(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2005-506541
(P2005-506541A)
(43)公表日　平成17年3月3日(2005.3.3)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
G01N 33/53	G01N 33/53	M	2G052
G01N 1/00	G01N 1/00	101F	
G01N 33/543	G01N 33/543	597	
G01N 37/00	G01N 37/00	101	
	G01N 37/00	102	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 138 頁）

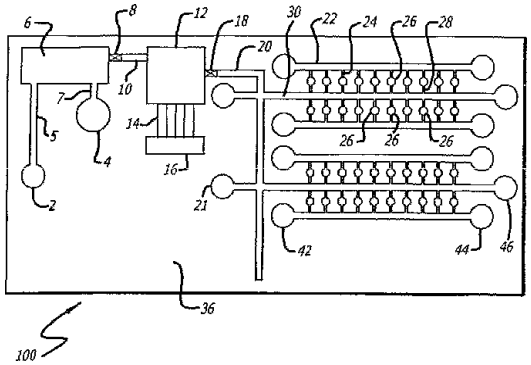
(21)出願番号　特願2003-537788(P2003-537788)
(86)(22)出願日　平成14年10月25日(2002.10.25)
(85)翻訳文提出日　平成16年4月26日(2004.4.26)
(86)国際出願番号　PCT/SG2002/000251
(87)国際公開番号　WO2003/035229
(87)国際公開日　平成15年5月1日(2003.5.1)
(31)優先権主張番号　60/335,875
(32)優先日　平成13年10月26日(2001.10.26)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　10/279,627
(32)優先日　平成14年10月24日(2002.10.24)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　502327861
エヌティーユー　ベンチャーズ　ピーティーイー　リミテッド
シンガポール共和国、シンガポール　６３７７２２、ナンヤンドライブ、１６番地、ブロック　１　ユニット　２１３
(71)出願人　504164837
ディーエスオー・ナショナル・ラボラトリーズ
シンガポール国、シンガポール　１１８２３０、サイエンス・パーク・ドライブ　２０
(74)代理人　100058479
弁理士　鈴江　武彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】試料調製一体型チップ

(57)【要約】
【課題】
【解決手段】本発明は、少なくとも１つのアッセイステーションを有する基材を備えた装置に関する。前記少なくとも１つのアッセイステーションは、少なくとも１つの第一のアッセイステーションチャネルと少なくとも１つの第二のアッセイステーションチャネルを有し、前記第一及び第二のアッセイステーションチャネルは、各々独立に、前記少なくとも１つのアッセイステーションと連通されている。前記装置は、それぞれ、前記第一及び第二のアッセイステーションチャネルと連通した配置の少なくとも第一及び第二の多目的チャネルを有している。前記第一の多目的チャネルと第一のアッセイステーションチャネルは、試料溶液を伝導できる内部表面特性を有している。前記少なくとも第一の多目的チャネルと連通した少なくとも１つの試料流体注入口と、前記少なくとも第一及び第二の多目的チャネルに連通した少なくとも１つの隔離媒体注入口とが存在する。前記少なくとも１つの第二の多目的チャネルは、前記試料溶液を伝導しない内部表面部分を有している。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
少なくとも１つのアッセイステーションを有する基材と、
少なくとも１つの第一の多目的チャネル及び少なくとも１つの第二の多目的チャネルの配列とを備え、前記少なくとも１つのアッセイステーションが前記第一及び第二の多目的チャネルの中間位に位置しており且つ液体を通じてこれらのチャネルと連通しており、前記第一の多目的チャネルが試料流体を伝導させる少なくとも１つの特性を有しており、
前記少なくとも第一の多目的チャネルと連通した少なくとも１つの試料流体注入口と、
前記少なくとも第一及び第二の多目的チャネルと連通した少なくとも１つの隔離溶媒注入口とを備え、前記少なくとも１つの第二の多目的チャネルが前記試料流体を伝導させない少なくとも１つの特性を有する、
ことを特徴とする装置。
【請求項２】
前記流体による連通が、前記第一及び第二の多目的チャネルと連通した少なくとも第一及び第二のアッセイステーションチャネルを介して連通されている、請求項１に記載の装置。
【請求項３】
前記試料流体を伝導する前記第一の多目的チャネルの特性が内部表面特性及び／又は形状特性のうち少なくとも１つを備え、前記試料流体を伝導させない前記少なくとも１つの第二の多目的チャネルの特性が内部表面部分及び／又は形状特性のうち少なくとも１つを備えたことを特徴とする、請求項１又は２に記載の装置。
【請求項４】
前記装置が少なくとも１つのアッセイステーションを密封する密封層をさらに備えたことを特徴とする、請求項１乃至３の何れか１項に記載の装置。
【請求項５】
前記第一の多目的チャネルの前記内部表面が、試料流体、空気、及び隔離媒体のうち少なくとも１つを貫流させることができることを特徴とする、請求項１乃至４の何れか１項に記載の装置。
【請求項６】
前記第二の多目的チャネルの前記内部表面が、空気又は隔離媒体のうち少なくとも１つを貫流させることができることを特徴とする、請求項１乃至５の何れか１項に記載の装置。
【請求項７】
前記アッセイステーション、第一の多目的チャネル、及び第二の多目的チャネルの少なくとも一部が前記基材層中に形成されていることを特徴とする、請求項１乃至６の何れか１項に記載の装置。
【請求項８】
前記アッセイステーション、第一の多目的チャネル、及び第二の多目的チャネルのうち少なくとも１つの少なくとも一部が前記基材層中に形成されており、前記アッセイステーション、第一の多目的チャネル、及び第二の多目的チャネルのうち少なくとも１つの少なくとも一部が密封層中に形成されていることを特徴とする、請求項４又は請求項４に従属した請求項５乃至７の何れか１項に記載の装置。
【請求項９】
前記多目的チャネルの前記内部表面と、前記第二のアッセイステーションチャネルと前記第二の多目的チャネルとの交差部に直接隣接した前記第二のアッセイステーションの表面とが、前記試料流体を伝導させないことを特徴とする、請求項２又は請求項２に従属した請求項３乃至７の何れか１項に記載の装置。
【請求項１０】
前記少なくとも第一及び第二の多目的チャネルが、それぞれ、前記複数のアッセイステーションの前記第一及び第二のアッセイステーションチャネルを介して、前記複数のアッセイステーションに連通していることを特徴とする、請求項２又は請求項２に従属した請求

項３乃至７の何れか１項に記載の装置。
【請求項１１】
前記複数のアッセイステーションに伝導される前記試料流体溶液による前記複数のアッセイステーションの同時充填又は順次充填のうち少なくとも１つが与えられるように、前記複数のアッセイステーションが配列されていることを特徴とする、請求項１０に記載の装置。
【請求項１２】
前記複数のアッセイステーションを密封するための前記隔離媒体による前記第一及び第二の多目的チャネルの同時充填又は順次充填のうち少なくとも１つが与えられるように、前記複数のアッセイステーションが配列されていることを特徴とする、請求項１０に記載の装置。
【請求項１３】
前記少なくとも１つのアッセイステーションの中に、少なくとも１つの反応アッセイ要素が配置されていることを特徴とする、請求項１乃至６の何れか１項に記載の装置。
【請求項１４】
前記試料流体注入口が試料流体調製要素と連通されていることを特徴とする、請求項１乃至１３の何れか１項に記載の装置。
【請求項１５】
少なくとも１つの試料調製チャンバーと蓋がさらに含まれていることを特徴とする、請求項１４に記載の装置。
【請求項１６】
少なくとも１つの前記チャネル中の流体のフローを調節するための少なくとも１つの要素がさらに含まれていることを特徴とする、請求項１乃至１５の何れか１項に記載の装置。
【請求項１７】
フロー促進流体を導入するためのチャンバーがさらに含まれていることを特徴とする、請求項１乃至１６の何れか１項に記載の装置。
【請求項１８】
少なくとも１つの前記チャンバー又は注入口が、前記フロー促進流体を前記試料流体と混合するための混合チャンバーと連通していることを特徴とする、請求項１７に記載の装置。
【請求項１９】
前記少なくとも１つのアッセイステーションの中に、アッセイ反応の少なくとも１つの成分が予め搭載されていることを特徴とする、請求項１乃至１８の何れか１項に記載の装置。
【請求項２０】
前記少なくとも１つのアッセイステーションでの前記アッセイ反応の前記少なくとも１つの成分が、少なくとも１つの検出可能な定性的データ又は定量的データを与えることを特徴とする、請求項１９に記載の装置。
【請求項２１】
前記アッセイ反応の前記少なくとも１つの成分を有するビーズがさらに含まれていることを特徴とする、請求項２０に記載の装置。
【請求項２２】
前記アッセイ反応の前記少なくとも１つの成分が、前記少なくとも１つのアッセイステーションに固定されていることを特徴とする、請求項１９に記載の装置。
【請求項２３】
前記試料調製チャンバーがさらに吸収剤を備えたことを特徴とする、請求項１５又は請求項１６に従属した請求項１６乃至２２の何れか１項に記載の装置。
【請求項２４】
前記少なくとも第一及び第二の多目的チャネルのうち少なくとも１つの終末部分と連通している吸収剤が与えられていることを特徴とする、請求項１乃至２２の何れか１項に記載

の装置。
【請求項２５】
前記吸収剤が、前記少なくとも第一及び第二の多目的チャネルの終末部分に取り外し可能に取り付けられていることを特徴とする、請求項２４に記載の装置。
【請求項２６】
前記少なくとも１つのフロー調節要素が、前記試料調製チャンバーと前記少なくとも第一の多目的チャネルとの間に配置されていることを特徴とする、請求項１６又は請求項１６に従属した請求項１７乃至２５の何れか１項に記載の装置。
【請求項２７】
前記少なくとも１つのフロー調節要素が、前記少なくとも１つのアッセイステーションに隣接して配置されていることを特徴とする、請求項１６又は請求項１６に従属した請求項１７乃至２５の何れか１項に記載の装置。
【請求項２８】
前記少なくとも１つのアッセイステーションがさらにフロー促進構造から構成されることを特徴とする、請求項１乃至２７の何れか１項に記載の装置。
【請求項２９】
前記少なくとも１つの第一のアッセイステーションチャネルの前記少なくとも一部が、前記少なくとも第二のアッセイステーションチャネルの少なくとも一部の断面積より小さな断面積を有することを特徴とする、請求項２又は請求項２に従属した請求項３乃至２８の何れか１項に記載の装置。
【請求項３０】
前記第一及び第二の多目的チャネルが、隔離媒体の貫流によって前記複数のアッセイステーションを密封する経路を与えることを特徴とする、請求項１０又は請求項１０に従属した請求項１１乃至２９の何れか１項に記載の装置。
【請求項３１】
前記第一及び第二の多目的チャネルが試料流体及び／又は隔離媒体によって充填された後に、前記少なくとも第一及び第二の多目的チャネルの露出部分が、粘着的、機械的、電気的、又は磁気的に、周囲の大気から固体により密封されることを特徴とする、請求項１又は請求項１に従属した請求項２乃至３０の何れか１項に記載の装置。
【請求項３２】
基材が設けられており、該基材が、
望ましくない成分を試料流体から除去するための試料調製チャンバーと、
前記試料調製チャンバーに流体を通じて連結された試料流体注入口と、
フロー促進流体を受容するためのチャンバー又は注入口と、
前記試料調製チャンバーから、フロー促進流体を受容するための前記チャンバー又は注入口への試料流体のフローを調節するためのフロー調節要素と、
前記チャンバーに流体を通じて連結された少なくとも１つの第一の多目的チャネルと、
少なくとも１つのアッセイステーションと、
前記少なくとも１つのアッセイステーションに連通された前記第一の多目的チャネルと、
前記チャンバーから前記少なくとも１つのアッセイステーションへの流体のフローを隔離し、フローを可能とするための第二のフロー調節要素と、
前記少なくとも１つのアッセイステーションに連結された第一のアッセイステーションチャネルと、
を備えたことを特徴とする、試料流体を分析するための装置。
【請求項３３】
前記試料調製チャンバーが、前記試料調製チャンバーの少なくとも一部を密封する焼結ガラスブロックを備えたことを特徴とする、請求項３２に記載の装置。
【請求項３４】
前記第一の多目的チャネルが試料流体及び／又は隔離媒体によって充填された後に、前記少なくとも第一の多目的チャネルの一部が、粘着的、機械的、電気的、又は磁気的に、周

囲の大気から固体により密封されることを特徴とする、請求項３２又は３３に記載の装置。
【請求項３５】
前記望ましくない成分を吸収するために、吸収剤が前記焼結ガラスブロックに吸着することを特徴とする、請求項３３に記載の装置。
【請求項３６】
密封層が、前記ろ過チャンバー、チャンバー、第一の多目的チャネル、アッセイステーション、第一のアッセイチャネルのうち少なくとも１つを密封することを特徴とする、請求項３２乃至３５の何れか１項に記載の装置。
【請求項３７】
前記環境から前記ろ過チャンバーの少なくとも一部を密封するダイアフラムと、
該ダイアフラムを振動させることにより、溶解緩衝液を攪拌するための振動式アクチュエータと、
がさらに加えられていることを特徴とする、請求項３２乃至３６の何れか１項に記載の装置。
【請求項３８】
前記基材が、（ａ）ガラス、（ｂ）プラスチック、（ｃ）エラストマー、（ｄ）複合材料、（ｅ）シリコン、及び（ｆ）金属のうち少なくとも１つを備えることを特徴とする、請求項３２乃至３７の何れか１項に記載の装置。
【請求項３９】
前記エラストマーがポリジメチルシロキサンを備えることを特徴とする、請求項３８に記載の装置。
【請求項４０】
基材上で反応を行う方法であって、前記基材が少なくとも１つのアッセイステーションと、少なくとも第一及び第二の多目的チャネルの配列とを備え、前記少なくとも１つのアッセイステーションが前記第一及び第二の多目的チャネルの中間位に位置しており且つ液体を通じてこれらのチャネルと連通しており、前記第一の多目的チャネルが試料溶液を伝導させる内部表面特性を有しており、前記少なくとも第一の多目的チャネルと連通した少なくとも１つの試料流体受容領域と、前記少なくとも第一及び第二の多目的チャネルと連通した少なくとも１つの隔離媒体注入口とを備え、前記少なくとも１つの第二の多目的チャネルが前記試料流体を伝導させない少なくとも１つの内部表面部分特性を有し、
前記方法が、
試料流体を取得することと、
少なくとも１つの試料注入口に試料流体を導入することと、
前記少なくとも１つの多目的チャネルを介して、前記少なくとも１つのアッセイステーションを充填することと、
前記少なくとも１つの隔離媒体ポートから、隔離媒体を少なくとも前記第一の多目的チャネルに流入させることと、
前記少なくとも１つのアッセイステーションにおいて少なくとも１つの反応を実行し、前記反応が前記試料流体に関する定性的データ又は定量的データのうち少なくとも１つ与えることと、
を備えた方法。
【請求項４１】
温度調節下で前記少なくとも１つの反応を実行することをさらに含むことを特徴とする、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
被検試料から前記試料流体を取得する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項４０又は４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記被検試料を少なくとも１つの予備操作に供する工程をさらに含むことを特徴とする、

請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記少なくとも１つの予備操作を前記基材とは分離して行うことをさらに含むことを特徴とする。請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記基材上又は基材内のうち少なくとも１つにおいて、前記少なくとも１つの予備操作を行うことをさらに含むことを特徴とする、請求項４３に記載の方法。
【請求項４６】
前記少なくとも１つの定性的データ又は定量的データが、比色分析、蛍光、又は発光結果のうち少なくとも１つを提供することを特徴とする、請求項４０乃至４５の何れか１項に記載の方法。
【請求項４７】
前記少なくとも１つの予備操作によって、前記少なくとも１つの反応中で使用できる核酸が与えられることを特徴とする、請求項４３乃至４６の何れか１項に記載の方法。
【請求項４８】
少なくとも１つのアッセイ反応成分を前記少なくとも１つのアッセイステーション中に配置する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項４０乃至４７の何れか１項に記載の方法。
【請求項４９】
前記少なくとも１つの反応を実行する前記工程が核酸増幅を備えたことを特徴とする、請求項４０乃至４８の何れか１項に記載の方法。
【請求項５０】
蛍光を利用して前記少なくとも１つの定性的データ又は定量的データを取得することをさらに含むことを特徴とする、請求項４０乃至４９の何れか１項に記載の方法。
【請求項５１】
フルオロフォアの結合又はフルオロフォア含有プローブのハイブリダイゼーションのうち少なくとも１つによって前記蛍光が与えられることを特徴とする、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記定性的データ又は定量的データが、フルオロフォア、酵素、又は結合複合体の成分のうち少なくとも１つで標識されたプローブから得られることを特徴とする、請求項４０乃至４６の何れか１項に記載の方法。
【請求項５３】
隔離媒体によって前記試料流体を置換する工程がさらに含まれることを特徴とする、請求項４０乃至５２の何れか１項に記載の方法。
【請求項５４】
前記隔離媒体を前記少なくとも第一及び第二の多目的チャネル中に順次導入することをさらに含むことを特徴とする、請求項５２に記載の方法。
【請求項５５】
前記隔離媒体が、まず前記少なくとも第一の多目的チャネル中に導入された後に、前記少なくとも第二の多目的チャネル中に導入されることを特徴とする、請求項５３に記載の方法。
【請求項５６】
隔離媒体の前記導入によって、前記少なくとも第二の多目的チャネルから空気が押し出され且つ前記少なくとも第一の多目的チャネルから前記試料流体が押し出されて、前記試料流体を含有する前記少なくとも１つのアッセイステーションが隔離されることになることを特徴とする、請求項５４又は５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記少なくとも１つのアッセイステーションを照射に曝露する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項４９又は請求項５０に従属した請求項５０乃至５６の何れか１項に記載

の方法。
【請求項５８】
前記隔離媒体を固化、硬化、及び重合する工程のうち少なくとも１つの工程をさらに含むことを特徴とする、請求項４０乃至５７の何れか１項に記載の方法。
【請求項５９】
前記第一及び第二の多目的チャネルが試料流体及び／又は隔離媒体によって充填された後に、前記少なくとも第一及び第二の多目的チャネルの露出部分が、粘着的、機械的、又は磁気的に、周囲の大気から固体により密封されることを特徴とする、請求項４０乃至５８の何れか１項に記載の方法。
【請求項６０】
前記少なくとも１つのアッセイステーションを充填する前に、前記流体試料を加熱することをさらに含むことを特徴とする、請求項４０乃至５９の何れか１項に記載の方法。
【請求項６１】
前記試料流体を取得する工程が、試料調製チャンバー中での少なくとも１つの予備操作を含み、前記被検試料を溶解緩衝液、溶出緩衝液、及び洗浄緩衝液に曝して前記試料流体を取得することのうち少なくとも１つを備えたことを特徴とする、請求項４３又は請求項４４に従属した請求項４４乃至６０の何れか１項に記載の方法。
【請求項６２】
前記試料流体にフロー促進流体を添加することをさらに含むことを特徴とする、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
前記少なくとも１つの予備操作が前記基材上で行われ、前記基材を揺動して、核酸含有被検試料中に含有される核酸が前記試料流体中に進入するのを促進する工程をさらに備えたことを特徴とする、請求項６１又は６２に記載の方法。
【請求項６４】
前記基材を揺動させる前記工程が、前記基材及び前記試料調製チャンバー中に含有される試料流体のうち少なくとも１つの共鳴周波数で前記基材を揺動させることによって行われることを特徴とする、請求項６３に記載の方法。
【請求項６５】
前記揺動工程が、前記試料調製チャンバー中で電磁気的に磁気ビーズを揺動することによって行われることを特徴とする、請求項６３に記載の方法。
【請求項６６】
前記ろ過チャンバー中に含有される前記溶出緩衝液を加熱して、熱的勾配によって誘導される対流を生じさせ、より多くの核酸分子を溶液中に進入させることをさらに含むことを特徴とする、請求項６３乃至６５の何れか１項に記載の方法。
【請求項６７】
前記試料調製チャンバー中に含有される前記溶出緩衝液に界面活性剤を添加する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項６６に記載の方法。
【請求項６８】
前記試料導入口に注入される前に、ホモゲナイズ、消化、及びろ過のうち少なくとも１つを前記被検試料に行うことを特徴とする、請求項４２又は請求項４２に従属した請求項４３乃至６７の何れか１項に記載の方法。
【請求項６９】
試料流体分析用の装置であって、
基材を備え、該基材は、
試料調製チャンバー、及び流体を通じて連結されたフロー促進流体を受容するためのチャンバー又は注入口と、
前記試料調製チャンバーに流体を通じて連結された被検試料導入口と、
前記試料調製チャンバー及びフロー促進流体を受容するためのチャンバー又は注入口のうち少なくとも１つに流体を通じて連結された少なくとも１つの緩衝液導入口と、

前記試料調製チャンバー又はフロー促進流体を受容するためのチャンバー若しくは注入口に流体を通じて連結された第一の多目的チャネルと、
アッセイステーションと、
前記少なくとも１つのアッセイステーションが第一及び第二の多目的チャネルの中間位に位置しており且つ第一及び第二の多目的チャネルと流体により連通されている、少なくとも第一及び第二の多目的チャネルの配列と、
前記試料調製チャンバー及びフロー促進流体を受容するためのチャンバー若しくは注入口のうち少なくとも１つから前記アッセイステーションへの流体のフローを調節するための少なくとも１つのフロー調節要素と、
前記アッセイステーションに流体を通じて連結された少なくとも１つのアッセイステーションと、
を備えている、装置。
【請求項７０】
前記流体による連通が、前記第一及び第二の多目的チャネルと連通した少なくとも第一及び第二のアッセイステーションチャネルを介して連通されている、請求項６９に記載の装置。
【請求項７１】
前記ろ過チャンバーが、前記試料調製チャンバーの少なくとも一部を密封する焼結ガラスブロックを備えたことを特徴とする、請求項６９又は７０に記載の装置。
【請求項７２】
前記焼結ガラスブロックを通して白血球を濾過するための前記焼結ガラスブロックに吸収剤が吸着していることを特徴とする、請求項７０に記載の装置。
【請求項７３】
密封層が、前記第一の多目的チャネル、アッセイステーション、及び第一のアッセイステーションチャネルのうち少なくとも１つを密封することを特徴とする、請求項７０又は請求項７０に従属した請求項７１乃至７２の何れか１項に記載の装置。
【請求項７４】
前記試料調製チャンバーの少なくとも一部を密封するダイアフラムと、該ダイアフラムを振動させるための振動式アクチュエータとがさらに加えられたことを特徴とする、請求項６９乃至７３の何れか１項に記載の装置。
【請求項７５】
前記基材が、（ａ）ガラス、（ｂ）プラスチック、（ｃ）エラストマー、（ｄ）複合材料、（ｅ）シリコン、及び（ｆ）金属のうち少なくとも１つを備えたことを特徴とする、請求項６９乃至７４の何れか１項に記載の装置。
【請求項７６】
前記エラストマーがポリジメチルシロキサンを含むことを特徴とする、請求項７５に記載の装置。
【発明の詳細な説明】
【発明の分野】
【０００１】
本発明は、例えば、疾病を検出診断し、及び／又は増幅された核酸産物を検出し、薬理遺伝学的な測定を行うために用いることができる装置及びアッセイシステムに関する。本装置は、１以上のアッセイステーション又はウェルを有する基材と、該装置を通過する液体のフローが促進されるように配置され且つ前記アッセイステーションが隔離媒体によって密閉されるように設計されたチャネルと、を備える。
【発明の背景】
【０００２】
生化学的検査は、例えば、疾病の有無を検出し、モニタリングするなどの様々なアッセイにとって、益々重要なツールとなっている。例えば、血液型や移植の適合性などの基礎的な医療情報を得るための検査が以前から知られているが、多数の疾病の基礎を成す生化学

に対する理解が進んだために、実施可能な検査の数も急激に増大した。このため、病原体の検査、疾病の診断やモニタリング、健康状態の変化の検出やモニタリング、薬物療法のモニタリングなどの様々な分析用途に、数多くの検査が利用できるようになっている。ゲノムデータに加え、化学的成分のコンビナトリアルライブラリーの調製が可能となったことにより、新規薬物の発見が容易となった。

【０００３】

様々な段階の核酸（例えば、ＤＮＡ）分析をマイクロチップなどの単一の装置上で行える「完全なシステム（ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ｓｙｓｔｅｍ）」が以前から望まれていた。ＤＮＡの分離やＰＣＲなどのＤＮＡ分析を迅速且つ同時に実施でき、病気の診断又は発見を可能とする、完全に一体化された高性能システムが必要とされている。「Sanders, et AL. (2000) Trends in Analytical Chemistry, 19 (6): 364-378」。これまでに、同一チップ上で最大４つの試料を増幅し分析することができるシステムが開示されている。「L.C. Waters, et al. (1998) Anal. Chem., 70: 5172」。さらに、ＰＣＲを実施するための小さな使い捨ての大量生産装置が報告されている。例えば、米国特許第５，４９７，３９２号を参照。例えば、「Yuen, et al. (2001) Genome Research 11: 405-412」には、血液試料の調製物や核酸の増幅反応物も一体的に行えるように設計構築されたプレキシグラス製マイクロチップモジュールが記載されている。このマイクロチップモジュールは、マイクロヒーター－クーラーと、ヒトの全血と試薬を輸送するための一連のマイクロチャネルとを備えている。まず、一体型細胞単離－ＰＣＲ（極めて低濃度且つ低効率（すなわち、３－５％）であるが、白血球を保持するゲート状の微小構造物を含有する）の中で、少量の全血から白血球が単離される。赤血球は、微小フィルター中を通過するが、時が経過するにつれて、フィルターを目詰まりさせて、白血球の単離効率を低下させる傾向がある。Ｙｕｅｎらのマイクロチップは、微小温度センサーを用いているので、Ｙｕｅｎらのチップを組み立てるには高価な費用が必要である。

【０００４】

現在では、ＤＮＡの分析にＤＮＡマイクロアレイ装置も利用されている。ｃＤＮＡマイクロアレイとオリゴマイクロアレイという２種類のＤＮＡマイクロアレイ技術が知られている。両技術では、ハイブリダイゼーション反応に基づいて、試料中でのｍＲＮＡの発現を調べる。マイクロアレイを用いたアッセイは取り扱いが煩雑で、終了までに約１日を要し、連続的なバッチ分析を行うために独立の装置が必要となる。迅速な診断は不可能であり、現在のマイクロアレイ装置では、試料の調製をチップ上で一体的に行うことができない現在のオンチップＤＮＡ分析システムには、さらに欠点があることが最近報告された。かかる欠点には、試料を注入できないこと、ＤＮＡの単離が不良であること、多重ＰＣＲ分析ができないことが含まれる。Ｙｕｅｎら、４００５ページ、右欄。

【０００５】

核酸は、遺伝子発現の調節と制御に機能することによって疾患を引き起こすなどの細胞プロセスに直接的な役割を果たしている。様々な種類の生体プロセスで遺伝情報がどのように機能しているかについて、さらに理解を深めるために、様々なタイプの核酸分析を行うためのハイブリダイゼーション技術が開発されている。ハイブリダイゼーション法は、一般に、制御された条件下で、標的核酸に核酸プローブを結合させることにより、相補的な配列の間でのみハイブリダイゼーションが生じるようにする。ハイブリダイゼーション技術を用いると、遺伝子発現研究や他の様々な種類の分析を実施することが可能となる。例えば、病態には遺伝子発現の変化を伴うことが示されているので、遺伝子発現を調べることは重要である。多くの病態では、遺伝子ＤＮＡのコピー数の変化や転写レベルの変化によって、様々な遺伝子の発現が異なることが特徴となる。ある種の疾病では、あるウイルスの感染は遺伝子発現の上昇を特徴とする。

【０００６】

核酸プローブが付着されたチップは、核酸分析を実施するために使用することができる。プローブは、アッセイステーションなどのチップ上の特定部位に付着させることができる。アッセイステーションは、第一及び第二の多目的チャネルの中間に存在する領域に位置

し、アッセイ反応は、下記に詳述されているように行われる。ある種の用途では、アレイの形態で配置されたアッセイステーションがチップに設けられることがある。このようなチップによって、手間のかかる試料の調製と電気泳動による分離が必要なことが多い従来の方法に比べて、分析を手早く実施できる同時並行処理が可能となるので、チップ上のアレイを用いた遺伝学的法は有利である。チップを用いた現行の核酸法には、通例、複雑なチップ外での試料ＤＮＡの単離、ＰＣＲ用の一体型微小ヒーターと微小温度センサーが必要であるため、現行のチップとこれを用いた関連法は、極めて高価で、使い捨てができない。

【０００７】

本発明の目的は、様々な生化学的アッセイをリアルタイムで実施するための複数のアッセイステーションが可能となる、使い捨てのマイクロチップを提供することである。

【発明の概要】

【０００８】

本発明は、例えば、被験者（ｓｕｂｊｅｃｔ）の疾病の有無を検出診断し、及び／又は増幅された核酸産物を検出し、又は薬理遺伝学的測定を行うのに有用なマイクロチップ装置とアッセイシステムに関する。前記装置は、１以上のアッセイステーションを有する基材と、試料流体と隔離媒体の導入と流動が促進されるように設計配置されたチャネルと、を備える。前記装置には、一体型の試料調製部分を設けることができ、本発明によって、改善された結果検出システムが提供される。

【０００９】

本発明は、多種類のアッセイを行うことができるマイクロチップ装置に関する。本明細書で使用する「アッセイ」という用語は、試験又は実験によって検査される物質の任意の定性又は定量分析を意味し、タンパク質、抗体、核酸断片のほか、本分野である種のアッセイに一般的に用いられる任意の指示物質又はマーカーなどの物質（これらに限定されるものではない）の不存在を示す反応が含まれる。前記マイクロチップは、一般的には、少なくとも１つのアッセイステーションを備え、各アッセイステーションは第一及び第二のアッセイステーションチャネルと連通させることができる。アッセイステーションと連通された多目的チャネルであって、そこから試料溶液及び／又は隔離媒体を導入し、マイクロチップに誘導するための多目的チャネルも提供される。

【００１０】

本発明の１つの実施形態は、疾病を検出するための装置であって、前記基材の中に組み込まれた基材と、白血球を濾過するように構成することができる試料調製チャンバーと、該試料調製チャンバーに流体を通じて連結されている試料導入口と、前記試料調製チャンバーに流体を通じて連結されている緩衝液導入口と、フロー促進流体チャンバーと、フロー促進流体を格納するための格納チャンバーであって前記フロー促進流体チャンバーに流体を通じて連結されている格納チャンバーと、前記フロー促進流体チャンバーに流体を通じて連結されている試料調製チャンバーと、を備えた装置に関する。さらに、本発明は、前記試料調製チャンバーから前記フロー促進流体チャンバーへの流体のフローを隔離し且つ可能とする隔離装置と、前記フロー促進流体チャンバーに流体を通じて連結された第一の多目的分配チャネルと、少なくとも１つのアッセイステーションと、前記アッセイステーションに流体を通じて連結された第一の多目的チャネルと、前記フロー促進流体チャンバーから一又は複数の前記アッセイステーションへの流体のフローを隔離し且つ可能とする隔離装置と、を備えることができる。さらに、少なくとも１つの緩衝液導入口であって、前記第一の多目的チャネルに流体を通じて連結された緩衝液導入口と、前記アッセイステーションに液体を通じて連結された第二の多目的チャネルと、該第二の多目的チャネルに液体を通じて連結された注入口であって通気を与えることができる注入口と、を設けることもできる。前記試料調製チャンバー、格納チャンバー、フロー促進流体チャンバー、アッセイステーション、及び前記チャネルは、前記基材の内部に組み込んでもよく、所望であれば、環境から遮蔽させることができる。

【００１１】

本発明の別の側面では、前記フロー促進流体チャンバー、付属チャネル、及び格納チャンバーは省略され、これらのチャンバー中で行われる機能は、代わりに、試料調製チャンバー中で行われる。

【００１２】

前述の装置は、病態の有無を検出する本発明の方法を実施するために用いることができる。典型的な方法では、例えば、動物、植物、及びその他の生体（ｌｉｖｉｎｇ　ｏｒｇａｎｉｓｍ）などの生物（これらに限定されない）などの被験者から得た被検試料中で、病態の有無が検出される。本方法は、（ａ）前記隔離装置を前記隔離位置に置いて、前記アッセイステーション中に特定のＤＮＡ断片を堆積させ、前記アッセイステーションを乾燥させる工程と、（ｂ）密封層を前記アッセイステーションに付与する工程と、（ｃ）生物の血液試料を前記試料導入口の中に注入する工程と、（ｄ）前記緩衝液導入口に洗浄緩衝液を注入して、前記試料調製チャンバー中に前記血液の試料と前記洗浄緩衝液との混合物を形成せしめる工程と、（ｅ）赤血球を白血球から分離させ、前記試料調製チャンバー中に前記白血球を残存させる工程と、（ｆ）前記緩衝液導入口に溶解緩衝液を注入して、ＤＮＡ断片を含有する前記白血球を前記溶解緩衝液中の溶液中に溶解させる工程と、（ｇ）前記試料調製チャンバー中に気体を注入することにより、前記溶解緩衝液を前記フロー促進流体チャンバー中に押し出す工程と、（ｈ）前記化学物質格納チャンバーから前記フロー促進流体チャンバー中に化学物質を拡散させる工程と、（ｉ）前記隔離装置により、ＤＮＡ断片を含有する前記溶解緩衝液を前記第一の多目的チャネル中に流動させ、アッセイステーションに流動させる工程と、（ｊ）前記ＤＮＡ断片を含有する前記溶解緩衝液で前記アッセイステーションが充填された時点を検出する工程と、（ｋ）前記ＤＮＡ断片を増幅する工程と、（ｌ）前記増幅されたＤＮＡ断片を検出する工程と、を備える。

【００１３】

本発明は、少なくとも１つのアッセイステーションを有する基材を備えた装置であって、前記少なくとも１つのアッセイステーションは少なくとも１つの第一のアッセイステーションチャネルを有し、且つ特定の実施形態では少なくとも１つの第二のアッセイステーションチャネルを有してもよい装置に関する。本明細書において使用するアッセイステーションという用語は、アッセイが行われる領域を意味する。特定の実施形態においては、アッセイステーションは、例えば、隔離媒体によって囲まれた領域を備える。前記第一及び第二のアッセイステーションチャネルは、それぞれ独立に、前記少なくとも１つのアッセイステーションと連通される。前記アッセイステーションと流体を通じて連通されている少なくとも第一及び第二の多目的チャネルの配置が与えられる。前記第一の多目的チャネルと第一のアッセイステーションチャネルは、試料溶液を伝導させ得る内部表面特性を有している。例えば、水性の流体試料を与えるのであれば、前記チャネルは親水性とするか又は親水性となるように処理を施すことができる。特定の実施形態では、とりわけ、異なる相対幾何学的特徴を有するチャネルが連通されている場合には、あるチャネルの形状（幾何学的特徴）により、当該チャネルに伝導的特性又は非伝導的特性が付与される。

【００１４】

少なくとも１つの試料流体注入口は、少なくとも前記第一の多目的チャネルと連通されており、少なくとも１つの隔離媒体注入口は、少なくとも前記第一及び第二の多目的チャネルと連通されている。少なくとも１つの前記第二の多目的チャネルは、前記試料溶液を伝導させない少なくとも１つの内部表面部分を有する。例えば、前記試料流体が水性であれば、前記第二の多目的チャネル内部表面は疎水性であるか、又は疎水性になるように処理が施されているであろう。

【００１５】

前記装置は、少なくとも１つのアッセイステーションを密封する密封層をさらに備えることができる。所望であれば、前記密封層は、前記少なくとも１つのアッセイステーションのみを密封してもよいし、あるいは、基材表面全体を含む前記装置の基材の一部を密封してもよい。

【００１６】

１つの実施形態では、前記第一の多目的チャネルの内部表面は、試料流体、空気、及び隔離媒体のうち少なくとも１つを貫流させることができ、前記第二の多目的チャネルの前記内部表面は、空気又は隔離媒体のうち少なくとも１つを貫流させることができるが、前記試料流体は貫流させない。

【００１７】

本発明の別の実施形態では、前記第二のアッセイステーションチャネルと前記第二の多目的チャネルとの交差部と直接に隣接する前記多目的チャネルの前記内部表面及び／又は前記第二のアッセイステーションチャネルの表面は何れも、前記試料流体を伝導させない。さらに、この実施形態により、試料流体のアッセイステーションへの局在が容易になるとともに、前記アッセイステーションの密封（ｓｅａｌｉｎｇ）と隔離（ｉｓｏｌａｔｉｏｎ）も容易となる。

【００１８】

少なくとも第一及び第二の多目的チャネルが、それぞれ、前記複数のアッセイステーションの前記第一及び第二のアッセイステーションチャネルを介して、複数のアッセイステーションと連通されるように、前記基材を構成することができる。前記複数のアッセイステーションは、少なくとも前記第一の多目的チャネルと前記第一のアッセイステーションチャネルを介して前記複数のアッセイステーションに伝導される試料流体溶液によって、前記複数のアッセイステーションに同時又は順次の充填のうち少なくとも１つが為されるように配置される。さらに、前記複数のアッセイステーションは、複数のアッセイステーションを密封するための隔離媒体によって、前記第一及び第二の多目的チャネルに同時又は順次の充填のうち少なくとも１つが為されるように配置することもできる。

【００１９】

前記アッセイステーションの中には、少なくとも１つの反応アッセイ成分を配置することができる。例えば、ＰＣＲを計画しているのであれば、前記反応アッセイ成分は１以上のプライマー及び／又はプローブであり得る。

【００２０】

試料流体注入口は試料流体調製領域と連通させることが可能であり、前記基材には、蓋を有しても又は有しなくてもよい試料調製チャンバーのうち少なくとも１つを設けることができる。前記装置又は基材の中には、前記チャネルの少なくとも１つにおける流体のフローを調節するための少なくとも１つの要素を取り込ませることができる。

【００２１】

前記基材上の前記チャネルにおける試料流体のフローは、フロー促進流体を導入するためのチャンバーを通じて、フロー促進流体を前記試料流体中に導入することによって促進させることができる。

【００２２】

前記チャンバーは、前記フロー促進流体を試料溶液と混合するためのチャンバーと連通させることができる。

【００２３】

さらに、本発明には、本発明の前記基材上で反応を実施する方法が包含される。

【００２４】

典型的な方法は、少なくとも１つの試料注入口に試料流体を導入することと、前記少なくとも１つの多目的チャネルを介して前記少なくとも１つのアッセイステーションと前記第二のアッセイステーションチャネルを充填することと、前記少なくとも１つの隔離媒体注入口から隔離媒体（ｉｓｏｌａｔｉｏｎ－ｍｅｄｉｕｍ）を少なくとも前記第一の多目的チャネルに流入させることと、前記少なくとも１つのアッセイステーションで少なくとも１つの反応を行うこととを備える。前記アッセイステーションでの反応は、少なくとも１つの定性的データ又は定量的データ（例えば、比色分析の結果）を与える。前記少なくとも１つの定性的データ又は定量的データは、フルオロフォア又は蛍光標識されたプローブが少なくとも１つインターカレートされることによって生じ得る蛍光を用いて取得することができる。蛍光を用いる場合には、前記基材中の前記アッセイステーションには、少な

くとも１つの励起周波数を照射することができる。前記プローブは、少なくとも１つのフルオロフォア、酵素、又は結合複合体の成分によって標識することができる。本方法の結果、アッセイされている試料流体に関連する少なくとも１つの定性的データ又は定量的データが得られる。典型的には、典型的な定性的データ又は定量的データは、例えば、蛍光共鳴エネルギー転移、ルミネセンス、又は比色変化によって与えることができる。

