



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 37 443 T2** 2008.06.12

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 304 388 B1**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **B01L 3/00** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 37 443.9**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 000 459.2**

(96) Europäischer Anmeldetag: **27.06.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.04.2003**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **20.02.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.06.2008**

(30) Unionspriorität:

**859 P**                      **03.07.1995**      **US**

**703 P**                      **29.07.1995**      **US**

**589027**                    **19.01.1996**      **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

**Affymetrix, Inc., Santa Clara, Calif., US**

(72) Erfinder:

**Anderson, Rolfe C., Mountain View, CA 94043, US;  
Lipshutz, Robert J., Palo Alto, CA 94301, US; Rava,  
Richard P., 94062 San Jose, CA 95129, US; Fodor,  
Stephen, Palo Alto, CA 94304, US**

(74) Vertreter:

**Uexküll & Stolberg, 22607 Hamburg**

(54) Bezeichnung: **Integrierte Nukleinsäure-Diagnostikvorrichtung**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0001]** Die Beziehung zwischen Struktur und Funktion von Makromolekülen ist von fundamentaler Wichtigkeit für das Verständnis von biologischen Systemen. Diese Beziehungen sind wichtig, um beispielsweise die Funktionen von Enzymen, die Struktur von Signal-Proteinen, die Arten, auf denen Zellen miteinander kommunizieren, wie auch die Mechanismen der zellulären Kontrolle und des metabolischen Feedbacks zu verstehen.

**[0002]** Die genetische Information ist bei Fortführung von Lebens-Prozessen entscheidend. Das Leben basiert im Wesentlichen auf Information und sein genetischer Inhalt kontrolliert das Wachstum und die Reproduktion der Organismen. Die Aminosäuresequenzen von Polypeptiden, die bei allen lebenden Systemen entscheidende Merkmale darstellen, werden vom genetischen Material der Zelle kodiert. Des Weiteren werden die Eigenschaften dieser Polypeptide, z.B. als Enzyme, funktionale Proteine und Struktur-Proteine, durch die Sequenz von Aminosäuren bestimmt, die sie ausmachen. Da Struktur und Funktion innerlich zusammenhängen, könnten viele biologische Funktionen durch Aufklärung der zu Grunde liegenden strukturellen Merkmale, die diese Funktionen bereitstellen, aufgeklärt werden. Diese Strukturen werden durch die zu Grunde liegende genetische Information in Form der Polynukleotidsequenzen bestimmt. Zusätzlich zur Kodierung von Polypeptiden können Polynukleotidsequenzen beispielsweise auch spezifisch an der Kontrolle und Regulierung der Genexpression beteiligt sein.

**[0003]** Es hat sich gezeigt, dass die Untersuchung dieser genetischen Information von großem Wert für ein besseres Verständnis von Lebensprozessen ist, wie auch für die Diagnose und Behandlung einer großen Anzahl von Erkrankungen. Insbesondere Erkrankungen, die durch Mutationen, Deletionen oder Wiederholungen in spezifischen Teilen des Genoms verursacht werden, könnten problemlos unter Verwendung gentechnischer Verfahren diagnostiziert und/oder behandelt werden. In ähnlicher Weise könnten Erkrankungen, die durch externe Agenzien verursacht werden, durch Nachweis des Vorhandenseins von genetischem Material, welches unverwechselbar für das externe Agens ist, z.B. bakterielle oder virale DNA, diagnostiziert werden.

**[0004]** Während die derzeitigen genetischen Verfahren im Allgemeinen in der Lage sind, diese genetischen Sequenzen zu identifizieren, basieren solche Verfahren im Allgemeinen auf einer Vielzahl von einzelnen Prozessen zur Aufklärung der Nukleinsäuresequenzen, wobei jeder Prozess das Potential für einen Fehler im Gesamtprozess mit sich bringt. Diese

Prozesse setzen sich ferner aus einer großen Anzahl von einzelnen Disziplinen zusammen, einschließlich Chemie, Molekularbiologie, Medizin u.a. Es wäre daher erstrebenswert, die verschiedenen Prozesse, die bei der genetischen Diagnose angewendet werden, bei minimalen Kosten und einer maximal einfachen Handhabung in einen einzigen Prozess zu integrieren.

**[0005]** Das Interesse an der Herstellung von mikrofluidischen Instrumenten ist gewachsen. In typischen Fällen wurden Fortschritte bei der Herstellungstechnik von Halbleitern in die Herstellung von mikromechanischen Strukturen, z.B. Mikropumpen, Mikroventilen und dergleichen, und mikrofluidischen Instrumenten übersetzt, die Miniatur-Kammern und Flüssigkeitsdurchgänge haben.

**[0006]** Eine Anzahl von Forschern hat versucht, diese Mikroherstellungstechniken in der Miniaturisierung von einigen Prozessen, die insbesondere in der genetischen Analyse eingebunden sind, einzusetzen. Zum Beispiel berichtet die veröffentlichte PCT-Anmeldung WO 94/05414, von Northrup und White, über einen integrierten Mikro-PCR-Apparat zur Sammlung und Amplifikation von Nukleinsäuren aus einer Probe. Es bleibt jedoch ein Bedarf nach einem Apparat, der die verschiedenen Prozessier- und Analyseoperationen, die in der Nukleinsäureanalyse vorkommen, kombiniert. Die vorliegende Erfindung befriedigt diesen Bedarf und andere Bedürfnisse

## ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0007]** Erfindungsgemäß werden miniaturfluidische Systeme wie in Anspruch 1 und 5 definiert und Verfahren zur Verwendung eines solchen Systems wie in Anspruch 5 definiert geschaffen.

**[0008]** Es werden integrierte miniaturfluidische Systeme zum Ausführen einer Vielzahl von präparativen und analytischen Operationen bereitgestellt, wie auch Verfahren zur Verwendung dieser Systeme zur Verfügung gestellt. Es wird ein miniaturfluidisches System bereitgestellt, das einen Körper mit wenigstens einer ersten und zweiten darin angeordneten Kammer aufweist. Jede dieser ersten und zweiten Kammern hat einen Flüssigkeitseinlass und ist in Strömungsverbindung. Wenigstens eine der ersten und zweiten Kammern ist eine Hybridisierungs-Kammer zum Analysieren einer Komponente einer flüssigen Probe. Die Hybridisierungs-Kammer enthält ein Polymer-Array, das eine Vielzahl von verschiedenen Polymersequenzen gekoppelt an die Oberfläche eines einzelnen Substrats aufweist, wobei jede aus der Vielzahl der verschiedenen Polymersequenzen an einer verschiedenen, bekannten Position an die Oberfläche gekoppelt ist. Das System umfasst ferner einen Probeneinlass, der mit wenigstens einer der ersten und zweiten Kammer in Strömungsverbindung

ist, zum Einführen einer flüssigen Probe in das System, und ein Flüssigkeitstransportsystem zum Bewegen einer Flüssigkeitsprobe aus der ersten Kammer in die zweite Kammer.

**[0009]** Nach einem bevorzugten Aspekt weist das Flüssigkeitslenkungssystem einen pneumatischen Verteiler zum Anwenden einer Druckdifferenz zwischen der ersten Kammer und der zweiten Kammer auf, um die flüssige Probe aus der ersten Kammer in die zweite Kammer zu bewegen.

**[0010]** Nach einem verwandten Aspekt wird ein Miniaturfluidisches System bereitgestellt, das im Wesentlichen das gleiche wie das oben beschriebene ist, außer dass das System anstelle oder zusätzlich zu einer Hybridisierungs-Kammer einen Trennungskanal zum Abtrennen einer Komponente der flüssigen Probe aufweist. Der Trennungskanal ist strömungsmäßig mit wenigstens einer der Kammern verbunden und weist wenigstens erste und zweite Elektroden in elektrischem Kontakt mit gegenüberliegenden Enden des Trennungskanals auf, um eine Spannung über den Trennungskanal anzulegen.

**[0011]** Ähnlich wird nach einem zusätzlichen Aspekt ein im Wesentlichen ähnliches fluidisches System wie beschrieben bereitgestellt, außer dass wenigstens eine der Kammern eine in vitro-Transkriptions-Reaktions-Kammer aufweist, wobei die in vitro-Transkriptions-Reaktions-Kammer eine wirksame Menge an RNA-Polymerase und vier verschiedene Nukleosidtriphosphate darin angeordnet aufweist.

**[0012]** Ferner kann das System einen Körper haben, wobei wenigstens eine der Kammern eine Zellyse-Kammer ist, die ein Zellyse-System zum Lysieren der Zellen in der flüssigen Probe enthält.

**[0013]** Nach einem weiteren in Beziehung stehenden Aspekt kann wenigstens eine der Kammern eine Nukleinsäure-Reinigungs-Kammer sein, um Nukleinsäuren in der flüssigen Probe von anderen Verunreinigungen in der flüssigen Probe abzutrennen.

**[0014]** Es wird auch ein Miniaturfluidisches System bereitgestellt, das ein Differenzdruck-Erzeugungssystem zum Transportieren der Flüssigkeiten durch das System aufweist. Insbesondere umfasst ein Miniaturfluidisches System einen Körper mit wenigstens einer ersten Reaktions-Kammer, die strömungsmäßig mit einer zweiten Reaktions-Kammer durch einen Flüssigkeitsdurchgang verbunden ist. Das System umfasst auch einen Probeneinlass, der strömungsmäßig mit der ersten Kammer verbunden ist, um eine flüssige Probe in das System einzuführen. Das System weist ferner ein Differenzdruck-Erzeugungssystem auf, um die erste Kammer auf einem ersten Druck und die zweite Kammer auf einem zweiten Druck zu halten, wobei der erste Druck größer als der

Umgebungsdruck und der zweite Druck größer als der erste Druck ist. Wenn die zweite Kammer auf Umgebungsdruck gebracht wird, drückt der erste Druck eine Flüssigkeitsprobe, die sich in der ersten Kammer befindet, in die zweite Kammer.

**[0015]** Nach einem alternativen Aspekt setzt das fluidische System eine Differenzdruck-Erzeugungsquelle auf, um die erste Kammer auf einem ersten Druck und die zweite Kammer auf einem zweiten Druck zu halten, wobei der zweite Druck kleiner als der Umgebungsdruck ist und der erste Druck kleiner als der zweite Druck. Wenn die erste Kammer auf Umgebungsdruck gebracht wird, zieht der zweite Druck eine Flüssigkeitsprobe, die sich in der ersten Kammer befindet, in die zweite Kammer.

**[0016]** Die vorliegende Erfindung stellt auch Verfahren zum Lenken, Steuern und Manipulieren von Flüssigkeiten in Miniatur- oder mikrofluidischen Systemen zur Verfügung.

**[0017]** Zum Beispiel kann nach einem Aspekt das vorliegende Miniaturfluidische System in einem Verfahren zum Lenken einer flüssigen Probe in einem Miniaturfluidischen System verwendet werden, wobei eine mikrogefestigte Vorrichtung mit wenigstens einer ersten und einer zweiten darin angeordneten Kammer bereitgestellt wird, wobei jede der ersten und zweiten Kammern in Fluidverbindung mit einer gemeinsamen Kammer oder einem gemeinsamen Kanal steht, wenigstens erste und zweite steuerbare Ventile, die über die Fluidverbindung angeordnet sind, und wenigstens eine Entlüftung aufweist. Das Verfahren umfasst die Anwendung eines positiven Druckes auf die gemeinsame Kammer oder den gemeinsamen Kanal. Das erste steuerbare Ventil wird selektiv geöffnet, wodurch der positive Druck die Fluidprobe aus der gemeinsamen Kammer oder dem gemeinsamen Kanal in die erste Kammer drückt.

**[0018]** Das Verfahren kann weiter die Anwendung eines positiven Druckes auf die erste Kammer und das selektive Öffnen des ersten steuerbaren Ventils beinhalten, wodurch der positive Druck die Fluidprobe aus der ersten Kammer in die gemeinsame Kammer oder den gemeinsamen Kanal drückt.

**[0019]** Das vorliegende Miniaturfluidische System kann auch in Verfahren zum Mischen von wenigstens zwei diskreten Flüssigkeitskomponenten in einem mikro-gefertigten fluidischen System verwendet werden. Speziell umfasst das Verfahren die Bereitstellung eines mikrogefertigten Kanals, der eine Lüftung angeordnet an einer mittleren Position in den Kanal aufweist. Typischerweise umfasst die Lüftung eine gasdurchlässige Flüssigkeitssperre, die über die Lüftung angeordnet ist. Dann werden wenigstens zwei diskrete Flüssigkeitskomponenten in den Kanal, getrennt durch eine Gasblase, eingeführt. Wenn die we-

nigstens zwei Flüssigkeitskomponenten vorbei an der Lüftung bewegt werden, tritt die Blase aus der Lüftung aus, was es ermöglicht, dass die wenigstens zwei Flüssigkeitskomponenten sich mischen.

#### KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0020]** [Fig. 1](#) zeigt eine schematische Darstellung eines Nukleinsäure-Diagnosesystems zur Analyse von Nukleinsäuren aus Proben.

**[0021]** [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) zeigen eine schematische Darstellungen von zwei anderen Reaktions-Kammeraufbauten in aufgeschnittener Ansicht.

**[0022]** [Fig. 3](#) zeigt eine schematische Darstellung einer integrierten Miniatur-Diagnosevorrichtung mit einer Anzahl von Reaktions-Kammern, die in Reihen-geometrie angeordnet sind.

**[0023]** [Fig. 4A-C](#) zeigen eine Darstellung einer Mikrokapillar-Elektrophorese-Vorrichtung. [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) zeigen die Mikrokapillaren ausgestaltet zum Ausführen alternativer Füllstrategien für die Mikrokapillaren, während [Fig. 4C](#) die Mikrokapillaren im Betriebszustand illustriert.

**[0024]** [Fig. 5A](#) illustriert eine Oberansicht einer integrierten Miniatur-Vorrichtung, die eine Zentralgeometrie einsetzt.

**[0025]** [Fig. 5B](#) zeigt eine Seitenansicht derselben Vorrichtung, wobei die zentrale Kammer eine Pump-Kammer ist und wobei Membranventilstrukturen zum Abdichten der Reaktions-Kammern verwendet werden.

**[0026]** [Fig. 6](#) zeigt schematische Illustrationen von pneumatischen Steuerverteilern zum Transportieren von Flüssigkeit der integrierten Miniatur-Vorrichtung. [Fig. 6A](#) zeigt eine Verteilergestaltung, die zur Anwendung von negativen Druck oder Unterdruck geeignet ist, während [Fig. 6B](#) eine Verteilergestaltung für positive Druckwerte zeigt. [Fig. 6C](#) illustriert ein Druckprofil zum Bewegen von Flüssigkeiten durch die verschiedenen Reaktions-Kammern.

**[0027]** [Fig. 7A](#) zeigt eine schematische Illustration einer Reaktions-Kammer, die ein PZT-Element zur Verwendung beim Mischen der Inhaltsstoffe der Reaktions-Kammer enthält. [Fig. 7B](#) zeigt das Mischen innerhalb einer Reaktions-Kammer unter Anwendung des PZT-Mischelements wie in [Fig. 7A](#) gezeigt. [Fig. 7C](#) ist ein Balkendiagramm, das einen Vergleich der Hybridisierungsintensitäten bei Anwendung von mechanischem Mischen, akustischem Mischen, stagnierender Hybridisierung und optimierter akustischer Mischung zeigt.

**[0028]** [Fig. 8](#) ist eine schematische Illustration einer

seitlichen und einer oberen Ansicht einer Basiseinheit zur Verwendung mit einer integrierten Miniatur-Vorrichtung.

**[0029]** [Fig. 9](#) ist ein Zeit-Temperatur-Profil von thermischen Zyklen in einer Miniatur-Reaktions-Kammer und eine Anzeige der programmierten Zyklusparameter.

**[0030]** [Fig. 10A](#) ist eine Gel-Aufnahme, die den Zeitverlauf einer RNA-Fragmentationsreaktion zeigt.

[Fig. 10B](#) ist eine Gel-Aufnahme, die einen Vergleich des Produkts einer in vitro-Transkriptionsreaktion in einer Mikro-Kammer gegenüber einer Kontrolle (Teströhrchen) zeigt. [Fig. 10C](#) ist ein Vergleich des PCR-Produkts, das in einer thermischen PCR-Zyklusvorrichtung erzeugt wurde und das in einem Mikroreaktor erzeugt wurde.

**[0031]** [Fig. 11](#) zeigt eine Ausführungsform einer Reaktions-Kammer, die ein elektronisches pH-Steuer-system einsetzt.

**[0032]** [Fig. 12A-C](#) zeigen schematische Darstellungen einer integrierten Miniatur-Vorrichtung, die ein pneumatisches Flüssigkeitsleitsystem unter Verwendung von Belüftungen, die durch gasdurchlässige Flüssigkeitssperren geschlossen sind, z.B. eine schlecht benetzbare oder hydrophobe Membran, und von pneumatisch gesteuerten Ventilen. [Fig. 12A](#) zeigt eine Ausführungsform einer einzelnen Kammer, die dieses System einsetzt. [Fig. 12B](#) ist eine schematische Darstellung einer Blasenablass-Kammer zum in Verbindung bringen von diskreten Flüssigkeitssäulen, die durch eine Gasblase getrennt sind, [Fig. 12C](#) illustriert schematisch dieses System in einer integrierten Vorrichtung, die viele Kammern hat, einschließlich einer Entgasungs-Kammer, einer Dosierungs- oder Volumen-Kammer, Speicher- und Reaktions-Kammern. [Fig. 12D](#) ist eine Illustration eines in Spritzguss hergestellten Substrats, das seine Ausführung des schematisch in [Fig. 12C](#) illustrierten Systems ist.

**[0033]** [Fig. 13](#) ist eine schematische Darstellung einer Vorrichtungsgestaltung zum Ausführen von generischen Probenvorbereitungsreaktionen.

**[0034]** [Fig. 14](#) ist eine schematische Darstellung einer Vorrichtungsgestaltung zum Ausführen von mehreren parallelen Reaktionen.

**[0035]** [Fig. 15](#) zeigt eine Demonstration von integrierten Reaktionen in einer mikrogefertigten Vorrichtung aus Polycarbonat, [Fig. 15A](#) zeigt den Aufbau der Vorrichtung einschließlich der thermischen Konfiguration der Vorrichtung. [Fig. 15B](#) zeigt die Resultate der PCR-Amplifikation und nachfolgender in vitro-Transkription innerhalb der Kammern der Vorrichtung.

## DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFIN- DUNG

### I. Allgemeines

**[0036]** Es ist eine allgemeine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, miniaturisierte integrierte Nukleinsäure-Diagnosevorrichtungen und -Systeme, die diese Vorrichtungen enthalten, zu schaffen. Die Vorrichtung der Erfindung ist allgemein dazu in der Lage, eine oder mehrere Probennahme- und -orbereitungsoperationen in Kombination mit einer oder mehreren Proben-Analyse-Operationen auszuführen. Zum Beispiel kann die Vorrichtung mehrere oder alle der Operationen innerhalb einer einzelnen miniaturisierten integrierten Einheit integrieren, die bei der Probennahme und -speicherung, Probenvorbereitung und Probenanalyse beteiligt sind. Die Vorrichtung ist nützlich für eine Vielzahl von Anwendungen und besonders für Diagnosenanwendungen auf Basis von Nukleinsäuren und de novo-Sequenzierungsanwendungen.

**[0037]** Die Vorrichtung der Erfindung wird typischerweise eine Komponente eines größeren Diagnosesystems sein, das weiter ein Lesegerät zum Abtasten und zur Aufnahme der Daten aus der Vorrichtung, und eine Schnittstelle auf Computerbasis zum Steuern der Vorrichtung und/oder zur Interpretation der aus der Vorrichtung abgeleiteten Daten.

**[0038]** Zur Ausführung ihrer Primärfunktion umfasst eine Ausführungsform der Vorrichtung der Erfindung typischerweise eine Vielzahl von verschiedenen Reaktions-Kammern zum Ausführen der Probennahme, -Vorbereitung und -analyse-Operationen. Insbesondere wird eine zu analysierende Probe in die Vorrichtung eingeführt, woraufhin sie in eine dieser verschiedenen Reaktions-Kammern geleitet wird, die zur Ausführung verschiedener Reaktionen als Vorbereitung der Analyse der Probe vorbereitet ist. Diese vorbereitenden Reaktionen umfassen im Allgemeinen, beispielsweise, Probenextraktion, PCR-Amplifikation, Nukleinsäurenfragmentation und Markierung, Extensionsreaktionen, Transkriptionsreaktionen und dergleichen.

**[0039]** Nach der Probenvorbereitung kann die Probe einer oder mehreren verschiedenen Analyse-Operationen unterzogen werden. Eine Vielzahl von Analyse-Operationen kann allgemein durchgeführt werden, einschließlich Analysen auf Größensbasis unter Verwendung von beispielsweise Mikrokapillar-Elektrophorese und/oder Sequenz-basierte Analysen unter Verwendung von beispielsweise der Hybridisierung auf einem Oligonukleotid-Array. Zusätzlich zu den verschiedenen Reaktions-Kammern wird die Vorrichtung im Allgemeinen eine Reihe von Flüssigkeitskanälen enthalten, die den Transport der Probe oder eines Teils davon zwischen den verschiede-

nen Reaktions-Kammern gestatten. Weitere Kammern und Komponenten können auch eingefügt werden, um Reagenzien, Puffer, Probenmanipulation, z.B. Mischen, Pumpen, Flüssigkeitslenkung (d.h. Ventile), Erwärmung und dergleichen zur Verfügung zu stellen.

### II. Integrierbare Tätigkeiten

#### A. Probenbeschaffung

**[0040]** Der Probensammlungs-Teil der erfindungsgemäßen Vorrichtung sorgt im Allgemeinen für die Identifizierung der Probe, wobei die Kontamination der Probe durch externe Elemente oder die Kontamination der Umgebung durch die Probe verhindert wird. Üblicherweise wird dies durch Einbringen einer Probe für die Analyse, z.B., eine zuvor amplifizierte Probe, Gewebe, Blut, Speichel, usw., direkt in eine Probensammlungs-Kammer innerhalb der Vorrichtung, durchgeführt. Üblicherweise kann das Verhindern einer Kreuzkontamination der Probe durch direktes Injizieren der Probe in die Probensammlungs-Kammer durch eine versiegelbare Öffnung erreicht werden, z.B. ein Injektionsventil oder ein Septum. Üblicherweise werden verschließbare Ventile bevorzugt, um jede potentielle Bedrohung eines Auslaufens während oder nach der Proben-Injektion zu reduzieren. Alternativ dazu kann die Vorrichtung für die direkte Beschaffung der Probe in die Proben-Kammer mit einer hypodermalen Nadel bereitgestellt werden, die in die Vorrichtung integriert ist und mit der Probensammlungs-Kammer verbunden ist. Dies kann die Gelegenheit zur Kontamination der Probe wesentlich reduzieren.

**[0041]** Zusätzlich zu dem oben Gesagten kann der Probensammlungsteil der Vorrichtung ferner Reagenzien und/oder Behandlungen zur Neutralisation von infektiösen Agenzien, zur Stabilisierung von Probenstücken und Proben, zur Anpassung des pH-Werts und Ähnlichem umfassen. Die Verfahren der Stabilisierung und pH-Anpassung können beispielsweise das Einbringen von Heparin umfassen, um das Verklumpen von Blutproben zu verhindern, sowie den Zusatz von puffernden Agenzien, den Zusatz von Protease- oder Nuklease-inhibitoren, Konservierungsmitteln und Ähnlichem. Solche Reagenzien können im Allgemeinen in der Probensammlungs-Kammer der Vorrichtung oder in einer separat zugänglichen Kammer gelagert werden, wobei die Reagenzien bei Einbringen der Probe in die Vorrichtung zu der Probe gegeben werden können oder mit der Probe vermischt werden können. Diese Reagenzien können in Abhängigkeit von der Natur und Stabilität des einzelnen verwendeten Reagenzes entweder in flüssiger oder lyophilisierter Form in die Vorrichtung inkorporiert werden.

## B. Proben-Präparation

**[0042]** Zwischen Einbringen der zu analysierenden Probe in die Vorrichtung und dem Analysieren dieser Probe, beispielsweise auf einem Oligonukleotid-Array, wird es oftmals erstrebenswert sein, eine oder mehrere Proben-Präparationstätigkeiten mit der Probe durchzuführen. Üblicherweise werden diese Proben-Präparationstätigkeiten solche Manipulationen wie die Extraktion von intrazellulärem Material, z.B. Nukleinsäuren, aus Proben ganzer Zellen, Viren und Ähnlichem, Amplifikation von Nukleinsäuren, Fragmentierung, Transkription, Markierung und/oder Extensionsreaktionen umfassen. Eine oder mehrere dieser verschiedenen Tätigkeiten können problemlos in die erfindungsgemäße Vorrichtung inkorporiert werden.

## C. DNA-Extraktion

**[0043]** Für diejenigen Ausführungsformen, in denen ganze Zellen, Viren oder andere Gewebe-Proben analysiert werden, wird es üblicherweise notwendig sein, Nukleinsäuren aus den Zellen oder Viren vor der Fortführung der verschiedenen Proben-Präparationstätigkeiten zu extrahieren. Demgemäß können Nukleinsäuren nach der Proben-Sammlung aus den gesammelten Zellen, der viralen Hülle usw. in ein ungereinigtes Extrakt freigesetzt werden, gefolgt von zusätzlichen Behandlungen, um die Probe für nachfolgende Tätigkeiten vorzubereiten, z.B. Denaturierung von kontaminierenden (DNA-bindenden) Proteinen, Reinigung, Filtration, Entsalzung und Ähnliches.

**[0044]** Die Freisetzung von Nukleinsäuren aus den Probenzellen oder Viren und die Denaturierung von DNA-bindenden Proteinen kann im Allgemeinen durch physische oder chemische Verfahren durchgeführt werden. Chemische Verfahren verwenden zum Beispiel im Allgemeinen lysierende Agenzien, um die Zellen aufzubrechen und die Nukleinsäuren aus den Zellen zu extrahieren, gefolgt von einer Behandlung des Extraktes mit chaotropischen Salzen, wie beispielsweise Guanidinium-Isothiocyanat oder Harnstoff, um jegliche kontaminierende und eventuell interferierende Proteine zu denaturieren. Wo chemische Extraktion und/oder Denaturierungs-Verfahren verwendet werden können die geeigneten Reagenzien im Allgemeinen in die Extraktions-Kammer imprägniert sein, in eine separat zugängliche Kammer inkorporiert sein oder können extern eingebracht werden.

**[0045]** Alternativ dazu können physikalische Verfahren verwendet werden, um die Nukleinsäuren zu extrahieren und DNA-bindende Proteine zu denaturieren. US-Patent Nr. 5,304,487 diskutiert die Verwendung von physikalischen Vorsprüngen in Mikrokanälen oder scharfkantigen Partikeln in einer Kammer

oder in einem Kanal, um Zellmembranen zu durchlöchern und ihre Inhalte zu extrahieren. Eine Kombination solcher Strukturen mit piezoelektrischen Elementen für die Bewegung kann für geeignete Scherkräfte für die Lyse sorgen. Solche Elemente werden nachfolgend detaillierter im Hinblick auf die Nukleinsäure-Fragmentierung beschrieben.

**[0046]** Herkömmlichere Verfahren der Zellextraktion können ebenfalls angewendet werden, z.B. die Verwendung eines Kanals mit eingeschränkter Querschnittsabmessung, der eine Zellyse verursacht, wenn die Probe mit ausreichendem Fließdruck durch den Kanal geleitet wird. Alternativ dazu kann die Zellextraktion und die Denaturierung von kontaminierenden Proteinen durch Anlegen eines elektrischen Wechselstromes an die Probe durchgeführt werden. Die Zell-Probe wird durch eine mikrotubuläre Anordnung geleitet, während ein elektrischer Wechselstrom über dem Flüssigkeitsstrom angelegt wird. Eine Vielzahl von anderen Verfahren kann auf die erfindungsgemäße Vorrichtung angewendet werden, um eine Zellyse/Extraktion zu bewirken, einschließlich, z.B. die Zellen einer Ultraschall-Behandlung unterziehen oder die Zellen durch mikrogeometrische Öffnungen zwingen, wobei die Zellen hoher Scherspannung unterworfen werden, was zu einem Zerreißen führt.

**[0047]** Nach der Extraktion wird es oftmals erstrebenswert sein, Nukleinsäuren von anderen Elementen des ungereinigten Extraktes zu trennen, z.B. von denaturierten Proteinen, Zellmembranpartikeln, Salzen und Ähnlichem. Das Entfernen von Partikel-Stoffen wird üblicherweise durch Filtration, Ausflocken oder Ähnlichem erreicht. Eine Vielzahl von Filter-Typen kann problemlos in die Vorrichtung inkorporiert werden. Wo chemische Denaturierungsverfahren angewendet werden, kann es ferner erstrebenswert sein, die Probe vor der Weiterbehandlung zu entsalzen. Das Entsalzen der Probe und die Isolierung der Nukleinsäure können im Allgemeinen in einem einzigen Schritt durchgeführt werden, z.B. mittels Bindung der Nukleinsäuren an eine Festphase und Abwaschen der kontaminierenden Salze oder durch Durchführung einer Gelfiltrationschromatographie mit der Probe, Durchleiten von Salzen durch Dialysemembranen und Ähnlichem. Geeignete feste Träger für die Bindung von Nukleinsäure umfassen z.B. Kieselrde, Silika (z.B. Glaswolle) oder Ähnliche. Geeignete Gelexklusions-Medien, die ebenfalls im Stand der Technik hinreichend bekannt sind, können ebenfalls problemlos in die erfindungsgemäßen Vorrichtungen inkorporiert werden und sind kommerziell erhältlich, z.B. von Pharmacia und Sigma Chemical.

**[0048]** Die Isolierung und/oder Gel-Filtration/Entsalzung kann in einer zusätzlichen Kammer durchgeführt werden, oder, alternativ dazu, können die jeweiligen chromatographischen Medien in einen Kanal

oder einen Fluid-Durchgang inkorporiert werden, der in eine nachfolgende Reaktions-Kammer führt. Alternativ dazu können die inneren Oberflächen von einem oder mehreren Fluid-Durchgängen oder Kammern ihrerseits derivatisiert sein, um funktionelle Gruppen für die gewünschte Reinigung bereitzustellen, z.B. geladene Gruppen, Affinitäts-Bindungs-Gruppen und Ähnliche, z.B. Poly-T-Oligonukleotide für die Reinigung von mRNA.

**[0049]** Alternativ dazu können Entsalzungs-Verfahren im Allgemeinen von der hohen elektrophoretischen Mobilität und der Negativität der DNA im Vergleich zu anderen Elementen profitieren. Elektrophoretische Verfahren können ebenfalls bei der Reinigung von Nucleinsäuren von anderen Zell-Kontaminanten und Trümmern verwendet werden. In einem Beispiel ist ein Trenn-Kanal oder eine Trenn-Kammer der Vorrichtung in Fluidkontakt mit zwei separaten "Feld"-Kanälen oder -Kammern, welche Elektroden aufweisen, z.B. darin angeordnete Platinelektroden. Die zwei Feld-Kanäle werden von dem Trenn-Kanal durch die Verwendung einer geeigneten Barriere oder "Auffang-Membran" getrennt, die den Durchgang von Strom erlaubt, ohne den Durchgang von Nucleinsäuren oder anderen großen Molekülen zu erlauben. Die Barriere hat im Allgemeinen zwei grundsätzliche Funktionen: zum einen hält die Barriere Nucleinsäuren zurück, die sich innerhalb der Trenn-Kammer auf die positiven Elektrode zu bewegen; zum zweiten halten die Barrieren die nachteiligen Effekte, die mit einer Elektrolyse an der Elektrode assoziiert sind, davon ab, in die Reaktions-Kammer einzutreten (z.B. die Wirkung als Salz-Brücke). Solche Barrieren können z.B. Dialysemembranen, dichte Gele, PEI-Filter oder andere geeignete Materialien umfassen. Bei Anlegen eines geeigneten elektrischen Feldes werden die in der Probe vorhandenen Nucleinsäuren sich auf die positive Elektrode zu bewegen und von der Auffang-Membran aufgefangen werden, Unreinheiten der Probe, die frei von der Membran verbleiben, werden anschließend durch Anwendung eines geeigneten Fluid-Flusses aus der Kammer gewaschen. Bei Umkehr der Spannung werden die Nucleinsäuren von der Membran in einer im wesentlichen reineren Form freigesetzt. Die Feld-Kanäle können auf derselben oder auf gegenüberliegenden Seiten oder Enden einer Trenn-Kammer oder eines Trenn-Kanals angeordnet sein, und sie können in Verbindung mit hier beschriebenen Misch-Elementen verwendet werden, um eine maximale Effizienz der Tätigkeit zu gewährleisten. Ferner können auch grobkörnige Filter auf die Barrieren aufgelegt werden, um jegliche Verkrustung der Barrieren durch Partikel-förmige Substanzen, Proteine oder Nucleinsäuren, zu verhindern, wodurch eine wiederholte Verwendung erlaubt wird.

**[0050]** Nach einem ähnlichen Gesichtspunkt kann die hohe elektrophoretische Mobilität von Nuclein-

säuren mit ihren negativen Ladungen dazu verwendet werden, um Nucleinsäuren von Kontaminanten durch Verwendung einer kurzen Säule eines Gels oder einer anderen geeigneten Matrix oder eines Gels zu trennen, das den Fluss von anderen Kontaminanten verlangsamt oder zurückhält, wohingegen es den schnellen Nucleinsäuren die Passage erlaubt.

**[0051]** Für eine Vielzahl von Anwendungen kann es erstrebenswert sein, Messenger-RNA aus Zellen, zellulären Trümmern und anderen Kontaminanten zu extrahieren und zu trennen. Die erfindungsgemäße Vorrichtung als solche kann in einigen Fällen eine mRNA-Reinigungs-Kammer oder einen mRNA-Reinigungskanal umfassen. Im Allgemeinen nutzt eine solche Reinigung die Poly-A-Schwänze einer mRNA. Wie oben erwähnt können insbesondere poly-T-Oligonukleotide in einer Kammer oder in einem Kanal der Vorrichtung immobilisiert werden, um als Affinitäts-Liganden für mRNA zu dienen. Poly-T-Oligonukleotide können auf einen festen Träger immobilisiert werden, der in die Kammer oder in den Kanal inkorporiert ist, oder alternativ dazu auf der (den) Oberfläche (n) der Kammer oder des Kanals selbst immobilisiert werden. Die Immobilisierung von Oligonukleotiden auf der Oberfläche der Kammer oder des Kanals kann mittels hier beschriebener Verfahren durchgeführt werden, einschließlich, z.B. Oxidation und Silanierung der Oberfläche, gefolgt von einer Standard-DMT-Synthese der Oligonukleotide.

**[0052]** Bei der Ausführung wird die lysierte Probe in einer hochkonzentrierten Salz-Lösung in diese Kammer oder diesen Kanal eingebracht, um die Innenstärke für die Hybridisierung zu erhöhen, wobei die mRNA daraufhin mit den immobilisierten Poly-T hybridisieren wird. Die Hybridisierung kann ferner durch Inkorporation von Misch-Elementen verstärkt werden, wie ebenfalls hier beschrieben wird. Nachdem ausreichend Zeit für die Hybridisierung vergangen ist, wird die Kammer oder der Kanal mit reiner Salzlösung gewaschen. Die an die immobilisierte Poly-T-Oligonukleotide gebundene mRNA wird dann durch Waschen mit einem Puffer von geringer Innenstärke freigesetzt. Der Oberflächenabschnitt, auf dem die Poly-T-Oligonukleotide immobilisiert sind, kann durch die Verwendung von geätzten Strukturen innerhalb der Kammer oder des Kanals, z.B. von Stegen, Furchen oder Ähnlichem erhöht werden. Solche Strukturen helfen ferner bei der Bewegung der Inhalte der Kammer oder des Kanals, wie hier beschrieben wird. Alternativ dazu können die Poly-T-Oligonukleotide auf porösen Oberflächen immobilisiert werden, z.B. auf porösem Silikon, auf Zeolith-Silika-Xerogelen, auf gesinterten Partikeln oder auf anderen festen Trägern.

