

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-254452

(P2012-254452A)

(43) 公開日 平成24年12月27日(2012.12.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
B01J 19/00 (2006.01)	B01J 19/00 321	4G035
B01F 5/00 (2006.01)	B01F 5/00 ZCCD	4G075
B01F 3/08 (2006.01)	B01F 3/08 Z	
G01N 37/00 (2006.01)	G01N 37/00 101	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 86 頁)

(21) 出願番号	特願2012-151353 (P2012-151353)	(71) 出願人	399019892
(22) 出願日	平成24年7月5日(2012.7.5)		ザ・ユニバーシティ・オブ・シカゴ
(62) 分割の表示	特願2011-151228 (P2011-151228) の分割		THE UNIVERSITY OF C H I C A G O
原出願日	平成15年5月9日(2003.5.9)		アメリカ合衆国60637イリノイ州シカ ゴ、サウス・エリス・アベニュー5801 番
(31) 優先権主張番号	60/379, 927	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成14年5月9日(2002.5.9)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/394, 544		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成14年7月8日(2002.7.8)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 圧力駆動プラグによる輸送と反応のための装置および方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】基板内部の少なくとも1つのプラグの内部における反応を誘導する好適な方法を提供すること。

【解決手段】基板の第1流路400へ搬送流体を導入する手段と、搬送流体に対して非混和性を持つ少なくとも2つの異なるプラグ流体を1つ以上のプラグ形成領域の第1流路へ導入する手段と、プラグ流体混合物を含む少なくとも1つのプラグを形成するために基板で流体の流れを誘発することを目的として第1流路に圧力を適用(加圧)する手段を備え、プラグ断面積がプラグ形成領域の第1流路断面積と本質的に同一であることを特徴とする、基板内部の少なくとも1つのプラグの内部における反応を誘導する方法。

【選択図】 図4

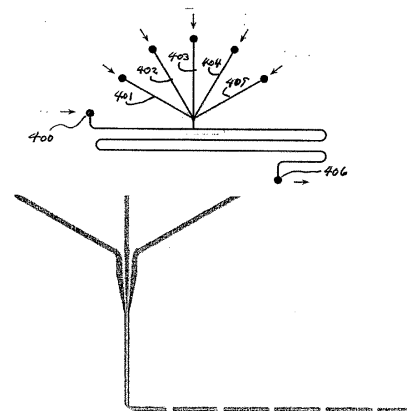


FIG. 4

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本明細書に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の背景)

非線形力学は、マイクロフルイディック（微細流体）とともに、本発明による装置の設計および方法において中心的な役割を果たす。マイクロフルイディックは、通常、ミクロレベルの寸法である流路網（チャンネル・ネットワーク）を通り流体の輸送処理を行う。（「チップ上の実験室（LOC）」とも称される）マイクロフルイディック・システムは、マイクロスケール化学または生物学的分析（マイクロ総合分析システム）の手段となりうる。マイクロフルイディック・システムの主な利点は、その高速試剤と低消費量にある。したがって、医療診断および高度な処理能力を伴うスクリーニングの分野において非常に有望である。マイクロフルイディック・システムの高度な平行構造は、巨視的な量におよぶ化学的および生物学的な化合物合成（例：化学兵器破壊・調合薬合成）の手段となりうる。その利点はより高度に物質および熱輸送を制御しうることである。

10

【0002】

一般的にマイクロフルイディック・システムは、流体を流路経由でポンプによりくみ出す手段を必要とする。最も一般的な方法として、圧力駆動によるものと、電気浸透流（EOF）駆動によるものとの2種類が挙げられる。EOF駆動による流れの魅力は、複雑なネットワーク（網状組織）においてでさえも容易に制御できるということにある。EOF駆動による流れは平坦なプラグ状の速度プロファイルを持つ。すなわち、流体速度は壁付近および流路中央において同じであることを示す。したがって、少量の複数検体が流路に連続注入される場合、これらのプラグは重複せずに（低度の分散で）輸送される。この場合、分散のほとんどはプラグ間の拡散から帰する。EOFの主な欠点は、流路壁の荷電表面部二重層の動きにより生じるため、荷電不純物による表面異物に大いに影響を受けやすいということである。DNAが一律に負の電荷をもち壁に吸着しないので、DNA分析・操作において、負の電荷をもつ面にある流路を使う場合には問題ないかもしれない。しかしながら、電荷を頻繁に伴い、荷電表面に吸着する傾向をもつタンパク質に関係する場合の用途において、これは大きな妨げとなりえる。さらに、大抵の場合、高電圧を伴うものは望まれず、なお、ポータブルアナライザーのような高電圧源を利用できない場合がある。

20

30

【0003】

典型的に、圧力駆動による流れはEOFとくらべると著しく界面化学に影響されにくい。圧力駆動による流れの主な欠点は、EOFのように平らなプロファイルをもたず、通常、放物線状の流れのプロファイルを持っているということである。流路中央の溶質は、流路壁付近の溶質よりはるかに速く流れる（平均流速の約2倍）。圧力駆動の流れは、放物線状の速度プロファイルにおいて、通常、大きく分散する。流路に注入された溶質のプラグは、流路形状に順応して直ちに歪み伸長する。流路中央から壁方向及び反転方向の拡散による溶質輸送によって、この歪みは多少減少するが、流路に沿う分散発生により歪みが大きくなる（この分散を総括してテイラーの分散と呼ぶ）。

40

【0004】

テイラーの分散によりサンプル（試料）プラグが広がり薄くなる。サンプルのいくつかはプラグの後にテール状（尾状）に残る場合が多々ある。これらテールの重なりは、通常、その他プラグ内サンプルの二次汚染につながる。このため、サンプルは頻繁に緩衝液洗浄（バッファー洗浄）により隔離され、流路内へと個々に導入される。一方、長い緩衝液プラグでサンプルをインターリーブする（すなわち、サンプル間の緩衝液でシステムを洗う）ことにより、システムの処理能力（コントロール）を低下させる。

【0005】

EOFにおける送流は本質的に線形である。すなわち、2つの反応原系がプラグに導入さ

50

れ、EOFによって輸送される場合、その滞留時間(および反応速度)は、単に、流路内輸送距離を速度で割ることにより計算することができる。当線形輸送は、流路長さと流量を適切に調節することにより滞留時間の精密な制御を可能にする。対照的に、圧力駆動の流れ分散作用においてプラグが移動するのには通常広範な滞留時間を要し、結果として時間的管理能力が低下する。

【0006】

ここでの時間的管理は重要である。多くの化学・生化学作用は特定の時間内に生じる。そして、反応時間測定値により、試剤濃度または反応性を示すことができる。典型的に静止流体式器機がこれらの測定の手段となる。これらの器機は乱流に依存して試剤を混合し、最小限の分散量でそれらを輸送する。

10

【0007】

通常、乱流は直径大および多流量のチューブ内で生じる。

【0008】

したがって、静止流体式器機は、多くの試剤(ml/秒単位レベル)を要する傾向がある。静止流体式のマイクロフルイディック機器は、試剤消費量が少な目(通常 $\mu\text{L}/\text{分}$)であり、科学器具(例：診断用装置)として効果的に利用できる可能性がある。これまで、マイクロフルイディック装置は、通常、圧力駆動による流れが分散されることにより(小規模分散ではあるが)EOFを多大に遅延させるため、静止流体式器機に対抗することができないでいた。

20

【0009】

さらに、マイクロフルイディック・システムでの混合は、(大型システムにおける乱流に対し)流れが層流であるため、流体を送る方法が何であろうと、速度低下が頻繁に見られる。層流での混合は拡散に依存し、DNAとタンパク質のような大型分子の場合は特に遅くなる。

【0010】

さらに、マイクロフルイディック・システムによる微粒子処理は困難であるといえる。細胞がこれらの緩衝液と同密度であるため水性緩衝液内細胞の懸濁(けんだく)が比較的容易である一方、流体と同密度でない微粒子は、流路の底に沈降する傾向があり、それにより最終的には流路をふさいでしまう。

30

【0011】

それ故に、微粒子を除去するために、分析用サンプルを頻繁にろ過する必要がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

(発明の要約)

発明による基板内部反応の伝導方法とは、基板第1流路に搬送流体を導入すること、第1流路に少なくとも2本のプラグ流体を導入すること、そして、プラグ流体の混合物を含む実質上同一のプラグを形成すべく基板内流体の流れを誘導するために第一流路に圧力を加えることが可能であるものとする。プラグ流体は搬送流体に対し不混和性を持つ。プラグ形成中に、プラグ断面は第1流路断面に実質的に似ているため、プラグが第1流路の壁全体に著しく接することになる。プラグ形成後、プラグ断面は流路断面より縮小する可能性がある。搬送流体の薄い層が消える場合もあるが、通常、この層は流路の壁とプラグの間に存在する。一般的に、流路における初期形成時と各プラグサイズが著しく類似する。さらに、流路内プラグのキャピラリー数は、一般的に1未満、というよりも 約0.2が好ましく、さらに 約0.1がより理想である。

40

【0013】

1本以上のプラグ流体(流体塊)からプラグが形成される場合、急速な流体混合が生じる。流路が直線でない場合、プラグ内部の混合はさら増加する(例：カオス的流れの発生時)。非周期流路の設計はプラグ内部の急速混合を誘導するのに好ましい。他の場合において、混合速度を緩めたり、もしくは、屈曲した流路を用いたり、流体粘度を変えたり、

50

プラグ流体の組成を変えたり、さらには、管理可能な旋回機能を使用することにより制御することもできる。

【0014】

本発明による装置は1本以上のプラグ流体を融合する(組合せる)手段となりうる。プラグ流体を単一または複数の入口から導入することができる。プラグ流体が単一の入口によって導入される場合、第1流路への導入に先立って大幅な混合が生じないように、入口のまさに上流で混合されるのが好ましい。プラグ流体が複数の入口によって導入される場合、異なるプラグ流体から成るプラグが出口前で一連のプラグに融合される(すなわち、一連のプラグはプラグ流体の混合物から構成され形成される)ように、複数のプラグ流体の(粘度、プラグ寸法、プラグ流体・搬送流体界面(接触面)の表面張力、またはプラグ流体・流路壁界面の表面張力といった)物理的性質が調節される。あるいは、単一のプラグ流体から成るプラグを形成するために、プラグ流体を個別の流路へ導入することもできる。

10

【0015】

その時、これらの流路は単一の融合した流路へと融合される。基板内部の連続的な輸送は、単一の合流した流路内で融合されたプラグを形成する。

【0016】

本発明による装置は、プラグを2本以上の流路へと分割する手段となりうる。上記の装置と技術を使い、重合・(小型分子とタンパク質等の)結晶化・ナノ粒子合成・不安定中間体の形成・酵素触媒作用の反応・分析評価、タンパク質結合などの、様々な反応作用を誘導することができる。複数反応を、同時にまたは連続して誘導することができる。

20

【0017】

さらに、本発明にのっとって、本発明は1つ以上の基板から構成される装置を備える。

【0018】

発明の装置及び方法は、詳細に渡り下記されるように、制限されることなく多様な実施形態や変更(修正)形態を備える。

(項目1)

基板の第1流路へ搬送流体を導入する手段(ステップ)と、搬送流体に対して非混和性を持つ少なくとも2つの異なるプラグ流体を1つ以上のプラグ形成領域の第1流路へ導入する手段と、プラグ流体混合物を含む少なくとも1つのプラグを形成するために基板で流体の流れを誘発することを目的として第1流路に圧力を適用(加圧)する手段を備え、プラグ断面積がプラグ形成領域の第1流路断面積と本質的に同一であることを特徴とする、基板内部の少なくとも1つのプラグの内部における反応を誘導する方法。

30

(項目2)

搬送流体が油を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

(項目3)

搬送流体にフッ素化物を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

(項目4)

フッ素添加油がパーフルオロデカリンまたはパーフルオバーハイドロフェナントレンであることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

(項目5)

搬送流体が少なくとも1つの界面活性剤を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

40

(項目6) プラグ流体の少なくとも1つが試剤と溶媒を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

(項目7)

プラグ流体の少なくとも1つが溶媒と界面活性剤を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

(項目8)

プラグ流体が少なくとも1つの入口を通して導入されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

(項目9)

50

プラグ流体の体積流量調節によりプラグに含まれるプラグ流体の濃度を調節する手段をさらに備えた、請求項1に記載の方法。

(項目10)

プラグがキャピラリー数<約0.2で形成されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

(項目11)

プラグ流体の反応により少なくとも1つのプラグ内部に不溶性反応生成物が形成されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

(項目12)

プラグ流体の反応により少なくとも1つのプラグ内部に溶性反応生成物が形成されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

(項目13)

プラグ流体が単一の入口を通して第1流路へ導入されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

(項目14)

入口における又は入口前のプラグ流体が特異的な(はっきりと識別できる)層流であることを特徴とする、請求項13に記載の方法。

(項目15)

プラグ流体が2つ以上の入口を通して第1流路へ導入されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

(項目16)

プラグ内におけるプラグ流体の混合を加速する手段をさらに備えた請求項1に記載の方法。

(項目17)

流路に沿った幾何学様式(形状)の変化により混合が加速されることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

(項目18)

流路が1つ以上の曲がり角、屈曲、および直線部またはそれらの組み合わせを備えることを特徴とする、請求項17に記載の方法。

(項目19)

「ペーカーによる変態の(補助)定理」の実装を目的として設計された流路形状を通してプラグを流すことにより混合が加速されることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

(項目20)

プラグ流体または搬送流体の少なくとも1つの構成を変化することにより混合が加速されることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

(項目21)

プラグ流体または搬送流体の少なくとも1つの粘度を変化することにより混合が加速されることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

(項目22)

流路壁のパターンを変化することにより混合が加速されることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

(項目23)

第1流路または分岐流路の少なくとも一部分の親水特性を変化することにより混合が加速されることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

(項目24)

第1流路または分岐流路の少なくとも一部分の電荷を変化することにより混合が加速されることを特徴とする、請求項16に記載の方法。

(項目25)

少なくとも1つのプラグが第1流路のプラグ形成領域下流にある別のプラグと融合する手段をさらに備える、請求項1に記載の方法。

(項目26)

10

20

30

40

50

第1流路および基板上の第2流路へ搬送流体を導入する手段を備えた第1および第2流路が流体交流（伝達）することを特徴とする、および、搬送流体に対して非混和性を持つ第1プラグ流体を第1プラグ形成領域の第1流路へ導入する手段と、搬送流体に対して非混和性を持つ第2プラグ流体を第2プラグ形成領域の第2流路へ導入する手段と、第1プラグ流体を含む第1プラグ集合体そして第2プラグ流体を含む第2プラグ集合体の形成を目的として基板で流体の流れを誘導するために圧力を適用（加圧）する手段を備えた、プラグ断面積がプラグ形成領域の流路断面積と本質的に同一であることを特徴とする、そして、第1プラグ集合体からの少なくとも1つのプラグが第2プラグ集合体からの少なくとも1つのプラグと融合することを特徴とする、基板内部における反応を誘導する方法。

（項目27）

10

プラグの第1および第2集合体の各断面が本質的に類似していることを特徴とする、請求項26に記載の方法。

（項目28）

プラグの第1および第2集合体異なる相対速度であることを特徴とする、請求項26に記載の方法。

（項目29）

第1流路においてプラグ形成領域下流の2箇所以上へとプラグを分裂させる手段をさらに備えた請求項1に記載の方法。

（項目30）

少なくとも1つのプラグを2箇所以上に分裂させ、従って、プラグ形成箇所の下流に第2流路が存在することを特徴とする空間（流路）を通過して第1プラグ集合体が第2流路へと送られる手段をさらに備えた請求項1に記載の方法。

20

（項目31）

第1流路の断面寸法が第2流路の断面寸法と異なることを特徴とする、請求項30に記載の方法。

（項目32）

第1流路の断面寸法が第2流路の断面寸法とほぼ等しいことを特徴とする、請求項30に記載の方法。

（項目33）

第1流路内の圧力が第2流路の圧力と異なることを特徴とする、請求項30に記載の方法。

30

（項目34）

第1および第2流路の合流地点またはその付近に収縮（圧縮）作用が存在することを特徴とする、請求項30に記載の方法。

（項目35）

搬送流体からの少なくとも1つのプラグを分離する手段をさらに備えた請求項1に記載の方法。

（項目36）

第1流路のプラグ形成領域下流において少なくとも1つのプラグの存在を検出する手段をさらに備えた請求項1に記載の方法。

（項目37）

40

反応生成物の検出をさらに備えた請求項1に記載の方法。

（項目38）

反応監視能力をさらに備えた請求項1に記載の方法。

（項目39）

反応速度の監視能力をさらに備えた請求項1に記載の方法。

（項目40）

プラグの少なくとも1つの光学特性を測定する能力が監視機能に含まれることを特徴とする、請求項38に記載の方法。

（項目41）

搬送流体およびプラグ流体の屈折率が本質的に類似していることを特徴とする、請求項1

50

に記載の方法。

(項目42)

基板流路沿いの一箇所以上で監視が行われることを特徴とする、請求項38に記載の方法。

(項目43)

多大なる数の基板を並行して消耗する機能をさらに備えた請求項1に記載の方法。

(項目44)

流体を一定期間停止する機能をさらに備えた請求項1に記載の方法。

(項目45)

重合反応を特徴とする、請求項1に記載の方法。

(項目46)

搬送流体を基板の第1流路へ導入する手段と、少なくとも1つのプラグ形成領域における少なくとも第1および第2プラグ流体を第1流路へ導入する手段と、少なくとも第1および第2プラグ流体を備えるプラグ形成を目的として基板における流体の流れを誘発するために第1流路に圧力を適用(加圧)する手段を備えた、少なくともプラグのいくつかにおいて結晶が形成されることを特徴とする、物質の結晶化方法。

(項目47)

物質がナノ粒子であるところの、請求項46に記載の方法。

(項目48)

物質が、タンパク質、DNA、RNA、病原体、薬剤、薬剤同質異像または小型分子であるところの、請求項46に記載の方法。

(項目49)

物質が、タンパク質、DNA、RNA、病原体、薬剤、薬剤同質異像または小型分子2つ以上の錯体であるところの、請求項46に記載の方法。

(項目50)

第1プラグ流体がタンパク質を含み、第2プラグ流体が沈殿剤を含むことを特徴とする、請求項46に記載の方法。

(項目51)

第1および第2プラグ流体間の界面を作り出す手段をさらに備えた請求項50に記載の方法。

(項目52)

第1流路長さ分(流体が第1流路を通過する間)界面が十分に維持されることを特徴とする、請求項50に記載の方法。

(項目53)

プラグの蒸発をさらに備えた請求項46に記載の方法。

(項目54)

一定の期間にわたり流体の流れを停止する機能をさらに備えた請求項46に記載の方法。

(項目55)

反応により不安定中間体が生じることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

(項目56)

非直線部を少なくとも1つ備えた少なくとも1つの流路と、前述流路と流体が交流している少なくとも1つのプラグ流体入口と、前述流路と流体が交流している少なくとも1つの搬送流体入口と、前述流路内部に流体の流れを生成する手段を備えた、少なくとも1つの基板を備える装置。

(項目57)

流体の流れが減速するところの、流路沿い膨張範囲1つ以上をさらに備えた請求項56に記載の装置。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1Aは、プラグ内の急速混合を誘導するために使うことができる流路構造の概略図。図1B(1)-(4)は、基本的な流路構造の一連の周期的変化を示す概略図。図1C(1)-(4)

10

20

30

40

50

は、図1Aにおいて示される基本設計要素と、図10B(1)―(4)において示される一連の周期的変化に基づく代替要素のシーケンスから生じる一連の非周期的な組み合わせを描いた概略図。

【図2】図2Aは、流路の層流輸送とプラグ輸送を対比する概略図。図2B(1)は、プラグ内部での屈曲する流路を通過する急速混合を図示する写真(右上)を示す図。図2B(2)は、流路屈曲により、PFD非存在下では、層流内の混合加速現象が生じないことを表す写真(右下)を示す図。

【図3】図3は、 $0.5\mu\text{L}/\text{分}$ と $1.0\mu\text{L}/\text{分}$ の流量で、湾曲した流路における水性プラグ流体と油(搬送流体)からのプラグ流れを示す写真(右側)と概略図(左側)を示す図。

【図4】図4は、油と複数プラグ流体の注入によるプラグ形成を図示する写真(下部)と概略図(上部)を示す図。

【図5】図5は、反応および混合作用を制御するために異なる幾何学形状の組み合わせを用いて油および複数プラグ流体の注入による2段階に渡るプラグ形成反応を図示する概略図。

【図6】図6は、プラグ分割・融合の両方を可能とする複数の入口を持つマイクロフルイディック・ネットワークの一部を示す概要描写。この概略図は、同時に誘導される2反応を示す図。(最初の2反応による混合の中間である)第3反応は精密な時間的遅延を利用して誘導される。

【図7】図7(a)-(b)は、均一総流速にて屈曲流路を通るプラグ内の急速混合(a)と層流における小規模な混合(b)を図示するマイクロ写真($10\mu\text{秒}$ の露光)を示す図。図7(c)は、Fluor-4溶液と CaCl_2 溶液プラグ内部の急速混合から生じる、蛍光性を時間平均して示す偽色彩法マイクロ写真(2秒の露光、個々のプラグは見えない)を示す図。図7(d)は、プラグを通過して移動した距離関数(左)と所定流量にてその距離を移動するのに要した時間関数(右)に基づき、画像から得た相関的且つ正規化補正後の蛍光強度(I)の線グラフを示す図。図7(e)は、(c)の溶液の層流における小規模混合から生じる弱い蛍光性の偽色彩法マイクロ写真(2s露光)を示す図。

【図8】図8は、各階段の屈折角度が 90° の階段流路における流量約 $0.5\mu\text{L}/\text{分}$ と約 $1.0\mu\text{L}/\text{分}$ での急速混合を図示する写真(右側)と結線図(左側)を示す図。

【図9】図9は、各階段の屈折角度が 135° の階段流路における流量約 $1.0\mu\text{L}/\text{分}$ と約 $0.5\mu\text{L}/\text{分}$ での急速混合を図示する結線図(左側)と写真(右側)を示す図。

【図10】図10a)は、プラグ内の乱流を三次元共焦点可視化したものを描く概略図。図10b)は、三次元流の可視化に好ましいシーケンスを示す線グラフ。

【図11】図11は、マイクロフルイディック流路を流れるプラグの「ベーカーによる変態の(補助)定理」を実装および可視化するために設計された流路形状の概略図を示す図。

【図12】図12は、個別の流路または流路の垂直分岐に流れるプラグの混合(上)と分裂(下)を表す写真。

【図13】図13は、プラグ内の急速混合(とがった吸収頂点を伴う範囲)および従来の溶液混合によって形成されたCdSナノ粒子のUV-VIS領域を示す図。

【図14】図14は、単相水性層流(図14A)および水不混和性パーフルオロデカリン(perfluorodecaline)により囲まれる水性プラグ(図14B)内のPDMSマイクロフルイディック流路のCdSナノ粒子合成を図示する概要図(左側)と写真(右側)を示す図。

【図15】図15は、プラグ内部のCdSナノ粒子合成の概要描写を示す図。

【図16】図16は、プラグのトラッピングを図示する、発明によるマイクロフルイディック装置の概要説明図。

【図17】図17は、タンパク質結晶化可変組成を伴いプラグを形成するマイクロフルイディック方式の略図図。

【図18】図18は、水性プラグ流体・搬送流体界面の界面化学を変えることにより、不均質核生成を制御する方法の概要描写を示す図。

【図19】図19は、本発明によるマイクロフルイディック・ネットワークを手段とする核生成と成長の分別方法を示す概要図。

10

20

30

40

50

【図 2 0】図20は、混合に対する精密且つ再現可能なレベルにおよぶ制御能力を可能にし、タンパク質結晶化に対する混合効果を定める手段となりうる二つの方法を図示する概要図。

【図 2 1】図21は、クロライト - チオ硫酸塩反応が不安定な点を図示する反応線図。

【図 2 2】図22A-Dは、単一視像から動態情報を得る手段となりうる発明によるマイクロフルイディック・流路形状の様々な事例を示す概要図。

【図 2 3】図23は、マイクロフルイディック・ネットワークの略図(左側)と、流路高さ15 μm と2 μm のネットワーク用パラメーターの表を示す図。

【図 2 4】図24は、(a)タンパク質吸着に対する抵抗力を備え、(b)陽の荷電を持ち、及び(c)負の電荷を持つ、単分子層を形成するフッ素添加界面活性剤の事例を表す反応スキームを示す図。図24bは、アミンまたはグアニジニウム群のプロトン化による水との相互作用により、荷電された中性界面活性剤の化学構造を示す。図24cは、カルボン酸群の脱プロトン化による水との相互作用により、荷電された中性界面活性剤の化学構造を示す。

【図 2 5】図25は、異なる水性流濃度によるプラグ形成を示す写真 (a・ b・ cの右側) だけでなく、プラグ内部の水溶液濃度を制御する手段となりえるマイクロフルイディック・ネットワーク(a・ b・ cの左側)の概要図。

【図 2 6】図26は、マイクロフルイディック・ネットワークの概要図(aとbの左側)と、流れ方式を示すために赤と緑の色素で水性流を染色したネットワーク内プラグ形成部位の写真(aとbの右側)を示す図。

【図 2 7】図27は、直線のマイクロ流路を通過するプラグ内部流れの再循環を伴う混合作用に対する初期条件の効果を示す写真と線グラフを示す図。図27a1は、(黒い矢印によって指される)再循環中の流れが、初期プラグ表半面・裏半面の試剤溶液と効率的に混合した状態を示す概要図。図27a2は、(黒い矢印によって指される)再循環中の流れが、初期プラグ表半面・裏半面の試剤溶液と効率的に混合しなかった状態を示す概要図。図27bは、入口部(左側)を示す概要図、およびプラグの様々な周期・長さの測定値を表す画像写真を示す図。図27c 1 は、異なった長さのプラグにおいて $\text{Fe}(\text{SCN})_x^{(3-x)+}$ 複素数の相関的光学強度のグラフを示す図。図27c2) は、各プラグが1.3mmの距離を横断する場合を除いて図7c1と同様。

【図 2 8】図28は、移動方向に関連したプラグの異なる部位を示すために、従来の表記法で描かれたプラグ概要描写を示す図。

【図 2 9】図29a-bは総流速の関数(図29a)と水の割合(図29b)を表す、プラグ周期および長さの線グラフ。

【図 3 0】図30は、プラグ周期・長さとは総計流速におけるプラグ内部の流れ方式との依存性が低いことを図示する写真を示す図。

【図 3 1】図31は、水の割合が各々0.20、0.40および0.73だった場合のプラグ周期と長さの分布を示す棒グラフ。

【図 3 2】図32は、マイクロフルイディック・ネットワークの図(左側)と共に、プラグ・トラップがマイクロフルイディック・ネットワーク内の結晶形成に不要であることを表す写真(中央と右側)を示す図。

【図 3 3】図33a-d(左側)は、同一又は非同尺寸法の流路を備えるマイクロフルイディック・ネットワークの平面図(左側)と写真(右側)を示す図。図33aは、写真に示されるように、T字型流路にてまれに生じるプラグ融合を示す図。図33bは、Y字型合流地点(表示されている拡大図参照)における、異なるタイミングで到達するプラグ間に生じるプラグ融合を示す図。図33cは、同相の融合(合流地点にある少なくとも2本のプラグが同時に到達した時に生じるプラグ融合、2対の入口において異なる油・水の割合により生じる異なるサイズから成るプラグが同時に到達した時に生じるプラグ融合、等)を示す図。図33dは、後に続く2本のプラグ流れの相関的な速度の変動によりもたらされた欠陥(つまり標準又は理想条件の下においてプラグ融合が生じないという異常)を図示する。

【図 3 4】図34a-cは、流路網を上から見た状態を概要図(a、左側)と写真(b、c)のおおのに示した図。図34aは、実験に使用された流路網の概要図。図34bは、プラグが第1プラ

10

20

30

40

50

グの約半サイズのプラグへと分裂する状態を示す写真図。図34cは、 $P_1 < P_2$ 時に生じたプラグの非対称分裂を表す写真を示す図。

【図35】図35は、マイクロフルイディック・ネットワークを利用して、合流地点付近における圧縮の無い状態で生じたプラグの分裂を示す概要図(a、左側)と写真(b、c)。

【図36】図36は、結晶化を伴ったマイクロフルイディック・ネットワークの線図(左側)だけでなく、マイクロフルイディック流路水源内の水プラグ内で成長(増加)したリゾチーム結晶の写真(右側)を示す図。

【図37】図37は、自触媒作用を伴う(且つ不安定ともいえる)反応混合物による小規模な化学信号を拡張する手段となりうる、発明によるマイクロフルイディック装置を示す概要図。

【図38】図38は、分子レベルで検知する手段となりうる多段化学を増幅する方法を図示する概要図。

【図39】図39は、マイクロフルイディック・ネットワークの図解(左側)と、PDMSの壁に付着した水プラグの写真(右側)を示す図。

【図40】図40は、蛍光発生基質(チップ上酵素反応動力学)により、リボヌクレアーゼA(RNA分解酵素A)による反応速度データを測定する手段となるマイクロフルイディック・ネットワークの概要描写(左側)、及び、リボヌクレアーゼAと蛍光発生基質間の反応速度データを線グラフで示す図。

【図41】図41は、マイクロフルイディック・ネットワークの図解(左側)だけでなく、マイクロフルイディック・ネットワークの水滴部位の写真(中央と右側、 T =時間)を示す図。

【図42】図42は、マイクロフルイディック・ネットワークの概要図(左側)と、勾配が流量変化により形成されたマイクロフルイディック・ネットワークのインク・プラグ部位の写真(右側)を示す図。

【図43】図43は、マイクロフルイディック・ネットワークの概要図(左側)と、勾配によりマイクロフルイディック・ネットワークに形成されたりゾチーム結晶の写真(右側)を示す図。

【図44】図44は、分離した試剤Bの水溶性サンプルを水流に注入することにより、最初の勾配がどのように発生しうるかを示す概要描写を示す図。

【図45】図45aは、試剤の流量変化によりチップ上での希釈を成し遂げうることを実証する手段となりうるマイクロフルイディック・ネットワークの略図を示す図。青い長方形は、図45cとdに記されている画像の視野を描く図。図45bは、マイクロ流路内プラグにおいて希釈したフルオレスセイン(蛍光色素)溶液の蛍光性を測定することにより、当希釈法を数量化したグラフを示す図。

【発明を実施するための形態】

【0020】

(発明の詳細な説明)

「分析」という用語は典型的に、分類・試験・測定・最適化・識別・総合・追加・ろ過・分解または混合を含む、物理学・化学・生化学・生物学的分析に関係する工程または手段に関係する。

【0021】

「分析ユニット」という用語は、典型的に化学物質に対しタイプ以上の分析を実施することを特徴とする、基板または流路内の一部分又は部位に関係する。

【0022】

「搬送流体」という用語は、プラグ流体に対し不混和性をもつ流体に関係する。搬送流体は、極性・無極性群の両方またはその半群の物質を備えうる。

【0023】

「流路」という用語は一般的に、少なくとも部分的な開口を備えうるが、典型的には包囲された導管(ダクト)に関係する。且つ、化合物・溶媒・溶液・乳剤・又は分散に関係するかもしれない同質もしくは異質でありうる、1つ以上の物質タイプまたは混合物タイ

10

20

30

40

50

ブが、流路を通過しえる。前述のうちのいずれか一つは、固形・液体・または気相形態でありえる。流路は、管状、円筒状、長さに伴い同一又は変形形態の寸法(例えば、テーパ一状、等)、及び長方形・円形・三角形等の長さに伴い1つ以上の断面形状のような、形態・形状を伴うと推測できる。流路は一般的に、重合体、金属、ガラス、合成、又はその他の比較的無活性な材質を含み且つ適合する材質からなる。本申請書では、「流路」という用語は、装置における用途に適切な寸法を備えるマイクロ流路に関係する。流路網とは、一般的に接続中もしくは相互伝達する流路の重複度に関係する。流路は、バルブなど別種の導管を通し他の少なくとも1本の流路に接続されうる。

【0024】

「化学物質」という用語は、物質、化合物、混合物、溶液、乳剤、分散、分子、イオン、二量体、重合体やタンパク質などの高分子、有生分子、沈殿物、結晶、化学系半群または群、粒子、ナノ粒子、試剤、反応生成物、溶媒あるいは液体に関係する。前述のうちのいずれか一つは、固形、流体、あるいは気態として存在するかもしれない、一般的に分析の対象となりえる。

10

【0025】

「検出領域」という用語は、化学物質が先決特性または特徴に基づいて識別、測定、選別されることを特徴とする基板または流路の一部あるいは部位に関係する。

【0026】

「装置」という用語は、ウェットエッチングまたはドライエッチング、かつまたは従来のリソグラフィ技術、あるいはソフトリソグラフィのようなマイクロマシーニング技術などの技術を手段として、製作または製造された装置に関係する。本申請書において、「装置」という用語は、マイクロファブリケーション(微細加工)された装置として、称される又は認識される又は分類されるものに関係する。発明による装置は、各側面の寸法が約0.3cmから約15cm(6インチ・ウエハー同等)、および約1マイクロメータから約1cmの厚さを備えうるが、装置の寸法はこれらの範囲外となりうる。

20

【0027】

「識別領域」という用語は、他のいかなる少なくとも1本の流路に進入するために流体の流れ方向が変更しえることを特徴とする、分岐流路などのような基板または流路の一部もしくは部位に関係する。

【0028】

「下流」という用語は、流体が初期点を通過後に到達する最初の位置に関係する。フロー装置循環中の場合、「下流」とは、流れが再び初期点を交差する前の流動経路に沿ってさらに前進したところの位置に関係する。「上流」とは、流体が基板または装置の与えられた初期点に達する又は通過する前に、その流体が達する又は通過するだろう流動経路のある時点に関係する。

30

【0029】

「流れ」という用語は、固体または液体のような流体の、いかなる動作をも意味する。例として、発明による基板または基板構成要素において、あるいは発明にのっとる方法に関係する基板または基板構成要素において(例:発明によるマイクロフルイディック基板の流路を通り)、プラグ流体・搬送流体・またはプラグの動作が流れを形成する。いかなる力も流れを形成する手段となりうる。いかなる特定の理論あるいはアクション・メカニズム(実施機構)に制限されるものではないが、流れを供給する力の例としては、圧力・毛管作用・電気浸透・電気泳動・誘電泳動・光ピンセット・およびそれらの組み合わせが挙げられる。

40

【0030】

「不混和性」という用語は、相がある種の機械的または物理学的攪拌作用を受けた後でさえも、少なくとも2相または2流体が少なくとも部分的に分離し続ける又は分離したままになるなどの、特定条件または一組の条件(例:温度かつまたは圧力)の下において、少なくとも2相あるいは2流体の混合時に生じる抵抗力に関係する。

【0031】

50

不混和性を伴う相または流体は一般的に、物理的にかつまたは化学的に識別可能、もしくは、少なくともある程度まで分離しうる。

【0032】

「吸込口(インレットポート)」という用語は、プラグ流体を受け入れる基板の一部に係る。吸込口は、化学物質の基板浸入を促進する吸込流路、水源または貯水溝、開口、および他の機構を備える。望ましくは、基板は1つ以上の吸込口を備えうる。吸込口は、流路と流体伝達しうる、あるいはバルブにより流路から分離しうる。

【0033】

「ナノ粒子」という用語は、一般的に約1~100ナノメートル(nm)の長さ尺度を持つ、原子・分子・高分子の粒子に係る。

10

【0034】

典型的に、ナノ粒子の新しい識別特性と機能は、一般に100nm未満の物質の限界長さ尺度で観察および発生しうる。ナノ粒子はナノサイズの構造を可能にする手段となりうる。そして、より大規模な材質構成要素やシステムおよび体系へと統合されうる。ある特定の場合、ナノ粒子に係る新しい特性と現象の限界長さ尺度は、1nm未満(例：約0.1nmでの原子操作)あるいは100nm以上(例：ナノ粒子により強化された重合体は、約200~300nmにおいて、ナノ粒子と重合体の間で局部ブリッジまたは結合剤として機能するなど、ユニークな機構を備える)。

【0035】

「核生成組成」という用語は、結晶形成にふさわしい条件の下における結晶化機能を備える1つ以上の核を含む物質または混合物に係る。例として、蒸発、試剤濃度の変化、沈殿剤などの物質添加、固形物を種とする形成、機械的攪拌、あるいは核生成の組成との界面上での干渉に伴って生じる結晶化により、核生成の組成が誘導されうる。

20

【0036】

「出口(アウトレットポート)」という用語は、プラグ流体、搬送流体、またはプラグあるいは反応生成物を収集または分布する基板の一部に係る。望ましくは、基板は1つ以上の出口を備えうる。

【0037】

「粒子」という用語は、いかなる物質の個別形態あるいはユニット形態を意味する。「粒子」という用語は、原子、分子、イオン、二量体、重合体あるいは有生分子に係る。

30

【0038】

「微粒子」という用語は、原子、分子、イオン、二量体、重合体あるいは有生分子などのような粒子の群または集塊に係る。

【0039】

微粒子は、固形物を有したり非常に固い場合があり、さらに、多孔性であったり部分的に空洞を有するかもしれない。液体またはガスを含んでいるかもしれない。さらに、微粒子は同質のものまたは異質的なものかもしれない。すなわち、それらは1つ以上の物質あるいは材質を備えうる。