【００２５】

所望であれば、前記基材上で行われる反応は、例えば、温度循環条件（ｔｈｅｒｍｏｃｙｃｌｉｎｇ　ｃｏｎｄｉｔｉｏｎ）などの温度制御下で実施することができる。前記被検試料は、まず少なくとも１つの予備操作に該被検試料を供することによって前記装置に供給することもできる。この予備操作は、前記基材とは別のところで行ってもよいし、前記基材の上又は内部に存在する少なくとも１つの予備ステーションにおいて行ってもよい。

【００２６】

前記少なくとも１つの予備操作は、例えば、前記基材上の前記アッセイステーション中で実施すべき反応に使用できる核酸を与えることができる。

【００２７】

さらに、前記少なくとも１つのアッセイステーション中に、少なくとも１つのアッセイ反応成分を配列又は配置してもよい。病原性（ｖｉｒｕｌｅｎｃｅ）、疾病、特定の表現型、又は個体間若しくは種間変異若しくは差異と関連した核酸配列の変異の検出が、前記反応によって与えられることもある。このような核酸配列中の変異には、一塩基多型（ＳＮＰ）、タンデムリピート、挿入及び／又は欠失などがある。

【００２８】

実施可能な前記少なくとも１つの反応には核酸増幅工程が含まれ、このケースでは、アッセイ反応成分に一又は複数のプライマーを含めてもよいかもしれない。

【００２９】

本発明の方法では、隔離媒体によって前記多目的チャネル中の試料流体を置換することによって、前記アッセイステーションの密封又は隔離が行われる。前記隔離媒体は、少なくとも前記第一及び第二の多目的チャネルの中に連続して導入してもよいし、少なくとも前記第一の多目的チャネル中にまず導入した後に、少なくとも前記第二の多目的チャネル中に導入してもよい。前記隔離媒体は、典型的には、前記試料流体とは反対の性質を有する物質、すなわち、前記試料流体と実質的に混和しない物質である。

【００３０】

隔離媒体の導入によって、前記少なくとも第二の多目的チャネルからは空気が追い出され（ｐｕｒｇｅ）、前記少なくとも第一の多目的チャネルからは前記試料流体が追い出されるので、前記試料隔離を含有する前記少なくとも１つのアッセイステーションが隔離される。前記隔離媒体が固化可能な場合には、本方法は、前記隔離媒体を固化、硬化、重合させる工程のうち少なくとも１つを備える。

【００３１】

本発明の具体的な実施形態は、使い捨て可能な試料調製一体型マイクロ流体装置(sample-preparation integrated microfluidic device)及びこのような装置を用いた方法に関するが、これらに限定されるものではない。本発明の前記装置と方法によって、生体試料中の疾病のリスクを迅速に検出及び／又は評価するために核酸（例えば、ＤＮＡ）を分析することが容易となる。本発明の前記装置は、例えば、遺伝子フィンガープリンティング等の薬理遺伝学的な測定のために増幅された核酸産物を検出するのに用いることができる。本明細書において、「検出する」又は「検出」又は「検出している」という用語は、被験者の被検試料が少なくとも１つの疾病関連核酸を含有していると診断又は示唆することを意味する。「装置」とは、核酸を輸送し、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）等の核酸増幅を実施するために必要な要素を組み込んだチップを意味する。前記装置には、例えば、ヒトの血液試料から白血球を捕捉できるサイズにした要素であって、チップ上での核酸の単離に必要な要素（マイクロフィルター等）を必要に応じて組み込んでもよい。本発明によれば、ＤＮＡ分子は、被検試料（例えば、生体試料）から迅速に分析することができる。

１つの実施形態では、前記装置に一度付与すれば、前記被検試料はアッセイされ、疾病の有無を診断し又は疾病を発症するリスクを評価する。本発明によって用いられる「被検試料」には、動物組織と血液が含まれる。被検試料は、全血であることが好ましい。１つの実施形態では、被験者から得た組織ホモジネート又は血液試料が、本発明の前記アッセイシステム中で検査される。本発明の装置と方法によって被検試料をアッセイする場合、組織試料をホモゲナイズし、消化し、ろ過して固体の破片を除去し、本発明の装置にかけることができる溶液中のＤＮＡを取得するのが慣例である。

【００３２】

例えば、感染性病原体（ウイルス、細菌、真菌、プロトゾア、微生物等）又は癌性腫瘍の存在は、フルオレセイン等の蛍光分子で予め標識されたウイルス特異的プライマー又はｃＤＮＡ又は断片を与えることによって検出することができる。被検試料ＤＮＡは、前記装置を通って前記プライマーに導かれ、被検試料が発症ウイルスを含有していれば、ＰＣＲの後に、そこで蛍光シグナルが生じるであろう。

【００３３】

本発明の生体被検試料は、静脈穿刺又は組織生検等の周知の技術を用いて、被験者から取得される。ヒト以外の動物（例えば、家畜）から生体被検試料を取得する場合には、家畜処理場から血液と組織試料を取得するのが一般的である。実施する実施形態に応じて、被検化合物を与えてもよいし（例えば、注入する）、あるいは、必要に応じて、溶液中に遊離させてもよい。本発明で想定している動物には、例えば、ヒト、爬虫類、家畜、鳥類、イヌやネコ等の飼い慣らされたペットが含まれる。好ましい動物は、ヒトである。

【００３４】

本発明によれば、前記装置は、様々なチャネルサイズ（すなわち、長さ、幅、高さ、直径）を有し得る実験室チップ(lab-on-a-chip)である。例えば、前記多目的チャネルは、約１ｍｍから約５００ｍｍの長さ、約２ｍｍから約１０ｍｍの幅、約０．５ｍｍから約１０ｍｍの厚さを有することができる。前記アッセイステーションチャネルも同様のサイズを有することができ、典型的な長さは約０．０１ｍｍから約５０ｍｍである。試料調製領域は、約５ｍｍから約１００ｍｍの長さ及び幅とし、約．５ｍｍから約１０ｍｍの高さとすることができる。前記装置は、１以上の試料導入注入口と、１以上のチャンバーと、（流体のフローを収容するサイズである）１以上の相互に接続されたチャネル（チャネル全体又はチャネルの一部の表面は、本来的に疎水性若しくは親水性とするか、又は疎水性物質若しくは親水性物質で処理するかを選択できる）と、核酸（例えば、ＤＮＡ及びＲＮＡ）を増幅するための１以上のアッセイステーションとを含有することができる。前記装置は、シリカで誘導体化された表面等の少なくとも１つの核酸吸着性表面も含有することが好ましい。あるいは、前記装置は、被検試料から白血球を分離するための膜フィルターを少なくとも１つ含有してもよい。１つの実施形態では、実質的に直ちに検出結果を得るために、生体被検試料を抽出した後に前記装置上で本発明の方法が実施される。「実質的に直ちに」とは、約５分から約２時間で結果が得られることを意味する。後に加工（ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ）が所望されるのであれば、別の実施形態では、本発明は、チップ外で試料を前処理し、被検試料を保存しておくことも想定している。フローセルソーティング装置又は遠心装置等から被検試料を取得する場合には、一般に、前処理が用いられる。ＤＮＡ又はＲＮＡの試料調製プロトコールは、「Sambrook et. al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition」に記載されており、及び／又は、ＤＮＡを結合するカラム／膜を用いた、Ｑｉａｇｅｎ、Ｗｈａｔｍａｎ等のキットを用いて行うことができる。

【００３５】

前処理を行う場合、その後の増幅を阻害し又は産物の蛍光分析を妨害する可能性がある非核酸分子は除去する。本発明の装置とは分離されたモジュラー式であり得る装置の中で、前処理を行うのが慣例である。本発明の装置と結合され及び／又は流体を通じて連結されることが想定される前処理モジュールは、スタンドアローンモジュールである。スタンドアローンモジュールは、本発明の装置の試料注入口２に接続可能な液体搬送チューブによ

って連結される。

【００３６】

好ましくは、前処理は、チップ上（ｏｎ－ｃｈｉｐ）で行われる。本発明においては、被検試料を前処理するために、体液（血液、便、唾液（ｓｐｕｔｕｍ）、吸引液、スワッブを含む）、ホモゲナイズされた組織試料（髪、口腔スワッブ、生検、吸引液、生物体そのもの）、環境試料（表面スワッブ、食物、水／液体）等の未精製試料中に存在する他の生体巨大分子や小分子からＤＮＡ及び／又はＲＮＡを分離させる。これらの試料は、濃縮し半精製することもできる。例えば、本発明では、バフィーコートの遠心分離を行った後の白血球、インビトロで培養した細胞、及びフローソーティング後に得られた細胞の濃縮又は半精製集団が想定されている。例えば、２１Ｇ－２８Ｇサイズの針等の細い針から固体試料を吸引するという標準操作によって、大きな断片を崩壊させるために、前処理がチップ外（ｏｆｆ－ｃｈｉｐ）で行われる。試料の加工を直ちに行うことができないのであれば、ＤＮＡ又はＲＮＡの分解を阻止するために、前記試料は、例えば、グアニジウムイソチオシアネート等の標準的な化学物質中に保存することができる。

【００３７】

本発明の側面に従えば、ＤＮＡ及び／又はＲＮＡは被検試料から単離される。ＤＮＡ及び／又はＲＮＡは、例えば、グアニジウムイソチオシアネート、水に溶かしてＴｒｉｓ－ＨＣｌでｐＨ７．２に調整したNH_4Cl、等の適切な緩衝液の存在下で、マイクロデバイス上に固定された誘導体化シリカ表面上に吸着させる。核酸は、静電的電荷のために表面に付着する。本発明が想定する吸着性表面には、フィルター付きチャンバー中に保有された粒子ビーズ（ガラスビーズ）、磁場によってチャンバー中に固定化された常磁性粒子、イオン電荷特性に基づいて液体を通過させる膜又はフィルターが含まれる。

【００３８】

固定化又は捕捉された核酸は、望ましくない細胞片や巨大分子を除去するために洗浄するのが慣例である。次いで、順方向のフロー又は逆流により、中性ｐＨの緩衝液（水を含む）を用いて、表面及び／又は核酸の電荷を変化させることによって、ＤＮＡ／ＲＮＡを溶出する。試料導入、洗浄、溶出のための流体の流動は、受動又は能動バルブ及びポンプ、陰圧吸引又は陽圧を用いて行う。好ましくは、シリンジポンプ、手動シリンジ、蠕動式ポンプ、又は真空ポンプ等の１以上のポンプを用いて、被検試料を前記装置の中に導入する。

【００３９】

本発明の１つの側面によれば、核酸は、アッセイステーションにおいて増幅される。検出部と画像を取得するための適切な光学装置とを有するデジタルカメラを用いて、ウェル中の試料から放射される特定波長の光を検出することができる。最小限の増幅後工程を行わずに又は行って、直接且つ同時検出を行うのに十分な量になるまで、核酸を選択的に増幅する。

【００４０】

本発明が想定する増幅反応には、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、又は等温性増幅反応が含まれる。ある実施形態では、主増幅工程の前に、ＲＮＡ標的を増幅するための逆転写工程（逆転写を行うことができる酵素を用いる）を行う。別の実施形態では、逆転写工程は、ＤＮＡ増幅工程と組み合わされる。

【００４１】

本発明によれば、酵素、プライマー、デオキシリボヌクレオチド三リン酸ｄＮＴＰ、蛍光色素、界面活性剤、塩、及び緩衝液等の増幅反応用の慣用試薬とともに、核酸をアッセイステーション中に導入する。別の実施形態では、幾つかの試薬（特に、プライマー及び／又はプローブ）をアッセイステーションに予め付与して、乾燥させてもよい。加えた試料／試薬液体ミックスと接触すると、これらの試薬は可溶化されるであろう。試料／試薬の混合後に、１以上のチャネルを通じて、ミネラルオイル、ワックス等の特徴的な不混和相にある第二の液体をチップに添加することも可能である。前記不混和性液体は、アッセイステーションへの流体のアクセスを「封鎖（ｓｅａｌ　ｏｆｆ）」し、アッセイステーシ

ョンの内容物が隣接するアッセイステーションの内容物と望ましくない混合を起こさないように物理的な障壁として機能するであろう。

【００４２】

本発明の前記装置上に位置するアッセイステーションは、二次元又は三次元に、高密度で配列（ａｒｒａｙ）させることができ、それぞれ、典型的には、約１ｐｌ乃至約５０μｌの容量を有する。本発明は、約１０乃至約５０，０００アッセイステーション中に存在する核酸を同時に増幅し、検出することができる。本発明では、各アッセイステーションを個別に温度調節することも想定されている。好ましい実施形態では、前記アッセイステーションには、共通の温度パラメータが与えられる。共通の温度パラメータを用いると、増幅反応のデザイン、又は試薬の濃度を変動させることによって、単一の温度条件になるように、各アッセイステーション中の反応を最適化することが可能となる。例えば、所定の温度群（例えば、９５℃で変性、５０－６０℃でプライマーのアニーリング、７２℃の伸長工程あり又はなし）を循環させることによって、増幅反応を行い得る。好ましくは、増幅反応は、定常温度（例えば、６０℃）で、等温的に実施される。

【００４３】

本発明によれば、ＤＮＡ増幅による産物は、増幅されたＤＮＡ産物の存在下で特異的に放射される蛍光を検出することによって、インシチュで均一に検出される。例えば、エチジウムブロミド又はＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　Ｉ等の二本鎖ＤＮＡと結合したときに、蛍光を特異的に発するフルオロフォアを用いて、検出が為される。あるいは、蛍光共鳴エネルギー転移を使用し、１又は２個のフルオロフォア標識されたオリゴヌクレオチドプローブを用いて、特異的なＤＮＡ配列を検出することができる。ある実施形態では、増幅プロセスの完了後に前記検出工程を行ってもよい。別の実施形態では、個別の温度循環の後に、検出工程を実施してもよい。さらに別の実施形態では、前記検出工程は、等温性反応の中間時点で、検出工程を行うこともできる。増幅された核酸の検出は、入射ＵＶその他の適切な波長の光のチップ外光源からの励起と放射された波長のチップ外検出装置を用いるデジタルカメラによって行われる。増幅されたＤＮＡ産物の検出結果は、実験中に増幅サイクルゼロの時点で得られた蛍光放射を読み取ることによって実験的に決定された増幅前ベースラインに対して比較される。あるいは、同一のアッセイステーションに存在する異なる蛍光プローブに対して又は異なるアッセイステーションの反応から得られるプローブを用いて、増幅前ベースラインを決定する。

【００４４】

本発明の方法は何れも、前記装置上で行うことが好ましい。前記実験室チップ装置には、例えば、生体試料中のウイルス又は細菌ＤＮＡの存在を検出し、疾病のリスクを評価するのに必要な要素が一体化されて全て含まれている。このため、本発明では、ＤＮＡの定量的測定と定性的測定の両方を用いて、被験者が疾病又は症状を有するリスクを評価できると考えられる。例えば、被検試料中にＢａｃｉｌｌｕｓ　ａｎｔｈｒａｃｉｓのＤＮＡが存在すれば、被験者が炭疽病を引き起こす細菌に曝露され、当該細菌に関連する疾病を有するリスクがある可能性が示唆される。逆に、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｎｔｈｒａｃｉｓのＤＮＡが被検試料中に存在しなければ、被験者は当該細菌に関連する疾病を有していないことが示唆される。

【００４５】

本発明によれば、現在知られている又は将来発見される感染性細菌又はウイルス疾患をいくつでも被検試料中に素早く検出することができる。本発明によって検出できるこのような疾病には、炭疽病、天然痘、レジオネラ症、ＡＩＤＳ、Ａ型、Ｂ型、及びＣ型肝炎、結核症、マラリアが含まれるが、これらに限定されるものではない。別の側面では、本発明によって、癌、白血病、サラセミア、喘息、アレルギー、連鎖球菌性咽頭炎（ｓｔｒｅｐ　ｔｈｒｏａｔ）又は咽頭痛（ｓｏｒｅ　ｔｈｒｏａｔ）、食中毒、子供と成人の近視、ニパウイルス感染症、及び性感染症を検出できる。

【００４６】

本発明は、被検試料中の薬を検出することもできる。本発明の本側面は、例えば、迅速な

薬物スクリーニングのために、ある組織中に薬物が存在することを測定するために、薬効の評価のために用いることができる。本発明のさらに別の側面では、遺伝子組換え食品の検出及び遺伝子フィンガープリンティングが行われる。例えば、遺伝子組換え食品に関連する用途では、前記チップは、食物中に人工的に導入された遺伝子をＰＣＲによって検出することになろう。遺伝子フィンガープリンティングに関する用途では、前記チップは、個体間（ヒト、植物、及び動物）のＤＮＡ配列の変動をＰＣＲによって分析することになろう。

【００４７】

前記チップ装置及び流体ネットワークは、ガラスエッチング、プラスチック加熱エンボス加工、プラスチック射出成形、樹脂注型、レーザー切断、ステレオリソグラフィー、フォトリソグラフィー、ＬＩＧＡプロセス、ＣＮＣ機械加工光硬化、又は金属成形技術等の既存の微細加工技術によって、マイクロスケールレベルで製造し、開放チャネル等の開放構造及びアッセイステーションを有するチップを成形させることができる。開放チャネル及びアッセイステーションは、次いで、密封し、カバーフィルム又はプレートにより閉鎖させ得る。

【００４８】

前記チャネルの大きさは、典型的には、１μｍから１０ｍｍの範囲であり得る。従って、微細加工（ｍｉｃｒｏｆａｂｒｉｃａｔｉｏｎ）は一つの選択肢にすぎず、チップ１００を製造するための唯一の手段というわけではない。コンピュータ数値制御（ＣＮＣ）機械加工、金属成形、プラスチック射出成形、又は加熱エンボス加工等のより一般的なその他の技術も、製作に使用することができる。

【図面の詳細な説明】

【００４９】

図１と図２には、基材３６の上に構築されている、試料流体調製領域を有するチップ装置１００の典型的な微細構造が示されている。基材３６は、ガラス、プラスチック、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）等のエラストマー、金属、セラミック、又は複合材料のような適切な素材から作製することができる。チャネル及びアッセイステーションを提供するために、例えば、ガラス基材に対して、様々な標準的ガラス化学エッチング技術を用いることができる。基材３６を与えるために（金属粉末の充填物を加えた又は加えない）プラスチックを用いるのであれば、本分野で公知である、エンボス加工金型を用いた加熱エンボス加工、プラスチック射出成形、樹脂注型（ｒｅｓｉｎ　ｃａｓｔｉｎｇ）、レーザー切断、ステレオリソグラフィー、フォトリソグラフィー、ＬＩＧＡプロセス、ＣＮＣ機械加工光硬化、及びプラスチック化学エッチング技術を使用することができる。ＬＩＧＡプロセスは、典型的には、ポリメチルメタクリル酸（ＰＭＭＡ）等のレジスト構造でのシンクロトロン放射を行い、前記構造を露光し、前記構造を化学的に現像して、レジスト構造のパターンに基づいたマイクロ金型を得ることを備える。金属粉末充填は、例えば、基材３６がプラスチックで構成されている場合に、熱の伝導を向上させるために用いることができる。エラストマーの基材を使用するのであれば、複製（固体微小構造化金型上である種のエラストマーを硬化させる）と成形技術を使用することができる。さらに、シリコンやシリコンをベースとした化合物を用いて、基材３６を作製することもできる。次いで、基材３６は密封層４０で密封され得る（上面図には図示されていない）。密封するのであれば、アッセイステーション２６の一部のみを密封したり、あるいは、それぞれ、アッセイステーションチャネル２４、２８、及び／又は第一及び／又は第二の多目的チャネル３０と２２と併せて、アッセイステーション２６を密封するなどの様々な構成の密封を与えることができる。前記密封層は、熱的ボンディング、静電的ボンディング、粘着的ボンディングを含む（これらに限定されない）ボンディングプロセスによって、通常、チャンバー６及び全ての注入口と排出口を除き、前記チャネルと一又は複数のアッセイステーションを密封するプラスチックフィルムである。前記密封層４０は、ガラスプレート又はプラスチックプレート又はポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）等の他の素材からなってもよい。

【００５０】
特定の実施形態では、前記密封層４０は、ゴム、エラストマー、ゲル、及び／又はバルブ／蓋（機械的及び／又は電気的及び／又は磁気的及び／又は化学的手段で開けることができ、被覆されたアッセイステーション２６の中に、例えば、シリンジを導入して、アッセイステーション２６の中に、例えば、特定のアッセイ反応成分を付与することができる）等の自己回復／密封タイプの材料から構成することもできる。シリンジを除去すると、密封層は、自動的に密封されるであろう。しかし、特定の実施形態では、自己回復／密封タイプの素材は使用されないことがある。

【００５１】
前記アッセイステーション又はその一部と様々なチャネルの製造は、基材３６又は密封層４０のうち何れか１つのみに限定する必要はない。例えば、アッセイステーション構造の一部を基材３６又は密封層４０の上に形成し、チャネル構造の一部を密封層又は基材の上に作製してもよい。密封層４０と基材３６をボンディングさせた後、基材３６と密封層４０の上／中に設けられた様々な要素の一部が、適切な配置でまとめられ、完全なチャネルその他の構造を与える。

【００５２】
装置１００の実施形態は、少なくとも１つのフロー調節要素を含んでもよい。フロー調節要素には、例えば、使用者の要望や流体のフローを制御／調節する必要性に応じて、例えば、チャネルや合流点を含む装置の実質的に任意の部分に設けることができる様々なバルブ、ゲート、障害（ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ）が含まれる。

【００５３】
アッセイステーション２６は、任意の数又はタイプ／クラスのアッセイ反応のうち少なくとも１つの成分を備えることができる。この少なくとも１つ成分には、例えば、核酸、プローブ、プライマー、抗体、細胞、アッセイ塩（ａｓｓａｙｉｎｇ　ｓａｌｔ）、触媒、レポーター、消光物質、酵素、タンパク質、ペプチド、薬物、小分子、及びフルオロフォアが含まれるが、これらに限定されるものではない。さらに別の例には、分子のコンビナトリアルライブラリー、ペプチドライブラリー、核酸ライブラリー、又はアプタマーライブラリーから得られた合成分子が含まれる。アッセイ反応の前記少なくとも１つの成分は、キャリアを介して少なくとも１つのアッセイステーション２６の中に配置してもよい。キャリアのごく一例には、水溶液、溶媒、及びゲルが含まれるが、これらに限定されない。前記少なくとも１つのアッセイステーション２６の中に少なくとも１つの成分を堆積させるためのキャリア（例えば、噴霧又はインクジェット堆積）として、空気及び気体を考えることもできる。このように用いられる一又は複数の担体は、例えば、蒸発によって取り除けるように適合させてもよい。オーブン、ランプ、レーザー、フォースエア（ｆｏｒｃｅ　ａｉｒ）等のキャリアを取り除くその他の方法も、当業者に周知である。例えば、プローブ及び／又は細胞等の前記少なくとも１つの成分は、共有結合及び／又は吸収によって、アッセイステーション２６の内部表面に結合させてもよい。

【００５４】
密封層４０の結合の前に、ＰＣＲ等の増幅反応を前記アッセイステーション２６の中で実行すべき場合には、手動で又は液体分注ロボットによって、基材３６上の各アッセイステーション２６の中に増幅すべき核酸断片及び／又は一又は複数のプライマーを堆積させてもよい。次いで、アッセイステーション２６を乾燥させ、密封層４０を追加する前に、反応成分のキャリアを取り除く。特定の実施形態では、アッセイステーション２６を乾燥させる前に密封層を追加してもよいし、幾つかの実施形態では、前記ステーションを乾燥させる必要がないこともある。他の実施形態では、アッセイを実行する間に加えられた密封層４０を有することもある。自己回復／密封層が用いられる場合には、アッセイステーション２６が試料流体５６で充填された後に、プローブ／プライマーを加えてもよい。

【００５５】
増幅すべき核酸断片には、標準的な方法を用いて、当業者が一般的に採取できるＤＮＡ又はＲＮＡ断片、ｃＤＮＡ、核酸プライマー及び／又はプローブが含まれるが、これらに限

定されない。例えば、本発明において有用なＤＮＡ断片は、市販のＤＮＡ合成機の中で予め組み立てることができる。前記アッセイステーションは、本発明の教示に従って、風乾してもよい。乾燥は、室温、大気圧下で行うことができる。アッセイステーションの数に応じて、乾燥には、約１０分から約５時間を要することがある。好ましくは、前記アッセイステーションは約２時間で乾燥される。

【００５６】

好ましくは、毛管力によって液体のフローを増大させるために、基材３６と密封層４０は何れも、親水性表面を有する。典型的な親水性基材３６はガラスである。プラスチック等の本来疎水性である物質には、希釈したフッ化水素酸又は硫酸を用いてプラスチックを処理することにより、前記物質を親水性物質に転換させることができる。本発明によって想定されている疎水性物質の表面特性を改変するための別の方法は、疎水性物質（例えば、プラスチック）に親水性ポリマー溶液を加えるか、又は界面活性剤を加えることである。

【００５７】

例えば、当業者であれば、表面、特に、例えば、プラズマ処理又はコーティング等のマイクロ流体用途に使用すべき表面を処理／修飾するための多数の様々な方法に習熟している。一例として、親水性表面を有することを一般に特徴とするガラスには、表面又は表面の一部が代わりに疎水性特性を有するように処理を施してもよい。使用者の好みの応じた構成の装置を提供するために、このような処理を用い、本発明の教示に従って、一定の特性（例えば、湿潤特性等）を有する装置及び／又は装置１００の部分を提供してもよい。様々なチャネル及びステーションの表面は、例えば、所望される表面特性の配置を与えるために、全体的に、差次的に、又は任意の組合せで処理された表面を有する様々な部分（すなわち、基材、密封層）を有することができる。

【００５８】

例えば、図１の２２、２０、及び３０等のチャネルは、所望のパターンを有するデザインされたマスクを用いるフォトリソグラフィーによるパターン形成の後に、例えば、スライドグラス上のフッ化水素（ＨＦ）酸によって化学的にエッチングすることができる。まず、約７０％の硫酸と過酸化水素の約３０％水溶液（約３０％H_2O_2）との新たに調製した混合物中に、エッチングしたスライドを約１００℃で約１０分間浸漬させる。次いで、それぞれ水道水を数回をかけた後、脱イオン化水をかけて、前記スライドを完全にすすぐ。この工程の間、例えば、スライドのすべての部分が完全に湿潤されるかどうか、スライドをチェックし、疎水性部分が残存していないかチェックする。もちろん、それらの領域の表面特性を変化させることを使用者が望まなければ、前記スライドの一又は複数の部分に処理を施さなくてもよい。上記の例では、親水性のガラス表面が得られる。

【００５９】

プラスチック基材上に親水性表面を得るための典型的な方法では、例えば、ポリ（メチルメタクリル酸）（ＰＭＭＡ）、ポリカーボネート、ポリイミド、ポリプロピレン、ポリエチレン等の親水性物質を使用して、プラスチック表面を処理することができる。親水性物質には、ポリ（エチレンイミン）（ＰＥＩ）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリアクリル酸等の本分野で公知のものが含まれる。例えば、ＰＥＩ溶液をコートし又はまぶし、次いで、０．５乃至１時間、オーブン中で乾燥させることによって、以前には疎水性であったプラスチック基材に、親水性表面が与えられる。

【００６０】

チャネル２２及びチャネル２４の一部に疎水性表面を得るためには、以下の工程が用いられる。

【００６１】

一旦処理してから、使用直前まで、脱イオン化水中に、きれいなスライドを保存する。典型的には、使用する前に、約１－２時間、約１００℃、大気圧で、これらをオーブン中にて乾燥する。何らかの前駆体化学物質を使用する場合には、乾燥洗浄された前記物質の表面に、約１時間、ＵＶ－O_3酸化をさらに照射して、最後に残った微量の混入物質を除去し、自己組織化単層膜（ＳＡＭ）の品質を向上させる。（例えば、オクタデシルトリクロ

ロシラン（ＯＴＳ）等の長鎖アルキルトリクロロシランのような）前駆体分子が、適切な溶媒（例えば、ヘキサン、ヘキサデカン等）中において、約１０％濃度の比で新たに調製される。次いで、例えば、室温で、約１５－２０分間硬化させるために、一定の割り当てられた領域中にこれらをまぶすか又は噴霧する。３Ｍが製造しているＥＧＣ－１７００等のフッ素系アクリル酸ポリマーを用いる場合には、約１．５％の酢酸を用いて前記コーティング溶液を新たに調製し、約８０乃至約１００℃で、約３０分間、最終処理された被コーティングスライドをオーブンで硬化することが必要である。このようにして、パターンが形成された親水性表面（ガラス）と疎水性表面（処理を施されたガラス）が得られる。これは、基材の表面特性を改変するための当業者に公知である多数の典型的方法の１つにすぎない。

【００６２】

典型的には、チャネル５を介して、被検試料注入口２が試料調製チャンバー６に流体を通じて連結されるように、被検試料（例えば、全血）用の被検試料注入口２は基材３６の上方表面と垂直に接続される。典型的には、チャネル７を介して、緩衝液注入口４が試料調製チャンバー６に流体を通じて連結されるように、緩衝液注入口４も基材３６の上方表面に垂直に接続される。例えば、焼結ガラスブロック３１から全血試料、溶解緩衝液、及び洗浄緩衝液の混合物を抽出するために、吸収剤５及び／又は真空ポンプ等の真空吸引手段が付与された焼結ガラスブロック３１によって、試料調製チャンバー６は、下方表面の少なくとも一部が密封されている。

【００６３】

試料調製チャンバー６の中に挿入されている焼結ガラス粉末３１のブロックは、多孔性ガラスとも称される。典型的な孔のサイズは、約１μｍから約５００μｍの範囲である。焼結ガラスブロック３１は、試料調製チャンバー６の下方部分を占めており、典型的には、僅かなサイズの差によって（すなわち、ガラスブロック３１のサイズは、試料調製チャンバー６のサイズより僅かに大きい）、チャンバー６の内部に強固に固定される。粘着性物質を用いて、試料調製チャンバー６の内部にガラスブロック３１を固定することもできる。

【００６４】

ガラスブロック３１の下に真空が作出される（すなわち、吸収剤５による液体吸収）ことによって、試料、洗浄緩衝液、及び溶解緩衝液がガラスブロック３１から抽出される。溶出緩衝液を試料調製チャンバー６の中に注入する。溶出緩衝液は、ガラスブロック３１の中に浸透し、ガラスブロック３１の表面からＤＮＡ分子を放出する。次いで、試料調製チャンバー６の中に含有された溶出緩衝液中にＤＮＡ分子が拡散する（又は循環流による）。従って、この時点で、溶出緩衝液はＤＮＡ分子を含有する。また、引き続きＰＣＲ反応及びＰＣＲ産物の蛍光検出を行うために必要とされる他の化学物質を、この時点で、溶出緩衝液に加えてもよい。

【００６５】

別の実施形態では、細胞を溶解するために、溶解緩衝液を使用又は添加する必要はない。代わりに、熱を用いて細胞を溶解する。試料調製チャンバー６の中に残存している時点で、又はアッセイステーションの中に導いた時点で、細胞を溶解温度まで加熱して、そこで溶解させることができる。特定の実施形態では、各アッセイチャンバー２６において個別にサーマルサイクリングを行うために、小型加熱機と温度センサーを各アッセイステーション２６中に組み込んでもよい。さらに、試料流体中の溶質（例えば、ＤＮＡ）の濃度を増加させるために、熱を用いて、ある量の溶出緩衝液を蒸発させてもよい。この蒸発工程は、例えば、試料調製領域７８又は各アッセイステーション２６において実施することができ、この場合、前記密封層４０は、例えば、気体透過性であるが、液体透過性ではないようにすることができる。

【００６６】

別の実施形態では、様々な電気化学的センサー並びに電気及び電子工学センサーを、各アッセイステーション２６中に組み込むことができる。この実施形態を用いると、前記アッ

セイステーション内でアッセイを実施した結果、電気化学を基礎とした検出／データが使用者に与えられる。データは、電気伝導度、抵抗、当業者に公知である、電気化学的検出を用いた実験で典型的なその他の指標の変化の形態であり得る。

【００６７】

本発明によって提供される装置及び方法は、数多くの様々なアッセイ／反応に利用できる。例えば、必要とされる酵素、蛍光色素、デオキシリボヌクレオチド三リン酸ｄＮＴＰ、界面活性剤、及びその他の化学物質や緩衝液を全て、緩衝液注入口４を通じて試料調製チャンバー６に添加することができる。溶出効率を増大させることが必要であれば、ダイアフラム４８を押さえるために、振動式アクチュエータ３４を用いて典型的には垂直に振動させることにより、前記試料調製チャンバー６の中の溶出緩衝液を攪拌し、より多くのＤＮＡ分子がガラスブロック３１から放出され、試料調製チャンバー６を占めている溶出緩衝液の中に進入するようにすることができる。

【００６８】

緩衝液注入口４を完全に閉鎖して被検試料注入口２から、流体（例えば、ガス又はオイル）を試料調製チャンバー６に注入してもよいし、あるいは、溶出緩衝液で充填されるまで、緩衝液注入口を開放したまま通気孔として機能させながら、被検試料注入口２から注入してもよい。前記流体は、放出されたＤＮＡ分子を含有する溶出緩衝液を追い出し、典型的なフロー調節要素（疎水性バルブ８）を開放させるので、試料溶液とフロー促進流体とを混合するための当初空であるチャンバーの中に溶出緩衝液が進入することが可能となり、ここで、溶出緩衝液がチャンバー１２を充填する。前記バルブ８は、機械、電気、空気圧、磁気式等の様々な他の手段によって操作されるバルブタイプとすることもできる。この時点では、主液体分配チャネル２０への入り口に配置された疎水性バルブ１８によって、前記溶出緩衝液はチャンバー１２を出ることができない。この場合にも、流体の供給は、加圧等の慣用技術によって行うことができる。

【００６９】

チャンバー１２中の緩衝液がアッセイステーションに流出する前に、チャンバー１２を以下の目的に使用することもできる。（１）チャンバー１２から流出する緩衝液を計量する（すなわち、チャンバー１２の容量を適切に選択することによってチャンバー１２から流出する緩衝液の容量を調節する）、（２）緩衝液がチャンバー１２から流出する前に、前記ＤＮＡの分布が均質化するまでの間、緩衝液を保持する、（３）先述したように、緩衝液中の水の一部を蒸発させることによって、チャンバー１２中のＤＮＡ濃度を増加させる。アッセイステーション２６に流れる緩衝液中のＤＮＡ濃度が増加すると、ＤＮＡ検出の感度と特異性が増大する。

【００７０】

ある実施形態では、拡散チャネル１４を通じてチャンバー１２に放出されるフロー促進流体（ＦＰＦ）を導入するために、チャンバー１６が与えられる。適切なフロー促進化学物質には、ヘパリン、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、臭化セチルトリメチル（ＣＴＡＢ）、Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ、Ｔｗｅｅｎ　２０、ＮＰ－４０、及び、その後のＤＮＡ増幅と検出化学反応を阻害せず且つ検出光励起下で蛍光を発しない他の任意の界面活性剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。ＦＰＦがチャンバー１２中に拡散すると、チャンバー１２の中に濃度勾配が確立されるであろう。

【００７１】

特定の実施形態では、１以上の主試料流体チャネル２０は、少なくとも１つの第一の多目的チャネル３０に流体を通じて連結されており、多目的チャネル３０は、少なくとも１つのアッセイステーションチャネル２８及び少なくとも１つのアッセイステーション２６と連通されている。ＤＮＡを含有する前記試料流体中のＦＰＦの化学濃度が臨界値に達するにつれて、疎水性バルブ１８の表面上にある試料流体の液体湿潤が十分大きくなり、前記緩衝液は、バルブ１８を通じて、チャンバー１２から主試料流体チャネルに流入し、さらに、第一の多目的チャネル３０、第一のアッセイステーションチャネル２８、及びアッセイステーション２６の流入する。本実施形態では、液体を前進させる表面張力によって生

成された毛管圧によってフローが引き起こされる。このような表面張力は、試料流体とチップの固体表面の間にある接触領域（すなわち、チャネル２０、３０、２８、及びアッセイステーション２６の表面）に生成される。ＦＰＦを添加すると、表面張力が十分低下するので、バルブ１８を通じて前記試料流体が流動し、他の全てのチャネルとアッセイステーション中に移動する。

【００７２】

この毛管圧によるフローの間に、チャネル２０、３０、２８及びアッセイステーション２６が試料流体で充填されるように、アッセイステーション２６と第二の多目的チャネル２２とに流体を介して連結された少なくとも１つの第二のアッセイチャネル２４を通じて、チャネル２０、３０、２８、及びアッセイステーション２６中の空気容量が試料流体によって少なくとも追い出される。全てのアッセイステーション２６が試料流体によって確実に充填されるように、チャンバー１２の容積容量は、少なくともチャンネル２０、３０、２８及びアッセイステーション２６の合計容積以上になるように設計される。

【００７３】

前記試料流体が第二の多目的チャネル２２に流入するのを防ぐために、以下の措置を講ずることができる。（１）前記第二のアッセイチャネル２４の内部に、バルブを取り付けることができる。このようなバルブは、機械、気圧、又は電磁気等の動作手段によって動作させることができる。（２）少なくとも１つの第二のアッセイチャネル２４の内部に多孔性物質を設置して、試料流体のフローは遮断するが、空気は第二の多目的チャネル２２の中に通気するようにすることができる。（３）前記第二のアッセイチャネル２４の少なくとも一部を疎水性物質の層で被覆して、試料流体のフローは遮断するが、空気は第二の多目的チャネル２２の中に通気するようにする。前記疎水性物質には、ポリ（スチレン－ブタジエン－スチレン）（ＳＢＳ）、ポリ（メチルメタクリレート）（ＰＭＭＡ）、ポリカーボネート、ポリイミド、ポリプロピレン、ＯＴＳ、フッ素系アクリル酸ポリマー（３Ｍ製造のＥＧＣ－１７００など）、又はエポキシ樹脂が典型的に含まれ得るが、これらに限定されるものではない。例えば、ＳＢＳを有機溶媒中に溶解させて溶液を形成させ、これをガラス又はプラスチック表面上に与え、乾燥により極めて薄いフィルムを得ることができる。ガラス又はプラスチック表面上にエポキシ樹脂を直接滴下させて、紫外線（ＵＶ）硬化又は加熱により薄いフィルムを形成させることも可能である。（４）前記試料流体が第二のアッセイチャネル２４を占有するが、第二の多目的チャネル２２の中に進入することはできず、第二の多目的チャネル２２の中に空気を追い出すことができるように、前記疎水性物質は、少なくとも１つの第二の多目的チャネル２２を被覆する。

【００７４】

特定の実施形態では、試料流体５６のフローが第二の多目的チャネル２２の中に進入しないようにするために、典型的には図１７に図示されているように（このタイプの構成例の側断面図を図示している）、第二の多目的チャネル２２の幅／直径は第二のアッセイチャネル２４の幅／直径より大きくなるようにする。

【００７５】

試料流体５６のフローを停止させ且つ第二の多目的チャネル２２に進入しないようにするためには、アッセイチャネル２４の末端近くを大幅に拡大させるのが有効であり、これは急激に拡大するように作製してもよい。様々なチャネルの間に図示された線は、説明のためだけに記されているものであり、前記例示の図面における様々なチャネルとその空間的関係を図解的に示している。

