(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113892035 B
(45)授权公告日 2025.05.09

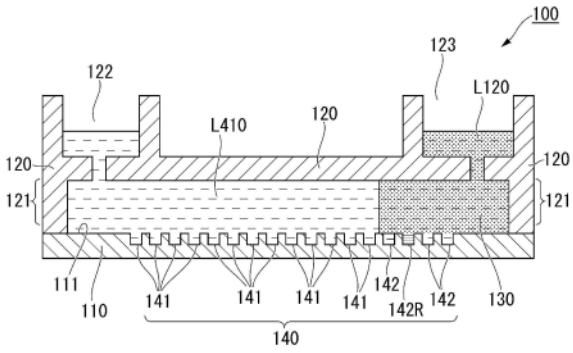
(21)申请号 202080039145.6
(22)申请日 2020.05.27
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113892035 A
(43)申请公布日 2022.01.04
(30)优先权数据
2019-101305 2019.05.30 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2020/020925 2020.05.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/241689 JA 2020.12.03
(73)专利权人 凸版印刷株式会社
地址 日本东京都
(72)发明人 牧野洋一 堀内阳介
(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 白丽
(51)Int.Cl.
G01N 35/02(2006.01)
G01N 37/00(2006.01)
C12M 1/34(2006.01)
C12M 1/00(2006.01)
(56)对比文件
Yoshiki Moriizumi et al..Hybrid cell reactor system from Escherichia coil protoplast cells and arrayed lipid bilayer chamber device.Scientific Reports.2018,第8卷(第11757期),1-13.
审查员 刘儒汗
权利要求书1页 说明书17页 附图22页

(54)发明名称

向孔中导入液体的方法

(57)摘要

本发明涉及第二液体向孔的导入方法,其包含在流体设备的一个面上导入所述第二液体的步骤,所述流体设备包含基板和在所述基板的一个面上开口且在内部收容有包含表面活性剂的第一液体的多个孔,在所述一个面上层叠有第一密封液,所述多个孔的开口部被所述第一密封液密封,在流体设备的一个面上导入所述第二液体的结果是,所述第二液体将所述第一密封液置换而被导入至所述孔的内部。



CN 113892035 B

1.一种第二液体向孔的导入方法,其包含在流体设备的一个面上导入所述第二液体的步骤,

所述流体设备包含基板和在所述基板的一个面上开口且在内部收容有包含表面活性剂的第一液体的多个所述孔,在所述一个面上层叠有第一密封液,所述多个孔的开口部被所述第一密封液密封,

在流体设备的一个面上导入所述第二液体的结果是,所述第二液体将所述第一密封液冲走,由此解除了所述多个孔的密封,成为未被密封的孔,所述第二液体将所述第一密封液置换而被导入至所述孔的内部。

2.根据权利要求1所述的方法,其中,所述第二液体的比重大于所述第一密封液的比重。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中,

在导入所述第二液体之后,进一步包含向所述流体设备导入第二密封液的步骤,

结果所述第二密封液层叠在所述一个面上而将所述多个孔的开口部密封,所述第二液体、或者所述第一液体及所述第二液体的混合物被封入在所述孔的内部。

4.根据权利要求3所述的方法,其中,所述第二密封液的比重大于所述第二液体的比重。

5.根据权利要求1或2所述的方法,其中,进一步包含:

在导入所述第二液体之前向所述流体设备导入所述第一液体的步骤;和

所述第一密封液层叠在所述一个面上而将所述多个孔的开口部密封,向所述流体设备导入所述第一密封液以使得将所述第一液体封入在所述孔的内部的步骤。

6.根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述第一液体和所述第二液体是能够混合的。

7.根据权利要求1或2所述的方法,其中,

所述流体设备进一步具有相向于所述一个面配置的盖构件,

所述盖构件与所述一个面之间的空间形成流路。

8.根据权利要求7所述的方法,其中,所述第二液体通过所述流路被导入至所述流体设备中。

9.根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述第一液体及所述第二液体包含反应试剂。

10.根据权利要求1或2所述的方法,其中,在将所述第二液体导入至所述孔的内部之后,将所述第一液体所含成分的至少一部分保持在所述孔的内部。

11.根据权利要求10所述的方法,其中,所述第一液体所含成分的至少一部分通过被载体保持而保持在所述孔的内部。

12.根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述一个面和所述第一密封液的亲和性与所述一个面和所述第二液体的亲和性为同等程度或更低。

13.根据权利要求12所述的方法,其中,所述一个面的材质为环烯烃聚合物,所述第一液体及所述第二液体的主成分为水,所述第一密封液为氟系油。

向孔中导入液体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及向孔中导入液体的方法。

[0002] 本申请对在2019年5月30日于日本申请的日本特愿2019-101305号主张优先权,将其内容援引于此。

背景技术

[0003] 通过定量地检测生物体试样中的靶分子来进行疾病的早期发现或给药的效果预测。一直以来,蛋白质的定量通过酶联免疫吸附检测(ELISA)等进行,核酸的定量通过实时PCR法等进行。

[0004] 近年来,出于更早期地发现疾病等目的,更加精度良好地检测靶分子的需求提高。作为精度良好地检测靶分子的手法,例如在专利文献1、专利文献2及非专利文献1等中记载了在多个微小分区内进行酶反应的技术。这些手法被称作数字化测量。

[0005] 在数字化测量中,将试样溶液分割成极多个的微小分区。进而,对来自各微小分区的信号进行二值化,仅辨别靶分子是否存在,然后测量靶分子的分子数。根据数字化测量,与现有的ELISA或实时PCR法等相比,可以格外地提高检测灵敏度及定量性。

[0006] 数字化测量技术不限于在上述诊断用途中的利用,还被广泛被用于将多个靶分子分成每1分子地进行分析的用途中,例如在非专利文献2等中,利用于跨膜蛋白的功能分析。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本专利第5551798号公报

[0010] 专利文献2:日本特表2014-503831号公报

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献1:KiM S.H.,et al.,Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules.,Lab on a Chip,12(23),4986-4991,2012.

[0013] 非专利文献2:Rikiya Watanabe,et al.,High-throughput formation of lipid bilayer membrane arrays with an asymmetric lipid composition.,Scientific Reports volume4,Article number:7076,2014.

发明内容

[0014] 发明要解决的技术问题

[0015] 数字化测量技术中,使用密封液或脂质双层膜将与反应试剂混合后的靶分子分割成多个微小分区后,在各微小分区的内部分别地进行反应来检测靶分子。因此,通常仅可以得到对应于微小分区的内部所含反应试剂的分析结果。于是,本发明的目的在于提供对单独密封的微小分区的内部的液体进行置换的技术。

[0016] 用于解决技术问题的手段

[0017] 本发明包含以下方式。

[0018] [1]一种第二液体向孔的导入方法,其包含在流体设备的一个面上导入所述第二液体的步骤,所述流体设备包含基板和在所述基板的一个面上开口且在内部收容有包含表面活性剂的第一液体的多个所述孔,在所述一个面上层叠有第一密封液,所述多个孔的开口部被所述第一密封液密封,在流体设备的一个面上导入所述第二液体的结果是,所述第二液体将所述第一密封液置换而被导入至所述孔的内部。

[0019] [2]根据[1]所述的方法,其中,在导入所述第二液体之后,进一步包含向所述流体设备导入第二密封液的步骤,结果所述第二密封液层叠在所述一个面上而将所述多个孔的开口部密封,所述第二液体、或者所述第一液体及所述第二液体的混合物被封入在所述孔的内部。

[0020] [3]根据[1]或[2]所述的方法,其中,进一步包含:在导入所述第二液体之前向所述流体设备导入所述第一液体的步骤;和向所述流体设备导入所述第一密封液以使得所述第一密封液层叠在所述一个面上而将所述多个孔的开口部密封、所述第一液体被封入在所述孔的内部的步骤。

[0021] [4]根据[1]~[3]中任一项所述的方法,其中,所述第一液体和所述第二液体是能够混合的。

[0022] [5]根据[1]~[4]中任一项所述的方法,其中,所述流体设备进一步具有相向于所述一个面配置的盖构件,所述盖构件与所述一个面之间的空间形成流路。

[0023] [6]根据[5]所述的方法,其中,所述第二液体通过所述流路被导入至所述流体设备中。

[0024] [7]根据[1]~[6]中任一项所述的方法,其中,所述第一液体及所述第二液体包含反应试剂。

[0025] [8]根据[1]~[7]中任一项所述的方法,其中,在将所述第二液体导入至所述孔的内部之后,所述第一液体所含成分的至少一部分保持在所述孔的内部。

[0026] [9]根据[8]所述的方法,其中,所述第一液体所含成分的至少一部分通过被载体保持而保持在所述孔的内部。

[0027] [10]根据[1]~[9]中任一项所述的方法,其中,所述一个面和所述第一密封液的亲和性与所述一个面和所述第二液体的亲和性为同等程度或更低。

[0028] [11]根据[10]所述的方法,其中,所述一个面的材质为环烯烃聚合物,所述第一液体及所述第二液体的主成分为水,所述第一密封液为氟系油。

[0029] 发明效果

[0030] 根据本发明,可以提供对分别密封的微小分区内部的液体进行置换的技术。

附图说明

[0031] 图1为表示流体设备之一例的示意截面图。

[0032] 图2为表示流体设备之一例的示意截面图。

[0033] 图3为表示流体设备之一例的示意截面图。

[0034] 图4为表示流体设备之一例的示意截面图。

[0035] 图5为表示流体设备之一例的示意截面图。

[0036] 图6为表示流体设备之一例的示意截面图。

[0037] 图7为表示流体设备之一例的示意截面图。

[0038] 图8为表示流体设备之一例的示意截面图。

[0039] 图9为表示流体设备之一例的示意截面图。

[0040] 图10为表示流体设备之一例的示意截面图。

[0041] 图11为表示流体设备之一例的示意截面图。

[0042] 图12为表示实施例1的结果的显微镜图像。

[0043] 图13为表示实施例1的结果的显微镜图像。

[0044] 图14为表示实施例2的结果的显微镜图像。

[0045] 图15为表示实施例2的结果的显微镜图像。

[0046] 图16为表示比较例1的结果的显微镜图像。

[0047] 图17为表示比较例2的结果的显微镜图像。

[0048] 图18为表示比较例1的结果的显微镜图像。

[0049] 图19为表示比较例2的结果的显微镜图像。

[0050] 图20为表示实施例3的结果的显微镜图像。

[0051] 图21为表示实施例3的结果的显微镜图像。

[0052] 图22为表示实施例3的结果的显微镜图像。

[0053] 图23为表示实施例4的结果的显微镜图像。

[0054] 图24为表示实施例4的结果的显微镜图像。

[0055] 图25为表示实施例4的结果的显微镜图像。

[0056] 图26为表示比较例3的结果的显微镜图像。

[0057] 图27为表示比较例3的结果的显微镜图像。

[0058] 图28为表示比较例3的结果的显微镜图像。

[0059] 图29为表示实施例5的结果的显微镜图像。

[0060] 图30为表示实施例5的结果的显微镜图像。

[0061] 图31为表示实施例6的结果的显微镜图像。

[0062] 图32为表示实施例6的结果的显微镜图像。

[0063] 图33为表示实施例7的结果的显微镜图像。

[0064] 图34为表示实施例7的结果的显微镜图像。

[0065] 图35为表示比较例4的结果的显微镜图像。

[0066] 图36为表示比较例4的结果的显微镜图像。

[0067] 图37为表示比较例5的结果的显微镜图像。

[0068] 图38为表示比较例5的结果的显微镜图像。

[0069] 图39为表示比较例6的结果的显微镜图像。

[0070] 图40为表示比较例6的结果的显微镜图像。

具体实施方式

[0071] 以下根据情况一边参照附图一边对本发明的实施方式详细地进行说明。此外,附图中相同或相当部分带有相同或相应的符号,重复的说明省略。此外,各图中的尺寸比有为了说明而夸张的部分,未必与实际尺寸一致。

[0072] [向孔中导入液体的方法]

[0073] 本发明的一实施方式提供第二液体向孔的导入方法,其包含在流体设备的一个面上导入所述第二液体的步骤,所述流体设备包含基板和在所述基板的一个面上开口且在内部收容有包含表面活性剂的第一液体的多个所述孔,在所述一个面上层叠有第一密封液,所述多个孔的开口部被所述第一密封液密封,在流体设备的一个面上导入所述第二液体的结果是,所述第二液体将所述第一密封液置换而被导入至所述孔的内部。

[0074] 根据本实施方式的方法,可以对分别密封的微小分区的内部的液体进行置换。由此,例如在数字化测量技术中,可以在利用收容于微小分区内部的第一液体所含的反应试剂获得分析结果之后,将微小分区的内部的液体置换成第二液体,从而使用第二液体所含的反应试剂进行不同的分析等。

[0075] (流体设备)

[0076] 首先,对能够在本实施方式的方法中使用的流体设备进行说明。图1为表示流体设备之一例的示意截面图。如图1所示,流体设备100具备基板110和相向于基板110的一个面111而配置的盖构件120。盖构件120具有凸部121。凸部121的前端接触于基板110。在流体设备100中,在基板110的一个面111上一体成型有多个孔141,形成孔阵列140。一个面111与盖构件120相向。盖构件120还可以焊接或粘接在基板110上。

[0077] 孔141在基板110的表面上进行开口。孔141的形状、尺寸及配置并无特别限定,优选在1个孔141中导入1个靶分子。孔141优选是容积小的微小孔。例如,1个孔141的容积可以是10fL~100pL左右。流体设备100中,同样形状同样大小的多个孔141构成孔阵列140。同样形状同样大小只要是为了进行数字化测量所要求的程度地同一形状且同一容量即可,制造上的误差程度的不均是允许的。

[0078] 孔141的直径例如可以为1~30μm左右。孔141的深度例如可以为1~30μm左右。另外,孔141的配置并无特别限定,例如可以排列成三角格子状、还可以排列成正方格子状、也可以无规地配置。

[0079] 流体设备100中,通过凸部121的存在,在一个面111与盖构件120之间形成了空间。该空间形成流路130。流路130作为用于对后述的第一液体、第一密封液、第二液体及第二密封液进行送液的路径发挥功能。即,第一液体、第一密封液、第二液体及第二密封液通过流路130被导入至流体设备100中。

[0080] 流路130的形状、结构及容量等并无特别限定,流路130的高度(即基板110的一个面111与盖构件120的相向于基板110的那一面之间的距离)例如可以为100μm以下。

[0081] 凸部121也可以与盖构件120一体地成形。盖构件120例如可以通过使用成形模具对热塑性树脂的流动体进行成形而成形为具有凸部121的板状。另外,还可以在盖构件120上形成有试剂的导入口122及排出口123。

[0082] 盖构件120具有凸部121时,按照凸部121接触于基板110的孔141进行开口的面111的方式,将盖构件120与基板110重叠。结果,盖构件120与基板110之间的空间变成流路130。盖构件120和基板110还可以通过激光焊接等进行焊接。

[0083] (流体设备的变形例1)

[0084] 本实施方式的方法中使用的流体设备不限于上述的流体设备100。图7为表示流体设备之一例的示意截面图。如图7所示,流体设备200具备基板110和壁构件210。流体设备

200中,孔阵列140在基板110的一个面111上与基板110一体成形。孔阵列140具有多个孔141。

[0085] 流体设备200主要在没有盖构件120的方面与上述流体设备100不同。因此,流体设备200没有流路。

[0086] (流体设备的变形例2)

[0087] 上述流体设备100中,盖构件120与凸部121是一体成形的。但是,盖构件120和凸部121也可分体地进行成形。

[0088] 另外,在上述流体设备100及流体设备200中,孔阵列140在基板110的一个面111上与基板110一体成形。但是,孔阵列也可以不与基板110一体成形。例如,还可以将与流体设备分体成形的孔阵列140配置在流体设备的基板110上。或者,还可以在基板110的表面上层叠树脂层,利用刻蚀等在树脂层上形成孔阵列。

[0089] (流体设备的材质)

[0090] 基板110例如使用树脂形成。树脂的种类并无特别限定,优选是对于第一液体、第二液体及密封液具有耐受性的树脂。另外,当所检测的信号为荧光时,优选自体荧光少的树脂。例如,作为树脂,可举出环烯烃聚合物、环烯烃共聚物、硅、聚丙烯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚乙烯、聚乙酸乙烯酯、氟树脂及无定形氟树脂等,但不限于这些。

[0091] 还可以在基板110的板厚方向的一个面111上形成多个孔141。作为使用了树脂的孔的形成方法,可举出注塑成形、热压印及光压印等。

[0092] 或者,例如还可以在基板110上层叠氟树脂、利用刻蚀等对该氟树脂进行加工而形成孔阵列。作为氟树脂,例如可以使用CYTOP(注册商标)(旭硝子)等。

[0093] 另外,流体设备具有盖构件120时,盖构件120的材质优选是自体荧光少的树脂,例如可以是环烯烃聚合物、环烯烃共聚物等热塑性树脂。

[0094] 另外,盖构件120可以由不透过在对信号进行荧光观察时所检测的波长及其附近波长的光的材料形成,也可以由完全不透光的材料形成。例如,盖构件120可以由添加有碳或金属粒子等的热塑性树脂形成。

[0095] (第一实施方式)

[0096] 如上所述,本实施方式的方法为第二液体向孔的导入方法,其包含在流体设备的所述一个面上导入所述第二液体的步骤,所述流体设备包含基板和在所述基板的一个面上开口且在内部收容有包含表面活性剂的第一液体的多个所述孔,在所述一个面上层叠有第一密封液,所述多个孔的开口部被所述第一密封液密封,在流体设备的一个面上导入所述第二液体的结果是,所述第二液体将所述第一密封液置换而被导入至所述孔的内部。

[0097] 根据情况,一边参照图1~6、一边以使用流体设备100的情况为例,对第一实施方式的方法进行说明。

[0098] 《第一液体的导入》

[0099] 首先,如图1所示,从流体设备100的导入口122导入第一液体L110,送液至流路130中。第一液体L110例如包含生物体试样或环境试样。作为生物体试样并无特别限定,可举出血清、血浆、尿及细胞培养液等。另外,作为环境试样,例如可举出河川的水及工厂排水等。

[0100] 生物体试样及环境试样有包含成为检测对象的靶分子的情况。另外,生物体试样及环境试样还有不包含成为检测对象的靶分子的情况。作为靶分子,例如可举出DNA、RNA、

蛋白质、病毒、细胞及特定化合物等。这里,作为RNA,可举出miRNA及mRNA等。另外,作为细胞,可举出细菌、酵母、动物细胞、植物细胞及昆虫细胞等。

[0101] 第一液体L110还可以包含检测靶分子的反应试剂。作为反应试剂,可举出缓冲物质、酶、底物、抗体及抗体片段等。酶例如在靶分子为核酸时,为了进行针对靶分子相关的模板核酸的酶反应等生化反应,对应于生化反应的内容来进行选择。针对模板核酸的生化反应例如是在模板核酸存在的条件下引起信号扩增那样的反应。反应试剂根据所采用的检测反应进行选择。作为具体的检测反应,可举出Invasive Cleavage Assay(侵入裂解分析,ICA)法、环介导等温扩增(LAMP)法(注册商标)、5'→3'核酸酶法(TaqMan(注册商标)法)及荧光探针法等。

