



1. 经构造用以分离基因组材料的盒式贮存器，其包括：  
反应室；  
至少一种结合与释放基质，其中所述至少一种结合与释放基质位于反应室内且经构造用以响应电压地结合和释放包含基因组材料的至少部分样品；  
至少一个电极；  
基因组分离和导向系统；和  
喷射头，其中所述喷射头中的室经构造用以接收来自基因组分离和导向系统的包含基因组材料的至少部分样品，其中所述喷射头将至少部分接收的样品作为喷射样品滴排出盒式贮存器。
2. 权利要求 1 的盒式贮存器，其中所述基质包含电荷转换材料。
3. 权利要求 1 的盒式贮存器，其中所述至少部分样品的结合与释放响应与基质接触的流体的离子组成的差异，和其中所述样品包含在流体中。
4. 权利要求 1 的盒式贮存器，其中所述至少部分样品的结合与释放响应与基质接触的流体的 pH 的差异，和其中所述样品包含在流体中。
5. 权利要求 1 的盒式贮存器，其中所述基质是颗粒或小珠。
6. 权利要求 1 的盒式贮存器，其中所述基质是磁性的或顺磁的。
7. 权利要求 1 的盒式贮存器，其中所述基质与反应室的内表面结合。
8. 权利要求 1 的盒式贮存器，其中从基质释放的至少部分样品的体积从样品的体积减去。
9. 权利要求 1 的盒式贮存器，其中所述喷射头使用通过热能发生器提供的热能。
10. 权利要求 1 的盒式贮存器，其中所述喷射头是压电喷射系统。

## 检测、分析和鉴定基因组 DNA 的方法和分子诊断装置

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求来自 2005 年 9 月 1 日提交的美国临时专利申请 60/712,813 的优先权，其以及其全文在此引用作为参考。

[0003] 发明背景

### 发明领域

[0004] 本发明涉及能用来表征可能存在于样品中的基因组材料的分子诊断装置。

[0005] 相关背景技术

[0006] 在生物技术学领域，存在对各种样品（例如，环境和医学样品）的生物例如细菌和病毒的快速鉴定的需要。例如从细菌分离的基因组材料的快速鉴定（即，细菌的品种和 / 或株系的鉴定）可能是为例如区域供水、医院（包括其中的住院患者）或食品加工厂提供质量保证所必需的；即，就污染生物体的存在监控各种样品（包括但不限于空气、尘埃、水、血液、组织、植物、食品等）以及在由公众消费、暴露和 / 或使用之前或在由公众使用期间或在从患者或公众的另一个成员获得的组织或血液样品中鉴定污染性生物可能是必需的。

[0007] 用于鉴定生物的标准微生物学方法，例如培养和革兰氏染色法或其他生化性质的检测是不精确的且通常不能区分不同的生物，更不用说生物的不同株系。用于鉴定生物的更精确的方法基于所述生物的基因组 DNA。二个这样的鉴定方法是聚合酶链式反应 (PCR)，该技术的发展（例如，自动化线内 PCR 平台）已增加了其产出量和自动化的水平，和波形表征的更新方法。

[0008] 因为 PCR 指数扩增 DNA，因此其可用于检测少量的基因组材料。然而，因为 PCR 需要对于基因组材料的序列是特异性互补的引物（所述引物是已知的且包围 DNA 目标基因座），因此 PCR 的限制在于其只可用于已知的生物的表征。换句话说，需要研究人员在检测所述生物的任何尝试之前知道或猜测生物的身份（即，用于使用的恰当引物对）。PCR 的另一个限制是除了关于与用于分析的两个引物互补的序列的信息外，研究人员，不通过进一步的研究，不能作图和 / 或获得关于扩增的 DNA（和从而分离的基因组材料）的序列信息。此外，自动化线内 PCR 平台通常不能在基因组材料已经历 PCR 后提供进一步分析（例如，作图）基因组材料的方法。基因组材料的进一步的分析（例如，提供物种和 / 或株系的更确定的鉴定）可以是更重要的并且用于例如区分病原体株系与非病原体株系、检测和提供新株系的序列、选择合适的抗生素方案等。

[0009] 为克服 PCR 的一些限制，发展了波形表征方法（参见，例如，美国专利申请 11/190,942 和 11/356,807，和日本专利申请公开号 2003-334082 和 2003-180351）。波形表征法提供了分析和表征基因组材料例如从生物例如细菌分离的 DNA 的方法，而无需研究人员在检测之前已知所述生物的身份。

[0010] 波型表征通常使用利用可检测的（例如，放射性的、荧光的、化学发光的等）试剂（例如，核苷酸、插入剂等）进行的解链温度分析，所述试剂被整合入通过波形表征法产生的高级 DNA 结构。随着样品的温度增加，高级结构离解从而例如损失荧光强度（例如，插入

的荧光剂分离)。将以这些高级结构的离解获得的荧光强度的改变率作为增加的温度的函数作图产生了对于生物的基因组 DNA 和使用的波形引物是独特的波形,即,观察和记录在不同解链温度 ( $T_m$ ) 下的高级 DNA 结构的离解以产生生物例如细菌的各个种(或株系)的特征“波形表征”。因此,波形表征可用于通过使用解链温度分析区分从第一生物分离的基因组 DNA 与从第二生物分离的基因组 DNA。然而,在没有进一步的研究的情况下,波形表征不提供被分析的基因组材料的图谱或序列。

[0011] 因为波形表征法是相对新的方法,因此此处描述的进步可用于增加其通量和 / 或自动化程度。

[0012] 如上所述,已发展了增加 PCR 通量和自动化的水平的新技术。一个这样的新技术的实例是微流系统的使用,包括用于微流装置的控制器 / 检测器界面,如例如美国专利号 6,033,546、6,238,538、6,267,858、6,500,323 和 6,670,153 中所描述的。这些微流系统,此处统称为自动化线内 PCR,在本领域内是熟知的并且通常在本说明书中进行描述。

[0013] 大多数自动化线内 PCR 平台使用与控制器 / 检测器界面一起工作的微流芯片以进行自动化上样 (sample accession)、微流 PCR 试剂的混合 (assembly)、PCR 热循环和光学检测光谱学。微流芯片通常包含具有至少一个可结合至第二板的微蚀刻 (micro-etched) 流体 (微流) 线内反应通道的第一板,在所述第二板中可以是金属丝 (metal trace) 和贮液池 (fluid reservoir)。当两块板结合在一起时,第一板的各微流反应通道可与第二板的贮液池连接,这样基因座特异性试剂可通过贮液池递送至微流线内反应通道。

[0014] 当毛细管或“吸浆管 (sipper)”从例如微量滴定板 (其可来自例如机械处理器) 抽吸样品滴 (其可以是或不是 DNA 样品滴,即包含从生物分离的基因组材料的样品滴) 入至少一个微流线内反应通道时,线内 PCR 开始进行。在将样品滴抽吸入微流线内反应通道后,可将吸浆管移入缓冲液通道中,这样缓冲液就可被抽出微流芯片。从而,将样品滴之间的交叉污染减少至最少或消除,因为各样品滴与紧邻的样品滴被缓冲液间隔物分开。然后将各样品滴沿微流线内反应通道移动并进入所述芯片的 PCR 装配区,其中所述样品滴通过与 PCR 所需的试剂例如引物对、DNA 聚合酶和 dNTP 以及可检测试剂例如插入剂等混合变成样品塞 (样品塞)。任意地,也可将缓冲液间隔物与 PCR 所需的试剂混合以用作负对照。在与 PCR 所需的和可检测的试剂混合后,样品塞 (其可以是或可以不是 DNA 样品塞,即包含基因组材料的样品塞) 沿微流线内反应通道的长度方向流入芯片的不同区域例如扩增区域,在该区域中 PCR 可在该样品塞上进行。

[0015] 一般地,当各样品塞 (例如,DNA 样品塞) 流过微流线内反应通道时,其进入温度受控制的扩增区,其中以局域化的方式重复地且快速地加热和冷却各微流线内反应通道,从而在各样品塞流过所述反应通道时对其进行 PCR 的变性、退火和延伸步骤;将不包含基因组材料的样品塞暴露于相同的加热和冷却过程等。DNA 的扩增只在 DNA 样品塞即包含基因组材料的样品塞中发生。控制扩增区中的温度的方法是焦耳加热法 (Joule heating) (参见,例如,美国专利 5,965,410 和 6,670,153)。一般地,可以受控和局域化的方式对微流线内反应通道中或附近折金属丝施用电压以获得 PCR 各循环所需的不同温度。可通过使用例如冷却流过螺旋管从而以热的形式从微流线内反应通道带走热能的流体,或通过使得能够快速扩散热量 (例如通过对所述微流芯片的底面使用冷水,或简单地辐射对流入大气或使用散热装置进行合适的热转移) 来实现反应的冷却。因为微流通道中的液体体积很小且金

属丝非常靠近微流线内反应通道,因此通道内液体(从而,样品塞)的加热和冷却可非常快速地实现。结果,DNA样品塞进行PCR,且以在少于9分钟的时间内进行例如30个循环的方式进行PCR循环。各DNA样品通过芯片的温度控制区中的微流通道期间进行的PCR循环次数可通过改变例如1)对所述金属丝使用的电压时限和2)DNA样品塞通过微流通道的流速中的任一条件或两个条件来改变。

[0016] 微流芯片可同时进行与其具有的微流线内反应通道一样多的聚合酶链式反应。例如,包含基因组材料的样品可被抽吸入多个不同的微流线内反应通道,所述各通道中加入了不同的基因座特异性试剂(例如,包围基因组材料例如DNA上的不同基因座的不同引物对)。这使得能够同时检测例如从相同生物体分离的基因组材料上几个不同的基因座。可选择地,可将包含一对特异性引物对的试剂抽吸入多个不同微流线内反应通道。这使得能够同时检测例如从不同生物体分离的基因组材料上的相同基因座。此外,可将多个样品滴抽吸入相同的微流反应通道。

[0017] 检测区通常在温度受控扩增区的下游,其通常是有利观察和检测扩增的DNA产物例如PCR产物的透明区域。在检测区,通常将各微流线内反应通道紧靠检测器且在其下通过。光源扩散穿过微流线内反应通道,这样可同时测量通过光学检测区的可检测试剂,例如从各通道各DNA样品塞发射的荧光。在检测区之后,各微流线内反应通道通常将各样品塞导向废液孔。

[0018] 通常使用3种不同的方法在微流线内反应通道内产生流体运动;所述方法包括电动法(electrokinetics)、压力或两者的结合(参见,例如,美国专利6,238,538、6,670,153、6,787,088和美国公开专利申请2001/0052460)和非机械阀(参见例如,美国专利号6,681,788和6,779,559)。在压流系统(pressure-based flow system)中,可使用内源或外源于线内反应通道内驱动流体流动。例如,可对各微流线内反应通道末端的废液孔施加真空和可将其用于启动吸浆管从而将流体沿着微流线内反应通道朝向废液孔运动。可选择地,因为基因组材料带电荷,因此可使用电动法即产生电压梯度(例如,通过对金属丝施加电压)来驱动带电流体沿微流线内反应通道运动。驱动流体沿所述线内反应通道流动的第3种方法使用电动力和压力。结果是微流线内反应通道内的流体的连续流动,其中样品塞(例如,DNA样品塞)被连续混合或流动至芯片的不同区域(例如,PCR装配区、温度控制区、检测区等)。

[0019] 可通过与芯片接合的仪器(通常描述于美国专利6,033,546和6,582,576)控制涉及微流芯片的电动力和/或压力驱动的流体运动,加热和冷却循环,检测和数据获得。所述仪器的接口通常包含密封芯片上的试剂小孔的O型圈密封、可与芯片上的金属丝连接从而为温度循环提供电压的弹簧针(poao pins)、用于废液孔的O型圈密封(在所述废液孔中可施用真空以使流体通过芯片)、可用于密封靠着循环冷却水的芯片底部和在温度循环期间加速冷却的大O型圈密封和用于例如荧光检测的检测区带。污染该系统的可能性最低,因为微流芯片通常是封闭的系统,物理屏障(例如,缓冲液间隔物)分开DNA样品塞。此外,连续流动阻止了样品塞回流。

[0020] 上述自动化线内PCR平台的限制在于微流芯片应当在使用之后被抛弃,不适合用于自动化线内波形表征;此外,使用该平台分析样品需要外来设备。另外,使用吸浆管抽吸样品滴是获得快速进行PCR循环所需的小体积的无效和浪费的方法。本发明通过提供分子

诊断装置来解决这些限制,所述装置可通过使用制备基因组材料的自动化方法,然后进行1)扩增基因组材料和检测任何扩增的产物和2)对基因组材料作图中的任一项或两者来表征从样品的生物(例如,细菌、病毒)分离的基因组材料。本发明的至少一个示例性实施方案的分子诊断装置具有可通过相同的微流芯片处理多个样品例如患者样品而无交叉污染的有利方面。此外,因为在一些示例性实施方案中,装置是便携式系统,本发明的至少一个示例性实施方案的装置可用于全美国或世界其他地方的不同患者保健中心,和可用于远离医院或其他患者保健中心的患者身边装置或被污染的位置。此处公开的分子诊断装置具有有利于在样品采集后短时间筛选样品的有利方面。

[0021] 发明概述

[0022] 至少一个示例性实施方案涉及经构造用于分离基因组材料的盒式贮存器(cartridge),所述盒式贮存器中包含至少一个通道和能够结合和释放基因组材料的固体基质。在至少一个进一步的示例性实施方案中,盒式贮存器还包含废液孔。在另一个示例性实施方案中,能够结合和释放基因组材料的固体基质(即结合与释放基质)包含电荷转换材料(charge switch material)。

[0023] 本发明的至少一个示例性实施方案涉及经构造用于分离基因组材料的盒式贮存器,其包括:反应室,和至少一种结合与释放基质,其中至少一种结合与释放基质位于反应室内并且被构造用于结合和释放部分包含基因组材料的样品。在至少一个其他示例性实施方案中,基质包含电荷转换材料。在至少一个其他示例性实施方案中,至少部分样品的结合和释放响应于电压。在至少一个其他进一步的示例性实施方案中,至少部分样品的结合和释放响应与基质接触的流体的离子组合物的差异并且样品包含在流体中。在至少一个其他的示例性实施方案中,至少部分样品的结合和释放响应与基质接触的流体的pH的差异并且样品包含在流体中。在至少一个其他的示例性实施方案中,基质是颗粒或小珠。在至少一个其他的示例性实施例中,基质是磁性的或顺磁的。在至少一个其他的示例性实施方案中,基质与反应室的内表面结合。在至少一个其他的示例性实施方案中,从基质释放的至少部分样品的体积从样品的体积中减少了。

[0024] 在至少一个本发明的示例性实施方案中,本发明涉及构造用于递送包含基因组材料的样品的盒式贮存器,其包括基因组分离和导向系统,以及喷射头(ejector head),其中喷射头中的小室经构造用于接收来自基因组分离和导向系统的基因组材料的至少部分样品,其中喷射头以喷射的样品滴形式将至少部分接收的样品喷出盒式贮存器。在至少一个其他的示例性实施方案中,喷射头使用由热能发生器提供的热能。在至少一个其他示例性实施方案中,喷射头是压电喷射系统。

[0025] 至少一个本发明的示例性实施方案涉及构造用于分离基因组材料的盒式贮存器,其包括反应室、至少一种结合与释放基质(其中至少一种结合与释放基质位于反应室内并且被构造用来响应电压以结合和释放包含基因组材料的至少部分样品)、基因组分离和导向系统以及喷射头,其中喷射头内的小室经构造用以接受至少部分来自基因组分离和导向系统的样品,其中喷射头以喷射的样品滴形式将至少部分接收的样品喷出盒式贮存器。在至少一个其他示例性实施方案中,基质包含电荷转换材料。在至少一个其他示例性实施方案中,基质是颗粒或小珠。在至少一个其他示例性实施方案中,基质是磁性的或顺磁的。在至少一个其他示例性实施方案中,基质结合到反应室的内表面。在至少一个其他示例性实

施方案中，喷射头使用由热能发生器提供的热能。在至少一个其他示例性实施方案中，喷射头是压电喷射系统。

[0026] 本发明的至少一个示例性实施方案涉及分子诊断装置，该装置包括至少一个盒式贮存器和至少一个微流芯片，其中芯片经构造用以接受至少部分从盒式贮存器喷射的样品滴，其中芯片包含至少一个用于接受从盒式贮存器喷射的样品滴的微流线内反应通道。在至少一个其他示例性实施方案中，可以重复脉冲率来重复脉冲盒式贮存器的喷射头以在微流芯片的微流线内反应通道中获得受控制的总液滴体积。在至少一个其他示例性实施方案中，重复脉冲率在大约 1kHz 至大约 100kHz 的范围内。在至少一个其他示例性实施方案中，重复脉冲率是大约 50kHz。在至少一个其他示例性实施方案中，喷射的样品滴具有大约 1 皮升至大约 25 皮升的体积。在至少一个其他示例性实施方案中，喷射的样品滴具有大约 3 皮升的体积。在至少一个其他示例性实施方案中，总液滴体积是大约 3 皮升至大约 100 纳升。在至少一个其他示例性实施方案中，微流芯片还包括在第一温度控制区内的用于扩增 DNA 产物的扩增区和在第二温度控制区内的检测区，扩增的 DNA 产物的检测可在多个温度下进行。在至少一个其他示例性实施方案中，装置进一步包括矩阵分析区域 (matrix analysis area)。