【００７６】

オクタデシルトリクロロシラン（ＯＴＳ）を用いる場合には、適切な溶媒（例えば、ヘキサン、ヘキサデカン等）中に約１０％濃度の比率で新たに調製することが好ましい。この後、例えば、室温で約１５－２０分間にわたって硬化させるために、一定の割り振られた領域中に前記溶液をまぶす（ｂｒｕｓｈ）か又は噴霧する。このようにして、疎水性表面が得られる。３Ｍ製造のＥＧＣ－１７００等のフッ素系アクリル酸ポリマーを用いる場合には、前記コーティング溶液は、約１．５％の酢酸を用いて新たに調製され、例えば、約

８０℃乃至約１００℃で約３０分間、被覆された完成スライドをオーブンの中で硬化させるのが好ましい。

【００７７】

デジタルカメラ３２は、全てのアッセイステーション２６が試料流体によって充填される時点を検出する。前記デジタルカメラは、電荷結合素子（ＣＣＤ）検出部と画像を取り込むための考え得る全てのタイプの適切な光学機器とを備えたカメラであり得る。アッセイステーション２６中の液体から放射される特定波長の光のみが、フィルターを通過して、（前記カメラによって検出すべき）前記検出部に到達できるように、光学フィルターは、前記カメラの検出部の前に配置される。

【００７８】

全てのアッセイステーション２６が充填された時点で、以下に一例を挙げた手段、すなわち、例えば、電気浸透ポンピング、陽圧加圧（シリンジによる注入等）、毛細管流動、エレクトロウェッティング、サーモキャピラリーフロー（ｔｈｅｒｍｏｃａｐｉｌｌａｒｙ　ｆｌｏｗ）、及び／又は真空吸引のうち任意のものを用いることによって、それぞれ、第一及び第二の多目的チャネル３０及び２２に流体を通じて連絡している注入口４２、４４、４６、及び２１から選択した組合せを通じ、隔離媒体５４を導入してもよい。前記多目的チャネルの上に密封層４０を与えない実施形態では、例えば、注入（ｃａｓｔｉｎｇ）及び／又はロボットによる分配によって、隔離媒体を堆積させてもよく、これにより、前記第一の多目的チャネル３０から試料流体５６が追い出されるであろう。隔離媒体のチャネル３０及び２２への充填は、順次に行ってもよいし、同時に行ってもよく、前記第一の多目的チャネルからまず試料流体を追い出す隔離媒体を注入口から導入した後、続いて、空気を追い出すために前記第二の多目的チャネルの中に隔離媒体を導入することによって行われるのが通例である。

【００７９】

従って、前記隔離媒体５４は、第一及び第二の多目的チャネル３０及び２２を完全に充填する。前記隔離媒体５４は、溶出緩衝液が浸透しないように選択される。すなわち、緩衝液は媒体５４の中に拡散することができない。前記隔離媒体５４は、典型的には、蝋、熱硬化性蝋、オイル、相変化プラスチック（ｐｈａｓｅ－ｃｈａｎｇｉｎｇ　ｐｌａｓｔｉｃｓ）、熱硬化可能なポリマー液体、シアノアクリル酸及びその誘導体、二液型エポキシ（ｔｗｏ－ｐａｒｔ　ｅｐｏｘｙ）、又は紫外（ＵＶ）若しくは可視光で硬化可能なポリマー液体、及び熱溶解性物質（例えば、グルー・ガンに通例用いられているもの等）であり得る。さらに、典型的な隔離媒体５４には、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）エラストマー等の熱硬化性ポリマー、並びに他のシリコーンエラストマー及び液体シリコーン前駆体が含まれるが、これらに限定されない。硬化活性温度は、約４０℃を超える温度であり得る。

【００８０】

ポリアクリル酸やその誘導体、ポリウレタン前駆体やその誘導体等の典型的な紫外線（ＵＶ）硬化可能隔離媒体５４を用いることもできる。ＵＶ又はその他の適切な照射源には、例えば、一又は複数のレンズによって、多目的チャネル２２及び／又は３０上に焦点を当てたＵＶランプ、多目的チャネル２２及び／又は３０の領域がＵＶに曝露されるように適切なくり抜き部位を有するマスクを着けた後に露出状態を保っている、多目的チャネル２２及び／又は３０の領域上に照射するＵＶランプが含まれる。さらに、多目的チャネル２２及び／又は３０を含有する隔離媒体５４上に導かれ得る局所照射源には、光ファイバー等の局所ＵＶ源も含まれ得る

さらに別の典型的な隔離媒体５４は、例えば、溶媒の蒸発により固化する任意の接着剤も含むことができる。このような隔離媒体５４を用いる場合には、密封層４０及び／又は基材の中に、適切な通気穴及び／又はスロット等の準備を与えてもよい。通気穴及び／又はスロットは、例えば、多目的チャネルを覆う密封層４０の領域中に設けることができる。

【００８１】

隔離媒体５４は、水及び／又は水性液体（界面活性剤を含有する水及び／又は水性液体を

含む）と実質的に混和しないことが好ましい。隔離媒体５４は、非透過性及び／又は（アッセイを妨害しないと思われる波長又は強度の）蛍光放射性のものとすることができ、低い粘度を有し得る。

【００８２】

多目的チャネル２２／３０の導入及び充填後に、隔離媒体５４が液体の形態のままで残存している実施形態においては、例えば、固化可能な封止剤６７（例えば、蝋、熱融解粘着性液体、ポリマー液体、エラストマー）を堆積させて、多目的チャネル２２と３０中の外気と流体（試料流体５６及び／又は隔離媒体５４等）との間に存在する全ての界面を密封する。キャップ、蓋、バルブ等の他の密封構造も、気液界面を密封するために用いることができ、固化可能な封止剤６７及びキャップ、蓋、及びバルブは、１００℃付近までの温度に耐え得ることが好ましい。封止剤６７及び／又は他の密封構造によって、アッセイステーション中の液体／流体が一定容量となるので、蒸気の発生や、ＰＣＲ中における、例えば、温度上昇時に起こる他の任意の配分（ｒａｔｉｏｎ）が抑えられる。固化可能な封止剤６７は、ロボット、手動、及び、マイクロ流体の分野において公知であるその他の分注手段によって堆積させることができる。

【００８３】

さらに別の実施形態では、アッセイステーションからの蒸発を最小限に抑えるために、アッセイステーション中に試料流体５６を誘導した後に、オイル／蝋タイプの隔離媒体５４に代えて、前記多目的チャネルの中には、大気若しくは飽和湿度の空気、又は他の任意の飽和湿度の蒸気を導入配置してもよい。第一の多目的チャネル３０から試料流体５６を追い出すために、大気若しくは飽和湿度の空気又は他の任意の飽和湿度の蒸気を用いてもよい。

【００８４】

さらに、別の実施形態では、アッセイステーションからの試料流体の蒸発を最小限に抑えるために、試料流体５６の蒸発温度が上昇するように、囲い５１４の内部に配置するときには、分子分析装置等の分析の間に、前記チップ１００に大気圧を超える圧力をかけてもよい。

【００８５】

本実施形態では、前記アッセイステーションアレイ中の隣接するアッセイステーションにＤＮＡ又はその他の化学物質が拡散しないように、各アッセイステーション２６の中に含有された試料流体中のＤＮＡ又はその他の化学物質は、アッセイステーション２６、第一のアッセイステーションチャネル２８、第二のアッセイチャネル２４のドメイン内に隔離される。隔離媒体５４の隔離特性は、１００℃付近の温度まで維持される。ＰＣＲプロセスの最高温度は９５℃なので、その後のＤＮＡ増幅工程において、交差汚染は起こらない。隔離媒体５４の注入は、電気浸透、注入による陽圧加圧、キャピラリーフローエレクトロウェッティング、サーモキャピラリーフロー、又は真空吸引等の慣用技術によって行うことができる。

【００８６】

さらに、アッセイステーション２６に、例えば、標識プローブその他の望ましくない反応成分が非特異的に結合したものなど、少なくとも１つの望ましくない反応成分を洗い流すために、洗浄工程を付加してもよい。これは、例えば、アッセイステーション２６の内部表面に強固に結合されたプローブ／マーカー分子が用いられ、目的の分子（例えば、ＤＮＡ）にも結合する実施形態において用いることができる。アッセイ反応が完了すると、アッセイ反応の非特異的成分を洗い流すために、洗浄工程（多目的チャネル及びアッセイステーション及びチャネルの中に、（例えば、真空又は圧力によって）洗浄緩衝液を導入することから構成される）が行われる。アッセイチャンバー２６の表面に結合しているマーカー／プローブは後に残され、次いで、マーカー／プローブに結合した目的の分子の有無をアッセイする。

【００８７】

各アッセイステーション２６は、蛍光色素を含有することができる。デジタルカメラ３２

は、蛍光色素から発せられる白色光及び／又は蛍光発光画像をともに捉える。前記チャンバー、チャネル、及びアッセイステーション（すなわち、流体区画とチャネル）が基材３６の表面下に組み込まれておらず、外気に曝されている場合には、流体区画並びにチャネル２０、３０、２８及びアッセイステーション２６の全ての上方表面に前記密封層４０を与えてもよい。密封層４０は、好ましくは、試料調製チャンバー６に被検試料を加える前に、前記基材に結合させるべきである。試料調製チャンバー６、注入口２、４及び２１、４２、４４、４６の入り口には、密封層４０を与えなくてもよい。用いるアッセイプロトコールとそれに伴う温度に応じて、密封層４０は、チャネル２４及び／又は２２の上方表面から省略することもできる。特定の実施形態では、密封層４０によってチャネルとアッセイステーションを外気から密封して、キャピラリーフローを増大させ、注入又は真空による液体の流動を可能としてもよい。前記密封層４０は、熱的ボンディング、静電的ボンディング、機械的ジョインティング（ｊｏｉｎｔｉｎｇ）、粘着的ボンディングを含む（これらに限定されない）ボンディング工程によって、試料調製チャンバー６と全ての導入用注入口以外は、チャネルとアッセイステーションを密封するプラスチックフィルムであるのが一般的である。前記密封層は、少なくとも１つのガラスプレート、プラスチックプレート、熱可塑性物質（ｔｈｅｒｍｏｐｌａｓｔｉｃ）、エラストマー、プラスチックフィルム、及び熱によって活性化される接着剤のうち少なくとも１つから構成することもできる。さらに、基材と同じ素材で密封層を構成してもよい。密封層４０と基材３６は、ＵＶやその他の波長（可視スペクトルの波長を含む）を透過し、実験の測定／結果を妨害する蛍光を発しないことが好ましい。

【００８８】

さらに別の実施形態では、密封層４０には、様々な位置に穴／通気孔を設けてもよい。例えば、前記密封層中に存在する少なくとも１つの穴は、例えば、チャネル又は廃棄物貯蔵タンク等の様々な領域上の位置（穴を複数設ける場合には複数の位置）に設けてもよい。さらに、密封層４０は、気体透過性物質によって作製してもよいと考えられる。これにより、例えば、装置１００から液状流体が失われるのを防ぐ障壁を与えながら、流体を放出させることが可能となるであろう。このような密封層が設けられる場合には、通気穴によって、流体や様々な媒体を様々なチャネル中に流動できるようにする必要はないかもしれない。

【００８９】

前記チャネル２０、３０、２８、２４、及び２２の幅は、典型的には、約１μｍから約５ｍｍの範囲とすることが可能であり、前記チャネルの深さは、典型的には、約１μｍから約１ｍｍの範囲とすることが可能である。前記アッセイステーション２６の幅又は直径は、典型的には、約１μｍから約１０ｍｍの範囲とすることができ、深さは、典型的には、約１μｍから約１ｍｍの範囲とすることができる。各種チャネル２０、３０、２８、２４、及び２２の表面湿潤特性と寸法は、他のタイプのチャネルと異ならせることができる。前記構造物は全て、微小電気機械システム（ＭＥＭＳ）技術、コンピュータ数値制御ＣＮＣ機械加工、レーザー機械加工、放電機械加工（ＥＤＭ）、化学エッチング、射出成形、加熱エンボス加工、又は打抜き加工等の方法を用いて製造することができる。

【００９０】

各アッセイステーション２６には、先述したように、ＤＮＡ増幅に必要とされる温熱条件を与えてもよい。このような温熱条件には、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）に必要とされるサーマルサイクリングが含まれる。

【００９１】

さらに、本発明の別の実施形態では、被検試料注入口２又は緩衝液注入口４を通じて試料調製チャンバー６中の溶出緩衝液にＦＰＦを添加して、アッセイステーション２６の中にフローを動かすことができる。この場合には、チャンバー１２、チャネル１４、及びチャンバー１６は不要である。このチップデザインは、図３と図４に示されている。ここでは、図１及び図２に示されているバルブ１８の機能をバルブ８が果たしている。他の全て点で、チップ１００のデザイン及び試料の調製と分析の動作方法は、図１及び図２に示され

ているものと同一である。従って、さらなる論述は行わない。

【００９２】

また、チップ表面（全チャネルと全アッセイステーションの表面）が親水性であれば、チップ操作のいかなる段階においても、ＦＰＦを使用する必要は全くない。この場合には、試料流体が水性なので、バルブ８を開放すれば、試料流体は全てのチャネルとアッセイステーション中に単独で流入することができる。バルブ８とバルブ１８はともに、任意の手段（例えば、機械、電気、磁気、化学、又は気圧）によって操作することができる。

【００９３】

特定の実施形態では、前記装置には試料調製領域を設けなくてもよく、この場合、試料流体の調製は、「チップ外（ｏｆｆ－ｃｈｉｐ）」で行われる。従って、図５Ａ－Ｅに図示されているような典型的構成を与えることができる。図５Ａでは、基材３６は、第一のアッセイチャネル２８と第二のアッセイチャネル２４とが連通した少なくとも１つのアッセイステーション２６を有している。さらに、隔離媒体注入口４２は、第二の多目的チャネル２２と連通するように設けられている。さらに、典型的な試料溶液注入口２１も、第一の多目的チャネル３０と連通するように設けられている。図５Ａの実施形態では、貯蔵タンク４５は、第一の多目的チャネル３０と第二の多目的チャネル２２とに連通するように描かれている。２組のアッセイステーション、アッセイステーションチャネルと多目的チャネルしか示されていないが、あらゆる個数の複数の組を設けてもよい。さらに、先述した特定の実施形態のように、特定の領域上に密封層４０を設けることもできる（図５Ａ－Ｅは上面図なので、図示されていない）。典型的な構成には、例えば、実行すべきアッセイのタイプや基材３６とともに用いられるであろう流体の特性に応じて、アッセイステーション２６のみをカバーし又は多目的チャネルの一方又は両方も合わせてカバーする密封層４０が含まれる。

【００９４】

幾つかの実施形態では、第一のアッセイチャネル２８は、図５Ａ－Ｅに示されているように、前記第二のアッセイチャネル２４より小さな断面積を有する。これにより、アッセイステーション２６に進入する試料流体５６の速度及び／又はフローが減少するため、アッセイステーション２６への試料流体５６の進入によって空気が置換されて、第二のアッセイチャンバーチャネル２４を通じて、第二の多目的チャネル２２の中に導かれる。試料流体５６がアッセイステーション２６に流入し、最終的にはアッセイステーションチャネル２４に流入するので、これにより、エアポケットが形成されてアッセイステーション２６内に閉じ込められる可能性が減少する。

【００９５】

本明細書では、環状の切断面形状／外形を有するように、第一のアッセイステーションチャネル２８が典型的に図示されているが、試料流体５６が第一の多目的チャネル３０に流出するのを最小限に抑えるためにフローを制限する任意の形状を該チャネルは有することができる。

【００９６】

図５Ｂでは、第二の多目的チャネル２２に隣接する第二のアッセイステーションチャネル２４の部分５０には、試料溶液５６のフローを伝導しない表面特性を付与することができる。例えば、第二の多目的チャネル２２は、疎水性表面を有することができ、あるいは疎水性表面を与えるように処理することができる。本実施形態では、試料溶液５６が水溶液であれば、該試料溶液５６は、試料溶液注入口２１を通じてアッセイステーション２６及び第一の多目的チャネル３０に流入する（本例では、親水性の表面特性を有する）。同様に、第一のアッセイチャネル２８及びアッセイステーション２６の表面も、例えば、親水性表面を有する。試料溶液５６は、第二の多目的チャネル２２に流動し、第二の多目的チャネル２２の疎水性表面特性のために、又は（図１７に図示されている実施形態の場合のように）第二のアッセイチャネル２４から第二の多目的チャネル２２に向けてチャネルの直径が突如増大しているために停止する。図示されているように、第二のアッセイチャネル２４の部分５０も、疎水性表面特性を有することができ、試料流体５６のフローは、例

えば図５Ｂ、Ｃに示されているようにこの地点で停止する。

【００９７】

図５Ｂ、Ｃに図示されている実施形態では、貯蔵タンク４５には、吸収剤５を付与してもよい。吸収剤５は、セルロースをベースとした材料又は合成材料、ポリアクリルアミドゲル、粒子、及び多孔性材料のうち少なくとも何れか１つから構成され得る。貯蔵タンク４５は、密封層４０によって密封してもよいし、大気に対して開放されていてもよい。さらに特定の実施形態では、図５Ｂ（上面図）に示されているように、密封層４０によって吸収剤５をカバーする場合には、。流体のフローが様々なチャネル中に生じ得るように、通気孔５２を設けてもよい。さらに、ここでは、貯蔵タンク４５と吸収剤５が、多目的チャネルの複数の終末部分と連通できるのに十分なサイズを有するように描かれているが、多目的チャネルの終末部分は、専ら貯蔵タンク及び／又は吸収剤５と連通し、他の全ての多目的チャネルとは連通しないようにすることも想定される。

【００９８】

アッセイステーション２６を密封するためには、隔離媒体５４を第一の多目的導管３０に流入させる。隔離媒体５４は、様々な方法及び本発明の様々な実施形態に従って導入することができる。例えば、隔離媒体５４は、隔離媒体注入口２１を介して第一の多目的チャネル３０に導入することができる。特定の実施形態では、例えば、図１及び３並びに図５Ａ－Ｅでは、隔離媒体注入口２１は、図５Ａに示されているように、試料液体注入口２１及び隔離媒体用の注入口として二重又は多重の役割を果たすことができる。他の実施形態、例えば図１に示されている実施形態では、二重目的を果たさずに、空気と隔離媒体５４のフローを伝導する第二の多目的チャネル２２への注入口である一又は複数の注入口４２を介して、隔離媒体５４が導入され得る。先述したように、隔離媒体５４は、アッセイステーション２６を密封する役割を果たすだけでなく、例えば、第一の多目的チャネル３０から試料流体５６を置換する役割も果たす。図５Ａに例示されているように、置換された試料流体５６は貯蔵タンク４５（密封層４０で密封してもよいし、密封しなくてもよい、あるいは吸収剤５を含有してもよいし、含有しなくてもよい）に流動し得る。

【００９９】

これまでに記載した置換によって、第一の多目的チャネル３０から試料流体５６の流出が起こる。しかし、前記第二の多目的チャネル２２の中に隔離流体５４を与えることによって、さらなる置換を行ってもよく、この場合には、隔離流体５４は試料流体５６を置換せず、空気を置換する。本実施形態においては、第二の多目的チャネル２２の表面は、例えば、本来的に疎水性であるか又は処理を施すことによって疎水性とし得るので、領域５０で試料流体のフローを停止させるように作用することを思い出していただきたい。隔離媒体５４を前記第二の多目的チャネルに導入すると、その中の空気は置換されるので、アッセイステーション２６又は複数のアッセイステーション２６が前記隔離流体５４によって密封される。これによって、あるアッセイステーションの内容物が蒸発して、別のアッセイステーションの内容物と交差汚染する懸念がなくなる。

【０１００】

典型的な第二の多目的チャネル２２に隔離媒体５４を導入し得る方法は数多く存在する。図５Ｃに図示された実施形態によれば、隔離媒体５４は注入口２１を介して導入され、流動し、試料流体５６を前記第一の多目的チャネルから貯蔵タンク４５の中に移動させる。図示されているように、これにより、アッセイステーション２６の下方部分が部分的に密封されることになる。次いで、隔離流体を吸収剤５の中に流入させた後、矢印で記されているように、第二の多目的チャネル２２と連通した状態にし、前記第二の多目的チャネル２２に流入させて、その中の空気を置換し、アッセイステーション２６の上方部分を密封するので、一又は複数の前記アッセイステーション２６が完全に密封される。本実施形態では、例えば、図５Ｄに示されているように、注入口４２は通気孔として働き、第二の多目的チャネル２２の中に隔離流体を導入するための入り口としては働かないであろう。

【０１０１】

図５Ｄには、前記多目的チャネルと連通させることができる、着脱可能な吸収剤５要素が

図示されている。ここでは、吸収剤５が過剰な試料流体５６を取り込み、過剰な隔離媒体５４を取り込む場合もある。さらに、吸収剤５を付与することによって、各第一の多目的チャネル中に存在する試料流体５６の列上に別の「引っ張り」力（ｐｕｌｌｉｎｇ　ｆｏｒｃｅ）を与えて、一又は複数のアッセイステーション２６の充填を加速させることもできる。図５Ｄでは、隔離媒体５４が注入口２１と４２を介して導入される。図５Ｅでは、アッセイステーションは密封され、吸収剤５が除去されているので、その中に過剰な試料流体が含有されている。先述したように、吸収剤５は、隔離媒体５４をその中に吸収してもよい。

【０１０２】

別の実施形態によって、チップの中に複数の試料流体５６を導入することもできる。典型的な構成が図１８に図示されている。ここでは、共通の第二の多目的チャネル２２が複数のアッセイステーションと連通された状態で設けられている。例えば、図示されているように（３０及び３０’）、該複数のアッセイステーションは、試料流体５６（相互に異なるものであってもよい）をその中に導入することができる複数の独立した第一の多目的チャネルと連通させることができる。これによって、１つの装置上で複数の試料流体／異なる試料流体をアッセイ／検査できるようになる。

【０１０３】

図６Ａ－Ｃには、別の実施形態が描かれている。本実施形態では、一又は複数のアッセイステーション２６に、密封層４０の中に形成された通気穴６６が設けられている（図６Ａには図示されていない、上面図）。図６Ｂ（典型図６Ａの側面図）には、これがさらに明瞭に示されている。ここでは、アッセイステーション通気穴６６は、大気に開放された状態で図示されている。支持体６２は、少なくとも前記アッセイステーション通気穴６６の上に配置され且つ間隙６４を画する隔離媒体プラットフォーム６０を支持するために与えられている。先述した実施形態のように、試料流体５６は第一の多目的チャネル３０の中に導入され、第一のアッセイチャネル２８を介してアッセイステーション２６に流動し、これを充填する。ここでは、第二の多目的アッセイチャネルに流動させることに代えて、図６Ｂに示されているように、試料流体５６は、アッセイステーション２６（又は複数のアッセイステーション２６）とともにアッセイステーション通気穴６６を充填している。続いて、隔離媒体５４は、前述のように、第一の多目的チャネル中の試料流体５６を置換する。しかし、ここでは、隔離媒体５４は間隙６４に導入されている。隔離媒体５４は流動して、図６Ｃに進行状態で示されているように、隔離媒体プラットフォーム６０と密封層４０によって画された間隙６４中を充填する。図６Ｄには、図６Ｃの垂直断面図によって、かかる充填と密封のプロセスが描かれている。図６Ｅには、アッセイステーション中の試料流体が隔離媒体５４によって密封される地点の典型的な実施形態が描かれている。

【０１０４】

固化しない隔離媒体５４が用いられ、隔離媒体５４が固化しない実施形態では、図６Ｆに側面図で描かれているように、全ての流体路（チャネル及び注入口）を密封して大気から隔離するために、例えば、全ての周囲の隔離媒体プラットフォーム６０と全ての排出口及び注入口２１の中に固化可能な封止剤６７を堆積させてもよい。このため、これにより、一定容量の液体（例えば、試料流体５６と隔離媒体５４）がチップ１００の内部に形成されて、ＰＣＲやその他の反応中に温度が上昇したときに蒸気が生成されるのを抑える。封止剤６７は、例えば、蝋、熱溶解組成物、粘着性液体、ポリマー液体、エラストマーの形態とすることができる。さらに、かかる固体封止剤の効果は、キャップ、蓋、及び／又はバルブを任意の好ましい組合せで用いることによっても達成することができる。固化可能な封止剤６７、キャップ、蓋、及び／又はバルブは、最高約１００℃の温度に耐えることが好ましい。

【０１０５】

図６Ｇに転じると、別の典型的な構成が図示されている。ここでは、隔離媒体プラットフォーム６０は用いられておらず、アッセイステーション通気穴６６は、アッセイステーションチャネル２４上の典型位置に移動されている。ある種の実施形態では、全ての流体路

を隔離し、先に詳述したように、大気から一定量の流体を供給することにより、流体（例えば、アッセイステーション中の試料流体５６）の混合を最少限に抑え及び／又は喪失させるために、固化可能な封止剤６７を密封層４０（この上面図には示されていない）の上に直接配置して、アッセイステーション排気穴６６及び排出口と注入口２１を覆ってもよい。特定の実施形態では、試料流体５６と隔離流体５４の充填順序は逆転させてもよい。

【０１０６】

図７Ａ１－７Ｃ４には、充填を行う際の典型的な手順が描かれている。これらの例では、第一の多目的チャネル３０、第一及び第二のアッセイチャネル２８及び２４、並びにアッセイステーション２６は親水性の表面特性を有しているが、第二の多目的チャネルは２２は疎水性表面を有している。特定の実施形態では、多目的チャネル２２の上部に位置する密封層４０の少なくとも一部は疎水性表面を有している。

【０１０７】

図７Ａ－１から７Ａ－４には、典型的なフロー及び充填順序が描かれている。ここでは、試料流体５６は第一の多目的チャネル３０の中に導入され、第一の多目的チャネル３０、第一のアッセイステーションチャネル２８、及びアッセイステーション２６の中を流動して、これらのチャネルを充填し、第二のアッセイステーションチャネル２４に流入し、第二の多目的チャネル２２に隣接して停止する。続いて、図７Ｂ１から７Ｂ４に示されているように、隔離流体５４が、第一の多目的チャネル３０の中に導入され、試料流体５６を置換するが、第二の多目的チャネル２２（この例では、疎水性）と第二のアッセイステーションチャネル２４（親水性）との表面特性が異なるために、試料流体５６は第二の多目的チャネル２２の中には流入しない。このため、前記第一のアッセイステーションチャネル２８中の試料流体５６と前記第一の多目的チャネル３０中の隔離媒体５４との間に存在する界面によって、前記アッセイステーション２６の単離と部分的な密封が達成される。

【０１０８】

図７Ｃ１から７Ｃ４では、第二の多目的チャネル２２に導入された隔離媒体５４がチャネル２２の中を流れて、その中の空気を置換している。第二の多目的チャネル２２の中を隔離媒体５４が流れることによって、前記複数のアッセイステーションの密封が完結する。先述したように、隔離媒体５４と試料流体５６は、実質的に互いに混和しないので、例えば、図７Ｃ－４に示されているように、両者が出会う地点が密封状態となる。多目的チャネル２２及び３０に導入された後に隔離媒体５４が固化しない特定の実施形態では、例えば、前記多目的チャネルの注入口／排出口を密閉するために固体の密栓を用いてもよい。このような固体の障壁により、温度が上昇したときに試料流体５６の気化又は膨張が阻止される。

【０１０９】

図７Ａ１－７Ｃ－４には、まず複数のアッセイステーションとアッセイステーションチャネルに試料流体５６が充填された後に、隔離媒体で密封されるという典型的な手順が図示されているが、この手順が、前記少なくとも１つのアッセイステーション２６を充填し得る唯一の手順というわけではない。図７Ｄ１－２では、あるアッセイステーション（及びアッセイチャネル）は密封されているが、他のアッセイステーション（及びアッセイチャネル）は様々な充填段階及び密封段階にあるように、複数のアッセイステーションを充填することができる。例えば、図７Ｄ２では、一番左のアッセイステーション２６とアッセイチャネルは既に試料溶液５６が充填され密封されているが、隣接したアッセイステーションとアッセイチャネルは充填されているが、隔離媒体５４によって一部が密閉されているにすぎない。これらの様々な典型的順序は、典型的には、第一及び第二の多目的チャネル中に隔離媒体５４を導入するタイミングによって、達成することができる。さらに、多目的チャネル中の流速を調節するために、異なるフロー特性を有するタイプの異なった隔離媒体５４を前記第一及び第二の多目的チャネル２２及び３０中に、それぞれ別異に与えてもよい。さらに、表面エネルギー及び隔離媒体５４との相互作用を変化させる、異なる表面処理を用いて、例えば、流速を調節してもよい。

【０１１０】

上記の充填及び密封の順序に加えて、多目的チャネル中への隔離媒体５４の充填を逆転させてもよい。この例では、上記のように、試料流体５６が導入され、一又は複数のアッセイステーション２６が充填される。続いて、隔離媒体５４が前記多目的チャネルのうちの１つに導入された後、硬化及び／又は重合及び／又は固化されて、例えば、固化された隔離媒体によって一方側が密封されたアッセイステーションを得る。引き続き、（最初に導入された隔離媒体５４と同一の組成又は異なる組成を有する）隔離媒体５４が反対側の多目的チャネル中に導かれ、続いて、硬化／及び／又は重合／固化され得る。かかる順序で試料流体５６と隔離媒体５４を充填すると、極めて粘度の高い隔離媒体を使用できる。アッセイステーションとチャネルには試料流体５４が既に充填されており、実質的に密封された固体の多目的チャネルが一方側に隣接しているので、二番目に与えられる隔離媒体５４に対する力又は圧力を増加させて、前記第二の隔離媒体５４を前記第二の多目的チャネル中に導入することができるが、試料流体がアッセイステーション２６及びアッセイチャネル２４、２８中に残存しているので、置換はされない。これによって、流動させるために加圧が必要なことがある極めて粘度の高い隔離媒体が使用できる。

【０１１１】

ここで図８に転じると、典型的な分析システムが示されている。本例は、例えば、ＰＣＲ等の蛍光を基礎としたアッセイを用いるときに特に有用である。標的ＤＮＡを増幅している間に又は増幅が終了した時点で、各アッセイステーション２６中に含有されている蛍光色素を励起するために必要とされる波長スペクトルを有する励起光源５００をチップ１００の一部又は全部に照射する。励起光５０２は光フィルター５０４を通過し、ここで、光学ハーフミラー５０６によって反射される。反射された光５０８は、透明ウインドウ５１２を通過し、アッセイステーション上に到達する。温度調節のために、囲い５１４でチップ１００全体が囲まれている。温度調節は、チップ１００と向き合った流体操作システム５１８と共同で、温度調節システム５１６によって行われる。囲い５１４には、温度調節システム５１６と流体操作システム５１８も入っている。

【０１１２】

チップ１００が光源５００によって照射されると、アッセイステーション２６の全部又は一部から生じた蛍光放射映像５２０が、カメラ３２のカメラレンズ５２２によって検出される。映像光５２０は、カメラレンズ５２２に到達する前に、他の光を全てカットして蛍光色素から放射された狭いスペクトルの光のみが通過しカメラレンズ５２２に到達するようにするフィルター５１０を通過する。図２と図４ではチップ１００の上にカメラ３２が図示されているが、カメラ３２はチップ１００の上又は下の何れに設置してもよい。図８に示されているように、ＤＮＡをＰＣＲ増幅する場合、各サーマルサイクルの終了時に又は増幅工程が完全に完了した後に、検出を行ってもよい。各アッセイステーションの存在する箇所で、前記映像の蛍光放射強度、放射映像の形状と位置、及び放射強度が解析される。画像化、データ取得、及びデータ処理は全て、コネクター５２６によってカメラ３２に接続され且つコネクター５２８によって温度調節システム５１６に接続され且つコネクター５３０によって流体操作システム５１８に接続されたハードウェア制御コンピュータ５２４によって制御される。

【０１１３】

図９と１０には、分析システムの様々な構成要素の典型的な配置が記されている。図９には、フルオロフォアの励起スペクトル中に励起周波数を含み得る光線が少なくとも１つのアッセイステーションを横又は底から照射する（構成要素にはＡ、Ｂ、Ｃの表記が付記されている）システムの図式的ブロック図が示されている。光源５３０Ａから励起光線として放射された光はビームコリメータ５３２Ａとフィルター５３４を通過した後、少なくとも１つのアッセイステーションを有するチップ１００上に到達する。前記少なくとも１つのアッセイステーション由来の蛍光放射は、光捕捉体５４２Ａと５２４Ｂ及びフィルター５４４によってオプティカルセンサー５４６に結像される。比例積分微分（ＰＩＤ）制御されたサーマルサイクリング装置５３８と二次元移動式ステージ５３６は、マイクロコントローラサブシステム５５０に、次いでメインコンピュータ５４８に接続されている。

【０１１４】
図１０には、光線が少なくとも１つのアッセイステーションを上から照射するシステムの図式的ブロック図が示されている。光源５３０Ｄから励起光線として放射された光がビームコリメータ５３２Ｄを通過し、フィルター５３４Ｄの進行方向が二色性ミラー５４１によって転換せられ、チップ１００に到達する。少なくとも１つのアッセイステーションから発せられた蛍光放射は、光捕捉体５４２Ｂとフィルター５４４によってオプティカルセンサー５４６に結像される。ＰＩＤ制御されたサーマルサイクリング装置５３８と二次元移動式ステージ５３６は、マイクロコントローラサブシステム５５０に、次いでメインコンピュータ５４８に接続されている。

【０１１５】
図８－１０では、５００及び５３０の光源は、レーザー、ＬＥＤ（ＬＥＤアレイ）、又はランプ（連続波（ＣＷ）又はパルス）とすることができる。ビームコリメータ５３２は、光源５３０から発せられた出力光を平行化（ｃｏｌｌｉｍａｔｅ）することが好ましい。ビームコリメータ５３２は、例えば、平凸レンズとすることができ、あるいは、レンズ等の複数の光学部品を組み合わせてもよいし、又はレンズを光ファイバーと組み合わせてもよい。光がビームコリメータ５３２を通過すると、フィルター５４４とともに励起波長を選別し、ある種の色素（例えば、蛍光標識）に対する励起波長及び発光波長バンドセレクターの対を構成するフィルター５３４によってフィルターにかけられる。フィルター５３４は、色素のピーク励起波長に等しいカットオフ波長を有する単一のショートパスフィルターとすることができる。ショートパスフィルターと干渉フィルターを組み合わせた一対のショートパスフィルターを用いることが好ましい。フィルター５４４は、色素のピーク発光波長に等しいカットオフ波長を有する単一のロングパスフィルターとしてもよいし、あるいは、色素のピーク発光波長に等しい中央波長を有する干渉フィルターとしてもよい。

【０１１６】
ある実施形態が図示された図１１Ａ及びＢに移ると、試料調製領域７８が基材３６の上に設けられており、液体により試料流体チャネル２０と連通させることができる。試料調製領域７８は、実施すべきアッセイのタイプに応じて決まる要素から構成され得る。従って、ある実施形態では、核酸単離要素７９と蓋７４を有する試料調製チャンバー６を備えることができる。蓋７４は、注入口７２及び７０と連通されたフロー調節要素８２を有してもよい。注入口７２と７０のうち何れかが、それぞれ溶解溶液、緩衝溶液、溶出溶液等の様々な溶液を受容するように構成することもできるし、あるいは、一方の注入口から試料調製チャンバー６の中に緩衝液を含む様々な流体を導入できるように設置することもできる。核酸単離要素７９は、例えば、本分野において公知である核酸結合膜、ガラスブロック、磁気粒子、又はシリカビーズによって構成することができる。例えば、プランジャーによって、又は８０及び８１に例示されているようなスラスト運動又はプランジング運動を行うプランジャー又は任意の機械部品によって変形させることができる柔軟部９０を密封層４０に設けてもよい。密封層の柔軟部９０の中に押し下げられると、チャネル２０又は廃棄チャネル８４へのフローを停止／妨害することができ、あるいは、フローを停止／妨害させてあるチャネルから別のチャネルに流体のフローを導くようにすることができる。

【０１１７】
図１１ＡとＢの実施形態では、チップ中に残存した洗浄緩衝液を空気により追い出すための空気ポンプを用い、バルブにより調節される「フィッシュポンプ」によって吹き込むことができる。

【０１１８】
さらに、洗浄緩衝液と溶出緩衝液の空気ポンピングは、バルブによって調節される「フィッシュポンプ」によって吹き込むこともできる。

【０１１９】
典型的には、試料の調製は、図１１ＡとＢに示された実施形態に対する以下の典型的な工

程から構成され得る。例えば、ＰＣＲ実験／アッセイをチップ上で実施すべきときには、核酸をその中に有する溶液を、蓋７４を取り去った試料調製チャンバー６の中に入れることができる。続いて、蓋７４を試料調製チャンバー６に戻し、プランジャーバルブ８１を閉じ且つプランジャーバルブ８０を開放した状態で試料調製チャンバー６の中に洗浄緩衝液を導入し、例えば、陽圧又は真空によって、前記洗浄緩衝液を廃棄タンクに誘導する。次に、試料調製チャンバー６とチャネル８８内に残存している洗浄緩衝液を、廃棄チャネル８４を通じて廃棄タンク（図示せず）の中に追い出すために（又は残存している緩衝液を廃棄物中に真空吸引するために）、チップ注入口８６から空気をポンプ供給してもよい。これにより、核酸単離要素７９に核酸が結合する。

【０１２０】

核酸単離要素７９から核酸を溶出するためには、プランジャーバルブ８０と８１を閉鎖し且つ通気のためにチップ注入口８６を開放しながら、試料調製チャンバー６の中に所定量の溶出緩衝液を導入する。試料調製チャンバー６の中に空気が送り込まれると、核酸単離要素７９を通じて、全ての溶出剤をチャネル８８の中に押し出すことができる。次いで、チップ注入口８６を介してＰＣＲ反応混合物（例えば、ｄＮＴＰ、緩衝液、及びポリメラーゼを含む）を溶出溶液に加え、溶出溶液と混合させ（この段階で核酸を含有することになる）、試料流体を得ることができる。最終工程では、試料調製チャンバー６及び／又は注入口８６にオイルを添加し、プランジャーバルブ８０を閉鎖し且つプランジャーバルブ８１を開放して、試料流体チャネル２０を介して、溶出された核酸を有する試料流体とＰＣＲミックスとをアッセイステーションに導くことができる。前記試料流体は、例えば毛管力によって少なくとも１つのアッセイステーションにも流れるので、気圧又は液体圧を加える必要はないであろう。

【０１２１】

本発明に使用することができるアッセイステーションは、様々な構成をとることができる。図１２では、アッセイステーションの中央部にフロー促進構造が設けられている。これらは、複数の節（ｎｏｄｅ）３７から構成させることができる。これらの典型的な構造により、試料流体５６のアッセイチャンバーへのフローも促進させ、アッセイチャンバー内に泡が生じるのを防ぐ。基材３６若しくは密封層４０又は両方の上に形成することができる柱（ｃｏｌｕｍｎ）及び／又は隆起によって、フロー促進構造を構成してもよい。図１３には、第二のアッセイチャネル導管内に形成することができる流体通気チャネル１１０が図示されている。これらのチャネルは、アッセイステーション中への進入速度が速すぎて、矢印で図示されているように、アッセイステーション２６の側壁に沿って移動することがある試料流体５６の流れを変えるのに役立つ。第二のアッセイチャネル２４への入り口で試料流体５６（アッセイステーション２６の側壁に沿って走行することがある）が合流し、泡を生じるのを防ぐために、代わりに、泡を生じずにアッセイステーション２６の中にいわば遅れた試料流体の先頭を充填させつつ、第二のアッセイチャネル２４の中に試料流体を流入させてもよいであろう。