[0102] 第一液体L110包含表面活性剂。作为表面活性剂,例如可举出Triton-X100(也称作聚乙二醇单-4-辛基苯基醚(n=约10))、十二烷基硫酸钠、Nonidet P-40(也称作辛基苯氧基聚(乙烯氧基)乙醇)及Tween20(也称作聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸酯)等。

[0103] 表面活性剂的浓度相对于第一液体L110的总体积优选为0.001v/v%以上且1.0v/v%以下、更优选为0.005v/v%以上且0.5v/v%以下、进一步优选为0.01v/v%以上且0.1v/v%以下。表面活性剂的浓度相对于第一液体L110的总体积为0.001v/v%以上时,易于进行向第二液体L410的置换。表面活性剂的浓度相对于第一液体L110的总体积为1.0v/v%以下时,对之后进行的靶分子的检测中的反应的影响少。

[0104] 送液至流路130的第一液体L110收容在孔141的内部。结果,反应试剂、表面活性剂及如果存在的话则还有靶分子被导入至孔141中。

[0105] 导入至1个孔141中的靶分子的数量并无特别限定,优选在1个孔141中导入1个以下、即0个或1个靶分子。由此,能够以1个单位进行靶分子的检测,即能够进行数字化测量。另外,并无必要将靶分子导入到孔阵列140的全部孔141中。

[0106] 将靶分子导入至孔141的手段并无特别限定,可以选择对应于所选择的靶分子的适当手段。例如,可举出利用自重在流体设备内(具体地为流路内)使靶分子沉降而分配在孔141中的方法。或者,还可以利用捕获靶分子的载体(即捕获物)、使捕获物结合于难以通过自重沉降的靶分子来进行送液。另外,通过预先使捕获物固定在孔141上、对所送液的靶分子进行捕获,也可以提高靶分子向孔的导入效率。

[0107] 使捕获物结合于靶分子的工序可以在任意的时间点进行。例如该工序可以通过在将靶分子导入至孔141之前、在样品管中使靶分子与捕获物接触来进行。或者,还可以在将捕获物导入至孔141之后、将靶分子导入至孔中、在孔内使捕获物与靶分子接触。

[0108] 捕获物是能够捕获靶分子的物质。捕获物例如可以是固相与针对靶分子的特异性结合物质的结合体。

[0109] 作为固相,可举出粒子、膜及基板等。另外,针对靶分子的特异性结合物质可以是1种、也可以是多种。例如可以是三种、还可以是四种、还可以是五种以上。

[0110] 作为粒子,并无特别限定,可举出聚合物粒子、磁性粒子及玻璃粒子等。粒子优选是实施了用于避免非特异性吸附的表面处理的粒子。另外,为了对特异性结合物质进行固定化,优选表面具有羧基等官能团的粒子。更具体地说,作为例子,可以使用JSR公司制的商品名"Magnosphere LC300"等。

[0111] 或者,例如作为靶分子使用病毒时,作为捕获物还可以使用病毒能够附着的细胞

(即具有病毒受体的细胞)。

[0112] 作为捕获物中的特异性结合物质,可举出抗体、抗体片段及适配体等。作为抗体片段,可举出Fab、F(ab')$_2$、Fab'、单链抗体(scFv)、二硫键稳定性抗体(dsFv)、二聚体V区域片段(Diabody)及包含CDR的肽等。抗体可以是单克隆抗体、也可以是多克隆抗体。另外,还可以是市售的抗体。

[0113] 另外,当靶分子包含糖链时,特异性结合物质还可以是外源凝集素。另外,当靶分子包含脂质膜时,特异性结合物质还可以是对脂质膜具有结合性的物质。作为对脂质膜具有结合性的物质,例如可举出己二醇等烃及跨膜蛋白等膜蛋白。作为膜蛋白,例如可举出α-溶血素等。

[0114] 作为将特异性结合物质固定化在固相上的方法并无特别限定,可举出利用物理吸附的方法、使用化学结合的方法、利用亲和素-生物素的结合的方法、及利用蛋白质G或蛋白质A与抗体的结合的方法等。作为利用物理吸附的方法,可以举出通过疏水性的相互作用或静电相互作用将特异性结合物质固定化在粒子表面上的方法。作为利用化学结合的方法,可举出使用交联剂的方法。例如,当粒子的表面具有羟基时,通过使交联剂与特异性结合物质所具有的羧基反应而进行活性酯化后、使羟基与该酯基反应,可以使特异性结合物质固定化在粒子表面上。另外,优选在特异性结合物质与粒子表面之间设置间隔物以使得不会阻碍特异性结合物质对靶分子的识别能力。

[0115] 使用捕获物将靶分子导入至孔141内时,优选在1个捕获物捕获0个或1个靶分子的条件下形成捕获物与靶分子的结合体。另外,优选构成为在1个孔141内导入0个或1个捕获物。由此,能够进行数字化测量。

[0116] 《密封液的导入》

[0117] 接着,如图2及图3所示,将第一密封液L120从导入口122导入,送液至流路130。

[0118] 第一密封液是能够将导入至多个孔141中的液体彼此按照不会互相混合的方式分别密封地形成液滴(微小液滴)的液体。第一密封液优选是油性溶液、更优选是油。作为油,可以使用氟系油、有机硅系油、烃系油或它们的混合物等。更具体地说,可以使用Sigma公司制的商品名"FC-40"等。FC-40(CAS编号:86508-42-1)是氟化脂肪族化合物,25℃下的比重为1.85g/mL。

[0119] 送液至流路130的第一密封液L120将已导入至流路130的第一液体L110中未收容在孔141内的第一液体L110冲走而将其置换。由此,第一密封液L120将多个孔141分别单独地密封,孔141成为独立的反应空间(微小分区142)。

[0120] 当流路130被第一密封液L120填满时,多余的第一密封液L120从排出口123被排出。图3表示孔阵列140的全部孔141被第一密封液L120密封而形成了微小分区(经密封的孔)142的状态。

[0121] 另外,还可以通过预先使脂质溶解在第一液体L110中,在将第一密封液L120送液至流路130后再次对包含脂质的液体进行送液,在孔141的开口部中形成脂质双层膜,通过该脂质双层膜将多个孔141分别单独地密封而形成微小分区142。作为形成脂质双层膜的脂质,例如可举出1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酰乙醇胺(DOPE)、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酰甘油(DOPG)及它们的混合物等,但并不限于这些。

[0122] 《靶分子的检测》

[0123] 这里,可以使第一液体L110所含的反应试剂反应来检测靶分子。例如,在微小分区142的内部进行信号扩增反应。即,按照在微小分区142的内部检测到反应试剂来源的信号的方式,利用反应工序使信号扩增至能够观察到信号的水平。作为信号,可以举出荧光、显色、电位变化及pH变化等。

[0124] 信号扩增反应例如是酶反应。作为一例,信号扩增反应是在包含用于信号扩增的酶的第一液体L110被收容在微小分区142内部的状态下、将流体设备100在可获得所需酶活性的一定温度条件下维持所需时间的等温反应。作为具体例,作为信号扩增反应,可以使用ICA反应。此时,微小分区142的内部包含ICA反应试剂及作为靶分子的核酸。酶反应的结果是,当微小分区142中收容有靶分子时,通过荧光物质从消光物质上游离,对应激发光发出规定的荧光信号。图3中,符号142R表示收容有靶分子而发出了信号的孔。

[0125] 《第二液体的导入》

[0126] 接着,如图4所示,从导入口122导入第二液体L410,送液至流路130。结果,第二液体L410将第一密封液L120冲走而被导入至孔141的内部。这里,第一密封液L120优选被第二液体L410完全地置换而除去,但第二液体L410只要是被导入至孔141的内部,则第一密封液L120的一部分也可以残留。

[0127] 以往认为,被密封液封入的微小分区142不再能够对内部的液体进行更换。但是,在实施例中,如后所述,发明人们发现,通过本实施方式的方法,能够将第二液体L410导入至已被第一密封液L120封入的微小分区142的内部。

[0128] 第二液体L410可以包含表面活性剂、也可以不包含。第二液体L410包含表面活性剂时,表面活性剂的种类及其浓度可以举出第一液体L110所含表面活性剂相同者。

[0129] 第二液体L410也可以与第一液体L110同样、包含检测靶分子的反应试剂。作为反应试剂,可举出与上述第一液体L110能够包含的试剂相同的试剂,但优选是与第一液体L110不同的试剂。由此,可以实施与第一液体L110所含反应试剂不同的反应。

[0130] 送液至流路130的第二液体L410将已导入至流路130中的第一密封液L120冲走而将其置换。由此,解除了被分别密封的微小分区142的密封,成为未被密封的孔141。并且,第二液体L410被导入至收容有第一液体L110的孔141的内部。

[0131] 第一实施方式的方法中,优选一个面111和第一密封液L120的亲和性与一个面111和第二液体L410的亲和性为同等程度,或者一个面111和第一密封液L120的亲和性比一个面111和第二液体L410的亲和性更低。由此,在导入第二液体L410时,第二液体L410易于将第一密封液L120冲走而解除微小分区142的密封。

[0132] 作为一个面111和第一密封液L120的亲和性与一个面111和第二液体L410的亲和性为同等程度或更低的例子,例如可举出一个面111的材质为环烯烃聚合物、第一液体L110及第二液体L410的主成分为水、第一密封液L120为氟系油的组合。

[0133] 本说明书中,液体的主成分为水是指液体的50质量%以上、例如60质量%以上、例如70质量%以上、例如80质量%以上、例如90质量%以上、例如95质量%以上、例如98质量%以上为水。另外,作为氟系油,例如可以使用Sigma公司制的商品名“FC-40”等。

[0134] 由于第一液体L110中包含表面活性剂,因此第二液体L410被导入至解除了密封的孔141的内部,结果可以将孔141的内部置换成第二液体L410。即,可以向孔141的内部导入包含表面活性剂的第一液体L110,利用第一密封液L120将第一液体L110密封之后,导入第

二液体L410,将孔141的内部置换成第二液体L410。

[0135] 第二液体L410导入至孔141的内部之后,也可以将第一液体L110所含成分的至少一部分保持在孔141的内部。例如,第一液体L110所含的靶分子结合于捕获物、该捕获物保持在孔141的内部。即,第一液体L110所含成分的至少一部分可以通过被捕获物(载体)保持而保持在孔141的内部。此时,在孔141的内部,变成第二液体L410与该捕获物及靶分子一起存在。

[0136] 或者,例如当第一液体L110所含的靶分子结合于捕获物、进而针对第一液体L110所含靶分子的抗体结合于所述靶分子,也可以将该捕获物保持在孔141的内部。此时,在孔141的内部,变成第二液体L410与该捕获物、靶分子及结合于靶分子的抗体一起存在。

[0137] 优选第一液体L110与第二液体L410是能够混合的。第一液体L110与第二液体L410能够混合时,可高效地进行孔141的内部的液体置换。这里,能够混合是指在混合第一液体L110和第二液体L410时不会发生层分离、可形成均匀的溶液或分散液。

[0138] 当流路130被第二液体L410填满时,多余的第二液体L410从排出口123被排出。

[0139] 《密封液的导入》

[0140] 在导入第二液体L410的工序之后,还可以进一步实施向流体设备100导入第二密封液的工序。这里,第二密封液可以与上述第一密封液相同、也可以不同。具体地说,如图5所示,可以将第一密封液L120再次从导入口122导入,送液至流路130。

[0141] 结果,第一密封液L120层叠在一个面111上,将多个孔141的开口部密封,第二液体L410、或者第一液体L110及第二液体L410的混合物被封入在孔141的内部,各个孔141成为独立的反应空间(微小分区142)。

[0142] 流路130被第一密封液L120填满时,多余的第一密封液L120从排出口123被排出。图6表示孔阵列140的孔141全部被第一密封液L120密封、形成微小分区(经密封的孔)142的状态。

[0143] 另外,还可以通过使脂质预先溶解在第二液体L410中,将第一密封液L120送液至流路130后,再次送液包含脂质的液体,在孔141的开口部形成脂质双层膜,通过该脂质双层膜将多个孔141分别单独地密封而形成微小分区142。作为形成脂质双层膜的脂质,可举出与前述相同的脂质。

[0144] 《靶分子的检测》

[0145] 这里,也可以使第二液体L410所含的反应试剂反应,与上述同样地检测靶分子。例如,可以在微小分区142的内部进行信号扩增反应。图6中,符号142R表示收容有靶分子、使反应试剂反应而结果发出了信号的孔。

[0146] (第二实施方式)

[0147] 接着,一边参照图7~图11,一边以使用流体设备200的情况为例,对第二实施方式的方法进行说明。第二实施方式的方法在流体设备没有盖构件的方面与第一实施方式的方法是不同的。另外,第二实施方式的方法中的第一密封液及第二密封液与第一实施方式的方法中的第一密封液及第二密封液在需要满足后述的比重的条件的方面是不同的。

[0148] 《第一液体的导入》

[0149] 首先,如图7所示,向流体设备200的内部导入第一液体L110。对于第一液体L110,与前述相同。如图7所示,第一液体L110收容在孔141的内部。结果,向孔141导入反应试剂及

如果存在时则还有靶分子。导入至1个孔141的靶分子的数量并无特别限定，但优选在1个孔141中导入1个以下、即0个或1个靶分子。

[0150] 《密封液的导入》

[0151] 接着，如图8所示，向流体设备200的内部导入第一密封液L120。第一密封液L120的比重大于第一液体L110的比重。因此，第一密封液L120沉降在比第一液体L110更低处、接触于一个面111。进而，第一密封液L120将收容第一液体L110的多个孔141分别单独地密封而形成独立的反应空间(微小分区142)。

[0152] 《靶分子的检测》

[0153] 这里，如图9所示，可以在微小分区142内进行规定的反应、观察所发出的信号。图9中，孔142R是收容有靶分子、检测到了信号的孔，微小分区142是未收容靶分子、未检测到信号的孔。

[0154] 《第二液体的导入》

[0155] 接着，如图10所示，向流体设备200的内部导入第二液体L410。第二液体L410的比重大于第一密封液L120的比重。因此，第二液体L410沉降在比第一密封液L120更低处。由此，分别密封的微小分区142的密封被解除，成为未被密封的孔141。并且，第二液体L410导入至孔141的内部。孔141中，优选第一密封液L120被第二液体L410完全地置换而除去，但只要将第二液体L410导入至孔141的内部，则第一密封液L120的一部分也可以残留。

[0156] 第二液体L410还可以包含检测靶分子的反应试剂。作为反应试剂，可举出与上述第一液体L110能够包含的试剂相同的试剂，但优选是与第一液体L110不同的试剂。由此，可以实施与第一液体L110所含反应试剂不同的反应。

[0157] 第二实施方式中，还可以与第一实施方式相同，在将第二液体L410导入至孔141的内部之后，将第一液体L110所含成分的至少一部分保持在孔141的内部。

[0158] 《密封液的导入》

[0159] 在导入第二液体L410的工序之后，还可以进一步实施向流体设备200导入第二密封液L620的工序。具体地说，如图11所示，将第二密封液L620导入至流体设备200的内部。第二密封液L620的比重大于第二液体L410的比重。因此，第二密封液L620沉降在比第二液体L410更低处、接触于一个面111。进而，第二密封液L620将收容有第二液体L410、或第一液体L110及第二液体L410的混合物的多个孔141分别单独地密封而形成独立的反应空间(微小分区142)。

[0160] 图11表示孔阵列140的孔141全部被第二密封液L620密封而形成微小分区(经密封的孔)142的状态。

[0161] 《靶分子的检测》

[0162] 这里，可以使第二液体L410所含的反应试剂反应，与上述同样地检测靶分子。例如，可以在微小分区142的内部进行信号扩增反应。图11中，142R表示收容有靶分子、使反应试剂反应而结果发出了信号的孔。

[0163] 第二实施方式的方法中，优选第一密封液L120的比重大于第一液体L110的比重、第二液体L410的比重大于第一密封液L120的比重、第二密封液L620的比重大于第二液体L410的比重。另外，第一液体L110及第二液体L410的主成分优选是水。此时，例如可以通过使蔗糖等含有在第二液体L410中来调整比重。另外，作为第一密封液L120、第二密封液

L620,可以从上述中适当选择使用满足比重等要件的液体。

[0164] 至此,对将分别密封的微小分区内部的液体进行1次置换的实施方式进行了说明,但根据本发明的一方式,也可以对分别密封的微小分区内部的液体进行2次以上的置换。即,通过反复实施本发明的一方式,可以对液体进行所需次数的置换。

[0165] 具体地说,在上述例中,上述第一液体L110的导入、利用第一密封液L120进行的密封及第二液体L410的导入连续地进行。但是,这些工序并非必须连续进行。例如,还可以在利用第一密封液L120进行的密封与第二液体L410的导入之间,将第三液体导入至流体设备100,利用第三密封液将第三液体密封在微小分区142的内部。此时,第三液体可以包含表面活性剂、也可以不包含表面活性剂。第三液体即便不包含表面活性剂,通过将第二液体L410导入至流体设备100,也可以将孔141的内部从不含表面活性剂的液体置换成第二液体L410。

[0166] 作为其理由认为,通过第一液体L110的导入,表面活性剂被导入至孔141的内部,之后,即便是利用不含表面活性剂的液体将孔141的内部置换,表面活性剂也会残留在孔141内、或者表面活性剂附着在孔141的内壁。因而,当导入第二液体L410时,通过残留于孔141内部的表面活性剂的作用,可以将孔141内部置换为第二液体L410。

[0167] 进而,还可以在利用第三密封液进行的密封与第二液体L410的导入之间,导入第四液体,通过第四密封液将第四液体密封在孔141的内部。第四液体也同样地可以包含表面活性剂、也可以不包含表面活性剂。

[0168] 根据本发明的一方式,当试样包含多个靶分子时,例如试样为细胞等时,可以使靶分子的检测变得简单。作为一例,可举出以下方式。

[0169] 将包含细胞及第一反应试剂的第一液体L110导入至孔141内。此时,优选使用捕获物将该细胞导入至孔141内。作为捕获物,使用在导入第二液体L410之后、与捕获物相结合的细胞也会滞留在微小分区142内的捕获物。例如,可举出使用质量足够大的捕获物、或者使用固定在孔141中的捕获物等。

[0170] 之后,利用第一密封液获得微小分区142、进行使用了第一反应试剂的第一靶分子的检测。进而,将包含第二反应试剂的第二液体L410导入至孔141内,将孔141置换成第二液体。之后,将第二密封液导入至流路130内,获得微小分区142。该微小分区142内包含与捕获物结合的细胞及第二液体L410。之后,进行使用了第二反应试剂的第二靶分子的检测。

[0171] 如此,当试样包含多个靶物质时,可以在不使用多个设备的情况下简单地进行多个靶物质的检测。

[0172] 实施例

[0173] 接着,示出实施例更为详细地说明本发明,但本发明不限于以下实施例。

[0174] (流体设备的制造)

