



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년12월10일
(11) 등록번호 10-1909764
(24) 등록일자 2018년10월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01J 3/42 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7021727
(22) 출원일자(국제) 2012년01월20일
심사청구일자 2016년11월23일
(85) 번역문제출일자 2013년08월19일
(65) 공개번호 10-2014-0003553
(43) 공개일자 2014년01월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/022130
(87) 국제공개번호 WO 2012/100235
국제공개일자 2012년07월26일
(30) 우선권주장
61/435,250 2011년01월21일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20080253933 A1*
JP61202142 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
테라노스, 인코포레이티드
미국, 캘리포니아주 94304, 팔로 알토, 페이지 밀
로드 1701
(72) 발명자
지본스 이안
미국 94028 캘리포니아주 포르톨라 밸리 라 메사
드라이브 831
누젠티 토니
미국 94568 캘리포니아주 두블린 라운드 힐 드라
이브 6083
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희

전체 청구항 수 : 총 19 항

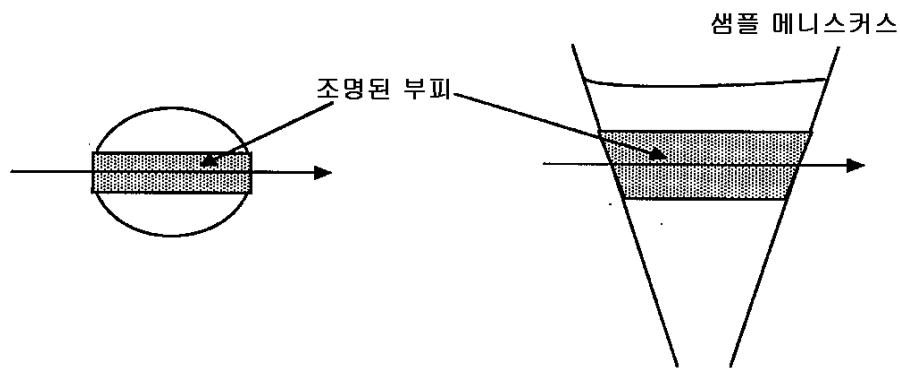
심사관 : 김창주

(54) 발명의 명칭 샘플 사용 최대화를 위한 시스템 및 방법

(57) 요약

본 발명은 현장진료 및/또는 분산된 시험 서비스를 위한 시스템, 디바이스 및 방법을 제공한다. 본 발명의 방법 및 디바이스는 체액 중의 분석물의 자동화된 검출에 관한 것이다. 상기 디바이스의 구성요소는 다양한 의학, 연구 및 다른 응용에 있어서 개시된 방법과 함께 보다 더 유연하고 강력한 이용을 허용하도록 변형될 수 있다. 본 발명의 시스템, 디바이스 및 방법은 개선된 샘플 준비 및 분석에 의한 샘플의 효과적인 사용을 허용할 수 있다.

대표도 - 도65



(72) 발명자

델라크루즈 안토니

미국 95123 캘리포니아주 산호세 브라이어 리지 드
라이브 240

영 다니엘

미국 94110 캘리포니아주 샌프란시스코 모울트리에
스트리트 359

홀메스 엘리자베쓰

미국 94301 캘리포니아주 팔로 알토 엘 카미노 리
일 855 스위트 31에이-404

드라케 앤드류

미국 94133 캘리포니아주 샌프란시스코 마슨 스트
리트 1909

캠프 티모티 마이클

미국 95120 캘리포니아주 산호세 레드몬드 애비뉴
1037

발와니 서니

미국 94301 캘리포니아주 팔로 알토 챈닝 애비뉴
325 #118

판가르카르 친마이

미국 94560 캘리포니아주 뉴왁 파파야 스트리트
36805

명세서

청구범위

청구항 1

용기에 함유된 샘플 유체 중의 분석물의 존재 또는 농도를 검출하는 방법으로서,

- (a) 제1 경로 길이를 갖는 제1 영역을 따라 상기 용기를 조명하여 상기 제1 경로 길이를 가로질러 투과된 광 강도의 제1 측정치를 획득하는 단계;
- (b) 상기 제1 측정치가 투과된 광 강도의 예정된 동적 범위를 벗어나는 경우 상기 샘플 유체를, 또 다른 경로 길이를 갖는 상기 용기 내의 또 다른 영역으로 이동시키는 단계;
- (c) 상기 또 다른 영역을 따라 상기 용기를 조명하여 상기 또 다른 경로 길이를 가로질러 투과된 광 강도의 또 다른 측정치를 획득하는 단계;
- (d) 광 강도의 측정치가 예정된 동적 범위 내에 들어갈 때까지 단계 (b) 및 (c)를 반복하여 분석물의 존재 또는 농도를 검출하는 단계

를 포함하는 검출 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 영상의 선 스캔을 복원(deconvoluting)함으로써 분석물의 존재 또는 농도를 검출하는 단계를 추가로 포함하는 검출 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 샘플이 이 샘플의 흡입에 의해 제1 경로 길이를 갖는 용기의 제1 영역으로부터 또 다른 경로 길이를 갖는 상기 용기의 제2 영역으로 이동되는 것인 검출 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 용기의 단부가 샘플을 흡입하도록 구성된 피펫에 부착되는 것인 검출 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 샘플이 용기의 길이 위로 또는 아래로 이동되는 것인 검출 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 용기가 피펫 팁인 검출 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 용기가 원주 형상인 검출 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 용기가 2개의 개방 단부를 갖는 것인 검출 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 제1 개방 단부가 제2 개방 단부보다 더 큰 직경을 갖는 것인 검출 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 용기가 복수의 가변 경로 길이를 따라 광의 투과를 허용하도록 복수의 상이한 폭을 갖는 것인 검출 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 용기 부피가 100 μl 미만인 검출 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 복수의 상이한 경로 길이가 동시에 영상화되는 것인 검출 방법.

청구항 13

샘플 유체 중의 분석물 농도를 측정하는 방법으로서,

- (a) 복수의 상이한 폭에 상응하는 복수의 가변 경로 길이를 따라 광의 투과를 허용하도록 복수의 상이한 폭을 갖는 치수를 가진 용기에 함유된 샘플을 제공하는 단계;
- (b) 상기 복수의 경로 길이 중 하나 이상의 경로 길이를 따라 상기 용기를 조명하는 단계;
- (c) 상기 용기를 영상화하여 복수의 경로 길이 중 상기 하나 이상의 경로 길이를 가로질러 투과된 제1 광 강도를 측정함으로써, 측정된 제1 광 강도에 기초하여 분석물의 농도를 결정하는 단계;
- (d) 상기 용기를 영상화하여 상기 용기의 또 다른 상이한 폭에 상응하는 또 다른 경로 길이를 가로질러 투과된 제2 광 강도를 측정하는 단계;
- (e) 상기 제1 광 강도와 상기 제2 광 강도를 비교하는 단계; 및
- (f) 상기 비교 단계에 기초하여 분석물 농도를 결정하는 단계

를 포함하는 측정 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

제13항에 있어서, (a) 광원을 샘플에 대해 이동시키는 것, (b) 검출기를 샘플에 대해 이동시키는 것, 또는 (c) 용기 내의 샘플을 광원에 대해 이동시키는 것 중 하나 이상에 의해 원하는 검출 경로 길이를 선택하는 단계를 추가로 포함하는 측정 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 조명이 광원에 의해 제공되고, 영상화가 검출기에 의해 제공되며, 여기서 광원 및 검출기가 용기의 대향 측에 존재하는 것인 측정 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 조명이 광원에 의해 제공되고, 영상화가 검출기에 의해 제공되며, 여기서 광원 및 검출기가 용기의 동일 측에 존재하는 것인 측정 방법.

청구항 18

제13항에 있어서, 복수의 경로 길이가 용기의 길이와 직교하는 것인 측정 방법.

청구항 19

제13항에 있어서, 용기가 제1 개방 단부 및 제2 개방 단부를 갖고, 여기서 상기 제1 개방 단부가 상기 제2 개방 단부보다 더 작은 폭을 갖는 것인 측정 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 제2 개방 단부가 유체 취급 디바이스에 연결되도록 구성되는 것인 측정 방법.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

상호참조

[0002]

본원은 2011년 1월 21일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/435,250호(이 출원은 전체적으로 본원에 참고로 도입됨)에 대한 우선권을 주장한다.

배경 기술

[0003]

엄청난 수의 질환 생체마커의 발견, 신규 치료법 및 소형화된 의학 시스템의 확립은 현장진료(a point-of-care) 또는 다른 분산된 시험 셋팅에서 질환의 예후, 진단 및 치료의 모니터링을 위한 새로운 길을 열었다. 현장진료 시스템은 시험 결과를 의료인, 다른 의학 전문가 및 환자에게 신속히 전달할 수 있다. 질환 또는 질환 진행의 초기 진단 및 치료법의 모니터링은 치명적인 상태, 예컨대, 일부 암 및 감염성 질환의 치료를 위해 종종 매우 중요하다.

[0004]

질환의 진단 및 치료는 환자의 상태에 대한 추가 지식을 제공하는 다중화된 생체마커 측정을 이용할 수 있다. 예를 들면, 약물의 효과를 모니터링할 때, 3개 이상의 생체마커를 동시에 측정할 수 있다. 전형적으로, 마이크로로타이터 플레이트 및 다른 유사한 장치가 다중화된 분리-기초 어세이(assay)를 수행하는 데에 사용되어 왔다. 마이크로로타이터 플레이트(예를 들면, 384웰 마이크로로타이터 플레이트)는 많은 수의 어세이들을 동시에 수행할 수 있다.

[0005]

현장진료(POC) 디바이스에서, 동시에 수행될 수 있는 어세이의 수는 종종 상기 디바이스의 크기 및 분석될 샘플의 부피에 의해 한정된다. 많은 POC 디바이스들에서, 수행되는 어세이의 수는 약 1개 내지 10개이다. 작은 샘플에 대한 다중화된 어세이를 수행할 수 있는 POC 디바이스가 바람직할 것이다.

[0006]

많은 다중화된 POC 어세이 디바이스들의 결점은 상기 디바이스의 구성요소의 높은 제작 비용이다. 상기 디바이스가 일회용인 경우, 상기 구성요소의 가격은 POC 디바이스의 제작을 비실용적으로 만들 수 있다. 또한, 상기 디바이스의 탑재된 필요한 시약들 모두를 포함하는 다중화된 POC 디바이스에 있어서, 상기 시약들 중 어느 하나가 불안정성을 나타내는 경우, 다른 시약들 모두가 여전히 사용될 수 있는 경우조차도 디바이스의 전체 제작된 전부가 폐기되어야 할 수 있다.

[0007]

고객이 특정 분석물 세트에 맞게 POC 디바이스를 주문제작하는 데에 관심이 있는 경우, 다중화된 POC 어세이 시스템의 제작자는 디바이스의 어세이 및 시약을 혼합하고 일치시킬 필요성에 종종 직면한다. 각각의 고객에 적합

한 다중화된 POC 어세이가 매우 비쌀 수 있고 교정하기 어려울 수 있고 질(quality) 제어를 유지하기 어려울 수 있다.

[0008] POC 방법은 질환 및 치료법의 모니터링에 있어서 매우 귀중한 것으로 입증되었다(예를 들면, 당뇨병 치료법에서 혈당 시스템, 와파린(Warfarin)을 사용한 항-응고제 치료법에서 프로트롬빈 시간 측정). 다수의 마커들을 측정함으로써 다중약물 치료법이 필요한 복합 질환(예컨대, 암)을 더 잘 모니터링할 수 있고 조절할 수 있다고 생각된다.

[0009] 개체의 건강 상태 또는 질환 상태뿐만 아니라 다양한 질환들의 치료를 모니터링하기 위해 다수의 정보 공급원을 이용할 필요성이 존재한다. 여러 선택된 분석물(생체마커, 항체, 유전자 발현 수준, 대사물질, 치료 약물 농도 등)의 농도를 시간에 따라 측정하는 것이 특히 중요하다. 이 과정을 편리하고 최대한 효과적이게 하기 위해, 작은 혈액 샘플(핑거스틱(finger-stick)에 의해 수득된 혈적) 또는 다른 적합한 샘플을 사용하여 (어떤 종류이든) 임의의 모든 필요한 분석물을 측정할 수 있는 기술이 특히 귀중하다. 이러한 기술은 이상적으로는 분산된 시험 셋팅, 예를 들면, 집, 병원, 진료실, 약국 및 소매점에서 기술적으로 훈련받지 않은 사용자에게 의해 실시될 것이다. 본 발명은 이 문제점을 다루고 환자의 집 또는 다른 비실험실 셋팅에서 이러한 측정을 관용적으로 수행할 수 있게 한다.

[0010] 특히, 샘플(예를 들면, 혈액 샘플)이 샘플 크기에 의해 한정되는 경우 사용가능한 샘플을 최대한 사용할 필요성도 존재한다. 혈액 샘플은 대다수의 의학/임상 시험을 위해 사용된다. 세포의 존재가 어세이 화학반응을 손상시킬 것이기 때문에 대다수 종류의 분석 전에 혈액 세포는 혈장(또는 혈청)으로부터 분리되어야 한다. 예를 들면, 글루코스 및 콜레스테롤은 형성된 요소, 특히 적혈구 세포 또는 (용해된 적혈구 세포로부터의) 헤모글로빈의 존재에 의해 방해될 색채 형성 화학반응에 의해 종종 측정된다.

[0011] 분산된 시험 시스템은 이상적으로는 핑거스틱 방법에 의해 수득된 작은 혈액 샘플을 필요로 한다. 이러한 샘플은 20 마이크로리터(μl)(한 방울) 이하만큼 작을 수 있다. 보다 더 큰 부피의 샘플(대략 200 μl 이하)은 통상적으로 손가락의 반복된 불편한 찌르기("밀킹(milking)") 없이 핑거스틱 방법에 의해 채취될 수 없다. 대안적으로, 수 밀리리터(mL)의 정맥 샘플이 채취될 수 있으나, 이것은 의학적으로 훈련받은 사혈전문의를 필요로 한다.

[0012] 20 μl 이하의 작은 혈액 샘플을 사용하는 하나 초과인 단일 어세이를 수행하는 것은 통상적으로 매우 어렵다. 이것은 세포를 제거하기 위해 혈액 샘플이 여과되어야 하고 이러한 작은 부피의 샘플로부터 사용가능한 혈장의 회수가 비효율적인 경우 특히 그러하다. 전형적으로 약 5 μl 이하의 혈장만이 회수될 수 있다. 200 μl 만큼 큰 샘플은 자동화된 POC 시스템(아박시스(Abaxis), 바이사이트(Biosite) 등)에 의해 효율적으로 분리될 수 있으나, 이것은 샘플을 추출하는 데에 기술자가 이용될 수 없는 경우 관용적으로 수행될 수 없다.

발명의 내용

[0013] 본 발명의 요약

[0014] 현재 방법들의 한계점에 비추어 볼 때, 혈액 세포로부터 혈장 및/또는 다른 물질을 자동적으로 분리하는 개선된 방법에 대한 절실한 필요성이 존재한다. 분석물 농도에 대한 이들 측정의 개선된 정확도에 대한 필요성도 존재한다. 치료법의 모니터링 및 진단을 목적으로 하는 혈액의 생체마커 및 다른 성분의 측정에 있어서, 정확한 부피의 샘플을 사용하는 것이 중요하다. 실험실 셋팅에서, 이것은 복잡한 자동화된 기기들 및 숙련된 전문 직원들의 이용에 의해 달성된다. 대조적으로, "현장진료" 셋팅, 예컨대, 집, 소매 약국 및 상점 등에서, 이용되는 방법 및 장치는 기술적으로 훈련받지 않은 사람들이 신뢰가능하게 샘플을 수득하고 프로세싱할 수 있게 하여야 한다.

[0015] 본 발명은 전술된 필요성을 다루고 관련된 장점을 제공한다.

[0016] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 현장진료 및/또는 현장서비스 디바이스에 관한 것이다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 현장진료 및/또는 현장서비스 디바이스를 이용하여 샘플을 분석하는 시스템, 디바이스, 사용자 인터페이스 및 방법에 관한 것이다.

[0017] 한 양태에서, 본원에 개시된 디바이스 및 방법은 어세이 절차에서 초기 충분한 샘플의 부피를 측정함으로써 적절한 샘플이 의도된 어세이에서 사용되는 것을 보장하기 위해 샘플 종류(혈액 대 혈장 등)를 확인하도록 디자인된다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 또한 어세이를 수행하는 데에 있어서 일어나는 유의한 부피 오차를 보정할 수 있게 한다.

- [0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상이한 종류의 여러 분석물들에 대한 동시적인 측정을 높은 정확도로 수행할 수 있게 한다.
- [0019] 본 발명의 한 양태는 생물학적 유체 중의 하나 이상의 성분을 분리하는 자동화된 시스템에 관한 것일 수 있다. 상기 자동화된 시스템은, 흡입기(aspirator)와 맞물리도록 구성된 피펫 팁(pipette tip) 또는 폐쇄된 튜브로서, 2개의 대향 단부(이들 중 하나 이상의 단부가 폐쇄되어 있거나 밀폐될 수 있음)를 포함하는 피펫 팁 또는 폐쇄된 튜브; 및 생물학적 유체 중의 하나 이상의 성분의 상기 분리를 수행하기 위해 상기 밀폐된 피펫 팁 또는 폐쇄된 튜브를 수용하도록 구성된 원심분리기를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 하나 이상의 성분은 혈액 혈장, 혈액 혈청, 혈액 세포 및 미립자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 피펫 팁은 생물학적 유체의 추출을 수행하도록 흡입기와 맞물려 있다. 또 다른 실시양태에서, 피펫 팁은 흡입기와 함께 기밀 밀폐부(airtight seal)를 형성하는 개방 단부를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 상기 시스템은 영상화 디바이스; 및 (a)의 피펫 팁 또는 튜브 내로의 액체의 분배를 허용하거나 (a)의 피펫 팁 또는 튜브로부터의 액체의 흡입을 허용하는 치수를 갖는 하나 이상의 다른 피펫 팁을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 피펫 팁 또는 폐쇄된 튜브는 원심분리기가 정지 상태에 있을 때 수직으로 배향된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 피펫 팁 또는 폐쇄된 튜브는 원심분리기가 예정된 회전 속도에서 회전할 때 수평으로 배향된다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 양태는 하기 단계들 중 하나 이상의 단계를 포함하는, 샘플 중의 성분을 분리하는 방법일 수 있다: 2개의 대향 단부(이들 중 하나 이상의 단부가 밀폐가능하거나 밀폐되어 있음)를 포함하는 피펫 팁 또는 튜브 내로 샘플을 로딩(적재)하는 단계; 피펫 팁의 하나 이상의 단부 상에서 상기 피펫 팁을 밀폐시키는 단계; 밀폐된 피펫 팁을 원심분리함으로써, 상기 샘플을 상청액과 펠렛으로 분리하는 계면 영역을 형성하는 단계; 원심분리된 피펫 팁을 영상화하여 계면 영역의 위치를 결정하는 단계; 및 상기 계면 영역의 위치에 기초하여 상청액을 자동적으로 흡입하는(aspirating) 단계. 한 실시양태에서, 상기 방법은 상기 영상화 단계로 상청액의 위치를 결정하고 상청액의 위치에 기초하여 상청액을 자동적으로 흡입하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 결정은 프로세서의 이용에 의해 일어나고, 상기 프로세서는 자동화된 흡입 단계를 수행하는 흡입 디바이스에게 지시를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 영상화는 피펫 팁 또는 튜브의 측면 프로파일(side profile)의 영상을 포착하도록 구성된 카메라의 이용에 의해 일어난다. 또 다른 실시양태에서, 상기 상청액은 혈액 혈장 및 혈액 혈청 중 하나 이상을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 펠렛은 혈액 세포 및 미립자 중 하나 이상을 포함한다.
- [0021] 샘플에 존재하는 것으로 의심되는 분석물을 특정구명하는 컴퓨터-보조된 방법이 본 발명의 추가 양태에 따라 제공될 수 있다. 상기 컴퓨터-보조된 방법은 하기 단계들을 포함할 수 있다: 샘플의 디지털 영상을 획득하는 단계로서, 이때 상기 디지털 영상이 적어도 2-차원적 화소 어레이(array)를 포함하고, 각각의 화소가 복수의 강도 값을 포함하고, 이들 강도 값 각각이 상이한 검출 스펙트럼 영역에 상응하는 것인 단계; 프로그래밍가능한 디바이스를 이용하여, 획득된 강도 값을 각각의 검출 스펙트럼 영역의 동적 범위를 정의하는 예정된 값 세트와 상호 관련시키는 단계; 및 상기 획득된 강도 값과 예정된 값 세트의 상기 상호관련에 기초하여 샘플 중의 상기 분석물의 존재 및/또는 양을 예측하는 단계. 한 실시양태에서, 복수의 강도 값은 적색, 녹색 및 청색 검출 스펙트럼 영역에 대한 강도 값을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 조명 파장을 선택하는 단계, 및 디지털 영상을 획득하기 전에 및/또는 디지털 영상을 획득함과 동시에 샘플을 선택된 조명 파장으로 조명하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 디지털 영상을 획득한 후, (a) 또 다른 조명 파장을 선택하는 단계; (b) 샘플을 다른 선택된 조명 파장으로 조명하는 단계; (c) 샘플의 또 다른 디지털 영상을 획득하는 단계로서, 이때 상기 디지털 영상이 적어도 2-차원적 화소 어레이를 포함하고, 각각의 화소가 복수의 강도 값을 포함하고, 이들 강도 값 각각이 상이한 검출 스펙트럼 영역에 상응하는 것인 단계; 및 (d) 상기 디지털 영상 및 상기 또 다른 디지털 영상으로부터 획득된 강도 값에 기초하여 샘플 중의 상기 분석물의 존재 및/또는 양을 예측하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0022] 또한, 본 발명의 양태는 하기 단계들을 포함하는, 샘플 유체 중의 분석물 농도를 측정하는 방법에 관한 것일 수 있다: 복수의 상이한 폭에 상응하는 복수의 변화하는 경로 길이를 따라 광의 투과를 허용하도록 복수의 상이한 폭을 갖는 치수를 가진 용기에 함유된 샘플을 제공하는 단계; 상기 복수의 경로 길이 중 하나 이상의 경로 길이를 따라 상기 용기를 조명하는 단계; 및 상기 용기를 영상화하여 복수의 경로 길이 중 상기 하나 이상의 경로 길이를 가로질러 투과된 제1 광 강도를 측정함으로써, 측정된 제1 광 강도에 기초하여 분석물의 농도를 결정하는 단계.
- [0023] 본 발명의 또 다른 양태에 따라, 용기(예를 들면, 큐벳)에 함유된 샘플 유체 중의 분석물의 존재 또는 농도를 검출하는 방법은 제1 경로 길이를 갖는 제1 영역을 따라 상기 용기를 조명(illuminating)하여 상기 제1 경로 길

이를 가로질러 투과된 광 강도의 제1 측정치를 획득하는 단계; 상기 제1 측정치가 투과된 광 강도의 예정된(predetermined) 동적 범위를 벗어나는 경우 또 다른 경로 길이를 갖는 용기 내의 또 다른 영역으로 상기 샘플 유체를 이동시키는 단계; 상기 또 다른 영역을 따라 상기 용기를 조명하여 또 다른 경로 길이를 가로질러 투과된 광 강도의 또 다른 측정치를 획득하는 단계; 및 임의적으로 광 강도의 측정치가 예정된 동적 범위 내에 포함될 때까지 제2 및 제3 단계를 반복함으로써, 분석물의 존재 또는 농도를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 영상의 선 스캔을 복원(deconvoluting)함으로써 분석물의 존재 또는 농도를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 샘플은 이 샘플의 흡입에 의해 제1 경로 길이를 갖는 용기의 제1 영역으로부터 또 다른 경로 길이를 갖는 용기의 제2 영역으로 이동된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 용기의 단부는 상기 샘플을 흡입하도록 구성된 피펫에 부착된다. 또 다른 실시양태에서, 샘플은 상기 용기의 길이 위로 또는 아래로 이동된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 용기는 피펫 팁이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 용기는 원추 형태를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 상기 용기는 2개의 개방 단부를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 제1 개방 단부는 제2 개방 단부보다 더 큰 직경을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 상기 용기는 복수의 상이한 경로 길이를 따라 광의 투과를 허용하도록 복수의 상이한 폭을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 상기 용기의 부피는 100 μ l 미만이다. 또 다른 실시양태에서, 복수의 상이한 경로 길이는 동시에 영상화된다.

[0024] 방법은 본 발명의 추가 양태로서 제공될 수 있다. 상기 방법은 생물학적 유체 샘플에 존재하는 것으로 의심되는 분석물을 특정규명하기 위해 제공될 수 있고, 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다: 상기 생물학적 유체 샘플을 제공하는 단계; 상기 분석물을 상기 분석물과 특이적으로 반응하는 하나 이상의 시약과 반응시켜 광학적으로 검출가능한 신호를 발생시키는 단계; 및 복수의 검출 스펙트럼 영역들을 이용하여 상기 광학적으로 검출가능한 신호를 측정하는 단계로서, 이때 하나 이상의 검출 스펙트럼 영역의 동적 범위 내의 상기 광학적으로 검출가능한 신호의 존재가 상기 생물학적 유체 샘플 중의 상기 분석물의 농도를 표시하는 것인 단계. 한 실시양태에서, 상기 측정은 복수의 검출 스펙트럼 영역들을 측정하도록 구성된 영상화 디바이스에 의해 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 영상화 디바이스는 복수의 검출 스펙트럼 영역들을 동시에 측정하도록 구성된다.

[0025] 본 발명의 한 양태는 하기 단계들을 포함하는, 어세이의 정확도를 증가시키는 방법을 제공한다: 제1 팁 내의 샘플을 영상화하여 제1 샘플의 부피를 측정하는 단계; 제2 팁 내의 하나 이상의 시약을 영상화하여 상기 하나 이상의 시약의 부피를 측정하는 단계; 상기 샘플과 상기 하나 이상의 시약을 혼합하여 반응 혼합물을 형성하는 단계; 상기 반응 혼합물을 영상화하는 단계; 상기 샘플 및 상기 하나 이상의 시약의 상기 측정된 부피에 기초하여 교정을 보정하는 단계; 및 보정된 교정을 이용하여 분석물의 농도를 계산하는 단계. 한 실시양태에서, 상기 방법은 반응 혼합물을 영상화하여 상기 반응 혼합물의 부피를 측정하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제1 팁 내의 샘플의 영상화는 상기 제1 팁의 측면 프로파일을 포착하도록 구성된 카메라의 이용에 의해 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 제2 팁 내의 하나 이상의 시약의 영상화는 상기 제2 팁의 측면 프로파일을 포착하도록 구성된 카메라의 이용에 의해 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 샘플 및 상기 하나 이상의 시약의 높이는 포착된 프로파일에 기초하여 계산된다. 또 다른 실시양태에서, 부피의 측정은 상기 샘플 및 상기 하나 이상의 시약의 높이, 및 각각 상기 샘플 및 상기 하나 이상의 시약의 공지된 횡단면적에 기초한다. 또 다른 실시양태에서, 교정은 또한 반응 혼합물의 측정된 부피에 기초한다.

[0026] 본 발명의 또 다른 양태는 샘플을 수용하고 국한시키도록 구성된 용기로서, 내면, 외면, 개방 단부 및 대향하는 폐쇄 단부를 포함하는 용기; 및 상기 개방 단부를 통해 상기 용기 내로 확장되도록 구성된 팁으로서, 제1 개방 단부 및 제2 개방 단부(이때, 상기 제2 개방 단부는 상기 용기 내로 삽입됨)를 포함하는 팁을 포함하는 셋업(setup)을 제공하고, 이때 상기 용기 또는 팁은 상기 팁의 제2 개방 단부가 상기 용기의 폐쇄 단부의 내면의 기저부(bottom)와 접촉하는 것을 방지하는 돌출 표면 특징부를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 표면 특징부는 상기 용기의 기저부 내면 상에서 일체형으로 형성된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 표면 특징부는 상기 용기의 기저부 내면 상의 복수의 용기부들(bumps)을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 돌출 표면 특징부는 폐쇄 단부에 존재하거나 폐쇄 단부 근처에 존재한다.

[0027] 본 발명의 또 다른 양태는 샘플 준비 구역(station), 어세이 구역 및/또는 검출 구역; 상기 샘플 준비 구역, 어세이 구역 및 검출 구역 중 하나 이상의 구역을 이용하여 지정된 위치에서 현장서비스를 수행하기 위한 컴퓨터-실행가능한 명령어를 갖는 제어 유닛(unit); 및 펌프시스템으로부터 획득된 샘플의 원심분리를 수행하도록 구성된 하나 이상의 원심분리기를 포함하는 샘플 프로세싱 장치를 제공한다. 한 실시양태에서, 원심분리기는 샘플 준비 구역 및/또는 어세이 구역 내에 함유된다. 또 다른 실시양태에서, 컴퓨터-실행가능한 명령어는 소매 장소(retailer site), 대상체의 집 또는 건강 평가/치료 장소(location)로 이루어진 군으로부터 선택된 장소에서 현장서비스를 수행하도록 구성된다.

- [0028] 본 발명의 또 다른 양태는 하기 단계들을 포함하는 동적 피드백 방법을 제공한다: 검출 기작을 이용하여 용기 내의 샘플의 초기 측정을 수행하는 단계; 상기 초기 측정에 기초하여, 프로세서를 이용하여 상기 샘플의 농도가 원하는 범위 내에 포함되는지를 결정하고, 프로세서를 이용하여 (a) 상기 샘플의 농도가 상기 원하는 범위보다 더 높은 경우 수행될 희석 정도, 또는 (b) 상기 샘플의 농도가 상기 원하는 범위보다 더 낮은 경우 수행될 농축 정도를 결정하는 단계; 및 결정된 희석 정도 또는 결정된 농축 정도에 따라 상기 샘플의 농도를 조절하는 단계. 한 실시양태에서, 상기 방법은 용기 내의 샘플의 후속 측정을 수행하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 상기 후속 측정에 기초하여 프로세서를 이용하여 상기 샘플의 농도가 원하는 범위 내에 포함되는지를 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 후속 측정은 검출 기작의 이용에 의해 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 샘플의 특성을 상기 후속 측정에 기초하여 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 특성은 하기 특성들 중 하나 이상의 특성들로부터 선택된다: 분석물의 존재 또는 농도, 세포의 존재 또는 농도 및 세포의 형태. 또 다른 실시양태에서, 상기 후속 측정은 초기 검출 기작과 상이한 별도의 검출 기작의 이용에 의해 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 초기 측정은 샘플의 미정제 세포 농도 측정을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 후속 측정은 상기 초기 측정보다 더 높은 해상도의 샘플의 세포 농도의 측정을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 초기 측정은 샘플의 영상화에 의해 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 샘플 농도의 조절은 원하는 범위를 벗어날 분석물의 검출을 허용한다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 양태는 하기 단계들을 포함하는, 질 조절을 제공하는 방법을 제공한다: 검출 기작이 샘플의 특성을 측정하는 조건의 영상을 포착하는 단계; 및 프로세서를 이용하여, 검출 기작이 작동되는 바람직하지 않은 조건이 존재하는지를 상기 영상에 기초하여 결정하는 단계. 한 실시양태에서, 상기 바람직하지 않은 조건은 하나 이상의 바람직하지 않은 물질의 존재를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 바람직하지 않은 물질은 하기 물질들 중 하나 이상의 물질을 포함한다: 샘플의 특성의 측정을 방해하는 기포, 입자, 섬유 debris(debris) 및 침전물. 또 다른 실시양태에서, 검출 기작은 영상을 포착하는 데에 이용된 기작과 상이한 기작이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 영상은 카메라의 이용에 의해 포착된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 바람직하지 않은 조건이 검출되는 경우 경보를 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 바람직하지 않은 조건이 검출되는 경우 샘플을 조절하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 영상은 샘플의 영상을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 영상은 샘플 용기 및 검출 기작 중 하나 이상의 영상을 포함한다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 양태는 생물학적 유체 중의 하나 이상의 성분을 분리하는 자동화된 시스템으로서, 유체 샘플 중의 하나 이상의 성분의 상기 분리를 수행하기 위해 용기를 수용하도록 구성된 하나 이상의 버킷(bucket)을 포함하는 원심분리기; 및 상기 버킷의 형태 특징부(shaped feature)에 상보적인 하나 이상의 형태 특징부를 포함하는 용기를 포함하는 자동화된 시스템이다. 한 실시양태에서, 상기 버킷의 형태 특징부는 용기의 돌출 부분이 받쳐지도록 구성된 하나 이상의 선반을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 버킷은 상이한 입체구조를 갖는 복수의 용기들을 수용할 수 있도록 구성되고, 이때 상기 버킷의 형태 특징부는 복수의 선반들을 포함하고, 제1 입체구조를 갖는 제1 용기는 제1 선반 상에 받쳐지도록(rest) 구성되고, 제2 입체구조를 갖는 제2 용기는 제2 선반 상에 받쳐지도록 구성된다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 양태는 제1 단부 및 제2 단부; 외면; 및 하나 이상의 선택된 패턴을 포함하는 내면(이들 패턴 각각은 생물학적 샘플에 존재하는 것으로 의심되는 분석물을 포획할 수 있는 포획 시약과 함께 상기 내면 상에 또는 상기 내면 내부에 고정되어 있음)을 포함하는 어세이 유닛을 제공하고, 이때 상기 제1 단부 및 제2 단부는 서로 상이한 치수를 갖는다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 양태는 (a) 내면 상에 고정된 하나 이상의 포획 시약; 및 (b) 어세이 유닛이 상기 샘플을 함유하는 경우 생물학적 샘플의 공급원을 확인하는 데에 사용되는 식별자를 포함하는 어세이 유닛을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 양태는 복수의 선택된 패턴들을 포함하는 어세이 유닛을 제공하고, 이때 상기 복수의 패턴들 각각은 상이한 포획 시약을 포함한다.
- [0034] 본 발명의 다른 목적 및 장점은 하기 설명 및 첨부된 도면과 함께 고려될 때 더 인식되고 이해될 것이다. 하기 설명이 본 발명의 특정 실시양태를 기술하는 구체적 세부설명을 함유할 수 있지만, 이것은 본 발명의 범위에 대한 한정으로서 간주되어서는 안 되고, 오히려 바람직한 실시양태의 예시로서 간주되어야 한다. 본 발명의 각각의 양태의 경우, 본원에서 암시된 바와 같이 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 공지되어 있는 많은 변경들이 가능하다. 다양한 변화 및 변경은 본 발명의 사상을 벗어나지 않으면서 본 발명의 범위 내에서 만들어질 수 있다. 단독으로 또는 임의의 조합으로 본원에 개시된 임의의 방법을 위한 본원에 개시된 다양한 화합물/디바이

스는 별도로 사용될 수 있거나 임의의 조합으로 함께 사용될 수 있다.

[0035] 참고문헌의 도입

[0036] 본 명세서에서 언급된 모든 공개문헌, 특허 및 특허출원은 각각의 개별 공개문헌, 특허 또는 특허출원이 참고로 도입되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 기재되어 있는 것과 동일한 정도로 참고로 본원에 도입된다.

도면의 간단한 설명

[0037] 본 발명의 신규 특징은 첨부된 특허청구범위에 구체적으로 기재되어 있다. 본 발명의 특징 및 장점의 보다 더 우수한 이해는 본 발명의 원리가 이용되는, 예시적 실시양태를 기술하는 하기 상세한 설명, 및 첨부된 도면을 참조함으로써 획득될 것이다.

도 1은 원심분리기의 측면도를 보여준다.

도 2는 원심분리기의 정면도를 보여준다.

도 3은 원심분리기의 후면의 투시도를 보여준다.

도 4는 샘플 팁의 상면도를 보여준다.

도 5는 샘플 팁의 측면도를 보여준다.

도 6은 샘플 팁의 횡단면도를 보여준다.

도 7은 혈장/팩킹된 세포 계면 위에 있는 샘플 내에 위치한 샘플 팁의 도면을 보여준다.

도 8은 분 당 회전의 함수로서 작도된 원심분리 시간의 그래프를 보여준다.

도 9는 원심분리기 로터의 반경의 함수로서 작도된 원심분리 시간의 그래프를 보여준다.

도 10은 빈 캡핑된 샘플 팁을 보여준다.

도 11은 채액, 예를 들면, 혈액 샘플을 함유하는 캡핑된 샘플 팁을 보여준다.

도 12는 원심분리 후 약 23% 헤마토크릿(hematocrit) 혈액의 샘플을 함유하는 캡핑된 샘플 팁을 보여준다.

도 13은 원심분리 후 약 31% 헤마토크릿 혈액의 샘플을 함유하는 캡핑된 샘플 팁을 보여준다.

도 14는 원심분리 후 약 40% 헤마토크릿 혈액의 샘플을 함유하는 캡핑된 샘플 팁을 보여준다.

도 15는 원심분리 후 약 52% 헤마토크릿 혈액의 샘플을 함유하는 캡핑된 샘플 팁을 보여준다.

도 16은 원심분리 후 약 68% 헤마토크릿 혈액의 샘플을 함유하는 캡핑된 샘플 팁을 보여준다.

도 17은 원심분리된 샘플을 사용하여 디지털 영상화 시스템으로 측정된 헤마토크릿("헤마토크릿, % 보고된")과 표준 마이크로헤마토크릿 장치로 측정된 헤마토크릿("헤마토크릿, % 목표")의 비교를 보여준다.

도 18은 반응에 사용된 팁과 혈액/혈장에 사용된 팁의 도면(mm로 나타낸 치수)을 보여준다.

도 19는 샘플을 함유하는 원통형 모세관을 보여준다.

도 20은 원추형 용기, 예를 들면, 모세관 내의 부피를 계산하기 위한 각도 및 치수를 보여준다.

도 21은 원추형 용기, 예를 들면, 모세관 내의 부피를 계산하기 위한 각도 및 치수를 보여준다.

도 22는 구형 캡의 부피를 계산하기 위한 각도 및 치수를 보여준다.

도 23은 원통형 팁 내에 함유된 샘플의 부피를 계산하기 위한 치수를 보여주고, 이때 상기 샘플은 단일 메니스커스(meniscus)를 갖는다.

도 24는 원통형 팁 내에 함유된 샘플의 부피를 계산하기 위한 치수를 보여주고, 이때 상기 샘플은 2개의 메니스커스를 갖는다.

도 25는 원통형 팁 내에 함유되어 있고/있거나 원통형 팁과 결합되어 있는 샘플의 부피를 계산하기 위한 치수를 보여주고, 이때 상기 샘플은 2개의 메니스커스를 갖고, 이들 중 하나는 원통형 팁의 외부에 존재한다.

도 26은 원통형 팁 내에 함유된 샘플의 부피를 계산하기 위한 치수를 보여주고, 이때 상기 샘플 내의 기포가 존

재한다.

도 27은 원통형 팁 내에 함유된 샘플의 부피를 계산하기 위한 치수를 보여주고, 이때 상기 원통형 팁의 폭에 걸쳐 있는 상기 샘플 내의 기포가 존재한다.

도 28은 원통형 팁 내에 함유되어 있고/있거나 원통형 팁과 결합되어 있는 샘플의 부피를 계산하기 위한 치수를 보여주고, 이때 상기 샘플은 상기 원통형 팁의 외부에 존재하는 샘플의 매달려있는 소적을 포함한다.

도 29는 원통형 팁 내에 함유된 잔류 샘플의 부피를 측정하기 위한 치수를 보여준다.

도 30은 자성 시약과 혼합되기 전에 팁 내의 혈액 샘플을 보여준다.

도 31은 자성 시약과 혼합되는 혈액 샘플을 보여준다.

도 32는 자성 시약과 혼합된 혈액 샘플을 보여준다.

도 33은 팁 내에 함유된 자성 시약과 혼합된 혈액 샘플을 보여준다.

도 34는 팁 내의 선택된 위치로 이동된 자성 시약과 혼합된 혈액 샘플을 보여준다.

도 35는 자석(M)에 의해 자성 시약과 혼합된 혈액 샘플에 인가된 자기력을 보여준다.

도 36은 자기력의 이용을 통해 적혈구 성분과 혈장 성분으로 분리된 혈액 샘플을 보여준다.

도 37은 적혈구 성분과 혈장 성분으로 분리된 혈액 샘플을 함유하는 팁 아래에 위치한 웰을 보여준다.

도 38은 팁으로부터 웰로 전달되는 혈액 혈장의 도면을 보여준다.

도 39는 혈액 혈장이 웰에 분배된 후 팁을 보여준다.

도 40은 저흡광도를 갖는 액체를 함유하는 원통형 팁의 높은 명암대비 영상을 보여준다.

도 41은 고흡광도를 갖는 액체를 함유하는 원추형 팁의 영상을 보여준다.

도 42는 팁 내의 2개 메니스커스들을 보이는 고흡광도 액체를 갖는 팁을 보여준다.

도 43은 샘플 액체, 및 팁의 직경에 걸쳐 있는 큰 기포를 갖는 팁을 보여준다.

도 44는 투명 팁 또는 모세관 내의 깨끗한 상부 메니스커스를 보여주는 물 함유 팁을 보여준다.

도 45는 샘플 부피의 함수로서 작도된, 계산된 단백질 C 농도의 그래프를 보여준다.

도 46은 모세관, 하우징(housing), 플런저(plunger), 홈(groove) 및 상승된 특징부를 갖는 샘플 전달 디바이스의 영상을 보여준다. 상기 상승된 특징부는 플런저를 하우징 내에 위치시키는 데에 도움을 줄 수 있다.

도 47은 샘플 전달 디바이스의 모세관 내에 함유된 샘플을 보여준다.

도 48은 샘플이 플런저에 의해 배출된 후 샘플 전달 디바이스를 보여준다.

도 49는 샘플이 불완전하게 배출된 후 샘플 전달 디바이스를 보여준다.

도 50은 샘플을 함유하는 원추형 팁을 보여주고, 이때 화살표로 표시된 위치 L3이 나타나 있다.

도 51은 샘플 부피의 함수로서 작도된, L2와 L1 사이의 거리 대 L3과 L1 사이의 거리의 비의 그래프를 보여준다.

도 52는 착색된 생성물을 생성하는 화학반응의 반응식을 보여준다.

도 53은 콜레스테롤로부터 착색된 생성물을 생성하는 화학반응의 반응식을 보여준다.

도 54는 착색된 생성물을 생성하기 위해 환원 등가물을 사용하는 화학반응의 반응식을 보여준다.

도 55는 금속 이온과 함께 착물을 형성하였을 때 색채를 변화시키는 화합물의 일례를 보여준다.

도 56은 알부민을 갖지 않는 가장 좌측의 팁을 제외하고 우측부터 좌측까지 2배 감소하는 농도의 알부민을 갖는 팁의 일련의 영상들을 보여준다.

도 57은 콜레스테롤을 갖지 않는 가장 좌측의 팁을 제외하고 우측부터 좌측까지 2배 감소하는 농도의 콜레스테

물을 갖는 팁의 일련의 영상들을 보여준다.

도 58은 백색 불투명 플라스틱의 블록으로부터 기계가공된 일련의 반구형 웰을 보여주고, 이때 각각의 웰은 분석물을 갖지 않는 가장 좌측의 웰을 제외하고 우측부터 좌측까지 2배 감소하는 농도의 분석물을 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 상기 분석물은 칼슘일 수 있다.

도 59는 백색 불투명 플라스틱의 블록으로부터 기계가공된 일련의 반구형 웰을 보여주고, 이때 각각의 웰은 분석물을 갖지 않는 가장 좌측의 웰을 제외하고 우측부터 좌측까지 2배 감소하는 농도의 분석물을 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 상기 분석물은 마그네슘일 수 있다.

도 60은 백색 불투명 플라스틱의 블록으로부터 기계가공된 일련의 반구형 웰을 보여주고, 이때 각각의 웰은 분석물을 갖지 않는 가장 좌측의 웰을 제외하고 우측부터 좌측까지 2배 감소하는 농도의 분석물을 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 상기 분석물은 우레아일 수 있다.

도 61은 브로모페놀 블루 용액을 함유하는 일련의 팁을 보여준다.

도 62는 복수의 상이한 광학 경로 길이를 갖는 팁의 예시이다.

도 63은 직사각형 큐벳을 관통하는 광 경로를 보여준다.

도 64는 마이크로타이터 웰을 관통하는 광 경로를 보여준다.

도 65는 원주 형태를 갖는 큐벳을 관통하는 광 경로를 보여준다.

도 66은 적색, 녹색 및 청색 채널을 위한 상이한 농도의 브로모페놀 블루 용액과 함께 샘플을 함유하는 팁에 대해 측정되었을 때 위치의 함수로서 작도된 광 강도의 그래프를 보여준다.

도 67은 도 66에서 분석된 팁의 영상을 보여준다.

도 68은 적색, 녹색 및 청색 채널에 의해 측정되었을 때 브로모페놀 블루 농도의 함수로서 작도된 신호의 그래프를 보여준다. 광학 밀도는 589 nm에서 측정될 수 있다.

도 69는 청색(마름모형) 및 적색(정사각형) 채널에 의해 측정되었을 때 브로모페놀 블루 농도의 함수로서 작도된 신호 반응의 로그 규모 그래프를 보여준다.

도 70은 실제 농도의 함수로서 작도된, 디지털 영상의 색채 분석에 의해 측정된 농도의 그래프를 보여준다.

도 71은 알부민 농도의 함수로서 작도된, 적색(정사각형), 녹색(마름모형) 및 청색(삼각형) 채널에 의해 측정된 신호 반응의 그래프를 보여준다.

도 72는 폴리스티렌 라텍스 입자에 대한 녹색, 적색 및 청색 채널에 대해 측정된 신호 반응의 3개 그래프를 보여준다.

도 73은 시약 NADH, WST-1 및 PMS를 각각 별도로 함유하는 팁, 및 상기 시약들의 혼합물을 함유하는 2개의 팁을 보여준다.

도 74는 좌측에서 우측까지 2배 감소하는 농도의 락테이트 데하이드로게나제(LDH)를 함유하는 팁의 디지털 영상을 보여준다.

도 75는 LDH의 함수로서 작도된, 450 nm에서 측정된 광학 밀도의 그래프를 보여준다.

도 76은 칼륨 어세이 스트립에 첨가된 염화칼륨의 용액을 보여준다.

도 77은 항-A, 항-B, 항-D 및 대조군(좌측에서 우측으로)에 대한 혈액형 분류 시약과 혼합된 혈액 샘플을 함유하는 팁을 보여준다.

도 78은 항-A, 항-B, 항-D 및 대조군 시약과 혼합된 샘플의 경우 적색(좌측 컬럼), 녹색(중간 컬럼) 및 청색(우측 컬럼)에 대한 위치의 함수로서 신호에 대한 측정된 신호를 보여준다.

도 79는 적색, 녹색 및 청색 채널을 이용하여 좁은 경로 길이 및 넓은 경로 길이에 대해 측정된 상대적 농도의 함수로서 표준화된 신호를 보여준다.

도 80은 측정 알고리즘의 정확도를 보여주는, 실제 농도의 함수로서 작도된 측정된 농도의 로그 그래프를 보여준다.

- 도 81은 튜브 내의 어세이 생성물의 형광 영상을 보여준다.
- 도 82는 팁 내의 반응 생성물의 영상을 보여준다.
- 도 83은 팁 내의 반응 생성물의 영상을 보여준다.
- 도 84는 팁 내의 반응 생성물의 영상을 보여준다.
- 도 85는 팁 내의 반응 생성물의 영상을 보여준다.
- 도 86은 팁 내의 반응 생성물의 영상을 보여준다.
- 도 87은 팁 내의 반응 생성물의 영상을 보여준다.
- 도 88은 교정을 위해 획득된 배경 색채 영상을 보여준다.
- 도 89는 팁 내의 반응 생성물의 형광 영상을 보여준다.
- 도 90은 DNA 카피 수의 함수로서 적색 및 청색 채널 반응 및 형광 반응을 보여준다.
- 도 91은 형광 신호의 함수로서 작도된, 변환된 3색 신호의 그래프를 보여준다.
- 도 92는 화소 위치의 함수로서 작도된, 녹색 채널 신호 반응의 그래프를 보여준다.
- 도 93은 브로모페놀 블루와 물로 구성된 용액을 함유하는 팁의 영상을 보여준다.
- 도 94는 브로모페놀 블루와 물로 구성된 용액을 함유할 수 있는 추가 팁의 영상을 보여준다.
- 도 95는 다수의 어세이를 수행하기 위한 반응 혼합물을 함유하는 팁의 개략도를 보여준다.
- 도 96은 브로모페놀 블루와 물로 구성된 용액을 함유하는 팁의 영상을 보여준다.
- 도 97은 다수의 표준물에서 샘플, 물 및 대조군에 대한 신호 반응의 그래프를 보여준다. 상기 샘플은 공지된 농도의 분석물을 함유하는 수성 교정제(calibrator)일 수 있다.
- 도 98은 Ca^{2+} (팁의 상부 영역) 및 Mg^{2+} (팁의 하부 영역) 둘다에 대한 어세이를 함유하는 팁을 보여준다.
- 도 99는 하기 다양한 종류의 혈청 샘플을 갖는 4개의 팁을 보여준다: 용혈된 혈청(적색), 유미(lipemic) 혈청(회색), 황달 혈청(황색) 및 정상 혈청(좌측에서 우측으로).
- 도 100은 카메라 및 광학 구성요소의 개략도를 보여준다.
- 도 101은 백색 광원, 천공 및 센서를 포함하는 카메라 및 광학 구성요소의 횡단면도를 보여준다.
- 도 102는 (A) 여기 광선에 대한 수직 각도에서 광을 검출하도록 배치된 센서 및 (B) 여기 광선과 수평하게 배치된 센서를 이용하여 광 신호를 측정하기 위한 광학 셋업의 개략도를 보여준다.
- 도 103은 (A) 센서에 수직한 여기 광선 및 (B) 센서와 수평한 여기 광선을 이용하여 촬영한 영상을 보여준다.
- 도 104는 광학 셋업을 교정하는 데에 사용될 수 있는 날염된 염료들의 어레이를 보여준다.
- 도 105는 샘플 부피의 함수로서 작도된 신호의 그래프를 보여준다. 시리즈 1 내지 5는 상이한 분석물 농도, 예컨대, 각각 0, 20, 40, 60 및 80에 상응할 수 있다.
- 도 106은 샘플 부피의 함수로서 작도된 신호의 그래프를 보여준다. 시리즈 1 내지 5는 상이한 분석물 농도, 예컨대, 각각 0, 20, 40, 60 및 80에 상응할 수 있다.
- 도 107은 샘플 부피의 함수로서 작도된 신호의 그래프를 보여준다. 시리즈 1 내지 5는 상이한 분석물 농도, 예컨대, 각각 0, 20, 40, 60 및 80에 상응할 수 있다.
- 도 108은 실제 분석물 농도의 함수로서 작도된, 측정된 분석물 농도의 그래프를 보여준다.
- 도 109는 실제 분석물 농도의 함수로서 작도된, 측정된 분석물 농도의 그래프를 보여준다.
- 도 110은 ELISA 어세이에 대한 예시적 방법을 개략적으로 보여준다.
- 도 111은 수직 버킷을 갖는 정지 상태의 로터의 일례를 보여준다.

- 도 112는 수평한 작은 각도에서 버킷을 갖는 일정 속도의 로터의 일례를 보여준다.
- 도 113은 버킷 입체구조의 일례를 보여준다.
- 도 114는 버킷과 교접된(mated) 원심분리 용기의 일례를 보여준다.
- 도 115는 버킷과 교접될 수 있는 또 다른 원심분리 용기의 일례를 보여준다.
- 도 116은 원심분리 용기의 일례를 보여준다.
- 도 117은 추출 팁의 일례를 보여준다.
- 도 118은 원심분리 용기와 추출 팁이 교접할 수 있는 방법의 일례를 제공한다.
- 도 119는 원심분리 전 원래의 반응 혼합물을 촬영한 영상이다.
- 도 120은 원심분리 전 원래의 반응 혼합물을 촬영한 또 다른 영상이다.
- 도 121은 원심분리 전 원래의 반응 혼합물을 촬영한 추가 영상이다.
- 도 122는 혈장 메니스커스로부터의 계면의 거리로서 결과를 보여준다.
- 도 123은 표시된 백혈구를 보여주는 형광 현미경사진의 일례를 제공한다.
- 도 124는 암시야 영상을 이용하는 세포내 패턴의 일례를 제공한다.
- 도 125는 표시된 세포 샘플로부터의 데이터의 다중 파라미터 획득의 일례를 제공한다.
- 도 126은 인간 전혈의 명시야 영상의 일례를 제공한다.
- 도 127은 정량적 다중 파라미터 데이터 획득 및 분석의 일례를 제공한다.
- 도 128은 광 분포의 변경을 보여준다.
- 도 129는 5개의 어세이로부터 수득된 데이터를 보여준다.
- 도 130은 분석물의 농도에 대해 작도된 파라미터뿐만 아니라, 정확도, 정밀도 및 예측된 농도에 관한 그래프도 보여준다.
- 도 131은 디지털 카메라에 의해 수집된 영상을 보여준다.
- 도 132는 반응 생성물을 촬영한 영상의 예를 보여준다.
- 도 133은 원심분리에서 회전하기 전 및 원심분리에서 회전한 후 분석된 영상의 예를 제공한다.
- 도 134는 반응 생성물을 촬영한 영상의 예를 보여준다.
- 도 135는 여러 혈청 샘플들의 스펙트럼을 보여준다.
- 도 136은 어레이를 사용하는 본 발명의 예시적 검출 과정을 보여준다.
- 도 137은 비드를 사용하는 본 발명의 예시적 검출 과정을 보여준다.
- 도 138은 태깅된(tagged) 앵타머를 사용하는 본 발명의 예시적 검출 과정을 보여준다.
- 도 139는 상보적 프로브에 결합하는 앵타머의 검출을 보여준다.
- 도 140은 앵타머와 비상보적 프로브 사이의 결합의 부재를 보여준다.
- 도 141은 어레이 상의 앵타머의 결합 특이성을 보여준다.
- 도 142는 어레이 상의 분석물 검출의 보다 더 상세한 도면을 보여준다.
- 도 143은 예시적 어레이를 보여준다.
- 도 144는 비타민 D 어세이를 위해 농도에 대해 작도된 화학발광도를 보여준다.
- 도 145는 에스트라디올 어세이를 위해 농도에 대해 작도된 화학발광도를 보여준다.
- 도 146은 WBC 농도의 분광광도측정을 보여준다.

도 147은 시간의 함수로서 작도된 탁도를 보여준다.

도 148은 800 카피/ μl 및 80 카피/ μl 에서 3개 실험에 대한 변곡점을 작도한 것이다.

도 149는 자성 비드가 ELISA 어세이를 통해 단백질 및 소분자의 분석에 사용되는 일례를 작도한 것이다.

도 150은 자성 비드가 ELISA 어세이를 통해 단백질 및 소분자의 분석에 사용되는 일례를 작도한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 본 발명의 바람직한 실시양태가 본원에서 제시되고 기재되어 있지만, 이러한 실시양태가 단지 예로서 제공되는 것임이 당업자에게 자명할 것이다. 본 발명을 벗어나지 않으면서 다수의 변경, 변화 및 치환이 당업자에게 인식될 것이다. 본원에 기재된 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 발명의 실시에 사용될 수 있다는 것을 이해해야 한다.
- [0039] 본 발명은 샘플 사용 최대화를 위한 시스템 및 방법에 대한 모바일 응용을 제공한다. 본원에 기재된 본 발명의 다양한 양태는 이하에 기재된 임의의 특정 응용, 또는 임의의 다른 종류의 진단 또는 치료 응용에 적용될 수 있다. 본 발명은 독립형 시스템 또는 방법으로서, 또는 통합된 임상전, 임상, 실험실 또는 의학적 응용의 일부로서 적용될 수 있다. 본 발명의 다양한 양태는 개별적으로, 집합적으로 또는 서로 조합된 상태로 인식될 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- [0040] 본원의 디바이스 및 시스템은 대상체로부터의 체액에 존재하는 분석물의 실시간 검출을 위한 효과적인 수단을 제공할 수 있다. 검출 방법은 특정 생물학적 과정, 생리학적 조건, 질환 또는 질환의 단계와 관련된 분석물의 확인 및 정량을 포함하는 매우 다양한 환경에서 이용될 수 있다. 따라서, 상기 시스템은 예를 들면, 약물 스크리닝, 질환 진단, 계통학적 분류, 부모 및 법의학적 확인, 질환 발병 및 재발, 치료에 대한 개체 반응 대 집단 기준, 및/또는 치료법의 모니터링에 있어서 광범위한 유용성을 갖는다. 본 디바이스 및 시스템은 치료제 개발의 임상전 및 임상 단계의 진행, 환자 순응도의 개선, 처방된 약물과 관련된 ADR의 모니터링, 개별맞춤 의학의 개발, 중앙 실험실로부터 집으로 혈액 시험의 외부위탁 또는 처방에 기초한 혈액 시험의 외부위탁, 및/또는 규제 승인 후 치료제의 모니터링에도 특히 유용하다. 본 디바이스 및 시스템은 중앙 실험실로부터 혈액 시험을 외부 위탁하는 지불인에 의해 이용될 수 있다. 상기 디바이스 및 시스템은 개별맞춤 의학에 대한 유연성 시스템을 제공할 수 있다. 동일한 시스템을 이용하여, 기재된 매우 다양한 어세이를 수행하기 위해 상기 시스템의 프로그래밍가능한 프로세서에 대한 프로토콜 또는 지시에 따라 디바이스를 변화시킬 수 있거나 교환할 수 있다. 본원에 기재된 시스템 및 디바이스는 훨씬 더 작고/작거나 휴대가능하지만 신규 특징을 구현하고 실험실 기기의 많은 기능을 제공한다.
- [0041] 한 양태에서, 본 발명의 시스템은 어세이 유닛; 및 시약, 예를 들면, 액체 및/또는 고체 상 시약 둘다를 포함하는 시약 유닛을 포함하는 디바이스를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 전체 디바이스의 하나 이상, 어세이 유닛, 시약 유닛 또는 이들의 조합물은 일회용이다. 본 발명의 시스템에서, 본 디바이스를 이용한 분석물의 검출은 전형적으로 자동화된다. 이러한 자동화는 내장된 프로토콜 또는 제작자에 의해 상기 시스템에 제공된 프로토콜에 의해 수행될 수 있다.
- [0042] 본원에 기재된 디바이스 및 시스템은 기존 POC 시스템 또는 통합된 분석 시스템에서 이용가능하지 않은 많은 특징을 제공할 수 있다. 예를 들면, 많은 POC 카트리지가 효율적인 방식으로 작은 부피의 액체를 처리하기 위해 폐쇄된 유체 시스템 또는 루프에 의존한다. 본원에 기재된 유체 디바이스, 예컨대, 카트리지는 주어진 카트리지 내의 유닛들 사이에 개방된 유체 이동을 가질 수 있다. 예를 들면, 시약은 유닛에 저장될 수 있고, 샘플은 샘플 수집 유닛에 저장될 수 있고, 희석제는 희석제 유닛에 저장될 수 있고, 포획 표면은 어세이 유닛에 저장될 수 있고, 이때 카트리지의 한 상태에서 유닛들 중 어떠한 유닛도 임의의 다른 유닛과 유체 통신 상태에 있지 않다. 시스템의 유체 전달 디바이스를 이용하여 몇몇 유닛들을 유체 통신 상태에 있게 하기 위해 상기 유닛들을 서로에 대해 상대적으로 이동시킬 수 있다. 예를 들면, 유체 전달 디바이스는 어세이 유닛과 맞물리고 어세이 유닛을 시약 유닛과 유체 통신 상태에 있게 하는 헤드를 포함할 수 있다. 몇몇 경우, 상기 헤드는 어세이 유닛(예를 들면, 팁)을 시약 유닛과 유체 통신 상태에 있게 하는 피펫 헤드이다.
- [0043] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은 체액 또는 조직 샘플 중의 분석물의 농도를 검출하고/하거나 측정하는 방법으로서, 전형적으로 하기 단계들을 포함하는 방법을 제공한다: 샘플(예를 들면, 혈액, 소변, 타액, 조직)을 본 발명의 디바이스 또는 시스템에 제공하는 단계, 상기 샘플이 상기 디바이스의 하나 이상의 어세이 유닛 내에서 반응하게 하는 단계, 및 혈액 샘플 중의 분석물로부터 발생된 검출가능한 신호를 검출하는 단계.

- [0044] 본 발명의 한 양태는 샘플 사용을 최대화하도록 구성된 현장진료 디바이스를 이용하여 샘플을 분석하는 것을 제공한다. 예를 들면, 약 $1\ \mu\text{l}$, $20\ \mu\text{l}$, $50\ \mu\text{l}$, $100\ \mu\text{l}$ 또는 $500\ \mu\text{l}$ 미만의 부피를 갖는 샘플에 대해 약 15개, 25개, 50개, 75개 또는 100개 초과 어세이를 수행할 수 있다. 샘플은 손가락 찌르기로부터 수득된 혈액 샘플일 수 있다. 샘플은 밀폐가능한 모세관 또는 팁 내에 수집될 수 있다. 샘플은 샘플을 분리(예를 들면, 원심분리) 및/또는 희석 과정으로 처리함으로써 하나 이상의 어세이를 위해 준비될 수 있다. 하나 이상의 어세이는 분리되고 희석될 수 있는 샘플을 반응 챔버 내에서 하나 이상의 시약과 조합함으로써 준비될 수 있다. 반응 챔버는 피펫 팁, 바이알, 샘플 전달 디바이스 및/또는 큐벳일 수 있다. 하나 이상의 어세이는 샘플 중의 하나 이상의 분석물의 농도를 표시하는 광학 신호가 측정될 수 있도록 구성될 수 있다. 반응 챔버는 공간적으로 분리될 수 있는 복수의 어세이들을 함유할 수 있다. 복수의 광학 신호들은 한 어세이, 또는 복수의 공간적으로 분리된 어세이들로부터 단일 반응 챔버 내에서 발생될 수 있다. 하나 이상의 광학 신호는 복수의 검출 스펙트럼 영역들 또는 검출 밴드들, 예를 들면, 적색, 녹색 및 청색을 측정할 수 있는 디지털 영상화 카메라에 의해 측정될 수 있다. 광학 신호는 피펫 팁 또는 다른 샘플 용기일 수 있는 반응 챔버 내의 어세이 반응 생성물에 대해 측정될 수 있다. 시스템, 디바이스 및 방법은 프로그래밍가능한 로직(logic)에 의해 전체적으로 자동화될 수 있거나 반자동화될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 양태는 분석용 샘플을 준비하는 시스템, 디바이스 및 방법을 제공한다. 샘플은 하나 이상의 분리 디바이스에 의해 분석용으로 준비될 수 있다. 예를 들면, 샘플은 원심분리기 내에서의 원심분리에 의해 분석용으로 준비될 수 있다. 전하, 크기, 소수성/친수성 및/또는 휘발성에 기초한 다른 분리도 실시될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 한 양태는 영상-기초 분석을 이용하는 샘플 및 반응 생성물 분석을 제공한다. 시스템은 하나 이상의 검출 스펙트럼 영역을 이용하여 광학 신호를 측정할 수 있는 카메라를 포함할 수 있다. 예를 들면, 카메라는 적색, 녹색 및 청색 검출 스펙트럼 영역을 이용하여 광학 신호를 측정할 수 있다. 측정된 신호는 본원에 기재된 하나 이상의 알고리즘을 이용하여 해석할 수 있는 3개의 측정된 값을 포함할 수 있다. 하나 초과 검출 스펙트럼 영역의 이용은 어세이의 동적 범위를 증가시킬 수 있고 단일 검출 스펙트럼 영역을 이용하는 측정에 비해 측정의 정확도를 증가시킬 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명은 반응 챔버(각각 복수의 상이한 경로 길이를 가짐) 내에 함유된 샘플 및 어세이 반응 생성물에 대한 광학 측정을 수행하는 시스템, 디바이스 및 방법을 제공한다. 반응 챔버는 보다 더 높거나 보다 더 낮은 양의 광 흡광도가 관찰되도록 복수의 상이한 경로 길이를 가질 수 있다. (예컨대, 샘플 및/또는 반응 챔버를 관통하는) 복수의 상이한 경로 길이는 선택된 어세이 프로토콜의 동적 범위의 증가를 허용한다. 반응 챔버의 영상을 본원에 기재된 바와 같이 분석하여 샘플 또는 어세이 반응 생성물에 대한 정보를 수득할 수 있다. 단일 반응 챔버 내의 복수의 이용가능한 경로 길이의 이용과 3개의 채널 검출 스펙트럼 영역의 이용의 조합은 주어진 어세이의 동적 범위를 크게 향상시킨다.
- [0048] 샘플 준비 및 분석을 수행하는 시스템은 기기, 일회용 구성요소 및 시약을 포함할 수 있다. 상기 시스템은 샘플을 수용할 수 있고 사용자 개입 없이 복수의 어세이들을 자동적으로 수행한다. 원하는 경우, 기기는 그래픽 사용자 인터페이스, 일회용일 수 있는 카트리지를 도입하기 위한 기작, 3차원에서 이동성을 가질 수 있는 모터 장착된 재물대, 하나 이상의 단일 헤드 액체 취급 디바이스, 하나 이상의 다중 헤드 액체 취급 디바이스, 샘플 준비를 수행하기 위한 하나 이상의 디바이스, PMT 및/또는 영상화 디바이스를 포함할 수 있는 광학 센서, 온도 조절기 및 통신 디바이스를 포함할 수 있다. 일회용 구성요소는 샘플 팁, 팁 밀폐부 및 시약을 함유하는 일회용 카트리지를 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 일회용 카트리는 액체 어세이 생성물을 흡수하고 중화시키도록 구성된 중화 조립체도 함유할 수 있다.
- [0049] 기기, 일회용 구성요소 및 시약은 폐쇄가능한 환경, 예컨대, 케이스 또는 캐비닛 내에 수용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 케이스는 약 $4\ \text{m}^2$, $2\ \text{m}^2$, $1\ \text{m}^2$, $0.5\ \text{m}^2$, $0.1\ \text{m}^2$ 또는 $0.05\ \text{m}^2$ 미만의 횡단면적을 갖는다. 본 발명은 하기 양태들 중 하나 이상의 양태를 포함할 수 있는 분산된 시험 시스템, 예컨대, 현장진료 디바이스를 제공한다:
- [0050] 1. 혈액의 효율적인(원심분리) 분리 및 분리된 혈장의 회수;
- [0051] 2. 각각의 어세이가 최적 희석에서 수행될 수 있도록 현장 샘플을 하나 이상의 수준(예를 들면, 1:10, 1:100, 1:1000)까지 희석;
- [0052] 3. 여러 상이한 방법들을 수반할 수 있는 여러 상이한 어세이들에의 샘플의 최적화된 분산;
- [0053] 4. 최적 어세이 프로토콜;

- [0054] 5. 샘플 분석, 시약과의 혼합, 항온처리 및 광학 시스템에의 제시를 위한 개방 단부 원형 단면 큐벳의 이용; 및
- [0055] 6. 영상화 기술을 이용하는 어세이(스캐닝 및/또는 사진촬영, 및/또는 현미경관찰)의 분석.
- [0056] 한 실시양태에서, 본 발명의 디바이스는 자가 함유되고 복수의 어세이들을 동시에 수행하기 위해 필요한 모든 시약(액체 상 시약 및 고체 상 시약)을 포함한다. 원하는 경우, 상기 디바이스는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 100개, 200개, 500개 또는 1000개 이상의 어세이를 수행하도록 구성된다. 원하는 경우, 하나 이상의 대조군 어세이도 동시에 수행되도록 디바이스 내로 도입될 수 있다. 어세이 시스템 교정을 위해 보정제도 제공될 수 있다. 어세이 시스템 보정에 유용한 건조된 대조군 및 교정제의 몇몇 예로는 공지된 수준의 분석물을 갖는 분석물 수용액, 혈청 또는 혈장 샘플이 있을 수 있고, 공지된 양의 이러한 교정제 및 대조군은 동결건조, 진공건조 및 다른 제작 과정에 의해 건조될 수도 있다(그리고, 어세이 동안 용해될 수도 있다).
- [0057] 이들 성분들을 현장진료 시스템 내에 도입함으로써, 환자 또는 사용자는 약 0.5분, 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 10분, 20분, 30분, 60분, 120분, 180분, 240분, 480분 또는 600분 미만의 시간 이내에 정량되는 복수의 분석물들, 예를 들면, 약 10개, 20개, 30개, 50개, 75개, 100개, 150개 또는 200개 초과 분석물을 가질 수 있다.
- [0058] 본 디바이스 및 시스템은 짧은 시간 이내에 완결될 수 있는 정량 면역어세이를 수행하는 데에 이용될 수 있다. 핵산 서열의 측정 및 대사물질, 예컨대, 콜레스테롤 또는 전해질, 예컨대, 마그네슘 및 염화물 이온의 측정을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다른 종류의 어세이도 본 발명의 디바이스의 이용에 의해 수행될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 어세이는 1시간 이내, 바람직하게는 120분, 60분, 30분, 15분, 10분, 5분, 4분, 3분, 2분 또는 1분 미만의 시간 이내에 완료된다. 다른 실시양태에서, 어세이는 5분 미만의 시간 이내에 수행된다. 어세이 검출의 지속시간은 본 발명의 디바이스의 이용에 의해 수행될 어세이의 종류에 따라 조절될 수 있다. 예를 들면, 보다 더 높은 민감도가 필요한 경우, 어세이는 1시간 초과 시간 동안 또는 1일 초과 시간까지 항온처리될 수 있다. 몇몇 예에서, 긴 지속시간을 필요로 하는 어세이는 임상 POC 셋팅 이외의 다른 POC 응용, 예컨대, 집에서 사용에 있어서 더 실용적일 수 있다.
- [0059] 본 발명의 다른 실시양태에서, 본 디바이스의 시약 유닛은 혼합-및-일치 구성요소의 세트가 되도록 구성된다. 시약 유닛은 전형적으로 주어진 분석물을 검출하는 어세이를 수행하는 데에 필요한 액체 또는 고체 시약을 저장한다. 어세이 유닛은 종종(또는 임의적으로 항상은 아님) 체액 샘플로부터의 분석물과 반응할 수 있는 하나 이상의 포획 표면을 포함할 수 있다. 어세이 유닛은 팁 내부의 포획 표면을 갖는 관형 팁일 수 있다. 본 발명의 팁의 예는 본원에 기재되어 있다. 각각의 개별 어세이 및 시약 유닛은 어세이가 독립적으로 작용하도록 구성될 수 있다. 디바이스를 조립하기 위해, 유닛은 카트리지의 포맷을 취할 수 있는 통합된 디바이스에서 사용될 적기 공급 생산(just-in-time) 방식으로 조립될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 디바이스를 위한 하우징은 중합체성 물질, 금속성 물질 또는 합성 물질, 예컨대, 알루미늄, 폴리스티렌 또는 다른 성형가능하거나 기계가공가능한 플라스틱으로 만들어질 수 있고, 어세이 유닛 및 시약 유닛을 배치하기 위한 한정된 장소를 가질 수 있다. 상기 하우징은 금속 또는 임의의 다른 물질을 포함할 수 있다. 상기 하우징은 어세이 유닛 및/또는 시약 유닛을 부분적으로 또는 전체적으로 둘러쌀 수 있다. 상기 하우징은 어세이 유닛 및/또는 시약 유닛의 중량을 지지할 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 하우징은 과량의 액체를 제거하기 위해 팁 또는 어세이 유닛을 블롯팅하기 위한 수단을 갖는다. 블롯팅하기 위한 수단은 다공성 막, 예컨대, 셀룰로스 아세테이트, 또는 조각 흡수성 물질, 예컨대, 필터지일 수 있다.
- [0061] 몇몇 실시양태에서, 상기 디바이스의 구성요소들 중 하나 이상의 구성요소는 중합체성 물질로 구축될 수 있다. 중합체성 물질의 비한정적 예로는 폴리스티렌, 폴리카보네이트, 폴리프로필렌, 폴리디메틸실록산(PDMS), 폴리우레탄, 폴리비닐클로라이드(PVC), 폴리설폰, 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA), 아크릴로니트릴-부타디엔-스티렌(ABS) 및 유리가 있다.
- [0062] 상기 디바이스 또는 상기 디바이스의 하위구성요소는 스탬핑, 사출 성형, 엠보싱, 주조, 취입 성형, 기계가공, 용접, 초음파 용접 및 열 결합을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 방법에 의해 제작될 수 있다. 한 실시양태에서, 디바이스는 사출 성형, 열 결합 및 초음파 용접에 의해 제작된다. 상기 디바이스의 하위구성요소는 열 결합, 초음파 용접, 마찰 피팅(압착 피팅), 접착제, 또는 일부 기관, 예를 들면, 유리 또는 반강성 및 비강성 중합체 기관의 경우 2개의 구성요소들 사이의 천연 접착에 의해 서로 부착될 수 있다.
- [0063] 기재된 시스템은 체액 샘플로부터 검출되는 분석물과 관계없이 다양한 어세이들을 실시할 수 있다. 디바이스의 본질에 의존하는 프로토콜은 이것이 저장될 수 있는 외부 디바이스로부터 판독기 조립체로 전달되어 판독기 조

립체가 디바이스 상에서 구체적인 프로토콜을 수행하게 할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 디바이스는 본원에 기재된 식별자 검출기에 의해 검출되거나 판독되는 식별자(ID)를 갖는다. 상기 식별자는 디바이스와 센서 또는 수용 시스템 사이의 쌍방향 통신을 가능하게 할 수 있다. 식별자 검출기는 식별자를 외부 디바이스에게 전달하는 조절기를 통해 통신 조절체와 통신할 수 있다. 원하는 경우, 외부 디바이스는 외부 디바이스 상에 저장된 프로토콜을 식별자에 기초하여 통신 조절체에게 보낸다. 시스템 상에서 실시될 프로토콜은 실시될 구체적인 어세이 및 수행될 검출 방법을 포함하나 이들로 한정되지 않는, 프로토콜을 수행하기 위한 시스템의 조절기에 대한 설명서를 포함할 수 있다. 일단 어세이가 시스템에 의해 수행되는 경우, 체액 샘플 중의 분석물을 표시하는 신호가 발생되고 시스템의 검출 조절체에 의해 검출된다. 그 다음, 검출된 신호는 통신 조절체에게 통신될 수 있고, 여기서 상기 신호는 샘플 중의 분석물 농도의 계산을 포함하나 이것으로 한정되지 않는 프로세싱을 위해 외부 디바이스로 전달될 수 있다.