【0040】

本発明によると、少なくとも1本のプラグ流体が本質的に混合できないところの搬送流体へ導入される場合に「プラグ」が基板において形成される。装置内における流体の流れは、例として、圧力、放射、熱、振動、音波、電界、又は磁界の存在またはアプリケーションから、直接あるいは間接的に生じる推進力または刺激により誘導される。本発明によるプラグ断面は、サイズは異なりえるが、プラグ形成時に形成される流路断面に事実上類似していることとする。プラグが融合またはプラグ・トラップ内部でトラッピングした場合、プラグの断面が変化するかもしれない。例えば、プラグがより広い流路に入るとき、通常、その横断面は拡大する。

40

【0041】

さらに、本発明によると、プラグ形状が異なりうる。例えば、球状かもしれないし、非

50

球状かもしれない。プラグの形状は、流路の形状に依存しないかもしれない(例：プラグが長方形流路内を移動する歪んだ球体でありうる。ここでいうプラグは、水性プラグ流体が油などの無極疎水性流体により囲まれていることを特徴とする1つ以上の試剤かつまたは試剤反応作用により形成された1つ以上の生成系を含む水性プラグ流体を備えるプラグの形をしているかもしれない。プラグはまた、主として水性流体で囲まれる無極・疎水性流体を備えるプラグの形をしているかもしれない。プラグは、疎水性・親水基の両方あるいはその半群を備える一層以上の分子層により包まれうる。「プラグ」という用語はまた、1つ以上の小さなプラグ(すなわちプラグ内部のプラグ)を備えるプラグに関係する。

【0042】

プラグに含まれる試剤と反応生成物の相関量は、プラグ内に生じる反応などの要素に常に依存する。好ましくは、少なくとも2本のプラグ流体の混合物がプラグに含まれているものとする。

10

【0043】

「プラグ形成領域」という用語は、発明による吸込口と基板上第1流路との合流地点に関係する。好ましくは、第1流路からの流体にプラグ形成領域で形成されたプラグ流体が流入できるように、吸込口へと導入された流体が第1流路の流体と「非互換性」(つまり不混和性)を有するものとする。

【0044】

「プラグ流体」という用語は、反応すなわち沈降反応が生じうることを特徴とする流体、もしくは反応すなわち沈降反応の発生を利用する流体に関係する。いくつかの実施形態において、試剤を含まないプラグ流体が少なくとも1本存在しうるが、典型的にプラグ流体は溶媒と試剤を含む。試剤は、溶媒に対し溶性あるいは不溶性のどちらでもありうる。プラグ流体は界面活性剤を含みうる。本発明において、少なくとも2本の異なるプラグ流体が用いられる。両プラグ流体が試剤を含む場合一般的に混和性をもつが、各プラグ流体の試剤が少なくとも1つの生成系または中間体に形成反応をおよぼしえる限り、これら2本のプラグにもたらされる混和性は不完全でありうる。

20

【0045】

「重合体(ポリマー)」という用語は、互いに反復結合する2つ以上の基礎成分(「mers」-特定部類に属する化合物)を備えるあらゆる物質あるいは化合物を意味する。例えば、「二量体」は2つの基礎成分がともに連結された化合物である。重合体は縮合と付加重合体の両方に関係する。縮合重合体の代表例として、ポリアミド、ポリエステル、タンパク質、ウール、絹、ポリウレタン、セルロースおよびポリシロキサンなどが挙げられる。付加重合体の例として、ポリエチレン、ポリイソブチレン、ポリアクリロニトリル、ポリ(塩化ビニル)およびポリスチレンが挙げられる。他の例は、導電性重合体あるいは光屈折性重合体など、重合体の電気的性質または光学的性質(例えば非線形光学的性質)が高まることに関係する。重合体には、線形および分岐型重合体がある。

30

【0046】

「タンパク質」という用語は、一般的に、特定のシーケンスで通常共に連結する一組のアミノ酸に関係する。天然タンパク質と人工たんぱく質とがありえる。本申請書において、「タンパク質」という用語は、半群または群を含むために組み替えられたアミノ酸シーケンスに関係する。その例として、糖分、重合体、有機金属群、蛍光群または発光群、分子内または分子間での電子伝達などの工程を増強するもしくは工程に関与する半群あるいは群、たんぱく質が特定の整合または一連の整合を備えることを促進または誘導する半群あるいは群、タンパク質が特定の整合または一連の整合を備えることを妨害もしくは抑制する半群あるいは群、タンパク質フォールディング(折りたたみ)を誘導・増強もしくは抑制する半群あるいは群、あるいはアミノ酸シーケンスに組込まれそのシーケンスの化学・生化学・生物学的特性の変更を目的とするその他の半群または群など、が挙げられる。本申請書において、タンパク質の例としてはこれらに限定されないが、細胞工程又は細胞活動などの過程に関与する酵素、構造要素、抗体、ホルモン、電子担体、およびその他の高分子が挙げられる。

40

50

【 0 0 4 7 】

タンパク質の特徴として、一次構造・二次構造・三次構造・四次構造の4レベルにわたる構造を有するといことが挙げられる。

【 0 0 4 8 】

「反応」という用語は、物理学・化学・生化学・生物学的変態に関係する。これらの変態は通常、反応原系、試剤、相、搬送流体あるいはプラグ流体を例とする少なくとも1つの化学物質に関係し、そしてまた、(物理学・化学・生化学・生物学的変態の場合には)共有結合、非共有結合、ファンデルワールス結合、水素結合あるいはイオン結合などの1つ以上の結合の分裂または形成に関係する。本用語は、共有結合と非共有結合、相転移、変色、相転移、結晶化、分解、発光、光吸収・放射特性の変化、温度変化あるいは熱吸収あるいは放射、整合の変化、そしてタンパク質などの高分子フォールディングまたは変性だけではなく、総合反応、中和反応、分解反応、変位反応、酸化還元反応、沈降反応、結晶化、燃焼反応、そして重合反応などの典型的な化学反応に関係する。

10

【 0 0 4 9 】

「試剤」という用語は、追加反応または一連の反応を受けるかもしれない1つ以上の反応生成物あるいは中間体を生成するために、基板上に存在する他のプラグ流体の構成要素1つ以上または試剤を含む搬送流体と伴って、少なくとも1タイプの反応を受けたりそれに関与したりする(例：反応率または平衡状態位置に影響を及ぼすことにより関与する)、プラグ流体の構成要素に関係する。

【 0 0 5 0 】

放射・熱・温度または圧力変化・超音波・触媒から帰する刺激により別の試剤や中間体または生成系での試剤変態反応を引き起こす誘導反応が、プラグ流体に含まれる試剤にもたらされるかもしれない。また、他のプラグ流体または試剤を含む搬送流体の構成要素1つ以上に相互作用で相転移するなどの反応(例えば沈降反応)が、試剤にもたらされるかもしれない。

20

【 0 0 5 1 】

「基板」という用語は、装置またはチップの作成又は製作に用いられた1つ以上の材質の層や部品に関係する。本申請書において、「基板」という用語は、従来の又は認知のいかなるマイクロ加工技術により組み立てられたあらゆる基板に関係する。

【 0 0 5 2 】

「基板」という用語はさらに、装置またはチップの、全本体あるいはその本体から取り外し可能又は着脱式の一部、一領域、又は一画に関係する。

30

【 0 0 5 3 】

基板は、ガラス、シリコン、シリコーン・エラストマー、およびこれらに限定されないがポリプロピレンまたはポリエチレンが例として挙げられる重合体などの、1つ以上の材質から成りうる。

【 0 0 5 4 】

プラグ形成、一連のプラグ勾配生成、プラグ試剤濃度の変化、プラグ内急速混合、および混合時間の尺度構成を目的とした、発明による様々な装置と方法の詳細説明を下記する。その中でも特に、流路によるプラグの融合、分裂かつまたは選別に関する詳細な説明が論じられている。当説明により、様々な製品の製作・分析から、電子工学・医学・診断学および薬学へのアプリケーション等の範囲に及ぶ様々な用途における、発明による様々な装置と方法の実用性を裏付けする根拠が確立される。プラグおよびプラグ内に生じる工程の検出・測定方法も、他のアプリケーションと共に記述されている。

40

【 0 0 5 5 】

粒子分離・選別、合成、非線形・(線形)確率システムの調査、不安定自触媒作用混合物による非線形増幅、化学増幅用確率化学システムの利用、反応速度測定、過程の時間的管理、反応速度測定ダイナミック・レンジ拡大、超高速測定、タンパク質結晶化、そして界面化学の動的制御などが、発明による装置と方法に関係する様々なアプリケーションとして挙げられる。

50

【 0 0 5 6 】

これらに加え、発明による装置と方法は、その他の広範囲にわたるアプリケーションを提供する。例として、発明による装置と方法は、一連の時間尺度(例：結晶化の場合、数十マイクロ秒単位から数時間または数週間単位)での、また、一連の溶液量(例：フェムトリットル単位から数百ナノリットル単位)での溶液や反応作用に関する効果的で迅速かつ精密な操作とモニタリング(監視)の手段となる。

【 0 0 5 7 】

発明の一態様において、発明による様々な装置と方法は、マイクロフルイディックがもつ次の問題1件以上を克服する手段となる。第一に、マイクロフルイディック流路では大幅な溶質分散は試剤消費量増加が生じるために、長期の時間尺度(例えば分単位から時間単位)での実験または測定が困難になる。発明による様々な装置と方法は、非混合性の搬送流体によりプラグ内部に閉じ込められている試剤を局部集中することにより、この難問を克服することを目的とする。

10

【 0 0 5 8 】

第二に、溶液混合スピードが遅い場合、極度に短い時間尺度(例：ミリ秒単位よりも短い尺度)での実験、試験、または反応が要されることになるが、これは、既存の技術では困難というよりも不可能である。

【 0 0 5 9 】

さらに、乱流に基づいた混合技術はサンプル消費量を法外に増加させる。本発明にのっとして、プラグ内部の混合作用によりこの難問に取り組むことが好ましい。発明による様々な装置と方法は、乱流に依存するのではなく、むしろ混合作用を加速するためにカオスの移流に依存することが好ましい。カオスの移流がもたらす利点は、小規模および大規模の両流路において効率的に作用することが期待されるということである。

20

【 0 0 6 0 】

第三に、装置内部表面の化学物質に対する制御を達成することは、装置が小規模の場合に極めて重要でありうる。したがって、非常に望ましい条件として、小型装置内の界面化学を制御することが可能であるということが例として挙げられる。発明による装置と方法にのっとして、好ましくはプラグとそれらを囲む不混和性流体の接点で結集する設計を伴う界面活性剤の念入りの選択により、溶液が露出される界面化学を好ましくは制御する。

30

【 0 0 6 1 】

発明による装置と方法はまた、例として小型化と高速化が重要視されるマイクロフルイディック従来の分野における手段を提供する。

【 0 0 6 2 】

したがって、発明による装置と方法は高度な処理能力をもつ化学または生物物理学的測定、化学合成、粒子形成およびタンパク質結晶化などに用いられる様々なツールを開発するための手段となりうる。

【 0 0 6 3 】

また、内蔵型プラットフォームとしても、または既存の技術(特に不混和性流体の流れに依存するもの)と組み合わせることによって、高度処理能力をとまなうスクリーニング、コンビナトリアル合成、分析および診断の手段ともなりうる。

40

【 0 0 6 4 】

ここで重要なのは、発明による装置はオートメーションおよびロボット工学技術による作動に適合しうることである。例として、高度処理能力を備える生体分子構造・機能分類用超オートメーション・システムの基本原理として応用してもよい。したがって、発明による様々な装置と方法は、生物学・化学・生物物理学・生物工学および医学(例：診断学)の分野における、高速かつ経済的でアクセス可能(手頃)な合成・分析および測定の手段を提供する。

【 0 0 6 5 】

発明による装置と方法は、この他にも多数の可能性に満ちた用途を提供する。例として、レイノルズ数低値でのカオスの混合は、不安定な化学反応を制御するための重要なツ

50

ルとして利用することができる。さらに、発明によるシステムと装置は、非常に不安定な(もしくは爆発性を持つ)中間体を生成する反応を制御かつまたは監視する手段となりうる。

【0066】

また、自触媒作用反応に関係する反応または工程を制御または監視するにあたり有益になりうる。例として、純粋過酸化水素(H_2O_2)は低コストという利点に加え非常に効果的な酸化体であるが、その自触媒分解(変質)作用により、たびたび保管および取り扱い時の爆発をもたらすという問題がある。発明によるマイクロフルイディック・システムの場合、好ましくは、 H_2O_2 が原位置(in-situ)において生成され、カオス的流れにより安定し、化学兵器および細菌戦の病原体を破壊する手段となる。

10

【0067】

これらのシステム中の不安定な混合物が、発明にのっとって形成されたプラグ内部において局部集中されるので、1つ以上のプラグ内で時折生じる自触媒分解(変質)がそれらのプラグ内に局部集中されたままになる。それによって、システム全体に関係する破局反応を防ぐ。さらに、高度な処理能力を供給するのと並行してマイクロフルイディック・リアクトルの大規模なシーケンスを機能しうる。

【0068】

また、発明による装置と方法を用いて、単一ネットワーク内にある複数の自触媒作用の反応を結合することも可能である。例として、サンプルプラグはそれ自体よりも小さい多数のプラグに分裂し、個々の増幅階段流へと転送されうる。階段流流出物に含まれるものは、システム中の検体パターンに相当するパターンを持っているので、人工ニューラル・ネット(ANN)(Jackson, R. B. a. T. Neural Computing : An Introduction, Hilger, New York, 1991; Zornetzer et al., An Introduction to Neural and Electronic Networks, Academic Press, San Diego, CA, 1990.)のアルゴリズムを用いて、これらのパターンを分析しうる。例として、血液または唾液分析において生じるパターンは、人間と動物などを例とする生態にたずさわる一定の正常状態または異常状態(例: 疾病、疲労、汚染、中毒)に匹敵しうる。

20

【0069】

さらにまた、発明にのっとり、非線形化学反応がANNアルゴリズムを手段として、検出だけでなく分析も実施できる知的マイクロフルイディック・システムを作り出すことが可能となりうる。例として、増幅後に、本発明による流路は典型的に、ヒドロゲル作動バルブを操作する材質を十分に含んでいる(Liu et al., "Fabrication and characterization of hydrogel-based microvalves," J. Microelectromech. Syst. 2002, vol. 11, pp. 45-53; Yu et al., "Responsive biomimetic hydrogel valve for microfluidics," Appl. Phys. Lett. 2001, vol. 78, pp. 2589-2591; Beebe et al., "Functional hydrogel structures for autonomous flow control inside microfluidic channels," Nature, 2000, vol. 404, 588.)。

30

【0070】

これらのバルブは、サンプルプラグ組成機能をもち、システム内部の流れを制御する手段となりうる。これにより、前送り網(feed-forward-network)が作り出され、分析の手段となりうる。同様に、(例として、ヒドロゲル・バルブで入力流れを制御することにより)逆送り網(feed-backward-network)さえも作り出され、分析の手段となりうる。このような非線形ネットワークは、流路接続により事前にプログラムされたパターンを認識する(Hjelmfelt et al., "Pattern-Recognition in Coupled Chemical Kinetic Systems," Science, 1993, 260, 335-337.)ためだけでなく、非線形ネットワーク自体を再構成することによりパターンを学ぶ手段となりうる(Jackson, R. B. a. T. Neural Computing : An Introduction, Hilger, New York, 1991; Zornetzer et al., An Introduction to Neural and Electronic Networks, Academic Press, San Diego, CA, 1990.)。このような知的マイクロフルイディック装置は、恐らく、完全に自律した検出・分析および信号処理を行うことが出来るなど、現代の生物学的システムおよび人工

40

50

システムによるものをしのご、前例無き能力を備えうるものである。

【0071】

また、発明による装置と方法は、分類を要し微量でのみ利用可能である何千もの新しい有生分子を識別する手段であるゲノミクスとプロテオミクスにおいて有用である。特に、ゲノミクスとプロテオミクスにおける成功事例として挙げられるのは、タンパク質結晶化に効果的な高度処理能力機構の需要増加である。X線の構造判定はタンパク質構造分類の主な方法として応用され続けている。しかしながら、結晶化作用を理解するための著しい努力にもかかわらず、その合理的な研究方法案のヒントとなる一般理論さえも発見されておらず、高分子結晶化作用の大部分は未だ実験的知識の分野として認識されるままである。結果として、タンパク質結晶に最も広く用いられている方法は実験的スクリーニングである。

10

【0072】

発明による装置と方法のアプリケーションを下記に続ける。例として、問題の多くは、高度処理能力の速度とタンパク質結晶化に携わるものである。タンパク質構造判定とタンパク質間の相互作用を量的に確認する場合、少なくとも次の技術的課題2項目が挙げられる。(1)ロボット工学技術の大部分は未だ、既存の方法を単にオートメーション化するだけであるにもかかわらず、多くの場合、小規模な研究所には賄えない金額を要する。そして(2)結晶化工程に対するさらに優れた制御能力を備える新しい概念による方式が必要とされる。さらに、結晶化試験のセットアップ(準備)と観察は、通常、秒単位から数日に及ぶ周期にわたり、マイクロリットル量以下という微量の流体処理に関係する。

20

【0073】

したがって、本発明による様々な装置と方法は、溶性・膜タンパク質の高度な処理能力を伴う結晶化の今までに無い効果的な手段を提供する設計がされている。発明によるシステムは、数千にわたる結晶化を分単位で試験できる簡易且つ経済的なセットアップ方を提供するだけでなく、結晶化に至る混合および核生成などの工程に関する独特な時間的管理を可能にする。また、本発明によるシステムは、核生成など短い時間尺度で生じる現象だけでなく、結晶成長など長期にわたる時間尺度で生じる現象を制御することにより、タンパク質結晶化を制御する手段となりうる。

【0074】

その上、本発明による装置と方法は、時間領域が 10^{-5} - 10^{-7} 秒という高度な処理能力・動力学・生物物理学的測定の手段となりうる。好ましくは、本発明による様々な装置と方法が必要とする各種溶液量は、約数ナノリットルから数マイクロリットルのみである。このような装置と方法のアプリケーションは、酵素反応動力学とRNAフォールディング、そしてナノ粒子分類・合成の研究に関係する。その詳細を後述する。

30

【0075】

(流路と装置)

発明の一態様として、出口とは別の入口を備える第1流路を備える1つ以上の基板をともなう装置が装置にはなされている。状況に応じて、第1流路と流体が伝達する1本以上の第2流路(又は分岐流路)、第1流路と流体が伝達する少なくとも1つの搬送流体貯水溝、第1流路と流体が伝達する少なくとも2つのプラグ流体貯水溝、そして基板内部の流体に連続的な圧力を加えるための手段も装置可能である。

40

【0076】

発明による装置は、少なくとも1つの基板を好ましくは備えている。

【0077】

基板は、プラグのトラッピングが生じえることを特徴とする流路に沿った、1つ以上の拡張部位または領域を備えうる。本発明による基板は多くの接続する流路を備えうる。

【0078】

装置は1つ以上の出口または吸込口を備えうる。また、各出口と吸込口は、水源または貯水溝と伝達しうる。入口と出口は、接続されている流路または貯水溝と流体伝達するかもしれない、または1つ以上のバルブを含んでいるかもしれない。

50

【0079】

いかなる手段においても流体を入口から流路へ導入することができる。典型的に、入口に入る流体の流量を制御できることを特徴とするシリンジポンプが手段となりうる。

【0080】

およそ同一サイズのプラグ又はプラグ形成領域内の流路断面とよく似たサイズの断面を備えるプラグがプラグ群により形成されるように、プラグ形成領域には通常、プラグ流体入口と搬送流体を含む流路の合流地点が備えられている。ある実施形態において、基板は複数プラグ形成領域を備える。

【0081】

異なるプラグ形成領域は各々、基板上の同一又は異なる流路に接続されてもよい。好ましくは、加圧されたプラグ流体が第1流路を通過する搬送流体の流れる角度で第1流路へ導入されるようにサンプル入口が第1流路と交差する。例として、T字型合流地点でサンプル入口と第1流路が交差する（例：サンプル入口が第1流路に垂直なるように〔つまり90度で〕交差する）のが好ましい実施形態。しかしながら、サンプル入口はいかなる角度でも第1流路と交差しうる。

10

【0082】

第1流路もまた、例えばT字形やY字形を形成しながら、別の合流地点または「分岐点」で2本以上の分岐流路と伝達しうる。

【0083】

用途に合わせて、他の形状および流路の幾何形状を用いてもよい。模範的な実施形態において、交差する流路間の角度は約60度～約120度の範囲内である。特定模範角度は45度、60度、90度、120度である。識別領域の精密な境界は必要ないが好ましい。

20

【0084】

本発明による第1及び分岐流路は、各別々に、直線または1つ以上の屈曲を備える。基板に関連する屈曲角度は約10度以上となりうる（好ましくは、約 135度・180度・270度または360度以上）。

【0085】

発明のある実施形態における基板は、プラグ形成領域またはその付近で第1流路と伝達する少なくとも1つの吸入口と、第1流路やプラグ形成領域の全範囲もしくは一部分の中にあるまたはこれらの領域に一致する検出領域と、検出領域を伴う検出器を備えている。ある特定の実施形態において、装置に2つ以上のプラグ形成領域が備えられているかもしれない。例として、分析ユニットが、第1プラグ形成領域で第1流路と伝達する第1吸込口と、第2プラグ形成領域で第1流路と伝達する第2吸込口（好ましくは第1プラグ形成領域の下流）とを備える場合に実施形態が実現する場合などがある。

30

【0086】

別の実施形態において、発明による基板は、搬送流体の加圧流が通過する第1流路と、プラグ形成領域で第1流路と交差しプラグ流体の加圧流が通過する2本以上の入口流路とを備える。

【0087】

好ましくは、これらの入口流路は並列しており、おのおの直角に第1流路と交差する。異なるプラグ形成領域から導入されるプラグの混合を特徴とする特定の実施形態において、入口流路が第1流路に沿って互いに隣接していることが好ましい。例として、第一流路の直径60 μm がプラグ形成領域またはその付近で30 μm に逓減(ていげん)しうる。それからまた、入口流路直径が約30 μm であるのが好ましく、且つ、プラグ混合が好まれる実施形態においては、第一流路が端から端まで入口流路直径とほぼ同等の距離(つまり約30 μm)で離れているのが好ましい。

40

【0088】

発明による実施形態においては、基板にもまた流路に沿う検出領域が備わっている。例えば、試剤のような化学物質に関する1つ以上の特性を分析するために、独立してまたは共に作用する複数の検出領域と検出器が備える。

50

【0089】

検出領域は、プラグ形成領域またはその下流の第1流路部の中にある又はそれと伝達もしくは一致する。実施形態を選別する際には、検出領域が、識別領域もしくは分岐点またはその上流の第1流路部の中にある又はそれと伝達もしくは一致する。検出領域の精密な境界は必要ではないが好ましい。

【0090】

発明による典型的な基板は、メイン吸収口下流にあるプラグ形成領域にある第1流路と伝達する1つ以上のプラグ流体入口に加えて、第1流路の一部であり且つ第一流路に直接供給または伝達する搬送流体入口を備える（個々の異なるプラグ流体入口が異なるプラグ形成領域で第1流路と好ましくは伝達する）。

10

【0091】

異なるプラグ流体または溶液から形成されたプラグの流れはいかなる順序においても開始されうる。例として、第1プラグ流体を含む水溶液の流れを、第1プラグ形成領域の第1入口から開始しうる。続いて、水性第2プラグ流体のプラグの流れを、第1入口下流の第2プラグ形成領域にある第2入口から開始しうる。

【0092】

（流路、基板、および装置の製作）

ソフトリソグラフィを例とする従来のフォトリソグラフィ（写真平版）技術またはマイクロ加工技術を用いてシリコン基板・チップまたは装置をエッチングすることにより、発明による基板と装置が製作される。ポリジメチルシロキサンを用いるマイクロフルイディック装置の製作は前ですでに述べられている。これらの製作およびその他の方法は、低コストの小型化された装置を提供する手段となりえ、ソフトリソグラフィの場合には、改善された柔軟性、安定性および機械的耐久性のような有利な特性を持つ強固な装置を提供する手段となりえる。好ましくは、光学的検出が用いられる場合、プラグ・搬送流体・および基板材質などから発する光拡散性が発明により最小限に保たれる。発明による装置は、比較的 low コストでセットアップが簡単である。

20

【0093】

発明による流路、基板および装置を製作する手段となりうる機械加工方法（例：マイクロ加工方法）は、その巧みな技術で世に知られており、回転塗布・化学蒸着法のような膜蒸着（膜形成）工程・レーザー製作またはフォトリソグラフィ技術・または湿式化学エッチング又はプラズマエッチングなどのいずれかに関係する。

30

【0094】

光学透明シリコーンゴム上またはポリジメチルシロキサン(PDMS) 上で（好ましくはPDMS上で）流路が成形されうる。これは、例として半導体製作において用いられる同タイプの結晶シリコンウエハーにこれらの流路の陰画をエッチングして流路を型鑄造することにより実行しえる。半導体機構をパターン化するのと同じ又は類似した技術が、流路パターンを形成する手段となりえる。流路製作の一方法として、硬化処理されていないPDMSを例としてベトリざら底に置かれた型に注ぐというものがある。好ましくは、硬化を促進するために型を焼成す。硬化後、PDMSは型から取り外されてトリミングされる。例えばコルクボーラーまたはシリンジ針のようなツールを用いてPDMSに穴加工しうる。表面に親水性をもたらすことが望まれる場合は、使用前にPDMS流路をHCl熱浴に浸してもよい。それから、流路の底あるいは床または上部を形成する手段となりうる顕微鏡カバースリップ（又は他の適切な平面状のいかなるもの）の上に、PDMS流路を設置することができる。

40

【0095】

発明による基板は、ガラスまたは重合体またはシリコン半導体集積回路素子またはシリコン・エラストマーのような材質から好ましくは製作される。

【0096】

例として、基板の寸法は 各側面約0.3cmから約7cm、厚さ約1ミクロンから約1cmに及ぶかもしれないが、これ以外の寸法が適合されるかもしれない。

【0097】

50

基板は通常、入口流路と流体伝達する吸込口の流体貯水溝または水源で構造しうる。貯水溝は、基板中および第1流路中への流体導入を好ましくは促進する。

【0098】

サンプルが装置内へ進入できるように、吸込口は基板の床のように開口が備えられているかもしれない。吸込口はまた、（流体供給管でありうる）Teflon（登録商標）パイプまたは液体クロマトグラフィーやHPLCパイプなどの適切な配管部品を接続するのに適合するコネクタを備えているかもしれない。このような処置は、プラグ形成領域で望まれる圧力を得るために、正圧流体の導入を促進することを目的とする。

【0099】

製作工程を経た流路と他の構成要素を含む基板は、（他の透明または不透明カバー材質も使用可能だが）好ましくは薄いガラスや水晶のような透明カバーで覆われ密封されていることが好ましい。精密且つ効率的な製作方法を確立すべく充実した開発が重ねられた技術であるという点で、シリコンは好ましい基板材質であるといえるが、ポリテトラフルオロエチレンのような重合体を含む他の材質を用いてもよい。流路、バルブおよび他の要素を備える分析装置は、様々な基板材質で設計し製作することができる。外部放射線源または検出器が使用される場合、流体への光学アクセスを可能にするために、検出領域は透明なカバー材質で覆われていることが好ましい。例として、シリコン基板をPYREX（登録商標）カバースリップと陽極結合するには、両構成要素を水性 $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 浴槽で洗浄してから水でゆすぎ、それから、一例として450Vの電圧をかけながら約350℃まで加熱することにより成し遂げることができる。

【0100】

サンプルの流れ・混合を目的とした様々な流路を基板上で製作することができ、これらの流路を検出点・識別点・または選別点として基板やチップまたは装置上のいかなる部位にも配置することができる。また、異なる時間・距離で検出器の視野に流体を入れるために、基板中に流路を設計することもできる。精密な時間・距離で流体の流れを融合または分裂するための流路を設計することもできる。

【0101】

一群のマニホールド（共通流路へ繋がる又は共通流路から繋がるいくつかの流路から成る領域）は、異なる分析ユニットから複数の分岐流路を通り適切な溶液出口に向かうプラグの動きを促進することに関係しえる。

【0102】

マニホールドは、異なるレベルの深さで基板内に好ましくは製作される。したがって、発明による装置は、各ユニットの分岐流路から溶液を集結し、溶液を出口へと導くマニホールドに送ることができる複数の分析ユニットを備えうる。出口は、例として配管のセグメントまたはサンプル管（例：標準の1.5ml遠心分離管）接続の受け側として適合しうる。またマイクロピペットを用いても集結操作が可能である。

【0103】

（プラグ形成方法）

発明による様々な流路、基板および装置は、主としてプラグ形成・操作のために使われる。

【0104】

好ましい実施形態において、プラグ流体が第1流路への導入時または導入前に著しい混合作用をしめさない。プラグ流体が、入口または入口前で別個の層流を形成しうる。それらは追加流体により分離されうる。

【0105】

あるいは、それらのプラグ流体は、異なるサイズの入口を経由して搬送流体に導入されうる。

【0106】

プラグ内のプラグ流体濃度は、プラグ流体の体積流量を調節することにより調節しうる。さらに、第1流路と分岐流路[複数可]の直径が異なりうる。

【0107】

図2Aは、流路の層流輸送とプラグ輸送を対比する概略図である。プラグ輸送を示す下図において(赤と青で印される)水性試剤2種は、仕切り(ディバイダ) 水性流により分離するところの層流を形成する。プラグ形成後、プラグ流体が混合する時点で、流展する油と共に3本の流れが流路に入る。一般的に、プラグ輸送中にプラグ流体の急速混合がプラグ内に生じる。それと対照的に、上図に示されるように、層流輸送では流体混合の激しい分散が徐々に生じる。上図において、 d_l が $d=0$ からの距離を示し、 U が流速を示すとして、所定の一点 d_l の時間 t を $t_1 = d_l / U$ から概算することができる。下図において、時間 t_1 は $t_1 = d_l / U$ から得ることができる。

【0108】

図2Bは、水プラグおよび油プラグ内混合(上部の略図と写真)、および水性プラグ流体のみを備える層流内混合(下部の略図と写真)を示す写真と概要図を示す。油(この場合は搬送流体)は基板の流路200番に導入される。油の代わりに層流による混合がなされる場合、水が(油の200番に相当する)207番の流路に導入される。201番と202番と203番の吸込口から(そして層流の場合は、204番、205番、206番の吸込口から)3本の水性プラグ流体が搬送流体に導入する。

【0109】

好ましいスキームとは、水性プラグ流体が、好ましくは短距離または最短距離で搬送流体に接する前に、共流するといったものである。好ましい実施形態において、共流するプラグ流体が横断する距離は流路幅とほぼまたは実質的に等しいとされる。

【0110】

上図が示す中央または第2水性プラグ流体は、淡水、緩衝液、溶媒、もしくは異なるプラグ流体でありうる。水性流体が搬送流体と接触する前に、中央の水性プラグ流体がまずは他の2本の水性プラグ流体を好ましくは分離する。したがって、間に入る(中央の)水性プラグ流体が搬送流体に接する前に、外部水性プラグ流体2本の反応または混合を防いだり、遅らせたり、最小限に抑えうる。非分岐流路に沿って継続すること、分裂後に流路内へ進入すること、別流路からのプラグと融合すること、または出口を通り基板の外に出ることが、プラグ形成領域で形成されるプラグには可能である。油の非存在下では、著しい混合が生じない又は単なる局所的な混合しか生じない状態において、水性プラグ流体が層流へと流れる状況が図2に表されている。これと対照的に、プラグ内でプラグ流体は大部分あるいは完全に混合する。

【0111】

図3は、水性プラグ流体と油(搬送流体)から $0.5 \mu\text{L}/\text{分}$ (上部の概要図と写真)と $1.0 \mu\text{L}/\text{分}$ (下部の概要図と写真)の流量で湾曲した流路内を流れるプラグ流れを示す写真と概要図を示す。このスキームは、滑らかなかどまたは曲線状に湾曲した流路に沿って流れる細長いプラグにおける試剤混合の増強を可能にする。3本の水性プラグ流体が個別の吸込口301番~306番に導入される間、搬送流体は基板上吸込口300番と307番に導入される。図2のように、好ましいスキームとは、プラグ流体が好ましくは短距離または最短距離で、搬送流体に接する前に、まず共流するといったものである。好ましい実施形態において、共流するプラグ流体(例: 水性プラグ流体)が横断する距離は流路幅とほぼまたは実質上等しいとされる。中央または第2水性プラグ流体は淡水、緩衝液、溶媒、またはプラグ流体を備えうる。そして、水性プラグ流体が搬送流体(この場合、油)と接触する前に、中央の水性プラグ流体が好ましくは最初に他の2本の水性プラグ流体を分離する。したがって、間に入る(中央の)水性プラグ流体は、油(又は搬送流体)に接する前に、2本の外部水性プラグ流体の反応または混合を防いだり、遅らせたり、最小限に抑えうる。

【0112】

図4は、油および複数プラグ流体の注入によるプラグ形成を図示する写真と概要図を示す。図4は別個のプラグ流体5本を示すが、一本のプラグ流体が5本未満又は5本以上のプラグ流体を別々に基板へ導入することもある。プラグ流体を形成する試剤または溶媒が異なるかもしれない、あるいは、それらのうちのいくつかは同一または類似するものかもしれ

ない。図2のように、水性プラグ流体が個別の吸込口401～405番に導入される一方、油は基板の吸込口400番に導入される。それから、水プラグは406番の出口を流れる。好ましいスキームは、水性プラグ流体が、好ましくは短距離または最短距離で、油に接する前にまず共流するといったものである。好ましい実施形態において、共流するプラグ流体が横断する距離は流路幅とほぼまたは実質上等しいとされる。1本以上の水性プラグ流体は、淡水、緩衝液、溶媒、またはプラグ流体を備えるかもしれない。そして、水性プラグ流体が油と接触する前に、少なくとも1本の水性プラグ流体が最初に少なくとも他の2本の水性流を分離することが好ましい。したがって、水性流が油に接する前に、間に入る少なくとも1本の水性プラグ流体が外部の水性流2つの反応または混合を防ぐかまたは遅らせるまたは最小限に抑えるとする。図5は、図4と類似して、いくつかの試剤が複数の入口から導入することができるマイクロフルイディック・ネットワークを示す。

10

【0113】

さらに、図5は、試剤4種（A、B、CおよびD）がプラグにより混合されるところの屈曲部を備える流路を示す。図5において示されるように、水性流が502番と504番と506番の吸込口に導入される一方、試剤A、B、CおよびDは501番と503番と505番と507番の吸込口に導入される。図5は、様々な混合段階におけるプラグを表している。様々な混合段階とは次のことを特徴とする。混合物50番は初期のA+B混合物に相当する。混合物51番は初期のC+D混合物に相当する。混合物52番は混合工程後のA+B混合物に相当する。混合物53番は混合工程後のC+D混合物に相当する。そして、混合物54番はA+B+C+D混合物に相当する。

20

等式

$$C.n. = U\mu/\gamma \quad \text{Eqn. (1)}$$

から算出されるキャピラリー数 $C.n$ が低数値の時に、選択的プラグ形成が生じる。等式（1）において、 U は流速、 μ はプラグ流体または搬送流体の粘度、そして γ は水と界面活性剤の界面における表面張力である。

【0114】

異なる粘度または本質的に同一粘度の溶媒によって、プラグが形成されうる。好ましくは、実験または反応において使われる条件とパラメーターは、キャピラリー数値結果が約0.001 $C.n.$ 約10の範囲内におさまるものとする。好ましくは、粘度や速度などのパラメーター設定値はプラグ形成が確実に行われるようなものとする。理論に関わらず、流れが停止しない限り $C.n.$ は約0.2となり、そしてプラグ流体・搬送流体界面の表面張力が溶液と壁の接触面の表面張力より低い限り、プラグ形成が持続すると考えられている。流れが停止した場合、 $C.n.$ は0である。

30

【0115】

搬送流体にパーフルオロデカリンが使われプラグ流体が水性であるところの一実施形態において、当システムを $C.n.$ 値約0.1 (300 mm s^{-1}) まで操作しえることが発見された。このシステムにおいて、 $C.n.$ 値が約0.2以上に上昇した時点でプラグ形成が不規則になった。パーフルオロデカリン粘度は $5.10 \times 10^{-3} \text{ kg m}^{-3} \text{ s}^{-1}$ で、プラグと搬送流体の界面における表面張力は $13 \times 10^{-3} \text{ N m}^{-1}$ であった。

【0116】

プラグ流体と搬送流体の割合変化、またはプラグ流体と搬送流体流れの相関的体積流量の変化などの技術により、そのサイズが、例として、流路断面寸法(d が流路の断面寸法であるところの「 d 」)の約1～4倍となるように、プラグの長さを制御することができる。水性流の流量が搬送流体より低い場合に短いプラグが形成される傾向がある。プラグ流体流量が搬送流体より多い場合に長いプラグが形成される傾向がある。

40

【0117】

ある近似値において、 d が流路断面寸法であるところの $2xd^3$ とプラグ量が等しくなる。したがって、例をとると、約16ピコリッター(pL)から16ナノリットル(nL)のプラグ量に相当する 20×20 から $200 \times 200 \mu^2$ の横断面積を伴う流路において、プラグを形成することができることになる。流路サイズは、約 $500 \mu\text{m}$ (量に換算すると約250nLに相当)またはそれ以上に増大しうる。流路サイズは、例として、 $1 \mu\text{m}$ (量に換算すると約1フェムトリッ

