



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103732325 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 16

(21) 申请号 201280021743. 6

(22) 申请日 2012. 03. 02

(30) 优先权数据

1100660 2011. 03. 04 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 11. 04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2012/051001 2012. 03. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/120424 FR 2012. 09. 13

(71) 申请人 国立科学研究中心

地址 法国巴黎

申请人 巴黎高等师范学院

皮埃尔-玛丽-居里大学(巴黎第六大学)

ESPCI 乔治·夏帕克基金

波尔多第二大学

(72) 发明人 M·达昂 M·莫雷尔 J-C·加拉

V·施图德 D·巴尔托洛

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王永建

(51) Int. Cl.

B01L 3/00(2006. 01)

C12M 3/06(2006. 01)

G01N 33/50(2006. 01)

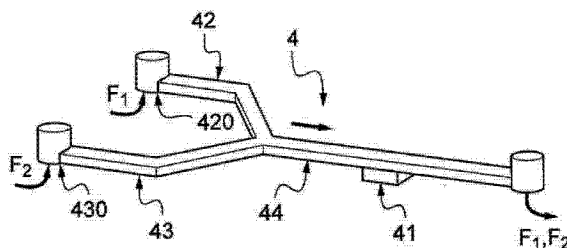
权利要求书2页 说明书14页 附图9页

(54) 发明名称

用于可靠地控制分子的浓度分布以刺激目标的微流体系统

(57) 摘要

本发明涉及一种用于控制能够刺激例如由活细胞的组件形成的目标的分子的浓度分布的微流体系统,该系统包括:微流体装置(1),其包括设有用于至少一种流体的至少一个进口孔(21)和至少一个出口孔(22)的至少一个微流体通道(4);用于为所述微流体通道(4)供应包含能刺激目标的分子的至少一种流体的至少一个装置;至少一个腔室(8)或者另一微流体通道,其包括用于接收所述目标的一底座(6);以及-将所述腔室(8)或另一微流体通道与所述微流体通道(4)分隔开的至少一个微孔薄膜(5),所述微孔薄膜(5)远离底座(6)设置,以使得当所述供应机构给所述微流体通道(4)供应按层流、与所述微孔薄膜(5)接触地流动的所述至少一种流体时,能刺激目标的分子在已经穿过微孔薄膜(5)通过腔室(8)或者另一微流体通道之后,然后扩散以便最后在该腔室(8)或者该另一微流体通道中形成一稳定的浓度分布。



1. 一种用于控制可刺激例如由一组活细胞形成的目标的分子的浓度分布的微流体系统,所述系统包括:

- 微流体装置(1、100),其包括至少一个微流体通道(4、40),所述微流体通道至少具有:

o 第一支管(42、42'),用于第一流体(F_1),设有进口孔(21、201、420),

o 第二支管(43、43'),用于包含可刺激所述目标的分子的第二流体(F_2),设有进口孔(430);

o 公共歧管(44、45'),用于所述流体(F_1 、 F_2),设有用于所述流体的出口孔(22、203、45);

- 至少一个机构,连接到所述微流体通道(4、40)的进口孔,以用于为所述通道供应所述流体(F_1 ; F_2);

- 至少一个腔室(8)或者另一微流体通道,具有用于接收所述目标的底座(6);以及

- 至少一个微孔薄膜(5),设置在所述公共歧管(44、45')的分界面(41、41')处,以将所述腔室(8)或者另一微流体通道与所述微流体通道(4、40)分隔开,

所述微孔薄膜(5)远离所述底座(6)设置,以使得当所述供应机构向所述微流体通道(4、40)供应所述流体(F_1 、 F_2)时,可刺激所述目标的分子在经过所述微孔薄膜(5、50),通过所述腔室(8)或者另一微流体通道之后,然后扩散以便控制该腔室(8)或者该另一微流体通道中的浓度分布。

2. 根据权利要求1所述的微流体系统,其特征在于,所述微流体通道(4、40)包括由选自于以下物质的材料制成的盖子(2、20):玻璃或硅、非弹性体的光致交联聚合物、金属、电导体或者半导体的合金、陶瓷、石英、蓝宝石、弹性体。

3. 根据前述权利要求中一项所述的系统,其特征在于,用于流体的所述至少一个进口孔(21、201、202)和所述至少一个出口孔(22、203)形成在所述盖子(2、20)中。

4. 根据前述权利要求中一项所述的微流体系统,其特征在于,所述微流体通道(4、40)包括由光致固化和/或热固化的树脂制成的至少一个壁(3、30、30')。

5. 根据前述权利要求中一项所述的微流体系统,其特征在于,所述微孔薄膜(5)在所述微流体通道(4、40)的侧壁(3、30、30')上横向地延伸以封闭所述通道的底部。

6. 根据前述权利要求中一项所述的微流体系统,其特征在于,所述微流体通道(40)设置在几等级上,每个等级具有用于至少一种流体的至少一个进口孔(201、202)。

7. 根据前述权利要求中一项所述的微流体系统,其特征在于,所述腔室(8)的底座(6)或者所述另一微流体通道的底座(6)由光学透明材料制成。

8. 根据前述权利要求中一项所述的微流体系统,其特征在于,所述腔室(8)或者所述另一微流体通道包括由光致固化和/或热固化的树脂制成的侧壁(7a、7b)。

9. 根据前述权利要求所述的微流体系统,其特征在于,所述微孔薄膜(5)在所述腔室(8)的侧壁(7a、7b)或者所述另一微流体通道的侧壁(7a、7b)之间横向地延伸以封闭所述腔室或者所述另一微流体通道的顶部。

10. 根据前述权利要求中一项所述的微流体通道,其特征在于,所述微孔薄膜(5)由选自于以下物质的材料制成:玻璃、聚碳酸酯、聚酯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、石英、硅、二氧化硅或者碳化硅。

11. 根据前述权利要求中一项所述的微流体系统,其特征在于,所述微孔薄膜(5)包括密度在 10^3 到 10^{10} 孔/cm² 之间的小孔。

12. 根据前述权利要求中一项所述的微流体系统,其特征在于,所述小孔具有在 0.05 μm 到 12 μm 之间的水力直径,优选在 0.05 μm 到 3 μm 之间的水力直径。

13. 根据前述权利要求中一项所述的微流体系统,其特征在于,提供光学可视化机构(18)。

14. 根据前述权利要求所述的微流体系统,其特征在于,所述光学可视化机构(18)使用光敏化局部显微术技术或者受激发射减损显微术技术。

用于可靠地控制分子的浓度分布以刺激目标的微流体系统

技术领域

[0001] 本发明涉及微流体领域。

背景技术

[0002] 微流体应用系统具有微米尺寸,其尺寸通常在几十微米到几百微米之间。

[0003] 所述系统可用于许多领域,例如,细胞诊断试验、医学产品研制、基本的生物科学或者美容术。

[0004] 在所述领域中,存在对用于定量测定活细胞对某些分子的反应(响应:response)且特别是对空间上和临时受控的浓度分布的反应的微流体系统的增加的需求。

[0005] 例如,可能存在测量癌细胞对用于化学疗法的分子的反应的问题。该反应的精确测定要求对产生该反应的分子施加控制。该控制可涉及与癌细胞相互作用的分子的数量、癌细胞暴露于其中的分子的浓度分布、所述分子的数量和/或用在癌细胞上的所述分子的浓度分布随时间的变化等。

[0006] 在美容术领域,可以使用微流体系统来测试某些分子对活细胞和/或细胞组织的毒性。对给予细胞的可以是有毒的分子数量的控制和给予所述分子的确定方式在确定毒性阈值时是必需的。

[0007] 在文件 US7374906 中提出了一种广泛用于刺激活细胞的微流体系统的实例。该微流体系统特别是允许活细胞经受分子的浓度梯度,该浓度梯度的分布是直线型的并且在时间上是稳定的。

[0008] 该类微流体系统的主要缺点是使活细胞经受产生剪切力的流体,使其紊乱。当旨在研究神经细胞的生长锥的趋化性反应时,该剪切效应是特别麻烦的。实际上,流体产生的剪切应力更改了最佳情况中的目标细胞的反应或者引起了细胞的死亡或者分离。

[0009] 利用该文件中所公开的系统按该方式来研究活细胞的生理特性是受到了干扰的。

[0010] 因此,已经提出了在不受流体干扰的情况下使活细胞经受分子的浓度梯度的解决方案。

[0011] 例如,在“Biomed Microdevices”(生物群落微装置)(2009)的第11卷第65-73页、Taesung Kim, Mikhail Pinelis 和 Michel M Maharbiz 的论文“Generating steep, shear-free gradients of small molecules for cell culture”中提出了一种应用可刺激活细胞的分子的浓度梯度的微流体系统。

[0012] 该微流体系统包括一微流体装置 10 和用于向所述装置供给流体的机构(未显示)。

[0013] 图 1 中按分解透视图的形式示出了该文件中公开的微流体系统 10。

[0014] 其包括一聚二甲硅氧烷(PDMS)底座 11,该底座 11 包括大致正方形形状的一中心区域 12,该中心区域 12 连接到按相对于中心部分 12 成十字形设置的通道 13a、13b、13c 和 13d 上。其还包括覆盖所述 PDMS 底座 11 的中心区域 12 的一聚脂微孔薄膜 14。最后,其包括覆盖聚脂薄膜 14、PDMS 底座 11 和通道 13a、13b、13c、13d 的一 PDMS 盖子 15(图 1 中按截去尖端的形式示出了盖子 15)。

[0015] 因此,微流体系统 10 被聚脂薄膜 14 分隔成两部分。

[0016] 第一部分形成了其中可以使流动流体循环的通道,所述通道在顶端处被薄膜 14 封闭住,薄膜的下侧从而形成了使该通道经受流体的壁。

[0017] 与通道相反的第二部分是由薄膜 14 的上侧形成的,并且被培养的活细胞(LC)位于其上面。

[0018] 未示出供应流体的机构。然而,应当注意到,第一流体通过进口 E1 被引入到微流体系统 10 的底座 11 中,并且第二流体通过与进口 E1 相反的进口 E2 被引入到微流体系统 10 的该底座 11 中。所述流体中的至少一个包含用于通过聚脂薄膜 14 来刺激活细胞的分子。

[0019] 因此,使经进口 E1、E2 进入在微流体系统 10 的底座 11 中循环的流体面对面地接触,在所述两个流体的分界面处产生了一混合区域,并且然后通过出口 S 离开该底座 11。

[0020] 为了在时间以及空间上控制活细胞的培养,可以利用微流体系统 10 来调节流体的流量以便在聚脂薄膜 14 上形成预定的分子浓度分布。

[0021] 更确切地说,在选择合适的流体之后,调节两个流体中每个的流量以允许在两个流体之间的分界面处形成非常特殊的混合区域,即,形成用来刺激活细胞的非常特殊的分子浓度分布。其中按照限定的分布来产生浓度梯度的该混合区域大致沿图 1 中所示的穿过底座 11 的两个出口 S 的轴线 A 延伸。

