muodostavat elektrisen liitoksen alustojen 142 välityksellä liitosjohtoon 146 sirulla 140. Tapit 147 yhdistyvät rasian 148 kanssa, joka vuorostaan on liitetty kontrollisysteemiin.

Mikro-osastojen aktiiviset ohjelmoitavat matriisit voidaan myös muodostaa kapillaariputkista. Kuvio 17 esittää systeemin ja tuotteet, jotka on muodostettu sellaisesta. Kapillaariputkimatriisit muodostetaan pinoamalla kapillaariputkia ryhmän 220 keinotekoiseen geometriaan tai sulattamalla kuumentimella 222 ja vetämällä esimerkiksi suuttimen 224 läpi nämä ryhmät 220 yhteen liittyneiksi ja integraaliseksi yksiköksi 226. Vaihtoehtoisesti kiinteitä sauvoja, jotka koostuvat kahdesta erilaisesta materiaalista järjestettynä toisiinsa konsentrisesti, voidaan käyttää kapillaariputkien sijasta. Kuvio 18 esittää sellaisen rakenteen perspektiivikuvana. Tässä materiaali, joka koostuu sisemmästä ytimestä 230, syövytetään ulommasta materiaalista 234 niin, että se selektiivisesti muodostaa aukon 232, joka menee osittain tai kokonaan laitteen läpi. Vaihtoehtoisesti sisempi ydin voidaan syövyttää niin, että se muodostaa säädellysti huokoisen lasin.

Yksittäiset kapillaariputket voidaan kohdentaa johdoilla, jotka on sijoitettu kapillaariputkeen, tai kiinnittämällä kapillaariputkimatriisi litografisesti muodostettujen elektrodien komplementaariseen matriisiin. Vaihtoehtoisesti kiinteiden sauvojen siemmät ytimet voidaan muodostaa sähköä johtavasta materiaalista. Elektrinen kontakti voidaan tehdä sisemmän ydinmateriaalin kanssa kiinnittämällä kiinteä sauvamatriisi elektrodien komplementaariseen matriisiin tai muodostamalla elektrodit kiinteälle sauvamatriisille litografisesti.

Kapillaariputket ja syövytetyt kiinteät sauvat täytetään sopivalla materiaalilla niin, että muodostetaan

läpäisykerros. Läpäisykerroksen pinta voidaan funktionalisoida spesifisellä kiinnityskemialla.

Vaihtoehtoinen menetelmä elektroforeettiselle kuljetukselle on käyttää konvektiivista massakuljetusta materiaalin kuljettamiseksi mikro-osastoihin. Yksi laite, joka voi suorittaa tämän, on pyörivä levy. Tässä konvektio saadaan aikaan hydrodynaamisilla leikkausvoimilla, jotka ovat läsnä pyörivän levyn ja liuoksen rajapinnassa. Neste virtaa suoraan pinnalle kokonaisliuoksesta. Elektrodialustamatriisi voidaan kiinnittää pyörivään levyyn tai kukin elektrodi matriisissa voidaan kiinnittää erilliseen levyyn. Jälkimmäisessä tapauksessa kukin elektrodi voidaan kohdentaa selektiivisesti konvektiivisella massakuljetuksella. Kun alustoihin on kohdennettu konvektiivinen massakuljetus, elektrodia voidaan käyttää poistamaan ei-toivottava materiaali käyttäen elektroforeettista kuljetusta.

Suositeltava prosessi aktiivisen ohjelmoitavan matriisisysteemin muodostamiseksi on kuvattu kuvioissa 11A - G. Puolijohteen 150, suositeltavasti p-tyypin testilaadun silikonia, päälle on muodostettu paksu (10 000 Å) oksidikerros 152. Kuvio 11B esittää metallikerroksen 154, joka on muodostettu oksidikerroksen 152 päälle. Metalli valitaan suositeltavasti ryhmästä, joka sisältää alumiinin, kullan, platinan, palladiumin, titaanin, titaani/tungsteenin. Puolijohtavaa polysilikonia voidaan myös käyttää metallin tilalla. Kuvio 11C esittää kuvioidun alumiinin 156, joka on muodostettu oksidikerroksen 152 päälle. Metalli voidaan kuvioida millä tahansa tavanomaisella litografisella menetelmällä, kuten fotolitografialla.

Kuvio 11D esittää kuvion 11C rakenteen niin, että siinä on lasipäällys, kuten TEOS-päällys. TEOS muodostetaan suositeltavasti PECVD-menetelmällä. Lasi muodostetaan suositeltavasti suhteellisen korkeassa lämpötilassa, kuten 475 °C:ssa, sen kiinnittymisen tehostamiseksi metallikerrokseen 156. Sitten TEOS-kerros 158 päällystetään nitridi-

kerroksella 160. Nitridikerros 160 ja TEOS-kerros 158 syövytetään suositeltavasti alueelta, joka on kuvioidun elektrodialueen 156 päällä. Tämä muodostaa ikkunan 162, joka sallii suoran kontaktin kuvioituun elektrodiin 156.

Kuvio 11G esittää tulokset, kun koko rakenne altistettiin aminopropyylisileenille (APS). APS164 kiinnittyy kuvioituun metallikerrokseen 156 eikä nitridikerrokseen 160. APS-kerros toimii kiinnityskerroksena DNA-nappauskoettimille.

Kuvio 12 esittää vaihtoehtoisen rakenteen, jossa käytetään polysilikonia normaalien metallikontaktien sijasta. Rakenne on samanlainen kuin kuvion 11F rakenne, mutta sisältää polysilikonikerroksen 166 alumiinikerroksen 156 tilalla. Suositeltavien vaiheiden järjestys on seuraava. Ensiksi puolijohde, suositeltavasti p-tyypin testilaadun silikonia, hapetetaan paksulla (10 000 Å) oksidilla. Muodostetaan sähkönjohtava polysilikonikerros, suositeltavasti 5 000 Å paksu seostettu polysilikonikerros. Sitten polysilikoni kuvioidaan suositeltavasti fotolitografialla käyttäen märkää etsiä. Seuraavaksi muodostetaan lasikerros, kuten PECVD-kerrostettu TEOS. Noin 3 000 Å:n paksuinen kerros, joka on muodostettu 475 °C:ssa, on suositeltava tehostunutta kiinnittymistä varten. Sitten lasikerros kuvioidaan jälleen suositeltavasti fotolitografisilla menetelmillä käyttäen märkää etsiä. Sitten muodostetaan pinnan yli metallikerros suositeltavasti pommittaen alumiinia paksuudeksi, joka on 3 000 Å. Sitten metalli kuvioidaan jälleen suositeltavasti fotolitografisesti märällä etsillä. Seuraavaksi muodostetaan nitridikerros, suositeltavasti PECVD-kerrostuksen avulla 70 °C:ssa, 3 000 Å:n paksuiseksi. Seuraavaksi muodostetaan reitti fotolitografisesti käyttäen märkää etsiä niin, että se koskettaa elektrodia.

Kuvio 13 esittää rakenteen, jossa metallijohteella on tehostunut kiinnittyminen alla oleviin eristäjäkerroksiin, käyttämällä keskitasoisesti kiinnittyvää metallia,

kuten titaanitungsteenia. Puolijohteen 170, suositeltavasti silikonia, päälle on sijoitettu oksidikerros 172. Keskitason elektrodikerros 176, joka muodostuu sähkönjohtavasta metallista, kuten kullasta tai alumiinista, on kerrostettu titaanitungsteenien 174 ja 178 väliin. Kiinnittyvä metallikerros 178 koskettaa ulkoista elektrodia 184, joka on muodostettu suositeltavasti platinasta. Lasikerros 180, joka on muodostettu esimerkiksi TEOS-materiaalista, on ulkoisen nitridipäällysteen 182 alla.

Kuvio 14 esittää parannetun elektrodijärjestyksen läpileikkauskuvan. Elektrodi 190 on sijoitettu eristäjän 192, joka on suositeltavasti oksidia, viereen. Nitridikerros 194 on eristäjäkerroksen 192 päällä. Nitridikerroksen 194 alta on suositeltavasti poistettu materiaalia niin, että eristäjäkerros 192 siirtyy taaksepäin nitridikerroksen reunasta 198. Näin määrittyy säiliö 196, jolla on suurempi tilavuus kuin samanlaisella rakenteella, jossa ei ole alta poistetun materiaalin aluetta.

Kuviossa 14 kuvattua rakennetta käytetään pitämään mekaanisesti paikoillaan materiaalilevy, joka muodostaa läpäisykerroksen. Yllä oleva kerros ottaa kiinni läpäisykerrokseen. Tämä suunnitelma voidaan yleistää keinotekoiseksi määräksi yllä olevia kerroksia niin, että muodostetaan järjestys, jolla on esimerkiksi kaventuvien konsentristen kehien mehiläiskennomuoto tai jossa konsentristen levyjen aukkojen säteet vaihtelevat.