50

トルに相当)まで縮小しえる。大きなプラグが、特にタンパク質結晶化のような特定のアプリケーションにおいて有用である一方、小さなプラグは、超高速での反応速度測定のようなアプリケーションにおいて特に有用である。

【0118】

好ましい実施形態において、プラグは個々の容量を維持しながら、流路のサイズと形状に順応(一致)する。したがって、プラグは、幅の広い流路からより狭い流路へ移動するにつれて、好ましくはより長くより薄くなり、その逆もまた同様である。

【0119】

プラグ流体は、溶媒と、状況に応じて反応原系を備えうる。発明における手段に適した溶媒は、プラグ流体で使われているようなものであり、有機溶媒、水性溶媒、油、あるいはメタノールとエタノール、メタノールおよび水などを例とする同一または異なるタイプの溶媒混合物に関係する。発明による溶媒は、極性・無極性溶媒に依存する中極性のものを含む極性溶媒・無極性溶媒に関係する。好ましい実施形態において、超純水(例: カラムクロマトグラフィーを例とする18M Ω の固有抵抗)、10mMのトリスHClおよび1mMのEDTA(TE)緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水または緩衝酢酸溶液を、溶媒としてもよい。試剤と互換性をもつその他の溶媒を使ってもよい。

10

【0120】

発明における手段に適した反応原系は、合成した小型分子、生体分子(例: タンパク質、DNA、RNA、炭水化物、糖分など)、金属と金属イオンなどに関係する。

【0121】

20

プラグ内試剤濃度は変更可能である。発明によるある実施形態において、大半のプラグが単一分子以上または粒子以上のものを含まないように十分なレベルの薄さに試剤濃度を調整しうる。これにより、プラグが2つ以上の分子または粒子を含む確立がわずかとなる。他の実施形態において、プラグ流体の試剤濃度は、反応生成物を最大限にするのに十分な濃度に調節しうる。

【0122】

油を含む搬送流体、好ましくはフッ素添加された油を含む搬送流体が適している。例として、パーフルオロデカリン(perfluorodecaline)またはパーフルオロペルヒドロフェナントレン(perfluoroperhydrophenanthrene)のような粘性流体、パーフルオヘキサン(perfluorohexane)のような非粘性流体、そしてその混合物(搬送流体とプラグ流体の粘度調和に特に有用)などが挙げられる。

30

【0123】

フルオリナーツ(Fluorinert)液体TM(3M社, St. Paul, MN, USA)のような市販のフッ素添加化合物を使用してもよい。

【0124】

搬送流体やプラグ流体、またはその両方は、表面張力を低下させる物質(例: 界面活性剤)等の添加物を含みうる。プラグ流体内に界面活性剤を含むことが望ましくない場合、プラグ流体と相対する搬送流体の中に存在する他の溶性物質もまたその手段となりうる。界面活性剤は、プラグのサイズ、流れおよび均一性の制御および最適化を促進する手段となりうる。

40

【0125】

例として、界面活性剤は、交差する流路へのプラグ押出成形または注入に要されるせん断力を低下させる手段となりうる。界面活性剤は、プラグ容量や周期、または交差する流路にプラグが離脱する割合または頻度に影響を及ぼすかもしれない。さらに、界面活性剤は、流体によって流路壁の湿潤性を制御する手段となりうる。発明による一実施形態において、プラグ流体の少なくとも1つは、界面活性剤を少なくとも1つ備えている。

【0126】

手段となりうる好ましい界面活性剤の例としてはこれらに限定されないが、搬送・プラグ流体と互換性をもつなどを特徴とする界面活性剤が挙げられる。

【0127】

50

典型的な界面活性剤として、TweenTM、SpanTM、ZonylTM(デュボン社、Wilmington, DE, USA)などのフッ素添加界面活性剤が挙げられる。例として、搬送流体がフッ素添加流体で、プラグ流体が水溶液である場合、親水基をもつフッ素添加界面活性剤が好ましい。

【0128】

しかしながら、界面活性剤の中には、そのアプリケーションによって、それほど望ましくないものがありうる。例えば、水性プラグが、(生化学反応を含む)化学反応マイクロリアクターとして、または生体適合物質の分析かつまたは選別に使用される場合、SDSのような水溶性界面活性剤によりプラグ内容の特性が奪われるまたは不活性化することがありうる。

【0129】

搬送流体がプラグよりも流路の壁を優先的に湿潤することが好ましい。この条件が満たされる場合、通常、プラグは流路の壁に接することなく搬送流体の薄い層により壁から離されたままの状態となる。この条件下で、プラグの安定性が保たれ、その流路に残留物を残さない。好ましくは、適切な界面活性剤の選択などにより表面張力を設定することで、プラグ流体よりも優先的な搬送流体による流路壁の湿潤が達成される。好ましくは、プラグ流体 - 流路壁界面における表面張力(例：水 - PDMS界面における表面張力約38 mN/m)は、プラグ流体 - 搬送流体界面の表面張力(例：搬送流体パーフルオロデカリンに含まれる10%の1H,1H,2H,2Hパーフルオオクタノール〔perfluorooctanol〕などの界面活性剤を伴う水 - 搬送流体界面における表面張力約13mN/m)よりも高い設定となる。この条件が満たされない場合、プラグは、流路壁に吸着し、円滑な輸送が行われない傾向にあり(例：1H,1H,2H,2Hパーフルオオクタノールの非存在により、水 - パーフルオロデカリン界面における表面張力が55mN/mで、水 - PDMS界面の表面張力〔例：約38 mN/m〕より高数値)、その結果、プラグはPDMS流路の壁に吸着する。

【0130】

フッ素添加界面活性剤の導入時、流路(PDMS、フッ素添加無し)と搬送流体(フッ素添加油)の壁が、化学上本質的に異なるため、壁 - 水界面上において、界面活性剤が油 - 水界面の表面張力を選択的に低下させる。

【0131】

これにより、流路壁に付着しないプラグの形成が可能になる。

【0132】

懸滴方法として知られるものを手段として(他の方法を手段とする場合もあるが)界面における表面張力を測定しうる。せん断によりプラグの破滅を避けるのに十分な表面張力が好ましい。

【0133】

プラグ流体と搬送流体は1つ以上の入口から導入されうる。特に流体は、プラグ流体または搬送流体のいずれかを含む空圧作動シリンジ貯水溝を通して基板に導入されるかもしれない。プラグは相対応力の変更により搬送流体において生成されるかもしれない。プラグ流体がプラグ形成領域内の搬送流体と接触後に分離したプラグへと剪断変形する。

【0134】

発明において、プラグ形成領域で、第1流路を通過する搬送流体の流れにプラグ流体を導入することによりプラグが形成される。圧力差によるもの、または弁作用によるものなど、望ましい流れ制御のいかなる方法を用いても、流れの応力と方向を制御することができる。これにより、1つ以上の望ましい分岐流路または出口にプラグを移動させることが可能となる。

【0135】

発明による好ましい実施形態において、物理的または化学的特性・標識・特質またはタグの検出または測定に基づき、ミクロレベルの流れにおいて1つ以上のプラグは力学的に検出・分析・分類・または選別される。

【0136】

第1流路の流れは、必ずしもではないが一般的に、連続的であり、停止・開始・反転・

10

20

30

40

50

速度変更等の動向を示しうる。選別に先立って、非プラグ流体は、(入口の水源または流路等の)サンプル吸入口へと導入され、使用に向けて装置を水和・調整するためにプラグ形成領域を通して(例:毛管作用によって)誘導される。同様に、(例:「停滞」空気の)基板を取り除き使用に向けて調整するために、緩衝液または油もまた、第1流路と直接伝達するメイン吸入口に導入することができる。望ましくは、例として出口に緩衝液または油を加えることによりその圧力を調節または均一化することもできる。

【0137】

例として吸入口に送られる加圧シリンジを伴うメインおよびサンプル吸入口での圧力調節により、プラグ形成領域圧もまた調整することができる。プラグ形成領域で油と水の流量差を制御することにより、生成されたプラグのサイズと周期を調整しうる。あるいは、プラグ形成領域に入る溶液の流れを制御することによりプラグサイズと周期を制御しているプラグ形成領域のサンプル吸入口、又はそこへ接続されているサンプル吸入口の、どちらにもバルブを設置または適合しうる。

10

【0138】

周期およびプラグ容量はまた、流路直径かつまたは流体粘度に依存するかもしれない。

【0139】

(プラグ内混合)

図7(a)-(b)は、同値の総流速にて屈曲流路を通るプラグ内急速混合(a)と層流内のごくわずかな混合作用(b)を図示するマイクロ写真(10p.s露光)を示す。水性流は、図7(a)-(b)に示される吸入口700番~705番に導入された。図7(c)と7(e)において、Fluo-4は吸入口706番と709番に導入され、緩衝液は吸入口707番と710番に導入され、CaCl₂は吸入口708番と711番に導入された。図7(c)は緩衝ナトリウム・モルホリノプロパンスルホン酸水溶液(aqueous sodium morpholinepropanesulfonate buffer) (20 μM、pH 7.2)内のFluo-4溶液(54 μM)とCaCl₂溶液(70 μM)から成るプラグ内部の急速混合により生じる時間平均された蛍光性を示す偽色彩法マイクロ写真(2s露光、個々のプラグは見えない)を示す。この緩衝液は中間水性流としても用いられた。図7(d)は、プラグを通り移動した距離の関数(左)と所定流量でその距離を移動するのに要した時間の関数(右)に基づき、画像から得た相関的且つ正規化補正後の蛍光強度(I)の線グラフを示す。全流路幅にわたる強度が測定された。「PFD:水」の総体積流(μL min⁻¹の流量)は、0.6 : 0.3、1.0 : 0.6、12.3 : 3.7、10 : 6、20 : 6であった。図7(e)は、(c)で使用された溶液の層流における小規模な混合から生じる弱い蛍光性の偽色彩法マイクロ写真(2s露光)を示す。全流路の深さは45 μm。吸入口流路の幅は50 μmで、屈曲流路の幅は28 μm: Re (レイノルズ数) -(約)5.3 (水)、-(約)2.0 (PFD)。

20

30

【0140】

図8は、各階段の屈折角度が90°の階段流路において約0.5 μL/分(上部の概要図と写真)と約1.0 μL/分(下部の概要図と写真)の流量における急速混合を図示する写真と結線図を示す。その一方、図9は、各階段の屈折角度が135°の階段流路において約1.0 μL/分(上部の概要図と写真)と約0.5 μL/分(下部の概要図と写真)の流量における急速混合を図示する結線図と写真を示す。

40

【0141】

搬送流体が流路806番と807番(図9の流路906番と907番)に導入される一方、水性流は図8の吸入口800番~805番(図9の吸入口900番~905番)に導入される。その時に形成されるプラグは、出口808番と809番(図8)そして出口908番と909番(図9)を通る。図8と図9に見られるように、(他の流路にみられる急カーブと比べて比較的)なだらかなカーブを伴う流路ではなく、多重階段を伴う流路に沿ってプラグが輸送されている。このような多重階段型流路の利点は、プラグ内部の物質混合をさらに促進しうるということである。

【0142】

混合を加速または改善する手段となりうるアプローチがいくつかある。これらのアプローチは、混合制御機能を備える幾何学様式により流路を設計する手段となりうる。流動プラグ内部流れと対称する直線流路移動中のプラグ内部流れが相違するように、前者を摂動

50

させることにより、流れを制御することができる。

【0143】

例として、流路の幾何学様式の変化(例：屈曲流路の適用)、プラグ流体の組成変化(例：粘度変化)、搬送流体の組成変化(例：プラグ形成の粘度または表面張力が異なる搬送流体層流のいくつかを適用する—この事例においては典型的に混合に対する影響が及ぼされ、他の場合には増強作用が生じる)、さらに、流路壁のパターン変化(例：親水性・疎水性あるいは差動荷電パッチ〔patches〕が流動中のプラグと相互作用し、その内部の混合増強をもたらすべく時間周期的な流れを誘導すること)により、流れの撓動をもたらすことができる。

【0144】

プラグ内の混合を増強するために、様々な流路設計を実装することができる。

【0145】

図1Aは基本的な流路設計の略図を示し、図1Bは基本的な流路設計の一連の周期的変化を示している。図1Cは、図1Aにおいて示される基本設計要素と、図1B(1)―(4)において示される一連の周期的変化に基づく代替要素のシーケンスにより生じる一連の非周期的組み合わせを示す。これらの周期的変化による影響を可視化した場合、その非周期的組み合わせは周期的な流れから生じる対称性を、好ましくは無効にする手段となる(図1Cを参照)。ここにおいて、関連するパラメータは、チャンネル幅、流路幅、周期、曲率半径、および曲り方向に基づく曲りのシーケンスである。基本設計のパラメータを、 c = 路幅、 l = 周期、そして r = 曲率半径のように定義する。基本設計において、「左」と「右」が流路内のプラグ経路に沿う中心線と相関関係にあるところの(左、右、左、右)としてシーケンスを定義することができる。

【0146】

図1B(1)-4は、基本設計における一連の周期的変化の概要図を示す。図1aのパラメータ定義に基づいて、少なくとも1つの可変パラメータを定義するのが好ましい。図1B(1)において、チャンネル幅は $c/2$ である。図1B(2)において、周期は $2l$ である。そして、図1B(3)において、曲率半径は $2r$ である。図1B(4)において、曲率半径は $r/2$ 、シーケンスは(左、左、右、右)。

【0147】

図1C(1)-(4)は、図1B(1)―(4)における周期的変化の一連要素と図1Aにおいて示される基本設計要素を組み合わせることにより形成された、一連の非周期的組み合わせの概要図を示す。図1C(1)において、図1Aで示される基本設計の周期(ここにおいて「 a 」と表記)と、図1B(1)で示される代替の流路周期パターン(ここにおいて「 b 」と表記)は、 $a + b$ 、 $1 + a + \dots$ から得られる。図1C(2)において、非周期的組み合わせは $b + 2a$ から得られる。図1C(3)に示される流路(ここにおいて「 c 」と表記)において、非周期的組み合わせは $c + 3a$ から得られる。図1C(4)に示される流路(ここにおいて「 c 」と表記)において、(右・左)シーケンスが特異性を持つパターンで導入され、通常(左、右)シーケンスの反復が観察される。この特異性を加えることによって、(左、右、左、右)+(右、左)+(左、右、左、右)というシーケンスになる。

【0148】

混合作用を加速する別のアプローチとしては、ベーカーによる変態の(補助)定理として知られるものを応用し、マイクロフルイディック・チップ上の合理的設計を伴うカオス的な流れに依存するものがある。

【0149】

ベーカーによる変態の(補助)定理による急速混合を達成するにあたり、流体の方向転換は重大な要素となる。ベーカーによる変態の(補助)定理によると、アンフォールディング(引き伸ばし)とフォールディング(折りたたみ)のシーケンスが、2つの構成要素の光条厚さ(混合が拡散によって生じなければならない距離)の指数関数の減少をもたらす。あらゆるフォールディング-アンフォールディング作用において、(異なる数値の場合もあるが)一般的に因数2の数により光条厚さを低下させる。理想的条件において、光条厚さ(S

10

20

30

40

50

T)は下の等式(2)で表すことが出来る。したがって、理想条件下において、シーケンスn数のフォールディング・アンフォールディング・方向転換作用で、

$$ST(t_n)=ST(t_0) \times 2^{-n} \quad \text{Eqn. (2)}$$

により得られる指数関数の減少が光条厚にもたらされる。等式(2)において、 $ST(t_n)$ は t_n 時の光条厚さ、 $ST(t_0)$ は t_0 時の初期光条厚さとして示され、nはフォールディング・アンフォールディング・方向転換作用の数を示す。

【0150】

発明にのっとって、ベーカーによる変態の(補助)定理は、直線領域と急な曲りを伴うシーケンスから成る流路を作り出すことにより好ましくは実装される。図11は、マイクロフルイディック流路を流れるプラグのベーカーによる変態の(補助)定理を実装し可視化することを目的とした流路の幾何学設計の概要図を示す。他の設計もまた手段となりうる。流路屈曲角度およびその直線部長さは、表記されている流れ方式に対応する最適な混合作用を生じさせることを前提に選択される。関連する特定の用途または反応に応じて、異なる直線経路長さおよび異なる屈曲を適用することができる。

【0151】

(ベーカーによる変態の補助定理の一周期に匹敵する)流路の直線部112番と急な屈曲部111番のペアをそれぞれ流動するプラグには、一連の方向転換とアンフォールディングおよびフォールディング作用がもたらされる。流路直線部において、プラグ流れは通常の再循環流となる。急な屈曲点では通常、プラグが波動し、その結果、方向転換をもたらす。これは、急な内角の勾配圧力が高くなるに高く、外部の壁に沿う移動経路がより広範のために起こる現象である。ベーカーによる変態の(補助)定理に基づく当混合法は非常に効果的であり、したがって、好ましい混合タイプの一例として挙げられる。特に、この種の混合は、拡散による試剤混合に要される時間を速やかに削減することを可能にする。

【0152】

流量限界が典型的に流路サイズに依存しないキャピラリー数(C.n.)によって設定されるので、異なるサイズの流路でほぼ均一の流量にてプラグ形成を維持することができると考えられている。定流量時の混合時間(t_{mix})は、流路サイズ(d)の縮小に伴って減少するかもしれない。第1に、大型・小型流路両方の試剤を混合するには、同n数のフォールディング・アンフォールディング・方向転換サイクルが要されると推定される。当仮定(n=5)は、前に測定した $d=55$ マイクロメートル(μm)と $d=20$ マイクロメートル(μm)の流路における混合の場合とほぼ一致する。各サイクルにおいて、プラグがプラグ長さの約2倍の距離(約3d)以上移動する必要がある。それ故に、15dを移動する時間とほぼ等しい混合時間、および流路サイズ($t_{mix} \sim d$)とともに直線的に減少することが推測される。25- μm の流路において約1msで混合できる方法を手段とし、好ましくは1- μm の流路において約40 μs での混合が可能になる。

【0153】

マイクロ秒単位の混合時間を達成するには、通常、小型流路を使う必要がある。

【0154】

小型流路により流れを送るためには、通常、高圧が必要とされる。

【0155】

理論に関わらず、理論モデリングは、直径dの流路で混合が生じるたのに必要とされるおおよそのサイクル数(往復動数)は、

$$n \times 2^{2n} \quad dU/D \quad \text{Eqn. (3)}$$

から得られる。等式(3)において、nはサイクル数、Uは流速、Dは拡散定数を示し、一サイクルは6dに等しいと想定され、さらに、対流と拡散の時間尺度が一致するときに混合が生じるとする。混合時間は、主としてサイクル数によって定められる。当結果は、混合が、単に流路直径に正比例して加速されるのではないだろうことを示す。例として、dが因数10の数により減少するとき、混合時間は $d \times \text{Log}(d)=10 \times \text{Log}(10)$ の因数により減少する。設計が適切になされている流路の場合、1 μm 流路の混合時間は約20 μs に制限されるかもしれない。しかしながら、(タンパク質結晶化等に関係する)低流量又は長い流路の場合でさ

えもなお、著しい混合が生じえる。さらに、理論に関わらず、因数10の数による流量Uの増加は、因数 $\text{Log}(U)/U = (\text{Log}(10))/10$ の数による混合時間の減少につながると推測される。

【0156】

発明による流路での混合作用を可視化するために、マーカ色素(a colored marker)を単一のプラグ流体に用いることができる。プラグ内マーカ色素の初期分布は、細目にわたるプラグ形成要素に強く依存することが認められている。移流する搬送流体への不動水性プラグ押出成形時に、搬送流体とプラグ流体の相互作用に対する剪断変形が、渦を引き起こし、この渦によりマーカ色素が異なるプラグ領域に再分布された。この渦の形成をここで「旋回(twirling)」と呼ぶ(図27bを参照)。旋回が本質的にあらゆるRe値と速度で認められたため、旋回はレイノルズ数(Re)が高値の場合にのみ生じる現象ではないといえる(図30を参照)。しかしながら、この渦流れ方式は、速度によって多少影響されるようである。

10

【0157】

旋回の様々な特性と行動が認められた。旋回は、プラグの方側から反対側に(例：プラグの右側から左側に)輸送することによりマーカを再分布した。最小限の強度変動が認められた時点、つまり、マーカがプラグ一帯に平等に分布された時点で、最も効果的な混合が認められた。研究対象となったあらゆる長さを伴うプラグの形成において旋回が認められた反面、混合工程における旋回の重要度はプラグの長さに依存するということも認められた。例として、長いプラグより短いプラグに伴う旋回の方がはるかに激しいということが認められた。

20

【0158】

また、長いプラグの場合、旋回の影響はわずかな部分にのみ及び、プラグ内マーカ分布への影響もわずかであることも認められた。それ以上に、形成中プラグ先端がマイクロチャンネル壁の右側に接触する前の地点では、旋回がその先端でのみ生じた。

【0159】

また、プラグにおける旋回量は、先端を通過した搬送流体量と関係あるということが認められた。旋回およびその混合作用への影響に関する実験結果によると、直線流路を移動するプラグ内混合発生に対する理想的条件を定める際に、旋回は(最も重要な要素であると断言できないとしても)最も重要な要素の1つであるということが判明した。なぜなら、旋回を引き起こすことによって混合を促進、旋回を防ぐことによって完全混合を抑えうるからである。

30

【0160】

混合の抑制は、(図5と図6において示されるもの例とする)いくつかの反応スキームにおいて重要でありうる。試剤Bに試剤Aを混合する際、そしてまた試剤Dに試剤Cを混合する際に、全4試剤すべてをいっぺんに混合せずに、選択的に各ペアを混合することが、これらの反応スキームにより可能になる。後に、例としてプラグが流路屈曲部を移流する際に、全4試剤すべての混合作用が生じる。当アプローチにより、いろいろな反応を異なったタイミングで生じさせることが可能になる。さらに、プラグ流体間の界面(例として、タンパク質結晶化方法に要される界面(図20))が生成されなければならない場合に、混合を抑えることが重要となりうる。

40

【0161】

形成中プラグ先端の渦により、混合の可視化と分析が複雑となるかもしれない。この渦は、短いプラグの場合に通常大きな影響をもたらすが、長いプラグの場合はわずかな影響しか及ぼさない。混合の可視化に係るアプリケーション用基板には、細長いプラグが形成されるようにプラグ形成領域に狭い流路を備える設計がなされている。プラグ形成領域の直ぐ下流で、流路寸法が拡張するのが好ましい。流路[複数可]の拡張領域で、表面張力によりプラグが拡張し、短い球形となる。これにより、プラグ内部のマーカ分布が維持される。

【0162】

50

当アプローチは、様々なサイズを伴うプラグの内部混合を比較的容易に可視化するための手段を提供する。ビデオ顕微鏡は水滴に含まれるマーカ色素分布の観察手段となりうる。共焦点顕微鏡もまた標準的な蛍光マーカ三次元分布を可視化する手段となりうる。

【0163】

$aCa^{2+}/Fluo-4$ 反応により、可視化を補足または確認することができる。当反応は、ミリモル単位の濃度で約1 μs の半減期を伴って生じると推測される。したがって、約10 μs またはそれ以上の時間尺度で生じる混合を測定する手段となりうる。

【0164】

プラグ内流れに関する三次元可視化の少なくとも一方法が次の議論において説明されている。三次元におけるカオスの輸送の可視化は、特に小規模の場合、非常に難しい作業である。二次元システムを用いて予測を生み出すことにより、三次元のマイクロフルイディック流路を移動するプラグに関する見識を得ることができるかもしれない。二次元システムに関係する実験とシミュレーションは、二次元の液体プラグ内のカオスの流れを確実にする流路の設計に役立てることができる。共焦点顕微鏡検査は流路の安定した継続的な三次元の流れを数量化する手段として使われてきた。しかしながら、共焦点顕微鏡などの光学機器には器械的制限があるため、高解像度での観察、例としてカオスの流れの自己相似的次元分裂構造特性を高解像度で観察するために、流れを十分に可視化することができない可能性がある。それでもやはり、全面的な流れのダイナミクスを捕らえ、(島状に分布した)非カオスの局所領域の非存在を確認しうる。好ましくは、可視化の過程で対象となる流路(周期的または非周期的)はPDMSのソフトリソグラフィを手段として製作される。PDMSレプリカ(複製)は、共焦点顕微鏡を使って流れを観察するために、ガラス製の薄いカバースリップにより密封されるのが好ましい。

【0165】

発明による一実験において、一連の回線走査により、プラグ内部の蛍光マーカ三次元分布の画像を得ることができる。図10aは、プラグ内カオスの流れを三次元共焦点で可視化したものを示す概要図である。プラグは3つの層流から形成されるのが好ましい。中間流1番は蛍光マーカを含んでいることが好ましい。

【0166】

好ましくは、中間流11番は体積流量が低い状態で流路システムに注入される。マーカの流れを流路における適切な部位に置くために、二面流10番・12番の体積流量を調節するのが好ましい。

【0167】

カール・ツァイスLSM 510のような共焦点顕微鏡を手段とするのが好ましい。LSM510は、約0.38ms/512ピクセルまたは約0.2ms/100ピクセルの線における回線走査能力を備える。拡散による干渉が最小限の状態における流れを可視化するために、好ましくは約0.2 μm の蛍光性微小球体および蛍光的に標識付けされた高分子量の重合体を手段とするのが好ましい。幅100 μm 、深さ100 μm といった寸法の流路が手段となりうる。回線走査技術は、長さ約800- μm の油流れにより分離している長さ200- μm のプラグを伴うものなど、様々なシーケンスに応用されうる。

【0168】

ビームをxとz方角に固定しy方向に沿って前後に繰り返し走査するのが好ましい。x方角へのプラグの動きが、好ましくはx方向に沿う解像度を提供する。幅100 μm の流路を横切る100ピクセルの回線走査はy方向に約1 μm /ピクセルの解像度を提供する。約1 μm /ピクセルの解像度をもたらすために、回線走査を一プラグ当たり約200回実施することが好ましい。約2000 μs /秒で移動する200 μm のプラグの場合、 $(200 \mu m)/(2000 \mu m/\text{秒}) = 0.1$ 秒または線一本に当たり約0.5 msで実施されるのが好ましい。

【0169】

* 図10bにおいて示されるシーケンスは、三次元のカオスの流れを可視化する手段となるのが好ましい。プラグが約500 μm で移動できるように、走査間隔に約0.3msの遅延を伴い、各回線走査に約0.2msかかるのが好ましい。プラグが約0.2 μm でx方向に移る時に、あ

る程度の光学的歪が約0.2msの走査中に生じるかもしれない。しかしながら、これらの歪みは適用手段の解像能力に相応すると認識されている。x方向の所定位置において、プラグ10本分のx-y断面をとるためにz方向に沿う各点において約10秒間、一連の回線走査を実施することが好ましい。プラグ内の蛍光マーカ分布の全面的な三次元画像を得るために、z方向走査を1 μ m間隔で行うことが好ましい。プラグが流路に沿って移動時のプラグ内蛍光マーカ三次元分布の変化などの情報を取得するために、x方向にある異なる位置で当方式を繰り返すことが好ましい。

【0170】

周期的摂動の場合には、上記の方式により回復されたy-z面プラグの蛍光断面は、ポアンカレ断面を表わし、初めの薄い色素層の発展に対応する。小型プラグの形成に際する水相旋回によりプラグ全体にわたり過度な色素が分布され、可視化の確実性を低下しかねない。プラグ形成領域に小さいネックを設計し、それから第一方向転換を下流方向において開始することにより、このような旋回を防ぐことが好ましい。当アプローチは、流れの可視化に効果的に実用されており、反応誘導管理に有用でありうる。

【0171】

(プラグ融合)

本発明は、さらに基板内におけるプラグの融合方法を提供する(図12の上を参照)。プラグは前述で説明されたように形成される。異なるプラグ流体を個別に流路へ導入することにより異なる試剤を含むプラグを形成することが可能である。異なる試剤を含む複数のプラグは、本質的に類似する又は異なる粘度を有するかもしれない。異なる試剤を含む複数のプラグは各々、本質的に類似する又は異なるサイズを有するかもしれない。異なる試剤を含む複数のプラグの相対速度が異なるという条件の下に、これらのプラグが流路において融合する。様々な方法で融合地点を制御することが可能である。その方法例として、プラグ流体入口の位置変化によるもの、(流体を形成するプラグの1つを第2流路へ導入する場合)流路合流地点の位置変化によるもの、プラグのサイズ変化によるもの、本質的に同サイズのプラグの粘度または表面張力変化によるもの、異なるプラグ集合体の輸送速度調節によるもの、などが挙げられる。

【0172】

図12(上欄の写真)で示されるように、プラグ120番・121番がT字形の流路あるいはT字形の流路領域を通過するように導くまたは通過することを可能にすることにより、プラグを融合しうる。結果として融合したプラグ122番は、個別の流路またはそれに垂直(図12)または非垂直(図33)でありうる流路分岐を流れる。融合プラグ122番にさらなる融合あるいは分裂が生じるかもしれず、もしくは、一種以上の特性化・測定・検出・選別(分類)・または分析など1つ以上の反応または「処理」が同プラグに帰されうるところの、基板上にある別の流路・流路分岐・範囲または領域へと同プラグを導きうる。

【0173】

一実施形態において、大小のプラグが個別の流路またはそれらが融合する共通流路に向かう流路分岐を流れる。大型(大きい)プラグが小型(小さい)プラグより速く流れるため、大型プラグと小型プラグが同地点で同時に合流しない場合は、大型プラグが小型プラグに追いつき互いに融合するという過程を経てから最終的に融合プラグが形成される。大型プラグと小型プラグが同地点あるいは領域でまともに真っ向から合流した場合、それらが即結合し融合プラグが形成される。融合プラグに分裂(下記に説明)あるいはさらなる融合が生じるかもしれず、もしくは、一種以上の特性化・測定・検出・選別(分類)・または分析など1つ以上の反応または「処理」が同プラグに帰されうるところの、基板上にある別の流路・流路分岐・範囲または領域へと同プラグを導きうる。

【0174】

他の実施形態において、二つのプラグがほぼ同時に流路共通点・部位・又は領域に到達し単一プラグを形成するように、その流路合流点・部位・又は領域に向かって流れるプラグの到達時間を制御することによりプラグ融合が可能になる。

【0175】

10

20

30

40

50

他の実施形態において、弓形・半円形・又は円形流路は、プラグ融合の効率を向上する手段を提供する。故に、例として、よりコンパクトな基板の範囲あるいは領域内においてより多くの頻度で融合が生じることになる。当スキームにおいて、弓形・半円形・又は円形流路又は流路分岐が本来違相にあるプラグの対(ペア)を同位相に存在するプラグの対に変換するため又はその変換補助するため、共通流路に向かい個別の流路を流れるプラグを従来よりも短い距離あるいは短い時間で融合しうる。

【0176】

特に、弓形・半円形・又は円形流路又は流路分岐により遅れプラグが先行プラグに追いつき、融合することが可能になり、それによって、一定期間または基板上の一定範囲または領域において融合するプラグ数を増加させることになる。

10

【0177】

(プラグの分裂かつまたは選別)

本発明はさらに、基板内プラグ分裂方法を提供する。第2流路がプラグ形成箇所下流にある開口(経路)を通して、プラグの始部を第2流路へ送ることによりプラグを分裂することが可能である、あるいは、流路の「Y字型」交差点でプラグを分裂しうる。両実施形態において、元のプラグは始部と別の部分に分かれて分裂する。そしてその後、各片は個別の流路(あるいは出口)へと送られる。一旦形成されたプラグが分割、あるいは、融合されたプラグが分裂しうるかのどちらかである。図6は、複数の入口(試剤A・B・C・D用入口601番・603番・605番・607番;水性流用入口602番・604番・606番)によりプラグ分割および融合の両機能を備えるマイクロフルイディック・ネットワークの一部を図示する概要図を示す。この概要図は、同時に誘導される2反応を示す。(最初の2反応による混合の間である)第3反応は精密な時間的遅れを利用して誘導される。プラグは反応前と反応後のどちらでも分裂しうる。図6はさらに、初期混合物60(A+B)と初期混合物61(C+D)から、混合溶液62(A+B)と63(C+D)およびこれら四成分の混合物64(A+B+C+D)にいたる、様々な混合過程におけるプラグを示す。

20

【0178】

図12(下部の写真)において示されるように、プラグ123番・124番をT字形流路またはT字形の流路領域を通過するように誘導またはその通過を可能にすることにより、プラグを分裂しうる。好ましい実施形態において、プラグが分裂する範囲または合流地点は、その合流地点よりある程度離れたところに存在するプラグの直径に比例して細め又は多少収縮したものでありうる。結果として生じた分裂プラグ125番は、垂直(図12)または非垂直(図33)でありうる個別の流路または流路分岐を流れる。分裂プラグ125番に融合あるいはさらなる分裂が生じるかもしれない、もしくは、一種以上の特性化・測定・検出・選別(分類)・または分析など1つ以上の反応または「処理」が同プラグに帰されうるところの基板上にある別の流路・流路分岐・範囲または領域へと同プラグを誘導しうる。

30

【0179】

別の実施形態において、分岐する親水性・疎水性流路を利用することにより油搬送流体から水プラグを分裂または選別することが可能である。流路または流路面が優勢的に親水性または疎水性を有するように、流路または流路領域の前処理により流路を親水性または疎水性にする。より詳細に渡り下記に論じられるように、ポリジメチルシロキサン (polydimethylsiloxane)における急速プロトタイピング(試作)のような方法を手段として、親水性流路表面を備えた基板を製作しうる。流路表面をシラン処理または熱処理のいずれかによって疎水性にすることが可能である。例として、(トリデカフルオロ〔tridecafluoro〕-1,1,2,2-テトラヒドロオクチル〔tetrahydrooctyl〕)-1-トリクロロシラン・ガス〔trichlorosilane vapor〕(United Chemical Technologies社)を、流路表面のシラン処理用搬送ガスとして乾燥窒素を伴う基板の入口に適用しうる。

40

【0180】

一旦プラグが個別の流路へ分裂したならば、さらなる反応原系を含むその他のプラグと共に分裂プラグを融合することにより、さらなる反応作用を生じさせることが出来る。

【0181】

50

誘電泳動のような方法または技術を用いて、流体の流れにおいてプラグおよびそこに含まれる試剤/生成物の操作を遂行することが可能である。

【0182】

正味荷電を持たず互いに関連して正または負の荷電をもつ領域を伴う誘電性物体の動きが、誘電泳動によりもたらされると考えられている。プラグ且つまたは粒子の存在下における交流の不均等な電界は、プラグ且つまたは粒子を電氣的に極性化し、結果として誘電泳動力をもたらす。粒子と懸濁化剤の誘電性分極率に依存して、誘電性粒子は磁界の強さが強い領域または弱い領域のどちらかに向かって移動する。従来の半導体技術を使って、マイクロ加工された装置中の力場を制御するために基板上に電極を製作することが可能である。

10

【0183】

誘電泳動は、電氣的導体である物体を動かすのに特に適している。イオンのパーマネント・アラインメントを防ぐために交流(AC)を用いることが好ましい。メガヘルツ頻度はネット・アラインメント、引力および比較的長距離の運動をもたらすのに適している。

【0184】

発明において、レーザーなどの集中光線でプラグおよびそこに含まれる試剤/生成物を偏向および移動させるために放射圧を手段とすることが可能である。

【0185】

温度差または圧力差をもたらすことにより、あるいは基板の1つ以上の流路間または発明による方法に勾配を備えることにより、流れを形成・制御することが可能である。

20

【0186】

プラグを含む流体と搬送流体の両方が、比較的低値のレイノルズ数(例として 10^{-2})を伴うことが好ましい。レイノルズ数は、流体濃度・速度および一定の断面範囲における流路粘度間の反比例関係を表わす。より粘着性が高く、密度が低めで、流れの遅い流体のレイノルズ数は低値を示すため、乱流を生じさせることなく転換・停止・開始・逆転がより簡単にできる。製作された流体システムは、サイズが小さく、速度が低速のため、大抵の場合レイノルズ数低領域($Re < 1$)に属する。当形態において、(乱流と二次流れを引き起こす)内部効果は数えるに足らないレベルであり、粘着効果によりそのダイナミクスが左右される。これらの条件は分析を行う際に有利であり、発明による装置によって提供される。従って、レイノルズ数100未満、一般的に50未満、好ましくは10未満、さらに好ましくは5未満、最も好ましくは1未満で、発明による装置を操作することが好ましい。

30

【0187】

(検出と測定)

本発明のシステムは、標準顕微鏡のような機器を用いての光測定に非常に適している。例として、PDMSは可視部において透明である。基板構築にPDMSを使う場合、PDMSネットワークを覆うか密閉するのにガラスまたは石英ガラスのカバースリップを手段としうる。それによって、可視光線、紫外線、または赤外線で特性化されうる一式の流路を構築しうる。蛍光測定は吸収測定より高感度が強いので、好ましくは、後者の代わりに前者を実行する。光学測定によりプラグを監視する場合、搬送流体およびプラグ流体の屈折率は、本質的に類似していることが好ましいが、場合によっては異なりうる。