[0022] 然而,该微流体系统具有几个缺点。

[0023] 第一,必须非常精确地控制来自进口 E1、E2 的流体的相应流量,以便在聚脂薄膜 14 的下侧产生稳定的分子浓度分布。

[0024] 在微流体系统 10 的上游处,即在流体供应机构自身执行流体流量的这种控制,在两个流体间的分界面处,对于底座 11 中的其部分产生梯度。

[0025] 因此,所述两个流体中的一个或另一个的流量的扰动改变了两个流体之间的分界面,并且因此还改变了薄膜 14 的下侧处的分子浓度分布。因此,难以达到浓度分布的稳定性。

[0026] 此外,因为活细胞设置在薄膜 14 的上侧,所以应用在活细胞上的浓度分布大致相当于应用在薄膜下侧上的分布。当薄膜 14 具有 $10\ \mu\text{m}$ 的小厚度时,这是更真实的。

[0027] 第二,在活细胞上获得的浓度分布的斜率取决于微流体通道中的流体速度和两个流体之间的分界面距离进口 E1、E2 的位置。因此很难控制分布的斜率。

[0028] 第三,微流体系统 10 应用一聚脂薄膜 14,其下侧粘到 PDMS 底座 11 的正方形的边缘,其上侧粘到由 PDMS 制成的盖子 15。选择所述材料,因为其特别是允许通过该文件中所述工艺将薄膜 14、底座 11 和盖子 15 粘到一起。通道 13a、13b、13c、13d 和薄膜 14 上存在的盖子 15 允许增强薄膜 14 与底座 11 之间的机械阻力和密闭性,实际上仅通过在底座 11 的边缘上进行薄膜 14 与底座 11 之间的粘附。此外,利用 PDMS 预聚物的沉积来执行薄膜 14 的粘附,其允许通过在机械压力下加热来进行装置的不可逆制造。一旦已经将薄膜 14 和盖子 15 粘附到一起,则可以通过盖子 15 侧面上留下的开口来将细胞插设到薄膜 14 上。

[0029] 利用所述材料的选择和该配置,从而可以获得合适的机械抗性和密闭度。

[0030] 为了确保通道与薄膜 14 之间的密闭性,必需通过盖子来封闭微流体系统。然后,需要在微流体系统 10 内部进行细胞培养。对于非常复杂的细胞培养,例如神经细胞的原代

培养、组织的移植或切片,是非常不现实的。

[0031] 此外,带有 PDMS 盖子 15,不能看到或者很难看到活细胞对刺激的反应。更关键的是 PDMS 盖子必须具有某一厚度以允许其操作,因为该材料具有较低的弹性模量。较大的厚度甚至进一步降低了该材料的光学性质。因此,很难通过合适的光学装置来观察到设置在薄膜上的活细胞的反应。

发明内容

[0032] 本发明的一个目标是克服所述缺点中的至少一个。

[0033] 为了实现所述目标中的至少一个,本发明提出了一种用于控制可刺激例如由一组活细胞形成的目标的分子的浓度分布的微流体系统,所述系统包括:

[0034] - 一微流体装置,其包括设有用于至少一种流体的至少一个进口孔和至少一个出口孔的至少一个微流体通道;

[0035] - 至少一个装置,其用于给微流体通道供应包括可刺激目标的分子的至少一种流体;

[0036] - 具有用来接收目标的底座的至少一个腔室或者另一个微流体通道;以及

[0037] - 将腔室或者另一微流体通道与所述微流体通道分隔开的至少一个微孔薄膜,

[0038] 所述微孔薄膜远离底座设置,以使得当所述供应机构向微流体通道供应所述至少一种流体时,其按层流状态与微孔薄膜接触地流动,然后,可刺激目标的分子在经过微孔薄膜、通过腔室或者所述另一微流体通道之后扩散,并且最后在该腔室或者该另一微流体通道中形成稳定的浓度分布。

[0039] 系统可预计有其他技术特征,单独或者组合:

[0040] - 微流体通道包括由选自于以下物质的材料制成的盖子:玻璃或者硅、非弹性体的光致交联(photocrosslinked)聚合物、金属、电导体或者半导体的合金、陶瓷、石英、蓝宝石、弹性体;

[0041] - 用于流体的所述至少一个进口孔和所述至少一个出口孔形成在盖子中;

[0042] - 微流体通道包括由光致固化和/或热固化的树脂制成的至少一个壁;

[0043] - 微孔薄膜在微流体通道的侧壁上横向地延伸以在底面处封闭所述通道;

[0044] - 微流体通道设置在几个等级(高度)处,每个等级具有用于至少一种流体的至少一个进口孔;

[0045] - 腔室或所述另一微流体通道的底座是由光学透明材料制成的;

[0046] - 腔室或者所述另一微流体通道包括由光致固化和/或热固化的树脂制成的侧壁;

[0047] - 微孔薄膜在腔室或者所述另一微流体通道的侧壁之间横向地延伸以在顶部处封闭所述腔室或者所述另一微流体通道;

[0048] - 微孔薄膜是由选自于以下物质的材料制成的:玻璃、聚碳酸酯、聚脂、聚对苯二甲酸乙二醇酯、石英、硅、二氧化硅或者碳化硅;

[0049] - 微孔薄膜包括密度在 10^3 到 10^{10} 孔/cm² 之间的小孔;

[0050] - 小孔具有在 0.05 μm 到 12 μm 之间的水力直径,优选在 0.05 μm 到 3 μm 之间的水力直径;

- [0051] - 其包括一光学可视化机构；
- [0052] - 所述光学装置应用光敏局部显微技术或者受激发射减损显微技术。

附图说明

- [0053] 本发明的其他特征、目的和优点出现在以下参见附图的详细说明中；
- [0054] - 图 2 是根据本发明的微流体装置的简图,其处于局部剖视图；
- [0055] - 图 3 (a) 到 3 (d) 酌情显示了图 2 中所示的微流体装置的制造工艺的步骤或者在该工艺的某些步骤的结尾处获得的中间结构；
- [0056] - 图 4 (a) 到 4 (c) 显示了在由装置的底座和侧壁形成的组件的制造期间获得的中间结构,所述组件用来形成图 2 的微流体装置的一部分；
- [0057] - 图 5 (a) 显示了根据本发明的微流体装置的一微流体通道,图 5 (b) 显示了在根据本发明的该第一通道中流动的流体,并且图 5 (c) 显示了在根据本发明的装置的腔室中所获得的浓度分布；
- [0058] - 图 6 (a) 到 6 (c) 全部以剖视图显示了根据本发明的微流体装置,通过其可以连续地观察到用于刺激在装置的腔室中的活细胞的分子的浓度分布随时间稳定性的不同阶段；
- [0059] - 图 7 (a) 显示了根据本发明的微流体装置的另一微流体通道,图 7 (b) 显示了在该第一通道中流动的流体,并且图 7 (c) 显示了在根据本发明的装置的腔室中所获得的浓度分布；
- [0060] - 图 8 显示了对于不同方案通过扩散来建立用于刺激活细胞的分子的恒定方式随时间的变化；
- [0061] - 图 9 是根据本发明的微流体装置的一实施例的剖视图的简图,能够产生比图 2 中示意性地示出的微流体装置更复杂的浓度分布；
- [0062] - 图 10 显示了类似于以上在根据图 9 的微流体装置的腔室中所获得的空间上定期的浓度分布；
- [0063] - 图 11 (a) 到 11 (c) 显示了以图 9 中所示的微流体装置的制造工艺获得几个中间结构。

具体实施方式

- [0064] 本发明涉及一种用于控制分子的浓度分布的微流体系统以能够刺激例如由一组活细胞形成的目标,所述系统包括微流体装置和用于给该装置供应包括能刺激该目标的分子的至少一种流体的至少一个机构。
- [0065] 参见图 2 描述了微流体装置,并且参见图 3 (a) 到 3 (d) 和 4 (a) 到 4 (c) 描述了该装置的制造工艺。然后将参见图 5(a) 和 6(a) 来描述作为非限制性实例的、可用在该装置内的微流体通道的特殊形式。
- [0066] 图 2 以局部剖视图、透视图的形式示出了根据本发明的微流体装置 1。
- [0067] 该微流体装置 1 包括有利地为刚性的、设有两个孔口 21、22 的一盖子 2 和有利地由光致固化和 / 或热固化的树脂制成的侧壁 3。装置 1 的侧壁 3 被制造成光致固化和 / 或热固化的树脂的单层。

[0068] 微流体装置 1 还在其下半部分中包括被横过侧壁 3 的底座延伸的微孔薄膜 5 覆盖的一开口 47。侧壁 3、盖子 2 和微孔薄膜 5 允许限定出一微流体通道 4，由所述孔口 21、22 构成了微流体通道 4 的进口和出口。

[0069] 微孔薄膜 5 防止在微通道 4 中流动的流体流到该薄膜的另一侧，然而，该薄膜的另一侧允许由微流体通道 4 中的流体携带的可刺激目标的分子扩散。

[0070] 该微流体装置 1 还包括有利地为刚性且透明的一底座 6 和有利地由光致固化和/或热固化的树脂制成的侧壁 7a、7b。所述侧壁 7a、7b、底座 6 和微孔薄膜允许形成用于目标细胞的培养腔室的一腔室 8。为了形成所述腔室 8，设置四个侧壁，但实际上所述侧壁可以被比作单个轮廓，因为制造工艺有利地所述侧壁生产为一件。

[0071] 腔室 8 的底部是由底座 6 的上侧 61 形成，其用来接收例如由活细胞形成的目标。因此，活细胞未设置在腔室 8 的底座 6 上的微孔薄膜 5 上，而是远离微孔薄膜 5。因此，其可以被在与微流体装置 4 分隔开的标准条件下培养。

[0072] 因此，微孔薄膜 5 将装置分隔成两个单独的微流体通道 4、8。微流体通道 4 允许包含可刺激目标的分子的流体循环(环流)。如将在稍后的说明中更详细地阐明的，通过经由微孔薄膜 5 扩散到腔室 8 中，并且然后通过腔室 8 (培养腔室) 扩散来执行，在腔室 8 的底部存在例如被刺激的活细胞(LC)。

[0073] 有利地，底座 6 是由例如玻璃的光学透明材料制成。这是有好处的，因为可在装置外设置光学可视机构来例如观察对位于腔室 8 底部的活细胞的刺激的反应。

[0074] 盖子 2 可由选自于以下的材料制成的：玻璃或者硅、非弹性体的光致交联聚合物、金属、电导体或者半导体的合金、陶瓷、石英、蓝宝石、弹性体。

[0075] 选择微孔薄膜 5 的小孔的尺寸以防止流体在第一微流体通道 4 与腔室 8 之间的任何通过。如果小孔是圆柱形的，则该尺寸可与小孔直径相比。一般地说，小孔的尺寸可与后者的水力直径相比。