[0027] 本发明的至少一个示例性实施方案涉及包括一个样品滴接收系统（经构造用以接收从盒式贮存器喷射的包含基因组材料的至少部分样品）和矩阵分析区的微流芯片，其中矩阵分析区包含发射器层 (emitterlayer)、滤波体层 (filter layer) 和检测器层，其中发射器层发射发射波长。在至少一个其他示例性实施方案中，滤波体层包括通过荧光波长和阻止发射波长的涂有光滤波体的镜片。在至少一个其他示例性实施方案中，微流芯片还包括至少 2 个通道，其中两个通道经构造用以使包含基因组材料的样品流过第一温度控制区内的扩增区以进行 DNA 产物的扩增，和流过第二温度控制区内的检测区以引发 DNA 产物的荧光，其中扩增的 DNA 产物的检测可在多个温度下进行。

[0028] 本发明的至少一个示例性实施方案涉及分子诊断装置，所述装置包括至少一个盒式贮存器和微流芯片，其中盒式贮存器将包含基因组材料的样品滴喷射入微流芯片的样品滴接收系统。在至少一个其他的示例性实施方案中，矩阵分析区还包括多个单元，各单元包括至少一个光子发生器元件、DNA 伸展芯片 (DNA stretchchip) 和至少一个光子探测器元件。在至少一个其他的示例性实施方案中，至少一个光子探测器元件包含卟啉栅材料。在至少一个其他的示例性实施方案中，至少一个光子检测器元件包含 3 个薄膜晶体管。在至少一个其他的示例性实施方案中，装置是便携式的。在至少一个其他的示例性实施方案中，装置是手持式的。

[0029] 至少一个本发明的示例性实施方案涉及表征样品中的基因组材料的方法，其包括步骤 (a) 用盒式贮存器分离样品中的任何基因组材料；(b) 将至少一个样品滴从盒式贮存器中的液体喷射装置喷射入微流芯片的样品滴接收系统；(c) 检测样品滴中的基因组材料；和 (d) 分析样品滴以表征存在的基因组材料。在至少一个其他示例性实施方案中，分析样品滴包括将检测到的样品中的基因组材料的条形码与已知条形码的数据库进行比较。

[0030] 至少一个本发明的示例性实施方案涉及分子诊断装置，该装置包括至少一个用于分离基因组材料的盒式贮存器；至少一个用于在基因组材料分离后从盒式贮存器喷射基因组材料的样品滴喷射头，其中至少一个盒式贮存器可附着于至少一个样品滴喷射头；和至

少一个用于分析基因组材料的微流芯片，其中微流芯片包括至少一个用于接收来自样品滴喷射头的喷射的基因组材料的微流线内反应通道和至少一个用于在微流线内反应通道内进行流体的加热和 / 或用于流体运动的金属丝，其中至少一个微流线内反应通道通过试剂装配区、第一温度控制区内用于扩增 DNA 产物的扩增区和检测区。在至少一个其他的示例性实施方案中，检测区位于第二温度控制区内，扩增的 DNA 产物的检测可在多个温度下进行。在另一个示例性实施方案中，装置还包括矩阵分析区。在其他示例性实施方案中，矩阵分析区包括多个单元，各单元包括至少一个光子发生器元件、DNA 伸展芯片和至少一个光子检测器元件。在本发明的另一个示例性实施方案中，分子诊断装置是便携式的。在至少一个其他的示例性实施方案中，分子诊断装置的矩阵分析区包括  $512 \times 512$  个单元的矩阵。

[0031] 附图概述

[0032] 图 1A 根据本发明的至少一个示例性实施方案举例说明盒式贮存器设计，和图 1B 根据本发明的至少一个示例性实施方案的举例说明具有芯片的盒式贮存器的接口连接。

[0033] 图 2 根据本发明的至少一个示例性实施方案显示位于相互之间固定的位置上的喷射头和微流端口 (microfluidic port) 的示意图。

[0034] 图 3 根据本发明的至少一个示例性实施方案示意性图解了将微流线内反应通道 (inline reaction channel) 分隔成多个子通道的大块样品滴。

[0035] 图 4 根据至少一个示例性实施方案示意性描述了当样品滴与扩增试剂混合从而在试剂装配区形成样品塞和在扩增区内进行扩增的样品滴途径。

[0036] 图 5 根据至少一个示例性实施方案示意性描述了在样品塞通过图 4 的温度控制区和通过检测区后微流线内反应通道内的样品塞途径。

[0037] 图 6A-6C 根据本发明的至少一个示例性实施方案描述了时序图的几个方面。图 6A 描述了  $2 \times 2$  矩阵的图示，包括行接线 (row wiring) (RW) 和柱接线 (column wiring) (CW) 的代表，以及二进制移位寄存器 (binary shiftregister) (BSR1) 的计时脉冲 OUT1 和 OUT2 的时序图 (时序图 2)。图 6B 描述了时序图 1 和 4，图 6C 描述时序图 3 (其遵从 BSR2 的脉冲 IN1 和 IN2 的状态 (如图 6A 中所示))。

[0038] 图 7 是根据至少一个示例性实施方案的装置的矩阵分析区域的单通道毛细管 (即，微流) 元件的横截面。

[0039] 图 8 是根据至少一个示例性实施方案总体显示在用作荧光检测系统时的操作原理的光学图解。

[0040] 图 9 根据至少一个示例性实施方案举例说明矩阵分析区域内的矩阵 (或阵列) 的实施形式。

[0041] 图 10 是根据至少一个示例性实施方案的具有矩阵光学检测区带的 90- 通道微流阵列。

[0042] 图 11 显示玻璃滤波体的波长特征。

[0043] 发明详述

[0044] 至少一个示例性实施方案的下列描述本质上是只用于举例说明的，决非限定本发明、其应用或用途。

[0045] 相关领域内的技术人员已知的方法、技术、装置和材料可以不进行详细地描述但希望作为授权描述的部分，该描述涉及例如微流通道、子通道和微通道和其相关材料的合

适的装配。

[0046] 在此处说明和描述的所有实施例中,任何确定的值例如流体的量(例如,皮升)应当解释为只是举例说明的和非限定性的。因此,示例性实施方案的其他实施例可具有不同的值。

[0047] 要指出的是,相似的参考数字和字母是指此处公开和描述的图中的相似的项(item),从而在一个图中确定了项后,可以不在下图中对其进行描述。

[0048] 至少一个本发明的示例性实施方案涉及分子诊断装置和使用该分子诊断装置进行表征样品中基因组材料的自动化方法的方法。在众多示例性实施方案中,所述方法使得制备样品基因组材料(即,分离任何材料,和分配样品)和通过1)扩增和检测扩增的产物和2)作图中的任一步骤或两个步骤来鉴定基因组材料成为必需。本发明的至少一个示例性实施方案的分子诊断装置包括至少一个盒式贮存器和至少一个用于制备(待分析的样品的基因组材料的分离和分配)的液体喷射装置;和至少一个用于扩增从样品分离的基因组材料和检测从基因组材料扩增的产物的微流芯片。在至少一个本发明的示例性实施方案中,液体喷射装置将制备的样品从盒式贮存器转移至微流芯片。在本发明的另一个实施方案中,本发明的分子诊断装置还包括用于基因组材料作图的矩阵分析区。因此,本发明的至少一个示例性实施方案的分子诊断装置可用于表征基因组材料的自动化方法,所述方法包括制备基因组材料以及1)扩增基因组材料,然后检测扩增的产物和2)对基因组材料作图中的任一或两者的步骤。

[0049] 将容易地认识到为了此处的目的,制备样品的步骤包括从样品分离基因组材料(如果存在)和分隔样品(包括任何分离的基因组材料)以进行分析。同样扩增基因组材料的步骤包括将任何分离的基因组材料与合适的扩增剂(例如,引物、dNTP、盐、缓冲剂等)和任意地检测试剂(例如,插入剂)混合,然后对分离的基因组材料进行扩增反应。可使用本发明的示例性实施方案的分子诊断装置进行的扩增反应的非限定性实例包括PCR和各种形式的波形表征法(参见,例如,美国专利申请11/190,942和11/356,807,其公开内容在此以其全文引用作为参考)。检测步骤依赖于使用的扩增方法,即,PCR产物或高级结构的解离的检测依赖于是否分别进行PCR或波形表征法。在制备样品后,本发明的至少一个示例性实施方案的分子诊断装置可允许任何分离的基因组材料1)被扩增和通过其扩增的产物进行检测,2)被扩增和通过其扩增的产物进行检测,并且在矩阵分析区进行作图,如此处描述的,或3)在矩阵分析区内进行作图,如此处描述的。

[0050] 分子诊断装置

[0051] 在过去的数年中,已发展了与多种现有的和熟知的荧光“混合-和-阅读”生物化学方法例如TaqMan、Molecular Beacons、EpochEclipse Probes和等位基因特异性扩增(Aallele Specific Amplification)兼容的自动化线内PCR平台。迄今为止,还没有已知的自动化线内平台使得能够进行有效的现场(例如,靠近患者)基因检测,所述检测避免了对外部来源的样品(例如,在医生办公室或在另一个近患者位置采集的患者样品)的需要。本发明的目的是提供可用于例如在相同的地方和在获得待分析的样品的短时帧(例如,大约1小时)内就例如细菌或病毒感染的存在分析患者样品的分子诊断装置。如在此处进一步描述的,本发明的至少一个示例性实施方案的分子诊断装置包括至少一个构造用于分离样品中的任何基因组材料的盒式贮存器;至少一个包括至少一个用于分隔任何分离的基因组

材料的喷射头的液体喷射装置,其中至少一个盒式贮存器可以附加或临时附加至少一个喷射头;和至少一个用于检测任何基因组材料的微流芯片,其中微流芯片包括至少一个用于接收从液体喷射装置喷射的基因组材料的微流线内反应通道和至少一个用于在微流线内反应通道内进行加热和/或用于液体运动的金属丝,其中至少一个微流线内反应通道通过试剂装配区、第一温度控制区内用于扩增DNA产物的扩增区和微流芯片的检测区。在本发明的另一个示例性实施方案中,本发明的分子诊断装置还包括用于基因组作图的矩阵分析区。

[0052] 1. 制备基因组材料

[0053] 本发明的至少一个示例性实施方案的分子诊断装置包括盒式贮存器和液体喷射装置,两者都特别参与制备存在于样品中的任何基因组材料的步骤中。换句话说,可通过盒式贮存器从收集的样品(例如,患者样品)分离基因组材料,然后在后来的通过微流芯片进行的扩增和检测(和/或作图)步骤之前通过液体喷射装置喷射所述材料。

[0054] 本发明预期:本发明的至少一个示例性实施方案的分子诊断装置可用于患者样品的现场(例如,靠近患者)检测;此外,可使用本发明的分子诊断装置检测许多不同类型的样品。这些样品包括,但不限于,水、空气、尘埃、食物和生物样品,包括体液(例如,唾液、全血、血浆、血沉棕黄层、尿等)、细胞(例如,完整细胞、细胞碎片和细胞提取物)和组织。生物样品也包括用于例如组织学目的组织切片例如活检组织和冰冻切片。示例性生物样品包括但不限于血液、血浆、淋巴、活检组织、尿、CSF(脑脊液)、滑膜液和BAL(支气管肺泡灌洗液)。在至少一个本发明的示例性实施方案中,生物样品是血。

[0055] A. 盒式贮存器

[0056] 可使用任何熟知的方法例如用于收集患者血液样品的注射器收集样品,然后将其置于本发明的至少一个示例性实施方案中的一次性使用的盒式贮存器内以从样品分离基因组材料;在至少一个示例性实施方案中,将样品直接收集入一次性使用的盒式贮存器。本发明的至少一个示例性实施方案的盒式贮存器经构造用以分离样品中包含的任何基因组材料,并且在盒式贮存器内包括至少一个通道(和/或室);在盒式贮存器内的至少一个通道中从样品分离基因组材料。

[0057] 图1A根据至少一个示例性实施方案举例说明盒式贮存器100a的非限定性实例,图1B举例说明了盒式贮存器100b和芯片190之间的相互作用。图1A中举例说明的盒式贮存器100a包括:外部样品入口(external sample inlet)110;任意地入口帽(inlet cap)115;样品室A;可被推压从而允许外部样品进入样品室A(例如,可通过泵入口F1对其抽真空,然后封闭,从而使低压将外部样品引进室A)的推动阀(push valve)B1;任意地电极140(例如,提供电压差以破碎细胞膜或细胞壁,从而将基因组材料释放入室A内);可被推动从而允许基因组材料从室A进入室B的推动阀B2;其中结合与释放基质150可结合和释放基因组材料;其中任意地电极160可用于指导基因组材料(例如,从样品提取的基因组材料)进入通道D,而废材料可通过通道C被导出通过废液出口I3;其中打印头130收集打印头E中的基因组材料并且可用于将材料喷射入通道例如微流线内反应通道,例如具有盒式贮存器的定位冲洗器(未显示);其中可通过洗液插入入口I1插入洗液;其中可通过试剂插入入口I2插入试剂;其中可推动试剂插入阀B3以允许试剂进入反应室B;其中可推动洗液插入阀B4以允许洗液进入反应室B;和其中任意地电源系统120可为打印头130和

电极 140 和 160 以及结合与释放基质 150 提供电能。在至少一个本发明的示例性实施方案中，电源系统 120 为与打印头 130 连接的或包含在其中的热能发生器提供电能。在至少一个本发明的示例性实施方案中，释放的基因组材料从反应室 B 运动通过通道 D 进入打印头室 E 的路径连同基因组材料和任意地控制基因组材料的运动的联动电极 160 的联合运动一起称为基因组分离和导向系统。

[0058] 要指出的是图 1A 只是举例说明一个非限定性实例；预期在其他示例性实施方案中存在变化。例如，电源系统 120 可以是外部的，试剂和洗液可存在于盒式贮存器的内部室内，可用如相关领域内的技术人员已知的其他类型的方法（包括推动阀和受电子手段控制的其他装置或方法）替换推动阀以阻断和打开液体通道，废材料可贮存在盒式贮存器的内室中，尽管图 1A 说明了来自一个注入的样品的基因组材料，但可通过复制已描述的，例如对于每个人（如患者）或其他来源取样的盒式贮存器的部分来插入来自例如不同个体（例如，患者）或其他来源（例如，供水）样品的多个插入物，

[0059] 尽管不存在对可收集入本发明的盒式贮存器的样品的量的限制，但预期将盒式贮存器用于确定来自大约  $100 \mu l$  的样品的基因组材料。例如，制备由本发明的至少一个示例性实施方案的盒式贮存器收集的样品的体积可在  $10 \mu l$  至  $1ml$  的范围内。

[0060] 在至少一个本发明的示例性实施方案的盒式贮存器中，只使用均质的水溶液从样品分离基因组材料。均质溶液的使用方便地避免了大多数分离基因组材料的方法的效率低下的需求（例如，基于酒精或基于其他有机物的溶液与水溶液之间的转换和离心），也促进了本发明的示例性实施方案的盒式贮存器与液体喷射装置的联合使用。此外，与其中将基因组材料与基质结合的方法不同，本发明的盒式贮存器（整合了此处描述的“电荷转换”技术）允许基因组材料在一个条件下对基质结合或在另一个条件下从基质释放。因此，在本发明的范围内的，在一些示例性实施方案中，可重新使用盒式贮存器从多个样品分离基因组材料。

[0061] 例如，在至少一个示例性实施方案中，可收集样品，将其稀释以获得一定的体积（例如，在水性裂解缓冲液中），并同时或相继抽吸入本发明的盒式贮存器（例如，进入盒式贮存器的反应室），其中的条件促进基因组材料对结合与释放基质（此处也称为基质）的表面结合。在另一个示例性实施方案中，可在盒式贮存器内稀释水性裂解缓冲液。在将基因组材料结合到结合与释放基质上后，未结合的大分子（例如，蛋白质、污染物等）被洗去。然后可改变盒式贮存器的条件以将基因组材料释放（即，洗脱）入例如水性缓冲液或水中。然后可通过此处描述的液体喷射装置将包含基因组材料的洗脱液送入微流芯片进行分析。在至少一个本发明的示例性实施方案中，将盒式贮存器与样品一起在使用后抛弃。在本发明的另一个实施方案中，可清洗盒式贮存器，包括使盒式贮存器的基质的表面经历促进基因组材料的结合和 / 或释放的条件，然后再重新用于从另一个样品分离基因组材料。