40

【0188】

発明によるプラグを基盤とするシステムにより、典型的に簡易的な様式で相対濃度(又は濃度変化)を測定することが可能である。

【0189】

いくつかの事例において、絶対的濃度を例とするものの量的光学測定を実行する際にプラグを手段とすることは、非水平状態の油と水の界面がプラグを囲んでいるために複雑な作業となる。これらの湾曲した界面はレンズのように機能し、放射光線の減少または光学的歪みをもたらす。このような歪みは、例として成長中のタンパク質結晶を目視観測する際に悪影響を及ぼしたり、もしくはその妨げとなったりするかもしれない。かなりの圧力勾配を流れるプラグの表面と裏面で当界面が適合されうる形状が複雑なために、これ

50

らの損失(減少)を正確にモデリングすることは通常困難である。

【0190】

発明にのっとって、屈折率整合などの技術を使うことによりこの問題を克服するか最小限に抑えることが可能である。減少と歪みは、水相の屈折率(η_D)と非混和性搬送流体の屈折率の間の差に依存する。好ましくは、分析に用いられる搬送流体の屈折率が、水および水成緩衝液の屈折率(表1)に本質的に類似していること(例：フッ素添加油が、589nmでナトリウムDライン付近の水の屈折率に近い屈折率を有するなど)。

【0191】

好ましくは、検出または測定に係するアプリケーション用搬送流体は、観察用波長において一般に使用される水溶液の屈折率と整合する屈折率をもつものであること。量的蛍光測定用にシステムを口径測定(調整)するために、プラグに既知の蛍光色素濃度が含まれていることが好ましい。プラグからの蛍光性が測定され、次に、油の非存在下における流路内の同蛍光色素溶液から発する蛍光性と好ましくは比較される。屈折率整合が生じる場合、プラグからの蛍光強度(I)は、水性流の画分調整後、水溶液からの蛍光強度に本質的に類似しているかまたは等しいと考えられている。

【0192】

$$I_{\text{plug}} = I_{\text{solution}} \times V_{\text{water}} / (V_{\text{water}} + V_{\text{oil}}) \quad \text{Eqn. (3)}.$$

等式(3)において、 V は流体の流れの体積流量。界面の湾曲部を多く備える小型プラグは理想的なプラグ反応よりも大きな偏差を示すと推測される、つまり、これらの小型プラグはより大きな光学歪みを生じる傾向がある。

【0193】

必要な場合、屈折率非整合に伴う誤差を断定するために部分的測定を行なう。未知の流体を分析する場合、または二流体の屈折率整合および粘度整合間における妥協が要される場合に、これらの測定データが役立つ。

【0194】

表1： 特定のマイクロフルイディック装置実施形態において用いられた流体いくつかの物理的性質。

【0195】

【表1】

流体	屈折率、 η_D	粘度、 μ [mPa-s]
水	1.3330	1.00
水性PBS緩衝液, 1%	1.3343	1.02
水性PBS緩衝液, 10%	1.3460	1.25
パーフルオロヘキサン	1.251	0.66
パーフルオロ (メチルシクロヘキサン)	1.30	1.56
パーフルオロ (1,3-ジメチルシクロヘキサン)	1.2895	1.92
パーフルオロデカリン	1.314	5.10
パーフルオロ・パーハイドロフルオレン (perfluoroperhydrofluorene)	1.3289	9.58
パーフルオロパーハイドロフェナントレン (perfluoroperhydrophenanthrene)	1.3348	28.4
パーフルオロトルエン (perfluorotoluene)	1.3680	N/A(該当無し)
ヘキサフルオロベンゼン (hexafluorobenzene)	1.3770	N/A(該当無し)

【0196】

検出器とは、流体が検出領域を通過する時に流体の物理的特性を評価するためのいかなる装置または方法でありえる。適する検出器の例としてCCD検出器が挙げられる。好ましい検出器は顕微鏡のような光学検出器である。これらは、既知の技術を用いて顕微鏡から出力された画像または情報を処理するコンピュータ且つ又は他の画像処理装置または画像補強装置につながれているかもしれない。例として、分子をサイズまたは分子量により分析または選別することが可能である。生成された生成物濃度または所定時間に残存する反応原系濃度の測定により、反応作用を監視することが可能である。酵素が酵素基板の化学反応を触媒する範囲で、酵素を分析且つまたは選別することが可能である。(その反面、酵素によって触媒された化学反応レベルに基づき酵素基板を分析〔例：選別〕することが可能である)。タンパク質の存在または量に関する光学示度を得るために各細胞またはビリオン(ウイルス粒子)を光学検出器を用いて検査(検討)することにより、それらが特定のタンパク質を含んでいるか生成するかどうかによって、生体微粒子または細胞およびビリオンのような分子を選別することが可能である。化学薬品そのものを、例として特殊蛍光によって検知できるかもしれない。または、標識付けしたり、もしくは例として(少なくとも限界量の)望まれるタンパク質の存在下で検知可能信号を出力するタグと関連したりできるかもしれない。

10

【0197】

希望特性を有する化学物質と有さない化学物質とを区別する目的で分析における重要特性(または複数特性)を十分に識別・検知または測定することができるという条件の下に、発明による技術を手段として化学物質のいかなる特性[複数可]をも識別または測定することが事実上可能である。例として、プラグ流体や反応生成物またはプラグを(例：選別によって)分析する基盤として、微粒子サイズや搬送流体に対する試剤の疎水性などを用いることが可能である。

20

【0198】

好ましい実施形態において、装置内の検出ウィンドーまたは検出領域を通過時に、光学検出可能な群または半群または化合物(ここにおいて「タグ」と呼ばれる)から送られる信号の強度に基づいてプラグが分析される。選択限界または選択範囲内で一定タグ量またはタグレベルを有するプラグを基板上の所定の出口または分岐流路に誘導することが可能である。タグ信号を顕微鏡により収集または光電子増倍管(PMT)のような検出器により測定しうる。PMT信号をデジタル化し且つ弁作用に基づく方法などによって流れを制御するために、好ましくはコンピュータを用いる。あるいは、タグ且つ又はそれに相応する特性または標識の基準として(例：プラグ選別などを必ずしも継続して行わず、評価目的のためだけに)信号を記録又は数量化することができる。

30

【0199】

発明による一実施形態において、感光性半導体素子のような検出器の直径は流路幅よりも大きいため、(流路長さに伴って)長さが幅を上回る検出領域を形成する。このような検出領域の容積は、半導体素子×半導体素子径の数値を上回り、流路横断面にほぼ等しいものとなる。化学物質またはタグを検知するため、あるいは化学物質またはタグが希望特性を備えているかどうか判定するために、その希望特性により測定可能な光エネルギー放射等の反応が生じるように化学物質を刺激する機器(例：レーザー、レーザー半導体素子、水銀灯のような高輝度ランプ等の光源)を検出領域は備えうる。ランプ使用の実施形態において、検出領域を除く全領域において流路を光線から保護することが好ましい。

40

【0200】

レーザー使用の実施形態において、一式の検出領域一帯を走査するためにレーザーを設置することが可能である。さらに、分析ユニットを含む基板と同じ基板にレーザー半導体素子を製作しうる。あるいは、半導体素子からのレーザー光線が検出領域[複数可]上にあたるように、分析または選別用基板に隣接する第2基板(つまりレーザー半導体素子・チップ)にレーザー半導体素子を組み入れてもよい。

【0201】

50

好ましい実施形態において、集積半導体レーザー且つ又は集積感光性半導体素子検出器が発明による装置内シリコンウェーハ上に備えられている。当設計は、そのコンパクトなサイズおよび放射線発光用または放射用の光学経路が短目という利点を備え、それにより、例として、光学歪みを最小限に抑える。

【0202】

各プラグが検出領域中に流れ込む時に、そのプラグ特性または特質を検査（調査）しうる（例：一定の特性または特質が存在するかどうかを断定するために、プラグからの対応信号またはプラグに含まれる化学物質を検知および測定しうる。その時、信号は、質的または量的な特性に相応しうる）。典型的に、信号量は臨在特性の度合いに相応する。例として、分子サイズ・反応中に形成された生成物量[複数可]・残留する反応原系量[複数可]、細胞により発現された酵素の効能または量、ある分子が別の分子に結合または混成するといったような陽性または陰性反応、または酵素によって触媒された基板の化学反応が、信号の強度によって示されうる。信号に応じて、データを収集すること、且つまたは、例としてある流路から別の流路にプラグを誘導するために流れ制御をアクティブ(有効)にすることが可能である。

10

【0203】

このように、例として、検出領域のプラグ内に存在する化学物質は、関連する検出領域における検査によって生じた信号に応じて適切な分岐流路へと選別されうる。例として、選別用に選ばれる特性または特質に関連した分子の特性またはタグの光学検出を手段としてもよい。しかしながら、他の検出技術(例えば電気化学または核磁気共鳴)も手段となりうる。

20

【0204】

発明にのっとる一実施形態において、流路の一部は分析ユニットまたは検出領域に相当し、好ましくは流路の床またはベースに位置する感光性半導体素子のような検出器を備える。流路内感光性半導体素子の受取りフィールド(円形)が、検出領域により取り囲まれていることが好ましい。

【0205】

検出領域の容積は、感光性半導体素子の受取りフィールドと等しい直径および感光性半導体素子上部の流路の深さと等しい高さを持つシリンダーの容積と同じまたは本質的に類似していることが好ましい。

30

【0206】

感光性半導体素子からの信号は、あらゆる電気通信のいかなる形式にも適合する一本以上の回線(ワイヤー、基板においてエッチングされた伝導性ライン等を含む)を経由してプロセッサに送信されうる。プロセッサにより好ましくはこれらの信号が数値データに変換され、例として、化学物質を前もって定義された設定値のセットと比較することにより分析する。一実施形態において、数値データとは、信号を発する化学物質の特定タイプまたは特性を示す化学物質から放射された光学検出可能信号の量(例えば強度)に相当する。例として化学物質の選別方法(例：弁作用)を決定するにあたり、識別領域の能動素子を制御するために、プロセッサがこの情報(すなわち、数値データ)を好ましくは適用する。

【0207】

40

1つ以上の検出領域が利用される場合、レーザー半導体素子基板中にある感光性半導体素子などの検出器は、分析ユニット検出領域の間隔に比例した間隔で個々に離れていることが好ましい。すなわち、より正確に検出を行うために、検出器が、検出領域の間隔と同じ間隔で個々に配置されることが好ましい。

【0208】

プロセッサは、少なくとも1つの分析ユニットを含む基板と同じ基板に集積しうる。もしくは、感光性半導体素子などによって検出領域[複数可]且つ又は識別領域[複数可]と接続する電子リード線経由で基板を含む分析ユニットに独立して接続するマイクロチップを例とするように個別形態でもありうる。プロセッサとは、コンピュータまたはマイクロプロセッサでありえ、コンピュータ・メモリ、ハードディスク(またはそれと同種のもの)

50

といったデータ記憶装置ユニット、且つ又はモニター、プリンター且つ又はプロッターなどのデータ出力装置に、通常、接続される。

【0209】

検出領域を通過する化学物質に関連又はそれに制限されるタグなどの検出に基づく化学物質のタイプおよび量は算定または断定することができ、また、取得したデータは、データ記憶装置ユニットに格納することができる。この情報はその後さらなる処理を経て、提示用（例：サンプル内のタンパク質、蔗糖エステルまたは他の細胞表面特性のレベルなどを表わすヒストグラム）としてデータ出力ユニットに送られうる。リアル・タイムでサンプルが流路を流れるデータを提示することが可能である。

【0210】

望ましくは、複数分析ユニット（つまり1つ以上の検出領域）および流体が伝達し識別領域から分岐する複数分岐流路を基板は備えうる。

【0211】

当然のことながら、検出領域追加により（例えば、検出領域を識別領域の直ぐ上流、且つ又は分岐点の直ぐ下流にある分岐流路内部に備え付けることにより）、識別領域の試剤の位置と経緯（到達点）を監視できる。検出領域追加により得られた情報をプロセッサで処理することにより、流路試剤速度の推定値を継続的に改訂したり、分子・微粒子・および選択特性を有する物質が望ましい分岐流路に流れ込むことを確認したりできる。

【0212】

一実施形態において、流路を継続して通る流れを循環させ、CCDカメラで空間分解された画像を撮り、該当するプラグの横断距離を時間に変換することにより、プラグが検知される。

【0213】

別の実施形態において、プラグは、質量分析計（MS：エレクトロスプレー質量分析計など）につながる流路点を経由して出口を通過した後に検知される。当実施形態において、プラグの流量および横断距離が分かっている場合に、時間分解された情報（例：質量領域）を得ることができる。当実施形態は、標識の使用を避けたい場合に好ましい。

【0214】

（プラグ内部の試剤濃度変化）

発明による様々な装置および方法は、プラグ組成と特性の制御および操作を可能にする。例として、プラグ内部の試剤濃度の変形形態を可能にする。発明による一様態において、プラグ内の試剤濃度は、プラグ流体の相対流量を変えることにより変化される。これは従来のシステムにおいて可能であるが、混合速度が遅くおよび分散の問題によって作業が複雑になる。発明による方法は、単一設定(Setup)で濃度を変更することができるため、多数の実験的条件（「スクリーニング」）を同時にテストするのに都合がよい。したがって、例として、シリンジを取り外したり再度接続したりする必要がなく、また、上記の技術を用いてプラグ中の試剤濃度を変化するために発明によるシステムの入口を補充する必要もない。

【0215】

プラグ内部の水溶液濃度は、プラグ流体の流量変更により変化することができる（図25を参照、例11で詳細にわたり説明されている）。図25において、パーフルオロデカリンは流路259番～261番を流れ、その一方、水は様々な流量で入口251番～258番へと導入される。

【0216】

水性層流において、マイクロフルイディック流路を流れる層流の流量比率は、約1000:1から1:1000、好ましくは100:1から1:100、さらに好ましくは1:20から20:1に変化しうる。

【0217】

実際の相対濃度を、既知濃度のフルオレスセイン溶液を用いて数量化しうる。当事例において、フルオレスセイン流の強度を励起ランプの強度変動を確認する基準点として利用することができる。

10

20

30

40

50

【0218】

様々なタイプのアプリケーション・測定・または実験の手段として変更（修飾）されうるまたは組込まれうる方法[複数可]の事例が次に述べられている。本発明が提供する、他の技術に優れた利点の例証に関しては、次の事例を検討のこと。異なる工程における異なる濃度の試剤が及ぼす影響を調べるために、試剤AとBとCのように2種類以上から成る試剤をスクリーニングするものとする。また、ここで重要となるのは、様々な酵素および基板濃度における、酵素の基板に対する反応が防止剤により阻止されうるという条件である。Aが酵素、Bが基板、Cが防止剤である場合、A/水/B/水/Cのように5つの入口を備えた基板を手段とすること、そしてAとBとCが基板に送り込まれる流量を変化することが可能である。全プラグ流体の総流量を一定に保つことにより、好ましくはプラグサイズが一定に保たれる。AとBとCの導入量が異なるため、AとBとCの濃度も変動する。スクリーニング対象の酵素反応またはその他の反応の検知または監視が可能な限り、出発溶液の濃度を変更することなく、濃度組み合わせのすべてを敏速にスクリーニングすることができる。溶液の流れおよび線形輸送により、相互作用または反応の存在・非存在を断定できるだけでなく、反応発生率を測定することが可能である。したがって、質および量的データを得ることができる。発明にのっとって、(全でないにしても)ほとんどの試剤がプラグ内部に含まれているため残留物がほとんど又は全く残らない。故に、典型的に基板を作動中に洗浄する必要はない。

10

【0219】

濃度変化可能範囲を拡張するために、例として試剤A・B・C・D・Eの組み合わせを用いてミクロモル溶液A、mM溶液B、およびM溶液C、などを調合しうる。当技術は、例えとして 10^6 という数を超える因子(要素)に携わる流量制御よりも簡単でありうる。また、プラグ内部の試剤比率変更には、融合作用を複雑化する原因となるプラグサイズの変更が要されるため、その他の既知方法を手段とすることは特にこの例において更に困難となるであろう。

20

【0220】

別例において、 Mg^{2+} および H^+ の濃度が異なる場合、溶液中のRNAフォールディング(折りたたみ)作用を観察しうる。従来、当作業は静止流体式の技術を使って行われてきたが、時間がかかりRNAを比較的大量に要するという問題があった。発明による方法を用いると、通常のml/shot単位の流れの代わりに μL /分単位の流れのみが必要とされ、且つ比較的短い時間(例:約15分間)内に全位相空間を処理することが可能である。

30

【0221】

小型分子によるタンパク質間相互作用媒介に関する研究や、小型分子によるタンパク質/RNA/DNA相互作用媒介に関する研究や、タンパク質およびいくつかの小型分子に係る結合現象に関する研究等を例とするこれら特定の事例は、本発明の有用性を強調する。異なる濃度を伴う数成分に係るその他の相互作用も、発明による方法を手段として研究されうる。

【0222】

(一連のプラグ中における勾配生成)

発明による一様態において、圧力駆動による流れの分散はプラグ流体の連続的な流れに勾配を生成する手段となる。プラグを形成することによって、勾配が「固定」される(つまり、勾配形成の原因である分散がプラグによって止められる)。流れが水性でなければならぬとは限らないが、水性流は様々な用途を備えている。例として、これらに限定されないが、その使用例を下記する。

40

【0223】

図44は、流動中の水流に個別の試剤B水性サンプルを注入した際、初期勾配がどのように発生しうるかを図示したものである。図44aにおいて、水+B混合物は流路441番を流れた。流路443番および445番は非流動性の水+B混合物を大幅に含んでいる。油流が流路449~452番によって流れ、その一方、水流は入口440番、442番、444番、および446~448番へと導入された。

50

【0224】

図44dは、試剤A・B・Cが入口453番・454番・455番から導入される複数吸込システムを示す。圧力駆動の流れにより流路伝いの試剤分散が可能となり、それにより、流路伝いにBの勾配をもたらす。流路範囲、流量、注入量、または複数注入時のサンプルまたは試剤の追加頻度を適切に調整または制御することによって勾配を制御することができる。その後、この勾配はプラグ形成によって「固定」される。これら流路のいくつかは、単一プラグ形成領域または接合部分へと組み合わせられることが好ましい。さらに、数成分を伴う複雑な勾配は流れを制御することにより生成しうる。

【0225】

当技術は様々なタイプの分析および合成の手段となりうる。例として、当技術はタンパク質またはライソゾーム(lysozyme)結晶化のためにプラグを生成する手段とすることができる。図42は、流量変化による勾配形成に関する実験を示す(実験の詳細は例17に記される)。図43は、勾配によるリゾチーム結晶形成を図示する(実験の詳細は例18に記される)。

【0226】

(不安定中間体の形成と隔離)

本発明による装置と方法はまた、不安定中間体の合成および分離の手段となりうる。発明による装置を手段として形成された不安定中間体は、さらなる反応且つ又は分析に適した作りを伴っていること、又は、さらなる反応且つ又は分析に適しうるところの他の装置部に導かれることが好ましい。一様態において、不安定中間体形成のために相互反応をもたらす少なくとも2つの異なるプラグ流体を使用する。基板の動力伝達路沿いに不安定中間体が形成されるときに、例として反応速度に関する情報を得ることができる。このような不安定中間体は、不安定中間体を含むプラグを別のプラグ流体と融合することにより、別の試剤とさらなる反応を示しうる。不安定中間体の例としてはこれらに限定されないが、遊離基、有機イオン、リビングイオン重合鎖、リビング有機金属の重合体鎖、リビング遊離基重合鎖、局所てにフォールドされたタンパク質または他の高分子、引き伸ばされた(stretched)分子、結晶化核、合成ナノ粒子核などが挙げられる。

【0227】

不安定中間体の形成に関する発明による装置の一アプリケーションとして高性能な生体分子構造の特性化が挙げられる。時間分解されたモードおよび時間分解されていないモードの両方で用いることができる。不安定(且つ又は反応的)中間体(例として水酸基(OH))を、一本のマイクロフルイディック流(例として、金属イオンの過酸化物との既知反応により)生成することができる。生体分子との反応を引き起こすために、生体分子を含む別の流れにこれらの反応核種を注入することができる。生体分子上の反応発生位置は、その位置にどれだけアクセス出来るかどうかに関係する。

【0228】

これは、生体分子内部で溶剤に露出または覆われた位置を識別する、または最初の生体分子に結合する第二の生体分子によって保護される位置を識別する手段とすることができる。当方法は、一連の生物学的問題における機構(構造)を理解する際に適用しうる。

【0229】

例としてはこれらに限定されないが、タンパク質フォールディング、タンパク質間相互作用(タンパク質フットプリント)、タンパク質RNA相互作用、タンパク質DNA相互作用、および(小型分子または別の生体分子のような)配位子[複数可]の存在下でのタンパク質間合成物形成が挙げられる。このようなシステムを質量分析計と接続することにより、強力な分析法の手段が提供されうる。

【0230】

複合化学物質システムに関する実験もまた、発明にのっとって行なうことができる。例として、不安定中間体を、局所フォールディングしたタンパク質またはRNAなどの個々のプラグにおいて多少調合することができる。その次に、例として、プラグが融合時に不安定中間体の反応性を研究することができる。

10

20

30

40

50

【0231】

(表面化学の動的制御)

マイクロフルイディック装置において、システムの寸法が縮小するとともに表面積対体積率が増加するため、表面化学の制御は特に重要である。特に、タンパク質と細胞の吸着に概して不活性な表面は、マイクロフルイディックにおいて非常に貴重な存在となる。ポリエチレングリコール(PEG)およびオリゴエチレングリコール(OEG)は表面上タンパク質の非特異性吸着を減少すると認められている。金上のOEGを末端にもつアルカンチオール自己組織化単層膜は、モデル基板として使われており、タンパク質吸着抵抗を実証および綿密に特性化する手段として利用されてきた。溶液が露出される表面化学は、シリコン表面上の自己組織化単層膜、またはPDMS上のグラフトPEG含有重合体およびマイクロフルイ

10

【0232】

発明による一様態において、水性プラグ内部の試剤は、装置 - プラグ流体界面ではなくむしろ搬送流体 - プラグ流体界面に露出される。ペルフルオロカーボンの場合によって炭化水素またはシリコンより生物学的適合性が高いため、表面研究においてペルフルオロカーボンを搬送流体として用いることが好ましい。

【0233】

このことは、手術中に乳化ペルフルオロカーボンを人体に代用血液として使用した実例により例証される。試剤が露出される表面化学の制御および変更(修正)を、単にフッ化PFD位相に適切な界面活性剤を導入することにより達成しうる。

20

【0234】

さらに、界面活性剤の使用は、例として物質または微粒子の流路壁などへの不必要な吸着に関する問題において利点を及ぼしえる。

【0235】

一定の状況または条件下で、流路の壁に付着する微粒子が生成される基板の1つ以上の流路または領域において反応が生じうる。それらが一定の数に達した時点で、吸着性微粒子は流路の詰まりまたは圧縮につながるか貢献するかもしれない。適切な界面活性剤を一種以上使用するといった、発明による方法により、物質または微粒子が流路壁へと不必要に付着または吸着することが防がれるか最小限となる、それによって、例として流路の詰まりあるいは圧縮が生じなくなるか最小限となる。

30

【0236】

被包性微粒子の場合、微粒子を含むプラグ外部の試剤と微粒子の直接的接触が防がれるため、1本以上の基板流路中の所要反応に対する被包性微粒子による妨害を(被包性でないものと比べて)より効果的に防ぎうる。

【0237】

OEG基を末端にもつフッ素界面活性剤は、代用血液およびその他バイオ医学アプリケーションにおける生物学的適合性を実証すると示してきた。

【0238】

好ましくは、オリゴエチレン基を末端にもつ油溶性は、一定のアプリケーションにおけるマイクロフルイディック装置内の界面を生成する手段とされる。

40

【0239】

明確に定義された組成を伴う界面活性剤は合成されうる。このような合成は、上記のような界面活性剤の存在下で、好ましくは水性プラグ形成特性化の後に続く。非特異性タンパク質吸着に対する不活性物質も特徴づけられる。図24は、タンパク質吸着に対する抵抗性、正の荷電、又は負の荷電を持つなどの条件を備える単層を形成するフッ化界面活性剤の例を示す。OEGを末端に持つ界面活性剤の場合、油溶性に変換され水相への進入を防ぐためにも、これらの界面活性剤のn数は高数値n(16)であることが好ましい。図24において、チオールに付着する約3~6のEGユニットからなる化合物は、金上にあるチノール単層へ

50

のタンパク質吸着を防止するのに十分であり、したがって、不活性物質に好適である。さらにまた、過フッ化炭化水素代用血液における生物学的適合性をもつと証明されている界面活性剤を、フッ化搬送流体への添加剤として使用してもよい。

【0240】

(アプリケーション：反応速度測定と評価分析)

発明による装置および方法はまた、典型的にわずかな試剤を様々な濃度で混合して監視または分析するマイクロタイター・プレートなどにおいて行われる実験の手段となりえる。これは、例として、必要な場合は流れを止め、可変組成を伴うプラグを形成した後にプラグを監視することにより実施されうる。評価分析 (Assays) を位置的に暗号化 (コード化) しうる。すなわち、プラグ組成は流路内プラグ位置から推定されうることである。発明による装置および方法は、高性能なスクリーニングの使用することもでき、その評価分析法は例として診断および新薬発見に有用である。特に、発明による装置および方法は、比較的高速の反応速度測定を行なう手段とすることができる。

10

【0241】

高速測定能力は、動態生理学の分野を革新した。タンパク質CフォールディングおよびシトクロムCフォールディング研究がその例として挙げられる。乱流に依存して溶液の急速混合を実施する高速反応機器を手段としてこれらの測定が行なわれる。乱流を確立するためには、大型流路および大量な流量が必要とされ、故に、大量なサンプルを要する。高速反応機構の研究用市販機器は、1ミリ秒単位でアクセス可能。改善されたキャピラリーガラス球ミキサー (capillary glass-ball mixer) オンチップバージョン (チップ上タイプ) は、約0.35mL/秒を超える流量を伴う約45 μ sの不感時間を生じる。これらの既存方式は、乱流を生成するのに大量な流量が要されるために概してその小型化が制限される。しかし、発明による装置および方式により可能となった小型化技術は、例として、遺伝子操作および細胞組織隔離をはじめとする (マイクログラム単位といった) わずかな量でのみ利用可能であることに加え非常に広範囲に及ぶ生体分子の量的特性化を可能にするという利点を持つ。さらに、いままでにないこれらの技術および機器は、広範囲に及ぶ測定可能時間尺度を提供する。

20

【0242】

時間的管理は様々な化学物質および生化学の工程において重要である。

【0243】

典型的には、静止流体式タイプの機器は反応速度を測定する手段となる。

30

【0244】

これらのタイプの機器は、典型的には乱流に依存して試剤を混合し、分散を最小限に抑えつつそれらを輸送する。乱流が比較的直径大および流量多のチューブに生じるので、静止流体式機器は大量 (mL/s単位の量) の試剤を消費する傾向がある。少量 (μ L/分の量) の試剤を消費する静止流体式機器のマイクロフルイディック機器は、診断法など様々なアプリケーションにおいて有用である。

【0245】

これまでのところ、EOFによる流れは (分散がより少ないという利点を持つが) 通常速度が遅すぎ、圧力駆動による流れは分散に悩まされる傾向があるという点で、マイクロフルイディック装置は静止流体式機器に対抗できないでいた。その上に、混合工程とは通常どちらのシステムであろうと非常に時間のかかる工程である。

40

【0246】

静止流体式の機器は典型的にはミリ秒以下の混合速度を有し、このような高速混合が要される実験に役立つことがある。同様に、発明の装置および方式はミリ秒以下での測定を可能にする。本発明は、約1ミリ秒 (ms) または約10ミリ秒以上そして0.5秒内の時間尺度にて生じる反応において、あるいは測定に要される溶質量が最重要条件である時に、特に有利となりえる。

【0247】

さらに、プラグが2種の無効分を伴って生成される場合、そのプラグは流路を下降して

50

輸送される際にマイクロリアクタとして機能しうる。その次に、光学的性質といったプラグ特性を、流路または基板の一点または領域からの距離関数で測定または監視することができる。プラグが一定流量で輸送される場合、反応時間はその輸送距離に基づいて断定することができる。

【0248】

プラグ容量を流路端から質量分析計(例：エレクトロスプレー質量分析計)に注入することにより、プラグが流路から出る際のプラグ組成を綿密に調べる。流路端との伝達時間は流量変更により異なる。例として複数の距離および時点で質量分析計を用いてプラグ容量を調べるために、複数の出口を流路沿いに設計しうる。

【0249】

発明による装置および方法の利点はプラグが連続的に形成される場合、本質的に低速な観察方式を手段とすることができるということである。例として、約10cm/秒の流量で原点から約1mmの距離を流動するプラグは約10ms歳(約10ms経たもの)である。この場合、本発明は、例として、実質的に時間制限無く10ms歳のプラグを繰り返し測定するのに、比較的低速な(時間的余裕のある)検出方式の使用を可能にするという点で特に有利である。対照的に、静止流体実験において反応を一度(約9~11ミリ秒以内)に観測するデータ収集時間は一回につき約2ミリ秒のみである。なおまた、本発明は、異なる原点からの距離で流路を観測するだけで、複合反応に関係する情報を数回同時に取得することを可能にする。

10

【0250】

反応時間を流路上の様々な地点で監視することができる(各地点は異なる反応または混合時間伴う)。一定の流体流量 u を前提として、流路に沿う様々な時点 $t_1, t_2, t_3, \dots, t_n$ に基づき、各反応時間を断定しうる。したがって、地点 n と $n-1$ 各組の間の距離(時間 t_n と t_{n-1} に相当)が、任意の n 値と同値の場合、流路上 n 点に相応する反応時間は $t_n = n l / u$ から算定されうる。したがって、あらゆる任意の時間 t_n において、理にかなうように繰り返し反応を監視することが可能となる。原則的に、本発明の基板は、一定流量で監視されるべき流路の長さを延長するだけで、または流路の一定距離上の流量を減少させるだけで、より長時間にわたる反応の監視が可能になる(例として図22を参照)。図22において、次のものを下記の入口へ導入することができる。すなわち、酵素を入口2201、2205、2210、2215番へ、緩衝液を入口2202、2206、2211、2216番へ、基板を入口2203、2207、2212、2217番へ、緩衝液を入口2204、2208、2213、2218番へ、抑制剤を入口2228、2209、2214、2219番へと導入することができる。図22において、搬送流体は2220、2221、2222、2223の流路部を左から右に流れる。点線の正方形2224、2225、2226、2227によって囲まれた流路部は、流路に沿う様々な地点の反応を監視するための視野を表わす。

20

30

【0251】

同原理は、流路沿いの共通原点から地点 n に伝達する距離が2の乗数または倍数で別の流路に伝達する距離と異なるところにおいて、本発明の代替実施形態に適應する。このことは以下の議論により、さらに明確化されうる。

【0252】

一定の流体流量 u を前提として、流路に沿う様々な時点 $t_1, t_2, t_3, \dots, t_n$ に基づき、各反応時間を断定しうる。したがって、地点 n と $n-1$ 各組の間の距離(時間 t_n と t_{n-1} に相当)が、任意の n 値と同値の場合、流路上 n 点に対応する反応時間は $t_n = n l / u$ から算定されうる。図22(c)に示されるような比較的複雑な流路幾何学様式において、それに相応する方程式は、様々な地点 n における反応時間は2の乗数または倍数で変動することを示す $t_n = 2^{(n-1)} l / u$ であらわされる。

40

【0253】

一面において、発明による流路は、異なる反応時点に対応する異なる領域を視野に置く手段となる。

【0254】

発明による流路は、完全な反応プロファイルの測定や、一連の直線状に分割された時点

50

の測定や(初期の酵素学的反応速度の測定に要されるものなど)、一連の指数関数的に分割された時点の測定(例:一次反応速度測定または他の指数分析)をはじめとする様々な測定を可能にする。画像フレームにおける時間尺度は、例として総流量および全流路長さの変更に伴い、マイクロ秒単位から秒単位へと変化しえる。

【0255】

図22A-Dは、単一視像から動的情報を得るための発明によるマイクロフルイディック流路の様々な幾何学様式例を示す。図示されている流路システムは、抑制剤の存在下での酵素反応動力学測定などの研究に適する。図22Dにおいて示される装置は、開閉可能な複数の出口を備える。図22Dにおいて示される装置において、一度に一つだけの出口が開いていることが好ましい。最高速度での流量において、長さ l の短い流体経路を通る流れの圧を低減するために上端の出口が開いていることが好ましい。流量が低下するにしたがって、同総圧で測定できるように、その他の出口も開き、より長い経路とより広範囲なダイナミック・レンジを供給することが好ましい。

【0256】

図22において、 n は反応混合物が時間 t_n で移動した一定の流路長さ l のセグメント数である(反応時間および流路長さに関連する説明については73ページ第2段落全般を参照のこと)。これらのシステムは、流量変化による試剤比率の制御を可能にする。当システムは、さらに酵素阻害を迅速に定量化することを可能にする。

【0257】

例えば、バナジウム(vanadium)イオンやオキソバナジウム(oxovanadium)イオン・ヌクレオシド錯体、および5'-ジホスホアデノシン(diphosphoadenosine)3'-リン酸エステルおよび5'-ジホスホアデノシン2'-リン酸エステルを例とする他の小型分子などの、既知の抑制剤と併用してリボヌクレアーゼAを使用することができる。データ収集および実験におけるLineweaver-BurkプロットまたはEadie-HofsteeプロットまたはHanes-Wolfeプロットの作成により、反応速度を特性化しうる。数マイクロリットルだけのタンパク質と抑制剤溶液で実験を実施しうる。当性能は、マイクログラム量レベルといった微量でのみ利用可能な新タンパク質および抑制剤を特性化するのに特に役立つ。

【0258】

発明にのっとって、光学顕微鏡などから得られた単一画像を分析することにより、蛍光性信号による反応速度測定を行なうことができる。(約2秒の)長期露光が(約2ミリ秒の)高速反応速度測定に使用されてきた。

【0259】

これは、流れが連続的なシステムにおいて、距離を流量で割った値に時間が等しいために可能であった。発明にのっとる流れが連続的な形態(状態)において、アクセス可能時間の尺度は約400秒まで延長しえる。この時間は、流れが大幅に減速した場合または停止した場合、数日または数週間まで延長しえる。典型的にこの時間尺度は、(通常シリンジポンプの安定性によって制限されるが、圧力ポンプの使用により改善されうる)約1mm/sの低流量を伴う流路長さ(例:直径3インチのチップ上で約1メートル以下)に依存する。最高速度における時間尺度は、通常混合時間に制限されるものだが、本発明においては約20まで減少しうる。混合時間は通常2つの主要な要因により制限される。その要因とは、(1)混合距離(例:流路幅のおよそ10-15倍)、そして(2)流量(例:およそ400mm/s、流れを送るのに要されるキャピラリー数および圧力降下に依存する)、である。混合距離は、通常、流量にほとんど影響されない。適切なマイクロフルイディック流路設計あるいはマイクロフルイディック流路網設計によって、広範囲にわたる速度実験を行なうことができる。

【0260】

流路サイズの縮小は通常混合時間の短縮につながる。しかし、それはまた、流れを送るのに必要な圧力の増加にもつながる。下記の方程式は、長方形毛管を流れる単相の圧力降下 ΔP (Pa単位)を表わす。

$$\Delta P = 28.42 \quad U \quad \mu l / a \quad b \quad \text{Eqn. (9)}$$

等式(9)において、 U (m/s)は流速(キログラム/メートル・秒)、 $kg \quad m^{-1} s^{-1}$ は流体の粘度、

l (m)は毛管長さ、a(m)は毛管高さ、そしてb(m)は毛管幅を指す。通常、マイクロフルイディック装置がどれだけの圧力に耐えられるかには物理的限界がある(例: PDMSは約3気圧、ガラスおよびSiは約5気圧)。当限界は小規模な流路において非常に重要であり、流路の全長に限界を及ぼし、したがって測定の(最大圧力÷混合距離の流量が維持されうる)ダイナミック・レンジを制限することになる。

【0261】

図23は、15 μm と2 μm の流路高さを伴う発明によるマイクロフルイディック・ネットワークを描く。図23に示される流路設計は、流路断面の変更により約100個のダイナミック・レンジに達する方法を図示する。これらの条件下で、巻線流路の混合時間は概算約25 μs 、蛇行流路の観察時間は概算約3msである。

10

【0262】

図23が示すように、急速混合が2 μm × 1 μm (高さ×幅)の流路で生じ、2 μm ×3 μm の流路で測定される。図23の表は、流路断面寸法の関数に基づく圧力降下と流速と流動時間の分布を示す。プラグが安定性を維持し減速しながら20- μm 幅の流路から50- μm 幅の流路に移動する場合、1 μm 幅の流路から3 μm 幅の流路への遷移が円滑に行われるものとする。流路幅を変更することは容易であり、容易にマスク設計に組入れることができる。例としてケイ素ウェーハー上で順次スピンする2種の異なる高さを有するフォトレジスト層などを手段として、流路の高さを変更できる。その後、二段階露光方式が望ましい断面寸法を伴うマイクロフルイディック・ネットワークを確保する手段となりうる。

20

【0263】

本発明による装置および方式の別の実施例においては、枯草菌リボザイムのRNase P触媒反応領域(P RNA C-領域)のフォールディングを発明による流路を使って調査することができる。RNAフォールディングは、既存技術の限界により、概して未解決のままになっている重要問題である。RNA機能別組織構造の進化機構の設計・修正・および解明において、三次構造におけるRNAフォールディングの律速段階を理解することが重要となる。