[0076] 实际上，微孔薄膜 5 不能完全不受流体通道的影响。因此，可以认为，如果流过微孔薄膜 5 的流体的速度低于极限值，则位于腔室 8 底部的细胞不会经受任何流体。

[0077] 例如，可以认为，该限制速度为 $1 \mu\text{m/s}$ 的量级。在该情况中，甚至对于具有例如 $20 \mu\text{m}$ 的较小高度 h' 的腔室 8，施加在细胞上的剪切应力是可以忽略的。

[0078] 此外，微流体通道 4 中的速度通常在 $100 \mu\text{m/s}$ 到 $1000 \mu\text{m/s}$ 之间。

[0079] 因此，为了达到 $1 \mu\text{m/s}$ 的极限值，取决于通道 4 中的流体速度，微孔薄膜 5 的流体阻力 $R_{h, \text{薄膜}}$ 必须大于微流体通道 4 的流体阻力 $R_{h, \text{通道}}$ 的 100 到 1000 倍。

[0080] 特别是，如果微流体通道 4 中流体的流速为 $1000 \mu\text{m/s}$ ，则其需要注意到以下不等式：

$$[0081] \quad 1000 * R_{h, \text{通道}} < R_{h, \text{薄膜}} \quad (R1)$$

[0082] 以确保通过薄膜 5 的流体的速度充分低于假定的 $1 \mu\text{m/s}$ 的极限值。

[0083] 此外，如果假定有高 h 、宽 w 且长 L 的一矩形微流体通道 4 以及厚 e 并且具有半径 $r_{\text{小孔}}$ 、表面小孔密度 ρ 的圆柱形的且相同的小孔的微孔薄膜 5，则按以下形式来编写关系式 (R1)：

$$[0084] \quad 1000 * \mu \cdot L / (w \cdot h^3) < \mu \cdot e / (r_{\text{小孔}}^4 \cdot \rho \cdot Lw) \quad (R2)$$

[0085] 并且：

[0086] $\theta = r_{\text{小孔}}^4 \cdot \rho / e < 10^{-3} * h^3 / L^2$ (R3)

[0087] 对于高度 $h=100 \mu\text{m}$ 、宽度 $w=1000 \mu\text{m}$ 且长度 $L=1000 \mu\text{m}$ 的微流体通道 4，则条件 θ 必须小于 10^{-9} 以满足关系式 (R3)。此外，如果考虑到有半径为 $1 \mu\text{m}$ 的圆柱形小孔和 $10 \mu\text{m}$ 厚的薄膜，则表面小孔密度 ρ 必须小于 10^6 孔 / cm^2 。

[0088] 当然，一方面，可以将关系式 (R3) 归纳为通过微孔薄膜 5 的流体的限制速度的假定值的函数，另一方面，归纳为该流体在微流体通道 4 中的流速的函数。

[0089] 微孔薄膜 5 可具有水力直径在 $0.05 \mu\text{m}$ 到 $12 \mu\text{m}$ 之间的小孔。特别是，如果小孔是圆柱形的，则小孔的水力直径相当于其直径。

[0090] 然而，有利地，该水力直径将在 $0.05 \mu\text{m}$ 到 $3 \mu\text{m}$ 之间。实际上，应当注意到，对于可能遇到大部分使用条件，使用具有其水力直径小于 $3 \mu\text{m}$ 的小孔的薄膜阻止了腔室 8 中的所有流体通道。

[0091] 目前，薄膜制造厂提供其小孔的水力直径通常大于 $0.2 \mu\text{m}$ 的薄膜。在本发明的上下文中，因此小孔可有利地具有在 $0.2 \mu\text{m}$ 到 $3 \mu\text{m}$ 之间的水力直径。然而，理论上，小孔的水力直径没有下限，这说明了为什么考虑应用其水力直径达到 $0.05 \mu\text{m}$ 的小孔。

[0092] 如果使用更大的小孔，则微流体装置更难以用来（例如，选择微流体通道 4 中的流量）确保流体不通过微孔薄膜 5。

[0093] 至于小孔密度，可以在 10^3 到 10^{10} 孔 / cm^2 之间。小孔高度可以在 50nm 到 $100 \mu\text{m}$ 之间。

[0094] 此外，微孔薄膜 5 可以由例如玻璃、石英、硅、二氧化硅或碳化硅或者与能用于微流体装置的其余部分的聚合物具有相同性能的聚合物的各种材料制成。因此，可以使用聚碳酸酯、聚脂或者聚对苯二甲酸乙二醇酯。

[0095] 根据第一实例，可以设想一聚碳酸酯微孔薄膜 5，其中小孔的水力直径在 $0.2 \mu\text{m}$ 到 $1 \mu\text{m}$ 之间，例如为 Whatman 公司的 Cyclopore 类型 (Whatman Cyclopore™)。根据第二实例，可以设想一聚脂微孔薄膜 5，其中小孔的水力直径在 $0.4 \mu\text{m}$ 到 $3 \mu\text{m}$ 之间，例如为 Corning 公司的 Transwell 类型 (Corning® Transwell®)。根据第三实例，可以设想一聚对苯二甲酸乙二醇酯微孔薄膜 5，其中小孔的水力直径在 $0.4 \mu\text{m}$ 到 $8 \mu\text{m}$ 之间，例如为 Becton Dickinson 公司的 “Track-Etched 类型”。

[0096] 所述微孔薄膜具有适合以下参见图 3(a) 到 3(d) 所描述的微流体装置 1 的制造工艺的优点。其还具有生物相容和具体地说可渗透任何分子的可功能化 (functionalizable) 的优点。“可功能化”是指可以在化学性质上改进微孔薄膜 5 以实现一特殊功能 (某些生物种的保持力、化学反应等)。

[0097] 通常，装置可具有以下尺寸。微流体通道的高度 h 可以在 $1 \mu\text{m}$ 到 $1000 \mu\text{m}$ 之间，有利地在 $10 \mu\text{m}$ 到 $200 \mu\text{m}$ 之间。其宽度 (未显示) 可以在 $10 \mu\text{m}$ 到 2mm 之间。腔室 8 的高度 h' 可以在 $10 \mu\text{m}$ 到 $1000 \mu\text{m}$ 之间，有利地在 $50 \mu\text{m}$ 到 $200 \mu\text{m}$ 之间。此外，进口 E 和出口 S 之间的距离为几厘米。

[0098] 根据本发明的微流体装置 1 的制造工艺的实例为至少包括以下步骤的一工艺：

[0099] (a) 使用由弹性体材料制成的一印模 1' 来压印放置在设有微孔薄膜 5 的衬底 2' 上的可光致固化和 / 或热固化的液体；

[0100] (b) 光照和 / 或加热液体 L 以形成在其底座处被微孔薄膜 5 封闭的第一侧壁 3；

[0101] (c) 在与衬底 2' 相对的一侧,将设有至少两个孔口 21、22 的盖子 3 粘附到第一侧壁 3 以形成流体可以在其中循环的一微流体通道 4;

[0102] (d) 在已经移除了衬底 2' 之后,将至少包括由光致固化和 / 或热固化的树脂制成的至少两个第二侧壁 7a、7b 和底座 6 的一组件粘附到第一侧壁 3 的可通过移除衬底 2' 来接近的那部分上,以形成腔室 8。

[0103] 该工艺是基于文件 W02008/009803 中所公开的工艺。

[0104] 图 3 (a) 中示出了步骤(a) 期间执行的操作。

[0105] 用于步骤(a)的印模 1' 可以由例如 PDMS 的弹性体材料制成。其具有用作与所希望生产的微流体装置 1 互补的模具的轮廓。因此,印模 1' 具有与所希望获得的微流体装置 1 的通道 4 相对应的凸起 1' a。其还具有包围凸起 1' a 的中空区域 1' b,其是用来形成微流体装置 1 的所述第一侧壁 3 的区域。衬底 2' 也可以由 PDMS 制成并且具有平坦的轮廓。

[0106] 微孔薄膜 5 预先设置在衬底 2' 上,将印模 1' 压到衬底 2' 上。因此,印模 1' 通过凸起 1' a 将薄膜 5 挤压到衬底 2' 上。

[0107] 其次,呈液态形式 LR 的光致交联和 / 或光致聚合的树脂按合适数量注入到位于印模 1' 与衬底 2' 之间的空间中,特别是注入到印模 1' 的中空区域 1' b 中。该注入不会改变微孔薄膜 5 的位置,因为微孔薄膜 5 被楔入在印模 1' 与衬底 2' 之间。

[0108] 光致交联和 / 或光致聚合的树脂是基于单体和 / 或预聚物的溶液或者悬液。在本发明的工艺中通常使用光致交联和 / 或光致聚合的树脂用作胶水或者表面涂料。

[0109] 有利地,选择通常用于光学领域的粘合剂、胶水或者表面涂料。一旦树脂已经被照射和光致交联和 / 或光致聚合,则其变成固体。优选是,如此形成的固体是透明的,并且没有气泡或者任何其他不规则性。

[0110] 所述树脂通常基于环氧、环氧硅烷、丙烯酸盐、异丁烯酸、丙烯酸或甲基丙烯酸类的单体 / 共聚单体 / 预聚物,但是还可以提及硫醇烯(thiolene)、聚氨基甲酸酯和氨基甲酸酯-丙烯酸酯树脂。所述树脂可以例如由聚丙烯酰胺凝胶的光致交联的水凝胶来代替,并且选择其在室温下为液体的。所述树脂还可以由聚二甲硅氧烷(PDMS)来代替。

[0111] 在可用于本发明的光致交联树脂之中,可能提及了 Norland Optics 公司按商标“**NOA®** Norland Optical Adhesives”销售的产品,例如,NOA81 和 NOA60,由 Dymax 公司以“Dymax Adhesive 和光固化系统”类别销售的产品,由 Bohle 公司以“UV 粘合剂”类别销售的产品,由 Sartomer 公司在商业标准 SR492 和 SR499 下销售的产品。

[0112] 通过利用例如以紫外线(UV)、可见光照射或者红外线(IR)辐射的任何合适方法的光敏化来进行所述树脂的聚合和 / 或交联。

[0113] 优选是,选择一种树脂,其一旦被聚合和 / 或交联,则为刚性的和不易弯的,这是因为当流体在压力下在微流体装置 1 中循环时弹性树脂趋向于变形。然而,对于某些应用,例如活细胞的弹性研究,并不排除使用光致交联的弹性树脂。

[0114] 在以液态树脂 LR 注入位于印模 1' 与衬底 2' 之间的容积中之后,在印模 1' 上施加一压力以将任何可能过剩的树脂排出。在图 2 中,弹性的印模 1' 的凸出部且特别是凸起 1' a 与衬底 2' 接触。液态树脂呈现出印模 1' 中中空区域的形状。