Läpäisykerros (esim. kuvion 2 kerros 14) voidaan muodostaa sellaisista materiaaleista, mutta ei rajoittuen niihin, kuten hiiliketjupolymeereistä, hiili-silikoniketjupolymeereistä, hiili-fosforiketjupolymeereistä, hiilityppiketjupolymeereistä, silikoniketjupolymeereistä, polymeerimetalliseoksista, kerrospolymeerikomposiiteista, toistensa läpi tunkeutuvista polymeerimateriaaleista, keraamisista aineista, säädellyn huokoisuuden sisältävästä lasista, sooligeeleinä muodostetuista materiaaleista, ae-

rogeeleinä muodostetuista materiaaleista, hydrogeeleinä muodostetuista materiaaleista, huokoisesta grafiitista, savista tai zeoliiteista.

Läpäisykerrokset erottavat sitoutuvat kokonaisuudet elektrodin pinnasta. Mikro-osastot on muodostettu käyttäen mikrolitografisia ja mikrotuotantomenetelmiä. Mikro-osastojen pinnan ja mikro-osastojen pinnalla olevien polymeerikerrosten kemiallista modifikaatiota on käytetty muodostamaan spesialisoituneet kiinnityskohdat pinnan toiminnallisia ryhmiä varten.

Seulatyyppiset läpäisykerrokset sisältävät polymeerimolekyylien umpimähkäisen järjestyksen, joka muodostaa seulan kaltaiset rakenteet, joiden keskimääräinen huokoskoko määräytyy ristisitoutumisten määrällä. Olemme osoittaneet seulankaltaisten läpäisykerrosten muodostumisen käyttäen useita polymerisoituvia formulaatioita, jotka sisältävät akryyliamidia monomeerina. Olemme käyttäneet ristisitovina aineina trietyleeniglykolidiakrylaattia, tetraetyleeniglykolidiakrylaattia ja N,N'-metyleenibisakryyliamidia. Poly-l-lysiiniä, joiden molekyylipainot olivat 330 kilodaltonia ja 25 kilodaltonia, sekoitettiin akryyliamidi/kopolymeeriformulaatioon niin, että saatiin aikaan keino spesialisoituneen toiminnallisen ryhmän kiinnittämiseksi läpäisykerroksen pintaan. Seos valettiin mikro-osaston pinnalle. Sitten se fotopolymerisoitiin ultraviolettivalolla. Joissain tapauksissa AuCl4-molekyyliä lisättiin fotopolymerisaation aloittajaksi. Polymeeriformulaatiot valettiin vedestä ja vedettömistä liuottimista metanolista, tetrahydrofuraanista, asetonitriilistä, asetonista ja näiden liuottimien seoksista.

Nappaava DNA-koetin kiinnitettiin läpäisykerroksen pintaan Schiff-emäsreaktiolla, joka tapahtui nappaavaan DNA-koettimeen kiinnittyneen hapettuneen ribonukleosidin ja poly-l-lysiinin primaarisen amiinin välillä. Tämä to-

disti spesifisen toiminnallisen ryhmän kovalenttisen kiinnittymisen läpäisykerroksen pintaan.

Hapettunut nappaava DNA-koetin tuotiin mikro-osaston pinnalle elektroforeettisella kuljetuksella. Nappaava koetin oli leimattu fluoresoivalla markkerilla. Tämä osoittaa kyvyn kohdentaa mikro-osastoon elektroforeettisella kuljetuksella.

Hapettunut nappaava koetin, jossa on fluoresoiva markkeri kiinnittyneenä, vietiin mikro-osaston läpäisykerroksen pintaan elektroforeettisella kuljetuksella. Läpäisykerros poistettiin mikro-osastosta mekaanisesti. Mitään todistetta fluoresoivasti leimatun nappaavan koettimen läsnäolosta ei havaittu. Tämä osoittaa läpäisykerroksen kyvyn suojata elektrodin pintaa DNA:lta.

Maksimaalinen DC-virtatiheys, joka saatiin aikaan kullalla päällystetyssä mikro-osastossa, jota ei oltu modifioitu läpäisykerroksell,a ennen veden hydrolyysistä johtuvia kuplia, oli 8 milliampeeria/cm^2. Maksimaalinen DC-virtatiheys, joka saatiin aikaan kullalla päällystetyssä mikro-osastossa, joka oli modifioitu akryyliamidiin perustuvalla läpäisykerroksella, ennen veden hydrolyysistä johtuvia kuplia, oli 40 milliampeeria/cm^2. Tämä osoittaa läpäisykerroksen kyvyn nostaa maksimaalista saatavissa olevaa virtatiheyttä ennen veden hydrolyysistä johtuvaa kuplintaa.

Ionomeerinen kerroksellinen läpäisykerros muodostetaan yhdestä tai useammasta polyelektrolyyttien kalvosta. Polyelektrolyyttikerroksilla voi olla sama varaus, eri varaus tai ne voivat olla varaukseltaan mosaiikkirakenteisia.

Kaksikerroksinen ionomeerinen kerros muodostettiin peruskerroksesta, joka oli perfluorinoitu sulfonihappopolyelektrolyytti (Nafion), ja ylemmästä kerroksesta, joka oli poly-l-lysiini. Nafion-peruskerros valettiin mikro-osastoon ja sen annettiin kuivua. Sitten tämä peruskerros

altistettiin vesipohjaiselle poly-l-lysiiniliuokselle, jonka konsentraatio oli painon mukaan 1 %. Kationinen lysiiniin perustuva polymeeri adsorboi vahvasti anioniseen Nafion-peruskerrokseen. Poly-l-lysiinikerros salli hapetetun nappaavan DNA-koettimen kiinnittymisen läpäisykerroksen pintaan Schiff-emäsreaktiolla. Nafion-peruskerros on anioninen ja selektiivisesti läpäisevä negatiivisille ioneille, kuten DNA:lle. Kuvio 15 esittää esimerkit graafisesta käyttäjäyhteydestä. Ikkuna 200 esittää näytön kokonaiskuvan. On annettu tunnistusinformaatio 202. Aktiivisen ohjelmoitavan matriisisysteemin eri alustat tunnistetaan suorakulmaisessa koordinaattisysteemissä. Näytöt 204 esittävät kukin elektrisen parametrin, kuten tiettyjen alustojen virran ja jännitteen. Laatikko 204A esittää alustan (3, 4) virran ajan funktiona, jossa virta vaihtelee ajan funktiona muuttaen suuntaansa sovelluksen aikana. Laatikko 204B esittää alustan (3, 5), johon ei ole annettu virtaa näytettynä aikana. Laatikko 204C esittää ajan suhteen vaihtelevan virran (4, 4), jossa virta on viivästynyt mitä tulee aikaan laatikossa 204A (3, 4) osoitetun alustan suhteen. Laatikko 204D esittää alustan (4, 5), johon ei ole annettu virtaa ajan funktiona. Laatikko 204E esittää alustan (1, 1), jossa jännitteellä on vakio negatiivinen DC-arvo. Laatikko 204F esittää jännitteen ajan funktiona alustalle (3, 4), jolla on enemmän negatiivinen DC-arvo. Kaikissa tapauksissa laatikot esittävät ohjelmoidun virran tai jännitteen pisteviivana ja mitatun virran tai jännitteen yhtenäisenä viivana.

Keksinnön yllä kuvatun suositeltavan suoritustavan ja sen vaihtoehtojen lisäksi useat muut vaihtoehdot ovat mahdollisia. Esimerkiksi sähkökenttää, joka nostaa ioniliikkuvuutta, voidaan moduloida ajan suhteen niin kauan kuin DC-esimagnetointijännite tai virta annetaan yhtäaikaa. AC-signaalin käyttö lisättynä DC-esimagnetointijännitteelle tai virralle voi saada aikaan kolme asiaa, 1)

minimoida taustan, joka johtuu epäspesifisesti sitoutuneesta DNA:sta, 2) esittää keinon elektroniselle olosuhteen vahvuuden säätelylle, jossa kontrollin muuttuja on vaihtelevan virran tai jännitteen frekvenssi, 3) esittää keinon DNA-molekyylien alekkain vertaamiseksi avaruudellisesti.