【０１２２】

図１４には、アッセイステーション２６の別の実施形態が図示されている。本実施形態では、第二のアッセイチャネル２４には、勾配付与部１１２が隣接している。勾配付与部１１２によって、第二の多目的チャネル２２が隔離媒体５４で完全に充填されることにより、流体が急な９０°の角度を過ぎるにつれて形成されることがある泡の生成を減らすとともに、製造が容易になる。第一に、疎水性等の所望の特性を付与するために、第二の多目的チャネル２２が処理された表面を有する場合には、施された前記処理（コーティングの付与等）に第二の多目的チャネル２２が曝されるように、基材３６の上にマスクをかぶせるのが通例である。しかし、施した処理が第二の多目的チャネル２２のみに与えられるようにするためには、第二のアッセイチャネル２４の上に正確にマスクを配置させなくてもよいことがある。例えば、マスクの敷設が正確でなく、第二のアッセイチャネル２４に隣接する領域上にコーティングの一部が付与されても、第二のアッセイチャネル２４中への試料流体５６のフロー、充填、最終的な停止に悪影響を与えないように、勾配１１２によ

って、表面処理の付与に対する耐性が増加する。さらに、このような勾配付与部を設けると、第二の多目的チャネル２２を通じた隔離媒体５４のフローが改善され、第二の多目的チャネル２２中での気体の入れ換えが制御されて円滑になり、第二のアッセイチャネル２４と第二の多目的チャネル２２とが（例えば、図１２に図示されているような）急な角で合流したときに泡が発生する可能性を減少させる。

【０１２３】

図１５には、伸長された第一のアッセイチャネル２８を有するさらに別のアッセイステーション２６が図示されている。この構成では、このようなアッセイステーションに流入し充填する試料流体５６に、アッセイステーション内で試料流体を加熱した結果、あるアッセイステーションから別のアッセイステーションに試料流体のフローを生じさせることがある対流が起こらない。これは、第一のアッセイチャネル２８によって与えられる長い遠回りの経路が、例えば前記アッセイステーションから流出し、前記第一の多目的チャネル３０に流入する試料流体５６のフローを遅くするためである。ある種の反応条件下では、アッセイステーションとチャネルを多目的チャネルから密封するために隔離流体が不要なことさえある。

【０１２４】

図１６には、少なくとも第一及び第二の多目的チャネルが配列されている、別の典型的なアッセイステーション２６の構成が図示されている。少なくとも１つのアッセイステーション２６は、第一及び第二の多目的チャネルの中間位置に配置されており、液体を通じてこれらのチャネルと連通している。ここでは、第一の多目的チャネル３０は、試料流体の伝導を可能とする内部表面特性を有しているのに対して、第二の多目的チャネル２２は、試料流体を伝導させない疎水性の表面特性を有していてもよい。前記力／表面特性は、試料流体５６をはじき、アッセイステーション２６中に保持するのに十分な強さを有する。アッセイステーションチャネル２４と２８は、他のチャネルと同じく、円形、半円形、又は他の横断面形状の他に、三角、楕円、菱形の切断面構造等の他の典型構造を有してもよい。

【０１２５】

疾病を検出し、又は疾病のリスクを評価する本発明の方法は、以下の典型的工程を備える。例えば、動物由来の全血の被検試料を被験者から取得する。分析の前に、チップ装置１００上にある各アッセイステーションには、特異的プローブとプライマーのうち少なくとも１つを蓄積させることができ、各アッセイステーションは乾燥される。従って、チップ１００上の全アッセイステーション２６中に、少なくとも１つのＤＮＡプローブ及び／又はプライマーが存在する。各アッセイステーション２６は、少なくとも１つのプローブ又はプライマーを含有している（アッセイの中には（例えば、ＦＲＥＴ）、２つのプライマーと１又は２つの蛍光色素標識プローブが必要なものも存在する）。

【０１２６】

前記被験者から取得した一定量の全血被検試料を、例えば、注入によって、前記装置上に与える。前記装置に加える血液試料の量は、充填すべきアッセイステーションの数を基にして、当業者が決定することができる。但し、一般的には、付与される血液の量は、チップ上に設けられたアッセイステーションを完全に充填するのに十分な量であると思われる。典型的には、約０．０１μｌ乃至約１０ｍｌの試料が、本発明の方法を実施するのに十分であろう。「付与（ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ）」又は「付与された（ａｐｐｌｉｅｄ）」とは、注入、電気浸透、加圧、又は真空手段を含む慣用手段によって、試料を装置に与えることを意味する。

【０１２７】

気体及び／又は液体は、緩衝液注入口４を完全に閉鎖しながら被検試料注入口２を介して試料調製チャンバー６の中に注入するか、緩衝液注入口４が充填されるまで緩衝液注入口４を当初開放しておき、後に閉鎖して、放出されたＤＮＡ分子を含有する溶出緩衝液を追い出し、空のチャンバー１２の中に前記緩衝液を押し入れて、チャンバー１２を完全に充填させる。本発明の方法に適した気体及び／又は液体の例には、空気、二酸化炭素、窒素

、アルゴン、又はオイル等のパージ液（ｐｕｒｇｉｎｇ　ｌｉｑｕｉｄ）が含まれるが、これらに限定されない。次いで、拡散チャネル１４を通じて、チャンバー１６中のフロー促進流体（ＦＰＦ、ｆｌｏｗ　ｐｒｏｍｏｔｉｎｇ　ｆｌｕｉｄ）がチャンバー１２中に放出される。緩衝液（ここでは試料流体）中に含有されるＤＮＡはチャネル２０に流入し、さらに、第一の多目的チャネル３０、第一のアッセイステーションチャネル２８、及びアッセイステーション２６に流入する。

【０１２８】

デジタルカメラ３２は、アッセイステイション２６が全て緩衝液で充填される時間を検出する。隔離媒体５４は、少なくとも１つのポート４４、４６を通じて、チャネル３０と２２の中に注入されて、多目的チャネルを完全に充填する。この場合にも、隔離媒体５４は、典型的には、蝋（ｗａｘ）、オイル、相変化プラスチック、熱硬化可能なポリマー液体、又は紫外線（ＵＶ）硬化可能なポリマー液体であり得る。前記隔離媒体は、予め加熱しておくことにより、約１００℃を超える高温に保たれるか、及び／又は前記チップ１００は高温環境中に置かれる。典型的には、隔離媒体が蝋である場合、蝋のような媒質は固相状態では流動しないので、一定の温度まで蝋を予め加熱する。しかし、熱硬化可能な樹脂やＵＶ硬化可能な樹脂等の他の材料は室温で液状なので、これらの材料は予め加熱する必要がない。全てのアッセイステーションはサーマルサイクラーの中に置かれ、公知の方法に従ってＰＣＲに供される。例えば、「Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, New York, 1995」を参照されたい（参考文献として、本明細書に援用される）。ＤＮＡ増幅に引き続き、各アッセイステーション２６中に含有される蛍光色素（例えば、フルオレセイン）を励起させるのに必要とされる波長スペクトラムを有する励起光源によって、少なくとも前記装置の一部を照射する。照射を行うと、カメラ３２が各アッセイステーション２６に由来する蛍光発光画像を検出する。各アッセイステーション２６に位置する蛍光発光強度、蛍光画像の形状と位置、各アッセイステーション中の画像の発光強度について蛍光発光画像を解析する。

【０１２９】

前記分析装置の主要構成要素は、蛍光発光検出カメラと、例えば、〒４３０－８５８７　日本国静岡県浜松市砂山町３２５－６の浜松から市販されている関連光学機器である。前記カメラと光学系は、液体／試料を注入するための液体操作システムとともに、囲いの中に設置されている。前記分析装置は、ＤＮＡ分子のＰＣＲ増幅に必要とされるサーマルサイクリングを実施するための温度調節システムも有する。

【実施例】

【０１３０】

以下の実施例には、試料を調製し、被検試料からＤＮＡを抽出する典型的な方法が記されており、図１－４に典型例が示してある。

【０１３１】

工程１　試料を注入する

被検試料注入口２から試料調製チャンバー６に、試料、例えば、被検試料（例えば、全血）を注入する。本工程における注入は、加圧、キャピラリーポンピング、又は真空吸引（ガラスブロック３１の下を真空状態にするのが一般的である）などを用いて行うことができる。

【０１３２】

工程２　細胞の溶解と多孔性ガラスブロック３１へのＤＮＡの結合

注入口４から試料調製チャンバー６の中に細胞溶解緩衝液を注入する。細胞溶解緩衝液は、試料中の赤血球と白血球をともに溶解し、白血球からＤＮＡ分子が放出されて、試料調製チャンバー６の中に含有される溶解緩衝液中で懸濁される。

【０１３３】

本発明が想定する細胞溶解緩衝液の一例を記す。

【０１３４】

（１）赤血球を溶解する場合（緩衝液Ａ）：
（ｉ）５００ｍｌの水の中に４．１５ｇのＮＨ$_4$Ｃｌを溶かし、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌでｐＨ７．２に調整する
（ｉｉ）２．０６ｇのＴｒｉｓ塩基を１００ｍｌの水に溶かして、ｐＨ７．２に調整された別の原液を作製する
（ｉ）と（ｉｉ）を９：１の容量比で混合する
（２）白血球を溶解する場合（緩衝液Ｂ）：６Ｍ　ＧｕＳＣＮ（グアジニンイソチオシアネート）と１０ｍＭ　ＥＤＴＡ
上記緩衝液「Ａ」と「Ｂ」は、同時に添加してもよいし、「Ｂ」の前に「Ａ」を加える又は「Ａ」の前に「Ｂ」を加える、というように順次添加してもよい。

【０１３５】
本発明が想定する別の溶解緩衝液は、
（１０ｍＭ　ＴＥ、ｐＨ６．７中の）６Ｍ　ＧｕＨＣｌ（グアジニン（ｇｕａｄｉｎｉｎｅ）塩酸）を用いて、１部の１０％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を１０部に希釈したものである。

【０１３６】
試料調製チャンバー６に注入する前に、試料を溶解緩衝液と混合してもよい。試料調製チャンバー６中の溶解された全血サンプルは（溶解緩衝液とともに）、吸収剤５による吸収作用又は真空によって、ガラスブロック３１を通じて吸引される。ガラスブロック３１は試料中に含有されているＤＮＡを誘引することができるので、溶解された試料がガラスブロック３１を通過する間に、溶解された試料中のＤＮＡ分子はガラスブロック３１の表面に結合する。

【０１３７】
溶解された試料と溶解緩衝液をガラスブロック３１中に通すための上記吸収手段及び真空手段に加えて、以下の手段、すなわち、試料と溶解緩衝液をブロック３１にポンプ注入するための陽圧加圧（シリンジポンプによって生み出された陽圧加圧等）又は電気浸透ポンピングを用いることもできる。

【０１３８】
前記ガラスブロック３１は、ガラスファイバーマット若しくはフロス、ガラス粉末、セルロースファイバーマットなどの非ガラス材、又はＤＮＡ分子を誘引する処理された表面を有する磁気粒子などの他のフィルター材と交換してもよい。前記ガラスブロック３１は、フィルター材を組み合わせて作製することも可能である。前記フィルター材上の前記ＤＮＡ誘引機構は、例えば、静電的な誘引の形態とすることができ、あるいは、前記フィルター材の上に予め固定化しておいた他の分子にＤＮＡを誘引させる形態とすることもできる。

【０１３９】
工程３　チャンバー２とガラスブロック３１の洗浄
緩衝液注入口４を通じて試料調製チャンバー６に洗浄緩衝液を注入し、吸収剤５による吸収又は真空作用によって、ガラスブロック３１の中に洗浄緩衝液を入れる。洗浄緩衝液を流すと、ガラスブロック３１に結合した前記ＤＮＡ分子は残存するが、試料調製チャンバー６とガラスブロック３１中の細胞細片やタンパク質を含むその他の物質は全て、ガラスブロック３１の下にある排水管（吸収体５自体を排水管としてもよい）に流し去られる。本洗浄工程が終了すると、続いて使用するために、単離されたＤＮＡ分子のみが集められる。

【０１４０】
本発明が想定する洗浄緩衝液の一例は、以下のとおりである。２００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、混合物のｐＨを７．５に調整し、１：１．４の容積比で（例えば、１００ｍｌの緩衝液に４０ｍｌのエタノールを加える）、９５％　エタノールにより混合物を希釈する。本発明で想定している別の洗浄緩衝液は、８０％　イソプロパノールである。

【０１４１】
洗浄緩衝液をガラスブロック３１中に導入するための上記吸収手段及び真空手段に加えて、以下の手段、すなわち、洗浄緩衝液をブロック３１にポンプ注入するための陽圧加圧（シリンジポンプによって生み出されたもの等）又は電気浸透ポンピングを用いることもできる。
【０１４２】
工程４　ガラスブロック３１からのＤＮＡの溶出
ガラスブロック３１を乾燥した後、緩衝液注入口４を通じて試料調製チャンバー６の中に溶出緩衝液を注入して、試料調製チャンバー６を完全に占有する。乾燥は、自然乾燥等の方法によって、又は周囲の温度を上昇させることによって、又は熱風を吹き付けることによって行われる。典型的には、乾燥時間は、数秒から数分である。溶出緩衝液の注入は、ガラスブロック３１を通じて試料調製チャンバー６の中に緩衝液を注入することによって行うこともできる（「ボトムアップ」、すなわち、ガラスブロック３１から上方向に注入する）。
【０１４３】
前記溶出緩衝液は、誘引されたＤＮＡ分子をガラスブロック３１から放出させることができ、放出されたＤＮＡ分子は、ガラスブロック３１上にある試料調製チャンバー６中に含有された溶出緩衝液の中に懸濁された状態となる。溶出緩衝液の一例は、加圧滅菌した水である。溶出緩衝液の別の例は、１０ｍＭ　ＴＥ、ｐＨ８．４である。
【０１４４】
溶出効率を増大させるために、振動式アクチュエータ３４はダイアフラム４８を押圧して試料調製チャンバー６とガラスブロック３１の中の溶出緩衝液を攪拌し、より多くのＤＮＡ分子がガラスブロック３１から放出され、溶出緩衝液に入るようにする。
【０１４５】
本発明では、前記ガラスブロック３１を、約５分間、溶出緩衝液中に浸すことも想定されている。
【０１４６】
溶出緩衝液には、その後の分析のために他の化学物質を含有させてもよいし、化学物質を追加してもよい（このように追加される化学物質は、このような化学物質を溶出緩衝液と予め混合した後に、続いて、被検試料注入口２及び／又は緩衝液注入口４から混合物を試料調製チャンバー６に加えることによって添加することができる）。追加すべき化学物質として想定されているものには、ＤＮＡを増幅するための酵素、蛍光共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）、ＴａｑＭａｎ（登録商標）(Roche Molecular Systems, Inc., Somerville, NJ)、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ（登録商標）(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)、及びＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｅａｃｏｎの原理に基づいてＤＮＡ分子を蛍光検出するための蛍光色素、並びにＤＮＡ増幅及び蛍光検出を行うために必要とされる他の任意の化学物質が含まれる。本工程における注入は、加圧、キャピラリーポンピング、真空吸引等によって行うことができる。
【０１４７】
図１に示されているごとく、溶出緩衝液がチャンネル１０の注入口に到達できるように、溶出緩衝液の量は、試料調製チャンバー６を完全に占有させるべきである。バルブ８が存在しているので、この操作工程中には、溶出緩衝液は試料調製チャンバー６の中に留まっている。
【０１４８】
チャンバー６の範囲外に溶出緩衝液が移動すると、引き続き分析を行うＤＮＡ分子が失われることになるので、可能な限りこれを防止するように努めなければならない。（とりわけ、吸収体５を不用意に接触させることは避けなければならない）。
【０１４９】
ＤＮＡ分子が溶出緩衝液全体に拡散する速度を増大させ、且つ緩衝液中へのＤＮＡ分子の均一な分布を促進させるために、代わりに、以下の方法を使用してもよい。すなわち、上

述のように、ダイアフラム４８に対して作用するアクチュエータ３４によって、緩衝液を攪拌し；振動装置を作用させて、１以上の振動数で（とりわけ、（１）チップ全体と（２）試料調製チャンバー６の中に含有される溶出緩衝液の共鳴周波数で）基材３６（チップ）全体を揺動（ａｇｉｔａｔｅ）させ；試料調製チャンバー６中に不均一に含有されている緩衝液を加熱して、熱勾配によって誘導された緩衝液の流れ（すなわち、強制対流）を試料調製チャンバー６内部に生じさせ；試料調製チャンバー６の中に含有された緩衝液に界面活性剤を添加して、ＤＮＡ分子がガラスブロック３１から放出され易くするか、又は緩衝液中に磁気ビーズ又は線維を添加し、電磁気アクチュエータを用いて前記緩衝液を攪拌して、ガラスブロック３１からＤＮＡを放出され易くする。

【０１５０】

上記の何れの工程においても、被検試料注入口２と緩衝液注入口４は互換的に用いることが可能であるし、あるいは、本発明の方法を実施するために、単一ポート（すなわち、被検試料注入口２又は緩衝液注入口４）を用いることもできる。

【０１５１】

前記の記述は、概ね、ＰＣＲや他の増幅アッセイを対象にしたが、本発明は、これらに限定されるものではない。本発明の装置と方法は、ホモジニアスアッセイを含む数多くの様々なアッセイを実施するために利用することもできる。前記チップ上で実施することができるホモジニアスアッセイは、ＤＮＡ／ＲＮＡ／Ａｐｔａｍｅｒ（核酸をベースとする）アッセイ、タンパク質／抗体をベースとするアッセイ、及び細胞をベースとするアッセイという３つの一般的なカテゴリーに分類することができる。典型的なアッセイと成分は、以下に記されている。

【０１５２】

ＤＮＡ／ＲＮＡ／アプタマー（核酸をベースとする）の実施形態では、０．１×ＴＥ緩衝液中のプライマーとプローブを、例えば、アッセイステーション２６の中に局在／配置させた後、凍結乾燥した。少なくとも１つのアッセイステーション内に少なくとも１つの反応成分を固定化するには、例えば、ビーズ、ゲル、又は膜に固定化してもよい。試料流体調製物は、（プライマーとプローブなしの）ＰＣＲ反応混合物中にＤＮＡ又はＲＮＡを放出し、１又は複数の第一の多目的チャネル３０を介して、混合物全体がアッセイステーション中に流入する。再水和されると、プライマーとプローブがＰＣＲに、あるいは、特に指定されていれる場合にはＲＴ－ＰＣＲ反応に加わる。

【０１５３】

産物の検出は、例えば、蛍光共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｅａｃｏｎによる検出、又は通常の非ＦＲＥＴ ＳｙｂｒＧｒｅｅｎ、ＥｔＢｒ検出又は他のインターカレータ（ＰｉｃｏＧｒｅｅｎ、ＴＯＴＯ色素群、例えば、Ｔｏｔｏ－１、ＰＯＰＯ－１、ＢＯＢＯ－１）を利用することによって行うことができるが、これらに限定されない。ＤＮＡ又はＲＮＡ増幅のリアルタイムデータが、各サイクルの間に収集され、次いで、ベースラインから差し引かれる。

【０１５４】

典型的なＤＮＡベースのアッセイでは、増幅と検出の方法として、ＰＣＲ、等温性増幅法、例えば、核酸配列に基づく増幅法（ＮＡＳＢＡ）、鎖置換増幅（ＳＤＡ、ｓｔｒａｎｄ ｄｉｓｐｌａｃｅｍｅｎｔ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）などのほか、上述のように、ＦＲＥＴ、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｅａｃｏｎ等を用いたリガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、ローリングサークル複製、及びライゲーション等を備えてもよい。

【０１５５】

本発明の教示に従って実施されることがある以下のアッセイは何れも、典型例にすぎず、限定を意図したものではない。

【０１５６】

＜ＤＮＡベースのアッセイ＞：

例１：アッセイステーション（直径約０，５－１ｍｍ）中でＳｙｂｒｇｒｅｅｎを用いたＰＣＲアッセイ、チップ厚＝約２ｍｍ

ＰＣＲミックス：１μｌの１０×Ｐｔ　Ｔａｑ　ポリメラーゼ緩衝液、０．８μｌの２５ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$、各々１μｌずつの１０μＭ　ストックトリプトファン水酸化酵素、フォワードプライマー（５’－ＴＧＴ　ＧＴＴ　ＡＧＣ　ＣＡＴ　ＴＡＴ　ＧＡＴ　ＴＡ－３’）とリバースプライマー（５’－ＣＴＧ　ＧＡＡ　ＴＡＣ　ＡＡＧ　ＣＴＴ　ＴＡＴ　ＧＣＡ　Ｇ－３’）、１μｌの２ｍＭ　ｄＮＴＰｓ、１μｌのｌ０ｎｇ／μｌ　ヒトゲノムＤＮＡ、０．５μｌの１０％　ＢＳＡ、０．５μｌの６０×ＳｙｂｒＧｒｅｅｎ、１μｌの５Ｕ／μｌ　Ｐｌａｔｉｎｕｍ　Ｔａｑ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ、及び２．２μｌの水。対照では、Ｔａｑポリメラーゼが存在しない点を除いて、上記成分と同一である。

【０１５７】

ＰＣＲ条件：ホットスタート９６℃－１分、９５℃－３０秒、５５℃－３０秒、７２℃－３０秒、７２℃－５分を３０サイクル、１２℃で放置。ＰＣＲは、インサイチュＰＣＲアルファモジュールを備えたＭＪ　ＰＣＲサーモサイクラー（ＰＴＣ－２００）中で行った。ＰＣＲの後に、各像につき同じ露光時間を用いて、デジタル画像を捕捉するためにコンピュータに接続されたＬｅｉｃａの蛍光顕微鏡下でチップ１００を観察した。結果は、対照反応と比較して、ヒトトリプトファン水酸化酵素遺伝子断片が明確に増幅されていることを示していた。

【０１５８】

例２：Plesiomonas shigelloides（ヒトの胃腸炎を引き起こすグラム陰性細菌）由来の２３Ｓ　ＲＮＡ遺伝子のＰＣＲ－ＦＲＥＴによる検出。参考文献：「J. P. Loh and Eric P. H. Yap, Rapid cycle Real-Time PCR, Methods and Applications, Microbiology and Food analysis, U. Reischl et. al.(Eds.), Springer, pp 161-171」。

【０１５９】

ＰＣＲミックス：ｌμｌの１０×Ｐｌａｔｉｎｕｍ　Ｔａｑ緩衝液、ｌμｌの２ｍＭ　ｄＮＴＰ、各０．３μＬの１０μＭ　ストックフォワードプライマー（５’－ＡＧＣ　ＧＣＣ　ＴＣＧ　ＧＡＣ　ＧＡＡ　ＣＡＣ　ＣＴＡ－３’）とリバースプライマー（５’－ＧＴＧ　ＴＣＴ　ＣＣＣ　ＧＧＡ　ＴＡＧ　ＣＡＣ－３’）、ｌμｌの２０μＭ　ストック蛍光プローブ（５’－ＬＣＲｅｄ６４０－ＧＧＴ　ＡＧＡ　ＧＣＡ　ＣＴＧ　ＴＴＡ　ＡＧＧ　ＣＴＡ　ＧＧＧ　ＧＧＴ　ＣＡＴ　Ｃ－３’－リン酸）、ｌμｌの５μｇ／μｌ　ＢＳＡ、１．６μｌの２５ｍＭ　ＭｇＣｌ$_2$、ｌμｌの１０×Ｓｙｂｒｇｒｅｅｎ、０．１μｌの５μ／μｌ　Ｐｌａｔｉｎｕｍ　ｔａｑ、２μｌの水、及びＰ．ｓｈｉｇｅｌｌｏｉｄｅｓ　ＤＮＡを含有する１．５μｌの試料。

【０１６０】

ＰＣＲ条件ホットスタート：９５℃－１分、７０サイクルの９０℃－０秒、７０℃－４秒、７２℃－５秒。

【０１６１】

一塩基多型の検出：対立遺伝子特異的ＰＣＲ、色素標識オリゴヌクレオチドライゲーション（ＤＯＬ）、ＰＣＲ－ＯＬＡ－ＦＲＥＴ（オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ）、ＬＣＲ－ＯＬＡ－ＦＲＥＴ、対立遺伝子特異的Ｔａｑｍａｎアッセイなど。

【０１６２】

例３：色素標識オリゴヌクレオチドライゲーション（ＤＯＬ、ｄｙｅ－ｌａｂｅｌｅｄ　ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　ｌｉｇａｔｉｏｎ）アッセイとは、ＤＮＡ配列を増幅するためにＰＣＲを使用し、次いで、ＦＲＥＴとともにＯＬＡ（すなわち、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ）を用いてポストＰＣＲ　ＳＮＰ検出（ＰＣＲ－ＯＬＡ－ＦＲＥＴ）を行うアッセイである。ＯＬＡアッセイでは、ＳＮＰを検出するために３つのプローブを用いる。１つの共通なドナープローブはＦＡＭ（５－カルボキシ－フルオレセイン）で標識され、他方の対立遺伝子特異的なアクセプタープローブはＲＯＸ（６－カルボキシ－Ｘ－ローダミン）又はＴＡＭＲＡ（Ｎ，Ｎ，Ｎ８，Ｎ８，－テトラメチル－６－カルボキシローダミン）で標識される。アクセプタープローブの５’に位置する一致したヌクレオチドと一致していないヌクレオチドを識別するために、耐熱性リガーゼが用いられた。参考文献：「Ｘ．Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｒｅｓ．１９９８

Ｍａｙ；８（５）：５４９－５６」。
【０１６３】
β－ｏ－サラセミアの原因遺伝子であるβ－グロビン遺伝子のコドン３９Ｃ／Ｔ変異を検出するためのＤＯＬアッセイ。アッセイステーション中でプライマーとプローブを凍結乾燥し、上記の様々なチャネルを介して、試料調製部分から得られたＤＮＡを前記アッセイステーション中に注入する。
【０１６４】
ＰＣＲ－ライゲーションミックス：２μｌの１００ｍＭ Ｔｒｉｓ Ｐｈ ８．０、２μｌの６５ｍＭ ＭｇＣｌ２、２μｌの０．５Ｍ ＫＣｌ、２μｌの１０ｍＭ ＮＡＤ、２μｌの２．５ｍＭ ｄＮＴＰｓ、ｌμｌの各 ５０μＭ ストックＰＣＲフォワードプライマー（５’－ＣＡＴ ＧＴＧ ＧＡＧ ＡＣＡ ＧＡＧ ＡＡＧ ＡＣＴ ＣＴＴ ＧＧＧ－３’）とリバースプライマー（５’－ＧＣＡ ＧＣＴ ＣＡＣ ＴＣＡ ＧＴＧ ＴＧＧ ＣＡＡ ＡＧＧ－３’）、ｌμｌの４μＭ ＦＡＭ標識ドナープローブ（５’－ＦＡＭ－ＴＣＴ ＡＣＣ ＣＴＴ ＧＧＡ ＣＣ－３’）、ｌμｌの４μＭ Ｒｏｘ標識アクセプタープローブ（５’－リン酸－ＣＡＧ ＡＧＧ ＴＴＣ ＴＴＴ ＧＡＧ Ｔ－３’－ＲＯＸ）、１μｌの５μＭ ＴＡＭＲＡ標識アクセプタープローブ（５’リン酸－ＴＡＧ ＡＧＧ ＴＴＣ ＴＴＴ ＧＡＧ ＴＣ－３’－ＴＡＭＲＡ）、３０ｎｇのヒトゲノムＤＮＡ、０．５ユニットのＡｍｐｌｉＴａｑ－ＦＳ ポリメラーゼ、１．５ユニットのＡｍｐｌｉｇａｓｅ ＤＮＡリガーゼ、及び水（２０μｌになるように）。
【０１６５】
ＰＣＲライゲーション条件：変性９５℃－２分、９５℃－１５秒、１．５分をかけて徐々に６５℃まで温度を下げて６５℃－３０秒を１０サイクル、次いで、９５℃－１５秒、６５℃－３０秒を３０サイクル、９５℃－１５秒、４５℃－１．５分で２５サイクルを用いてライゲーション。
【０１６６】
＜ＲＮＡベースのアッセイ＞：
例１：増幅と検出：ＩＩ型デングウイルスのＲＴ－ＰＣＲ－ＦＲＥＴによる検出。参考文献：「Ｂ．Ｈ Ｔａｎ，Ｅ．Ｓｅｅ，Ｅｌｉｚａｂｅｔｈ Ｌｉｍ ａｎｄ Ｅｒｉｃ Ｐ．Ｈ．Ｙａｐ，Ｒａｐｉｄ ｃｙｃｌｅ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｆｏｏｄ ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｕ．Ｒｅｉｓｃｈｌ ｅｔ．ａｌ．（Ｅｄｓ．），Ｓｐｒｉｎｇｅｒ，ｐｐ ２４１－２５１」。
【０１６７】
ＲＴ－ＰＣＲミックス：２μｌの５×ＲＴ－ＰＣＲ緩衝液、ｌμｌの３ｍＭ ｄＮＴＰ、ｌμｌの５μｇ／μｌ ＢＳＡ、１μｌの２５ｍＭ ＭｎＯＡｃ、各０．５μｌの９μＭ ストックフォワードプライマー（５’；－ＣＣＴ ＡＧＡ ＣＡＴ ＡＡＴ ＣＧＧ Ｇ－３’）とリバースプライマー（５’－ＧＴＧ ＧＴＣ ＴＴＧ ＧＴＣ ＡＴＡ Ｇ－３’）、及び０．５μｌの４μＭ ストックプローブ（５’－ＬＣＲｅｄ６４０－ＡＧＡ ＡＡＡ ＡＡＴ ＡＡＡ ＡＣＡ ＡＧＡ ＧＣ－３’－リン酸）、０．５μｌの２０×ＳｙｂｒＧｒｅｅｎ、０．５μｌの５ｕ／μｌ Ｔｔｈポリメラーゼ、１．５μｌの水、１０μｌの最終容量となるように添加したウイルスＲＮＡ。
【０１６８】
ＲＴ－ＰＣＲの条件：ＲＴ－５０℃で１５分、変性９５℃－５分、９５℃－０秒と５５℃－７秒を８サイクル、８７℃－０秒、５５℃－７秒を５０サイクル。
【０１６９】
＜アプタマーベースのアッセイ＞：
アプタマーとは、標的タンパク質、リガンド（脂質、炭水化物、代謝物など）と相互作用する合成ＤＮＡ、ＲＮＡ、又はペプチド配列（元の状態のままの場合もあり、あるいは修飾が施されている場合（例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、チオリン酸化されたＤＮＡ等）もある）である。例えば、色素（例えば、ＴＡＭＲＡ）で標識されたアプタマーを合成

し、アッセイチャンバー２６又は複数のチャンバー中に点在させ、凍結乾燥することができる。次いで、上記の方法を用いて、アッセイステーション中に標的タンパク質／抗原を導入することができる。次いで、蛍光偏光を用いて、結合対のうちの１つが蛍光色素で標識されていれば、アプタマー／タンパク質の結合をスクリーニングすることができる。

【０１７０】

タンパク質／抗体ベースのアッセイ

病原体（例えば、オープンサンドイッチＥＬＩＳＡ）、タンパク質が豊富な相互作用、薬物スクリーニングを検出するために、本発明の教示に従って、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着検定法）などのタンパク質／抗体アッセイを用いることができる。

【０１７１】

これらの典型的な実施形態では、抗体又はタンパク質は、ＦＲＥＴ色素の対、生物発光共鳴エネルギー転移（ＢＲＥＴ）タンパク質、蛍光色素－消光色素の組合せ、β－ｇａｌ再編成アッセイタンパク質断片で標識し、１×ＰＢＳ中に溶解させ、スポッティングし、アッセイステーション中で凍結乾燥させることができる。試料流体調製物は、様々な濃度（例えば、０．０５％　Ｔｗ－２０や１％　Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ－１００）の界面活性剤（例えば，Ｔｗ－２０又はＴｒｉｔｏｎ－Ｘ　１００）を加えた又は加えないＰＢＳ又はＴＢＳ緩衝液中にタンパク質又はその他の抗原を放出し、これらは、上記のチャネルを介してアッセイステーションに流入する。再水和されると、前記抗体又はタンパク質対は、ＦＲＥＴ、ＢＲＥＴ、蛍光消光、又はβ－ｇａｌ再編成に加わり、蛍光、比色分析、又は高感度化学発光（ＥＣＬ）シグナルを生じることができる。

【０１７２】

例１：抗体－抗原蛍光消光アッセイ：抗体をＯＧ－５１４（Ｏｒｅｇｏｎ　ｇｒｅｅｎ　５１４カルボン酸、スクシンイミジルエステル）で標識し、抗原（ペプチド、タンパク質、細胞全体、炭水化物、アプタマー等）をＱＳＹ－７（ＱＳＹ－７カルボン酸、サクシニミジルエステル）で標識した。蛍光消光は、ＯＧ－５１４蛍光の検出を阻止又は抑制した。標識された抗体－抗原複合体をアッセイステーション中で凍結乾燥した。試料流体調製物は、様々な濃度（例えば、０．０５％　Ｔｗ－２０及び１％　Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ－１００）の界面活性剤（例えば，Ｔｗ－２０又はＴｒｉｔｏｎ－Ｘ　１００）を加えた又は加えないＰＢＳ又はＴＢＳ中にタンパク質又はその他の抗原を放出し、チャネルを介してアッセイステーションに流入する。前記アッセイステーション中で再水和されると、前記標識された抗体－抗原複合体は、未標識抗原との競合反応に加わる。未標識抗原との競合によって、ＯＧ－５１４標識抗体（その蛍光は、約５２８－５３０ｎｍで検出される）が放出される。

【０１７３】

例２：ダブルサンドイッチ抗体ＦＲＥＴ

ＣＤ８－α鎖の２つの非競合的エピトープに対する２つのモノクローナル抗体を用いた。一方のモノクローナル抗体は色素フィコエリトリン（ＰＥ）で標識し、他方のモノクローナル抗体はアロフィコシアニン（ＡＰＣ）で標識した。

【０１７４】

励起光をＰＥに当てるとＰＲＥＴが観察されたが、その効率は１０％にすぎなかった。参考文献：「Batard P., et. al., Cytometry 2002 Jun 1 ; 48 (2): 97-105」。スクアライン色素（Ｓｑ６３５及びＳｑ６６０）などの近赤外ＦＲＥＴ色素対を用いることによって、ＦＲＥＴの効率が向上する場合がある。参考文献：Oswald B. et al.,Analytical Biochemistry 280,272-277(2000)。

【０１７５】

例３：架橋抗原によって誘導された組換え抗体軽鎖と重鎖の再会合（オープンサンドイッチアッセイ）。

【０１７６】

組換え抗体抗ＨＥＬ（ニワトリ卵リゾチーム）断片の重鎖（ＶＨ）と軽鎖（ＶＬ）を、それぞれ、フルオレセインのスクシンイミドエステルとローダミン－Ｘで標識した。ＶＨと

ＶＬ相互の親和性が弱いために会合とＦＲＥＴは妨げられるが、例えば約４℃の低温下且つ抗原の存在下では、ＶＨとＶＬの相互作用は安定化されるため、ＦＲＥＴが生じた。４９０ｎｍで励起すると、１－１００μｇ／ｍｌの範囲の濃度でＨＥＬ（抗原）の量を増加させながら混合物に添加したときに、５２０ｎｍの蛍光が著しく減少し、６０５ｎｍの蛍光が増加するのが観察された。参考文献：Ueda H et al.,Biotechniques 1999 Oct;27(4):738-42。

【０１７７】

上記方法は、以下のように改変して用いることもできる。フルオレセインやローダミン等の蛍光色素による標識に代えて、ＶＨ－Ｒｌｕｃ（Ｒｅｎｉｌｌａルシフェラーゼ）とVL-EYFP(Enhance Yellow fluorescence Protein)のキメラタンパク質を構築する。Ｒｌｕｃの基質セレンテラジンの存在下では、光（４７５ｎｍ）の放出を伴う化学発光が観察されるが、ＢＲＥＴ（生物発光蛍光エネルギー転移）は観察されない。しかし、低温下（例えば、約４℃）且つ抗原（ＨＥＬ）の存在下では、ＶＨとＶＬの相互作用が安定化されるために、ＢＲＥＴが起こり、ＥＹＦＰの蛍光が５２５ｎｍで検出される。参考文献：Arai R, et. al.,Anal Biochem.2001 Feb 1;289(1):77-81。

【０１７８】

前記第一の方法のさらに別の改変法は、以下のとおりである。フルオレセインやローダミン等の蛍光色素で標識する代わりに、チオレドキシン（Ｔｒｘ）融合タンパク質タンパク質、Ｔｒｘ－ＶＨ－ＥＢＦＰ(enhance blue fluorescent protein)とＴｒｘ－ＶＬ－ＥＧＦＰ(enhance green fluorescence protein)を構築する。Ｔｒｘは、発現されたタンパク質の溶解度を増加させた。抗原ＨＥＬの存在下で、ＦＲＥＴが生じた。参考文献：Arai R., et.al.,Protein Eng. 2000 May;13(5)369-76。

本発明の装置と方法は、プロテオミクス研究／アッセイを構築するために使用することもできる。タンパク質－タンパク質相互作用は、細胞プロセス（例えば、塩基性ヘリックス－ループ－ヘリックス（ｂＨＬＨ）転写因子の二量体化による転写の制御、例えば、リガンドが結合したときに細胞シグナル伝達を生じる上皮成長因子（ＥＧＦ）受容体の二量体化）を制御するための重要な機序である。

【０１７９】

前記装置を用いると、候補タンパク質、すなわち改変型緑色蛍光タンパク質（ＥＧＦＰ）との融合タンパク質として発現される「プレイ（ｐｒｅｙ）」は、例えば、アッセイステーションの中で凍結乾燥されるか、あるいは、アッセイステーション内のハイドロゲル中に埋め込むことができる。標的、すなわち、改変型青色蛍光タンパク質（ＥＢＦＰ）との融合タンパク質として発現される「ベイト（ｂａｉｔ）」は、上記チャネルを通じてアッセイステーション中に導入される。タンパク質－タンパク質相互作用は、本分野において公知であるように、例えば、ＦＲＥＴ活性又は他の検出法を活性化する。

【０１８０】

細胞をベースとしたアッセイ：

本発明は、薬物のスクリーニングや毒性学的アッセイ用途に用いることもできる。当業者に公知であるように、ＦＲＥＴやその他の検出方法を基礎とした多数の薬物スクリーニング法を用いることができる。

【０１８１】

例えば、本発明の教示に従って、毒物学的アッセイを実施することができる。アッセイステーションには、コンビナトリアルケミカル、又はペプチドライブラリー、アプタマーライブラリー等から得られた合成小分子が予め搭載される。アッセイステーションには、所定の細胞種（チップの試料調製部分から（但し、このようにして与えられている場合）、又は組織培養物、増殖培地から回収されたものであり得る）が導かれる。生死を判定する蛍光色素を与えることもできる。数日後、顕微鏡を用いた観察によって、予め搭載された前記供与成分に曝露された細胞が死滅しているのか、なお生存しているのか、あるいは、アッセイステーション中に加えた予め搭載された前記アッセイ成分によって他の何らかの影響を受けているのかが明らかとなるであろう。

【０１８２】
薬物スクリーニングの場合、検査すべき薬物の標的（例えば、異なる蛍光タンパク質（例えば、ＥＧＦＰ、ＥＹＦＰ）が融合されたマルチサブユニット受容体、ヘテロ二量体化又はホモ二量体化するタンパク質パートナー）を発現するように、細胞に改変操作を施すことができる。合成リガンドの結合、小分子、又は抗体によって、受容体若しくはタンパク質が自己会合若しくは自己架橋され又はそれらのサブユニットに会合若しくは架橋が引き起こされると、前記蛍光タンパク質対が集結され、例えば、ＦＲＥＴが起こり、又はβ－ｇａｌ再編成が生じ得る。逆に、合成リガンド、小分子、アプタマー等によってホモ二量体化若しくはヘテロ二量体化又はマルチサブユニットタンパク質複合体が崩壊すると、ＦＲＥＴシグナルの減少が引き起こされ得る。