【0264】

P RNA C-領域のフォールディングは、アンフォールド状態(U)と中間体状態(I)と原型(N、フォールド状態)といった3種の関連形式に関係すると認識される。本来の二次構造およびいくつかの三次構造は最初の1ミリ秒内にフォールディングする(RNAが本来の寸法の約90%まで圧縮される)が、静止流体のような従来技術ではこの時間的条件(Time Regime)に関わる問題を解決することができない。発明による流路と基板を手段とすることにより、 Mg^{2+} 添加条件下でのP RNAフォールディング反応速度の時間的依存性を研究することができる。

30

【0265】

吸光度評価分析、ロウリー(Lowry)評価分析、ハートリー・ロウリー(Hartree-Lowry)評価分析、ビウレット(Biuret)評価分析、ブラッドフォード(Bradford)評価分析、BCA評価分析など、当技術分野で周知の様々なタイプの評価分析法(例: タンパク質評価分析)は、発明による装置および方法と共に併用または適合することができる。溶液内タンパク質は約280および200nmの最大吸光度を伴う紫外線を吸収する。芳香環を伴うアミノ酸が最大吸光度280nmをもたらす主な要因である。ペプチド結合が、最大値200nmをもたらす主な要因である。吸光度評価分析にはいくつかの利点がある。吸光度検定は、試剤追加または定温放置を必要としないので、高速かつ便利である。

40

【0266】

タンパク質原基を調合する必要もない。当評価分析法はタンパク質を消費せず、タンパク質濃度と吸光度が線形関係にある。さらに、当評価分析は紫外線分光測光器だけを手段として行なうことができる。

【0267】

ロウリーの評価分析はよく引き合いに出され、最も一般的に用いられているタンパク質評価分析法であり、細胞分画、クロマトグラフィー分画、酵素調合などを目的とする正確なタンパク質測定方法の中で最も推奨されるものであった。同原理に基づくシンコニン酸

50

(BCA)評価分析法はさらに、一過程のみで実施できるという利点を持っている。けれども、ロウリー法の修正バージョンはすべて室温にて行われる。ロウリー評価分析法のハートリー・バージョン(より少量の試剤のみを必要とする最新の修正バージョン)は、一定の種類のタンパク質への感度を改善し、食塩水との互換性に欠けるという心配もあまり無く、より多くの線形反応をもたらし、飽和作用がさらに生じにくい。

【0268】

ハートリー-ロウリー評価分析法において、二価銅イオンは、アルカリ条件下において一価イオンとなり、ペプチド結合を伴う錯体を形成する。

【0269】

一価銅イオンおよびチロシン原基やトリプトファン原基やシステイン原基はフォルリン試薬に反応し、モリブデン/タングステン(青)に変形する不安定生成物を生成する。標準液(原基)で給液がなされることに加えて、評価分析は赤外線電球とフィルターを備える分光測光器のみを必要とする。ガラスまたは低価格のポリスチレン・キュベットが手段とされうる。

10

【0270】

ビウレット評価分析は、その原理においてロウリー法と類似するが、20分間の単一定温放置を必要とする。ビウレット評価分析において、アルカリ条件下で、2つ以上のペプチド結合を含む物質は、試剤中に銅塩を伴う紫色錯体を形成する。ビウレット評価分析の利点として、妨害要因(アンモニウム塩がそういった要因の一つである)が全くといって無いことと、ロウリー法または紫外線吸収方式とよりも小規模の偏差が報告されていることが挙げられる。

20

【0271】

しかしながら、ビウレット法ははるかに多くの原料を消耗する。ビウレット法は、収率にこだわらないパッチ形態の原料に適した一般的なタンパク質評価分析である。給液に用いられる標準液に加えて、450nmの領域内で最大伝送率を伴う可視光線分光測光器が必要とされる。ガラスまたは低価格のポリスチレン・キュベットが手段とされうる。ブラッドフォード評価分析法は非常に高速で、ロウリーの評価分析法とほぼ同量のタンパク質を使用する。極めて正確であり、範囲外サンプルを数分で再テストすることができる。ブラッドフォード法の一般的な用途、特に細胞分画のタンパク質含有量断定およびゲル電気泳動用タンパク質濃度評価での使用が推奨される。

30

【0272】

発色試薬、タンパク質原基および取扱説明書などの評価分析資料は、Bio-Rad株式会社から入手可能。当評価分析の基準は、タンパク質への結合が生じる際にコマシーブリリアントブルー-G-250(Coomassie Brilliant Blue G-250)酸性溶液に対する最大吸光度が465nmから595nmに変化するという観察に基づく。

【0273】

両疎水性およびイオン相互作用は、色素の陰イオン形態を安定させて、その結果目に見える変色を引き起こす。色素-アルブミン合成溶液の消衰係数は10倍の濃度範囲に対して一定であることから、評価分析は有用であるといえる。給液に用いられる標準液(基準液)に加えて、可視領域境界線上で595nmの領域内最大伝送を伴う可視光線分光測光器が必要とされる(通常必要とされる特別なランプまたはフィルターは不要)。ガラスまたはポリスチレン・キュベットが手段とされうるが、発色試薬によりこれら両方が着色される。使い捨てのキュベットが推奨される。

40

【0274】

ビシンコニン酸(BCA)評価分析用ツールはPierce社(ロックフォード、IL)によるキット形態で入手可能である。当手順はマイクロタイター・プレート方式(microtiter plate methods)に極めて適応しうる。BCAは、ロウリー法と同じ目的(理由)で使用される。BCA評価分析法は、一段階作業のみを要するという点で有利であり、また、アルカリ条件下で発色試薬が安定している。ロウリーの評価分析におけるフォルリン試薬を用いて成し遂げられるとともに、BCAは二価銅イオンをアルカリ条件下にて一価イオンに変形する。BCAの利点

50

は、試剤がアルカリ条件下でかなり安定していること、および試剤を銅溶液に含むことが可能なため一過程のみで処理工程を完了するということである。ロウリー法同様、モリブデン/タングステン(青)の生成物が生成される。給液に用いられる標準液に加えて、562 nmの設定で伝送を行う可視光線分光測光器が必要とされる。ガラスまたは低価格のポリスチレン・キュベットが手段とされうる。

【0275】

上記の評価分析法で測定可能な濃度領域は、波長280nmでの光吸収で約20マイクログラムから3mgにわたり、波長205nmでの光吸収で約1~100マイクログラムにわたり、ロウリー評価分析の修正バージョンでは約2~100マイクログラムにわたり、ビウレット評価分析法では約1~10mgにわたり、ブラッドフォード評価分析法では約1~20マイクログラムにわたり、そしてBCA評価分析法では約0.2~50マイクログラムにわたる。様々な蛍光または蛍光変化に基づく評価分析が開発されており、発明の方式および装置を手段として実施しえる。

10

【0276】

様々な物理学上・化学上評価分析に関する説明は、Remington : The Science and Practice of Pharmacy, A. R. Gennaro (ed.), Mack Publishing Company, chap. 29, "Analysis of Medicinals," pp. 437-490 (1995) およびその引用文献において詳細にわたり記述されている。なおまた、同参考文献の第30章でも様々な生物試験法の詳述が提供される。

【0277】

そこに記される評価分析には、酸塩基反応、沈降反応、レドックス反応および錯形成反応に基づく滴定評価分析、分光測定法、電気化学方式、クロマトグラフィー方式、およびガス定量評価分析法のようなその他の方式、容積測定および旋光・比重および放射能測定に関係する評価分析が含まれる。その他、そこに記される評価分析として、酵素含有物質の評価分析、近似評価分析、アルカロイド薬評価分析、そしてピロゲン試験・細菌内毒素試験・降圧物質試験・また生物反応性試験(生体内および生体外)のような生物試験が含まれる。

20

【0278】

さらに、Reinington : The Science and Practice of Pharmacy, A. R. Gennaro (ed.), Mack Publishing Company, chap. 31, "Clinical Analysis," pp. 501-533 (1995) およびその引用文献において、血液および他の体液に関する様々な特性化・定量化の方式の詳述が提供されている。特に、赤血球、ヘモグロビン、紡錘細胞、網状赤血球、血糖、非タンパク窒素合成物、酵素、電解質、血液量と赤血球生成メカニズム、血液凝固のような様々な体液成分に関する、様々な試験および評価分析の詳述が当参照文献には含まれる。

30

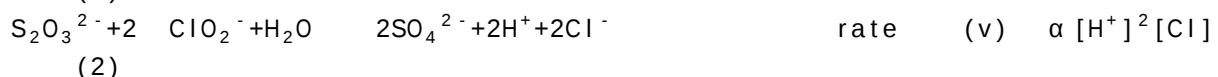
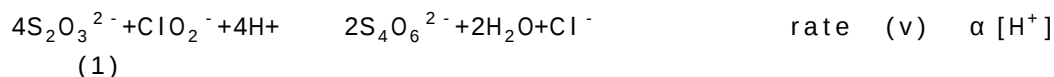
【0279】

(非線形・確率的検出)

確率的挙動は、多くの化学反応(例: 無機化学薬品反応といった自己触媒反応、燃焼、爆発)および鎌状赤血球貧血の重合作用において認められる。結晶化も自触媒作用工程の一つであると言えうる。これらの反応に対する理論的対応(処理)方法のいくつかが開発されてきている。これらの反応は、混合に対して高度に敏感である傾向がある。広範囲にわたり研究されてきた NaClO_2 と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 間に生じる確率的な自触媒作用の化学反応(亜塩素酸塩—チオ硫酸塩反応)を考えてみる。当反応メカニズムを、反応(1)と(2)により説明することができる。

40

【0280】



$[\text{H}^+]$ は H^+ の濃度を表わす。低速反応(1)は、反応混合物に対して若干のアルカリ性 $\text{pH}=7$.

50

5で優性となり、反応混合物のアルカリ性pHを維持する(当反応速度 v が $[H^+]$ に正比例するため、その反応作用により H^+ が消費され、自抑制性をもたらす)。反応(2)は、酸性pHで優性となる(当反応速度は $[H^+]^2[C1^-]$ に比例して変動するため、その反応作用により両 H^+ と $C1^+$ が生成され、超自触媒作用をもたらす)。図21は、曲線211・212番に関連する2反応の反応線図を示す。特定のpH値で、当2反応(ここで反応211番および反応212番とする)の速度は、不安定限界点において等しくなる。当限界点におけるNaC102およびNaS203反応混合物の寿命はその攪拌工程に極めて依存する。攪拌の非存在下で、溶液の確率的変動は $[H^+]$ の局部的増加をもたらす。このような $[H^+]$ 増加による反応212番の加速現象はわずかなものだが、反応211番は $[H^+]$ に高次依存性を持つため及ぼされる加速効果ははるかに大きい。

10

【0281】

したがって、局部変動が局部 $[H^+]$ の増加をもたらす領域において、反応211番が優性となり、より多くの H^+ が生成される(これは初期変動領域から急速に拡散する)。その後、化学波が発生し全溶液に急速な反応がもたらされる。非攪拌状態のNaC102とNaS203混合物は数秒間だけしか安定状態を維持できない。また、これらの変動(動揺現象)は攪拌の存在下でさえも生じうる。

【0282】

図21は、クロライト・チオ硫酸塩反応の不安定段階(点)を図示する反応線図を表す。限界点より下の $[H^+]$ 数では、低速反応(1)が優性となる。限界点より上の $[H^+]$ 数では、自己触媒反応(2)が優性となる。限界点と等しい $[H^+]$ 数の反応混合物は、変動がない状態において準安定状態となる。完全混合状態において、小規模な変動効果が平均化され、システムが準安定状態に停滞する。不完全混合状態における $[H^+]$ 低下は、反応(2)の自触媒特性による $[H^+]$ 増加よりもゆっくりと徐々に生じるため、反応混合物が急速に酸性化される。

20

【0283】

カオスの流れが流体内部の拡散性輸送に強力な影響(「異常拡散」)を及ぼすべきことは周知のことである。カオス的なダイナミクスが非ガウスの輸送特性(「奇妙な動力学[*strange kinetics*]」)をもたらすということもさらに認められている。カオスの混合は効果的に変動を抑えることができる。このため、発明による一様態において、発明による流路を用いたカオスの混合の存在下でこれらの非常に不安定な混合物を安定化できる。

30

【0284】

当発明は、クロライト・チオ硫酸塩システムを例として含むシステムの確率的挙動に対する混合の影響を理解する手段となりえる。

【0285】

層流において、流路中央の流れプロファイルは平坦で、実質的に対流による混合は存在しない。流路中央で発生する $[H^+]$ に関係する変動が進展して反応混合物の完全分解を引き起こしうる。

【0286】

低速混合により、直線流路を流れるプラグが変動する可能性が低下する。渦の中心に生じる変動が無くなるまで効率的に混合されない場合、数個のプラグに関係する1種以上の自発反応が生じえる。本発明における蛇行流路を流れるプラグのカオスの混合は、変動が無くなるまで効果的にその混合作用を持続する。したがって、自発反応が生じる可能性が大幅に削減されるか、またはその可能性がゼロとなる。

40

【0287】

単純な層流においては通常、速度勾配がほとんど又は全くなく、流路中心での混合は本質的に生じない。したがって、臨界 $[H^+]$ で調合されたクロライト・チオ硫酸塩反応混合物に生じる変動が拡張し、反応混合物の急速分解をもたらすことができる。層流に生じる自己触媒反応における化学表面(Chemical Fronts)の伝搬は数値シミュレーション法により解析されてきたが、逆伝搬(すなわち、層流方向に上流する反応表面)に関しては現在にいたるまで予測(推測)に頼ってきた。しかし、本発明の方式を手段として、層流状態に

50

おける NaClO_2 - NaS_2O_3 間反応に係るこの逆伝播を観察することができた。発明にのつとる蛇行流路を通過するプラグのカオス的流れは変動を抑制し、安定した反応混合物をもたらす。

【0288】

もちろん、カオス的に攪拌されたプラグでさえ変動が発生しうる有限確率空間が存在する。発明による一様態において、これら反応の進化状態の詳細は高速デジタル・カメラで監視されるようになっている。一プラグの反応が隣接するプラグの挙動に影響しないように、プラグが油によって分離され互いに伝達していない状態が好ましい。何千ものプラグの全挙動を網羅する統計データを、実質上同一実験条件において迅速に得ることができる。変動により自己触媒反応が生じるかどうかは、変動の大きさとその寿命などの要素に依存する。変動寿命は、典型的にシステムの混合時間により制限される。攪拌されていない溶液の場合は、拡散作用によって混合されるためかなり速度が低下し、変動が継続して、自己触媒反応につながりうる。

10

【0289】

攪拌された溶液の場合は、変動寿命が比較的短いため、自己触媒反応を引き起こしえるほど長期間維持されるのは大規模な変動のみである。

【0290】

混合時間および変動寿命は、通常、プラグサイズに依存する。プラグサイズの縮小とともに、混合が加速され、変動が抑制される。

【0291】

20

しかしながら、 10^{-8} モル/リットルの H^+ 濃度($\text{pH}=8$)を含む溶液中にある極小プラグ(例：約 $1\mu\text{m}^3$ または 10^{-15}L)は、一プラグ当たりになぜかな H^+ イオン(約 10^{-23} モルまたは約6個の H^+ イオン)しか含まない。このような小型プラグの形成時、これらのプラグにおける H^+ イオン数はポアソン分布を示す。

【0292】

実験における多大なる挑戦は、これらのシステムでの確率的挙動が主として内部濃度変動によるということを立証することである。

【0293】

ノイズと不安定状態の原因となるその他の要因は次のとおりである：(1)異なる量の試剤を伴うプラグ形成につながりえる導入試剤流の一時的流量変動、(2)顕微鏡の照度により発生しうるマイクロフルイディック装置内溶液などの温度変動、そして(3)異なるプラグ表面特性の変形形態につながりえる搬送流体中の不純物による変動。

30

【0294】

発明によるマイクロフルイディック・システムは、その非線形反応速度のために離散した確率的挙動を示す様々な化学・生化学工程を調査する手段となりうる。さらに、それらは、システムで生じる極めて小規模(例：細菌性細胞の容積に相当する約 $1\mu\text{m}^3$)な工程を調査する手段となりうる。極めて少量を伴うシステムにおいて、単純な反応でさえ、これらの容積に局部集中された少数分子により確率的挙動を示すと推測される。

【0295】

40

自己触媒反応は、わずかな量の自触媒高感度検出の分野における多大なる可能性を提供する。最も幅広く使用されているハロゲン化銀写真をはじめとして、当原理において作動するシステムがいくつかある。ハロゲン化銀写真において、光線の光子エネルギーはハロゲン化銀 AgX 乳剤をナノメートルサイズの金属銀微粒子に分解する手段となる。その後、銀微粒子に組み込まれたフィルム(膜)は、溶解性銀(I)塩および還元剤(ヒドロキノン)準安定性混合物の添加によって化学的に増幅される。

【0296】

金属銀の微粒子は、初めの銀微粒子の成長をうながすので、ヒドロキノンによる銀(I)の還元を触媒する。

【0297】

自己触媒反応の別例として、生物科学において広く使われる非常に効果的な増幅方式で

50

ある合成酵素連鎖反応(PCR)が挙げられる。

【0298】

しかしながら、超高感度および増幅を伴うシステムを設計する際にジレンマが生じる。超高感度および増幅を達成するために、典型的にシステムが極めて不安定な状態でなければならない。一方、不安定システムはノイズに非常に敏感なうえ、寿命が非常に短い。さらに、自発的分解と検体によって生じた反応を不安定システムにおいて識別するのは困難である。一様態において、カオス的混合および区画化を可能にする本発明によるマイクロフルイディック装置はこのジレンマを克服する手段とされる。

【0299】

本発明によるマイクロフルイディック・システムの将来性を実証すべく、発明によるマイクロフルイディック・システムは不安定混合物を処理するために使用される。一アプリケーションにおいて、発明によるマイクロフルイディック・システムを NaClO_2 と NaS_2O_3 間における確率反応を制御する手段とすることが好ましい。当反応は、特に高感度増幅工程に使用されるのが好ましい。

【0300】

不安定な NaClO_2 と NaS_2O_3 の反応混合物を含むプラグが、限界値を超える H^+ 局部濃度をもたらすのに十分な H^+ 量を含む小型プラグと融合する場合に、急速な自己触媒反応が通常発生する。典型的に、当自己触媒反応は H^+ の大量生成に結びつく。したがって、弱い化学信号(例：少量の H^+)は、不安定反応混合物によって急速に増幅される。したがって、例として、当アプローチは少量の H^+ が生成される酵素を要するなどの生物学的反応を調査する手段となりうる。

【0301】

上記の自触媒作用システムは、その斬新さと有用性を更に引き出すいくつかの特徴を有する。一様態において、不安定な増幅反応混合物は原位置で調合され、分解する間もなく数ミリ秒内に消耗される。

【0302】

一画に生じる反応が別の一画での反応に影響を及ぼさないようにシステムを区画化することが好ましい。当区画化により、微量のサンプルだけを使い、数秒間で何千という独自の実験を実施することが可能になる。ここで重要視すべき点は、システム内のカオス的混合が変動を弱め、反応混合物を安定させるということである。

【0303】

発明にのっとるこの制御可能な自触媒作用増幅の適用範囲は陽子や Co^{2+} イオンの検出の分野に限られない。

【0304】

例として、 $(\text{Co}(\text{III})\text{-5-Br-PAPS})/\text{ペルオキシ1硫酸(peroxomonosulfate)}$ 酸化反応もまた、抗体に結合する標識付け酵素として使用しえる。例として少量のペルオキシダーゼ検出に間接的に使用することができる。分析的に特性化された $(\text{Co}(\text{III})\text{-5-Br-PAPS})/\text{ペルオキシ1硫酸(peroxomonosulfate)}$ 酸化反応は、自触媒として機能する無色の Co^{2+} イオンを生成するカリウムペルオキシ1硫酸と酸化における、バイオレット・ビスBis[2-(5-プロモ-ピリジルアゾ)-5-(N-プロピル-N-スルホプロピル-アミノ-フェノラート)]コバルト酸、 $(\text{Co}(\text{III})\text{-5-Br-PAPS})$ の自触媒分解に関係する。(当反応に対する自触媒現象のオーダーは未だ確立されていない。) (Endo et al., "Kinetic determination of trace cobalt (II) by visual autocatalytic indication," Talanta, 1998, vol.47, pp.349-353; Endo et al., "Autocatalytic decomposition of cobalt complexes as an indicator system for the determination of trace amounts of cobalt and effectors," Analyst, 1996, vol.121, pp.391-394.)。

$\text{Co}(\text{III})\text{-[5-Br-PAPS]}$ (還元) $+\text{HSO}_5^- \rightarrow$



$(\text{Co}(\text{III})\text{-5-Br-PAPS})$ とペルオキシ1硫酸のバイオレット(すみれ色の)混合物へ Co^{2+} を少量追加することにより、急速な色素減少が生じて無色溶液が生成される。当変質現象前に

生じる時間的遅延は、溶液に追加される Co^{2+} の量に依存する。当反応は $1 \times 10^{-1} \text{ mole/L}$ といった低い Co^{2+} 濃度を検出する手段とされてきた。他のイオン(V (V)、Cr (III)、Cr (VI)、Mn (II)、Fe (II)、Ni (II)、Cu (II)、およびZn (II))の存在下において、反応は優れた選択性を示す。

【0305】

発明による装置と方式は、その他の自己触媒反応に適用されうる。それらの自己触媒反応のいくつかは無機化学、有機化学、および生物化学において説明される。Cr(III)(B82) Mn^{2+} またはコロイド性 MnO_2 などの遷移金属イオン反応およびハロゲン化合物やオキシハロゲン化合物の反応は多くの場合において自己触媒的である。

【0306】

10

ランタニド元素(Eu^{2+})およびアクチニド系列(U^{4+})に関係する自触媒現象も報告されている。

【0307】

これらの元素はすべて、化学廃棄物、飲料水または生体液の検出および監視の際に標的となりえるものである。生体分子のような微量の光学活性キラル不純物を検出するために非対称自己触媒反応を手段とすることにより、興味をそそる可能性が生まれる。

【0308】

これに加え、今までに無い自己触媒反応を設計することも可能である。生物学の世界には自触媒現象が満ち溢れている。また、多くの酵素は自己触媒性である(例：プログラムによる細胞死に関係するカスパーゼ、規制と増幅に関係するキナーゼ、および、物質(新陳代謝・信号伝達・血液凝固に関与するその他の酵素)。

20

【0309】

パーフルオロデカリン(PFD)のようなペルフルオロカーボン乳剤は様々な生体分子と互換性をもち、手術中人体において代用血液としても使用されている。酵素反応動力学の定量測定の適応性が発明により形成されたプラグにより実証されたことから、発明により形成されたプラグが生物学的自己触媒性の検出にも適用しうるといえる。本発明による装置と方式の適用範囲は自触媒そのものの検出に限られない。例として、自触媒による検体の標識付けもまた本発明の適用範囲である。生体分子は頻繁に金属ナノ粒子により標識付けされる。このような金属ナノ粒子は、金属イオンを金属に還元するのに非常に効果的な自触媒である。好ましくは、本発明のシステムおよび方式は、DNA、RNA、または自触媒経路でナノ粒子により標識付けされたタンパク質の単一分子を視覚的検出する手段となる。発明にのっとる予備実験において、プラグ内の汚染されていない微粒子形成および輸送が観察された。

30

【0310】

さらに、化学的還元における析出金属(例：銅、銀、金、ニッケル)およびナノ粒子の生成もまた、自触媒作用メカニズムによって生じる。これらの反応は、一般的に無電解による金属析出に適用され、微量な金属微粒子の検出に有用であるとされる。水中の金属微粒子の存在により、作動する機械的装置の存在が示されうる。発明による一様態において、発明による装置と方式は、微量またはごく少量存在する金属微粒子を検出する手段となる。

40

【0311】

本発明にのっとる装置は単純設計を伴い、原料消費量がごくわずかであり、それに加えて耐久性に富む。高圧源を必要とせず、例として重力またはポケットサイズの圧縮空気源を手段として操作することができる。一様態において、発明によるシステムはポータブルおよび携帯型の装置に適用される。

【0312】

自己触媒反応は閾値反応を示す。すなわち、非常に突発且つ一時的な未反応混合物から反応混合物への変化を示す。時間が距離に等しい場合、短距離で生じる突然の遷移を、発明による装置および方法を使って観察することができる。時間(また距離)は、触媒の初期濃度に非常に敏感である。したがって、反応前にその反応システムがどれだけ移動したか

50

に注目すれば、サンプルの自触媒濃度を断定するのは容易である。

【0313】

自己触媒工程の一例として血液凝固が挙げられる。自己触媒作用は流れおよび混合に対して非常に敏感である。したがって、流れの非存在下で自己触媒作用を伴う実験からは、信頼性に欠ける結果や、凝析階段流の本来の機能にほとんど関連性がない結果しか得られない。従来のマイクロフルイディック・システムは血液に適用するのが難しいかもしれない。なぜなら、一度凝析が生じると、それにより流路がふさがれてマイクロフルイディック装置内の流れを止めてしまうからである。その上、凝結した血液は自触媒として機能する。たとえ流路内で凝結した血液が少量だとしても、その測定値の信頼性は低下しうる。

【0314】

これらの問題は本発明の装置により克服することができる。

【0315】

プラグを用いることにより、自己触媒反応を簡単に制御することができ、そしてまた、形成されたあらゆる固体により流路が詰まったり、自己触媒残留物が残ったりすることなく、プラグ内部に輸送され、流路外部へと排出されるため、固体クロット形成の心配がなくなる。それに加えて、生理学的条件下の流れに類似するように、プラグ内部の流れを簡単に制御・調節することができる。

【0316】

階段流は通常表面上で始まる。故に、表面に血液凝固感応性をもたらすために、表面上の不動組織因子(階段流開始剤)を含む微視的な玉は、一本の流れに加わりその後プラグ内部において輸送されうる。さらに、界面活性剤の表面化学を制御する手段ともなりうる。

【0317】

したがって、発明による装置および方法は例として、血液循環の実質条件下におおける(例：血友病または血栓形成傾向のある事例における)凝析階段流機能検査の手段となりうる。当検査は特に、診断検査の分野において価値がある。血液を一本の流れに注入し、そして既知濃度の凝析を引き起こすとして知られる分子(例：VIIa因子)をプラグ形成前に別の流れを経由して投入することができる。一定流量において、正常な血液は(その一定時間に関連する)一定距離で凝結するとされる。当凝結反応は光散乱または顕微鏡検査によって光学上観察することができる。血友病患者の血液はこれよりも後に凝結するとされる。当検査タイプは外科手術前(の検査)に有用である。幼児分娩(特に母体に血友病が存在する可能性がある場合)を円滑に進めるためにも、この種の試験は重要である。発明によるシステムにおいて、微量の血液だけが要されるために胎児の検査も実施しうる。

【0318】

血液は、患者体内から直接注入または血液凝固阻止剤(例：EDTA)の存在下で収集し、それから Ca^{2+} を加えることによりプラグにおいて再構成されうる。場合によっては、 Ca^{2+} を追加するだけで凝析階段流初期反応をもたらしうる。

【0319】

発明による装置および方法はまた、実際の血液循環の条件下における血液凝固阻止剤の効能を評価する手段となりうる。正常な血液(単独での使用および、 Ca^{2+} または他の薬剤との併用による再構成可)、凝析を誘発するとして知られる薬剤、および血液凝固阻止剤として研究されている薬剤(またはその他いくつかの比較研究を要する薬剤)から、プラグを形成することができる。これらの薬剤濃度は流量を変えることにより変化することができる。凝析発生距離に焦点を置いて、凝析を防ぐ様々な薬剤の効能が比較される。システム内の流れの状態および様々な化合物の存在による、血液凝固阻止剤の効能への影響を迅速に調査することができる。同技術はまた、凝析の起因となる薬剤(というよりもむしろ凝析を防止する薬剤)を評価する手段ともなりうる。これらの検査は候補薬評価において非常に貴重となりえる。

【0320】

(合成)

本発明にのっとって、基板内反応を処理する方法が提供される。本発明の基板内に反応

10

20

30

40

50

原系を含む2つ以上のプラグ流体を導入することにより、反応が導かれる。

【0321】

一様態において、プラグ流体は試剤・溶媒を含んでいるため、プラグ流体の混合が反応生成物の形成をもたらす。別の実施形態において、プラグ流体のうち1つは試剤を含まず単に流体のみを含みうる。当実施形態において、プラグ流体混合によりプラグ内の試剤濃度を操作することができる。

【0322】

各プラグ流体からプラグを形成しその後これらの異なるプラグを融合することにより反応を導きえる。

【0323】

融合プラグを形成するためにプラグが融合される場合、プラグの1番目と2番目の組はそのサイズにおいて本質的に類似または異なるかもしれない。さらに、プラグの1番目と2番目の組は異なる相対速度を有するかもしれない。一実施形態において、マイクロフルイディック・リアクターの大規模な配列は多大な処理能力を可能にするために並列状態で作動する。

【0324】

発明による装置および方法はナノ粒子合成に使用することができる。単分散のナノ粒子はセンサと電子部品同様に重要であるが合成するのが難しい (Trindade et al., Chem. Mat. 2001, vol. 13, pp. 3843-3858)。

【0325】

一様態において、半導体および貴金属の単分散ナノ粒子は発明による流路による時間的管理の下で合成される (Park et al, J : Phys. Chem. X, 2001, vol. 105, p. 11630- 11635)。高速での核生成は、急速混合によって好ましくは誘発され、それによって、これらのナノ粒子が管理される期間中に成長することを可能にする。そのとき、それらの成長が例としてチオールを伴う微粒子表面の不動態化により直ちに終結することが好ましい。流量したがって成長時間を変化することにより、異なるサイズのナノ粒子が好ましくは得られる。それに加えて、発明による装置は、ナノ粒子合成を監視し、それゆえに所要の特性を伴うナノ粒子を得る手段となりえる。例として、ナノ粒子の発光色または吸収性の変化を測定することによりナノ粒子形成を監視しうる。さらに、主要流路上にある一定の位置で消光剤の流れを導入することによりナノ粒子の成長を止めうる。

【0326】

発明による流路で発生するミリ秒レベルの急速混合は、従来の溶液混合により合成されたナノ粒子より小さくはるかに単分散性の強いナノ粒子の形成を確実にするのに役立ち得る。図13は、プラグ内急速混合(先の尖った吸収頂点を持つ影が薄目の領域)によって、および従来の溶液混合(影が濃い目の領域)によって形成されたCdSナノ粒子のUV-VIS領域を示す。プラグ内で生じた合成に見られる鋭い吸収頂点は、形成されたナノ粒子が高度に単分散であることを示す。それに加えて、青色で示される吸収頂点の転位(波長のより短い方への転位)は、形成された微粒子が小さいことを示す。

【0327】

図14A-Bは、単相且つ水性層流(図14A)のPDMSマイクロフルイディック流路において、および非水溶性パーフルオロデカリンに囲まれた水性プラグ(FIG.14B)において生じたCdSナノ粒子の合成を図示する。

【0328】

図14A-Bにおいて、 Cd^{2+} は入口1400と1403番へ導入され、水様液流は入口1401と1404番へ導入され、および S^{2-} は入口1402と1405番へ導入された。図14Aにおいて、水様液流は流路1406番を流れた。その間、図14Bにおいて油は流路1407番を流れた。図14Aは、時間 $t=6$ 分の流路1408および1410番の一部、および時間 $t=30$ 分の流路1409と1411番の一部を示す。合成に層流を使うと大量のCdS沈殿物が流路壁上に形成されるということが、図14Aから分かる。

【0329】

合成にプラグを使用した場合、全CdSはプラグ内部で形成され、表面汚染は認められなかった。図15は、下記の例13で詳細にわたり説明されているCdSナノ粒子の合成技術を図示する。

【0330】

次の発明による方法はナノ粒子に関係する合成の手段となりえる：(a) 均質核生成条件下において、アクセスできない結晶構造を伴うナノ粒子核生成に自己組織化単層膜を手段とする方法(例：核生成が生じる表面を制御することにより同質異像を制御する方式)。

【0331】

(b) 一連のコアとシェルのサイズを伴うコアシェルナノ粒子を生成するためにプラグ融合を手段とする方法。第1流路のプラグ流において、CdSe微粒子のような小さなコアナノ粒子は数ミリ秒の内に合成しうる。そのとき、 Zn^{+2} および S^{-2} を含む溶液と混合する種としてCdSe微粒子を使用することができる。ZnS形成用種の役割をするCdSe微粒子は、したがってCdSe(コア)/ZnS(シェル)ナノ粒子の形成を可能にする。融合工程を二度以上繰り返すだけで二層以上を伴うコアシェル微粒子を得られうる。

10

【0332】

(c) 複合ナノ粒子を生成するためにプラグ融合を手段とする方法。例として、個別の流路二本からのプラグ流れを利用して、CdSeとZnSの小型ナノ粒子を形成することができる。これらの流れを合流すると、CdSe/ZnS合成物を含むより大きなナノ粒子を形成することになり、その結果、微粒子の凝集につながる。原ナノ粒子を少数だけしか含まない複合ナノ粒子は非中心対称の可能性があり、通常とは異なる光物理的特性を有するかもしれない。

20

【0333】

(d) カプセル入りの薬品や複合薬といった医学に重要なナノ粒子を合成する発明による装置と方法を手段とする方法。

【0334】

(e) コアシェル微粒子および他の複合システムの組み合わせ合成。

【0335】

例として、CdSe/ZnS微粒子の発光を監視し、そして様々なコアとシェルのサイズ、コアとシェルの様々なドーピング不純物、および微粒子表面に様々な配位子組成を備える微粒子を生成するために条件調節しうる。これらは発明による装置を手段としてリアル・タイムで処理することができる。全工程の自動化もできる。

30

【0336】

また、本発明による装置と方法は重合体合成の手段ともなりうる。

【0337】

重合反応のタイミングを正確に制御することが発明により可能となったため、分子量・多分散・およびブロックネス(blockiness：分体の合体部が分かりづらいという点)といった1つ以上の重合体特性を容易に制御または調節することができる。さらに、流路の経路長さが特定の重合反応期間に一致するので、装置内部においてプラグを融合することによりブロック共重合体を精密に形成することが本発明の基板を使うことにより可能となる。

40

【0338】

同様に、個別の分子量部分集合体から成る重合体をもたらす特定の末端基でリビングポリマー(重合体)鎖を終結することができる。

【0339】

さらに、これに似たアプローチを使って候補薬の連結ライブラリを合成しうる。流路のプラグ位置を利用してライブラリを暗号化しうる。流量を変化することにより可変組成を有するプラグを生成しうる。

【0340】

ライブラリを合成した組み合わせを、本発明による同マイクロフルイディック・チップ上で行なわれるスクリーニングおよび評価分析と連結しうる。いくつかの実施形態において、合成や評価分析などを実行中にプラグの融合・分裂・および選別を手段としうる。

50

【0341】

上記される本発明の合成法はすべて、複数反応を並行して引き起こすことにより1つ以上の巨視的な量の反応生成物を形成する手段とすることができる。

【0342】

(プラグによる微粒子の分離と選別)

移動中のプラグ内部の流れは、重合体と微粒子を分離する手段となりうる。まず最初に移動中プラグ内の流れを使ってプラグ内部の重合体または微粒子(例:プラグの前後左右どれかに存在する余分な重合体)の分布を確立し、そしてその次に、分裂を利用して高濃度の重合体または微粒子を含むプラグの一部を分離および隔離するといった方法で、プラグを分離工程に利用することができる。二個の重合体または微粒子がプラグの内部に存在して異なる分布を確立している場合、重合体または微粒子の分離に分裂を利用しえる。当アプローチは、例としてこれらに限定されないが次のもののいずれかをマイクロフルイディック・チップ上で達成する際に有用となりうる:分離、精製、濃縮、非膜透析および濾過。

10

【0343】

(結晶化)

発明による装置および方法は、既存の結晶化法および例として新型タンパク質のスクリーニングおよび結晶化技術に適応できる他の方法の高速且つ低価格な小型化を可能にする。発明による結晶化法は様々な薬剤、物質、小型分子、高分子、コロイドまたはナノ粒子、あるいはこれらのあらゆる組み合わせに適用しうる。用途に適した多くのタンパク質構造が結晶化に対する抵抗性を有するために未定義のままである。さらに、関心をそそる多くのタンパク質はマイクログラムレベルの量においてのみ利用可能である。したがって、スクリーニング工程での分析を少量のタンパク質だけで実施せざるをえない。現在の結晶化スクリーニング技術は、通常、ミリグラム単位で、タンパク質結晶化の理想条件を定義する。

20

【0344】

発明による装置と方法は、シングルユーザーに利用可能な現在のベンチトップの方法論を改善し、速度改善、サンプル低消費、および全く新しい結晶化制御方式を伴うより高性能な自動化システムを可能にする。

