

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

B01L 3/00

G01N 1/28 B01D 35/00



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95192097.9

[43] 授权公告日 2003 年 6 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1110369C

[22] 申请日 1995.11.13 [21] 申请号 95192097.9

[30] 优先权

[32] 1994.11.14 [33] US [31] 08/338,369

[32] 1994.11.14 [33] US [31] 08/338,380

[32] 1994.11.14 [33] US [31] 08/338,728

[86] 国际申请 PCT/US95/14825 1995.11.13

[87] 国际公布 WO96/14934 英 1996.5.23

[85] 进入国家阶段日期 1996.9.13

[71] 专利权人 宾夕法尼亚州大学信托人

地址 美国宾夕法尼亚州

[72] 发明人 P·韦尔丁 L·J·克里卡

审查员 秦士魁

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

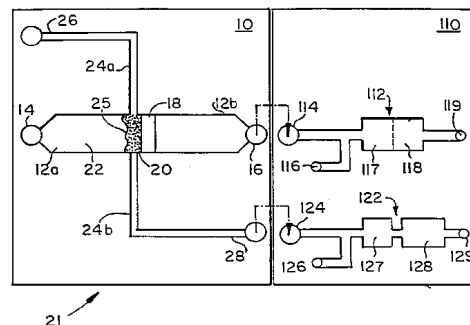
代理人 罗宏 谭明胜

权利要求书 4 页 说明书 29 页 附图 7 页

[54] 发明名称 用于测定和加工分析物的中尺度样品制备设备和系统

[57] 摘要

一种中尺度的样品制备设备，它能提供微量体积的试验样品，并分为细胞富含级份和降低的细胞内容物级分的两部分，以便进行各种分析，为结合分析、涉及多核苷酸扩增的鉴定等。也公开了包括这一设备的分析系统。



ISSN 1008-4274

1. 一种用以制备含有颗粒物质成份的用于分析的样品的设备，该设备包括具有样品入口和出口的样品流道，它们之间可以流通流体；还包括设置在所述入口和出口之间的隔板，该隔板的迎流面在流道中划出一个分隔区，在此分隔区内收集颗粒物质；还包括与分隔区之间能流通流体的渠道以便能从过滤区内取出所收集的颗粒物质，该渠道设有入口槽，用以引导载体流体进入分隔区直抵隔板的迎流面，还有出料槽，用以从隔板迎流面处引导载体流体流出分隔区；至少有一条流道和渠道的截面具有一处中尺度尺寸（mesoscale dimension）。
2. 权利要求 1 的设备，其中所说的流道具有至少一处中尺度尺寸，而所说的隔板包括一个该流道中的限流区，该限流区由至少一个具有至少一处中尺度尺寸是小于流道的最小中尺度尺寸的孔道形成，并小到足以从试验样品中分离出颗粒物质来。
3. 权利要求 2 的设备，其中所说的至少一个孔道中应具有至少一个弯头，这样可使至少孔道的一部分总是垂直于流道的。
4. 权利要求 1 的设备，其中流道和渠道是在固体基片的表面上形成的，并用一个与固体基片表面粘结的盖子密封起来。
5. 权利要求 4 的设备，其中隔板的形式是至少一个通常是用固体基片做的直立的凸起，该隔板放置在流道中来限制试验样品沿流道的流量。
6. 权利要求 4 的设备，其中所说的盖子是透明的。
7. 权利要求 1 的设备与联合使用的支座的结合体，该支座包括有容纳该设备的座套、与该设备上的样品入口相配合的试验样品输入导管、以及推动试验样品沿流道流动的推动器。
8. 权利要求 7 的结合体，其中所说的支座还包括有试验样品贮器。
9. 权利要求 7 的结合体，其中所说的支座还包括有与渠道上的入口槽相配合的载体流体输入导管和推动载体流体沿渠道流动的推动器。
10. 权利要求 9 的结合体，其中所说的支座还包括有载体流体贮器。

11. 用于鉴定流体样品中的分析物的系统，该系统包括权利要求 1 的样品制备设备和一种分析物测定设备，该测定设备包括：

固体基片，其上装配有：

样品入口；以及流道系统，流道系统包括有：

- 5 分析物测定区，它与入口之间可流通流体，该测定区内放有试剂，该试剂与分析物相互反应而产生可测定的产物，该产物可对分析物起鉴定作用；以及测定该产物的测定器；

样品制备设备的流道出口，它与分析测定设备的样品入口之间可以流通流体。

- 10 12. 权利要求 11 的系统，它的分析测定设备另外还包括连结入口和分析物测定区的样品渠道，至少有一个分析物测定区和样品渠道具有至少一处中尺度尺寸。

13. 权利要求 11 的系统，其中所说的试剂是结合物质，它能特异地结合分析物。

- 15 14. 权利要求 13 的系统，其中所说的分析物是抗原，而所说的结合物质是抗体。

15. 权利要求 13 的系统，其中所说的分析物是配体，而所说的结合物质是受体。

- 20 16. 权利要求 13 的系统，其中所说的分析物是预定序列的核苷酸分子，而所说的结合物质是其序列与分析物序列互补或同源的核苷酸分子。

17. 权利要求 11 的系统，它另外还包括对预先选定的从细胞衍生出的多核苷酸进行分析的设备，这种分析包括多核苷酸扩增反应，该多核苷酸分析设备包括：

- 25 固体基片，其上装配有：

样品入口；以及流道系统，流道系统包括：

多核苷酸扩增区，它与入口之间可流通流体，多核苷酸扩增区内放有用以扩增多核苷酸的试剂；还包括有用以溶胞的细胞溶解装置，它连结在样品制备设备渠道出料槽与多核苷酸扩增区之间，还有样品制备设

备渠道的出料槽，它与多核苷酸分析设备的样品入口之间可以流通流体。

18. 权利要求 17 的系统，它还另外包括多核苷酸分析设备上的样品渠道，该渠道把分析设备入口与多核苷酸扩增区连结起来，至少一个  
5 多核苷酸分析区和与之连结的样品渠道具有至少一处中尺度尺寸。

19. 权利要求 11 的系统与联合使用的支座的结合体，该支座包括有容纳该系统的座套、与样品制备设备的样品入口相配合的试验样品输入导管、以及推动试验样品沿样品制备设备流道流动的推动器。

20. 权利要求 19 的结合体，其中所说的支座上还包括有试验样品  
10 贮器。

21. 权利要求 17 的系统与联合使用的支座的结合体，该支座包括有容纳该系统的座套、与样品制备设备的样品入口相配合的试验样品输入导管、以及推动试验样品沿样品制备设备流道流动的推动器、与样品制备设备渠道入口槽相配合的载体流体输入导管以及推动载体流体沿  
15 渠道流动的推动器。

22. 权利要求 21 的结合体，其中所说的支座上还包括有载体流体贮器。

23. 权利要求 21 的结合体，其中所说的支座上还包括有测定器，它是用来在分析测定设备或多核苷酸分析设备内测定试验样品的特性  
20 指标的。

24. 对预先选定的从细胞衍生出的多核苷酸进行分析的系统，这种分析包括多核苷酸扩增，该系统包括权利要求 1 的样品制备设备和进行多核苷酸扩增的设备，该扩增设备包括：

固体基片，其上装配有：

25 样品入口；以及流道系统，流道系统包括有：

多核苷酸扩增区，它与入口之间可流通流体，多核苷酸扩增区内放有用以扩增多核苷酸的试剂，至少一个样品渠道和多核苷酸扩增小室具有至少一处中尺度尺寸；在反应区上游方向渠道内的细胞溶胞装置，用以溶解细胞；样品制备设备渠道上的出料槽，它与多核苷酸扩增设备的  
30 入口之间可以流通流体。

25. 权利要求 24 的系统, 它在多核苷酸扩增设备内另外还包括连结入口与多核苷酸扩增区的样品渠道, 至少一个多核苷酸扩增区和与之连结的渠道具有至少一处中尺度尺寸。

5 26. 对含有颗粒物质成份的流体样品中的分析物进行鉴定的系统, 该系统包括有样品制备设备, 该制备设备包括具有样品入口和出口的流道, 相互间可流通流体; 在入口和出口之间配置有隔板, 该隔板的迎流面在流道中划出一个分隔区, 在此收集颗粒物质; 该系统还包括分析物测定设备, 该测定设备包括:

固体基片, 其上装配有:

10 样品入口; 以及流道系统, 流道系统包括有:

分析物测定区, 它与入口之间可流通流体, 该区内放有能与分析物相互反应而生成可测定产物的试剂, 该产物对分析物可起到鉴定作用; 以及测定该产物的测定器。

15 样品制备设备的流道出口, 它与分析物测定设备的样品入口之间可以流通流体, 而且至少一条流道和测定区具有至少一处中尺度尺寸。

27. 权利要求 26 的系统, 它在样品制备设备上另外还包括有渠道, 它与分隔区之间可以流通流体, 以使能从过滤区内把所收集的颗粒物质组分卸取出来, 该渠道上有入口槽用以往分隔区导入载体流体直抵隔板的迎流面, 渠道上还有出料槽以便从隔板迎流面处把载体流体导出  
20 分隔区。

28. 权利要求 27 的系统, 其中至少一条渠道的截面具有至少一处中尺度尺寸。



(1990)。美国的 Ciba Corning Diagnostic Corp.公司制造出了一种微处理器控制的探测血液凝块用的激光光度计。

5 显微切削工艺始于微电子工业。见 Angell 等, Scientific American, 248: 44--55 (1983)。显微切削工艺使得具有微细尺寸结构部件的显微工程设备的制造成为可能, 这些结构部件的微细尺寸的范围为从数十微米(生物细胞的尺寸)至数毫微米(某些生物大分子的尺寸)。迄今所报导的包含如此微小结构的多数科学仪器都与微机械学即机械运动和流动特性的研究有关。这些设备在生命科学中的潜在能力尚未全部发挥出来。

10 Brunette (Exper.Cell Res.,167:203--217 (1986) 和 164:11--26 (1986))研究了成纤维细胞和上皮细胞在硅、钛涂层聚合物等的凹槽中的行为。McCartney 等人(Cancer Res.41:3046--3051 (1981))考察了瘤细胞在开槽的塑料基片上的行为。LaCelle(Blood Cells,12:179--189 (1986))研究了微血管中的红白细胞流以取得对微循环的透彻理解。

15 Hung 和 Weissman 报导了一项在显微切削的渠道中的流体动力学研究, 但没有做出与分析设备相关数据。见 Hung 等, Med.and Biol. Engineering,9:237--245 (1971); 和 Weissman 等, Am.Inst.Chem.Eng.J.,17:25--30 (1971)。Columbus 等人利用由两块刻有正交 V 形导向槽的板子构成的夹心结构来控制生物流体在实验

20 型多路测试设备中流向分立的离子选择电极的毛细流。见 Columbus 等, Clin. Chem.,33:1531--1537 (1987)。Masuda 等和 Washizu 等曾报道过一种用于细胞操作(即细胞融合)的流体流小室的运用。见 Masuda等, Proceedings IEEE/IAS Meeting,PP.1549--1553 (1987);和 Washizu 等,Proceedings IEEE/IAS Meeting,PP.1735--1740 (1988)。在

25 本领域中,运用显微工程设备在流体样品特别是在生物分析中鉴定分析物的潜力尚未全部挖掘出来。

利用多核苷酸扩增技术来进行生物分析是众所周知的(见例如 Maniatis 等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, PP. 14.1--14.35)。这种技术之一就是PCR扩增, 它可

30 利用热稳定的DNA聚合酶例如 Taq DNA 在 DNA 模板上实现(Chien

等, J.Bacteriol.,127:1550 (1976) ),三磷酸核苷和两个有着不同序列的寡核苷酸, 这些序列与模板 DNA 对立两股上的序列互补, 并位于在要扩增的 DNA 片段(“引物”)的侧翼。这些反应成分在促使双链结构的模板 DNA 变性(dehybridizing)的高温(例如 94℃)和随后令其复性(annealing)和延伸(polymerization)的较低温度(例如 65℃)下重复进行多次。在变性、复性和延伸温度下的重复反应周期中, 模板DNA约可得到指数级的扩增。利用温度变化周期来进行自动化的PCR 链式反应的设备现已可以买到(Perkin Elmer Corp.)。

PCR 扩增技术已被应用于诸多方面, 如遗传紊乱的诊断(Engelke 等Proc. Natl.Acad.Sci.,85:544 (1988) ), 临床样品中致病生物体核酸序列的测定(Ou等, Science, 239:295 (1988) ), 法医样品如精液的遗传学鉴别(Li 等Nature, 335:414 (1988) ),活化的癌基因突变的分析(Farr 等, Proc. Natl. Acad.Sci., 85: 1629 (1988) )以及分子克隆的许多方面(Oste,BioTechniques,6:162 (1988) )。PCR 分析可用于广阔的应用范围, 如用作探针的克隆出来的双链结构 DNA 特定序列的生成; 依靠有选择地扩增 cDNA 特定片段而生成特定于非克隆基因的探针; 从少量 mRNA 生成 cDNA 文库;用于测序的大量 DNA 的生成; 以及突变的分析等。需要一种方便而快速的系统来实现多核苷酸扩增, 这一技术在临床试验上有广阔的潜在应用范围, 例如亲缘关系试验、遗传疾病和传染疾病的试验等。