#### D. Amplifikation und In Vitro-Transkription

**[0053]** Nach Probensammlung und Nucleinsäu-

re-Extraktion wird der Nukleinsäure-Anteil der Probe üblicherweise einer oder mehreren präparativen Reaktionen unterworfen. Diese präparativen Reaktionen umfassen in vitro-Transkription, Markierung, Fragmentierung, Amplifikation und andere Reaktionen. Die Nukleinsäure-Amplifikation erhöht die Anzahl der Kopien der Ziel-Nukleinsäure-Sequenz, die von Interesse ist. Eine Vielzahl von Amplifikationsverfahren sind zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Verfahren und der erfindungsgemäßen Vorrichtung geeignet, einschließlich z.B. das Polymerase-Ketten-Reaktions-Verfahren (PCR) oder die Ligate-Ketten-Reaktion (LCR), selbstunterhaltende Sequenzreplikation (3SR) und die Nukleinsäurebasierte Sequenzamplifikation (NASBA).

**[0054]** Die letzten beiden Amplifikationsverfahren umfassen auf isothermaler Transkription basierende isothermale Reaktionen, die sowohl einzelsträngige RNA (ssRNA) als auch doppelsträngige DNA (dsDNA) als Amplifikationsprodukte in einem Verhältnis von ungefähr jeweils 30 oder 100 zu 1 produzieren. Daraus folgt, dass sofern diese letztgenannten Verfahren verwendet werden, die Sequenzanalyse unter Verwendung von beiden Arten von Substrat, d.h. komplementär entweder zu DNA oder RNA verwendet werden können.

**[0055]** Unter besonders bevorzugten Gesichtspunkten wird der Amplifikationsschritt unter Verwendung von PCR-Verfahren ausgeführt, die im Stand der Technik hinreichend bekannt sind. Siehe PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. und White, T., Hrsg.) Academic Press (1990). Die PCR-Amplifikation umfasst im Allgemeinen die Verwendung eines Stranges der Ziel-Nukleinsäure-Sequenz als Matrize für die Erzeugung einer großen Anzahl von Komplementen zu dieser Sequenz. Im Allgemeinen hybridisieren zwei Primer-Sequenzen, die komplementär zu verschiedenen Enden eines Segmentes der komplementären Stränge der Ziel-Sequenz sind, mit ihren jeweiligen Strängen der Ziel-Sequenz, und in Gegenwart von Polymerase-Enzymen und Nukleosid-Triphosphaten werden die Primer entlang der Ziel-Sequenz verlängert. Die Verlängerungen werden von der Ziel-Sequenz geschmolzen und der Prozess wird wiederholt, dieses Mal mit den zusätzlichen Kopien der Ziel-Sequenz, die in den vorhergehenden Schritten synthetisiert wurden. Die PCR-Amplifikation umfasst üblicherweise wiederholte Zyklen von Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Extensions-Reaktionen, um ausreichende Mengen einer Ziel-Nukleinsäure zu erzeugen. Der erste Schritt eines jeden PCR-Zyklus umfasst die Trennung des Nukleinsäure-Duplex, das durch die Primer-Extension gebildet wurde. Wenn die Stränge einmal getrennt sind, umfasst der nächste Schritt der PCR die Hybridisierung der getrennten Stränge mit Primern, die die Ziel-Sequenz flankieren. Die Primer werden anschließend verlängert, wobei

komplementäre Kopien der Ziel-Stränge gebildet werden. Für eine erfolgreiche PCR-Amplifikation werden die Primer so konstruiert, dass die Position, an der jeder Primer entlang einer Duplex-Sequenz hybridisiert, dergestalt ist, dass ein Extensionsprodukt, das von einem Primer synthetisiert wurde, als Matrize für die Extension des anderen Primers dient, sobald er von der Matrize (Komplement) getrennt wird. Der Zyklus von Denaturierung, Hybridisierung und Extension wird so oft wie nötig wiederholt, um die gewünschte Menge von amplifizierter Nukleinsäure zu erhalten.

**[0056]** In PCR-Verfahren wird die Strang-Trennung normalerweise erreicht, indem man die Reaktion auf eine ausreichend hohe Temperatur für eine ausreichende Zeit erhitzt, um die Denaturierung des Duplex zu verursachen, jedoch keine irreversible Denaturierung des Polymerase-Enzyms zu verursachen (siehe US-Patent Nr. 4,965,188). Eine typische Hitze-Denaturierung umfasst Temperaturen, die von 80°C bis 105°C reichen, für einen Zeitraum, der von Sekunden bis Minuten reicht. Die Strang-Trennung jedoch kann durch jedes geeignete Denaturierungsverfahren, erreicht werden, einschließlich physikalische, chemische oder enzymatische Mittel. Die Strang-Trennung kann beispielsweise durch eine Helicase oder ein Enzym, welches in der Lage ist, eine Helicase-Aktivität zu zeigen, induziert werden. Das Enzym RecA weist beispielsweise Helicase-Aktivität in Gegenwart von ATP auf. Die Reaktionsbedingungen, die für die Strang-Trennung durch Helicasen geeignet sind, sind im Stand der Technik bekannt (siehe Kuhn Hoffman-Berling, 1978, CHS-Quantitative Biology, 43:63-67; und Radding, 1982, Ann. Rev. Genetics 16:405-436). Andere Ausführungsformen können eine Strang-Trennung durch Anlegen von elektrischen Feldern über der Probe erreichen. Die veröffentlichten PCT-Anmeldungs-Nrn. WO 92/04470 und WO 95/25177 wobei diese durch Verweis eingeschlossen sind, beschreiben elektrochemische Verfahren der Denaturierung von doppelsträngiger DNA durch Anlegen eines elektrischen Feldes eine DNA-erhaltende Probe. Anordnungen zur Durchführung dieser elektrochemischen Denaturierung umfassen eine Arbeits-Elektrode, eine Gegen-Elektrode und eine Referenz-Elektrode, die in einer Potentiostat-Anordnung über einer Reaktions-Kammer angeordnet sind (siehe veröffentlichte PCT-Anmeldungs-Nr. WO 92/04470 und WO 95/25177). Solche Vorrichtungen können problemlos für die Inkorporation in die erfindungsgemäßen Vorrichtungen unter Verwendung der hier beschriebenen Mikro-Fertigungsverfahren miniaturisiert werden.

**[0057]** Die Matrizen-abhängige Extension von Primern bei der PCR wird durch ein polymerisierendes Agens in Gegenwart von adequaten Mengen von mindestens 4 Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (üblicherweise ausgewählt aus dATP, dGTP, dCTP,

dUTP und dTTP) in einem Reaktionsmedium katalysiert, welches geeignete Salze, Metallkationen und ein pH-pufferndes System umfasst. Die Reaktionsbestandteile und Reaktionsbedingungen sind im Stand der Technik hinreichend bekannt (siehe PCR-Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. und White, T., Hrsg.) Academic Press (1990). Geeignete polymerisierende Agenzien sind Enzyme, von denen bekannt ist, dass sie die Matrizen-abhängige DNA-Synthese katalysieren.

**[0058]** Die veröffentlichte PCT-Anmeldungs-Nr., WO 94/05414, von Northrup and White, diskutiert die Verwendung einer Mikro-PCR-Kammer, die Mikroheizer und Mikropumpen in das thermale Cycling und Mischen während der PCR-Reaktionen einbezieht.

**[0059]** Die Amplifikations-Reaktionskammer der Vorrichtung kann eine abdichtbare Öffnung für die Zugabe von verschiedenen Amplifikations-Reagenzien umfassen. Unter bevorzugten Gesichtspunkten jedoch wird die Amplifikations-Kammer eine wirksame Menge der verschiedenen oben beschriebenen Amplifikations-Reagenzien aufweisen, verfügbar in der Amplifikations-Kammer oder in einer assoziierten Reagenz-Kammer, wobei die Reagenzien problemlos bei Beginn der Amplifikations-Tätigkeit in die Amplifikations-Kammer transportiert werden können. Mit "wirksame Menge" ist eine Menge und/oder Konzentration eines Reagenzes gemeint, die benötigt wird, um die Amplifikation der Ziel-Nukleinsäure-Sequenz durchzuführen. Diese Mengen sind problemlos anhand von bekannten PCR-Protokollen bestimmbar. Siehe z.B. Sambrook, et al. Molecular cloning: A Laboratory Manual, (2te Auflage), Bände 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989) und PCR Protocols: Guide to Methods and Applications (Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. und White, T., Hrsg.) Academic Press (1990). Für diejenigen Ausführungsformen, in denen die verschiedenen Reagenzien zu der Amplifikations- oder der benachbarten Kammer verfügbar sind, wird es oftmals erstrebenswert sein, dass diese Reagenzien in lyophilisierter Form vorliegen, um eine maximale Haltbarkeit der gesamten Vorrichtung zu gewährleisten. Das Einbringen der flüssigen Probe in die Kammer rekonstituiert anschließend die Reagenzien in aktiver Form, und die jeweiligen Reaktionen können durchgeführt werden.

**[0060]** Unter einigen Gesichtspunkten kann das Polymerase-Enzym in der Amplifikations-Kammer vorliegen, gekoppelt an einen geeigneten festen Träger, oder an die Wände und Oberflächen der Amplifikations-Kammer. Geeignete feste Träger umfassen diejenigen, die im Stand der Technik hinreichend bekannt sind, z.B. Agarose, Cellulose, Silika, Divinylbenzen, Polystyren usw. Es wurde berichtet, dass die Kopplung von Enzymen an feste Träger dem betreffenden Enzym Stabilität verleihen, die es erlaubt, das Enzym für Tage, Wochen oder sogar Monate ohne ei-

nen wesentlichen Verlust der Enzym-Aktivität zu lagern, und ohne die Notwendigkeit einer Lyophilisierung des Enzyms. Die 94 kd DNA-Polymerase aus einer Untereinheit von *Thermus aquaticus* (oder taq-Polymerase) ist besonders für die PCR-basierten Amplifikationsverfahren geeignet, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden, und ist im Allgemeinen kommerziell erhältlich, z.B. von Promega, Inc., Madison, WI. Insbesondere sind monoklonale Antikörper erhältlich, die das Enzym binden, ohne seine Polymerase-Aktivität zu beeinflussen. Somit kann das kovalente Anheften des aktiven Polymerase-Enzyms an einen festen Träger oder die Wände der Amplifikations-Kammer unter Verwendung des Antikörpers als ein Verbindungsmolekül zwischen dem Enzym und dem Träger durchgeführt werden.

**[0061]** Zusätzlich zu PCR- und IVT-Reaktionen sind die erfindungsgemäßen Verfahren und Vorrichtungen auch auf eine Anzahl von anderen Reaktionstypen anwendbar, z.B. reverse Transkription, Nick-Translation und ähnliche.

#### E. Markierung und Fragmentierung

**[0062]** Die Nukleinsäuren in einer Probe werden im Allgemeinen markiert sein, um den Nachweis in nachfolgenden Schritten zu ermöglichen. Die Markierung kann während der Amplifikations-, in vitro-Transkriptions- oder Nick-Translations-Verfahren durchgeführt werden, Amplifikation, in vitro-Transkription oder Nick-Translation können eine Markierung in die amplifizierte oder transkribierte Sequenz einbauen, entweder durch die Verwendung eines markierten Primers oder durch den Einbau von markierten dNTPs in die amplifizierte Sequenz.

**[0063]** Alternativ dazu können die Nukleinsäuren in der Probe nach der Amplifikation markiert werden. Die Post-Amplifikations-Markierung umfasst üblicherweise das kovalente Anheften einer besonders nachweisbaren Gruppe an die amplifizierte Sequenzen. Geeignete Markierungen oder nachweisbare Gruppen umfassen eine Vielzahl von fluoreszenten oder radioaktiv markierten Gruppen, die im Stand der Technik hinreichend bekannt sind. Diese Markierungen können ferner unter Verwendung von Verfahren, die im Stand der Technik hinreichend bekannt sind, an die Sequenzen gekoppelt werden. Siehe z.B. Sambrook, et al.

**[0064]** Des Weiteren können amplifizierte Sequenzen anderen post-Amplifikations-Behandlungen unterworfen werden. In einigen Fällen kann es beispielsweise erstrebenswert sein, die Sequenz vor der Hybridisierung mit einem Oligonukleotid zu fragmentieren, um Segmente bereitzustellen, die für die Sonden leichter zugänglich sind, was die Bildung von Schleifen und/oder die Hybridisierung an verschiedene Sonden verhindert. Die Fragmentierung der Nuk-

leinsäuren kann im Allgemeinen durch physikalische, chemische oder enzymatische Verfahren durchgeführt werden, die im Stand der Technik bekannt sind. Diese zusätzlichen Behandlungen können in der Amplifikations-Kammer oder, alternativ dazu, in einer getrennten Kammer durchgeführt werden. Physikalische Fragmentierungsverfahren können beispielsweise Schritte umfassen, bei denen die Nukleinsäure-enthaltende Probe über Vertiefungen oder Spitzen auf der Oberfläche einer Reaktions-Kammer oder eines Fluid-Kanals bewegt werden. Die Bewegung der flüssigen Probe in Kombination mit den Unregelmäßigkeiten der Oberfläche erzeugt eine hohe Seher-Rate, die zu einer Fragmentierung der Nukleinsäuren führt. Unter einem Gesichtspunkt kann dies wie hier beschrieben in einer Miniatur-Vorrichtung durch Platzierung eines piezoelektrischen Elementes, z.B. eines PZT-keramischen Elementes, neben einer Substrat-Schicht erreicht werden, die eine Reaktions-Kammer oder einen Fließ-Kanal entweder direkt oder durch eine Flüssigkeits-Schicht bedeckt. Die Substrat-Schicht hat in die Oberfläche eingearbeitet Vertiefungen, Spitzen oder Öffnungen, die innerhalb der Kammer oder des Fließ-Kanals liegen. Durch Betreiben des PZT-Elementes im Dicke-Modus wird eine stehende Welle innerhalb der Kammer errichtet, Kavitation und/oder Strömung innerhalb der Kammer resultieren in beträchtlichem Scheren. Ähnliche Seher-Raten können erreicht werden, indem man die Nukleinsäure-enthaltende Flüssigkeitsprobe durch Flüssigkeits-Durchgänge von beschränkter Größe zwingt, z.B. durch Öffnungen mit einer Querschnittsabmessung im Mikron- oder Submikron-Größenbereich, wodurch eine hohe Seher-Rate erzeugt und die Nukleinsäure fragmentiert wird.

**[0065]** Eine Vielzahl von Proben-Präparations-Tätigkeiten kann durch Anpassung des pH-Wertes der Probe durchgeführt werden, wie beispielsweise Zellyse, Nukleinsäure-Fragmentierung, Enzym-Denaturierung und Ähnliches. Die pH-Kontrolle kann gleichermaßen auch eine Rolle bei einer großen Vielzahl von anderen in der Vorrichtung auszuführenden Reaktionen spielen, z.B. für die Optimierung der Reaktionsbedingungen, neutralisierende Säure oder Basen-Zugaben, Denaturierung von exogenen eingebrachten Enzymen, Quenching-Reaktionen und Ähnliches. Ein solches Verfolgen des pH-Wertes und seine Kontrolle kann problemlos unter Verwendung hinreichend bekannter Verfahren erreicht werden. Beispielsweise kann der pH-Wert durch Einbau eines pH-Sensors oder -Indikators in eine bestimmte Kammer verfolgt werden. Die Kontrolle kann anschließend durch Titration der Kammer-Inhalte mit einer geeigneten Säure oder Base durchgeführt werden.

**[0066]** Unter einem alternativen Gesichtspunkt kann die Vorrichtung ein elektronisch kontrolliertes pH-System umfassen. Bei Betrieb wird eine Elektro-

de, z.B., in Fluidkontakt neben eine Reaktions-Kammer positioniert, während eine Gegen-Elektrode in eine zweite Kammer oder in einen zweiten Kanal positioniert wird, die (der) über ein Fluid mit der (dem) ersten verbunden ist. Bei Anlegen eines Stroms an diese Elektroden wird der pH-Wert der Reaktions-Kammer durch die Elektrolyse von Wasser an der Oberfläche der Elektrode, bei der Sauerstoff und Wasserstoff produziert werden, verändert. Ein pH-Sensor kann ebenfalls in der Reaktions-Kammer enthalten sein, um für das Verfolgen und/oder die rückgekoppelte Regelung des genauen pH-Wertes in der Kammer zu sorgen.

**[0067]** Ein Beispiel für eine Reaktions-Kammer, die ein elektronisches pH-Kontrollsystem verwendet, wird in [Fig. 11](#) gezeigt. Wie gezeigt wird umfasst eine Vorrichtung **1100**, die aus zwei planaren Bauteilen **1102** und **1104** gefertigt ist, drei verschiedene Kammern, eine Referenz-Kammer **1106**, eine Reaktions-Kammer **1108** und eine Kammer für die Gegen-Elektrode **1110**. Sowohl die Referenz-Kammer **1106** als auch die Kammer für die Gegen-Elektrode **1110** sind über ein Fluid mit der Reaktions-Kammer **1108** verbunden, z.B. über die Fluid-Durchgänge **1112** und **1114**. Diese Durchgänge sind üblicherweise durch eine geeignete Barriere **1116** blockiert, z.B. eine Dialysemembran, ein Gel-Pfropfen oder Ähnliches, um den elektrophoretischen Durchgang von Elementen der Probe zwischen den Kammern zu verhindern. Die Referenz-Kammer **1106** umfasst üblicherweise eine Referenz-Elektrode **1118**. Die Referenz-Elektrode kann z.B. aus einer Platin-, Gold- oder Nickel-Schicht, die mit einer Mischung aus Teflon und Platinmohr gepresst wird (Herstellung einer Wasserstoff-Elektrode), gefertigt werden. Die Reaktions-Kammer **1108** umfasst üblicherweise eine Elektrolyse-Elektrode **1120**, z.B. eine Platin-, Gold- oder Nickel-Schicht, die mit einer geeigneten Barriere, z.B. einer Polyacrylamid-Gel-Schicht beschichtet ist und eine Wasserstoff-Elektrode **1122**, die ebenfalls mit einer geeigneten Barriere geschützt ist. Die Referenz-Elektrode **1118** und die Wasserstoff-Elektrode **1122** sind an ein Elektrometer **1126** angeschlossen, um den pH-Wert in der Reaktions-Kammer zu verfolgen. Die Kammer für die Gegen-Elektrode **1110** umfasst üblicherweise eine Gegen-Elektrode **1123**, z.B. eine einzelne Platin-, Gold- oder Nickel-Elektrode. Die Elektrolyse-Elektrode und die Gegen-Elektrode sind an eine geeignete Spannungsquelle **1124** angeschlossen.

**[0068]** Bei Einbringen der Probe, z.B. einer Zellsuspension oder einer Nukleinsäure-haltigen Probe wird eine Spannung durch die Spannungsquelle angelegt. Die Elektrolyse an der Elektrolyse-Elektrode verändert den pH-Wert in der Reaktions-Kammer **1108**. Das Elektrometer vergleicht den pH-Wert, der durch die Spannung zwischen Referenz- und Wasserstoff-Elektroden gemessen wird. Dieses Signal kann

durch geeignete Mittel, z.B. einen geeignet programmierten Computer oder einen anderen Mikroprozessor **1128** mit einem Sollwert verglichen werden, und dazu verwendet werden, das Anlegen der Spannung zu kontrollieren. Das resultierende System erlaubt die automatische Kontrolle des pH-Wertes in der Reaktions-Kammer durch Veränderung des Sollwert-Signals.

## F. Proben-Analyse

**[0069]** Nach den verschiedenen Proben-Präparations-Tätigkeiten wird die Probe im Allgemeinen einer oder mehrerer Analyse-Tätigkeiten unterworfen. Besonders bevorzugte Analyse-Tätigkeiten umfassen z.B. Sequenz-basierte Analysen unter Verwendung eines Oligonukleotid-Arrays und/oder Größen-basierter Analysen unter Verwendung von z.B. Mikrokapillar-Array-Elektrophorese.

### 1. Oligonukleotid-Sonden-Array

**[0070]** Unter einem Gesichtspunkt wird die Nukleinsäure-Probe nach der Proben-Präparation unter Verwendung eines Arrays von Oligonukleotid-Sonden überprüft. Oligonukleotid-Arrays umfassen im Allgemeinen ein Substrat mit einer großen Zahl von positionell unterschiedlichen Oligonukleotid-Sonden, die an das Substrat gebunden sind. Diese Oligonukleotid-Arrays, die auch als <sup>®</sup>"Genechip-Arrays" beschrieben sind, sind im Stand der Technik beschrieben worden, beispielsweise in US-Patent Nr. 5,143,854 und in den PCT-Patent-Veröffentlichungs-Nrn. WO 90/15070 und 92/10092. Diese wegbereitenden Arrays können unter Verwendung von mechanischen oder Licht-gesteuerten Syntheseverfahren hergestellt werden, die eine Kombination von photolithographischen Verfahren und Verfahren der Festphasen-Oligonukleotidsynthese einbeziehen. Siehe Fodoi et al., Science, 251:767-777 (1991), Pirrung et al., US-Patent Nr. 5,143,854 (siehe auch PCT-Anmeldungs-Nr, WO 90/15070) und Fodor et al., PCT-Veröffentlichungs-Nr. WO 92/10092. Diese Literaturverweise offenbaren Verfahren zur Herstellung von großen Arrays aus Peptiden, Oligonukleotiden und anderen Polymer-Sequenzen, wobei beispielsweise Lichtgesteuerte Syntheseverfahren verwendet werden. Verfahren zur Synthese dieser Arrays unter Verwendung mechanischer Synthesestrategien werden beispielsweise in PCT-Veröffentlichungs-Nr. 93/09668 und US-Patent Nr. 5,384,261 beschrieben. Das Einarbeiten dieser Arrays in mittels Spritzgussverfahren hergestellte Gehäuse wurde in der veröffentlichten PCT-Anmeldungs-Nr. 95/33846 beschrieben.

**[0071]** Die grundlegende Strategie für die Licht-gesteuerte Synthese von Oligonukleotid-Arrays ist die Folgende. Die Oberfläche eines festen Trägers, der mit photosensitiven Schutzgruppen modifiziert ist,

wird durch eine photolithographische Maske angestrahlt, was zu reaktiven Hydroxyl-Gruppen in den angestrahlten Bereichen führt. Ein ausgewähltes Nukleotid, üblicherweise in Form eines 3'-O-Phosphoramidit-aktivierten Desoxynukleosids (an seiner 5'-Hydroxyl-Gruppe mit einer photosensitiven Schutzgruppe geschützt) wird anschließend der Oberfläche präsentiert, und es erfolgt eine Kopplung an den Stellen, die dem Licht ausgesetzt waren. Nach Capping und Oxidation wird das Substrat gespült und die Oberfläche wird durch eine zweite Maske angestrahlt, um zusätzliche Hydroxyl-Gruppen für die Kopplung zu exponieren. Ein zweites ausgewähltes Nukleotid (z.B. 5'-geschütztes 3'-O-Phosphoramidit-aktiviertes Desoxynukleosid) wird der Oberfläche präsentiert. Die Zyklen der selektiven Entfernung des Schutzes und der Kopplung werden wiederholt, bis die gewünschte Gruppe von Produkten erhalten wird. Da Photolithographie verwendet wird, kann das Verfahren problemlos miniaturisiert werden, um Arrays aus Oligonukleotid-Sonden von hoher Dichte zu erzeugen. Des Weiteren ist die Sequenz der Oligonukleotide an jeder Stelle bekannt. Siehe Pease, et al. Verfahren der mechanischen Synthese sind den Licht-gesteuerten Verfahren ähnlich, außer dass sie eine mechanische Richtungsgebung von Fluiden für die Entfernung des Schutzes und die Addition bei den Syntheseschritten umfassen.

**[0072]** Üblicherweise werden die Arrays, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, eine Stellen-Dichte von größer als 100 verschiedene Sonden pro cm<sup>2</sup> aufweisen. Vorzugsweise werden die Arrays eine Stellen-Dichte von größer als 500/cm<sup>2</sup> aufweisen, besonders bevorzugt größer als etwa 1.000/cm<sup>2</sup> und ganz besonders bevorzugt größer als etwa 10.000/cm<sup>2</sup>. Vorzugsweise werden die Arrays mehr als 100 verschiedene Sonden auf einem einzelnen Substrat aufweisen, besonders bevorzugt mehr als etwa 1.000 verschiedene Sonden und noch mehr bevorzugt mehr als etwa 10.000 verschiedene Sonden und ganz besonders bevorzugt mehr als 100.000 verschiedene Sonden auf einem einzelnen Substrat aufweisen.

**[0073]** Für einige Ausführungsformen können Oligonukleotid-Arrays hergestellt werden, die alle möglichen Sonden einer gegebenen Länge aufweisen. Solche Arrays können in solchen Gebieten wie beispielsweise Sequenzierung oder Sequenz-Überprüfungs-Anwendungen verwendet werden, was wesentliche Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren bietet. Die Verwendung von Oligonukleotid-Arrays in solchen Anwendungen wird beispielsweise in US-Patent-anmeldungs-Seriennummer 08/515,919, eingereicht am 24. Juli 1995 (US-A-5 968 740) und in US-Patentanmeldungs-Seriennummer 08/284,064 (WO-A-97 434450), eingereicht am 2. August 1994 beschrieben. Diese Verfahren verwenden üblicherweise eine Gruppe von kurzen Oligonukleotid-Son-

den definierter Sequenz, um nach komplementären Sequenzen auf einem längeren Ziel-DNA-Strang zu suchen. Die Hybridisierungsmuster der Ziel-Sequenz auf dem Array wird verwendet, um die Ziel-DNA-Sequenz zu rekonstruieren. Die Hybridisierungsanalyse einer großen Anzahl von Sonden kann verwendet werden, um lange DNA-Abschnitte zu sequenzieren.

**[0074]** Eine Strategie der de novo-Sequenzierung lässt sich durch das folgende Beispiel illustrieren. Eine 12-mer Ziel-DNA-Sequenz wird auf einem Array mit einer vollständigen Gruppe von Octanukleotid-Sonden überprüft. Fünf der 65.536 Octamer-Sonden werden perfekt mit der Ziel-Sequenz hybridisieren. Die Identität der Sonden ist an jeder Stelle bekannt. Daher kann man die Sequenz der Ziel-Sequenz bestimmen, indem man die Orte bestimmt, an denen das Ziel auf dem Array hybridisiert, oder das Hybridisierungsmuster bestimmt. Während diese Strategien vorgeschlagen und in einigen Anmeldungen genutzt worden sind, gab es Schwierigkeiten beim Nachweis der Sequenzierung von längeren Nukleinsäuren unter Verwendung der gleichen Strategien. Unter bevorzugten Gesichtspunkten verwenden demgemäß SBH-Verfahren, die die hier beschriebenen Vorrichtungen verwenden, sowohl Daten von fehlgepaarten als auch von perfekt passenden Sonden, um nützliche Sequenzdaten zu liefern, wie in US-Patentanmeldungs-Nr. 08/505,919 (US-A-5 968 740) beschrieben wird.

**[0075]** Während Oligonukleotid-Sonden mit jeder möglichen Sequenz der Länge  $n$  hergestellt werden können, wird es oftmals bei der Ausführung der vorliegenden Erfindung erstrebenswert sein, einen Oligonukleotid-Array bereitzustellen, der spezifisch und komplementär zu einer besonderen Nukleinsäure-Sequenz ist. Unter besonders bevorzugten Gesichtspunkten wird der Oligonukleotid-Array beispielsweise Oligonukleotid-Sonden umfassen, die komplementär zu spezifischen Ziel-Sequenzen sind, sowie individuelle oder multiple Mutationen derselben. Solche Arrays sind insbesondere nützlich bei der Diagnose von spezifischen Erkrankungen, die durch das Vorhandensein einer besonderen Nukleinsäure-Sequenz charakterisiert sind. Beispielsweise kann die Target-Sequenz die eines besonderen, exogenen krankheitsverursachenden Agens sein, z.B. Humanes Immun-Defizienzvirus (siehe US-Anmeldungs-Seriennummer 08/284,064, oder, alternativ dazu kann die Ziel-Sequenz derjenige Anteil des humanen Genoms sein, von dem bekannt ist, dass er in Fällen einer bestimmten Erkrankung mutiert ist, d.h. Sichelzellenanämie (siehe z.B. US-Anmeldungs-Seriennummer 08/082,937) oder cystische Fibröse).

**[0076]** In einer solchen Anwendung umfasst der Array im Allgemeinen mindestens 4 Gruppen von Oligonukleotid-Sonden, in der Regel mit einer Länge von etwa 9 bis etwa 21 Nukleotiden. Eine erste Son-

den-Gruppe weist eine Sonde auf, die jedem Nukleotid in der Ziel-Sequenz entspricht. Eine Sonde ist mit ihrem entsprechenden Nukleotid verwandt, indem sie zu einer Untersequenz der Ziel-Sequenz, die das entsprechende Nukleotid umfasst, exakt komplementär ist. Daher weist jede Sonde eine Position auf (als Interrogations-Position bezeichnet), die von einem zu dem entsprechenden Nukleotid in der Ziel-Sequenz komplementären Nukleotid besetzt ist. Die drei zusätzlichen Sonden-Gruppen haben jeweils eine entsprechende Sonde für jede Sonde in der ersten Sonden-Gruppe, substituieren jedoch die Interrogations-Position mit den drei anderen Nukleotiden. Demgemäß gibt es für jedes Nukleotid in der Ziel-Sequenz vier entsprechende Sonden, eine aus jeder der Sonden-Gruppen. Die drei entsprechenden Sonden in den drei zusätzlichen Sonden-Gruppen sind identisch mit der entsprechenden Sonde aus der ersten Sonde oder einer Untersequenz derselben, die die Interrogations-Position umfasst, außer dass die Interrogations-Position in jeder der vier entsprechenden Sonden durch ein unterschiedliches Nukleotid besetzt ist.

**[0077]** Manche Arrays haben fünfte, sechste, siebte und achte Sonden-Gruppen. Die Sonden in jeder Gruppe werden durch analoge Prinzipien zu denjenigen für die Sonden in den ersten vier Sonden-Gruppen ausgewählt, außer dass die Sonden der fünften, sechsten, siebten und achten Gruppe Komplementärität zu einer zweiten Referenzsequenz zeigen. In manchen Arrays ist die erste Gruppe von Sonden komplementär zu dem kodierenden Strang der Ziel-Sequenz, während die zweite Gruppe komplementär zu dem nicht-kodierenden Strang ist. Alternativ dazu kann die zweite Referenzsequenz eine Untersequenz der ersten Referenzsequenz mit einer Substitution von mindestens einem Nukleotid sein.

**[0078]** In manchen Anwendungen weist die Ziel-Sequenz relativ zu der Sonden-Sequenz ein substituiertes Nukleotid in mindestens einer unbestimmten Position auf, und die relative spezifische Bindung der Sonden verweist auf den Ort der Position und das Nukleotid, das die Position in der Ziel-Sequenz besetzt.

**[0079]** Nach Amplifikation und/oder Markierung wird die Nukleinsäure-Probe mit dem Oligonukleotid-Array in der Hybridisierungs-Kammer inkubiert. Die Hybridisierung zwischen der Nukleinsäure der Probe und den Oligonukleotid-Sonden auf dem Array wird anschließend nachgewiesen, z.B. unter Verwendung von Epifluoreszenz-Konfokalmikroskopie. Üblicherweise wird die Probe während der Hybridisierung gemischt, um die Hybridisierung von Nukleinsäuren in der Probe mit Nukleinsäure-Sonden auf dem Array zu verstärken. Das Mischen kann wiederum durch die hier beschriebenen Verfahren durchgeführt werden, z.B. durch Verwendung piezoelektrischer Ele-

mente, durch elektroforetische Verfahren oder durch physikalisches Mischen durch das Pumpen von Fluiden in und aus der Hybridisierungs-Kammer, d.h. in eine angrenzende Kammer. Im Allgemeinen wird die Nachweis-Tätigkeit unter Verwendung einer Lese-Vorrichtung durchgeführt werden, die sich außerhalb der Diagnose-Vorrichtung befindet. Es kann jedoch in manchen Fällen erstrebenswert sein, die Daten-sammelnde Tätigkeit in die diagnostische Vorrichtung selbst einzubauen.

**[0080]** Die Hybridisierungsdaten werden als nächstes analysiert, um das Vorhandensein oder das Fehlen einer besonderen Sequenz in der Probe zu bestimmen oder, um durch Analyse von multiplen Hybridisierungen die Sequenz der Ziel-Nukleinsäure unter Verwendung der bereits beschriebenen SBH-Verfahren zu bestimmen.

**[0081]** In einigen Fällen können die hybridisierten Oligonukleotide nach der Hybridisierung markiert werden. Wo beispielsweise Biotin-markierte dNTPs verwendet werden, z.B. bei der Amplifikation oder Transkription, können Streptavidin-gebundene Reporter-Gruppen verwendet werden, um hybridisierte Komplexe zu markieren. Solche Tätigkeiten können problemlos in die Systeme der vorliegenden Erfindung integriert werden.

## 2. Kapillar-Elektrophorese

**[0082]** In einigen Ausführungsformen kann es wünschenswert sein, zusätzliche oder alternative Maßnahmen zum Analysieren der Nukleinsäuren aus der Probe zur Verfügung zu stellen. In einer Ausführungsform umfasst die Vorrichtung der Erfindung optional oder zusätzlich ein Mikrokapillar-Array zur Analyse von aus der Probe erhaltenen Nukleinsäuren.

**[0083]** Mikrokapillar-Array-Elektrophorese beinhaltet die Verwendung von dünnen Kapillaren oder Kanälen, die mit einem bestimmten Separationsmedium gefüllt sein können oder nicht. Die Elektrophorese einer Probe durch die Kapillaren liefert ein Größenbasiertes Trennungsprofil für die Probe. Die Anwendung von Mikrokapillar-Elektrophorese bei der Größentrennung von Nukleinsäuren wurde z.B. in Woolley und Mathias, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (1994) 91:11348-11352 berichtet. Die Mikrokapillar-Array-Elektrophorese bietet im Allgemeinen ein schnelles Verfahren für die größenbasierte Sequenzierung, PCR-Produktanalyse und Restriktionsfragmentgrößenbestimmung. Das hohe Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis dieser Kapillaren erlaubt die Anwendung höherer elektrischer Felder über die Kapillaren ohne wesentliche thermische Variation über die Kapillaren, und erlaubt folglich schnellere Trennungen. Ferner liefern diese Verfahren, wenn mit konfokalen Bildgebungsverfahren kombiniert, Empfindlichkeit im Attomol-Bereich, was vergleichbar mit der Empfind-

lichkeit von radioaktiven Sequenzierungsverfahren ist.

**[0084]** Die Mikrofertigung von mikrofluidischen Vorrichtungen mit Mikrokapillar-Elektrophoresevorrichtungen wurde detailliert z.B. von Jacobsen et al. diskutiert, Anal. Chem. (1994), 66:1114-1118, von Effenhauser et al., Anal. Chem. (1994) 66:2949-2953, von Harrison et al., Science (1993) 261:895-897, von Effenhauser et al., Anal. Chem. (1993) 65:2637-2642, und von Manz et al., J. Chromatog. (1992) 593:253-258. Typischerweise umfassen diese Verfahren photolithographisches Ätzen von Kanälen im Mikrometermaßstab auf einem Substrat aus Siliciumdioxid, Silicium oder einem anderen festen Substrat oder Chip, und können einfach angepasst werden zur Anwendung auf die miniaturisierten Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung. In einigen Ausführungsformen können die Kapillar-Arrays aus den gleichen Polymermaterialien gefertigt werden, die für die Herstellung des Körpers der Vorrichtung beschrieben wurden, unter Verwendung von ihren beschriebenen Spritzgusstechniken. In solchen Fällen können die Kapillaren und die anderen Flüssigkeitskanäle in ein erstes ebenes Element geformt werden. Ein zweites dünnes Polymer teil mit Anschlüssen entsprechend den Enden der darauf angeordneten Kapillarkanäle, wird auf das erste Polymerteil aufgelegt oder durch Ultraschallschweißen geschweißt, um eine Deckfläche für diese Kanäle zu bilden, Elektroden für die elektrophoretische Steuerung werden innerhalb dieser Anschlüsse/Vertiefungen angeordnet, um elektrischen Strom auf die Kapillarkanäle anzuwenden. Durch Verwendung eines relativ dünnen Plättchens als Deckteil der Kapillarkanäle kann während der Elektrophorese erzeugte Wärme schnell abgeführt werden. Zusätzlich können die Kapillarkanäle mit thermisch besser leitfähigem Material, z.B. Glas oder Keramik, beschichtet werden, um die Wärmeabfuhr zu verbessern.