[0175] 首先,制造具有图1所示结构的流体设备。利用双面胶将通过注塑成型形成的、具有孔阵列140的环烯烃聚合物制基板110与添加炭黑而着色了的环烯烃聚合物制盖构件120粘接,制造流体设备。双面胶作为凸部121发挥功能,流路130的高度(基板110的一个面111与盖构件120的相向于基板110的那一面之间的距离)为100μm。另外,盖构件120具有导入口122及排出口123。另外,构成孔阵列140的孔141的直径为5μm、孔141的深度为3μm。孔141的每1个的体积Vd为93fL。

[0176] (第一液体及第三液体)

[0177] 第一液体及第三液体是以水(AccuGENE Molecular Biology Grade Water(LONZA公司制))为溶剂、包含作为荧光试剂的5μg/ml的Redmond Red、作为缓冲物质的10mM Tris-HCl(Nippon Gene公司制、pH:8.5)、作为盐的6.25mM $MgCl_2$(SIGMA-ALDRICH公司制)及作为表面活性剂的0.1v/v%Tween 20(SIGMA-ALDRICH公司制)的液体。

[0178] (第二液体)

[0179] 第二液体是以水(AccuGENE Molecular Biology Grade Water(LONZA公司制))为溶剂、包含作为荧光试剂的1μM的异硫氰酸荧光素(以下称作FITC)、作为缓冲物质的10mM Tris-HCl(Nippon Gene公司制、pH:8.5)、作为盐的6.25mM $MgCl_2$(SIGMA-ALDRICH公司制)及作为表面活性剂的0.1mass%Tween 20(SIGMA-ALDRICH公司制)的液体。

[0180] (密封液)

[0181] 作为密封液,使用油(Fluorinert FC-40、SIGMA-ALDRICH公司制)。

[0182] (显微镜观察)

[0183] 所使用的装置如下。

[0184] 显微镜:BZ-800(Keyence公司制)

[0185] 物镜:CFIPlan-Apochromat Lambda10X(尼康公司制)

[0186] 滤光片1:BZ-X滤光片TexasRed(Keyence公司制)

[0187] 滤光片2:BZ-X滤光片GFP(Keyence公司制))

[0188] [实施例1]

[0189] (第一液体的导入)

[0190] 从流体设备的导入口122注入第一液体20μL。

[0191] (信号的检测1)

[0192] 接着,从流体设备100的基板110的与形成有孔阵列140的面相反的面,按照焦点对准孔141的方式,使用荧光显微镜进行拍摄。此时,从基板110的与形成有孔阵列140的面相反的面照射激发光。使用滤光片1,以曝光时间1/4秒拍摄荧光图像,还拍摄了同一视野的亮视野图像。

[0193] 图12(a)的图像为信号检测1的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、下段为荧光图像。结果,在视野的整个面中观察到荧光。

[0194] (密封液的导入)

[0195] 从流体设备的导入口122注入密封液100μL。结果,孔141被分别地密封而形成微小分区142。

[0196] (信号的检测2)

[0197] 接着,从流体设备100的基板110的与形成有孔阵列140的面相反的面,按照焦点对准孔141的方式,使用荧光显微镜进行拍摄。此时,从基板110的与形成有孔阵列140的面相反的面照射激发光。使用滤光片1,以曝光时间5秒拍摄荧光图像,还拍摄了同一视野的亮视野图像。

[0198] 图12(b)的图像为信号检测2的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、下段为荧光图像。结果,观察到对应于微小分区142的配置的荧光信号。即,确认了第一液体被分别地收容在多个微小分区142中。

[0199] (第二液体的导入)

[0200] 从流体设备的导入口122注入第二液体20μL。

[0201] (信号的检测3)

[0202] 接着,从流体设备100的基板110的与形成有孔阵列140的面相反的面,按照焦点对准孔141的方式,使用荧光显微镜进行拍摄。此时,从基板110的与形成有孔阵列140的面相反的面照射激发光。使用滤光片1,以曝光时间5秒拍摄荧光图像,使用滤光片2,以曝光时间1/40秒拍摄荧光图像,还拍摄了同一视野的亮视野图像。

[0203] 图13(a)的图像为信号检测3的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、中段为Redmond Red的荧光图像、下侧为FITC的荧光图像。结果,未观察到Redmond Red的荧光,在整个面上观察到FITC的荧光。

[0204] (密封液的导入)

[0205] 从流体设备的导入口122注入密封液100μL。结果,孔141被分别地再密封而形成微小分区142。

[0206] (信号的检测4)

[0207] 接着,从流体设备100的基板110的与形成有孔阵列140的面相反的面,按照焦点对准孔141的方式,使用荧光显微镜进行拍摄。此时,从基板110的与形成有孔阵列140的面相反的面照射激发光。使用滤光片1,以曝光时间5秒拍摄荧光图像,使用滤光片2,以曝光时间1.5秒拍摄荧光图像,还拍摄了同一视野的亮视野图像。

[0208] 图13(b)的图像为信号检测4的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、中段为Redmond Red的荧光图像、下侧为FITC的荧光图像。结果,在Redmond Red的荧光图像中未观察到荧光信号,在FITC的荧光图像中观察到对应于微小分区142的配置的荧光信号。

[0209] [实施例2]

[0210] 除了第二液体不含Tween 20之外,在与实施例1相同的条件下进行实验。

[0211] 图14(a)的图像为信号检测1的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、下段为荧光图像。结果,在视野的整个面上观察到荧光。

[0212] 图14(b)的图像为信号检测2的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、下段为荧光图像。结果,观察到对应于微小分区142的配置的荧光信号。即,确认了第一液体被分别地收容在多个微小分区142中。

[0213] 图15(a)的图像为信号检测3的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、中段为Redmond Red的荧光图像、下侧为FITC的荧光图像。结果,未观察到Redmond Red的荧光,在整个面上观察到FITC的荧光。

[0214] 图15(b)的图像为信号检测4的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、中段为Redmond Red的荧光图像、下侧为FITC的荧光图像。结果,在Redmond Red的荧光图像中未观察到荧光信号,在FITC的荧光图像中观察到对应于微小分区142的配置的荧光信号。

[0215] [比较例1]

[0216] 除了第一液体不含Tween 20之外,在与实施例1相同的条件下进行实验。

[0217] [比较例2]

[0218] 除了第一液体及第二液体不含Tween 20之外,在与实施例1相同的条件下进行实验。

[0219] 图16(a)的图像为比较例1的信号检测1的观察图像。图17(a)的图像为比较例2的信号检测1的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、下段为荧光图像。结果,在视野的整个面上观察到荧光。

[0220] 图16(b)的图像为比较例1的信号检测2的观察图像。图17(b)的图像为比较例2的信号检测2的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、下段为荧光图像。结果,观察到对应于微小分区142的配置的荧光信号。即,确认了第一液体被分别地收容在多个微小分区142中。

[0221] 图18(a)的图像为比较例1的信号检测3的观察图像。图19(a)的图像为比较例2的信号检测3的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、中段为Redmond Red的荧光图像、下侧为FITC的荧光图像。结果,观察到对应于微小分区142的配置的Redmond Red的荧光信号。即,确认了第一液体被分别地收容在多个微小分区142中。进而,在整个面上观察到FITC的荧光信号。

[0222] 图18(b)的图像为比较例1的信号检测4的观察图像。图19(b)的图像为比较例2的信号检测4的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、中段为Redmond Red的荧光图像、下侧为FITC的荧光图像。结果,观察到对应于微小分区142的配置的Redmond Red的荧光信号。即,确认了第一液体被分别地收容在多个微小分区142中。未观察到FITC的荧光信号。

[0223] 由实施例1~2及比较例1~2的结果可知,当第一液体中包含表面活性剂时,第一液体即便通过密封液被分别地收容、也可利用第二液体将孔141内置换。此时可知,无论第二液体中是否包含表面活性剂,均可利用第二液体将孔141内置换。进而可知,即便是第二液体中包含表面活性剂,当第一液体中不含表面活性剂时,也无法利用第二液体将孔141内置换。

[0224] [实施例3]

[0225] 通过与实施例1相同的顺序,从(第一液体的导入)进行至(信号的检测4)。之后,进行以下的操作。

[0226] (第三液体的导入)

[0227] 从流体设备的导入口122注入第三液体20μL。

[0228] (信号的检测5)

[0229] 从流体设备100的基板110的与形成有孔阵列140的面相反的面,按照焦点对准孔141的方式,使用荧光显微镜进行拍摄。此时,从基板110的与形成有孔阵列140的面相反的面照射激发光。使用滤光片1,以曝光时间1/4秒拍摄荧光图像,使用滤光片2,以曝光时间1.5秒拍摄荧光图像,还拍摄了同一视野的亮视野图像。

[0230] (密封液的导入)

[0231] 从流体设备的导入口122注入密封液100μL。结果,孔141被分别地再密封而形成微小分区142。

[0232] (信号的检测6)

[0233] 接着,从流体设备100的基板110的与形成有孔阵列140的面相反的面,按照焦点对准孔141的方式,使用荧光显微镜进行拍摄。此时,从基板110的与形成有孔阵列140的面相反的面照射激发光。使用滤光片1,以曝光时间5秒拍摄荧光图像,使用滤光片2,以曝光时间1.5秒拍摄荧光图像,还拍摄了同一视野的亮视野图像。

[0234] 图20(a)的图像为信号检测1的观察图像。图20(b)的图像为信号检测2的观察图

像。图像的上段为亮视野的图像、下段为荧光图像。

[0235] 图21(a)的图像为信号检测3的观察图像。图21(b)的图像为信号检测4的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、中段为Redmond Red的荧光图像、下侧为FITC的荧光图像。

[0236] 由图20及图21的结果可知,获得了与实施例1相同的结果。

[0237] 图22(a)的图像为信号检测5的观察图像。图22(b)的图像为信号检测4的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、中段为Redmond Red的荧光图像、下侧为FITC的荧光图像。

[0238] 如图22(a)的图像所示,在整个面上观察到Redmond Red的荧光信号。而未观察到FITC的荧光信号。如图22(b)的图像所示,观察到对应于微小分区142的配置的Redmond Red的荧光信号。即,确认了第三液体被分别地收容在多个微小分区142中。但未观察到FITC的荧光信号。

[0239] [实施例4]

[0240] 除了第二液体不含Tween 20之外,在与实施例3相同的条件下进行实验。

[0241] 图23(a)的图像为信号检测1的观察图像。图23(b)的图像为信号检测2的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、下段为荧光图像。

[0242] 图24(a)的图像为信号检测3的观察图像。图24(b)的图像为信号检测4的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、中段为Redmond Red的荧光图像、下侧为FITC的荧光图像。

[0243] 由图23及图24的结果可知,获得了与实施例2相同的结果。

[0244] 图25(a)的图像为信号检测5的观察图像。图25(b)的图像为信号检测4的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、中段为Redmond Red的荧光图像、下侧为FITC的荧光图像。

[0245] 如图25(a)的图像所示,在整个面上观察到Redmond Red的荧光信号。而未观察到FITC的荧光信号。如图25(b)的图像所示,观察到对应于微小分区142的配置的Redmond Red的荧光信号。即,确认了第三液体被分别地收容在多个微小分区142中。但未观察到FITC的荧光信号。

[0246] 由此结果可知,即便不连续地进行包含表面活性剂的液体(本实施例中为第一液体)的导入、利用密封液进行的密封和最终置换的液体(本实施例中为第三液体)的导入,也可以将最终置换的液体收容在孔中。换而言之可知,即便是在最终置换的液体(本实施例中为第三液体)最跟前所收容的液体(本实施例中为第二液体)不含表面剂,只要是在最终置换的液体之前、将包含表面活性剂的液体(本实施例中为第一液体)收容在孔141中,则最终置换的液体即可收容在孔141中。

[0247] 作为其理由,认为是通过第一液体的导入,表面活性剂被导入至孔141的内部,之后即便是利用不含表面活性剂的第二液体将孔141的内部置换,表面活性剂也残留在孔141内、或表面活性剂附着在孔141的内壁。因此认为,当导入第三液体时,通过残留于孔141的内部的表面活性剂的作用,实现了将孔141内部置换成第三液体。

[0248] [比较例3]

[0249] 除了第一液体不含Tween 20之外,在与实施例3相同的条件下进行实验。

[0250] 图26(a)的图像为信号检测1的观察图像。图26(b)的图像为信号检测2的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、下段为荧光图像。由图26的结果可知,获得了与比较例1相同的结果。

[0251] 图27(a)的图像为信号检测3的观察图像。图27(b)的图像为信号检测4的观察图

像。图像的上段为亮视野的图像、中段为Redmond Red的荧光图像、下侧为FITC的荧光图像。由图27(a)的图像可知,获得了与比较例1相同的结果。图27(b)的图像中,在Redmond Red的荧光图像中,有对应于微小分区142的配置、黑色中空的部分。该黑色中空部分与FITC的荧光图像中观察到荧光信号的部分是一致的,因此可以认为微小分区142仅有一部分被第二液体置换。如此可知,当第一液体不含表面活性剂时,无法利用第二液体可靠地对微小分区142内进行置换。

[0252] 图28(a)的图像为信号检测5的观察图像。图28(b)的图像为信号检测4的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、中段为Redmond Red的荧光图像、下侧为FITC的荧光图像。

[0253] 如图28(a)的图像所示,在整个面上观察到Redmond Red的荧光信号。而未观察到FITC的荧光信号。如图28(b)的图像所示,观察到对应于微小分区142的配置的Redmond Red的荧光信号。即,确认了第三液体被分别地收容在多个微小分区142中。但未观察到FITC的荧光信号。即可知,当第二液体包含表面活性剂时,收容在微小分区142内的第二液体被置换成第三液体。

[0254] [实施例5]

[0255] 除了将流体设备的盖构件120的材质变为玻璃之外,在与实施例1相同的条件下进行实验。

[0256] [实施例6]

[0257] 除了将流体设备的盖构件120的材质变为聚丙烯(AS ONE公司制、型号:PPN-051001)之外,在与实施例1相同的条件下进行实验。

[0258] [实施例7]

[0259] 除了将流体设备的盖构件120的材质变为硅(Togawa Rubber公司制、型号:K-125(50))之外,在与实施例1相同的条件下进行实验。

[0260] [比较例4]

[0261] 除了第一液体及第二液体不含表面活性剂之外,在与实施例5相同的条件下进行实验。

[0262] [比较例5]

[0263] 除了第一液体及第二液体不含表面活性剂之外,在与实施例6相同的条件下进行实验。

[0264] [比较例6]

[0265] 除了第一液体及第二液体不含表面活性剂之外,在与实施例7相同的条件下进行实验。

[0266] 图29(a)的图像为实施例5的信号检测1的观察图像。图29(b)的图像为实施例5的信号检测2的观察图像。图31(a)的图像为实施例6的信号检测1的观察图像。图31(b)的图像为实施例6的信号检测2的观察图像。图33(a)的图像为实施例7的信号检测1的观察图像。图33(b)的图像为实施例7的信号检测2的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、下段为荧光图像。

[0267] 图30(a)的图像为实施例5的信号检测3的观察图像。图30(b)的图像为实施例5的信号检测4的观察图像。图32(a)的图像为实施例6的信号检测3的观察图像。图32(b)的图像为实施例6的信号检测4的观察图像。图34(a)的图像为实施例7的信号检测3的观察图像。图

34(b)的图像为实施例7的信号检测4的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、中段为Redmond Red的荧光图像、下侧为FITC的荧光图像。

[0268] 由图29～图34的结果可知,实施例5～7获得了与实施例1相同的结果。即可知,即便流体设备的盖构件120的材质是玻璃、聚丙烯、或硅,当第一液体包含表面活性剂时,都可以利用第二液体对通过密封液分别地收容有第一液体的微小分区142进行置换。

[0269] 图35(a)的图像为比较例4的信号检测1的观察图像。图35(b)的图像为比较例4的信号检测2的观察图像。图37(a)的图像为比较例5的信号检测1的观察图像。图37(b)的图像为比较例5的信号检测2的观察图像。图39(a)的图像为比较例6的信号检测1的观察图像。图39(b)的图像为比较例6的信号检测2的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、下段为荧光图像。

[0270] 图36(a)的图像为比较例4的信号检测3的观察图像。图36(b)的图像为比较例4的信号检测4的观察图像。图38(a)的图像为比较例5的信号检测3的观察图像。图38(b)的图像为比较例5的信号检测4的观察图像。图40(a)的图像为比较例6的信号检测3的观察图像。图40(b)的图像为比较例6的信号检测4的观察图像。图像的上段为亮视野的图像、中段为Redmond Red的荧光图像、下侧为FITC的荧光图像。

[0271] 由图35～图40的结果可知,比较例4～6获得了与比较例2相同的结果。即可知,即便流体设备的盖构件120的材质是玻璃、聚丙烯、或硅,当第一液体未包含表面活性剂时,均无法利用第二液体对通过密封液分别地收容有第一液体的微小分区142进行置换。

[0272] 产业上的可利用性

[0273] 根据本发明,可以提供对分别密封的微小分区内部的液体进行置换的技术。

[0274] 符号说明

[0275] 100,200流体设备、110基板、111一个面、120盖构件、121凸部、122导入口、123排出口、130流路、140孔阵列、141孔、142微小分区(经密封的孔)、210壁构件、L110第一液体、L120第一密封液、L620第二密封液、L410第二液体。

