

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-527022

(P2013-527022A)

(43) 公表日 平成25年6月27日(2013.6.27)

(51) Int.Cl.

B01J 19/00 (2006.01)
G01N 37/00 (2006.01)
B81B 1/00 (2006.01)

F 1

B01J 19/00
G01N 37/00
B81B 1/00

321

101

1/00

テーマコード(参考)

3C081
4G075

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2012-549966 (P2012-549966)
 (86) (22) 出願日 平成23年1月21日 (2011.1.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年6月4日 (2012.6.4)
 (86) 國際出願番号 PCT/PL2011/050002
 (87) 國際公開番号 WO2011/090396
 (87) 國際公開日 平成23年7月28日 (2011.7.28)
 (31) 優先権主張番号 P-393619
 (32) 優先日 平成23年1月11日 (2011.1.11)
 (33) 優先権主張国 ポーランド(PL)
 (31) 優先権主張番号 P-390251
 (32) 優先日 平成22年1月24日 (2010.1.24)
 (33) 優先権主張国 ポーランド(PL)
 (31) 優先権主張番号 P-390250
 (32) 優先日 平成22年1月24日 (2010.1.24)
 (33) 優先権主張国 ポーランド(PL)

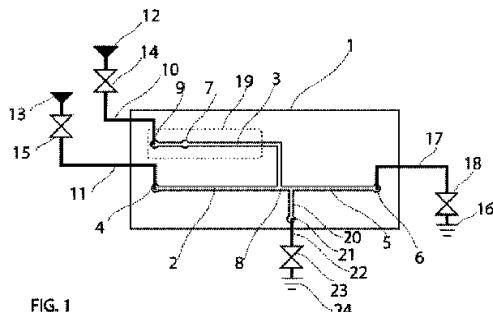
(71) 出願人 512146133
 インヂュート・ケミイ・フィジズネジ
 ・ポルスキージ・アカデミイ・ナウク
 ポーランド国 PL-01-224 ワルシ
 ャワ、カスブルズーカ 44/52番
 (71) 出願人 512146144
 ピージ・コレメイ・ソエテ・アノニム
 ポーランド国 PL-05-092 ロミア
 ンキ、ビオセンナ 22番
 (74) 代理人 100091465
 弁理士 石井 久夫
 (72) 発明者 チュルスキー クルジストーフ
 ポーランド国 PL-01-224 ワルシ
 ャワ、カスブルズーカ 44/52番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】液体混合物の自動形成及び操作システムと方法。

(57) 【要約】

本発明は、マイクロ流体サブシステムに液体を供給するシステム(1)に関するもので、第1バルブ(14, 29, 46)と、第1流体ダクト(10, 25, 28)とを備え、該第1バルブ(14, 29, 46)を上記マイクロ流体サブシステムと接続して第1液を供給し、第2流体ダクト(11)を備え、上記マイクロ流体サブシステムとを接続し、第2液を供給するようになっており、上記第1流体バルブ(14, 29, 46)は100msecより悪くない時間分解能でもって閉鎖するに適し、そして第1流体ダクト(10, 25, 28)のパラメータは $X_1 [Pa^{-1}]$ の値が $X_1 [Pa^{-1}] = (0.5 \times 10^{-9} + 1/E_1) (R_1^2 L_1^2 / A_1)$ で定義され、 $10^4 Pa^{-1}$ より小さいことを特徴とする。ここで E_1 は材料のヤング率で、この材料で第1流体ダクト(10, 25, 28)は製造され、 L_1 は第1流体ダクト(10, 25, 28)の長さで、 A_1 は第1流体ダクト(10, 25, 28)の内腔面積で、 R_1 は第1流体ダクト(10, 25, 28)の流体抵抗 R_1 を示す式： $R_1 = R_1 (L_1 \mu / A_1^2)$ における幾何学的構造を特徴づける定数であり、 μ は R_1 の測定における第1流体ダクト(10, 25, 28)を満たす流体の動



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マイクロ流体サブシステムと該マイクロ流体サブシステムに液体を供給する供給パーティからなるシステム(1)であって、

上記供給パーティは第1バルブ(14, 29, 46)と,該第1バルブ(14, 29, 46)と上記マイクロ流体サブシステムとを接続し、第1液体を供給する第1流体ダクト(10, 25, 28)と、上記マイクロ流体サブシステムとを接続し、第2液体を供給する第2流体ダクト(11)とかなり、

上記第1流体バルブ(14, 29, 46)は100msecより悪くない時間分解能でもって閉鎖し,そして第1流体ダクト(10, 25, 28)のパラメータは X_1 [Pa⁻¹]の値が

X_1 [Pa⁻¹] = (0.5 × 10⁻⁹ + 1/E₁) (R₁ L₁² / A₁) で定義され、10⁴ Pa⁻¹より小さいことを特徴とするシステム。

ここで E₁ は第1流体ダクト(10, 25, 28)の材料のヤング率で、L₁ は第1流体ダクト(10, 25, 28)の長さで、A₁ は第1流体ダクト(10, 25, 28)の内腔面積、R₁ は第1流体ダクト(10, 25, 28)の流体抵抗 R₁ を示す式: R₁ = R₁ (L₁ μ / A₁²) における幾何学的構造を特徴づける定数であり、μ は R₁ を測定する第1流体ダクト(10, 25, 28)を満たす流体の動的粘性係数である。

【請求項 2】

上記供給パーティが上記第2流体ダクト(11)の流れを閉じるための第2バルブ(15)をさらに備え、第2バルブ(15)は100msecより悪くない時間分解能でもって閉鎖し,そして第2流体ダクト(11)のパラメータは X_2 [Pa⁻¹]値が

X_2 [Pa⁻¹] = (0.5 × 10⁻⁹ + 1/E₂) (R₂ L₂² / A₂) で定義され、10⁴ Pa⁻¹より小さいことを特徴とする請求項1記載のシステム。

ここで E₂ は第2流体ダクト(11)の材料のヤング率で、L₂ は第2流体ダクト(11)の長さで、A₂ は第2流体ダクト(11)の内腔面積、R₂ は第2流体ダクト(11)の流体抵抗 R₂ を示す式: R₂ = R₂ (L₂ μ / A₂²) における幾何学的構造を特徴づける定数であり、μ は R₂ を測定する第2流体ダクト(11)を満たす流体の動的粘性係数である。

【請求項 3】

前記 X_1 [Pa⁻¹]又は X_2 [Pa⁻¹]値が10³ Pa⁻¹より低く、好ましくは10₂Pa⁻¹より低く、最も好ましくは10 Pa⁻¹より低い請求項1又は2記載のシステム。

【請求項 4】

第1流体ダクト(10, 25, 28)の弾性 Cc₁ 又は第2流体ダクト(11)の弾性 Cc₂ が10⁻¹⁶ m³/Paより高くななく、好ましくは、10⁻¹⁸ m³/Paより高くななく、最も好ましくは10⁻²⁰ m³/Paより高くなない前記請求項のいずれかに記載のシステム。

【請求項 5】

第1流体ダクト(10, 25, 28)又は最2流体ダクト(11)の流体抵抗 Rout が 第1流体ダクト(14, 29, 46)又は最2流体ダクト(11)の入口の流体抵抗 Rin より高く、好ましくは10倍高く、最も好ましくは100倍高い前記請求項のいずれかに記載のシステム。

【請求項 6】

第1流体ダクト(10, 25, 28)又は最2流体ダクト(11)の流体抵抗 Rout がマイクロ流体サブシステムの流体抵抗より高く、好ましくは10倍高く、最も好ましくは100倍高い前記請求項のいずれかに記載のシステム。」

【請求項 7】

第1流体ダクト(10, 25, 28)又は最2流体ダクト(11)がヤング率0.5 Gpaより高く、好ましくは10 Gpaより高く最も好ましくは100 Gpaより高く、例えば金属、スチール、セラミックス、ガラス又は硬質ポリマーから製造される前記請求項のいずれかに記載のシステム。

【請求項 8】

前記バルブ(14, 15, 29, 46)の少なくとも一つが10 msecより悪くない時間分解能で閉鎖するに適当である前記請求項のいずれかに記載のシステム。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

前記バルブ(14、15、29、46)の少なくとも一つの電気コントローラ(124)をさらに備える前記請求項のいずれかに記載のシステム。

【請求項 10】

前記バルブ(14、15、29、46)の少なくとも一つがピエゾ電気バルブ、メンブレンバルブ、又はマイクロバルブである前記請求項のいずれかに記載のシステム。

【請求項 11】

前記最1液体および第2液体と混和しない第3液体の連続液滴(47、49)を前記マイクロ流体サブシステムに供給するに適するセットを備え、該セットは第3液体の液滴(47)の入口ポートを低圧又は真空に貯槽に接続し、前記バルブ(43)の開放により第3液体の液滴(47)を入口ポート(40)からシステムに引き入れるようにする請求項1～10のいずれかに記載のシステム。

10

【請求項 12】

前記最1液体および第2液体と混和せず、懸濁する第3液体の連続液滴(36、38)を前記マイクロ流体サブシステムに供給するに適するセットを備え、第3液体の液滴(36、38)をソース(36、38)に接続する入口ポート(7、9)を備える請求項1～10のいずれかに記載のシステム。

【請求項 13】

連続液滴のソースが流体ダクト(39)又はピペット(35)である請求項12記載のシステム。

20

【請求項 14】

前記第1流体ダクト(51)と第2流体ダクト(61)の接合部(54)を備えるとともに、第3流体ダクト(60)にポート(61)を介して接続するバルブを備え、前記接続部(54)からポート(57)に導き、そこで前記バルブを低圧又は真空の貯槽に接続し、前期バルブの開放により前記第3流体ダクト(60)の少なくとも一部の流体抵抗を減少させるようになっている前記請求項のいずれかに記載のシステム。

【請求項 15】

流体ダクトの流れの少なくとも一つの検出器(56、81、82、121、122、136、137)を備え、好ましくはホト検出器であって、前記電気コントローラ(124)と接続し、前記検出器(56、81、82、121、122、136、137)からの信号により前記バルブ(14、15、29、46)を開放または閉鎖することができるようになっている前記請求項11又は12に記載のシステム。

30

【請求項 16】

前記検出器(56)は、前記液滴(50)の一つのヘッドにより第1流体ダクト(51)と第2流体ダクト(61)の接続部(54)への接近について電気コントローラへの検出時に信号を検出して伝達するように、配置され、かつ形成されている請求項15に記載のシステム。

【請求項 17】

少なくとも2つの追加バルブ(98、109、113、130、132、100、111、115、131、133)を備え、そこで、前記バルブの第1(98、109、113、130、132)は前記バルブ第2(100、111、115、131、133)より高い圧力の供給源(97、108、112)に接続するとともに、流体ダクト(94)の同一部分に接続し、前記バルブの双方(98、109、113、130、132、100、111、115、131、133)の開放によって流体ダクト(94)の一部にある液体をバルブ第1(98、109、113、130、132)からバルブ第2(100、111、115、131、133)の方向に流し、前記バルブの双方(98、109、113、130、132、100、111、115、131、133)の閉鎖によって流体ダクト(94)の一部にある液体の流れを停止させることを特徴とする前記請求項のいずれかに記載のシステム。

40

【請求項 18】

2対のバルブ(109、113、130、132、111、115、131、133)を

50

備え、そこで、前記バルブの第1対(109、113、130、132)は前記バルブの第2対(100、111、115、131、133)より高い圧力の供給源(108、112)に接続するとともに、前記各対は流体ダクトの同一部分に接続し、前記バルブの第1対の双方(109と115、130と133)を開放する一方、バルブ第2対の双方(113と115、132と131)を閉鎖することによって流体ダクトの一部にある液体を一方向に流し、バルブ第2対の双方(113と115、132と131)を開放する一方、前記バルブ第1対の双方(109と115、130と133)を開鎖することにより流体ダクトの一部にある液体を反対方向に流すことを特徴とする前記請求項17に記載のシステム。

【請求項19】

システム(84, 86, 126, 128)は、前記マイクロ流体サブシステムが液体混合のための流体ダクトの蛇行部分を構成していることを特徴とする前記請求項のいずれかに記載のシステム。

【請求項20】

検出モジュール(116、134)、好ましくは、分光光度検出器を備え、液体を有する流体ダクトに放射線ビームを提供する手段、好ましくは導波路を構成し、前記液体を通過した放射線の検出器を備えることを特徴とする前記請求項のいずれかに記載のシステム。

【請求項21】

前記マイクロ流体サブシステムが使い捨てであることを特徴とする前記請求項のいずれかに記載のシステム。

【請求項22】

前記マイクロ流体サブシステムが2またはそれ以上の取り外し可能な接続可能なパーツを備えることを特徴とする前記請求項のいずれかに記載のシステム。

【請求項23】

前記第1バルブ、前記第2バルブ、前記第1流体ダクト、または前記第2流体ダクトが前記マイクロ流体サブシステムと一体となっていることを特徴とする前記請求項のいずれかに記載のシステム。

【請求項24】

接合部で出会う第1流体ダクトと第2流体ダクトとからなるシステムでオンデマンドで微小液滴を提供する方法であって、以下に述べるステップからなる；

- ・ 第1バルブと第1流体ダクトを通して第1液を前記マイクロサブシステムに供給する工程と、

・ 第2バルブを通しての第2液と第2流体ダクトとを備える前記マイクロサブシステムを供給する工程とからなり、

前記第1液の流れは第1及び第2流体ダクトの接合部においてマイクロ液滴を発生させるように制御されることを特徴とする方法。

【請求項25】

前記第1流体ダクト(10, 25, 28)のパラメータは X_1 [Pa⁻¹]の値が X_1 [Pa⁻¹] = (0.5 × 10⁻⁹ + 1/E₁) (R₁ L₁² / A₁) で定義され、10⁴ Pa⁻¹より小さくなるように選択されることを特徴とする請求項24に記載の方法。

ここでE₁は第1流体ダクト(10, 25, 28)の材料のヤング率で、L₁は第1流体ダクト(10, 25, 28)の長さで、A₁は第1流体ダクト(10, 25, 28)の内腔面積、R₁は第1流体ダクト(10, 25, 28)の流体抵抗R₁を示す式: R₁ = R₁ (L₁ μ / A₁²) における幾何学的構造を特徴づける定数であり、μはR₁を測定する第1流体ダクト(10, 25, 28)を満たす流体の動的粘性係数である。

【請求項26】

第2液が第2バルブ及び第2流体ダクトを介して前記マイクロ流体サブシステムに供給される工程を備え、そして第2流体ダクト(11)のパラメータは X_2 [Pa⁻¹]値が

10

20

30

40

50

X_2 [Pa⁻¹] = (0.5 × 10⁻⁹ + 1/E₂) (R₂ L₂² / A₂) で定義され、10⁴ Pa⁻¹より小さくなるように選択されることを特徴とする請求項 24」又は 25 記載の方法。

ここで E₂ は第 2 流体ダクト (11) の材料のヤング率で、L₂ は第 2 流体ダクト (11) の長さで、A₂ は第 2 流体ダクト (11) の内腔面積、R₂ は第 2 流体ダクト (11) の流体抵抗 R₂ を示す式 : R₂ = R₂ (L₂ μ / A₂²) における幾何学的構造を特徴づける定数であり、μ は R₂ を測定する第 2 流体ダクト (11) を満たす流体の動的粘性係数である。

【請求項 27】

更に第 2 液の流れは第 1 及び第 2 流体ダクトの接合部にマイクロ液滴を発生させるように制御される請求項 24、25 又は 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記第 2 液は連続液でマイクロ流体サブシステムのマイクロ流路の壁面を湿潤させる請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記第 1 液は連続液でマイクロ流体サブシステムのマイクロ流路の壁面を湿潤させず、第 2 液と混和しない請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