[0115] 在图 3 (b) 中示出了步骤(b) 的末尾获得的所述结构。

[0116] 在步骤(b)期间,通过印模 1', 沿垂直于装置的底座的轴线进行树脂的照射。必须

正确地按比例照射,以便如果需要,在所述第一树脂的侧壁 3 的表面上留下能起作用的聚合和 / 或交联点。然后,从该装置去除印模 1'。图 3 (b) 显示了由光致聚合和 / 或光致交联的树脂制成的第一侧壁 3,其具有与印模 1' 的中空区域互补的轮廓。

[0117] 很清楚,有可设想印模 1' 的轮廓是如此的,以便光致聚合和 / 或光致交联的树脂限定出其他图案。这对于根据本发明的微流体装置 100 的情况是值得注意的,将参见图 9 进一步描述。

[0118] 利用弹性印模 1' 压印到液态的树脂中允许获得具有很好清晰度的非常小尺寸的结构。

[0119] 然后,在步骤(c)期间,将具有至少两个孔口 21、22 的盖子 2 在所述第一侧壁 3 预先接触印模 1' 的一侧处固定到装置上。然后,可以移除衬底 2'。

[0120] 在图 3 (c) 中示出了步骤(c)的末尾获得的所述结构。

[0121] 在没有将微孔薄膜从光致聚合和 / 或光致交联的树脂上松开的情况下并且在没有拔出或者局部地撕破的情况下进行衬底 2' 的移除

[0122] 盖子 2 可由玻璃、硅、固态聚合物薄膜、金属、导体或半导体的合金、陶瓷、石英、蓝宝石、弹性体制成。

[0123] 优选玻璃载片、聚合物膜或者硅载片。依据微流体装置 1 的目的应用来选择用来形成盖子 2 的材料。

[0124] 因此,由例如玻璃的光学透明材料制成的盖子 2 更适于方便观测和光检测(透明性)。玻璃的另一优点是其很好的导热性,其允许均匀地加热装置。

[0125] 应当注意到,微孔薄膜 5 设置在微流体通道 4 的下半部分处使得其用途和活细胞培养的标准规约相适合。实际上,然后可设想,底座 6 是在其上培养活细胞的玻璃载片,然后将所述载片固定到步骤(c)的末尾所获得的结构上以形成腔室 8 (培养腔室),如稍后在说明书中阐明的。

[0126] 可以根据以下工艺步骤来生产包括底座 6 和两个第二侧壁 7a、7b 的组件:

[0127] (e_1) 使用由弹性体材料制成的一敞口模具 3' (open mold),其具有用来接收光致固化和 / 或热固化的液态树脂 LR 的衬底侧 3' a 和空腔 3' b;

[0128] (e_2) 将底座 6 设置到模具 3' 的衬底侧 3' a 上;

[0129] (e_3) 将掩模 4' 设置到底座 6 上,然后光照或者加热以形成所述第二侧壁 7a、7b。

[0130] 在步骤(e_3)由光照液态树脂构成的情况下,图 4 (a) 示出了在步骤(e_1)到(e_3)的末尾所获得的结构。

[0131] 类似于印模 1' 和衬底 2', 模具 3' 可以由例如 PDMS 的弹性材料制成。

[0132] 用来形成壁 7a、7b 的光致固化和 / 或热固化的液态树脂可以选自于已经描述了其特征的用于步骤(a)的液态树脂。优选是,用于步骤(a)和(e_1)到(e_3)的液态树脂是相同的。作为一变型,可使用例如如上所述的光致交联的水凝胶或者聚二甲硅氧烷(PDMS)。

[0133] 底座 6 可以选自于用于盖子的材料。有利地,可以使用光学透明材料以便于利用专用设备来进行光学目测可视化。该光学透明材料可特别是玻璃,因此通常应用形成为玻璃盖子的底座 6 来培养活细胞(LC)。此外,使用玻璃允许获得该衬底可用的化学和生物表面处理的优点。

[0134] 掩模 4' 可具有允许光照液态树脂的精确区域以形成微流体装置的所述第二侧壁

7a、7b 的孔口 4' a、4' b。

[0135] 一旦完成步骤(e₃),所有剩下的就是在步骤(e₄)中移除掩模 4' 和模具 3' 以刚好留下由所述第二侧壁 7a、7b 和底座 6 所形成的组件。图 4 (b) 中示出了该组件。

[0136] 通常,然后进行步骤(e₅),包括利用按体积计算 90/10 比例的乙醇 / 丙酮混合物来冲洗所述组件。该冲洗允许移除没有被光照或者没有被加热而可能保持在底座 6 上的所有树脂。

[0137] 然后,在设置利用在步骤(c)末尾所获得结构的该组件之前并且在开始步骤(d)之前,培养活细胞(LC)。

[0138] 为此,需要使组件生物相适合。

[0139] 为了该目的,可以例如利用 UV 强烈地光照组件,紧跟着在例如水的中性溶液中猛烈地冲洗几小时。

[0140] 最后,然后可以在底座 6 的上侧 61 处进行活细胞的培养,如图 4 (c) 中所示。在标准条件下进行该培养。特别是可以在呈传统的玻璃载片形式的底座 6 上进行所述培养。

[0141] 一旦完成该培养,则可以执行步骤(d)。

[0142] 在图 3 (d) 中所示的步骤(d)中执行该操作。

[0143] 一旦已经执行步骤(d),则随时可使用微流体装置 1。特别是包括底座 6 的上侧 61 上的活细胞,该上侧 61 与腔室 8 (培养腔室) 中的微孔薄膜 5 相对。

[0144] 为了使用该微流体装置 1,使其与也属于根据本发明的微流体系统的流体供应机构(未显示)结合到一起。该供应机构允许给微流体通道供应包含可刺激活细胞的分子的至少一种流体。

[0145] 该供应机构例如可由通过毛细管连接到微流体通道 4 上的一组流体储罐形成。利用该装置,则可在使来自不同储罐的不同流体进入微流体通道之前对其进行稀释和 / 或混合。

[0146] 此外,微流体通道 4 可具有特定形状。

[0147] 图 5 (a) 中以透视图的形式示意性地显示了可被使用的微流体通道 4 的一实例。

[0148] 其是用于两个不同流体 F₁、F₂ 的微流体通道 4。流体 F₁、F₂ 仅在两个流体之一和用于目标细胞的刺激分子的低浓度方面不同。流体在两个支管 42、43 中被输送,所述两个支管 42、43 组成具有一分界面 41 的公共歧管 44,微流体装置 1 的微孔薄膜 5 计划设置在该分界面 41 处。

[0149] 很清楚,在该特殊情况下,供应机构分别为流体 F₁、F₂ 提供了两个流体源。

[0150] 所述流体 F₁、F₂ 通过进口 420、430 被引导到微流体通道 4 中。此外,在公共歧管 44 的末端处具有用于两个流体 F₁、F₂ 的一公共出口 45。微流体通道 4 的大致形状为 Y 形。

[0151] 注意到,进口 420、430 可与图 2 中的进口孔 21 相匹配,且出口 45 可与图 2 中的出口孔 22 相匹配。在图 2 中,微流体通道 4 设计成使通过单个孔口 21 进入并通过单个孔口 22 离开的仅单一流体循环。

[0152] 图 5 (b) 是流体 F₁、F₂ 在微流体通道 4 的不同支管中流动的简图。特别是,注意到,在公共歧管 44 中,流体 F₁、F₂ 相互并排按层流方式流动。当流动为层流时,流体不会水力地混合。

[0153] 如已知的,如果在该公共歧管 504 中流动的雷诺数小于临界雷诺数,则可以认为

该流动是分等级(层, level)的,可以由流体力学手册容易地确定该临界雷诺数。

[0154] 雷诺数是由关系式 $Re=(V \cdot D_h)/\nu$ 定义的无量纲数,其中 V 是公共歧管 44 中的流体速度, D_h 是公共歧管 44 的水力直径,并且 ν 是流体的流动粘度。水力直径取决于公共歧管的几何结构。

[0155] 考虑到微流体通道的形状,临界雷诺数具有 2300 的量级。

[0156] 考虑到流动的特性,提及一种“同向流动(co-flow)”型供应机构。

[0157] 实际上,因为微流体通道 40 的尺寸为微米级,所以对于通常用于本发明设想的应用的流体和所述流体的流动速度来说,流动是分等级的。

[0158] 所述流体 F_1 、 F_2 用于在微流体装置 1 的微流体通道 4 中流动,两者都与微孔薄膜 5 接触,但不处于腔室 8 (培养腔室)中。

[0159] 在微流体通道 4 与设置在腔室 8 的底座 6 上的所述细胞之间输送可刺激活细胞的分子(包含在两种流体 F_1 或者 F_2 中的至少一种中),然后通过穿过微孔薄膜 5 扩散到腔室 8 中来进行。

[0160] 更确切地说,首先通过扩散穿过微孔薄膜 5、然后扩散穿过腔室 8、最后到达腔室 8 的底座 6 的上侧 61 (即,活细胞所处的侧面 61) 来执行输送所述分子。

[0161] 然而,使腔室中的浓度分布稳定需要花一定时间。特别是,在腔室 8 的底座 6 处,稳定时间 t_{stab} 是 h'^2/D 的量级,其中 h' 是腔室 8 的高度,并且 D 是用来刺激腔室 8 中的目标细胞的分子的扩散系数。应当注意到,为了避免过多的稳定时间,腔室的高度普遍限制到 $500 \mu m$ 。

[0162] 图 6 (a) 到 6 (c) 显示了当假定为“同向流动”型流体供应时的扩散现象中的几个步骤。处于白色的流体 F_2 包含用于计划放置在腔室 8 的底座 61 上的活细胞的刺激分子。处于黑色的流体 F_1 是中性的。在图 6 (a) 中,供应的流体到达微孔薄膜 5 处并且分子开始扩散到腔室 8 中。在图 6 (b),处于其中浓度分布为稳定阶段的过渡流态。在图 6 (c),浓度分布已经稳定了。

[0163] 很清楚,扩散主要出现在腔室 8 (培养腔室)的高度上,即,大致垂直于微流体通道 4 中的流体 F_1 、 F_2 的流动方向的方向,即使腔室 8 中的该扩散还出现在其他方向上。

[0164] 图 5 (c) 以剖视图显示了在与微流体装置 1 的分界面 41 处发生的情况。

[0165] 为此,利用如中性溶液的第一流体 F_1 和如荧光溶液的第二流体 F_2 进行实验。荧光溶液 F_2 包含扩散系数类似于通常用于刺激活细胞的分子的扩散系数。在该情况中,所使用的荧光溶液可以是异硫氰酸荧光素,可以包含一种称为 GFPuv (“绿色荧光蛋白质”)的荧光蛋白质或者可以包含一种与右旋糖酐 -70MW- 若丹明荧光分子有关的蛋白质。这是与若丹明 B 的荧光分子相联系的蛋白质右旋糖酐 -70。