【０１８３】
前記小分子は、化学構造に応じて、細胞中に拡散することができる。このように、標的タンパク質は表面タンパク質である必要はないが、例えば、グルココルチコイドの存在下でホモ二量体化するグルココルチコイド受容体等の細胞内タンパク質又は受容体とすることができる。

【０１８４】
前記小分子、リガンド、アプタマー等は、コンビケムライブラリー、ペプチド合成機、ファージライブラリー等から得ることができ、まず、アッセイステーション中にスポッティングした後、凍結乾燥される。次いで、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）対に融合された薬物標的タンパク質により改変加工された細胞が、上記のように、細胞培地中で、チャネルを介してアッセイステーション２６の中に導入される。約３７℃で細胞を薬物候補とともにインキュベートすると、例えば、ＦＲＥＴをもたらすタンパク質－タンパク質相互作用が引き起こされることがあり、あるいは、タンパク質の相互作用が破壊されるとＦＲＥＴが減少するであろう。

【０１８５】
本発明の薬物スクリーニング用途では、細胞をベースとしたアッセイ及び／又はタンパク質アッセイを用いることができる。このようなスクリーニング用途では、野生型細胞集団のうち少なくとも１つと組換え分子を発現している細胞集団のうち少なくとも１つとが、本発明の教示に従って、例えば、少なくとも１つの前記アッセイステーション中に導入される。

【０１８６】
ＰＣＲ用の蛍光プローブを２つ用いるＦＲＥＴアッセイの他に、ＰＣＲ－Ｔａｑｍａｎアッセイは蛍光消光を利用するが、この場合には、プローブが消光物質とドナーの両方で標識されている。増幅されるＤＮＡ断片にハイブリダイズされると、前記プライマーから下流に広がるＴａｑポリメラーゼの５’から３’方向へのエキソヌクレアーゼ活性によって、前記プローブは消化される。プローブが消化されると、ドナーが消光物質から分離されることによって、ドナー色素から生じる蛍光シグナルの増加が検出可能となる。等温性増幅アッセイでは、比色分析による検出をβ－ｇａｌ再編成アッセイと組み合わせて使用できる可能性がある。使用可能なその他の典型的アッセイ手法には、蛍光偏光が含まれる。この場合、例えば、ＰＣＲ産物中に小さな蛍光ｄＮＴＰが取り込まれ、その結果、回転が低下して、ＰＣＲ混合物と生成され得る産物とが入ったアッセイステーション２６に当てられた光の偏光解消に対する効果が減少し、引き続き、検出が行われる。

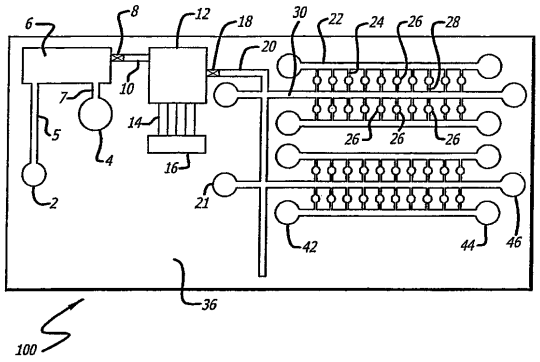
【０１８７】
以上、具体的な実施形態を参照しながら本発明を説明してきた。当業者であれば、前述の記載に照らして、別の実施形態に容易に想到することができるであろう。添付の特許請求の範囲とそれらの完全な範囲の均等物以外に、本発明を限定することを意図したものではない。

【図面の簡単な説明】

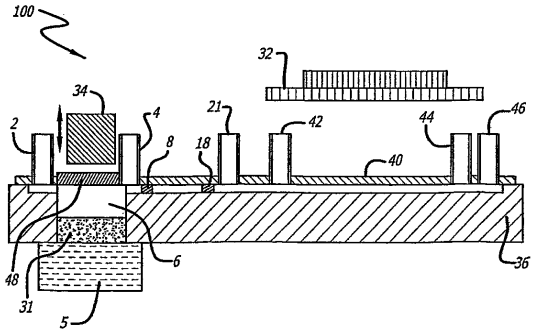
【０１８８】
【図１】図１は、本発明の教示に係る典型的な試料調製一体型（ＳＰＩ、sample prepart

aion integrated）チップの上方表面の平面図である。
【図２】図２は、図１の典型的チップの側面図である。
【図３】図３は、本発明の別の実施形態に係る別の試料調製一体型（ＳＰＩ）チップの上方表面の平面図である。
【図４】図４は、図３の典型的チップの側面図である。
【図５－１】図５Ａは、本発明の教示に係る典型的なマイクロ流体チップの平面図である。図５Ｂは、別の典型的なマイクロ流体チップの平面図である。図５Ｃは、本発明の教示に係る典型的なマイクロ流体チップであって、その中に試料流体と隔離媒体が配置されたチップのさらに別の図である。
【図５－２】図５Ｄは、試料流体と隔離媒体と着脱可能な吸収剤を有する典型的なマイクロ流体チップの別の実施形態である。図５Ｅは、隔離媒体がその中に配置され、複数のアッセイステーション中の密封試料流体及び過剰な試料流体を有する吸収剤が除去された図５Ｄのチップを図示している。
【図６－１】図６Ａ～Ｃは、本発明の教示に基づいて作製され、別の密封配置を与えるマイクロ流体チップの別の典型的な実施形態を示している。
【図６－２】図６Ｄ～Ｅは、本発明の教示に基づいて作製され、別の密封配置を与えるマイクロ流体チップの別の典型的な実施形態を示している。
【図６－３】図６Ｆは、本発明の別の側面に係る別の典型的な密封配置を示している。図６Ｇは、本発明の教示に基づいて作製された別の典型的なマイクロ流体チップを図示している。
【図７Ａ】図７Ａ－１～図７Ａ－４は、試料流体を用いて複数のアッセイステーションを充填する典型的な順序を示している。
【図７Ｂ】図７Ｂ－１～図７Ｂ－４は、隔離媒体による試料流体の置換と複数のアッセイステーションの一方側の密封を示している。
【図７Ｃ】図７Ｃ－１～図７Ｃ－４は、隔離媒体による複数のアッセイステーションの別側面の密封を示している。
【図７Ｄ】図７Ｄ－１～２は、複数のアッセイステーションを充填し密封する別の典型的な順序を示している。
【図８】図８は、本発明の教示に係る典型的な分析装置システムを示している。
【図９】図９は、本発明に従って用いることができる別の分析装置システムを示している。
【図１０】図１０は、本発明に従って用いることができる別の典型的な配置を図示している。
【図１１】図１１Ａは、典型的な試料流体調製領域を示している。図１１Ｂは、図１１Ａの試料流体調製領域の上方平面図である。
【図１２】図１２は、典型的なフロー促進構造を有するアッセイステーションの上面図を図示している。
【図１３】図１３は、典型的なアッセイステーション構造の典型的な流体排出チャネルを示している。
【図１４】図１４は、ある実施形態に従って設けられることがある典型的な勾配部を示している。
【図１５】図１５は、アッセイステーションの別の典型的な実施形態を示している。
【図１６】図１６は、本発明の教示に係るアッセイステーションのさらに別の典型的な実施形態を図示している。
【図１７】図１７は、本発明の教示に係るチャネルの典型的構造の側断面図である。
【図１８】図１８は、本発明の教示に係る複数試料の検査を行うためのチャネルの別の典型的実施形態である。

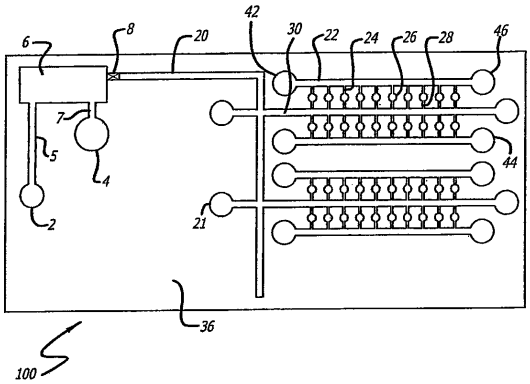
【図１】



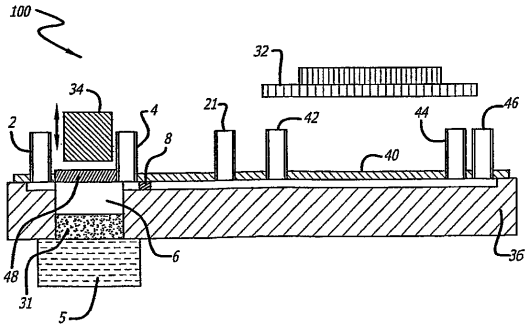
【図２】



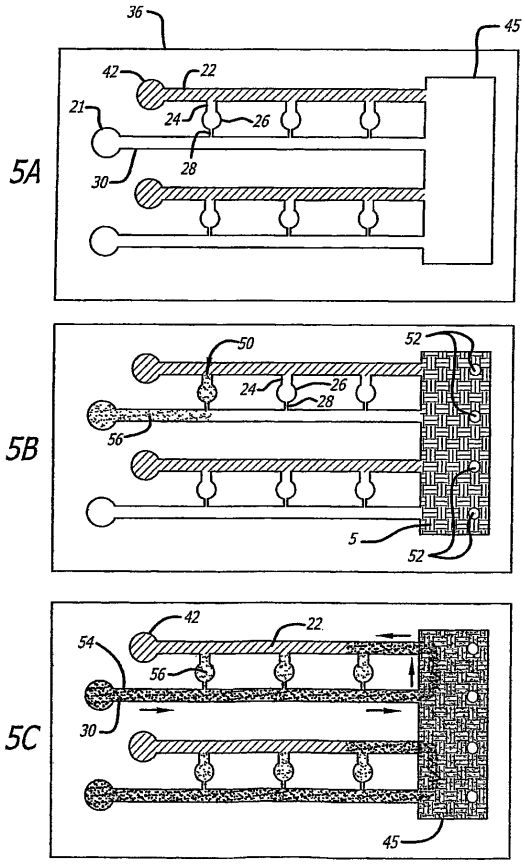
【図３】



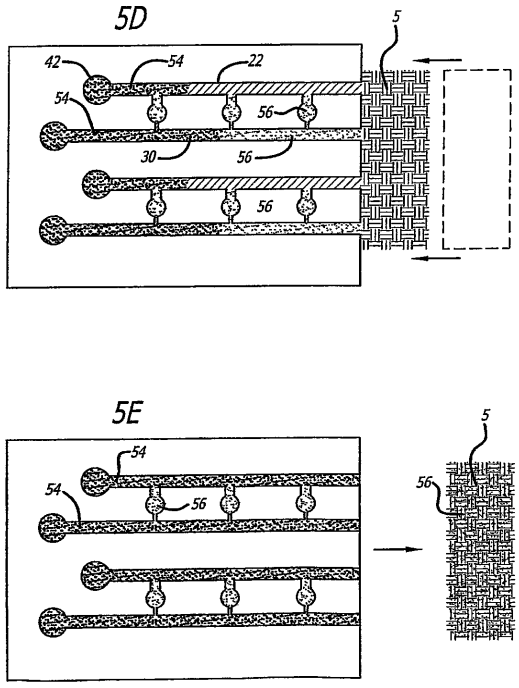
【図４】



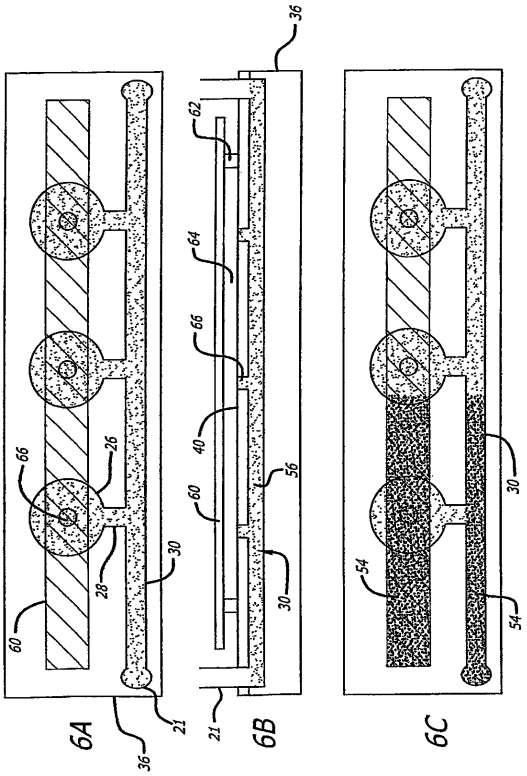
【図５－１】



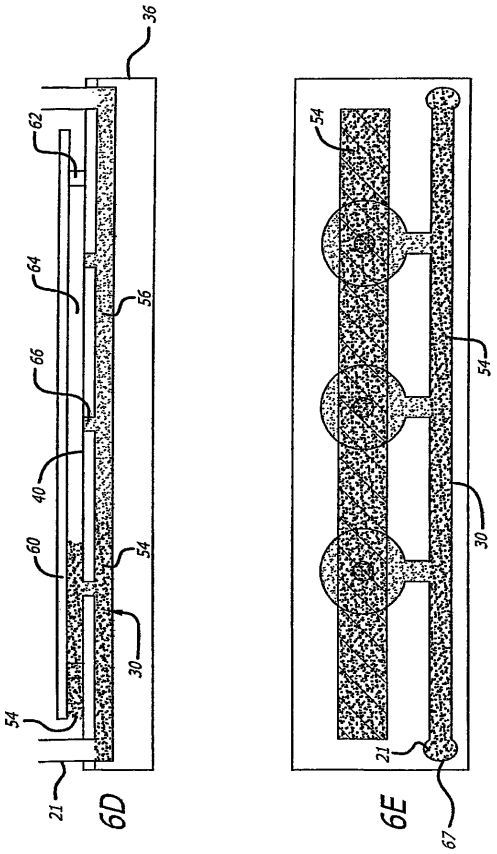
【図５－２】



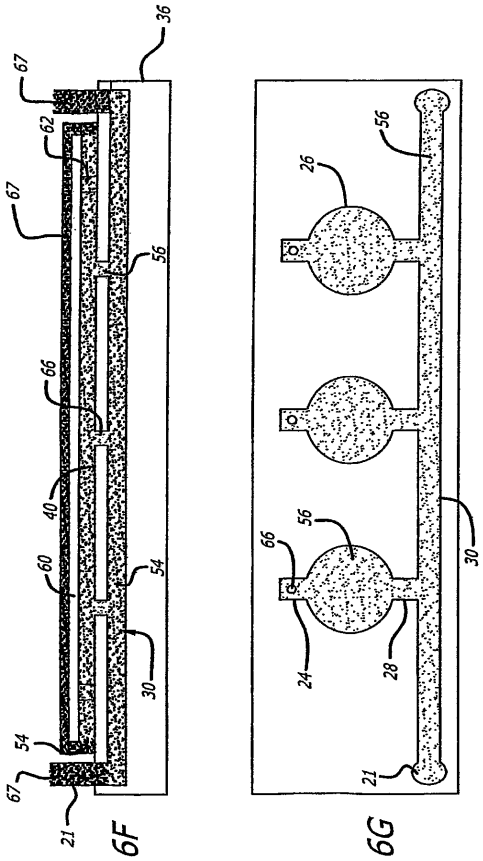
【図６－１】



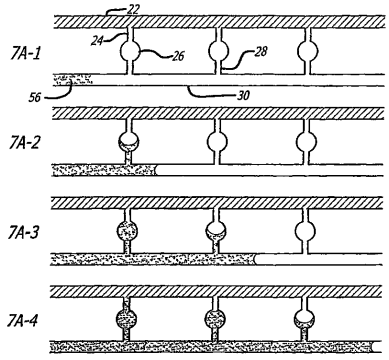
【図６－２】



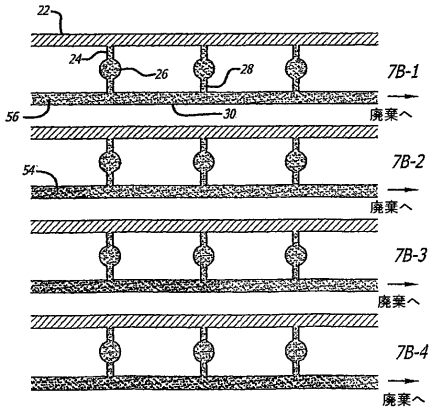
【図６－３】



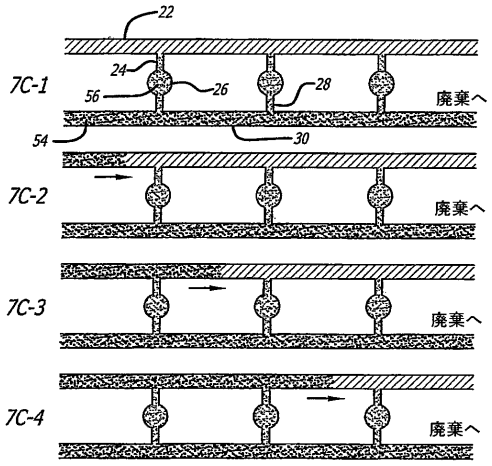
【図７Ａ】



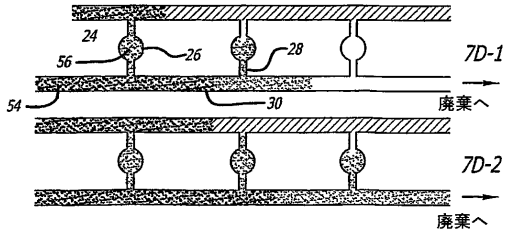
【図７Ｂ】



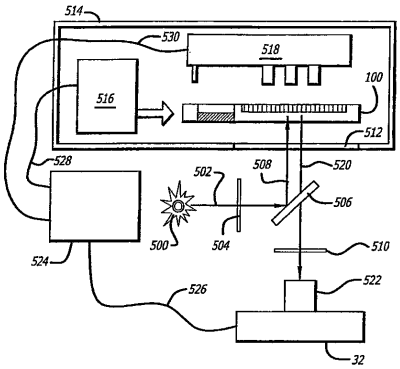
【図７Ｃ】



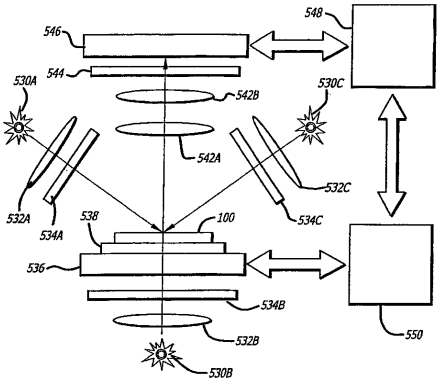
【図７Ｄ】



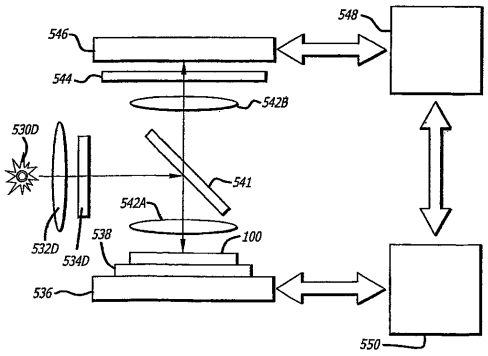
【図８】



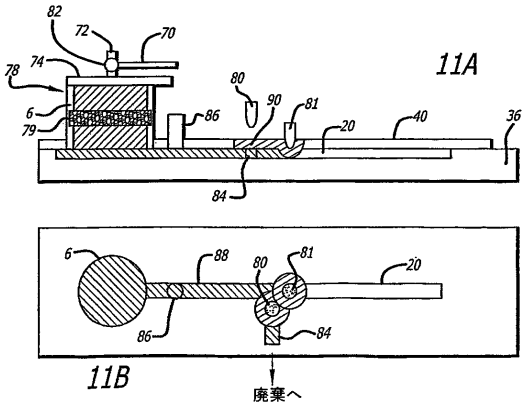
【図９】



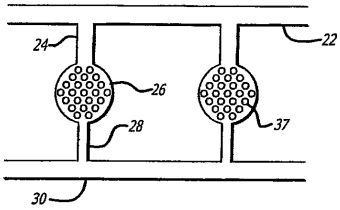
【図１０】



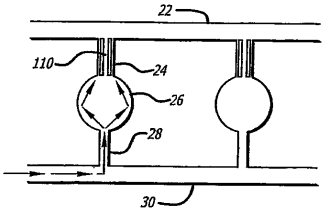
【図１１】



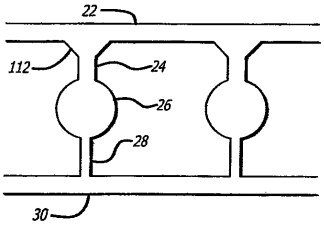
【図１２】



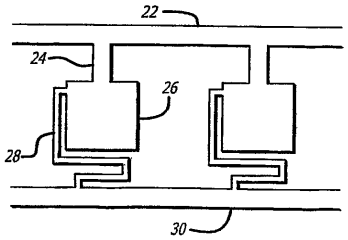
【図１３】



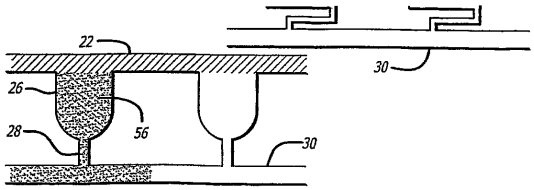
【図１４】



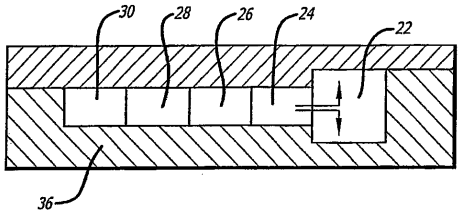
【図１５】



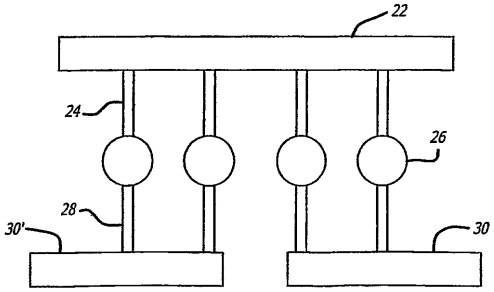
【図１６】



【図１７】



【図１８】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
1 May 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/035229 A2

(51) International Patent Classification[7]: B01D 61/00

(21) International Application Number: PCT/SG02/00251

(22) International Filing Date: 25 October 2002 (25.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/335,875 26 October 2001 (26.10.2001) US
10/279,627 24 October 2002 (24.10.2002) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **NTU VENTURES PTE LTD** [SG/SG]; Block 1 Unit 213, Innovation Centre, 16 Nanyang Drive, Singapore 637722 (SG). **DEFENCE SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY** [SG/SG]; 71 Science Park Drive #02-05, Singapore 118253 (SG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **YAP, Peng, Huat, Eric** [SG/SG]; 9 Taman Serasi, Unit #06-17, Singapore 257720 (SG). **GONG, Haiqing** [SG/SG]; 218 Westwood Avenue, #10-01 The Floravale, Singapore 648351 (SG). **CHEN, Longqing** [CN/SG]; Blk 945 #03-513, Jurong West Street 91, Singapore 640945 (SG).

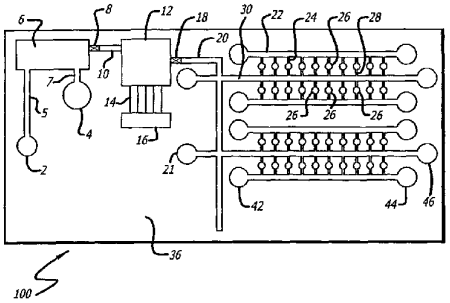
(74) Agents: **SHEENA, Jacob** et al.; Alban Tay Mahtani & De Silva, 39 Robinson Road #07-01, Robinson Point, Singapore 068911 (SG).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[Continued on next page]

(54) Title: SAMPLE PREPARATION INTEGRATED CHIP



(57) Abstract: The present invention relates to an apparatus comprising a substrate having at least one assay station. The at least one assay station has at least a first assay station channel and at least a second assay station channel and the first and second assay station channels each separately being in communication with the at least one assay station. The apparatus has an arrangement of at least first and second multipurpose channels in communication with the first and second assay station channels, respectively. The first multipurpose channel and first assay station channel have internal surface characteristics conducive to conduction of a sample solution therethrough. There is at least one sample fluid inlet in communication with the at least first multipurpose channel,. and at least one isolation-medium inlet in communication with the at least first and second multipurpose channels. The at least one second multipurpose channel has an internal surface portion non-conducive to conduction of said sample solution.

WO 03/035229 A2

WO 03/035229 A2

ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

SAMPLE PREPARATION INTEGRATED CHIP

[0001] FIELD OF THE INVENTION

[0002] The present invention relates to an apparatus and assay systems which can be employed, for example, for detecting and diagnosing diseases and/or detecting amplified nucleic acid products and/or for pharmacogenetic determinations. The apparatus comprises a substrate with one or more assay stations or wells and channels arranged in a manner to facilitate the flow of fluids through the apparatus and designed to provide for isolation-medium sealing of the assay stations.

[0003] BACKGROUND OF THE INVENTION

[0004] Biochemical testing is becoming an increasingly important tool for various assays including, for example for detecting and monitoring the presence or absence of diseases. While tests have long been known for obtaining basic medical information such as blood type and transplant compatibility, for example, advances in understanding the biochemistry underlying many diseases have vastly expanded the number of tests which can be performed. Thus, many tests have become available for various analytical purposes, such as detecting pathogens, diagnosing and monitoring disease, detecting and monitoring changes in health, and monitoring drug therapy. Genomic data in conjunction with the ability to prepare combinatorial libraries of chemical components has facilitated the discovery of new drugs.

[0005] There has long been a need for "complete systems" allowing various stages of nucleic acid, e.g., DNA, analysis to be performed on a single device, such as a microchip. Fully integrated, high throughput systems are needed which rapidly and simultaneously perform DNA analyses such as DNA separation and PCR and thereby permit disease diagnosis or detection. Sanders, et al. (2000) Trends in Analytical Chemistry, 19(6): 364-378. Systems where up to four samples can be amplified and analyzed on the same chip have been previously disclosed. L.C. Waters, et al. (1998) Anal. Chem., 70: 5172. In addition, small, disposable mass-produced devices for conducting PCR have been reported; see e.g. United States Patent No. 5,498,392. For example, Yuen, et al. (2001) Genome Research 11:405-412, provides a plexiglas-based microchip module designed and constructed for the integration of blood sample preparation and nucleic acid amplification reactions. The microchip module comprises a micro heater-cooler and

a series of microchannels for transporting human whole blood and reagents. The white blood cells are first isolated from a small volume of whole blood in integrated cell isolation-PCR containing gate-like microstructures which retain white blood cells, albeit at a very low concentration and efficiency (i.e. 3-5%). Red blood cells pass through the micro-filters but tend to clog up the filters over time causing inefficiencies in white blood cell isolation. The Yuen, et al. microchip employs a microtemperature sensor, making the Yuen, et al. chip expensive to fabricate.

[0006] DNA microarray devices are also currently employed for DNA analysis. Two types of DNA microarray technologies are known, cDNA microarray and oligo microarray. Both technologies examine the mRNA expression in a sample based on hybridization reactions. The microarray-based assays are cumbersome, taking about a day to complete and requiring stand-alone equipment to conduct sequential batch analyses. Rapid diagnoses are precluded and current microarray devices do not permit sample preparation to be integrated onto the chip.

[0007] Additional disadvantages of the current on-chip DNA analysis systems have recently been reported. Such disadvantages include lack of sample injection ability, poor DNA isolation and inability to conduct multiple PCR analyses. Yuen, et al. Page 4005, right column.

[0008] Nucleic acids play a direct role in cellular processes, including those resulting in disease states by functioning in the control and regulation of gene expression. Hybridization techniques have been developed to conduct various types of nucleic acid analyses to better understand how genetic information functions in diverse types of biological processes. Hybridization methods generally employ the binding of certain target nucleic acids by nucleic acid probes under controlled conditions thereby enabling hybridization to occur only between complementary sequences. Using hybridization techniques, it is possible to conduct gene expression studies as well as a variety of other types of analysis. For example, gene expression studies are important because differential expression of genes has been shown to be associated with disease states. Many disease states have been characterized by differences in the expression of various genes either through change in copy number of the genetic DNA or through alterations in levels of transcription. In certain diseases, infection by a particular virus is characterized by elevated expression of genes.

[0009] Chips to which nucleic acid probes are attached can be used to conduct nucleic acid analyses. Probes can be attached at specific sites on the chip, such as assay stations. Assay stations are situated in areas intermediate between first and second multi-purpose channels, wherein assay reactions are run, as detailed below. In some applications, the chip may include assay stations arranged in the form of an array. Genetic methods utilizing arrays on chips are advantageous because such chips allow for simultaneous, parallel processing that can increase the rate at which analyses can be conducted as compared to conventional methods which often require labor intensive sample preparations and electrophoretic separations. Current nucleic acid methods using chips typically require complex off-chip sample DNA isolation, integrated micro-heaters and micro-temperature sensors for PCR thus making current chips and associated methods of using same very expensive and non-disposable.

[0010] It is an object of this invention to provide disposable microchips permitting multiples of assay stations for carrying out various biochemical assays in real-time.

[0011] SUMMARY OF THE INVENTION

[0012] The present invention is directed to a microchip apparatus and assay systems useful, for example, for detecting and diagnosing the presence of absence of diseases in a subject and/or for detecting amplified nucleic acid products or for pharmacogenetic determinations. The apparatus comprises a substrate with one or assay stations and channels which are designed and arranged in a manner which facilitates the introduction and flow of sample fluid and isolation-medium. The apparatus can also include an integral sample preparation portion and the invention provides an improved result detection system.

[0013] The present invention relates to a microchip apparatus on which numerous types of assays can be performed. Use of the term "assay" herein is meant to describe any qualitative or quantitative analysis of a substance that is examined by trial or experiment, including reactions that indicate the absence of a particular substance, such as, but not limited to, a protein, antibody, nucleic acid fragment as well as any indicator or marker typically utilized in the art for particular assays . The instant microchips generally comprise at least one assay station wherein each assay station may communicate with a first and second assay station channel. Also provided are multi-purpose channels in communication with the assay station through which sample solution and/or isolation medium can be introduced and conducted through the microchip.

[0014] An embodiment of the present invention is directed to an apparatus for detecting a disease comprising a substrate, the substrate having embedded in the substrate: a sample preparation chamber which may be configured for filtering white blood cells; a sample introduction inlet fluidically coupled to said sample preparation chamber; a buffer introduction inlet fluidically coupled to the sample preparation chamber; a flow-promoting fluid chamber, a storage chamber for storing flow-promoting fluid, the storage chamber fluidically coupled to the flow-promoting fluid chamber; and the sample preparation chamber fluidically coupled to the flow-promoting fluid chamber. The present invention can further comprise an isolation device for isolating and permitting flow of a fluid from the sample preparation chamber to the flow-promoting fluid chamber; a first multi purpose distribution channel fluidically coupled to the flow-promoting fluid chamber; at least one assay station; the first multi purpose channel fluidically coupled to the assay station; and an isolation device for isolating and permitting flow of a fluid from the flow-promoting fluid chamber to the assay station/plurality of assay stations. Further there may be provided at least one buffer introduction inlet, the buffer introduction inlet fluidically coupled to the first multi purpose channel; second multi-purpose channel, the second multi-purpose channel fluidically coupled to the assay station; and an inlet which may provide venting, with the inlet fluidically coupled to the second multi-purpose channel. The sample preparation chamber, the storage chamber, the flow-promoting fluid chamber, the assay station, and the channels, may be embedded within the substrate and can be, if desirable, sealed from the environment.

[0015] In another aspect of the invention, the flow-promoting fluid chamber, and associated channels, and the storage chamber are omitted and the functions performed in those chambers are instead performed in the sample preparation chamber.

[0016] The foregoing apparatus can be employed to carry out the method of the present invention of detecting a presence or absence of a disease state. An exemplary method is directed to detecting a presence or absence of a disease state, in a test sample from a subject such as, for example, an organism such as, but not limited to, animals, plants and other living organisms. The method comprises the steps of: (a) with the isolating device in the isolating position, depositing a specific DNA fragment in the assay station and drying the assay station; (b) applying a sealing layer to the assay station; (c) injecting into the sample introduction inlet a biological blood sample; (d) injecting a washing buffer into the buffer introduction inlet to form

a mixture of the sample of blood and the washing buffer in the sample preparation chamber; (e) causing red cells to separate from white blood cells, therein leaving said white blood cells in the sample preparation chamber; (f) injecting a lysing buffer into the buffer introduction inlet to lyse the white blood cells containing DNA fragments into solution in the lysing buffer; (g) injecting a gas into the sample preparation chamber, thereby pushing the lysing buffer into the flow-promoting fluid chamber; (h) diffusing a chemical from the chemical storage chamber into the flow-promoting fluid chamber; (i) causing the isolation device to permit flow of the lysing buffer containing DNA fragments into the first multi purpose channel to the assay station; (j) detecting when the assay station is filled with the lysing buffer containing the DNA fragments; (k) amplifying the DNA fragments; and (l) detecting the amplified DNA fragments.

[0017] BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0018] FIG. 1 is a plan view of the upper surface of an exemplary sample preparation integrated (SPI) chip in accordance with the teachings of the present invention;

[0019] FIG. 2 is a side view of the exemplary chip of FIG. 1;

[0020] FIG. 3 is a plan view of the upper surface of another sample preparation integrated (SPI) chip in accordance with an alternate embodiment of the present invention;

[0021] FIG. 4 is a side view of the exemplary chip of FIG. 3;

[0022] FIG. 5A is a plan view of an exemplary microfluidic chip in accordance with the teachings of the invention;

[0023] FIG. 5B is a plan view of an alternative exemplary microfluidic chip;

[0024] FIG. 5C is still another view of an exemplary microfluidic chip in accordance with the teachings of the present invention, having sample fluid and an isolation medium therein disposed;

[0025] FIG. 5D is another embodiment of an exemplary microfluidic chip having sample fluid and isolation medium and a detachable absorbent;

[0026] FIG. 5E depicts the chip of FIG. 5D having isolation medium therein disposed, sealing sample fluid in a plurality of assay stations and an absorbent having excess sample fluid removed;

[0027] FIGS. 6A-E show another exemplary embodiment of a microfluidic chip made in accordance with the teachings of the present invention providing another sealing arrangement;

[0028] FIG. 6F shows another exemplary sealing arrangement in accordance with another aspect of the invention;

[0029] FIG. 6 G depicts another exemplary microfluidic chip made in accordance +with the teachings of the invention.

[0030] FIGS. 7A-1-7A-4 show an exemplary sequence of filling a plurality of assay stations with sample fluid;

[0031] FIGS. 7B-1-7B-4 show the displacement of sample fluid by an isolation medium and sealing on one side of a plurality of assay stations;

[0032] FIGS. 7C-1-7C-4 show the sealing of another side of a plurality of assay stations by an isolation medium;

[0033] FIGS 7D-1-2 shows another exemplary sequence of filling and sealing a plurality of assay stations;

[0034] FIG. 8 shows an exemplary analyzer system according to the teachings of the instant invention;

[0035] FIG. 9 shows an alternative analyzer system that maybe utilized in accordance with the instant invention;

[0036] FIG. 10 depicts another exemplary arrangement that may be utilized in accordance with the present invention;

[0037] FIG. 11A depicts an exemplary sample fluid preparatory area;

[0038] FIG. 11B is a top plan view of sample fluid preparatory area of FIG. 11A;

[0039] FIG. 12 depicts a top view of assay stations having exemplary flow promoting structures;

[0040] FIG. 13 shows exemplary fluid vent channels of an exemplary assay station configuration;

[0041] FIG. 14 shows an exemplary bevel that may be provided according to an embodiment;

[0042] FIG. 15 shows another exemplary embodiment of assay station;

[0043] FIG. 16 depicts still another exemplary embodiment of assay stations in accordance with the teachings of the invention;

[0044] FIG. 17 is a side cross-sectional view of an exemplary configuration of channels in accordance with the teachings of the invention;

[0045] FIG. 18 is another exemplary embodiment of channels for multiple sample testing according to the teachings of the invention.

[0046] DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0047] The present invention relates to an apparatus comprising a substrate having at least one assay station in which the at least one assay station has at least a first assay station channel and in particular embodiments may have at least a second assay station channel. As utilized herein, the term assay station describes the area at which a particular assay takes place. In particular embodiments, an assay station comprises an area bounded by isolation medium, for example. The said first and second assay station channels each separately are in communication with said at least one assay station. An arrangement of at least first and second multi-purpose channels are provided which are in fluid communication with said assay station. The first multi-purpose channel and first assay station channel have internal surface characteristics conducive to conduction of a sample solution therethrough. For example, if an aqueous fluid sample is provided , the channels may be either hydrophilic or are treated so as to be hydrophilic. In particular embodiments, the shape of particular channels (geometric characteristic) provides particular conducive or non-conducive characteristics to particular channels, particularly when channels having different relative geometric characteristics are in communication.

[0048] At least one sample fluid inlet is in communication with the at least first multi-purpose channel, and at least one isolation-medium inlet is in communication with the at least first and second multi-purpose channels. The at least one second multi-purpose channel has at least an internal surface portion non-conducive to conduction of said sample solution. For example, if the sample fluid is aqueous, the second multipurpose channel inner surface would be hydrophobic or would be treated so as to be hydrophobic.

[0049] The apparatus can further comprise a sealing layer which seals at least one assay station. If desired the sealing layer can seal only the at least one assay stations or can seal portions of the apparatus substrate up to and including the entire substrate surface.

[0050] In one embodiment, the internal surface of said first multi-purpose channel permits flowthrough of at least one of a sample fluid, air and an isolation-medium and the internal surface of said second multi-purpose channel permits the flowthrough of at least one of air or an isolation-medium but is not conducive to flowthrough the sample fluid.

[0051] In another embodiment of the invention, the internal surface of the multi-purpose channel and/or a surface of the second assay station channel immediately adjacent to the intersection of the second assay station channel and the second multi-purpose channel are both non-conducive to conduction of said sample fluid. This embodiment further assists in the localization of sample fluid to the assay station as well as the sealing and isolation of the assay station.

[0052] The substrate can be configured such that at least first and second multi-purpose channels are in communication with a plurality of assay stations via the first and second assay station channels, respectively, of said plurality of assay stations. The plurality of assay stations are arranged to provide at least one of simultaneous or sequential filling of the plurality of assay stations with the sample fluid solution conducted thereto via the at least first multi-purpose channels and the first assay station channels. Additionally, the plurality of assay stations can be arranged to provide at least one of simultaneous or sequential filling of the first and second multi-purpose channels with the isolation medium to seal the plurality of assay stations.

[0053] The assay stations can have disposed therein at least one reaction assay component. For example, if PCR is contemplated, the reaction assay component can be one or more primers and/or a probe.

[0054] A sample fluid inlet can be in communication with a sample fluid preparation area and the substrate can include at least one of a sample preparation chamber which may or may not have a lid. At least one element for controlling fluid flow in at least one of said channels can be incorporated into the apparatus or substrate.