现在用来鉴定微生物的现有分析技术很少有自动化的, 通常需要在适当的培养基中培养以增加生物体的数量, 并且通常是用可视或化学方法来辨别所要查验的菌株或亚种。这种方法固有的迟延常常造成在分辨出感染的性质以前就进行药物干预。在工业保健、公众保健和临床环境下, 这样的迟延可能造成不幸的后果。需要有一种能快速测定微生物的方便系统。

本发明的目的是要提供一种与相关分析设备联用的样品制备设备, 它能基于极小的容积快速有效地分析样品流体, 并在极低浓度下鉴定其中存在的物质。另一个目的是要提供一种易于大量生产的、操作方便的、小型的(例如小于 1cc 容积)设备, 它具有显微装配的结构件,



它能使生物学和其它范围内对分子分析物或细胞分析物包括细胞内分子如DNA的分析快速化和自动化。本发明进一步的目的是要提供多种多样的这类设备，它们各自可以用来进行一定范围内的快速临床试验，如病毒或细菌感染试验、遗传调查试验、精子游动试验、血液指标试验、食品、水或体液中的污染物试验等等。

### 发明概述

本发明提供一种显微装配 (microfabricate) 的样品制备设备，它能方便地提供各种生物学分析和其它分析用的、含有颗粒物质、如细胞的微量体积的试验样品。本发明还进一步提供包括显微装配的样品制备设备和与之共同使用的显微装配的分析物测定设备，例如免疫分析设备和/或进行多核苷酸扩增的显微装配的设备。

本发明的样品制备设备上包括有样品流道，它有样品的入口和出口，相互间可流通流体，在入口和出口中间装有隔板。隔板的迎流面在流道中隔出一个分隔区，在此收集样品流体中存在的颗粒物质。该制备设备优选地包括有与分隔区相通的渠道，通过该渠道能卸取分隔区内的颗粒物质。渠道上有一入口槽供引导载体流体进入分隔区直抵隔板的迎流面之用，渠道上还有一出料槽以把隔板迎流面处的载体流体导出分隔区。至少有一条流道和一条渠道的截面具有至少一处中尺度的尺寸，其特征将在后文叙述。

在本发明的一个实施方案中，流道有至少一处中尺度尺寸，而隔板上在流道中限制流量的区域，该区域系由具有至少一处中尺度尺寸的至少一条孔道构成，该中尺度尺寸小于流道上最小的中尺度尺寸，并小到足以能从样品流体中分离出颗粒物质来。

本发明的样品制备设备可用众所周知的显微装配技术来制造，把流道和渠道做在固体基片的表面上。在优选的实施方案中，装有结构件的基片表面上封有盖子，比如粘结在基片表面上的透明玻璃或塑料盖子。

本发明的中尺度样品制备设备特别适于与中尺度测定设备连接使用，和/或与中尺度多核苷酸扩增设备连接使用，这两者分别是共同未决的美国系列号07/877,702和08/038,199的发明目标。'702和'

199 申请的全部公开内容都在本申请中引入以供参考，就象在此列述一样，这在上文中已经提到过。

上述的中尺度设备可以各种组合方式用来作为分析系统而发挥作用，下文将要进一步详细描述。在一个实施方案中，这些设备可用来进行含有细胞的试验样品的分析。由本发明的样品制备设备所提供的试验样品的一部分可被顺序地或基本上同时地进行分析。

能够用来鉴定各种所要查验的分析物的中尺度测定设备，它包括显微装配有样品入口和中尺度流道系统的固体基片，流道系统中包括有分析物测定区，它与入口间可流通流体，还包括有可任选的连接入口和分析物测定区的渠道。至少有一个分析和样品渠道（如果有的话）具有至少一处中尺度尺寸。在分析物测定区内放入试剂，试剂与要查验的分析物相互反应而生成可测定的产物，该产物可对分析物起鉴定作用。在一个实施方案中，试剂用的是结合物质，可任选地在测定区内降低其流动性，或是放在固定的支承物上，或是放在可移动的支承物上，专门用来结合分析物。在测定区内还包括有测定设备，用以测定试验样品中可对分析物作出鉴定的上述产物。

中尺度的多核苷酸扩增设备包括有一块显微装配着样品入口和中尺度流道系统的固体基片，流道系统中包括有多核苷酸扩增区，它与入口间可流通流体，还包括有可任选的连接入口和多核苷酸扩增区的渠道。至少有一个多核苷酸扩增区和样品渠道（如果有的话）具有一处中尺度尺寸。在多核苷酸扩增区上游的样品渠道中还加有溶菌剂以溶解生物试验样品中的细胞成分。这种设备可以用来实现 PCR，在进行这一反应时，在多核苷酸扩增区内放有适当的试剂并备有使试剂温度循环的设施，以使在每一循环周期中，把温度控制得能使双链结构的多核苷酸变性，把引物和单链多核苷酸退火，并在引物之间合成扩增的多核苷酸。

这里所描述的各项分析设备，不管它是否与本发明的样品制备设备连接使用，都是在本发明的范围之内。

上面所描述的设备通常要与一个支座联结使用，支座作为容纳设备的座套把设备上的一个或多个出入口与支座上的一个或多个管道啮合起来。含有要查验的分析物的试验样品，如全血，可加到样品制备设备

的入品，此后，就用装在支座上或制备设备本身上的推动器（如泵）推动样品沿流道流动并穿过分隔区。不含颗粒物质的试验样品就从样品制备设备输运到分析物测定设备，前者的出口与后者的入口之间是可以流通流体的。留在分隔区内的象血细胞那样的颗粒物质或是别的成形体可通过样品制备设备渠道上的出料槽被取出分隔区并输运到多核苷酸扩

5 增设备中，出料槽与多核苷酸扩增设备的入口之间是可以流通流体的。替代的办法是，试验样品可用注射器注入样品制备设备，或者借助毛细作用把样品吸入中尺度样品制备设备。依据要在上面描述的设备上进行的分析方法，支座也可任选设计成能向设备内注射试剂的，如注射标记

10 结合物质、多核苷酸扩增试剂、缓冲剂或任何其它为分析所需的试剂。

本发明的设备和系统可用来完成多种自动化的、灵敏的、快速的临床试验，包括分析细胞和分子或用以监视反应或细胞生长过程。基本说来，凡是涉及鉴定分子或离子分析物的存在或浓度、鉴定特殊细胞类型的存在或鉴定细胞中基因或重组DNA 序列的存在的任何测试，都可从

15 利用本发明的设备和分析系统中得到好处。这些中尺度设备可为测定致病细菌或病毒提供快速的化学试验。这些设备还可用来快速试验出血液构成成分为激素的存在或浓度。其它有价值的用途包括（但不限于）一定范围内的其它生物学分析如血型试验。

本发明的设备和系统应在使用前经无菌处理。用本发明的这种设备和系统来进行的试验可以快完成，在试验结束时这些设备可以废弃，这样做可有利于防止样品这间相互污染，埋葬潜在的危物质，只产生微小容积的有待处理的废流体，并使分析费用不太昂贵。

20

本发明的其它优点和特性将在下文的发明详述中结合附图加以叙述，本领域的熟练人员将从中得到透彻理解。

25

#### 附图简述

图 1 是本发明的样品制备设备从透明盖看下去的透视图。

图 2 和图 3 示出不同实施方案的显微装配的限流隔板（过滤型）的局部平面图，隔板是装在穿越样品制备设备一部分的流道内部，隔板上有一系列的孔道，用以限制样品流过流道。

图 4 是本发明的样品制备设备与支座相结合的横断面图，支座用来支承制备设备并调节流过制备设备的流体流量。

图 5 是图 1 所示同一设备的平面图，该样品制备设备的两个出口分别与第一和第二个显微装配的分析装置之间是可以流通流体的，这两个分析装置是设计来分开分析由样品制备设备提供的样品的两部分的。

图 6A 和图 6B 是本发明的样品制备设备横断面的图解说明，图中示出从分隔区出来的流道出口与分析设备的样品入口之间是可以流通流体的，该分析设备可用来实现多种分析方法。两种设备是与支座结合在一起示出的，支座用来支承这些设备并调节流经这些设备的流体流量。在图 6A 所示的实施方案中，还可在沿流体流过设备路线的选定地点测定压力差。图 6A 所示为两设备互相衔接摆放；而图 6B 所示为两设备叠码摆放。

图 7 是本发明的样品制备设备横断面的图解说明，图中载体流体渠道的出口与进行多核苷酸扩增的分析设备的入口之间是可以流通流体的。两设备是与支座结合在一起示出的，支座用来支承这些设备、调节流经这些设备的流体流量，并在沿流体流过设备路线的选定地点测定压力差。

图 8A 和 8B 示出两种打算与本发明的样品制备设备结合使用的分析设备平面图。图 8A 中的分析设备具有两个中尺度流道系统，每个系统都有两个入口，用渠道连通到单一的用于捕获分析物或任选来分析分析物的小室。图 8B 示出一个相类似设计的分析设备，它是用来进行酶免疫分析的，它有两个捕获小室。要查验的分析物，例如蛋白质，可被例为适当的免疫捕获试剂在第一小室内捕获，该试剂系用抗体酶结合物物标记并暴露于生色基质之下。酶把基质变换成发色团，发色团又被适当的免疫捕获试剂在第二小室内捕获，第二小室使发色团浓缩并减弱本底信号。第二小室也可任选地用来测定发色团。

图 9 是与本发明的样品制备设备结合使用的显微装配分析设备的平面图解说明图。分析设备包括一组曲折的渠道，它使得在实施各种分析方法草案时需用的试剂、冲洗液等等能够定时加入并搅匀。从图 9A

可以看出, 只提供了单一的小室来捕获和测定要查验的分析物; 图 9B 示出该设备替代方案一部分的部件分解图, 它具有一个分析捕获小室和一个分开的分析测定小室; 图 9C 示出该设备另一实施方案一部分的部件分解图, 它包括带分支的流道区, 它使得基于分支区内流量限制的分析测量得以进行。

图 10A 是分析设备另一实施方案的平面图, 该分析设备可用以实施各种微容积样品的分析方法草案, 它可与本发明的样品制备设备结合使用;

图 10B 是第一流道一部分的局部分解平面图, 样品流体在被引入分析设备样品入口以后就流过这第一流道, 样品入口见图 10A;

图 10C 是沿图 10B 中 10C--10C 线的第一流道局部横断面图, 图中示出构成第一流道的两个并排的 V 形渠道;

图 10D 是沿图 10C 中 10D--10D 线的第一流道局部纵断面图, 图中示出把两个 V 形渠道分隔开的挡板的某种结构形式。

图 11A 是一种与本发明的样品制备设备结合使用的分析设备的平面图, 该分析设备具有一系列的中尺度小室, 适于在此实施各种分析程序, 包括细胞分类、细胞融合和多核苷酸扩增, 如 PCR; 图 11B 是一种替代设计的中尺度 PCR 分析设备的平面图。

图 12A 和 12B 是放置在本发明的样品制备设备流道中的、显微装配的、限制流量隔板的附加实施方案的局部平面图。

图 12C 和 12D 是放置在本发明的样品制备设备流道中的、显微装配的、限制流量隔板的另一个附加实施方案的局部纵断面图。

在图中出现的相似部件都标有相似的参考字符。

### 发明详述

本发明的样品制备设备包括有一块固体基片, 优选的是小薄片形状, 其尺寸范围为: 厚小于 1 至几个毫米, 面积约 0.1 至 5.0 平方厘米。基片需进行显微装配, 做成带有入口和出口样品流道, 并有隔板装在入口和出口中间。隔板的迎流面在流道中划出一个分隔区, 在此收集试验样品中的颗粒物质。制备设备还可包括与分隔区之间能流通流体的渠道, 它的作用是从分隔区内取出所收集的颗粒物质。渠道两端

有入口槽和出口槽,入口槽用来向分隔区导入载体流体直抵隔板的迎流面,出口槽用来把带有颗粒物质的载体流体引出分隔区。至少有一条上述的流道和渠道的截面具有至少一处中尺度尺寸。