液体が流れる流体ダクトの接合部を通しての第 1 液及び第 2 液の流れによりマイクロ液滴をオンデマンドで発生させる請求項 29 記載の方法。

【請求項 31】

前記第 1 液は連続液でマイクロ流体サブシステムのマイクロ流路の壁面を湿潤させ、さらに第 1 液及び第 2 液と混和せず、マイクロ流体サブシステムのマイクロ流路の壁面を湿潤させない第 3 液をシステムに供給する工程を含む請求項 28 記載の方法。

【請求項 32】

前記第 3 液はポートを通して流体ダクトに液滴の形態で提供され、該液滴は前記流体ダクトに移動させた後流体ダクトからの流出を停止し、前記流体ダクトへの流入を開放して連続液でポートを満たすことを特徴とする請求項 31 記載の方法。

【請求項 33】

前記第 1 及び第 2 液に懸濁させた第 3 液の液滴の連続をシステムに供給する工程を含む請求項 32 記載の方法。

【請求項 34】

前記第 3 液と第 1 又は第 2 液の流れにより流体ダクト接合部を通してオンデマンドでマイクロ液体を発生させ、流体ダクト接合部を通して前記液が流れることを特徴とする請求項 32 又は 33 記載の方法。

【請求項 35】

前記第 1 液と第 2 液が同一液である請求項 32、33 又は 33 に記載の方法。

【請求項 36】

前記第 1 及び第 2 液の流れ、選択的に第 3 液の流れが第 1 及び第 2 バルブの開閉により制御される請求項 28 ~ 35 のいずれか記載の方法。

【請求項 37】

前記第 1 及び第 2 バルブの開閉モーメントが所定のパルス関係に対応する請求項 36 記載の方法。

【請求項 38】

前記第 1 バルブが開放されると時間間隔の始期及び終期を、前記第 2 バルブの閉鎖した時の時間間隔の始期及び終期に関連して時間シフトさせる請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

前記第 1 バルブを開放したとき第 2 バルブが閉じられ、第 1 バルブが閉じられたとき第 2 バルブが開放される請求項 37 記載の方法。

【請求項 40】

第 1 及び第 2 バルブの開閉のために第 1 及び第 2 バルブに送られるステアリングインパルス間で時間シフトが、前記バルブの電気機械慣性を補償又は利用するように選択され、前

10

20

30

40

50

記バルブが実際に開放又は閉鎖されるときその時間間隔が基本的に同期されることを特徴とする請求項 36～39のいずれかに記載の方法。

【請求項 41】

ステアリングインパルスが方形インパルスである請求項 36～40のいずれかに記載の方法。

【請求項 42】

必要な濃度の反応物を有する反応混合物を製造する工程がオンデマンドで発生させる反応物のマイクロ液滴が必要な体積を有し、これを混合させることにより行われる請求項 24ないし 41のいずれかに記載の方法。

【請求項 43】

オンデマンドで発生させるマイクロ液滴が 0.01 nL から 10 mL の容量を有する請求項 24ないし 41のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マイクロ流体システムに液体を供給するためのシステム及びそのシステムにおいて、要求に応じて（マイクロ（微小）液滴を製造する方法に関するものである。特に、本発明は、連続的な流れ（ストリーム）の形でまたは非混和性液体中に懸濁する離散液滴の連続列として液体を供給するための、マイクロ流体システムで、これらの液体を計量移送するための自動システム及び技術に関する。さらに、本発明は、連続的な流れから、または前記液体サンプルから、微小液滴を生成するためのシステムおよび方法であって、マイクロ流体サブシステム内で入力液体の混合物を生成するため、これらの微小液滴を混合するシステムおよび方法に関する。本発明は、また、本発明によって行われる液体の供給を活用するのに適するマイクロ流体モジュールにも関する。本発明に従って構成されたシステムは、マイクロ液滴内部のシングルおよびマルチステップの化学反応を実行するためを使用することができ、マイクロモジュール内で微小液滴の化学的組成及び位置の機能としてこれらの反応の結果の測定のために使用される。好ましくは、本発明に従って構成されたシステムは溶液または生化学的流体の少量のサンプルにおいて行われる化学的又は生化学的反応の結果の評価のために有効に使用される。

本発明に従って構成されたシステムはまた、微生物学では、時間と費用対効果の高い研究を実行するために使用される。

【背景技術】

【0002】

多くの科学的作品及び化学的な分野でのマイクロ流体システムの使用に関する特許出願によって、"ラボ・オン・チップ(Lab-on-a-chip)の急速な発達を予測しており、典型的にはミニチュア反応ビーカーのようなマイクロメートル流路内部で生成されたピコリットルからマイクロリットルまでの容量の微小（マイクロ）液滴を使用する考えが有望になっていく。マイクロ液滴内部の反応を行わせるマイクロ流体システムはマイクロ流体チップ内で相互に接続する多様なマイクロ流体チャネルを構成しており、少なくとも2つの非混和性の液体の供給を可能にし、少なくとも1つの液体の非混和性液体中の微小液滴形成を可能にする。さらに、マイクロ液滴はマイクロチャネルに沿って輸送され、混合され、選択された条件（一定または一時的变化）でインキュベートされ、最終的には分級され、マイクロ流体システムから取り出される。

【0003】

以下の文献には、微視的反応ビーカーとしてマイクロ流路内の微小液滴を利用するいくつかの利点が示されている [H. ソング、DL陳、RF Ismagilov著 AngChem Int Ed, 2006, 45, 733 6-7356] :

i) チャネル内での液体の要素の滞留時間が分散しない、ii) 効率的かつ迅速混合、iii) 動態を制御する能力、iv) 並行してマルチ反応を行わせる能力、v) 試薬の低消費である。これらの特性は、マイクロ流体システムでのマイクロ液滴形成の化学分析と合成のため

の潜在的に貴重なツールを 生化学及びフォルム微生物学のために提供する。既に液滴の使用上の既存のレポートには、化学反応の区分のためのマイクロ流体システムの使用[A. Griffithsらのマイクロ流体制御による区別コンビナトリアルケミストリー米国特許出願US20060078893]、および生化学的反応における使用[A.Hsiehら、迅速な核酸分析のための方法および装置、米国特許出願US20080166720]が提案されている。

【0004】

マイクロ液滴のマイクロ流体チップの開発において、卓越した挑戦の一つは、自動化にあり、それにより処理量の増加（単位時間内に行われる異なる反応数）およびスクリーンプロトコルのフレキシビリティの増加、特にスクリーンで全てのマイクロ液滴の化学的組成を個別に制御することにある。目標は、マイクロ液滴のマイクロ流体チップを開発し、マイクロ液滴の自動生成を可能にするとともに、マイクロ液滴内で反応を行わせ、より少量の反応混合物を提供し、自動化滴定システム又は血液の生化学的分析の自動化システムにより行われるものと同等又はより良好な精度及び速度を与えることにある。ロボットマイクロ滴定ステーションでは、単一マイクロリットル又はそれ以上範囲の反応容量で操作し、1ヘルツまたはより低速で反応試薬をウェルに充填する。同様に、生化学的アッセイのロボットステーションでは血液（または血清）ミリリターの数十から数百のボリュームで、1ヘルツまたはより低速の10分の1範囲内での速度を提供する。両方の技術では試薬の投与量の精度は数パーセント（体積比）又はそれ以上である。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0005】

【特許文献1】米国特許出願US20060078893明細書

【特許文献2】米国特許出願US20080166720明細書

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】H.ソング、DL陳、RF Ismagilov著AngChemInt Ed, 2006、45、7336-7356

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

自動化されたマイクロ液滴マイクロ流体チップの開発には、所定の微小液滴を生成し、電気制御ユニットの電気信号に応答して所定の時間で放出し、マイクロ液滴を合わせ、その成分を混合し、所定の間隔で所定の条件で培養し、反応やインキュベーションの結果の読み出しする必要がある。したがって、最初の課題は、マイクロ液滴を自動的に、オンデマンドで形成するためのシステムを開発することにある。このような形成を可能にするシステムでは、正確に液体の微小（ナノリットルの範囲）のボリュームを管理するバルブを備えるべきである。多くの場合、特に、分析アプリケーションでは微小液滴は、その使用を減らすために、試薬の溶液の小さなサンプルから生成させるのが好ましい。本発明は、オンデマンドで少量の液体サンプルから微小液滴の生成を可能にすることにある。以下、用語"液滴"とはサンプルから続いて多くのマイクロ液滴の生成のためにチップに導入される液体サンプルのことをいい、ここでは"微小（マイクロ）液滴は1pLから100μLの容量を持っていることをいう。

30

【0008】

マイクロ流体チップ内でオンデマンドでマイクロ液滴を生成した例がほとんどないが、M. Ungerら（サイエンス288、2000、113から116頁）では、薄い弹性膜で区切られた2つ垂直チャンネルを上記の一つを含む、マイクロバルブを構築した。これらのいずれかの流路に対する圧力の適用により、流路の膜を偏向し、第2のチャネルの内腔を閉じる。この解決策は、マイクロ流体技術において、非常に人気があり、多くの例がある。マイクロ液滴のオンチップ生成に使用される修正には、例えば、S.Hulme著（ラボチップ9、2009、79から86頁）、S.Zeng著（ラボオンチップ9、2009、1340～1343頁）またはJ.Galas著（N.] PH YS11、2009、075027）がある。

40

50

【0009】

W.グローバー著（センサアクチュエータB 89、2003、315～323頁）では、硬い材料（すなわち、ガラス）で作製したチャネルとチャンバーを備え、薄い弹性膜で区切られた異なるマイクロバルブを報告した。Churski著（ラボチップ、2010、10、512～518頁、ポーランド特許出願は、P-388565）では、マイクロチップ内でオンデマンドで微小液滴を生成するためにマイクロバルブを修正した。

【0010】

マイクロ流体チップ内でオンデマンドでマイクロ液滴を形成する上記引用した文献では、マイクロ液滴内で液体分散の流れを制御するバルブがチップ内に組み込まれており、組み込まれたマイクロバルブの形成によりマイクロチップの組み込みコストおよび時間がかかる。マイクロ流体システムを使いやすくする観点ではマイクロ流体チップは使い捨てであることが必要とされる。このような解決策は、異なる反応間のクロスコンタミネーションのリスクを軽減または排除する必要がある。このように、経済的な理由のために、マイクロ流体チップはできるだけ単純であるのが有益で、分散させる液体の流れを制御するバルブは使い捨てチップの外に配置されるのがよい。

10

【0011】

本発明者のChurski（ラボチップ、2010、10、816から818、そして未公開のポーランド特許出願P-390250とP-390251）は、外部バルブのシステムを開示し、大きなデッドボリュームを特徴しており、大きな液圧抵抗の毛細管の挿入により改良した。このシステムはナノリットルからマイクロリットルまでの微小（マイクロ）液滴の形成を可能とし、閉鎖時にシステムの洪水（フラッディング：flooding）を回避している。このシステムおよび方法は、多くの適用において有利である。例えば、それは大きな貯槽から送られる溶液からオンデマンドで大量に微小（マイクロ）液滴を形成すべき場合で、例えば、自動化された化学合成のプロセス試薬の供給源として機能することを可能とし、異なる分析実験の多くで使用されている溶液の微小液滴の好ましい供給源として役立つ。そこでは1またはそれ以上の共通液が大きな貯槽からバルブを介して供給され、この溶液でマイクロ流体モジュールを再充填する必要性を回避している。

20

【0012】

Churskiによって提示されたシステム（ラボチップ、2010、10、816～818、未公開ポーランド特許出願P-390250とP-390251）及び方法は分散される液体をバルブを介して流す必要があり、化学分析又は医療分析として、好ましい少量のサンプルを含む異なる範囲の適用には有利でない。この解決策は欠点としては、以下を含む。i) バルブによって興味ある溶液を接触させること、それは溶液の交換を行わせ、システムの洗浄を困難にし、マイクロ液滴間のクロス汚染のリスクを伴う。ii) マイクロ液滴の形成には大量（ミリリッターランプ）の溶液を必要とする。異なる例では、国際出願PCT/GB82/00319は、マイクロ流体チップ内で液滴を生成するために、液体の流れの外部ソースを使用するシステムを開示している。このシステムでは、液体の流れの制御（すなわち、シリンジポンプとコックバルブの使用）が、現在のロボットステーションで提供されるものと競争的になるであろう精度と速度をもって液滴を生成することを不可能にしている。別の手法の、欧州特許EP 1 099 483 A1では、キャピラリーで終了する弁が開示されており、大きな液圧抵抗によってキャピラリの先端を取り巻く大気中に、正確に投与された液滴を放出するために使用されることを特徴としている。この手法では、基板上での液滴の沈着のために設計されているので、圧力の変化に応答するキャピラリーコンプライアンスの影響が考慮されていらず、しかもマイクロ流体チップへの液体の投与のためにこのようなバルブを使用するための重要なパラメータを定義していない。

30

【0013】

好ましい解決策ではマイクロ流体チップへの液体の少量のサンプルの供給を可能にする必要があり、一般的にはマイクロ流体チップと液圧的にインターフェースすることができる液圧サブユニット内で行う必要があり、これらの液体サンプルからマイクロ液滴を作成し、マイクロ液滴を混合し、反応混合物を作成し、混合物中で化学的または生化学反応を行

40

50

わせるのがよい。このようなシステムでは、マイクロ液滴の生成過程で液体のサンプルの流れを非混和性のキャリア液の流れによって制御する必要がある。マイクロ流体システムへの液体のサンプルの吸引およびこれらのサンプルからの微小（マイクロ）液滴の形成はマイクロ流体技術における現在の課題である。

【0014】

例えば、J.Clausell-Tormos著（ラボチップ、2010、10、1302～1307頁）は、通常、クロマトグラフィーで使用されるマルチチャンネル・バルブを使用するサンプルの自動吸引システムを提示した。液体のサンプルは、ウェルプレートから非混和性の連続的な液体で満たされたチューブ内に吸引される。V. Trivedi著（ラボオンチップ、2010、10、2433～2442）では、チューブに蓄積された液体からマイクロ液滴を形成するために、流れを集中させる接合部を使用している。Du著（ラボチップ、2009、9、2286～2292頁）ではSlipChipと呼ばれるシステムを構築し、一方のマイクロ流体プレートを他のプレートに対しスライドさせることで液滴をチップ内に位置させるようにしている。Chen著（PNAS、2008年、105、44、16843～16848）では興味のある地点（例えば、細胞培養）上で、通過する液滴に液体試料を吸引させるChemistrokeと呼ばれるシステムを報告している。Liu著（オンチップラボ、2009、9、2153～2162頁）では、少量の吸引のためのシステムを変更した。Sun著（ラボチップ、2010、10、2864～2868頁）ではエッペンドルフチューブからの液体のサンプルの吸引のための自動化システムを発表した。液体試料の吸引のすべての手法で重要な問題は、マイクロ流体システムへの気泡の導入を避けることにある。

10

【0015】

この分野ではこれらのサンプルに含まれる液体からオンデマンドで、続いて微小液滴を発生させるためにマイクロ流体システムに液体の小さなサンプルを簡単に供給するシステムや方法はなく、この適用における解決策は簡単な供給に続き、自動的にマイクロ液滴の形成を可能とすることにある。本発明の課題は多くの異なるルート、および多くの異なる供給源から液体サンプルをマイクロ流体チップへの液体サンプルの導入を可能にすることがあり、ピッペット先端から非混和性キャリア液体に分散したサンプルを有するチューブに又はマイクロ流体システムに形成されたウエル上に直接導入することを含む。