[0064] 반응 챔버로서 작용할 수 있는 현장진료 디바이스 및 팁을 이용하는 샘플 분석을 수행하는 시스템, 디바이스 및 방법은 미국 특허 공개 제2009/0088336호 및 미국 가출원 제60/997,460호(이들 각각은 모든 목적을 위해 전체적으로 본원에 참고로 도입됨)에 기재되어 있다.

[0065] 샘플 취급 및 반응 챔버

[0066] 본원에 기재된 샘플, 시약 및 조립된 어세이는 다양한 종류의 반응 챔버에 의해 취급될 수 있고 함유될 수 있다. 샘플 취급 디바이스 및 반응 챔버는 웰, 튜브, 또는 개방 단부 팁(큐벳일 수도 있음)일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 팁은 샘플 팁, 큐벳 팁, 반응 챔버, 큐벳, 모세관, 샘플 취급 디바이스 또는 샘플 전달 디바이스로서도 지칭될 수 있다. 샘플은 공급원으로부터 팁 또는 튜브 내로 수집될 수 있다. 팁은 밀폐될 수 있다. 이러한 밀폐는 영구적 또는 가역적일 수 있다. 회석된 샘플은 하나 이상의 시약과 조합될 수 있고 "어세이 요소", 예컨대, 팁(개방 단부 큐벳) 또는 개방된 또는 피복된 웰 내에서 (선행 출원에 기재된 바와 같이) 혼합될 수 있다. 일단 어세이가 판독될 준비가 되면, 어세이 요소는 영상 분석 또는 다른 종류의 판독을 위해 광학 시스템에 제시될 수 있다. 대안적으로, 어세이 반응 혼합물은 한 종류의 요소로부터 또 다른 종류의 요소로 전달될 수 있다. 예를 들면, 팁 내에서 항온처리된 어세이는 흡수성 또는 흡수하는 매질 상으로 블롯팅될 수 있거나, 웰 내에서 항온처리된 어세이는 팁 내로 흡입될 수 있다. 많은 어세이들이 동시에 프로세싱될 수 있다. 어세이 판독은 어세이 프로토콜 및/또는 항온처리 시간에 따라 연속적 또는 동시적일 수 있다. 변화율의 측정을 수반하는 어세이의 경우, 어세이 요소는 상이한 시간에서 1회 초과 횟수로 광학 시스템에 제시될 수 있다.

[0067] 유체 및 물질 전달 디바이스

[0068] 유체 전달 디바이스는 시스템의 부분일 수 있다. 유체 전달 디바이스는 복수의 헤드들을 포함할 수 있다. 샘플 중의 복수의 분석물들을 검출하는 것이 필요할 때 임의의 수의 헤드가 본 발명의 유체 전달 디바이스에 대해 예상된다. 일례에서, 유체 전달 디바이스는 일렬로 탑재되어 있고 일정한 거리에 의해 분리되어 있는 약 8개의 헤드를 갖는다. 한 실시양태에서, 헤드는 압착 피팅에 의해 다양한 팁, 예컨대, 본원에 기재된 바와 같은 어세이 유닛 또는 샘플 수집 유닛과 맞물리는 테이퍼형(tapered) 노즐을 갖는다. 팁은 이 팁이 기기에 의해 자동적으로 제거되게 하고 사용 후 기재된 바와 같은 디바이스의 하우징 내로 배치되게 하는 특징부를 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 어세이 팁은 깨끗하고 투명하며 광학 검출기, 예컨대, 광전자증배관 또는 카메라 센서에 의해 검출될 수 있는 어세이가 실시되는 큐벳과 유사할 수 있다.

[0069] 일례에서, 시스템의 프로그래밍가능한 프로세서(예를 들면, 중앙 프로세싱 유닛, CPU)는 (예컨대, 기억 장소로부터) 지시 또는 명령을 포함할 수 있거나 상기 지시 또는 명령을 수용하도록 구성될 수 있고, 피스톤을 폐쇄된 공기 공간 내로 잡아당기거나(액체를 추출하기 위함) 확장시킴으로써(액체를 배출하기 위함) 액체 샘플을 전달하기 위해 지시에 따라 유체 전달 디바이스를 작동시킬 수 있다. 상기 프로세서는 흡입 및/또는 분배를 용이하게 하도록 구성될 수 있다. 이동된 공기의 부피 및 이동 속도 둘다가 예를 들면, 상기 프로그래밍가능한 프로세서에 의해 정밀하게 조절될 수 있다.

[0070] 샘플(또는 시약)과 회석제(또는 다른 시약)의 혼합은 공통된 튜브 내로 혼합되도록 성분들을 흡입한 후 상당한 분율의 조합된 액체 부피를 팁 내로 상하로 반복적으로 흡입함으로써 달성될 수 있다. 튜브 내로의 건조된 시약의 용해는 유사한 방식으로 수행될 수 있다. 액체 샘플 및 시약을 포획 시약(예를 들면, 항체)에 의해 결합되는 포획 표면과 함께 항온처리하는 것은 적절한 액체를 팁 내로 추출하고 이를 상기 팁 내에서 예정된 시간 동안 보유함으로써 달성될 수 있다. 샘플 및 시약의 제거는 액체를 기재된 바와 같은 디바이스 내의 저장기 또는 흡수 패드 내로 배출함으로써 달성될 수 있다. 그 후, 또 다른 시약을 프로그래밍가능한 프로세서로부터의 지시 또는 프로토콜에 따라 팁 내로 추출될 수 있다.

- [0071] 시스템은 어세이 유닛 또는 팁을 이동시키기 위한 홀더 또는 맞물림 수단(engager)을 포함할 수 있다. 맞물림 수단은 진공 조립체, 또는 어세이 유닛 팁의 양각(boss) 내로 편안하게 피팅(fit)되도록 디자인된 조립체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 팁을 이동시키기 위한 수단은 유체 전달 디바이스 헤드와 유사한 방식으로 이동될 수 있다. 디바이스는 맞물림 수단 또는 홀더의 위치에 따라 재물대 상에서 이동될 수도 있다.
- [0072] 한 실시양태에서, 팁을 이동시키기 위한 기기는 일정 부피의 샘플을 이동시키기 위한 기기, 예컨대, 본원에 기재된 바와 같은 유체 전달 디바이스와 동일하다. 예를 들면, 샘플 수집 팁은 수집 팁 상의 양각에 따라 피켓 헤드 상에 피팅될 수 있다. 그 후, 수집 팁은 액체를 디바이스 및 시스템 전체에 분포시키는 데에 사용될 수 있다. 액체가 분포된 후, 수집 팁은 폐기될 수 있고, 피켓 헤드는 어세이 유닛 상의 양각에 따라 어세이 유닛 상에 피팅될 수 있다. 그 후, 어세이 유닛 팁은 시약 유닛으로부터 시약 유닛으로 이동될 수 있고, 시약은 피켓 헤드에 의해 제공된 흡입 작용 또는 피켓형 작용에 따라 어세이 유닛에 분포될 수 있다. 피켓 헤드는 흡입 또는 주사기 유형의 작용으로 수집 팁, 어세이 유닛 또는 시약 유닛 내에서 혼합을 수행할 수도 있다.
- [0073] 또 다른 실시양태에서, 어세이 반응 혼합물을 포함하는 액체를 함유하는 팁은 피켓팅 디바이스로부터 분리될 수 있고 기기 또는 일회용 유닛 내의 특정 위치에서 "머물러" 있을 수 있다. 필요한 경우, 팁은 액체의 배출을 방지하기 위해 (원심분리기에서 사용된 바와 같이) 밀폐부의 이용에 의해 캡핑될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 밀폐부는 비닐 밀폐부일 수 있다.
- [0074] 예시적 샘플 팁
- [0075] 다양한 용기 형태가 샘플 팁, 반응 챔버 및 큐벳으로서 이용될 수 있다. 예를 들면, 큐벳은 원형, 원통형, 정사각형, 직사각형, 입방체형, 원추형, 피라미드형, 또는 유체 샘플을 보유할 수 있는 임의의 다른 형태일 수 있다. 광선이 도 63의 평면도 및 단면도에 나타난 바와 같이 큐벳 표면에 대해 직각으로 충돌하는 직사각형 큐벳이 사용될 수 있다. 이러한 직사각형 큐벳에서, 조명되는 액체 샘플도 직사각형이고 큐벳에 의해 한정된다. 원형 횡단면을 갖는 큐벳도 사용될 수 있다. 예를 들면, 몇몇 종류의 마이크로타이터 플레이트에서 조명된 샘플 부피는 도 64의 평면도 및 단면도에 나타난 바와 같이 샘플 메니스커스에 의해 부분적으로 한정된다.
- [0076] 가변 경로 길이 큐벳을 사용하여 어세이 반응을 최적화하고 연장하고 어세이를 측정하는 데에 필요한 샘플 부피를 최소화할 수 있다. 큐벳은 하나 이상의 영역에서 그들의 횡단면에 비하여 더 길 수 있다. 몇몇 경우, 큐벳의 경로 길이는 큐벳의 기하학적 형태 및/또는 재료에 기초하여 선택될 수 있다. 상이한 큐벳들이 상이한 어세이들을 위해 선택될 수 있다.
- [0077] 본 발명에서, 어세이 큐벳의 한 바람직한 버전은 도 65에 나타난 바와 같이 광선의 방향으로 원형 횡단면을 갖는다. 원형 횡단면을 갖는 큐벳의 사용은 하기 장점들을 포함하나 이들로 한정되지 않는 여러 장점들을 갖는다:
- [0078] 1. 광학 경로 길이가 정밀하게 한정될 수 있다. 사출 성형된 부분의 치수 정밀도는 1% 내지 2% CV보다 더 우수한 것으로 밝혀졌다. 통상적인 마이크로타이터 플레이트에서 비구속된 액체 메니스커스는 경로 길이에 비정밀도를 도입할 수 있다.
- [0079] 2. 팁의 개방 단부 특성 및 원형 단면은 액체가 매우 정밀하게 흡입되게 하는 뛰어난 유체 취급 특성을 부여한다.
- [0080] 3. 팁의 광학 영상은 팁 위치 및 액체 컬럼의 경계를 확인하고 신호가 최대인 팁의 중심을 매우 정밀하게 위치시키는 능력을 제공한다.
- [0081] 4. 1개 초과액의 액체 샘플이 동일한 팁에서 항온처리될 수 있고 분석될 수 있다. 이것은 팁의 좁은 부분에서 매우 적은 물질 전달이 액체의 인접하는 "슬러그들(slugs)" 사이에서 (측 방향으로) 일어나기 때문이다.
- [0082] 예시적 팁은 하기 일반적인 특성을 가질 수 있다:
- [0083] 팁 길이: 0.5 cm 내지 4 cm
- [0084] 팁 OD: 0.2 cm 내지 1.0 cm
- [0085] 팁 ID: 0.1 cm 내지 0.5 cm
- [0086] 액체에 대한 팁 성능: 5 μ l 내지 50 μ l
- [0087] 팁 치수 정밀도: 일반적으로 2% 또는 +/- 0.001 cm보다 더 우수하다.

- [0088] 팁 입체구조(configuration): 팁은 일반적으로 유체 기밀 밀폐부를 형성하도록 (원통형) 피켓과 맞물리는 특징부를 가질 것이다. 영상화에 이용되는 일반적으로 원통형 또는 원추형의 영역이 존재한다. 일반적으로, 팁의 광학 부분은 상이한 경로 길이를 갖는 2개 이상의 상이한 구획을 가질 것이다. 팁의 하단부는 중력 하에서 수직 액체 컬럼의 보유를 돕도록 전형적으로 좁을 것이다.
- [0089] 팁 재료: 투명한 플라스틱 또는 균일 반사(specular) 플라스틱(폴리스티렌, 폴리프로필렌 등)(80% 초과)의 가시광의 투과)
- [0090] 영상화 목적을 위해, 팁은 일반적으로 투명할 수 있거나 반투명할 수 있지만, 팁은 3색 분석이 이용될 때 어셈블이 큐벳으로서 잘 작용하기 위해 투명할 필요는 없다. "탁하게" 보이는 팁 큐벳은 투명한 팁과 유사하게 작용할 수 있다. 탁한 팁은 비연마된 또는 결이 있는 표면을 갖는 사출 성형물로 만들어지거나 몇몇 광 산란 물질을 팁의 제작에 사용되는 플라스틱에 첨가함으로써 만들어진다. 이러한 탁한 팁의 광 산란 강도는 착색된 액체가 측정되는 것을 방해할 정도로 크지 않도록 선택될 수 있다. 일반적으로, 투과된 광에 대한 광 산란의 영향은 착색된 물질의 영향에 비해 상대적으로 10%, 20% 또는 30% 미만인 되도록 선택될 수 있다. 광 산란 효과는 탁한 팁의 광 산란이 균일하도록 선택될 수 있다.
- [0091] 본원에 기재된 팁 및 반응 챔버는 길이가 약 2 cm 이고 약 10 μl 내지 50 μl 의 성능에 상응하는 약 1 mm 내지 5 mm의 내경을 갖는 원통형(또는 원추형) 샤프트(shaft)로 구성될 수 있다.
- [0092] 일례에서, 원통에 유체적으로 연결되어 있고 피켓터의 테이퍼형 특징부와 맞물릴 수 있도록 구성된 절두된 원통형 "양각"이 원통의 상단부에 존재한다. 팁의 하단부는 수직으로 배향되고 피켓터에 부착되지 않을 때 팁이 그의 액체 내용물을 보유하게 하는 특징부를 제공하도록 좁아질 수 있다. 팁은 뾰족한 팁일 수 있다. 팁의 하단부의 외부 형태도 전형적으로 팁 단부가 압착 피팅되는 유연성 (비닐) 캡에 의해 유체적으로 밀폐될 수 있도록 원통형 샤프트의 주요 부분으로부터 단부를 향하여 감소되는 직경을 가지면서 다소 뾰족하다. 팁은 통상적으로 성형된 플라스틱(폴리스티렌, 폴리프로필렌 등)으로 만들어진다. 팁은 샘플에 대한 정보가 영상화에 의해 획득될 수 있도록 투명할 수 있거나 반투명할 수 있다.
- [0093] 도 4, 도 5 및 도 6은 팁의 일례를 보여준다. 팁은 (1) 피켓 헤드와 함께 공기 기밀 밀폐부를 형성하도록 맞물릴 수 있는 상부 특징부, 및 (2) 기본적으로 원통형(실제로 매우 작은 구배각을 갖는 원추형) 샤프트 및 좁고 뾰족한 하부 팁을 갖도록 구성된다. 이 팁은 캡과 함께 액체 기밀 밀폐부를 형성할 수 있다. 뾰족한 형태는 적절할 힘 하에서 캡에 대한 우수한 순응성을 수득하는 데에 있어서 도움을 준다. 사용된 물질은 사출 성형된 폴리스티렌이다. 전체 치수는 다음과 같다: 32 mm의 길이, 약 7.6 mm의 가장 큰 외경, 약 20 μl 의 유용한 성능. 팁의 치수는 보다 더 큰 부피까지 규모 확장될 수 있다. 예를 들면, 50 μl 샘플의 경우, ID는 약 1.6배까지 증가될 수 있다.
- [0094] 밀폐는 z 방향으로의 기기 재물대의 이동에 의해 발생된 힘을 이용하여 샘플 함유 수단의 좁은 단부에 용이하게 압착 피팅되는, 비닐 또는 다른 물질로 만들어진 캡의 이용을 통해 달성될 수 있다. 기포는 팁이 캡핑될 때 팁 내부에 포획될 수 있다. 원심분리 단계를 이용하여 기포를 혈액의 컬럼의 상부로 이동시켜 기포의 효과를 제거할 수 있다. 팁의 치수 및/또는 원심분리기 내의 팁 홀더의 치수는 팁이 원심분리를 위해 고착될 수 있도록 일치될 수 있다.
- [0095] **샘플 준비**
- [0096] 본 발명은 다양한 공급원으로부터 수집될 수 있는 샘플을 프로세싱하고 분석하는 시스템, 방법 및 디바이스를 제공한다. 예를 들면, 샘플은 환자, 동물 또는 환경으로부터 수집될 수 있다. 샘플은 체액일 수 있다. 관심 있는 분석물을 함유하는 것으로 의심되는 임의의 체액이 본 발명의 시스템 또는 디바이스와 함께 이용될 수 있다. 통상적으로 사용되는 체액은 혈액, 혈청, 타액, 소변, 위액 및 소화액, 눈물, 대변, 정액, 질액, 종양 조직으로부터 유래된 간질액, 및 뇌척수액을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0097] 몇몇 실시양태에서, 체액은 인간 환자로부터의 혈액 샘플이다. 혈액 공급원은 손가락 찌르기로부터 수집될 수 있고 약 0.5 μl , 1 μl , 5 μl , 10 μl , 20 μl , 50 μl , 100 μl , 200 μl , 300 μl , 400 μl , 500 μl 또는 1000 μl 미만의 부피를 가질 수 있다.
- [0098] 체액은 환자로부터 추출될 수 있고 랜싱(lancing), 주입 또는 피켓팅을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 방식으로 디바이스에 제공될 수 있다.
- [0099] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체" 및 "환자"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고 척추동물, 바람직하

게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간을 지칭한다. 포유동물은 무린, 원숭이, 인간, 농장 동물, 스포츠 동물 및 애완동물을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0100] 한 실시양태에서, 란셋(lancet)이 피부를 천공하고 예를 들면, 중력, 모세관 작용, 흡입 또는 진공 힘을 이용하여 샘플을 뽑아낸다. 란셋은 디바이스의 부분, 또는 시스템 또는 독립형 구성요소의 부분일 수 있다. 필요한 경우, 란셋은 다양한 기계적, 전기적, 전기기계적 또는 임의의 다른 공지된 활성화 기작, 또는 이러한 방법들의 임의의 병용에 의해 활성화될 수 있다. 활성화 기작이 필요하지 않은 또 다른 실시양태에서, 예를 들면, 타액 샘플을 사용하는 경우 일어날 수 있는 바와 같이, 환자는 체액을 디바이스에 단순히 제공할 수 있다. 수집된 유체는 디바이스 내부의 샘플 수집 유닛 내에 놓일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 디바이스는 피부를 천공하는 하나 이상의 마이크로바늘을 포함한다.

[0101] 디바이스와 함께 사용될 체액의 부피는 약 $500\ \mu\text{l}$ 미만, 전형적으로 약 $1\ \mu\text{l}$ 내지 $100\ \mu\text{l}$ 일 수 있다. 원하는 경우, $1\ \mu\text{l}$ 내지 $50\ \mu\text{l}$, $1\ \mu\text{l}$ 내지 $40\ \mu\text{l}$, $1\ \mu\text{l}$ 내지 $30\ \mu\text{l}$, $1\ \mu\text{l}$ 내지 $10\ \mu\text{l}$ 또는 심지어 $1\ \mu\text{l}$ 내지 $3\ \mu\text{l}$ 의 샘플이 디바이스를 이용하여 분석물을 검출하는 데에 이용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 디바이스 또는 시스템을 이용하여 분석물을 검출하는 데에 이용되는 체액의 부피는 한 방울의 유체이다. 예를 들면, 찔러진 손가락으로부터 수득된 한 방울의 혈액은 본원에 기재된 디바이스, 시스템 또는 방법에 의해 분석될 체액 샘플을 제공할 수 있다.

[0102] 체액 샘플은 대상체로부터 본원에 기재된 팁 내로 직접적으로 수집될 수 있거나 팁으로 추후에 전달될 수 있다.

[0103] *샘플 희석*

[0104] 몇몇 경우, 유체 전달을 지시하는 프로세서의 입체구조는 검출되는 복수의 분석물들을 표시하는 신호가 검출가능한 범위 내에 있게 하여 상기 복수의 분석물들이 상기 시스템에 의해 검출될 수 있도록 어세이 유닛의 어레이에서 체액 샘플의 희석 정도에 영향을 미친다. 일례에서, 체액 샘플은 1배, 2배, 5배, 10배, 15배, 50배, 100배, 500배, 1000배, 10,000배, 10^5 배, 10^6 배, 10^7 배, 10^8 배, 10^9 배 또는 10^{10} 배 이상까지 상이한 농도로 존재하는 2개 이상의 분석물을 포함한다. 일례에서, 체액 샘플은 한 방울의 혈액이다. 한 실시양태에서, 샘플에 존재하는 2개 이상의 분석물의 농도는 10 자릿수까지 상이하(예를 들면, 제1 분석물은 $0.1\ \text{pg/ml}$ 로 존재하고, 제2 분석물은 $500\ \mu\text{g/ml}$ 로 존재한다). 또 다른 예에서, 몇몇 단백질 분석물들은 관심 있는 범위를 약 12 자릿수까지 확장할 수 있는, $100\ \text{mg/ml}$ 보다 더 큰 농도로 발견된다. 기하학적 증폭 방법, 예컨대, 중합효소 반응을 이용하여 핵산 분석물, 예컨대, DNA 및 RNA를 측정하는 경우, 분석물의 카피 수는 측정 전의 십억배까지 증가할 수 있다.

[0105] 원하는 경우, 체액 샘플의 희석 정도는 2개 이상의 분석물을 표시하는 신호가 검출가능한 범위 내에 있게 할 수 있다.

[0106] 기재된 바와 같이, 본원의 시스템 및 디바이스는 POC 환경에서 실험실 셋팅의 유연성의 많은 특징을 가능하게 할 수 있다. 예를 들면, 샘플은 테이블 상면 크기 또는 보다 더 작은 디바이스 또는 시스템에서 자동적으로 수집되고 조작될 수 있다. POC 디바이스의 공통된 과정은 복수의 어세이들을 수행할 때 상이한 희석 범위를 달성하는 것이고, 이때 상기 어세이는 상당히 상이한 민감도 또는 특이성을 가질 수 있다. 예를 들면, 샘플에 2개의 분석물이 존재할 수 있지만, 1개의 분석물은 샘플에서 높은 농도를 갖고, 다른 분석물은 매우 낮은 농도를 갖는다. 제공된 바와 같이, 본원의 시스템 및 디바이스는 두 분석물을 검출하기 위해 샘플을 상당히 상이한 수준까지 희석할 수 있다. 대안적으로, 한 샘플은 2개 이상의 샘플로 분할될 수 있고, 이것은 개별 분석물이 다양한 희석 수준에서 검출되게 할 수 있다.

[0107] 예를 들면, 분석물이 높은 농도로 존재하는 경우, 샘플은 적절한 검출 범위까지 연속적으로 희석될 수 있고 검출을 위해 포획 표면에 제공될 수 있다. 동일한 시스템 또는 디바이스에서, 낮은 농도로 분석물을 갖는 샘플은 희석될 필요가 없을 수 있다. 이 방식으로, 본원에서 제공된 POC 디바이스 및 시스템의 어세이 범위를 대다수의 현재 POC 디바이스들로부터 확장할 수 있다.

[0108] 희석제를 함유하는 일회용 카트리지를 이용하는 POC 어세이 시스템에서, 희석 정도에 대한 실제적인 한계가 종종 존재한다. 예를 들면, 핑거스틱에 의해 수득된 적은(예를 들면, 약 $20\ \mu\text{l}$) 혈액 샘플이 희석되어야 하고 튜브 내에 놓일 수 있는 희석제의 최대 부피가 $250\ \mu\text{l}$ 인 경우, 전체 샘플의 희석의 실제적인 한계는 약 10배이다. 본원의 일례에서, 시스템은 보다 더 작은 부피(예를 들면, 약 $2\ \mu\text{l}$)의 샘플을 흡입하여 최대 희석률을 약 100배로 만들 수 있다. 많은 어세이들의 경우, 이러한 희석률은 허용가능하지만, (본원의 실시예에 기재된 바와 같이) CRP의 어세이와 같은 어세이의 경우 샘플을 보다 더 많이 희석할 필요성이 존재한다. 분리-기초 ELISA 어

세이는 분석물(예를 들면, 전형적인 단백질 분석물의 경우 약 수백 ng/ml)에 결합하는 포획 표면의 성능에서 내재적 한계를 가질 수 있다. 몇몇 분석물들은 수백 $\mu\text{g/ml}$ 의 수준으로 혈액에 존재한다. 심지어 100배까지 희석될 때, 분석물 농도는 교정 범위를 벗어날 수 있다. 본원의 시스템, 디바이스 및 유체 전달 디바이스의 예시적 실시양태에서, 다회 희석은 개별 어세이 유닛 또는 샘플 수집 유닛 내로의 희석제의 다회 유체 전달을 수행함으로써 달성될 수 있다. 예를 들면, 분석물의 농도가 전술된 바와 같이 샘플에서 매우 높은 경우, 샘플은 분석물의 농도가 허용가능한 검출 범위 내에 있을 때까지 다회 희석될 수 있다. 본원의 시스템 및 방법은 분석물의 원래의 농도를 계산하기 위해 희석물의 정확한 측정 또는 평가를 제공할 수 있다.

[0109] 샘플 분리

[0110] 본 발명의 몇몇 실시양태에서, 샘플은 초기 분리 단계에 의해 분석용으로 준비될 수 있다. 예를 들면, 어세이가 DNA의 분석인 경우, DNA 분리 단계를 이용하여 오염물질 또는 원치 않는 공급원 물질을 제거할 수 있거나 감소시킬 수 있다. 분리 단계는 크로마토그래피, 원심분리, 액체-액체 추출, 고체-액체 추출, 친화성 결합, 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 기작을 이용할 수 있다.

[0111] 몇몇 실시양태에서, 분석될 혈액 샘플은 혈장 성분을 혈액 샘플로부터 분리함으로써 먼저 프로세싱된다. 이 단계는 다양한 기법, 예컨대, 여과, 원심분리 및 친화성 결합의 이용을 통해 수행될 수 있다. 원심분리는 혈액 샘플 성분의 분리를 위한 효율적인 방법일 수 있고 본 발명에서 이용될 수 있다.

[0112] 혈장 분리

[0113] 혈액은 다양한 방식으로 폐쇄 단부 팁 또는 밀폐가능한 팁 내로 도입될 수 있고, 예를 들면, 샘플은 튜브 내에 제공될 수 있고 밀폐가능한 팁은 모세관 작용 또는 공압력을 통해 상기 튜브로부터 샘플을 제공받을 수 있다. 한 바람직한 도입 수단은 모세관 작용의 이용이다. 대안적으로, 원심분리에 의한 분리를 위해 샘플을 보유하는 데 이용되는 용기는 통상적인 원심분리기에서와 같이 단지 1개의 개구를 갖도록 구성될 수 있다.

[0114] 팁은 일단 혈액으로 충전되면 밀폐 요소가 존재하는 일회용 카트리지 내의 위치로 자동적으로 이동될 수 있다. 밀폐 요소는 팁의 하단부 상에 피팅되어 팁을 밀폐시키기에 적합한 변형가능한 (유연한) 물질(비닐, 실리콘 등)로 만들어진 작은 "캡"일 수 있다. 팁은 기기에 의해 밀폐제 내로 압착되어 액체-밀착 연결을 형성한다. 그 다음, 밀폐된 팁은 (전형적으로 기기의 부분 내에 위치하여 기기의 부분을 형성하는) 작은 원심분리기로 이동되고 팁의 (밀폐된) 하단부가 원심분리 단계 동안 팁을 지지할 강성 선반에 당도록 원심분리기 로터 내의 위치선정 특징부 내로 압착 피팅된다.

[0115] 원심분리기 로터는 직경이 약 10 cm인 원형일 수 있다. 혈액 함유 팁의 질량은 (1) 로터에 비해 상대적으로 작거나 (2) 원하는 경우 원심분리 단계 동안 임의의 진동이 최소화되도록 로터의 대향하는 부분 상에 위치한 반대 중량에 의해 균형이 잡힌다. 원심분리기 로터의 한 예시적 배향은 수직(수평 회전의 축)이다. 로터는 전기 모터에 의해 유도된 유도 샤프트 내에 탑재된다.

[0116] 원심분리는 로터를 약 15,000 rpm에서 5분 동안 회전시킴으로써 달성될 수 있다. 이 과정 동안, 혈액 중의 특정 요소(적혈구 및 백혈구)는 팁의 밀폐된 단부까지 침강되고 밀폐부로부터 멀리 떨어진 팁의 부분에서 분리된 무세포 혈장을 갖는 조밀하게 팩킹된 컬럼을 형성한다.

[0117] 그 다음, 분리된 샘플을 함유하는 팁은 x-y-z 재물대 상에 탑재된 피펫팅 디바이스 상에 탑재된 좁은 피펫 팁("샘플 획득 팁")으로 구성된 유체 취급 디바이스에 접근가능한 위치에서 수직으로 놓여 있을 수 있다.

[0118] 혈장은 원심분리된 샘플로부터 효율적으로 회수될 수 있다. 이것은 샘플 획득 팁이 혈장과 유체 접촉하고 예를 들면, 공압 수단의 이용을 통해 혈장을 위쪽으로 추출할 수 있도록 상기 샘플 획득 팁을 원심분리기 팁의 축을 따라 수직으로 이동시킴으로써 달성된다.

[0119] 임의적으로, 이 작업은 샘플 헤마토크릿을 측정하고 재물대/피펫터 조절기에 인접한 혈장/적혈구 세포의 위치에 대한 정보를 제공하는 데에 이용될 수 있는 카메라 또는 다른 영상화 디바이스의 이용을 통해 모니터링될 수 있다. 분리된 혈액의 영상화를 이용하여, 피펫에 피팅된 좁은 피펫 팁을 수직으로 아래로 서서히 이동시킴으로써 상기 팁이 혈장과 접촉할 때까지 축을 따라 샘플 함유 수단 쪽으로 하향하게 한다. 그 다음, 상기 팁은 팩킹된 세포 계면에 가깝게(약 3 mm, 2 mm, 1 mm, 0.5 mm 또는 0.1 mm 미만 이내) 있을 때까지 더 이동된다. 동시에, 혈장은 컴퓨터 조절 하에서 좁은 피펫 팁 내로 흡입된다. 혈장이 샘플 함유 수단의 상부 내로 옮겨지지 않도록 좁은 피펫 팁을 혈장 컬럼 내로 이동시키면서 혈장을 동시에 흡입할 수 있다. 흡입은 혈장 제거 단계 동안 공기가 흡입되지 않도록 조절될 수 있다.

- [0120] 일반적으로, 매우 좁은 단부를 갖는 피펫 팁, 예컨대, 샘플을 전기영동 시스템에 인가하는 데에 사용되는 피펫 팁을 사용하여 원심분리된 샘플 팁으로부터 혈장을 흡입할 수 있다. 좁은 팁은 전형적으로 원추형이거나 테이퍼형이고, 1 cm 내지 3 cm x 0.1 cm 내지 0.5 cm(길이 x 직경)의 치수를 갖고 임의의 다양한 물질(폴리프로필렌, 폴리스티렌 등)로 만들어진다. 상기 물질은 시각적으로 투명할 수 있거나 반투명할 수 있다. 팁의 한 단부는 피펫팅 디바이스와 맞물린다. 다른 단부는 샘플 팁의 내면에 닿지 않으면서 샘플 팁 내로 이동할 수 있을 정도로 매우 좁다(0.05 mm 내지 0.5 mm OD). 혈장 흡입 팁과 샘플 팁 사이에 접촉이 있는 경우조차도 혈장 흡입이 방해되지 않는다.
- [0121] 혈장 흡입 팁이 흡입 단계 동안 혈장-팩킹된 세포 계면 바로 위에 위치하는 재물대에서의 혈장 흡입 과정의 개략도는 도 7에 나타나 있다.
- [0122] 이 방식에서 본 발명자들은 원심분리된 샘플 팁 내에 예를 들면, 1 μ l만큼 적은 혈장을 남기면서 혈장의 거의 전부가 제거될 수 있다는 것을 발견하였다. 이것은 40% 헤마토크릿을 갖는 20 μ l의 혈액으로부터의 약 11 μ l 혈장(90% 회수)에 상응한다. 추가로, (용혈, 지질혈증 및 황달에 대한) 혈장 샘플의 질은 원심분리된 샘플의 영상으로부터 확인될 수 있다.
- [0123] 흡입된 혈장은 대사물질, 전해질, 단백질 생체마커, 약물 및 핵산을 포함하나 이들로 한정되지 않는 분석물을 위한 어세이가 수행될 수 있도록 희석 및 어세이 시약과의 혼합을 위해 다른 위치로 이동될 수 있다.
- [0124] *백혈구 세포의 분리*
- [0125] 본 발명의 추가 용도는 혈액으로부터 백혈구 세포를 분리하고 농축하는 것이다. 본 발명의 한 양태에서, 시약(예를 들면, 비디 팜라이스(BD Pharmlyse)TM 555899 또는 비디 팩스(BD FACS)TM 용해 용액 349202)을 혈액에 첨가하고 혼합함으로써 적혈구 세포를 용해시키는(그리고 임의적으로 백혈구 세포를 고정시키는) 과정으로 혈액 샘플을 먼저 처리한다. 짧은 항온처리 후, 백혈구 세포가 혈액 팁의 밀폐된 단부에서 농축되도록 용해된 샘플을 전술된 바와 같이 원심분리로 처리한다. 그 다음, 용해된 적혈구 세포 용액을 흡입으로 제거할 수 있다. 백혈구 세포의 회수는 (1) 소량의 완충제 용액을 첨가하고 위아래로 흡입을 반복하여 세포를 재현탁시킨 후 용기 내로 옮기거나, (2) 밀폐부를 제거하고 공기압을 이용하여 팩킹된 세포를 용기 내로 아래쪽으로 옮김으로써 달성된다.
- [0126] 대안적 방법은 적혈구 세포의 용해 없이 백혈구 세포의 회수를 가능하게 한다. (잘 공지된 바와 같이) 혈액의 원심분리 후, 백혈구 세포는 팩킹된 적혈구 세포의 상부 상에서 버피 코트(Buffy Coat)로서 공지된 층을 형성한다. (전술된 바와 같이) 혈장의 대부분을 제거한 후, (1) 임의적으로 작은 부피(예를 들면, 약 5 μ l)의 등장성 완충제를 첨가하거나 (2) 잔류 혈장을 이용하고, 샘플 획득 팁을 이용하여 반복된 흡입 및/또는 기계적 교반으로 백혈구 세포를 재현탁시킴으로써 백혈구 세포를 효율적으로 회수할 수 있다. 일단 현탁되면, 백혈구 세포와 재현탁된 작은 비율의 적혈구 세포의 생성된 혼합물을, 백혈구 세포의 분석을 위해 흡입으로 획득할 수 있다. 이 방식으로 단지 소량(오염)의 적혈구 세포(전형적으로 원래의 양의 5% 미만)와 함께 대부분의(전형적으로 모든) 백혈구 세포를 회수할 수 있다.
- [0127] *원심분리기*
- [0128] 도 1, 도 2 및 도 3은 시스템 내로 통합될 수 있는 원심분리기의 확대 투시도를 보여준다(도 1 - 측면도, 도 2 - 정면도, 도 3 - 후면도). 원심분리기는 15,000 rpm에서 로터를 회전시킬 수 있는 전기 모터를 함유할 수 있다. 한 종류의 원심분리기 로터는 수직 평면에서 모터 방추(spindle) 상에 탑재된 팬 블레이드(fan blade)와 다소 유사한 형태를 갖는다. 샘플 보유 수단(팁)을 보유하고 모터 축으로부터 멀리 떨어져 있는 팁의 단부를 받쳐주고 샘플이 빠져나갈 수 없도록 원심분리 동안 지지체를 제공하는 받침대 또는 선반을 제공하는 요소가 로터에 부착된다. 팁은 로터 내의 기계적 제동장치(stop)에 의해 그의 근위 단부에서 더 지지될 수 있다. 이것은 원심분리 동안 발생한 힘이 연결 비닐 캡을 통해 팁의 절단을 야기하지 않게 하기 위해 제공될 수 있다. 팁은 표준 픽킹(picking) 및 배치 기작, 바람직하게는 피펫에 의해 삽입되고 제거될 수 있다. 로터는 원심분리의 작동 동안 진동 및 소음을 최소화하는 형태를 갖는 아크릴(또는 다른 물질)의 단일 조각이다. 로터는 (임의적으로) 수직에 대해 특정 각도로 배향되어 있을 때 기기 내의 다른 이동가능한 구성요소가 원심분리기를 지나 이동할 수 있게 하는 형태를 갖는다. 샘플 보유 수단은 회전 관성의 중심이 모터에 대한 축이 되도록 로터의 대향 측(opposing side) 상에서 반대 질량에 의해 원심분리적으로 균형이 잡힌다. 원심분리기 모터는 (전형적으로 원심분리 전 및 후에 수직으로) 로터의 정지 위치를 조절할 수 있는 컴퓨터에게 위치 데이터를 제공할 수 있다.
- [0129] 도 8 및 도 9의 2개 그래프로부터 알 수 있는 바와 같이, 공개된 표준(DIN 58933-1; 미국의 경우, CLSI 표준

H07-A3 "Procedure for Determining Packed Cell Volume by the Microhematocrit Method"; 승인된 표준 - 제3 개정판)에 따라 (원심분리 동안 너무 많은 기계적 응력을 발생시키지 않으면서) 원심분리 시간을 최소화하기 위해 로터에 대한 편리한 치수는 약 5분의 적혈구 세포 팩킹 시간을 제공하는 약 10,000 내지 20,000 rpm에서 약 5 cm 내지 10 cm의 범위 내에 있다.

[0130] 원심분리력을 계산하기 위한 예시적 방정식은 하기에 제시되어 있다:

$$RCF = \frac{r(2\pi N)^2}{g}$$

[0131]

상기 식에서,

[0132]

g 는 지구의 중력 가속도이고,

[0133]

r 는 회전 반경이고,

[0134]

N 은 단위 시간 당 회전수로 측정된 회전 속도이다.

[0135]

$$RCF = 1.118 \times 10^{-5} r_{cm} N_{RPM}^2$$

[0136]

상기 식에서,

[0137]

r_{cm} 는 센티미터(cm)로 측정된 회전 반경이고,

[0138]

N_{RPM} 은 분 당 회전수(RPM)로 측정된 회전 속도이다.

[0139]

몇몇 실시양태에서, 원심분리기는 선회(swinging) 버킷 디자인을 갖는 수평으로 배향된 원심분리기일 수 있다. 몇몇 바람직한 실시양태에서, 원심분리기의 회전 축은 수직이다. 대안적 실시양태에서, 상기 회전 축은 수평일 수 있거나 임의의 각도로 존재할 수 있다. 원심분리기는 2개 이상의 용기를 동시에 회전시킬 수 있고 컴퓨터-조절된 피펫을 이용하는 자동화된 시스템 내로 전체적으로 통합되도록 디자인될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 용기는 기저부가 폐쇄된 용기일 수 있다. 선회 버킷 디자인은 원심분리 용기가 정지되어 있을 때 수직 위치에서 수동으로 배향되게 할 수 있고 회전할 때 고정된 각도로 회전하게 할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 선회 버킷은 원심분리 용기가 수평 배향으로 회전하게 할 수 있다. 대안적으로, 상기 선회 버킷은 수직 위치와 수평 위치 사이의 임의의 각도(예를 들면, 수직으로부터 약 15도, 30도, 45도, 60도 또는 75도)로 회전할 수 있다. 선회 버킷 디자인을 갖는 원심분리기는 다수의 위치선정 시스템이 이용되는 로봇 시스템의 위치 정확도 및 반복가능성 요건을 충족시킬 수 있다.

[0141]

컴퓨터-기초 조절 시스템은 로터를 조절된 느린 속도에서 회전시키기 위해 광학 암호기(encoder)로부터의 위치 정보를 이용할 수 있다. 고속 성능에 적합한 모터가 디자인될 수 있기 때문에, 위치 피드백을 단독으로 이용하여 정확한 정적 위치를 유지할 필요가 없다. 몇몇 실시양태에서, 셀레노이드-작동된 레버와 함께 캠(cam)을 이용하여 고정된 수의 위치에서 매우 정확하고 안정한 정지를 달성할 수 있다. 별도의 조절 시스템, 및 모터 내에 내장된 홀-이펙트(Hall-Effect) 센서로부터의 피드백을 이용하여 로터의 속도를 고속에서 매우 정확하게 조절할 수 있다.

[0142]

다수의 민감한 기기들이 어세이 기기 시스템 내에서 동시에 작용해야 하기 때문에, 원심분리기의 디자인은 바람직하게는 진동을 최소화하거나 감소시킨다. 로터는 버킷이 그들의 수평 위치에 존재할 때 상기 버킷을 전체적으로 둘러싸는 매끄러운 외부를 갖도록 공기역학적으로 디자인될 수 있다. 또한, 진동 축임(dampening)을 케이스의 디자인에서 다수의 위치에서 사용할 수 있다.

[0143]

로터

[0144]

원심분리기 로터는 원심분리 용기(들)를 보유할 수 있고 회전시킬 수 있는 시스템의 구성요소일 수 있다. 회전 축은 수직일 수 있으므로, 로터 자체는 수평으로 위치될 수 있다. 그러나, 대안적 실시양태에서, 상이한 회전 축 및 로터 위치를 이용할 수 있다. 원심분리 용기를 보유하는 로터의 측면 상에 대칭적으로 위치된 버킷으로서 공지된 2개의 구성요소가 존재한다. 버킷이 방사형 대칭으로 배향되는, 예를 들면, 3개의 버킷이 120도로 배향되는 대안적 원심분리가 가능하다. 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개 이상의 버킷을 포함하나 이들

로 한정되지 않는 임의의 수의 버킷이 제공될 수 있다. 버킷은 서로로부터 균일하게 이격될 수 있다. 예를 들면, n 개의 버킷이 제공되는 경우(이때, n 은 정수임), 상기 버킷은 서로로부터 약 $360^\circ/n$ 만큼 떨어져 이격될 수 있다. 다른 실시양태에서, 버킷은 서로의 주변에서 균일하게 또는 방사형 대칭으로 이격될 필요가 없다.

[0145] 로터가 정지 상태일 때, 중력에 의해 영향을 받는 이들 버킷들은 용기를 수직으로 위치시키고 상기 용기를 펌프에 접근가능하게 만들기 위해 수동적으로 떨어질 수 있다. 도 111은 수직 버킷을 갖는 정지된 로터의 일례를 보여준다. 몇몇 실시양태에서, 버킷은 수직일 수 있거나 수직이 아닐 수 있는 예정된 각도로 수동으로 떨어질 수 있다. 로터가 회전할 때, 버킷은 원심분리력에 의해 거의 수평 위치 또는 예정된 각도로 존재한다. 도 112는 수평에 대해 작은 각도로 버킷을 갖는 일정 속도의 로터의 일례를 보여준다. 정확도 및 위치 반복가능성을 강화시키는 작용을 하는, 수직 위치 및 수평 위치 둘다에 대한 물리적 하드(hard) 제동장치가 존재할 수 있다.

[0146] 로터는 디스크 형태, 및 난기류에 의해 야기된 진동을 최소화하기 위해 가능한 적은 물리적 특징부를 갖도록 공기역학적으로 디자인될 수 있다. 이를 달성하기 위해, 버킷의 외부 기하학적 형태는 로터가 회전하고 버킷이 수평으로 존재할 수 있을 때 버킷 및 로터가 완벽히 정렬될 수 있도록 로터의 외부 기하학적 형태와 정확히 일치할 수 있다.

[0147] 혈장 추출을 용이하게 하기 위해, 로터는 수평에 대해 상대적으로 땅을 향해 아래로 기울어져 있을 수 있다. 버킷의 각도가 로터의 각도와 일치할 수 있기 때문에, 이것은 버킷에 대한 고정된 회전 각도를 강화시킬 수 있다. 이러한 원심분리로부터 생성된 펄셋은 똑바로 배치될 때 용기에 대해 상대적으로 기울어져 있을 수 있다. 좁은 추출 팁을 이용하여 원심분리 용기의 상부로부터 혈장을 흡입할 수 있다. 추출 팁을 각진 펄셋에 의해 생성된 기울기의 기저부 근처에 배치함으로써 민감한 버피 코트를 교란시키지 않으면서 최종 부피의 혈장을 보다 더 효율적으로 추출할 수 있다.

[0148] 다양한 튜브 디자인이 디바이스의 버킷에서 수용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 다양한 튜브 디자인은 폐쇄 단부를 갖는 디자인일 수 있다. 몇몇은 원추형 기저부를 갖는 통상적인 원심분리기 튜브와 유사한 형태를 갖는다. 다른 튜브 디자인은 원통형일 수 있다. 높이 대 횡단면적의 비가 낮은 튜브는 세포 프로세싱에 유리할 수 있다. 보다 더 큰 비($> 10:1$)를 갖는 튜브는 헤마토크릿의 정확한 측정 및 다른 영상화 요건에 적합할 수 있다. 그러나, 임의의 높이 대 횡단면적 비가 이용될 수 있다. 버킷은 임의의 여러 플라스틱(폴리스티렌, 폴리프로필렌) 또는 본원의 임의의 부분에서 논의된 임의의 다른 물질로 만들어질 수 있다. 버킷은 수 μl 내지 약 1 ml의 용적을 갖는다. 튜브는 "픽킹 및 배치" 기작의 이용을 통해 원심분리기 내로 삽입될 수 있거나 원심분리기로부터 제거될 수 있다.

[0149] 제어 시스템

[0150] 원심분리기 디바이스의 회전 및 위치선정 요건으로 인해, 이중 제어 시스템 방식을 이용할 수 있다. 로터를 특정 회전 배향에 대해 지수화하기 위해, 위치-기초 제어 시스템을 실행할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 제어 시스템은 PID(비례적 적분 미분(Proportional Integral Derivative)) 제어 시스템을 이용할 수 있다. 당분야에서 공지되어 있는 다른 피드백 제어 시스템도 이용할 수 있다. 위치 제어기에 대한 위치 피드백은 고해상 광학 압호기에 의해 제공될 수 있다. 원심분리기를 저속도 내지 고속도에서 작동시키기 위해, 속도 제어를 위해 조정된 PID 제어 시스템을 이용하면서 속도 제어기를 실행할 수 있다. 속도 제어기에 대한 회전을 피드백은 모터 샤프트 상에 배치된 단순한 홀-이펙트 센서 세트에 의해 제공될 수 있다. 각각의 센서는 모터 샤프트 회전 당 한 주기에서 정사각형 파장을 발생시킬 수 있다.

[0151] 정지 기작

[0152] 특정 위치에서 로터를 일관되게 단단히 위치시키기 위해, 물리적 정지 기작을 이용할 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 정지 기작은 솔레노이드-작동된 레버와 함께 로터에 커플링된 캠을 사용할 수 있다. 상기 캠은 둘레 주위에서 기계가공된 다수의 "C" 형태 노치를 갖는 원형 디스크와 유사한 형태를 가질 수 있다. 원심분리기 로터를 위치시키기 위해, 그의 회전 속도는 먼저 최대한 30 rpm까지 낮추어질 수 있다. 다른 실시양태에서, 회전 속도는 약 5 rpm, 10 rpm, 15 rpm, 20 rpm, 25 rpm, 35 rpm, 40 rpm 또는 50 rpm을 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 다른 양까지 낮추어질 수 있다. 일단 속도가 충분히 느려지면, 레버를 작동시킬 수 있다. 레버의 단부에는 최소한의 마찰을 가지면서 캠의 둘레를 따라 미끄러질 수 있는 캠 공이(follower)가 존재한다. 일단 캠 공이가 캠에서 특정 노치의 중심에 도달하면, 솔레노이드-작동된 레버의 힘이 모터의 힘을 극복할 수 있고, 로터가 정지될 수 있다. 그 시점에서 모터는 전기적으로 제동될 수 있고, 정지 기작과 함께 회전 위치가 매우 정확하고 확고하게 무기한으로 유지될 수 있다.

[0153] 원심분리기 버킷

[0154] 원심분리기 스윙아웃(swing-out) 버킷은 상이한 종류의 원심분리기 튜브들을 수용하도록 구성될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 다양한 종류의 튜브들이 그들의 (개방) 상단부에서 이음고리(collar) 또는 테두리(flange)를 가질 수 있다. 이 이음고리 또는 테두리 특징부는 버킷의 상단부 상에 받쳐져 있을 수 있고 원심분리 동안 튜브를 지지할 수 있다. 도 113, 도 114 및 도 115에 나타난 바와 같이, 다양한 길이 및 부피의 원추형 및 원통형 튜브가 수용될 수 있다. 도 113, 도 114 및 도 115는 버킷의 예를 제공하고 다른 버킷 디자인이 이용될 수 있다. 예를 들면, 도 113은 버킷 입체구조의 일례를 보여준다. 버킷은 원심분리기와 교접될 수 있고 버킷이 자유롭게 흔들리게 하는 측면부를 가질 수 있다. 버킷은 폐쇄된 기저부를 가질 수 있고 상부에서 개구부를 가질 수 있다. 도 114는 버킷과 교접된 원심분리 용기의 일례를 보여준다. 전술된 바와 같이, 버킷은 다양한 입체구조의 원심분리 용기를 수용하는 형태를 가질 수 있다. 원심분리 용기는 버킷 상에 받쳐져 있을 수 있는 하나 이상의 돌출 부재를 가질 수 있다. 원심분리 용기는 원심분리 버킷과 교접될 수 있는 하나 이상의 특징부를 갖는 형태를 가질 수 있다. 상기 특징부는 상기 용기 또는 하나 이상의 돌출부의 형태 특징부일 수 있다. 도 115는 버킷과 교접될 수 있는 또 다른 원심분리 용기의 일례를 보여준다. 전술된 바와 같이, 버킷은 상이한 입체구조의 원심분리 용기가 버킷과 교접할 수 있게 하는 하나 이상의 형태 특징부를 가질 수 있다.

[0155] 원심분리기 튜브 및 샘플 추출 수단

[0156] 원심분리기 튜브 및 추출 팁은 개별적으로 제공될 수 있고 원심분리 후 물질의 추출을 위해 함께 교접될 수 있다. 원심분리 튜브 및 추출 팁은 자동화된 시스템에서 복잡한 과정을 처리하도록 디자인될 수 있다. 도 116은 원심분리 용기의 일례를 보여준다. 도 117은 추출 팁의 일례를 보여준다. 도 118은 원심분리 용기 및 추출 팁이 교접할 수 있는 방법의 일례를 제공한다. 임의의 치수가 단지 예로서 제공되고, 동일한 또는 상이한 비율의 다른 치수가 이용될 수 있다.

[0157] 시스템은 하기 과정들 중 하나 이상의 과정을 수행할 수 있다:

[0158] 1. 적은(전형적으로 $5\ \mu\text{l}$ 내지 $50\ \mu\text{l}$) 혈액 샘플의 신속한 프로세싱

[0159] 2. 헤마토크릿의 정확하고 정밀한 측정

[0160] 3. 혈장의 효율적인 제거

[0161] 4. 형성된 요소(적혈구 세포 및 백혈구 세포)의 효율적인 재현탁

[0162] 5. (형광 항체를 사용한 표지 및 고정 + 적혈구 세포의 용해 후) 백혈구 세포의 농축

[0163] 6. 적혈구 세포 용해 및 백혈구 세포의 회수의 광학적 확인

[0164] 원심분리 용기 및 추출 팁의 개요

[0165] 시스템에 부여된 다양한 제한을 충족시키기 위해 주문제작 용기 및 팁이 원심분리기의 작동을 위해 이용될 수 있다. 원심분리 용기는 원심분리기 내에서 회전되도록 디자인되고 기저부가 폐쇄된 튜브일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 원심분리 용기는 도 116에 예시된 용기일 수 있거나 도 116에 예시된 하나 이상의 특징부를 가질 수 있다. 상기 용기는 헤마토크릿 측정, RBC 용해, 펠렛 재현탁 및 효율적인 혈장 추출을 포함하는 광범위한 요구된 기능을 수행하게 하는 다수의 독특한 특징부를 가질 수 있다. 추출 팁은 정밀한 유체 추출 및 펠렛 재현탁을 위해 원심분리 용기 내로 삽입되도록 디자인될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 추출 팁은 도 117에 예시된 팁일 수 있거나 도 117에 예시된 하나 이상의 특징부를 가질 수 있다. 각각의 팁에 대한 예시적 규격은 본원에서 논의되어 있다.

[0166] 원심분리 용기

[0167] 원심분리 용기는 상이한 항-응고제 및 전혈 부피와 각각 관련되어 있는 2개의 상이한 사용 시나리오를 다루도록 디자인될 수 있다.

[0168] 제1 사용 시나리오는 $40\ \mu\text{l}$ 의 전혈이 헤파린에 의해 펠렛화되고 최대 부피의 혈장이 회수되고 헤마토크릿이 컴퓨터 비전의 이용을 통해 측정될 것을 요구할 수 있다. 60% 헤마토크릿 이하의 경우, 요구되거나 바람직한 혈장 부피는 약 $40\ \mu\text{l} \times 40\% = 16\ \mu\text{l}$ 일 수 있다.

[0169] 몇몇 실시양태에서, 버피 코트가 교란되지 않아야 하기 때문에 100%의 혈장을 회수하는 것이 가능하지 않을 것이므로, 팁의 기저부와 펠렛의 정점 사이에 최소한의 거리가 유지되어야 한다. 이 최소한의 거리는 실험적으로

측정될 수 있으나, 희생된 부피(V)를 하기 식을 이용하여 요구된 안전 거리(d)의 함수로서 추정할 수 있다: $V(d) = d \cdot \pi \cdot 1.25 \text{ mm}^2$. 예를 들면, 0.25 mm의 요구된 안전 거리를 위해, 희생된 부피는 60% 헤마토크릿의 경우 1.23 μl 일 수 있다. 이 부피는 원심분리 용기의 헤마토크릿 부분의 내부 반경을 감소시킴으로써 감소될 수 있다. 그러나, 몇몇 실시양태에서 좁은 부분이 1.5 mm보다 더 작을 수 없는 추출 팁의 외부 반경을 전체적으로 수용해야 하기 때문에, 원심분리 용기의 기존 치수는 최소치에 가까울 수 있다.

[0170] 혈장 추출과 함께, 몇몇 실시양태에서, 컴퓨터 비전을 이용하여 헤마토크릿을 측정할 필요가 있을 수도 있다. 이 과정을 용이하게 하기 위해, 용기의 좁은 부분의 내경을 최소화함으로써 주어진 부피의 헤마토크릿에 대한 총 높이를 최대화할 수 있다. 상기 높이를 최대화함으로써, 헤마토크릿 부피의 변화와 컬럼 높이의 물리적 변화 사이의 관계를 최적화하여 측정에 이용될 수 있는 화소의 수를 증가시킬 수 있다. 또한, 용기의 좁은 부분의 높이는 컬럼의 상부에서 효율적인 추출을 허용하기 위해 소량의 혈장을 여전히 남기면서 80% 헤마토크릿이라는 최악의 경우의 시나리오를 수용할 정도로 충분히 길 수 있다. 따라서, $40 \mu\text{l} \cdot 80\% = 32 \mu\text{l}$ 가 헤마토크릿의 정확한 측정을 위해 요구된 부피 용적일 수 있다. 디자인된 팁의 좁은 부분의 부피는 최악의 경우에서조차도 작은 부피의 혈장이 잔존하게 할 수 있는 약 35.3 μl 일 수 있다.

[0171] 제2 사용 시나리오는 훨씬 더 복잡하고 하기 요건들 중 하나 이상 또는 전부를 요구할 수 있다:

[0172] - 펠렛화된 전혈

[0173] - 추출된 혈장

[0174] - 용해 완충제 및 염료에 재현탁된 펠렛

[0175] - 펠렛화된 잔존하는 백혈구 세포(WBC)

[0176] - 제거된 상청액

[0177] - 재현탁된 WBC

[0178] - 전체적으로 추출된 WBC 현탁액

[0179] 팩킹된 펠렛을 전체적으로 재현탁시키기 위해, 실험은 펠렛을 함유하는 용기의 기저부에 완전히 도달할 수 있는 팁으로 펠렛을 물리적으로 교란시킬 수 있다는 것을 보여주었다. 재현탁에 사용되는 용기의 기저부의 바람직한 기하학적 형태는 표준 상업적 PC 튜브와 유사한 반구 형태인 것으로 보인다. 다른 실시양태에서, 다른 용기 기저부 형태가 이용될 수 있다. 추출 팁과 함께 원심분리 용기는 추출 팁이 기저부와 물리적으로 접촉하게 하면서 이들 기하학적 요건을 충족시킴으로써 재현탁 과정을 용이하게 하도록 디자인될 수 있다.

[0180] 수동 재현탁 실험 동안 용기의 기저부와 팁의 기저부 사이의 물리적 접촉이 유체 이동을 방해하는 밀폐부를 생성할 수 있다는 것이 인지되었다. 유체가 유동하게 하면서 펠렛을 전체적으로 교란시키기 위해 섬세한 이격을 이용할 수 있다. 로봇 시스템에서 이 과정을 용이하게 하기 위해, 물리적 특징부를 원심분리 용기의 기저부에 부가할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이 특징부는 상기 용기의 기저부의 둘레 주변에 배치된 4개의 작은 반구형 너브(nub)를 포함할 수 있다. 추출 팁이 용기 내로 전체적으로 삽입되고 물리적으로 접촉하게 되는 경우, 팁의 단부는 너브 상에 받쳐질 수 있고, 유체는 상기 너브들 사이에서 자유롭게 유동하게 된다. 이것은 소량의 부피(약 25 μl)가 간극(gap)에서 상실되는 것을 초래할 수 있다.

[0181] 몇몇 실시에서, 용해 과정 동안 최대 예측된 유체 부피는 60 μl 이고, 이 부피는 추출 팁에 의해 옮겨진 25 μl 와 함께 85 μl 의 총 부피 용적을 요구할 수 있다. 100 μl 의 유동 최대 부피를 갖는 디자인은 이 요건을 능가할 수 있다. 제2 사용 시나리오의 다른 양태는 유사한 또는 이미 논의된 팁 특성을 요구한다.

[0182] 원심분리 용기의 상부 기하학적 형태는 피켓 노즐과 교접하도록 디자인될 수 있다. 본원의 임의의 부분에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 임의의 피켓 노즐이 사용될 수 있다. 용기의 상부의 외부 기하학적 형태는 반응 팁의 기하학적 형태와 정확히 일치할 수 있고, 상기 반응 팁의 주변에서 유동 노즐 및 카트리지가 둘다가 디자인될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 작은 리지(ridge)가 상부의 내면 주위를 둘러쌀 수 있다. 이 리지는 컴퓨터 비전 시스템의 이용을 통한 자동 오류 검출을 용이하게 하기 위한 최대 유체 높이의 시각적 마커일 수 있다.

[0183] 몇몇 실시양태에서, 전체적으로 교접된 노즐의 기저부부터 최대 유체 선의 정점까지의 거리는 2.5 mm이다. 이 거리는 추출 팁에 의해 충족된 4 mm 권장된 거리보다 1.5 mm 더 작다. 이 감소된 거리는 최소 부피 요건을 충족시키면서 추출 팁의 길이를 최소화할 필요성에 의해 유도될 수 있다. 이 감소된 거리에 대한 정당화는 용기의

구체적인 용도로부터 도출된다. 몇몇 실시에서 유체가 상부로부터만 용기와 교환될 수 있기 때문에, 노즐과 교접되어 있는 동안 가질 최대 유체는 임의의 주어진 시간에서 예측된 전혈의 최대 양($40\ \mu\text{l}$)이다. 이 유체의 높이는 노즐의 기저부보다 충분히 낮을 수 있다. 또 다른 관심사는 다른 시간에서 용기 내의 유체의 부피가 이것보다 훨씬 더 높을 수 있고 노즐의 높이까지 벽을 적실 수 있다는 것이다. 몇몇 실시양태에서, 총 부피가 특정된 최대치 미만인 경우조차도 용기 내에 함유된 임의의 유체의 메니스커스가 최대 유체 높이를 초과하지 않도록 보장하는 것은 용기를 사용하는 자가 할 일이다. 다른 실시양태에서, 유체가 용기 내에 함유된 상태를 유지하기 위해 다른 특징부가 제공될 수 있다.

[0184] 본원에서 제공된 임의의 치수, 크기, 부피 또는 거리는 단지 예로서 제공된다. 본원에서 언급된 양에 비례할 수 있거나 비례하지 않을 수 있는 임의의 다른 치수, 크기, 부피 또는 거리가 이용될 수 있다.

[0185] 원심분리 용기는 유체를 교환하고 팁을 신속히 삽입하고 제거하는 과정 동안 다수의 힘을 받을 수 있다. 상기 용기가 구속되어 있지 않은 경우, 이들 힘은 원심분리기 버킷으로부터 상기 용기를 들어 올리거나 다른 방식으로 이동시킬 정도로 충분히 강할 수 있다. 이동을 방지하기 위해, 상기 용기는 몇몇 방식으로 고착되어야 한다. 이를 달성하기 위해, 상기 용기의 기저부 외부 주위를 둘러싸는 작은 고리가 부가되었다. 이 고리는 버킷 상의 유연한 기계적 특징부와 용이하게 교접될 수 있다. 너브의 보유력이 유체 조작 동안 경험되는 힘보다 더 크지만 노즐과 교접될 때의 마찰력보다 더 작은 한, 문제점은 해결된다.

[0186] 추출 팁

[0187] 추출 팁은 원심분리 용기와 접촉하고 혈장을 효율적으로 추출하고 펠렛화된 세포를 재현탁시키도록 디자인될 수 있다. 원하는 경우, 그의 총 길이(예를 들면, $34.5\ \text{mm}$)는 미국 특허출원 제12/244,723호(본원에 참고로 도입됨)에 기재된 혈액 팁을 포함하나 이들로 한정되지 않는 또 다른 혈액 팁의 총 길이와 정확히 일치할 수 있으나 원심분리 용기의 기저부에 물리적으로 닿을 정도로 충분히 길 수 있다. 상기 용기의 기저부에 닿는 능력은 몇몇 실시양태에서 재현탁 과정 및 백혈구 세포 현탁액의 완전한 회수를 위해 요구될 수 있다.

[0188] 추출 팁의 요구된 부피는 임의의 주어진 시간에서 원심분리 용기로부터 흡입될 것으로 예측되는 최대 부피에 의해 결정될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이 부피는 $85\ \mu\text{l}$ 인 팁의 최대 용적 미만일 수 있는 대략 $60\ \mu\text{l}$ 일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 요구된 부피보다 더 큰 부피의 팁이 제공될 수 있다. 원심분리 용기와 마찬가지로, 상기 팁의 상부의 내부 주위를 둘러싸는 내부 특징부를 이용하여 이 최대 부피의 높이를 표시할 수 있다. 최대 부피 선과 교접된 노즐의 정점 사이의 거리는 $4.5\ \text{mm}$ 일 수 있고, 이 거리는 노즐 오염을 방지하기 위한 안전 거리인 것으로 간주될 수 있다. 노즐 오염을 방지하기에 충분한 임의의 거리가 이용될 수 있다.

[0189] 원심분리기를 이용하여 침전된 LDL-콜레스테롤을 침강시킬 수 있다. 영상화를 이용하여 상청액이 투명하다는 것(침전물의 완전한 제거를 표시함)을 확인할 수 있다.

[0190] 일례에서, 혈장을 황산텍스트란($25\ \text{mg/dl}$)과 황산마그네슘($100\ \text{mM}$)의 혼합물 내로 희석한 후(예를 들면, 1:10) 1분 동안 황온처리하여 LDL-콜레스테롤을 침전시킬 수 있다. 반응 생성물을 원심분리기의 튜브 내로 흡입한 후 캡핑하고 $3,000\ \text{rpm}$ 에서 3분 동안 회전시킬 수 있다. 도 119, 도 120 및 도 121은 각각 원심분리 전 원래의 반응 혼합물을 촬영한 영상(백색 침전물을 보임), 원심분리 후 원래의 반응 혼합물을 촬영한 영상(투명한 상청액을 보임) 및 LDL-콜레스테롤 펠렛을 촬영한 영상(캡의 제거 후)이다.

[0191] 본 발명에서 이용될 수 있는 원심분리기의 다른 예는 모든 목적을 위해 전체적으로 참고로 도입되는 미국 특허 제5,693,233호, 제5,578,269호 및 제6,599,476호, 및 미국 특허 공개 제2004/0230400호, 제2009/0305392호 및 제2010/0047790호에 기재되어 있다.

[0192] 예시적 프로토콜

[0193] 프로토콜의 많은 변경이 원심분리 및 프로세싱을 위해 이용될 수 있다. 예를 들면, 세포분석(cytometry)을 위해 백혈구 세포를 프로세싱하고 농축하기 위한 원심분리기의 이용에 대한 전형적인 프로토콜은 하기 단계들 중 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다. 하기 단계들은 상이한 순서로 제공될 수 있거나 하기 단계들 중 임의의 단계는 다른 단계로 치환될 수 있다:

[0194] 1. EDTA로 항-응고된 $10\ \mu\text{l}$ 혈액을 수용하는 단계(피펫이 혈액을 원심분리기 버킷의 기저부 내로 주입함);

[0195] 2. 원심분리로 적혈구 세포 및 백혈구 세포를 침강시키는 단계($< 5\ \text{분} \times 10,000\ \text{g}$);

[0196] 3. 영상화로 헤마토크릿을 측정하는 단계;

- [0197] 4. 세포 펠렛을 교란시키지 않으면서 피펫 내로의 흡입으로 혈장을 서서히 제거하는 단계(최악의 경우의 시나리오[60% 헤마토크릿]에 상응하는 4 μl);
- [0198] 5. 완충된 식염수 + BSA(1 mg/ml)에 용해된 최대 5종의 형광 표지된 항체(표준 실험실 방법에 비해 상대적으로 상이한 부피 비를 다루기 위해 농도가 적절하게 조절될 것임(구체적으로 약 5x 더 낮음))의 적절한 각테일 20 μl 를 첨가한 후 펠렛을 재현탁시키는 단계(총 반응 부피 약 26 μl (필요한 경우, 이 부피는 최적 염색을 갖기 위해 더 클 수 있지만 50 μl 이하임));
- [0199] 6. 37°C에서 15분 동안 항온처리하는 단계;
- [0200] 7. 적혈구 세포 용해 용액(염화암모늄/중탄산칼륨)을 백혈구 세포 고정 시약(포름알데하이드)과 혼합하여 용해/고정 시약을 제조하는 단계;
- [0201] 8. 30 μl 의 용해/고정 시약을 첨가하는 단계(총 반응 부피 약 60 μl);
- [0202] 9. 37°C에서 15분 동안 항온처리하는 단계;
- [0203] 10. 원심분리(5분, 10,000 g)로 백혈구 세포를 침강시키는 단계;
- [0204] 11. 상청액 용혈물(약 57 μl)을 제거하는 단계;
- [0205] 12. 8 μl 의 완충제(등장성 완충된 식염수)를 첨가하여 백혈구 세포를 재현탁시키는 단계;
- [0206] 13. 부피를 정확히 측정하는 단계; 및
- [0207] 14. 샘플(대략 10 μl)을 세포분석에 전달하는 단계.
- [0208] 상기 단계들은 샘플을 수용하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 샘플은 체액, 예컨대, 혈액, 또는 본원의 임의의 부분에 기재된 임의의 다른 샘플일 수 있다. 샘플은 작은 부피, 예컨대, 본원의 임의의 부분에 기재된 부피 측정치 중 임의의 부피 측정치의 샘플일 수 있다. 몇몇 경우, 샘플은 항-응고제를 가질 수 있다.
- [0209] 분리 단계가 일어날 수 있다. 예를 들면, 밀도-기초 분리가 일어날 수 있다. 이러한 분리는 원심분리, 자기 분리, 용해 또는 당분야에서 공지된 임의의 다른 분리 기법을 통해 일어날 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 샘플은 혈액일 수 있고, 적혈구 세포와 백혈구 세포는 분리될 수 있다.
- [0210] 측정이 수행될 수 있다. 몇몇 경우, 측정은 영상화, 또는 본원의 임의의 부분에 기재된 임의의 다른 검출 기작을 통해 수행될 수 있다. 예를 들면, 분리된 혈액 샘플의 헤마토크릿은 영상화에 의해 획득될 수 있다. 영상화는 디지털 카메라 또는 본원에 기재된 임의의 다른 영상 포착 디바이스를 통해 일어날 수 있다.
- [0211] 샘플의 하나 이상의 성분이 제거될 수 있다. 예를 들면, 샘플이 고체 성분과 액체 성분으로 분리되는 경우, 액체 성분이 제거될 수 있다. 혈액 샘플의 혈장이 제거될 수 있다. 몇몇 경우, 액체 성분, 예컨대, 혈장은 피펫을 통해 제거될 수 있다. 액체 성분은 고체 성분을 교란시키지 않으면서 제거될 수 있다. 영상화는 액체 성분 또는 샘플의 임의의 다른 선택된 성분의 제거에 있어서 도움을 줄 수 있다. 예를 들면, 영상화는 혈장이 위치하는 장소를 확인하는 데에 이용될 수 있고 혈장을 제거하기 위한 피펫의 배치에 있어서 도움을 줄 수 있다.
- [0212] 몇몇 실시양태에서, 시약 또는 다른 물질이 샘플에 첨가될 수 있다. 예를 들면, 샘플의 고체 부분이 재현탁될 수 있다. 물질이 표지와 함께 첨가될 수 있다. 하나 이상의 항온처리 단계가 일어날 수 있다. 몇몇 경우, 용해 및/또는 고정 시약이 첨가될 수 있다. 추가 분리 및/또는 재현탁 단계가 일어날 수 있다. 필요한 경우, 희석 및/또는 농축 단계가 일어날 수 있다.
- [0213] 샘플의 부피가 측정될 수 있다. 몇몇 경우, 샘플의 부피는 정밀하고/하거나 정확한 방식으로 측정될 수 있다. 샘플의 부피는 낮은 변동계수, 예컨대, 본원의 임의의 부분에 기재된 변동계수 값을 갖는 시스템에서 측정될 수 있다. 몇몇 경우, 샘플의 부피는 영상화의 이용을 통해 측정될 수 있다. 샘플의 영상은 포착될 수 있고 샘플의 부피는 영상으로부터 계산될 수 있다.
- [0214] 샘플은 원하는 과정으로 전달될 수 있다. 예를 들면, 샘플은 세포분석을 위해 전달될 수 있다.
- [0215] 또 다른 예에서, 핵산 정제를 위해 원심분리기를 이용할 수 있거나 이용할 수 없는 전형적인 프로토콜은 하기 단계들 중 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다. 시스템은 핵산 주형을 검출을 위한 기하급수적 증폭 반응으로 전달하기 위해 DNA/RNA 추출을 수행할 수 있다. 상기 과정은 전혈, 혈청, 바이러스 전달 매질, 인간 및 동물 조직 샘플, 식품 샘플 및 세균 배양물을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 샘플들로부터 핵산을 추출하도록

디자인될 수 있다. 상기 과정은 완전히 자동화될 수 있고 일관되고 정량적인 방식으로 DNA/RNA를 추출할 수 있다. 하기 단계들은 상이한 순서로 제공될 수 있거나 하기 단계들 중 임의의 단계는 다른 단계로 치환될 수 있다:

- [0216] 1. 샘플 용해. 무질서(chaotropic)-염 완충제를 사용하여 샘플 중의 세포를 용해시킬 수 있다. 무질서-염 완충제는 하기 물질들 중 하나 이상의 물질을 포함할 수 있고, 완충제, 예컨대, HEPES를 사용하여 pH를 7 내지 7.5로 설정할 수 있다: 무질서 염, 예컨대, 3 M 내지 6 M 구아니딘 하이드로클로라이드 또는 구아니디늄 티오시아네이트(그러나, 이들로 한정되지 않음); 0.1% 내지 5%(부피/부피)의 전형적인 농도의 나트륨 도데실 설페이트(SDS); 1 mM 내지 5 mM의 전형적인 농도의 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA); 1 mg/ml의 전형적인 농도의 라이소자임; 및 1 mg/ml의 전형적인 농도의 프로테아제(proteinase)-K. 몇몇 실시양태에서, 샘플은 20℃ 내지 95℃의 전형적인 온도에서 완충제에서 0분 내지 30분 동안 항온처리될 수 있다. 이소프로판올(50% 내지 100%(부피/부피))이 용해 후 혼합물에 첨가될 수 있다.
- [0217] 2. 표면 로딩. 용해된 샘플은 작용화된(functionalized) 표면(종종 비드의 팩킹된 층의 형태를 가짐), 예컨대, 크로마토그래피 스타일 컬럼에 팩킹된 수지-지지체, 회분(batch) 스타일 방식으로 샘플과 혼합된 자성 비드, 유동화된 층 모드로 현탁된 수지를 통해 펌핑된 샘플, 및 표면 상에서의 접선 유동 방식으로 폐쇄된 채널을 통해 펌핑된 샘플(그러나, 이들로 한정되지 않음)에 노출될 수 있다. 상기 표면은 용해 완충제의 존재 하에서 핵산(예를 들면, DNA, RNA, DNA/RNA 혼성체)에 결합하도록 작용화될 수 있다. 표면 종류는 실리카, 및 이온 교환 작용기, 예컨대, 디에틸아미노에탄올(DEAE)을 포함할 수 있다. 용해된 혼합물은 표면에 노출될 수 있고 핵산은 결합한다.
- [0218] 3. 세척. 고체 표면은 pH 7.0 내지 7.5에서 염 용액, 예컨대, 0 M 내지 2 M 염화나트륨 및 에탄올(20% 내지 80% 부피/부피)로 세척된다. 세척은 로딩과 동일한 방식으로 수행될 수 있다.
- [0219] 4. 용출. 핵산은 표면을 물 또는 pH 7 내지 9의 완충제에 노출시킴으로써 표면으로부터 용출될 수 있다. 용출은 로딩과 동일한 방식으로 수행될 수 있다.
- [0220] 이들 프로토콜들 또는 다른 프로토콜들의 많은 변경물들이 시스템에 의해 이용될 수 있다. 이러한 프로토콜들은 본원에 기재된 임의의 프로토콜 또는 방법과 함께 또는 본원에 기재된 임의의 프로토콜 또는 방법 대신에 이용될 수 있다.
- [0221] 몇몇 실시양태에서, 세포분석을 위해 원심분리에 의해 팩킹되고 농축된 세포를 회수할 수 있는 것이 중요하다. 몇몇 실시양태에서, 이것은 피펫팅 디바이스의 이용에 의해 달성될 수 있다. 액체(전형적으로 등장성 완충된 식염수, 용해제, 용해제와 고정제의 혼합물 또는 완충제 중의 표지된 항체들의 컬테일)는 원심분리기 버킷 내로 분배될 수 있고 반복적으로 흡입되고 재분배될 수 있다. 피펫의 팁은 팩킹된 세포 내로 도입되어 상기 과정을 용이하게 할 수 있다. 영상 분석은 모든 세포들이 재현탁되어 있다는 것을 객관적으로 입증함으로써 상기 과정을 돕는다.
- [0222] 분석 전 샘플을 프로세싱하기 위한 피펫 및 원심분리기의 이용
- [0223] 본 발명의 한 실시양태에 따라, 시스템은 피펫팅 성능, 픽업 및 배치 성능 및 원심분리 성능을 가질 수 있다. 이러한 성능들은 매우 작은 부피의 샘플을 사용할 때 거의 임의의 종류의 샘플 전처리 및 복잡한 어레이 절차가 효율적으로 수행되게 할 수 있다.
- [0224] 구체적으로, 시스템은 형성된 요소(적혈구 및 백혈구 세포)가 혈장으로부터 분리되게 할 수 있다. 시스템은 형성된 요소의 재현탁을 가능하게 할 수도 있다. 몇몇 실시양태에서, 시스템은 고정되고 용혈된 혈액으로부터 백혈구 세포가 농축되게 할 수 있다. 시스템은 세포의 용해가 핵산을 방출하게 할 수도 있다. 몇몇 실시양태에서, (전형적으로 비드 형태의) 고체 상 시약(예를 들면, 실리카)로 팩킹된 팁을 통한 여과에 의한 핵산의 정제 및 농축이 시스템에 의해 가능해질 수 있다. 시스템은 고체 상 추출 후 정제된 핵산의 용출을 허용할 수도 있다. 침전물(예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 침전시킨 LDL-콜레스테롤)의 제거 및 수집도 시스템에 의해 가능해질 수 있다.
- [0225] 몇몇 실시양태에서, 시스템은 친화성 정제를 가능하게 할 수 있다. 소분자, 예컨대, 비타민-D 및 세로토닌을 비드 형태(미립자)의 소수성 기관 상에 흡착시킨 후 유기 용매를 사용하여 용출할 수 있다. 항원을 항체-코팅된 기관 상에 제공하고 산으로 용출할 수 있다. 동일한 방법을 이용하여 저농도로 발견된 분석물, 예컨대, 트롬복산-B2 및 6-케토-프로스타글란딘 F1 α 를 농축할 수 있다. 항원을 항체 또는 애포타머(aptamer)-코팅된 기관 상에

제공한 후 용출할 수 있다.