5 如果样品中的颗粒物质不需分析,可把它们留在分隔区内,在这种情况下,渠道基本上就不起作用,因此可从制备设备中取消。

这里所用的“中尺度”一词,指的是流道或渠道以及其他结构成分,例如反应室和/或测定室,它们中至少有一样具有至少一个横断面尺寸是在  $0.1\ \mu\text{m}$  至  $1000\ \mu\text{m}$  的范围之内,优选的是在  $0.2\ \mu\text{m}$  至  $500\ \mu\text{m}$  的范围之内。优选的流道和小室深度是在  $0.1\text{--}100\ \mu\text{m}$  更优选的是在  $2\text{--}50\ \mu\text{m}$  的范围之内。优选的流道宽度是在  $2\text{--}200\ \mu\text{m}$  更优选的是在  $3\text{--}100\ \mu\text{m}$  的范围之内。优选的小室宽度是在  $0.05\text{--}5\ \text{mm}$ ,更优选的是在  $50\text{--}500\ \mu\text{m}$  的范围之内。隔板上孔道的宽度典型的是在小于  $50\ \mu\text{m}$  的范围内,这一尺寸已小到足以从大多数要查验的生物样品和其它样品中分离出颗粒物质来。隔板孔道的深度通常为约  $0.1$  至约  $100\ \mu\text{m}$  隔板孔道的长度典型的是在约  $0.1$  至约  $5\ \text{mm}$  的范围之内。

流道和其它装置的横断面可以是三角形、椭圆形、方形、长方形、园形或任何其它形状,但至少要有一个垂直于样品流体流过或流入指定装置的通道上的横断面尺寸是中尺度的。

20 本发明的中尺度设备方便了广泛范围的生物分析中的样品制备,并可与所描述的分析设备一起,促使能够快速地鉴定各种试验样品中的微量分子分析物和细胞分析物。在分析完毕后,这些设备一般地都可废弃掉。

25 至少有一个流道或其它结构件具有至少一个中尺度尺寸的中尺度设备,可用本领域技术人员所懂得的各种显微切削方法用固体基片材料大量地设计和生产。这些方法包括薄膜沉积法,例如沉降镀膜和化学蒸汽沉积法;激光切削或光刻技术,例如紫外线(UV)或X射线法;蚀刻法,这可用湿化学法或等离子体法来进行;LIGA法或塑料铸模法。这里举出一个例子,请参见:Manz等, Trends in Analytical Chemistry 10:144--149 (1991)。

本发明的样品制备设备可以方便地在适当的基片表面上做成流道和隔板后再在表面上装上盖子而成。固体基片和/或盖子的材料可包括硅、聚硅、石英玻璃、热电偶材料、砷化镓、聚酰亚胺、氮化硅和二氧化硅。盖子和/或基片也可包括塑料材料，例如丙烯酸类、聚碳酸酯类、  
5 聚苯乙烯、聚乙烯或其它树脂材料。作为任选方案，盖子和/或基片可包括使用透明材料，例如较薄的粘结在阳极上玻璃层或用超声焊接的塑料板材料。作为任选方案，可用两块相似材料的基片构成夹层，或者用一种适当的基片材料夹在两层透明盖子之间形成夹层结构。

本发明的中尺度样品制备设备的方案之一示于图 1。该设备 10 是  
10 显微装配在一块适当的基片 11 上的，在基片上做成了样品流道 12a 和 12b，流道上有入口 14 和出口 16。在流道内入口 14 和出口 16 之间插入了一个过滤型的隔板 18。隔板的迎流面 20 划出了一个分隔区 22 用以收集试验样品中的颗粒物质。该设备还包括有渠道 24a 和 24b，渠道与分隔区 22 之间可以流通流体，以便往分隔区内送入载体  
15 流体，并从分隔区内取出所收集的颗粒物质。渠道 24a、24b 上有入口槽 26 和出口槽 28。入口槽的作用是从流体源（未画出）导入载体流体，例如等渗缓冲剂，直抵隔板 18 的迎流面 20。出口槽 28 的作用是把载体流体从过滤器迎流面处运出分隔区 22。

隔板 18 是显微装配在样品制以道 12a 和 12b 中的，用以在分析  
20 前从流过设备的试验样品中分离出颗粒物质。在一个实施方案中，如图 2 和图 3 所示，隔板上包括有一系列比流道 12a、12b 减小了尺寸的孔道。在操作中，隔板 18 起着过滤的作用，它在滤出液沿流道 12b 连续不断地流出孔道 19 的同时，把颗粒物质蓄积在它的迎流面 18a 上。过滤孔道 19 的深度和宽度显微装配成约为  $5\mu\text{m}$  至  $50\mu\text{m}$  的范  
25 围，而流道 12a、12b 的最大深度和宽度约在  $1000\mu\text{m}$  的范围。过滤器优选的是显微装配在该设备的基片上，以便做成至少一个、最好是几个基片材料的直立凸块放置在流道中，用以限制样品流体流过分隔区的流量。

在隔板 18 迎流面的外部可以做上突起 P，用以帮助防止孔道 19  
30 被颗粒物质堵塞，如图 2 所示。此外，在隔板 18 的迎流面附近还可

做一个贮槽（图中未画）用以收集从样品流体中脱离出来的不溶性残渣。

在隔板 18 优选的是一个基本上固定的结构，常设在流道的样品入口 14 和出口 16 之间，这从图 1 中可以看到。但替代的办法是，隔板可以暂时地放置在流道内。例如，可采用磁场把一堆磁颗粒保持在流道 12a、12b 中相对固定的位置，用以从试验样品中过滤出颗粒物质。样品中的流体组分穿过颗粒间的空隙作为滤出液而流走。过了适当的时间，把磁场撤去，磁颗粒就可以与从试验样品中收集在那里的某些颗粒物质一起被从流道中输送出去，供所要求的分析或处理使用。

如果需要的话，隔板 18 上还可包含能促使从试验样品中除去颗粒或成形体的试剂。在含有混合细胞粒子的生物样品的情况下，可把例如一种结合物质吸附在或者用其它方法添加到隔板上，以有效除去并有选择地保留住靶细胞类型。这种结合物质能粘住混合细胞粒子中的特定的靶细胞类型，但在一定条件下仍能放开。不被保留的细胞则可从分隔区内输送出去作适当处理。保留的细胞随后即被从结合物质上放开并进行分析。

本发明的样品制备设备可与例如支座 30 结合使用，见图 4 中的横断面示意图所示，该支座用来为构成本发明的分析系统的不同的设备配送、卸取流体并在这些设备之间输运流体。支座 30 上备有嵌套座 32 供容纳设备 10 用，还备有管道 33 供设备上的探测口例如入口 14 使用。支座上也可包括有推动器，例如图 4 中所示的泵 34，用来通过设备上的流道输运样品。当认为含有要查验的特定分析物的生物流体样品被加进支座上的入口 35 后，泵 34 就启动，把样品输运进入设备 10 上的入口 14 然后通过流道 12a、12b。虽然示出的泵 34 象是支座 30 中的一部分，但需要时可用众所周知的显微装配技术把它连接到设备 10 上去。但是，从经济上考虑，仍以把泵布置在支座 30 内为有利。作为替代办法，根据要进行的分析的性质，也可把样品注射到设备中去，或者利用毛细作用把样品通过入口送入设备的流道。在另一个实施方案中，支座可放在样品制备薄片的上部，用一根管道通到制备设备的入口（例如这制备设备没有加盖子），以使样品注入制备设备。制备设备上的显



微装配的装置在水力学上都可充满全部容积，而支座则可用来借助设备或支座上的阀门来引导流体流过这些装置。在显微装配的硅片加装阀门可根据本领域已知的技术来完成。

5 支座 30 的出口 36 可连接到支承着前述分析设备的类似支座的入口上，以便把在制备设备 10 中制备出来的样品输送到分析设备中去试验。

分析设备也可与支座结合使用以便观察其中尺度流道和其它装置中的内容物。例如，支座上可包括一架显微镜（图中未画）以便观察分析设备中尺度装置中的内容物。图 1 中所示的透明盖子 29，起到窗户  
10 的作用，用它可对分析设备中的内容物进行动态观察。

图 5 示出图 1 中的样品制备设备与分析设备 110 相结合的平面图，分析设备 110 是设计用来实施各种结合分析以及进行多核苷酸扩增的。为此分析设备 110 设有分析装置 112 和多核苷酸扩增/分析装置 122。在图 5 所说明的实施方案中，流道 12a、12b 的出口与分析设备的  
15 的分析装置 112 的入口 114 之间是可以流通流体的；而渠道 24a、24b 的出口槽 28 与多核苷酸扩增/分析装置 122 的入口 124 之间是可以流通流体的。用于实施分析或其它试验或分析的试剂可分别从试剂入口 116 或 126 加进去。在分析装置 112 中一般都设一个反应区 117，  
20 在此，适当的试剂与分析物相互反应而生成可进行测定的产物，该产物可用以鉴定分析物。也就是说，所生成的产物可对分析物的性质或数量提供确定的信息。该产物可在反应区 117 内生成的状态下进行测定，或者也可还需进一步的反应以使测定得更好。为此可另设一个反应/测定区 118。

25 可通过一个与反应区之间能流通流体的入口（图中未画）将含有分析物 -- 特异性结合物的溶液引入反应区 117。加到水溶液中的蛋白质结合物质可在冻干形态下被保留在中尺度装置之中。替代的办法是，可用例如物理吸附、化学附着  
的办法把结合物质在分析设备制造完成后固定在中尺度小室内，或者固定在小室的表面上，或者固定在可移动的固态支承物上，例如固定在放置于小室中的磁性或非磁性聚合物颗粒上。

在利用分析设备 110 进行多核苷酸扩增时，要查验的细胞从样品制备设备10的出料槽 28 输运出来后，要用或是细胞溶解剂或是一种溶解装置来进行溶解，这种溶解结构在上述的美国专利 No.5,304,487 中有所描述。从细胞中释放出来的靶多核苷酸在扩增区 127 中经受扩  
5 增，扩增后的多核苷酸可在测定区 128 中被测定出来。一个或多个小孔 116、119、126 和 129 可以通向大气以使系统能通风。结合分析装置 112 和多核苷酸扩增/分析装置 122 的操作方法将在下文参照这种设备的别的实施方案进一步作出解释。

虽然分析装置 112 和多核苷酸扩增/分析装置 122 系制作在共同的基片上做成单一的设备，如图 5 所示，但这些装置也可以装配在分  
10 开的基片上，作为性质不同的分析设备而起作用，这在下文中将会出现。

当上述样品制备设备和分析设备结合在一起作为分析系统使用时，例如象图5所示的那样，那么该系统与图 6A、6B 和图 7 所示类  
15 型的支座相结合是有利的。与上述图 4 中的支座相似，图 6A 中的支座 50 是用来往有关设备中送入、取出流体并在各设备之间输运流体的。支座 50 上有嵌套座 52，用以支承住样品制备设备 10 和分析设备 112，并用支座上的管道对准这些设备上的出入口。具体地说，管道 54a 是对准样品制备设备的入口 14，管道 54b 是既对准样品制备设备的  
20 的出口 16，又对准分析设备的入口 114，管道 54c 是对准分析设备分析装置 112的出口 119。如图 6A 所示，管道 54a 与支座的入口 56、而管道 54c 与支座的出口 57 之间是可以流通流体的。支座上一般都包括有推动器为泵 58，以使样品流体在分析系统中流通。在向支座 50 的入口 56 加进内含颗粒的流体试验样品例如全血后(认为血浆中含有  
25 要查验的分析物)，泵 58 就启动，推动样品流过隔板18，以提供基本上减少了颗粒含量的样品流体如血浆。基本上不带颗粒的样品流体则通过管道 54b 从制备设备 10 输运到装置 112 内，以便进行试验，例如免疫分析。

就其本身而论，分析物的结合，或在分析设备的反应/测定区内分  
30 析物与结合物质的反应产物，是可以多种方法测定出来的，包括监视

分析设备内样品流体的压力或电导率,这在上面引用过的有关专利申请中已经公开了(例如见美国系列号No.877,702),或者可通过透明盖子进行光学测定,或用肉眼观察或用机器.例如,在图 6A 所示的分析设备 112 的反应区 117 内进行的分析物与结合物质的反应,就可用在中尺度流道的一定区段内监视样品流体的压力的办法来测定.这可用图 6A 5 中分析系统与支座的结合体中的两个测压器 59a 和 59b 来完成,该两个测压器是用来分别测定通过分析设备入口 14 和出口 119 的流体流入和流出压力的.在分析操作中,当颗粒附聚物或分子互相反应形成网络而引起限制流过反应/测定区的样品流体的流量或增大其粘度时,这种变化可以以压力变化的形式被测量出来,这一变化表示是阳性结果. 10 中尺度的压力传感器和其它的电气或电气-机械传感器可用已建立起来的成熟技术直接装配在硅基片上,并可大量生产.见 Angell 等, Scientific American, 248:44--55 (1983)。

可以制造出另外的支座实施方案以用来与本发明的不同设备一起来实施不同的分析方法.一种这样的实施方案示于图 6B,图中示出一种分析系统的横断面图,它包括叠置在样品制备设备 10' 上的分析设备 110',都放置在支座 70 上设有的嵌套座 72 中.当含有颗粒的试验样品流体加进支座的样品入口 74 后,支座上的推动器如泵 75 就推动样品流体流经制备设备 10,以提供基本上减了颗粒含量的样品流以供 20 在分析设备 110' 中作分析用.分析设备 110' 上的盖子 116' 上有一个通向大气的孔洞 114',以使系统通风.把分析设备 110' 放置在叠堆的顶部,就使得可能通过盖子 116' 的透明部分进行光学测定。

图 7 中示出样品制备设备和进行多核苷酸扩增的分析设备分立的分析系统与上述类型支座结合在一起的图.图 7 中的分析系统横断面 25 图示出,支座 90 上设有被样品制备设备 10 和多核苷酸扩增/分析装置 122 所占用的嵌套座.样品制备设备 10 上的渠道 24b 的出料槽 28,与多核苷酸扩增/分析装置 122 的入口 124 之间,通过管道 92,是可以流通流体的.管道 93 对准着分析设备的出口 129,并与支座出口 30 口 94 之间可以流通流体。

在样品制备设备 10 中细胞组分被从样品流体中分离出来,而后举例说象上面描述的那样令其与适当的细胞溶解剂接触,这样从细胞中释放出来的多核苷酸样品被导向扩增区 127. 扩增所需的试剂也通过图 5 中所示的入口 126 而加入扩增区 127. 用一推动器例如泵(图中未画)把多核苷酸样品通过管道 92 送入扩增区 127.

