



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101793826 A

(43) 申请公布日 2010. 08. 04

(21) 申请号 200910246173. 0

G02B 21/16 (2006. 01)

(22) 申请日 2005. 06. 07

(30) 优先权数据

60/578, 106 2004. 06. 07 US

(62) 分案原申请数据

200580025595. 5 2005. 06. 07

(71) 申请人 先锋生物科技股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 M · A · 厄金 G · R · 费瑟

B · 克拉克森 C · G · 西泽

N · 斯威兹

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 刘佳

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006. 01)

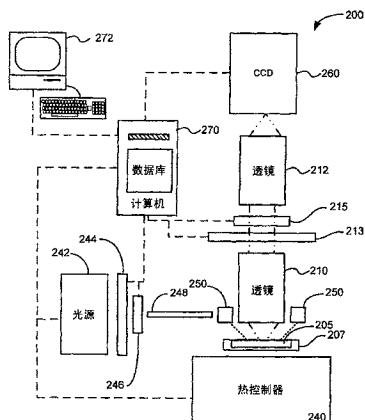
权利要求书 3 页 说明书 30 页 附图 30 页

(54) 发明名称

用于微流体器件的光学透镜系统和方法

(57) 摘要

一种给来自微流体器件 (205) 的一种或多种选定的荧光指示成像的装置。该装置包括成像通路，该成像通路耦合到至少一个微流体器件 (205) 中的至少一个反应室。该成像通路可以传输从至少一个微流体器件 (205) 的至少一个反应室中的一个或多个样品那儿获得的一个或多个荧光发射信号。该反应室具有一定的反应室大小，该反应室大小的特征在于其实际空间维度与成像通路正交。该装置还包括耦合到成像通路的光学透镜系统 (210, 212)。该光学透镜系统适用于传输与该反应室相关联的一个或多个荧光信号。



1. 一种给微流体器件成像的方法,所述方法包括:

传输微流体器件的空间区域的像,所述空间区域与不止 96 个室有关;以及  
用与图像检测设备有关的图像检测空间区域来拍摄所述空间区域的图像,所述图像检  
测空间区域具有和所述微流体器件的空间区域大约相等的尺寸。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述空间区域除以所述图像检测空间区域  
大约等于一(1)。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述空间区域除以所述图像检测空间区域  
大约等于 0.99 或更小。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述空间区域除以所述图像检测空间区域  
大约等于 0.88 或更小。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述图像检测空间区域大约是  
30.7mm×30.7mm 或更大。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述图像检测空间区域大约是  
27.6mm×27.6mm 或更大。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述图像检测空间区域包括大约  
2048×2048 个像素区域。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述图像检测空间区域包括大约  
2048×2048 个像素区域,每一个像素区域具有约为 15 μm×15 μm 或更大的空间维度。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,至少两个像素区域与至少一个室相关。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,至少九个像素区域与至少一个室相关。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,不止 20 个像素区域与至少一个室相关。

12. 一种给微流体器件成像的方法,所述方法包括:

在小于 1 分钟的时间帧内,通过使用图像检测空间区域,给和微流体器件中至少确定  
数目的室相关的空间区域拍摄图像,在哪儿拍摄所述空间区域的图像基本上不受缝合和 /  
或扫描过程的影响。

13. 如权利要求 12 所述的方法,还包括:

在大于 10 毫秒的时间帧内,通过使用图像检测空间区域,给和所述微流体器件中至少  
确定数目的室相关的空间区域拍摄图像。

14. 如权利要求 12 所述的方法,其特征在于,拍摄所述空间区域的图像是在小于 30 秒  
的时间帧内发生的。

15. 如权利要求 12 所述的方法,其特征在于,拍摄所述空间区域的图像是在小于 15 秒  
的时间帧内发生的。

16. 如权利要求 12 所述的方法,其特征在于,在所述小于 1 分钟的时间帧内,对所述确  
定数目的室进行同步拍摄。

17. 如权利要求 12 所述的方法,其特征在于,在使所述确定数目的室保持在确定的温  
度范围中的同时,进行所述拍摄。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其特征在于,所述确定的温度范围是 ±2°C。

19. 如权利要求 17 所述的方法,其特征在于,所述确定的温度是与 PCR 过程相关的循环  
温度环境的一部分。

20. 如权利要求 12 所述的方法,其特征在于,所述确定数目的室是至少 96 个或更多。

21. 如权利要求 12 所述的方法,还包括:

在小于 1 分钟的时间帧内,通过使用图像检测空间区域,给和所述微流体器件中至少确定数目的室相关的空间区域拍摄至少第二张图像,在哪儿拍摄所述空间区域的第二张图像代表了荧光发射。

22. 一种用于分析弹性微流体器件中的各种过程的方法,所述方法包括:

在小于 1 分钟的时间周期内给至少 96 个室拍摄图像,其中所述至少 96 个室中的每一个室都处于和所述至少 96 个室中的任何其它室流体隔离的状态;以及  
处理所述图像。

23. 如权利要求 22 所述的方法,还包括:

在小于 1 分钟的时间周期内,给所述至少 96 个室拍摄第二张图像;以及  
处理所述第二张图像。

24. 如权利要求 22 所述的方法,其特征在于,通过使用其数值孔径大于或等于 0.23 且其放大率小于或等于 2 的光学系统,来执行图像拍摄。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其特征在于,所述光学系统具有大于或等于 0.23 的数值孔径。

26. 如权利要求 22 所述的方法,其特征在于,所述至少 96 个室中的每一个室都包括约 100 纳升或更小的体积。

27. 如权利要求 26 所述的方法,其特征在于,所述至少 96 个室中的每一个室都包括约 10 纳升或更小的体积。

28. 如权利要求 27 所述的方法,其特征在于,所述至少 96 个室中的每一个室都包括约 100 皮升或更小的体积。

29. 如权利要求 22 所述的方法,其特征在于,所述至少 96 个室的密度大约是每平方厘米有 100 个室或更大。

30. 如权利要求 29 所述的方法,其特征在于,所述至少 96 个室的密度大约是每平方厘米有 250 个室或更大。

31. 如权利要求 30 所述的方法,其特征在于,所述至少 96 个室的密度大约是每平方厘米有 1000 个室或更大。

32. 一种给包括多个处理位点的微流体器件成像的装置,所述多个处理位点包含从 M 种样品中选出的至少一种样品以及从 N 种试剂中选出的至少一种试剂,所述装置包括:

照明系统,耦合到所述微流体器件并适用于用电磁辐射来照射所述微流体器件;

成像系统,耦合到所述微流体器件并适用于接收从所述多个处理位点那儿发出的电磁辐射;以及

耦合到所述成像系统的检测器。

33. 如权利要求 32 所述的装置,其特征在于,所述微流体器件是一种弹性微流体器件。

34. 如权利要求 32 所述的装置,其特征在于,所述处理位点是封闭的反应室。

35. 如权利要求 34 所述的装置,其特征在于,所述多个封闭的反应室包括每平方厘米有大约 250 个流体隔离的反应室或更大的反应室密度。

36. 如权利要求 32 所述的装置,其特征在于,从所述多个处理位点中发出的电磁辐射

是荧光信号。

37. 如权利要求 36 所述的装置,还包括耦合到所述微流体器件的热控制器。

38. 如权利要求 37 所述的装置,其特征在于,所述多个处理位点以大约 100 纳升或更小的体积为特征。

39. 如权利要求 38 所述的装置,其特征在于,所述多个处理位点以大约 10 纳升或更小的体积为特征。

40. 如权利要求 38 所述的装置,其特征在于,所述多个处理位点以每平方厘米有 250 个位点或更大的阵列密度为特征。

41. 如权利要求 38 所述的装置,其特征在于,所述多个处理位点以每平方厘米有 1000 个位点或更大的阵列密度为特征。

42. 如权利要求 32 所述的装置,其特征在于,所述多个处理位点适用于支持蛋白质结晶过程。

43. 如权利要求 32 所述的装置,其特征在于,所述电磁辐射是光辐射。

44. 一种光学成像系统,所述系统包括:

计算机;

所述弹性微流体阵列设备包括由多层构成的弹性模块,其中至少一层具有形成于其中的至少一个凹陷,所述凹陷具有至少一个可弯曲的膜,所述膜与具有所述凹陷的层构成一体;以及

光学检测系统。

45. 如权利要求 44 所述的光学成像系统,其特征在于,所述至少 1536 个反应室都以小于 100 纳升的体积为特征。

46. 如权利要求 44 所述的光学成像系统,其特征在于,所述至少 1536 个反应室按照每平方厘米大于或等于 250 个室的阵列密度来进行空间排列。

47. 如权利要求 44 所述的光学成像系统,其特征在于,M 种样品和 N 种试剂分布在所述至少 1536 个反应室中。

48. 如权利要求 44 所述的光学成像系统,其特征在于,所述光学照明系统从所述至少 1536 个反应室的子集中激发出一个或多个荧光信号的发射。

49. 如权利要求 44 所述的光学成像系统,其特征在于,所述光学检测系统适用于提供与所述至少 1536 个反应室的子集相关的蛋白质结晶过程的一个或多个图像。

## 用于微流体器件的光学透镜系统和方法

[0001] 本发明专利申请是申请日为 2005 年 6 月 7 日、申请号为 200580025595.5、名称为“用于微流体器件的光学透镜系统和方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 有关申请的交叉参照

[0003] 本申请要求 2004 年 6 月 7 日提交的美国临时申请 60/578,106 的优先权。

### 技术领域

[0004] 本发明一般涉及微流体技术。特别是，本发明提供用于给微流体器件的室内的（例如悬浮在流体体积中的）一个或多个实体成像的方法和系统。更具体地讲，这种成像方法和系统利用了与微流体器件中的一个或多个实体有关的荧光信号指示。仅作为示例，通过使用耦合到微流体器件的荧光、化学发光和生物发光读出器，来应用微流体方法和系统技术，但是将会认识到本发明具有更广的应用范围。

[0005] 经共同努力已开发并制造出各种微流体系统，来执行化学和生物化学的各项分析与综合。这些系统已被开发成用于各项制备和分析应用。制造这种微尺寸器件的目标源自常规大尺度分析与综合（这通常很笨重且不太有效）的小型化过程所实现的诸多重要益处。通过使用这些微流体系统，便实现了时间大幅减少、成本更低、空间分配更有效等诸多益处。对于使用这些微流体器件的自动化系统而言，附带的好处可以包括人工操作更少。自动化系统还减少了操作人员的过失以及其它和操作人员有关的局限。已经提出，微流体器件可用于各种应用，其中包括毛细电泳、气体层析和细胞分离。

[0006] 适于进行核酸扩增过程的微流体器件有可能有广泛的应用。例如，这种器件作为一种分析工具，可以用于确定在样品中是否存在特定的靶核酸。利用微流体器件作为分析工具的示例包括：

[0007] • 鉴定过程（例如，亲子鉴定和法医学应用）；

[0008] • 检测和表征与特定疾病或遗传病相关联的特定核酸；

[0009] • 检测与特定药物行为相关联的基因表达分布型 / 序列（例如药物遗传学，即选择对特定遗传概况相容的 / 特别有效的 / 无害的药物）；以及

[0010] • 进行基因型分析和基因表达分析（例如，差别基因表达研究）。

[0011] 或者，该器件可以按制备方式用于核酸扩增，从而产生足以进行进一步分析的水平的扩增产物。这些分析方法的示例包括扩增产物的测序、细胞分型、DNA 指纹鉴定等。扩增产物也可用于各种遗传工程应用。这些遗传工程应用包括（但不限于）生产所需蛋白质产物，这是通过将扩增产物插入载体，然后用该载体转化细胞使其产生所需蛋白质产物完成的。

[0012] 尽管有这些潜在的应用，适用于从这种微流体器件中收集并处理成像数据（例如，荧光数据）的成像系统（也被称为读出器）具有各种缺点。一些常规的读出器按扫描模式工作，其中激光束在微流体器件上进行光栅扫描。在其它这样的系统中，器件被平移，或者激光和器件同时平移。这些扫描器按照和激光源 / 器件的光栅扫描相关联的有序方式，从微流体器件中存在的反应室中收集荧光数据。其它常规的扫描器按缝合模式工作，按顺

序地给小区域（例如，尺寸小于  $1\text{mm}^2$  的区域）成像，并且将这些小图像缝合到一起，从而形成测试中的微流体器件的图像。

[0013] 扫描和缝合模式都有缺点。例如，两种类型的系统都工作在相对低的系统频率下，而系统频率作为时间的函数正比于成像面积。常规系统的工作频率在每分钟  $1\text{-}20\text{cm}^2$  的量级。对于某些感兴趣的试验，比如蛋白质热量测定和核酸扩增，通常需要大于约每分钟  $1\text{-}20\text{cm}^2$  的系统频率，以便对微流体器件的反应器皿中发生的荧光过程进行成像。常规的扫描和缝合系统无法满足这些性能目标。除了使系统通量放缓以外，这些扫描和缝合系统还会限制利用某些试验（例如，实时 PCR 的性能）的可能性。

[0014] 因此，本领域需要改进的方法和系统，来对微流体器件的反应室中的流体体积中悬浮的一个或更多的实体进行成像。

## 发明内容

[0015] 根据本发明，提供了用于微流体系统的技术。特别是，本发明提供了用于给微流体器件的反应室中的流体体积中悬浮的一个或多个实体成像的方法和系统。更具体地讲，本发明的成像方法和系统利用了与微流体器件中的一个或多个实体相关联的荧光信号指示。仅仅作为示例，通过使用和微流体器件相耦合的荧光、化学发光和生物发光读出器，来应用微流体方法和系统技术，但是将会认识到本发明具有更广的应用范围。

[0016] 在特定的实施例中，本发明提供了一种给微流体器件中的一个或多个选出的荧光指示成像的装置。该装置包括成像通道，耦合到至少一个微流体器件中的至少一个反应室。该成像通道用于传输从上述至少一个微流体器件的至少一个反应室中的一个或多个样品那儿获得的一个或多个荧光发射信号。该反应室具有一定的大小，其实际空间维度与成像通道正交。该装置还包括耦合到成像通道的光学透镜系统。该光学透镜系统用于传输与该反应室有关的一个或多个荧光信号。

[0017] 在另一个特定的实施例中，提供了一种用于给微流体器件的至少一个反应室中的一个或多个选出的荧光指示成像的方法。该方法包括：沿耦合到至少一个反应室的成像通道，传输从至少一个微流体器件的至少一个反应室内的一个或多个样品那儿获得的一个或多个荧光发射信号。上述至少一个反应室具有一定的大小，其实际空间维度与成像通道正交。该方法还包括：通过耦合到成像通道的光学透镜系统，传输与该反应室相关联的一个或多个荧光发射信号。该光学透镜系统用于将实际空间尺寸的大小减小到确定的水平。

[0018] 在本发明的另一个特定实施例中，提供了一种用于给微流体器件的一个或多个反应室内的一个或多个指示成像的系统。该系统包括光学通道，该光学通道能够传输微流体器件的空间区域的一部分的一个或多个图像。在一个实施例中，上述微流体器件的空间区域的那部分具有第一尺寸。该系统还包括第一透镜系统，它耦合到上述光学通道的第一部分。该第一透镜系统具有第一光学特性。该系统还包括第二透镜系统，它耦合到上述光学通道的第二部分。第二透镜系统具有第二光学特性。该系统另外包括检测器，该检测器耦合到上述光学通道的第三部分。该检测器可用于给上述空间区域的那部分拍摄一个或多个图像。此外，该检测器适用于拍摄一个或多个图像。在该检测器处，上述一个或多个图像具有确定的尺寸，约为第一尺寸或更小。

[0019] 在可选实施例中，提供了一种给微流体器件的一个或多个反应室的一个或多个指

示成像的方法。该方法包括：沿光学通道，传输微流体器件的空间区域的一部分的一个或多个图像。上述微流体器件的空间区域的那部分具有第一尺寸。该方法还包括：将第一透镜系统耦合到光学通道的第一部分。第一透镜系统具有第一光学特性。该方法另外包括：将第二透镜系统耦合到光学通道的第二部分。第二透镜系统具有第二光学特性。此外，该方法包括：用检测器给上述空间区域的那部分拍摄一个或多个图像。该检测器耦合到光学通道的第三部分，并且在检测器处，一个或多个图像具有确定的尺寸，约为第一尺寸或更小。

[0020] 在另一个可选实施例中，提供了一种给微流体器件成像的方法。该方法包括：在小于一分钟的时间范围内，通过使用图像检测空间区域，给和至少确定数目的微流体器件反应室相关联的空间区域拍摄图像。在特定的实施例中，上述空间区域的图像拍摄基本上不受缝合和 / 或扫描过程的影响。

[0021] 在另一个可选实施例中，提供了一种给微流体器件的一个或多个选出的荧光指示成像的装置。该装置包括成像通道，该成像通道耦合到至少一个微流体器件的至少一个反应室。该成像通道用于传输从上述至少一个微流体器件的至少一个反应室内的一个或多个样品那儿获得的一个或多个荧光发射信号。该装置还包括滤光器件，它耦合到成像通道（用于传输一个或多个发射信号）的第一空间部分。滤光器件用于传输一个或多个荧光发射信号的选定光谱带宽，还用于将与一个或多个荧光发射信号相关联的一种或多种色差处理到确定的程度。

[0022] 在特定的实施例中，提供了一种在弹性微流体器件中分析各种处理的方法。该方法包括：在不到一分钟的时间周期内，拍摄至少 96 个反应室的图像。在一个实施例中，这至少 96 个反应室处于彼此之间的流体隔离状态。该方法还包括处理该图像。

[0023] 在另一个特定实施例中，提供了一种用于给包括多个处理位置的微流体器件成像的装置。上述多个处理位置包含选自 M 个样品的至少一个样品以及选自 N 种试剂的至少一种试剂。该装置包括照明系统，该照明系统耦合到微流体器件并用电磁辐射照亮该微流体器件。该装置还包括成像系统，该成像系统耦合到微流体器件并用于接收从多个处理位置发射过来的电磁辐射。该装置另外包括耦合到成像系统的检测器。

[0024] 在另一个特定实施例中，提供了一种光学成像系统。该光学成像系统包括计算机和光学照明系统，该光学照明系统用于照射弹性微流体阵列器件，这种器件至少包括 1536 个处于流体隔离状态中的反应室。该弹性微流体阵列器件包括由多个层构成的弹性块。在这多个层中，至少一层具有形成于其中的至少一个凹陷。该凹陷具有至少一个可弯曲的膜，该膜被整合到凹陷的层上。光学成像系统还包括光学检测系统。

[0025] 在另一个可选的特定实施例中，提供了一种给微流体器件的多个反应室内的一个或多个选出的荧光指示成像的方法。该方法包括：沿成像通道，传输一个或多个荧光发射信号，所述一个或多个荧光发射信号是从微流体器件的多个反应室中的至少一个反应室内的一个或多个样品那儿获得的。该方法还包括：通过使用滤光器件，沿成像通道，选择性地传输上述一个或多个荧光发射信号的子集，该滤光器件用于使预定光谱带宽内的荧光发射信号通过，并且将与上述一个或多个荧光发射信号相关联的一种或多种色差处理到预定的程度。

[0026] 在特定的实施例中，该方法还包括：在检测器处，读取上述一个或多个荧光发射信号的子集的一部分；拍摄上述一个或多个荧光发射信号，这些信号是从微流体器件的多个

反应室中的至少一个反应室内的一个或多个样品那儿获得的；照亮上述至少一个微流体器件中的至少 96 个反应室，其中在多于 48 个反应室构成的一组中的每一个反应室与多于 48 个反应室构成的另一组中的每一个反应室都处于流体隔离状态，并且使上述至少一个微流体器件在确定的时间维持预定的温度，其中预定时间处的预定温度是多步热循环分布中的一部分。在另一个特定的实施例中，处理与上述一个或多个荧光发射信号相关联的一种或多种色差的过程包括：使上述一种或多种色差减小到预定的程度。该预定的程度以预定的焦点移动为特征，而该预定的焦点移动又与具有第一颜色的第一光线和具有第二颜色的第二光线相关联。在另一个特定的实施例中，滤光器件包括多个零屈光度双透镜和多个光谱滤光片。

[0027] 在本发明的一个实施例中，使用光学成像系统来收集和微流体器件有关的信息。在特定的实施例中，成像系统的使用包括一种由不止 63 个反应室构成的微流体器件。在另一个特定的实施例中，成像系统的使用包括一种具有弹性微流体器件的微流体器件。在可选的实施例中，成像系统的使用包括由不止 95 个反应室构成的微流体器件。在另一个可选的实施例中，成像系统的使用包括一种由不止 383 个反应室构成的微流体器件。在另外的实施例中，成像系统的使用包括一种由不止 511 个反应室构成的微流体器件。在另外的实施例中，成像系统的使用包括一种由 2304 个或更多个反应室构成的微流体器件。在另一个附加实施例中，成像系统的使用包括一种由 9216 个或更多个反应室构成的微流体器件。在另一个附加实施例中，成像系统的使用包括一种由 100000 个或更多个反应室构成的微流体器件。

[0028] 根据本发明的另一个实施例，使用光学成像系统来收集和微流体器件有关的信息。光学系统的使用包括一种弹性微流体器件，这种弹性微流体器件适合于在特定的实施例中执行蛋白质结晶化处理。在另一个实施例中，成像系统的使用包括一种弹性微流体器件，这种弹性微流体器件适合于执行有关处理。在另一个实施例中，成像系统的使用包括一种弹性微流体器件，这种弹性微流体器件适合于在选定的温度或温度范围内进行各种反应。在另一个特定的实施例中，光学成像系统被用于收集和 PCR 反应有关的信息。在另一个特定的实施例中，成像系统的使用包括一种微流体器件，这种微流体器件包括处于微流体隔离状态中的封闭式反应室。在其它实施例中，成像系统的使用包括耦合到该微流体器件的热控制器。

[0029] 在可选的实施例中，使用光学成像系统来给微流体器件成像。在这种可选实施例中，光学成像系统具有多个双透镜，适合于将色差的值减小到预定的程度。在一个实施例中，光学成像系统具有大于 0.23 的 NA。在另一个实施例中，光学成像系统具有大于或等于 0.36 的 NA。在另一个实施例中，光学成像系统具有大于 0.2 的 NA。在特定的实施例中，光学成像系统包括：第一光谱滤光片，耦合到第一双透镜；以及第二光谱滤光片，耦合到第二双透镜。此外，在另外的实施例中，第一双透镜使第一光谱滤光片所透射的第一波长处的色差值减小到第一预定程度，而第二双透镜使第二光谱滤光片所透射的第二波长处的色差值减小到第二预定程度。在某些实施例中，第一双透镜和第二双透镜是零屈光度双透镜。在其它实施例中，第一光谱滤光片、第一双透镜、第二光谱滤光片和第二双透镜是作为滤光轮来排列的。

[0030] 在本发明的另一个实施例中，使用荧光成像系统从微流体器件那儿获取多个图

像,其中包括一个或多个荧光发射信号。荧光成像系统的使用包括一种具有不止 63 个反应室的微流体器件,这些反应室都处于流体隔离状态中。在一个实施例中,荧光成像系统的使用包括一种具有图像微流体器件的微流体器件。在另一个实施例中,荧光成像系统的使用包括多个其体积小于 10nl 的反应室。在另一个实施例中,荧光成像系统的使用包括一种弹性微流体器件,这种弹性微流体器件具有每平方厘米大于或等于 100 个反应室的阵列密度。在可选的实施例中,荧光成像系统包括一种滤光器件,该滤光器件适合于使上述一个或多个荧光发射信号中选定的光谱带宽透射,并且还适合于将与上述一个或多个荧光发射信号相关联的一种或多种色差处理到确定的程度。

[0031] 在本发明的一个实施例中,提供了一种对微流体系统中的样品进行询问的光学系统。在本实施例所提供的光学系统中,检测器由一个阵列(例如,CCD 阵列)构成,其尺寸等于或大于要被成像到其上的微流体系统。在另一个实施例中,检测器通过使用至少一个透镜,以光学方式耦合到微流体器件。在另一个实施例中,检测器并不与微流体器件保形接触。在特定的实施例中,检测器与微流体器件保形接触。在另一个特定的实施例中,在光学系统中使用了在整个说明书中都讨论到的色差校正系统。

[0032] 在另一个实施例中,提供了一种对微流体器件进行询问的光学系统。光学系统具有放大率  $M \geq NA_o/NA_{det}$ ,其中  $NA_o$  是物方 / 样品那一侧的 NA,而  $NA_{det}$  是在因检测器表面反射所造成的损耗超过阈值之前可允许到达该检测器的最大的 NA。在特定的实施例中,检测器是 CCD,并且  $NA_{det} = 0.36$ 。在另一个实施例中,检测器是 CCD,并且  $0.23 \leq NA_{det} \leq 0.5$ 。

[0033] 在附加的实施例中,提供了一种对微流体系统中的样品进行询问的光学系统。检测器包括一种阵列(例如,CCD 阵列),其大小等于包含多个反应室的微流体器件的面积的 M 倍。在一个实施例中,微流体器件的面积包括多个要被询问的样品室。在该实施例中, $M = NA_o/NA_{det} +/-10\%$ ,其中  $NA_o$  是由焦深等种种考虑所确定的可接受的最大 NA,而焦深等种种考虑则涉及反应室之间可接受的串扰、它们的 XY 间隔和尺寸以及它们沿 Z 轴的宽度,并且  $NA_{det}$  使得  $\leq 40\%$  的入射光因反射、晕影等原因而在检测器表面处损失了。在另一个特定的实施例中,  $NA_{det}$  使得  $\leq 20\%$  的入射光因反射、晕影等原因而在检测器表面处损失了。在另一个特定的实施例中,  $NA_{det}$  使得  $\leq 10\%$  的入射光因反射、晕影等原因而在检测器表面处损失了。在可选的实施例中,  $M \geq 1$ 。在另一个可选的实施例中,  $M = 1$ 。

[0034] 和常规技术相比,通过使用本发明,实现了大量的益处。一些实施例提供了光学成像系统,以产生并检测来自微流体器件的荧光。另外,本发明的各实施例提供了一些光学系统,这些光学系统通过使用耦合到光谱滤光片的零屈光度消色差双透镜来减小色差。

[0035] 本发明的各实施例能够在单个平台上执行许多应用。例如,通过使用本发明的各实施例,来执行各种基因组应用,其中包括基因表达和基因型鉴定。此外,数字隔离与检测(DID) 应用是可行的。作为一个示例,提供了许多涉及癌症检测、单细胞大分子检测和量化等应用。此外,通过本发明的各实施例,提供了许多蛋白质组学的应用,其中包括蛋白质配体结合以及免疫测定处理。

[0036] 另外,根据本发明的各实施例,可以实现某些益处和 / 或优点,以克服其它技术的某些局限。下面的内容都是基于计算而确定的:

[0037] 一些扫描系统具有期望的分辨率 10 微米。在这些系统中,总共有  $3000 \times 3000$ (= 约  $10^{67}$ ) 个“点”,期望针对这些“点”来使荧光量化。例如,为了在 10 秒内实现上述这一点,

