



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0096567  
(43) 공개일자 2008년10월30일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

B01F 3/00 (2006.01) B06B 1/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7020469

(22) 출원일자 2008년08월21일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년08월21일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/061573

국제출원일자 2007년02월02일

(87) 국제공개번호 WO 2008/030631

국제공개일자 2008년03월13일

(30) 우선권주장

60/764,980 2006년02월03일 미국(US)

(71) 출원인

마이크로칩 바이오테크놀로지스, 인크.

미국 94568 캘리포니아주 더블린 스위트 에프 시  
에라 레인 6693

(72) 발명자

조바노비치 스테판 보그단

미국 캘리포니아주 94550 리버모어 헤이즐 스트리트 723

블라가 이우리우 이오안

미국 캘리포니아주 94538 프레몬트 로빈 스트리트 40771

랭크 데이비드

미국 캘리포니아주 94306 팔로 알토 엘 캐피탄 플  
레이스 485

(74) 대리인

김성기, 김진희

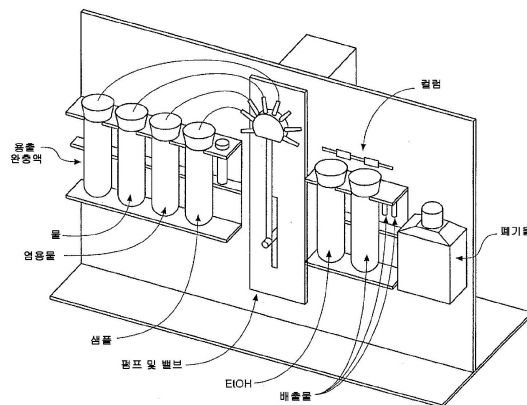
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 마이크로유체 장치

(57) 요약

본 발명은 각종 유형의 모듈에 마이크로칩을 인터페이싱하기 위한 방법 및 장치에 관한 것이다. 본 발명에 개시된 기술은 각종 적용예, 예컨대 DNA 서열화 및 유전형 분석, 프로테오믹스, 병원체 검출, 진단학 및 생물방어에 대한 샘플 제조 및 분석 시스템으로서 사용할 수 있다.

대표도



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

표적 분석물을 포획 및 정제하는 수단 및 상기 표적 분석물을 마이크로유체 장치에 투입하는 수단을 포함하는 제1 모듈, 및

상기 마이크로유체 장치를 포함하는 제2 모듈을 포함하고,

상기 마이크로유체 장치는 상기 표적 분석물을 검출 또는 분석하기에 적합한 것인 모듈 시스템.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 표적 분석물은 박테리아, 바이러스, 포자, 진핵 세포 또는 핵산으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 모듈 시스템.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 박테리아는 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*)인 모듈 시스템.

### 청구항 4

제2항에 있어서, 상기 포자는 바실러스 안트라시스 포자인 모듈 시스템.

### 청구항 5

제2항에 있어서, 상기 세포는 암 세포인 모듈 시스템.

### 청구항 6

제2항에 있어서, 상기 핵산은 DNA인 모듈 시스템.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 분석은 상기 DNA의 서열 분석을 포함하는 것인 모듈 시스템.

### 청구항 8

제6항에 있어서, 상기 분석은 상기 DNA의 증폭을 포함하는 것인 모듈 시스템.

### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 마이크로유체 장치는 제32항의 마이크로유체 장치인 모듈 시스템.

### 청구항 10

회전 폴 피스;

유통형 튜브; 및

자기 고정 피스를 포함하고,

여기서, 상기 회전 폴 피스, 상기 튜브 및 상기 고정 폴 피스는 소정의 방식으로 배열되고, 상기 폴 피스의 회전시에 상기 유통형 튜브에서 이동 자기파를 생성하기에 적합한 물질을 포함하는 이동 자기파 유통형 장치(traveling magnetic wave flowthrough device).

### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 폴 피스의 회전율은 약 100 Hz 이상인 장치.

### 청구항 12

제10항에 있어서, 상기 튜브의 관강에 배치된 비드를 더 포함하는 장치.

#### 청구항 13

제10항에 있어서, 상기 비드는 자기 비드인 장치.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 표적 분석물은 상기 자기 비드에 부착되는 것인 장치.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 표적 분석물은 상기 자기 비드에 친화성 포획되는 것인 장치.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 표적 분석물은 박테리아, 포자, 바이러스, 진핵 세포 및 핵산으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 장치.

#### 청구항 17

제10항에 있어서, 상기 유통형 튜브는 마이크로유체 장치로 공급되는 것인 장치.

#### 청구항 18

- a) 표적 분석물 및 자기 비드를 제10항의 이동 자기과 장치의 유통형 튜브에 투입하는 단계; 및
- b) 상기 튜브내에서 한 방향 이상으로 상기 자기 비드를 가속화시키기에 적합한 주파수에서 상기 장치의 폴 피스를 회전시키고, 그에 따라 상기 비드가 상기 표적 분석물을 용해 또는 분쇄하는 단계를 포함하는 표적 분석물의 용해 또는 분쇄 방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 표적 분석물은 박테리아, 포자, 바이러스, 진핵 세포 및 핵산으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 20

제18항에 있어서, 상기 회전율은 약 100 Hz 이상인 것인 방법.

#### 청구항 21

제18항에 있어서, 상기 표적 분석물은 상기 자기 비드에 부착되는 것인 방법.

#### 청구항 22

제21항에 있어서, 상기 표적 분석물은 상기 자기 비드에 친화성 포획된 것인 방법.

#### 청구항 23

제18항에 있어서, 상기 유통형 튜브는 마이크로유체 장치에 유체 연결된 것인 방법.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, 상기 표적 분석물은 핵산이고, 상기 마이크로유체 장치는 상기 핵산의 서열을 증폭시키기에 적합한 것인 방법.

#### 청구항 25

제23항에 있어서, 상기 표적 분석물은 핵산이고, 상기 마이크로유체 장치는 상기 핵산을 서열 분석하는데 적합한 것인 방법.

## 청구항 26

에어로졸을 수용하기에 적합한 챔버; 및

초음파처리기 프로브를 포함하고,

여기서, 상기 챔버는 샘플 투입구 및 샘플 배출구를 포함하며, 상기 프로브는 상기 샘플 투입구 및 샘플 배출구 사이에 위치하는 샘플을 초음파처리하기에 적합한 방식으로 상기 챔버에 배치시킨 것인 유통형 초음파처리기.

## 청구항 27

제26항에 있어서, 유체 샘플을 더 포함하고, 이때, 상기 샘플은 상기 챔버를 통하여 흐르는 것인 초음파처리기.

## 청구항 28

제26항에 있어서, 상기 샘플 배출구는 마이크로유체 장치에 유체 연결된 것인 초음파처리기.

## 청구항 29

표적 분석물을 포함하는 샘플이 상기 초음파처리기의 챔버내에 체류하는 동안 제27항의 유통형 초음파처리기의 프로브를 활성화시키고, 그에 따라 상기 표적 분석물이 초음파처리되는 단계를 포함하는 표적 분석물의 용해 또는 분쇄 방법.

## 청구항 30

제29항에 있어서, 상기 표적 분석물은 박테리아, 포자, 바이러스, 진핵 세포 및 핵산으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

## 청구항 31

2개의 친화성 포획 챔버에 유체 연결된 로딩 저장기로서, 상기 포획 챔버는 각각 분리 채널에 유체 연결된 것인 로딩 저장기,

정방향 및 역방향 핵산 서열화 생성물을 포함하는 샘플을 상기 저장기로부터 상기 친화성 포획 챔버로 전기 영동시키기에 적합한 전극으로서, 상기 포획 챔버는 상기 정방향 또는 역방향 서열화 생성물을 포획하기에 적합한 친화성 포획 매트릭스를 포함하는 것인 전극; 및

상기 친화성 포획 챔버의 온도 조절용 수단

을 포함하는 마이크로유체 장치.

## 청구항 32

2 이상의 MOV 밸브 또는 펌프에 의해 구동되는 라우터 또는 "T" 구조체를 통하여 마이크로유체 장치내에서 2 이상의 용액의 유동 방향을 반복적으로 변화시키고, 그에 따라 상기 용액을 혼합하는 단계를 포함하는, 마이크로 스케일 또는 나노스케일 용액의 혼합 방법.

## 청구항 33

2 이상의 MOV 밸브 또는 펌프에 의해 구동되는 라우터 또는 "T" 구조체를 통하여 2 이상의 용액을 전후 방향으로 이동시키고, 그에 따라 상기 용액을 혼합하는 단계를 포함하는, 마이크로 스케일 또는 나노스케일 용액의 혼합 방법.

## 명세서

### 배경 기술

<1>

A. 연방 정부 지원에 의한 연구 또는 개발에 관한 진술

<2>

본 발명은 하나 이상의 미국 국방부가 수여한 프로젝트 번호 W911SR-04-0047, NIH가 수여한 인가 번호 5R01HG003583-01, HSARPA가 수여한 계약 번호 NBCHC050133, HSARPA가 수여한 주문 번호 TTA-1-0014(협약 번호



W81XWH-04-9-0012)의 지원하에서 이루어졌다. 미정부는 본 발명에 대한 일정 권리를 갖는다.

### <3> B. 배경

<4> 지난 10-20년간 본질적으로 상이하며 그리고 종종 비상용적인, 디자인을 갖는 각종 마이크로유체 장치가 생물분석학적 방법에서 샘플 부피 요건을 감소시키고자 하는 목적으로 개발되어 왔다. 외부 치수 형태 요인인 상류 및 하류 외부 인터페이스의 성질, 길이, 단면 기하 및 내부 마이크로유체 경로의 직경을 조절하는 기준의 부재하에서, 이와 같은 마이크로유체 장치는 종종 서로 그리고 기존의 상류 정제 및 하류 분석 장치와의 비상용성이 확인되었다.

<5> 마이크로리터, 심지어 나노리터 또는 피코리터에서의 분석이 가능하도록 하는 미세가공에서의 진보에도 불구하고, 다수의 생물학적 및 환경적 샘플은 우선 기존의 마이크로유체 분석 장치의 규모보다 훨씬 더 크고, 이와 비호환적인 부피 중에서 얻어진다.

<6> 그래서, 당업계에서는 통합된 유체 시스템의 부품으로서 사용될 수 있으며, 각종 외부 치수 형성 요인인 외부 인터페이스 및/또는 내부 유체 기하를 갖는 마이크로유체 부품을 효과적인 유체 소통으로 인터페이스 처리할 수 있으며, 마이크로유체 제조용 및/또는 분석 부품을 사용하여 더 큰 규모로 작동되는, 인터페이스 제조용 모듈 또는 방법을 인터페이스 처리할 수 있는 모듈 마이크로유체 부품에 대한 수요가 존재하고 있다.

### <7> C. 개요

<8> 본 발명은 당업계에서의 상기 및 기타 요구를 해소한다.

## 발명의 상세한 설명

### <59> E. 상세한 설명

<60> 도면을 비롯한 상기의 일반적인 설명 및 하기의 상세한 설명 모두는 예시 및 설명만을 위한 것이며, 이로써 본 개시를 한정하지 않는 것으로 이해하여야 한다. 본 개시에서는 단수형을 사용한 것은 특별하게 명시하지 않는 한 복수형도 포함한다. 또한, "또는"의 사용은 특별히 명시하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 유사하게, "포함하며", "포함하고", "포함한"("comprise", "include")도 한정하지 않고자 한다. 용어, 예컨대 "엘리먼트" 또는 "부품"은 특별하게 명시하지 않는 한, 하나의 유닛을 포함하는 엘리먼트 또는 부품 및, 1 초과 유닛을 포함하는 엘리먼트 또는 부품 모두를 포괄한다. 본 명세서에서 사용한 단락의 제목은 단지 명세서 구성을 위하여 서만 사용한 것이며, 기재한 보호받고자 하는 사항을 제한하는 의미로 해석하여서는 아니된다. 특허, 특허출원, 논문, 서적 및 보고서를 비롯한(이에 한정되지 않음) 인용된 모든 참조 및 참조의 일부는 본 명세서에서 모든 목적에 대하여 전체로서 명백하게 인용하고자 한다. 1 이상의 인용된 문헌이 본 개시와 상반될 경우에는 본 개시를 우선으로 한다.

<61> 본 개시는 각종 샘플로부터 표적 분석물의 제조 및 분석을 위한 보충의 상관 관계를 갖는 통합된 모듈 시스템을 제공한다. 본 명세서에 개시된 시스템은 의료인의 판단에 의하여 선택될 수 있는 분자(예, 독소, 약제), 생물분자(예, 핵산, 폴리펩티드, 지질), 세포(예, 진핵 및 원핵 세포(예, 바실러스(*Bacillus*), 에شري치아(*Escherichia*)), 포자(예, 비. 안트라시스(*B. anthracis*)), 바이러스(예, 인플루엔자, 천연두) 및 기타 물질을 비롯한(이에 한정되지 않음) 각종 표적 분석물의 제조 및 분석에서의 용도를 발견하였다. 각종 예시의 실시태양에서, 샘플 제조 및 분석은 하기에서 설명하는 바와 같이 시스템 모듈중 1 이상에 의하여 실시될 수 있다.

<62> 특정의 실시태양에서, 본 명세서에 개시된 시스템은 통상의 실시태양에서 포획 및/또는 정제된 샘플을 바이오프로세서 모듈(BPM)로 추가로 투입이 가능한 샘플 포획 또는 정제(SCPM)를 위한 진단 모듈을 포함하며, 추가의 제조 및/또는 분석을 위한 하나의 또는 마이크로유체 장치(예, 마이크로단위, 나노단위 또는 피코단위 장치)를 포함할 수 있다. 그래서, 본 명세서에서는 샘플로부터 표적 분석물을 포획, 농축 또는 정제하고, 그후, 표적 분석물을 1 이상의 마이크로유체 장치에 투입하기 위한 용도를 갖는 모듈 시스템 및 방법이 개시되어 있다. 특정의 실시태양에서, 마이크로유체 장치는 오프-칩 플랫폼에 공급할 수 있다.

<63> 각종 예시의 실시태양에서, SCPM은 각종 방법, 예컨대 용해, 유화, 음파처리, 원심분리, 크로마토그래피, 고상추출(SPE), 면역포획(예, 면역자기 분리(IMS)), 비드에 기초한 포획 및 이의 조합에 의하여 표적 분석물을 포획, 정제 또는 농축시킬 수 있다. 특정의 실시태양에서, SCPM은 예를 들면 1 이상의 마이크로유체 장치에 투입하기 위하여 밀리리터를 마이크로리터로 또는 더 작은 부피로 농축시켜 매크로단위 샘플 용액을 마이크로단위 부피로 감소시킬 수 있다. 이러한 SCPM 실시태양은 모듈 단위 인터페이스로서 작용하며, 마이크로단위 및/또는

나노단위 장치가 더 큰 단위로 작동하는 작동 모듈을 포함하는 유체 시스템으로 통합되도록 할 수 있다. 이러한 SCPM 실시태양은 각종 치수 형태 요인을 갖는 모듈이 유체 소통하는 시스템으로 통합되도록 하는데 유용하다. 특정의 실시태양에서, SCPM은 미정제 샘플중에 존재할 수 있으며 그리고 하류 처리 또는 분석의 억제제로서 작용하는 1 이상의 제제를 제거하여 샘플을 정제할 수 있다. 샘플중의 표적 분석물을 포획, 정제 또는 농축시킴으로써, SCPM은 통상의 방법에 비하여 본 명세서에 개시된 시스템의 감도를 증가시킬 수 있다.

<64> BPM은 통상적으로 1 이상의 마이크로유체 장치를 포함한다. 본 명세서에서 사용한 바와 같은 "마이크로유체 장치"는 유체의 밀리리터 이하의 양, 예컨대 마이크로리터( $\mu\text{l}$ ), 나노리터(nl) 및/또는 피코리터(pl) 부피를 조작, 보관, 처리 또는 분석하기에 적절한 장치를 지칭한다. 각종 예시의 실시태양에서, 마이크로유체 장치는 1 이상의 마이크로칩(예, 마이크로단위, 나노단위, 피코단위 장치), 모세관 및 이의 조합을 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 마이크로칩은 당업자에게 공지된 미세가공 기법에 의하여 제조될 수 있으며, 밸브, 펌프, 챔버, 채널, 저장기 등을 포함할 수 있으며, 1 이상의 표적 분석물을 처리 또는 분석하기에 적절할 수 있다. 각종 예시의 실시태양에서, 마이크로유체 장치는 마이크로칩 기반 카트리지가 될 수 있으며, 이는 교체/재사용 불가 또는 1회용이 될 수 있다. 본 명세서에 개시된 마이크로칩은 임의의 형상 또는 치수를 지닐 수 있다. 예를 들면, 마이크로칩은 1 이상의 방사상 샘플 제조 또는 분석 유닛을 갖는 원형 카트리지가 될 수 있으며, 마이크로칩을 작동시키는 기기와 함께 사용할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 마이크로유체 장치는 자동화될 수 있다. 예를 들면, 마이크로칩은 "CD 체인저"에 저장되고, 자동으로 삽입, 조작되어 1 이상의 기능을 수행하며, 필요한 만큼 프로그래밍 가능한 기기에 의하여 저장될 수 있다. 그래서, 기기는 마이크로칩 취급, 외부 공기, 온도 조절, 제제 용액 등을 제공하여 1 이상의 마이크로칩을 동시에 또는 순차적으로 작동시킬 수 있다.

<65> 특정의 실시태양에서, SCPM은 1 이상의 부착된 표적 분석물을 포함할 수 있는 현탁액, 콜로이드(예, 에멀전) 또는 포획-비드를 BPM에 투입할 수 있으며, 각종 상기 실시태양에서 BPM의 1 이상의 마이크로유체 장치에 투입할 수 있다. 상기 실시태양에서, BPM의 1 이상의 마이크로유체 장치는 장치의 마이크로유체 경로를 통하여 폐색되지 않으면서 1 이상의 상기 고형물, 예컨대 비드의 이동에 적절하다.

<66> SCPM으로부터 BPM으로 비드 또는 기타의 고형물의 통과는 분석물 함유 샘플 부피의 규모 축소를 실시하는데 작용하여 매크로단위 모듈을 마이크로단위 장치로 인터페이스 처리할 수 있다. 그래서, 이러한 SCPM 및 BPM 실시태양은 각종 단위 및/또는 치수 형태 요인을 갖는 장치의 모듈 인터페이스 처리가 가능하며, 마이크로단위 및/또는 나노단위 장치가 더 큰 단위에서 작동하는 작동 모듈을 포함하는 유체 시스템으로 통합되도록 할 수 있다.

<67> 비드에 기초한 마이크로유체 장치 처리에 적절한 각종 예시의 실시태양에서, 비드는 유체 회로내에 삽입된 위어(weir) 또는 기타의 물리적 방해물에 의하여, 자기장에 의하여, 비드의 친화성 포획에 의하여, 전기 포획 또는 기타의 메카니즘에 의하여 마이크로유체 통과 또는 회로의 각종 시점에서 가역적으로 고정될 수 있다. 각종 실시태양에서, 비드는 유체 통과 또는 회로를 통하여 이동될 수 있고, 물리적 또는 화학적 처리를 실시할 수 있다. 점착성이거나 또는, 비드에 고정 또는 흡착 또는 흡수 내지는 부착되는 분석물을 추가의 온-칩(즉, 마이크로유체 장치내에서) 처리 또는 분석을 위하여 하류 반응 챔버로 차후에 이동시킬 수 있다. 특정의 실시태양에서, 물질, 예컨대 표적 분석물은 원하는 바에 따라 비드로부터 용출될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 친화도가 상이한 일련의 비드는 높은 특이성 및 감도를 갖는 더욱 복잡한 생체분자 과정으로 연결될 수 있으며, 예를 들면 하나의 단계는 비드상에서 세포를 결합시킬 수 있으며, 그 다음은 반응 이전에 정화를 위하여 비드상에서 특이성 DNA 서열을 고정시킬 수 있으며, 제3의 비드는 질량 분광기 등에 투입하기 이전에 정제를 위하여 반응 생성물을 결합시키는데 사용될 수 있다. 또한, 특정의 실시태양에서, 친화성 포획 제제를 갖는 겔은 당업자의 판단으로 선택된 각종 단계에서 사용될 수 있다.

<68> 특정의 실시태양에서, BPM은 자립형 샘플 제조 시스템으로서 사용될 수 있다. 그러므로, 각종 예시의 실시태양에서, BPM은 각종 상류 샘플 수집 장치(예, 에어로졸 샘플러) 또는 공급물 하류 분석 플랫폼 또는 방법론(예, 질량 스펙트럼(MS), 핵 자기 공명(NMR), 모세관 어레이 전기영동(CAE), 역전사-PCR(RT-PCR), 단일 분자 검출 시스템, 등)에 연결될 수 있다. 그러나, 특정의 실시태양에서, 1 이상의 분석 방법론은 채널, 저장기, 반응 챔버, 등 또는 이의 조합에서 마이크로칩상에서 실시될 수 있다.

<69> 본 명세서에서 개시된 시스템은 생물방어 모니터링, 감염 질환 진단학, 법의학, 게노믹스, 프로테오믹스 및 기타의 분야에서 광범위한 적용예를 갖는다. 생물방어의 경우, 기법은 예를 들면 건물, 비행기 또는 공항의 장치의 병원체 모니터링 장치로서 기능하는 분야에 배치될 수 있거나 또는 테스트 요구에서의 증가에 대처하기 위하여 실험실에서 사용할 수 있는 소형 유닛을 제공한다. 시스템은 표적 병원체를 검출하기 위하여 공기, 생물학적 유체, 농산물 또는 기타의 공급원으로부터 샘플을 생성 및 분석할 수 있다. 소비 가능한 낮은 비용과 자동화된

제조 및 분석의 조합은 분자 진단학에 상당한 영향을 미쳤다. 임상 진단학의 경우, 기법은 원하는 바에 따라 추가의 분석을 구성하기 위하여 무이음매 통합된 1회용 장치를 사용한 PCR 진단 계측을 생성하도록 변형될 수 있다. 본 명세서에 개시된 시스템은 약물유전학, 인체 의학 유전학, 생물의학 연구, 동물 및 식물 유형 및 사람 확인에 적용될 수 있다.

<70> 개시된 시스템의 추가의 적용예로는 분자 진단학, 예컨대 미생물, 유전형 유기체, 서열화 및 법의학을 검출하고; 각종 방법론, 예컨대 RT-PCR, 재서열화 및 단백질 분석을 위한 샘플 제조 및 분석 플랫폼의 생성; 대부분의 분석 플랫폼, 예컨대 질량 스펙트럼, 모세관 어레이 전기영동, 차등 표시 및 단일 분자 검출에 대한 샘플 제조 스테이션의 생성; 생물방어 적용에 등이 있다.

<71> 본 명세서에 개시된 시스템은 전부 또는 일부, 예를 들면 로봇공학을 사용하여 자동화될 수 있으며, 필드 모니터에 대한 핸드 헬드 장치로부터 실험실 계측까지 확장 가능하다.

<72> 1. 표적 분석물의 농축

<73> 특정의 실시태양에서, 샘플중의 표적 분석물은 추가의 처리 또는 분석에 대하여 마이크로유체 장치로 투입하기 이전에 농축시킬 수 있다. 특정의 실시태양에서, 1 이상의 표적 분석물은 매크로단위 부피(예, 밀리리터 내지 리터 부피)를 보유할 수 있는 1 이상의 오프-칩 유통형 장치를 사용하여 농축시킬 수 있으며, 작은 표면(예, 마이크로비드)상에서 1 이상의 표적 분석물을 농축시킬 수 있다. 특정의 실시태양에서, 1 이상의 표적 분석물은 매크로단위 부피를 보유하는 오프-칩 저장기에 의하여 공급될 수 있는 온-칩 유통형 장치를 사용하여 농축될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 온-칩 및 오프-칩 장치는 조합하여 사용될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 포획된 표적 분석물을 하류 처리 또는 분석에 적절한 부피로 선택적으로 용출시킬 수 있다. 도 1에 도시한 바와 같이, SCPM(1)은 면역포획(2), 용해(3), 핵산 정제(4)를 위한 모듈을 포함할 수 있으며, 나노바이오프로세서(5)와 통합될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 분자, 예컨대 독소는 면역포획될 수 있으며, 직접 나노바이오프로세서(5)에 공급될 수 있다(도 2).

<74> 표면상에서 표적 분석물을 포획시키기에 적절한 물질은 비드, 모노리쓰, 개질된 중합체 등으로 이루어질 수 있는 각종 유형의 추출 매트릭스 물질을 포함한다. 특정의 실시태양에서, 추출 매트릭스 물질은 각종 결합된 작용기(예, C<sub>4</sub>, C<sub>18</sub>, 카르복시 및 아미노 기), 각종 비드 또는 화학의 혼합상 또는 친화성 포획 부분(예, 항체, 렉틴, 합텐, 리간드(예, 비오틴), 수용체, 핵산, 등)를 포함할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 핵산은 카르복실화 비드, 예컨대 SPRI 또는 비개질 실리카 비드를 사용하여 포획시키고, 적절한 부피의 극성 용매, 예컨대 물에 용출시킬 수 있다. 특정의 실시태양에서, 염용물(chaotrop), 예컨대 티오시아네이트가 핵산을 모세관 표면에 가하는 실리카 모세관을 사용하고, 세정후 농축 및 정제된 핵산을 추가의 처리 또는 분석을 위하여 완충액으로 용출시킬 수 있는 나노단위 포획 방법을 사용할 수 있다(미국 특허 제6,489,112호 참조). 각종 표적 분석물의 고상 포획의 기타 방법은 예를 들면 문헌[Weimer et al. 2001 *Appl. Environ. Microbiology*, 67:1300-1307]에 기재되어 있다.

<75> a) 오프-칩 유통형 장치

<76> 특정의 실시태양에서, 표적 분석물은 농축 매트릭스(140)를 통하여 매크로단위 샘플 부피를 보내는 오프-칩 유통형 장치(130)를 사용하여 농축시킬 수 있다(도 4). 특정의 실시태양에서, 농축 매트릭스는 표적 분석물을 보유하는 반면, 벌크 용액 및 방해 화합물은 장치를 통과하게 된다. 특정의 실시태양에서, 방해 또는 원치 않는 화합물은 매트릭스(140)상에서 보유되며, 표적 분석물은 장치를 통과한다. 샘플 형태(표면, 물, 토양, 에어로졸, 생물질)에 따라, 거친 여과(약 20  $\mu$ m)는 벌크 오염물 및 미립자를 제거하는 작용을 할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 오프-칩 유통형 장치는 이에 로딩된 매트릭스와 함께 바닥에서 소결 개구부(150)를 포함할 수 있으며, 용출을 위한 구멍( $\leq 1$  mm) 포트를 포함할 수 있다(도 4). 농축 매트릭스는 본 명세서에서 설명한 바와 같이 비-친화성 배지 또는 친화성 포획 배지를 사용할 수 있다. BPM 마이크로유체 장치와 통합된 오프-칩 유통형 장치의 예는 도 3에 도시되어 있다.

<77> i) 비-친화성 포획

<78> 본 명세서에서 사용한 바와 같이, "비-친화성 포획"은 소수성, 친수성 또는 이온 상호작용에 의하여 배지상에서의 표적 분석물의 비-특이성 포획을 지칭한다.

<79> 특정의 실시태양에서, 표적 분석물의 비-친화성 포획은 20  $\mu$ m 폴리에틸렌 소결물을 갖춘 SPE 배지 분류로 예비 충전시킨 1.5 ml(또는 4 ml) 컬럼을 포함하는 Extract-Clean™ 고상 추출(SPE) Kit(알테크)를 사용할 수 있다.

배지는 미래의 용출을 위한 표적 분석물을 포획할 수 있거나 또는, 표적 분석물이 원치 않는 물질을 배지에 보유 한 채 통과하도록 한다. 예를 들면, 각각 약 1 내지  $10^4$  CFU/ml, 약  $10^2$  내지  $10^3$  PFU/ml 및 0.1 내지  $10^2$  ng/ml 범위내의 세포 용해질중의 세포, 바이러스 또는 단백질은 배지에 적용될 수 있다. 샘플은 수동으로 또는 로봇공학에 의하여 로딩될 수 있거나 또는 필요한 만큼 가한 진공을 사용하여 배지를 유통시킬 수 있다. 특정의 실시태양에서, 표적 분석물은 세정시킬 수 있는 충전 물질에 결합되며, 표적 분석물은 배지로부터의 용출에 의하여 농축될 수 있다. 각종 예시의 실시태양에서, 흐름 성질 및 보유 특성 또는 Big Beads에 대한 채널링을 방지하기 위하여 실리카 마이크로섬유 디스크를 갖는 3 ml 주사기 배럴 SPEC(ANSYS 테크놀로지즈)를 사용할 수 있다. 또한, 표준 또는 특수 크로마토그래피 매체를 사용하여 목적하는 물질의 농축 또는 정제를 제공할 수 있다. 임의의 선택된 매체의 경우, 상 부피, 각종 매체 배합, 세정 및 용출 조건은 당업자에 의하여 감도를 향상시키기 위하여 최대 보유율에 대하여 최적화시킬 수 있다.

<80> 장치를 유통하는 샘플을 모니터링하기 위한 각종 방법론, 예를 들면 Avalanche 형광 스캐너(GE)를 사용한 면역표지 및 형광 검출, 예를 들면 MegaBACE 1000(GE)을 사용한 모세관 전기영동, 세포에 대한 성장 분석 또는 당업자에게 공지된 기타의 방법을 사용할 수 있다.

<81> ii) 친화성 포획

<82> 본 명세서에서 사용한 바와 같이, "친화성-포획"은 표적 분석물에 대하여 실질적으로 특이성이 있는 분자(예, 항체, 리간드, 수용체, 렉틴, 합텐, 에피토프, 올리고뉴클레오타이드 등)를 포함하는 배지를 사용한 표적 분석물의 포획을 지칭한다. 특정의 실시태양에서, 표적 분석물(예, 세포, 유기체, 포자 또는 독소)의 표면 에피토프에 대하여 모노클로날 항체로 개질된 자기 비드를 샘플에 첨가할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 특이성 유기체, 세포 유형, 아형, 종, 핵산, 단백질 등에 대한 항체로 코팅된 비드의 혼합물 또는 세트를 의료인의 판단하에 선택한, 각종의 조합으로 또는 순차적으로 샘플에 적용할 수 있다. 항체 코팅된 비드는 표적 분산물에 결합되어 이들을 용액으로부터 포획시킨다. 비드는 자석에 의하여 수집할 수 있으며, 원치 않는 오염물 및 잠재적인 억제제는 세척에 의하여 제거할 수 있다.

<83> 각종 예시의 실시태양에서, 수집하여 세정한 비드를 유통형 장치 또는 기타의 장치에서 추가의 처리를 위하여 재현탁시킬 수 있거나 또는 BPM의 마이크로칩으로 이동시킬 수 있다. 본 명세서에서 설명한 바와 같이, 생물방어 적용예와 관련한 실시태양의 경우, 수집하여 세척한 비드를 10  $\mu$ l의 완충액에 재현탁시키고, 작은 음파처리 뿔(horn)을 삽입할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 도 6에서 설명한 바와 같은 장치를 사용하는 유통형 음파처리를 사용할 수 있다. 음파처리후, 음파처리된 물질을 필터를 통하여 그리고 BPM 마이크로유체 장치상에서 통과시킬 수 있다.

<84> b) 온-칩 유통형 장치

<85> 특정의 실시태양에서, BMP 마이크로유체 장치는 표적 분석물을 농축시키는데 사용할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 표적 분석물 농축 온-칩은 모듈 통합, 미세가공 기법의 사용 및 각종 방법론, 예컨대 동일한 챔버내에서의 PCR을 실시할 수 있는 능력을 촉진시킬 수 있다. 특정의 실시태양에서, 이는 적절한 유속을 산출하기 위하여 비교적 커다란 직경의 채널의 사용을 필요로 할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 면역-친화성 포획은 샘플로부터의 병원성 유기체 또는 바이러스, 단백질 또는 기타의 표적 분석물을 농축 및 정제시키기 위한 신속하고 특이성인 방법을 제공한다. 예를 들면, 표적 분석물을 농축시키기 위하여, 비드에 기초한 샘플 제조는 회분식 공정으로부터 온-칩 공정으로 변형될 수 있다. 예를 들면, 항체-코팅된 비드는 계면동전기 비드 상 충전 및 위어 비드 포획 방법론을 사용하여 통합된, 미세가공된 포획 챔버에 배치할 수 있다(Oleschuk et al. 2000. *Analytical Chemistry* 72:585-5909).