**[0085]** Bei vielen Kapillar-Elektrophoreseverfahren sind die Kapillaren, z.B. Quarz-Kapillaren oder Kanäle, die in ebene Substrate geätzt, eingearbeitet oder gegossen sind, mit einer geeigneten trennenden/siebenden Matrix gefüllt. Eine Vielzahl von Siebmatrizen sind im Stand der Technik bekannt und können in Mikrokapillar-Arrays verwendet werden. Beispiele für solche Matrizen umfassen z.B. Hydroxyethylcellulose, Polyacrylamid, Agarose und dergleichen, Gel-Matrizen können in den Kapillarkanal eingeführt und darin polymerisiert werden. In einigen Fällen kann das jedoch zum Einschluss von Blasen innerhalb der Kanäle führen, was die Probenentrennungen stören kann. Demgemäß ist es oft wünschenswert, eine vorgefertigte Trennungsmatrix in dem oder den Kapillarkanälen zu plazieren, bevor die ebenen Elemente des Kapillarteils zusammengefügt werden. Das Verbinden der beiden Teile, z.B. durch Ultraschallschweißen, fixiert die Matrix permanent inner-

halb des Kanals. Die Polymerisation außerhalb der Kanäle hilft dabei sicherzustellen, dass keine Blasen gebildet werden. Ferner hilft der Druck des Schweißvorgangs dabei, sicherzustellen, dass ein System ohne Hohlräume gebildet wird. Allgemein werden die spezifische Gel-Matrix, die verwendeten Puffer und die Betriebsbedingungen so ausgewählt, um die Trennungseigenschaften für die bestimmte Anwendung zu maximieren, z.B. die Größe der Nukleinsäurefragmente, die erforderliche Auflösung und das Vorhandensein von nativen oder nicht-denaturierten Nukleinsäuremolekülen. Die verwendeten Puffer können z.B. Denaturierungsmittel, chaotrope Agenzien wie etwa Harnstoff oder dergleichen aufweisen, um die Nukleinsäuren in der Probe zu denaturieren.

**[0086]** Zusätzlich zu ihrer Anwendung in "Fingerprinting" für Nukleinsäuren und anderen Größen-basierten Analysen können die Kapillar-Arrays auch in Sequenzierungsanwendungen angewendet werden. Insbesondere können Sequenzierungstechniken auf Gel-Basis leicht für die Kapillar-Array-Elektrophorese angepasst werden. Zum Beispiel kann die Kapillar-Elektrophorese mit Didesoxy-Kettenabbruchs-Sequenzierungsverfahren nach Sanger kombiniert werden, wie in Sambrook et al., diskutiert (siehe auch Brenner et al., Proc. Nat'l Acad. Sci (1989), 86:8902-8906). Bei diesen Verfahren wird die Proben-Nukleinsäure in Gegenwart von fluoreszierenden Didesoxynukleosid-Triphosphaten in einer Extensions-Reaktion amplifiziert. Der zufällige Einbau von Didesoxymikletiden beendet Transkription der Nukleinsäure. Dies führt zu einer Verteilung von Transkriptionsprodukten, die sich voneinander durch eine einzelne Base unterscheiden. Komparative Größen-basierte Trennung erlaubt dann die Bestimmung der Sequenz der Nukleinsäure auf Grundlage des letzten einzubauenden Didesoxynukleotids.

#### G. Datensammlung und -Analyse

**[0087]** Die Sammlung von Daten aus den verschiedenen Analyse-Operationen, z.B. von Oligonukleotid- und/oder Mikrokapillar-Arrays, wird typischerweise unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Verfahren ausgeführt. Zum Beispiel können die Arrays unter Verwendung von Lasern abgetastet werden, um mit Fluoreszenzmarkierungen versehene Ziele anzuregen, die an Regionen des Proben-Arrays hybridisiert wurden, deren Bild dann unter Verwendung von Charged Coupled Devices ("CCDs") für eine Wide-Field-Abtastung des Arrays aufgenommen wird. Alternativ ist ein anderes besonders nützliches Verfahren zum Sammeln von Daten von den Arrays die Anwendung von Laser-gestützter konfokaler Mikroskopie, die die Einfachheit und Geschwindigkeit eines leicht automatisierbaren Prozesses mit der Detektierung mit hoher Auflösung kombiniert. Besonders bevorzugte Abtastgeräte sind allgemein beispielsweise in US-Patent Nr. 5,143,854 und

5,424,186 beschrieben.

**[0088]** Nach der Datensammlungs-Operation werden die Daten typischerweise an eine Datenanalyse-Operation weitergeleitet. Um die Proben-Analyse-Operation zu erleichtern, werden die durch das Lesegerät von der Vorrichtung gesammelten Daten typischerweise unter Verwendung eines Digitalcomputers analysiert. In typischen Fällen ist der Computer geeignet für die Aufnahme und die Speicherung der Daten von der Vorrichtung wie auch für die Analyse und die Meldung der gesammelten Daten geeignet programmiert, d.h. zum Interpretieren der Fluoreszenzdaten zur Bestimmung der Sequenz von Hybridisierungs- und/oder Trennungsinformation, die auf der Vorrichtung vorhanden ist, zu detektieren. Die Hybridisierungs- und/oder Trennungsdaten werden dann von dem Lesegerät an einen Computer 6 gemeldet, der mit geeigneter Software zur Interpretation der von dem Lesegerät von der diagnostischen Vorrichtung erhaltenen Daten programmiert ist. Die Interpretation der Daten von der diagnostischen Vorrichtung kann in einer Vielzahl von Wegen angewendet werden, einschließlich Nukleinsäuresequenzierung, die auf ein bestimmtes Krankheitsverursachendes Agens gerichtet ist, wie etwa Virus- oder Bakterieninfektionen, z.B. AIDS, Malaria etc., oder auf genetische Krankheiten, z.B. Sichelzellenanämie, zystische Fibröse, Fragiles X Syndrom, Duchenne-Muskeldystrophie und dergleichen. Alternativ kann die Vorrichtung bei de novo-Sequenzierungen eingesetzt werden, um Nukleinsäuresequenzen einer vorher unbekanntes Sequenz zu identifizieren.

### III. Nukleinsäurediagnosesystem

#### A. Analysesystem

**[0089]** Eine schematische Repräsentation eines analytischen Systems auf Basis der Vorrichtung der Erfindung ist in [Fig. 1](#) gezeigt. Das System umfasst die Diagnose Vorrichtung 2, die eine oder mehrere Operationen von Probensammlung, Probenvorbereitung und/oder Probenanalyse unter Verwendung von beispielsweise Hybridisierung und/oder größenbasierter Trennung ausführt. Die diagnostische Vorrichtung wird dann in einem Lesegerät 4 platziert, um die Hybridisierungs- und/oder Trennungsinformation, die auf der Vorrichtung vorhanden ist, zu detektieren. Die Hybridisierungs- und/oder Trennungsdaten werden dann von dem Lesegerät an einen Computer 6 gemeldet, der mit geeigneter Software zur Interpretation der von dem Lesegerät von der diagnostischen Vorrichtung erhaltenen Daten programmiert ist. Die Interpretation der Daten von der diagnostischen Vorrichtung kann in einer Vielzahl von Wegen angewendet werden, einschließlich Nukleinsäuresequenzierung, die auf ein bestimmtes Krankheitsverursachendes Agens gerichtet ist, wie etwa Virus- oder Bakterieninfektionen, z.B. AIDS, Malaria etc., oder auf genetische Krankheiten, z.B. Sichelzellenanämie, zystische Fibröse, Fragiles X Syndrom, Duchenne-Muskeldystrophie und dergleichen. Alternativ kann die Vorrichtung bei de novo-Sequenzierungen eingesetzt werden, um Nukleinsäuresequenzen einer vorher unbekanntes Sequenz zu identifizieren.

#### B. Die Diagnosevorrichtung

##### 1. Allgemeines

**[0090]** Wie oben beschrieben ist die Vorrichtung der

vorliegenden Erfindung allgemein zum Ausführen einer Anzahl von präparativen und analytischen Reaktionen an einer Probe in der Lage. Um dieses Ziel zu erreichen, weist die Vorrichtung allgemein eine Anzahl von diskreten Reaktions-, Speicher- und/oder Analyse-Kammern auf, die innerhalb einer einzelnen Einheit oder einem Körper angeordnet sind. Während die Vorrichtung hier als Diagnosevorrichtung bezeichnet wird, werden Fachleute anerkennen, dass die Vorrichtung der Erfindung eine Vielzahl von Anwendungen außerhalb der Diagnostik hat. Solche Anwendungen können Sequenzierungsanwendungen, Probenidentifizierungs- und Charakterisierungsanwendungen (z.B. für taxonomische Studien, gerichtliche Anwendungen, d.h. kriminaltechnische Untersuchungen und dergleichen) umfassen.

**[0091]** Typischerweise definiert der Körper der Vorrichtung die verschiedenen Reaktions-Kammern und Flüssigkeitsdurchgänge in denen die oben beschriebenen Operationen ausgeführt werden. Die Herstellung des Körpers und daher der verschiedenen Kammern und Kanäle, die in dem Körper angeordnet sind, kann allgemein unter Verwendung von einer oder einer Kombination von mehreren wohl bekannten Herstellungstechniken und -materialien ausgeführt werden. Das Material, aus dem der Körper hergestellt wird, wird allgemein so ausgewählt, um eine maximale Widerstandsfähigkeit über einen ganzen Bereich von Bedingungen zu bieten, denen die Vorrichtung ausgesetzt sein wird, z.B. Temperaturextremen, Salz, pH, Anwendung von elektrischen Feldern und dergleichen, und wird auch im Hinblick auf die Kompatibilität mit anderen in der Vorrichtung verwendeten Materialien ausgewählt. Zusätzliche Komponenten können später, wenn notwendig, in den Körper eingeführt werden. Alternativ kann die Vorrichtung aus einer Mehrzahl von einzelnen Teilen gebildet werden, die später zusammengebaut oder zusammengefügt werden. Zum Beispiel können getrennte und individuelle Kammern und Flüssigkeitsdurchgänge zusammengesetzt werden, um die verschiedenen Kammern der Vorrichtung bereitzustellen.

**[0092]** Als eine miniaturisierte Vorrichtung wird der Körper der Vorrichtung typischerweise eine Länge von etwa 1 bis 20 cm und eine Breite von etwa 1 bis 10 cm und eine Höhe von etwa 0,1 bis 2 cm haben. Obwohl dies auf eine rechteckige Form hinweist, wird einfach zu erkennen sein, dass die Vorrichtung der Erfindung in einer Anzahl von Formen abhängig von den speziellen Bedürfnissen ausgeführt werden kann. Außerdem werden diese Dimensionen typischerweise abhängig von der Anzahl der durch Vorrichtung durchzuführenden Operationen, der Komplexität der Operationen und dergleichen variieren. Infolgedessen sind diese Dimensionen als allgemeine Angabe der Größe der Vorrichtung angegeben. Die Anzahl und die Größe der Reaktions-Kammern, die in der Vorrichtung enthalten sind, wird auch ab-

hängig von der spezifischen Anwendung, für die die Vorrichtung benutzt werden soll, variieren. Allgemein wird die Vorrichtung wenigstens zwei separate Reaktions-Kammern haben, vorzugsweise wenigstens drei, vier oder fünf verschiedene Reaktions-Kammern, die alle innerhalb eines einzigen Körpers integriert sind. Die individuellen Reaktions-Kammern werden in Größe und Form auch gemäß ihrer spezifischen Funktion variieren. Zum Beispiel können in einigen Fällen kreisförmige Reaktions-Kammern eingesetzt werden. Alternativ können längliche Reaktions-Kammern verwendet werden. Im Allgemeinen werden die Reaktions-Kammern jedoch von etwa 0,05 bis etwa 20 mm in der Breite oder im Durchmesser, vorzugsweise von etwa 0,1 oder 0,5 bis etwa 20 mm in Breite oder Durchmesser, und etwa 0,05 bis etwa 5 mm tief, vorzugsweise 0,05 bis etwa 1 mm tief sein. Bei länglichen Kammern wird die Länge typischerweise innerhalb derselben Bereiche variieren. Flüssigkeitskanäle unterscheiden sich auf der anderen Seite typischerweise von Kammern darin, dass sie kleinere Dimensionen relativ zu Kammern haben und werden typischerweise eine Breite im Bereich von 10 bis 1,000  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 100 bis 500  $\mu\text{m}$  haben und eine Tiefe von 1 bis 500  $\mu\text{m}$ . Obwohl die Beschreibung ausdrücklich Reaktions-Kammern betrifft, wird zu erkennen sein, dass diese Kammern eine Anzahl von verschiedenen Funktionen ausführen können, z.B. als Speicher-Kammern, Inkubations-Kammern, Misch-Kammern und dergleichen.

**[0093]** In einigen Fällen kann eine separate Kammer oder separate Kammern als volumetrische Kammern verwendet werden, z.B. um Flüssigkeitsvolumina zur Einführung in eine nachfolgende Reaktions-Kammer präzise abzumessen. In solchen Fällen wird das Volumen der Kammer durch den Volumenbedarf einer gegebenen Reaktion diktiert. Ferner kann die Vorrichtung so hergestellt werden, um einen Bereich von volumetrischen Kammern mit verschiedenen, aber bekannten Volumina oder Volumenverhältnissen (z.B. in Vergleich zu einer Reaktions-Kammer oder anderen volumetrischen Kammern) zu haben.

**[0094]** Wie oben beschrieben kann der Körper der Vorrichtung hergestellt werden, indem eine oder mehrere aus einer Vielzahl von Verfahren und Materialien angewendet werden, die für Mikrofertigungstechniken geeignet sind. Zum Beispiel kann in bevorzugten Aspekten der Körper der Vorrichtung eine Anzahl von ebenen Teilen aufweisen, die individuelle Spritzgussteile sind, die aus einer Vielzahl von Polymermaterialien hergestellt sind, oder aus Silicium, Glas oder dergleichen bestehen. Im Fall von Substraten aus Siliciumdioxid, Glas oder Silicium können Verfahren zum Ätzen, Fräsen, Bohren etc. angewendet werden, um Ausnehmungen und Vertiefungen zu erzeugen, die die verschiedenen Reaktions-Kammern und Flüssigkeitskanäle innerhalb der Vorrich-

tung bilden. Mikrofertigungstechniken wie sie regelmäßig in der Halbleiter und Mikroelektronikindustrie angewendet werden, sind besonders für diese Materialien und Verfahren geeignet. Diese Techniken umfassen z.B. die elektrolytische Abscheidung, Dampfabscheidung bei niedrigem Druck, Photolithographie, chemisches Nass-Ätzen, reaktives Ionenätzen (RIE), Laser-Bohren und dergleichen. Wenn diese Verfahren angewendet werden, wird es im Allgemeinen wünschenswert sein, die ebenen Teile der Vorrichtung aus Materialien herzustellen, die denen in der Halbleiterindustrie verwendeten ähnlich sind, d.h. Siliciumdioxid-, Silicium-, Galliumarsenid-, Polyimid-Substrate. US-Patent Nr. 5,252,294 von Kroy et al. berichtet über die Fertigung eines Geräts mit einer Vielzahl von Vertiefungen zur Handhabung von Proben auf Siliciumbasis für biotechnologische Anwendungen.

**[0095]** Photolithographische Verfahren zum Ätzen von Substraten sind besonders gut für die Mikrofertigung dieser Substrate geeignet und sind in der Technik gut bekannt. Zum Beispiel kann die erste Schicht des Substrats mit einem Photowiderstand überschichtet werden. Eine elektromagnetische Strahlungsquelle kann dann durch eine photolithographische Maske strahlen, um den Photowiderstand in einem Muster zu belichten, das das Muster der Kammern und/oder Kanäle auf der Oberfläche der Schicht widerspiegelt. Nach Entfernen des belichteten Photowiderstands kann das belichtete Substrat geätzt werden, um die gewünschten Vertiefungen und Kanäle zu erzeugen. Im Allgemeinen bevorzugte Photowiderstände enthalten diejenigen, die in großem Umfang in der Halbleiterindustrie verwendet werden. Solche Materialien umfassen Polymethacrylat (PMMA) und dessen Derivate und Elektronenstrahlwiderstände wie Polyolefin-Sulfone und dergleichen (vollständig diskutiert beispielsweise in Ghani, "VLSI Fabrication Principles", Wiley (1983), Kapitel 10).

**[0096]** Beispielsweise bilden die in die Oberfläche des einen ebenen Teils eingearbeiteten Vertiefungen die verschiedenen Reaktions-Kammern der Vorrichtung. Die in die Oberfläche dieses oder eines anderen ebenen Teils eingearbeiteten Kanäle bilden die Flüssigkeitskanäle, die dazu verwendet werden, um die verschiedenen Reaktions-Kammern zum Durchfluss zu verbinden. Ein anderes ebenes Teil wird dann über das erste gelegt und damit verbunden, wodurch die Vertiefungen in dem ersten ebenen Teil Hohlräume innerhalb des Körpers der Vorrichtung definieren, wobei die Hohlräume die verschiedenen Reaktions-Kammern der Vorrichtung sind. In ähnlicher Weise bilden die Flüssigkeitskanäle, die in die Oberfläche des einen ebenen Teils eingearbeitet sind, wenn letzteres mit einem zweiten ebenen Teil bedeckt ist, Flüssigkeitsdurchgänge durch den Körper der Vorrichtung. Diese ebenen Teile werden miteinander verbunden oder laminiert, um einen flüssig-

keitsdichten Vorrichtungskörper zu schaffen. Das Verbinden der ebenen Teile der Vorrichtung kann im Allgemeinen unter Verwendung einer Vielzahl von in der Technik bekannten Verfahren durchgeführt werden, wobei die Verfahren abhängig von den verwendeten Materialien variieren können. Zum Beispiel können im Allgemeinen Klebstoffe verwendet werden, um die ebenen Teile miteinander zu verbinden. In Fällen, in denen die ebenen Teile beispielsweise aus Glas, Silicium oder Kombinationen daraus bestehen, können thermisches Verbinden, anodische/elektrostatische Verfahren oder Silicium-Schmelzverbindungsverfahren angewendet werden. Für Teile aus Polymermaterial kann ebenfalls eine Vielzahl von Verfahren eingesetzt werden, um die Substrateile miteinander zu verbinden, z.B. Erwärmung mit Druck, Verbinden auf Lösungsmittelbasis. Im Allgemeinen sind akustische Schweißtechniken bevorzugt. In einem anderen Aspekt können Klebebänder eingesetzt werden als ein Element der Vorrichtung, die eine dünne Wand der Strukturen aus Reaktions-Kammern und Kanälen bilden.

**[0097]** Obwohl die oben beschriebenen Verfahren vornehmlich in Bezug auf die Herstellung eines vollständig integrierten Körpers der Vorrichtung beschrieben wurden, können die Verfahren auch zur Fertigung von individuellen einzelnen Komponenten der Vorrichtung angewendet werden, die später zu dem Körper der Vorrichtung zusammengebaut werden.

**[0098]** In zusätzlichen Ausführungsformen kann der Körper eine Kombination von Materialien und der oben beschriebenen Fertigungstechniken umfassen. In einigen Fällen kann der Körper einige Teile aus Spritzgusskunststoff und dergleichen enthalten, während andere Bereiche des Körpers geätztes Siliciumdioxid oder ebene Siliciumteile und dergleichen aufweisen können. Zum Beispiel können Spritzguss-techniken verwendet werden, um eine Anzahl von diskreten Hohlräumen in einer ebenen Oberfläche zu bilden, die die verschiedenen Reaktions-Kammern definieren, während weitere Komponenten, z.B. Flüssigkeitskanäle, Arrays, etc. auf einem ebenen Glas, Siliciumdioxid oder Siliciumchip oder Substrat gefertigt werden können. Die Übereinanderschichtung eines Satzes von Teilen mit dem anderen wird dann zur Bildung der verschiedenen Reaktions-Kammern führen, die durch geeignete Flüssigkeitskanäle verbunden sind.

**[0099]** In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist der Körper der Vorrichtung aus wenigstens einem Spritzguss-, Druckguss-Polymermaterial oder einem bearbeiteten Polymermaterial hergestellt, das ein oder mehrere Vertiefungen oder Ausnehmungen in seiner Oberfläche gefertigt hat, um die Mehrzahl von Wänden der Reaktions-Kammer oder Reaktions-Kammern zu definieren. Gussformen oder Guss-

formflächen zur Herstellung dieser Spritzgussteile können im Allgemeinen unter Verwendung Verfahren hergestellt werden, die hierin für beispielsweise Siliciumformen beschriebenen sind. Beispiele für geeignete Polymermaterialien für den Spritzguss oder Bearbeitung umfassen Polycarbonat, Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen, Acryl und kommerziellen Polymere wie Kapton, Valox, Teflon, ABS, Delrin und dergleichen. Ein zweites Teil, das von ähnlicher ebener Form ist, wird mit der Oberfläche des Polymerteils zusammengeführt, um die übrige Wand der Reaktions-Kammern) zu definieren. Die veröffentlichte PCT-Anmeldung Nr. 95/33846 beschreibt eine Vorrichtung, die dazu verwendet wird, um individuelle Oligonukleotid-Arrays zu verpacken. Die Vorrichtung umfasst eine Hybridisierungskammer, die innerhalb eines ebenen Körpers angeordnet ist. Die Kammer ist mit einem Einlassanschluss und einem Auslassanschluss über Durchflusskanäle in dem Vorrichtungskörper zum Durchfluss verbunden. Der Körper enthält eine Mehrzahl von ebenen Spritzgussteilen, die zusammengefügt sind, um den Vorrichtungskörper zu bilden, und die die Durchflusskanäle und die Hybridisierungskammer definieren.

**[0100]** Die Oberflächen der Flüssigkeitskanäle und der Reaktions-Kammern, die mit den Proben und Reagenzien in Berührung kommen, können auch modifiziert sein, um die gewünschte Reaktion zu unterstützen. Die Oberflächen können stärker hydrophobisch oder stärker hydrophil, abhängig von der bestimmten Anwendung, gemacht werden. Alternativ können die Oberflächen mit einer Anzahl von Materialien beschichtet werden, um das Gesamtsystem mit den ausgeführten Reaktionen besser verträglich zu machen. Zum Beispiel kann es im Fall von Nukleinsäureanalysen wünschenswert sein, die Oberflächen beispielsweise mit Teflon oder einer anderen Antihafbeschichtung zu beschichten, um die Adhäsion von Nukleinsäuren an der Oberfläche zu verhindern. Außerdem können Isolationsbeschichtungen in solchen Fällen wünschenswert sein, in denen elektrische Leiter in Kontakt mit Flüssigkeiten platziert sind, um Kurzschlüsse zu vermeiden oder übermäßige Gasbildung aus Elektrolyse. Solche Isolatoren können die in der Technik wohl bekannten umfassen, beispielsweise Siliciumoxid, Keramik oder dergleichen. Weitere Oberflächenbehandlungen werden unten genauer beschrieben.

**[0101]** [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) zeigt eine schematische Darstellung einer Ausführung einer Reaktions-Kammer zum Einbau in die Vorrichtung der Erfindung. Die Reaktions-Kammer weist ein bearbeitetes oder Spritzguss-Polymerteil **102** auf, das eine in seiner Oberfläche erzeugte Vertiefung **104** hat, die durch Bearbeitung oder Gießen erzeugt ist. Diese Vertiefung kann an dem der Vertiefungsöffnung gegenüberliegenden Ende geschlossen sein, wie in [Fig. 2A](#) gezeigt, oder optional mit einer weiteren Öffnung **118**

zum Vorsehen einer Lüftung versehen sein, wie in [Fig. 2B](#) gezeigt.

**[0102]** Die Reaktions-Kammer ist auch mit zusätzlichen Elementen versehen, um eine Flüssigkeitsprobe in die Reaktions-Kammer hinein und heraus zu transportieren. Diese Elemente umfassen einen oder mehrere Flüssigkeitskanäle (**122** und **110** in [Fig. 2A](#) und [B](#)), die die Reaktions-Kammer mit einem Einlass/Auslass-Anschluss für die Gesamtvorrichtung, weiteren Reaktions-Kammern, Speicher-Kammern oder einer oder mehreren Analyse-Kammern verbinden.

**[0103]** Ein zweites Teil **124**, typischerweise mit ebener Struktur, wird mit dem Polymerteil zusammengefügt, um einen Verschluss für die Reaktions-Kammer zu bilden. Dieses zweite Teil kann die Flüssigkeitskanäle enthalten wie in [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) gezeigt, oder kann einfach nur eine weitere Wand für die Flüssigkeitskanäle definieren, die in der Oberfläche des ersten Polymerteils (nicht gezeigt) gebildet sind. Typischerweise weist das zweite Teil eine Reihe von Flüssigkeitskanälen hergestellt in einer seiner Oberflächen auf, um die Reaktions-Kammer mit einem Einlassanschluss der Gesamtvorrichtung oder mit einer anderen Reaktions- oder Analyse-Kammer zum Durchfluss zu verbinden. Wiederum kann das zweite Polymerteil durch Spritzguss- oder Bearbeitungstechniken hergestellt sein. Alternativ kann dieses zweite Teil aus einer Vielzahl anderer Materialien hergestellt sein, einschließlich Glas, Siliciumdioxid, Silicium oder andere kristalline Substrate. Mikrofertigungstechniken, die für diese Substrate geeignet sind, sind in der Technik gut bekannt und oben beschrieben.

**[0104]** In einer ersten bevorzugten Ausführungsform ist die Reaktionskammer ohne Einlass/Auslass-Ventilstruktur vorgesehen, wie in [Fig. 2A](#) gezeigt. Für diese Ausführungsformen können die Fluidkanäle **122** in der Oberfläche des zweiten Teils vorgesehen sein, das mit der Oberfläche des Polymerteils zusammengesetzt wird, so dass durch das Zusammensetzen des zweiten Teils und des ersten Polymerteils der Fluidkanal **122** fluidmäßig mit der Reaktionskammer **104** verbunden wird.

**[0105]** Alternativ kann die Reaktions-Kammer in einer bevorzugten Ausführungsform mit einer Einlass/Auslass-Ventilstruktur zum Abdichten der Reaktions-Kammer, um eine Flüssigkeitsprobe darin zurückzuhalten, versehen sein. Ein Beispiel einer solchen Ventilstruktur ist in [Fig. 2B](#) gezeigt. Insbesondere kann das mit dem Polymerteil zusammengefügte zweite Teil **124** eine Mehrzahl verbundener ebener Teile aufweisen, wobei ein erstes ebenes Teil **106** mit dem ersten Polymerteil **102** zusammengefügt ist, um eine Wand der Reaktions-Kammer zu definieren. Das erste ebene Teil **106** hat eine hindurchgehende Öff-

nung **108**, die einen Einlass zu der Reaktions-Kammer definiert. Dieses erste ebene Teil umfasst auch einen Flüssigkeitskanal **110**, der in die Oberfläche geätzt ist, die der mit dem ersten Polymerteil **102** zusammengefügte Oberfläche gegenüberliegt. Der Flüssigkeitskanal endet angrenzend an, aber nicht innerhalb des Einlasses **108** der Reaktions-Kammer. Das erste ebene Teil wird im Allgemeinen aus irgendeinem der oben beschriebenen Materialien hergestellt, unter Verwendung der oben beschriebenen Verfahren. Ein zweites ebene Teil **112** ist mit dem ersten verbunden und weist ein Membranventil **114** auf, das sich über den Einlass **108** erstreckt und mit dem Flüssigkeitskanal **110** überlappt, so dass eine Wölbung der Membran zu einem Zwischenraum zwischen dem ersten und zweiten ebenen Teil führt, wodurch eine Strömungsverbindung zwischen der Reaktions-Kammer **104** und dem Flüssigkeitskanal **110** durch den Einlass **108** erzeugt wird. Die Wölbung des Membranventils kann durch eine Vielzahl von Verfahrenswegen bewirkt werden, zum Beispiel Anwenden eines Unterdrucks, Anwenden von elektromagnetischen und/oder piezoelektrischen Stellgliedern, die mit dem Membranventil verbunden sind, und dergleichen. Um eine auswölbare Membran zu ermöglichen, wird das zweite ebene Teil typischerweise wenigstens teilweise aus einem flexiblen Material hergestellt, beispielsweise Silicium, Silikon, Latex, Mylar, Polyimid, Teflon oder andere flexible Polymere. Wie die Reaktions-Kammern und Durchflusskanäle sind auch diese Membranen im Miniaturgrößenmaßstab. Insbesondere werden die in der Vorrichtung verwendeten Ventil- und Pumpmembranen in einem Größenbereich liegen, der von der Größe der Kammer oder des Flüssigkeitsdurchgangs abhängt, mit dem sie zum Durchfluss verbunden sind. Im Allgemeinen werden diese Membranen in einem Größenbereich von etwa 0,5 bis etwa 5 mm für Ventilmembranen und von etwa 1 bis etwa 20 mm Durchmesser für Pumpmembranen liegen. Wie in **Fig. 2**, enthält das zweite Teil **124** ein zusätzliches ebene Teil **116** mit einer Öffnung **126** zur Anwendung von Druck oder Unterdruck zur Aufwölbung des Ventils **114**.

**[0106]** In Fällen, in denen an einer bestimmten Analyse beteiligte Reagenzien nicht mit den zur Herstellung der Vorrichtung verwendeten Materialien, beispielsweise Silicium oder Glas oder Polymerteile, verträglich sind, kann eine Vielzahl von Beschichtungen auf die Oberflächen dieser Teile, die in Kontakt mit diesen Reagenzien kommen, aufgebracht werden. Zum Beispiel können Komponenten, die Siliciumelemente haben, mit einer Siliciumnitridschicht beschichtet werden, oder eine metallische Schicht, beispielsweise aus Gold oder Nickel, kann durch Sputtern oder durch Galvanisieren auf die Oberfläche aufgebracht werden, um die nachteiligen Reaktionen mit diesen Reagenzien zu vermeiden. In ähnlicher Weise können inerte Polymerbeschichtungen,

z.B. aus Teflon und dergleichen, Pyralin-Beschichtungen oder Oberflächensilanmodifizierungen auf die inneren Oberflächen der Kammern und/oder Kanäle aufgebracht werden.

**[0107]** Die Reaktions-/Speicher-Kammer **104**, die in **Fig. 2B** gezeigt ist, ist auch mit einer optionalen Lüftung **118** zum Ablassen von in der Kammer vorhandenen Gas, das, wenn die Flüssigkeit eingeführt wird, verdrängt wird. In bevorzugten Aspekten kann diese Lüftung mit einer gasdurchlässigen Flüssigkeitssperre **120** versehen sein, die den Durchgang von Gas erlaubt, ohne den Durchgang von Flüssigkeit zuzulassen, z.B. ein schwer benetzbarer Filterstopfen. Zur Verwendung als schwer benetzbarer Filterstopfen ist eine Reihe von Materialien geeignet, einschließlich beispielsweise porösen, hydrophoben Polymermaterialien, wie etwa gesponnene Fasern aus Acryl, Polycarbonat, Teflon, gepresste Polypropylenfasern oder irgendeiner aus einer Anzahl kommerziell verfügbarer Filterstopfen (American Filtrona Corp., Richmond, VA, Gelman Science usw.). Alternativ kann eine hydrophobe Membran über einem Loch angebracht werden, um eine ähnliche Struktur zu liefern. Modifizierte Acryl-Copolymer-Membranen sind kommerziell erhältlich beispielsweise von Gelman Science (Ann Arbor, MI), und teilchenspurgeätzte Polycarbonatmembranen sind von Poretics, Inc. (Livermore, CA) erhältlich. Lüftungen für geheizte Kammern können Sperren gegen die Verdampfung der Probe beinhalten, z.B., eine Rückfluss-Kammer oder eine Mineralölschicht, die in der Kammer und über der oberen Oberfläche der Probe angeordnet ist, um die Entwicklung von Gas zuzulassen, während übermäßige Verdampfung von Flüssigkeit aus der Probe verhindert wird.

**[0108]** Wie hierin beschrieben kann die Gesamtgeometrie der Vorrichtung der Erfindung eine Anzahl von Formen annehmen. Zum Beispiel kann die Vorrichtung eine Mehrzahl von Reaktions-Kammern, Speicher-Kammern und Analyse-Kammern enthalten, die in Reihe zueinander angeordnet sind, wodurch eine Fluidprobe aufeinanderfolgend seriell durch die Kammern bewegt wird und die jeweiligen Operationen in diesen Kammern ausgeführt werden. Alternativ kann die Vorrichtung einen zentralen Flüssigkeitsverteilungskanal oder eine zentrale Flüssigkeitsverteilungskammer beinhalten, um die die verschiedenen Reaktions-/Speicher-/Analyse-Kammern angeordnet sind, die in Strömungsverbindung mit dem zentralen Kanal oder der zentralen Kammer verbunden sind, wobei der zentrale Kanal oder die zentrale Kammer als Leitung oder Knotenpunkt für die Weiterverteilung der Probe an die verschiedenen Kammern wirkt.

**[0109]** Ein Beispiel der seriellen Geometrie der Vorrichtung ist in **Fig. 3** gezeigt. Insbesondere enthält die dargestellte Vorrichtung eine Vielzahl von Reakti-

ons-/Speicher-/Analyse-Kammern zum Ausführen einer Anzahl von den oben beschriebenen Operationen, wobei die Kammern in Reihe zum Durchfluss verbunden sind.

**[0110]** Die schematische Darstellung der Vorrichtung in [Fig. 3](#) zeigt eine Vorrichtung, die mehrere Reaktions-Kammern aufweist, die in einer seriellen Geometrie angeordnet sind. Insbesondere umfasst der Körper der Vorrichtung **200** die Reaktions-Kammern **202**, **206**, **210**, **214** und **218**. Diese Kammern sind durch Flüssigkeitskanäle **208**, **212** und **216** zum Durchfluss in Reihe verbunden.

**[0111]** Bei der Ausführung der oben angedeuteten, verschiedenen Operationen, sind jeder dieser Reaktions-Kammern eine oder mehrere verschiedene Funktionen zugeordnet. Zum Beispiel kann die Reaktions-Kammer **202** eine Proben-Sammel-Kammer sein, die zur Aufnahme einer flüssigen Probe angepasst ist, d.h. einer Zellen enthaltenden Probe. Zum Beispiel kann diese Kammer eine Öffnung zum Äußeren der Vorrichtung haben, die zur Aufnahme der Probe angepasst ist. Die Öffnung enthält typischerweise einen abdichtbaren Verschluss, um ein Auslecken der Probe zu verhindern, z.B. ein Ventil, ein Rückschlagventil, oder ein Septum, durch die die Probe eingeführt oder injiziert wird. In einigen Ausführungsformen kann der Apparat eine hypodermische Nadel oder eine andere Probenleitung enthalten, die in den Vorrichtungskörper integriert ist und in Durchflussverbindung mit der Proben-Sammel-Kammer steht, um die Probe von einem Wirtstier, einem Patienten, einem Probenfläschchen oder einem Probenröhrchen oder einem anderen Ursprung der Probe zu der Proben-Sammel-Kammer zu leiten.

**[0112]** Außerdem kann die Proben-Sammel-Kammer darin angeordnet ein Reagenz oder Reagenzien für die Stabilisierung der Probe für eine längere Speicherung enthalten, wie oben beschrieben. Alternativ können die Reagenzien in einer Reagenzspeicher-Kammer angrenzend an und in Strömungsverbindung mit der Proben-Sammel-Kammer platziert sein.