每一个点处的停留时间是 $\sim 1$ 微秒。相应地，在3毫秒内将完成线扫描（3000个点）。为了获得和使用本发明各实施例而实现的信噪比等价的信噪比，该“点”处的光强应该比本发明的成像系统通过在1秒周期内获得一个信号从而实现的光强要亮 $\sim 10^6$ 倍。为了在3毫秒内越过3厘米扫描一个点，1000次/秒在机械方面常常是很有挑战性的。另外，期望高效地收集发射信号。这通常需要很大的场光学镜片或NA很高的浮动头（例如，以 $>= 10\text{m/s}$ 的速度移动）。在这种情况下，和器件左上角处收集的数据相比，器件右下角处收集的数据将晚10秒，这在某些应用中是不期望出现的。

[0038] 一些缝合系统获取多个图像，并且将它们缝合到一起从而形成复合图像。在一个系统中，为了用多个3mmx3mm的图像缝合出一个图像，利用了100个图像。获取这些单张图像所用的总时间将是100毫秒。假设大约一半的时间用在移动上面，另一半时间用在获取图像上面，则图像时间将大约是50毫秒。该系统通常需要比本发明各实施例在1秒周期内获取1个信号的过程中所用的光强要强20倍的光强，和/或还需要NA更高的物镜。另外，这些系统通常需要快速的镜台—能够移动3毫米并且能够在50毫秒内完全结束。另外，这些系统通常需要对移动和光强进行仔细的校准，以消除缝合过程中的伪像。和左上角处收集的数据相比，右下角处收集的数据将晚10秒，这在某些应用中是不期望出现的。

[0039] 本发明的一些实施例提供了能够使微流体器件所在区域一次全部成像的成像系统。在每个图像可以有10秒的一个实施例中，可以有若干秒的整合时间。同步化问题减小了或消除了，因为数据是同时从所有的像素中收集的。此外，本发明的各实施例通常同时照亮整个微流体器件（ $\sim 31\text{mm} \times 31\text{mm}$ 的区域），并且使用具有高NA和大视场的透镜系统。如本说明书中所描述的，本发明的各实施例提供了比常规系统简单且更有用的方法和系统。根据各实施例，本发明各实施例的方法和系统可以克服上述这些局限中的一种或多种。在本说明书中，尤其是在下文中，可以找到本发明的细节。根据各实施例，可能存在这些益处中的一种或多种。在本说明书中，尤其是在下文中，会描述这些和其它益处。

[0040] 参照下面的详细描述和附图，可以更全面地理解本发明的各种其它的目的、特征和优点。

## 附图说明

- [0041] 图1A是示出了本发明一实施例的光学成像系统的简化示意图；
- [0042] 图1B描绘了本发明一可选实施例的典型成像系统的概观；
- [0043] 图1C是示出了本发明一实施例的热控制器件的简化示意图；
- [0044] 图2A-2C是示出了本发明一实施例的透镜组件的简化示意图；
- [0045] 图3是根据本发明一实施例在微流体器件的许多反应室中通过反应而产生的以第一波长为中心的荧光发射的照片；
- [0046] 图4是根据本发明一实施例在微流体器件的许多反应室中通过反应而产生的以第二波长为中心的荧光发射的照片；
- [0047] 图5-7是使用本发明一实施例而产生的选定波长的光点图；
- [0048] 图8是使用本发明一实施例而产生的照明图，该照明图示出了相对均匀性和位置的函数关系图；
- [0049] 图9-11是本发明若干实施例的正方块块内能量图；

- [0050] 图 12 是示出了本发明一实施例所提供的光学系统的场曲和畸变的图；
- [0051] 图 13 是示出了本发明一实施例的系统所产生的“双波长对焦点”的图；
- [0052] 图 14-16 是使用本发明一实施例而产生的选定波长的光点图；
- [0053] 图 17-19 是使用本发明一实施例而产生的选定波长的光点图；
- [0054] 图 20-22 是使用本发明一实施例而产生的选定波长的光点图；
- [0055] 图 23-25 是使用本发明一实施例而产生的选定波长的光点图；
- [0056] 图 26-28 是本发明若干实施例的正方块块内能量图。

## 具体实施方式

[0057] 根据本发明，提供了用于微流体系统的多种技术。特别是，本发明提供了一种给微流体器件的反应室内的流体体积中悬浮的一个或多个实体成像的方法和系统。更具体地讲，这种成像方法和系统利用了与微流体器件中的一个或多个实体相关联的荧光信号的指示。仅仅作为示例，通过使用和微流体器件相耦合的荧光、化学发光和生物发光读出器，来应用微流体方法和系统技术，但是将会认识到本发明具有更广的应用范围。

[0058] 在本申请中，提到了微流体器件中的某些类型的“反应”室。通常，这些“反应室”包括处理位置、处理室、和 / 或反应位置、它们的任意组合等等。这些室室可以是闭合的、部分闭合的、打开的、部分打开的、密封的、或它们的组合等等，其中包括涉及这些状态中的任何状态的任何暂时或瞬时条件。在一些实施例中，这些室室是密封的、能够密封的、可闭合的、隔离的、能够隔离的、和它们的组合、以及涉及这些状态中的任何状态的任何暂时或瞬时条件中的任何组合或单个条件。因此，术语“反应室”的使用并不旨在限制本发明，而是包括这些其它结构。另外，术语“室”并不旨在限制本发明，而是应该按其普通的意思来使用，除非已经引用和该室相关联的特定特征。当然，可以有其它变化、修改和替换。

[0059] 此外，在本申请中，提到了来自微流体器件的荧光指示。本发明的范围内不仅包括荧光指示，还包括发光指示，其中包括化学发光、电致发光、电化学发光、磷发光、生物发光和其它发光过程、或包括可用检测器件检测的任何其它类型的指示的任何其它过程。对于本领域的技术人员，很明显，可用于检测并分析这些荧光和发光指示的方法和系统可以从一种指示转移到另一种指示。另外，尽管本发明的一些实施例利用光谱滤光片作为光学元件，但是本发明并没有要求这一点。一些荧光和发光应用并不在光激发通道、光发射通道或二者中使用光谱滤光片。如本文所述，其它实施方式采用光谱滤光片。本领域的技术人员会理解与特定应用相关联的诸多差异。

[0060] 在一些实施方式中，使用了用于进行微流体分析的各种器件和方法，其中包括可用于进行热循环反应如核酸扩增反应的器件。这些器件和常规微流体器件相比不同之处在于：它们包括了弹性组件；在某些情况下，该器件大部分或全部都是由弹性材料构成的。例如，扩增反应可以是线性扩增（用一种引物扩增）以及指数扩增（即用正向和反向组进行扩增）。

[0061] 本发明的一些实施方式所提供的方法和系统在执行核酸扩增反应的过程中利用了盲端通道类型的器件。在这些器件中，通常沉积在反应位点内的试剂是进行所需类型的扩增反应所必需的那些试剂。通常，这意味着沉积以下某些或全部试剂：引物、聚合酶、核苷酸、金属离子、缓冲液和辅因子。在这种情况下，引入反应位点的样品是核酸模板。然而，可

沉积该模板，并且使扩增试剂流入反应位点。如本发明中详细讨论的那样，当使用矩阵器件进行扩增反应时，含核酸模板的样品流过垂直的流动通道，而扩增试剂则流过水平的流动通道，反之亦然。

[0062] PCR 或许是已知最好的扩增技术。本发明各实施例所使用的器件并不限于进行 PCR 扩增。可以进行的其它类型的扩增反应包括但不限于：(i) 连接酶链反应 (LCR) (参照 Wu 和 Wallace, Genomics 4 :560 (1989) 以及 Landegren 等人, Science 241 :1077 (1988))；(ii) 转录扩增 (参照 Kwoh 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :1173 (1989))；(iii) 自动维持序列复制 (参照 Guatelli 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 :1874 (1990))；以及(iv) 基于核酸的序列扩增 (NASBA) (参照 Sooknanan, R. 和 Malek, L., BioTechnology 13 : 563–65 (1995))。上述各种参考文献以其全部内容引用在此。

[0063] 此外，设计某些器件，以采用包括一个或多个弹性阀的器件进行热循环反应（如 PCR），所述弹性阀用来调控流过该器件的溶液。因此，也提供了用这种设计的器件来进行扩增反应的方法。

[0064] 不管是被隔离在反应室内还是在随后的任何时刻，都可以用检测核酸的常规方法来检测并区分扩增产物（扩增子）。使用嵌入染料如 SYBR<sup>TM</sup>、Pico Green (俄勒冈州 Eugene 市 Molecular Probes 有限公司)、溴化乙锭等 (参照 Zhu 等人, 1994, Anal. Chem. 66 : 1941–48) 和 / 或凝胶电泳，可以检测包含双链 DNA 的扩增子。更常见的是，使用序列特异性检测方法（即基于核苷酸序列检测扩增子）。检测方法的示例包括：固定的寡核苷酸或多核苷酸的阵列杂交；以及使用基于差别标记分子信标的检测系统，或者其它“荧光共振能量转移”(FRET) 检测系统。根据本发明的一些实施方式，FRET 检测是较佳的检测方法。在 FRET 试验中，检测供体 / 受体荧光团对中供体（报道物）和 / 或受体（淬光剂）荧光团的荧光变化。选择供体和受体荧光团，使得供体的发射光谱与受体的激发光谱交迭。因此，当使这对荧光团彼此靠得足够近时，会发生从供体到受体的能量转移，并且可以检测到这种能量转移。已知各种试验，包括但不限于：模板延伸反应、定量 RT-PCR、分子信标 (Molecular Beacons) 和侵入检测 (Invader assay)，下面对它们进行简述。

[0065] FRET 和模板延伸反应使用：用供体 / 受体对中的一个成员标记的引物，以及用此供体 / 受体对中的另一成员标记的核苷酸。在模板依赖性延伸反应期间将标记核苷酸掺入引物中之前，先将供体和受体分隔得足够远，以使能量转移无法发生。然而，如果标记核苷酸掺入引物并且间隔足够近，则会发生能量转移并且可以检测到这种能量转移。这些方法在检测单核苷酸多态性的单碱基对延伸反应中特别有用，参见美国专利 5,945,283 和 PCT 公开 WO 97/22719。通过使用本说明书中所述的温度控制方法和装置，可以任选地对这些反应进行热循环，以增大信号。

[0066] 也可以使用各种所谓的“实时扩增”方法或“实时定量 PCR”方法，通过测量扩增过程期间或之后所形成的扩增产物的量，来确定样品中存在的靶核酸量。发荧光的核酸酶试验是实时定量方法的一个特定示例，实时定量方法可以和本文所述器件一起成功地使用。这种监控扩增产物的形成的方法包括：用双标记的荧光寡核苷酸探针连续测量 PCR 产物累积，此方法在文献中常被称为“TaqMan”法。参见例如，美国专利 5,723,591。

[0067] 在使用分子信标的情况下，当它杂交到扩增产物的互补区域时探针构象的变化产生了可检测的信号。探针自身包括两部分：5' 端的一部分，以及 3' 端的另一部分。这些部

分侧接于退火到探针结合位点的探针部分，并且彼此互补。一端部分通常连接于报道染料，而另一端部分通常连接到淬光染料。在溶液中，这两个端部分可以彼此杂交形成发夹环。在这种构象中，报道物和淬光剂靠得足够近，使得报道物的荧光被淬光染料有效地淬灭。相反，杂交探针产生线性化构象，其中淬灭程度降低。由此，通过监测这两种染料的发射光变化，有可能间接地监测扩增产物的形成。这种类型的探针及其使用方法在下面的文献中有进一步的描述：如 Piatek 等人，1998 年，*Nat. Biotechnol.* 16 :359-63；Tyagi 和 Kramer，1996 年，*Nat. Biotechnology* 14 :303-308；以及 Tyagi 等人，1998 年，*Nat. Biotechnol.* 16 :49-53(1998)。

[0068] 下列文献中描述了 Scorpion 检测法：Thelwell 等人，2000 年，*Nucleic Acids Research*, 28 :3752-3761；以及 Solinas 等人，2001 年，“SNP 分析和 FRET 应用中的双链体 Scorpion 引物”(Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications), *Nucleic Acids Research* 29 :20。Scorpion 引物是荧光 PCR 引物，其中探针元件通过 PCR 终止物连接到 5' 端。它们用于均一溶液中 PCR 产物的实时扩增子特异性检测。可能有两种不同的形式，即“茎-环”形式和“双链体”形式。在这两种情况下，探测机制都是作用于分子内。所有形式的 Scorpion 基本元件是：(i)PCR 引物；(ii)PCR 终止物，用于防止探针元件的 PCR 通读 (read-through)；(iii)特定探针序列；以及(iv)荧光检测系统，该系统包含至少一个荧光团和淬光剂。在 Scorpion 引物的 PCR 延伸之后，所得扩增子包含与探针互补的序列，在各 PCR 循环的变性阶段将其分解成单链。在冷却时，该探针可自由地结合该互补序列，从而增加荧光，因为淬光剂不再位于荧光团附近了。PCR 终止物防止 Taq DNA 聚合酶进行不期望的探针通读。

[0069] 侵入检测 (Third Wave Technologies 公司，Madison 市，威斯康星州) 被特别地用于 SNP 基因型分析，它利用与靶核酸 (DNA 或 RNA) 或多态性位点互补的寡核苷酸，称为信号探针。第二寡核苷酸 (称为侵入寡核苷酸) 包含相同的 5' 核苷酸序列，但 3' 核苷酸序列包含核苷酸多态性 (位点)。侵入核苷酸干扰信号探针与靶核酸的结合，使得信号探针的 5' 端在包含多态性 (位点) 的核苷酸处形成“下垂物”。该复合物被一种称为 Cleavase 酶的结构特异性内切核酸酶识别。Cleavase 酶切下核苷酸的 5' 下垂物。所释放的下垂物与携带 FRET 标签的第三探针结合，由此形成另一种由 Cleavase 酶识别的双链体结构。此时，Cleavase 酶从淬光剂中切下荧光团，产生荧光信号。对于 SNP 基因型分析，设计信号探针，使其与参比 (野生型) 等位基因或变异 (突变) 的等位基因杂交。不像 PCR，有一种线性的信号扩增，其中没有核酸扩增。足以指导本领域普通技术人员的诸多细节参见：Neri, B. P. 等人，*Advances in Nucleic Acid and Protein Analysis* 3826 :117-125, 2000 年；以及美国专利 6,706,471。

[0070] 各种多重扩增系统可与本发明联用。在一种类型中，可使用多个标记不同的探针 (每一个探针被设计成只杂交到特定的目标) 同时检测若干个不同的靶标。因为各探针具有不同的标记，所以根据荧光信号检测与各靶标的结合。通过明智地选择所使用的不同标记，可进行在单次反应中以不同波长激发和 / 或检测不同标记的各种分析。例如，可以参照：《荧光光谱学》(Fluorescence Spectroscopy) (Pesce 等人著) Marcel Dekker, New York, (1971)；White 等人著，《荧光分析：实践方法》(Fluorescence Analysis: A Practical Approach)，Marcel Dekker, New York, (1970)；Berlman 著，《芳族分子的荧光光谱手册》

(Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules), 第二版, Academic Press, New York, (1971); Griffiths 著,《有机分子的颜色和构造》(Colour and Constitution of Organic Molecules), Academic Press, New York, (1976);《指示物》(Indicators) (Bishop 编), Pergamon Press, Oxford, 1972; 以及 Haugland 著,《荧光探针和研究用化学物质手册》(Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals), Molecular Probes, Eugene 市 (1992)。

[0071] 许多与基因组修饰有关的疾病,无论是宿主有机体的抑或感染有机体的疾病,是少量核苷酸发生变化(常常包括单个核苷酸改变)的结果。这种单核苷酸变化称为单核苷酸多态性(简称为 SNP),并且发生 SNP 的位点通常称为多态性位点。本文所述的器件可用于确定这种多态性位点处存在的核苷酸的身份。作为这种能力的扩展,这些器件可用于基因型分析。基因型分析包括:确定二倍体生物体(即各基因有两个拷贝的生物体)是否包含两个拷贝的参比等位基因(参比型纯合子),或者包含参比和变异等位基因各一个拷贝(即杂合子),抑或包含两个拷贝的变异等位基因(即变异型纯合子)。当进行基因型分析时,可用本发明方法询问单个变异位点。然而,如下文关于多道传输那部分所进一步描述的,这些方法也可用于确定许多不同的 DNA 位置(loci)(相同基因上的 DNA 位置、不同基因上的 DNA 位置或二者的组合)中单个(基因)的基因型。

[0072] 用于进行基因型分析的器件被设计成采用大小合适的反应位点,以在统计学上确保该反应位点中存在可行 DNA 浓度的二倍体的两种等位基因各一拷贝。否则,分析可能产生表明杂合子就是纯合子的结果,仅仅因为该反应位点处不存在第二种等位基因的拷贝。下表 1 指出本文所述器件可利用的各种示范性 DNA 浓度下 1 纳升反应体积中存在的基因组的拷贝数。

[0073] 表格 1: 在所示 DNA 浓度下 1 纳升体积中存在的基因组拷贝数。

[0074]

体积(纳升)	[DNA]( $\mu$ g/ $\mu$ L)	N
1	0.33	100
1	0.10	32
1	0.05	16
1	0.01	3
1	0.003	1

[0075] 一般说来,因样品的随机配比,扩增反应开始之前存在的拷贝数决定了测量中可能的误差。通常用 DNA 浓度约为 0.10  $\mu$  g/ $\mu$  L 的样品来进行使用某些器件的基因型分析,尽管本发明人已经在每一反应位点有一个基因组的浓度下成功地运行了 TaqMan 反应。

[0076] 基因型分析可以使用各种不同的方法来进行。在这些方法中,通常足以获得“是”或“否”的结果,即检测过程只需要能够回答是否存在给定等位基因的问题。因此,只有使用用来检测可能位于多态性位点处的一种等位基因的存在所必需的引物或核苷酸,才能够

进行各种分析。然而,更常见的是,包括了用于检测多态性位点处可能存在各等位基因的引物和核苷酸。

[0077] 单碱基对延伸 (SBPE) 反应是一种专门针对基因型分析而开发的技术。尽管已经开发出许多 SPBE 试验,但是一般方法相当相似。通常,这些试验包括杂交一种与靶核酸互补的引物,使得该引物的 3' 端恰恰是变异位点的 5' 端或与其相邻。在一种或多种标记的不可延伸的核苷酸和聚合酶的存在下进行延伸,这种核苷酸与占据变异位点的核苷酸互补。不可延伸的核苷酸是一种核苷酸类似物,一旦将该核苷酸类似物掺入引物中便可以防止聚合酶的进一步延伸。如果所添加的不可延伸的核苷酸与变异位点的核苷酸互补,则标记的不可延伸的核苷酸被掺入该引物的 3' 端,从而产生标记的延伸产物。因此,延伸引物可以表示哪一种核苷酸存在于靶核酸的变异位点处。这些方法和相关的方法在下列文献中进行了讨论:美国专利 5,846,710、6,004,744、5,888,819、5,856,092、5,710,028 以及 WO 92/16657。

[0078] 也可用定量 PCR 方法进行基因型分析。在这种情况下,与各等位基因形式互补的区别标记探针与引物、核苷酸和聚合酶一起被包括成为试剂。然而,可以只用一种探针进行反应,尽管这会产生不确定性,即没有信号是因为没有特定的等位基因还是简单地因为反应失效。对于一个多态性位点有两个等位基因的典型双等位基因情况,试剂混合物中通常包含两个区别标记的探针(各自与等位基因之一完美互补),以及扩增引物、核苷酸和聚合酶。将包含靶 DNA 的样品引入反应位点。如果靶 DNA 中存在与探针互补的等位基因,则进行扩增,由此产生在上述检测中所描述的可检测信号。根据所获的差别信号,可以确定多态性位点处的核苷酸身份。如果两个信号都被检测到,则两个等位基因都存在。如上述温度控制部分所述,进行反应期间的热循环。

[0079] 基因表达分析包括:测定在特定细胞中表达一种或多种基因的水平。这种测定可以是定性的,但通常是定量的。在差别基因表达分析中,将一种细胞(例如受试细胞)中的基因水平与另一种细胞(对照细胞)中相同基因的表达水平进行比较。可以做出非常多的这种比较。示例包括但不限于:健康细胞和病变细胞之间的比较;用一种药物治疗的个体的细胞和未治疗个体的细胞之间的比较;接触和未接触具体毒剂的细胞之间的比较,等等。在受试和对照细胞中表达水平不同的那些基因可以用作治疗的标记物和/或靶点。例如,如果在病变细胞而非健康细胞中发现某组基因被上调,则这些基因可以用作疾病的标记物并且有可能用作诊断测试的基础。这些基因也可以是靶点。治疗该疾病的方案可包括导致这些上调基因表达降低的步骤。

[0080] 本发明实施方式中所使用的微流体器件的设计有利于各种基因表达分析。因为这些器件包含大量的反应位点,所以可同时测定大量的基因和/或样品。采用盲端流体通道器件,可以同时测定成百上千种基因的表达水平。这些器件也有利于差别基因表达分析。在使用矩阵设计的情况下,获自健康细胞的样品可以在一条流体通道中进行测试,而来自病变细胞的样品则在紧邻的通道中运行。这种特征使检测变得容易,并且提高了结果的精确度,因为两个样品同时在同一器件上运行并且处于相同的条件下。

[0081] 根据本发明的各实施方式,也使用各种矩阵器件或以阵列为基础的器件。某些这样的器件包括:(i)第一类多个流体通道,形成于弹性基板中;(ii)第二类多个流体通道,形成于弹性基板中并与第一类多个流体通道相交从而限定了反应位点的阵列;(iii)多个

隔离阀,设置在第一类和第二类多个流体通道内,可用于将各反应位点内的溶液与其它反应位点处的溶液隔离开;以及(iv)多个保护通道,它们覆盖在一条或多条流体通道和/或一个或多个反应位点上,以防止溶液蒸发。上述器件可用于许多不同类型的反应,包括那些涉及温度调节的反应(例如,核酸分析的热循环)。

[0082]一些微流体器件使用一种常被称为“盲端通道”或“盲端填充”的设计,这种设计具有多个盲端通道,盲端通道是具有一个死端或隔离端使得溶液只能从该盲端通道的一个端进出的这样一种流体通道(即盲端通道没有单独分离的入口和出口)。这些器件只需要给每一个盲端通道配单个阀,以便隔离盲端通道的区域从而形成隔离的反应位点。在这种类型的器件的制造过程中,用于进行分析的一种或多种试剂被沉积在反应位点处,由此使输入和输出的次数显著减小。另外,这些盲端通道连接到互连的通道网络,使得可以从单个或有限个样品输入填充所有的反应位点。因为输入和输出复杂性减小了并且只使用单个阀来隔离每一个反应位点,所以可用于反应位点的空间增大了。由此,这些器件的特征意味着,每一个器件可以包括大量的反应位点(例如,多达上万个),并且可以实现高反应位点密度(例如,每平方厘米超过1,000-4,000个反应位点)。和常规的微流体器件相比,上述这些特征也直接地使器件的尺寸显著减小。

[0083]本文所揭示的其它微流体器件使用矩阵设计。通常,这种类型的微流体器件使用多个相交的水平和垂直流体通道,以便在相交的点处定义反应位点的阵列。由此,这种设计的器件也具有阵列或反应位点;然而,在使用的这种设计时,仍然有大量的样品输入和相应的样品输出供给大量的样品。被称为可切换式流体阵列构架的阀系统能够使溶液选择性地流过水平或流体通道,由此允许对矩阵中的各种流体通道进行可切换的隔离。因此,尽管盲端通道被设计成在不同的条件下用有限数目的样品来进行大量的分析,但是矩阵器件被构建成在有限的条件下分析大量的样品。其它器件都是这两个通用设计类型的混合。

[0084]其它微流体器件是整体分隔器件(DID),在下列文献中对此进行了描述:PCT公报WO 2004/089810;美国专利申请10/819088,作为US 20050019792予以公布;2006年6月2日提交的共同待批共同转让的专利申请No.\_\_\_\_\_且题为“Analysis using microfluidic partitioning devices”(代理人档案标号020174-012400),这些文献全部引用在此作为参考。通过使用整体分隔器件,样品可以被分隔到多个隔离的反应室中,并且在每一个室内同时执行多个反应。

[0085]本文所描述的微流体器件进一步还具有下列部分特征:使用由弹性材料制成的各种组件,比如流体通道、控制通道、阀和/或泵。在一些情况下,

[0086]基本上整个器件都是由弹性材料制成的。结果,和用塑料或以硅为主的材料构成的常规微流体器件相比,上述器件在形状和功能方面具有显著的不同。根据本发明的各实施例,所提供的反应室的数目可以有所不同。

[0087]这些器件的设计能够使它们与许多不同的加热系统相结合地使用。由此,这些器件可用于进行需要温度控制的各种不同的分析。另外,适合于用在加热应用中的微流体器件可以包括另一种设计特征,以便使反应位点处样品的蒸发最小化。这种类型的器件通常包括许多形成于弹性器件内的保护通道和/或储液囊或室,通过它们可以使水流入从而增大构成该器件的弹性材料内的水蒸气气压,由此减小样品材料在反应位点处的蒸发。

[0088]在另一个实施方式中,可用温度循环器件来控制微流体器件的温度。较佳地,微流

体器件将用于与微流体器件热接触。在基板材料支撑微流体器件的情况下,如载玻片或载板(如塑料托架)底部,可以在载板或载玻片的区域中形成窗口,使得微流体器件(最好是具有弹性模块的器件)可以直接接触温度循环器件的加热/冷却模块。在较佳的实施方式中,加热/冷却模块具有形成于其中的槽,这些槽和真空源相连,用于对该微流体器件施加吸入力,最好对发生反应的位点邻接的部分施加吸入力。或者,可以将刚性导热盘接合到微流体器件,然后与加热和冷却模块配对以便有效地进行热传导。

[0089] 某些器件的阵列格式意味着这些器件可以实现高通量。总的说来,高通量和温度控制能力使这些器件可用于进行大量核酸扩增(例如,聚合酶链反应(PCR))。本文将详细讨论这种反应,以说明该器件的实用性,尤其是它们在需要温度控制的任何反应中的应用。然而,应该理解,这些器件并不限于这些特定应用。这些器件可用于各种其它类型的分析或反应之中。这些示例包括:分析蛋白质-配体相互作用;以及分析细胞与各种化合物之间的相互作用。在本说明书中提供了更多的示例。

[0090] 本文所揭示的微流体器件通常至少部分地由弹性材料构成,并且由单层和多层软光刻(MSL)技术和/或牺牲层包裹方法(例如,参照Unger等人,(2000)Science 288:113-116;以及PCT公报WO 01/01025,它们全部引用在此作为参考)。通过使用这些方法,微流体器件可以被设计成,溶液流过该器件的流体通道的过程至少部分程度受到控制,其中用弹性膜或区段使一个或多个控制通道和流体通道分隔开。通过向控制通道施加作用力,该膜或区段可以弯曲到和控制通道相关联的流体通道中或从该流体通道中缩回来。通过控制上述膜弯曲到流体通道中的程度或者控制上述膜从该流体通道中缩回来的程度,在流体通道中的溶液流动可以放缓或完全被阻挡。通过使用这种类型的控制通道和流体通道的组合,便可以制备各种不同类型的阀和泵以便调节溶液流动,在下列文献中对此有更多的细节描述:Unger等人,(2000)Science 288:113-116;以及PCT公报WO/02/43615和WO 01/01025。

