

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-6145

(P2017-6145A)

(43) 公開日 平成29年1月12日(2017.1.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/00	2 G 0 5 8
C 1 2 Q 1/25 (2006.01)	C 1 2 Q 1/25	4 B 0 6 3
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 1
G 0 1 N 35/08 (2006.01)	G 0 1 N 35/08	B

審査請求 有 請求項の数 15 O L (全 98 頁)

(21) 出願番号	特願2016-197852 (P2016-197852)	(71) 出願人	508208340
(22) 出願日	平成28年10月6日 (2016. 10. 6)		レインダンス テクノロジーズ, インコ
(62) 分割の表示	特願2015-79308 (P2015-79308)		ーボレイテッド
原出願日	平成19年5月11日 (2007. 5. 11)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(31) 優先権主張番号	60/799, 833		4 2 1, レキシントン, ハートウェル
(32) 優先日	平成18年5月11日 (2006. 5. 11)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/799, 834	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成18年5月11日 (2006. 5. 11)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100181674
(31) 優先権主張番号	60/808, 614		弁理士 飯田 貴敏
(32) 優先日	平成18年5月25日 (2006. 5. 25)	(74) 代理人	100181641
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微小流体デバイス

(57) 【要約】

【課題】 微小流体デバイスを提供すること。

【解決手段】 本発明は、生物学的適用、化学的適用、および診断的適用を、迅速、効率的、および安価に実施するために必須である、単離された構成要素の多段階処理を実施するために、流体処理システムに合わせることができる個別の流体取り扱いモジュールを有する基材を提供する。液滴の電気的操作に基づく原理を使用することにより、本発明の微小流体基材は、液滴に試薬をカプセル化可能であり、これは組み合わせ、分析、および分別が可能である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞から分泌された物質を分析する方法であって、該方法は、
複数の液滴を提供する工程であって、それぞれの液滴は少なくとも 1 つの細胞および増殖
培地を含む、工程；
複数の該液滴をインキュベートし、それにより、それぞれの液滴において少なくとも 1 つ
の分泌された物質を形成する工程；および
複数の液滴のそれぞれにおいて該分泌された物質の同種アッセイを実施する工程
を含む、方法。

【請求項 2】

前記細胞が、細菌細胞、真菌細胞、植物細胞または動物細胞である、請求項 1 に記載の
方法。

【請求項 3】

前記実施する工程の前に、前記液滴のそれぞれを標識された化合物を含むアッセイ液滴
と合同する工程をさらに含む、請求項 1～2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

前記標識された化合物が標識されたペプチドである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記標識が色素である、請求項 3～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記合同する工程の後に、前記液滴において少なくとも 1 つの条件を変化させる工程を
さらに含む、請求項 3～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つの条件が pH および／または温度である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 pH が酸性に変化される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 pH がアルカリ性に変化される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記合同する工程が前記インキュベートする工程の前である、請求項 3～9 のいずれか
1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記合同する工程が前記インキュベートする工程の後である、請求項 3～9 のいずれか
1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記実施する工程の前に、それぞれの液滴において前記細胞を溶解する工程をさらに含
む、請求項 3～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記提供する工程における前記複数の液滴のそれぞれが酵素のための基質を含む、請求
項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

インキュベーションの後に、酵素のための基質を前記複数の液滴のそれぞれに導入する
工程をさらに含む、請求項 3～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記酵素が抗体と結合体化される、請求項 13～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、一般的に、流体種の形成および／または制御のためのシステムおよび方法、

10

20

30

40

50

ならびにかかるシステムおよび方法によって製造される物品に関する。より詳細には、本発明は、流体の精密な取り扱いのための高スループット微小流体デバイスの開発、および種々の生物学的アッセイ、化学的アッセイ、または診断的なアッセイにおけるかかるシステムの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

（背景）

流体送達、製品の製造、分析などのための所望の配置の流体の流れ、不連続な流体の流れ、液滴、粒子、分散物などを形成するための流体の操作は、比較的よく研究されている分野である。例えば、直径100ミクロン未満の高度に単分散の気泡は、毛細管流動フォーカシングと呼ばれる技術を使用して製造されてきた。この技術において、気体は、キャピラリーチューブから液体の槽まで強制的に押し出し、ここで、チューブは小さな開口部上に配置され、そしてこの開口部を通した外部液体の圧縮された流れが気体を薄い噴流に押し出し、これが、次には、毛細管の不安定さを通して等しいサイズの気泡に分かれる。同様の配置は、空気中の液滴を製造するために使用することができる。

【0003】

微小流体システムは、種々の状況において、典型的には、小型化実験室（例えば、臨床的）分析に関連して記載されてきた。他の用途も同様に記載されてきた。例えば、特許文献1は、表面上の物質、例えば、生物学的物質および細胞のパターンを提供するために使用可能な複数レベルの微小流体システムを記載している。他の刊行物は、バルブ、スイッチ、および他の構成要素を備えた微小流体システムを記載している。

【0004】

微小流体システムを用いる流体の流れの精密な操作は、流体に基づく多くの技術に革命を起こしつつある。小さなチャネルのネットワークは、少量の流体の精密な操作のための柔軟なプラットフォームである。かかる微小流体デバイスの有用性は、微小流体ペリスターポンプ、電気運動ポンプ、誘電泳動ポンプ、または電気湿潤ポンプ駆動流などの技術を可能にすることに決定的に依存する。かかるモジュールの完全なシステムへの組み立ては、微小流体デバイスを構築するための便利かつ強固な方法を提供する。しかし、実質的にすべての微小流体デバイスは、流体の流れの流量に基づいており；これが、拡散および表面吸収の効果の混合により、効果的に使用できる試薬の最少量の限度を設定している。小さな体積の大きさが縮小するので、拡散は混合のための主要なメカニズムとなり、反応物の分散に導く；さらに、濃度が低くかつ量が少ない場合に、反応物の表面吸収は、小さいが、高度に有害であり得る。結果として、現在の微小流体技術は、ごく少量の試薬を含む適用のために高い信頼性で使用することができない；例えば、単一の細胞上でのバイオアッセイまたは単一のビースを含むライブラリー検索は容易に実施されない。これらの制限を克服する代替的なアプローチは、非混和キャリア流体中での水性液滴の使用である；これらは、拡散または表面相互作用に起因する相互汚染または濃度の変化を除外する、特定の、カプセル化された微小環境を提供する。液滴は、さらなる操作および研究のために反応性物質、細胞、または小さな粒子を単離することができる理想的なマイクロカプセルを提供する。しかし、微小流体システムのためのこれまでに開発された本質的にすべての可能な技術が、単一相の流体の流れに焦点を当てており、液滴の取り扱い技術の開発を必要とする液滴を操作するための等価に有効な手段はほとんど存在していない。マクロ流体スケールまたはミクロ流体スケールにおける動力学において顕著な進歩がなされたが、技術の改善およびこれらの技術の結果がなお必要とされている。例えば、これらの反応装置のスケールが縮小するにつれて、表面吸収および拡散に起因する汚染効果が、使用され得る最少量を制限する。非混和キャリア流体の液滴中での試薬の閉じ込めが、これらの制限を克服するが、新たな流体取り扱い技術を要する。

【0005】

さらに、流体に対する電場の影響の基本的な物理法則は周知である。正電荷または負電荷に対して電場によって生成される引力および反発力は、電荷を有する流体の構成要素に

対する力、非極性分子の分極、および電場に沿って分子を整列させる極性分子上のトルクを生じる。不均一な電場においては、正に荷電した分配の部分上の力が負に荷電した部分上の力とは異なるため、極性分子は、より高い電場強度の領域に向かって正味の力もまた受ける。連続体極限において、その結果は流体中の動重力である。液滴の高い表面張力の極限において、流体上の正味の動重力を、あたかもそれが剛球であるかのように記述することは有用である：

【0006】

【化1】

$$F = qE + 2\pi R(\epsilon_m)r^3R(K)\nabla E^2$$

10

ここで、第1の項は液滴上の電気泳動力であり（ q は正味の液滴の電荷であり、 E は電場である）、第2の項は誘電泳動力である（ r は球の半径であり、

【0007】

【化2】

$R(K)$

はClausius-Mossotti因子の実数部分であり

$$K = (\epsilon_p^* - \epsilon_m^*) / (\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*)$$

そして ϵ_p^* および ϵ_m^* は液滴およびキャリア流体の複素誘電率である）。

【0008】

20

液滴の電気泳動制御の有用性は大きい、これは顕著な制限を有している。第1に、液滴の負荷は、ノズルにおいてのみ効率的に達成される。第2に、スクリーニング効果を除外するために必要とされる排出路は、液滴もまた排出する。第3に、キャリア流体の有限導電率は、小さいが、最終的に液滴を排出する。それゆえに、一旦液滴が形成すると、液滴の電荷密度に依存する任意の動重力機能を実施するための機会は本質的に1回のみであり（例えば、それらの相互のクーロン引力を通して反対の電荷を有する液滴を合体させること、または電気泳動的に液滴を分別すること）、そしてこの機能は、十分な電荷が液滴から漏出しない場合に限り実施することができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

30

【0009】

【特許文献1】国際公開第01/89788号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

従って、区画化および電気的操作を合わせる電氣的にアドレス可能な乳化系を開発することが望まれており、これは、種々の化学的アッセイ、生物学的アッセイ、およびスクリーニングアッセイにおいて、分析および分別を含む多段階の化学処理を可能にして、優れたタイミングおよび計量の正確さに制限されて開始され、かかるアッセイを実施するためのコストおよび時間が劇的に減少される。1つより多くの電氣的な動重力機能が液滴形成から有意に長時間遅れた後で実行することができるように、誘電泳動力（これは電荷密度に依存しない）を使用するデバイスを開発して液滴を操作することもまた望まれている。

40

【課題を解決するための手段】

【0011】

（発明の概要）

本発明は、生物学的適用、化学的適用、および診断的適用を迅速、効率的、および安価に実施するために必須である、単離された構成要素の多段階処理を実施するために、流体処理システムに合わせることができる個別の流体取り扱いモジュールを有する基材を提供する。液滴の電気的操作に基づく原理を使用することにより、本発明の微小流体基材は、液滴に試薬をカプセル化可能であり、これは組み合わせ、分析、および分別が可能である

50

。

【0012】

本発明は微小流体基材を提供する。この基材は、流体連通されるように、互いに一体型で配置されている複数の微小流体モジュールを含み得る。この基材は、例えば、以下を含み得る：(i) 少なくとも1つの分散相流体を運ぶように適合されている少なくとも1つの入口チャンネルを備えた少なくとも1つの入口モジュール、(ii) 少なくとも1つの連続相流体を運ぶように適合されている少なくとも1つの主チャンネルであって、ここで上記入口チャンネルが連結部において上記主チャンネルと流体連通され、そして上記連結部は、上記分散相流体が上記連続相流体と非混和性でありかつ上記連続相流体中で複数の高度に均一な単分散液滴を形成するように、フローフォーカシングのために設計された流体ノズルを備える、主チャンネル。分散相および連続相の流れは、例えば、圧力によって駆動することができる。分散相（例えば、液滴）は中性であり得、または電荷を有さず、そしてこれらの液滴は、連続相液体中で電場の中で操作（例えば、合流、分別）することができる。

【0013】

入口モジュールは、入口チャンネルにサンプル流体を導入するための手段に上記入口チャンネルを接続するための少なくとも1つの自己整合流体相互接続装置をさらに備えることができ、上記装置は、上記微小流体基材とサンプルを導入するための上記手段の間に放射状シールを形成する。上記手段は、例えば、温度制御可能なウェルまたはリザーバを備え得る。このウェルまたはリザーバは、任意に、音響アクチュエータを備え得る。

【0014】

微小流体基材は、合流モジュール、検出モジュール、分別モジュール、収集モジュール、廃棄モジュール、遅延モジュール（例えば、加熱モジュールおよび冷却モジュール）、液滴間隔モジュール、混合モジュール、UV放出モジュール、分割モジュール、および／または再順序付けモジュールを含むがこれらに限定されない1つ以上のさらなるモジュールを備え得る。これらのモジュールは、主チャンネルと流体連通されている。0個、1個、またはそれ以上の各々のモジュールが存在し得る。

【0015】

上記基材は、入口モジュールの下流にあり、かつ合流装置を備えた主チャンネルを介して入口モジュールと流体連通している少なくとも1つの合流モジュールをさらに備えることができ、ここで、そこを通過する2つ以上の液滴が合流してナノリアクターを形成する。

【0016】

上記基材は、上記合流モジュールの下流にあり、かつこれと流体連通している少なくとも1つの検出モジュールをさらに備えることができる。上記検出モジュールは、例えば、ナノリアクターの内容物および／または特徴を評価するための検出装置を備え得る。上記検出装置は光学的または電氣的検出器を備え得る。

【0017】

上記基材は、上記検出モジュールの下流にあり、かつこれと流体連通している分別モジュールをさらに備えることができる。上記分別モジュールは、検出モジュール中で評価されたナノリアクターの内容物または特徴に応答して、例えば上記ナノリアクターを収集モジュールの中にまたは収集モジュールから離れて方向付けるように適合された分別装置を備え得る。上記分別モジュール中のチャンネルは、非対称分岐ジオメトリまたは非対称分岐フローを含み得る。

【0018】

合流装置および分別装置は、1つ以上の電極またはパターン化された導電層を備えることができ、これらは電場を生成可能である。これらの電極は、導電性材料から作ることができ、基材の主チャンネルおよび入口チャンネルから単離された1つ以上のチャンネルに一体型で備えることができる。導電性材料は、金属合金成分または有機材料であり得る。導電材料は、1つ以上の導電性粒子を含むエポキシ樹脂であり得る。導電性粒子は銀粒子であり得る。

【0019】

10

20

30

40

50

合流モジュールは、上記電極間の主チャンネルの拡張部分をさらに備えて、連続する液滴を近接させ、それによって、対の液滴を電場の中で合流させ得る。上記合流モジュールは、電極間の主チャンネルの拡張部分の前に、液滴を主チャンネルの中心に集めるための主チャンネルの狭窄部分をさらに備え得る。

【0020】

微小流体基材のチャンネルは、分散相のための濡れ防止剤またはブロッキング剤でコートすることができる。濡れ防止剤またはブロッキング剤には、例えば、シリカプライマー相、続いて、パーフルオロアルキルアルキルシラン化合物、アモルファス溶解性パーフルオロポリマー、BSA、PEG-シラン、またはフルオロシランが含まれ得る。微小流体基材のチャンネルは、液滴の内容物を遅延、停止、または反応させるためにウェル様のくぼみを備え得る。

10

【0021】

この基材は、上記基材からのサンプルを保存するための手段に接続されている収集モジュール、および上記基材から廃棄されたサンプルを収集するための手段に接続されている廃棄モジュールをさらに備え得る。これらの手段は、温度制御され得るウェルまたはリザーバであり得る。

【0022】

この基材は、合流モジュールの下流にありかつ検出モジュールの上流にある、主チャンネルと流体連通している遅延モジュールをさらに備え得る。遅延モジュールは、遅延ライン、サーペントインチャンネル、浮遊アワーグラス、またはオフチップボリュームであり得る。好ましくは、サーペントインチャンネルは、1時間未満、時間を遅らせるために使用される。好ましくは、オフチップボリュームは、1時間より長く時間を遅らせるために使用される。遅延モジュールは、加熱領域および冷却領域をさらに備え得る。

20

【0023】

この基材は、合流モジュールの下流にありかつ検出モジュールの上流にある、主チャンネルと流体連通している混合モジュールをさらに備え得る。

【0024】

この基材は、入口モジュールの下流にありかつ合流モジュールの上流にある、主チャンネルと流体連通しているUV放出モジュールをさらに備え得る。

【0025】

この基材は、適切な液滴を合流のために近接させることを可能にするための、入口モジュールの下流にある、主チャンネルと流体連通している液滴間隔モジュールをさらに備え得る。

30

【0026】

微小流体基材のチャンネル中で使用される連続相は、例えば、フルオロカーボンオイルなどの非極性溶媒であり得る。この連続相は、液滴を安定化するために、界面活性剤またはフッ素系界面活性剤などの1種以上の添加物をさらに含み得る。フッ素系界面活性剤は、例えば、パーフルオロ化ポリエーテルであり得る。

【0027】

微小流体基材の分散相は、同じまたは異なるサイズの液滴のライブラリー（すなわち、エマルジョン流）または連続水流を含み得る。液滴のライブラリーには、例えば、組織、細胞、粒子、タンパク質、抗体、アミノ酸、ヌクレオチド、小分子、および医薬などの生物学的または化学的物質が含まれ得る。生物学的／化学的物質には、DNAタグ、色素、量子ドット、または高周波同定タグなどの標識を含み得る。液滴のライブラリーには、例えば、粘度の変化、不透明度の変化、体積の変化、密度の変化、pHの変化、温度の変化、誘電率の変化、伝導率の変化、液滴中に存在するビーズの量の変化、液滴中の綿状沈殿の量の変化、液滴中の選択した溶媒の量の変化、または液滴中の任意の測定可能な実体の量の変化、またはこれらの任意の組み合わせなどの標識が含まれ得る。標識は、蛍光偏光、蛍光強度、蛍光寿命、蛍光エネルギー移動、pH、イオン含量、温度、またはこれらの組み合わせによって検出可能である。

40

50

【0028】

本発明は、例えば、以下を備える微小流体基材もまた提供する：(i)少なくとも1つの分散相流体を運ぶように適合されている少なくとも1つの入口チャンネルを備えた少なくとも1つの入口モジュール；(ii)少なくとも1つの連続相流体を運ぶように適合されている少なくとも1つの主チャンネルであって、上記入口チャンネルが連結部において上記主チャンネルと流体連通され、そして上記連結部は、上記分散相流体が上記連続相流体と非混和性でありかつ上記連続相流体中で複数の高度に均一な単分散液滴を形成するように、フローフォーカシングのために設計された流体ノズルを備える、主チャンネル；(iii)上記主チャンネルが少なくとも2つの分割チャンネルに分割され、ナノリアクターが少なくとも2つの娘ナノリアクターに分けられる、上記入口モジュールの下流にある少なくとも1つのナノリアクター分割モジュール；(iv)少なくとも1つの第2の分散相流体を運ぶように適合されている少なくとも1つの第2の入口チャンネルであって、上記入口チャンネルが連結部において少なくとも1つの上記分割チャンネルと流体連通され、そして上記連結部は、上記第2の分散相流体が上記連続相流体と非混和性でありかつ上記連続相流体中で複数の高度に均一な単分散液滴を形成するように、フローフォーカシングのために設計された流体ノズルを備える、第2の入口チャンネル；(v)入口モジュールの下流にあり、かつこれと、合流装置を備える上記主チャンネルを介して流体連通している少なくとも1つの合流モジュールであって、ここで、そこを通過する工程(ii)からの少なくとも1つの液滴および工程(iv)からの少なくとも1つの液滴が合流する、合流モジュール；(vi)上記分割チャンネルからの娘ナノリアクターが近接して再順序付けられるが、合流されないような、分割モジュールの下流の少なくとも1つの再順序付けモジュール；および(vii)上記再順序付けモジュールの下流の少なくとも1つの検出モジュールであって、上記検出モジュールが近接したナノリアクターまたは液滴の少なくとも1つの内容物または特徴を評価するための検出装置を備える、検出モジュール。

10

20

【0029】

この微小流体基材は、検出モジュールと近接し、かつこれと流体連通している分別モジュールもまた備えることができ、分別モジュールは、検出モジュール中で評価された液滴またはナノリアクターの内容物または特徴に応答して、上記液滴またはナノリアクターを収集モジュールの中にまたは収集モジュールから離れて方向付けるように適合された分別装置を備える。

30

【0030】

この検出モジュールは、近接した2つのナノリアクターまたは液滴の内容物を評価することができ、分別モジュールは、検出モジュール中で評価された液滴またはナノリアクターの内容物または特徴の比率に応答して、上記液滴またはナノリアクターを収集モジュールの中にまたは収集モジュールから離れて方向付けることができる。

【0031】

本発明は、例えば、以下の工程を包含する、微小流体基材を製造する方法もまた提供する：(i)平らな表面を含む基板を提供する工程；(ii)微小基材のチャンネルおよび電極のパターンを含むマスターを提供する工程；(iii)エラストマー基材を成型するための開口部を備える成型キャビティを提供する工程；(iv)上記マスターが基板と成型キャビティの間に配置され、上記マスターのパターンが、上記エラストマー基材を成型するために上記開口部の直下に配置されかつそれに対して整列されるように、上記基板、上記マスター、および上記成型キャビティを組み立てる工程；(v)1つ以上の流体の相互接続および／または電気による相互接続を形成するために使用される1つ以上のスライド成型ピンを含む上端板を提供する工程；(vi)スライド成型ピンがマスター上のチャンネルおよび電極のパターン上の点に接触するように、上記上端板を工程dの成型キャビティ上に組み立てる工程；(vii)上記マスターと接触するように、液体エラストマーポリマーを該成型キャビティ上の開口部に導入する工程；(viii)上記成型キャビティ中で該エラストマーポリマーを固化させる工程；(ix)上記上端板、上記底板、および上記成型キャビティのアセンブリから、固化したエラストマーポリマー基材

40

50

を取り出す工程；ならびに（ix）上記固化したエラストマーポリマー基材を、適合可能なポリマー性媒体または非ポリマー性媒体に結合させる工程。スライド成型ピンはエラストマースリーブによって囲まれ得る。本発明は、提供する方法によって製造される微小流体デバイスもまた提供する。

【0032】

マスターはフォトリソグラフィーによって生成され、フォトリソグラフィーによって生成されかつ耐久性金属マスターに転換され、微細加工（micromachining）または光造形法などのラピッドプロトタイピング法によって生成される。マスターは、フォトレジストでパターン化されたケイ素またはガラス基材であり得る。好ましくは、マスターはSU-8でパターン化されたケイ素またはガラス基材である。

10

【0033】

エラストマーポリマーはシリコンエラストマーポリマーであり得る。好ましくは、シリコンエラストマーポリマーはポリジメチルシロキサンである。エラストマーポリマーは硬化によって固化することができる。エラストマーポリマーは、高強度酸素（high intensity oxygen）または空気プラズマ（air plasma）で処理されて、適合可能なポリマー性媒体または非ポリマー性媒体への結合を可能にすることができる。ポリマー性媒体または非ポリマー性媒体は、ガラス、ケイ素、酸化ケイ素、石英、窒化ケイ素、ポリエチレン、ポリスチレン、ガラス状炭素、またはエポキシポリマーであり得る。

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

20

（項目1）

微小流体基材であって：

a）少なくとも1つの分散相流体を運ぶように適合されている少なくとも1つの入口チャンネルを備えた少なくとも1つの入口モジュール；および

b）少なくとも1つの連続相流体を運ぶように適合されている少なくとも1つの主チャンネルであって、この入口チャンネルが連結部においてこの主チャンネルと流体連通され、この連結部は、この分散相流体がこの連続相流体と非混和性であり、かつこの連続相流体中で複数の高度に均一な単分散液滴を形成するように、フローフォーカシングのために設計された流体ノズルを備える、主チャンネル；

を備える、微小流体基材。

30

（項目2）

上記入口モジュールが、上記入口チャンネルにサンプル流体を導入するための手段に、この入口チャンネルを接続するための少なくとも1つの自己整合流体相互接続装置をさらに備え、この装置は、上記微小流体基材とサンプルを導入するためのこの手段の間に放射状シールを形成する、項目1に記載の微小流体基材。

（項目3）

上記手段がウェルまたはリザーバである、項目2に記載の微小流体基材。

（項目4）

上記入口モジュールの下流にあり、かつこの入口モジュールと、合流装置を備える上記主チャンネルを介して流体連通している少なくとも1つの合流モジュールをさらに備え、ここで、そこを通過する2つ以上の液滴が合流してナノリアクターを形成する、項目1に記載の微小流体基材。

40

（項目5）

上記合流装置が、電場を生成する1つ以上の電極を備える、項目4に記載の微小流体基材。

（項目6）

上記電極が、1つ以上のチャンネルに一体型で収容されており、かつ上記入口チャンネルおよび上記主チャンネルから単離されている導電性材料を含む、項目5に記載の微小流体基材。

（項目7）

上記合流モジュールが、上記電極間の主チャンネルの拡張部分を備えて、連続する液滴を近

50

接させ、それによって、対の液滴を上記電場の中で合流させる、項目 4 に記載の微小流体基材。

(項目 8)

上記合流モジュールが、液滴を上記主チャネルの中心に集めるためのこの主チャネルの狭窄部分、続いて連続する液滴を近接させるための上記電極間の主チャネルの拡張部分を備え、それによって、対の液滴を上記電場の中で合流させる、項目 4 に記載の微小流体基材。

(項目 9)

上記基材が、上記合流モジュールの下流にあり、かつこれと流体連通している少なくとも 1 つの検出モジュールをさらに備え、この検出モジュールは、液滴またはナノリアクターの内容物または特徴を評価するための検出装置を備える、項目 1 に記載の微小流体基材。

10

(項目 10)

上記検出装置が光学的検出器または電気的検出器を備える、項目 9 に記載の微小流体基材。

(項目 11)

上記基材が、上記検出モジュールと近接しており、かつこの検出モジュールと流体連通している分別モジュールをさらに備え、この分別モジュールは、この検出モジュール中で評価された液滴またはナノリアクターの内容物または特徴に応答して、この液滴またはナノリアクターを収集モジュールの中にまたは収集モジュールから離れて方向付けるように適合された分別装置を備えている、項目 1 に記載の微小流体基材。

20

(項目 12)

上記分別装置が電場を生成する 1 つ以上の電極を備える、項目 11 に記載の微小流体基材。

(項目 13)

上記電極が、1 つ以上のチャネルに一体型で収容されており、上記入口チャネルおよび上記主チャネルから単離されている導電性材料を含む、項目 12 に記載の微小流体基材。

(項目 14)

上記入口チャネルおよび上記主チャネルが上記分散相のための濡れ防止剤またはブロッキング剤でコートされている、項目 1 に記載の微小流体基材。

(項目 15)

上記チャネルが、シリカプライマー層、続いて、パーフルオロアルキルアルキルシラン化合物、アモルファス溶解性パーフルオロポリマー、BSA、PEG-シラン、またはフルオロシランでコートされている、項目 1 に記載の微小流体基材。

30

(項目 16)

上記チャネルが、シリカプライマー層、続いて、パーフルオロアルキルアルキルシラン化合物でコートされている、項目 1 に記載の微小流体基材。

(項目 17)

上記分別モジュール中のチャネルが非対称分岐ジオメトリーを含む、項目 11 に記載の微小流体基材。

(項目 18)

上記分別モジュール中のチャネルが非対称フロージオメトリーを含む、項目 11 に記載の微小流体基材。

40

(項目 19)

上記チャネルが、液滴の内容物を遅延、停止、または反応させるためにウェル様のくぼみを備える、項目 1 に記載の微小流体基材。

(項目 20)

上記基材が、上記入口モジュールの下流の主チャネルと流体連通している遅延モジュールをさらに備える、項目 1 に記載の微小流体基材。

(項目 21)

上記遅延モジュールが遅延ラインである、項目 20 に記載の微小流体基材。

50

(項目 2 2)

上記遅延モジュールが加熱領域および冷却領域をさらに備える、項目 2 0 に記載の微小流体基材。

(項目 2 3)

上記基材が、上記入口モジュールの下流の主チャネルと流体連通している混合モジュールをさらに備える、項目 1 に記載の微小流体基材。

(項目 2 4)

上記基材が、上記入口モジュールの下流の主チャネルと流体連通している UV 放出モジュールをさらに備える、項目 1 に記載の微小流体基材。

(項目 2 5)

上記基材が、この基材からのサンプルを保存するための手段に接続されている収集モジュールをさらに備える、項目 1 に記載の微小流体基材。

(項目 2 6)

上記手段がウェルまたはリザーバである、項目 2 5 に記載の微小流体基材。

(項目 2 7)

上記基材が、この基材から廃棄されたサンプルを収集するための手段に接続されている廃棄モジュールをさらに備える、項目 1 に記載の微小流体基材。

(項目 2 8)

上記手段がウェルまたはリザーバである、項目 2 7 に記載の微小流体基材。

(項目 2 9)

上記連続相が非極性溶媒である、項目 1 に記載の微小流体基材。

(項目 3 0)

上記連続相がフルオロカーボンオイルである、項目 1 に記載の微小流体基材。

(項目 3 1)

上記連続相が 1 種以上の添加物をさらに含む、項目 1 に記載の微小流体基材。

(項目 3 2)

上記添加物がフッ素系界面活性剤である、項目 3 1 に記載の微小流体基材。

(項目 3 3)

上記フッ素系界面活性剤がパーフルオロ化ポリエーテルである、項目 3 2 に記載の微小流体基材。

(項目 3 4)

上記フッ素系界面活性剤が上記液滴を安定化する、項目 3 2 に記載の微小流体基材。

(項目 3 5)

上記分散相が液滴のライブラリーを含む、項目 1 に記載の微小流体基材。

(項目 3 6)

上記液滴のライブラリーが生物学的／化学的物質を含む、項目 3 5 に記載の微小流体基材。

(項目 3 7)

上記生物学的／化学的物質が、組織、細胞、粒子、タンパク質、抗体、アミノ酸、ヌクレオチド、小分子、および医薬からなる群より選択される、項目 3 6 に記載の微小流体基材。

(項目 3 8)

上記生物学的／化学的物質が標識を含む、項目 3 6 に記載の微小流体基材。

(項目 3 9)

上記液滴のライブラリーが標識を含む、項目 3 5 に記載の微小流体基材。

(項目 4 0)

上記標識が、タンパク質、DNA タグ、色素、量子ドット、高周波同定タグである、項目 3 8 に記載の微小流体基材。

(項目 4 1)

上記標識が、粘度の変化、不透明度の変化、体積の変化、密度の変化、pH の変化、温度

10

20

30

40

50

の変化、誘電率の変化、伝導率の変化、上記液滴中に存在するビーズの量の変化、この液滴中の綿状沈殿の量の変化、この液滴中の選択した溶媒の量の変化、またはこの液滴中の任意の測定可能な実体の量の変化、またはこれらの組み合わせである、項目 39 に記載の微小流体基材。

(項目 42)

上記標識が、蛍光偏光、蛍光強度、蛍光寿命、蛍光エネルギー移動、pH、イオン含量、温度、またはこれらの組み合わせによって検出可能である、項目 38 に記載の微小流体基材。

(項目 43)

上記分散相流体の流れおよび上記連続相流体の流れが圧力によって駆動される、項目 1 に記載の微小流体基材。

10

(項目 44)

合流される液滴が電荷を有さない、項目 4 に記載の微小流体基材。

(項目 45)

分別されるナノリアクターが電荷を有さない、項目 11 に記載の微小流体基材。

(項目 46)

微小流体基材であって：

a) 少なくとも 1 つの分散相流体を運ぶように適合されている少なくとも 1 つの入口チャンネルを備えた少なくとも 1 つの入口モジュール；

b) 少なくとも 1 つの連続相流体を運ぶように適合されている少なくとも 1 つの主チャンネルであって、この入口チャンネルが連結部においてこの主チャンネルと流体連通され、この連結部は、この分散相流体がこの連続相流体と非混和性であり、かつこの連続相流体中で複数の高度に均一な単分散液滴を形成するように、フローフォーカシングのために設計された流体ノズルを備える、主チャンネル；

20

c) この入口モジュールの下流にある少なくとも 1 つのナノリアクター分割モジュールであって、この主チャンネルが少なくとも 2 つの分割チャンネルに分割され、ナノリアクターが少なくとも 2 つの娘ナノリアクターに分けられる、ナノリアクター分割モジュール；

d) 少なくとも 1 つの第 2 の分散相流体を運ぶように適合されている少なくとも 1 つの第 2 の入口チャンネルであって、この入口チャンネルが連結部において少なくとも 1 つのこの分割チャンネルと流体連通され、この連結部は、この第 2 の分散相流体がこの連続相流体と非混和性でありかつこの連続相流体中で複数の高度に均一な単分散液滴を形成するように、フローフォーカシングのために設計された流体ノズルを備える、第 2 の入口チャンネル；

30

e) この入口モジュールの下流にあり、かつこの入口モジュールと、合流装置を備えるこの主チャンネルを介して流体連通している少なくとも 1 つの合流モジュールであって、ここでそこを通過する工程 (b) からの少なくとも 1 つの液滴および工程 (d) からの少なくとも 1 つの液滴が合流する、合流モジュール；

f) この分割チャンネルからの娘ナノリアクターが近接して再順序付けられるが、合流されないような、この分割モジュールの下流の少なくとも 1 つの再順序付けモジュール；

g) この再順序付けモジュールの下流の少なくとも 1 つの検出モジュールであって、この検出モジュールが、近接したナノリアクターまたは液滴の少なくとも 1 つの内容物または特徴を評価するための検出装置を備える、検出モジュール；

40

を備える、微小流体基材。

(項目 47)

上記検出モジュールと近接し、かつこの検出モジュールと流体連通している分別モジュールをさらに備え、この分別モジュールが、この検出モジュール中で評価された液滴またはナノリアクターの内容物または特徴に応答して、この液滴またはナノリアクターを収集モジュールの中にまたは収集モジュールから離れて方向付けるように適合された分別装置を備えている、項目 46 に記載の方法。

(項目 48)

上記検出モジュールが、近接した 2 つのナノリアクターまたは液滴の内容物を評価し、上

50

記分別モジュールが、この検出モジュール中で評価された液滴またはナノリアクターの内容物または特徴の比率に応答して、この液滴またはナノリアクターを収集モジュールの中にまたは収集モジュールから離れて方向付ける、項目 47 に記載の方法。

(項目 49)

微小流体基材であって、以下のプロセス：

- a) 平らな表面を含む基板を提供する工程；
- b) 微小流体基材のチャンネルおよび電極のパターンを含むマスターを提供する工程；
- c) エラストマー基材を成型するための開口部を備える成型キャビティを提供する工程；

d) このマスターがこの基板とこの成型キャビティの間に配置され、このマスターのパターンが、エラストマー基材を成型するためにこの開口部の直下に配置されかつこの開口部に対して整列されるように、この基板、このマスター、およびこの成型キャビティを組み立てる工程；

e) 1 つ以上の流体および／または電気による相互接続を形成するために使用される 1 つ以上のスライド成型ピンを備える上端板を提供する工程；

f) このスライド成型ピンがこのマスター上のチャンネルおよび電極のパターン上の点に接触するように、この上端板を工程 d に記載の成型キャビティ上に組み立てる工程；

g) このマスターと接触するように、液体エラストマーポリマーをこの成型キャビティ上の開口部に導入する工程；

h) この成型キャビティ中でこのエラストマーポリマーを固化させる工程；

i) この上端板、底板、およびこの成型キャビティのアセンブリから、固化したエラストマーポリマー基材を取り出す工程；ならびに

j) この固化したエラストマーポリマー基材を、適合可能なポリマー性媒体または非ポリマー性媒体に結合させる工程；

よって製造され、それによって流体の相互接続および／または電氣的な相互接続を有する微小流体基材を形成する、微小流体基材。

(項目 50)

上記スライド成型ピンがエラストマースリーブによって囲まれている、項目 49 に記載の上端板。

(項目 51)

上記マスターがフォトリソグラフィーによって生成される、項目 49 に記載の微小流体基材。

(項目 52)

上記マスターがフォトリソグラフィーによって生成され、耐久性金属マスターに転換される、項目 49 に記載の微小流体基材。

(項目 53)

上記マスターが微細加工によって生成される、項目 49 に記載の微小流体基材。

(項目 54)

上記マスターが、光造形法などのラピッドプロトタイピング法によって生成される、項目 49 に記載の微小流体基材。

(項目 55)

上記マスターが、フォトレジストでパターン化されたケイ素またはガラス基材である、項目 49 に記載の微小流体基材。

(項目 56)

上記マスターが、SU-8 でパターン化されたケイ素またはガラス基材である、項目 49 に記載の微小流体基材。

(項目 57)

上記エラストマーポリマーがシリコンエラストマーポリマーである、項目 49 に記載の微小流体基材。

(項目 58)

10

20

30

40

50

上記シリコンエラストマーポリマーがポリジメチルシロキサンである、項目 57 に記載の微小流体基材。

(項目 59)

上記エラストマーポリマーが硬化によって固化される、項目 49 に記載の微小流体基材。

(項目 60)

上記エラストマーポリマーが、高強度酸素または空気プラズマで処理されて、上記適合可能なポリマー性媒体または非ポリマー性媒体への結合を可能にする、項目 49 に記載の微小流体基材。

(項目 61)

上記ポリマー性媒体および非ポリマー性媒体が、ガラス、ケイ素、酸化ケイ素、石英、窒化ケイ素、ポリエチレン、ポリスチレン、ガラス状炭素、またはエポキシポリマーである、項目 49 に記載の微小流体基材。

(項目 62)

微小流体基材を製造する方法であって、以下の工程：

a) 平らな表面を含む基板を提供する工程；

b) 微小流体基材のチャンネルおよび電極のパターンを含むマスターを提供する工程；

c) エラストマー基材を成型するための開口部を備える成型キャビティを提供する工程；

d) このマスターがこの基板とこの成型キャビティの間に配置され、このマスターのパターンが、エラストマー基材を成型するためにこの開口部の直下に配置されかつこの開口部に対して整列されるように、この基板、このマスター、およびこの成型キャビティを組み立てる工程；

e) 1 つ以上の流体の相互接続および／または電気による相互接続を形成するために使用される 1 つ以上のスライド成型ピンを備える上端板を提供する工程；

f) このスライド成型ピンがこのマスター上のチャンネルおよび電極のパターン上の点に接触するように、この上端版を工程 d の成型キャビティ上に組み立てる工程；

g) このマスターと接触するように、液体エラストマーポリマーをこの成型キャビティ上の開口部に導入する工程；

h) この成型キャビティ中でこのエラストマーポリマーを固化させる工程；

i) この上端板、底板、およびこの成型キャビティのアセンブリから固化したエラストマーポリマー基材を取り出す工程；ならびに

j) この固化したエラストマーポリマー基材を、適合可能なポリマー性媒体または非ポリマー性媒体に結合させる工程；

を包含し、それによって流体の相互接続および／または電氣的な相互接続を有する微小流体基材を形成する、方法。

(項目 63)

上記スライド成型ピンがエラストマースリーブによって囲まれている、項目 62 に記載の上端板。

(項目 64)

上記マスターがフォトリソグラフィーによって生成される、項目 62 に記載の微小流体基材。

(項目 65)

上記マスターがフォトリソグラフィーによって生成され、耐久性金属マスターに転換される、項目 62 に記載の微小流体基材。

(項目 66)

上記マスターが微細加工によって生成される、項目 62 に記載の微小流体基材。

(項目 67)

上記マスターが、光造形法などのラピッドプロトタイピング法によって生成される、項目 62 に記載の微小流体基材。

(項目 68)

10

20

30

40

50

上記マスターが、フォトレジストでパターン化されたケイ素またはガラス基材である、項目 6 2 に記載の微小流体基材。

(項目 6 9)

上記マスターが、SU-8 でパターン化されたケイ素またはガラス基材である、項目 6 2 に記載の微小流体基材。

(項目 7 0)

上記エラストマーポリマーがシリコンエラストマーポリマーである、項目 6 2 に記載の微小流体基材。

(項目 7 1)

上記シリコンエラストマーポリマーがポリジメチルシロキサンである、項目 7 0 に記載の微小流体基材。

(項目 7 2)

上記エラストマーポリマーが硬化によって固化される、項目 6 2 に記載の微小流体基材。

(項目 7 3)

上記エラストマーポリマーが、高強度酸素または空気プラズマで処理されて、上記適合可能なポリマー性媒体または非ポリマー性媒体への結合を可能にする、項目 6 2 に記載の微小流体基材。

(項目 7 4)

上記ポリマー性媒体および非ポリマー性媒体がガラス、ケイ素、酸化ケイ素、石英、窒化ケイ素、ポリエチレン、ポリスチレン、ガラス状炭素、またはエポキシポリマーである、項目 6 2 に記載の微小流体基材。

【0034】

他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する当該技術分野の当業者によって共通して理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似のまたは等価な方法および材料は本発明の実施または試験において使用することができるが、適切な方法および材料は以下に記載される。本明細書で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それらの全体が参照により援用される。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先する。加えて、材料、方法、および実施例は例示のみであり、限定を意図するものではない。

【0035】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および添付の特許請求の範囲から明らかになる。

【0036】

本発明の非限定的な実施形態は、概略的でありかつスケールで描かれることを意図しない、添付の図面を参照して、例証として記載される。図面の中では、図示される各々の同一またはほぼ同一の構成要素は、典型的には、単数字によって表される。明確さの目的のために、すべての構成要素がすべての図面において標識されているわけではなく、本発明の各々の実施形態のすべての構成要素が示されるわけでもなく、ここで、図示は、当業者が本発明を理解するために必要であるわけでもない。以下が図面の説明である。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図 1】図 1 は、本発明の微小流体基材の相互作用モジュールを図示する概略図である。

【図 2 A】図 2、パネル A および B は、ノズルセクションのための小さなフェルールを使用するノズルコンセプトの二重オイルバージョンおよび単一オイルバージョンを示す。パネル C および D は、小口径チュービングから直接的に作られる同じノズルを示す（「ノズル」はチュービングの全体の長さに達する）。

【図 2 B】図 2、パネル A および B は、ノズルセクションのための小さなフェルールを使用するノズルコンセプトの二重オイルバージョンおよび単一オイルバージョンを示す。パネル C および D は、小口径チュービングから直接的に作られる同じノズルを示す（「ノズル」はチュービングの全体の長さに達する）。

10

20

30

40

50

【図 2 C】図 2、パネル A および B は、ノズルセクションのための小さなフェルールを使用するノズルコンセプトの二重オイルバージョンおよび単一オイルバージョンを示す。パネル C および D は、小口径チュービングから直接的に作られる同じノズルを示す（「ノズル」はチュービングの全体の長さに達する）。

【図 2 D】図 2、パネル A および B は、ノズルセクションのための小さなフェルールを使用するノズルコンセプトの二重オイルバージョンおよび単一オイルバージョンを示す。パネル C および D は、小口径チュービングから直接的に作られる同じノズルを示す（「ノズル」はチュービングの全体の長さに達する）。

【図 3】図 3 は、図 2 A および 2 B に示されるノズルフェルールコンセプトの拡張を示す。

【図 4】図 4 は、フェルールに備えられるノズルセクションの拡張を示す。

【図 5】図 5 A は吸引モードにあるノズルの操作を示し、図 5 B は注入モードにあるノズルの操作を示す。

【図 6】図 6 は、導入されるサンプルよりも低い密度を有する流体でウェルが最初に満たされている、リザーバベースのサンプル乳化を示す。

【図 7】図 7 は、サンプルがサンプルポート中の液体よりも低い密度であるサンプル導入を図示し、これは、サンプルを乳化するために使用されるオイルよりも低い密度であるサンプルを導入するために使用される代替スキームである。