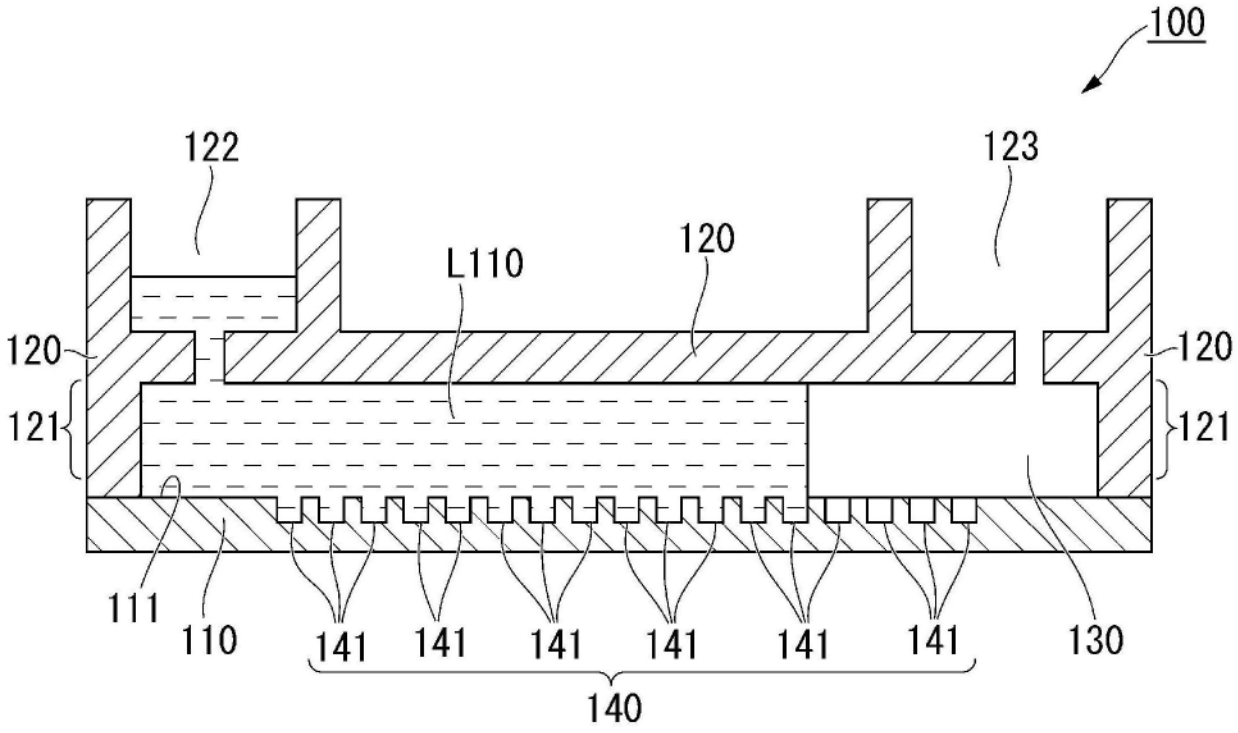

100
122
123
L110
120
120
120
121
121
111
110
141
141
141
141
141
141
130
140

图1

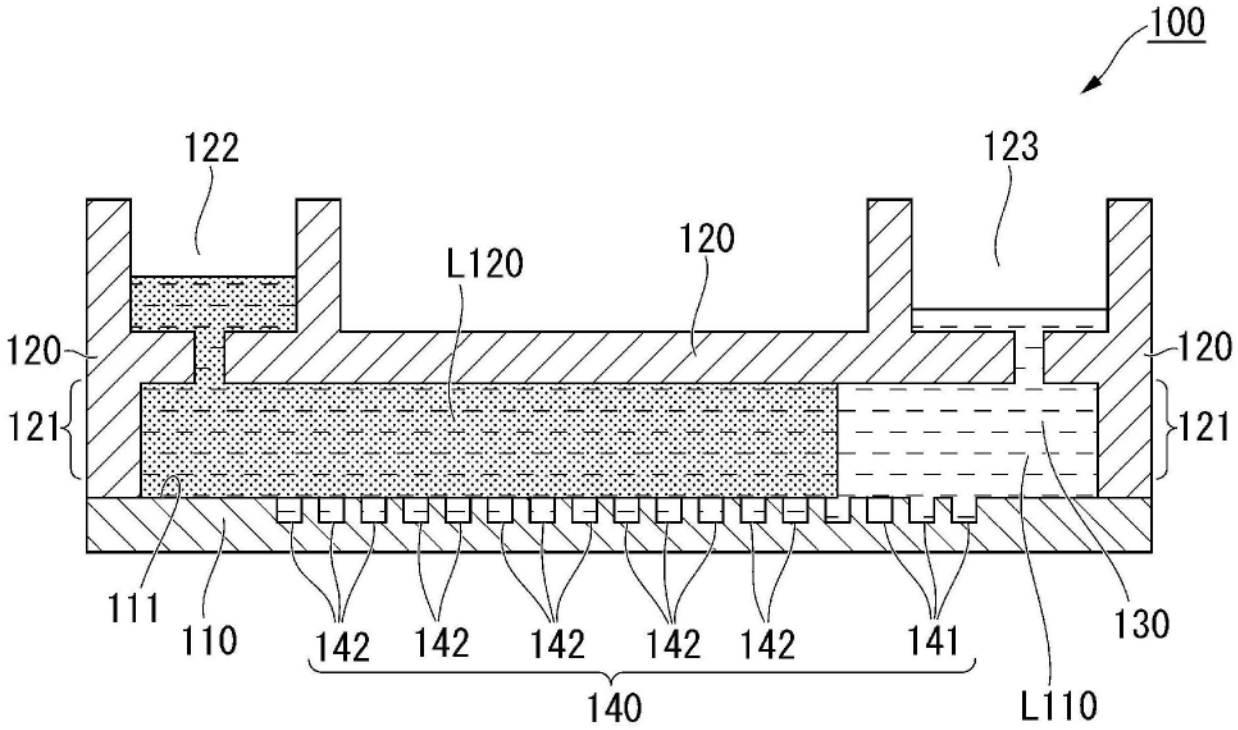

100
122
123
L120
120
120
120
121
121
111
110
142
142
142
142
142
141
130
140
L110

图2

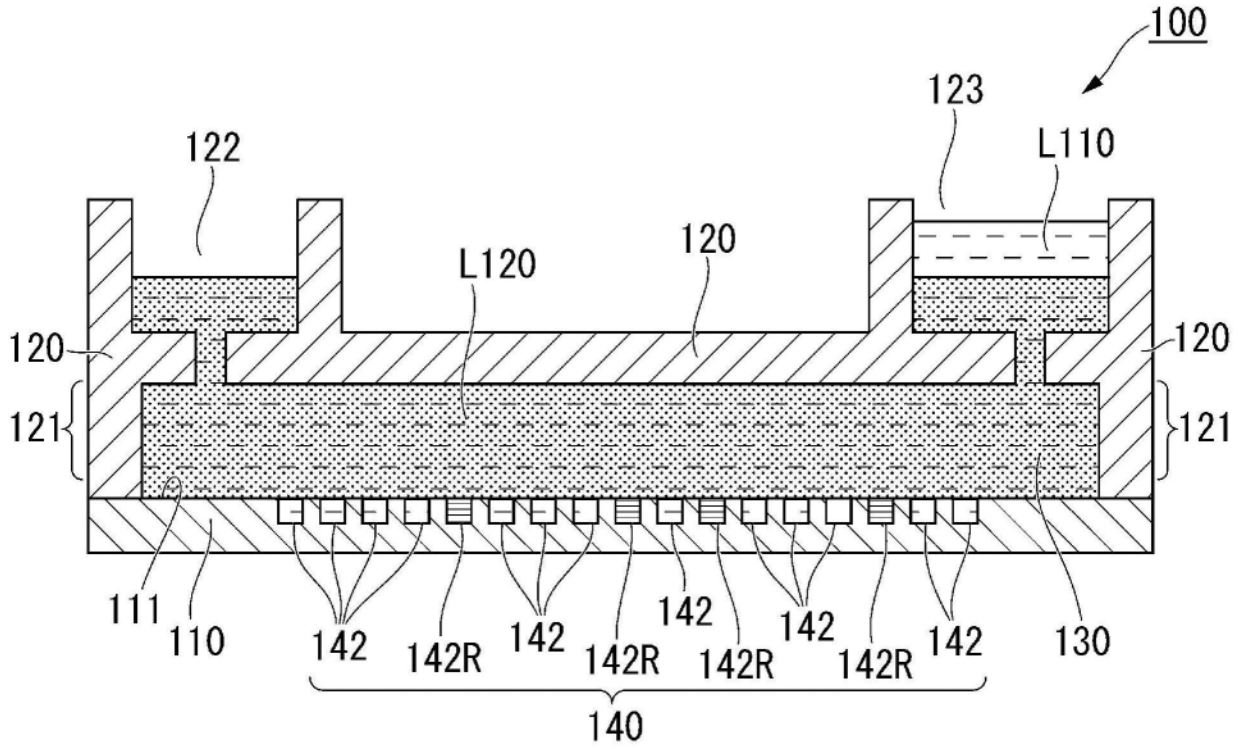

100
123
122
L110
L120
120
120
120
121
121
111
110
142
142R
142
142R
142
142R
142
130
140

图3

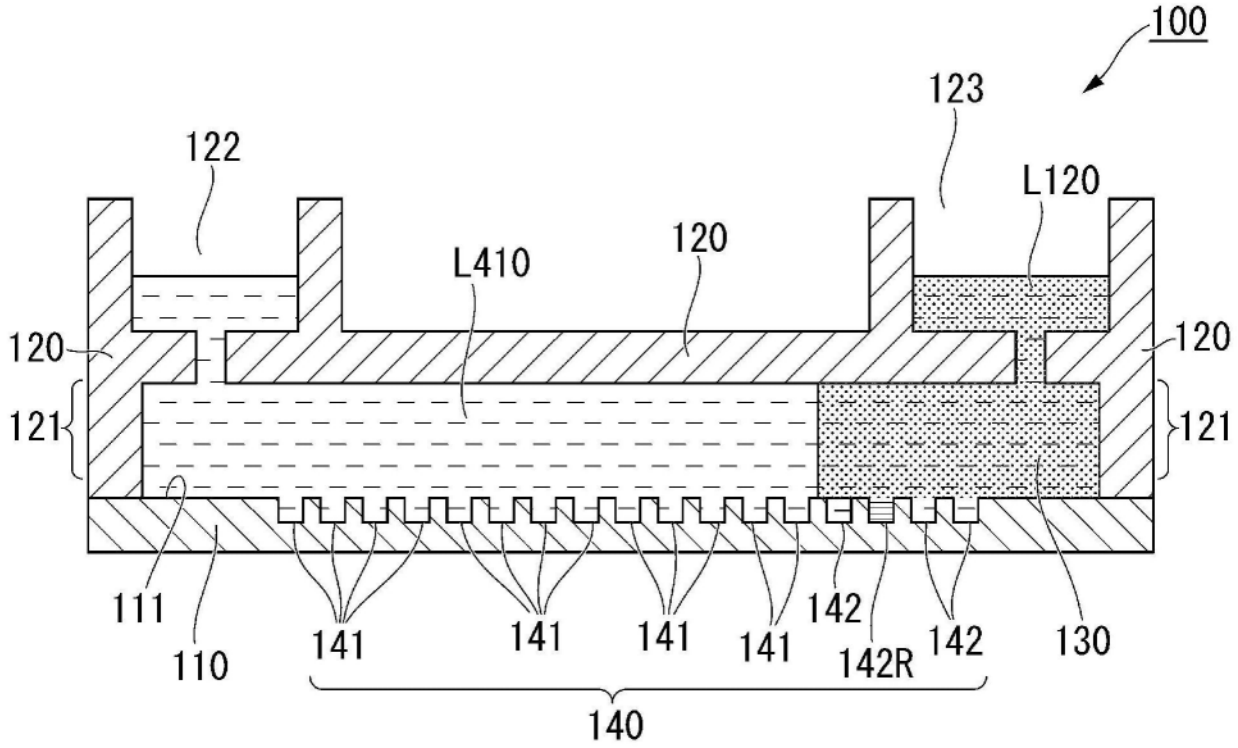

100
123
122
L120
L410
120
120
120
121
121
111
110
141
141
141
141
142
142R
142
130
140

图4

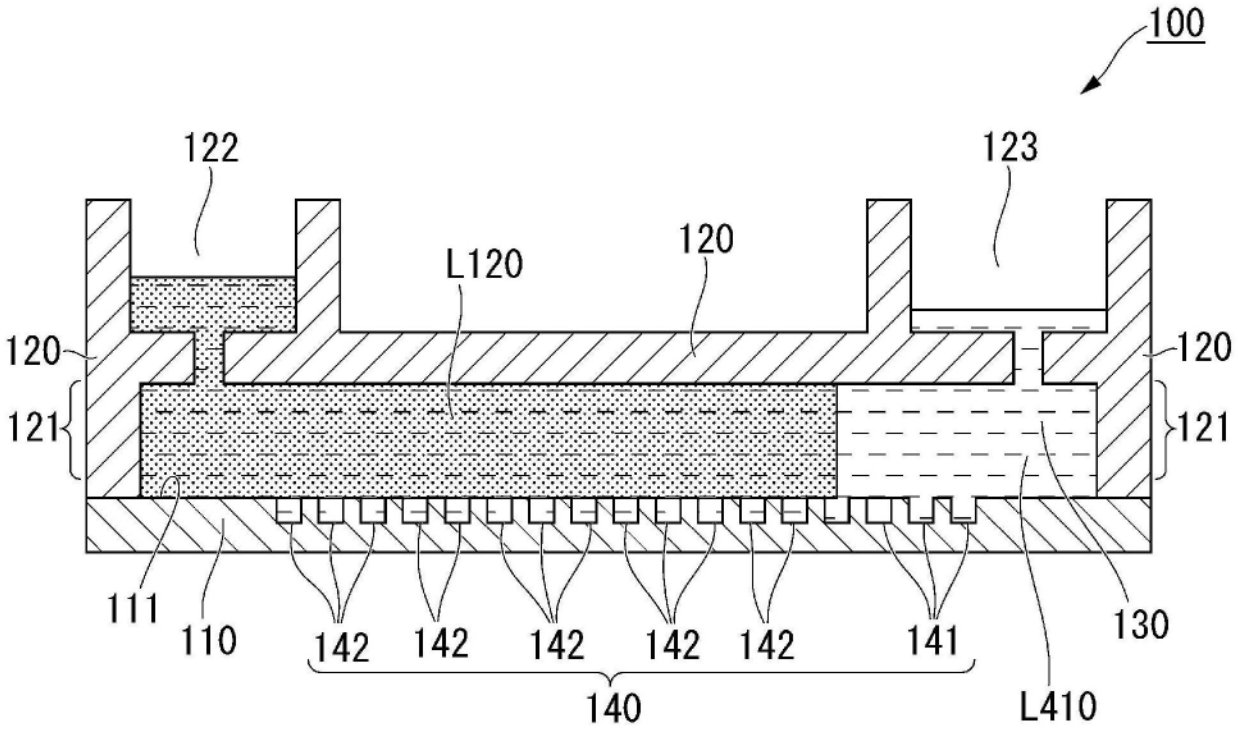

100
122
123
L120
120
120
120
121
121
111
110
142
142
142
142
142
141
130
140
L410

图5

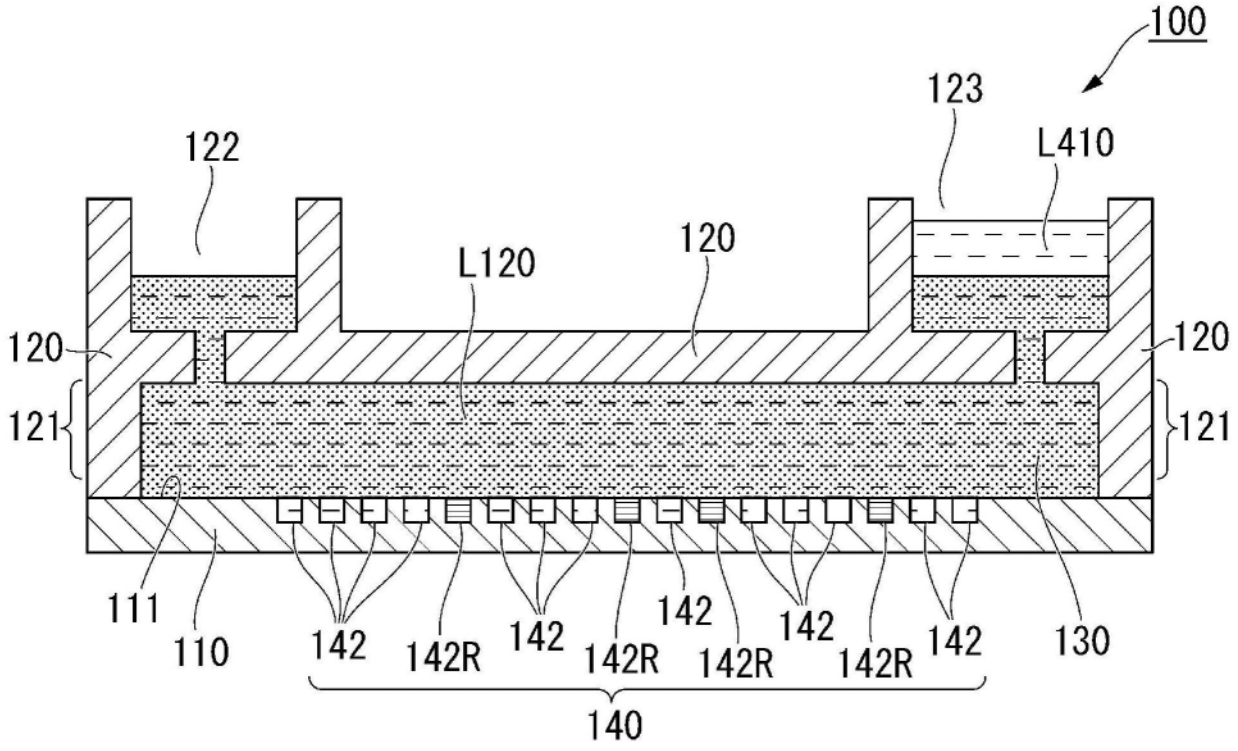