On olemassa monia vaihtoehtoja hybridisoituneen DNA:n tunnistamiseksi fluoresenssilla. Useimmat vaihtoehtoisista menetelmistä sisältävät myös nappaavan tai kohde- tai reportteri-DNA-koettimien modifioimisen sellaisilla reportteriryhmillä, jotka tuottavat tunnistettavan signaalin. Muutamat näistä menetelmistä, jotka perustuvat puhtaasti fysikaalisiin mittauksiin, eivät vaadi reportteriryhmiä. Nämä vaihtoehtoiset menetelmät ovat seuraavia: 1) Lineaariset optiset menetelmät sisältäen fluoresenssin, aikamoduloidun fluoresenssin, fluoresenssin tukahdutuksen modulaation, polarisaatioselektiivisen fluoresenssin, absorption, peilireflektanssin, muutokset refraktioindeksissä, ellipsometrian, pintaplasmoniresonanssitunnistuksen, kemiluminesenssin, täpläinterferometrian ja magneto-optisen Kerr-ilmiön; 2) epälineaariset optiset menetelmät sisältäen toisen yliaaltomuodostuksen, kolmannen yliaaltomuodostuksen, parametrisen sekoituksen, optisen apuvärähtelijätunnistuksen, faasikonjugaation, Soliton-vaimennuksen ja optisen Kerr-ilmiön; 3) menetelmät, jotka perustuvat lämpövaikutuksiin sisältäen differentiaaliskandeerauskalorimetrian, monifrekvenssisen differentiaaliskandeerauskalorimetrian ja differentiaalilämpöanalyysin; 4) menetelmät, jotka perustuvat massamuutoksiin sisältäen kidemikrobalanssit, konsolimikrobalanssit, pinta-akustiset aallot ja pinnan Love-aallot; 5) elektrokemialliset menetelmät sisältäen amperometrian, coulometrian, voltametrian, elektrokemiluminesenssin, varauksen siirron luovuttaja-vastaanottajakomplekseissa ja pintaimpedanssispektro-

skopian; ja 6) radioaktiiviset tunnistusmenetelmät käyttäen leimattuja ryhmiä.

Vaikka edellä oleva keksintö on kuvattu jossain määrin yksityiskohtaisesti kuvioiden ja esimerkkien avulla selvyyden ja ymmärtämisen vuoksi, alan asiantuntijoille on heti ilmeistä tämän keksinnön opetuksien valossa, että siihen voidaan tehdä tiettyjä muutoksia ja modifikaatioita, ilman että poistutaan lisättyjen patenttivaatimusten hengestä ja piiristä.

Patenttivaatimukset

1. Elektroninen laite, joka on adaptoitu suorittamaan molekyylibiologisia prosesseja, t u n n e t t u siitä, että se sisältää:

kantajan, jossa on ensimmäinen yleensä tasopinta,

useita mikro-osastoja, jotka sisältävät elektrodin sijoitettuna kantajan ensimmäiselle pinnalle ja läpäisykerroksen sijoitettuna elektrodin yläpuolelle,

erilliset elektriset liitokset elektrodeihin, ja

optisen pääsyn elektrodeihin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen elektroninen laite, t u n n e t t u siitä, että erilliset elektriset liitokset elektrodeihin sisältävät johdot, jotka on sijoitettu kantajan ensimmäiselle pinnalle.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen elektroninen laite, t u n n e t t u siitä, että erilliset elektriset liitokset elektrodeihin ovat elektrisiä reittejä, jotka ulottuvat elektrodien kosketuskohdasta kantajaan.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen elektroninen laite, t u n n e t t u siitä, että kantaja sisältää eristäjän.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen elektroninen laite, t u n n e t t u siitä, että eristäjä on oksidi.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen elektroninen laite, t u n n e t t u siitä, että kantaja sisältää puolijohdemateriaalia.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen elektroninen laite, t u n n e t t u siitä, että kantaja sisältää puolijohteen lisäksi sille sijoitetun oksidikerroksen.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen elektroninen laite, t u n n e t t u siitä, että säätelylelektroniikat on sisällytetty puolijohdemateriaaliin ja liitetty erillisten elektristen liitosten välityksellä elektrodeihin.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen elektroninen laite, t u n n e t t u siitä, että optinen pääsy muodostetaan kantajan läpi niin, että muodostetaan pääsy elektrodien kosketusosaan.

10. Patenttivaatimuksen 1 tai 9 mukainen elektroninen laite, t u n n e t t u siitä, että optinen pääsy sisältää kuituoptiikan.

11. Patenttivaatimuksen 1 tai 9 mukainen elektroninen laite, t u n n e t t u siitä, että optinen pääsy sisältää valoputken.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen elektroninen laite, t u n n e t t u siitä, että pääsy sisältää aukon.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen elektroninen laite, t u n n e t t u siitä, että se sisältää lisäksi kiinnityskerroksen, joka on sijoitettu elektrodien yläpuolelle.

14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen elektroninen laite, t u n n e t t u siitä, että se sisältää lisäksi kiinnityskerroksen, joka on sijoitettu läpäisykerroksen yläpuolelle.

15. Patenttivaatimuksen 1 mukainen elektroninen laite, t u n n e t t u siitä, että se sisältää lisäksi sisältöastian, joka on sijoitettu kantajan yläpuolelle.

16. Patenttivaatimuksen 1 mukainen elektroninen laite, joka lisäksi sisältää säätelysysteemin aktiivisen ohjelmoitavan elektronisen mikrobiologiasysteemin käyttämiseksi, jossa on useita elektrodeja, t u n n e t t u siitä, että se sisältää:

säätelijän, joka on adaptoitu vastaanottamaan käyttäjän sisääntulo ja muodostamaan ulostulon, joka sisältää säätelysignaalit toisistaan riippumattomien elektronisten ympäristöjen muodostamiseksi elektrodeihin,

sisääntulosysteemin, joka vastaanottaa käyttäjän ohjeet, joka on liitetty säätelijän sisääntuloon,

generaattorin, joka muodostaa halutun elektronisen ympäristön elektrodiin niin, että generaattori toimii säätelijän ulostulon säätelyn alaisuudessa, ja

jakopinnan, joka on adaptoitu liittämään säätelysysteemi aktiiviseen ohjelmoitavaan elektroniseen systeemiin.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen säätelysysteemi, t u n n e t t u siitä, että generaattori sisältää voimanlähteen.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen säätelysysteemi, t u n n e t t u siitä, että voimanlähde on säädelty voimanlähde.

19. Patenttivaatimuksen 16 mukainen säätelysysteemi, t u n n e t t u siitä, että voimanlähde sisältää aaltogeneraattorin.

20. Patenttivaatimuksen 16 mukainen säätelysysteemi, t u n n e t t u siitä, että jakopinta sisältää relesysteemin.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen säätelysysteemi, t u n n e t t u siitä, että jakopintasysteemi sisältää releet, jotka muodostavat selektiivisen liitoksen generaattorista elektrodeihin.

22. Patenttivaatimuksen 20 mukainen säätelysysteemi, t u n n e t t u siitä, että jakopinta sisältää releet, jotka on adaptoitu muuttamaan generaattorin ulostulon polariteettia.

23. Patenttivaatimuksen 20 mukainen säätelysysteemi, t u n n e t t u siitä, että jakopinta sisältää releet, jotka muodostavat selektiivisen liitoksen signaalin joko ensimmäiselle tai toiselle tasolle.

24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen säätelysysteemi, t u n n e t t u siitä, että signaali on esimääritetty jännitetaso.

25. Patenttivaatimuksen 23 mukainen säätelysysteemi, t u n n e t t u siitä, että signaali sisältää virran esimääritetyllä tasolla.

26. Patenttivaatimuksen 16 mukainen säätelysysteemi, t u n n e t t u siitä, että säätelijä sisältää tietokoneen.

27. Patenttivaatimuksen 16 mukainen säätelysysteemi, t u n n e t t u siitä, että säätelijä perustuu mikroprosessoriin.

28. Patenttivaatimuksen 16 mukainen säätelysysteemi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää lisäksi ulostulosysteemin, joka antaa informaatiota käyttäjälle.

29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen säätelysysteemi, t u n n e t t u siitä, että ulostulosysteemi sisältää näyttöpäätteen.

30. Elektroninen systeemi, joka sisältää komponenttilaitteiden integroidun järjestyksen biologisen näytteen prosessoinnin ja molekyylibiologisten analyysien suorittamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää:

kantajan integroiduille komponenttilaitteille, joka on adaptoitu vastaanottamaan näytteen, joka sisältää analysoitavaa materiaalia,

aktiivisen näytevalmistuskomponenttilaitteen, johon analysoitava näytemateriaali voidaan laittaa aktiivisen näytevalmistuskomponenttilaitteen sisältäessä keinot kuljettaa elektroforeettisesti mainittu materiaali näytevalmistuskomponenttilaitteeseen, jossa materiaali prosessoidaan suhteellisesti puhdistettujen analyyttien muodostamiseksi, ja tuloksena syntyneet analyytit kuljetetaan seuraavaan integroituun komponenttilaitteeseen, ja

aktiivisen ohjelmoitavan elektronisen analyyttisen komponenttilaitteen, joka sisältää useita erikseen kohdennettavia mikro-osastoja.

31. Patenttivaatimuksen 30 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että aktiivinen ohjelmoitava matriisi sisältää suuren elektrodijoukon.