20

【0016】

本発明の別の好ましい特徴は、それを提供するモジュールにある。本発明に従って構成され、液体が供給されるマイクロ流体システムとサブシステムは、モジュールとして扱うことができ、チューブや標準液圧接合部の助けを借りて接続できる。本分野においては、マイクロ液滴を自動的に生成し、操作し、液滴を個別に制御するモジュラーマイクロ流体システムについては解決策がなかった。P. K. Yuenら著（ラボチップ、2008、8、1374～1378、ラボオンチップ、2009、9、3303～3305）はSmartBuild Plug-n-Play Modularのマイクロ流体システムを発表し、単一相流れの接続、切斷及び混合を可能とする。このシステムは、レゴシステムに用いたものと類似の方法でモジュールがピン止めされるプラットフォームを利用するものであり、GV Kaigala著（アナリスト、2010、135、1606～1617頁）では、ポリメラーゼ連鎖反応のためのモジュラーシステムを実証した。V. Trivedi著（ラボオンチップ、2010、10、2433～2442頁）では液滴の生成、混和および液滴の分光光度検出のためのモジュラーシステムを実証したが、このシステムは、化学組成やタイプを個別に制御したり、インキュベーション間隔を個別に制御できるものでなかった。

30

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明者は、予期せず、気泡（空気）導入を回避するように、非混和性のキャリア液で区切られた液体の供給（deposition）を可能とするマイクロ流体システムを構築できることに気付いた。このようなことを可能にするマイクロ流体システムはチューブやピペットの先端から試料を導入するための追加のポートを備える。本発明者らはまた、マイクロ流体システムの出口に負の圧力を適用することにより、前もって構成されたウエルから非混和性のキャリア液に囲まれた、液体サンプルの吸引を可能にするシステムを構築することが可能であることを発見した。

40

50

【0018】

以下で詳細に説明するように、本発明はマイクロ流体チップとバルブとを接続する液圧ダクトを形成する材料の適当な選択のためのルールに及びもので、ダクトの正しい材料選択によって、マイクロ流体チップとバルブを接続する液圧ダクトを作製することにある。ダクトの正しい選択は、流れを開始するのに必要な最小時間の要件およびダクトとダクトの液圧コンプライアンスによって決定され、これらダクトの幾何学形状およびダクト壁の弾性的性質（すなわちポアソン比とヤング率）を含む。

【0019】

同様に、予想外にも、本発明者らは、単一のナノリットルから数マイクロリットルまでの体積の微小（マイクロ）液滴を、システム内のそれらの体積を満足できる精度をもって与えることにより形成できることを見出した。そこではるかに大きなデッドボリューム（すなわち、バルブ閉鎖時にバルブから追い出されるボリューム）のバルブを介して液体が供給される。

10

【0020】

本発明者らは、チップ上に供給された試料から微小液滴をオンデマンドで形成し、これらの液滴が反応混合物に混和する工程を含む自動化されたプロトコルを実行することが可能であると見出した。予想に反して、本発明に従って構成されたシステムは、大幅に異なるボリュームの微小液滴（単一ナノリットルのマイクロ液滴と単一のマイクロリットルの容積のマイクロ液滴）の混和を、マイクロ液滴のマイクロ流体接合部への流入を自動同期する助けを借りて、可能にすることができる。本発明によれば、マイクロ液滴の流れをそれらの放出時間の適当な選択を介して又はマイクロ液滴の位置のセンサーから電気制御ユニットへのフィードバックにより同期させることができる。

20

【0021】

さらに、本発明に従って構成されたシステムは秒から時間までの大きな間隔にわたって反応混合物及び培養混合物の培養時間の制御を可能とする。さらに、本発明に従って構成されたシステムは、一連の測定（分光光度計）を独立した液滴に対して、マイクロ液滴のサブグループに対して連続して、又は一連の反応混合物や培養混合物の全て列に対して行うことができる。独立した液滴に対して行われる一連の測定によりマイクロ液滴内で進行するプロセス速度の監視を行うことができる。

30

【0022】

本発明によれば、システムはマイクロ流体サブシステムと該マイクロ流体サブシステムに液体を供給する供給パーティとからなり、

上記供給パーティは第1バルブと第1流体ダクトとを備え、第1バルブと上記マイクロ流体サブシステムとを接続し、第1液体を供給し、

第2流体ダクトを備え、上記マイクロ流体サブシステムと接続し、第2液体を供給し、

、上記第1流体バルブは100msecより悪くない時間分解能でもって閉鎖し、そして第1流体ダクトのパラメータは₁ [Pa⁻¹]の値が

$X_1 [Pa^{-1}] = (0.5 \times 10^{-9} + 1/E_1) (R_1 L_1^2 / A_1)$ で定義され、10⁴ Pa⁻¹より小さいことを特徴とする。

40

ここで E_1 は第1流体ダクトの材料のヤング率で、 L_1 は第1流体ダクトの長さで、 A_1 は第1流体ダクトの内腔面積、 R_1 は第1流体ダクトの流体抵抗 R_1 を示す式： $R_1 = R_1 (L_1 \mu / A_1^2)$ における幾何学的構造を特徴づける定数であり、但し、 μ は R_1 を測定する第1流体ダクト (10, 25, 28) を満たす流体の動的粘性係数である。

【0023】

好ましくは、上記供給パーティが上記第2流体ダクトの流れを閉じるための第2バルブをさらに備え、第2バルブは100msecより悪くない時間分解能でもって閉鎖し、そして第2流体ダクトのパラメータは₂ [Pa⁻¹] 値が

$X_2 [Pa^{-1}] = (0.5 \times 10^{-9} + 1/E_2) (R_2 L_2^2 / A_2)$ で定義され、10⁴ Pa⁻¹より小さいことを特徴とする。

50

ここで E_2 は第 2 流体ダクト材料のヤング率で、 L_2 は第 2 流体ダクトの長さで、 A_2 は第 2 流体ダクトの内腔面積、 R_2 は第 2 流体ダクトの流体抵抗 R_2 を示す式： $R_2 = \frac{R_2}{(L_2 \mu / A_2^2)}$ における幾何学的構造を特徴づける定数であり、但し、 μ は R_2 を測定する第 2 流体ダクトを満たす流体の動的粘性係数である。

【0024】

好ましい実施態様においては、前記 X_1 [Pa⁻¹] 又は X_2 [Pa⁻¹] 値は 10^3 Pa⁻¹ より低く、好ましくは 10_2 Pa⁻¹ より低く、最も好ましくは 10 Pa⁻¹ より低い。

【0025】

好ましくは、第 1 流体ダクトの弾性 Cc_1 又は第 2 流体ダクトの弾性 Cc_2 と組み合わせる液圧コンプライアンスは 10^{-16} m³/Pa より高くなく、好ましくは、 10^{-18} m³/Pa より高くなく、最も好ましくは 10^{-20} m³/Pa より高くなない。

10

【0026】

好ましい実施態様においては、第 1 流体ダクト又は第 2 流体ダクトの流体抵抗 R_{out} が第 1 流体ダクト又は第 2 流体ダクトの入口の流体抵抗 R_{in} より高く、好ましくは 10 倍高く、最も好ましくは 100 倍高い。

【0027】

他の好ましい実施態様においては、第 1 流体ダクト又は第 2 流体ダクトの流体抵抗 R_{out} はマイクロ流体サブシステムの流体抵抗より高く、好ましくは 10 倍高く、最も好ましくは 100 倍高い。

20

【0028】

好ましくは、第 1 流体ダクト又は第 2 流体ダクトはヤング率 0.5 Gpa より高く、好ましくは 10 Gpa より高く最も好ましくは 100 Gpa より高く、例えば金属、スチール、セラミックス、ガラス又は硬質ポリマーから製造される。

【0029】

好ましくは、前記バルブの少なくとも一つは 10 msec より悪くない時間分解能で閉鎖するが適當である。

【0030】

好ましくは、前記バルブの少なくとも一つはピエゾ電気バルブ、メンプランバルブ、又はマイクロバルブである。

30

【0031】

好ましくは、前記バルブの少なくとも一つは電気コントローラをさらに備える。

【0032】

本発明によれば、前記システムは、好ましくは、前記最 1 液体および第 2 液体と混和しない第 3 液体の連続液滴を前記マイクロ流体サブシステムに供給するに適するセットを備え、該セットは第 3 液体の液滴の入口ポートを低圧の貯槽又は真空に接続し、前記バルブの開放により第 3 液体の液滴を入口ポートからシステムに引き入れるようにする。

【0033】

好ましい実施態様においては、本発明に係るシステムは、前記最 1 液体および第 2 液体と混和せず、懸濁する第 3 液の連続液滴列を前記マイクロ流体サブシステムに供給するに適するセットを備え、第 3 液の連続列の液滴をソースに接続する入口ポートを備える。

40

【0034】

好ましくは、連続液滴列のソースが流体ダクト又はピペットである。

【0035】

第 3 液の液滴をシステムに引き込む又は供給する解決手段は液体の体積を著しく減少させ、実験を行うために必要である。連続液体を供給する場合、第 3 液体で流体ダクトを化学反応が起こるある点まで満たす必要がある。反応物（特に第 3 液）の変更には流体ダクトを清掃又は洗浄する必要がある。もし、第 2 液が液滴の形態でシステムに供給されると、第 1 及び第 2 液の動きによりシステム内に第 3 液が供給される（なお、そのような必要はない）。第 3 液において著しい節約になる（数 mL の第 3 液の代わりに数 μ L が必要な実験が行われる）とともに、実験システムのキャパシティが著しく向上する（異なる液体で

50

迅速に実験を行える)。

【0036】

したがって、好ましくは、前記第1流体ダクトと第2流体ダクトの接合部を備えるとともに、第3流体ダクトにポートを介して接続するバルブを備え、前記接続部からポートに導き、そこで前記バルブを低圧貯槽又は真空に接続し、前記バルブの開放により前記第3流体ダクトの少なくとも一部の流体抵抗を減少させるようになっている。

【0037】

好ましくは、本発明に係るシステムは流体ダクトの流れの少なくとも一つの検出器を備え、好ましくはそれはホト検出器であって、前記電気コントローラと接続し、前記検出器からの信号により前記バルブを開放または閉鎖することができるようになっている。

10

【0038】

好ましくは、前記検出器は、前記液滴の一つのヘッドにより第1流体ダクトと第2流体ダクトの接続部(54)への接近を検出し、電気コントローラへ信号を伝達するように、配置され、かつ形成される。

【0039】

好ましくは、本発明に係るシステムは、少なくとも2つの追加バルブを備え、そこで、前記バルブの第1は前記バルブの第2より高い圧力の供給源に接続するとともに、流体ダクトの同一部分に接続し、前記バルブの双方の開放によって流体ダクトの一部にある液体を前記バルブの第1から前記バルブの第2の方向に流し、前記バルブの双方の閉鎖によって流体ダクトの一部にある液体の流れを停止させるようになるのがよい。

20

【0040】

特に好ましい実施態様では、本発明に係るシステムは2対のバルブを備え、そこで、前記バルブの第1対は前記バルブの第2対より高い圧力の供給源に接続するとともに、前記各対は流体ダクトの同一部分に接続し、前記バルブの第1対の双方を開閉する一方、バルブ第2対の双方を閉鎖することによって流体ダクトの一部にある液体を一方向に流し、バルブ第2対の双方を開閉する一方、前記バルブ第1対の双方を閉鎖することにより流体ダクトの一部にある液体を反対方向に流すようにすることができる。

20

【0041】

好ましくは、前記マイクロ流体サブシステムは液体混合のための流体ダクトの蛇行部分を構成している。

30

【0042】

好ましくは、本発明に係るシステムは、検出モジュール、好ましくは、分光光度検出器を備え、液体を有する流体ダクトに放射線ビームを提供する手段、好ましくは導波路と、更に前記液体を通過した放射線の検出器を備える。

【0043】

非常に好ましいのは、前記マイクロ流体サブシステムが使い捨てであることである。

【0044】

また、好ましくは、前記マイクロ流体サブシステムが2またはそれ以上の取り外し可能な接続可能なパーツを備える。

40

【0045】

他の好ましい実施態様では、前記第1バルブ、前記第2バルブ、前記第1流体ダクト、または前記第2流体ダクトが前記マイクロ流体サブシステムと一体となっている。

【0046】

本発明は、接合部で出会う第1流体ダクトと第2流体ダクトとからなるシステムでオンデマンドで微小液滴を提供する方法であって、以下の工程を含み；

- ・ 第1バルブと第1流体ダクトを通して第1液を前記マイクロサブシステムに供給する工程と、

- ・ 第2バルブを通しての第2液と第2流体ダクトとを備える前記マイクロサブシステムを供給する工程とからなり、

前記第1液の流れは第1及び第2流体ダクトの接合部においてマイクロ液滴を発生させる

50

ように制御される。

好ましくは、前記第1流体ダクト(10, 25, 28)のパラメータは X_1 [Pa⁻¹]の値が X_1 [Pa⁻¹] = (0.5 × 10⁻⁹ + 1/E₁) (R₁ L₁² / A₁) で定義され、10⁴ Pa⁻¹より小さくなるように選択されることを特徴とする。

ここで E₁ は第1流体ダクトの材料のヤング率で、L₁ は第1流体ダクトの長さで、A₁ は第1流体ダクトの内腔面積、R₁ は第1流体ダクトの流体抵抗 R₁ を示す式: R₁ = R₁ (L₁ μ / A₁²) における幾何学的構造を特徴づける定数であり、但し、μ は R₁ を測定する第1流体ダクトを満たす流体の動的粘性係数である。

【0047】

好ましくは、本発明方法は、第2液が第2バルブ及び第2流体ダクトを介して前記マイクロ流体サブシステムに供給される工程を備え、

そして第2流体ダクトのパラメータは X_2 [Pa⁻¹] 値が

X_2 [Pa⁻¹] = (0.5 × 10⁻⁹ + 1/E₂) (R₂ L₂² / A₂) で定義され、10⁴ Pa⁻¹より小さくなるように選択される。

ここで E₂ は第2流体ダクト(11)の材料のヤング率で、L₂ は第2流体ダクト(11)の長さで、A₂ は第2流体ダクト(11)の内腔面積、R₂ は第2流体ダクト(11)の流体抵抗 R₂ を示す式: R₂ = R₂ (L₂ μ / A₂²) における幾何学的構造を特徴づける定数であり、但し、μ は R₂ を測定する第2流体ダクト(11)を満たす流体の動的粘性係数である。

【0048】

好ましくは、本発明方法は、更に第2液の流れは第1及び第2流体ダクトの接合部にマイクロ液滴を発生させるように制御される。

【0049】

好ましくは、前記第2液は連続液でマイクロ流体サブシステムのマイクロ流路の壁面を湿润させる。

【0050】

好ましい実施態様では、前記第1液はマイクロ流体サブシステムのマイクロ流路の壁面を湿润させず、第2液と混和しない。

【0051】

このような場合、流体ダクトの接合部を通しての第1液及び第2液の流れによりマイクロ液滴をオンデマンドで発生させ、ここを通して液体が流れようになる。

【0052】

他の好ましい実施態様では、前記第1液は連続液でマイクロ流体サブシステムのマイクロ流路の壁面を湿润させ、さらに第1液及び第2液と混和せず、マイクロ流体サブシステムのマイクロ流路の壁面を湿润させない第3液をシステムに供給する工程を含む。

【0053】

好ましくは、前記第3液はポートを通して流体ダクトに液滴の形態で提供され、該液滴は前記流体ダクトに移動させた後流体ダクトからの流出は停止され、前記流体ダクトへの流入を開放して連続液でポートを満たすようとする。