<86> 특정의 실시태양에서, 유통형 방식으로 충전된 상에서의 카르복실화 비드는 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 DNA 서열화 혼합물을 후-처리하기 위하여 미세가공된 유리 장치에 사용할 수 있다. 비드를 포획시키기 위한 댐을 갖는 유리 칩은 Borofloat 유리로부터 미세가공될 수 있다. 댐의 상부 및 대향 채널 사이의 댐 간극은 카르복실화 비드 또는 기타 유형의 비드, 예컨대 실리카 비드, 항체, 렉틴 또는 핵산 등을 사용한 친화성 포획을 갖는 비드에 대하여 설계될 수 있다. 깊은 채널은 HF를 사용하여 우선 에칭시킨 후, 제2의 얇은 에칭은 특이성 비드 및 적용예에 따라 0.5  $\mu$ m 또는 그 이상의 댐 높이로 구획시킬 수 있다. 특정의 실시태양에서, 비드는 가압에 의하여 패킹되고, 진공 흡인에 의하여 제거할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 면역-작용화된 또는 기타의 자기 비드를 위어가 없는 챔버에 투입할 수 있다. 챔버의 면에 수직인 작은 자기장의 적용시, 비드는 약 5 mm 이격으로 준-규칙 연속의 수직 포스트로 자동 조립된다(Doyle et al. 2002. *Science* 295:2237).



- <87> 각종 예시의 실시태양에서, 매트릭스, 예컨대 크로마토그래피 매체, 결합된 항체 또는 기타의 친화성 포획 물질을 갖는 겔, 화학적 변형이 있거나 또는 없는 겔, 고상 추출 배지, 모노리쓰 또는, 당업자에게 공지된 기타의 분리 또는 결합 매트릭스를 사용할 수 있다.
- <88> 2. 용해 모듈
- <89> 특정의 실시태양에서, 표적 분석물은 분열 및 용해된 온-칩 또는 오프-칩이 될 수 있다. 분열 또는 용해될 수 있는 표적 분석물의 비제한적인 예로는 (예, 원핵, 진핵, 고세균), 포자[예, 박테리아(예, 비. 안트라시스(*B. anthracis*), 클로스트리디움(*Clostridium*)) 또는 진균(예, 씨. 이미티스(*C. immitis*))], 소기관(예, 미토콘드리아, 핵 등), 핵산, 염색체, 플라스미드, 리보솜, 프로테오솜, 바이러스 (예컨대 천연두, 인플루엔자, 웨스트나일, 폴리오, 간염 및 레트로바이러스 등) 등이 있다. 특정의 실시태양에서, 표적 분석물은 음파처리에 의하여 분열 또는 용해될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 비드상에서 포획된 표적 분석물은 마이크로칩상에 도입하기 이전에 음파처리할 수 있다.
- <90> 초음파 분열은 비드상에서 포획시키고, 농축 및 정제시킨 미정제 표적 분석물 용액 또는 표적 분석물을 포함하는 용액에 침지시킨 빨을 사용하여 실시할 수 있다. 또한, 초음파처리기는 수집기 유출물로 직접 삽입될 수 있는 프로브를 갖는 유통형 음파처리 장치가 될 수 있다(도 6). 또한, 챔버는 에어로졸을 수용 또는 포획시키도록 설계될 수 있으며, 본 명세서에 기재된 바와 같이 자동화될 수 있다.
- <91> 특정의 실시태양에서, 분열 또는 용해는 비드 교란에 의하여 달성될 수 있다. 비드는 본 명세서에 기재한 포획 비드와 동일하거나 또는 상이할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 용해 및/또는 포획에 사용되는 비드의 각종 성질, 예컨대 자기 대 비-자기, 상이한 밀도 등은 하류 처리 또는 분석을 단순화하기 위하여 각종 유형의 비드를 분리하는데 사용될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 유통형, 이동중인-파, 비드-교란 장치(10)를 사용할 수 있다(도 5). 예를 들면, 도 5에 도시한 바와 같이, 회전하는 자기 폴 피스(pole piece)(20)는, 폴 피스가 회전함에 따라 유통형 튜브(30) 아래로 자기 파를 생성한다. 회전은 약 100 Hz 이하가 될 수 있으며, 튜브를 유통하는 표적 분석물의 포자 및 기타 유형을 분해시키기 위하여 이웃하는 튜브를 통하여 비드의 충분한 가속을 생성할 수 있다. 특정의 실시태양에서의 비드는 용해를 촉진시키기 위한 복수의 형상을 갖는다.
- <92> 분열 또는 용해를 평가하기 위하여, 생육성의 손실 대 시간을 사용하여 소정의 전원 설정, 노출 시간, 부피 및 기하를 측정할 수 있으며, 이와 같은 변수의 설정은 당업자의 권한에 포함된다. 특정의 실시태양에서, 선택한 샘플은 TaqMan 분석에서의 DNA 또는 RNA의 방출을 테스트하는데 사용될 수 있다. 분열은 하류 처리 또는 분석에 부적절하도록 하지 않으면서 이의 점도 및 단면적을 감소시키는 거대분자를 전단처리하기 위하여 그리고 포자에 대하여 최적화될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 용해질은 공극 크기가 약 10  $\mu\text{m}$  이상, 심지어 적어도 약 20  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$  또는 심지어 그 이상을 갖는 필터를 통하여 통과시켜 마이크로유체 장치의 마이크로채널을 폐색시킬 수 있는 덩어리를 제거할 수 있다.
- <93> 특정의 실시태양에서, 분열 또는 용해된 물질은 온-칩 또는 오프-칩을 추가로 정제하기 위한 공급원료로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 핵산을 분석하기 위하여, 비드상에서 선택적 올리고뉴클레오티드를 사용한 핵산 하이브리드화의 정제 단계는 배경으로부터의 표적 서열을 정제할 수 있다. 단백질의 경우, 고체 표면, 예컨대 소수성, 카르복실화 또는 기타의 화학에서의 포획은 소정 등급의 단백질의 비-특이성 정제를 제공할 수 있으며, 친화성 포획은 필요할 경우 개선된 특이성을 제공할 수 있다. 유사하게, 복수 단계의 정제는 필요한 만큼 온-칩 및 오프-칩 및 비드에 기초한 및 기타의 매트릭스의 짜맞춤으로 실시할 수 있다.
- <94> 특정의 실시태양에서, 용해는 마이크로칩으로 도입후 실시될 수 있다. 이와 같은 실시태양에서, 마이크로칩은 용해시키고자 하는 세포와 함께 샘플을 수용한다.
- <95> 3. 핵산 정제 모듈
- <96> 특정의 실시태양에서, 본 발명의 시스템은 핵산 정제 모듈(NAPM)을 포함할 수 있다. NAPM은 기타의 물리적 형태의 용액 또는 샘플, 예컨대 1 이상의 비드, 콜로이드, 다중상(불균질 또는 불균일) 용액 또는 기타의 조성물을 허용하도록 설계될 수 있다. 특정의 실시태양에서, NAPM은 용해 모듈로부터의 투입물을 수용하도록 설계될 수 있다. NAPM에 의하여 수용되는 부피는 밀리리터 내지는 피코리터 이하의 부피가 될 수 있다. 특정의 실시태양에서, NAPM 배출물은 추가의 처리 또는 분석을 위하여 BPM 마이크로칩 또는 기타의 마이크로유체 장치에 전달될 수 있다.
- <97> NAPM에 의한 사용을 위하여 각종 화학을 변형시킬 수 있다. 각종 예시의 실시태양에서, NAPM은 각종 방법에 의

한 완전 핵산 정제, 예컨대 염용물을 사용한 표면 흡착/탈착에 의한 정제; 예를 들면 올리고뉴클레오타이드 함유 겔상에서의 전기영동 포획에 의한 선택적 핵산 정제; 또는 올리고뉴클레오타이드 함유 비드상에서의 하이브리드화에 의한 선택적 핵산 정제를 실시하도록 설계될 수 있다. NAPM의 예는 도 7에 예시되어 있다.

<98> a) 전체 핵산 정제

<99> 샘플중의 전체 핵산은 용액으로부터의 핵산을 표면으로 가하는 염용물을 사용하는 비-특이성 포획 방법을 사용하여 정제할 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제6,489,112호에는 실리카 모세관의 표면으로 핵산을 가하기 위하여 염용물, 예컨대 티오시아네이트 또는 구아니디늄을 사용하는 정량적 나노단위 "주형 포획" 방법을 설명한다. 세정후, 농축 및 정제된 핵산을 나노단위 샘플 처리 또는 분석, 예컨대 사이클 시퀀싱을 위한 완충액으로 용출시킬 수 있다. 또한, 이러한 방법은 용해질로부터 핵산을 정제하는데 사용할 수 있다.

<100> 특정의 실시태양에서, 투입구 샘플은 유리 비드 또는 기타의 적절한 표면, 예컨대 채널 벽면의 존재하에 염용물과 혼합할 수 있다. 염용물은 용액으로부터 핵산을 가하여 이들이 유리 비드 또는 기타의 표면으로 흡착되도록 한다. 또한, 염용물은 핵산 분해를 실질적으로 억제시키는 샘플중에 존재할 수 있는 뉴클레아제를 불활성화시킨다. 배양 기간후, 세포 부스러기, 변성된 단백질 및, 염용물중에서 가용성인 기타의 부품은 예를 들면 진공을 사용한 흡인에 의하여 제거하고, 이를 폐기물 흐름에 버릴 수 있다. 정제된 샘플은 추가로 세정하여 추가의 오염물을 제거하고, 핵산은 회수 및, 마이크로칩 또는 기타의 유체 시스템으로의 투입을 위하여 완충액에 용출시킬 수 있다.

<101> 특정의 실시태양에서, 핵산 정제를 위한 조건으로는 변성시키기 위하여 5 M 티오시아나트륨, 95℃, 90 초, 표면(예, 유리 비드)에 결합시키기 위하여 30℃ 5 분 그리고, 80% EtOH 2 초 등이 있다. 특정의 실시태양에서, 핵산은 여러 개의 각종 염용물 및 용출 회수 화학을 사용하여 개질된 비드, 예컨대 SPRI 카르복실화 비드상에서 정제될 수 있다.

<102> b) 선택적 핵산 정제

<103> 특정의 실시태양에서, 표적 핵산은 올리고뉴클레오타이드 포획 서열로의 오프-칩 하이브리드화를 사용하여 선택적으로 정제시킬 수 있다.

<104> 특정의 실시태양에서, 샘플은 고정되거나 또는 이동 가능한 매트릭스상에서의 전기영동, 유체역학 압력, 원심분리 또는 기타의 힘에 의하여 이동되고, 비개질된 비드, 개질된 비드, 교체 가능한 친화성 포획 겔, 모노리프, 콜로이드, 2 상 용액 및 기타의 물질로 이루어질 수 있다. 각종 예시의 실시태양에서, 매트릭스는 비개질될 수 있으며, 물질의 표면 성질을 기준으로 하여 표적 핵산을 결합시키고, 매트릭스는 개질되어 샘플의 성분의 결합을 향상 또는 지연시킬 수 있거나 또는, 매트릭스는 표적 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열, 결합된 항체 또는 기타의 친화성 포획 물질을 부착시킬 수 있다. 특정의 실시태양에서, 올리고뉴클레오타이드상에서의 비오틴 표지는 표적 DNA로 하이브리드화될 수 있다. 비드상에서의 스트랩타비딘 부분은 목적하는 표적 핵산을 정제하기 위하여 비오틴에 결합될 수 있다.

<105> 예를 들면, 표적 핵산을 포함하는 샘플을 표적 핵산에 상보적인 결합된 올리고뉴클레오타이드 서열을 포함하는 비드에 가할 수 있다. 결합된 표적 핵산은 저 이온 강도 완충액중에서 세정하여 염, 오염물 및 잘못 쌍을 이룬 분절을 제거하며, 나노리터 부피로 열 및 전압에 의하여 용출될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 친화성 포획은 높은 효율(사이클 시퀀싱 생성물의 경우  $\geq 90\%$ )로 신속할 수 있다( $\leq 7$  분). 이러한 접근법은 오프-칩 구조로 확대될 수 있다. 배출물 부피는 물리적 구조에 따라서 약 10 nℓ 내지 약 1 μℓ로 변경될 수 있다.

<106> 특정의 실시태양에서, 전술한 조성물 및 방법은 핵산을 샘플로부터 제거하는데 사용될 수 있으며, 이는 단백질, 지질, 탄수화물 또는 비-인지체 핵산에 대하여 분석할 수 있다.

<107> 4. 비드 또는 용액의 마이크로칩으로의 투입

<108> 샘플을 각종 마이크로유체 장치 또는 기타의 유체 시스템으로 직접 또는 처리후, 예를 들면 본 명세서에서 설명한 바와 같은 포획 및 핵산 정제에 의하여 투입할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 친화성 포획 단계로부터의 비드는 작은 부피로, 예컨대 마이크로리터 또는 나노리터 부피로 마이크로칩에 투입될 수 있다. 비드는, 예컨대 주사기 펌프 또는 피펫 장치를 사용하여 마이크로칩상의 저장기로 펌핑 처리할 수 있으며, 온-마이크로칩 펌프는 비드가 포획 또는 보유될 수 있는 마이크로칩의 일부로 비드를 이동시키는데 사용될 수 있다.

<109> 특정의 실시태양에서, 단일 비드는 처리 또는 분석, 예컨대 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화(MALDI) 스캐닝 및 펩티드 지문을 비롯한 단백질의 DNA 서열화, 단일 분자 분석, MS 분석에 대하여 마이크로칩상에서 이동 가능

하다. 단일 비드는 예를 들면 유세포 분석 기법을 적용하여 각각의 챔버에 온-마이크로칩을 보낼 수 있다. 또는, 단일 비드는 확률적인 분배 방법에 의하여 챔버에 배치될 수 있으며, 여기서 평균 단일 비드만이 챔버내에 도달할 것으로 예상된다.

<110> 특정의 실시태양에서, 샘플은 각종 유형의 유체 시스템, 예컨대 회분식 모드 또는 유통형 시스템 또는 이의 조합에서 추가로 처리될 수 있다. 시스템은 마이크로칩, 모세관(들), 튜빙, 벽 또는 기타의 용기 및 마이크로유체 장치에 기초할 수 있다. 투입된 샘플은 성분, 태그 성분으로 생화학적으로 또는 화학적으로 처리하거나 또는 온-마이크로칩으로 분석하거나 또는 하류 분석에 대하여 생성할 수 있다.

<111> 5. BPM

<112> BPM은 통상적으로 하기에서 설명하는 바와 같이 계측 및 프로그래밍 가능한 소프트웨어에 의하여 임의로 작동될 수 있는 1 이상의 마이크로유체 장치를 포함한다. 특정의 실시태양에서, 마이크로유체 장치는 샘플을 SCPM으로부터 투입하고, 액체를 유체 회로 및 반응 챔버 사이로 보내고, 제제를 첨가하고, 각종 표적 분석물, 예컨대 핵산 및 독소에 대한 분석을 실시하는 카트리리지내에 보유된 마이크로칩, 나노칩 또는 피코칩이 될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 각종 유형의 칩은 시스템 조절 엘리먼트로서 MOV 밸브, 펌프 및 라우터를 사용하여 각각의 바이오프로세서 모듈에서 샘플을 처리하여 반응 시간 및 서열을 조절할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 본 명세서에 개시된 칩은 SCPM과 함께 통합될 수 있다.

<113> a) 마이크로-로봇공학 온-칩 밸브 및 펌프(MOV™) 기법

<114> MOV 마이크로-밸브, 마이크로-펌프 및 마이크로-라우터는 2 개의 유리 마이크로유체 층을, 밸브를 개방 및 폐쇄시키는 변형 가능한 멤브레인 층, 예컨대 폴리디메틸 실록산(PDMS) 및, 멤브레인을 변형시키고 그리고 밸브를 작동시키기 위한 공기 층과 합한다. 상부 유리 층(도 9)에서 에칭된 유체 채널은 불연속이며, 밸브 시트(seat)로서 작동하는 바이어스를 초래한다. PDMS 멤브레인(40)은 밸브 시트에 대하여 배치되며, 통상적으로 2 개의 바이어스 사이에서의 유체 경로에 근접한다. PDMS 멤브레인(40)의 대향면에서, 에칭에 의하여 형성된 공기 변위 챔버는 전장 진공 또는 가압 원에 연결된다. 소형 오프-칩 솔레노이드를 조절함으로써, 진공 또는 가압(대기압의 대략 절반)은 가요성 멤브레인의 단순 변형에 의하여 PDMS 멤브레인(40)을 개방(50) 또는 폐쇄(60)로 적용시킬 수 있다.

<115> 자체 프라이밍 MOV 펌프(도 10)는 3 개의 밸브(70, 80, 90)의 작동을 조정하여 생성될 수 있으며, 임의의 방향으로 흐름을 생성할 수 있다. 다양한 유속은 작동 시퀀스의 타이밍, 격막 크기, 교호 채널 폭 및 기타의 온-칩 치수에 의하여 달성될 수 있다. 라우터(도 11)는 유사하게 이들 밸브 및 펌프로부터 형성될 수 있다. 라우터는 중앙의 격막 밸브(100)에 연결되는 별도의 채널(110, 120)상에서 3 이상의 밸브를 각각 사용하여 형성될 수 있다. 밸브의 적절한 조합을 작동시킴으로써, 채널중 하나로부터의 액체를 중앙의 격막 밸브로 보내고, 각종 채널로 배출시켜 액체를 보낼 수 있다. 또한, 부스(bus) 구조체를 생성할 수 있다.

<116> MOV 밸브 및 펌프는 PDMS 멤브레인의 단일 시이트를 사용하는 하나의 제조 공정으로 동시에 생성될 수 있으며, 즉 이는 칩상에서 5 개의 MOV 펌프를 생성하는 것은 500 개의 칩을 생성하는 것과 동일한 비용이 소요된다. 그래서, 본 개시는 칩에서 복잡한 마이크로-, 나노- 및 피코-유체 회로를 생성하기 위한 방법을 제공하며, 칩상에서 실질적으로 임의의 반응 또는 분석의 포팅이 가능케 한다. 일반적으로 이러한 기법은 용액 이온 강도 및 표면 오염의 변화에 적어도 거의 둔감할 수 있으며, 이는 인가한 전기 장을 필요로 하지 않는다.

<117> b) 마이크로유체 장치

<118> 도 31은 핵산 분석에 사용될 수 있는 단일 바이오프로세서 모듈의 예를 도시한다. 이러한 설계에서, IMS 및 핵산 정제로부터 결합 정제된 핵산을 갖는 포획된 비드는 하부 채널(350)로 투입될 수 있다. 온-칩 MOV 펌프(351)는 위어(352)로 비드를 이동시키며, 여기서 핵산은 열의 국부 적용에 의하여 방출되며, 실시간 PCR 체제로서  $\mu$ RT-PCR 챔버(353)로 펌핑 처리될 수 있으며, 내부 표준 물질은 제제 투입으로부터 첨가될 수 있다. 챔버를 둘러싼 밸브는 열 순환에 근접한다.

<119> 도 32는 도 31로부터의 설계를 사용하여 6" 마이크로칩에 대하여 48-유닛 설계의 예를 도시한다. 특정의 실시태양에서, 96 개 이상의 유닛이 6" 칩에 방사상으로 배치될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 384 개의 분리 채널은 8" 칩에 배치될 수 있다. 96-채널 마이크로칩은 채널이 약 3회만 재사용될 경우 약 30 일간 작동될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 240 개의 유닛은 최종 세부사항의 요건, 테스트한 표적 분석물의 수 및 복잡도에 따라서 12" 마이크로칩에 방사상으로 배치될 수 있다.

- <120> 특정의 실시태양에서, 각종 칩은 예를 들면 RT-PCR에서 사용할 수 있는 반응 챔버(도 29)로서 밸브 챔버를 형성하는 천공된 비아 홀(via hole)을 포함할 수 있다. 3 mm 두께의 천공된 웨이퍼 및 300  $\mu\text{m}$  직경의 드릴을 사용하여 장축 아래로(채널을 횡단하기보다는) 3 mm 검출 경로길이를 갖는 212 nℓ 챔버가 생성될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 이들 챔버는 표면-대-부피 비가 우수할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 더 커다란 부피는 더 우수한 표면-대-부피 비 및 더 긴 경로길이를 가질 수 있다. 일반적으로, 칩상에서의 검출은 채널을 가로질러 실시될 수 있으며, 채널 깊이가 약 30  $\mu\text{m}$ 에 해당하는 경로 길이를 지니며; 유사하게, 모세관 시스템에서, 경로길이는 약 50 내지 200  $\mu\text{m}$ 이다. 우수한 부피-대-표면 비 및 약 100-배 더 긴 경로길이는 이와 같은 단일 디자인을 사용하여 각각 샘플 제조 생화학(더 높은 부피-대-표면 비에 의하여) 및 형광 검출 모두에 이롭다. 동일한 검출 디자인은 독소를 검출하는데 사용될 수 있다.
- <121> 특정의 실시태양에서, 각종 칩은 MOV 라우터를 사용하여 적절한 수의 반응(달성되는 복잡도에 의존함)으로 투입 샘플을 분할시키고, 제제, 예컨대 내부 표준 물질을 포함하는 PCR 마스터 믹스를 첨가할 수 있다. 도 33에서 알 수 있는 바와 같이, 법의학 기록 및 재시험을 위한 샘플은 투입 MOV 라우터를 사용하여 등분할 수 있으며, 임의의 양의 실시간 PCR 반응으로부터의 샘플을  $\mu\text{CAE}$ 에 대하여 선택할 수 있다. 도 33은 특정의 실시태양에서  $\mu\text{CAE}$  채널이 각각의 바이오프로세서 유닛 또는 반응에 대하여 필요치 않다는 것을 예시한다. 특정의 실시태양에서, 완전 6" 마이크로칩상에서의 2 내지 4 개의  $\mu\text{CAE}$  채널이 사용될 수 있는데, 이는 이러한 채널이 확인에 사용될 수 있으며, 수십개의 실시간 PCR 챔버 및 기타 유형의 분석 챔버(예, 독소 분석 챔버)에 연결시키기 위하여 깊게 배치될 수 있기 때문이다.
- <122> 도 25는 병원체의 샘플 제조를 위하여 마이크로칩을 작동시키는 플랫폼 및 1회용 카트리지로써 설계된 생물방어 적용예를 위한 마이크로칩의 예가 예시되어 있다. 칩은 MOV 밸브, 펌프 및 반응 챔버, 제제의 주입을 위한 샘플 포트, 상류 농축 및 하류 분석 모듈과 인터페이스 처리하기 위한 투입구 및 배출구 포트를 포함한다. 도 17은 방사상으로 배치된 바이오프로세서의 12 개의 유닛을 갖는 원형 기판을 사용한 마이크로칩을 예시한다. 특정의 실시태양에서, 한번에 하나의 유닛이 사용될 수 있으며, 마이크로칩은 사용 사이에서 회전된다. 또는, 각종 기하를 갖는 기판 및 상이한 유체 레이아웃을 갖는 실시태양을 사용할 수 있다.
- <123> 이러한 예에서 마이크로칩에서 유체를 포함하는 바이오프로세서 모듈은 상류 SCPM으로부터 샘플을 수용하며, 기록 및 재시험을 위하여 분석을 생성하며, 샘플 온-칩을 용해시키고, 샘플을 생성 및 표지시키고, 분석을 위하여 검출기로 이들을 배출시킬 수 있다. 이러한 예에서, BPM은 유체를 수용하는 마이크로칩 카트리지와 및, 카트리지를 작동시키는 기기를 포함한다. 카트리지는 "CD" 포맷으로 존재할 수 있으며, 단일 샘플 또는 복수의 샘플에 사용된 각각의 유닛을 갖는 섹터에서의 카트리지는 1 개당 12 개의 바이오프로세서 유닛을 갖는다(도 17). 예를 들면, 카트리지는 하나의 샘플을 처리한 후, 회전하여 그 다음 샘플을 수용할 수 있다. 카트리지는 필요한 만큼 상이한 샘플링 영역으로 변형 및 변경될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 카트리지는 세트는 CD 체인저와 유사하게 미니-카루셀(carousel)에 저장될 수 있다. 기기는 제제를 저장, 로딩시키고, 실시 및 카트리지를 변경시키고, 과정을 조절할 수 있는 역학을 제공할 수 있다.
- <124> 특정의 실시태양에서, 조절 엘리먼트로서 온-카트리지는 MOV 밸브 및 펌프를 갖는, 나노유체를 사용하여 샘플을 처리하도록 설계된 나노-바이오프로세서 카트리지를 사용할 수 있다. MOV 밸브는 통상적으로 폐쇄되고, 울퉁불퉁하며(rugged) 그리고 제조가 용이하며, 밀집한 어레이로 작동될 수 있으며, 낮은 사부피를 갖는다. 밸브는 유리 층을 변형 가능한 멤브레인으로서 폴리디메틸 실란(PDMS) 층과 합하여 문헌[Grover et al. (2003), *Sensors and Actuators* B89:315-323]의 설계에 따라 제조할 수 있다.
- <125> 특정의 실시태양에서, 자체 프라임링 펌프(도 10)는 도 9에 도시된 3 개의 밸브를 합하여 생성될 수 있다. 중앙의 격막 밸브는 흐름의 방향을 조절하는 기능을 하는 측면 밸브보다 더 클 수 있다. 또한, 중앙의 밸브는 반응 챔버 또는 혼합기로서 작용할 수 있으며, PDMS는 2 mm 이하로 변형되어 수백 마이크로미터 정도 또는 수십 나노리터 정도를 수용할 수 있는 반응 챔버를 생성할 수 있다(Grover et al. 2003. *Sensors and Actuators* B89:315-323). 이들 챔버는 동역학적으로 팽창 및 수축이 가능하다.
- <126> 본 개시에서, MOV 밸브 및 펌프는 프로세서로 통합되어 마이크로- 및 나노단위 샘플을 생성 및 처리할 수 있다.
- <127> 본 개시에서, 비아 홀의 크기는 비아 홀내에서 반응 챔버를 생성하도록 변경될 수 있다. 비아 홀의 폭 및, 비아 홀이 통과하게 되는 웨이퍼(들)의 두께에서의 변화를 합하면, 광범위한 챔버가 형성될 수 있다. 반응 챔버로서 작용하는 것 이외에, 또한 비아 홀은 광학 및 기타의 검출에 대하여 증가된 경로길이를 제공하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 도 29는 비아 홀(231)이 실시간 PCR을 실시하고 그리고 검출 세포로서 사용되는 마이크로칩(230)이 도시되어 있다. 또한, 검출은 비아 홀의 코팅을 위하여 또는 웨이퍼 기판을 위한 내부 반사 물질을 사



용하여 향상될 수 있다.

<128> 6. 적용예, 계측 및 소프트웨어

<129> 특정의 실시태양에서, 마이크로칩은 진공 척상에서 고정된 위치로 유지될 수 있다. 마이크로칩 인터페이스 장치는 외부 공기, 열 순환 온도 조절 엘리먼트, 온도 조절 및 제제 투입 라인을 비롯한 외부 조절 엘리먼트를 제공하기 위하여 마이크로칩과 함께 도크(dock) 처리될 수 있다.

<130> 도 16은 흐름을 조절하기 위하여 외부 작동된 MOV 밸브 및 펌프를 사용하여 설계한 마이크로칩 카트리지의 실시태양을 도시하며, 더 큰 중앙 격막 밸브는 반응 챔버로서 작용한다. 카트리는 바이오처리를 위한 3 개의 주요 채널(160-162), 저장 부위(170) 및 저장기(180)를 포함한다. 이들 채널 중 하나는 DNA 기반 분석을 위한 처리에 사용될 수 있으며, 제2 및 제3의 채널은 면역분석 분석에 의하여 각각 독소 및 입자를 처리하기 위한 것이다. 도 16에 도시한 레이아웃은 다수의 가능한 레이아웃중 하나이며, 생물방어 적용을 위한 하류 단일 분자 검출기와 인터페이스 처리되도록 설계된다.

<131> 특정의 실시태양에서, 카트리는 하기와 같이 작용할 수 있다. 100  $\mu$ l 샘플을 내부 조절의 추가후 오프-칩 샘플 농축기에 의하여 카트리지에서 투입 저장기(190)에 전달한다. 7 개의 미처리 10  $\mu$ l 분액을 "A"로 표시한 라우터(200)에 의하여 저장기로부터 4℃로 유지된 온-카트리지 저장 챔버로 펌핑 처리한다. 이들 분액중 3 개는 재시험을 위한 것(180)이며, 분석한 샘플 테스트가 양성인 경우 확인이 가능하며; 추가의 4 개의 분액(170)은 초기 양의 검출이 재시험에 의하여 확인된 경우 차후의 검색 및 법의학 분석을 위한 것이다. 모든 분액은 외부 냉각기, 예컨대 TEC Peltier 냉각기에 의하여 카트리지에서 저장 냉각되며; 안정화 제제는 필요할 경우 이들 저장기내에서 건조 저장될 수 있다. 카트리의 사용후, 사용한 카트리는 냉장된 미니-카루젤에 저장한다.

<132> 즉시의 처리를 위한 분액을 형성 및 처리한다. 10  $\mu$ l 테스트 분액은 하기에서 설명한 바와 같이 독소의 검출을 위한 면역 표지를 위하여 바이오처리 채널 2(161)로 라우터 A(200)를 경유하여 챔버 D(163)로 이동시킨다. 제2의 10  $\mu$ l 테스트 분액은 하기에서 설명하는 바와 같이 무상해 박테리아 또는 바이러스 입자의 검출을 위한 면역 표지를 위하여 바이오처리 채널 3(160)로 라우터 A(120)를 경유하여 챔버 E(164)로 이동시킨다. 그후, 투입 저장기를 상부로부터 마개로 막고, 나머지 샘플은 카트리지 하부를 통하여 연결된 외부 초음파처리기 랙을 사용하여 음파 처리한다. 생성된 초음파는 식물 세포, 포자 및 바이러스를 분열시키며, DNA를 진단 처리하여 개선된 하이브리드화 역학 및 흐름 성질을 위하여 점도를 감소시켰다. 용해된 샘플은 DNA 분석을 위하여 표지된 프로브를 사용한 하이브리드화를 위하여 바이오처리 채널 1(162)로 라우터 A(200)를 경유하여 챔버 C(165)로 이동시킨다.

<133> 3 개의 채널의 바이오처리는 동시에 발생할 수 있다. RNA, 단백질 및 지질을 분해시키기 위한 샘플 소화 단계는 DNA 기반 단일 분자 검출을 위한 샘플의 배경을 감소시키고, 하류 검출기에서의 요구치를 감소시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 처리를 실시할 경우(예컨대 단일 분자 검출의 경우), DNA 분석 샘플은 비-DNA 물질을 분해시키기 위하여 첨가한 완충액중의 RNase, 프로테아제 및 리파제의 각테일을 지닐 수 있다. 첨가는 샘플을 저장기 B로부터 챔버 C로 물질을 펌핑 처리하여 실시될 수 있다. 필요할 경우, 샘플 및 소화 제제는 혼합하기 위하여 이웃하는 챔버 사이에서 정방향 및 역방향으로 펌핑 처리될 수 있다. 챔버 C에서의 분액은 저장기 F로부터의 DNA 프로브를 사용한 하이브리드화에 의하여 DNA 분석을 위하여 표지될 수 있다. 하이브리드화 또는 항체 프로브는 제제 카트리지내에서 저온 보관되고, 각각의 바이오프로세서 유닛의 사용 직전에 외부 펌프를 사용하여 카트리에 첨가될 수 있다. 프로브는 제제를 혼합하기 위하여 온-카트리지 펌프를 사용하여 챔버로 펌핑 처리할 수 있다. 다시, 샘플 및 제제는 필요할 경우 추가로 혼합하기 위하여 프로브 챔버 및 반응 챔버 C 사이에서 정방향 및 역방향으로 펌핑 처리할 수 있다. 고정구는 챔버 아래에서 가열 엘리먼트를 포함할 수 있다. 하이브리드화의 경우, 측면 밸브는 폐쇄되고, 챔버를 95℃로 가열하여 DNA를 변성시킨 후, 존재하는 임의의 표적으로 DNA 프로브를 하이브리드화시키기 위하여 최적의 하이브리드화로 냉각시킨다. 이들 밸브는 이들 챔버내에서 PCR을 실시하기에 충분하도록 밀폐되며, 그리하여 증발을 거의 배제시킬 수 있다.

<134> 전술한 BPM은 임의의 PCR 기반 분석, 예컨대 각각의 또는 다중화된 PCR, 가변 연속 반복(VNTR), 다좌위 VNTR 분석(MLVA) 또는 기타의 분석에 적용할 수 있다. 하이브리드화 프로브는 적절한 PCR 프라이머로 교체될 수 있으며, 외부 열원이 순환된다. 소화 단계는 증폭 절편 장다형(AFLP)을 실시하기 위하여 제한 소화에 의하여 교체될 수 있다. 독소 검출의 경우, 챔버 D에서의 분액은 저장기 G로부터 독소로의 항체 프로브와 혼합할 수 있으며, 입자 검출의 경우, 챔버 E중의 분액은 저장기 H로부터 미생물 표면 코트로 항체 프로브와 혼합시키고, 샘플을 37℃에서 유지할 수 있다.