[0166] 在微孔薄膜 5 上方,即在微流体装置 1 的微流体通道 4 中,图 5 (c) 中所示的荧光溶液的浓度分布处于锥碟形(此外,如图 6 (c) 中的)。实际上,该荧光溶液仅占据微流体通道 4 的一部分,所述通道 4 的其他部分被中性溶液占据。

[0167] 为了确定在底座 6 的上侧 61 处获得的浓度分布,利用属于根据本发明的微流体系统的一光学机构 18 来观察微流体装置 1,被刺激的活细胞可设置在该上侧 61 上。

[0168] 在底座 6 的上侧 61 上获得的浓度分布具有“erf”型函数的典型曲线形式。通过中性溶液和荧光溶液扩散穿过微孔薄膜 5,然后穿过腔室 8 来获得所述形式。

[0169] 利用“同向流动”型流体供应机构 50,从而有可在腔室 8 的底座处获得非常特殊的浓度分布,并从而活细胞将被刺激。

[0170] 图 7 (a) 到 7 (c) 中示出了微流体通道 4 的另一形式。

[0171] 流体 F_1 、 F_2 在两个支管 42'、43' 中被输送,所述支管都引入到具有三个出口的同一直道 44' 中,以形成三个管状旋管(非标准的(not referenced))。第一流体 F_1 通过第一出口并被引至第一管状旋管,第二流体 F_2 通过第二出口并被引至第二管状旋管,两个流体 F_1 和 F_2 的混合物最后通过通道 44' 的中央出口并被引至中央管状旋管。在蛇形管的出口处,流体在具有与根据本发明的微流体装置 1 的微孔薄膜 5 的分界面 41' 的公共歧管 45' 中结合。

[0172] 公共歧管 45' 的端部 46' 具有用于流体 F_1 、 F_2 的出口。

[0173] 图 7 (b) 是流体 F_1 、 F_2 在微流体通道 4' 的不同支管中流动的简图。不同的流体按层流方式在微流体通道 4 中流动。

[0174] 然后,谈及“三重流动(tri-flow)”型的流体供应机构。

[0175] 图 7 (c) 以剖视图显示了在分界面 41' 处的流体特性。用于该目的的实验装置类似于以上所述的用于“同向流动”型的微流体通道 4 的装置。

[0176] 图 7 (c) 特别显示了微流体通道 4' 中的浓度分布具有阶梯形状。还显示,在底座 6 (光学上透明的) 的上侧 61 上所获得的浓度分布具有线性中心部分,其可以用于刺激某些目标细胞。

[0177] 因此,利用“三重流动”型的该微流体通道 4', 在被刺激的活细胞位于其上的覆盖物的中心处应用线性浓度分布。

[0178] 根据本发明的微流体系统不限于使用仅根据如上所述的“同向流动”或者“三重流动”型设计的第一微流体通道 4、4'。因此,可以依据希望应用在活细胞上的浓度分布来构想其他种类的第一微流体通道。

[0179] 因此,根据本发明的微流体系统允许更为容易地控制可刺激例如活细胞的目标的分子的浓度分布。

[0180] 因此,流体 F_1 、 F_2 中任何一个流量的变化不会引起应用于活细胞的分子的浓度分布的巨大变化。

[0181] 一个理由是:活细胞未设置在微孔薄膜 5 上,而是设置在腔室 8 的底座 6 上。实际上,当将活细胞与薄膜 5 相对地设置时,穿过腔室 8 的扩散时间减弱了流体在微流体通道 4 中流动的可能扰动。

[0182] 作为实例,图 5 (c) 和 7 (c) 显示了可应用于活细胞的不同的浓度分布。

[0183] 根据本发明的微流体系统的设计还显现出了一动态特性,其允许很快地执行多次试验。

[0184] 这通过如下所述的按动态方式执行的试验来演示。

[0185] 对于所述试验,微孔薄膜 5 是具有 400nm 小孔的 Whatman Cyclopore 型薄膜。培养腔室具有 200 μ m 的高度 h' 和 1mm 的宽度。

[0186] 使第一流体 F_1 (中性溶液) 在微通道 4 中循环,然后使第二流体 F_2 在前述通道 4 中循环,在该情况中,流体 F_2 是由包含扩散系数与通常用于刺激活细胞的分子的扩散系数相匹配的荧光溶液形成。

[0187] 图 8 中示出了三种荧光溶液(荧光素、GFP 和 Dextran70MW) 所获得的结果。

[0188] 图 8 显示了利用例如定位在底座 6 后面的共焦显微镜的一光学机构所测得的作为时间函数的荧光溶液的标准亮度的变化。在底座 6 处利用显微镜进行的测量,在该情况中底座 6 处于玻璃载片中。

[0189] 图 8 中所示三条曲线中每条的原点($t=0s$) 对应于第二流体 F_2 的循环的起点。

[0190] 可以看到,根据荧光溶液的特性,在该玻璃载片上建立浓度分布的时间在几十秒到几分钟之间。逻辑上,该溶液中包含的分子越大,则用于建立的时间越长。

[0191] 通常,可看到,与在约为腔室 8 (培养腔室) 的高度 h' 的量级的距离上扩散的时间相对照,用于建立的时间比较短的,并且允许以稳定的浓度分布快速地进行实验。

[0192] 因为微流体系统允许独立地进行活细胞的培养,所以通常可以在 1 到 2 小时之间的时间中快速地进行试验。然后,可以利用另一培养物传送到另一试验中。

[0193] 这对于图 1 中所示的微流体系统是不可能的。实际上,在该情况中,在微流体系统内进行培养,使得进行一次试验需要几天的时间。

[0194] 通常,微流体系统包括用于通过底座 6 对培养腔室 8 进行可视化的光学装置。当提供所述光学装置时,底座有利地是由光学透明材料制成的。因此,更容易跟踪设置在该底座 6 上的活细胞对被某些分子刺激的反应。

[0195] 图 9 以局部剖视图显示了根据本发明的微流体装置的一实施例。图 9 仅显示了微流体装置的上半部分,需要包括底座(例如可接收活细胞的培养物)和侧壁以在微孔薄膜 5 下面形成腔室的一组件,以便可以使用微流体装置 100。

[0196] 微流体装置 100 具有类似于参见图 2 描述的微流体装置 1 的特性,并且在该情况中,可以与“同向流动”或者“三重流动”型的微流体通道 40 一起使用。

[0197] 微流体通道 40 可以由如上所述的流体供应机构来供应。

[0198] 然而,改进微流体通道的结构。实际上,在该实施例中,微流体通道 40 设置在多个等级处,这样的话,在该图 9 中所示的实例中为两等级 401、402。每等级包括对应于形成在盖子 20 中的孔口 201、202 的流体进口,具有一公共的流体出口 203。

[0199] 使用一种在几个高度上包含微流体通道的微流体装置的优点是其允许应用更复杂的可刺激活细胞的分子的浓度分布。例如,可以设想在腔室 8 中使用凹形的、凸状的或者周期性的浓度分布,而仍然保持用于流体的有限数量的进口和出口。

[0200] 此外,图 10 显示了利用包括在两等级上的通道 4 的一微流体装置所获得的模拟结果,以允许获得空间上的周期性的浓度分布。横坐标显示了腔室 8 的宽度,并且纵坐标显示了刺激分子的标准浓度。不同的实曲线显示了模拟的浓度分布随时间的变化直到稳定。虚曲线对应于由荧光素的流动所获得的实验数据。

[0201] 特别是,为了实现周期性应用一给定的浓度分布,可以设想在微流体通道的第一等级 40_1 (通过孔口 202) 中利用“同向流动”型供应机构引入流体 F_1 、 F_2 , 然后例如利用“同向流动”型供应机构每隔一定时间通过孔口 201 在第二等级 40_2 中引入其他流体 F'_1 、 F'_2 。

[0202] 因为所使用的制造工艺使得这是特别可能的,其允许在微孔薄膜 5 之上构造出任何形状的微流体通道。

[0203] 很清楚,第一通道 40 可以具有超过两等级,这取决于希望应用的浓度分布的复杂度。

[0204] 图 8 中所示的制造结构是基于如上所述的工艺改编的。

[0205] 因此,执行步骤(a)和(b)生产出图 11 (a)中所示的结构 200。用于该步骤中的衬底为附图标记 20', 并且侧壁 30'' 在其底部处被微孔薄膜 5 封闭。

[0206] 然后,利用类似于以上给出的步骤(a)到(c)的步骤生产图 11 (b)中所示的结构 200'。结构 200' 包括固定到设有三个孔口 201、202 (流体进口)和 202 (或者流体的公共出口)的盖子 3 上的四个第一侧壁 30、30'''。在该情况中,在侧壁 30 的底部处未设置微孔薄膜,因为微流体通道 40 的等级 40₁ 必须与前述微流体通道 40 的第二等级 40₂ 处于流体连通。

[0207] 然后,将结构 200 和 200' 中的一个固定到另一个上,如图 11 (c)中所示。可以通过光照或者加热来执行该固定,以便将侧壁 30'' 和 30''' 固定到一起以形成侧壁 30'。由此,该步骤允许形成微流体通道 40 的第二等级 40₂。

[0208] 最后,对于包括两个光致固化和 / 或热固化树脂的第二侧壁的组件执行类似于步骤(d)的一步骤,以在微孔薄膜下面形成腔室。为了该目的,执行如上参见图 4 (a)到 4 (c)所述的重复的工艺步骤(e₁)到(e₃)。

[0209] 应当注意到,前述的装置 1、100 包括其中设置活细胞的腔室 8 (当粘附到微流体通道 4 上时自然地封闭)。该腔室 8 可包括培养凝胶,虽然有利地不会是所述情况。此外,该腔室可以由微流体通道来代替,因此有利地包括横向地设置的开口。在该后一种情况中,微流体装置则包括其中流体循环的微流体通道 4、40 和其中设置活细胞的另一微流体通道。

[0210] 因此,根据本发明的微流体系统提供了多种可能性。

[0211] 特别是,有可能应用一种用于刺激活细胞的、在所述活细胞处具有所需形状(以上给出的实例显示出“erf”函数形式的梯度或者装置 1、100 的腔室 8 的中心部分中直线形状的梯度)的分子浓度梯度。在腔室 8 中建立了浓度分布,将活细胞设置在远离微孔薄膜 5 的装置的底座上,且更准确地是与腔室 8 内的该薄膜 5 相反(可用一微流体通道来代替该腔室)。

[0212] 因此,在流体供应机构处不进行该分布的应用。流体供应机构则是简单的并且仅供应流体,所述流体的流量可在应用于活细胞的浓度分布没有任何明显变化的情况下稍微变化。因此,更容易控制活细胞处的浓度分布,并且较少受微流体系统以外的潜在干扰的影响。