[0062] 为了本发明的至少一个实施方案的盒式贮存器的目的，结合与释放基质可以是具有固体表面的任何支持物，例如，颗粒、小珠、管、小孔、玻璃、塑料等。具有用于本发明的至少一个示例性实施方案的盒式贮存器的固体表面的合适的支持物是这样的支持物，即其可具有对于基因组材料的天然亲和力或其已进行了条件化或容易进行调节（例如，使用调节缓冲液）以便在盒式贮存器内结合和释放基因组材料。用于调节固体相支持物的表面的合适的方法包括用条件化缓冲液（例如可在表面上导入电荷（例如，正电荷），或使表面亲水

或疏水等的物质)对其处理。此外,合适的支撑物是可以磁化的、有磁性的、顺磁的等。在至少一个示例性实施方案中,盒式贮存器的内表面包括盒式贮存器内的通道的内表面。在本发明的至少一个其他实施方案中,盒式贮存器的内表面可用作基质。在另一个示例性实施方案中,盒式贮存器内的颗粒或小珠(包括磁化的或可磁化的颗粒或小珠)可用作基质。

[0063] 例如,美国公开专利申请 2003/0054395 和 2003/0130499(其各自在此以其全文引用作为参考)描述了在水溶液中分离基因组材料的方法,该方法包括条件化固体相基质以结合和随后释放基因组材料。简而言之,这些申请描述了给固相基质(例如,无孔固相基质)的表面提供可依赖于条件化缓冲液进行转换的电荷,即存在于固相基质的内部、表面或实际上包括固相基质的“电荷转换材料”。根据美国公开专利申请 2003/0054395,电荷转换材料是可离子化的。例如,可通过吸附、离子键或共价键将包含可离子化的基团的化学物质以单体或多聚体的形式固定至固体支持物,或共价附着至聚合物主链,然后将该聚合物主链固定至固体支持物。或者,可将化学物质整合入固体和不溶性形式例如小珠、颗粒、路径、通道等(例如,在盒式贮存器内)。通常这样选择电荷转换材料以使可离子化基团的 pKa 适合于能理想地使核酸与固体相基质结合和释放的条件。通常,若电荷转换材料带正电荷,基因组材料在低于或大致等于 pKa 的 pH 下与电荷转换材料结合,若电荷转换材料呈现较少的正电荷、中性或带负电荷,其在更高的 pH(通常高于 pKa)下释放。换而言之,在低 pH 的条件下,基质表面具有能够结合带负电荷的基因组材料的正电荷。污染物例如蛋白质、其他大分子等不被结合,并可在正常生理温度下在水性清洗缓冲液中洗去。增加 pH 将中和基质表面的电荷,从而影响可用水性洗脱缓冲液进行洗脱的基因组材料的释放。

[0064] 因此,在至少一个本发明的示例性实施方案中,盒式贮存器的内壁或盒式贮存器内的通道的内壁可以是拥有可依赖于 pH 的条件转换的电荷的固相基质。在另一个实施方案中,可对其提供可转换电荷的小固相颗粒和小珠(例如,磁珠)在盒式贮存器内。该后一个示例性实施方案通过使用磁场提供了防止小珠与污染物一起被洗去的合适的机制。在至少一个示例性实施方案中,任意的盒式贮存器内部或外部的电源系统提供电源以实现本发明的结合与释放基质的状态下的变化。

[0065] 流体(例如,条件化缓冲液、样品、裂解缓冲液、污染物、洗脱液、清洗缓冲液等)在盒式贮存器内可采用不同的途径分离基因组材料,最终,喷射可包含分离的基因组材料的样品滴。例如,样品可沿着直的、弯曲的或管状路径(其可以是任何三维形状(例如,横截面为圆形、半圆形、正方形等的管))行进,连接另一条路径(例如,从而与裂解缓冲液混合),在盒式贮存器内分成两个或更多个其他路径,从而允许与其他材料汇集、混合和/或温育等。在至少一个本发明的示例性实施方案中,毛细作用用于抽吸样品、条件化缓冲液、裂解缓冲液、污染物、洗脱剂、清洗缓冲液等通过盒式贮存器至本发明的至少一个示例性实施方案的液体喷射装置。毛细作用可以要求盒式贮存器在导入样品之前充满液体(例如,充满条件化缓冲液);在另一个示例性实施方案中,来自样品(例如,血)的压力单独地可足以推动样品通过盒式贮存器。在本发明的其他示例性实施方案中,使用真空抽吸样品通过盒式贮存器。在另一个实施方案中,电动力驱动样品或样品的部分(例如,从样品提取的基因组材料)移动通过盒式贮存器。

[0066] 盒式贮存器的另一个要素是其减少患者样品的体积的能力。在至少一个本发明的示例性实施方案中,将任何分离的基因组材料洗脱为少于样品的原始体积的液体体积。在

本发明的至少一个其他示例性实施方案中,以微升例如大约 1-10  $\mu$  l,例如大约 2.5  $\mu$  l 的体积洗脱任何基因组材料。

[0067] 当此处的方法描述 DNA 的扩增过程时,如果分离的基因组材料是 RNA,在通过微流芯片扩增之前其必须首先被反转录成 DNA 例如 cDNA。反转录的方法在本领域内是熟知的。在至少一个示例性实施方案中,分离的基因组材料是生物的总 DNA。在另一个示例性实施方案中,使用熟知的试剂例如 RNA 酶纯化基因组 DNA 以排除 RNA。

[0068] 本领域技术人员将认识到分离技术的理想性,其中例如相互分开地保持样品滴(例如,分离样品滴并且其与其之前的样品滴和与其之后的样品滴不同),特别是对于分子诊断。尽管大多数自动线内平台使用吸浆管进行该分离,即将制备的样品抽吸入微流芯片,吸浆管的使用是浪费的,因为并不检查小孔中的整个样品。此外,吸浆管本身不适于大块样品的分隔,即以小体积例如大约 2.5  $\mu$  l 将样品分成例如大约一千个分离的(样品)小滴。本发明解决了吸浆管的限制,通过液体喷射装置帮助大块样品分隔。例如,可以以密闭的方式将至少一个本发明的示例性实施方案的盒式贮存器附着至或连接至液体喷射装置以通过液体喷射系统喷射样品滴,包括 DNA 样品滴,所述喷射系统适合将样品滴喷射入或穿过空隙而被微流芯片的微流线内反应通道接收。

#### [0069] B. 液体喷射机械装置

[0070] 如所指出的,本发明的至少一个示例性实施方案的盒式贮存器包括或被提供以对液体喷射装置的连接以通过液体喷射系统喷射样品滴,包括 DNA 样品滴。液体喷射机械装置反过来可包括一个或多个液体喷射部分,即,喷射头(此处也称为打印头)。通常用待测试的样品或微流芯片内的微流线内反应通道的数目预先确定喷射头的数目。为各液体喷射(或液体发射)头提供盛装液体的贮液池部分以盛装制备的样品,喷射端口通过液体与液体贮液池部分连接(如果需要,与流体路径一起用于联系液体贮液池部分与相应的喷射端口),并在喷射端口附近提供能量发生装置。该排列使得可能通过喷射独立于保留在贮液池部分的制备的样品滴来进行制备的样品的大块分隔。

[0071] 本发明的至少一个示例性实施方案的喷射头适合通常利用热能发生器提供的热能喷射或发射样品滴。可使用常规的液体喷射系统,例如通过使用来自电热转化器例如加热器或激光加热以产生水泡(例如,液体泡)来喷射液体的发泡喷射系统(bubble jet system)。此外,在至少一个本发明的示例性实施方案中,喷射头是压电喷射系统。因此,可使用通过对压电元件施加电压来喷射液体的常规压电喷射系统。与压电喷射系统中的头相比,与热喷射系统一起使用的喷射头具相对简单的结构,因此,可以更容易地减小规模,从而提供多个喷嘴。此外,形成递送至微流线内反应通道(或端口)的样品所需的时间相对短,这样可避免通过加热产生 DNA 的二级结构,从而可提高随后对例如扩增引物的杂交功效。因此,热喷射系统有利地用作用于本发明的目的的液体喷射系统。

[0072] 通常,出于本发明的目的有利地使用流体喷射器领域的基本原理以将液体滴喷射(例如,如美国专利 4,723,129 和 4,740,796 中所公开的)入样品滴喷射物。此处可使用所谓的按需(on-demand)型和连续型过程的两个公开原理。然而,出于本发明的目的可以有利地使用按需型的过程使相应于液体路径排列的电热转化器中产生的热能减少至最小。从而,可以相对于驱动信号的 1 对 1 的对应在制备的样品中产生液泡。经制备的样品通过喷射端口作为液泡的生长和压缩的结果而喷射以产生至少一个样品滴。如果驱动信号是重

复的（例如，1kHz 至 100kHz’ 例如，50kHz），可在短时帧内分配多皮升的液滴以产生特定分析所需的任何实际大小和体积的液泡。因为可以控制液泡对包围介质的体积比，当分配样品滴（例如包含基因组材料和试剂的样品滴）时可获得已知的稀释浓度。脉冲形状的驱动信号，如美国专利 4, 463, 359 和 4, 345, 262 中所描述的，可适当地用于这些目的。在至少一个本发明的分子诊断装置的示例性实施方案中，可对盒式贮存器的喷射头重复脉冲，从而以重复的脉冲率顺次形成多个液滴以在微流芯片的微流线内反应通道（例如，微流线内反应通道的微流端口）中获得受控制的总液滴体积。在本发明的至少一个其他示例性实施方案中，重复脉冲率在大约 1kHz 至大约 100kHz 的范围内。在至少一个其他示例性实施方案中，重复脉冲率是至少大约 50kHz。当在熟知的条件例如美国专利 4, 313, 124 中描述的条件下进行时可进一步改进品滴的喷射。

[0073] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，喷射的样品滴具有范围在大约 1 皮升至大约 25 皮升的体积。在本发明的至少一个其他示例性实施方案中，喷射的样品滴的体积是 3 皮升。在本发明的至少一个其他示例性实施方案中，总样品滴体积（例如，一起接收到微流线内反应通道的微流端口中的喷射样品滴的总和）在大约 3 皮升至大约 100 纳升的范围内。在本发明的至少一个另外的示例性实施方案中，总样品滴体积在大约 20 皮升至大约 10 纳升的范围内。

[0074] 关于喷射头的构型，美国专利 4, 558, 333 和 4, 459, 600 教导的那些构型在本发明的范围之内。此外，可通过为多个电热转化器（如在日本专利申请公开 59-123670 中公开的）的喷射部分提供共同的狭长开口 (slit) 并且安排用于吸收压力波的开放的孔（如在日本专利申请公开 59-138461 中公开的）来更有效地获得本发明的有利方面。简而言之，无论液体喷射头的特定构型是什么，可按照本发明准确而有效地实现通过微流线内反应通道捕获样品滴。

[0075] 此外，可有利地使用刚性可靠地固定至仪器主体的串列型 (serial-type) 液体喷射头、通过电力连接至仪器主体的可替换尖头型液体喷射头或提供以整体溶液贮液池的盒式液体喷射头。

[0076] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，使用包含提供了发射复原 (ejection-restoring) 装置和 / 或备用辅助装置 (spare auxiliary apparatus) 的液体喷射头的液体喷射装置。特定的实例包括用于液体喷射头的清洁器，压缩或抽吸装置，可以是不同类型的电热转化器或加热元件或其组合的备用加热器，和适合以除了点滴 (spotting) 外的形式喷射液体的备用喷射器。

[0077] 液体喷射系统通常产生比样品滴小的卫星滴形式的废液。在至少一个示例性实施方案中，这些卫星滴斜角偏转离开任何微流线内反应通道以防止污染。通过提供真空或另一种合适的装置将卫星小滴抽离微流线内反应通道并朝向例如任何熟知的和合适的废液捕获装置，可将任何喷射头与任何微流线内反应通道之间的空隙用于防止卫星小滴的污染。此外，废液捕获装置可用于从盒式贮存器捕获废液例如条件化缓冲液、来自清洗的废液等。

[0078] 在至少一个示例性实施方案中，液体喷射装置的设计允许喷射头和微流线内反应通道以有利于样品滴从液体喷射头穿过空隙进入微流线内反应通道的喷射的方式排列。例如，在至少一个其他示例性实施方案中，至少一个微流线内反应通道和至少一个喷射头相

互之间处于固定的位置。然而，喷射头还可以旋转指向不同的方向，例如指向废液捕获装置。此外，可设计微流线内反应通道用以接收来自不同角度的样品滴（例如，进入微流线内反应通道的入口可具有漏斗样开口），并且多个喷射头对准通道入口。在这样的示例性实施方案中，可在相对于液滴运动（来自各自附着的盒式贮存器的）的方向在不同的角度放置一个或多个样品滴喷射头（例如，各种不同的角度允许多个喷射头对单个微流线内反应通道提供样品滴）。在本发明的范围内，至少一个包含待检测的患者样品（制备的）的盒式贮存器包括或附属于其本身的喷射头，和喷射头能够对准至少一个微流线内反应通道。

[0079] 或者，在至少一个其中至少一个喷射头和至少一个微流线内反应通道相互之间相对处于固定的位置的其他示例性实施方案中，可以存在多个导向微流通道的端口。在该示例性实施方案中，希望每个多喷射头对准多个微流端口之一（例如，与存在的喷射头一样多）。各微流端口导向单个微流线内反应通道（参见，例如，图 2）。在至少一个其他示例性实施方案中，一个喷射头可在含有（制备的）待测样品的盒式存贮器（或为了清洗喷射头目的的空盒式存贮器）之间移动。在附着至盒式存贮器后，可将喷射口角度转向至少一个处于固定位置的微流线内反应通道（或当附着的盒式贮存器排出废液（例如，条件化缓冲液）时或当附着的盒式贮存器是清洗盒式贮存器时朝向废液捕获装置）。在另一个示例性实施方案中，一个或多个喷射头可保留在固定位置，而微流芯片可移动，这样至少一个微流线内反应通道与处于不同位置的不同喷射头排成直线。

[0080] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，盒式贮存器包括喷射头（例如，本发明的打印头）（参见，例如，图 1A）。在本发明的至少一个其他示例性实施方案中，包含喷射头的盒式贮存器经构造用于将包含基因组材料的样品递送至微流芯片，例如递送至微流芯片的微流线内反应通道的微流端口。在至少一个其他示例性实施方案中，包含基因组材料的样品，如在例如打印头室 E 中发现的样品和 / 或被排出的（或喷射出的）导向到例如微流端口上的样品（或样品滴）进一步包含试剂，例如通过试剂插入入口 I2 插入盒式贮存器的试剂。

## [0081] 2. 扩增基因组材料和检测扩增的产物

[0082] 如上所述，在制备样品和通过液体喷射装置重复喷射样品滴后，使用微流芯片分析可以为大约 1-25 pL（或一些其他合适的体积）的样品滴。特别地，微流线内反应通道接收连续的样品的样品滴（例如，通过漏斗和 / 或微流端口），并通过自动化方法分析样品滴。总样品滴体积（例如，一起接收到例如微流线内反应通道的微流端口中的喷射样品滴的总和）可具有大约 3 皮升至大约 100 纳升的体积。分析包括将扩增和 / 或检测试剂（在芯片的试剂装配区内）混合，扩增基因组材料（在芯片的扩增区）和检测扩增的产物（在芯片的检测区）和 / 或对基因组材料作图（在芯片的矩阵分析区）。

### [0083] A. 微流端口

[0084] 可将样品滴直接喷射入微流线内反应通道。此外，在本发明的范围内，将样品滴喷射入至少一个微流端口，该端口包括入口和通道，并且其导向微流线内反应通道（参见，例如，图 2）。在本发明的该示例性实施方案中，可将样品滴喷向微流端口的入口（所述入口经制造大小适合接收喷射的样品滴（例如，比喷射样品滴略大）、微流端口通道和 / 或微流反应通道等，所述结构中各结构可方便地具有漏斗形状。在至少一个本发明的示例性实施方案中，样品滴接收系统例如微流线内反应通道和 / 或导向微流线内反应通道的微流端口经

构造用以接收至少部分样品滴，所述样品滴是由喷射头，例如包含在盒式贮存器内的喷射头喷射的包含基因组材料的样品滴。在本发明的至少一个其他示例性实施方案中，端口的入口是微流端口通道的大小的 10 倍。在至少一个本发明的其他示例性实施方案中，微流端口的入口的最宽直径是例如 1mm，端口通道的直径是例如 100  $\mu\text{m}$ 。

[0085] 可基于基因组材料的负电荷，即通过电动力和 / 或压力驱动的流动将样品滴运输通过端口通道。在至少一个本发明的示例性实施方案中，端口通道内的样品滴的运动完全或大部分受电动力的控制（例如，通过正极和负极对）。例如，可将正极方便地置于各微流端口的入口，阴极置于各端口通道的另一端（例如，端口通道导向的微流线内反应通道内（参见，例如，图 2））。为控制各端口中的液体的流动（如果存在多个微流端口，从而存在多对负极和正极），只有在特定的微流端口已接收到一个或多个样品的样品滴后，才可激活控制特定的微流端口内的液体流动的各配对。也在本示例性实施方案的范围内的是，通过压力驱动的流动将样品滴运输入或通过微流线内反应通道。此外，可通过使用熟知的流动缩窄器 (flow constrictor) 控制样品滴通过端口通道进入微流线内反应通道的运输。