【0054】

特に好ましくは本発明方法は第1または第2液に懸濁させた第3液の液滴の列をシステムに供給する工程を含む。

【0055】

このような場合、前記第3液と第1又は第2液の流れにより流体ダクト接合部を通してオンデマンドでマイクロ液体を発生させ、流体ダクト接合部を通して前記液が流れる。

【0056】

好ましい実施態様では、前記第1液と第2液は同一液である。

【0057】

好ましくは、本発明に係る方法では、前記第1及び第2液の流れ、選択的に第3液の流れが第1及び第2バルブの開閉により制御される。

10

20

30

40

50

【0058】

このような場合、前記第1及び第2バルブの開閉モーメントが同期される。

【0059】

好ましい実施態様では、前記第1バルブが開放される時、時間間隔の始期及び終期を、前記第2バルブの閉鎖される時の時間間隔の始期及び終期に関連して時間シフトさせる。

【0060】

好ましい実施態様では前記第1バルブを開放されるとき第2バルブが閉じられ、第1バルブが閉じられるとき第2バルブが開放される。

【0061】

好ましくは、本発明に係る方法では、第1及び第2バルブの開放または閉鎖のためにステアリングインパルス間で時間シフトし、第1及び第2バルブに送られる時間は、前記バルブの電気機械慣性を補償又は利用するように選択され、前記バルブが実際に開放又は閉鎖されるときその時間間隔が基本的に同期されるようにする。

10

【0062】

好ましい実施態様のひとつでは、ステアリングインパルスは方形インパルスである。

【0063】

特に好ましい実施態様では、本発明方法は必要な濃度の反応物を有する反応混合物を製造する工程を備え、オンデマンドで発生させる反応物のマイクロ液滴を混和することに行われ、該液滴は必要な体積を有することになる。

20

【0064】

このようなオンデマンドで発生させるマイクロ液滴は、好ましくは0.01nLから100μLの容量を有する。

【図面の簡単な説明】

【0065】

【図1】本発明に係るマイクロ流体システムのマイクロ液滴形成のスキームを示す。

【図2】液体サンプルを導入するポートを備える本発明に係るマイクロ流体システムの一部の断面概要図を示す。

【図3】チューブから液体サンプルを導入するポートを備える本発明に係るマイクロ流体システムの断面概要図である。

30

【図4】液体サンプルの導入のためのポート及びウエルを備える本発明に係るマイクロ流体システムの一部の断面概要図である。

【図5】本発明のマイクロ流体システムにおける所定の放出時間のマイクロ液滴の生成および液体サンプルのシステムに初期に付着させた液体サンプルがらの容量の生成のための概要ダイアグラムを示す。

【図6】本発明に係るシステムで、混和しない相の双方の流れの制御によりマイクロ液滴を形成するプロセスにおけるバルブを制御する一連の信号の概略を示す。

【図7】液滴液体を制御するバルブが開放されている間隔の関数として本発明のシステムにおけるマイクロ液滴の容量を示すグラフであって、スチールキャピラリーを備えるシステムとシリコンゴムキャピラリーの性能を比較するものである。

40

【図8】本発明に係るシステムの一つの概略図で、二種の液体サンプルからマイクロ液滴を形成し、これらのマイクロ液滴を結合させるのに使用される。

【図9】本発明に係るシステムのもう一つの概略図で、試薬の添加の二段階を行うために使用され、マイクロ液滴の内部で試薬の結果を監視するために使用される。

【図10】本発明に係るシステムの一つの概略図で、一連のマイクロ液滴の列を検出器のウインドウを通過させ、前記ウインドウ内でマイクロ液滴の列のいくつかを停止させるためのものである。

【図11】本発明に係るシステムの一つで、検出器のウインドウを通して前後して通過する一連のマイクロ液滴の列のいくつかのマイクロ液滴で多数の測定を行うように使用するものである。

【図12】本発明の実施態様において100Hzの速度でバルブを通して大きな貯槽から供

50

給される液体で形成されるマイクロ液滴の容量及び標準偏差を示すグラフである。

【図13】本発明の実施態様において、生成させる周波数の範囲でバルブを通して大きな貯槽から供給される液体から形成されるマイクロ液滴の容量及び標準偏差を示すグラフである。

【図14】マイクロ流体チップに付着した少量の液体サンプルからマイクロ液滴を生成する実施態様でのマイクロ液滴の容量を示すグラフで、サンプルの流れを制御するバルブの開放する間隔の長さに対する容量の関係がリニアに適合するのを示す。

【図15】三種の異なる化学組成のマイクロ液滴のパケットをオンデマンドで同時に生成させ、これらのパケットを混合物に混和させるシステムの概略図で、グラフは反応混合物の2種の成分の濃度のスクリーンを示す。

【図16】化学反応物の反応速度を決定するための本発明に係るシステムの概略図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0066】

以下に本発明の実施態様を添付図面を参照して説明する。

本発明においてはマイクロ液滴はマイクロ流体システム内で形成される。該システムは液体の輸送のための少なくとも2本の相互接続した流路を備える。制限を加えるものでないが、実施例では流路は数十マイクロメータ、数百マイクロメータから1ミリメータまで幅及び高さを有する。

【0067】

本発明の実施形態ではマイクロ液滴はマイクロ流体チップ1内で生成され、該チップ1は流路2を備え、マイクロ液体流路を湿潤させる連続液体をガイドする。また、相互接続する流路3を備え、連続液体と混和しないで分散させ、マイクロ流体流路を湿潤しない液体の流れ(ストリーム)か、又は連続液体に懸濁する湿潤性連続液体と混和しない非湿潤性液体の懸濁サンプルのいずれかをガイドする。

【0068】

前記連続液体は入口ポート4を介してチップに注入される一方、システム内で生成されるマイクロ液滴は出口流路5を通して出口ポート6に流れる。

【0069】

本システム及び方法の一つの変形ではチップ1は選択的ポート7を含まず、マイクロ液滴内に分散させる液体は供給源12からバルブ14および流体ダクト10を通してポート9および接合部8への流路3に送られる。本システムおよび方法の第2の変形では、マイクロ液滴に分散させる液体は少量のサンプルの形式でチップ内にポート7を介して付着させる。液体サンプルのポート7を介しての挿入後このポートは閉鎖され、液体サンプルは供給源12からバルブ14、流体ダクト10およびポート9を介してシステムに注入される連続液体の流れを使用して接合部8に押し込まれる。

【0070】

本発明のシステムでのモジュールに適するマイクロ流体チップは弾性定数の広い範囲により特徴付けられる材料の範囲で組み立てることができる。限定するものでないが、実施例ではチップはポリジメチルシリコサン(PDMS)又はポリカーボネイト(PC)で製造することができる。

【0071】

好ましくは、マイクロ流体システムは電気信号を使用してマイクロ流体システムへのこれらの液体の流入を制御できるように液体が供給される。本発明の好ましい実施態様では、

マイクロ流体チップに流体ダクト10及び11を介して供給し、一定の体積流量12及び13で液体を加圧容器から導く。本発明の好ましい実施例では、電気的に制御されるバルブ14および15は加圧容器12及び13およびキャピラリー10及び11間の流体路に配置される。

好ましくは、制限する形式でないが、マイクロ流体システムの出口は大気圧16に流体接続部17及び電気的に制御されるバルブ18を介して連結することができる。

【0072】

10

20

30

40

50

好ましくはポート 9及び 4に送られる液体は、液体の流れがスイッチオンしている間隔の間は その流量は一定であるのが有効的である。好ましい実施態様では、バルブ 14 および 15の入口ポートは 液体貯槽に接続され、その圧力はマイクロ流体 システム 1の圧力より大きく、一定に維持される。更に、好ましい実施態様では、バルブ 14及び 15の出口は流体ダクト10及び 11に接続され、そこでは大きな液圧抵抗を特徴としている。

【 0 0 7 3 】

本発明の好ましい実施態様ではマイクロ液滴はオンデマンドでtopenの間隔の長さで制御される容量で形成され、そのtopen間隔ではマイクロ液滴内に分散される液体の流れを制御するバルブ 14 は開放されている。

【 0 0 7 4 】

本発明によれば、マイクロ液滴を単一nLから単一 μ Lの典型的な大きさを有する容量に渡り正確に制御され、Hzから数百Hzに渡る周波数で生成するためのシステム 1の使用には流体ダクト 10及び 11 の寸法及びダクトを製造する材料の適切な選択が必要である。

【 0 0 7 5 】

流体ダクト 10及び 11の マイクロ液滴の最小容量 Vmmを精度 ESVで且つ周波数 fで生成するための寸法および様式を適切に選択するためには、次の基準を考慮すべきである：

- (1)ダクト10及び 11内の液体の流れの切り替えに必要な最小間隔
- (ii) ダクト10 及び11 の、液圧抵抗のi) バルブ 14 及び15の入口の液圧抵抗比率、及びii) マイクロ流体 チップ1の液圧抵抗に対する比率
- (iii) ダクト10 及び11の液圧コンプライアンス

【 0 0 7 6 】

ダクト (e.g. ダクト 10) を満たす何れの液体も慣性を有する。このようなダクト内でこのような液体の流れを開始するには次の関係により見込まれる一定時間を必要とする。

$$\text{関係式 : } t = r^2 / (\lambda^2 v)$$

ここで、r はダクトルーメンの半径, $\lambda = 2.4048$ は第 1 種のベッセル関数の第 1 根、vは液体の動的粘性係数である。

ダクトが非円形、コンパクトな断面 (e. g. 矩形の幅の高さに対するアスペクト比が 1/2 より大きく、2以下で、同一の式が近似として使用できる。

【 0 0 7 7 】

マイクロ液滴の周波数fでの生成には tは1/f 値より小さい、好ましくはtは 1/f 値よりずっと小さいのがよい。本発明の好ましい実施態様では流体ダクトを備え、可能なだけ小さい断面であることを特徴とする。この式はダクトを満たす比較的大きい粘性の液体は比較的短いリラックス時間を与える。例えば、低粘性の水性サンプルの下方流の流れを制御するためにはバルブ及びダクトを通して駆動されるオイルを使用する方法が好ましい。

【 0 0 7 8 】

例えば、内径 1 mmの流体ダクトであって、このダクトに水を満たす場合、慣性時間 $t = 43.2 \text{ ms}$ はマイクロ液滴を形成する有効な周波数を单一Hertz のものに制限する。本発明の好ましい実施例の実験ではダクト 10 の内径は200 pm に等しく、水の慣性(inertia)時間 $t = 1.73 \text{ ms}$ を与え、1 0 の位 Hertzの周波数で、システムがマイクロ液滴を形成するのを可能とする。本発明の好ましい実施例ではダクト 10の内径は50 pmに等しいと、水に対する慣性時間 $t = 0.11 \text{ ms}$ を与え、システムが百台の Hertzでマイクロ液滴を形成することができる。

【 0 0 7 9 】

本発明の好ましい実施例ではバルブ (e.g. バルブ 14)はデッド容量が大きいことを特徴としており、すなわち. μ L又はmLの容量を特徴とし、この容量をバルブ閉鎖のバルブ部材の動きによりバルブの出口に押し出す。マイクロ流体チップに上記デッド容量の注入を回避するために、マイクロ流体チップ 1のバルブ 14に接続するダクト 10の液圧抵抗 Routはバルブ 14と圧力 P_{valve} で液体を保有する容器の間の流体接続部の液圧抵抗Rinよりかなり大きくするべきである。次の記載ではRout/Rin > 100と想定する。.

【 0 0 8 0 】

10

20

30

40

50

一定のダクト(i.e. 断面はダクトの長さに沿っては変化しない)の液圧抵抗は次のように説明される:

$$R = (\frac{L}{A^2}) \mu$$

ここで、Lはダクトの長さで、Aはダクトの内腔(ルーメン)面積、 $\frac{L}{A^2}$ はダクトの内腔に依存する定数であり、 μ はダクトを満たす流体の動的粘性係数である。その $\frac{L}{A^2}$ 値はダクトを満たす液体のパラメータに依存せず、当業者には円形パイプでは $\frac{L}{A^2} = 8$ であることが知られている。他の断面の値は例えば(Mortensen等著, Phys. Rev. E 71, 057301 (2005))に記載がある。

【0081】

バルブの上流と下流の接続部の双方が基本的に円筒ダクトで、長さが L_{in} と L_{out} で内腔半径が r_{in} 及び r_{out} であると、 $Rout/Rin$ 比 $= (r_{in}/r_{out})^4 (L_{out}/L_{in})$ となる。更に、 $r_{in} = 1$ mm, $r_{out} = 100$ pm, $L_{in} = 10$ mmの場合、マイクロ流体チップ1のバルブ14と接続するダクト10の最小長さは $L_{out} > 100$ pmである。

【0082】

本発明の好ましい実施態様ではマイクロ流体チップに液体を配達するシステムは、マイクロ流体チップ内の流路の内容に依存しない速度で液体を配達すべきで、マイクロ流体チップは数十 μ mから単一mmの幅の範囲の種々の断面の流路を備えることができる。マイクロ流体システムは μ mの断面の流路を備えることができるので、典型的なマイクロ流体システムはキャピラリーが内径100 μ mの液圧抵抗と同等の液圧抵抗を有すると見積もるのが有益な想定である。このようなキャピラリーは単位長さ当たり同様の液圧抵抗を有する。かかる観点では、キャピラリーがバルブをマイクロ流体チップに接続するとして、流体ダクト10はマイクロ流体チップ内の流路の長さの少なくとも100倍とすべきである。典型的な流路の長さはマイクロ流体チップ上では数mmであるとすると、キャピラリー10内の流路は $L_{out} > 100$ cmとすべきで、本発明の具体例ではマイクロ流体流路は典型的には200pmより広く(高く)、内径200 pmのキャピラリー10の長さは数十cmの範囲にある。

【0083】

本発明の好ましい実施態様では、オンデマンドでマイクロ液滴を形成するマイクロ流体システムは追加の出口20を備え、接合部8の下流にあり、ポート21、流体ダクト22およびバルブ23を介して大気圧の貯槽24に接続する。さらに出入口20はマイクロ液滴の形成工程中、接合部8および大気圧の貯槽24間を流れる液圧抵抗を減ずるために使用できる。オンデマンドでマイクロ液滴を形成する方法はマイクロ液滴形成の間隔中、バルブ23を開放させ、キャピラリー10の液圧抵抗 $Rout$ の、接合部8の下流の液圧抵抗に対する比率を、マイクロ流体チップ内の流体流路の内容物とは有効的に独立させ、特に出口流路5内の内容物とは独立させる。

【0084】

生成されるマイクロ液滴への所定の液体を投与する精度はマイクロ流体チップのバルブに接続する流体ダクトの全液圧コンプライアンスCにより制限される。この全液圧コンプライアンスCは以下のように計算される:

$$C = C_f + C_c,$$

ここで、 C_f はキャピラリーを満たす液体の圧縮率と関連する液圧コンプライアンスを示し、 C_c はキャピラリー壁の弾性と関連する液圧コンプライアンスを示す。

【0085】

液圧コンプライアンスはキャピラリーの弾性コンプライアンスおよびキャピラリーを満たす液体の圧縮率の物理量を示す。もし p_0 の圧力に維持されたキャピラリーが容量 V_0 の液体で満たされ、キャピラリーが $p_1 = p_0 + \Delta p$ の圧力に維持された同一の液体の容器に接続されると、キャピラリーに追加の液体が流れる。その後圧力 p_1 に維持された加圧容器と接続するキャピラリーの接続部が閉鎖され、キャピラリーが圧力 p_0 に維持された第2貯槽に接続されると、容量 V の液体がキャピラリーから第2貯槽に流れる。 V は数字的に次のように見積られる:

$$V = P (C_f + C_c)$$

10

20

30

40

50

【0086】

バルブ 14又は15が拡張された間隔 t 内に閉鎖された後流体ダクト10又は 11 から容量 V が押し出されるのが観測されるべきである。流体ダクトの収縮性壁および圧縮された液体により与えられる圧力差はバルブ 14 又は15の閉鎖後の液体の出力流れの速度 p (バルブが解放されている時と等しいか小さい) と等しいか 小さくなる。このように V の大きさは 間隔 t_{open} の制御により投与させるマイクロ液滴の精度及び最小間隔 (新しいマイクロ液滴の生成が始まる前に次のマイクロ液滴がダクト 10又は11から押し出される最小間隔) の双方を制限する。本発明の好ましい実施態様では次のマイクロ液滴の生成の間の間隔の最大制限はマイクロ液滴 の形成の典型的な間隔(t_{open})又はマイクロ液滴の形成の予期される周波数 (f) の逆数より大きくすべきでない。