[0213] 因此,在经过主要取决于腔室的高度和刺激分子的扩散系数的稳定时间之后,可在腔室 8 中,特别是可在该腔室的底部 61 处获得稳定的浓度分布。

[0214] 根据本发明的微流体装置的制造工艺还允许使用由光学透明材料制成的底座,例如可以使用根据标准工艺在其上进行细胞培养的载片。因此,可以利用定位在玻璃载片后面的一光学可视化机构来容易地进行活细胞特性(生长等)的观测。

[0215] 因为由光学透明材料制成的底座可以非常薄,所以可以在很高的空间清晰度下进行光学观察。例如,可以使用厚度为 150 μm 的玻璃载片形成的底座来执行由例如光敏化局部显微术(PALM)或者受激发射减损显微术(STED)的技术所获得的高分辨率或者甚至超高分辨率的荧光显微术。

[0216] 同时,该可视化机构允许了解应用于活细胞的刺激分子的浓度分布。因此,更容易获得所观测到的活细胞的特性与应用于被进行实验的活细胞的浓度分布之间的关系。

[0217] 最后,可以快速地进行多次试验。

[0218] 本发明特别是可用于活细胞的培养、观测和研究的生物学领域中。特别是,可以确定神经细胞对某些分子的趋化性反应,例如以建立起神经网络。特别是,还可以测量癌细胞对用于化学疗法的分子的反应。还可以使用所述微流体系统来制造生物芯片。

[0219] 本发明可用于其他应用领域,例如用于在美容术中确定某些分子的毒性阈值。

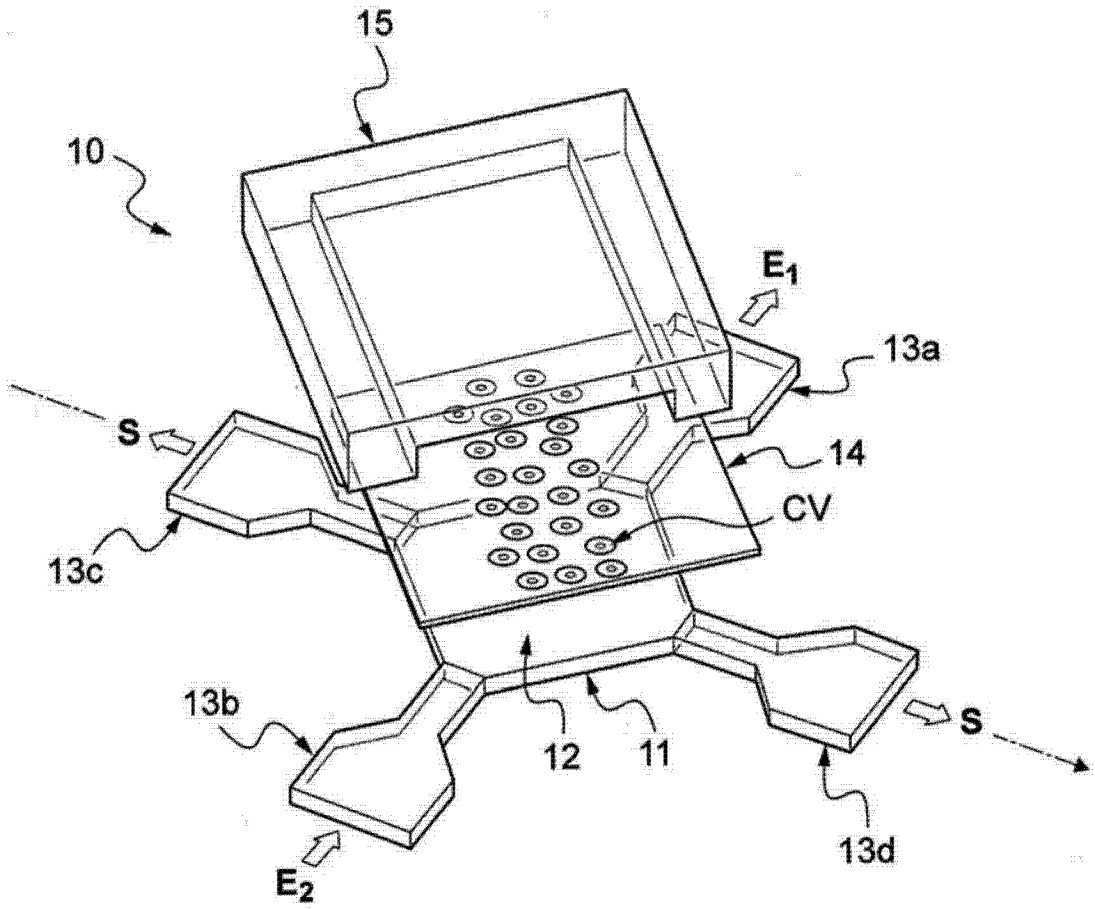


图 1 现有技术

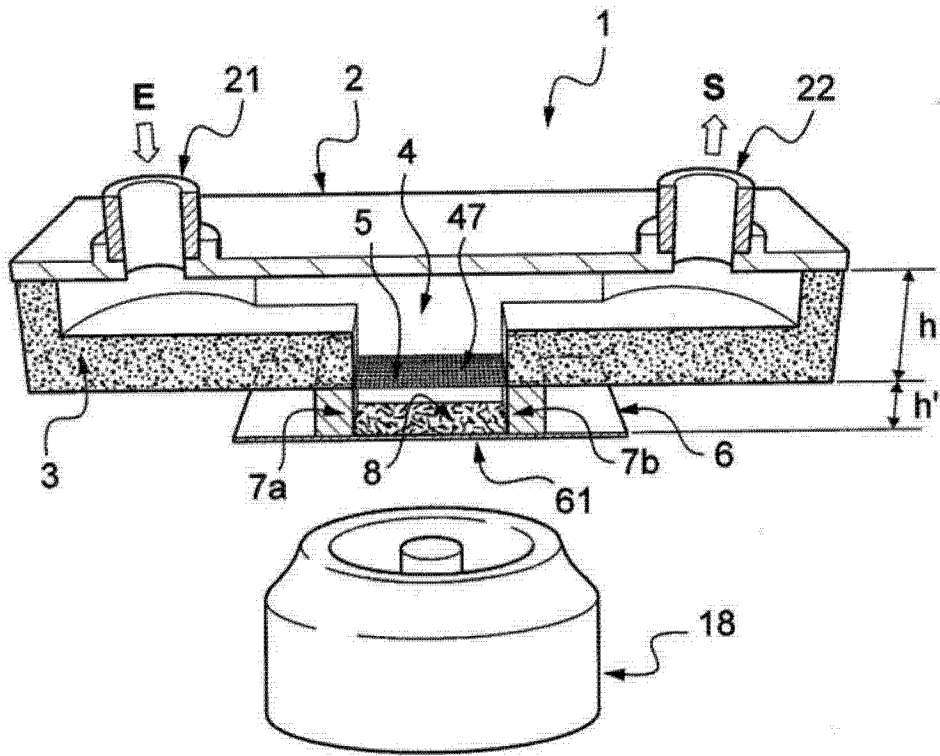


图 2

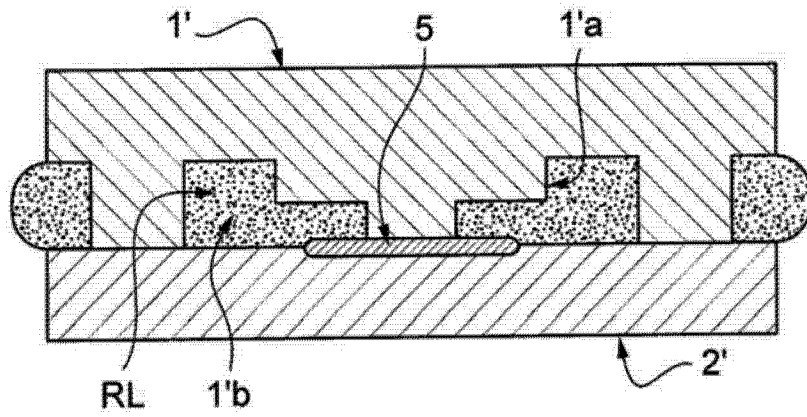


图 3(a)

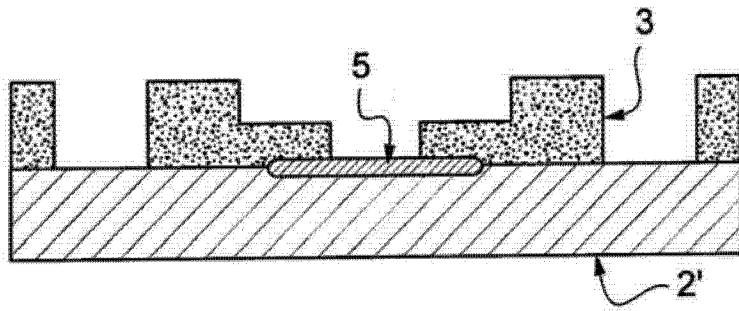


图 3(b)

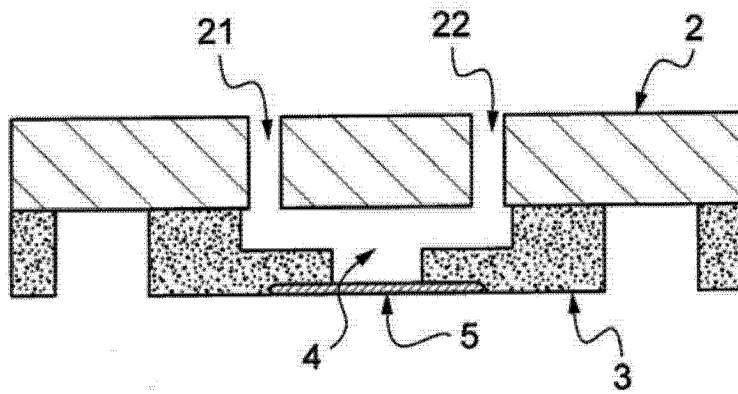


图 3(c)