[0086] 其他熟知的力，例如表面张力可用于驱动样品滴通过微流端口、通道和 / 或线内反应通道。例如，在至少一个本发明的示例性实施方案中，可用例如与包含基因组材料洗脱液相同的缓冲液的缓冲液充注微流端口入口、通道和 / 或线内反应通道，所述缓冲液通过例如表面张力促进样品滴在微流端口入处的收集。在该示例性实施例中，可观察到样品滴变成缓冲液的部分，并且不保持为离散的液滴。然而，电动力的电渗透组分 (electro-osmotic component) 产生沿通道向下的液体的均一塞样流动，从而减少或防止基因组材料的扩散。因此，如此处所用的，样品滴和样品塞（包括 DNA 样品滴和 DNA 样品塞）是指当横截段前行通过微流端口通道进入微流线内反应通道时，液体的连续流动的塞样横截段，所述液体包含作为样品滴从喷射头喷射的样品。类似地，如此处所描述的，“引物塞”是指在包含特定的扩增和 / 或检测试剂的“塞”的液体连续流动的任何时间上的横截段。

#### [0087] B. 微流线内反应通道

[0088] 通常，如上所述，微流线内反应通道可包含例如为样品液体提供基础的基于水的液体。或者，微流线内反应通道可以是基于有机物的液体，例如大约为 60 泊的硅油。在至少一个本发明的示例性实施方案中，将重复的样品滴喷射入微流线内反应通道，并且间隔物分隔样品滴。在至少一个其他示例性实施方案中，空气间隔样品滴。在至少一个其他示例性实施方案中，疏水物质例如矿物油或一些其他的基于有机物的液体或溶剂等用作各样品滴之间的缓冲间隔物以在微流线内反应通道中围绕各样品滴和将其与之前或之后的样品滴分隔开。此外，本发明的至少一个示例性实施方案的分子诊断装置的微流通道的内壁可提供以疏水涂层以减少或防止样品滴之间的交叉污染。在至少一个其他示例性实施方案中，如上所述，产生例如样品塞（例如，DNA 样品塞）的运动的电动力的电渗透元件防止或减少了基因组材料在塞中的扩散。换句话说，尽管微流中存在固有的运动，但微流线内反应通道液体和缓冲间隔物（例如，油或空气）之间的疏水性 / 亲水性差异使单个的 DNA 分子能够在塞子（例如，DNA 样品塞）沿着微流线内反应通道移动的过程中保持在其中而不与缓冲间隔物或与相邻的液滴或塞子混合。

[0089] 通常，微流芯片的微流线内反应通道直径可以为 50  $\mu\text{m}$  至 300  $\mu\text{m}$ ，通常直径为 100  $\mu\text{m}$ 。至于微流端口通道，微流线内反应通道可以是为球形、半球形、正方型等和玻璃、石

英、塑料等形成的管，并且其依赖于芯片区域可用不同材料形成，例如当其在分子诊断装置的检测区内时用透明材料形成。形成微流芯片中的微流线内反应通道的方法在本领域内是熟知的。微流线内反应通道可具有任何想要的构型，例如，其可是直的，可与另一个微流线内反应通道在汇合接合处形成接头或联合，可在分开的连接处分离成两个或更多个微流线内反应通道，可允许液体在其内汇合和 / 或混合等。如上所述，微流线内反应通道内的流动也可受例如电动力、流体动力（即，压力）或两者结合的控制。

[0090] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，“母”微流线内反应通道也可用于大块样品的分隔。例如，微流线内反应通道可导入多个“子通道”，其各自可具有例如母微流线内反应通道的十分之一的流量（参见，例如，图 3）。该结构有利于各样品滴分隔成“子滴（subdroplet）”，例如，如果母微流线内反应通道导向 10 个子通道，各子通道具有母微流线内反应通道的十分之一流量，那么各滴将分成 10 个子滴，各子滴存在于其自己的子通道内。该分隔，特别是当重复时，此处是指大块样品分隔的实施方案。为此目的，微流线内反应通道包括所述子通道，样品滴包括所述子滴。此外，母微流线内反应通道可逐渐变细以实现希望的分离。此外，该大块样品的分隔方法可在 1) 芯片的试剂装配区之前和 / 或之后，2) 芯片的扩增区之前和 / 或之后，3) 芯片的检测区之前和 / 或之后，和 / 或 4) 芯片的矩阵分析区之前和 / 或之内发生。微流线内反应通道（或子通道）可与其他微流线内反应通道汇合，例如用于加入扩增和 / 或检测试剂，例如引物塞。

[0091] C. 试剂装配 / 扩增区

[0092] 图 4 提供了包含一个微流线内反应通道的微流芯片的试剂装配区和扩增区的非限性实例。当然，相互之间平行进行的多个微流线内反应通道和 / 或子通道在本发明的范围之内。在微流芯片中在例如接头 (10) 例如 T 型接头处通过与包含扩增试剂（例如，引物、核苷酸、聚合酶等）和任选地检测试剂（例如，可检测试剂，例如标记，荧光探针、插入剂等）的引物塞混合来进一步制备存在于微流线内反应通道 (5) 中的各样品滴 (8)。本领域技术人员知道何种扩增试剂应当与各样品滴混合和所述试剂应当使用何种浓度。例如，扩增试剂一般包含聚合酶、dNTP、镁、缓冲剂和引物或引物对。本领域技术人员也能够确定使用的引物或引物对；例如，如果进行 PCR，引物对是恰当的。相反地，如果进行波形表征分析，则波形引物将是恰当的。这些引物的设计和选择在本领域内是熟知的。此外，检测试剂和使用这些试剂直接或间接地标记扩增的 DNA 产物的方法是熟知的。

[0093] 在样品滴已被喷射入微流端口（或微流线内反应通道）并将其与扩增试剂混合以形成样品塞后，将其沿着微流线内反应通道运输入本发明的至少一个示例性实施例的装置的扩增区，即第一温度控制区。当在此处使用该技术时，与样品滴相似，样品塞可包含或可不包含基因组材料，如果其包含基因组材料，也可被当作 DNA 样品塞。

[0094] 当沿着线内微流反应通道 (5) 连续地抽吸样品塞（其包含与引物，如引物塞混合的样品滴）时，其被导入扩增区，即第一温度控制区，例如热控制板 (11)。微流线内反应通道的路径 (12) 可以是使其有助于各样品塞在热控制板 (11) 的低温区 (13) 与高温区 (14) 之间以蜿蜒的且交替的方式流动。

[0095] 本领域技术人员将认识到，可根据选择的扩增方法适当地调节 (A) 低温区 (13)、高温区 (14) 以及低温和高温区之间的区域的温度，(B) 微流线内反应通道的路径 (12)，和 (C) 样品塞流过微流线内反应通道的速度。例如，可将低温区 (13) 设置至适合进行退火的

温度,可将高温区(14)设置为进行变性的温度。此外,在至少一个本发明的示例性实施方案中,可设计微流线内反应通道的路径(12)以促进样品塞以交替的方式在低温区和高温区之间流动,例如大约20至40个变性、退火和延伸循环。最后,可将样品塞(或DNA样品塞)流过微流线内反应通道的速度设置为允许样品塞(或DNA样品塞)保持在变性、退火或延伸温度下合适的时间长度。

[0096] 如前面所描述的,也可以局部和/或重复的方式快速加热和冷却各微流线内反应通道或其部分,以使当样品塞沿微流线内反应通道流动和通过本发明的至少一个示例性实施方案的装置的第一温度控制区时进行扩增方法(例如,PCR、波形表征)的变性、退火和延伸步骤。例如,可使用焦耳加热法沿着本发明的至少一个示例性实施方案的装置的各微流线内反应通道、在其内侧和/或在与各反应通道的交叉方向上对金属丝使用电压。加热微流线内反应通道的可选择的方法包括例如热水、热空气等。此外,微流线内反应通道或其部分的冷却可通过使用流过螺管的冷却液体带走热能,或通过促进快速热扩散来实现。加热和冷却微流线内反应通道等各种方法是熟知的。

[0097] 理想地改变DNA样品塞接受的温度、在该温度下的时间长度和循环的次数以进行DNA的扩增以进行筛选、鉴定、定量等。例如,在至少一个示例性实施方案中,变性温度是90°C至95°C,退火温度是55°C至65°C,延伸温度依赖于选择的聚合酶(例如,对于Taq聚合酶最佳延伸温度是大约72°C)。同样,扩增方法可包括“热起动”和/或任意地在75°C下进行的DNA样品的最后温育。

[0098] 样品塞可以约50μm/秒至约5000μm/秒的不同速度例如约500μm/秒流过微流线内反应通道。依赖于反应的体积,基因组DNA的浓度等,改变样品塞流过微流线内反应通道的速度可实现样品塞保持在某个温度(例如,变性、退火、延伸等所需的温度等)下的持续时间。例如,尽管一般的循环是大约94°C进行1分钟,60°C进行1分钟,72°C进行1分钟(72°C延伸的一般规律是1分钟扩增各1000碱基对)。此外,所需的扩增循环次数能够确定微流线内反应通道所需的合适路径。

[0099] 在样品滴被制备,被微流线内反应通道接收,与扩增试剂混合从而形成样品塞,并扩增DNA样品塞内的DNA后,驱动各样品塞沿着微流线内反应通道进入装置的检测区,所述区域也可以是第二温度控制区。如上所述,样品滴可在被微流线内反应通道接收后和在被吸入微流芯片检测区前的任何时间在微流线内反应通道中进行大块样品的分隔(即,除了通过液体喷射装置进行的大块样品分隔外的分隔)。本领域技术人员将认识到只有DNA样品塞将包含可检测的扩增的DNA产物。

#### [0100] D. 检测区

[0101] 设计本发明的至少一个示例性实施方案的分子诊断装置使之:(A)使DNA能够作为样品滴被微流线内反应通道接收,(B)在试剂装配区通过将样品滴与包含扩增反应组分和/或检测组分的引物塞混合形成样品塞,(C)当DNA样品塞沿着微流线内反应通道流过扩增区即第一温度控制区时进行DNA的扩增,和(D)当DNA样品塞通过检测区时便利于检测扩增的DNA产品。

[0102] 使微流线内反应通道通过第二温度控制区内的检测区在本发明的范围之内。将微流线内反应通道置于通过第二温度控制区内的检测区将使样品塞能够在检测期间沿微流线内反应通道流过时受到温度或温度梯度(或扫描(sweep)),即一或多个温度。本领域技

术人员认识到当样品接受温度扫描时,检测样品塞例如检测 DNA 样品塞在不同温度下的荧光有助于进行例如扩增的 DNA 产物的解链温度分析。

[0103] 图 5 提供了本发明的至少一个示例性实施方案的微流芯片的检测区的实例。当沿着微流线内反应通道(5,如图 4 中所示)抽吸样品塞或样品塞存在于第一温度控制区(例如,11,如图 3 中所示)时,其向下游前进至与鉴定和 / 或分析相关的区域,例如,其被导入检测区,即第二温度控制区,所述区域可以是例如第二热控制板(16)。微流线内反应通道可具有检测路径(17),当样品塞流至低温区(18) 和高温区(19) 之间时,该路径有利于在样品塞中检测扩增 DNA 的不存在或存在。当样品塞通过光学扫描区(20) 时,任何可检测试剂(例如,荧光探针、插入剂等)可用例如三色激光束进行光学激发,且可测量任何所得的发射。

[0104] 通常,可将检测区的低温区(18) 设置在大约 25°C 至大约 65°C 的温度范围内。可将检测区的高温区(19) 设置在大约 55°C 至大约 95°C 的温度范围之内。在检测 PCR 扩增的 DNA 的情况下,可将检测区(16) 的低温区(18) 和高温区(19) 设置在例如大约 25°C 至大约 55°C 之间的一个温度下。

[0105] 可用于调节检测区内的温度、激发 DNA 样品塞中的可检测试剂和检测发射光或发射光的变化的各种仪器可商购获得。例如,可用例如覆盖光学扫描区(20) 或更大或更小的扫描区的红外电荷耦合器件(CCD)(未显示)测量温度。在至少一个示例性实施方案中,推荐将精确温度传感器置于第二热控制板上以校准红外 CCD 来增加温度测量的精确性。

[0106] 将 DNA 样品塞在检测区接受温度梯度或扫描将使得能够检测由波形表征法产生的波形表征。当样品塞通过温度之间时,所得的发射与样品塞的温度相关。此外,可将 PCR 扩增的 DNA 经历温度梯度,尽管只需要在一个温度下检测发射。可选择地,可将低温区和高温区设置为一个以检测 PCR 扩增的 DNA 的温度。

[0107] 当将扩增的 DNA 接受温度扫描时,通过测量、检测和确定分离的 DNA 的波形表征,可将检测台光学系统(未显示)用于检测来自扩增的 DNA(例如高级结构)的发射的改变。某些波形表征的检测可表示被筛选的样品被污染(例如,被细胞污染),然后将所得的波形表征与用已知的引物和从已知的生物分离的 DNA 产生的波形表征的数据库进行比较可鉴定所述污染性生物。此外,如果分离的基因组材料浓缩在样品溶液中,且已知样品浓度,则可基于波形表征的检测定量污染水平。

[0108] 当对于样品是否被污染和 / 或哪种生物污染样品知之甚少时,可有效地使用本发明的至少一个示例性实施方案的装置。当然,使用本发明提供用于分析的 PCR 产物可进一步确证从波形表征获得的生物的鉴定。在至少一个本发明的示例性实施方案中,通过形成几个来自相同的生物的 DNA 样品滴,将各 DNA 样品塞与专门选择用于确认生物的鉴定的不同引物混合,使用不同的引物(或引物组)通过 PCR 或与波形表征相关的方法扩增各 DNA 样品滴,然后检测扩增的样品的不存在或存在来进一步缩小所述生物的鉴定范围。将扩增产物的存在与使用的特定引物发生关联可鉴定生物。

[0109] 如上所述,使用本发明的至少一个示例性实施方案中的分子诊断装置通过波形表征和 / 或 PCR 可在样品中筛查生物的存在、鉴定所述生物和 / 或定量生物的浓度,所述分子诊断装置包含 1) 至少一个用于提取基因组材料等的盒式贮存器,2) 至少一个样品滴喷射头,其中至少一个盒式贮存器包含或可附着于至少一个用于喷射基因组材料的样品滴喷射

头；和 3) 至少一个用于分析基因组材料的微流芯片，其中微流芯片包括至少一个用于接收从样品滴喷射头喷射的基因组材料的微流线内反应通道和至少一个用于加热微流线内反应加通道和 / 或用于其内液体流动的金属丝或其他元件，其中至少一个微流线内反应通道通过试剂装配区、第一温度控制区内的用于扩增 DNA 产物的扩增区和检测区。当需要对分离的基因组材料进行更细致的检查时，本发明的至少一个示例性实施方案的分子诊断装置可用于从目标样品中选择一个或多个 DNA 样品滴或 DNA 样品塞（其可以被扩增或可以不被扩增）以在至少一个本发明的示例性实施方案的微流芯片的矩阵分析区内进行作图；在至少一个示例性实施方案中，样品滴或样品塞内的 DNA 未被扩增。如上所述，样品滴可在被微流线内反应通道接收后，包括在被抽吸入芯片的矩阵分析区之前或之后的任何时间，在微流线内反应通道中进行大块样品的分隔（例如，除了通过液体喷射装置进行的大块样品分隔外的分隔）。

[0110] 3. 基因组材料的作图

[0111] 本发明可对存在于 DNA 样品中的基因组信息作图。进行这样的作图是要预期 (1) 作为通过使用上述检测步骤需要或想要响应污染性生物的部分特征（例如属、种）的更多信息的结果，或 (2) 作为不依赖于上述检测步骤表征污染性生物的方法。进一步预期在本发明装置的至少一个示例性实施方案的芯片的矩阵分析区内进行所述作图。作图策略基于最近报导的称为直接线性分析 (direct linear analysis) 的技术 (“DLA”; 参见 Chan 等人 (2004) “DNA mapping using microfluidic stretching and single-molecule detection offluorescent site-specific tags” Genome Res. 14 (6) :1137-46, 其在此以其全文引用作为参考) 而得到改进。

[0112] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，为响应细菌 DNA（或在芯片的检测区内被监测到的一些其他形式的基因组 DNA）的检测，如上所述，通过液体喷射头产生一连串样品滴例如连串的新样品滴，然后将其导向通过至少一个导向芯片的矩阵分析区的微流线内反应通道。在到达矩阵分析区之前或其内向样品滴中加入染料（嵌入染料和 / 或其他染料），从而形成样品塞。