【図 8】図 8 は、ライブラリーウェルから直接的に単分散エマルジョンを作製するために、シリンジチップ（例えば、キャピラリーチュービング）に収集シリンジを接続するために使用されるフィッティングに直接的に形成されるノズルを図示する。ステップ 1 は、サンプルの吸引が、2 つのオイルシリンジの流速より上の流速（Q 3）において引っ込みモードで収集シリンジを作動させることによって、達成可能であることを示す。ステップ 2 は、キャピラリーチュービングに負荷されたサンプルの適切な量を示し、そしてキャピラリーチュービングはサンプルウェルから取り出され、気泡、およびおそらく、洗浄溶液が吸引される。ステップ 3 は、サンプルのほぼすべてが乳化されたときに、収集シリンジの引っ込み速度が、オイル流速より下に減少し、停止し、またはある程度の名目的な速度で注入するように設定されることを示す。

【図 9】図 9 は、試薬が第 2 の非混和性相の上端に注入される二相系を図示する。（A）注入の間、第 1 の相から第 2 の相までの移行の前。（B）移動ラインにちょうど入っている第 2 の相。（C）第 2 の相は移動ラインを完全に満たし、システム全体を通して全体の体積の試薬を押し出している。

【図 10】図 10 は異なる密度を有する 2 つの溶液間の超微量の液体（すなわち、ナノリットル以下）のサンドイッチを図示する。

【図 11】図 11 は P D M S デバイスを伴う使用のための可能な相互接続設計を図示する。

【図 12】図 12 は、液体相互接続の自己整合を図示する。

【図 13】図 13 は、単一のモノリシック自己整合部分に成型された、各チューブのために必要である相互接続を図示する。

【図 14】図 14 は、このコンセプトに基づく成型ツールの概略図を示す。ピン（オレンジ色）はエラストマー成型スリーブの中に捕捉され、強固な背面プレートおよびフォームラバーから作成された圧縮板は、穏やかな均一な圧力をピンに適用し、およびピンをマスターに均一に接触させるために必要とされる力を生成するために使用される。

【図 15】図 15 は、この拡大の直前の任意の小さな狭窄（ネックダウン）が、それらの道筋上の液滴を合流点により良好に整列させるために使用可能であることを示す、合流モジュールの改善の概略図である。

【図 16】図 16 は、蛍光偏光（F P）が溶液中の化合物の回転速度を測定し、そしてその体積の関数である（多くの場合において、体積は MW と相関する）ことを図示する。

【図 17】図 17 は、3 種の異なる化合物の蛍光偏光を示す。3 種の別個の種（F C、B T F C、および S A に結合した B T F C）を含む 18, 000 ドロップの偏光の読み取り

10

20

30

40

50

の結果。薬物スクリーニングアッセイ、タンパク質相互作用、またはDNAハイブリダイゼーションの読み取り結果のために理想的である。

【図18】図18A)は、液滴中の全体の蛍光偏光と全体の色素強度の両方を使用して、液体溶液をコードすることを図示する；B)は、複数の色の蛍光偏光を示し、FIが可能な標識の数を増加する。2種の色で10通りの蛍光偏光レベルを有する10通りの強度レベルは、10, 000種の標識を生じる。

【図19】図19は、異なる蛍光寿命を有する色素を使用するFPコーディングを図示する。これらは、一度に1つの構成要素が作られ、単一のシリンジに一晩保存し、次いでチップ上に戻してロードされる。コードは2つの異なる色素の比率を使用することによって作製し、1つは短い寿命、従って、高FPを有し、1つは長い寿命、従って、低FPを有する。この混合物は中間FPシグナルを有する。この強度は、2つの色素の全体の濃度を制御することによって調整される。

【図20A】図20A～20Dは、本発明の別の実施形態に従う液滴の分別および／または分割を図示する。

【図20B】図20A～20Dは、本発明の別の実施形態に従う液滴の分別および／または分割を図示する。

【図20C】図20A～20Dは、本発明の別の実施形態に従う液滴の分別および／または分割を図示する。

【図20D】図20A～20Dは、本発明の別の実施形態に従う液滴の分別および／または分割を図示する。

【図21A】図21A～Fは、非対称分別適用において使用される可能なフロージオメトリーを示す。

【図21B】図21A～Fは、非対称分別適用において使用される可能なフロージオメトリーを示す。

【図21C】図21A～Fは、非対称分別適用において使用される可能なフロージオメトリーを示す。

【図21D】図21A～Fは、非対称分別適用において使用される可能なフロージオメトリーを示す。

【図21E】図21A～Fは、非対称分別適用において使用される可能なフロージオメトリーを示す。

【図21F】図21A～Fは、非対称分別適用において使用される可能なフロージオメトリーを示す。

【図22A】図22は、非対称分別適用において使用される可能な電極ジオメトリーを示す。パネルAは、先端が短い電極を使用する設計を示す。パネルBは、液滴と電場の間の相互作用時間を増大させるための広い先端の電極を示す（先端は多くの滴下直径の長さであり得る）。パネルCは、収集ラインをまたぐ電極を示す。パネルDは、主チャネルの反対側の電極を示す。パネルEは非対称電極対を示す（非対称性は他の電極対配置のいずれかにも同様に存在し得る）。

【図22B】図22は、非対称分別適用において使用される可能な電極ジオメトリーを示す。パネルAは、先端が短い電極を使用する設計を示す。パネルBは、液滴と電場の間の相互作用時間を増大させるための広い先端の電極を示す（先端は多くの滴下直径の長さであり得る）。パネルCは、収集ラインをまたぐ電極を示す。パネルDは、主チャネルの反対側の電極を示す。パネルEは非対称電極対を示す（非対称性は他の電極対配置のいずれかにも同様に存在し得る）。

【図22C】図22は、非対称分別適用において使用される可能な電極ジオメトリーを示す。パネルAは、先端が短い電極を使用する設計を示す。パネルBは、液滴と電場の間の相互作用時間を増大させるための広い先端の電極を示す（先端は多くの滴下直径の長さであり得る）。パネルCは、収集ラインをまたぐ電極を示す。パネルDは、主チャネルの反対側の電極を示す。パネルEは非対称電極対を示す（非対称性は他の電極対配置のいずれかにも同様に存在し得る）。

10

20

30

40

50

【図 2 2 D】図 2 2 は、非対称分別適用において使用される可能な電極ジオメトリーを示す。パネル A は、先端が短い電極を使用する設計を示す。パネル B は、液滴と電場の間の相互作用時間を増大させるための広い先端の電極を示す（先端は多くの滴下直径の長さであり得る）。パネル C は、収集ラインをまたぐ電極を示す。パネル D は、主チャンネルの反対側の電極を示す。パネル E は非対称電極対を示す（非対称性は他の電極対配置のいずれかにも同様に存在し得る）。

【図 2 2 E】図 2 2 は、非対称分別適用において使用される可能な電極ジオメトリーを示す。パネル A は、先端が短い電極を使用する設計を示す。パネル B は、液滴と電場の間の相互作用時間を増大させるための広い先端の電極を示す（先端は多くの滴下直径の長さであり得る）。パネル C は、収集ラインをまたぐ電極を示す。パネル D は、主チャンネルの反対側の電極を示す。パネル E は非対称電極対を示す（非対称性は他の電極対配置のいずれかにも同様に存在し得る）。

【図 2 3】図 2 3 は、液滴を分け、2 つの娘液滴上で異なる実験を実施し、次いでデバイスが検出器を通して逐次的に通過するように再順序付けするデバイスの概略図を示す。

【図 2 4】図 2 4（パネル A）は、障害物マトリックスを規定するジオメトリーパラメーターを示す。（パネル B）は、3 つの液体流を示す。（パネル C）は、レーン 1 より大きな半径を有する粒子が、粒子の中心（黒色ドット）を通る流線をたどることを示す。

【図 2 5】図 2 5 は、種々のギャップサイズのマトリックスを用いる、 $0.80\text{ }\mu\text{m}$ （緑色）、 $0.90\text{ }\mu\text{m}$ （赤色）、および $1.03\text{ }\mu\text{m}$ （黄色）の直径を有する蛍光ミクロスフェアの高分解能分離を示す。

【図 2 6】図 2 6 は、一例としての 3 分の 1 の行シフト画分を伴う、マイクロポストのアレイ中での決定的側方置き換えによる分離を図示する概略図である。

【図 2 7】図 2 7 は、微細加工チップ上でのジデオキシヌクレオチド配列決定を示す。DNA 配列決定チップ設計のための 1 つの実施形態を示す。鋳型 DNA およびプライマーはステップ「添加 1」で合わされ、反応はホットスタートのために 95°C でインキュベートされる（位置 1）。次いで、反応は 20～30 回のサイクルを行い（位置 2）、その後、SAP および Exo I を「添加 2」で付加する。反応は、 37°C にて所定の時間の間インキュベートされ、次いで、SAP および Exo I 酵素は 95°C で不活化される（位置「4」）。SAP/Exo I 手順は、PCR 後に残っているヌクレオチドおよび一本鎖 DNA（プライマー）を分解する。ユニバーサル配列決定プライマー、ddNTP、および緩衝液は「添加 3」で添加され、PCR 配列決定反応が位置「5」において進行することが可能になる。最終反応産物が収集され、チップの外で保存することができる。

【図 2 8 A】図 2 8、パネル A は、ローリングサークル増幅を使用する TempliPhi 増幅プロセスの概略図を示す。パネル B は転写媒介反応を図示する。パネル C は鎖置き換え増幅を図示する。パネル D はヘリカーゼ依存性増幅の概略図を示す。

【図 2 8 B】図 2 8、パネル A は、ローリングサークル増幅を使用する TempliPhi 増幅プロセスの概略図を示す。パネル B は転写媒介反応を図示する。パネル C は鎖置き換え増幅を図示する。パネル D はヘリカーゼ依存性増幅の概略図を示す。

【図 2 8 C】図 2 8、パネル A は、ローリングサークル増幅を使用する TempliPhi 増幅プロセスの概略図を示す。パネル B は転写媒介反応を図示する。パネル C は鎖置き換え増幅を図示する。パネル D はヘリカーゼ依存性増幅の概略図を示す。

【図 2 8 D】図 2 8、パネル A は、ローリングサークル増幅を使用する TempliPhi 増幅プロセスの概略図を示す。パネル B は転写媒介反応を図示する。パネル C は鎖置き換え増幅を図示する。パネル D はヘリカーゼ依存性増幅の概略図を示す。

【図 2 9】図 2 9 は、エマルジョンベースのサンプル調製、サンプル調製、および DNA 配列決定を図示する。DNA フラグメントのランダムライブラリーは、全体のゲノムを剪断すること、および限界希釈によって単一 DNA 分子を単離することによって生成される。

【図 3 0】図 3 0 は、微小流体デバイス上で抗体を単離するための 1 つの方法を示す。

【図 3 1】図 3 1 は、微小流体デバイス上で抗体を単離するための代替方法を示す。

【図 3 2】図 3 2 は、微小流体デバイス上で抗体を単離するための本発明の方法を示す。右のパネルは、抗体および抗原を相互作用させるシグナルを増幅するために提案されている個々のステップの図式である。左のパネルは、微小流体デバイス上で使用されるチップのために設計されるような概略図である。

【図 3 3】図 3 3 は、全長抗体クローンのための遺伝的選択を示す。遺伝的選択は、E. coli を形質転換すること、および適切な糖が唯一の炭素源である培地上で増殖可能であるクローンを選択することによって、全長抗体クローンについて富化させるために使用することができる。

【図 3 4】図 3 4 は、本発明に従う多段階チップの概略図である。第 1 段階：液滴は C 2、収集ポートに送られる；第 2 段階：C 2 に収集された第 1 段階のエマルジョンは再注入してチップに戻され、第 2 段階ノズルの中に形成された液滴と 1 つにされる。

【図 3 5】図 3 5 は、23 対すべてのヒト染色体を一度に見ることを可能にするスペクトルプローブを使用する染色体分析を示し、各染色体の対は異なる蛍光色を塗布される。

【図 3 6】図 3 6 は、再生可能なバイオマスに基づく 6 つのビルディングブロックを有する未来のバイオベースエコノミー (Bio Based Economy) を示す。

【図 3 7】図 3 7 は、石油に基づく 8 つの再生可能でないビルディングブロックを示す。

【発明を実施するための形態】

【0038】

詳細な説明

本明細書に記載される微小流体デバイスおよび使用方法は、不活性な非混和性のオイル流によって完全に封入された水相液滴の作製および電気的操作に基づく。この組み合わせは、正確な液滴生成、高効率、電氣的にアドレス可能な液滴合流、および制御可能な、電氣的にアドレス可能な単一液滴分別を可能にする。微小流体デバイスは 1 つ以上のチャネルおよびモジュールを備える。微小流体基材の相互作用モジュールの概略的な一例は図 1 に示される。これらのモジュールの組み込みは、液滴ベースの、高スループット微小流体リアクターシステムのために必須の機能を付与する技術である。

【0039】

本発明の微小流体デバイスは、本明細書でさらに詳細に記載されるように、多数の生物学的、化学的、または診断的な適用のために利用することができる。

【0040】

基材

本発明の微小流体デバイスは 1 つ以上の分析ユニットを備える。「分析ユニット」は、微小基材、例えば、マイクロチップである。微小基材、基材、マイクロチップ、およびチップという用語は本明細書で交換可能に使用される。分析ユニットは、少なくとも 1 つの入口チャネル、少なくとも 1 つの主チャネル、少なくとも 1 つの入口モジュール、少なくとも 1 つの合流モジュール、および少なくとも 1 つの検出モジュールを備える。分析ユニットは 1 つ以上の分別モジュールをさらに備え得る。分別モジュールは、1 つ以上の出口モジュール (収集モジュールおよび廃棄モジュール) と流体連通している分岐チャネルと流体連通することができる。分別適用のために、少なくとも 1 つの検出モジュールは少なくとも 1 つの分別モジュールと協働し、検出器で生じたシグナルを経由して方向転換させる。「モジュール」および「チャネル」は互いに流体連通され、それゆえに重複することができ；すなわち、モジュールまたはチャネルが開始または終了する明確な境界が存在しなくてもよいことが理解されるべきである。本発明の複数の分析ユニットは、1 つのデバイスに合わせられてもよい。分析ユニットおよび特定のモジュールは本明細書により詳細に記載される。

【0041】

基材の寸法は典型的なマイクロチップのそれであり、側面あたり約 0.5 cm から約 1.5 cm の間、および厚みが約 1 ミクロンから約 1 cm までの範囲である。基材は透明であり得、カバーガラスなどの透明特性を有する材料で覆うことができ、例えば、光学顕微鏡などの光学機器によるレポーターの検出を可能にする。この材料は、機能的相互接続、例

えば、流体、電気、および／または光学的な相互接続のために穿孔することができ、デバイスへの相互接続の連結部が漏れ防止性であるように、デバイスの背面の界面をシールすることができる。かかるデバイスは、漏れを伴うことなく、流体チャネルへの高い圧力の適用を可能にし得る。

【0042】

本発明の特定の態様に従って、種々の材料および方法が使用され、本発明のシステムおよびデバイスの記載された構成要素のいずれかを形成することができる。ある場合において、選択される種々の材料は、種々の方法に対してそれ自体を役立てる。例えば、本発明の種々の構成要素は固体材料から形成することができ、ここでは、チャネルは、成型、微細加工使用、スピンコーティングおよび化学蒸着などのフィルム沈着プロセス、レーザー製造、フォトリソグラフィ技術、ウェットケミカルまたはプラズマプロセスを含むエッチング方法などを介して形成することができる。例えば、Scientific American, 248:44-55, 1983 (Angellら)を参照のこと。流体システムの少なくとも一部は、シリコンチップを成型することによってシリコンから形成することができる。本発明の種々の流体システムおよびデバイスのシリコンからの正確かつ効率的な形成のための技術は公知である。本発明のシステムおよびデバイスの種々の構成要素は、ポリジメチルシロキサン(「PDMS」)、ポリテトラフルオロエチレン(「PTFE」)、またはテフロン(登録商標)(Teflon(登録商標))などのエラストマーポリマーからもまた形成可能である。

【0043】

本発明のチャネルは、例えば、従来のフォトリソグラフィ技術を使用してシリコンチップをエッチングすること、またはWhitesidesおよびXia, Angewandte Chemie International Edition 37, 550 (1998)によって記載されるような「ソフトリソグラフィ」と呼ばれる微細加工技術を使用することによって、形成することができる。これらの方法および他の方法は、安価な小型化デバイスを提供するために使用されてもよく、ソフトリソグラフィの場合には、柔軟性、安定性、および機械的強度の改善などの有益な特性を有する強固なデバイスを提供することができる。光学的検出が利用される場合、本発明は、分子、細胞、小分子、または粒子懸濁物およびチャンバー材料からの最小限の光散乱もまた提供する。

【0044】

異なる構成要素は、異なる材料から形成可能である。例えば、底壁および側壁を備える基部は、シリコンまたはPDMSなどの不透明材料から形成可能であるが、上端部は、流動プロセスの観察および／または制御のために、ガラスまたは透明ポリマーなどの透明または少なくとも部分的に透明な材料から形成することができる。構成要素は、内部のチャネル壁に接触する流体に所望の化学的機能性を露出するように、コートすることができ、ここで、基部支持材料は正確な所望の機能性を有してはいない。例えば、構成要素は、図示されるように形成することができ、内部チャネル壁は別の材料でコードされる。本発明のシステムおよびデバイスの種々の構成要素を形成するために使用される材料、例えば、流体チャネルの内部壁をコートするために使用される材料は、とりわけ、流体システムを通して流れる流体に有害な影響を与えないか、またはそれによって有害な影響を受けない材料から、例えば、デバイスの中で使用される流体の存在下で化学的に不活性である材料から、望ましく選択されてもよい。

【0045】

本発明の種々の構成要素は、ポリマー性および／または柔軟性および／またはエラストマー性の材料から形成される場合に、硬化可能な流体で便利に形成され得、成型(例えば、レプリカ成型、注入成型、キャスト成型など)を介する形成を容易にする。硬化可能な流体は、流体ネットワークにおける、およびこれを伴う使用のために意図される流体を含み、および／またはそれを輸送することが可能である固体に、固化するように誘導可能であるかまたはそれに自発的に固化する、本質的に任意の流体であり得る。1つの実施形態において、硬化可能な流体は、ポリマー液体または液体ポリマー前駆体(すなわち、「プ

レポリマー」)を含む。適切なポリマー液体には、例えば、熱可塑性ポリマー、熱硬化性ポリマー、またはそれらの融点より上に加熱したかかるポリマーの混合物を含めることができる。別の例として、適切なポリマー液体は、適切な溶媒中に1種以上のポリマーの溶液を含んでもよく、この溶液は、例えば、蒸発による溶媒の除去の際に、固体ポリマー材料を形成する。例えば、融解状態から、または溶媒蒸発によって固化することができるかかるポリマー材料は当業者に周知である。その多くがエラストマー性である種々のポリマー材料もまた、型マスターの一方または両方がエラストマー材料から構成される実施形態のために、型または型マスターを形成するために適切である。かかるポリマーの例の非限定的なリストには、シリコンポリマー、エポキシポリマー、およびアクリル酸ポリマーの一般的クラスのポリマーが含まれる。エポキシポリマーは、一般的にエポキシ基、1, 2-エポキシイド、またはオキシランと呼ばれる3員環状エーテル基の存在によって特徴付けられる。例えば、ビスフェノールAのジグリシジルエーテルは、芳香族アミン、トリアジン、および脂環式バックボーンに基づく化合物に加えて、使用することができる。別の例には、周知のNovolacポリマーが挙げられる。本発明に従う使用のために適切なシリコンエラストマーの非限定的な例には、メチルクロロシラン、エチルクロロシラン、フェニルクロロシランなどのようなクロロシランを含む前駆体から形成されるものが含まれる。

【0046】

シリコンポリマー、例えば、シリコンエラストマー、ポリジメチルシロキサンが好ましい。PDMSポリマーの非限定的な例には、Dow Chemical Co., Midland, Mich.によって商品名シルガード(Sylgard)、および特に、シルガード182、シルガード184、およびシルガード186で販売されているものが含まれる。PDMSを含むシリコンポリマーには、本発明の微小流体構造の形成を単純化するいくつかの有益な特性を有する。例えば、かかる材料は安価であり、容易に利用可能であり、そして熱を用いる硬化を介してプレポリマー液体から固化することができる。例えば、PDMSは、典型的には、例えば、約65℃～約75℃の温度に、例えば、約1時間の曝露時間で、プレポリマー液体を曝露することによって硬化可能である。また、PDMSなどのシリコンポリマーはエラストマー性であり得、従って、本発明の特定の実施形態において必要である、比較的高いアスペクト比を有する非常に小さな特徴を形成するために有用であり得る。柔軟な(例えば、エラストマー性)成型またはマスターは、この点において有利であり得る。

【0047】

本発明は、互換性がない媒体にPDMSを結合する方法の改善を提供する。伝統的な結合実務(接着剤、エポキシなど)を使用して、PDMS、シリコン、テフロン(登録商標)、およびPEEKなどの材料に直接的に種々の材料(プラスチック、金属など)を結合する通常の方法は、PDMSなどの材料に対する結合剤の乏しい接着に起因して良好に作用しない。市販の表面活性剤による通常表面調製は、微小流体デバイス製造において良好に機能しない。この問題は、高強度酸素または空気プラズマを用いて結合されるようにPDMS表面を処理することによって除去される。このプロセスは、PDMSの最上層を、通常接着剤を用いて極度に良好に結合するガラスに転換する。UV硬化性接着剤(ロックタイル(LocTile)352、363、およびその他)を使用して、外部の流体ラインをPDMSに結合させるためのこの方法を使用する試験は、PDMS基材よりも強力である結合を生じ、結合の失敗の前にPDMSの破碎を生じる。本発明の方法は、高放射フラックス、波長の選択、および硬化曝露時間を組み合わせて、接着剤の結合強度を有意に増強する。

【0048】

PDMSなどのシリコンポリマーからの本発明の微小流体構造などの構造を形成することの1つの利点は、例えば、空気プラズマなどの酸素含有プラズマへの曝露によってかかるポリマーを酸化させる能力であり、その結果、酸化された構造は、それらの表面において、他の酸化されたシリコンポリマー表面に、または種々の他のポリマー材料および

非ポリマー材料の酸化された表面に架橋可能である化学基を含む。従って、構成要素は、別々の接着剤または他のシール手段の必要性なしで、他のシリコンポリマー表面、または酸化されたシリコンポリマー表面と反応性である他の基材の表面に、形成可能であり、次いで酸化可能であり、そして本質的に不可逆的にシール可能である。多くの場合において、シーリングは、シールを形成するために補助的な圧力を適用する必要性なしで、単に酸化シリコンを別の表面に接触させることによって、達成することができる。すなわち、あらかじめ酸化したシリコン表面が、適切な接合表面に対する接触接着剤として働く。具体的には、それ自体に対して不可逆的にシール可能であることに加えて、酸化PDMSなどの酸化シリコンもまた、それ自体以外の一連の酸化材料に不可逆的にシールすることができ、この材料には、例えば、PDMS表面へと同様の様式で（例えば、酸素含有プラズマへの曝露を介して）酸化されている、ガラス、ケイ素、酸化ケイ素、石英、窒化ケイ素、ポリエチレン、ポリスチレン、ガラス状炭素、およびエポキシポリマーが含まれる。本発明の状況において有用である酸化方法およびシーリング方法は、全体の成型技術と同様に、当該分野において、例えば、参照により援用される、「Rapid Prototyping of Microfluidic Systems and Polydimethylsiloxane」という標題の論文、Anal. Chem., 70: 474-480, 1998 (Duffyら)において記載されている。

10

【0049】

酸化シリコンポリマーからの本発明の微小流体構造（例えば、内部の、流動接触表面）を形成することに対する別の利点は、これらの表面が、典型的なエラストマーポリマーの表面（ここでは親水性の内部表面が所望される）よりもはるかに親水性であり得ることである。従って、かかる親水性チャネル表面は、典型的な、酸化されていないエラストマーポリマーまたは他の疎水性材料から構成される構造よりも、水溶液でより容易に満たしかつ濡らすことができる。

20

【0050】

1つの実施形態において、底壁は、1つ以上の側壁もしくは上端壁、または他の構成要素とは異なる材料から形成される。例えば、底壁の内部表面は、シリコンウェハもしくはマイクロチップの表面、または他の基材を含み得る。他の構成要素は、上記のように、かかる代替的な基材にシールすることができる。異なる材料の基材（底壁）にシリコンポリマー（例えば、PDMS）を含む構成要素をシールすることが所望される場合、基材は、酸化シリコンポリマーが不可逆的にシール可能である材料の群（例えば、ガラス、ケイ素、酸化ケイ素、石英、窒化ケイ素、ポリエチレン、ポリスチレン、エポキシポリマー、およびガラス状炭素の酸化されている表面）から選択されてもよい。または、当業者には明らかであるように、別個の接着剤、熱結合、溶剤結合、超音波溶接などの使用を含むがこれらに限定されない、他のシーリング技術が使用できる。

30

【0051】

チャネル

本発明の微小流体基材には、流体のための境界を形成するチャネルが含まれる。「チャネル」とは、本明細書で使用される場合、流体の流れを少なくとも部分的に方向付ける基材上または基材中の特徴を意味する。ある場合において、チャネルは、単一の構成要素、例えば、エッチング基材または成型ユニットによって、少なくとも部分的に形成されてもよい。チャネルは任意の断面形状、例えば、円形、卵形、三角形、不規則、正方形、または長方形（任意のアスペクト比を有する）などを有することができ、そしてカバーすることが可能でありまたはカバーしないこと（すなわち、チャネル周辺の外部環境に対して開いている）が可能である。チャネルが完全にカバーされている実施形態において、チャネルの少なくとも一部が完全に取り囲まれた断面を有し得、および／または全体のチャネルは、入口および出口を例外として、その任意の長さに沿って完全に取り囲まれてもよい。

40

【0052】

開いたチャネルは、一般的に、流体輸送に対する制御を容易にする特徴、例えば、構造的特性（長いくぼみ）および／または物理的もしくは化学的特徴（疎水性対親水性）およ

50

び／または流体に対して力を発揮し得る（例えば、力を含む）他の特徴を含む。チャンネルの中の流体は、部分的にまたは完全にチャンネルを満たしてもよい。ある場合において、流体は、ある様式で、例えば、表面張力を使用して（例えば、流体は、凹面または凸面のメニスカスなどのメニスカス中にあるチャンネルの中に保持されるように）、チャンネルまたはチャンネルの一部の中に保持または閉じ込められてもよい。物品または基材中において、いくつかの（またはすべての）チャンネルは、特定のサイズ以下であってもよく、ある場合において、例えば、約5mm未満、約2mm未満、約1mm未満、約500ミクロン未満、約200ミクロン未満、約100ミクロン未満、約60ミクロン未満、約50ミクロン未満、約40ミクロン未満、約30ミクロン未満、約25ミクロン未満、約10ミクロン未満、約3ミクロン未満、約1ミクロン未満、約300nm未満、約100nm未満、約30nm未満、約10nm未満、またはそれ以下の流体の流れに対して最大垂直寸法を有する。当然、ある場合において、より大きなチャンネル、チューブなどが、バルクに流体を保存するために、および／またはチャンネルに流体を送達するために使用することができる。1つの実施形態において、チャンネルはキャピラリーである。

【0053】

チャンネルの寸法は、例えば、流体が細胞を含む場合には、流体がチャンネルを通して自由に流れることが可能であるように選択されてもよい。チャンネルの寸法は、チャンネル中の流体の特定の容積測定的または直線的な流速を許容するように選択されてもよい。当然、チャンネルの数およびチャンネルの形状は、当業者に公知である任意の方法によって変化させることができる。ある場合において、1つより多くのチャンネルまたはキャピラリーが使用されてもよい。例えば、2つ以上のチャンネルが使用されてもよく、ここでは、チャンネルは互いの内部に配置されたり、互いに隣接して配置される、などである。

【0054】

主チャンネルの流れ中の液滴中にある（入口モジュールによって配置される）粒子（例えば、細胞）または分子については、デバイスのチャンネルは、好ましくは、約2ミクロンから1mmの間の直径を有する正方形である。このジオメトリーは、チャンネル中の秩序立った液滴の流れを容易にする。同様に、分析デバイス中での検出モジュールの体積は、典型的には、約0.1ピコリットルから500ナノリットルの間の範囲にある。

【0055】

「主チャンネル」は、1つ以上の液滴を合流させるための合流モジュール、液滴の検出（同定）または測定のための検出モジュール、および、存在する場合、検出モジュール中での検出に基づいて液滴を分別するための分別モジュールを過ぎて、分子、細胞、小分子、または粒子の流れを可能にする、本発明のデバイスのチャンネルである。主チャンネルは、典型的には、合流、検出、および／または分別モジュールと、ならびに入口モジュールの入口チャンネルと流体連通している。主チャンネルはまた、典型的には、出口モジュールと、および任意に分岐チャンネルと流体連通しており、その各々は収集モジュールまたは廃棄モジュールを有し得る。これらのチャンネルは、主チャンネルからの分子、細胞、小分子、または粒子の流れを可能にする。「入口チャンネル」は、主チャンネルへの分子、細胞、小分子、または粒子の流れを可能にする。1つ以上の入口チャンネルは、本発明のデバイスにサンプルを導入するための1つ以上の手段と連絡している。入口チャンネルは、入口モジュールにおいて主チャンネルと連絡している。

【0056】

微小流体基材は、液滴間の間隔を変化させる目的のために、液滴流の中の液滴間の流体を注入または除去するための1つ以上の流体チャンネルもまた含み得る。

【0057】

本発明のデバイスのチャンネルは、記載されるような任意のジオメトリーであり得る。しかし、このデバイスのチャンネルは、チャンネルの内容物が操作されるように、例えば、分別され、混合され、目詰まりを防止されるなどのように、特定のジオメトリーを含むことができる。

【0058】

10

20

30

40

50

微小流体基材は、生物学的／化学的材料の凝集を妨害し、そして液滴への封入の前に互いから分離される生物学的／化学的材料を維持するための様式で設計された特定のジオメトリーもまた含むことができる。チャンネル寸法のジオメトリーは、種々の方法によって凝集を妨害し、およびそれらを破壊するために変化させることができ、これらの方法には、ジオメトリー的な締め付け（（１つまたは一連の）狭い領域に細胞を通すこと、その寸法は、単一の細胞の寸法よりも小さいかまたはそれと比較可能である）、またはバリケード（動作を妨害するため、および細胞の凝集を破壊するために、動いている細胞の進路に対する一連のバリケードを配置する）が含まれるがこれらに限定されない。

【００５９】

チャンネルの両側に物質（例えば、細胞または他の粒子または分子）が接着することを妨害するために、チャンネル（および使用される場合はカバーガラス、）は接着を最小化するコーティングを有してもよい。かかるコーティングは、デバイスが製造された材料に固有であり得るか、またはチャンネルの構造的態様が微細加工された後で適用されてもよい。「テフロン（登録商標）（T E F L O N）」は適切な表面特性を有するコーティングの一例である。微小流体デバイスのチャンネルの表面は、分散相のための任意の濡れ防止剤またはブロッキング剤でコートすることができる。チャンネルは、生物学的／化学的サンプルの接着を防止するために任意のタンパク質でコートすることができる。例えば、１つの実施形態において、チャンネルは、B S A、P E G－シラン、および／またはフルオロシランでコートされる。例えば、5 m g / m l B S Aが、付着を防止するため、および目詰まりを防止するために十分である。別の実施形態において、チャンネルは、商品名サイトップ（C y t o p）でA s a h i G l a s s C o . によって販売されている型のようなパーフルオロ（アルケニルビニルエーテル）の共重合によって得られる環化透明光学ポリマーでコートすることができる。かかる実施形態において、コーティングは、C T－S o l v 1 8 0 中で0 . 1 ~ 0 . 5 w t % 溶液のC y t o p C T L－8 0 9 Mから適用される。この溶液は、プラスチックシリンジを介して、微小流体デバイスのチャンネルに注入することができる。次いで、このデバイスは、約9 0 ℃まで2 時間加熱し、続いて2 0 0 ℃でさらに2 時間加熱することができる。別の実施形態において、このチャンネルは、商品名アクアペル（A q u a p e l）でP P G I n d u s t r i e s , I n c . によって販売され、参照により本明細書に援用される米国特許第5, 5 2 3, 1 6 2 号に開示されている型の疎水性コーティングでコートすることができる（例えば、シリカプライマー層の使用と合わせた、プラスチックおよびコートしたプラスチック基材表面のパーフルオロアルキルアルキルシラン表面処理）。チャンネルの表面をフッ素化することによって、連続相はチャンネルを優先的に濡らし、デバイスを通しての液滴の安定な生成および移動を可能にする。チャンネル壁の低い表面張力は、それによって、チャンネルを目詰まりさせる微粒子の蓄積を最小化する。

【００６０】

微小流体デバイスのチャンネルの表面は、望ましくない濡れ挙動を妨害するためにフッ素化することもできる。例えば、微小流体デバイスは、（トリデカフルオロー１，１，２，２－テトラヒドロオクチル）トリクロロシランの栓なしボトルとともにポリカーボネートデシケーター中に配置することができる。このデシケーターは5 分間空気を抜き、次いで2 0 ~ 4 0 分間シールする。次いで、このデシケーターに空気を戻して、除去する。このアプローチは、単純な拡散メカニズムを使用して、フルオロシランでの微小流体デバイスのチャンネルの容易な浸透を可能にし、同時のデバイスフッ素化のために容易にスケールアップできる。

【００６１】

流体

本発明の微小流体デバイスは、デバイスの中の流体および実体の方向および流れを制御可能である。「流れ」という用語は、本発明のデバイスまたは方法を通しての液体または固体の任意の動きを意味し、ならびに、非限定的に任意の流体の流動を包含し、および、物質がその流動によって運ばれているか否かに関わらず、その流動とともに、その流動の

中で、またはその流動に逆らって動いている任意の物質を包含する。例えば、本発明のデバイスを通しての、または本発明の方法における、例えば、本発明の微小流体チップのチャンネルを通しての分子、ビーズ、細胞、またはビリオンの動きは、流れを含む。これは、本発明に従って、分子、ビーズ、細胞、もしくはビリオンが、流れもまた含む流体の流動によって運ばれるか否かに関わらず、または分子、ビーズ、細胞、またはビリオンが何らかの他の直接的もしくは間接的な力もしくは動機付けによって動かされるか否かに関わらず、そして任意の動機付けする力が既知であるかもしくは理解されているか否かに関わらず、そのようになっている。任意の力の適用は、分子、細胞、またはビリオンが本発明に従って検出、測定、または分別のために方向付けられる限りにおいて、任意の特定の作用の理論またはメカニズムに関わりなく、圧力、キャピラリー作用、電気浸透、電気泳動、誘電泳動、光ピンセット、およびこれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない、流れを提供するために使用されてもよい。特定の流れ力は、本明細書でさらに詳細に記載される。

10

【0062】

主チャンネルにおける流れの流動は、典型的には、連続しているが、これは必ずしも必要なわけではなく、停止および開始してもよく、速度が逆転または変化してもよい。サンプルの分子、細胞、または粒子を含まない液体は、サンプルの入口ウェルまたはチャンネルに導入し、使用のためにデバイスを水和および準備するために、例えば、キャピラリー作用によって、入口モジュールを通して方向付けることができる。同様に、緩衝液またはオイルもまた、使用のためにデバイスをパージし（例えば、または「停滞」空気）、そしてデバイスを準備するために、主チャンネルと直接的に連絡している主入口領域に導入することができる。所望される場合、圧力は、例えば、出口モジュールに緩衝液またはオイルを加えることによって、調整または均等化することができる。

20

【0063】

本明細書で使用される場合、「流体流動」または「流体の流動」という用語は、典型的には、一般的に、特定の方向にある流体の流れをいう。流体の流動は、連続的であってもよいし、および／または不連続的であってもよい。「連続的な」流体の流動は、例えば、連続的な流体の流動がチャンネルから産生される場合に、単一の実体として産生される流体の流動であり、流体の流動は、産生後に、チャンネル出口と連続しているようである。連続的な流体の流動は、連続相流体またはキャリア流体とも呼ばれる。連続的な流体の流動は、ある場合において、層流または乱流であってもよい。

30

【0064】

同様に、「不連続な」流体の流動は、単一の実体として産生されない流体の流動である。不連続な流体の流動は、分散相流体またはサンプル流体とも呼ばれる。不連続な流体の流動は、任意に、第2の流体によって取り囲まれた個々の液滴の外見を有する可能性がある。「液滴」は、本明細書で使用される場合、第2の流体によって完全に取り囲まれた第1の流体の単離された部分である。ある場合において、液滴は、球状または実質的に球状であり得る；しかし、他の場合において、液滴は非球状であり得、例えば、液滴は、例えば、外部環境に依存して、「小塊」または他の不規則な形状の外見を有し得る。本明細書で使用される場合、閉ループが、第2の実体のみを通して第1の実体の周辺に描かれるか、または理想化されるならば、第1の実体は第2の実体によって「取り囲まれる」。分散相流体は、生物学的／化学的物質を含み得る。生物学的／化学的物質は、組織、細胞、粒子、タンパク質、抗体、アミノ酸、ヌクレオチド、小分子、および医薬であり得る。生物学的／化学的物質は、当該分野において公知である1種以上の標識を含み得る。この標識は、DNAタグ、色素、または量子ドット、またはこれらの組み合わせであり得る。

40

【0065】

液滴

「エマルジョン」という用語は、第2の液体の本体における小球（本明細書では、滴、液滴、またはナノリアクターとも呼ばれる）中に分布する1種の液体の調製物をいう。第1の流体および第2の流体は、互いに非混和性である。例えば、不連続相は水溶液であり

50

得、連続相はオイルなどの疎水性流体であり得る。これは、油中水型エマルジョンと呼ばれる。または、エマルジョンは、水中油であり得る。この例において、小球中に分散される第1の液体は不連続相と呼ばれるのに対して、第2の液体は連続相または分散媒体と呼ばれる。連続相は水溶液であり得、非連続相はオイル（例えば、デカン、テトラデカン、またはヘキサデカン）などの疎水性流体である。水中油エマルジョン中のオイルの液滴または小球は、本明細書では、「ミセル」とも呼ばれるのに対して、油中水エマルジョン中の水の小球は「逆ミセル」と呼ばれ得る。

【0066】

流体の液滴は、各々が実質的に同じ形状および／またはサイズであり得る。形状および／またはサイズは、例えば、液滴の平均直径または他の特徴的な寸法を測定することによって決定することができる。複数のまたは一連の液滴の「平均直径」は、各々の液滴の平均直径の算術平均である。当業者は、例えば、レーザー光散乱、顕微鏡検査、または他の公知の技術を使用して、複数のまたは一連の液滴の平均直径（または他の特徴的な寸法）を決定することが可能である。非球状液滴中の液滴の直径は、全体の表面を横切って組み込まれている、数学的に定義された、液滴の平均直径である。液滴（および／または複数のもしくは一連の液滴）の平均直径は、ある場合において、例えば約1 mm未満、約500マイクロメートル未満、約200マイクロメートル未満、約100マイクロメートル未満、約75マイクロメートル未満、約50マイクロメートル未満、約25マイクロメートル未満、約10マイクロメートル未満、または約5マイクロメートル未満であり得る。平均直径はまた、特定の場合において、少なくとも約1マイクロメートル、少なくとも約2 20 マイクロメートル、少なくとも約3マイクロメートル、少なくとも約5マイクロメートル、少なくとも約10マイクロメートル、少なくとも約15マイクロメートル、または少なくとも約20マイクロメートルでもあり得る。

【0067】

本明細書で使用される場合、「ナノリアクター」という用語およびその複数形は、本明細書で定義されるような「液滴」、「ナノ滴」、「ナノ液滴」、「微小滴」、または「微小液滴」という用語、ならびに、本明細書で詳細に記載されるような、液滴の操作およびプローブのための統合システムを包含する。本明細書に記載されるようなナノリアクターは、0.1～1000 μm （例えば、0.1、0.2...5、10、15、20、25、30、35、40、45、50...1000）またはこの範囲内の任意のサイズであり得る。これらの寸法の液滴は、それらのそれぞれの体積を維持しながら、チャネルのサイズおよび形状に適合する傾向がある。従って、液滴がより広いチャネルからより狭いチャネルに移動するにつれて、これらはより長くかつ薄くなり、逆もまた然りである。

【0068】

本発明の微小流体基材は、最も好ましくは、円形の、単分散液滴を生成する。これらの液滴は、微小チャネルの直径よりも小さい直径を有することができ；すなわち、好ましくは、細胞が使用される場合には15～100 μm ；試薬もしくは他の化学物質もしくは生物学的因子が使用される場合には、10～75 μm ；または、液滴が取り出され、他の収集装置、例えば、マイクロタイタープレートに分配され、もしくは配列決定デバイスの中で利用されるように、液滴が反応を配列決定するために使用される場合には、100～1 40 000 μm である。例えば、高スループットデバイス、ならびに、高頻度および高均一性で液滴を生成することが望ましい他の実施形態において、単分散液滴が特に好ましい。

【0069】

液滴を形成する液体は、典型的には、水性緩衝液、例えば、超純水（例えば、カラムクロマトグラフィーによって得られる、例えば、18 Ω オーム抵抗）、10 mM Tris HCl および 1 mM EDTA (TE) 緩衝液、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS)、または酢酸緩衝液である。分析および／または分別される分子、細胞、または粒子の集団と生理学的に適合性である任意の液体または緩衝液を使用することができる。主チャネルを通過し、そして液滴がその中に形成される流体は、液滴を形成する流体と非混和性であるものである。主チャネルを通過する流体は、非極性溶媒、デカン（例えば、テトラデカ 50

ンまたはヘキサデカン)、フルオロカーボンオイル、シリコンオイル、または別のオイル(例えば、ミネラルオイル)であり得る。

【0070】

分散相流体は、デバイスの中での組み合わせ、分析、および／または分別のための、生物学的／化学的物質(例えば、分子、細胞、または他の粒子)を含み得る。分散相流体の液滴は、1個より多くの粒子を含むことができ、または1個以下の粒子を含むことができる。例えば、生物学的材料が細胞を含む場合、各液滴は、好ましくは、平均して、1個以下の細胞を含む。しかし、ある実施形態において、各液滴は、平均して、少なくとも1000個の細胞を含んでもよい。これらの液滴は、それらの内容物に従って、検出および／または分別することができる。

10

【0071】

液滴中の分子、細胞、または粒子の濃度(すなわち、数)は、分別効率に影響を与える可能性があり、それゆえに、好ましくは最適化される。特に、サンプル濃度は十分に薄いべきであり、大部分の液滴が単一の分子、細胞、または粒子を超えずに含み、1つの液滴が2つ以上の分子、細胞、または粒子を含むという小さな統計学的偶然のみを伴う。大多数の測定については、検出モジュールを通過するときに各液滴中で測定されるレポーターのレベルは、単一の分子、細胞、または粒子に一致し、2つ以上の分子、細胞、または粒子には一致しない。

【0072】

この関連性を支配するパラメーターは、液滴の体積、およびサンプル溶液中の分子、細胞、または粒子の濃度である。液滴が2つ以上の分子、細胞、または粒子を含む確率($P_{\geq 2}$)は、以下のように表現され得る

20

【0073】

【化3】

$$P_{\geq 2} = 1 - \{1 + [\text{細胞}] \times V\} \times e^{-[\text{細胞}] \times V}$$