扩增试剂也可用类似方法通过支座上或分析设备上不同的管道(图中未画)送入扩增区 127. 多核苷酸扩增反应的产物可输运到测定区 128, 在以前描述过的状态下进行测定. 如果需要的话, 可把生成的产物通过支座出口 94 进行复原.

10 试验样品流体通过设备 10 和 122 时沿流道流动的压力差, 可用压力传感器 96 与配置在支座上或设备上用以测定制备设备 10 出料槽 28 迎流面上一点的压力的另一个压力传感器(图上未画)相结合而测定出来.

15 支座 90 可包括一个加热/冷却元件 95, 用以控制多核苷酸扩增区内的温度,例如一个电加热元件和/或一个制冷元件. 电加热元件(图中未画)可代之以装分析设备 122 的基片成为一个整体, 该元件的功率要与够用的电能点相配, 电能点设于扩增区 127 下方的支座上. 作为替代办法, 支座上可包括一个内部的或外部的加热设施, 例如激光源或其它电磁能源(图中未画), 可配置在多核苷酸扩增/分析装置 122 的  
20 扩增区 127 附近. 支座 90 中的微处理器可用来调节电加热元件, 以给多核苷酸扩增区提供一个温度循环周期, 它介于适合变性的温度为 94 °C 和适合复性和延伸的温度为 65 °C 之间. 还可在扩增区 127 周围安置热电偶, 它与支座之间有电接触, 以使微处理器或其它电子控制器得以在反应小室内测定并保持温度循环. 还可在支座上包括冷却元  
25 件, 例如微型的热电热泵(见 Materials Electronic Products Corp., Trenton,NJ), 用以调节扩增小室内的温度. 在另一个实施方案中, 多核苷酸扩增小室内的温度可用定时的激光脉冲来调节, 激光脉冲穿过玻璃盖子 109 而导入反应小室, 以把样品顺序地加热和冷却到扩增循环所要求的两种温度. 硅的热性能使得加热和冷却的循环得以迅速进行.

在图 4、6A、8B 和 7 中所示出的本发明的所有实施方案中，泵可以由支座内的微处理器来控制。另外，在刚刚提到的那些图中所示的设备可用各种方法使其保持可靠啮合于支座上的嵌套座中或者保持可能的相互间的接触，这些方法包括举例说用一个装在支座上的夹子（图中未画），或用例如粘合剂把面对面的设备表面互相粘结起来，或者适当做好各设备相对于嵌套座的尺寸，使设备靠摩擦力保持在那个位置。

可与本发明的样品制备设备结合使用的生物学分析设备示于图 8A。该分析设备装配在基片 131 上，基片上有中尺度渠道 132a、132b，在渠道两端显微装配有入口 133，在渠道中央还有一个中尺度混合/捕获/测定小室 135。由图 8A 可见，小室 135 的横断面相对地要比渠道 132a、132b 的横断面大。

捕获试剂，例如特异地粘结要查验的分析物的物质，可以固定在小室 135 中，或者放在固定的支承物上或者放在可移动的支承体上。当使用可移动的支承物为聚合物颗粒时，颗粒的大小必须选得比渠道 132a、132b 的横断面尺寸大些，以使固定不动的试剂可被局限在小室 135 内。固定在颗粒状固体支承体上的试剂，可在这种状态下很方便地通过入口 137 被加进小室 135 内。

刚才描述的这种类型的分析设备可用来进行多种免疫分析反应。例如，在小室 135 中注入单克隆抗 -- CEA 抗体，固定在颗粒状支承体为塑料珠子上，就可进行无竞争对手的免疫定量分析，以鉴定癌胚抗原（CEA）。此后加进要分析 CEA 的样品，使之充满小室 135，并排出任何由固定试剂带入的流体。此后小室 135 中的内容物被培育一定的时间，足以使抗原 -- 抗体结合。随后往小室加入抗体酶结合物，例如单克隆抗 -- CEA 抗体 -- 辣根过氧化物酶，并再次培育小室的内容物。然后往小室 135 中加入生色基质溶液，用以冲洗固定试剂，排除未结合的共轭物。在小室中保留足够的基质，以便与结合在固定试剂上的任何过氧化物酶标记进行反应。发色团的产生速率是与样品中的 CEA 浓度成正比的。

分析设备 130 还可以用来进行鉴定样品中的甲状腺素的有竞争力的分析。在进行这项分析时，在小室 135 中充注的是包括结合在塑料

珠子表面的抗甲状腺素抗体在内的固定化试剂。要分析甲状腺素的试验样品事先与甲状腺素 -- 过氧化物酶共轭体混合，并加入到小室中，这样使小室充满并排出任何由固定试剂带入的流体。然后小室中的内容物被培育一定的时间，足以使抗原 -- 抗体结合。可以任选用缓冲剂通过小室 135 以冲洗固定化试剂。此后往小室中加进生色基质，冲洗固定化试剂，排除任何未结合的试剂。在小室 135 中保留足够的基质，以便与结合在固定试剂上的任何过氧化物酶除标记进行反应。发色团的产生与样品中甲状腺素浓度成反比。

虽然图 8A 中的分析装置是配置得把固定试剂限定在渠道 135 内的，但该设计可使流体被泵推动得流过并越过固定试剂达到冲洗的目的。

必须说明，这里所述的两个实例是很少有代表性的，因为图 8A 中的设备，以及本文描述的设备是可以用来完成众多的其它分析程序的。

图 8B 示出显微装配在基片 141 上的分析设备 140，上面的入口 143 与小室 145 之间可以流通流体，小室 145 是用来例如用免疫捕获的办法来捕获分析物的。该分析设备是用来实施酶免疫分析的。为此目的，分析设备包括一个分立的小室 147，其中保持有用以捕获和浓缩发色团的结合剂，发色团是由于酶标记作用于适当的基质而产生的。例如，利用“夹层”分析技术可以鉴定蛋白质分析物，这种技术是，在小室 145 中利用固定在那里的特异地结合分析物的抗体来捕获分析物。被捕获的分析物又用酶 -- 抗体结合物作上标记，该结合物是由例如碱性磷酸酶和特异的结合蛋白质分析物的抗体组成的。把磷酸荧光素作为酶标记的生色基质加入小室 145 内。碱性磷酸酶作用于该基质上而产生出荧光素，荧光素又被固定在小室 147 中的抗 -- 荧光素抗体所捕获。小室 147 中借助粘贴在室壁上的材料而形成的疏水环境，使捕获剂或者反应混合物中的一个组分，例如表面活性剂或胶束形成剂，能改善从荧光素中发出的荧光信号。发色团的测定可在小室 147 中进行，也可把发色团通过出口 149 移出分析设备而在单独的设备中测定。在进行这项鉴定中还可选用其它的基质，例如 4-- 硝基苯酚磷酸盐或 4-

- 甲基缙形酮磷酸盐, 与适当的用以捕获脱去磷酸的产物的结合剂结合使用。

可用于本发明实践中的另一个生物学分析设备实施方案示于图9。分析设备150的基片151上显微装配着出入口152a -- e, 渠道154a -- g, 反应小室156a和156b, 以及捕获/测定小室158。反应小室156a和156b各包括一条曲折的中尺度渠道。曲折渠道的路程长度可设计成使样品试剂得以定时混合和添加。这种类型的设备可与支座结合使用, 支座上设有与分析设备上的出入口相啮合的出入口, 支座能往分析设备的流道系统输入并接收流体, 并且还可任选在小室158内能进行光学测定阳性的或定量的结果。这种分析设备的应用之一是可以鉴定样品中的胆固醇。胆固醇酯酶从入口152a加入, 而缓冲剂和样品则分别从152b和152c入口加入。然后, 这混物流过渠道154d进入曲折的混合/反应小室156a。混合和反应的时间可借助于把曲折渠道显微装配成适当的长度以及控制流动速度来事先确定。通过入口152d加入胆固醇氧化酶并流经渠道154g进入曲折渠道156b, 在此进行胆固醇氧化酶与从渠道156a过来的流体的定时混合和反应。可提供与前文所述相类似的加热设施来保持分析设备的温度在37℃或更高些。通过一条渠道(图中未画)在154e处加入生色物质以便测定。观察测定小室158, 例如通过配置在小室上面的光学玻璃来观察就可测定出阳性的或定量的结果。在测定小室158中可放入一部分能捕获酶反应产物的结合剂, 以此来方便测定。该分析设备可用于一定数量的临床酶催化反应和其它反应。

按照图9B中示出的变通实施方案, 可在158a小室中捕获有荧光标记的分析物, 在小室中放有分析物的特异结合剂, 它结合住分析物后仍然是可以分离开的。分离后的有荧光标记的分析物在小室158b中被捕获供测定使用。

图9c示出的另一个实施方案中, 渠道154f可以是狭窄的, 以使流道具有较渠道154e更小的横断面, 借此限制试验流体通过分析设备的流量。如图9c所示, 渠道154f做成了多条平行渠道的型式, 每条岔道的尺寸都减小, 提供出顺序变窄的流道。该分析设备可用来实施多

种凝集反应测试, 基于样品通过渠道 154f 的分岔部分 159 时流量会减小, 所发出的粒子诱导或配合物诱导的胶结作用就可以被测定出来。

图 10A 示出一种中尺度分析设备 170 的设计, 它是用来实施多种结合分析方法的。利用该分析设备只利用微量的样品和很少的经过称量的试剂, 加上在分析设备内被测定的带标记产物, 就可鉴定一定数量的分析物, 这就使得全部样品、未反应的试剂和反应产物都被限制在分析设备内以便下一步处理。

该分析设备可与上述图 6A 中的普通类型的支座结合使用。支座上设有支承分析设备的嵌套座、管道、配用的泵和阀门, 用以向分析设备输送样品、试剂、冲洗溶液等。支座上还可包括温度控制和传感器、压力传感器和/或电气接头以方便分析物测定, 还可包括光学测定装置、信号放大器和定量装置, 一如前述。该结合体还可包括整个系统序列和控制元件、量化信息显示器和记录装置, 举例说, 可通过支座上的微处理器来工作, 或者与外部计算机连接来工作。

一如前述, 该分析设备显微装配有多组流道, 设计的总容量为在  $0.01\text{--}100\ \mu\text{m}$  范围内, 优选的是在约  $0.5$  至约  $50\ \mu\text{m}$  范围内。

在使用时, 在入口 171 处引入微小容积的试验样品流体。在引入入口 171 以前, 试验样品流体可以先经过滤, 例如先流经本发明的样品制备设备。替代的办法是, 样品流体可在引入分析设备 170 以后再进行过滤。使用交叉流过滤技术可以有益地实现器内过滤。如图 10B 所示, 样品流体在从入口 171 引入后首先流过的流道 172, 是分为两条并排的 V- 形渠道 172a、172b 的, 中间用一条纵向的堤坝 173 隔开, 堤坝优选的是用基片材料制成(但也可以是盖板的一部分并从盖板上悬垂下来)。堤坝 173 与分析设备盖板一起, 划定了至少一条流道 174 (见图 10C 所示), 它能让流体在那里流过, 但有足够小的尺寸来阻挡流体样品中颗粒物即细胞的流过。堤坝 173 是布置得使入口 171 送来的样品流体直接进入流道 172b, 流入流道 172b 的流体与先前进入入口 171 的未经过滤的样品来, 已是基本上除去了颗粒物质的流体了。



流道 172 的两壁可以做成从入口到下游方向逐渐张开，从较小的横断面尺寸变到较大的横断面尺寸，或者做成从入口到下游方向逐渐收缩，从较大的横断面尺寸变到较小的横断面尺寸，堤坝 173 则配置得与至少一面的流道壁平行。这样的设计可使样品流体增加非线性流动，有助于从流道 174 中除去颗粒物。