- <135> 표지후, 바이오처리된 샘플을 3 개의 외부 저장기로 펌핑 처리할 수 있으며, 여기서 이들은 검출기에 의한 분석을 위하여 흡인에 의하여 얻을 수 있다. 또는, 모세관 전기영동 또는 광학 검출은 마이크로칩의 개질된 버전으로 실시할 수 있다.
- <136> 검출기가 내부 조절만을 검출할 경우, 카트리지는 회전되고, 그 다음 바이오프로세서 유닛이 생성될 수 있다. 샘플 테스트가 양성인 경우, 바이오프로세서 유닛은 회전되지 않지만, 그 대신 재시험 저장기로부터 플러쉬 처리되고, 새로운 제제를 로딩시킨다. 재시험을 위한 저장에서의 3 개의 샘플은 라우터를 경유하여 다시 펌핑 처리되며, 한 샘플은 독성 검출을 위하여 챔버 D로 직접, 제2의 샘플은 입자 검출을 위하여 챔버 C로 그리고, 제3의 샘플은 음파처리 및 DNA 분석을 위하여 투입 저장기로 보낸다. 재시험 샘플은 상기와 같이 처리하고, 가능한 추정치의 양의 검출의 경우로서 확인하기 위하여 검출기로 배출시킨다.
- <137> 마이크로칩을 작동시키기 위한 계측은 외부 계측인 마이크로칩 인터페이스 장치내에 수용될 수 있다. 마이크로칩은 제제를 저장기로 이동시키기 위한 주사기 펌프 및, 공기, 가열 및 냉각을 갖는 마이크로칩으로 도킹 처리되는 마이크로칩 인터페이스 장치, 진공 척의 상부에 지지된 마이크로칩을 사용하여 형성될 수 있다. 컴퓨터 제어된 마이크로칩 인터페이스 장치는 외부 전장 밸브를 개방 및 폐쇄시키는 솔레노이드를 제어할 수 있으며, 다시 마이크로칩 밸브 및 펌프를 제어하여 마이크로칩상의 샘플을 이동시킬 수 있다.
- <138> 마이크로칩 인터페이스 장치는 가열기, 예컨대 니크롬과 같은 저항 가열기, Peltier 가열기, 공기 기반 가열기, 적외선 가열기 또는, 당업자에게 공지된 기타의 실시태양 및 열전쌍 또는 기타의 온도 측정 장치 및, 마이크로칩의 구역의 온도, 가열 및 냉각 속도를 조절하기 위한 관련 제어 회로 및 소프트웨어를 포함할 수 있다. 냉각은 복사 냉각, 팬으로부터의 능동 냉각, Peltier에 의한 냉각, 물에 의한 냉각 또는, 당업자에게 공지된 기타의 방법에 의하여 실시될 수 있다. 전체 마이크로칩의 온도는 또한 진공 척을 가열시켜 설정할 수 있다.
- <139> 주사기 펌프는 장착된 마이크로칩상에서의 저장기에 제제를 전달하도록 조절될 수 있거나 또는, 제제를 포함하는 가압 챔버는 밸브를 포함할 수 있으며, 이러한 밸브는 개방되어 제제가 마이크로칩상의 저장기로 튜브를 유통하도록 한다. 특징의 실시태양에서, 중력 흐름을 사용할 수 있다. 특징의 실시태양에서, 전기력은 제제를 이동시키도록 하며, 비드 또는 입자에 부착된 제제의 자기 전달은 본 발명의 범위내에 포함된다. 전술한 하드웨어 및 NanoPrep 소프트웨어 모두는 Laboratory Rapid Automation Toolkit 소프트웨어 또는 기타의 소프트웨어를 사용하여 제어될 수 있다.
- <140> Laboratory Rapid Automation Toolkit(LabRAT™) 소프트웨어 플랫폼(500)(도 26)은 로버스트, 상업용 등급의 소프트웨어 플랫폼의 신속한 생성이 계측 및 자동화 프로세스를 구동시키도록 하는 계측 소프트웨어 개발 키트이다. LabRAT는 소통 및 명령 프로토콜(501-503) 세트를 정의하며, 입수 가능한 어떤 것보다 더 단순하며, 더 플렉시블하며 더 효과적인 표준화된 자동화 아키텍처 및 프레임워크를 갖는다. LabRAT 프레임워크는 복수의 작동 시스템, 개발 언어 및 소통 배지(504)를 확장시킬 수 있는 핵심 기술 세트에 기초한다.
- <141> LabRAT 자동화 아키텍처의 핵심은 SOAP(단순 객체 접근 프로토콜) 표준의 핵심인 XML-RPC(확장 가능한 메이크업 언어-원격 절차 호출)에 기초한 기기 소통 및 제어 인터페이스 프로토콜이다. XML-RPC는 프로세스간 소통을 위한 우수한 메카니즘이며, 이는 단순하며, 신속하며, 로버스트성을 지니며, 거의 모든 통상의 소프트웨어 개발 시스템에 대하여 널리 이용 가능한 실행이며, TCP/IP 및 HTTP에 대하여 작동하며, 실행이 용이하다. XML-RPC는 매우 높은 레벨의 "메타-메카니즘"으로서 작용하며, 정밀하게 명령된 계측 시스템으로 상이한 성분을 함께 묶을 수 있다. 코어 소통 및 명령 프로토콜 이외에, 실험실 계측에 적절한 인터페이스 세트는 성분 사이의 "랩 서비스"의 교환으로 실행된다.
- <142> LabRAT 또는 유사한 소프트웨어는 마이크로칩 인터페이스 장치를 제어하도록 변형된다. 기존의 LabRAT 소프트웨어는 각각의 성분에 대한 드라이버가 "랩핑"되면 모든 층에 대하여 기능을 제공한다. 국부 열 순환을 제어하기 위한 NanoPrep 서멀 사이클러 소프트웨어는 이미 LabRAT에 혼입되어 있다. 공기 솔레노이드, 주사기 펌프 및, 검출기를 포함한 기타의 엘리먼트는 LabRAT 소프트웨어에 의하여 제어될 수 있다. 또한, 각종 하드웨어 부품의 상호작용은 LabRAT 스크립팅 명령을 통하여 조절될 수 있다.
- <143> 특징의 실시태양에서, 3 개의 하드웨어 장치: 1) 가열 및 열 순환, 2) 온-칩 밸브 및 펌프(공기 작동됨) 및 3) 제제를 전달하기 위한 주사기 펌프를 조절할 수 있다. 열 순환은 반응 챔버 아래에 직접 배치된 니크롬 가열 코일을 사용하여 달성되며, 기존의 NanoPrep 소프트웨어 및 하드웨어에 의하여 제어될 수 있다. MiniPrep Cartesian 로봇(테칸)은 "Smart I/O" 보드(테칸)를 구동시켜 마이크로칩상의 샘플을 로딩 및 언로딩시키는데 사용되는 마이크로칩 및 전장 로봇공학상에서 미니-로봇공학 밸브 및 펌프를 조절하는 32 ttl 이하의 출력 라인을

작동시키는데 사용될 수 있으며; LabRAT CAN 인터페이스는 또한 고 정밀 주사기 펌프를 작동시켜 유체를 칩에 분배할 수 있다.

- <144> Smart I/O 보드는 Crydom 고체 상태 릴레이 모듈(각각의 라인에 대하여 하나, MODC-5 SSR 모듈, DigiKey # CC1226-ND 및 MS-4 4-Pos Mounting Board, DigiKey # CC1230-ND)을 구동시킬 수 있으며, 이는 다시 24V DC 솔레노이드 밸브(ARO, P251SS-024-0))를 작동시킬 수 있다. 이들 밸브는 공통의 포트를 갖는 3방향, 직접 구동 유닛이며, 하나는 각각 통상적으로 개방되고 그리고 통상적으로 폐쇄된 포트(각각 진공 및 가압 공기 라인에 연결됨)이다. 솔레노이드는 8 개의 전장 진공 및 가압 라인을 제어하며, 이는 8 개의 매니폴드(마이크로칩상의 M1-M8)를 경유하여 작동된다. 제어 소프트웨어는 칩상의 채널내에서 유체를 구동시키는 펌핑 작용을 생성하도록 이들 솔레노이드를 순차적으로 작동시킬 수 있다. 로봇 조절 소프트웨어는 Express Script Engine(테칸)에 의하여 실행되는 ASCII 암호화된 스크립트의 형태로 존재할 수 있다. 기존의 LabRAT 소프트웨어는 고급 XML-RPC 기반 프레임워크를 사용한 기기를 작동시키기 위하여 완전한 작동을 제공한다.
- <145> 마이크로칩을 작동시키기 위한 하드웨어는 자립형 기기로 개발될 수 있거나 또는 기존의 기기와 조합될 수 있다. 예를 들면, Tecan MiniPrep 기기는 필요한 만큼 온-칩 및 오프-칩에서 용액을 피펫팅하는데 사용될 수 있으며, Tecan Smart I/O 카드는 MOV 밸브 및 펌프를 조절하는 하드웨어를 제어하는데 사용될 수 있다.
- <146> 도 27은 마이크로칩을 갖는 MiniPrep 로봇을 사용한 시스템의 전면도의 실시태양을 도시한다. 스테이지의 전면(오른쪽)에는 알루미늄-합금 진공 척이 존재한다. 척은 칩의 전체 가열을 가능케 하는 "샌드위치형" 구조체내에 매립된 저항 가열 엘리먼트를 갖는다. 온도 조절기는 가장 왼쪽의 검은색 패널의 상부에서 볼 수 있다. 척의 왼쪽으로부터 온-칩 밸브 및 펌프를 구동시키는 8 개의 진공 라인은 Tecan 패널(이 사진에서는 보이지 않음)중 하나의 뒤쪽에 설치된 진공 매니폴드로 튜브로 연결된다. 이러한 스테이지의 좌측에는 주사기 펌프(주사기 부착됨)가 있어서 칩에서의 "저장기" 제제를 분배시킨다.
- <147> 도 28은 온도 조절기, 8 개의 24V DC 솔레노이드 및 릴레이를 포함하는 다수의 설치된 부품을 포함하는 MiniPrep(후방 패널을 제거한 후)의 내부를 도시한다. 공기 펌프 및 Smart I/O 보드는 또한 MiniPrep의 내부에 장착되었으나, 보이지는 않는다.
- <148> 본 명세서에 기재된 바이오프로세서 카트리지는 제어 엘리먼트로서 마이크로유체 온-카트리지 밸브 및 펌프를 사용하여 샘플을 처리하도록 설계될 수 있다. 카트리지는 흐름을 조절하기 위하여 상기 외부 작동된 밸브 및 펌프를 사용하도록 설계될 수 있으며, 또한 더 큰 중앙 격막 밸브는 반응 챔버로서 작동한다. 도 15는 카트리지상에서 12 개의 동일한 바이오프로세서 유닛(200)중 하나를 나타낸다. 각각의 유닛은 샘플을 투입하고, 3 개의 바이오처리된 배출 샘플(201-203)을 생성하였다: 1) DNA 하이브리드화 표지를 사용한 DNA 분석, 2) 면역표지를 사용한 독소 분석 및 3) 면역표지를 사용한 입자 분석. 또한, 각각의 유닛은 제제 첨가(204), 혼합 및 반응(205) 및, 재시험을 위한 기록 샘플(206)을 위한 부위를 지닐 수 있다.
- <149> 특정의 실시태양에서, 내부 조절물을 첨가한 후 공기 샘플러에 의하여 카트리지상에서 투입 저장기(207)에 1 mL 샘플을 전달할 수 있다. 투입 저장기는 채널을 폐색시킬 수 있는 "커다란 미립자"를 제거하기 위하여 혼입된 거친 필터를 포함할 수 있다. 미처리 700  $\mu$ L 분액을 투입 저장기로부터 4°C로 유지된 온-카트리지 아카이브 챔버(206)로 "A"로 표지된 챔버(208)로 펌핑 처리할 수 있다. 아카이브 샘플은 1) 임의의 분석한 샘플 테스트가 양성인 경우 재시험 및 가능한 확인 및 2) 초기의 양성 검출이 재시험에 의하여 확인되는 경우 차후의 검색 및 법의학 분석에 사용될 수 있다. 아카이브 샘플은 외부 냉각기, 예컨대 TEC Peltier 냉각기에 의하여 카트리지상에서 저장 냉각될 수 있으며; 필요할 경우 안정화 제제는 이들 저장기내에서 건조 저장될 수 있다. 카트리지를 사용한 후, 사용한 카트리지는 냉장된 미니-카루젤내에 보관될 수 있다.
- <150> 특정의 실시태양에서, DNA, 독소 및 입자의 즉각적인 처리를 위한 3 가지의 분액을 형성 및 처리할 수 있다. 독소 표지에 대한 100  $\mu$ L 테스트 분액은 우선 챔버 A(208)로 펌핑 처리될 수 있으며, 독소의 면역표지화 및 검출을 위한 제제를 펌핑 처리할 수 있다. 샘플은 샘플 및 제제를 혼합하기 위하여 필요할 경우 챔버 B(209)로 정방향 및 역방향으로 펌핑 처리할 수 있다. 샘플은 배양 및 반응기로의 수송을 위하여 배출 저장기(201-203)로 펌핑 처리할 수 있다. 제2의 100  $\mu$ L 테스트 분액은 무상해 박테리아 또는 바이러스 입자의 검출을 위한 면역표지를 위하여 챔버 A(208)로 이동시킬 수 있다. 미생물 또는 바이러스 표면 코트로의 항체 프로브는 챔버 A(208)로 펌핑 처리될 수 있으며, 샘플은 37°C에서 유지될 수 있다. 항체 프로브는 검출기내에서 식별 가능한 항체의 복합 혼합물이 될 수 있다. 표지화 이후, 바이오처리된 입자 샘플은 저장기로 펌핑 처리하여 검출기에 의한 분석을 위하여 모세관으로 흡인에 의하여 얻을 수 있다.



- <151> DNA 샘플 제조의 경우, 독소 및 입자 검출에 대하여 분액 및 샘플을 처리한 후, 투입 저장기를 위에서 마개로 덮고, 나머지 샘플을 카트리지의 바닥을 통하여 연결된 외부 초음파처리기 랙을 사용하여 음파처리하였다. 생성된 초음파는 식물 세포, 포자 및 바이러스를 분열시키며, DNA를 전단 처리하여 개선된 하이브리드화 역학 및 흐름 성질을 위하여 점도를 감소시켰다. 용해된 샘플은 제제 투입구(204)로부터 DNA 분석을 위하여 표지된 프로브를 사용한 하이브리드화를 위하여 챔버 A(208)로 이동시킬 수 있다. 하이브리드화의 경우, 고정구는 챔버 A(208) 아래에서 가열 엘리먼트를 포함할 수 있다. 측면 밸브를 폐쇄시키고, 챔버를 95℃로 가열하여 DNA를 변성시키고, 최적의 온도로 냉각시켜 존재하는 임의의 표적으로 DNA 프로브를 하이브리드화시킬 수 있다. 이들 밸브는 챔버내에서 PCR을 실시하기에 충분하도록 밀폐시키며, 그리하여 증발이 실질적으로 배제될 수 있다.
- <152> RNA, 단백질 및 지질을 분해시키기 위한 샘플 소화 단계는 DNA 기반 검출을 위한 샘플의 배경을 감소시키고, 하류 검출기에서의 요구치를 감소시키는 것이 바람직할 수 있다. 이것이 바람직할 경우, DNA 분석 샘플은 제제 투입구(208)로부터 첨가된 완충액중의 RNase, 프로테아제 및 리파제의 각테일을 포함하여 비-DNA 물질을 분해시킬 수 있다. 첨가는 물질을 챔버 A(208)로 샘플과 함께 펌핑 처리하여 수행될 수 있다. 필요할 경우, 샘플 및 소화제제는 이웃한 챔버 A(208) 및 챔버 B(209) 사이에서 정방향 및 역방향으로 펌핑 처리하여 혼합되도록 할 수 있다. 소화가 바람직한 경우, 챔버 A(208)중의 소화된 분액은 본 명세서에서와 같이 DNA 프로브를 사용한 하이브리드화에 의하여 DNA 분석에 대하여 표지시킬 수 있다.
- <153> 하이브리드화 또는 항체 프로브는 제제 카트리지내에서 저온 저장되고, 각각의 바이오프로세서 유닛의 사용 직전에 외부 펌프를 사용하여 카트리지에 첨가할 수 있다. 프로브는 온-카트리지 펌프를 사용하여 챔버로 펌핑 처리하여 제제를 혼합할 수 있다. 다시, 필요할 경우, 샘플 및 제제를 챔버 A 및 챔버 B 사이에서 정방향 및 역방향으로 펌핑 처리하여 추가로 혼합할 수 있다. 미래의 수행은 바이오프로세서 카트리지내에서 예비로딩된 제제를 포함할 수 있다.
- <154> 특정의 실시태양에서, 검출기가 첨가된 내부 조절물만을 검출할 경우, 카트리지를 회전시키고, 그 다음 바이오프로세서 유닛을 생성할 수 있다. 샘플 테스트가 양성인 경우, 바이오프로세서 유닛을 회전시키지 않으나, 그 대신 제제 투입구로부터의 완충액으로 플러쉬 처리한다. 저장중인 100  $\mu$ l 샘플은 양성으로 테스트된 절차를 개시하여 재시험을 위하여 챔버 A로 다시 펌핑 처리할 수 있다. 재시험 샘플을 상기와 같이 처리하고, 가능한 가정의 양의 검출 경우 확인을 위하여 검출기로 배출시킨다. LabRAT™ 소프트웨어는 주사기 펌프, 챔버 A를 위한 열 순환 가열 엘리먼트 및 전장 솔레노이드를 제어하는데 사용하여 온-칩 밸브를 가동시킬 수 있다.
- <155> 하이브리드화 및 항체 결합을 위한 화학은 전체 부피 또는 매크로단위 부피 결과에 기초하여 카트리지내에서 개별적으로 최적화될 수 있다. 반응물의 농도, 반응 시간 및 온도는 스파이크 처리된 공기 샘플을 사용하는 재구성 실험에서 테스트한 투입 미생물 범위의 영향 및 카트리지 포맷에 대하여 다시 최적화시킬 수 있다. 제제에 대한 저장 조건을 결정하는 것은 당업자의 권한내에 포함된다. 모든 제제는 제제 카트리지내에서 4℃에서 저장할 수 있으며, 추가의 안정화제, 예컨대 내삼투압제(트레할로스, 글리신 베타인) 또는 기타의 제제를 첨가하여 저장 수명을 연장시킬 수 있다.
- <156> 특정의 실시태양에서, 혼합에 대한 전략은 얇게 에칭된 치수로 하나의 스트림이 다른 스트림의 상부에 있는 채널내에서 2 개의 스트림이 혼합되도록 배치하고자 하는 것이다. 스트림 사이의 짧은 경로는 혼합을 향상시킨다. 또다른 혼합 전략은 반응 챔버내에서의 비드, 예컨대 자기 비드의 존재 또는, 비드를 자기 조작시켜 층상 흐름을 분열시키기 위한 첨가를 이용할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 이는 하나의 흐름에서 표적 분석물이 "다른" 흐름으로 투입되도록 하며, 이는 처리 또는 분석 반응을 개시하는데 사용될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 위어는 필요할 경우 비드를 포획시키는데 사용될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 비드는 사용후 폐기물로 플러쉬 처리할 수 있다.
- <157> 제제 안정화는 개시된 시스템, 예를 들면 현장 장치의 각종 실시태양에 대한 임계적 문제가 될 수 있다. 그러므로, 특정의 실시태양에서, 제제 저장기는 Peltiers를 사용하여 온도 조절하여 4℃로 냉각시킨다. 특정의 실시태양에서, 제제는 내삼투압제, 예컨대 트레할로스 또는 글리신 베타인을 사용하여 Ready-To-Go™ 화학 또는 기타의 동결 건조 방법으로 안정화시킨 후, 사용전 재수화시킬 수 있다. 재수화의 개념은 파손시킬 수 있는 밀폐물을 갖는 앰플내에서 안정화된 제제의 매일 또는 매주 분액이 될 수 있다. 물 또는 완충액은 안정화된 제제를 수화시키기 위하여 기기내에서 앰플로 펌핑 처리하여 매일 또는 매주 작업 스톱을 제공할 수 있다. 작업 스톱은 주사기 펌프로 이동될 수 있거나 또는 안정성에 따라서 바이오프로세서내에서 직접 로딩될 수 있다.
- <158> a) 마이크로비드 통합된 DNA 서열화(MINDS) 시스템

- <159> 특정의 실시태양에서, MINDS 시스템은 Sanger 샘플의 자동화된 무인 제조 및 분석을 사용하여 극저 소비 가능한 비용으로 서열화 샘플을 생성 및 분석할 수 있다. 서열화 주형은 단일 DNA 분절로부터 유래하는 DNA를 담지하는 각각의 비드를 사용한 벌크 에멀전 PCR 반응에서 전단 처리한 염색체 또는 BAC DNA로부터 출발하여 비드상에서 생성할 수 있다. 분절이 없는 비드를 배제시키기 위하여 분류한 후, 각각의 비드는 정화 및  $\mu$ CAE 분석과 함께 400 채널 마이크로칩상에서 통합된 낮은 부피(예, 25 n $\ell$ ) 사이클 시퀀싱 반응 챔버로 전달할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 비드는 위에 의하여 포획될 수 있으며, 사이클 시퀀싱은 정방향 또는 역방향 관독에 대하여 친화성 겔 포획 매트릭스를 포함하는 2중 샘플 정화 챔버로 전기영동 처리한 생성물 및 정방향 및 역방향 쌍-말단 관독 모두에 대하여 실시할 수 있다. 친화성 겔을 세정하여 이온 및 혼입시키지 않은 뉴클레오티드를 제거할 수 있다. 정제된 사이클 시퀀싱 분절은 온도를 증가시켜 친화성 매트릭스로부터 용출시킨 후, 전기영동 분석에 대한 폴딩 CE 채널로 주입시킬 수 있다. 이러한 접근법은 부분적으로는 10 배까지의 범위로 제제 부피와 비용을 절감시킬 수 있는데, 이는 분자의 수에 의하여 지정되는 기본 한계치에 근접한 규모로 서열화를 실시할 수 있기 때문이다.
- <160> 특정의 실시태양에서, 통합된 MINDS 시스템은 산탄 서열화, 지정된 서열화 및 재서열화에 대한 모든 방법을 자동화 및 최소화할 수 있다. MINDS 시스템은 100 배 이상으로 마이크로비드에 기초한 형광 DNA  $\mu$ CAE 서열기를 생성할 수 있으며, 존재하는 서열화 바탕구조에 영향을 미치는 작동 비용을 절감시킨다. 각각의 시스템은 전장 로봇공학을 교체하는 미니-로봇공학 마이크로유체로 1 주 이하 동안 무인 작동으로 완전 자동화된 서열화를 실시할 수 있다.
- <161> MINDS 시스템은 모듈내에서 실행된 후 통합될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 200 n $\ell$  사이클 시퀀싱 마이크로칩 기반 모듈을 사용할 수 있다. 고급 회전 LIF 스캐너에 기초한 DNA 분석 모듈은, 최신 매트릭스를 사용한 전기영동 채널의 쌍으로 이온을 주입시키기 이전에 2중 친화성 포획 챔버를 사용하여 쌍-말단 관독 샘플을 정화시킬 수 있는  $\mu$ CAE 마이크로칩을 갖는 MINDS 시스템에 대한 플랫폼 모듈로서 구조된다. 이와 같은 5층 마이크로칩은 "작동중인(servicing)" 마이크로유체를 사용하여 MOV 밸브 및 펌프에 의하여 작동될 수 있다. 사이클 시퀀싱 모듈은 온-칩과 합하여 100 n $\ell$  사이클 시퀀싱, 샘플 정화 및 분리를 통합시키는 Core MINDS 칩을 생성할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 25 n $\ell$  샘플 제제를 갖는 완전 MINDS 칩은 마이크로비드 라이브러리를 투입할 수 있으며, 배출 시퀀싱 정보가 가능하게 된다.
- <162> b) 사이클 시퀀싱 모듈
- <163> 마이크로유체 사이클 시퀀싱 모듈(CSM)은 MINDS 시스템에 대한 마이크로칩 기반 샘플 제조에서의 모듈로서 그리고 자립형 기능으로서 사용될 수 있다. CSM은 1) 흐름을 조절하기 위하여 온-칩 밸브 및 펌프를 사용한 샘플 제조 마이크로유체를 수용하는 마이크로칩 및 2) 온-칩 밸브 및 펌프를 통하여 마이크로칩을 작동시키기 위한 외부 인터페이스를 포함할 수 있다. 샘플 제조 CSM은 모세관(CAE) 및 마이크로칩( $\mu$ CAE)에 의한 오프-칩 분석을 사용한 200 n $\ell$  사이클 시퀀싱 부피의 16-채널 규모가 될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 외부 유체 인터페이스, 가열 및 공기 작동을 갖는 마이크로칩 인터페이스 장치(MID)는 400 개 이상의 채널로 확장될 수 있다.
- <164> 특정의 실시태양에서, 온-칩 밸브 및 펌프를 갖는 16-채널 200 n $\ell$  사이클 시퀀싱 샘플 제조 마이크로칩 장치를 사용할 수 있다. 단순화된 마이크로칩 카트리지의 2 개의 채널은 도 14에 개략적으로 도시한다. "투입구"(260) 및 "배출구"(261)로 표시한 저장기는 거의 마이크로유체 채널에 연결될 수 있는 마이크로칩(262)의 상부층에서의 구멍이 된다. 장치는 미량역가 평판으로부터 DNA 샘플(PCR, 플라스미드 또는 기타의 주형)을 투입하고, 200 n $\ell$  부피로 사이클 시퀀싱을 실시하고, CAE 기기 또는  $\mu$ CAE 분석으로의 샘플 정화 및 주입의 준비가 된 미량역가 평판으로 형광 표시된 사이클 시퀀싱 생성물을 배출시킬 수 있다. 마이크로칩은 마이크로칩 인터페이스 장치에 의하여 작동될 수 있으며, 다시 이는 LabRAT™ 소프트웨어에 의하여 구동된다. CSM 마이크로칩 인터페이스 장치는 1) 온-칩 밸브를 개방 및 폐쇄시키고, 2) 온-칩 펌프를 작동시키고, 3) 저장으로부터의 사이클 시퀀싱 제제를 마이크로칩상에서 계측하고, 4) 가열 및 냉각을 조절하여 사이클 시퀀싱을 실시하고, 5) 완충액 및 세정 용액으로 칩을 재생시키는 역학을 제공할 수 있다. 마이크로칩 및 MID는 유체 전달을 실시할 수 있는 Tecan MiniPrep 유체 취급 로봇의 데크에 장착시킬 수 있다.
- <165> 특정의 실시태양에서, 200 n $\ell$  CSM 마이크로칩은 하기와 같이 작동할 수 있다. 미량역가 평판으로부터 투입구(260) 저장기의 벽면으로 Tecan MiniPrep 로봇에 의하여 샘플을 로딩시킬 수 있다. MOV 온-칩 펌프(264)는 도 9 내지 도 10에서 설명한 바와 같이 온-칩 펌프를 구동시키는 진공/압력 라인의 외부 작동을 사용한 펌핑 처리를 제어하여 반응 챔버로 분액을 이동시킬 수 있다. 사이클 시퀀싱 믹스(265)(CS 믹스, 도 14)는 이의 온-칩 펌프

에 의하여 펌핑 처리하여 염료 종결체 사이클 시퀀싱 마스터 믹스를 반응 챔버(263)에 분배시킬 수 있다. 컴퓨터 제어하에서의 MID는 각각의 반응 챔버(263)를 둘러싼 3 개의 밸브를 밀폐시키고, 반응 믹스를 열 순환시킨다. 완료시, 200 nℓ 샘플은 5  $\mu$ ℓ의 물을 포함하는 배출구 저장기(261)로 온-카트리지 펌프에 의하여 펌핑 처리할 수 있다. 희석한 샘플을 차후의 오프-칩 후-처리 및 분석을 위한 미량역가 평판중의 35  $\mu$ ℓ의 알콜로 Tecan에 의하여 이동시킬 수 있다. 특정의 실시태양에서, 정화 및 분석을 위한 2중 친화성 포획 챔버로 샘플을 이동시킬 수 있다. CSM 카트리지는 잔기 DNA 주형을 이동시키기 위하여 완충액으로 플러쉬 처리하고, 새로운 샘플을 다시 로딩시키고, 프로세스는 다시 개시된다. 사이클 시퀀싱은 이전의 반응으로부터의 주형을 사용하여 5% 보다 큰 오염을 용인할 수 있으며, 그리하여 반응 챔버를 플러쉬 처리하는 것은 마이크로칩을 재생할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 각각의 마이크로칩은 수백개의 반응에 재사용 가능하다.

<166> c) CSM 계측

<167> CSM을 작동시키는 계측의 특징은 1) CSM 마이크로칩 기반 카트리지에서 액체의 이동을 조절하는 온-칩 미니-로봇공학의 자동화된 외부 작동, 2) 열 순환을 위한 외부 가열 및 냉각의 조절, 3) 사이클 시퀀싱 체제를 칩으로 전달하기 위한 구동 주사기 펌프 및 4) 미량역가 평판으로부터 투입 저장기로 샘플을 이동시키고, 생성된 사이클 시퀀싱 샘플을 마이크로칩 배출구 저장기로부터 미량역가 평판으로 보내는 Tecan MiniPrep 로봇의 제어를 포함할 수 있다. 전체 4 개의 엘리먼트는 LabRAT 소프트웨어를 통하여 제어될 수 있다.

<168> 열 순환은 마이크로칩 제조를 단순화하고 작동 비용을 절감하기 위하여 외부 공급원으로부터 가열 및 냉각을 사용할 수 있다. 특정의 실시태양은 팬으로부터의 냉각을 이용한 저장 가열된 코일의 군을 사용한다. 특정의 실시태양에서, 열전쌍 센서를 갖는 마이크로칩의 상부에 배치된 니크롬 가열기를 사용할 수 있으며, 램프 시간이 30  $^{\circ}$ C/초 이상일 수 있다. 특정의 실시태양에서, 가열기는 400 채널 레벨에서 실행될 수 있으며, 이는 채널마다 모니터링하지 않고도 재현 가능하며 신뢰성이 있다. 특정의 실시태양에서, 인클로저는 냉각 공기에 사용되어 샘플 제조 및 분석을 통합시킬 경우 마이크로칩의 기타의 부분의 온도를 변경시키는 것을 방지하는데 사용될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 고 성능 Peltier-효과 열 펌프는 반응 챔버에서의 급격한 사이클 온도로 스트립에 사용될 수 있다. 이와 같은 각종 방법은 LabRAT<sup>TM</sup> 제어하에서 기존의 NanoPrep 서멀 사이클러 소프트웨어를 사용할 수 있다.

<169> Peltier 열 펌프에 의하여 냉각 유지된 주사기 펌프는 사이클 시퀀싱 체제를 마이크로칩상의 CS 저장기 채널로 전달하는데 사용될 수 있으며, 온-칩 펌프로서 보충된 저장기는 체제를 분배한다. 유사하게, 마이크로칩을 재생시키기 위한 물 또는 완충액은 전달 및 조절될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 주사기 펌프는 1 nℓ 전체 단계 크기를 지닐 수 있으며, LabRAT<sup>TM</sup> 소프트웨어에 의하여 제어될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 저장기를 보충하기 위한 단순 중량 흐름을 갖는 용액이 가능하며, 소프트웨어 제어하에서 미니-밸브는 흐름을 조절할 수 있다.

<170> 특정의 실시태양에서, CSM은 Tecan MiniPrep의 데크상에서 실행할 수 있다. Tecan은 샘플을 미량역가 평판으로부터 투입 저장기로 이동시키고, 배출구 저장기로부터의 최종 샘플을 취하고, 이를 미량역가 평판으로 옮긴다. Tecan은 단일 주사기 펌프를 작동시키는 능력을 가지며, 이의 단부에는 CAN 제어하에서 X-Y-Z 이동으로 로봇에 장착된다. 전술한 바와 같이, LabRAT 소프트웨어는 Microsoft WSH 제어기를 사용하여 CAN 장치를 제어할 수 있다. 액체를 미량역가 평판으로 그리고 미량역가 평판으로부터 이동시키는 스크립팅은 간단하다. 수동 피펫 대신에 Tecan의 사용은 CSM이 완전 자동화 모드로 작동하도록 한다.

<171> 특정의 실시태양에서, CSM은 사이클 시퀀싱 온-칩을 샘플링하고, MegaBACE CAE 및  $\mu$ CAE 마이크로칩 시스템 모두에 의하여 오프-칩을 분석하는 것을 포함할 수 있다. 염료-종결체 서열화 반응은 DYEnamic<sup>TM</sup> ET Terminator Sequencing Kits(애머샴)를 사용하여 제조업자의 상세한 프로토콜에 의하여 거의 실행될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 체제는 30 회 순환에 대하여 95 $^{\circ}$ C에서 25 초간, 50 $^{\circ}$ C에서 10 초간 및 60 $^{\circ}$ C에서 2 분간 순환될 수 있다. 열 순환후, 샘플을 마이크로칩 배출구 저장기로 이동시키고, 40  $\mu$ ℓ의 80% 에탄올에 실온에서 공기압에 의하여 미량역가 평판내에서 옮길 수 있다. 에탄올 후-처리의 경우, 샘플을 약 2,800 RCF에서 45 분 동안 원심분리하고, 알콜을 50 RCF에서 30 초간 약한 역전 회전에 의하여 제거한다. 샘플을 10  $\mu$ ℓ의 이중 증류수에 재현탁시킬 수 있다.