100
123
122
L410
L120
120
120
120
121
121
111
110
142
142R
142
142R
142
142R
142
142R
142
130
140

图6

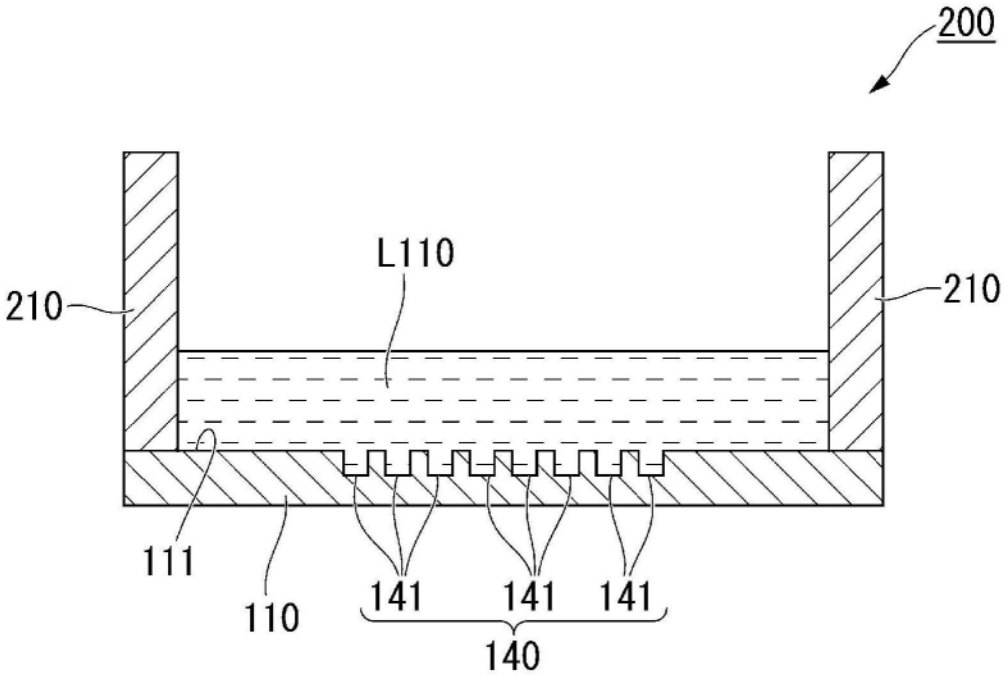

200
210
L110
210
111
110
141
141
141
140

图7

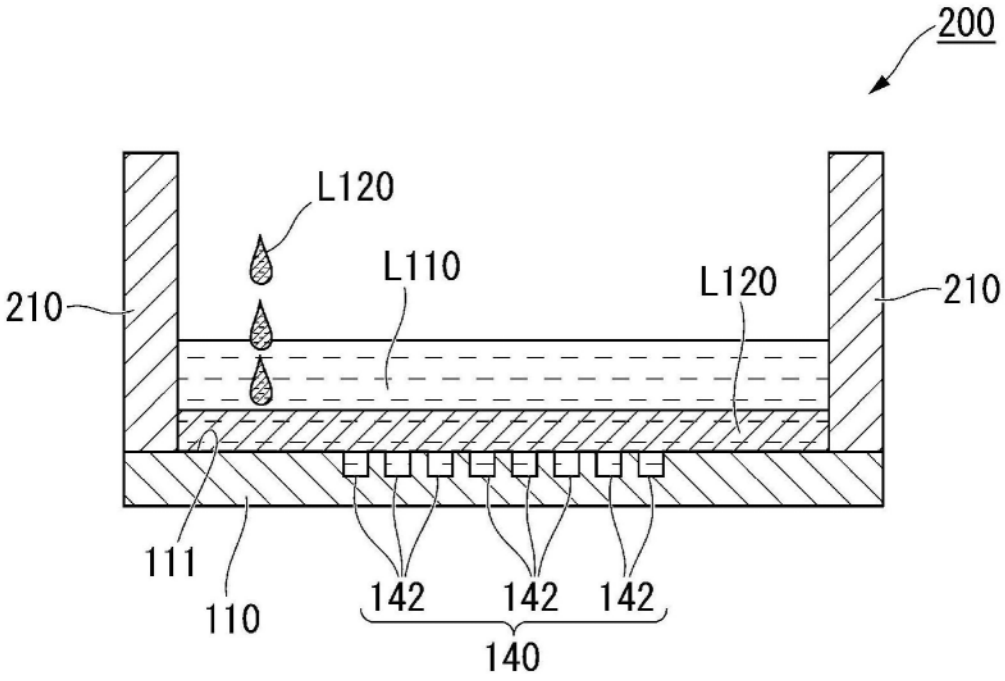

200
L120
L110
L120
210
210
111
110
142
142
142
140

图8

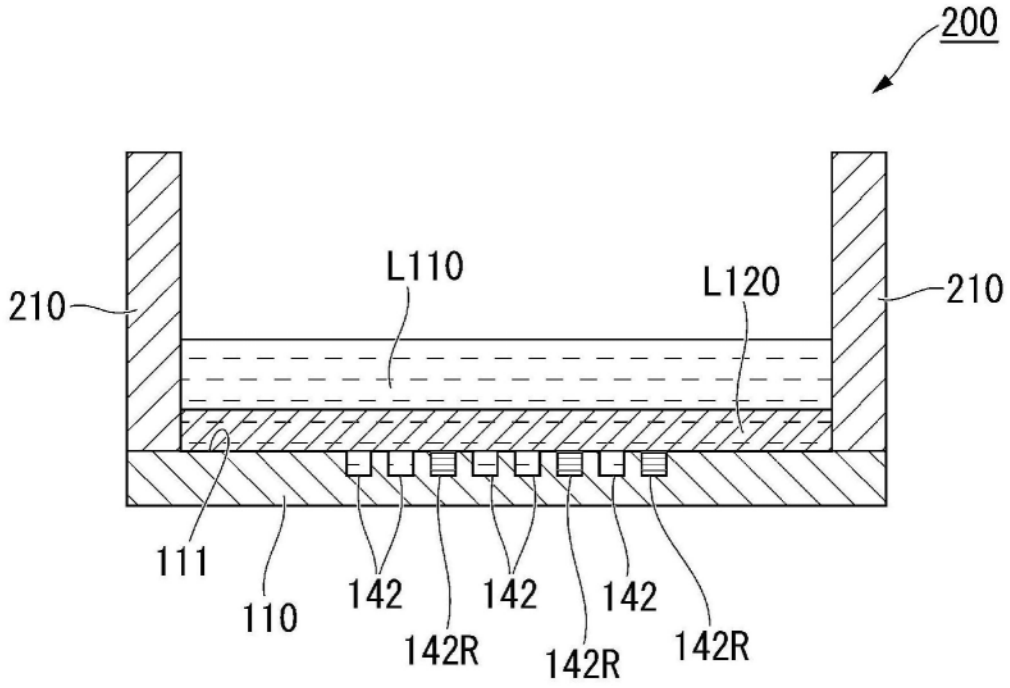

200
210
L110
L120
210
111
110
142
142R
142
142R
142
142R

图9

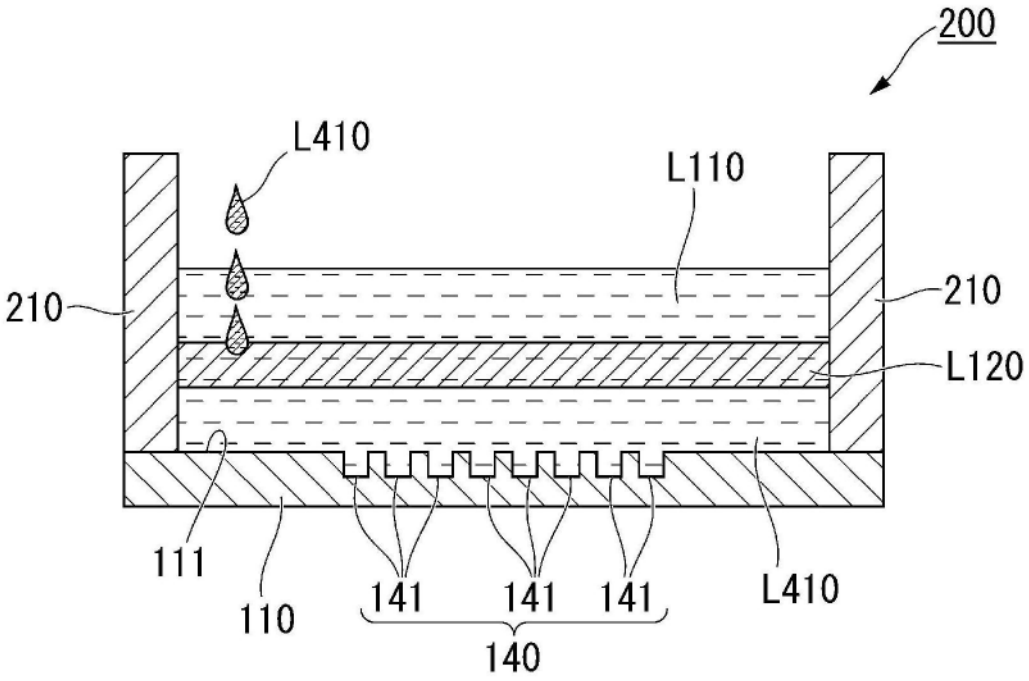

200
L410
L110
210
210
L120
111
110
141
141
141
L410
140

图10

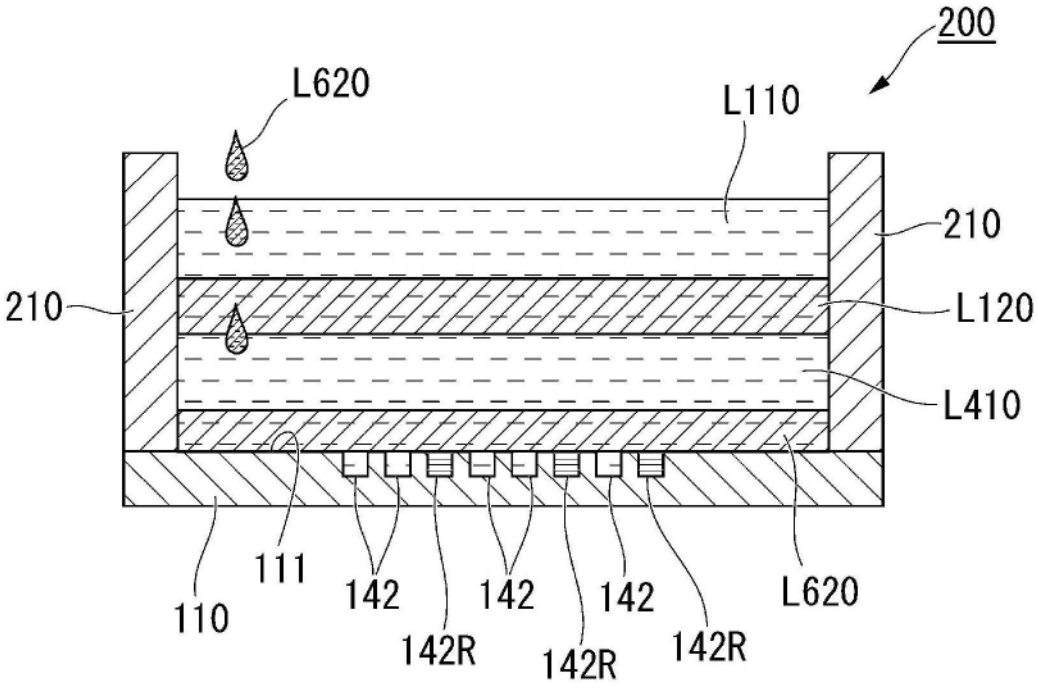

200
L620
L110
210
210
L120
L410
110
111
142
142
142
L620
142R
142R
142R

图11

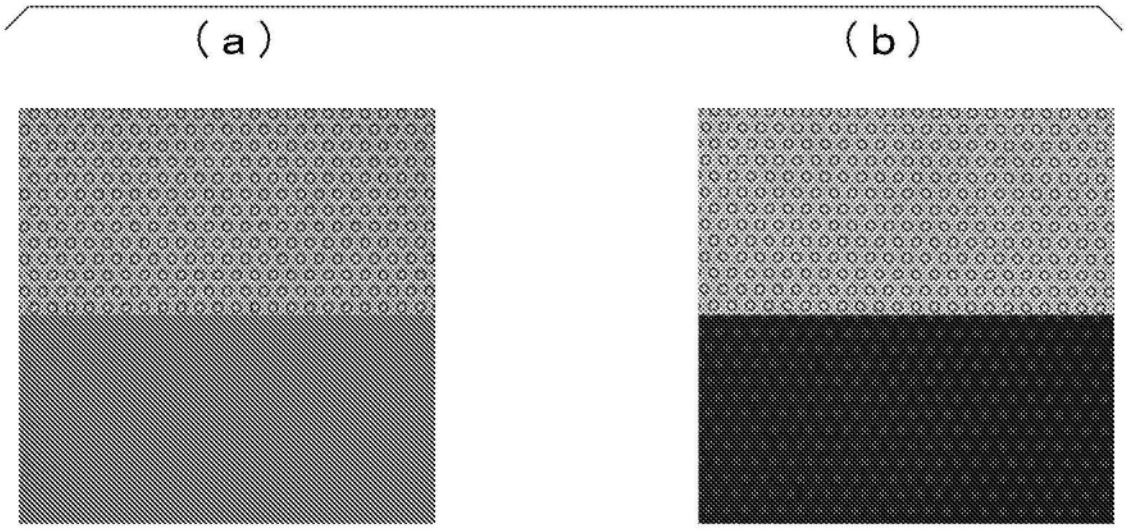

(a)
(b)