【0345】

発明によるマイクロフルイディック・システムは、小型分子または高分子の結晶化およびそれらの錯体に適用することができる。

30

【0346】

例として、本発明にのっとるシステムおよび方法の例としてはこれらに限定されないが次のものが挙げられる:(1)生体高分子(細胞質内タンパク質、細胞外タンパク質、膜タンパク質、DNA、RNAおよびそれらの複合した組み合わせ)、(2)翻訳前後修飾生体分子(例としてはこれらに限定されないが、ハロゲン化・脱塩基・アルキル化などの処理がなされた核酸同様に、燐酸化・硫黄化・糖鎖形成・ユビキチン化などの処理がなされたタンパク質が挙げられる)、(3)重原子に標識付けされたDNA、RNA、およびタンパク質(またそれらの錯体)、セレノメチオニンに標識付けされたタンパク質および核酸(またそれらの錯体)、ハロゲン化されたDNA、RNAおよびタンパク質(またそれらの錯体)のような慎重に被覆化された高分子、(4)ビールの全体または大型細胞微粒子(リボソーム、レプリソーム、スプライセオソーム、チューブリン・フィラメント、アクチンフィラメント、染色体などを含む)、(5)薬品のような小型分子化合物、鉛化合物、配位子、塩剤、および有機または有機金属化合物、(6)小型分子/生体高分子錯体(例:薬剤/タンパク質錯体、酵素/基板錯体、酵素/生成物錯体、酵素/調整器錯体、酵素/抑制剤錯体およびそれらの組み合わせ)、(7)コロイド粒子、および、(8)ナノ粒子。

40

【0347】

好ましくは、本発明による一般的な結晶化技術は、次の根本的な二工程のスクリーニングに関係する。すなわち、大量の小型プラグを含む比較的小規模な流路を手段とする結晶化パラメーターの粗スクリーン、および回折品質の結晶を得るためにより大規模な流路お

50

よびよりプラグを手段とする精密スクリーンの二工程である。

【0348】

例として、横断面寸法 $(50\text{ }\mu\text{m})^2$ の流路および 10mg/mL のタンパク質最終濃度に相応する 150pL のプラグを使って行なわれた一回に10試行を含む粗スクリーンをおよそ1000回(合計10,000試行)実施するのに、通常、約 $1.5\text{ }\mu\text{L}$ の溶液を必要とし、約 (10nm) 以下の大きさの結晶を生成し、およそ $15\text{ }\mu\text{g}$ のタンパク質を消耗する。これらのマイクロフルイディック・ネットワークにおいて、300個またはそれ以上の数に及ぶこれらのプラグが約1秒で形成されうる。 $(500\text{ }\mu\text{m})^2$ の流路での最適条件下における精密スクリーンは、およそ50個のプラグを使用すると推測される。その他に溶液 $\sim 5\text{ }\mu\text{L}$ およびタンパク質 $50\text{ }\mu\text{g}$ が消耗されると推測される。これにより、 $(100\text{ }\mu\text{m})^3$ 以下の大きさ結晶を生成することができる。一秒毎またはそれくらいの時間でおよそ30のプラグを形成することができる。システムの処理能力は、通常プラグ形成率によって定められ、どれほど急速に流量が変化されうるかによって制限されるかもしれない。周波数100ヘルツで機能する圧力制御法が利用可能なため、PDMSマイクロフルイディック・ネットワークに適用されうる(Unger et al., "Monolithic fabricated valves and pumps by multilayer soft lithography," Science 2000, vol. 288, pp. 113-116)。

10

【0349】

外観、サイズ、光学品質および回折特性のような結晶特性を、異なる条件の下で特性化および測定しうる。例として、二重収束鏡およびMSCクライオシステムを装備するRigaku RU 200回転陽極X線ジェネレータの上面に取り付けられたRaxis IIcX線検出器が、少なくとも特性化および測定の一部において手段となりうる。

20

【0350】

シンクロトロン・ビームは小さな結晶の特性化に役立ちうる。さらに、X線ビームによる構造研究との互換性を備える発明によるマイクロフルイディック・システムを構築するために、これらの装置と方法を手段としうる。

【0351】

現在の結晶化への取り組みに関係する重要課題は、最適な回折特性を有する結晶の形成条件を判断(設定)することである。

【0352】

通常、結晶が成長し、分離し、増大してから、その回折特性をX線ジェネレータまたはシンクロトロンにより判断しなければならない。マイクロフルイディック・システム内部の結晶回折特性の断定には、壁沿いの薄い非散乱性マイクロフルイディック・システムが望ましい。好ましくは、発明による方法を用いる当システムの内部で結晶化が起る。ここにそれを説明する。

30

【0353】

結晶構造または回折特性を判断するために、結晶をX線ビームに露出する(スクリーニングモード)。例としてPDMS層。

【0354】

ある種の塩類とともに大小の分子量有機物を含む沈殿剤は、1%以下から40%以上の濃度、または $<0.5\text{M}$ から 4M 以上の濃度で使用されうる。溶解性を保つために一定レベルのイオン強度を要するサンプルとは異なり、水そのものが沈殿剤のように作用しうる。結晶化スクリーンの化学的多様性を増大させるために、多くの沈降剤を互いに混合しうる。発明による装置は、これらの広範囲にわたる化合物に対して優れた互換性をもつ。

40

【0355】

沈殿剤として適用しうる塩類の包括的一覧は以下のとおりである：酒石酸塩(Li, Na, K, Na/K, NH₄)、リン酸エステル(Li, Na, K, Na/K, NH₄)、酢酸エステル(Li, Na, K, Na/K, Mg, Ca, Zn, NH₄)、ギ酸エステル(Li, Na, K, Na/K, Mg, NH₄)、クエン酸塩(Li, Na, K, Na/K, NH₄)、塩化物(Li, Na, K, Na/K, Mg, Ca, Zn, Mn, Cs, Rb, NH₄)、硫酸エステル(Li, Na, K, Na/K, NH₄)、マレイン酸エステル(Li, Na, K, Na/K, NH₄)、グルタミン酸塩(Li, Na, K, Na/K, NH₄)

50

。沈殿剤として適用しうる有機物質の包括的一覧は以下のとおりである：PEG 400、PEG 1000、PEG 1500、PEG2K、PEG 3350、PEG 4K、PEG 6K、PEG 8K、PEG10K、PEG 20K、PEG-MME 550、PEG-MME 750、PEG-MME 2K、PEG MME5K、PEG-DME 2K、ジオキサン、メタノール、エタノール、2-ブタノール、n-ブタノール、t-ブタノール、ジェファミン(jeffamine)m-600、イソプロピルアルコール、2-メチル-2,4-ペンタンジオール(pentanediol)、1,6ヘキサンジオール(hexanediol)。緩衝効果を有する介在物により溶液中pHを変化することができる(生体試料の典型的なpH範囲は3~10.5の間における任意の数値である)。また、緩衝液濃度は通常0.01~0.25Mである。当文書に記されるマイクロフルイディック装置は、広範囲にわたるpH値、特に標的生物に適するpH値に対して優れた互換性をもつ。

10

【0356】

発明にのっとり、手段としうる緩衝液候補薬の包括的一覧は、以下のとおりである：Na酢酸エステル、HEPES、Naカコジル酸塩、Naクエン酸塩、Na琥珀酸塩、NaK-リン酸エステル、トリス、トリスマレイン酸エステル、イミダゾールマレイン酸エステル、ビス-トリスプロパン、CAPSO、CHAPS、MESおよびイミダゾール。

【0357】

添加剤は標的の溶解度且つ又は活性挙動に影響を及ぼす小型分子である。このような化合物は結晶化スクリーニングを促進するか、または標的の代替結晶形または同質異像をもたらすことができる。添加剤は考えうる化学形態のほぼ全ての形態を有することができるが、典型的には、一価および多価塩類(無機または有機)、酵素配位子(基板、生成物、アロステリック・エフェクター)、化学的架橋剤、洗浄剤且つ又は脂質、重金属、有機金属化合物、微量沈殿剤、および小分子量有機物などの形態を有する。

20

【0358】

次のものは、発明にのっとり使用されうる添加剤の包括的一覧である：

2-ブタノール、DMSO、ヘキサンジオール、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール、フッ化ナトリウム、フッ化カリウム、フッ化アンモニウム、無水塩化リチウム、塩化マグネシウム6水化物、塩化ナトリウム、塩化カルシウム二水和物、塩化カリウム、塩化アンモニウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、ヨウ化アンモニウム、チオシアン酸ナトリウム、チオシアン酸カリウム、リチウム硝酸塩、マグネシウム硝酸エステル6水化物、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、硝酸アンモニウム、ギ酸マグネシウム、ギ酸ナトリウム、ギ酸カリウム、ギ酸アンモニウム、リチウム酢酸エステル二水和物、マグネシウム酢酸エステル四水和物、酢酸亜鉛二水和物、酢酸ナトリウム三水和物、酢酸カルシウム水和物、酢酸カリウム、酢酸アンモニウム、リチウム硫酸塩一水化物、リチウム硫酸エステル一水化物、硫酸ナトリウム十水塩、硫酸カリウム、硫酸アンモニウム、酒石酸塩二水和物2ナトリウム、酒石酸ナトリウムカリウム四水和物、酒石酸2アンモニウム、リン酸二水素ナトリウム一水化物、水素リン酸エステル2ナトリウム二水和物、カリウム二水素リン酸塩、水素リン酸エステル2カリウム、燐酸二水素アンモニウム、塩基水素リン酸エステル2アンモニウム、クエン酸3リチウム四水和物、クエン酸3ナトリウム二四水和物水和物、クエン酸3カリウム一水化物、クエン酸水素2アンモニウム、塩化バリウム、塩化カドミウム二水和物、塩化カドミウム二水和物、塩化第二銅二水和物、塩化ストロンチウム6水化物、イットリウム塩化物6水化物、エチレングリコール、無水グリセリン、1,6ヘキサンジオール、MPD、ポリエチレングリコール400、トリメチルアミンHCl、グアニジンHCl、尿素、1,2,3-ヘプタントリオール、ベンズアミジンHCl、ジオキサン、エタノール、イソプロパノール、メタノール、ヨウ化ナトリウム、L-システイン、EDTAナトリウム塩、NAD、ATPジナトリウム塩、D(+) - グルコース一水化物、D(+) - スクロース、キシリトール、スペルミジン、スペルミン4HCl、6-アミノカプロン酸、1,5-2アミノペンタン2HCl、1,6-2アミノヘキサン、1,8-アミノオクタン、グリシン、グリシル・グリシル・グリシン、ヘキサミンコバルト三塩化物、タウリン、ベタイン一水化物、ポリビニルピロリドンK15、非洗浄性スルホベタイン195、非洗浄性スルホベタイン201、フェノール、DMSO、硫酸デキストランナトリウム塩、ジェファミンM-600、2、5つのヘキサンジオール、(+/-)

30

40

50

-1,3ブタンジオール、ポリプロピレングリコールP400、1,4ブタンジオール、三次ブタノール、1,3プロパンジオール、アセトニトリル、ガンマ・ブチロラクトン、プロパノール、酢酸エチル、アセトン、ジクロロメタン、n-ブタノール、2,2,2トリフルオロエタノール、DTT、TCEP、ノナエチレン・グリコール・モノドデシル・エーテル、ノナエチレン・グリコール・モノラウリル・エーテル、ポリオキシエチレン(9)エーテル、オクタエチレン・グリコール・モノドデシル・エーテル(オクタエチレン・グリコール・モノラウリル・エーテル)、ポリオキシエチレン(8)ラウリル・エーテル、ドデシル-β-Dマルトピラノシド、ラウリン酸スクロース・エステル、シクロヘキシルペンチル-β-Dマルトース配糖体、ノナエチレン・グリコール・オクチルフェノール・エーテル、N,N-bis(3-D-グルコン酸アミドプロピル)デオキシコール酸アミン、デシル-β-Dマルトピラノシド、ラウリルジメチルアミン酸化物、シクロヘキシルペンチル基-β-Dマルトース配糖体、ra-ドデシルスルホベタイン3-(ドデシルジメチルアンモニウム)プロパン-1-スルフォナート)、ノニル-β-D-グルコピラノシド、オクチル-β-D-チオグルコピラノシド、OSG、N,N-ジメチルデシルアミン-β-酸化物、メチルO-(N-ヘプチルカルバモイル)-α-D-グルコピラノシド、スクロース・モノカプロイル基、n-オクタノイル-β-D-フルクトフラノシル-α-D-グルコピラノシド、ヘプチル基-β-D-チオグルコピラノシド、オクチル-β-D-グルコピラノシド、OG、シクロヘキシル・プロピル基-β-D-マルトース配糖体、シクロヘキシルブタノイル-N-ヒドロキシエチルグルカミド、n-デシルスルホベタイン：3-(デシル・ジメチルアンモニウム)プロパン-1-スルフォナート、オクタノイル-N-メチルグルカミン、OMEGA、ヘキシル-β-D-グルコピラノシド、Brij 35、Brij 58、トリトンX-114、トリトンX-305、トリトンX-405、トウイーン20、トウイーン80、ポリオキシエチレン(6)デシルエーテル、ポリオキシエチレン(9)デシルエーテル、ポリオキシエチレン(10)ドデシルエーテル、ポリオキシエチレン(8)トリデシルエーテル、デカノイル-N-ヒドロキシエチルグルカミン、ペンタエチレン・グリコール・モノオクチル・エーテル、3-[(3-コールアミドプロピル)-ジメチルアンモニウム]-1-プロパンスルフォナート、3-[(3-コールアミドプロピル)-ジメチルアンモニウム]ドロキシ-1-プロパンスルフォナート、シクロヘキシルペンタノイル-N-ヒドロキシエチルグルカミド、ノナノイル-N-ヒドロキシエチルグルカミド、シクロヘキシルプロパノール-N-ヒドロキシエチルグルカミド、オクタノイル-N-ヒドロキシエチルグルカミド、シクロヘキシルエタノイル-N-ヒドロキシエチルグルカミド、ベンジル・ジメチルドデシル・臭化アンモニウム、n-ヘキサデシル-β-Dマルトピラノシド、n-テトラデシル-β-Dマルトピラノシド、n-トリデシル-β-Dマルトピラノシド、ドデシルポリ(エチレングリコエーテル)、n-テトラデシル-N,N-ジメチルアンモニウム-1-プロパンスルフォナート、n-アンデシル-β-Dマルトピラノシド、n-デシルD-チオマルトピラノシド、n-ドデシルホスホコリン、α-D-グルコピラノシド、β-D-フルクトフラノシル・モノデカン酸エステル(スクロース・モノ・カプリン酸塩)、1-s-ノニル-β-D-チオグルコピラノシド、n-ノニル-β-D-チオマルトイラノシド、N-ドデシル-N,N-(ジメチルアンモニオ)-酪酸塩、n-ノニル-β-D-マルトピラノシド、シクロヘキシル・ブチルD-マルトース配糖体、n-オクチル-β-D-マルトース配糖体、n-オクチル-β-D-チオマルトピラノシド、n-デシルホスホコリン、n-ノニルホスホコリン、ノナノイルN-メチルグルカミン、1-s-ヘプチル基-β-D-チオグルコピラノシド、n-オクチルホスホコリン、シクロヘキシル・エチルDマルトース配糖体、n-オクチル-N,N-ジメチル・アンモニウム-1-プロパンスルフォナート、シクロヘキシル・メチル-β-D-マルトース配糖体。

【0359】

凍結剤とは、結晶が氷ではなくむしろ硝子体ガラスに埋め込まれるように、液体窒素、液体プロパン、液体エタン、または窒素ガスやヘリウム(全て約100-120 °K)などの起寒剤の瞬間冷凍において、標的結晶を安定させる試剤である。いかなる分量の塩類または分子量小型有機化合物は凍結防止剤として使用できる。代表的なものはこれらに限定されないが、次のものが挙げられる：MPD、PEG-400(両PEG誘導体およびより高分子量のPEG化合

物とともに)、グリセリン、糖(キシリトール、ソルビトール、エリトリトール、スクロース、グルコースなど)、エチレングリコール、アルコール(短鎖と超鎖の両方、揮発性と不揮発性の両方)、 LiOAc 、 LiCl 、 LiCHO_2 、 LiNO_3 、 Li_2SO_4 、 $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 、 NaCl 、 NaCHO_2 、 NaNO_3 など。また、本発明にのっとるマイクロフルイディック装置が製作される材料はこのような一連の化合物と互換性をもちうる。

【0360】

両スパス行列およびグリッドスクリーニング実験の両方を研究者にとって実施可能なものとするこれらの化学物質の多くは、例としてこれらに限定されないが、Hampton Research of Laguna Niguel社(CA, USA)、Emerald Biostructures of Bainbridge Island社(WA, USA)、およびJena BioScience of Jena社(ドイツ)などの様々な製造供給元(ベンダー)から、あらかじめ指定(定義)されたスクリーニング・キット形態で購入することができる。疎行列スクリーンは、できるだけ多くの沈殿剤と緩衝液そしてできるだけ少数の条件を伴う添加剤空間(additive chemical space)のランダムサンプリングを試みる。グリッドスクリーニングは典型的に、互いに対する2つまたは3つのパラメーター(例：沈殿濃度 対 pH)の組織的な変形形態から構成される。両タイプのスクリーンは結晶化試験に好結果を伴って活用されており、また、これらのスクリーンにおいて使われる大多数の化学物質およびそれらの組み合わせは、本発明の実施形態にのっとるチップの設計および行列に適合する。

10

【0361】

なおその上に、マイクロフルイディック装置の現在のおよび将来的な設計により、特定の標的または一組の標的に対する多くの異なる化学物質による配列に関する順応性に優れた組合せスクリーニング(ロボット工学や手作業のいずれかによるスクリーニングでは困難な工程)を可能にするかもしれない。後者の場合、初回通過スクリーンでの初回成功結果を最適化するのに特に重要である。

20

【0362】

化学物質変動性に加えて、その他多数のパラメーターを結晶化スクリーニング中に変化することができる。そのようなパラメーターはこれらに限定されないが、次のものが挙げられる：(1)結晶化試験回数、(2)標的溶液と結晶化溶液の比率、(3)標的濃度、(4)標的の二次的小型分子あるいは高分子との共結晶化、(5)水和、(6)温置時間、(7)温度、(8)圧力、(9)接触面、(10)分子を標的とする修正(変更)、および(11)重力。

30

【0363】

下記の記述はタンパク質について述べられているが、上記される他のサンプルタイプ(小型分子、その他の高分子、ナノ粒子、コロイド粒子などを例とする)の結晶化にも下記される特定の装置または方法を使用または適切に適合することができる。本発明による一様態において、タンパク質結晶化は小型化されたマイクロバッチ形態により処理される。その工程は2段階から成る。第一に、タンパク質、沈殿剤および添加剤濃度がこれらの溶液の相対流量を変更することにより調節されることを特徴とするところにおいて、プラグが形成されることが好ましい。当段階はスクリーニング段階に該当する。一旦最適濃度が明確になると、その最適条件で流量を一定に保つことができる。当段階において、プラグが成形するとともに、流路を通して輸送されることが好ましい。第二に、必要とされる数のプラグが形成された時点で、流れが停止することが好ましい。その後、プラグが定温で放置されることが好ましい。発明によるいくつかの実施形態において、流れを止めずにむしろ継続させうる。これらの実施形態において、流れが適切な速度でゆっくりと継続し、そして結晶化発生に十分な時間(数十分から数週間に及ぶが、それよりも早い場合も遅い場合もありうる)プラグが流路内を流れるように流路長さが十分に伸ばされる。

40

【0364】

一様態において、プラグの形成に際する流路内の膨張によりそれらのプラグはトラッピングされる。プラグが流れの存在下で形成される間、膨張は死容積(無駄容積)要素として存在する。したがって、流路を通るプラグの流れが膨張により妨げられる心配がない。一旦流れが停止すると、表面張力が最小のところで、プラグが表面張力により膨張範囲内に

50

送られる。膨張形状の例としてこれらに限定されないが、卵型、丸型、正方形、長方形、又は星形が挙げられる。特に、星形の膨張は、膨張壁へのプラグまたは結晶の密着を防ぎうる。膨張の開口サイズ(膨張した経路のサイズ)と流路幅の比率は、各実験の特定条件群に基づく実験結果ごとに異なりうる。

【0365】

図16は、プラグのトラッピングを図示する発明によるマイクロフルイディック装置の概要図である。実験において、プラグは流路内部のパーフルオロデカリン中に1日保留されていたが、その間プラグに変化は認められなかった(フッ素添加相と水相間での屈折率の非整合が生じプラグ可視化の補助として導入された)。

【0366】

上記の方法は、タンパク質および沈殿剤濃度に対する高度な制御能力の実現を可能にする。さらに、プラグサイズおよび組成を制御することにより一連の時間尺度に対する高度な制御能力の実現を可能にする。図17は、タンパク質結晶化の可変組成によりプラグを形成するマイクロフルイディック法の略図を示す。入ってくる流れは連続的に変化する様々な流量を伴い、その変動流量により、様々な濃度のタンパク質・沈殿剤および添加剤を伴ってプラグが形成されるのが好ましい。例として、図17にあるように、次のものは様々な入口へと導入されうる。緩衝液は入口171、172番へ、PEGは入口173番へ、塩類は入口174番へ、溶媒は入口175番へ、そしてタンパク質は入口176番へと導入されうる。これらの様々な溶液は、パーフルオロデカリンのような搬送流体が流れる流路177番に入ることができる。例として、 $200 \times 80 \mu\text{m}^2$ の断面積を伴う長さ1メートルの流路は6nL(ナノリットル)のプラグをおよそ200個形成する手段となりうる。各プラグが $40 \mu\text{m}^3$ の結晶を形成するのに十分なタンパク質を含んでいる場合、試験を200回執行して、およそ10mg/mLのタンパク質溶液(12 μg のタンパク質)の約1.2 μL のみを消費することになる。これらの試験でプラグを形成するには、約1分あれば十分でありうる。

【0367】

発明による別の様態において、マイクロバッチ・システムに関する説明で上記されるようにプラグが形成された後に、結晶化工程に対するさらなる制御をもたらすために、超薄のPDMS層(あるいは若干透水性を伴うその他の層)を通しての低速蒸発を適用することが好ましい。蒸気拡散実験の場合に類似する結晶化位相空間によって蒸発中にゆっくりと生じるプラグ量減少が溶液の径路を作り出すと推測される。従って、当方法はマイクロバッチ方法に加えて、蒸気拡散法を小型化および最適化する手段とすることができる。

【0368】

蒸気拡散方法において、はるかに大きな貯水溝を伴うクローズドシステム(閉鎖系)で、タンパク質、安定化用緩衝剤、沈殿剤且つ又は結晶化剤を含む液滴の平衡を保つことが可能である。液滴から選択的に水が蒸発するように、通常、全面的により高濃度を伴う同じ化学物質からタンパク質を除いたものが貯蔵溝には含まれている。正常な形態において、これは、タンパク質濃度の漸増をもたらし、数個の結晶を形成しうる。

【0369】

蒸気拡散は2つの方法で行なうことができる。最も頻繁に使われるものはハンギングドロップ法(Hanging Drop)と呼ばれる。液滴をガラス製のカバースリップに載せた後に、そのカバースリップを反転して「リンブロプレート(Linbro Plate)」の小さな貯水溝を密閉する。数時間から数週間後に、微視的な結晶が形成または継続的成長を続けうる。二つ目の方式はシッティングドロップ法(Sitting Drop)として知られている。この方法では、はるかに大きな貯水溝と釣り合わせるために、液滴(通常 $>10 \mu\text{L}$)を、「リンブロプレート(Linbro Plate)」の「マイクロブリッジ(Micro Bridge)」かガラス板どちらかのくぼみに載せ、それから再びクローズドシステムに置く。液滴の表面引張力が低すぎるとそれを反転することが困難となるので、通常、液滴の表面引張力が極めて低い場合、又は液滴が $20 \mu\text{L}$ 以上でなければならぬ場合にシッティングドロップ法を用いる。また、場合によっては用いる手段によって、結晶が他方よりも効率的に成長する。

【0370】

別の実施形態において、プラグが形成および輸送されることにより、余分な沈殿剤とタンパク質の混合が最小限に抑えられる又は防止されることが好ましい。例として、スパイラル流路による温和混合は、これを達成、さらにタンパク質と沈殿剤の界面を生成する手段となりうる。

【0371】

あるいは、T分岐でプラグ2本の流れを融合させずに組み合わせることにより、拡散してから結合するプラグを生成し、大規模な混合を生じることなく流れが停止した後に自由界面を確立しうる。界面によるタンパク質および沈殿剤の拡散は結晶化を誘発する。これは、自由界面拡散法(Free-Interface Diffusion)の類似形態である。上記のマイクロバッチまたは蒸気拡散どちらの形態においても実施しうる。

10

【0372】

プラグ間の拡散を減少させるために、プラグ間の間隔が広がるか、又は油組成が変更しえることが好ましい。例として、パラフィン油における約2.5mmの間隔を利用することができる。これは結晶化試験での水様液拡散に対する効果的なバリアとして実証されている。

【0373】

マイクロバッチ実験を実施する際、曲面を伴うプラグ内部の小さな結晶を視覚的に確認することは非常に難しいかもしれない。発明による形態において、可視化向上を目的として、プラグ流体の屈折率と搬送流体の屈折率の整合に基づいた方法を用いる。顕微鏡の検出は、浅い流路を手段とすること、および水溶液(水様液)屈折率に搬送流体混合物の屈折率を一致させることにより行なわれることが好ましい。

20

【0374】

加えて、いままでにないその他少なくとも三種のタンパク質結晶化制御法を以下に述べる：(1) 表面化学を用いてタンパク質結晶の核生成を達成する方法、(2) 異なる混合方法を使って結晶化を達成する方法、そして、(3) (絶対)空間における核生成および成長の位相を分離することによりタンパク質結晶を種とする形成を行なう方法。

【0375】

核生成の制御は、タンパク質結晶化過程における難点の1つである。

【0376】

不均質核生成工程はその溶液位相工程の相当物より統計的に好ましい工程である。不均質核生成の理想的表面は、その高分子の相当物に関する相補的な静電分布を有する。このような表面においての方が溶液中よりも臨界核が安定する。さらに、不均質核生成に要される過飽和度は、溶液位相核形成に要されるものよりもはるかに低い。ケイ素、結晶のミネラル成分、エポキシ表面、ポリスチレンビーズおよび体毛等の表面はタンパク質結晶化の能率に影響を及ぼすとして知られる。金上の自己組織化単層膜のメチル、イミダゾール、水酸基およびカルボン酸終点におけるタンパク質結晶化に関する研究は、ほんのわずかしが行われていないが、将来を期待できる好結果を生み出している。自己組織化単層膜を用いてタンパク質結晶化を行うことにより、タンパク質はより広範囲な結晶化形態で結晶化し、且つ従来のシラン処理ガラスを用いた場合より高速な結晶化がなされた。

30

【0377】

* 図18は、水性プラグ流体と搬送流体の界面における表面化学を変化することにより不均質核生成を制御する方法の概要図である。図18において、異なる官能基を有する界面活性剤溶液いくつかの存在下でプラグが形成される(図の左側)。図18の右側は、沈殿剤、溶媒およびタンパク質が入口180番と181番と182番へめいめい導入されうる水相領域を示す。界面活性剤単層の構成は、流量を変化することにより好ましくは制御される。図18において図示される方法の別途アプリケーションにおいて、表面化学を連続的に変化することができる。表面化学が重要なところのスクリーニング、評価分析、結晶化および他のアプリケーションに、表面化学の操作および制御を使用することができる。

40

【0378】

発明の一様態において、搬送流体がフルオロカーボン(過フッ化炭化水素)である場合、

50

フルオロ溶性界面活性剤を含む搬送流体における水性プラグの形成により、タンパク質の不均質核生成を好ましくは制御する。界面活性剤溶液の相対的流量変化により、混合単層または位相分離混合単層の形成をもたらしえる種々様々な形態におよぶ液体間界面の形成につながりうる。

【0379】

好ましくは、数種の界面活性剤がタンパク質結晶の不均質核生成を制御するために用いられる。エチレングリコール単層は不均質核生成を減少するために、そして、タンパク質の静電特性を補完する静電特性をもつ単層が不均質核生成を増強するために好ましくは手段とされる。不均質核生成を制御するこれらの方法は、通常収集することが困難である結晶の形成を誘発または増強するために設計される。これらの方法はまた、比較的安定性又は整列度(制御性)に優れる異なる結晶同質異像の形成を誘発または増強する手段ともなりうる。

10

【0380】

上記のように、核生成制御は、高度な結晶化スクリーンにおける需要が極めて多い。核生成制御を達成する手段となりうる一方法は、核生成結晶を希釈することによりある濃度から別の濃度に移転する過程を含む。マクロシステムで主として蒸気拡散に適用されてきた当方法は、核生成相と成長相の分断(非干渉化)を可能にすることを目的としていた。当方法は、核生成が微結晶発生のかかなり前に生じるので、従来の結晶化法を使って実施することが難しい。

【0381】

20

図19は、本発明によるマイクロフルイディック・ネットワークによる、これに限定されないが例としてタンパク質を用いての核生成と成長を分ける方法を図示する。図19の左側は、好ましくはタンパク質と沈殿剤の高濃度により形成されるプラグを示す。図19において、次のものを図示される様々な入口へと導入することができる。緩衝液を入口191と196番へ、PEGを入口192と197番へ、沈殿剤を入口193と198番へ、溶媒を入口194と199番へ、そしてタンパク質を入口195と200番へと導入することができる。油は流路201と202番を左から右に流れる。流路の203と204と205番の部分は、高速核生成が生じる領域(203番)と核生成が生じない領域(204番)、そして結晶の成長が生じる領域(205番)に一致する。適用濃度は相平衡状態図中の核形成領域に相応するものである。一定期間にわたりプラグが流路を通過して合流地点へと移動するにしたがい、核生成が生じる。その後、好ましくは、準安定な(核生成ではなくむしろ成長)領域(図19の右側)に相応する点で、これらのプラグがタンパク質溶液を含むプラグと融合する。当段階は核生成を終了し、結晶の成長を促進する。結合した流路が融合プラグにより充填された時に、結晶化が生じるように、流れが好ましくは停止し、そして核が成長できることが好ましい。

30

【0382】

核生成流路の流量を変えることにより、核生成時間を変更することができる。

【0383】

準安定領域に相応する溶液濃度を伴うより大きなプラグの種晶として核を用いることが好ましい。既存データによると、核の形成作用に要される時間は約5分以下である。

【0384】

40

流体混合は結晶の核生成および成長において大きな影響力をもたらす要因であると考えられている。正確且つ再生可能なレベルの混合制御を可能にする方法が発明により提供される。図20は、これらの方法のうちの2つを図示する。沈降反応を引き起こさずに、相平衡状態図に示される核生成ゾーンへと溶液を送り入れる混合法が好ましい。

【0385】

これを達成するために、タンパク質と沈殿剤濃縮溶液間の接触を防ぐか、減少させるか、最小限にすることにより温和混合(図20、左側)を手段とすることが好ましい。あるいは、これを達成するために、沈殿ではなく核生成を引き起こすのに十分な速さで沈降反応ゾーンの通過を可能にすることにより急速混合(図20、右側)を手段とすることが好ましい。

【0386】

50

ここで例となる2つの方法は、温和混合のためのスパイラル流路 および急速混合のための蛇行流路の使用に関係している。図20において描写される発明にのっとった2つの方法は、タンパク質結晶化に対する混合効力を判断する手段となりえる。加えて、前述の様々な混合制御法(例：直線流路における低速混合、非直線流路におけるカオスの混合、または旋回が生じえる又は生じえない混合)は、とりわけ結晶化に適用することができる。

【0387】

上記で説明された技術のうちの一つを用いて結晶を収得後、構造測定用マイクロフルイディック装置から結晶を採取しうる。他のシステムでは、タンパク質結晶は脆弱であり且つゼラチン状となっているため、結晶を収集することが困難である。例として、堅い表面からタンパク質結晶を採取するときにそれらの結晶に損傷が生じ使用不可能になる場合がある。本発明は、液体環境で結晶から核を形成および成長させることによりこの問題の解決策を提示する。発明による様態において、界面活性剤で覆われる搬送流体の薄い湿潤層は、成長中の結晶が堅い表面から分離することを可能にする又は促進する手段となる。結晶形成時に、搬送流体の薄い層を利用してPDMS層からそれらを分離しうる。

10

【0388】

上記の技術はタンパク質結晶化のところで詳細にわたり説明されているが、上記と類似する技術もまた、他の生体分子または合成化学物質を含む他の物質の結晶化の手段となりうるということが、当業者には明らかである。さらに、発明による装置と方法は共結晶化を行なう手段となりうる。

20

【0389】

例えば、タンパク質の流れ少なくとも1本、沈殿剤の流れ、および任意選択で、抑制剤・別種タンパク質・DNAなどのような第三次化学物質を含む流れを例とするものの適用により、1種以上の化学物質を含む結晶を収得しうる。その後、共晶形成の最適条件を判断するための条件を変更しうる。

【0390】

(プラグによる微粒子分離・選別)

移動中プラグ内部の流れは、重合体と微粒子の分離に使用することができる。まず最初に移動中プラグ内の流れを使ってプラグ内部の重合体または微粒子(例：プラグ前後左右の側面内部のいずれかに存在する余分な重合体)の分布を確立し、そしてその次に、分裂を利用して高濃度の重合体または微粒子を含むプラグの一部を分離および隔離するといった方法で、分離工程にプラグを使用できる。2種の重合体または微粒子がプラグ内部に存在する時にそれらが異なる分布を確立している場合、重合体または微粒子を分離するために分裂を手段とすることができる。

30

【0391】

以下の事例に基づき、発明のさらなる説明を下記する。

【0392】

当事例は多数の実施形態のうちの1つであり、単なる例証であるということは、当業者には分かるはずである。特に、当事例に記される装置および方法(流路構造、バルブ、切替えおよびフロー制御用装置および方法を含む)の適合は容易である(プラグを特性化、分析、監視、または選別できるように、ユーザーの希望に担って、1つ以上の装置または方法と共に使用しうる)。

40

【実施例】

【0393】

[実施例1] マイクロフルイディック装置の製作および一般的な実験手順親水性流路面を備えるマイクロフルイディック装置は、ポリジメチルシロキサンにおける急速プロトタイプングにより製作された。流路面は、シラン処理または熱処理のいずれかを経て疎水性とされた。流路面をシラン処理するために、(トリデカフルオロ-1,1, 2,2-テトラハイドロオクチル)-1-トリクロロシラン(United Chemical Technologies, Inc.社)の蒸気を搬送ガスとして、約1気圧より約40~60mm Hg高圧で乾燥窒素を有する装置入口に適用した。それと同時に真空作用を、大気圧より約650mm Hg低圧で装置出口に適用した。約1

50

～3時間シラン蒸気があてられた。流路を熱処理するために、装置を約3時間およそ120の炉(オーブン)の中に放置した。ちなみに、代替として、パナソニック製1300ワット電子レンジ「The Genius」の出力(温度調整)を10に設定して約10分間、装置を加熱することもできる。

【0394】

A K D社製サイエンティフィック・シリンジポンプ(モデル200)またはハミルトンアラタス(Harvard Apparatus)社製PhD2000ポンプにより、装置を通して油と水溶液を流した。ハミルトン社(Hamilton Company)製ガスタイト(GASTIGHT)シリンジ(10-250 μ l)が使用され、ハミルトン社製30ゲージ・テフロン(登録商標)針がシリンジを装置に取り付けるために使用された。約0.10 μ l/分から約10.0 μ l/分にわたるの体積流量で装置を通して油と水溶液をポンプで流した。

10

【0395】

クレイヨール特有調合法マーカーまたはフェロイン(Ferrouin)指示薬(0.025M、Fisher Scientific社)を使って水溶液に着色した。パーフルオロデカリン(95%のシス/トランス〔cis,trans〕混合物、Acros Organics社)、パーフルオパーハイドロフェナントレン(tech. Alfa-Aesar製)、または1H,1H, 2H, 2H-パーフルオオクタノール(98%、Alfa-Aesar製)が、ここで使われた油には含まれていた。典型的に10:1のパーフルオロデカリンと1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオオクタノール混合物で実験が実施された。

【0396】

実験における監視工程にはフォステック社製(Schott-Fostec, LLC)モデュランプ(Modulamps)とともにリカ(Lica)MZFLIIIステレオスコープを使用した。スポットインサイトカラーカメラ(Spot Insight Color Camera)モデル3.2.0 (Diagnostic Instruments, Inc.社)で実験写真を撮影。スポットアプリケーションバージョン3.4.0.0は当カメラでの写真撮影に使用された。

20

【0397】

[実施例 2] プラグを用いての水溶液濃度変更図25A～Cそれぞれの左側に、マイクロフルイディック・ネットワークおよび実験条件の概要図が示されている。図25A～Cそれぞれの右側に、異なる濃度の水性流によるプラグの形成を図示するマイクロ写真が示されている。食用染料水溶液(赤/濃・緑/淡)および水により3本の流れが構成された。溶液3種の体積流量(μ l/分単位の流量)が示される。濃い色の流れは薄い色の流れより粘着性が高い。したがって、濃い色の(粘着性強い)流れは、さらにゆっくりと移動し(mm/s単位の測定値)、所定の体積流量でより大きな流路の一面を占める。

30

【0398】

図45aは、試剤流量の変更によりチップ上での希釈を成し遂げることができることを実証するために使われたマイクロフルイディック・ネットワークの略図を示す。

【0399】

図45aにおいて、希釈緩衝液が入口452番から導入される一方、試剤は入口451と453番から導入される。油流れは流路454番を流れる。青い長方形は、図45c-dに示される画像の視野を概説する。図45bは、マイクロチャンネルのプラグにおいて希釈されたフルオレスセイン溶液の蛍光度測定により当希釈法を定量化したグラフを示す。 C_{measured} および $C_{\text{theoretical}}$ [μ M]によりフルオレスセイン濃度が測定され推測される入口3個のうちの1個にフルオレスセインを流すことにより実施された実験80回分のデータが示されている。図45(c)は、45nL/秒と10 nL/秒と10nL/秒の流量をそれぞれ伴う食用染料流れ455と456と457番で、当希釈法を図示する写真を示す。図45(d)は、10 nL/秒と45nL/秒と10nL/秒の流量をそれぞれ伴う食用染料流れ458と459と460番で、当希釈法を図示する写真を示す。搬送流体は60nL/秒で流れた。