- [0226] 몇몇 실시양태에서, 시스템은 어세이 전에 분석물의 화학적 변경을 가능하게 할 수 있다. 예를 들면, 세로토닌 (5-하이드록시트립타민)을 분석하기 위해, 시약(예컨대, 아세트산 무수물)을 사용하여 분석물을 유도체(예컨대, 아세틸화된 형태)로 전환시키는 것이 필요할 수 있다. 이것은 항체에 의해 인식될 수 있는 형태의 분석물을 생성하기 위해 수행될 수 있다.
- [0227] 피펫(진공 흡입 및 펌핑)을 이용하여 액체를 이동시킬 수 있다. 피펫은 상대적으로 낮은 양의 압력 및 음의 압력(대략 0.1 대기압 내지 2.0 대기압)으로 한정될 수 있다. 액체를 비드 형태의 고체 상 매질에 통과시킬 필요가 있는 경우 원심분리기를 이용하여 훨씬 더 높은 압력을 발생시킬 수 있다. 예를 들면, 10,000 rpm의 속도에서 5 cm의 반경을 갖는 로터를 이용하여, 액체를 저항성 매질, 예컨대, 팩킹된 층에 통과시키기에 충분한 약 5,000 x g(약 7 대기압)의 힘을 발생시킬 수 있다. 본원의 임의의 부분에 논의되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 임의의 원심분리기 디자인 및 입체구조가 이용될 수 있다.
- [0228] 매우 작은 부피의 혈액을 사용하는 헤마토크릿의 측정이 일어날 수 있다. 예를 들면, 저렴한 디지털 카메라는 명암대비가 약한 경우조차도 작은 물체의 우수한 영상을 만들 수 있다. 본 발명의 시스템은 이러한 성능을 이용하여 매우 작은 부피의 혈액을 사용하는 헤마토크릿의 자동화된 측정을 가능하게 할 수 있다.
- [0229] 예를 들면, 1 μ l의 혈액을 마이크로캡 유리 모세관 내로 추출할 수 있다. 그 후, 상기 모세관을 경화가능한 접착제로 밀폐시킨 후 10,000 x g에서 5분 동안 원심분리시킬 수 있다. 팩킹된 세포 부피를 용이하게 측정할 수 있고, 혈장 메니스커스(화살표로 표시됨)도 헤마토크릿을 정확하게 측정할 수 있을 정도로 가시화될 수 있다. 이것은 시스템이 이 측정을 수행하기 위해 상대적으로 큰 부피의 혈액을 낭비하지 않게 할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 현미경을 작동시키지 않으면서 카메라를 "있는 그대로" 사용하여 보다 더 큰 영상을 만들 수 있다. 다른 실시양태에서, 현미경 또는 다른 광학 기법을 이용하여 영상을 확대할 수 있다. 한 실시에서, 추가 광학 간섭 없이 디지털 카메라를 이용하여 헤마토크릿을 측정할 수 있고, 측정된 헤마토크릿은 많은 μ l의 샘플을 요구하는 통상적인 마이크로헤마토크릿 실험실 방법에 의해 측정된 헤마토크릿과 동일하였다. 몇몇 실시양태에서, 샘플 컬럼의 길이 및 팩킹된 적혈구 세포의 컬럼의 길이를 매우 정밀하게($\pm < 0.05$ mm) 측정할 수 있다. 혈액 샘플 컬럼이 약 10 mm 내지 20 mm일 수 있다는 것을 고려하면, 헤마토크릿의 표준 편차는 표준 실험실 방법에 의해 수득된 1% 일치보다 훨씬 더 우수할 수 있다.
- [0230] 시스템은 적혈구 침강률(ESR)의 측정을 가능하게 할 수 있다. 매우 작은 거리 및 거리의 변화율을 측정하는 디지털 카메라의 능력을 활용하여 ESR을 측정할 수 있다. 일례에서, 3개의 혈액 샘플(15 μ l)을 "반응 팁" 내로 흡입하였다. 영상을 2분 간격으로 1시간에 걸쳐 포착하였다. 영상 분석을 이용하여 적혈구 세포와 혈장 사이의 계면의 이동을 측정하였다. 도 122는 혈장 메니스커스로부터의 계면의 거리로서 결과를 보여준다.
- [0231] 데이터를 다항 함수에 피팅하고 (모든 샘플에 대해) 데이터와 피팅된 곡선 사이의 차이의 표준 편차를 계산함으로써 측정의 정밀도를 평가할 수 있다. 상기 예에서, 이것은 1시간에 걸쳐 이동된 거리와 관련될 때 0.038 mm 또는 $< 2\%$ CV인 것으로 확인되었다. 따라서, ESR은 이 방법에 의해 정밀하게 측정될 수 있다. 또 다른 ESR 측정 방법은 거리 대 시간 관계의 최대 기울기를 측정하는 것이다.
- [0232] **어세이 준비**
- [0233] 몇몇 실시양태에서, 팁은 복수의 반응들 또는 어세이들을 수용하도록 디자인될 수 있다. 여러 상이한 어세이 혼합물들 및 하나 이상의 대조군 또는 하나 이상의 고정제의 동시 측정을 본 발명의 한 팁 내에서 수행할 수 있다. 이를 수행함에 있어서, 본 발명자들은 액체를 동일한 팁 내로 순차적으로 흡입함으로써 여러 액체 공급원들을 샘플링하는 능력을 활용하였다. 작은 부피의 공기, 및 관심 있는 다음 액체의 흡입 전에 팁의 표면을 세척하는 작은 부피의 세척 용액을 순차적으로 흡입함으로써 액체의 효과적인 침강 및 분리를 크게 개선한다.
- [0234] 전술된 바와 같이, 팁은 원추 형태를 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 어세이는 반응물로서 산소를 요구할 수 있다. 이러한 반응에서, 샘플 및/또는 어세이 혼합물을 팁의 넓은 부분으로 이동시켜 표면적 대 부피 비를 증가시킴으로써 반응 내의 산소의 이용가능성을 증가시키는 것을 달성할 수 있다.
- [0235] 도 93 및 도 94에서, 브로모페놀 블루 용액을 팁 내로 흡입하였다. 가장 위에 있는 부분(먼저 흡입됨) 6 μ l는 2 배 희석 시리드로부터 수득된다(물 블랭크인 가장 좌측의 팁을 제외하고 영상의 우측에 대한 최대 농도(0.0781 mg/ml)). 그 다음, 공기(2 μ l) 및 세척 용액(2 μ l) 각각을 흡입한 후 6 μ l 부피의 고정된 농도 대조군 용액(0.625 mg/ml)을 흡입하였다.

[0236] 이 방법을 이용하여 여러 대안적 어세이 구성, 예를 들면, 하기 구성을 달성할 수 있다:

[0237] 1. 시약 및/또는 샘플 블랭크 및 어세이의 동시 측정;

[0238] 2. 샘플, 블랭크 및 대조군의 동시 측정; 및

[0239] 3. 어세이의 팁 내 교정

[0240] 하기 표는 어세이, 대조군 및 교정제의 바람직한 조합이 한 팁 내에서 조립되는 몇몇 "다중체 종류"를 보여준다.

다중체 종류	대역 #										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	상부										기저부
대조군을 사용하는 어세이	공기	대조군1	공기	세척	공기	어세이	공기	세척	대조군2		
3종의 어세이	공기	어세이1	공기	세척	공기	어세이2	공기	세척	공기	어세이3	공기
교정 시리즈	공기	교정제1	공기	세척	공기	교정제2	공기	세척	공기	교정 3	공기
블랭크를 사용하는 어세이	공기	어세이	공기	세척	공기	블랭크	공기				

[0241]

[0242] 경우 2는 도 95에 나타나 있다.

[0243] 블랭크 용액, 샘플, 대조군 및 교정제의 연속 측정도 단일 팁을 사용하여 수행할 수 있다. 이 시나리오에서, 팁을 제1 용액으로 충전시키고 판독한 후 비운다. 그 다음, 팁을 다른 샘플들 등으로 순차적으로 재충전시키고 판독할 수 있다. 한 샘플로부터 다음 샘플로의 착색된 생성물의 "전달" 효과는 하기 1 및 2 중 어느 하나 또는 둘다에 의해 최소화된다:

[0244] 1. 이전 샘플과 먼저 접촉하는 부분으로부터 멀리 떨어져 있는 중간 부분에서 액체 컬럼을 판독한다.

[0245] 2. 샘플들 사이에 팁을 세척한다.

[0246] 한 액체 부분으로부터 다음 액체 부분으로 "전달된" 정도를 측정하기 위해, 하기 절차를 수행하였다. 소량(예를 들면, 6 μl)의 고농도 브로모페놀 블루(예를 들면, 0.625 mg/ml)를 팁 내로 흡입한 후 2 μl 의 공기 및 2 μl 의 세척 용액을 흡입하였다. 하기 결과를 이용하여 최종적으로 브로모페놀 블루의 연속 2배 희석물 6 μl 를 흡입한다(우측에 대한 최고 농도(0.0781 mg/ml); 가장 좌측의 팁은 물 블랭크임).

[0247] 도 96에 나타난 영상 및 도 97에 나타난 3색 분석으로부터 알 수 있는 바와 같이, 측정가능한 양의 고농도 용액을 세척 용액에 전달한다.

[0248] (고농도 대조군으로부터 물 세척물로의) 평균 전달은 1.4%로 계산된다. 사실상, 액체의 추후 슬러그(slug)의 선두(leading) 대역(가장 초기의 슬러그에 근접함)이 제2 세척 단계로서 작용하고 색채 판독이 이 선두 대역으로부터 떨어져 있는 위치에서(전형적으로 상기 슬러그의 중심 대역에서) 수행되기 때문에, 한 슬러그로부터 다음 슬러그로의 효과적인 전달은 전형적으로 1%보다 훨씬 낮으므로 일반적으로 의미가 없다. 팁을 충전시키기 위해 희석 시리즈 샘플만을 사용하여 희석 시리즈를 측정하는 경우, 결과는 상기 수득된 결과와 동일하다. 상기 시험은 전달 정도를 평가하도록 디자인된 "응력 시험"을 대표한다.

[0249] 도 98은 측정을 위해 팁 내로 흡입된 이온화된 칼슘 Ca^{2+} (상부) 및 마그네슘 Mg^{2+} (하부)에 대한 2종의 상업적으로 입수가 가능한 어세이를 위한 반응 생성물을 함유하는 팁을 보여준다. 이 실험에서 사용된 Ca^{2+} 농도는 0 mg/dl, 2.5 mg/dl, 5 mg/dl, 10 mg/dl, 20 mg/dl 및 40 mg/dl이고, Mg^{2+} 농도는 0 mg/dl, 1.25 mg/dl, 2.5 mg/dl, 5 mg/dl, 10 mg/dl 및 20 mg/dl이다. 2 μl 의 공기, 3 μl 의 세척물 및 추가 4 μl 의 공기를 사용하여 어세이 반응 혼합물(6 μl [Ca^{2+}] 및 4 μl [Mg^{2+}])을 잘 분리한다. 이 방식으로 판독된 각각의 어세이에 대한 결과는 팁 당 1개의 어세이 반응 혼합물만을 가짐으로써 측정된 결과와 본질적으로 동일하다.

[0250] 상기 인지된 바와 같이, 본 발명은 복수의 어세이들의 동시 평가를 허용한다. 동일한 시야에서 많은 어세이 큐벳들의 영상을 만들 수 있다. 구체적으로, 동일한 어세이 큐벳에서 어세이 및 대조군의 동시 평가를 수행할 수 있다. 동일한 어세이 큐벳에서 여러 어세이들의 동시 평가도 수행할 수 있다.

[0251] 반응 환경

- [0252] 시스템은 어세이 또는 어세이 유닛을 가열하고/하거나 어세이 온도를 조절하기 위한 가열 블록을 포함할 수 있다. 어세이 반응의 항온처리 단계에서 열을 사용하여 반응을 촉진하고 항온처리 단계 동안 필요한 지속시간을 단축할 수 있다. 시스템은 본 발명의 어세이 유닛을 수용하도록 구성된 가열 블록을 포함할 수 있다. 가열 블록은 본 발명의 디바이스로부터의 복수의 어세이 유닛들을 수용하도록 구성될 수 있다. 예를 들면, 8종의 어세이들을 디바이스 상에서 실행하고자 하는 경우, 가열 블록은 8개의 어세이 유닛들을 수용하도록 구성될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 어세이 유닛을 이동시키기 위한 수단을 이용하여 어세이 유닛을 가열 블록과 열적으로 접촉하도록 이동시킬 수 있다. 당분야에서 공지되어 있는 가열 수단으로 가열을 수행할 수 있다.
- [0253] **프로토콜 최적화**
- [0254] 샘플을 분석하기 위한 어세이 프로토콜을 다양한 방식으로 최적화할 수 있다. 한 샘플에 대해 다수의 어세이들을 수행해야 하는 경우, 모든 프로토콜을 가장 엄격한 반응 조건으로 최적화할 수 있거나, 각각의 어세이 프로토콜을 특정 어세이의 원하는 성능에 기초하여 최적화할 수 있다.
- [0255] 몇몇 실시양태에서, 단일 프로토콜은 모든 가능한 사용 경우 하에서 시험 요건을 충족시키도록 디자인될 수 있다. 예를 들면, 다중 카트리지에 대한 단일 프로토콜은 상기 카트리지 상에서 모든 시험이 수행되어야 하는 경우(즉, 한정 경우)에 기초하여 특정될 수 있다. 이 프로토콜은 최소한의 시험 요건, 예컨대, 카트리지 상에서의 각각의 시험에 대한 정밀도 및 동적 범위를 충족시키도록 디자인될 수 있다. 그러나, 이 방법은 대안적 사용 경우, 예를 들면, 카트리지 상에서 시험의 서브세트만이 수행되어야 하는 경우에는 차선의 방법일 수 있다. 이들 경우에서, 몇몇 어세이들은 보다 더 많은 샘플을 사용함으로써 민감도 및 정밀도의 관점에서 개선된 성능을 달성할 수 있다. 많은 샘플이 어세이에 할당되는 방법과 어세이 민감도 사이에 거래(trade-off)가 있을 수 있다. 예를 들면, 샘플이 1:100으로 희석되어 있을 때 1 유닛/㎖의 민감도를 갖는 어세이는 희석률이 1:10까지 증가한 경우 0.1 유닛/㎖를 검출할 수 있다. 제한된 샘플 부피를 갖는 다중화된 어세이 시스템에서 보다 더 낮은 희석률을 이용하였을 때의 한 불리한 점은 최소한의 부피를 사용하여 상기 어세이를 수행하는 경우조차도 이 어세이를 위해 요구된 샘플의 분율이 10배까지 증가한다는 점일 수 있다. 마찬가지로, 보다 더 높은 샘플 농도를 이용함으로써 어세이 정밀도를 개선할 수 있다. 예를 들면, 그의 검출 한계에서 (대략) 0.1 흡광도 $\pm$ 0.02(20% 신호 비정밀도)의 신호를 발생시키는 어세이는 생성된 신호가 10배 더 높아 10배 더 낮은 분석물 농도에서 0.1 $\pm$ 0.02 OD의 신호를 제공하고 1.0, $\pm$ 0.02의 신호에서 비정밀도가 단지 2%가 되도록 10배 샘플 농도를 이용함으로써 개선될 수 있다. 이것이 사실인 이유는 (보다 더 낮은 범위의 분석물 농도에서) 전형적으로 어세이 신호가 분석물 농도(및 따라서 샘플 농도)에 정비례하는 반면, 신호 비정밀도가 전형적으로 신호의 제공근과 관련되어 있을 수 있고 분석물 농도(및 샘플 농도)의 제공근만큼 증가하기 때문이다. 따라서, 신호의 변동계수(CV)는 신호의 제공근에 반비례할 수 있으므로, 신호의 10배 증가는 신호 CV의 대략 3배 감소에 상응한다. 농도 CV는 전형적으로 신호 CV와 직접적으로 관련되어 있기 때문에, 농도 CV는 샘플 농도의 증가(감소된 희석)에 따라 감소될 것이다.
- [0256] 프로토콜은 전술된 전형적인, 널리 적용되도록 만든 방법보다는 오히려 특정 사용 경우에 대해 최적화될 수 있다. 예를 들면, 프로토콜은 다중 디바이스에서 수행될 각각의 시험의 정밀도를 향상시키도록 최적화될 수 있다. 더욱이, 몇몇 시험은 최적화를 위해 다른 시험에 비해 상대적으로 우선시될 수 있다. 프로토콜 최적화는 선형적으로 공지된 사용 경우를 위해 사전계산될 수 있다. 프로토콜 최적화는 선형적으로 공지되지 않은 새로운 사용 경우를 위해 실시간으로 수행될 수도 있다. 시스템 검증을 수행하여 사용 경우의 적합성을 파악할 수 있다.
- [0257] 2종의 사용 경우를 비교하는 프로토콜 최적화의 일례가 후술되어 있다. 상기 두 사용 경우에 있어서, 필요한 시험을 실행하기 위해 8 μ l의 희석되지 않은 샘플이 사용될 수 있다. 본 예에서, 다중 카트리지는 탑재된 20종의 시험을 갖고, 이때 상기 시험 중 5종의 시험이 1:5 희석을 필요로 하고, 상기 시험 중 15종의 시험이 1:25 희석을 필요로 한다.
- [0258] 제1 사용 경우에서, 샘플에 대한 모든 시험이 실행될 필요가 있다. 본 사용 경우(사용 경우 B)에서 프로토콜은 다음과 같다:
- [0259] 1) 1:5 희석물(8 μ l 샘플 + 32 μ l 희석제)을 제조한다.
- [0260] 2) 1:25 희석물(15 μ l 1:5 샘플 + 60 μ l 희석제)을 제조한다.
- [0261] 3) 각각의 시험(n = 20)을 위해, 5 μ l의 적절하게 희석된 샘플을 10 μ l의 시약과 혼합한다. 이 프로토콜은 모든 20종의 시험에 대해 최소 요건을 충족시키는 10% CV의 농도 비정밀도를 발생시킨다. 샘플 사용은 각각의 1:5 희석 어세이의 경우 1 μ l이고 각각의 1:25 희석 어세이의 경우 0.2 μ l이다(모든 사용가능한 샘플을 사용할 때 총

$$5 \times 1 + 15 \times 0.2 = 8 \mu\text{l}).$$

- [0262] 동일한 종류의 카트리지를 사용하는 제2 사용 경우(사용 경우 "B")에서, 샘플을 위해 모든 20종의 시험이 아니라 10종의 시험만이 실행될 필요가 있다. 나아가, 모든 이들 10종의 시험은 사용 경우 A에서의 1:25 희석 수준에서 수행될 것이다. 보다 더 낮은 희석(1:5)을 이용하여 모든 시험에 대한 정밀도를 최대화하기 위해 이 사용 경우에 대한 프로토콜을 최적화한다. 이 특정 사용 경우에 대한 최적화된 프로토콜은 다음과 같다:
- [0263] 1) 1:5 희석물(8 μl 샘플 + 32 μl 희석제)을 제조한다.
- [0264] 2) 각각의 시험(n = 10)에 대해 4 μl 의 희석된 샘플을 11 μl 의 시약과 혼합한다.
- [0265] 샘플 사용은 총 8 μl 에 대해 어세이 당 0.8 μl 의 희석되지 않은 샘플이다. 어세이에서 샘플 농도가 사용 경우 A의 샘플 농도에 비해 상대적으로 5배까지 증가하기 때문에, 어세이 민감도는 5배까지 개선되고, 어세이 비정밀도는 약 $2.4(5^{0.5})$ 배 내지 약 4.5%까지 감소한다.
- [0266] 프로토콜을 다시 최적화함으로써, 사용 경우 B에서 각각의 시험에 대해 5배 더 많은 원래의 샘플을 사용하여 전체 성능을 개선한다. 상기 논의는 부피 계측의 오차로 인한 임의의 비정밀도를 설명하지 않고 광학 신호의 측정의 비정밀도로 인한 오차만을 다룬다는 것을 주목한다. 사용 경우 B는 더 적은 피펫팅 단계를 이용하기 때문에 부피의 비정밀도로 인한 보다 더 낮은 비정밀도를 가질 것이다. 예를 들면, 부피 비정밀도가 상기 두 사용 경우에서 보고된 분석물 농도의 5% 비정밀도를 도입하는 경우, (어세이에서 비정밀도를 야기하는 요인들이 비정밀도의 각각의 원인의 제곱의 합의 제곱근으로서 합쳐진다고 가정할 때(일반적으로 사실임)) 사용 경우 B에서 $6.5\%(4.5^2 + 5^2)^{0.5}$ 에 비해 사용 경우 A에서 $11.2\%(10^2 + 5^2)^{0.5}$ 의 총 분석물 비정밀도가 존재할 것이다.
- [0267] 전술된 효과는 어세이 신호가 단위 시간 당 방사된 광자의 수로서 표현되는 발광-기초 어세이의 경우에서 보다 더 용이하게 관찰될 수 있다. 예를 들면, 방사면역어세이에서 방사성 방사를 카운팅하는 경우에서와 같이, 신호 비정밀도는 신호의 제곱근과 동일하므로 신호 CV는 $100/(\text{신호의 제곱근})$ 이다. 예를 들면, 10,000 카운트의 신호는 1%의 CV를 가질 것이다. 광자를 생성하는 많은 어세이들(예를 들면, 화학발광 면역어세이)에서, 신호는 적어도 보다 더 낮은 농도 범위에서 분석물 농도에 거의 정확하게 비례한다. 따라서, 측정된 분석물 비정밀도는 검출 한계를 상당히 초과하는 농도에 대해 $1/(\text{신호의 제곱근})$ 의 크기를 갖는다. 따라서, 샘플의 희석물을 사용하는 어세이에서, 측정된 분석물 비정밀도는 $1/(\text{샘플 희석})$ 의 크기를 가질 것이다. 예를 들면, 샘플의 1:100 희석물을 사용하는 어세이는 1:10 희석물을 사용하는 어세이보다 약 3.2배($10^{0.5}$) 더 높은 신호 및 농도 CV를 가질 것이다(그리고 약 10배 더 높은 민감도를 가질 것이다).
- [0268] **화학반응**
- [0269] 다양한 어세이들을 본 발명에 따른 유체 디바이스 상에서 수행하여 샘플 중의 관심 있는 분석물을 검출할 수 있다. 표지가 어세이에서 사용되는 경우, 본 어세이를 수행하는 데에 사용될 수 있는, 당분야에서 입수가 가능한 매우 다양한 표지들로부터 선택할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 표지는 분광학적 수단, 광화학적 수단, 생화학적 수단, 전기화학적 수단, 면역화학적 수단 또는 다른 화학적 수단에 의해 검출될 수 있다. 예를 들면, 유용한 핵산 표지는 형광 염료, 전자-조밀 시약 및 효소를 포함한다. 생물학적 성분을 표지하기에 적합한 매우 다양한 표지들이 공지되어 있고 과학 문헌 및 특허 문헌 둘다에서 광범위하게 보고되어 있고 생물학적 성분을 표지하기 위해 본 발명에 일반적으로 적용될 수 있다. 적합한 표지는 효소, 형광 잔기, 화학발광 잔기, 생물발광 표지 또는 착색된 표지를 포함한다. 어세이 특이성을 한정하는 시약은 임의적으로 예를 들면, 단일클론 항체, 다중클론 항체, 앵타머, 단백질, 핵산 프로브 또는 다른 중합체, 예컨대, 친화성 매트릭스, 탄수화물 또는 지질을 포함한다. 검출은 형광 또는 발광 마커의 분광광도측정 추적 또는 광학적 추적, 또는 크기, 전하 또는 친화성에 기초하여 분자를 추적하는 다른 방법을 포함하는 다양한 공지된 방법들 중 임의의 방법에 의해 진행될 수 있다. 검출가능한 잔기는 검출가능한 물리적 또는 화학적 성질을 갖는 임의의 물질일 수 있다. 이러한 검출가능한 표지는 겔 전기영동, 컬럼 크로마토그래피, 고체 기판, 분광학적 기법 등의 분야에서 잘 개발되어 있고, 일반적으로 이러한 방법들에서 유용한 표지는 본 발명에 적용될 수 있다. 따라서, 표지는 분광학적 수단, 광화학적 수단, 생화학적 수단, 면역화학적 수단, 핵산 프로브-기초 수단, 전기적 수단, 광학 열적 수단 또는 다른 화학적 수단에 의해 검출될 수 있는 임의의 조성을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0270] 몇몇 실시양태에서, 표지(예컨대, 착색된 화합물, 플루오르 또는 효소)는 당분야에서 잘 공지되어 있는 방법에 따라 검출될 분자에 직접적으로 또는 간접적으로 커플링된다. 다른 실시양태에서, 표지는 분석물(예컨대, 항체, 핵산 프로브, 앵타머 등)에 대한 수용체에 부착된다. 전술된 바와 같이, 매우 다양한 표지가 사용되고, 이때 표지의 선택은 요구된 민감도, 화합물의 접합의 용이성, 안정성 요건, 이용가능한 기기 및 처리 규정에 의해 좌우

된다. 비방사성 표지는 종종 간접적인 수단에 의해 부착된다. 일반적으로, 분석물에 특이적인 수용체는 신호 발생 잔기에 연결된다. 종종 분석물 수용체는 어댑터 분자(예컨대, 바이오틴 또는 아비딘)에 연결되고, 어댑터 시약 세트는 어댑터 및 분석물에 결합하는 결합 잔기(예컨대, 바이오티닐화된 시약 또는 아비딘)를 포함한다. 분석물은 반응 부위 상의 특정 수용체에 결합한다. 표지된 시약은 분석물이 중심에 있는 샌드위치 복합체를 형성할 수 있다. 또한, 시약은 반응 부위 상의 수용체에 대해 분석물과 경쟁할 수 있거나 분석물에 의해 점유되지 않은 반응 부위 상의 빈 수용체에 결합할 수 있다. 표지는 본질적으로 검출가능하거나 신호 시스템, 예컨대, 검출가능한 효소, 형광 화합물, 화학발광 화합물 또는 화학발광 물질, 예컨대, 발광 기질을 갖는 효소에 결합된다. 다수의 리간드 및 항-리간드를 사용할 수 있다. 리간드가 천연 항-리간드, 예를 들면, 바이오틴, 티록신, 디곡시제닌 및 코티졸을 갖는 경우, 상기 리간드는 표지된 항-리간드와 함께 사용될 수 있다. 대안적으로, 임의의 헵텐성 또는 항원성 화합물이 항체와 함께 사용될 수 있다.

[0271] 표지로서 관심 있는 효소는 주로 하이드롤라제(hydrolase), 특히 포스파타제(phosphatase), 에스테라제(esterase) 및 글리코시다제(glycosidase), 또는 옥시도리덕타제(oxidoreductase), 특히 퍼옥시다제(oxidase)일 것이다. 형광 화합물은 플루오레세인(fluorescein) 및 이의 유도체, 로다민(rhodamine) 및 이의 유도체, 댄실(dansyl) 기, 및 움벨리페론(umbelliferone)을 포함한다. 화학발광 화합물은 디옥세탄, 아크리디늄 에스테르, 루시페린 및 2,3-디하이드로프탈라진디온, 예컨대, 루미놀을 포함한다.

[0272] 표지를 검출하는 방법은 당업자에게 잘 공지되어 있다. 따라서, 예를 들면, 표지가 형광 표지인 경우, 표지는 플루오로크롬을 적절한 파장의 광으로 여기시키고 생성된 형광을 예를 들면, 현미경관찰, 시각적 조사, 사진촬영 필름, 전자 검출기, 예컨대, 디지털 카메라, 전자-커플링된 디바이스(CCD) 또는 광전자증배관 및 광전관의 이용, 또는 다른 검출 디바이스로 검출함으로써 검출될 수 있다. 유사하게, 효소 표지는 효소에 적합한 기질을 제공하고 생성된 반응 생성물을 분광학적으로 또는 디지털 영상화(본 발명의 대상)로 검출함으로써 검출된다. 최종적으로, 단순한 색도측정 표지는 종종 단순히 상기 표지와 관련된 색채를 관찰함으로써 검출된다. 예를 들면, 콜로이드성 금 줄은 종종 분홍색으로 보이는 반면, 염료로 도핑된 다양한 비드는 강하게 착색된다.

[0273] 몇몇 실시양태에서, 검출가능한 신호는 발광 공급원에 의해 제공될 수 있다. 발광은 그의 온도의 상승 이외의 임의의 이유로 광이 물질로부터 방사되는 것을 지칭하기 위해 통상적으로 사용되는 용어이다. 일반적으로, 원자 또는 분자는 이들이 여기된 상태에서 보다 더 낮은 에너지 상태(통상적으로 바닥 상태)로 전이될 때 전자기적 에너지(예를 들면, 광)의 광자를 방사한다. 여기 물질이 광자인 경우, 발광 과정은 광발광 또는 형광으로서 지칭된다. 여기 원인이 전자인 경우, 발광 과정은 전계발광으로서 지칭될 수 있다. 보다 구체적으로, 전계발광은 전자-정공 쌍을 형성하기 위한 전자의 직접적인 주입 및 제거, 및 광자를 방사하기 위한 전자-정공 쌍의 후속 재조합으로부터 발생된다. 화학반응으로부터 발생되는 발광은 통상적으로 화학발광으로서 지칭된다. 살아있는 유기체에 의해 생성된 발광은 통상적으로 생물발광으로서 지칭된다. 광발광이 회전 허용 전이(예를 들면, 단일항-단일항 전이, 삼중항-삼중항 전이)의 결과인 경우, 광발광 과정은 통상적으로 형광으로서 지칭된다. 전형적으로, 형광 방출은 여기 원인이 이러한 회전 허용 전이를 통해 신속히 이완할 수 있는 짧은 수명의 여기된 상태의 결과로서 제거된 후에 지속되지 않는다. 광발광이 회전 금지 전이(예를 들면, 삼중항-단일항 전이)의 결과인 경우, 광발광 과정은 통상적으로 인광으로서 지칭된다. 전형적으로, 인광 방사는 여기 원인이 이러한 회전 금지 전이를 통해서만 이완할 수 있는 긴 수명의 여기된 상태의 결과로서 제거된 후에 오래 지속된다. 발광 표지는 전술된 성질 중 어느 한 성질을 가질 수 있다.

[0274] 적합한 화학발광 공급원은 화학반응에 의해 전자적으로 여기된 후 검출가능한 신호로서 작용하거나 에너지를 형광 수용체에게 공여하는 광을 방사할 수 있는 화합물을 포함한다. 다양한 수의 화합물 패밀리가 다양한 조건 하에서 화학발광을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 한 화합물 패밀리는 2,3-디하이드로-1,4-프탈라진디온이다. 빈번하게 사용되는 화합물은 5-아미노 화합물인 루미놀이다. 상기 패밀리의 다른 구성원은 5-아미노-6,7,8-트리메톡시 유사체 및 디메틸아미노[ca]벤즈 유사체를 포함한다. 이들 화합물들은 알칼리성 과산화수소 또는 차아염소산칼슘 및 염기에 의해 발광하도록 만들어질 수 있다. 또 다른 화합물 패밀리는 모 생성물에 대한 일반 명칭이 로핀(lophine)인 2,4,5-트리페닐이미다졸이다. 화학발광 유사체는 파라-디메틸아미노 및 파라-메톡시 치환기를 포함한다. 화학발광은 염기성 조건 하에서 옥살레이트, 통상적으로 옥살릴 활성 에스테르, 예를 들면, p-니트로페닐 및 과산화물, 예컨대, 과산화수소에 의해 수득될 수도 있다. 마찬가지로 공지되어 있는 다른 유용한 화학발광 화합물은 N-알킬 아크리디늄 에스테르 및 디옥세탄을 포함한다. 대안적으로, 루시페린은 루시페라제 또는 루시게닌과 함께 사용되어 생물발광을 제공할 수 있다. 특히 바람직한 화학발광 공급원은 "발광" 효소 기질, 예컨대, 디옥세탄-포스페이트 에스테르이다. 이들은 발광하지 않고, 포스파타제, 예컨대, 알칼리성 포스파타제가 작용하였을 때 발광 생성물을 생성한다. 효소에 대한 발광 기질의 사용은 효소가 초 당 수천 개의 기질 분자

를 생성물로 전환시킬 수 있는 증폭제로서 작용하기 때문에 특히 바람직하다. 신호(광)가 PMT의 사용을 통해 큰 동적 범위에 걸쳐 매우 민감하게 검출될 수 있기 때문에 발광 방법도 바람직하다.

- [0275] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 분석물은 약물, 전구약물, 약제, 약물 대사물질, 생체마커, 예컨대, 발현된 단백질 및 세포 마커, 항체, 혈청 단백질, 콜레스테롤 및 다른 대사물질, 전해질, 금속 이온, 다당류, 핵산, 생물학적 분석물, 생체마커, 유전자, 단백질, 호르몬 또는 이들의 임의의 조합물을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 분석물은 폴리펩티드, 당단백질, 다당류, 지질 및 핵산의 조합물일 수 있다.
- [0276] 시스템은 다양한 분석물을 검출하고/하거나 정량하는 데에 이용될 수 있다. 예를 들면, 검출될 수 있고/있거나 정량될 수 있는 분석물은 알부민, 알칼리성 포스포타제, ALT, AST, 빌리루빈(직접적), 빌리루빈(총), 혈액 우레아 질소(BUN), 칼슘, 염화물, 콜레스테롤, 이산화탄소(CO₂), 크레아티닌, 감마-글루타미드-트랜스페티다제(GGT), 글로불린, 글루코스, HDL-콜레스테롤, 헤모글로빈, 호모시스테인, 철, 락테이트 데하이드로게나제, 마그네슘, 인, 칼륨, 나트륨, 총 단백질, 트리글리세라이드 및 요산을 포함한다. 이들 분석물들의 검출 및/또는 정량을 광학적 측정, 전기적 측정 또는 임의의 다른 종류의 측정을 이용하여 수행할 수 있다.
- [0277] 특정 질환 또는 특정 질환 단계와 관련된 생체마커가 특히 흥미롭다. 이러한 분석물은 자가면역 질환, 비만, 고혈압, 당뇨병, 신경 및/또는 근육 퇴행성 질환, 심장 질환, 내분비 장애, 대사 장애, 염증, 심혈관 질환, 패혈증, 혈관신생, 암, 알츠하이머병, 운동 합병증 및 이들의 임의의 조합과 관련된 분석물들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0278] 심장, 간, 전립선, 폐, 신장, 골수, 혈액, 피부, 방광, 뇌, 근육, 신경, 및 다양한 질환, 예컨대, 상이한 종류의 암(악성 또는 비전이성), 자가면역 질환, 염증성 또는 퇴행성 질환에 의해 영향을 받는 선택된 조직을 포함하는 신체 조직들 중 하나 이상의 신체 조직에서 변화하는 존재도로 존재하는 생체마커도 흥미롭다.
- [0279] 미생물, 바이러스 또는 클라미디아세에(*Chlamydiae*)를 표시하는 분석물도 흥미롭다. 예시적 미생물은 세균, 바이러스, 진균 및 원생동물을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 본 방법에 의해 검출될 수 있는 분석물은 스태피로코커스 에피데르미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 메티실린 내성 스태피로코커스 아우레우스(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)(MSRA), 스태피로코커스 아우레우스, 스태피로코커스 호미니스(*Staphylococcus hominis*), 엔테로코커스 파칼리스(*Enterococcus faecalis*), 슈도모나스 애틀리노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스태피로코커스 캡티스(*Staphylococcus capitis*), 스태피로코커스 와르네리(*Staphylococcus warneri*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 스태피로코커스 시뮬란스(*Staphylococcus simulans*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*) 및 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)로 이루어진 비한정적 군으로부터 선택된 혈액 유래의 병원체도 포함한다.
- [0280] 본 방법에 의해 검출될 수 있는 분석물은 임질(네이세리아 고노르호에애(*Neisseria gonorrhoeae*)), 매독(트레포네나 팔리둠(*Treponema pallidum*)), 클라미디아(클라미다 트라코미티스(*Chlamydia trachomatis*)), 비임균성 요도염(우레아플라즈마 우레알리티쿰(*Ureaplasma urealyticum*)), 효모 감염(캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)), 무른게양(헤모필러스 듀크레이(*Haemophilus ducreyi*)), 트리코모나스증(트리코모나스 바지날리스(*Trichomonas vaginalis*)), 생식기 헤르페스(HSV I형 및 II형), HIV I, HIV II 및 간염 A, B, C, G, 및 TTV에 의해 야기된 감염으로부터 선택된 다양한 성적으로 전염되는 질환들도 포함한다.
- [0281] 본 방법에 의해 검출될 수 있는 추가 분석물은 슈도모나스 애틀리노사, 메티실린 내성 스태피로코커스 아우레우스(MSRA), 클렙시엘라 뉴모니아, 헤모필러스 인플루엔자, 스태피로코커스 아우레우스, 스테노트로포모나스 말토틸리아(*Stenotrophomonas maltophilia*), 헤모필러스 파라인플루엔자, 에스케리키아 콜라이, 엔테로코커스 파칼리스, 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*), 헤모필러스 파라헤모라이티커스(*Haemophilus parahaemolyticus*), 엔테로코커스 클로아카(*Enterococcus cloacae*), 캔디다 알비칸스, 모락시엘라 카타르할리스(*Moraxiella catarrhalis*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 시트로박터 프레운디이(*Citrobacter freundii*), 엔테로코커스 파시움(*Enterococcus faecium*), 클렙셀라 옥시토카(*Klebsella oxytoca*), 슈도모나스 플루오르센스(*Pseudomonas fluorescens*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 스트렙토코커스 피오케네스(*Streptococcus pyogenes*), 뉴모시스티스 카리니이(*Pneumocystis carinii*), 클렙셀라 뉴모니아(*Klebsella pneumoniae*), 레기오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 마이코플라스마 뉴모니아(*Mycoplasma pneumoniae*) 및 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 호흡기 병원체를 포함한다.

- [0282] 본 발명에 따른 추가 예시적 마커가 하기에 나열되어 있다: 테오피린(Theophylline), CRP, CKMB, PSA, 미요글로빈(Myoglobin), CA125, 프로게스테론, TxB2, 6-케토-PGF-1-알파 및 테오피린, 에스트라디올, 황체형성 호르몬, 트리글리세라이드, 트립타제(Tryptase), 저밀도 지단백질 콜레스테롤, 고밀도 지단백질 콜레스테롤, 콜레스테롤, IGFR.
- [0283] 예시적 간 마커는 LDH, (LD5), 알라닌-아미노트랜스퍼라제(ALT), 아르기나제 1(간 유형), 알파-태아단백질(AFP), 알칼리성 포스파타제, 락테이트 데하이드로게나제 및 빌리루빈을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0284] 예시적 신장 마커는 TNF α 수용체, 시스타틴 C, 리포칼린형 비뇨기 프로스타글란딘 D, 합성효소(LPGDS), 간세포 성장인자 수용체, 폴리스티닌(Polycystin) 2, 폴리스티닌 1, 피브로시스티닌(Fibrocystin), 유로모듈린(Uromodulin), 알라닌, 아미노펩티다제, N-아세틸-B-D-글루코사아미니다제, 알부민 및 레티놀 결합 단백질(RBP)을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0285] 예시적 심장 마커는 트로포닌(Troponin) I(TnI), 트로포닌 T(TnT), 크레아틴 디나제(Creatine dinase)(CK), CKMB, 미요글로빈, 지방산 결합 단백질(FABP), C-반응성 단백질(CRP), 피브리노겐 D-이량체, S-100 단백질, 뇌 나트륨이온 펩티드(BNP), NT-proBNP, PAPP-A, 미엘로퍼옥시다제(Myeloperoxidase)(MPO), 글리코겐 포스포릴라제(phosphorylase) 동종효소 BB(GPBB), 트롬빈 활성화가능한 피브리노겐 억제제(TAFI), 피브리노겐, 허혈 변경 알부민(IMA), 카디오트로핀(Cardiotrophin)-1 및 MLC-I(미오신 경쇄-I)를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0286] 예시적 췌장 마커는 아밀라제(Amylase), 췌장염 관련 단백질(PAP-1) 및 리제너레이테인(Regeneratein) 단백질(REG)을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0287] 예시적 근육 조직 마커는 미오스타틴을 포함하나 이것으로 한정되지 않는다.
- [0288] 예시적 혈액 마커는 에리트로포이에틴(EPO)을 포함하나 이것으로 한정되지 않는다.
- [0289] 예시적 골 마커는 골 I형 콜라겐의 가교결합된 N-텔로펩티드(NTx), 골 콜라겐의 카복시말단 가교결합 텔로펩티드, 라이실-피리디놀린(Lysyl-pyridinoline)(테옥시피리디놀린), 피리디놀린, 주석산염 내성 산 포스파타제, 프로콜라겐 I형 C 프로펩티드, 프로콜라겐 I형 N 프로펩티드, 오스테오칼신(Osteocalcin)(골 gla-단백질), 알칼리성 포스파타제, 카텝신(Cathepsin) K, COMP(연골 올리고머성 매트릭스 단백질), 오스테오크린(Osteocrin), 오스테오프로테제린(Osteoprotegerin)(OPG), RANKL, sRANK, TRAP 5(TRACP 5), 조골세포 특이적 인자 1(OSF-1, 플레이오토트로핀(Pleiotrophin)), 가용성 세포 부착 분자, sTfR, sCD4, sCD8, sCD44 및 조골세포 특이적 인자 2(OSF-2, 페리오스틴(Periostin))을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0290] 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따른 마커는 질환 특이적이다. 예시적 암 마커는 PSA(총 전립선 특이적 항원), 크레아티닌, 전립선 산 포스파타제, PSA 복합체, 전립선 특이적 유전자-1, CA 12-5, 암배아 항원(CEA), 알파 태아단백질(AFP), hCG(인간 융모성 성선자극호르몬), 인히빈(Inhibin), CAA 난소 C1824, CA 27.29, CA 15-3, CAA 유방 C1924, Her-2, 췌장, CA 19-9, CAA 췌장, 신경 특이적 에놀라제, 안지오스타틴 DcR3(가용성 미끼(decoy) 수용체 3), 엔도스타틴, Ep-CAM(MK-1), 자유 면역글로불린 경쇄 카파, 자유 면역글로불린 경쇄 람다, 헤르스타틴(Herstatin), 크로모그라닌(Chromogranin) A, 아드레노메둘린(Adrenomedullin), 인테그린(Integrin), 표피 성장인자 수용체, 표피 성장인자 수용체-티로신 키나제, 프로-아드레노메둘린 N-말단 20 펩티드, 혈관 내피 성장인자, 혈관 내피 성장인자 수용체, 줄기세포 인자 수용체, c-kit/KDR, KDR 및 미드카인(Midkine)을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0291] 예시적 감염성 질환 상태는 바이러스혈증, 세균혈증, 패혈증 및 하기 마커를 포함하나 이들로 한정되지 않는다: PMN 엘라스타제(Elastase), PMN 엘라스타제/ α 1-PI 복합체, 계면활성제 단백질 D(SP-D), HBVc 항원, HBVs 항원, 항-HBVc, 항-HIV, T-억제제 세포 항원, T-세포 항원 비, T-헬퍼 세포 항원, 항-HCV, 발열원, p24 항원, 뮤라밀-디펩티드.
- [0292] 예시적 당뇨병 마커는 C-펩티드, 헤모글로빈 A1c, 당화된 알부민, 진행된 글리코실화 최종 생성물(AGE), 1,5-안하이드로글루시톨, 위 억제 폴리펩티드, 글루코스, 헤모글로빈 A1c, ANGPTL3 및 ANGPTL4를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0293] 예시적 염증 마커는 류마티스 인자(RF), 항-핵 항체(ANA), C-반응성 단백질(CRP) 및 클라라(Clara) 세포 단백질(자궁글로빈(Uteroglobulin))을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0294] 예시적 알레르기 마커는 총 IgE 및 특이적 IgE를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

- [0295] 예시적 자폐증 마커는 세룰로플라스민(Ceruloplasmin), 메탈로티오네인(Metallothioneine), 아연, 구리, B6, B12, 글루타티온, 알칼리성 포스파타제 및 아포(apo)-알칼리성 포스파타제의 활성화를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0296] 예시적 응고 장애 마커는 b-트롬보글로불린, 혈소판 인자 4 및 본 빌레브란트(Von Willebrand) 인자를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0297] 몇몇 실시양태에서, 마커는 치료법 특이적일 수 있다. COX 억제제의 작용을 표시하는 마커는 TxB2(Cox-1), 6-케토-PGF-1-알파(Cox-2) 및 11-데하이드로-TxB-1a(Cox-1)를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0298] 본 발명의 다른 마커는 렙틴(Leptin), 렙틴 수용체 및 프로칼시토닌(Procalcitonin), 뇌 S100 단백질, 물질 P 및 8-이소-PGF-2a를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0299] 예시적 노인의학 마커는 신경 특이적 예놀라제, GFAP 및 S100B를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0300] 영양 상태의 예시적 마커는 프레알부민, 알부민, 레티놀 결합 단백질(RBP), 트랜스페린, 아실화 자극 단백질(ASP), 아디포넥틴(Adiponectin), 아구티(Agouti) 관련 단백질(AgRP), 안지오펜이에틴 유사 단백질 4(ANGPTL4, FIAF), C-펩티드, AFABP(지방세포 지방산 결합 단백질, FABP4), 아실화 자극 단백질(ASP), EFABP(표피 지방산 결합 단백질, FABP5), 글리센틴(Glicentin), 글루카곤, 글루카곤 유사 펩티드-1, 글루카곤 유사 펩티드-2, 그렐린(Ghrelin), 인슐린, 렙틴, 렙틴 수용체, PYY, RELMs, 레시스틴(Resistin) 및 sTfR(가용성 트랜스페린 수용체)을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0301] 지질 대사의 예시적 마커는 아포-지단백질(여러 종류), 아포-A1, 아포-B, 아포-C-II, 아포-D 및 아포-E를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0302] 예시적 응고 상태 마커는 인자 I: 피브리노겐, 인자 II: 프로트롬빈, 인자 III: 조직 인자, 인자 IV: 칼슘, 인자 V: 프로악셀러린(Proaccelerin), 인자 VI, 인자 VII: 프로컨버틴(Proconvertin), 인자 VIII: 항-용혈 인자, 인자 IX: 크리스마스 인자, 인자 X: 스튜어트-프로워(Stuart-Prower) 인자, 인자 XI: 혈장 트롬보플라스틴 전구 물질, 인자 XII: 하게만(Hageman) 인자, 인자 XIII: 피브린 안정화 인자, 프레칼리크레인(Prekallikrein), 고분자량 키니노겐(kininogen), 단백질 C, 단백질 S, D-이량체, 조직 플라스미노겐 활성화제, 플라스미노겐, a2-항-플라스민, 플라스미노겐 활성화제 억제제 1(PAI1)을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0303] 예시적 단일클론 항체는 EGF, ErbB2 및 IGF1R에 대한 항체를 포함한다.
- [0304] 예시적 티로신 키나제 억제제는 Ab1, Kit, PDGFR, Src, ErbB2, ErbB4, EGFR, EphB, VEGFR1-4, PDGFRb, FLt3, FGFR, PKC, Met, Tie2, RAF 및 TrkA를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0305] 예시적 세린/쓰레오닌 키나제 억제제는 AKT, 오로라(Aurora) A/B/B, CDK, CDK(pan), CDK1-2, VEGFR2, PDGFRb, CDK4/6, MEK1-2, mTOR 및 PKC-베타를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0306] GPCR 표적은 히스타민 수용체, 세로토닌 수용체, 안지오텐신 수용체, 아드레노수용체, 무스카린성 아세틸콜린 수용체, GnRH 수용체, 도파민 수용체, 프로스타글란딘 수용체 및 ADP 수용체를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0307] 콜레스테롤
- [0308] 대사물질의 측정은 옥시다제(예컨대, 콜레스테롤 옥시다제)(H₂O₂를 만들기 위함) 및 호스라디쉬 퍼옥시다제 + 발색체(chromogen)(예컨대, 착색된 생성물, 예컨대, 트린더(Trinder) 염료를 형성하기 위한 N-에틸-N-(2-하이드록시-3-설포프로필)-3,5-디메톡시아닐린 나트륨 염["DAOS" + 아미노 항-피렌])를 사용하여 착색된 생성물을 생성함으로써 수행될 수 있다. 이러한 화학반응의 일례는 도 52 및 도 53에 나타나 있다.
- [0309] NADH 또는 NADPH
- [0310] NADH 또는 NADPH의 생성 또는 소비는 임상 어세이에서 빈번히 사용된다. 이것은 이들 보조효소들이 효소에 대한 공통된 기질이기 때문이다. 예를 들면, 임상적으로 관심 있는 효소, 예컨대, 락테이트 데하이드로게나제(LDH)의 측정은 NADH의 생성물에 의해 측정될 수 있다. NADH가 340 nm에서 최대한으로 광을 흡수하고 (1) 폴리스티렌 및 다른 플라스틱이 근자외선에서 광을 약하게 투과시키고 (2) 백색 광원이 근자외선에서 광을 거의 생성하지 않고 (3) 카메라 및 스캐너 센서가 근자외선 광에 대한 낮은 민감도를 갖기 때문에, 3색 영상 분석으로 NADH를 측정하는 것은 실용적이지 않다. 이 문제점을 처리하기 위해, 테트라졸륨 염, 예컨대, 수용성 테트라졸륨(예를

들면, WST-1(도진도 몰레쿨라 테크놀로지스(Dojindo Molecular Technologies)) + "전자 매개자" 예컨대, 1-메톡시페나진 메토설페이트(PMS)를 사용하여 NADH를 착색된 생성물로 전환시킬 수 있다.

[0311] 몇몇 실시양태에서, NADH 또는 NADPH를 생성하거나 소비하는 어세이는 색도측정을 가능하게 하는 다른 반응과 짝을 이룰 수 있다. 예를 들면, 도 54에 나타낸 바와 같이, NADH 또는 NADPH는 페나진 메토설페이트를 전자 매개자로서 사용하여 하기에 나타낸 바와 같이 화합물, 예컨대, 2-(4-요오도페닐)-3-(4-니트로페닐)-5-(2,4-디설포페닐)-2H-테트라졸륨 일나트륨 염(WST-1)을 착색된 포르메잔(formezan) 염료로 환원시키는 데에 사용될 수 있다.

[0312] 도 73에 나타낸 바와 같이, NADH, WST-1 및 PMS가 밀리몰 농도로 조합되는 경우, (표시된 틱에서 혼합물로서 나타낸) 황색 생성물이 형성된다.

[0313] 이 화학반응을 이용하여 LDH에 대한 어세이를 셋업하였다. 락테이트(mM), NAD(mM) 및 LDH를 조합하고 37°C에서 10분 동안 항온처리한 후 WST-1 및 PMS를 첨가하였다. LDH에 대한 우수한 용량 반응은 도 75의 그래프에 나타낸 OD 450 nm 값에 상응하는 LDH(1000 IU/ℓ)의 2배 연속 희석물(좌측에서 우측으로)에 대해 도 74에 나타낸 바와 같이 획득되었다.

[0314] 알칼리성 포스파타제

[0315] 다른 실시양태에서, 효소, 예컨대, 알칼리성 포스파타제를 사용하는 어세이를 발색성 기질, 예컨대, p-니트로페닐 포스페이트를 사용하여 측정할 수 있다. 효소 반응은 알칼리성 조건에서 황색을 나타내는 p-니트로페놀을 만들 수 있다.

[0316] 금속 이온

[0317] 예컨대, 금속 이온과, 결합 시 색채를 변화시키는 킬레이팅 염료 사이에 착색된 착물을 형성하는 어세이에 대한 측정을 수행할 수도 있다. 예를 들면, (도 55에 나타낸) o-크레솔프탈레인 콤플렉손(Cresolphthalein Complexone)은 시약과 상이한 색채를 갖는, 칼슘과의 착물을 형성한다. 이러한 어세이의 일반적 반응식은 다음과 같다: 킬레이팅 염료(색채 1) + M^{N+} <-> 킬레이팅 염료: M^{N+} :(색채 2).

[0318] 금속 의존성 효소를 사용하는 금속 이온 어세이에 대한 광학 신호도 측정될 수 있다. 예를 들면, 나트륨 이온은 o-니트로-페닐 갈락토사이드(ONPG)를 기질로서 사용하는 나트륨 의존성 β-갈락토시다제 활성을 통해 효소적으로 측정될 수 있다. 생성물 o-니트로페놀의 405 nm에서의 흡광도는 나트륨 농도에 비례한다.

[0319] ELISA

[0320] 색채 형성 ELISA로 분석물에 대한 어세이를 수행할 수 있다. 발색성 기질, 예컨대, o-페닐렌 디아민, p-니트로페닐 포스페이트 및 o-니트로페닐 갈락토사이드 각각과 함께 효소, 예컨대, 호스라디쉬 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제 및 β-갈락토시다제를 사용하여 색채를 발생시키는 많은 ELISA 방법들이 공지되어 있다. 이러한 어세이들은 본 발명에 의해 용이하게 수행될 수 있고 판독될 수 있다.

[0321] 발광 면역어세이

[0322] 발광 면역어세이도 수행될 수 있다. 어세이는 발광 기질과 함께 화학발광 물질, 예컨대, 효소를 사용할 수 있다. 예를 들면, 화학발광 화합물은 디옥세탄, 아크리디늄 에스테르, 루시페린 및 2,3-디하이드로프탈라진디온, 예컨대, 루미놀을 포함한다.

[0323] 나아가, 적합한 화학발광 공급원은 화학반응에 의해 전자적으로 여기된 후 검출가능한 신호로서 작용하거나 에너지를 형광 수용체에게 공여하는 광을 방사할 수 있는 화합물을 포함한다. 다양한 수의 화합물 패밀리가 다양한 조건 하에서 화학발광을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 한 화합물 패밀리는 2,3-디하이드로-1,4-프탈라진디온이다. 빈번하게 사용되는 화합물은 5-아미노 화합물인 루미놀이다. 상기 패밀리의 다른 구성원은 5-아미노-6,7,8-트리메톡시 유사체 및 디메틸아미노[ca]벤즈 유사체를 포함한다. 이들 화합물들은 알칼리성 과산화수소 또는 차아염소산칼슘 및 염기에 의해 발광하도록 만들어질 수 있다. 또 다른 화합물 패밀리는 모 생성물에 대한 일반 명칭이 로핀인 2,4,5-트리페닐이미다졸이다. 화학발광 유사체는 파라-디메틸아미노 및 파라-메톡시 치환기를 포함한다. 화학발광은 염기성 조건 하에서 옥살레이트, 통상적으로 옥살릴 활성 에스테르, 예를 들면, p-니트로페닐 및 과산화물, 예컨대, 과산화수소에 의해 획득될 수도 있다. 마찬가지로 공지되어 있는 다른 유용한 화학발광 화합물은 N-알킬 아크리디늄 에스테르 및 디옥세탄을 포함한다. 대안적으로, 루시페린은 루시페라제 또는 루시게닌과 함께 사용되어 생물발광을 제공할 수 있다.

- [0324] **핵산 증폭**
- [0325] 수행될 수 있는 어세이는 핵산 증폭도 포함한다. 이들 어세이들의 예로는 등온 증폭 및 루프 매개 등온 증폭 어세이(LAMP)가 있다. 핵산 증폭은 분석물, 예컨대, 핵산 표적(유전자 등)을 위한 시간적으로 탁한, 형광 또는 착색된 어세이 반응 생성물을 생성하는 데에 이용될 수 있다. 핵산 증폭 기술은 특이적 DNA 및 RNA 표적의 등온 증폭을 위해 이용될 수 있다. 등온 핵산 증폭에 대한 추가 정보는 문헌(Goto et al., "Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue", BioTechniques, Vol. 46, No. 3, March 2009, 167-172)에 기재되어 있다.
- [0326] 핵산 증폭은 DNA를 측정하는 데에 이용될 수 있고 역전사 효소의 사용과 커플링되어 RNA를 측정하는 데에 이용될 수 있다. 일단 반응이 일어나면, 증폭의 부생성물로서 발생된 방출된 피로포스페이트와 반응하는 인터칼레이팅 염료 또는 발색성 시약을 사용하여 증폭된 생성물을 광학적으로 검출할 수 있다.
- [0327] 반응은 색채, 형광도 또는 탁도의 변화(증가)에 의해 가시화될 수 있다. 매우 작은 카피 수의 DNA가 1시간 미만의 시간 이내에 검출될 수 있다. 3색 영상 분석을 이용하여 본 발명에서 이 기술을 유리하게 판독할 수 있다. 하기에 나타낸 바와 같이, 등온 핵산 증폭 어세이 반응 생성물의 영상은 광의 흡광도를 측정하는 역광(back lit)-조명(투과 광학), (2) 디지털 카메라에 의해 포착된, 반응 생성물을 관통하여 투과된 광의 영상 또는 (3) 디지털 카메라에 의해 포착된, UV 공급원(또는 임의의 다른 적절한 광원)을 사용한 반응 생성물의 조명에 의해 발생된 형광성 광 영상에 의해 측정될 수 있다.
- [0328] 핵산 증폭 어세이는 일반적으로 샘플과 시약이 밀폐된 튜브 내에서 조합되고 승온에서 항온처리되는 "1-용기(pot)" 포맷으로 수행된다. 몇몇 포맷에서, 반응은 광학 성질의 변화에 의해 실시간으로 모니터링될 수 있다. 다른 어세이 포맷에서, 반응은 중단되고, 반응 생성물은 발색성 또는 형광성 시약의 첨가 후에 가시화된다. 본 발명은 반응 용기에서 직접적으로 또는 본원에 기재된 팁 내로의 흡입 후에 핵산 증폭 어세이 생성물의 판독을 허용한다.
- [0329] **탁도**
- [0330] 본 발명은 광학 탁도측정 어세이도 제공한다. 예를 들면, 작은 라텍스 입자(50 nm 내지 300 nm)의 응집을 측정하여 면역어세이를 셋업할 수 있다. 이들 어세이들에서, 상기 입자를 항원 및/또는 항체로 코팅할 수 있고, 응집은 샘플 중의 결합 상대방, 예컨대, 항체 또는 항원이 첨가될 때 일어난다. 어세이는 직접적 모드(예를 들면, 다중 에피토프 단백질 또는 생체마커와 반응하는 입자 상의 항체) 또는 경쟁적 모드(예를 들면, 입자 상의 약물 합텐이 샘플 중의 자유 약물과 경쟁하는 항-약물 항체와 반응함)로서 셋업될 수 있다. 라텍스의 분산액은 보다 더 탁해지고, 탁도는 3색 광학소자의 이용에 의해 광의 감소된 투과율로서 측정될 수 있다.
- [0331] 유사하게, 큰 라텍스 입자(직경 약 1 μm) 또는 적혈구 세포의 응집에 기초한 어세이가 측정될 수 있다. 어세이 구성은 상기 개시된 탁도측정 어세이와 유사하나, 측정은 응집물의 수 및 크기를 해석하기 위한 소프트웨어를 사용하는 영상 분석(스캐너 또는 카메라 측정)에 의해 달성될 수 있다.
- [0332] 화학반응을 수행하기 위한 시약은 본원에 기재된 카트리지, 예컨대, 피펫 팁 내에 포함될 수 있다. 상기 시약은 액체로서 저장될 수 있거나 건조된, 동결건조된 또는 유리질 형태로서 저장될 수 있다.
- [0333] **국소화된 시약**
- [0334] 몇몇 실시양태에서, 반응 부위의 위치 및 입체구조는 어세이 디바이스에서 중요한 요소이다. (전부는 아니지만) 대부분의 일회용 면역어세이 디바이스가 상기 디바이스의 일체형 부분으로서 그들의 포획 표면을 갖도록 구성되어 있다.
- [0335] 한 실시양태에서, 성형된 플라스틱 어세이 유닛은 상업적으로 입수될 수 있거나 정밀한 형태 및 크기를 갖도록 사출 성형에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 특징적인 치수는 0.05 mm 내지 3 mm의 직경일 수 있거나 3 mm 내지 30 mm의 길이일 수 있다. 마이크로타이터 플레이트를 코팅하는 데에 이용된 방법과 유사하되, 상기 유닛을 큰 용기 내에 배치하고 코팅 시약을 첨가하고 체(sieve), 홀더 등을 이용하여 프로세싱하여 조각을 회수하고 필요에 따라 이들을 세척함으로써 상기 유닛을 대량으로 프로세싱할 수 있다는 장점을 갖는 방법을 이용하여 상기 유닛을 포획 시약으로 코팅할 수 있다.
- [0336] 어세이 유닛(예를 들면, 본원에 개시된 팁, 팁, 용기 또는 임의의 다른 용기를 포함함)은 반응물이 고정될 수 있는 강성 지지체를 제공할 수 있다. 또한, 어세이 유닛은 광과의 상호작용에 대해 적절한 특성을 제공하도록

선택된다. 예를 들면, 어세이 유닛은 물질, 예컨대, 작용화된 유리, Si, Ge, GaAs, GaP, SiO₂, SiN₄, 변경된 실리콘, 또는 매우 다양한 겔 또는 중합체 중 어느 하나, 예컨대, (폴리)테트라플루오로에틸렌, (폴리)비닐리덴디플루오라이드, 폴리스티렌, 폴리카보네이트, 폴리프로필렌, 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA), 아크릴로니트릴-부타디엔-스티렌(ABS) 또는 이들의 조합물로 만들어질 수 있다. 한 실시양태에서, 어세이 유닛은 폴리스티렌을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 어세이 유닛은 균질한 물질, 불균질한 물질, 피복된 물질, 코팅된 물질, 함침된 물질 및/또는 포매된 물질로부터 형성될 수 있다. 다른 적합한 물질이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 투명 반응 부위가 유리할 수 있다. 추가로, 광이 광학 검출기에 도달할 수 있게 하는 광학적 투과 창이 있는 경우, 표면은 유리하게는 불투명성 및/또는 바람직하게는 광 산란성을 나타낼 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 어세이 유닛은 투명한 물질로부터 형성될 수 있다. 대안적으로, 어세이 유닛의 부분은 투명한 물질로부터 형성될 수 있다.

[0337] 어세이 유닛은 그 위에 코팅되어 있고/있거나 그 내부에 함침되어 있는 시약을 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 시약은 반응물을 포획 표면에 고정시킬 수 있는 포획 시약일 수 있다. 반응물은 세포 및/또는 분석물, 또는 본원의 임의의 부분에 기재된 임의의 다른 반응물일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 시약은 세포 포획 제일 수 있는 분자일 수 있다. 세포 포획제는 유체 수송 동안 원하는 세포의 표면에 고착될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 포획 시약은 세포막과 상호작용할 수 있는 항체, 펩티드, (예를 들면, 지질 쇄 또는 친유성 분자일 수 있는) 유기 분자, 중합체 매트릭스, 단백질, 단백질 합성물 또는 당단백질일 수 있다. 포획 시약은 분자, 가교결합된 분자, 나노입자, 나노구조체 및/또는 스카폴드(scaffold)일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 용기에서 분석 기작이 될 수 있는 마이크로구조체가 제공될 수 있다. (어세이 유닛 물질에 의해 형성된 포획 구조체를 포함할 수 있는) 포획 시약은 세포가 고착되게 하고/하거나, 결합되게 하고/하거나 포획되게 할 수 있다.

[0338] 포획 시약은 프로세싱 동안 반응물, 예컨대, 세포를 고정시킬 수 있다. 포획 기법은 화학적 기법, 물리적 기법, 전기적 기법, 자기적 기법, 기계적 기법, 크기 관련 기법, 밀도 관련 기법 또는 이들의 임의의 병용일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 포획 시약은 원하는 위치에서 반응물, 예컨대, 세포를 농축하는 데에 사용될 수 있다. 예를 들면, 어세이 유닛은 세포가 어세이 유닛 표면에서 포획되게 하여 포획된 표면 상에서 세포를 농축시킬 수 있는 포획 시약으로 코팅될 수 있다. 포획 시약은 포획된 반응물을 세포 표면 상에서 고정된 상태로 유지할 수 있다. 이것은 영상화 동안 반응물(예를 들면, 세포, 분석물)을 정지 상태로 유지하는 데에 도움을 줄 수 있다.

[0339] 반응물의 고정은 반응 및/또는 검출을 위해 긴 획득 시간이 존재할 수 있는 응용에 있어서 유용할 수 있다. 예를 들면, 다수의 영상화 응용은 연장된 노출 시간(약 1분), 또는 유의한 브라운 운동을 가질 수 있는 작은 물체 (<1 μm)의 영상화를 필요로 할 수 있다.

[0340] 몇몇 실시양태에서, 포획 시약은 영상화에 대한 배경을 거의 또는 전혀 제공할 수 없는 물질로부터 형성될 수 있다. 몇몇 경우, 어세이 유닛의 물질은 영상화에 대한 배경을 거의 또는 전혀 제공할 수 없다. 포획 시약은 이들이 영상화 및/또는 검출을 방해하지 않거나 단지 약간 방해하도록 선택될 수 있다.

[0341] 포획 표면에 고정된 반응물은 체액 샘플 중의 관심 있는 분석물을 검출하는 데에 유용한 임의의 반응물일 수 있다. 예를 들면, 이러한 반응물은 핵산 프로브, 항체, 세포막 수용체, 단일클론 항체, 항혈청, 및 특정 분석물과 반응하는 앵타머를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 다양한 상업적으로 입수가능한 반응물, 예컨대, 특정 분석물을 위해 특이적으로 개발된 다중클론 항체 및 단일클론 항체의 숙주가 사용될 수 있다.

[0342] 당업자는 다양한 반응물을 반응이 일어날 수 있는 지지체 상에 고정시키는 많은 방법들이 존재한다는 것을 인식할 것이다. 고정은 공유 또는 비공유 고정, 링커 잔기를 통한 고정, 또는 반응물을 고정된 잔기에 고착시키는 것일 수 있다. 핵산 또는 단백질성 분자, 예컨대, 항체를 고체 지지체에 부착시키기 위한 비한정적 예시적 결합 잔기는 스트렙타비딘 또는 아비딘/바이오틴 결합, 카바메이트 결합, 에스테르 결합, 아마이드, 티올에스테르, (N)-작용화된 티오우레아, 작용화된 말레이미드, 아마노, 디설파이드, 아마이드, 하이드라존 결합 등을 포함한다. 또한, 당분야에서 공지되어 있는 방법을 이용하여 실릴 잔기를 핵산에 부착시켜 상기 핵산을 기관, 예컨대, 유리에 직접적으로 부착시킬 수 있다. 표면 고정은 표면과의 전하-전하 커플링을 제공하는 폴리-L 라이신 고착제(tether)를 통해 달성될 수도 있다.

[0343] 어세이 유닛은 포획 표면을 도입하는 마지막 단계 후 건조될 수 있다. 예를 들면, 건조는 건조 대기에의 수동 노출 또는 진공 매니폴드(manifold)의 사용 및/또는 매니폴드를 통한 또는 동결건조에 의한 깨끗한 건조 공기의 적용에 의해 수행될 수 있다.

[0344] 임의의 기법을 이용하여 포획 표면을 어세이 유닛에 적용할 수 있다. 예를 들면, 포획 표면은 페인팅될 수 있거나, 프린팅될 수 있거나, 전기분무될 수 있거나, 물질에 포매될 수 있거나, 물질에 함침될 수 있거나, 임의의

다른 기법에 의해 적용될 수 있다. 포획 시약은 어세이 유닛 물질에 코팅될 수 있거나, 상기 물질에 도입될 수 있거나, 상기 물질을 공침투할 수 있거나, 상기 물질로부터 형성될 수 있다. 예를 들면, 시약, 예컨대, 포획 시약은 센서로서 사용될 수 있는 중합체 매트릭스에 포매될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 하나 이상의 소립자, 예컨대, 나노입자, 마이크로입자 및/또는 비드가 시약으로 코팅될 수 있고/있거나 함침될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 포획 시약은 어세이 유닛 물질 자체의 일부일 수 있거나 상기 물질에 첨가되는 물질일 수 있다.

[0345] 많은 실시양태에서, 어세이 유닛은 상기 유닛이 큰 부피의 신속한 제작 과정에서 제작될 수 있도록 디자인된다. 예를 들면, 팁은 팁 내로의 또는 팁 상으로의 포획 표면의 회분 코팅을 위해 대규모 어레이로 탑재될 수 있다. 또 다른 예에서, 팁은 연속 프로세싱을 위해 이동 벨트 또는 회전 테이블 내에 배치될 수 있다. 또 다른 예에서, 팁의 큰 어레이는 단순한 프로세싱을 위해 진공 및/또는 압력 매니폴드에 연결될 수 있다.

[0346] 포획 시약은 과정의 임의의 시점 동안 어세이 유닛에 적용될 수 있다. 예를 들면, 포획 시약은 제작 동안 어세이 유닛에 적용될 수 있다. 포획 시약은 어세이 유닛을 목적으로 운반하기 전에 상기 어세이 유닛에 적용될 수 있다. 대안적으로, 포획 시약은 어세이 유닛이 운반된 후에 상기 어세이 유닛에 적용될 수 있다. 몇몇 경우, 포획 시약은 현장사용, 예컨대, 현장서비스 위치에서 어세이 유닛에 적용될 수 있다.

[0347] 몇몇 실시양태에서, 포획 시약은 어세이 유닛의 전체 표면 또는 영역을 덮을 수 있다. 포획 시약은 어세이 유닛의 내면 상에 제공될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 포획 시약은 어세이 유닛 표면의 부분 또는 구획을 덮을 수 있다. 포획 시약은 표면 상에 패턴으로 제공될 수 있다. 유닛은 그 위에 적용된 포획 시약을 갖는 표면의 부분, 및 그 위에 적용된 포획 시약을 갖지 않는 표면의 부분을 가질 수 있다. 예를 들면, 코팅된 영역 및 비코팅된 영역이 존재할 수 있다. 포획 시약은 포획 시약이 적용되는 방법의 기하학적 선택에 따라 표면에 적용될 수 있다. 예를 들면, 포획 시약은 점, 줄, 컬럼, 어레이, 영역, 원, 고리, 또는 임의의 다른 형태 또는 패턴으로 적용될 수 있다. 포획 시약은 표면 상의 원하는 위치에서 적용될 수 있다.