[0113] 矩阵是芯片的矩阵分析区的整体部分。在包含几个用于微流样品滴运动通过矩阵分析区的单元的微流线内反应通道的玻璃基质上形成矩阵或所述矩阵包含在玻璃基质内。矩阵分析区的各单元（或“像素”）反过来包含至少三个此处描述的元件。矩阵分析区的各单位能够 (1) 通过微流 DNA 伸展微芯片的微通道 (DNA-stretching microchip) 分离和“伸展”DNA 分子；(2) 产生多个波长的可见光光子束以激发多种结合至 DNA 分子的染料；和 (3) 检测光子束与染料的相互作用的结果。

[0114] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，各样品滴与包含进行分析所必需的试剂的液滴（或塞）混合。为了该目的，可将微流线内反应通道与其他微流线内反应通道汇合，例如为了加入矩阵分析区内分析所必需的染料和 / 或其他试剂。在本发明的至少一个其他示例性实施方案中，所述试剂包括至少两种可结合存在于液滴中的 DNA 的染料。一种染料是非特异性的从而以非特异性的方式（即，用插入剂均匀地对 DNA 染色）与 DNA 结合（或插入）（参见，例如，Chan 等人 (2004) GenomeRes. 14 (6) :1137-46）；另一种染料是位点专一性的；例如，荧光肽核酸 (PNA) 靶向，例如特定的 7-8bp 的位点（参见，例如，Chan 等人 (2004)）。

[0115] 如上所述（关于芯片的检测区），可通过大块样品的分隔实现液滴对矩阵分析区的几个单位的分配。母微流线内反应通道可逐渐变细从而产生想要的分隔。为了快速和均匀地将样品滴（和子滴）分配至矩阵分析区内的恰当的位置，(1) 从母通道分支的子通道的数目可以是本发明的至少一个示例性实施方案的装置内可容纳的任何数目（即，10、100、250、500、1000 或更多），和 (2) 子通道可从其他子通道分支。在至少一个示例性实施方案中，子通道只是来自其他更大的子通道。在至少一个其他示例性实施方案中，512 个子通道直接或间接从依次从母通道分支的 512 个更大的子通道的各子通道分支而来。此外，可在芯片的矩阵检测区之前或其内进行该大块样品的分隔。微流线内反应通道或子通道可与其他微流线内反应通道或子通道汇合，例如为了加入通过 DLA 技术进行的矩阵分析区的分析步骤所必需的染料和 / 或其他试剂。

[0116] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，通过一连串微流线内反应通道（母通道，和从其分支的子通道，和（任意地）依次从其分支的更小的子通道），矩阵分析区内的矩阵包含  $512 \times 512$  个矩阵，从而包含大约 260,000（例如，262,144）个用于通过 DLA 技术分析 DNA 分子的单元（或像素）。在本发明的至少一个其他示例性实施方案中，矩阵可以是  $2 \times 2$ 、 $3 \times 3$ 、 $9 \times 10$ 、 $10 \times 10$ 、 $100 \times 100$ 、 $256 \times 256$ 、 $1024 \times 1024$ ，或任何合适的正方形或非正方形维度。

[0117] 可通过许多方法使样品滴或子滴移动通过本发明的至少一个示例性实施方案的装置的通道和子通道，可通过所述方法控制预先确定的液滴运动速率。例如，可使用对通道或子通道的开始部分施加正压力和 / 或对通道或子通道的尾部或对废液孔等施加负压（即，真空）来移动液滴或子滴。此外，可使用电动力以及本领域技术人员已知的任何其他方法移动液滴和子滴。

[0118] 在至少一个示例性实施方案中，已与包含试剂的液滴混合的样品塞向前通过一连串微流线内反应通道或从母微流线内反应通道分流的子通道。分流装置（“分流器（splitter）”）控制液滴沿着串联的不同微流线内反应通道或子通道流动。例如，在  $3 \times 3$  矩阵的非限制性实例中，三个通道能够接收来自分流器的样品滴。

[0119] 在该示例性实施方案中，连串的液滴或塞沿着母微流线内反应通道朝向分流器移动。分流器的末梢是三通道（此处编号为 1、2 和 3），各自附着至真空装置以沿着微流线内反应通道拉动液滴。以下列方式处理第一批 9 个液滴（编号 1 至 9）。分流器使得液滴进入（通过施加至通道 1 的真空）通道 1，而液滴 1、2 和 3 沿着该通道移动直至其各自位于预先确定的位置。然后释放或移去通道 1 的真空，然后开始对通道 2 施加真空（即，将真空用于通道 2，从而使液滴 4、5 和 6 沿着通道 2 移动至预先确定的位置）。然后针对通道 3 重复该方法。

[0120] 可将该方法扩展至任何数目的通道。在至少一个本发明的示例性实施方案中，使用 512 个通道，从而 512 个液滴沿着各个通道移动直至各液滴位于预先确定的位置。因此在通道 512 的真空循环结束时， $512 \times 512$  个液滴的矩阵排列存在于装置中。

[0121] 在上述  $3 \times 3$  矩阵的示例性实施方案中，在通道 3 的真空循环结束时，9 个液滴位于矩阵上预先确定的位置中。在这些预先确定的位置的各位置上的是进入本发明的至少一个示例性实施方案的“单元”（或“像素”）的进入端口。因此，在  $3 \times 3$  矩阵中，在本发明的至少一个示例性实施方案中有九（9）个单元。本发明的至少一个示例性实施方案的单元，无

论单元的数目是多少,包含三个主要元件。一个元件包括光源(例如,光子发生器)。第二元件包括微流DNA伸展微芯片(参见Chan等人(2004))或使用直接线性分析(DLA)技术的相似结构。第三元件包括光检测器(例如,光子检测器)。

[0122]通常,存在几种可获得的光源和检测器形式(即,有源光器件)。此外,存在几种可获得的可与有源光器件一起使用的无源光器件形式,例如平面光波导、显微镜头(microlens)和滤波体。关于有关各种形式的光源器件在微流装置中的使用的综述,参见,例如,Mogensen等人(2004)Electrophoresis 25:3498-512;Sia和Whitesides(2003)Electrophoresis 24:3563-76。

[0123]在已知用于微流装置的光源和检测器中的是发光二极管(LED),包括有机发光二极管(OLED)(例如,LED与单模平面波导的组合、Si光敏检测器(photodetector)和聚(二甲基硅氧烷)(PDMS)中的微流通道管型(cast)在本领域内是已知的,对于通过常规互补式金属氧化物半导体(complementary metal oxide silicon)(CMOS)加工和人工底蚀(underetching)产生的LED、Si光敏探测器和微流通道的整体也是这样)。在至少一个本发明的示例性实施方案中,光源(例如,光子发生器)也称为发射器层。

[0124]激光也可用于微流装置。垂直腔面发射激光器(VCSEL)已应用于旋涂在聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)基质上的荧光基团的近红外荧光检测,其中基质的装配还包括用于检测的高通滤波体和光电二极管。在至少一个本发明的示例性实施方案中,滤波体也称为滤波体层(filterlayer),光检测器(例如,光子检测器例如光电二极管)也称为检测器层(detector layer)。

[0125]另一个有用的光源是微放电光源(microdischarge lightsource),例如,由金属阳极和用BaCl<sub>2</sub>的水溶液充注的微流阴极组成的微放电光源(其用于用SYBR荧光基团标记的DNA分子的激发)。

[0126]用于微流系统的光检测器(例如,半导体光检测器)包括其中将光电二极管等作为微流通道的部分装配在相同基质中的系统(例如,在用于DNA分析的装置中,可整合干涉滤波体以抑制激发光)。在另一个光检测器系统中,将商购可获得的CMOS图像仪芯片与PDMS中的微流通道网络管型结合(溴酚蓝和橙黄G的测量是可能的,对于荧光的测量也如此,因为CMOS图像仪整合了干涉滤波体)。另一个已知的技术包括使用低温薄膜沉积技术(low-temperature thinfilm depositiontechnique)用以在玻璃基质的上面产生具有滤波体的无定型硅光电二极管(与二极管在半导体晶片内的整合正好相反)。

[0127]显微镜头和平面波导在微流装置中的整合通常通过将光聚焦在通道中以增加用于荧光测量的激发能或通过使用平面波导增加吸收检测的光程长度来提高检测。平面波导的其他有利方面是可对多点检测进行光束分裂;从而当与适当的光源和光检测器整合时可获得紧凑的装置。可将显微镜头装配在基质的顶上(以构造光线进入与晶片垂直的路径中)或装配在装置的平面中。2D平面显微镜头可用于装配微流装置。平面波导(例如,聚合物波导、玻璃波导、光电子带隙传感器(photonics bandgap sensor)等)也可用于设计微流装置。特别有兴趣的是光子晶体结构:光子晶体可视为半导体晶体的光学等同物,其特征在于其中不允许某些波长范围内的光通过的带隙。可在文献(例如,Mogensen等人,同上)中获得关于用于微流装置的光学系统的其他信息。

[0128]在下面更详细地公开本发明的至少一个示例性实施方案中的光源(例如,光子发

生器)和DNA伸展微芯片。

[0129] A. 光子发生器

[0130] 光子发生器元件(“PGC”)(例如发射器层中的)产生至少两种不同波长(例如,WV.I和WV.II)的光子,并且至少一种波长(例如,WV.II)分裂成两个不同的光束(例如,WV.IIa和WV.IIb)(通常参见Chan等人(2004));产生该不同波长的该光子和光束的几种方法和装置在本领域内是已知的。将PGC包埋在玻璃基质中,所述基质包含本发明的至少一个示例性实施方案的矩阵芯片,且可提供“光导”将光子束导向微流DNA伸展微芯片的微通道(“线性DNA微通道”)中的至少两个准确的位置。

[0131] B. DNA伸展微芯片

[0132] 在微流DNA伸展微芯片(“DNA伸展芯片”)中,与序列特异性染料(或荧光标签)和非特异性染料(成荧光标签)结合的各DNA分子(例如,双链的)流经“后场(post field)”和“漏斗”,并且在该过程中变成线性的或伸展的,从而使每次只有一个DNA分子通过微通道(线性DNA微通道),在所述微通道中不同光束和波长的光聚焦在DNA分子上。在至少一个本发明的示例性实施方案中,线性DNA微通道的宽度为5μm。在本发明的至少一个其他示例性实施方案中,可见光是光的形式。

[0133] DNA伸展芯片包括通过例如照相平板印刷术蚀刻入基质中和夹入两块基质之间(例如,如下面详细描述的)的一连串通道(例如,包含后场和漏斗的微流线内反应通道和/或子通道,和线性DNA微通道)。

[0134] 随着各个DNA分子通过线性DNA微通道,伸展的分子遇到光子束在其上聚焦的至少两个位置。在至少一个本发明的示例性实施方案中,存在两个光速聚焦至其上的位置:一个位置(第一位置,如以流过线性DNA微通道的方向运动的DNA分子遇到的位置)包含两个光子束,一束检测位点专一性染料(例如,WV.I),一束检测非特异性染料(例如,WV.IIa)。在第二位置,在进一步沿着流入线性DNA微通道的方向上的某一存在的距离上,检测非特异性染料(例如,WV.IIb)的另外的光子束发生聚焦。在存在的距离上被分开的检测非特异性染料的两束光(例如,WV.IIa和WV.IIb)用于在各DNA分子通过线性DNA微通道时确定其的长度。检测非特异性染料的光束用于鉴定和分析各DNA分子。在DNA分子上结合相对少量的几个碱基对(bp)位置的位点专一性染料可用于对从其提取所述基因组DNA的生物作图(例如,鉴定和/或表征)。作为非限定性实例,位点专一性染料可靶向例如7-8bp的位置。

[0135] 在一些情况下,沿着基因组DNA的双链分子的长度结合的位点专一性染料的位置分析称作“条码制作(barcoding)”。当不同的DNA分子通过线性DNA微通道时它们的该条码制作,可鉴定特定类型的基因组DNA(当与数据库的条形码比较时,例如分类学类型,例如DNA分子的条形码可鉴定特定的家族、属、种、株系等)。

[0136] C. 光子检测器

[0137] 在至少一个示例性实施方案中,本发明的光子检测器(例如,光检测器、光探测器、光子计数器)元件(“PDC”)包含至少一个三维(3D)光子晶体(所述晶体在相对低的温度下进行操作并在玻璃基质上形成或生长)和至少一个也在玻璃基质上形成的场发射晶体管(FET),例如,薄膜晶体管(TFT)(例如,TFT可具有硅的薄膜,使用该薄层制作晶体管)。在至少一个其他示例性实施方案中,可使用除了FET外的合适类型的晶体管。在至少

一个示例性实施方案中，PDC 也称作检测层。在至少一个示例性实施方案中，光子检测器是数字光子检测器。在至少一个本发明的其他示例性实施方案中，玻璃是基质，尽管也可考虑提供本发明所需的光学特性的任何其他相容性基质（例如，透明塑料）。例如，几篇综述论文涉及用于至少一个本发明的示例性实施方案的芯片中的多个类型的基质（参见，例如，Mogensen 等人，同上；Sia 和 Whitesides，同上）。

[0138] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，用不同的染料（如上面所解释的）激发光子，所述光子来自几束对通过线性 DNA 微通道的 DNA 分子聚焦的光束（例如，WV. I、WV. IIa、WV. IIb），激发的荧光反射至朝向至少一个光子检测器的“光导”。可用光子晶体（例如，针对三原色的）实现该光导线内检测器。在至少一个本发明的其他示例性实施方案中，3D 光子晶体能够进行滤波，从而使多种（例如，2、3 种）波长的光可到达光子检测器，在另一个示例性实施方案中，使用 2、3 或更多种不同的 3D 光子晶体（各自进行滤波以允许不同的波长通过）。将本发明的至少一个示例性实施方案的光子晶体整合入矩阵芯片的各个单元；芯片中的光子晶体使用波导将光子导入芯片内的新检测器（芯片内检测器）。芯片内检测器由 TFT 光检测器组成。在一些本发明的示例性实施方案中，将多种 TFT（例如，2、3 或更多种 TFT）整合入矩阵芯片的各单元（以监测光的多个波长）。在一些其他示例性实施方案中，将光扩增 TFT 整合入矩阵芯片的各个单元以进行有效的光子发射检测。

[0139] 然而，至少一些以标准形式存在的 TFT 不太适用于光的光子的直接检测。因此，在至少一个本发明的示例性实施方案中，构建（pre-TFT）“门电路（gate）”，从而使光子的光能转换成以电子的形式存在的能量，所述能量可被至少一个本发明的示例性实施方案的 TFT 直接检测。门电路包括门控材料（“卟啉栅材料”），其主要组分是包含卟啉的三维（3D）单晶聚合物。该卟啉栅材料可由例如可见光谱中的光子激发，且可用作半导体材料。关于涉及该聚合物和其作为栅材料的用途的公开内容，参见 H. Segawa “Nanostructured molecular systems that freely manipulate photons and electrons,” 可在 [jstore.jst.go.jp/image/research/pdf/R99/R993100836.pdf](http://jstore.jst.go.jp/image/research/pdf/R99/R993100836.pdf) 获得；也参见 Segawa 等人（1994）J. Am. Chem. Soc. 116 :11193-94；Susumu 等人（1995）Chem. Lett. (No. 10) :929-30；Segawa 等人（1995）Synthetic Metals 71 :2151-54；Susumu 等人（1995）J. Phys. Chem. 99 :29-34；Susumu 等人（1995）J. Photochem. Photobiol. A :Chem. 92 :39-46；Shimidzu 等人（1995）J. Photochem. Photobiol. A :Chem. 92 :121-27；Susumu 等人（1996）Tetrahedron Lett. 37(46) :8399-402；Shimidzu 和 Segawa（1996）Thin Solid Films 273 :14-19。简而言之，以建立进行光诱导的电子传递的分子系统的方式连接（作为卟啉阵列）多个卟啉；将这些卟啉阵列直接连接在正中间位置。以一、二和三维分子结构构建卟啉阵列（参见 Segawa，同上）。

[0140] 矩阵分析区还可包括 CMOS 型门控机制和传输来自几个矩阵单元的数据的 CCD 型方法。用于执行所述技术以完成与至少一个本发明的示例性实施方案的矩阵装置相关的电数据收集的方法在本领域内是已知的。

[0141] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，本发明的光子检测器（如上所述的）减少或消除了对 AC 供电（对于 Chan 等人（2004）中描述的光检测器，所述电源和放大器一起都是需要供电的）的需要。至少一个本发明的示例性实施方案的该改进的光子检测器有助于相当大地减少对电的需要（例如，通过使用 TFT）和大大减小仪器的大小。根据事实这是特别有利的考虑因素，所述事实是：至少一个本发明的示例性实施方案的矩阵的各个单

元（或像素）包括与其结合的光子检测器，在至少一个本发明的其他示例性实施方案（即 $512 \times 512$  矩阵）中，262,144 个单元被整合入矩阵芯片。此外，至少一个本发明的示例性实施方案的单元消除了对 Chan 等人（2004）中公开的外部激发激光和相关外部光学系统的需要。