如果试验样品流体是在分析设备 170 的外部过滤的，就可以省去上述的器内过滤器。替代的办法是，在外部过滤的样品流体可以通过入口 175 直接进入分析设备，越过流道 172 而旁通。需要时，缓冲液也可通过入口 175 引入以制备稀释的样品流体。多余的缓冲液可收集在出口 176 内。

在流道 172a 中捕获的颗粒物被输送到出口 176，如图 10B 所示。

从流道 172b 出来的滤出液下一步就进入流道 177，该流道的尺寸是仔细设计的，用以起到测量室的作用，以提供预定容积的样品供分析用。预定的样品容积通常约为  $1\ \mu\text{L}$ 。在分析设备 170 上还可设有标尺，标尺举例说可用蚀刻来制作，用以帮助测量进入分析设备供分析用的样品流体所需的数量。为使能把规定容积的样品引入分析设备 170，流道 177 也可进行分析物的定量。

可用装在分析设备 170 上或装在与分析设备结合使用的支座上的推动器（图中未画）来输运定量好的样品流体进入流道 179，该流道可任选进行样品流体与用来进行分析的主要试剂的混合。在分析设备 170 上包括这样一个混合用的小室对在分析物和主要试剂之间获得更快和更完全的反应是有利的。

用来输运样品流体、试剂、缓冲剂等通过分析设备 170 的流道系统用的适当的推动器包括各种各样的泵，如显微切削泵、隔膜式泵、唧筒泵、容积吸留泵（Volume occlusion pumps），以及内渗透诱导流动、用电化学析出气体诱导的流动，和本领域技术人员所熟知的其它泵压手段。

主要试剂可通过入口 180 直接加入分析设备上的流道 179。主要试剂在进入流道 179 后就与定量好的样品流体混合，这可以是顺序进

行的或在基本上同时进行的。多余的主要试剂可以通过出口 181 流出系统。

主要试剂源可以是任选地设在分析设备 170 内的内部贮藏小室。替代方案是，主要试剂可从与分析设备结合使用的如上述图 6A 的支座上的贮器内输送到分析设备来，或从分析设备外面别的什么试剂源输送过来。主要试剂可以以溶液状态、凝胶状态或纯净状态如干的或冻干的状态，或者任何别的状态贮存。例如，主要试剂可以在流道 179 内就地冻干，在这种情况下，例如从入口 180 引入的试验样品流体或适当的溶剂，就可用来溶解这主要试剂，替代方案是，试验样品或溶剂可如上述用液体输运装置从渠道 179 推向一个贮藏小室（图中未画），该小室位于图 10 所示的流道系统之外，在该小室内溶解主要试剂。另外，在贮藏小室内还可备有加热和搅拌装置来帮助溶解贮藏在那里的主要试剂。

主要反应混合物，其中包含有样品流体和溶解的主要试剂，还可在渠道 179 内进行反应，如上所述，渠道 179 可以包括有促进紊流的结构件。可设有搅拌器或其它装置，以确保主要反应混合物充分地混合。主要反应混合物被设法留在渠道 179 内一定的时间，以使要求的反应得以继续完成。

在渠道 179 中，可任选地使用象前述图 7 那样的温度调节装置，以改善主要反应的条件。如果需要的话，在流道 179 内也可备有温度传感装置。温度传感装置可在使用中与控制该系统总的功能的微处理器或类似仪器连接起来，以把传感的温度与主要反应混合物在流道 179 中的停留时间联系起来。

当反应完成后，全部或一部分主要反应混合物，可用例如上述的泵或其它推动器输运到捕获区 182 和测定区 183，样品流体中的一种或多种初始成分或主要反应的产物可在此被监视或测定。替代的办法是，可用辅助反应的产物来作分析物鉴定，辅助反应产物的存在和浓度是与样品流体中要查验的分析物的存在和浓度相关联的。

与分析设备 170 有关的测定技术，是在结合分析中通常使用的技术。简言之，这些技术包括：化学试验，例如进行时要加试验试剂的；

光谱学分析,例如,测定在主要反应中由化学变化引起的分析物性质变化,如吸光度的偏移、波长的变更、荧光极化的变化、荧光燃烧漂移的变化等;凝集作用,如用显微镜测量、图象分析或类似的方法;以及测量反应过的主要反应混合物的电化学性能,例如利用测量电流和/或电位/电压技术的专用测量。

关于进行辅助反应以用于鉴定分析物,在分析设备上专设有一个捕获区,这就是流道 182,利用前述的液体输运装置把全部或一部分反应过的主要反应混合物输运到流道 182 中,在此用粘接到表面上的办法就可捕获主要反应混合物中的反应产物的一种或多种成分,随后即进行测定和/或定量。捕获试剂可固定在流道 182 的两边壁上或固定在流道 182 中的颗粒或珠子表面上。

可设置一个入口或注入口 184 以事先往流道 182 中装入固体状态的捕获试剂,其中包括塑料胶乳、硅石或其它适当的支承材料,包括磁性成分,这些试剂能特异地与主要反应混合物的产物相结合。微粒状的捕获试剂可以以稀浆的形态被装入流道 182,随后被干燥或冻干,也可以在干燥形态下装入。这两种方法都可任选用振动或其它措施来帮助装入流道 182。捕获试剂的可移动的固体态包括直径为从数十毫微米至数十微米的颗粒或珠子,外表面涂有抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素或其它物质,生物素化的或另一种方式结合的抗体是会特异地结合到这些物质上去的。

流道 182 中可以装配有限流结构件 189a、189b 或其它装置以使捕获试剂留置在流道 182 内而只让流体通过。微颗粒状的捕获试剂也可在前述参照图 8 的状态下被留置在流道 182 内。

主要反应混合物被设法留在流道 182 内一定的时间,使它与捕获试剂的反应足以继续进行到已知的程度,最好是进行到完成。在流道 182 中也可任选地备有温度调节和传感置,可参照流道 179 的说明去做。

所捕获的主要反应混合物中的产物最好在辅助反应以前把它冲洗掉。

辅助反应所用的试剂溶液可通过入口 185 直接加到分析设备 170 中。多余的辅助试剂可通过出口 186 或 187 从流道系统中除去。替代的办法是，辅助反应所用的试剂在溶解和使用以前可保存在分析设备 170 上的贮藏小室内，或保存在与分析设备结合使用的支座上的贮藏小室内，或保存在分析设备以外的某个另外的方便容器内。可任选地用一根或多根与分析设备 170 的流道啮合好的管道，在操作时可与推动器接通，以从一个入口把溶剂输送到上述的辅助试剂贮藏小室，在此把保存的辅助试剂溶解成辅助反应溶液。

辅助反应所用的试剂可以包括对与被捕获的主要反应产物结合的酶有特异性的酶底物，此外还可包括当溶解于辅助反应溶液中后能帮助冲洗掉结合的主要反应产物的物质。

辅助反应最好在流道 182 中进行，在此辅助反应溶液与捕获的主要反应产物发生反应。辅助反应的产物可以从分子或离子群中选出的物质，它可根据以下性质直接或间接地进行测定：光吸收率；荧光；磷光；可以是根据它们的放射性质能进行测定的分子或离子；可以是根据它们的核磁共振性质或顺磁性质能进行测定的分子或离子。辅助反应的产物可以按照本领域已知的程序来进行扩增，借此来提高测定效率。例如可采用酶扩增反应，该反应能释放出荧光团，该荧光团是由辅助反应溶液中的非荧光的前体所生成的。

辅助反应完成后，所生成的产物或者可在流道 182 中进行测定和定量，或者可随后在测定区 183 或在分析设备 170 以外的测定设备内进行测定和定量。

流道 177 和 183 与样品流体流动方向相垂直的横断面尺寸，优选的是约宽  $100\ \mu\text{m}$ 、深  $70\ \mu\text{m}$ 。而流道 179 和 182 与样品流体流动方向相垂直的横断面尺寸优选的是约宽  $400\ \mu\text{m}$ 、深  $70\ \mu\text{m}$ 。如上所述，这些尺寸是在中尺度的范围内。

多种多样的结合分析方法草案可在分析设备 170 上实施，其中包括免疫定量（夹层）分析以及竞争性免疫分析，免疫分析时采用多克隆和单克隆抗体两者来达到捕获和测定分析物的目的。测定抗体的一种方式包括结合标记，其中的标记是在被捕获在固体上时可作为结合半体

(bound moiety) 来加以测定的荧光团。另一种测定抗体的方式包括结合标记, 其中的标记是在从被捕获的主要反应产物中释放出来后可加以测定的荧光团。还有一种测定抗体的方式包括结合的酶半体, 例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

5 如果需要从分析设备 70 中消除潜在的干扰物质时, 可以进行冲洗。

多余的样品流体、试剂、冲洗溶液等来自各流道和各结构件的废液可以合并起来导向有足够容量的废液贮槽, 贮槽最好设在分析设备 170 内部, 这样可使全部样品流体和反应产物都能安全保存以待处理。

10 图 11A 示出一种分析设备 191, 可用以从含有生物细胞的流体样品中鉴定细胞内多核苷酸的存在, 然后再完成特定核苷酸序列的分析。在基片 192 上显微装配有中尺度流道 194a--c, 其中包括细胞分离小室 196a、细胞溶解小室 196b、过滤构件 197、多核苷酸扩增小室包括 198a 和 98b 两小间、以及测定区 199。中尺度流道系统还设有出入口 15 193a--d。该分析设备可与参考图 6A 的上述支座结合使用。

开始时, 上述支座上的阀门起作用使出入口 193c 和 93d 关闭, 而 193a 和 193b 开启。例如一种含有细胞混合物的样品从样品制备设备用适当的推动器例如泵 (图中示画) 送到入口 193a, 并流经中尺度渠道 194a 进入分离小室 196a。小室 196a 内包含有结合半体, 结合半体被 20 固定在小室的壁上, 该室选择性地结合住样品中需要的细胞类型的表面分子。余下的细胞成分则通过出入口 193b 流出基片。在小室 196a 粘住要求的细胞类型后, 缓冲液继续流动, 以冲洗并隔离靶细胞。然后出入口 193b 关闭, 193c 开启。然后流量增加到足以从小室 196a 内除去固定在那里的细胞。继续流动就推动细胞穿过小室 196b 中的刺膜 25 尖凸 195, 尖凸撕开细胞而释放出细胞内物质。

样品流继续通过过滤器 197, 过滤器过滤掉大的细胞膜残片和其它残渣, 滤出液则流入中尺度 PCR 小室的 198a 小间, 该小间用渠道连通 PCR 小室的 198b 小间。然后通过出入口 193c 从试剂贮藏室 (图中未画) 把 Tag 聚合酶、引物和其它为 PCR 分析所需的试剂加入到 30 198b 小间内, 让从细胞中分离出来的次级粒子内的细胞内可溶成分与

PCR 试剂混合。把其它出入口关闭（以确保反应混合物不挥发，否则就会从分析设备中损失掉），用一只推动器例如一个泵（图中未画）对出入口 193b 发出推动力，使 PCR 样品和试剂通过渠道 194b 而循环，渠道 194b 连接在小间 198a 和 198b 之间，两小间的温度分别整  
5 定在 94 °C 和 65 °C，以实现多次多核苷酸熔化和延伸循环，使要查  
验的多核苷酸扩增。在下一步处理以前，出入口 193c 被关闭，出入口  
193d 则被开启。这时同一个推动力被用来引导扩增好的与细胞粒子隔  
离的多核苷酸进入测定区 199，测定区的形式与上面参照图 9c 所描述  
10 的渠道类型相似。在狭窄区内流量减少就可作为存在着扩增的多核苷酸  
产物的阳性指标，并可通过测定区 199 上的玻璃盖子用光学方法测定  
出来。替代的办法是，可利用一些试剂直接在反应小室内测定出扩增的  
多核苷酸产物，这些可从商店买到，是为此目的而开发出来的，例如“Taq  
Man ®”试剂，就可从 Perkin Elmer Corporation 公司购得。扩增的多  
核苷酸还可以在分析设备之外利用本领域内已知的各种方法来测定，例如  
15 在琼脂糖凝胶中进行电泳，电泳时要有溴化乙锭参与。

在本发明的实践中有用的另一个分析设备实施方案示于图 11B。分析设备 210 包括基片 214，其上显微装配有中尺度的多核苷酸扩增小室 222A。该分析设备 210 可与图 7 中所示的支座 90 相似的支座结  
20 合使用。支座上设有流道并与分析设备 210 上的出入口 216A、216B、  
216C 和 216D 相啮合。支座上还可包括有阀门，这些阀门可用机械方  
式使出入口 216A、216B、216C、216D 开启或关闭。在一种实施方案  
中，分析设备的流道系统可以在液力上保持充满容积，而在支座上或分  
析设备本身上的阀门则用来控制流体的流动方向。小室 222A 被加  
热并冷却到 PCR 所要求的适于变性、复性和延伸的温度。反应区的温  
25 度是可以控制的，有如前文参照图 7 所述。