[0055] The flow of sample fluid in the channels on the substrate can be facilitated by the introduction of a flow-promoting fluid in to the sample fluid via a chamber for introduction of flow-promoting fluid.

[0056] The chamber can be in communication with a chamber for mixing said flow-promoting fluid with the sample solution.

[0057] The present invention further comprise a method for conducting reactions on the substrates of this invention.

[0058] An exemplary method includes introducing a sample fluid to at least one sample inlet; filling the at least one assay station and the second assay station channel via the at least one multi-purpose channel; allowing isolation-medium from the at least one isolation medium inlet to flow into at least the first multi-purpose channel; and running at least one reaction at said at least one assay station. The reaction in the assay station provides at least one of qualitative or quantitative data, for example, a colormetric result. The at least one of qualitative or quantitative data can be obtained utilizing fluorecence which can be provided by at least one of intercalation of a flurophore or fluorecently labeled probe. When fluorescence is employed, the assay stations in the substrate can be irradicated with at least one excitation frequency. The probe can be labeled by at least one of a flurophore, an enzyme or component of a binding complex. The result of this method provides at least one of qualitative or quantitative data relating to the sample fluid being assayed. Exemplary qualitative or quantitative may be exemplarily provided by florescence resonance energy transfer, luminescence or colorimetric change, for example.

[0059] If desired, the reactions conducted on the substrate can be conducted under temperature control, for example, thermocycling conditions. The test sample can be provided to the apparatus by initially subjecting the test sample to at least one preparative operation. The preparative operation can be performed separately from said substrate or can be performed at at least one preparative station which is upon or within the substrate.

[0060] The at least one preparative operation can, for example, provide nucleic acids susceptible for use in the reactions to be conducted in the assay stations on the substrate.

[0061] Additionally, at least one assay reaction component can be disposed or placed into the at least one assay stations. The reactions may provide for the detection of a variation in nucleic

acid sequence that is associated with virulence, disease, a particular phenotype or interindividual or interspecific variations or differences. Such variations in nucleic acid sequences include single nucleotide polymorphisms (SNPs), tandem repeats and insertions and/or deletions.

[0062] The at least one reaction which can be conducted includes a nucleic acid amplification step, and the assay reaction component might in that case include a primer or primers.

[0063] The method of the invention provides for sealing or isolation of the assays stations by displacement of sample fluid in the multi-purpose channels by an isolation-medium. The isolation-medium can be introduced sequentially into the at least first and second multi-purpose channels or isolation medium can be first introduced into the at least first multipurpose channel followed by introduction into the at least second multipurpose channel. The isolation-medium is typically a material which is of an opposite nature as compared to the sample fluid, that is, substantially immiscible with the sample fluid.

[0064] The introduction of isolation medium provides the purging of air from said at least second multipurpose channel and the purging of said sample fluid from said at least first multipurpose channel, resulting in the isolation of said at least one assay station containing said sample isolation. In the case where the isolation medium is solidifiable, the instant method includes a step of at least one of solidifying, curing and polymerizing said isolation medium.

[0065] A particular but not limiting embodiment of the present invention is directed to sample-preparation integrated, disposable, microfluidic devices and methods of using such devices. The devices and methods of the present invention facilitate analysis of nucleic acids, e.g. DNA, to rapidly detect and/or assess the risk of diseases in biological samples. The devices of the present invention can also be used for detecting amplified nucleic acid products for e.g. pharmacogenetic determinations such as for genetic fingerprinting. As used herein the term "detect" or "detection" or "detecting" means to diagnose or indicate that a subject test sample contains at least one disease-associated nucleic acid. By "device" is meant a chip which incorporates elements necessary to transport nucleic acids and perform nucleic acid amplification, such as polymerase chain reaction (PCR). The device can optionally incorporate elements necessary for on-chip isolation of nucleic acids, such as a micro-filter, sized to trap white blood cells from a human blood sample, for example. In accordance with the present invention, DNA molecules can be rapidly analyzed from a test sample, e.g. a biological sample. In one embodiment, once

applied to the device, the test sample is assayed to determine the presence or absence of a disease or assess the risk for developing a disease. A "test sample" employed by the present invention includes animal tissue and blood. The test sample is preferably whole blood. In one embodiment, a tissue homogenate or blood sample from a subject is tested in the assay system of the invention. Where a tissue sample is to be assayed by the device and methods of the present invention, the tissue sample is conventionally homogenized, digested and filtered to remove solid debris and obtain DNA in a solution which can be applied to the device of the invention.

[0066] For example, the presence of infectious pathogens (viruses, bacteria, fungi, protozoans, microbial organisms or the like) or cancerous tumors can be detected by providing a virus-specific primer or cDNA or fragment, pre-labeled with a fluorescent molecule such as fluorescein. The test sample DNA is conducted through the device to the primer where a fluorescent signal will be produced if the test sample contains the disease-causing virus, following PCR.

[0067] Biological test samples in accordance with the present invention are derived from subjects using well-known techniques such as venipuncture or tissue biopsy. Where the biological test sample is derived from non-human animals, such as livestock, blood and tissue samples are generally obtainable from livestock processing plants. Depending upon the particular embodiment being practiced, the test compounds are provided, e.g. injected, or optionally free in solution. Animals contemplated by the present invention include, for example, humans, reptiles, livestock, avian species, and domesticated pets such as dogs and cats. A preferred animal is a human being.

[0068] According to the present invention, the device is a lab-on-a-chip which can have various channel dimensions (i.e. lengths, widths, heights, diameters). For example, the multipurpose channels may have lengths of about 1 mm to about 500mm in length, from about 2 mm to about 10 mm in width, from about 0.5 mm to about 10 mm in thickness. The assay station channels may have similar dimensions and have exemplary lengths of about 0.01mm to about 50mm. A sample preparation area may be about 5 to about 100mm in length and width and about .5 mm to about 10mm in height. The device can contain one or more sample introduction inlets, one or more chambers, one or more interconnected channels (sized to accommodate fluid flow) with surface of entire channels or a part of channels being selectively either inherently hydrophobic or

hydrophilic or can be treated with hydrophobic or hydrophilic materials, and one or more assay stations for nucleic acid (e.g., DNA and RNA) amplification. The device also preferably contains at least one nucleic acid-adsorbant surface, such as a silica-derivitized surface. The device may alternatively contain at least one membrane filter for separating white blood cells from a test sample. In one embodiment, the methods of the present invention are carried out on the device following extraction of a biological test sample for substantially immediate detection results. By "substantially immediate" is meant results can be obtained in about 5 minutes to 2 about hours. In another embodiment, the present invention also contemplates sample pre-processing off-chip and storage of the test sample, if processing is desired at a later time. Pre-processing is generally employed when the test sample is obtained from flow cell sorting devices or centrifugation devices, and the like. Sample preparation protocols for DNA or RNA can be found in Sambrook et. al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition. and/or be accomplished with kits from Qiagen, Whatman, etc., which utilize columns/membrane to bind DNA.

[0069] For pre-processing, non-nucleic acid molecules that may inhibit subsequent amplification or interfere with the fluorescent analysis of products are removed. Pre-processing is conventionally performed in a device which can be modular and separate from the device of the present invention. The pre-processing module contemplated to mate with and/or fluidically attach to the device of the present invention is a stand alone module. The stand alone module is linked by a liquid delivery tube which can connect to sample inlet 2 of the device of the present invention.

[0070] Preferably, pre-processing is performed on-chip. In accordance with the present invention, for pre-processing of a test sample, DNA and/or RNA is separated from other biological macromolecules and small molecules in crude samples such as body fluids (including blood, feces, sputum, aspirates, swabs), homogenized tissues samples (hair, mouth swabs, biopsies, aspirates, whole organisms), environmental samples (surface swabs, food, water/liquids) and the like. These samples can also be enriched and semi-purified. For example, the present invention contemplates enriched or semi-purified populations of: white cells after buffy coat centrifugation separation; cells cultured *in vitro* and cells obtained after flow sorting. Preprocessing is performed off-chip to disintegrate large pieces by the standard procedure of aspirating the solid sample through a fine-bore needle such as a 21G-28G sized needle, for example. The sample can be stored in standard chemicals, such as guanidium isothiocyanate, for

example, to inhibit the degradation of DNA or RNA if sample processing cannot take place immediately.

[0071] In accordance with aspects of the present invention, DNA and/or RNA is isolated from a test sample. The DNA and/or RNA is adsorbed onto a derivitized silica surface immobilized on the microdevice in the presence of appropriate buffers such as guanidium isothiocyanate and NH_4Cl dissolved in water and Tris-HCl adjusted to pH 7.2, for example. The nucleic acids adhere to the surface due to electrostatic charges. The adsorbent surfaces contemplated by the present invention include: particle beads (glass beads) held in chambers with filters; paramagnetic particles immobilized in chambers by magnetic fields; and membranes or filters allowing liquids to pass through based on ionic charge properties.

[0072] Immobilized or trapped nucleic acids are conventionally washed to remove unwanted cellular debris and macromolecules. The DNA/RNA is then eluted by changing the charge of surface and/or nucleic acid using buffer of neutral pH (including water), either by forward-flow or by back-flushing. The fluidics of sample introduction, washing and elution are carried out using passive or active valves and pumps, negative pressure suction or positive pressure. Preferably, test samples are introduced into the device using one or more pumps, such as syringe pumps, manual syringes, peristaltic pumps or vacuum pumps.

[0073] In accordance with one aspect of the present invention, nucleic acids are amplified at assay stations. A digital camera having a sensing element and suitable optics for acquiring images can be employed to detect light of specific wavelengths emitted from the samples in the wells. Nucleic acids are selectively amplified to sufficient quantities for direct and simultaneous detection without or with minimal post-amplification steps.

[0074] Amplification reactions contemplated by the present invention include, for example, polymerase chain reaction, ligase chain reaction or isothermal amplification reactions. In one embodiment, a reverse-transcription step (employing enzymes capable of reverse transcription) for amplifying RNA targets is conducted before the main amplification step. In another embodiment a reverse transcription step is combined with the DNA amplification step.

[0075] In accordance with the present invention, nucleic acids are introduced into the assay stations together with conventional reagents for the amplification reaction such as enzymes, primers, deoxyribonucleotide triphosphates dNTPs, fluorescent dyes, detergents, salts and

buffers. In an alternative embodiment, some of the reagents (particularly primers and/or probes) may be pre-applied to the assay station and dried; these reagents will be solubilized on contact with the incoming sample/reagent liquid mix. A second liquid in characteristic, immiscible phase such as Mineral oil, wax, and the like, can be added to the chip through one or more channels after the sample/reagent mixture. The immiscible liquid will "seal off" fluidic access to the assay stations and act as a physical barrier to prevent the unwanted mixing of the contents of the assay station with that of adjacent assay stations.

[0076] The assay stations on the device of the present invention can be arrayed in high density, either in two-dimensions or in three-dimensions, with each having an exemplary volume ranging from about 1 pico liter to about 50 micro liters. The present invention has the capacity to simultaneously amplify and detect nucleic acids present in about 10 to about 50,000 assay stations. The present invention also contemplates the inclusion of individualized thermal controls for each assay stations. In a preferred embodiment, the assay stations are subjected to common thermal parameters. Common thermal parameters permit the reactions in each assay station to be optimized to a single set of thermal conditions by varying the design of the amplification reaction, or the concentrations of the reagents. For example, the amplification reaction may take place either by cycling through a set of predetermined temperatures for example, 95°C for denaturation, 50-60°C for primer annealing, with or without a 72°C extension step. Preferably, the amplification reaction is conducted isothermally at a constant temperature (e.g. 60°C).

[0077] In accordance with the present invention, the products of DNA amplification are detected *in situ* homogeneously by detecting fluorescence emitted specifically in the presence of amplified DNA product. Detection is achieved using a fluorophore that specifically fluoresces on binding with double-strand DNA such as ethidium bromide or SYBR Green I, for example. Alternatively, a specific DNA sequence can be detected using one or two fluorophore-labeled oligonucleotide probes using transfer of fluorescent resonance energy. In one embodiment, the detection step can be performed after the complete amplification process. In another embodiment, the detection step can be performed after individual thermal cycles. In still another embodiment, the detection step can be performed during intermediate points of an isothermal reaction. The detection of amplified nucleic acids is performed with a digital camera using excitation from an off-chip source of incident UV or other appropriate wavelength light, and off-chip detectors for the emitted wavelength. The results of detecting amplified DNA

products are used in comparison against a pre-amplification baseline which is experimentally determined by the fluorescent emission reading within the experiment obtained at amplification cycle zero. Alternatively, the pre-amplification baseline is determined with respect to different fluorescent probes at the same assay station, or with probes from the reactions of different assay stations.

[0078] It is preferred that all methods of the present invention are carried out on the device. The lab-on-a-chip device contains all the integrated elements required for detecting the presence of e.g., viral or bacterial DNA in a biological sample and assessing the risk of disease. The present invention thus contemplates that both quantitative and qualitative measurements of DNA can be used to assess the subject's risk of having a disease or condition. For example, the presence of a Bacillus anthracis DNA in a test sample indicates the subject has been exposed to the bacterium which causes anthrax and may be at risk for having the disease associated therewith. Conversely, the absence of Bacillus anthracis DNA in a test sample indicates that the subject does not have the disease associated therewith.

[0079] Any number of infectious bacterial or viral diseases now known or later-identified can be rapidly detected in a test sample in accordance with the present invention. Such diseases detectable in accordance with the present invention include, but are not limited to: anthrax, small pox, Legionnaire's disease, AIDS, Hepatitis A, B, and C, tuberculosis plague, and malaria. In another aspect, the present invention permits the detection of cancer, leukemia, thalassemia, asthma, allergies, strep or sore throat, food poisoning, near-sightedness in children and adults, Nipah and sexually transmitted diseases.

[0080] The present invention also permits the detection of pharmaceuticals in a test sample. This aspect of the present invention can be used for e.g. rapid drug screening or for determining the presence of a drug in a particular tissue, for drug efficacy assessments, for example. Still another aspect of the present invention provides for the detection of genetically-modified food and for genetic fingerprinting. For example, in applications pertaining to genetically modified food, the chip will detect the artificially introduced genes in the food by PCR. For applications pertaining to the genetic fingerprinting, the chip will analyze DNA sequence variation between individual (human, plants, and animals) by PCR.

[0081] The chip apparatus and fluidic network can be manufactured at the micro scale level by existing microfabrication techniques such as glass etching, plastic hot embossing, plastic injection molding, resin casting, laser ablation, stereolithography photolithography, LIGA processes, CNC machining photocuring or metal forming techniques to form a chip with open structures such as open channels and assay stations. The open channels and assay stations can then sealed and closed with cover film or plate.

[0082] The dimensions of the channels can range typically from 1 micro meter to 10 mm. Therefore, microfabrication is only an option, not the exclusive means by which to produce the chip 100. Other more common technologies such as computer numerically controlled (CNC) machining, metal forming, plastic injection molding, or hot embossing can also be used for fabrication.

[0083] DETAILED DESCRIPTION OF THE FIGURES

[0084] In FIG. 1 and FIG. 2, exemplary microstructures of a chip apparatus 100 having a sample fluid preparatory area shown as constructed on substrate 36. Substrate 36 can be made of a suitable material such as glass, plastic, an elastomer such as poly-dimethylsiloxane (PDMS), metal, ceramic or a composite. To provide channels and assay stations, for example, various standard glass chemical etching techniques can be used on a glass substrate. If utilizing plastic (with or without metallic powder filling) to provide substrate 36, hot embossing with an embossing die, plastic injection molding, resin casting, laser ablation, stereolithography photolithography, LIGA processes, as known in the art, CNC machining photocuring and plastic chemical etching techniques can be used. LIGA processes typically comprise synchrotron radiation in a resist structure, such as polymethylmethacrylate (PMMA), and exposing the structure and chemically developing the structure to provide a micro mold based upon pattern of the resist structure. Metallic powder filling may be utilized in order to provide for improved conduction of heat, for example, when substrate 36 is comprised of plastic. If utilizing an elastomer substrate, a replication (a type of elastomer casting on a solid microstructured die) and molding techniques can be used. Additionally, silicon and silicon-based compounds may be utilized to provide substrate 36. Then substrate 36 may be sealed with the sealing layer 40 (not shown in top view). If sealed, various configurations of sealing may be provided, such as sealing a portion of the assay stations 26 only, or sealing assay stations 26 in combination with assay

station channels 24, 28 and/or first and/or second multipurpose channel 30 and 22, respectively. The sealing layer is normally a plastic film that seals the channels and assay station or plurality of assay stations, except chamber 6 and all the inlets and outlets, by a bonding process including, but limited to, thermal bonding, electrostatic bonding, adhesive bonding. The sealing layer 40 can also consist of other materials such as glass plate or plastic plate or an elastomer like poly-dimethylsiloxane (PDMS).

[0085] In particular embodiments, the sealing layer 40 may also be comprised of a self-healing/sealing type of material such as rubbers, elastomers, gels and/or a valve/lid which may be opened via mechanical, and/or electrical, and/or magnetic, and/or chemical means that would allow for introduction of a syringe, for example, into covered assay station 26, to provide for the application of a particular assay reaction component, for example, into assay station 26. Upon removal of the syringe, the sealing layer will self seal. In particular embodiments however, a self-healing/sealing type of material may not be utilized.

[0086] Fabrication of the assay stations or portions thereof and the various channels need not be restricted to only one of either substrate 36 or sealing layer 40. For example, a portion of assay station structures can be formed on the substrate 36 or sealing layer 40, and a portion of channel structure can be made on the sealing layer or substrate. Following bonding of sealing layer 40 and the substrate 36, the particular portions of various elements provided upon/in the substrate 36 and sealing layer 40 are brought together in proper alignment to provide the complete channel or other structure.

[0087] Embodiments of the apparatus 100 may include at least one flow controlling element. Flow controlling elements include various valves, gates and restrictions that may be provided at virtually any part of the apparatus, including channels as well as points of communication, for example, according to a user's desire or need for regulating/controlling fluid flow.

[0088] Assay station 26 may comprise at least one component of any number or type/class of assay reaction, the at least one component including, but not limited to, nucleic acids, probes, primers, antibodies, cells, assaying salts, catalysts, reporters, quenchers, enzymes, proteins, peptides, drugs, small molecules and fluorophores, for example. Additional examples include a synthetic molecule(s) from a combinatorial library of molecules, a peptide library a nucleic acid library or aptamer library. The at least one component of the assay reaction may be disposed

into at least one assay station 26 via a carrier. A short list of carriers includes, but is not limited to, aqueous solutions, solvents and gels. Air and/or a gas may also be considered as a carrier for the deposition of at least one component into said at least one assay station 26 (spray or ink jet deposition, for example). The particular carrier or carriers so utilized may be adapted to be driven off by evaporation, for example. Other methods to drive off a carrier, such as ovens, lamps, lasers, force air, etc., are well known to those in the art. The at least one component, such as probes and/or cells for example, may be bound to the internal surface of assay station 26 by covalent bonds and/or absorption.

[0089] In the instance that an amplification reaction, such as PCR, is to be run in the assay stations 26, before bonding of the sealing layer 40, a nucleic acid fragment to be amplified and/or primer or primers may be deposited into each assay station 26 on the substrate 36 manually or by a liquid dispensing robot. The assay station 26 is then dried to drive off the carrier of the reaction component before adding the sealing layer 40. In particular embodiments, the sealing layer may be added before the drying of assay station 26 and in some embodiments the station may not need to be dry. Other embodiments may have the sealing layer 40 added during the running of the assay. In the case where a self-healing/sealing layer is utilized, the probes/primers may be added after assay station 26 is filled with sample fluid 56.

[0090] The nucleic acid fragment to be amplified includes, but is not limited to DNA or RNA fragments, cDNA, nucleic acid primers and/or probes conventionally obtained by the skilled artisan using standard methods. For example, a DNA fragment useful in accordance with the invention can be pre-fabricated in a commercial DNA synthesizer. The assay stations may be air dried in accordance with the teachings of the present invention. Drying may be carried out at room temperature at ambient atmospheric pressure. Depending upon the number of assay stations, drying may take from about 10 minutes to about 5 hours. Preferably, the assay stations are dried in about two hours.

[0091] Preferably, both the substrate 36 and the sealing layer 40 have hydrophilic surfaces to enhance the liquid flow by capillary force. A typical hydrophilic substrate 36 is glass. A normally hydrophobic substance such as a plastic can be treated to transform the substance into a hydrophilic substance by treating the plastic with diluted hydrofluoric acid or sulfuric acid. Another way to alter the surface properties of a hydrophobic substance , contemplated by the

invention, is by adding a hydrophilic polymer solution, or by adding a surfactant to the hydrophobic substance, e.g., plastic.

[0092] For example, those of skill in the art are familiar with many various methods for treating/modifying surfaces, particularly surfaces that are to be utilized for microfluidic applications, such as plasma treatments or coatings, for example. As an example, glass, which is typically characterized as having hydrophilic surfaces, may be treated so that the surface or portions of its surface has instead hydrophobic characteristics. Such treatments may be utilized to provide apparatus and/or portions of the apparatus 100 having particular characteristics (such as wetting characteristics, for example) in accordance with the teachings of the present invention, in order to provide an apparatus configured according to a particular user's preference. The surfaces of the various channels and stations, for example, may have various portions (i.e. substrate, sealing layer) having either wholly, differentially or in any combination, treated surfaces in order to provide a desired arrangement of surface characteristics.

[0093] Channels such as 22, 20 and 30 in FIG.1 for example, may be chemically etched by hydrofluoric (HF) acid on a glass slide for example, after patterning by photolithography using designed masks having desired patterns. Initially, etched slides are immersed into a freshly prepared mixture of about 70% sulfuric acid and about 30% aqueous solution of hydrogen peroxide (about 30% H_2O_2) at about 100°C for about 10 min. The slides are then rinsed thoroughly by running tap water over them several times followed by deionised water, respectively. During this step, the slide is checked for total wetting achieved on every part of the slide, for example, and that there are no remaining hydrophobic patches. Of course, a portion or portions of the slide may not be treated if a user desires not to alter the surface characteristics at those area/areas. In the above example, hydrophilic glass surfaces are obtained.

[0094] In an exemplary method to obtain hydrophilic surface on plastic substrates, for example, poly(methyl methyacrylate) (PMMA), polycarbonate, polyimide, polypropylene, polyethylene etc, hydrophilic materials can be used to treat the plastic surfaces. The hydrophilic materials include poly(ethylene imine) (PEI), poly(vinyl alcohol), polyacrylate etc as known in the art. By coating or brushing a PEI solution, for example, and then drying in an oven for 0.5 to 1 hour, the previously hydrophobic plastic substrates are now provided with hydrophilic surfaces

[0095] To obtain hydrophobic surface in channel 22 and a part of channel 24, the following steps are used.

[0096] Once treated, clean slides are stored in deionized water until ready for use. Before using, they are typically dried in an oven at about 100°C at atmosphere pressure for about 1-2 hrs. If and when some precursor chemicals are used, the dried and cleansed material surfaces are further radiated by UV-O_3 oxidation for about 1 hr to remove the last traces of contaminants and improve self assembled monolayers (SAMs) quality. Precursor molecules (such as long alkyl trichlorosilanes, such as octadecyltrichlorosilane (OTS), for example) are prepared freshly at the ratio of about 10% concentration in a suitable solvent, e.g. Hexane, Hexadecane etc. These are then brushed or sprayed into the certain assigned regions for curing for about 15-20 min at room temperature, for example. When using fluorochemical acrylate polymer, such as EGC-1700 made by 3M, the coating solution is prepared freshly with about a 1.5% acetic acid and it is necessary for the finishing coated slides to be cured at an oven at about 80 to about 100°C for about 30 min. Thus patterned hydrophilic (glass) and hydrophobic surfaces (treated glass) are provided. This is only one of many exemplary methods known to those of ordinary skill in the art for altering surface characteristics of a substrate.

[0097] Test sample inlet 2 for test sample (e.g. whole blood) is connected typically perpendicular to the upper surface of substrate 36 such that test sample inlet 2 is fluidically coupled to sample preparation chamber 6 through channel 5. Buffer inlet 4 is also connected typically perpendicular to the upper surface of substrate 36, and such that buffer inlet 4 is fluidically coupled to sample preparation chamber 6 through channel 7. Sample preparation chamber 6 is sealed at least partially on its lower surface by sintered glass block 31, to which absorbent 5 and/or a vacuum suction means such as a vacuum pump is applied to extract a mixture of e.g. whole blood sample, lysing buffer and washing buffer through the sintered glass block 31.

[0098] The block of sintered glass powder 31, which is inserted into sample preparation chamber 6, is also called porous glass. The typical size of a pore ranges from about 1 micro meter to about 500 micro meter. The sintered glass block 31 occupies the lower portion of the sample preparation chamber 6 and typically is rigidly fixed inside the chamber 6 by a slight size difference; that is, the size of the glass block 31 is slightly larger than the size of the sample

preparation chamber 6. An adhesive substance can also be used to fix the glass block 31 inside the sample preparation chamber 6.

[0099] A vacuum, or liquid absorption by the absorbent 5, is created underneath the glass block 31 thereby extracting the sample, washing buffer and lysing buffer through the glass block 31. Elution buffer is injected into sample preparation chamber 6. Elution buffer penetrates into the glass block 31 and releases the DNA molecules from the surface of the glass block 31. Then, the DNA molecules diffuse (or by flow circulation) into the elution buffer contained in sample preparation chamber 6. So, therefore, the elution buffer contains DNA molecules at this time. Also, other chemicals required to perform the subsequent PCR reaction and fluorescent detection of the PCR product can be added to the elution buffer at this time.

[00100] In another embodiment, there is no need for the use of or addition of a lysing buffer to lyse cells. Instead, the cells are lysed utilizing heat. The cells may be heated to a lysing temperature either when still in sample preparation chamber 6 or may be conducted into the assay stations and lysed there. In a particular embodiment, a miniature heater and temperature sensor may be embedded into each assay station 26 in order to perform individual thermal cycling at each assay chamber 26. Furthermore, heat may be also utilized to evaporate an amount of elution buffer in order to increase the concentration of a solute, for example DNA, in a sample fluid. This evaporative step may be conducted at the sample preparation area 78 or at individual assay stations 26, for example, wherein the sealing layer 40, may be gas permeable but not liquid permeable, for example.

[00101] In another embodiment, various electrochemical sensors and electrical and electronic sensors may be embedded into each assay station 26. Utilizing this embodiment, a user is provided electrochemical-based detection/data as a result of assays run within said assay station. The data may be in the form of changes of electrical conductance, resistance and other indicators typical to experiments utilizing electrochemical detection, as known to those in the art.

[00102] The apparatus and methods provided by the present invention are useful for a number of various assays/reactions. For example, all of the required enzymes, fluorescent dye, deoxyribonucleotide triphosphates dNTPs, detergents, and other chemicals and buffers can be added into sample preparation chamber 6 through buffer inlet 4. If required to enhance the elution efficiency, vibrating actuator 34 can be applied to oscillate, typically vertically, to press

diaphragm 48, thereby agitating the elution buffer in the sample preparation chamber 6 to allow more DNA molecules to leave the glass block 31 and enter the elution buffer which occupies sample preparation chamber 6.

[00103] A fluid, for example a gas or an oil, may be injected into sample preparation chamber 6 through either through test sample inlet 2 exclusively with buffer inlet 4 closed, or alternatively through test sample inlet 2 with buffer inlet 4 remaining open to act as vent until it is filled with elution buffer. The fluid purges the elution buffer containing the released DNA molecules, and causes exemplary flow controlling element, hydrophobic valve 8, to open, permitting elution buffer to enter into initially empty chamber for mixing sample solution and flow promoting fluid, where the elution buffer fills chamber 12. The valve 8 can also be a valve type that is operated by various other means such as mechanical, electrical, pneumatic or magnetic. At this time, the elution buffer is prevented from exiting the chamber 12 by hydrophobic valve 18 that is located at the entrance to main liquid distribution channel 20. Providing fluid can be achieved again through conventional techniques such as pressurization.

[00104] Before the buffer in chamber 12 flows out to assay stations, chamber 12 can also be used for the following purposes: (1) to meter the buffer flowing out of chamber 12 (that is, to control the volume of buffer flowing out of chamber 12 by proper choice of volume of chamber 12); (2) to retain buffer for period of time to let the DNA distribution homogenize before the buffer flows out of chamber 12; and (3) to increase DNA concentration, as mentioned previously, in the chamber 12 by evaporating a portion of the water in buffer. The resulting higher concentration of DNA in buffer flowing to assay stations 26 increases the DNA detection sensitivity and specificity.

[00105] In one embodiment, chamber 16 is provided for the introduction of flow promoting fluid (FPF), released through diffusion channels 14 to chamber 12. Suitable flow promoting chemicals include, but are not limited to, heparin, sodium dodecyl sulfate (SDS), cetyltrimethyl bromide (CTAB), Triton-X, Tween 20, NP-40 and any other surfactant that does not inhibit subsequent DNA amplification and detection chemistry, and does not fluoresce under detection light excitation. Upon diffusion of FPF into chamber 12, a concentration gradient of may be established in chamber 12.

[00106] In particular embodiments, one or more main sample fluid channel 20 is fluidically coupled to at least one first multi-purpose channel 30 which is in communication with at least one first assay station channel 28, and at least one assay station 26. As the chemical concentration of FPF in the DNA containing sample fluid reaches a critical level, liquid wetting of the sample fluid over the surface of hydrophobic valve 18 becomes large enough to cause the buffer to flow through the valve 18 from chamber 12 into main sample fluid channel and further flow into first multi-purpose channel 30, first assay station channel 28, and assay stations 26. In this embodiment, the flow is caused by capillary pressure generated by surface tension which moves the liquid forward. Such surface tension is generated at the contact region between the sample fluid and the solid surface of the chip (that is, the surface of channels 20, 30, 28, and assay stations 26). With the addition of the FPF, the surface tension is lowered enough to cause the sample fluid to flow through valve 18 and move further into all other channels and assay stations.

[00107] During this capillary pressure flow, the air volumes in channels 20, 30, 28 and assay stations 26 are at least purged by sample fluid through at least one second assay channel 24, which are fluidically coupled to the assay stations 26 and second multi-purpose channels 22, so that channels 20, 30, 28 and assay stations 26 become filled with the sample fluid. To ensure that all of the assay stations 26 become filled with the sample fluid, the volume capacity of chamber 12 is designed to be at least equal to or greater than the combined volume of the channels 20, 30, 28 and assay stations 26.

[00108] To prevent the sample fluid from flowing into second multi-purpose channel 22, the following measures can be used: (1) Valves can be installed inside the second assay channel 24. Such valves can be actuated by actuating means such as mechanical, pneumatic or electromagnetic; (2) a porous material can be installed inside at least one second assay channel 24 to block the flow of sample fluid but allow air to vent into second multi-purpose channel 22; (3) a layer of hydrophobic material may coat at least a portion of the second assay channel 24 to block the flow of sample fluid but allow air to vent into second multi-purpose channel 22; the hydrophobic material typically can include, but is not limited to, poly (styrene-butadiene-styrene) (SBS), poly(methyl methyacrylate) (PMMA), polycarbonate, polyimide, polypropylene, OTS, fluorochemical acrylate polymer (such as EGC-1700 made by 3M) or epoxy resin. For example, SBS can be dissolved in an organic solvent to form a solution, which can be cast onto a

glass or plastic surface to obtain a very thin film by drying. Epoxy resin can be directly dropped onto glass or plastic surfaces to form a thin film by ultra-violet (UV) curing or heating; (4) The hydrophobic material coats at least one second multi-purpose channel 22 so that the sample fluid can occupy second assay channel 24 but cannot enter into second multi-purpose channel 22 while air can be purged into second multi-purpose channel 22.

[00109] In particular embodiments, in order to stop sample fluid 56 flow from entering second multipurpose channel 22, the width/diameter of second multipurpose channel 22 is provided to be larger that the width/diameter of second assay channel 24 as depicted in exemplary FIG. 17, which depicts a side cross-sectional view of an example of this type of configuration. A drastic enlargement, which may be sharply made, at approximately the end of assay channel 24 is effective to stop the flow of sample fluid 56 and prevent it from entering second multipurpose channel 22. Line depicted between the various channels are only for illustrative purposes, to show graphically the various channels and their spatial relationships in the exemplified figure.

[00110] When using octadecyltrichlorosilane (OTS), it is preferably prepared freshly at the ratio of about 10% concentration in a suitable solvent, e.g. Hexane, Hexadecane etc. Following this, the solution is then brushed or sprayed into the certain assigned regions for curing for about 15-20 min at room temperature, for example. In this way, hydrophobic surfaces are obtained. When using fluorochemical acrylate polymer such as EGC-1700 made by 3M, the coating solution is prepared freshly with about 1.5% acetic acid and the finished coated slides are preferably cured in an oven, for example, at about 80 to about 100°C for about 30 min.

[00111] Digital camera 32 detects when all the assay stations 26 are filled by sample fluid . The digital camera may be a camera with a charge-coupled device (CCD) sensing element and all possible types of suitable optics for acquiring images. An optical filter is positioned in front of the sensing element of the camera, so that only light of specific wavelengths emitted from the liquid in assay stations 26 is allowed to pass through the filter and reach the sensing element (to be detected by the camera).

[00112] At the time that all the assay stations 26 are filled, isolation medium 54 may be introduced through selected combinations of inlets 42, 44, 46, and 21, for example, which are fluidically coupled to first and second multi-purpose channel 30 and 22 respectively, for example, by any of the following non-comprehensive list of means: electro-osmosis pumping,

positive pressurization (such as injection with a syringe), capillary flow, electrowetting, thermocapillary flow and/or vacuum suction. In embodiments where a sealing layer 40 is not provided over the multipurpose channels, isolation medium may be deposited by casting and/or robotic dispensing, for example, which would purge sample fluid 56 from the first multipurpose channel 30. Filling channels 30 and 22 with isolation medium can be executed sequentially or simultaneously, and is typically performed by the introduction of isolation medium through inlets that first purge sample fluid from the first multi-purpose channel and then subsequently isolation medium is introduced into the second multi-purpose channel to purge air therefrom.

[00113] Therefore, the isolation medium 54 fully fills first and second multi-purpose channels 30 and 22. The isolation medium 54 is selected so as to be impermeable to the elution buffer, i.e. the buffer cannot diffuse into medium 54. The isolation medium 54 typically can be wax, heat cured wax, oil, phase-changing plastics, thermally curable polymer liquid, cyanoacrylate and its derivatives, two-part epoxies or ultra-violet (UV) or visible light curable polymer liquid and hot-melt materials (such as those typically utilized in glue guns, for example). Further exemplary isolation mediums 54 include, but are not limited to, thermally cured polymer, such as polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer, as well as other silicone elastomer and liquid silicone precursors. Curing activation temperatures may be higher than about 40 degrees C.

[00114] Exemplary ultra-violet (UV) curable isolation medium 54 such as polyacrylate and its derivatives, polyurethane precursors and its derivatives may also be utilized. The UV or other appropriate radiation sources include a UV lamp that is focused onto multipurpose channel 22 and/or 30, for example, by a lens or lenses, a UV lamp illuminating onto multipurpose channel 22 and/or 30 areas that remain exposed after application of a mask having appropriate cut-out portions which provide multipurpose channel 22 and/or 30 areas exposed to UV, for example. Additionally, a localized irradiation source that may be directed onto isolation-medium 54 containing multipurpose channels 22 and/or 30 may also include a localized UV source such as fiber optics.

[00115] Additional exemplary isolation medium 54 may also comprise any adhesive which solidifies as a result of solvent evaporation, for example. When utilizing such isolation medium 54, provisions, such as appropriate venting holes and/or slots, in sealing layer 40 and/or substrate

may be provided. The venting holes and/or slots may be provided in sealing layer 40 areas that cover the multipurpose channels, for example.

[00116] Isolation medium 54 is preferably, substantially immiscible with water and/or aqueous fluid, including with water and/or aqueous fluid containing a surfactant. Isolation medium 54 may be non-transparent and/or fluoresce (not at a wavelength or intensity that may interfere with the assay) and have low viscosity.

[00117] In embodiments wherein isolation medium 54 remains in liquid form after introduction and filling of the multipurpose channels 22/30, for example, a solidifiable sealant 67 (for example, wax, hot melt adhesive liquid, polymer liquid, elastomers) are to be deposited to and seal all of the interfaces between the ambient atmosphere and fluids (such as sample fluid 56 and/or isolation medium 54) in multipurpose channels 22 and 30. Other sealing structures, such as caps, lids and valves, can also be utilized to seal off air-liquid interfaces and it is preferable that solidifiable sealant 67 and the caps, lids, and valves can endure temperatures up to and around 100^0C. The sealant 67 and/or the other sealing structures form a fixed volume of liquid/fluid in the assay stations and suppresses the generation of vapor and during PCR, for example, and any other ration that takes place at elevated temperatures. The solidifiable sealant 67 may be deposited via robotic, manual and other dispensing means, as known in the microfluidic arts.

[00118] In still other embodiments, the multipurpose channels may have, instead of oil/wax-like–type isolation medium 54, ambient air or saturated humid air, or any other humidity saturated vapor, introduced and disposed therein after conduction of sample fluid 56 into the assay stations, to minimize evaporation from assay stations. Ambient air or saturated humid air, or any other humidity saturated vapor may be utilized to purge sample fluid 56 from first multipurpose channel 30.

[00119] Additionally and in further embodiments, the chip 100 may be subjected to pressure above atmospheric pressure when placed inside an enclosure 514, such as a molecular analyzer, during analysis such that the evaporative temperature of sample fluid 56 is raised in order to minimize sample fluid evaporation from assays stations.

[00120] In this embodiment the DNA or other chemicals in the sample fluid contained in each assay station 26 are isolated within the domain of the assay stations 26 and the first assay station

channel 28 and second assay channel 24 so that the DNA or other chemicals do not diffuse to an adjacent assay station in the assay station array. The isolation property of the isolation medium 54 is sustained at temperatures up to and around 100°C. Since the highest temperature for the PCR process is 95°C, no cross contamination occurs in the subsequent DNA amplification step. The injection of the isolation medium 54 can be achieved through conventional techniques such as electro-osmosis, positive pressurization by injection, capillary flow electrowetting, thermocapillary flow or vacuum suction.

[00121] Additionally, a washing step may be added in order to wash away at least one undesired component of a reaction, such as non-specific binding of a labeled probe or other unwanted reaction components, for example, in assay stations 26. This may be utilized in embodiments wherein a probe/marker molecules are utilized which are strongly bound to the internal surface of assay station 26, for example, and also bind to the particular molecule (DNA, for example) that is of interest. Upon the completion of the assay reaction, a washing step, comprised of introducing a washing buffer (via vacuum or pressure, for example) into the multipurpose channels and assay station and channels, is provided in order to wash away nonspecific components of the assay reaction. The markers/probes that are bound to assay chamber 26 surfaces remain behind and are then assayed for the presence or absence of the molecule of interest bound to the marker/probe.