10

【0087】

液体の圧縮率と関連する液圧コンプライアンス C_f はキャピラリーを満たす液体の種類に依存する。数字的には液圧コンプライアンス C_f は液体の圧縮率に関連し、
 $C_f = V_0 * r$ と見積られる。ここで、 r はキャピラリーを満たす液体の等温圧縮率を示す。

【0088】

特に、ガスの等温圧縮率の大きさが非常に大きい場合、本発明の好ましい実施態様では、キャピラリー内での気泡の存在を避けなければならない。本発明の具体例では流体ダクト内に液体サンプルを付着(投与)させることを可能とし、その後 液体サンプルの動きを起こさせ、非混和性連続相を気泡の導入なく、流体ダクト内に 流入させることができる。

20

【0089】

ほとんどの液体の等温圧縮率係数の大きさは 同様で、水の等温圧縮率係数は、通常の状態で 約 $5 \times 10^{-10} [\text{Pa}^{-1}]$ である一方、ほとんどのアルカン類及びオイル類の等温圧縮率係数は 約 $5 \times 10^{-10} [\text{Pa}^{-1}]$ と 約 $12 \times 10^{-10} [\text{Pa}^{-1}]$ の間にある。

【0090】

液圧コンプライアンス C_c はキャピラリーの弾性と関連し、キャピラリーが構成される材料の物性に依存し、特に、材料のヤング率 (E) 及びポアソン比()に依存し、そしてキャピラリーの幾何学形状、特に、その長さ(L)、キャピラリー内腔半径 (r)、キャピラリー壁の幅 (h) に依存する。キャピラリーが厚い壁 ($h > r$) を備えるためには液圧コンプライアンス C_c は次のように見積もられる:

$$C_c = 2V_0 \cdot (1 + \frac{r}{h}) / E.$$

30

他方、キャピラリーが薄い壁を備える場合 ($h < r$)、同じコンプライアンスが次のように見積もられる:

$$C_c = 2V_0 \cdot (r / h) / E.$$

ここで、キャピラリー容量は $V_0 = r^2 \cdot L$ で示される。本発明の主題は液圧コンプライアンスを減少させることにあるが、我々は厚い壁(図示せず)を備える流体ダクトの使用を考えており、円形断面と非円形断面(マイクロ流体システムに対し典型的に矩形断面)のダクトを含む。

40

【0091】

コンプライアンス C_c 及び C_f 関係を挿入すると、バルブの液体の圧力 p の減少時にキャピラリーから押し出される容量 V の式が得られる。

$$V = pV_0 \cdot r + 2V_0 \cdot (1 + \frac{r}{h}) / E = V_f + V_c$$

減少する圧力 p 時のキャピラリーから押し出される容量は寄与 V_f を有し、液体の圧縮率と関連し、 V_c はキャピラリーの壁の弾性と関連する。

【0092】

1 本発明によれば、マイクロ液滴 形成のプロセスはダクト 10 内の流れを制御するバルブ 14が閉じられると共に始まり、ダクト 10内の圧力が マイクロ流体チップ1の圧力 (P_{chip})に等しくなる。バルブ 14が開放されると、キャピラリー10を通して液体が流れ始める。良好に仮定すると、キャピラリー10内の圧力はキャピラリーの入口の値 P_{valve} とキ

50

キャピラリーの終端の値 P_{chip} の間で直線的に変化する。コンプライアンスの効果は局部圧力に比例するから $p = P_{valve} - P_{chip}$ でもって全ダクトに収容される容量と平均圧力変化($p/2$)を見積もることができる。キャピラリーは追加の容量を収容する:

$$V = V_f + V_c$$

ここで、 $V_f \sim (p/2)V_0$ 、 $V_c \sim pV_0(1 + \dots)/E$ である。

また、バルブ 14 の連続する閉鎖後キャピラリーの圧力は P_{chip} に減少し、キャピラリーからマイクロ流体チップに容量 V が押し出される。

【0093】

次の分析において、マイクロ液滴の一定の容量を投与するに精度 1 % を維持するためには、容量 V はシステム内で生成されるマイクロ液滴の最小容量 V_{min} の 1 % を超えるべきでないと想定される。同様に投与されるマイクロ液滴の 10 % の精度を維持するためには、容量 V はシステム内で生成されるマイクロ液滴の最小容量 V_{min} の 10 % を超えるべきでない。キャピラリーの弾性と関連するキャピラリーの全コンプライアンスへの寄与を次に分析する。コンプライアンス C_c の制限は液体の圧縮率と関連するコンプライアンス C_f のそれよりも制限的であり、コンプライアンス C_f はマイクロ液滴を生成するシステムの精度を決定する。数字的には 2 つの寄与の重要性は値 $(1/E_{min})$ と値 t を比較して評価することができる。ここで、 E_{min} はマイクロ液滴の容量を投与する一定の精度のために要求されるヤング率の最小値を示す。もし、 $1/E_{min}$ の値が t の値より小さいなら、マイクロ液滴を投与する最大の精度は液体の等温圧縮率により制限される。

【0094】

次の必要な寸法およびキャピラリーの弾性特性の計算において、システムにおける生成されるマイクロ液滴の異なる最小容量: $V_{min} = 1 \text{ nL}$, 10 nL , 及び 100 nL を想定する。また、簡易化のため、液体の等温圧縮率を $t = 1 \times 10^{-9} [\text{Pa}^{-1}]$ とする。マイクロ液滴の投与における必要な精度が 1% であると、バルブ閉鎖時のキャピラリーから押し出される容量の最大許容値は、 $V_{max} = V_{min}/100 = 0.01 \text{ nL}$, 0.1 nL 及び 1 nL である。

【0095】

キャピラリー 10 がキャピラリー内の流れを切り替えるに必要な、上述した短い慣性時間 t を与えるという観点において、キャピラリー内腔の半径は $50 \mu\text{m}$ と想定する。キャピラリーの液圧抵抗をマイクロ流体チップ 1 の液圧抵抗より大きくすべきあるという観点では、キャピラリーの長さは $L = 5 \text{ cm}$ と想定する。

【0096】

計算の簡略化のため、

ホ・アソン比は 0.4 としてヤング率の最小値のための次の近似式を得、必要な精度を与える。

$$E_{min} = 1.4 * V_0 * p / V_{max},$$

$p = 5$ バールの実施例では:

$$E_{min} = 27.489 \text{ GPa} \quad (V_{min} = 1 \text{ nL}); 1/E_{min} = 0.04 \times 10^{-9} \text{ Pa}^{-1}$$

$$E_{min} = 2.749 \text{ GPa} \quad (V_{min} = 10 \text{ nL}); 1/E_{min} = 0.36 \times 10^{-9} \text{ Pa}^{-1}$$

$$E_{min} = 0.275 \text{ GPa} \quad (V_{min} = 100 \text{ nL}); 1/E_{min} = 3.6 \times 10^{-9} \text{ Pa}^{-1}$$

$p = 0.5$ バールの実施例では

$$E_{min} = 2.749 \text{ GPa} \quad (V_{min} = 1 \text{ nL}); 1/E_{min} = 0.36 \times 10^{-9} \text{ Pa}^{-1}$$

$$E_{min} = 0.275 \text{ GPa} \quad (V_{min} = 10 \text{ nL}); 1/E_{min} = 3.6 \times 10^{-9} \text{ Pa}^{-1}$$

$$E_{min} = 0.027 \text{ GPa} \quad (V_{min} = 100 \text{ nL}); 1/E_{min} = 36 \times 10^{-9} \text{ Pa}^{-1}.$$

$p = 0.05$ バールの実施例では:

$$E_{min} = 0.275 \text{ GPa} \quad (V_{min} = 1 \text{ nL}); 1/E_{min} = 3.6 \times 10^{-9} \text{ Pa}^{-1}$$

$$E_{min} = 0.027 \text{ GPa} \quad (V_{min} = 10 \text{ nL}); 1/E_{min} = 36 \times 10^{-9} \text{ Pa}^{-1}$$

$$E_{min} = 0.003 \text{ GPa} \quad (V_{min} = 100 \text{ nL}); 1/E_{min} = 360 \times 10^{-9} \text{ Pa}^{-1}.$$

【0097】

上記結果は材料の範囲を一義的に制限するものでなく、マイクロ流体チップ 1 とバルブ 14 とを連結するキャピラリー 10 を製造することができる。

10

20

30

40

50

いくつのかの弾性パラメータを以下の表1に示す。

【0098】

【表1】

	シリコングム	テフロン	ポリエチレン	PEEK	ガラス	スチール
ヤング率E(GPa)	0.002	0.5	2	3.6	50—90	210
ポアソン比 σ [-]	0.5	0.45	0.4	0.4	0.2—0.3	0.3

10

20

30

40

50

【0099】

上記結果から、およそ5バールの圧力で維持される貯槽からマイクロ液滴を供給されるシステムに対し、1nLより小さいマイクロ液滴を生成し、1%の容量精度とするためには、ガラスまたはスチールでキャピラリーを製造する必要がある一方、10nLより小さいマイクロ液滴の生成のためにはポリエチレン、PEEKのような硬質ポリマーで、ガラスまたはスチールでキャピラリーを製造する必要がある。また、同様に100nLより小さいマイクロ液滴の生成のためには大きいものを含め、上記実施例からキャピラリーの弾性特性はマイクロ液滴の、同等の精度の生成には同一の材料(硬質ポリマーで、ガラスまたはスチール)で製造できる。上記実施例からキャピラリーの弾性特性は約10nLより大きい容量のマイクロ液滴の生成精度に有意量の影響を有するのは明らかである。

【0100】

また、上記結果から、およそ0.5バールの圧力で維持される貯槽からマイクロ液滴を供給されるシステムに対し、1nLより小さいマイクロ液滴を生成し、1%の容量精度とするためにはPEEKのような最硬質のポロマー、ガラスまたはスチールでキャピラリーを製造する必要がある一方、10nLより小さい又は100nLより小さいマイクロ液滴の生成のためにはテフロン、ポリエチレン、PEEKのようなポリマーで、又はガラスあるいはスチールでキャピラリーを製造する必要がある。上記実施例からキャピラリーの弾性特性は約1nLより大きな容量のマイクロ液滴の生成の精度に有意量の影響を有するのは明らかである。

【0101】

また、上記結果から、およそ0.05バールの圧力で維持される貯槽からマイクロ液滴を供給されるシステムに対し、1nLより小さい又は10nLより小さいマイクロ液滴を生成し、1%の容量精度とするためにはPEEKのような最硬質のポロマー、ガラスまたはスチールでキャピラリーを製造する必要がある一方、10nLより小さい又は100nLより小さいマイクロ液滴の生成のためにはテフロン、ポリエチレン、PEEKのようなポリマーで、又はガラスあるいはスチールでキャピラリーを製造する必要がある。上記実施例からキャピラリーの弾性特性は約1nLより小さいかまたは大きい場合を含め、考えられる全ての容量のマイクロ液滴の生成の精度に有意量の影響を有するのは明らかである。

【0102】

以下に、マイクロ流体チップとバルブとを連結する流体ダクトの全液圧コンプライアンス、 $V_{min}=1nL$ のマイクロ液滴の生成、マイクロ液滴の容量の精度1%では液圧コンプライアンスは $10^{-18}m^3/Pa$ より小さく、他方 $V_{min} 10 nL$ では $C < 10^{-17}m^3/Pa$ 、 $V_{min} 100 nL$ では $C < 10^{-16}m^3/Pa$ 。同様に $p = 1$ バールでは、 $V_{min} 1 nL$ で $C < 10^{-19} m^3/Pa$ 、 $V_{min} 10 nL$ で $C < 10^{-18} m^3/Pa$ 、 $V_{min} 100 nL$ で $C < 10^{-17} m^3/Pa$ 。同様に $p = 10$ バールでは、 $V_{min} 1 nL$ で $C < 10^{-20} m^3/Pa$ 、 $V_{min} 10 nL$ で $C < 10^{-19} m^3/Pa$ 、 $V_{min} 100 nL$

で $C < 10^{-18} \text{ m}^3/\text{Pa}$ となる。

【0103】

さらに本発明に係るシステムのデザインのガイドラインを供給するために、液圧コンプライアンスの効果により流体ダクトから押し出される容量はおよそ次のように示される。

$$V = pA L$$

ここで、 p はバルブ上流の P_{valve} とマイクロ液体チップの圧力 P_{chip} の差であり、 A はマイクロ流体流路でバルブと接続する流体ダクトの断面積で、 L は上記ダクトの長さ、

はダクトのコンプライアンスを示す近似された定数で、

$= (t/2) + (1 + \dots)/E$ である。 t は通常の状態ではほとんどの液体で同様であり、材料の広い範囲で 20% 以下の範囲で変化し(スチールで 1.3、シリコンゴムで 1.5)、単位の 50% 以下であるので、簡略化のため、 $= 1.5 \times 10^{-9} + 1/E$ と見積もられる。 10

ここで E は Pa の単位で示され、 $= \text{Pa}^{-1}$ の単位で示される。さらに、

オンデマンドで生成されるマイクロ液滴の最小容量 V_{min} に対する V の比率は実際的に興味あるもので、

$$V_{\text{min}} = t_{\text{open}} Q = t_{\text{open}} p/R = t_{\text{open}} A^2 / \mu L$$

そのとき、比率 V/V_{min} は次のように簡略化される：

$$(V/V_{\text{min}}) = (L^2/A) (\mu / t_{\text{open}})$$

ここで L は液圧ダクトを特徴つけるパラメータであり、 μ 及び t_{open} は方法のパラメータである。本発明の好ましい実施態様では t_{open} は 1s より大きくないと算定され、より好ましくは 100ms、最も好ましくは 10 ms と算定される。動的粘性係数は 100 mPa、10 mPa または 1 mPa (水溶液では) と算定する事ができる。 20

【0104】

マイクロ液滴の形成周波数の過剰に制限しないように、比率 V/V_{min} は 1 より小さくすべきであるからマイクロ流体流路にバルブを接続する流体ダクトの簡単な条件に上記考慮を集めることができる：

$$R L^2 / A = (0.5 \times 10^{-9} + 1/E) (L^2 / A) < [\text{Pa}^{-1}]$$

ここで、 $= (V/V_{\text{min}})(t_{\text{open}} / \mu)$ である。

上記 t_{open} 及び μ の値を挿入すると、 $= 10^4 \text{ Pa}^{-1}$ 、好ましくは $= 10^3 \text{ Pa}^{-1}$ 、より好ましくは $= 100 \text{ Pa}^{-1}$ 、最も好ましくは $= 10 \text{ Pa}^{-1}$ が得られる。 30

【0105】

図 1 内に点線で示された領域 19 はマイクロ流体チップ 1 内に多くの液体サンプルを導入することを可能とする。領域の断面の詳細は図 2 の断面概略図に示され、マイクロ流体チップ 1 は流路 3 を含み、該流路には連続液体 26 がポート 9 を介して供給される。.