ここで、[細胞]は、立方ミクロン(μm^3)あたりの分子、細胞、または粒子の数の単位での分子、細胞、または粒子の濃度であり、Vは μm^3 の単位での液滴の体積である。

30

【0074】

$P_{\leq 2}$ は、サンプル溶液中の分子、細胞、または粒子の濃度を減少させることによって最小化できることが理解される。しかし、サンプル溶液中の分子、細胞、または粒子の濃度を減少させることは、デバイスを通して処理される溶液の体積の増加もまた生じ、より長い実行時間を生じ得る。従って、液滴中の複数の分子、細胞、または粒子の存在を最小化すること(それによって、分別の正確さを増加させること)、およびサンプルの体積を減少させ、それによって、分子、細胞、または粒子の受容可能な濃度を含む合理的な体積で、合理的な時間内にサンプルの分別を可能にすることが望ましい。

【0075】

最大耐容性 $P_{\leq 2}$ は、分別されたサンプルの所望の「純度」に依存する。この場合の「純度」は、所望の特性を有する(例えば、特定の抗原を提示し、特定のサイズ範囲にあり、または特定の型の分子、細胞、または粒子である)、分別した分子、細胞、または粒子の画分をいう。分別したサンプルの純度は $P_{\leq 2}$ に反比例する。例えば、高純度が必要とされておらずまたは所望されていない適用において、比較的高い $P_{\leq 2}$ (例えば、 $P_{\leq 2} = 0.2$)が受容可能である。多くの適用において、 $P_{\leq 2}$ を約0.1以下に、好ましくは約0.01以下に維持することは、満足の行く結果を提供する。

40

【0076】

微小流体デバイスにおいて液滴を生成するために使用される流体は、典型的には、オイルおよび水のような非混和性液体である。これらの2つの物質は、互いに関連した、非常に異なる誘電率を一般的に有する。これらの違いは、微小流体デバイスの小さなセクショ

50

ンを通過しているすべての液滴について、液滴の速度およびサイズを決定するために利用することができる。この誘電定数の変動を直接的にモニターするための1つの方法は、密接して間隔の空いた対の電極間で経時的な静電容量の変化を測定する。この静電容量の変化は、これらの電極において測定される電流の変化によって検出することができる：

【0077】

【化4】

$$i = V \frac{dC}{dt}$$

ここで、 i は電流であり、 V は電極を横切って適用される電圧であり、そして dC/dt は経時的な静電容量の変化である。または、静電容量は、時間で変化する電圧が同じ電極に適用される場合に、直接的に測定することができる： $i = C dV/dt$ ここで、 C は測定された静電容量であり、 dV/dt は経時的な電圧の変化である。第1の近似として、電極対は、平行板コンデンサーとして決定することができる：

【0078】

【化5】

$$C = \epsilon_0 k \frac{A}{d}$$

ここで、 ϵ_0 は自由空間の誘電率であり、 k は有効誘電定数であり（これは、液滴が通過する度に毎回変化する）、 A はコンデンサーの領域であり、 d は電極分離である。次いで、デバイス中で測定される電流は、時間の関数としてプロットされる。

【0079】

流体の液滴は、さらなる実体、例えば、他の化学的、生化学的、または生物学的実体（例えば、流体中に溶解または懸濁される）、細胞、粒子、ガス、分子などを含んでもよい。ある場合において、液滴は、上記に議論したように、各々が実質的に同じ形状またはサイズであり得る。特定の例において、本発明は、その中の実質的に均一な数の種の实体（すなわち、分子、細胞、粒子など）から本質的になる液滴の製造を提供する。例えば、複数のまたは一連の液滴の約90%、約93%、約95%、約97%、約98%、または約99%、またはそれ以上が、同じ数である特定の種の实体を各々含み得る。例えば、製造される流体の液滴の実質的な数は、例えば、上記のように、1個の実体、2個の実体、3個の実体、4個の実体、5個の実体、7個の実体、10個の実体、15個の実体、20個の実体、25個の実体、30個の実体、40個の実体、50個の実体、60個の実体、70個の実体、80個の実体、90個の実体、100個の実体などを各々含んでもよく、ここで、これらの実体は、分子または高分子、細胞、粒子などである。ある場合において、液滴は、一定の範囲の実体、例えば、20個未満の実体、15個未満の実体、10個未満の実体、7個未満の実体、5個未満の実体、または3個未満の実体を各々独立して含んでもよい。ある実施形態において、液滴は、100, 000, 000個の実体を含んでもよい。他の実施形態において、液滴は、1, 000, 000個の実体を含んでもよい。

【0080】

流体の液滴を含む液体中で、そのいくつかは目的の種を含み、そのいくつかは目的の種を含まず、流体の液滴は、以下にさらに記載されるように（例えば、蛍光または上記に記載されるような他の技術を使用する）、それらの種を含む流体の液滴についてスクリーニングまたは分別されてもよく、そしてある場合において、液滴は、例えば、前に記載されたように、目的の種の実体の特定の数または範囲を含む流体の液滴についてスクリーニングまたは分別されてもよい。従って、ある場合において、複数のまたは一連の流体の液滴は、そのいくつかがそれらの種を含み、それらのいくつかがそれらの種を含まないが、例えば、ある場合において、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約5、少なくと

10

20

30

40

50

も約10、少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約50、少なくとも約100、少なくとも約125、少なくとも約150、少なくとも約200、少なくとも約250、少なくとも約500、少なくとも約750、少なくとも約1000、少なくとも約2000、少なくとも約5000、またはそれ以上の因数でそれらの種を含む液滴の比率で富化されてもよい（枯渇されてもよい）。他の場合において、富化（または枯渇）は、少なくとも 10^4 、少なくとも 10^5 、少なくとも 10^6 、少なくとも 10^7 、少なくとも 10^8 、少なくとも 10^9 、少なくとも 10^{10} 、少なくとも 10^{11} 、少なくとも 10^{12} 、少なくとも 10^{13} 、少なくとも 10^{14} 、少なくとも 10^{15} 、またはそれ以上の比率であってもよい。例えば、特定の種を含む流体の液滴は、種々の種を含む流体の液滴のライブラリーから選択されてもよく、ここで、このライブラリーは、約100個、約10³個、約10⁴個、約10⁵個、約10⁶個、約10⁷個、約10⁸個、約10⁹個、約10¹⁰個、約10¹¹個、約10¹²個、約10¹³個、約10¹⁴個、約10¹⁵個、またはそれ以上の品目、例えば、DNAライブラリー、RNAライブラリー、タンパク質ライブラリー、コンビナトリアルケミストリーライブラリーなどを有してもよい。特定の実施形態において、次いで、これらの種を有する液滴は、例えば、反応を開始または決定するために、以下でさらに詳細に記載されるように、融合、反応、またはさもなくば使用もしくは処理されてもよい。

【0081】

サンプル流体の液滴は、微小流体デバイス上の入口モジュールの中に形成することができ、または液滴（もしくは液滴ライブラリー）は、サンプル流体が微小流体デバイスに導入される前に形成することができる（「オフチップ」液滴形成）。効果的な相互嵌合、合流、及び検出を可能にするために、分析される各々のサンプルを含む液滴は単分散でなくてはならない。本明細書でより詳細に記載されるように、多くの適用において、分析される異なるサンプルは異なるサイズの液滴の中に含まれる。液滴のサイズは、液滴が分析および合流のために正確な内容物を適切に含むことを保証するために高度に制御されなければならない。このようにして、本発明は、液滴および液滴のライブラリーを形成するためのデバイスおよび方法を提供する。

【0082】

微小流体基材上でサンプル液滴を形成するためのデバイスおよび方法

本発明は、微小流体基材上でサンプル液滴エマルジョンを形成するための組成物および方法を提供する。本発明は埋め込み微小流体ノズルもまた提供する。ライブラリーウェルから直接的に単分散エマルジョンを作製するために、本発明は、図2～6に示されるような、シリンジ先端（例えば、キャピラリーチューブ）に保存ウェル／リザーバ（例えば、シリンジ）を接続するために使用されるフィッティング内までのノズルを形成する。図2、パネルAおよびBは、ノズルセクションのための小さなフェルールを使用するノズルコンセプトの二重および単一オイルバージョンを示す。図2、パネルCおよびDは、小口径チュービングから直接的に作られる同じノズルを示す（「ノズル」はチュービングの全体の長さに及ぶ）。両方の設計は、全く同様に液滴を形成可能であるが、チューブベースのノズルでは圧力の低下がより高い（下側）。図3は、図2Aおよび2Bにおいて示されるノズルフェールの拡張を示す。チューブベースのノズルは、「ノズル」が短い移行部分を有する代わりにチューブの全体の長さに及ぶこと以外は、フェニルルールの場合と全く同一に機能する（図2C、2D）。液滴を形成する能力は、両方の場合で同一である。図4は、フェルールに含まれるノズルセクションの拡張を示す。図2DのT型設計が構築および試験され、この設計の断面のカットは図5に示される。図5Aは吸引モードにあるノズルの操作を示し、図5Bは注入モードにあるノズルの操作を示す。形成した液滴は約45 μm直径であり、PCRミックス（210 μl／時間）およびSpectraSyn-10（600 μl／時間）から形成された。他の試験は、SpectraSyn-2およびPCRミックスを用いて実証した。液滴は、300 μm幅×260 μm深さのチャンネルの中を移動している。使用したノズルチューブは100 μm直径であり、使用した流体はPCRミックスおよび界面活性剤を有するSpectasyn-10であった。

【0083】

流れは三次元的であるので、この設計では、表面の濡れ効果は最小化されている。ノズルは、1個または2個のオイルラインから作ることができ、オイルのノズルへの定常流、キャピラリーチュービングへの接続、および保存ウェル／リザーバ（例えば、シリンジ）への接続を提供する。ノズルの高分解能部分は、適切な材料（テフロン（登録商標）（Teflon（登録商標））、プラスチック、金属など）から成型されまたは型打ちした、小さな孔のチュービングまたは小さな単純な部分から作ることができる。必要な場合、ノズルそれ自体を、レーザー切断またはドリル穴開けなどの成型後加工を使用して、フェールの先端に形成することができる。

【0084】

このノズル設計は、ソフトリソグラフィまたは他の標準的な微小流体チップ製造技術を使用して作られる典型的な微小流体ノズルに付随する擬似2D流を取り囲む表面濡れの問題を除外する。これは、ノズル設計が完全に3次元的であり、連続する水相からのノズルセクションの完全な分離が得られるからである。この同じ設計は、即時使用のために必要とされるエマルジョンの生成のためにもまた使用でき、ここでは、水のラインがシリンジに直接的に結合され、ノズルの出口は、使用の点まで（例えば、微小流体PCRチップ、遅延ラインなどまで）エマルジョンを移動させるために使用される。

【0085】

別の実施形態において、本発明は、標準的な保存ジオメトリー（例えば、96ウェルプレートなど）からライブラリーの構成要素を直接的に乳化するための組成物および方法を提供する。ライブラリーウェルプレートに含まれる流体から単分散エマルジョンを作製するために、本発明は、適切に設計された流体相互接続またはウェルと同時に製造された微小流体ベースのノズルを備える。図6および7は、ノズルと連動する2つの可能なアプローチを提示する。

【0086】

図6は、リザーバベースのサンプルの乳化を示す。図6において、ウェルは、導入されるサンプルよりも低い密度を有する流体で最初に満たされる。このデバイスの操作は、サンプルがサンプルウェルから直接吸引される代わりにポートに導入されること以外は、上記のデバイスと非常に類似している。これは、ノズルから直接得られる乳化オイル、または自動的にウェルに負荷もしくは流動される異なる材料のいずれかであり得る。オイルラインはそれらの規定された速度で流動を開始するのに対して（図6e）、収集または廃棄ポートは、全体のオイル流プラス所望のサンプル流に対応する速度で引っ込みを開始する。一旦、流れが確立されると、サンプルは、手動で（例えば、ピペット）またはロボットサンプル扱いシステムを用いてのいずれかで、ポートに導入される。許容されるサンプルの体積はポートの体積に依存する。サンプルは、ウェル中の流体よりも密度が高いため、ウェルの底に定着され、そしてノズルまで移動される（図6a～6d）。この時間の間、廃棄（一過性なものが問題を引き起こす場合に限り、スタートアップの間に使用）または収集ポートのいずれかが、乳化サンプルを引っ込み、そして保存する。サンプルが完全に乳化されたときに、次のサンプルが導入され、プロセスが反復される。実行の間に洗浄工程が必要とされる場合、線上流体は廃棄ラインに引き出される。ノズルを通した圧力の低下が収集に対してキャビテーションを引き起こすならば、入力ウェルの任意の加圧を利用できる。

【0087】

図7は、サンプルがサンプルポート中の流体よりも密度が低い場合のサンプル導入を示す。図7は、サンプルを乳化するために使用されるオイルよりも密度が低いサンプルを導入するために使用できる代替スキームを描いている。図1のコンセプトと同様に、ポートにサンプルを導入するプロセスは、手動でまたはロボットサンプリングシステムを用いてのいずれかで実行できる。このコンセプトにおいて、サンプルポートは、サンプルの導入の前に、ノズルからの逆流を通して、乳化オイルで満たすことができる（図7a）。このオイルが適切でない場合、ポートは、乳化オイルよりも望ましい特性を有する可能性があ

10

20

30

40

50

る、異なる非混和流体で上端を満たすことができる（例えば、より良好な濡れ、より少ない界面活性剤など）。この第2の非混和流体は、スタートアップの間に導入することができ、サンプルチップが挿入されない場合に、ポートに連続的に流れる。流体で満たしたサンプルポートを維持することは、スタートアップの間に空気混入を防止し、一過性の性能を改善する。

【0088】

サンプルチップが、サンプルをデバイスに導入可能であるポンプに接続されているならば、これは、チップがデバイスに挿入されるにつれて始動する（7b～c）。この種のサンプル導入とともに使用される場合、デバイスは、「廃棄のための輸送」ライン（7e）をポンプに接続させないことを含む、本発明者らのデバイスの「通常」操作と同じに実行することができた。サンプルチップ負荷ポンプが流れを正確に強制することが不可能な場合（すなわち、適切なポンプに接続されていない）、チップの後端は、そのチップがポートに完全に挿入されている場合には、大気圧（またはおそらく加圧ガス供給）いずれかに対して開かれているバルブに接続することができる。サンプルチップおよびデバイスへの空気混入を妨害するために、この接続は、所望の非混和流体で満たしたりザーバを通して作製することができる。いずれの場合においても、デバイスは、上記に記載され、図6に示されるものに対して同じく実行する。図7もまた、図6におけるデバイスのために使用される吸引プローブアセンブリーの別の可能な構成を示す。

【0089】

微小流体基材上での注入の前にサンプル液滴エマルジョンを形成するための方法

本発明は、本発明の微小流体デバイスへのサンプル流体の導入の前に、サンプル流体（例えば、液滴）のエマルジョンを作製するための組成物および方法もまた提供する。より具体的には、これらの方法は、例えば、シリンジ中で「オフチップで」サンプル液滴エマルジョンを作製することに向けられる。ライブラリーウェルから直接的に単分散エマルジョンを作製するために、ノズルは、図8に示されるように、シリンジチップ（例えば、キャピラリーチュービング）に収集シリンジを接続するために使用されるフィッティングに直接的に形成される。ノズルは、ノズル、キャピラリーチュービングへの接続部、および収集シリンジへの接続部まで一定流量のオイルを供給する1個または2個のオイルラインから作ることができる。サンプルの吸引は、2個のオイルシリンジの流速よりも上の流速（Q3）である引っ込みモードにある収集シリンジを実行することによって達成することができる（図8のステップ1）。流れの違いは、サンプルウェルから吸引した流速に対応する。適切な体積のサンプルがキャピラリーチュービングに負荷された場合、キャピラリーチュービングはサンプルウェルから取り外され、気泡、およびおそらく、洗浄溶液が吸引される（図8のステップ2）。ほとんどすべてのサンプルが乳化される場合、収集シリンジ引っ込み速度は、オイル流速よりも下に減少され、停止され、またはある程度の名目の速度で注ぎ込むように設定されるかのいずれかである（図8、ステップ3）。キャピラリー中に残された残りのサンプル、空気、洗浄溶液などは、洗浄ウェルに流され、キャピラリーの外側が「洗浄ステーション」で洗浄される。キャピラリーが完全に清浄である場合、このプロセスは次のライブラリー構成要素のために反復される。

【0090】

ノズルは、小口径チュービング（ガラス、テフロン（登録商標）（Teflon）（登録商標）、PEEK、チュービング、またはキャピラリー）を使用すること、または微細加工、または成型プロセス、例えば、PDMSソフトリソグラフィ、ガラスエッチング、ホットエンボス加工、または同様の高分解能製造技術を通して、形成することができる。

【0091】

本発明の装置は、相互汚染が除去されなければならない臨床適用または研究のために容易に適合させることができる。なぜなら、ノズルからシリンジまでの領域は、サンプル流から単離されているからである（例えば、オイルはこれらの表面を濡らし、サンプルが水性サンプルと直接的に接触しないように保持する）。吸引チップは、使い捨て品目として

設計することができ（ロボットサンプラー吸引チップと同様に）、そしてサンプル間で自動的に置き換えることができる。

【0092】

複数のノズル／シリンジ対は並行して操作することができ、従って、処理能力を増大する。このことは、単回のプロセス段階の間に、複数のウェル／サンプルの同時サンプリングを可能にする。各サンプルは、別個のシリンジに収集することができる。

【0093】

サンプル液滴エマルジョンおよびエマルジョンライブラリーを「オフチップ」で形成するための他の方法は、実施例1に記載されている。

【0094】

サンプル体積の損失を最小化するための方法

本明細書に記載されるように、非常に少量の試薬を用いて作業する際の顕著な問題は、保存容器および輸送ラインにおいて見出されるデッドボリュームに付随する損失から来る。一例として、50マイクロリットルの物質が254ミクロンの内径のキャピラリーチューブに注入される場合、75cm長チューブは約38マイクロリットルの物質を消費する（～75%）。この問題に取り組むために、本発明は、極度に少量の試薬を用いて作業した場合に、デッドボリュームおよび試薬の消費に付随する問題を取り除く組成物および方法を提供する。

【0095】

1つの実施形態において、第1の試薬（サンプル）は、保存容器（例えば、シリンジまたは他のリザーバ）中で、第2の非混和相と合わせられる。この第2の相は、顕著な損失を伴うことなく、第1の相の全体量をシステムに押し出すために使用される。より具体的には、2つの非混和流体がリザーバ中で合わせられるときに、これらの2つの流体は物質の密度が異なる限り、層に分離する傾向がある。目的の流体（例えば、サンプル流体）がリザーバの出口に最も近い場合、これは、リザーバが空である場合に、最初に離れなくてはならない（出口は、密度の違いに依存して、上端または底のいずれかに設けられ得る）。一旦試薬がリザーバから汲み出されると、第2の相が続く。次いで、この第2の相は、いかなるサンプル流体の損失も伴うことなく、第1の相をシステムから完全に汲み出す。これの一例として、オイルおよび水（試薬）がシリンジ中で合わせられる。オイルが水よりも高密度である場合、シリンジはその出口を上に向けて配向し、オイルがより低密度である場合、シリンジは下を向く。オイルは、試薬中の目的の物質が油相に溶解しないように選択される。図9はこのアプローチの一例であり、この場合、シリンジはリザーバとして使用され、第2の相は試薬相よりも高密度である。試薬がより高密度であるならば、シリンジの配向は逆転される（すなわち、出口は図の下側を向く）。詳細には、図9は、試薬が第2の非混和相の上端に注入される場合の2相システムを示す：（A）注入の間、第1の相から第2の相までの移行の前、（B）第2の相がちょうど輸送ラインに入っている、（C）第2の相が輸送ラインを完全に満たし、システムを通して試薬の全体の体積を押し出している。

【0096】

または、サンプル溶液は、2つの非混和液体間にサンドイッチにされ、ここで、1つの液体は、サンプル密度よりも高い密度を有し、第2の液体はサンプル密度よりも低い密度を有する。図10を参照すると、サンプル（密度1.0）は、パーフルオロカーボンオイル（密度1.8）とミネラルオイル（密度0.914）の間で層状化できる。理想的には、このデバイスが生物学的反応を分析するために使用される場合、非混和溶液はサンプルの反応を阻害しなく、いずれかの非混和流体中で可溶性であるサンプル中の任意の試験分子、またはサンプルそれ自体でもない。より密度が低い流体（図10ではミネラルオイル）は、「ポンプを始動し」、通常の注入の間に起こる任意の空気またはデッドスペースを除去するために使用することができる。次いで、サンプルは、ミネラルオイルの後で注入点まで上昇する。本明細書に開示される方法は、気体についてもまた作動することがさらに意図される。気体および／または液体は混和性であり得るが、異なる密度であり得、そ

10

20

30

40

50

の結果、これらは、それらの混合を妨害する様式で、互いの上に層状化される。

【0097】

固体または半固体相液滴

本発明は、固体相粒子、および下流の分析のために微小流体デバイス上で固体相粒子を形成するための方法もまた提供する。固体相粒子は、種々の生物学的または化学的な分析（例えば、DNAまたはタンパク質の分析）のために使用することができる。

【0098】

DNA分析のために、アンプリコンの増幅後カプセル化は、液滴エマルジョンの破壊の前に、ゲルまたはポリマーマトリックスの中で行う。液滴の中での増幅反応は、いくつかの増幅型方法の1つ（本明細書でさらに詳細に記載される）を使用し、これには以下が含まれるがこれらに限定されない：PCR、ローリングサークル増幅（RCA）、核酸配列に基づく増幅（NASBA）、リガーゼ連鎖反応など。その後、化学的または物理的手段のいずれかを使用して液滴を重合させることによって、液滴の中での増幅反応のカプセル化／固化を行う。

【0099】

物理的手段は「ゲル化」と呼ばれ、これにより、製剤化の間に液滴の中に低温アガロースを組み入れ、液滴が固化することが所望されるまで、液滴を固化温度よりも上に保持する。

【0100】

化学的手段は「重合」と呼ばれてもよく、これにより、重合溶液と液滴を合わせ（必要とされる場合）、次いで、重合開始剤（例えば、フリーラジカル）またはUV光などの手段のいずれかを用いて液滴を重合する。ゲル化または重合のいくつかの他の手段には、マトラゲル（matragel）、ポリアクリルアミド、混合ポリサッカリドなどが含まれる。いくつかの例示的な開始剤は、温度、UV照射などであり得る。

【0101】

さらなる例において、増幅のために使用されるDNAプライマーの1つは、重合マトリックスを形成する分子の1つに結合させることができる。結合は、直接的化学結合を通して、またはビオチン-スト렙トアビジン結合などの二次的結合を通してであり得る。この例において、DNAは、液滴の固化後に起こる、形成された固相に物理的に結合する。いくつかのゲル化または重合の方法の1つを使用して、これらの液滴をさらに操作することが可能であるはずである。

【0102】

取り込まれていないヌクレオチド、プライマーを交換または洗浄して除くことのいずれかが可能であり、および初期の増幅緩衝液、ポリメラーゼなどを除去するために緩衝液を交換することが可能である。鎖の一方が添付したDNA増幅プライマーから重合される、さらなる液滴操作の一例において、重合またはゲル化液滴を塩基性溶液で処理して、2つのDNA鎖を解離し、ゲル化または重合液滴から、結合していない鎖を溶離させることが可能である。

【0103】

タンパク質分析のために、タンパク質は、ゲルまたはポリマーマトリックスの中に捕捉されるか、またはそれに結合されるかのいずれかであり得る。結合される場合、これは、共有結合を通して、または親和性タグ、例えば、his6またはaviタグを通してであり得る。タンパク質は、ゲルもしくはポリマー試薬を含む液滴に加えることができ、またはこれらは、ゲルもしくはポリマー試薬とともに製剤化することができる。両方を含むバリエーションもまた可能である。タンパク質は液滴に加えることができる。加えて、液滴にDNAを加えること、およびタンパク質を合成するためにインビトロ転写／翻訳を行うことが可能である。

【0104】

液滴は、微小流体デバイス上で液体型で保持することができ、取り出す際にはゲル化もしくは重合を行うことができ、または液滴が形成された後で、デバイス上の任意の位置で

10

20

30

40

50

液滴の中でゲル化もしくは重合を行うことができる。

【0105】

一例において、複数のプラスミドが、インビトロ転写／翻訳反応を用いて、液滴の中に製剤化される。プラスミドによってコードされる遺伝子は、タンパク質分子に翻訳および転写される。タンパク質分子はaviータグを介してポリマーに結合され、液滴はゲル化が許容され、そしてプラスミド分子はゲル中に「固定」または「捕捉」される。ゲル化液滴は収集され、エマルジョンは破壊され、そして固化した液滴は収集され洗浄される。1つの例示的な適用として、DNAは、1つのプライマーがポリマーモノマーに物理的に結合している液滴の中で増幅される。次いで、液滴は、酵素であるDNAポリメラーゼ、ルシフェラーゼ、およびスルフリラーゼを含む液滴とともに合わせられる。合体した液滴はゲル化または重合が許容され、これらは収集され、そして必要な場合、洗浄される。次いで、これらの洗浄したゲル化液滴は、DNA配列決定反応において使用することができる。

10

【0106】

界面活性剤

本発明において使用される流体は、1種以上の添加剤、例えば、表面張力を低下させる剤（界面活性剤）を含んでもよい。界面活性剤には、Tween、Span、フッ素系界面活性剤、および水と比較してオイルに溶解性である他の剤が含まれ得る。ある適用において、性能は、水相に第2の界面活性剤を加えることによって改善される。界面活性剤は、例えば、交差するチャンネルに液滴を排出または注入するために必要とされる剪断力を減少することによって、液滴のサイズ、流れ、および均一性を制御または最適化する際の補助となり得る。これは、液滴のサイズおよび周期性、または交差するチャンネルに液滴が中断される速度もしくは頻度に影響を与え得る。さらに、界面活性剤は、フッ素化オイル中の水性エマルジョンが合流しないように安定化させるように働くことができる。

20

【0107】

液滴は界面活性剤でコートされてもよい。連続相液滴に加えることができる好ましい界面活性剤には以下が含まれるがこれらに限定されない：ソルビタンモノラウレート（Span 20）、ソルビタンモノパルミテート（Span 40）、ソルビタンモノステアレート（Span 60）、およびソルビタンモノオレエート（Span 80）、およびパーフルオロ化ポリエーテル（例えば、DuPont Krytox 157 FSL、FSM、および／またはFSH）を含む、ソルビタンベースのカルボン酸エステル（例えば、「Span」界面活性剤、Fluka Chemika）などの界面活性剤。使用され得る非イオン系界面活性剤の他の非限定的な例には以下が含まれる：ポリオキシエチレン化アルキルフェノール（例えば、ノニルフェノール、p-ドデシルフェノール、およびジノニルフェノール）、ポリオキシエチレン化直鎖アルコール、ポリオキシエチレン化ポリオキシプロピレングリコール、ポリオキシエチレン化メルカプタン、長鎖カルボン酸エステル（例えば、天然脂肪酸のグリセリルエステルおよびポリグリセリルエステル）、プロピレングリコール、ソルビトール、ポリオキシエチレン化ソルビトールエステル、ポリオキシエチレングリコールエステルなど）、およびアルカノールアミン（例えば、ジエタノールアミン-脂肪酸縮合物およびイソプロパノールアミン-脂肪酸縮合物）。加えて、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）などのイオン性界面活性剤もまた使用されてもよい。しかし、かかる界面活性剤は、一般的に、本発明の実施形態のために好ましくはない。例えば、水性液滴が化学反応（生化学反応を含む）のためのナノリアクターとして使用され、または生体物質を分析および／もしくは分別するために使用される実施形態では、SDSなどの可溶性界面活性剤は液滴の内容物を変性または不活性化する可能性がある。

30

40

【0108】

キャリア流体は、添加物（好ましくは、約0.2から5%体積、より好ましくは約2%）として界面活性剤（例えば、Span界面活性剤などの非イオン性界面活性剤）を含むオイル（例えば、デカン、テトラデカン、またはヘキサデカン）またはフルオロカーボンオイルであり得る。ユーザーは、好ましくは、キャリア流体中の界面活性剤がチャンネルウ

50

エルをコートするように、微小流体デバイスのチャネルを通してキャリア流体を流れさせ得る。

【0109】

1つの実施形態において、フッ素系界面活性剤は、揮発性フッ素系溶媒中でパーフルオロ化ポリエーテルDuPont Kryptox 157 FSL、FSM、またはFSHを水酸化アンモニウム水溶液と反応させることによって調製できる。溶媒および残渣の水およびアンモニアは、ロータリーエバポレーターを用いて除去できる。次いで、界面活性剤は、フッ素系オイル（例えば、Flourinert（3M））に溶解でき（例えば、2.5重量%）、次いで、これはエマルジョンの連続相として役立つ。

【0110】

駆動力

本発明は、1つ以上の方向で、および／または微小流体デバイスの1つ以上のチャネルに向かって、細胞、粒子、分子、酵素、または試薬の流れを操作するために、バルブおよびポンプを利用することによって、圧力駆動流れ制御を使用する。しかし、電気浸透流れ制御、電気泳動、および誘電泳動（Fulwyer, Science 156, 910 (1974); LiおよびHarrison, Analytical Chemistry 69, 1564 (1997); Fiedlerら, Analytical Chemistry 70, 1909-1915 (1998); 米国特許第5,656,155号）などの他の方法もまた、単独で、またはポンプおよびバルブと組み合わせて使用されてもよい。本発明に従うこれらの技術の適用は、例えば、検出モジュールにまたはその直後に配置可能な分別モジュール上またはその中で分別が起こるので、分析または分別のためのより迅速かつ正確なデバイスおよび方法を提供する。このことは、分子または細胞が移動するためのより短い距離を提供し、これらはより迅速に移動可能であり、より乱流が少なく、そして単一のファイル中で、すなわち、一度に1つで、容易に移動、試験、および分別可能である。

【0111】

容積式圧力駆動流は、流体の流れを制御するための好ましい方法であり、誘電泳動はその流れの中の液滴を操作する好ましい方法である。

【0112】

入口モジュールの圧力は、例えば、入口チャネルへの加圧シリンジの供給を用いて、主チャネルおよびサンプル入口チャネル上の圧力を調整することによって調節することもできる。入口モジュールにおいて、オイルの供給源と水の供給源の間の圧力の違いを制御することによって、生成される液滴のサイズおよび周期性が調節されてもよい。または、バルブは、入口モジュールへの溶液の流れを制御し、それによって、液滴のサイズおよび周期性を制御するために、入口モジュールまたはそれに接続されたサンプル入口チャネルのいずれかに、または同時に配置されてもよい。周期性および液滴の体積もまた、チャネル直径、流体の粘度、および剪断圧力に依存する可能性がある。

【0113】

いかなる理論にも束縛されることはないが、電気浸透は、2つ以上の電極間の電圧差または電荷勾配の適用によって、イオン、例えば、緩衝液などの液体を含む流れの動きを生じると考えられている。中性の（荷電していない）分子または細胞は、この流れによって運ぶことができる。電気浸透は、流れの進路、方向、または速度を急減に変化させるために特に適切である。電気泳動は、反対の電荷である1つ以上の電極に向かい、同じ電荷である1つ以上の電極から遠ざかる、流体中での荷電した物体の動きを生じると考えられている。水相がオイル相と合わされる場合、水性液滴はオイルによりカプセル化され、またはオイルにより互いから離される。典型的には、オイル相は導電体ではなく、電気浸透場から液滴を絶縁し得る。この例において、電気浸透は、オイルが電場まで運ばれもしくは反応するように修飾される場合に、またはオイルが、水中で非混和性であるが電場から水相を絶縁しない別の相の代わりに置換される場合に、液滴の流れを駆動するために使用されてもよい。

10

20

30

40

50

【0114】

誘電泳動は、正味の電荷を有さないが、互いとの関連で正または負に荷電している領域を有する、誘電性物の動きを生じると考えられている。または、液滴および／または粒子、例えば、細胞もしくは分子の存在下での均一でない電場は、液滴および／または粒子が電氣的に分極し、従って、電気泳動力を受けることを引き起こす。粒子および懸濁媒体の誘電分極率に依存して、誘電性粒子は、高い電場の強さまたは弱い電場の強さのいずれかの領域に向かって移動する。例えば、生きている細胞の分極率は、それらの組成、形態、および表現型に依存し、そして適用される電場の周波数に高度に依存性である。従って、異なる型であり、異なる生理学的状態にある細胞は、一般的に、明確に異なる誘電特性を有し、このことは、例えば、示差的誘電電気泳動力によって、細胞分離の基礎を提供し得る。同様に、液滴の分極率もまた、それらのサイズ、形状、および組成に依存する。例えば、塩を含む液滴は分極し得る。Fiedlerら、Analytical Chemistry 70, 1909-1915 (1998)において提供される式に従って、単一の液滴の個々の操作は、液滴に近い寸法を有する場の差異（不均質性）を必要とする。

10

【0115】

「誘電泳動力勾配」という用語は、物体が周囲の媒体とは異なる誘電定数を有する場合に、電場の中でその物体に対して誘電力が発揮されることを意味する。この力は、物体をより大きな電場領域に引き込むか、または該より大きな電場領域から押し出すかのいずれかである。この力は、物体はまたは周囲の媒体が大きな誘電定数を有するか否かにそれぞれ依存して、誘引性または反発性である。

20

【0116】

操作もまた、周囲の媒体との液滴および／または粒子の誘電率（誘電特性）に依存する。従って、ポリマー粒子、生きている細胞は、水中で高い場の周波数である負の誘電泳動を示す。例えば、水中で0.5 MV/m場（20ミクロン電極ギャップで10V）においてラテックス球が受ける誘電力は、3.4ミクロンラテックス球についての約0.2ピコニュートン（pN）～15ミクロンラテックス球についての15 pNまでと予測される（Fiedlerら、Analytical Chemistry 70, 1909-1915 (1998)）。これらの値は、大部分が、流れの中で球が受ける流体力よりも大きい（3.4ミクロン球について約0.3 pNおよび15ミクロン球について1.5 pN）。それゆえに、個々の細胞または粒子の操作は、誘電泳動を使用して、セルソーターデバイスなどの流れている流体の中で達成することができる。従来の半導体技術を使用して、電極を本発明の微細加工分別デバイスの力場を制御するために基材上で微細加工できる。誘電泳動は、導電体である物体を移動させるために特に適切である。AC電流の使用は、イオンの永続的な整列を妨害するために好ましい。メガヘルツ周波数が、正味の整列、誘引力、および比較的長い距離にわたる動作を提供するために適切である。米国特許第5,454,472号を参照のこと。

30

【0117】

放射圧もまた、光の集束ビーム、例えば、レーザーを用いて、物体、例えば、液滴およびそこに含まれる粒子（分子、細胞、粒子など）の方向をそらし、そして移動させるために本発明において使用することができる。流れもまた、デバイスの1つ以上のチャンネルの間で、または本発明の方法において、圧力差または勾配を提供することによって、入手および制御することができる。

40

【0118】

分子、細胞、または粒子（または分子、細胞、もしくは粒子を含む液滴）は、例えば、オン-オフバルブを用いて、またはチャンネルを絞ることによる、直接的な機械的スイッチ切り換えによって移相させることができる。圧力制御もまた、例えば、チップ上のチャンネルの内部の圧力を変化させるために出力ウェルを上昇または低下させることによって使用されてもよい。例えば、米国特許第6,540,895号に記載されているデバイスおよび方法を参照のこと。これらの方法およびデバイスは、係属中の米国特許出願公開第20010029983号および同第20050226742号に記載されている方法および

50

デバイスと組み合わせてさらに使用することができる。異なるスイッチ操作およびフロー制御メカニズムは、1つのチップ上または1つのデバイスにおいて組み合わせることができ、所望されるように独立してまたは一緒に働くことができる。

【0119】

入口モジュール

本発明の微小流体デバイスは1つ以上の入口モジュールを含む。「入口モジュール」は、さらなる合流、検出、および／または分別のために分子、細胞、小分子、または粒子を受容する微小流体基材デバイスの領域である。入口モジュールは、1つ以上の入口チャネル、ウェル、またはリザーバ、開口部、および、基材への分子、細胞、小分子、または粒子の進入を容易にする他の特徴を含むことができる。基材は、所望される場合、1つより多くの入口モジュールを含んでもよい。異なるサンプル入口チャネルが異なる入口モジュールにおいて主チャネルと連絡することができる。または、異なるサンプル入口チャネルが同じ入口モジュールにおいて主チャネルと連絡することができる。入口モジュールは主チャネルと流体連通している。入口モジュールは、一般的に、サンプルの溶液（すなわち、分子、細胞、小分子（有機または無機）または粒子などのサンプルを含む流体）が主チャネルに導入され、複数の液滴を形成するように、サンプル入口チャネルと主チャネルの間の連結部を備える。サンプル溶液は加圧可能である。サンプル入口チャネルは、サンプル溶液が、主チャネルを通過する流体の流動に対して直角である角度で主チャネルに導入されるように、主チャネルと交差することができる。例えば、サンプル入口チャネルおよび主チャネルはT型形状連結部で遮られる：すなわち、サンプル入力チャネルは主チャネルに対して直角（90°）である。しかし、サンプル入力チャネルは任意の角度で主チャネルを遮ることができ、流れに対して直角である角度で主チャネルにサンプル流体を導入する必要はない。交差するチャネルの間の角度は約60°から約120°までの範囲である。特定の例示的な角度は、45°、60°、90°、および120°である。

【0120】

主チャネルにサンプルの液滴を導入する2つ以上の入口モジュールが存在する本発明の実施形態もまた、提供される。例えば、第1の入口モジュールは、主チャネル中の流体の流れに第1のサンプルの液滴を導入し得、第2の入口モジュールは、主チャネル中の流体の流れに第2のサンプルの液滴を導入し得る、などである。第2の入口モジュールは、好ましくは、第1の入口モジュールから下流にある（例えば、約30 μm）。2つ以上の異なる入口モジュールに導入される流体は、同じ流体または同じ型の流体（例えば、異なる水溶液）を含み得る。例えば、酵素を含む水溶液の液滴は、第1の入口モジュールにおいて主チャネルに導入され、酵素のための基質を含む水溶液の液滴は、第2の入口モジュールにおいて主チャネルに導入される、または、異なる入口モジュールにおいて導入される液滴は、適合性または不適合性であり得る異なる流体の液滴であり得る。例えば、異なる液滴は異なる水溶液であり得、または第1の入口モジュールにおいて導入される液滴は1つの流体（例えば、水溶液）の液滴であり得るのに対して、第2の入口モジュールにおいて導入される液滴は、別の流体（例えば、アルコールまたはオイル）であり得る。

【0121】

液滴相互嵌合

本明細書に記載される微小流体デバイスの特定設計の実施形態は、特定の液体の液滴のより再現可能でかつ制御可能な相互嵌合、続いて、本明細書にさらに詳細に記載される、これらの液滴の対合流を可能にする。液滴対は、異なる組成および／または体積の液体を含むことができ、次いで、これらは研究される特定の反応を可能にするために組み合わせる。液滴の対は、以下のいずれかからであり得る：（i）2つの連続する水性流動またはオイル流動；（ii）連続する水性流動、エマルジョン流動、およびオイル流動、または（iii）2つのエマルジョン流動およびオイル流動。「相互嵌合」という用語は、本明細書で使用される場合、最終的な合流のための、別々の水性流動からまたは2つの別々の入口ノズルからの液滴の対合を意味する。

【0122】

本明細書に記載されるノズル設計は、相互嵌合のより良好な制御および液滴の対の間のより近い距離に起因して、液滴の相互嵌合を増強し、そして液滴の合流を改善する。相互嵌合に対するより高度な制御は、液滴のいずれかの頻度に対して完全な制御を可能にする。最適な操作を得るために、液滴間の間隔および液滴のカップリングは、流動のいずれかの流れ、流動の粘度、ノズル設計（オリフィス直径、チャネル角度、およびオリフィス後のノズルのネックを含む）を調整することによって調整することができる。

【0123】

リザーバ／ウェル

本明細書のデバイスは、入口モジュールにおいて、サンプルをデバイスに導入するためのサンプル溶液リザーバまたはウェルまたは他の装置を備えることができ、これは、典型的には、入口チャネルと流体連通している。本発明の微小流体デバイスに1つ以上のサンプルを負荷するために使用されるリザーバおよびウェルには、シリンジ、カートリッジ、バイアル、エッペンドルフチューブ、および細胞培養材料（例えば、96ウェルプレート）が含まれるがこれらに限定されない。リザーバは、デバイスへの、または各分析ユニットのサンプル入口チャネルへの分子または細胞の導入を容易にし得る。

【0124】

流体の相互接続

本発明の微小流体デバイスは、表面PEG官能基化をもたらしするために適切なPEGシランの蒸気または溶液で処理されたシリンジ（または他のガラス容器）を備え得る。ガラス容器（例えば、シリンジ）の壁をPEG官能基で処理することの目的は、本発明の微小流体デバイスへの生物学的／化学的物質の適切な移動を妨げる、容器の内壁への生物学的付着を妨害することである。入口チャネルは、上記デバイスにサンプルを導入するための手段にさらに接続される。この手段は、ウェルまたはリザーバであり得る。この手段は温度制御され得る。入口モジュールは、サンプルがそこを通して供給されてもよい液体クロマトグラフィーまたはHPLCチュービングなどのチュービングの1本の適切なチュービングを受容するように適合されたコネクタもまた備え得る。かかる配置は、入口モジュールにおいて所望の注入速度を達成するために陽圧下でサンプル溶液を導入することを容易にする。

【0125】

チューブを含む相互接続は、デバイスの適切な操作を可能にするために、極めて清潔でなくてはならず、PDMS表面との結合に優れていなくてはならない。微小流体デバイスへの流体接続を作製する際の困難さは、デッドボリュームを最小化しながら、巨視的流体ラインからデバイスへの転位の困難さに主として起因する。

【0126】

相互汚染および漏れを最小化するため、およびより高い再現性および信頼性の改善を可能にするために、PDMSスラブのためのチューブおよび相互接続を適所に硬化させることができる。チューブおよび相互接続は、シリコンウェハ上の適所でのチューブの保持を可能にするために、UV硬化性接着剤を適用することによって、適切な位置に配置することができる。一旦、チューブが適切な位置に配置されると、PDMSは、ウェハに注ぎ、硬化させることができる。硬化したPDMSは、適所にあるチューブとともに、シリコンウェハから容易にはがすことができる。このプロセスは、他の接続チャネルと同様に、流体チャネルに適用することができる。一旦、接着剤がウェハに適用されると、このプロセスは、チャネルの位置および清潔さの正確な再現性を伴って、PDMSスラブの迅速なテンプレート化を可能にする。任意のサイズのチューブがこのプロセスのために実施できる。このプロセスは、デバイス中の相互接続ジョイントおよびより小さな相互接続フットプリントに対してより小さなストレスを許容する（例えば、2006年6月1日出願されたPCT/US2006/02186；2006年6月1日出願されたPCT/US2006/021280および2006年6月1日出願されたPCT/US2006/021380を参照のこと、これらの各々はすべての目的のためにそれらの全体が参照により援用される）。