<172> 조절은 미량역가 평판에서 생성한 전체 부피 샘플 및, 모세관에서 생성한 500 nℓ 및 200 nℓ NanoPrep 샘플을 포함할 수 있다. 샘플은 10 kV, 15 초 주입을 사용하여 96-모세관 MegaBACE 기기로 주입시키고, 120 V/cm 전계 강도를 사용하여 분리하였다. 4색 전기영동도는 Cimarron 3.12 염기 판독기(애머샴 바이오사이언스) 및 Phred 염기 판독 및 설명한 바와 같은 품질 평가 생성 적용을 사용한 Sequence Analyzer 염기 판독 소프트웨어 패키지를 사용하여 처리할 수 있다. 모든 판독길이는 99% 정확도의 Phred20 윈도우로서 보고할 수 있다.



- <173> 증폭 사이클의 횟수, 반응 시간, 순환 프로파일 및 각종 반응물, 즉, 프라이머, 폴리머라제, dNTP, ddNTP 등의 농도는 필요한 만큼 개별적으로 최적화될 수 있으며, 이는 당업자의 권한 범위에 포함된다. 예를 들면, 용인되는 DNA 농도의 범위를 측정할 수 있으며, 소정 범위의 DNA-대-프라이머 농도의 성능의 매트릭스를 측정하였다. 초기에, 샘플은 정제된 PCR 생성물이 될 수 있다. CSM이 PCR 생성물에 대하여 최적화될 경우, 비공격 및 공격 서열 모두의 대표적인 일련의 실제의 샘플은 CAE 및  $\mu$ CAE 분석 모두에 대하여 테스트하고, 전체 부피 샘플 제조를 CAE 분석 결과와 비교하였다. 허용 기준은 전체 부피 샘플 제조 결과와 비교하여 등가의 데이터 품질, 판독길이 및 성공율이 될 수 있다. 조절은 전체 부피 반응 및 NanoPrep (500 nℓ 및 200 nℓ 부피) 반응을 포함한다.
- <174> 균일성은 가열기 및 냉각기 디자인에 의하여 그리고 마이크로칩 레이아웃에서의 변화에 의하여 모두 평가될 수 있다. 표면 상호작용은 부가작용, 예컨대 BSA 또는 PVA에 의하여 억제될 수 있다. 반응 챔버의 표면 화학은 개질된 LPA, PEG 또는 기타의 코팅을 사용하여 억제될 수 있다. 유리의 경우, 또다른 접근법은 동시에 다수의 표면 부위로의 중합체, 예컨대 폴리에테르 및 산화된 다당류의 다중점 공유 결합이 될 수 있으며, 그래서 표면 부동화의 수명을 연장시킬 수 있게 되는데, 이는 다수의 부위가 가수분해되어 중합체를 유리시켜야만 하기 때문이다.
- <175> d) 통합된 MINDS 시스템
- <176> 특정의 실시태양에서, 완전 MINDS 시스템은 3 개의 모듈, 즉 비드 라이브러리 모듈, 사이클 시퀀싱 모듈 및 DNA 분석 모듈을 포함할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 완전 MINDS 시스템은 하이퍼턴(hyperturn)으로 폴딩 마이크로채널상에서의 25 nℓ 쌍-판독 사이클 시퀀싱, 쌍을 이룬 친화성 포획 정화 및  $\mu$ CAE 분리를 통합하는 400 채널 MINDS 마이크로칩상에서의 비드에 기초한 라이브러리를 분석할 수 있다. MINDS 시스템은 비드 라이브러리 구조에 따라서 산탄 서열화에 대하여 또는 재서열화에 대하여 완전 자동화될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 사이클 시퀀싱 모듈 및 DNA 분석 모듈은 통합되어 샘플, 예컨대 PCR 또는 정제된 플라스미드를 생성할 수 있으며, 투입 샘플로서 사용될 수 있다. 특정의 실시태양에서, PCR 또는 기타의 증폭은 마이크로칩상에서 실행될 수 있다.
- <177> DNA 분석 모듈은 회전 스캐너를 포함할 수 있으며(도 30), 마이크로칩상에서의 쌍-말단 판독 샘플 정화를 실행한 후, 정방향 및 역방향 서열화 반응의 분리 및 검출을 위한 2 개의 별도의  $\mu$ CAE 채널에 샘플을 주입할 수 있다. 검출기는 488 nm 여기 및 4색 검출을 갖는 회전 LIF 스캐너가 될 수 있다. Core MINDS 시스템을 생성하기 위하여, 사이클 시퀀싱 모듈은 DNA 분석 모듈 계측과 함께 통합될 수 있다. 이러한 코어 시스템은 100 nℓ 사이클 시퀀싱, 쌍을 이룬 친화성 포획 정화 및 동일한 마이크로칩상에서의 분리를 통합할 수 있다. FACS 기기에 의하여 분류된 PCR 분절을 포함하는 비드는 마이크로칩으로 전달될 수 있으며, 각각의 비드는 25 nℓ 사이클 시퀀싱 챔버로 보낼 수 있다.
- <178> i) DNA 분석 모듈
- <179> DNA 분석 모듈은 쌍-말단 판독 및  $\mu$ CAE의 샘플 정화를 실시하여 각각의 쌍-말단 판독으로부터의 표지된 DNA 분절을 분리 및 검출할 수 있다. 사이클 시퀀싱은 백터에 삽입된 단독의 친화성 포획 시퀀스를 각각 갖는 정방향 및 역방향 방향 모두에서 프라이머를 사용할 수 있다. 전체 부피, 나노단위 제조 또는 CSM으로부터의 쌍을 이룬 사이클 시퀀싱 샘플은 방사상 디자인을 갖는 분석 마이크로칩의 저장기로 로딩될 수 있다. 샘플은 정방향 또는 역방향 판독에 대하여 친화성 포획 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 2 개의 샘플 정화 챔버로 계면동전기 이동될 수 있다. 사이클 시퀀싱 샘플은 약 20 nℓ의 부피로 농축될 수 있는 반면, 이온, 혼입되지 않은 염료, 주형, 뉴클레오타이드 및 효소는 폐기물을 통과시킨다. 농축 및 세정된 샘플은 온도를 승온시켜 방출되고, 분리 매트릭스로 충전된 마이크로채널에서의 분리를 위하여 트윈 T 인젝터로 주입될 수 있다. 방사상 채널은 마이크로채널을 스캐닝 및 검출할 수 있는 원형 검출 구역에서 집중된다.
- <180> 모듈 하드웨어 부품은 1) 다수의 각종 마이크로칩 크기 및 디자인을 수용할 수 있는 LIF 회전 스캐너, 2) 마이크로칩, 3) 전기영동 조절, 4) 온도 조절 및 5)마이크로칩 재생을 포함한다. DNA 분석 모듈은 완전 통합되고 자동화된 MINDS 시스템의 일부가 될 수 있다.
- <181> 특정의 실시태양은 기존의 회전 스캐너에 비하여 10 배 개선된 검출 성능을 갖는 매우 민감한 스캐닝 시스템을 생성한다. 10 배 개선은 스캐너, 마이크로칩 디자인 및 염료 화학에서의 작은 (1.5 내지 3 배) 증가하는 개선을 추출하여 얻을 수 있다. 스캐너의 경우, 최상 품질의 PMT, 색 선별 및 검경이 광학 효율을 개선시킬 수 있으며, 높은 개구수 렌즈를 갖는 고 출력(200 mW) 콤팩트 레이저와 결합될 수 있다. 염료 화학은 시아닌 공여체를 사용

하는 더 밝은 염료를 사용하여 개선될 수 있다. 마이크로칩은 검출 영역에서 매우 깊은 에칭을 지녀서 여분의 경로 길이로 검출을 개선시키고 밴드를 예리하게 하여 해상도를 개선시킬 수 있다. 마이크로칩 샌드위치 및 마이크로-광학에서의 반사면은 광 수집을 향상시킬 수 있다. 마지막으로, 하기에 설명한 직접 주입 방법은 완전 사이클 시퀀싱 샘플이 분리 채널로 로딩되도록 할 수 있다. 각각의 엘리먼트를 조심스럽게 최적화시킴으로써, 검출의 한계치는 통상의 연구에 비하여 크게 개선될 수 있는데, 이는 로버스트 서열화에 요구되는 표지된 분절의 양이 동시에 감소되기 때문이다.

<182> 회전 스캐너 및 계측. 특정의 실시태양에서, 상부를 향하는 회전 공초점 레이저-유발된 형광 스캐너는 방사상  $\mu$ CAE 장치를 조사하는데 사용될 수 있다. 회전 스캐너는 4 색 공초점 검출 유닛에 결합된 회전하는 대물 헤드를 포함한다. 회전 스캐닝은 높은 위치 정확성 및 속도 균일성을 갖는 높은 스캔 비율을 제공하는 기본적인 잇점을 갖는다. 회전 스캐닝은 384 개의 채널에 대하여 1 개 정도로 적은 임의의 방사상 웨이퍼 장치 10-, 30-cm 이상의 직경의 웨이퍼와 적합성을 지닐 수 있다. 그러므로, 칩 디자인은 각종 적용예에 대하여, 예를 들면 새로운 서열화에 대한 긴 레인 및, 재서열화를 위한 짧은 레인에 대하여 조절될 수 있다.

<183> 회전 스캐너의 개략적인 예는 도 30에 제시되어 있다. 200 mW, 488 nm 레이저(Sapphire™ OPSL, 미국 캘리포니아주 산타 클라라에 소재하는 코우허어런트)는 이분 광분리기 및 검경에 의하여 스테퍼 모터의 중공 샤프트를 통하여 반사된다. 샤프트의 상부에서, 룬 프리즘은 회전축으로부터 1 cm 변위시키고, 높은 개구수(>0.7) 대물은 마이크로칩의 바닥층을 통하여 채널상에서 이를 집속시킨다. 형광은 대물에 의하여 수집되고, 광학 시스템을 통하여 다시 통과되는데, 여기서 DA에 대한 8 개의 채널을 갖는 Microstar IDSC 보드를 갖는 모듈 공초점 4 개의 PMT 유닛에서 검출 이전에 분광 및 공간 필터링 된다. 스테퍼 모터는 통상의 100 미크론 채널을 가로질러 12 미크론의 공간 분해능을 갖는 5120 데이터 포인트/해상도, 약 8 개의 데이터 포인트를 부여하는 5 Hz에서 실시된다. 다섯번째 채널은 스캐너 샤프트에 부착된 디스크내의 슬롯에 의하여 개시되는 광다이오드가 공급되며; 기타의 4 개의 채널에서의 데이터 수집의 개시는 다섯번째 채널에서의 전압 상승을 참조한다. 이러한 디자인은 통상적으로 5 Hz의 스캔 비율로 여러 pM의 플루오레세인의 검출 한계치로 민감하다. 특정의 실시태양에서, 데이터는 통상의 염기 판독기를 사용하여 예비-처리 및 분석할 수 있다.

<184> 특정의 실시태양에서, 또한 DNA 분석 모듈 기기는 전기영동 및 마이크로칩 재생을 제어하기 위하여 마이크로칩 인터페이스 장치를 가질 수 있다. 마이크로칩은 정렬 도구를 사용하여 배치한 후 가열된 진공 척에 의하여 적소에서 유지될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 마이크로칩은 약 600 회의 실시 수명을 가질 수 있다. 척은 3 개의 지점을 지녀서 칩의 상승을 조절하여 공초점 검출기의 면에 대하여 평면을 유지할 수 있다. 전극 링은 마이크로칩의 둘레에서 저장기에 필적하며; 전극은 4 개의 고 전압 전력 공급원(스탠포드 리서치 시스템, 모델 3101)에 의하여 제어될 수 있다. 하기에 설명한 마이크로칩 재생은 중앙에 배치된 "체대"를 사용하여 적소에서 실시하여 사용한 매트릭스의 플러쉬 처리 및 재충전을 제공하면서, 저장기 청소 및 보충은 튜브-인-튜브 디자인으로부터 내부 튜브를 사용하여 물질을 제거하고, 외부 튜브는 완충액 또는 기타의 용액을 유동시킬 수 있다.

<185> 마이크로칩 및 작동. 특정의 실시태양에서, 마이크로칩은 친화성 샘플 정화 및 분리 채널을 4층 장치에 혼입시킬 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 포획 시퀀스를 갖는 친화성 포획 정화는 샘플 정화 및 농축에 대한 로버스트 용액이 될 수 있다. 농축 단계 온-칩을 사용하지 않고 주입시 묶은 샘플을 농축시킬 수 있는 계면동전기 주입과는 반대로, 트윈 T 인젝터는 로딩시 예비분리를 실시한 후, "하트-컷" 주입을 실시하며, 여기서 둘다 묶은 샘플의 검출에 대하여 작업한다. 분리 마이크로칩상에서의 친화성 포획의 포함은 로딩 이전에 200 nM CSM 샘플을 마이크로리터 부피로 희석시키도록 할 수 있는데, 이는 친화성 포획이 미혼입된 종결체, 이온 및 주형을 제거하면서 묶은 샘플을 재구성할 수 있기 때문이다. 그러므로, CSM 및 DNA 분석 모듈은 별도로 설계한 후, 통합될 수 있다.

<186> 특정의 실시태양에서, MINDS 시스템은 방사상 디자인(290)(도 34), 하이퍼턴 및 중앙의 기원(291)을 갖는 12" 웨이퍼를 사용할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 적용예에 따라서, 400 개의 채널을 갖고 분리 길이가 45 cm 이하인(채널의 폴딩에 의하여 달성됨) 12" 디자인과 동일한 채널 밀도 및 길이를 갖는 8" 웨이퍼(292)를 갖는 부분 방사상 디자인을 사용할 수 있다. 8" 웨이퍼는 약 108 개의 분리 채널(293)을 포함할 수 있다.

<187> 도 21은 8" 웨이퍼의 한 실시태양을 도시한다. 각종 예시의 실시태양에서, 이러한 8" 웨이퍼는 짧은 판독의 경우 직선형 14 cm 분리 채널 또는, 긴 판독의 경우 약 45 cm 이하의 폴딩 채널을 가질 수 있다. 샘플은 각각 분리 채널을 공급하는 2 개의 친화성 포획 챔버에 연결된 단일 로딩 저장기로 피펫 처리할 수 있다. 샘플을 로딩한 후, 전극을 갖는 전극 고리를 낮추고, 각각 사이클 시퀀싱 샘플을 2 개의 친화성 포획 샘플 정화 챔버에 전기영동시키고, 각각은 매트릭스와 함께 사이클 시퀀싱 반응 믹스의 원치 않는 성분을 제거하면서 정방향 또는



역방향 관독을 포획 및 농축시킨다. 정방향 또는 역방향 관독은  $>65^{\circ}\text{C}$ 로 챔버를 가열하고, 분석을 위하여 트윈 T 인젝터로 개별적으로 각각의 관독을 전기영동시켜 방출시킬 수 있다. 그래서, 각각 로딩 저장기는 2 개의 분리 채널을 작동시킨다. 분리후, 분리 매트릭스를 교체할 수 있다. 매트릭스는 매트릭스 및 플러쉬 용액을 위한 튜브뿐 아니라, 중앙의 공동의 애노드 완충 저장기를 위한 전기 연결을 포함하는 중앙 "제대"를 통하여 펌핑 처리될 수 있다. 다수의 기하 및 디자인이 400 채널 MINDS 마이크로칩에 사용될 수 있다. 분리는 다수의 CAE 매트릭스에서 실행될 수 있다.

<188> 특정의 실시태양에서, 마이크로칩은 필요한 만큼 최적의 분리 조건 및 매트릭스 조작을 위한 온도를 조절하기 위하여 Peltier 가열기상의 진공 척에 지지될 수 있다. 분리후, 완충액은 사용한 매트릭스를 교체하기 위하여 제대를 통하여 플러쉬 처리할 수 있다. 마이크로칩 인터페이스 장치중의 수동 튜브-인-튜브 진공 흡인 유닛은 저장기로부터 사용된 완충액과 매트릭스를 제거할 수 있다. 새로운 매트릭스는 중앙의 챔버를 통하여 첨가될 수 있으며, 매트릭스 센서는 매트릭스 폐기물을 최소로 하기 위한 피드백을 제공하기 위하여 혼입될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 매트릭스의 교체는 컬럼의 길이보다 약간 더 많은 매트릭스를 교체만 하는 정밀 펌핑 처리로 조절될 수 있다. 이러한 방법은 10 배 이하만큼 매트릭스 사용을 감소시킬 수 있다. 완충액은 튜브-인-튜브의 외부 튜브에 의하여 저장기로 보충되면서, 매트릭스는 내부 튜브에 의하여 진공이 된다. 또한, 친화성 샘플 정화 매트릭스는 본 명세서에서 설명한 바와 같이 서비스 라인을 사용하여 필요한 만큼 교체할 수 있다.

<189> 특정의 실시태양에서, 마이크로칩은 깨끗한 샘플을 사용하여 600 회 실시 동안 지속될 수 있다. 마이크로칩 성능은 소프트웨어에 의하여 모니터링될 수 있으며, 작동자는 성능이 저하됨에 따라 이메일, 호출 또는 온-스크린 디스플레이에 의하여 경고를 받게 된다. 마이크로칩의 교체는 작동자에 의하여 수동으로 실시될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 사용한 마이크로칩의 제거는 마이크로칩을 방출하기 이전에 온-칩 밸브 및 펌프를 위하여 제대, 전극 고리 및 작동 변들을 뽑는 것을 수반할 수 있다. 새로운 마이크로칩의 설치의 마이크로칩을 적절하게 배치하기 위하여 정렬 도구에 의하여 촉진될 수 있다. 정렬은 정렬 마크의 검출 및, 소프트웨어 보조를 사용하여 수동으로 또는 완전 자동화로 광학체를 집속시켜 확인할 수 있다.

<190> 마이크로칩 제조. 각종 예시의 실시태양에서, 미세가공 공정은 문헌[Liu et al. 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(10):5369-5374] 및 문헌[Anderson et al. 2000. *Nucleic Acids Res.* 28:e60]에 기재된 바와 같을 수 있다. 일반적으로, Borofloat 유리 웨이퍼(스코트, 미국 뉴욕주 용커스 소재)를 진한 HF로 예비에칭시킨 후, 비정형 실리콘 마스크를 CVD 또는 스퍼터링으로 증착시켰다. 특정의 실시태양에서, 크롬-금을 비정형 실리콘 대신에 사용할 수 있다. HMDS의 접착층을 비정형 실리콘의 상부에 코팅시키고, 웨이퍼를 포토레지스트의 박층으로 스펀 코팅시키고(엡플리, 미국 캘리포니아주 산타 클라라 소재), 가볍게 구웠다. 포토레지스트는 소정의 채널 패턴을 갖는 마스크를 통하여 UV 광을 사용하여 패턴을 형성할 수 있다. 포토레지스트를 현상시킨 후, 노광된 비정형 실리콘을 제거할 수 있으며, 채널 패턴은 진한 수소화불소산을 사용하여 유리에 유체 웨이퍼상의 채널에 대하여 약  $40\ \mu\text{m}$ 의 깊이로 그리고 매니폴드 웨이퍼의 경우 약  $70\ \mu\text{m}$  깊이로 화학적 에칭을 실시한다. 그러나, 각종 부품 깊이의 결정은 당업자의 권한에 포함된다. 잔류 포토레지스트 및 비정형 실리콘을 스트리핑으로 제거할 수 있다.  $250\ \mu\text{m}$  또는 그보다 작은 액세스 홀은 다이아몬드 드릴을 갖는 CNC-미니분쇄기를 사용하여 Borofloat 비아 웨이퍼에 천공할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 더 작은 홀은 통상의 레이저를 사용하여 천공할 수 있다. 제조의 경우, 초음파 천공은 모든 홀을 동시에 천공할 수 있다.  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 중에서의 최종 세정후, 유체 웨이퍼 및 비아 웨이퍼는 비아 홀이 채널 간극과 함께 적절하게 배치되고, 약  $570^{\circ}\text{C}$ 에서 진공 오븐내에서 비아 웨이퍼를 사용하여 열 접합시켜 2 층의  $\mu\text{CAE}$  칩을 생성하도록 정렬시킬 수 있다. 5층 마이크로칩의 경우, 3 개의 유리 웨이퍼를 우선 정렬 및 조립하고, 유리층중 2 개는 얇은 웨이퍼가 될 수 있다. 매니폴드 웨이퍼 및  $254\ \mu\text{m}$  두께의 PDMS 멤브레인(비스코 실리콘스, 미국 일리노이주 엘크 그로브 소재)을 UV 오존 세정실내에서 세정하고, 4 또는 5 층의 마이크로칩을 조립할 수 있다. UV 오존 처리는 비가역적 유리-PDMS 결합을 생성할 수 있다. 최종 마이크로칩은 다이싱 처리하여 각각의 CSM 마이크로칩을 생성하거나 또는 MINDS 마이크로칩에 전부 사용될 수 있다.

<191> 특정의 실시태양에서, 마이크로칩은 디자인을 복제하기 위하여 방법, 예컨대 주입 성형, 고온 엠보싱, 적층 및 기타의 공지의 방법을 사용하여 플라스틱 및 기타의 물질중에서 생성될 수 있다. 마이크로칩을 생성하기 위한 이들 제조 방법의 적용은 본 개시의 범위내에 포함된다.

<192> DNA 분석 모듈의 특성화. 회전 스캐너를 사용하는 실시태양에서, 검출의 한계치는 유동중인 염료 용액 및, 내부 기준으로서 측정된 물 Raman 피크(2 개의 피크로부터,  $577.6\ \text{nm}$  및  $589.4\ \text{nm}$ )를 사용하여 측정할 수 있다. DNA 분석 모듈을 사용한 샘플 정화 및 분리 마이크로칩의 성능은 전체 부피 PCR 반응의 기준을 사용하여 특성화

한 후, 표준 PCR 생성물을 회석할 수 있다. 샘플 정화에 대한 변수(예, 로딩, 세정 및 용출 조건) 및 주입 및 분리에 대한 변수(시간, 전압, 분리 온도, 완충액 농도 등)는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 최적화될 수 있다. 품질값, 성공률 및 판독길이를 측정하고, 테스트 샘플 및 실제의 샘플과 비교할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 판독길이는 약 600 개의 염기 이상이 될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 친화성 포획의 재생을 테스트 하고, 성능 저하 이전의 실시 시간을 측정할 수 있다. 분리 매트릭스중에서 DMSO로 우레아를 부분 치환하는 것은 실시 시간을 감소시킬 수 있으며, 모세관내에서 긴 판독길이를 생성할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 마이크로칩은 각종 매트릭스 또는 코팅을 사용한 마이크로칩 수명을 결정하기 위하여 표준 샘플을 사용하여 반복 실시할 수 있다. 예를 들면, 8×BAC 라이브러리의 산탄 서열은 100 채널 DNA 분석 모듈 마이크로칩의 약 22 회 실시를 취할 수 있다.

<193> ii) DNA 분석 모듈을 갖는 통합된 사이클 시퀀싱 모듈

<194> CSM의 특징과 DNA 분석 모듈을 조합하면 Core MINDS 시스템을 생성할 수 있다. 상기 및 도 14에서 설명한 CSM 마이크로칩의 기본 유닛 디자인은 8" DNA 분석 모듈 마이크로칩상에서 포트 처리될 수 있다. 이는 100 쌍-말단 판독 친화성 샘플 정화 챔버 및 분리 마이크로채널과 통합된 쌍-말단 판독에 대하여 50 개의 100-nl 사이클 시퀀싱 샘플 제조 챔버를 갖는 마이크로칩을 생성할 수 있다. 시스템의 서비스는 마이크로유체 및 미니-로봇공학 온-칩 기능을 사용하여 마이크로칩을 작동 및 재생시킬 수 있다. 샘플을 로딩시키기 위한 외부 자동화를 포함하는 실시태양에서, Core MINDS 시스템은 통상의 방법론에 비하여 실질적으로 절감된 비용으로 매일 고품질의 시퀀스를 갖는 7 M염기를 생성할 수 있다.

<195> 계측. Core MINDS 시스템 계측에 대한 염기는 DNA 분석 모듈 계측이 될 수 있다. 스캐너는 변형 없이 사용할 수 있다. 전술한 CSM 마이크로칩 인터페이스 장치는 1) CSM 마이크로칩 기반 카트리지에서 액체의 이동을 조절하는 온-칩 미니-로봇공학의 외부 작동을 자동화시키고, 2) 열 순환을 위한 외부 가열 및 냉각을 조절하고 그리고 및 3) 사이클 시퀀싱 체제를 칩에 전달하기 위하여 주사기 펌프를 구동시키는 최소의 변형으로 직접 적용시킬 수 있다. 특정의 실시태양에서, Tecan 로봇은 필요치 않다. 1)의 경우, 온-칩 밸브의 외부 작동은 기기의 변형이 필요치 않은데, 이는 각각 작동 채널이 2 또는 400 개가 존재하건 간에 모든 채널에 대하여 1 개의 특정 밸브 전체가 서비스 될 수 있기 때문이다. 2)의 경우, 가열 및 냉각은 마이크로칩에 대하여 외부가 될 수 있으며, Peltiers의 저항 가열기 또는 스트립의 어레이가 될 수 있다. 가열기의 추가의 길이 및 수를 갖는 기하를 포함하는 설계에 의하여 변형이 달성될 수 있다. 열 관리는 시스템에 대하여 중요한 요건이 된다. 3)의 경우, 주사기 펌프는 추가의 펌프를 필요로 하지 않는다. 하기에서 설명한 서비스 채널의 추가는 하나의 주사기 펌프만이 모든 채널에 서비스되도록 하여야만 한다. 그래서, 기기 변형은 CSM 마이크로칩 인터페이스 장치의 부품을 DNA 분석 모듈 마이크로칩 인터페이스 장치와 조합하도록 할 수 있다.

<196> 특정의 실시태양에서, 마이크로칩 인터페이스 장치 및 마이크로칩 세부사항은 임의의 공간 또는 온도 충동을 배제시키도록 설계할 수 있다. 진공 척은 샘플 제조 및 정화 챔버에 대한 저온의 고리를 갖도록 변형될 수 있다. 합한 CSM 및 DNA 분석 모듈 마이크로칩 인터페이스 장치의 설계는 하기에서 논의한 온-칩 마이크로-로봇공학을 갖는 마이크로칩을 서비스하는 개념에 의하여 크게 간략화될 수 있다.

<197> 마이크로칩 및 작동. Core MINDS 마이크로칩은 CSM 마이크로칩 작용 및 설계를 DNA 분석 모듈로부터의 샘플 정화 및 분리와 직접 통합시킬 수 있다. 도 22는 일례의 설계에서 한쌍의 채널을 나타낸다. 밸브 및 펌프에 대한 작동 라인(314)은 마이크로칩상에서 원형 고리에 존재하며, 이들은 도 22에서는 수평선으로서 나타난 것에 유의한다.

<198> 샘플-PCR 생성물 또는 PCR 생성물을 갖는 비드-을 투입 저장기에 로딩시킬 수 있다. 기본 CSM 반복 유닛(약 200 회 반복할 수 있음)은 사이클 시퀀싱 믹스를 사용하여 100 nl 사이클 시퀀싱 반응 챔버(316)로 샘플을 펌핑 처리할 수 있으며, 4 개의 주위 밸브가 폐쇄되며, 사이클 시퀀싱이 발생한다. CSM에서와 같이 사이클 시퀀싱 이후에, 사이클 시퀀싱 생성물 및 반응물은, 전극 연결이 존재하는 것을 제외하고 물을 포함하는 저장기로 펌핑 처리할 수 있다. 샘플은 2 개의 쌍-판독, 친화성 포획 챔버(317-318)상에서 전기영동 처리할 수 있다. 오염물을 제거하고, 정제된 형광 표지된 사이클 시퀀싱 분절을 트윈-T 인젝터를 통하여 2 개의 분리 채널로 주입시킬 수 있으며; 이러한 유닛은 예를 들면 약 200 회 반복하여 400 개의 분리 채널을 산출한다. 분절은 고 성능 나노젤 또는 기타의 매트릭스에서 분리되어 회전 스캐너에 의하여 중심 부근에서 검출될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 약 100 개의 분리 채널을 갖는 8"를 사용하여 약 400 개의 분리 채널을 가질 수 있는 12" 웨이퍼의 1/4 섹션을 모델링할 수 있다.

<199> 마이크로칩은 45 분 분리 사이클 시간 및 45 분 사이클 시퀀싱 및 정화 사이클 시간을 제공할 수 있으며, 한쌍

의 관독 사이클 시퀀싱 반응 챔버는 2 개의 분리 채널을 제공할 수 있다. 이는 설계를 단순화하며, 필요한 밸브, 전극 및 채널의 수를 감소시킬 수 있다. 분리는 마이크로칩 재생 단독과 거의 연속될 수 있으며, 예비실시는 분리와 함께 사이클 시간을 공유할 수 있다. 35 분의 분리 동안 샘플 제조 사이클은 투입 저장기로 로딩된 샘플을 사용하여 다시 개시할 수 있다. 특정의 실시태양에서, 샘플은 분리 채널이 주입에 대하여 준비될 때까지 분리를 위하여 생성 및 준비될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 설명한 바와 같은 단일 분리 채널을 공급하는 복수의 사이클 시퀀싱 또는 유전형 챔버를 사용할 수 있다. 공통의 중앙 애노드를 갖는 것 이외에, 마이크로칩은 또한 완충 용량이 큰 마이크로칩의 원주 주위에서 실시되는 통상의 원형의 개방된 캐소드 채널을 가질 수 있다. 이러한 채널은 이온 고갈이 분리를 저하시키는 것을 방지하기 위하여 과잉의 완충 용량을 지닐 수 있으며, 전극 수 및 배치를 단순화하며, 완충액 및 잉여의 매트릭스를 제거하지 않고도 반복된 매트릭스 로딩을 가능케 할 수 있다. 또한, 마이크로칩은 서비스 채널(즉, 사이클 시퀀싱 믹스, 폐기물, 친화성 겔 중합체, 물)이 기타의 채널 상에서 가로지를 수 있도록 하는 3차원을 사용하여 설계 및 작동을 크게 단순화시킬 수 있다.

<200> 특정의 실시태양에서, 조합한 CSM 및 DNA 분석 모듈 마이크로칩 인터페이스 장치는 양면에서 에칭된 중앙 웨이퍼를 갖는 3차원 마이크로칩 설계를 사용하여 온-칩 미니-로봇공학을 사용하는 마이크로칩을 서비스 처리하는데 의존할 수 있다. 서비스 채널은 다층 설계에서 상이한 층을 밸브가 연결할 수 있는 능력에 기초한다.

<201> 도 12는 샘플 정화 챔버(321)에 새로운 친화성 포획 매트릭스를 제공하는 서비스 채널(320) 연결의 실시태양을 도시한다. 제시한 설계에서, 서비스 채널 유체 경로는 에칭된 웨이퍼(322)의 상부에서 좌측으로부터 투입되며, 분리 채널을 가로지르게 되며, PDMS 층상의 밸브(323)의 하나의 개구에서 올라간 후, 밸브의 제2의 개구의 위에서 진행된 후, 밸브의 제2의 개구 아래에서 2중 에칭된 웨이퍼의 바닥층으로 진행하며, 여기서 샘플 제조, 정화 및 분리 채널(321, 324)이 에칭된다. 그후, 서비스 채널 유체 경로는 친화성 포획 샘플 정화 챔버를 통과하며 (도면의 면에 수직으로 진행됨) 그리고 밸브를 통과하여 에칭된 마이크로칩의 상부에서 다시 합체된다. 이는 마이크로칩의 상부에서의 서비스 채널이 샘플 분리를 통과하게 되며, 다른 채널이 상부에서 방해 없이 통과하게 한다. 이와 동일한 원리는 분석 채널이 아닌 샘플 제조 채널에 적용할 수 있다. 각각의 서비스 채널은 넓고 깊을 수 있으며, 이는 사이클 시퀀싱 믹스를 전달하고, 2 개의 친화성 포획 매트릭스를 2 개의 샘플 정화 챔버에 다시 채우며, 세정액을 제공하여 샘플 제조 챔버를 복구하며, 모든 샘플 제조, 샘플 정화 및 분리 채널로부터 폐기물을 수집한다. 6 개의 서비스 채널은 마이크로칩상에서 동심 고리를 각각 형성한다. 이들은 주사기 펌프, 매크로단위 유체 또는 진공 라인에 연결된다. 2중 에칭된 웨이퍼 및 PDMS 사이의 "여분의" 웨이퍼 층은 관통 홀만을 포함한다. 에칭된 채널이 에칭된 웨이퍼의 양면상에 존재하기 때문에, 관통 홀은 사이클 시퀀싱 혼합물을 제외하고 비교적 클 수 있다.