32. Patenttivaatimuksen 30 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että aktiiviset ohjelmoitavat

elektrodit sisältävät lisäksi kiinnityskerroksen, joka on sijoitettu elektrodien yläpuolelle.

33. Patenttivaatimuksen 32 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että kiinnityskerros sisältää nappaavat sekvenssit.

34. Patenttivaatimuksen 30 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää lisäksi tunnistimen, joka on toiminnallisesti sijoitettu tarkkailemaan aktiivista ohjelmoitavaa laitetta.

35. Patenttivaatimuksen 34 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että tunnistin sisältää kuvantamissysteemin.

36. Patenttivaatimuksen 35 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että kuvantamissysteemi sisältää CCD-kameran.

37. Patenttivaatimuksen 34 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää lisäksi analyysisysteemin, joka on adaptoitu vastaanottamaan tunnistinsysteemin ulostulon.

38. Patenttivaatimuksen 30 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että näytevalmistusyksikkö sisältää solulajittelijan.

39. Patenttivaatimuksen 30 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että näytevalmistusyksikkö sisältää DNA-selektorin.

40. Patenttivaatimuksen 30 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että näytevalmistusyksikkö sisältää restriktiofragmenttiselektorin.

41. Patenttivaatimuksen 30 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että näytevalmistusyksikkö sisältää amplifikaatiosysteemin.

42. Patenttivaatimuksen 31 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että amplifikaatioyksikkö käyttää polymeraasiketjureaktiota.

43. Patenttivaatimuksen 30 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää lisäksi reagenssikuljetussysteemin.

44. Patenttivaatimuksen 43 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että reagenssikuljetussysteemi on elektroninen reagenssikuljetussysteemi.

45. Patenttivaatimuksen 43 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että reagenssikuljetussysteemi on fluidiikkireagenssikuljetussysteemi.

46. Patenttivaatimuksen 30 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää lisäksi jätteenhävityssysteemin.

47. Patenttivaatimuksen 46 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että jätteenhävityssysteemi on elektroninen jätteenhävityssysteemi.

48. Patenttivaatimuksen 46 mukainen systeemi, t u n n e t t u siitä, että jätteenhävityssysteemi on fluidiikkijätteenhävityssysteemi.

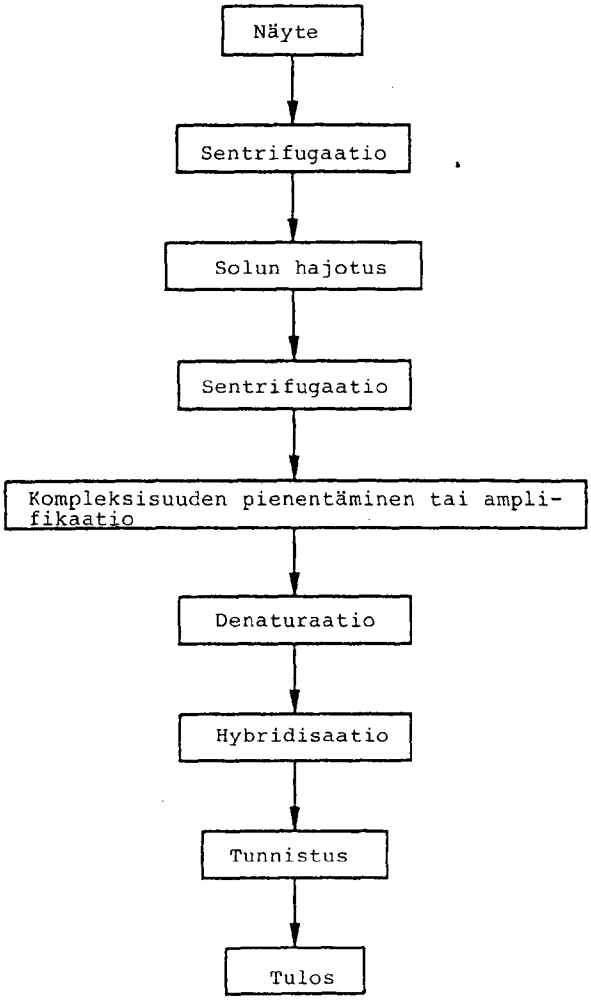

Näyte
Sentrifugaatio
Solun hajotus
Sentrifugaatio
Kompleksisuuden pienentäminen tai amplifikaatio
Denaturaatio
Hybridisaatio
Tunnistus
Tulos