**[0113]** Die Proben-Sammel-Kammer ist über einen ersten Flüssigkeitskanal **204** mit einer zweiten Reaktions-Kammer **206** verbunden, in der die Extraktion der Nukleinsäuren aus den Zellen in der Probe ausgeführt wird. Dies ist besonders für Analyse-Operationen geeignet, die in Fällen auszuführen sind, in denen die Proben ganze Zellen enthalten. Die Extraktions-Kammer ist typischerweise mit der Proben-Sammel-Kammer verbunden; in einigen Fällen kann die Extraktions-Kammer jedoch in die Proben-Sammel-Kammer integriert sein und als ein Bereich der Proben-Sammel-Kammer vorliegen. Wie zuvor beschrieben kann die Extraktions-Kammer physikalische oder chemische Mittel zum Extrahieren der Nukleinsäuren aus Zellen enthalten. Die Extrakti-

ons-Kammer ist über einen zweiten Flüssigkeitskanal **208** in Strömungsverbindung mit der dritten Reaktions-Kammer **210** verbunden, in der die Amplifizierung der aus der Probe extrahierten Nukleinsäuren durchgeführt wird. Der Amplifizierungsprozess beginnt, wenn die Probe in die Amplifizierungs-Kammer eingeführt wird. Wie zuvor beschrieben können Amplifizierungsreagenzien von außen eingeführt werden oder können vorzugsweise in der Reaktions-Kammer vorab eingelagert sein. Jedoch können diese Reagenzien in alternativen Ausführungsformen aus einer optionalen angrenzenden Reagenzien-Kammer in die Amplifizierungs-Kammer oder aus einer externen Quelle durch eine abdichtbare Öffnung in die Amplifizierungs-Kammer eingeführt werden.

**[0114]** Für PCR-Amplifizierungsverfahren werden Denaturierungs- und Hybridisierungszyklen vorzugsweise durch wiederholtes Erwärmen und Kühlen der Probe durchgeführt. Demgemäß werden Amplifizierungs-Kammern auf PCR-Basis typischerweise eine Temperaturregeleinrichtung zum Erwärmen der Reaktion enthalten, um die thermischen Zyklen auszuführen. Beispielsweise kann ein Heizelement oder ein Temperaturregelblock angrenzend an die äußere Oberfläche der Amplifizierungs-Kammer angeordnet sein, um dadurch Wärme in die Amplifizierungs-Kammer zu übertragen. In diesem Fall enthalten bevorzugte Vorrichtungen eine dünne Außenwand für solche Kammern, in denen eine thermische Regelung gewünscht ist. Diese dünne Wand kann ein dünnes Deckelement, z.B. ein Polycarbonat-Blatt oder ein Hochtemperaturband, d.h. Silikonklebstoff auf Kapton-Band (kommerziell erhältlich beispielsweise durch 3M Corporation). Über PCR-Vorrichtungen im Mikro-Maßstab wurde zuvor berichtet. Beispielsweise berichtet die veröffentlichte PCT-Anmeldung WO 94/05414 von Northrup und White über eine miniaturisierte Reaktions-Kammer zur Verwendung als PCR-Kammer, die Mikroheizungen, beispielsweise Widerstandsheizungen, enthält. Das hohe Wandflächen-zu-Volumen-Verhältnis der Kammer ermöglicht eine sehr schnelle Erwärmung und Abkühlung der darin befindlichen Reagenzien. In ähnlicher Weise diskutiert auch US-Patent 5,304,487 von Wilding et al. die Verwendung einer mikrofertigten PCR-Vorrichtung.

**[0115]** In bevorzugten Ausführungsformen enthält die Amplifizierungs-Kammer eine regelbare Heizung, die innerhalb oder angrenzend an die Amplifizierungs-Kammer angeordnet ist, um die thermischen Zyklen der Probe zu durchlaufen. Das Durchlaufen der thermischen Zyklen wird durch Variieren des der Heizung zugeführten Stroms durchgeführt, um die für eine bestimmte Stufe der Reaktion erwünschte Temperatur zu erreichen. Alternativ kann das Durchlaufen der thermischen Zyklen für die PCR-Reaktion erreicht werden, indem die flüssige Probe durch eine Anzahl von verschiedenen Reaktions-Kammern oder

-Regionen der gleichen Reaktions-Kammer geleitet wird, die verschiedene, aber konstante Temperaturen haben, oder indem die Probe durch einen Serpentin kanal geleitet wird, der durch eine Anzahl von Zonen variierender Temperatur verläuft. Alternativ kann Wärme zugeführt werden, indem die Amplifizierungs-Kammer einem Laser oder anderem Licht oder einer anderen elektromagnetischen Strahlungsquelle ausgesetzt wird.

**[0116]** Die Amplifizierungs-Kammer ist in Strömungsverbindung über einen Flüssigkeitskanal, beispielsweise Flüssigkeitskanal **212**, mit einer zusätzlichen Reaktions-Kammer **214** verbunden, die zusätzliche präparative Operationen ausführen kann, wie z.B. Markieren oder Fragmentieren.

**[0117]** Ein vierter Flüssigkeitskanal **216** verbindet die Markierungs- oder Fragmentierungs-Kammer mit einer Analyse-Kammer **218**. Wie dargestellt enthält die Analyse-Kammer ein Oligonukleotid-Array **220** an der Bodenfläche der Kammer. Die Analyse-Kammer **218** kann optional oder zusätzlich eine Mikrokapillar-Elektrophorese-Vorrichtung **226** und zusätzliche präparative Reaktions-Kammern aufweisen, beispielsweise **224** zum Ausführen von beispielsweise Extensionsreaktionen, die in Strömungsverbindung mit beispielsweise Kammer **210** sind. Die Analyse-Kammer hat typischerweise wenigstens eine Oberfläche als transparentes Fenster zur Beobachtung oder Abtastung der speziell ausgeführten Analyse.

**[0118]** [Fig. 4A-C](#) illustrieren eine Ausführungsform einer Mikrokapillar-Elektrophorese-Vorrichtung. In dieser Ausführungsform wird die zu analysierende Probe in ein Probenreservoir **402** eingeführt. Das Probenreservoir kann eine separate Kammer sein oder nur ein Teilbereich des Flüssigkeitskanals, der aus einer vorhergehenden Reaktions-Kammer kommt. Die Reservoirs **404**, **406** und **414** sind mit Probe/Laufpuffer gefüllt. [Fig. 4A](#) illustriert das Einfüllen der Probe durch Stopfeneinfüllung, wobei die Probe über den Schnittpunkt des Einfüllkanals **416** und des Kapillarkanals **412** durch Anwendung eines elektrischen Stromes über das Pufferreservoir **406** und das Probenreservoir **402** gezogen wird. In alternativen Ausführungsformen wird die Probe "seriell" eingefüllt, indem ein elektrischer Strom über das Probenreservoir **402** und das Abfallreservoir **414** angewendet wird, wie in [Fig. 4B](#) gezeigt. Folgend auf die Füllung der Probe wird ein elektrisches Feld über das Pufferreservoir **404** und das Abfallreservoir **414** angelegt, was die Elektrophorese der Probe durch den Kapillarkanal **412** zur Folge hat. Der Betriebsmodus für die Probe ist in [Fig. 4C](#) gezeigt. Obwohl in den [Fig. 4A-C](#) nur eine einzelne Kapillare gezeigt ist, kann die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung typischerweise mehr als eine Kapillare aufweisen und kann typischerweise eine Array von vier oder mehr

Kapillaren umfassen, die parallel laufen. Die Herstellung der Mikrokapillar-Elektrophorese-Vorrichtung kann allgemein unter Anwendung der hierin beschriebenen Verfahren und wie beispielsweise von Woolley und Mathies, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:11348-11352 (1994) beschrieben, durchgeführt werden. Typischerweise ist jede Kapillare zum Durchfluss mit einer separaten Extensions-Reaktions-Kammer zum Einbau eines verschiedenen Didesoxynukleotids verbunden.

**[0119]** Eine alternative Ausgestaltung der Reaktions-Kammern innerhalb der Vorrichtung der Erfindung umfasst, wie oben bemerkt, eine zentralisierte Geometrie mit einer zentralen Kammer zum Sammeln und Verteilen einer flüssigen Probe auf eine Anzahl von separaten Reaktions-/Speicher-/Analyse-Kammern, die um die zentrale Kammer herum angeordnet und mit dieser durchflussmäßig verbunden sind. Ein Beispiel dieser zentralisierten Geometrie ist in [Fig. 5](#) gezeigt. Bei der bestimmten dargestellten Vorrichtung wird eine flüssige Probe in die Vorrichtung durch den Probeneinlass **502** eingeführt, der typischerweise durchflussmäßig mit einer Proben-Sammel-Kammer **504** verbunden ist. Die flüssige Probe wird dann zu einer zentralen Kammer **508** über einen Flüssigkeitskanal **506** transportiert. Sobald sie sich in der zentralen Kammer befindet, kann die Probe zu irgendeiner aus einer Anzahl von Reaktions-/Speicher-/Analyse-Kammern (**510**, **512**, **514**) transportiert werden, die um die zentrale Kammer herum angeordnet sind und durchflussmäßig mit der zentralen Kammer verbunden sind. Wie dargestellt enthält jede Reaktions-Kammer **510**, **512** und **514** eine Membran **516**, **518** und **520**, wie in [Fig. 2B](#) gezeigt, zum Öffnen und Schließen der Strömungsverbindung zwischen der zentralen Kammer **508** und der Reaktions-Kammer. Weitere Reaktions-Kammern können strömungsmäßig mit der zentralen Kammer verbunden werden oder können alternativ mit einer der oben beschriebenen Reaktions-Kammern verbunden werden.

**[0120]** In bestimmten Aspekten kann die zentrale Kammer eine zweifache Funktion sowohl als Knotenpunkt als auch als Pump-Kammer haben. Insbesondere kann diese zentrale Pump-Kammer durchflussmäßig mit einer oder mehreren zusätzlichen Reaktions-Kammern und/oder Speicher-Kammern und einer oder mehreren Analyse-Kammern verbunden sein. Die zentrale Pump-Kammer wirkt wiederum als ein Knotenpunkt für die verschiedenen durch die Vorrichtung insgesamt auszuführenden Operationen, wie oben beschrieben. Diese Ausführungsform bietet den Vorteil einer einzigen Pump-Kammer zur Lieferung einer Probe zu zahlreichen Operationen, wie auch die Möglichkeit, in einfacher Weise zusätzliche Probenvorbereitungs-Operationen in die Vorrichtung durch Öffnen eines anderen Ventils bei der zentralen Pump-Kammer aufnehmen zu können. Insbesondere

kann die zentrale Kammer **508** eine Membranpumpe als eine Oberfläche der Kammer enthalten, und hat in bevorzugten Aspekten eine Verdrängung von 0, wenn die Membran nicht ausgelenkt (gewölbt) ist. Die Membranpumpe wird im Allgemeinen ähnlich der oben für die Reaktions-Kammer beschriebenen Ventilstruktur sein. Zum Beispiel wird die Membranpumpe im Allgemeinen aus einem aus einer Vielzahl von flexiblen Materialien hergestellt sein, z.B. Silicium, Latex, Teflon, Mylar und dergleichen. In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist das Material der Membranpumpe Silicium.

**[0121]** Mit Bezugnahme auf beide [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#), ist die zentrale Kammer **508** zum Durchfluss mit der Proben-Sammel-Kammer über den Flüssigkeitskanal **506** verbunden. Das Ende des Flüssigkeitskanals **506** an der Proben-Sammel-Kammer enthält eine Membranpumpe **524**, um den Flüssigkeitsdurchfluss zu stoppen. Eine flüssige Probe wird typischerweise durch eine abdichtbare Öffnung **502** im Körper der Vorrichtung, z.B. ein Ventil oder ein Septum, in die Proben-Sammel-Kammer eingeführt. Zusätzlich kann die Sammel-Kammer **504** eine Lüftung aufweisen, um die Verdrängung von Gas oder Flüssigkeit während der Einführung der Probe zu erlauben.

**[0122]** Sobald die Probe in die Proben-Sammel-Kammer eingeführt ist, kann sie durch den Betrieb der Pumpmembran **526** in die zentrale Pump-Kammer **508** gezogen werden. Speziell öffnet das Proben-Kammer-Ventil **524** den Flüssigkeitskanal **506**. Nachfolgendes Ziehen oder Auslenken der Pumpmembran **526** erzeugt einen Unterdruck innerhalb der Pump-Kammer **508**, wodurch die Proben durch den Flüssigkeitskanal **506** in die zentrale Kammer gesogen wird. Nachfolgendes Schließen des Proben-Kammer-Ventils **524** und die Entspannung der Pumpmembran **526** erzeugen einen Überdruck innerhalb der Pump-Kammer **508**, der dazu verwendet kann, um die Probe zu weiteren Kammern in der Vorrichtung zu befördern. Wenn es beispielsweise erwünscht ist, der Probe spezifische Reagenzien zuzusetzen, können diese Reagenzien in flüssiger oder fester Form innerhalb einer benachbarten Speicher-Kammer **510** bereitgehalten werden. Das Öffnen des Ventils **516** öffnet den Durchflusskanal **528**, was auf die Entspannung der Membranpumpe hin die Förderung der Probe in die Speicher-Kammer **510** erlaubt. Die Operation der Pump-Kammer kann weiter dazu eingesetzt werden, um Reagenzien zu mischen, indem das Proben/Reagenz-Gemisch wiederholt in die Speicher-Kammer gedrückt und wieder herausgezogen wird. Das hat den zusätzlichen Vorteil, dass die Notwendigkeit, zusätzliche Mischkomponenten innerhalb der Vorrichtung vorzusehen, entfällt. Zusätzliche Kammer/Ventil/Flüssigkeitskanal-Strukturen können in Durchflussverbindung mit der Pump-Kammer **508** nach Bedarf vorgesehen

sein, um Reagenz-Speicher-Kammern, zusätzliche Reaktions-Kammern oder zusätzliche Analyse-Kammern bereitzustellen. [Fig. 5A](#) illustriert eine zusätzliche Reaktions-/Speicher-Kammer **514** und ein Ventil **520**, die über den Durchflusskanal **530** in Durchflussverbindung mit der Pump-Kammer **508** sind. Dies wird typischerweise abhängig von der Art der zu analysierenden Probe, der auszuführenden Analyse und der gewünschten Probenvorbereitungs-Operation variieren. Folgend auf jegliche Probenvorbereitungs-Operation erlaubt das Öffnen des Ventils **520** und das Schließen anderer Ventile zu der Pump-Kammer die Förderung der Probe durch die Fluidkanäle **530** und **532** zu der Reaktions-Kammer **514**, die eine analytische Einrichtung, wie etwa ein Oligonukleotid-Array zur Bestimmung der Hybridisierung von Nukleinsäuren in der Probe an dem Array, oder eine Mikrokapillar-Elektrophorese-Einrichtung zur Ausführung einer Größen-basierten Analyse der Probe enthalten kann.

**[0123]** Der Transport von Flüssigkeit innerhalb der Vorrichtung der Erfindung kann durch eine Anzahl von verschiedenen Verfahren ausgeführt werden. Zum Beispiel kann Flüssigkeitstransport durch die Anwendung von Druckdifferenzen bereitgestellt entweder durch externe oder interne Quellen bewirkt werden. Alternativ können interne Pumpelemente, die in die Vorrichtung eingebaut sind, dazu verwendet werden, um Flüssigkeitsproben durch die Vorrichtung zu transportieren. In einer ersten Ausführungsform werden flüssige Proben aus einer Reaktions-/Speicher-/Analyse-Kammer über Flüssigkeitskanäle zu einer anderen Kammer durch Anwenden einer Überdruckdifferenz von der ursprünglichen Kammer aus, die die Kammer ist, aus der die Probe herauszutransportieren ist, zu der empfangenden Kammer bewegt, die die Kammer ist, in die die flüssige Probe zu transportieren ist. Um die Druckdifferenzen anwenden zu können, sind die Reaktions-Kammern der Vorrichtung typischerweise mit Druckeinlässen versehen, die die Reaktions-Kammer mit der Druckquelle (für Überdruck oder Unterdruck) verbinden. Zur Vereinfachung der Diskussion wird die Anwendung eines Unterdrucks, d.h. auf die empfangende Kammer, hierin allgemein beschrieben. Bei der Lektüre der vorliegenden Offenbarung wird ein Fachmann jedoch erkennen, dass die Anwendung eines Überdrucks, d.h. auf die Ausgangskammer, mit kleinen Modifikationen, die im Folgenden, wenn sie auftreten, illustriert werden, ebenso effektiv ist.

**[0124]** In einem Verfahren kann die Anwendung der Druckdifferenz auf eine bestimmte Reaktions-Kammer ausgeführt werden, indem der Druck in der empfangenden Kammer selektiv erniedrigt wird. Die selektive Erniedrigung des Drucks in einer bestimmten empfangenden Kammer kann durch eine Vielzahl von Methoden ausgeführt werden. Zum Beispiel kann der Druckeinlass für die Reaktions-Kammern

mit einer steuerbaren Ventilstruktur ausgerüstet sein, die selektiv betrieben werden kann, um zu der Druckquelle geöffnet zu werden. Die Einwirkung der Druckquelle auf die Proben-Kammer zwingt die Probe dann in die nächste Reaktions-Kammer, die auf einem niedrigeren Druck ist,

**[0125]** Typischerweise wird die Vorrichtung einen Druck/Unterdruck-Verteiler zum Richten der externen Unterdruckquelle auf die verschiedenen Reaktions-/Speicher-/Analyse-Kammern aufweisen. Ein besonders elegantes Beispiel eines bevorzugten Unterdruck-Verteilers ist in [Fig. 6A](#), [Fig. 6B](#) und [Fig. 6C](#) illustriert. Der Unterdruck-/Druck-Verteiler erzeugt eine abgestufte Druckdifferenz zwischen jedem Paar von verbundenen Reaktions-Kammern. Nimmt man z.B. an, dass der Umgebungsdruck mit einem Wert von 1 definiert ist, so wird auf ein Unterdruck auf die erste Reaktions-Kammer angewendet, der als  $1-3x$  geschrieben werden kann, wobei  $x$  ein Druckdifferenzschritt ist. Ein Unterdruck von  $1-2x$  wird auf die zweite Reaktions-Kammer in der Reihe angewendet, und ein Unterdruck von  $1-x$  wird auf die dritte Reaktions-Kammer angewendet. Daher ist die erste Reaktions-Kammer auf dem niedrigsten Druck und die dritte auf dem höchsten, wobei die zweite auf einem Zwischenniveau ist. Alle Kammern sind jedoch unterhalb des Umgebungsdruckes, z.B. Atmosphärendruck. Die Probe wird in die erste Reaktions-Kammer durch die Druckdifferenz zwischen dem Umgebungsdruck (1) und dem auf die Reaktions-Kammer angewendeten Unterdruck ( $1-3x$ ) in die erste Reaktions-Kammer gezogen, wobei die Druckdifferenz  $-3x$  ist. Aufgrund der Druckdifferenz zwischen der ersten und der zweiten Reaktions-Kammer ( $1-3x$  gegenüber  $1-2x$ ) bewegt sich die Probe nicht in die zweite Reaktions-Kammer. Nach Abschluss der in der ersten Reaktions-Kammer durchgeführten Operation wird der Unterdruck in der ersten Reaktions-Kammer abgebaut, was der ersten Reaktions-Kammer erlaubt, den Umgebungsdruck, z.B. 1, anzunehmen. Die Probe wird dann aus der ersten Kammer in die zweite Kammer aufgrund der Druckdifferenz zwischen dem Umgebungsdruck der ersten Reaktions-Kammer und dem Unterdruck der zweiten Kammer, z.B. 1 gegenüber  $1-2x$ , gezogen. Wenn die in der zweiten Reaktions-Kammer durchzuführende Operation abgeschlossen ist, wird in ähnlicher Weise der Unterdruck in dieser Kammer abgebaut und die Probe bewegt sich zu der dritten Reaktions-Kammer.

**[0126]** Eine schematische Darstellung einer pneumatischen Verteilergestaltung zur Ausführung dieses Druckdifferenz-Flüssigkeit transportsystems ist in [Fig. 6A](#) gezeigt. Der pneumatische Verteiler umfasst eine Unterdruckquelle **602**, die an einen Unterdruckhauptkanal **604** angeschlossen ist. Der Unterdruckhauptkanal ist mit abzweigenden Kanälen **606**, **608** und **610** verbunden, die wiederum mit den Reaktions-Kammern **612**, **614** und **616** verbunden sind, wo-

bei die Reaktions-Kammern in Reihe durchflussmäßig verbunden sind. Die erste Reaktions-Kammer **616** in der Reihe enthält typischerweise einen Probeneinlass **640**, der typischerweise einen abdichtbaren Verschluss umfasst, um die flüssige Probe zurückzuhalten und den Druck innerhalb der Reaktions-Kammer aufrechtzuerhalten. Jeder abzweigende Kanal ist mit einem oder mehreren Strömungswiderständen **618** und **620** versehen, die in den abzweigenden Kanal eingebaut sind. Diese Strömungswiderstände führen zu einer Umwandlung des Drucks aus der Druck-/Unterdruck-Quelle, d.h. einen Reduktionsschritt des Gasdruckes oder Unterdruckes, der über dem Widerstand angelegt ist. Strömungswiderstände können eine Vielzahl von verschiedenen Strukturen einsetzen. Zum Beispiel führt eine Verengung des Durchmessers oder der Querschnittsfläche eines Kanals typischerweise zu einem Strömungswiderstand durch den Kanal. In ähnlicher Weise führt ein Stopfen innerhalb des Kanals, der eine oder mehrere hindurchgehende Öffnungen hat, die im Effekt den Kanal verengen, durch den der Druck angewendet wird, zu einem Strömungswiderstand, wobei der Widerstand abhängig von der Anzahl und/oder Größe der Öffnungen in dem Stopfen variiert werden kann. Zusätzlich kann der Stopfen aus einem porösen Material hergestellt sein, das einen Strömungswiderstand durch den Stopfen verursacht, wobei der Widerstand abhängig von der Porosität des Materials und/oder der Anzahl der verwendeten Stopfen variiert werden kann. Variationen in der Kanallänge können auch zum Variieren des Strömungswiderstandes eingesetzt werden.

**[0127]** Jeder abzweigende Kanal ist typischerweise an einem Druckknoten **622** über Druckeinlässe **624** mit der Reaktions-Kammer verbunden. Die Druckeinlässe **624** sind typischerweise mit schwer benetzbaren Filterstopfen **626** versehen, um zu verhindern, dass im Fall von Verfahren auf Unterdruckbasis Probe in den pneumatischen Verteiler gezogen wird. Schwer benetzbare Filterstopfen können im Allgemeinen aus einer Vielzahl von Materialien hergestellt werden, die in der Technik bekannt sind und die oben beschrieben sind. Jeder abzweigende Kanal ist mit einem Belüftungskanal **628** verbunden, der über eine Belüftung **630** dem Umgebungsdruck gegenüber geöffnet ist. Ein differentieller Strömungswiderstand **632** ist in den Belüftungskanal **628** eingebaut. Der Strömungswiderstand, der durch den Strömungswiderstand **632** geliefert wird, wird kleiner als der Strömungswiderstand sein, der durch den Strömungswiderstand **634** erzeugt wird, welcher kleiner als der Strömungswiderstand sein wird, der durch den Strömungswiderstand **636** erzeugt wird. Wie oben beschrieben kann dieser differentielle Strömungswiderstand erhalten werden, indem der Durchmesser des Belüftungskanals, die Anzahl von Kanälen, die in einem einzelnen Belüftungskanal enthalten sind, die Kanallänge variiert werden oder ein Stopfen im Belüf-

tungskanal vorgesehen wird, der eine variierende Anzahl von hindurchgehenden Öffnungen aufweist.

**[0128]** Die variierenden Strömungswiderstände für jeden Belüftungskanal führen zu einem variierten Niveau von Unterdruck, das auf jede Reaktions-Kammer angewendet wird, wobei, wie oben beschrieben, die Reaktions-Kammer **616** einen Druck von 1-3x, die Reaktions-Kammer **614** einen Druck von 1-2x und die Reaktions-Kammer **612** einen Druck von 1-x haben kann. Der Druck einer gegebenen Reaktions-Kammer kann auf Umgebungsdruck angehoben werden, was erlaubt, dass die Probe in die nachfolgende Kammer gesogen wird, indem die Kammer gegenüber dem Umgebungsdruck geöffnet wird. Dies wird typischerweise durch Vorsehen einer abdichtbaren Öffnung **638** zum Umgebungsdruck in dem abzweigenden Kanal erreicht. Diese abdichtbare Öffnung kann eine steuerbare Ventilstruktur oder alternativ eine Berstmembran sein, die zu einem gewünschten Zeitpunkt durchstoßen werden kann, um es der betreffenden Reaktions-Kammer zu ermöglichen, Umgebungsdruck anzunehmen, was es ermöglicht, dass die Probe in die nachfolgende Kammer gesogen wird. Das Durchstechen der Berstmembran kann ausgeführt werden, indem Solenoid-betätigte Stifte vorgesehen werden, die innerhalb der Vorrichtung oder in der Basiseinheit der Vorrichtung eingebaut sind (was genauer unten beschrieben wird). In einigen Fällen kann es wünschenswert sein, einen Rückfluss aus einer vorhergehenden oder nachfolgenden Reaktions-Kammer, die sich auf einem höheren Druck befindet, zu verhindern. Dies kann erreicht werden, indem die Flüssigkeitskanäle zwischen den Reaktions-Kammern **644** mit in einer Richtung wirkenden Rückschlagventilen versehen werden. Beispiele von in einer Richtung wirksamen Ventilstrukturen umfassen Kugel-Sitz-Strukturen, Klappenventile, Entenschnabel-Rückschlagventile, gleitende Ventilstrukturen und dergleichen.

**[0129]** Eine graphische Illustration der Druckprofile zwischen den drei Reaktions-Kammern, die einen pneumatischen Verteiler auf Unterdruckbasis einsetzen, ist in [Fig. 6C](#) gezeigt. Die durchgezogene Linie deutet den Anfangsdruck jeder Reaktions-Kammer /jedes Druckknotens an. Die gepunktete Linie deutet das Druckprofil während des Betriebs an. Das Durchstechen einer Berstmembran führt zu einem Anstieg des Drucks der Reaktions-Kammer auf Umgebungsdruck, was dazu führt, dass ein Druckgefälle zwischen der betreffenden Kammer und der nachfolgenden Kammer erzeugt wird. Dieses Druckgefälle saugt die Probe aus der ersten Reaktions-Kammer in die nachfolgende Reaktions-Kammer.

**[0130]** In einem ähnlichen Aspekt kann eine Überdruckquelle auf die Ursprungs-Kammer einwirken, um die Probe in die nachfolgenden Kammern zu drücken. Ein pneumatischer Druckverteiler, der in dieser

Hinsicht einsetzbar ist, ist in [Fig. 6B](#) gezeigt. In diesem Aspekt liefert eine Druckquelle **646** einen Überdruck an den Hauptkanal **604**. Bevor eine Probe in die erste Reaktions-Kammer eingeführt wird, wird das steuerbare Ventil **648** geöffnet, um den Druck aus der Druckquelle abzulassen und um zu ermöglichen, dass die erste Reaktions-Kammer **650** in der Reihe auf Umgebungsdruck für die Einführung der Probe bleibt. Wieder umfasst die erste Kammer in der Reihe typischerweise einen Probeneinlass **640**, der einen abdichtbaren Verschluss **642** hat. Nachdem die Probe in die erste Reaktions-Kammer **650** eingeführt ist, wird das steuerbare Ventil **648** geschlossen, was das System auf Druck bringt. Geeignete steuerbare Ventile umfassen eine Anzahl von verschiedenen kommerziell erhältlichen Solenoid-Ventilen und dergleichen. In dieser Anwendung wird jede nachfolgende Kammer auf einem schrittweise höheren Druck gehalten, indem geeignete Strömungswiderstände und Lüftungen, wie oben beschrieben, vorhanden sind. Ein Basisdruck wird an dem Ursprungsdruckknoten **652** angelegt. Wenn es gewünscht ist, die Probe in die zweite Kammer **654** zu befördern, wird die abdichtbare Öffnung **656** dem Umgebungsdruck gegenüber geöffnet. Dies ermöglicht es, dass die zweite Kammer **654** auf Umgebungsdruck kommt, was es ermöglicht, dass der auf den Ursprungsdruckknoten **652** angewendete Druck die Probe in die zweite Kammer **654** drückt. Mithin wird, wie oben illustriert, die erste Reaktions-Kammer **650** auf einem Druck von 1+x gehalten, indem dieser Druck an dem Ursprungsdruckknoten **652** angewendet wird. Die zweite Reaktions-Kammer **656** wird auf einem Druck von 1+2x gehalten, und die dritte Reaktions-Kammer **658** wird auf einem Druck von 1+3x gehalten. Das Öffnen des abdichtbaren Ventils **656** führt zu einem Abfall des Drucks in der zweiten Reaktions-Kammer **654** auf 1 (oder Umgebungsdruck). Die Druckdifferenz zwischen der ersten und der zweiten Reaktions-Kammer, x, drückt die Probe aus der ersten Reaktions-Kammer in die zweite Reaktions-Kammer und schließlich in die dritte. Zwischen dem Druckknoten **662** und dem abdichtbaren Ventil **656** ist ein Strömungswiderstand **660** vorgesehen, um zu verhindern, dass der überschüssige Druck entweicht, wenn das abdichtbare Ventil **656** geöffnet wird. Dies erlaubt es, dass das System einen Überdruck hinter der Probe aufrechterhält, um sie in die nachfolgenden Kammern zu drücken.

**[0131]** Unter einem verwandten Gesichtspunkt kann eine steuerbare Druckquelle auf den Ursprungsreaktionsbehälter angewendet werden, um eine Probe durch die Vorrichtung zu drücken. Die Druckquelle wird intervallweise angewendet, je nach Bedarf zur Bewegung der Probe von Kammer zu Kammer. Eine Vielzahl von Vorrichtungen kann beim Anwenden von intervallweisem Druck auf die Ursprungs-Reaktion-Kammer eingesetzt werden, z.B. eine Spritze oder eine Verdrängerpumpe oder der-

gleichen. Alternativ kann bei dem Größenmaßstab der Vorrichtung auch einfach eine thermopneumatische Pumpe eingesetzt werden. Ein Beispiel für eine solche Pumpe enthält typischerweise ein Heizelement, z.B. eine kleine Widerstandsheizung, die in einer Druck-Kammer angeordnet ist. Ferner ist in der Kammer eine Menge einer Flüssigkeit mit steuerbarem Dampfdruck enthalten, z.B. Fluorkohlenwasserstoffe, erhältlich von 3M Corp. Diese Flüssigkeiten sind mit einem weiten Bereich von verfügbaren Dampfdrücken kommerziell erhältlich. Der Anstieg des Drucks führt zu einer Bewegung der Probe von einer Reaktions-Kammer zur nächsten. Wenn die Probe die nachfolgende Reaktions-Kammer erreicht, wird die Temperatur in der Druck-Kammer reduziert.

**[0132]** Die Einbeziehung von gasdurchlässigen Flüssigkeitssperren, z.B. von schwer benetzbaren Filterstopfen oder hydrophoben Membranen, in diese Vorrichtungen ermöglicht ein Flüssigkeitslenkungs- und Steuersystem zum Bewegen von Flüssigkeiten innerhalb der Vorrichtung ohne Sensoren. Zum Beispiel ermöglichen, wie oben beschrieben, solche Filterstopfen, die an dem Ende der Reaktions-Kammer gegenüber einem Flüssigkeitseinlass eingebaut sind, dass Luft oder anderes in der Reaktions-Kammer vorhandenes Gas während der Einführung der Flüssigkeitskomponente in die Kammer herausgedrückt wird. Beim Füllen der Kammer kommt die flüssige Probe in Kontakt mit dem hydrophoben Stopfen, was mithin den Flüssigkeitsnettofluss stoppt. Strömungswiderstände können, wie zuvor beschrieben, auch als gasdurchlässige Flüssigkeitssperren eingesetzt werden, um das gleiche Ergebnis zu erzielen, z.B. durch Anwendung von Flüssigkeitsdurchgängen, die ausreichend eng sind, um einen übermäßigen Strömungswiderstand zu bewirken, wodurch die Flüssigkeitsströmung effekt gestoppt oder verzögert wird, während Luft oder Gasfluss möglich ist. Das Ausstoßen der Flüssigkeit aus der Kammer bedingt dann die Anwendung eines Überdrucks an der verstopften Belüftung. Dies ermöglicht Kammern, die ohne Ventil am Eingang gefüllt werden können, d.h. um die Flüssigkeitsströmung in die Kammer zu steuern. In den meisten Fällen wird jedoch ein einzelnes Ventil am Kammereinlass eingesetzt, um die Zurückhaltung der flüssigen Probe innerhalb der Kammer sicherzustellen oder um einen Mechanismus bereitzustellen, um eine flüssige Probe in eine Kammer aus einer Anzahl von Kammern, die an einem gemeinsamen Kanal angeschlossen sind, zu lenken.

**[0133]** Eine schematische Darstellung einer Reaktions-Kammer, die dieses System einsetzt, ist in [Fig. 12A](#) gezeigt. Kurz gesagt enthält die Reaktions-Kammer **1202** einen Flüssigkeitseinlass **1204**, der gegenüber einem Flüssigkeitsdurchgang **1206** durch ein Ventil **1208** abgedichtet ist. Typischerweise kann dieses Ventil, eine Vielzahl von Strukturen einsetzen, wie hierin beschrieben, ist aber vorzugsweise

ein Ventil vom flexiblen Membrantyp, das pneumatisch, magnetisch oder elektrisch verstellt werden kann. In bevorzugten Ausführungsformen werden die Ventile pneumatisch gesteuert, z.B. durch Anwenden eines Unterdrucks auf das Ventil, um die Membran weg von dem Ventilsitz zu verlagern, wodurch eine Öffnung in die angrenzenden Durchgänge erzeugt wird. An dem Ende gegenüber dem Einlass befindet sich eine Auslassbelüftung **1210**, und über dieser Auslasslüftung ist eine hydrophobe Membran **1212** angeordnet. Eine Anzahl von verschiedenen kommerziell erhältlichen hydrophoben Membranen können wie hier beschrieben verwendet werden, einschließlich z.B. Versapore 200 R Membranen, die von Gelman Sciences erhältlich sind. In die Reaktions-Kammer eingeführte Flüssigkeit füllt die Kammer, bis sie die Membran **1212** berührt. Das Schließen des Ventils erlaubt dann die Durchführung von Reaktionen innerhalb der Reaktions-Kammer, ohne Elemente außerhalb der Kammer zu beeinflussen oder von diesen beeinflusst zu werden.

**[0134]** In einem anderen Beispiel können diese Stopfen oder Membranen dazu verwendet werden, Flüssigkeiten innerhalb der Vorrichtung zu entgasen oder Bläschen zu entfernen. Für die Zwecke der Entgasung kann eine Kammer z.B. mit einer oder mehreren Lüftungen oder mit einer Wand ausgestattet sein, die vollständig oder im Wesentlichen durch eine hydrophobe Membran begrenzt wird, um den Durchgang von gelösten oder eingeschlossenen Gasen zu erlauben. Zusätzlich kann Unterdruck auf die externe Oberfläche der Membran angewendet werden, um Gase aus den Probenflüssigkeiten herauszuziehen. Aufgrund der kleinen Querschnittsdimensionen der Reaktions-Kammern und der Flüssigkeitsdurchgänge, hat die Entfernung solcher Gase eine gesteigerte Wichtigkeit, da Bläschen die Flüssigkeitsströmung stören können und/oder zur Erzeugung von irregulären Daten führen können. Unter einem verwandten Gesichtspunkt können solche Membranen zur Entfernung von Bläschen verwendet werden, die mit Absicht in die Vorrichtung eingeführt wurden, d.h. zu dem Zweck, zwei Flüssigkeiten zu mischen, die zuvor getrennt bleiben sollten. Zum Beispiel können diskrete Flüssigkeiten, z.B. Reagenzien, in einen einzelnen Kanal oder eine Bläschenentfernungs-Kammer eingeführt werden, die durch eine Gasblase getrennt sind, die ausreichend ist, um die Flüssigkeitssäulen zu trennen, aber die Flüssigkeitsströmung nicht unterbindet. Man kann diese Flüssigkeitssäulen dann entlang eines Kanals mit einer daran angeordneten Lüftung fließen lassen, wobei die Lüftung eine hydrophobe Membran enthält. Wenn die Flüssigkeitssäule an der Membran vorbei fließt, entweicht das Gas durch die Membran, wodurch die beiden Flüssigkeiten sich mischen. Eine schematische Darstellung einer solchen Blasenentfernungs-Kammer ist in [Fig. 12B](#) gezeigt.