10

20

30

40

50

【0127】

相互接続のチュービング側は、チュービングの正確な位置決めを提供する保持ブロックに装着することができるのに対して、微小流体デバイスは、保持ブロックが整列しかつ固定されるキャリアの中に正確に配置することができる。これらの設計に付随する全体のデッドボリュームは、2つの対合する表面が互いに対していかに正確に配置できるかに決定的に依存する。シールを維持するために必要とされる最大力、デバイスそれ自体の強固さおよび強度と同様に、シール材料の正確な形状および組成によって制限される。対合する表面の形状は、最小限の漏れの潜在性、必要とされるシール力、および誤整列の潜在性に対して調整することができる。非限定的な例として、示される単一の環は、適切な断面形状の一連の環で置き換えることができる。

10

【0128】

本発明の微小流体デバイスに1種以上のサンプルを負荷するために使用されるリザーバおよびウェルには、上記のような、シリンジ、カートリッジ、バイアル、エッペンドルフチューブ、細胞培養材料（例えば、96ウェルプレート）が含まれるがこれらに限定されない。基材の入口モジュールにおいて入口チャンネルにサンプルを負荷する際に解決されるべき問題の1つは、負荷手段または注入手段、例えば、キャピラリーまたはHPLCチュービングと入口チャンネルの間のサイズの違いである。漏れを制限し、デッドボリュームおよびコンプライアンスの問題を最小化する、相互接続および負荷の方法を作製することが必要である。本明細書でさらに詳細に記載されるいくつかのデバイスおよび方法が、これらの当該技術における問題に取り組み、そして解決する。

20

【0129】

自己整合流体相互接続

本発明は、サンプルの負荷および／または注入の効率を改善するために1つ以上の入口チャンネルに近接する自己整合流体接続を含む1つ以上の入口モジュールを含む。

【0130】

本発明は、微小流体デバイスと相互接続の間のフェイスシールの代わりに、放射状シールを作製することに基づく小さな相互接続の使用を提案する。挿入される相互接続は、デバイス上の対合特徴よりも大きな直径を有する。挿入されるとき、チップの伸展は、外部流体ラインと微小流体デバイスの間に漏れがないシールを作製するために必要とされるシール力を提供する。図11は、このシールを作製するための設計の可能性を詳述する。

30

【0131】

P D M S中の鋳抜き孔および1/32" PEEKチュービングを使用して図1の最も左の設計を用いる研究を実施し、これは、このシールが漏れを伴うことなく90PSIよりも高い圧力に耐えることが可能であったことを示した。

【0132】

機器およびチップ製造の耐久性を取り扱うために、外部の相互接続は自己整列でなくてはならず、成型した穴の「捕捉半径」は、シールした表面への相互接続を高い信頼性で導くために十分に大きくなければならない。図12は、成型した穴への進入が、捕捉を保証するために十分に大きい、シーリング表面に向かって先細になっていることを示す。外部の相互接続は微小流体基材まで導かれるチュービングから直接的に作ることができ、従って、潜在的な漏れの点および通らない体積は除外される。図12に見られるように、相互接続は、その長さの大部分について、基材相互接続または「チップドック」によって取り囲まれ、それがシステムの耐容性の積み重ねの中に保持されることを確かにする。外部の相互接続は、1/32" PEEKチュービングなどの硬いが柔軟性がある材料から作られる。微小流体デバイスの特徴は、製造プロセスの間にその中に直接的に成型することができるのに対して、挿入されるシールは、チュービングの末端に直接的に成型／機械加工することができるか、または個々のピースとして成型され、チュービングに機械的に固定することができる。図12に示される保持フェルールは製造の間に取り付けられ、そしてチューブ長の良好な絶対的参照を提供する。このフェルールは、既製の構成要素であり得るか、または特注製造された部品であり、例えば、ポリマー、エラストマー、または金

40

50

属から作られ得る。チュービングの末端は、末端で先細にされ得るか（最も上の図）、または四角形にされ得る（上図）。末端の特定の形状は、挿入の間に微小流体デバイスがいかに容易に摩耗するかによって制御される。

【0133】

または、図13に詳述されるように、単一のモノリシック自己整合部分に各チューブのために必要とされる相互接続のすべてを成型することもまた可能である。このことは、多くの外部流体ラインの整合をチップに維持する際の困難さを減少することを補助し得る。

【0134】

基材上で直接的に流体相互接続を成型するための方法

本発明は、微小流体デバイスへの流体相互接続の直接的成型の方法もまた提供する。市販の微小流体プラットフォームの開発は、操作者の誤りおよび漏れの可能性を減少させるために、単純な信頼できる流体相互接続を必要とする。これらの相互接続を微小流体デバイスに直接的に成型することは、微小流動および電氣的チャンネルを形成するために使用されるパターン化されたシム（シリコン／フォトレジストから製造され、またはある金属から作られた「マスター」）への成型ピンの正確な整列を必要とする。PDMSなどの低粘度エラストマーを用いる成型の場合に必要とされる極度な耐久性は、マスターの不完全さ、および成型ツールの組み立てをなお調整しながら、マスターへのピン面のほぼ完全なシーリングを必要とする。1つの実施形態において、本発明は、ツールに直接的に成型されたエラストマースリーブに捕捉された移動可能なピンを導入することによって、成型プロセスにおける不完全さを調整しながら、相互接続を成型する正確かつ反復可能な方法を提供する。比較的少ない体積で効率的に製造するため、および安価にデバイスのプロトタイプを製造することが可能であるように、このツールは、標準的なフォトリソグラフィープロセスを使用して生成したマスターを使用可能でなければならない（例えば、SU-8でパターン化されたシリコンウェハ）。

【0135】

図14は、このコンセプトに基づく成型ツールの概略図を示す。図14において、ピン（オレンジ色）は、エラストマー（elastomeric）成型スリーブの中に捕捉される。強固な背面プレートおよびフォームラバーから作られた圧縮プレートは、ピンに穏やかで均一な圧力を適用し、ピンをマスターに均一に接触させるために必要である力を生成するために使用される。成型スリーブは、硬化していないエラストマーがピンと上端プレートとの間の領域に浸透することを一貫して妨害する必要があることが見出された。初期の設計は、密接なクリアランスの穴に捕捉されたピンを使用し、これらのピンは、頻繁に所定の位置に結合し（潤滑剤とでさえも）、ピンのスムーズな動きおよびマスターとの不適切な接触を妨害した。これは、次には、エラストマーの薄膜が、ピンの底とマスターの間に形成することを起こす（「フラッシュ」）。このフラッシュは、チップ操作の間に相互接続の適切な操作を妨害する。各ピンの周囲へのエラストマースリーブの付加はこの問題を取り除き、マスターとピンの間の一貫した、信頼性のある遮断を生じる。

【0136】

音響アクチュエータ

入口モジュールのウェルまたはリザーバは音響アクチュエータをさらに備える。特定の生物学的／化学的物質（例えば、細胞）の単一の構成要素を含む1つの液滴を得るために、生物学的／化学的物質の分離、および微小流体チャンネル中の生物学的／化学的物質の数密度の均一性が所望される。従って、微小流体デバイスは音響アクチュエータを備え得る。負荷したサンプル（生物学的／化学的物質）は十分に混合し、カプセル化のためのノズル領域に送る前に、音波によって小型チャンバーの中で分離できる。音波の周波数は、細胞にいかなる損傷も引き起こさないように微調整するべきである。音響混合の生物学的効果は十分に研究されており（例えば、インクジェット工業）、多くの公開された文献もまた、圧電微小流体デバイスが、生きている微生物およびDNAなどのインタクトな生物学的ペイロードを送達し得ることを示した。

【0137】

音響共鳴の設計は、P D M S スラブ中で刻まれる共鳴音の側に位置する圧電バイモルフ平板を使用し得る。共鳴入口は細胞フロー入力チャンネルに接続可能であり、出口は細胞フロー締め付けチャンネルに接続可能である。圧電駆動波形は、流体中の細胞を分離可能である臨界周波数を選択するために、注意深く最適化することができる。周波数パラメーターを超えて最適化するための5つのパラメーターが存在し、L a b e l e c t r o n i c s は、圧電駆動波形を最適化するために使用可能である。その後、低コスト回路が、好ましい微小流体デバイス中で最適化される波形のみを生成するために設計可能である。

【0138】

合流モジュール

本発明の微小流体デバイスは1つ以上の合流モジュールもまた備える。「合流モジュール」は、入口モジュールにおけるまたはその下流の主チャンネルの少なくとも一部の中にまたはそれと同時にあり、ここで、液滴内に含まれる分子、細胞、小分子、または粒子が、分子、細胞、小分子、または粒子を含む他の液滴の近傍に運ばれ、近接する液滴がそれらの内容物を融合し、合流し、または合わせる。合流モジュールは、電気力を生成するための装置もまた含み得る。

【0139】

流体液滴上で発揮される電気力は、液滴が液体中で移動することを引き起こすために十分に大きくあり得る。ある場合において、流体液滴上で発揮される電気力は、液体中の液滴の所望の動きを、例えば、チャンネルまたは微小流動チャンネルまでまたはその中に（例えば、さらに本明細書でさらに記載されるように）などで、方向付けるために使用されてもよい。

【0140】

電場は、電場発生器、すなわち、流体に適用可能な電場を作製可能であるデバイスまたはシステムから生成することができる。電場発生器は、A C 場（すなわち、時間に関して周期的に変化するもの、例えば、正弦的に、鋸歯状に、正方形に）、D C 場（すなわち、時間に関して一定であるもの）、パルス電場などを生じ得る。電場発生器は、チャンネルまたは微小流体チャンネルの中に含まれる流体の中で電場を作製するように構築および配置されてもよい。電場発生器は、ある実施形態に従って、チャンネルまたは微小流体チャンネルの中に含まれる流体系に統合されてもよく、またはそれから分離されてもよい。本明細書で使用される場合、「統合」とは、互いに対して統合されている構成成分の一部が、その構成成分の少なくとも1つを切断または破壊しなければ、その構成成分が手動で分離できないように結合されることを意味する。

【0141】

適切な電場（これは、A C、D C などであり得る）を生じるための方法は当業者に公知である。例えば、1つの実施形態において、電場は、電極の対を横切って電圧を適用することによって生じ、これらの電極は、電場の少なくとも一部が流体と相互作用するように、流体系の中に（例えば、チャンネルまたは微小流動チャンネルを規定する基材の中に）配置もしくは包埋されてもよく、および／または流体に近接して配置されてもよい。電極は、当業者に公知である任意の適切な電極材料から構築することができ、この材料には、銀、金、銅、炭素、白金、銅、タンゲステン、スズ、カドミウム、ニッケル、インジウムスズ酸化物（「I T O」）など、ならびにこれらの組み合わせが含まれるがこれらに限定されない。

【0142】

電極

本発明のデバイスは、流体制御における使用のためのチャンネル、および統合金属合金成分（すなわち、電極）を鑄造するための金属合金で満たした他のチャンネルを含み得る。または、これらの電極は、他の技術（例えば、インジウムスズ酸化物または白金などの金属から作られた、リソグラフィパターン化された電極）を使用して製造できる。微小流動デバイスは、合流液滴の内容物を混合するために、液滴を合流させること、液滴を荷電させること、液滴を分別すること、液滴を検出すること、および液滴を振盪させることを含

むがこれらに限定されない、流体に対して電気的機能を実施することのために有用な金属合金成分を含み得る。このデバイスは、1つより多くの上述の機能のために、1つより多くの上述の構成成分を含み得る。

【0143】

金属合金成分を含む電極は、流体チャネルで末端となっているか、または流体チャネルから単離されているかのいずれかであり得る。これらの電極は、適切なチャネルを金属合金で満たすことによって構築することができる。この1つの方法は、例えば、シリンジを用いて、溶融状態である金属合金のチャネルへの陽圧注入を使用し、次いで、金属合金を固体状態に冷却することで達成され得る。別の例は、溶融状態である合金金属をチャネルまで引き出すために陰圧を使用し、次いで、金属合金を固体状態に冷却することである。これは、例えば、毛管力の使用によって達成することができる。構築の別の方法は、上述の実施形態のいずれかを使用でき、次いで、金属合金成分のジオメトリーを規定するために別の液体で溶融状態の金属合金を洗い流す。別の例は、上述の実施形態のいずれかを使用し、次いで、金属合金の固化終了点を規定するために局所的低温プローブを使用し、次いで、残りの金属合金を冷却して固化することである。さらなる例は、顕微鏡的ハンダ球またはUV硬化性導電性インクなどの別の物質を使用して、流体と金属合金チャネルの間の障壁を形成し、金属合金成分のジオメトリーを規定することである。

【0144】

このデバイスは、統合金属合金成分と、パターン化された導電性層の両方の組み合わせを含み得る。パターン化された導電性層は、それらの境界が漏れ防止シールの中にあるようにパターン化された特徴を有し得る。これらのデバイスは、2つの荷電した電極の一方としてパターン化された導電性特徴を、および2つの荷電した電極の他方として1つの統合金属合金成分を有し得る。

【0145】

このデバイスは、デバイス中に存在する流体から絶縁された複数の電極を備えることができ、操作の方法は、誘電性シグナルおよび適切な流体の適切な適用が含まれる。既知のデバイスにおいては、電極は、典型的には、あるいは適用される誘電場をスクリーニングする種の放出を可能にするために、流体と接触される。それに対して、電極が流体から絶縁されているデバイスにおいては、このスクリーニング効果は、典型的には、迅速に上昇し過ぎ、このデバイスは任意の有意に長い時間の間では有用ではない。絶縁電極に対する、流体と接触した電極の欠点は、(a) 漏れに対して信頼性が損なわれていること（なぜなら、電極とデバイスの他の構成要素との間の界面が、漏れ防止シールをもたらしことが困難であり得る）、および(b) 電極腐食に対して信頼性が損なわれていること（その失敗モード効果には、誘電場の適用の失敗、および流体チャネルの相互汚染が含まれる）である。

【0146】

デバイス中に存在する流体から絶縁されている複数の電極を備えた本発明のデバイスは、スクリーニング立ち上がり時間を延長すること、およびデバイスの中で適用される異なる誘電場のすべてのための極性スイッチを備えることによって、このスクリーニング効果に対抗する。スクリーニング立ち上がり時間は、誘電特性を有する流体を使用することによって延長される。デバイスに適用されるすべての異なる誘電場のための極性スイッチは、誘電制御のためのアルゴリズムを使用することによって達成される。これは、デバイスの適切な誘電性機能を維持するために、十分に高い周波数で、誘電場の極性を切り換える。この誘電制御アルゴリズムは、カスケードで、流体のもとの点で開始し、下流に進行する時間制御様式で誘電場の極性を切り換え、その結果、所定の流体構成要素がそれらのコースに沿ってすべての点において1つの極性を受ける。本発明のデバイスは、金属合金電極とともに、または金属合金電極とパターン化された導電性フィルム電極の組み合わせを使用して、使用可能である。

【0147】

本発明は、注入電極を使用する微小流動デバイスを提供し得る。顕微鏡的電極（典型的

には25 μm 厚)と巨視的相互接続の間の界面は、2つの間の接続部が曲げられる場合に容易に損なわれ得る。接続部の曲がり、界面に接続部(すなわち、グロメット)を固定、支持、および強化するために働く硬い材料を固定することによって取り除くことができる。曲がりを妨害するために、デバイスの対合表面は、ガラスまたはプラスチックなどの固い材料から製造することができる。外部システムとの電氣的接続は、デバイスがバネ仕掛けの接触に接続されるようにデバイスを固定することによって行うことができ、これは、グロメット(これによってハンダ領域に適用された力を最小化する)からのオフセットであるか、またはグロメット上に集中させるかのいずれかである(接触がハンダに触れない限り)。

【0148】

金属合金成分は、鏡を含み得るジオメトリの液滴の光学的検出を含むがこれに限定されない、流体上での光学的機能を実施するためにもまた有用である。

【0149】

微小流動チャンネル中に配置された電極からの流体の漏れを防止するために、微小流動デバイスは、流体制御のためのチャンネルでパターン化された層、およびパターン化された導電性特徴を有する別の層を備えることができ、ここで、これらの特徴は、それらの境界が漏れ防止シールの中にあるようにパターン化される。この漏れ防止シールは、流体制御層のパターン化されていない領域と、導電性層のパターン化されていない領域との間の界面において達成することができる。この漏れ防止シールは、流体制御層と、導電性層のパターン化されていない領域との間の第3の界面層によってもまた達成することができる。この第3の界面層は、流体層と導電性層の間の接触を可能にするように特定の位置で穿孔でき、または穿孔できない。電氣的接近もまた、流体制御層の中でパターン化できる。

【0150】

記載されたような電極およびパターン化された導電性層は、デバイスの任意のモジュール(入口モジュール、合流モジュール、混合モジュール、遅延モジュール、検出モジュール、および分別モジュール)に付随することができ、液滴およびそれらの内容物を操作および制御するために、誘電力または電気力を生成する。

【0151】

微小流動デバイス中での電荷を有さない液滴の効果的な制御は、極度に強力な誘電場勾配の生成を必要とし得る。平行板コンデンサーの端からのフリンジ場は、これらの勾配を形成するための優れたトポロジーを提供し得る。本発明に従う微小流動デバイスは、2つの平行電極間に流体チャンネルを配置することを含み得、これは、電極対の末端におけるエッジ効果に起因して、入口で電極までの急な電場勾配を生じ得る。分割した対称チャンネルにこれらの電極対を配置することは、デバイスの中で正確な二方向性の液滴の制御を可能にし得る。同じ原理を使用して、非対称分割のみを有するものは、同じ様式で液滴の方向のシングルエンド制御を可能にし得る。または、このジオメトリのバリエーションは、移動による液滴相の正確な制御を可能にする。

【0152】

ある場合において、透明なまたは実質的に透明な電極を使用することができる。電場発生器は、少なくとも約0.01 V/マイクロメートル、ある場合においては、少なくとも約0.03 V/マイクロメートル、少なくとも約0.05 V/マイクロメートル、少なくとも約0.08 V/マイクロメートル、少なくとも約0.1 V/マイクロメートル、少なくとも約0.3 V/マイクロメートル、少なくとも約0.5 V/マイクロメートル、少なくとも約0.7 V/マイクロメートル、少なくとも約1 V/マイクロメートル、少なくとも約1.2 V/マイクロメートル、少なくとも約1.4 V/マイクロメートル、少なくとも約1.6 V/マイクロメートル、または少なくとも約2 V/マイクロメートルの流体に適用可能な電場を生じるように構築および配置(例えば、位置決め)することができる。ある実施形態において、さらに高い電場強度、例えば、少なくとも約2 V/マイクロメートル、少なくとも約3 V/マイクロメートル、少なくとも約5 V/マイクロメートル、少なくとも約7 V/マイクロメートル、または少なくとも約10 V/マイクロメートル、ま

たはそれ以上を使用してもよい。

【0153】

記載されるように、電場は、液滴が電気力を受けるように、流体液滴に適用されてもよい。流体液滴上で働く電気力は、ある場合において、少なくとも約 10^{-16} N/マイクロメートル³ であり得る。特定の場合において、流体液滴上で働く電気力はより高くあり得、例えば、少なくとも約 10^{-15} N/マイクロメートル³、少なくとも約 10^{-14} N/マイクロメートル³、少なくとも約 10^{-13} N/マイクロメートル³、少なくとも約 10^{-12} N/マイクロメートル³、少なくとも約 10^{-11} N/マイクロメートル³、少なくとも約 10^{-10} N/マイクロメートル³、少なくとも約 10^{-9} N/マイクロメートル³、少なくとも約 10^{-8} N/マイクロメートル³、または少なくとも約 10^{-7} N/マイクロメートル³、またはそれ以上であり得る。流体の表面領域と比較した、流体液滴上で働く電気力は、少なくとも約 10^{-15} N/マイクロメートル² であり得、ある場合において、少なくとも約 10^{-14} N/マイクロメートル²、少なくとも約 10^{-13} N/マイクロメートル²、少なくとも約 10^{-12} N/マイクロメートル²、少なくとも約 10^{-11} N/マイクロメートル²、少なくとも約 10^{-10} N/マイクロメートル²、少なくとも約 10^{-9} N/マイクロメートル²、少なくとも約 10^{-8} N/マイクロメートル²、少なくとも約 10^{-7} N/マイクロメートル²、または少なくとも約 10^{-6} N/マイクロメートル²、またはそれ以上であり得る。なお他の実施形態において、流体液滴上で働く電気力は、ある場合において、少なくとも約 10^{-9} N、少なくとも約 10^{-8} N、少なくとも約 10^{-7} N、少なくとも約 10^{-6} N、少なくとも約 10^{-5} N、または少なくとも約 10^{-4} N、またはそれ以上であり得る。

【0154】

チャネル拡張ジオメトリー

本明細書に記載される好ましい実施形態において、液滴合流は、現在、液滴を同じ主チャネルに放出する2つの液滴形成ノズルを備えることによって実行されている。ノズルのサイズは、一方のノズルが排出ラインを満たす大きな液滴を形成し、一方他方のノズルが第1の液滴よりも小さな液滴を形成することを可能にする。より小さな液滴は、より大きな液滴の速度よりも遅い速度で形成され、このことは、最大でも1つの小さな液滴が大きな液滴間にあることを保証する。通常は、小さな液滴は、比較的短い距離にわたってより大きな液滴に追いつくが、時折、大きな液滴の背後の再循環区域は、小さな液滴が大きな液滴からサイクリ的に分離することを引き起こす。加えて、小さな液滴は、たまに、ノズルと合流電極の間の距離にわたって大きな液滴に追いつかないことがある。従って、ある状況において、より強固な合流スキームが必要とされる。

【0155】

合流モジュールのジオメトリーの変化は、より広い範囲のサイズおよび流れにわたって、より強固で信頼できる、液滴の合流または融合を行うことができる。性能を改善するための解決法は、電極間の主チャネルの拡大を配置することである。図15は、改善された合流モジュールの概略図である。任意に、この拡大の直前の小さな狭窄（ネックダウン）は、合流点までの道筋上の液滴を良好に整列させるために使用可能である（図15にもまた示す）。この任意のネックダウンは、チャネルの流動ライン中で小さな液滴を中心に集めることを補助でき、これが拡大部における合流の前に大きな液滴の周囲を流れる可能性を減少する。電極対は、チャネルの片側または両側のいずれかに配置されてもよい。

【0156】

合流領域の拡大は、操作デバイス上で撮影される顕微鏡写真を通して示されるように、小さな液滴が大きな液滴を劇的に捕捉することを可能にする。拡大の体積は、大きな液滴を遅くするために十分に大きく、その結果、小さな液滴が常に大きな液滴に追いつくが、次の大きな液滴が合流される対に追いつかず、かつそれと接触しない。電極は、液滴が互いに接触し、場の勾配を通過するときに、合流が起こることを可能にする。

【0157】

検出モジュール

本発明の微小流動デバイスは、1つ以上の検出モジュールもまた備え得る。「検出モジュール」は、デバイスの中の位置、典型的には、主チャネルの中の位置であり、ここでは、分子、細胞、小分子、または粒子が、少なくとも1つの所定の特徴に基づいて、検出、同定、測定、または問い合わせされる。任意に、例えば、レポーターの存在または量について試験することによって、分子、細胞、小分子、または粒子は一度に試験することができ、そして特徴が光学的に検出または測定される。例えば、検出モジュールは、1つ以上の検出装置と連絡される。検出装置は、光学的検出器または電氣的検出器またはその組み合わせであり得る。適切な検出装置の例には、光導波路、顕微鏡、ダイオード、光刺激デバイス（例えば、レーザー）、光電子増倍管、およびプロセッサ（例えば、コンピュータおよびソフトウェア）、およびその組み合わせが含まれ、これらは、特徴、マーカー、またはレポーターを表すシグナルを検出するために、ならびに測定または分別モジュールにおける分別動作を決定および方向付けするために協働する。しかし、他の検出技術もまた利用できる。

10

【0158】

「決定する」という用語は、一般的には、例えば、定量的または定性的である、種の分析もしくは測定、および／または種の存在もしくは非存在の検出をいう。「決定する」とは、例えば、定量的または定性的である、2つ以上の種の間の相互作用の分析もしくは測定、または相互作用の存在もしくは非存在の検出もまたいう。適切な技術の例には以下が含まれるがこれらに限定されない：本明細書にさらに記載されるような、赤外線、吸収、蛍光、UV／可視光、FTIR（「フーリエ変換赤外分光」）、またはラマンなどのスペクトル測定；重力測定技術；偏光解析法；圧電測定；イムノアッセイ；電気化学測定；光学密度測定などの光学測定；円二色性；擬似電光散乱などの光散乱測定；偏光分析；屈折分析；または濁度測定。

20

【0159】

検出モジュールは、入口モジュールにおけるまたはその下流にある主チャネルの一部、および分別の実施形態においては、分別モジュールまたは分岐点の近傍にある、またはその上流にある主チャネルの一部の、中にあるか、それと連絡しているか、またはそれと同時にある。分別モジュールは、検出モジュールのすぐ下流に位置してもよく、またはこれは、分子、チャネルの寸法、および検出システムのサイズと一致している適切な距離で分けられてもよい。検出モジュールについての正確な境界は、必要とはされないが好ましい。

30

【0160】

分子および細胞を検出するために使用する検出モジュールは、所望の分子、細胞、ビーズ、または粒子が、それを運ぶ流れと比較して実質的に遅くされことなく、通過するために十分に大きな断面積を有する。検出モジュールの寸法は、研究されるサンプルの性質によって、特に、研究される液滴、ビーズ、粒子、分子、または細胞（ビリオンを含む）のサイズによって影響を受ける。例えば、哺乳動物細胞は、約1～50ミクロン、より典型的には10～30ミクロンの直径を有し得るが、ある哺乳動物細胞は（例えば、脂肪細胞）、120ミクロンよりも大きくあり得る。植物細胞は、一般的には、10～100ミクロンである。しかし、他の分子または粒子はより小さくあり得、約20nmから約500nmまでの直径を有する。

40

【0161】

導波管

本発明は、液滴の検出および制御のために、自己整合光学的導波管および光学素子（レンズ、プリズム、ミラー、相互接続など）を提供する。かかる導波管は、流体チャネルへの十分に規定された光学的アクセスを提供して、光学的散乱、吸収、蛍光、または任意の他の光学的測定技術を可能にするために使用することができる。

【0162】

導波管を作製するために、別々のシリーズのチャネルおよび有用な形状（レンズ、ミラーなど）が、基材中の他のチャネルの中で同時に（すなわち、同じ処理ステップにおいて

50

）、または連続するステップにおいてのいずれかで作製することができる。次いで、この方法で作製された再使用可能なマスターは、特別な備品または引き続くステップにおける注意深い整列の必要なしで、導波管構成要素および流体チャネルを形成するために使用することができる。次いで、余分のチャネルまたは形状は、チャネルまたは空隙への注入を通して高い指標の屈折液体（導波管のため）または屈折材料（ミラーのため）で充填される。液体は、流体として残るか、または固化させるかのいずれかであり得る。電気通信産業によって使用されるUV硬化エポキシは、導波管材料としての優れた選択である。可能な導波管ジオメトリーは、焦点レンズおよび後方反射ミラーを含むことができる。

【0163】

センサー

1つ以上の検出センサーおよび／またはプロセッサは、流体液滴と検知連絡されるように配置することができる。「検知連絡」は、本明細書で使用される場合、流体システム中（例えば、チャネル中）の流体液滴、および／または流体液滴を含む流体システムの一部が同じ様式で検知および／または決定されるように、センサーがどこにでも配置され得ることを意味する。例えば、センサーは、流体液滴、および／または流体液滴を含む流体システムの一部と、流体的に、光学的または視覚的に、熱的に、空気圧的に、電子的になどで、検知連絡にあり得る。センサーは、流体液滴、および／または流体液滴を含む流体システムの一部（例えば、チャネルまたは微小チャネル、流体液滴を含む液体など）を検知および／または決定することが可能であるように、流体システムに近接して配置され得、例えば、チャネルの壁の中に包埋されるかもしくは統合的に接続され、または流体システムから別々に配置されるが、しかし、流体系と物理的、電気的、および／または光学的な連絡を有する。例えば、センサーは、液滴を含むチャネルと任意の物理的連絡を含まないかもしれないが、しかし、赤外、紫外、または可視光などの、液滴または流体系から生じる電磁放射を検出するために配置されてもよい。電磁放射は、液滴によって產生される可能性があるし、および／または流体システム（または流体システムの外部）の他の部分から生じる可能性があり、そして、例えば、吸収、反射、回折、屈折、蛍光、リン光、極性変化、相変化、時間に関する変化などを通して、流体液滴の1つ以上の特徴を示すためのような様式で、流体液滴および／または流体液滴を含む流体システムの一部と相互作用する。一例として、流体液滴および／または流体液滴を取り囲む液体に向けてレーザーを方向付けてもよく、流体液滴および／または流体液滴を取り囲む液体の蛍光が決定されてもよい。「検知連絡」は、本明細書で使用される場合、直接的または間接的であり得る。一例として、流体液滴からの光はセンサーに向けられ、またはセンサーに向けられる前に、光ファイバーシステム、導波管などを通して最初に向けられてもよい。

【0164】

本発明において有用である検出センサーの非限定的な例には、光学的または電磁ベースのシステムが含まれる。例えば、センサーは、蛍光センサー（例えば、レーザーによって刺激される）、顕微鏡システム（これは、カメラまたは他の記録デバイスを含み得る）などであり得る。別の例として、センサーは、電子センサー、例えば、電場または他の電気特性を決定することが可能であるセンサーであり得る。例えば、センサーは、流体液滴および／または流体液滴を含む流体系のキャパシタンス、インダクタンスなどを検出し得る。ある場合において、センサーはプロセッサに接続されてもよく、次には、例えば、液滴を分別することによって、流体液滴上で実施される操作を引き起こす。

【0165】

特徴

液滴に関して決定的であり、本発明において使用できる特徴は、当業者によって同定可能である。かかる特徴の非限定的な例には、蛍光、スペクトル測定（例えば、光学的、赤外、紫外など）、放射能、質量、体積、密度、温度、粘度、pH、生物学的物質（例えば、タンパク質、核酸など）のような物質の濃度などが含まれる。

【0166】

次いで、対応するシグナルが生じ、例えば、「はい」特徴が存在する、または「いいえ

」特徴が存在しないを示す。このシグナルは、定性的または定量的に特徴に対応し得る。すなわち、シグナルの量は、特徴が存在する程度まで、測定することができ、そして一致させることができる。例えば、シグナルの強度は、分子のサイズ、または細胞によって発現される酵素の効力もしくは量、または1つの分子から別の分子への結合もしくはハイブリダイゼーションなどのポジティブもしくはネガティブ反応、または酵素によって触媒される基質の化学反応を示し得る。シグナルに応答して、データを収集することができ、および／または分別モジュール中の制御システムは、存在する場合、収集モジュールまたは廃棄モジュールへの送達のために、1つの分岐チャネルまたは別の分岐チャネルに、液滴を迂回させるように活性化することができる。従って、分別の実施形態において、分別モジュールにおける液滴中の分子または細胞は、検出モジュールにおける対応する試験によって生じるシグナルに従って適切な分岐チャネルに分別することができる。流路を変更する手段は、機械的、電気的、光学的、または本明細書に記載されるいくつかの他の技術を通して達成することができる。

10

【0167】

好ましい検出器は、顕微鏡などの光学的検出器であり、これは、公知の技術を使用して顕微鏡によって生じた画像または情報を処理するために、コンピュータおよび／または他の画像処理もしくは増強デバイスと連動されてもよい。例えば、分子は、サイズまたは分子量によって分析および／または分別できる。酵素は、酵素が基質の化学反応を触媒する程度により分析および／または分別することができる（反対に、基質は、酵素によって触媒される化学的反応性のレベルによって分析および／または分別することができる）。細胞は、特定のタンパク質の存在または量の光学的な指標について各細胞を試験するために光学的検出器を使用することによって、細胞がそのタンパク質を含むかまたは産生するかなどに従って分別することができる。タンパク質は、それ自体が、例えば、特徴的な蛍光によって検出可能であり得るか、またはタンパク質は、所望のタンパク質が存在するか、または少なくとも閾値量で存在する場合に、検出可能なシグナルを生じるレポーターを用いて標識されまたはそれに付随されてもよい。本発明の技術を使用して同定または測定され得る特徴の種類または数には限度がなく、分別のための目的の1つまたは複数の特徴が、所望の特徴を有する細胞を、それらの特徴を有さないものから区別するために十分に同定および検出または測定できるという条件で、これらの特徴には、非限定的に、細胞の表面特徴および細胞内の特徴が含まれる。例えば、本明細書に記載されるような任意の標識またはレポーターが、分子または細胞を分析および／または分別するため、すなわち、収集される分子または細胞を検出するための基礎として、使用することができる。

20

30

【0168】

蛍光偏光

本明細書で使用される場合、分析される生物学的／化学的実体は、それ自体が、例えば、特徴的な蛍光によって検出可能であり得、または、所望のタンパク質が存在するか、または少なくとも閾値量で存在する場合、検出可能なシグナルを生じるレポーターで標識されまたはそれに付随されてもよい。

【0169】

量子ドットまたはq-ドット（QD）と呼ばれる発光コロイド半導体ナノ結晶は、有機色素によって遭遇する機能的な制限のいくつかを回避するための潜在能力を有する無機蛍光団である。特に、CdSe-ZnSコアシェルのQDは、可視スペクトルおよび広い吸収バンドに及ぶ狭い発光バンド幅（FWHM $\sim$ 30 $\sim$ 45 nm）を有するサイズ依存性調節可能光ルミネッセンス（PL）を示す。これらは、共通の波長でいくつかの粒子サイズの同時励起（色）を可能にする。これは、次には、標準的な機器を使用して、いくつかの色の同時分解を可能にする。CdSe-ZnS QDは、高い量子収率もまた有し、光分解に対して抵抗性であり、そして有機色素に比較し得る濃度で光学的に検出できる。

40

【0170】

量子ドットは、典型的には、結晶性セレン化カドミウムなどの材料からなるナノスケール半導体である。「q-ドット」という用語は、これらの物質の量子閉じ込め効果を協調

50

し、典型的には、量子閉じ込めサイズ範囲にある蛍光ナノ結晶をいう。量子閉じ込めとは、電氣的に、または上に光を照射し、再結合するときに光を放射する電子正孔対を生じることによってのいずれかで、半導体を励起することによって生じる、LEDなどのバルク（巨視的）半導体からの光放射をいう。発光のエネルギー、およびそれゆえにその波長は、半導体材料の組成によって支配される。しかし、半導体の物理的サイズが、電子正孔対の天然の半径（ボア半径）よりもはるかに小さくまで顕著に減少される場合には、さらなるエネルギーが、ナノスケール半導体構造中でのこの励起を「閉じ込め」、より短い波長への放射のシフトを導くために必要とされる。いくつかの濃度における3つの異なるq-ドットは、各々が微小液滴中に配置でき、次いで、何が液滴中にあるかを解読するために、微小流体デバイスとともに使用することができる。Q-ドットの読み出しの蛍光ステーションまでの拡張は、微小流体デバイスの設計に組み込むことができる。一連の二色性ビームスプリッター、発光フィルター、および検出器は、このシステムに積み重ねることができ、必要とされる5つの発光チャネル（2つの蛍光偏光シグナルおよび3つのq-ドットバンド）の測定を可能にする。

10

【0171】

蛍光偏光（FP）検出技術は、薬物発見分野における高スループットスクリーニングアッセイのために適切である均質アッセイを可能にする。アッセイにおいて最も一般的な標識はフルオレseinである。FPアッセイにおいて、蛍光団は、偏光で励起される。光に平行な蛍光団のみが光を吸収し、励起される。励起状態は、光放射が起こる前に寿命となる。この時間の間に、標識された蛍光団分子は回転し、放射された光の偏光は励起表面とは異なる。偏光を評価するために、2種の測定が必要である：第1の測定は励起フィルターに平行な偏光放射フィルターを使用し（S-平面）、そして第2の測定は励起フィルターに垂直な偏光放射フィルターを用いる（P-平面）。蛍光偏光応答は、mP（ミリ偏光レベル）として与えられ、そして下記式から得られる：

20

$$\text{偏光 (mP)} = 1000 * (S - G * P) / (S + G * P)$$

ここで、SおよびPはバックグラウンドを引いた蛍光計数比率であり、G（格子）は機器およびアッセイ依存的因子である。

【0172】

分子の回転速度は、分子のサイズ、温度、および溶液の粘度に依存する。フルオレseinは、ハプテンの受容体ーリガンド結合アッセイまたはイムノアッセイのような生物ー親和性アッセイにおける分子の回転速度のために適している蛍光寿命を有する。基本的な原理は、標識された化合物が小さく、迅速に回転する（低偏光）ということである。標識された化合物がより大きな分子に結合するとき、その回転は顕著に遅くなる（低偏光から高偏光へ偏光が変化する）。従って、FPは、タンパク質、核酸、および他のバイオポリマーに結合するトレーサーの含量の直接的な読み取りを提供する。

30

【0173】

蛍光偏光技術は、何十年もの間、基礎研究および商業的な診断アッセイにおいて使用されてきたが、過去6年間においてのみ、薬物発見において広範に使用され始めた。もともとは、薬物発見のためのFPアッセイは、単一チューブの分析機器のために開発されたが、この技術は、等価な感度を有する市販のプレートリーダーが利用可能になったときに、高スループットスクリーニングアッセイに迅速に転換された。これらのアッセイには、キナーゼ、ホスファターゼ、プロテアーゼ、Gタンパク質共役受容体、および核受容体などのような周知の薬学的標的が含まれる。蛍光強度に基づく他の同種技術が開発されてきた。これらには、エネルギー移動、クエンチング、および増強アッセイが含まれる。FPは、これらを超えたいくつかの利点を提供する。これらのアッセイは、通常、構築することが容易である。なぜなら、トレーサーは、強度の変化による結合に応答しなくてもよいからである。加えて、1つのトレーサーのみが必要とされ、粗受容体調製物が利用されてもよい。さらに、FPは強度に依存しないので、着色した溶液および曇った懸濁液から比較的影響を受けない。FPは機器の領域においていくつかの利点を提供する。FPは分子の基本的な特性であるので、試薬は安定であり、標準化がほとんど必要ないか、全く必要な

40

50

い。FPは検出器のゲイン設定およびレーザー出力のドリフトに対して比較的感受性でない。

【0174】

FPのために選択される色素は、多くの細胞および酵素ベースのアッセイにおいて共通して使用され、qードットと有意に重複しないように設計されている。色素は、クロストークを評価するために、独立して、qードットと一緒に両方で（最初は機器なしで）評価される。好ましくは、液体qードット標識は、FACS分析および分別において現在使用されているスペクトル波長（すなわち、色素フルオレセイン、Cy3、Cy5など）の外側で読み取られる。このことは、現在使用されているアッセイ（これらの色素に依存している）の使用を可能にする。特定のqードットを使用して、クロストークが最小化される。

10

【0175】

従って、本発明は、FPの間に他の色素とのクロストークを回避するために唯一の色素コードを使用することによって、微小流体デバイス上で形成した液滴および／またはナノリアクターを標識するための方法を提供する。加えて、本発明は、化合物が、微小流体デバイス上でのFPによって区別されるように設計されている液体（液滴および／またはナノリアクターを含む）の中に含まれる化合物を標識するためのFP色素コードを作製するための方法を提供する。この様式において、同じ色、吸収、および発光を有する色素コードは、液体の中の化合物を標識するために使用できる。

【0176】

1つの態様において、本発明は、液体を標識するための蛍光偏光の使用に向けられる。液滴はいくつかの手段を使用して標識することができる。これらの標識手段には、異なる色素、量子ドット、キャパシタンス、不透明性、光散乱、蛍光強度（FI）、蛍光寿命（FL）、蛍光偏光（FP）、円二色性（CD）、蛍光相関、およびこれらの以前の標識手段のすべての組み合わせの使用が含まれるがこれらに限定されない。以下の開示は、微小流体デバイス上で液滴を標識するための手段としてのFPおよびFIの使用を記載している。加えて、溶液の全体のFPを調整するための手段としてのFLの使用、および全体のFIの濃度を変化させることによって二次元コードスキームを作製が実証されている。

20

【0177】

一般的に、より多くの体積を取り込む分子は、同じ蛍光団に結合したより小さな分子よりもより遅く転がる（図16）。FPは色素の濃度とは独立しており；液体は非常に大きく異なるFITCの濃度を有し得、それらの中で、なお同一のFP測定を有する。

30

【0178】

好ましい実施形態において、FP色素は有機色素であり、アッセイ色素と干渉しない有機色素が使用される。さらに、FP色素の全体の強度は定量できるので、液滴を標識するための第2の次元が提供される。従って、液滴を含む液体溶液中で色素のコードスキームを作製するために、FPの違いを利用することができる。一例は図17に示され、それによって、液滴は3つの異なるサイズのFITC分子（すなわち、3つの異なる液滴は、それぞれ、FITC分子、およびビオチンまたはストレプトアビジンのいずれかに結合されているFITCを含む）で標識される。それゆえに、一次元において、FPはコードスキームを作製するために使用することができる。しかし、本発明は、第2次元において、さらに多くの標識を作製するために、全体の溶液の蛍光強度（FI）もまた使用できる。二次元で液滴を標識する一例は図18に示される。

40

【0179】

興味深いことに、合わせた溶液の全体のFPを変化させるために、検出された発光波長のスペクトルの重複を用いる2種の色素の蛍光寿命（FL）の違いもまた、利用することができる（図18および19を参照のこと）。

【0180】

図17は、色素分子が一定の範囲のFPに及ぶように結合されている複数の化合物の使用を議論しているが、高分子量または低分子量の化合物のセットを使用して、その範囲を

50

測ることもまた可能である。図 19 に例示されているように、色素は、大きな化合物（例えば、ストレプトアビジン）に結合でき、固定濃度で維持でき、そしてその濃度まで、より小さな化合物（例えば、遊離の色素分子）が同じ溶液に滴定される。溶液の F P は、より小さな分子の F P よりもいくぶんわずかに大きくなるまで、より大きな分子の値からの識別可能な増分の中にあるように、調整することができる。「全体の」色素強度は、2つの色素結合化合物の混合物の濃度を変化させることによって、変化させることができる。全体の色素濃度および F P を変化させることにより、2つの次元が、F P 色素コード（F P コード）を生成するために使用できる。従って、多くの F P コードは、2つの化合物のみを使用して生成することができる。

【0181】

このことは、GFPなどの大きな蛍光タンパク質、およびより小さな分子と組み合わせたフィコビリタンパク質の使用もまた含むことができる。

【0182】

生物学的色素中で一般的に使用されている色素の例を以下の表に列挙する。

【0183】

【化6】

励起波長	発光波長	適合可能な色素の例
450	500	Cyan 500
483	533	SYBR Green, FAM
523	568	HEX, VIC
558	610	RED 610
615	640	RED 640
650	670	CY5

別の態様において、本発明は、色素発光および色素濃度以外の特性を使用して、固体を直接標識している。1つの実施形態において、固体は、例えば、ビーズまたは固体支持体もしくはチップ上の位置を含み得る。液体について上記に実証したように、F I および F L は、標識として使用される特徴の多くの次元のうちの2つであり得る。非限定的な例として、ビーズまたは他の移動性固体支持体などの固体について、全体の F P を変化させるために異なる F L とともに2つの色素を使用することが可能である。