<202> 마이크로칩의 재생은 하기와 같이 실시할 수 있다. 분리후, 중앙의 제대는 새로운 매트릭스를 채널로 밀어내며, 분리 채널을 채울 수 있다. 측면 채널상의 차동 채널 폭은 캐소드를 향하여 매트릭스를 보낼 수 있다. 특정의 실시태양에서, 2 개의 샘플 정화 챔버는 2 개의 서비스 채널을 사용하여 재생될 수 있다. 서비스 채널은 정상적으로 밸브에 의하여 폐쇄될 수 있다. 친화성 매트릭스를 교체하기 위하여, 밸브를 개방시키고, 채널에 대한 주사기 펌프를 활성화시키고, 새로운 친화성 매트릭스를 모든 정방향 챔버로 펌핑 처리할 수 있다(친화성 매트릭스의 로딩 1회당 복수의 실시가 가능할 수 있다). 유사한 시퀀스가 기타의 친화성 챔버에 대하여 발생한다. 사이클 시퀀싱 반응 챔버는 유사하게 세정 서비스 라인으로부터 챔버를 통하여 그리고 폐기물 저장기로 세정 용액을 펌핑 처리하여 세정할 수 있다. 완충액 저장기는 최상부의 웨이퍼 위에 커다란 통상의 저장기에 연결될 수 있다. 더 큰 부피는 증발 및 완충액 고갈의 충격을 최소화하고, 완충액 충전 및 플러시 처리를 단순화시킬 수 있다.

<203> 본 개시의 구체예는 하기의 실시예로부터 추가로 이해될 수 있으며, 이러한 실시예는 어떠한 방법으로도 본 개시의 범위를 한정하는 것으로 간주하여서는 아니된다.

## 실시예

<204> 1. 이. 콜리(*E. coli*)의 비드에 기초한 포획

<205> 자기 비드에 접합된 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 이용하여 회석 용액으로부터 모델 표적 유기체의 포획은 BPM 마이크로장치로 투입하기 위한 농축, 정제된 물질을 제공하는데 사용된다. 여기서, 이. 콜리(*E. coli*) 균주 0157에 대하여 접합된 항체를 갖는 DYNAL<sup>®</sup> 비드의 사용을 설명하고자 한다. 3 개의 일련의 실험을 실시하였다: (1) 회석한 스톱으로부터 이. 콜리(*E. coli*)를 포획시키고, (2) 다량의 과량의 바실러스(*Bacillus*)의 존재하에서 이. 콜리(*E. coli*)를 포획시키고, (3) Baltimore Air-Sampler로부터의 에어로졸 샘플로부터 이. 콜리

(*E. coli*)를 포획시킨다.

- <206> 우선, 식품 샘플중에서 이. 콜리(*E. coli*) 0157을 검출하는데 사용되는 DYNAL<sup>®</sup> "도포(swab) 프로토콜"을 적절한 성장 배지에 비드의 직접 평판 배양과 비교하였다. 트립티케이스 대두 한천(TSA)상에서의 비-병원성 균주 0157 및 이. 콜리(*E. coli*) ATCC 균주 700728의 직접 평판 배양이 약 5 배 이상의 콜로니를 산출하여 도포 방법 보다 포획된 유기체의 수의 더 우수한 평가를 제공하는 것으로 밝혀졌다. 그러므로, 이하의 모든 실험에서는 직접 평판 배양을 사용하였다.
- <207> DYNAL<sup>®</sup> 비드가 PBS/Tween 완충액중의  $10^5$  CFU/ml 내지  $10^1$  CFU/ml의 세포 역가 범위에 걸쳐 이. 콜리(*E. coli*)를 결합시키는 능력을 측정하였다. 이와 같은 그리고 하기의 면역자기 분리(IMS) 실험에서, 프로토콜은 250  $\mu$ l PBS/Tween중의 이. 콜리(*E. coli*)의 적절한 회수에 DYNAL<sup>®</sup> 비드의 5  $\mu$ l 현탁액을 첨가하고자 한다. 첨가된 비드를 갖는 세포를 흔들리는 플랫폼상에서 10 분간 뚜껑이 닫힌 플라스틱 마이크로퓨지관에서 혼합하였다. 그후, 비드를 강한 자석을 가진 튜브의 면에 대하여 포획시키고, 상청액을 제거하고(평판 배양을 위하여 보관함), 비드를 PBS/Tween 완충액으로 3회 세정하였다. 비드를 재현탁시키고, 비드의 회수를 평판 배양하였다. 여러 개의 실험에서, 세정물을 평판 배양하였다. 일반적으로, 세정물은 약간의 표적 유기체를 포함하며; 표적 세포를 비드 상에서 포획시키거나 또는 1차 상청액중에서 결합되지 않고 회수 가능하였다.
- <208> 도 35는  $2 \times 10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 20 및 2 세포/ml의 박테리아의 출발 농도에 대하여 포획을 3회 실시한 경우 PBS/Tween중에 회수된 이. 콜리(*E. coli*) 0157을 포획시킨 결과를 도시한다. 관찰된 포획된 세포의 수는  $10^5$  내지 10 세포/ml 범위에 걸쳐 선형( $R^2=0.995$ )이며, 포획의 효율은  $10^5$  내지  $10^3$  세포/ml 범위에 대하여 약 95%가 넘으며, 100 세포/ml에 대하여 87% 및 20 세포/ml에 대하여 69%로 떨어졌다. 기타의 실험(데이터는 제시하지 않음)은 일반적으로  $10^3$ - $10^5$ 의 이. 콜리(*E. coli*) 농도에 대하여 PBS/Tween로부터 85% 초과 회수율을 산출하였다.
- <209> 2. 모노클로날 항체를 사용한 이. 콜리(*E. coli*) 포획의 동적 범위
- <210> 포획 화학은 우선 튜브중에 250  $\mu$ l 부피로 실험하고, 포획 및 세정은 완충액에 분산된 모델 유기체를 사용하여 최적화하였다. 도 36은 DYNAL<sup>®</sup> 비드에 결합된 모노클로날 항체를 사용한 이. 콜리(*E. coli*)의 대표적인 포획을 나타낸다. 이. 콜리(*E. coli*) 0157은 각종 농도에서 250  $\mu$ l PBS/Tween중의 항-이. 콜리(*E. coli*) 0157 항체와 결합된 5  $\mu$ l의 비드에 첨가하였다. 혼합물을 회전하는 혼합기에서 10 분간 혼합하였다. 비드를 강한 자석을 사용하여 튜브쪽으로 당기고, 상청액을 제거하였다. 비드를 250  $\mu$ l PBS/Tween(PBST)로 3회 세정하였다. 세정한 비드를 250  $\mu$ l PBST에 재현탁시키고, 포획된 이. 콜리(*E. coli*)를 TSA상에서 계수하였다.
- <211> 도 36에 도시한 결과는 투여량 반응이 비드의 함량 및 이. 콜리(*E. coli*)를 포획시키는 능력 사이에서 발견되는 것으로 입증되었다. 도 36은 포획이 약  $10^6$  세포/ml 이하에서 직선형이며, 약  $4 \times 10^7$  세포/ml의 최대치에서 포획된다는 것을 나타낸다.  $10^6$  세포/ml 이상에서, 세포의 증가율은 상청액에서 복구된다. 이. 콜리(*E. coli*)로 포획된 DYNAL<sup>®</sup> 비드의 직접적 현미경 검사에 의하면 약 5 세포/비드인 것으로 밝혀졌다. 이러한 포획 방법은 15 분 미만 이내에 정제 및, 250  $\mu$ l에 포함된 표적 세포의 90% 이상의 평균치를 10  $\mu$ l 미만의 부피로 농축시킬 수 있는 능력을 입증한다.
- <212> 3. 모노클로날 항체를 사용한 이. 콜리(*E. coli*)의 특수 포획
- <213> 비드에 기초한 포획의 특수성을 측정하기 위하여, 표준 분석 조건하에서 이. 콜리(*E. coli*)를 항체-코팅된 비드에 결합시키는 것에 대하여 첨가된 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)(ATCC 11778) 세포의 영향을 테스트하였다. 약  $10^4$ 의 이. 콜리(*E. coli*)/ml의 현탁액을 다양한 역가의 비. 세레우스(*B. cereus*)와 혼합하고, 비. 세레우스(*B. cereus*)를 선택적으로 억제시키는 레벨에서 첨가된 테트라졸륨을 사용하여 TSA 배지상에서 복구되는 것을 제외하고 전술한 바와 같이 IMS를 실시하였다. 이는 세포 혼합물의 직접 평판 배양을 가능케 하나, 이. 콜리(*E. coli*)만이 복제되어 콜로니 형성 유닛(CFU)으로서 정량화될 수 있다.
- <214> 도 37에서 알 수 있는 바와 같이, 비. 세레우스(*B. cereus*) 첨가는 2 개의 미생물이 1/1의 비로 존재할 경우 비드에 결합된 이. 콜리(*E. coli*)의 양을 약 20%만큼 감소시키지만, 100,000 배 과량의 바실러스(*Bacillus*)만이



이. 콜리(*E. coli*) 결합을 대조군의 56%로 감소시킨다. 이와 같은 항체-세포 조합의 경우 DYNAL<sup>®</sup> 비드가 우수한 특수성을 산출할 수 있다는 것을 시사한다.

<215> 4. 모노클로날 항체를 사용한 에어로졸 샘플로부터의 이. 콜리(*E. coli*)의 포획

<216> 박테리아 세포를 효과적으로 포획, 정제 및 회수할 수 있는지를 알아보기 위하여 스펙터 인더스트리즈의 Baltimore Air-Sampler-유래 액체(BASL) 샘플 courtesy 90% (v/v)를 포함하는 용액으로부터 이. 콜리(*E. coli*) 0157을 복구하는 것으로 확대시키고자 한다. BASL은 항체-매개 결합 및 회수를 잠재적으로 방해하는 매우 다양한 경쟁 미생물, 화분 및 기타의 화학적 및 생물학적 물질을 포함한다.

<217> BASL 용액으로부터 이. 콜리(*E. coli*) 0157을 농축 및 회수하는 능력을 테스트하기 위하여, 순수한 배양액중에서 균주를 성장시키고, 대조군으로서 PBST 및 90% BASL중의  $10^2$ ,  $10^3$  및  $10^4$  CFU/ml의 역가를 생성하였다. DYNAL<sup>®</sup> 비드(항-0157 항체 함유)의 5  $\mu$ l 현탁액을 90% BASL 또는 PBST중의 이. 콜리(*E. coli*)를 포함하는 250  $\mu$ l 샘플에 첨가하고, 10 분 동안 흔들리는 플랫폼에서 배양한 후, 비드 포획을 실시하였다. 상청액을 제거하고, 비드를 PBST로 3회 세정하고, PBST에 재현탁시켰다. 1차 상청액 및 비드를 CFU의 수를 측정하기 위하여 평판 배양하였다. 모든 평판 계수는 MacConkey-Sorbitol 한천을 사용하여 측정하고, Cefixime 및 Tellurite(CT-SMAC)를 첨가하였다. CT-SMAC는 BASL에 함유된 커다란 수의 유기체로부터 비-이. 콜리(*E. coli*) CFU의 전체 수를 감소시키는 작용을 하는 이. 콜리(*E. coli*) 0157에 대한 반-선택적 배지이며, 이는 소르비톨의 발효에 의한 0157의 비색 표시를 제공한다.

<218> 이. 콜리(*E. coli*) 0157의 우수한 결합 및 회수는 90% BASL을 포함하는 용액으로부터 표준 IMS 프로토콜을 사용하여 얻었다(도 38). 일반적으로, 세포의 90% 초과하는 IMS 비드에 결합되며, 세포가 PBST 또는 90% BASL에 분산되는지의 여부와는 상관 없이 회수되었다. 이는  $10^4$ ,  $10^3$  및  $10^2$  CFU/ml로부터 테스트한 세포 농도 범위에 걸쳐 해당된다.

<219> 도 39는  $10^4$  CFR/ml 역가에 대하여 구체적으로 설정된 데이터를 도시한다. 첫번째 막대 및 세번째 막대는 대조군의 역가를 나타낸다. 두번째 막대는 샘플을 대조군으로서 PBST에서 단독으로 실시한 경우 비드 분획 및 상청액 분획에서 회수한 세포의 비율을 나타낸다. 네번째 막대는 실험을 90% BASL에서 단독으로 실시한 경우의 비드 분획 및 상청액 분획에서 회수한 세포의 비율을 나타낸다. 본 실험은 BASL에서의 성분이 적어도 이러한 항체 및 이의 에피토프에 대하여 결합 및 회수를 방해하지 않는다는 것을 나타낸다.

<220> 5. 고상 추출(SPE)

<221> 본 실험은 방해 화합물이 유통되도록 하면서 작은 표면에서 분석물을 결합시키는, 리터 이하의 샘플 부피를 처리할 수 있는 오프-칩 1회용 유통형 장치에 대한 SPE를 평가하였다. 결국, 표적 분석물은 마이크로칩 기반 바이오프로세서에 의한 하류 처리를 위하여 농축된 형태로 회수될 수 있거나 또는 SPE 물질 자체는 마이크로칩을 위한 피드스톡이 될 수 있다.

<222> 본 실험은 이. 콜리(*E. coli*)의 실리카 매트릭스 SPE 포획을 평가하였다. 기본적인 기구는 고상을 통하여 다양한 역가를 갖는 박테리아를 실시하고, 소 부피의 백-플러쉬로 용출시킨 후, 박테리아 함량에 대한 상청액 및 용출액을 분석하고자 한다. 하기의 실험에서, 이. 콜리(*E. coli*)의 DH5a 균주(인비트로젠 테크놀로지스)는 PBS/Tween(PBST)중에서  $10^4$ - $10^2$  세포/ml 범위의 희석으로 생성하였다. 100 mg 고체상을 갖는 노출된 실리카 Extract-Clean SPE 카트리지(알테크 어소시에이츠)를 모든 실험에서 사용하였다.

<223> 각각 카트리지의 경우: (1) 18 ml의 박테리아/효소 혼합물을 약 5 ml/분의 유속으로 SPE 층을 통하여 실시하고; (2) 상청액을 수집하고, 박테리아 역가에 대하여 분석하고; (3) 카트리지를 2 ml의 완충액 및 용출액으로 백-플러쉬 처리하고, 박테리아의 수를 측정하였다. 상기에서와 같이 TSA상에서 37°C에서 박테리아 성장에 의하여 분석을 실시하여 박테리아의 상대적 포획 및 회수를 측정하였다.

<224> 6. 유통형 방식의 SPE 배지에 의한 박테리아의 보유

<225> 도 40은 로딩된 샘플, 후-SPE 상청액(미결합) 및 용출액중에서의 박테리아 농도에 대한 박테리아 분석의 결과를 도시하며, 여기서 샘플은 박테리아 농도가 25,000 또는 45,000 CFU/ml로 비교적 높다. 이러한 범위내에서, 80 내지 90%의 이. 콜리(*E. coli*)는 SPE 매트릭스상에서 보유되며(도 41), 소량의 박테리아가 통과하며, 매우 소량(1%)이 역세척에 의하여 회수되었다. 그래서, 실리카상에서 강한 결합이 나타났으며, 생육 가능한 세포에서는

용출이 불량하다. 매우 낮은 역가 125 및 250 CFU/ml에서, 더 많은 세포가 비례하여 컬럼을 통과하며, 약 20%만이 보유되었다(데이타 도시하지 않음).

<226> 7. 유통형 방식의 SPE 및 아가로스 "Big Beads" 배지에 의한 단백질( $\beta$ -갈락토시다제)의 보유

<227> 일부 실시태양은 생체물질을 포획 또는 정제시키기 위하여 아가로스를 주성분으로 하는 "Big Beads"를 사용하였다. 시판중인  $\beta$ -갈락토시다제(시그마)를 100 및 10 ng/ml의 2 가지의 농도에서 0.1 M 인산염 완충액, pH 7.5, 1 mM  $MgCl_2$ 에 용해시켰다. 이들 2 개의 용액은 50 Å 공극 크기를 갖는 100 mg의 50  $\mu m$  실리카 입자 또는, 500  $\mu m$  경화된 아가로스 비드를 갖는 5 ml "Big Beads" 컬럼을 포함하는 "Extract Clean" SPE 카트리지(알테크)를 통하여 실시하였다. 아가로스 및 실리카 유래 배지 모두의 경우, 효소 용액(20 ml)은 약 5 ml/분의 유속에서 각각의 SPE 층을 통하여 실시하고, 상청액을 수집하고, 카트리지를 약 1 ml/초의 유속으로 2 ml의 완충액으로 백-플러쉬 처리하였다. 상청액 및 용출액은 기질로서 o-니트로페닐- $\beta$ -갈락토시드(ONPG)를 사용하여 효소 활성에 대하여 분석하였다.

<228> 도 42는 10 및 100 ng/ml 효소 농도 모두에서 2 가지 매트릭스에 대한 "상청액", "용출" 및 "보유된" 분획에서의  $\beta$ -갈락토시다제 활성의 분포 그래프를 도시한다. "보유된"은 로딩, 유통 및 용출 사이에서의 차이에 의하여 계산한다. 실리카계 SPE 배지의 경우, 약 75%의  $\beta$ -갈락토시다제가 유통되고, 상청액에서 회수되었다. 매우 적은 효소(1-2%)는 백-플러쉬 처리된 용출액에서 검출된다. 그러므로,  $\beta$ -갈락토시다제의 약 25%는 컬럼에서 보유된다. "Big Beads" 배지의 경우,  $\beta$ -갈락토시다제의 85-99%는 컬럼을 통하여 흐르는 반면, 5% 미만은 용출액에서 회수된다(도 42). 이는 매우 소량, 약 0-10%가 매트릭스상에 보유된다는 것을 의미한다. 그러므로, 이들 배지는 보유된 물질로부터 표적 분석물, 예컨대 독소를 분리하기 위하여 유통형 방식에서 유용하다.

<229> 8. 유통형 방식에서의 포획 배지로서 아가로스 "Big Beads"에 의한 이. 콜리(*E. coli*)의 보유

<230> 본 실험은 아가로스 Big Beads 카트리지가 이. 콜리(*E. coli*) 균주 DH5  $\alpha$ 를 선택적으로 결합 및 농축시키는 능력을 평가하였다. 도 43은 2,000 또는 4,700 CFU/ml의 초기 세포 농도에서 실시한 Big Beads 포획 실험으로부터 얻은 분획중의 이. 콜리(*E. coli*) DH5  $\alpha$ 의 분포를 도시한다. 이러한 실험은  $10^4$  또는  $10^3$  CFU/ml에서 20 ml의 박테리아 현탁액을 사용하여 0.1 M 인산염 완충액, pH 7.5, 1 mM  $MgCl_2$ 중에서 실시하였다. 분석은 TSA 평판상에서 성장이다. 더 낮은 역가(2,000 CFU/ml)에서, 박테리아의 >70%는 유통형 분획에서 회수되며, 1% 미만은 백-플러쉬 처리된 용출액중에서 회수되었다. 더 높은 역가(4,730 CFU/ml)에서, 박테리아의 >80%는 유통형 분획에서 회수되며, 5% 미만은 용출액중에서 회수되었다. 박테리아의 25-10%만이 Big Beads 매트릭스에 결합된 채 보유되었다.

<231> 9. 나노바이오프로세서 마이크로칩

<232> 마이크로유체 장치의 미세가공은 문헌[Liu et al. 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(10):5369-5374]에 기재되어 있는 바와 같이 실시하였다. 간단히, Borofloat 유리 웨이퍼를 세정하고, 비정형 실리콘 마스크를 증착시킨 후, HMDS층의 접착층 및 포토레지스트층을 증착시켰다. 포토레지스트는 마스크를 통하여 UV광으로 패턴을 형성시키고, 채널 패턴은 진한 HF를 사용하여 통상적으로 유체 웨이퍼상에서의 채널의 경우 40  $\mu m$ 의 깊이로 그리고, 매니폴드 웨이퍼의 경우 70  $\mu m$ 의 깊이로 화학적 에칭 처리하였다. 포토레지스트 및 비정형 실리콘을 스트리핑으로 제거하고, 액세스 홀은 다이아몬드 드릴을 갖는 CNC-미니분쇄기를 사용하여 천공시켰다. 이들 홀은 반응 및 검출 챔버로서 4 층의 마이크로칩에 사용될 수 있다. 또한, 모든 홀을 동시에 천공시키기 위하여 초음파 천공을 사용한다. 세정후, 유체 웨이퍼 및 비아 웨이퍼를 정렬시키고, 열을 사용하여 접합시켰다. 매니폴드 웨이퍼 및 PDMS 멤브레인을 첨가하여 4층 마이크로칩을 생성하였다.

<233> 2 개의 나노바이오프로세서 마이크로칩을 설계 및 제작하였다. 제1의 마이크로칩, MBI-11(240)(도 19)은 다양한 규모로 필수 마이크로유체 처리 온-칩 부품을 분리 및 테스트하도록 설계하였다. 이는 (1) 밸브 설계, (2) 반응 챔버 설계, (3) 집단(ganging) 반응 및 (4) 라우터 설계의 실시태양을 예시한다. 각각 엘리먼트의 작업은 8 개의 채널, 실제 규모(full-scale)의 공기 시스템(241)에 의하여 제어되어 밸브, 펌프 및 라우터를 작동시킨다. 3 층 및 4층 칩에서의 MOV 밸브, 펌프 및 라우터의 작동을 테스트하였다. 칩의 각각 엘리먼트는 8-채널 실제 규모 공기 부스와 인터페이스 처리되도록 하여 밸브 작동을 촉진하도록 설계하였다.

<234> 제2의 나노바이오프로세서 마이크로칩, MBI-12은 샘플 제조와 별도로 그리고 샘플 제조와 결합하여 사이클 시퀀싱 또는 PCR에 대한 비드로부터의 샘플 제조 모두를 테스트하고,  $\mu$ CAE를 테스트하기 위하여 개발하였다. 도 20에 도시한 마스크 디자인을 에칭 처리하고, 작용성 4층 마이크로칩으로 조립하고, 테스트하였다. MBI-12는  $\mu$

CAE 채널의 여러 가지 설계 및, 이를 상류 샘플 제조 장치에 연결시키는 방법을 포함한다.

- <235> MOV 밸브, 펌프 및 라우터를 사용하고 그리고 딥(deep) 챔버, 예컨대 비아에서 잘 작동하는 표면 탄성파(SAW) 혼합을 사용한 혼합을 예시하였다. SAW는 마이크로칩중의 챔버내에서 맥동 내부 기압파를 생성하고, 용액을 균질화시켜 이들을 혼합한다.
- <236> 마이크로 및/또는 나노단위 부피를 혼합하는 것을 달성하기가 곤란할 수 있으며, 통상적으로 확산에 의하여 제한될 수도 있으나, 본 명세서에 개시된 MOV 밸브, 펌프 및 라우터는 혼합을 향상시키며, 용액을 혼합하는 시간을 실질적으로 단축시킬 수 있다. 각종 예시의 실시태양에서, 본 명세서에 개시된 1 이상의 밸브, 펌프, 및/또는 라우터는 각종 기하 또는 포맷으로 정렬되어 2 이상의 액체를 순차적으로 또는 거의 동시에 혼합하는 것을 촉진시킬 수 있다. 혼합의 속도 및 정도는 의료인의 판단하에 선택될 수 있다. 각종 예시의 실시태양에서, 혼합은 신속하게 이루어질 수 있고 및/또는 거의 완료될 수 있다. 당업자는 혼합의 속도 및 정도가 유체의 수 및 유형, 부피 및 혼합성에 의존할 수 있다는 것을 숙지할 것이다. 혼합의 소정의 속도 및 정도의 선택은 당업자의 권한에 포함된다. 각종 예시의 실시태양에서, 혼합은 MOV 밸브 및/또는 펌프를 라우터로서 또는 "T" 혼합기내에서 사용할 수 있을 경우에 실시될 수 있다. 특정의 실시태양에서, 용액은 라우터를 통한 유체의 정방향 및 역방향 이동에 의하여 또는 2 이상의 펌프에 의한 "T" 구조체 구동에 의하여 혼합될 수 있다.
- <237> 10. 생물방어를 위한 샘플 제조를 실행하는 나노바이오프로세서
- <238> 이와 같은 바이오프로세서 모듈은 상류 공기 샘플 수집기 또는 기타의 투입 장치로부터 샘플을 수용하며, 기록 및 재시험을 위하여 분액을 생성하고, 샘플을 용해시키고, 샘플을 생성 및 표지화하고, 이들을 분석을 위한 단일 분자 형광 보정 검출기로 배출시킨다. 바이오프로세서 모듈은 유체를 수용하는 1회용 플라스틱 카트리지와, 카트리지를 작동시키는 기기를 포함한다.
- <239> 분석 이전에, 샘플을 분배하고, 이를 분액으로 나눈다. 자동화된 마이크로유체 프로세서는 1) 테스트를 위하여 핵산을 제조하고; 2) 테스트를 위하여 단백질을 생성하고; 3) 검출을 위하여 세포를 생성하고; 4) 양의 샘플 및 법의학 분석의 재시험을 위하여 기록할 수 있다.
- <240> 카트리지는 "CD" 포맷으로 존재하며, 섹터에서 카트리지 1 개당 바이오프로세서 유닛 12 개를 가지며, 각각 유닛은 단일 샘플에 사용하였다. 카트리지는 바이오프로세서 유닛에서의 하나의 샘플을 처리한 후, 이를 회전시켜 그 다음 바이오프로세서 유닛에서의 그 다음 샘플을 수용한다. 2 시간의 샘플링 형태의 경우, CD 체인저와 유사한 미니-카루젤에 저장된 카트리지 세트로부터 매일 자동적으로 카트리지를 변경시킨다. 카트리지 및 체제를 재공급하기 위한 수동 간섭은 2 주당 약 1회 실시한다.
- <241> 기기는 저장, 체제의 로딩, 실시 및 카트리지 변경의 역학을 제공한다. 이러한 기기는 1) 밸브 및 펌프를 작동시키기 위하여 가압 또는 진공을 전달하는 솔레노이드를 개방 및 폐쇄시키는 작용, 2) 카트리지의 부위를 가열 및 냉각시키는 작용, 3) 카트리지를 미니-카루젤로 그리고 미니-카루젤로부터 이동시키는 작용, 4) 미생물을 초음파 분열시키는 작용 그리고 4) 필요할 경우 기타의 작용을 갖는다.
- <242> 11. 생물방어를 위한 유전적 분석을 실시하는 나노바이오프로세서
- <243> 샘플 농축 모듈. 매크로단위에서 출발하여, 표적 유기체의 표면 에피토프에 대한 항체로 개질된 자기 비드를 챔버에서 밀리리터 부피의 공기 수집기(210) 유출물(또는 기타의 매트릭스로부터 생성된 슬러리)에 첨가하였다(도 8). 비드는 각각의 유기체, 아형, 종 등에 대하여 특이성을 갖는 항체로 코팅된 비드 세트의 혼합물이다. 조사하고자 하는 유기체의 범위는 추가의 체제 혼합물을 사용하여 연장될 수 있다. 비드는 세정에 의하여 오염물을 제거하면서 표적 유기체를 포획시켜 제1의 차원의 선택성 및 특이성을 제공한다. 표적 유기체를 포함하는 비드는 SCPM 211에서 자석에 의하여 수집한다.
- <244> 샘플 증폭 및 분석 모듈. 이제, 마이크로단위로 들어가보면, 마이크로유체 단위에서 발생하는 모든 추가의 조작으로 나노바이오프로세서(NBP) 마이크로칩(213)상에서 용해 완충액을 포함하는 저장기(212)로 비드를 로딩시켰다. NBP 마이크로칩(200)(도 18)은 조절 엘리먼트로서 마이크로유체 온-칩 밸브 및 펌프를 사용하여 각각의 바이오프로세서 유닛에서 샘플을 처리하도록 설계하였다. 음과 처리하여 포자 및/또는 세포를 분열시키고, DNA를 방출시키는 위어(222)에 의하여 포획될 때까지 저장기(221)로부터 비드를 펌핑 처리한다. DNA는 반응 챔버(223)로 이동되고, 여기서  $\mu$ RT-PCR를 위한 프로브를 포함하는 특이성 프라이머를 갖는 PCR 체제는 온-칩 펌프에 의하여 첨가되고,  $\mu$ RT-PCR이 다중화된 반응으로 실시되어 제2의 생화학적 차원의 선택성 및 특이성을 제공한다.

- <245> RT-PCR이 강력한 분자 진단 도구이기는 하나, RT-PCR이 높고 가변적인 배경을 겪게 되는데, 이는 형광제가 뉴클레아제, 비-특이성 확장 또는 기타의 메카니즘에 의하여 종결되지 않기 때문이다. 거짓 양성을 최소로 하기 위하여 가상의 양성  $\mu$ RT-PCR 샘플을 추가의 선택성 및 특이성을 위하여 신속하게(<5 분) 온-칩 마이크로채널 모세관 어레이 전기영동 분리(224)에 의하여 분리하였다. 상이한 분절 길이를 갖는 생성물은 생명정보 프라이어 디자인에 의하여 생성되며, 마이크로채널 전기영동 분리 및 형광 발광에 의하여 구분되며, 분절 크기에 의하여 진실 양성 확인 및 구별로 PCR 반응의 복잡성을 증가시키게 된다. 96 개 이상의 바이오프로세서 유닛은 마이크로칩(225)상에서 방사상으로 배치된다(도 18). 96 개의 채널 마이크로칩은 1 시간당 단일 채널을 사용하여 4 일 동안 작동된다.
- <246> 12. 나노바이오프로세서에서 실시된 EXPAR 반응
- <247> EXPAR는 올리고뉴클레오타이드 서열, 열 안정성 폴리머라제 및 틸내기 효소를 사용하여 60°C에서 DNA의 짧은 분절을 특이적으로 증폭시키기 위한 신속한 등온 방법이다. 생성물은 형광 또는 MS에 의하여 검출된다. EXPAR 반응은 나노바이오프로세서에서 유전자 테스트, 유전자 발현 측정, 분자 진단학, 생물방어 및 기타의 적용예에 대하여 실시할 수 있다.
- <248> 반응 믹스를 샘플에 단일 단계로 첨가하고, 열 안정성 폴리머라제 및 틸내기 효소는 마이크로채널에서 대부분의 기타 단백질과 같이 실시된다. EXPAR은 약간 변형시킨 후 도 15 및 도 20에 도시된 마이크로칩에서 또는 도 13에 도시한 마이크로칩에서 실시한다. 핵산, DNA 또는 RNA는 마이크로채널, 예컨대 표지된 IMS 투입구(250)에서 MOV 펌프(251)를 사용하여 챔버로 이동한 후, 단일 반응 믹스는 제제 채널(252)중 하나로부터 첨가된다. 유체 회로는 1 이상의 반응물을 반응 챔버(253)에 첨가하기 위하여 사용한다. 반응 챔버의 온도는 임의로 조절된다. 반응후, 처리한 샘플은 MOV 펌프를 사용하여 저장기 또는 튜브(254)로 오프-칩 MS에 의한 분석을 위하여 펌핑 처리하거나 또는 형광, 화학발광 또는 기타의 검출 방법에 의하여 온-마이크로칩을 분석한다. 분석을 위한 단일 채널 이외에, 샘플을 MOV 라우터를 사용하여 다수의 채널로 분할시킨 후 복수의 EXPAR을 실시한다.
- <249> 13. 나노바이오프로세서에서 실시한 RiboMaker 반응
- <250> RiboMaker 검출 시스템은 Artificial Promoter Complexes(APC) 및 RiboLogs™로 지칭되는 뉴클레오타이드 유사체를 사용하여 abscorption™로 지칭되는 RNA 폴리머라제(RNAP) 전사의 불완전 개시를 기초로 한다. APC는 50-450 개의 트리뉴클레오타이드 불완전 생성물/분/부위를 생성하기 위한 RNAP 폴리머라제에 대한 개시 부위를 제공한다. 검출은 MS 분석, 형광, 화학발광 또는 당업자에게 공지된 기타의 방법에 의하여 실시될 수 있다. DNA 또는 RNA 분석의 경우, APC는 표적 부위 프로브에 대한 특이성을 제공하는 인접 서열을 포함할 수 있다. 상이한 중량 단위를 갖는 RiboLogs는 부위가 결합된 것을 확인할 수 있다. 조사하고자 하는 시퀀스의 상이한 부분에 복수의 APC를 결합시켜 RiboLogs의 지문이 생물방어를 위한 추가의 특이성 정보를 제공할 수 있으며, 이는 거짓 양성 및 거짓 경보를 배제시키는 것을 도울 수 있다. 단백질의 경우, APC 유닛은 항체에 결합될 수 있다. RiboMaker 검출은 신속하며, 직선형이고, PCR보다 억제에 대하여 덜 민감한 것이 요구된다.
- <251> RiboMaker 반응은 나노바이오프로세서 마이크로칩, 예컨대 도 13의 것에서 실시된다. 단일 APC 제제의 첨가에 이어서 단일 반응 믹스는 2 가지의 혼합 단계를 필요로 한다. RiboMaker 샘플이 비드상에서 포획될 경우, 비드는 IMS 투입구(도 13)를 통하여, 임의로 위어 또는 자석을 갖는 반응 챔버로 진행되어 비드를 포획하게 된다. APC는 제제 채널중 하나를 사용하여 첨가한다. RiboLogs는 제2의 제제 채널로부터 첨가된다. 필요할 경우, 반응은 펌프 A 및 B 사이에서 정방향 및 역방향으로 이동된다.
- <252> 14. 마이크로칩 CMS 어레이 디자인
- <253> 16 개의 채널 마이크로칩(270)의 실시태양을 도 23에 도시한다. 밸브 및 펌프에 대한 작동 라인(271)은 수직으로 진행하며, 외부 작동 라인이 연결될 수 있는 마이크로칩의 바닥의 바이어스에서 종료된다. 사이클 시퀀싱 혼합물은 주사기 펌프를 경유하여 좌측에서 채널(272)로 제공되며, 마이크로칩을 재생시키기 위한 물 또는 완충액은 우측에서 채널(273)로 제공된다. 이들 "서비스" 채널 모두는 다중화되어 전체 16 개의 채널을 공급하며, 온-칩 펌프 또는 밸브(274) 각각은 흐름을 조절하도록 한다. 이와 같은 마이크로칩은 유리 웨이퍼 및 PDMS 멤브레인으로부터 4층 장치로서 구조된다.
- <254> 15. 완전 MINDS 시스템
- <255> 완전 MINDS 시스템을 생성하기 위하여, Core MINDS 시스템으로부터의 계측은 변형된다: 1) 비드 서비스 채널이 추가되며, 비드 분류 방법과 인터페이스 처리되어 각각의 비드를 전달하며; 2) 마이크로칩 인터페이스 장치상의



저항 가열기 디자인 및 전극 고리는 마이크로칩으로 변경되며; 3) 단일 비드가 반복적으로 로딩 및 언로딩되는 지를 확인하기 위한 마이크로칩 변경.