[0348] 복수의 포획 시약들이 임의적으로 어세이 유닛에 적용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 포획 시약들은 상이한 포획 시약들이 중첩되지 않도록(예를 들면, 상이한 포획 시약들이 동일한 영역 또는 구역에 적용되지 않도록) 적용될 수 있다. 대안적으로, 상기 포획 시약들은 중첩될 수 있다(예를 들면, 상이한 포획 시약들이 동일한 영역 또는 구역에 적용될 수 있다). 임의의 포획 시약을 갖지 않는 공간이 상이한 포획 시약들을 갖는 영역들 사이에 제공될 수 있거나 제공되지 않을 수 있다. 상이한 포획 시약들을 사용하여 상이한 반응물들을 고정시킬 수 있다. 예를 들면, 상이한 포획 시약들을 사용하여 상이한 세포들 및/또는 분석물들을 포획 표면 상에 고정시킬 수 있다. 선택된 영역에서 패턴화된 복수의 포획 시약들을 사용함으로써, 복수의 반응물들을 동일한 어세이 유닛으로부터 탈착시킬 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 7개 이상, 10개 이상, 15개 이상, 20개 이상, 30개 이상, 40개 이상, 50개 이상, 70개 이상, 100개 이상, 150개 이상, 200개 이상 또는 300개 이상의 상이한 포획 시약들이 어세이 유닛의 표면에 적용될 수 있다. 상이한 포획 시약들은 임의의 패턴 또는 형태로 적용될 수 있다. 예를 들면, 상이한 포획 시약들은 어세이 유닛의 내면 상에 고리의 어레이 또는 시리즈로서 적용될 수 있다. 예를 들면, 상이한 포획 시약들은 팁, 관, 용기, 큐벳, 또는 본원의 임의의 부분에 기재된 임의의 다른 용기의 내면 상에 적용될 수 있다.

[0349] 어세이 유닛 상의 상이한 포획 시약들의 위치는 포획된 반응물의 검출 전에 공지되어 있을 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 어세이 유닛은 어세이 유닛의 종류 및/또는 내부의 포획 시약의 패턴을 표시할 수 있는 식별자를 가질 수 있다. 대안적으로, 어세이 유닛의 상이한 포획 시약들의 위치는 포획된 반응물의 검출 전에 공지되어 있지 않을 수 있다. 상이한 포획 시약들의 위치는 포획된 반응물의 검출된 패턴에 기초하여 확인될 수 있다.

[0350] 임의의 기법, 예컨대, 본원의 임의의 부분에 기재된 기법을 이용하여 포획 시약을 적용할 수 있다. 몇몇 경우, 마스크(masking) 또는 석판술 기법을 이용하여 상이한 포획 시약들을 적용할 수 있다.

[0351] 어세이 유닛에 적용된 포획 시약 및/또는 코팅에 대한 본원의 임의의 설명은 팁, 관, 큐벳 또는 시약 유닛을 포함하나 이들로 한정되지 않는, 본원의 임의의 부분에 기재된 임의의 다른 유닛 또는 용기에 적용될 수 있다.

[0352] *시약 조립체(assembly)*

[0353] 본 발명의 많은 실시양태에서, 시약 유닛은 모듈식 유닛이다. 시약 유닛은 상기 유닛이 큰 부피의 신속한 제작 과정에서 제작될 수 있도록 디자인될 수 있다. 예를 들면, 많은 시약 유닛들이 대규모 과정에서 동시에 충전되고 밀폐될 수 있다. 시약 유닛들은 디바이스에 의해 실행될 어세이 또는 어세이들의 종류에 따라 충전될 수 있다. 예를 들면, 한 사용자가 또 다른 사용자와 상이한 어세이를 원하는 경우, 전체 디바이스를 제작할 필요 없이 각각의 사용자의 선호에 따라 시약 유닛을 제작할 수 있다. 또 다른 예에서, 시약 유닛은 연속 프로세싱을

위해 이동 벨트 또는 회전 테이블 내에 배치될 수 있다.

- [0354] 또 다른 실시양태에서, 시약 유닛은 디바이스의 하우징 내의 캐비티(cavity) 내로 직접적으로 수용된다. 이 실시양태에서, 밀폐부는 상기 유닛을 둘러싸는 하우징의 구역 상에서 만들어질 수 있다.
- [0355] 본 발명에 따른 시약은 세척 완충제, 효소 기질, 희석 완충제, 접합체, 효소-표지된 접합체, DNA 증폭제, 샘플 희석제, 세척 용액, 샘플 전처리 시약(첨가제, 예컨대, 세제를 포함함), 중합체, 킬레이팅제, 알부민 결합 시약, 효소 억제제, 효소, 항-응고제, 적혈구 세포 응집제, 항체, 또는 디바이스 상에서 어세이를 실행하는 데에 필요한 다른 물질을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 효소-표지된 접합체는 적절한 기질과의 반응 시 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 효소로 표지된 다중클론 항체 또는 단일클론 항체일 수 있다. 이러한 효소의 비 한정적 예는 알칼리성 포스파타제 및 호스라디쉬 퍼옥시다제이다. 몇몇 실시양태에서, 시약은 면역어세이 시약을 포함한다. 일반적으로, 시약, 특히 지질과 혼합될 때 상대적으로 불안정한 시약이 디바이스 내의 한정된 영역(예를 들면, 시약 유닛) 내에 별도로 수용되어 있다.
- [0356] 몇몇 실시양태에서, 시약 유닛은 대략 약 5 μl 내지 약 1 ml 의 액체를 함유한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 유닛은 약 20 μl 내지 200 μl 의 지질을 함유할 수 있다. 추가 실시양태에서, 시약 유닛은 100 μl 의 유체를 함유한다. 한 실시양태에서, 시약 유닛은 약 40 μl 의 유체를 함유한다. 시약 유닛 내의 유체의 부피는 실행될 어세이 또는 제공된 체액 샘플의 종류에 따라 달라질 수 있다. 한 실시양태에서, 시약의 부피는 예정될 필요가 없지만 공지된 최소치보다 더 커야 한다. 몇몇 실시양태에서, 시약은 먼저 건조 저장되고 디바이스 상에서 실행될 어세이의 시작 시 용해된다.
- [0357] 한 실시양태에서, 사이펀(siphon), 깔대기, 피펫, 주사기, 바늘 또는 이들의 조합물을 이용하여 시약 유닛을 충전시킬 수 있다. 충전 채널 및 진공 추출 채널을 이용하여 시약 유닛을 액체로 충전시킬 수 있다. 시약 유닛을 개별적으로 충전시킬 수 있거나 대용량 제작 과정의 부분으로서 충전시킬 수 있다.
- [0358] 한 실시양태에서, 개별 시약 유닛은 서로로부터 시약을 분리하는 수단으로서 상이한 시약을 포함한다. 또한, 시약 유닛은 세척 용액 또는 기질을 함유하도록 사용될 수도 있다. 추가로, 시약 유닛은 발광 기질을 함유하도록 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 복수의 시약들이 시약 유닛 내에 함유된다.
- [0359] 몇몇 경우, 디바이스의 셋업은 본 디바이스의 일회용품들의 조립 전에 어세이 유닛 및 시약 유닛의 예비교정 능력을 가능하게 한다.
- [0360] *애포타머 결합 어세이*
- [0361] 본 발명은 샘플 중의 하나 이상의 분석물에 특이적으로 결합하는 결합 요소의 사용에 기초한 다양한 어세이 방법들을 가능하게 한다. 일반적으로, 결합 요소는 복수의 상이한 분자들의 존재 하에서 결합 쌍의 다른 구성원에 특이적으로 및 선택적으로 결합할 수 있는 상기 결합 쌍의 한 구성원이다. 결합 요소의 예로는 항체, 항원, 금속 결합 리간드, 핵산 프로브 및 프라이머, 본원에 기재된 수용체 및 반응물, 및 애포타머가 있으나 이들로 한정되지 않는다. 몇몇 실시양태에서, 분석물의 검출에 사용되는 결합 요소는 애포타머이다. 용어 "애포타머(aptamer)"는 하나 이상의 분석물에 특이적으로 결합하는 능력에 대해 선택된 펩티드, 핵산 또는 이들의 조합물을 지칭하기 위해 사용된다. 펩티드 애포타머는 스카폴드 단백질의 표면 상에 표시된 하나 이상의 가변 루프 도메인을 일반적으로 포함하는 친화성 물질이다. 핵산 애포타머는 의도된 표적 분석물과 선택적으로 복합체를 형성할 수 있는 올리고뉴클레오타이드인 특이적 결합 올리고뉴클레오타이드이다. 복합체 형성은 표적 분석물을 동반할 수 있는 다른 물질, 예컨대, 다른 분석물이 큰 친화성으로 애포타머와 복합체를 형성하지 않는다는 의미에서 표적 특이적이다. 복합체 형성 및 친화성은 정도의 문제이지만, 이 내용에서 "표적 특이적"은 애포타머가 오염 물질에 결합하는 것보다 훨씬 더 높은 친화도로 표적에 결합한다는 것을 의미한다는 것이 인식된다. 따라서, 이 내용에서 특이성의 의미는 예를 들면, 항체에 적용된 특이성의 의미와 유사하다. 애포타머는 합성 방법, 재조합 방법 및 정제 방법을 포함하는 임의의 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 추가로, 용어 "애포타머"는 2개 이상의 공지된 애포타머와 주어진 표적의 비교로부터 유도된 컨센서스 서열을 함유하는 "이차 애포타머"도 포함한다.
- [0362] 일반적으로, 핵산 애포타머의 길이는 약 9개 내지 약 35개 뉴클레오타이드이다. 몇몇 실시양태에서, 핵산 애포타머의 길이는 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 80개, 90개 또는 100개 이상의 잔기이다. 애포타머의 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 단일 가닥 또는 이중 가닥이지만, 애포타머가 종종 삼중 가닥 또는 사중 가닥 구조를 취할 수 있다는 것이 고려된다. 몇몇 실시양태에서, 핵산 애포타머는 예컨대, 미국 특허 공개 제20050176940호에서와 같이 원형 애포타머이다. 애포타머의 특이적 결합 올리고뉴클레오타이드는 서열 부여 특이성을 함유해야 하지만, 플랭킹

(flanking) 영역에 의해 연장될 수 있거나 다른 방식으로 유도체화될 수 있거나 변경될 수 있다. 표적 분석물에 결합하는 것으로 확인된 앵타머는 단리되고 서열분석된 후 통상적인 DNA 또는 RNA 잔기로서 재합성될 수 있거나 변경된 올리고머일 수 있다. 이들 변경은 (1) 변경된 또는 유사한 형태의 당(예를 들면, 리보스 및 데옥시리보스); (2) 대안적 연결기; 또는 (3) 푸린 및 피리미딘 염기의 유사한 형태의 도입을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0363] 핵산 앵타머는 DNA, RNA, 작용화된 또는 변경된 핵산 염기, 핵산 유사체, 변경된 또는 대안적 골격 화합물, 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다. 앵타머의 올리고뉴클레오타이드는 통상적인 염기인 아데닌, 구아닌, 사이토신 및 타이미딘 또는 유리딘을 함유할 수 있다. 푸린 및 피리미딘의 유사한 형태를 포함하는 합성 앵타머도 용어 "앵타머" 내에 포함된다. 푸린 및 피리미딘의 "유사한" 형태는 당분야에서 일반적으로 공지되어 있는 것들이고, 이들 중 대다수는 화학치료제로서 사용된다. 푸린 및 피리미딘의 유사한 형태(즉, 염기 유사체)의 비한정적 예로는 아지리디닐사이토신, 4-아세틸사이토신, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오우라실, 5-카복시메틸-아미노메틸우라실, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸아데닌, 1-메틸슈도우라실, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸사이토신, 5-메틸사이토신, N6-메틸아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸-우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실쿠에오신, 5-메톡시우라실, 2-메틸-티오-N6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 슈도우라실, 쿠에오신, 2-티오사이토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산, 5-펜틸-우라실 및 2,6-디아미노푸린이 있다. 데옥시리보핵산에서 타이미딘에 대한 치환 염기로서 우라실(이하, "dU"로서 지칭됨)의 사용은 본 발명에서 피리미딘의 "유사한" 형태인 것으로 간주된다.

[0364] 앵타머 올리고뉴클레오타이드는 2' 치환된 당, 예컨대, 2'-O-메틸-리보스, 2'-O-알릴-리보스, 2'-플루오로-리보스 또는 2'-아지도-리보스, 탄소환 당 유사체, 알파-아노머 당, 에피머 당, 예컨대, 아라비노스, 자일로스 또는 릭소스(lyxose), 피라노스 당, 퓨라노스 당, 세도헥톨로스, 락킹된 핵산(LNA), 캡티드 핵산(PNA), 비환식 유사체 및 탈염기(abasic) 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대, 메틸 리보사이드를 포함하나 이들로 한정되지 않는, 당분야에서 공지되어 있는 리보스 또는 데옥시리보스 당의 유사한 형태를 함유할 수 있다.

[0365] 앵타머는 그들의 합성 중간체도 포함할 수 있다. 예를 들면, 통상적으로 존재하는 임의의 하이드록실 기가 포스포네이트 기 또는 포스포이트 기로 치환될 수 있거나, 표준 보호기에 의해 보호될 수 있거나, 추가 뉴클레오타이드 또는 기질과의 추가 결합을 형성하도록 활성화될 수 있다. 5' 말단 OH는 통상적으로 자유롭지만 인산화될 수 있고, 3' 말단에 존재하는 OH 치환기도 인산화될 수 있다. 하이드록실은 표준 보호기로 유도체화될 수도 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 결합이 대안적 연결기로 치환될 수 있다. 이들 대안적 연결기는 P(O)O가 P(O)S("티오에이트"), P(S)S("디티오에이트"), P(O)NR2("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH2("포름아세탈")로 치환되는 실시양태(이때, R 또는 R'는 각각 독립적으로 H이거나 임의적으로 에테르(-O-) 결합을 함유하는 치환된 또는 비치환된 알킬(1-20C), 알릴, 알케닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐 또는 아르알킬임)를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0366] 본 발명에서 유용한 앵타머의 한 구체적인 실시양태는 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제5,270,163호 및 제5,475,096호에 개시된 바와 같이 RNA 앵타머에 기초한다. 상기 특허들은 후보 올리고뉴클레오타이드들의 혼합물로부터 선택하는 단계, 및 동일한 일반적인 선택 방법을 이용하여 결합, 분할 및 증폭을 단계적으로 반복하여 사실상 임의의 원하는 결합 친화성 및 선택성 기준을 달성하는 단계를 포함하는 SELEX 방법을 개시한다. SELEX 방법은 바람직하게는 무작위화된 서열의 분절을 포함하는 핵산들의 혼합물로부터 출발하여, 결합에 유리한 조건 하에서 상기 혼합물을 표적, 예컨대, 표적 분석물과 접촉시키는 단계, 표적 분자에 특이적으로 결합된 핵산으로부터 비결합된 핵산을 분할하는 단계, 핵산-표적 복합체를 해리시키는 단계, 상기 핵산-표적 복합체로부터 해리된 핵산을 증폭하여 핵산의 리간드-풍부한 혼합물을 생성하는 단계, 및 이어서 상기 결합 단계, 분할 단계, 해리 단계 및 증폭 단계를 원하는 만큼 많은 주기를 통해 반복하여 표적 분자에 대한 고특이성 및 고친화성 핵산 리간드를 생성하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 복수의 앵타머들이 분석물, 또는 분석될 샘플 중의 표적 분석물과 함께 발견될 가능성이 높은 다른 물질에 노출되고 결합하지 않은 앵타머만이 보유되는 음성 스크리닝이 이용된다.

[0367] SELEX 방법은 개선된 특성, 예컨대, 개선된 생체내 안정성 또는 개선된 전달 특성을 리간드에 부여하는 변경된 뉴클레오타이드를 함유하는 고친화성 핵산 리간드의 확인을 포함한다. 이러한 변경의 예로는 리보스 및/또는 포스포에이트 및/또는 염기 위치에서의 화학적 치환이 있다. 몇몇 실시양태에서, 2개 이상의 앵타머가 연결되어 단일 다가 앵타머 분자를 형성한다. 다가 앵타머 분자는 한 앵타머의 다수의 카피(각각의 카피가 동일한 분석물을 표

적화합), 상이한 분석물을 표적화하는 2개 이상의 상이한 애포타머, 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다.

[0368] 애포타머는 진단 시약 및 예후 시약으로서, 신규 치료제의 발견을 위한 시약으로서, 개체에서 약물 반응을 모니터링하기 위한 시약으로서, 및 신규 치료 표적의 발견을 위한 시약으로서 사용될 수 있다. 애포타머는 하나 이상의 표적 분석물을 검출하거나, 상기 표적 분석물의 기능을 변경시키거나, 또는 상기 표적 분석물의 기능을 방해하거나 억제하는 데에 사용될 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "분석물"은 약물, 전구약물, 약제, 약물 대사물질, 생체마커, 예컨대, 발현된 단백질 및 세포 마커, 항체, 혈청 단백질, 콜레스테롤 및 다른 대사물질, 전해질, 금속 이온, 다당류, 핵산, 생물학적 분석물, 생체마커, 유전자, 단백질, 호르몬 또는 이들의 임의의 조합물을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 분석물은 폴리펩티드, 당단백질, 다당류, 지질 및 핵산의 조합물일 수 있다. 애포타머는 하기 기작들(그러나, 이들로만 한정되지 않음) 중 어느 한 기작으로 유전자 생성물의 기능을 억제할 수 있다: (i) 단백질-단백질 상호작용의 친화성의 조절; (ii) 전사 수준에서 단백질의 발현의 조절; (iii) 전사후 수준에서 단백질의 발현의 조절; (iv) 단백질의 활성의 조절; 및 (v) 단백질의 위치의 조절. 펩티드 애포타머들의 정밀한 작용 기작은 이들과 다른 유전자들 및 유전자 생성물들의 상호작용 면에서 이들의 특이적 기능을 확인하기 위한 생화학적 수단 및 유전적 수단에 의해 확인될 수 있다.

[0369] 애포타머는 본원에 기재된 임의의 검출 방법에서 분석물을 검출하는 데에 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 애포타머는 기질에 공유적으로 또는 비공유적으로 커플링된다. 애포타머가 커플링될 수 있는 기질의 비한정적 예로는 마이크로어레이, 마이크로비드, 피펫 팁, 샘플 전달 디바이스, 큐벳, 모세관 또는 다른 튜브, 반응 챔버, 또는 본 검출 시스템과 상용가능한 임의의 다른 적합한 포맷이 있다. 바이오칩 마이크로어레이 제조는 다양한 반도체 제작 기법, 예컨대, 고체 상 화학적 기법, 조합 화학적 기법, 분자생물학적 기법 및 로봇을 이용할 수 있다. 전형적으로 이용되는 한 과정은 단일 칩 상에 수백만 개의 프로브들을 갖는 마이크로어레이를 제조하는 사진식각술 제작 과정이다. 대안적으로, 프로브들이 미리 합성되는 경우, 이들은 기법, 예컨대, 마이크로채널 펌핑, "잉크-젯" 스폿팅(spotting), 주형-스탬핑(stamping) 또는 광가교결합의 이용을 통해 어레이 표면에 부착될 수 있다. 예시적 사진식각술 과정은 석영 웨이퍼를 감광성 화합물로 코팅하여 상기 석영 웨이퍼와 DNA 프로브의 제1 뉴클레오티드 사이의 커플링이 생성되는 것을 방지함으로써 시작된다. 석판술 마스크를 사용하여 광이 웨이퍼 표면의 특정 위치 상으로 투과되는 것을 억제하거나 허용한다. 그 다음, 상기 표면은 아데닌, 타이미딘, 사이토신 또는 구아닌을 함유할 수 있는 용액과 접촉되고, 커플링은 조명을 통해 탈보호된 유리 상의 영역에서만 일어난다. 커플링된 뉴클레오티드는 감광성 보호기를 보유하여 주기가 반복될 수 있게 한다. 이 방식으로, 프로브로서 생성되는 마이크로어레이는 탈보호 및 커플링의 반복된 주기를 통해 합성된다. 상기 과정은 프로브들이 그들의 전체 길이에 도달할 때까지 반복될 수 있다. 상업적으로 입수가능한 어레이는 전형적으로 어레이 당 130만 개 초과와 독특한 특징부의 밀도로 제작된다. 실험의 요구사항 및 어레이 당 필요한 프로브의 수에 따라 각각의 웨이퍼는 수십 개 또는 수백 개의 개별 어레이로 절단될 수 있다.

[0370] 다른 방법을 이용하여 바이오칩을 제조할 수 있다. 바이오칩은 랭뮤어-보제트(Langmuir-Bodgett) 필름, 작용화된 유리, 게르마늄, 실리콘, PTFE, 폴리스티렌, 갈륨 아르세나이드, 금, 은, 막, 나일론, PVP, 또는 그의 표면에 도입된 작용기, 예컨대, 아미노, 카복실, 디엘스-알더(Diels-Alder) 반응물, 티올 또는 하이드록실을 가질 수 있는, 당분야에서 공지되어 있는 임의의 다른 물질일 수 있다. 그 후, 이들 기들은 핵산 리간드의 후속 부착 및 이들과 표적 분자의 상호작용이 바이오칩으로부터의 방해 없이 용액에서 일어나도록 가교결합제에 공유적으로 부착될 수 있다. 전형적인 가교결합기는 에틸렌 글리콜 올리고머, 디아민 및 아미노산을 포함한다. 대안적으로, 효소적 절차, 예컨대, 미국 특허 공개 제20100240544호에 기재된 효소적 절차를 이용하여 애포타머를 어레이에 커플링시킬 수 있다.

[0371] 몇몇 실시양태에서, 애포타머는 마이크로비드의 표면에 커플링된다. 올리고뉴클레오티드와의 커플링에 유용한 마이크로비드는 당분야에서 공지되어 있고 자성 비드, 자가화가능한 비드 및 비자성 비드를 포함한다. 마이크로비드는 상기 비드의 암호화 및 이것에 연결된 애포타머의 확인을 용이하게 하기 위해 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 염기로 표지될 수 있다. 마이크로비드의 암호화를 이용하여 단일 어레이에서 10개, 50개, 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1500개, 2000개 또는 5000개 이상의 상이한 마이크로비드들을 식별할 수 있고, 각각의 마이크로비드는 상이한 분석물에 대한 특이성을 갖는 상이한 애포타머에 상응한다.

[0372] 몇몇 실시양태에서, 시약은 반응 챔버, 예컨대, 팁의 표면에 커플링된다. 예를 들면, 팁의 내면은 단일 분석물에 대해 특이적인 애포타머로 코팅될 수 있다. 대안적으로, 팁의 내면은 상이한 분석물들에 대해 특이적인 2개 이상의 상이한 애포타머들로 코팅될 수 있다. 2개 이상의 상이한 애포타머들이 동일한 팁 내면에 커플링되는 경우, 상이한 애포타머들 각각은 상이한 공지된 위치들에서 커플링되어, 예컨대, 팁의 축을 따라 상이한 위치들에서 상이

한 차수의 고리들 또는 밴드들을 형성할 수 있다. 이 경우, 샘플을 팁 내로 추출하고 상기 샘플에 함유된 분석물이 팁을 따라 연속적인 위치에서 코팅된 앵타머와 결합하게 함으로써 다수의 상이한 분석물들을 동일한 샘플에서 분석할 수 있다. 그 다음, 특정 공지된 분석물에 상응하는 밴딩 패턴에서 각각의 밴드의 위치와 함께 결합 사건을 본원에 기재된 바와 같이 가시화할 수 있다.

[0373] 몇몇 실시양태에서, 광학 특징을 이용하여 하나 이상의 앵타머와 하나 이상의 표적 분석물의 결합을 검출한다. 몇몇 실시양태에서, 광학 특징은 형광이다. 몇몇 실시양태에서, 분석될 분석물을 함유하는 샘플을 표지 화합물로 처리하여 상기 분석물을 형광 태그와 접합시킨다. 그 다음, 예컨대, 도 136에 나타난 바와 같이 어레이에 커플링된 앵타머와 함께 및 도 137에 나타난 바와 같이 암호화된 비드에 커플링된 앵타머와 함께 형광을 이용하여 결합을 측정하여 하나 이상의 분석물의 존재 및 임의적으로 양을 검출할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 샘플을 표지 화합물로 처리하여 분석물을 링커와 접합시킨다. 결합 시, 링커는 형광 태그로 작용화되고, 양성 결과는 형광에 의해 측정된다. 몇몇 실시양태에서, 앵타머의 분석물 결합 도메인은 형광적으로 표지된 상보적 프로브에 부분적으로 혼성화된다. 분석물과의 결합 시, 상보적 프로브가 방출되어, 형광 신호의 광학적으로 측정가능한 감소를 초래한다. 몇몇 실시양태에서, 앵타머는 형광적으로 표지되고 형광 표지에 인접하는 소광제(quencher)로 표지된 상보적 프로브에 부분적으로 혼성화된다. 분석물과의 결합 시, 상보적 프로브가 방출되어, 앵타머에 접합된 표지의 형광의 측정가능한 증가를 초래한다. 몇몇 실시양태에서, 앵타머는 상보적 프로브에 부분적으로 혼성화되고, 이 혼성화는 이차 구조를 함유하는 도메인을 가진다. 분석물과의 결합 시, 상보적 프로브가 방출되고, 측정가능한 신호를 생성하는 데에 사용된 인터칼레이팅 염료가 이차 구조를 이용할 수 있게 된다. 결합 쌍에서 앵타머와 분석물 사이의 결합의 검출에 유용한 표지는 예를 들면, 플루오레세인, 테트라메틸로다민, 텍사스 레드, 또는 당분야에서 공지되어 있는 임의의 다른 형광 분자를 포함할 수 있다. 그 다음, 바이오칩 상의 각각의 위치에서 검출된 표지의 수준은 분석되는 혼합물 중의 표적 분석물의 양에 따라 달라질 것이다.

[0374] 몇몇 실시양태에서, 치환된 상보적 프로브는 친화성 쌍의 한 구성원, 예컨대, 바이오틴에 접합된다. 그 다음, 검출가능한 분자는 친화성 쌍의 다른 구성원, 예를 들면, 아비딘에 접합된다. 시험 혼합물이 바이오칩에 적용된 후, 접합된 검출가능한 분자가 첨가된다. 바이오칩 상의 각각의 부위에서 검출가능한 분자의 양은 시험 혼합물에 존재하는 표적 분자의 양에 따라 반비례적으로 달라질 것이다. 또 다른 실시양태에서, 치환된 상보적 프로브는 표지된 바이오틴일 것이고 형광 표지된 아비딘의 첨가에 의해 검출될 수 있고, 그 후 아비딘 자체는 또 다른 형광 표지된 바이오틴-접합된 화합물에 결합될 것이다. 치환된 올리고뉴클레오타이드 상의 바이오틴 기도 아비딘-결합된 레포터(reporter) 효소를 결합시키는 데에 사용될 수 있고, 그 후 상기 효소는 반응을 촉진하여 검출가능한 화합물의 침착을 유발할 것이다. 대안적으로, 상기 레포터 효소는 본질적으로 형광을 나타내는 바이오칩의 형광을 국소적으로 소광할 불용성 생성물의 생성을 촉진할 것이다. 치환 어세이의 또 다른 실시양태에서, 치환된 상보적 프로브는 면역학적으로 검출가능한 프로브, 예컨대, 디콕시제닌으로 표지될 것이다. 그 후, 치환된 상보적 프로브는 상기 프로브를 특이적으로 인식하는 제1 항체 세트에 의해 결합될 것이다. 그 후, 이들 제1 항체들은 형광적으로 표지되거나 레포터 효소에 접합된 제2 항체 세트에 의해 인식되고 결합될 것이다. 이들 예들에 대한 많은 변형이 공지되어 있거나 당업자에게 인식될 것이다. 항체와 앵타머의 조합물을 수용체로서 사용하여 "이중 샌드위치" ELISA와 유사한 어세이를 셋업할 수도 있다. 예를 들면, 포획 표면은 앵타머로 작용화될 수 있고, 검출 시약은 효소로 표지된 항체일 수 있다. 대조적으로, 항체는 포획 표면 상에 존재할 수 있고, 검출 시약은 표지된 앵타머일 수 있다.

[0375] 몇몇 실시양태에서, 분석될 분석물을 함유하는 샘플을 3-차원적 하이드로겔 매트릭스 내로 분산시킨다. 상기 하이드로겔 매트릭스를 활성화시켜 단백질 및 소분자를 공유적으로 포획할 수 있다. 과량의 비결합된 샘플의 세척 후, 예컨대, 도 138에 나타난 바와 같이, 존재하는 특정 분석물의 검출을 위해 형광 표지된 앵타머를 도입할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 3-차원적 하이드로겔 매트릭스를 작은 서브세트 또는 마이크로웰 내에 나누고, 존재하는 분석물의 특이적 분석을 수행하기 위해 단일 앵타머를 상기 작은 서브세트 또는 마이크로웰에 첨가할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 앵타머를 독특한 신호에 상응하는 암호화된 양자 점 또는 형광 태그의 세트에 표지한다. 몇몇 실시양태에서, 표지된 앵타머를 샘플과 함께 동시에 상기 3-차원적 매트릭스에 첨가한다.

[0376] 몇몇 실시양태에서, ELISA 분석에서 항체 대신에 앵타머를 사용한다. 일반적으로, 샘플을 표면에 노출시키고 상기 표면에 특이적으로 또는 비특이적으로 커플링시킨다. 샌드위치 ELISA에서, 분석물을 표면에 커플링된 제1 항체에 결합시킴으로써 상기 표면에 특이적으로 커플링시킨다. 그 후, 전형적인 ELISA에서, 특이적으로 결합되어 있는 아니면 비특이적으로 결합되어 있는 관계없이 표지를 보유하는 제2 항체에 분석물을 결합시킴으로써 상기 분석물을 검출한다. 앵타머 ELISA에서, 제1 항체, 제2 항체 또는 이들 둘다를 분석물에 대해 특이적인 앵타머로 치환시킨다.

[0377] **샘플 및 어세이 반응 생성물의 영상화 분석**

[0378] 본 발명의 몇몇 실시양태에서, 디지털 영상화를 이용하여 샘플 및 어세이 반응 생성물의 분석을 수행할 수 있다. 측정을 위해 어세이 큐벳을 정렬할 수 있고 단일 작업으로 스캐닝할 수 있거나 영상화할 수 있다. 본 발명의 기기화된 시스템에서, 이것은 기계적 구성요소에 의해 자동적으로 달성된다. 어세이 큐벳을 카트리지 내의 한정된 위치에 위치시키고 동일한 배향 및 간격을 유지하면서 스캐너로 이동시킨다. 도 92에 나타난 그래프는 큐벳의 폭에 걸쳐 녹색 채널 반응에 상응한다. 나타난 바와 같이, 큐벳의 가장자리는 큐벳의 중간에 상응하는 위치와 마찬가지로 잘 뚜렷하게 나타나 있다.

[0379] 스캐닝 또는 영상화에 의해 수득된 영상은 화소의 2-차원적 어레이일 수 있고, 이때 각각의 화소는 상이한 검출 스펙트럼 영역(예를 들면, 적색, 청색, 녹색)에 상응하는 복수의 강도 값들을 포함한다. 영상을 팁의 수평 부분에 상응할 수 있는 선 스캔으로 해석할 수 있다. 팁이 원형 팁인 경우, 적절한 함수에 대해 선 스캔을 복원하여 유효 흡광도를 측정할 수 있다. 예시적 함수는 포물선 함수, 및 원에 대한 함수를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 물리적 위치 범위에 걸쳐 팁 또는 샘플을 촬영한 다수의 영상들에 대해 영상의 데이터-평균을 산출할 수 있다.

[0380] 한 실시양태에서, 어세이가 검출될 때 어세이 유닛을 검출기에 대해 상대적으로 위치시키기 위해 센서를 제공한다.

[0381] 도 61 및 도 62에 나타난 바와 같이, 브로모페놀 블루 용액을 원추형 팁 세트 내로 흡입시키고 정면 조명(물체의 동일 측(same side) 상의 광원 및 검출기)으로 영상화하였다. 영상의 상부에서 최고 농도를 갖는 작은 부피($5\ \mu\text{l}$)의 $0.78\ \text{mg/ml}$ 용액의 연속 희석물을 사용하였다. 도 61에서, 좌측 상의 팁은 원추형 팁 내의 가장 넓은 위치에 위치하는 샘플을 갖는 반면, 우측 상의 팁은 가장 좁은 위치에서 샘플을 갖는다. 스캐닝 광학 시스템을 이용하여 도 61의 영상을 촬영하였다.

[0382] 도 62는 역광 입체구조(영상화된 물체의 대향 측 상의 광원 및 검출기)를 이용하여 영상화한 팁을 보여준다. 역광 입체구조는 보다 더 높은 영상 질 때문에 바람직할 수 있다.

[0383] 도 61 및 도 62에 나타난 바와 같이, 팁 디자인을 변화시킴으로써 착색된 용액의 유효 광학 경로 길이를 변경시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 경로 길이를 단일 팁 내에서 변경시켜 광 흡광도의 측정 민감도를 증가시킬 수 있거나(긴 경로 길이) 상기 측정의 동적 범위를 증가시킬 수 있다. 예를 들면, 팁의 직경을 변화시킴으로써 상기 경로 길이를 변화시킬 수 있다.

[0384] 팁 디자인의 추가 특징은 상기 팁이 매우 작은 부피의 샘플을 필요로 하는 매우 작은 부피의 어세이 반응 생성물을 사용하여 어세이를 판독할 수 있다는 것일 수 있다. 전형적으로, 액체/공기 표면적 대 부피의 높은 비를 제공하여 증발을 최소화하는 팁의 좁은 부분에서 어세이 반응 혼합물을 향온처리한다. 그 후, 착색된 생성물의 측정을 위해 상기 작은 부피를 팁의 넓은 부분으로 이동시켜 주어진 반응 혼합물 부피에 대해 이용가능한 광학 경로 길이를 최대화할 수 있다(이로써 광의 흡광도를 증가시킬 수 있다).

[0385] 예를 들면, 하기 표에서, 본 발명자들은 $1\ \mu\text{l}$ 의 샘플이 1:10으로 희석되어 있는 $10\ \mu\text{l}$ 의 어세이 반응 혼합물의 판독을 비교한다. 본 발명의 팁에서, $1\ \text{mm}$ 의 직경을 갖는 팁 영역의 $13\ \text{mm}$ 길이에서 어세이 혼합물의 향온처리를 달성한 후 색채 측정을 위해 상기 혼합물을 $3\ \text{mm}$ 직경 영역으로 이동시킬 수 있다. 표준 치수의 마이크로타이터 플레이트(전형적으로 384웰 플레이트)를 이용하여 동일한 어세이를 향온처리하고 판독하는 것과 비교하였을 때, (증발을 허용하는) 공기에 노출된 액체 표면적은 약 5배 더 작고, 광학 경로 길이는 약 2배 더 크다.

샘플 부피	1.00	μl	
회석률	10.00	배수	
반응 부피	10.00	μl	
팁			
팁 직경	1.00	mm	향온처리를 위한
노출된 표면적	1.57	mm^2	향온처리를 위한
액체 컬럼의 길이	12.73	mm	향온처리를 위한
팁 직경	3.00		판독을 위한 경로길이
액체 컬럼의 길이	1.41	mm	판독을 위한
마이크로타이터 플레이트			
웰 직경	3.00	mm	
노출된 표면적	7.07	mm^2	
액체 컬럼의 길이	1.41	mm	경로길이

[0386]

[0387]

광학 경로 길이의 최적화

[0388]

전통적으로, 흡광도 파장 최대치에서 큐벳을 관통하여 투과된 광의 분율을 기록함으로써 착색된 용질의 분광학적 측정치를 측정한다. 그 다음, 데이터를 변환하여 흡광도(A) 또는 광학 밀도(OD) 값을 제공한다. 비어(Beer)의 법칙에 따르면, 하기 관계가 성립된다: $A(\lambda_{\text{최대}}) = \epsilon M \cdot l \cdot \text{농도}$ (이때, ϵM 은 몰 소광 생성물(L/Mole.cm)이고, l 은 광학 경로 길이(cm)이고, 농도는 몰 단위이다. $l = 1$ 인 경우 $OD = A$ 이다. 이것은 용질 농도에 정비례하는 측정치 A를 제공하기 위해 수행된다.

[0389]

용질 농도를 분석함에 있어서 흡광도 측정의 2가지 유의한 한계가 있다. 저농도에서, 투과의 변화는 작으므로 배경(또는 블랭크) 투과의 편차 때문에 비정밀하다. 고농도에서, 투과는 매우 낮다(예를 들면, $A = 3$ 에서, 투과된 광은 입사 광의 1/1000이다). 임의의 "벗어난" 광 또는 다른 형태의 신호 노이즈(noise)는 측정에 대해 상당한 영향을 미치고, 농도에 대한 반응은 비선형적이고 비정밀하게 된다. 전형적으로, 흡광도 측정치는 약 0.1 내지 약 2.0의 범위(20배 범위)에 걸쳐 정밀하고 정확한 것으로 간주된다.

[0390]

본 발명의 방법은 매우 넓은 동적 범위(최대 1000배)에 걸쳐 색채의 용이한 측정을 가능하게 함으로써 이들 문제점들을 상당한 정도로 극복한다:

[0391]

1. 상이한 경로들에서: 낮은 농도는 긴 파장 길이에서 측정될 수 있고, 높은 농도는 짧은 파장 길이에서 측정될 수 있다.

[0392]

2. 상이한 색채 채널들에서: 낮은 농도는 가장 우수한 일차 색채 채널에서 측정될 수 있고, 높은 농도는 색채와 불일치된 색채 채널에서 측정될 수 있다.

[0393]

이것은 도 79에 나타난 데이터에 의해 예시된다. 5 mg/ml 저장액으로부터 연속적으로 회석된 브로모페놀 블루 용액을 2개의 위치[약 5 mm("넓은")의 최대 경로 길이(본원에서 "경로길이"로도 지칭됨)]를 갖는 한 위치, 및 약 1 mm("좁은")의 최대 경로 길이를 갖는 다른 위치]에서 팁 내에서 3색 방법을 이용하여 분석하였다. 3색 채널의 신호를 하기 그래프에 나타난 바와 같이 그들의 최고 수준 및 최저 수준으로 표준화하였다. 분석물(브로모페놀 블루)의 농도를 최적으로 유추하기 위한 알고리즘을 다음과 같이 셋업하였다:

[0394]

1. 10% 최대치 < 신호 < 90% 최대치의 범위 내의 표준화된 신호의 경우, 값 농도 = $a + b \cdot \text{Log}(\text{신호}) + c \cdot (\text{Log}(\text{신호}))^2$ 를 계산한다(이때, b 및 c 는 임의의 상수이다). 이 작업을 두 경로 길이에서 각각의 색채에 대해 수행하였다.

[0395]

2. 잘 공지되어 있는 최적화 루틴(예를 들면, 마이크로소프트 엑셀에서 "솔버(Solver)")을 이용하여, 모든 색채 및 경로 길이에 대해 a , b 및 c 의 가장 우수한 피트 값을 계산한다.

[0396]

3. 모든 색채 및 두 경로 길이에 대해 계산된 농도 값의 평균을 산출한다.

[0397]

도 80에 나타난 바와 같이, 상기 방법은 1000배 농도 범위에 걸쳐 정확한 결과를 제공하였다. 상기 알고리즘을 이용하여 반복 측정($N = 3$)에 대한 농도 값을 계산하였을 때, 평균 CV는 3.5%이었다.

[0398]

다양한 경로 길이에서 측정을 수행할 수 있다. 몇몇 경우, 경로 길이는 적어도 부분적으로 용기(예를 들면, 큐

벧, 틸, 바이알)의 기하학적 형태에 의해 좌우된다. 용기의 기하학적 형태 및/또는 용기의 특징, 예컨대, 산란 특징은 용기의 광학 경로 및 경로 길이에 영향을 미칠 수 있다.

[0399] 다중 색채 분석

[0400] 스캐너 및 카메라는 복수의 상이한 색채 채널 검출 스펙트럼 영역들(예를 들면, 적색, 녹색 및 청색)을 측정할 수 있는 검출기를 갖는다. 이들 채널들 각각의 스펙트럼 폭이 넓고 색채 화학반응이 넓은 밴드 폭을 갖는 착색된 생성물을 생성하기 때문에, 복수의 채널 검출 스펙트럼들을 사용하여 착색된 반응 생성물을 검출할 수 있다. 예를 들면, 도 71은 적색(정사각형), 녹색(마름모형) 및 청색(삼각형) 검출 채널 스펙트럼의 반응을 분석물 농도의 함수로서 보여준다. 각각의 검출기에 의해 생성된 신호는 각각의 검출 스펙트럼 내의 광 강도에 상응하고 전형적으로 0 내지 255의 수치로서 표현된다. 상기 나타낸 바와 같이 백색 광이 착색된 용질을 함유하는 원형 단면 큐벳을 관통하여 투과되는 경우, 광은 흡수되고 광 강도는 검출기 반응이 변화하도록 감소된다.

[0401] 예를 들면, 브로모페놀 블루를 0 mg/ml 내지 5 mg/ml의 농도로 알칼리성 완충제에 용해시키고 도 62에서 "C3"으로서 표시된 위치에서 스캐닝한 경우, 도 66에 나타낸 신호는 큐벳의 길이를 따라 7개의 화소에 상응하는 대역에 걸쳐 평균이 산출된 검출기 반응이다. 신호를 엡손(Epson) 역광 스캐너 상에서 기록하였다. 도 66은 5 mg/ml 브로모페놀 블루 용액의 2배 연속 희석물 및 "블랭크" 용액을 함유하는 11개 큐벳으로 구성된 세트(영상에서 좌측에서 우측으로 정렬됨)에 대한 3색 반응을 보여준다. 스캐닝된 틸의 영상은 도 67에 나타나 있다. 상기 용액에 상응하는 각각의 채널에서 신호는 광학 경로와 관련된 정도까지 감소된다. 따라서, 신호의 최대 변화는 큐벳의 중심에서 관찰된다. 큐벳의 중심 영역에서 신호의 평균을 (좌측에서 4번째 큐벳에 대해 작은 직사각형으로 표시된 대역에 걸쳐) 산출하고 브로모페놀 블루 농도에 대해 작도하였을 때, 도 68에 나타낸 용량-반응을 관찰하였다. 각각의 색채 "채널"에서, 신호는 농도에 따라 매끄럽게 감소하였다. 녹색 신호가 가장 많이 변화하였고, 청색 신호가 가장 적게 변화하였다. 최대 흡광도의 파장(예를 들면, 589 nm)에서 M5 분광계(몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices))에서 측정된 상응하는 광학 밀도도 나타나 있다. 최고 농도에서, 분광광도계 반응은 비선형적이게 되고 농도에 따라 매우 적게 변화한다. 유사한 효과를 스캐너 녹색 및 적색 채널 반응에서 인지하였다. 대조적으로, 청색 채널 반응은 최고 농도까지 매우 미미하였다.

[0402] 비어의 법칙에 따르면, 용액의 흡광도는 $\epsilon M \times \text{농도} \times \text{경로 길이}$ 와 동등하다. 흡광도는 $\text{Log}_{10}(\text{투과}/\text{블랭크 투과})$ 로서 정의되고, 이때 블랭크 투과는 용매에 대한 투과에 상응하는 투과이다. 엄격히 비어 법칙은 통상적으로 직사각형 큐벳을 통과하는 단색 광(사실상 수 nm의 밴드 폭)의 평행한 광선에 적용된다. 분광광도계는 약 1.5의 흡광도 값까지 농도에 선형적으로 반응한다. 보다 더 높은 흡광도에서, 기기 반응은 "벗어난 광" 및 다른 효과로 인해 비선형적이게 된다. 광학 밀도는 1 cm 광학 경로 길이에 대한 흡광도로서 정의된다.

[0403] 통상적인 분광광도측정에서 농도에 비례하는 흡광도 값을 획득하기 위해 광학 투과를 선형화하는 식($-\text{Log}(\text{신호}/\text{블랭크 신호})$)에 따라 상기 실험으로부터의 색채 신호 데이터를 변환하였을 때, 녹색(정사각형) 및 적색(마름모형) 채널에 대해 도 69에 나타낸 그래프를 획득하였다.

[0404] 녹색 채널 데이터는 비어 법칙을 따랐지만, 적색 채널 데이터는 분광광도계의 OD 반응과 유사한 방식으로 약 2 mg/ml를 갖는 샘플에 대해 정제기(plateau) 수준에 도달하지 못하였다.

[0405] 3색 분석 및 광학 경로 길이의 최적화에 의한 개선된 어세이 이용

[0406] 해석불가능한 데이터를 제공할 반응 셋업으로부터 수득된 어세이 결과를 본 발명을 이용하여 활용할 수 있다. 본 발명은 광학 경로 길이 최적화와 3색 분석을 조합하여 어세이의 증가된 동적 범위 및 민감도를 허용한다. 감소된 동적 범위에 의해 야기된 데이터 활용에 대한 무능력은 어세이 관리에서, 특히 샘플이 진단 또는 치료 관리 목적으로 평가된다는 면에서 주요 문제점이다(즉, 어세이가 우수한 신뢰도로 보고될 수 있는 한정된 동적 범위 또는 한정된 분석물 값 범위를 갖는다). 어세이 결과가 실험실-기초 어세이 시스템 또는 분산된 시험 상황으로부터 이용가능할 수 없는 2가지 주요 이유가 존재한다. 즉, 분석물 값은 보고되기에는 너무 높거나 너무 낮다. 이것은 몇몇 상황에서 상이한 희석을 이용하여 보유된 샘플의 부분을 재분석함으로써 임상 실험실에서 바로잡아질 수 있다. 분산된 시험에서, 전형적으로 의뢰는 없지만, 환자를 소환하여 새로운 샘플을 수득하고 상이한 (실험실) 방법을 이용하는 것은 가능하다. 이것은 어세이 시스템이 고정된 프로토콜 및 고정된 수준의 샘플 희석을 이용하기 때문이다. 어느 상황에서도, 문제점을 바로잡는 것은 매우 불편하고 비용이 많이 소요된다. 더욱이, 적당한 진단 및/또는 치료 관리에 적절한 귀중한 정보를 상실하여 환자에게 피해를 발생시킬 수 있다.

[0407] 본 발명의 시스템에서, 이들 문제점들은 어세이를 그들의 실행 동안 모니터링하고 임의의 문제점을 인식하고 어세이 생성물의 측정에 이용된 광학 경로 길이를 변경시키거나 어세이 색채 및 결과적으로 분석물 민감도에 대한

3색 채널의 상이한 민감도 수준을 이용함으로써 제거된다.

[0408] 특히, 측정된 신호가 너무 높거나 너무 낮은 경우 어세이 반응 생성물을 측정할 때, 시스템은 하기 1 및/또는 2에 의해 반응할 수 있다:

[0409] 1. 상이한 경로 길이를 이용하여 측정을 수행한다(경로 길이가 보다 더 크거나 보다 더 작도록 광학 큐벳을 광학 시스템에 대해 상대적으로 이동시킨다). 이것은 (a) 표준 제1 위치에서 측정을 수행하고, (b) (기기 내에서 및/또는 원거리 서버 상에서) 결과를, 어세이를 관리하는 소프트웨어에 보고하고, (c) 문제 상태를 인식하고, (d) 판독 위치를 변경하고 제2 측정을 수행함으로써 달성될 수 있다.

[0410] 2. 신호 분석에서 보다 더 민감한 또는 보다 덜 민감한 색채 채널을 강조한다. 이것은 적합한 어세이 분석 알고리즘에 의해 자동적으로 실행될 수 있다.

[0411] 색채 교정

[0412] 신호 반응을 교정하여 영상화 데이터로부터 착색된 종의 농도를 계산할 수 있다. 착색된 용질의 농도를 예측하는 데이터 변환을 수득하기 위해, 하기 절차를 이용할 수 있다. 다른 실시양태에서, 다른 방법도 이용할 수 있다.

[0413] 1. 모든 농도에 대한 각각의 채널에 대해, 변환 $-\text{Log}(\text{신호}/\text{블랭크 신호})$ 를 계산하였고 "A"로 표기하였다.

[0414] 2. 모든 농도에 대해, 추가 변환("C")을 $a \cdot A + b \cdot A^2 + c \cdot A^3$ 으로서 계산하였다(a, b 및 c에 대한 초기 값은 임의의 값으로 설정되었다).

[0415] 3. 모든 농도에 대해, 3색 채널에 대한 C 값을 합산하였고 $C_{\text{추정}}$ 으로서 표기하였다.

[0416] 4. 목표 (공지된) 농도와 $C_{\text{추정}}$ 사이의 제곱 차이의 합계를 모든 농도에 걸쳐 계산하였다.

[0417] 5. 상기 제곱 차이의 합계를 최소화하는 잘 공지된 알고리즘으로 모든 채널들에 대한 a, b 및 c 파라미터의 값을 유도하였다.

[0418] 도 70에 나타낸 결과는 전체 농도 범위에 걸친 스캐너 반응의 정확한 교정을 입증한다.

[0419] 다른 자동화된 교정 알고리즘이 개발되었고 동등하게 효과적인 것으로 밝혀졌다. 예를 들면, 하기 교정은 반응 팁에서 수행된 콜레스테롤 어세이에 대한 교정의 일례이다.

[0420] 측정된 신호를 적색(R), 녹색(G) 및 청색(B) 채널로 분해한다. 교정 방정식을 계산하여 어세이 디자인 요건에 따라 정확도, 정밀도 및 동적 범위를 최적화한다.

[0421] 이 어세이 예에서, 적색 및 녹색 채널만을 이용하여 농도를 계산한다. 이들 2개의 신호를 변환하여 중간 변수(F)를 다음과 같이 계산한다:

[0422]
$$F = p_1 + p_2 \cdot G + p_3 \cdot G^2 + p_4 \cdot R + p_5 \cdot R^2$$

[0423] 상기 식에서, p_i 은 교정 파라미터이다.

[0424] 마지막으로, 신호 F를 사용하여 선형 변환을 통해 농도(C)를 계산한다:

[0425]
$$C = \frac{(F - p_6)}{p_7}$$

[0426] 상기 식에서, C는 계산된 농도이고, p_6 및 p_7 은 (이 경우 각각 선형 관계의 절편 및 기울기 파라미터를 나타내는) 교정 파라미터이다.

[0427] 전체 가시광 스펙트럼(400 nm 내지 700 nm의 $\lambda_{\text{최대}}$)에 걸쳐 착색된 생성물을 생성한 다양한 분석물들에 대해 큰 어세이 세트를 동일한 방법에 따라 수행하였을 때, 필적할만한 결과를 수득하였다.

[0428] 통상적인 투과 분광광도측정에서, "블랭크" 값을 이용하여 측정치를 표준화한다. 방법 (1)은 전형적으로, 샘플과 동등하지만 측정될 임의의 성분을 갖지 않는 샘플을 측정함으로써 블랭크를 구축한다. 전형적으로, 샘플에 대해 사용될 큐벳 또는 광학적으로 동등한 큐벳과 동일한 큐벳에서 측정을 수행한다. 따라서, 분광광도측정 어세이에서, 샘플을 분석물 무함유 용액으로 치환시키는 동일한 프로토콜을 이용하여 모든 시약들을 동일한 농도

로 조합할 것이다. 방법 (2)는 (흡광도에서 결코 변화하지 않을) 절대적 기준물, 예컨대, 공기에 대해 측정을 수행하고 상기 절대적 기준물과 대비하여 샘플 및 블랭크 둘다를 측정하는 2 단계 공정을 이용한다. 그 다음, 샘플의 값으로부터 블랭크 값을 차감하여 샘플 흡광도를 계산한다. 방법 (3)은 샘플 또는 어세이 반응 생성물의 스펙트럼을 수집하고, 측정될 종이 0의 흡광도를 갖는 것으로 공지되어 있는 파장에서의 흡광도와 대비하여 최적 파장(통상적으로 측정된 종에 대한 최대 흡광도를 갖는 파장)에서 측정된 흡광도(또는 투과)를 표준화하는 것이다. 흡광도는 상기 2개의 파장에서 기록된 흡광도들 사이의 차이이다.

[0429] 디지털 영상화 및 3색 분석이 이용될 수 있으나, 몇몇 실시양태에서 어세이 신호의 디지털(화소화된) 부호에 따라 변경될 수 있다. 즉, 다음과 같다:

[0430] 1. 영상의 각각의 화소 및 각각의 색채에 대해, 백색 표준물을 영상화하고, 신호 강도를 0의 흡광도에 상응하는 값으로 조절한다. 이것은 하기 예시적 절차에 의해 수행될 수 있다:

[0431] a. 광원의 강도의 조절,

[0432] b. 검출기의 민감도의 조절(바람직함), 또는

[0433] c. 소프트웨어 조절(그 자체로 바람직하지 않음).

[0434] 바람직한 방법은 상기 (b)와 (c)의 조합이다. 먼저, 아날로그 범위에서 검출기를 조절한 후 디지털 범위에서 결과를 섬세하게 조정한다.

[0435] 아날로그 조절의 경우, 광 센서와 아날로그-대-디지털 구획 사이의 증폭기의 게인(gain) 및 오프셋(offset)을 조절하여 디지털화의 최대 해상도를 보장한다. 관심 있는 광 범위의 하한은 0으로 설정될 것이고, 상기 범위의 상한은 센서의 포화도 바로 아래로 설정될 것이다.

[0436] 그 후, 영상은 디지털 도메인에서 섬세하게 조정될 수 있다. 특히, 바람직한 방법은 $m \times n$ 영상에 대해 "2-영상 교정"으로 지칭되는 것을 사용하는 것일 것이다. 기작은 검출기로 향하는 모든 광을 차단하여 흑색 영상을 먼저 수집하는 것이다. 본 발명자들은 이 영상을 BLACK[m,n]으로 지칭할 것이다. 민감도 범위의 상한에서 광으로 구성된 제2 교정 영상을 기록한다. 본 발명자들은 이 영상을 WHITE[m,n]으로 지칭할 것이다. 따라서, 보정된 영상 $a[m,n]$ 을 다음과 같이 화소별로 구축할 수 있었다:

$$a[m,n] = \frac{c[m,n] - BLACK[m,n]}{WHITE[m,n] - BLACK[m,n]}$$

[0437]

[0438] 이 디지털 보정은 디지털화된 데이터의 동적 범위를 개선하지 않지만, 전체 백색 기준물 및 흑색 기준물이 일관 되도록 값을 조절한다는 것을 주목한다.

[0439] 2. 팁 내의 물리적 블랭크의 영상을 화소별 및 색채별 블랭크로서 사용할 수 있다. 상기 블랭크는 a. 공기; b. 물; c. 블랭크 어세이 반응 생성물(분석물 부재); d. 샘플 블랭크(어세이 시약 부재); 또는 e. 상기 a 내지 d의 일부 조합물일 수 있다.

[0440] 3. 반응이 없거나 약한 색채 채널로부터 수득된 신호를 사용하여 다른 채널로부터 수득된 신호를 표준화할 수 있다.

[0441] 광학소자를 조절하고 표준화하는 추가 방법은 어세이 전에 또는 어세이 동안에 물리적 (안정한) 표준물 세트를 영상화하는 것이다. 예를 들면, (카메라 및 스캐너를 교정하는 데에 사용되는 표준 색채 "휠"과 유사한) 표준 강도를 갖는 표준 색채 세트에 상응하는 (도 104에 나타낸) 인쇄된 염료의 어레이를 만들 수 있다.

[0442] 불투명한 표면으로부터의 반사를 이용하거나 투명한 필름을 통한 투과(바람직함)를 이용하여 이러한 표준물을 측정할 수 있다.

[0443] 광학소자의 안정성에 따라, 광학소자의 교정 및 표준화를 (1) 1회 수행할 수 있거나, (2) 정기적인 간격으로 수행할 수 있거나, (3) 각각의 어세이에 대해 수행할 수 있다.

[0444] *디지털 영상화기 범위의 교정*

[0445] 몇몇 실시양태에서, 광학 밀도를 영상화하는 데에 이용되는 디지털 영상화기를 교정하는 방법이 제공될 수 있다.

- [0446] 분석물의 광학 밀도를 시험함에 있어서, 영상화기의 가능한 넓은 동적 범위를 이용하는 것이 바람직한 수 있다. 정상적인 사용 하에서, 셋업은 상대적으로 균질한 조명된 백색 배경, 영상화기, 및 이들 사이의 투명한 큐벳에서 시험될 분석물을 포함할 수 있다. 작동적으로, 시험은 영상화기와 백색 역광 광원 사이에 큐벳을 배치하는 단계를 포함할 수 있고 큐벳 내에서 분석물에 의해 흡수된 광의 양을 측정할 수 있다. 센서의 전체 동적 범위를 최대화하기 위해, 배경을 측정가능한 최대 강도로서 감지할 수 있다. 센서가 포화될 때 이후로 정보가 상실될 수 있고 약화가 정확하게 측정될 수 없기 때문에 센서를 포화시키지 않도록 주의를 기울이는 것이 바람직할 수 있다. 시스템은 포화된 화소의 수를 최소화하면서 역광의 측정된 값을 효율적으로 최대화하도록 구성될 수 있다.
- [0447] 조명된 배경은 그의 전체 표면에 걸쳐 동등한 강도의 백색 광을 방사할 수 있다. 영상화기에 의해 검출된 화소 강도의 정규 분포를 생성하는 광 출력은 다소 변경될 수 있다. 이것은 도 128에 나타난 곡선에 의해 예시된다. 이 예의 경우, 센서는 그가 제공받는 광의 양의 표시자로서 각각의 화소로부터 0 내지 256의 값을 돌려줄 수 있다. 각각의 화소는 256의 값에서 포화될 수 있다. 즉, 광 강도 또는 센서 민감도의 추가 증가와 관계없이 256의 값만이 기록될 수 있다. 도 128의 시리즈 1(점선)은 광이 너무 강하여 정규 곡선을 절단하는 위치를 보여준다. 시리즈 3(파선)은 모든 화소들이 강도를 정확하게 판독하지만, 영상화기 민감도가 최대 동적 범위에 대한 민감도보다 더 낮다는 것을 보여준다. 대부분의 화소는 200 미만의 값에 존재한다. 시리즈 2는 분포의 평균이 가능한 높지만 충분히 작은 수의 화소가 포화되는 원하는 셋팅을 나타낸다.
- [0448] 한 실시양태에서, 역광의 강도는 일정하게 유지될 수 있는 반면, 영상화기의 셋팅은 조절될 수 있다. 영상화기 민감도를 목적으로, 2가지 조절을 이용할 수 있다: 노출 시간 및 게인. 노출 시간은 값이 판독되기 전에 센서 화소가 광자를 수집하도록 허용되는 시간의 양일 수 있다. 주어진 양의 광의 경우, 판독 값은 노출 시간이 보다 더 길 때 보다 더 클 수 있다. 이러한 조절(제어)은 응용을 위한 "개략적인" 조절일 수 있다. 게인은 센서 신호에 적용된 증폭의 양을 조절하는 조절일 수 있다. 게인의 증가는 센서로부터의 신호 값을 증가시킬 수 있다. 게인은 "섬세한" 조절일 수 있다.
- [0449] 영상화기의 민감도 파라미터를 설정하는 예시적 절차는 하기 단계들 중 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다:
- [0450] 1. 노출 시간을 포화도 미만인 것으로 공지된 값으로 설정한다. 게인을 최고 사용가능한 값으로 설정한다.
- [0451] 2. 위쪽으로 출발하는 이원 연구는 영상의 관심 있는 영역 내의 모든 화소가 포화되는 것이 아닌 설정을 발견하기 위해 노출 시간을 조절한다. 이것은 평균 화소 값이 256 미만이 되는 점을 관찰함으로써 검출될 수 있다.
- [0452] 3. 포화 한계에 있는 충분히 적은 화소가 존재할 때까지 게인을 점차적으로 다시 낮춘다. 허용가능한 수준에서의 화소의 수는 분산의 형태에 의해 결정될 것이다. 넓은 표준 편차는 포화되도록 허용된 화소의 수를 증가시킬 것이다.
- [0453] 다음으로, 백색 밸런스(balance)를 보정할 수 있다. 디지털 영상화기에는 3개의 센서 군이 존재한다. 각각의 군의 구성원은 상이한 파장의 광, 즉 적색, 녹색 또는 청색 광을 수집한다. 백색 광을 검출할 때, 센서는 바람직하게는 동등한 값, 또는 적색, 녹색 및 청색을 보일 것이다. 백색 밸런스 조절은 적색 및 청색 채널의 상대적 게인을 조절한다. 역광으로부터 나오는 광이 백색으로서 정의되기 때문에, 채널이 동일한 값을 판독할 때까지 절차는 단순히 백색을 조절하는 것일 것이다. 사실상, 녹색 채널은 전형적으로 비조절된 상태로 남아 있고, 적색 및 청색 채널은 조절이 변화되기 때문에 서로에 대해 대향하는 방향으로 변화된다. 그러나, 다른 실시양태에서, 또 다른 채널, 예컨대, 적색 채널 또는 청색 채널은 비조절된 상태로 남아 있을 수 있는 반면, 나머지 2개의 채널은 변화될 수 있다.
- [0454] 마지막으로, 영상은 디지털 도메인에서 섬세하게 조정될 수 있다. 특히, 바람직한 방법은 전술된 바와 같이 $m \times n$ 영상에 대한 "2-영상 교정"으로 지칭되는 것을 사용하는 것일 것이다.
- [0455] 다양한 착색된 생성물들을 생성하는 어세이를 본 발명에서 분석하였다. 낮은 파장 흡수 최대치를 갖는 어세이(황색)부터 높은 파장 최대치를 갖는 어세이(청색)까지 색채를 성공적으로 측정하였다. 몇몇 대표적인 어세이들에 대한 파장 최대치는 전체 가시광 스펙트럼에 걸쳐 색채를 판독하는 능력을 입증하는 405 nm, 450 nm, 500 nm, 510 nm, 540 nm, 570 nm, 612 nm 및 620 nm이었다.
- [0456] 많은 화소(전형적으로 약 1000개)에 대한 평균 데이터를 이용하여 색채를 정량할 수 있다. 용량-반응 데이터에의 우수한 적합도(fit)(예를 들면, 가장 높은 R^2)를 생성하는 파라미터(f)를 선택할 수 있다. 먼저 상기 파라미터를 식 $a_1 + b_1 \cdot R + c_1 \cdot R^2 + b_2 \cdot G + c_2 \cdot G^2 + b_3 \cdot B + c_3 \cdot B^2$ (이때, a, b 및 c는 상수이고, R, G 및 B는 각각 적색, 녹색 및

청색 채널에 대한 색채 강도 값임)에 피팅할 수 있다. 그 다음, 1의 최대 값 및 0의 최소 값을 갖게 함으로써 파라미터 f 를 유도할 수 있다. 파라미터 f 는 착색된 반응 생성물을 통한 광의 투과와 관련된다. 예측되는 바와 같이, f 를 분광광도측정에서 사용되는 파라미터 광학 밀도(OD)와 밀접하게 관련시켜 흡수 종을 정량할 수 있다. 3색 영상화에 의해 측정된 $1 - f$ 가 분광광도계에서 마이크로타이터 플레이트 내의 동일한 어세이 반응 생성물에 대해 흡수 최대치에서 측정된 OD에 대해 작도된 경우, $1 - f$ 는 본질적으로 OD와 선형관계를 갖는다는 것을 관찰할 수 있다. 도 129에서, 5종의 어세이에 대한 이러한 데이터가 제시되어 있다. OD는 "상대적 OD" = $(OD - OD_{\text{최소}})/(OD_{\text{최대}} - OD_{\text{최소}})$ 로서 표준화될 수 있다. 몇몇 경우, 다소 굽어진 관계가 존재하나, 상관계수(R)는 통상적으로 0.99를 초과한다.

[0457] 파라미터 f 를 이용하여 3색 영상 분석에 의해 측정된 어세이를 교정할 수 있다. 분석물의 농도에 대해 작도된 경우, 대표적인 콜레스테롤 어세이에 대한 매끄러운 교정 관계가 도 130에서 나타날 수 있다. 농도를 f 와 관련시키는 식인 $\text{농도} = a + b \cdot f + c \cdot f^2$ (이때, a , b 및 c 는 상수임)의 방정식이 유도되고, 도 130에 나타낸 바와 같이, 계산된 농도는 "공칭(nominal)"(예측된, 원하는) 값의 농도와 본질적으로 동일하다(1.0에 가까운 회귀 선 기울기, 0.0에 가까운 절편, 및 $R^2 = 0.998$). 어세이 정확도 및 정밀도의 그래프도 도 130에 나타나 있다. 정확도는 100%에 가깝고(평균 100.2%), (CV%로 표시된) 비정밀도는 낮다(10% 미만, 평균 CV 3.9%).

[0458] 어세이의 동시 영상화

[0459] 도 56, 도 57, 도 58, 도 59 및 도 60에 나타낸 바와 같이, 여러 어세이 요소들(팁, 웰, 블롯)을 동시에 영상화할 수 있다. 일반적으로, 특정 요소가 특정 어세이와 관련될 수 있도록 상기 요소들을 카트리지 내의 공지된 위치에 배치할 수 있거나 기기의 서브시스템 상에 탑재할 수 있다. 상기 요소들이 완전하게 배향되거나 위치하지 않는 경우조차도, 영상 분석을 이용하여 어세이 요소들의 특징부를 위치시켜 임의의 이러한 위치선정 오류를 바로잡을 수 있다.

[0460] 알부민(도 56) 및 콜레스테롤(도 57)에 대한 상업적으로 입수가 가능한 어세이를 제작자의 지시에 따라 사용하였다. 분석물 농도가 최고 농도로부터 2배 감소된 일련의 교정제를 사용하여 관심 있는 임상 범위 내의 일련의 분석물 농도를 측정하였다. 도 56 및 도 57에서, 분석물 농도는 우측 상에서 가장 높고, 가장 먼 좌측 팁은 분석물 없음에 상응하였다. 팁 내로 흡입된 어세이 반응 혼합물의 부피는 20 μl 이었다.

[0461] 도 58, 도 59 및 도 60은 동시에 영상화될 수 있는 웰들을 보여준다. 백색 불투명 플라스틱의 블록을 기계가공하여 얇은 반구형 웰의 세트를 만들었다. 3종의 상업적으로 입수가 가능한 색채 형성 어세이를 이들 웰들에서 수행하였고, 반응 생성물을 영상화하였다. 전술된 바와 같이, 가장 우측의 웰은 최고 분석물 농도를 갖고, 각각의 인접한 웰은 분석물을 갖지 않는 가장 좌측의 웰을 제외하고 2배 더 낮은 농도를 갖는다. 7 μl 의 어세이 반응 생성물을 각각의 웰 내로 도입하였다.

[0462] 반응 생성물들을 다공성 막 또는 종이 상에 블롯팅한 후 일단 액체가 매질 내로 흡수되면 영상화함으로써 상기 반응 생성물을 영상화할 수도 있다. 종이 또는 막 내로 함침된 다양한 어세이 화학물질들 중 임의의 화학물질을 사용하고 샘플의 첨가 후 생성된 반응 생성물을 영상화하는 것도 가능하다.

[0463] 탁도의 분석

[0464] 입사 광이 측정되는 샘플을 통과한 후 상기 입사 광의 강도의 감소를 측정함으로써 탁도측정을 수행한다. 어세이의 결과가 액체의 불투명성을 증가시키는 분산된 침전물인 경우 이 기법을 이용한다.

[0465] 라텍스 응집 어세이에서 탁도측정을 수행할 수 있다. 라텍스 응집 어세이 반응의 모델로서, 폴리스티렌 라텍스 입자(1 μm 직경)를 주어진(중량/부피) 농도로 완충제에 분산시키고 3색 영상 분석으로 분석하였다. 도 72에서 볼 수 있는 바와 같이, 모든 3개의 채널에서 우수한 반응을 발견하였고 이를 이용하여 라텍스 입자 농도 및 라텍스의 응집을 측정할 수 있었다.

[0466] 응집의 분석

[0467] 탁도 분석과 유사하게, 시스템을 이용하여 응집, 혈구응집 및 이들의 억제를 측정할 수 있다.

[0468] 시스템을 이용하여 적혈구 세포 응집에 의한 혈액형 분류를 수행할 수 있다. 혈액을 희석하고 상업적 분류 키트로부터의 혈액형 분류 시약(항-A, 항-B, 항-D)과 혼합하였다. B+ 혈액에 대해 하기에 나타낸 바와 같이, 혼합물을 영상화할 때 적절한 응집 반응을 용이하게 관찰할 수 있다. 더욱이, 도 77에 나타낸 영상을 팁의 수직 축을

따라 스캐닝하였을 때, 도 78에 나타난 바와 같이, 3색 신호의 변화를 측정함으로써 응집의 정량적 측정치를 수득할 수 있었다. 보다 더 큰 변화는 응집을 표시하였고 각각의 색채 채널에서 검출될 수 있다. 상기 방법을 이용하여 이러한 응집 반응의 정도를 측정할 수 있다는 것이 명백하다.

[0469] *형태 인식*

[0470] 형태 인식을 위해 영상을 분석할 수 있다. 형태 인식을 표준 확대율 및 매우 높은 확대율에서 수행할 수 있다. 높은 확대율 하에서 영상 분석을 이용하여 세포의 크기 및 형태를 인식할 수 있다. 이들 기법들은 적혈구 세포, 백혈구 세포 및 혈소판의 상대적 농도를 측정하기 위한 세포 카운팅에서 통상적으로 이용된다. 표준 확대율 하에서, 형태 인식을 이용하여 샘플의 상태를 관찰한다. 기포 및 다른 결함 인식 방법을 이용하여, 측정된 액체 양이 정확하게 흡입되고 분배되게 한다.

[0471] *고체 상 기관(기재) 상에서의 샘플 분석*

[0472] 정면 조명을 이용한 디지털 영상화를 이용하여 도 76에 나타난 바와 같이 고체 상 기관 상에서의 어세이 반응을 관측할 수도 있다. 반사 어세이 시스템에서의 사용을 위해 디자인된 레플로트론(Reflotron)TM 칼럼 어세이 스트립(보링거-만하임(Boehringer-Mannheim)/로슈(Roche))에 염화칼륨(0 mM, 2 mM, 4 mM 및 8 mM) 용액을 첨가하였다.

[0473] *샘플 질의 분석*

[0474] 일부 샘플 특성들은 어세이 결과를 실효성이 없게 만들 수 있다. 예를 들면, 용혈은 칼륨 이온이 적혈구 세포로부터 혈장 내로 누출되게 하여 측정된 혈장 또는 혈청 칼륨 이온 농도를 부정확하게 높인다. 유사하게, 황달 및 지질혈증은 측정된 흡광도를 변경시킴으로써 여러 색채 형성 화학반응을 방해할 수 있다. 본 발명에서, 본 발명자들은 영상 분석을 이용하여 이러한 방해 물질을 검출하고 정량할 수 있다. 그 다음, (1) 잘못된 결과를 제공할 어세이를 분석 시스템에 의해 전달된 결과의 목록으로부터 제거할 수 있거나 (2) 방해 물질의 측정된 수준을 파악하도록 광학 신호를 보정할 수 있다. 상이한 종류의 혈청 샘플들의 영상이 도 99에 나타나 있다(좌측에서 우측으로: 용혈된, 지질혈증, 황달(황색) 및 "표준").

[0475] *디지털 데이터 분석*

[0476] 색채를 발생시키고/시키거나 변화시키는 어세이 방법에서 데이터 발생 및 교정을 위한 통상적인 방법은 전형적으로 샘플을 시약과 혼합함으로써 발생시킨 어세이 혼합물의 흡광도 특성의 변화를 나타내는 아날로그 신호를 측정한다. 반응 혼합물의 일부 부분은 조명되고, 상기 부분을 관통하여 투과되거나 상기 부분으로부터 반사된 광은 검출기에 충돌하고 아날로그 신호로서 평가된다. 샘플의 부피 및 질에 의해 측정된 어세이의 질, 샘플 프로세싱, 어세이 혼합물 내로의 어세이의 조립 및 상기 혼합물을 광학 시스템에 제시하는 데에 이용된 물리적 요소들의 조립은 이용된 물리적 시스템의 추정된 질에 의해 좌우된다.

[0477] 본 발명에서, 본 발명자들은 (1) 샘플, (2) 샘플 프로세싱 과정 및 (3) 어세이 혼합물을 영상화할 수 있고 하나 이상의 디지털 영상으로 이루어진 세트로서 데이터를 수집할 수 있다. 어세이 혼합물의 영상에서 각각의 화소는 전체의 매우 작은 분율을 나타내지만, 본 발명자들은 많은 화소들로부터의 3색 신호의 평균을 산출함으로써 적어도 통상적인 아날로그 방법에 의해 수득된 어세이 신호만큼 우수한 어세이 신호를 수집한다. 그러나, 통상적인 방법이 평균 산출에 의해 정보를 상실하는 경우, 본 발명은 정보를 모으고 통상적인 방법에 의해 상실된 세부정보를 보유한다. 이와 관련하여, 색채-기초 어세이는 대사물질, 전해질, 효소, 생체마커(면역어세이를 이용함), 약물(면역어세이를 이용함) 및 핵산 표적("LAMP" 기술을 이용함)에 대한 어세이를 포함한다. 동일한 원리가 형광 및/또는 발광을 이용하는 어세이에 적용될 수 있다.