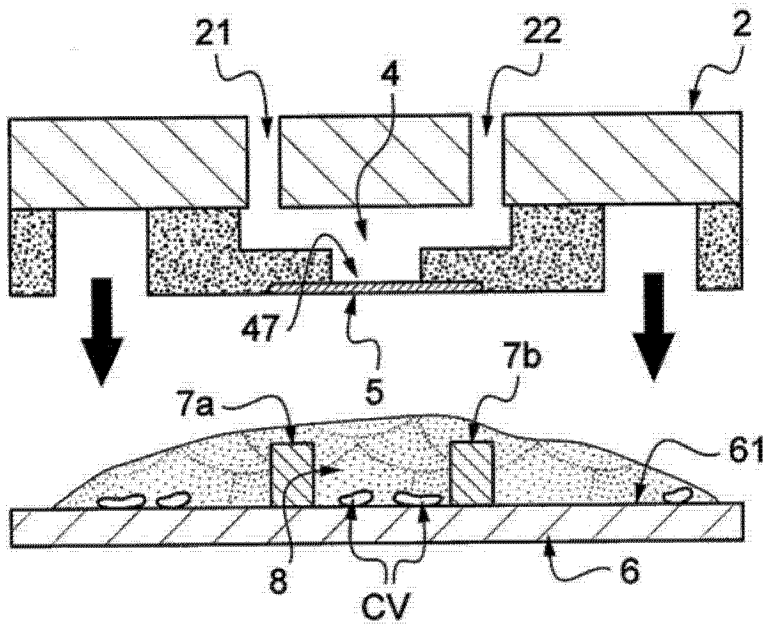


图 3(d)

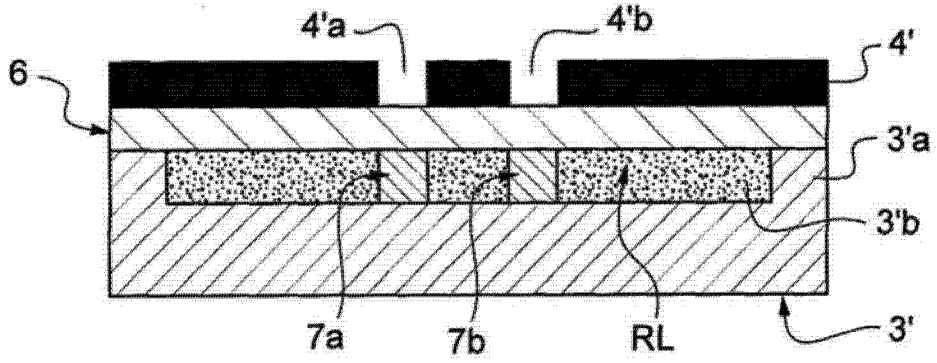


图 4(a)

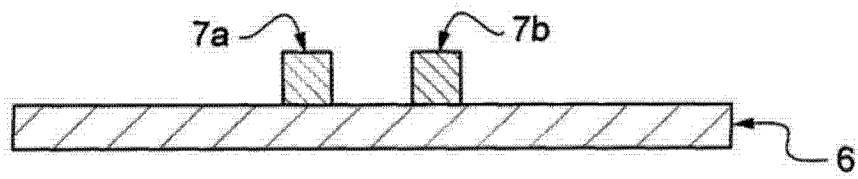


图 4(b)

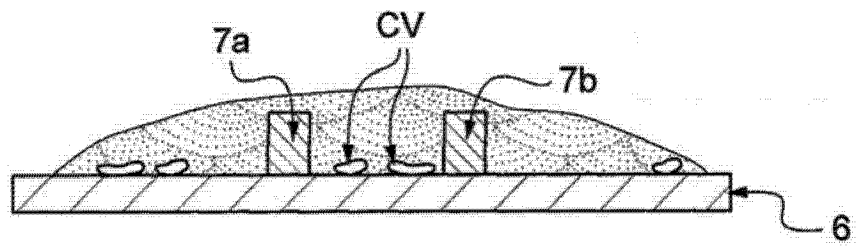


图 4(c)

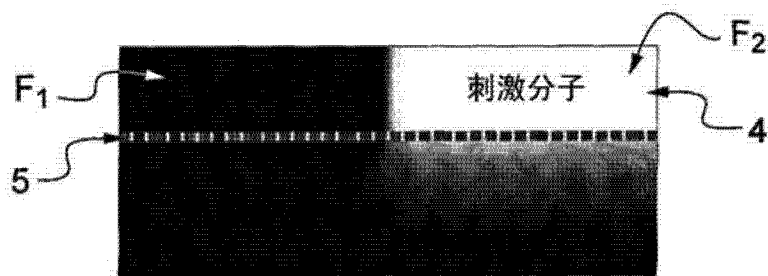


图 6(a)

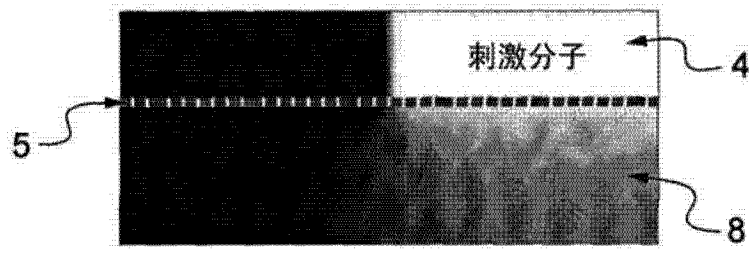


图 6(b)

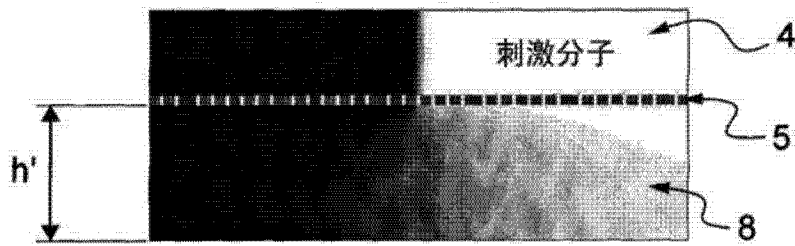


图 6(c)

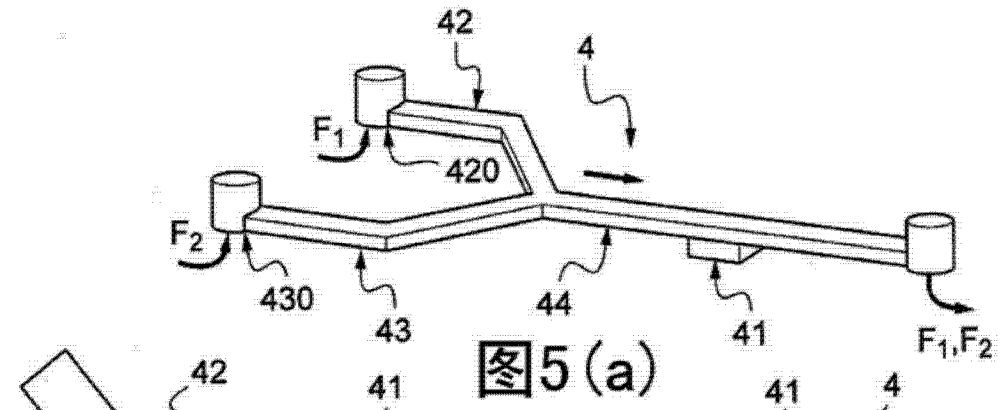


图5(a)

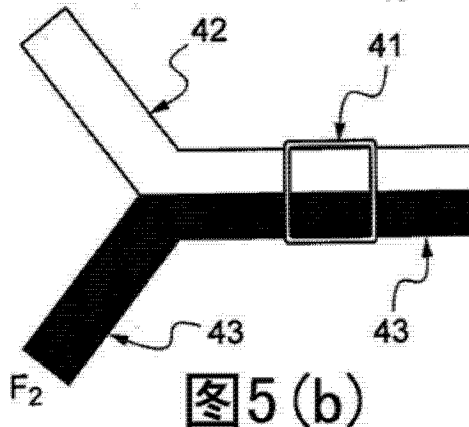


图5(b)

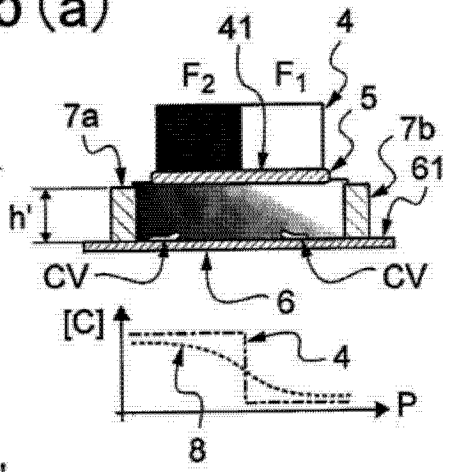


图5(c)

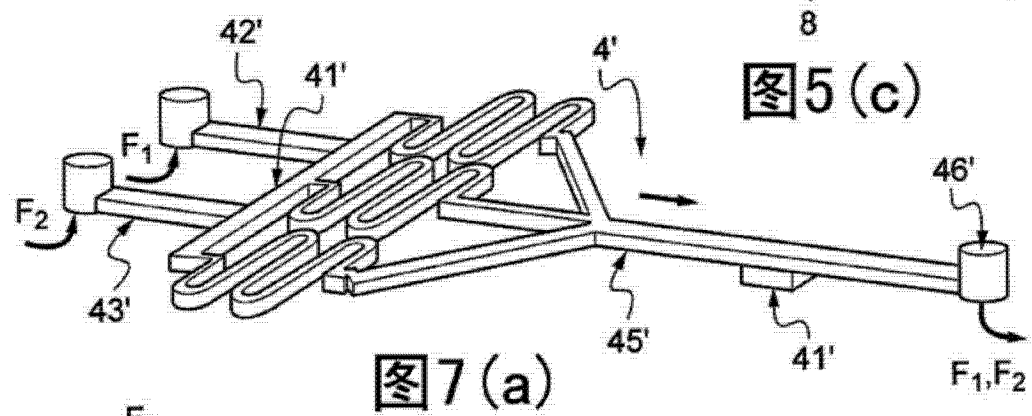


图7(a)

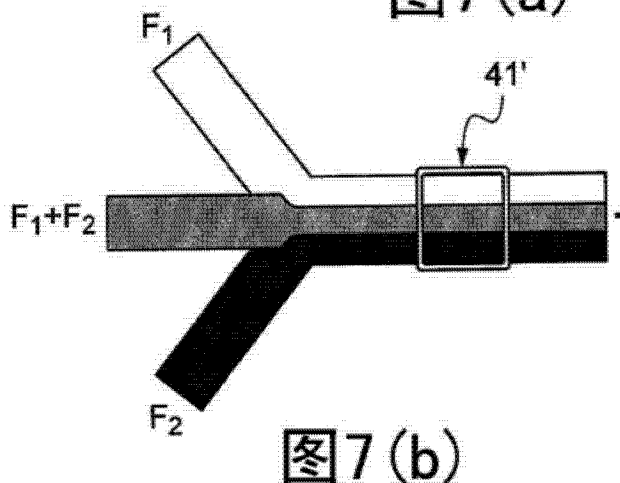


图7(b)