40

【0400】

[実施例3]

長方形断面を持つマイクロチャンネル・ネットワークはPDMSにおける急速なプロトタイピングにより製作された。ここで、PDMSとしてDow Corning社シルガード・ブランド製品18

50

4シリコーン・エラストマー(Sylgard Brand 184 Silicone Elastomer)が使用され、そしてプラズマプレプリ(Plasma Prepli、SPI Supplies社)で装置を密閉した。2~4時間120℃で装置を焼成することにより装置表面に疎水性をもたらした。

【0401】

図26において、赤い水性流は赤色のマコーミック食物着色料(水、プロピレングリコール、FD&C赤40と3、プロピルパラベン)、緑の水性流は1:1の比率で水と薄めた緑色のマコーミックX食物着色料(水、プロピレングリコール、FD&C黄5とFD&C青1、プロピルパラベン)、無色の流れは水。ここで使用されたPFDは、パーフルオロデカリン(シスノトランス混合物、95%、Acros Organics社): 1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオオクタノール(Acros Organics社)の比率10:1での混合物。緑色の水性流が図26bにおける入口262と263番に導入された一方、赤色の水性流は入口260と265番に導入された。無色の水性流は入口261と264番に導入された。流れおよびプラグの濃い陰影は、主に赤色色素によるものであり、その一方、薄い陰影は主に緑色色素によるものである。

10

【0402】

100 µLのハミルトン・ガスタイトシリンジ(1700シリーズ、TLL)または50 µL SGEガスタイトシリンジにより、水溶液はポンプでくみ出された。

【0403】

1mLハミルトン・ガスタイトシリンジ(1700シリーズ、TLL)により、PFDをポンプでくみ出した。ハミルトン・テフロン(登録商標)針(30ゲージ、1hub)を用いてマイクロフルイディック装置にシリンジを取り付けた。

20

【0404】

ハーバードアパラタス社製シリンジポンプ(PHD2000輸液ポンプ: 特注ブロンズ・ブッシングがポンプの吸い上げを安定させるために伝動機構に取付けられているもの)は、水溶液およびPFD注入の手段となった。

【0405】

マイクロ写真は、ライカ(Leica) MZ12.5実体顕微鏡およびスポットインサイトカラー・デジタル・カメラ(モデル#3. 2. 0、Diagnostic Instruments社)で撮影された。

【0406】

スポット最新式ソフトウェア(バージョン3.4.0、Windows(登録商標)対応、Diagnostic Instruments社)は、画像収集に使用された。照明にはマシンビジョン・ストロボX-ストロボX1200(Machine Vision StrobeX-strobeX1200: 20Hz、12 µF、600V、Perkin Elmer Optoelectronics社)を用いた。画像を得るために、カメラのシャッターを1秒間開き、ストロボを約10 µs間の閃光時間で一回フラッシュした。

30

【0407】

画像はNIH画像ソフトウェア「イメージJ(Image J)」を使って分析された。イメージJは、図27bに示されるようなマイクロ写真からの周期およびプラグ長さを測定するために使われた。周期は一プラグ中心から隣接したプラグの中心までの距離に相当し、そして、プラグ長さは、プラグ前面の最端から裏面の最端までの距離に相当するとした(前面および裏面の定義に関しては図28を参照)。

【0408】

当初はピクセルによる測定がなされた。しかし、流路幅50 µmのピクセルで測定したものと比較することにより絶対測定値に変換することもできた。

40

【0409】

プラグの $\text{Fe}(\text{SCN})_x^{(3-x)+}$ 錯体の光学強度測定を行なうために、アドビ・フォトショップ6.0でマイクロ写真をRGBカラーモードからCMYKカラーモードに変換した。その後、同プログラムを使って、マイクロ写真の黄色流路を隔離し濃淡画像に変換した。さらに当濃淡画像の強度を転化した。プラグの末端およびプラグと流路の界面での鮮明な反射光の強度を減少させるために、黄色流路が選択された。フォトショップでの処理後、高濃度の $\text{Fe}(\text{SCN})_x^{(3-x)+}$ 錯体を含むプラグ領域は白く見え、その一方、低濃度の領域は黒く見えた。イメージJを使って、プラグ前面と裏面の中間にある細い長方形のプラグ領域一帯(図27a1の

50

白い1点鎖線)で、強度の測定がなされた。システムのマイクロ写真撮影に使われたカメラでは、光学濃度の線形測定を行なうことができなかったため、強度測定を定量化できなかった。流路一帯の強度 対 相対位置に関するプロットのいくつか(図27c)は、異なる画像部位における異なる(非同一な)照度に対する調節反応が生じたため50ユニット以下の強度で垂直方向に変動した。

【0410】

これらの調整反応は、絶対濃度が原因ではなく分布形状が原因で生じたために、正当化されるとした。

【0411】

図29a-bは、総流速(図29a)および含水率(w_f 、図29b)の関数で周期サイズおよびプラグサイズのプロットを示す。キャピラリー数($C.n.$)の数値データは0.0014、0.0036、0.0072、0.011、レイノルズ数(Re)の数値データは1.24、3.10、6.21、9.31だった。ここにおいて、各 $C.n.$ および Re 数は含水率(w_f)0.20、0.52、0.52、0.20の数値点に相当する(図29aにおける上下方向[Y軸]数値点)。次には、これら一組の数値点は各々、図29aに示される特定流速に相当する。図29bにおけるプラグは、約50ミリメートル/秒(mm/s)で移動する。長さサイズ的全測定値は流路(50tam)の幅に相当する。

【0412】

図30は、総流速においてプラグ内部のプラグ周期とプラグ長さおよびプラグの流れ方式の間に依存性があまりないことを図示するマイクロ写真を示す。図30の左側は、マイクロフルイディック・ネットワークの線図を示す。ここで、図27に示される実験と同一の溶液が使われた。無色の水性流が入口302と303番へ導入された一方、 $Fe(SCN)_x^{(3-x)+}$ 溶液は入口301番へ導入された。図27の実験で使用したのと同じ搬送流体は、流路1304番へ流入した。図30の右側は、同値の含水率(0.20)と異なる総流速(上から下に20、50、100、150mm/秒)で形成されたプラグのマイクロ写真を示す。キャピラリー数はめいめい上から下に0.0014、0.0036、0.0072、0.011。それに相当するレイノルズ数は1.24、3.10、6.21、9.31。

【0413】

図31A - Cは、それぞれ0.20、0.40、0.73の含水率を有するところの周期およびプラグ長さの分布を示すプロットである。全ての事例において、総流速は約50mm/秒、 $C.n=0.0036$ 、 $Re=3.10$ であった。

【0414】

図27は、直線のマイクロチャンネル(微細流路)を通過するプラグ内部の流れを再循環させることにより混合した時の初期状態がもたらす影響を示す。図27a1は、(黒い矢印によって示される)流れを再循環させることにより、最初にプラグの左半面および右半面に局部集中された試剤溶液が効率的に混合したことを示す。前・後・左・右の表記法は図28におけるそれと同じである。

【0415】

図27a2は、(黒い矢印によって示される)流れを再循環させることにより、最初にプラグの左半面および右半面に局部集中された試剤溶液が効率的に混合しなかったことを示す。図27bの左側は、マイクロフルイディック・ネットワークの概要図を示す。パーフルオロデカリンの搬送流体が流路273番を流れた一方、無色の水性流2本は入口271と272番へ導入された。これらの溶液は、プラグの内部の流れ方式を混乱させなかった。

【0416】

図27bの右側は、0.14~1.00の含水率に適したマイクロフルイディック・ネットワークのプラグ形成領域付近に存在する様々な長さをもつプラグのマイクロ写真を示す。図27c1は、変化する長さを伴うプラグの $Fe(SCN)_x^{(3-x)+}$ 錯体の相対的光学強度のグラフを示す。プラグが直線のマイクロチャンネルを通り長さの4.4倍の距離を移動した後、プラグ幅を横切って、左($x=1.0$)から右($x=0.0$)へと強度測定がおこなわれた(図27a1-a2で白い1点鎖線によって示される)。灰色の陰影範囲は、マイクロチャンネルの壁を示す。各プラグが1.3mmの距離を横断したという条件を除き、図27c2は図27c1と同じである。dがプラグの移動距離で1がプラグ長さであるところにおいて、それぞれの含水率(w_f)のd/lは15.2(w_f

0.14)、 13.3(wf 0. 20)、 11.7(wf 0. 30)、 9.7 (wf 0.40)、 6.8(wf 0. 60)、 4.6 (wf 0. 73)、 2.7(wf 0. 84)。

【 0 4 1 7 】

〔実施例 4〕 プラグの融合

異なる(T字型またはY字型の)流路合流地点、横断面および流量におけるプラグの融合を調査する実験が行なわれた(図33a-dを参照)。

【 0 4 1 8 】

図33a-dの左側の図は、一定または非同一寸法(例：同じ又は異なる流路直径)のどちらかを伴う流路を備えるマイクロフルイディック・ネットワークの平面図を示す。これに関連する右上の図は、(Y字合流地点の分岐形成部を有する別個の流路2本から)共通流路に流れ込むプラグ流れ2本の拡大図を含むマイクロ写真である。

10

【 0 4 1 9 】

図33aにおいて、油：水の容量比率は、油と水の入口各組において4:1だった。水性流が入口331と333番へ導入された一方、油流れは入口330と332番へ導入された。油と水が出会う合流地点を過ぎたところの油水結合流の流量は8.6mm/秒であった。流路(四角形)の寸法は、50(幅)× 50(高さ) μm^2 であった。

【 0 4 2 0 】

図33aに示されるように、一定サイズの流路を流れるプラグは典型的にT分岐に同時に到達した場合のみ融合した。したがって、これらの流路でのプラグ融合は希にしか生じない。加えて、遅れプラグは典型的に、共通流路沿いの先行プラグに追いつくことができなかった。

20

【 0 4 2 1 】

図33bは、Y字型合流地点に異なるタイミングで到達したプラグ間に生じるプラグ融合を図示する(拡大図記載)。水性流が入口335と337番へ導入された一方、油流れは入口334と336番へ導入された。図33bにおいて、油と水が出会う合流地点を過ぎたところの油水結合流体の流量は、流路346番(50 × 50 μm^2 流路)では平均6.9、流路347番(25 × 50 μm^2 流路)では8.6mm/秒だった。油：水の容量比率は、油と水の入口各組において4:1だった。2本の流路(分岐流路)の断面積は100 × 50 μm^2 であり、ともに共通流路348番に流れ込んだ。図において示されるように、その合流地点に同時に到達しない場合でさえ、より広い流路からのより大きなプラグは、より狭い流路からのより小さなプラグと融合することができる。これは、一旦プラグが共通の流路に入ると、遅れをとっている大型プラグが、先を行く小型プラグに追い付くことができるからである。

30

【 0 4 2 2 】

図33cは、2組の入口の異なる油水率を利用して生じた同位相における異なるサイズのプラグ融合(つまり、合流地点で少なくとも2つのプラグが同時に到着した際のプラグ融合)を描写する。水性流が入口339と341番へ導入された一方、油流れは入口338と340番へ導入された。油：水容積比率が4:1である流路350番を通る流体の流量が6.9mm/秒であった一方、油：水容積比率が1:1である流路349番通る流量は4.0mm/秒であった。共通流路351番(分岐流路が合流する流路)の寸法が125 × 50 μm^2 だった一方、Y形となっているネットワーク部の各分岐流路(拡大図記載)の寸法は50 × 50 μm^2 であった。

40

【 0 4 2 3 】

図33dは、流れ込んでくる2本のプラグ流れの相対速度の変動によってもたらされた欠陥(つまり、通常の又は理想の条件下において融合すべきプラグが融合しない状態)を図示する。水性流が入口343と345番へ導入された一方、油流れは入口342と344番へ導入された。当実験において、油：水容積比率が4:1である流路353番を通る流体の流量が6.9mm/秒であった一方、1:1の油：水容積比率に起因する流路352番通る流量は4.0mm/秒であった。

【 0 4 2 4 】

Y字形の交差点にある分岐2本のうちの1本を形成する各分岐流路(拡大図記載)の寸法は50 × 50 μm^2 であった。その一方で共通流路354番(2本の分岐流路が合流する流路)は125 × 50 μm^2 である。

50

【0425】

[実施例 5] 収縮(圧縮)された合流地点によるプラグ分裂収縮された合流地点を伴う流路網を用いてプラグの分裂を調査した。この場合、プラグは合流地点を通過する際に分裂し互いに180度の角度を成す2本の分岐流路(この場合の分岐流路と合流地点が分岐するところの流路である)へとそれぞれ流れ込んだ(流路網の平面図をそれぞれ示す図34a-cを参照)。これらの実験において、収縮された合流地点を過ぎたところで出口圧(P_1 と P_2)が $P_1 = P_2$ (図34b)または $P_1 < P_2$ (図34c)のいずれかに変化した。ここで、相対圧力は、圧力 P_1 および P_2 以下である流路の相対的高さを調節することにより変化した。プラグが長いほど分裂の確実性が増す傾向があるため、当分岐地点(あるいは合流地点)はプラグ延長を目的として流路より狭く設計されている。図34aは、実験の手段となる流路網の概要図を示す。油と水は、入口3400番および3401番へとそれぞれ導入された。油と水が出会う合流地点を過ぎたところの流量が4.3mm/秒だったときの油:水の比率は4:1であった。

10

【0426】

図34bは、初期プラグ半分の大きさであるプラグへと流れるプラグの分裂を示すマイクロ写真である。流路3404番(長方形)の測定断面寸法は $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ であった。分岐点の直ぐ隣にある流路3402番の収縮した接合部分の測定面積は $25 \times 50 \mu\text{m}^2$ であった。出口圧 P_1 および P_2 は両分岐流路中においてほぼ同値だった。ここで、ほぼ同サイズのプラグへとプラグが分裂する。

【0427】

図34cは、 $P_1 < P_2$ の時に生じたプラグの非対称的分裂(つまり、異なるサイズまたは長さのプラグへのプラグ分裂)を示すマイクロ写真である。このマイクロ写真は、小さ目のプラグ(球状)が高圧 P_2 の流路を流れた一方、大型プラグ(いくぶん長方形)が低圧 P_1 の流路を流れたことを示す。図34bで示されるように、流路3405番の各測定断面面積は $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ だった。合流地点における流路3403番の収縮した接合部分の測定値は $25 \times 50 \mu\text{m}^2$ だった。

20

【0428】

[実施例6] 収縮された合流地点を使用しないプラグの分裂

図35b-cで示されるような収縮作用が存在しない流路網を使ってプラグの分裂を調査した。当実験の場合はプラグが分裂しお互いに90度の角度を成す2本の流路それぞれへと合流地点を通過した後に流れ込んでいったということを除いては、図34aに示されるものに類似した流路網が使用された(ここでいうプラグ流れは矢印によって指されている)。油および水性流(4:1の油:水性流比)は、入口3500と3501番へとそれぞれ導入された。油のみの流れは流路3502番を流れた。全流路の断面面積は $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ であった。ここで適用された流量は4.3mm/秒だった。流路網の平面図を表わす図35a-cは、流路収縮(図35b-cに見られる収縮)の非存在下における合流地点を通過するときに当実施例のプラグは実施例3のプラグと比べると異なった動きをするということを示す。図35cが示すように、 $P_1 < P_2$ の時に、プラグは合流地点を通り抜けた後も原型を保っていた。さらに、プラグはより低圧(図35cにおける P_1)の流路に沿って流れ、その一方で間に入る油流れが合流地点で分裂した。合流地点における油流れの分裂は、分岐点または合流地点上流の流路内プラグ間の分離と比較して、圧力 P を伴う流路を流れるプラグ間の分離時間の短縮をもたらす。

30

40

【0429】

[実施例 7] マイクロフルイディック・システムによる自己触媒反応の監視

図37は、確率的自己触媒反応の調査に関係している発明によるマイクロフルイディック装置における化学物質増幅に関係する実験設計を図示する。当事例は、酸に鋭敏な $\text{NaClO}_2 \cdot \text{NaS}_2\text{O}_3$ 間の自己触媒反応を研究するにあたり本発明の装置をどのように利用しうるかを例証する。マイクロフルイディック・ネットワークの左側において、3本の流路から成る入口は、流路3702番経由で水性流を、流路3701番経由でエステルを、および流路3703番経由でエステラーゼを導入する。油は流路3713と3714番を通して流れた。エステルとエステラーゼ間の反応は、少量の酸を含むプラグ3704番をもたらす。マイクロフルイディック・ネットワークの右側において、5本の流路からなる入口は、入口3705番から NaClO_2 を、入

50

口3706番から水性流を、入口3707番からpH指示薬を、入口3708番から第2水性流を、および流路3709番経由でNaS2O3を導入する。搬送流体は流路3713と3714番を通して流れる。

【0430】

非拡散性NaCl O₂とNaS₂O₃混合物は非常に不安定であり、また、その混合物におけるわずかな濃度変動さえ急速な分解に結びつく。

【0431】

したがって、NaCl O₂/NaS₂O₃混合物を含むプラグ3710番は、直ちに混合されるだけでなく、形成後に即刻使用されなければならない。申請対象となる本実験において、屈曲した流路によりカオスの混合が促進される。若干の酸性を有するエステルエステラーゼ反応のプラグが接触領域3712番で不安定なNaClO₂/NaS₂O₃混合物のプラグと合流するとき、通常、自己触媒反応が生じる。これら2つのプラグの急速混合が生じる際に、それによって生じるプラグ3711番は超酸性となる。5本の流路から成る入口に導入されたpH指示薬は当増幅工程すべてを可視化する手段となる。

10

【0432】

[実施例 8] マイクロフルイディック装置における高感度自己増幅検出要素としての化学反応の利用

発明による一様態において、制御されている自触媒システムによる順次的増幅は、自触媒単一分子を含むサンプルを、十分な高濃度の自触媒を含むサンプル内へと増幅する手段となる。これにより、増幅された自触媒が肉眼でも検出できうる。確率的挙動を示すシステムが高感度性および増幅を示すと推測されるが、様々な自触媒システムが発明にのって使用されうる。発明によるマイクロフルイディック装置による順次的増幅は分析的に標識付けられた反応を用いて例証することができる。無色Co²⁺イオンを生成するカリウム・ペルオキソ1硫酸を伴う酸化における、バイオレットbis[2- (5-プロモ-ピリジルアゾ)-5- (N-プロピル基-N-スルホプロピル-アミノ酸-フェノラート)]コバルト酸、(Co(III)-5-Br-PAPS)、の自触媒分解。ここで、Co²⁺イオンは、自触媒として役立つ(当反応に対する自触媒現象(m)のオーダーは未だ確立されていない。)。

20

【0433】

Co(III)- [5-Br-PAPS] (還元)+HSO₅⁻
Co²⁺ +[5-Br-PAPS](酸化) +HSO₄⁻(3)

(Co (III)-5-Br-PAPS)とペルオキソ1硫酸のバイオレット混合物へCo²⁺を少量追加することにより、無色溶液を提供すべく急速な色素減少を生じる。当分解発生前に生じる時間的遅延は、溶液に追加されるCo²⁺の量に依存する。

30

【0434】

当反応は1 ×10⁻¹⁰ mole/Lのように低いCo²⁺濃度を検出する手段とされてきた。他のイオン(V (V)、 Cr (III)、 Cr (VI)、 Mn (II)、 Fe (II)、 Ni (II)、 Cu (II)、およびZn (II))の存在下において、反応は優れた選択性を示す。

【0435】

当反応を利用して増幅を行うために、図38に示されるようなマイクロフルイディック・ネットワークを手段とすることが好ましい。

【0436】

40

流路において、大型プラグ内のCo (III)- [5-Br-PAPS]が還元され、ペルオキソ1硫酸化atpH=7緩衝剤の不安定な溶液が好ましくは生成される。

【0437】

発明にのって、これらの大型プラグは、好ましくは3種の異なるプラグサイズへと分裂する。好ましくは、プラグサイズは第1流路で (1 m)³ = 10⁻¹⁵ L、第2流路で(10 μm)³=10⁻¹²L、そして第3流路で(100 μm)³= 10⁻⁹ L。三段階フォトリソグラフィは、これらのマイクロフルイディック流路の親装置(マスター)製作において好ましくは使用される。

【0438】

[実施例 9] 単一分子検出用マイクロフルイディック装置における多段化学増幅

50

図38は、発明によるマイクロフルイディック装置による、単一分子検出用の多段化学物質増幅用の方法を例証する。当事例は、 Co^{2+} イオンによって自触媒された $\text{pH}=7$ 緩衝液(入口3802番から導入)内の Co(III)-5-Br-PAPS (入口3803番から導入)と KHSO_4 (入口3801番から導入)間自己触媒反応の使用を例証する。流路3804と3805番を通して油流れが流れることを可能とする。当反応混合物(プラグ3811番に含まれる)は不安定で、少量の Co^{2+} 3810番が追加されただけで急速に分解する(赤で表示)。したがって、当反応混合物は好ましくは敏感に混合され、直ちに使用される。反応混合物は、サイズが $(1\mu\text{m})^3$ 、 $(10\mu\text{m})^3$ 、 $(100\mu\text{m})^3$ のプラグ内ネットワークを介して好ましくは輸送される。マイクロフルイディック・ネットワークの左側において、分析用サンプルのおよそ $1\mu\text{m}^3$ のプラグが流路2本の合流地点(緑で表示)で形成される。その Co^{2+} イオンを含むプラグ、および反応混合物を含むプラグの融合は、急速な自己触媒反応に帰着する。さらなる大規模な反応混合物のプラグが増幅に用いられるところの増幅階段流によって、プラグ内の Co^{2+} イオン各々を、一プラグ当たり約 10^{10} 個の Co^{2+} イオンに増幅することができる。増幅の結果は視覚検知できる。 $(10\mu\text{m})^3$ のプラグは、およそ $4 \times 10^{-8} \text{ mole/L}$ の Co^{2+} イオン溶液を供給するために第3流路のより大きな $(100\mu\text{m})^3$ のプラグと好ましくは融合する。およそ 10^{-9} L のプラグにおける自己触媒分解により約 2.4×10^{10} の Co^{2+} イオン($4 \times 10^{-5} \text{ mole/L}$)を伴うプラグ3809番が生成される。各分岐でプラグが費やす時間を制御するために、好ましくは当システムに対する慎重な制御がほどこされる。

【0439】

増幅作用に与えられる時間は、低速分解を防ぐ又は最小限に抑えうる(短)時間を維持する一方、増幅作用を実質的に完了するのに十分な(長)時間であることが好ましい。

【0440】

プラグを融合する際に、異なるプラグサイズを手段とすることには利点がある。

【0441】

サイズが約 $(1\mu\text{m})^3$ のプラグは、流路3806番を通して約 $3 \times 10^{-9} \text{ mole/L}$ の Co^{2+} を含むサンプルの流れにより好ましくは形成される。当反応は、前述の濃度またはそれよりも低い濃度で Co^{2+} を検出する手段となりえる(Endo et al., "Kinetic determination of trace cobalt (II) by visual autocatalytic indication," Talanta, 1998, vol.

47, pp. 349-353; Endo et al., "Autocatalytic decomposition of cobalt complexes as an indicator system for the determination of trace amounts of cobalt and effectors," Analyst, 1996, vol. 121, pp. 391-394.)。これらのプラグは、約 10^{-15} L 相当の容量を含み、一プラグ当たり平均1.8個のイオン(ポアソン分布に相当)で少量のコバルト・イオンを搬送する。これらのプラグ3810番は、 Co(III)-5-Br-PAPS /ペルオキシ硫酸塩(peroxomonosulfate)混合物(約 $4 \times 10^{-5} \text{ mole/L}$)を含む $(1\mu\text{m})^3$ のプラグ3811番と好ましくは融合する。

【0442】

錯体の自己触媒分解に際して、融合プラグ3807番における Co^{2+} イオンの数は、 10^4 から $1.2 \times 10^4 \text{ Co}^{2+}$ イオン($2\mu\text{m}^3$ における $2 \times 10^{-5} \text{ mole/L}$)だけ増加する。これらのプラグ3807番は、不安定混合物(約 $4 \times 10^{-5} \text{ mole/L}$)を含む $(10\mu\text{m})^3$ のプラグ3811番と好ましくは融合する。これら約 10^{-12} L のプラグ中の Co^{2+} イオン濃度は $2 \times 10^{-8} \text{ mole/L}$ ぐらいで、自己触媒分解を誘発するのに十分であることが好ましい。 Co^{2+} イオンの数は、プラグ3808番において、約 10^3 から約 2.4×10^7 イオン/プラグだけ増加する。出発溶液は濃いスミレ色である(Co(III)-5-Br-PAPS に対して $\epsilon = 9.8 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。チャンネルは、少なくとも10個一続きとなった $100\mu\text{m}$ のプラグを通して光学経路を生成するように設計されていることが好ましい。これらのプラグは、 $4 \times 10^{-5} \text{ mole/L}$ の出発溶液吸光度約0.4を持つ長さがおよそ1mmの光学経路を提供する。チップ上光検出器または肉眼によって当吸光度を検出することができる。 Co^{2+} がサンプル溶液中にある場合、自触媒の階段流は反応混合物の色の消失に帰着する。

【0443】

サンプル中 Co^{2+} の濃度が低い場合、システムに確率的挙動が生じうる。つまり、 Co^{2+} イ

オンすべてにより分解階段流が発するというのではない。

【0444】

しかしながら、当システムの魅力的な特徴は、数秒で何千もの試験を行い統計および平均値を収集することができるという点である。系列し制御されている自己触媒増幅反応は好ましくは単一イオンの視覚検出へとつながる。

【0445】

[実施例 10] 酵素反応動力学

いき通った研究がなされている酵素リボヌクレアーゼA(RNase A; EC 3.1. 27.5)のミリ秒単位のシングルターンオーバーの動力学(single-turnover kinetics)を測定するために、発明によるマイクロフルイディック・チップが使用される。従来、これらの測定にはおびただしい量の酵素消費量にともない高濃度な酵素と基板の両方が必要とされたため、このような測定を行なう際にサンプル消費量が単にマイクロリットル以下にすぎないという事実は、マイクロフルイディック・チップを格別魅力的なものとする。

【0446】

反応混合物が流路を下流する時、RNase Aによって蛍光発生基質の開裂から発生する定常的蛍光の監視により、反応速度測定が実施された(図40(a)を参照)。図40において、基板、緩衝液およびRNase Aは、入口401番と401番と403番へそれぞれ導入された。搬送流体は流路404番を流れた。一定反応時間 $t[s]$ における生成物量は、対応する距離に達する点 $d[m]$ での蛍光強度から計算された($U=0.43m/秒$ が流速であるところの、 $t=d/U$)。流路には、急速なカオスの混合を誘発するために屈曲する設計、および、空間分解された一画像において反応プロフィール全体を測定しえるように顕微鏡の視野内に入る設計がなされた。生成物阻害またはRNase A変性をもたらす要因がないと立証するために、セルウィンの試験(Selwyn's test—Duggleby, R. G., *Enzyme Kinetics and Mechanisms*, Pt D; Academic Press: San Diego, 1995, vol. 249, pp. 61-90; Selwyn, M. J. *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, vol. 105, pp. 193-195)が当システムにおいて実施され好結果をもたらした。

【0447】

150 μM のRNase A保存溶液流量は、プラグ内部における50 μM のRNase Aを維持(保存)するために一定に保たれた。緩衝液および基板の流量の変化(図45を参照)によって、8種の異なる基板濃度で進行曲線が得られた。 $[E]_0 \gg [S]_0$ の単純反応方程式は $[P]_t = [S]_0 \cdot (1 - \exp(-kt))$ である。これは $[E]_0$ が初期の酵素濃度である場合と、 $[S]_0$ が初期の基板濃度である場合と、 $[P]_t$ が時間依存生成物濃度である場合と、 $k[s^{-1}]$ がシングルターンオーバーの率の定数である場合とに該当する。

【0448】

より正確なデータ適性値を達成するために、反応混合物 f_n の画分を混合するのに必要な時間遅延 Δt_n が評価された。使用されたマイクロフルイディック・システムの魅力的な特徴は、時間 $t=0$ (不感時間無し)で反応混合物を観察できるということである。この特徴は、前述のようにフルオ-4/ Ca^{2+} システムを使って混合曲線定規を得ることにより当装置における t_n と f_n を断定するため(Song et al., *Angew.Chem. Int. Ed.* 2002, vol. 42, pp. 768-772)、および拡散定数偏差を調整するため(Stroock et al., *Science*, 2002, vol. 295, pp. 647-651)に使用された。進行曲線定規は全8種とも、 $1100 \pm 250 s^{-1}$ の同一速度定数を伴い優れた適性値をもたらした。より単純な理論的適性値は識別不可能な速度定数をもたらした。これらの結果は、リボヌクレアーゼによるオリゴヌクレオチドの劈割率が約 $10^3 s^{-1}$ であることを証明する前研究結果に一致している。

【0449】

したがって、当事例は、発明によるマイクロチャンネル・チップを使って急速に経済的に、ミリ秒レベルの分解(分割)を伴うミリ秒レベルの動きを可能にすることを実証する。各蛍光画像が2秒で得られ、70nL以下の試剤溶液のみを要した。静止流体を伴うこれらの実験は、少なくとも数百マイクロリットルの溶液を要するとされている。一連の濃度範囲における実験に係する約25回の動力学的実験には約2 μL の量で十分である。 $[P]_t = \sum_n$

$f_n[S]_0(1-\text{Exp}(-k(t-\Delta t_n)))$ PDMSにおけるこれらの装置製作は単純である(McDonald, et al., AccountsCicem. Res. 2002, vol. 35, pp. 491-499)。また、実験を行うために、CCDカメラを備えた標準顕微鏡を除いては特殊な設備を必要としない。当システムは、化学と生化学の分野における広範囲の動態実験で、静止流体方式を補い完全にすることで低価格且つ経済的な補足システムとして役立つ。

【0450】

[実施例 11] RNAフォールディングの反応速度

本発明のシステムおよび方法は例として数十マイクロ秒から数百秒にわたる時間を要するフォールディングの反応速度測定を実施するために好ましくは使われる。発明によるシステムと方法は、少量のサンプルのみでの反応速度測定を可能にするため、何百もの異なるRNA突然変異体のフォールディングを測定することができ、そしてフォールディングに対する突然変異の影響を確認することができる。発明による一様態において、RNAフォールディングの反応速度は、異なる位置で対となったFRETにより標識付けされあらかじめ合成されたアンフォールド(引き伸ばし)状態のRNA溶液に Mg^{2+} を入れることにより好ましくは測定される。

【0451】

発明にのっとり、一連の条件におけるフォールディング反応速度を迅速に測定するために、流量を変更し、 Mg^{2+} 濃度が $0.04 \sim 0.4 \mu\text{M}$ の範囲で好ましくは変化する(例として図25a-cを参照)。発明による定常流マイクロフルイディック装置を使用することにより、何秒間にもわたり信号を集積する能力が得られるため、その感度をさらに向上させることができる。

【0452】

図25a-cにおいて示されるように、プラグ内部の水溶液濃度は、水性流の流量変更により制御することができる。図25a-cにおいて、2本の水性流に伴う約 $0.6 \mu\text{L}/\text{分}$ の流量および約 $2.7 \mu\text{L}/\text{分}$ の流量が第3の流れに適用されることを特徴とする入口251~258番へと、水性流が導入された。 $2.7 \mu\text{L}/\text{分}$ の体積流量率を伴う流れは、図25a-cに示される左側の入口、中央の入口、右側の入口へとそれぞれ導入された。パーフルオロデカリンの搬送流体は流路259、260、261番へ導入された。図25a-c各図右側の該当写真は、異なる濃度の水性流におけるプラグ形成を図示する。食用染料の水溶液を使って、流れおよびプラグ内部の様々な陰影(赤/濃、緑/淡)を可視化することができた。また、水を3本の流れに適用した。色のうすい陰影は主として緑色色素によるものであり、色の濃い陰影は主として赤色色素によるものである。色の濃い流れは色の薄い流れより粘着性が強いために、移動速度がより遅く(ミリメートル/秒単位の速度)、一定の体積流量($\mu\text{L}/\text{分}$ 単位の流量)でより広大な流路の画分を占める。

【0453】

[実施例 12] プラグ有・無でのナノ粒子実験

図15は、CdSナノ粒子155番の合成技術を図示する。一実験において、ナノ粒子がマイクロフルイディック・ネットワークにおいて形成された。マイクロフルイディック装置の流路横断面積は $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ 。フッ化搬送流体(パーフルオロヘキサンと1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオオクタノールの10:1 v/v混合物)は、 $15 \mu\text{L}/\text{分}$ で主要(メイン)流路を流れた。 0.80mM の CdCl_2 水溶液と 0.80mM の3-メルカプトプロピオン酸水溶液($\text{pH}=11.4$)は $8 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ で左端の吸込路151番を流れた。 0.80mM ポリリン酸塩 $\text{Na}(\text{PO}_3)_n$ 水溶液(水様液)は $8 \mu\text{L}/\text{分}$ で中央の吸込路152番を流れた。そして、 0.96mM の Na_2S 水溶液(水様液)は $8 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ で右端の吸込路153番を流れた。

【0454】

26.2mM の3-メルカプトプロピオン酸水溶液($\text{pH}=12.1$)は $24 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ で装置底の入口157番を流れた。ナノ粒子成長を終結した。図15は、154番の核生成、158番の成長、156番の終結が生じる領域又は地点に相応する流路に沿う様々な領域または地点を示す。当実験では、実質的に単分散のナノ粒子がUV-VIS領域において形成された。

【0455】

10

20

30

40

50

ナノ粒子はまた、マイクロフルイディック無しでも形成された。マイクロフルイディック実験において使われるものと同じ CdCl_2 溶液、ポリリン酸塩溶液、 Na_2S 溶液、3-メルカプトプロピオン酸溶液が使用された。 CdCl_2 溶液と3-メルカプトプロピオン酸溶液0.5mLとポリリン酸塩溶液0.5mLと Na_2S 溶液0.5mLを、キュベットで混ぜ合わせた。キュベットは手動で振られた。

【0456】

混合直後に、26.2mM 3-メルカプトプロピオン酸1.5mLが反応混合物に添加され反応を終結させた。キュベットは手動で振られた。当実験において、実質的に多分散系のナノ粒子がUV-VIS領域において形成された。

【0457】

10

[実施例13]

マイクロ流路網はポリジメチルシロキサン(PDMS)における急速なプロトタイピングを手段として製作された。

【0458】

PDMSは、Dow Corning社シルガード・ブランド製品184シリコーン・エラストマーから入手(購入)された。PDMS装置は、プラズマプレプII(SPI Supplies社)によるプラズマ酸化処理後に密閉された。2~4時間120℃で装置を焼成することにより、装置に疎水性をもたらした。マイクロ写真はライカMZ12.5実体顕微鏡とスポットインサイトカラー・デジタルカメラ(モデル3.2.0、Diagnostic Instruments社)で撮影された。照明には、マシビジョン・ストロボX-ストロボX1200(20Hz、12μF、600V、Perkin Elmer Optoelectronics社)を使用した。画像を得るために、カメラのシャッターを1秒間開き、ストロボを約10μs間フラッシュした。

20

【0459】

10μlまたは50μlハミルトン・ガスタイト・シリンジ(1700シリーズ)を使って水溶液をポンプでくみ出した。50μlハミルトン・ガスタイト・シリンジ(1700シリーズ)を使って搬送流体をポンプでくみ出した。シリンジは、テフロン(登録商標)管(Weico Wire & Cable社、30ゲージ)によってマイクロフルイディック装置に取り付けられた。ハーバードアパラタス社製シリンジポンプ(PHD 2000)はマイクロチャンネルに液体を注入する手段となった。

【0460】

30

マイクロパッチ法で結晶化条件を達成することが可能である。プラグサイズを維持することができ、水の蒸発が防がれたことを当実験は示す。

【0461】

当実施例では、水をPDMSに飽和させ染み込ませるため、実験前にPDMS装置を夜通し水に浸した。実験中にも装置を水中に浸し続けた。実験中に、搬送流体およびNaCl溶液の流量はそれぞれ2.7μL/分と1.0μL/分だった。搬送流体およびNaCl溶液の両テフロン(登録商標)管を遮断することにより流れを止めた。

【0462】

図16は、発明によるマイクロフルイディック装置の回路略図、および油の中に保持された1Mの水性NaClプラグのマイクロ写真を示す。

40

【0463】

搬送流体は2%の1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオオクタノールを含むパーフルオロデカリンである。マイクロチャンネル内部で、プラグサイズは明らかな変化を見せなかった。

【0464】

B. マイクロチャンネルにおける蒸気拡散結晶化：プラグからの水の蒸発制御当実験は、装置を通常より短時間水に浸すか全く浸さないかのどちらかにより、プラグからの水の蒸発を制御することができることを証明する。装置の製作時に使用するPDMSの厚さによってもまた、蒸発率を制御することができる。純水の中で装置を保管する代わりに、食塩水または他の物質の溶液の中で装置を保管することにより、蒸発率を上げることができる。