[0478] *부피 확인 및 보정*

[0479] 샘플 또는 임의의 다른 물질, 예컨대, 액체 또는 고체의 부피를 광학적으로 측정할 수 있다. 이것은 내부 치수가 공지되어 있는 용기를 영상화하고 점유된 용기의 관찰된 부분으로부터 샘플 부피를 수학적으로 측정함으로써 수행될 수 있다. 고체 측정을 일차적으로 이용하여 원심분리에 의해 침전된 고체를 측정한다. 가장 일반적인 경우는 헤마토크릿 수준을 측정하기 위해 원심분리된 적혈구 세포의 부피를 관측하는 것이다. 실시예 6 내지 11 및 16은 샘플 부피 및 다른 측정치를 계산하기 위한 영상화 분석의 이용을 기술한다. 이것은 개선된 어세이 결과를 허용할 수 있다. 예를 들면, 이용될 목표 부피가 10 μ l이고 본 발명의 기술에 의해 실제 부피가 8 μ l로서 측정되는 경우, 어세이 시스템은 부피에 대한 결과를 보정할 수 있다(이 예에서, 10 μ l의 샘플을 가정하여 계산한 분석물의 농도는 10/8을 곱한 값일 것이다).

- [0480] 실제 샘플 및 시약 부피에 관한 지식은 샘플 및 시약을 영상화함으로써 획득될 수 있고 샘플 중의 분석물을 검출하고/하거나 정량하는 데에 이용되는 계산을 보정하는 데에 이용될 수 있다.
- [0481] 상기 많은 예에서 나타낸 바와 같이, 영상화의 이용은 샘플 및 어세이 혼합물이 질 및 어세이 반응에 대해 평가될 수 있게 한다. 또한, 반응 용기로서 이용된 "팁"의 영상화 및 샘플 획득 방법은 (1) 샘플 및 시약 부피의 정확하고 정밀한 측정 및 (2) 부피 오차로 인한 어세이 결과의 임의의 부정확도 및/또는 비정밀도를 보정하기 위한 이러한 데이터의 이용을 가능하게 한다. 이를 달성하기 위해, 팁은 정확하고 정밀하게 공지된 기하학적 형태를 가질 수 있다(사출 성형에 의해 제조된 팁의 경우). 영상화를 이용한 팁의 반복 측정은 팁의 치수가 약 1%보다 더 우수한 정도까지 정밀하다는 것을 입증한다. 따라서, 상응하는 정밀도를 갖는 이러한 팁에서 액체 샘플 및 시약의 부피를 측정하는 것이 가능하다. 샘플 및 시약의 피펫팅이 덜 정확하고 정밀한 경우, (영상 측정에 의해) 실제 부피를 아는 결과의 보정이 가능하다.
- [0482] 예를 들면, 반응이 분석물 농도에 정비례하는 어세이를 고려한다(본원에 논의된 대다수의 어세이들 경우 사실이다). 10%의 샘플 부피 오차는 분석 시스템에 의해 보고된 값에서 10%의 오차를 초래할 것이다. 그러나, 부정확하게 분배된 샘플 부피가 정확하게 측정되는 경우(실제 값의 대략 2% 이내에 해당함), 오차를 10%에서 2%로 감소시키도록 시스템 반응을 보정할 수 있다. 시약 부피의 부피 오차에 대해 상응하는 보정을 수행할 수 있다. 보정 알고리즘은 부피에 대한 어세이 시스템의 반응 또는 각각의 어세이 성분(샘플, 시약)에 대한 지식에 의해 좌우될 수 있으나, 이 정보는 어세이 개발 및 검증 동안 용이하게 확인될 수 있다.
- [0483] 따라서, 본 발명은 통상적인 기법에 비해 다양한 장점을 제공한다. "어세이 신호"의 발생에 있어서, 본 발명은 어세이 큐벳에서의 물리적 결합 및 어세이 혼합물에서의 결합(기포 등)을 검출할 수 있다. 일단 이들 결합들이 확인되면(영상 분석), 잘못된 결과가 발생하지 않도록 어세이 결과를 거부할 수 있거나 상기 결합의 효과를 제거할 수 있고 정확한 어세이 신호를 계산할 수 있다(바람직함).
- [0484] 어세이 혼합물의 조립에서, 하기 결합들을 포함하는 임의의 모든 결합들을 검출할 수 있다: 부정확한 샘플 종류(예를 들면, 혈액 대 혈장), 부정확한 샘플 부피, 혈액 샘플의 경우 형성된 요소(적혈구 세포 및 백혈구 세포)로부터의 혈장의 분리 실패, 어세이 결과의 질을 손상시킬 수 있는 샘플 요인(예를 들면, 지질혈증, 황달, 용혈, 침전물의 존재, 또는 다른 미확인된 이질물), 어세이 혼합물의 조립에서의 결합(예를 들면, 기포의 존재, 적절한 혼합물의 실패(색채의 불균일성)), 후향적 질 평가 및 상세한 기록 정보의 보존을 위한 기작, 샘플 및 시약 부피의 측정(및 이러한 부피에서 부정확도 및/또는 비정밀도의 보정)을 위한 기작.
- [0485] 치료제의 평가
- [0486] 별도의 실시양태에서, 치료제의 효능 및/또는 독성을 평가하는 데에 유용한 하나 초과의 약리학적 파라미터를 모니터링하는 디바이스 및 방법이 제공된다. 예를 들면, 치료제는 치료적 유용성 및/또는 잠재력을 갖는 임의의 물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질은 생물학적 또는 화학적 화합물, 예컨대, 단순한 또는 복잡한 유기 또는 무기 분자, 펩티드, 단백질(예를 들면, 항체) 또는 폴리뉴클레오티드(예를 들면, 항-센스)를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 매우 다양한 화합물들, 예를 들면, 중합체, 예컨대, 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드, 및 다양한 모핵 구조에 기초한 합성 유기 화합물이 합성될 수 있고, 이들도 치료제로서 포함될 수 있다. 또한, 다양한 천연 공급원이 스크리닝을 위한 화합물, 예컨대, 식물 또는 동물 추출물 등을 제공할 수 있다. 상기 물질이 단독으로 또는 또 다른 물질과 함께 사용된다고 항상 명시되어 있지 않더라도, 본 발명의 스크린에 의해 확인된 물질과 동일한 또는 상이한 생물학적 활성을 갖는다는 것을 이해해야 한다. 또한, 상기 물질 및 방법은 다른 치료법과 조합될 것으로 예상된다. 예를 들면, 소분자 약물은 종종 비정밀할 수 있는 질량 분광측정에 의해 측정된다. ELISA(항체-기초) 어세이가 훨씬 더 정확하고 정밀할 수 있다.
- [0487] 본 발명에 따른 생리학적 파라미터는 온도, 심박수/심박동, 혈압 및 호흡률과 같은 파라미터를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 약력학적 파라미터는 생체마커, 예컨대, 단백질, 핵산, 세포 및 세포 마커의 농도를 포함한다. 생체마커는 질환을 표시할 수 있거나 약물 작용의 결과일 수 있다. 본 발명에 따른 약동학적(PK) 파라미터는 약물 및 약물 대사물질의 농도를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 샘플 부피로부터 PK 파라미터를 실시간으로 확인하고 정량하는 것은 약물의 적절한 안전성 및 효능을 위해 매우 바람직하다. 약물 및 대사물질의 농도가 원하는 범위를 벗어나고/벗어나거나 예측되지 않은 대사물질이 약물에 대한 예측되지 않은 반응으로 인해 발생하는 경우, 환자의 안전성을 보장하기 위한 즉각적인 조치가 필요할 수 있다. 유사하게, 임의의 약력학적(PD) 파라미터가 치료 요법 동안 원하는 범위를 벗어나는 경우, 마찬가지로 즉각적인 조치가 취해져야 할 수 있다.

- [0488] 약물의 농도이든 아니면 이들의 대사물질의 농도이든 관계없이, 단일 대상체에서 일정한 시간 동안 분석물 농도, 또는 PD 또는 PK 파라미터의 변화율을 모니터링할 수 있다는 것, 또는 상기 농도, PD 또는 PK 파라미터에 대한 경향 분석을 수행하는 것은 잠재적으로 위험한 상황을 방지하는 데에 도움을 줄 수 있다. 예를 들면, 글루코스가 관심 있는 분석물인 경우, 주어진 시간에서 샘플 중의 글루코스의 농도뿐만 아니라 주어진 시간 동안의 글루코스 농도의 변화율은 예를 들면, 저혈당 사건을 예측하고 피하는 데에 있어서 매우 유용할 수 있다. 이러한 경향 분석은 약물 투약 요법에서 광범위한 유리한 결과를 갖는다. 다수의 약물들 및 이들의 대사물질들이 관련되는 경우, 경향을 발견하고 사전 조치를 취하는 능력이 종종 바람직하다.
- [0489] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 개별맞춤 의학 치료를 제공하는 데에 있어서 임상의를 보조하는 영업 방법을 제공한다. 영업 방법은 시간에 따라 생체마커의 경향을 모니터링함으로써 약물 치료법의 처방후 모니터링을 포함할 수 있다. 상기 영업 방법은 투약을 제공받은 개체로부터 하나 이상의 약리학적 파라미터를 수집하는 단계를 포함할 수 있고, 상기 수집 단계는 상기 하나 이상의 약리학적 파라미터를 표시하는 검출가능한 신호를 생성하기 위해 상기 개체에게 제공되는 유체 디바이스에 함유된 반응물에 체액 샘플을 노출시키고 컴퓨터를 이용하여 상기 개체의 상기 하나 이상의 약리학적 파라미터와 함께 상기 개체의 의학적 기록을 교차참조하여 개별맞춤 의학 치료를 제공하는 데에 있어서 상기 임상의를 보조함으로써 수행된다.
- [0490] 본원의 디바이스, 시스템 및 방법은 환자의 약리학적 파라미터의 자동 정량뿐만 아니라, 상기 파라미터와, 예를 들면, 모니터링된 파라미터의 이력을 포함할 수 있는 환자의 의학적 기록 또는 또 다른 대상체 군의 의학적 기록의 자동 비교를 가능하게 한다. 예를 들면, 데이터를 저장할 수 있을 뿐만 아니라 임의의 종류의 데이터 프로세싱 또는 알고리즘을 수행할 수 있는 외부 디바이스와 시간 분석물 모니터링의 커플링은 예를 들면, 현재 환자 데이터를 과거 환자 데이터와 비교하는 것을 포함할 수 있는 전형적인 환자 관리를 보조할 수 있는 디바이스를 제공한다. 따라서, 본원은 의료인에 의해 현재 수행되는 환자의 모니터링의 적어도 일부를 효과적으로 수행하는 영업 방법도 제공한다.
- [0491] **샘플 및 반응 생성물 영상화를 위한 광학 셋업**
- [0492] 광학 셋업을 이용하여 샘플 및 반응 생성물 분석을 수행할 수 있다. 광학 셋업은 광원, 조리개 및 센서 또는 검출기를 포함할 수 있다. 광학 셋업에 대한 개략도는 도 100 및 도 101에 나타나 있다. 몇몇 실시양태에서, 카메라는 로기텍(Logitech) C600 웹카메라일 수 있고, 카메라 센서는 1/3" 2.0 MP(1600x1200) CMOS: (MI-2010-SOC)일 수 있고, 렌즈는 표준 물체 거리 웹캠 렌즈(렌즈-대-물체 거리: 35 mm)를 갖는 유리일 수 있다. 광원은 9.4 볼트에서 작동하는 모리텍스 화이트 에지(Moritex White Edge) 조명기 MEBL-Cw25(백색)일 수 있다. 카메라 영상은 순차적으로 촬영될 수 있다(이때, 1개, 2개, 3개 또는 4개 이상의 틸이 x-y-z 재물대에 의해 광학 경로 내로 이동된다).
- [0493] 한 실시양태에서, 검출기는 디바이스 상에서 하나 이상의 어세이에 의해 생성된 신호를 검출하기 위해 검출 조립체를 보유하는 판독기 조립체이다. 검출 조립체는 예를 들면, 수행되는 어세이 및 이용되는 검출 기작의 종류에 기초하여 디바이스 상에 존재할 수 있거나 디바이스에 대해 상이한 배향으로 존재할 수 있다. 검출 조립체를 어세이 유닛과 통신하도록 이동시킬 수 있거나, 어세이 유닛을 검출 조립체와 통신하도록 이동시킬 수 있다.
- [0494] 센서는 PMT, 광범위 광다이오드, 애벌랜치(avalanche) 광다이오드, 단일 주파수 광다이오드, 영상 센서, CMOS 칩 및 CCD일 수 있다. 조명원은 레이저, 단색 LED, 형광 램프 또는 LED로부터의 넓은 주파수 광, LED 어레이, 적색, 녹색 및 청색 광원의 혼합물, LED에 의해 활성화된 인광체, 형광관, 백열광, 및 아크 광원, 예컨대, 섬광관일 수 있다.
- [0495] 많은 경우, 광학 검출기가 검출 디바이스로서 제공되고 사용된다. 비한정적 예로는 광다이오드, 광전자증배관(PMT), 광자 카운팅 검출기, 애벌랜치 광다이오드 또는 전하-커플링된 디바이스(CCD)가 있다. 몇몇 실시양태에서, 핀 다이오드를 사용할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 핀 다이오드를 증폭기에 커플링시켜 PMT에 필적할만한 민감도를 갖는 검출 디바이스를 생성할 수 있다. 몇몇 어세이들은 본원에 기재된 바와 같이 발광을 발생시킬 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 화학발광이 검출된다. 몇몇 실시양태에서, 검출 조립체는 다발로서 CCD 검출기 또는 PMT 어레이에 연결된 복수의 섬유 광학 케이블을 포함할 수 있다. 섬유 광학 다발은 상이한 섬유들로 제작될 수 있거나 함께 융합되어 고체 다발을 형성하는 많은 작은 섬유들로 제작될 수 있다. 이러한 고체 다발은 상업적으로 입수가능하고 CCD 검출기에 용이하게 접속된다.
- [0496] 검출기는 광원, 예컨대, 전구 또는 발광 다이오드(LED)도 포함할 수 있다. 광원은 결과를 검출하기 위해 어세이를 조명할 수 있다. 예를 들면, 어세이는 통상적으로 핵산 어세이와 함께 사용되는 형광 어세이 또는 흡광 어세이

이일 수 있다. 검출기는 광원을 어세이에 전달하는 광학소자, 예컨대, 렌즈 또는 광섬유도 포함할 수 있다.

- [0497] 몇몇 실시양태에서, 검출 시스템은 대상체의 특정 파라미터를 검출하기 위한 비광학 검출기 또는 센서를 포함할 수 있다. 이러한 센서는 산화되거나 환원되는 화합물, 예를 들면, O_2 , H_2O_2 및 I_2 , 또는 산화가능한/환원가능한 유기 화합물에 대한 온도, 전도성, 전위차측정 신호 및 전류측정 신호를 포함할 수 있다.
- [0498] 조명은 역광 조명, 정면광 조명 및 사(측)광 조명일 수 있다. 역광 조명은 광 흡수를 검출하거나(색도측정) 산란을 검출하기(탁도) 위한 목적으로 일반 화학에서 이용될 수 있다. 정렬은 2가지 형태, 즉 넓고 균일하게 조명된 후방 시야, 및 대상체에 의해 단절되는 구체적인 형태의 광선을 취한다. 정면광 조명은 반사 및 형광 여기를 위해 이용될 수 있다. 반사에서, 대상체는 광원에 의해 정면으로부터 광을 받고 상기 대상체로부터 반사된 광을 관찰함으로써 측정된다. 흡수된 색채는 역광에 의해 조명된 액체와 동일한 정보를 생성한다. 반사에서, 사광 조명을 이용하여 대상체를 조명할 수도 있다. (측면으로부터의) 사광 조명의 이용은 영상에 3-차원적 외관을 제공하고 비가시적 특징부를 밝게 보이게 할 수 있다. 이 방법에 기초한 보다 더 최근의 기법은 세포 배양에서 이용되는 도립 현미경 상에서 발견된 시스템인 호프만 조절 명암대비 시스템이다. 사광 조명은 명시야 현미경과 동일한 한계점을 갖지만(많은 생물학적 샘플들의 낮은 명암대비; 초점이 맞지 않은 물체로 인한 낮은 외관 해상도), 비가시적 구조를 밝게 보이게 할 수 있다.
- [0499] 형광 여기에서, 대상체는 형광 조명을 목적으로 정면으로부터 조명될 수 있다. 이들은 통상적으로 단색 광, 가장 일반적으로는 레이저이다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경이 이의 일반적인 실시양태이다. 사광 조명도 형광 여기에서 이용될 수 있다. 형광 세포분석에서, 대상체는 감쇠 광자가 나타날 각도, 통상적으로 90도에서 종종 여기된다. 이러한 형태의 조명은 대상체 바로 뒤에서 산란 검출을 가능하게(역광) 할 뿐만 아니라 측면으로부터 나오는 형광 방사도 가능하게 한다.
- [0500] 몇몇 실시양태에서, 형광성 광은 여기 광선에 대해 90도에서 영상화된다. 도 102의 A에서, 광자 공급원(S), 전형적으로 고강도 LED는 광선 확산기(D) 및 성형 렌즈(L1)를 통과하여, 시준된 또는 느리게 발산하는 여기 광선을 생성한다. 여기 광선은 밴드-통과 필터(F1)를 통과하고, 형광 표지된 샘플을 갖는 용액을 함유하는 용기(튜브, 큐벳 또는 피펫 팁)로 구성된 샘플을 조명한다. 스토크(Stoke)-변위 형광을 통과시키기에 적합한 긴-통과 또는 밴드-통과 필터(F2)를 이용하여 여기 광으로부터 등방성 방사 형광을 스펙트럼으로 분리한다. 그 다음, 렌즈(L2)를 통해 광을 디지털 카메라(C) 또는 다른 검출기 상에 영상화한다. 형광 강도는 영상 분석을 통해 생성된 영상으로부터 추출된다.
- [0501] 도 102의 A에 나타낸 광학 셋업을 이용하여 촬영한 영상은 (도 103의 A에 나타낸 바와 같이) 단일 튜브 영상을 생성한다. 연속적인 실험은 인터칼레이팅 염료를 사용하여 음성 LAMP 실험 및 양성 LAMP 실험으로부터의 형광 강도의 차이를 보여준다.
- [0502] 다른 실시양태에서, 투과된 광은 여기 과정에서 광을 제거하기 위한 광학 여과 후에 영상화된다. 도 102의 B에서, 광자 공급원(S), 전형적으로 고강도 LED는 광선 확산기(D) 및 성형 렌즈(L1)를 통과하여, 서서히 발산하는 타원형 여기 광선을 생성한다. 여기 광선은 밴드-통과 필터(F1)를 통과하고, 형광 표지된 샘플을 갖는 용액을 각각 함유하는 샘플 용기들(튜브, 큐벳 또는 피펫 팁)의 어레이로서 제시된 샘플을 조명한다. 스토크-변위 형광을 통과시키기에 적합한 긴-통과 또는 밴드-통과 필터(F2)를 이용하여 여기 광으로부터 등방성 방사 형광을 스펙트럼으로 분리한다. 그 다음, 카메라 렌즈(L2)를 통해 광을 디지털 카메라(C) 상에 영상화한다. 형광 강도는 영상 분석을 통해 생성된 영상으로부터 추출된다. (도 103의 B에 나타낸 바와 같이) 도 103에 나타낸 광학 셋업을 이용하여 다수의 튜브들의 어레이 영상들을 동시에 생성할 수 있다.
- [0503] 색도측정의 경우, 감지에 바람직한 실시양태는 결과를 영상화 센서로 감지하면서 대상체를 백색 광으로 역광 조명하는 것이다. 이 경우, 투과 색채 흡수가 측정된다.
- [0504] 탁도측정의 경우, 감지에 바람직한 실시양태는 결과를 영상화 센서로 감지하면서 대상체를 백색 광으로 역광 조명하는 것이다. 탁도측정의 경우, 투과된 광의 강도 감소가 측정된다.
- [0505] 발광측정은 대상체가 그 자신의 광자를 방사하기 때문에 조명 방법을 이용하지 않는다. 방사된 광은 약할 수 있고 매우 민감한 센서, 예컨대, 광전자증배관(PMT)의 이용을 통해 검출될 수 있다.
- [0506] 몇몇 실시양태에서, 형광, 암시야 조명 또는 명시야 조명을 이용하여 영상화를 일으킬 수 있다. 이러한 영상화는 세포분석 또는 다른 응용을 위해 이용될 수 있다. Epi-형광 조명은 상이한 파장의 3개 조명원의 이용에 의해 달성될 수 있다. 추가로, 필요한 경우 2개의 상이한 조명원이 동시에 이용될 수 있다. 결과적으로, 영상화 플랫폼

폼을 이용하여 매우 다양한 형광 염료들을 영상화할 수 있다. 조명원과 방사 광학소자의 조합은 복수의 스펙트럼 독립적인 영상화 채널들을 달성하도록 구성될 수 있다.

[0507] 암시야 조명은 환형광(샘플 위 또는 아래에 위치함), 암시야 아베(abbe) 집광렌즈, 환상면 거울을 갖는 암시야 집광렌즈, 대물렌즈 주변의 슬리브(sleeve) 내에 탑재된 epi-암시야 집광렌즈, 또는 다크 스탑(dark stop)을 갖춘 재물대 집광렌즈와 환형광의 조합의 사용에 의해 달성될 수 있다. 기본적으로, 이들 광학 구성요소들은 사용되는 물체의 개구수(NA)보다 더 큰 NA의 광원추를 생성한다. 조명 방법의 선택은 다수의 고려사항, 예컨대, 필요한 확대율, 기계적 디자인 고려사항, 영상화 센서의 크기 등에 의해 좌우된다. 환형광-기초 조명 방법은 일반적으로 보다 더 넓은 면적에 걸쳐 균일한 암시야 조명을 제공함과 동시에 전체 시스템의 기계적 디자인에서 충분한 유연성을 제공한다.

[0508] 명시야 조명은 재물대-집광렌즈와 함께 백색 광원을 이용하여 쾰러(Koehler) 조명을 생성함으로써 달성될 수 있다.

[0509] 몇몇 실시양태에서, 자동 필터 휠이 이용될 수 있다. 자동 필터 휠은 영상화 광학 경로의 조절을 허용하여 동일한 시야 상에서 다수의 형광단의 영상화를 가능하게 한다.

[0510] 몇몇 실시양태에서, 영상-기초 자동초점맞춤이 일어날 수 있다. 영상-기초 알고리즘을 이용하여 물체의 z-위치(예를 들면, 수직 위치)(즉, 샘플로부터의 그의 거리)를 조절하여 자동초점맞춤을 달성할 수 있다. 요약하건대, 암시야 조명을 이용하여 작은 영상(예를 들면, 128x128 화소)을 빠른 속도로 포착한다. 이 영상을 분석하여 영상 선예도(sharpness)의 척도인 자동초점맞춤 기능을 유도할 수 있다. 빠른 검색 알고리즘에 기초하여 물체의 다음 z-위치를 계산한다. 물체를 새로운 z-위치로 이동시킬 수 있고, 또 다른 작은 영상을 포착할 수 있다. 이 폐쇄된-루프 시스템은 초점맞춤을 위해 임의의 다른 하드웨어의 이용을 필요로 하지 않는다. 현미경 재물대를 컴퓨터-조절된 노광기 모터에 연결하여 X 방향 및 Y 방향(예를 들면, 수평 방향)으로의 병진을 가능하게 한다. 모든 위치에서, 원하는 수의 영상을 포착하고 재물대를 다음 XY 위치로 이동시킨다.

[0511] 검출기를 이용하여 영상화 또는 다른 감지를 수행할 수 있다. 검출기는 카메라, 또는 전자기적 방사선을 전자 신호로 전환시키도록 구성된 다른 감지 장치를 포함할 수 있다. 일례에서, 카메라는 전하-커플링된(CCD) 또는 전자-증배 CCD(EMCCD) 카메라일 수 있다. 검출기는 센서, 예컨대, 능동 화소 센서 또는 CMOS 센서일 수 있다. 검출기는 신호를 검출하기 위한 광전자증배관을 포함할 수 있다.

[0512] 검출기는 샘플 용기(예를 들면, 큐벳, 팁, 바이알)와 광학적 통신 상태에 있을 수 있다. 몇몇 경우, 검출기는 샘플 용기의 직선 시야에 존재한다. 다른 경우, 검출기는 하나 이상의 광학소자, 예컨대, 렌즈, 거울, 시준기 또는 이들의 조합물의 이용에 의해 샘플 용기와 광학적 통신 상태에 있다.

[0513] 영상화 및 세포분석을 이용하여 세포 카운팅을 수행할 수 있다. 대상체가 명시야 조명을 받을 수 있는 상황에서, 바람직한 실시양태는 대상체를 정면으로부터 백색 광으로 조명하고 세포를 영상화 센서로 감지하는 것이다. 후속 디지털 프로세싱은 세포를 카운팅할 것이다. 세포가 드물거나 작은 경우, 바람직한 실시양태는 형광 마커를 부착시킨 후 대상체 시야를 레이저로 조명하는 것이다. 공초점 스캐닝 영상화가 바람직하다. 유세포 분석의 경우, 대상체를 형광 마커로 표지하고 감지 디바이스를 지나 유동시킨다. 2종의 센서가 존재하고, 이들 중 한 센서는 대상체가 역광을 반도록 위치하고 광선 산란을 측정하여 세포의 존재를 확인한다. 측면으로부터 조명되도록 정렬된 다른 센서는 표지된 대상체로부터 방사된 형광성 광을 측정한다. 세포분석을 위한 영상화 방법에 관한 추가 설명은 하기에 제공되어 있다.

[0514] 최종 사용자 시스템

[0515] 디바이스 및 시스템은 제작 후 함께 또는 개별적으로 최종 사용자에게 운반될 수 있다. 본 발명의 디바이스 또는 시스템은 사용을 위한 사용자 매뉴얼 또는 설명서와 함께 포장될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 시스템은 상이한 디바이스들 상에서 실시되는 종류의 어세이들에 널리 통용된다. 디바이스의 구성요소들이 모듈식일 수 있기 때문에, 사용자는 현장진료 또는 다른 분산된 시험 환경에서 다수의 어세이들을 실행하기 위해 1개의 시스템 및 다양한 디바이스들 또는 어세이 유닛들 또는 시약 유닛들만을 필요로 할 수 있다. 이와 관련하여, 시스템은 다수의 디바이스들과 함께 반복적으로 이용될 수 있고, 예를 들면, 운반 동안 이러한 변화를 검출하기 위해 디바이스 및 시스템 둘다 상에 센서를 가질 필요가 있을 수 있다. 운반 동안, 압력 또는 온도 변화는 본 시스템의 다수의 구성요소들의 성능에 영향을 미칠 수 있으므로, 디바이스 또는 시스템 상에 위치한 센서는 교정 동안 또는 외부 디바이스 상에서의 데이터 프로세싱 동안 조절이 수행될 수 있도록 이들 변화를 예를 들면, 외부 디바이스에게 전달할 수 있다. 예를 들면, 유체 디바이스의 온도가 운반 동안 일정 수준까지 변화된 경우,

상기 디바이스 상에 위치한 센서는 이 변화를 검출할 수 있고 상기 디바이스가 사용자에게 의해 시스템 내로 삽입될 때 이 정보를 상기 시스템에게 전달할 수 있다. 이들 작업을 수행하기 위해 시스템 내에 추가 검출 디바이스가 존재할 수 있거나, 이러한 디바이스가 또 다른 시스템 구성요소 내로 도입될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 정보는 시스템 또는 외부 디바이스, 예컨대, 개인용 컴퓨터 또는 텔레비전으로 무선으로 전달될 수 있다. 마찬가지로, 시스템의 센서는 유사한 변화를 검출할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 시스템 구성요소 대신에 또는 시스템 구성요소 이외에 운반 포장물 내에서도 센서를 갖는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 감지될 수 있는 어세이 카트리지 또는 시스템을 실효성이 없게 만들 불리한 조건은 견딜 수 있는 최대치보다 더 높은 온도 또는 카트리지 통합성의 파괴, 예컨대, 수분 침투에의 노출을 포함할 수 있다.

[0516] 한 실시양태에서, 시스템은 정보를 외부 디바이스로부터 무선으로 전달받고 수용할 수 있는 통신 조립체를 포함한다. 이러한 무선 통신은 블루투스(Bluetooth) 또는 RTM 기술일 수 있다. 다양한 통신 방법들, 예컨대, 모뎀과의 다이얼 접속 유선 연결, 직접적인 링크, 예컨대, T1, ISDN 또는 케이블 선이 이용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 예시적 무선 네트워크, 예컨대, 무선전화, 위성 또는 무선통신기 네트워크, GPRS, 또는 지역 데이터 수송 시스템, 예컨대, 근거리 네트워크 상의 이더넷(Ethernet) 또는 토큰 링(token ring)을 이용하여 무선 연결을 확립한다. 몇몇 실시양태에서, 무선 네트워크 상에서 정보를 전달하기 전에 상기 정보를 암호화한다. 몇몇 실시양태에서, 통신 조립체는 정보를 보내고 수용하기 위한 무선 적외선 통신 구성요소를 함유할 수 있다. 시스템은 정보의 표시를 용이하게 하기 위한 내장된 그래픽 카드를 포함할 수 있다.

[0517] 몇몇 실시양태에서, 통신 조립체는 수집된 정보가 저장될 수 있는 기억 또는 저장 디바이스, 예를 들면, 국소화된 RAM을 가질 수 있다. 저장 디바이스는 예를 들면, 네트워크에 무선으로 연결하는 능력의 일시적 부재로 인해 정보가 주어진 시간에서 전달될 수 없는 경우 필요할 수 있다. 정보는 저장 디바이스 내의 디바이스 식별자와 관련될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 통신 조립체는 일정한 시간 후에 저장된 정보의 전달을 재시도할 수 있다.

[0518] 몇몇 실시양태에서, 외부 디바이스는 판독기 조립체 내의 통신 조립체와 통신한다. 외부 디바이스는 시스템과 무선으로 또는 물리적으로 통신할 수 있으나, 환자, 의료인, 임상의, 연구원 또는 건강 관리 산업의 종사자를 포함하나 이들로 한정되지 않는 제3 관계자와도 통신할 수 있다.

[0519] 몇몇 실시양태에서, 시스템은 외부 디바이스, 예컨대, 컴퓨터 시스템, 서버, 또는 정보를 저장할 수 있거나 정보를 프로세싱할 수 있는 다른 전자 디바이스를 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 외부 디바이스는 하나 이상의 컴퓨터 시스템, 서버, 또는 정보를 저장할 수 있거나 정보를 프로세싱할 수 있는 다른 전자 디바이스를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 외부 디바이스는 환자 정보의 데이터베이스, 예를 들면, 의학적 기록 또는 환자 병력, 임상 시험 기록 또는 임상전 시험 기록(그러나, 이들로 한정되지 않음)을 포함할 수 있다. 외부 디바이스는 어떤 디바이스가 시스템 내로 삽입되어 있는지를 표시하는 식별자를 제공받았을 때 시스템의 통신 조립체로 전달될 수 있는, 시스템 상에서 실행될 프로토콜을 저장할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 프로토콜은 디바이스 식별자에 의해 좌우될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 외부 디바이스는 각각의 디바이스에 대해 1개 초과인 프로토콜을 저장한다. 다른 실시양태에서, 외부 디바이스 상의 환자 정보는 1개 초과인 프로토콜을 포함한다. 몇몇 경우, 외부 서버는 통신 조립체로부터 전달받은 광자 카운트를 프로세싱하고 몇몇 실시양태에서 체액 샘플 중의 분석물 농도를 계산하기 위한 수학적 알고리즘을 저장한다.

[0520] 몇몇 실시양태에서, 외부 디바이스는 당분야에서 공지되어 있고 상업적으로 입수가 가능한 하나 이상의 서버를 포함할 수 있다. 이러한 서버는 부하 밸런싱, 작업 관리, 및 외부 디바이스의 하나 이상의 서버 또는 다른 구성요소가 작동하지 않는 경우 백업 성능을 제공하여 상기 서버의 이용가능성을 개선할 수 있다. 서버는 당분야에서 공지되어 있는 바와 같이 저장 및 프로세서 유닛의 분산된 네트워크 상에서 실행될 수도 있고, 이때 본 발명에 따른 데이터 프로세싱은 작업단말기, 예컨대, 컴퓨터 상에 존재함으로써 서버에 대한 필요성을 제거한다.

[0521] 서버는 데이터베이스 및 시스템 프로세스를 포함할 수 있다. 데이터베이스는 서버 내에 존재할 수 있거나, 서버에 접근할 수 있는 또 다른 서버 시스템 상에 존재할 수 있다. 데이터베이스 내의 정보가 민감한 정보를 함유할 수 있기 때문에, 권한이 없는 사용자가 데이터베이스에 접근하는 것을 방지하는 보안 시스템이 실행될 수 있다.

[0522] 본원에 기재된 특징들 중 일부의 한 장점은 정보가 외부 디바이스로부터 판독기 조립체뿐만 아니라 다른 관계자 또는 다른 외부 디바이스, 예를 들면, PDA 또는 휴대폰(그러나, 이들로 한정되지 않음)으로 다시 전달될 수 있다는 점이다. 이러한 통신은 본원에 개시된 바와 같이 무선 네트워크를 통해 달성될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 계산된 분석물 농도 또는 다른 환자 정보는 예를 들면, 의료인 또는 환자(그러나, 이들로 한정되지 않음)에게 보내질 수 있다.

- [0523] 따라서, 본 디바이스 및 시스템을 이용하여 발생시킨 데이터는 시간에 따라 변화하는 대상체 내의 분석물 농도에 대한 경향 분석을 수행하는 데에 이용될 수 있다.
- [0524] 본원에 기재된 또 다른 장점은 어세이 결과가 이 결과의 수득으로부터 이익을 얻을 수 있는 임의의 제3 관계자에게 실질적으로 즉시 통신될 수 있다는 점이다. 예를 들면, 일단 분석물 농도가 외부 디바이스에서 측정되면, 상기 농도는 추가 조치를 취할 필요가 있을 수 있는 환자 또는 의료인에게 전달될 수 있다. 제3 관계자에게의 통신 단계는 데이터를, 디바이스를 보유한 제3 관계자의 손에게 전달함으로써 본원에 기재된 바와 같이 무선으로 수행될 수 있고, 상기 제3 관계자는 사실상 언제 어디서든 어세이 결과를 통보받을 수 있다. 따라서, 시간 민감성 시나리오에서, 환자는 긴급 의료 조치가 요구될 수 있는 경우 어디서든 즉시 접촉될 수 있다.
- [0525] 본원의 임의의 부분에 기재된 바와 같이, 영상화는 검출을 위해 이용될 수 있다. 영상화를 이용하여 샘플의 하나 이상의 특징을 검출할 수 있다. 예를 들면, 영상화를 이용하여 샘플의 존재 또는 부재를 검출할 수 있다. 영상화를 이용하여 샘플의 위치, 배치, 부피 또는 농도를 검출할 수 있다. 영상화를 이용하여 샘플 중의 하나 이상의 분석물의 존재, 부재 및/또는 농도를 검출할 수 있다.
- [0526] 몇몇 실시양태에서, 단일 측정을 이용하여 샘플 및/또는 분석물에 대한 다양한 정보를 수집할 수 있다. 예를 들면, 단일 측정을 이용하여 샘플의 부피 및 샘플 내의 분석물의 농도에 대한 정보를 수집할 수 있다. 단일 측정을 이용하여 샘플 내의 복수의 분석물들의 존재 및/또는 농도, 및/또는 분석물의 종류에 대한 정보를 수집할 수 있다. 단일 영상을 이용하여 본원에 기재된 1개, 2개 또는 그 이상의 정보 또는 정보의 종류에 관한 정보를 수집할 수 있다.
- [0527] 이러한 영상화 및 검출은 작은 샘플 부피를 사용하는 상황, 예컨대, 본원의 임의의 부분에 기재된 상황에서 유리할 수 있는 보다 더 정밀하고 정확한 어세이를 제공할 수 있다. 샘플 부피의 추가 예로는 500 μl 이하, 250 μl 이하, 200 μl 이하, 175 μl 이하, 150 μl 이하, 100 μl 이하, 80 μl 이하, 70 μl 이하, 60 μl 이하, 50 μl 이하, 30 μl 이하, 20 μl 이하, 15 μl 이하, 10 μl 이하, 8 μl 이하, 5 μl 이하, 1 μl 이하, 500 nL 이하, 300 nL 이하, 100 nL 이하, 50 nL 이하, 10 nL 이하, 1 nL 이하, 500 pL 이하, 250 pL 이하, 100 pL 이하, 50 pL 이하, 10 pL 이하, 5 pL 이하 또는 1 pL 이하가 있을 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 샘플 부피는 핑거스틱으로부터 약 3개 이하의 방울, 핑거스틱으로부터 약 2개 이하의 방울, 또는 핑거스틱으로부터 약 1개 이하의 방울을 포함할 수 있다. 이러한 작은 부피는 현장서비스 응용에 있어서 유용할 수 있다.
- [0528] 이러한 영상화 및/또는 검출은 낮은 변동계수를 갖는 어세이를 제공할 수 있다. 변동계수는 표준 편차와 평균의 절대 값 사이의 비일 수 있다. 한 실시양태에서, 반응 및/또는 어세이는 약 20%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.3% 또는 0.1% 이하의 변동계수(CV)(본원에서 "상대 표준 편차"로도 지칭됨)를 가질 수 있다. 단일 반응 및/또는 어세이, 또는 복수의 반응들 및/또는 어세이들을 이용하는 절차는 약 20%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.3% 또는 0.1% 이하의 변동계수를 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 영상화 및/또는 검출 단계, 또는 복수의 영상화 및/또는 검출 단계들을 이용하는 절차는 약 20%, 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.3% 또는 0.1% 이하의 변동계수를 가질 수 있다.
- [0529] 몇몇 실시양태에서, 현장서비스 위치에 배치될 수 있는 디바이스를 이용하는 영상화의 이용은 상기 디바이스의 전체 성능을 개선할 수 있다. 정확도 및/또는 정밀도를 개선할 수 있고/있거나 변동계수를 감소시킬 수 있다. 디바이스의 성능은 작은 부피, 예컨대, 본원에 기재된 부피를 취급할 때 개선될 수 있다. 영상화는 다른 검출 시스템과 함께, 다른 프로세스와 함께 또는 독립형 시스템으로서 이용될 수 있다. 성능의 개선은 약 15%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.3% 또는 0.1%의 변동계수 감소를 포함할 수 있다.
- [0530] 영상화는 1종 이상의 어세이 또는 샘플 취급 절차를 위한 다양한 종류의 검출에 유용할 수 있다. 이러한 어세이 또는 샘플 취급 절차의 예로는 원심분리, 분리, 세포분석, 면역어세이, ELISA, 핵산 어세이, 효소적 어세이, 색도측정, 또는 본원의 임의의 부분에 기재된 임의의 다른 종류의 어세이 또는 반응이 있을 수 있다.
- [0531] 영상화 시스템은 데이터 수집, 데이터 프로세싱 및 결과 해석을 위한 다른 방법들에 비해 다수의 장점을 제공할 수 있다. 영상화 시스템은 작은 샘플의 사용을 최대화할 수 있거나 작은 샘플의 사용의 효율을 증가시킬 수 있고 시스템 수준 성능을 향상시킬 수 있다. 영상화 시스템은 독립형 시스템으로서 검출을 위해 사용될 수 있거나 다른 검출 시스템 또는 기작과 함께 사용될 수 있다.
- [0532] 몇몇 시스템들에서, 전형적으로 조사되는 샘플에 대한 임의의 공간적 정보를 제공하지 않는 센서 및 시스템(예컨대, 광다이오드 및 광전자증배관, 및 관련된 광학소자/디바이스)이 사용될 수 있다. 오히려, 이들 시스템들은

전형적으로 샘플과 관련된 공간적 정보를 상실하면서 정보를 공간적으로 통합한 후 샘플에 대한 정보를 수집할 수 있다. 샘플로부터 신호를 공간적으로 통합하는 것이 센서에 의해 검출되는 신호 수준을 증가시킬 수 있지만, 광학소자 및 다른 센서의 민감도의 개선은 이러한 통합에 대한 필요성을 없앨 수 있다. 검출을 위한 영상화는 이러한 센서 대신에 이용될 수 있거나 이러한 센서와 함께 이용될 수 있다.

[0533] 하기 특징들 중 하나 이상의 특징을 유리하게 가질 수 있는 영상화 시스템을 이용할 수 있다. 영상화 센서는 통상적인 비영상화 센서의 민감도 및 동적 범위를 충족시키고/시키거나 초과하는 민감도 및 동적 범위를 가질 수 있다. 영상화 디바이스는 조사되는 샘플의 공간적 양태를 유지하여 후-프로세싱에 대한 상당한 능력을 제공할 수 있다. 후-프로세싱은 QA/QC(예를 들면, 질 조절, 예컨대, 자동화된 오차 검출 및/또는 병리학자에 의한 검토), 및/또는 특정 샘플 특징을 추출하기 위한 영상 분석을 포함할 수 있다. 영상화 디바이스는 3D, 2D, 1D (선 센서), 및/또는 샘플을 수집 광학소자/센서에 대해 상대적으로 병진시켜 샘플의 공간적 재구성을 가능하게 하기 위한 수단을 갖는 점 센서를 이용할 수 있다. 영상화 디바이스로부터 수집된 데이터를 프로세싱하여 영상의 선택된 영역으로부터 매우 구체적인 정보, 예컨대, 샘플의 형태학적 특징(예컨대, 세포 카운트) 및 데이터 (샘플 전체에 걸쳐 또는 영상 내의 세포에서 피크 형광)를 추출할 수 있다. 영상화 디바이스로부터 수집된 데이터를 프로세싱하여 측정의 민감도 및 해상도를 개선할 수 있다. 영상화 디바이스로부터 수집된 데이터는 영상화 되는 샘플 전체에 걸친 신호 변경의 평가를 가능하게 할 수 있다. 데이터를 후-프로세싱하여 샘플 전체에 걸쳐 또는 샘플 영상에서 확인된 관심 있는 임의의 영역 내에서 평균, 표준 편차, 최대치, 최소치 및/또는 다른 적용 가능한 통계자료를 계산할 수 있다. 영상화 디바이스는 다수의 영상들을 수집하고 시간 및 공간에 따른 영상의 변화, 예컨대, 응집 과정(예컨대, 프로트롬빈 시간의 어세이의 경우)에서 분명한 변화 또는 시간 및 공간에 따른 샘플의 다른(예를 들면, 화학적, 물리적, 생물학적, 전기적, 형태학적) 변화를 비교함으로써 시간에 따른 샘플의 변화를 조사할 수 있게 한다. 영상화 디바이스는 어레이, 조직 절편, 및 다른 어레이/샘플 입체구조의 보다 더 신속한 데이터 획득을 가능하게 할 수 있다.

[0534] 세포분석 응용

[0535] 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 실시양태는 시스템이 세포분석을 수행할 수 있도록 개조될 수 있다. 영상 분석을 이용하여 시스템에서 세포분석(예를 들면, 세포의 수 세기 및 기능 분석)을 수행할 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 피펫 및 원심분리기를 이용하여 혈액을 프로세싱할 수 있다. 전형적으로, 공지된 측정된 부피의 혈액($1\ \mu\text{l}$ 내지 $50\ \mu\text{l}$)을 먼저 원심분리하고 혈장 분획을 제거할 수 있다. 그 다음, 피펫을 반복적으로 이용하여 분배하고 흡입함으로써 세포 분획을 완충제 내에 재현탁할 수 있다. 형광 항체들의 각테일은 선택된 세포 마커(예컨대, CD45, CD4 등)에 대해 유도될 수 있다. 짧은 항온처리 후, 백혈구 세포에 대한 고정제 및 적혈구 세포에 대한 용해제로서 작용할 수 있는 시약을 첨가할 수 있다. 또 다른 항온처리 후, 원심분리하여 백혈구 세포를 수집할 수 있고 상청액 용혈물을 흡입으로 제거할 수 있다. 염색된 백혈구 세포를 측정된 부피의 완충제(전형적으로 원래의 혈액 부피(대략 $1\ \mu\text{l}$ 내지 $20\ \mu\text{l}$) 미만임) 내로 재현탁할 수 있고 영상 분석을 위해 투명 모세관 채널 내로 분배할 수 있다. 전형적으로, 상이한 형광 표지들을 갖는 항체들 및/또는 상이한 플루오르/단백질 비로 표지된 항체들을 사용하여 최대 3종 또는 심지어 5종 이상의 세포들을 영상화할 수 있다. 보다 더 많은 종류의 세포들이 카운팅되거나 분석되어야 하는 경우, 1개 초과와 반응 혼합물을 사용할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 반응 혼합물을 사용하여 다양한 종류의 세포를 카운팅하거나 분석할 수 있다.

[0536] 몇몇 실시양태에서, 모세관 채널은 전형적으로 약 $10\ \mu\text{m}$ 내지 $100\ \mu\text{m}$ 깊이, $0.5\ \text{mm}$ 내지 $2\ \text{mm}$ 폭 및 $0.5\ \text{cm}$ 내지 $5\ \text{cm}$ 길이를 가질 수 있다. 모세관 채널은 본원의 임의의 부분에서 기재된 다른 치수를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다른 치수를 가질 수 있다. 염색된 세포 분산액은 통상적으로 모세관 작용에 의해 채널을 충전시킬 수 있고 세포는 보다 더 낮은 채널 표면 상에 가라앉을 수 있다. 채널을 하나 이상의 레이저 또는 다른 광원(예를 들면, LED)로 조명할 수 있다. 광학 트레인은 하나 이상의 광학 요소, 예컨대, 이색성 거울 또는 렌즈를 가질 수 있고 시야를 확대할 수 있거나 확대할 수 없다. 몇몇 실시양태에서, 시야를 2배 내지 100배 확대할 수 있다. 전형적으로 약 $1\ \text{mm} \times 0.5\ \text{mm}$ 의 시야를 나타내고 약 1000×1000 화소(총 100만 개)의 면적을 갖는 센서 상에서 영상화된 1개 내지 10,000개 세포(이상적으로는 300개의 관심 있는 세포)를 함유하는 일련의 영상들을 수집할 수 있다.

[0537] 채널의 인접 구획을 나타내는 일련의 영상들을 수집할 수 있다. 기계적 재물대를 이용하여 채널을 광원에 대해 상대적으로 이동시킬 수 있다. 몇몇 경우, 서보-기작은 영상에 초점을 맞추도록 재물대를 수직 방향으로 이동시킬 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 광원 또는 하나 이상의 광학 요소는 영상에 초점을 맞추도록 재물대에 대해 상대적으로 이동할 수 있다. 영상은 통상적으로 광원과 광학 필터의 하나 이상의 조합의 이용을 통해 만들어진다. 광원은 전원이 켜지고 꺼질 수 있고, 필터는 필요한 경우 광 경로 내로 이동할 수 있다. 바람직하게는, 임의의

주어진 종류의 최대 1000개 세포를 카운팅할 수 있다. 다른 실시양태에서, 약 1개 세포, 5개 세포, 10개 세포, 30개 세포, 50개 세포, 100개 세포, 150개 세포, 200개 세포, 300개 세포, 500개 세포, 700개 세포, 1000개 세포, 1500개 세포, 2000개 세포, 3000개 세포 또는 5000개 세포 이상 또는 이하를 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 주어진 종류의 다양한 수의 세포를 카운팅할 수 있다. 이용가능한 카운팅 알고리즘을 이용하여 세포를 카운팅할 수 있다. 세포는 그의 특징적인 형광, 크기 및 형태에 의해 인식될 수 있다. 패턴 인식 알고리즘을 이용하여 염색된 세포 데브리스를 배제할 수 있고, 응집된 세포들이 존재하는 대다수의 경우 이들을 분석으로부터 배제할 수 있거나 응집체로서 해석할 수 있다.

[0538] 세포분석 플랫폼은 전체적으로 자동화된 조절된 환경에서 하기 작업들을 수행할 수 있는 통합된 자동화된 현미경 디바이스일 수 있다. 하기 작업들 중 하나 이상의 작업이 세포분석 응용에서 일어날 수 있다. 하기 작업들이 이들이 기재된 순서대로 또는 대안적 순서대로 일어날 수 있거나 적절한 경우 다른 작업으로 치환될 수 있다:

- [0539] 1. 원하는 종류의 혈액 세포의 단리;
- [0540] 2. 형광 및/또는 착색된 염료 및/또는 비드를 사용한 세포의 표지;
- [0541] 3. 광학적으로 상용가능한 큐벳 내로의 세포 현탁액의 수용;
- [0542] 4. 형광 현미경, 암시야 조명 및/또는 명시야 조명을 이용한 세포의 영상화;
- [0543] 5. 원하는 세포 특성을 추출하기 위한 영상의 자동화된 분석; 및
- [0544] 6. 임상적으로 보고될 수 있는 정보를 유도하기 위한 진보된 통계적 방법 및 분류 방법을 이용한 추출된 정보의 자동화된 분석.

[0545] 하기 단락에서, 이들 작업들 각각이 보다 더 상세히 논의되어 있고, 영상 및 스케치는 필요하다고 간주되는 경우 언제든지 제공된다.

[0546] 1. *원하는 종류의 혈액 세포의 단리*. 본원의 임의의 부분에 기재된 하나 이상의 실시양태에 따라 원하는 종류의 혈액 세포를 단리할 수 있다. 예를 들면, 이러한 단리는 세포분석 또는 원심분리에 관한 이전 설명에서 언급된 바와 같이 일어날 수 있다.

[0547] 2. *형광 및/또는 착색된 염료 및/또는 비드를 사용한 세포의 표지*

[0548] 특정 형광 염료를 사용할 수 있다. 관심 있는 세포를 이들 세포 상의 마커에 대해 특이적인 형광 표지된 결합제 (예를 들면, 항체, 앵타머 등)의 사전분취된 용액과 함께 혼용처리할 수 있다. 핵심 고려사항은 "밝은" 또는 높은 소광계수 및 높은 양자 수율 플루오르와 마커(세포는 상기 마커에 대한 낮은 결합 성능을 가짐)의 페어링(역의 경우도 성립)일 수 있다. 예를 들면, 마커 CD22는 CD45의 약 10분의 1 수준으로 B 림프구 상에서 발현될 수 있다. 이 상대적 발현이 주어지면, CD22를 "밝은" 염료로 표지할 수 있고, CD45를 "이량체" 염료로 표지할 수 있다. 이 기법을 이용하여 표지할 마커는 세포내 마커 또는 세포 표면 마커일 수 있다. 낮은 발현 마커에 대해 이차 표지 방법을 이용하여 검출 및 정량의 민감도를 개선할 수 있다. 요약하건대, 일차 결합제를 이차 결합제에 의해 특이적으로 인식될 수 있는 또 다른 분자와 접합시킬 수 있다. 그 다음, 보다 더 많은 수의 형광단으로 표지된 이차 결합제는 제자리(*in situ*)에서 일차 결합제와 결합할 수 있고 형광 신호를 향상시킬 수 있다. 이를 달성하기 위한 한 방법은 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)로 표지된 항-바이오틴 항체에 의해 인식될 수 있는 바이오틴-접합된 항-CD22 항체의 사용일 수 있다. 상기 사용은 형광 신호를 급격히 향상시킬 수 있다. 도 123은 표지된 백혈구를 보여주는 형광 현미경사진의 일례를 제공한다. 상기 예는 고정되고 용해된 혈액 샘플 중의 알렉사-플루오르 647-항-CD45-표지된 인간 백혈구의 형광 현미경사진을 예시한다. 가성색채(pseudocolor) 배합을 이용하여 (높은 CD45 발현을 갖는) "밝은" 세포와 (낮은 CD45 발현을 갖는) "흐린" 세포 사이의 차이를 감지를 향상시킨다.

[0549] 세포 도말(smear)의 색채 염색도 시스템 내에서 이용할 수 있다. 예를 들면, 스테인라이트(StainRITE)TM 라이트-지엠사 스테인(Wright-Giemsa Stain)(폴리사이언시스 인코포레이티드(Polysciences Inc.))에서 주어진 매뉴얼 절차를 본 발명의 디바이스에서 자동화하고 관독할 수 있다.

[0550] 몇몇 실시양태에서, 비특이적 형광 염료를 사용할 수 있다. 백혈구 하위집단을 구별하기 위해, 플랫폼은 핵산에 결합할 수 있는 형광 염료(예를 들면, SYTO, 핵스트(Hoechst)) 또는 지질 막에 결합할 수 있는 형광 염료(예를 들면, DiI, DiD, FM-4-64)도 사용할 수 있다.

[0551] 3. *광학적으로 상용가능한 큐벳 내로의 세포 현탁액의 수용*

- [0552] 몇몇 실시양태에서, 세포분석 큐벳은 세포 위아래에서 광학적으로 투명한 영상화 물질을 제공하도록 제작된 "채널" 내에 고정된 부피의 사전표지된 세포 현탁액을 수용하도록 디자인될 수 있다. 샘플을 샘플 도입구를 통해 채널 내로 도입할 수 있다. 샘플 도입구로부터 일정한 거리에서, 통기공(air vent)은 기압의 방출 및 채널 내로의 샘플의 유동을 허용할 수 있다.
- [0553] 채널 치수는 샘플 도입구에서 분배된 부피와 관계없이 예정된 공지된 부피의 유체를 보유하도록 디자인될 수 있다. 각각의 큐벳은 동일한 및/또는 상이한 부피의 다수의 채널들을 가질 수 있고, 이때 이들 각각은 하나 이상의 샘플 도입구 및 하나 이상의 통기공을 갖는다.
- [0554] 샘플 중의 관심 있는 세포의 농도는 큐벳 내로의 수용 후 영상화 시스템에서 시야 당 원하는 수의 세포가 달성될 수 있도록 샘플 준비 동안 조절될 수 있다. 이를 수행하는 한 방법은 세포 분산액을 갖는 용기를 영상화하고 탁도를 측정하는 것이다. 탁도와 세포 카운트 사이의 사전확립된 관계를 이용하여 세포 밀도를 계산할 수 있다. 전형적으로, 세포 분산액은 가장 낮을 것 같은 세포 카운트를 갖도록 일정 부피의 완충제에서 만들어질 것이고, 세포 농도는 영상-기초 세포 카운팅에 대한 최적 농도보다 더 높을 것이다. 그 다음, 보다 더 많은 완충제를 첨가하여 분산액을 최적 수준으로 만들 수 있다.
- [0555] 큐벳의 영상화 구역은 관심 있는 응용을 위해 충분한 수의 세포를 제공하도록 디자인될 수 있다. 예를 들면, 풍부한 RBC의 카운팅은 단지 1000개 내지 2000개의 세포의 카운팅을 필요로 할 수 있으므로 희석된 샘플 및 큐벳 내의 작은 영상화 구역만을 필요로 할 수 있다. 그러나, 희귀한 골수모세포의 카운팅은 몇몇 경우 (총) 100,000개 초과인 세포를 영상화하는 능력을 필요로 할 수 있다. 이러한 시나리오에서, 시스템은 100,000개의 세포가 합리적인 수의 시야로 영상화될 수 있도록 세포 현탁액을 농축할 수 있다. 따라서, RBC 영상화에 전용되는 큐벳 상의 채널은 골수모세포의 영상화에 전용되는 채널보다 더 작을 것이다.
- [0556] 큐벳은 영상화 플랫폼으로의 큐벳의 전달을 가능하게 하는 자동화된 방식으로 표준 피펫팅 기작에 의해 픽업되도록 디자인될 수 있다. 피펫팅 기작의 팁 배출기는 큐벳을 피펫팅 기작으로부터 영상화 플랫폼 상으로 배출할 수 있다. 영상화 플랫폼에의 큐벳의 정합(Registration)은 2 단계로 일어날 수 있다. 큐벳이 영상화 플랫폼으로 전달되었을 때, 큐벳 상의 정적 정합 특징부는 영상화 플랫폼 상의 고정 특징부와 접촉하여 큐벳을 영상화 플랫폼의 광학 축과 평행하게 정렬할 수 있다(X,Y 정합). 그 다음, 영상화 플랫폼 상에 위치한 기작으로 정합을 완료할 수 있다. 이 기작은 영상화 플랫폼의 광학 축에 수직인 평면 표면에 대해 큐벳을 기울여지게 하여(Z 정합), 샘플을 영상화 플랫폼의 초점 범위 내에 국한시킬 수 있다.
- [0557] 4. 형광, 암시야 조명 및 명시야 조명을 이용한 세포의 영상화
- [0558] 세포를 영상화하는 방법은 본원의 임의의 부분에 기재된 본 발명의 다른 응용에도 적용될 수 있다. 전술된 바와 같이, 영상화 기법은 다른 영상화 용도에 이용될 수 있다.
- [0559] 조명 성능: 세포분석 플랫폼은 3종의 조명 방법을 갖도록 디자인될 수 있다: epi-형광, 암시야 및 명시야. 또한, 셋업의 모듈식 성질은 상 대비와 차등 간섭 대비(DIC)의 통합을 가능하게 한다.
- [0560] epi-형광 조명은 3개의 레이저 선(예를 들면, 488 nm, 532 nm 및 640 nm)의 이용에 의해 달성될 수 있으나, 시스템의 모듈식 성질은 다른 광원, 예컨대, 다른 레이저원, LED 및 표준 아크 램프(예를 들면, 제논, 수은 및 할로겐)의 통합도 가능하게 한다. 추가로, 필요한 경우, 2개의 상이한 광원이 동시에 사용될 수 있다. 결과적으로, 세포분석 플랫폼을 이용하여 매우 다양한 형광 염료들을 영상화할 수 있다. 조명원과 방사 광학소자의 조합은 다양한 수(예를 들면, 3개 내지 5개)의 스펙트럼 독립적인 영상화 채널을 달성하도록 구성될 수 있다.
- [0561] 암시야 조명은 환형광(샘플 위에 또는 아래에 위치함), 암시야 아베 집광렌즈, 환상면 거울을 갖는 암시야 집광렌즈, 대물렌즈 주변의 슬리브 내에 탑재된 epi-암시야 집광렌즈, 다크 스탑을 갖춘 재물대 집광렌즈와 환형광의 조합의 사용에 의해 달성될 수 있다. 기본적으로, 이들 광학 구성요소들은 사용되는 물체의 개구수(NA)보다 더 큰 NA의 광원추를 생성할 수 있다. 조명 방법의 선택은 다수의 고려사항, 예컨대, 필요한 확대율, 기계적 디자인 고려사항, 또는 영상화 센서의 크기에 의해 좌우된다. 환형광-기초 조명은 일반적으로 보다 더 넓은 면적에 걸쳐 균일한 암시야 조명을 제공함과 동시에 전체 시스템의 기계적 디자인에서 충분한 유연성을 제공한다. 도 124는 암시야 영상을 이용하는 세포내 패턴의 일례를 제공한다. 상기 예는 인간 백혈구의 암시야 영상에서 상이한 세포내 패턴들, 즉 (a) 호산구 내의 과립의 존재로 인한 강한 산란 패턴, (b) 특징적인 핵인 엽(nucleolar lobe)을 갖는 다형핵 호중구, 및 (c) 유의한 정도로 광을 산란시키지 않는 세포(림프구 또는 호염기구)를 보여준다.

- [0562] 명시야 조명은 재물대-집광렌즈와 함께 백색 광원을 사용하여 켈러 조명을 생성함으로써 달성될 수 있다. 도 126은 인간 전혈의 명시야 영상의 일례를 제공한다. 상기 예는 라이트-지엠프 염색 방법으로 염색된 인간 전혈 도말의 명시야 영상을 보여준다. 인간 백혈구의 염색의 특징적인 패턴이 명확히 보인다. 특징적인 형태를 갖는 적혈구 세포도 이들 영상들에서 확인될 수 있다.
- [0563] 자동 필터 휠: 자동 필터 휠은 영상화 광학 경로의 조절을 허용하여 동일한 시야 상에서 다수의 형광단의 영상화를 가능하게 할 수 있다.
- [0564] 영상-기초 자동조점맞춤: 세포분석 플랫폼은 영상-기초 알고리즘을 이용하여 물체의 z-위치(예를 들면, 수직 위치)(즉, 샘플로부터의 그의 거리)를 조절하여 자동조점맞춤을 달성할 수 있다. 요약하건대, 암시야 조명을 이용하여 작은 영상(예를 들면, 128x128 화소)을 빠른 속도로 포착할 수 있다. 이 영상을 분석하여 영상 선예도의 측정에 이용될 수 있는 자동조점 기능을 유도할 수 있다. 빠른 검색 알고리즘에 기초하여 물체의 다음 z-위치를 계산할 수 있다. 샘플을 새로운 z-위치로 이동시킬 수 있고, 또 다른 작은 영상을 포착할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이 폐쇄된-루프 시스템은 초점맞춤을 위해 임의의 다른 하드웨어의 이용을 필요로 하지 않는다.
- [0565] 재물대(stage)의 병진: 현미경 재물대를 컴퓨터-조절된 노광기 모터에 연결하여 X 방향 및 Y 방향(예를 들면, 수평 방향)으로의 병진을 허용할 수 있다. 모든 위치에서, 원하는 수의 영상을 포착할 수 있고 재물대를 다음 XY 위치로 이동시킬 수 있다.
- [0566] 영상화 센서: CCD, EMCCD, CMOS, 또는 몇몇 경우 신호의 검출에 이용될 수 있는 광전자증배관을 갖는 카메라.
- [0567] 5. 원하는 세포 특성을 추출하기 위한 영상의 분석
- [0568] 세포분석 플랫폼은 상이한 조명 기법들을 이용하여, 세포의 다양한 성질들 및 특징들을 보여주는 영상을 획득할 수 있다. 세포-마커 특이적 결합제를 사용한 표지는 세포 표면 상에서 또는 세포 내에서 그 특정 마커의 발현도를 보여줄 수 있다. 암시야 영상은 세포의 광 산란 성질을 보여줄 수 있다. 보다 더 많은 광을 산란시키는 세포의 내부 및 외부 특징부는 보다 더 밝게 보이고, 보다 더 적은 양의 광을 산란시키는 특징부는 암시야 영상에서 보다 더 어둡게 보인다. 세포, 예컨대, 과립구는 충분한 양의 광을 산란시킬 수 있는 크기 범위(100 nm 내지 500 nm)의 내부 과립을 갖고 일반적으로 암시야 영상에서 보다 더 밝게 보인다. 나아가, 임의의 세포의 외측 경계는 광을 산란시킬 수 있고 밝은 광의 고리로서 보인다. 이 고리의 직경은 직접적으로 세포의 크기를 제공할 수 있다. 세포의 명시야 영상은 세포가 미리 염색되어 있는 경우 세포 크기, 세포 내의 상-조밀 물질 및 세포 내의 착색된 특징부를 보여줄 수 있다.
- [0569] 영상 프로세싱 라이브러리는 각각의 세포에 대한 하기 정보들(그러나, 이들로 한정되지 않음) 중 하나 이상의 정보를 추출할 수 있다:
- [0570] 1. 세포 크기;
- [0571] 2. 세포 과립성(통상적으로 유세포분석 어법에 기초할 때 측면 산란으로도 지칭됨)의 정량적 측정;
- [0572] 3. 스펙트럼 채널들 사이의 혼선을 보완한 후 영상화의 각각의 스펙트럼 채널에서 형광의 정량적 측정;
- [0573] 4. 표준 형태 및 사용자지정 형태 특성, 예컨대, 종횡비, 페렛(Feret) 직경, 첨도(Kurtosis), 관성 모멘트, 환형성, 고체성 등에 의해 정량된 세포의 형태;
- [0574] 5. 세포가 (한체 또는 다른 종류의 수용체에 부착되지 않은) 염료로 염색되어 있는 경우 세포의 색채, 색채 분포 및 형태;
- [0575] 6. 생물학적 특징, 예를 들면, 암시야 영상에서 세포 내의 과립의 밀도, 또는 다형핵 호중구 등의 지엠프-라이트 염색된 영상에서 핵인 엽의 수 및 크기의 정량적 매트릭스로서 정의되는 염색 또는 산란 또는 색채의 세포내 패턴;
- [0576] 7. 별도의 영상에서 보이는 세포의 특징부들의 동시국소화.
- [0577] 이 단계에서 이용된 영상 프로세싱 알고리즘은 영상 여과, 가장자리 검출, 주형 일치, 자동 역치화, 형태학적 연산 및 물체의 형태 분석의 조합을 이용할 수 있다.
- [0578] 6. 임상적으로 보고가능한 정보를 유도하기 위한 진보된 통계적 방법 및 분류 방법을 이용한 추출된 정보의 분석

- [0579] 임의의 수의 측정된 특성을 세포의 영상으로부터 추출할 수 있다. 예를 들면, 영상으로부터 추출된 각각의 세포의 측정된 특성은 7개 내지 15개일 수 있으므로, 각각의 세포가 하나의 점인 7-차원적 내지 15-차원적 공간을 생성할 수 있다. n 개의 측정된 특성이 영상으로부터 추출되는 경우, 각각의 세포가 하나의 점인 n -차원적 공간이 제공될 수 있다.
- [0580] 많은 수의 세포(예를 들면, 100개 내지 100,000개의 세포)에 대해 획득된 데이터에 기초할 때, 복잡한 n -차원적 산란된 데이터 세트가 발생될 수 있다.
- [0581] 통계적 방법들은 이 n -차원적 공간에서 세포를 개개의 분리된 집단으로 클러스터링하는 데에 이용될 수 있다. 또한, 이 방법들은 세포생물학 및 혈액학의 최신 기술 지식을 이용하여 클러스터링 및 세포 집단 확인에 있어서 도움을 줄 수 있다.
- [0582] 도 125는 표지된 세포 샘플로부터의 데이터의 다중 파라미터 획득의 일례를 제공한다. 인간 백혈구를 범-백혈구 마커인 항-CD45-알렉사 플루오르 700(여기서 녹색으로 표시됨) 및 B 세포 마커 항-CD22-APC(여기서 적색으로 표시됨)로 표지하였다. 개개의 채널은 CD45 및 CD22 발현의 상이한 패턴 및 측면 산란을 보인다. CD22 및 CD45에 대해 양성을 나타내는 세포(B 림프구)는 특징적으로 낮은 측면 산란을 보인다. 다른 한편으로, 높은 측면 산란을 갖는 세포, 예컨대, 호중구 및 호산구는 CD22에 대한 표지를 보이지 않는다.
- [0583] 도 127은 정량적 다중 파라미터 데이터 획득 및 분석의 일례를 보여준다. 예를 들면, 인간 백혈구 상의 CD45 강도의 분포를 보여줄 수 있는 막대그래프가 제공될 수 있다. 임의의 다른 그래픽 데이터 분포 기법을 이용하여 상기 분포를 보여줄 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 측면 산란의 산란도가 제공될 수 있다. 측면 산란은 인간 백혈구 샘플에 대한 암시적 영상 분석 대 CD45 형광 강도에 의해 측정될 수 있다. 측면 산란도는 과립구(상부 좌측) 및 림프구(하부 우측)의 2개 주요 집단들을 보여줄 수 있다.
- [0584] 상기 단락에는 세포분석 플랫폼의 주요 구성요소 및 성능 및 응용이 기재되어 있다. 이들 성능에 기초하여, 넓은 범위의 세포-기초 어레이들이 이 플랫폼 상에서 작동하도록 디자인될 수 있다. 예를 들면, 5-파트 백혈구 감별을 수행하기 위한 어레이가 제공될 수 있다. 이 경우 하기 종류의 백혈구들에 대한 혈액 μL 당 세포의 수가 보고될 수 있다: 단핵구, 림프구, 호중구, 호염기구 및 호산구. 세포분석 플랫폼 상의 이 어레이의 개발을 위한 기초 전략은 이것을, 백혈구가 이 n -차원적 공간에서 (예를 들면, 5개의) 상이한 집단으로 분리될 수 있도록 백혈구의 몇몇 특성, 예컨대, 측면 산란, CD45 형광 강도 또는 CD20 형광 강도가 측정되는 문제로 전환시키는 것일 수 있다. 세포의 클러스터 주변에서 만들어진 영역은 2-차원적 공간에서 산란도 상에 위치될 수 있고 유세포 분석 어법에 따라 "게이트(gate)"로서 지칭된다. 예시적 표지 및 "게이팅(gating)" 전략은 다음과 같다:

마커	표지	목적
CD2/CRTH2/CD19/CD3 콕테일	PE-Cy7	림프구의 확인, 및 호염기구 및 호산구의 표지
CD45	알렉사-플루오르 647	모든 백혈구들을 표지하기 위한 범-백혈구 마커
CD14/CD36 콕테일	FITC	단핵구의 확인

세포 종류	"게이트"
호염기구	CD2/CRTH2/CD19/CD3 양성, SSC 낮음, CD45 중간, CD14/CD36 낮음
호산구	CD2/CRTH2/CD19/CD3 양성, SSC 높음, CD45 높음, CD14/CD36 낮음
호중구	CD2/CRTH2/CD19/CD3 음성, SSC 높음, CD45 중간(호산구보다 낮음)
림프구	CD2/CRTH2/CD19/CD3 양성, SSC 낮음, CD45 높음, CD14/CD36 낮음
단핵구	CD2/CRTH2/CD19/CD3 음성, SSC 중간, CD45 중간, CD14/CD36 양성

- [0585]
- [0586] 본원에 기재된 세포분석 플랫폼 및 분석 시스템은 유리하게는 순서가 매겨진 샘플에 기초한 자동화된 샘플 준비 및 실행을 허용할 수 있다. 기재된 시스템 및 방법은 VCS(부피, 전도성 및 산란)과 반대로 세포의 구체적인 확인을 가능하게 할 수도 있고, 이것은 확인의 신뢰도를 증가시킬 수 있고 확인 시험될 경우를 감소시킬 수 있다. 본원에 기재된 영상 분석은 필요한 경우 추후 확인 분석을 위해 세포 영상의 보존도 허용할 수 있다. 유리하게는 세포의 형태학적 특징의 이용가능성도 존재할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 광범위한 농도의 세포 샘플을 처리하기 위한 샘플 준비 및 영상화 파라미터의 동적 조절도 제공될 수 있다.
- [0587] 몇몇 실시양태에서, 원심분리기를 이용하여 세포 집단을 준비하고 농축할 수 있다. 방법은 세포 준비를 위한 원심분리기, 및 본원의 임의의 부분에 기재된 영상화 및 분석 시스템의 이용을 포함할 수 있다.

- [0588] 몇몇 실시양태에서, 암시야 영상화와 다수의 형광 항체들로 염색된 세포의 영상화의 조합을 이용할 수 있다. 이러한 조합은 다른 기법들보다 훨씬 더 단순하고 더 저렴한 디바이스에서 FACS 분석의 등가물을 제공할 수 있다.
- [0589] 본 발명의 몇몇 실시양태에 따라, 본원에 기재된 시스템 및 방법은 하기 특징들 중 하나 이상의 특징을 가능하게 할 수 있다. 이러한 특징들은 다양한 응용에 유리할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 자동화된 샘플 검사 및 프로세싱이 가능해질 수 있다. 이러한 샘플 검사 및 프로세싱은 샘플 질, 샘플 부피 측정, 희석(및 희석률의 측정), 및 혈장으로부터의 적혈구 및 백혈구 세포의 분리 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0590] 자동화된 화학적/어세이 관련 공정도 이용될 수 있다. 이것은 침전, 혼합 또는 침강을 포함할 수 있다.
- [0591] 몇몇 실시양태에서, 발광을 생성하거나 광을 변화시키는(예를 들면, 색채 화학) 임의의 모든 어세이들의 자동화된 측정이 존재할 수 있다. 이들은 분광광도측정, 형광측정, 발광측정, 탁도측정, 혼탁도측정, 굴절률측정, 3색 영상 분석, 편광측정, 응집의 측정, 영상 분석(카메라, 디지털 카메라, 스캐너, 무렌즈 사진촬영, 3-D 사진촬영 및 비디오 사진촬영 중 하나 이상을 이용할 수 있음), 및 현미경관찰 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0592] 어세이의 자동화된 질 조절 및/또는 교정도 본원에 기재된 시스템 및 방법 내에 제공될 수 있다.
- [0593] 몇몇 실시양태에서, 쌍방향 통신이 제공될 수 있다. 이러한 통신은 모든 어세이 단계들의 기록 유지를 가능하게 할 수 있다. 또한, 쌍방향 통신은 어세이 프로토콜의 변화를 가능하게 하여 다수의 어세이들의 완료를 최적화할 수 있거나 증가시킬 수 있다.
- [0594] **질 조절/보완 응용**
- [0595] 몇몇 실시양태에서, 영상화를 하나 이상의 다른 측정 또는 검출 단계와 함께 이용할 수 있다. 영상화는 다른 기법, 절차, 반응 및/또는 어세이를 보완할 수 있다. 예를 들면, 영상화를 이용하여 임의의 다른 작업, 예컨대, 샘플 준비, 어세이 또는 검출 단계에 대한 하나 이상의 질 조절 검사 또는 단계를 수행할 수 있다. 영상화를 이용하여 다른 검출을 용이하게 할 수 있다. 영상화를 이용하여 수집된 데이터의 정확도 및/또는 정밀도를 개선할 수 있다. 영상화는 데이터, 결과 및/또는 임의의 측정치를 검증하는 질 조절 양태일 수 있다. 영상화는 조절 기작 또는 개선 기작일 수 있다. 영상화를 이용하여 수집된 데이터, 및/또는 데이터의 정확도 및/또는 정밀도에 영향을 미칠 수 있는 하나 이상의 조건을 검출할 수 있다. 따라서, 영상화는 샘플 준비, 어세이 및/또는 검출 절차를 개선할 수 있다. 이것은 작은 샘플 부피, 예컨대, 본원의 임의의 부분에 기재된 부피가 존재하는 상황에서 특히 유리할 수 있다.
- [0596] 일례에서, 분석물의 존재 및/또는 농도를 확인하기 위해 검출 단계를 수행할 수 있다. 후속 정성적 및/또는 정량적 평가에 유용할 수 있는 데이터를 대표할 수 있는 하나 이상의 신호의 검출을 수행할 수 있다. 검출은 가시광의 검출을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다. 검출은 전자기 스펙트럼(예를 들면, 적외선, 마이크로파, 자외선, 감마선, x-선, 가시광)을 따라 임의의 위치로부터 에너지를 측정하는 것을 포함할 수 있다. 광학 센서, 온도 센서, 동작 센서, 압력 센서, 전기 센서, 음향 센서, 화학 센서, 분광계 또는 본원의 임의의 부분에 기재된 임의의 다른 센서, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함할 수 있는 임의의 종류의 센서를 이용하여 검출을 수행할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 검출은 광 및/또는 에너지의 공간적 분포를 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다. 몇몇 경우, 검출은 에너지 밀도 분포를 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다.
- [0597] 영상화는 검출이 일어나는 하나 이상의 조건을 검출할 수 있다. 영상화를 이용하여 검출에서 사용될 수 있는 샘플, 시약, 용기 또는 디바이스의 부분의 조건을 검출할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 영상화는 시각적 영상화일 수 있다. 예를 들면, 영상화는 스냅사진, 포토 및/또는 사진을 포착하는 단계를 포함할 수 있다. 영상화는 전자기 스펙트럼을 따라 존재하는 에너지의 공간적 분포를 포착하는 단계를 포함할 수 있다. 전자기 스펙트럼을 따라 존재하는 에너지는 가시광을 포함할 수 있거나 다른 범위(예를 들면, 적외선, 자외선 또는 본원에 기재된 임의의 다른 광선)를 포함할 수 있다. 예를 들면, 가시광의 공간적 분포는 2-차원적 영상을 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 영상화는 본원의 임의의 부분에 보다 더 상세히 기재되어 있는 영상 포착 디바이스의 이용을 포함할 수 있다. 영상 포착 디바이스의 몇몇 예로는 카메라, 예컨대, 무렌즈(계산) 카메라(예를 들면, 프렌켄카메라) 또는 오픈-소스(open-source) 카메라가 있을 수 있다. 영상 포착 디바이스는 영상화된 물품의 1-차원적, 2-차원적 또는 3-차원적 화상을 발생시킬 수 있는 신호를 포착할 수 있다. 몇몇 경우, 영상 포착 디바이스는 물체의 3-차원적 또는 가상 3-차원적 화상을 제공하도록 구성된 움직임 감지 인풋 디바이스일 수 있다.
- [0598] 영상화 기법은 이용되는 검출 기작과 동일할 수 있거나 상이할 수 있다. 몇몇 경우, 검출 단계와 질 조절 영상화 단계 사이에 상이한 종류의 검출 기작이 이용된다. 몇몇 경우, 검출은 예컨대, 분광계로부터의 에너지 밴드

평가 또는 에너지 밀도 분포를 포함할 수 있지만, 질 조절 영상화는 예컨대, 카메라로부터의 가시광의 공간적 분포를 포함할 수 있다.