FIG. 1

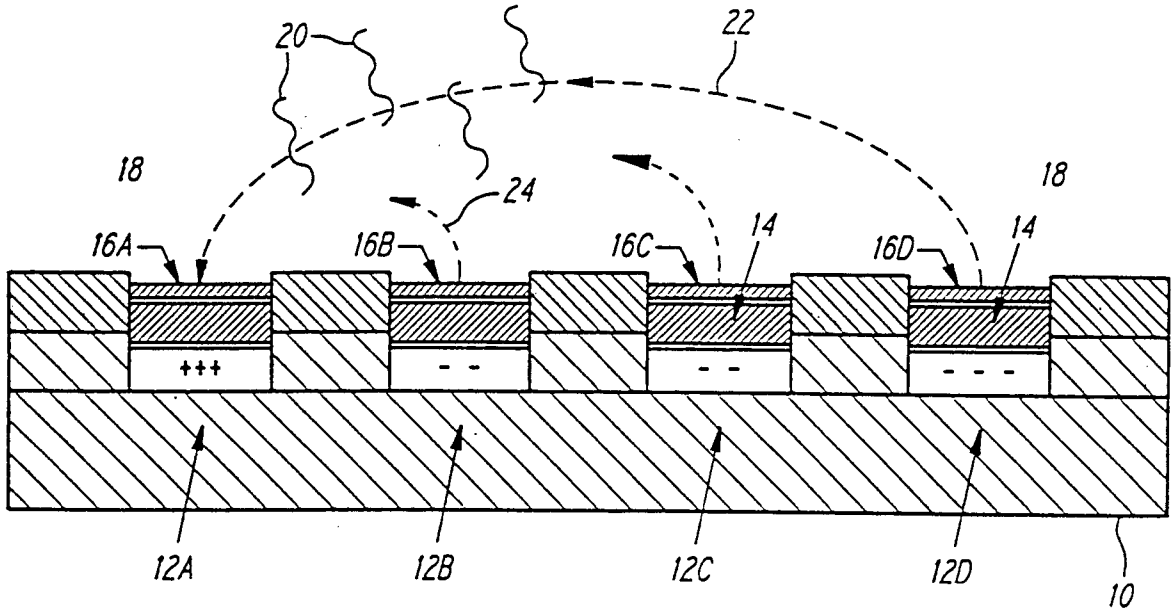

20
22
18
18
24
16A
16B
16C
16D
14
14
+++
- -
- -
- - -
12A
12B
12C
12D
10

FIG. 2A

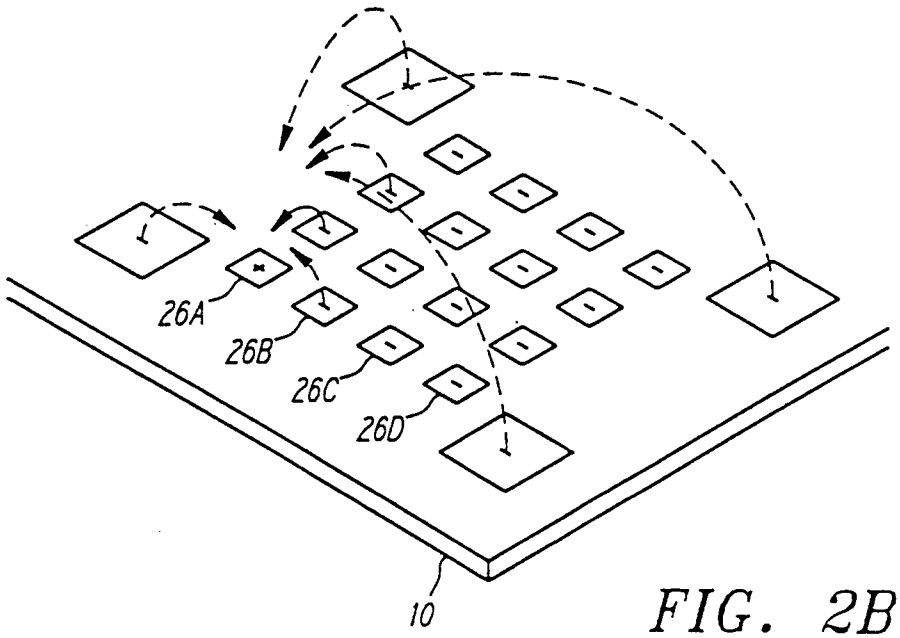

26A
26B
26C
26D
10

FIG. 2B

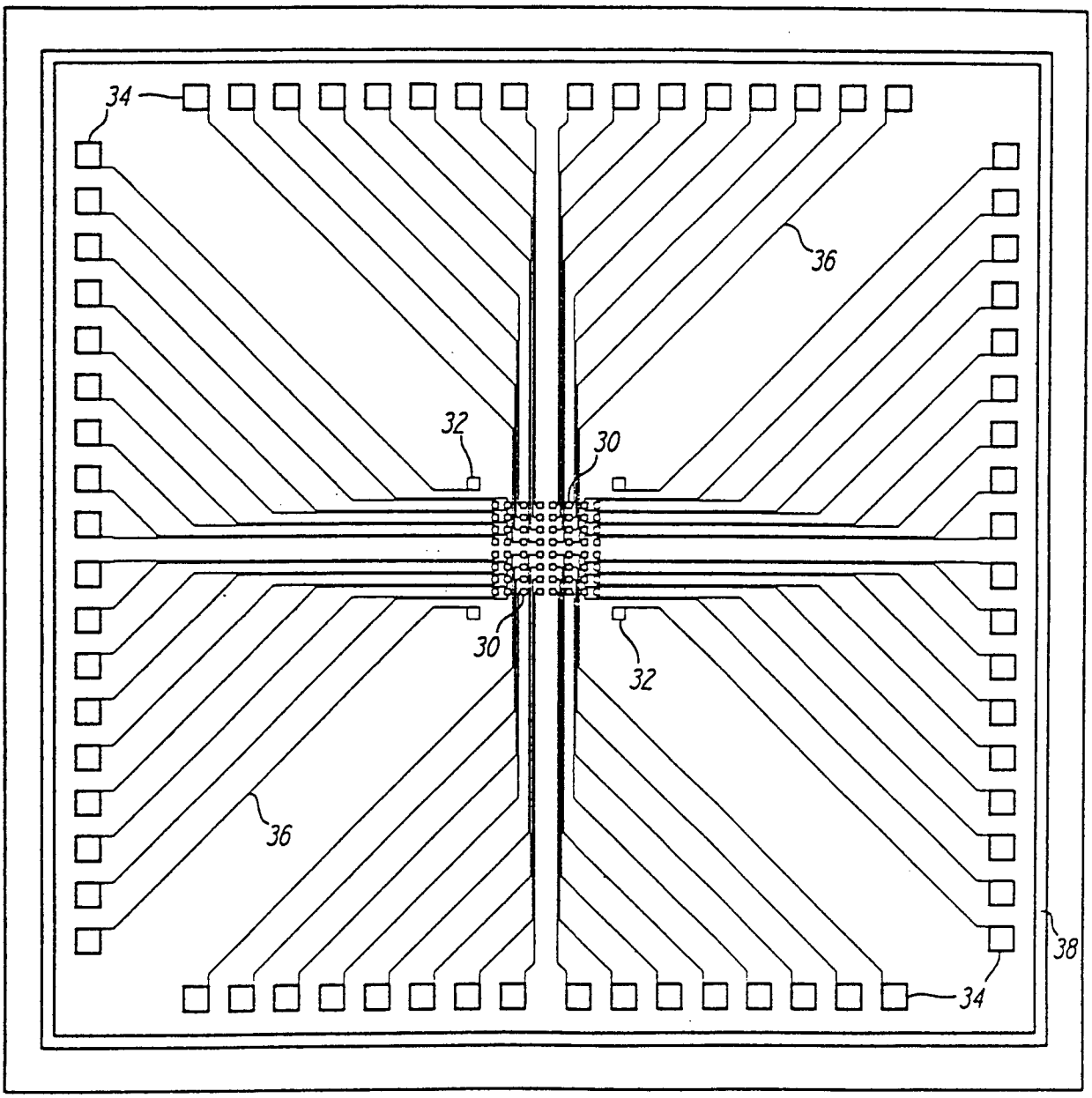


FIG. 3

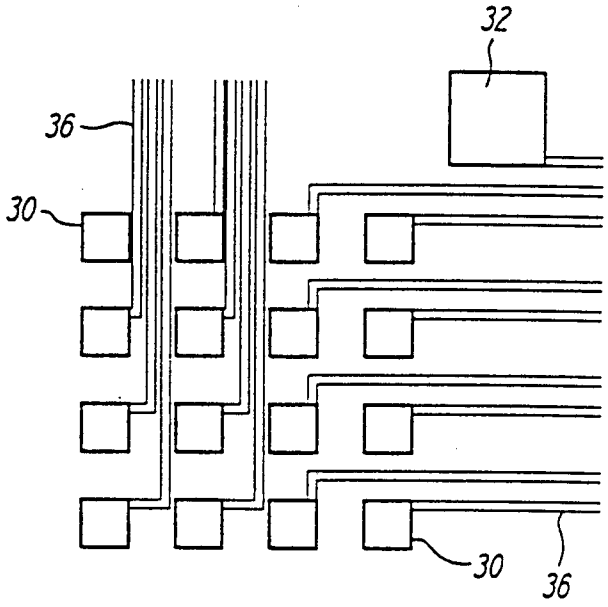


FIG. 4

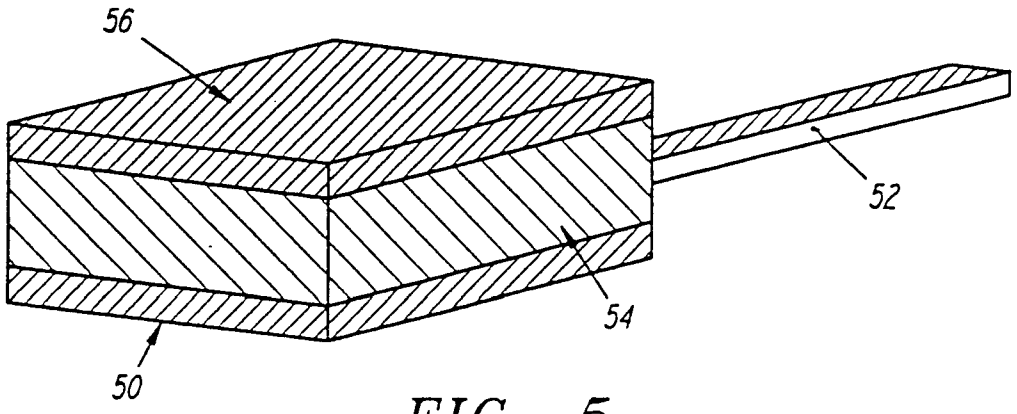


FIG. 5

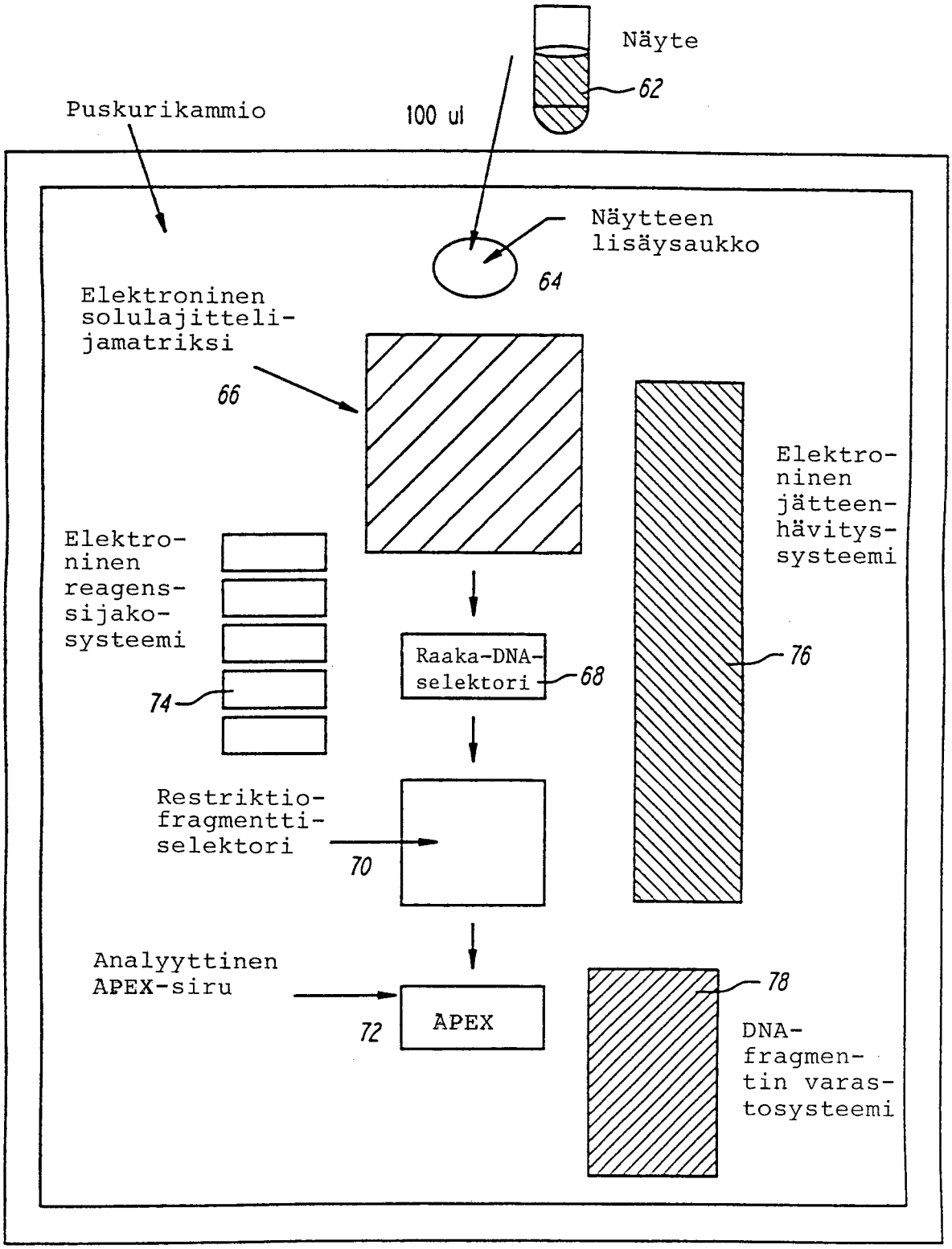

Näyte
62
Puskurikammio
100 ul
Näytteen
lisäysaukko
64
Elektroninen
solulajitteli-
jamatriksi