[0091] 本文所提供的器件包括这种泵和/或阀,以便选择性地隔离允许试剂发生反应的那个反应位点。或者,使用不带泵和/或阀的器件,这些器件使用压力驱动流或聚合过程来关闭合适的通道,并由此选择性地隔离反应位点。反应位点可以被定位到该器件内大量不同位置中的任何位置。例如,在一些矩阵型器件中,反应位点被定位到一组流体通道的相交处。在盲端通道器件中,反应位点被定位到盲端通道的一端。

[0092] 如果该器件用于温度控制反应(例如,热循环反应),则如下文更详细的描述,弹性器件通常被固定到托架(例如载玻片)上。所得的结构可以接着被放到温度控制板上,以便控制各个反应位点处的温度。在热循环反应的情况下,该器件可以被放到许多热循环板上。

[0093] 因为这些器件均由相对而言具有光学透明性的弹性材料制成,所以在微流体器件上基本上任何位置处,通过使用各种不同的检测系统,都可以很容易地监控各种反应。然而,通常,都是在反应位点自身处进行检测(例如,在包括流体通道交点的区域或在流体通道的盲端)。上述器件由基本上透明的材料制成这一事实也意味着,某些检测系统可以和目前尚不能与常规硅基微流体器件一起使用的那些器件一起使用。通过使用被嵌入上述器件中的检测器,或者通过使用与上述器件分离但与待测器件区域对准的检测器,便可以实现检测。

[0094] 使用矩阵设计的器件通常具有多个垂直的和水平的流体通道,这些流体通道彼此相交以便形成多个结的阵列。因为不同的样品和试剂(或试剂组)可以被引入每一个流体通道,所以可以按高通量形式在相对大量的反应条件下测试大量的样品。由此,如果不同的样品被引入M个不同的垂直流体通道中的每一个通道之内并且不同的试剂(或试剂组)被引入N个水平的流体通道的每一个通道之内,则可以同时进行MxN个不同的反应。通常,矩阵器件包括阀,允许对垂直和水平的流体通道进行可切换的隔离。这些阀定位成允许选择性地只流过垂直的流体通道,或只流过水平的流体通道。因为该类型的器件具有和样品类型和数目选择、试剂数目和类型选择等有关的灵活性,所以这些器件可很好地适用于进行许多特定的分析,在这些特定的分析中,人们想要根据相对大量的反应条件来筛选大量的样品。矩阵器件可以选择性地包括保护通道,以便防止样品和试剂的蒸发。

[0095] 一些高密度矩阵设计利用了微流体器件各层之间的流体连通孔,以便使整个器件中的控制线和流体线交织起来。例如,通过使双层弹性模块的每一层中都具有流体线,密度更高的反应室排布是可行的。对于本领域的技术人员而言,很明显,多层器件允许流体线彼此在上或在下相交,同时不处于流体传递的状态中。例如,在特定的设计中,第一层中的试剂流体通道通过一个孔连接到第二层中的试剂流体通道,而第二层中还具有样品通道,样品通道和试剂通道分别终结于样品和试剂室。样品室和试剂室通过一个连接通道而进行流体传递,该连接通道具有相关的连接阀,以便控制反应室的每一个室之间的流体传递。在使用过程中,该连接首先闭合,然后从试剂入口将试剂引入试剂通道中,并且从样品入口将样品引入样品通道中。然后,密封阀闭合,以便使反应室和其它室隔离开。一旦反应室被隔离,则打开连接阀以便使样品室和试剂室进行流体传递,从而可以发生想要的反应。本领域的技术人员将认识到许多变体、修改和替换。

[0096] 相应地,用于微流体器件的特定设计提供了一种微流体器件,它适用于使M种不同的样品和N种不同的试剂进行反应,该器件包括:多个反应室,每一个反应室包括样品室和试剂室,样品室和试剂室通过连接通道进行流体传递,该连接通道具有相关的连接阀,用于控制样品室和试剂室之间的流体传递;多个样品入口,都和样品室相通;多个试剂入口,都和试剂室相通;其中样品入口或试剂入口之一通过小孔分别与样品室之一或试剂室之一进行流体传递。某些实施例包括:在多层结合所构成的弹性模块中形成多个反应室,并且连接阀是可弯曲的膜;使样品入口通过样品通道和样品室相通,使试剂入口通过试剂通道和试剂室相通,样品通道的一部分和试剂通道的一部分定向成大约彼此平行,并且各自具有相关联的密封阀,用于控制所通过的流体传递过程;使与样品通道相关联的阀和与试剂通道相关联的阀通过共用的密封控制通道彼此相通;使密封共用控制通道沿着大约和样品通道或试剂通道正交的线定位。

[0097] 本发明各实施例中所使用的微流体器件可以进一步被集成到一种托架器件中,这在共同待批、共同拥有的由Unger filed于2004年3月29日提交的美国专利申请60/557,715中进行了描述,该专利申请引用在此作为参考。Unger的托架提供了工作中的连续流体压力,以便保持阀闭合状态远离流体压力源(例如,房间空气压力)。如上述专利申请中所述的,Unger进一步提供了一种自动系统,用于充注并启动本发明的阀。在另一个较佳实施例中,用于充注蓄能器并启动阀的自动系统使用了一种具有滚筒的器件,该滚筒顶住微流体器件的一个或多个表面,其中该滚筒具有至少两个或多个与受控真空或压力源

相通的端口，并且可以包括用于操纵微流体器件多个部分的机械部分，例如但不限于单向止回阀。

[0098] 本发明各实施例中所使用的另一种器件提供了一种被用作基板的托架，用于使弹性模块稳定。较佳地，该托架具有一个或多个下面的特征：一个井或储液囊，它通过形成于托架中或与托架一起形成的至少一个通道而与弹性模块相通；蓄能器，它通过形成于托架中或与托架一起形成的至少一个通道而与弹性模块相通；以及流体端口，与弹性模块相通，其中该流体端口最好可以接入自动真空或压力源（比如上述自动系统），其中自动源还包括一种具有端口的滚筒，它与上述流体端口配对，以便在用于将流体压力或真空施加到弹性模块的自动系统之间形成隔离的流体连接。在某些实施例所用的器件中，自动源也可以与一个或多个与托架相关联的蓄能器相通，以便充注并释放蓄能器中所维持的压力。在某些实施例中，该托架可以进一步包括定位于该托架范围内接触微流体器件的一个区域，其中该区域由与该托架另一个部分不相同的材料制成，该区域材料的选择是为了改善热传导和热分布特性，这些与该托架的其它部分不相同。用于改善热传导和热分布的较佳材料包括但不限于硅，最好是高度抛光的硅，比如半导体领域中可获得的抛光的晶片或从晶片中切割的一部分即芯片。

[0099] 如下文更全面地描述，本发明的各实施例使用一种热源，但不限于 PCR 热循环装置，它可能已从其原始制造状态中获得修改。通常，该热源具有热调节部分，该部分与托架的一部分（最好是托架的热传导和热分布部分）配对，以便通过该托架的热传导和热分布部分向弹性模块提供热控制。在较佳的实施例中，通过将真空源施加到热源的热调节部分内所形成的一个或多个通道，便改善了热接触，其中形成多个通道以便接触该托架的热传导和热分布部分的表面，从而施加吸力并维持该托架的热传导和热分布部分的位置。在较佳的实施例中，通过将热传导和热分布部分只附着于弹性模块上并且在热传导和热分布部分的边缘周围留下空隙以便减小由该托架造成的寄生热效应，该托架的热传导和热分布部分并不与该托架的其余部分进行物理接触，而是与该托架的其余部分和弹性模块相关联。应该理解，在本文所描述的本发明的许多方面，较佳的弹性模块可以用本文没有描述但本领域已知的任何微流体器件来替代，例如由美国加州 Santa Clara 的 Affymetrix(R) 公司或美国加州 Mountain View 的 Caliper 公司所生产的器件 GeneChip(R)。授权给 Soane、Parce、Fodor、Wilding、Ekstrom、Quake 或 Unger 的美国专利描述了可以被替代的微流体器件或中尺度流体器件，因为本发明的弹性模块利用了上述温度方面的优点和改进，例如吸入定位，减少到流体器件的其它区域的寄生热转移，这些在上文使用弹性模块的情况下进行过描述。

[0100] 通过使用本发明各实施例所提供的系统和方法，用 384 孔系统提高了通量。例如，在一些实施方式中使通量以因数 4、6、12、24 或更大增加。在产生通量增加的同时，还减小了各种操作的逻辑冲突。此外，本发明各实施方式的系统和方法能够进行多个样品的多次试验。例如，在特定的实施方式中，采用 96 个样品和 96 次试验，提供了总共 9,216 个数据点。在特定的示例中，这 96 次试验是 TaqMan 5' 核酸酶试验的一部分。

[0101] 此外，本发明的各实施方式减小了反应体积。在本发明的各实施例中，所用反应体积为 10 皮升 ( $10^{-12}$  升)-100 纳升 ( $10^{-9}$  升)。在一些实施方式中，使用大于 100 纳升的反应体积。仅作为示例，在一个实施方式中，本发明的方法和系统所用反应体积为 10 皮升、50

皮升、100 皮升、250 皮升、500 皮升和 1 纳升。在另选的实施方式中，使用 2 纳升、5 纳升、10 纳升、20 纳升、30 纳升、40 纳升、50 纳升、75 纳升和 100 纳升的反应体积。

[0102] 根据特定微流体器件的几何形状和该微流体器件的大小以及流体连接通道和处理位点的排列情况，本发明的各实施例提供了范围不同的处理位点（或反应室）密度。在一些实施例中，在使用本发明的方法和系统时，反应室密度大约从每平方厘米 100 个反应室到每平方厘米 1 百万个反应室。仅作为示例，根据本发明的各实施例，使用了每平方厘米有 250 个、1,000 个、2,500 个、10,000 个、25,000 个、100,000 个和 250,000 个反应室的反应室密度。在一些实施例中，使用了每平方厘米超过 1,000,000 个反应室的反应室密度，尽管这不是本发明所要求的。

[0103] 操作具有这种小反应体积的微流体器件可以减小试剂用量和样品用量。此外，本发明的一些实施方式提供了与实时定量 PCR 联用时可进行实时检测的方法和系统。使用这些系统和方法，可以为某些应用提供六个数量级的线性动态范围，并且使定量分辨率足够高以致于可以检测 10 纳升体积中亚纳摩尔级的荧光团浓度。本领域的技术人员将会认识到许多改变、修改和替换。

[0104] 用某些盲端通道类型的器件实现的方法包括：提供一种微流体器件，该微流体器件包括形成于弹性材料内的流体通道；以及多个盲端流体通道，它们与流体通道流体相连，各盲端流体通道的末端区域限定了一个反应位点。至少一种试剂被引入各反应位点中，然后，在一个或多个反应位点处检测反应。该方法可以任选地包括加热反应位点内的至少一种试剂。因此，一种方法可以包括：引入用于核酸扩增反应的各种成分；然后使这些成分热循环以形成扩增产物。如下文更全面的描述那样，根据本发明各实施方式，提供了一种光学成像系统，它适用于表征某些微流体器件中发生的反应。

[0105] 如图 1A 所示，本发明的一些实施例所提供的光学成像系统包括耦合到热控制模块的荧光成像系统。一些系统适用于收集来自几何形状为 NxM 的微流体芯片的数据。在一些实施例中，N 等于 M。例如，本发明的各实施例使用具有 48x48 个反应室的微流体器件、具有 96x96 个反应室的微流体器件、以及其它几何形状的微流体器件。在特定的实施例中，在具有 96x96 反应室几何形状的微流体器件中，使用了 96 个样品和 96 个试剂。对于本领域的技术人员而言，很明显，本发明各实施例所提供的方法和系统能够使一个平台执行多种应用。

[0106] 图 1A 是示出了本发明一实施例的光学成像系统的简化示意图。如图 1A 所示，根据本发明各实施例，提供了光源 242。如下文更全面地描述，在本发明的一些实施例中，来自光源 242 的光线被用来诱导样品中的荧光。在其它实施例中，化学发光被用作一种指示。根据该实施例，将添加、除去、或使用各种系统成分，这对本领域的技术人员而言是很明显的。在各种实施例中，使用发光二极管 (LED)、激光器、弧光灯、白炽灯等光源。这些源可以是多色的或单色的。在特定的实施例中，该光源具有第一光谱带宽。在特定的实施例中，该光源是白光源，可产生光谱范围介于约 400 纳米到约 700 纳米的光学辐射。仅作为示例，在本发明的一些实施例中，从加州 Novato 市 Sutter Instruments 公司那里可以买到的 Lambda LS 300W 氙弧光灯被用作光源。对于本领域的技术人员而言，很明显，在可选实施例中能够使用光谱带宽更大或更小的其它光源。

[0107] 图 1A 示出了激发滤光轮 244。在一些实施例中（例如，光源为多色的实施例），使

用激发滤光轮 244，对光源 242 发出的光线进行光谱滤光。当然，也可以使用多个滤光片。作为一个示例，在一个实施例中，激发滤光轮提供了许多光谱滤光片，每一个光谱滤光片透射能够从样品中激发出特定荧光的预定波长范围。如图 1A 所示，激发滤光轮 244 耦合到计算机 270，从而提供滤光片的计算机控制。在特定的实施例中，激发滤光轮提供了许多光谱滤光片：

- [0108] 滤光片 1：其中心波长为 485nm，光谱带宽为 20nm；
- [0109] 滤光片 2：其中心波长为 530nm，光谱带宽为 20nm；以及
- [0110] 滤光片 3：其中心波长为 580nm，光谱带宽为 20nm。

[0111] 对于本领域的技术人员而言，很清楚，本发明的各实施例并不限于这些特定的光谱滤光片，而是将针对特定的样品使用适于荧光处理的光谱滤光片。此外，尽管上述讨论涉及滤光轮的使用，但是这并不是本发明所要求的。在可选的实施例中，光谱滤光片以除轮子以外的更多几何形状来设置。例如，根据本发明的各实施例，可以包括落入滤光片托架中的光谱滤光片、电光滤光片、由执行器将其置入光路中的滤光片等。此外，在其它实施例中，光源是可调谐的激光器，可以发射适于激发荧光的预定波长的辐射。本领域的技术人员将会认识到许多变体、修改和替换。

[0112] 如图 1A 所示，根据本发明的各实施例，提供了激发快门 246。在一些实施例中，在计算机 270 的控制下，操作该激发快门 246，以便阻挡 / 透射由光源 242 产生并由激发滤光轮 244 进行光谱滤光之后的光信号。根据这种应用，在样品被插入系统中或从系统中取出样品时以及在校准操作期间，激发源被阻挡。在一些实施例中，激发快门并不用在使用激光光源的实施例中，使用激光光源的实施例提供可替换的手段来使光源熄灭。

[0113] 当激发快门处于打开位置时，光激发信号穿过光纤束 248 并被引导照射到芯片托架中所设置的微流体器件 205 上。本发明的其它实施例使用石英光导、液体光导、其它扰频系统等，来增大照明均一性。如图 1A 所示，引导激发光信号，使其通过光照明装置 250 的反射、折射或其组合，到达微流体器件 205 的表面上。如图 1A 所示，微流体器件的照明是通过光照明装置 250 进行的。在其它实施例中，通过环形光，或通过收集光学系统的一部分（微流体器件和检测器 260 之间的光路），照明可以从器件的一个或多个侧面倾斜地耦合到该微流体器件。

[0114] 在一些实施例中，在样品的二维面积上，用激发源产生的光线对微流体器件进行照明。在这些实施例中，提供了较大的视场，这能够执行许多涉及到给时间分辨化学过程和反应成像的荧光应用。作为一个示例，蛋白质热量测定和核酸控制过程的荧光成像都是可从本发明各实施例中获益的时间分辨过程。在这些过程中，期望同时激发许多反应室中所提供的多个荧光样品，并且还期望同时收集由这些反应室中正发生的各种反应所产生的荧光信号。在其它过程（例如荧光寿命成像）中，在简短的激发脉冲之后，就是荧光信号的检测（和分析），因为荧光信号从其初始水平随时间流逝而衰减。本领域的技术人员将会认识到许多变体、修改和替换。

[0115] 作为一个示例，核酸扩增过程通常包括靶 DNA、耐热 DNA 聚合酶、两种寡核苷酸引物、脱氧核苷酸三磷酸 (dNTP)、反应缓冲液和镁盐。一旦混合后，就将该反应用于热循环器中，该热循环器是一种使该反应在一系列不同温度下保持不同时间的仪器。这一系列温度和时间调节被称为一个扩增循环。在该反应中，每一个循环从理论上讲能使靶序列（扩增

子)的量倍增。10 次循环从理论上讲使该扩增子乘以约为 1000 的因数;在大约几个小时内,20 次循环能使该扩增子乘以大于 1 百万的因数。在一些应用中,需要在几秒到几分钟的时间内获得很大面积(例如,若干个平方厘米的数量级)的荧光成像数据。

[0116] 在本发明的一些实施例中,本发明各实施例所提供的方法和系统有利于在预定的时间周期内执行的图像拍摄过程。仅作为一个示例,在本发明的一个实施例中,提供了一种给微流体器件成像的方法。该方法包括:在不到一分钟的时间帧中,通过使用图像检测空间区域,拍摄与微流体器件的至少确定数目的反应室相关联的空间区域的图像,因此空间区域的图像拍摄基本上不受缝合和/或扫描过程的影响。

[0117] 本发明的各实施例提供了用于图像拍摄的各种时间帧,范围从 1 毫秒到 1 分钟。在一些实施例中,用于图像拍摄的时间帧大于 1 分钟。根据与微流体器件的反应室中所执行的各种过程相关联的发光特性,用于图像拍摄的时间帧将发生变化。例如,在一个实施例中,时间帧是 10ms、50ms、100ms、250ms、500ms、750ms 或 1 秒。在其它实施例中,时间帧是 2 秒、5 秒、10 秒、15 秒、20 秒、30 秒、40 秒、50 秒、或 1 分钟。当然,时间帧将取决于特定的应用。

[0118] 在一些实施例中,图像拍摄过程是按同步方式来执行的,从而可以同时拍摄确定数目的反应室的图像。作为一个示例,在示例性的 PCR 过程中,微流体器件维持 92°C 15 秒。接下来,该微流体器件维持 60°C 60 秒。在一分钟的循环周期内重复加热和冷却,并且进行许多次循环。通过使用本发明的各实施方式,同步地获得了微流体器件中存在的确定数目的反应室的图像,同时这些反应室根据位置保持在均匀的温度下。例如,在微流体器件保持在温度 60°C 的情况下,使用 30 秒曝光,便可以获得整个微流体器件的二维图像。和光栅扫描或缝合系统相比,本领域的技术人员应该理解本发明所提供的诸多益处,因为在光栅扫描或缝合系统中微流体器件第一部分(例如,左上象限)中的反应室的图像是先于微流体器件第二部分(例如,右下象限)中的反应室的图像而获得的。

[0119] 在其它实施方式中,在不到一分钟的时间帧内,获得了确定数目的反应室的多张图像。作为这些实施例的一个示例,在一个特定的实施例中获得了与多个荧光团相关联的多张图像。在微流体器件保持在温度 60°C 下的 60 秒时间周期内,可以针对三种不同的荧光团(例如,Rox<sup>TM</sup>、Vic<sup>®</sup> 和 Fam<sup>TM</sup>),获得使用 20 秒曝光的三张连续的图像。当然,根据该应用,曝光时间可以更短,甚至短到 1 秒或更短。通过使用这些图像,可以计算并分析不同的荧光比。当然,根据荧光发射的强度,可以修改各种荧光团的曝光次数,以适应特定的应用。这样,本发明的各实施例可以在微流体器件保持恒定温度的同时在多个光谱波带中给微流体器件成像。像上述示例所示,恒定的温度可以是包括循环温度处理的 PCR 过程的一部分。

[0120] 本发明各实施例所提供的方法和系统也适合执行并分析化学发光过程。在这些过程中,各种反应发生在第一时间标度,而化学发光过程的图像则是在第二时间标度获得的。在特定的过程中,第二时间标度小于第一时间标度。因此,当感兴趣的反应室中的样品已经反应了相等的时间量时,本发明的各实施例适于拍摄化学发光过程的同步图像。在这些过程中,提供了包括样品温度循环的温度控制,而在其它实施例中,反应室保持在恒定的温度下。

[0121] 如图 1A 所示,根据本发明的各实施例,提供了热控制器 240,也被称为温度控制器 240。改变精密化的许多不同的选择可用于控制微流体器件的选定区域内的温度或整个微

流体器件的温度。因此,如本文所使用的那样,术语温度控制器广泛地指代一种器件或元件,它能够调节整个微流体器件的温度或微流体器件的一部分内(例如,在特定的温度区域内或微流体器件的通道矩阵的一个或多个结处)的温度。

[0122] 图1C是示出了本发明一实施例的热控制器件的简化示意图。如图1C所示,微流体器件205包括样品阵列206。对于本领域的技术人员而言,很明显,尽管图中样品阵列206是一维的,但是本发明各实施例提供三维样品阵列。作为一个示例,在本发明各实施例所使用的一些微流体器件中,反应室的阵列和流体连接通道延伸到该图所在的平面中。包括反应室在内的微流体器件的各种元件具有第三维度即深度。微流体器件205由托架207支撑,托架207由托架立柱208支撑。微流体器件或芯片底层209耦合到托架207和集成热传播装置(IHS)241。热滚筒243在图1C中有示出并且在下文中进行更完整地描述。在一些实施例中,提供了在微流体器件和HIS/滚筒之间的硬接触。此外,如下文更详细地描述,在一些实施例中使用真空技术,使微流体器件相对于托架定位并固定住。

[0123] 通常,这些器件被置于热循环板上,以便使该器件热循环。各种这样的板都可以从下列公司买到:ThermoHybaid Px2(Franklin, MA);MJ ResearchPTC-200(South San Francisco, CA);Eppendorf Part#E5331(Westbury, NY);Techne Part#205330(Princeton, NJ)。

[0124] 在一些实施例中,微流体器件与热控制器件接触,使得热控制器件与热控制源热连通,所以作为热控制源的温度变化的结果,至少一个反应室中的反应温度会发生变化。在不同的实施例中,热转移器件可以包括半导体(比如硅),可以包括反射材料,和/或可以包括金属。

[0125] 热控制器件可以向热转移器件施加力,以便朝着热控制源推动热转移器件。在不同的实施例中,这种力可以包括机械压力、磁力、静电力、或真空力。例如,在一个实施例中,这种力包括真空力,真空力是通过热控制器件或热转移器件的表面中所形成的通道朝着热转移器件施加的。可以检测热控制器件的表面和热转移器件的表面(或表面的一部分)之间所实现的真空度。这种检测可以用真空度检测器(它位于沿通道远离真空源的一位置处)来执行。当真空没有超过预设的水平时,可能出现警报,或者可能进行重新对准。

[0126] 通过使用一个或多个机械或电机械定位器件,阵列器件可以与热控制器件接触。该方法的执行过程可以受到自动地控制和监控。例如,用自动控制系统可以执行这种自动控制和监控,该自动控制系统与机器人控制系统相连,以便将该阵列器件引入热控制器件或从热控制器件中取出该阵列器件。各种反应的进程也可以受到监控。

[0127] 可以提供一种包括热控制器件的单元。可以提供一种包括阵列器件和热控制器件的系统。为了确保热循环步骤的精确度,在某些器件中,包括传感器是很有用的,这些传感器可用于检测该器件各个区域的温度。一种用于检测温度的结构是热电偶。这种热电偶可以作为底层基板材料上图形化的薄膜导线而产生,或者作为被直接引入微制造的弹性材料中的导线而产生。

[0128] 通过电阻变化,也可以检测温度。例如,使用常规技术在底层半导体基板上制造的热敏电阻的阻抗变化可以被校准到给定的温度变化。或者,热敏电阻可以被直接插入微制造的弹性材料中。在Wu等人的文章“MEMS Flow Sensors for Nano-fluidic Applications”(Sensors and Actuators A 89152-158, 2001年)中,描述了另一种利用阻

抗来检测温度的方法,该文章整体引用在此作为参考。该文章描述了将掺杂多晶硅结构应用于控制和检测温度。对于多晶硅和其它半导体材料,阻抗的温度系数可以由杂质的类别和量来精确地控制,由此针对给定的应用使传感器的性能最佳化。

[0129] 热 - 色材料 (Thermo-chromatic material) 是另一种可用于检测扩增器件各区域温度的结构。具体来讲,某些材料在经历不同温度时会急剧地且可复现地改变颜色。这种材料可以被添加到溶液中,因为它们历经不同的温度。热 - 色材料可以形成于底层基板上,或者被包括到弹性材料中。或者,热 - 色材料可以以颗粒的形式被添加到样品溶液中。

[0130] 另一种检测温度的方法是使用红外照相机。红外照相机和显微镜相结合可以被用来确定整个扩增结构的温度分布。对于合适波长的辐射(例如,热辐射、红外辐射等)而言,弹性材料的渗透性将有利于这种分析。

[0131] 温度检测的另一种方法是使用热电传感器。具体来讲,一些结晶材料特别是那些呈现出压电行为的材料可以呈现出热电效应。该效应描述了一种现象,即材料晶格的极化和材料上的电压高度依赖于温度。这种材料可以被包括到基板或弹性体中并且被用于检测温度。根据本发明的各实施例,其它电学现象(比如电容和电感)都可以被用于检测温度。本领域的技术人员将会认识到许多变体、修改和替换。

[0132] 在一个实施例中,成像系统 200 按下面的方式来工作。首先,微流体器件 205 被牢固地置于托架 207 上。基于微流体器件 205 的固定的特征(例如,微流体器件的底座的边缘),计算机 270 使 x、y 驱动(未示出)移动托架 207,以便对准第一 x、y 位置中的微流体器件。在一些实施例中,在对准和定位过程中,使用一个或多个基准标记。在特定的实施例中,系统用户用成像系统来记录一个或多个基准标记的精确坐标。在其它实施例中,该过程是自动执行的,因为通过定位对称的 XY 基准物体并除去任何非对称成分便可以精确地计算基准的中心。在一些实施例中,在对准过程中使用了基准的特征(比如边和角)。本领域的技术人员将会认识到许多变体、修改和替换。

[0133] 在计算机 270 的控制下,调节托架 207 使其定位于光学元件 210 和 212 的焦平面中,或者调节光学元件 210 和 212 使光学元件 210 和 212 的焦平面定位到托架 207。在较佳实施例中,视场可以包住整个微流体器件,其中包括微流体器件上存在的许多反应室。

[0134] 微流体器件的反应室中正发生的化学过程所发出的荧光、化学发光或光信号均被第一透镜系统 210 收集。在本发明的一些实施例中,第一透镜系统是多元件光学系统,其中包括一个或多个透镜以及一个或多个孔径。如图 2A 所示,第一透镜系统 210 包括多个单独的透镜元件以及成对的透镜元件等。选择第一透镜系统 210 的光学特性(其中包括焦距 f/# 等)以提供期望的光学性能。本领域的技术人员将会认识到许多变体、修改和替换。图 1A 中示出了发射快门 215,用于阻挡离光轴预定距离以外的光线,当然本发明对此不作要求。

[0135] 再次参照图 1A,提供了滤光器件 213,作为光学组件的一部分。在一些实施例中,滤光器件是一种包括许多光学元件的滤光轮 213,用于使荧光标记试剂或化学发光标记试剂所产生的荧光发射或化学发光发射通过并且对其进行光学处理。作为一个示例,在一个实施例中,该发射滤光轮的第一部分适用于使第一荧光染料 Cy<sup>TM</sup>3 所产生的荧光发射通过,该第一荧光染料可以从 Amersham Biosciences 公司(该公司是新泽西州 Piscataway 市 GE Healthcare 的一部分)购买。上述发射滤光轮的第二部分适用于使第二荧光染料 Cy<sup>TM</sup>5 所产生的荧光发射通过,该第二荧光染料也可以从 Amersham Biosciences 公司购买。当然,这