[0135] [Fig. 12C](#) zeigt eine schematische Darstellung einer Vorrichtung, die ein Flüssigkeitsströmungssystem einsetzt, das mit hydrophoben Membranen bedeckte Lüftungen zur Steuerung der Flüssigkeitsströmung benutzt. Wie dargestellt hat die Vorrichtung **1250** einen Hauptkanal **1252**. Der Hauptkanal ist durchflussmäßig mit einer Reihe von separaten Kammern **1254-1260** verbunden. Jede dieser Flüssigkeitsverbindungen mit dem Hauptkanal wird betrieben (geöffnet oder geschlossen) durch die Einfügung eines separaten Ventils **1262-1268** an der Kreuzung dieser Flüssigkeitsverbindungen mit dem Hauptkanal. Ferner enthält jede der verschiedenen Kammern typischerweise einen Lüftungsanschluss **1270-1276** zu der äußeren Umgebung, wobei die Lüftungsanschlüsse typischerweise durch eine hydrophobe oder schwer benetzbare Membran bedeckt sind. Die grundlegende Gestaltung dieses Systems spiegelt sich in der Prinzipdarstellung aus [Fig. 5](#) wieder, sowie darin, dass sie ebenfalls eine zentrale Verteilungs-Kammer oder -kanal einsetzt.

[0136] Beim Betrieb können Proben oder andere Flüssigkeiten in den Hauptkanal **1252** über einen Flüssigkeitseinlass **1278** oder **1280**, die jeweils mit einem Ventil oder anderweitig abdichtbar sind, eingeführt werden. Die Anwendung von Überdruck auf den Flüssigkeitseinlass, kombiniert mit der selektiven Öffnung des Elastomer-Ventils an der Durchflussverbindung einer ausgewählten Kammer mit dem Hauptkanal zwingt die Flüssigkeit in diese Kammer, wobei Luft oder andere Gase durch den Lüftungsanschluss am Ende der ausgewählten Kammer ausgestoßen wird, bis die Lüftung in Kontakt mit der Flüssigkeit kommt, woraufhin die Flüssigkeitsströmung gestoppt wird. Das Ventil zu der ausgewählten Kammer kann dann in seine geschlossene Position zurückgestellt werden, um die Flüssigkeit innerhalb der Kammer abzudichten. Wie oben beschrieben, kann die erforderliche Druckdifferenz, die für die Flüssigkeitsströmung benötigt wird, alternativ oder zusätzlich die Anwendung eines Unterdrucks an dem Lüftungsanschluss beinhalten, zu dem die Flüssigkeit geleitet werden soll.

[0137] Als ein spezifisches Beispiel unter Einsatz der in [Fig. 12C](#) gezeigten Vorrichtung, wird eine Probe, die in den Hauptkanal **1252** eingeführt ist, zunächst in die Entgasungskammer **1254** durch Öffnen des Ventils **1262** und Anwenden eines Überdrucks am Einlassanschluss **1278** gedrückt. Sobald die Flüssigkeit die Entgasungs-Kammer gefüllt hat, kann das Ventil **1262** geschlossen werden. Die Entgasung der Flüssigkeit kann dann durch Anwenden eines Unterdrucks auf die Probe durch die hydrophobe Membran ausgeführt werden, die über den Lüftungsanschluss **1270** angeordnet ist. Die entgaste Probe kann dann aus der Entgasungs-Kammer **1254** in beispielsweise die Reaktions-Kammer **1256** bewegt werden, indem die Ventile **1262** und **1264** geöffnet

und ein Überdruck auf den Lüftungsanschluss **1270** der Entgasungs-Kammer angewendet wird. Die Flüssigkeit wird dann aus der Entgasungs-Kammer **1254** durch den Hauptkanal **1252** in die Reaktions-Kammer **1256** gezwungen. Wenn die Flüssigkeit die Reaktions-Kammer füllt, kommt sie in Kontakt mit der hydrophoben Membran, wodurch die Flüssigkeitsströmung unterbrochen wird. Wie dargestellt enthält die Vorrichtung eine Volumen- oder Mess-Kammer **1258** wie auch eine Speicher-Kammer **1260**, die eine ähnliche Lüftung enthalten: die Lüftungsanschlüsse **1266:1274** und **1268:1276**. Die Flüssigkeit kann dann selektiv wie beschrieben in andere Kammern gelenkt werden.

[0138] [Fig. 12D](#) zeigt eine Draufsicht auf einen Bereich eines durch Spritzguss hergestellten Substrats zum Ausführen der Operationen, die schematisch in [Fig. 12C](#) illustriert sind. Wie dargestellt umfasst diese Vorrichtung Flüssigkeits-Einfluss-Kammern **1278a** und **1280a**, die in Durchflussverbindung mit den Flüssigkeitseinlässen **1278** und **1280** (nicht gezeigt) stehen. Diese Flüssigkeitseinlässe können typischerweise in den durch Spritzguss hergestellten Bereich eingearbeitet werden, z.B. in die Einfüll-Kammer gebohrt werden, oder in ein darüber liegendes ebenes Teil (nicht gezeigt) eingearbeitet werden. Ebenfalls enthalten sind Reaktions-Kammern **1254**, Entgasungs-Kammern **1256** und **1256a**, Mess-Kammern **1258**, und Speicher-Kammern **1260**. Jede dieser Kammern ist durchflussmäßig mit dem Hauptkanal **1252** verbunden.

[0139] Eine Anzahl von durch die verschiedenen Reaktions-Kammern der Vorrichtung ausgeführten Operationen erfordern eine steuerbare Temperatur. Zum Beispiel muss zur PCR-Amplifizierung, wie oben beschrieben, die Probe zyklisch auf eine Strang-Trennungstemperatur, eine Annealing-Reaktionstemperatur und eine Extensions-Reaktionstemperatur gebracht werden. Eine Anzahl anderer Reaktionen, einschließlich Extensions-, Transkriptions und Hybridisierungsreaktionen werden im Allgemeinen auch bei optimierten gesteuerten Temperaturen durchgeführt. Die Temperatursteuerung innerhalb der Vorrichtung der Erfindung wird im Allgemeinen durch Dünnschicht-Widerstandsheizelemente durchgeführt, die unter Verwendung im Stand der Technik wohl bekannten Verfahren hergestellt werden. Zum Beispiel können diese Heizelemente aus dünnen Metallschichten hergestellt werden, die innerhalb oder angrenzend an eine Reaktions-Kammer unter Verwendung wohl bekannter Verfahren aufgebracht werden, z.B. Sputtern, gesteuerte Dampfabscheidung und dergleichen. Das Dünnschicht-Heizelement wird typischerweise elektrisch mit einer Energiequelle verbunden, die einen Strom über das Heizelement liefert. Die elektrischen Verbindungen werden ebenfalls unter Verwendung von Verfahren ähnlich wie denen für die Heizelemente beschriebenen hergestellt.

**[0140]** Typischerweise werden die Heizelemente dazu in der Lage sein, Temperaturen oberhalb von 100° zu erzeugen, ohne nachteilige Effekte als Ergebnis der Aufheizung zu erfahren. Beispiele für Widerstandsheizelemente umfassen beispielsweise das Heizelement, das in der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 94/05414 beschrieben ist, laminierte Dünnschicht-NiCr/Polyimid/Kupfer-Heizelemente wie auch Graphit-Heizelemente. Diese Heizelemente können als eine Schicht auf einer Oberfläche einer Reaktions-Kammer vorgesehen sein, oder können als gegossene oder eingearbeitete Einsätze für den Einbau in die Reaktions-Kammern vorgesehen sein. **Fig. 2B** illustriert ein Beispiel einer Reaktions-Kammer **104** mit einem Heizeinsatz **128**, der darin angeordnet ist. Das Widerstandsheizelement ist typischerweise elektrisch mit einer gesteuerten Energieversorgung verbunden, um einen Strom über das Heizelement zu liefern. Die Steuerung der Energiequelle wird typischerweise durch einen geeignet programmierten Computer durchgeführt. Die oben beschriebenen Heizelemente können innerhalb der individuellen Reaktions-Kammern durch Ablagerung von Widerstandsmetallschichten oder durch Einsätze innerhalb der Reaktions-Kammer eingebaut werden, oder können alternativ an der Außenseite der Vorrichtung benachbart der betreffenden Reaktions-Kammer vorgesehen werden, wodurch die Wärme aus dem Heizelement in die Reaktions-Kammer geleitet wird.

**[0141]** Temperatur-gesteuerte Reaktions-Kammern werden typischerweise auch einen Miniaturtemperatursensor zum Überwachen der Temperatur der Kammer und dadurch zum Steuern des Stroms durch das Heizelement enthalten. Eine große Vielzahl von Mikrosensoren stehen zum Bestimmen der Temperatur zur Verfügung, einschließlich Thermolemente mit einer Bimetallverbindung, die eine temperaturabhängige elektromotorische Kraft (EMF) erzeugt, Widerstandsthermometer, die ein Material enthalten, das einen elektrischen Widerstand proportional zur Temperatur des Materials hat, Thermistoren, IC-Temperatursensoren, Quarzthermometer und dergleichen: siehe Hornwitz und Hill, *The Art of Electronics*, Cambridge, University Press 1994 (2. Auflage 1994). Eine Gestaltung von Heizelement und Sensor, die besonders für die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung geeignet ist, ist beispielsweise in US-Patentanmeldung Seriennummer 08/535,875 eingereicht am 28. September 1995 (WO-A-97 12063) beschrieben. Die Steuerung von Reaktionsparametern innerhalb der Reaktions-Kammer, z.B. der Temperatur, kann manuell vorgenommen werden, wird aber vorzugsweise über einen geeigneten Computer gesteuert. Insbesondere wird die durch einen Temperatursensor gemessene Temperatur und die Eingabe für die Energieversorgung über eine Schnittstelle mit einem Computer verbunden, der dazu programmiert ist, diese Daten zu empfangen und aufzuzeichnen, z.B. über einen Analog-Digital/Digital-Analog (AD/DA)

Wandler. Derselbe Computer wird typischerweise Programme enthalten, die Befehle für die Lieferung des richtigen Stroms zum Anheben oder Absenken der Temperatur der Reaktions-Kammer liefern. Zum Beispiel kann der Computer so programmiert sein, die Reaktions-Kammer durch irgendeine Anzahl von vorgegebenen Zeit/Temperatur-Profilen zu führen, z.B. die thermische zyklische Führung für PCR und dergleichen. Bei der Größe der Vorrichtungen der Erfindung wird die Kühlung der Reaktions-Kammern typischerweise durch Kontakt mit der Umgebungstemperatur ablaufen, es können jedoch wenn erwünscht zusätzliche Kühlelemente vorgesehen sein, z.B. Kühlmittelsysteme, Peltier-Kühlelemente, Wasserbäder etc.

**[0142]** Zusätzlich zu Flüssigkeitstransport- und Temperatursteuerungselementen können eine oder mehrere der Reaktions-Kammern der Vorrichtung eine Mischfunktion einbeziehen. Für eine Anzahl von Reaktions-Kammern kann das Mischen einfach durch Pumpen der Probe hin und zurück in und aus einer betreffenden Reaktions-Kammer durchgeführt werden. In einigen Fällen ist jedoch ein kontinuierliches Mischen innerhalb einer einzelnen Reaktions-/Analyse-Kammer erwünscht, z.B. bei PCR-Amplifizierungsreaktionen und Hybridisierungsreaktionen. In bevorzugten Aspekten wird akustisches Mischen angewendet, um die Probe innerhalb einer gegebenen Reaktions-Kammer zu mischen. Insbesondere wird eine PZT-Element (ein aus Blei, Zirkon und Titan enthaltender Keramik bestehendes Element) in Kontakt mit der größeren Oberfläche der Vorrichtung, benachbart der Reaktions-Kammer, wie in **Fig. 7A** gezeigt, gebracht. Für eine Diskussion von PZT-Elementen zur Verwendung von Methoden auf akustischer Basis siehe *Physical Acoustics, Principles and Methods*, Band 1 (Mason ed., Academic Press 1965), und *Piezoelectric Technology, Data for Engineers*, erhältlich von Clevite Corp. Wie dargestellt berührt das PZT-Element **702** die äußere Oberfläche **704** der Hybridisierungs-Kammer **706**. Die Hybridisierungs-Kammer enthält als eine innere Oberfläche ein Oligonukleotid-Array **708**. Die Anwendung von Strom auf dieses Element erzeugt Schallschwingungen, die in die Reaktions-Kammer übertragen, woraufhin das Mischen der darin befindlichen Probe erfolgt. Die Schwingungen dieses Elements führen zu einer erheblichen Konvektion, die in der Reaktions-Kammer erzeugt wird. Ein in einer Mikro-Reaktions-Kammer, in der dieses Mischsystem angewendet wird, erzeugtes symmetrisches Mischmuster ist in **Fig. 7** gezeigt.

**[0143]** Unvollständiger Kontakt (d.h. Verbindung) des Elements an der Vorrichtung kann zu einer unvollständigen Mischung einer Flüssigkeitsprobe führen. Infolgedessen wird das Element typischerweise eine Flüssigkeits- oder Gelschicht (nicht gezeigt) haben, die zwischen dem Element **702** und der äußeren Oberfläche der Vorrichtung **704** angeordnet ist, z.B.

Wasser. Diese Flüssigkeitsschicht wird im Allgemeinen innerhalb einer Membran vorgesehen sein, z.B. einem Latex-Ballon, der eine Oberfläche in Kontakt mit der äußeren Oberfläche der Reaktions-Kammer und eine andere Oberfläche in Kontakt mit dem PZT-Element hat. Ein geeignet programmierter Computer **714** kann verwendet werden, um die Anwendung von Spannung auf das PZT-Element über einen Funktionsgenerator **712** und einen RF-Verstärker **710** zu steuern, um die Geschwindigkeit und/oder den Zeitablauf des Mischens zu steuern. Nach alternativen Gesichtspunkten kann das Mischen durch Einsatz von ferromagnetischen Elementen innerhalb der Vorrichtung ausgeführt werden, die durch Zuführen eines Wechselstroms zu einer Spule in Nachbarschaft der Vorrichtung in Schwingungen versetzt werden. Der oszillierende Strom erzeugt ein oszillierendes Magnetfeld durch das Zentrum der Spule, das zu Schwingungsbewegungen und Drehungen der magnetischen Teilchen in der Vorrichtung führt, was die Mischung, entweder durch direkte Konvektion oder akustische Gleichströmung, zur Folge hat.

**[0144]** Zusätzlich zu den oben angegebenen Elementen können die Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung zusätzliche Komponenten zum Optimieren der Probenvorbereitung oder -analyse enthalten. Zum Beispiel kann eine elektrophoretische Kraft angewendet werden, um Ziel-Moleküle in die Oberfläche des Arrays zu ziehen. Zum Beispiel können Elektroden auf der Oberfläche des Arrays oder auf der Oberfläche gegenüber dem Array angeordnet oder musterförmig aufgebracht werden. Die Anwendung eines geeigneten elektrischen Feldes wird die Ziele in der Lösung von dem Array entweder abstoßen oder sie dahin ziehen. Eine Vielzahl von ähnlichen Erweiterungen können vorgesehen sein, ohne vom Umfang der Erfindung abzuweichen.

**[0145]** Obwohl es oft wünschenswert sein kann, alle der oben beschriebenen Elemente innerhalb einer einzelnen Einweg-Einheit unterzubringen, werden die Kosten von einigen dieser Elemente und Materialien, aus denen sie hergestellt sind, es wünschenswert machen, eine Einheit bereitzustellen, die wenigstens teilweise wiederverwendbar ist. Demgemäß kann in einer besonders bevorzugten Ausführungsform eine Mehrzahl von Steuerelementen der Vorrichtung, z.B. Temperatursteuerungselemente, Misch- und Flüssigkeitstransportelemente innerhalb einer wiederverwendbaren Basiseinheit bereitgestellt werden.

**[0146]** Zum Beispiel kann in einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Reaktions-Kammerbereich der Vorrichtung mit einer wiederverwendbaren Basiseinheit zusammengesetzt werden, die dazu angepasst ist, die Vorrichtung aufzunehmen. Wie beschrieben kann die Basiseinheit ein oder mehrere Heizelemente zur Steuerung der Temperatur inner-

halb ausgewählter Reaktions-Kammern innerhalb der Vorrichtung aufweisen. In ähnlicher Weise kann die Basiseinheit Mischelemente, wie die hierin beschriebenen, wie auch Unterdruck- oder Druckquellen, um die Probe zu mischen und sie innerhalb der Vorrichtung zu transportieren, beinhalten.

**[0147]** Beispielsweise kann die Basiseinheit eine erste Oberfläche haben, auf der ein oder mehrere Widerstandsheizelemente des oben beschriebenen Typs angeordnet sind. Die Heizelemente sind auf der Oberfläche der Basiseinheit so positioniert, dass, wenn die Reaktions-Kammer-Vorrichtung mit dieser Oberfläche zusammengesetzt ist, die Heizelemente benachbart zu und vorzugsweise in Kontakt mit der Außenoberfläche der Vorrichtung in Nachbarschaft zu einer oder mehreren Reaktions-Kammern gebracht wird, in denen die Temperatur Steuerung erwünscht ist. In ähnlicher Weise können ein oder mehrere Mischelemente, wie die oben beschriebenen akustischen Mischelemente, auch auf dieser Oberfläche der Basiseinheit angeordnet sein, wodurch, wenn sie mit der Reaktions-Kammer-Vorrichtung zusammengesetzt ist, die Mischelemente in Kontakt mit der äußeren Oberfläche der Reaktions-/Speicher-/Analyse-Kammern sind, in denen ein solches Mischen erwünscht ist. Für diejenigen Reaktions-Kammern, in denen sowohl Mischen als auch Heizen erwünscht ist, können gemischt angeordnete Heizelemente und Mischelemente auf der Oberfläche der Basiseinheit vorgesehen sein. Alternativ kann die Basiseinheit eine zweite Oberfläche haben, die die der ersten Oberfläche gegenüberliegende Oberfläche der Vorrichtung kontaktiert, um eine Heizung auf eine äußere Oberfläche der Reaktions-Kammer und Mischen auf eine andere einwirken zu lassen.

**[0148]** Zusammen mit den verschiedenen oben beschriebenen Elementen kann die Basiseinheit auch geeignete elektrische Verbindungen zur Verbindung der Heiz- und Mischelemente mit einer geeigneten Energieversorgung aufweisen. In ähnlicher Weise kann die Basiseinheit auch dazu verwendet werden, um die Reaktions-Kammer-Vorrichtung selbst mit externen Energiequellen, Druck/Unterdruckquellen und dergleichen zu verbinden. Insbesondere kann die Basiseinheit Verteiler, Anschlüsse und elektrische Verbindungen bereitstellen, die in Aufnahmeverbindungen oder Anschlüsse an der Vorrichtung eingesteckt werden, um elektrische Energie, Druck oder Unterdruck für die verschiedenen Steuerelemente bereitzustellen, die im Inneren der Vorrichtung vorhanden sind. Zum Beispiel kann das Aufsetzen der Vorrichtung auf die Basiseinheit eine Verbindung einer Druckquelle in der Basiseinheit zu einem Druckhauptverteiler herstellen, der in die Vorrichtung eingearbeitet ist, wie oben beschrieben. In ähnlicher Weise kann die Basiseinheit elektrische Verbindungen bereitstellen, die mit komplementären Verbindern an

der Vorrichtung in Verbindung treten, um elektrischen Strom für eine beliebige Anzahl von Operationen innerhalb der Vorrichtung über die elektrischen Schaltungen, die in die Vorrichtung eingearbeitet sind, bereitzustellen. In ähnlicher Weise können auch geeignete Verbindungen vorgesehen sein, um die verschiedenen Operationen der Vorrichtung zu überwachen, z.B. die Temperatur, den Druck und dergleichen.

**[0149]** Für diejenigen Ausführungsformen, die einen pneumatischen Verteiler zum Transport von Flüssigkeit einsetzen, der auf dem Durchstechen von Berstmembranen innerhalb der Membran beruht, um die Vorrichtung zu nachfolgenden Kammern zu bewegen, wird die Basiseinheit in typischen Fällen einen oder mehrere Solenoidgetragene Einstichstifte umfassen. Die Solenoid-getragenen Einstichstifte sind innerhalb von Aufnahmen angeordnet, die in die Oberfläche der Basiseinheit eingearbeitet sind, wobei die Aufnahmen den Positionen der Berstmembranen an der Vorrichtung entsprechen. Die Stifte werden, wenn sie nicht in Funktion sind, unter der Oberfläche der Basiseinheit zurückgehalten. Die Aktivierung des Solenoids stellt die Stifte über die Oberfläche der Basiseinheit hinaus aus, in und durch die Berstmembran.

**[0150]** Eine schematische Darstellung einer Ausführungsform einer Basiseinheit ist in **Fig. 8** gezeigt. Wie in **Fig. 8** gezeigt umfasst die Basiseinheit **800** eine Gehäusestruktur **802** mit einer Kopplungsfläche **804**. Die Gehäusestruktur nimmt verschiedene Elemente auf, die in der Basiseinheit untergebracht werden sollen. Die Basiseinheit kann auch ein oder mehrere thermoelektrische Heiz-/Kühlelemente **806** enthalten, die innerhalb der Basiseinheit so angeordnet sind, dass, wenn der die Reaktions-Kammern enthaltende Teil der Vorrichtung mit der Kopplungsfläche der Basiseinheit zusammengefügt wird, die Reaktions-Kammern in Kontakt mit oder unmittelbar benachbart zu den Heizelementen sind. Für solche Ausführungsformen, die ein System auf Druckdifferenzbasis zum Bewegen von Flüssigkeiten innerhalb der Vorrichtung einsetzen, wie oben beschrieben, kann die Basiseinheit typischerweise eine Druckquelle umfassen, die zu der Kopplungsfläche über den Druckquellenanschluss **810** geöffnet ist. Die Basiseinheit kann typischerweise auch andere Elemente dieser Systeme enthalten, wie beispielsweise durch Solenoid **812** betriebene Stifte **814** zum Durchstechen von Berstmembranen. Diese Stifte befinden sich typischerweise innerhalb von Aufnahmevertiefungen **816** in der Kopplungsfläche **804**. Die Basiseinheit wird typischerweise auch Montagestrukturen an der Kopplungsfläche aufweisen, um die richtige Zusammenfügung des die Reaktions-Kammern enthaltenden Teils der Vorrichtung mit der Basiseinheit sicherzustellen. Solche Montagestrukturen umfassen im Allgemeinen Montagestifte oder -löcher

(nicht gezeigt), die auf der Kopplungsfläche angeordnet sind und die komplementären Strukturen an dem die Reaktions-Kammern enthaltenden Teil der Vorrichtung entsprechen. Die Montagestifte können unterschiedliche Größenabmessungen haben und/oder verjüngt sein, um die richtige Zusammenfügung des die Reaktions-Kammer enthaltenden Teils und der Basiseinheit in der richtigen Orientierung sicherzustellen. Alternativ kann die Basiseinheit so hergestellt sein, um eine Wanne zu haben, in die der die Reaktions-Kammern enthaltende Teil gesteckt wird, wobei die Wanne eine asymmetrische Form hat, die zu einer asymmetrischen Form des die Reaktions-Kammern enthaltenden Teils passt. Eine solche Gestaltung ähnelt denjenigen, die bei der Herstellung von Tonbandkassetten und -spielern verwendet werden. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Komponenten kann die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung eine Anzahl von anderen Komponenten enthalten, um die Analysen weiter zu verbessern. Insbesondere kann eine Anzahl von Operationen von Proben transport, Manipulation und -überwachung von Elementen ausgeführt werden, die sich außerhalb der Vorrichtung befinden. Diese Elemente können innerhalb der oben beschriebenen Basiseinheit untergebracht sein oder als weitere Zusatzteile zu der Vorrichtung und/oder der Basiseinheit ausgeführt sein. Zum Beispiel können externe Pumpen oder Flüssigkeitsströmungseinrichtungen dazu verwendet werden, um die Probe durch die verschiedenen Operationen der Vorrichtung zu bewegen und/oder um sie zu mischen, Temperatursteuerungen können extern zu der Vorrichtung angebracht werden, um die individuellen Operationen zu optimieren, und Ventilsteuerungen können extern betrieben werden, um die Strömung der Probe zu lenken und zu steuern. In bevorzugten Ausführungsformen werden die verschiedenen Operationen jedoch in die Vorrichtung integriert sein. Daher kann die integrierte Vorrichtung der Erfindung zusätzlich zu den oben beschriebenen Komponenten typischerweise eine Anzahl von zusätzlichen Komponenten zum Proben transport, zur Probenlenkung und -manipulation und dergleichen beinhalten. Im Allgemeinen wird dies eine Mehrzahl von Mikropumpen, Ventilen, Mischern und Heizelementen umfassen.

**[0151]** Pumpeinrichtungen, die besonders gut verwendbar sind, umfassen eine Vielzahl von Mikro-bearbeiteten Pumpen, über die im Stand der Technik berichtet wurde. Geeignete Pumpen können z.B. Pumpen umfassen, die eine gewölbte Membran haben, angetrieben durch eine piezoelektrische Säule und zwei Rückschlagventile, wie etwa die in US-Patent Nr. 5,277,556, 5,271,724 und 5,171,132 beschriebenen, oder angetrieben durch ein thermopneumatisches Element, wie in US-Patent Nr. 5,126,022 beschrieben, piezoelektrische peristaltische Pumpen unter Verwendung von Vielfachmembranen in Reihe und dergleichen. Die veröffentlichte

PCT-Anmeldung WO 94/05414 diskutiert ebenfalls die Verwendung einer Lamb-Wellen-Pumpe für den Transport von Flüssigkeit in Kanälen in mikroskopischem Maßstab. Ferrofluid-Flüssigkeitstranport- und -mischsysteme können auch in die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung eingebaut werden. Typischerweise umfassen diese Systeme eine Ferrofluidsubstanzen, die in dem Apparat untergebracht ist. Die Ferrofluid-Substanzen wird von außen durch die Verwendung von Magneten gesteuert/gelenkt. Insbesondere bietet die Ferrofluidsubstanzen eine Sperre, die selektiv bewegt werden kann, um die Probe durch den Apparat zu bewegen oder durch eine individuelle Operation des Apparates. Diese Ferrofluid-Systeme können z.B. eingesetzt werden, um die effektiven Volumen zu reduzieren, wenn die Probe ein unzureichendes Volumen einnimmt, um die Hybridisierungskammer zu füllen. Ein ungenügendes Probenflüssigkeitsvolumen kann zu einer unvollständigen Hybridisierung auf dem Array führen und zu unvollständigen Hybridisierungsdaten. Das Ferrofluid-System wird dazu verwendet, um die Probenflüssigkeit in einem ausreichend kleinen Volumen zu umfassen. Dieses kleine Volumen wird dann in einer Weise über das Array gezogen, die sicherstellt, dass die Probe die gesamte Oberfläche des Arrays kontaktiert. Ferrofluide sind allgemein kommerziell erhältlich, z.B., FerroFluidics Inc. New Hampshire.

**[0152]** Alternative Flüssigkeitstransportmechanismen zum Einbau in die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung umfassen beispielsweise elektrohydrodynamische Pumpen (siehe z.B. Richter et al., 3. IEEE Workshop on Micro Electro Mechanical Systems, February 12-14, 1990, Napa Valley, USA, und Richter et al., Sensors and Actuators 29:159-165 (1991), US-Patent Nr. 5,126,022). Typischerweise setzen solche Pumpen eine Reihe von Elektroden ein, die über eine Oberfläche eines Kanals oder einer Reaktions-/Pump-Kammer angeordnet sind. Die Anwendung eines elektrischen Feldes über die Elektroden führt zu einer elektrophoretischen Bewegung der Nukleinsäuren in der Probe. Indium-Zinn-Oxidfilme können besonders geeignet dazu sein, um Elektroden auf Substratoberflächen in einem Muster aufzubringen, z.B. auf ein Glas- oder Siliciumsubstrat. Diese Verfahren können auch dazu verwendet werden, Nukleinsäure auf ein Array zu ziehen. Zum Beispiel können Elektroden musterförmig auf der Oberfläche eines Arraysubstrats aufgebracht werden und mit geeigneten funktionellen Gruppen zur Kopplung von Nukleinsäuren an die Oberfläche der Elektroden modifiziert sein. Die Anwendung eines Stroms zwischen den Elektroden auf der Oberfläche eines Arrays und einer gegenüberliegenden Elektrode führt zu einer elektrophoretischen Bewegung der Nukleinsäuren auf die Oberfläche des Arrays zu.

**[0153]** Elektrophoretisches Pumpen durch Anwendung von nichtstationären elektrischen Feldern kann

auch eingesetzt werden, um Elektrolyse an der Oberfläche der Elektroden zu vermeiden, während noch ausreichende Probenbewegung bewirkt wird. Insbesondere ist die elektrophoretische Beweglichkeit einer Nukleinsäure nicht konstant in Bezug auf das angelegte elektrische Feld. Eine Erhöhung des elektrischen Feldes von 50 auf 400 V/cm führt zu einem Anstieg von 30% der Beweglichkeit einer Nukleinsäurenprobe in einem Acrylamid-Gel. Durch Anwenden einer Wechselspannung zwischen einem Paar von Elektroden, die kapazitiv mit dem Elektrolyten gekoppelt sind, kann eine elektrophoretische Nettobewegung ohne einen Nettodurchgang von Ladung erhalten werden. Zum Beispiel wird ein hohes elektrisches Feld in Vorwärtsrichtung der Probenbewegung angelegt und ein niedrigeres Feld wird dann in Rückwärtsrichtung angelegt. Siehe z.B., Luckey et al. Electrophoresis 14:492-501 (1993).

**[0154]** Die oben beschriebenen Mikropumpen können auch dazu verwendet werden, um Reagenzien und Proben innerhalb des Apparats zu mischen, indem ein zurückgeführter Flüssigkeitsstrom durch die betreffende Kammer, die gemischt werden soll, zirkuliert wird. Zusätzliche Mischverfahren können auch eingesetzt werden. Zum Beispiel können elektrohydrodynamische Mischer innerhalb der verschiedenen Reaktions-Kammern eingesetzt werden. Diese Mischer setzen typischerweise ein wanderndes elektrisches Feld zum Bewegung einer Flüssigkeit, in die eine Ladung eingeführt ist, ein. Siehe Bart et al., Sensors and Actuators (1990) A21-A-23:193-35 197. Diese Mischelemente können leicht in miniaturisierte Vorrichtungen eingebaut werden. Alternativ kann das Mischen unter Verwendung von thermopneumatischen Pumpmechanismen ausgeführt werden. Dies beinhaltet typischerweise den Einbau von kleinen Heizelementen, die hinter Öffnungen innerhalb einer bestimmten Kammer angeordnet sind. Wenn die Flüssigkeit, die in Kontakt mit dem Heizelement ist, erwärmt wird, dehnt sie sich durch die Öffnungen aus, was eine konvektive Kraft in die Kammer bewirkt, wodurch die Probe gemischt wird. Alternativ kann ein Pumpmechanismus, der hinter zwei Einweg-Rückschlagventilen gehalten ist, wie etwa die in US-Patent Nr. 5,375,979 von Tran beschriebene Pumpe, eingesetzt werden, um eine flüssige Probe innerhalb einer Kammer zu zirkulieren. Insbesondere wird die Flüssigkeit in die Pump-Kammer durch ein erstes Einweg-Rückschlagventil eingesaugt, wenn die Pumpe in ihrem Unterdruck- oder Saugzyklus betrieben wird. Die Flüssigkeit wird dann aus der Pump-Kammer durch ein anderes Einweg-Rückschlagventil während des umgekehrten Pumpzyklus ausgestoßen, was zu einer zirkulären Flüssigkeitsströmung innerhalb der Reaktions-Kammer führt. Die Pumpmechanismen können irgendeine Anzahl von Ausgestaltungen einsetzen, wie hierin beschrieben, d.h. membranartige, thermodruckartige, elektrohydrodynamische Pumpmechanismen etc.

**[0155]** Es wird typischerweise erwünscht sein, elektrische Komponenten der Vorrichtung, die in Kontakt mit flüssigen Proben kommen können, zu isolieren, um Elektrolyse der Probe an der Oberfläche der Komponente zu verhindern. Im Allgemeinen kann eine beliebige Zahl von nicht-leitfähigen isolierenden Materialien für diese Funktion verwendet werden, einschließlich beispielsweise Teflon-Beschichtungen,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Si}_3\text{N}_4$  und dergleichen. Vorzugsweise bestehen die Isolierschichten aus  $\text{SiO}_2$ , das im Allgemeinen über die Oberfläche der Komponente durch Sputtern aufgebracht werden kann, um eine Isolierschicht bereitzustellen.

**[0156]** Die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung wird typischerweise auch eine Anzahl von Mikroventilen für die Lenkung der Flüssigkeitsströmung innerhalb der Vorrichtung beinhalten. Eine Vielzahl von Mikroventil-Gestaltungen sind für die vorliegende Vorrichtung besonders geeignet. Beispiele von Ventilen, die in der Vorrichtung verwendet werden können, sind beispielsweise in US-Patent Nr. 5,277,556 von van Lintel beschrieben. Ventilstrukturen zur Verwendung in den vorliegenden Vorrichtungen umfassen typischerweise eine Membran oder ein Diaphragma, das auf einen Ventilsitz gezogen werden kann. Beispielsweise können elektrostatische Ventile, Silicium/Aluminium-Bimetall-betätigte Ventile oder thermopneumatische betätigte Ventile leicht zum Einbau in die Vorrichtung der Erfindung angepasst werden. Typischerweise werden diese Ventile innerhalb oder an einem oder an beiden der Enden des Flüssigkeitskanals eingebaut, der die verschiedenen Reaktionskammern verbindet, und sind die Ventile in der Lage, den Druckwerten oder Reagenzien, die in den verschiedenen Operationen eingesetzt werden, zu widerstehen. Eine Illustration einer Ausführungsform eines Membranventil/Flüssigkeitskanal-Aufbaus ist in [Fig. 3](#) dargestellt.

**[0157]** In alternativen Aspekten können auch Fluidventile eingesetzt werden. Solche Fluidventile umfassen typischerweise einen "Flüssigkeitsvorhang", der eine Flüssigkeit aufweist, die mit dem wässrigen System, das in der Vorrichtung verwendet wird, nicht mischbar ist, zum Beispiel Silikongel, ferrofluidische Flüssigkeiten und dergleichen. Im Betrieb enthält ein Fluidventil einen flachen Ventilkanal, beispielsweise von 50  $\mu\text{m}$  Tiefe, der quer über einen tieferen Primärkanal verläuft und diesen unterbricht, der zum Beispiel ein 200 mm tiefer Kanal in einem passenden ebenen Bauteil sein kann. Der Ventilkanal ist mit wenigstens einem Ölanschluss verbunden. Beim Betrieb wird der Ventilkanal zunächst mit Öl (oder einem anderen geeigneten Fluidelement) gefüllt, das durch Kapillarwirkung in den Kanal gezogen wird. Wenn Gas oder Flüssigkeit durch den Primärkanal gedrückt werden, weicht das Öl oder der "Flüssigkeitsvorhang" aus und erlaubt den Durchfluss. In Abwesenheit eines Differenzdrucks über dem Primärkanal kehrt das

Öl zurück, um das Fluid oder Gas hinter einer Dampfbarriere abzudichten. In solchen Fällen sind diese Fluidventile nützlich, um zu verhindern, dass Fluidproben oder Reagenzien innerhalb der Vorrichtung verdampfen. Im Fall von anderen Fluiden, zum Beispiel Ferrofluiden oder Ölen mit suspendierten Metallteilchen, erlaubt die Anwendung eines geeigneten Magnetfeldes an der Ventilposition die Immobilisierung des Fluidventils, wodurch der Fluiddurchgang bei Drücken größer als 3 bis 5 psi verhindert wird. In ähnlicher Weise können auch elektrorheologische Effekte beim Steuern dieser Fluidventile eingesetzt werden. Zum Beispiel kann der Ölanteil des Fluidventils darin suspendierte geeignete Teilchen mit hohen Dielektrizitätskonstanten aufweisen. Die Anwendung von geeigneten elektrischen Feldern erhöht dann die Viskosität des Fluids, wodurch eine geeignete Sperre für den Fluidfluss erzeugt wird.