[0142] 通过检测矩阵分析区的 PDC 中的光子产生的数据（即，在至少一个示例性实施方案中，在通过介于线性 DNA 微通道与 TFT 之间的基于卟啉（例如卟啉栅材料）的晶体转导光子信号后检测电子）被传输至预先确定的目的地，例如记录设备或其他贮存设备例如计算机芯片或高速缓冲存储器等，或显示设备或其他类型的用户可视输出界面。通过在预先确定的时限读出数据（代表检测的光）来协调来自矩阵分析区的数据至预先确定的目的地的传输。

[0143] 至少一个本发明的示例性实施方案涉及用于读出代表检测的光（即，在一些示例性实施方案中，由卟啉栅材料转导的光）的数据的矩阵结构，如图 6A 中描述的。在至少一个本发明的示例性实施方案中，矩阵是 $512 \times 512$  的单位（像素）矩阵，尽管为了方便只在图中显示了 2 乘 2 ( $2 \times 2$ ) 的单位的矩阵。

[0144] 矩阵包括以图 6 中显示的方式相互连接的多个行接线 (RW)、多个柱接线 (CW)、电容器、光敏晶体管 (phototransistor)（例如，上述的卟啉栅材料 /TFT）、栅晶体管 (gating transistor) 和二进制移位寄存器 (BSR1 和 BSR2)。在至少一个本发明的示例性实施方案中，晶体管是 FET（例如，TFT），尽管在其他示例性实施方案中，也可使用其他适合类型的晶体管。

[0145] 以上述方式获得的代表光（例如，通过卟啉栅材料转导产生的光）的电信号用于相应的光敏晶体管，如果电信号具有预先确定的阈电压水平，将其以电荷的形式贮存在相应的电容器中。

[0146] 用以从矩阵读出信号的方式可从图 6A–6C 中显示的时序图的角度得到理解。例如，对连接至相应的行接线的晶体管的门电路使用计时脉冲 (OUT1 或 OUT2；图 6A) 导致从电容器读出电荷 (charge)。将计时脉冲 (OUT1、OUT2) 用于根据时序图 2 (图 6A) 的门电路以响应由用于二进制移位寄存器 (BSR1) 的整个系统的控制器（例如，CPU）(未显示) 产生的计时脉冲。然后将读出电荷作为相应的信号向前传输通过相应的晶体管至与该晶体管连接的相应的柱接线。然后通过柱接线将信号向前传输至相关的二进制移位寄存器 (BSR2) 的相应的输入端 (IN1 或 IN2)。

[0147] 时序图 1 (图 6B) 是表示测量周期（即，其间检测光子的周期）是如何与其间从电容器读出信号的周期相关并且在各读出周期内读出信号被读至相应于脉冲 OUT1 和 OUT2 的行接线的计时的实例。如时序图 4 中所示 (图 6B)，从偶联至行接线 (相应于读出期的前半期内的计时脉冲 OUT1) 的电容器输出信号，然后从偶联至行接线 (相应于读出期的后半期内的计时脉冲 OUT2) 的电容器输出信号。

[0148] 在时序图 3 (图 6C) 中显示了相应于用于 BSR2 的终端 IN1 和 IN2 (参见图 6A) 的信号的可能的状态的实例。按照从柱接线接收到其的顺序，依次从 BSR2 输出代表所述状态的数据。

[0149] 与矩阵分析区相关的上述时序图包括可与本发明一起使用的至少一个示例性实施方案。在其他示例性实施方案中，可使用其他合适的时序，只要信号可在不同的时间读

出,以进行随后的显示、贮存和 / 或处理。

[0150] 时序图还可用于控制样品滴和子滴通过矩阵分析区的运动,用于协调 (1) 子滴通过线性 DNA 微通道的运动和 (2) 矩阵分析区的单元 (或像素) 的相关 PGC 和 PDC 的激活。

[0151] 如通常由 Chan 等人 (2004) 所教导的,样品滴或子滴以预先确定的速度通过 DNA 伸展芯片。基本上,将速率设置在对于结合染料的 DNA 分子的分析仍然准确的近最大速率。一个考虑是流动不应当以这样的快速率进行,使得多个 DNA 分子同时存在于不同光束在其中聚焦的线性 DNA 微通道的部分中。另一个考虑是控制速率以避免 DNA 伸展芯片的后场和漏斗元件的堵塞。在至少一个示例性实施方案中,1 飞升液滴 (即,子滴、塞等。) 在大约 0.12 毫秒内穿过至少一个本发明的示例性实施方案的 DNA 伸展芯片;在这样的示例性实施方案中,矩阵的大小可以是大约  $512 \times 512$  个单位 (或像素)。该示例性实施方案经计算 (1) 用于针对从例如  $2.5 \mu l$  包含基因组材料的洗脱液产生的 (依次地,在至少一个本发明的示例性实施方案的盒式贮存器中从例如  $100 \mu l$  血液产生的) 液滴 (即,子滴、塞等) 的数目,考虑分辨率、动态范围、信噪比等的合适的水平以及 (2) 进行大约 1 小时的分析时间。

[0152] 在至少一个本发明的示例性实施方案中,分子诊断装置 (包括至少一个本发明的示例性实施方案的盒式贮存器、液体喷射装置、扩增区和检测区以及矩阵分析区) 是便携式的 (例如,容易移动的、方便携带的)。在至少一个其他的示例性实施方案中,分子诊断装置是手持式的。在一些示例性实施方案中,装置用于在病人身边 (即,现场;远离医院或医生办公室) 帮助检测和分析来自例如细菌的基因组 DNA。在一些其他示例性实施方案中,装置使用 AC 电源和 / 或 DC 电源 (参见,例如,图 6A 中的电源电压 (V))。在至少一个本发明的示例性实施方案中,装置在无需 AC 电源的情况下工作;例如,装置仅只使用来自附带 (或包含的)、便携式 (例如,手持) 来源的 DC 电源工作。

[0153] 在至少一个本发明的示例性实施方案中,预期装置主要产生“0 检测”,即,大部由例如装置的检测区产生的数据将显示例如细菌基因组 DNA 的 0 检测。在该情况下,例如细菌基因组 DNA 的检测 (即,“非 0 检测”) 将导致装置的矩阵分析区的激活和导致液滴 (例如,子滴、塞等) 朝向矩阵芯片运动和流入其中。在至少一个本发明的其他示例性实施方案中,响应非 0 检测的该激活和运动是自动的 (即,由例如 CPU 控制的)。

[0154] 如上所述,特定的基因组 DNA 分子的条形码可用于鉴定 DNA 的分类范畴 (例如,家族、属、种、株系等)。条形码用作 DNA 的核酸序列的部分代表,其可与代表已知分类学实体的条形码 (例如,已知条形码的数据库中的) 进行比较。可将条形码数据的解释自动化,并且在至少一个示例性实施方案中,条形码数据的解释包括在本发明的分子诊断装置内。在一些示例性实施方案中,解释功能直接连接至装置的矩阵分析区。

[0155] 在至少一个本发明的示例性实施方案中,装置的解释功能设计用以解释在给定的分类学鉴定水平内 (例如,在物种水平上) 天然发生的预期的序列变化。在至少一个示例性实施方案中,该预期的变化在序列同一性上可以是高达 75% 的变化。在至少一个其他的本发明的示例性实施方案中,将概率解释特征整合入本发明的解释功能以辅助通过装置的矩阵芯片最合适地鉴定被分析的基因组 DNA 的来源。

[0156] 在至少一个本发明的示例性实施方案中,将数据库 (例如,包含已知的或预期的病原体的条形码信息) 作为装置的部分包含在其中。因此可将装置的矩阵分析区中分析的基因组 DNA 的未知分子的条形码与数据库中的进行比较和对比 (例如,匹配) 来潜在地确

定未知 DNA 分子（即，被分析的 DAN 分子）的同一性。于是至少一个本发明的示例性实施方案的包括这样的数据库的分子诊断装置，可鉴定相应于给定的被分析的 DNA 分子的来源生物，并通过包括概率解释特征的解释功能，可提供对不同的分类学鉴定水平的相似性的计算（例如，借助于概率准确度估计）。例如，在达到本发明的特定示例性实施方案的位点专一性染色和条形码制作能够准确地鉴定未知的基因组 DNA 分子的序列的特定部分的程度时，成套的该 DNA 分子的条码数据可显示与数据库中成套的条码数据 100% 的相似性或同一性。在该情况下，装置可鉴定例如来源的属和种。在另一种情况下，例如，当显示 83% 的同一性时，装置可鉴定相同的属和种，但带有显示检测变化的精确度评价。在另一种情况下，例如，显示 50% 的同一性，装置只可鉴定属（带有对该鉴定水平的准确性评价），但关于种未给出指示。

[0157] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，数据库不作为装置的部分包括在其中；相反分子诊断装置与中心数据库进行无线电通讯。

[0158] 本申请中引述的所有科学论文综述、专利和专利申请在此以其全文引用作为参考。

[0159] 实施例

[0160] 列出下列实施例以帮助理解本发明但不希望，和不应当解释为以任何方式限定其范围。实施例不包括对于本领域技术人员来说是熟知的常规方法的详细描述。

[0161] 实施例 1

[0162] 分子诊断装置的矩阵分析区

[0163] 在至少一个示例性实施方案中，单元的（分子诊断装置的矩阵分析区的）光子发生器元件 (PGC) 和光子检测器元件 (PDC) 被描述为具有整合的光滤波体的微毛细管波导，并且描述于图 7-11 中。在生产过程中将单波长光滤波体整合入微毛细管夹层的一半中。这导致了将光检测器置于非常靠近微毛细管检测管从而增加接收荧光发射光谱的光效率的能力。关于有关涉及至少一个本发明的示例性实施方案的装置的成本的有利方面，由于微毛细管生产材料与光滤波材料共享相同的材料（例如，它们是相同的）的事实，因此制造成本可以低得多。

[0164] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，矩阵分析区包括发射器层、滤波体层和检测器层。

[0165] 图 7 显示矩阵分析区的一个单元（或“像素”）的部分。如上面所指出的，各单位具有至少三个元件。在该图中，PGC 是“光子激光”，PDC 是“光检测器”。“毛细管通道”（例如，半圆形毛细管通道）用作 DNA 伸展芯片的部分。微毛细管装置的两块板显示于图 7 中。微毛细管装置的一块板（下方），“染色的滤波体材料和波导”，由想要的滤色片材料制造，从而控制从毛细管通道至光检测器的荧光发射的光谱性质和波长，在至少一个本发明的示例性实施方案中，滤波体层包括通过荧光波长和阻止发射波长的涂有滤波体的玻璃。在至少一个示例性实施方案中，下方的板的维度 d1 (dimension d1) 在大约 10 微米至大约 150 微米的范围内。在至少一个其他的示例性实施方案中，d1 是大约 60 微米。其他板，“激发波导玻璃射流晶片 (excitationwaveguide glass fluidic wafer)”（图 7 中上方的板）是光学透明的，从而允许激发光（例如，发射波长）从激光到达反应区域。DNA 伸展芯片内的微流通道或子通道（此处也称为毛细管通道），在至少一个非限定性示例性实施方案中，包括

直径或宽度大约 50 微米的区域（包含后场）和直径或宽度大约 5 微米的线性 DNA 微通道，并且流体和 DNA 通过漏斗样端口（例如，在大约  $20 \mu m$  的长度上将通道的宽度从大约  $50 \mu m$  减少至大约  $5 \mu m$ ）（参见，例如，Chan 等人（2004））从约 50 微米的区域流至约 5 微米的 DNA 伸展芯片微通道。

[0166] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，如图 8 所示的用于矩阵分析区的单元中的和参与光（“激光激发”、荧光）的透射和“荧光发射”的光滤波体和波导可包含一种或多种光学材料，包括但不限于光子晶体、具有有机涂层的塑料树脂、Schott 光学玻璃、有色石英、有色玻璃、涂有光滤波体的玻璃等。在至少一个示例性实施方案中，图 8 中的维度  $d_2$  在大约 20 微米至大约 300 微米之间。至少一个其他示例性实施方案中， $d_2$  是大约 120 微米。如上面所提及的，在至少一个示例性实施方案中，滤波体层包括通过荧光波长和阻止发射波长的涂有光滤波体的玻璃。在至少一个其他示例性实施方案中，单元包括 3D 光子晶体。

[0167] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，使用照相平板印刷术制造矩阵分析区的单元和特别地其中含有的微流通道。照相平板印刷术可用于在玻璃或石英基质的一侧产生微流通道、子通道和 / 或微通道（照相平板印刷术方法可置于基质的任一侧上进行）。然后将蚀刻的基质与另一个（例如，扁平的）基质结合，从而形成微流通道阵列。本领域技术人员将认识到通过将蚀刻的基质结合到扁平的基质上产生例如截面为半圆形的通道，以及在结合之前匹配两块基质上的蚀刻可用于在横截面上产生具有对称形状（例如，圆形）的通道。

[0168] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，将多个单元（各单元包含 3 个主要的单元元件（即，PGC、DNA 伸展芯片和 PDC）一起进行矩阵排列。如图 9 中所示（也参见图 10 中的顶视图），可使用共同的整合的滤波体制作许多 PDC。该示例性实施方案的有利方面是一个制造部分可为许多检测通道（即，线性 DNA 微通道）形成光学荧光滤波体。事实上，当使用该方案时，必须要考虑到光“串扰”的可能性并使用方法避免该问题。

[0169] 本领域技术人员将认识到用于芯片的矩阵分析区的玻璃滤波体的波长特征和厚度的重要性。玻璃滤波体的波长特征例如显示于图 11。通过使用微光刻制作 (microlithography fabrication) 领域内已知的方法，可使光学玻璃滤波体材料在 0.1mm 至 480mm 的厚度范围内。在至少一个矩阵分析区的示例性实施方案中，材料的厚度可在 0.5mm 至 5mm，或 1mm 至 3mm 的范围内。通过使用本领域内熟知的方法和计算，选择滤波体材料（例如，滤波体层中的）的波长和厚度以将激发光谱以足够的光学 SNR（信噪比）与荧光发射光谱分开；因此，滤波体层可包括滤波体，例如，涂有光滤波体的玻璃，该滤波体允许荧光波长通过但阻止来自发射器层的光的波长。

[0170] 在至少一个本发明的示例性实施方案中，用矩阵芯片的各单元（或像素）监测多个波长的光（例如，2、3 或更多波长）。在至少一个本发明的其他示例性实施方案中，将多个 TFT（例如，2、3 或更多个 TFT）整合入矩阵芯片的各个单元（以监测多个波长的光）。