[00122] Each assay station 26 may contain a fluorescent dye. Digital camera 32 captures both white light and/ or the fluorescent emission images from fluorescent dye. In the case where the chambers, channels, and assay stations, i.e., fluid compartments and channels, are not embedded underneath the surface of the substrate 36, and are otherwise exposed to the environment, a sealing layer 40 may be applied to the upper surfaces of all of the fluid compartments and channels 20, 30, 28 and assay stations 26. The sealing layer 40 should be bonded to the substrate 36 preferably before the test sample is added to the sample preparation chamber 6. The sealing layer 40 may not applied to sample preparation chamber 6, and the mouths of the inlets 2, 4 and 21, 42, 44, 46. The sealing layer 40 can be omitted from the upper surface of channels 24 and/or 22 depending upon the particular assay protocol utilized and the temperatures associated therewith. Sealing layer 40 may in particular embodiments seal off the channels and assay stations from the environment, enhance the capillary flow, and enable the liquid flow by injection or vacuum. The sealing layer 40 is normally a plastic film that seals the channels and

assay stations, except sample preparation chamber 6 and all the introduction inlets, by a bonding process including, but limited to, thermal bonding, electrostatic bonding, mechanical jointing and adhesive bonding. The sealing layer can also be comprised of at least one of a glass plate, a plastic plate, a thermoplastic, an elastomer, a plastic film and a thermally activated adhesive. Additionally, sealing layer may be comprised of the same material as the substrate. Preferably, sealing layer 40 and substrate 36 are transparent to UV and other wavelengths, including those in the visible spectrum, and do not generate fluorescence that will interfere with experimental measurements/results.

[00123] In additional embodiments, sealing layer 40 may also be provided with holes/vents that are located at a variety of locations. For example, at least one hole in the sealing layer may be provided at a location, or locations in the case of a plurality of holes, over the various areas, such as channels or waste reservoir 45, for example. Furthermore, it is also contemplated that sealing layer 40 may be comprised of a material that is gas permeable. This would allow venting fluids to escape, for example, while providing a barrier to the loss of a liquid fluid from the apparatus 100, for example. If such a sealing layer is provided, venting holes may not be required to allow fluids and various mediums to flow through the various channels.

[00124] The channels 20, 30, 28, 24 and 22 can range in width typically from about 1 micro meter to about 5 mm, while the channels can range in depth typically from about 1 micro meter to about 1 mm. The assay stations 26 can range in width or diameter typically from about 1 micro meter to about 10 mm, and typically from about 1 micro meter to about 1 mm in depth. The surface wetting properties and dimensions of each type of channel 20, 30, 28, 24 and 22 can vary from the other types of channels. All of the structures can be manufactured using such processes as micro electro-mechanical systems (MEMS) technology, computer numerically controlled (CNC) machining, laser machining, electrical discharge machining (EDM), chemical etching, injection molding, hot embossing, or stamping.

[00125] Each assay station 26 may subject to a thermal condition required for DNA amplification as previously discussed. Such thermal conditions include thermal cycling required for the polymerase chain reaction (PCR).

[00126] Moreover, in an alternate embodiment of the present invention, the FPF can also be added through test sample inlet 2 or buffer inlet 4 to elution buffer in sample preparation

chamber 6 to actuate the flow into the assay stations 26. In this case, there is no need for chamber 12, channels 14 and chamber 16. This chip design is shown in FIG 3 and FIG 4. Here, the valve 8 assumes the function of valve 18 shown in FIG 1 and FIG. 2. In all other respects, the design of the chip 100 and the operating method of sample preparation and analysis is identical to that presented for FIG 1 and FIG 2. Therefore, no additional discussion is presented.

[00127] Also, if the chip surface (surface of all the channels and all the assay stations) is hydrophilic, there is no need to use a FPF at all at any stage of chip operation. In this case, since the sample fluid is aqueous, it can flow into all the channels and assay stations by itself when valve 8 is opened. Both valve 8 and valve 18 can be operated by any means, for example mechanical, electrical, magnetic, chemical or pneumatic.

[00128] In particular embodiments, the apparatus may not be provided with a sample preparation area wherein preparation of sample fluid is conducted "off-chip". Exemplary configurations such as those depicted in FIGs. 5A-E may therefore be provided. In FIG 5A substrate 36 has at least one assay station 26 having in communication thereto a first assay channel 28 and a second assay channel 24. Additionally, isolation media inlet 42 is provided in communication with second multipurpose channel 22. Furthermore, exemplary sample solution inlet 21 is also provided in communication with first multipurpose channel 30. In the embodiment of FIG 5A, a reservoir 45 is depicted in communication with first 30 and second 22 multipurpose channel. While only two sets of assay stations, assay station channels and multipurpose channels are shown, any number of a plurality of sets may be provided. Additionally, sealing layer 40 may be provided over particular areas according to particular embodiments as described previously (not shown due to top view of FIGs 5A-E). Exemplary configurations include sealing layer 40 covering assay stations 26 only or in combination with one or both multipurpose channels, for example, depending upon the type of assay to be run and the characteristics of fluids that will be utilized in conjunction with substrate 36.

[00129] In some embodiments, first assay channel 28 has a smaller cross-sectional area than the second assay channel 24, as shown in FIG 5A-E. This reduces the speed and/or flow of sample fluid 56, that enters assay station 26, thus allowing the air being displaced, via sample fluid 56 entry into assay chamber 26, to be conducted through second assay chamber channel 24 and into second multipurpose channel 22. This reduces the likelyhood that air pockets will form and be

trapped within assay station 26 as sample fluid 56 flows into assay station 26 and eventually into assay station channel 24.

[00130] While first assay station channel 28 is depicted exemplarily herein as having a circular cross-sectional shape/profile, this channel may have any shape that provides flow restriction to minimize sample fluid 56 flow out into first multipurpose channel 30.

[00131] In FIG 5B, a portion 50 of second assay station channel 24 adjacent second multipurpose channel 22, may be provided with surface characteristics that are non-conducive to the flow of sample solution 56. For example, second multipurpose channel 22 may have or be treated to provide a hydrophobic surface. In this embodiment, if sample solution 56 is an aqueous solution, the sample solution 56 will flow into assay station 26 via sample solution inlet 21, and first multi-purpose channel 30, which in this example has hydrophilic surface characteristics. Similarly, the surfaces of first assay channel 28 and assay station 26, also have hydrophilic surfaces, for example. Sample solution 56 flows to second multipurpose channel 22 and stops, due to second multipurpose channel's 22 hydrophobic surface characteristic or, as in particular embodiments as depicted in FIG. 17, the abrupt expansion of channel diameter from second assay channel 24 to second multipurpose channel 22. As depicted, portion 50 of second assay channel 24 may also have hydrophobic surface characteristics at which point sample fluid 56 flow would stop, shown in FIG 5B, C, for example.

[00132] In the embodiments depicted in FIGs 5B, C, reservoir 45 may be provided with absorbent 5. Absorbent 5 may be comprised of at least any one of cellulose-based material or synthetic material, polyacrylamide gels, particles and porous materials. Reservoir 45 may be sealed by sealing layer 40 or may be open to the atmosphere. Furthermore and in particular embodiments, when absorbent 5 may be covered by sealing layer 40, as shown in FIG 5B (top view), vents 52 may be provided so that fluid flow in the various channels may occur. Additionally, while reservoir 45 and absorbent 5 are herein depicted as being of sufficient size to be in communication with a plurality of terminal portions of multipurpose channels, it is also contemplated that terminal portions of the multipurpose channels may be in communication with exclusive reservoirs and/or absorbent 5 not in communication with any other multipurpose channel.

[00133] In order to seal assay station 26, isolation medium 54 is allowed to flow into first multipurpose conduit 30. Isolation medium 54 may be introduced via various methods and in accordance with various embodiments of the instant invention. For example, isolation medium 54 may be introduced into first multipurpose channel 30 via isolation medium inlet 21. In particular embodiments, for example in FIGS 5A-E as well as FIGS 1 and 3, isolation medium inlet 21 may serve a dual or multipurpose as sample fluid inlet 21 and as an inlet for isolation medium as shown in FIG 5A. In other embodiments for example, as also seen in FIG. 1, isolation medium 54 may be introduced via an inlet 42 or inlets that do not serve a dual purpose but rather are inlets to second multipurpose channel 22 that is conducive to the flow of air and an isolation medium 54. As previously discussed, isolation medium 54 not only serves to seal assay station 26, for example, but also provides for the displacement of sample fluid 56 from first multipurpose channel 30. The displaced sample fluid 56 may flow to a reservoir 45, as exemplified in FIG 5A, which may or may not be sealed with sealing layer 40 and may or may not contain absorbent 5.

[00134] The displacement described so far results in the flow of sample fluid 56 out of first multipurpose channel 30. However, additional displacement may also take place by the application of isolation fluid 54 into the second multipurpose channel 22, wherein the isolation fluid 54 displaces not sample fluid 56, but air. Recall that in this embodiment the surface of second multi-purpose channel 22 may be inherently or treated to be hydrophobic, for example, and thus acts to halt the flow of sample fluid at area 50. Upon introduction of isolation medium 54 into the second multipurpose channels, the air therein is displaced and thus assay station 26, or pluralities thereof, are sealed by said isolation fluid 54. This addresses the concern of evaporation and cross contamination of the contents of one assay station with others.

[00135] There are a number of methods by which isolation medium 54 may be introduced to exemplary second multipurpose channel 22. According to the embodiment depicted in FIG. 5C, isolation medium 54 is introduced via inlet 21, flows and displaces sample fluid 56 from the first multipurpose channel into reservoir 45. This results in the partial sealing of assay station 26 at the lower hand portion, as depicted. Isolation fluid may then flow into absorbent 5 and then come into communication with second multipurpose channel 22, as indicated by the arrows, and flow into the second multipurpose channel 22, displacing the air therein and sealing the upper hand portion of assay station 26, resulting in the complete sealing of the assay station 26 or

stations. In this embodiment, inlet 42 may act as a vent and not as a point of entry for the introduction of isolation fluid into second multipurpose channel 22, for example, as shown in FIG 5D.

[00136] FIG 5D depicts a detachable absorbent 5 component, that may be bought into communication with the multipurpose channels. Here, the absorbent 5 provides for the uptake of excess sample fluid 56, and may also uptake excess isolation medium 54. Further, the application of absorbent 5 may also provide to speed up the filling of assay station 26 or stations by providing another "pulling" force onto the columns of sample fluid 56 in the respective first multipurpose channel. In FIG 5 D, isolation medium 54 has been introduced via inlets 21 and 42. In FIG 5E the assay stations have been sealed and the absorbent 5 removed, now having excess sample fluid contained therein. At mentioned previously, absorbent 5 may also have absorbed therein isolation medium 54.

[00137] Alternative embodiments may provide for the introduction of multiple sample fluids 56 into the chip. An exemplary configuration is depicted in Fig 18. Here a common second multipurpose channel 22 is provided in communication with multiple assay stations. The plurality of assay stations may be in communication with a plurality of separate first multipurpose channels, for example as shown (30 and 30'), into which sample fluid 56 which may differ from one another, may be introduced. This provides for assaying/testing of multiple/different sample fluids on one apparatus.

[00138] FIG 6A-C depict an alternative embodiment. In this embodiment, assay station 26 or stations, are provided with a venting hole 66 formed in sealing layer 40 (not shown in FIG 6A, a top view). This is shown more clearly in Fig 6B, a side view of exemplary Fig 6A. Here, assay station vent 66 is shown open to the atmosphere. Supports 62 are provided to support isolation medium platform 60 which is disposed over at least the assay station vent 66 and defines gap 64. As in previous embodiments, sample fluid 56 is introduced into first multipurpose channel 30 and flows and fills assay station 26 via first assay channel 28. Here, instead of flowing to a second multipurpose assay channel, sample fluid 56 fills assay station 26 (or stations) as well as assay station vent 66, as seen in Fig 6B. Subsequently, isolation medium 54 displaces sample fluid 56 in first multipurpose channel as before. However, isolation medium 54 now is introduced to gap 64. Isolation medium 54 flows to fill in gap 64 defined by isolation medium

platform 60 and sealing layer 40, as shown in progress in Fig 6C. Fig 6D depicts this filling and sealing process from a cross sectional side view of Fig 6C. Fig. 6E depicts this exemplary embodiment at the point where the sample fluid in assay stations is sealed by isolation medium 54.

[00139] In embodiments where a non-solidifiable isolation medium 54 is utilized, and isolation medium 54 does not solidify, a solidifiable sealant 67 may be deposited all around isolation medium platform 60 and into all outlets and inlets 21, for example, in order to seal off and isolate all the fluidic paths (channels and inlets) from the atmosphere, as depicted in a side view in Fig 6F. This thus forms a fixed volume (of sample fluid 56 and isolation medium 54, for example)of liquid inside the chip 100 to suppress vapor generation during PCR and other reaction at elevated temperature. Sealant 67 can be in form of wax, hot-melt compositions , adhesive liquid, polymer liquid and elastomer for example. Additionally, this solid sealant effect can also be achieved utilizing caps, lids and/or valves, in any preferred combination. It is preferred that solidifiable sealant 67 as well caps, lids and/or valves endure temperatures up to about 100^0C.

[00140] Turning to Fig 6G, another exemplary configuration is depicted. Here, isolation medium platform 60 is not utilized and assay station vent 66 has been moved to an exemplary position over assay station channel 24. In certain embodiments, solidifiable sealant 67 may be disposed directly onto sealing layer 40 (not shown in this top view) to cover assay station vent 66 as well as outlets and inlets 21, in order to isolate all the fluidic paths and provide a fixed volume of fluid, as detailed above, from the atmosphere and thus minimized and/or eliminates mixing of fluids (sample fluid 56 in assays stations, for example). In particular embodiments, the sequences of the filling of sample fluid 56 and isolation fluid 54 may reversed.

[00141] FIGS 7A1-7C4 depict an exemplary sequence of filling events. In these examples, first multipurpose channel 30, first and second assay channel, 28 and 24, as well as assay station 26, have hydrophilic surface characteristics, while second multipurpose channel 22 has a hydrophobic surface. In particular embodiments, at least a portion of sealing layer 40 located above multipurpose channel 22 has a hydrophobic surface.

[00142] FIGS 7A-1 to 7A-4 depict an exemplary flow and filling sequence wherein sample fluid 56, having been introduced into first multipurpose channel 30, flows through and fills the first multipurpose channel 30, first assay station channel 28 and assay station 26, and flows into

the second assay station channel 24 and stops adjacent to the second multipurpose channel 22. Subsequently, as shown in FIG 7B1 to 7B4, isolation fluid 54, having been introduced into the first multipurpose channel 30, displaces sample fluid 56 which does not flow into the second multipurpose channel 22 due to the differences in surface characteristics between second multipurpose channel 22 (in this example, hydrophobic) and the second assay station channel 24 (hydrophilic). This results in the isolation and partial sealing of the assay station 26 via the interface between the sample fluid 56 in the first assay station channel 28 and the isolation medium 54 in the first multipurpose channel 30.

[00143] In FIG 7C1 to 7C4, isolation medium 54, having been introduced to second multipurpose channel 22, flows therethrough and displaces the air within. The flow of isolation medium 54 through second multipurpose channel 22 completes the sealing of the plurality of assay stations. As mentioned previously, isolation medium 54 and sample fluid 56 are substantially immiscible with one another, thus providing a seal at points where they meet, such as shown in FIG 7C-4, for example. In particular embodiments wherein isolation medium 54 does not solidify after introduction into multipurpose channels 22 and 30, for example, a solid seal may be utilized to seal the inlets/outlets of the multipurpose channels. Such a solid barrier prevents vapor generation or expansion of sample fluid 56 at higher temperatures.

[00144] While FIGS 7A1-7C-4 depict an exemplary sequence wherein a plurality of assay stations and assay station channels are first filled with sample fluid 56 and subsequently sealed with isolation medium, this is not the only sequence by which the at least one assay station 26 may be filled. In FIG 7D1-2, the filling of a plurality of assay stations may be accomplished wherein particular assay stations (and assay channels) are sealed while still other assay stations (and assay channels) are at various stages of filling and sealing. For example, in FIG 7D2, the left-most assay station 26 and assay channels are already filled with sample solution 56 and sealed, while the adjacent assay station and assay channels are filled but only partially sealed by isolation medium 54. These various exemplary sequences are typically achieved by the timing of the introduction of isolation medium 54 into the first and second multipurpose channels. Additionally, differential application of differing types of isolation medium 54, having different flow characteristics, into the first and second multipurpose channels 22 and 30, respectively, may also be utilized to control flow rates through multipurpose channels. Furthermore, differential

surface treatments that alter surface energies and interactions with the isolation medium 54 may be utilized to control flow speed, for example.

[00145] In addition to the filling and sealing sequences described above, reversed filling of the isolation medium 54 into the multipurpose channels may also be utilized. In this example, sample fluid 56 is introduced, as above, and fills assay station 26, or a plurality thereof. Subsequently, isolation medium 54 is introduced into one of the multipurpose channels and is subsequently cured and/or polymerized and/or solidified, thus providing assay stations having one of their sides sealed by a solidified isolation medium, for example. Subsequently, isolation medium 54 (having the same or different composition than the first introduced isolation medium 54) is then conducted into the opposing multipurpose channel and may be subsequently cured and/or polymerized/solidified. This sequence of sample fluid 56 and isolation medium 54 filling provides for the use of very viscous isolation mediums. Since assay stations and channels are already filled with sample fluid 54 and bounded on one side with a substantially sealed and solid multipurpose channel, the introduction of the second isolation medium 54 into the second multipurpose channel may be accomplished utilizing greater force or pressure upon isolation medium 54 applied secondarily, as the sample fluid will remain in assay station 26 and assay channels 24, 28 and thus not subject to displacement. This provides for the use of very viscous isolation mediums that may require pressurization to be applied in order for them to flow.

[00146] Now turning to FIG 8, an exemplary analyzer system is shown. This example is particularly use fully when utilizing a fluorescence-based assay, such as PCR, for example. During or at the end of the amplifying of the targeted DNA, some or all of the chip 100 is illuminated by an excitation light source 500 having a wavelength spectrum required to excite the fluorescent dye contained in each assay station 26. The excitation light 502 passes through light filter 504 where it is reflected by optical half-mirror 506. The reflected light 508 passes through transparent window 512 and on to the assay stations. The entire chip 100 is enclosed in an enclosure 514 for thermal control. Thermal control is achieved by temperature control system 516 in conjunction with fluidic handling system 518 which interfaces with the chip 100. The enclosure 514 also includes the temperature control system 516 and the fluidic handling system 518.

[00147] When the chip 100 is illuminated by the light source 500, camera 32 detects the fluorescent emission images 520 from all or a subset of the assay stations 26 at camera lens 522. Before the image light 520 reaches the camera lens 522, it passes through filter 510 that filters out all other light and only allows a narrow spectrum of light emitted from the fluorescent dye to pass through and reach the camera lens 522. Camera 32 can be located either above or below the chip 100, although the camera 32 is shown in FIG 2 and FIG 4 above the chip 100. As shown in FIG 8, for PCR amplification of DNA, the detection may be performed at the end of each thermal cycle or after the amplifying process has been entirely completed. The images are analyzed for the fluorescent emission intensity at the location of each assay station, the shape and location of the emission image and the emission intensity. The entire imaging, data acquisition and data processing are controlled by a hardware control computer 524 which is connected to camera 32 by connector 526 and to the temperature control system 516 by connector 528 and to the fluidic handling system 518 by connector 530.

[00148] FIGS 9 and 10 illustrate exemplary arrangement of various components of an analyzer system. FIG 9 shows a schematic block diagram of a system in which a light beam, which may have comprise an excitation frequency within the excitation spectrum of a fluorophore, illuminates at least one assay station from sides or from the bottom (A, B and C designations of components). Light emitted from source 530A as an excitation beam passes through a beam collimator 532A and a filter 534A, and then strikes onto chip 100 having at least one assay station. Florescent emission from the at least one assay station are imaged to optical sensor 546 by optical capturing assembly 542A and 542B and filter 544. A proportional integral and differential (PID) controlled thermal cycling assembly 538 and a two-dimensional translation stage 536 is connected to microcontroller subsystem 550 then to main computer 548.

[00149] FIG 10 shows a schematic block diagram of a system in which a light beam illuminates at least one assay station from the top. Light emitted from source 530D as an excitation beam passes through a beam collimator 532D and a filter 534D is diverted by dichroic mirror 541 and then strikes on chip 100. Fluorescent emission from at least one assay station is imaged to optical sensor 546 by optical capturing assembly 542B and filter 544. A PID-controlled thermal cycling assembly 538 and a two-dimensional translation stage 536 is connected to microcontroller subsystem 550 then to main computer 548.

[00150] In FIGs 8-10, 500 and 530 light source can be lasers, LEDs (LED Array) or Lamps (CW or pulsed). Beam collimator 532 is preferred to collimate the output light from light source 530. The beam collimator 532 can be a plano-convex lens, for an instance, or it can also be a combination of several optical components such as lenses or lenses in conjunction with optical fiber. After light passes through beam collimator 532, it is filtered by filter 534 which provides excitation wavelength selection together with filter 544 comprise a pair of excitation and emission wavelength band selectors for certain dye, for example, fluorescent-labels. The filter 534 can be a single short pass filter having a cutoff wavelength equal to peak excitation wavelength of the dye. Preferably, a pair of short pass filters of the combination of short pass filter and interference filter are be applied. The filter 544 can be a single long pass filter with cutoff wavelength equal to peak emission wavelength of the dye, or an interference filter with central wavelength equal to peak emission wavelength of the dye.

[00151] Turning to Figs. 11A and B depicting particular embodiments, a sample preparation area 78 may be provided upon substrate 36, in fluid connection with sample fluid channel 20. The sample preparation area 78 may be comprised of particular components depending upon the particular type of assay to be run. Accordingly, one embodiment may comprise a sample preparation chamber 6 having a nucleic acid isolation component 79 and a lid 74. Lid 74 may have a flow controlling element 82 in communication with inlets 72 and 70. Either of inlets 72 and 70 may be configured to receive various solutions such as, lysing solutions, buffer solutions and elution buffers, respectively, or one inlet may be provided through which various fluids, including buffers, may be introduced into the sample preparation chamber 6. Nucleic acid isolation component 79 may be comprised of a nucleic acid binding membrane, glass block, magnetic particles or silica beads, for example, as known in the art. Sealing layer 40 may be provided with flexible portions 90 that may be deformed, for example, by a plunger or any machine part that operates with a thrusting or plunging movement, as exemplified by 80 and 81. When depressed into flexible portions 90 of sealing layer, flow to channel 20 or waste channel 84, may be stopped/impeded or allowed to so as to direct fluid flow to one channel or the other.

[00152] In the embodiments of Figs 11A and B, an air pump for air purging of washing buffer left in chip may be utilized and injected by a "fish pump" controlled by valves.

[00153] Furthermore, air pumping of washing buffer and elution buffer may be injected by "fish pump" controlled by valves also.

[00154] Typically, sample preparation may be comprised of the following exemplary steps for the embodiment shown in FIGs 11 A and B. For example, if PCR experiments/assays are to be run upon the chip, a solution having nucleic acids therein may be provided into sample preparation chamber 6 having lid 74 removed. Subsequently, lid 74 is replaced upon sample preparation chamber 6 and washing buffer is introduced into sample preparation chamber 6 with plunger valve 81 closed and plunger valve 80 open to guide the washing buffer to waste reservoir by positive pressure or by vacuum, for example. Secondly, one may pump in air from chip inlet 86 to purge remaining washing buffer inside the sample preparation chamber 6 and channel 88 into waste reservoir (not shown) via waste channel 84 (or vacuum the remaining buffer into waste). This results in the nucleic acids binding to nucleic acid isolation component 79.

[00155] In order to elute nucleic acids from nucleic acid isolation component 79, a prescribed amount of elution buffer is introduced into sample preparation chamber 6 with plunger valve 80 and 81 closed and chip inlet 86 open to vent air. Air may be pumped into sample preparation chamber 6 to push all the eluent through nucleic acid isolation component 79 and into channel 88. A PCR reaction mixture (comprising for example, dNTPs, buffer and polymerase) may then be added to elution solution via chip inlet 86 and allowed to mix with the elution solution, now containing nucleic acids, thus providing a sample fluid. In a final step, oil may be added into sample preparation chamber 6 and/or inlet 86 and plunger valve 80 closed and plunger valve 81 open to conduct sample fluid having nucleic acid eluted and PCR mix to assay stations via sample fluid channel 20. The sample fluid may also flow to at least one assay station via capillary force, for example and not require the addition of air or liquid pressure.

[00156] The assay stations that may be utilized with the instant invention may have a variety of configurations. In FIG 12, the assay station's central portion is provided with flow promoting structures. These may be comprised of a plurality of nodes 37. These exemplary structures promote even flow of sample fluid 56 into the assay chamber in order to prevent the formation of bubbles within the assay chambers. Flow promoting structures may also be comprised of columns and/or raised protuberances that may be formed upon substrate 36 or sealing layer 40 or both. FIG 13 depicts fluid vent channels 110 that may be formed within second assay channel

conduit. These channels help to divert sample fluid 56 that may enter the assay station too quickly and run along sides assay station 26, as depicted by arrows. In order to prevent the sample fluid 56, which may run along the sides of assay station 26, from meeting at the entrance to second assay channel 24 and forming a bubble, sample fluid would instead flow into second assay channel 24 while a lagging sample fluid front, so to speak, would fill in assay station 26 without bubble formation.

[00157] Figure 14 depicts another embodiment of assay station 26. Here, second assay channel 24 has adjacent to it a beveled portion 112. Beveled portion 112 provides for complete isolation-medium 54 filling of second multipurpose channel 22, thereby reducing bubble formation that may form as fluid flows past sharp 90° corners and ease of manufacturing. First, if second multipurpose channel 22 has its surface treated in order to impart desired characteristics, such as hydrophobicity, for example, a mask is typically laid over substrate 36 in a manner such that second multipurpose channel 22 is exposed to the applied treatment, such as the application of a coating. However, application of the mask may not be exactly laid out to cover over second assay channel 24 in order for the applied treatment to be restricted to being applied only to second multipurpose channel 22. Having bevel 112 provides for an increased tolerance for the application of the surface treatment, for example, such that if the laying of the mask is not exact, some of the coating may be applied onto the area adjacent the second assay channel 24 and not adversely affect the flow, filling and eventual stoppage of sample fluid 56 into second assay channel 24. Additionally, having such a beveled portion allows for improved flow of isolation-medium 54 through second multipurpose channel 22, allowing for controlled and smooth displacement of air in second multipurpose channel 22 and reduces the likelihood of bubble formation that may occur as a result when second assay channel 24 and second multipurpose channel 22 meet at a sharp corner, such as depicted in FIG 12 for example.

[00158] Figure 15 depicts yet another assay station 26 having an extended first assay channel 28. In this configuration, sample fluid 56 that flows into and fills such assay stations is not subjected to the convective flow that may result in the flow of sample fluid from one assay station to another as a result of heating said sample fluid within assay stations. This is due to the long circuitous path provided by first assay channel 28, which results in the slowing of the flow of sample fluid 56 out of said assay station and into the first multipurpose channel 30, for

example. Under particular reaction conditions, isolation fluid may not even be needed to seal assay station and channels from the multipurpose channels.

[00159] Figure 16 depicts another exemplary configuration of an assay station 26, wherein an arrangement of at least first and second multi-purpose channels is provided. At least one assay station 26 is situated in a position intermediate between a first and second multipurpose channels and is in fluid communication therewith. Here, first multi-purpose channel 30 has internal surface characteristics conducive to conduction of a sample fluid therethrough while second multipurpose channel 22 may have a hydrophobic surface characteristic that is not conducive to conduction of sample fluid therethrough. The forces/surface characteristics are strong enough to repel sample fluid 56 and retain it in the assay station 26. Assay station channels 24 and 28, as well as the other channels, may have other exemplary configurations such as triangular, ellipse and lozenge-type cross-sectional configurations in addition to circular, semicircular or other cross-sectional shape.

[00160] The method of detecting disease or assessing the risk of disease of the present invention comprises the following exemplary steps. A test sample of whole blood, for example, from an animal is obtained from a subject. Before the analysis, each assay station on the chip device 100 may have deposited at least one of a specific probe and primer(s), and each assay station is dried. So there is at least one DNA probe and/or primer in all of the assay stations 26 on chip 100. Each assay station 26 contains at least one probe or primer (some assays, for example, FRET, requires two primers and 1 or 2 fluorescent dye-labeled probes).

[00161] A quantity of the test sample whole blood obtained from the subject is provided onto the device by e.g. injection. The quantity of blood sample applied to the device can be determined by the skilled artisan based on the number of assay stations to be filled. But in general, the amount of blood applied will be sufficient to completely fill the assay stations provided on the chip. Typically, about 0.01 ul to about 10 ml of sample will be sufficient to carry out the methods of the present invention. By "application" or "applied" is meant that the sample is provided to the device by conventional means including injection, electro-osmosis, pressurization, or vacuum means.

[00162] A gas and/or fluid is injected into sample preparation chamber 6 via test sample inlet 2 exclusively with buffer inlet 4 closed, or else with buffer inlet 4 initially open until buffer inlet 4

is filled, after which it is closed, to purge the elution buffer containing released DNA molecules and push the buffer into an empty chamber 12 and completely fill chamber 12. Examples of gases and/or fluids suitable for the methods of the present invention include, but are not limited to air, carbon dioxide, nitrogen, argon, or a purging liquid like oil. A flow promoting fluid (FPF) in chamber 16 is then released into chamber 12 through diffusion channels 14. DNA contained in buffer (now sample fluid) will flow into channel 20 and further flow into first multi-purpose channel 30, first assay station channel 28 and assay station 26.

[00163] The digital camera 32 detects the time when all the assay stations 26 are filled by buffer. Isolation medium 54 is injected through at least one of ports 44, 46 into channels 30 and 22 to fully fill the multipurpose channels. Again, the isolation medium 54 typically can be wax, oil, phase-changing plastics, thermally curable polymer liquid, or ultra-violet (UV) curable polymer liquid. The isolation medium remains at an elevated temperature above about 100°C via preheating and/or the chip 100 is in an environment of an elevated temperature. Typically, when the isolation medium is wax, the wax is pre-heated to a particular temperature, since a medium like wax does not flow in its solid phase. However, other materials like thermal curable and UV curable resin are in liquid state at a room temperature and therefore these materials do not require pre-heating. All assay stations are placed in a thermal cycler and subjected to PCR according to known methods. See e.g. Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, New York, 1995, incorporated herein by reference. Following DNA amplification, at least a portion of the device is illuminated by an excitation light source having a wavelength spectrum required to excite the fluorescent dye, e.g. fluorescein, contained in each assay station 26. When the illumination is performed, camera 32 detects the fluorescent emission images from each assay station 26. The fluorescent emission images are analyzed for: fluorescent emission intensity at the location of each assay station 26, shape and location of the fluorescent image and the emission intensity of the image in each assay station.

[00164] The main components of the analyzer are the fluorescent emission detection camera and the related optics which are available commercially, for example, from Hamamatsu, 325-6, Sunayama-cho, Hamamatsu City, Shizhoka Pref., 430-8587, Japan. The camera and the optics system are installed in an enclosure together with a liquid handling system for liquid / sample

injection. The analyzer also includes a temperature control system to perform thermal cycling required for PCR amplification of DNA molecules.

[00165] EXAMPLE

[00166] An exemplary method of preparing the sample and extracting DNA from the test sample is illustrated in the following example, exemplarily illustrated in Figs. 1-4:

[00167] Step 1. Injecting the sample:

[00168] Sample, for example, a test sample (e.g. whole blood), is injected into sample preparation chamber 6 via test sample inlet 2. The injection in this step can be achieved by means such as pressurization, capillary pumping, or vacuum suction (a vacuum is conventionally generated below glass block 31).

[00169] Step 2. Lysing of cells and binding of DNA on porous glass block 31

[00170] Cell lysing buffer is injected into sample preparation chamber 6 via inlet 4. Cell lysing buffer lyses both red cells and white cells in sample and DNA molecules are released from the white cells, and become suspended in the lysing buffer contained in sample preparation chamber 6.

[00171] One example of the cell lysing buffer contemplated by the present invention is:

(1) For lysing of red blood cells (Buffer A):

(i) 4.15g of NH_4Cl dissolved in 500ml of water and Tris-HCl adjusted to pH 7.2.

(ii) Make a separate stock by dissolving 2.06g of Tris base into 100ml water adjusted to pH 7.2.

Mix (i) and (ii) in the volumetric ratio of 9:1

(2) For lysing of white blood cells (Buffer B): 6M GuSCN (guadinine isothiocyanate) and 10mM EDTA

[00172] The above buffers "A" and "B" can be added together or in sequence "A" before "B" or "B" before "A".

[00173] Another lysing buffer contemplated by the present invention is:

[00174] 1 part of 10% Triton X-100, dilute to 10 parts using 6M GuHCl (guadinine hydrochloride) (in 10mM TE, pH 6.7).

[00175] Sample can also be mixed with lysing buffer before being injected into sample preparation chamber 6. The lysed whole blood sample (together with the lysing buffer) in sample preparation chamber 6 is sucked through the glass block 31 due to the absorption by the absorbent 5 or by vacuum. When the lysed sample passes through the glass block 31, DNA molecules in the lysed sample are bound to the surface of the glass block 31, since the glass block 31 has the ability to attract DNA contained in sample.

[00176] In addition to the absorption and the vacuum means described above to pass the lysed sample and lysing buffer through the glass block 31, the following means can also be applied: positive pressurization, such as that generated by a syringe pump, to pump the sample and lysing buffer through the block 31 or electro-osmosis pumping.

[00177] The glass block 31 can also be replaced by other filter media including: glass fiber mat or floss, glass powders, non-glass media such as cellulose fiber mat, or magnetic particles with treated surfaces to attract DNA molecules, etc. The glass block 31 can also be made of a combination of filter media. The DNA attraction mechanism on the filter media can be in the form of, for example, electrostatic attraction or attraction of DNA to other molecules pre-immobilized onto the filter media.

[00178] Step 3. Washing the chamber 2 and glass block 31

[00179] Washing buffer is injected to sample preparation chamber 6 via buffer inlet 4, and washing buffer is pulled through the glass block 31 due to the absorption by the absorbent 5 or by vacuum. Under the flow of the washing buffer, the DNA molecules bound to the glass block 31 still remain, while all other substances including cell debris or proteins in sample preparation chamber 6 and glass block 31 flow through to a waste drain, which can be the absorbent 5 itself, underneath the glass block 31. At the end of this washing step, only isolated DNA molecules are collected for subsequent use.

[00180] One example of washing buffer contemplated by the present invention is

[00181] 200mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5mM EDTA, adjust pH of mixture to 7.5. Dilute mixture with 95% ethanol in the volumetric ratio of 1:1.4 (eg: add 40ml ethanol to 100ml buffer). Another washing buffer contemplated by the present invention is 80% isopropanol.

[00182] In addition to the absorption and the vacuum means described above to pass the washing buffer through the glass block 31, the following means can also be applied: positive pressurization such as that generated by a syringe pump to pump the washing buffer through the block 31 or electro-osmosis pumping.

[00183] Step 4. Eluting DNA from glass block 31

[00184] After the glass block 31 is dried, the elution buffer is injected into sample preparation chamber 6 via buffer inlet 4 to fully occupy sample preparation chamber 6. The drying is performed by methods such as natural drying or by elevating the ambient temperature or by hot air blowing. The drying duration typically ranges from a few seconds to a few minutes. Injection of the elution buffer can also be performed by injecting the buffer into the sample preparation chamber 6 through the glass block 31 ("bottom up", i.e., injected in the upward direction through the glass block 31).

[00185] The elution buffer is capable of releasing attracted DNA molecules from glass block 31, and the DNA molecules released become suspended in the elution buffer contained in sample preparation chamber 6 above the glass block 31. One example of the elution buffer is autoclaved water. Another example of the elution buffer is 10mM TE at pH 8.4.

[00186] To enhance the elution efficiency, a vibrating actuator 34 presses diaphragm 48 to agitate the elution buffer in the sample preparation chamber 6 and glass block 31 to allow more DNA molecules to leave the glass block 31 and enter the elution buffer.

[00187] The present invention also contemplates soaking the glass block 31 in elution buffer for about five minutes.

[00188] The elution buffer can contain, or be added with other chemicals for subsequent analysis, (such additional chemicals can be added by premixing such chemicals with the elution buffer, then by adding the mixture to sample preparation chamber 6 subsequently via test sample inlet 2 and/or buffer inlet 4). Additional chemicals contemplated include the enzymes for DNA amplification, fluorescent dye for fluorescent detection of DNA molecules based on principle of

fluorescence energy resonance transfer (FRET), TaqMan® (Roche Molecular Systems, Inc., Somerville, NJ), SYBR Green® (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), and Molecular Beacon, and any other chemicals required to perform DNA amplifications and fluorescent detection. The injection in this step may be achieved through pressurization, capillary pumping, vacuum suction, etc.

[00189] The amount of elution buffer should fully occupy the sample preparation chamber 6 so that the elution buffer can reach the inlet of the channel 10, as shown in FIG. 1. Since there exists a valve 8, the elution buffer is confined to sample preparation chamber 6 during this operating step.

[00190] All efforts should be made to prevent the elution buffer from moving outside the domain of the chamber 6, since this would cause the loss of DNA molecules for subsequent analysis. (In particular, inadvertent application of the absorbent 5 should be avoided).

[00191] To enhance the spread rate of DNA molecules into the entire volume of the elution buffer and to enhance the uniform distribution of the DNA molecules in buffer, the following methods can be used in the alternative: agitating buffer by actuator 34 acting on diaphragm 48, as described above; applying a vibrator to shake the entire substrate 36 (chip) at one or more than one vibration frequencies, especially at a resonant frequency of (1) the entire chip, and (2) the mass of the elution buffer contained in sample preparation chamber 6; heating the buffer contained in sample preparation chamber 6 non-uniformly to generate a thermal-gradient induced flow, or forced convection flow, of the buffer inside sample preparation chamber 6; adding surfactant to the buffer contained in sample preparation chamber 6 to help to release the DNA molecules from the glass block 31; or adding magnetic beads or fibers into buffer and using an electro-magnetic actuator to agitate the buffer to help to release the DNA from the glass block 31.

[00192] In all of the above steps, test sample inlet 2 and buffer inlet 4 can be used interchangeably, or a single port (i.e. test sample inlet 2 or buffer inlet 4) can be employed to conduct the methods of the present invention.

[00193] While the description has been generally directed to PCR and other amplification assays, the invention is by no means so limited. The apparatus and methods of the present invention may also be utilized to conduct a plethora of various assays, including homogeneous

assays. Homogeneous assays which may be performed on the chip can be divided into 3 general categories: DNA/RNA/Aptamers (nucleic acid based), Protein/antibody based and cell based assays. Exemplary assays and components are provided below.

[00194] In DNA/RNA/Aptamers (nucleic acid based) embodiments, primers and probes in 0.1X TE buffer, for example, were spotted/placed into the assay stations 26 and then lyophilized. Immobilization of at least one reaction component within at least one assay station may also comprise, for example, immobilization onto beads, gels or membranes. Sample fluid preparation releases DNA or RNA into a PCR reaction mixture (minus primers and probes) and the whole mixture flows into the assay stations via first multi purpose channel 30 or channels. Upon re-hydration the primers and probes participate in the PCR or if specified, RT-PCR reaction. Detection of products may be conducted by, and not limited to, utilizing fluorescence resonance energy transfer (FRET), molecular beacon detection, or normal non-FRET SybrGreen, EtBr detection or other intercalators (PicoGreen, the TOTO dye family e.g. Toto-1, POPO-1, BOBO-1) for example. Real-time data of DNA or RNA amplification is collected during each cycle and then subtracted from a baseline.

[00195] In exemplary DNA based assays, amplification and detection methodologies may comprise PCR, isothermal amplification methods e.g. nucleic acid strand-based amplification (NASBA), strand displacement amplification (SDA), etc, as well as ligase chain reaction (LCR), rolling circle amplification and ligation, etc., using FRET, molecular beacon, etc. as described above.

[00196] All of the following assays that may be conducted in accordance with the teachings of the present invention are meant to be exemplary and non-limiting.