この連続液体は液体の加圧容器から液圧ダクト 28 を介して図示しない電気制御機によって制御されているバルブ 29 から送られ、バルブが開放されると、上記液体の有効な一定量が得られる。好ましくは、流路 3 の出口がマイクロ流体チップ、又は他のマイクロ流体チップに流体ダクトを介して接続されると、流路 3 を通してバルブ 31 によって液体流れを制御することができる。バルブは液圧ダクト 32 上に位置し、該ダクトは大気圧力 33 の貯槽を備えるマイクロ流体チップに接続している。好ましくは流路 3 は追加の入口ポート 7 を備え、ピペット先端 35 の終端をマイクロ流体チップ内に挿入することを可能とする。本発明の好ましい実施態様では、マイクロ流体チップの流体ダクトはまず、連続する、湿潤液体 26 で入口ポート 9 を介して満たされ、その後、連続液体の流れをバルブ 29 を介して停止させる。その後ピペットの先端の終端をポート 7 に差し込む。好ましくはこのピペットの先端は、少なくとも連続液体 26、37 と混和せず、非混和性連続液体に懸濁している少なくとも一つの液体サンプル 36 を含む。バルブの制御により流路 3 からの出流 (例えば 31) を制御することによってピペット先端 35 の懸濁液体サンプルは流路に移送され、移送後はサンプル 36 はポート 7 の下流 38 に位置する。好ましくは液体サンプル 36、38 が流路内に移送され、流路 3 からの出流が閉じられ、そして流路 3 内への流入が開放されると、連続液体 26 でポート 7 が満たされ、気泡のトラップが回避される。本発明の好ましい実施例ではピペット先端 35 からのサンプル 36 の流路 3 への移送操作は、必要な液体サンプル 38 40

の列が流路3内に供給されるまで繰り返すことができる。好ましくは、液体サンプルの流路3内への供給が終わると、ポート7はきっちりと閉鎖され、連続液体26の流れによってサンプルの列を移送させることができる。この連続液体は入力（例えば29）と出力（例えば31）バルブの状態を制御する図示しない電気制御器からの信号を使用して制御される。

【0106】

本発明の他の好ましい実施態様ではピペット先端35は非混和性の連続液体中に分散させた液体サンプルを含むチューブで置き換えられる。チューブから流路3への液体サンプルの列の移送は上述したピペットからの移送と同様に行われる。

【0107】

本発明の好ましい実施態様（図3）ではマイクロ流体チップ34は液体サンプルの供給のための追加の入口ポートを含まない。このような実施形態では混和しない連続液体37に懸濁させた液体サンプル36を含むチューブ39が液圧ダクト28とマイクロ流体チップ34との間に液圧的に直列に接続される。

10

【0108】

本発明の好ましい実施形態（図4）では上記チップに液体サンプルを供給するマイクロ流体チップのセクションはウエルの形態の入口ポート40を備える。好ましくはマイクロ流体チップの出口は少なくとも貯槽41と液圧ダクト42及び電気制御バルブを介して接続し、大気圧より低い圧力となっている。好ましい実施形態ではウエル40とともにマイクロ流体チップのダクトは入口ポート45を介して連続液体でまず満たされ、連続液体の流入は電気的に制御されるバルブ46を使用して停止される。その後、上記連続液体に混和しない液体サンプル47はウエル40に供給される。このサンプルがウエル40とダクト48の接続部のルーメンを十分に覆うならバルブ43を開放することにより次のものがダクト内に引き込まれる。その後マイクロ流体チップからの流出は停止され、ウエルは連続液体44によってバルブ46により再充填される。液体サンプル47はダクト48内へそして地点49への供給及び移送の操作は図4に概略が示されるように液体サンプルの列がダクト48内に供給されるまで繰り返すことができる。

20

【0109】

本発明の好ましい実施態様では、マイクロ流体チップに供給された液体サンプルは後に液体供給源として使用され、オンデマンドでの液滴の形成、所定放出回数で、所定容量でのマイクロ液滴の形成に使用される。図5の具体例では、入口ポート52から流路51内に供給されるサンプル50はポート53からチップ内に流入し、その後ポート53を介してチップ内に流入する連続液体の流れによって押されることになる、流路51はマイクロ液滴内に分散させる液体サンプル50を含み、流路61で上記流路を連結する液圧接合部54に導き、流路61は入口ポート55からの連続液体をガイドする。好ましい実施例では、選択的に検出器56は接合部の上流の流路51に配置される。検出器56は図示しない電子機器にマイクロ流体チップの所定の位置での液体サンプルの存在を伝達する。好ましい実施例で、限定するものでないが、前記検出器は光学センサー又は電気的センサーで、このような好ましい実施例ではチップへの液体の流入を制御するバルブに対し信号のプロトコールを実行し、接合部への液体サンプル63の前方を前進させる。液体サンプル63の前方を接合部54に前進させると電子機器は電気信号のプロトコールをバルブに送り、流路51内のサンプル50の懸濁液の流れ及び流路61内の連続液体64の流れを制御し、出口流路60内に液滴を生成させる。

30

【0110】

本発明の好ましい実施形態では位相不一致（out of phase）であるが、マイクロ液滴の生成はサンプル液体63の接合部及び出口流路60の流入と、連続液体64の接合部54および出口流路60への流入からなる。

40

【0111】

図6は液体サンプル50の懸濁液の流れと連続液体64の流れを制御する電気信号のスキームを示し、所定の容量の広い範囲内でマイクロ液滴の生成に使用される。本発明に従って液体50及び60の接合部54内への流入を制御するバルブの状態は一時的变化の電気信号65及び66（図7）によって決定される。好ましくは信号65及び66は有効に位相不一致（out of

50

phase) であって、すなわち、間隔69内で液体50の流れを制御してマイクロ液滴内に分散させる信号がゼロでない(バルブ開放)とき、連続相64、の流れを制御する信号65はゼロとなる(バルブ閉鎖)ことを意味する。好ましくはマイクロ液滴ば形成プロセス間隔69を含み、その間隔内で液体サンプルは流れ、接合部62に前方を有するサンプル63は流路60内に流入し、成長するマイクロ液滴を形成する。所定の位相関係では有効的に、間隔67中連続相64の流れは停止される。サンプル液体63が流路60を通過した後、マイクロ液滴は所望の容量に達し、電子ユニットは間隔70を切り替え、その間隔中分散される液体50および63の流れは停止され、間隔68に有効に同期してその間隔中連続相64が流れ、生成されるマイクロ液滴を切斷し、出口流路60の下流に運ぶ。本発明の好ましい実施形態では間隔69は間隔67に対して時間的に間隔の開始時には一時的にシフト71を以って、間隔の終期には一時的シフト72を以ってシフトさせることができる。このシフト71および72は正または負の値を持ってもよいし、ゼロに等しくてもよい。好ましい実施形態では、シフト71及び72を選択し、ステアリング信号65及び66の値の変化に対しバルブの反応の一時的な遅れを補償または利用させる。これにより接合部62への2つの液体の流入を制御するこのバルブの状態の変化は有効に同期される。

【0112】

図7は図5で示すと同様のシステムにおいて発生させる液滴の体積の値を示す。この実験的システムにおいては、すべてのマイクロ流体チャンネルは200×200マイクロメーターの公称寸法の均一な正方形断面を有する。この実施例のシステムでは、マイクロ流体チップに液体が電磁ソレノイドバルブ、大きな絵気圧抵抗を特徴とするキャピラリーを介して、供給される。分散される液体の貯槽に適応される圧力は50ミリバールに設定された。第1実験ではバルブはマイクロ流体チップと内径200 μm 長さ100cmのスチールキャピラリーを介してマイクロ流体チップに接続された。第2実施例ではキャピラリーはシリコンゴムで製造され、内径190 μm であって長さ74cmであり、上記スチールキャピラリーとして流れる同様の液圧抵抗が存在した。スチールキャピラリーの液圧コンプライアンスは $C_K = 3.89 \times 10^{-19} \text{ m}^3/\text{Pa}$ に等しく、シリコンゴムの液圧コンプライアンスは $C_K = 3.15 \times 10^{-14} \text{ m}^3/\text{Pa}$ に等しい。図7に示すグラフは本発明によって構成されたシステムがスチールキャピラリーを備え、マイクロ液滴の容量を正確にコントロールする限り、シリコンゴムのキャピラリーを備える第2システムは満足な精度を与えないを明示している。

【0113】

図5のシステムを使用すると、マイクロ液滴の長い列を形成し、出口チャンネル60または、外部液圧ダクトは出口ポート57を介してマイクロ流体チップと連結し、追加の出口チャンネル62を利用して出口ポート58に導き、マイクロ流体チップの圧力より低い圧力または大気圧の貯槽に液圧的に接続される。ポート58を通しての流出を開放すると、マイクロ流体チップの抵抗チャンネル60の内容物と独立してまたはポート57を介してチップに連結した他の液圧ダクトと独立して抵抗を形成する。好ましくはポートを通しての流出は接合部62においてオンデマンドでマイクロ液滴の生成中だけ開放される。

【0114】

本発明の好ましい実施形態においてはオンデマンドで形成されるマイクロ液滴は反応混合物または培養混合物を形成するために後で使用される。図8は反応混合物を形成するために使用できるマイクロ流体システム83の設計を示す。このシステムは2つ接合部73,74を備え、独立してオンデマンドでチャンネル75および76に導入されるサンプルからマイクロ液滴を形成する。一旦形成されるとマイクロ液滴は接合部73および74から接合部77に流れる。そこでマイクロ液滴が結合される。好ましくは制限しない形態でマイクロ液滴の混合は接合部77又はその下流に配置したエネルギー源からのエネルギーの入力により刺激されてもよく、例えば一定または変化する電界を適用することによって、そして液体の流れに平行又は垂直であるか又はその間の角度をもって適用することによって行われる。たとえば電界は2つの電極78および79を使用することによって発生させることができる。マイクロ液滴はより大きなマイクロ液滴を形成するように混合され、次の処理のため

10

20

30

40

50

の溶液混合物を含む。そして、それらの混合物の内容物を加工、培養又は検出するか、あるいはポート80を介して他のマイクロ流体システム又は流体ダクトに移送される。接合部73および74から接合部77にマイクロ液滴をガイドする流路はマイクロ液滴の存在を検出する検出器81および82を備えることができる。このような検出器からの信号は連続液体の流れを制御し、接合部77のマイクロ液滴の発現に同期させるようする。

【0115】

本発明の好ましい実施形態において、上述した溶液の混合物の形成および培養又は反応の成果の検出ではマイクロ流体モジュールの多数を連結することが出来る。図9の実施においてはマイクロ流体チップ83の出口はマイクロ流体モジュール84の入口と接続され、そこではマイクロ液滴の内容物を混合するために使用される。モジュール84で混合された後、マイクロ液滴はモジュール85内に入り、そこでオンデマンドで形成される、追加の溶液を含むマイクロ液滴と混合される。次にマイクロ液滴はモジュール86内に入り、そこで再び混合され、次にモジュール87に入る。モジュール87はマイクロ液滴の内容物の検出器を含む。好ましい実施例であって制限するものでない実施例では混合用モジュール84および86はマイクロ液滴の内容物の混合を加速する曲がりくねった蛇行流路の区分を備えてもよい。制限的でない実施例において、モジュール87はマイクロ液滴内での培養又は反応結果の検出をなし、分光光度計を備えてもよく、それをもって検出器のウインドウ部を通って又はそこに残るマイクロ液滴の吸収又は蛍光を測定する。好ましくはモジュール87の出口は液圧的に電気的に制御されるバルブ89を介して大気圧の貯槽88と連結している。

10

20

30

40

【0116】

モジュール85では、追加の溶液のマイクロ液滴で反応（又は培養）の滴下を行う役目を果たす。モジュール83で形成され、モジュール84で混合されたマイクロ液滴は流路90に流入し、次に接合部91に入る。これに並行して接合部92では初期に流路93に供給された追加の溶液の新しいマイクロ液滴が形成される。接合部91内においてモジュール83および84からのマイクロ液滴は、接合部92で形成されたマイクロ液滴と混合される。マイクロ液滴の同期はモジュール85内でのマイクロ液滴の存在を検出する検出器を備える必要がある場合がある。マイクロ液滴の接合部91での混合は電界の適用によって刺激することは出来る。混入後はマイクロ液滴は混合モジュール86および検出モジュール87内に流入する。

【0117】

本発明の好ましい実施形態（図10）では、溶液の混合物を含むマイクロ液滴をウエル95および96に液圧的に接続する液圧ダクト94内に送ることが出来る。好ましくは、制限するものではないが、上記マイクロ液滴はダクト94の全断面を覆う。モジュール95は少なくとも1つの入口ポートを備え、注入される連続液体をダクト94に注入することを可能とし、電気的に制御されるバルブ98を介しての流れ97を一定の速度で供給源から供給される。モジュール96は少なくとも1つの液圧連結部を備え、大気圧99の貯槽と、電気的に制御されるバルブ100を介して連結している。好ましくはダクト104は検出モジュール101を通るのが好ましい。非制限的実施例においては、検出モジュール101はマイクロ液滴の内容物に対し分光光度的測定を行う。このような具体例ではモジュール101はスポット（すなわち検出器のウインドウ部102）を備え、ここで、光をマイクロ液滴を横断して又は沿って通過させる。好ましい実施例においては、両方の検出が行える。

1つは、検出器のウインドウ部102を連続的に通過するマイクロ液滴上で、又は、もう1つは検出器のウインドウ部102に一定の間隔で停止させるマイクロ液滴上で行われる。

流路94内でマイクロ液滴104の列を前方に送る能力又はこれらのマイクロ液滴の流れを必要な間隔の間、停止させる能力はこれらの列104中のすべてのマイクロ液滴（たとえば103）に対し单一又は複数の測定を行わせる。また、マイクロ液滴のすべての列104上で測定を行うことおよび上記列での单一の液滴（たとえば103）の測定の間隔を調整することが出来る。

【0118】

50

好ましい実施例で制限するものでない実施例ではモジュール101は流体ダクト94のルーメンを通して光を通過させることが出来る。好ましい実施例では、光はウェブガイドを介してチャンネルに運ばれる。同様にダクト94のルーメンを通して通過する又はダクト94のルーメン内の液滴103から放出される光の一部はウェブガイド内に集められ、分光光度計に導かれる。

【0119】

異なる実施例においては、ウェブガイドを使うことなくダクト94のルーメン内に光を届け少なくとも上記ルーメンを通過させる又は上記ルーメンから放出される光の一部を直接ダクト94の近傍に位置するセンサーに集めることが出来る。好ましくは、その角度は検出の分解能および感度を最適化するように選ばれる。好ましくは吸収および透過の測定の場合は角度は0に等しくされる。蛍光の測定の場合は角度は0と異なっており、90度に等しくすることが出来る。

10

【0120】

本発明の異なる好ましくかつ制限するものでない実施例においては、図11に示されるように、マイクロ液滴の列は液圧ダクト105に注入され、該ダクトは液圧的にモジュール106および107に接続している。モジュール106は液圧的に少なくとも1つのポートに接続し、電気的に制御バルブ109を介して一定の速度の流れの供給源108から連続液体を注入し、また少なくとも1つのポートからダクト105からの液体を電気的に制御されるバルブ111を介して大気圧の貯槽110内に液体を流入させる。同様にモジュール107は液圧的に少なくとも1つのポートに接続し、一定の流れの供給源112から連続液体を電気的に制御されるバルブ113を介して注入し、また少なくとも1つのポートと接続し、ダクト105から大気圧の貯槽114に電気的に制御されたバルブ115を介して注入する。好ましい実施例では、ダクト105はモジュール116を備え、マイクロ液滴の内容物を検出するようになっている。非制限的な実施例において、モジュール116は検出器のウィンドウ部117を通してダクト105を通過するマイクロ液滴の内容物を分光光度的に検出する。好ましい実施例では溶液の混合物を含むマイクロ液滴の列118はダクト105の区分119および120の間を前進又は後進して反復して送られる。反応混合物118の列は連続層の流れを使用して前進又は後進させる。バルブ109及び115の開放及びバルブ111及び113の閉鎖によって、区分119から区分120にマイクロ液滴118の列を流す。同様にバルブ111及び113の開放とバルブ109及び114の閉鎖によりマイクロ液滴の列118は区分120から119に流れる。好ましくは、非制限的な形式では、区分119及び120はマイクロ液滴の圧力のセンサー121及び122を備え、接続部123を介して電気的制御器124に接続している。検出器121及び122からの信号又は検出器116からの信号あるいは検出器121及び122からと検出器110からの信号の双方は電子ユニットにマイクロ液滴の列118の位置を判断させ、バルブ109, 111, 113及び115に適切な信号を適用し、セクション119および120の間のマイクロ液滴118の列の移送のプロトコールを実行させる。