些荧光染料的使用不是本发明所要求的。在可选实施例中，使用一种可以从加州 Carlsbad 市的 Invitrogen 公司买到的 Alexa 荧光染料。作为一个示例，在另一个实施例中，上述发射滤光轮的第一部分适用于使第三荧光染料 Alexa Fluor 350 所产生的荧光发射通过，该第三荧光染料可以从 Invitrogen 公司购买。上述发射滤光轮的第二部分适用于使第四荧光染料 Alexa Fluor 488 所产生的荧光发射通过，该第四荧光染料也可以从 Invitrogen 公司购买。在下文中将提供与该发射滤光轮有关的其它细节。

[0136] 在一些实施例中，滤光器件 213 和发射快门 215 都位于第一透镜系统和第二透镜系统之间。在这些实施例中，穿过滤光器件的光线以相对于光轴很小的角度进行传播。对于本领域的技术人员而言，很明显，在光线入射角很小的各区域中的光谱滤光片（例如，干涉滤光片）更易于设计，并且有可能提供更窄的总光谱带宽，通过这种窄光谱带宽，各种特征和 / 或滤光片定位都是本发明所要求的。如图 1A 所示，滤光器件和发射快门都耦合到计算机 270，从而为这些元件提供了计算机控制。此外，对于本领域的技术人员而言，很明显，可以在光路中设置多个滤光片且很可能是多个完全一样的滤光片，以增大对激发波长的阻隔。在一些实施例中，这些滤光片相对于光轴有一定角度，所以被滤光片反射掉的光线会离开光路。

[0137] 在其它实施方式中，某些嵌入染料在结合于双链 DNA 后会产生剧烈的荧光增强和 / 或显示出对双链 DNA 具有强烈的化学亲和力，可用于检测双链扩增 DNA。合适的染料示例包括但不限于 SYBR<sup>TM</sup> 和 Pico Green（俄勒冈州 Eugene 市的 Molecular Probes 公司）、溴化乙锭、碘化丙啶、色霉素、吖啶橙、Hoechst33258、Toto-1、Yoyo-1 和 DAPI（4'，6-二脒基-2-苯基吲哚盐酸盐）。关于嵌入染料的使用，在 Zhu 等人 Anal. Chem. 66 : 1941-1948 (1994) 中进行了另外的讨论，该文章整体引用在此作为参考。

[0138] 图 1A 也示出了第二透镜系统 212。穿过滤光器件 213 和发射快门 215 的荧光或化学发光发射被第二透镜系统聚焦到检测器 260。在一个实施例中，该检测器是 CCD 照相机阵列，但本发明对此不作要求。在特定的实施例中，使用了一种阵列检测器，大小和微流体器件差不多。较佳地，选择检测器阵列 260 的像素大小，以提供比微流体器件的反应室面积要小的面积，由此使每个反应室对应多个检测器像素。在特定的实施例中，检测器 260 是一种具有大约 15 μm x 15 μm 像素的 CCD 阵列。

[0139] 对于本文所提供的微流体器件，可以使用许多不同的检测方案。合适系统的部分程度上基于所检测的事件和 / 或试剂的类型。这些检测器可以被设计成检测许多不同的信号类型，包括但不限于来自下列物质的信号：放射性同位素、荧光团、生色团、电子密集颗粒、磁性粒子、自旋标记物、化学发光分子、电化学活性分子、酶、辅因子、连接于核酸探针的酶，以及酶底物。

[0140] 适于本发明微流体器件使用的说明性的检测方法包括但不限于：光散射、多通道荧光检测、UV 和可见光波长吸收、发光、示差反射、和激光共聚焦扫描。可用于某些应用中的其它检测方法包括：闪烁亲近测定技术、放射化学检测、荧光偏振各向异性、荧光寿命、荧光相关频谱学 (FCS)、时间分辨能量转移 (TRET)、荧光共振能量转移 (FRET)、以及像生物发光共振能量转移 (BRET) 这样的变化形式。其它检测选择包括电阻、电阻率、阻抗和电压的检测。

[0141] 在一些实施例中，在“检测部分”或“检测区域”进行检测。这些术语和其它相关

术语是指微流体器件上进行检测的那部分。在一些微流体器件中，检测部分常常是微流体器件中存在的反应室。其它器件的检测部分可以在与交叉点相邻的流体通道区域内、交点本身、或包括交点及其周围区域的区域。

[0142] 检测部分可以连接到一个或多个显微镜、二极管、光激励器件（例如，激光器）、光电倍增管、处理器、以及上述的组合，它们配合在一起检测和特定事件和 / 或试剂相关联的信号。通常，待测信号是光信号，由一个或多个光检测器在检测部分中对其进行检测。光检测器可以包括一个或多个光电二极管（例如，雪崩光电二极管）、引向如光电倍增管的光纤光导、显微镜、和 / 或视频照相机（例如，CCD 照相机）。

[0143] 检测器可以在微流体器件内被微制造，或者可以是分离的元件。如果检测器作为分离的元件存在并且微流体器件包括多个检测部分，则在任何给定的时刻可以在单个检测部分内进行检测。作为一个具体的示例，微流体器件可以被附在可平移的工作台上并且在显微镜物镜下进行扫描。如此获得的信号接下来传递到处理器，以便于信号解释和处理。也可以使用光电倍增管的阵列。另外，可以使用这样的光学系统，它们能够从所有不同的检测部分中同时收集信号，而且能够判定来自每一个部分的信号。

[0144] 外部检测器是可以使用的，因为所提供的器件完全或大部分都由对受监控的波长透明的材料制成。该特征能够使本发明的器件使用许多光学检测系统，这对于常规的硅基微流体器件而言是不可能的。

[0145] 本发明的特定实施例使用了形如 CCD 照相机的检测器以及可提供大视场和高数值孔径的光路，以使从每一个反应室中收集到的光量最大化，由此增大了检测灵敏度。在本实施例中，该 CCD 被用作光电检测器的阵列，其中每一个像素或像素组对应于一个反应室，而非被用来产生该阵列的图像。因此，可以设计或改变光学元件，使得在检测器处图像质量下降或图像变得模糊，以增大该光学系统的可用场深，从而从每一个反应室中收集更多的光线。特别是，因为本发明的一些实施例中所预期的试验包括使用荧光染料的生物试验，这些染料因暴露于激发光线而使光反差变小 (photobleach)，因此限制了从给定样品中可以获得的信号光子的总数，有限信号光子的有效收集在仪器中是很重要的。对于任何光学系统，Etendue 的种种考虑涉及物像 NA (数值孔径) 和总的系统放大率；因为像方 NA 通常是有限的（例如，对高入射角光线而言在 CCD 表面上有反射损耗），对于任意高的放大率而言无法同时实现任意高的物方 (样品那边) NA。事实上，更大的系统放大率可以允许更高的物方 NA，同时不要求像方 NA 同时上升（该上升有可能有害，原因如上）。结果，在所描述的系统中，大 CCD (例如, 30.7mmx30.7mm) 焦平面阵列被用于允许 1 : 1 的光学系统（即系统放大率为 1）。这允许选取 NA 为 0.36，同时 CCD 上的像方 NA 为 0.36，这便提供了相对于表面反射损耗的合理的性能。

[0146] 在一些实施例中，更大的物方 NA 产生减小的物方焦深，因此对于样品中给定的反应室深度，检测器处的模糊更严重了（假定因焦深引起的模糊大于或等于因透镜像差和其他问题所引起的模糊），从而如果在反应室之间实现了低信号串扰则限制了样品处各反应室之间可允许的最小间隔。在与 1 : 1 光学系统相结合的情况下，如果想要避免其表面处的反射损耗，则这种物方 NA 考虑与 CCD (或硅检测器) 上一般期望的  $\sim 0.5NA$  最大值很一致。该 1 : 1 成像透镜系统还固有地免受大多数奇数阶像差的影响，从而增大了该特定放大率 ( $M = 1$ ) 的优势。作为详细的设计，在本发明的一些实施例中，使用了具有检测

器的 1 : 1 光学系统, 它和待成像的微流体系统一样大或更大。

[0147] 在其它实施例中, 可能存在和检测器 (例如, CCD 焦平面阵列) 尺寸有关的成本限制。例如, 目前一些高量子效率、全画面 CCD 阵列具有 27.6mmx27.6mm 的尺寸。和尺寸为 30.7mmx30.7mm 的微流体器件相比, 该检测器稍微小一点, 从而产生 0.88 的系统放大率, 作为用于上述系统的一种设计。因为接近系统放大率  $M = 1$ , 所以针对这种放大率, 与上述检测器 (像方) 入射 NA 有关的种种约束条件均得到满足。

[0148] 在其它实施例中, 可以指定各反应室的给定 XY 平面 (和光轴相垂直) 间隔和大小 (例如, 在 XY 平面上实现期望的样品 - 反应室密度), 同时反应室的最小总体积仍然受到约束 (例如, 实现最小所需化学体积, 以避免因试剂或目标分子数目太小而导致的过大的统计波动, 或简单地实现所需的最少数目的荧光或其它发光分子或物体)。在这种情况下, 可能有必要平行于 Z 轴 (光轴) 来延伸反应室, 使得每一个反应室的总体积仍然等于或大于一些最小数字。假定焦深所引起的模糊大于或等于由透镜像差和其他问题所导致的模糊, 考虑到焦深, 对于给定的物方 NA 而言, 沿 Z 轴作更大的延伸 (从而产生高纵横比或柱状反应室, 这使待询问的样品沿 Z 轴集中) 通常将使检测器处的反应腔图像更模糊。在一些情况下, 这将导致使用更低的物方 NA。使用更低的 NA 透镜系统可以允许焦深更大, 因此, 从平行于光轴延伸的反应室中更好地进行光线收集, 同时通常不会引起相邻或相近的反应室之间的光信号串扰。这样, 可以使 XY 平面 (存在于光轴的地方) 中反应室的密度更大, 却没有过度的串扰, 同时通过在 Z 方向 (平行于光轴) 延伸, 使总的反应室体积保持很大。在这种情况下, 或者在更低的物方 NA 尚可接受的情况下 (例如, 情况一, 各反应室之间更大的 XY 间隔使检测器处的反应腔 - 图像更模糊, 同时却没有过多的串扰; 情况二, 在非光发射应用中, 更高的 NA 不是必需的; 情况三, 有足够多的样品以至于光白化不是问题; 情况四, 没有光白化的样品, 像降低可接受的系统灵敏度这样的情形), 较低的系统放大率 ( $M < 1$ ) 可能是合适的, 尤其是当  $M \geq NA_o/0.5$  时,  $M \geq NA_o/0.36$  更佳, 其中  $NA_o$  = 物方 NA, 或者  $M \geq NA_o/NA_{det}$ , 其中  $NA_{det}$  等于可允许到检测器表面上的最大 NA, 同时对于检测器而言没有过大的反射 / 插入损耗 (对于典型的 CCD 而言,  $NA_{det} = 0.36 \sim 0.5$ )。

[0149] 当物方焦深和 / 或模糊要求并不需要物方  $NA \leq 0.36$  或 0.5 或者更一般地讲  $NA_o \leq NA_{det}$  时, 基于 Etendue 的种种考虑 (如上所述) 期望用更大的检测器, 因为对于给定的  $NA_o$ , 更大的 M (对于给定的样品尺寸, 通常需要更大的检测器) 将允许更小的  $NA_i$  (像方 NA)。因此, 当光收集要求 (例如, 实现某些试验灵敏度) 需要很大的  $NA_o$  (由  $NA_o > NA_{det}$  来定义) 并且其它设计考虑 (例如, 成本) 允许很大的  $NA_o$ , 期望 M 更大, 使得检测器处的损耗最小化。在这种实施例中, 有用的是, 使用一个或多个 CCD 器件等检测器件, 其尺寸要大于待成像的微流体器件的面积。使用这种大检测器可以增大光学系统的放大率, 因此 (通过 Etendue 的种种考虑), 对于到检测器的固定入射 NA, 从样品中收集光线的 NA 可以更高 (例如, 通过 CCD 表面处更高入射角的入射光的反射损耗来实现后者)

[0150] 一种较佳的检测器使用 CCD 照相机和可以提供大视场和高数值孔径的光路, 从而使从各反应室中收集的光的量最大化, 由此增大了检测灵敏度。关于这一点, CCD 是作为光电检测器的阵列而被使用的, 其中每一个像素或像素组对应于一个反应室, 而非被用来产生该阵列的图像。因此, 可以改变光学系统, 使得图像质量下降或散焦, 从而增大光学系统的场深, 以便从每一个反应室中收集更多的光线。在一些实施例中, 有用的是, 使用高纵横

比或圆柱形反应室，使要由检测器询问的样品沿光学系统的光轴集中，并且较佳地通过使图像散焦来增大场深。使用低 NA 透镜系统，较佳地使用两侧对称的透镜系统。有用的是，使用一个或多个 CCD 器件等检测器件，其尺寸大于待成像的微流体器件的面积。与低 NA 光学系统结合使用，可以实现改进的检测灵敏度。

[0151] 一种检测系统可以包括光源，用于激发报道物来产生可检测的信号。所用光源的类型取决于待激发的报道物的性质。合适的光源包括但不限于激光器、激光二极管、白光源、和高强度灯。如果使用激光器，则激光器可以用来在一组检测部分上或单个检测部分上进行扫描。激光二极管可以被微制造成微流体器件本身。或者，激光二极管可以被微制造成位于微流体器件附近的另一个器件，它被用来进行热循环反应，使得该二极管的激光被引至检测部分。

[0152] 检测可以包括许多非光学方法。例如，检测器可以包括温度传感器、电导传感器、电势传感器（例如，pH 电极）和 / 或测量电流的传感器（例如，监测氧化和还原反应）。

[0153] 某些嵌入染料在结合于双链 DNA 时会产生剧烈的荧光增强和 / 或显示出对双链 DNA 具有强烈的化学亲和力，它们可用于检测双链扩增 DNA。合适的染料示例包括但不限于 SYBR<sup>TM</sup> 和 Pico Green（俄勒冈州 Eugene 市的 Molecular Probes 公司）、溴化乙锭、碘化丙啶、色霉素、吖啶橙、Hoechst 33258、Toto-1、Yoyo-1 以及 DAPI(4',6- 二脒基 -2- 苯基吲哚盐酸盐）。关于嵌入染料的使用，在 Zhu 等人 Anal. Chem. 66 :1941-1948 (1994) 中进行了另外的讨论，该文章整体引用在此作为参考。

[0154] 如图 1A 所示，本发明的一些实施例提供了 1 : 1 成像系统，用于产生并检测荧光、化学发光、生物发光以及来自微流体器件的其它信号。在所使用的图像检测器件和待成像的样品一样大的一些实施例中，提供了 1 : 1 成像系统。通过提供大视场（量级在若干个平方厘米）的 1 : 1 成像，本发明的各实施例提供了增大的数值孔径 (NA) 光学系统。因为光收集效率大约正比于  $NA^2$ ，所以本发明的一些实施例所提供的 NA 增大能够从反应室中收集到合适的荧光信号，这些反应室包括量级在一纳升到数十纳升的反应体积以及量级为 1.0 纳摩尔的活性荧光团浓度。在其它的实施例中，浓度为皮摩尔范围中的活性荧光团提供合适的荧光信号。

[0155] 另外，本发明的各实施例提供了这样的成像系统，它们稍微减小并构成的图像范围从大约和物体大小一样到大约是物体大小的一半。例如，在一个实施例中，微流体器件的空间区域的图像被传输且被拍摄，该空间区域和不止 96 个反应室相关联。通过使用比微流体器件的空间区域稍小或大致相等的图像检测空间区域，图像检测器件被用于拍摄上述空间区域的图像。仅作为示例，微流体器件的空间区域的面积比上该空间区域的像的面积得到的比例可以是 1 : 1、1 : 0.99、1 : 0.95、1 : 0.9、1 : 0.88、1 : 0.85、1 : 0.8、1 : 0.7、1 : 0.6 和 1 : 0.5。在一些实施例中，该比例小于 1 : 0.5。这些特定的比例只是示例性的，因为针对成像系统来选择的比例将取决于特定的应用。

[0156] 在一些实施例中，光学成像系统包括大约 3cmx3cm 的视场。在其它实施例中，光学成像系统包括范围从大约 1cmx1cm 到大约 5cmx5cm 的视场。在特定的实施例中，提供大小为 2cmx2cm、2.5cmx2.5cm、2.76cmx2.76cm、3.07cmx3.07cm、3.5cmx3.5cm 和 4cmx4cm 的物体视场。通常，光学成像系统的视场被选择成对应于微流体器件的空间区域（例如，包括许多感兴趣的反应室的区域）。

[0157] 此外,本发明的各实施例提供了具有许多数值孔径的光学成像系统。作为一个示例,根据各种实施例,提供了范围从 0.1 到 0.5 的 NA。在特定的实施例中,提供了大小为 0.15、0.18、0.2、0.23、0.25、0.3、0.36 和 0.4 的多种 NA。

[0158] 光学成像系统的空间分辨率通常是图像检测器件中像素大小的函数。在本发明的一些实施例中,放大率(在一些实施例中等于 1)和检测器中的像素大小将决定和每一个反应室相关联的像素的数目。通常,每一个反应室最好和多个检测器像素相关联。例如,在 1 : 1 成像系统中,如果反应室一边是 45 微米,则它将与多达 9 个方形像素(其边等于 15 微米)重叠。因此,根据本发明的各实施例,与每一个反应室相关联的像素数目介于从 1 到 100 的范围内。例如,根据本发明的一些实施例,与每一个反应室相关联的有 4 个像素区域、9 个像素区域、16 个像素区域、25 个像素区域、36 个像素区域、49 个像素区域、64 个像素区域和 81 个像素区域。

[0159] 在本发明的各实施例中,使用范围介于  $1 \mu\text{m}^2 \sim 900 \mu\text{m}^2$  之间的像素大小。例如,在本发明的各种实施例中,使用了边长为  $1 \mu\text{m}$ 、 $2 \mu\text{m}$ 、 $3 \mu\text{m}$ 、 $4 \mu\text{m}$ 、 $5 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{m}$ 、 $13.5 \mu\text{m}$ 、 $15 \mu\text{m}$ 、 $20 \mu\text{m}$ 、 $25 \mu\text{m}$ 、 $30 \mu\text{m}$  的正方形像素。对于本领域的技术人员而言,很明显,像素大小、检测器阵列尺寸、和每个阵列的像素数目是彼此相关的。在可选的实施例中,使用矩形像素,其像素面积介于  $1 \mu\text{m}^2 \sim 900 \mu\text{m}^2$  之间。

[0160] 此外,根据本发明各实施例,使用了检测器阵列(也被称为图像检测器件,其中包括不同范围的像素数)。阵列大小介于 512x512 像素区域到 3,000x3,000 像素区域。根据检测器阵列的可获得性,在一些实施例中可以使每个阵列具有更多的像素数目。在特定的实施例中,使用大小为 1,024x1,024 像素区域和 2,048x2,048 像素区域的阵列。

[0161] 本发明的各实施例提供了一种光学成像系统,它具有若干系统参数。例如,在本发明的各实施例中,可以使用大于 35mm 的工作距离,例如 45.92mm。在另一个实施例中,提供了平均为  $13.44 \mu\text{m}$  的均方根(RMS)光斑直径,其最大值为  $17.85 \mu\text{m}$ 。此外,在本发明的各实施例中,实现约  $\pm 5\%$  的照明变化。在一些实施例中,光学成像系统总长是 542.1mm,其最大滤光片 AOI 为 12.56 度,在滤光片处最大光束直径为 76mm,失真  $< 0.10\%$ ,并且最大透镜直径为 5.512 英寸。

[0162] 图 1B 是本发明一实施例的成像系统的简化图。在一些实施例中,图 1B 所示的成像系统被用于给微流体器件成像,该微流体器件包括用于执行蛋白质结晶处理的器件。关于图 1B 所示成像系统及相关联的微流体器件的其它细节在下列文献中可以找到:共同待批且共同拥有的美国专利申请 10/902,494(2004 年 7 月 28 日提交),以及美国专利申请 10/851,777(2004 年 5 月 20 日提交),这两个专利申请引用在此作为参考。特别是,在这两个专利申请中,可以找到关于本发明各实施例所提供的微流体器件及其和图 1B 所示成像系统结合使用的其它细节。这些图只是示例,不应该过多限制权利要求书的范围。本领域的技术人员将会认识到许多变体、替换和修改。

[0163] 在一个实施例中,成像系统(10)以下面的方式操作。首先,微流体器件(30)牢固地设置在工作台(20)上。基于微流体器件(30)的固定特征,计算机(110)使 x, y 驱动(25)去移动工作台(20),以便使第一 x, y 位置中的微流体器件(30)与多个基准标记中的第一基准标记对准,其中基准标记被嵌入微流体器件内(离反应室中心点的 z 维度距离已知),基于该固定特征的推算定位通过成像设备(60)达到聚焦。然后,系统用户使精确的

基准坐标与像系统重合。在用户的辅助下,两个或更多个其它的基准标记也同样地被绘制。在其它实施例中,该过程是自动的,因为通过定位对称的 XY 基准物并除去任何非对称的成分,便可以精确地计算这些基准的形心。成像设备 (60) 在计算机 (110) 的控制下接下来调节焦平面 (100) 的 z 维度定位以便聚焦到基准标记。例如,一旦聚焦到第一基准标记,成像系统就获得了微流体器件 (30) 的第一 x, y 坐标图像,从而寻找成像设备 (60) 的视场之内其它的基准标记。在较佳实施例中,该视场可以包括整个测定单元。然后,计算机分析该第一 x, y 坐标图像以确定微流体器件是否具有偏斜和延伸,并且如果确定有偏斜或延伸,则变换该第一 x, y 图像以使微流体器件的图像和坐标图成为理想的坐标图。随后在图像减影和掩模步骤中使用该理想的坐标图。

[0164] 在较佳实施例中,当微流体器件 x, y 坐标图像与理想的坐标图对准时,系统接下来通过比较 x, y 坐标图中的基准标记位置和理想的存储图像图的 x, y 坐标图中的基准标记位置,来确定微流体器件中是否存在延伸、扭曲、或各微流体层没有共同重合。如果在实际基准位置和成像基准位置之间有差异,则执行矩阵变换(最好是仿射变换),以便将测定单元的成像形状转换成理想测定单元形状的虚拟形状。通过使用矩阵变换(该矩阵变换是从测得的实际基准位置和所存储的理想基准位置之间的差异中计算出来的)将实际图像转换成已知且固定的理想图像,便可以使图像减影和其它图像分析成为可能。

[0165] 通过矩阵分析计算坐标图之间的差异,矩阵变换可以演化成将实际图像重新构造成为理想的图像以便作进一步的图像处理。通过使成像的微流体器件与标准形状一致,图像减影和掩模便可能使测定单元反应室的可视区域最大化。此外,如果在一系列基于时间的图像中时间零处的反应室内存在缺陷或碎片,则在接下来的图像中可以遮掉这种缺陷或碎片以避免施加自动分析时的伪信号。除了遮掉反应室中含缺陷或碎片的区域,还可以从接下来的图像中减去反应室的壁,同样是为了在接下来的分析中不引起伪读数。基于控制层中发现的物体(比如控制线自身)的位置,也可以计算各层之间(比如控制层和通道层之间)的差异。在另一个示例中,这种校正是基于控制层基准自身而确定的。对于某些实施例,这种额外的变换是重要的,因为控制层将蛋白质反应室与其它控制线隔离开。

[0166] 图 2A-2C 是示出了本发明一实施例的透镜组件的简化示意图。如图 2A-2C 所示,每张图都提供了微流体器件 205。尽管在图 2A-2C 中没有示出热控制器和其它系统元件,但是本领域的技术人员将会理解这两种图之间的关系。因此,在合适的地方,标号都是取自图 1A,以进一步澄清各图之间的关系。

[0167] 图 2A 示出了第一透镜系统 210,其中包括第一孔径 211。如图所示,第一孔径定位于单独的透镜元件之间,然而,这不是本发明所要求的。在其它光学设计中,选择第一孔径的位置、大小和其它特征,以实现预定的光学设计目标。图 2A 还示出了第二透镜系统 212,其中包括第二孔径 213。如结合第一透镜系统 210 所讨论的那样,光学元件都根据预定的光学设计目标来排列。

[0168] 参照图 1A 和 2A-2C,示出了和滤光器件有关的其它细节。通常,透镜系统 210、212 以及滤光设备 213 都设置在成像通路的一部分中。在一些实施例中,成像通路是一种发射通路,用于将来自微流体器件的一个或多个荧光发射信号传输到检测器。如下文更全面的描述,滤光器件适用于使一个或多个荧光发射信号中的选定光谱带宽通过,并且还适用于将与一个或多个荧光发射信号相关联的一种或多种色差处理到确定的水平。在一些实施例

中,处理一种或多种色差包括减小这种色差

[0169] 在特定的实施例中,如图 2A 所示,提供了第一光谱滤光片 214 和零屈光度光学元件 261。参照图 1,当滤光器件 213(在一些实施例中是发射滤光轮)处于第一工作位置时,在微流体器件和检测器之间的光路中存在滤光片 / 零屈光度元件的组合。针对大约位于光谱中心的波长的传输和聚焦,使图 2A 的光学元件最佳化。因此,在一个实施例中,光谱滤光片 214 以 570 纳米波长为中心,该波长和荧光团 fluorophore Vic<sup>®</sup>(从加州 Foster 市 Applied Biosystems 公司那儿可以买到)有关。另外,该光谱滤光片的特征在于其 30 纳米的光谱带宽。在一些实施例中,如下文更全面地描述那样,还提供了适用于校正色差的滤光片 / 零屈光度元件,但以其它波长(通常比 570 纳米要短或长)为中心。

[0170] 如结合图 1 中的光谱滤光片 244 所讨论的那样,滤光器件并不限于轮子这种形状。例如,在本发明的一些实施例中,包括光谱滤光片、像差校正元件及其组合(它们落在滤光片支架中)。此外,根据本发明的实施例,还包括与像差校正元件组合在一起的电光滤波器和被驱动器置入光路中的滤光片。

[0171] 图 2B 示出了第一和第二透镜系统,其中发射滤光轮位于第二工作位置。在图 2B 所示的实施例中,光谱滤光片 224 以 518 纳米波长为中心(该波长与荧光团 Fam<sup>TM</sup> 有关,可以从 Applied Biosystems 公司买到)并且其特征在于 25 纳米的光谱带宽。通常,光谱滤光片 224 适用于透射和在“蓝色”波长处发光的荧光团有关的荧光信号,通常该荧光信号和光谱短波长部分附近的波长相关。

[0172] 图 2B 示出了充当零屈光度双透镜的光学元件 226。在一些实施例中,滤光片 / 零屈光度双透镜是作为复合光学元件而提供的,而在其它实施例中,滤光片和零屈光度双透镜是彼此分开的。此外,在一些实施例中,使发射滤光轮旋转以调整滤光片 / 零屈光度光学元件的位置,从而从第一工作位置变到第二工作位置。图 2B 所示的零屈光度双透镜 226 被设计成用于校正由光学系统在“蓝色”波长处引入的色差。在特定的实施例中,选择零屈光度双透镜,以便校正与特定荧光团(比如 Fam<sup>TM</sup>)的发光相关的波长处的色差。