【0184】

別の実施形態において、色素をビーズに結合するために、リンカーを使用することができる。リンカーは、色素が回転する（すなわち、転がる）ための異なる自由な角度を有することを許容するために、変化させることができる。この様式でリンカーを変化させることは、結合した色素の F P を変化させることができ、これは、独特な組み合わせで、標識として使用することができる。ある実施形態において、ビーズは、有機溶媒中で膨張し得、色素は疎水性力によって、適所に保持され得る。この場合において、液体標識のための上記の F P、F I、F L の方法は、ビーズを標識するための手段としてもまた使用できる。クエンチング分子もまた、色素の特徴を変化させるために使用できる。かかるクエンチングは、連続的であり得るか、または、リンカー内部の相互作用の強度（例えば、種々の長さのヌクレオチドステムループ構造）に依存して、ペプチドまたは核酸リンカーなどの分子の、一緒に分子を運ぶ異なる手段との相互作用を通して、もたらされ得る。

【0185】

実質的アレイ、ランダムアレイ、および非ランダムアレイ上で分析される反応（以下に手短かに議論される）もまた、多重化のために一般的に使用される2種（cy3およびcy5の強度）を超えて増加することができる。例えば、異なる F P、F I などが読み取りとして使用できる。

【0186】

ランダムアレイ解説：先行技術のビーズは、光ファイバー面板の中で適所に保持されている1つ以上の付着前オリゴヌクレオチド結合ビーズを使用している（例えば、I l l u m i n aによって使用されるもの）。ビーズ上のオリゴは、標識された相補性オリゴの連続的ハイブリダイゼーションを使用して解説される。先行技術のアッセイは、各々の型のビーズに装着された別々のオリゴヌクレオチド相補性ジップコード（「I l l u m a c o d e」）を使用する。

【0187】

本明細書に記載される本発明は、F P、F I、F L 標識ビーズまたは移動性固体支持体がランダムアレイ（例えば、I l l u m i n aによって製造されたようなチップ）に配置され得、F P、F I、F Lがビーズを解説するために使用されるという点で、先行技術の方法よりも優れている。ビーズのF P、F I、F Lは、チップを使用する前に解説可能であり、異なるビーズは、それらの特定の位置に関して「マッピング」される。または、ビーズは、アッセイの読み取りの結合の間に解説することができる。有意には、本発明によって記載される方法は、分析前または分析の間のいずれかに、各ビーズ型の位置をあらかじめ決定するために使用できる。

【0188】

実質的アレイ解説：先行技術の方法は、100ビーズ型のセットを区別するために2つのレーザーおよび3つの検出器を使用する。ビーズ型は、ビーズ中に含まれる10濃度（色素あたり）の1つで存在する2つの異なる色素のF Iによって区別され、アッセイ検出器は、ビーズ上のフルオレセイン濃度を測定するために使用される。有機溶媒で膨張したビーズに加えられる色素は、ビーズには直接的に付着されないが、疎水性力によってビーズ中に保持されたままである。

【0189】

本発明に記載されるような本発明の方法を使用して、F Pを測定するために使用される先行技術の機械への第2の検出器を加えることができ、それによって、三次元目を加え、先行技術において利用可能である100個を超えるコードスキームを拡張する。

【0190】

非ランダムアレイ解説：先行技術のチップ（A f f y m e t r i xによって使用されるものなど）において、オリゴヌクレオチドをチップ上で直接的に合成する。解説は、チップ上のアッセイの位置を知るという単純な問題である。

【0191】

本発明に記載されるような方法は、チップ上で同時に分析する（すなわち、多重化すること）ことが可能である、事象の数を増加させるためのようなチップとともに有利に使用できる。非限定的な例として、C y 3、C y 5、F L、およびF Pが、ハイブリダイゼーション反応のための分析マーカーとして使用できる。

【0192】

本発明は、高周波識別（R F I D）を使用してマイクロサイズまたはナノサイズの液滴を標識するための方法もまた提供する。R F I Dタグは、液滴中の内容物の同定を改善できる。好ましくは、液滴は、微小流体デバイス中で利用される。

【0193】

R F I Dは、R F I Dタグまたはトランスポンダと呼ばれるデバイスを使用して、データを保存すること、およびデータを遠隔操作で取り出すことに依存する、自動化同定方法である。R F I Dタグは、電波を使用する同定の目的のために、製品、動物、またはヒトに付着され得、または取り込まれ得る物体である。チップベースのR F I Dタグは、シリコンチップおよびアンテナを備える。パッシブタグは内部電源を必要としないのに対して、アクティブタグは電源を必要とする。H i t a c h iは「粉末」0.05mm×0.05mm R F I Dチップを有する。新たなチップは遺伝の記録ホルダー、0.4mm×0.4mm m uチップよりも64倍小さく、H i t a c h iの去年のプロトタイプよりも9倍小さく、そして独特な38桁ID番号を保存し得る128ビットROMの余裕がある。

。

10

20

30

40

50

【0194】

1つの実施形態において、RFIDタグを含む溶液は液滴に乳化され、液滴溶液中での物質の同定のための標識として使用される。適用には、遺伝学、ゲノミクス、プロテオミクス、化学合成、バイオ燃料、その他が含まれるがこれらに限定されない。

【0195】

レーザー

レポーターを検出するため、または分子、細胞、もしくは粒子が所望の特徴を有するかどうかを決定するために、検出モジュールは、例えば、レーザー、半導体レーザー、発光ダイオード(LED)、高輝度ランプ(例えば、水銀ランプ)などのような測定可能な光エネルギーを放射する特徴について、レポーターを刺激するための装置を備えてもよい。ランプが使用される場合、チャンネルは、好ましくは、検出モジュールを除くすべての領域において光から遮断される。レーザーが使用される場合、レーザーは、異なる分析ユニットからの検出モジュールのセットを横切って走査するように設定することができる。加えて、半導体レーザーまたはLEDは、分析ユニットを備える同じチップ上で微細加工されてもよい。代替的には、半導体レーザーまたはLEDは、ダイオードからのレーザー光が検出モジュール上で輝くように、分析またはマイクロチップに隣接して配置される第2のチップ(すなわち、半導体レーザーチップ)に取り込まれ得る。

【0196】

一体型半導体レーザーおよび/または一体型光ダイオード検出器は、検出モジュールの近傍の基材上に備えることができる。この設計は、励起および/または発光放射のためのコンパクトさおよびより短い光路の利点を提供し、従って、ゆがみおよび損失を最小化する。

【0197】

レポーターによって産生される蛍光は、検出領域を通過している分子(例えば、DNA、タンパク質、酵素、または基質)または細胞に焦点を合わせたレーザービームを使用して励起される。蛍光レポーターには、ローダミン、フルオレセイン、テキサスレッド、Cy3、Cy5、フィコビリタンパク質(例えば、フィコエリトリン)、グリーン蛍光タンパク質(GFP)、YOOO-1、およびピコグリーンが含まれ得るがこれらに限定されない。分子フィンガープリンティング適用において、レポーター標識は、フルオレセイン-dNTP、ローダミン-dNTP、Cy3-dNTPなどのような蛍光標識された単一のヌクレオチドであり得る;ここで、dNTPは、dATP、dTTP、dUTP、またはdCTPを表す。このレポーターは、ビオチン-dNTPなどの化学修飾された単一のヌクレオチドでもあり得る。レポーターは、蛍光的にまたは化学的に標識されたアミノ酸または抗体(これは、細胞またはウイルスによって発現またはディスプレイされたときに、特定の抗原またはそのフラグメントに結合する)であり得る。

【0198】

本発明のデバイスは、蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)設備を使用して現在利用されているのと同様の様式で、そこに結合した検出可能なレポーターを有する、細胞表面マーカーなどの選択した細胞マーカーの発現のレベルに基づいて、細胞を分析および/または分別できる。細胞内にあり、細胞表面に出現する必要は必ずしもないタンパク質または他の特徴もまた、同定または分別のための基礎として使用することができる。このデバイスはまた、検出モジュールを通過しているポリヌクレオチドまたはポリペプチド(酵素または他のタンパク質を含む)またはそのフラグメントのような分子のサイズまたは分子量を決定することもできる。または、このデバイスは、レポーターによって示されるいくつかの他の特徴の存在または程度を決定することができる。所望される場合、細胞、粒子、または分子は、この分析に基づいて分別することができる。分別した細胞、粒子、または分子は、収集モジュール中の出口チャンネルから収集することができ(または廃棄モジュールから廃棄することができ)、そして必要に応じて使用することができる。収集された細胞、粒子、または分子は、さらなる合流、分析、および分別のために、デバイスから取り出すことができ、またはデバイスに再導入することができる。

【0199】

プロセッサ

本明細書で使用される場合、「プロセッサ」または「マイクロプロセッサ」は、例えば、数式または電子回路もしくは計算回路を使用することによって、1つ以上のセンサーからのシグナルを受け取り、シグナルを保存し、および／または1つ以上の応答を方向付ける（例えば、上記のように）ことが可能である任意の構成要素またはデバイスである。シグナルは、センサーによって決定される環境因子を示す任意の適切なシグナル、例えば、空気シグナル、電子シグナル、光学的シグナル、機械的シグナルなどであり得る。

【0200】

本発明のデバイスは、液滴の周囲のシグナルを送信すること、および液滴に近接している電気シグナルを拾い上げることによって液滴を検出するための、組み込まれた金属合金成分、および／または導電性層の中にパターン化された特徴などの特徴を備えることができる。

10

【0201】

並行分析

液滴内容物検出はまた、単分子限界と同程度の感度を有する分光学的蛍光画像処理を使用して、並行して複数の液滴の内容物の同時検出によって達成することもできる。蛍光団生物学的マーカーのような蛍光実体、および／または顕微鏡の視野の二次元シートの中の量子ドットを含む液滴を空間的に分配することができる。次いで、これらの液滴の視野は、蛍光励起源によって照射することができ、得られる蛍光は分光学的に画像化できる。それゆえに、所定の蛍光検出感度について、単一液滴蛍光検出法と比較した、蛍光検出の処理能力は、所定の感度について、 a/b の因数で増加され得、ここで、 a は所定の視野内で画像化できる液滴の数であり、 b は、複数液滴の蛍光検出器と比較した、単一液滴の蛍光検出器の蛍光感度の比率である。さらに、液滴が検出体積を通して流れ、その結果、それらの検出体積への滞留時間、従って、シグナル積分時間および感度が制限されている単一液滴蛍光検出法とは異なり、視野の中の液滴の滞留時間は無制限であり得、それによって、単一分子限界と同程度に高い感度を可能にする。

20

【0202】

ビーズ

本発明のデバイスは、ビーズの使用、ならびにビーズを分析および分別するための方法（すなわち、ビーズリーダーデバイス）もまた含む。このデバイスは、2つ以上のビーズのセットの1つ以上を含む液滴を読み取り、そして分別するかまたは分別しないかのいずれかであり得る。各ビーズはセット内の他のビーズから互いに区別することができる。ビーズは、量子色素、蛍光色素、蛍光色素の比率、放射能、放射性タグなどを含むがこれらに限定されない、いくつかのタグによって分離することができる。例えば、一連のビーズは、区別できる量である2種の色素の一定の比率を含み、1つの区別できる比率を含むビーズを、2つの色素の異なる比率を有するこのセット中の他のビーズから検出および分別するための装置を伴う。微小流体デバイスは常磁性ビーズを含み得る。常磁性ビーズは、液滴の合流事象と分裂事象を使用して、液滴からの化学成分の導入および取り出しを行うことができる。常磁性ビーズは、液滴を分別するためにもまた使用できる。

30

40

【0203】

本発明は、限定された希釈－負荷、次いで液滴内部での化学的または光学的放出を通して、ビーズ上の分子ライブラリーをスクリーニングする方法を提供する。ビーズ上での化学合成方法が提供され、液滴中での放出手段（化学的、UV光、熱など）を使用して、ビーズに付着した上記化学物質を遊離させ、次いで、さらなる操作のために第2の液滴を第1の液滴と合わせる。例えば、ビーズを同定するための手段（例えば、質量スペクトルタグを使用する）と同時の、ビーズ上での化学物質のテーバック合成である。流体の流れにおける液滴中で得られる混合化学ビーズを使用すること、およびUV光にビーズを曝露することで、ビーズから液滴環境に合成した化学物質を放出する。細胞を含む液滴と、放出した化学物質を含む液滴を合わせ、そして細胞ベースのアッセイを実施する。所望の特徴

50

を有する液滴を分別し（例えば、レポーター遺伝子を作動させる）、次いで、質量スペクトル測定を使用して、分別したビーズを分析する。

【0204】

本発明のデバイスは、ビーズ分別の前にカラム分離を含むことができる。デバイスは、液滴形成の前に、サンプルをクロマトグラフィーで分別するための分離手段を負荷したチャンネルを備える。かかる分離手段は、サイズ、電荷、疎水性、原子量などを含み得る。分離は、同一組成で、または化学的（例えば、塩または疎水性を使用する）、電氣的、圧力によるなどの勾配を生成する手段の使用によって、行うことができる。例えば、チャンネルに、セファロースサイズ排除媒体を前負荷する。サンプルは一方の末端から負荷し、液滴は反対側の末端で形成される。サンプルは、液滴中に取り込まれる前にサイズによって分離される。

10

【0205】

分別モジュール

本発明の微小流体デバイスは、1つ以上の分別モジュールをさらに備え得る。「分別モジュール」は、検出モジュール中での試験と関連して受容されるシグナルに依存して、出口モジュール（すなわち、収集モジュールまたは廃棄モジュール）への送達のために、1つ以上の他のチャンネル、例えば、分岐チャンネルに入るために、分子、細胞、小分子、または粒子の流れが方向を変えることができるチャンネルの接続部である。典型的には、分別モジュールは、モニターされ、および／または検出モジュールの制御下にあり、それゆえに、分別モジュールは、かかる検出モジュールに「対応」し得る。分別領域は、1つ以上の分別装置と連絡し、そしてこれによって影響を受ける。分別装置は、技術または制御システム、例えば、誘電性、電気性、電気浸透性、（微小）バルブなどを備える。制御システムは、分子、細胞、小分子、または粒子の流れを、所定の分岐チャンネルに変更または方向付けるための種々の分別技術を利用することができる。「分岐チャンネル」は、分別領域および主チャンネルと連絡しているチャンネルである。主チャンネルは、例えば、T形状またはY形状を形成する、分別モジュールまたは「分岐点」において2つ以上の分岐チャンネルと連絡することができる。他の形状およびチャンネルジオメトリが所望されるように使用されてもよい。典型的には、分岐チャンネルは、検出モジュールによって検出され、そして分別モジュールにおいて分別されるように、目的の分子、細胞、小分子、または粒子の特徴に依存して、分子、細胞、小分子、または粒子を受容する。分岐チャンネルは、出口モジュールを有し、および／または、分子、細胞、小分子、もしくは粒子の収集もしくは廃棄を可能にするためのウェルもしくはリザーバ（それぞれ、収集モジュールまたは廃棄モジュール）で終結し得る。または、分岐チャンネルは、さらなる分別を可能にするための他のチャンネルと連絡してもよい。

20

30

【0206】

本発明のデバイスは、1つ以上の出口モジュールをさらに備え得る。「出口モジュール」は、合流、検出、および／または分別の後で、分子、細胞、小分子、または粒子を収集または分配するデバイスの領域である。出口モジュールは、収集モジュールおよび／または廃棄モジュールを備え得る。収集モジュールは、サンプルを保存するための手段に接続することができる。収集モジュールは、検出モジュールにおいて特定の所定の特徴を有するとして検出される液滴を収集および含有するためのウェルまたはリザーバであり得る。収集モジュールは温度制御され得る。廃棄モジュールは、サンプルを廃棄するための手段に接続することができる。廃棄モジュールは、検出モジュールにおいて特定の所定の特徴を有さないとして検出される液滴を収集および含有するためのウェルまたはリザーバであり得る。出口モジュールは、存在する場合、分別モジュールの下流にあり、または分別モジュールが存在しない場合、検出モジュールの下流にある。出口モジュールは、収集モジュールまたは廃棄モジュールへの接続のための分岐チャンネルまたは出口チャンネルを含み得る。デバイスは、1つより多くの出口モジュールを含み得る。

40

【0207】

流体液滴の特徴は、例えば、本明細書に記載されるように、いくつかの様式で検知およ

50

び／または決定されてもよく（例えば、液滴の蛍光が決定され得る）、そして応答においては、電場が流体液滴から適用または取り出されてもよく、特定の領域（例えば、チャンネル）に流体液滴を方向付ける。流体液滴は、好ましくは、電荷を有さない流体液滴（これは最初には、電荷を有してもよく、または電荷を有さなくてもよい）の中に双極子を誘導することによって分別または案内され、電場の適用を使用して、液滴を分別または導く。電場はA C場またはD C場などであり得る。例えば、図20Aを参照すると、液滴530および液体535を含むチャンネル540は、チャンネル542および544に分かれる。液滴530は電荷を有さない。電極526はチャンネル542の近くに配置されているのに対して、電極527はチャンネル544の近くに配置されている。電極528は、チャンネル540、542、および544の接合部の近くに配置されている。図20Cおよび20Dにおいて、電極526、527、および／または528を使用して、流体液滴中で双極子が誘導される。図20Cにおいて、電極527および528を使用して、液滴に電場525を適用することによって液滴530中で双極子が誘導される。電場の強さに起因して、液滴は、右側に強く誘引され、チャンネル544に入る。同様に、図20Dにおいて、電極526および528を使用して電場525を液滴に適用することによって、液滴530中で双極子が誘導され、液滴がチャンネル542に誘引されることを引き起こす。従って、適切な電場を適用することによって、液滴530は、所望されるように、チャンネル542または544のいずれかに方向付けることができる。

【0208】

本発明は、上記の好ましい誘電性液滴分別技術の効率、正確さ、および信頼性の改善もまた提供する。片側の誘電性分別は、2つの排出レッグと切り換え可能な電場の間の流れの不均衡の組み合わせに依存して、主サンプル流動から目的の液滴を選択的に分別する。分別の決定は、液滴およびその内容物のリアルタイム測定のある形態に基づいて行われる。図21および22は、片側誘電性分別のための種々の可能な多くの流体および電極ジオメトリーを示す。図21、パネルA～Dは、非対称分別適用において使用できる、可能なフロチャンネルジオメトリーを示す。パネルFは、障壁、例えば、その左側に流体の流れが通らない障壁の使用を図示する。これらの設計は、流体チャンネルの単なる概念的な表示であり、実際の設計は、当業者によって決定されるように、絶対的および相対的な寸法で異なる可能性があることに注意されたい。

【0209】

図22は、非対称分別適用において使用される可能な電極ジオメトリーを示す。パネルAは、鋭い先端の電極の使用を示す。パネルBは、液滴と電場の間の相互作用時間を増加させるための広い先端の電極を示す（先端は多くの滴下直径の長さであり得る）。パネルCは、収集ラインをまたぐ電極を示す。パネルDは、主チャンネルの反対側の電極を示す。パネルEは非対称電極対を示す（非対称性は他の電極対配置のいずれかにも同様に存在し得る）。これらの設計は、電極の単なる概念的な表示であり、実際の設計は、当業者によって決定されるように、絶対的な寸法および電極形状で異なる可能性があることに注意されたい。流体チャンネルジオメトリーは「Y」接続部として描かれているが、図21に示される任意のチャンネルジオメトリーが、これらの図において置き換え可能である。

【0210】

典型的には、収集レッグの流速が、収集ラインへの液滴の押し出しを開始するために必要なレベルのすぐ下の値に設定される（図では40%と示しているが、実際の値はこれとは異なる可能性があり、実際の流体および電極のジオメトリー、全体の流れ、ならびに液滴のサイズおよび組成に依存する）。

【0211】

代替的な設計戦略として、収集レッグは、液滴が通常分別収集ラインを下って流れる流速で操作可能であり（すなわち、図に示す分流は、40%収集／60%廃棄から、60%収集／40%廃棄に変更する）、目的の液滴が検出されるまで、電場は加圧を維持する。この時点で、電場は停止し、液滴は、電気力の代わりに流体力に基づいて収集レッグを引き下ろす。

【0212】

または、流体液滴は、液滴上で電場を作り出すことによって方向付けてもよく（例えば、以前に記載されたように）、AC場、DC場などであり得る、適用した電場を使用して液滴を導く。一例として、電場は、必要に応じて、特定の領域に流体液滴を方向付けるために、選択的に適用されてもよく、取り除かれてもよい（または異なる電場が適用されてもよい）。電場は、ある実施形態においては、流体液滴を含む液体の流れを実質的に変化させることなく、必要に応じて、選択的に適用されてもよく、取り除かれてもよい。例えば、液体は、実質的に、定常状態を基礎として（すなわち、流体液滴を含む液体の平均流速が、定常状態流または時間に関する液体の流れの予想値の20%未満または15%未満偏向し、そしてある場合において、平均流速は、10%未満または5%未満偏向する）、または本発明の流体システムを通して（チャンネルまたは微小チャンネルを通して）の他の所定の基礎に基づいて流れてもよく、液体中に含まれる流体液滴は、流体システムを通しての液体の流れを実質的に変化させることなく、例えば、電場を使用して、種々の領域に方向付けられてもよい。

10

【0213】

しかし、他の実施形態において、流体液滴は、液滴を含む液体の流れを変化させることによって、本発明の流体システムの中でスクリーニングまたは分別されてもよい。例えば、1つのセットの実施形態において、流体液滴は、流体液滴を取り囲む液体を、第1のチャンネル、第2のチャンネルなどに方向付けることによって、誘導または分別されてもよい。

【0214】

20

別のセットの実施形態において、流体システム、例えば、異なるチャンネルの中、またはチャンネルの異なる部分の中の圧力は、流体液滴の流れを方向付けるために制御可能である。例えば、液滴は、流れのさらなる方向のために、複数の選択肢を含むチャンネル接続部に向かって方向付けることができる（例えば、任意の下流の流れチャンネルを規定するチャンネル中で、分岐またはフォークに向かって）。任意の下流の流れチャンネルの1つ以上の中の圧力は、液滴をチャンネルの1つに選択的に方向付けるように制御することができ、圧力の変化は、接続部に到達するために連続液滴が必要とする時間のオーダーに対して影響を与える可能性があり、その結果、各々の連続的な液滴の下流の流路は、独立して制御可能である。1つの配置において、液体リザーバの延長および／または短縮は、例えば、流体液滴を含む液体の方向付けられた動きを引き起こすことによって、流体液滴をチャンネルに誘導または分別するために使用されてもよい。液体リザーバは、活性化されたときに、活性化リザーバによって引き起こされる液体の流れが液体を好ましい方向に流させ、その好ましい方向で流体液滴を運ぶように、配置されてもよい。例えば、液体リザーバの延長は、リザーバに向かう液体の流れを引き起こす可能性があるのに対して、液体リザーバの短縮は、リザーバから離れる液体の流れを引き起こす可能性がある。ある場合において、液体リザーバの延長および／または短縮は、例えば、本明細書に記載されるような、他の流れ制御デバイスおよび方法と組み合わせてもよい。液体リザーバの延長および／または短縮を引き起こすことが可能なデバイスの非限定的な例には、ピストンおよび圧電部品が含まれる。ある場合において、圧電部品は、例えば、電気シグナルに応答した、それらの比較的迅速な応答時間に起因して、特に有用であり得る。

30

40

【0215】

ある実施形態において、流体液滴は、2つより多くのチャンネルに分別されてもよい。または、流体液滴は、例えば、特定の適用に依存して、2つ以上の別々の液滴に分別および／または分割されてもよい。上記の技術のいずれかが、液滴を分割および／または分別するために使用されてもよい。非限定的な例として、第1の電場をデバイス（またはその一部）に適用する（または取り除く）ことによって、流体液滴は、第1の領域またはチャンネルに方向付けられてもよい；第2の電場をデバイス（またはその一部）に適用する（または取り除く）ことによって、液滴は、第2の領域またはチャンネルに方向付けられてもよい；第3の電場をデバイス（またはその一部）に適用することによって、液滴は、第3の領域またはチャンネルに方向付けられてもよい、などであり、ここで、電場は、何らかの点で

50

、例えば、強度、方向、周波数、時間などが異なってもよい。一連の液滴中で、各液滴は、独立して、分別および／または分割されてもよい；例えば、ある液滴は、1つの位置から別の位置まで方向付けられてもよいのに対して、他の液滴は複数の液滴に分割され、2つ以上の位置に方向付けられてもよい。

【0216】

ある場合において、速い分別速度は、本発明の特定のシステムおよび方法を使用して達成可能であり得る。例えば、1秒あたり少なくとも約1液滴が、ある場合において決定および／または分別されてもよく、他の場合において、1秒あたり少なくとも約10液滴、1秒あたり少なくとも約20液滴、1秒あたり少なくとも約30液滴、1秒あたり少なくとも約100液滴、1秒あたり少なくとも約200液滴、1秒あたり少なくとも約300液滴、1秒あたり少なくとも約500液滴、1秒あたり少なくとも約750液滴、1秒あたり少なくとも約1000液滴、1秒あたり少なくとも約1500液滴、1秒あたり少なくとも約2000液滴、1秒あたり少なくとも約3000液滴、1秒あたり少なくとも約5000液滴、1秒あたり少なくとも約7500液滴、1秒あたり少なくとも約10、000液滴、1秒あたり少なくとも約15,000液滴、1秒あたり少なくとも約20,000液滴、1秒あたり少なくとも約30,000液滴、1秒あたり少なくとも約50,000液滴、1秒あたり少なくとも約75,000液滴、1秒あたり少なくとも約100,000液滴、1秒あたり少なくとも約150,000液滴、1秒あたり少なくとも約200,000液滴、1秒あたり少なくとも約300,000液滴、1秒あたり少なくとも約500,000液滴、1秒あたり少なくとも約750,000液滴、1秒あたり少なくとも約1,000,000液滴が、かかる様式で、決定および／または分別されてもよい。

【0217】

複数測定分別

ある実施形態において、2つの異なる測定に基づいて液滴を分別することが有用であり得る。例えば、2つのシグナルの比率、2つのシグナルの合計、または2つのシグナル間の違いに基づいて分別することが望ましくあり得る。具体的には、これは、酵素を最適化したい場合であって、その結果、その酵素が1種の基質に対して働くが他に対しては働かず、または2種の基質に対して働く場合に有用である。これは、液滴の集団に対して複数ラウンドの選択を使用して行うためには容易ではない。現在の分別技術のこの欠点を克服するために、本発明は、液滴を分割し、2つの娘液滴に対して異なる実験を実施し、次いで再順序付けを行い、その結果、連続的に検出器を通過するための適切なジオメトリーを有する複数チャンネルを備えたデバイスを提供する。次いで、2つのシグナルにおける合計、比率、または違いを、液滴が分別分岐に入る前に計算することができる。指標色素または等価な物質は、各液滴がレーザーに入りそして離れるときを示すために、一方または両方の液滴に加えてもよい。代表的なスケッチを図23に示す。

【0218】

サンプル回収

本発明は、細胞の生存度に対する潜在的な損傷を最小化するように、最小限の数の工程でかつ穏やかな様式で、微小流体デバイス上で収集された水性エマルジョンから水相成分を回収するための方法を提案する。

【0219】

1つの態様において、連続相キャリア流体中の水相成分を含む安定な水性サンプル液滴エマルジョンは、連続相キャリアオイルの上端にクリーム状にされる。非限定的な例として、連続相キャリア液体は、1つ以上の安定化界面活性剤を有し得るパーフルオロカーボンオイルを含み得る。水相エマルジョンの密度よりも高い連続相流体の密度によって、水性エマルジョンは、上端に上昇するか、または連続相キャリア流体から分離する。例えば、1.0である水性エマルジョンの密度と比較される、デバイスの1つの実施形態において使用されるパーフルオロカーボンオイルは1.8である。

【0220】

次いで、クリーム状にされたエマルジョンは、パーフルオロ化アルコール（例えば、1

H, 1 H, 2 H, 2 H-パーフルオロ-1-オクタノール)などの不安定化界面活性剤を含む第2の連続相キャリア流体の上に配置される。この第2の連続相キャリア流体もまた、パーフルオロカーボンオイルであり得る。混合の際に、水性エマルジョンは合流し始め、合流は、低速の手短な遠心分離(例えば、微量遠心管中、2000rpm、1分間)によって達成される。ここで、合流した水相は除去できる(細胞は、さらなる分析のために適切な環境に配置することができる)。

【0221】

本発明とともに有用である、さらなる不安定化界面活性剤および/またはオイルの組み合わせは、同定または合成することができる。

【0222】

混合モジュール

本発明の微小流体デバイスは、1つ以上の混合モジュールをさらに備えることができる。1つ以上の合流モジュール中での1つ以上の液滴の合流は、合流液滴の内容物を混合するために十分であり得るが(例えば、液滴内に存在するものを回転ボルテックスすることを通して)、2つの液滴が融合または合流する場合、液滴中の完全な混合は、即時的には起こらないことに注意するべきである。その代わりに、例えば、合流した液滴は、最初に、第1の流体領域(第1の液滴から)および第2の流体領域(第2の液滴から)から形成される可能性がある。従って、ある場合において、流体領域は、例えば、流体液滴中の内部の「逆回転」流に起因して、別々の領域として残っている可能性があり、従って、不均一な流体液滴を生じる。「混合モジュール」は、これらの内容物を混合するために、振盪するための特徴を備え、またはさもなくは液滴を操作することができる。混合モジュールは、好ましくは、合流モジュールから下流でかつ検出モジュールの上流である。混合モジュールは、液滴の内容物を混合するため、および微小流体デバイス中で単一の液滴に合わせる流体の混合回数を減少させるために、チャネルジオメトリー、音響アクチュエータ、金属合金成分電極、または導電性パターン化された電極を含み得るがこれらに限定されない。例えば、流体液滴は、1つ以上のチャネル、または液滴がその速度および/または動きの方向の変化を引き起こす他のシステムを通過させてもよい。方向の変化は、液滴中の対流パターンを変化させる可能性があり、流体が少なくとも部分的に混合されることを引き起こす。組み合わせもまた可能である。

【0223】

音響操作のために、音波の周波数は、細胞にいかなる損傷も引き起こさないように微調整するべきである。音響混合の生物学的効果は十分に研究されており(例えば、インクジェット工業)、多くの公開された文献もまた、圧電微小流体デバイスが、生きている微生物およびDNAなどのインタクトな生物学的ペイロードを送達し得ることを示した。一例において、音響共鳴の設計は、PDMSスラブ中で刻まれる共鳴音の側に位置する圧電バイモルフ平板を使用する。圧電駆動波形は、流体中の細胞を分離可能である臨界周波数を選択するために、注意深く最適化される。周波数パラメーターを超えて最適化するための5つのパラメーターが存在する。Lab electronicsは、圧電駆動波形を最適化するために使用可能である。その後、低コスト回路が、好ましい微小流体デバイス中で最適化される波形のみを生成するために設計可能である。

【0224】

液滴中での流体混合の他の例は、参照により本明細書に援用されるWO 2004/091763に記載されている。

【0225】

遅延モジュール

本発明の微小流体デバイスは、1つ以上の遅延モジュールをさらに備えることができる。「遅延モジュール」は、遅延ラインであり得る。液体内の反応が、ささいではない時間の長さの間、起こることを可能にする微小流体デバイスの操作は、デバイス中の滞留時間を増加させるために遅延ラインを必要とする。長い滞留時間を要求する反応については、より長いまたはより大きな遅延ラインが必要とされる。従って、本発明は、微小流体デ

バイス中の滞留時間を増加させるための方法を提供する。

【0226】

遅延モジュールは、主チャネルと液体連絡しており、またはこれは、主チャネルそれ自体の長い部分であり得る。遅延モジュールは、合流モジュールの下流でありかつ検出モジュールの上流に配置され得る。遅延モジュールは、サーペンタインチャネルまたは浮遊アワーグラスであり得る。遅延モジュールは、加熱領域および冷却領域をさらに備え得る。加熱領域および冷却領域は、本明細書でさらに記載されるような、チップ上でのフロースルーPCRを実行するために使用できる。

【0227】

チャネルの寸法および配置は、デバイスを横切る最小圧力を液滴を用いて、必要とされる滞留時間が付随するように設計することができる。例えば、微小流体デバイス中での非常に長い遅延ラインを伴うように、このデバイスは、いくつかのパターン化されたPDMSスラブから構成される多層PDMSスラブを備え得る。

【0228】

チャネルの寸法もまた、必要とされる流れ、滞留時間、および圧力の低下を可能にするように、設計することができる。いくつかのチャネルは、非常に大きな幅および高さであることが必要とされる可能性がある。チャネルの崩壊を回避するために、このデバイスは、チャネル設計の中に支持ポストを備える。ポストの背後のデッドボリュームを減少させ、さらに液滴の安定性を改善するために、支持ポストは、チャネルの中に流線の流れを最適化するように設計される。これらの設計は、鋭い端とは対照的に、曲がった特徴を備え得る。

【0229】

より長い期間のデバイス操作を可能にするために、遅延ラインはまた、チップの外側に延長できる。このオフチップ遅延ラインは、ミクロンサイズの内径のチューブであり得る。

【0230】

利用可能な空間のより効率的な使用およびより迅速な操作を可能にするために、液滴が電荷を有する方法において、荷電後、オイルおよび液滴の非対称分裂は、液滴が荷電された後のチャネルからオイルを吸い出すことによって、適合させることができる。

【0231】

遅延ラインは、浮力が液滴輸送の制御を補助することを可能にすることに関して、タワー型（すなわち、周囲の重力場に関して垂直である構造）であり得る。既知の遅延ラインは、チャネルおよび／またはチューブ中に流れるキャリア流体中で液滴を乳化することによって、液滴を輸送することを含む。チャネルおよび／またはチューブの断面を通るキャリア流体の速度プロファイルは均一ではないので、液滴の速度分布は狭くなく、これは液滴の遅延時間の分布が狭くなることを引き起こす（すなわち、いくつかの液滴は他よりもより多くまたはより少なく遅延する）。

【0232】

本発明のデバイスは、浮力補助微小流体遅延ラインもまた備え得る。浮力補助微小流体遅延ラインにおいて、浮力は、1つ以上のタワー中の流体中で乳化した液滴に対して作用する。これは、タワーが所望の遅延時間を満たすこと、次いで、液滴を放出することを含み得る。このタワーは、必要に応じて、継続して液滴を満たし、および液滴を放出できるか、またはできない。この例において、ピラミッド型のフネル部分によってキャップされる円筒状タワー部分を有することが所望され得る。このタワーは、アワーグラスとして効率的に機能し得る。キャリア流体よりも小さな密度を有する液滴は、タワーの基部に供給され、実質的に均質な速度分布で、浮力がタワーの上端まで上がり、そして微小流体デバイス（例えば、Y分岐）の機能的要素に注ぎ込む。キャリア流体は、頂部に導入されたのと同じ速度でタワーの基部に排出され、その結果、遅延ラインを通したキャリア流体の正味の流れは0である。タワー部分およびフネル部分は、円形、楕円形、または多角形などの任意の断面形状を有し得る。微小流体デバイスは、調節可能な長さを有するタワー

を備え得る。

【0233】

このデバイスは、5%の遅延時間分散を保証するために、20個のタワーのネットワークを切り換えを含み得る（なぜなら、 $1/20 = 0.05$ ）。各タワーの容量は $0.05 * T$ であり、ここで、 T は遅延時間である。このコンセプトは、例えば、以下を含む：（a）デバイス開始の際、 $0.05 * T$ について第1のタワーを満たし、しかし二方活栓はその排出にし、また他の19個のタワーは閉じておく；（b） $0.05 * T$ 後、第1のタワーを閉じ、第2のタワーを $0.05 * T$ から $0.10 * T$ の間で満たし；（c）残りの18個のタワーについて、工程（b）を反復し；（d）時間 T において、第1のタワーを排出させ（e）時間 $1.05 * T$ で、二方活栓は第1のタワーの排出にし、第2のタワーを排出させ、そして第1のタワーを満たし；（f）時間 $1.10 * T$ において、二方活栓は第2のタワーの排出にし、第3のタワーを排出させ、第1のタワーを閉じ、そして第2のタワーを満たし；ならびに（g）工程（f）を無限に反復する。20個より多くのタワーは、遅延時間分散の幅の、さらに強固な制御を提供し得る。このスキームは、バルブネットワークを必要とし得る。このタワーのネットワークは微小流体デバイスの外側であり得る。

10

【0234】

この遅延モジュールはまた、微小流体デバイス中の液滴の「パーキング」（例えば、低速化または停止）を許容するジオメトリの変化を有するチャンネル（例えば、主チャンネル）を備え得る。

20

【0235】

本明細書に提供される方法において、液滴は、所定の位置におけるウェルまたはチャンネルに停止可能である。これは、チャンネル中の個別のウェル様のくぼみを作製することによって行うことができ、それによって、液滴がウェルに「落下」し、液体がその上を流れるときにそこに残り、または「バイパスポート」と呼ばれる技術を使用することにより、それによって、液滴がウェル中で小さな液滴を遮断するように使用され、それによって、液滴を含有するウェルをバイパスすることを引き起こす。

【0236】

本発明は、微小流体デバイス中のランダムなまたは所定のいずれかの位置に液滴を配置するために、これらの技術または任意の関連技術のいずれかを使用すること、例えば、ちょうどチャンネル中で液滴を停止することである。次いで、これらのランダムなまたは所定の位置は、行われた反応について、または再懸濁とその後の吸引などの別の手段を使用する液滴の除去について、より後の時点において問い合わせることができる。

30

【0237】

一例において、ローリングサークル増幅反応が液滴中で開始され、次いで、液滴は、チップ内に停止し、熱の使用を通して反応を停止する前に、設定した時間の間、増幅反応を進行させる。次いで、停止した液滴をインサイチュで乾燥させ、チップのカバーをチップから分解する。次いで、液滴パーキング空間と並べることが可能である針様デバイスの1つまたはセットが、乾燥させた液滴の上端に隣接してまたはその上に配置され、さらなる下流の処理のために、液体溶液を使用して、チップに沈着した乾燥液滴中の物質を再懸濁した。

40

【0238】

別の例において、液滴中の第1および第2の反応のセットからの反応内容物の拡散の可能性を回避するために、第1の反応を $10 \mu m$ 液滴で行い、液滴をチャンネルパーキング空間内で、または $10 \mu m$ よりも大きなサイズの液滴を保持可能であるバイパスポートによって乾燥させ、液滴はインサイチュで乾燥する。次いで、 $10 \mu m$ よりも大きな液滴の第2のセットを上記チャンネルの下流に進行させ、上記パーキング空間に、またはバイパスポートに捕捉されたときに、第1のパーキング空間の壁に沿って、またはバイパスポートによって乾燥する第1の液滴からの物質を再懸濁させることが可能である。そのようにする際に、第2の液滴は、第1の液滴よりもわずかに大きく、これは、壁に沿った物質が第2

50

の液滴によって「捕捉され」、拡散によって第1の液滴の壁から拡散されないことを確実にする。そうすることによって、界面活性剤の使用は、第1または第2のいずれかの液滴製剤において任意的になる。

【0239】

本発明は、本明細書に記載される方法を実施する際の使用のための以下のデバイスおよび方法もまた提供する。微小流体デバイスの部分を備えるPDMS基材は、剥離によって除去可能である接着テープまたはストリップでカバーまたはコート可能である。PDMS基材はまた、一連の針によって穿孔可能である超薄層シリカによって結合可能である。このシリカは、薄い背面がスピンコート処理または電気プレート処理されてもよい。液滴は、液滴中のNコードを決定するため、および液滴中で増幅反応が起こったか否かを決定するために、第2のデバイスによって検出可能である一切れの紙の上で乾燥することができる。いずれかの光学アレイデバイス、例えば、高性能カメラまたはファイバー、光学デバイスにおいて見出されるようなものを使用する、乾燥したスポットおよび乾燥していないスポットを含むプレートの読み取りもまた、意図される。乾燥窒素は、チャンネルを通してスポットを流すこと、または乾燥N₂チャンバーにデバイスを配置することのいずれかによって、スポットを乾燥するために利用できる。チャンネルは乾燥窒素で満たすことができ、またはパーキング空間チャンネルの下またはそれに隣接して塩が移動して、チップ中に化学的または物理的な型の勾配を設定する。チャンネル壁は、それがインサイチュで付着するように、ストレプトアビジンおよび産生される反応物質、例えば、ビオチン化DNAで、コートすることができる。ウェルに沈着する多孔性ビーズは、流れによってビーズを洗浄するためのオイルを含まない溶液と組み合わせて使用することができ、その後、ビーズを再コートするために界面活性剤で液滴を再沈着させる。基材中のウェルは以下によって多くの小さなビーズで満たすことができる：液滴に小さなビーズを負荷すること、ビーズよりもわずかに小さい開口を含む個々のウェルに液滴を保存すること、乾燥または界面活性剤を含むかもしくは含まない水溶液のチャンネルへのおよびビーズを過ぎる流れによって、液滴を破壊すること、および次いで、インサイチュでビーズを再カプセル化すること。微小流体基材の中またはそれに隣接する電極のセットは、保存／保持空間のなかで、2つの液滴を融合させるために使用することができる。電極は、チャンネルの平面に対して垂直であり得、電極またはチャンネルのいずれかが、液滴の融合を起こさせるために移動され得る。

【0240】

UV放出モジュール

本発明の微小流体デバイスは、1つ以上のUV放出モジュールをさらに備え得る。「UV放出モジュール」は、主チャンネルと液体連絡している。UV放出モジュールは、入口モジュールの下流でありかつ合流モジュールの上流に配置される。UVモジュールは、ビーズアッセイにおいて使用することができる。カプセル化ビーズからの化合物は、UV光を使用して、UV放出モジュール中で切断することができる。感光性リンカーは、単一のビーズがカプセル化された後で、要求に応じて分解することができ、従って、単一の化合物の複数コピーを溶液に放出する。本明細書に開示される細胞ベースのアッセイにおいて、アッセイされる化学化合物は、細胞膜を透過するために、溶液中にあることが所望される。さらに、細胞を用いての単一の化合物の区画化を保証するために、固体支持体からの化合物の切断は、ビーズがカプセル化された後でのみ行うことができる。光切断性リンカーは、液滴形成後のビーズの化合物を切断するために、液滴をUV放出モジュールに通過させること（すなわち、適切な波長のレーザー）によって利用することができる。

【0241】

本発明はまた、ビーズ上での化学合成のための方法もまた提供し、液滴中で放出手段（化学的、UV光、熱など）を使用して、ビーズに結合した上記化学物質を放出させ、次いで、さらなる操作のために第1の液滴に第2の液滴を合わせる。好ましくは、放出手段はUVモジュールである。例えば、ビーズ上での化学物質のティーバッグ合成は、同時に、上記ビーズを同定するための手段を伴う（例えば、質量スペクトルタグを使用する）。流

体の流れにおける液滴中で得られる混合化学ビーズを使用し、そしてビーズから液滴環境に合成された化学物質を放出するためにビーズをUV光に曝露する。放出された化学物質を含む液滴を、細胞を含む液滴と合わせ、そして細胞ベースのアッセイを実施する。所望の特徴を有する液滴を分別し（例えば、レポーター遺伝子の活性化）、次いで、質量スペクトル分析を使用して、分別したビーズを分析する。