20

【0121】

本発明の好ましい実施形態において、マイクロ液滴の内容物の検出はマイクロ液滴の検出モジュール116を通しての流れの間に行われる。流路105の流れは必要な間隔中、検出器のウィンドウ部117においてマイクロ液滴を保留するために停止させることが出来る。セクション120へのマイクロ液滴の移送後、バルブ109及び115の閉鎖及びバルブ111及び113の開放によってマイクロ液滴118は検出モジュール116を通してセクション119に戻る。好ましくは本システムはマイクロ液滴の存在を検出する検出器121及び122を備え、そのために信号を電気制御器124に送るマイクロ液滴の存在を検出し、バルブ109、111、113及び115の状態を調整する。

30

【0122】

実施例1 マイクロ液滴の形成

本発明の例示的な実施形態は、図1に示すようなシステムであり、任意の入口ポート7なしで、オンデマンドでマイクロ液滴を生成するために役立てることができ、バルブ14、ポート9及び油圧ダクト10を介して、供給源12から供給される液体から形成される。この実施例では、マイクロ流体サブシステムは正方形の断面公称寸法 $100 \times 100 \mu\text{m}$ のマイクロ

40

50

流体流路を備える。この例では、分散される液体は蒸留水で、マイクロ流体流路の壁を濡らさないで、ソース13から供給され、バルブ15及び流体ダクト11を介してポート4に入る連続相はヘキサデカンのスパン80界面活性剤(1重量%)溶液である。この実施例では、ダクト10および11は長さ2mで内径200μmの鋼製キャピラリーである。油の貯槽に適用される圧力は1バールで、水の貯槽に加えられる圧力は333ミリバールである。液体を供給するシステムは、100Hzのペースで駆動され、各10msでマイクロ液滴が接合部8で形成される。これらのマイクロ液滴の体積は t_{open} の間隔の長さによって制御され、その間、バルブ14が開かれ、バルブ15が閉じられる。図12に示すグラフはマイクロ液滴の量が直線的に変化することを示し、 t_{open} の1msから9msまでの変更時～0.45nLから～4nLに変化する。 t_{open} の同じ値で生成された10個のマイクロ液滴から計算された偏差は、所定量の1%未満である(図12)。

10

【0123】

別の例では、液体を供給する同じシステムと同じ液体を使用して、図1に示すと類似するモジュール内であるが、すべての流路が200×200μmの公称断面積を有するマイクロ流体モジュール内でマイクロ液滴を生成する。この例では油の貯槽に適用される圧力は2.5バールであり、水の貯槽に適用される圧力は700バールである。システムはペースの周波数fがf=10Hzからf=100Hzまでで作動される。バルブ14が開放され、バルブ15が閉鎖される t_{open} は周波数及び $t_{open}=(1/2)(1/f)$ に伴って変化する。図13に示すグラフはオンデマンドでマイクロ液滴を非常に広い範囲の容量～20nLから20μLで形成するシステムの能力を示す。一定の t_{open} で生成されるマイクロ液滴の容量の標準偏差は全体の範囲に渡って2%未満であり、(～20nLから1μL)の範囲の大部分は1%未満である。

20

【0124】

図8と同様のシステムの、本発明の別の例示的な実施形態では、流路75と76に供給された2つの異なる試料から引き出された液体からマイクロ液滴を形成するのに使用することができる。この実施例では例えば、流路75は(400×400μm)の断面を持っていた。この流路に供給されたサンプル(～5μL)は赤インクの水溶液であった。このサンプルは接合部73へのヘキサデカンの連続的な液体の流れに押され、 t_{open} を50msから500ms(図14)の間で変更することにより、330nLに80nLの容量のマイクロ液滴を生成することに使用される。同じ実施例では、流路76は、断面(800×800μm)有している。青インクの水溶液のサンプル(～100μL)を流路76に供給する。このサンプルは、ヘキサデカンの連続的な流れに押され、 t_{open} を150msから2.8s(図14)の間で t_{open} を変更することにより、～0.8μLから～9.8μLに容量の範囲でマイクロ液滴を生成するのに使用され、各接合部で生成されたマイクロ液滴の誤差は平均容量の1%未満であった。

30

【0125】

実施例2 - 反応混合物の化学組成のスクリーニング

本発明の例示的な実施形態は、図15に示し、反応混合物の化学組成の急激なスクリーニングを実行するために使用される。

40

システムはマイクロ液滴の形成のための3つの独立した接合部を含み、各接合部には異なる溶液が供給される。この実施例では、接合部に送られる液体は赤インクのきれいな水溶液、青インクの水溶液で、このシステムは電子制御ユニットによって制御され、三つの接合部で同期されて液滴を発生させるプロトコールを実行し、これらのボリュームのすべての可能な組み合わせを合計で1.5μLの一定体積になるようにスクリーニングする。同期されるパケットは、3Hzのレートで生成され、パケットの各々は3つの液滴発生器の接合部に集合される。集合された液滴は溶液とクリーン水の所定の組み合わせを含む。図15に示すグラフは入力流れを10%とする工程における二つのインキの濃度のすべての可能な組み合わせのスクリーンを示す。

【0126】

実施例3 - 血清中のアルブミン及びビリルビンの測定

本件発明の典型的な実施例は、アルブミンを量的に測定して人間又は動物の血清中におけるアルブミンの濃度を決定するものである。その典型的な測定は連続液体に作用する

50

つの加圧された貯槽から構成されるシステムによって実行され、前記の貯槽は電気的な制御バルブ及び流路を経てマイクロ流体チップに接続され、液圧抵抗及び液圧コンプライアンスについての要求を満たすようになっている。このマイクロ流体システムは2つの流路を有するモジュール（例えば、83）で構成され、血清及び試薬のサンプルを供給し、要求に応じて血清及び試薬を含むマイクロ液滴を生成し、これらのマイクロ液滴を反応混合物を含むより大きなマイクロ液滴に混入できるようになっている。また、このシステムは混合モジュール（例えば、84）及び分光光度計87によって構成することができる。この検出モジュール87の幾何学的な形状は、必要な光学的な流路がマイクロ液滴を通って得られるように選択することができる。本件発明によれば、連続流体をチップ83に分配するバルブを適切に操作することによって、正確に決定され望ましい容積のマイクロ液滴を生成することができる。これによって反応混合物内の血清と試薬の相対濃度を正確に決定することができる。また、これによって測定中の試薬の相対濃度を精査（screen）することができる。さらに、モジュール83内の適切な流路に最初に供給された（血清及び試薬）の各サンプルから同一の又は異なる容積の複数のマイクロ液滴を形成することが可能となる。マイクロ液滴を形成し、混入し、混合し及びモジュール83、84、87を通過する流速をコントロールすることによって、反応混合物へのマイクロ液滴の混入の実行と反応結果の分光光度計の動作の間における時間間隔を調整することができる。従って、この典型的な測定によって、比色計による測定を通して血清中のアルブミンの濃度を決定することができ、アルブミンの測定を最適化すること、例えば混合と、最適な測定感度及び分析のための測定との間における時間間隔、試験を実行するために必要な血清の容積及び試薬の容積の最小化、試薬の混入と結果の検出との間における培養の時間を短縮化することができる。

【0127】

異なる実施例においては、同一のマイクロ流体システムを用いて、モジュール83に血清の複数の異なるサンプルを供給するとともに試薬の1つのサンプルを供給して、同一のモジュール83内にてアルブミン濃度の比色測定を行うことができる。そのような供給後、システムを用いて、血清の複数の異なるサンプルについて複数の測定を実行することができる。

【0128】

異なる実施例においては、同一のシステムを用いて、モジュール83に1つの血清のサンプルを供給するとともに異なる試薬の複数のサンプルを供給して、異なる単一ステップの血清測定を行うことができる。

【0129】

異なる実施例においては、複数の血清のサンプル及び複数の試薬のサンプルを供給して、一連の複数の血清のサンプルについて一連の異なる単一ステップの比色測定を実行することができる。

【0130】

異なる実施例においては、血清について2ステップの比色測定を実行することができる。例えば、ビリルビンを測定することができる。この測定は、図9に示されるマイクロ流体システムにおいて実行することができる。この実施例においては、モジュール83に血清のサンプルを供給するとともに、ビリルビンの2ステップ比色測定のための第1試薬のサンプルもモジュール83に供給し、ビリルビンの2ステップ比色測定のための第2試薬のサンプルをモジュール85に供給する。この測定には血清のサンプルから血清のマイクロ液滴を生成するとともに、モジュール83内のサンプルから第1試薬のサンプルの溶液を効率よく同期して生成するステップが含まれる。次に、これらのマイクロ液滴はモジュール83に混入されてモジュール85に送られる。これらの反応混合物は接合部91に、要求に応じて生成された第2試薬の溶液のマイクロ液滴に対して同期的に到達し、この第2試薬のマイクロ液滴に混入され、モジュール86に送られて混合される。所定の時間の経過後、血清と2つの試薬を含むマイクロ液滴はモジュール87に流れ込み、反応の結果の分光光度が測定される。このシステムではモジュール83に供給された血清と試薬の1

10

20

30

40

50

つのサンプルについて複数の反応が可能である。マイクロ液滴の生成、混入及び混合モジュールを通過する流速比を適切にコントロールすると、i)最終反応混合物の全ての成分の濃度、ii)第1試薬に対する血清の混入と第2試薬の添加との間の時間間隔、及び第2試薬の添加と分光光度の測定との間の時間間隔を調整することができる。そのようなコントロールによって、血清中のビリルビンの濃度の比色測定が可能となり、反応混合物の成分及び試薬の添加と分光光度の測定との間の時間間隔を最適化し、これによって反応の時間と容量を最小化するとともに測定の感度及び決定を最大化できる。

異なる実施例においては、モジュール83に血清の複数の異なるサンプルを供給し、血清の複数の異なるサンプルについて複数の測定を自動的に行うことができる。

【0131】

異なる実施例においては、血清の複数のサンプルをモジュール83に、第1試薬の複数のサンプルをモジュール83に、第2試薬の複数のサンプルをモジュール85に各々供給し、血清の複数の異なるサンプルについて一連の異なる2ステップ比色測定を自動的に行うことが可能である。

【0132】

異なる実施例において、図9に示されるシステムを用いて、1ステップ比色測定を行うことができる。そのような実施例において、モジュール83で生成された血清のマイクロ液滴は同じモジュール内で試薬のマイクロ液滴に混入され、その後モジュール84において混合され、いかなる試薬を添加されることなくモジュール85を通過して流れモジュール86に流入し、最終的にモジュール87に流れ分光光度が測定される。

【0133】

異なる実施例においては、血清の複数のサンプルがモジュール83内の第1のマイクロ液滴の生成器に供給され、1ステップ測定のための複数の試薬及び2ステップ測定のための複数の第1試薬がモジュール83内の第2のマイクロ液滴の生成器に供給され、2ステップ測定のための対応する複数の第2試薬がモジュール85に供給され、血清の複数の異なるサンプルについて一連の1ステップ又は2ステップ測定が自動的に行われる。

【0134】

実施例4 - 動的測定

異なる実施例においては、図16に概略的に示されるシステムが用いられ、動的測定が実行される。例えば、血清のサンプルはモジュール125に供給され、アミラーゼの濃度を動的に測定するための試薬が同じモジュール125の第2のマイクロ液滴の生成器に供給される。これらのサンプルを用いて、モジュール125内で要求に応じてマイクロ液滴が生成される。これらのマイクロ液滴は同じモジュール125内に混入され、モジュール126内で混合され、モジュール127、128を経て、流路が接続されたモジュール129、139に流れ込み、反復測定のために用いられる。同一の又は異なる濃度の血清及び試薬を含むマイクロ液滴の連続列がダクトが接続されたモジュール129、139に移送されると、バルブ130、131、132、133がいずれかに位置され、検出モジュール134の検出器の窓に連続してマイクロ液滴を保持し、いずれかのマイクロ液滴について一連の分光光度の測定が実行される。また、(バルブ130、131、132、133によって)マイクロ液滴138の連続列が検出器の窓135を順方向及び逆方向に反復して移送され、これによってマイクロ液滴138の列の全て又は一部について一連の分光光度の測定を行うことができる。

【0135】

また、同じシステムを用いて、同一又は異なる濃度の血清及び試薬によって特徴づけられる反応混合物の連続列を生成し、血清に対する試薬の混合と第1の分光光度の測定との間の時間間隔を調整し、マイクロ液滴の列が検出モジュール134を順方向及び逆方向に移送されるときにマイクロ液滴について連続的に実行される一連の分光光度の測定の時間間隔を調整することができる。このシステムはマイクロ液滴の有無を検知する検出器136、137を用いて、モジュール129、139を接続する流路内におけるマイクロ液滴の列の位置をコントロールすることができる。

10

20

30

40

50

【0136】

同様に、図16に示されたシステムを用いて、2ステップ動的測定を実行することができる。例えば、血清中のアラニン・アミノ基転移酵素の濃度を測定することができる。血清のサンプル及び第1試薬のサンプルはモジュール125に供給され、第2試薬のサンプルはモジュール127に供給される。要求に応じて生成された血清のマイクロ液滴はモジュール125内で同期的に生成された第1試薬の液滴に混入され、混入されたマイクロ液滴はモジュール126、続いてモジュール127で混合され、これらの混合されたマイクロ液滴は要求に応じて生成された第2試薬の液滴に混入される。得られたマイクロ液滴はモジュール128内で混合され、モジュール129、139間の流路に移送される。次に、マイクロ液滴の列138は検出器134を一度だけ通過し、その間に検出窓135に各マイクロ液滴が保持されて必要な測定回数を確保されるか、又はマイクロ液滴の列138が検出器の窓135を順方向及び逆方向に反復して移送され、マイクロ液滴の列の各々について分光光度の測定が行われる。

10

【0137】

同様に、同一のシステムを用いて、血清、第1及び第2試薬の単一のサンプルから生成されたマイクロ液滴について複数回反応させて測定を最適化し、反応の時間及び容量を最小化するとともに、検出結果の決定及び検出の感度を最大化することができる。同様に、血清の複数のサンプルを供給し、1ステップ動的測定のための複数の試薬及び2ステップ動的測定のための第1試薬をモジュール125に供給し、2ステップ動的測定のための複数の第2試薬をモジュール127に供給し、血清の複数の異なるサンプルについて一連の1ステップ及び2ステップ動的測定を自動的に行うことができる。そのような手順において、マイクロ液滴の有無の検出器136、137を用い、検出器135を通過するマイクロ液滴の列138の流れを適切に操作するのが好ましい。

20

【0138】

同様に、サンプル、1ステップ及び2ステップ定点測定(1測定)のための試薬、1ステップ及び2ステップ動的測定のための試薬を供給し、自動化された手順においてこれら全てのタイプの測定を行うことができる。本発明を限定するものではないが、好ましい実施例においては、まず定点測定のためのマイクロ液滴が反応混合物の列において生成され、次に動的測定のための混合物が反応混合物の列において生成される。その実施例においては、まずマイクロ液滴の列138が順移送されて列の最初の部分について定点分光光度測定が(1回)、動的測定のための一連の分光光度測定の最初の測定が行われ、次に上記マイクロ液滴の列138が反復測定されるべき動的測定のために全ての混合物が通過する点に逆移送される。

30

【0139】

異なる実施例においては、上述のシステムを用いて、抗体及び抗原の有無及び濃度を比濁測定することができる。

【0140】

また、異なる実施例においては、上述のシステムを用いて、定点、動的測定及び臨床診断の概略測定を実行することができる。例えば、上述のシステムを用いて、反応混合物の濃度、インキュベーション時間及び化学合成における条件(例えば、温度、照射)を最適化することができる。