66
Elektro-
ninen
reagens-
sijako-
systeemi
74
Raaka-DNA-
selektori
68
Elektro-
ninen
jätteen-
hävitys-
systeemi
76
Restriktio-
fragmentti-
selektori
70
Analyyttinen
APEX-siru
72
APEX
78
DNA-
fragmen-
tin varas-
tosysteemi

FIG. 6

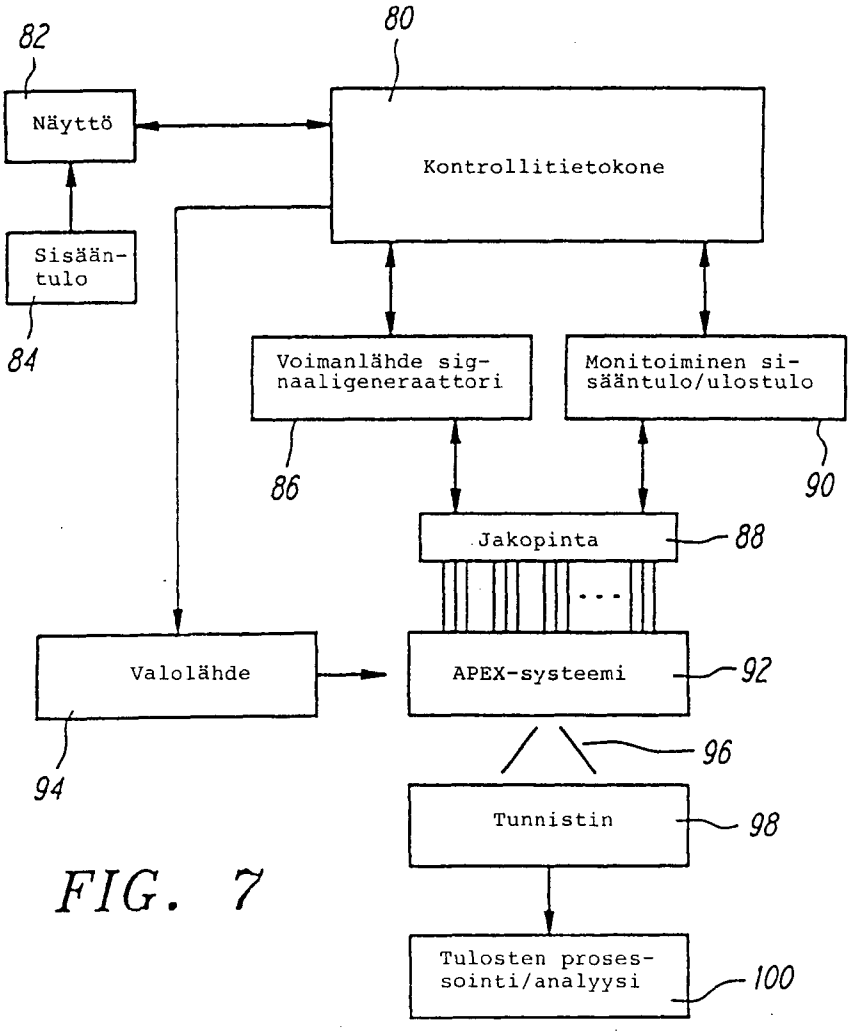

82
80
Näyttö
Kontrollitietokone
Sisään-
tulo
84
Voimanlähde sig-
naaligeneraattori
Monitoiminen si-
sääntulo/ulostulo
86
90
Jakopinta
88
Valolähde
APEX-systeemi
92
94
96
Tunnistin
98
Tulosten proses-
sointi/analyysi
100