- <256> MINDS 마이크로칩의 설계는 도 24에 도시한다. 마이크로칩은 비드 서비스 채널이 330을 투입구 라인으로 보내고, 샘플 부피는 25 nℓ로 4배 감소되고, 위어가 사이클 시퀀싱 챔버에서 형성되어 비드를 포획시키는 것을 제외하고, 도 22에 도시한 Core MINDS 마이크로칩과 유사하다. 단일 비드는 투입구 채널을 통하여 투입된다. 위어는 2 μm만 예칭되며, 이는 추가의 마스크 및 제조 단계를 필요로 한다.
- <257> 단일 비드는 전극을 향한 채널만을 갖는 사이클 시퀀싱 챔버로 그리고, 유동중인 친화성 포획 챔버로 펌핑 처리한다. 위어는 비드의 이동을 중단시킨다. 일단 비드가 로딩되면, 정방향 및 역방향 쌍-말단 판독 모두에 대한 프라이머와의 25 nℓ의 사이클 시퀀싱 혼합물은 온-칩 펌프에 의하여 반응 챔버로 펌핑 처리된다. 챔버에 이웃한 밸브를 닫고, 온도를 순환시킨다. 순환후, 사이클 시퀀싱 혼합물중의 사이클 시퀀싱 생성물은 전극 저장기(6)로 펌핑 처리하고, 2 개의 샘플 정화 챔버로 전기영동 처리하고, 상기에 기재한 바와 같이 거의 처리하고, 각각 쌍-말단 판독을 별도의 분리 채널에 주입하였다. 폐기물을 보내는 밸브를 개방시키고, 비드를 세정 라인에 의하여 폐기물 채널로 플러쉬 처리한다. 분리 재생은 상기 기재한 바와 같이 실시한다.
- <258> 단일 비드는 1) 잘 분리되는 비드의 마이크로유체 스트링을 조작하고, 이들을 각각의 채널로 직렬로 또는 병렬로 이동시키며, 2) 각각의 채널중의 비드의 "통"으로부터 공급하고, 이를 동시에 사이클 시퀀싱 반응기로 분배시키고, 또는 3) "집어서 배치하는(pick-and-place)" 조작에 대하여 모세관의 단부에서 각각의 비드 또는 픽업을 자기 조작하여 각각 채널로 공급하게 된다. 비드 접근의 스트링을 위하여, 비드는 가능한한 비혼화성인 액체의 볼루스, 예컨대 FluorInert(3엠)에 의하여 그 다음의 것으로부터 공간 분리된다. 사이클 시퀀싱 및 PCR 반응에서 FluorInert의 볼루스를 이전에 성공적으로 사용하였었다. 비드 스트링은 거친 위치로 함께 이동된다. 그후, 밸브는 순환중인 비드 서비스 채널상에서 폐쇄되고, 비드를 로딩 채널로 이동시키기에 충분히 긴 개개의 사이클 시퀀싱 챔버를 통하여 흐름을 전환시킨다. 로딩 채널상의 밸브를 폐쇄시키고, 비드 서비스 채널상의 밸브를 개방시키고, 그 다음의 비드를 그 다음의 채널에 배치하였다. 또한, 평행한 변경이 가능하며, 로딩 시간을 최소로 할 수 있다. 또한, 광학 비드 센서는 시간을 조절하고, 흐름을 공급하는 것을 도울 수 있다.
- <259> MINDS 시스템은 여러 나노리터의 펌프 부피를 감소시키기 위하여 50 μm의 레이저 천공된 테스트 홀을 갖는 펌프 및 밸브를 사용한다. 또는, 250 μm 홀을 갖는 밸브는 각각의 사이클상에서 부분 "스트로크"를 사용하여 부분적으로 개방된다. 챔버를 둘러싼 밸브는 펄스 처리되어 비드를 챔버내에서 이동시키거나 또는 외부 초음파 혼합을 적용한다. 표면 상호작용은 필요한 만큼 적용된 표면 변경을 갖는 첨가제에 의하여 개선된다.
- <260> 직접 주입의 경우, 샘플 정화 매트릭스는 분리 채널과 일직선으로 배치된다. 도 44에 도시한 바와 같이, 이와 같은 디자인은 샘플 정화 챔버를 분리 채널의 캐소드쪽으로 이동시킨 것을 제외하고, 비드 및 샘플 정화를 위한 사이클 시퀀싱 챔버의 알려진 엘리먼트를 갖는다. 사이클 시퀀싱 샘플은 샘플 정화 매트릭스상에서 전기영동 처리되고, 오염물은 필요할 경우 플러쉬 처리되는 캐소드 챔버로 제거된다. 깨끗한 샘플은 샘플 정화 매트릭스상에서 날카로운 밴드내에 존재하며, 챔버를 가열하여 방출되고 분리가 개시된다. 이는 분리 채널상에서 날카로운 밴드를 부피 주입한다. 그러므로, 각각 샘플 정화 매트릭스상에서 수집한 모든 샘플은, 트윈 T의 로딩만이 샘플의 분획을 분석하도록 하는 통상의 트윈 T 주입에서 발견되는 "헤어 컷"과는 반대로 분석된다.
- <261> 16. 온-칩 MOV 장치를 사용한 혼합
- <262> 4층 마이크로칩은 온-칩 MOV 장치를 사용한 혼합을 예시하는데 사용한다. 혼합 예시는 MBI-13 마이크로칩-볼루스 혼합, 라우터 혼합 및 "T" 혼합에서 제조한 혼합기의 3 가지 상이한 디자인을 사용한다. 물 및 Brilliant Red 염료 용액을 혼합하였다.
- <263> 이들 디자인은 (1) 2 개의 대향 MOV 펌프(도 45), (2) 공기에 의하여 분리되는 볼루스를 생성하기 위한 2 개의 대향 MOV 펌프와 제3의 펌프 및 (3) 2 개의 흐름을 혼합하기 위하여 라우터를 사용한다. 모든 칩 혼합 디자인은 맑은 물 및 적색 염료 용액의 우수한 혼합을 나타낸다. 펌핑 시퀀스중에, 최종 밸브에서 배출되는 액체의 일부분의 정방향 및 역방향으로의 이동을 관찰하였다. 최종 밸브는 채널로부터 액체의 부피를 흡인시키는데, 이는 채널이 개방되었기 때문이다. 이러한 이동은 밸브 내부에서 우수한 혼합을 생성한다.
- <264> 도 46에 제시된 구조체는 볼루스를 생성하는데 사용된다. MOV 라우터는 공기에 의하여 분리된 볼루스를 형성하기 위하여 청색 반응 챔버로의, 2 개의 벽(1 및 3으로 표시)으로부터의 5 개의 밸브 펌프 제제 그리고, 벽(2)으로부터의 공기에 의하여 형성된다. 각종 논문에는 벽면과 접촉하는 물질이 느려짐에 따라 볼루스의 내부에서 혼합을 생성하는 벽의 전단력에 의하여 구동되는, 볼루스의 내부에서 우수한 혼합을 나타낸다. 이 경우, 혼합은

복수의 펌핑 단계중에 2 가지의 제제를 공기 채널로 정방향 및 역방향 이동시켜 보조된다. 하나는 염료 그리고 나머지는 단순히 물인 2 가지 용액을 사용함으로써 볼루스가 반응 챔버에 도달하는 시간까지 변색이 관찰되지 않았다.

- <265> 도 45는 볼루스 및 라우터 혼합을 위한 예시의 칩 디자인을 도시한다. 혼합된 액체/공기 볼루스는 포트(1)부터의 물, 포트(2)부터의 공기 그리고 포트(3)으로부터의 적색 염료를 펌핑 처리하여 생성된다. 반응 챔버를 가로질러 색상 차이는 관찰되지 않았다. 라우터에서의 제제(1) 및 제제(3)의 혼합은 포트(2)의 폐쇄된 상태를 유지하여 실험하였다. 각각의 펌핑 사이클에서, 물 및 염료는 층류 모드로 라우터에 투입되고(라우터는 절반은 백색, 절반은 적색으로 나타남), 혼합은 배출구 밸브에서 그리고 채널의 도입부에서 개시된다. 그 다음 펌핑 사이클은 밸브가 개방될 때 배출구 밸브의 부피에 해당하는 부피를 채널로부터 다시 흡입시킨다. 이와 같은 배출구 밸브 내부에서의 정방향 및 역방향 이동은 매우 효과적인 혼합 효과를 생성한다. 다시, 반응 챔버에는 색상 차이가 관찰되지 않았으며, 이는 적어도 현미경적 규모에서는 균일한 혼합에 해당한다.
- <266> 도 47은 "T" 혼합에 대한 예시의 칩 디자인을 도시한다. 우수한 혼합은 펌프 배출구 밸브 내부에서 "정방향 및 역방향" 이동으로 인하여 "T" 연결부로부터 수 mm에서 관찰된다. 2 mm 반응 챔버에서는 색상 차이가 관찰되지 않았다. 이와 같이 특수한 "T" 혼합에 대한 이해를 돕기 위하여, 하기의 무비 프레임(도 48)이 과정을 예시한다. 단계 1에서 투입구 밸브가 개방되고, 배출구 밸브가 폐쇄된다(혼합된 용액은 주요 채널로 보내진다). 펌프 밸브는 단계 2에서 개방된다(물에서의 적색 염료의 더 많은 확산이 관찰될 수 있다). 단계 4에서 투입구 밸브가 폐쇄되고, 배출구 밸브가 개방된다(반-혼합된 용액의 플러그는 주요 채널로부터 다시 흡입된다). 단계 4에서 펌프 밸브가 폐쇄된다(새로운 용액 슬러그가 보내지며, 주요 채널에서는 층류가 관찰될 수 있다).
- <267> 단계 3에서의 혼합된 액체의 역류(배출구 밸브의 개방으로 인한)는 우수한 혼합을 달성하는 것을 돕는다. 도 49는 "T" 연결부로부터 수 mm 하류에서 균일한 용액 색상의 확대도를 도시한다.
- <268> 3 가지 테스트한 MOV 혼합 전략 모두는 이와 같은 유형의 펌핑 시스템에 의하여 야기되는 유체의 "정방향 및 역방향" 이동으로 인하여 우수한 혼합을 생성한다. 볼루스 혼합은 반응 챔버내에서 기포를 생성하며, 상기 기포는 우수한 반응을 달성하는데 있어서 치명적일 수 있다. 약간의 mm의 150  $\mu$ m 채널(연결부로부터 하류)은 우수한 혼합을 달성하기에 충분하다. Gen II 디자인에서, 칩에서 제제 및 샘플을 혼합하고, 반응을 실시하고, MOV 혼합으로 반응을 중지시키기 위하여 새로운 Ionian NEA 분석과의 MOV 혼합을 사용하고자 한다.

### 도면의 간단한 설명

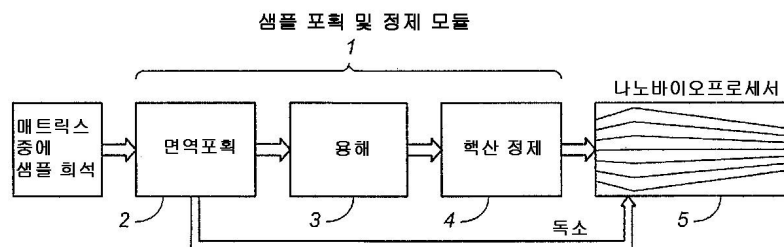
- <9> 당업자는 하기에 설명한 도면이 단지 예시를 위한 것이며, 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아님을 이해할 것이다.
- <10> 도 1은 샘플 포획 및 정제 모듈(SCPM) 및 바이오프로세서 모듈(BPM) 작업 흐름의 실시태양을 도시한다.
- <11> 도 2는 독소 분석 작업 흐름의 실시태양을 도시한다.
- <12> 도 3은 바이오프로세서 모듈(BPM)과 통합된 샘플 포획 및 정제 모듈(SCPM)의 실시태양을 도시한다.
- <13> 도 4는 오프-칩 유통형(flowthrough) 카트리지의 실시태양을 도시한다.
- <14> 도 5는 이동과 유통형 비드 교란기의 실시태양을 도시한다.
- <15> 도 6은 프로브가 수집기 유출물에 직접 삽입된 유통형 음파처리의 실시태양을 도시한다.
- <16> 도 7은 핵산 정제 모듈의 실시태양을 도시한다.
- <17> 도 8은 공기 샘플러, 샘플 농도 모듈 및 마이크로유체 샘플 증폭 및 분석 모듈을 포함하는 생물방어 적용예에 사용될 수 있는 나노바이오프로세서 모듈 시스템의 실시태양을 도시한다.
- <18> 도 9는 MOV™ 밸브의 실시태양을 도시한다.
- <19> 도 10은 미세가공된 펌프의 실시태양을 도시한다.
- <20> 도 11은 미세가공된 라우터(router)의 실시태양을 도시한다.
- <21> 도 12는 샘플 정화 매트릭스를 공급하는 3차원 연결 서비스 채널의 단면에서의 실시태양을 도시한다.
- <22> 도 13은 1 이상의 반응물을 반응 챔버에 첨가하기 위한 유체 회로의 실시태양을 도시한다.

- <23> 도 14는 사이클 시퀀싱 모듈(CSM) 반복 유닛의 실시태양을 도시한다.
- <24> 도 15는 단일 바이오프로세서 유닛의 실시태양을 도시한다.
- <25> 도 16은 외부 작동된 MOV 밸브 및 펌프를 사용하는 마이크로칩 카트리지의 실시태양을 도시한다.
- <26> 도 17은 12 개의 유닛 바이오프로세서 카트리지의 실시태양을 도시한다.
- <27> 도 18은 비-바이오프로세서 유닛 및 마이크로칩 레이아웃의 실시태양을 도시한다.
- <28> 도 19는 마이크로칩 실시태양 MBI-11을 도시한다. 패널 A는 청색이 유체 층을 그리고, 적색이 작동 층을 나타내는 마스크 디자인을 나타낸다. 패널 B는 2 개의 각각 투입 및 배출 저장기, 반응 챔버 및 아카이브 챔버 및 3방향 라우터를 갖는 서브-어셈블리를 나타낸다. 밸브에 대한 8 개의 공기 조절 라인도 공기로의 표준 연결체로 종결된다. 패널 C는 에칭된 마이크로유체 웨이퍼를 나타낸다. 패널 D는 일정 비율로 나타낸 실험실 마킹 펜을 사용하여 조립된 MBI-11 3층 마이크로칩을 나타낸다.
- <29> 도 20은 샘플 제조와 통합된 미세모세관 전기영동( $\mu$ CAE)에 대한 나노유체 구조체를 사용한 마이크로칩 실시태양 MBI-12를 도시한다. 유체 채널은 청색으로 나타내고, MOV 작동 채널은 적색으로 나타낸다.
- <30> 도 21은 2중 분석 채널을 갖는 2중 쌍-말단 판독 친화성 포획 샘플 정화의 실시태양을 도시한다. 어두운 층은 마이크로유체이고, 회색선은 서비스 층이다. 밸브 작동 층은 도시하지 않았다. 열은 점선 네모는 DNA 분석 반복 유닛을 구획한다.
- <31> 도 22는 통합된 샘플, 제조, 정화 및 분석 MINDS 마이크로칩 반복 유닛의 실시태양을 도시한다.
- <32> 도 23은 16-채널 200 nL 사이클 시퀀싱 모듈 마이크로칩의 실시태양을 도시한다.
- <33> 도 24는 마이크로비드-공급물 통합된 샘플, 제조, 정화 및 분석 MINDS 마이크로칩 반복 유닛의 실시태양을 도시한다. 25 nL 샘플 제조 챔버는 2 개의 친화성 포획 및 분리 채널을 사용하여 나타낸다.
- <34> 도 25는 내장형 제제, 핵산 정제 및 독소 모듈을 포함하는 1회용 카트리지로써 설계된 마이크로칩의 실시태양을 도시한다.
- <35> 도 26은 마이크로칩 인터페이스 장치의 기기 제어의 실시태양을 도시한다.
- <36> 도 27은 튜브가 MiniPrep 기기에 장착된 마이크로칩 진공 척의 실시태양을 도시한다.
- <37> 도 28은 MiniPrep 기기의 내부에서 바이오프로세서 마이크로칩을 작동시키기 위한 연결된 하드웨어 실시태양을 도시한다.
- <38> 도 29는 경로길이가 증가된 RT-PCR 챔버의 실시태양을 도시한다.
- <39> 도 30은 회전 스캐너의 실시태양을 도시한다.
- <40> 도 31은 핵산 분석(RT-PCR 및  $\mu$ CAE)에 사용될 수 있는 바이오프로세서 모듈의 마스크 디자인의 실시태양을 도시한다.
- <41> 도 32는 각각 RT-PCR 및  $\mu$ CAE 능력을 갖는 6" 웨이퍼상에서 48 개의 유닛을 갖는 바이오프로세서 마이크로칩에 대한 웨이퍼 규모의 디자인의 실시태양을 도시한다.
- <42> 도 33은 다중화된 바이오프로세서 회로의 실시태양을 도시한다. MOV 라우터는 3 개의 다중화된 RT-PCR 반응으로 샘플을 분할하고, 법의학 및 재시험 샘플을 생성하며,  $\mu$ CAE 확인을 위한 샘플을 선택할 수 있다.
- <43> 도 34는 8" 웨이퍼를 사용한 12" 웨이퍼의 모델링을 도시한다.
- <44> 도 35는 다양한 농도에서 비드에 의한 이. 콜리(*E. coli*)의 포획을 도시한다.
- <45> 도 36은 이. 콜리(*E. coli*)의 면역포획에서 DYNAL™1 비드에 결합된 모노클로날 항체의 적정을 도시한다.
- <46> 도 37은 이. 콜리(*E. coli*)의 면역포획에 대한 비. 세레우스(*B. cereus*)의 효과를 도시한다.
- <47> 도 38은 스파이크 공기 샘플러 액체로부터 면역포획에 의한 이. 콜리(*E. coli*)의 회수를 도시한다.
- <48> 도 39는 도 38의  $10^4$  CFU/mL 역가에 대하여 특이적으로 설정된 데이터로 도시한다.

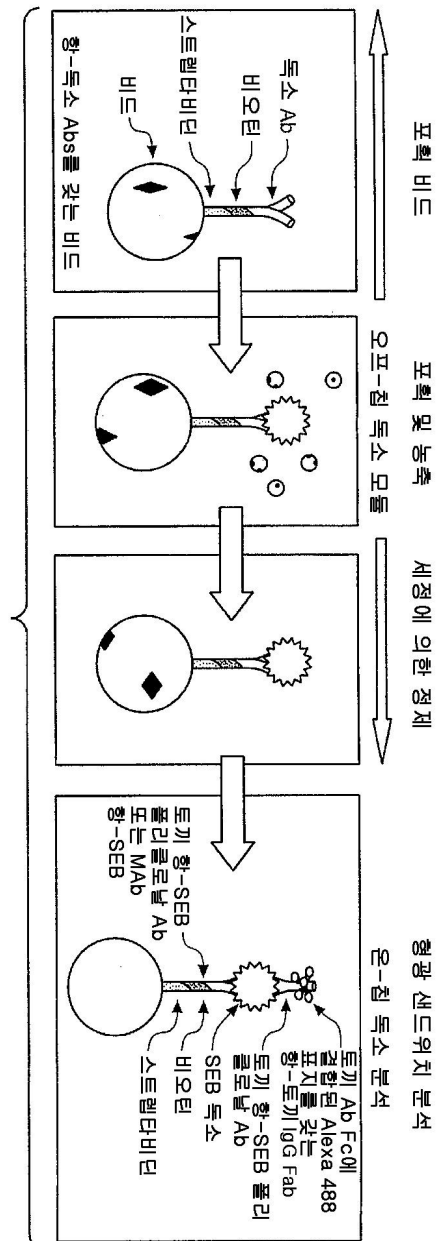
- <49> 도 40은 실리카 Extract-Clean SPE 배지의 100 mg 층을 통하여 실시한 샘플의 각종 분율에 대한 높은 역가의 이. 콜리(*E. coli*)를 농축시킨 결과를 도시한다.
- <50> 도 41은 실리카 Extract-Clean SPE 배지의 100 mg 층을 통하여 실시한 후 각종 분율중에 존재하는 고 농도 이. 콜리(*E. coli*) 샘플로부터 전체 박테리아의 비율을 도시한다.
- <51> 도 42는 실리카 비드(좌측) 및 Big Beads(우측)을 사용한  $\beta$ -갈락토시다제의 회수를 도시한다.
- <52> 도 43은 Big Beads를 사용한 이. 콜리(*E. coli*)의 회수를 도시한다.
- <53> 도 44는 분리 채널로 직접 주입한 샘플 정화를 사용한 직접 주입 기구의 실시태양을 도시한다.
- <54> 도 45는 온-칩과 MOV 장치를 혼합한 실시태양을 도시한다.
- <55> 도 46은 MBI-13 T-채널 및 볼루스상에서의 온-칩 MOV 펌프와의 혼합 실시태양을 도시한다.
- <56> 도 47은 물을 포트(1)로부터 펌핑 처리하고, 적색 염료를 포트(2)로부터 펌핑 처리하는 "T" 혼합을 위한 칩 디자인의 실시태양을 도시한다. 실질적인 혼합은 "T" 연결부로부터 수 밀리미터에서 관찰되며, 2 mm 반응 챔버를 가로질러 변색은 관찰되지 않았다.
- <57> 도 48은 4 단계 펌핑 시퀀스중의 "T" 채널 연결부의 실시태양의 화상을 도시하며, 여기서 시간은 각 단계당 1 초이다. 채널 치수는 깊이가 50  $\mu\text{m}$ 이고, 폭이 150  $\mu\text{m}$ 이다. 펌프 밸브 부피는 약 50 nL이다.
- <58> 도 49는 "T" 연결부로부터 하류로 수 밀리미터에서의 펌핑 처리 단계 3에서 촬영한 확대 화상을 도시한다. 채널 폭은 150  $\mu\text{m}$ 이다. 실질적인 혼합과 일치하는 균일한 색상이 뚜렷하다.

## 도면

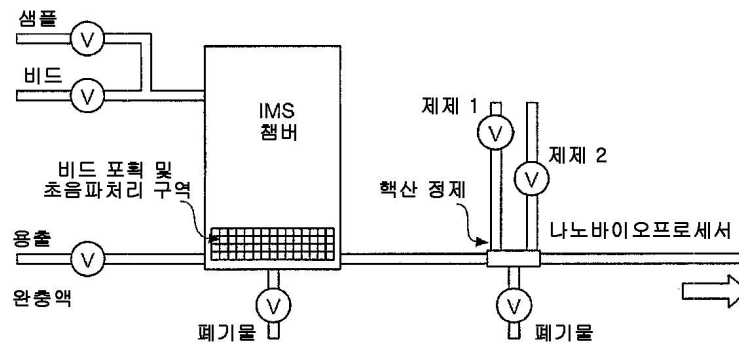
### 도면1



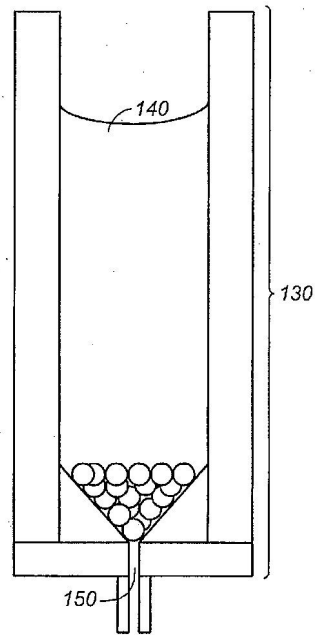
도면2



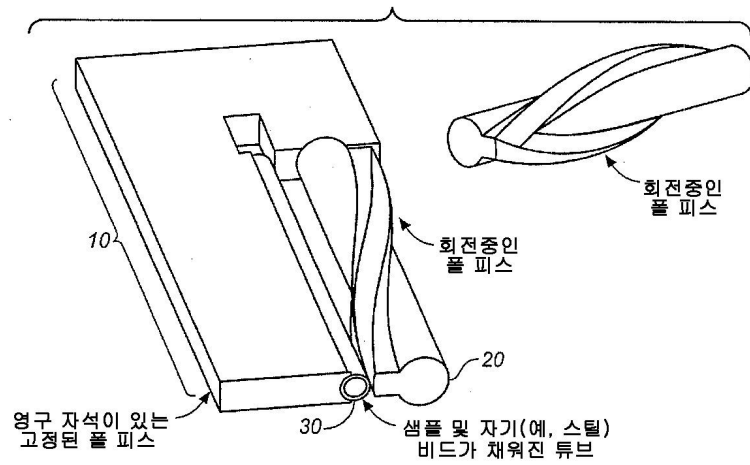
도면3



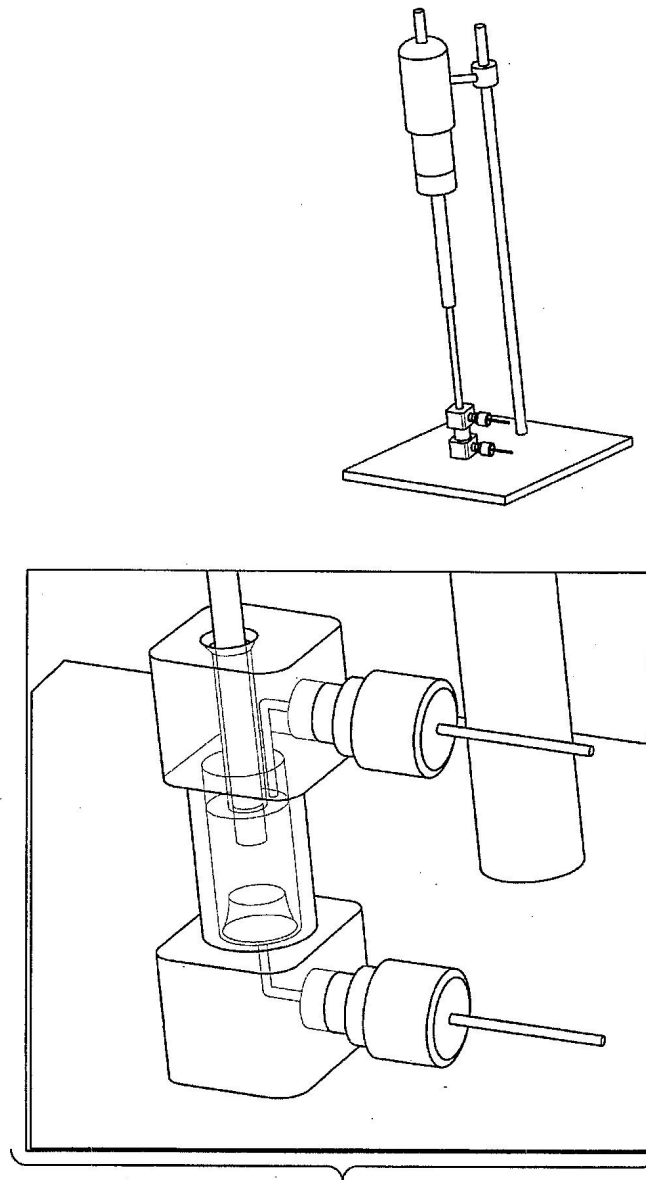
도면4



도면5

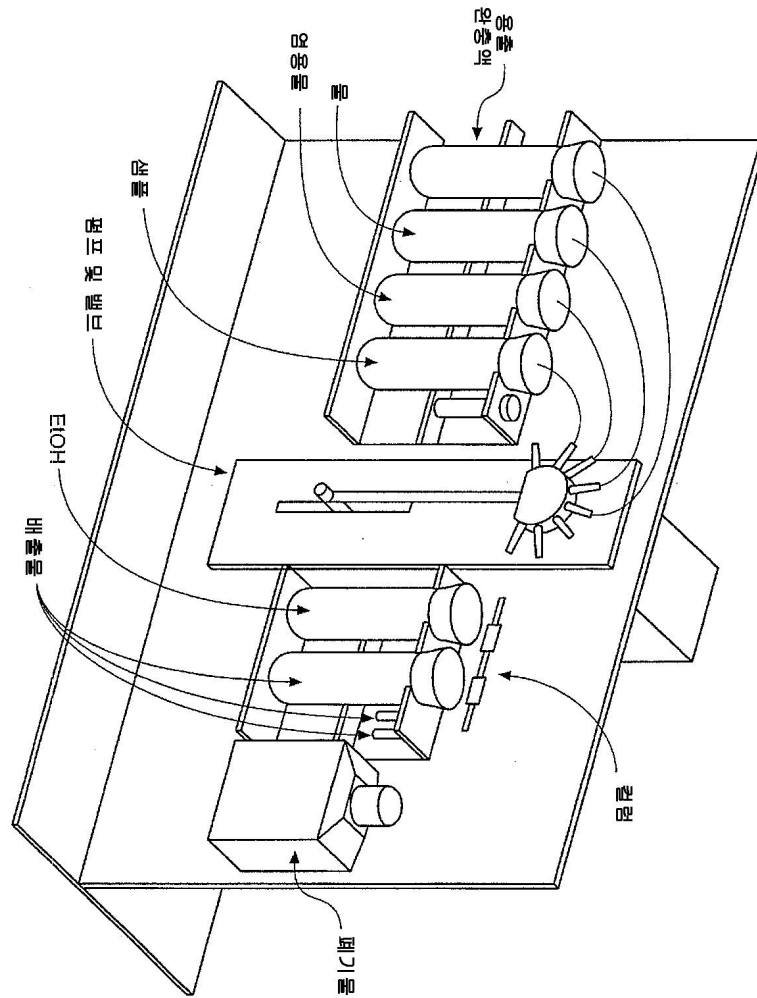


도면6



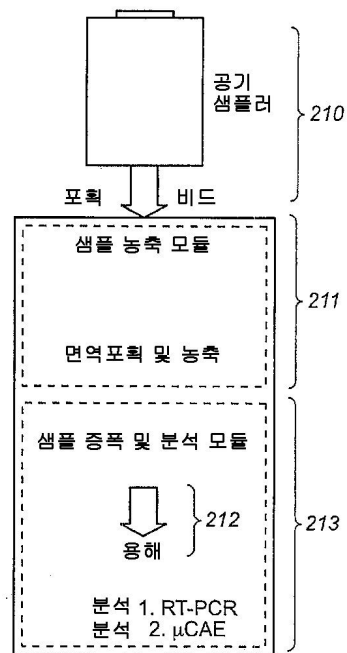


도면7





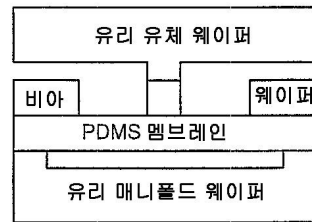
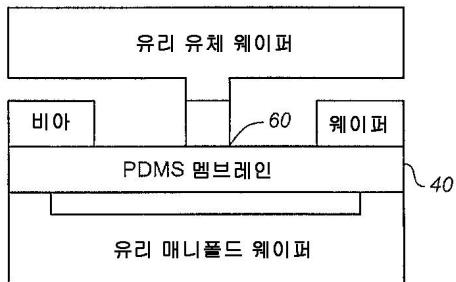
도면8