【0242】

キット

便宜上、本明細書に記載され、本明細書において利用される所定量の試薬、化合物ライブラリー、および／またはエマルジョンは、本明細書に記載される種々のアッセイおよび方法の適用を容易にするために、パッケージした組み合わせでのキットとして任意に提供することができる。かかるキットは、典型的には、対象のアッセイを実行するための指示書もまた含み、そして任意に、そこで反応が実行される、流体容器、例えば、キュベット、マルチウェルプレート、微小流体デバイスなどを含む。

10

【0243】

典型的には、キット中に含まれる試薬は、組織、細胞、粒子、タンパク質、抗体、アミノ酸、ヌクレオチド、小分子、基質、および／または医薬を含む、独特に標識されたエマルジョンである。これらの試薬は、事前に測定した容器（例えば、バイアルまたはアンプル）の中に供給されてもよく、これらは、すぐに使える単一の箱、ポーチなどの中に同時にパッケージされている。試薬を保持する容器は、反応が実行されるデバイスの流体容器に容易に結合されるように、配置することができる（例えば、本明細書に記載されるような微小流体デバイスの入口モジュール）。1つの実施形態において、このキットは、RNAiキットを含み得る。他の実施形態において、このキットは、化学合成キットを含み得る。これらの実施形態は単なる例示であること、および他のキットもまた本発明の範囲内にあることが当業者によって認識される。

20

【0244】

方法

本発明の微小流体デバイスは、多数の化学的アッセイおよび生物学的アッセイを実施するために利用でき、かかるアッセイには以下が含まれるがこれらに限定されない：エマルジョンライブラリーの作製、フローサイトメトリー、遺伝子増幅、等温遺伝子増幅、DNA配列決定、SNP分析、薬物スクリーニング、RNAi分析、核型分析、バイオマス転換の改善を伴う微生物株の作製、光ピンセット／細胞トラッピングを使用する細胞の移動、エレクトロポレーションによる細胞の形質転換、μTAS、およびDNAハイブリダイゼーション。

30

【0245】

定義

本明細書で使用される用語は、一般的に、本発明の状況の中で、および各々の用語が使用される特定の状況の中で、当該分野におけるそれらの通常の意味を有する。特定の用語は、以下でまたは本明細書の他の箇所で議論され、本発明のデバイスおよび方法、ならびにこれらをいかにして作製および使用するかを説明する際に、実務者に対するさらなる手引きを提供する。同じことが、典型的には、1つより多くの様式で説明できることが認識される。結果的に、代替的な言葉および同義語が、本明細書で議論される任意の1つ以上の用語のために使用されてもよい。特定の用語のための同義語が提供される。しかし、1つ以上の同義語の列挙は、他の同義語の使用を除外せず、その用語が本明細書で詳述または議論されているか否かについて、いかなる特別な意味も与えない。本明細書で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照により本明細書に援用される。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が優先する。加えて、材料、方法、および実施例は例示のみであり、限定を意図するものではない。

40

【0246】

本発明はまた、特定の実施例によって記載される。しかし、本明細書で議論される任意の用語の例を含む、明細書のいずれかの箇所でかかる実施例の使用は、例示のみであっ

50

て、いかなる方法によっても、本発明または任意の例示される用語の範囲および意味を限定するものではない。同様に、本発明は、本明細書に記載される任意の特定の好ましい実施形態に限定されない。確かに、本発明の多くの改変およびバリエーションが、本明細書を読む際に当業者には明らかになり、そしてこれは本発明の精神および範囲から逸脱することなく行なわれ得る。それゆえに、本発明は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定され、これは、特許請求の範囲が権利を有する等価物の全範囲を伴う。

【0247】

本明細書で使用される場合、「約」または「およそ」は、所定の値または範囲の20パーセント以内、好ましくは、10パーセント以内、およびより好ましくは、5パーセント以内を意味する。

【0248】

「分子」という用語は、1つ以上の原子を含む物質の任意の別個のまたは区別できる構造単位を意味し、これには、例えば、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドが含まれる。

【0249】

「ポリマー」という用語は、互いに反復して連結されている2つ以上のビルディングブロック（「マー」）から構成される、任意の物質または化合物を意味する。例えば、「ダイマー」は、2つのビルディングブロック一緒に結合されている化合物である。

【0250】

「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書で使用される場合、典型的なポリヌクレオチドに水素結合することが可能である塩基を支持するバックボーンを有するポリマー分子をいい、ここで、このポリマーバックボーンは、ポリマー分子と典型的なポリヌクレオチド（例えば、一本鎖DNA）の間で配列特異的様式であるかかると水素結合を可能にするような様式で塩基を提示する。かかる塩基は、典型的には、イノシン、アデノシン、グアノシン、シトシン、ウラシル、およびチミジンである。ポリマー分子は、二本鎖および一本鎖のRNAおよびDNA、ならびにそのバックボーン修飾、例えば、メチルホスホネート結合を含む。

【0251】

従って、「ポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド配列」は、一般的には、DNAおよびRNA中の一連のヌクレオチド塩基（「ヌクレオチド」とも呼ばれる）であり、2つ以上のヌクレオチドの任意の鎖を意味する。ヌクレオチド配列は、典型的には、遺伝情報を有し、これには、タンパク質および酵素を作るために細胞機構によって使用される情報が含まれる。これらの用語は、二本鎖または一本鎖のゲノムおよびcDNA、RNA、任意の合成および遺伝子操作されたポリヌクレオチド、ならびにセンスとアンチセンスの両方のポリヌクレオチドが含まれる（しかし、センス鎖のみが本明細書では示される）。これには、一本鎖および二本鎖の分子、すなわち、DNA-DNA、DNA-RNA、およびRNA-RNAのハイブリッド、ならびにアミノ酸バックボーンに塩基を結合体化することによって形成される「タンパク質核酸（PNA）」が含まれる。これにはまた、修飾塩基、例えば、チオウラシル、チオグアニン、およびフルオロウラシルを含む核酸が含まれる。

【0252】

本発明のポリヌクレオチドは、天然の調節配列によって隣接されてもよく、または、プロモーター、エンハンサー、応答エレメント、シグナル配列、ポリアデニル化配列、イントロン、5'および3'非コード領域などを含む異種配列が付随してもよい。これらの核酸はまた、当該分野で公知である多くの手段によって修飾されてもよい。かかる修飾の非限定的な例には、メチル化、「キャップ」、1つ以上の天然に存在するヌクレオチドのアナログによる置換、およびヌクレオチド内修飾、例えば、電荷を有さない結合を伴うもの（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カルバメートなど）および電荷を有する結合を伴うもの（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）などが含まれる。ポリヌクレオチドは、1つ以上のさらなる共有結合部分、例えば、タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、トキシン、抗体、シグナルペプチ

10

20

30

40

50

ド、ポリ-L-リジンなど）、インターカレーター（例えば、アクリジン、ソラレンなど）、キレート剤（例えば、金属、放射活性金属、鉄、酸化金属など）、およびアルキル化剤などを含んでもよい。ポリヌクレオチドは、メチルもしくはエチルホスホトリエステル、またはアルキルホスホルアミデート結合の形成によって誘導体化されてもよい。さらに、本明細書に記載のポリヌクレオチドはまた、直接的または間接的のいずれかで、検出可能なシグナルを提供可能である標識で修飾されてもよい。例示的な標識には、放射性同位元素、蛍光分子、ビオチンなどが含まれる。

【0253】

「誘電泳動力勾配」という用語は、対象物が周囲の媒体とは異なる誘電率を有するという条件で、電場において誘電泳動力が対象物に対して発揮されることを意味する。この力は、より大きな電場の領域に対象物を引き出し得るか、またはより大きな電場の領域から対象物を押し出し得るかのいずれかである。この力は、対象物または周囲の媒体がより大きな誘電率を有するかによりそれぞれ依存して、誘引性または反発性である。

【0254】

「DNA」（デオキシリボ核酸）は、ヌクレオチド塩基と呼ばれ、デオキシリボース糖バックボーン上で一緒に連結される化学的ビルディングブロックであるアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、およびチミン（T）の任意の鎖または配列を意味する。DNAは、ヌクレオチド塩基の一本鎖、または二重らせん構造を形成し得る2つの相補鎖を有し得る。「RNA」（リボ核酸）は、ヌクレオチド塩基と呼ばれ、リボース糖バックボーン上で一緒に連結される化学的ビルディングブロックであるアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、およびウラシル（U）の任意の鎖または配列を意味する。RNAは、典型的には、ヌクレオチド塩基の一本鎖を有する。

【0255】

「ポリペプチド」（1個以上のペプチド）は、ペプチド結合と呼ばれる化学結合によって一緒に結合される、アミノ酸と呼ばれる化学的ビルディングブロックの鎖である。「タンパク質」は、生きている生物によって産生されるポリペプチドである。タンパク質またはポリペプチドは「ネイティブ」または「野生型」であり得、これは天然に存在することを意味し；または「変異型」「改変型」または「修飾型」であり得、これは作製、変化、誘導されているか、または何らかの方法で、ネイティブタンパク質、もしくは別の変異体とは異なるかもしくは変化していることを意味する。

【0256】

「酵素」は、ポリペプチド分子、通常は、生きている生物によって産生されるタンパク質であり、これは、他の物質の化学反応を触媒する。酵素は、反応の完了の際には、それ自体は変化または破壊されず、それゆえに、反応を触媒するために反復して使用できる。「基質」とは、酵素が作用する任意の物質をいう。

【0257】

本明細書で使用される場合、「粒子」は、分析、反応、分別、または本発明に従う任意の操作のために液滴中でカプセル化され得る任意の物質を意味する。粒子には、微視的ビーズ（例えば、クロマトグラフィー用ビーズおよび蛍光ビーズ）、ラテックス、ガラス、シリカ、または常磁性ビーズなどの対象物であるのみならず、他のカプセル化多孔性および／または生体材料、例えば、リボソーム、ベシクル、および他のエマルジョンもまた含まれる。0.1ミクロンから1mmまでのサイズの範囲のビーズが、本発明のデバイスおよび方法において使用でき、それゆえに、本明細書で使用される場合、「粒子」という用語に包含される。粒子という用語は、生体細胞、ならびに、同様のサイズ（例えば、約0.1～120ミクロン、および典型的には約1～50ミクロン）またはより小さなサイズ（例えば、約0.1～150nm）のビーズおよび他の顕微鏡的対象物もまた含む。本発明のデバイスおよび方法は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、およびタンパク質（酵素を含む）を含む任意の種類の分子、ならびにそれらの基質および小分子（有機または無機）を分別および／または分析することにもまた向けられる。従って、粒子という用語は、これらの物質をさらに含む。

【0258】

粒子（例えば、細胞および分子を含む）は、個々の液滴（例えば、オイル中の水溶液の液滴）に粒子をカプセル化することによって、分別および／または分析され、次いで、これらの液滴は、微細加工デバイス中で分別、組み合わせ、および／または分析される。従って、「液滴」という用語は、一般的には、液滴中に含まれるかまたは含まれることができるすべてを含む。

【0259】

「小分子」は、本明細書で使用される場合、約5 kD未満、最も好ましくは約4 kD未満の分子量を有する組成物をいうことを意味する。小分子は、例えば、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭水化物、脂質、または他の有機分子もしくは無機分子であり得る。化学的および／または生物学的混合物のライブラリー、例えば、真菌、細菌、または藻類の抽出物は、当該分野において公知である。

【0260】

本明細書で使用される場合、「細胞」とは、任意の細胞ならびにウイルス、または顕微鏡的サイズ、例えば、生物学的細胞のサイズと同程度またはそれよりも小さいサイズを有する任意の他の粒子を意味し、任意の原核生物細胞または真核生物細胞、例えば、細菌、真菌、植物、および動物の細胞を含む。細胞は、典型的には球形であるが、細長型、平板型、変形型、および非対称型、すなわち、非球形であり得る。細胞のサイズまたは直径は、典型的には約0.1～120ミクロン、および典型的には約1～50ミクロンの範囲である。細胞は、生きていてもよいし死んでいてもよい。本発明の微細加工デバイスは、生物学的細胞と同様のサイズ（例えば、約0.1～120ミクロン）またはより小さなサイズ（例えば、約0.1～150 nm）を有する物質を分別することに向けられるので、生物学的細胞と同様のサイズまたはより小さなサイズを有する任意の物質が、本発明の微細加工デバイスを使用して特徴付けおよび分別することができる。従って、細胞という用語は、微視的ビーズ（例えば、クロマトグラフィー用ビーズおよび蛍光ビーズ）、リポソーム、エマルジョン、または任意の他のカプセル化生体材料および多孔質材料をさらに含めるべきである。非限定的な例には、ラテックス、ガラス、または常時性ビーズ；ならびにエマルジョンおよびリポソームなどのベシクル、ならびにシリカビーズなどの他の多孔質材料が含まれる。0.1ミクロンから1 mmまでのサイズ範囲のビーズもまた、例えば、コンビナトリアルケミストリーによって製造された化合物のライブラリーを分別する際に使用できる。本明細書で使用される場合、細胞は、電荷を有してもよく、電荷を有さなくてもよい。例えば、電荷を有するビーズは、流れもしくは検出を容易にするため、またはレポーターとして使用されてもよい。生きているかまたは死んでいる生物学的細胞は、例えば、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）などの界面活性剤を使用することによって荷電されてもよい。細胞という用語は、「ビリオン」をさらに含み、これは、ビリオンが明確に言及されるか否かに関わらない。

【0261】

「ビリオン」「ウイルス粒子」は、ウイルスの完全な粒子である。ウイルスは、典型的には、核酸コアを含み（DNAまたはRNAを含む）、特定のウイルスにおいては、タンパク質コート、または「キャプシド」を含む。特定のウイルスは「エンベロープ」と呼ばれる外部のタンパク質覆いを有し得る。ビリオンは、生きているか（すなわち、「生存可能」）または死んでいる（すなわち、「生存可能でない」）かのいずれかであり得る。生きているかまたは「生存可能」ウイルスは、生きている細胞に感染可能であるものである。ウイルスは、一般的には、生物学的細胞よりも小さく、典型的には、約20～25 nm直径以下（パルボウイルス、ピコルナウイルス）から、約200～450 nm（ボックスウイルス）のサイズの範囲である。しかし、いくつかの線状ウイルスは2000 nmの長さには達する可能性があり（クロステロウイルス（*clostervirus*））、それゆえに、一部の細菌細胞よりも大きい。本発明の微細加工デバイスは、ウイルスと同様のサイズを有する物質を分別するために特に適しているので（すなわち、約0.1～150 nm）、ビリオンと同様のサイズを有する任意の物質は、本発明の微細加工デバイスを使用

して特徴付けおよび分別することができる。非限定的な例には、ラテックス、ガラス、または常時性ビーズ；エマルジョンおよびリポソームなどのベシクル；ならびにシリカビーズなどの他の多孔質材料が含まれる。0.1から150nmまでのサイズ範囲のビーズもまた、例えば、コンビナトリアルケミストリーによって製造された化合物のライブラリーを分別する際に使用できる。本明細書で使用される場合、ビリオンは、電荷を有してもよく、電荷を有さなくてもよい。例えば、電荷を有するビーズは、流れもしくは検出を容易にするため、またはレポーターとして使用されてもよい。生物学的ウイルスは、生存可能であるかまたは生存可能ではないに関わらず、例えば、SDSなどの界面活性剤を使用することによって荷電されてもよい。

【0262】

「レポーター」は、例えば、光学的検出によって検出可能であるかまたは測定可能である、任意の分子、またはその部分である。加えて、レポーターは、分子、細胞、もしくはビリオンと連携し、あるいは特定のマーカーまたは分子、細胞、もしくはビリオンの特徴と連携し、あるいは、それ自体が、分子、細胞、もしくはビリオンの同定を、または分子、細胞、もしくはビリオンの特徴の存在もしくは非存在の同定を可能にするために検出可能である。ポリヌクレオチドなどの分子の場合において、かかる特徴には、サイズ、分子量、特定の構成要素または部分（例えば、特定のヌクレオチド配列または制限部位）の存在または非存在が含まれる。細胞の場合において、レポーターによってマークされ得る特徴には、抗体、タンパク質、および糖部分、受容体、ポリヌクレオチド、およびそのフラグメントが含まれる。「標識」という用語は、「レポーター」と交換可能に使用することができる。レポーターは、典型的には、色素、蛍光、紫外線、または化学発光剤、発色団、または放射性標識であり、これらの任意のものが、ある種の刺激事象を用いてまたは用いずに検出され得、例えば、試薬を用いてまたは用いずに蛍光を発する。1つの実施形態において、レポーターは、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）などのレポーターを刺激するために、デバイス、例えば、レーザーを用いずに光学的に検出可能であるタンパク質である。タンパク質レポーターは、検出される細胞中で発現させることができ、かかる発現は、タンパク質の存在を示す可能性があり、またはこれは、レポーターとともに同時発現されてもよく、同時発現されなくてもよい別のタンパク質の存在を示すことができる。レポーターは、例えば、検出可能な生成物を生じる反応のための出発物質、反応物質、または触媒として働くことによって、検出可能な反応を引き起こす、細胞上または細胞中の任意の物質を含んでもよい。細胞は、例えば、レポーター物質が提供されるときに、その物質の存在に基づいて、または検出可能な生成物を産生する細胞の能力に基づいて、分別されてもよい。

【0263】

「マーカー」は、検出可能であるか、またはレポーターによって検出可能にされるか、またはレポーターとともに同時発現されてもよい、分子、細胞、またはビリオンの特徴である。分子については、マーカーは、特定の構成要素または部分、例えば、ポリヌクレオチドの場合では制限部位または特定の核酸配列であり得る。細胞およびビリオンについては、特徴には、酵素、受容体、およびリガンドタンパク質を含むタンパク質、サッカリド、ポリヌクレオチド、およびその組み合わせ、または細胞もしくはビリオンに付随する任意の生物学的物質を含めてもよい。酵素反応の生成物はまた、マーカーとしても使用され得る。このマーカーは、直接的または間接的にレポーターに付随してもよく、またはそれ自体がレポーターであり得る。従って、マーカーは、一般的には、分子、細胞、またはビリオンの際立った特色であり、そしてレポーターは、一般的には、直接的または間接的にマーカーを同定しまたはその測定を許容する因子である。しかし、これらの用語は交換可能に使用されてもよい。

【0264】

本発明は、次の実施例によって以下でさらに説明される。実施例もまた、本発明を実施するための有用な方法論を例証する。これらの実施例は、特許請求される本発明を限定しない。

【実施例】

【0265】

(実施例1)

本発明は、液滴の各々が同じ所定のサイズである液滴エマルジョン（単分散）のライブラリーを調製するための方法を提供する。さらに、本発明は、微小流体デバイス上の液滴中に存在し得る連続的粒子分離のための予定的側方変位のための方法を提供する。

【0266】

溶液中の粒子は、通常、排除クロマトグラフィーまたは流体力学クロマトグラフィーによってサイズに従って分離される。前者においては、サンプル混合物は、多孔性ビーズを充填したチューブの一方の末端に注入し、次いで、チューブを通して洗浄する。ポアサイズよりも小さな粒子はビーズの中に入り、これが粒子の移動経路を長くし、それゆえに、これらの粒子は、より大きな粒子よりも平均して遅く溶出される。しかし、各区域中の粒子は多くの異なる経路を取るために、所定のサイズの粒子の区域は広くなり、異なる保持時間をもたらす。この多経路効果は、サイズ排除クロマトグラフィーの分解能を減少させる。流体力学クロマトグラフィーにおいては、サンプル混合物は、放物線状流れプロファイルを有する流体力学流によって毛細管を通して駆動される。大きな粒子は、毛細管壁の近くの低速流を遮ることができず、従って、平均してより速く移動し、小さな粒子とは分離されるようになる。多経路効果は、流体力学クロマトグラフィーの解像度もまた制限する。なぜなら、各移動経路は、放物線状流れの中では異なる速度でサンプリングするからである。

【0267】

最近、Huangら、Science 304 (5673) : 987-90, 2004 およびDavisら、Proc Natl Acad Sci U S A. 103 (40) : 14779-84, 2006は、混合物中の各粒子についての等価な移動経路を作製し、それによって、多経路区域の広がり解消する分離プロセスを実証している。彼らは、粒子サイズに基づく、溶液中での粒子の分離のための「側方変位」手段を記載している。

【0268】

溶液中の液滴をサイズ分けおよび分離するための側方変位手段（液滴のサイズに基づく）を利用することができる。本発明は、側方拡散のために設計されている列と行の両方での高くなったピラーからなる微小流体デバイスの生成に関する。これらのピラーは、種々のサイズの液滴を含む液体から、同様のサイズの液滴を分離するための手段であるように調整することができる。

【0269】

一例として、オイル、水、および界面活性剤を含む液体は、バルクエマルジョンを作製するように混合される。このバルクエマルジョンは、微小流体側方拡散デバイスの開始部に注入され、そして種々の画分は特定のサイズの対応する位置でデバイスの末端部で収集される。この側方拡散分離手段に対する利点は、迅速かつ容易な手段で同様のサイズの液滴をオフラインでの単離である。バルクエマルジョンはサイズ選択することができ、次いで、所望される場合、得られるエマルジョンを、微小流体デバイスへの再導入のためにサイズ付けしたライブラリーを作製するために合わせられる。さらなる例において、側方拡散微小流体デバイスは、シリンジに巻き上げ、または平行プロセッシングのために設計することができる。

【0270】

最近、両方の技術を利用するデバイスは、微細加工技術を用いて小型化されている。分離のための拡散に固有に依存する微細加工デバイスもまた設計されてきた。粒子混合物は、微小電極によって作製される空間的に非対称な電位に反復して供されるか、または拡散距離の違いを利用するためにマイクロメートルスケール非対称障害物のアレイを通して駆動される。これまでに議論されたデバイスのすべてにおいて、所定の区域中の粒子は多くの異なる移動経路を有し、拡散が分離のために必要とされる。

【0271】

本発明は、混合物中の各粒子について等価な移動経路を作製する分離プロセスを説明し、それによって、多経路区域の広がり进行を解消する（図24）。図24。（パネルA）障害物マトリックスを規定するジオメトリックパラメーター。液体流は垂直方向に適用される（オレンジ色矢印）。（パネルB）ギャップにおける3つの液体流（赤色、黄色、および青色）は、これらはマトリックスを流れるので混合しない。第1の障害物行におけるレーン1は、第2の行においてレーン3になる、レーン3は第3の行においてレーン2になる、などである。従って、流線後の小粒子は、同じレーンの中に留まる。（パネルC）レーン1よりも大きな半径を有する粒子は、粒子の中心（黒色ドット）を通る流線に続き、レーン1に向かって移動する。粒子は、次のギャップに入るのに従って物理的に置き換えられる。黒色ドット線はレーンの印である。

10

【0272】

分離プロセスは、マイクロメータースケール障害物の周期的なアレイを通る層流を使用する。障害物の各行は、以前の行に関して、 $\delta\lambda$ だけ水平方向に移動し、ここで、 λ は障害物間の中心間の距離である（図24）。便宜上、 $\delta\lambda/\lambda$ を $1/3$ とする。2つの障害物間のギャップから出現する液体は、次の行の障害物に接触し、障害物の周辺の移動するにつれて二つに分岐する。障害物の左側にそれた流れを $\delta\phi$ とし、ここで、 ϕ はギャップを通る全体の流体流である。流体がアレイを通して直進して下方に移動するように制限される場合、 δ は $\delta\lambda/\lambda$ に等しいはずである。次に、その各々が定義によって $\phi/3$ の流れを有する、3つのレーンから作られるギャップを通した流れを考慮してみる。Reynolds数は低く（マイクロメートルスケール環境において $<10^{-3}$ ）、流れが層流であるので、各レーンの流れは交差または混合しない（図24B）。顕著には、レーンがギャップを通り抜けるのに従って、ギャップに対するこれらの位置は変化する。レーンは、各ギャップ中で、左から右に向かって、それぞれ、1、2、および3で表される。レーン1は、次のギャップでレーン3になり、レーン2はレーン1になり、そしてレーン3はレーン2になる（図24）。3つの行の後で、3つのレーンはそれらのもとの位置で再結合する。

20

【0273】

レーン幅よりも小さな粒子は流線をたどる。レーン1で開始した粒子は、第2の行の中レーン3（ギャップに対して右側のレーン）、第3の行の中レーン2（中央のレーン）を通り抜け、第4の行の中レーン1（左のレーン）に戻る（図24B）。実際、3つのレーンのいずれかから開始した粒子は、正味の移動が平均流方向にあるように、3つの行の後でももとのレーンの割り当てに戻る。この動作は「ジグザグモード」と呼ばれる。実務上、粒子は、隣接するレーンに拡散することができる。しかし、すべてのレーンについての顕微鏡的経路は等価であり、多孔性ビーズのカラムを通して移動するときに複数の経路粒子を取ることとは異なる。より小さな粒子とは対照的に、ギャップにおいてレーン1の幅よりも大きな半径を有する粒子は、アレイ中で異なる挙動をする。これは、粒子の中心がギャップ中のレーン1に「フィット」できないからである。このようにして、1つのギャップ中のレーン2からの粒子は次のギャップに移動し、レーン1の中のギャップを通して移動することが予測され、粒子は「ぶつけられ」、従って、その中心はレーン2に置き換えられる（図24C）。次いで、粒子は、レーン2の中の液体とともに流れる。このプロセスは、粒子がアレイを通して下方に移動するときにレーン2の中に残ったままであるように、大きな粒子が障害物の行に接近する度に反復される。この輸送パターンは、「置き換えモード」と呼ばれる。これは、液体の流れの代わりに、イオン流を考慮することによって、電気泳動にもまた適用可能である。

30

40

【0274】

図25は、種々のギャップサイズのマトリックスを有する、 $0.80\mu\text{m}$ （緑色）、 $0.90\mu\text{m}$ （赤色）、および $1.03\mu\text{m}$ （黄色）の直径を有する、蛍光ミクロスフェアの高解像度分離を示す。レジストリのシフトおよびマトリックスの格子定数は同じままであるのに対して、障害物直径は変化して、異なるサイズのギャップ d を作製し、これは、

50

蛍光画像の左側に標識される。蛍光プロフィール上の赤いバーはピーク幅（SD）を表し、黒いバーはビーズ集団中の1%の不均一性をa. u. すなわち、任意単位で標識する。

【0275】

図26は、マイクロポストのアレイ中の決定的な側方変位による分離を図示する概略図であり、一例は3分の1の行シフト画分である。このシフトは、3つの等しい流動の流線を作る。波線は流線間の境界であり、これらは、ポスト間のギャップにおける指標を割り当てている。臨界的な閾値よりも小さいものと大きいものとの両方である粒子の経路は、緑の点線および赤の点線でそれぞれ描かれている。小さな粒子は流れの中に留まり、大きな粒子は各々の障害物において置き換えられる。Gはギャップ間の明確な間隔であり、中心間のポストの分離であり、そしてdは隣接する行におけるポスト中心の相対的シフトである。

10

【0276】

これらの記載した方法は、本発明の微小流体デバイスに対するさらなる用途のために、均一のサイズの液滴エマルジョンライブラリーの迅速かつ効率的な形成を可能にする。

【0277】

（実施例2）

本発明は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を実施するための方法を提供する。PCRは、本発明に従う微小流体デバイスにおいて一滴ずつを基礎（drop-by-drop basis）にして実施することができる。加熱ラインおよび冷却ラインがチップの中に構築され、分類手段が提供されているモノリシックチップを提供することができる。かかるチップ上の液滴中でPCRを実施することの利点は、チップが使い捨て可能であり、反応の間にデバイスを洗浄することなく反応を反復できるという点である。さらに、チップは、正確な濃度で液滴中のPCRを実施するためにすべての成分を得る便利な方法を提供する。加えて、熱移動が小さな体積に起因してより効率的であるので、PCRはより効率的である。このことは、より短いインキュベーション／滞留時間を提供する。核酸、すべてのPCRプライマー、および、存在する場合、ビーズを含む液滴は、1秒あたり100～20,000個の間の液滴の速度で、一度に1つ生成される。次いで、液滴は、加熱ラインと冷却ラインの間のサーペンタイン経路を通して送り、液滴の中の遺伝物質を増幅することができる。デバイスを出る際に、液滴は、さらなるオンチップまたはオフチップでのプロセッシングのために送られ、別のチップに方向付けられてもよく、またはエマルジョンが破壊されてPCR産物を放出してもよい。存在する場合、ビーズは、濾過デバイスを通してエマルジョンを通過させること、沈殿、または遠心分離によって収集してもよい。

20

30

【0278】

チャンネルの幅および深さは、各温度における滞留時間を設定するように調整することができ、1秒未満から数分間までの間のいずれでも制御できる。1秒あたり1000滴の典型的な速度において、100万個のDNA鎖が、1つのデバイス上で約20分間で増幅される。250 μ L／時間の典型的な流速は、毎秒生成される50ミクロン直径の1000滴に対応する。流速および液滴サイズは、ノズルのジオメトリを制御することによって、必要に応じて調整することができる。

40

【0279】

本発明はまた、微小流体デバイス上でジデオキシヌクレオチド配列決定反応を実施するための方法を提供する。チェンターミネーター配列決定（サンガー配列決定）は当業者に周知である。DNA鋳型調製物、配列決定のサイクルを行うこと、および電気泳動のための伸長産物を調製することは関連技術であり、これらもまた当業者に周知である。Applied Biosystemsの「Automated DNA Sequencing: Chemistry Guide」2000は、これらの技術を網羅している優れた資料であり、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0280】

1つの方法はPCR鋳型を配列決定することであり、これは、単純な増幅PCRまたは

50

ネスト化または半ネスト化PCRストラテジーを含むことができる。最も単純なPCR配列決定の場合において、標的DNAは、単純なプライマーのセットを用いて増幅され、次いで、同じプライマーを使用して配列決定する。多くのサンプルについては、これは良好に機能する。この方法で良好に機能しないサンプルについては、PCR増幅の最適化が必要とされるかもしれない。PCRの最適化は、非特異的な産物バンドの存在を最小化し、十分な収量を補償する。単純なPCR増幅はまた、一方または両方のPCRプライマーに対して内部で結合する（半ネスト化またはネスト化）配列決定プライマーの使用ともまた適合可能である。このことは、プライマーダイマー（プライマーのオリゴマー化）アーティファクトが問題である場合に助けとなり得る。

【0281】

細菌ゲノムDNAなどのより複雑なサンプルに伴う困難さに遭遇する場合には、ネスト化または半ネスト化PCRを使用することができる。これらの技術は、標的が少量存在する場合に有用である。これらは、バックグラウンドシグナルの減少を伴う優れた配列決定データを提供する、より多くの特異性を提供する。ネスト化と半ネスト化の両方のPCRは2つの増幅を必要とする。第1の増幅はネスト化および半ネスト化で同一であるが、第2の増幅は、以下に記載されるように異なる。PCRプライマーの1つのセットを用いる増幅は、複雑なサンプル（細菌ゲノムDNAなど）を、第1のPCR産物およびある程度の副産物からなる複雑でないサンプルに転換する。ネスト化PCR：第1のセットに対して内部の位置でハイブリダイズする第2のPCRプライマーの第2のセットを使用して、第1のPCR反応産物の1%以下を増幅する。半ネスト化PCR：第2のPCRプライマーのセットの一方のプライマーのみが内部である。他方のプライマーはもとのPCRプライマーの一方である。

【0282】

PCRプライマーは、5'末端に付加されたユニバーサル配列決定プライマー結合部位を用いて合成することができる（例えば、ユニバーサルプライマー配列についてのApplied Biosystemsの「Automated DNA Sequencing: Chemistry Guide」の付録Eを参照のこと）。これは、任意のPCR産物がユニバーサルプライマーを用いて配列決定されることを可能にする。ユニバーサルの末端を有するPCRプライマーは、市販の色素標識配列決定プライマーの使用を可能にする。この技術は、ダイターミネーター法とともに有用である。なぜなら、ユニバーサル配列決定プライマーは、良好なアニーリング特性を有しているからである。しかし、より長いPCRプライマーは、反応の全体のコストを増大する。ユニバーサル末端プライマーを使用することは、時折、プライマーのオリゴマー化を生じる。これらの産物は存在するプライミング部位を有するので、これらは、最初の20～100塩基についてノイズが大きいデータを生じ得る。PCRプライマーを再設計すること、さらなるPCR増幅を最適化すること、およびホットスタート法を利用することは、この状況を克服することを手助けし得る。

【0283】

PCR増幅後、得られるPCR産物は、PCRプライマー、dNTP、酵素、および緩衝剤成分とともに溶液中に存在する。配列決定のためにPCR産物を調製するために使用される方法は、キャリアオーバーであるこれらの成分の量、および配列決定のために使用される化学に依存する。増幅反応からのキャリアオーバーである過度のPCRプライマーは、配列決定反応の結合部位および試薬のための配列決定プライマーと競合する。PCRプライマーのこのキャリアオーバーは、ダイターミネーター化学におけるよりも大きな問題を提示する。なぜなら、色素標識は、プライマーが鋳型にアニールした後で伸張産物に取り込まれるからである。1種より多くのプライマーが存在する場合、複数の色素標識配列ラダーが生成し、ノイズの大きなデータを生じる。増幅反応からの過度のdNTPは、配列決定反応のバランスに影響を与え、より短い伸長フラグメントでの終結の減少を生じ得る。

【0284】

非特異的PCR産物には、プライマー二量体アーティファクトおよび二次的PCR産物が含まれる。いずれかの任意の有意な量のPCR産物中での存在は、乏しい品質の配列決定データを生じ得る。非特異的PCR産物は、配列決定反応における鋳型として振る舞い、伸張産物を生じ、これはノイズが大きいデータを生じる。これらの産物は、しばしば、配列決定の前にアガロースゲル上で可視化され得る。これらが存在する場合、PCR増幅は、配列決定の前に最適化および反復されるべきである。ネスト化または半ネスト化配列決定プライマーの使用は、良好な配列決定データが得られることもまた可能にする。または、目的のPCR産物は、アガロースゲル電気泳動によって精製することができる。

【0285】

PCR増幅における汚染物質を最小化するためのいくつかの方法が存在する：PCR optimization (InnisおよびGelband, 1990)：(1) 開始DNAの量；(2) 注意深いプライマー設計；(3) プライマー濃度；(4) 酵素濃度；(5) マグネシウムイオン (Mg^{2+}) 濃度；(6) ヌクレオチド濃度；(7) 緩衝液組成；(8) サイクルの数；(9) pH；(10) 手動ホットスタート法；(11) 自動ホットスタートとしてのAmpliTaq Gold (登録商標) DNAポリメラーゼおよび/または(12) dNTPおよびプライマーの制限。これらの方法のすべてが、PCR増幅の特異性を増加させ、配列決定反応と干渉し得る汚染物質の量を減少する。

【0286】

PCR産物を精製するためのいくつかの方法が存在する：(1) カラム精製；(2) エタノール沈殿；および/または(3) ゲル精製。

【0287】

上記に列挙した非常にストリンジェントな精製方法の1つに対する代替は、配列決定の前の、シュリンプアルカリホスファターゼ (SAP) およびエキソヌクレアーゼ I (Exo I) を用いるPCR産物の処理である。SAP/Exo I手順は、PCR後に残っているヌクレオチドおよび一本鎖DNA (プライマー) を分解する (Werleら、1994)。この手順は、限定濃度のプライマーおよびヌクレオチドが直接的PCR配列決定のために使用できない場合に特に有用である。

【0288】

図27は、DNA配列チップ設計のための1つの実施形態を示す。テンプレートDNAはおおよそプライマーは、ステップ「添加1」において合わされ、反応は、ホットスタートのために95℃でインキュベートされる (位置1)。次いで、反応を20～30サイクルで行い (位置2)、その後、SAPおよびExo Iの添加を「添加2」において行う。反応は、所定の時間の間、37℃にてインキュベートし、次いで、SAPおよびExo I酵素は95℃で不活化する (位置4)。SAP/Exo I手順は、PCR後に残っているヌクレオチドおよび一本鎖DNA (プライマー) を分解する。ユニバーサル配列決定プライマー、ddNTP、および緩衝液は、「添加3」において加えられ、PCR配列決定反応は、5位において進行させる。最終反応産物を収集し、オフチップで保存することができる。

【0289】

ステップの働き

1. 各サンプルについて、以下を合わせる：

SAP (1ユニット/ μL) 2 μL

Exo I (10ユニット/ μL)、0.2 μL

脱イオン水、6.0 μL

注記：一般にPCR産物マイクロリットルあたり、0.5単位の各酵素を使用して、この手順が良好に働く。この手順は、SAP緩衝液の使用あり、または使用なしで、等しく良好に働くようであり、従って、これは、このプロトコールにおいて除外されている。

2. 上記の混合物に4.0 μL のPCR産物を加える。

3. 37℃で1時間インキュベートする。

4. 酵素を不活化するために、72℃で15分間インキュベートする。

【0290】

配列決定反応の推奨されるDNA量は以下の表3-1に示される。

【0291】

表3-1 各ケミストリーについてのDNA鋳型量の推奨範囲

【0292】

【化7】

鋳型	サイクル配列決定ケミストリー				
	ローダミンダイターミネーター	dローダミンターミネーター	Bigダイターミネーター	フルオレセイン/ローダミンダイプライマー	Bigダイプライマー
PCR産物：					
100-200 bp	1-3 ng	1-3 ng	1-3 ng	2-5 ng	2-5 ng
200-500 bp	3-10 ng	3-10 ng	3-10 ng	5-10 ng	5-10 ng
500-1000 bp	5-20 ng	5-20 ng	5-20 ng	10-20 ng	10-20 ng
1000-2000 bp	10-40 ng	10-40 ng	10-40 ng	20-50 ng	20-50 ng
>2000 bp	40-100 ng	40-100 ng	40-100 ng	50-150 ng	50-150 ng
一本鎖	100-250 ng	50-100 ng	50-100 ng	150-300 ng	150-400 ng
二本鎖	200-500 ng	200-500 ng	200-500 ng	300-600 ng	200-800 ng
コスミド, BAC	0.5-2.0 µg	推奨しない	0.5-1.0 µg	0.5-2.0 µg	0.5-1.0 µg
細菌ゲノムDNA	推奨しない		2-3 µg	推奨しない	

10

20

プライマーおよびdNTPの量を制限するPCRプロトコルは、反応の産物が、精製なしで配列決定のために使用されることを可能にする。これは、通常、プライマーおよびdNTPの大部分が増幅の間に使い果たされるように、5~10 pmolのプライマーおよび20~40 µMのdNTPを用いてPCR増幅を設定することによって実行される。所望のPCR産物の収量が高く、産物が特異的である場合、すなわち、アガロース電気泳動によって分析したときに単一バンドを生じる場合には、サンプルは配列決定の前に希釈でき、良好な結果を与える。希釈比率はPCR産物の濃度に依存し、経験的に決定する必要がある（脱イオン水を用いて、1:2および1:10希釈で開始する）。プライマーおよびdNTPの濃度を制限し、PCR産物を希釈する場合、PCRパラメーターは強固でなければならない。直接的PCR配列決定は、同じ標的が増幅され、反復して配列決定され、そしてPCR条件が最適化されている適用において最も有用である。直接的PCR配列決定は、ダイプライマー法を用いて行うことができる。ダイターミネーター法を用いると、PCRプライマーが消費されることが遙かにより重要である。過度のPCRプライマーは、サイクル配列決定反応によって伸長および標識され、ノイズが大きいデータを生じる。直接的PCR配列決定は、XL PCRのためには機能しない。なぜなら、プライマーおよびdNTPの制限量は使用することができない。PCR産物は精製されるべきであり、または過度のプライマーおよびヌクレオチドは、SAP/Exo I処理によって分解するべきである。

30

【0293】

（実施例3）

40

本発明は、微小流体デバイス上で等温増幅方法を実施するための方法を提供する。等温増幅は、本明細書に記載される標準的なPCR技術の代替である。等温増幅は、サンプル中のバックグラウンドDNAの相対量を減少するために使用される。プライマーは、増幅の一定温度手段において一般的に使用される。等温増幅は、SNP検出において適用される。一旦、DNAが等温増幅によって増幅されると、どのヌクレオチド多型が存在するかを検出するためのいくつかの周知の手段が存在する。これらには、対立遺伝子特異的プライマー伸長、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ、ミニ配列決定、蛍光偏光などが含まれる。等温増幅はまた、DNA配列決定調製のために適用可能である。等温増幅したDNAは、液滴の中の固相に結合させることができ、チップ上のパーキング空間中に配置させることができる。ビーズまたはパーキング空間は評価することができ、増幅され

50

たDNAはDNA配列決定反応のために使用される。さらに、等温増幅は、遺伝子発現分析のために適用可能である。等温増幅は、定量的な様式で産生されたcDNAの量の測定によって遺伝子発現をモニターするために使用することができる。等温増幅のための多くの方法が当該分野において公知であり、これには以下の例が含まれるがこれらに限定されない。

【0294】

ローリングサークル増幅(RCA)。DNAポリメラーゼは、環状鋳型上でプライマーを伸長し、鋳型の相補配列の直列にリンクしたコピーを生成する(FireおよびXu, 1995)。ローリングサークル増幅を使用するTempliphi増幅プロセスは、当該分野において公知である。このプロセスにおいて、ランダムヘキサマープライマーが、複数の部位で環状鋳型DNAにアニールする。Phi29 DNAポリメラーゼは、これらのプライマーの各々を伸長する。DNAポリメラーゼが下流の伸長したプライマーに到達するときに、鎖置換合成が起こる。置換された鎖は一本鎖にされ、より多くのヘキサマープライマーによって反応開始されるために利用可能である。このプロセスは継続し、指数関数的な等温増幅を生じる。

10

【0295】

転写媒介増幅(TMA)。RNAポリメラーゼは、プライマー領域において操作されるプロモーターからRNAを作製するために使用され、逆転写酵素は、RNA鋳型から相補的DNAを産生するため、そしてRNase HはcDNAからRNAを除去するために使用される(Guattelliら、1990)。

20

【0296】

鎖置換増幅(SDA)。制限エンドヌクレアーゼは、その標的DNAの非修飾鎖にニックを入れるために使用され、エキソヌクレアーゼ欠損DNAポリメラーゼの作用がニックで30末端を伸長し、そして下流のDNA鎖を置換する(Walkerら、1992)。鎖置換増幅は当該分野において公知である。

【0297】

ヘリカーゼ依存性増幅(HDA)。DNAヘリカーゼは、プライマーハイブリダイゼーションおよびDNAポリメラーゼによる引き続くプライマー伸長のための一本鎖鋳型を生成するために使用される。HADの概略図は図28に示される。2つの相補的DNA鎖が2本の線として示される：厚い線はトップ鎖であり、薄い鎖はボトム鎖である。1：ヘリカーゼ(黒三角)は、2つの相補的DNA鎖を分離し、これは、SSB(灰色円)によって結合される。2：プライマー(矢印を付けた線)はssDNA鋳型上の標的領域にハイブリダイズする。3：DNAポリメラーゼ(モザイクパターンを付けた正方形)は、鋳型DNAにハイブリダイズしたプライマーを伸長する。4：増幅産物は、次のラウンドの増幅に入る。