FIG. 7

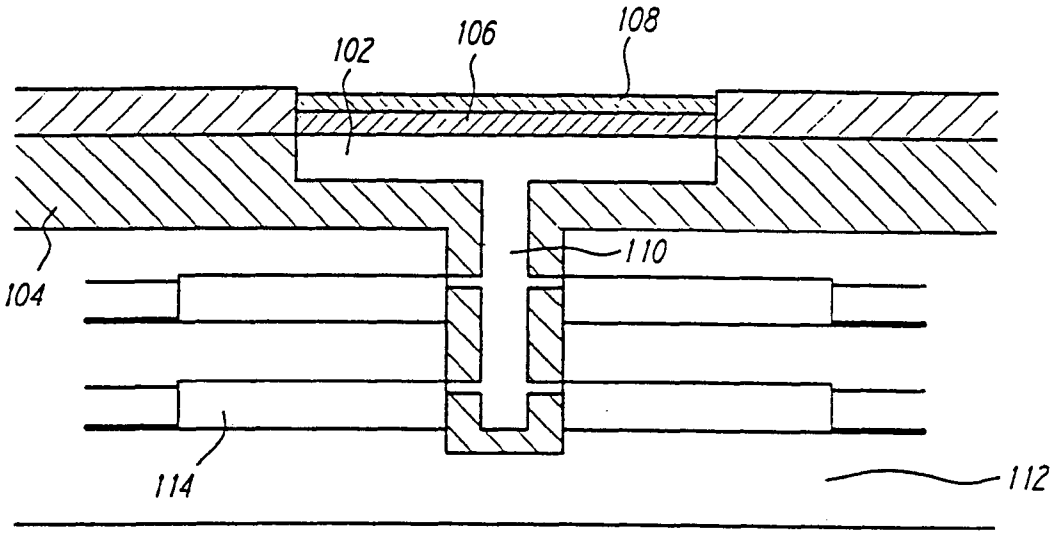


FIG. 8

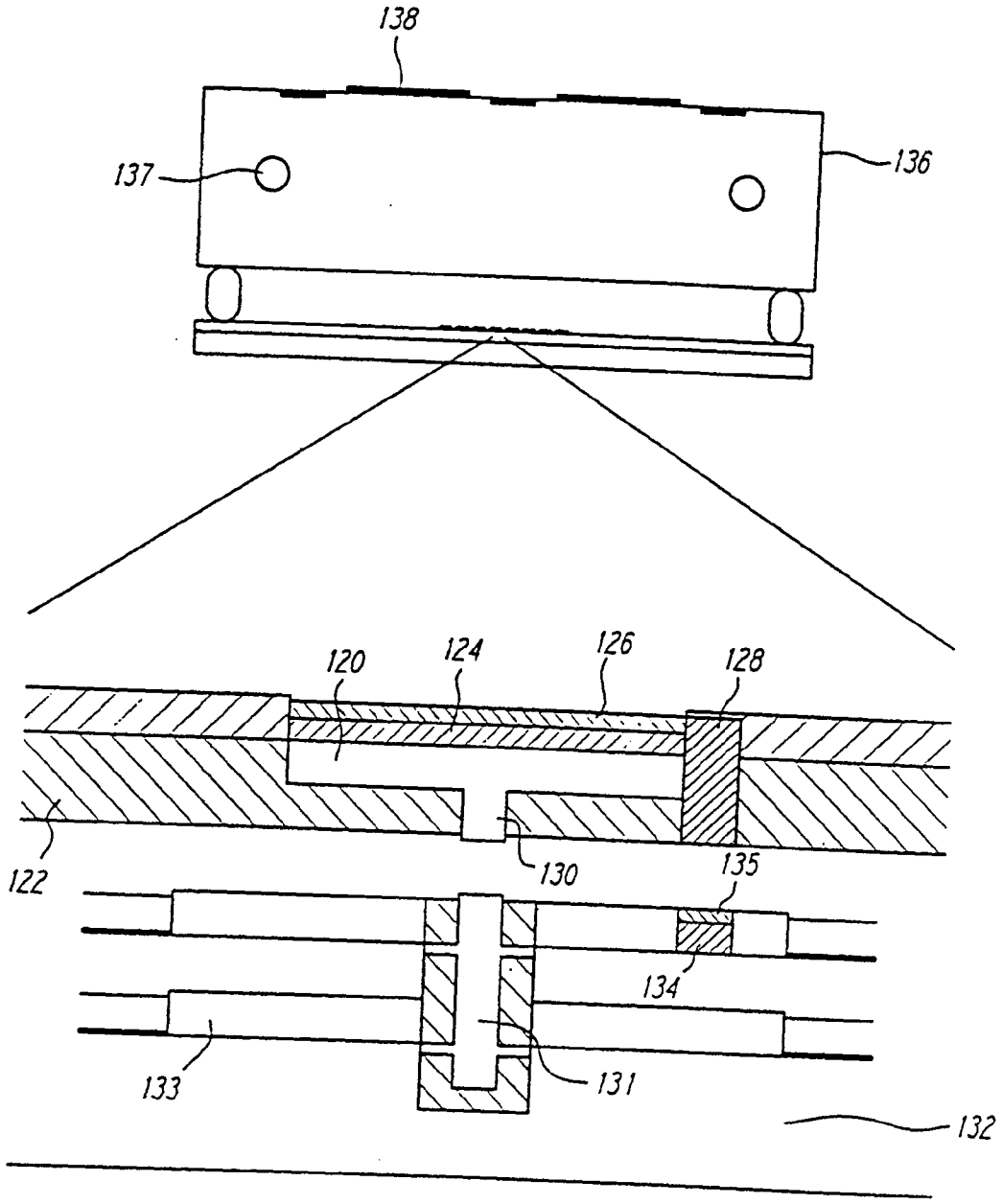


FIG. 9

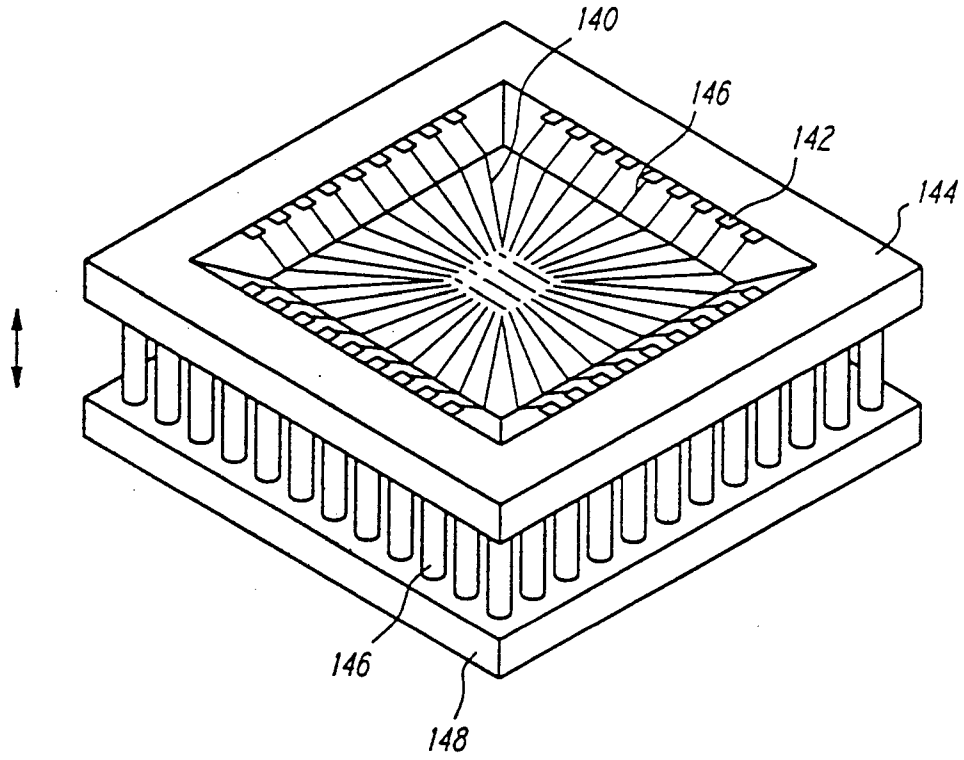


FIG. 10

FIG. 11A

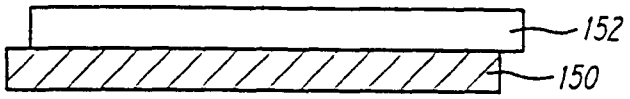


FIG. 11B

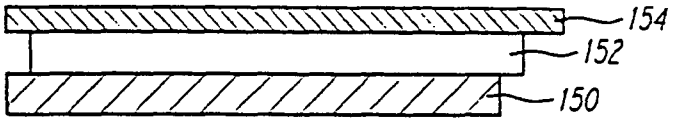


FIG. 11C

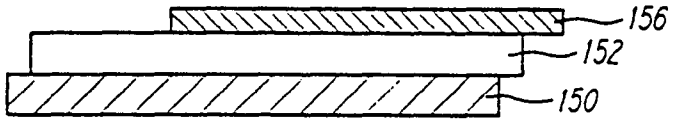


FIG. 11D

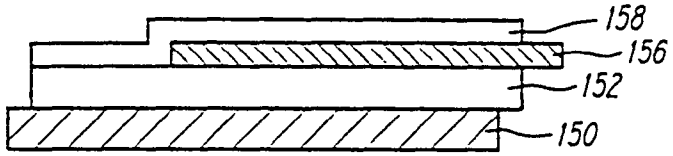


FIG. 11E

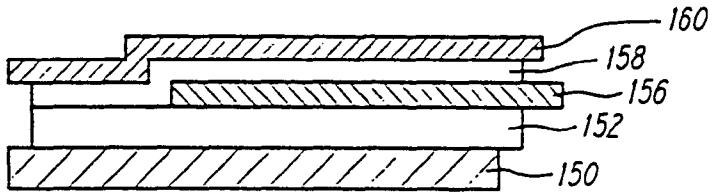


FIG. 11F

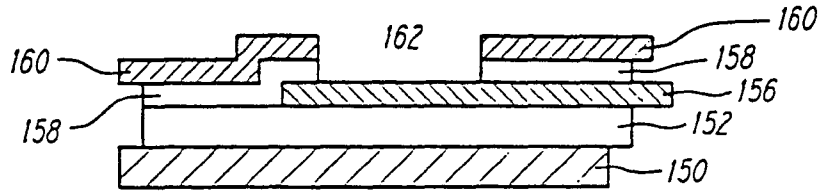
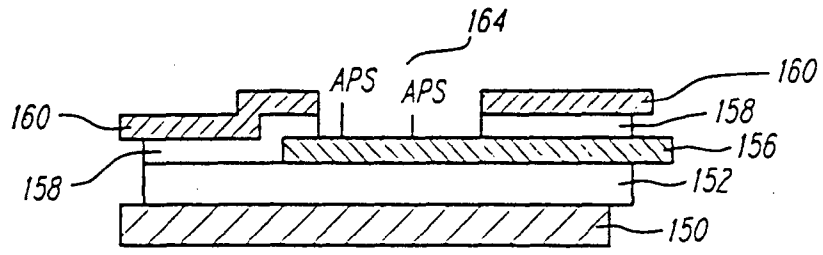