图 11B 中的流道系统包括过滤构件 224，是前述普通类型的过滤  
构件，用它来除去样品流体中可过滤掉的对分析有干扰倾向的成分。

在操作时，把含有聚合酶和 PCR 所要求的其它试剂的样品通过入  
口 216A 送入反应小室 222A。把出入口关闭，然后用加热元件使反应  
30 小室的温度在适合于进行变性和复性、延伸的温度之间循环。当 PCR

反应循环结束后，出入口 216B 和 216D 开启，推动小室 222A 的内容物进入测定区 222B，测定区内含有多核苷酸探针，例如固定在珠子 292 上。珠子在测定区内发生胶结就指示出多核苷酸分析为阳性 (positive assay)。

5 虽然这里对多核苷酸扩增的描述是特别参照 PCR 来进行的，但本领域的技术人员将会赞赏的是，本发明的设备和系统可以同样有效地用来进行多种多样的其它多核苷酸扩增反应。这些外加的反应可以是依赖于温度的，例如聚合酶链式反应，也可以是在单一温度下进行的（例如基于核苷酸序列的扩增(NASBA)）。此外，这样的反应可应用多种多样的  
10 的扩增试剂和酶，包括 DNA 连接酶、 $T_7$  RNA 聚合酶和/或反向转录酶等等。再则，多核苷酸的变性可单独地、或与温度变化相结合，用已知的多种化学或物理方法来实现。可以在本发明的设备内实践的多核苷酸扩增反应包括（但不限于）：(1) 靶多核苷酸扩增法如自持序列复制 (Self-sustained sequence replicatran) (3SR) 和链置换扩增 (strand-  
15 displacement amplifcatran) (SDA)；(2) 基于扩增单个附着于靶多核苷酸的信号的方法，如“分枝链”DNA 扩增 (Chiron Corp., Emeryville,CA)；(3) 基于扩增或探针 DNA 的方法，为连接酶链式反应 (LCR) 和 QB 复制酶扩增 (QBR)；(4) 基于转录的方法，如连接激活的转录 (NASBA)；以及 (5) 各种其它的扩增方法如修补链式  
20 反应 (RCR) 和循环探针反应 (CPR)（这些方法的概要和商业资源，可参见 PP.2 -- 7 of The Genesis Report, DX, Vol.3, No.4, Feb.1994; Genesis Group, Montclair, NJ）。

本发明的样品的制备设备可与中尺度多核苷酸扩增设备结合使用，该扩增设备是美国系列号 08/308,199 (Attorney Docket  
25 No.G1·158) 的主题内容，该系列号是与本申请同时提交的。该申请的全部公开内容都在此引入作为参考。

简单地说，上述专利申请涉及对样品流体中预先选定的多核苷酸进行扩增的中尺度设备。该设备为一显微装配的基片，其上包括多核苷酸扩增反应小室，其中至少有一个横断面尺寸为约 0.1 至 1000  $\mu\text{m}$ 。  
30 该设备还包括至少一个出入口与反应小室之间可以流通流体，以便向小

室内导入样品，需要时可使小室通风，并且还可任选用以从设备中除去反应产物或废弃物。反应小室内可备有为预先选定的多核苷酸扩增所需的试剂。该设备还可包括调节反应小室内内容物温度的装置，以扩增预先选定的多核苷酸。反应室最好做成面积对容积之比较高，以便进行温度调节。扩增反应小室还可包含一种组成成分，它可削弱材料包括反应室壁对扩增反应的阻滞作用，在需要时就可进行这样的处理。

分别在图 4、6A、6B 和 7 中示出的支座 30、50、70 和 90，都可按照规定的分析方法的实施情况用来往设备中输送定量好的样品、试剂、缓冲液等，还可用来定时添加样品和其它流体。

当支座上包括有微处理器时，可用它来帮助收集一次或一系列分析的数据。

虽然前文描述的分析物鉴定是特别参照全血作为样品流体来进行的，但是要查验的分析物可能存在于各种来源的试验样品或标本中，包括存在于其它生物流体中，如含有抗凝剂的全血、稀释的全血、溶胞的全血、含有分析试剂的全血、血清、血浆、尿液、精液、脑脊髓液、羊水、洗胃肠液、组织萃取液、细胞悬浮物以及任何其它样品流体中，这些都可用有利地利用本设备来进行分析。

图 12A -- D 示出显微装配的限流隔板的另外多种实施方案。这些隔板都可置于上述设备的流道内使用。图 12A 中的隔板做成从渠道 253 两对面 252a、252b 伸出很多间壁 251 的形式，以形成一系列的孔道 254a、254b 沿渠道纵向排列。可用一个或多个从渠道 250 底部伸出的中部间壁 255 配置在一个或多个间壁 251 靠下游的一面，用作排成一行的孔道 253 形成的流道中的拦板或挡板。

以较高的速度流过的较窄的孔道 254a、254b 的样品流体会倾向于分散进入连续排列的间壁之间的空间中去，同时降低流速并移动到空间的死角中。这样当样品流体流入下一个顺序的间壁间空间时，颗粒物质就可能相对地被滞留在死角内。因此，每进入一个顺序的间壁间空间，颗粒物质就更多地被滞留，而样品流体则随着它穿越多个间壁流向下流而变得愈来愈清。只要排列的间壁足够多，就可以逐步降低颗粒物质的



浓度，其效率可以预先确定。挡板 255 能在把样品流体导向死角区中起到帮助作用。

在图 12c 中示出一种拦河堰式的隔板结构，它由从渠道 250 底部 258 伸出的拦板 257 组成。

5 图 12c 和 12D 示出的隔板结构是利用了颗粒物质会在重力影响下下沉的倾向。这可能对分析全血特别有用，因为它能促使红细胞沉积。样品流体在高速下越过拦板 157，随后立刻慢下来。任何颗粒物质落到渠道 250 的底部后会经历一次速度降低，减少一次回荡上去越过下一块拦板机会。样品流体流过一系列的这样的拦板，就会逐步降低颗粒  
10 物质的浓度，产生出愈来愈清的样品流体。从盖板 260 上悬垂下来的一块或多块叶片 259 可对使样品流体流向下方向起到帮助作用。

下面的实施例是用来更详细地对本发明进行描述的。这些实施例是用来说明而不是限制本发明的。

#### 实施例 1

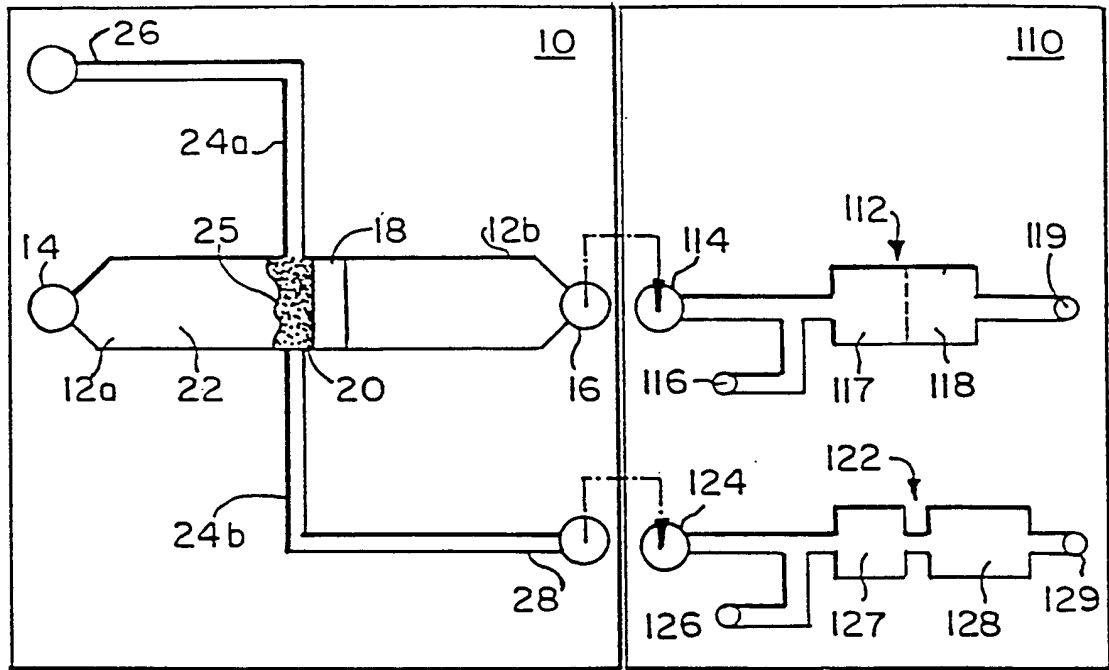
15 用硅基片 131 上盖塑料(3M 透明板)盖而制成的塑料--硅组合的分析设备，其上显微装配有渠道 132a、132b，渠道相对两端设有入口 133，中部设有反应/测定小室 135，其示意图为图 8A 所示。使用支承器通过注射器向渠道 132a、132b 相对两端的入口 133 注入抗 --  
20 A 稀释液(用 0.05M 的碳酸氢钠稀释，PH9.6)和 1:10 的 A 型血盐水稀释液。两种溶液在中部小室 135 中混合，通过塑料盖用光学显微镜观察其凝集作用。观测结果总结如下表。

	<u>抗 -- A</u>	<u>稀 释</u>	<u>渠道中的凝集作用</u>
	Gamma 试剂盒	1:20	+
	Gamma 鼠单核细胞	1:20	+
25	Gamma 人血稀释剂	1:5	+
	Immucor Affinity Pure	1:100	+
30	Immucor Ascites	1:100	+

## 实施例 2

准备好另一个象实施例 1 那样的分析设备, 使用支承器通过注射器向渠道132a、132b 相对两端的入口注入鼠 IgG 溶液 (50  $\mu$  m/ml 溶  
5 在 0.05 M 碳酸氢钠中, PH9.6) 和山羊抗 -- 鼠 IgG -- 荧光羧酸盐珠子 (Polysciences, Inc.) 在 PBS 缓冲液中 1:20 的稀释液。这些溶液在反应/测定小室 135 中互相混合, 通过透明塑料盖用光学显微镜观察了凝集作用。

尽管在前面已描述了或举例说明了本发明的一些实施方案, 但对本  
10 领域的技术人员来说, 他们从已进行的描述中会明白, 还有各种各样另外的实施方案。因此, 本发明并不限于已描述的和/或举例说明的特殊实施方案, 而是在不偏离所附权利要求的条件下可以作出可观的变动和改进的。