30

【0298】

一例は、エマルジョンベースのサンプル調製である。DNAフラグメントのランダムライブラリーは、全体のゲノムを剪断すること、および限界希釈によって単一のDNA分子を単離することによって生成される。図29を参照のこと。具体的には、Sollex, 454 Life Sciencesなどによって実施されたもののような配列決定反応は、全体のゲノムのランダムなフラグメント化、フラグメントに特別の共通アダプターを加えること、それら自体のビーズ上、およびエマルジョンの液滴中に個々のフラグメントを捕捉すること、個々のフラグメントをクローニング的に増幅することを含む(図29a、29b)。現在の配列決定技術とは異なり、これらのアプローチは、サブクローニングまたは個々のクローンの取り扱いを必要としない；鋳型はエマルジョン中でまとめて取り扱われる。典型的には、約30%のビーズがDNAを有し、エマルジョン反応あたり450,000個の鋳型運搬ビーズを生じる。

40

【0299】

サンプル調製およびDNA配列決定は図29に示される。パネルA、ゲノムDNAは単離され、フラグメント化され、アダプターにライゲーションされ、そして単一の鎖に分離

50

される（上左）。フラグメントは、ビーズあたり1つのフラグメントが好ましい条件でビーズに結合され、ビーズは、油中PCR反応混液エマルジョンの液滴中に捕捉され、PCR増幅は各液滴中で起こり、独特なDNA鋳型の数千万個のコピーを各々が有するビーズを生じる（上、左から2番目）。エマルジョンは破壊され、DNA鎖は変性され、そして一本鎖DNAクローンを有するビーズは、光ファイバースライドのウェルに沈着される（下左）。ピロリン酸配列決定のために必要とされる固定化酵素を有するより小さなビーズは、各ウェルに沈着される（下、左から2番目）。パネルB、ビーズおよび空の液滴を含む液滴を示すエマルジョンの顕微鏡写真。細い矢印は28mmビーズを指し示し；太い矢印は約100mm液滴を指し示す。パネルC、光ファイバースライドの一部の走査型電子顕微鏡写真、ビーズ沈着前の光ファイバー被覆加工およびウェルを示す。パネルD、配列決定機器は、以下の主要なサブシステム：流体アセンブリーからなる。パネルE、ウェルを含む光ファイバースライドを備えたフローチャンバー。パネルF、CCDカメラベースの画像化アセンブリー。パネルG、必要なインターフェース機器制御を提供するコンピュータ。

10

【0300】

別の例は、加工ピコリットルサイズ反応ベッセル中での配列決定である。1つの方法は、小スケールのウェルを活用するように設計されている修飾ピロ配列決定プロトコールを使用する。光ファイバースライドのオープンウェル中での同時合成による配列決定を使用する。光ファイバースライドは、光ファイバーの引き出しおよび融合の反復によって得られる光ファイバブロックのスライスによって製造される。各反復において、個々のファイバーの直径は、それらが断面サイズが増加している束状構造に六方充填されるにつれて減少する。各光ファイバーコアは44μm直径であり、2~3μmの被覆加工により取り囲まれる；各コアのエッチングは、約55μmの深さで、50μmの中心間距離を有する反応ウェルを作製し（図29c）、75plの計算ウェルサイズおよび平方mmあたり480ウェルのウェル密度を生じる。約160万ウェルを含むスライドにビーズを負荷し、ウェル開口部の上の300μm高さのチャンネルを作製するように設計されたフローチャンバーに装着し、そこを通して配列決定試薬が流れる（図29d）。エッチングしていないスライドの基部は、電荷結合素子（CCD）センサーに結合された第2の光ファイバー画像化束状構造と光学的に接触しており、各個々のウェルの底からの放射光子の捕捉を可能にする（図29d）。3ビーズシステムが開発され、構成要素は、固体支持体上で高い効率を達成するように最適化される。ピコリットルサイズのウェル、小さなビーズによって可能にされる酵素負荷の均一性、および固体支持体化学の増強の組み合わせは、ユーザーが、100塩基までの合成による配列決定の有用な読み取り長を延長する方法を開発することを可能にする。

20

30

【0301】

フローチャンバーにおいて、サイクル的に送達される試薬は、ウェルに対して垂直に流れる。この配置は、オープンウェル中で鋳型を有するビーズ上での同時伸長反応を可能にし、そして試薬および副産物の添加または除去を制御するための対流および拡散輸送に依存する。ウェルにおよびウェルからの拡散の時間スケールは、現在の配置では10sのオーダーであり、ウェルの深さおよびフローチャンネルの高さに依存する。シグナル生成酵素反応の時間スケールは、0.02~1.5sのオーダーである。現在の反応は、質量輸送効果によって支配され、試薬のより迅速な送達に基づく改善が可能である。ウェルの深さは、多数の競合する要件に基づいて選択した：（1）ウェルは、ウェルを過ぎた対流輸送の存在下で、ウェル中にDNAを有するビーズが残るために十分である深さにあることを必要とする；（2）ウェルは、ウェルからの副産物の拡散に対抗して十分な単離を提供するために十分に深くなくてはならず、ここで、取り込みは、取り込みが起こっていないウェルに対して起こっている；ならびに（3）ウェルは、ウェルへのヌクレオチドの迅速な拡散のために、ならびに高配列決定処理能力および試薬使用の減少を可能にするために各流れサイクルの終わりに残っているヌクレオチドを迅速に洗い流すことを可能にするために、十分に浅くなくてはならない。次のヌクレオチドが導入される前に、任意のウェル

40

50

中にヌクレオチドが残っていないことを保証するために、各ヌクレオチドの流れの後で、ピラーゼを含む洗浄液が使用される。

【0302】

別の例は、個々の読み取りの塩基呼び出しである。ヌクレオチドの取り込みは、無機ピロリン酸の付随する放出、および光子の生成によって検出される。鋳型を有するビーズを含むウェルは、読み取りの開始において、公知の4ヌクレオチド「鍵」配列を検出することによって同定される。生のシグナルは、バックグラウンドを減算し、標準化し、および補正する。特定のウェルについての、各ヌクレオチド流における標準化されたシグナル強度は、もしあれば、取り込まれたヌクレオチドの数を示す。シグナルの直線性は、少なくとも長さ8のホモポリマーに対して保存されている。合成による配列決定は、各ビーズ上の非常に少ない数の鋳型が同期性を失っている（すなわち、配列中のすべての他の鋳型の前方に出ているか、またはそれらの後方にあるかのいずれかである）。この効果は、主として、ウェル中の残りのヌクレオチド（「前進」を生じる）または不完全な伸長に起因する。典型的には、1～2%の前進比率および0.1～0.3%の不完全伸長比率が見られる。これらのシフトの補正は不可欠である。なぜなら、同期性の喪失は、より長い読み取り長で配列決定する品質を破壊する累積効果であるからである。

【0303】

方法は、新たに開発されたインビトロサンプル調製方法論および配列決定技術を使用して、機器の単回の実行において、数10万回の配列読み取りの同時獲得、80～120塩基長、96%の平均正確さを実証してきた。Phred 20をカットオフとして用いて、これらは、それらの機器が、試験フラグメントからの4700万個の塩基およびゲノムライブラリーからの2500万個の塩基より多くを生じることが可能であることを示すことができる。ウェル間のクロストークを補正する、配列決定ケミストリーおよびアルゴリズムについての最近の研究は、シグナル分布が狭く、付随するエラーの減少および読み取り長さの増加を伴うことを示唆する。エマルジョンプロトコールにおける改善もまた含む、ゲノムライブラリーを用いる予備的な実験において、84サイクルを使用して、100塩基について実証したものと同様の正確さで、200塩基の読み取り長さを達成可能である。時折、168サイクルにおいて、400塩基を超える塩基に対して100%正確である個々の読み取りが生じた。

【0304】

等温増幅反応は、上記のように、大きな忠実度を伴って高い収率を生じるという大きな期待を示した。しかし、反応が鋳型DNAの非存在下で行われる場合に、偽の非鋳型増幅産物を生成するポリメラーゼの傾向から、付随する欠点が生じる。加えて、本発明者らの応用は、単一の鋳型分子を増幅するためにDNA鋳型の限界希釈とともに高処理能力の微小流体を利用する。結果として、空の反応液滴の数は顕著に増大し、ポアソン分布に従って、全体の液滴集団の90%以上を含む。全体の液滴のさらに小さな画分中での非鋳型増幅（本明細書以後、NTA）は、挿入色素のレーザー尋問（interrogation）に基づく増幅検出ストラテジーを混乱させる可能性があり、従って、この問題は解決されなければならない。当該分野においてこの問題に取り組むために、本発明は、鋳型ベースの増幅を進行させながら、NTAを遅らせるために、微小流体反応中での修飾および標準のヘキサマープライマーの混合物の使用を提供する。

【0305】

以前の研究は、ランダムプライマー（Lage, Leamonら、2003）へのニトロインドール塩基の組み込み（LoakesおよびBrown 1994; Loakes, Hillら、1997）または600nLまで反応体積を減少させること（Hutchison, Smithら、2005）を通して、NTAを減少させるように試みた。不運にも、修飾ニトロインドールプライマーは、複製することが困難であることが判明し、そしてしばしば、それらが取り込まれる増幅の全体の速度および収率を有意に減少する効果を有する。複数プレートウェル中で行われる小体積反応は、小体積の分配に起因する困難さ、およびサンプル蒸発、ウェルからウェルへの相互汚染などの関連する問題に直面した

。

【0306】

ニトロインドールおよびC3非複製要素を含む本発明の修飾プライマーは、バルク反応と微小流体反応の両方でNTAを減少させるための試みの中で研究された。ニトロインドールとC3非複製要素の両方が、NTA抑制において最も有効である2種の5'ニトロインドールを含むプライマーを用いて、NTAを減少する際に有効であることが見出された。しかし、NTA抑制の増加は、鋳型増幅反応における収量の減少と強固に連鎖していた。一定の比率のニトロインドール対ランダムヘキサマープライマーを使用する増幅は、一定の範囲の鋳型増幅収量と非鋳型増幅収量を生じ、15:85の比率であるニトロインドール対ランダムヘキサマープライマーは、ランダムヘキサマープライマー単独と釣り合った鋳型収量を生じるが、鋳型の非存在下では、もしあったとしても、わずかな偽産物を生じる。

10

【0307】

(実施例4)

本明細書に記載されるPCRおよび等温増幅は、単一ヌクレオチド多型分析を実施する際に非常に有用であり得る。単一ヌクレオチド多型、またはSNPは、ヒトのDNAは配列中に存在し得る小さな遺伝子の変化またはバリエーションである。遺伝コードは、4つのヌクレオチド「文字」A（アデニン）、C（シトシン）、T（チミン）、およびG（グアニン）によって特定される。SNPのバリエーションは、単一のヌクレオチド、例えば、Aが、他の3種のヌクレオチド文字—C、G、またはTを置き換えるときに起こる。

20

【0308】

SNPの一例は、DNAセグメントAAGGTTAのATGGTTAへの変化であり、ここでは、第1の断片における2番目の「A」は、「T」で置き換えられている。平均して、SNPは、ヒト集団の中で0.1パーセントより多くの頻度で存在する。ヒトのDNA配列の約3~5パーセントのみがタンパク質の産生のためにコードされているので、大部分のSNPは「コード配列」の外側で見出される。コード配列の中で見出されるSNPは、特に研究者の関心の的である。なぜなら、これらは、タンパク質の生物学的機能を変化させる可能性が高いからである。最近の技術の進歩により、遺伝子同定を容易にするこれらの遺伝子のバリエーションの独特な能力と結び付けて、SNPの発見および検出が最近相次いでいる。

30

【0309】

多くのSNPはヒトにおいて物理的変化を生じないので、科学者は、他のSNPがヒトに疾患の素因を与え、さらに薬物レジメンへの彼らの応答に影響を与えさえする可能性があると考えている。現在、患者がいかにして特定の投薬に応答するかを決定するための簡単な方法は存在しない。1人の患者に有効であることが判明した治療は、他の患者に対しては有効ではない可能性がある。さらに悪いことに、一部の患者は、特定の薬物に対する有害な免疫学的反応を受ける可能性がある。今日、製薬会社は、「平均的な」患者が応答する薬物を開発することに限定されている。結果として、少人数の患者に利益を与え得る多くの薬物が市場に出ていない。

【0310】

将来は、個人のための最も適切な薬物が、患者のSNPプロフィールを分析することによって、治療に先立って決定できる。「個人用医薬」と呼ばれる、薬物が最も利益がある個人を標的とする能力は、製薬会社がより多くの薬物を市場に出すことを可能にし、医師が患者の必要性に対して特異的な個人治療を処方することを可能にする。

40

【0311】

ヒトゲノム中で単一ヌクレオチドの変化を発見することは、困難な見通しであるように見えるが、しかし、過去20年間にわたり、生物医学の研究者らは、ちょうどそれを行うことを可能にする多数の技術を開発してきた。各々の技術は、共通の形質を共有する複数の個体から得られたDNA配列の選択した領域を比較するための異なる方法を使用する。各試験において、結果は、SNPが一例の個体において検出され、他の個体において検出

50

されない場合にのみ、DNAサンプル中で物理的な違いを示す。現在、既存のSNPは、マイクロアレイを使用して最も容易に研究されている。マイクロアレイは、数十万種までの別々のSNPの同時試験を可能にし、コンピュータによって迅速にスクリーニングされる。

【0312】

製薬会社間の今日の競争は、最も効率的な様式で、新規な標的を同定するため、およびこれらの標的を立証するために、新たなシステムゲノミクスアプローチを適用することである。SNP研究は、多くの多遺伝子性疾患の根本的な理解を提供し、従って、新たな治療標的を提供する。グループがゲノム幅スキャンおよび数千のSNPおよびサンプルの遺伝子型決定を必要とする他の大きな研究を実施したので、高処理能力SNP遺伝子型決定

10

【0313】

本発明の微小流体デバイスは、1秒あたり少なくとも10,000種のSNP分析を実施可能である。10倍の過剰表示を用いる全ゲノムスキャン（すなわち、100K SNP）が1時間未満に実施可能である。本発明のデバイスおよび方法を使用して可能にされる速度および効率は、付随するコストおよびSNP分析を実施するための試薬の消費を低減する。

【0314】

（実施例5）

本明細書に記載されるPCRおよび等温増幅は、基材については固定化DNAに依存する、Solexaの1Gシークエンサーなどの市販のDNAシークエンサーのために必要なサンプル調製プロセスを提供する際に非常に有用であり得る。1つの実施形態において、単一の分子は、表面固定化のために使用される部分で処理されたPCRプライマーを使用して増幅でき、次いで、スライドの表面を横切って、PCRポジティブ液滴を流し、充填エマルジョンを形成する。次いで、このエマルジョンを破壊することができ、プライマーは、PCR産物を結合する適切なコーティングの存在のために、スライドに結合することが可能にされる。

20

【0315】

Solexa 1Gシークエンサーは、現在、ブリッジ増幅により、スライドに結合したプライマー上で、適所で増幅された増幅物質を配列決定する。このプロセスにおいて、鋳型DNAは、非常に低い濃度でスライド表面を横切って流れ、そして各鋳型に事前にライゲーションしたアダプターを、8つのレーンのいずれか1つの中のスライドに結合した相補的プライマーにハイブリダイズさせる。一旦ハイブリダイズすると、プライマーは、固定化プライマーを利用するPCR増幅のバージョンであるブリッジ増幅に供せられ、反応の産物は、スライドに固定化されたDNAのパッチである。この様式でDNAを増幅するときには、いくつかのリスクに直面する。このプロセスは、極めて精巧にDNA濃度に感受性である。はるかに多いDNAが使用される場合、DNAパッチはあまりにも接近しすぎて生成され、または重複にさえなり、引き続く配列決定の間に混合シグナルを生じる。少なすぎるDNAが使用される場合、DNAパッチは非常に低い密度で存在し、実行の間に不十分な配列が生成し得る。配列決定反応が72時間かかるので、滴定の実行は、増幅の前のDNA濃度を試験するために実施されず、時間および費用の潜在的な損失は顕著である。加えて、単分子増幅もブリッジ増幅も非常に効率的というわけではなく、そしてブリッジ増幅は上限および下限のサイズ制限があるので、特定の長さの範囲内でのみ産物を生成する。

30

40

【0316】

本発明は、この制限を克服する方法を提供する。1つの実施形態において、Solexaスライドは、結合および固定化を可能にするために一般的に使用される任意の化合物（例えば、カルボキシーエステル、ストレプトアビジン、IgG、金など）でコートすることができる。PCR反応は、溶液中でPCR産物を効率的に増幅するための適切な結合部分（それぞれ、5'アミン、5'ビオチン、5'DNP、または5'チオール）で修飾し

50

たプライマーを使用して本発明の微小流体デバイス中で、記載されるように実施することができ、このPCR産物は、引き続き配列決定のためにSolexaスライドに効率的かつ容易に結合させることができる。増幅は全く直接的なものであり、標準的なサンプル調製プロセスを通してSolexa鑄型にライゲーションされたアダプターと適合性である、鑄型の限界希釈およびプライマー対のセットを用いて実施する。プライマー対の一方は、前の方に記載したように、5'結合部分を有し、かかる対の一方のみが、反対の鎖の除去、およびスライド上の単一の標準的な固定化鑄型の生成を可能にする。一旦、増幅が実施されたら、そしてポジティブ液滴が分別されたら、液滴は、Solexaスライドのレーンの各々に流すことができる。液滴間の適切な間隔は、PCRポジティブ液滴が互いに対してまれにしか近接しないことを保証するために十分な比率でPCRポジティブ液滴とともに、緩衝液または非混和油のみを含む液滴を混合することによって得ることができる。一旦、各レーンが液滴で充填されると、液滴は、電場の適用を通して破壊され、PCR産物は、液滴が占めたのと同じジオグラフィ領域中のスライドに結合させることができる。固定化鑄型は、基本的な洗浄、温度などの適用を通して、一本鎖にすることができる。このことは、配列決定のための、Solexaチップ上でのPCR画分の迅速な増幅、およびそれらの引き続き密度制御沈着を可能にする。

【0317】

(実施例6)

本発明は、微小流体デバイス上の液滴中で少ないコピー数の核酸の存在および／または配列を検出するための方法を提供する。核酸の相補的配列を用いてサンプルをプローブすることによる、サンプル中に存在する特定の核酸配列の検出は、周知の技術である。核酸は、相補的核酸に結合する際に高度に特異的であり、従って、特定の核酸がサンプル中に存在するか否かを決定することは有用である。検出される特異的核酸の配列を知らなければならず、次いで特異的核酸配列に相補的な核酸配列を有するプローブを構築しなくてはならない。

【0318】

核酸プローブは高度に特異的なので、ある状況においては、核酸配列によって産生されるタンパク質ではなく、核酸配列それ自体をプローブすることが好ましい。特定の例として、単にタンパク質検出に基づく診断方法は、DNAゲノムを欠く非感染性抗原粒子の有意なレベルの存在に起因して、B型肝炎ウイルスの感染性粒子の存在を決定するためには信頼性がない。別の例において、前癌性または良性のいずれかの子宮頸部腫瘍において見出されるヒトパピローマウイルスの種々のサブタイプは、核酸プローブハイブリダイゼーションの使用によってのみ区別することができる。また、AIDSウイルスの特定の遺伝子構成は、AIDSウイルス特異的核酸配列の存在に基づくアッセイが診断剤として優れていることを確実にする。

【0319】

細胞あたり100,000コピーまでの、天然に存在する数の多いリボソームRNAは、GenProbeによって使用され、核酸プローブを使用して、レジオネラおよびマイコプラズマなどの特定の細菌病原体の診断を容易にする。しかし、この戦略は、ウイルスなどの非細胞性病原体、または低コピー数を有するプローブした核酸配列とともに使用することはできない。コピー数は、AIDSウイルスの検出のための核酸プローブ法の開発に伴う特定の問題であり、ここでは、組み込まれたプロウイルスが、10,000個の末梢血リンパ球のうちの1個未満で存在し得る。従って、サンプル中に存在すると疑われる特定の核酸配列が増幅できる場合、コピー数の問題は回避でき、プローブアッセイはより容易に使用できる。

【0320】

数個の細胞のみを含み、または結果的に数コピーのみの特定の遺伝子を含む通常の生体サンプルにおいて、コピー数の問題を克服するために、増幅プロセスを利用することが必要である。

【0321】

増幅するための1つの方法は、サンプルを「成長させる」ことであり、すなわち、サンプル中に存在する、生きている生物学的物質がそれ自体を複製できるように、条件を設定することである。複製は、検出可能なレベルまで、核酸配列の量を増加することができる。食品業界において、例えば、食品に毒となる細菌、サルモネラについて加工食品を試験するために、食品サンプルは、核酸コピー数の量を増加させるように、何日もの間インキュベートしなくてはならない。臨床サンプルにおいては、病原体もまた、ある程度長時間にわたって、成長させることによってそれらの数を増加させなければならない。

【0322】

現在の方法は、プライマー伸長産物が合成され、これが次には鋳型として働き、標的DNA配列の増幅を生じるように、標的DNA配列を含むことが疑われているサンプルがオリゴヌクレオチドプライマーで処理されるプロセスを利用している。プライマー伸長産物は、熱変性を使用して鋳型から分離される。現在の方法はまた、2つの別々の相補鎖を有する標的DNA配列を増幅するためのプロセスもまた含む。このプロセスは、鎖をプライマーで処理して伸長産物を合成すること、鋳型からプライマー伸長産物を分離すること、および次には、鋳型としてプライマー伸長産物を使用することを含む。

【0323】

上記の方法の両方が、手動または機械でのいずれかの関与、および増幅プロセスにおけるユーザーによる多段階操作を必要とし、DNAを増幅することのみに制限されている。これらの方法に含まれる工程は、ユーザーがサンプルを加熱すること、サンプルを冷却すること、適切な酵素を加えること、次いで、これらの工程を反復することを必要とする。温度の変化は、酵素がそれらの活性を弱めることを引き起こす。従って、ユーザーは、増幅プロセスの間、適切な酵素のアリコートをし、繰り返し増幅混液に補充する。

【0324】

本発明は、微小流体上で液滴中の低コピー数の核酸の存在および／または配列を検出するための方法を提供する。本発明の1つの実施形態において、水性エマルジョン（すなわち、液滴）内部に位置する低コピー数の鋳型DNA分子に結合するときに、酵素にスイッチを入れまたは活性化するように、ヌクレオチド／ペプチド核酸（pna）プローブ（オリゴプローブ）をつなぐことができる。非限定的な例として、アルカリホスファターゼ結合体は、低コピー数ヌクレオチドの一方の末端に配置し、アルカリホスファターゼの阻害剤は、他方の末端に配置することができる（分子ビーコンのように）。オリゴプローブが低コピー数鋳型に結合するとき、阻害剤は酵素から取り外され、酵素は基質を代謝する。つなぎは、タンパク質相補アッセイであり得、ここで、低コピー数鋳型へのオリゴプローブの結合は、酵素が活性であることを引き起こす。

【0325】

種々の実施形態が本明細書に記載され、これらは本明細書を限定するものとして見なされるべきではない。例1：Taqmanはオリゴプローブの3'末端に結合したβ-galタンパク質を消化し、それによって、溶液中のオメガフラグメントに結合するために遊離α-サブユニットを放出する。例2：2つのオリゴプローブが互いに隣接する低コピー数鋳型上に存在し、それによって、タンパク質相補アッセイ試薬の2つのサブユニットを一緒にする。例3：活性部分を放出させるTaqman様酵素もまた使用できる。活性部分には、例えば、オリゴプローブからの放出の際に活性化される酵素、またはオリゴプローブにつながれたときにクエンチされる蛍光基を含めることができる。プローブが結合したときのみにプローブを切断する二本鎖特異的ヌクレアーゼの使用は、それによって、活性酵素または蛍光基質を放出する。例4：プローブは、検出されるハイブリダイゼーションが、Taqman式に蛍光基の放出を引き起こすように結合した蛍光基を有する。例5：プローブは、検出されるハイブリダイゼーションが、Taqman型放出によって活性酵素の放出を引き起こすように結合した不活性酵素を有する。例6：プローブは、検出されるハイブリダイゼーションが、相補可能である酵素の活性部分の放出を引き起こすように結合した不活性相補酵素を有する。例7：2つのプローブは、検出されるハイブリダイゼーションが、酵素の相補および活性化を引き起こすように結合した不活性酵素部分を

有する。例 8：2つのプローブは、一緒になり、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）反応が起こることを可能にする。これは、FRET-オリゴライブラリーを必要とする。ほとんどすべてのSNPまたは転写プロファイリング法がこのコンセプトを受け入れ可能であり得る。

【0326】

多くのアッセイが、微小流体デバイス上で実施され、これには以下が含まれるがこれらに限定されない：タンパク質-タンパク質、抗体-抗原、核酸-タンパク質、核酸-核酸、リガンド-タンパク質、リガンド-核酸、リガンド-リガンド、真核生物または原核生物細胞の表面部分-第2の部分、真核生物または原核生物細胞の表面上の2つ以上の受容体の測定、タンデム融合を使用する3ハイブリッドシステムの開発、インターアクター-コファクターなど。システムに適合できる多くの他の型の相互作用もまた公知である。相補アッセイを組み入れたアッセイは、プロテオミクスとゲノミクスの両方において使用できる。

10

【0327】

現在、これらのアッセイ方法は、相互作用/結合を検出するために、 $>10\text{ K}$ フルオレセイン分子を必要とする方法を必要とする。1つの実施形態において、本発明は、相互作用する分子のシグナルを増幅することによって、多数の相互作用タンパク質を減少させる方法を提供する。いくつかのアッセイの好ましい実施形態において、安定なエマルジョンは必要とされないかもしれない。利点は、液滴中のタンパク質活性に影響を与え得る界面活性剤および安定剤を除外できることである。

20

【0328】

同様に、上記のアッセイのいずれかにおいて、相補の損失を理解可能に見ることができる。相補の損失または増加は、物理的（例えば、熱、光）または化学的な添加、または液滴の製剤の関数であり得る。これらの相互作用には以下が含まれるがこれらに限定されない：タンパク質-タンパク質、抗体-抗原、核酸-タンパク質、核酸-核酸、リガンド-タンパク質、リガンド-核酸、リガンド-リガンド、真核生物または原核生物細胞の表面部分-第2の部分、真核生物または原核生物細胞の表面上の2つ以上の受容体の測定、タンデム融合を使用する3ハイブリッドシステムの開発、インターアクター-コファクターなど。システムに適合できる多くの他の型の相互作用もまた公知である。相補アッセイを組み入れたアッセイは、プロテオミクスとゲノミクスの両方において使用できる。

30

【0329】

各相互作用パートナーの量は、一方または他方に対して、レポーター分子（例えば、色素または量子ドット、GFPタンパク質）を遺伝的にまたは化学的にカップリングすることによって、液滴内で定量可能である。同様に、酵素的増幅のために記載される相補アッセイは、同じかまたは異なる時点において液滴に加えられた異なる酵素基質を使用することによって、各パートナーの濃度が液滴中で計算できるように、いくつかの異なる相補タンパク質の1つを使用することができる。基質添加のタイミングは決定的ではなく、添加は異なる時点で行うことができることを当業者は容易に認識する。種々の変性剤によってプロテアーゼなどを「殺す」ことは当業者の範囲内である。

【0330】

1つの実施形態において、相補アッセイは、例えば、IVT合成タンパク質を加えるか、または特別に加えるために使用できる。一例として、RNase AのS-ペプチドおよびSタンパク質があり、ここで、S-ペプチドは、IVT生成されたAbおよびSタンパク質に遺伝的に融合され、S-ペプチドへの結合の際に、RNase A活性を活性化し、それによって、さらなるIVT合成を停止する。同様に、任意の2つの相補相互作用が、活性を生成するために使用できる。

40

【0331】

液滴中のインターアクターの量を定量することによって、相互作用反応速度（例としては、親和性定数および解離定数）を誘導することが可能であり得る。1つの実施形態において、本発明は、以下のタンパク質の定量を可能にし、これは、増幅の非存在下では蛍光

50

分光によって見ることができる方法を提供する。または、増幅は、分子の末端に定量した数のレポーターを遺伝的に加えることが可能である場合に、増幅はまた、必要とはされないかもしれない。例えば、タンパク質の末端に10個のGFPタンパク質を遺伝的に融合し、それによって、蛍光強度を10倍増強する。同様に、一連の小さな相補部分は、タンパク質の末端に融合することができ、長い遺伝的融合の必要性を取り除く。一例として、リンカーによって間隔を空けて配置された一連の10ペプチドは、Sタンパク質の各「グラブホールド」が可能であり、単一の酵素によって達成できるものを超えた、シグナルの増加を生成する。他の例には、ビオチンまたはビオチン-結合タンパク質模倣物のいずれかおよびストレプトアビジンまたはアビジン、FLAGタグ、ポリヒスチジン、相補GFPなどが含まれる。別の例には、液滴のQcodingが含まれる。

10

【0332】

図30および31は、微小流体デバイス上で抗体を単離するための現在の方法を示す。現在の方法において、DNAビーズは、バルクエマルジョンPCRを使用して作製する；DNA含有ビーズは、好ましくは、微小流体デバイスへの負荷の前に単離される。抗原は<20kDであり得（好ましくは、<10kD）、適切な色素で標識される（好ましくはいくつかの色素-分子を用いる）。シグナルを増大させるためにポリリジンテールを抗原に配置することがさらに好ましくあり得る（しかしクエンチングが懸念される）。抗原は、液滴中での適切な感度を可能にするために、100nmの濃度で、ビーズ含有液滴に製剤化される（複数の異なる色素の使用は、この濃度を低下させることを可能にする）。ある状況において、IVT溶液と同時に抗原を加えることが可能である。

20

【0333】

図32は、微小流体デバイス上で抗体を分離するための本発明の方法を示す。右のパネルは、抗体および抗原を相互作用させるシグナルを増幅するために提案される個々のステップの図である。左のパネルは、微小流体デバイス上で使用されるチップのために設計されるような概略図である。

【0334】

図33は、全長抗体クローンについての遺伝的選択を示す。遺伝的選択は、E.coliを形質転換すること、および適切な糖類が唯一の炭素源である培地上で増殖可能なクローンについて選択することによって、全長抗体クローンについて富化するために使用することができる。

30

【0335】

（実施例7）

本発明は、強制的な引っ込みおよび同じ流体ポートへの再注入を使用することによって、第1の微小流体基材の機能性を、第2の微小流体基材のそれと合併する、微小流体デバイスのトポロジーおよび実行を提供する。現在の多段階アッセイにおいて、以下のステップが、「2段階」実験を完了するために実施しなくてはならない：（1）第1の微小流体基材の導入；（2）すべての第1段階試薬の導入；（3）すべての流体ラインの開始およびデバイス操作の安定化；（4）デバイスの安定化後、機器への保存容器のパッシブ接続；（5）収集完了時、第1のデバイスからの保存容器への分断；（6）収集したエマルジョンのインキュベーション；（7）機器からの第1のデバイスの取り出し；（8）実験の第2の段階のために必要とされる流体ラインの洗浄；（9）機器への第2のデバイスの導入；（10）すべての第2段階試薬の接続、第1の段階の間に収集したエマルジョンを含む；（11）測定の後半を実行する前に第2のデバイスへの流体接続を開始すること；および（12）第2段階の収集／読み取り。

40

【0336】

本発明の方法は、以下を用いて多段階アッセイの現在の手順を置き換える：（1）第1の微小流体基材の導入；（2）すべての第1段階試薬および第2段階試薬の導入、第1段階の保存容器を含む（すでに接続されていない場合）；（3）流体ラインの開始およびデバイス操作の安定化；（4）オイルのいくつかの画分および生成したエマルジョンのすべてを保存容器まで活発に引っ込めることによる、第1段階の合わせた液滴の収集の制御；

50

(5) 収集したエマルジョンのインキュベーション；(6) デバイスの後半に戻して収集した液滴の開始および再注入；および(8) 第2段階の収集／読み取り。図34は、このデバイスとポロジの概略図を示す。

【0337】

収集したエマルジョンの取り扱いの除外は、機器とのユーザーの相互作用を単純化することを超えて、顕著な利点を有し得る。汚染物質は、実験を台無しにする潜在性を有し、任意の過度の取り扱いおよび接続／分断は、汚染物質が機器に混入する可能性を増大させる。

【0338】

(実施例8)

10

低分子干渉RNA (siRNA) の使用による、RNAi (RNA干渉) を通しての遺伝子サイレンシングは、分子生物学のための強力なツールとして出現し、治療用遺伝子サイレンシングのために使用される潜在能力を保持している。標的細胞内の低分子DNAプラスミドから転写した低分子ヘアピンRNA (shRNA) もまた、安定な遺伝子サイレンシングを媒介し、化学合成したsiRNAを用いるトランスフェクションによって得られたものと比較し得るレベルの遺伝子ノックダウンを達成することが示されてきた (T. R. Brummelkamp, R. Bernards, R. Agami, Science 296, 550 (2002), P. J. Paddison, A. A. Caudy, G. J. Hannon, PNAS 99, 1443 (2002))。治療目的のためのRNAiの可能な適用は広範囲であり、癌遺伝子またはウイルス遺伝子などの疾患遺伝子のサイレンシングまたはノックダウンを含む。

20

【0339】

多くのアッセイが、微小流体デバイス上で実施され、これには以下が含まれるがこれらに限定されない：タンパク質-タンパク質、抗体-抗原、核酸-タンパク質、核酸-核酸、リガンド-タンパク質、リガンド-核酸、リガンド-リガンド、真核生物または原核生物細胞の表面部分-第2の部分、真核生物または原核生物細胞の表面上の2つ以上の受容体の測定、タンデム融合を使用する3ハイブリッドシステムの開発、インターアクター-コファクターなど。システムに適合できる多くの他の型の相互作用もまた公知である。しかし、RNAiスクリーニングを、迅速かつ正確に行う改善方法についての必要性が当該分野において存在している。

30

【0340】

本発明は、微小流体デバイス上で致死的または合成した致死的RNAi誘導性表現型のスクリーニングのための方法を提供する。本発明は、各ウイルスが独特な60ntを有し、すべてのベクターに対して共通であるヌクレオチド配列をいずれかの側で有し、括弧付きのバーコードで同定される、RNAiのレンチウイルスライブラリーを利用する。

【0341】

致死的小および合成の致死的小RNAi-誘導性表現型の分析は2段階で行う。第1段階において、ウイルスライブラリーは、バルクおよび感染で、またバルクで、適切な宿主株の中に合わせる。ライブラリー中の異なるレンチウイルスの各々のモル量は、例えば、適切な機器上での配列決定によって、または微小流体デバイス上での遺伝子発現分析によってあらかじめ決定される。感染後、処理した細胞を収集し、60ntバーコードを、括弧を付けた配列に基づいて、PCRプライマーを使用して、染色体DNAから増幅する。第2段階において、PCR増幅産物は、微小流体デバイスに加え、標識した液滴ライブラリーに対して分析し、ここで、標識した液滴は、上記レンチウイルスバーコードの各々に対してレンチウイルスバーコード-定量試薬 (例えば、分子ビーコン、Taqmanプローブなど) を含む。遺伝子発現分析様分析は、処理した細胞中での各々のレンチウイルスバーコード型の量で定量するために実施する。増幅産物中の任意のレンチウイルスバーコードの非存在または有意な減少は、処理した細胞中のバーコード含有レンチウイルスの死滅に起因して仮定することができる。1つの実施形態において、液滴中の産物は、増幅することもできる。

40

50

【0342】

GFPまたはさらなる転写分析もまた、2段階で行うことができる。第1段階において、ウイルスライブラリーは、バルクおよび感染で、またバルクで、適切な宿主株の中に合わせる。ライブラリー中の異なるレンチウイルスの各々のモル量は、例えば、適切な機器上での配列決定によって、または微小流体デバイス上での遺伝子発現分析によってあらかじめ決定される。感染後、処理した細胞をi)バルクで収集し、ii)微小流体デバイス中で分別可能な表現型を使用して分別し(例えば、GFP発現、細胞表面マーカー、低コピー細胞表面マーカーなど)そしてiii)60ntバーコードを、括弧を付けた配列に基づいて、PCRプライマーを使用して、染色体DNAから増幅する。第2段階において、PCR増幅産物は、微小流体デバイスに加え、標識した液滴ライブラリーに対して分析し、ここで、標識した液滴は、上記レンチウイルスバーコードの各々に対してレンチウイルスバーコード一定量試薬(例えば、分子ビーコン、Taqmanプローブなど)を含む。遺伝子発現分析様分析は、処理した細胞中での各々のレンチウイルスバーコード型の量で定量するために実施する。増幅産物中の任意のレンチウイルスバーコードの非存在または有意な減少は、処理した細胞中のバーコード含有レンチウイルスの死滅に起因して仮定することができる。

10

【0343】

(実施例9)

多くの疾患が、特定の染色体異常に関連する。例えば、癌細胞の染色体は、しばしば、転座と呼ばれる異常を示し、ここでは、1つの染色体の断片がちぎれて、別の染色体の末端に付着する。かかる染色体異常を同定すること、および疾患におけるこれらの役割を決定することは、多くの遺伝疾患を診断するための新しい方法を開発する際の重要な段階である。ギムザ染色を使用する伝統的な核型分析は、科学者がヒトの染色体のフルセットを黒色および白色で見ることを可能にし、染色体の数およびサイズを観察するために有用な技術である。しかし、核型分析を迅速かつ正確に改善する方法についての必要性が当該分野において存在している。

20

【0344】

本発明は、核型分析のための方法を提供する。好ましくは、核型分析のスクリーニングは、微小流体デバイス上の液滴中で行う。現在、科学者は、黒色および白色の核型分析のみを使用して、多くの転座または他の異常を正確に同定することはできない。スペクトル核型分析(SKY)は、科学者が一度に23対すべてのヒト染色体を可視化することを可能にする研究用技術であり、染色体の各対は、異なる蛍光色で塗られている。SKYを使用することによって、彼らは、1つの色で塗られた染色体が、そこに付着した、別の色で塗られた異なる染色体の小さな断片を有する例を容易に見ることができる。

30

【0345】

液滴ベースの方法の使用を通して、染色体は、剪断力について心配することなく、液滴中で捕捉可能である。次いで、染色体は、外側に伸びた「ネックダウン」を通過させることができる。ギムザ染色またはオリゴヌクレオチドプローブのいずれかをを用いる、負荷の前の標識は、液滴が流れるときにDNA核型分析するために使用できる。

【0346】

本発明は、個別の染色体を「塗る」ためのSKYプローブを使用する方法を提供する。フローソーティングを含む、フロー分析前の染色体の調製のためのフローサイトメトリーによって使用される方法もまた提供される。本発明は、微小流体デバイス上での使用のためのこれらの方法の適合を可能にする方法を提供する。

40

【0347】

SKYは、プローブと呼ばれる一本鎖DNAの短い配列の大きなコレクションの調製を含む。このDNAライブラリー中での個々のプローブの各々は、1つの染色体の独特な領域に対して相補的であり；一緒に、すべてのプローブが、ヒトゲノム内のすべての染色体に相補的であるDNAのネットワークを形成する。各プローブは、そのプローブが相補的である染色体に対応する蛍光分子で標識される。例えば、染色体1に相補的なプローブは

50

黄色分子で標識されるのに対して、染色体2に相補的なプローブは赤色分子で標識される、などである。これらのプローブがヒト細胞からの染色体と混合されるとき、プローブは、染色体中のDNAに、ハイブリダイズまたは結合する。これらがハイブリダイズするにつれて、蛍光プローブは、本質的に、染色体のセットを虹色に塗る。次いで、科学者は、塗られた染色体を分析するためにコンピュータを使用して、染色体のいずれかが転座または他の構造的な異常を示すか否かを決定することができる。図35を参照のこと。

【0348】

分析の前に、染色体は、以下のように、Bee Ling NgおよびNigel P. Carter「Factors Affecting Flow Karyotype Resolution. Cytometry」Part A 69A:1028-1036 (2006)に記載されるように調製することができる：

1. 細胞株の細胞周期時間に依存して、最適な時間の長さで、0.1 lg/ml デメコルチン使用して、細胞を中期で静止させる（懸濁液の場合は約5時間、接着細胞株のときは16時間、およびLPS刺激Bリンパ球培養物では4時間）。
2. 細胞を収集し、289gで5分間遠心分離する。上清を除く。
3. 5mlの低張液（75mM KCl、10mM MgSO₄、0.2mM スペルミン、0.5mM スペルミジン、pH 8.0）中に細胞ペレットを再懸濁し、室温で10分間インキュベートする。
4. 細胞懸濁液を289gで5分間遠心分離する。上清を除く。
5. 3mlの氷冷したポリアミン単離緩衝液（PAB、15mM Tris、2mM EDTA、0.5mM EGTA、80mM KCl 3mM ジチオスレイトール、0.25% Triton X-100、0.2mM スペルミン、0.5mM スペルミジン、pH 7.50を含有）中で細胞ペレットを再懸濁、そして20秒間ボルテックスする。
6. 染色体懸濁液を、201gで2分間手短に遠心分離する。上清を201mメッシュフィルターに通す。
7. 5 lg/ml Hoechst、40 lg/ml クロモマイシンA3、および10mM MgSO₄を用いて、染色体を一晩染色する。
8. フロー分析の1時間前、染色した染色体懸濁液に、10mMのクエン酸ナトリウムおよび25mMの亜硫酸ナトリウムを加える。

【0349】

本発明は、個々の染色体が分別される、核型分析のための染色体を分別するための方法もまた提供する。この分別は、1つ以上の特定の染色体の集団について富化するために、染色体特異的同定（例えば、標識プローブのハイブリダイゼーション）の後に行うことができる。この富化された集団は、DNA配列決定反応において使用できる。

【0350】

ギムザ染色および／または標識プローブハイブリダイズ染色体は、個々の染色体上での転座の領域を同定するために、微小流体デバイス上のチャネルの狭窄を通して送られ、染色および／または遺伝的「バーコード」としての標識の領域を検出できる。

【0351】

染色体および核型分析の同定は、特定の細胞型、例えばi) 母体血からの胎児細胞、またはii) ヒト血液からの癌細胞の富化後に使用できる。

【0352】

（実施例10）

本発明は、バイオマス転換の改善を有する微生物株およびかかる株を調製する方法を提供する。バイオマスは、植物材料、すなわち、木、草、農作物、または他の生物学的材料、例えば、動物材料などの有機材料である。これは、固形燃料として、または液体型もしくは気体型に転換され、電力、熱、化学物質、もしくは燃料の製造のために、使用することができる。バイオマスは、繊維製品、食品供給、環境、通信、住宅などの他の産業分野における他の市販品を製造する際に使用することができる。例えば、バイオ燃料開発は、

バイオマスのエタノールへの転換の改善を有する、新たな微生物株の開発を探索する。

【0353】

研究者らは、バイオマス中の糖類をより有効に発酵できる微生物を開発するために洗練された代謝操作技術を応用してきた。リグノセルロースバイオマスには、キシロースなどの5炭糖（ヘミセルロースから）ならびにより「一般的な」、穀物中で見られるグルコースなどの6炭糖が含まれる。これは、発酵およびはるかににより困難である他の生物処理を行う。ある生物精製シナリオは異なる糖の流れを利用して複数の製品を製造するが、他のものは、すべての糖が単一セットの装置の中で補酵素であり得るならば、よりコスト効果が高い。従って、研究者らは、エタノール製造経済を改善するために、バイオマス中のすべての糖を補酵素とし得る微生物を開発している。産業上のパートナーとともに、研究者らは、特定の原料、供給の流れ、およびプロセスのバイオマス転換のための微生物のデザイナー株を開発するために研究している。従って、改善されたバイオマス転換を有する新規な微生物株の迅速な操作のためのデバイスおよび方法についての必要性が存在する。