FIG. 11G



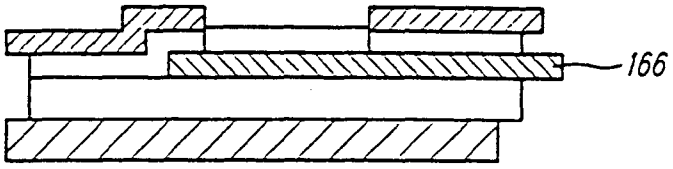


FIG. 12

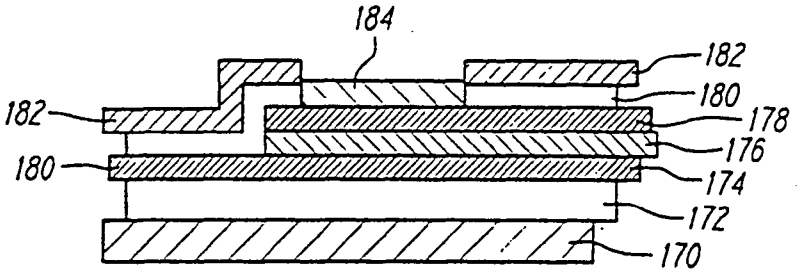


FIG. 13

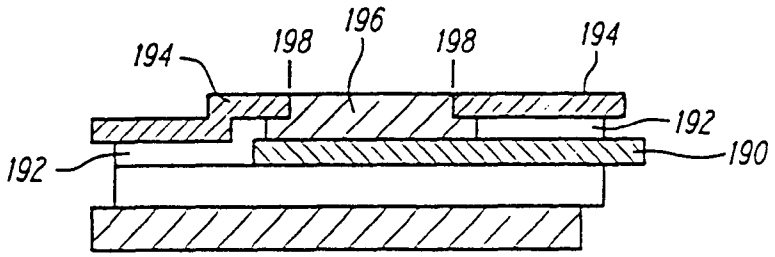


FIG. 14

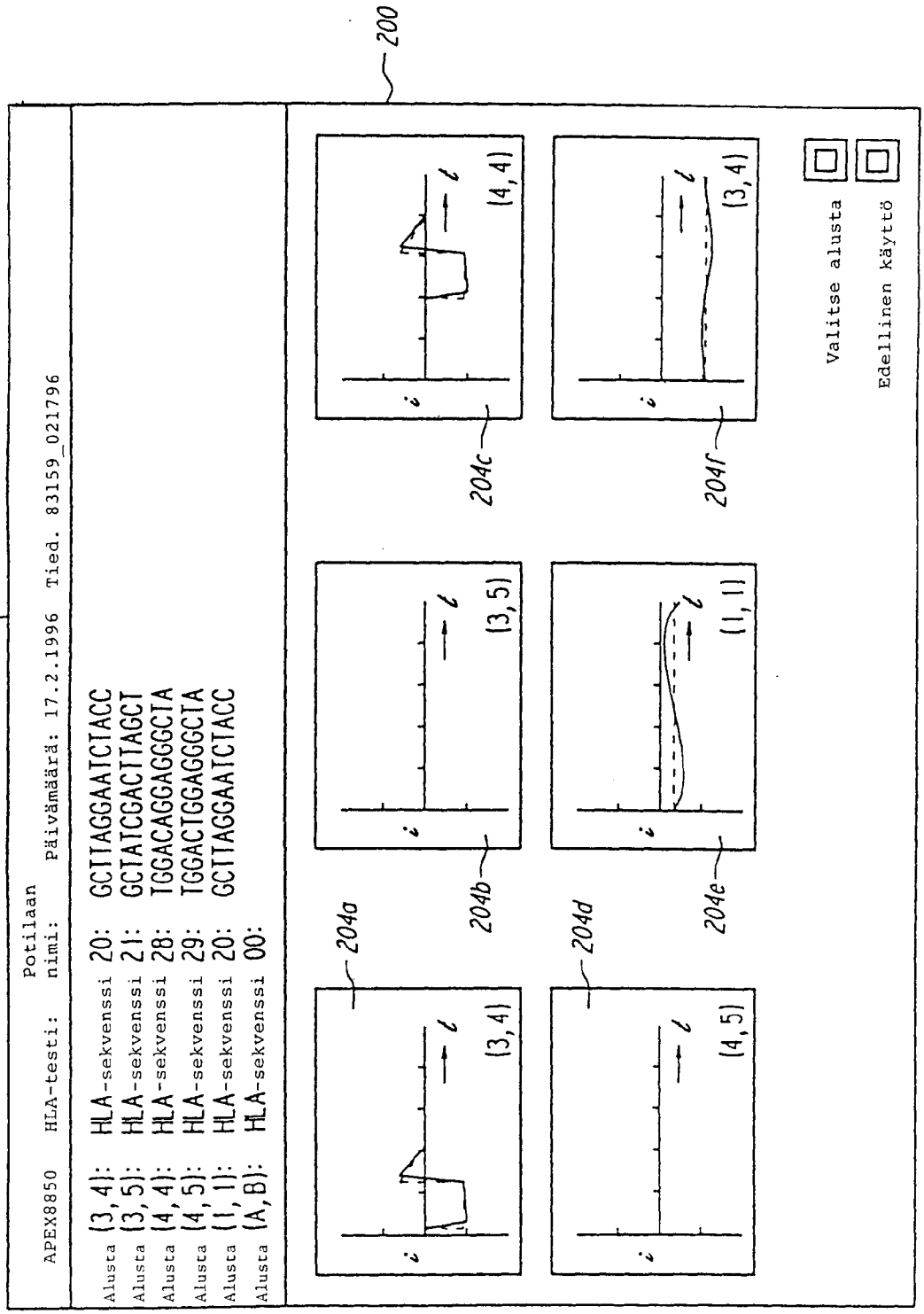

202
200
APEX8850 HLA-testi: Potilaan nimi: Päivämäärä: 17.2.1996 Tied. 83159_021796
Alusta (3,4): HLA-sekvenssi 20: GCTTAGGAATCTACC
Alusta (3,5): HLA-sekvenssi 21: GCTATCGACTTAGCT
Alusta (4,4): HLA-sekvenssi 28: TGGACAGGAGGGCTA
Alusta (4,5): HLA-sekvenssi 29: TGGACTGGAGGGCTA
Alusta (1,1): HLA-sekvenssi 20: GCTTAGGAATCTACC
Alusta (A,B): HLA-sekvenssi 00:
204a
(3,4)
204b
(3,5)
204c
(4,4)
204d
(4,5)
204e
(1,1)
204f
(3,4)
Valitse alusta
Edellinen käyttö

FIG. 15

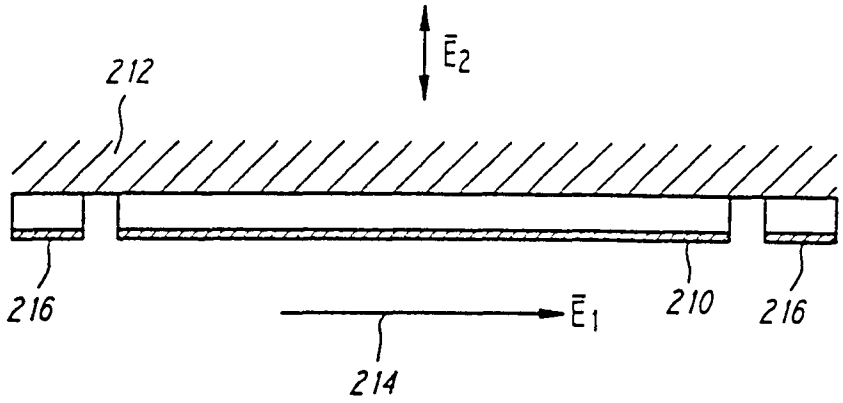


FIG. 16

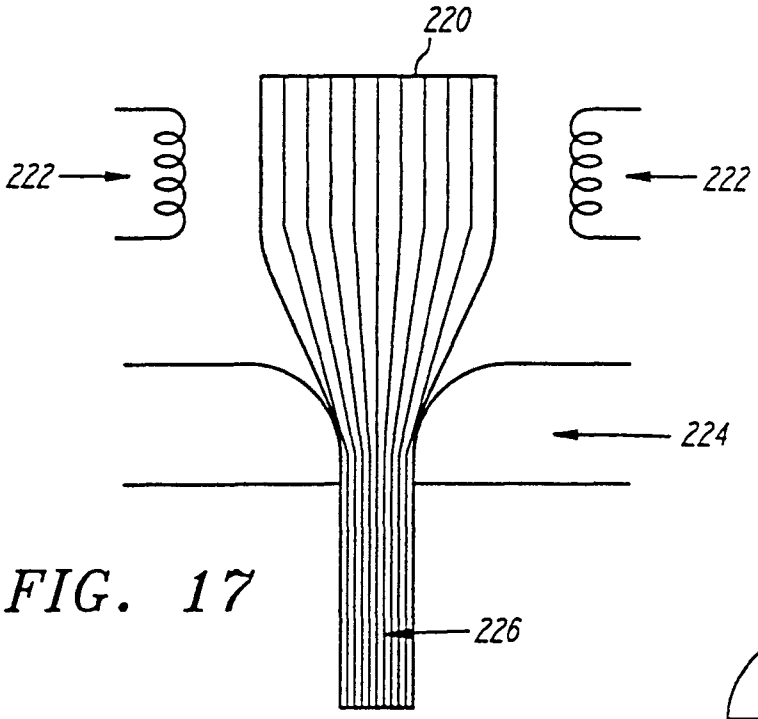


FIG. 17

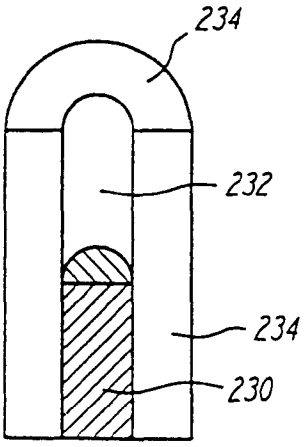


FIG. 18