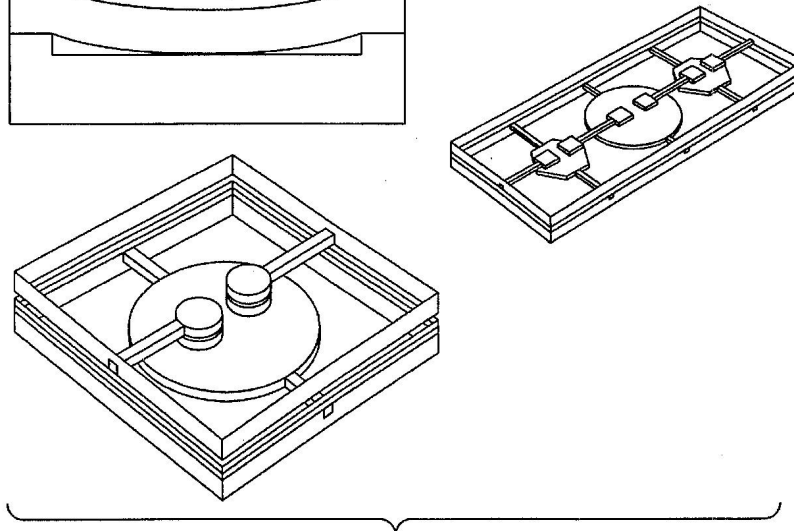
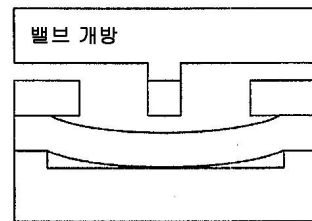
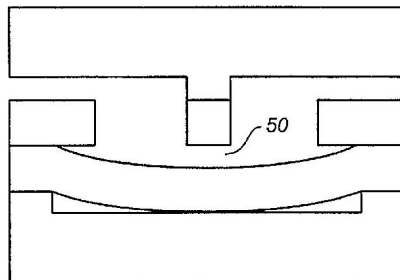
도면9