图12

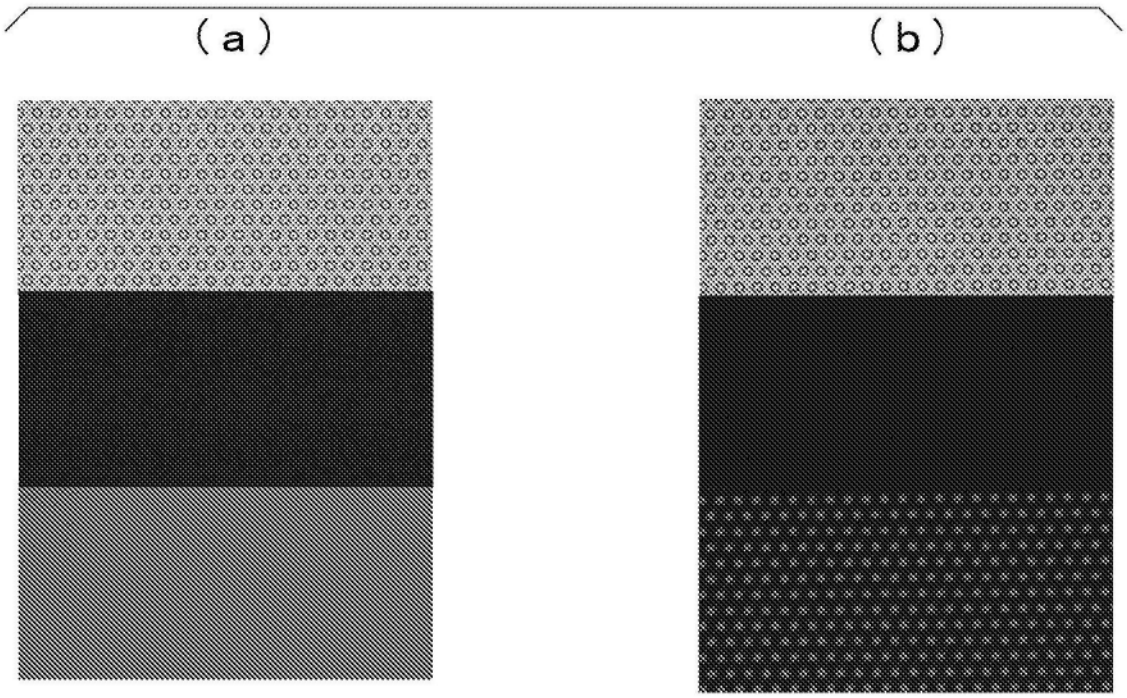


图13

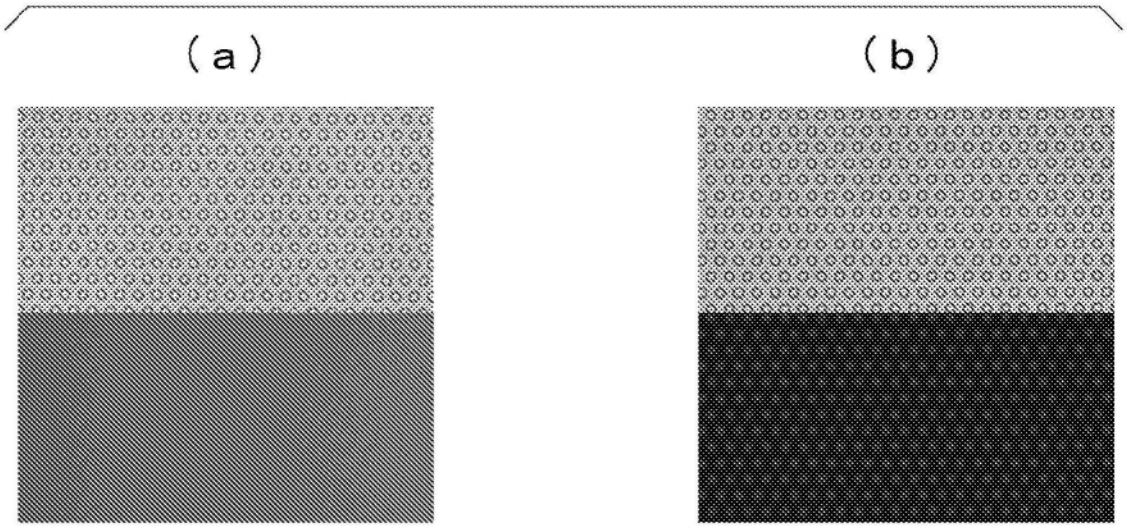


图14

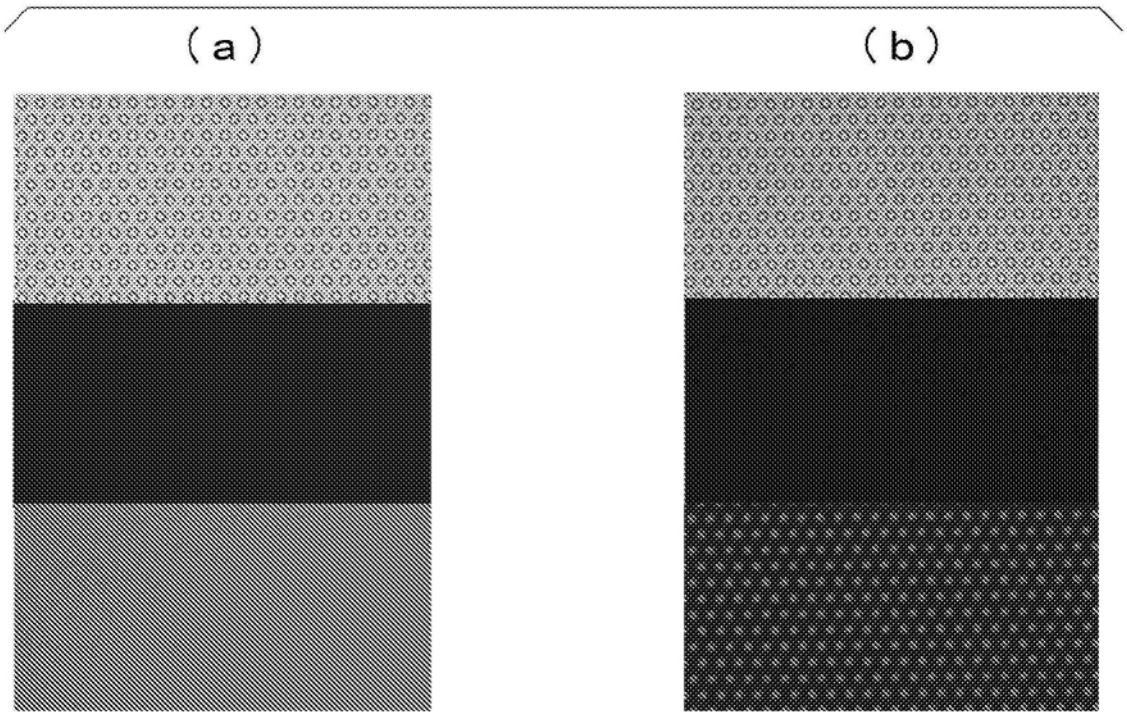


图15

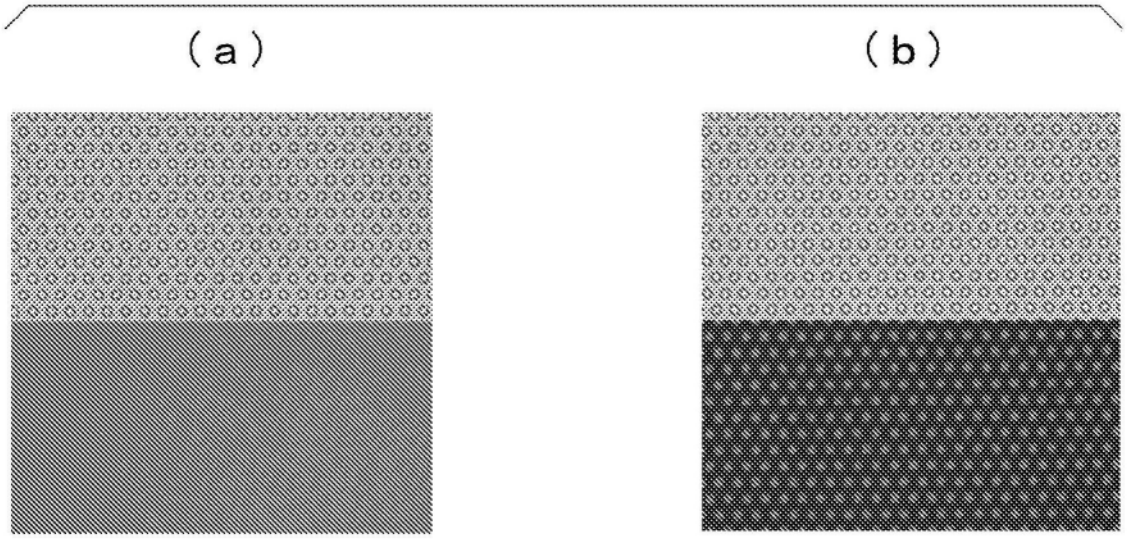


图16

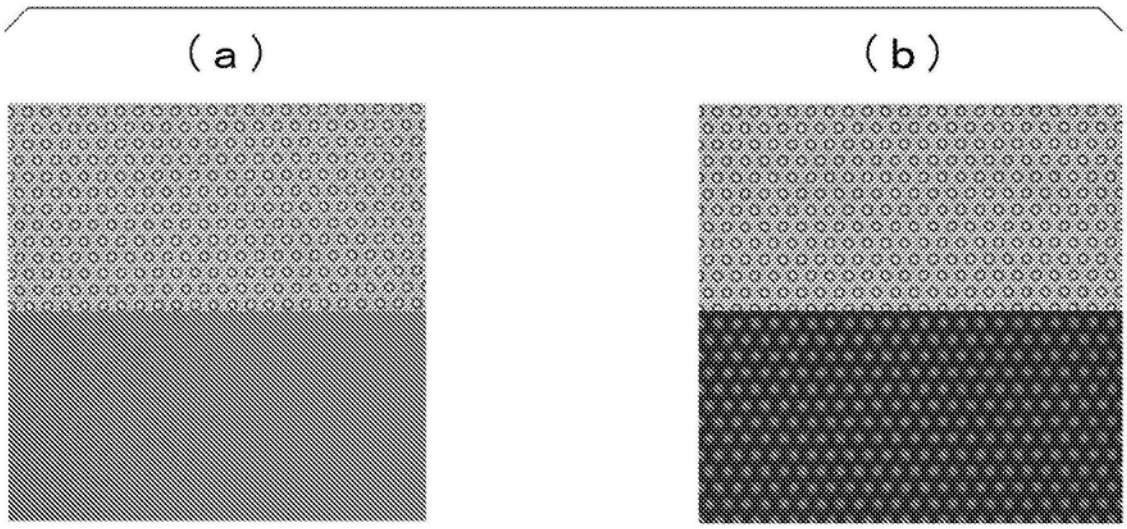


图17

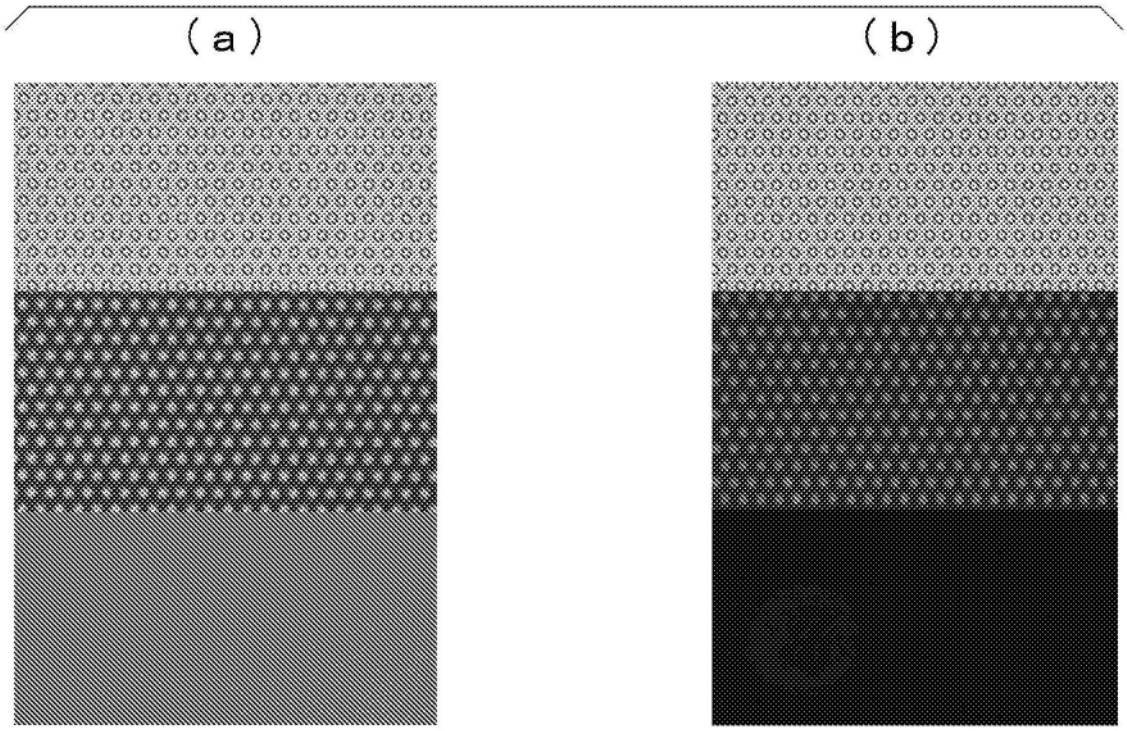


图18

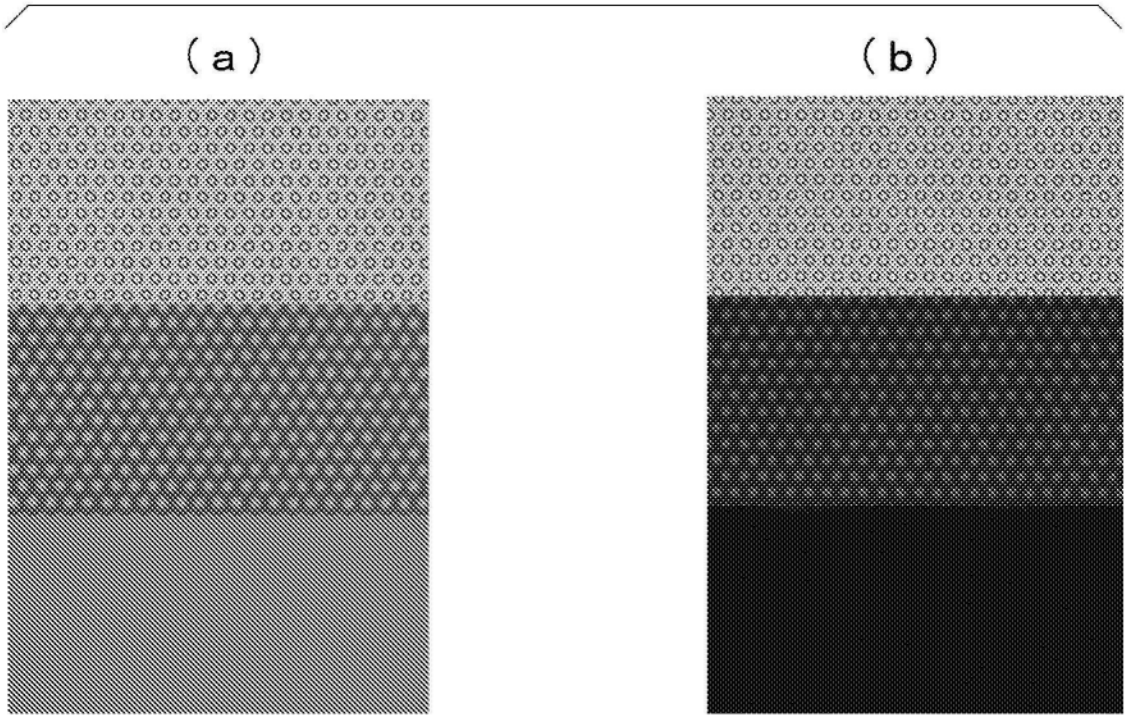


图19

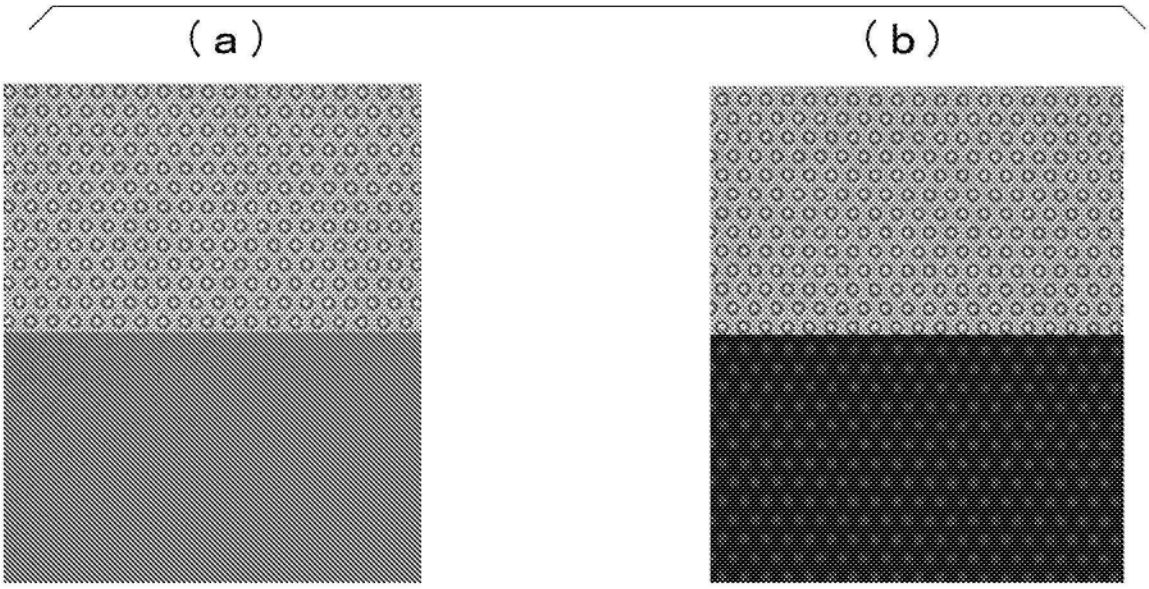


图20

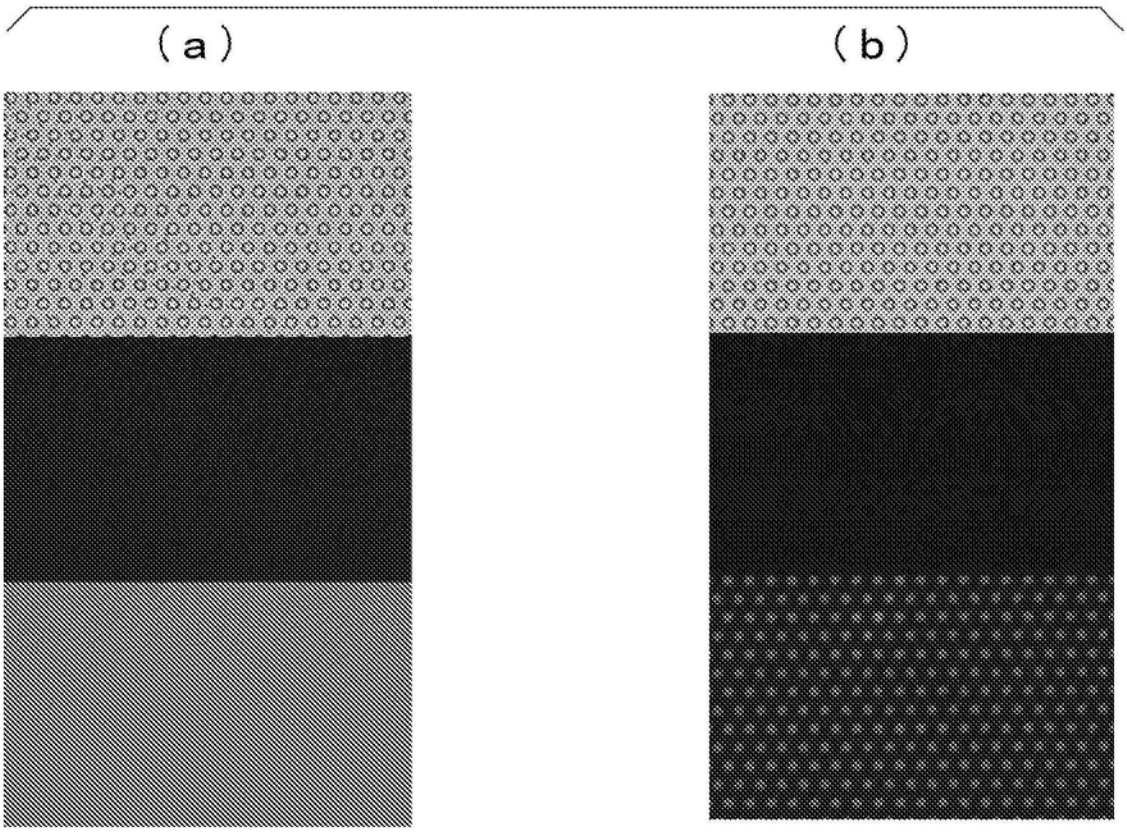


图21