40

【0141】

実施例5 - 微生物有毒性の測定

本発明を限定するものではないが、他の実施例においては、本件発明に従って設計されたシステムを用いて、化学合成物の有毒性の決定、特にこれらの合成物の最小阻害濃度(MIC)を決定することができる。MICは微生物の成長を阻害する殺菌剤又は静菌剤の最小濃度である。実施例において、マイクロ流体のシステムはモジュール125に類似のモジュールを備え、このモジュールには2つではないがN個の接合部(ジャンクション)が設けられ、異なる供給源又はモジュールに供給されたサンプルから要求に応じて(オンデマンドで)マイクロ液滴を生成するようになっている。実施例においては、このシステム

50

ムは所定の容積の N 個のマイクロ液滴を効率よく同期的に成形し、各マイクロ液滴には微生物の懸濁物及び殺菌剤又は静菌剤の溶液、成長媒体及び微生物の成長の比色測定又は蛍光測定のための溶液が含まれている。本発明を限定するものではないが、好ましい実施例において、細胞の懸濁物は $5 \times 10^5 \cdot \text{CFU}$ (群生成単位) の濃度を有し、媒体はミューラ・ヒントン又はルリア・バータニ媒体、微生物の精査や所定の有毒性の検査に特に有用な異なる媒体が含まれる。微生物の成長の検出には吸収測定あるいは代謝マーカー(例えばアラマーブルー (Alamar Blue))からの蛍光の強さの測定を通じて行う光濃度計が含まれる。そのような実施例において、要求に応じて生成された N 個のマイクロ液滴は培養混合物に混入され、得られたマイクロ液滴はモジュール 126 に類似のモジュール内で混合され、次に培養混合物の列が流路に送られ、そこで必要な時間だけ培養される。次に、マイクロ液滴の列は検出モジュールを通過し、マイクロ液滴中の微生物の群の成長(又は代謝のレベル)が検出される。

10

【 0 1 4 2 】

異なる実施例においては、各々が異なる濃度の殺菌剤及び/又は静菌剤を含む培養混合物の列について行われた測定の精査を用いることによって、殺菌剤及び/又は静菌剤の混合物の有毒性を血清し、及びこれら複合物間における後生的な相互作用を決定することができる。

【 0 1 4 3 】

本発明を限定するものではないが、異なる実施例においては、図 16 に概略的に示されるシステムに類似のシステムを用いて、各々が所定の濃度の複数の殺菌剤及び/又は静菌剤を含む培養混合物の列を生成し、マイクロ液滴中のコロニーの濃度を複数測定しあるいはマイクロ液滴中のコロニーの代謝のレベルを複数測定して培養混合物の複合物の機能としての微生物のコロニーの成長をモニターすることができる。

20

【 0 1 4 4 】

異なる実施例においては、類似のシステムを用いて、媒体の複合物に対するバクテリアのコロニーの成長の比率を精査し、媒体の複合物を最適化して選択された微生物の鎖を最速で成長させることができる。

【図1】

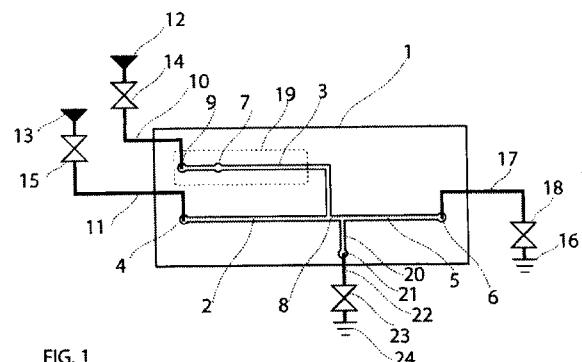


FIG. 1

(2)

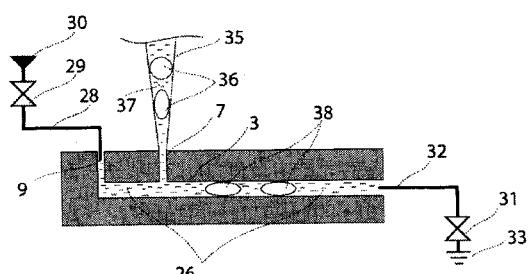


FIG. 2

【図3】

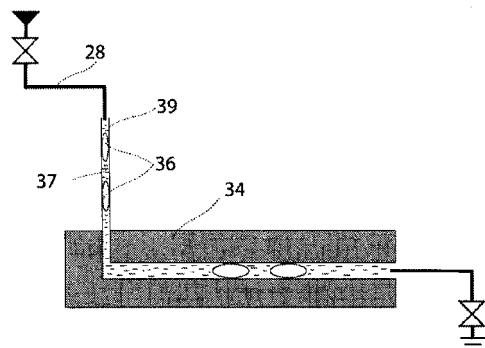


FIG. 3

〔 図 4 〕

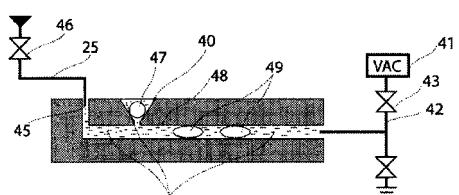


FIG. 4

【 5 】

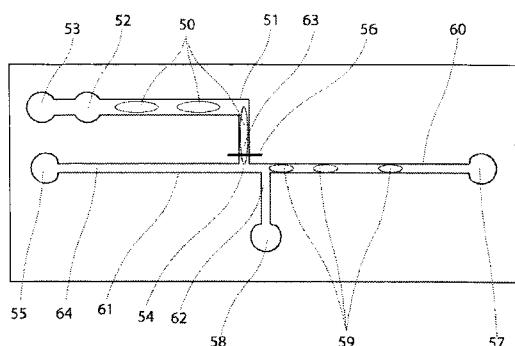


FIG. 5

【図6】

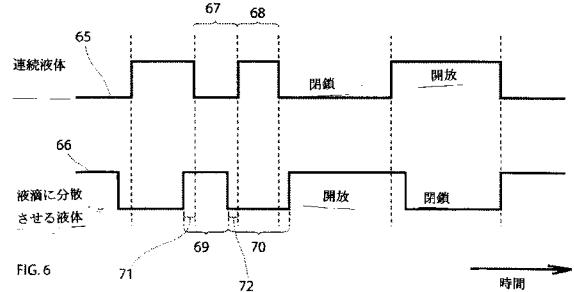


FIG. 6

【 図 7 】

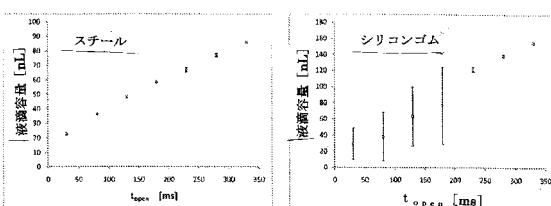


FIG. 7

【图 8】

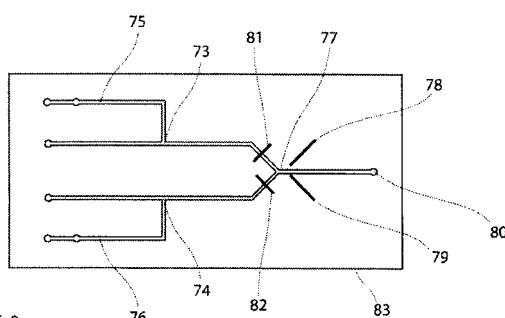


FIG. 8

【図 9】

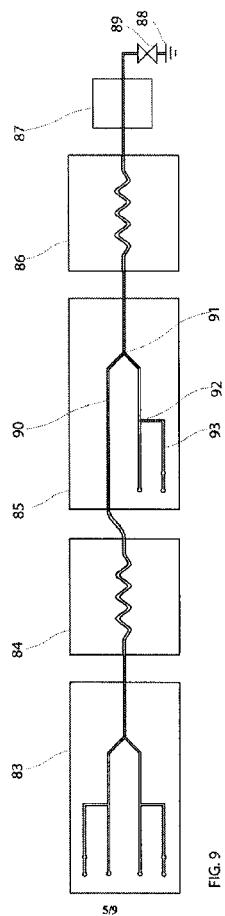


FIG. 9

【図 10】

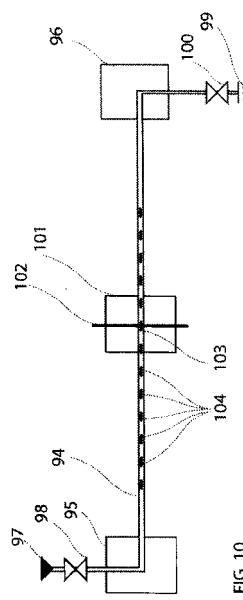


FIG. 10

【図 11】

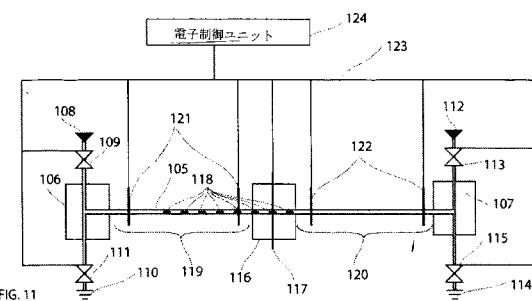


FIG. 11

【図 13】

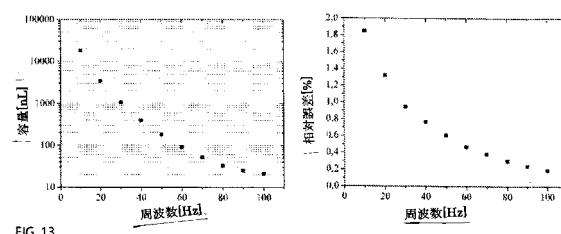


FIG. 13

【図 12】

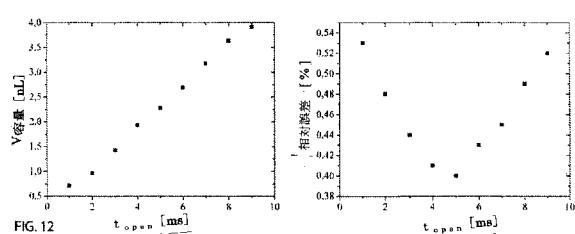


FIG. 12

【図 14】

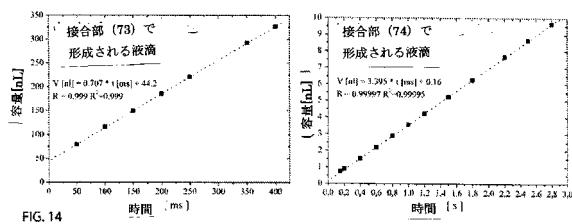
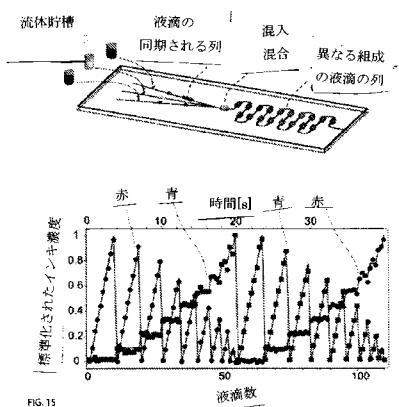
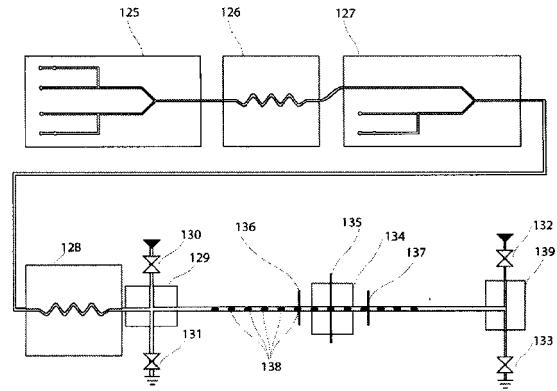


FIG. 14

【図 15】



【図 16】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/PL2011/050002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. B01L3/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K. CHURSKI, J. MICHALSKI, P. GARSTECKI: "Droplet on demand system utilizing a computer controlled microvalve integrated into a stiff polymeric microfluidic device", LAB ON A CHIP, vol. 2010, no. 10, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 512-518, XP002637214, internet the whole document -----	24, 27-34, 36-43
X	US 2009/235990 A1 (BEER NEIL REGINALD [US]) 24 September 2009 (2009-09-24) paragraphs [0004], [0028] - [0069]; figures 1-10 -----	24-34, 36-43

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

31 May 2011

14/06/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pessenda García, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/PL2011/050002

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 1-23, 25, 26, 35 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ PL2011/ 050002

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-23, 25, 26, 35

Present claim 1 relates to a product defined (inter alia) by reference to the following unusual parameter: $Xi=(0.5 \times 10^{-9} + 1/Ei) (\sqrt{Ri} L/2/Ai)$ The use of this unusual parameter (Xi) in the present context is considered to lead to a lack of clarity because the claim does not clearly identify the products encompassed by it as the parameter cannot be clearly and reliably determined by indications in the description or by objective procedures which are usual in the art. This makes it impossible to compare the claim to the prior art. As a result, the application does not comply with the requirement of clarity under Article 6 PCT. The equation given in the claim is obtained by taking into account several assumptions not mentioned in the claims. In addition some factors, e.g. \sqrt{Ri} , are not clearly disclosed in the description (it is only clearly mentioned for a circular pipe, $\sqrt{Ri}=8$?, but not for another type of cross section). In addition it is not disclosed if there is any technical effect obtained when a fluidic duct has a Xi value either lower or higher than 104 Pa-1. Furthermore the description gives no example of any device that complies with the requirements of claim 1, as well as no comparative example of a device with a Xi higher than the value expressed in the claim. For all reasons mentioned above there is a lack of disclosure of the description (Article 5 PCT) since no clear instruction are given in the description to produce a fluid duct having the desired Xi value. The lack of clarity and disclosure is to such an extent, that no meaningful search could be performed for claim 1 and those claims depending on claim 1 (claims 2-23) and those claims related to the parameter Xi as defined by the same equation of claim 1 (claims 25 and 26). The subject-matter of claim 35 (said first liquid and said second liquid is the same liquid) does not fall within the scope of independent claim 24. It seems impossible to produce droplets of a liquid in the same liquid (generate microdroplets in the junction of the first and second fluidic ducts with first and second liquid), thus claim 35 does not comply with the requirement of clarity under Article 6 PCT.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/PL2011/050002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009235990	A1 24-09-2009	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ガルステッキー ピオトル

ポーランド国 PL - 01 - 224 ワルシャワ、カスプルズーカ 44 / 52 番

(72)発明者 イジドルザーク マルシン

ポーランド国 PL - 01 - 224 ワルシャワ、カスプルズーカ 44 / 52 番

(72)発明者 ジャキエラ スラボミール

ポーランド国 PL - 01 - 224 ワルシャワ、カスプルズーカ 44 / 52 番

(72)発明者 カミンスキ トマスズ

ポーランド国 PL - 01 - 224 ワルシャワ、カスプルズーカ 44 / 52 番

(72)発明者 コルチーク ピオトル

ポーランド国 PL - 01 - 224 ワルシャワ、カスプルズーカ 44 / 52 番

(72)発明者 マクルスカ シルビア

ポーランド国 PL - 01 - 224 ワルシャワ、カスプルズーカ 44 / 52 番

F ターム(参考) 3C081 BA24 BA25 BA80 DA06 DA10 DA11 EA28

4G075 AA13 AA39 AA65 BA10 BB10 BD05 BD15 DA02 DA18 EB21

EB50 EC06 EC25 FB02 FB06 FB12

【要約の続き】

的粘性係数である。本発明はかかるシステムでマイクロ液滴をオンデマンドで作成する方法である。