[0173] 在一些实施例中,零屈光度双透镜是由多种折射率数值不同的单独的光学材料制成的。仅作为示例,如图 2B 所示,平凹透镜耦合到凸平透镜。在特定的实施例中,零屈光度双透镜是一种由多个光学元件胶合在一起的夫琅和费消色差透镜。在其它实施例中,使用对本领域技术人员而言很明显的可替换的设计。在一些实施例中,使用本说明书中所示的嵌入式双透镜,来减小蓝色和红色滤光波带中的轴向色差。

[0174] 图 2C 示出了第一和第二透镜系统,其中发射滤光轮处于第三工作位置。在图 2C 所示的实施例中,光谱滤光片 228 以 645 纳米波长为中心(该波长和荧光团 Rox<sup>TM</sup> 有关,这种荧光团可以从 Applied Biosciences 公司买到)并且特征在于 75 纳米的光谱带宽。通常,光谱滤光片 228 适用于透射与在“红色”波长处发光的荧光团有关的荧光信号,该荧光信号通常与光谱的长波长部分附近的波长有关。

[0175] 如图 2B 所示,图 2C 示出了充当零屈光度双透镜的光学元件 230。在一些实施例中,滤光片 / 零屈光度双透镜是作为复合光学元件来提供的,而在其它实施例中,滤光片和零屈光度双透镜彼此分开。此外,在一些实施例中,使发射滤光轮旋转,以便调整滤光片 / 零屈光度光学元件的位置,从而从第一或第二工作位置变为第三工作位置。图 2C 所示的零屈光度双透镜 230 被设计成校正由光学系统在“红色”波长处所引入的色差。在特定的实

施例中,选择零屈光度双透镜,以便校正与特定的荧光团(例如Rox<sup>TM</sup>)发光有关的波长处的色差。比较图2B和2C,图2C所示的零屈光度双透镜包括耦合到凹平透镜的平凸透镜。

[0176] 如结合图2A、2B和2C所讨论的那样,与各个滤光片有关的校正光学元件216、226和230被设计成,它们帮助校正在上述各个滤光片所透射的波长处的色差。这种设计允许在不同的滤光片(透射不同的波长区域)上使透镜系统的光斑大小、模糊和其它光学特性更均匀和更一致。这些益处可用于许多应用,例如,微流体器件中的反应室紧密填充。另外,针对来自不同反应室的光信号之间的可允许串扰而定的设计目标通常对图像平面上可允许的最大光斑或模糊的尺寸给出限制。像差校正光学元件减小一个波长极限(例如,蓝色波长区域中的滤光透射)处的模糊或光斑大小,并且还减小不同波长区域处的模糊或光斑大小(例如,对于其通带位于红色波长区域中的滤光片)。该益处可用于下列情形:整个测量是一种比例度量,这取决于在红色和蓝色波长区域中检测到的单独信号,由此提高了整个试验的灵敏度。上文提供的讨论涉及特定的实施例,但是本领域的技术人员应该理解,有许多校正零屈光度光学元件的变体,它们以相似的方式和具有不同波长通带的滤光片结合起来被置于光学系统中,这些都被包括在本发明的范围内。

[0177] 图3是本发明一实施例的微流体器件中存在的许多反应室中发生的反应所产生的以第一波长为中心的荧光发射的照片。如图3所示,许多反应室产生第一波长“波长1”的发光。在图3所示的本发明的实施例中,10x16的反应室阵列被成像。在一些实施例中,第一波长与上述荧光团相关联。对于本领域的技术人员而言,很明显,第一波长的发光强度是反应室中发生的化学过程的函数。如图所示,用根据本发明一实施例提供的光学成像系统给10x16反应室的二维阵列成像。如上所述,在本发明的一些实施例中,反应室处于流体隔离。此外,根据可替代的实施例,反应室的特征在于,体积在纳升范围,和/或反应室密度的量级为每平方厘米有几百个反应室。

[0178] 图4是本发明一实施例的微流体器件中存在的许多反应室中发生的反应所产生的以第二波长为中心的荧光发射的照片。如图4所示,许多反应室产生第二波长“波长2”处的发光比较图3和4,一些反应室产生很少的光或不产生光,而其它反应室产生第一波长的光、第二波长的光、或第一和第二波长的光。当然,荧光活性的收集和分析可以对反应室中发生的化学反应的本质作出理解。

[0179] 图5-7是用本发明一实施例产生的选定波长的光点图。参照这些图的说明,图中所示的波长范围通常分成三个波带:绿色波长,蓝色波长和红色波长。图5示出了525、550和575nm的波长,它们通常与光谱的绿色区域相关联。图6示出了486、501和516nm的波长,它们通常与光谱的蓝色区域相关联。图7示出了616、636和656nm的波长,它们通常与光谱的红色区域相关联。图5是针对图2A所示的透镜系统而计算的,图6是针对图2B所示的透镜系统而计算的,而图7是针对图2C所示的透镜系统而计算的。

[0180] 图8是用本发明一实施例产生的照度图,该图示出了作为位置的函数的相对均匀性。在图8中,针对图2A所示的光学系统,绘出了作为Y段(毫米)的函数的相对照度。在0.550 μm的波长处,超过距离21.4mm的相对照度均匀性大于90%。

[0181] 图9-11是本发明若干实施例的正方块块内能量图。在一些光学系统中,光学系统性能的测量是正方块块内能量百分比,这是指定中心区域中的总能量的百分比。参照图9,通过使用图2A所示的透镜系统,所包括的能量的百分率被绘制成各位置的形心的半宽(以

微米为单位)的函数。作为一个示例,对于离中心 14.8mm 的位置,约 50%的能量被包括在离形心约  $7.5 \mu m$  处,而对于离中心 21.4mm 的位置,约 90%的能量被包括在离形心相同距离处。在图 9-11 中,包括衍射,通常用快速傅立叶变换(FFT)算法来执行上述计算。图 10 和 11 分别是图 2B 和 2C 所示透镜系统的正方块块内能量图。在这些图中,如图 9 所示,包括衍射。

[0182] 图 12 是示出了本发明一实施例所提供的光学系统的场曲和畸变的图。针对波长  $0.525 \mu m$ 、 $0.550 \mu m$  和  $0.575 \mu m$  示出了场曲,它们都标记在图中。对于不同的所示波长,畸变不相同,其中各波长之间可忽略的差异在 0.05% 的水平。

[0183] 图 13 是本发明一实施例的系统所产生的“双波长 - 焦点”的图。在该图中,色焦点移动是波长(以微米为单位)的函数。图 13 所示的波长范围覆盖了从 480 纳米到 650 纳米的波长范围。如图所示,最大焦点移动范围是  $214.3702 \mu m$ ,而衍射限制范围是  $4.243 \mu m$ 。参照图 13,超过  $214 \mu m$  长的颜色焦点跨越所示范围。因此,系统性能的分析通常包括要考虑  $\pm 100 \mu m$  的散焦处的光斑大小。通常,散焦光斑的大小将超过焦点中的光斑的大小。根据本发明各实施例,通过使用上述嵌入式双透镜,来校正轴向色差。在可选的实施例中,使用特殊的玻璃类型来实现复消色差性能(通常在比其它玻璃类型要贵的情况下获得)。

[0184] 图 14-16 是用本发明一实施例产生的针对选定波长的光点图。如图 14 的说明所示,当上述系统在最佳焦点位置时,提供了光谱绿色区域中若干个波长(525、550 和 575nm)的光点图。为了产生图 14-16 所示的光点图,使用了图 2A 所示的透镜系统。图 15 和 16 分别是在  $+100 \mu m$  的散焦和  $-100 \mu m$  的散焦处计算出的光点图。在图 15 和 16 中,考虑光谱绿色区域中相同的波长。

[0185] 图 17-19 是用本发明一实施例产生的针对选定波长的光点图。如图 17 的说明所示,当系统位于最佳焦点位置时,提供了光谱蓝色区域中若干个波长(486、501 和 516nm)的光点图。为了产生图 17-19 所示的光点图,使用了图 2B 所示的透镜系统。图 18 和 19 分别是在  $+100 \mu m$  的散焦和  $-100 \mu m$  的散焦处计算的光点图。在图 18 和 19 中,考虑光谱的蓝色区域中相同的波长。如图 19 所示,场 4 包括 501nm 处的光线,延伸到  $100 \mu m$  盒子以外。

[0186] 图 20-22 是用本发明一实施例产生的针对选定波长的光点图。如图 20 的说明所示,在系统位于最佳焦点位置时,提供了光谱的红色区域中若干个波长(616、636 和 656nm)的光点图。为了产生图 20-22 所示的光点图,使用了图 2C 所示的透镜系统。图 21 和 22 分别是在  $+100 \mu m$  散焦和  $-100 \mu m$  散焦处计算出的。在图 21 和 22 中,考虑光谱的红色区域中相同的波长。

[0187] 在本发明的可选实施例中,提供了另一个 1 : 1 光学中继成像系统,其中包括对图 2A-2C 所示光学元件的修改。尽管保留了一般的光学系统,但是特定元件(包括滤光片 / 零屈光度双透镜的组合)的特性被修改了。在这种可选实施例中,提供了大于 35mm(例如,46.12mm)的工作距离。此外,提供了平均为  $11.28 \mu m$  的 RMS 光斑直径,其中最大值是  $14.73 \mu m$ ,光学成像系统的总长是 542.2mm,其中最大滤光片 AOI 为 12.59 度,且滤光片处的最大光束直径为 76mm。

[0188] 图 23-25 是用本发明一可选实施例产生的针对选定波长的光点图。参照这些图的说明,图中所示波长范围通常分成三个波带:绿色波长,蓝色波长,和红色波长。图 23 示出了波长 525、550 和 575nm,它们通常和光谱的绿色区域相关。图 24 示出了波长 486、501 和

516nm, 它们通常和光谱的蓝色区域相关。图 25 示出了波长 621、636 和 651nm, 它们通常和光谱的红色区域相关。图 23 是基于图 2A 针对透镜系统而计算的, 图 24 是基于图 2B 针对透镜系统而计算的, 图 25 是基于图 2C 针对透镜系统而计算的。

[0189] 图 26-28 是根据本发明的若干实施例的正方块块内能量图。参照图 26, 通过使用图 2A 所示的透镜系统, 针对各个位置, 绘出了所包括的能量的百分率, 作为形心半宽 (以微米为单位) 的函数。作为一个示例, 对于离中心 14.8mm 的位置, 约 80% 的能量被包括在离形心约  $7.5 \mu\text{m}$  处, 而对于离中心 21.4mm 的位置, 约 90% 的能量被包括在离形心相同距离处。在图 26-28 中, 包括衍射, 通常用快速傅里叶变换 (FFT) 算法来执行计算过程。图 27 和 28 分别是图 2B 和 2C 所示透镜系统的正方块块内能量图。在这些图中, 像在图 26 中那样, 包括衍射。

[0190] 还应该理解, 上文所描述的示例和实施例只用于解释说明, 并且各种修改和变化对于本领域的技术人员而言都是很明显的并且应该被包括在本申请的精神和权限以及所附权利要求书的范围之内。