21 ↗

图 5

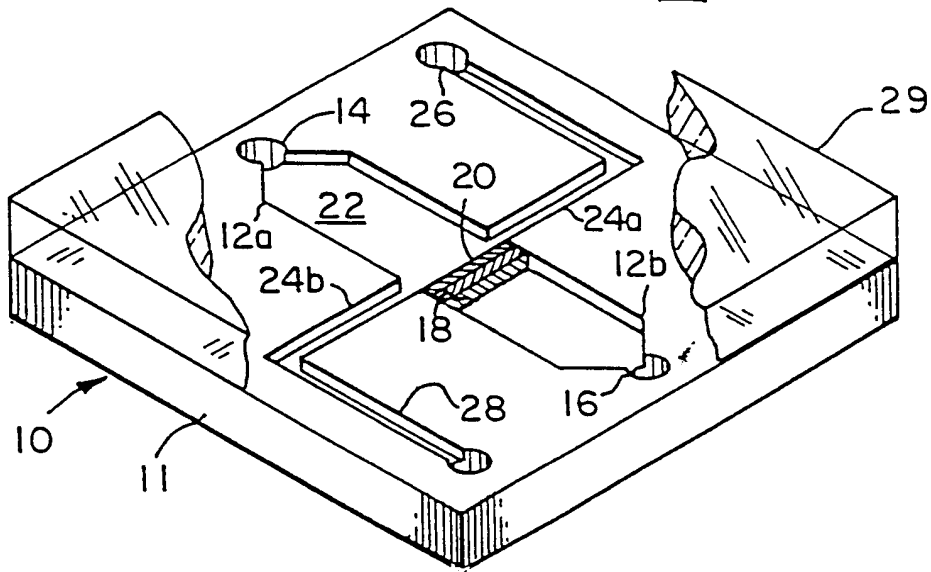


图 1

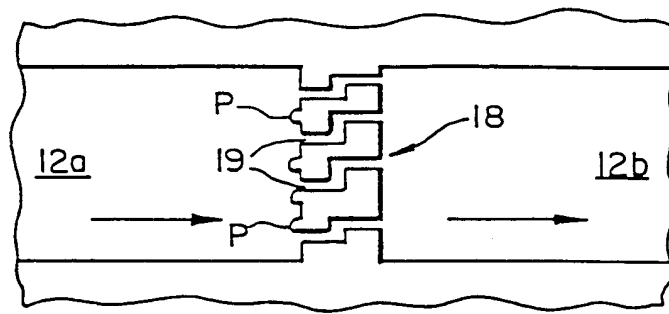


图 2

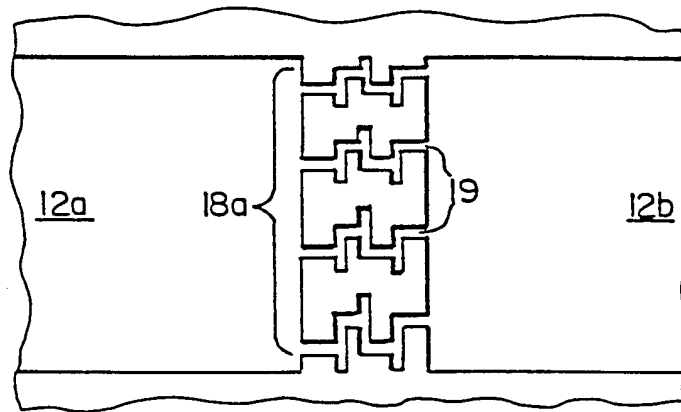


图 3

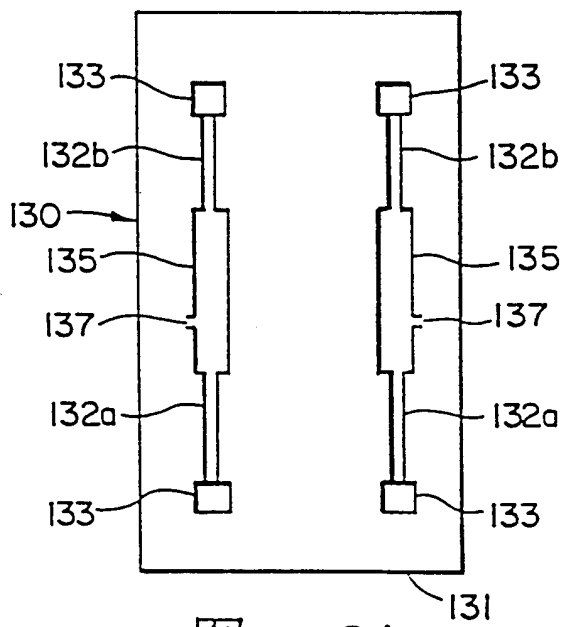


图 8A

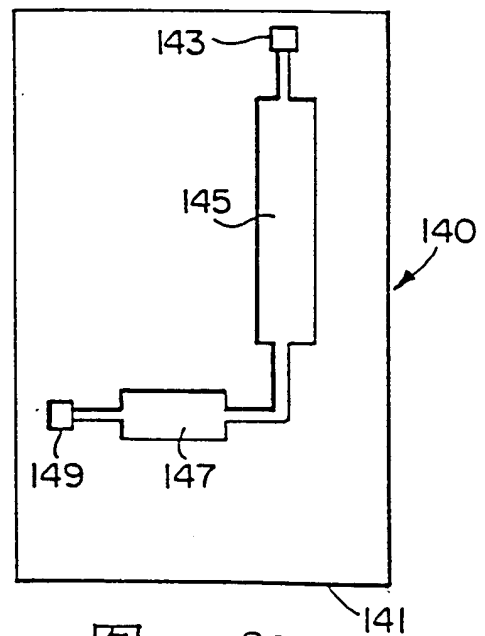


图 8B

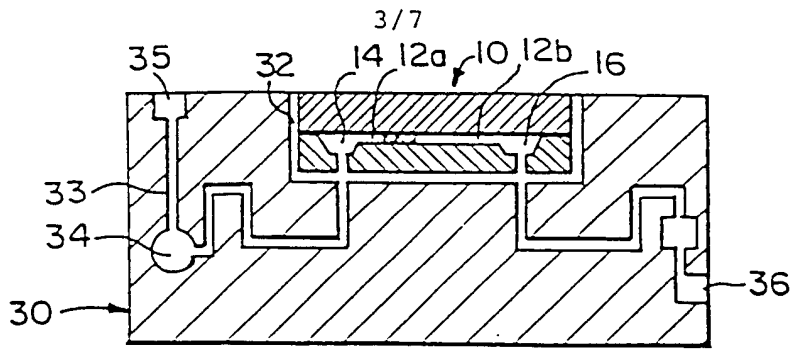


图 4

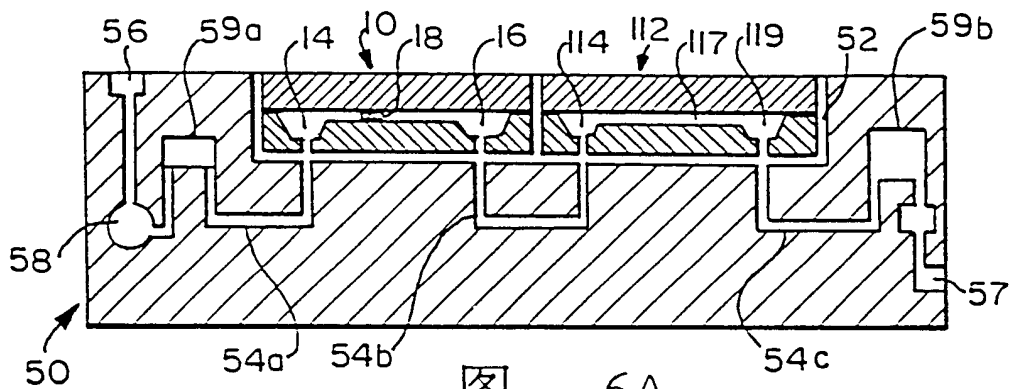


图 6A

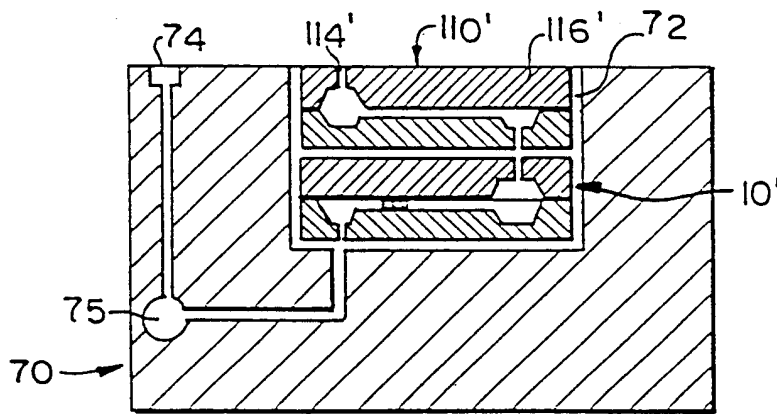


图 6B

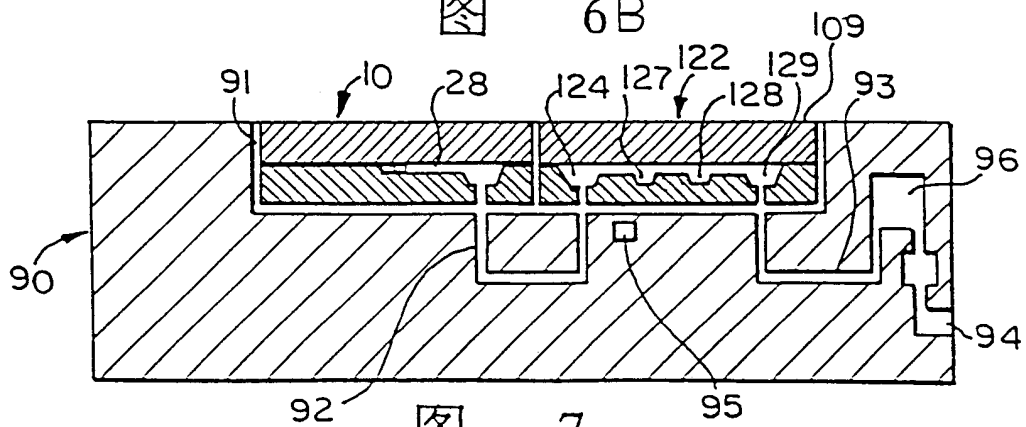


图 7

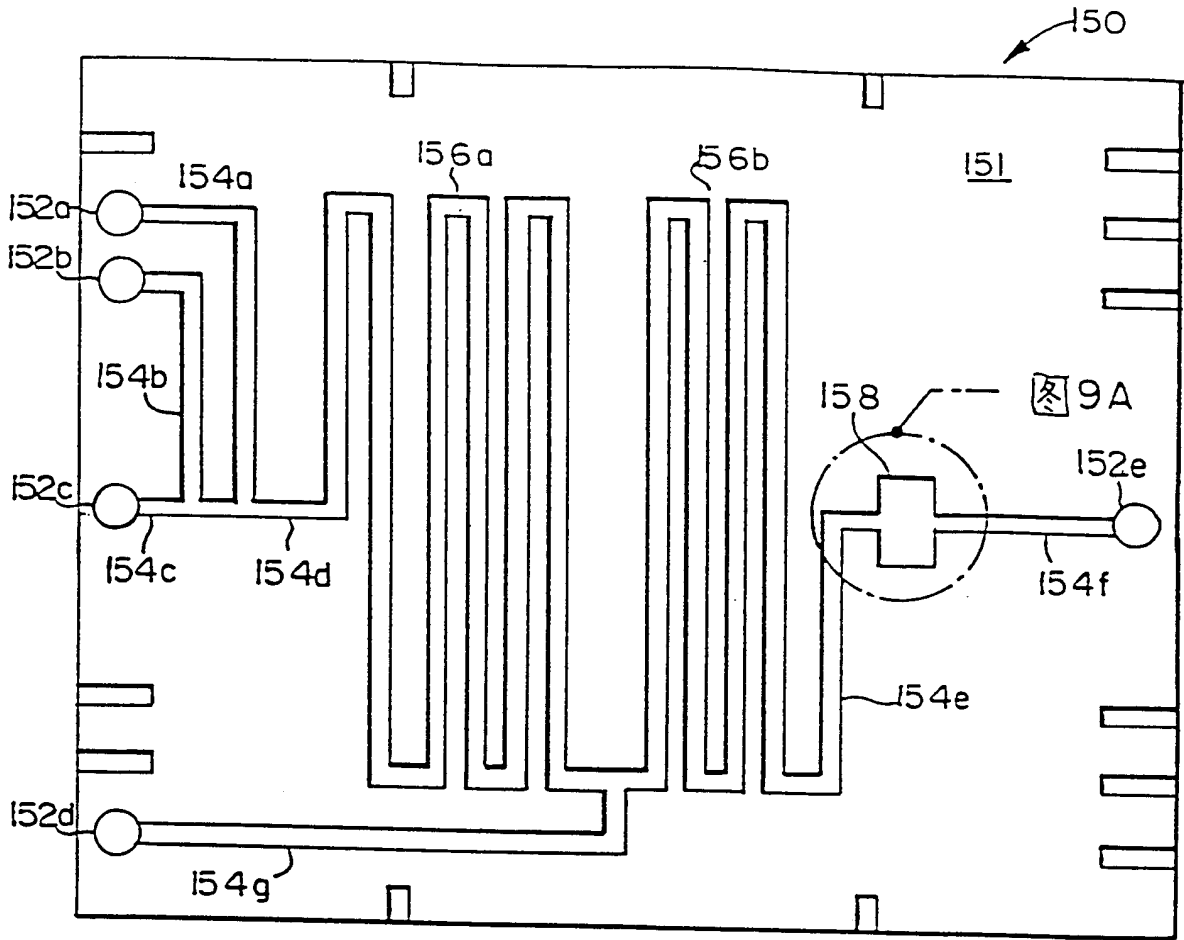


图 9