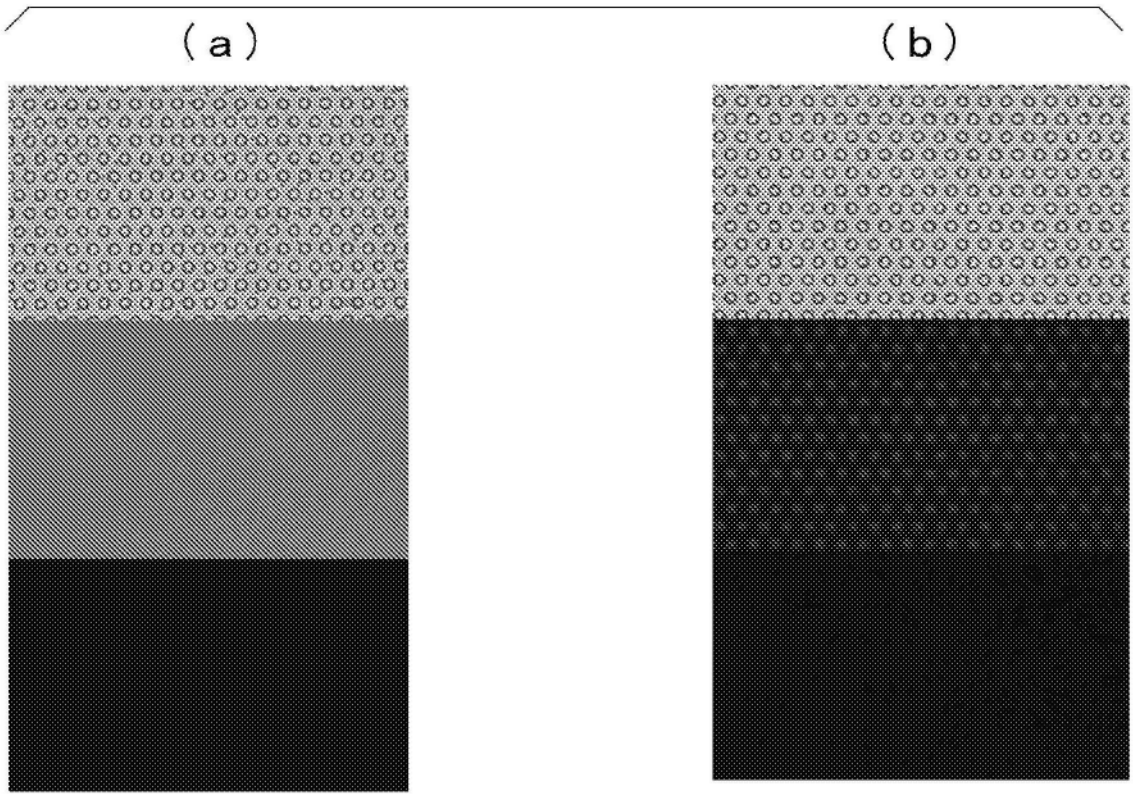


图22

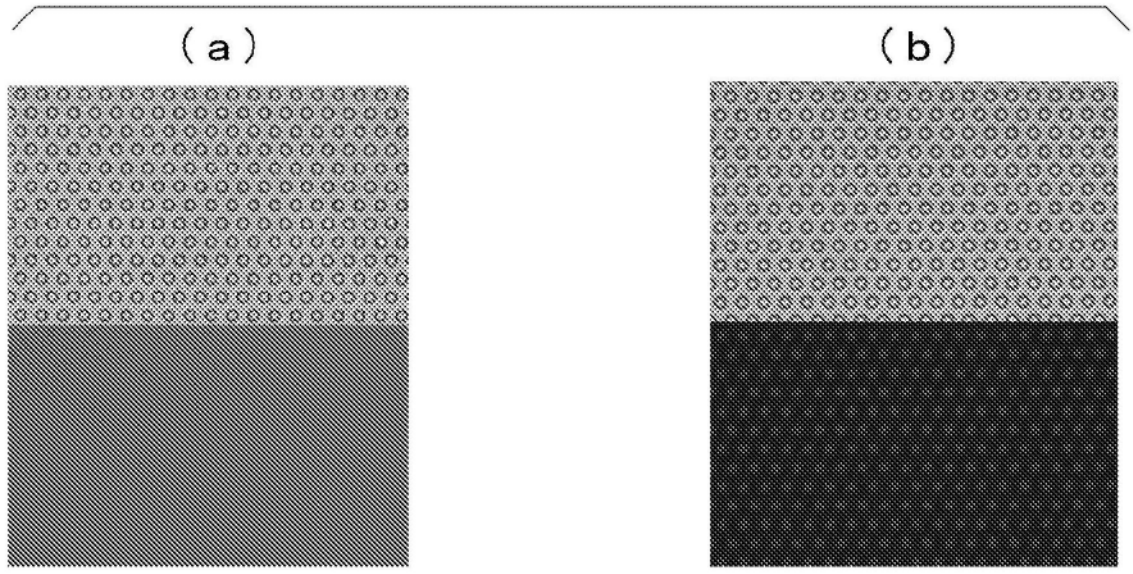


图23

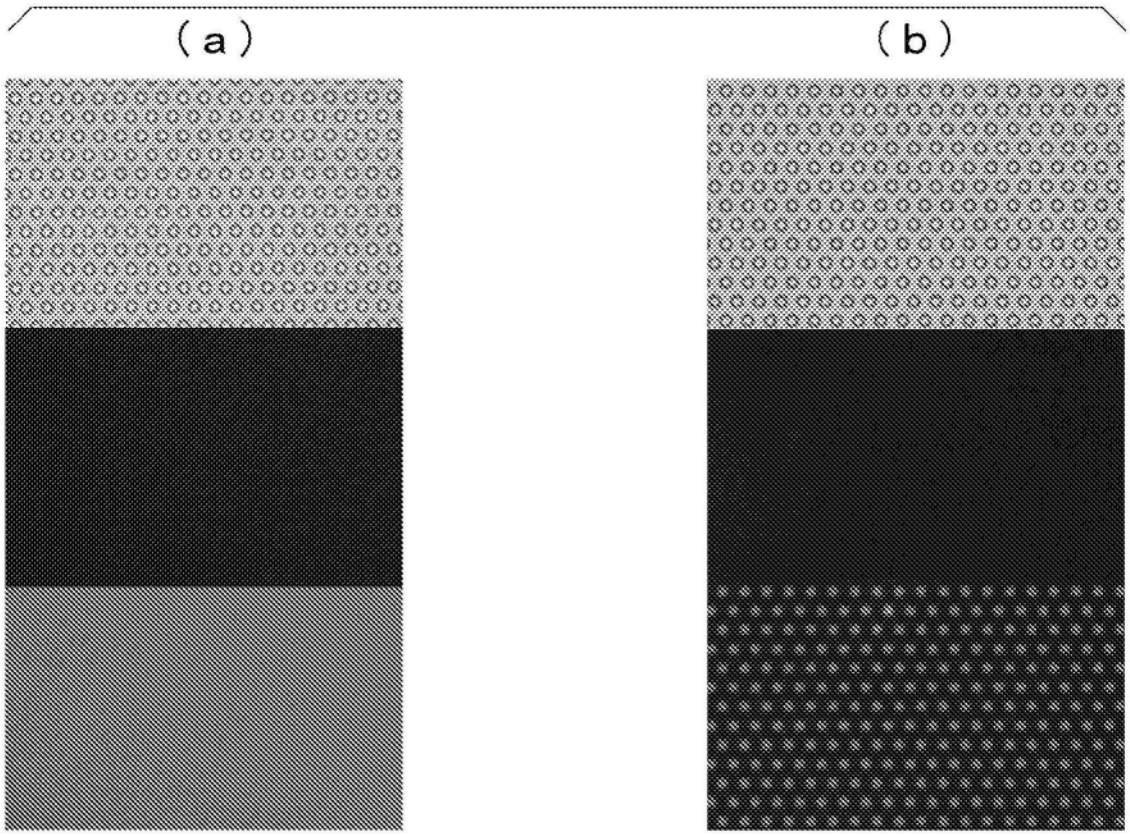


图24

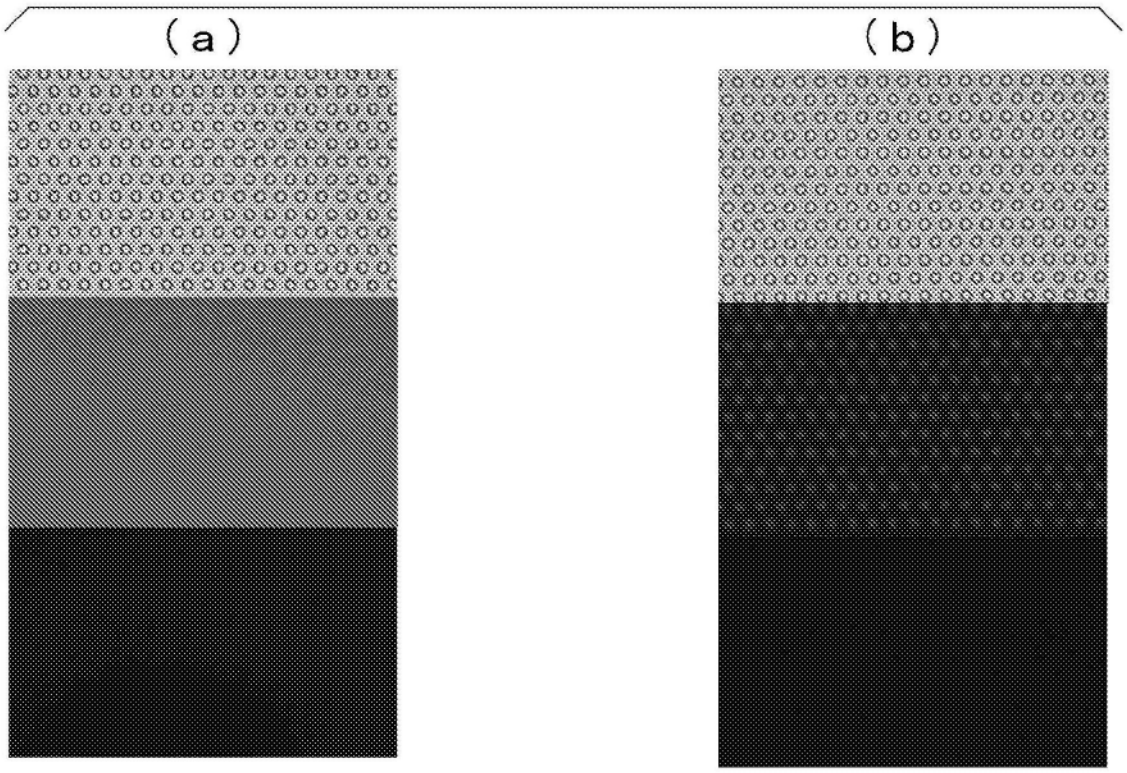


图25

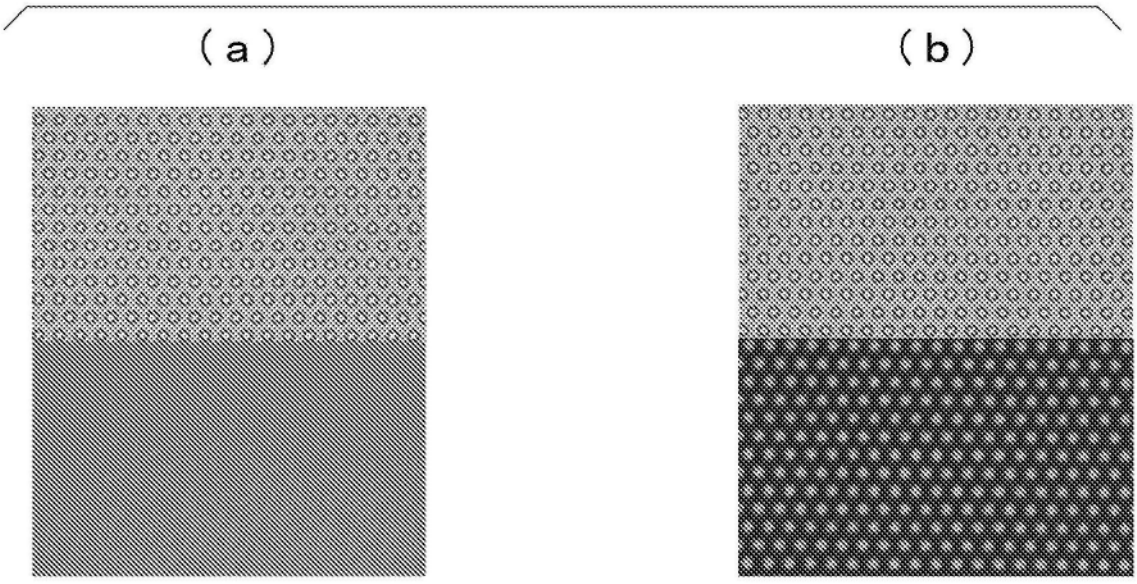


图26

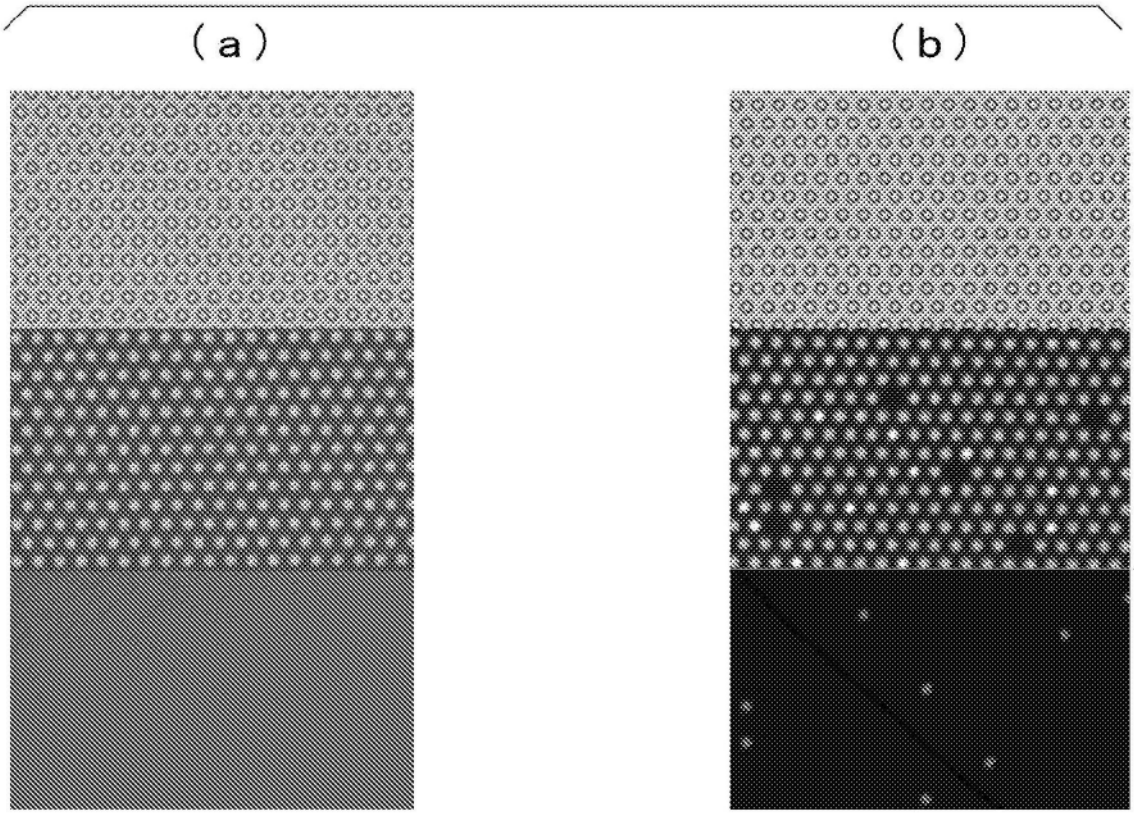


图27

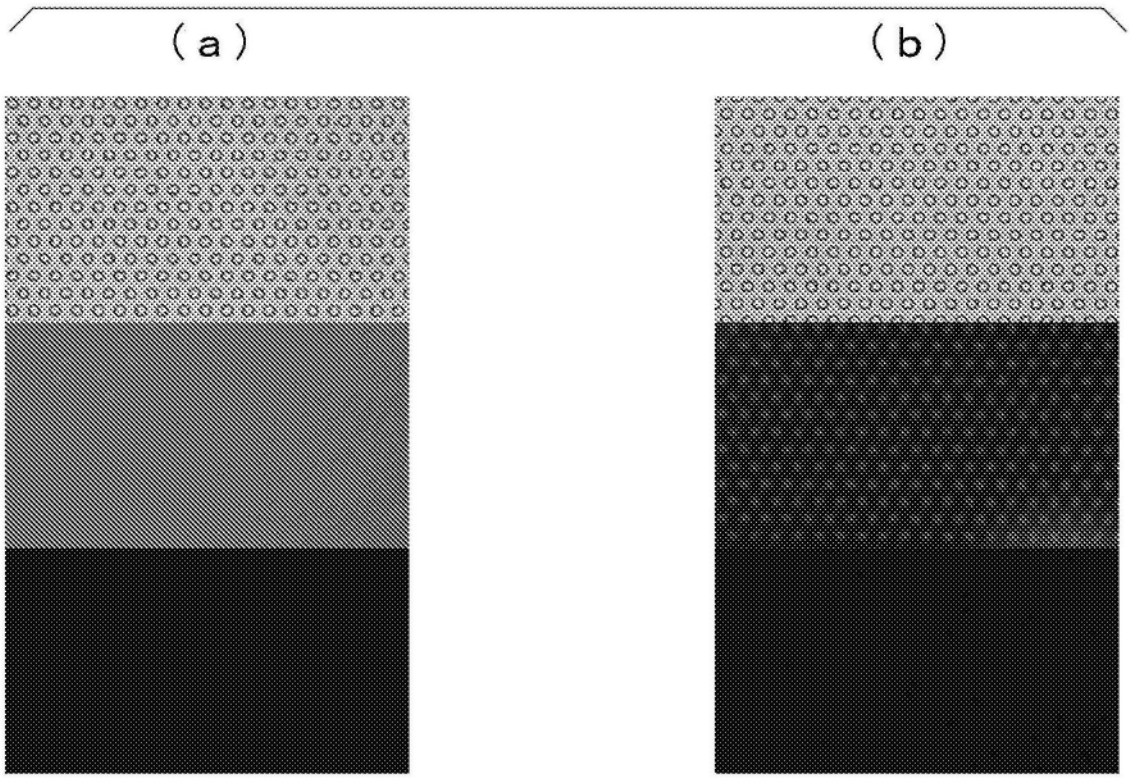


图28

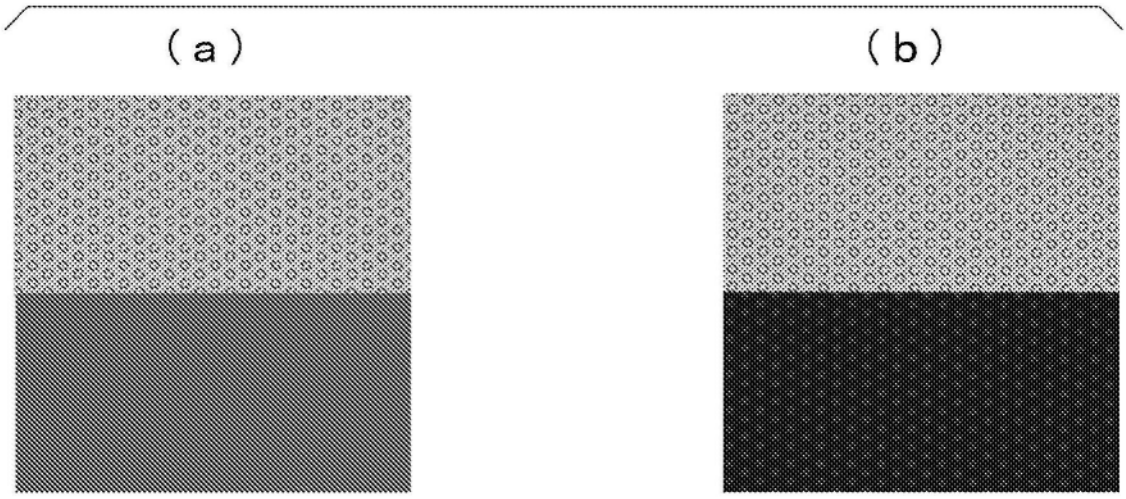


图29

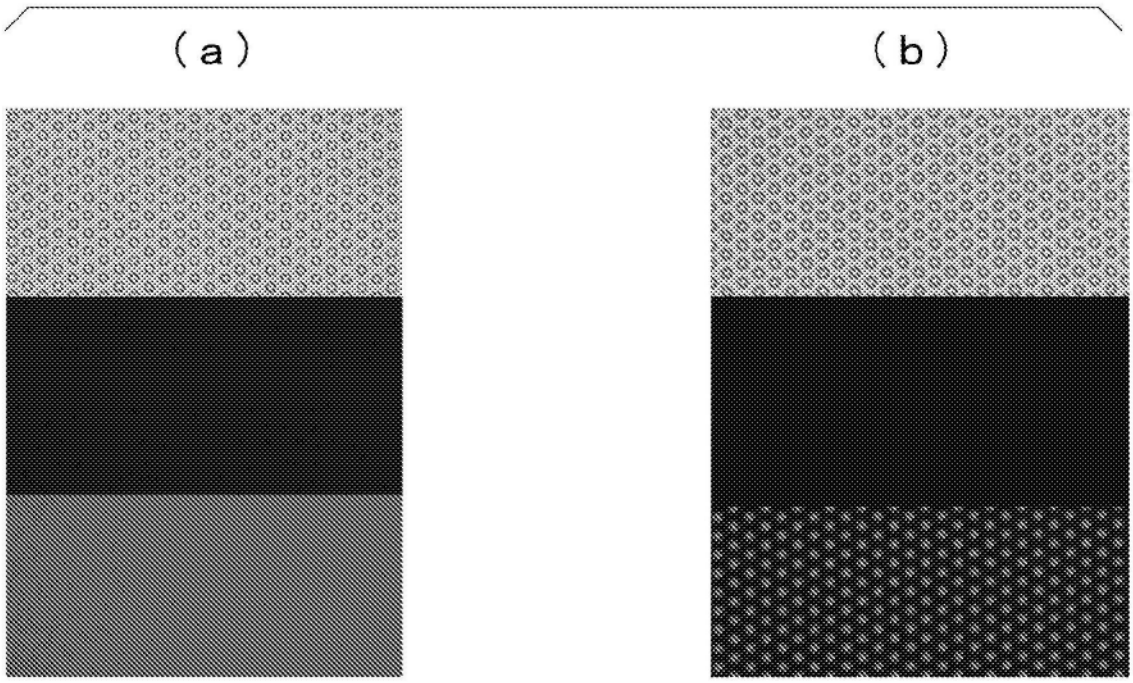


图30

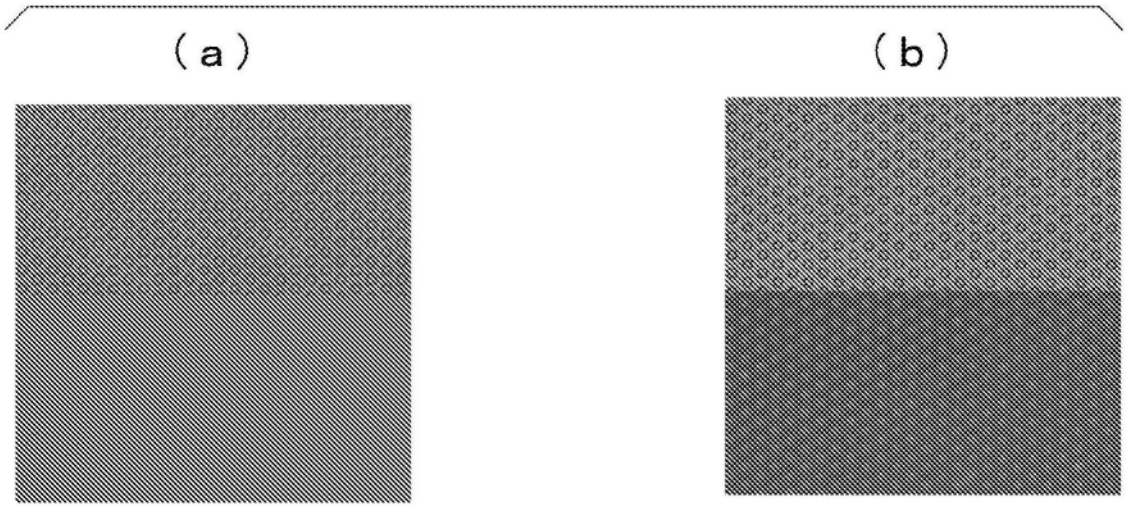