**[0158]** Die Vorrichtung kann auch einen oder mehrere Filter zur Entfernung von Zellrückständen und Protein-Feststoffen aus der Probe beinhalten. Die Filter können im Allgemeinen innerhalb der Vorrichtung angeordnet sein, z.B. innerhalb der Flüssigkeitsdurchgänge, die von der Probenvorbereitungs-/Extraktions-Kammer ausgehen. Eine Vielzahl von wohl bekannten Filtermedien können in der Vorrichtung vorgesehen sein, einschließlich beispielsweise Zellulose, Nitrocellulose, Polysulfon, Nylon, Vinyl/Acryl-Copolymere, Glasfasern, Polyvinylchlorid und dergleichen. Alternativ kann der Filter eine in die Vorrichtung eingearbeitete Struktur ähnlich der in US-Patent Nr. 5,304,487 von Wilding et al. beschrieben sein. In ähnlicher Weise können Separationskammern mit Separationsmedien, z.B. Ionenaustausch-Harze, Affinitäts-Harze und dergleichen, innerhalb der Vorrichtung vorgesehen sein, um unreinigende Proteine, etc. zu eliminieren.

**[0159]** Zusätzlich zu Sensoren zur Überwachung der Temperatur kann die Vorrichtung der vorliegenden Erfindung auch einen oder mehrere Sensoren innerhalb der Vorrichtung selbst enthalten, um das Fortschreiten von einer oder mehreren Operationen der Vorrichtung zu überwachen. Zum Beispiel können optische Sensoren und Drucksensoren in ein oder mehrere Reaktionskammern eingebaut sein, um das Fortschreiten der verschiedenen Reaktionen zu überwachen, oder innerhalb der Durchflusskanäle, um das Fortschreiten der Flüssigkeit zu überwachen oder Eigenschaften der Flüssigkeiten zu erfassen, z.B. pH-Wert, Temperatur, Fluoreszenz und dergleiche.

**[0160]** Wie zuvor beschrieben können Reagenzien, die in einer der innerhalb der Vorrichtung integrierten Operationen verwendet werden, von außen in die Vorrichtung eingeführt werden, z.B. durch abdichtbare Öffnungen in jede betreffende Kammer. Nach bevorzugten Aspekten können diese Reagenzien je-

doch vorher innerhalb der Vorrichtung eingelagert sein. Zum Beispiel können diese Reagenzien innerhalb der Reaktions-Kammer angeordnet sein, die die Operation ausführt, für die das Reagenz verwendet wird, oder innerhalb der Durchflusskanäle, die zu dieser Reaktions-Kammer führen. Alternativ können die Reagenzien innerhalb von Speicher-Kammern angeordnet sein, die benachbart zu und durchflussmäßig verbunden mit ihren betreffenden Reaktions-Kammern liegen, wodurch die Reagenzien leicht nach Bedarf zu der richtigen Kammer transportiert werden können. Zum Beispiel wird die Amplifizierungs-Kammer typischerweise geeignete Reagenzien haben, um die Amplifizierungsreaktion auszuführen, z.B. Primer-Sondensequenzen, Desoxynukleosid-Triphosphate ("dNTPs")/Nukleinsäure-Polymerasen, Puffer-substanzen und dergleichen, die vorab innerhalb der Amplifizierungs-Kammer eingelagert sind. In ähnlicher Weise können Probenstabilisierungsmittel innerhalb der Proben-Sammel-Kammer vorher eingelagert sein.

## 2. Die Allgemeine Probenvorbereitungsvorrichtung

**[0161]** [Fig. 13](#) zeigt eine schematische Darstellung einer Vorrichtungskonfiguration zur Ausführung von Probenvorbereitungsreaktionen, die allgemein das hierin beschriebene Flüssigkeitsleitsystem verwendet, z.B. unter Einsatz von externen Druckquellen, von hydrophoben Lüftungen und pneumatischen Ventilen. In der dargestellten Konfiguration werden vier Bereiche der Vorrichtung jeweils durch ein Array von Ventilen angesteuert, z.B. ein Array von 10 Ventilen, mit ihrem eigenen gemeinsamen Kanal. Die vier Bereiche können allgemein definiert werden als: (1) Reagenzien-Speicher, (2) Reaktionen, (3) Probenvorbereitung, und (4) Nachprozessieren, die untereinander durchflussmäßig verbunden sind. Der Probenvorbereitungsbereich wird typischerweise verwendet, um Nukleinsäuren aus einer Probe zu extrahieren und zu reinigen. Wie dargestellt enthält der Probenvorbereitungsbereich fünf Reagenzieneinlässe, die durchflussmäßig mit Vorratsbehältern mit größeren Volumen verbunden sind, z.B. innerhalb der Basiseinheit. Beispiele für solche Reagenzien für Extraktionsreaktionen können z.B. 4M-Guanidin-Isothiocyanat, 1 × TBE und 50:50 EtOH:H<sub>2</sub>O umfassen. Die beiden Reaktions-Kammern können z.B. Affinitätsmedien zur Reinigung von Nukleinsäuren wie etwa Glaswolle oder mit Poly-T-Oligonukleotiden beschichtete Kügelchen enthalten.

**[0162]** Der Speicherbereich ist mit dem Probenvorbereitungsbereich verbunden und wird dazu verwendet, um Reagenzien und Gemische zu speichern, z.B. PCR-Gemisch mit FITC-dGTP und dUTP, aber ohne Matrize, UNG-Reaktionsgemisch und IVT-Reaktionsgemisch ohne Matrize. Der Reaktionsbereich ist auch mit dem Probenvorbereitungsbereich sowie mit dem Speicherbereich verbunden und umfasst

eine Anzahl von Reaktions-Kammern (5), Mess-Kammern (2) und Blasenentfernungs-Kammern (1). Eine thermische Steuereinheit, z.B. Heizungen oder thermoelektrische Heizelemente/Kühlelemente können sowohl auf den Probenvorbereitungsbereich als auch auf den Reaktionsbereich einwirken.

**[0163]** Der Nachprozessierbereich ist typischerweise mit dem Reaktionsbereich verbunden und enthält eine Anzahl von Reagenzeinflüssen (5), Reaktions-Kammern (2), Speicher-Kammern (1) und Probeneinflüssen (1). Die Reagenzeinflüsse können dazu verwendet werden, um Puffer, z.B. 6 × SSPE oder Wasser, in das Analyseelement hinein einzuführen, z.B. ein Oligonukleotid-Array.

## 3. Allgemeines Mehrfach-Parallel System

**[0164]** [Fig. 14](#) ist eine schematische Darstellung einer Vorrichtungskonfiguration zur Handhabung von Situationen, wo mehrere Reaktionen unter den gleichen thermischen Bedingungen ausgeführt werden, z.B. mehrfache parallele Probenanalysen, duplizierende Multiplex-PCR durch Ausführen von mehreren PCR-Reaktionen mit einzelnen Primer-Paaren in Parallelausführung gefolgt von ihrer Rekombination oder zyklische Sequenzierung mit einer Vielzahl von Primer-Paaren und/oder Matrizen.

**[0165]** In der dargestellten Konfiguration liefern zwei Speicherbereiche Reagenzien zu zwei Reaktionsbereichen, wobei jeder der Reaktionsbereiche durch ein Array von 50 Ventilen angesteuert wird. Die Reaktions- und Speicher-Arrays weisen jeweils eine 4 × 12 Matrix von Reaktoren/Kammern auf, von denen jede ein Volumen von 10 nl bis 5 µl hat. Diese Kammern werden durch 4 Spalten pneumatischer Anschlüsse angesteuert. Die zusätzlichen Arrays von 10 Ventilen steuern den Probenvorbereitungsbereich und den Nachprozessierbereich an. Eine Reihe von Solenoidventilen kann verwendet werden, um die pneumatischen Anschlüsse und die Ventil-Arrays zu betreiben.

## IV. Anwendungen

**[0166]** Die Vorrichtung und das System der vorliegenden Erfindung hat einen weiten Anwendungsbeereich bei der Manipulation, Identifikation und/oder Sequenzierung von Nukleinsäureproben. Diese Proben können aus pflanzlichen, tierischen, viralen oder bakteriellen Quellen abgeleitet werden. Die Vorrichtung und das System der Erfindung können z.B. bei diagnostischen Anwendungen, z.B. bei der Diagnose von genetischen Krankheiten, wie auch bei der Diagnose auf Vorhandensein von infektiösen Erregern, z.B., bei bakteriellen oder viralen Infektionen, verwendet werden. Außerdem kann die Vorrichtung und das System in einer Vielzahl von Charakterisierungs-

anwendungen verwendet werden, wie etwa gerichtsmedizinische Analysen, beispielsweise bei genetischen Fingerabdrücken, bei der Identifizierung oder Charakterisierung von Bakterien, Pflanzen oder Viren, beispielsweise bei epidemiologischen oder taxonomischen Analysen und dergleichen.

**[0167]** Obwohl allgemein in Bezug auf individuelle Vorrichtungen beschrieben, wird anerkannt werden, dass Mehrfach-Vorrichtungen parallel vorgesehen werden können, um Analysen an einer großen Anzahl von individuellen Proben auszuführen. Da die Vorrichtungen miniaturisiert sind, ist der Bedarf an Reagenzien und/oder Raum erheblich reduziert. In ähnlicher Weise erlaubt die kleine Größe die Automatisierung des Probeneinführungsprozesses unter Verwendung von Probennahmerobotern und dergleichen.

**[0168]** In bevorzugten Aspekten wird die Vorrichtung und das System der vorliegenden Erfindung bei der Analyse von menschlichen Proben verwendet. Insbesondere wird die Vorrichtung dazu verwendet, um das Vorhandensein oder Fehlen einer bestimmten Nukleinsäuresequenz innerhalb einer bestimmten menschlichen Probe festzustellen. Dies beinhaltet die Identifizierung von genetischen Anomalien, die mit einer bestimmten Erkrankung einhergehen, wie auch die Identifizierung eines bestimmten infektiösen Agens innerhalb der Probe, z.B. eines Virus, von Bakterien, Hefe oder Pilz.

**[0169]** Die Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung können auch bei de novo-Sequenzierungsanwendungen verwendet werden. Insbesondere kann die Vorrichtung bei der Sequenzierung durch Hybridisierung (SBH) verwendet werden. Die Verwendung von Oligonukleotiden-Arrays bei de novo SBH-Anwendungen ist beispielsweise in US-Patentanmeldung Seriennummer 08/082,937, eingereicht am 25. Juni 1993, beschrieben.

## BEISPIELE

### Beispiel 1 - Extraktion und Reinigung von Nukleinsäuren

**[0170]** In separaten Experimenten wurde HIV Klon DNA entweder in Pferdeblut oder eine Suspension von Ratten-Plasmazyt mit voll differenzierten B-Zellen, die aus BALBc-Mäusen gewonnen wurden, eingeschleust. Guandinin-Isothiocyanat wurde auf eine Konzentration von 4 M zugegeben, um das Material zu lysieren. In separaten Experimenten wurde das Lysat durch eine Patrone geleitet, die Glaswolle (20 µl) enthielt, durch eine Trommel mit Natronglaswänden (20 µl) und durch eine Glasröhre. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde das verbliebene Lysat mit einigen Volumenteilen Ethanol:Wasser (1:1) ausgewaschen und die gebundene DNA wurde

bei 60°C unter Verwendung von 1 × TBE eluiert. Die Ausbeute eluierter DNA wurde unter Verwendung von Ethidiumbromid-Einfärbung auf einem Agarosegel gemessen, und die Reinheit wurde getestet, indem das eluierte Material als Matrize für eine PCR-Reaktion verwendet wurde. Die Eluierungsausbeute lag im Bereich von 10% bis 25% und die PCR-Ausbeute lag im Bereich von 90% bis 100% im Vergleich zu Kontrollen unter Verwendung von reinen Matrizen.

### Beispiel 2 - RNA-Vorbereitungsreaktionen im miniaturisierten System

**[0171]** Ein Miniatur-Modellreaktorsystem wurde aufgebaut, um die Wirksamkeit der miniaturisierten Vorrichtungen beim Ausführen von vorbereitenden Prähybridisierungsreaktionen an Ziel-Nukleinsäuren zu untersuchen. Insbesondere wurde ein duales Reaktions-Kammersystem zum Ausführen von in vitro-Transkription und Fragmentation hergestellt. Die Vorrichtung setzt eine Struktur auf Röhrenbasis unter Verwendung von Polymerröhren als in vitro-Transkriptionsreaktor gekoppelt mit einem Glaskapillar-Fragmentationsreaktor ein. Reagenzien, die nicht mit der Probe eingeführt wurden, wurden als getrocknete Ablagerungen auf den inneren Oberfläche der Verbindungsröhren vorgesehen. Das Experiment war dazu ausgestaltet, um die Effekte der Reaktions-Kammermaterialien und der Reaktionsvolumen in präparativen RNA-Reaktions-Kammern zu untersuchen.

**[0172]** Die Probe mit der Ziel-Nukleinsäure, DNA-Amplikon mit einem 1 kb-Bereich des HIV-Gens flankiert von Promotor-Regionen für die T3- und T7-RNA-Primer auf dem Sinn- und Gegenstrang, RNA-Polymerase, NTPs, fluoriniertes UTP und Puffer wurden in das Reaktorsystem an einem Ende in das System auf Röhrenbasis eingeführt. Die in vitro-Transkription wurde in einem Silikon-Röhrenreaktor ausgeführt, der in ein Wasserbad eingetaucht war. Folgend auf diese erste Reaktion wurde die Probe durch das System in einen Glaskapillar-Reaktor bewegt, der auf 94°C gehalten wurde, um die Fragmentationsreaktion auszuführen. Die Produkte einer repräsentativen Zeitverlauf-Fragmentationsreaktion sind in dem Gel in **Fig. 10A** gezeigt. In einigen Fällen enthielten die Röhren, die den IVT-Reaktor mit dem Fragmentationsreaktor verbinden, zusätzliches MgCl<sub>2</sub> zur Zugabe zu der Probe. Die Glaskapillare wurden zuerst mit BSA beschichtet, um Wechselwirkungen zwischen der Probe und dem Glas zu vermeiden. Nach der Fragmentation wurde die Probe mit einem geeignet beschichteten Oligonukleotid-Array, wie oben beschrieben, hybridisiert. Die Präparation unter Verwendung dieses Systems mit der Zugabe von 14 mM MgCl<sub>2</sub> führte zu einer korrekten Basen-Aufruftrate von 96,5%. Das Weglassen des MgCl<sub>2</sub> ergab eine korrekte Basen-Aufruftrate von

95,5%.

**[0173]** Eine ähnliche vorbereitende Transkriptionsreaktion wurde in einer Mikro-Reaktions-Kammer ausgeführt, die aus Polycarbonat gefertigt war. Eine Vertiefung wurde in die Oberfläche eines ersten Polycarbonatanteils eingearbeitet. Die Vertiefung war 250 µm tief und hatte näherungsweise ein Volumen von 5 µl. Ein zweites Polycarbonatteil wurde dann durch Ultraschallschweißen mit dem ersten verbunden, um eine Oberwand für die Reaktions-Kammer zu bilden. Das zweite Teil hatte zwei darin gebohrte Löcher, die an gegenüberliegenden Enden der Reaktions-Kammer angeordnet waren. Die Temperatursteuerung für die Transkriptionsreaktion wurde durch Anwendung einer externen Temperatursteuerung auf die Reaktions-Kammer bereitgestellt, wie für das System auf Röhrenbasis beschrieben. Proben von 3 µl wurden sowohl für die Transkriptions- als auch die Fragmentationsexperimente verwendet.

**[0174]** Transkriptionsreaktionen, die in dem Mikro-Reaktor ausgeführt wurden, erreichten eine 70% Ausbeute verglichen mit herkömmlichen Methoden, d.h. mit dem gleichen Volumen in einer Microzentrifugen-Röhre und Wasserbad oder einer thermischen PCR-Zykluseinrichtung. Ein Vergleich von in vitro-Transkriptionsreaktionsprodukten unter Verwendung einer Mikro-Kammer gegenüber einer Kontrolle in größerem Maßstab ist in [Fig. 10B](#) gezeigt.

#### Beispiel 3 - PCR-Amplifizierung in miniaturisiertem System

**[0175]** Eine miniaturisierte Polymer-Reaktions-Kammer ähnlich der in Beispiel 2 beschriebenen wurde verwendet, eine PCR-Amplifizierung auszuführen. Insbesondere wurde die Kammer in einem ebenen Stück aus Polycarbonat mit 4 mm Dicke gefertigt, wobei eine Vertiefung mit 500 µm Tiefe in seine Oberfläche eingearbeitet wurde. Ein zweites ebenes Polycarbonatstück wurde über die Vertiefung geschweißt. Dieses zweite Stück war nur 250 µm dick. Eine thermische Steuerung wurde bereitgestellt, indem ein Peltier-Heizelement auf die dünnere zweite Wand des Hohlraums aufgesetzt wurde.

**[0176]** Die Amplifizierung einer Ziel-Nukleinsäure wurde mit dem Perkin-Elmer GeneAmp PCR-Kit durchgeführt. Die Reaktions-Kammer wurde zyklisch für 20 Sekunden auf 94°C (Denaturierung), 40 Sekunden auf 65°C (Annealing) und 50 Sekunden auf 72°C (Extension) gebracht. Ein Profil der thermischen Zyklen ist in [Fig. 9](#) gezeigt. Nach 35 Zyklen wurde eine Amplifizierung von etwa 10<sup>9</sup> sichtbar. [Fig. 10C](#) zeigt die Produktion von amplifiziertem Produkt in der Mikro-Kammer im Vergleich zu einer Kontrolle, die unter Verwendung einer typischen thermischen PCR-Zykluseinrichtung erhalten wurde.

#### Beispiel 4 - Systemdemonstration, integrierte Reaktionen

**[0177]** Eine mikrogefertigte Polycarbonat-Vorrichtung wurde mit der Struktur wie in [Fig. 15A](#) gezeigt hergestellt. Die Vorrichtung enthielt drei diskrete belüftete Kammern. Zwei der Kammern (oben und in der Mitte) waren von der PCR-Kammer (unten) thermisch isoliert, um die Denaturierung der RNA-Polymerase zu verhindern, die bei IVT-Reaktionen bei PCR-Temperaturen verwendet wurde. Die thermische Isolierung wurde erreicht, indem die Kammern mehr als 10 mm entfernt voneinander in einem dünnen Polycarbonat-Substrat angefertigt wurden und indem die Temperaturen in jeder Region durch Verwendung von thermoelektrischen Temperatur-Steurelementen, z.B. Peltier-Einrichtungen, kontrolliert wurden.

**[0178]** Die Reaktordimensionen waren wie folgt: Kanäle waren 250 µm breit und 125 µm tief; die drei Reaktions-Kammern waren 1,5 mm breit, 13 mm lang und von 125 bis 500 µm tief, wobei die Reaktorvolumina im Bereich von 2,5 bis 10 ml lagen. Kurz gesagt wurde die PCR ausgeführt, indem 0,3 Einheiten von Taq-Polymerase, 0,2 µM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM Primer-Sequenzen, näherungsweise 2000 Moleküle Matrizen-Sequenzen und 1x Perkin-Elmer PCR-Puffer in die untere Kammer eingeführt wurden. Das thermische Zyklusprogramm enthielt (1) eine anfängliche Denaturierung bei 94°C für 60 Sekunden, (2) einen Denaturierungsschritt bei 94°C für 20 Sekunden, (3) einen Annealing-Schritt bei 65°C für 40 Sekunden, (4) einen Extensionsschritt bei 72°C für 50 Sekunden, (5) wiederholter, 35maliger Zyklusdurchlauf durch Schritte 2 bis 4, und (6) ein endgültiger Extensionsschritt bei 72°C für 60 Sekunden.

**[0179]** Nach der PCR wurden 0,2 µl des PCR-Produktes in die IVT-Kammer (Mitte) zusammen mit 9,8 µl von IVT-Gemisch (2,5 mM ATP, CTP, GTP und 0,5 mM UTP, 0,25 mM Fluorescein-UTP, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM HEPES, 1x Promega Transkriptionspuffer, 10 mM DTT, 1 Einheit T3 RNA-Polymerase, 0,5 Einheiten RNAGuard (Pharmacia)) übertragen, das in einer Speicher-Kammer (oben) gespeichert war. Die Übertragung der Flüssigkeit wurde ausgeführt, indem Druck auf die Lüftungen an den Enden der Kammern angewendet wurde. IVT wurde bei 37°C für 60 Minuten ausgeführt.

**[0180]** Die Resultate der PCR und IVT sind in [Fig. 15B](#) gezeigt, im Vergleich mit Kontrollexperimenten, die z.B. in Eppendorf-Röhren ausgeführt wurden.

#### Beispiel 5 - Akustisches Mischen

**[0181]** Die Wirksamkeit eines Akustikelements zum Mischen der Inhaltsstoffe einer Reaktions-Kammer

wurde getestet. Ein 0,5" × 0,5" × 0,04" Kristall aus PZT-5H wurde auf die äußere Oberfläche einer 0,030" dicken Region eines ebenen Stückes aus Delrin geklebt, das eine Vertiefung eingearbeitet in die Oberfläche gegenüber dem PZT-Element hatte. Ein auf einem flachen Silika-Substrat synthetisiertes Oligonukleotid-Array wurde dicht über den Hohlraum unter Verwendung eines Gummiring angebracht, so dass die Oberfläche des Arrays mit den darauf synthetisierten Oligonukleotid-Sonden dem Hohlraum zugewandt waren, was zu einer 250 µl Reaktions-Kammer führte. Der PZT-Kristall wurde durch eine ENI200 Hochfrequenzleistungsversorgung betrieben, die durch ein Funktionsgenerator von Hewlett Packard betrieben wurde, der wiederum durch einen zweiten Funktionsgenerator betrieben bei 1 Hz getaktet wurde.

**[0182]** In einem ersten Test wurde die Kammer mit entionisiertem Wasser gefüllt und eine kleine Menge von 2% Milch wurde zur Visualisierung injiziert. Der Kristall wurde bei 2 MHz mit einer mittleren Leistung von 3 W betrieben. Die Flüssigkeitsgeschwindigkeiten innerhalb der Kammer wurden auf über 1 mm/s geschätzt, was eine signifikante Konvektion andeutet. Ein diese Konvektion zeigendes Photo ist in [Fig. 7B](#) gezeigt.

**[0183]** Die Wirksamkeit des akustischen Mischens wurde auch in einem tatsächlichen Hybridisierungsprotokoll getestet. Für diesen Hybridisierungstest wurde eine Fluoreszenz-markierte Oligonukleotid-Zielsequenz mit der Sequenz 5'-GAGATG-CGTCGGTGGCTG-3' und eine Array mit einem Schachbrettmuster von 400 µm Quadraten mit darauf synthetisierten Komplementen zu dieser Sequenz verwendet. Dann wurde eine Hybridisierung von einer 10 nM Lösung an dem Ziel in 6 × SSPE durchgeführt. Während der Hybridisierung wurde die äußere Oberfläche des Arrays in Kontakt mit einem thermoelektrischen Kühlelement, das auf 15°C eingestellt war, gehalten. Die Hybridisierung wurde für 20 Minuten durchgeführt, während der Kristall bei 2 MHz mit einer mittleren Leistung von 4 W (Einschaltzeit = 0,2 Sekunden, Ausschaltzeit = 0,8 Sekunden) betrieben wurde. Die resultierende mittlere Intensität war identisch mit der unter Verwendung von mechanischem Mischen der Kammer erhaltenen (vertikale Drehen mit einer eingeführten Blase).

**[0184]** Weitere Experimente unter Verwendung eines Fluoreszenzmarkierten und fragmentierten 1 kb-Bereichs des HIV-Virus hatte eine erfolgreiche Basenaufufrate. Insbesondere wurde ein 1 kb HIV-Nukleinsäuresegment sequenziert unter Verwendung eines musterförmig beschichteten HIV-Oligonukleotid-Arrays oder Chips. Siehe US-Patentanmeldung Seriennummer 08/284064, eingereicht am 2. August 1994, die hier durch Bezugnahme für alle Zwecke aufgenommen wird. Akustisches Mischen erreichte

eine korrekte Basenaufufrate von 90,5% im Vergleich zu einer korrekten Basenaufufrate von 95,8% bei mechanischem Mischen.

#### Beispiel 5 - Demonstration des Flüssigkeitsleitsystems

**[0185]** Eine Polycarbonatpatrone wurde unter Anwendung herkömmlicher Bearbeitungstechniken bearbeitet, um eine Reihe von Ventilen zu bilden, die einen gemeinsamen Kanal mit einer Reihe von Kanälen verbinden, die zu einer Reihe von 10 µl Kammern führen, von denen jede in einer hydrophoben Belüftung endete. Die Kammern enthielten (1) eine Einlass-Kammer #1, (2) eine Einlass-Kammer #2, (3) eine Reaktions-Kammer, (4) eine Blasenentfernungskammer mit einer hydrophoben Lüftung im Zentrum, (5) eine Mess-Kammer und (6) eine Speicher-Kammer. Elastomerventile wurden geöffnet und geschlossen durch Anwendung von Unterdruck oder Druck (etwa 60 psi) auf den Raum oberhalb der individuellen Ventile.

**[0186]** In einem ersten Experiment wurde Wasser mit blauem Farbstoff (Lebensmittelfarbe) in die Einlass-Kammer #1 eingeführt, während Wasser mit gelbem Farbstoff (Lebensmittelfarbe) in die Einlass-Kammer #2 eingeführt wurde. Durch Öffnen der betreffenden Ventile und durch Anwenden von 5 psi auf die richtige Lüftung wurde die folgende Folge von Flüssigkeitsbewegungen ausgeführt. Das blaue Wasser wurde aus der Einlass-Kammer #1 in die Reaktions-Kammer bewegt; das gelbe Wasser wurde aus der Einlass-Kammer #2 in die Speicher-Kammer #6 bewegt, das blaue Wasser wurde aus der Reaktions-Kammer in die Mess-Kammer und das verbleibende blaue Wasser wurde in die Einlass-Kammer #1 bewegt; das gemessene blaue Wasser (etwa 1,6 ml) wurde aus der Mess-Kammer in die Blasenentfernungskammer bewegt; das gelbe Wasser wurde dann aus der Speicher-Kammer in die Blasenentfernungskammer bewegt, woraufhin es mit dem blauen Wasser in Verbindung kam und anscheinend mischte, was eine grüne Farbe erzeugte; und schließlich wurde das Gemisch aus der Blasenentfernungskammer in die Reaktions-Kammer und dann in die Speicher-Kammer bewegt.

**[0187]** Die Funktion der Blasenentfernungskammer wurde demonstriert, indem vier separate Säulen aus gefärbtem Wasser aus der Reaktions-Kammer in die Blasenentfernungskammer bewegt wurden. Die diskreten Säulen vereinten sich, beim Durchlauf in die Blasenentfernungskammer, miteinander zu einer einzigen Flüssigkeitssäule.

**[0188]** Die Funktion der Mess-Kammer wurde demonstriert, indem wiederholt Mengen von 10 µl einer gefärbten Wasserprobe aus der Speicher-Kammer in die Mess-Kammer bewegt wurden, gefolgt von Ab-

lassen dieser Flüssigkeit aus der Mess-Kammer. Diese Flüssigkeitsübertragung wurde 6 mal ausgeführt, was eine wiederholt gleichbleibende Teilprobe von etwa 1,6 µl pro Mess-Kammervolumen (10 µl in 6 Teilproben) zeigte.

### Patentansprüche

#### 1. Miniatur-Fluidiksystem mit:

Einem Gehäusekörper mit wenigstens einer ersten Kammer (650) die über einen Fluiddurchgang durchflussmäßig mit einer zweiten Kammer (654) verbunden ist, einem Probeneinlass (640), der durchflussmäßig mit der ersten Kammer verbunden ist, um eine Fluidprobe in das System einzuführen, einem Differenzdruckerzeugungssystem (604, 646) mit Einrichtungen zum Aufrechterhalten eines ersten Druckes in der ersten Kammer und eines zweiten Druckes in der zweiten Kammer, wobei der erste Druck größer als der Umgebungsdruck und der zweite Druck größer als der erste Druck ist, wodurch, wenn die zweite Kammer auf Umgebungsdruck gebracht wird, der erste Druck eine flüssige Probe in der ersten Kammer in die zweite Kammer drückt.

#### 2. System nach Anspruch 1, wobei das Differenzdruckerzeugungssystem aufweist:

Eine Druckquelle (646), wenigstens erste und zweite Durchgänge (608, 610), die die Druckquelle durchflussmäßig mit der ersten beziehungsweise zweiten Kammer verbinden, einem ersten Strömungswiderstand (618), der in dem ersten Durchgang zwischen der Druckquelle und der ersten Kammer angeordnet ist, wobei der erste Strömungswiderstand einen Druck von der Druckquelle in den ersten Druck umwandelt, einem zweiten Strömungswiderstand, der in dem zweiten Durchgang zwischen der Druckquelle und der zweiten Kammer angeordnet ist, wobei der zweite Strömungswiderstand den Druck von der Druckquelle auf den zweiten Druck umwandelt, und einen ersten und einen zweiten zu öffnenden Verschluss (638) in der ersten und zweiten Kammer, wobei das Öffnen des ersten oder zweiten Verschlusses es ermöglicht, dass die erste oder zweite Kammer Umgebungsdruck erreicht.

3. System nach Anspruch 2, wobei der erste und der zweite Strömungswiderstand unabhängig ein oder mehrere Fluiddurchgänge aufweisen, die die ersten und zweiten Durchgänge mit den ersten und zweiten Kammern verbinden, wobei der erste Strömungswiderstand eine kleinere Querschnittsfläche als der zweite Strömungswiderstand hat.

4. System nach Anspruch 2, wobei die ersten und zweiten Strömungswiderstände unabhängig einen oder mehrere Fluiddurchgänge aufweisen, die die

ersten und zweiten Durchgänge mit den ersten und zweiten Kammern verbinden, wobei die Fluiddurchgänge des ersten Strömungswiderstands eine größere Länge als die Fluiddurchgänge des zweiten Strömungswiderstands haben.

#### 5. Miniatur-Fluidiksystem, mit:

Einem der Gehäusekörper mit wenigstens einer ersten Kammer (616), die durchflussmäßig mit einer zweiten Kammer (614) verbunden ist, einem Probeneinlass (640), der durchflussmäßig mit der ersten Kammer verbunden ist, um eine flüssige Probe in die erste Kammer einzuführen, einem Differenzdruckerzeugungssystem (602, 604) mit Einrichtungen zum Aufrechterhalten eines ersten Drucks in der ersten Kammer und eines zweiten Drucks in der zweiten Kammer, wobei der zweite Druck geringer als der Umgebungsdruck ist und der erste Druck kleiner als der zweite Druck ist, wodurch, wenn die erste Kammer auf Umgebungsdruck gebracht wird, der zweite Druck eine flüssige Probe aus der ersten Kammer in die zweite Kammer zieht.

6. System nach Anspruch 5, wobei die wenigstens eine erste Kammer durch einen Fluiddurchgang (644) durchflussmäßig mit der zweiten Kammer verbunden ist.

#### 7. System nach Anspruch 6, wobei das Differenzdruckerzeugungssystem aufweist:

Eine Druckquelle, wenigstens einen ersten und einen zweiten Durchgang, die die Druckquelle mit der ersten und der zweiten Kammer verbinden, einem ersten Strömungswiderstand, der in dem ersten Durchgang zwischen der Druckquelle und der ersten Kammer angeordnet ist, wobei der erste Strömungswiderstand einen Druck von der Druckquelle in den ersten Druck umwandelt, einen zweiten Strömungswiderstand, der in dem zweiten Durchgang zwischen der Druckquelle und der zweiten Kammer angeordnet ist, wobei der zweite Strömungswiderstand den Druck von der Druckquelle in den zweiten Druck umwandelt, und einen ersten und einen zweiten zu öffnenden Verschluss in der ersten und der zweiten Kammer, wodurch das Öffnen des ersten oder zweiten Verschlusses es ermöglicht, dass die erste oder zweite Kammer Umgebungsdruck erreicht.

8. System nach Anspruch 7, wobei der erste und der zweite Strömungswiderstand unabhängig ein oder mehrere Fluiddurchgänge aufweisen, die die ersten und zweiten Durchgänge mit den ersten und zweiten Kammern verbinden, wobei der erste Strömungswiderstand eine größere Querschnittsfläche als der zweite Strömungswiderstand hat.

9. System nach Anspruch 7, wobei der erste und der zweite Strömungswiderstand unabhängig ein

oder mehrere Fluiddurchgänge aufweisen, die die ersten und zweiten Durchgänge mit den ersten und zweiten Kammern verbinden, wobei der erste Strömungswiderstand Durchgänge mit einer kürzeren Länge als die Kanäle des zweiten Strömungswiderstands aufweist.

10. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6 oder 7, mit einer Mikro-Heizeinrichtung, die thermisch mit einer der Kammern verbunden ist.

11. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6 oder 7, mit einer Kühleinrichtung, die thermisch mit einer der Kammern verbunden ist.

12. System nach Anspruch 11, wobei die Kühleinrichtung ein thermoelektrischer Kühler ist.

13. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6 oder 7, wobei jede der Kammern eine Querschnittsabmessung von etwa 0,05 bis etwa 20 mm und eine Tiefenabmessung von etwa 0,05 bis etwa 5 mm hat.

14. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6 oder 7, wobei die wenigstens zwei Kammern durch einen Fluiddurchgang durchflussmäßig verbunden sind, wobei der Fluiddurchgang eine Querschnittsabmessung von etwa 10 µm bis etwa 1.000 µm und eine Tiefenabmessung von etwa 1 bis 500 µm hat.

15. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6, oder 7, wobei eine der Kammern eine Extraktionskammer umfasst.

16. System nach Anspruch 15, wobei die Extraktionskammer ein Mittel zum Verstärken der Nukleinsäurebindungseigenschaften aufweist.

17. System nach Anspruch 16, wobei das Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Säuren, Basen, Silane, Polysine, gebundene Antikörper, synthetisierte Nukleinsäuren und Poly-T DNA.

18. System nach Anspruch 15, wobei die Extraktionskammer eine Affinitätsoberfläche enthält.

19. System nach Anspruch 15, wobei die Extraktionskammer eine Affinitätsoberfläche aufweist, die Teilchen mit Nukleinsäurebindungseigenschaften hat.

20. System nach Anspruch 19, wobei die Teilchen Glaskügelchen oder Zelluloseteilchen umfassen.

21. System nach Anspruch 18, wobei die Affinitätsoberfläche durch Mikrofabrikation hergestellt, maschinell bearbeitet oder durch Spritzguss hergestellt ist.

22. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6 oder 7, wo-

bei dem Gehäusekörper zugeordnet ein Mischsystem vorhanden ist.

23. System nach Anspruch 22, wobei das Mischsystem ein piezoelektrisches Element aufweist, das nahe an einer äußeren Oberfläche des Gehäusekörpers angrenzend an wenigstens eine der Reaktionskammern angeordnet ist, wobei die Aktivierung des piezoelektrischen Elements einen konvektiven Effekt innerhalb der Reaktionskammer erzeugt.

24. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6 oder 7, wobei eine der Kammern zum Fragmentieren von Nukleinsäure ausgebildet ist.

25. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6 oder 7, wobei eine der Kammern eine Zellysekammer zum Lyysieren von Zellen in einer Fluidprobe aufweist.