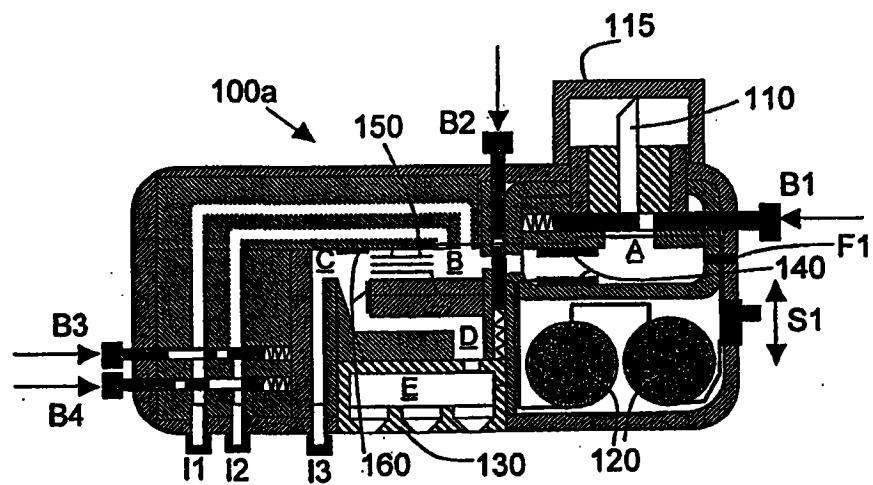


图 1A

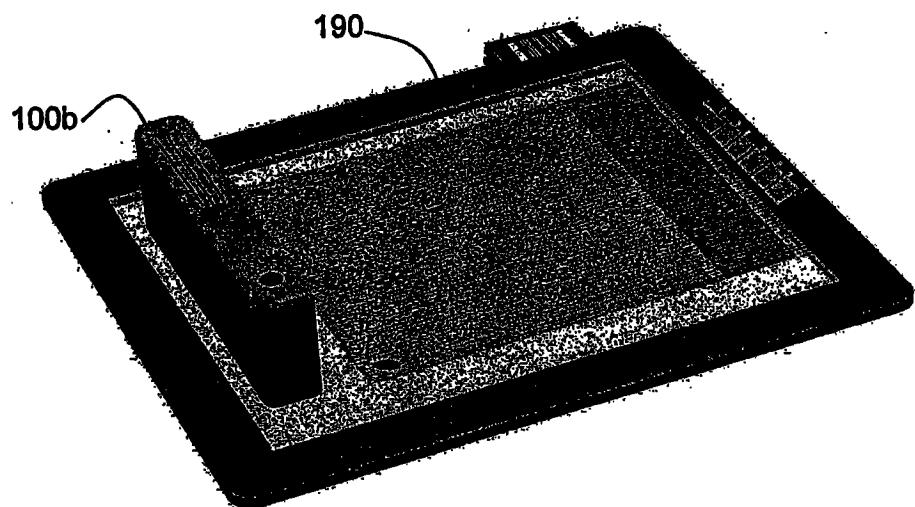


图 1B

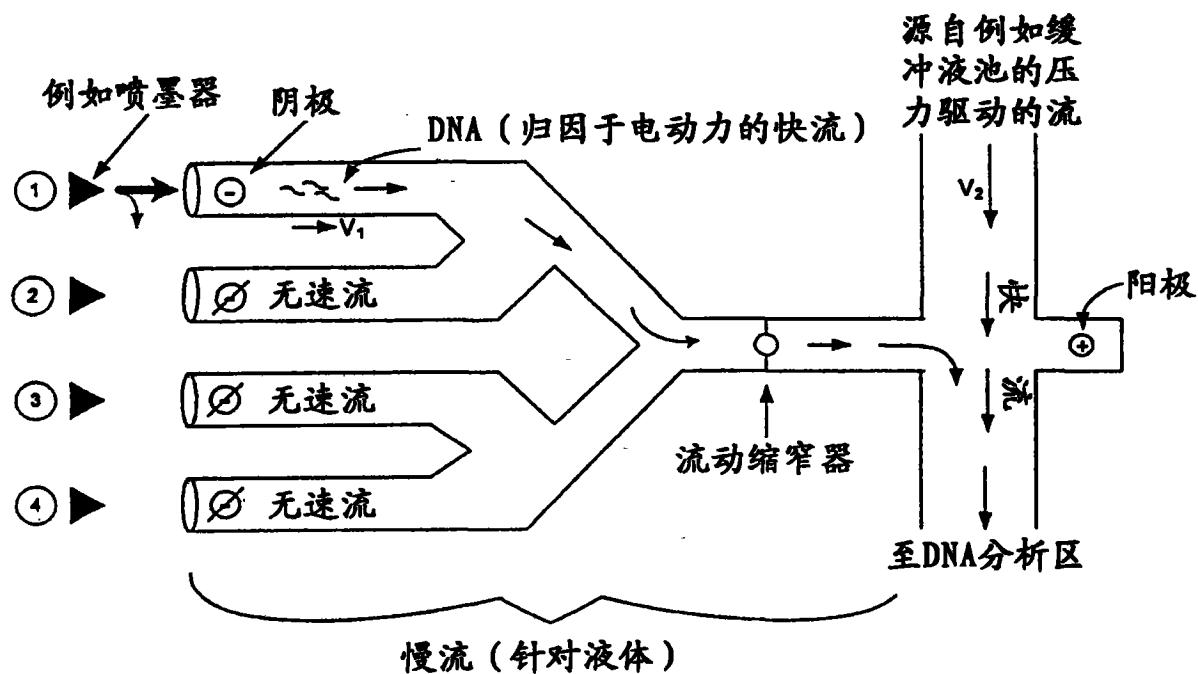


图 2

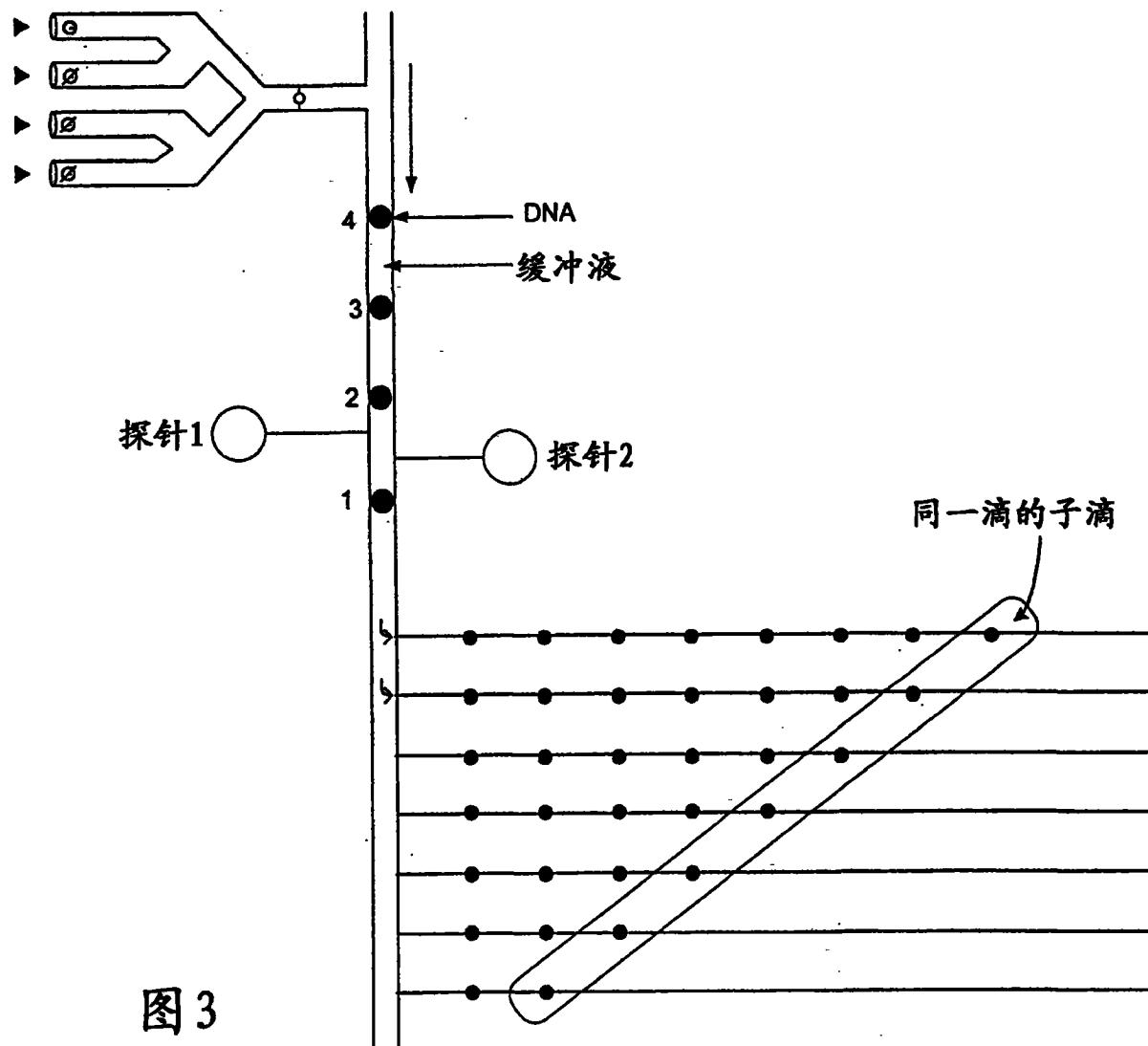


图 3

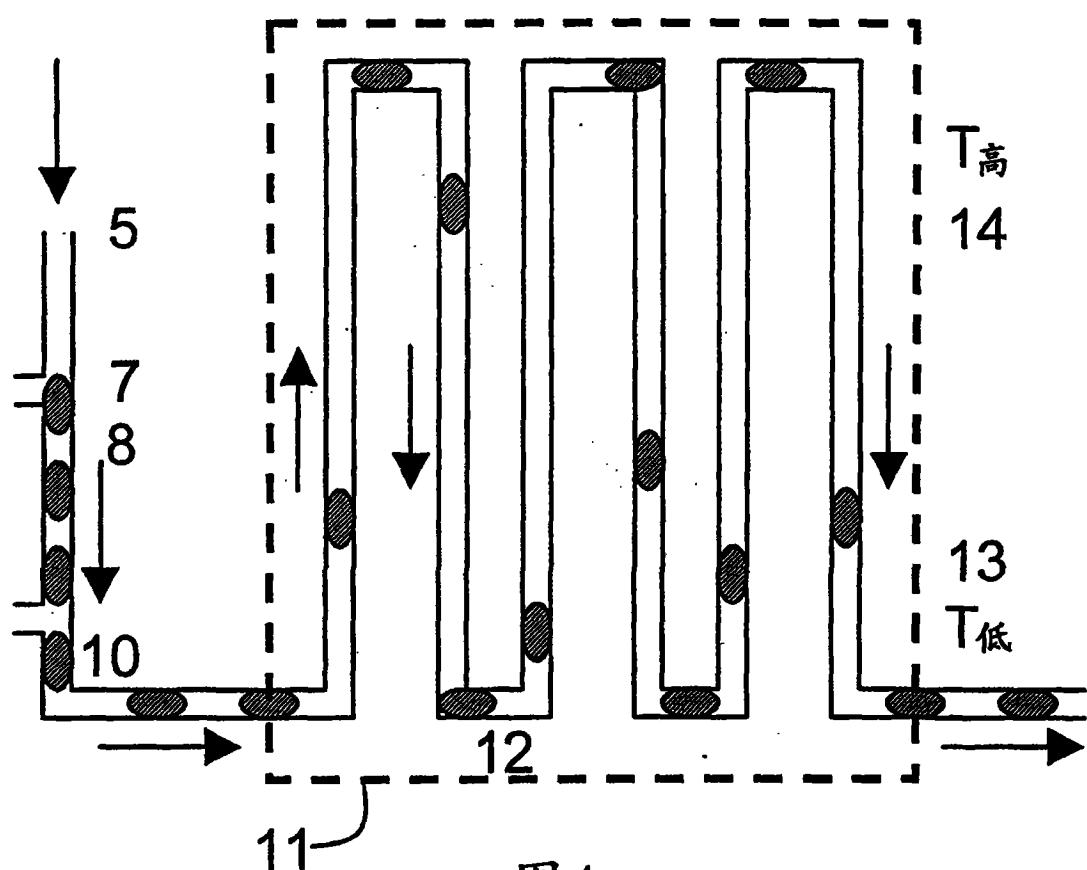


图 4

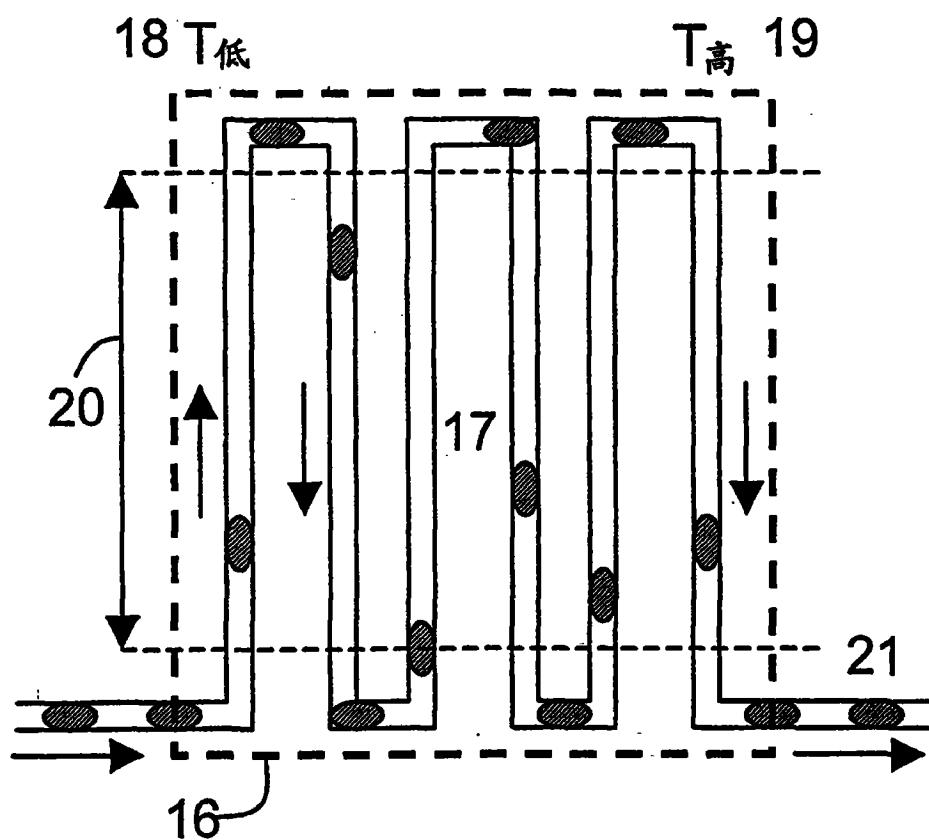


图 5

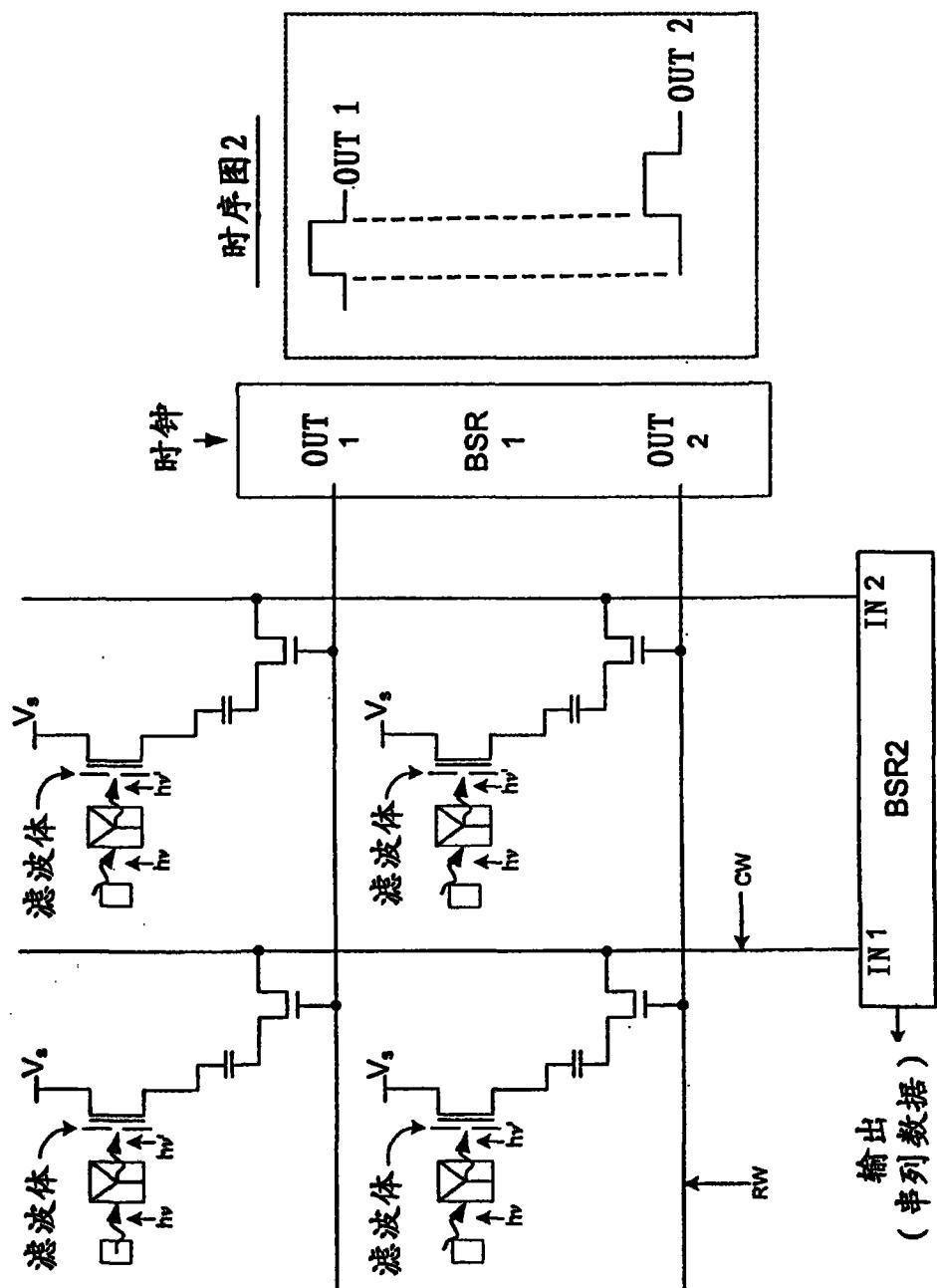


图 6A