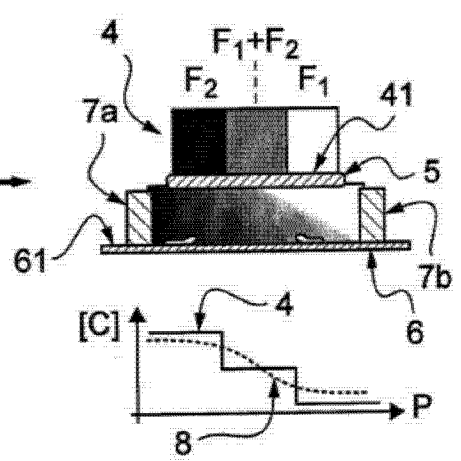


图7(c)

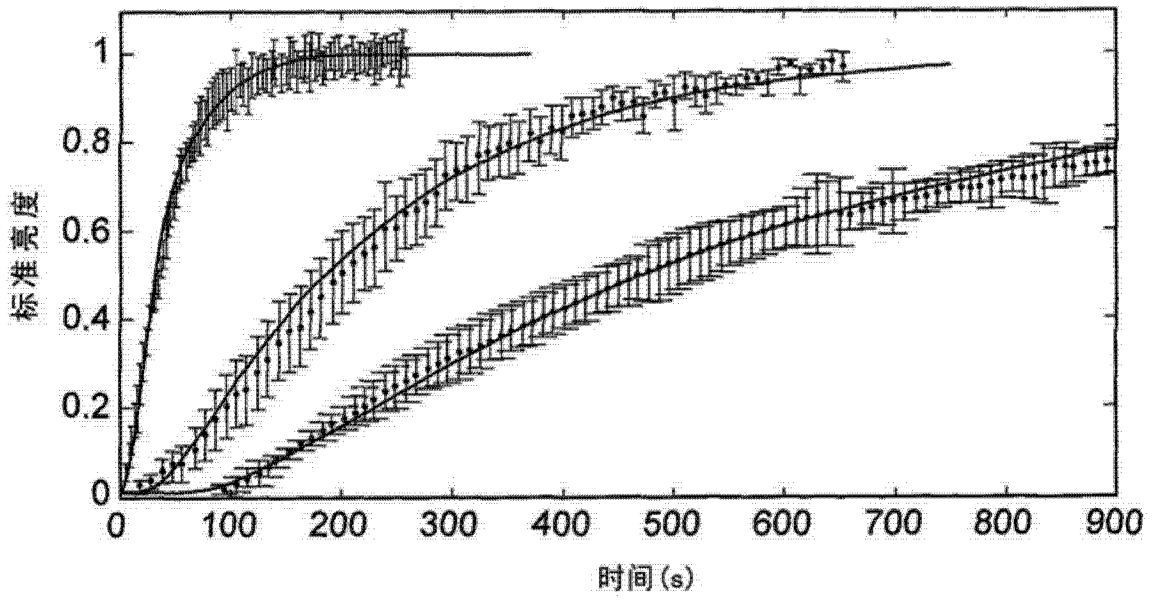


图 8

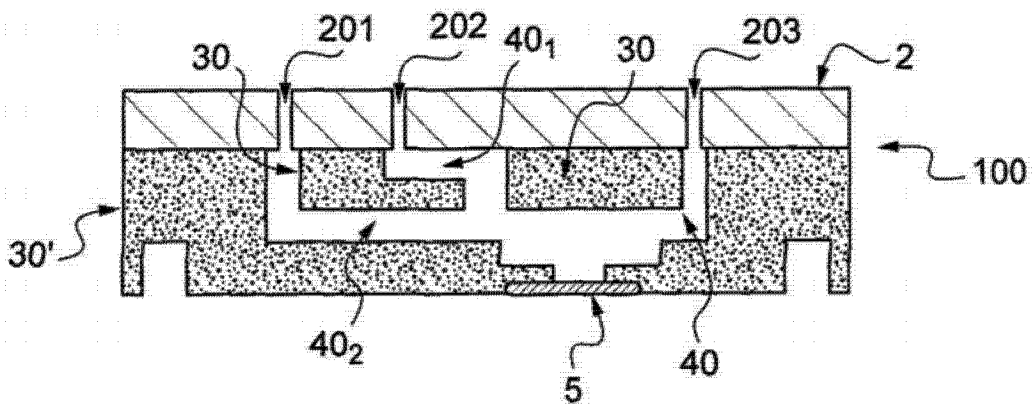


图 9

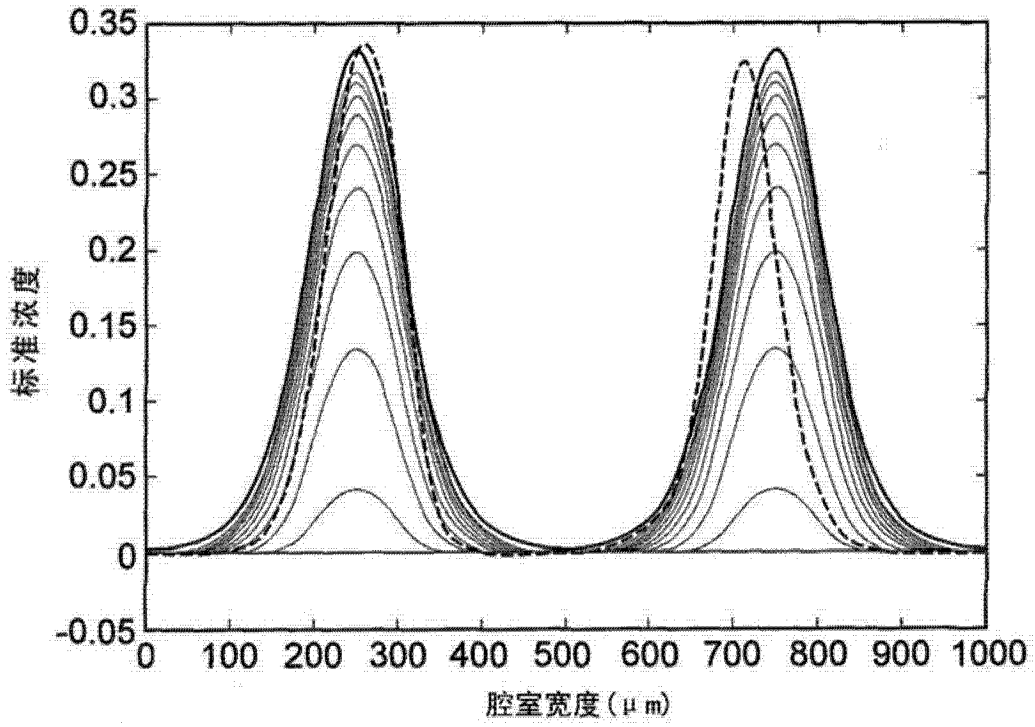


图 10

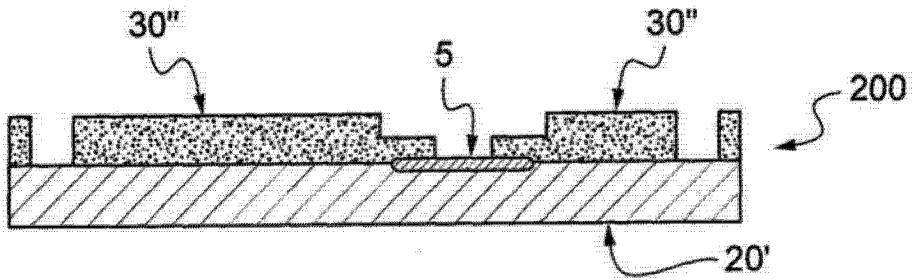


图 11(a)

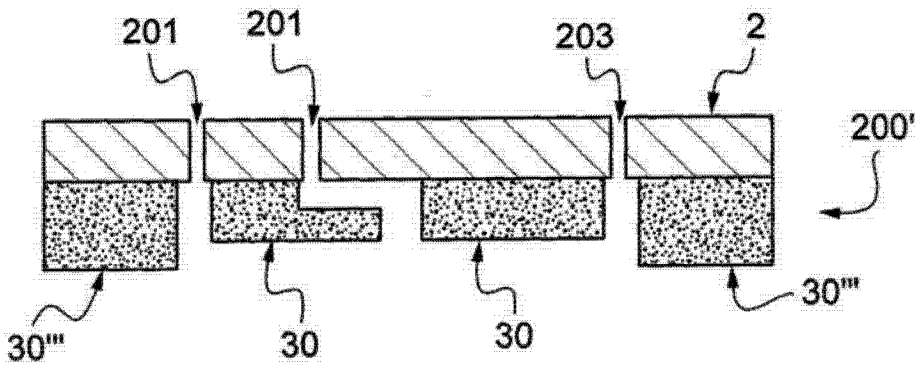


图 11(b)

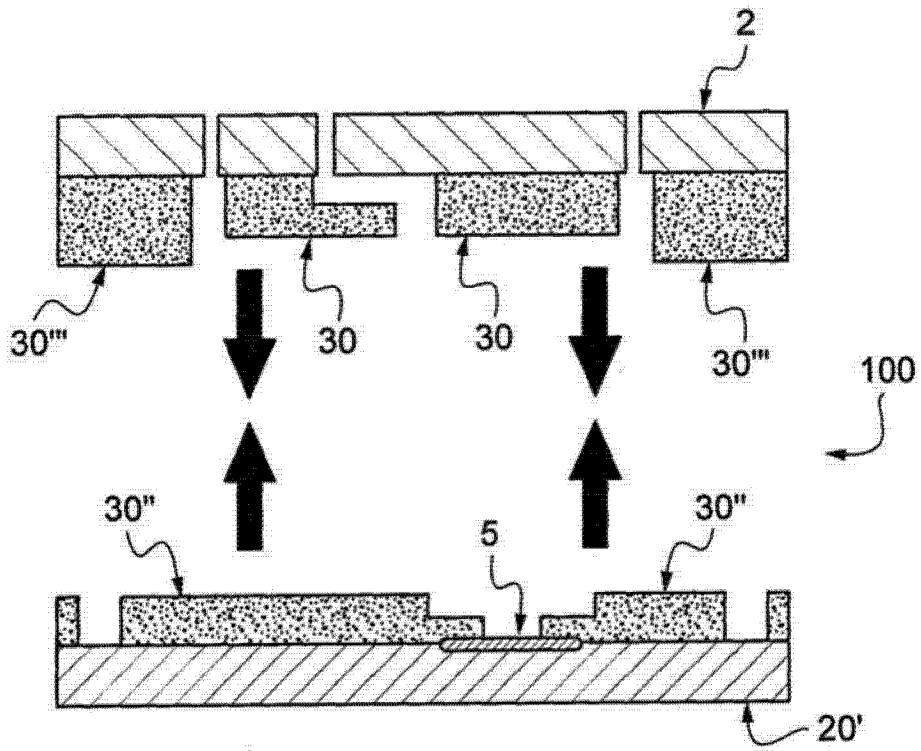


图 11(c)