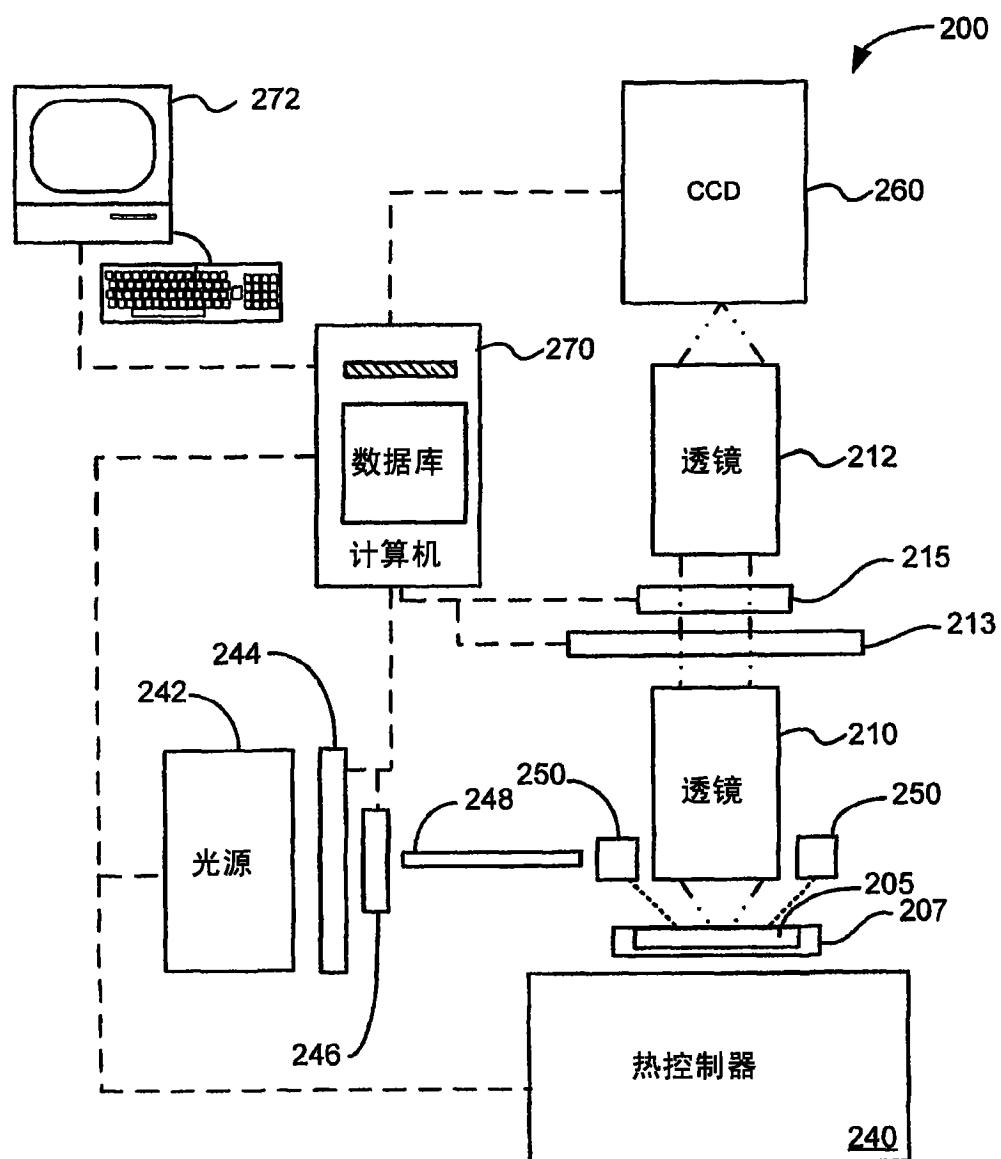


图 1A

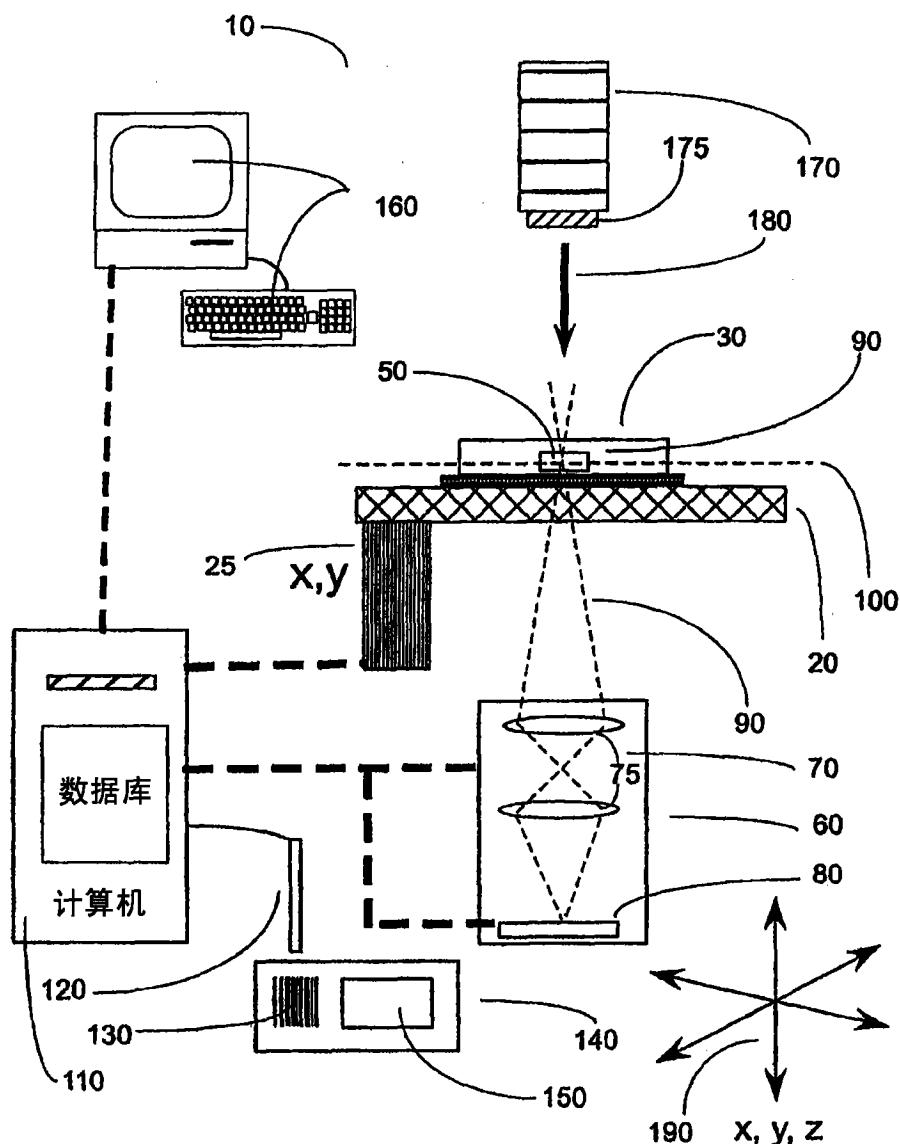


图 1B

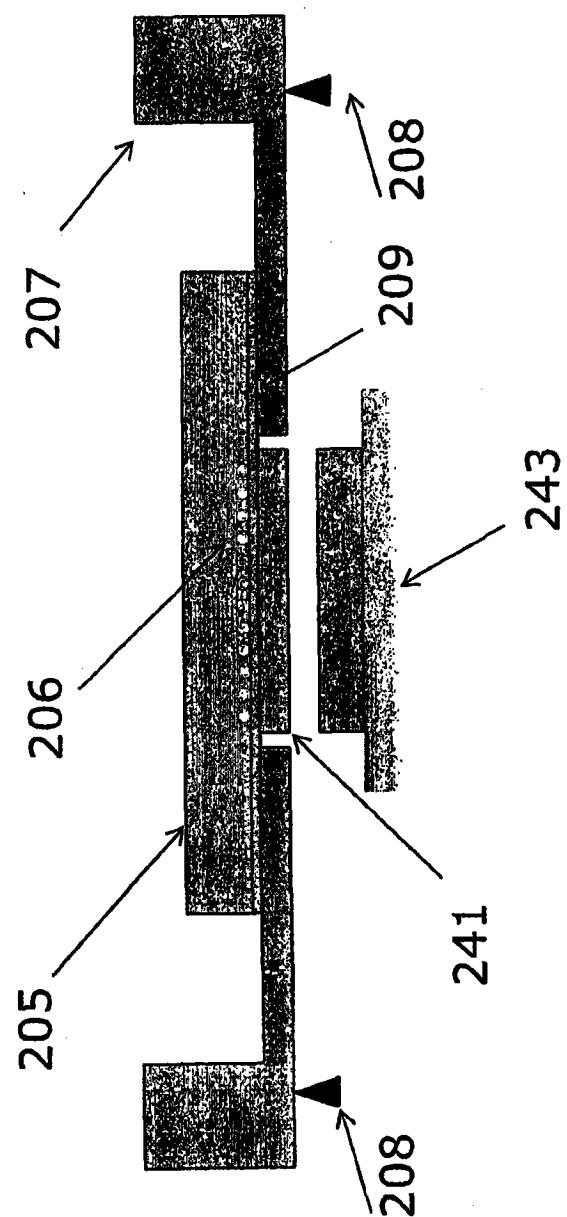


图 1C

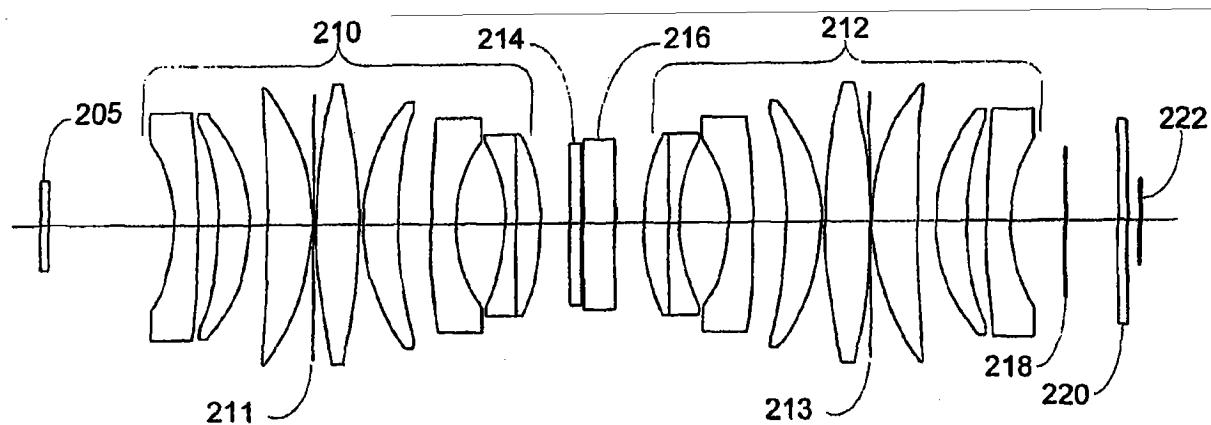


图 2A

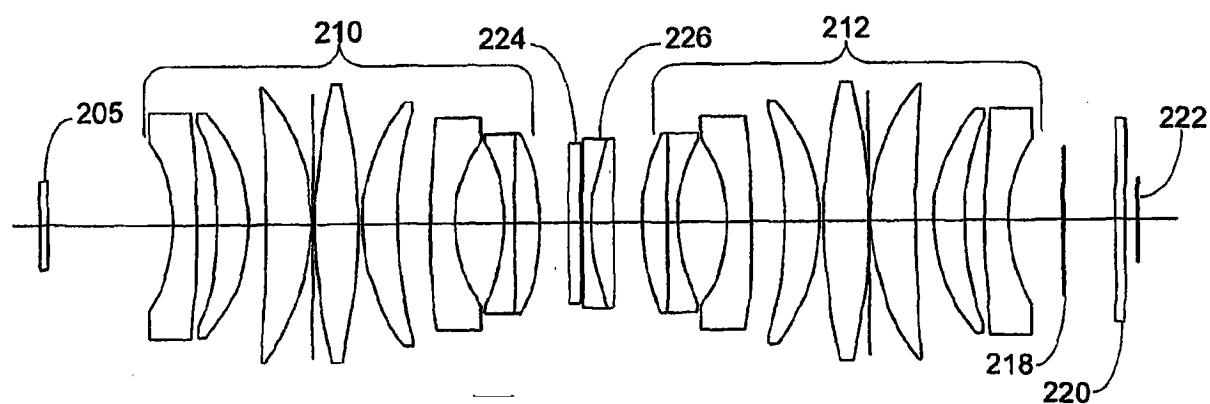


图 2B

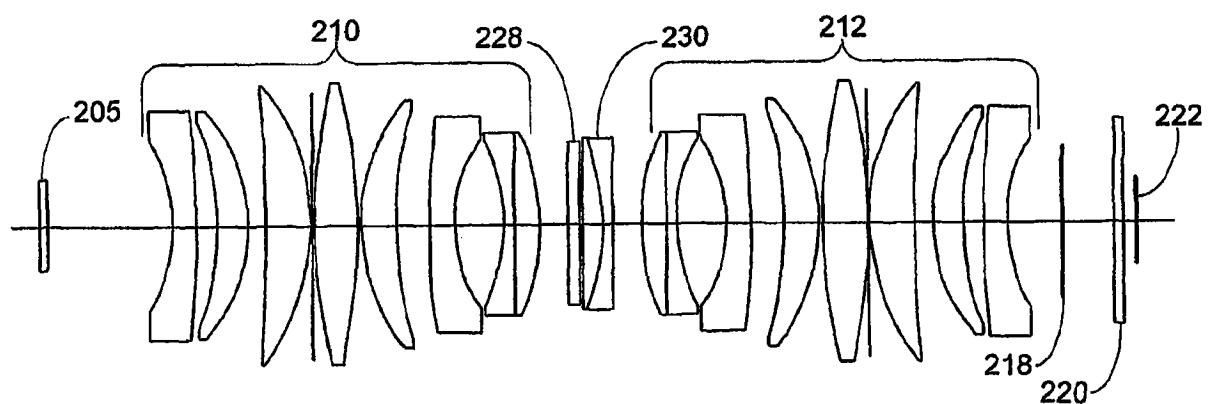


图 2C

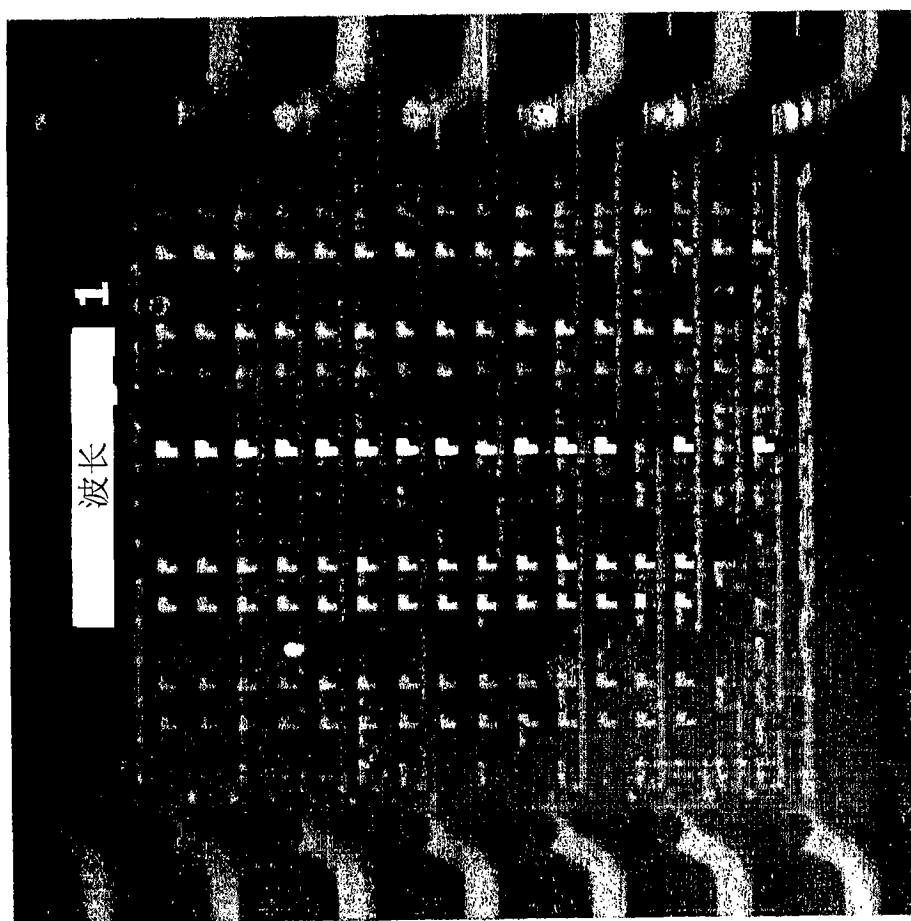


图 3

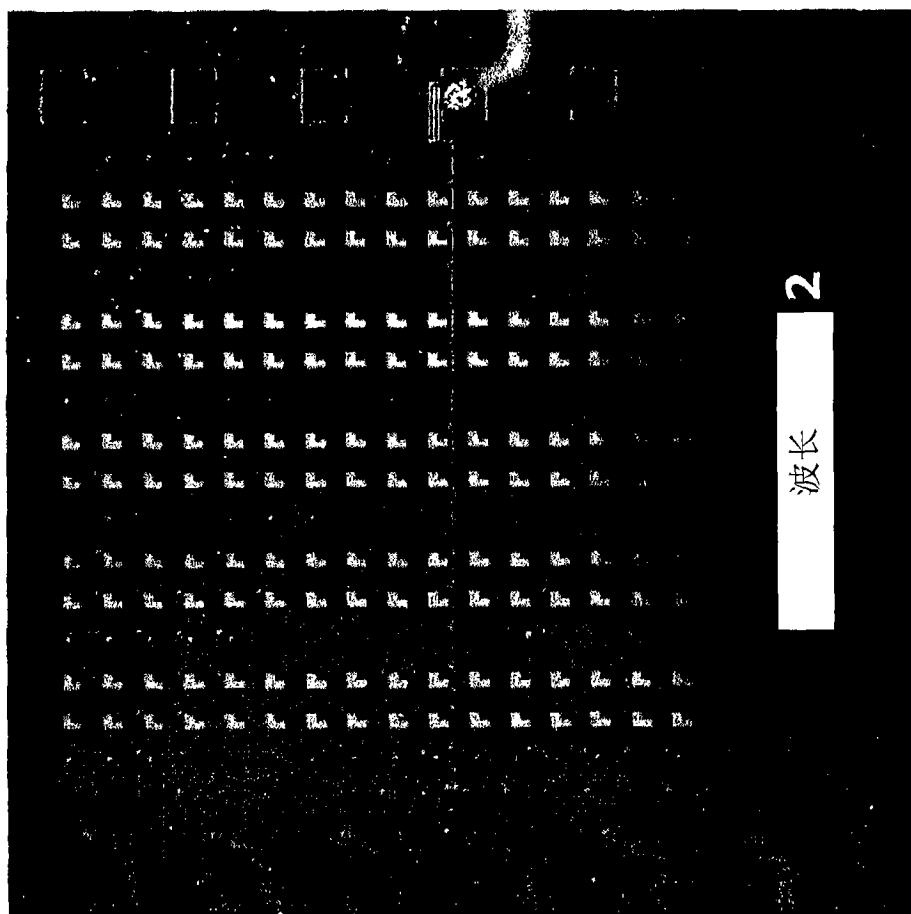
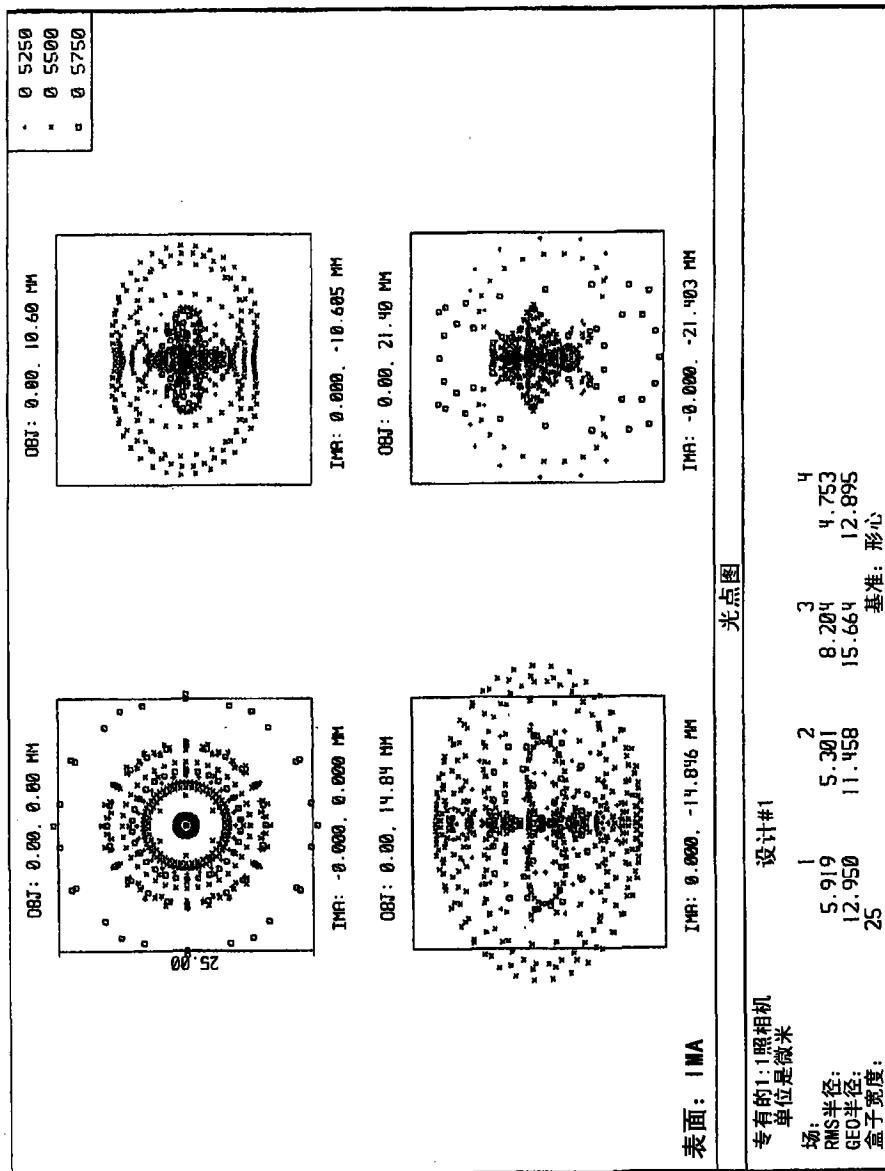


图 4



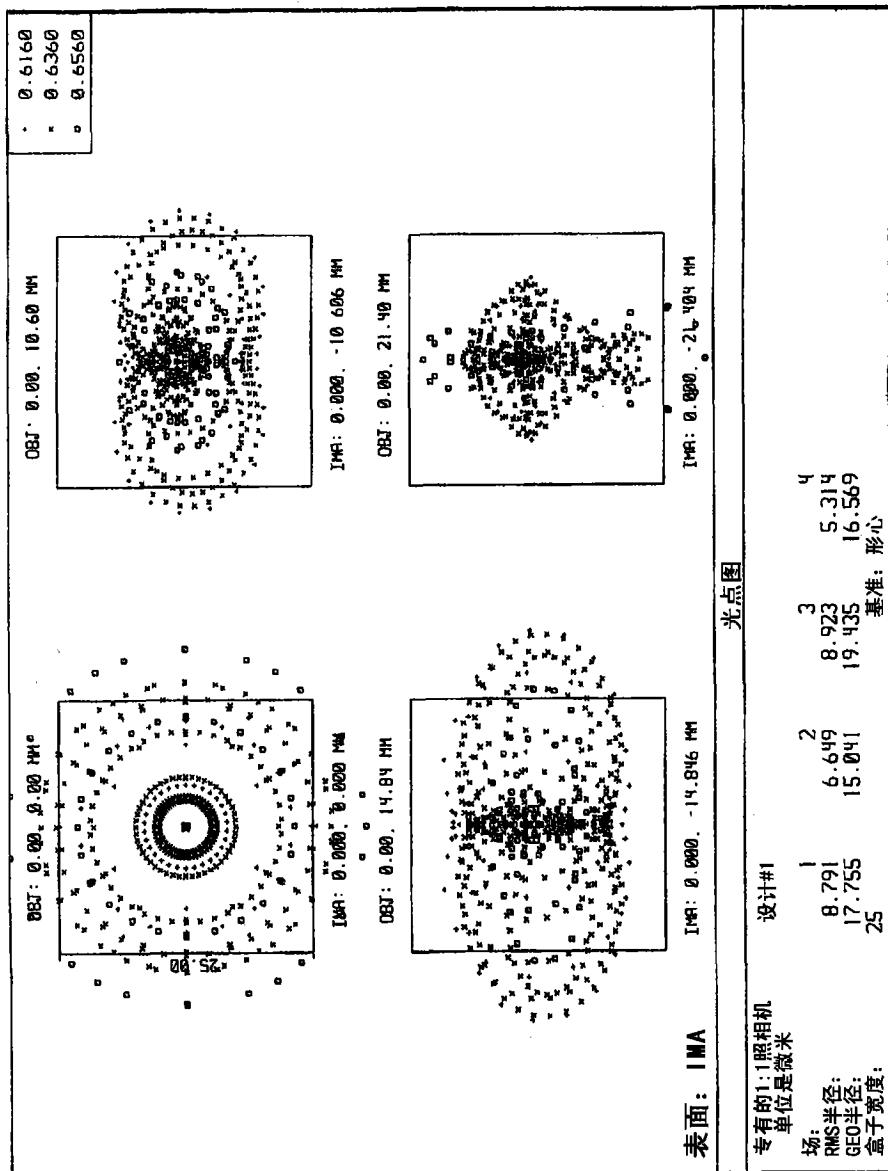


图 6

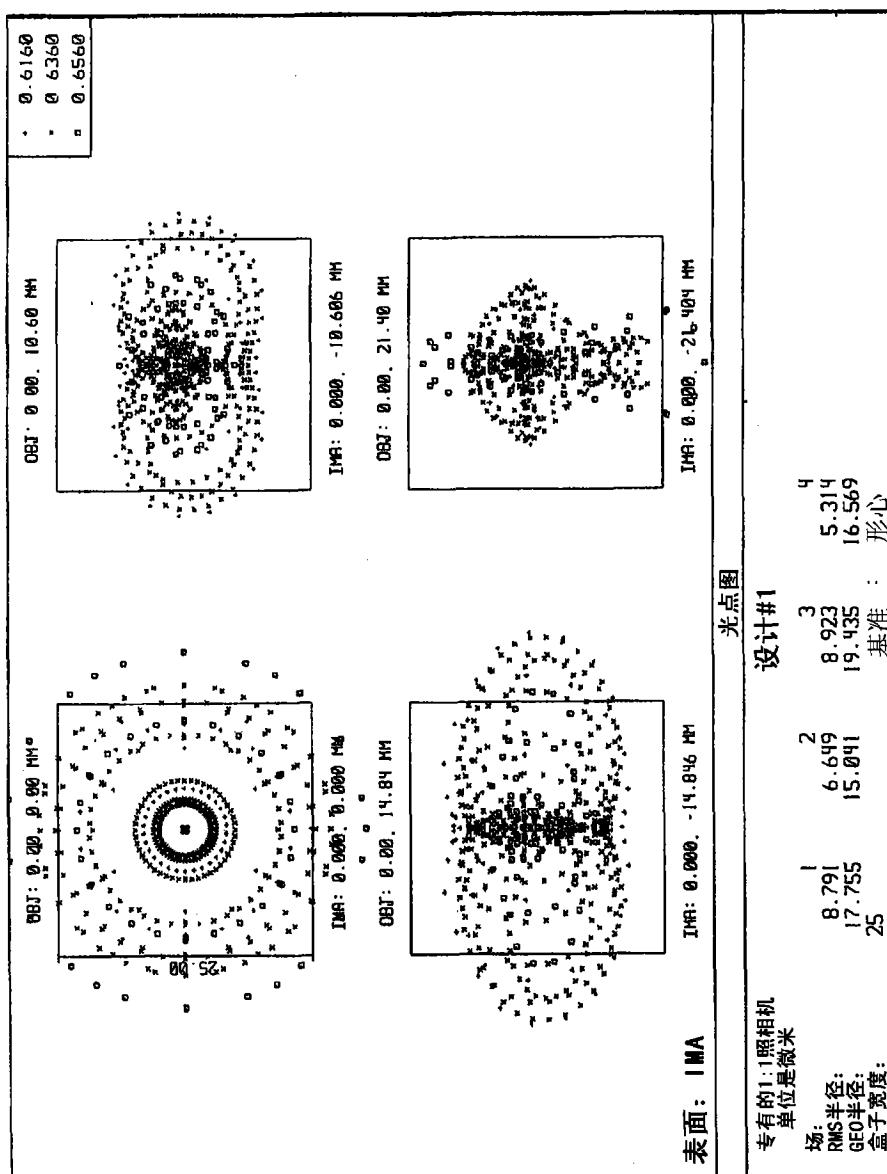


图 7

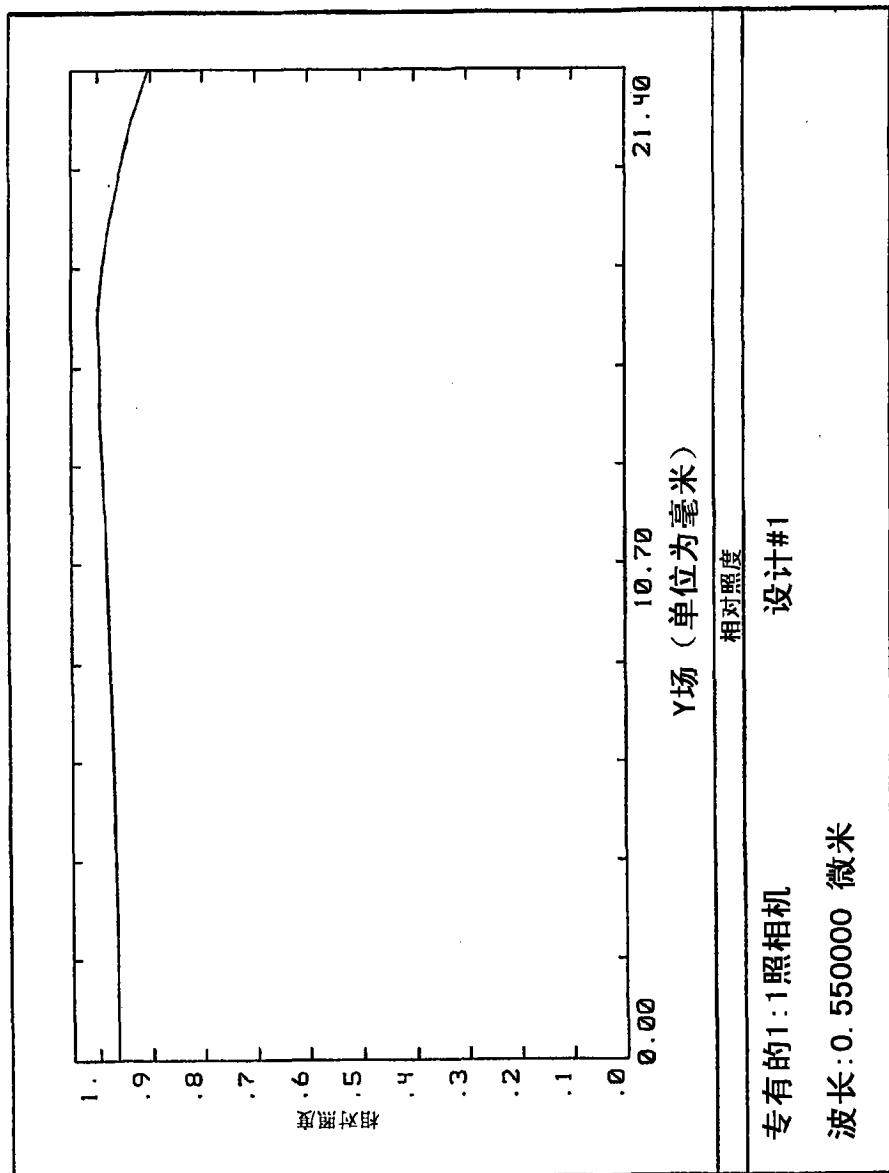
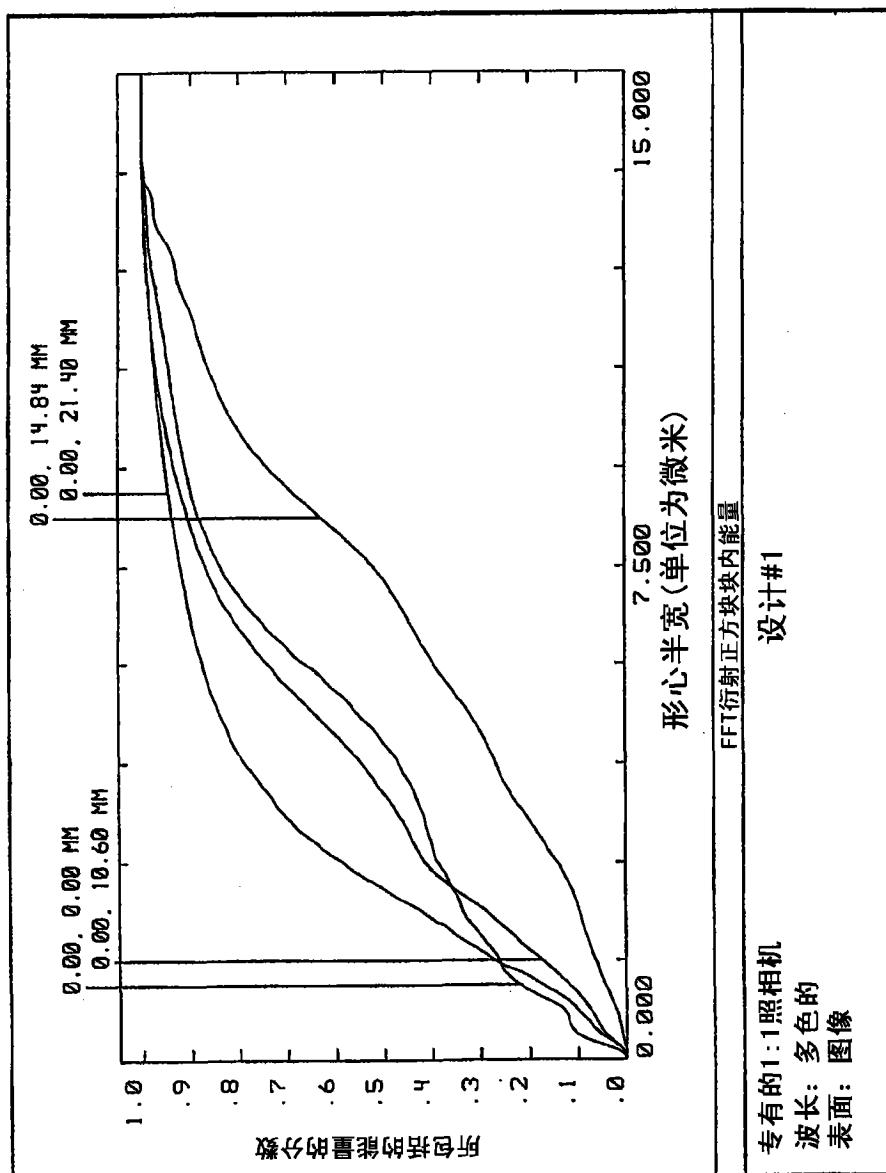


图 8



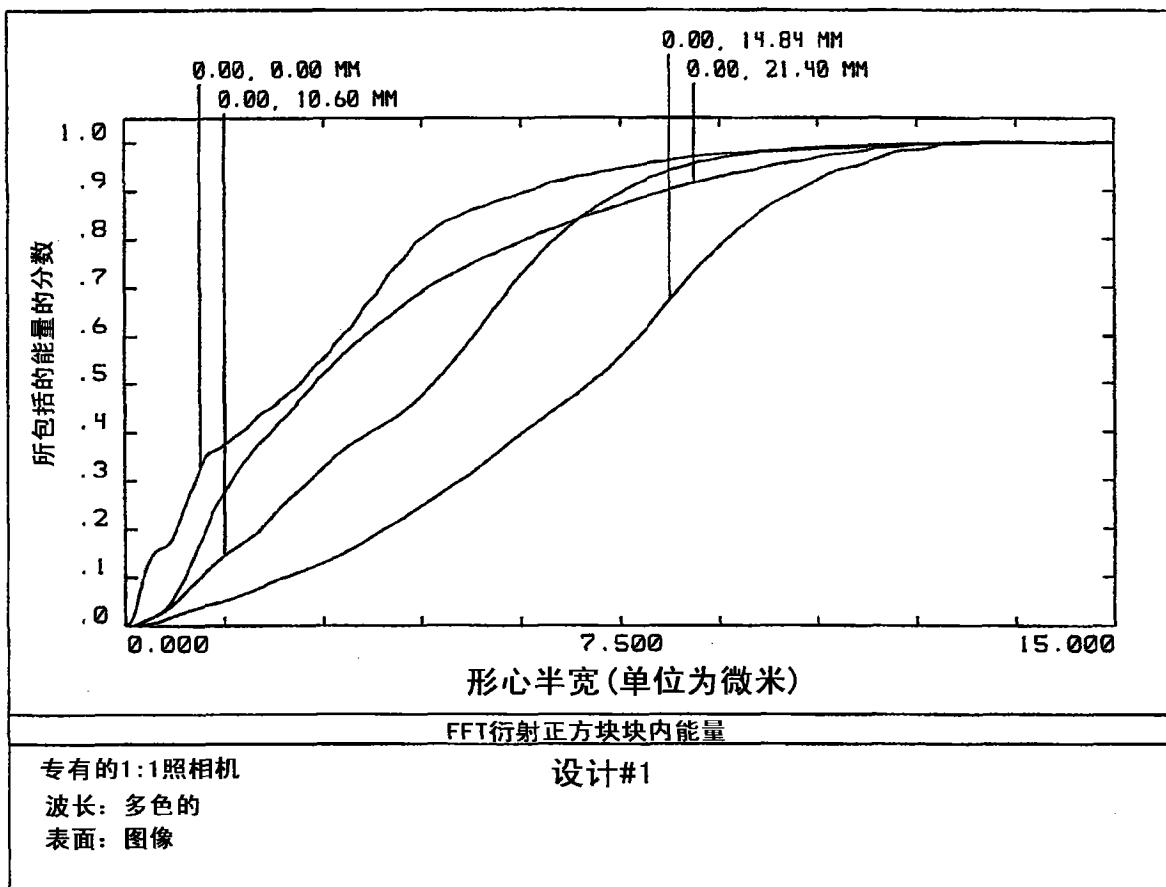


图 10

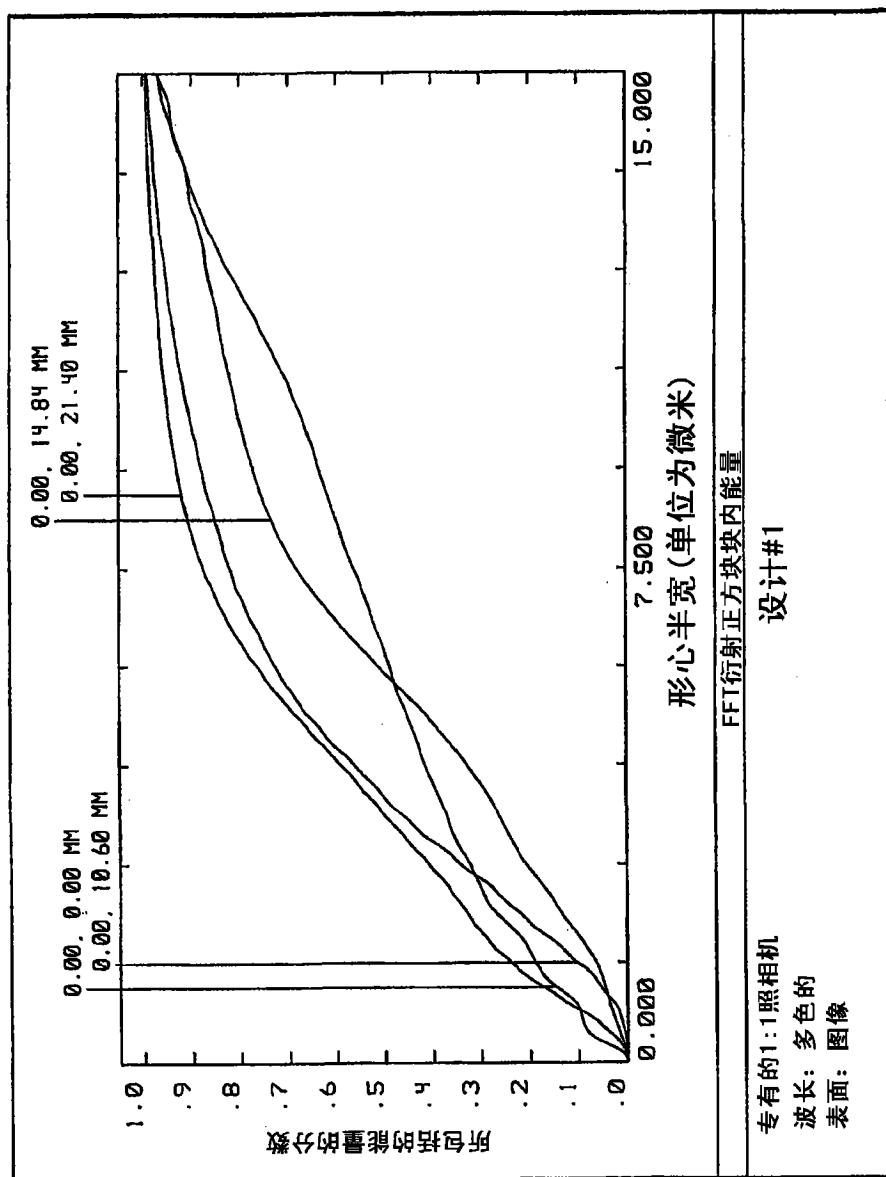
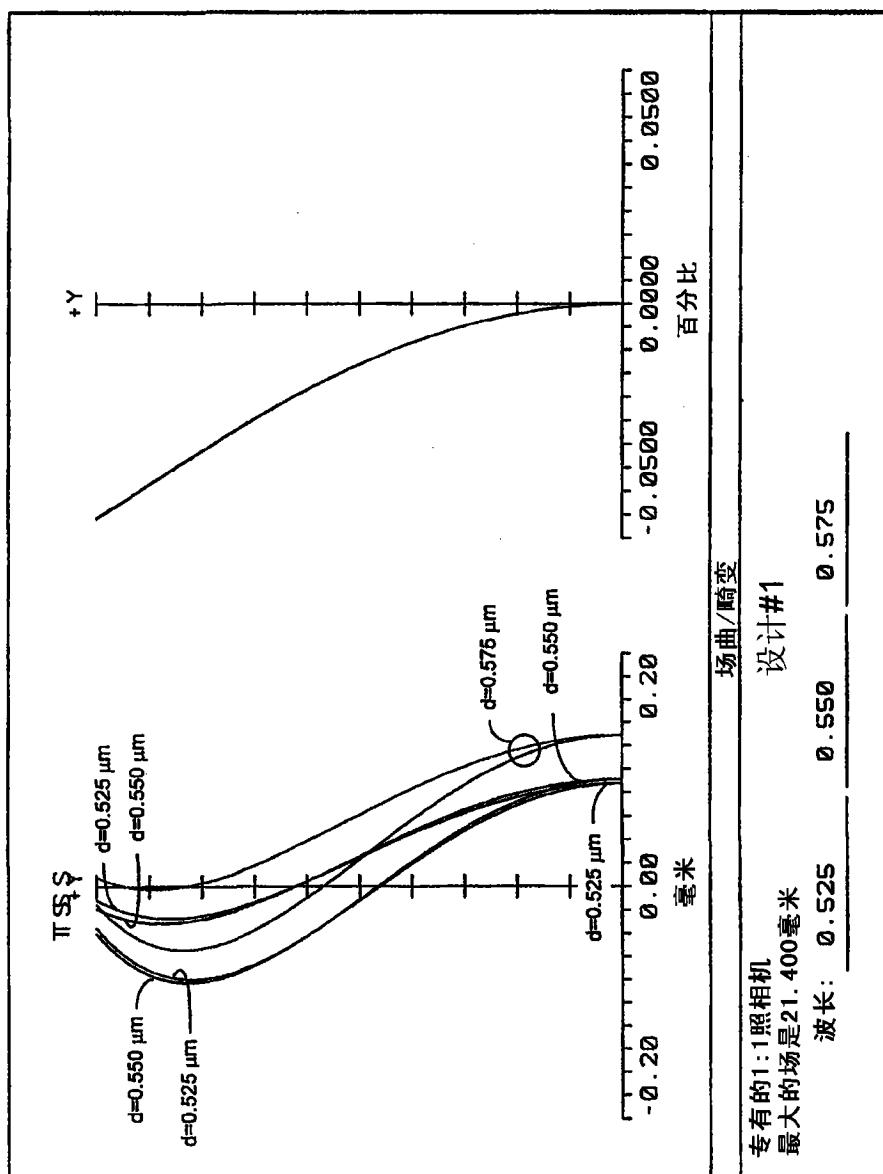