[0599] 민감한 검출은 영상화에 의해 달성될 수 있다. 예를 들면, 영상화 디바이스는 1 mm, 500 μm , 200 μm , 100 μm , 75 μm , 50 μm , 25 μm , 15 μm , 10 μm , 7 μm , 5 μm , 1 μm , 800 nm, 700 nm, 500 nm, 300 nm, 100 nm, 50 nm, 30 nm, 10 nm, 5 nm, 1 nm, 500 pm, 300 pm 또는 100 pm 이내까지 영상을 포착할 수 있다. 일례에서, 영상화는 약 2 메가화소, 4 메가화소, 6 메가화소, 8 메가화소, 10 메가화소, 12 메가화소, 15 메가화소, 20 메가화소, 25 메가화소, 30 메가화소, 40 메가화소 또는 50 메가화소 이상의 해상도를 가질 수 있는 카메라에 의해 달성될 수 있다.

[0600] 영상화를 이용하여 오차 또는 다른 결함 상태를 검출할 수 있다. 영상화를 이용하여 오차의 확률을 증가시킬 수 있고/있거나 부정확도 및/또는 비정밀도를 초래할 수 있는 조건을 확인할 수 있다. 예를 들면, 영상화를 이용하여 하나 이상의 바람직하지 않은 물질의 존재 및/또는 부재를 확인할 수 있다. 바람직하지 않은 물질의 예로는 기포, 입자, 섬유, 미립자, 데브리, 침전물, 또는 측정예 영향을 미칠 수 있는 다른 물질이 있을 수 있다. 또 다른 예에서, 영상화를 이용하여 샘플, 시약 또는 다른 물질의 부피가 원하는 범위 내에 포함되는지 아니면 샘플, 시약 또는 다른 물질이 원하는 위치에 위치하는지를 확인할 수 있다. 영상화를 이용하여 샘플, 시약 또는 다른 물질의 농도를 측정할 수 있거나 샘플, 시약 또는 다른 물질이 원하는 농도 범위 내에 포함되는지를 확인할 수 있다.

[0601] 일례에서, 작은 부피의 샘플에 대한 효소적 어세이를 수행할 수 있다. 부피 값의 예는 본원의 임의의 부분에서 제공될 수 있다. 분광계, 또는 본원에 기재된 다른 검출 방법 또는 기작을 이용하여 효소적 어세이에 대한 검출 단계를 수행할 수 있다. 검출이 일어나는 조건을 확인하기 위해 영상화 단계를 수행할 수 있다. 예를 들면, 영상화 단계는 원하지 않는 미립자, 예컨대, 기포, 또는 임의의 다른 원하지 않는 조건이 존재하는지를 확인할 수 있다. 영상화 단계는 어세이가 작동되어야 하는 대로 작동되는지를 검증할 수 있다. 영상화 단계는 어세이가 일어나고/나거나 검출이 수행되는 작동 조건이 원하는 허용오차 또는 최적화된 조건 내에 포함되는지를 확인할 수 있다. 몇몇 예에서, 영상화는 용기에서 일어나는 반응의 스냅사진을 촬영하는 단계를 포함할 수 있다. 포착된 영상은 임의의 바람직하지 않은 조건 및/또는 바람직한 조건에 대해 분석될 수 있다. 몇몇 경우, 포착된 영상은 컴퓨터-보조된 방법에서 자동적으로 분석될 수 있다. 하나 이상의 프로세서가 몇몇 경우 기억 위치에 저장된 기기-실행가능한 암호에 의해 실행되는 하나 이상의 루틴을 이용하여 포착된 영상의 분석을 도울 수 있다. 영상화는 인간의 개입을 필요로 하지 않으면서 질 조절을 위해 이용될 수 있다.

[0602] 영상화는 시스템에 정보를 제공할 수 있다. 영상화 단계는 샘플 준비, 어세이 및/또는 검출이 일어나는 조건에 대한 정보를 제공할 수 있다. 검출 방법은 질 조절 절차에서 영상화를 이용할 때 현장서비스 디바이스 또는 이 디바이스의 구성요소로부터 보다 더 신뢰할만한, 정확한 및/또는 정밀한 측정치를 제공할 수 있다. 질 조절은 작은 부피가 사용될 때 유리할 수 있다.

[0603] 동적 피드백

[0604] 몇몇 실시양태에서, 동적 피드백은 샘플 프로세싱 단계 동안 제공될 수 있다. 예를 들면, 동적 피드백은 샘플 준비 단계, 어세이 단계 및/또는 검출 단계 동안 일어날 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 동적 피드백은 영상화를 통해 제공될 수 있다. 대안적으로, 동적 피드백은 임의의 다른 검출 기작, 예컨대, 본원의 임의의 부분에 기재된 검출 기작을 통해 일어날 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 동적 피드백 기작은 광학 검출, 전기기계 기술, 임피던스, 전기화학 기술, 마이크로유체공학 기술 또는 임의의 다른 기작, 또는 이들의 조합을 이용할 수 있다.

[0605] 동적 피드백은 임의적으로 영상화 또는 다른 검출 기작을 이용할 수 있다. 동적 피드백은 시스템에 대한 자동화된 의사결정에 관여할 수 있다. 예를 들면, 영상을 포착할 수 있고, 결정 단계에서 고려될 수 있는 데이터를 포착할 수 있다. 센서, 예컨대, 영상화 센서는 후속 단계 또는 절차의 결정에서 이용될 수 있는 물리적 정보를 포착할 수 있다. 이러한 후속 단계 또는 절차는 자동화된 방식으로 그때그때 결정될 수 있다.

[0606] 일례에서, 동적 회석이 일어날 수 있다. 용기, 예컨대, 큐벳 또는 본원에 기재된 임의의 다른 용기는 그 내부에 샘플을 가질 수 있다. 동적 피드백 기작(예를 들면, 영상화, 분광광도계, 또는 임의의 다른 검출 기작)은 샘플의 농도를 측정할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 측정은 대략적인 또는 대충의 측정일 수 있다. 초기 측정은 보다 더 정밀한 또는 섬세하게 조정된 검출 및/또는 분석을 위한 조건 하에 샘플을 놓이게 할 수 있는 피드백을 제공할 수 있는 개략적인 측정일 수 있다. 일례에서, 동적 피드백 기작은 초기 형광 검출을 이용하여 농도에 대한 초기 추정을 수행할 수 있는 영상화 방법일 수 있다.

- [0607] 동적 피드백 기작은 샘플 농도가 허용가능한 범위 내에 포함되는지를 확인할 수 있다. 일례에서, 농도는 세포 농도일 수 있다. 대략적인 세포 카운트를 수행하여 세포 농도를 측정할 수 있다. 동적 피드백 기작으로부터의 하나 이상의 신호를 세포 카운트에 사용할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 세포는 광범위한 농도로 제공될 수 있다. 몇몇 경우, 농도는 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 이상의 자릿수에 걸쳐 달라질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 측정되고/되거나 분석될 세포 또는 분석물에 따라, 상이한 농도가 동일한 샘플 내에 제공될 수 있다. 측정된 농도에 기초하여, 샘플을 희석할 수 있거나 농축할 수 있고/있거나 증폭할 수 있다. 예를 들면, 농도가 원하는 범위보다 더 높은 경우, 샘플을 희석할 수 있다. 농도가 원하는 범위보다 더 낮은 경우, 샘플을 농축할 수 있고/있거나 증폭할 수 있다. 희석 및/또는 농축/증폭의 정도를 평가된 농도에 기초하여 그때그때 결정할 수 있다.
- [0608] 희석 및/또는 농축/증폭의 정도를 자동화된 방식으로 결정할 수 있다. 동적 피드백을 자동화할 수 있다. 동적 피드백 기작(예를 들면, 영상화 또는 다른 검출 기작)은 작동 조건을 확인하기 위해 분석될 수 있는 데이터를 제공할 수 있다. 예를 들면, 샘플 농도를 동적 피드백 기작에 기초하여 결정할 수 있다. 동적 피드백 기작으로부터 하나 이상의 신호를 제공받을 수 있고/있거나 프로세싱할 수 있는 프로세서가 제공될 수 있다. 프로세서는 제공받은 신호에 기초하여 농도를 결정할 수 있고 농도가 원하는 범위 내에 포함되는지를 확인할 수 있다. 농도가 원하는 범위 내에 포함되는 경우, 프로세서는 추가 희석 또는 농도/증폭이 필요하지 않다는 것을 확인할 수 있다. 농도가 원하는 범위보다 더 높은 경우, 프로세서는 희석이 필요하다는 것을 확인할 수 있다. 프로세서는 농도가 원하는 범위로부터 얼마나 멀리 벗어나 있는지에 기초하여 필요한 희석 정도를 결정할 수 있다. 농도가 원하는 범위보다 더 낮은 경우, 프로세서는 농축(또는 증폭)이 필요하다는 것을 확인할 수 있다. 프로세서는 농도가 원하는 범위보다 얼마나 더 낮은지에 기초하여 필요한 증폭의 정도를 결정할 수 있다. 이러한 결정은 암호, 로직, 또는 하나 이상의 단계를 수행하기 위한 지시를 포함할 수 있는 유형(tangible) 컴퓨터 판독가능한 매질에 기초할 수 있다. 이러한 결정은 자동화된 수 있으므로 인간의 개입을 필요로 하지 않으면서 수행될 수 있다. 이것은 임의의 작동 조건에 적용될 수 있고 샘플 농도, 예컨대, 세포 농도로 한정될 필요가 없다.
- [0609] 몇몇 실시양태에서, 초기 피드백 측정 및 희석 또는 농축/증폭 단계 후, 보다 더 정밀한 측정이 수행될 수 있다. 예를 들면, 샘플이 바람직한 범위 내에 있다는 것이 확인된 후 세포 카운팅의 보다 더 정밀한 측정이 일어날 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 단일 희석 및/또는 농축/증폭 단계 후 샘플은 바람직한 범위에 도달할 수 있다. 다른 실시양태에서, 추가 피드백 단계가 일어날 수 있고, 필요한 경우 추가 희석 및/또는 농축/증폭 단계가 제공될 수 있다. 예를 들면, 초기 측정이, 샘플이 높은 농도를 갖는다는 결과를 제공하는 경우, 희석 단계가 일어날 수 있다. 희석 단계 후, 임의적으로 추가 피드백 단계가 일어날 수 있다. 샘플 농도가 원하는(또는 달리 예정된) 범위 내에 포함되지 않는 경우, 측정된 농도가 원하는 범위보다 높은지 아니면 낮은지에 따라 각각 추가 희석 또는 농축/증폭 단계가 일어날 수 있다. 이것은 샘플이 원하는 범위 내에 포함되기 위해 필요한 횟수만큼 많이 반복될 수 있다. 대안적으로, 피드백 단계는 반복될 수 있거나 반복되지 않을 수 있거나, 또는 고정된 횟수로 반복될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 각각의 피드백 단계는 보다 더 높은 정밀도로 일어날 수 있다. 대안적으로, 동일한 정밀도가 각각의 피드백 단계에서 이용될 수 있다.
- [0610] 몇몇 실시양태에서, 샘플 농도(예를 들면, 세포 농도, 분석물 농도)가 원하는 범위 내에 포함되는 경우, 샘플은 효과적으로 분석될 수 있다. 예를 들면, 샘플 세포 농도는 영상화에 유리할 수 있는 원하는 범위를 가질 수 있다. 시야 당 원하는 수의 세포가 제공될 수 있다.
- [0611] 영상화 동안 세포 밀도를 조절하여 세포의 군집형성 및 클러스터링을 제한함으로써 영상화에 의한 세포 정량 및 수 세기를 향상시킬 수 있다. 결과적으로, 어세이가 선형성을 보이는 분석물 농도의 범위가 최대화될 수 있거나 증가할 수 있다. 어세이 선형 범위를 확장하기 위해, 동적 시스템은 샘플 중의 대략적인 세포 농도 측정을 제공하기 위해 높은 동적 범위를 갖는 방법을 이용하여 샘플에 대한 선행 비파괴적 측정을 수행할 수 있다. 그 다음, 알고리즘은 주요 측정을 위해 세포 농도를 허용가능한 범위 내에 있게 하는 데에 필요한 희석비를 계산할 수 있다. 따라서, 희석 및/또는 농축/증폭을 제공하여 동적 희석 및/또는 농축을 제공할 수 있다.
- [0612] 이러한 동적 피드백, 예컨대, 동적 희석은 작은 부피를 이용하는 시스템에서 유리할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 총 샘플 부피는 본원의 임의의 부분에 기재된 임의의 부피를 포함할 수 있다. 몇몇 경우, 분석될 샘플의 특정 부분에 대한 부피는 본원의 임의의 부분에 기재된 임의의 부피를 가질 수 있다. 동적 희석은 낮은 변동계수를 제공하는 것을 도울 수 있다. 예를 들면, 샘플 준비, 어세이 및/또는 검출 단계에 대한 변동계수는 본원의 임의의 부분에 기재된 변동계수 값을 가질 수 있다. 이것은 작은 부피를 이용할 수 있고/있거나 낮은 변동계수를 가질 수 있는 현장서비스 디바이스에서 유리할 수 있다.
- [0613] 동적 피드백은 유리하게는 샘플의 비파괴적 시험을 허용할 수 있다. 이것은 작은 부피를 이용하는 시스템에서

유리할 수 있다. 동일한 샘플이 초기 피드백 검출 및 후속 검출을 위해 사용될 수 있다. 동일한 샘플이 동일한 용기(예를 들면, 큐벳, 바이알, 튜브) 내에서 초기 피드백 검출 및 후속 검출 하에서 존재할 수 있다. 용기는 그의 초기 상태에서 원하고/원하거나 검출가능한 범위 외부에 있는 샘플을 제공받을 수 있다. 예를 들면, 하나 이상의 분석물 및/또는 세포의 농도가 초기에 원하고/원하거나 검출가능한 범위를 벗어날 수 있다. 동일한 샘플은 동일한 용기에서 상기 범위 내에서 측정될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 하나 이상의 분석물 및/또는 세포의 농도는 추후에 동일한 용기에서 원하고/원하거나 검출가능한 범위 내에 있을 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 샘플을 원하고/원하거나 검출가능한 범위 내에 있게 하기 위해 하나 이상의 개입 단계, 예컨대, 희석 및/또는 농축/증폭을 샘플에 대해 수행할 수 있다. 이러한 개입 단계는 자동화된 방식으로 수행될 수 있다.

[0614] 몇몇 실시양태에서, 희석은 자동화된 방식으로 샘플에 제공될 수 있다. 예를 들면, 희석제는 샘플을 보유하는 용기 내로 분배되고 샘플과 혼합되어 새로운 샘플 부피를 만들 수 있다. 몇몇 경우, 희석제는 단일 희석제를 포함한다. 다른 경우, 희석제는 복수의 희석제들을 포함한다. 희석제는 유동을 용이하게 하기 위한 펌핑 시스템, 밸브 및/또는 유체 유동 채널, 예컨대, 하나 이상의 마이크로유체 채널 및/또는 하나 이상의 마이크로유체 펌프를 갖는 마이크로유체 시스템의 이용에 의해 용기 내로 분배될 수 있다. 마이크로유체 시스템은 하나 이상의 기계적 및/또는 전기화학적 구성요소, 예컨대, 유체의 유동을 용이하게 하기 위한 하나 이상의 가동된(예를 들면, 공압적으로 가동된) 밸브를 갖는 기계적 펌핑 시스템을 포함할 수 있다. 몇몇 경우, 펌핑 시스템은 유체 유동을 용이하게 하도록 구성된 기계적 펌프를 포함한다. 펌핑 시스템은 작동 파라미터, 예컨대, 유체 유속, 농도, 온도 및/또는 압력을 측정하고 조절 시스템에게 전달하기 위한 하나 이상의 센서를 포함할 수 있다. 일례에서, 희석제는 용기를 희석제 저장기와 유체 통신 상태에 있게 하는 마이크로유체 채널에 커플링된 기계적 펌프를 갖는 마이크로유체 시스템의 이용에 의해 용기 내로 분배된다.

[0615] 몇몇 경우, 펌핑 시스템은 측정된 샘플 희석에 기초하여 희석제를 방출하도록 제공된다. 샘플 희석은, 센서, 예컨대, 광 센서에 의해 측정될 수 있다. 일례에서, 광 센서는 광선이 샘플을 관통하여 향하게 한 후 샘플을 관통하는 광의 산란에 적어도 부분적으로 기초하여 샘플 희석을 측정하기 위해 광원과 커플링된다. 측정된 샘플(예를 들면, 세포, 조직) 농도가 예정된 한계(또는 역치)를 초과하는 경우, 펌핑 시스템은 희석제(예를 들면, 물)를 희석제 저장기로부터 샘플 보유 용기로 향하게 한다.

[0616] 몇몇 실시양태에서, 동적 희석은 유체 유동 채널(예를 들면, 마이크로유체 채널)과 유체 통신 상태에 있는 펌프(예를 들면, 마이크로유체 펌프)를 갖고 유체 유동을 조절하기 위한 하나 이상의 밸브를 추가로 포함하는 유체 유동 시스템의 이용에 의해 전자적으로 자동화된다. 희석의 자동화를 이용하여 교정 셋팅, 예컨대, 원하는 농도를 달성하는 데에 사용된 사전설정된 희석 유체 부피를 시험할 수 있고/있거나 조절할 수 있다.

[0617] 몇몇 경우, 펌프는 하나 이상의 밸브, 예컨대, 공압적으로 가동된 밸브를 포함한다. 펌프, 유체 유동 채널 및 하나 이상의 밸브는 희석제 저장기가 샘플을 보유하도록 구성된 용기와 유체 통신 상태에 있게 한다. 하나 이상의 밸브 및/또는 펌프는 샘플의 농도를 조절하기 위해 희석제 저장기로부터의 희석제의 유동을 조절하기 위한 프로세서를 갖는 조절 시스템과 전기적 통신 상태에 있을 수 있다.

[0618] 동적 피드백은 유리하게는 사용자 관여를 최소화하면서(제거하지 않는 경우) 샘플 농도의 자동화된 조절을 가능하게 한다. 몇몇 경우, 샘플의 농도는 임의의 사용자 관여 없이 자동적으로 조절된다(예를 들면, 희석되거나 증폭된다). 이러한 최소한의 사용자 관여는 본원의 임의의 부분에 기재된 바와 같이 영상화 및 전체적인 시스템 사용에서 낮은 변동계수를 제공할 수 있다.

[0619] 일례에서, 동적 피드백 시스템은 영상화를 이용하여 유체 샘플 중의 세포의 농도를 조절하는 데에 이용된다. 샘플 용기, 예컨대, 큐벳 내에 제공된 샘플을 사용하는 경우, 영상화를 이용하여 유체 샘플 중의 세포 농도를 측정한다. 측정된 농도는 농도의 대략적인(또는 개략적인) 측정치일 수 있다. 그 다음, 동적 피드백 시스템은 희석제를 샘플 용기 내에 제공함으로써 유체 샘플을 희석한다. 이것은 희석 시 세포에 대한 임의의 교란(또는 파괴)을 최소화할 수 있다(제거하지 않는 경우). 그 다음, 유체 샘플 중의 세포 농도의 임의적 측정을 수행하여 희석 후 농도를 측정할 수 있다. 몇몇 경우, 희석 후 반응은 샘플을 희석하는 데에 이용된 샘플 용기와 동일한 샘플 용기 내에서 일어날 수 있다. 몇몇 경우, 반응은 희석이 최적 희석이 아닌 경우에서 일어날 수 있다.

[0620] 몇몇 경우, 동적 피드백 동안 샘플 농도의 대략적인 측정은 분광계의 이용에 의해 수행되고, 샘플 농도의 보다 더 정밀한 측정은 영상화 디바이스의 이용에 의해 수행된다. 영상화 디바이스는 광원(예를 들면, 간섭성 광, 예컨대, 레이저, 또는 비간섭성 광) 및 카메라, 예컨대, 전하-커플링된 디바이스(CCD) 카메라를 포함할 수 있다. 일례에서, 대략적인 측정 후, 동적 피드백 시스템은 희석제를 제공함으로써 샘플 농도를 대략적으로 조절한 후 보다 더 정밀한 측정을 수행한다. 대략적인 조절 동안 제공된 희석제의 부피에 비해 보다 더 작은 부피의 희석

제를 제공함으로써(즉, 섬세한 조절) 샘플 농도를 더 조절할 수 있다. 대안적으로, 샘플 농도의 대략적인 측정은 영상화 디바이스의 이용에 의해 수행되고, 보다 더 정밀한 측정은 분광계의 이용에 의해 수행된다(대략적인 조절 및 섬세한 조절).

[0621] 본원에서 제공된 동적 피드백 시스템은 샘플, 예컨대, 유체 샘플 중의 세포를 농축/증폭하도록(즉, 샘플 농도를 증가시키도록) 구성될 수 있다. 몇몇 경우, 이것은 원심분리 또는 장-유도된 분리(예를 들면, 전기장 분리, 자기 분리)의 이용에 의해 달성된다.

[0622] 몇몇 경우, 영상화 디바이스를 이용하여 샘플의 농축을 수행하는데, 이때 상기 영상화 디바이스의 위치는 원하는 경로 길이 및/또는 초점을 선택하도록 선택된다. 몇몇 경우, 영상화 디바이스와 관련된 하나 이상의 광학소자의 위치는 원하는 경로 길이 및/또는 초점을 제공하도록 조절된다. 몇몇 경우, 영상 분석 및 다양한 초점을 계산적으로 제공할 수 있는 무렌즈 카메라가 영상 포착을 위해 이용된다.

[0623] 다양한 샘플 부피에 대해 동적 회석을 수행할 수 있다. 몇몇 경우, 샘플 부피가 예정된 한계를 초과하는 경우, 순차적 또는 병행적 프로세싱 및/또는 영상화를 위해 샘플을 다수의 샘플 용기들(예를 들면, 큐벳들) 내에 분포시킬 수 있다.

[0624] 자가 학습

[0625] 동적 피드백 기작은 시스템에 의한 자가 학습을 야기할 수 있다. 예를 들면, 동적 회석/농축 시스템의 경우, 초기 피드백 측정을 수행할 수 있다. 피드백 측정에 기초하여, 샘플에 대해 조치를 취하지 않을 수 있거나 샘플을 회석할 수 있거나 농축/증폭할 수 있다. 후속 측정 및/또는 검출이 일어날 수 있다. 후속 측정 및/또는 검출은 추가 피드백 측정일 수 있거나 아닐 수 있다. 후속 측정에 기초하여, 취해진 조치(예를 들면, 조치 없음, 회석, 농축/증폭)가 정확하였는지 및/또는 정확한 정도의 조치(예를 들면, 충분한 회석 또는 농축/증폭)가 취해졌는지를 확인할 수 있다. 예를 들면, 초기 피드백 기작은 샘플 농도가 높고 회석될 필요가 있다는 것을 확인할 수 있다. 샘플은 특정 양까지 회석될 수 있다. 후속 측정치가 수득될 수 있다(예를 들면, 샘플의 영상이 수득될 수 있다). 회석 정도가 샘플을 원하는 범위 내에 있게 하지 않는 경우(예를 들면, 회석이 너무 많거나 너무 적은 경우), 시스템은 동일한 또는 유사한 초기 피드백 기작에 의한 후속 동적 회석/농축을 위해 상이한 정도의 회석을 이용할 수 있다는 표시를 제공받을 수 있다. 회석 정도가 샘플을 원하는 범위 내에 있게 하는 경우, 시스템은 동일한 또는 유사한 종류의 초기 피드백 측정을 위한 후속 회석을 위해 상기 회석 정도가 이용되어야 한다는 확인을 제공받을 수 있다.

[0626] 초기 조건 및 후속 조치에 기초하여, 후속 동적 피드백 상황에서 취할 적절한 조치를 결정하는 것을 도울 수 있는 데이터 점을 모을 수 있다. 이것은 시스템이 특정 동적 상황에서 취할 단계에 대해 시간에 따라 자가 학습하게 할 수 있다. 자가 학습은 개별맞춤 상황에 적용될 수 있다. 예를 들면, 자가 학습 시스템은 샘플이 추출되는 특정 개체가 또 다른 개체와 상이한 정도의 회석/농축을 필요로 할 수 있다는 것을 학습할 수 있다. 자가 학습은 하나 이상의 특성을 갖는 개체 군에 적용될 수 있다. 예를 들면, 자가 학습 시스템은 특정 종류의 약물을 사용하는 개체가 또 다른 개체와 상이한 정도의 회석/농축을 필요로 할 수 있다는 것을 학습할 수 있다. 자가 학습 시스템은 일반화될 수도 있다. 예를 들면, 시스템은 특정 인구통계학의 사람들 또는 특정 특성을 갖는 사람들이 상이한 정도의 회석 및/또는 농축을 필요로 할 수 있거나 필요로 하지 않을 수 있다는 패턴을 인식하게 될 수 있다. 시스템은 과거 데이터 점, 개체의 기록, 다른 개체의 기록, 일반적인 건강 정보, 공개 정보, 의학적 데이터 및 통계자료, 보험 정보 또는 다른 정보를 추출할 수 있다. 정보 중 일부는 인터넷(예를 들면, 웹 사이트, 논문, 저널, 데이터베이스, 의학적 통계자료) 상에서 공개적으로 입수될 수 있다. 시스템은 임의적으로 정보에 대한 업데이트를 위해 웹 사이트 또는 데이터베이스를 검색할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 자가 학습은 디바이스, 클라우드(cloud) 또는 외부 디바이스 상에서 일어날 수 있다. 추가 데이터가 모아짐에 따라, 상기 추가 데이터는 클라우드 또는 외부 디바이스에 업로드될 수 있고, 자가 학습 시스템에 의해 접근될 수 있다.

[0627] **영상 포착 및/또는 조작 디바이스**

[0628] 몇몇 실시양태에서, 전자기 방사선(또는 광) 포착 및/또는 조작 디바이스, 예컨대, 영상화 디바이스 또는 분광계를 포함하는 영상 포착 및/또는 조작 디바이스를 이용하여 샘플 준비, 프로세싱 및/또는 분석을 수행한다. 몇몇 경우, 영상화 디바이스를 분광계와 함께 이용할 수 있다. 분광계를 이용하여 분광 분석, 예컨대, 물질 분석을 위해 이용될 수 있는 광의 성질을 전자기 스펙트럼의 선택된 부분에 걸쳐 측정할 수 있다. 영상화(또는 영상 포착) 디바이스를 이용하여 샘플 농도, 조성, 온도, 탁도, 유속 및/또는 점도를 측정할 수 있다.

[0629] 일례에서, 영상 포착 디바이스는 디지털 카메라일 수 있다. 영상 포착 디바이스는 역광이든 아니면 정면광이든

관계없이 전하-커플링된 디바이스(CCD) 또는 광전자증배관 및 광전관, 또는 광검출기 또는 다른 검출 디바이스, 예컨대, 스캐닝 현미경도 포함할 수 있다. 몇몇 경우, 카메라는 CCD 또는 CMOS를 이용할 수 있거나, 무렌즈(계산) 카메라(예를 들면, 프렌켄카메라) 또는 오픈-소스 카메라일 수 있거나, 당분야에서 공지되어 있는 임의의 다른 시각적 검출 기술을 이용할 수 있다. 몇몇 경우, 영상화 디바이스는 렌즈일 수 있는 광학 요소를 포함할 수 있다. 예를 들면, 광학 요소는 검출기 상의 렌즈의 초점 평면으로부터 광을 포착하는 렌즈이다. 카메라는 사용 동안 광에 초점을 맞출 수 있는 하나 이상의 광학 요소를 포함할 수 있거나 추후에 초점이 맞추어질 수 있는 영상을 포착할 수 있는 하나 이상의 광학 요소를 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 영상화 디바이스는 2-차원적 영상화, 3-차원적 영상화 및/또는 4-차원적 영상화(시간에 따른 변화를 도입함)를 이용할 수 있다. 정적 영상은 하나 이상의 시점에서 포착될 수 있다. 영상화 디바이스는 비디오 및/또는 동적 영상도 포착할 수 있다. 비디오 영상은 하나 이상의 시간에 걸쳐 연속적으로 포착될 수 있다.

[0630] 몇몇 경우, 영상 포착 디바이스는 상대적으로 짧은 시간, 예컨대, 즉시 복수의 샘플들의 농도를 측정하는 데에 이용되는 계산 카메라이다. 몇몇 실시양태에서, 계산 카메라는 렌즈와 상이할 수 있는 광학소자를 가질 수 있다. 일례에서, 계산 카메라는 엇갈린 샘플 용기들(예를 들면, 큐벳들)에서 복수의 샘플들의 사진을 촬영하는 무렌즈 카메라이다. 그 다음, 특정 샘플 용기 내의 샘플의 농도는 예를 들면, 상기 특정 샘플 용기를 갖는 영상의 부분에서 또는 이 부분에 인접한 위치에서 초점을 선택하도록 영상을 수학적으로 만들고 만들어진 영상으로부터 샘플 농도를 유도함으로써 계산될 수 있다. 영상의 이러한 수학적 조작은 무렌즈 카메라의 이용에 의해 획득될 수 있기 때문에 무렌즈 카메라의 시야 내의 공간 내의 다양한 점(산란된 광으로부터 추정될 수 있는 공간 내의 점을 포함할 수 있음)에서 다른 정보를 제공할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 최종 신호는 복잡한 알고리즘에 의해 분석될 수 있다. 이러한 셋업의 일례는 검출기 상에서 푸리에(Fourier)-변환된 영상을 생성할 수 있는 광학 요소를 갖는 계산 카메라이다. 생성된 "영상"을 분석하여 필요한 정보를 추출할 수 있다. 이러한 검출기는 영상화된 대상체로부터 풍부한 정보를 수득하게 할 수 있을 것이다. 영상으로부터 상이한 특징들, 예를 들면, 상이한 초점 길이에서 정보를 수득하는 것은 전적으로 소프트웨어를 통해 수행될 수 있으므로 영상화 하드웨어를 단순화하고 보다 더 신속하고 유익한 데이터 획득을 제공할 수 있다.

[0631] 전자기 방사선 포착 및/또는 조작 디바이스는 본원에서 제공된 다양한 응용, 예컨대, 동적 회석을 포함하는 샘플 농도의 측정에서 사용될 수 있다. 일례에서, 광 포착 및/또는 조작 디바이스는 광원이 샘플을 관통하여 향하게 될 때 샘플로부터 방출될 수 있는 산란된 광을 포착하기 위한 광 센서, 예컨대, CCD 카메라와 커플링된 광원, 예컨대, 간섭성 광원(예를 들면, 레이저)을 포함한다. 이것을 이용하여 샘플의 농도를 측정할 수 있다. 광 센서는 다양한 파장의 광, 예컨대, 적색, 녹색 및 청색, 또는 다른 색채 조합, 예컨대, 적색, 주황색, 황색, 녹색, 청색, 남색 및 자색의 조합을 포착하도록 구성될 수 있다. 몇몇 경우, 광 센서는 광의 가시 스펙트럼 이외에 적외선 또는 근적외선 이상의 파장 또는 자외선 이하의 파장을 갖는 광을 감지하도록 구성된다.

[0632] 광 포착 및/또는 조작 디바이스를 이용하여, 복수의 정지 영상 및/또는 이 영상과 관련된 소리(또는 다른 데이터, 예컨대, 텍스트 데이터)를 갖는 비디오를 구축하는 데에 이용될 수 있는 정보를 특정 시점 또는 다양한 시점에서 수집할 수 있다.

[0633] 계산(또는 무렌즈) 카메라를 포함하는 광 포착 및/또는 조작 디바이스를 이용하여 2-차원적 영상 또는 3-차원적(또는 가상 3-차원적) 영상 및/또는 비디오를 포착할 수 있다.

[0634] 몇몇 실시양태에서, 영상 포착 및/또는 조작 디바이스는 물체를 섭동시키고 섭동을 고려하여 반응을 측정한다. 섭동은 광(예를 들면, x-선, 자외선 광), 소리, 전자기장, 정전기장 또는 이들의 조합에 의해 달성될 수 있다. 소리에 의한 섭동은 음향 영상화에서 이용될 수 있다. 음향 영상화는 의학에서 이용되는 진단 초음파와 유사한 원리를 이용할 수 있다. 음향 영상화는 일반 현미경과 유사하게 작용할 수 있으나 음파를 이용할 수 있다. 초음파의 공급원은 샘플을 관통하여 이동할 수 있고 샘플의 탄성의 불균질성으로 인해 반사/산란될 수 있는 파를 생성할 수 있다. 반사된 파는 센서에 의해 "영상화"될 수 있다. 이 방법의 변형은 샘플을 관통하여 이동하는 음파가 샘플의 국소적 압착 및 확장을 야기할 수 있는 "광-음향 영상화"를 포함할 수 있다. 이 압착/확장은 샘플에 의한 레이저 광선의 반사를 측정/영상화함으로써 검출될 수 있는 샘플 물질의 굴절 지수의 변화를 야기할 수 있다.

[0635] 몇몇 경우, 영상화 디바이스를 이용하여 세포의 부피를 측정할 수 있다. 일례에서, 광원과 CCD 카메라의 조합을 이용하여 세포의 정지 영상을 포착한다. 컴퓨터 시스템은 정지 영상을 디지털화하고 세포를 가로지르는, 예컨대, 세포의 중심을 관통하는 선을 그은다. 그 다음, 컴퓨터 시스템은 상기 선이 세포의 경계(또는 세포벽 또는 세포막)와 교차하는 점들 사이의 거리를 측정하여, 세포의 부피를 추정하는 데에 이용될 수 있는 세포의

직경의 추정치를 제공한다.

- [0636] 영상화 디바이스는 광원으로부터의 전력이 작은 면적에 집중되어 높은 전력 밀도를 제공할 수 있도록 간섭성 레이저 광의 얇은 선 또는 점을 이용한 샘플 조명을 가능하게 하기 위해 선 스캐닝 현미경관찰을 이용할 수 있다. 검출기의 기하학적 형태는 상기 선 또는 점과 일치될 수 있다. 그 다음, 상기 선/점은 샘플의 상이한 부분들이 영상화될 수 있도록 상기 샘플을 가로질러 스캐닝될 수 있다. 그 다음, (예를 들면, 문서 스캐너와 유사한 방식으로) 각각의 스캐닝된 선을 연결하여 전체 영상을 형성할 수 있다. 이 방법은 하기 이유들 중 하나 이상의 이유로 분석/영상화 방법으로서 유리할 수 있다: (1) 조명의 높은 전력 밀도, (2) (선 스캐닝 및 점 스캐닝 둘다가 전체 프레임 또는 고전적 영상화보다 더 느릴 수 있지만) 점 스캐닝과 반대로 선 스캐닝으로부터 상대적으로 높은 속도가 수득될 수 있다는 점, (3) 샘플에 대한 분석 측정치, 예컨대, 형광도, 흡광도, 발광도의 높은 정밀도 및/또는 정확도, (4) 샘플의 완전한 스펙트럼이 각각의 화소에 대해 획득될 수 있도록 스펙트럼 또는 초스펙트럼 영상화와의 조합, (5) 그때그때의 해상도 조절(즉, 임의의 요소를 변화시키지 않으면서 원하는 경우 샘플을 낮은 또는 높은 측면 해상도로 스캐닝할 수 있음), 또는 (6) 조직 샘플의 영상화를 허용할 정도로 높은 피사계심도(depth of field)를 제공할 수 있다는 점.
- [0637] 몇몇 실시양태에서, 영상화 디바이스는 예컨대, 신틸레이션(scintillation)을 통해 이온화(형광 또는 발광) 사건으로부터 방출되는 광을 검출하도록 구성된다. 일례에서, 신틸레이터는 샘플 용기를 포함하는 물질 상에 코팅되거나 상기 물질 내에 포매된다. 샘플이 결합할 때(또는 다른 방식으로 신틸레이터와 상호작용할 때), 신틸레이터는 영상화 디바이스의 검출기에 의해 검출되는 광(예를 들면, 형광성 광)을 방출한다. 이것을 이용하여 일부 샘플들의 방사성 붕괴(예를 들면, 알파 및/또는 베타 붕괴)를 측정할 수 있다.
- [0638] 몇몇 경우, 영상화 디바이스는 하전된 입자, 예컨대, 이온의 검출을 위한 전계 효과 트랜지스터이다. 대안적으로, 영상화 디바이스는 예를 들면, 열 맵(map)의 구축에 이용될 수 있는 열 교환을 측정하기 위한 열 검출기일 수 있다.
- [0639] 몇몇 경우, 샘플 용기는 샘플을 고정시키기 위한 하나 이상의 웰을 포함한다. 샘플 용기는 하나 이상의 웰에 고정된 샘플의 영상화를 위한 영상화 디바이스와 커플링될 수 있다. 샘플 고정은 예를 들면, 웰의 기저부에 배치될 수 있는 표면 결합제(예를 들면, 항체)를 갖는 비드 또는 표면 결합제의 사용에 의해 용이해질 수 있다. 상기 웰은 대략 나노미터 내지 마이크로미터의 직경 또는 이보다 더 큰 직경을 가질 수 있다.
- [0640] 몇몇 실시양태에서, 샘플 검출 및/또는 분석은 영상 향상 중, 예컨대, 염료의 사용에 의해 용이해진다. 염료는 샘플에 결합하여, 영상화 디바이스의 검출기에 의해 검출될 수 있는 광학, 전기 또는 광전자 신호를 제공할 수 있다. 일례에서, 염료는 세포에 결합하고 검출기에 의해 기록되는 형광을 생성한다. 형광을 측정함으로써 세포의 공간적 분포 및/또는 농도를 측정할 수 있다. 영상 향상 중은 영상 획득(또는 포착) 동안 개선된 신호-대-노이즈를 달성하는 데에 도움을 줄 수 있다. 염료는 표면 수용체 및/또는 항체의 사용에 의해 세포에 결합할 수 있다.
- [0641] 몇몇 경우, 염료의 사용은 영상을 일그러뜨릴 수 있는 배경 형광을 발생시킬 수 있다 - 형광 샘플은 형광 배경으로부터 해상되기 어려울 수 있다. 이러한 경우, 유체 중의 샘플을 형광 염료와 접촉시켜 영상 획득을 향상시킬 수 있다. 비결합된 염료로부터 샘플을 분리하는 원심분리기(또는 자기 또는 전기 분리)를 이용하여 비결합된 염료를 제거한다. 원심분리기는 영상화 디바이스를 갖는 현장서비스 디바이스에 통합될 수 있다. 그 다음, 샘플을 유체에 재현탁한 후 영상화 디바이스를 이용하여 영상화할 수 있다.
- [0642] 몇몇 경우, 영상 향상 중의 사용 이외에 또는 영상 향상 중의 사용 대신에 동적 피드백을 이용하여 영상 획득을 향상시킬 수 있다. 일례에서, 영상 획득 전에 희석 및/또는 증폭을 이용하여 샘플의 농도를 최적화한다.
- [0643] 샘플 분리는 원심분리기의 이용에 의해 용이해질 수 있다. 대안으로서, 자기장 또는 전기장을 이용하여 샘플 분리를 수행할 수 있다. 예를 들면, 자기장의 존재 하에서 자기 인력의 공급원을 향하여 세포를 끌어당기는 데에 사용될 수 있는 자성 입자는 세포에 결합할 수 있다.
- [0644] 본원에서 제공된 시스템 및 방법은 다양한 종류의 샘플들, 예컨대, 조직(예를 들면, 피부, 혈액), 타액 또는 소변으로부터 유래할 수 있는 세포에 적용될 수 있다. 일례에서, 동적 피드백 및/또는 영상화는 조직 샘플, 또는 이러한 조직 샘플로부터 유래된 세포 샘플에 적용될 수 있다.

[0645] 실시예

[0646] 실시예 1: 루프-매개된 등은 증폭(LAMP)에 의한 핵산 증폭

- [0647] 형광 및 흡수 둘다에 대한 3색 영상 분석 방법이 LAMP 어세이를 관독하는 능력을 평가하기 위해, 하기 실험을 수행하였다.
- [0648] *LAMP 반응 조건*
- [0649] 500 μ l PCR 튜브(VWR, 미국 펜실베이니아주 웨스트 체스터 소재)에서 25 μ l의 총 부피로 LAMP 반응을 수행하였다. 반응 혼합물은 0.8 μ M의 프라이머 1 및 프라이머 2, 0.2 μ M의 프라이머 3 및 프라이머 4, 400 μ M의 각각의 dNTP(인비트로젠(Invitrogen), 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재), 1 M의 베타인(시그마(Sigma), 미국 미조리주 세인트 루이스 소재), 1X 써모폴(Thermopol) 완충제(뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs), 미국 매사추세츠주 입스위치 소재), 2 mM $MgSO_4$ (록랜드 이뮤노케미칼스(Rockland Immunochemicals), 미국 펜실베이니아주 길버츠빌 소재), 8 U의 Bst DNA 중합효소 큰 단편(뉴 잉글랜드 바이오랩스, 미국 매사추세츠주 입스위치 소재), 및 주어진 양의 주형 DNA(약 10 카피 내지 10^9 카피)를 포함하였다. 음성 대조군의 경우, 대략 10^9 카피의 관련 없는 DNA를 첨가하였다.
- [0650] *반응 조건*
- [0651] 반응을 밀폐된 튜브 내에서 1시간 동안 65°C에서 항온처리하였다. 그 다음, 반응 생성물을 80°C까지 5분 동안 가열하여 중합효소를 불활성화시켰다.
- [0652] *생성물 검출 및 가시화*
- [0653] SYBR 그린 I 염료(인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재) 저장액을 100배 희석하였고, 5 μ l를 10 μ l의 완료된 LAMP 반응 생성물과 혼합하였고 실온에서 5분 동안 항온처리하였다. 그 다음, 반응 생성물을 하기 방식으로 관독하였다:
- [0654] 형광 관독: 상기 혼합물을 함유하는 PCR 튜브 또는 피펫을 302 nm UV 광으로 조명하였고 형광 방사(λ 최대 약 524 nm)를 디지털 카메라(캐논 EOS T1i, 18-55 mm, 캐논, 미국 뉴욕주 레이크 석세스 소재)로 영상화하였다.
- [0655] 색채 관독: 반응 생성물을 팁 내로 흡입하였고 디지털 카메라를 이용하여 영상화하였다.
- [0656] *결과:*
- [0657] 튜브 내의 어세이 생성물의 형광 영상은 도 81에 나타나 있다.
- [0658] 팁 내의 어세이 생성물의 형광 영상은 도 89에 나타나 있다.
- [0659] 팁 내의 어세이 생성물의 색채 영상은 도 82, 도 83, 도 84, 도 85, 도 86 및 도 87에 나타나 있다. 도 88은 교정을 위해 수득된 배경 색채 영상을 보여준다.
- [0660] 도 90은 "벌크" 형광의 측정(통상적인 형광측정)에 의해 수득된 LAMP 용량-반응과 카메라에 의해 수득된 2개의 색채 채널에 대한 반응의 비교를 보여준다. 분명히 보이는 바와 같이, 색채 방법은 형광측정의 반응에 필적할만한 반응을 보여준다.
- [0661] 모든 3색 채널들을 이용하는 본원에 기재된 방법에 따라 색채 영상을 분석하고 교정하였을 때, 교정된 색채 신호와 형광 신호의 밀접한 상응관계가 도 91에 나타난 바와 같이 분명히 보였다.
- [0662] **실시예 2: 샘플 사용을 최대화하는 시스템**
- [0663] 샘플 사용을 최대화하는 시스템은 하기 특성을 가질 수 있다:
- [0664] 1. 혈액으로부터 혈장의 효율적인 분리 및 혈장의 효율적인 회수
- [0665] a. 분리는 모세관에서의 원심분리에 의해 달성된다.
- [0666] 2. 높은 민감도 어세이 및 낮은 민감도 어세이 둘다에 적합한 몇몇 사전확립된 수준으로의 혈장의 희석.
- [0667] 3. 각각의 어세이에 필요한 각각의 어세이 반응 혼합물의 부피의 최소화.
- [0668] a. 증발을 방지하면서 어세이 항온처리에 적합한 낮은 부피의 개방-단부 큐벳을 이용한다.
- [0669] i. 큐벳은 폭에 비해 상대적으로 길다.
- [0670] b. 광학 경로 길이를 변경함으로써 상기 낮은 부피 큐벳 내에서 어세이 신호 민감도의 증가를 가능하게 한다.

- [0671] i. 큐벳은 원추형이거나 폭이 넓고 좁은 특징부를 갖는다.
- [0672] c. 필요한 경우, 광학 측정 시 반응 생성물(큐벳을 충전시키지 않음)을 보다 더 큰 경로 길이를 갖는 선택된 위치로 이동시킴으로써 어세이 신호 민감도의 상기 증가를 달성한다.
- [0673] i. 큐벳 내부 부피는 어세이 혼합물의 부피보다 훨씬 더 크다.
- [0674] 4. 어세이의 유용한 동적 범위를 증가시키기 위한 가변 경로 길이 및 3색 채널 분석 중 어느 하나 또는 이들 둘다의 이용.
- [0675] **실시예 3: 현장진료 어세이 디바이스**
- [0676] 현장진료 어세이 디바이스는 샘플을 프로세싱하고 어세이를 작동하는 기기인 단일 사용 일회용 카트리지를, 및 상기 기기로부터 멀리 떨어져 있는 서버를 포함할 수 있고, 측정 및 검출 시스템은 하기 사항을 포함한다:
- [0677] - 샘플 획득 및 측정 방법(예컨대, 샘플 팁)을 함유하는 일회용 카트리지를;
- [0678] - 광 영상화 센서(예컨대, 광원(예를 들면, 섬광) 및 CCD 영상 수집 디바이스를 갖는 휴대폰 카메라), 및 상기 광 영상화 센서가 영상을 획득할 수 있는 위치로 상기 팁을 이동시키는 기작을 함유하는 기기 하우징;
- [0679] - 상기 영상을 상기 기기로부터 멀리 떨어져 있는 서버에 무선으로(또는 다른 방법으로) 업로딩;
- [0680] - 2-차원적 영상으로부터 부피를 측정할 수 있고 샘플 종류를 식별할 수 있는 영상 해석 소프트웨어;
- [0681] - 샘플 통합성에 대한 프롬프트(prompt)를 시스템 사용자에게 제공하고, 임의의 필요한 프롬프트를 제공하여 증가된 또는 대체 샘플을 제공하고, 샘플 종류 및/또는 샘플 부피를 감안하여 어세이 결과의 관점에서 상기 기기로부터의 신호 데이터를 해석하기 위한 작동 알고리즘의 일부로서 상기 샘플 종류 및/또는 부피 데이터의 이용.
- [0682] 시스템은 임의적으로 하기 기작들을 포함하는, 사용자에게 의해 "샘플 획득 디바이스(모세관)" 내로 획득된 샘플의 프로세싱 및/또는 영상화를 위한 추가 기작을 포함할 수 있다:
- [0683] - 정해진 위치에서 모세관을 수용하고 상기 모세관을 영상이 획득될 수 있는 또 다른 정해진 위치로 이동시키는 기작; 및
- [0684] - 실질적으로 모든 샘플들을 정해진 위치에서 상기 카트리지 내로 배출하는 기작.
- [0685] **실시예 4: 혈액 샘플을 함유하는 모세관의 분석**
- [0686] 사용자는 모세관의 원위 단부가 (전형적으로 핑거스틱으로서) 한 방울의 혈액에 닿게 함으로써 샘플을 획득한다. 충분한 혈액이 존재하는 한, 모세관은 통상적으로 모세관 작용에 의해 충전된다. 본 발명의 한 버전에서, 사용자는 모세관을 카트리지 상의 잠금 위치에 배치한 후 상기 카트리지를 기기 내의 슬라이드 상에 삽입한 다음, 기기 GUI 상의 스크린 버튼을 누름으로써 어세이를 활성화시킨다. 모든 후속 어세이 단계들이 자동화된다. 기기는 카트리지를 그의 하우징 내부로 이동시키고 카트리지의 삽입된 문을 폐쇄시킨다. 본 발명의 이 버전에서, 기기는 모세관을 붙잡고 이를 섬광 광원 CCD를 갖춘 디지털 카메라의 정면에 있는 위치로 이동시키기 위한 구성요소를 이동시킨다. 섬광 조명을 이용하여 모세관의 영상을 촬영하고 (샘플의 종류, 위치 및 양의 관점에서 상기 영상을 해석하는) 서버에게 무선으로 전달한다. 사전설정된 기준이 충족된 경우, 서버는 기기가 어세이를 계속 수행하도록 지시한다. 샘플이 적절하지 않은 경우, 모세관은 배출된 카트리지로 되돌려 보내지고, 서버는 GUI가 적절한 프롬프트를 표시하게 한다. 그 후, 사용자는 (1) 보다 더 많은 샘플을 첨가할 수 있거나 (2) 신선한 샘플을 수득할 수 있고 새로운 모세관을 사용할 수 있다. 일단 사용자가 정확한 조치를 취하였고 모세관/카트리지를 기기 내에 재삽입하였다는 것을 GUI로 표시하면, 서버는 기기가 어세이 프로세싱을 재개하도록 지시한다. 적절한 부피의 샘플에 대한 기준은 통상적으로 부피가 어세이에 필요한 최소치보다 더 많다는 것이다. 따라서, 몇몇 어세이들에서 예를 들면, 측정된 부피가 12 μ l를 초과하는 경우 전형적으로 샘플이 적절한 것으로 간주되도록 10 μ l의 샘플을 사용할 수 있다.
- [0687] 단독으로 실시될 수 있거나 제1 버전과의 조합으로 실시될 수 있는 본 발명의 제2 버전에서, 영상 획득을 이용하여 기기에 의해 원래의 샘플로부터 수득된 샘플의 부피를 측정한다. 어세이 순서에서, 샘플은 (1) 사용자, 또는 (2) 기기에 의해 모세관으로부터 카트리지 내의 샘플 웰 내로 배출된다. 그 다음, 모세관 작용 또는 (바람직한) 공압 방법으로 제2 팁을 이용하여 샘플 웰로부터 정확한 부피를 수득한다. 이 단계에서, 상기 팁을 영상화하여 하위샘플의 종류 및 하위샘플 부피를 (전송된 바와 같이) 측정한다. 샘플 종류 및 부피가 허용가능한 경우 (목표 +/- < 5%), 어세이를 진행한다. 그러하지 않은 경우, 어세이를 중단할 수 있고, 사용자는 즉각적으로 시

정 조치를 취할 수 있다. 식별될 수 있는 샘플 종류는 혈액 및 혈장 또는 혈청 등이다. 영상화 시스템은 혈장과 혈청의 경우보다 혈액(불투명)과 틱(투명) 사이의 훨씬 더 높은 명암대비를 관찰함으로써 식별한다. 샘플 부피가 목표 수준이 아니지만 어세이가 만족스러운 결과를 제공하기에 여전히 충분한 경우(상기 예에서, 5 μ l 초과)의 부피는 목표 부피가 10 μ l인 경우 허용가능할 것임), 분석물 농도를 계산하는 어세이 알고리즘은 하기 식을 이용한다: 보정 함수 농도(실제) = 농도(목표 부피를 가정하였을 때 관찰됨)*목표 부피/측정된 부피.

[0688] 혈액은 용이하게 검출될 수 있고, 그의 부피는 틱의 화소 맵을 생성하고 어두운 화소를 카운팅한 후 목표 부피에 대해 미리 확립된 수치와 비교함으로써 측정될 수 있다. 심지어 샘플 종류, 즉 혈청 및 혈장(및 다른 수정 비혈액 샘플)이 투명할지라도, 영상화 시스템은 샘플 메니스커스 상에서 일어나는 굴절의 변화, 및 틱 물질과 샘플 사이의 굴절 지수의 차이로 인해 샘플의 존재를 여전히 검출할 수 있다. 대안적으로, 샘플에 의해 용해되는, 모세관 내부에 코팅된 건조된 염료 제제를 제공함으로써 염료를 샘플에 첨가할 수 있다.

[0689] 샘플 부피를 측정하는 다른 방법(본원에 기재된 바와 같이) 각각의 메니스커스의 정점 및 기저부를 위치시키는 단계 및 단순한 기하학적 기법을 이용하는 단계를 포함한다. 샘플 액체 컬럼 내의 기포를 인식할 수 있고 상기 논의된 방법으로 측정할 수 있고, 적절한 부피를 샘플에 의해 점유된 총 부피로부터 차감할 수 있다.

[0690] 상기 제공된 방법은(본원에 기재된 바와 같이) 샘플 모세관 내에 있거나 모세관의 단부에 매달려 있는 샘플을 측정한다. 샘플이 측정되고 시스템에 의해 수용된 후, 상기 샘플은 기기 내에서 피펫팅/공압 방법에 의해 배출된다. 일단 이것이 일어나면, 틱을 다시 영상화할 수 있고 임의의 잔류 샘플을 측정할 수 있다. 실제로 어세이에서 사용되는 부피는 총 부피와 잔류 부피의 차이이다.

[0691] 특히 기술적으로 훈련받지 않은 사용자에게 의해 사용될 때 POC 어세이 시스템에서 또 다른 구체적인 문제점은 샘플이 샘플 모세관의 외측에 존재한다는 것이다.

[0692] 본 발명을 이용하여 이것을 영상화하고 측정할 수 있고, 사용자는 즉각적으로 과량의 혈액을 제거할 수 있다.

[0693] 어세이 디바이스에서 샘플 획득 및 전달의 효과는 이용되는 액체 취급 기법에 의해 좌우된다. 자동화된 디바이스는 (1) 공압 흡입 및 배출(일회용 틱을 사용하는 많은 실험실 단일 및 다중 채널 피펫팅 디바이스에서와 같음; 공압 방법은 양의 또는 음의 압력(진공)을 이용할 수 있음), 또는 (2) 양의 변위(주사기에서와 같음), 잉크 젯 유사 기술 등을 이용할 수 있다. 샘플 및 다른 액체, 예컨대, 시약은 (3) 모세관 작용에 의해 저장기로부터 추출되어 나올 수 있거나 (4) 다공성 매질 내로 흡입될 수 있다. 액체(샘플 및/또는 시약)는 다른 액체와 접촉하거나 접촉하지 않으면서 배출될 수 있다. 예를 들면, 샘플이 희석되어야 하는 경우, 샘플 틱은 희석제 내에 침지될 수 있거나 건조 웰 또는 희석제를 함유하는 웰 내로 떨어지도록 공기 내로 옮겨질 수 있다. 본 발명을 이용하여 모든 상기 시스템들 및 방법들의 성능을 검증할 수 있고/있거나 측정할 수 있다.

[0694] 다른 실시양태에서, 모세관은 외부 카메라를 갖춘 기기 외측에서 사용자에게 의해 영상화될 수 있다. 부피 측정치는 모세관의 크기에 맞게 조정될 수 있다. 이러한 외부적으로 배향된 카메라는 결과가 정확한 환자에게 신뢰가능하게 귀착될 수 있도록 사용자/환자의 인식을 위해 이용될 수 있다. 상기 방법은 적절한 투약이 이용되고 있다는 것을 검증하는 데에도 이용될 수 있다(환제 용기 또는 환제의 영상 또는 대안적으로 기기 내의 바 코드 판독기가 이 목적을 위해 이용될 수 있음).

[0695] 본 발명은 어세이 틱 내로 흡입된 시약의 위치 및 부피를 측정하는 데에도 이용될 수 있다. 몇몇 경우, 염료를 시약에 첨가하여 상기 시약이 용이하게 영상화되게 할 수 있다(개선된 명암대비).

[0696] 혈장이 혈액으로부터 분리되는 어세이에서, 본 발명은 적혈구 세포 제거의 효과 및 혈장의 이용가능한 부피를 검증하는 데에 이용될 수 있다. 샘플 함유 틱을 이동시키는 것에 대한 대안은 카메라를 이동시키는 것이다.

[0697] 이러한 시스템은 하기 장점들을 가질 수 있다:

[0698] 1. 샘플의 정량적 측정;

[0699] 2. 샘플 종류를 확인하는 능력;

[0700] 3. 샘플 부피의 객관적 정량적 기록의 생성;

[0701] 4. 샘플 부피가 정확하지 않을 때 어세이가 결과를 제공하게 할 수 있다는 점; 및

[0702] 5. 어세이 시스템의 신뢰도를 개선한다는 점.

[0703] **실시예 5: 틱**

[0704] 도 18은 샘플 및 시약을 흡입하는 데에 이용된 팁의 도면(mm 단위의 치수)을 보여준다.

[0705] **실시예 6: 원통형 모세관의 기하학적 측정**

[0706] 도 19는 샘플을 함유하는 원통형 모세관의 치수를 보여준다.

[0707] R = 반경

[0708] L_1 = 실린더의 하단부부터 하부 샘플 메니스커스까지의 거리

[0709] L_2 = 실린더의 하단부부터 상부 샘플 메니스커스까지의 거리

[0710] 도입된 부피 = $\pi * (R^2) * (L_2 - L_1)$

[0711] **실시예 7: 원추형 모세관의 기하학적 측정**

[0712] 도 20 및 도 21은 원추형 모세관의 치수를 보여준다.

[0713] R_b = 원추의 기저에서의 반경

[0714] L = 길이

[0715] L_1 = 원추의 (돌출된) 정점부터 하부 샘플 메니스커스까지의 거리

[0716] L_2 = 원추의 (돌출된) 정점부터 상부 샘플 메니스커스까지의 거리

[0717] 도입된 부피 = $\pi * (R_b/L)^2 * [(L_1)^3 - (L_2)^3] / 3$

[0718] $\tan \theta = R_b/L$

[0719] **실시예 8: 액체 메니스커스의 효과**

[0720] 잘 공지되어 있는 바와 같이, 모세관 내의 액체는 전형적으로 굽어진 메니스커스를 갖는다. 접촉각에 따라, 메니스커스는 액체에 비해 상대적으로 내부로 또는 외부로 굽어질 수 있다. 순 외부 압력이 인가되지 않은 경우, 모세관 표면이 친수성을 나타내면(접촉각 $< \pi/2$) 메니스커스는 내부로 향하고 상기 표면이 소수성을 나타내면(접촉각 $> \pi/2$) 메니스커스는 외부로 향한다. 순 압력이 액체 컬럼에 인가되는 경우(수직으로 배향된 모세관 또는 기기에 의해 인가된 공압), 하부 메니스커스는 모세관의 하단부 아래에서 돌출될 수 있다. 작은 직경 모세관에서, 표면 장력은 메니스커스를 가로지르는 작은 중력에 비해 상대적으로 강하다. 수직으로 배향된 원형 모세관 내의 메니스커스를 가로지르는 표면 장력 압력은 $2\pi * R * \gamma * \cos \theta$ (이때, γ 는 표면 장력이고, θ 는 접촉각임)이다. 중력에 의해 야기된, 메니스커스를 가로지르는 압력은 $\rho g \Delta L (\pi * R^2)$ (이때, ρ 는 액체 밀도이고, ΔL 은 메니스커스를 가로지르는 거리이고, g 는 중력 상수임)이다. 따라서, 메니스커스 표면은 구형이다. 메니스커스(메니스커스들)에 의해 점유된 부분(들) 내의 액체의 부피는 다음과 같이 계산될 수 있고 부피의 보다 더 정확한 추정치를 수득하는 데에 이용될 수 있다:

[0721] 샘플 모세관의 기저부로부터 정의된 거리

[0722] L_1 = 하부 메니스커스의 기저부까지의 거리

[0723] L_2 = 하부 메니스커스의 정점까지의 거리

[0724] L_3 = 상부 메니스커스의 기저부까지의 거리

[0725] L_4 = 상부 메니스커스의 정점까지의 거리

[0726] 구형 캡의 부피

$$\pi h(3a^2 + h^2)/6$$

[0728] 구형 캡의 치수는 도 22에 나타나 있다.

[0729] 메니스커스의 수 및 위치에 의해 정의된 여러 상이한 상황들이 일어날 수 있다. 하기 제공된 식들은 내부로 굽어진 메니스커스 및 외부로 굽어진 메니스커스를 다룬다는 것을 주목한다.

[0730] 경우 1: (도 23에 나타낸 바와 같이) 상부 메니스커스는 굽어져 있고, 하부 메니스커스는 수평하다.

- [0731] 치환: $a = R$, $h = L_4 - L_3$
- [0732] L_3 과 L_4 사이의 부피 = $\pi * (L_4 - L_3) * (3 * (R)^2 + (L_4 - L_3)^2) / 6$
- [0733] 총 부피 = $\pi * ((R)^2 * L_3 + (L_4 - L_3) * (3 * (R)^2 + (L_4 - L_3)^2) / 6)$
- [0734] 경우 2: (도 24에 나타낸 바와 같이) 두 메니스커스들은 모세관 내에 있고 곁여져 있다.
- [0735] 총 부피 = $\pi * ((R)^2 * L_3 - (L_2 - L_1) * (3 * (R)^2 + (L_2 - L_1)^2) / 6 + (L_4 - L_3) * (3 * (R)^2 + (L_4 - L_3)^2) / 6)$
- [0736] 경우 3: 2개의 곁여진 메니스커스들이 존재한다. (도 25에 나타낸 바와 같이) 하부 메니스커스는 곁여져 있고 모세관의 하단부 아래에 있다.
- [0737] 총 부피 = $\pi * ((R)^2 * L_3 + (L_1) * (3 * (R)^2 + (L_1)^2) / 6 + (L_4 - L_3) * (3 * (R)^2 + (L_4 - L_3)^2) / 6)$
- [0738] **실시예 9: 기포**
- [0739] 액체 샘플 또는 시약 내의 기포는 계측된 액체의 부피의 가변 감소를 야기한다. 작은 모세관에서, 기포는 모세관 횡단면보다 더 작은 경우 구형이다. 기포가 더 큰 경우, 기포는 (원통형 모세관에서) 원통형 공간을 점유하고 반구형 단부를 갖는다.
- [0740] 경우 1: (도 26에 나타낸 바와 같이) 기포는 모세관의 폭에 걸쳐 있을 정도로 충분히 크지 않다.
- [0741] 차감 기포 부피 = $(4/3) * \pi * r^3$
- [0742] 경우 2: (도 27에 나타낸 바와 같이) 기포는 모세관의 전체 폭을 점유한다.
- [0743] 차감 기포 부피 = $4 * \pi * R^3 + \pi * R^2 * L$
- [0744] **실시예 10: 모세관 텅 외측의 혈액**
- [0745] 경우 1: 수직 모세관 외측에 매달려 있는 혈액 또는 시약은 조절을 벗어난 상황을 나타내기 때문에 어세이에서 주요 문제점을 야기할 수 있다. 도 28에 나타낸 바와 같이, 영상화는 이 상황을 용이하게 인식할 수 있다.
- [0746] 경우 2: 매달려 있는 혈액 이외의 모세관 외측의 혈액
- [0747] 모세관 외측의 잔류 혈액도 시약 오염 및 과도한 부피의 잠재적 원인이기 때문에 문제가 된다. 마찬가지로, 영상화는 이 상황을 인식할 수 있다.
- [0748] **실시예 11: 일단 샘플 분배가 일어났을 때 모세관 내부의 잔류 혈액**
- [0749] 이것은 잔류 부피를 추정하고 총 샘플 부피로부터 차감함으로써 처리될 수 있다. 도 29는 잔류 혈액을 갖는 모세관의 일례를 보여준다.
- [0750] 잔류 부피 = $\pi * R^2 * L$
- [0751] **실시예 12: 혈액 샘플로부터의 적혈구 세포 분리의 평가**
- [0752] 많은 어세이들에서, 샘플로부터 적혈구 세포를 제거하여 혈장을 수득하는 것이 바람직하다. 이것을 특히 POC 디바이스에서 수행할 때, 상기 분리가 효과적이라는 것을 인식하고 어세이를 수행하기에 충분한 혈장이 존재한다는 것을 확인하는 것이 바람직하다.
- [0753] 도 30 내지 도 39는 본 발명의 POC 디바이스에 적합한 적혈구 세포 제거의 한 바람직한 실시양태의 개략도를 보여준다. 도 30에 나타낸 바와 같이, 적혈구 세포에 대한 자유 항체와 혼합된, 적혈구 세포에 대한 항체를 갖는 자화가능한 입자가 혈액 샘플을 수용할 웰 내에 건조된 제제로서 제공된다. 혈액 샘플이 상기 웰에 첨가되고(도 31에 나타냄) 자성 시약과 혼합될 때(도 32, 도 33 및 도 34에 나타냄), 적혈구 세포는 자성 입자와 응집되고 혈액 함유 웰을 강한 자석에 근처에 배치함으로써(도 35에 나타냄) 제거될 수 있다. 상기 웰을 자석에 대해 상대적으로 적절하게 이동시킴으로써 적혈구 세포를 혈장으로부터 분리한 후(도 36에 나타냄), 상기 혈장을 어세이에 이용될 수용 웰 내로 배출할 수 있다(도 37, 도 38 및 도 39에 나타냄). 영상화 분석은 상기 분리가 얼마

나 효과적으로 수행되었는지를 확인할 수 있고 어세이에 이용가능한 혈장의 부피를 추정할 수 있다는 것이 명확하다.

[0754] **실시예 13: 모세관 내의 액체 샘플의 영상**

[0755] 도 40은 저흡광도를 갖는 액체를 함유하는 원통형 팁의 높은 명암대비 영상을 보여준다.

[0756] 도 41은 고흡광도를 갖는 액체를 함유하는 원추형 팁의 영상을 보여준다.

[0757] 도 42는 팁 내의 2개 메니스커스들을 보이는 고흡광도 액체를 갖는 팁을 보여준다.

[0758] 도 43은 샘플 액체, 및 팁의 직경에 걸쳐 있는 큰 기포를 갖는 팁을 보여준다.

[0759] 도 44는 투명 팁 또는 모세관 내의 깨끗한 상부 메니스커스를 보이는 물 함유 팁을 보여준다.

[0760] 도 41은 액체 컬럼의 길이(5 μ l에 상응함) 및 상부 액체 메니스커스의 해상도(90% 초과 신뢰도를 갖는 메니스커스 위치의 선명도)에 대해 분석되었다. 메니스커스 위치의 정밀도는 액체 컬럼의 길이의 1% 미만에 상응하였다.

치수	화소 폭
길이	276
메니스커스의 해상력	2
정밀도	0.7%

[0761]

[0762] **실시예 14: 어세이 결과에 대한 불충분한 샘플 부피의 효과**

[0763] 시스템을 이용하여 혈액 중의 단백질 C를 측정하였다. 샘플 전달 디바이스가 적절하게 이용된 경우, 시스템 내로 삽입된 샘플 부피를 20 μ l가 되도록 디자인하였다. 이 샘플로부터 10 μ l의 혈액을 사용하도록 기기를 셋업하였다. 샘플 부피가 목표 수준으로부터 의도적으로 감소되었을 때, 시스템에 의해 계산된 분석물 농도는 도 45에 나타나 있다. 샘플 부피가 필요한 부피 미만이 될 때까지 결과는 본질적으로 불변하였다.

[0764] **실시예 15: 샘플 전달 디바이스**

[0765] 도 46은 샘플 전달 디바이스의 일례를 보여준다. 상기 디바이스는 하기 (a) 내지 (e)로 구성된다: (a) 임의적으로 항-응고제 또는 샘플의 분석 전 처리에 적합한 다른 시약으로 코팅된 모세관(유리 또는 플라스틱으로 만들어진), (b) (c) 하우징 내에서 활주할 수 있고 하우징 내의 홈 내에서 활주하는 상승된 특징부를 갖는 플런저(피스톤)와 피팅된 모세관을 보유하는 하우징, (d) 히스톤 특징부와 맞물리고 일단 샘플이 옮겨지면 플런저의 축 이동이 방지되도록 플런저의 축 이동을 한정하는 하우징 내의 홈, 및 (e) 모세관 내의 임의의 액체를 옮기도록 플런저가 활성화될(디바이스의 원위 단부를 향하여 이동될) 때 차단되는, 통상적으로 개방된 하우징 내의 환기구.

[0766] 도 47은 샘플로 충전된 모세관을 갖는 샘플 전달 디바이스를 보여준다. "충전" 위치가 표시되어 있다.

[0767] 도 48은 플런저의 이동에 의해 옮겨진 샘플을 갖는 샘플 전달 디바이스를 보여준다.

[0768] 도 49는 샘플이 불완전하게 배출된 후 샘플 전달 디바이스를 보여준다.

[0769] **실시예 16: 영상 분석에 의한 부피의 측정**

[0770] 피펫팅 디바이스를 이용하여 공지된 부피의 액체 샘플을 샘플 팁 내로 흡입하였다. 시판되는 평판 스캐너(델(De11))를 이용하여 팁의 영상을 수집하였고, (a) 팁의 원위 단부부터 메니스커스까지의 거리 및 (b) 팁의 원위 단부부터 영상 상에 표시된 특징부까지의 거리를 하기와 같이 측정하였다. 거리 (a) 대 거리 (b)의 비를 샘플 부피의 척도로서 측정함으로써 영상을 분석하였기 때문에, 팁의 배향, 및 스캐너 압반에 대해 상대적인 그 위치를 조절하지 않았다. 상업적으로 입수가능한 영상화 소프트웨어(Jasc)를 이용하여 팁, 메니스커스 및 특징부의 위치를 측정하였다. 상기 소프트웨어를 이용하여 영상을 수평으로 배향한 후, 위치를 기록하였고 상기 소프트웨어에 의해 제공된 등급으로 직접적으로 판독할 수 있었다. 도 50은 예시적 영상을 보여준다.

[0771] 거리 L1은 팁의 위치이었다.

[0772] 거리 L2는 메니스커스의 위치이었다.

[0773] 거리 L3은 도 50에 표시된 화살표의 위치이었다.

부피	거리(임의 단위)					비	계산된 부피
μl	L1	L2	L3	$\Delta\text{L2-1}$	$\Delta\text{L3-1}$		μl
10.0	120	374	590	254.00	470	0.540426	9.7
12.5	112	400	584	288.00	472	0.610169	12.9
15.0	156	470	636	314.00	480	0.654167	15.2
17.5	171	505	654	334.00	483	0.691511	17.3
20.0	114	469	596	355.00	482	0.736515	20.0
25.0	214	600	694	386.00	480	0.804167	24.5
30.0	165	585	640	420.00	475	0.884211	30.3

[0774]

[0775] 도 51에 나타낸 바와 같이, 부피는 단순히 거리의 비와 관련되었고 계산될 수 있었다. 부피 추정치는 평균 실제 부피의 2% 미만 이내에 있었다.