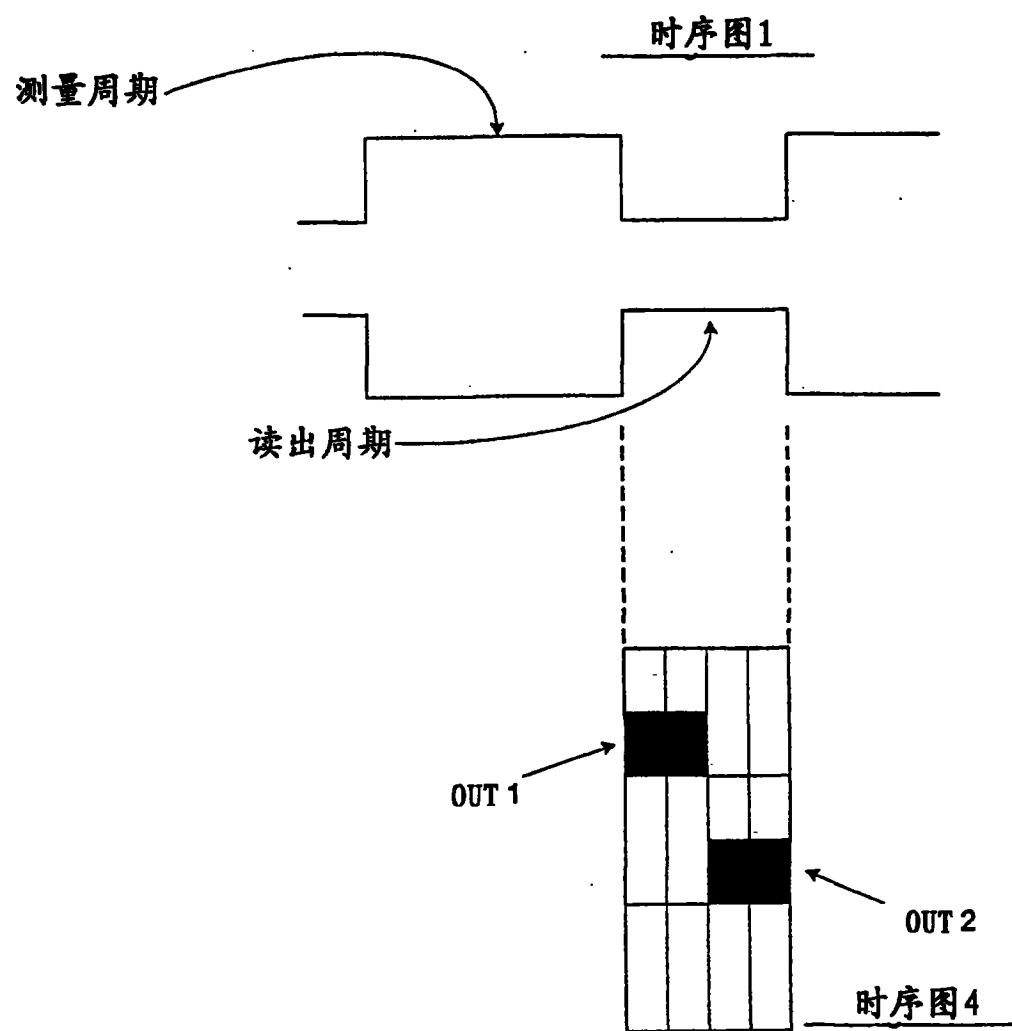
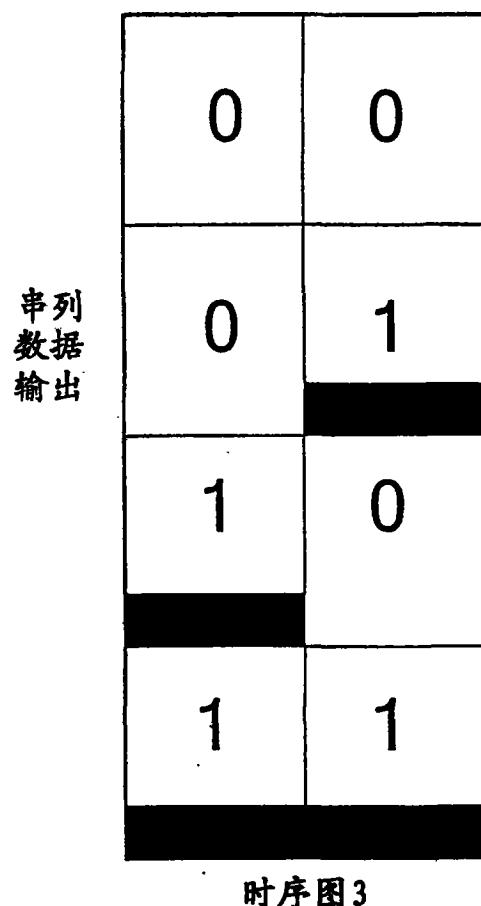


图 6B



时序图3

图6C

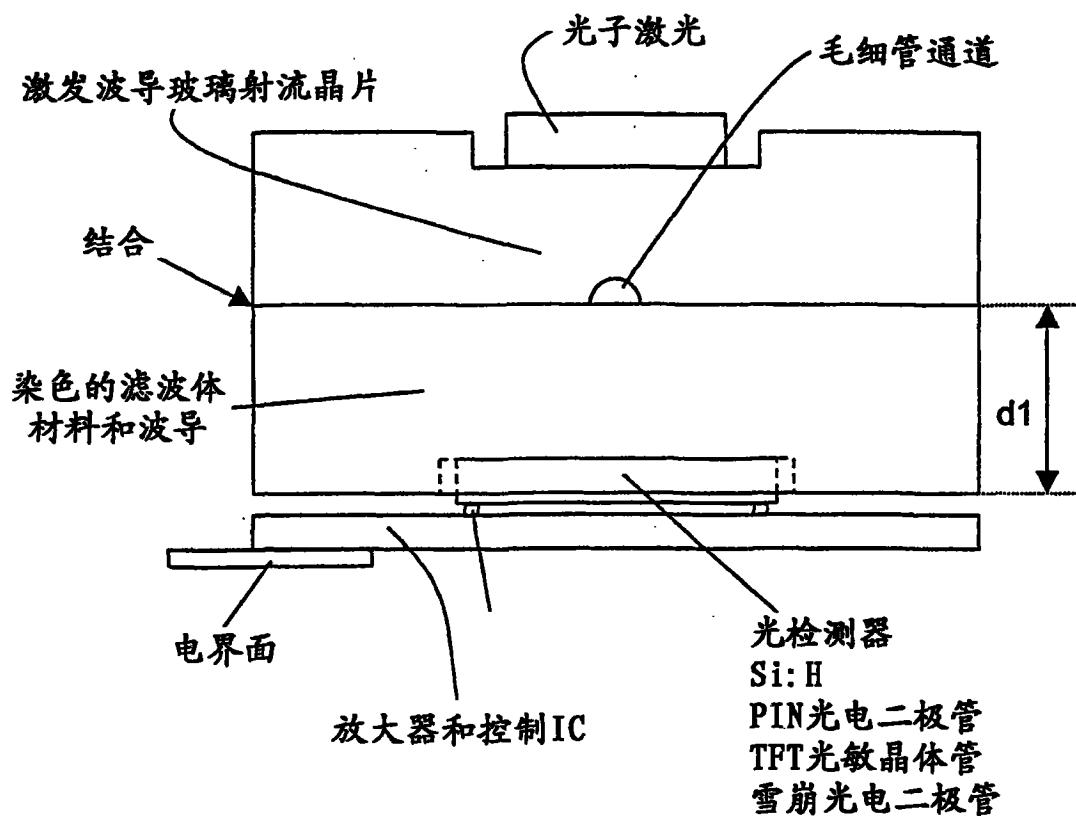


图 7

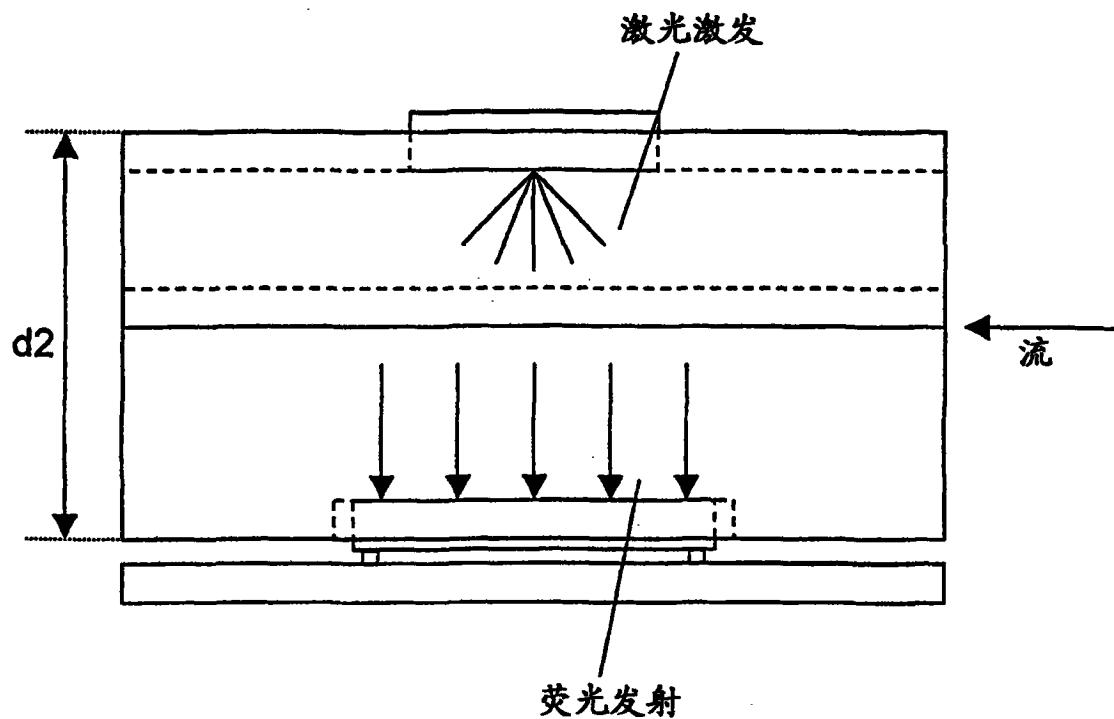


图 8

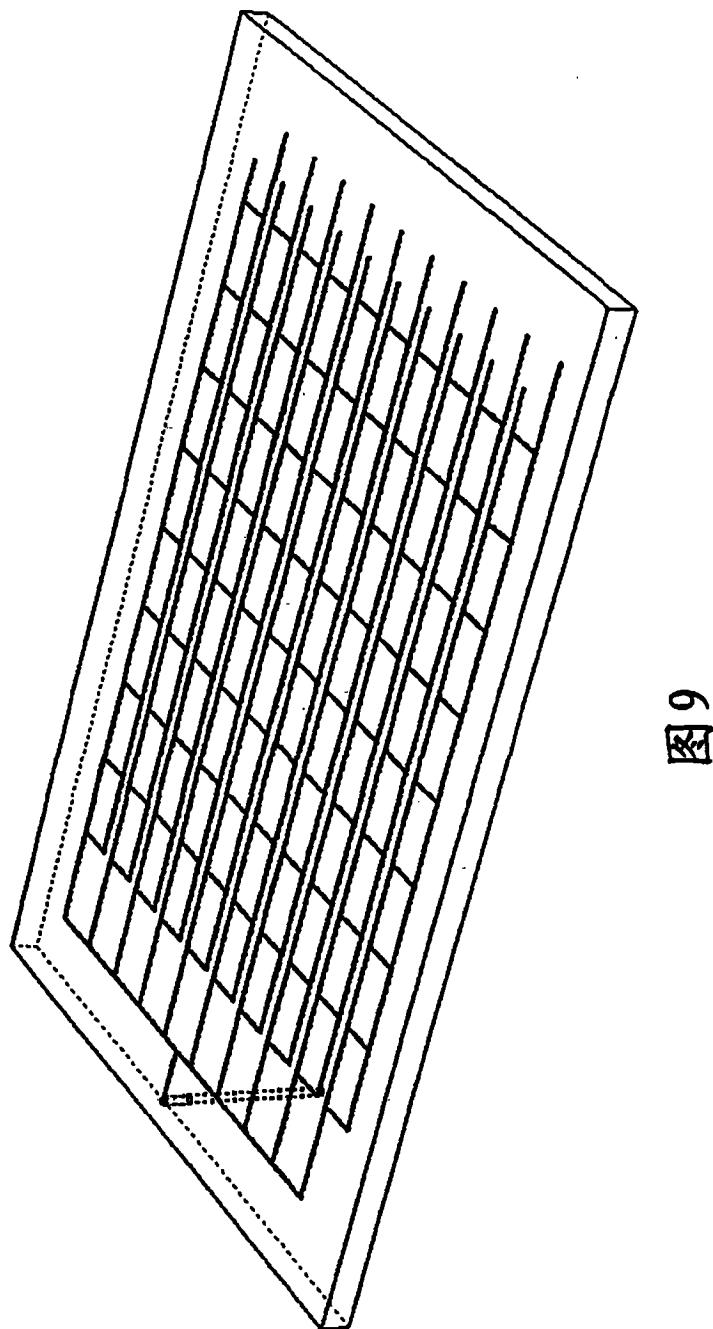


图9

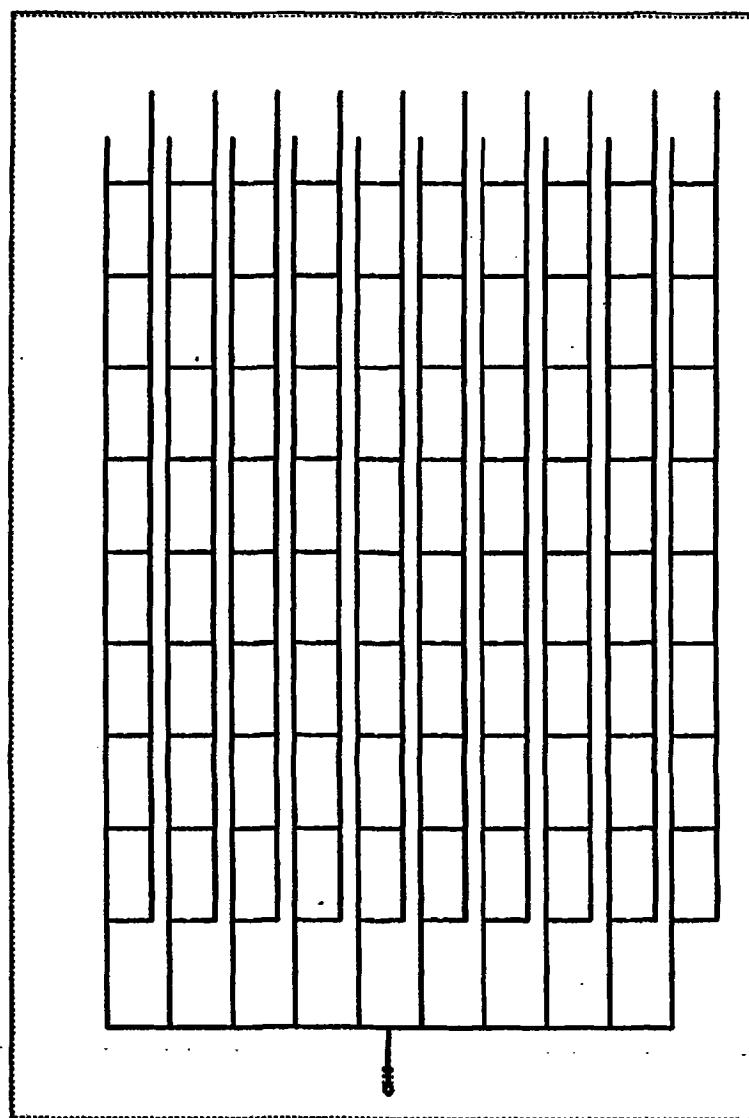


图 10

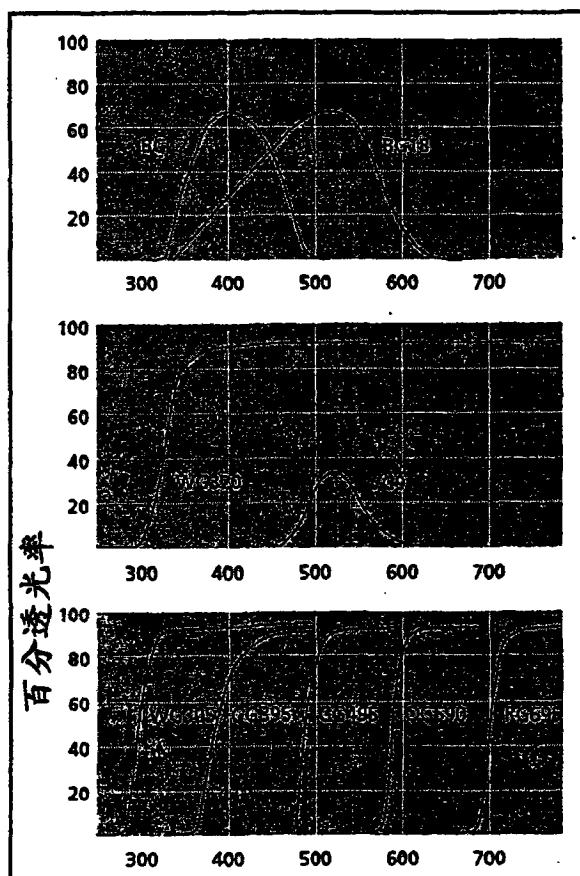


图 11