图 11



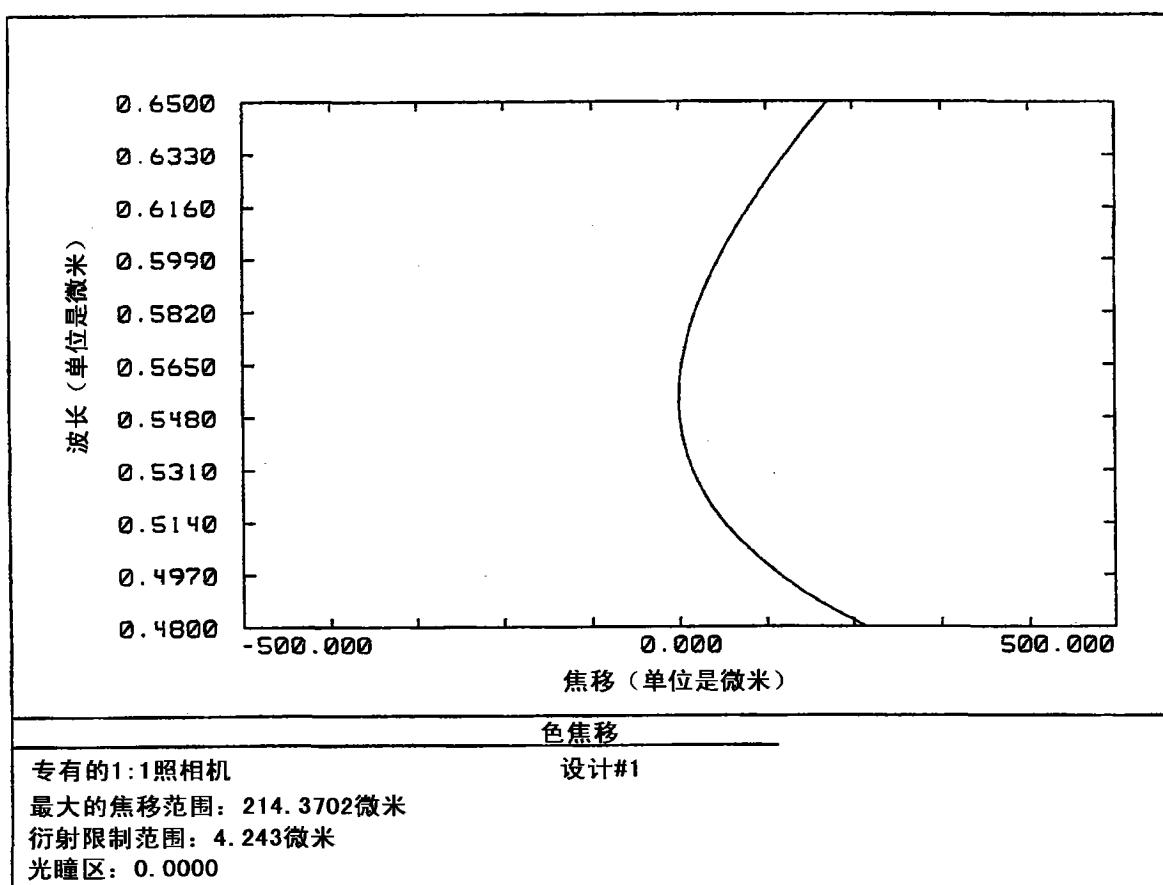


图 13

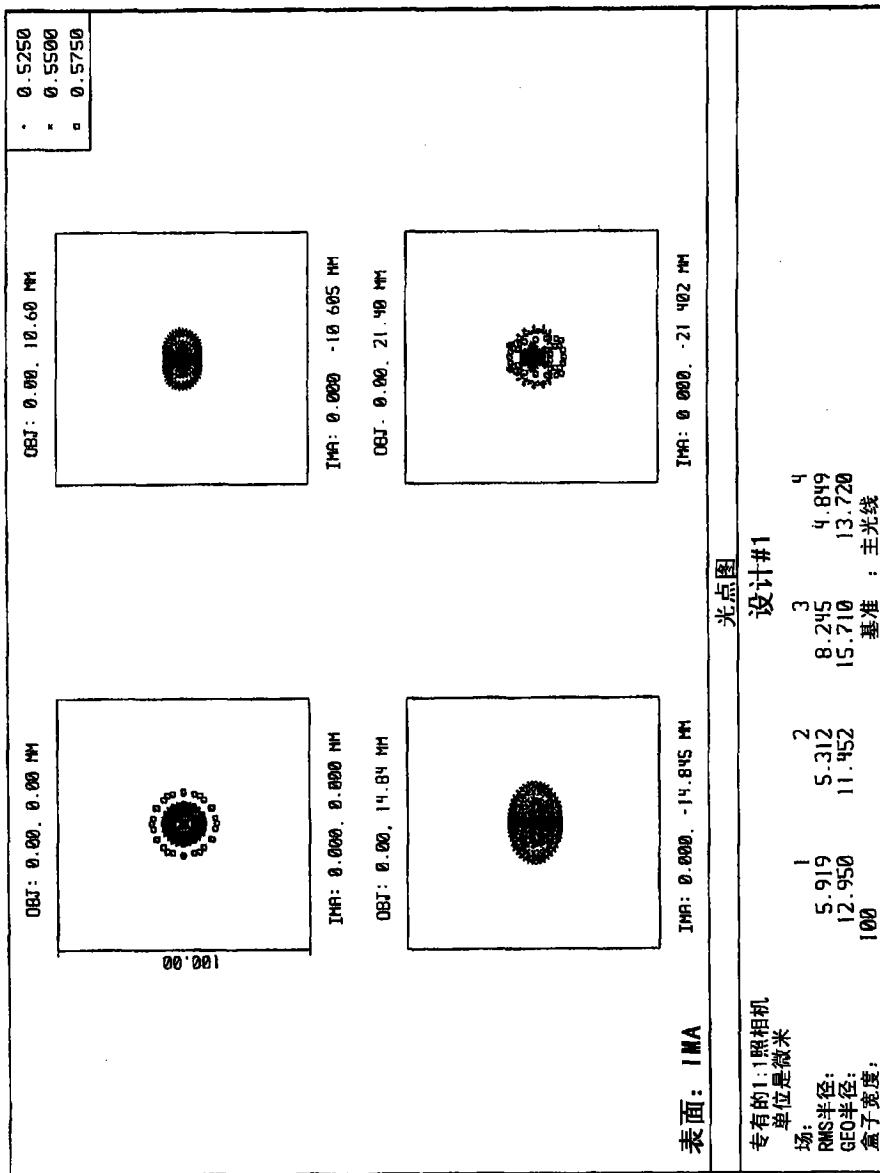


图 14

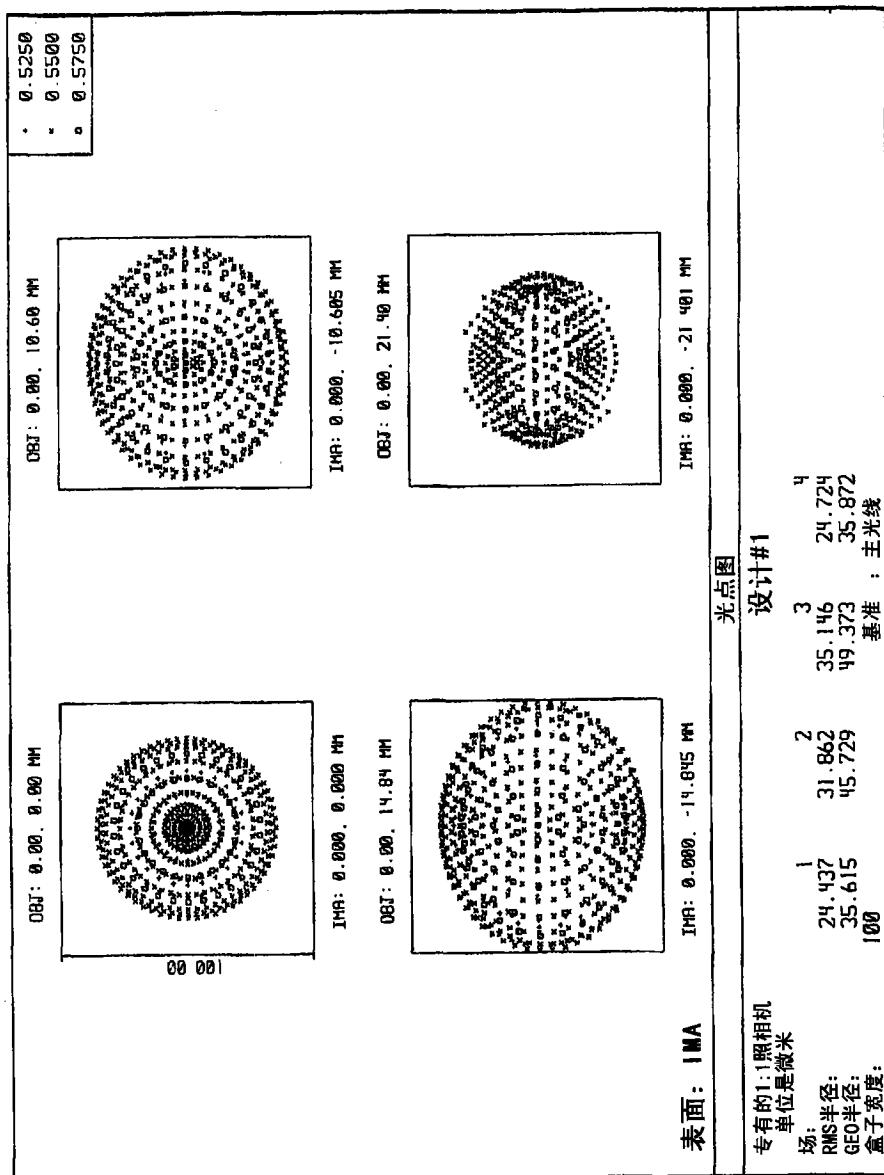


图 15

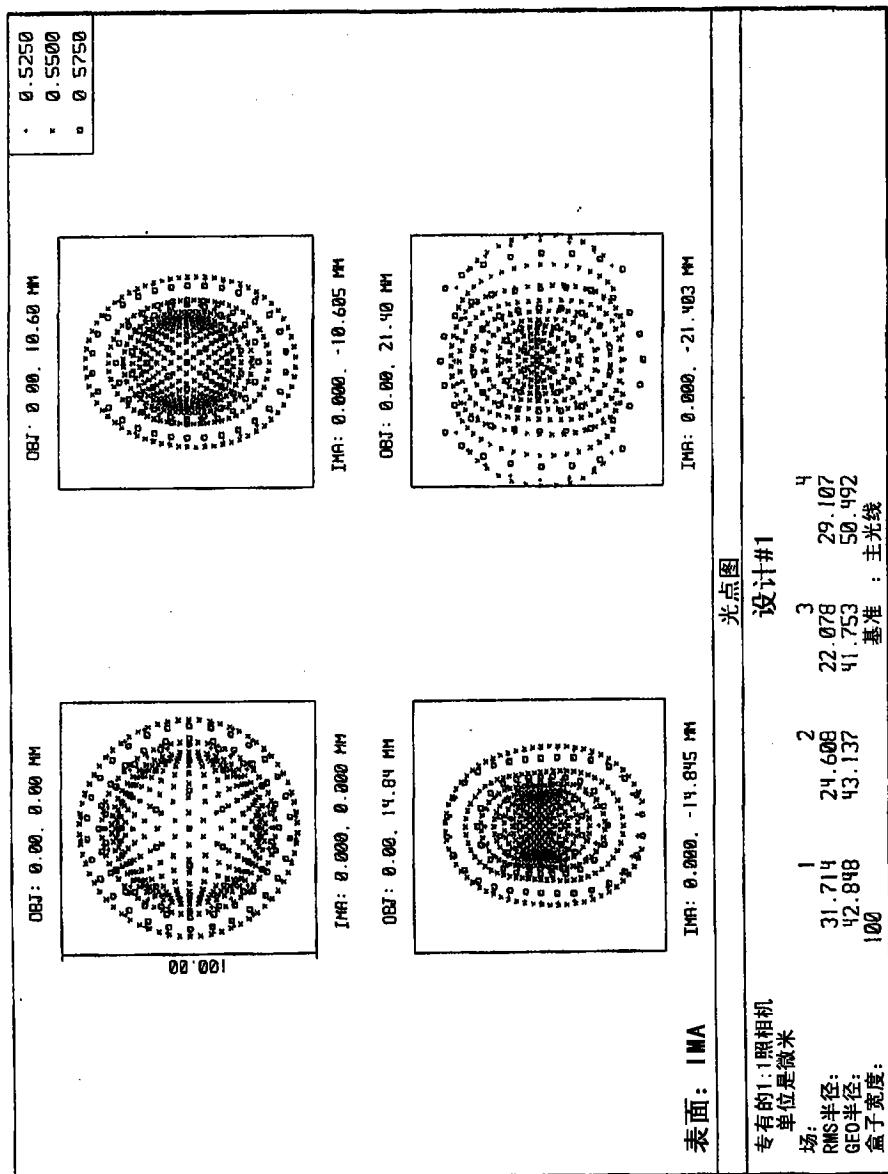


图 16

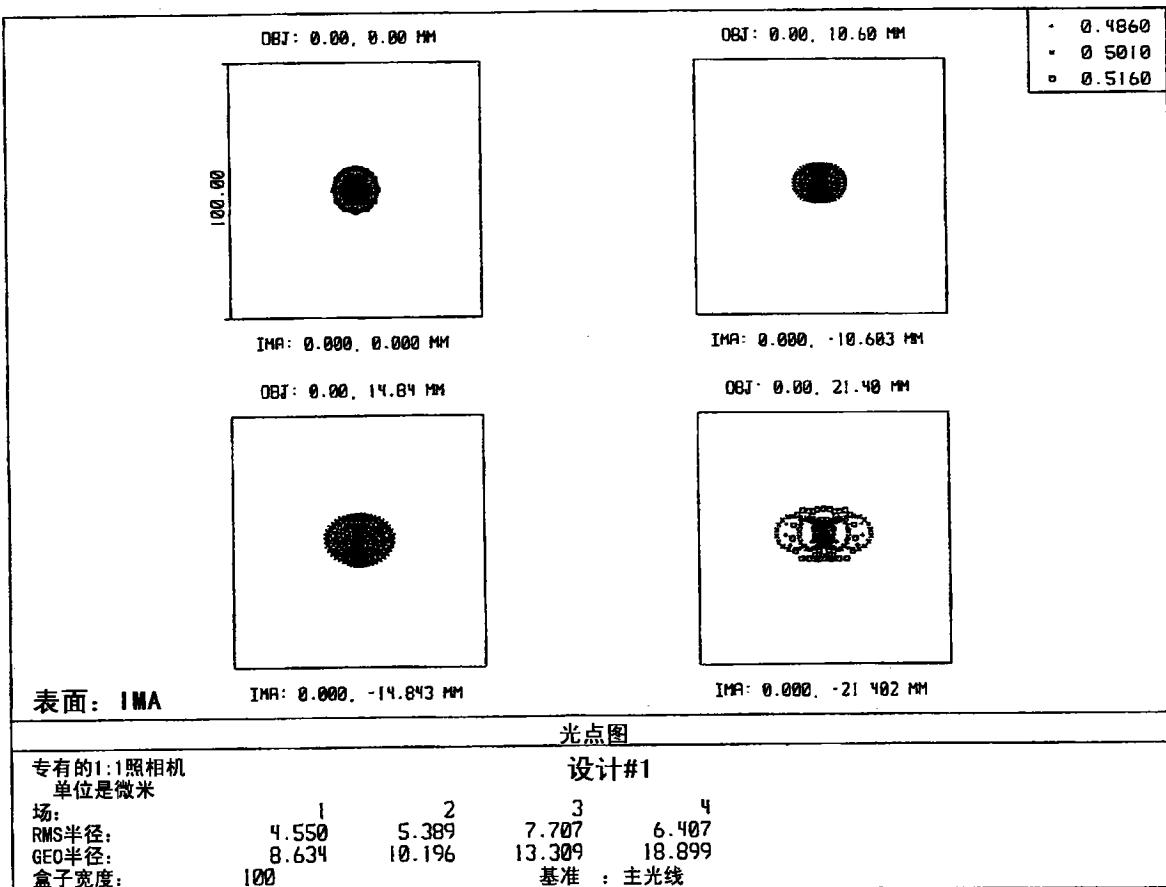


图 17

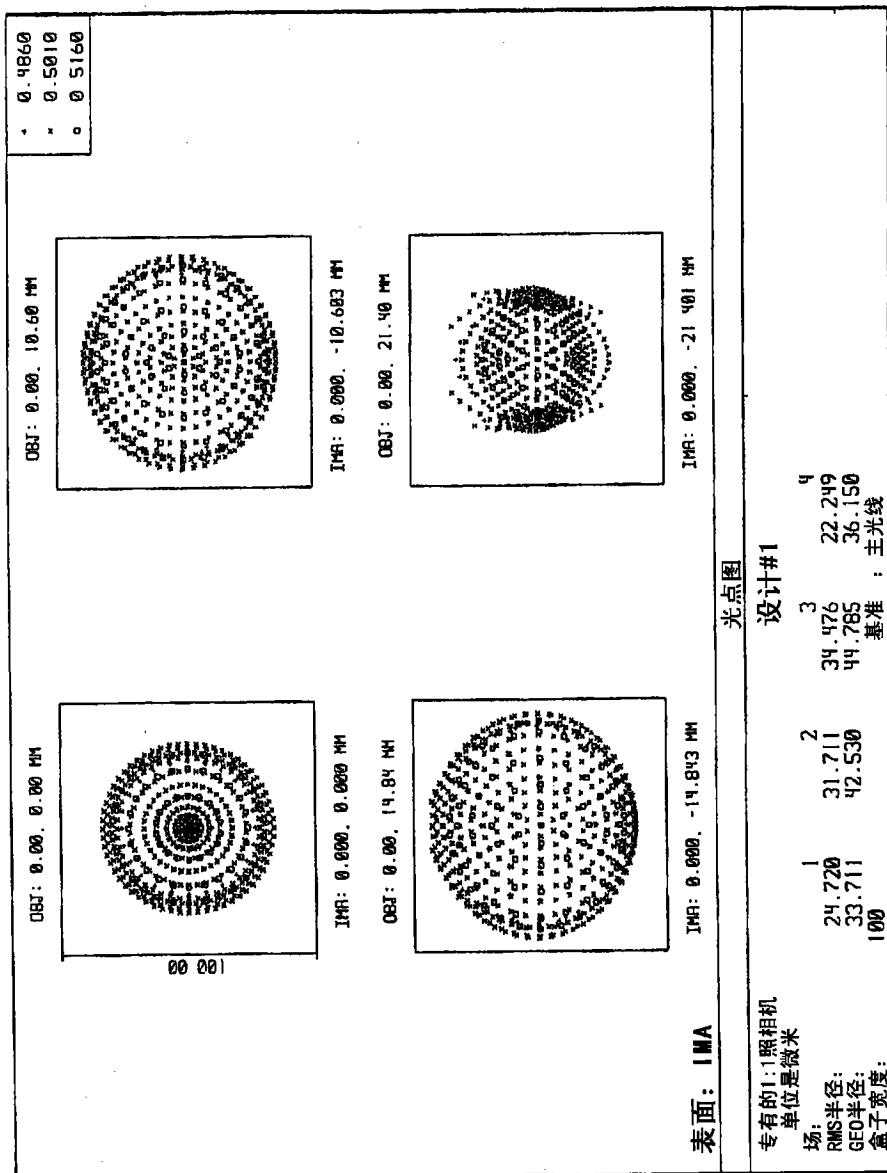
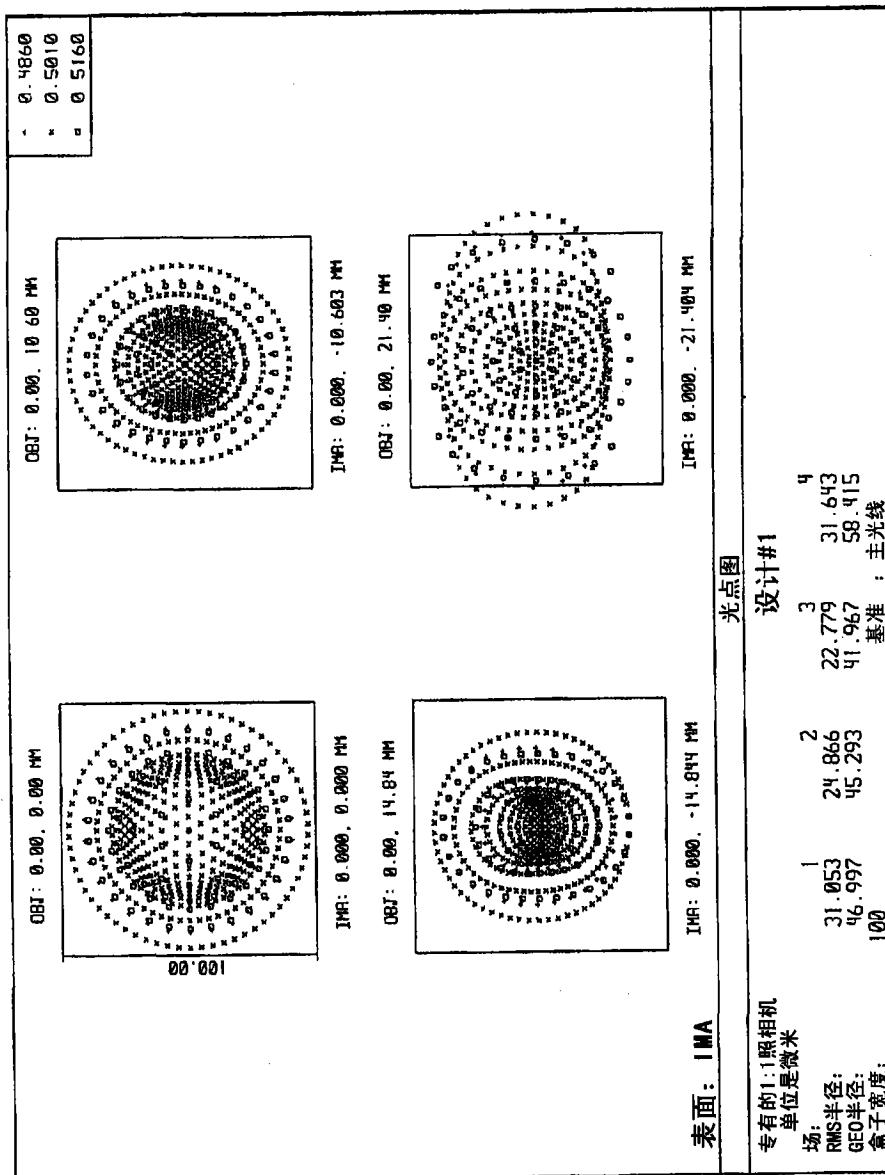