[0776] **실시예 17: 팁 내에서 원심분리된 혈액의 영상**

[0777] 팩킹된 적혈구 세포의 컬럼의 길이 대 총 액체 컬럼의 길이(팁 대 메니스커스)의 비를 측정함으로써 헤마토크릿을 디지털 영상으로부터 결정하였다. 이것은 팁을 공지된 방향으로 배향시키고 특징부들 사이의 화소를 카운팅하는 특징부 인식 소프트웨어에 의해 용이하게 달성된다. 상기 팁의 경우, 거리는 정밀한 측정을 허용하는 수백 개의 화소에 상응하였다.

[0778] 도 10은 빈 캡핑된 샘플 팁을 보여준다.

[0779] 도 11은 혈액 샘플을 함유하는 캡핑된 샘플 팁을 보여준다.

[0780] 도 12는 원심분리 후 23% 헤마토크릿 혈액 샘플을 함유하는 캡핑된 샘플 팁을 보여준다.

[0781] 도 13은 원심분리 후 31% 헤마토크릿 혈액 샘플을 함유하는 캡핑된 샘플 팁을 보여준다.

[0782] 도 14는 원심분리 후 40% 헤마토크릿 혈액 샘플을 함유하는 캡핑된 샘플 팁을 보여준다.

[0783] 도 15는 원심분리 후 52% 헤마토크릿 혈액 샘플을 함유하는 캡핑된 샘플 팁을 보여준다.

[0784] 도 16은 원심분리 후 68% 헤마토크릿 혈액 샘플을 함유하는 캡핑된 샘플 팁을 보여준다.

[0785] 도 17은 원심분리된 샘플을 사용하여 디지털 영상화 시스템으로 측정한 헤마토크릿(헤마토크릿, % 보고된)과 표준 기법으로 측정한 헤마토크릿(헤마토크릿, % 목표)의 비교를 보여준다. 헤마토크릿 측정의 표준 기법의 일례는 표준 실험실 원심분리기를 이용하여 유리 모세관 내에서 마이크로헤마토크릿을 측정하는 것, 및 팩킹된 적혈구 세포 층의 길이 및 샘플에 의해 점유된 모세관의 총 길이를 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0786] **실시예 18: 혈액 분리를 위한 구성요소를 포함하는 시스템**

[0787] 혈액의 분리를 위해 디자인된 시스템은 하기 특징을 포함할 수 있다:

[0788] 1. 팁 형태의 디자인

[0789] a. 약 20:1 길이:직경의 중횡비는 샘플, 팩킹된 세포 및 혈장 부피의 측정에 편리한 길이를 제공한다.

[0790] b. 형태를 갖는 팁은 필요한 경우 비닐 캡을 사용한 밀착 밀폐 및 캡의 용이한 제거를 가능하게 한다.

[0791] c. 팁의 주요 부분의 작은 구배각 원추 형태 및 팁의 보다 더 넓은 원추 상부 구획은 혈장 회수 수단의 삽입에 최적이다. "반방사형(counter radial)" 디자인(팁이 회전축의 원위 단부에서 보다 더 좁음)은 흔하지 않다는 것을 주목한다.

[0792] d. 팁의 보다 더 넓은 원추형 상부 구획은 자동화된 피펫팅 및 x-y-z 이동 재물대 상에서 수용되도록 구성된다. 필요한 경우 유체 밀착 연결을 형성하는 연결 및 용이한 제거가 용이해진다.

[0793] 2. 혈장 회수 팁을 이동시키기 위한 매우 정밀하고 정확한 x-y-z 재물대의 이용.

[0794] 3. 원심분리의 작동 및 혈장 회수를 자동적으로 조절하기 위한 영상화 기술의 이용. 혈장 회수 팁을 팩킹된 세포-혈장 계면의 1 mm 미만 이내까지 이동시킨다.

[0795] **실시예 19: 어세이 교정을 개선하기 위한 액체 부피의 영상 측정의 이용**

[0796] 자동 피펫팅 디바이스는 일반적으로 (대략) 5 μl 내지 50 μl 의 범위 내에서 약 5% 이상까지 정확하고 정밀하다. 많은 어세이들에서, 분석물 측정의 요구되는 정확도 및 정밀도를 수득하기 위해 부피 정확도 및 정밀도 둘다가 매우 우수해야 한다(대략 < 2%). (1) 5 μl 미만의 부피의 액체(작은 부피 샘플의 최대 사용이 필요한 경우 매우 바람직함), 및 (2) "문제가 되는" 물성을 갖는 액체(예컨대, 점성 용액, 세제를 함유하는 용액 등)의 계측 및 전달은 어세이 결과의 정확도를 손상시키는 낮은 정밀도 및 정확도를 종종 가질 수 있다. 이들 문제점에 대한 한 발명적 해법은 액체의 영상 분석을 이용하여 액체(샘플, 희석제, 시약, 교정제 및 대조군)의 부피를 측정한 후, 의도된 부피로부터의 편차([대략] 20% 이하)를 허용하도록 어세이 교정 기능을 보정하는 것이다. 본 발명자들은 매우 정밀한 치수를 갖는 피펫 팁에서 5 μl 만큼 작은 부피가 매우 우수한 정확도 및 정밀도(<2%)으로 측정될 수 있다는 것을 보여주었다. 이하에서, 본 발명자들은 (1) 부피 측정 정확도 및 정밀도, 및 (2) 어세이에 사용된 용액(샘플, 시약 등)의 부피와 어세이의 교정을 보정하기 위한 어세이 반응 사이의 공지된 관계의 이용을 입증한다.

[0797] (1) 영상 분석에 의한 부피 측정의 정확도;

[0798] 하기 표에서, 공지된 부피의 브로모페놀 블루의 용액을 원추형 팁 내로 흡입하였다.

[0799] 상기 용액을 상기 팁의 중간 부분에 위치시키고 스캐너를 이용하여 영상화하였다. 팁 배향 및 위치를 표준 방법으로 확인하였다. 팁 배향을 알고리즘으로 조절하고 액체 컬럼의 길이를 측정하였다. 팁의 공지된 내부 치수를 이용하여 액체 부피를 계산하였다. 4개의 팁에서 4개의 분취액에 대해 4개의 복제 영상을 촬영하였다. 따라서, 하기 제시된 오차는 영상 복제가능성, 및 팁 치수 정확도 및 정밀도를 반영한다.

목표 부피	측정된 부피	총 오차
μl	μl	%
5	5.01	1.39
20	19.98	1.80

[0800]

[0801] 부피 측정은 팁 내의 액체의 정확한 위치선정에 의해 좌우되지 않는다는 것을 주목한다. 영상 분석은 팁 내의 액체의 위치에 대한 정보를 제공한다. 팁의 치수를 인식함으로써 어디에서든 액체에 의해 점유된 팁의 부분으로부터 부피를 항상 계산할 수 있다.

[0802] (2) 액체 부피 측정의 도입에 의한 어세이 교정의 보정

[0803] 이것은 하기 시뮬레이션에서 예시된 바와 같이 달성된다. 샘플이 2종의 시약(시약 1 및 시약 2로 지칭됨)과 조합된 어세이를 고려한다. 샘플, 시약 1 및 시약 2에 대한 목표 부피는 10 μl 이다. 어세이 결과는 측정된 신호를 분석물 농도와 관련시키는 표준 곡선으로부터 계산된다. 어세이 교정 과정의 일부로서, 샘플 및 시약을 위해 사용된 부피가 10 μl 이외에 8 μl 및 12 μl 로 변화되고 어세이 결과가 10 μl 부피에 적합한 교정에 기초하여 계산되는 실험을 수행할 수 있다. 도 105, 도 106 및 도 107에서, 결과는 실제 부피에 대하여 작도되었다. 샘플 부피의 경우, 어세이 결과는 본질적으로 사용된 부피에 정비례한다(도 105에 나타냄). 시약의 경우, 다소 비선형적인 반응이 관찰되었다(도 106 및 도 107에 나타냄). 이들 반응들은 당분야에서 잘 공지되어 있는 "전형적인" 어세이에 기초하고, 부피에 따른 변화의 크기가 표시된다.

[0804] 그 다음, 본 발명자들은 본 발명자들이 부적합한 부피의 사용의 효과 이외에 어세이 결과에 대한 일정한 정도의 무작위 오차(약 5%, "현실 상황"을 반영하기 위함)를 부과한 평가를 시뮬레이션하였다. 본 발명자들은 샘플, 시약 1 및 시약 2가 모든 조합에서 8 μl , 10 μl 및 12 μl 로 설정되어 있는 결과를 포함한다. 이 실행으로부터의 결과가 부피 오차에 대한 보정 없이 도 108에 나타낸 바와 같이 작도되는 경우, 예측된 바와 같이, 사용된 실제 부피가 어세이 교정에 사용된 부피와 상이하였다는 사실을 무시하였기 때문에 보고된 결과에는 유의한 오차가 존재한다.

[0805] 그러나, 본 발명자들이 부피에 대한 공지된 어세이 반응을 이용하여 목표 값으로부터의 부피 변량을 허용하고 보정된 분석물 값을 작도하는 경우, 본 발명자들은 도 109에 나타낸 상당히 개선된 결과를 수득한다. 이것은 데이터의 다중 회귀 분석에 의해 달성되었다.

[0806] 부피 보정을 이용하여 계산한 결과와 부피 보정을 이용하지 않고 계산한 결과를 비교하는 요약 통계자료는 하기 표에 제시되어 있고 부피 보정의 이용에 의한 모든 매트릭스에서의 유의한 개선을 반영한다. SEE는 추정치의 표

준 오차이다.

부피 보정	회귀 기울기	상관계수	분석물 CV	SEE/평균
		R ²	%	%
보정 없음	0.994	0.914	13.3	16.5
보정	0.999	0.994	3.6	7.4

[0807]

[0808]

실시예 20: 현미경관찰 및 영상 분석을 이용한 혈구응집 억제 어세이 판독

[0809]

0.3%(중량/부피) 글루타르알데하이드를 함유하는 인산염 완충 식염수(100 μ l)에서, 안정화된 칠면조 적혈구 세포 및 0.5 mg/ml 소 혈청 알부민, 및 표시된 경우 2 혈구응집 유닛의 불활성화된 인플루엔자 바이러스 및 15 μ g의 염소 다중클론 항-인플루엔자 B 항체를 RT에서 원추형 기저부 PCR 튜브 내에서 15분 동안 항온처리하였다. 반응 생성물을 튜브의 기저부로부터 백색 광으로 조명된 투명 슬라이드로 옮기고 디지털 카메라를 이용하여 4배 확대율로 영상화하였다. 도 131에서 볼 수 있는 바와 같이, 적혈구 세포와 상기 바이러스의 혈구응집소의 반응에 의해 야기된 응집(도 131, 샘플 3)이 비응집된 대조군(도 131, 샘플 1)과의 비교에 의해 용이하게 관찰될 수 있다. 상기 바이러스에 대한 과량의 항체도 존재하였을 경우에는 응집이 완전히 억제되었다. 응집 반응의 2가지 효과가 주목할 만하다: (1) 응집된 샘플에서, 대조군에 비해 응집물의 보다 더 빠른 침강으로 인해 보다 더 많은 적혈구 세포가 존재하고, (2) 각각의 적혈구 세포가 평균적으로 다른 적혈구 세포와 보다 더 많이 클러스터링된다. 응집 반응을 영상 인식 소프트웨어에 따라 정량하여 적혈구 세포 및 응집물을 확인할 수 있고 위치를 찾아낼 수 있고 카운팅할 수 있다.

[0810]

도 131의 샘플 1은 비응집된 대조군(바이러스 부재, 항체 부재)을 보여준다. 도 131의 샘플 2는 비응집된 샘플(바이러스 + 항체)을 보여준다. 도 131의 샘플 3은 응집된 샘플(바이러스, 항체 부재)을 보여준다.

[0811]

실시예 21: 샘플 준비, 상청액 질의 조사 및 LDL 침전물의 질 평가

[0812]

혈장을 황산텍스트란(25 mg/dl)과 황산마그네슘(100 mM)의 혼합물로 희석한 후(1:10) 1분 동안 항온처리하여 LDL-콜레스테롤을 침전시켰다. 반응 생성물을 원심분리기의 튜브 내로 흡입하고 캡핑한 후 3000 rpm에서 3분 동안 회전시켰다. 원심분리 전(백색 침전물을 보임) 및 원심분리 후(깨끗한 상청액을 보임) 원래의 반응 혼합물의 영상을 촬영하였고 (캡의 제거 후) LDL-콜레스테롤 펠렛의 영상을 촬영하였다. 예를 들면, 도 132 및 도 134는 반응 생성물을 촬영한 영상의 예를 보여준다.

[0813]

LDL-침전 반응 생성물의 영상을 다음과 같이 분석하였다. 화소 색채 수준을 그들의 수직 위치의 함수로서 작도하였다. 값의 변량을 측정하였고, 3가지 색채에 대한 값들을 합산하였다. 광을 강하게 산란시키는 침전된 LDL의 입자 때문에, 침전물 값(1154)은 깨끗한 상청액의 값(672)보다 훨씬 더 컸다. 상기 상청액 값과 침전 시약에 노출되지 않은 대조군의 값의 비교는 원심분리의 질이 평가되게 한다(데이터는 나타나지 않음). 도 133은 원심분리기 내에서 회전시키기 전 및 원심분리기 내에서 회전시킨 후 분석된 영상의 예를 제공한다.

[0814]

흑색 비닐 캡의 제거 후, LDL 침전물의 영상을 촬영하였다. 그의 부피는 팁의 기하학적 형태 및 영상에서의 화소의 크기를 알 때 매우 정확하게 측정될 수 있다. 이 실험에서, 침전물의 부피는 $0.155 \pm 0.015 \mu$ l로서 추정되었다.

[0815]

실시예 22: 샘플로 인한 광학 신호의 3색 영상 블랭킹의 이용에 의한 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT)에 대한 어세이의 성능 개선

[0816]

혈청 중의 ALT는 이 효소가 알라닌을 피루베이트(산소 및 피루베이트 산화효소를 사용하여 과산화수소를 제조하는 데에 사용됨)로 전환시키는 어세이에서 측정될 수 있다. 그 다음, 상기 과산화물은 효소 호스라디쉬 퍼록시다제, 아미노안티피렌 및 N-에틸-N-(3-설포프로필)아닐린을 사용하여 착색된 생성물을 제조하는 데에 사용된다. 상기 착색된 생성물은 560 nm에서 최대로 흡수한다.

[0817]

도 135에 나타난 바와 같이 일부 혈청 샘플들이 이 파장에서 유의한 흡광도를 가지므로 상기 어세이를 방해한다는 것을 발견하였다. 구체적으로, 상대적으로 높은 샘플 농도(예컨대, 상기 어세이에서 1:10의 최종 희석)를 이용하였을 때, ALT 어세이의 3색 영상 분석은 임상 샘플의 사용 시 좋지 않은 결과를 제공하였다.

[0818]

도 135는 완충제 내로 1:10으로 희석된 여러 혈청 샘플들의 스펙트럼을 보여주고, OD는 파장(nm)에 대해 작도되어 있다. OD의 큰 변경이 도 135에 나타나 있다.

[0819] 통상적인 분광법에서, 이 문제점은 첨가된 어세이 성분들을 갖지 않는 샘플의 블랭크 관독치를 수득하고 어세이에 의해 발생된 신호로부터 상기 블랭크를 차감함으로써 처리된다. 본 발명에서와 같은 3색 영상 분석에서, 유사한 방법이 이용될 수 있다는 것을 발견하였다. 회색된 샘플을 영상화할 수 있고 3색 값을 추출할 수 있다. 그 다음, 비반응된 샘플로부터의 신호를 포함하도록 어세이 교정 알고리즘을 변화시킬 수 있다. 구체적으로 이 경우, (샘플 블랭크 신호를 포함하지 않는) 원래의 알고리즘은 다음과 같았다: $ALT\ 농도 = a + b \cdot R + c \cdot G + d \cdot B + e \cdot R^2$ (이때, a, b, c, d 및 e 는 실험적으로 유도된 상수이고, R, G 및 B 는 각각 적색, 녹색 및 청색 채널의 신호 값이다). 개선된 알고리즘은 다음과 같았다: $ALT\ 농도 = a + b \cdot R + c \cdot G + d \cdot B + e \cdot R_s + f \cdot R_s^2$ (이때, R_s 는 적색 채널의 샘플 블랭크로부터의 신호이다)(a, b, c, d 및 e 의 실험적으로 유도된 값은 원래의 알고리즘의 값과 상이하였다).

[0820] ALT 활성이 0 U/ℓ 내지 250 U/ℓ 인 21개의 혈청 샘플들을 삼중으로 측정하였고, 3색 영상 분석의 결과를 임상 실험실 방법(Teco)에 의해 제공된 결과와 비교하였을 때, 훨씬 더 개선된 결과를 표시하는 하기 회귀 통계자료를 수득하였다.

교정 방법	R ²	기울기	절편(U/ℓ)	SEE
원래의	0.922	0.922	4.5	18.9
개선된	0.972	0.972	1.6	10.0

[0821]

[0822] **실시예 23: 항-인플루엔자 항체에 대한 혈구응집 억제 어세이의 객관적인 분석의 가속 및 제공**

[0823] 실시예 20에 기재된 바와 같이 제조된 반응 혼합물을 1분 동안만 항온처리한 후 (상기 세포분석 실시예에 대해 기재된 바와 같이) 3개의 분리된 마이크로채널 내로 도입하고 영상화하였다. 적절한 통계자료를 수득하기 위해 각각의 샘플에 대해 약 5개 내지 10개의 영상을 촬영하였다. 평균적으로, 각각의 영상은 약 800개 내지 900개의 세포로 구성된다. 함수를 이용하여 개별 세포의 대표적인 선택 주변에서 세포의 방사형 분포를 측정함으로써 응집 과정을 객관적으로 평가할 수 있다.

[0824] 상기 영상을 프로세싱하여 2-차원적 공간에서 개별 세포의 중심 위치를 수득하였다. 2-차원적 위치를 이용하여 쌍 상관관계 함수로도 공지되어 있는 방사형 분포 함수(RDF)를 계산하였다. 방사형 분포 함수 $g(r)$ 는 선택된 세포로부터 거리 r 만큼 떨어진 위치에서 세포를 발견할 확률을 정량한다. 수학적으로, 하기 식으로 표시된다:

[0825]
$$g(r) = \rho(r) / \rho_0$$

[0826] 상기 식에서, $\rho(r)2\pi r dr$ 은 특정 세포로부터 거리 r 만큼 떨어진 위치에서 발견된 세포의 수이고, ρ_0 는 전체 영상 창에 걸친 평균 세포 밀도이다. 값 $g(r)$ 는 통계적으로 유의한 결과를 보장하기 위해 영상 내의 모든 입자들 및 다수의 영상들에 대한 평균으로서 계산된다.

[0827] 결과

[0828] $g(r)$ 의 제1 피크의 값은 샘플에서 이중항의 수를 정량한다. 따라서, 응집된 샘플에 대한 $g(r)$ 는 다른 2개의 샘플들에 비해 크기 면에서 더 높아야 한다. g 의 값은 약 20개의 화소(적혈구 세포의 직경의 약 2배인 약 12 μm에 상응함)의 거리에 걸쳐 0부터 최대치까지 신속히 상승한 후 약 1.0까지 감소한다. 하기 나타낸 바와 같이, 바이러스로 인한 응집은 바이러스가 존재하지 않거나 항체가 바이러스에 의해 유도된 응집을 억제할 때의 응집 부재와 구별될 수 있었다.

바이러스	항체	응집	$g_{최대}$
부재	부재	무	1.44
존재	부재	유	1.67
존재	존재	무	1.47

[0829]

[0830] **실시예 24: 앵타머를 사용한 분석물 검출 시스템의 준비**

[0831] 단백질(트롬빈 및 인슐린)을 선택적으로 포획하도록 2개의 올리고 DNA 앵타머를 디자인하였다. 상기 올리고 DNA 앵타머는 공개된 데이터로부터 선택된 서열을 갖는 결합 부위, 비드 또는 마이크로어레이의 표면으로부터 상기 결합 부위를 확장시키는 불활성 부위, 및 앵타머를 표면에 화학적으로 고정시키는 반응성 기로 구성되었다. (트롬빈에 대해 특이적인) 앵타머 1은 하기 서열을 가졌다: 5'-Am-(T)₄₅GGTTGGTGTGGTTGG-3'. (인슐린에 대해 특이

적인) 앵타머 2는 하기 서열을 가졌다: 5'-Am-(T)₃₂ACAGGGGTGTGGGGACAGGGGTGTGGGG-3'. 각각의 서열의 시작에서 "Am"은 아미노 기를 나타낸다.

[0832] 상기 2개의 앵타머를 카복실 기로 작용화된 폴리스티렌 비드(5 μ m) 상에 고정시켰다. 그 다음, 상기 비드를 세척하였고 과량의 시약을 제거하였다. 그 다음, 상기 비드를 상기 앵타머의 결합 부위에 상보적인 형광 표지된 올리고 DNA 프로브와 혼합하였다. 상기 프로브와 상기 앵타머의 혼성화를 형광 방사로 검출하였다. 평균 형광 방사에 의해 측정되었을 때, 상보적인 프로브만이 양성 혼성화 사건을 보였다. 혼성화 특이성은 상보적 프로브와의 혼성화 후 비드를 보여주는 도 139와 비상보적인 프로브와의 혼성화 후 비드를 보여주는 도 140의 비교에 의해 확인된다. 상기 비드가 분석 기관 상에 침착된 후, CCD 카메라 상에서 635 nm에서 레이저 여기 및 650 nm (± 10 nm)에서 여과된 방사를 이용하여 검출을 수행하였다. 앵타머 1 및 2를 고정시키기 위해 에폭시실란으로 코팅된 유리 표면 상에서 유사한 절차를 이용하였다. 상기 어레이를 형광 프로브와 혼성화시켰고 앵타머 결합 부위의 특이적 인식을 CCD 카메라 셋업 및 어레이 스캐너(이놉시스(Inopsys))를 이용한 형광 방사 검출로 측정하였다. 도 141은 상기 어레이에 대한 상기 앵타머의 결합 특이성을 보여주고, 이것은 도 142에 더 상세히 나타나 있다. 도 143은 예시적 어레이 스캔을 보여준다.

[0833] 실시예 25: 앵타머를 사용한 분석물의 검출

[0834] 형광 표지된 상보적 프로브와 혼성화된 앵타머 1을 포함하는 어레이를 실시예 24에 기재된 바와 같이 제조하였다. 트롬빈을 약 100 nM의 농도로 상기 어레이에 도입하였고 앵타머 1-프로브 복합체와 반응시켰다. 상기 어레이 상의 앵타머 1로부터의 형광 방사 신호는 2.5배까지 감소되었는데, 이것은 앵타머 1과 트롬빈의 결합에 의한 상기 프로브의 치환을 암시한다.

[0835] 실시예 26: 결합제(binder)

[0836] 2종의 결합제를 바이오티닐화시키고 아비딘으로 코팅된 어레이 유닛 고체 상에서 포획 표면을 생성하는 데에 사용한다. 마이크로타이터 플레이트 상에서 (1) 앵타머 및 (2) 단일쇄 Fv 항체 단편(scFv)을 사용하여 어레이 시약 생성 및 발광 판독 어레이 결과를 수득한다. 앵타머 및 scFv는 발광-기초 어레이를 위한 결합제로서 본원에서 제공된 팁 및 영상화 시스템 및 디바이스에 적용될 수 있다. 발색 기질과 함께 신호 발생 시약을 알칼리성 포스파타제에서 예를 들면, 호스라디쉬 퍼옥시다제로 변경하거나 발색 기질과 함께 알칼리성 포스파타제를 사용함으로써 색채를 측정하기 위해 카메라를 이용하여 분석물을 분석하고 판독할 수 있다. 마이크로플레이트(또는 다른 포맷) 내의 팁을 임의의 카트리지(어레이 유닛) 포맷에서 판독할 수 있다.

[0837] 실시예 27: 마이크로타이터 플레이트 상에서 DNA 앵타머를 사용한 비타민 D 어레이

[0838] 본 실시예에서, 단일 가닥 DNA 앵타머를 사용하여 비타민 D에 대한 어레이를 수행한다. 복수의 웰을 갖는 마이크로타이터 플레이트의 울트라비딘-코팅된 폴리스티렌 표면 상에 바이오티닐화된 DNA 앵타머를 코팅한다. 코팅 전, 상기 앵타머를 약 95°C에서 가열한 후 얼음 상에서 즉시 냉각시킴으로써 신속히 변성시키고 재생시킨다. 그 다음, NaCl, MgCl₂ 및 10% 에탄올을 함유하는 25 mM 트리스(pH 7.5) 중의 재폴딩된 바이오티닐화된 비타민 D DNA 앵타머 약 15 μ l를 각각의 웰에 첨가하여 포획 표면을 형성한다. 코팅 후, 상기 웰을 세척하고 약 100 μ l의 차단제로 차단하여 비특이적 결합을 감소시킨다.

[0839] 상기 어레이에 대한 분석물(비타민 D)을 트리스(NaCl, MgCl₂ 및 10% 에탄올, pH 7.5)로 희석하고 원하는 어레이 범위 내의 상이한 농도에서 비타민 D-알칼리성 포스파타제 접합체의 용액과 혼합하고 어레이 유닛에 제공하여 실온에서 10분 동안 항온처리한다. 그 다음, 어레이 유닛을 100 μ l의 세척 완충제로 3회 세척한다. 알칼리성 포스파타제에 대한 기질 약 40 μ l를 각각의 어레이 웰에 첨가하고, 화학발광 데이터(하기 표)를 약 10분 후에 수집한다. 도 144는 비타민 D의 농도(ng/ml)에 대해 화학발광도를 작도한 것이다.

비타민 D(ng/ml)	0	1	100	200
화학발광도(RLU)	155674.1	113824.3	49346.13	33824.27
	159471	110794.2	49699.04	35794.18
	162650.3	101655.7	53158.25	36655.66
	159920.8	99266.41	50195.63	35166.41
평균	159429.1	106385.1	50599.76	35360.13
cv%	1.80	6.60	3.44	3.37
B/B0	100%	67%	32%	22%

[0840]

[0841] **실시예 28: 마이크로타이터 플레이트 상의 에스트라디올 어세이**

[0842] 본 실시예에서, 단일쇄 가변 단편(scFv)을 사용하여 스테로이드 호르몬(에스트라디올)에 대한 어세이를 수행한다. 본 어세이에서, 복수의 웰을 갖는 마이크로타이터 플레이트의 울트라비딘-코팅된 폴리스티렌 표면 상에서 어세이 유닛의 내면을 바이오티닐화된 scFv로 코팅한다. 트리스 완충 식염수(pH 8, 0.03% BSA, 0.05% 티메로살) 중의 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 바이오티닐화된 scFv 약 15 μl 를 각각의 어세이 유닛에 첨가하였다. 세척 후, 각각의 어세이 유닛을 100 μl 의 고정 시약으로 고정시킨 후 건조 공기로 밤새 건조하고 건조된 상태로 저장한다.

[0843] 상기 어세이에 대한 분석물(자유 에스트라디올)을 트리스 완충 식염수(pH 8, BSA, 티메로살)로 희석하고 바이오스텝(Biostab)으로부터의 안정화제 중의 에스트라디올-알칼리성 포스파타제 접합체와 혼합하고 실온에서 약 10 분 동안 scFv로 코팅된 어세이 유닛에 제공한다.

[0844] 그 다음, 어세이 웰을 100 μl 의 세척 완충제로 5회 세척한다. 세척 후, 알칼리성 포스파타제에 대한 발광 기질(KPL 포스파글로(PhosphaGlo)) 40 μl 를 각각의 어세이 유닛에 첨가하고, 화학발광도 데이터(하기 표)를 약 10분 후에 수집한다. 도 145는 에스트라디올의 농도(pg/ml)에 대해 화학발광도를 작도한 것이다.

에스트라디올(pg/ml)	0	20	200	2000
화학발광도(RLU)	5505.454	1997.885	493.864	389.863
	5505.454	2005.112	496.932	374.317
	5659.613	1739.771	503.25	417.021
평균	5557	1914	498	394
%cv	1.6	7.9	1.0	5.5
b/bo	100%	34%	9%	7%

[0845]

[0846] **실시예 29: 백혈구 세포 카운팅 및 감별 어세이**

[0847] 인간 대상체의 말초혈 중의 백혈구 세포(WBC)의 농도는 약 1,000개 세포/ μl 내지 100,000개 세포/ μl 일 수 있다. 그러나, 몇몇 경우, 영상화 시스템의 범위는 보다 더 한정된다(예컨대, 약 4,000개 세포/ μl 내지 7,000개 세포/ μl). 세포 농도가 4,000개 세포/ μl 미만인 경우, 시스템은 어세이에 의해 요구될 수 있는 목표치인 10,000개 세포를 셀 수 없을 수 있다. 샘플 중의 세포 농도가 7,000개 세포/ μl 를 초과하는 경우, 각각의 시야는 정확한 영상 분할 및 세포 수 세기를 수행하기에는 너무 군집되어 있을 수 있다. WBC를 영상화하는 예시적 방법이 하기에 제공되어 있다.

[0848] 일례에서, 형광 분광광도측정을 위해 구성된 영상화 시스템(예를 들면, 세포분석기)이 제공된다. 상기 시스템은 형광 분광광도측정을 이용하여 샘플 중의 세포 농도를 측정한다. 상기 샘플을 영상화를 위한 형광 집합된 항체(예를 들면, AF647-CD45)로 표지하고 형광 핵산 마커(예를 들면, DRAQ5)로도 표지한다. 분광광도계 모듈 상에서의 정량적 형광 판독은 낮은 민감도(약 5,000개 세포/ μl 의 LLOQ) 및 (그러나) 높은 동적 범위(예를 들면, 5,000개 세포/ μl 내지 100,000개 세포/ μl)에서 WBC의 농도의 측정치를 제공한다. 분광광도계 상에서 측정된 농도는 세포 현탁액의 최종 농도가 4,000개 세포/ μl 내지 7,000개 세포/ μl 가 되도록 최적 희석비의 계산을 가능하게 한다.

[0849] 도 146은 WBC 농도의 분광광도측정에서 형광의 높은 동적 범위를 보여준다. 형광 표지된 항-CD45 및 다른 항체 태그로 태깅된 WBC를, 약 640 nm의 파장을 갖는 적색 광으로 여기시켰고, 정량적 형광 방사 스펙트럼을 수집하였다. 적분된 형광도가 y-축 상에 작도되어 있다.

[0850] **실시예 30: 등은 증폭에 의한 스트렙토코커스 군 A 검출**

[0851] 특정 계능 샘플의 등은 증폭을 탁도로 검출할 수 있다. 본 실시예에서, 스트렙토코커스 군 A(StrepA) 세포(저장액 농도 = 2×10^8 org/ ml , 마이 바이오소스(My biosource)로부터 입수됨)로부터 추출된 계능 샘플을 등은 증폭으로 증폭하였고, 반응의 진행을 탁도로 측정하였다. 약 5 μl 의 저장액 세균 세포 및 45 μl 의 RT PCR 등급 물(저장액의 10X 희석)을 약 95°C에서 약 8분 내지 10분 동안 열처리하였다(세포가 파괴되고 DNA를 방출함). 계능 샘플을 희석하였고, 증폭을 위한 물질(예를 들면, DNA 중합효소, 프라이머, 완충제)을 함유하는 PCR 튜브 내에 약 25 μl 의 샘플 부피로 도입하였다. 반응의 진행을 탁도로 기록하면서 상기 PCR 튜브를 약 61°C에서 약 60분 동안 항온처리하였다. 결과는 다음과 같고, 도 147은 시간의 함수로서 탁도를 작도한 것을 보여준다:

농도(카피/ μ l)	T(분)	표준 편차(분)
800	24.0	1.6
80	28.3	2.9
0	n/a	n/a

[0852]

[0853] 3종의 분리된 실험을 800 카피/ μ l 및 80 카피/ μ l에서 수행하였다. 합성 게놈 DNA 주형(진스크립트(Genescript)로부터 입수됨)을 갖는 StrepA를 사용하여 실험 A를 수행하였다. 저장액 StrepA를 10배 희석한 후 95℃에서 약 8분 내지 10분 동안 열 불활성화시킨 다음, 열 불활성화된 10배 희석된 저장액 StrepA를 연속적으로 희석함으로써 실험 B를 수행하였다. 가변 농도의 저장액 StrepA(불활성화된 세균 세포)를 사용한 후 95℃에서 약 10분 동안 열불활성화시킴으로써 실험 C를 수행하였다. 각각의 실험에 대한 변곡점은 도 148에 나타나 있다. 800 카피/ μ l 및 80 카피/ μ l 각각의 경우, 3개 도표의 그룹핑은 좌측에서 실험 A, 중간에서 실험 B 및 우측에서 실험 C를 포함한다. 평균 변곡점은 하기 표에 제공되어 있다:

[0854]

	실험 A		실험 B		실험 C	
	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차
800 카피/ μ l	23.1	0.6	24	1.6	21.1	0.4
80 카피/ μ l	27	1.4	28.3	2.9	27.2	1.8

[0855]

실시예 31: 자성 비드의 사용

[0856]

본 실시예에서, ELISA 어세이를 통해 단백질을 분석하기 위해 자성 비드를 사용한다. 도 110은 ELISA 어세이에 대한 예시적 방법을 개략적으로 보여준다. 상기 어세이는 2종의 단백질들, 즉 단백질 1 및 단백질 2를 포함한다. 단백질 1은 약 150배(팁 프로토콜 = 30배)의 샘플 희석, 약 0.007 μ l의 샘플 부피, 약 1 μ l의 희석된 샘플 부피, 약 3 μ l의 반응 부피 및 약 10분(min)(샘플 항온처리 및 기질 항온처리)의 반응 시간을 갖는다. 단백질 1에 대한 결과는 하기 표에 나타나 있다. 단백질 1에 대한 시험 2의 결과는 도 149에 나타나 있다.

[0857]

농도 (ng/ml)	시험 1	시험 2	시험 3	계산 1	계산 2	계산 3	회수 1	회수 2	회수 3	% CV
40	59316	46862	57396	40	40	40	99	99	99	0.3
20	25120	25225	25099	21	20	20	104	102	102	1.2
10	10551	11360	11463	9	10	10	92	96	97	2.6
5	5940	5607	5825	5	5	5	106	102	102	2.2
2.5	2476	2588	2497	2.5	2.5	2.5	99	99	100	0.3
0	190	166	166							

[0858]

단백질 2는 약 667배의 샘플 희석, 약 0.0015 μ l의 샘플 부피, 약 1 μ l의 희석된 샘플 부피, 약 3 μ l의 반응 부피 및 약 10분(샘플 항온처리 및 기질 항온처리)의 반응 시간을 갖는다. 단백질 2에 대한 결과는 하기 표에 나타나 있다. 단백질 2에 대한 시험 1의 결과는 도 150에 나타나 있다.

[0859]

농도(ng/ml)	시험 1	시험 2	계산 1	계산 2	회수 1	회수 2	% CV
200000	322161	381202	203030	172490	102	86	12
100000	232455	310876	107910	117056	108	117	6
50000	133290	192460	43286	52415	87	105	13
25000	89282	101643	24919	21908	100	88	9
12500	49856	59574	12576	12041	101	96	3
4000	15926	18350	4117	4059	103	101	1
1000	4547	4722	1140	1124	114	112	1
200	1238	1229	163	172	82	86	4
20	504	458	22	21	109	106	2
0	302	292					

[0860]

특정 실시가 예시되고 기재되어 있지만, 이에 대한 다양한 변형물들을 만들 수 있고 이 변형물들도 본원에서 고려된다는 것을 상기 설명으로부터 이해해야 한다. 또한, 본 발명은 본 명세서에 내에 제공된 특정 예로 한정되어서는 안 된다. 본 발명이 전술된 설명과 관련하여 기재되어 있지만, 본원의 바람직한 실시양태의 설명 및 예시는 한정하는 의미로서 해석되어서는 안 된다.

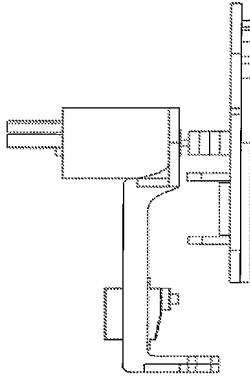
[0861]

나아가, 본 발명의 모든 양태들이 다양한 조건들 및 변수들에 의해 좌우되는 본원에 기재된 특정 묘사, 구성 또

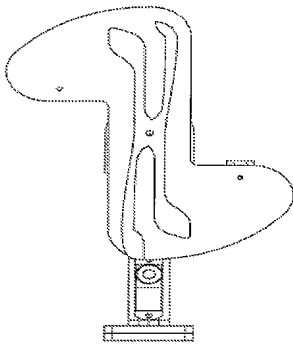
는 상대적 비율로 한정되지 않는다는 것을 이해할 것이다. 본 발명의 실시양태의 형태 및 세부사항에서의 다양한 변형물들이 당업자에게 자명할 것이다. 따라서, 본 발명은 임의의 이러한 변형물, 변경물 및 등가물도 포함할 것으로 예상된다.