4-층 토폴로지

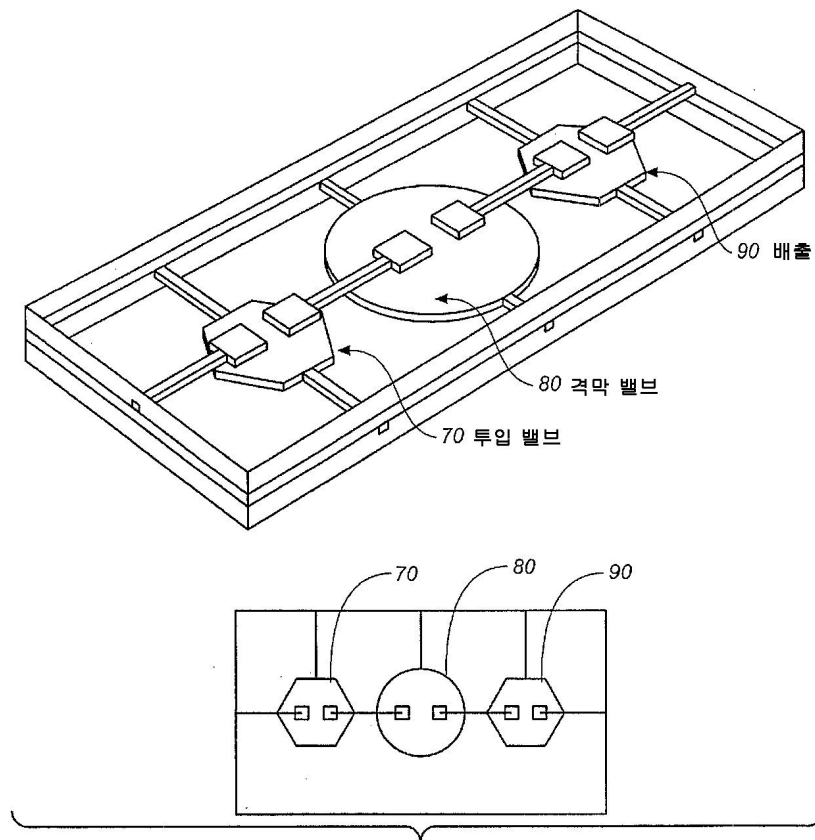
밸브 폐쇄



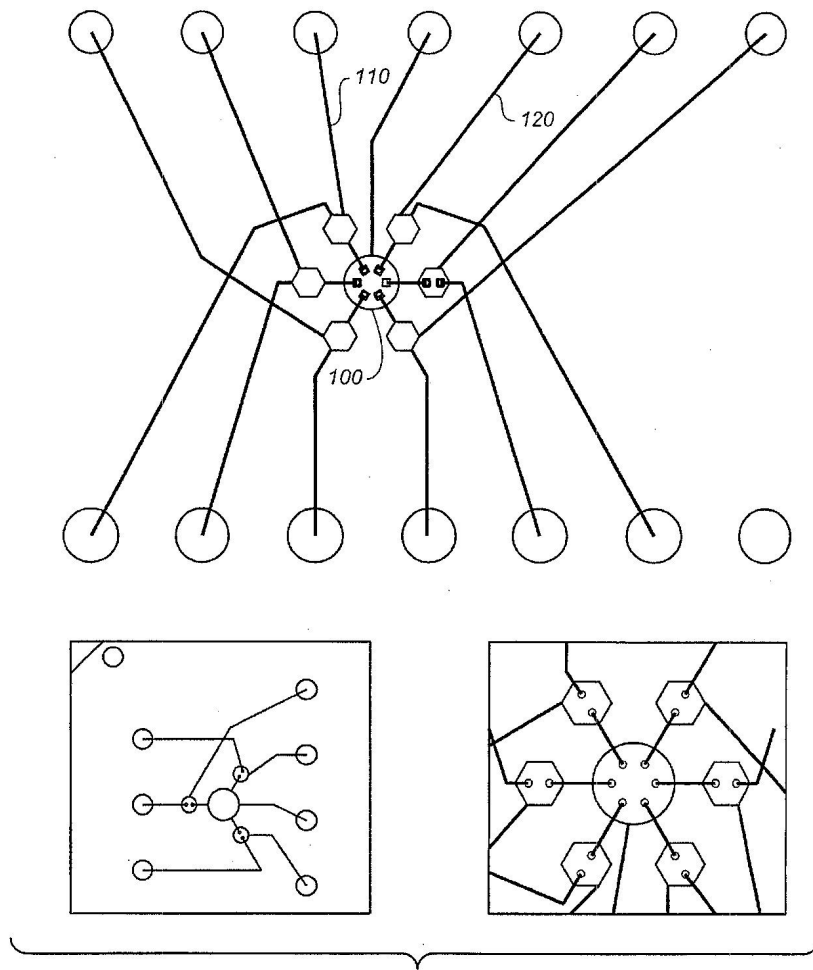
밸브 개방



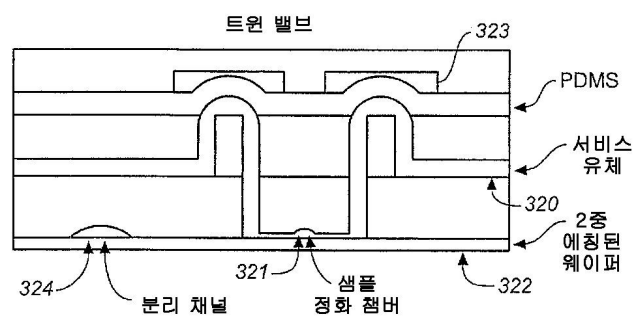
도면10



도면11

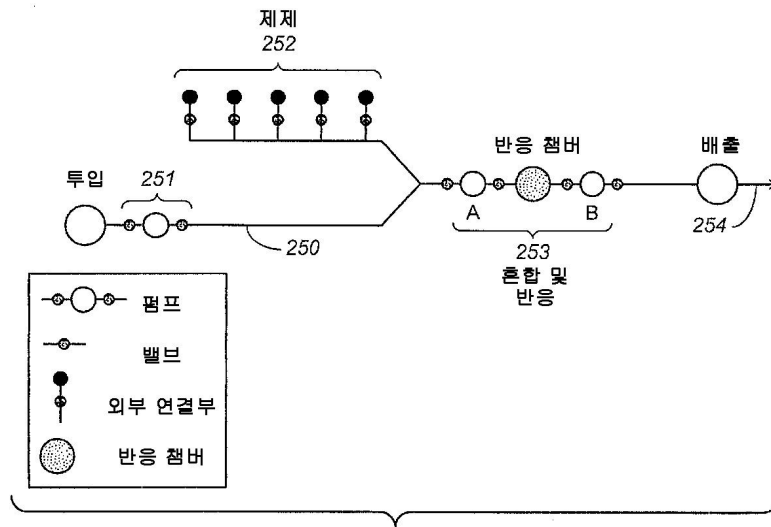


도면12

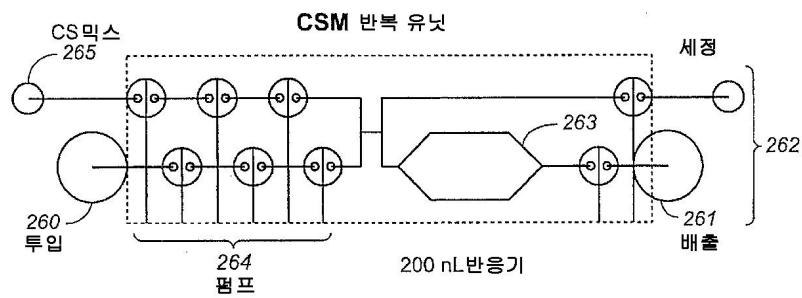




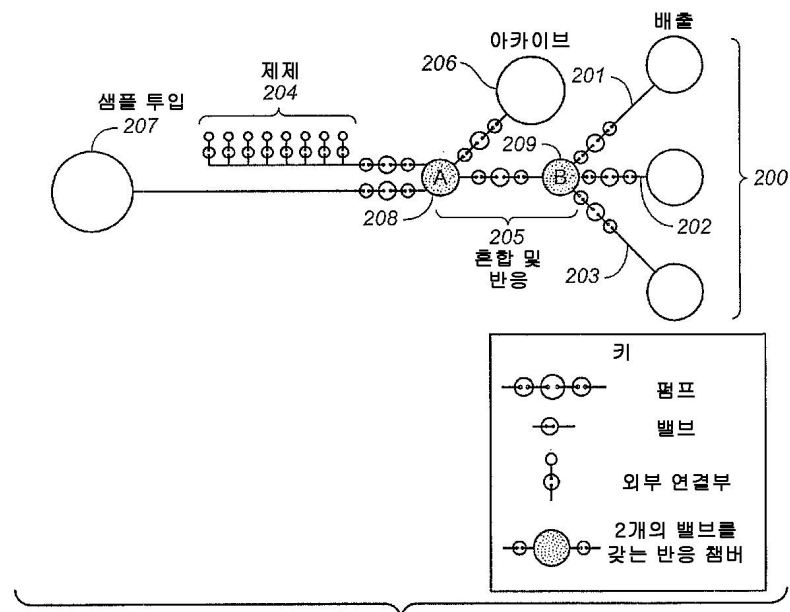
도면13



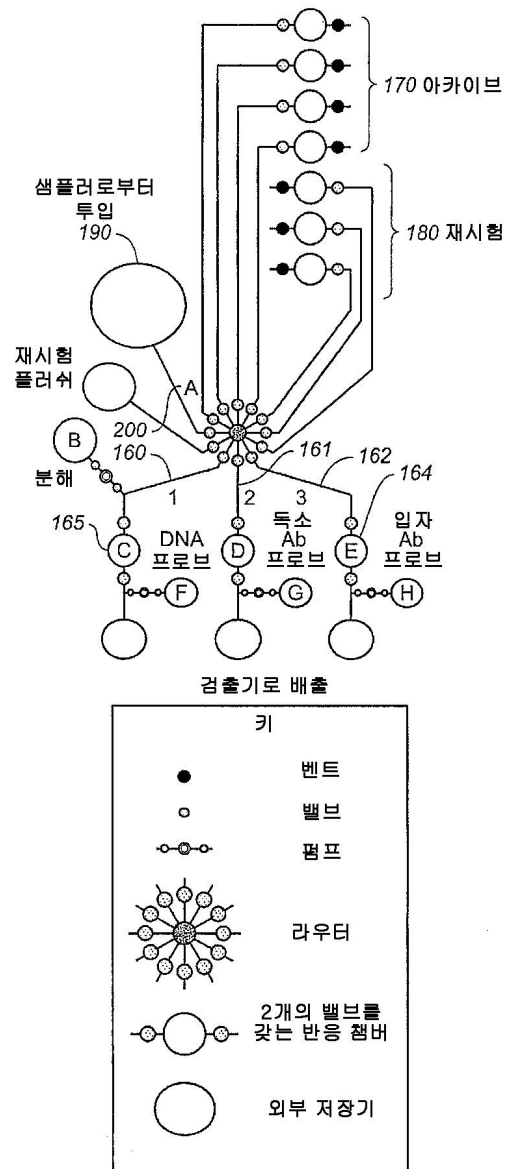
도면14



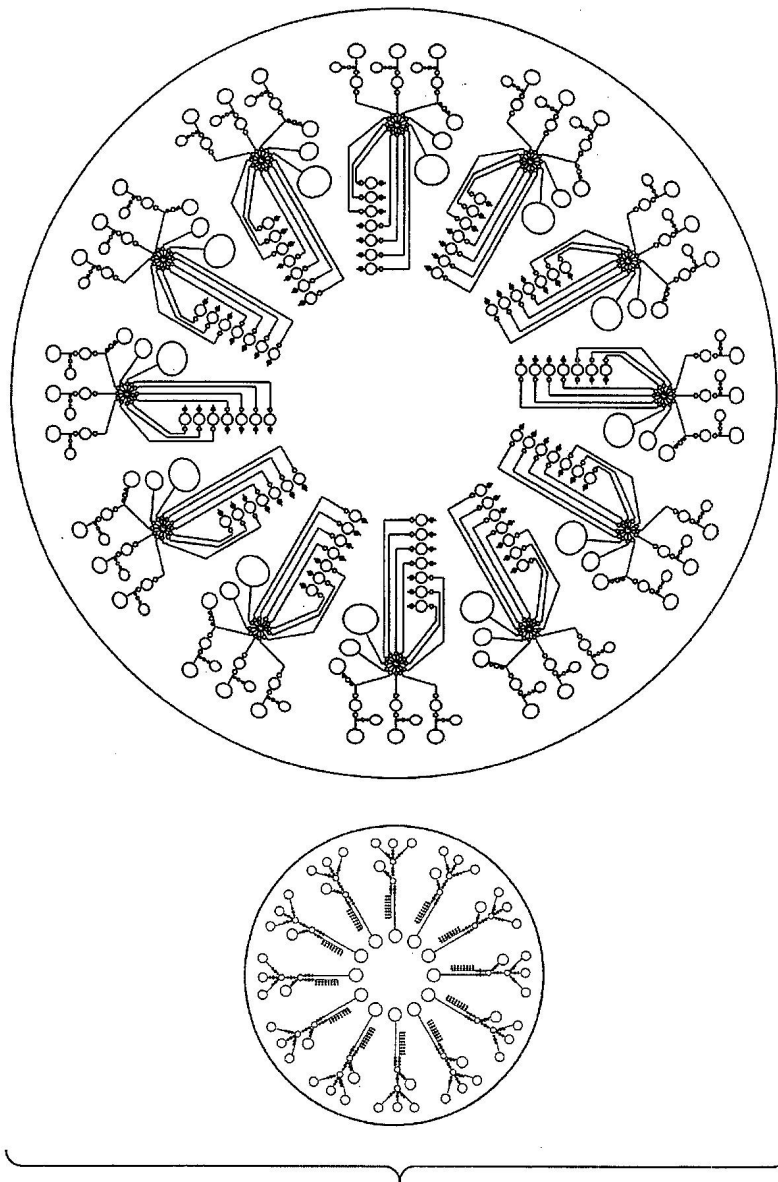
도면15



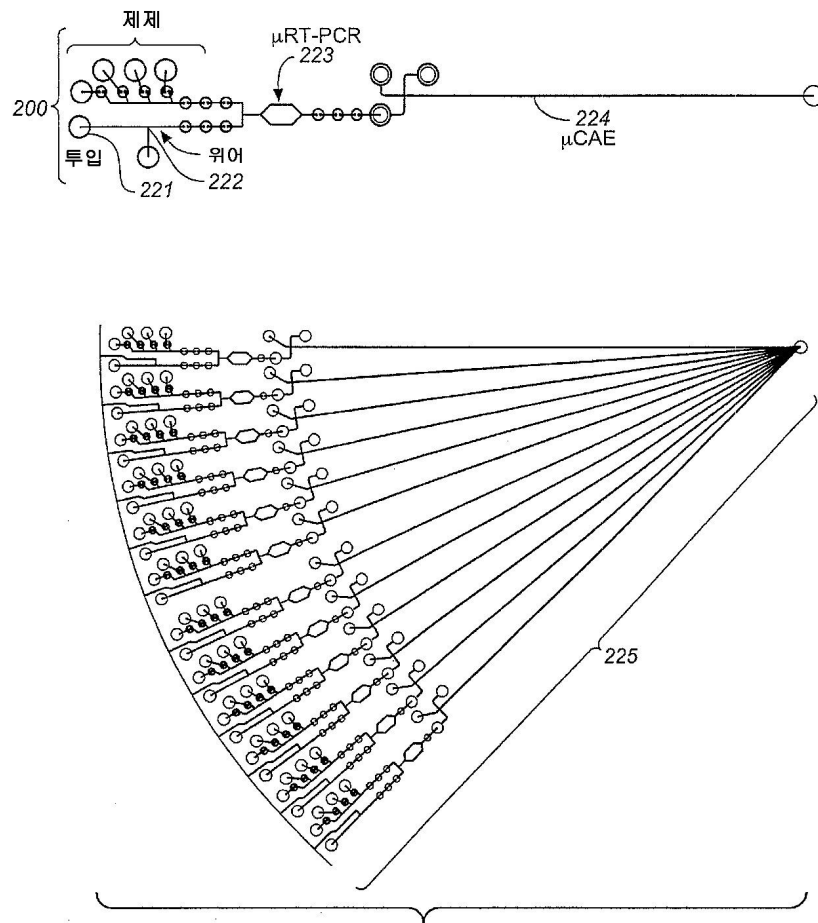
도면16



도면17

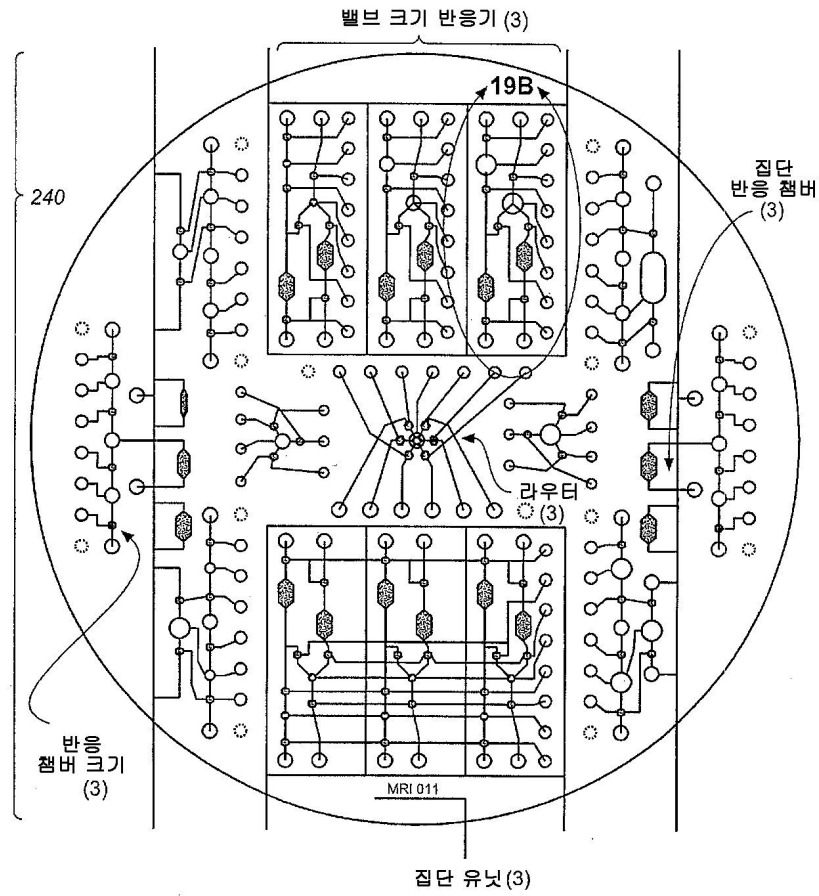


도면18

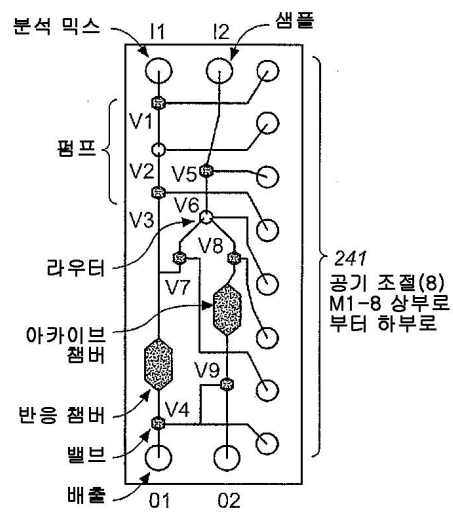




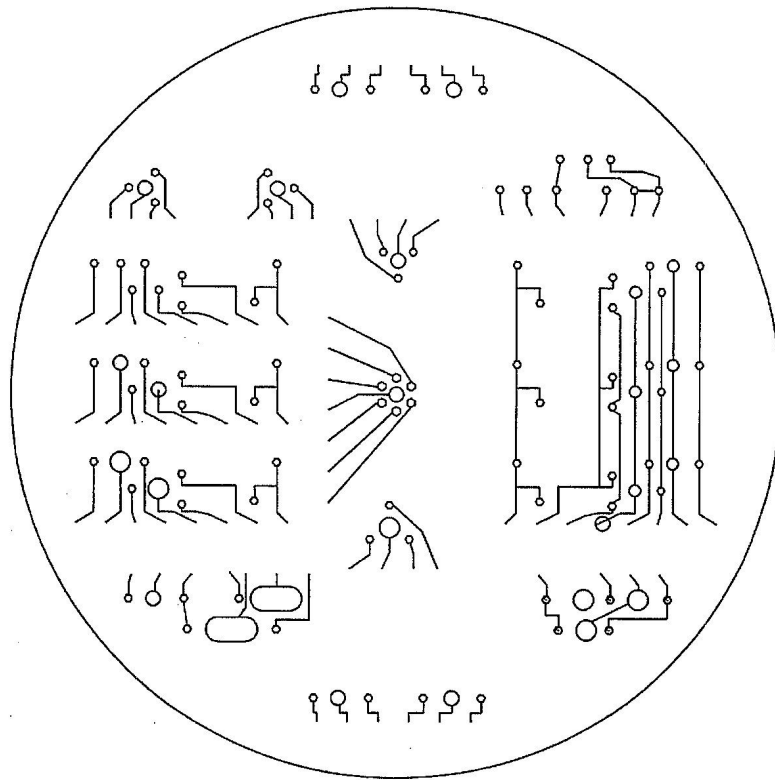
도면19a



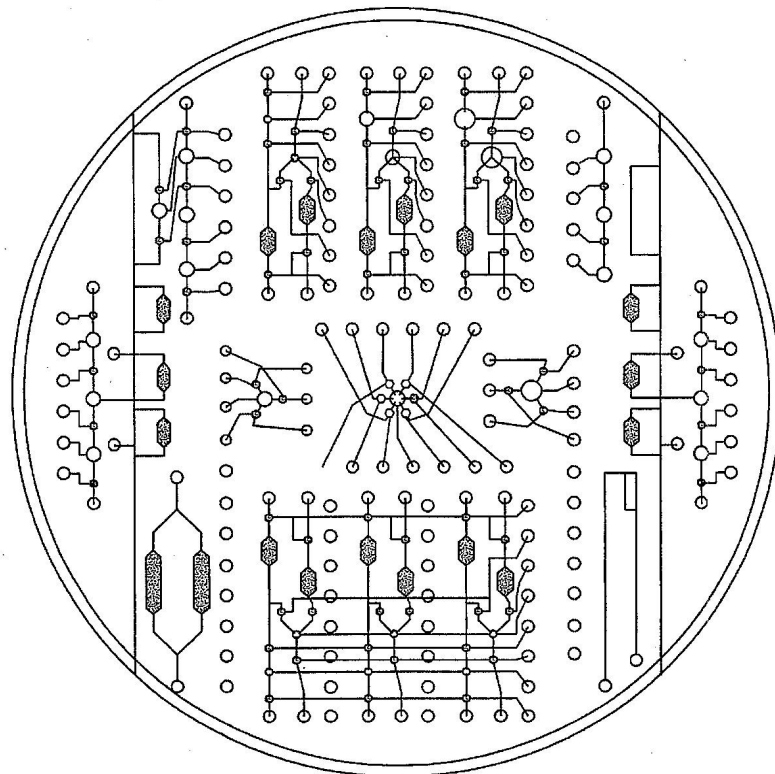
도면19b



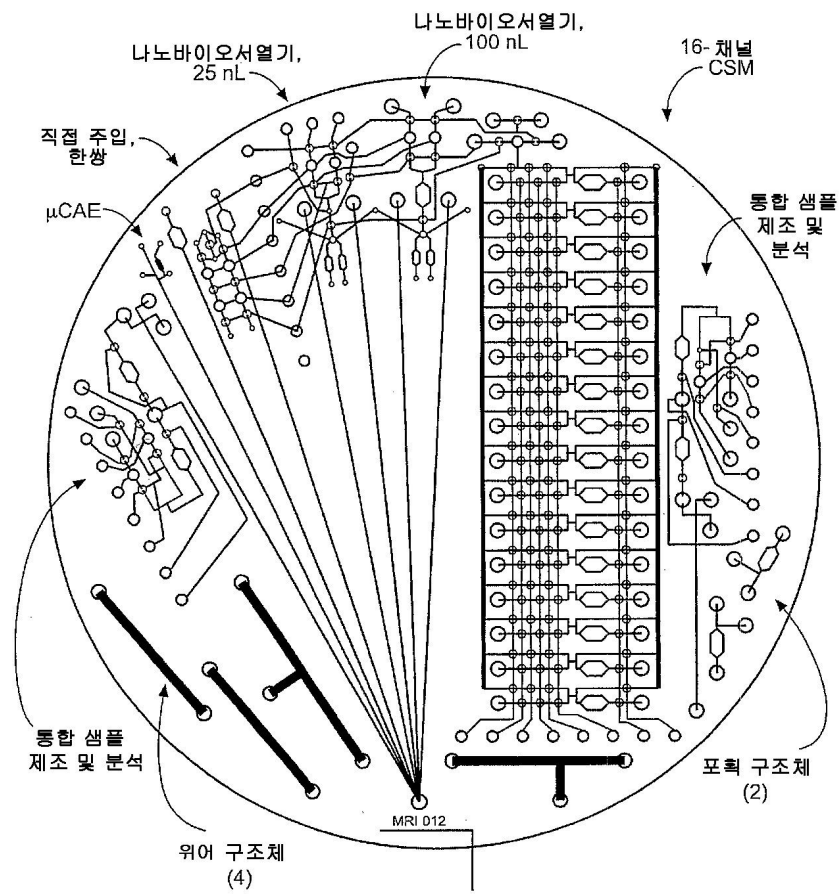
도면19c



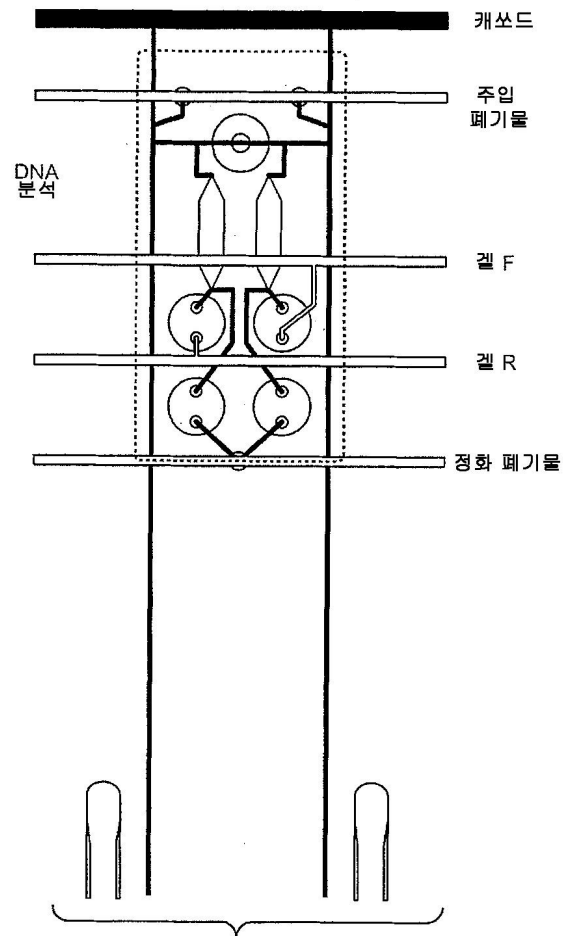
도면19d



도면20

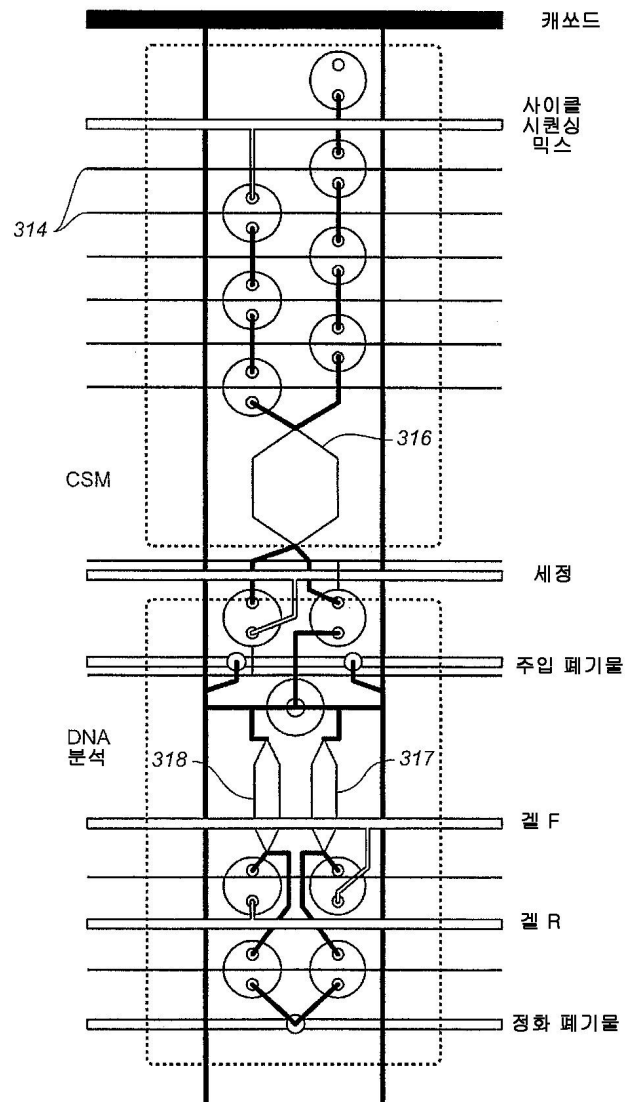


도면21

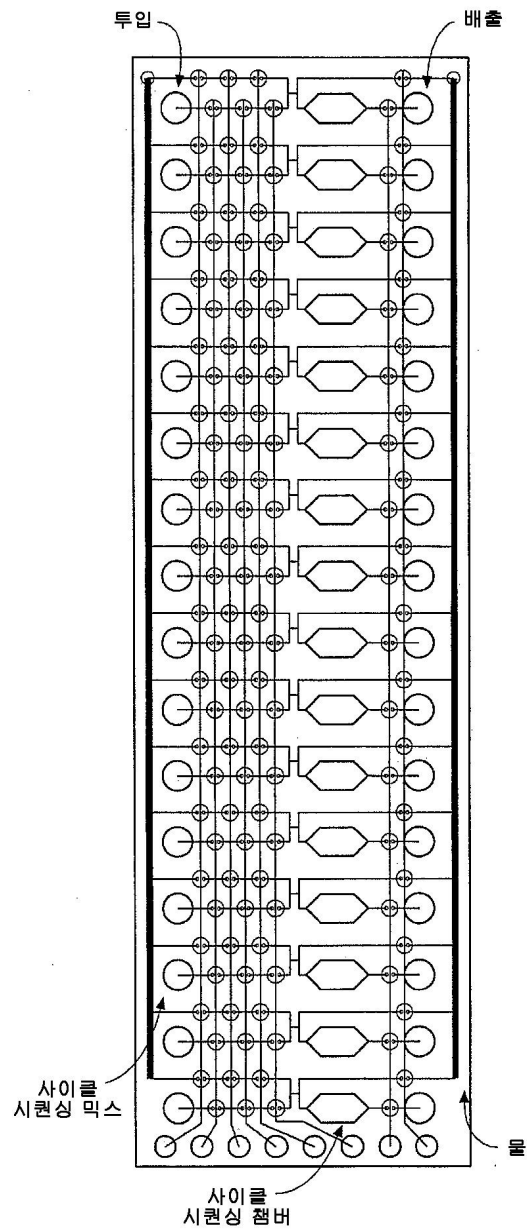




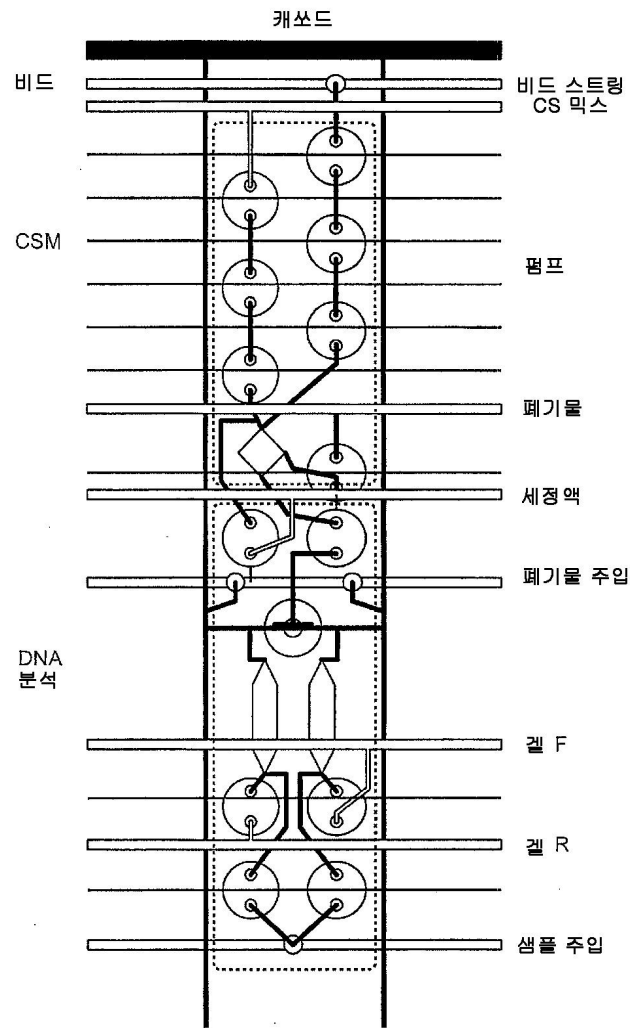
도면22



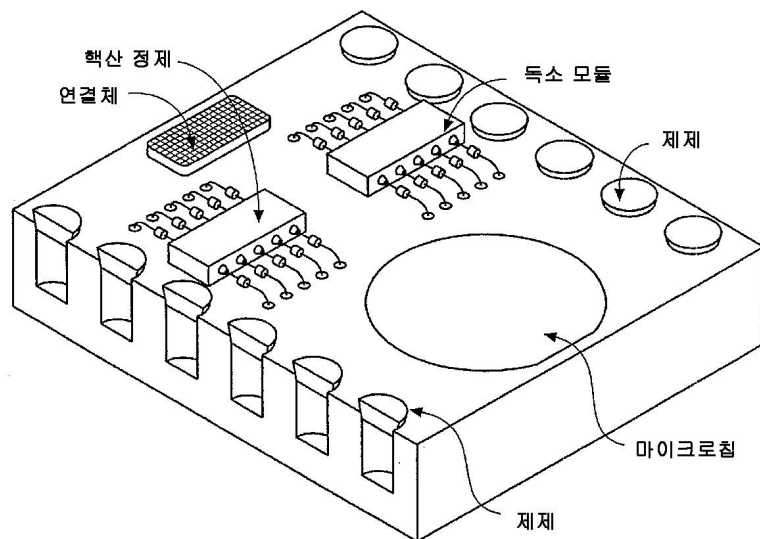
도면23



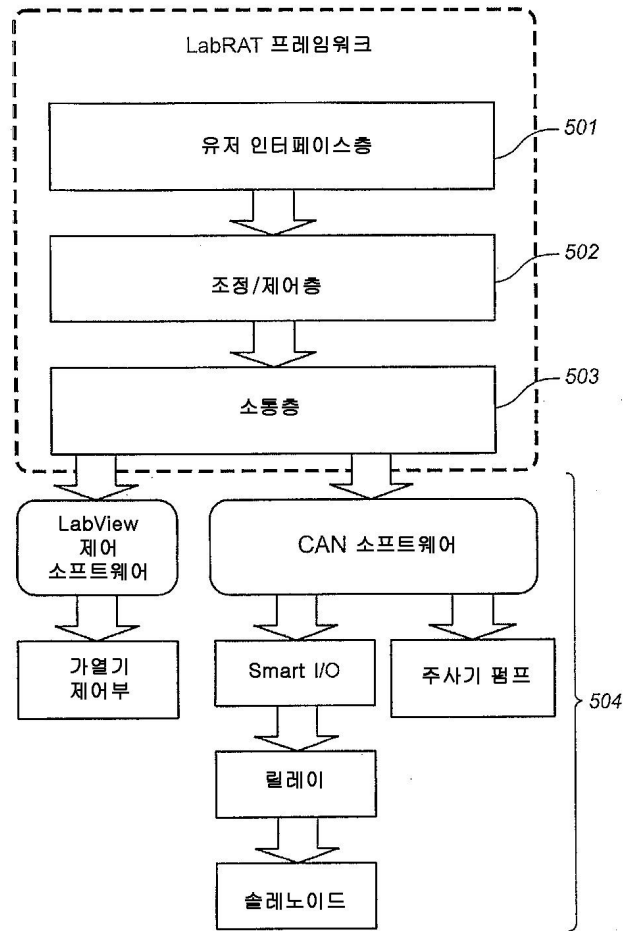
도면24



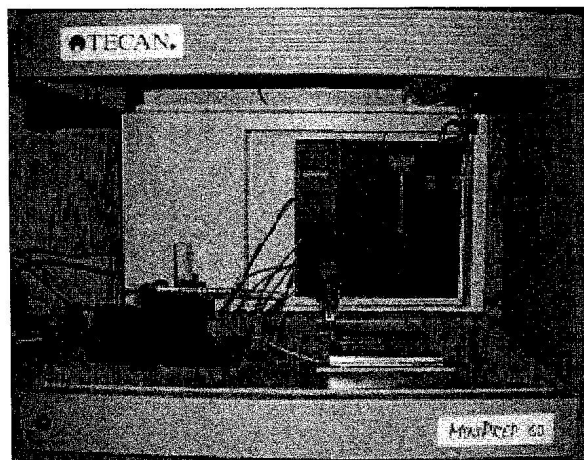
도면25



도면26

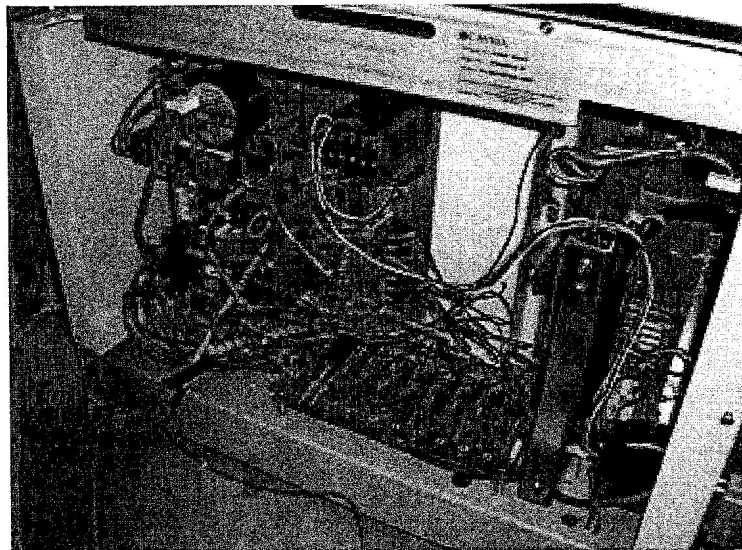


도면27

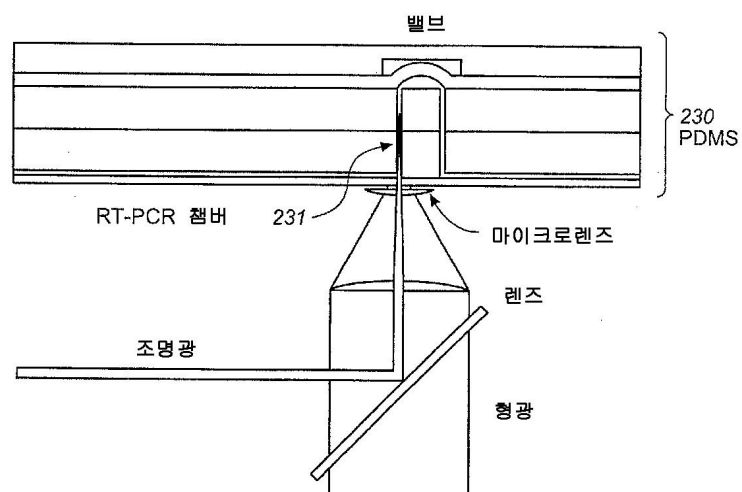




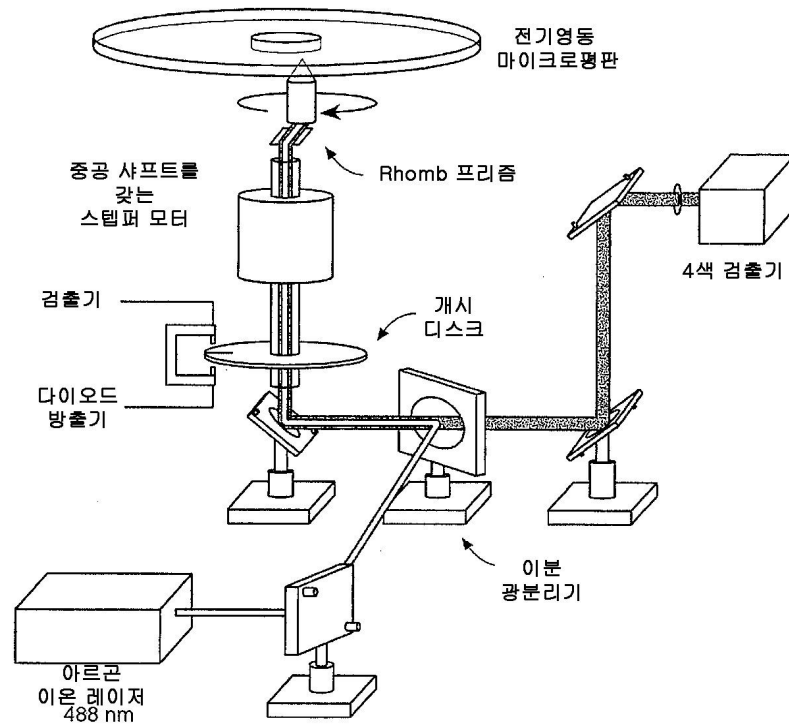
도면28



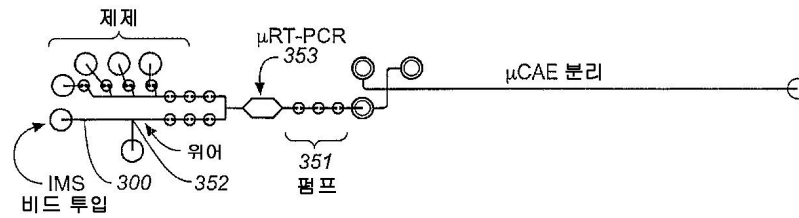
도면29



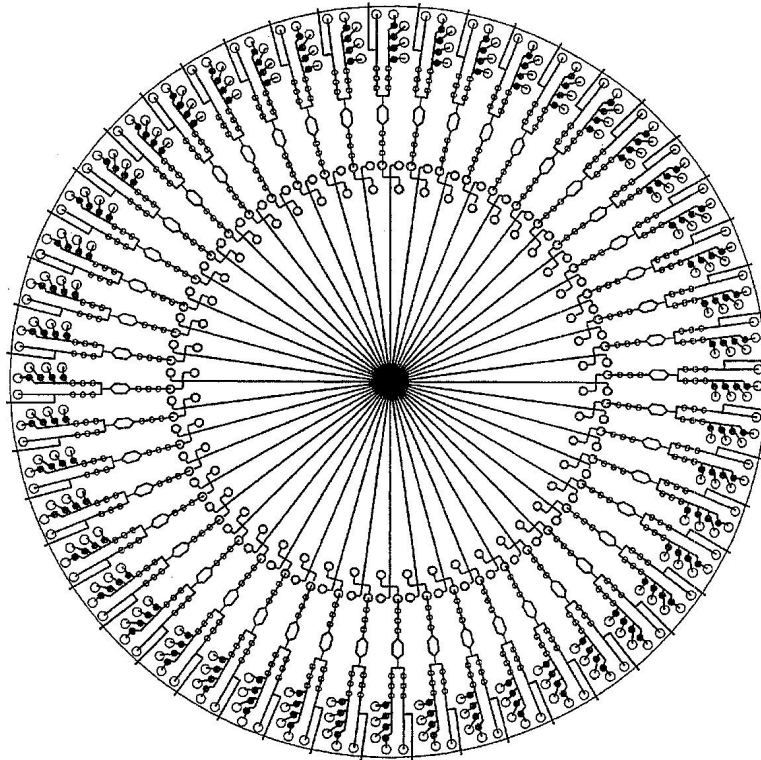
도면30



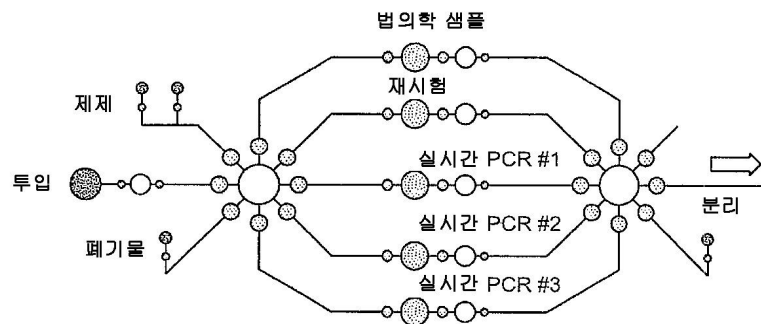
도면31



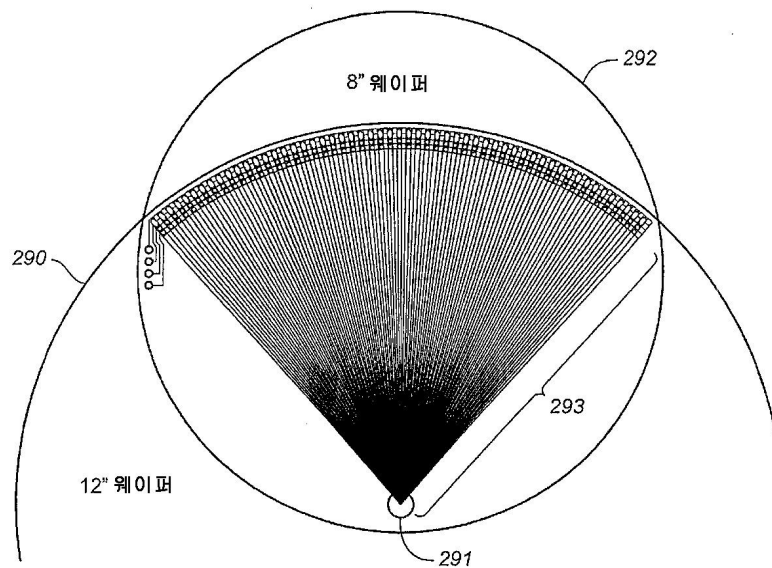
도면32



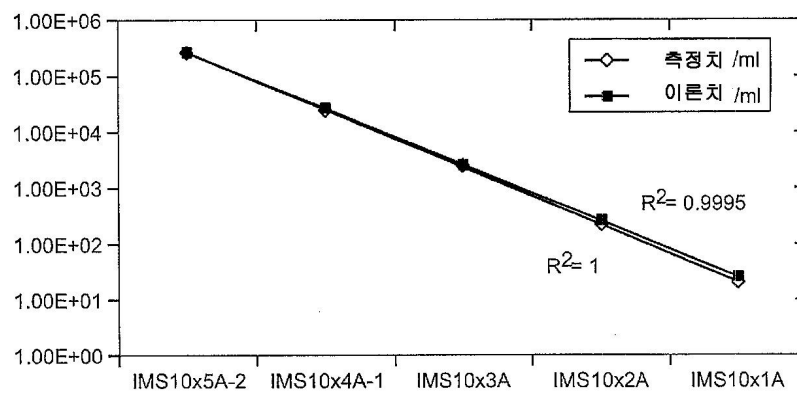
도면33



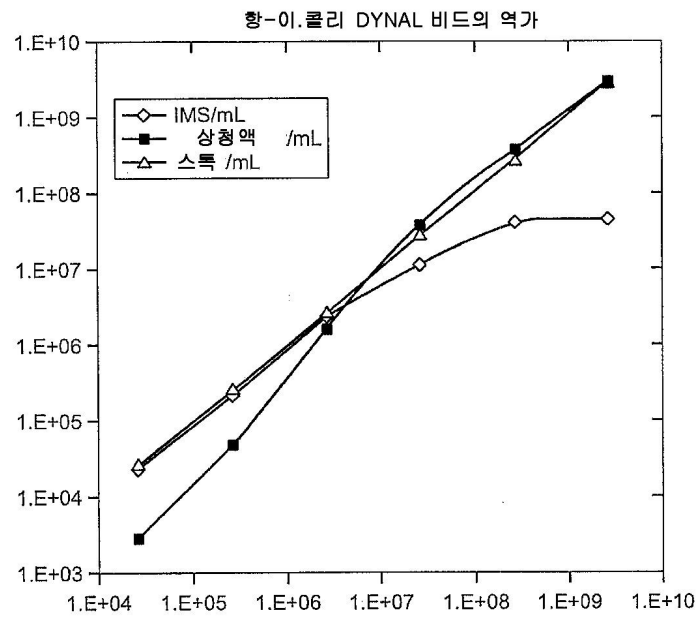
도면34



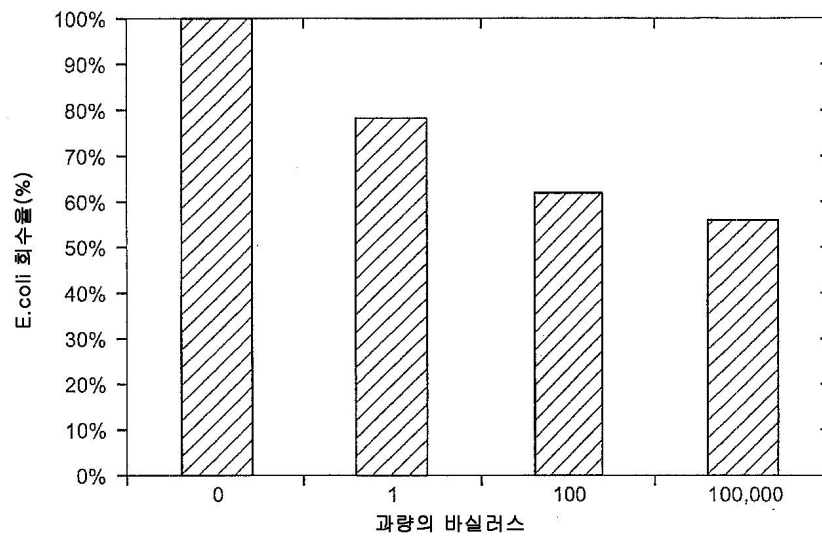
도면35



도면36

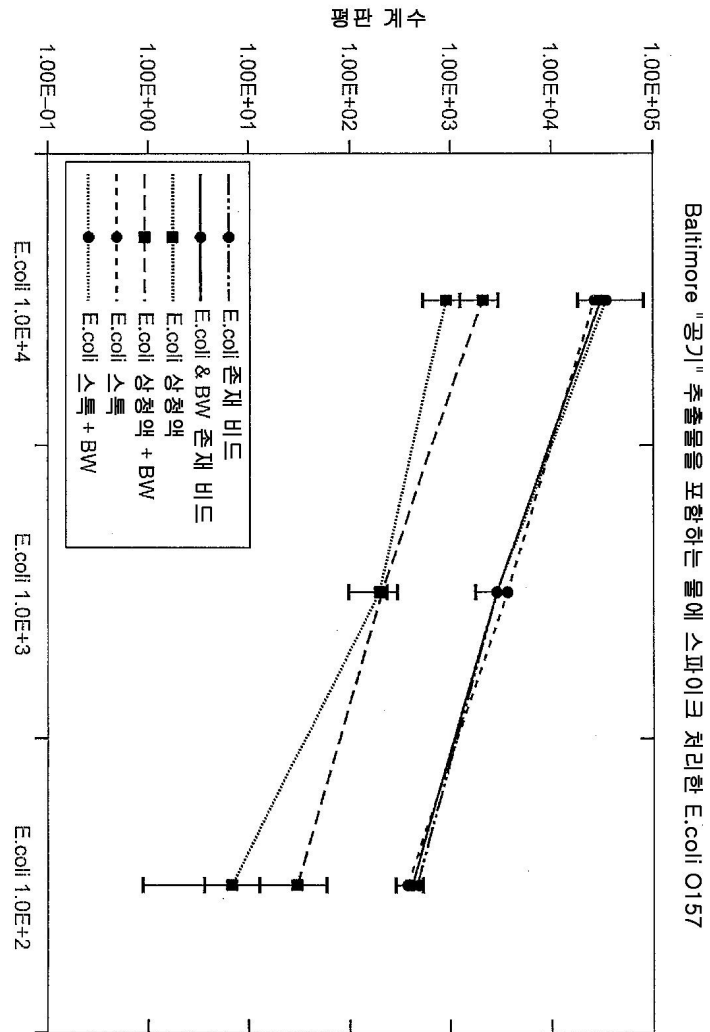


도면37

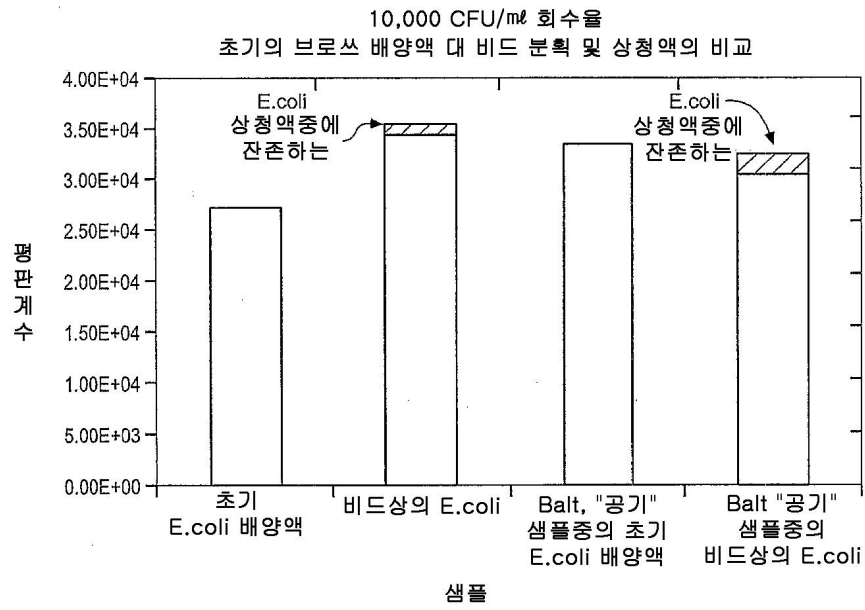




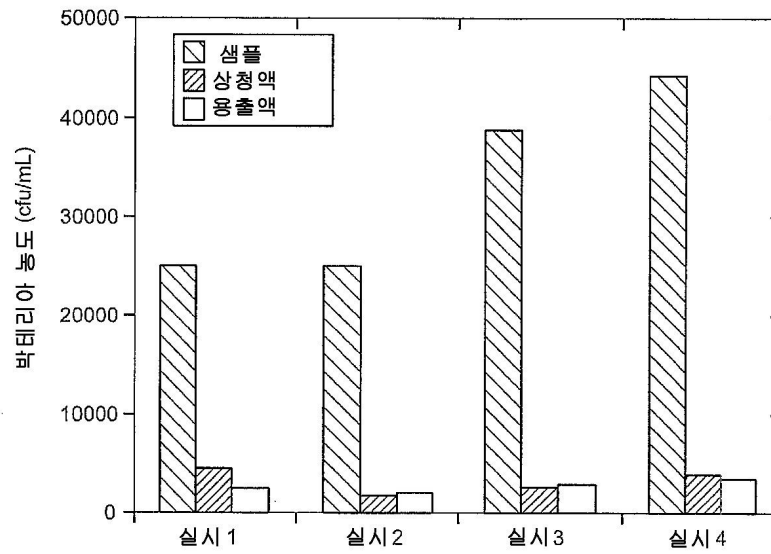
도면38



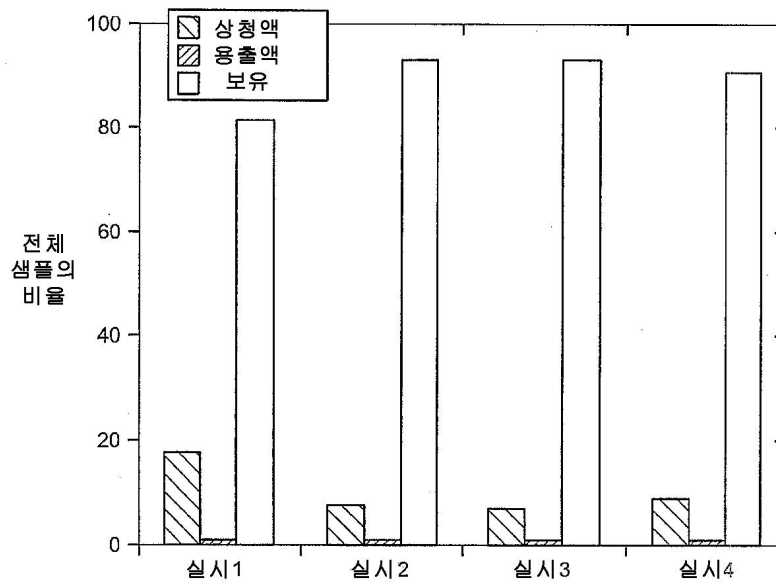
도면39



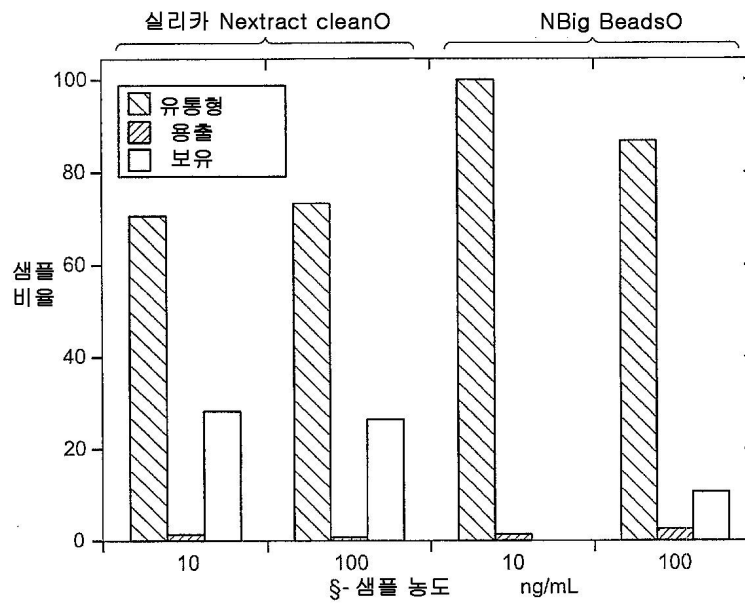
도면40



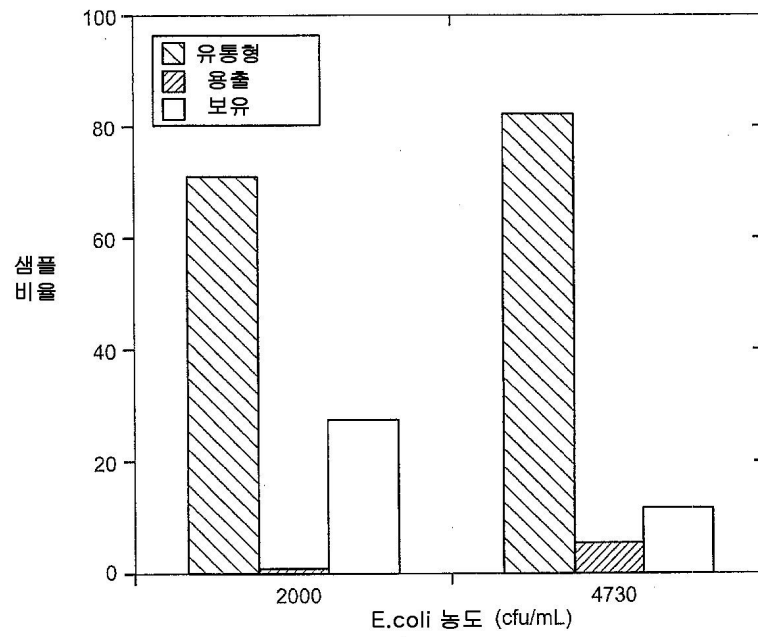
도면41



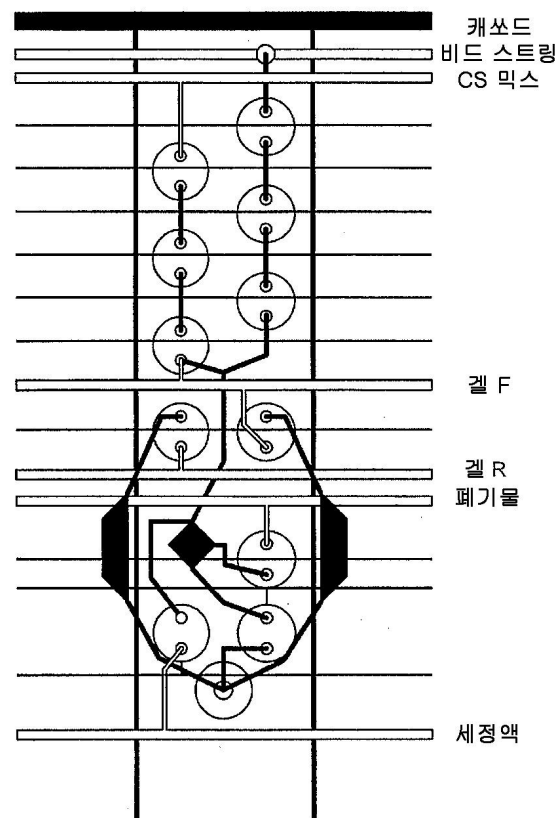
도면42



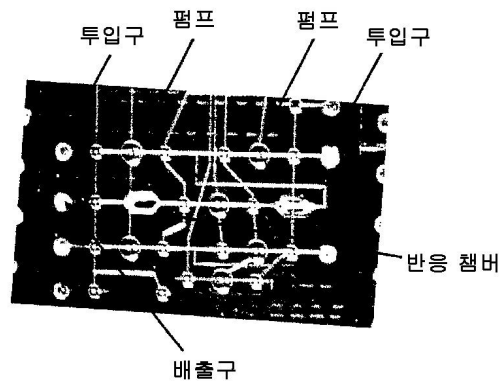
도면43



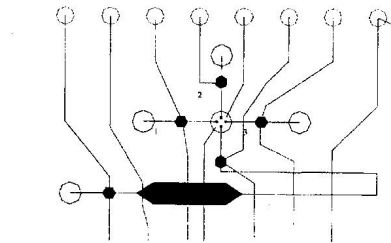
도면44



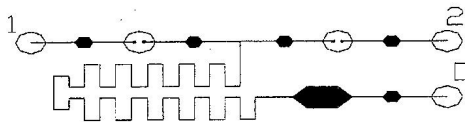
도면45



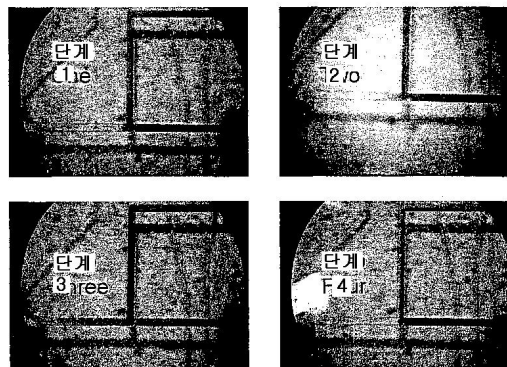
도면46



도면47



도면48





도면49