10

【0354】

本発明は、バイオマスエネルギー転換のために使用できる変異体細菌、酵母、または真菌の株を製剤化するための微小流体デバイスを提供する。この微生物株は、例えば、組換え方法によって操作することができ、1つ以上の目的のポリペプチドをコードする1つ以上の核酸配列を含み、ここで、この変異体株は、同じ条件下で、対応する変異型ではない株よりも高いレベルで、目的のポリペプチドを発現する。

【0355】

20

1つの実施形態において、この核酸配列は、セルラーゼ発現、キシラナーゼ発現、またはg p d A発現と関連するプロモーター配列からなる群より選択される発現調節領域に作動可能に連結することができる。別の実施形態において、この核酸配列はさらに、分泌シグナル配列に任意に連結することができる。

【0356】

1つの実施形態において、この核酸配列は、異種ポリペプチドコード核酸配列、異種シグナル配列、または異種発現調節配列、またはこれらの組み合わせから選択される異種核酸配列であり得る。例えば、この核酸配列は、異種シグナル配列、例えば、分泌シグナル配列であり得る。または、この核酸配列は、異種発現調節領域、例えば、誘導性プロモーターまたは高発現プロモーターであり得る。

30

【0357】

目的のポリペプチドは異種ペプチドであり得、変異型株の中で、同じ条件下で、対応する変異型ではない株よりも高いレベルで目的のポリペプチドを発現する。1つの実施形態において、目的のポリペプチドは、炭水化物分解酵素、プロテアーゼ、リパーゼ、エステラーゼ、他のヒドロラーゼ、オキシドレダクターゼ、およびトランスフェラーゼの1つ以上から選択され得る。なお別の実施形態において、目的のポリペプチドは、一次代謝産物、有機酸、二次代謝産物、および抗生物質の発現または過剰発現を可能にする1種以上の真菌酵素から選択できる。これらの真菌配列は、例えば、分泌シグナル配列を含み得、そしてセルラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、キシラナーゼ、ペクチナーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼ、ポリガラクトツロナーゼ、またはハイドロフォビンの1つ以上から選択できる。または、真菌配列は、1つ以上の真菌発現調節領域を含み得る。好ましくは、目的のポリペプチドは、6より上のpHで最適活性および／もしくは安定性を示し、ならびに／または6より上のpHでその活性の70%より多くおよび／もしくは安定性を示す。

40

【0358】

変異型微生物は、選択マーカーをさらに含み得る。選択マーカーは、薬物に対する耐性を付与し得、例えば、栄養欠損から回復する。

【0359】

別の実施形態において、微生物は、変異誘発を介して変異することができる。変異誘発は、例えば、UV照射または化学的変異誘発の一方または両方によって達成することがで

50

きる。例えば、1つの実施形態において、変異誘発は、微生物をUV照射に曝露すること、微生物をN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンに曝露すること、および微生物をUV照射に曝露することを含み得る。

本発明はまた、バイオマス転換の改善を有する微生物株を作製するための方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、微細加工基材で作った微小流体デバイスを提供する工程を包含する。この微細加工基材は、互いに流体連通されており、それによって、少なくとも1つの連続相流体を運ぶように適合された少なくとも1つの主チャンネルを形成するように、一体的に配置された、複数の電氣的にアドレス可能なチャンネルを有するモジュールを備え得る。この方法はさらに以下の工程を包含する：1つ以上の液滴が連続相流体中で形成されるように、第1の入口チャンネルを通して、微細加工基材の主チャンネルまで、緩衝液、微生物ライブラリー、および媒体（別々の液体または1つの液体ですべて一緒に）を流す工程；1つ以上の液滴が上記連続相流体中で形成されるように、第2の入口チャンネルを通して、微細加工基材の主チャンネルまで、基材を流す工程；液滴が合流モジュールを通過するときに基材を含む液滴とともに、微生物ライブラリーを含む液滴を合流させ、それによって、NanoRefineryを生成する工程；微細加工基材上の検出モジュール中の所定の特徴について、NanoRefineryに問い合わせる工程；および微細加工基材上の収集モジュール中の目的の微生物を含むNanoRefineryを収集する工程。アッセイシステム、例えば、それによって所望の生成物が産生されたか否かを決定する手段、またはそれによって出発基材材料の非存在を決定するための手段もまた、液滴またはNanoRefineryの1つに取り込まれ得る。このアッセイシステムは、基材の添加の前、その後、または同時のいずれかで、加えることができる。

【0360】

1つの実施形態において、このアッセイ系は、溶液中の糖の量を測定できる色素である。別の実施形態において、微生物ライブラリーは、DNA、細菌、酵母、または真菌の1つ以上を含む。この基材は、発酵ブロス、セルロース、または他のポリサッカリド、または植物リグニンの1つ以上を含むバイオマスを含み得る。

【0361】

本発明は、バイオマスを1つ以上の生成物に分解または転換するための方法をさらに提供する。1つの実施形態において、この方法は、有効量の組換え微生物でバイオマスを処理する工程を包含し、ここで、組換え微生物は、バイオマスを1つ以上の生成物に分解または転換する酵素をコードする1種以上の異種配列を発現、または過剰発現する。1つの実施形態において、バイオマスは、植物細胞壁ポリサッカリドを含み得る。別の実施形態において、生成物は、図36および37に列挙された中間体または製品および消費財の1種以上を製造するために使用される1種以上の汎用化学製品または二次汎用化学製品を含み得る。

【0362】

（実施例11）

本発明は、改善された活性を有する酵素をスクリーニングする方法を提供する。一例として、少なくとも1つの細胞（原核生物または真核生物）が液滴中に沈着され、細胞は、同種アッセイが利用可能である物質を分泌するようにされる。特別な例として、変異原処理培地からの個別のバチルス・スプチリス細胞は、30ミクロン増殖培地含有液滴中に沈着され、得られる液滴は収集され、一晚インキュベートされる。この細菌は液滴中にプロテアーゼを分泌する。次いで、バチルスを含む液滴は、プロテアーゼ切断可能な色素で標識したペプチドを含むアッセイ液滴とともに個々に合同される。切断されていないペプチドは無色であるのに対して、切断されたペプチドは赤色になる。液滴は、色形成を可能にするように、十分な時間、チップ上でインキュベートする。赤色である液滴を分別する。次いで、収集した分別した液滴は、固形増殖培地上に配置し、得られるコロニーは、一晚インキュベーション後、液滴からの個々のクローン性単離物を表す。

【0363】

加えて、アッセイ液滴は、比活性度、例えば、特定の時間後により強烈な赤色液滴によ

って示される、より活性な酵素に基づいて分別することができる。加えて、液滴中の条件は、2つの液滴を合同させる間に、細菌のためにそれ自体許容されない可能性があるアッセイ条件に変更することができる。例えば、液滴中のpHは、酸性またはアルカリ性のいずれかの条件下でより良好に働く変異型酵素を見つけるために変化させる。または、液滴は、より耐熱性である酵素が同定されるように、加熱することができる。

【0364】

液滴の合同は、個々の細胞が液滴中に配置された直後、またはさらなるインキュベーション後であり得る。

【0365】

本発明の別の方法は、液滴中の細胞の内容物を放出するために、アッセイ段階前に細胞が溶解される以外は、上記と同様である。

【0366】

他の実施形態において、基材は、液滴中に含まれる2つ以上の別々の試薬流動とともに加え、またはそれと同時に製剤化することができる。具体的な例として、マクロファージ細胞は、緩衝液中で洗浄され、酵素結合体化抗細胞表面抗体とともにインキュベートされる。次いで、細胞は、酵素基質とともに、個々に同時に製剤化された液滴中に負荷される。液滴中で代謝される酵素基質の量は、液滴中の酵素分子の数に比例し、これはマクロファージ表面に結合する抗体の数に比例する。注意深い較正により、細胞表面に結合した細胞表面分子の数を見積もることが可能である。

10

【図1】

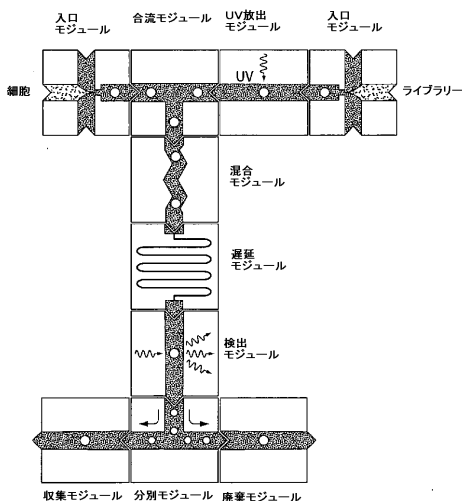


Fig. 1

【図2A】

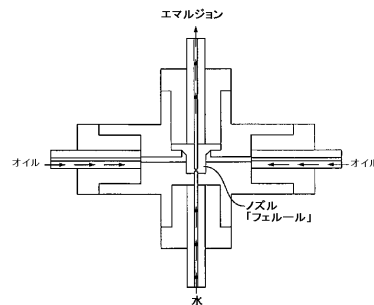


Fig. 2A

【図 2 B】

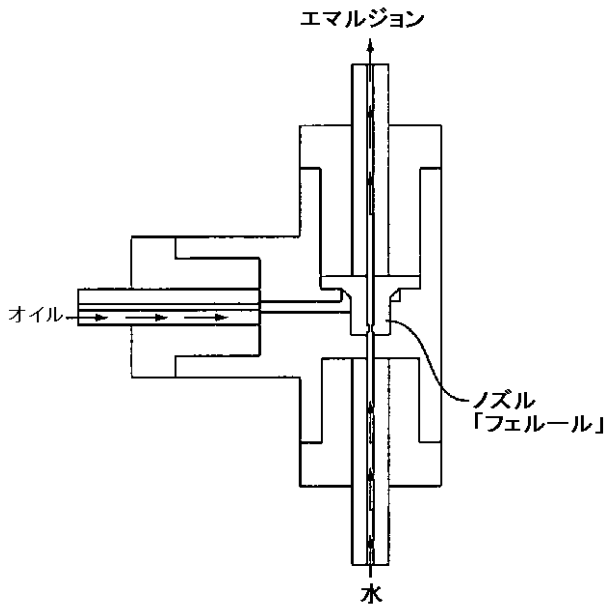


Fig. 2B

【図 2 C】

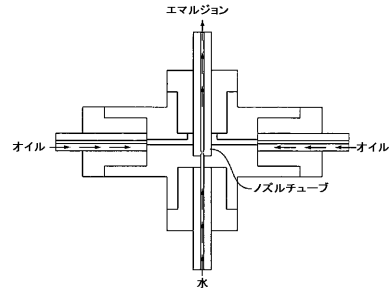


Fig. 2C

【図 2 D】

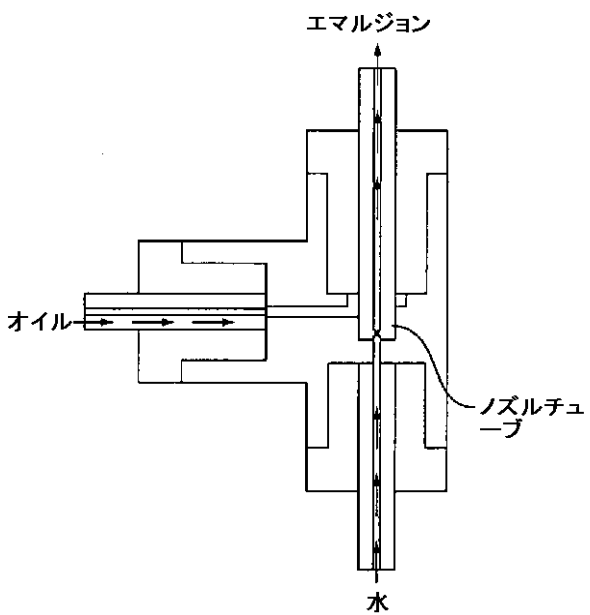


Fig. 2D

【図 3】

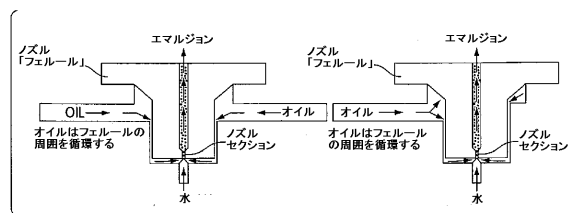


Fig. 3

【図 4】

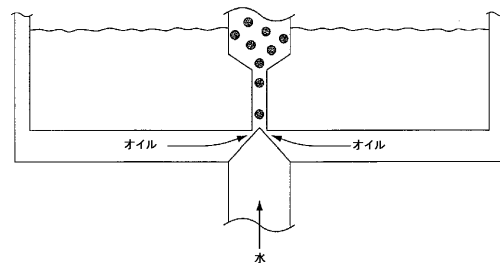


Fig. 4

【図 5】

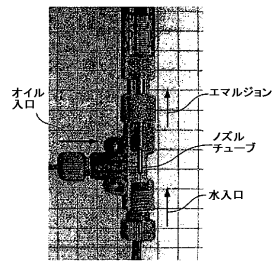


Fig. 5A

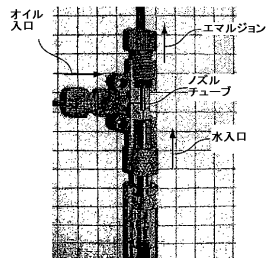


Fig. 5B

【図 6】

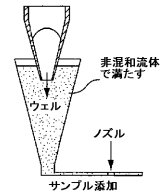


Fig. 6A

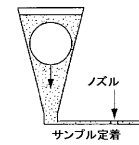


Fig. 6B

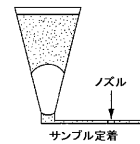


Fig. 6C

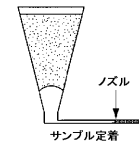


Fig. 6D

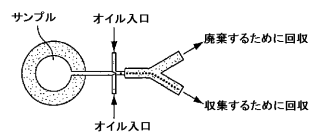


Fig. 6E

【図 7】

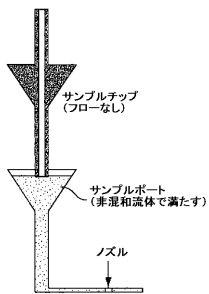


Fig. 7A

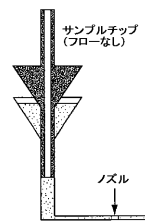


Fig. 7B

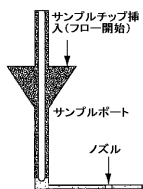


Fig. 7C

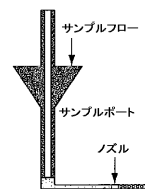


Fig. 7D

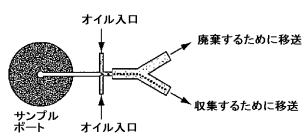


Fig. 7E

【図 8】

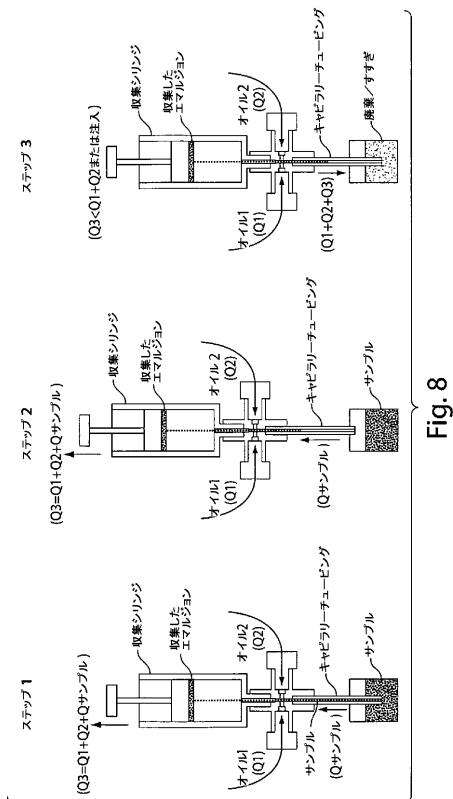


Fig. 8

【図 9】

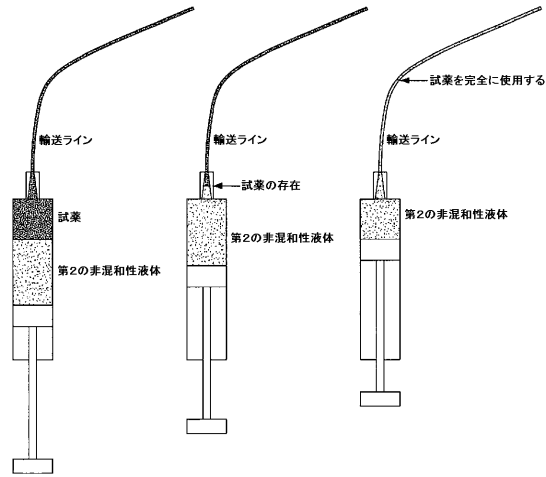
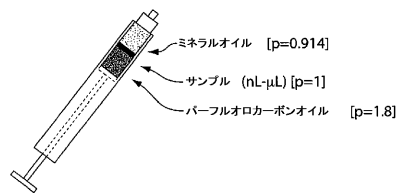


Fig. 9A

Fig. 9B

Fig. 9C

【図 10】



異なる密度のオイルを使用することにより、PLSデバイスに負荷するための小サンプルをサンディングすることができる

2-オイル系を使用するキャピラリーチューブは実行可能な負荷代替品である

Fig. 10

【図 12】

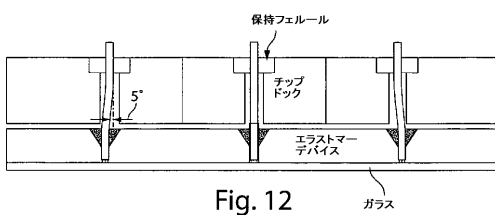


Fig. 12

【図 13】

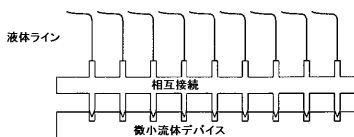


Fig. 13

【図 14】

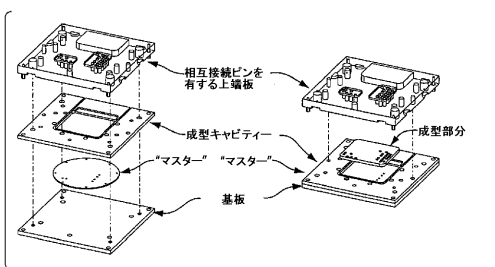


Fig. 14

【図 11】

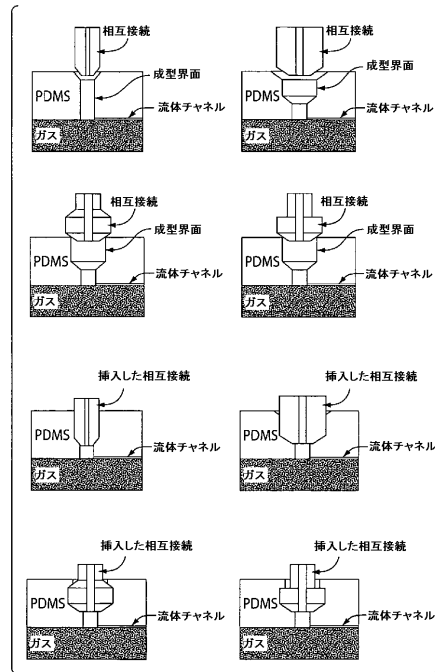


Fig. 11

【図 15】

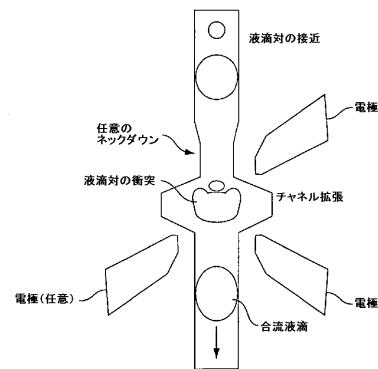


Fig. 15

【図 16】

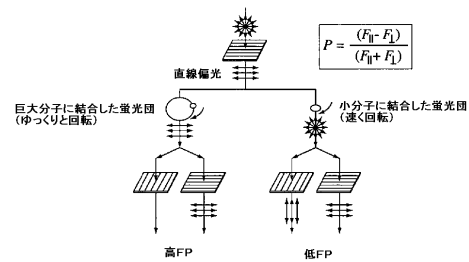
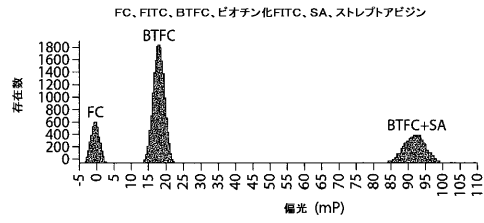
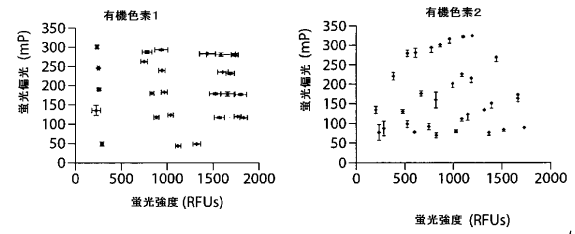
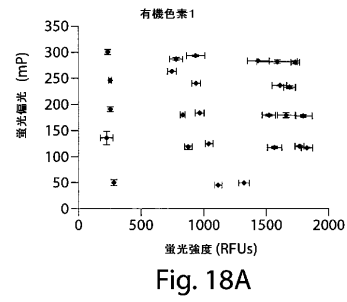


Fig. 16

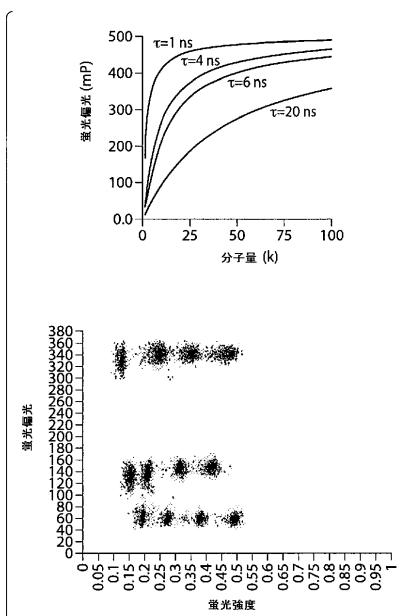
【図 17】



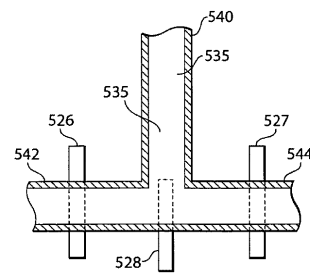
【図 18】



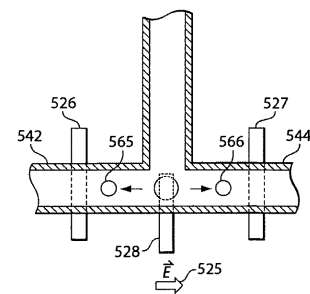
【図 19】



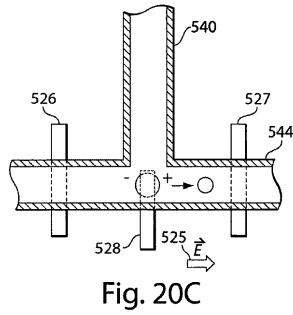
【図 20 A】



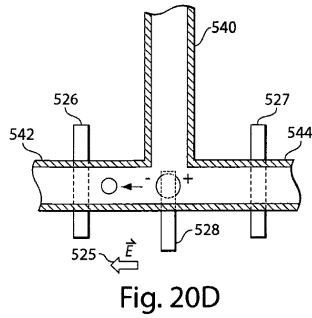
【図 20 B】



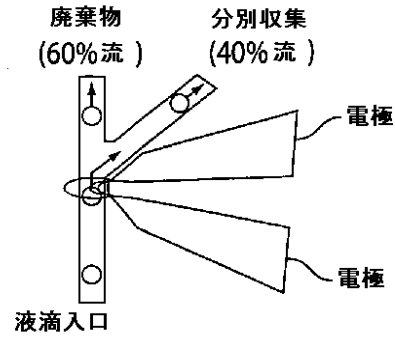
【図 20 C】



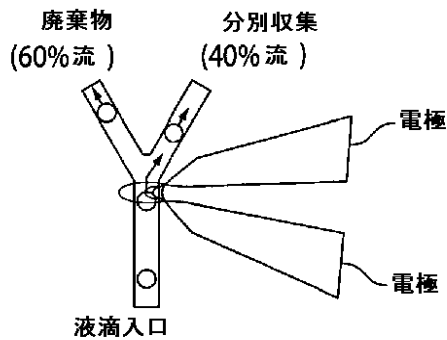
【図 20 D】



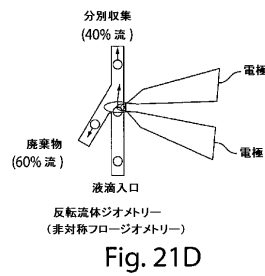
【図 21 A】



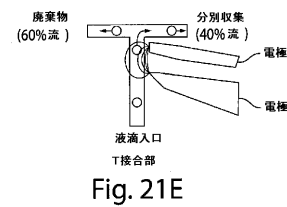
【図 21 B】



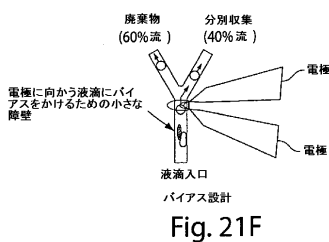
【図 21 D】



【図 21 E】



【図 21 F】



【図 2 2 A】

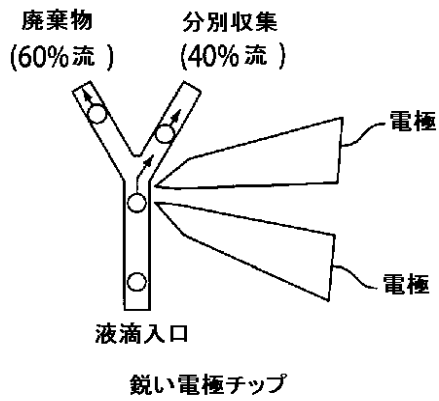


Fig. 22A

【図 2 2 B】

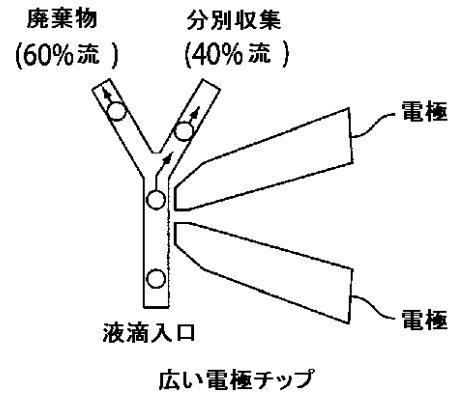


Fig. 22B

【図 2 2 C】

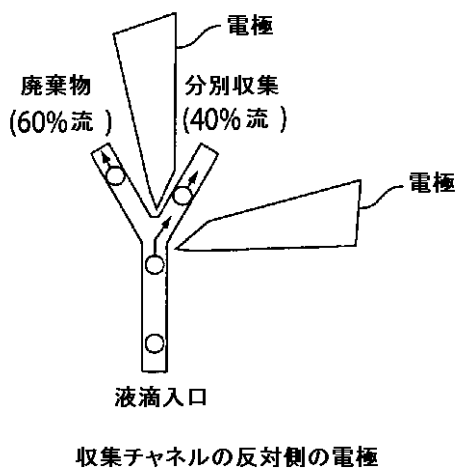


Fig. 22C

【図 2 2 D】

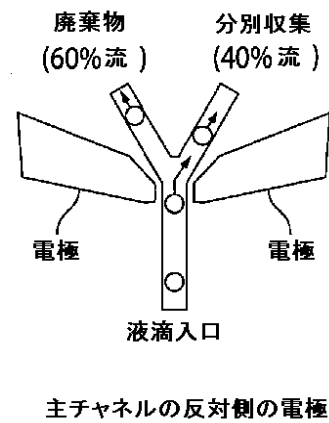
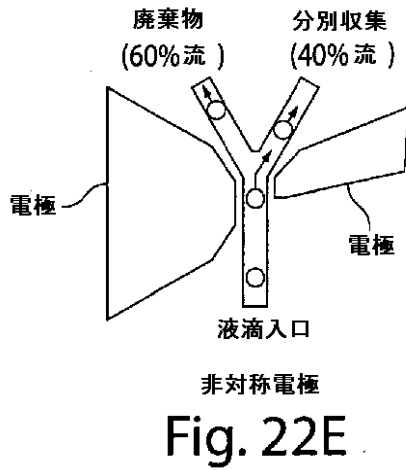
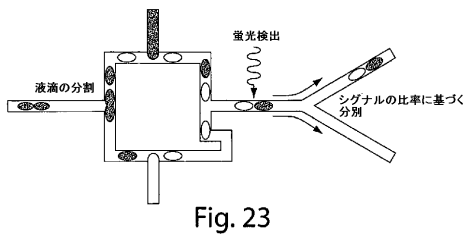


Fig. 22D

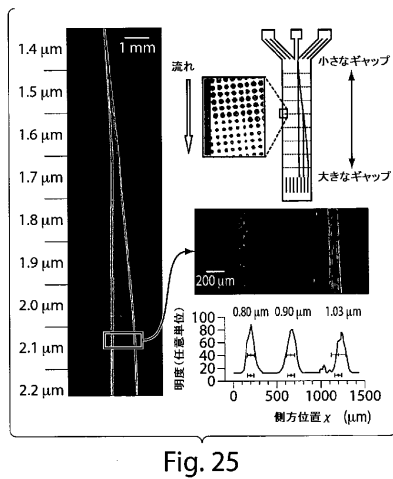
【図 2 2 E】



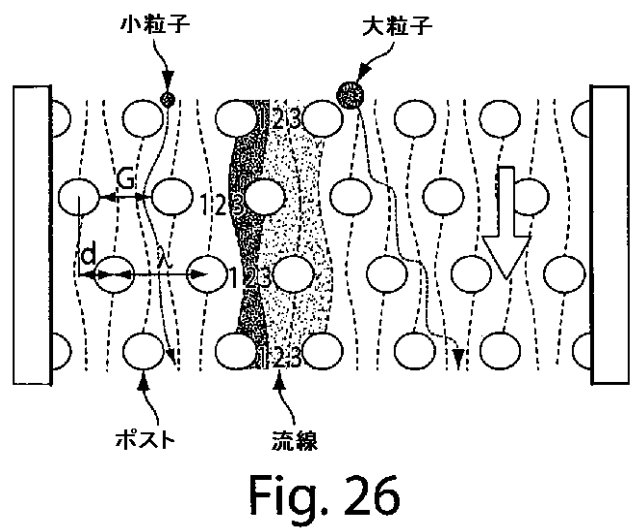
【図 2 3】



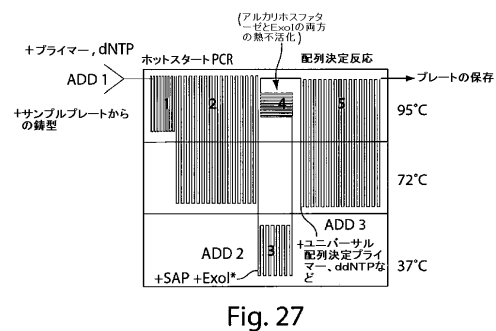
【図 2 5】



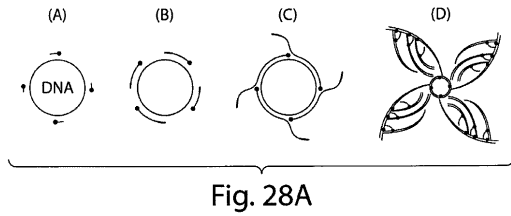
【図 2 6】



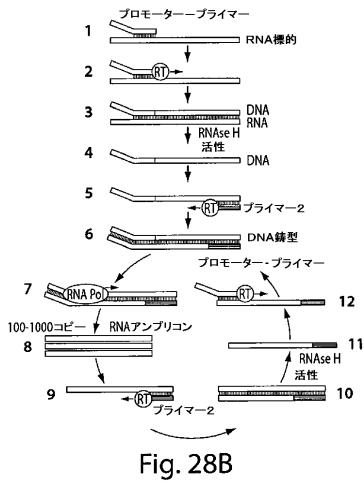
【図 2 7】



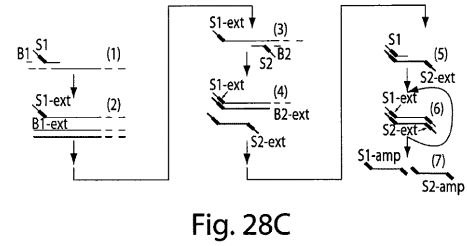
【 図 2 8 A 】



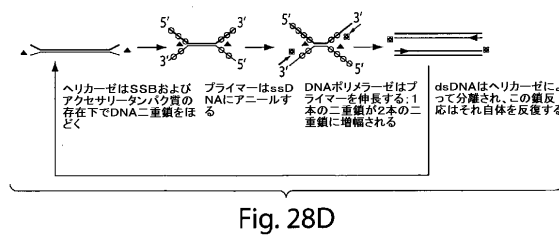
【 図 2 8 B 】



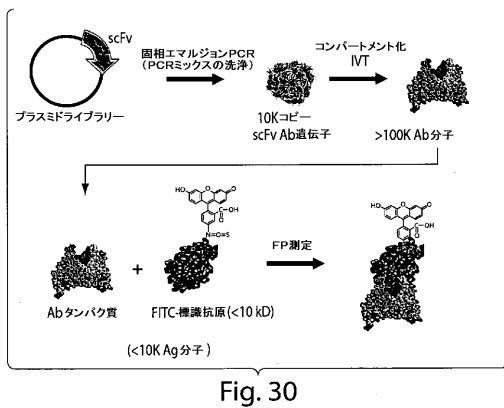
【图 2 8 C】



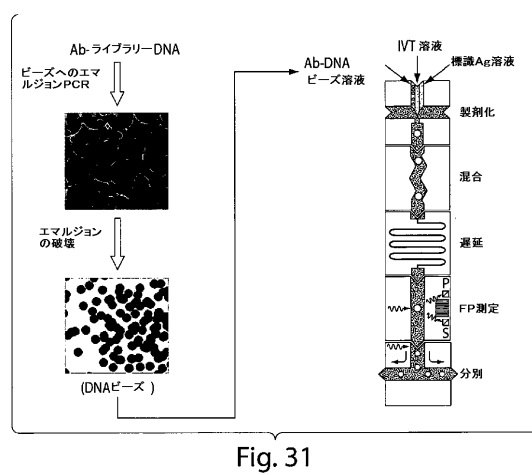
【图 28 D】



【図 30】



【图 3 1】



【図 3 2】

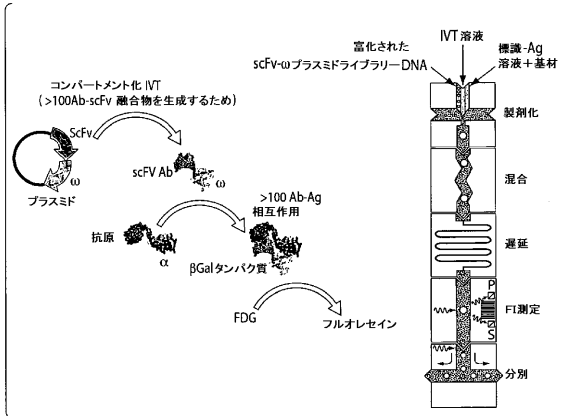


Fig. 32

【図 3 4】

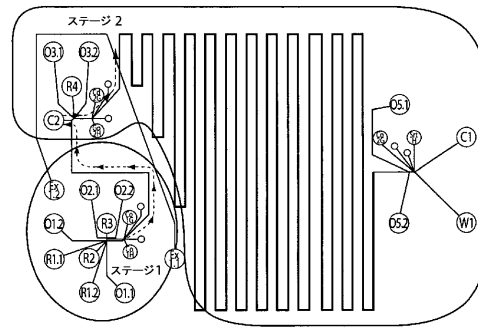


Fig. 34

【图 3 3】

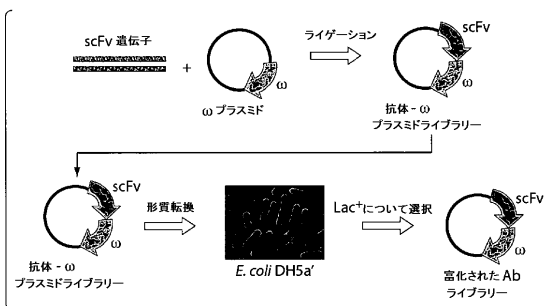


Fig. 33

【図 3 6】

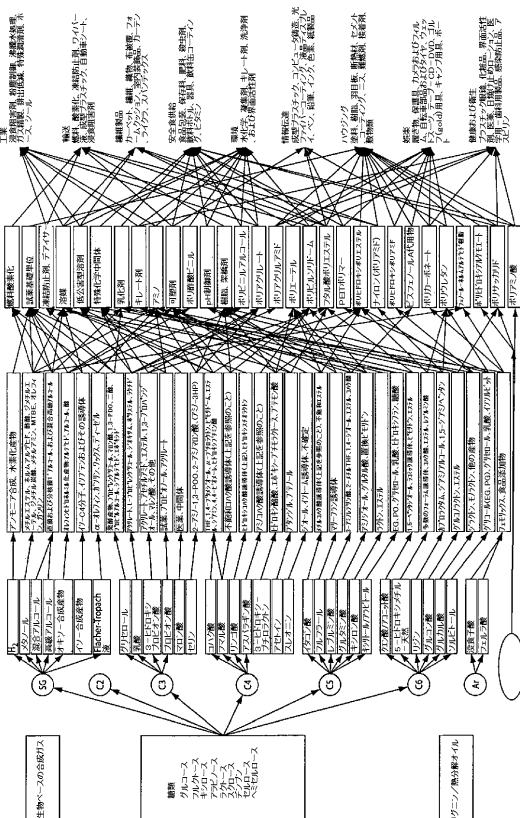


Fig. 36

【図 3 7】

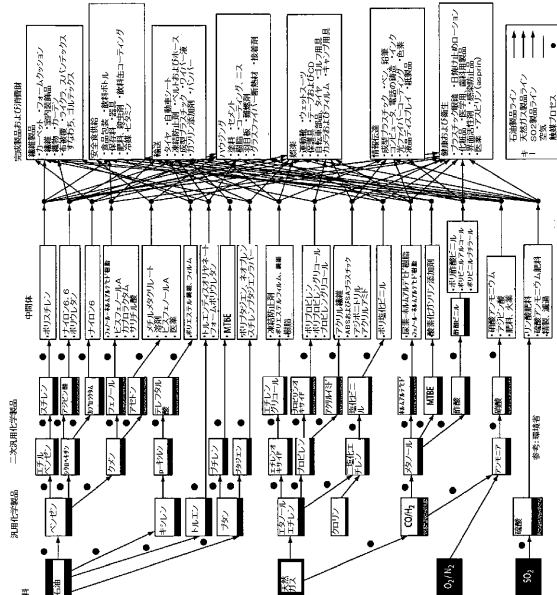


Fig. 37

【図 29】

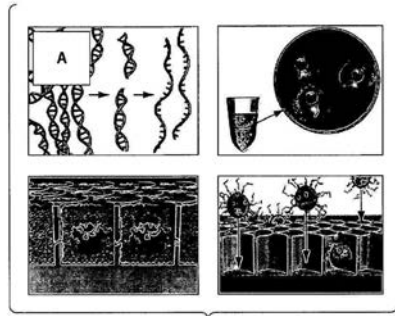


Fig. 29A

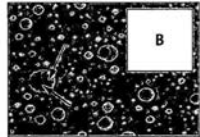


Fig. 29B

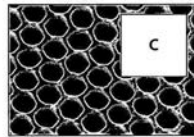


Fig. 29C

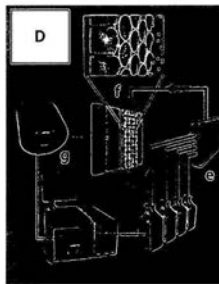


Fig. 29D

【図 35】

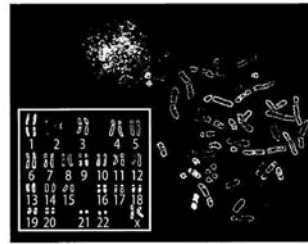


Fig. 35

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/815,097
(32)優先日 平成18年6月19日(2006.6.19)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/819,733
(32)優先日 平成18年7月7日(2006.7.7)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/819,734
(32)優先日 平成18年7月7日(2006.7.7)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/833,151
(32)優先日 平成18年7月24日(2006.7.24)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/834,987
(32)優先日 平成18年7月31日(2006.7.31)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/837,871
(32)優先日 平成18年8月14日(2006.8.14)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/837,695
(32)優先日 平成18年8月14日(2006.8.14)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/841,716
(32)優先日 平成18年9月1日(2006.9.1)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/843,374
(32)優先日 平成18年9月8日(2006.9.8)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/843,327
(32)優先日 平成18年9月8日(2006.9.8)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/856,440
(32)優先日 平成18年11月3日(2006.11.3)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/856,540
(32)優先日 平成18年11月3日(2006.11.3)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/858,279
(32)優先日 平成18年11月8日(2006.11.8)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/858,278
(32)優先日 平成18年11月8日(2006.11.8)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/860,665
(32)優先日 平成18年11月22日(2006.11.22)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/873,766
(32)優先日 平成18年12月8日(2006.12.8)
(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/874,640
(32)優先日 平成18年12月12日(2006.12.12)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/874,561
(32)優先日 平成18年12月12日(2006.12.12)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/876,209
(32)優先日 平成18年12月20日(2006.12.20)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/899,258
(32)優先日 平成19年2月2日(2007.2.2)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/903,153
(32)優先日 平成19年2月23日(2007.2.23)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/904,293
(32)優先日 平成19年2月28日(2007.2.28)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/920,337
(32)優先日 平成19年3月26日(2007.3.26)
(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ダレン アール. リンク

アメリカ合衆国 コネチカット 06437, ギルフォード, ストーニー ヒル ロード 11

(72)発明者 マイケル ウェイナー

アメリカ合衆国 コネチカット 06437, ギルフォード, レイトン トレイル 55

(72)発明者 デイビッド マレン

アメリカ合衆国 コネチカット 06422, ダラム, クラーク ロード 55

(72)発明者 ジョナサン エム. ロスバーグ

アメリカ合衆国 コネチカット 06437, ギルフォード, ホイットフィールド ストリート 530

Fターム(参考) 2G058 DA00

4B063 QA20 QQ03 QQ06 QQ07 QQ08 QQ09 QR01 QX04