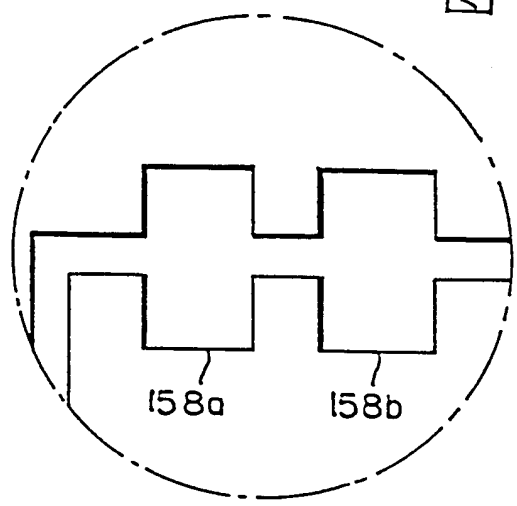


图 9B

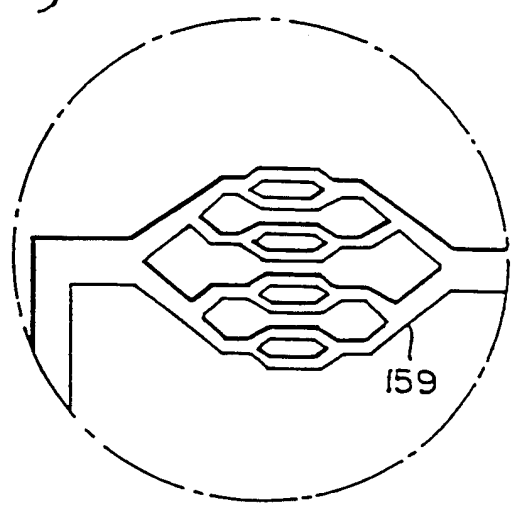


图 9C

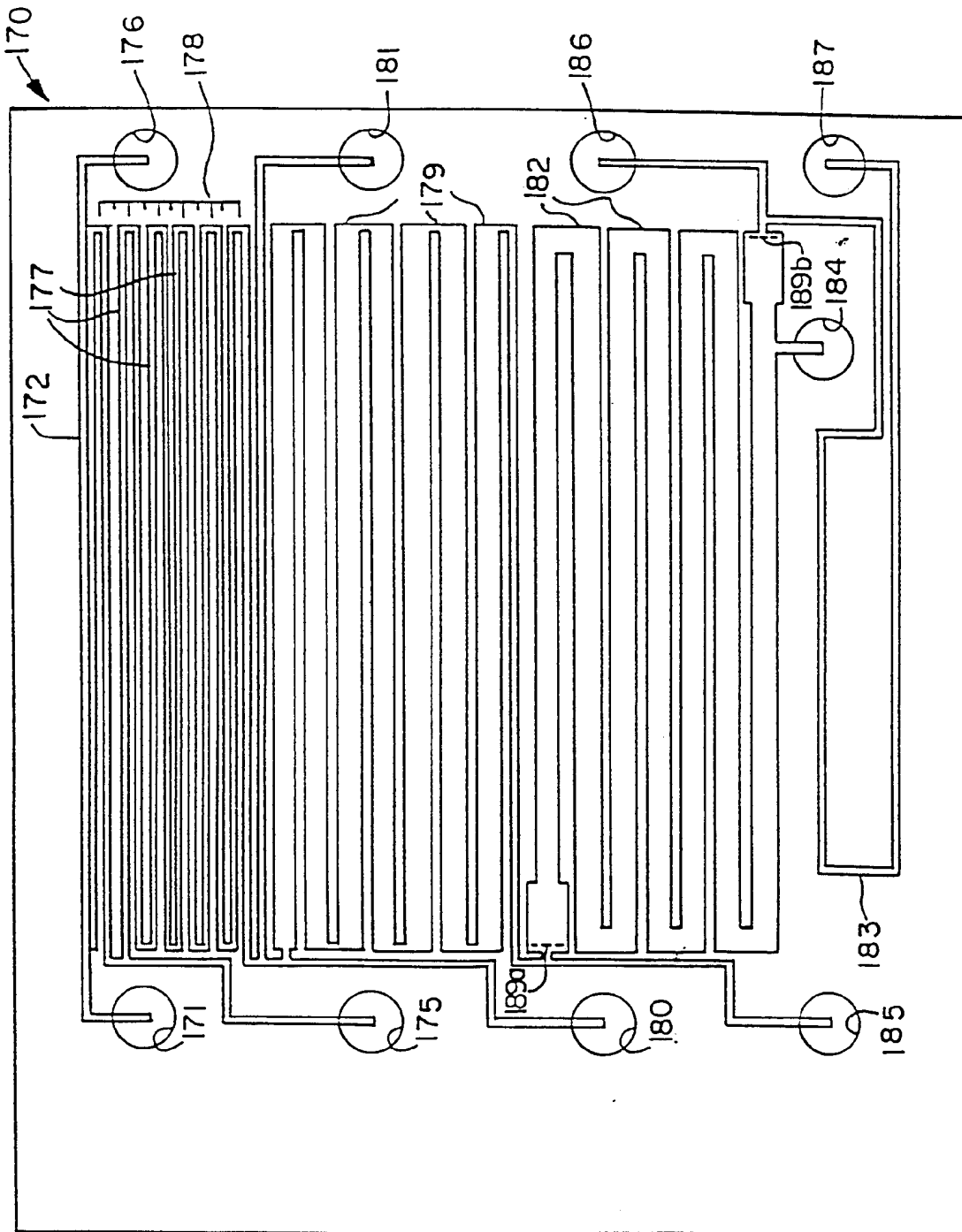


图 10A

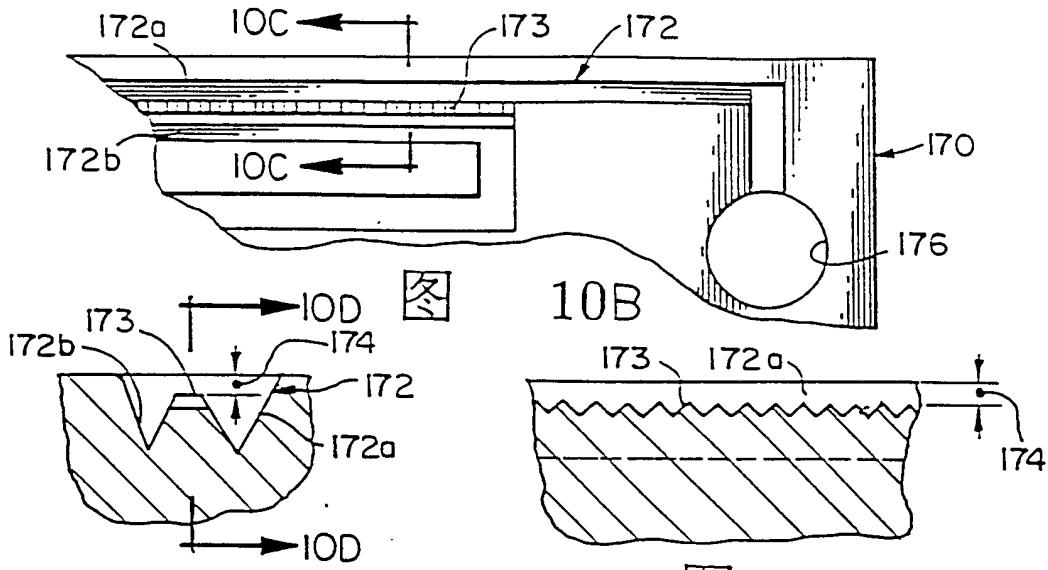


图 10C 图 10D

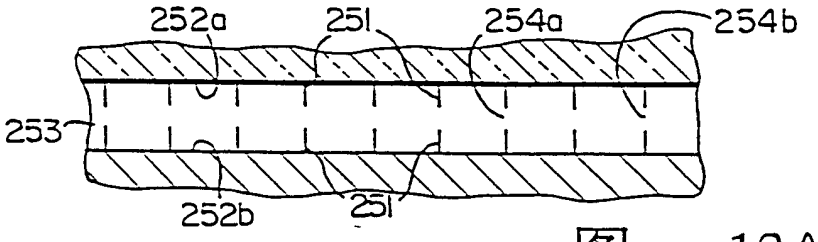


图 12A

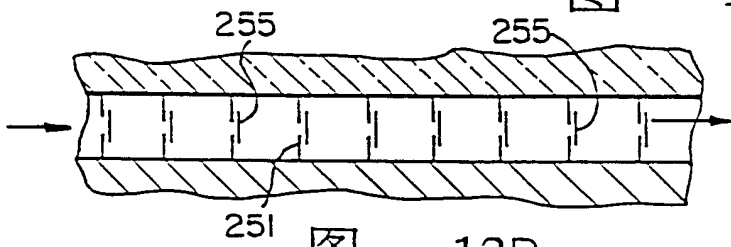


图 12B

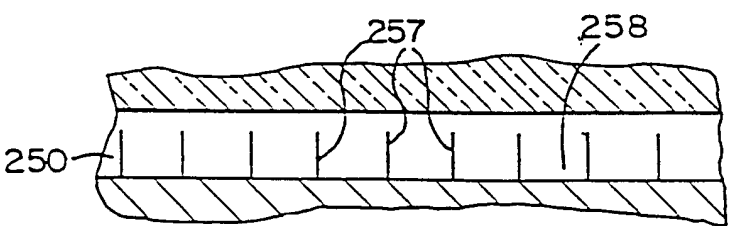


图 12C

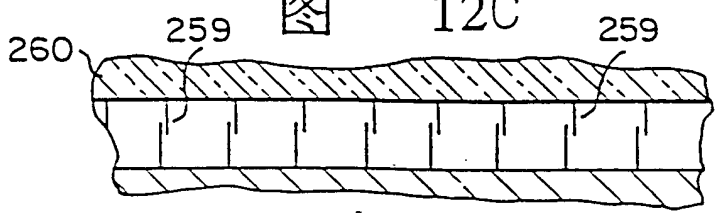


图 12D



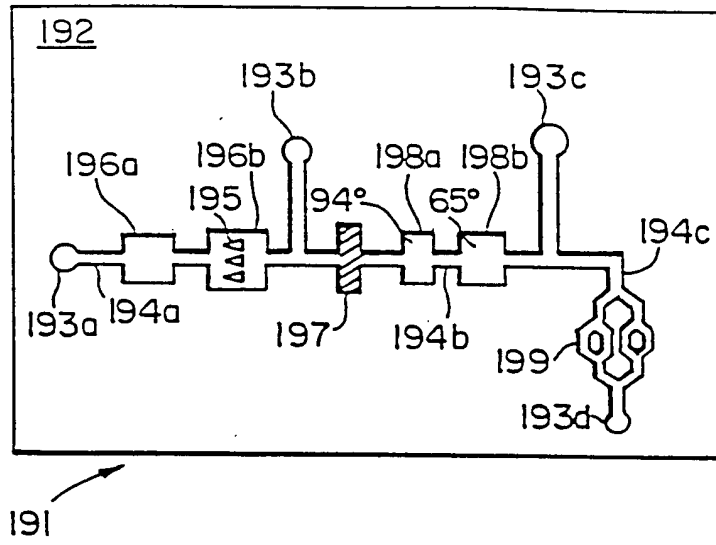


图 11A

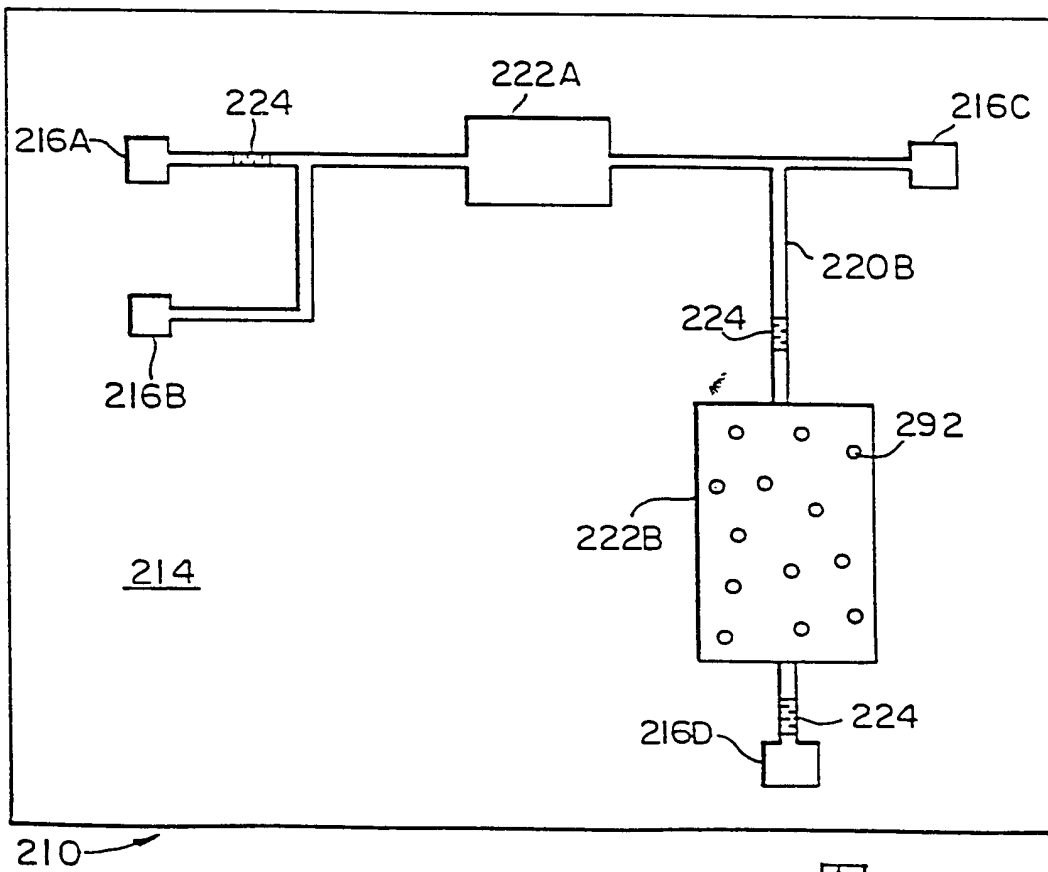


图 11B