图31

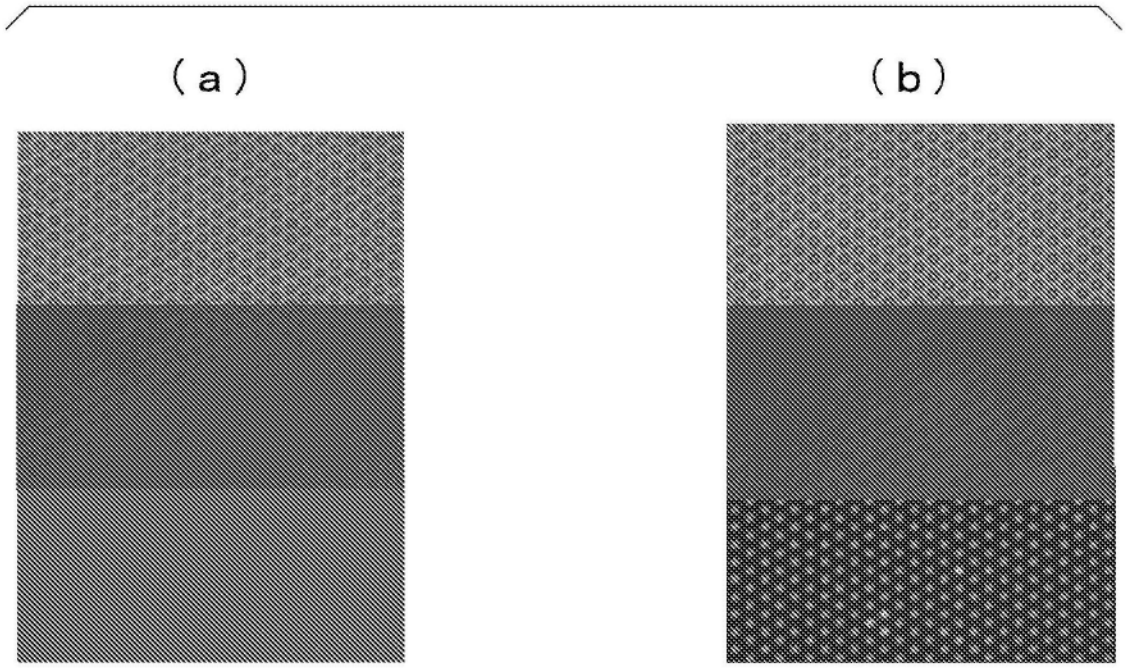


图32

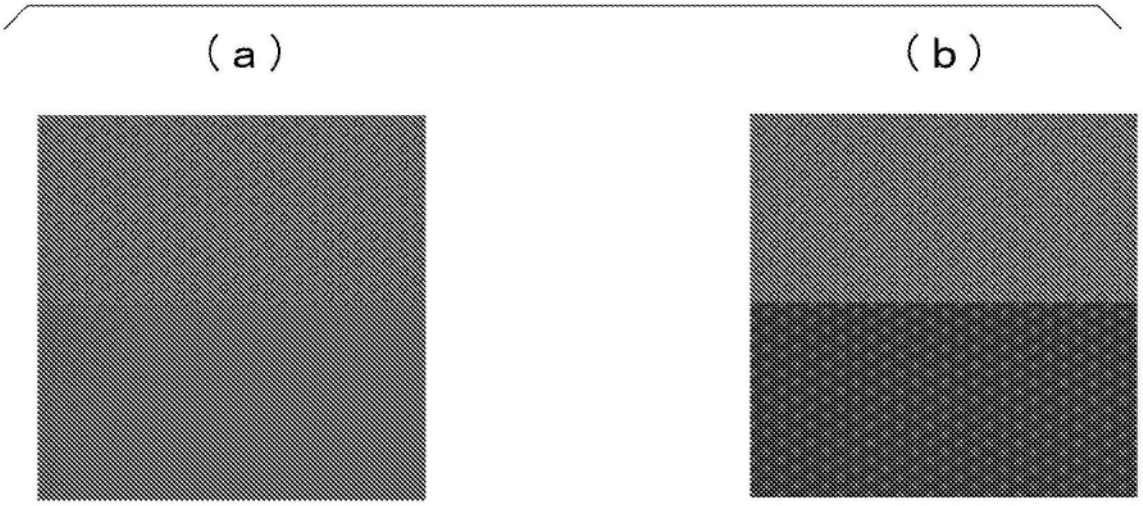


图33

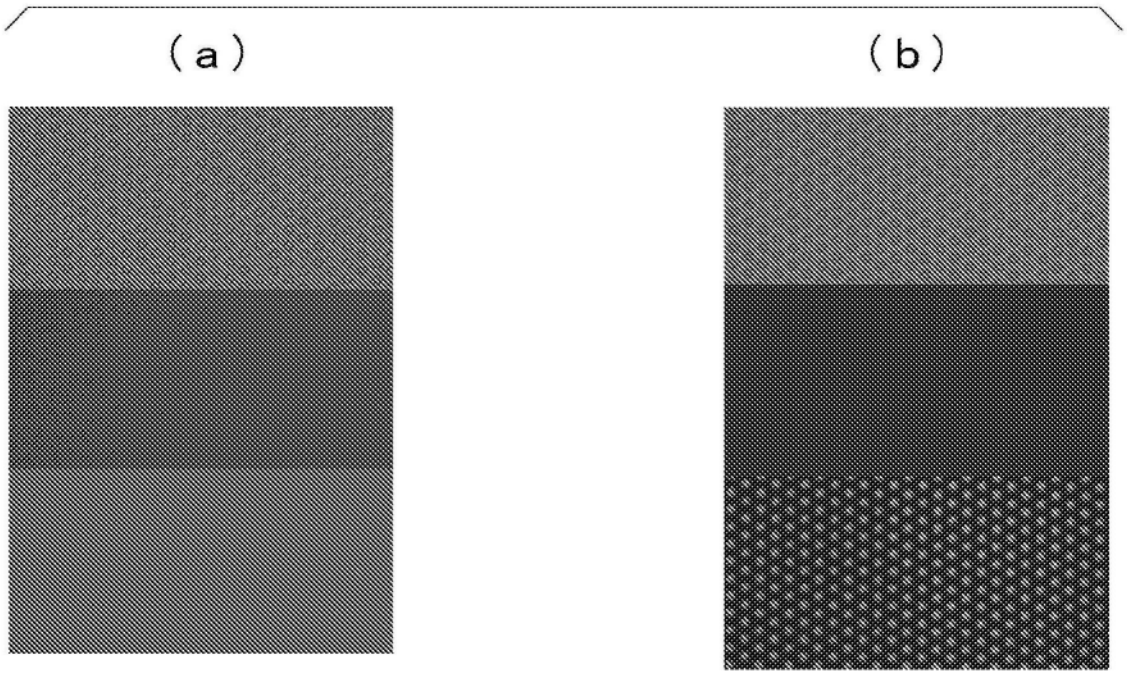


图34

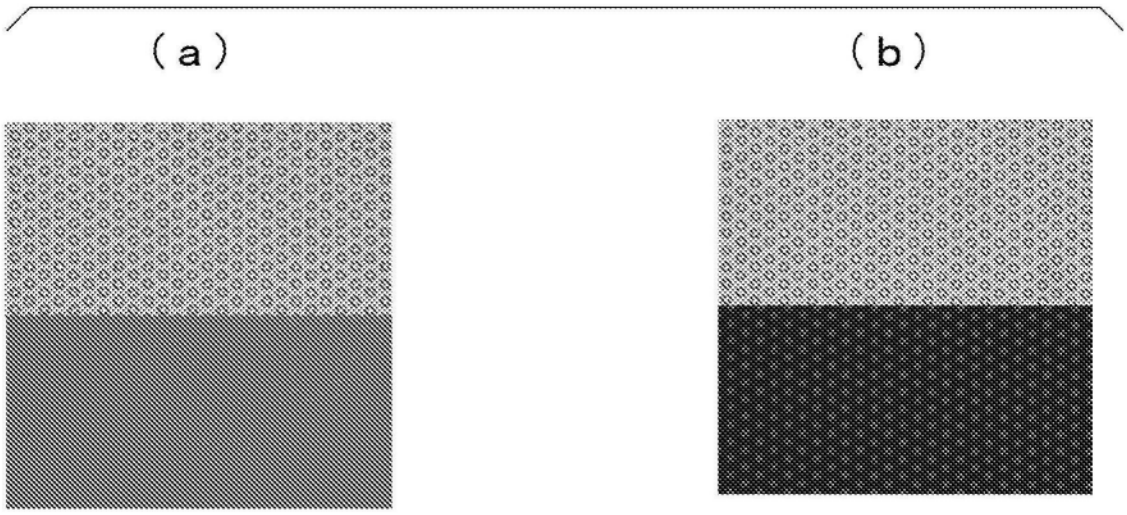


图35

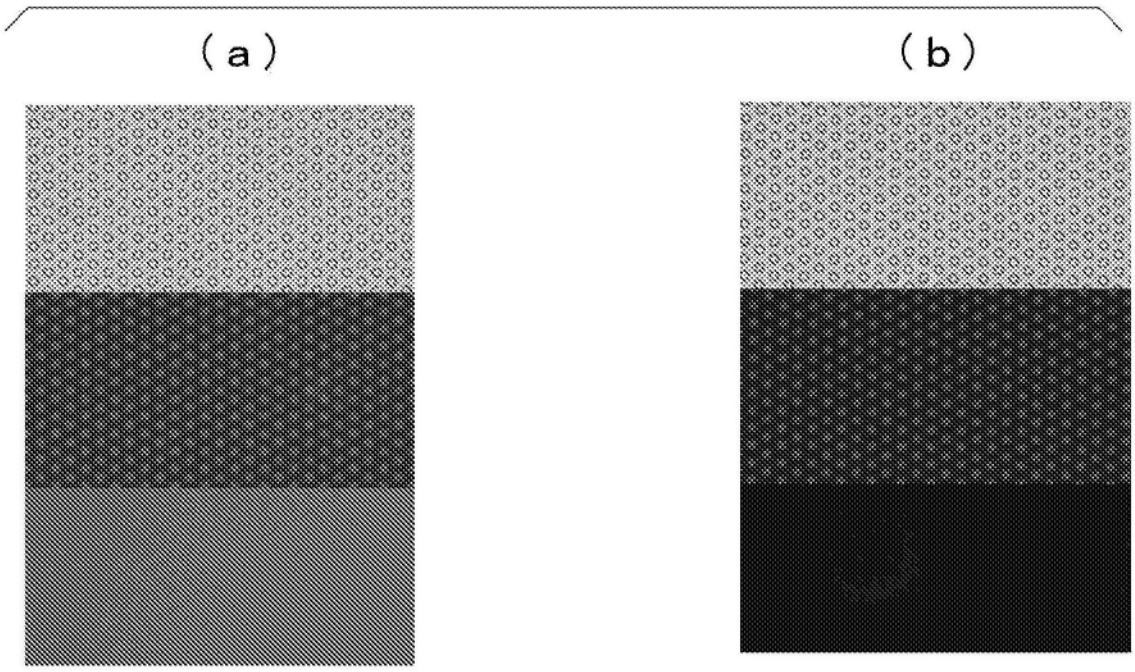


图36

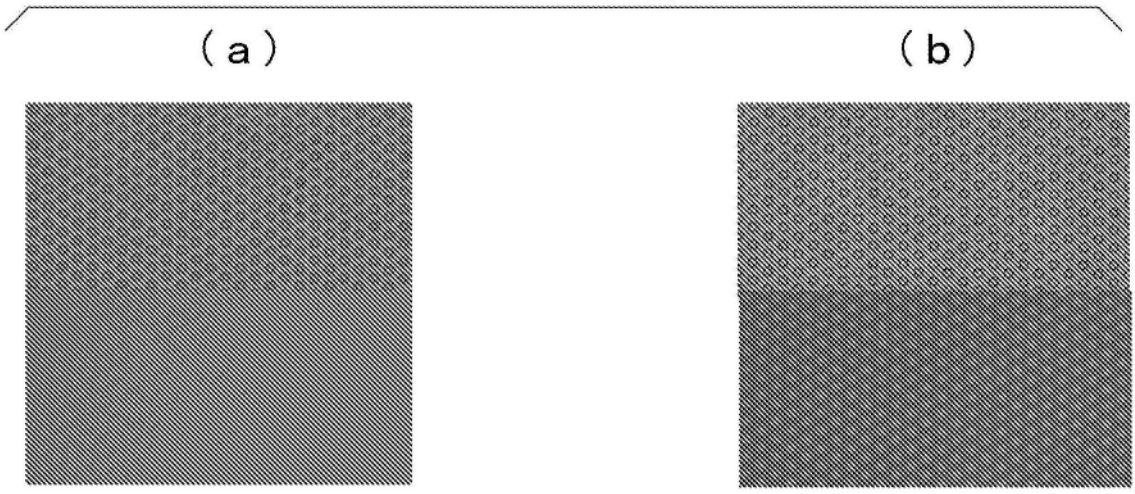


图37

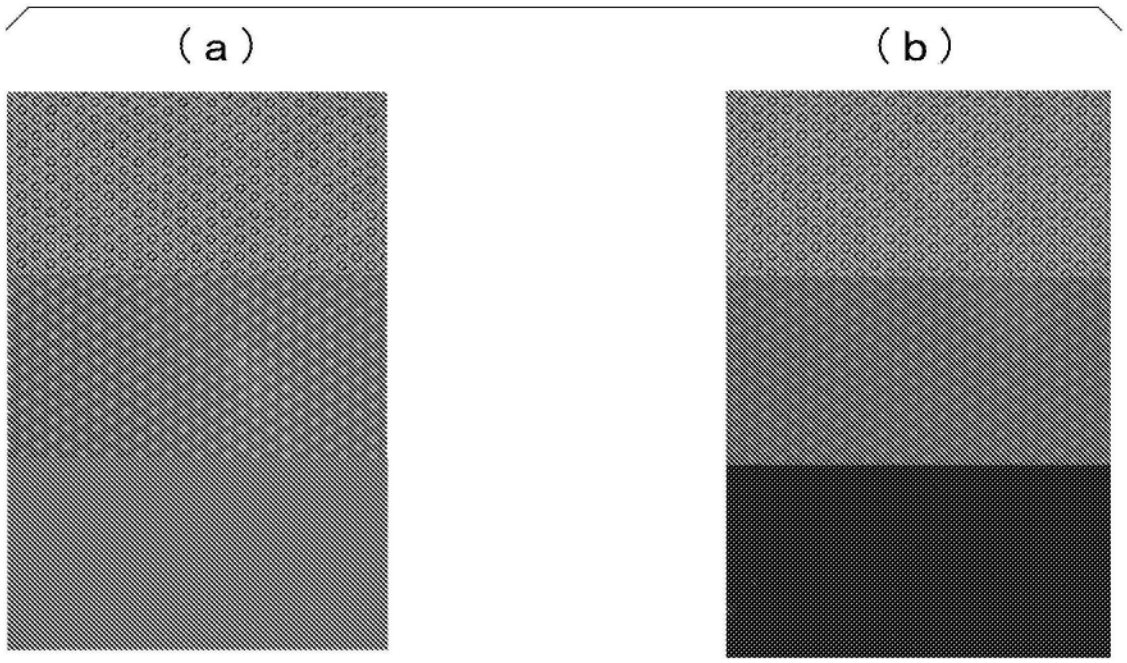


图38

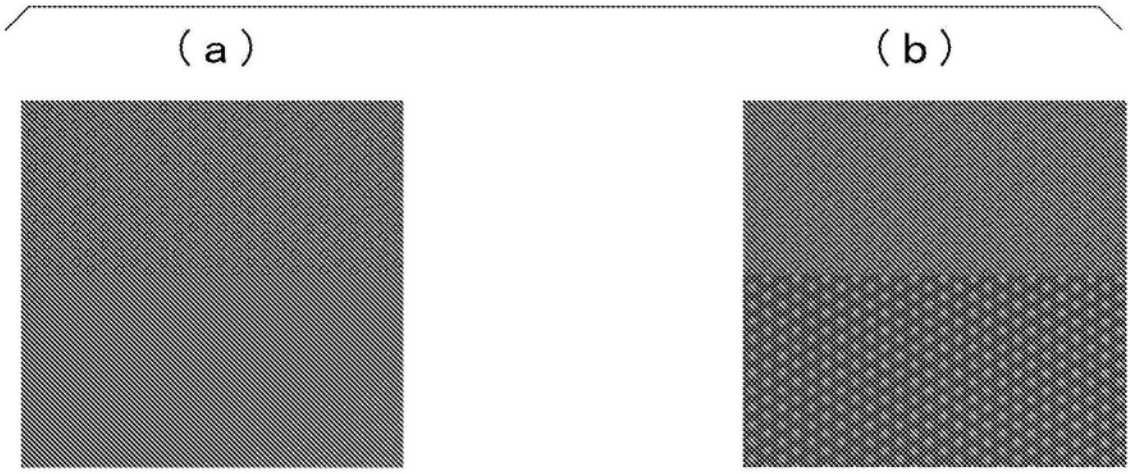


图39

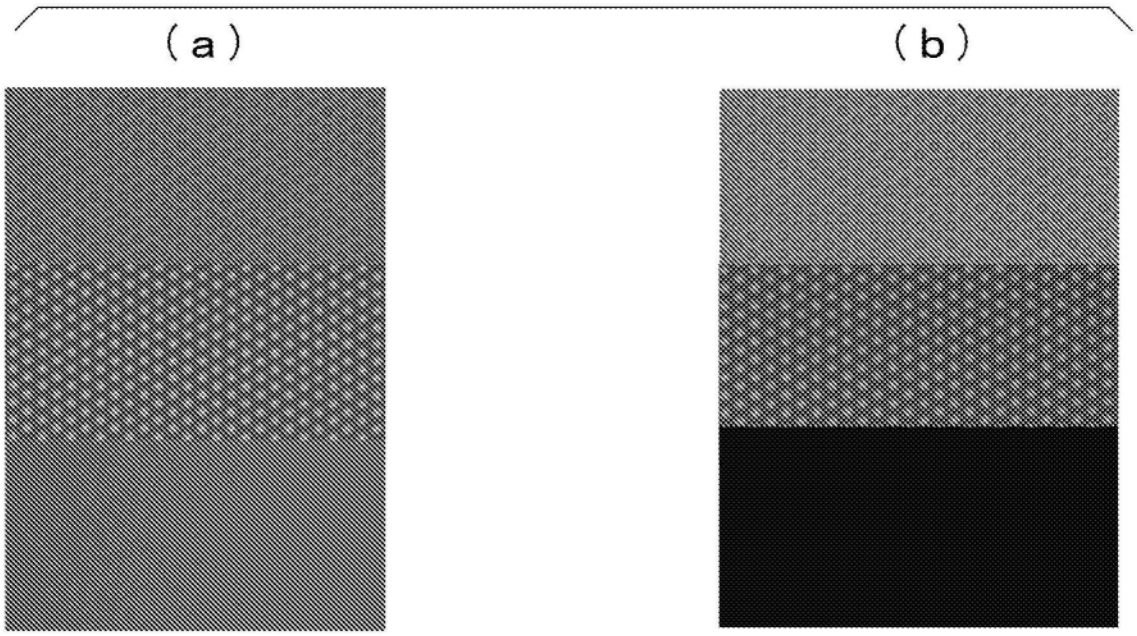


图40