图 18



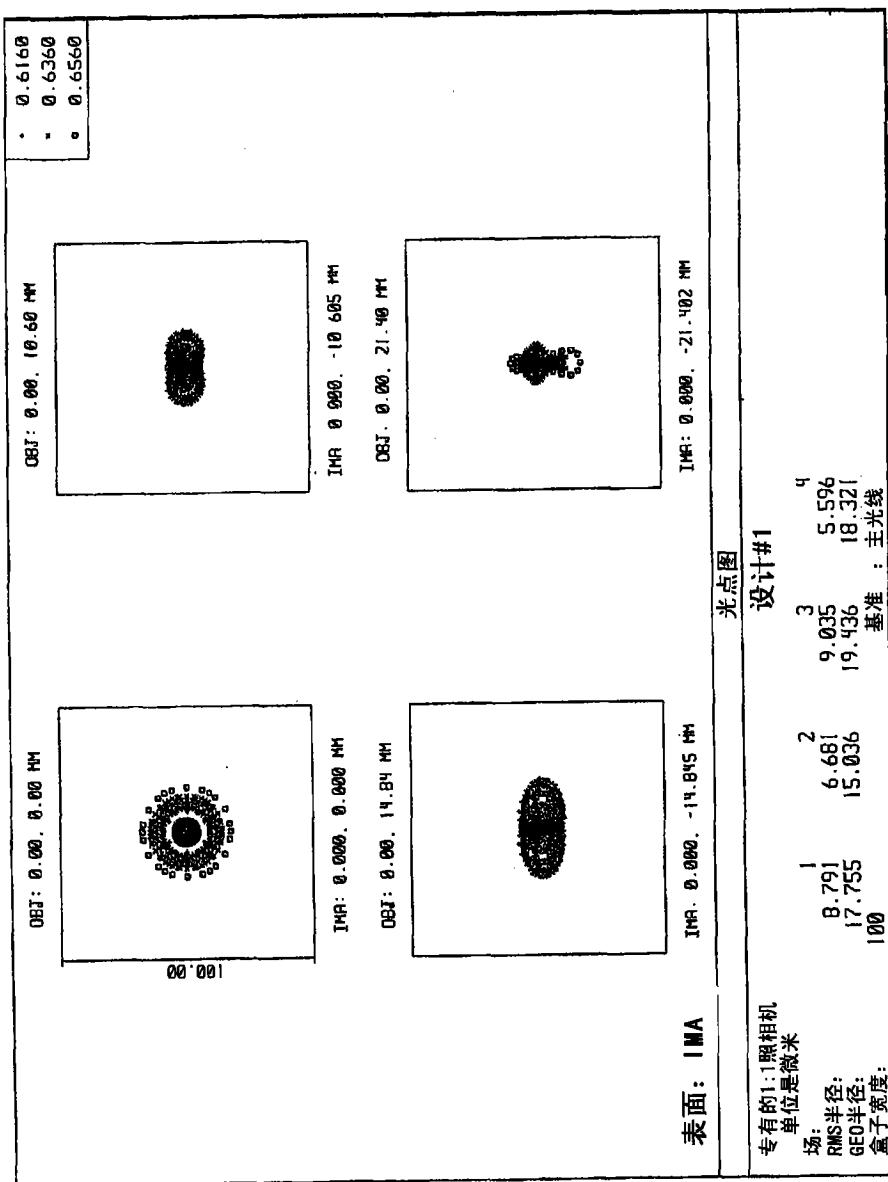


图 20

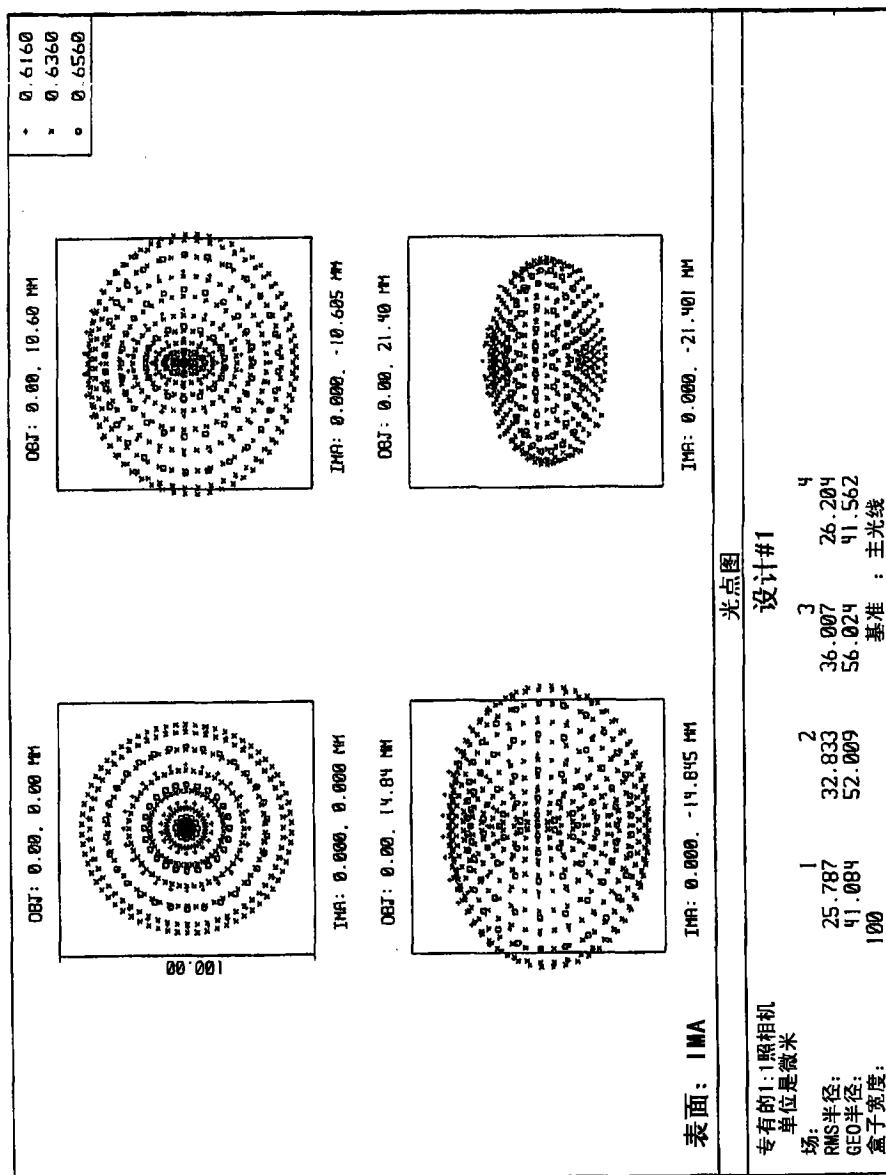


图 21

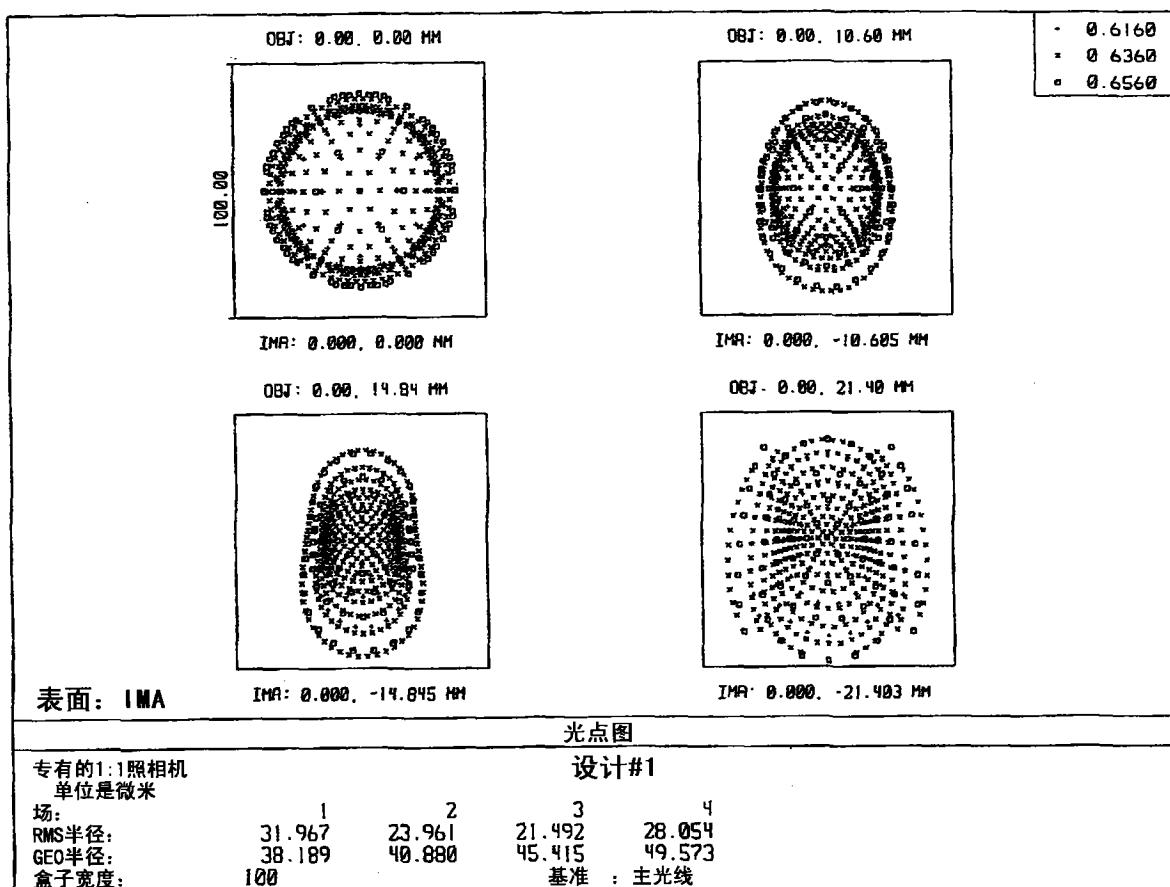


图 22

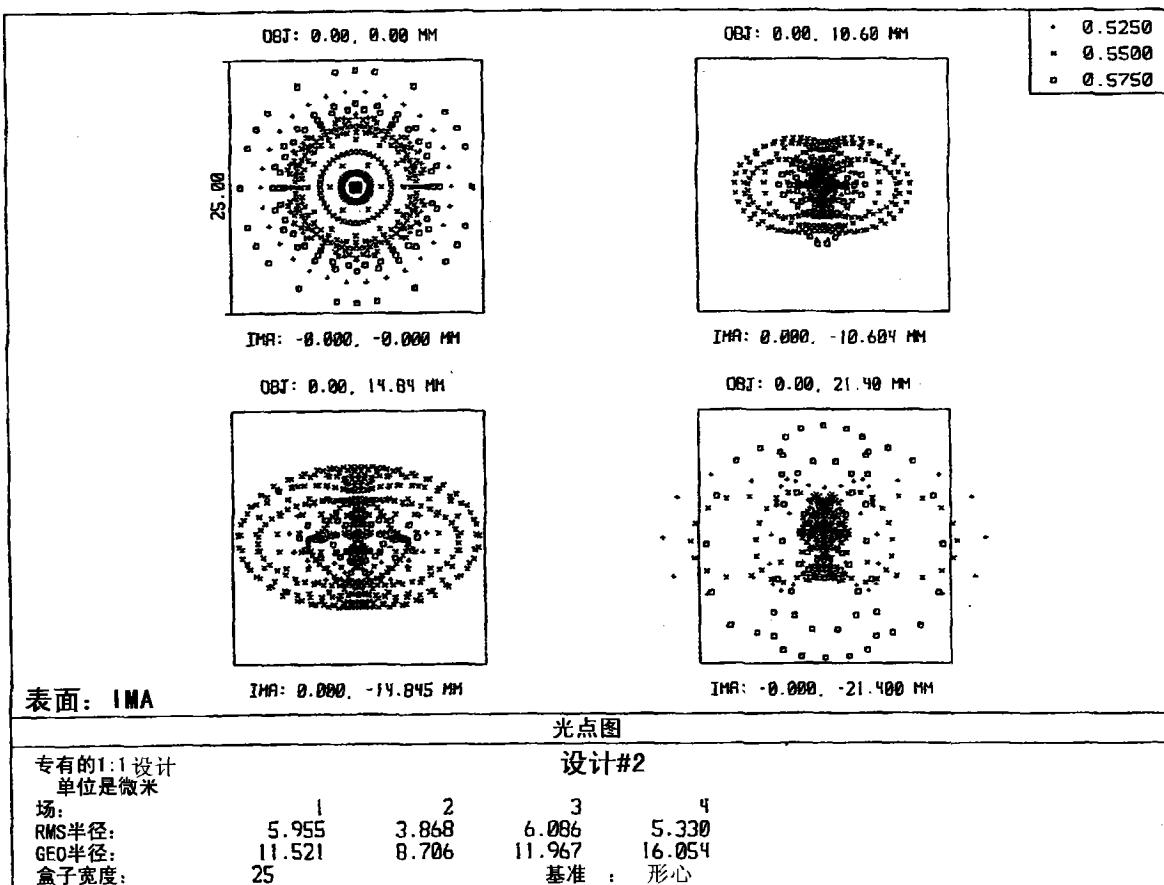


图 23

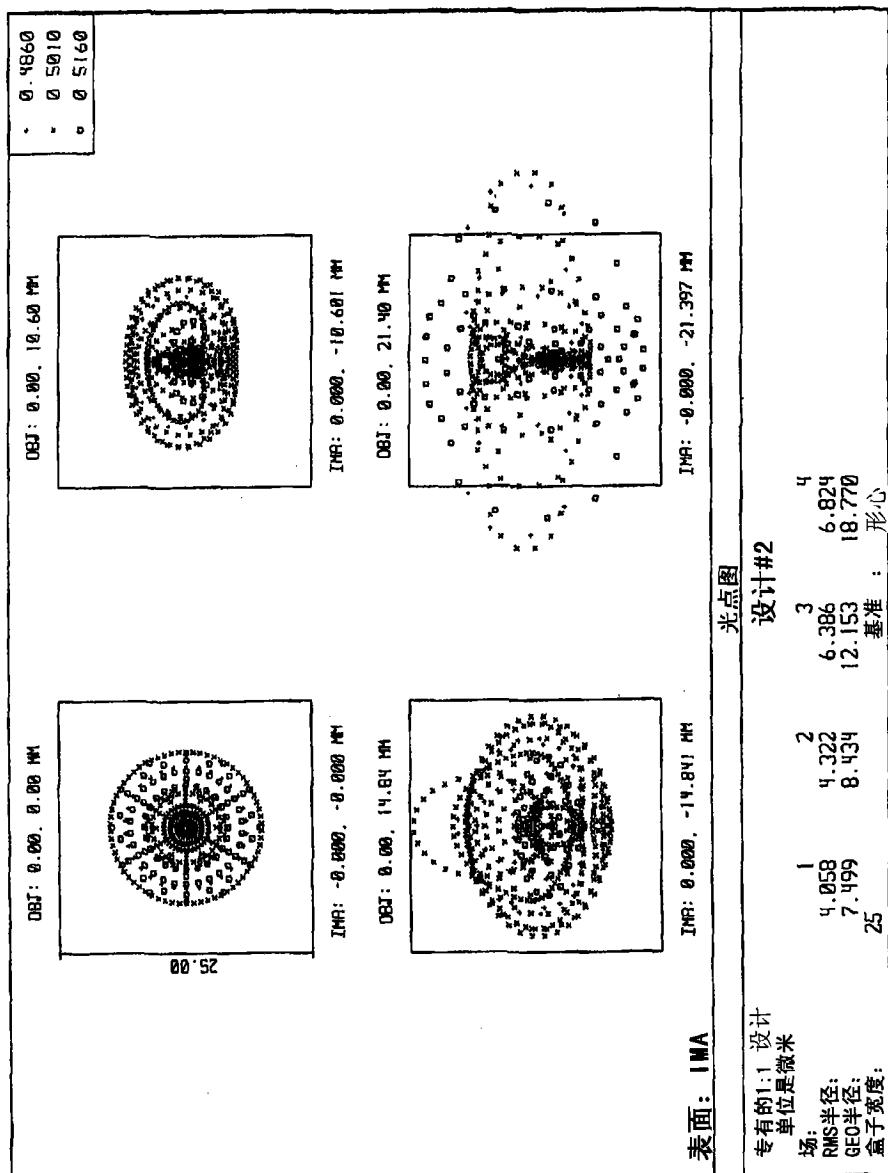


图 24

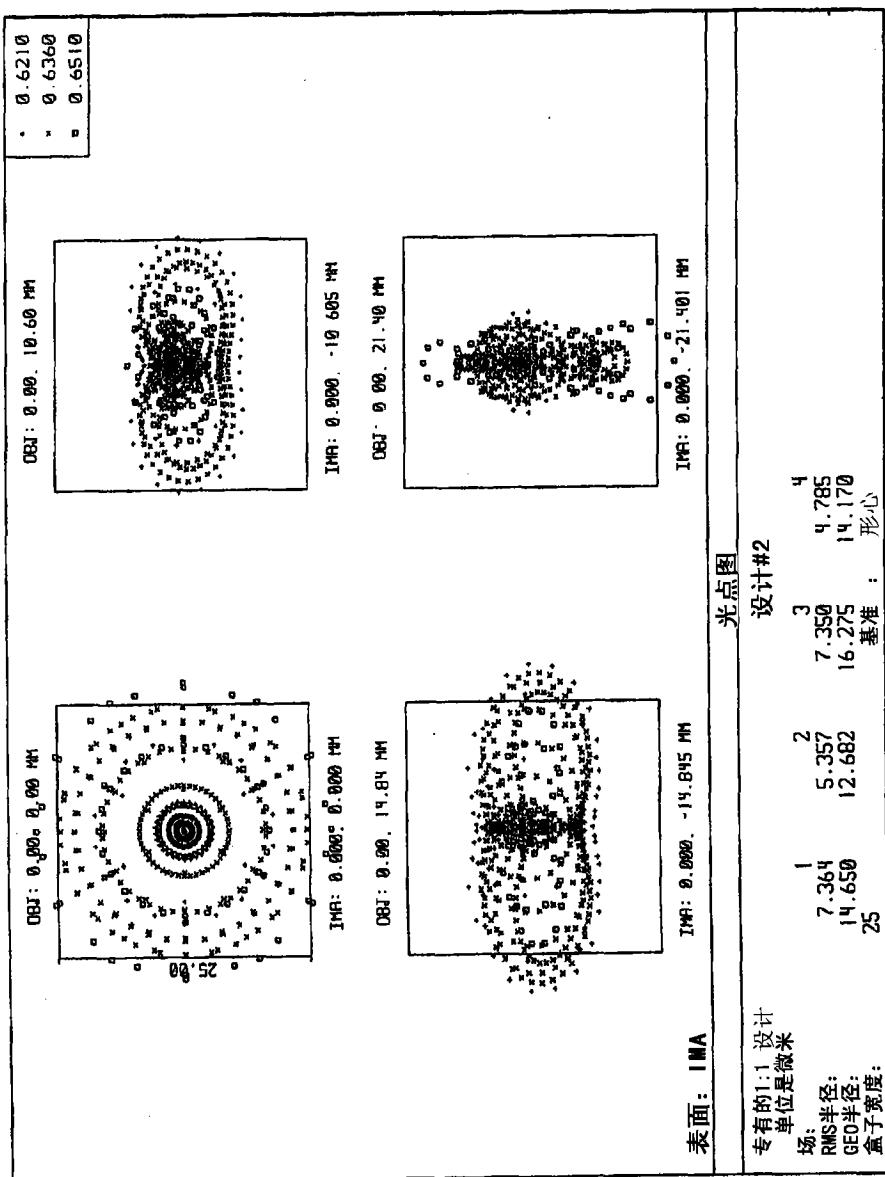


图 25

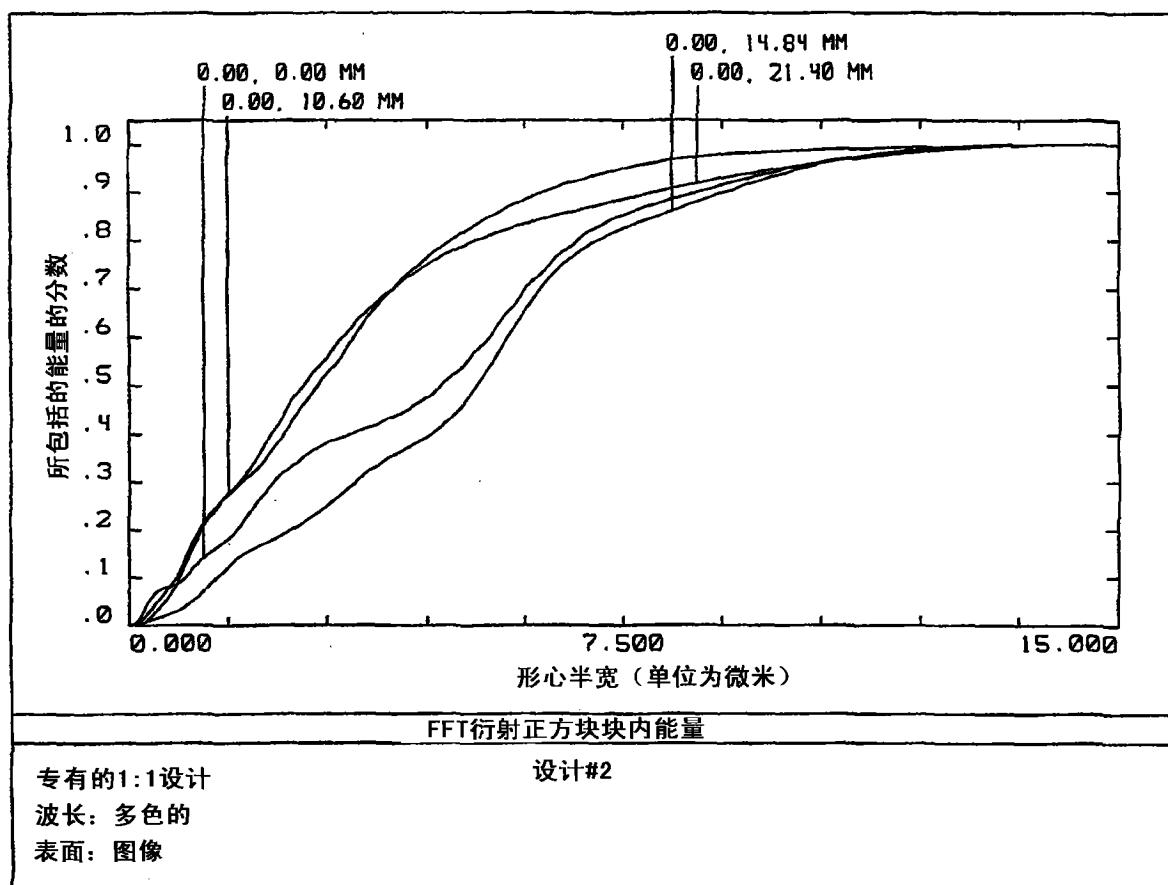


图 26

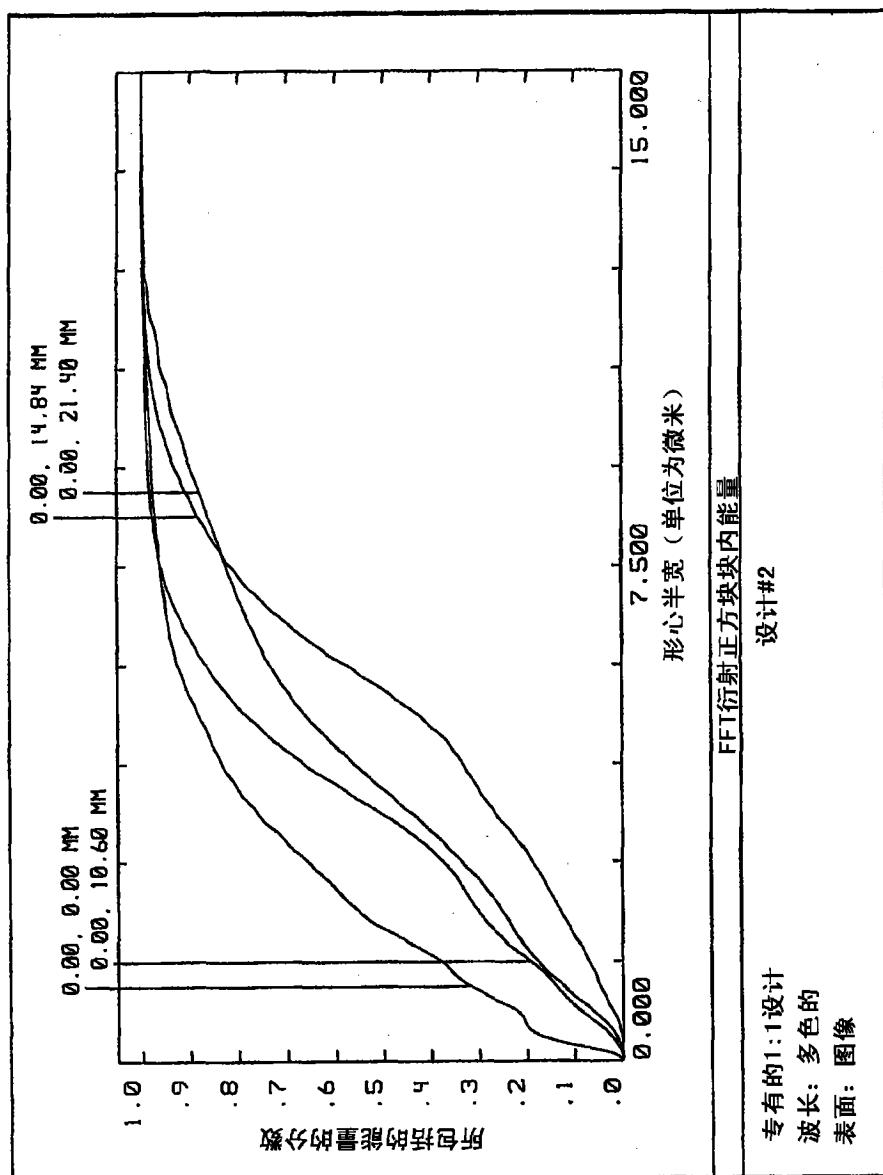


图 27

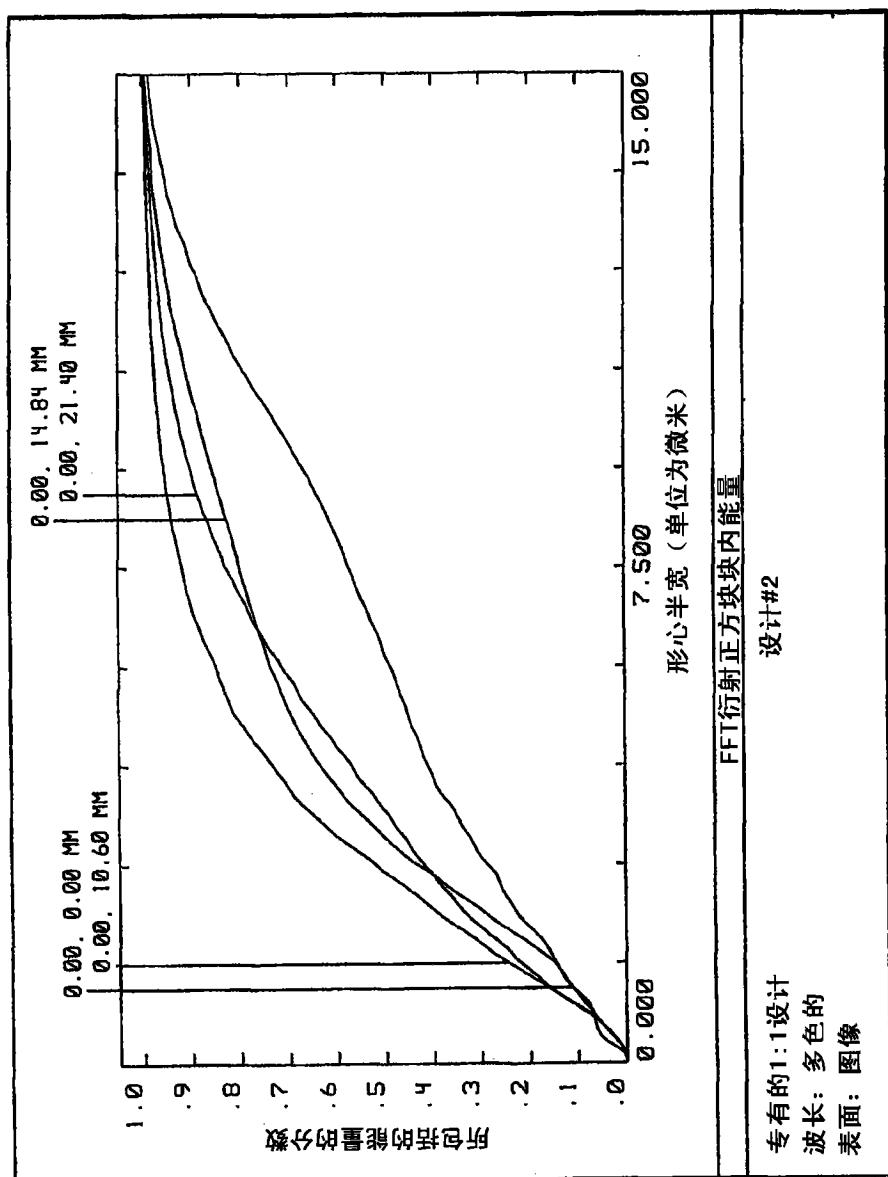


图 28