26. System nach Anspruch 25, wobei benachbart der Zellysekammer eine Quelle für akustische Energie angeordnet ist.

27. System nach Anspruch 25, wobei die Zellysekammer Mikrostrukturen enthält, die auf einer Innenfläche der Zellysekammer zum Beschleunigen der Zellyse hergestellt sind.

28. System nach Anspruch 25, wobei der Zellysekammer ein elektrolytisches pH-Steuersystem zugeordnet ist, um den pH-Wert der Zellysekammer zu verändern.

29. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6, oder 7, wobei eine der Kammern ein Nukleinsäurefragmentierungssystem zum Fragmentieren von Nukleinsäure in einer flüssigen Probe aufweist.

30. System nach Anspruch 29, wobei das Fragmentierungssystem ein fokussiertes piezoelektrisches Element umfasst, das benachbart einer Fragmentierungskammer angeordnet ist.

31. System nach Anspruch 30, wobei das Fragmentierungssystem weiter Mikrostrukturen umfasst, die auf einer ersten Oberfläche der Kammer hergestellt sind.

32. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6 oder 7, wobei eine der Kammern eine in-vitro-Transkriptionsreaktionskammer ist, wobei die in-vitro-Transkriptionsreaktionskammer darin angeordnet eine effektive Menge von einer RNA-Polymerase und wenigstens vier verschiedene Nukleosidtriphosphate aufweist.

33. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6 oder 7, wobei eine der Kammern eine Nukleinsäureamplifikationskammer umfasst.

34. System nach Anspruch 33, wobei die Amplifi-

kationskammer eine PCR-Kammer ist.

35. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6 oder 7, wobei eine der Kammern ein Nukleinsäurereinigungssystem umfasst, um Nukleinsäuren in der Probe von Verunreinigungen in der Probe zu trennen.

36. System nach Anspruch 35, wobei das Reinigungssystem eine Trennungsmatrix zum Trennen von Nukleinsäuren in der Probe von Verunreinigungen in der Probe aufweist, wobei die Trennungsmatrix funktionelle Gruppen zum bevorzugten Binden der Nukleinsäuren in der Probe aufweist.

37. System nach Anspruch 36, wobei die funktionellen Gruppen Poly-T Oligonukleotide umfassen.

38. System nach Anspruch 35, wobei das Reinigungssystem eine Silika- oder Gel-Matrix aufweist.

39. System nach Anspruch 35, wobei das Reinigungssystem Glaswolle aufweist.

40. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6 oder 7, wobei eine der Kammern eine Hybridisierungskammer zum Analysieren einer Komponente der flüssigen Probe aufweist, wobei der innerhalb der Hybridisierungskammer ein Oligonukleotid-Array vorhanden ist, das eine Vielzahl von verschiedenen Nukleinsäuresequenzen gekoppelt an einer Oberfläche eines einzelnen Substrats aufweist.

41. System nach Anspruch 40, wobei der Gehäusekörper ein durchsichtiges Gebiet umfasst, das zum Detektieren der Hybridisierung einer Komponente der flüssigen Probe an dem Oligonukleotid-Array angeordnet ist.

42. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6, oder 7, das weiter aufweist:

Einen Trennungskanal zum Trennen einer Komponente der flüssigen Probe, wobei der Trennungskanal durchflussmäßig mit wenigstens einer der Kammern verbunden ist und wenigstens erste und zweite Elektroden in elektrischem Kontakt mit gegenüberliegenden Enden des Trennungskanals zum Anlegen einer Spannung über den Trennungskanal aufweist.

43. System nach Anspruch 42, wobei eine der Kammern eine Hybridisierungskammer zum Analysieren einer Komponente der flüssigen Probe umfasst, wobei die Hybridisierungskammer ein Polymer-Array enthält, das eine Vielzahl von verschiedenen Polymersequenzen gekoppelt an eine Oberfläche eines einzelnen Substrats aufweist, wobei jede aus der Vielzahl von verschiedenen Polymersequenzen an einem anderen, bekannten Ort an die Oberfläche gekoppelt ist.

44. System nach Anspruch 43, wobei das Poly-

mer-Array wenigstens 100 verschiedene Polymersequenzen gekoppelt an die Oberfläche des einzelnen Substrats aufweist, wobei jede aus der Vielzahl der verschiedenen Polymersequenzen an einem anderen, bekannten Ort an die Oberfläche gebunden ist.

45. System nach Anspruch 43, wobei das Polymer-Array wenigstens 1000 verschiedene Polymersequenzen gekoppelt an die Oberfläche des einzelnen Substrats aufweist, wobei jede aus der Vielzahl der verschiedenen Polymersequenzen an einem anderen, bekannten Ort an die Oberfläche gebunden ist.

46. System nach Anspruch 43, wobei das Polymer-Array wenigstens 10.000 verschiedene Polymersequenzen gekoppelt an die Oberfläche des einzelnen Substrats aufweist, wobei jede aus der Vielzahl der verschiedenen Polymersequenzen an einem anderen, bekannten Ort an die Oberfläche gebunden ist.

47. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6 oder 7, wobei dem Gehäusekörper eine Basiseinheit zugeordnet ist.

48. System nach Anspruch 47, wobei die Basiseinheit weiter Durchflussanschlüsse zum Fördern von Flüssigkeit zu der Reaktionskammer aufweist.

49. System nach Anspruch 46, wobei die Basiseinheit weiter elektrische Anschlüsse zur Versorgung mit elektrischem Strom umfasst.

50. System nach Anspruch 1, 2, 5, 6, oder 7, wobei eine der Kammern eine volumetrische Kammer mit einem bekannten Volumen ist.

51. Verfahren zur Verwendung des Miniatur-Fluidiksystems nach einem der Ansprüche 1 bis 50 zur Ausführung einer Analyseoperation.

52. Verfahren zur Verwendung des Miniatur-Fluidiksystems nach einem der Ansprüche 1 bis 50 zur Durchführung einer Analyseoperation, wobei bei dem Verfahren:

Dem Gehäusekörper eine Probe zugeführt wird, biologische Materialien in der Probe in einer der Kammern analysiert werden und Nukleinsäure in der Probe in einer der Kammern amplifiziert wird, um amplifizierte Nukleinsäure zu erzeugen.

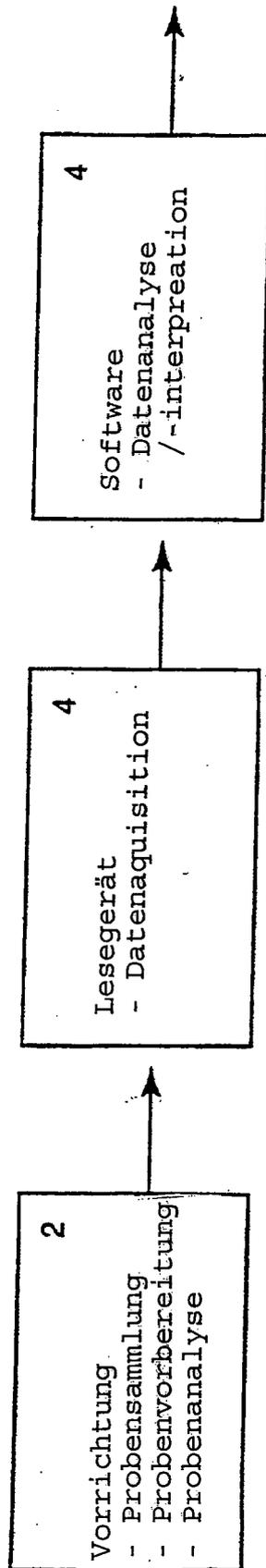
53. Verfahren nach Anspruch 52, bei dem weiter die amplifizierte Nukleinsäure an einem Oligonukleotid-Array hybridisiert wird.

54. Verfahren nach Anspruch 52, bei dem weiter die Hybridisierung der amplifizierten Nukleinsäure an

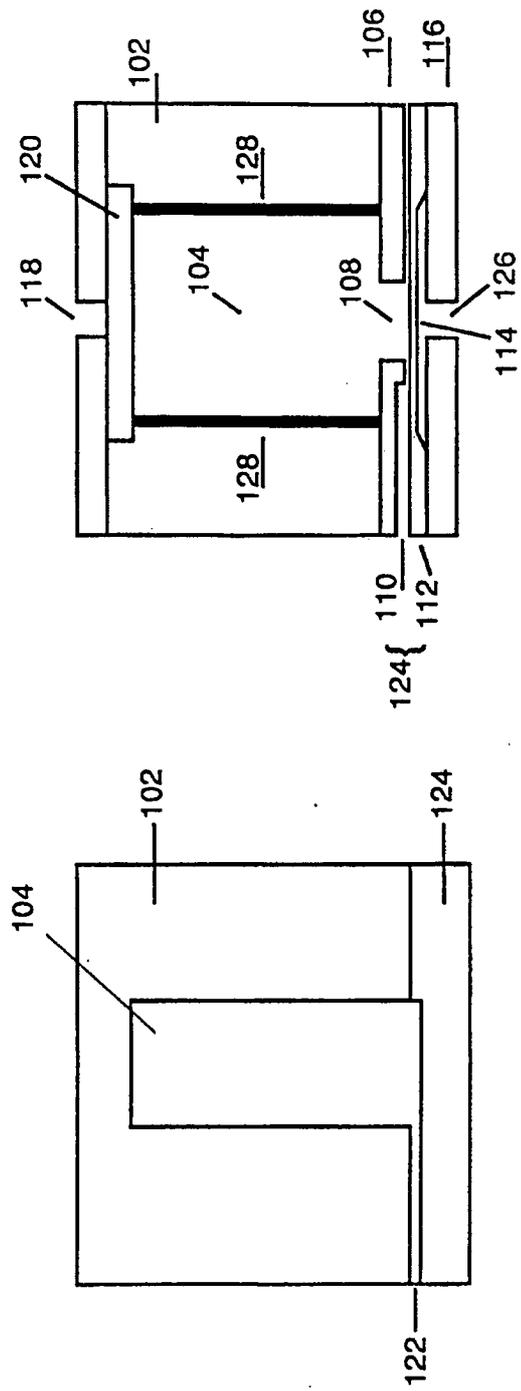
dem Oligonukleotid-Array detektiert wird.

Es folgen 26 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



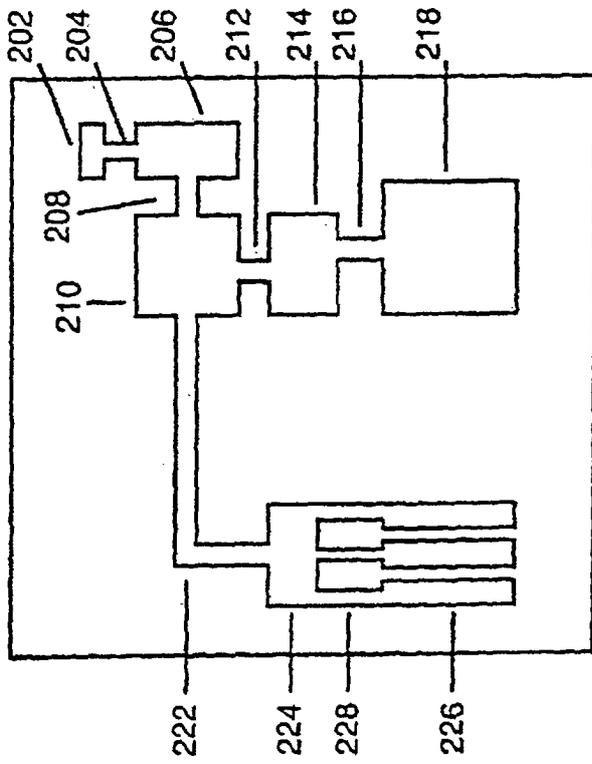
Figur. 1



Figur 2a

Figur 2b

Figuren 2a & 2b



Figur. 3

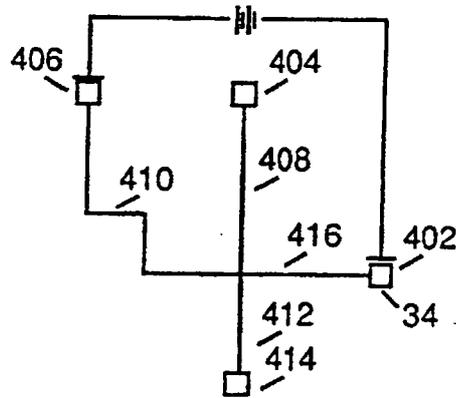


Fig. 4a

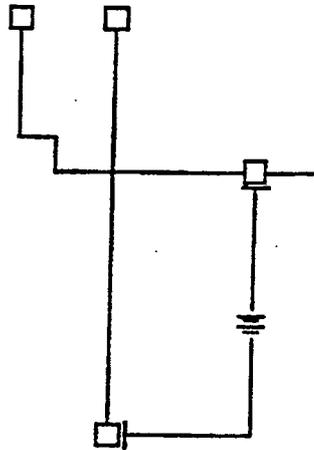


Fig. 4b

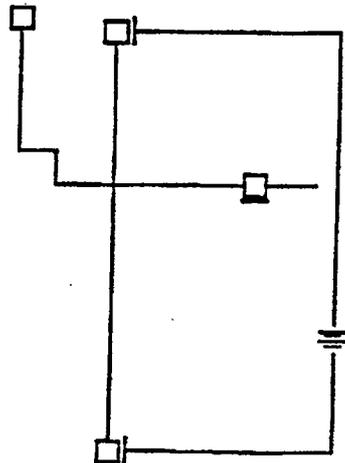
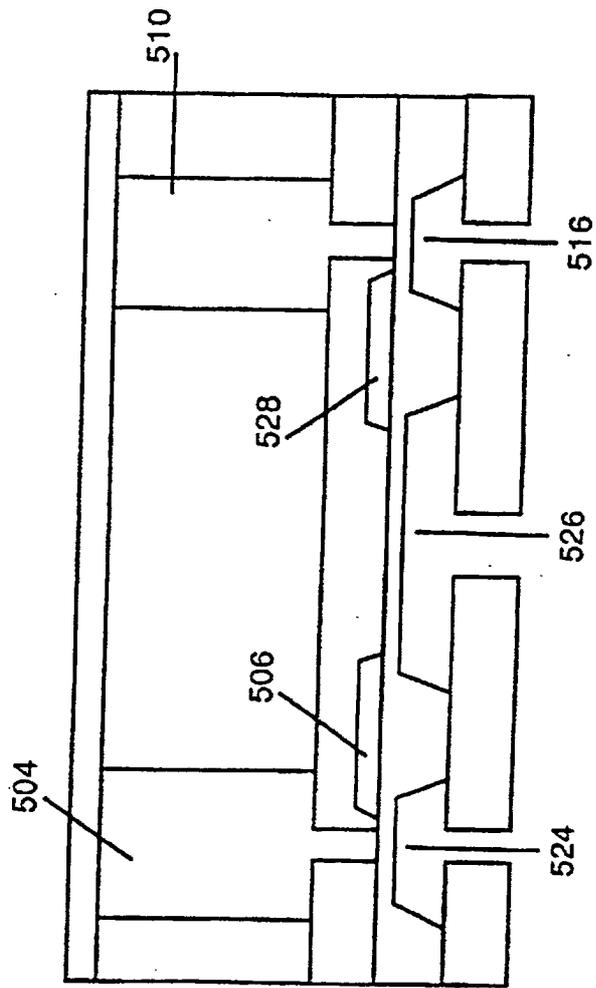


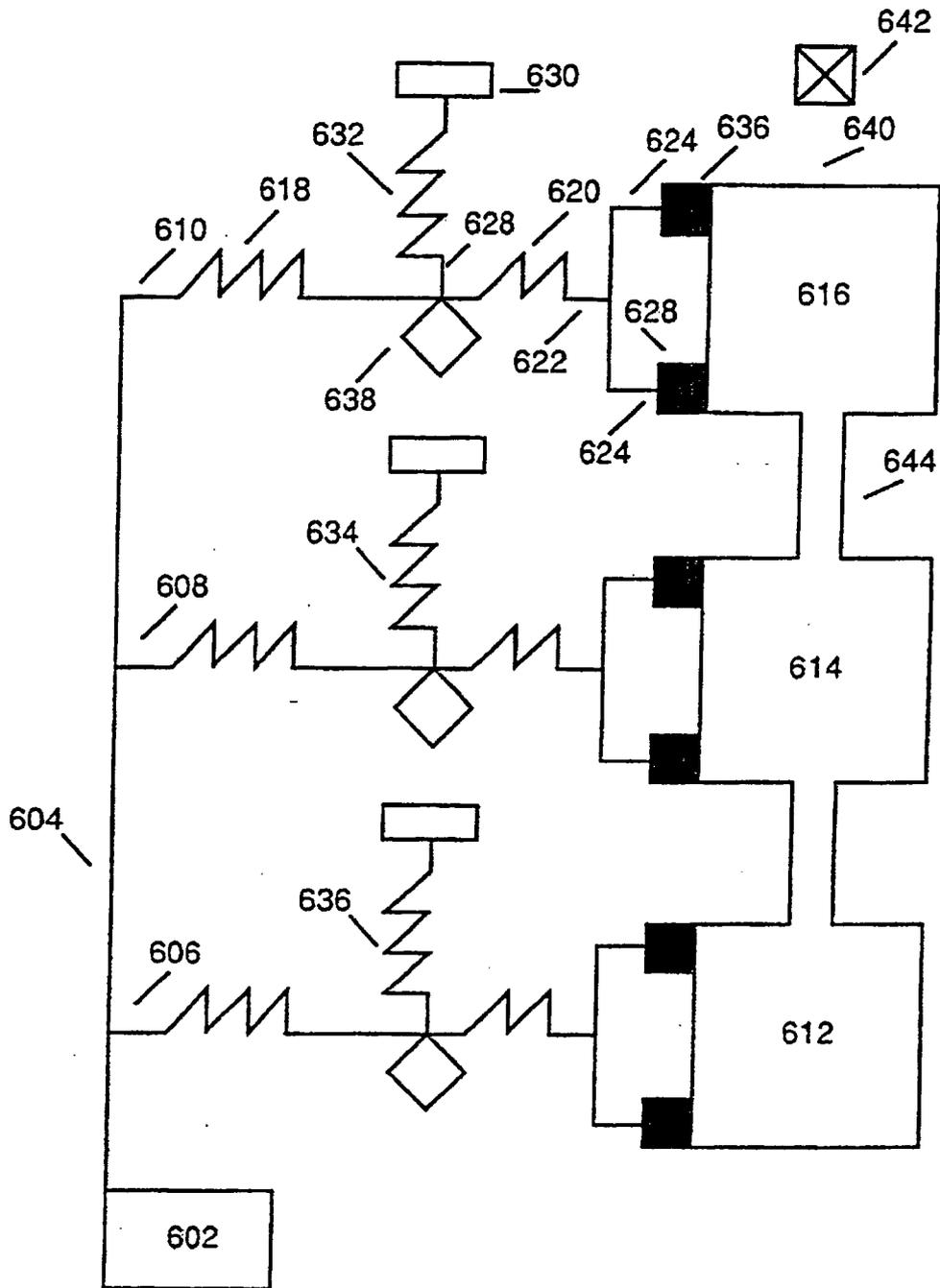
Fig. 4c

Figur: 4a-4c

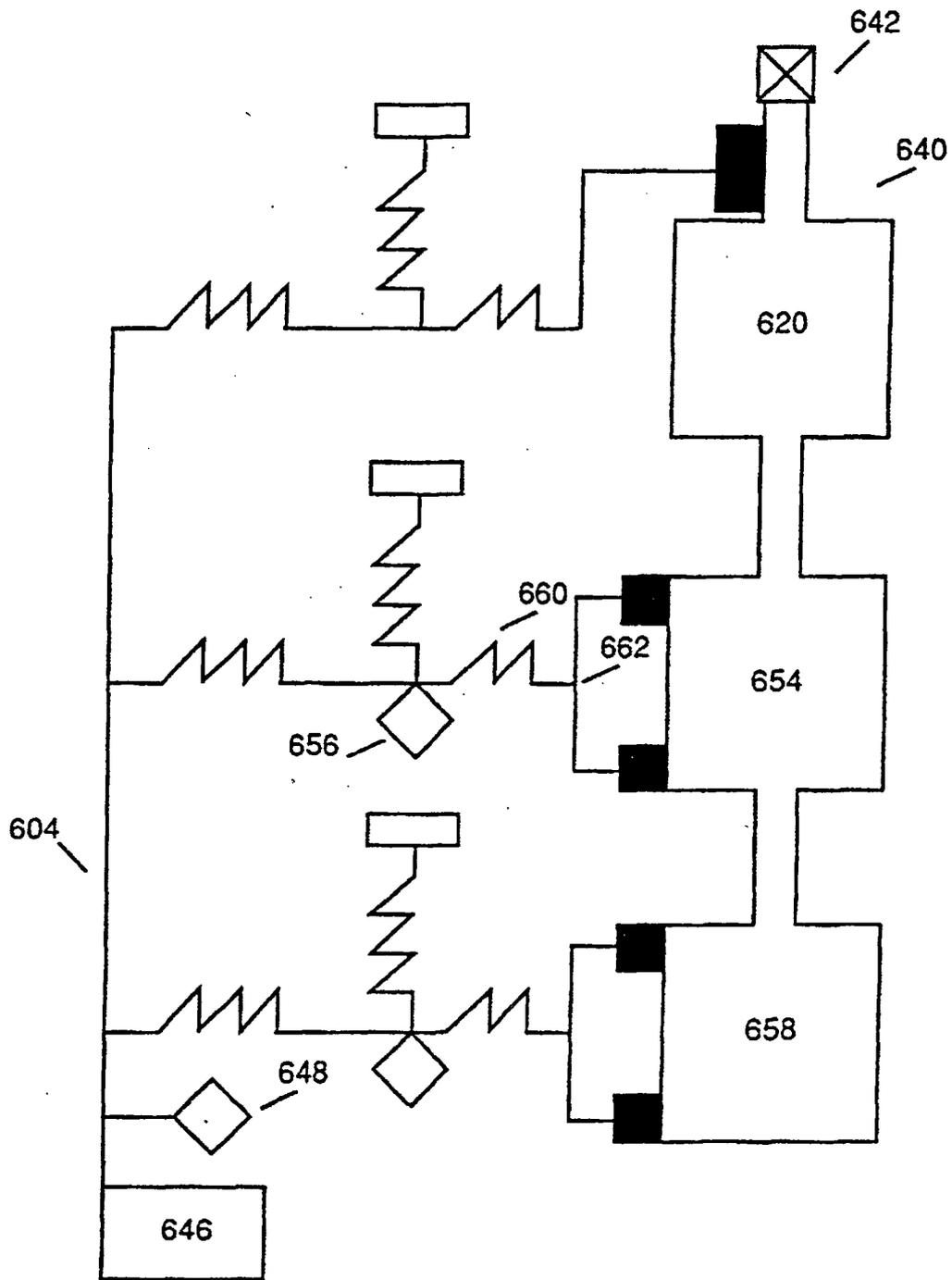




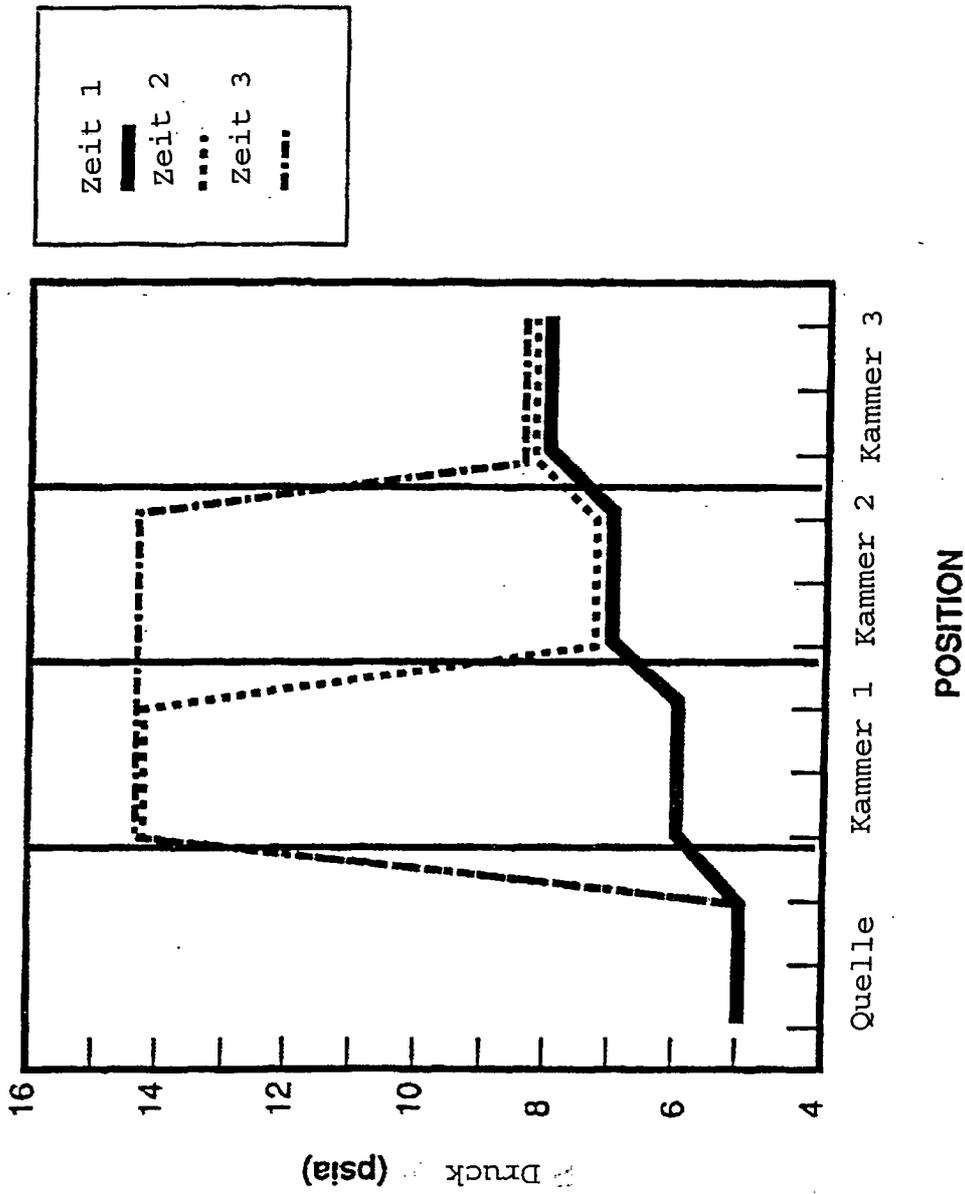
Figur 5b



Figur 6a



Figur 6b



Figur 6c

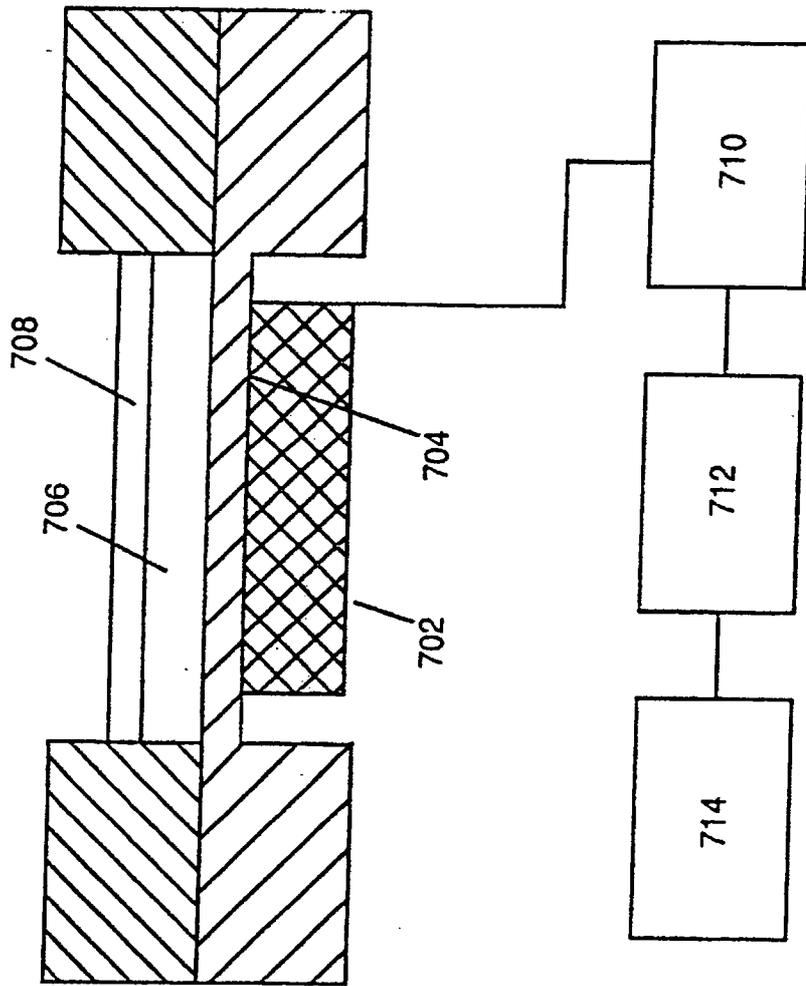


Figure 7a

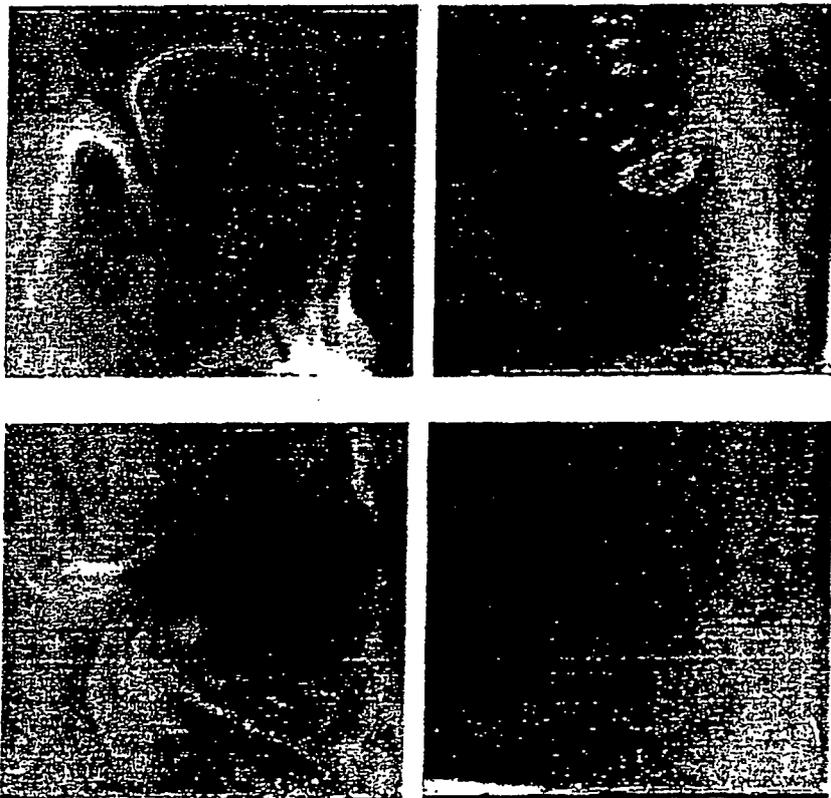
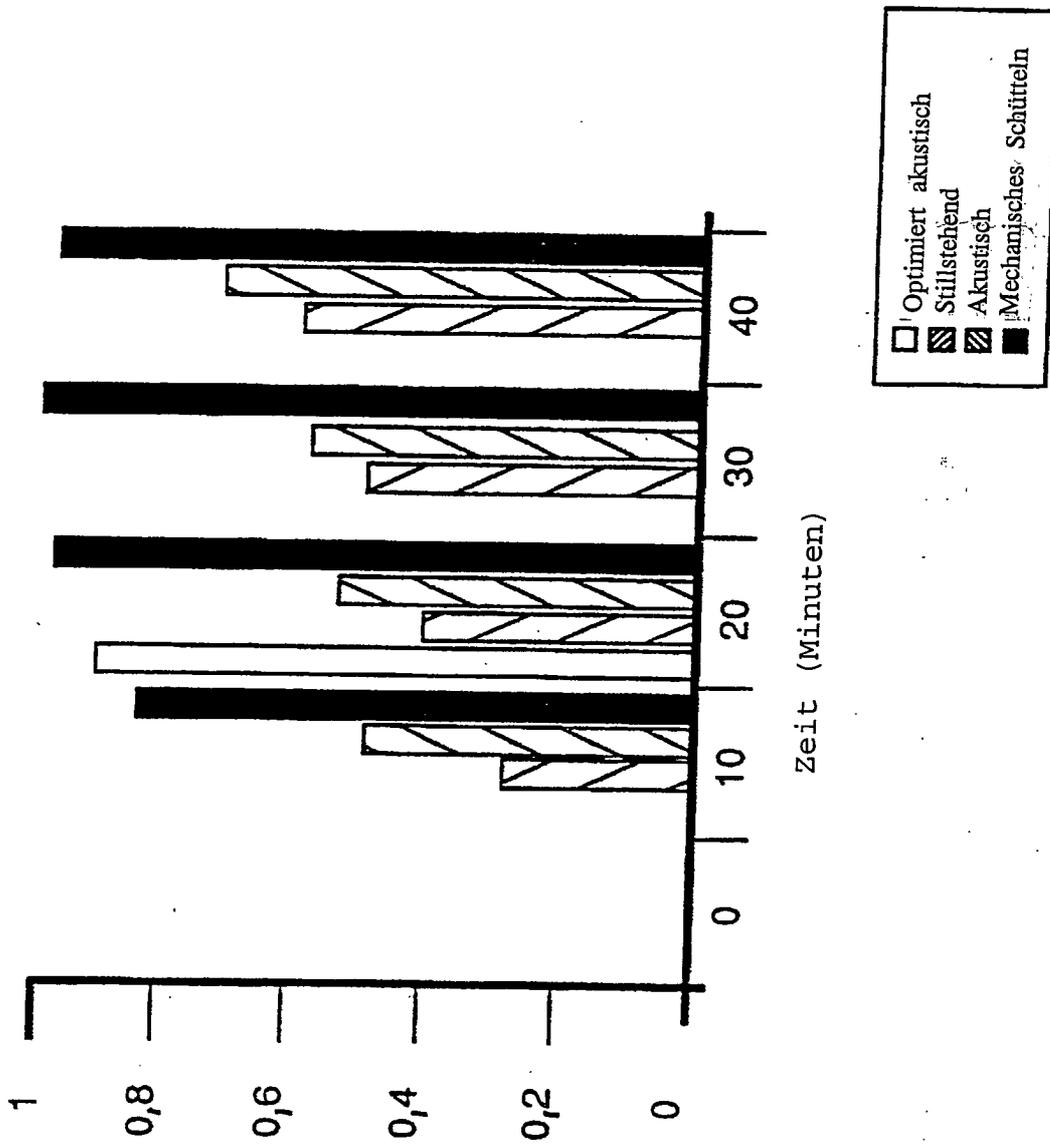