도면

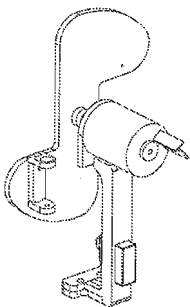
도면1



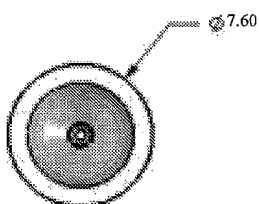
도면2



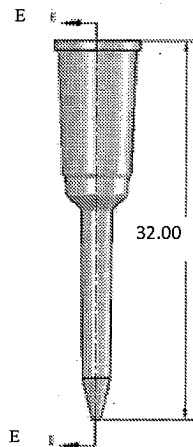
도면3



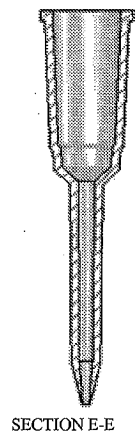
도면4



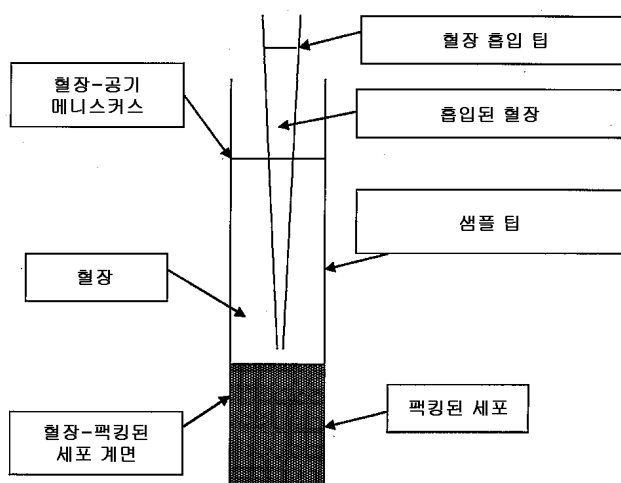
도면5



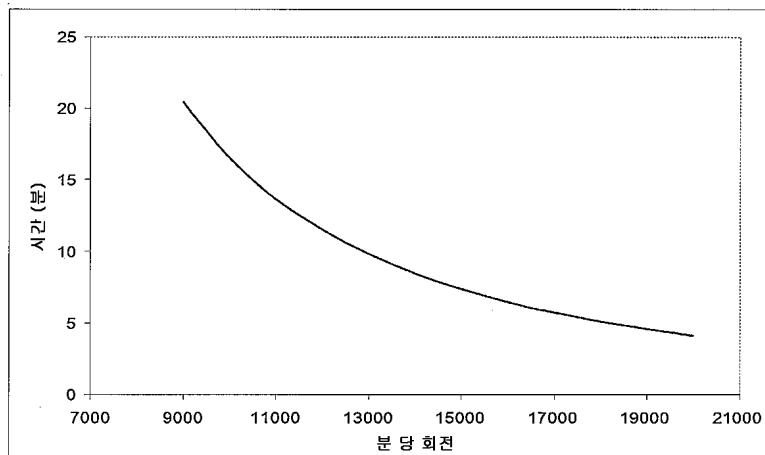
도면6



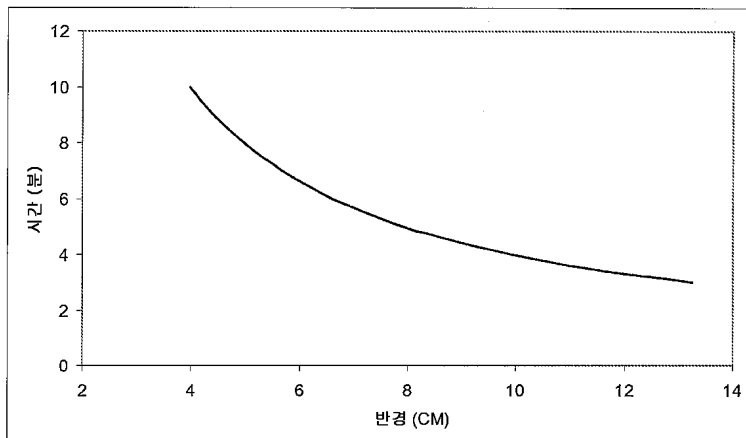
도면7



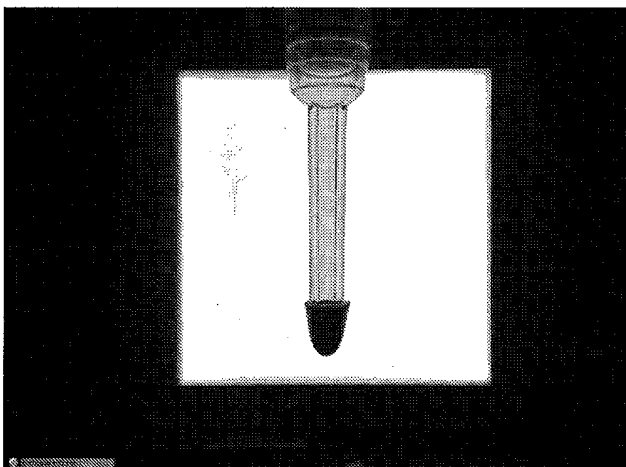
도면8



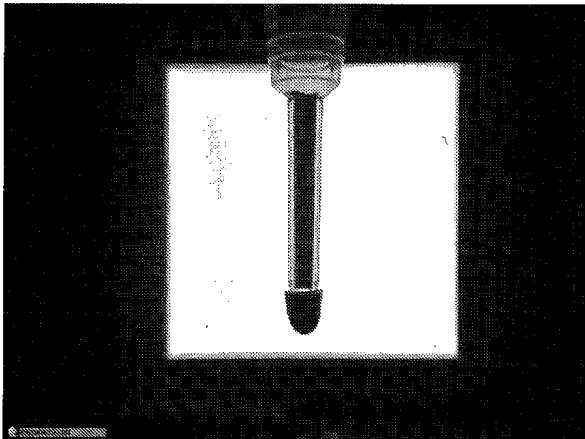
도면9



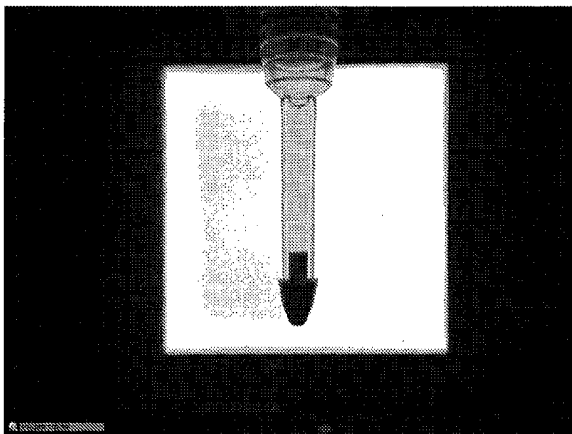
도면10



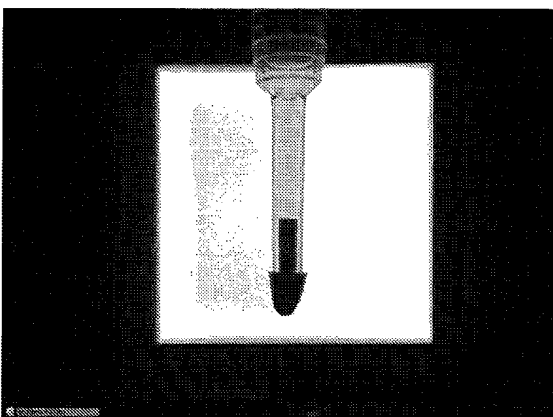
도면11



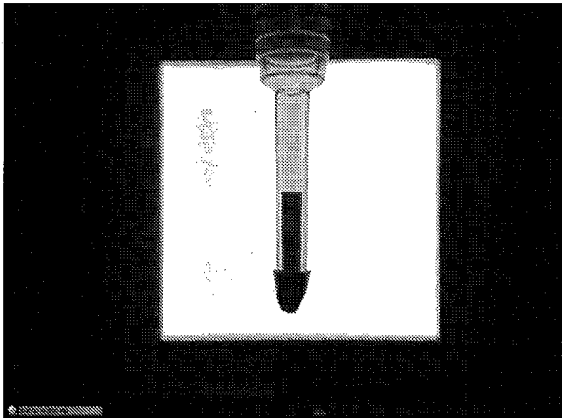
도면12



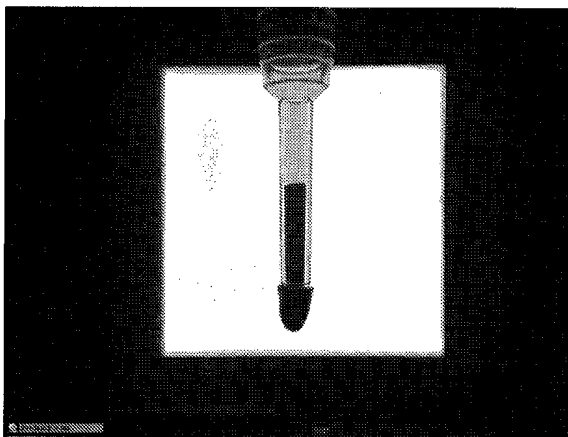
도면13



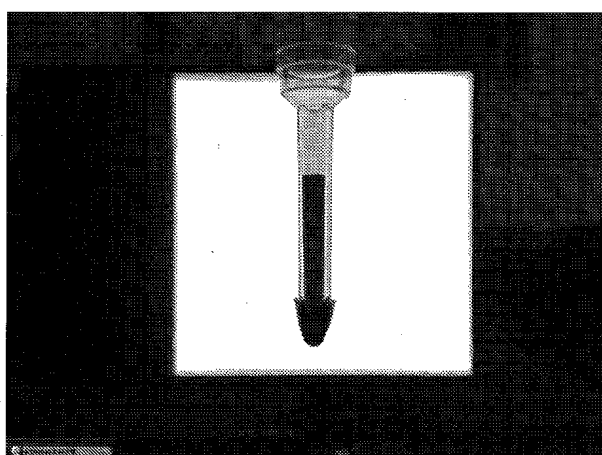
도면14



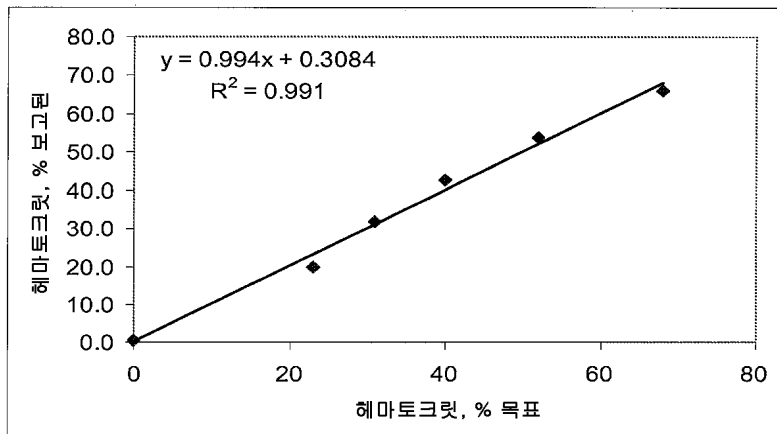
도면15



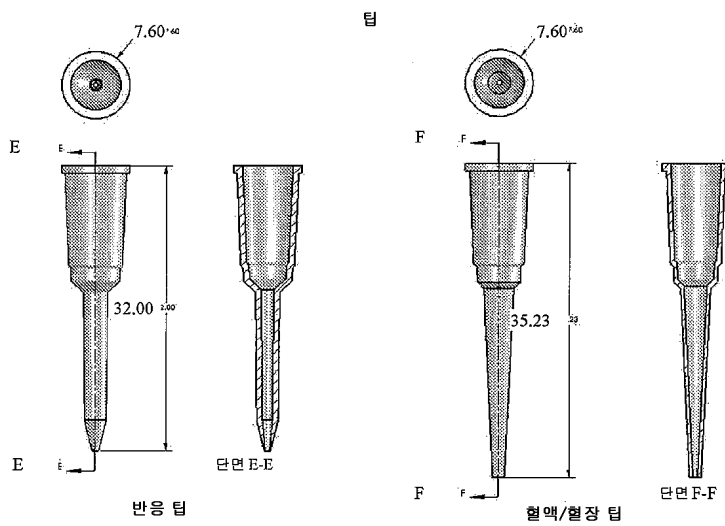
도면16



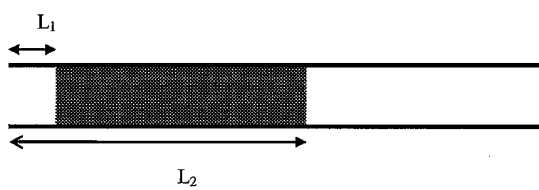
도면17



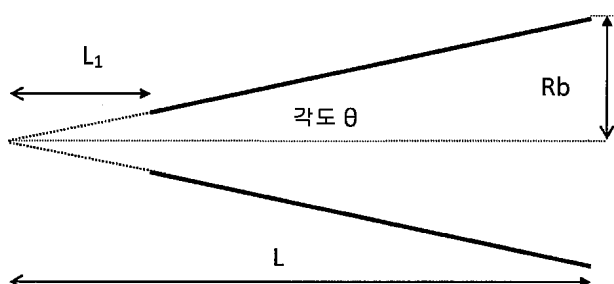
도면18



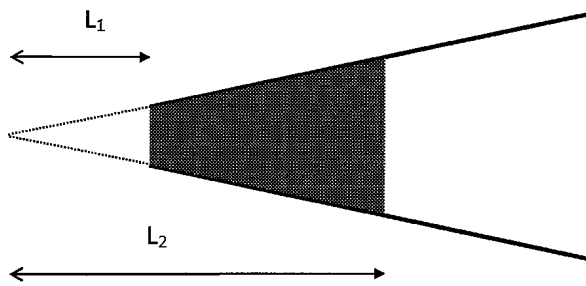
도면19



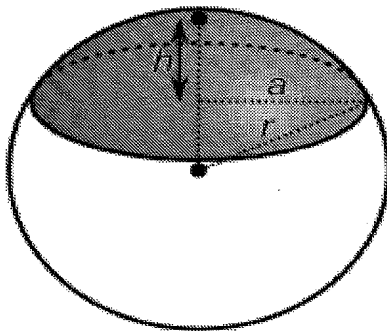
도면20



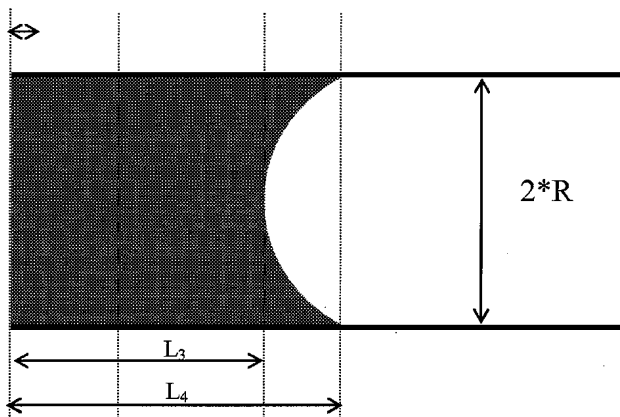
도면21



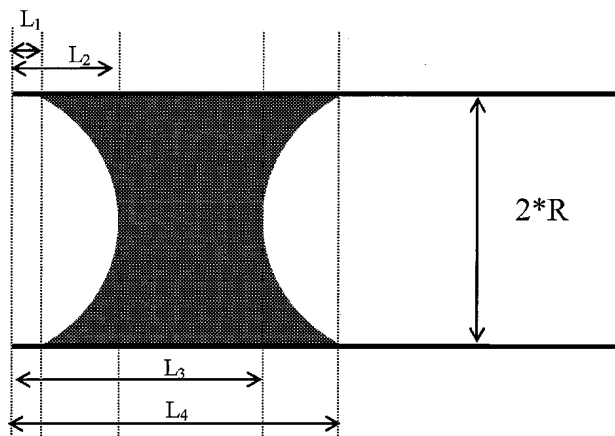
도면22



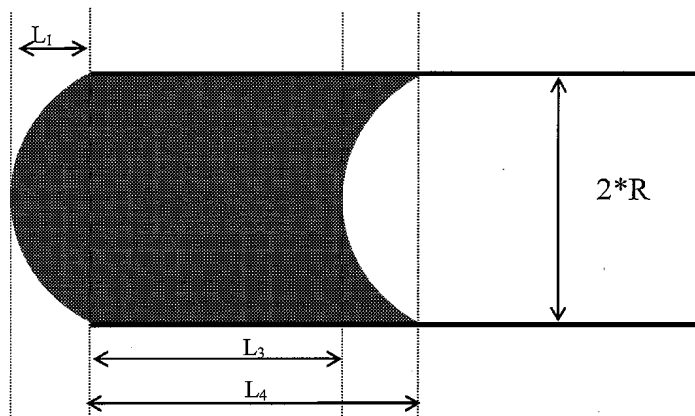
도면23



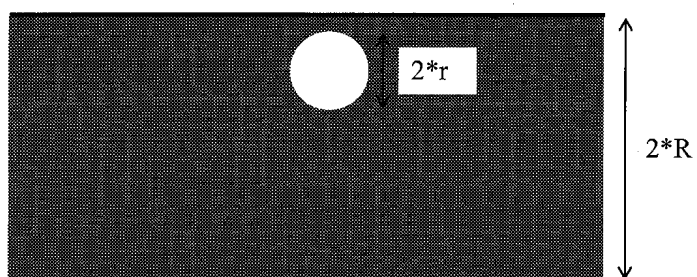
도면24



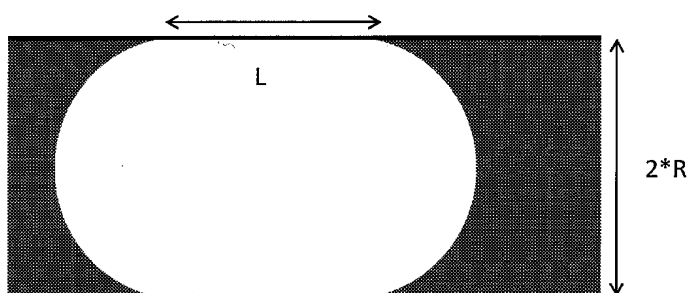
도면25



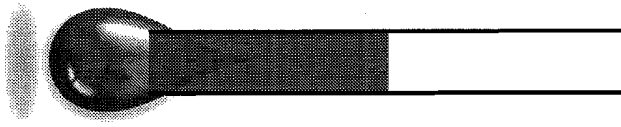
도면26



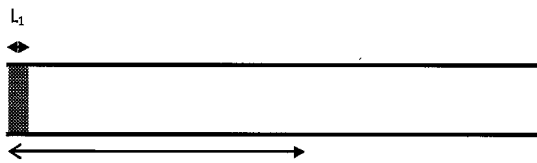
도면27



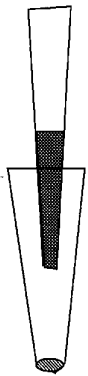
도면28



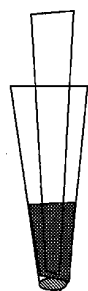
도면29



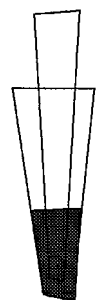
도면30



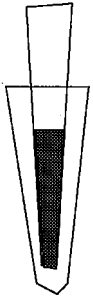
도면31



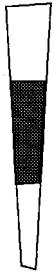
도면32



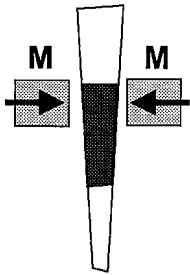
도면33



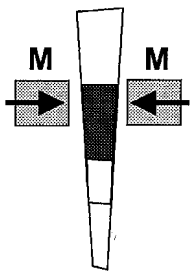
도면34



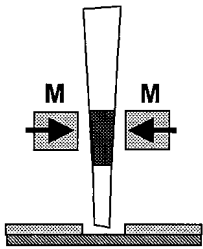
도면35



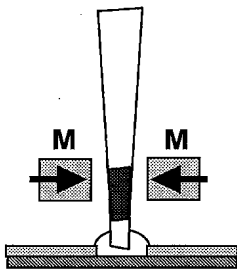
도면36



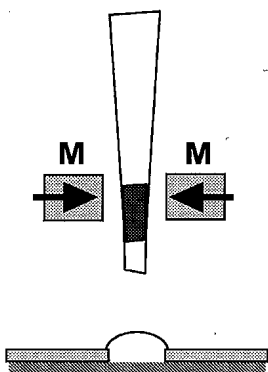
도면37



도면38



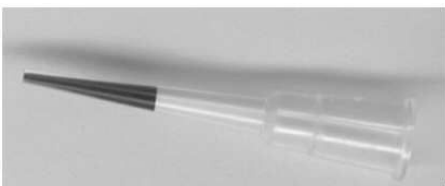
도면39



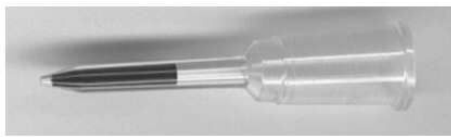
도면40



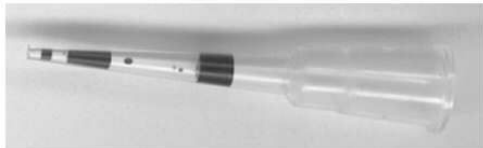
도면41



도면42



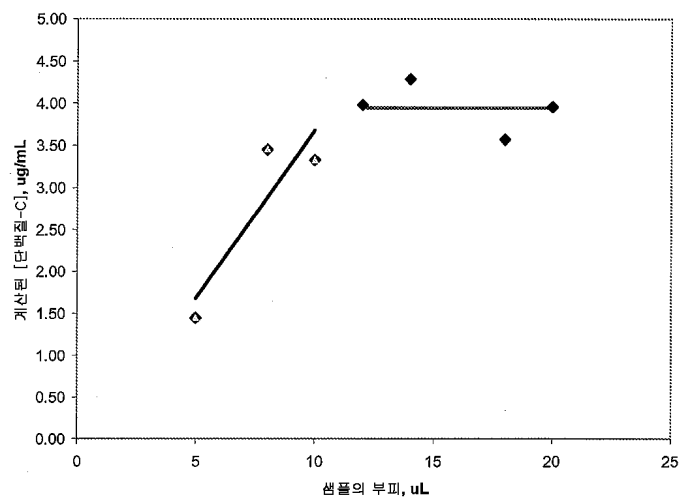
도면43



도면44



도면45



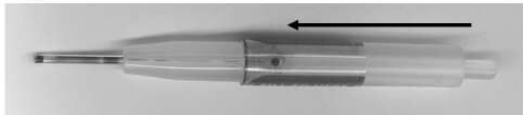
도면46



도면47



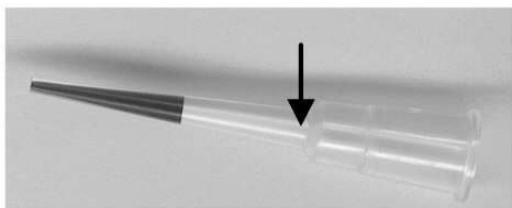
도면48



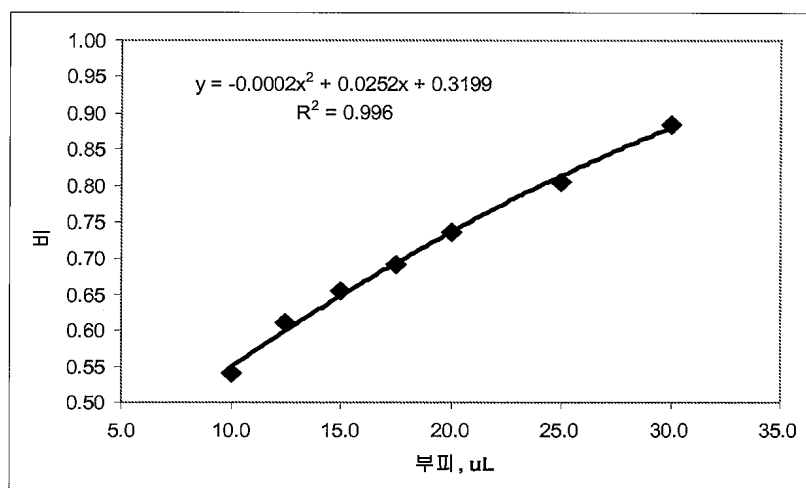
도면49



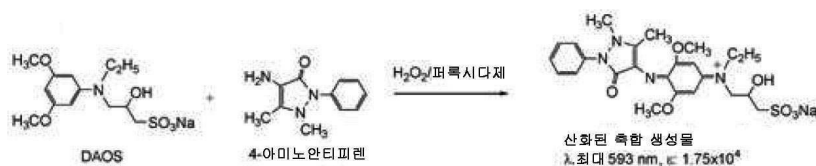
도면50



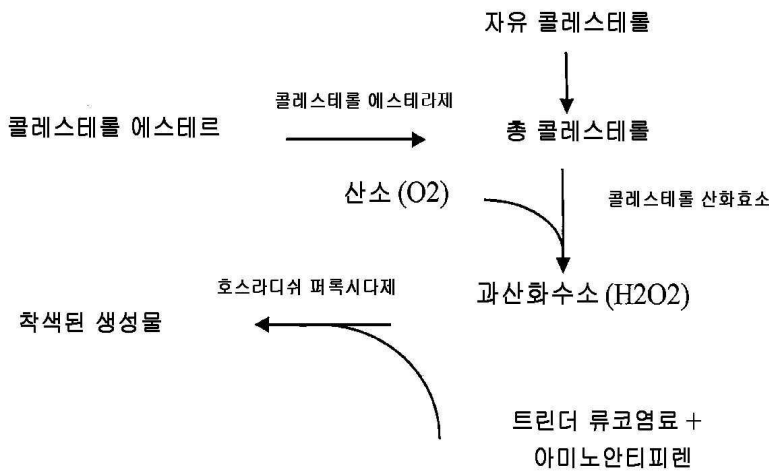
도면51



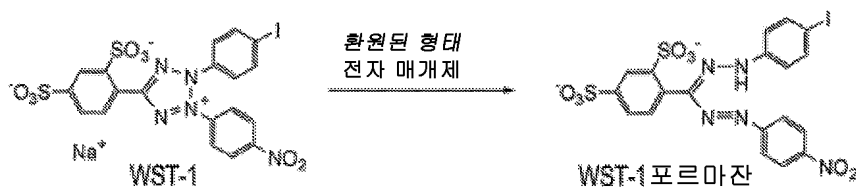
도면52



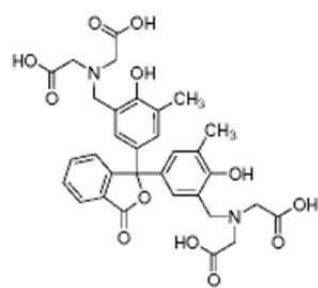
도면53



도면54



도면55



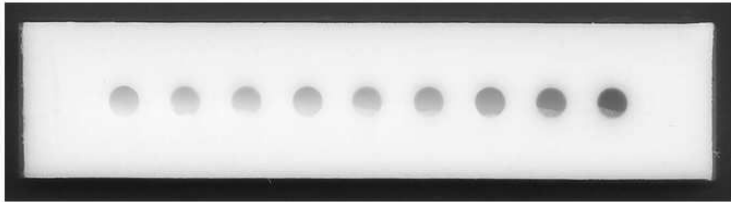
도면56



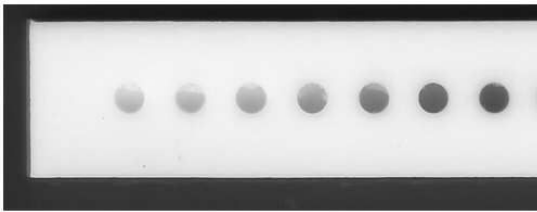
도면57



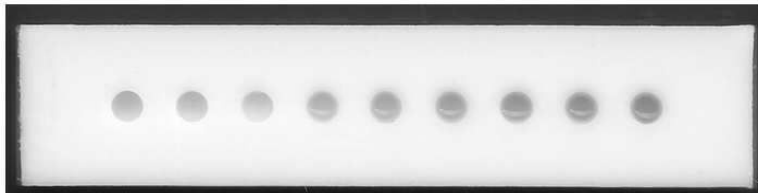
도면58



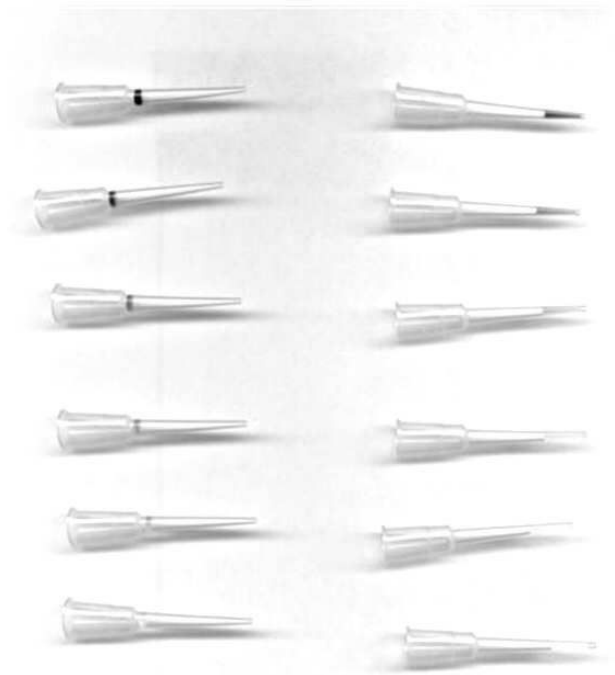
도면59



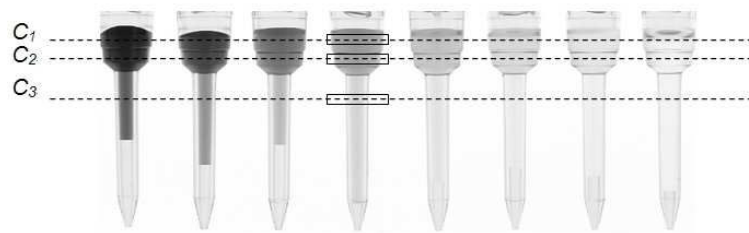
도면60



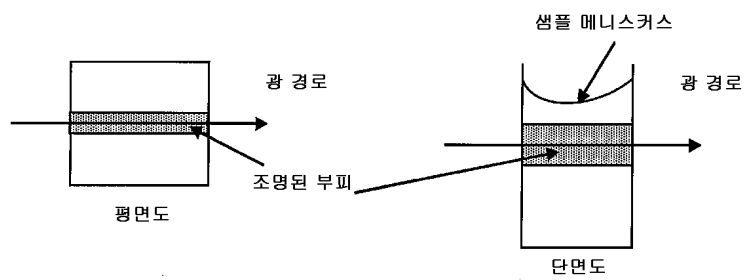
도면61



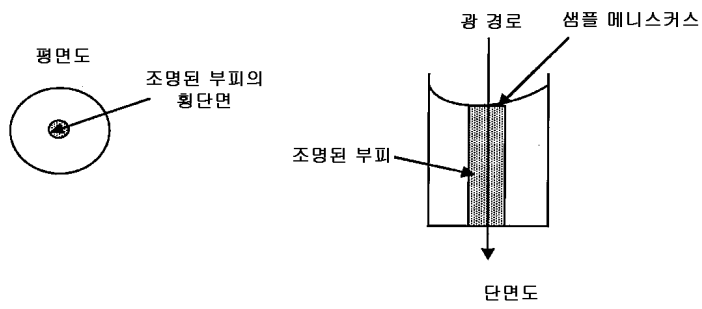
도면62



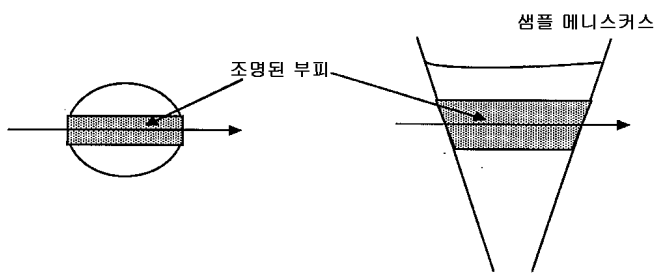
도면63



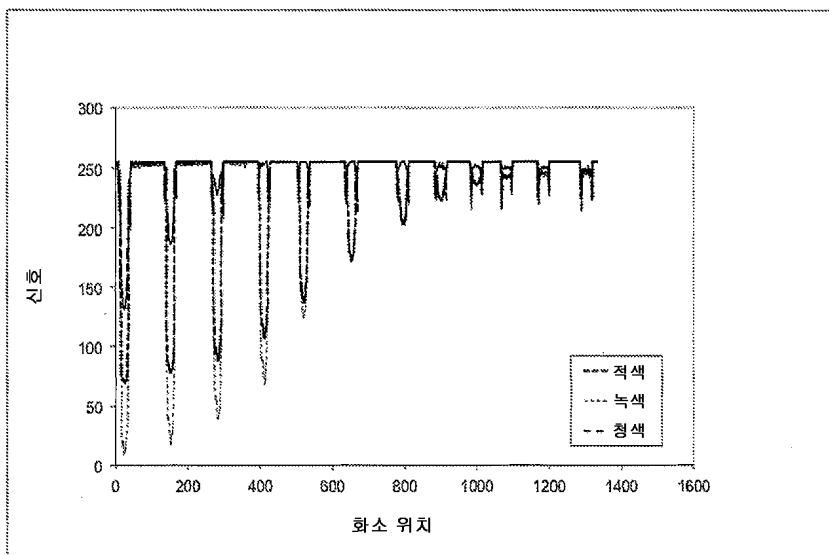
도면64



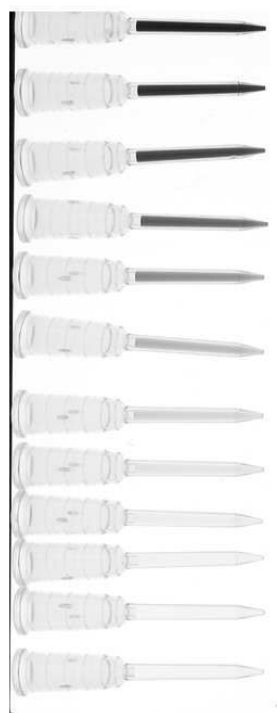
도면65



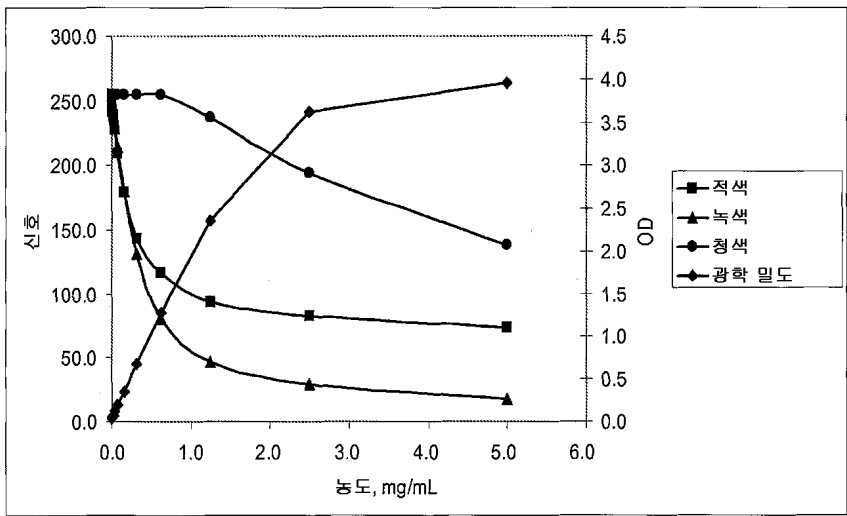
도면66



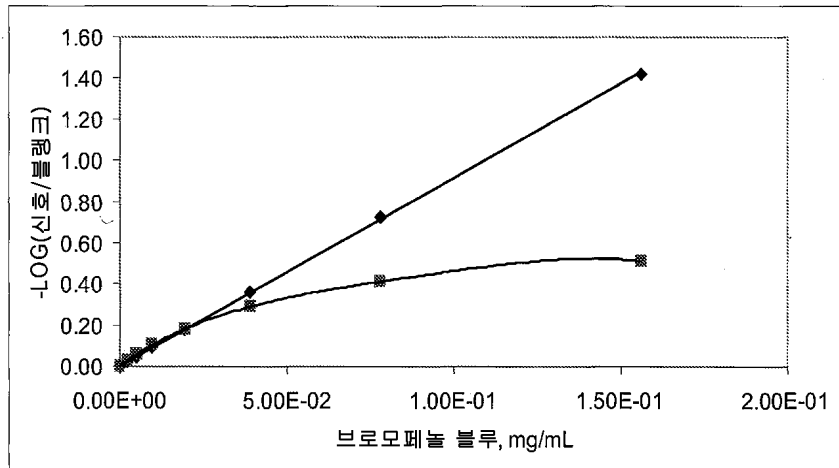
도면67



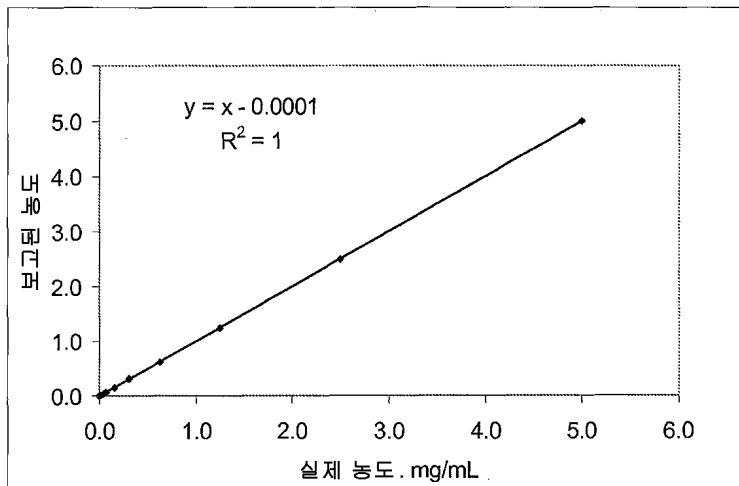
도면68



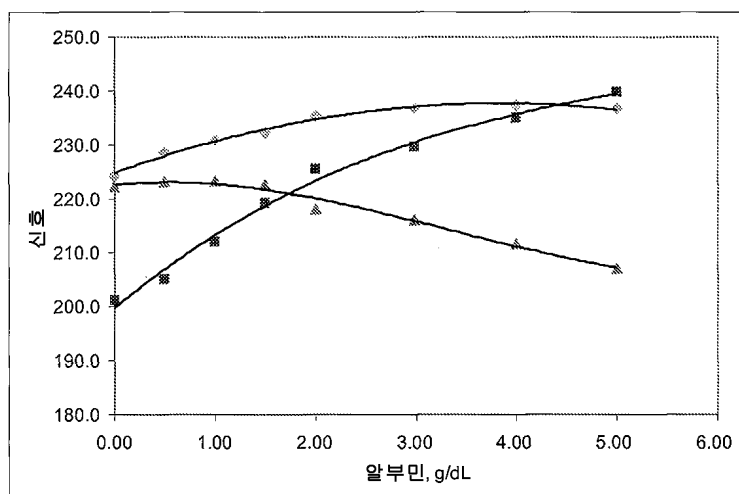
도면69



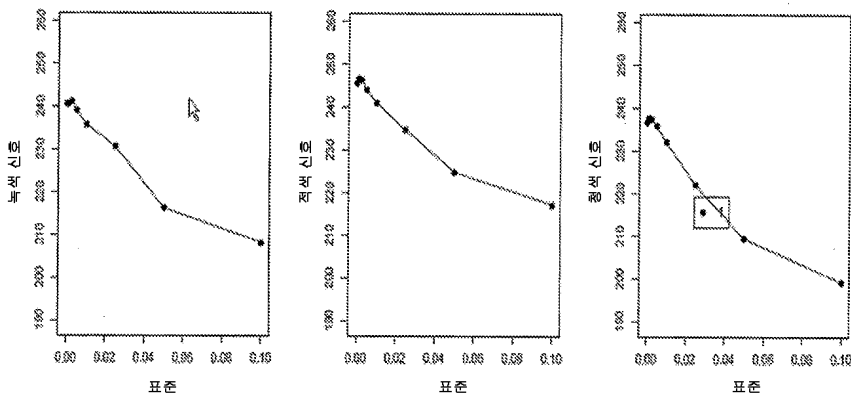
도면70



도면71



도면72



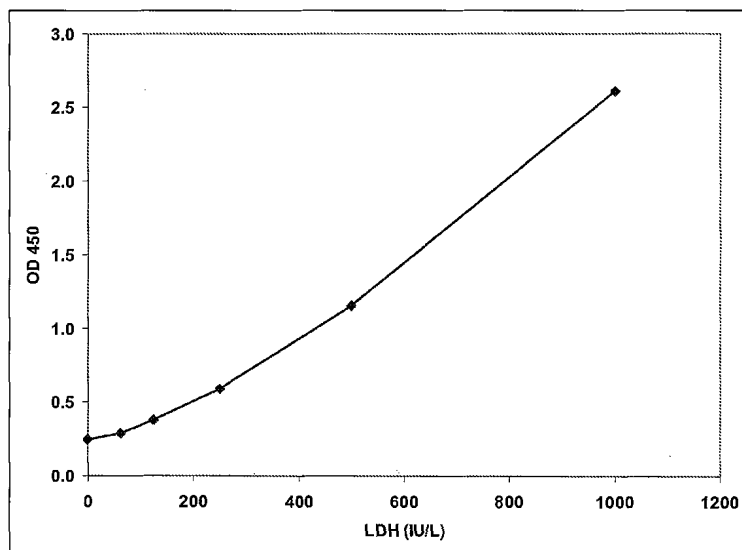
도면73



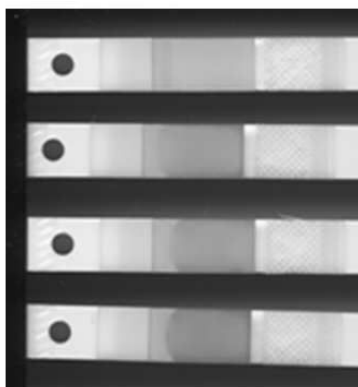
도면74



도면75



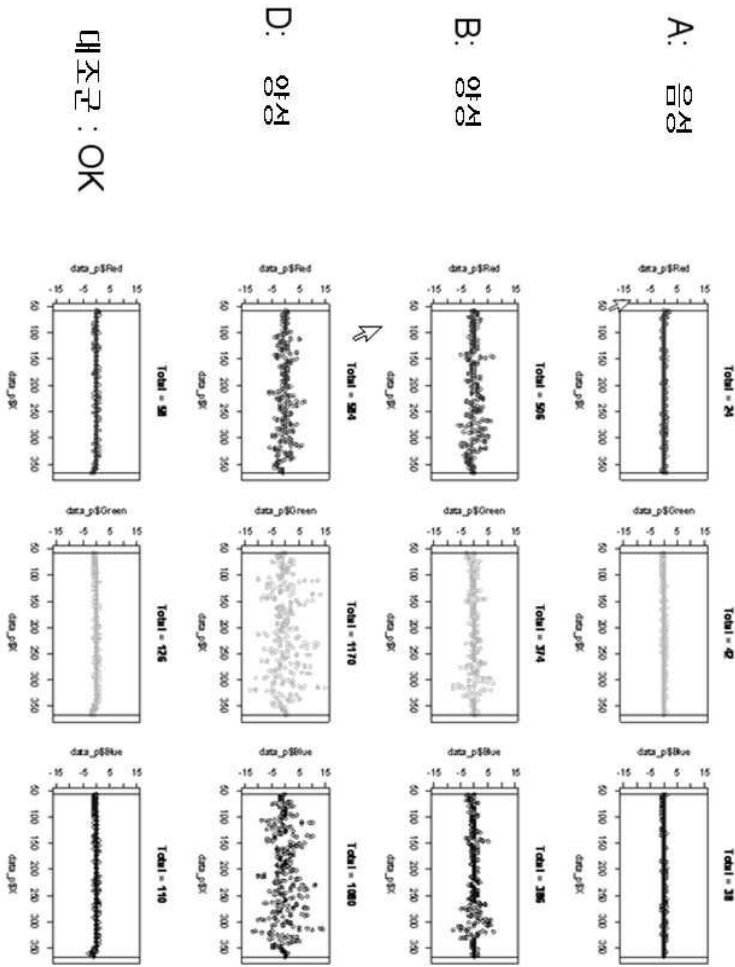
도면76



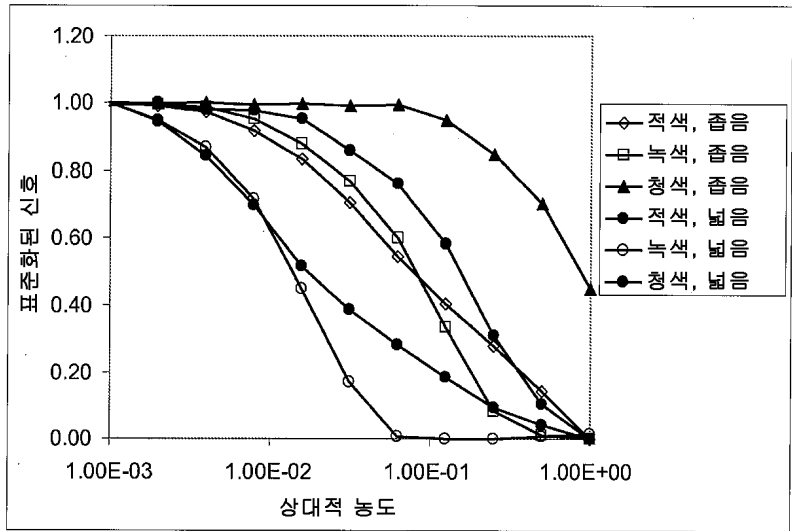
도면77



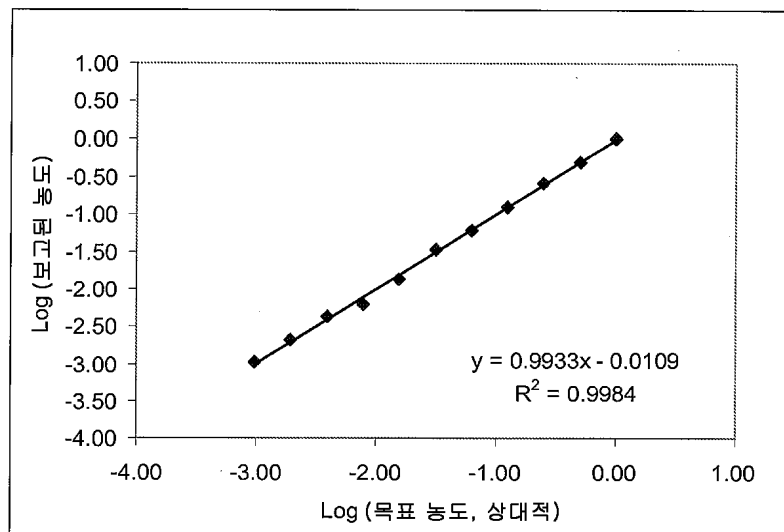
도면78



도면79



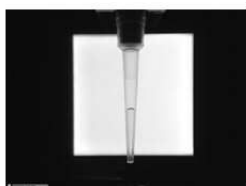
도면80



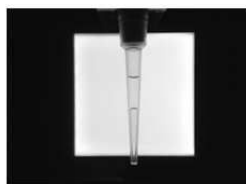
도면81



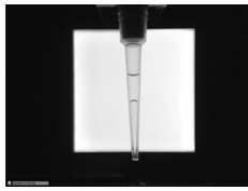
도면82



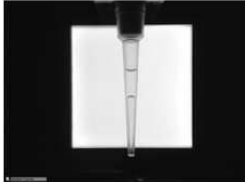
도면83



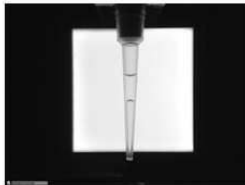
도면84



도면85



도면86



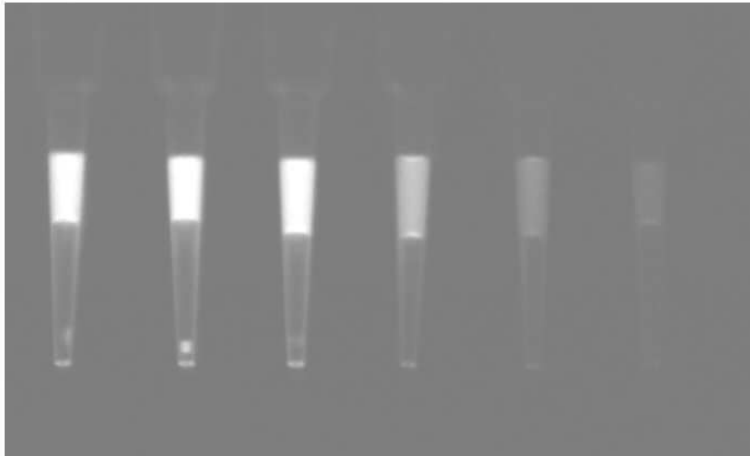
도면87



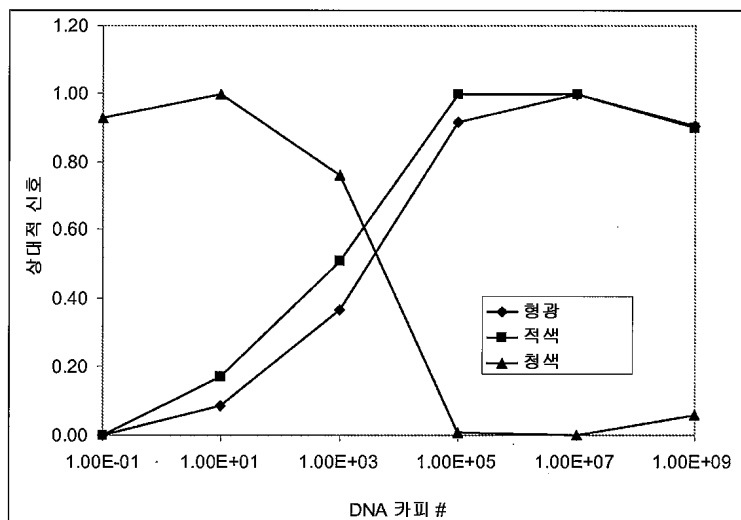
도면88



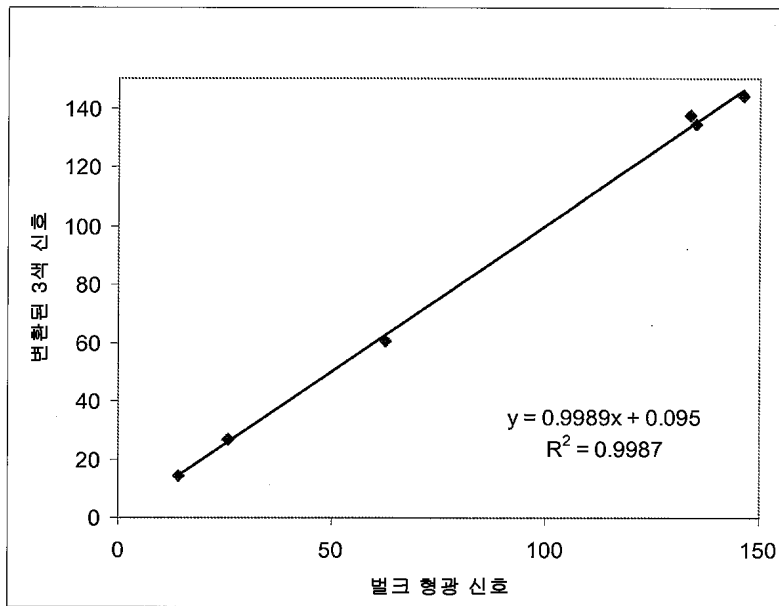
도면89



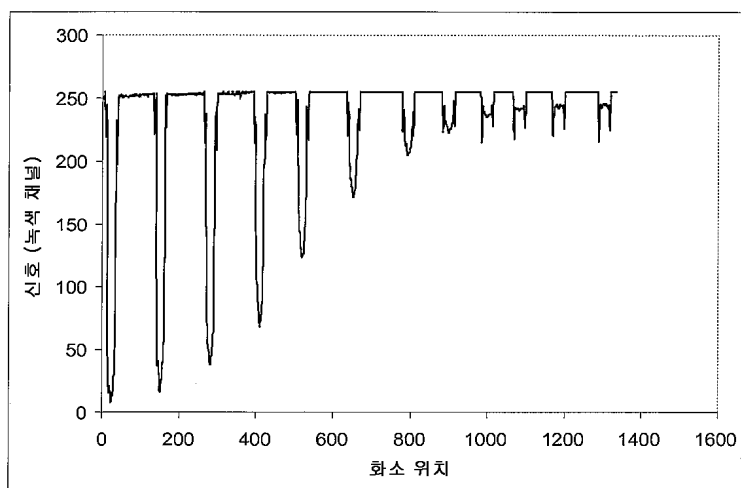
도면90



도면91



도면92



도면93



도면94



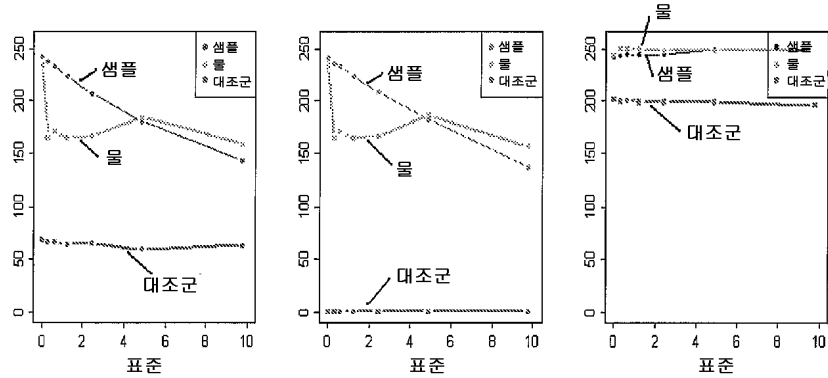
도면95

대역 #										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
공기	어세이1	공기	세척	공기	어세이2	공기	세척	공기	어세이3	공기

도면96



도면97



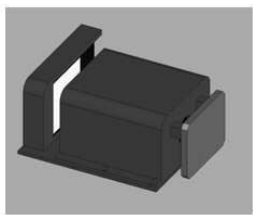
도면98



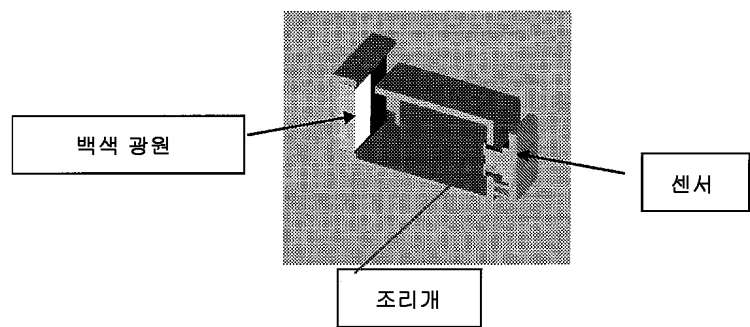
도면99



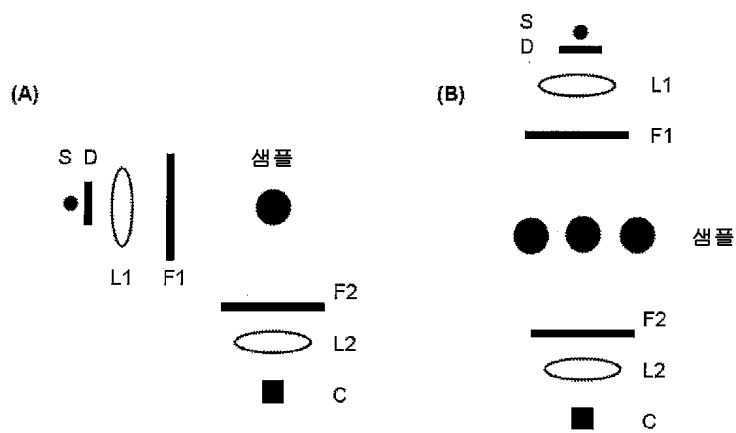
도면100



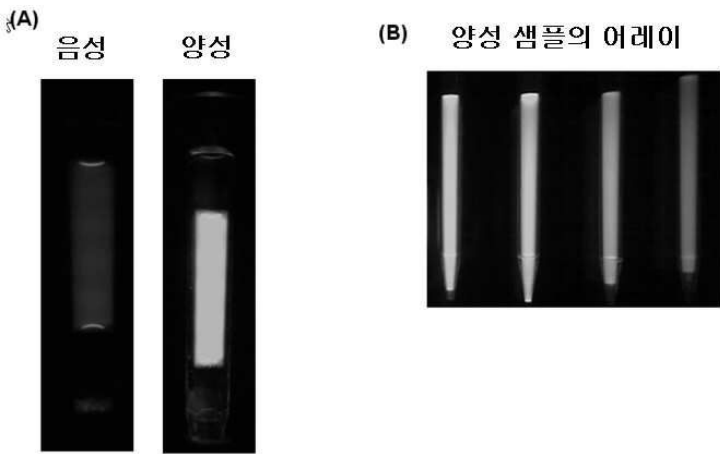
도면101



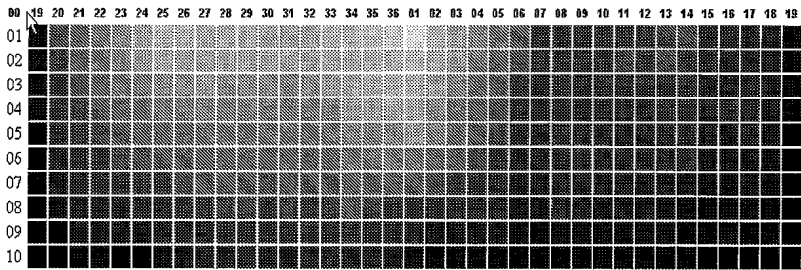
도면102



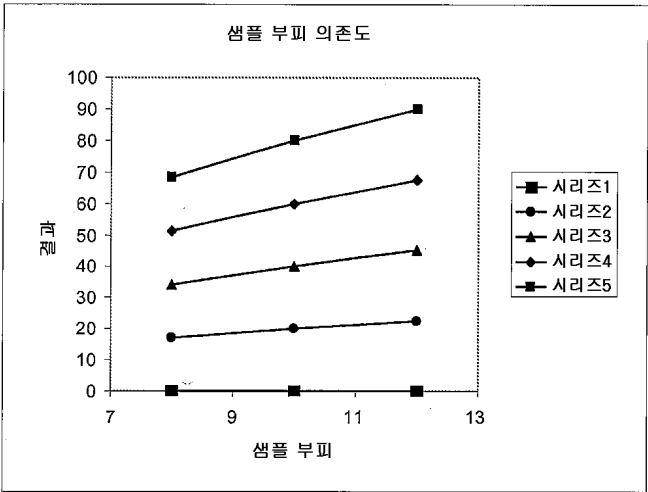
도면103



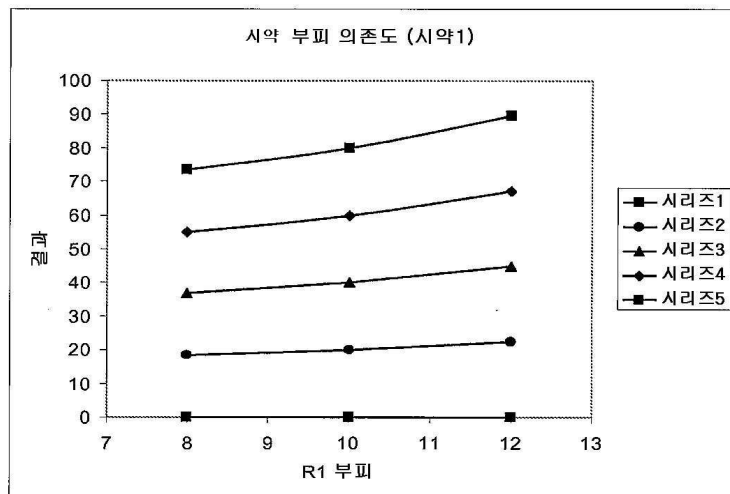
도면104



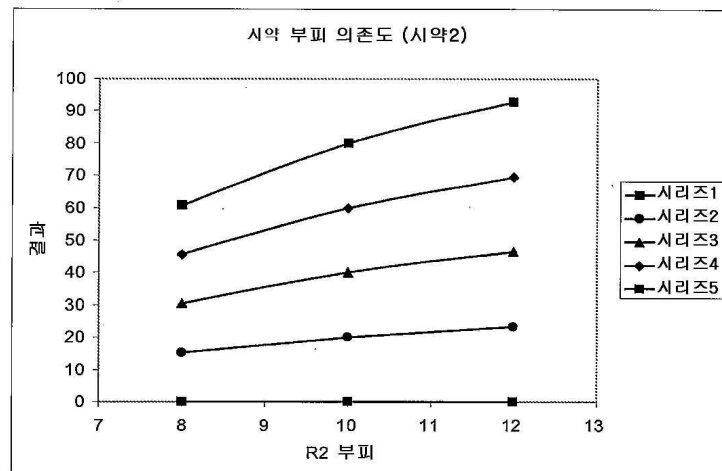
도면105



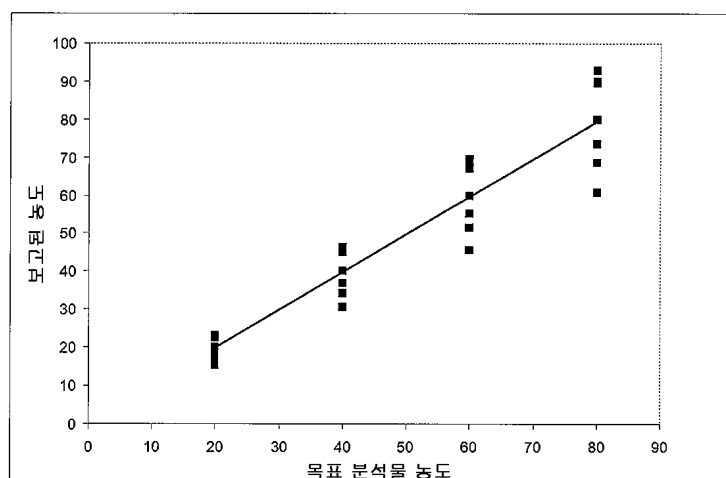
도면106



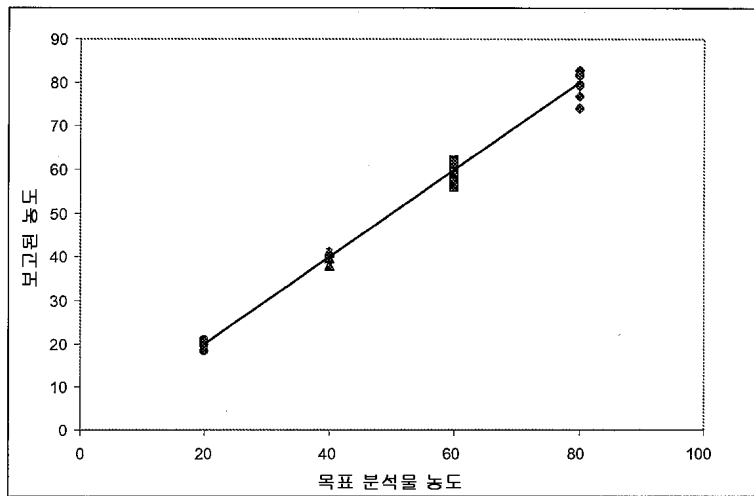
도면107



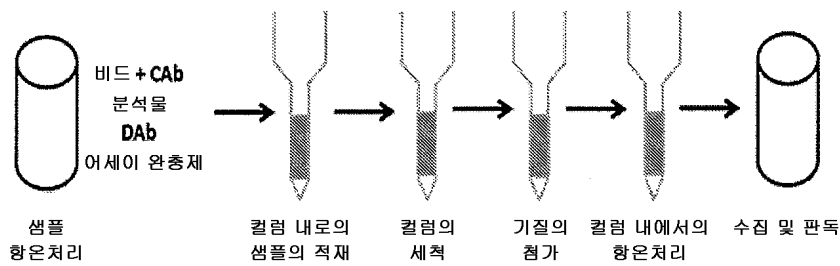
도면108



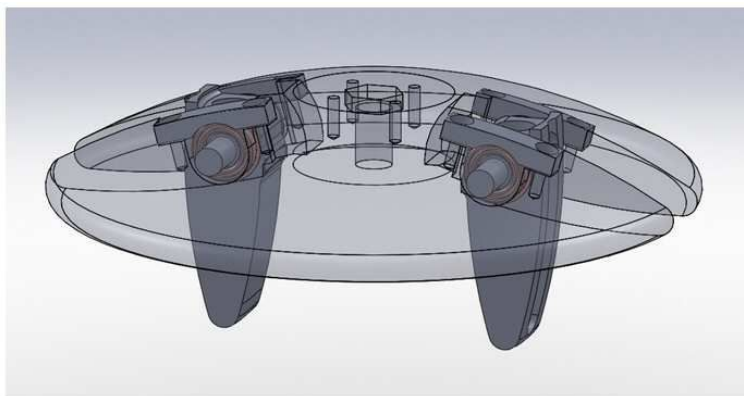
도면109



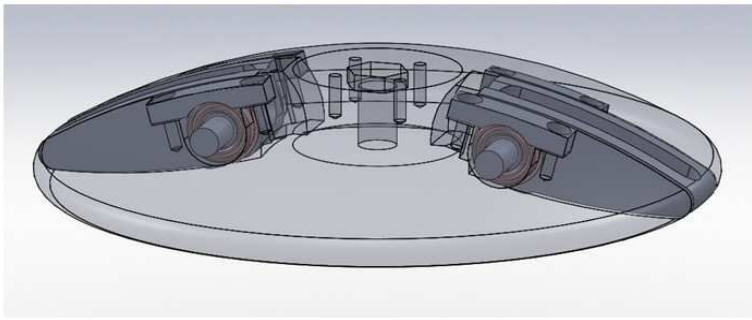
도면110



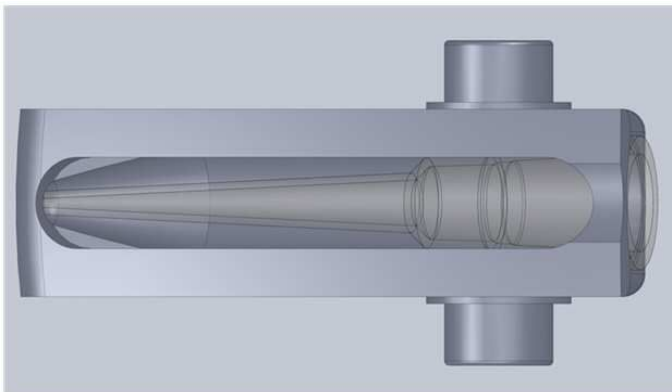
도면111



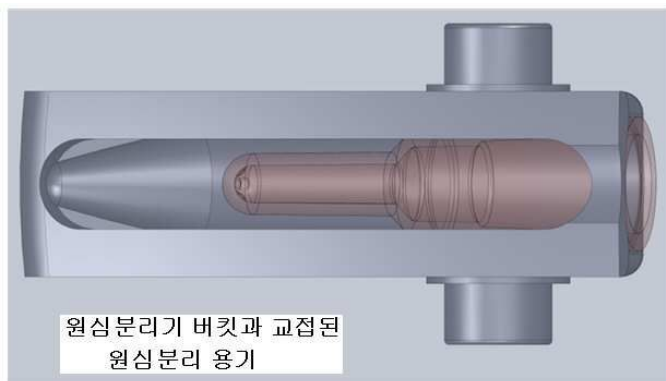
도면112



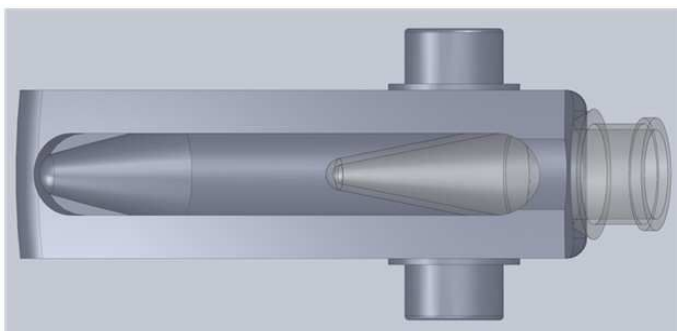
도면113



도면114



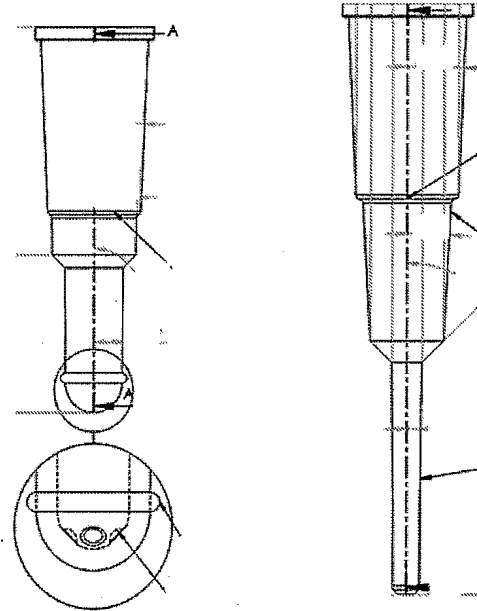
도면115



도면116

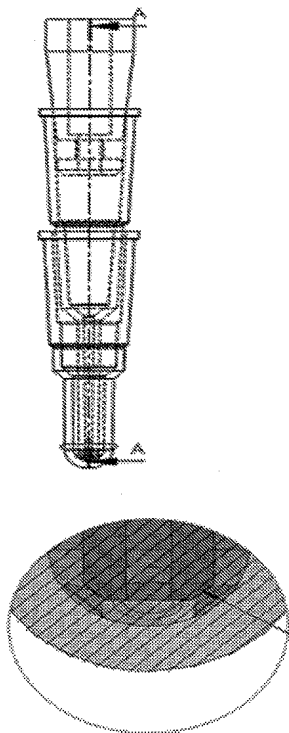
원심분리 용기

추출 팁



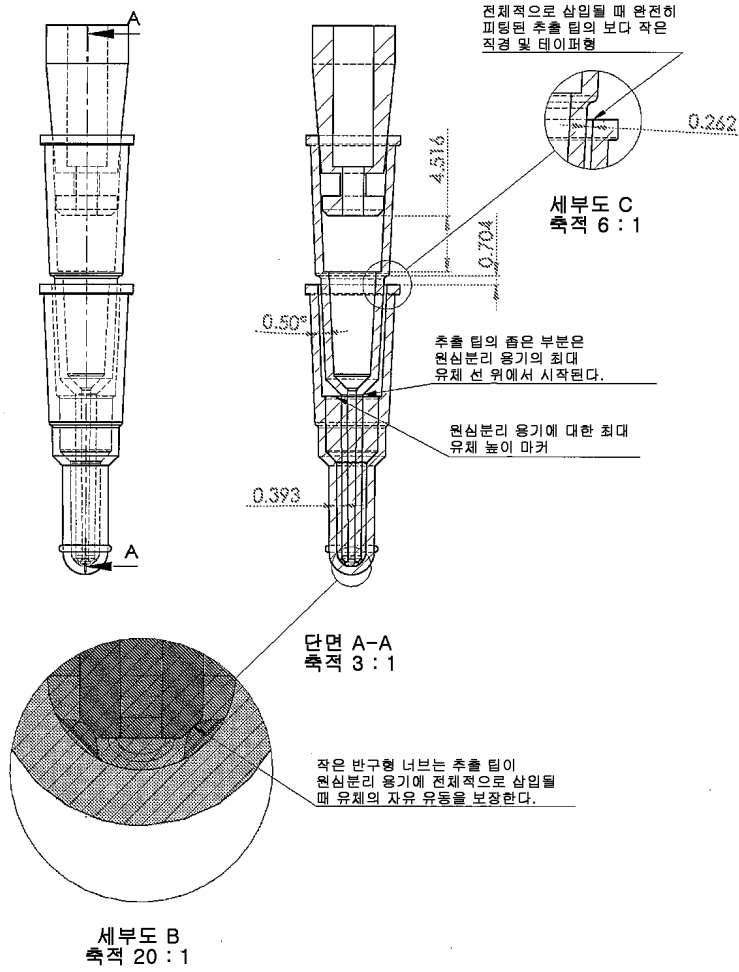
도면117

원심분리 용기, 추출 팁 및 노즐 교점

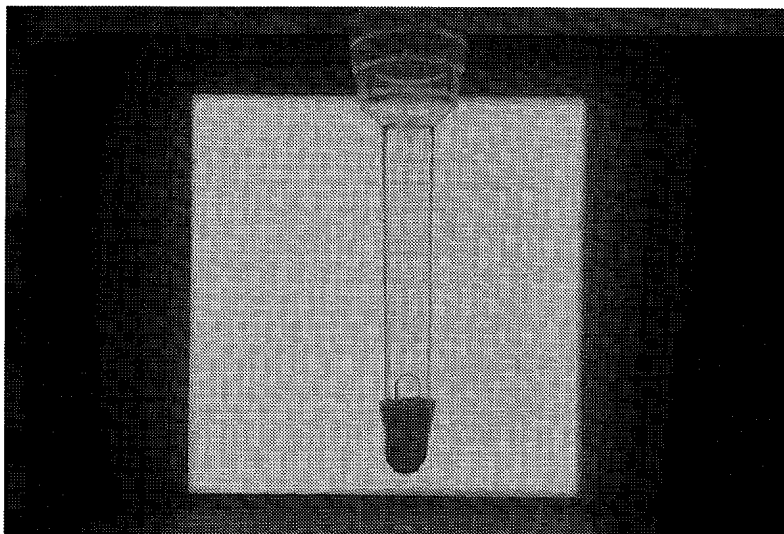


도면118

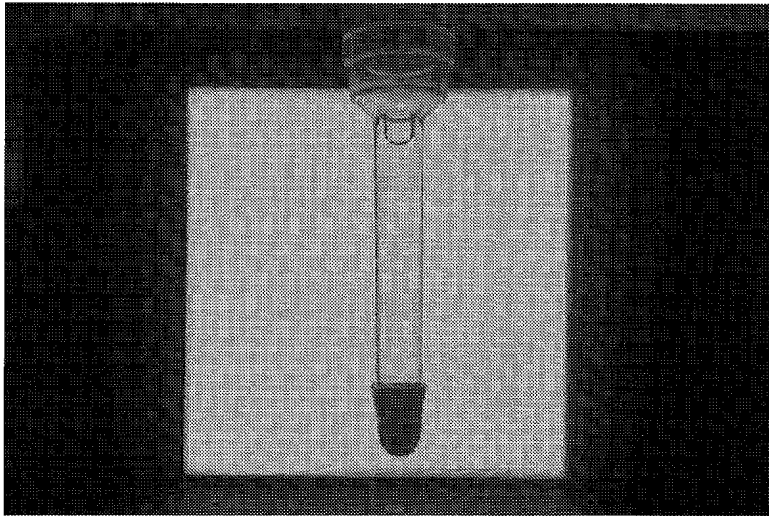
원심분리 용기, 추출 팁 및 노즐 교점



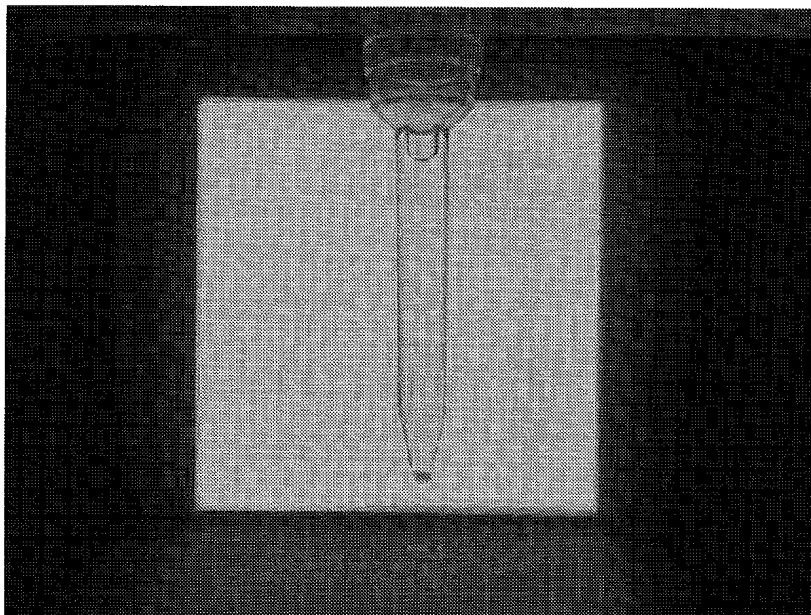
도면119



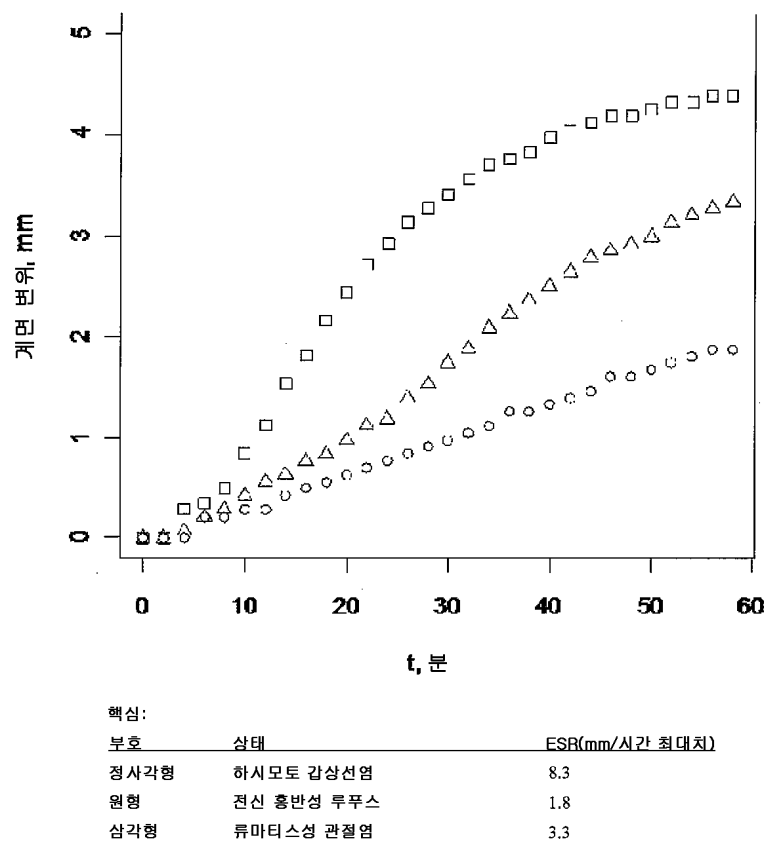
도면120



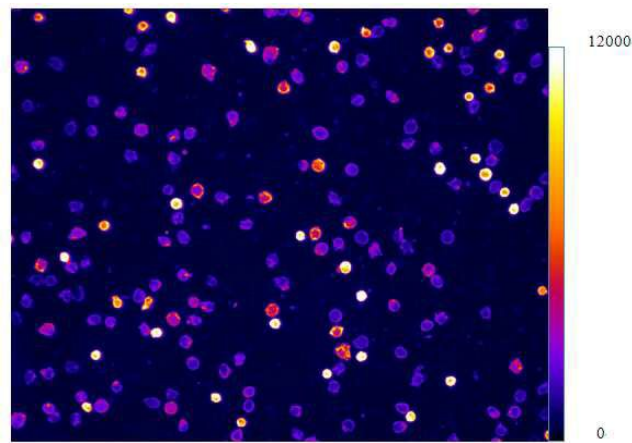
도면121



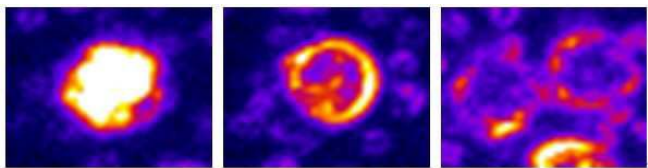
도면122



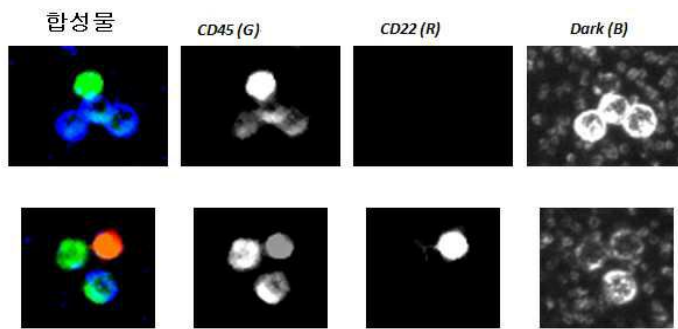
도면123



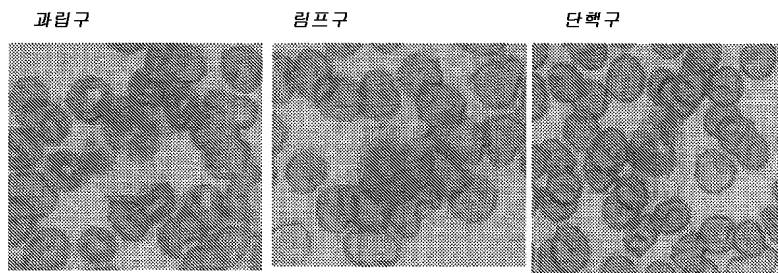
도면124



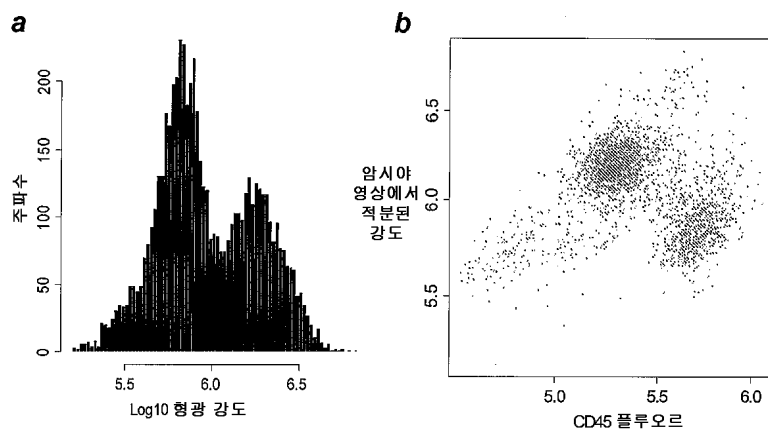
도면125



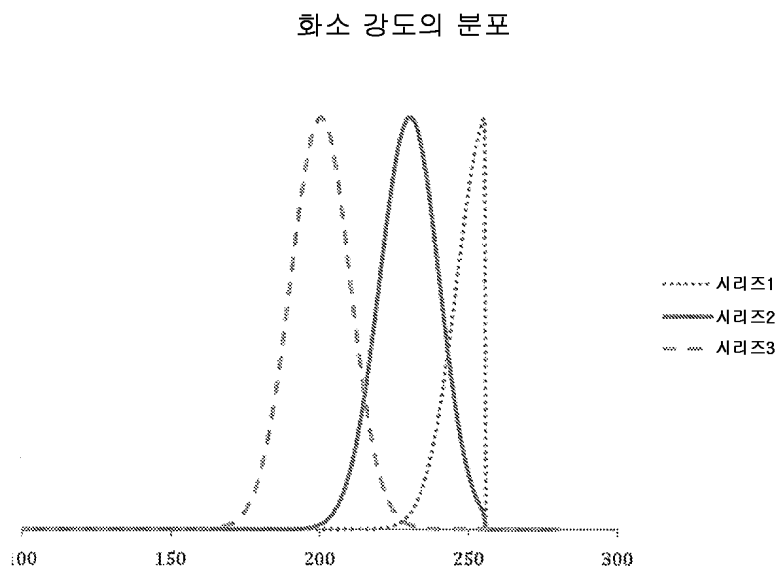
도면126



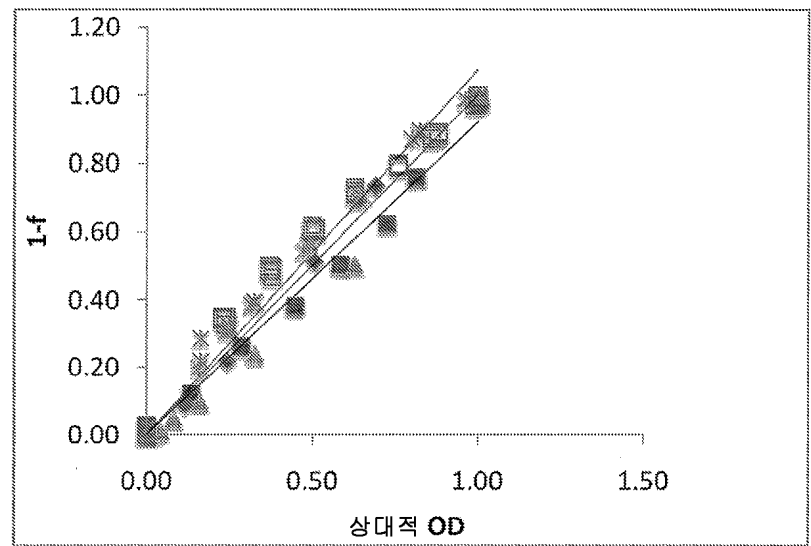
도면127



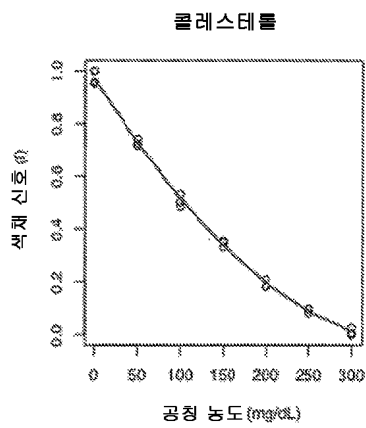
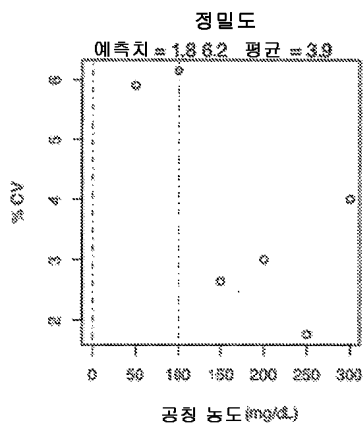
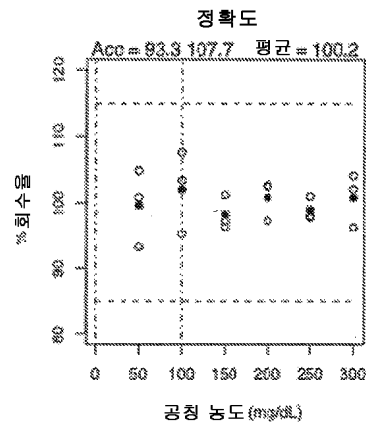
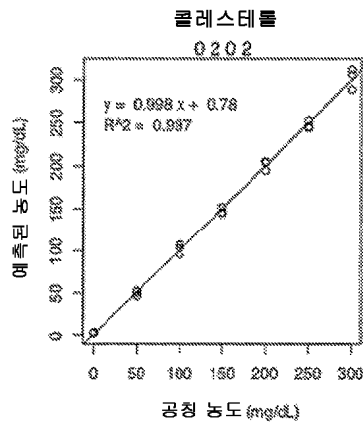
도면128



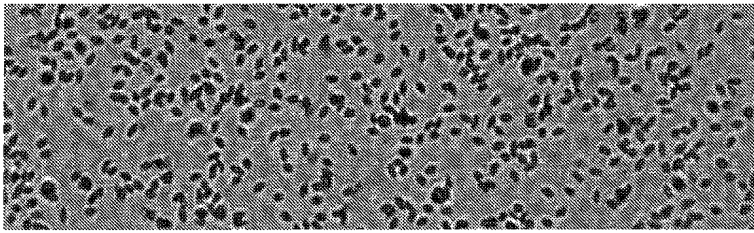
도면129



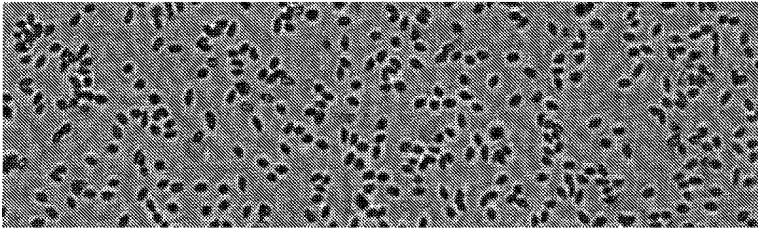
도면130



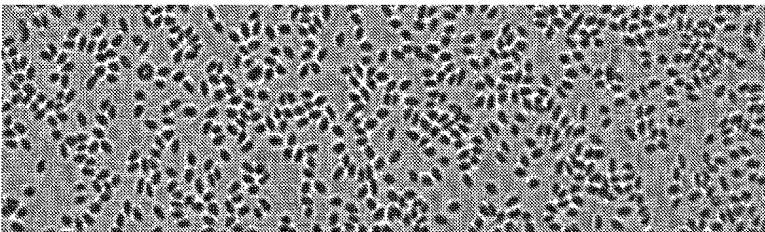
도면131



샘플 1 - 비응집됨 (바이러스 부재, 항체 부재)

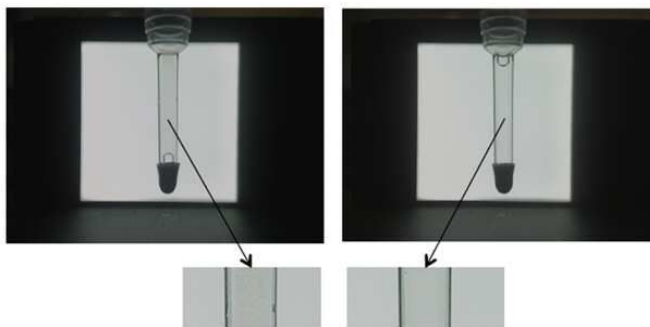


샘플 2 - 비응집됨 (바이러스 + 항체)

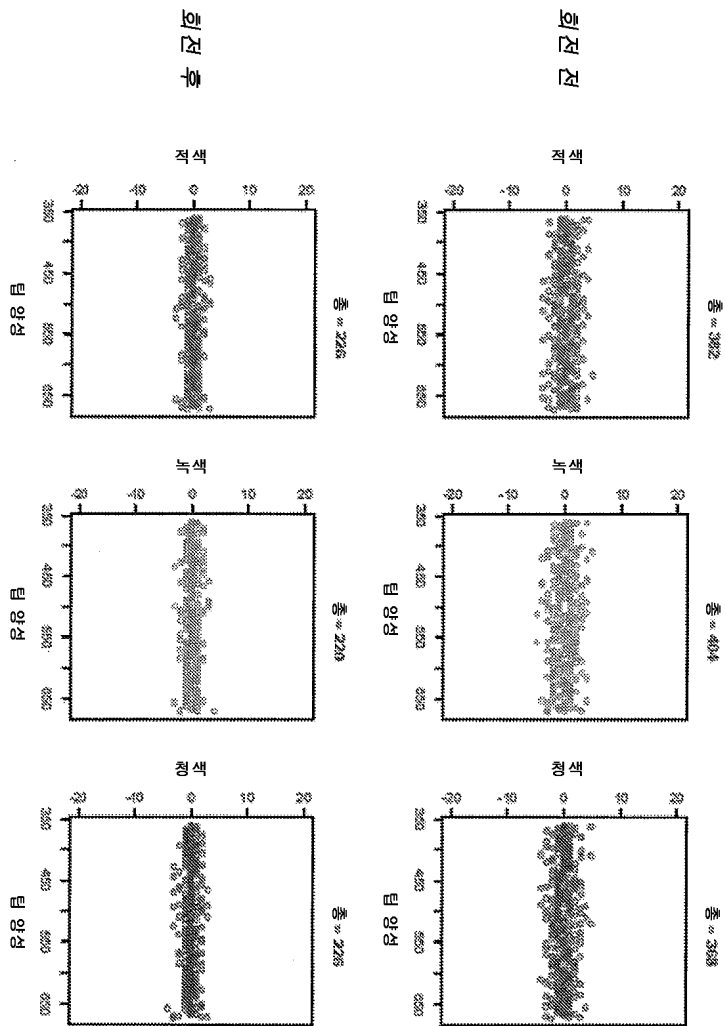


샘플 3 - 응집됨 (바이러스, 항체 부재)

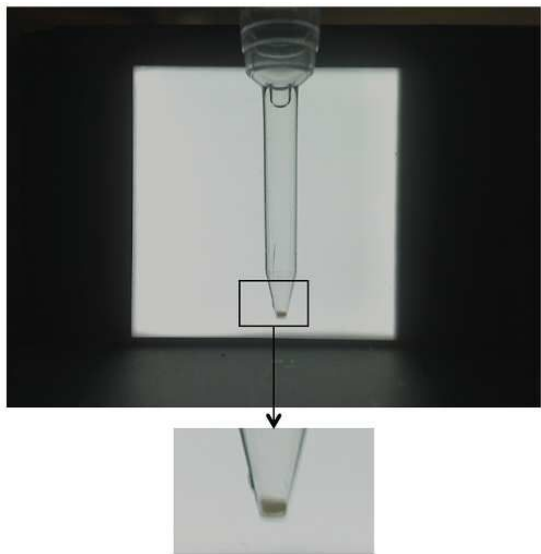
도면132



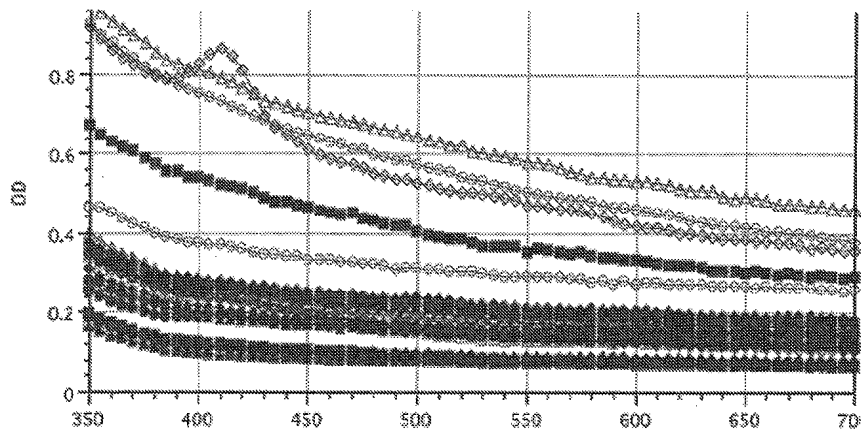
도면133



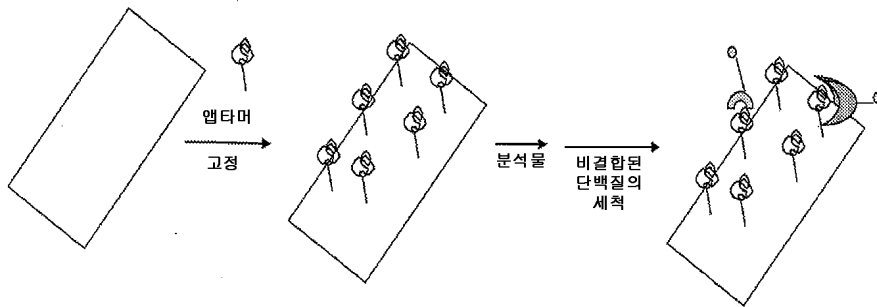
도면134



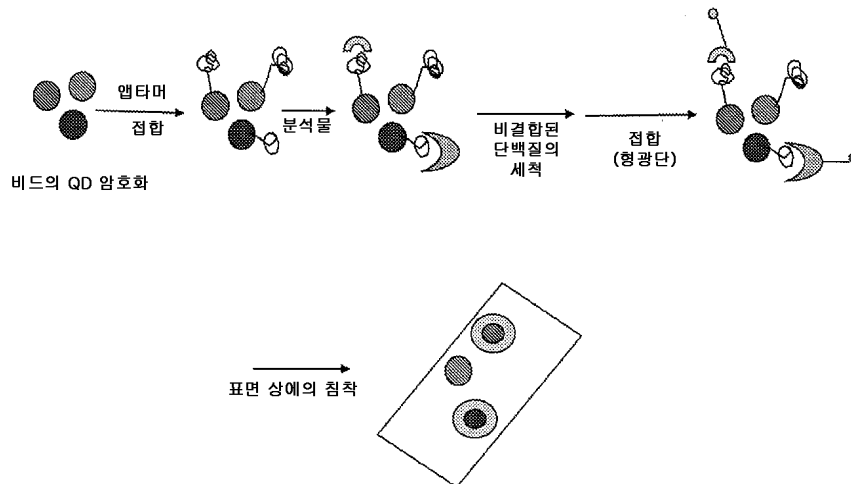
도면135



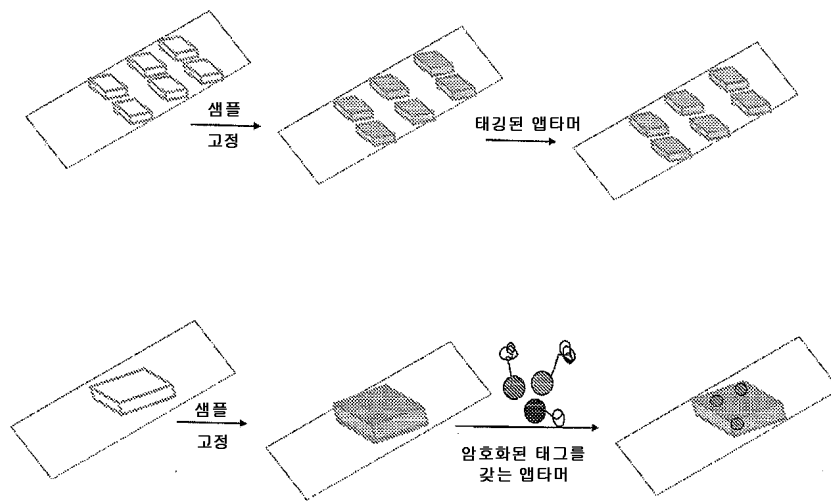
도면136



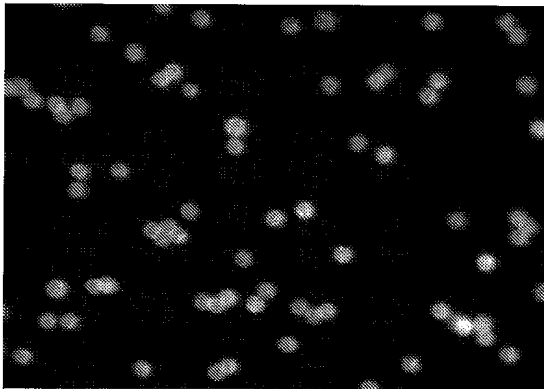
도면137



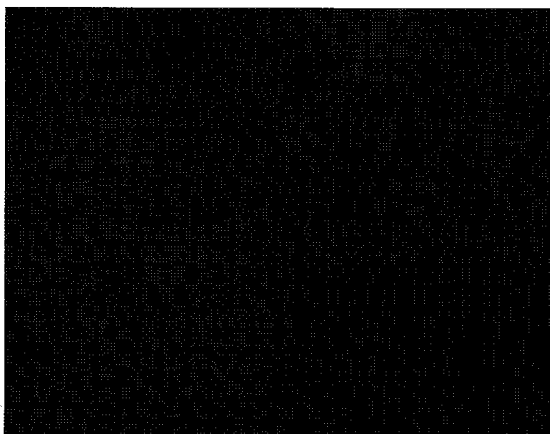
도면138



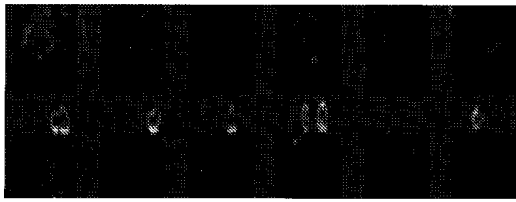
도면139



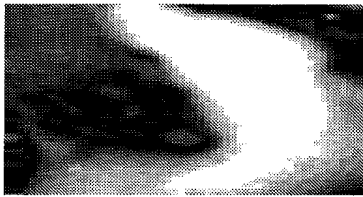
도면140



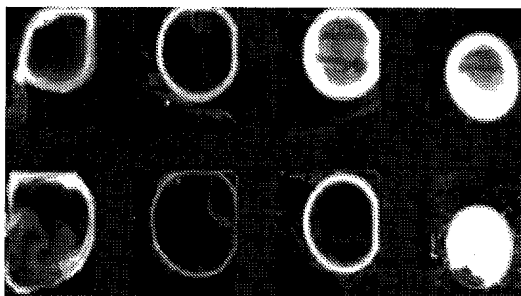
도면141



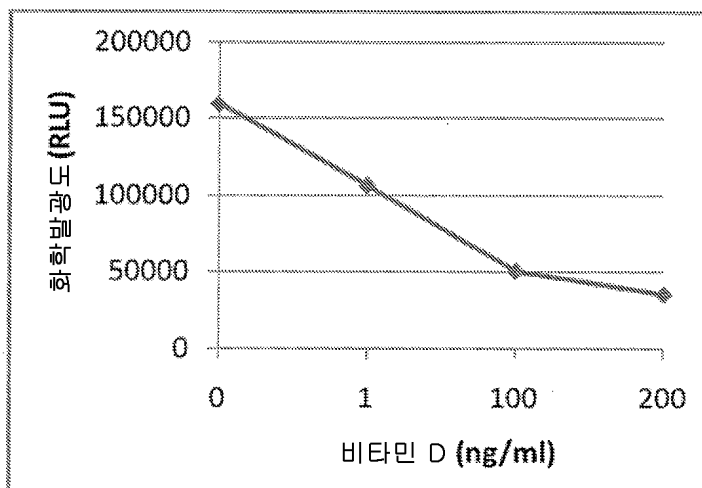
도면142



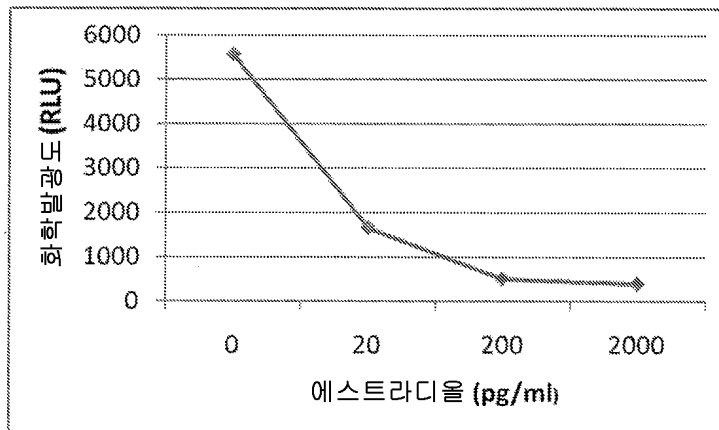
도면143



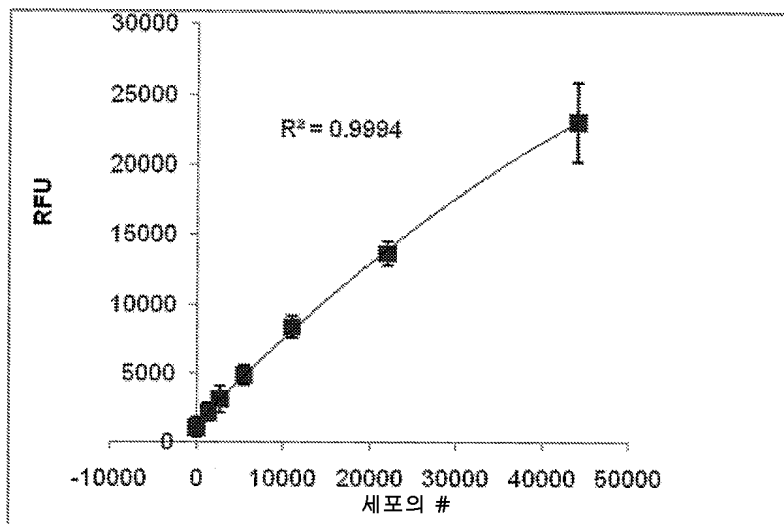
도면144



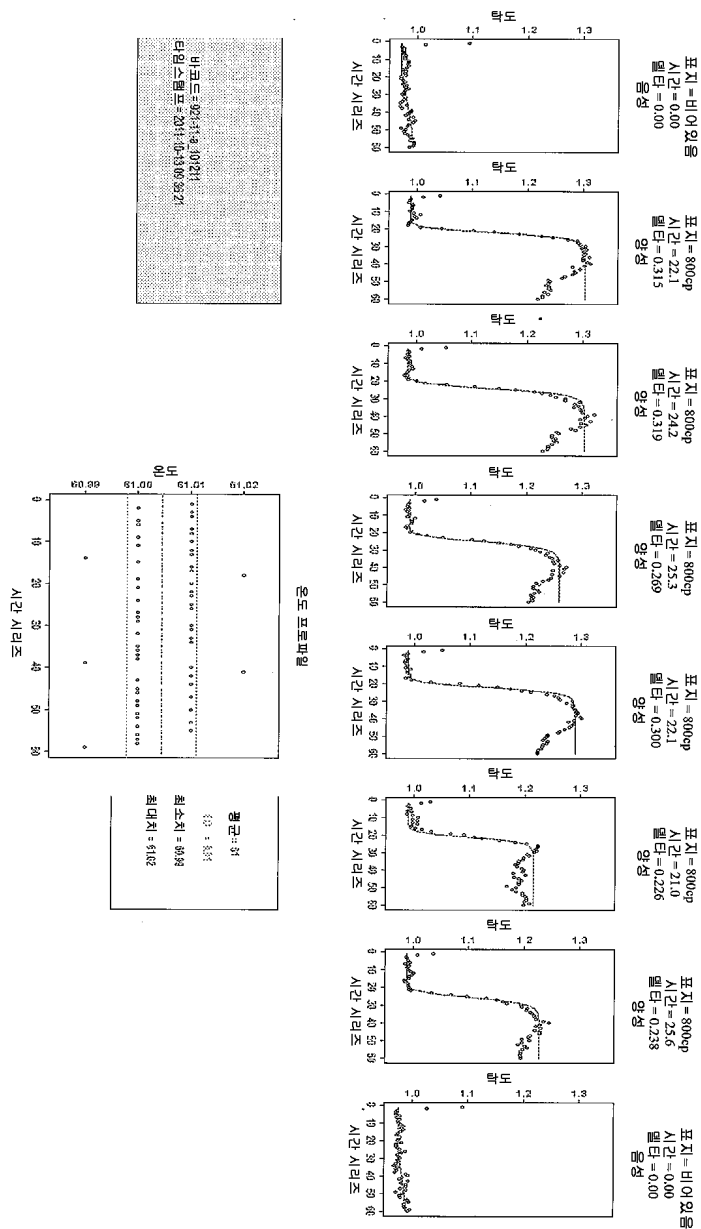
도면145



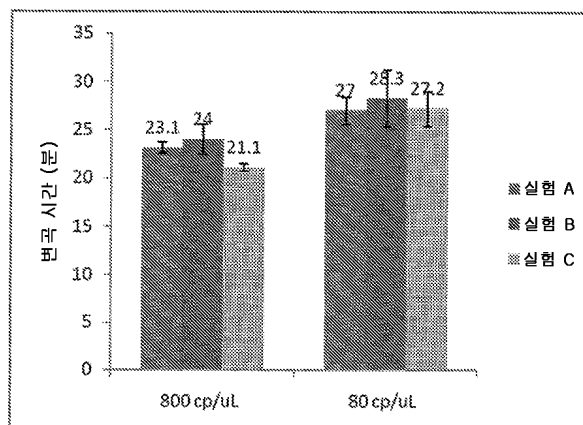
도면146



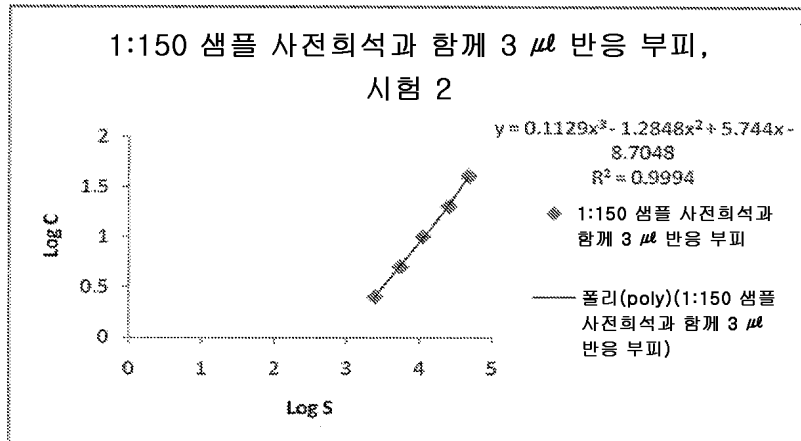
도면147



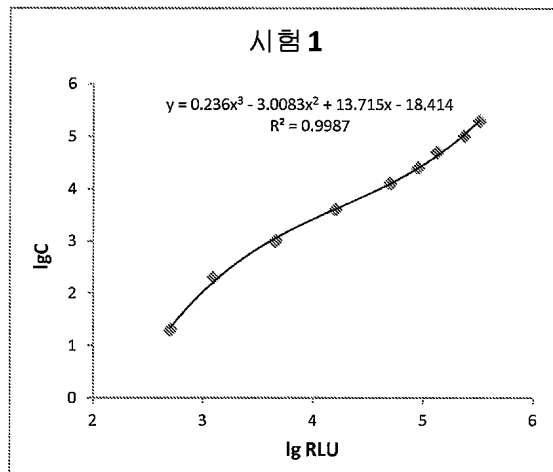
도면148



도면149



도면150



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1, 제9줄

【변경전】

단계; 임의적으로

【변경후】

단계;