【0465】

50

プラグ・トラップは、プラグをトラップの中に押し入れるのに役立つ狭隘(きょうあい)領域によって分離される。

【0466】

当実験において、合成ガラスとPDMS装置の両方が使用された。PDMS層はマイクロチャンネルを備え、また、顕微鏡検査スライド(フィッシャー社、35x50-1)が基板として使用された。ガラススライドとPDMSの両方はプラズマクリーナー(Harrick)で処理された後に密閉された。2~4時間120℃でまず装置を焼成し、その後、(トリデカフルオロ-1,1, 2,2-テトラヒドロオクチル)-1-トリクロロシラン(United Chemical Technologies社)でシラン処理することにより、装置に疎水性をもたらした。

【0467】

実験中に、1.0 μL /分の搬送流体の流れが確立され、その次に、水溶液の流れが0.9 μL /分の総流量で確立された。プラグ形成がマイクロチャンネル内部に認められた。その後、出口からの圧力を加えてシリンジポンプを同時に止めることによりおよそ5~10分間流れを停止した。

【0468】

図41は、マイクロフルイディック・ネットワークの水プラグ領域のマイクロ写真(中央と右側)を示す。図41(b)-(c)はおおの、 t (時間)=0および $t=2$ 時間でのプラグを示す。赤色の水溶液は、NaCl溶液0.5M内のウォーターマン(Waterman)赤色インク50%溶液である。その後、インク流れは入口411、412、413番へと導入された。

【0469】

油流れは流路414番を流れた。搬送流体は、2%の1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオデカノールを含むFC-3283(3M社製フロリナート液体〔Fluorinert Liquid〕)である。PDMS中の水の蒸発を制御することが可能であり、したがって液滴内部容量の濃度を上げることが可能であることを当写真は実証する(これはマイクロバッチ法結晶化と同じである)。図41(a)は、マイクロフルイディック・ネットワークの線図を示す。

【0470】

C. 水プラグ形状および付着の制御

実験中に、1.0 μL /分の搬送流体の流れが確立され、次に、水溶液の流れが2.1 μL /分の流量で確立された。プラグ形成がマイクロチャンネル内部に認められた。その後、出口からの圧力を加えてシリンジポンプを同時に止めることによりおよそ5~10分間流れを停止した。

【0471】

図39は、発明によるマイクロフルイディック・ネットワークの線図(左側)を示す。油流れが流路3904番を流れた一方、水性の流れは入口3901、3902、3903番へと導入された。図39はさらに、マイクロフルイディック・ネットワークの水プラグ領域のマイクロ写真(右側)を示す。当画像は、PDMS壁に付着する水プラグを示す。このような付着は、低濃度または効果の薄い界面活性剤使用時に生じる。この場合、1 H, 1 H, 2H, 2H-パーフルオオクタノールは1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオデカノールほど効果的ではない。当実験において、界面活性剤として2%の1 H, 1 H, 2H, 2H-パーフルオオクタノールを使っているFC-3283(3Mのフロリナート液体)を油として使用した。

【0472】

(D. タンパク質結晶化の例)

実験中に、1.0 μL /分で油の流れが確立された。その後、水の流れが0.1 μL /分で確立された。最後に、リゾチームと沈殿剤の流れが0.2 μL /分で確立された。プラグ形成がマイクロチャンネル内部に認められた。流路内部の流れが安定した後、水の流れを0まで減速した。その後、出口からの圧力を加えてシリンジポンプを同時に止めることによりおよそ5~10分間流れを停止した。

【0473】

図36は、マイクロフルイディック流路の水源中にある水プラグにおいて成長したリゾチーム結晶を表わす。リゾチーム結晶は、およそ10分でプラグ・トラップの内部および外部

10

20

30

40

50

の両方の水性プラグ内で姿を見せ始めた。図36に示される結晶3個の画像は流れが停止した1時間後に撮影された。

【0474】

偏光の下で観察されたため、リゾチーム結晶が色つきに見える。これはタンパク質結晶についても同様である。図36の左側は発明によるマイクロフルイディック・ネットワークの線図であり、右側はマイクロフルイディック・ネットワークにおけるプラグ内で形成された結晶のマイクロ写真である。沈殿剤、リゾチームおよび水は、入口3601と3602と3603番へそれぞれ導入された。油は流路3604番を通して流れた。リゾチーム溶液は0.05Mの酢酸ナトリウム(pH 4.7)中に100mg/mlのリゾチームを含んでいる。沈殿溶液には30%のw/v PEG(M.W.5000)、1.0MのNaClおよび0.05Mの酢酸ナトリウム(pH 4.7)が含まれる。搬送流体は、10%のIH₁, IH₂, 2H₁, 2H₂-パーフルオオクタノール含むFC-3283(3M社製フロリナート液体)である。実験前にマイクロチャンネル装置をFC-3283/H₂Oに1時間浸した。

10

【0475】

図32は、プラグ・トラップがマイクロフルイディック・ネットワークにおける結晶形成に必要とされないことを証明する。図32は、マイクロフルイディック・ネットワークの線図(左側)を示す。沈殿剤は入口321番へ、リゾチームは入口322番へ、水性流は入口323番へと導入された。油は流路324番を通して流れた。図32は、さらにマイクロフルイディック流路の内部で成長したリゾチーム結晶のマイクロ写真(中央と右側)を示す。実験条件は図36のものと同じである。

20

【0476】

[実施例 14] 荷電表面用の油溶性界面活性剤

発明にのっとって、全フッ素置換された位相に対して溶性である中性界面活性剤が、好ましくは正および負の電荷を持つ界面を作り出す手段とされる。水との相互作用によって(例: アミンまたはグアニジン基のプロトン化〔図24B〕又はカルボン酸基の脱プロトン化〔図24C〕によって)電荷を持ちえる中性界面活性剤が、好ましくは電荷を伴う表面を作り出す手段となる。

30

【0477】

好ましくは、電荷を伴う表面は電荷を伴う生体分子を拒絶する(はねのける)か、不動とするか、安定させる手段となる。負の電荷を伴う表面は、表面吸着性を持たないDNAおよびRNAの処理に有用である。好ましくは、負と正の両方の荷電を持つ表面はタンパク質結晶の核生成を制御する手段となる。酸性基および塩基性基(RfC(O)OH、Rf(CH₂)₂NH₂、Rf(CF₂)₂C(NH)NH₂)を伴う中性のフッ化界面活性剤の多くが市販されている(Lancaster製, Fluorochem製, Aldrich製)。

40

【0478】

オリゴエチレン・グリコールを末端にもつ界面活性剤の合成に、パーフルオ非イオン性界面活性剤の合成法に基づく方式(手順)の修正および改善形態が好ましくは使用される。一様態において、オリゴエチレン・グリコールの重縮合を防ぐために、フッ素化アルコールのより高い酸性度に依存して合成作用が生じる。改良された合成法は、オリゴエチレン・グリコールのアルコール基1種の選択的ベンジル化(benzylation)、そしてその後続くトシレート(tosylate、トシル基)となる他種アルコール基の活性化を手段とする。

50

【0479】

その後、「ウィリアムソンの凝縮(Williamson Condensation)」が位相移転条件下で生じ、それから炭(活性炭)上パラジウムによる接触水素化を経て脱保護の最終段階へと進む。

【0480】

[実施例 15] フッ化界面活性剤および表面引張力存在下におけるプラグ形成油/水の界面は、キャピラリー数(C.n.)を低数値に保つのに十分な(十分高い)表面引張力を伴わなければならない。不水溶性フッ素界面活性剤のフッ素界面活性剤/水の界面は特性化されていないが、これらの界面活性剤はヘキサン/水の界面上のスパンに関係するシステムで認められたもの(約20 mN/m)同様のものに、表面引張力を下げると推測される。水様液/

50

フルオラス(fluorous)の界面の表面引張力は、ハンギングドロップ法によりフッ素界面活性剤の存在下で好ましくは測定される。これらのような測定用に特別に構築されたビデオ顕微鏡検査機器は界面の特性化に使用され成功結果を生み出している。図24は、パーフルオアルキル鎖およびオリゴエチレン・グリコール基を含むフッ化界面活性剤の合成を図示する。

【0481】

[実施例 16] 流量変化による勾配形成

図42は、流量変化による勾配形成に関係する実験を示す。当実験において、マイクロチャンネル・ネットワークはポリジメチルシロキサン(PDMS)における急速なプロトタイピングを手段として製作された。流路の幅および高さは両方とも $50\text{ }\mu\text{m}$ 。パーフルオオーバーハイドロフェナントレンに含まれる10%の1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオデカノールが油として用いられた。0.5MのNaCl溶液におけるウォーターマン赤インク50%溶液からなる赤色水溶液は入口421番へ導入された。油は $0.5\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ で流路424番を流れて流れた。水性流は入口422と423番へ導入された。流路にインク勾配を生じさせるために、水の総流量を $0.01/\text{分}$ 丁度の勾配率(Ramp Rate)で20秒間に $0.03\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ から $0.23\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ へと徐々に上げた。同時に、インク流量を勾配率 $0.01\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ で20秒間かけて $0.25\text{ pL}/\text{分}$ から $0.05\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ へと徐々に下げた。

10

【0482】

総流量は一定して $0.28\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ だった。プラグ内部で確立されたインク勾配濃度が、図42にははっきりと見られる。入口からさらに離れたプラグは、より高いインク流量で形成されたために色が濃い目である。

20

【0483】

[実施例 17] 勾配によるリソゾーム結晶化

図43は、勾配によるリソゾーム結晶の形成に関係する実験を図示する。流路領域436番が最適値域にある沈殿剤濃度に関連する一方、流路領域435と437番は沈殿剤濃度が非常に低い流路領域に関連する。当実験において、マイクロチャンネルのネットワークはポリジメチルシロキサン(PDMS)における急速なプロトタイピングを手段として製作された。流路の幅は $150\text{ }\mu\text{m}$ 、高さは $100\text{ }\mu\text{m}$ 。パーフルオオーバーハイドロフェナントレンの10%の1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオデカノールが油として使用された。

30

【0484】

実験中に、流路434番中の油流れは $1.0\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ で確立された。その後、入口432番を流れて導入された水流は $0.2\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ で確立され、入口431番を流れて導入されたリゾチームの流れと入口433番を流れて導入された沈殿剤の流れは $0.2\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ で確立された。プラグは流路の内部で形成した。勾配を作り出すために、水の流量を、まずは勾配率1.5秒当たり $0.01\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ で45秒間にわたり徐々に $0.35\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ から $0.05\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ 丁度に下げ、次に、勾配率1.5秒当たり $0.01\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ 丁度で45秒間にわたり徐々に $0.35\text{ }\mu\text{L}/\text{分}$ まで上げ戻した。同時に、沈殿の流量を、まずは勾配率1.5秒当たり 0.01 丁度で45秒間にわたり徐々に 0.05 丁度から 0.35 丁度まで上げ、次に、勾配率(1.5秒当たり 0.01 丁度)で45秒間にわたり徐々に 0.05 丁度まで下げ戻した。水および沈殿剤の流量が初期値に戻った直後に入口の配管を引き抜くことにより、流れを止めた。当方法により生成されたプラグでは一定のタンパク質濃度が保たれたが、沈殿剤濃度には変動が見られた(沈殿剤濃度は、流路の始点および末端で最低値を示し、流路の中央〔真ん中の列〕で最高値に達した)。流路の中央(真ん中の列)におけるプラグ内部のリゾチーム結晶を観察することにより確認された結果から分かるように、流路の中央にあるプラグだけがリゾチーム結晶化に最適の沈殿剤濃度を含んでいる。

40

【0485】

可視化は偏光の下で行なわれた。好ましくは、沈殿剤と水の流量だけでなく、すべての流量を変化しうる。

【 図 1 】

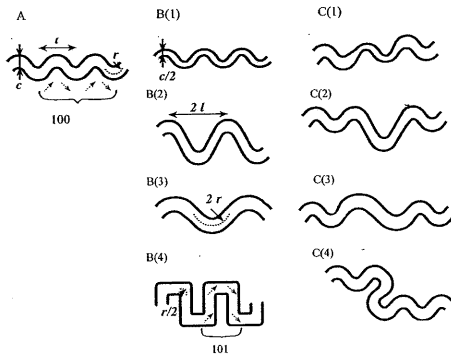


FIG. 1

【 図 3 】

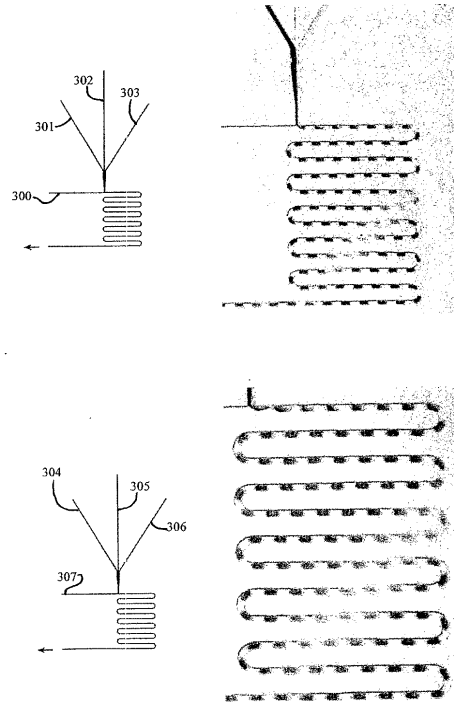


FIG. 3

【 図 4 】

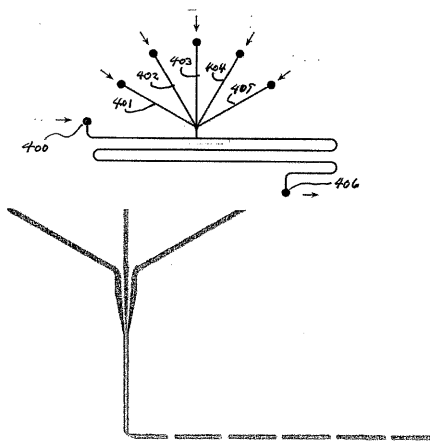


FIG. 4

【 図 6 】

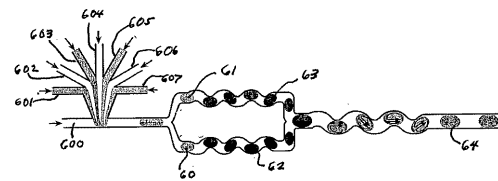


FIG. 6

【 図 7 】

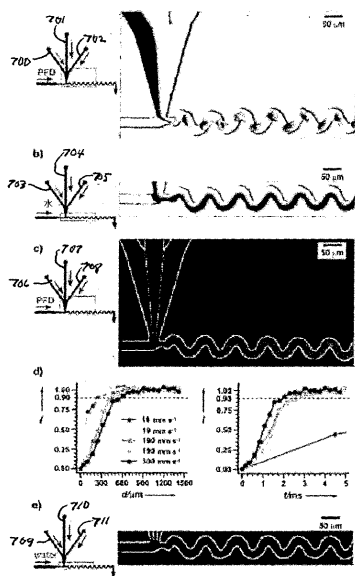


FIG. 7

【 図 8 】

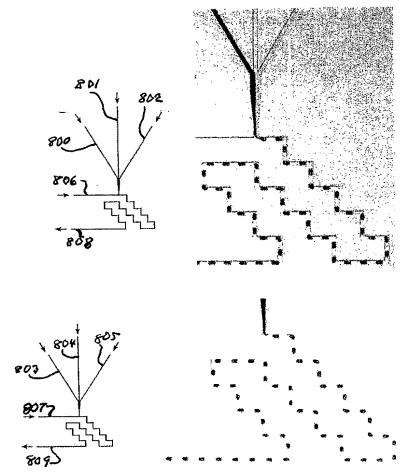


FIG. 8

【 図 9 】

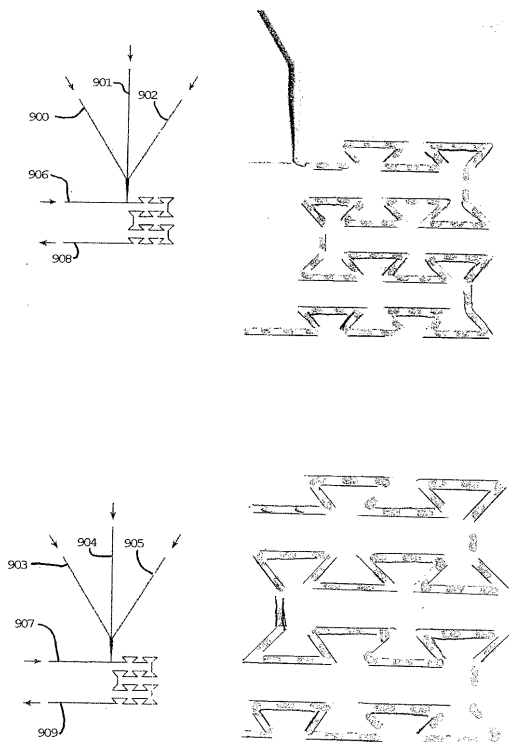


FIG. 9

【 図 10 】

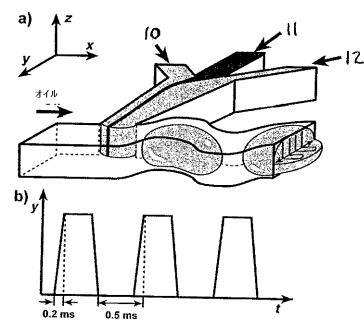


FIG. 10

【図 1 1】

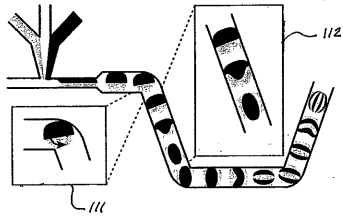


FIG. 11

【図 1 2】

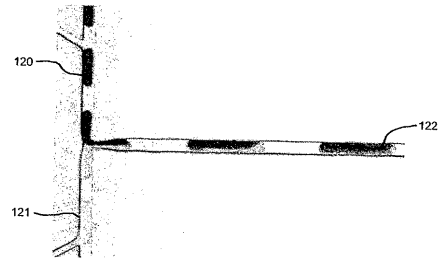


FIG. 12

【図 1 3】

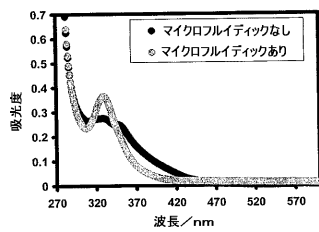


FIG. 13

【図 1 5】

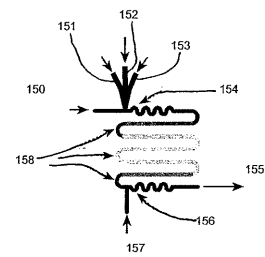


FIG. 15

【図 1 6】

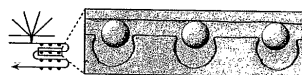


FIG. 16

【 図 1 7 】

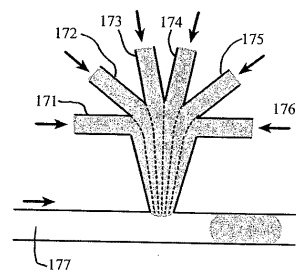


FIG. 17

【 図 1 8 】

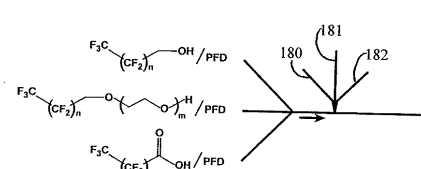


FIG. 18

【 図 1 9 】

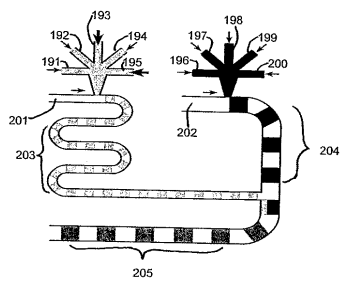


FIG. 19

【 図 2 0 】

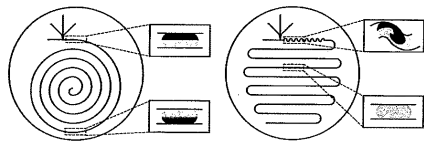


FIG. 20

【 図 2 1 】

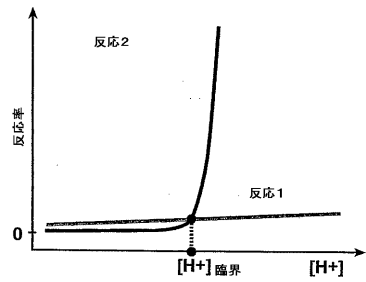


FIG. 21

【 図 2 2 】

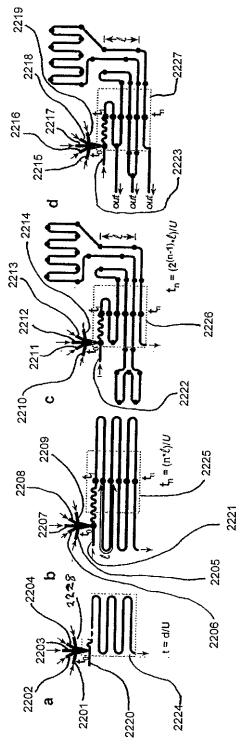


FIG. 22

【図 23】

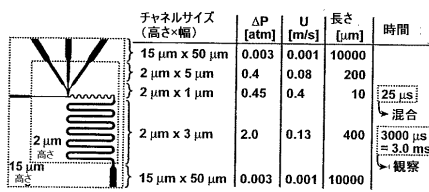


FIG. 23

【図 24】

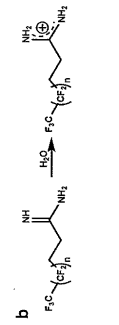


FIG. 24

【図 25】

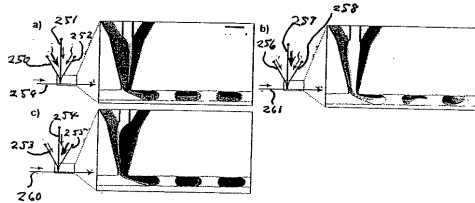


FIG. 25

【図 26】

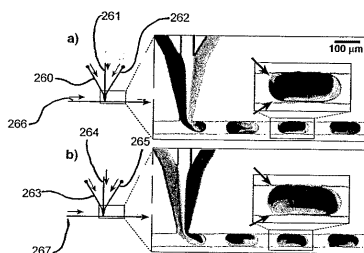


FIG. 26

【図 27】

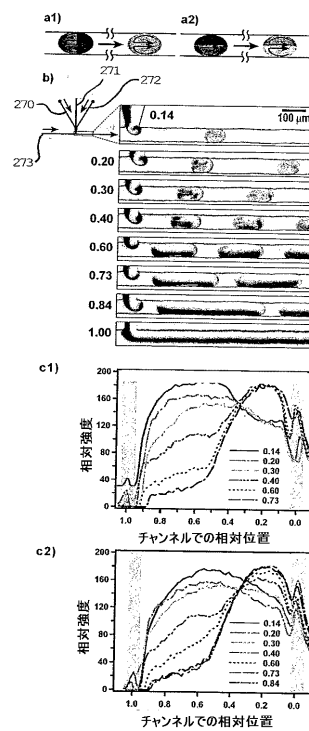


FIG. 27

【図 28】

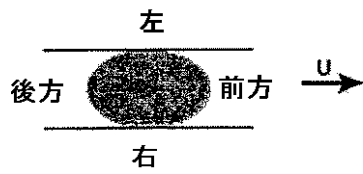


FIG. 28

【図 29】

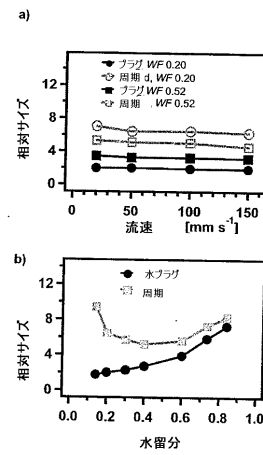


FIG. 29

【図 30】

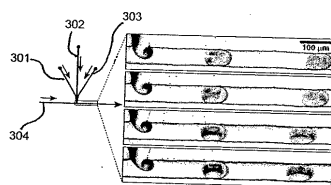


FIG. 30

【図 31】

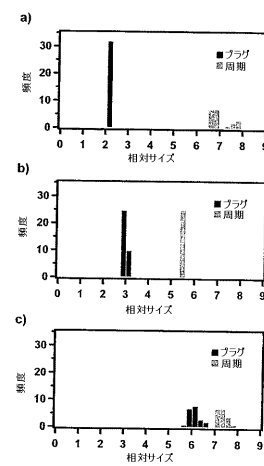


FIG. 31

【図 32】

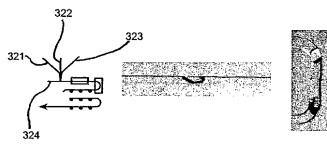


FIG. 32

【図 33】

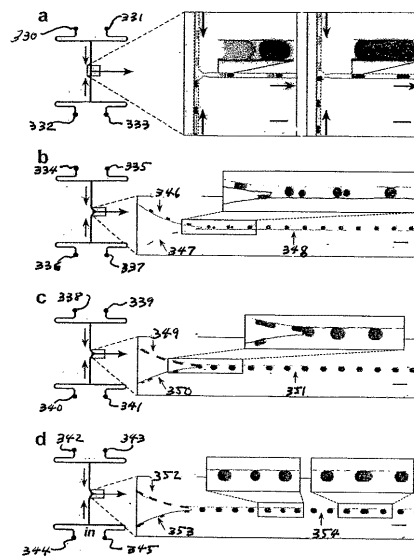
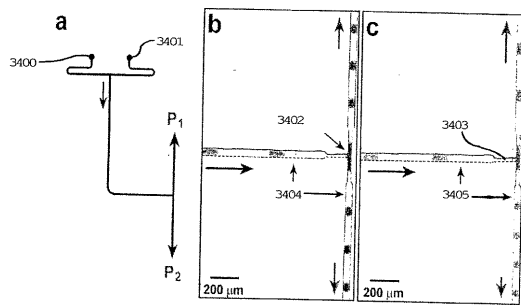


FIG. 33

【図 34】



FIGS. 34a-c

【図 35】

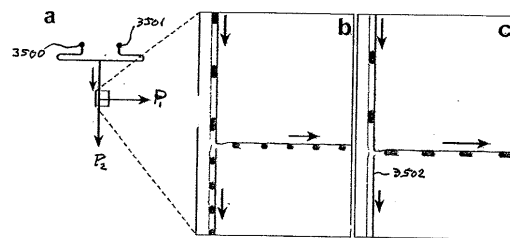


FIG. 35

【図 36】

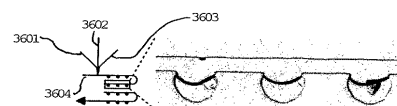


FIG. 36

【図 37】

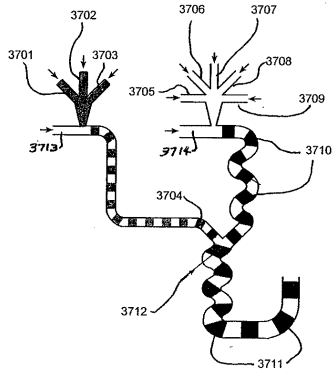


FIG. 37

【図 38】

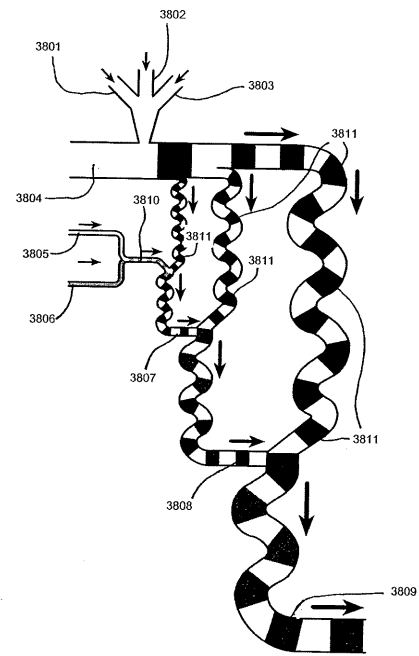


FIG. 38

【図 39】

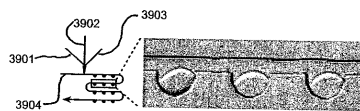


FIG. 39

【図 40】

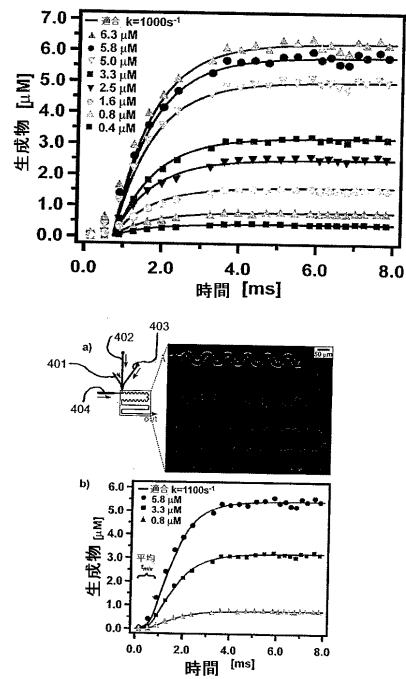


FIG. 40

【図 4 1】

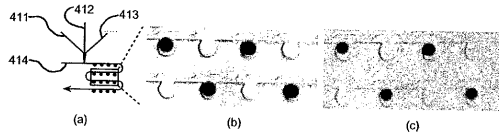


FIG. 41

【図 4 2】

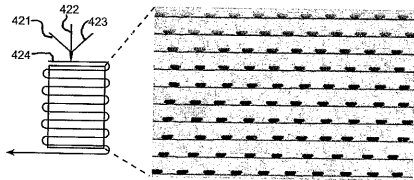


FIG. 42

【図 4 3】

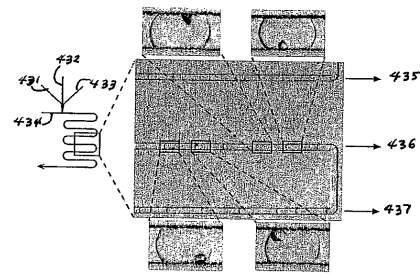


FIG. 43

【図 4 4】

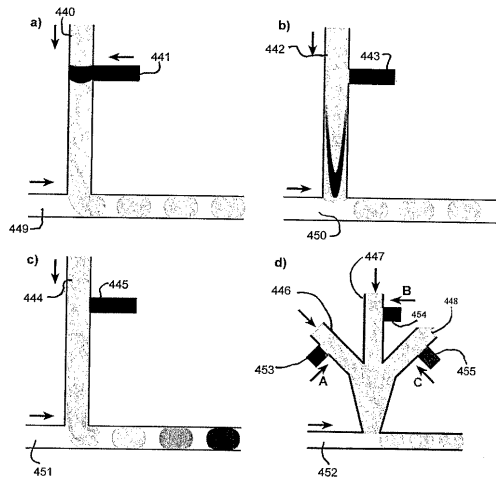


FIG. 44

【図 4 5】

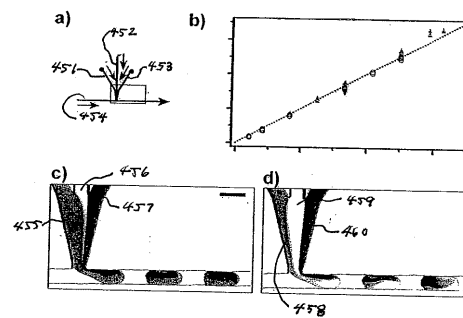


FIG. 45

【 図 2 】

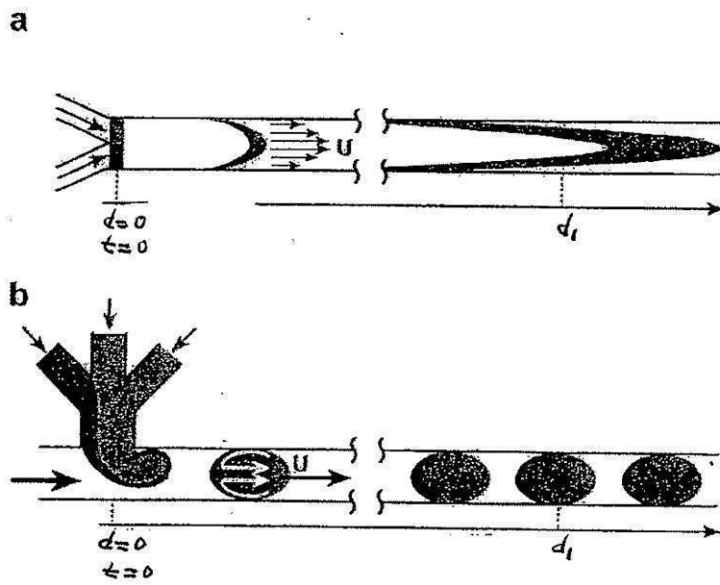


FIG. 2A

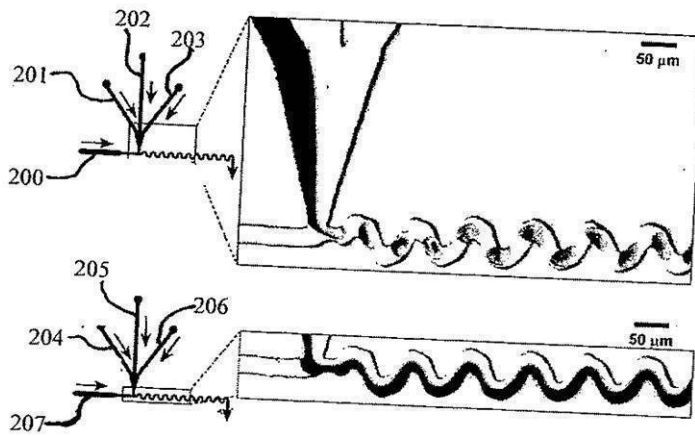


FIG. 2B

【 図 5 】

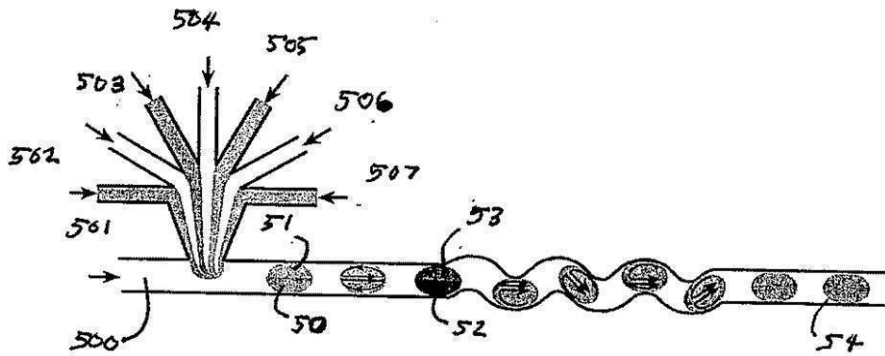


FIG. 5

【 図 1 4 】

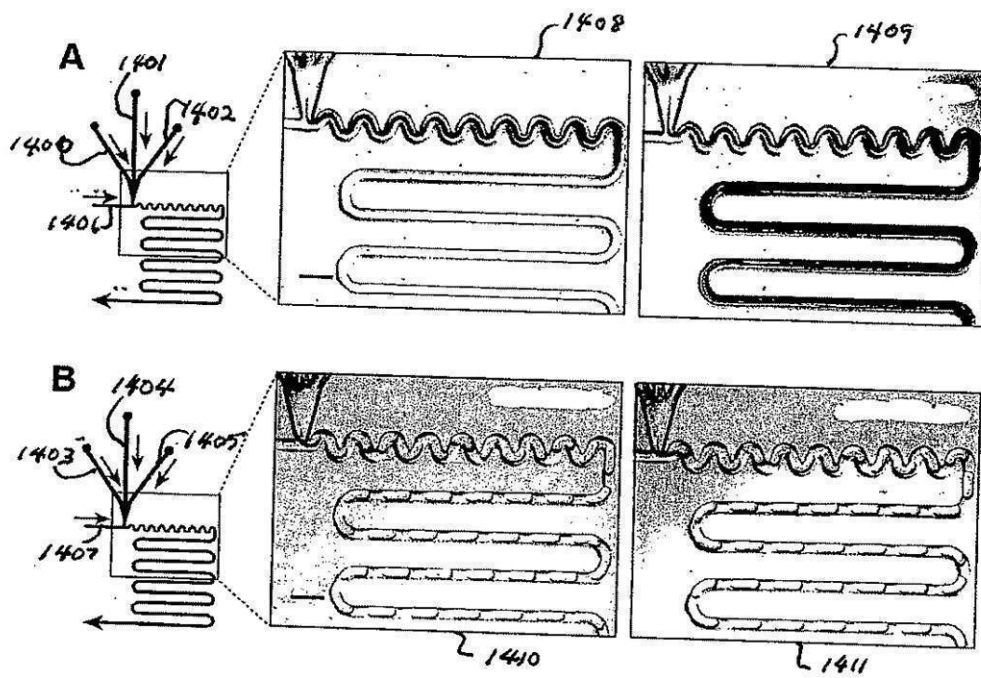


FIG. 14

フロントページの続き

(72)発明者 ルステム エフ． イスマジロフ

アメリカ合衆国 イリノイ 60637, シカゴ, イースト 56ティーエイチ ストリート
1700, アpartment 2804

Fターム(参考) 4G035 AB37 AC12 AE01

4G075 AA27 AA32 AA39 BA10 BB05 BB10 BD07 BD15 DA02 EB22
EB50 EC06