Fig. 7B



Figur 7c

800

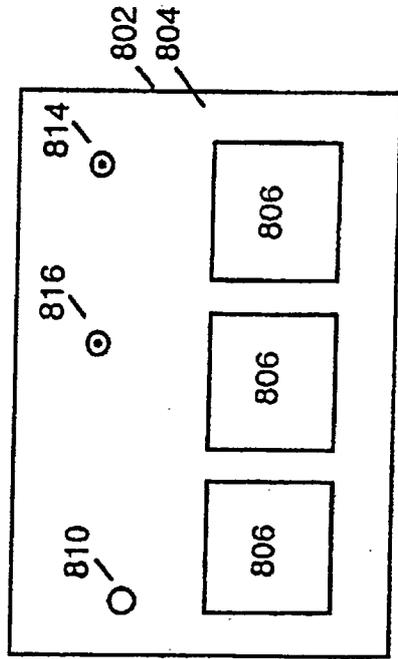


Fig. 8a

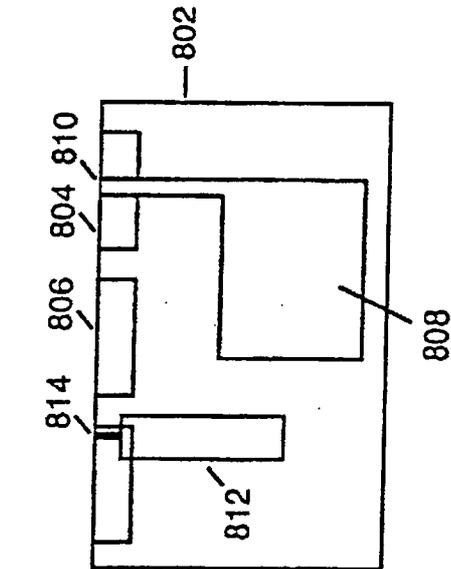


Fig. 8b

Figur : 8a & 8b

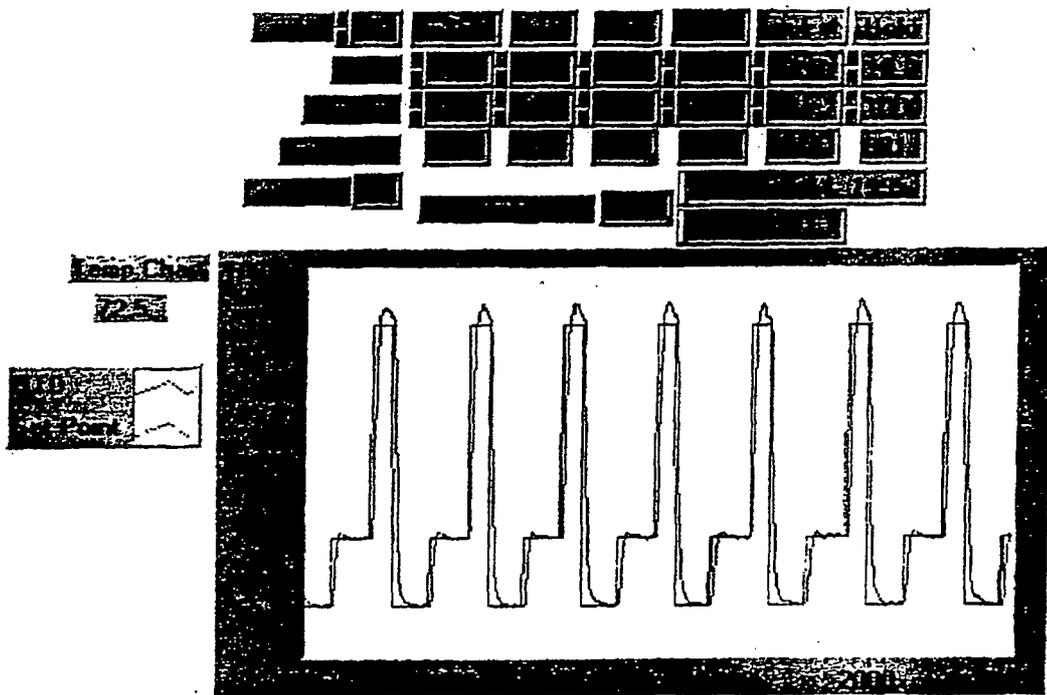
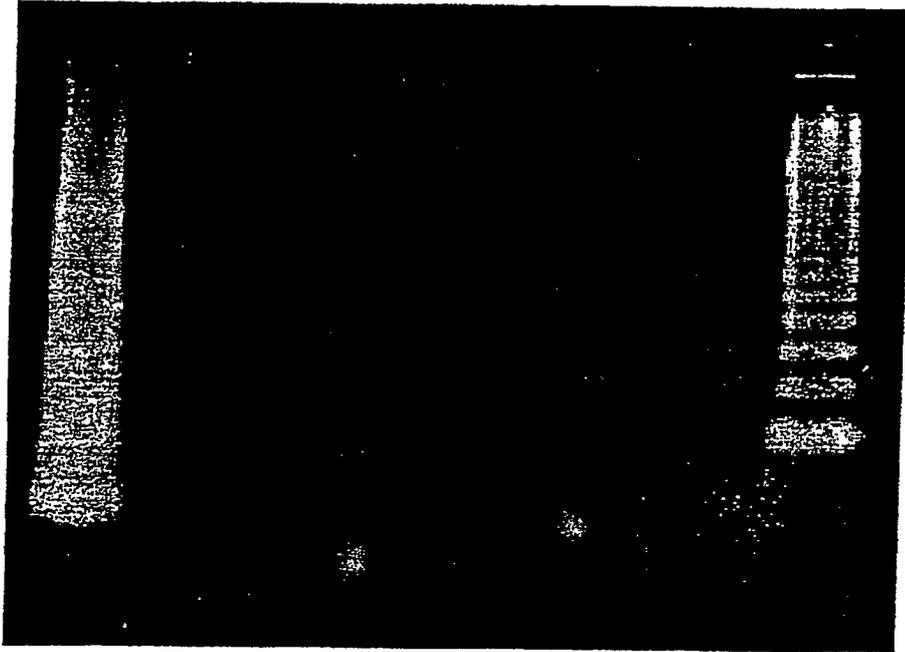


Fig. 9

t = 0 5 10 30 60 120 Minuten



Gu fragen:

74%	95.8%	95.9%
95.9%	95.5%	83%

Fig. 10A

**Standard**

Auf Röhrenbasis:



Fig. 10B

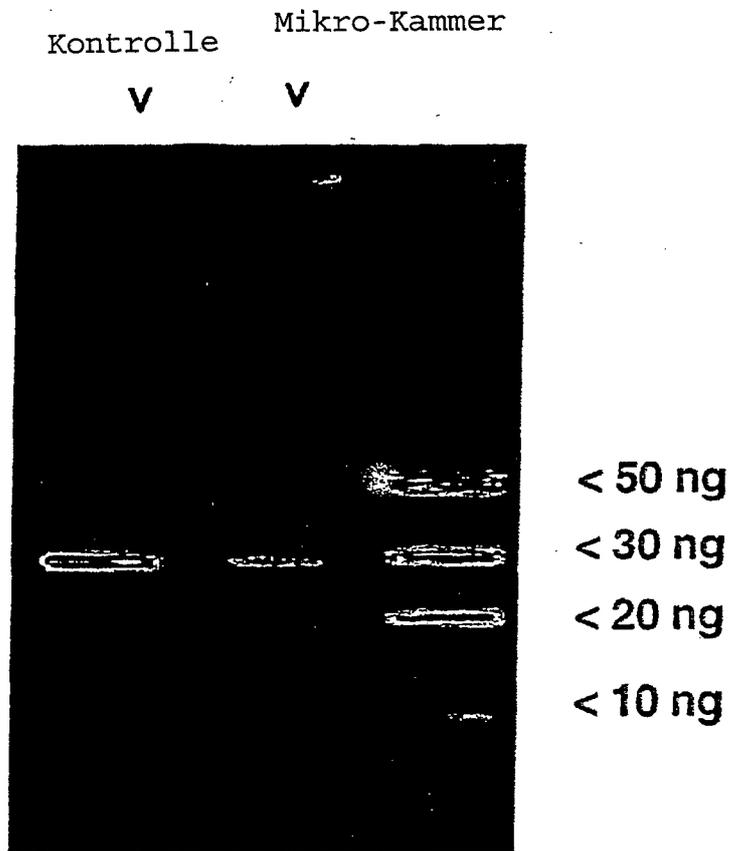


Fig. 10C

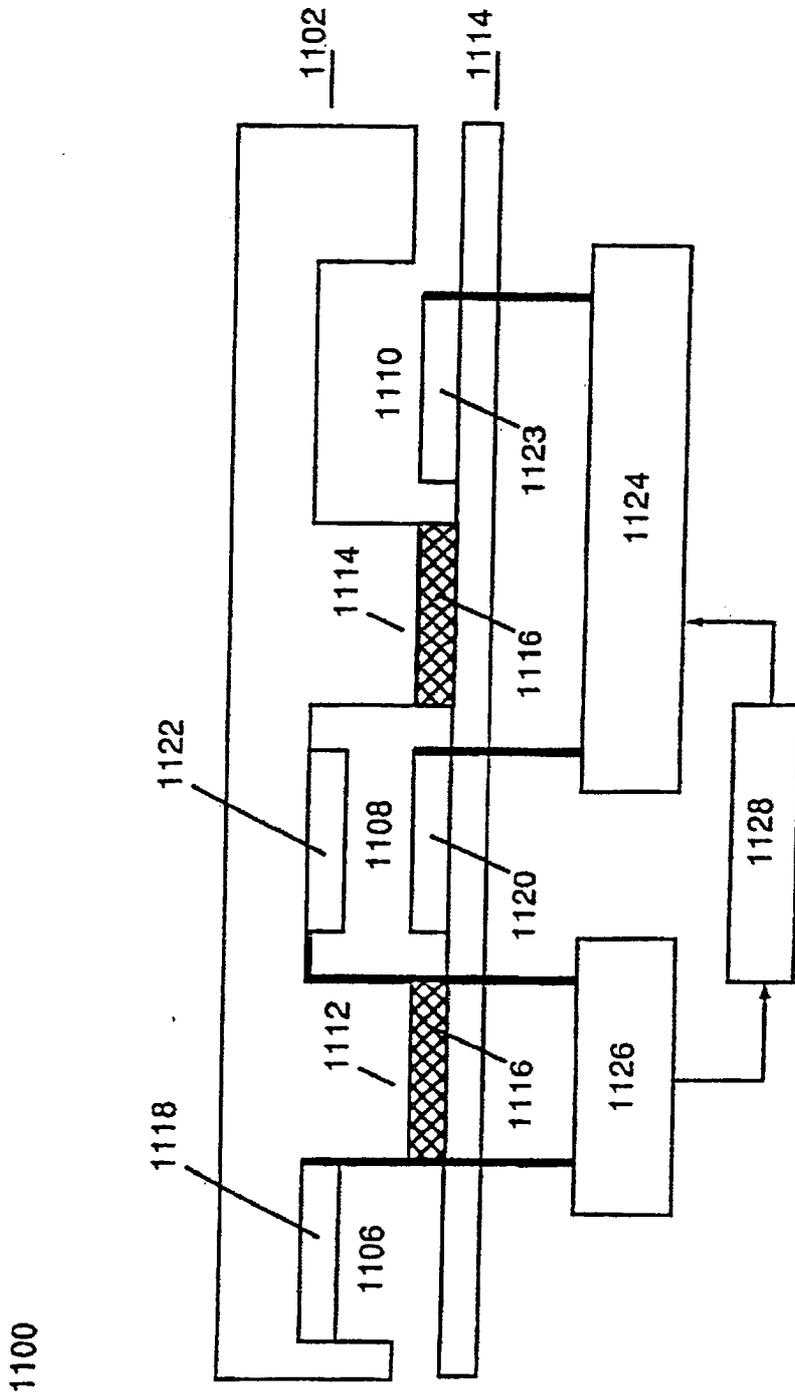


Figure 11

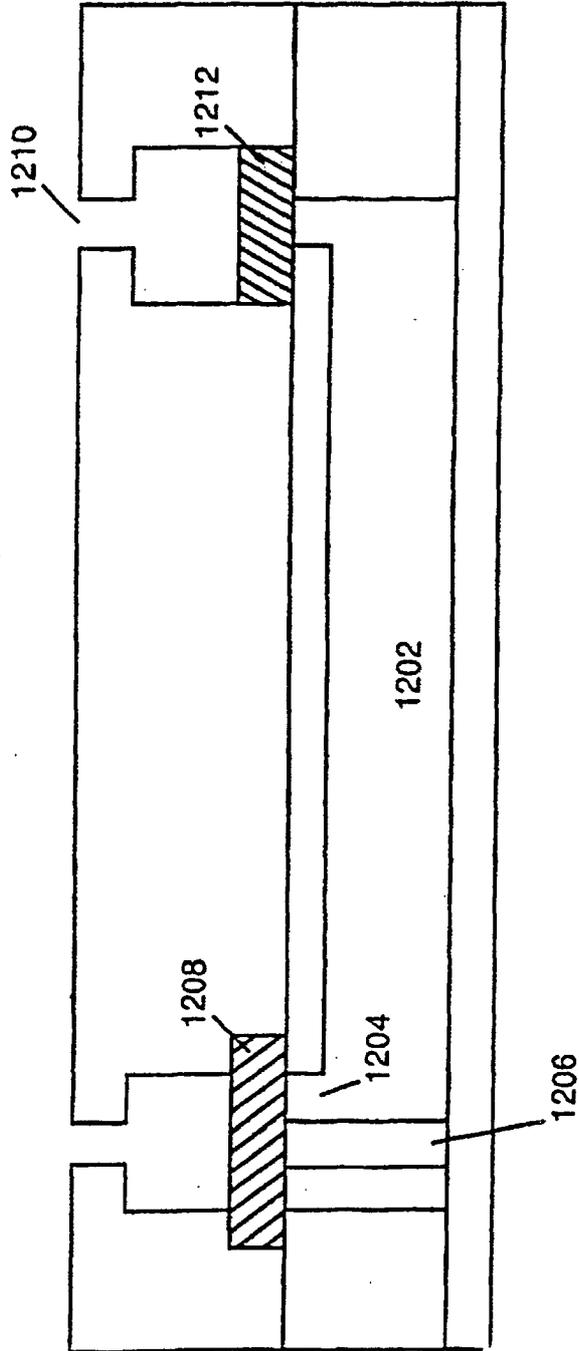
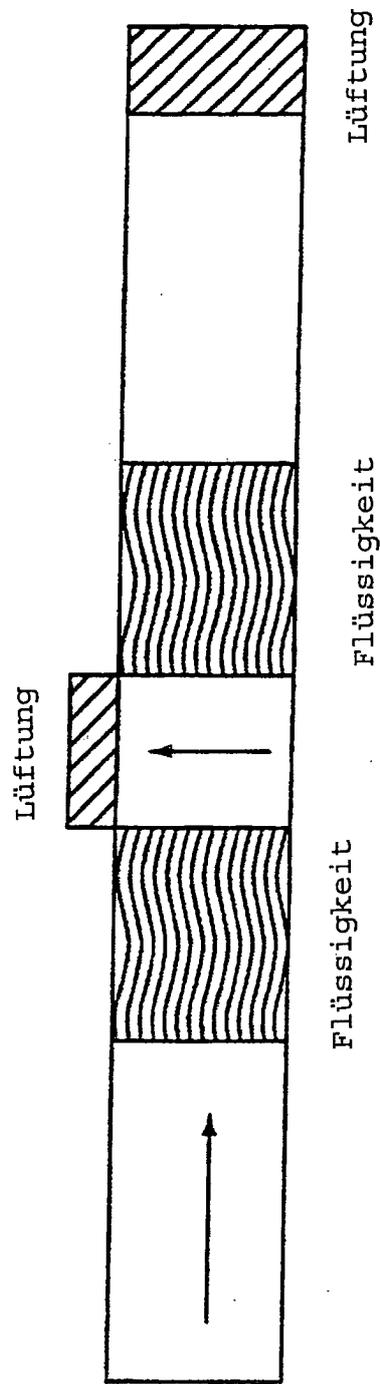


Figure 12a



Figur 12b

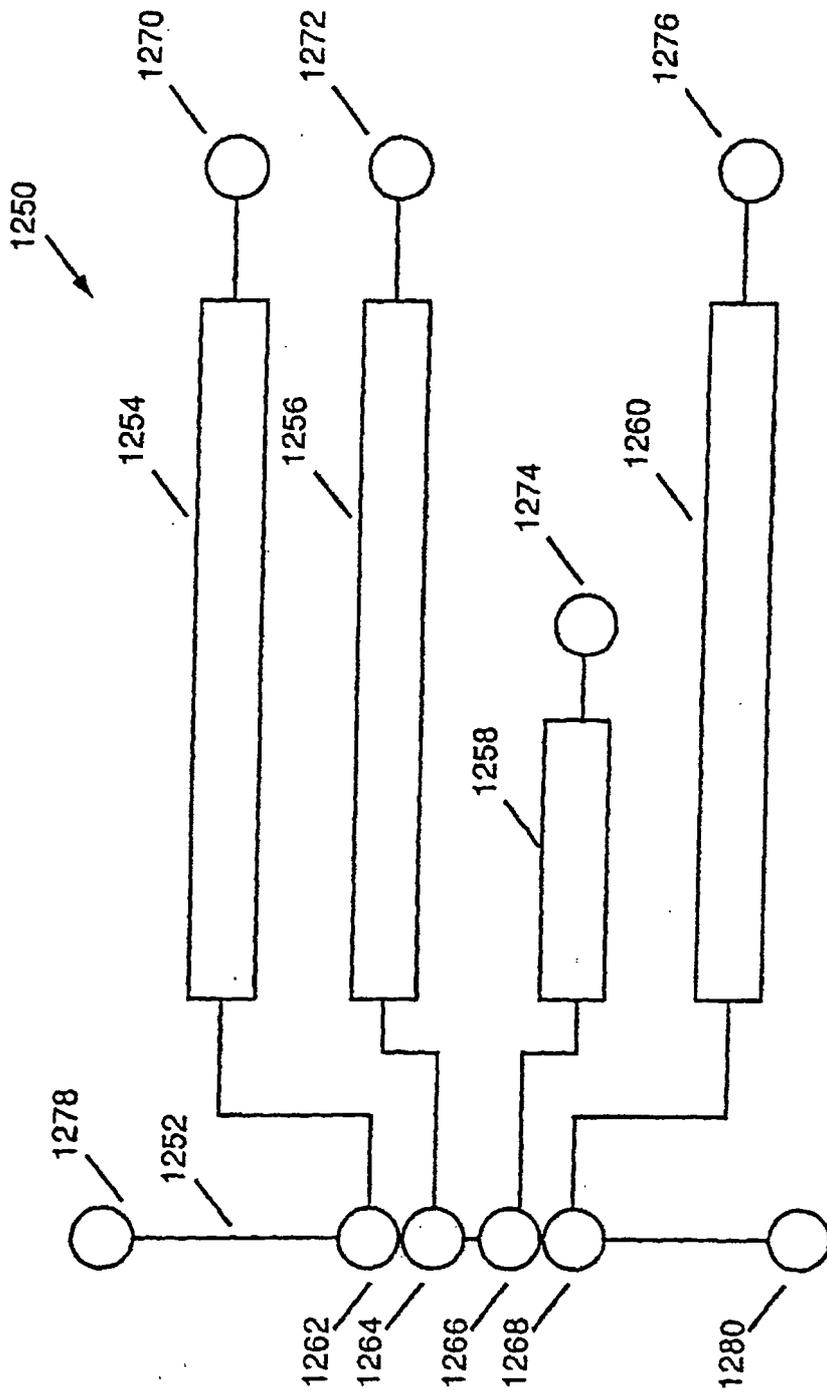


Figure 12c

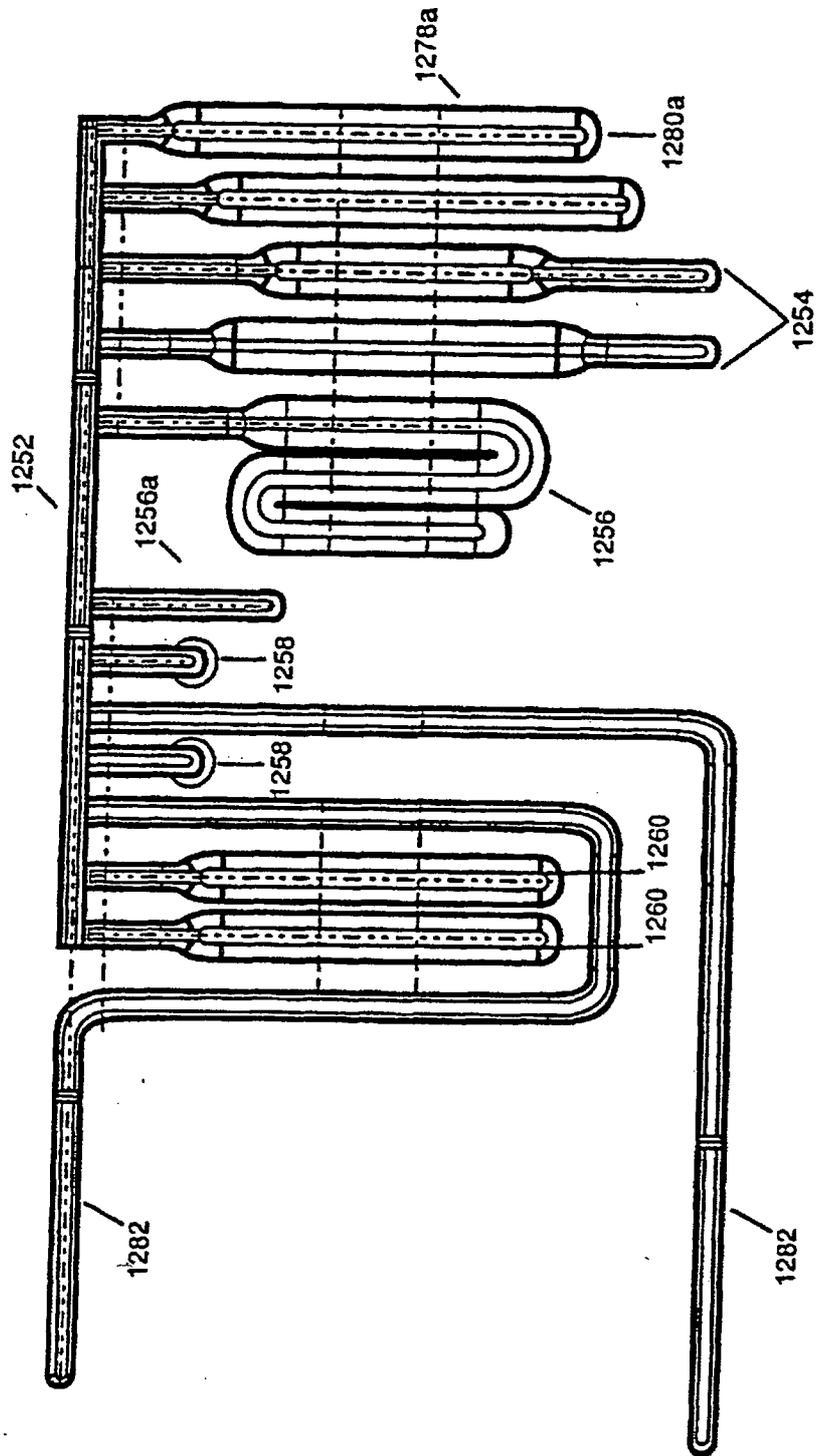
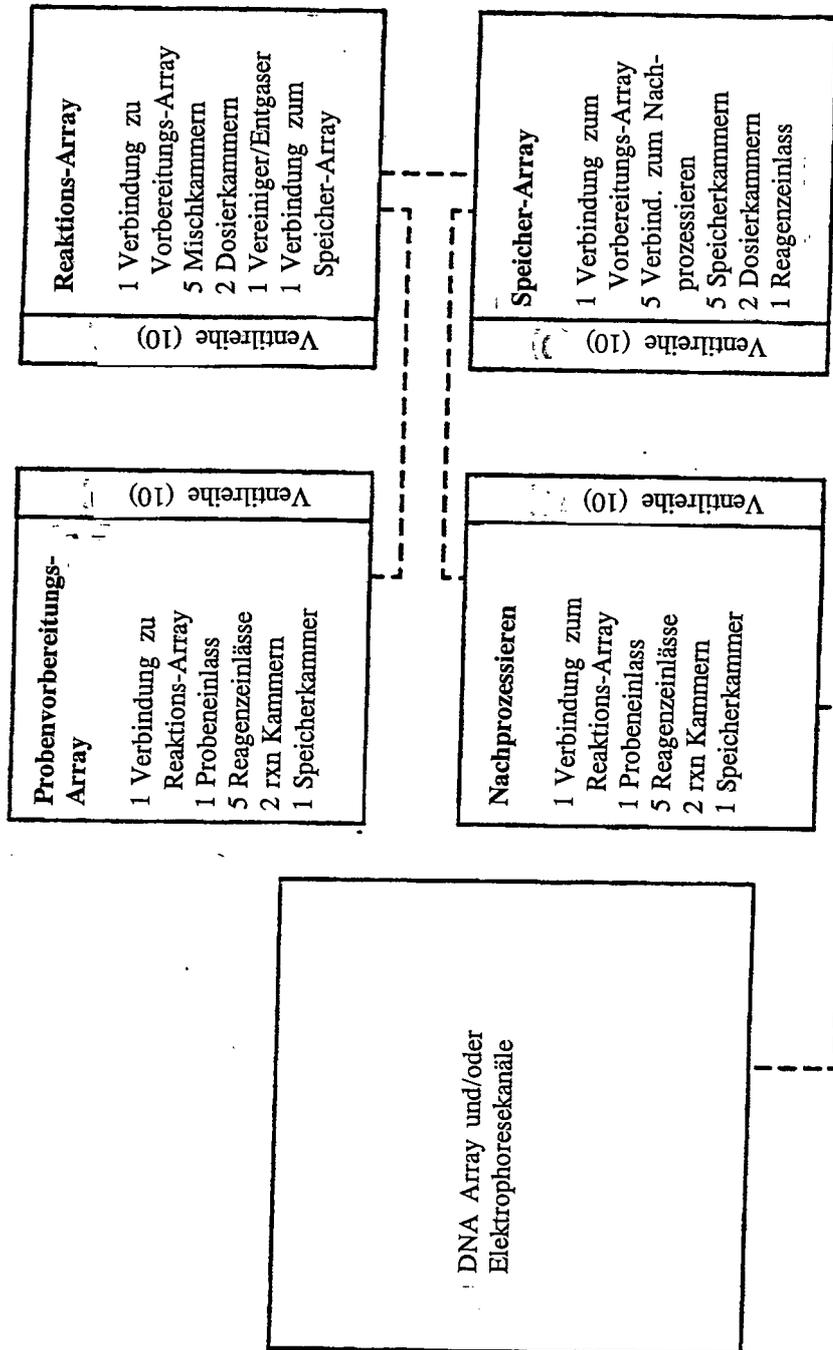
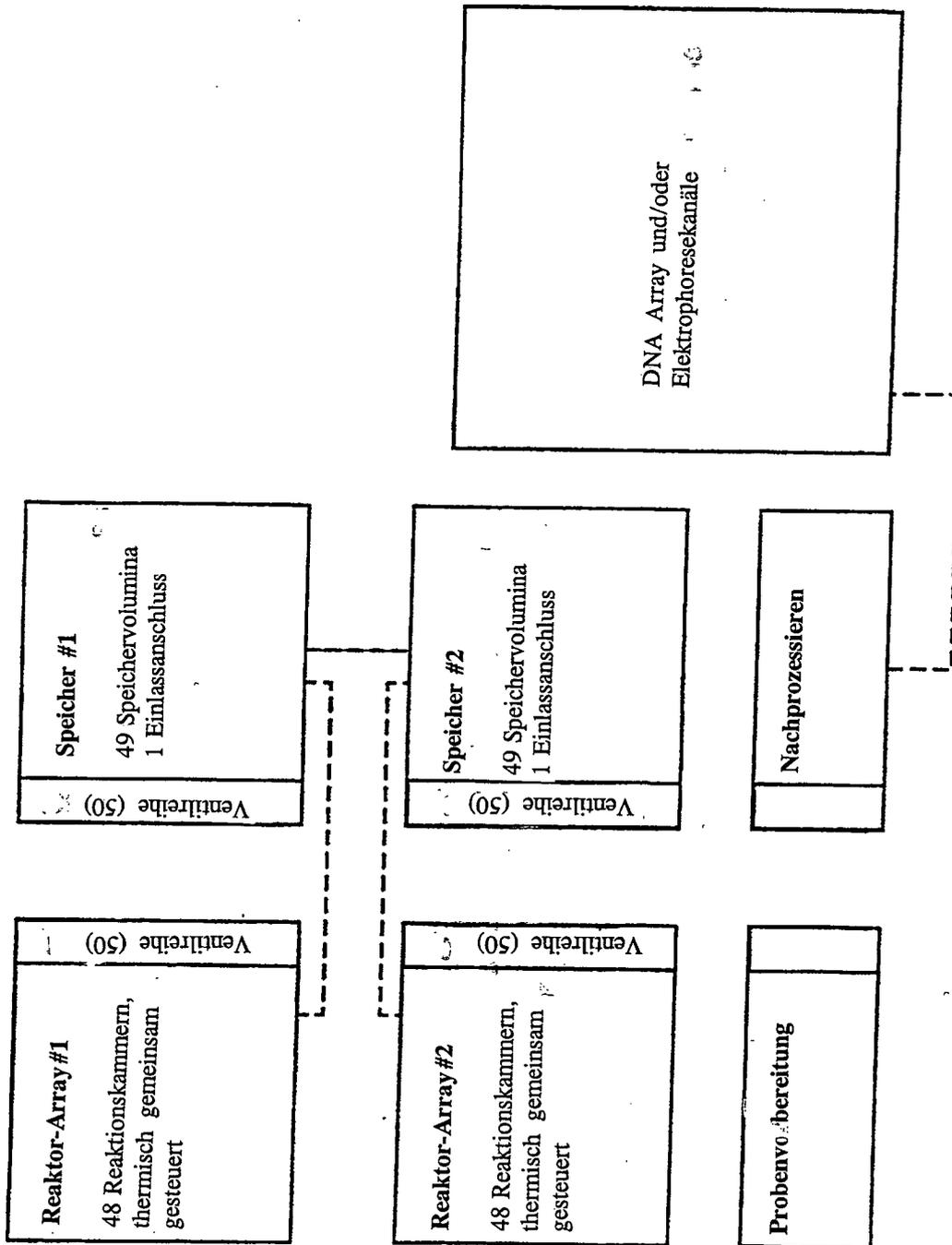


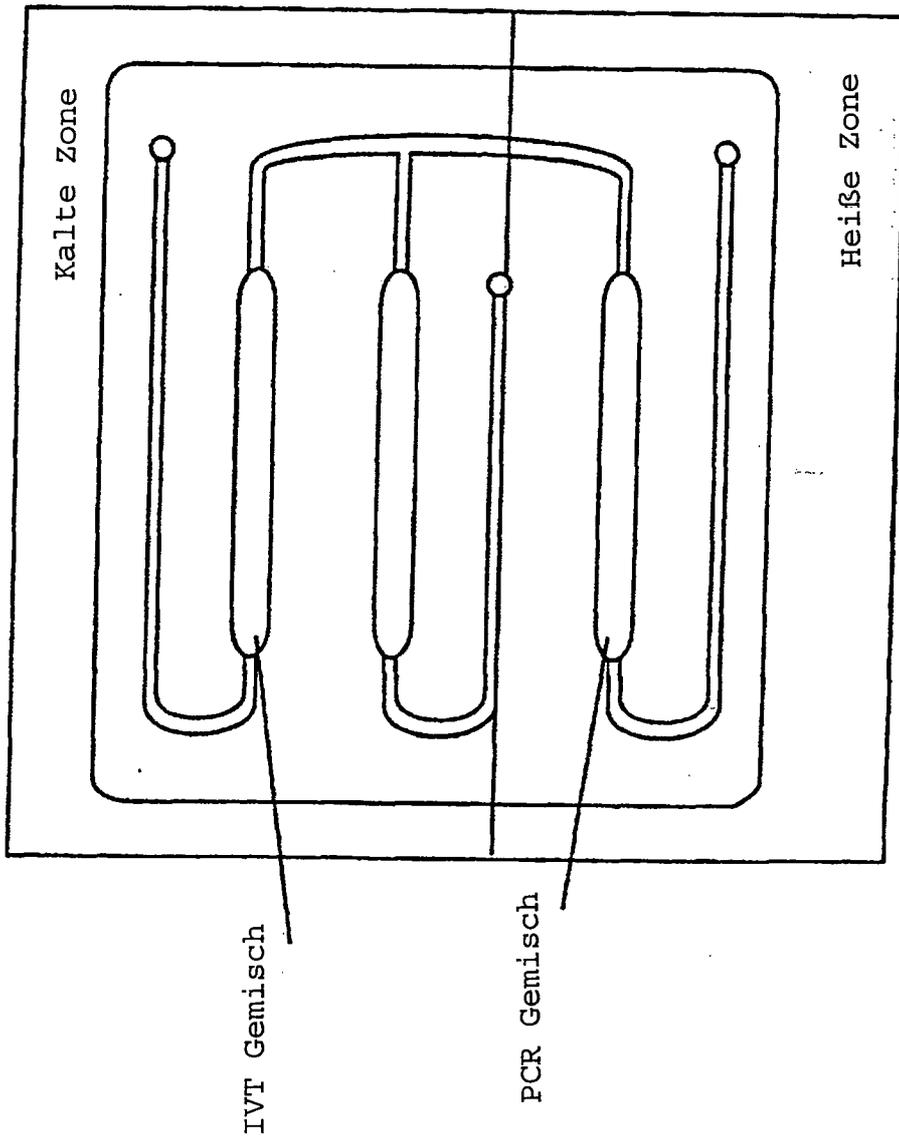
Figure 12d



Figur 13



Figur 14



Figur 15a

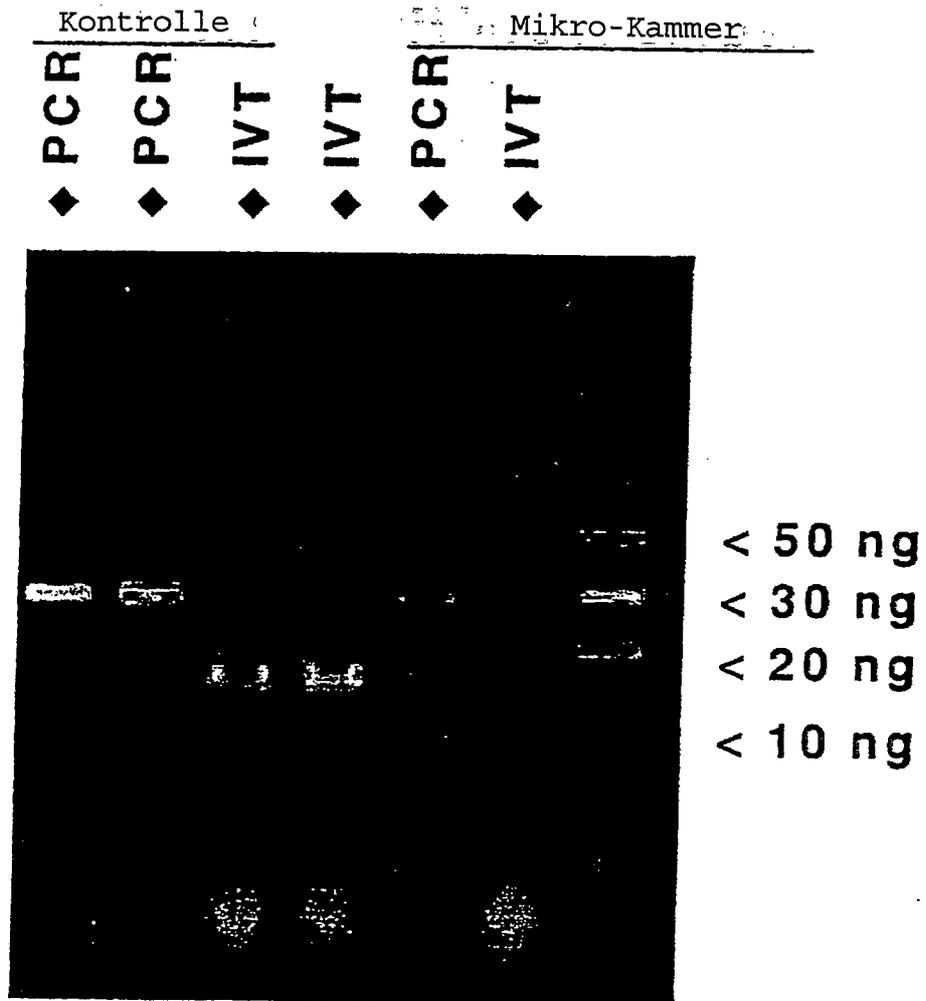


Fig. 15B