[00197] DNA Based Assays

[00198] **Example 1**: PCR assay with Sybrgreen in assay stations (diameter ~0.5 - 1mm), chip thickness ~ 2mm:

[00199] PCR mix: 1ul of 10X Pt Taq polymerae buffer, 0.8ul of 25mM $MgCl_2$, 1ul each of 10uM stock Trytophan hydroxylase, Forward primer (5'-TGT GTT AGC CAT TAT GAT TA - 3') and reverse primer (5'- CTG GAA TAC AAG CTT TAT GCA G - 3'), 1ul of 2mM dNTPs, 1ul of 10ng/ul human genomic DNA, 0.5ul of 10%BSA, 0.5ul of 60X SybrGreen, 1ul of 5u/ul

Platinum Taq Polymerase and 2.2ul water. In the control, the above components are the same except there is no Taq polymerase.

[00200] PCR conditions: hot start 96°C – 1min, 30 cycles of 95°C – 30sec, 55°C – 30sec and 72°C – 30sec, 72°C – 5min, 12°C – forever. PCR was done in a MJ PCR thermocycler (PTC-200) with an *in-situ* PCR alpha module. After PCR, the chip 100 was observed under a Leica fluorescent microscope using the same exposure time for each image, hooked up to a computer for digital image capture. The results showed positive amplification of human Tryptophan hydroxylase gene fragment as compared to control reactions.

[00201] **Example 2**: PCR-FRET detection of the 23S RNA gene from *Plesiomonas shigelloides,* a Gram-negative bacteria that causes human gastroenteritis. Reference: J.P. Loh and Eric P.H. Yap, Rapid cycle Real-Time PCR, Methods and Applications, Microbiology and Food analysis, U. Reischl et. al. (Eds.), Springer, pp 161-171.

[00202] PCR mix: 1ul of 10X Platinum Taq buffer, 1ul of 2mM dNTPs, 0.3ul each of 10uM stock forward primer (5'- AGC GCC TCG GAC GAA CAC CTA -3') and reverse primer (5'- GTG TCT CCC GGA TAG CAC -3'), 1ul of a 20uM stock fluorescent probe (5'- LCRed640 - GGT AGA GCA CTG TTA AGG CTA GGG GGT CAT C- 3'-Phosphate), 1ul of 5ug/ul BSA, 1.6ul of 25mM Mgcl2, 1ul of 10X Sybrgreen, 0.1ul of 5u/ul Platinum taq, 1.2ul of water and 1,5ul of sample containing *P. shigelloides* DNA.

[00203] PCR conditions Hot start: 95°C-1min, 70cycles of 90°C – 0 sec, 70°C- 4sec, 72°C – 5sec.

[00204] Single Nucleotide Polymorphism (SNP) detection: Allele-specific PCR, dye-labeled oligonucleotide ligation (DOL), PCR-OLA-FRET (oligonucleotide ligation assay), LCR-OLA-FRET, allele specific Taqman assay, etc.

[00205] **Example 3:** Dye-labeled oligonucleotide ligation (DOL) assay is an assay that uses PCR to amplify the DNA sequence and then post-PCR SNP detection using OLA or oligonucleotide ligation assay with FRET (PCR-OLA-FRET). The OLA assay uses 3 probes to detect a SNP, one common donor probe is labeled with FAM (5-carboxy-fluorescein), and the other allele-specific acceptor probe labeled with either ROX (6-carboxy-X-rhodamine) or TAMRA *(N,N,*N8,N8-tetramethyl-6-carboxyrhodamine). Thermostable ligase was used to

discriminate between a match or mismatch nucleotide at the 5'-of the acceptor probe. Reference: X. Chen, et.al., Genome Res. 1998 May;8(5):549-56.

[00206] DOL assay for detecting codon 39 C/T mutation in the beta-globin gene responsible for beta-o–thalassemia. The primers and probes were lyophilized in the assay stations and the DNA from sample prep portion was infused into the assay stations via the various channels described above.

[00207] PCR-ligation mix: 2ul of 100mM Tris Ph 8.0, 2ul of 65mM MgCl2, 2ul of 0.5M KCl, 2ul of 10mM NAD, 2ul of 2.5mM dNTPs, 1ul of each 50uM stock PCR forward primer (5'-CAT GTG GAG ACA GAG AAG ACT CTT GGG –3') and reverse primer (5'- GCA GCT CAC TCA GTG TGG CAA AGG –3'), 1ul of 4uM FAM-labeled donor probe (5'-FAM-TCT ACC CTT GGA CC-3'), 1ul of 4uM Rox-labeled acceptor probe (5'-phosphate-CAG AGG TTC TTT GAG T-3'-ROX), 1ul of 5uM TAMRA-labeled acceptor probe (5'-phosphate-TAG AGG TTC TTT GAG TC-3'-TAMRA), 30ng of human genomic DNA, 0.5unit of AmpliTaq-FS polymerase, 1.5unit of Ampligase DNA ligase and water to 20ul.

[00208] PCR-ligation conditions: Denaturation 95°C – 2min, 10 cycles of 95°C – 15sec, ramping slowly to 65°C over 1.5min, 65°C – 30sec, followed by 30cycles of 95°C - 15sec, 65°C – 30sec, and ligation using 25 cycles at 95°C – 15sec, 45°C – 1.5min.

[00209] RNA Based Assays

[00210] **Example 1:** Amplification and detection: RT-PCR-FRET detection of Dengue virus type II. Reference: B.H. Tan, E. See, Elizabeth Lim and Eric P.H.Yap, Rapid cycle Real-Time PCR, Methods and Applications, Microbiology and Food analysis, U. Reischl et. al. (Eds.), Springer, pp 241-251.

[00211] RT-PCR mix: 2ul of 5X RT-PCR buffer, 1ul of 3mM dNTPs, 1ul of 5ug/ul BSA, 1ul of 25mM MnOAc, 0.5ul each of 9uM stock forward primer (5'-CCT AGA CAT AAT CGG G-3') and reverse primer (5'-GTG GTC TTG GTC ATA G-3') and 0.5ul of 4uM stock probe (5'-LCRed640 – AGA AAA AAT AAA ACA AGA GC- 3'-Phosphate), 0.5ul of 20X SybrGreen, 0.5ul of 5u/ul Tth polymerase, 1.5ul water and viral RNA added to 10ul final volume.

[00212] RT-PCR conditions: RT – 15min at 50°C, denaturation 95°C – 5min, 8 cycles of 95°C – 0 sec and 55°C – 7 sec, 50 cycles of 87°C – 0sec, 55°C – 7 sec.

[00213] Aptamer Based Assays:

[00214] Aptamers are synthetic DNA, RNA or peptide sequences which may be normal and modified (e.g. peptide nucleic acid (PNA), thiophophorylated DNA, etc) that interact with a target protein, ligand (lipid, carbohydrate, metabolite, etc). Aptamers labeled with a dye, e.g. TAMRA for example, may be synthesized and spotted into assay chamber 26 or chambers and lyophilized. A target protein/antigen may then be introduced into the assay stations utilizing methods as described above. Fluorescent polarization may then be utilized to screen for aptamer/protein binding if one of the binding pair is labeled with the fluorescent dye.

[00215] Protein / Antibody based Assay

[00216] Protein/Antibody assays, such as ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) may be utilized according to the teachings of the present invention to detect pathogens (e.g., open sandwich ELISA), protein-rich interactions and drug screenings.

[00217] In these exemplary embodiments, the antibodies or proteins can be labeled with pairs of FRET dyes, bioluminescence resonance energy transfer (BRET) protein, fluorescent dye-quencher dye combinations, beta gal complementation assays protein fragments, and dissolved in 1X PBS, spotted and lyophilized in the assay stations. Sample fluid preparation releases proteins or other antigens into PBS or TBS buffer with or without detergent (e.g. Tw-20 or Triton-X 100) of various concentration (e.g. 0.05% Tw-20 and 1%Triton-X-100), and these flow into the assay stations via channels as described above. Upon re-hydration the antibodies or protein pairs may participate in FRET, BRET, fluorescence quenching or beta-gal complementation to generate fluorescence, colorimetric or enhanced chemiluminescence (ECL) signals.

[00218] **Example 1**: Antibody-antigen fluorescence quenching assay: An antibody was labeled with OG-514 (Oregon green 514 carboxylic acid, succinimidyl esters) and the antigen (peptide, protein, whole cells, carbohydrate, aptamers, etc.) was labeled with QSY-7 (QSY-7 carboxylic acid, succinimidyl esters). Fluorescence quenching prevented or suppressed the detection of OG-514 fluorescence. The labeled antibody-antigen complex was lyophilized in the assay stations. Sample fluid preparation releases proteins or other antigens into PBS or TBS buffer with or without detergent (e.g. Tw-20 or Triton-X 100) of various concentration (e.g. 0.05% Tw-20 and 1%Triton-X-100), and flow into the assay station(s) via channels. Upon re-hydration in the assay station, the labeled antibody-antigen complex participates in competitive reaction with the

unlabeled antigen. Competition with unlabeled antigen releases the OG-514 labeled antibody whose fluorescence is detected at about 528-530nm.

[00219] **Example 2**: Double sandwich antibody FRET

[00220] Two monoclonal antibodies directed against 2 non-competitive epitopes of the CD8-alpha chain were utilized. One of the monoclonals was labeled with the dye phycoerythrin (PE) and the other allophycocyanin (APC).

[00221] FRET was observed when excitation light was directed to PE but the efficiency was only 10%. Reference: Batard P., et.al., Cytometry 2002 Jun 1;48(2):97-105. The efficiency of FRET may be improved by using near Infra-red FRET dye pairs such as the squaraine dyes (Sq635 and Sq660). Reference: Oswald B. et. al., Analytical Biochemistry **280,** 272–277 (2000).

[00222] **Example3**: Re-association of recombinant antibody light and heavy chain directed by a bridging antigen (open sandwich assay).

[00223] Recombinant antibody anti-HEL (Hen egg lysozyme) fragment heavy chain (VH) and light chain (VL) were labeled with succinimide esters of fluorescein and rhodamine-X, respectively. The weak affinity of VH and VL towards each other prevent association and FRET, but at low temperature e.g. about 4C and in the presence of antigen, the VH and VL interactions stabilized and hence FRET occurred. When excited at 490 nm, significant decrease in the fluorescence at 520 nm and its increase at 605 nm were observed when an increasing amount of HEL (antigen) was added to the mixture in the concentration range of 1-100 micrograms/ml. Reference: Ueda H et. al., Biotechniques 1999 Oct;27(4):738-42.

[00224] A modification of the above method may be utilized as follows. Instead of labeling with fluorescent dyes such as fluorescein and rhodamine, chimeric protein of VH – Rluc (*Renilla* luciferase) and VL-EYFP (Enhance Yellow fluorescence Protein) is constructed. In the presence of Rluc's substrate coelenterazine, chemilumiscence with emission of light (475nm) is observed, but no BRET (Bioluminescence fluorescent energy transfer) is observed. However, at low temperature e.g. about 4^0C and in the presence of antigen (HEL), the VH and VL interactions was stabilized, hence BRET occurred and fluorescence of EYFP is detected at 525nm. Reference: Arai R, et. al., Anal Biochem. 2001 Feb 1;289(1):77-81.

[00225] Yet another modification of the first method is as follows. Instead of labeling with fluorescent dyes such as fluorescein and rhodamine, thioredoxin (Trx) fusion protein protein, Trx-VH –EBFP (enhance blue fluorescent protein) and Trx-VL-EGFP (enhance green fluorescence protein) is constructed. Trx increased the solubility of the expressed proteins. FRET occurred in the presence of the antigen HEL. Reference: Arai R., et. al., Protein Eng. 2000 May;13(5):369-76.

[00226] The apparatus and methods of the present invention may also be utilized to conduct proteomic studies/assays. Protein-protein interactions are important mechanisms for regulating cellular process, e.g., regulation of transcription by the dimeraztion of basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors, dimerization of Epidermal growth factor (EGF) receptor upon ligand binding to generate cellular signaling, for example.

[00227] Utilizing the apparatus, candidate proteins or 'Preys' expressed as fusion proteins with enhanced green fluorescent protein (EGFP) , for example, may either be lyophilized in assay staions or embedded into hydrogels in the assay stations. The target or 'bait' expressed as fusion protein with enhanced blue fluorescent protein (EBFP) is introduced into the assay stations through the channels as described above. Protein-protein interaction activates FRET activity, for example or other detection methods, as known in the art.

[00228] Cell-Based Assay:

[00229] The present invention may also be utilized in drug screening and toxicological assay applications. Numerous methods for drug screening based on FRET, and other detection methods may be utilized as known to those of ordinary skill in the art.

[00230] For example, toxological assays may be conducted according to the teachings of the present invention. Synthetic small molecules from combinatorial chemical, or peptide library, aptamer library, etc, are pre-loaded into the assay stations. The assay stations have conducted thereto particular cell type of interest, which may have been recovered from a sample preparation portion of the chip (if so provided), or from tissue culture, growth media. A fluorescent vital dye may also be provided. After a few days observation with microscopy will reveal if cells exposed to the provided pre-loaded components undergo cell death remain alive or are otherwise affected by the pre-loaded assay components that had been provided in the assay stations.

[00231] For drug screening, cells can be engineered to express the drug target to be tested e.g. multi-subunit receptor, heterodimerizing or homodimerizing protein partner, fused with different fluorescent protein (e.g. EGFP, EYFP). Association or cross linking of receptors or proteins with themselves or to their subunits triggered by synthetic ligand binding, small molecule or antibody, brings the fluorescent protein pair together such that FRET can take place or beta-gal complementation could occur, for example. Conversely, disruption of homodimerized or heterodimerized or multi-subunit protein complex by synthetic ligands, small molecule, aptamer, etc, could trigger a decrease in FRET signal.

[00232] The small molecules may diffuse into cells depending on the chemical structure. Hence, target protein does not need to be a surface proteins, but can be an intracellular protein or receptor, such as glucocorticoid receptor, that homodimerize in the presence of glucocorticoid, for example.

[00233] The small molecules, ligand, aptamer, etc. may be derived from a combi-chem library, peptide synthesizer, phage library, etc. and are first spotted into the assay station and then lyophilized. Cells engineered with a drug target protein fused to green fluorescent protein (GFP) pairs are then introduced into the assay station(s) 26 via channels, as described above, in cell culture media. Incubation of the cells with the potential drug at about 37C, for example, may trigger protein-protein interaction resulting in FRET, or disruption of protein interaction would decrease FRET.

[00234] Drug screening applications according to the invention may utilize cell based and/or protein assays. Such screening applications may utilize the introduction of at least one of a population of wild-type cells and a population of cells expressing a recombinant molecule, for example, into said at least one assay station, in accordance with the teachings of the present invention.

[00235] Besides FRET assays which utilized two fluorescent probes for PCR, PCR-Taqman assays make use of fluorescent quenching whereby a probe is labeled with both quencher and donor. The probe, when hybridized to amplified DNA fragments, is digested by the 5' to 3' exonuclease activity of Taq polymerase extending downstream from the primer. Upon digestion of the probe, separation of donor from quencher leads to a detectable increase in fluorescence signal from the donor dye. Colorimetric detection can potentially be used in conjunction with

beta-gal complementation assays in isothermal amplification assays. Another exemplary assay methodology that may be utilized includes fluorescence polarization, wherein small fluorescent dNTPs are incorporated into PCR product, for example, and as a result tumble less and decrease their effect on the depolarization of light applied to the assay station 26 having the PCR mixture and potential product therein and subsequently detected.

[00236] The invention has now been explained with reference to specific embodiments. Other embodiments will be apparent to those of ordinary skill in the art in view of the foregoing description. It is not intended that this invention be limited except as indicated by the appended claims and their full scope equivalents.

We Claim:

1) An apparatus characterized in that the apparatus comprises:

a substrate having at least one assay station;

an arrangement of at least one first multipurpose channels and at least one second multipurpose channel wherein said at least one assay station being situated in a position intermediate between said first and second multipurpose channels and in fluid communication therewith, wherein said first multipurpose channel has at least one characteristic conducive to conduction of a sample fluid therethrough;

at least one sample fluid inlet in communication with said at least first multipurpose channel; and

at least one isolation-medium inlet in communication with said at least first and second multipurpose channels, said at least one second multipurpose channel having at least one characteristic non-conducive to conduction of said sample fluid.

2) The apparatus according to claim 1, characterized in that said fluid communication is via at least first and second assay station channels in communication with said first and second multipurpose channels.

3) The apparatus according to claim 1 or claim 2, characterized in that said first multipurpose channel characteristic conducive to conduction of said sample fluid comprises at least one of internal surface characteristic and/or shape characteristic and said at least one second multipurpose channel characteristic that is non-conducive to conduction of said sample fluid comprises at lease one of an internal surface portion and/or shape characteristics.

4) The apparatus according to any one of claims 1 to 3, characterized in that the apparatus further comprises a sealing layer sealing at least one assay station.

5) The apparatus according to any one of claims 1 to 4, characterized in that the internal surface of said first multipurpose channel permits flowthrough of at least one of a sample fluid, air and an isolation-medium.

6) The apparatus according to any one of claims 1 to 5, characterized in that the internal surface of said second multipurpose channel permits the flowthrough of at least one of air or an isolation-medium.

7) The apparatus according to any one of claims 1 to 6, characterized in that at least a portion of said assay station, first multipurpose channel and second multipurpose channel are formed in the substrate layer.

8) The apparatus according to claim 4 or any one of claims 5 to 7 when appended to claim 4, characterized in that at least a portion of at least one of said assay station, first multipurpose channel and second multipurpose channel is formed in the substrate layer and at least a portion of at least one of said assay station, first multipurpose channel and second multipurpose is formed in the sealing layer.

9) The apparatus according to claim 2 or any one of claims 3 to 7 when appended to claim 2, characterized in that said internal surface of said multipurpose channel and a surface of said second assay station channel immediately adjacent to the intersection of the second assay station channel and said second multipurpose channel are non-conducive to conduction of said sample fluid.

10) The apparatus according to claim 2 or any one of claims 3 to 7 when appended to claim 2, characterized in that said at least first and second multipurpose channels are in communication with a plurality of assay stations via the first and second assay station channels, respectively, of said plurality of assay stations.

11) The apparatus according to claim 10 characterized in that said plurality of assay stations are arranged to provide at least one of simultaneous or sequential filling of said plurality of assay stations with said sample fluid solution conducted thereto.

12) The apparatus according to claim 10 characterized in that said plurality of assay stations are arranged to provide at least one of simultaneous or sequential filling of said first and second multipurpose channels with said isolation medium to seal said plurality of assay stations.

13) The apparatus according to any one of claims 1 to 6, characterized in that said at least one assay station has disposed therein at least one reaction assay component.

14) The apparatus according to any one of claims 1 to 13, characterized in that said sample fluid inlet is in communication with a sample fluid preparation element.

15) The apparatus according to claim 14, characterized in that there is further included at least one of a sample preparation chamber and a lid.

16) The apparatus according to any one of claims 1 to 15, characterized in that there is further included at least one element for controlling fluid flow in at least one of said channels.

17) The apparatus according to any one of claims 1 to 16, characterized in that there is further included a chamber for introduction of flow-promoting fluid.

18) The apparatus according to claim 17, characterized in that at least one of said chamber or an inlet is in communication with a mixing chamber for mixing said flow-promoting fluid with said sample fluid.

19) The apparatus according to any one of claims 1 to 18, characterized in that said at least one assay station comprises at least one component of an assay reaction pre-loaded therein.

20) The apparatus according to claim 19, characterized in that said least one component of said assay reaction at said at least one assay station provides at least one of detectable qualitative or quantitative data.

21) The apparatus of claim 20, characterized in that there is further included beads having said at least one component of said assay reaction.

22) The apparatus according to claim 19, characterized in that said at least one component of said assay reaction is secured to said at least one assay station.

23) The apparatus according to claim 15 or any one of claims 16 to 22 when appended to claim 16, characterized in that said sample preparation chamber further comprises an absorbent.

24) The apparatus according to any one of claims 1 to 22, characterized in that there is provided an absorbent in communication with a terminal portion of at least one of said at least first and second multipurpose channels.

25) The apparatus according to claim 24, characterized in that said absorbent is removeably attached to the terminal portion of said at least first and second multipurpose channels.

26) The apparatus according to claim 16 or any one of claims 17 to 25 when appended to claim 16, characterized in that said at least one flow controlling element is disposed between said sample preparation chamber and said at least first multipurpose channel.

27) The apparatus according to claim 16 or any one of claims 17 to 25 when appended to claim 16, characterized in that said at least one flow controlling element is disposed adjacent said at least one assay station.

28) The apparatus according to any one of claims.1 to 27, characterized in that said at least one assay station is further comprised of flow promoting structures.

29) The apparatus according to claim 2 or any one of claims 3 to 28 when appended to claim 2, characterized in that said at least a portion of said at least one first assay station channel has a cross-sectional area that is less than the cross-sectional area of at least a portion of said at least second assay station channel.

30) The apparatus according to claim 10 or any one of claims 11 to 29 when appended to claim 10, characterized in that said first and second multipurpose channels provide a path by which said plurality of assay stations are sealed via the flow through of an isolation medium.

31) The apparatus according to claim 1 or any one of claims 2 to 30 when appended to claim 1, characterized in that exposed portions of the said at least first and second multipurpose channels are sealed with a solid from ambient atmosphere adhesively, mechanically, electrically, or magnetically after the first and second multipurpose channels are filled with a sample fluid and/or an isolation medium.

32) An apparatus for analyzing a sample fluid, characterized in that there is provided:

a substrate, said substrate comprising:

a sample preparation chamber for removal of undesired components from a sample fluid;

a sample fluid inlet fluidically coupled to said sample preparation chamber;

a chamber or inlet for receiving a flow-promoting fluid;

a flow controlling element for controlling flow of a sample fluid from said sample preparation chamber to said chamber or inlet for receiving a flow-promoting fluid;

at least one first multi purpose channel fluidically coupled to said chamber;

at least one assay station;

said first multi purpose channel in communication to said at least one assay station;

a second flow controlling element for isolating and permitting flow of a fluid from said chamber to said at least one assay station; and

a first assay station channel, coupled to said at least one assay station.

33) The apparatus according to claim 32, characterized in that said sample preparation chamber comprises a sintered glass block which seals at least a portion of said sample preparation chamber.

34) The apparatus according to claim 32 or 33, characterized in that portions of said at least first multipurpose channel is sealed with a solid from ambient atmosphere adhesively, mechanically, electrically, or magnetically after the first multipurpose channel is filled with sample fluid and/or an isolation medium.

35) The apparatus according to claim 33, characterized in that an absorbent adheres to said sintered glass block for absorbing said undesired undesired components.

36) The apparatus according to any one of claims 32 to 35, characterized in that a sealing layer seals at least one of said filtration chamber, chamber, first multipurpose channel, assay station, and first assay channel.

37) The apparatus according to any one of claims 32 to 36, characterized in that there is further included a diaphragm which seals at least a portion of said filtration chamber from the environment; and

a vibrating actuator for vibrating said diaphragm, thereby agitating a lysing buffer.

38) The apparatus according to any one of claims 32 to 37, characterized in that said substrate comprises at least one of (a) glass, (b) plastic, (c) elastomer, (d) a composite, (e) silicon and (f) metal.

39) The apparatus according to claim 38, characterized in that said elasomer comprises poly-dimethylsiloxane.

40) A method for conducting reactions on a substrate characterized in that said substrate comprises at least one assay station, an arrangement of at least first and second multipurpose channels wherein said at least one assay station being situated in a position intermediate between said first and second multipurpose channels and in fluid communication therewith, and wherein said first multipurpose channel has internal surface characteristics conducive to conduction of a sample solution therethrough, at least one sample fluid receiving area in communication with said at least first multipurpose channel, at least one isolation-medium inlet in communication with said at least first and second multipurpose channels, said least one second multipurpose channel having at least an internal surface portion non-conducive to conduction of said sample solution, said method comprising:

obtaining a sample fluid;

introducing a sample fluid to at least one sample inlet;

filling said at least one assay station via said at least one multipurpose channel;

allowing isolation-medium from said at least one isolation medium port to flow into at least said first multipurpose channel; and

running at least one reaction at said at least one assay station, said reaction providing at least one of qualitative or quantitative data relating to said sample fluid.

41) The method according to claim 40, characterized in that there is further included running said at least one reaction under temperature control.

42) The method according to claim 40 or 41, characterized in that there is further included the step of obtaining said sample fluid from a test sample.

43) The method according to claim 42, characterized in that there is further included the step of subjecting said test sample to at least one preparative operation.

44) The method according to claim 43, characterized in that there is further included performing said at least one preparative operation separately from said substrate.

45) The method according to claim 43, characterized in that there is further included performing said at least one preparative operation at at least one of upon or within said substrate.

46) The method according to any one of claims 40 to 45, characterized in that said at least one of qualitative or quantitative data provides at least one of a colorimetric, flurometric or luminescent result.

47) The method according to any one of claims 43 to 46, characterized in that said at least one preparative operation provides nucleic acids susceptible for use in said at least one reaction.

48) The method according to any one of claims 40 to 47, characterized in that there is further included the step of disposing at least one assay reaction component into said at least one assay station.

49) The method according to any one of claims 40 to 48, characterized in that said step of running said at least one reaction comprises nucleic acid amplification.

50) The method according to any one of claims 40 to 49, characterized in that there is further included obtaining said at least one of qualitative or quantitative data utilizing fluorescence.

51) The method according to claim 50, characterized in that said fluorescence is provided by at least one of binding of a fluorophore or hybridization of fluorophore containing probe.

52) The method according to any one of claims 40 to 46, characterized in that said qualitative or quantitative data is obtained via probe labeled with at least one of a fluorophore, an enzyme or component of a binding complex.

53) The method according to any one of claims 40 to 52, characterized in that there is further included the step of displacing said sample fluid via isolation-medium.

54) The method according to claim 52, characterized in that there is further included introducing sequentially said isolation-medium into said at least first and second multipurpose channels.

55) The method according to claim 53, characterized in that said isolation medium is first introduced into said at least first multipurpose channel followed by introduction into said at least second multipurpose channel.

56) The method according to claims 54 or 55, characterized in that said introduction of isolation medium provides the purging of air from said at least second multipurpose channel and the purging of said sample fluid from said at least first multipurpose channel, resulting in the isolation of said at least one assay station containing said sample fluid.

57) The method according to claim 49 or any one of claims 50 to 56 when appended to claim 50, characterized in that there is further included the step of exposing said at least one assay station to irradiation.

58) The method according to any one of claims 40 to 57, characterized in that there is further included the step of at least one of solidifying, curing and polymerizing said isolation medium.

59) The method according to any one of claims 40 to 58, characterized in that exposed portions of the said at least first and second multipurpose channels are sealed with a solid from ambient atmosphere adhesively, mechanically, or magnetically after the first and second multipurpose channels are filled with sample fluid and/or isolation medium.

60) The method according to any one of claims 40 to 59, characterized in that there is further included heating said fluid sample prior to filling said at least one assay station.

61) The method according to claim 43 or any one of claims 44 to 60 when appended to claim 44, characterized in that the step of obtaining said sample fluid includes at least one preparative operation in a sample preparation chamber, comprising at least one of exposing said test sample to a lysing buffer, elution buffer and a washing buffer, in order to obtain said sample fluid.

62) The method according to claim 61, characterized in that there is further included adding a flow promoting fluid to said sample fluid.

63) The method according to claim 61 or 62, characterized in that said at least one preparative operation is conducted upon said substrate, further comprising the step of agitating said substrate in order to promote the entry of nucleic acids, contained in a nucleic acid containing test sample, to enter into said sample fluid.

64) The method according to claim 63, characterized in that said step of agitating said substrate is performed by agitating said substrate at the resonant frequency of at least one of said substrate and the sample fluid contained in said sample preparation chamber.

65) The method according to claim 63, characterized in that said agitating step is performed by agitating electro-magnetically magnetic beads in said sample preparation chamber.

66) The method according to any one of claims 63 to 65, characterized in that there is further included heating said elution buffer contained in said filtration chamber to generate a thermal-gradient induced convection flow, and causing more nucleic acid molecules to enter into solution.

67) The method according to claim 66, characterized in that there is further included a step of adding surfactant to said elution buffer contained in said sample preparation chamber.

68) The method according to claim 42 or any one of claims 43 to 67 when appended to claim 42, characterized in that said test sample is at least one of homogenized, digested and filtered before injection into said sample introduction inlet.

69) An apparatus for sample fluid analysis characterized in that the apparatus comprises:

a substrate, said substrate comprising

a sample preparation chamber and fluidically coupled chamber or inlet for receiving a flow-promoting fluid;

a test sample introduction inlet fluidically coupled to said sample preparation chamber;

at least one buffer introduction inlet fluidically coupled to at least one of said sample preparation chamber and chamber or inlet for receiving a flow-promoting fluid;

a first multipurpose channel fluidically coupled to said sample preparation chamber or chamber or inlet for receiving a flow-promoting fluid;

an assay station;

an arrangement of at least first and second multipurpose channels wherein said at least one assay station being situated in a position intermediate and in fluid communication between said first and second multipurpose channels;

at least one flow control element for controlling fluid flow from at least one of said sample preparation chamber and chamber or inlet for receiving a flow-promoting fluid to said assay station;

at least one assay station channel fluidically coupled to said assay station.

70) The apparatus according to claim 69, characterized in that said fluid communication is via at least first and second assay station channels in communication with said first and second multipurpose channels.

71) The apparatus according to claim 69 or 70, characterized in that said filtration chamber comprises a sintered glass block which seals at least a portion of said a sample preparation chamber.

72) The apparatus according to claim 70, characterized in that an absorbent adheres to said sintered glass block for filtering white blood cells through said sintered glass block.

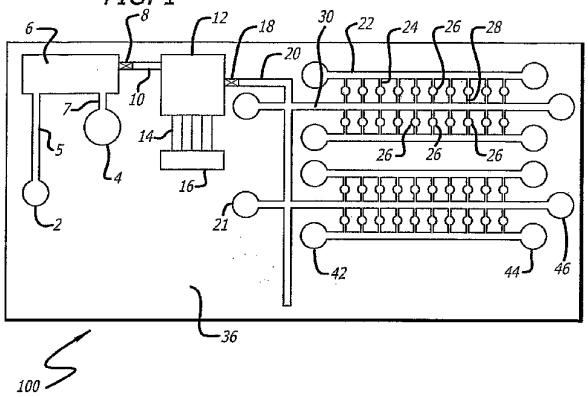
73) The apparatus according to claim 70 or claims 71 to 72 when appended to claim 70, characterized in that a sealing layer seals at least one said first multi purpose channel, assay station, and first assay station channel.

74) The apparatus according to any one of claims 69 to 73, characterized in that there is further included a diaphragm which seals at least a portion of said a sample preparation chamber and a vibrating actuator for vibrating said diaphragm.

75) The apparatus according to any one of claims 69 to 74, characterized in that said substrate comprises at least one of (a) glass, (b) plastic, (c) elastomer, (d) a composite, (e) silicon and (f) metal.

76) The apparatus according to claim 75, characterized in that said elastomer comprises poly-dimethylsiloxane.

FIG. 1


6
8
12
18
30
22
24
26
28
20
10
7
5
14
4
16
2
21
26
26
26
42
44
46
36
100

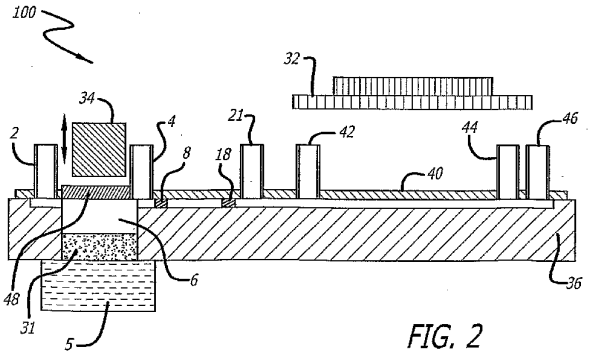
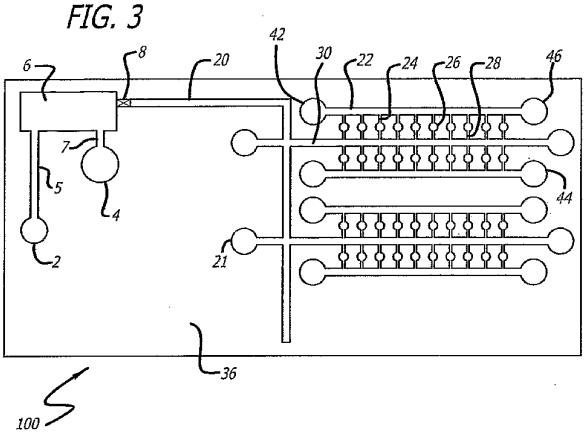

100
32
34
4
21
42
44
46
2
8
18
40
48
6
36
31
5

FIG. 2

FIG. 3


6
8
20
42
30
22
24
26
28
46
7
5
4
44
2
21
36
100

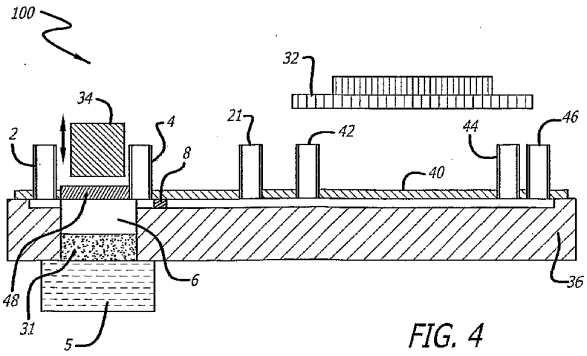

100
32
34
4
21
42
44
46
2
8
40
6
36
48
31
5

FIG. 4

FIG. 5A

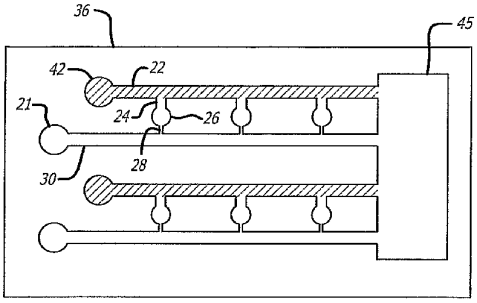


FIG. 5B

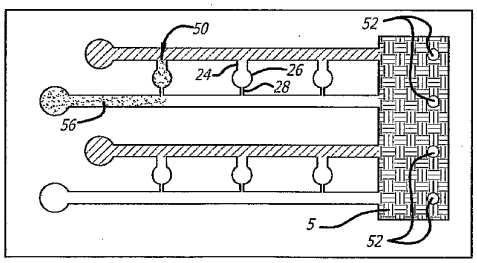


FIG. 5C

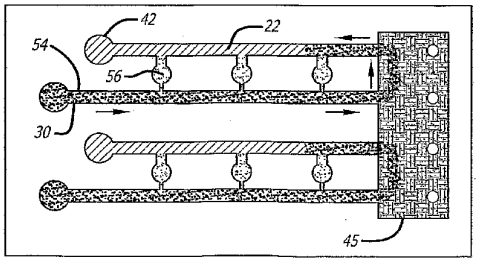


FIG. 5D

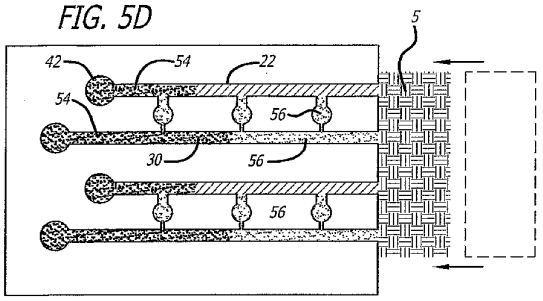
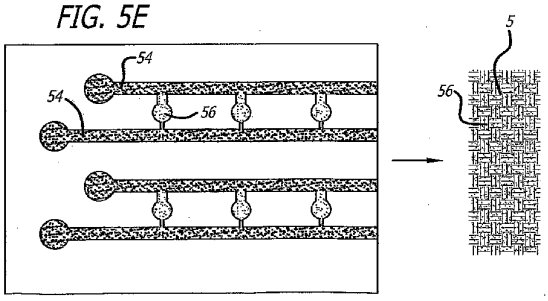
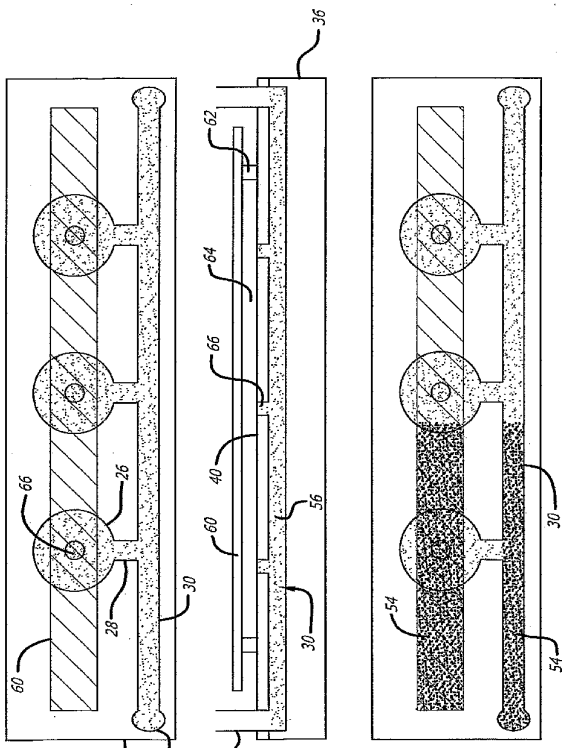


FIG. 5E




66
26
28
30
60
36
21
FIG. 6A
36
62
64
66
40
60
56
30
21
FIG. 6B
54
30
54
FIG. 6C

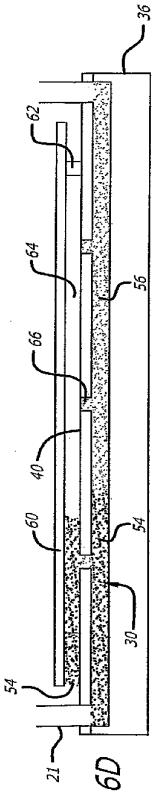


FIG. 6D

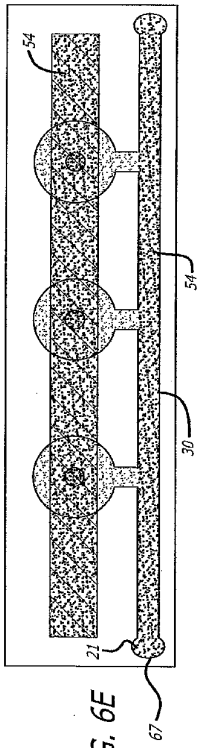


FIG. 6E

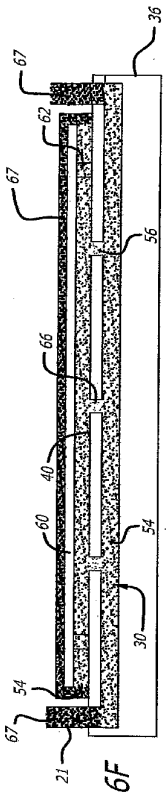


FIG. 6F

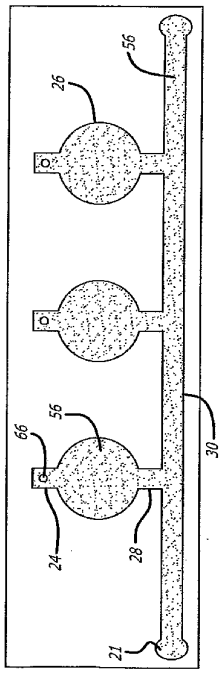


FIG. 6G

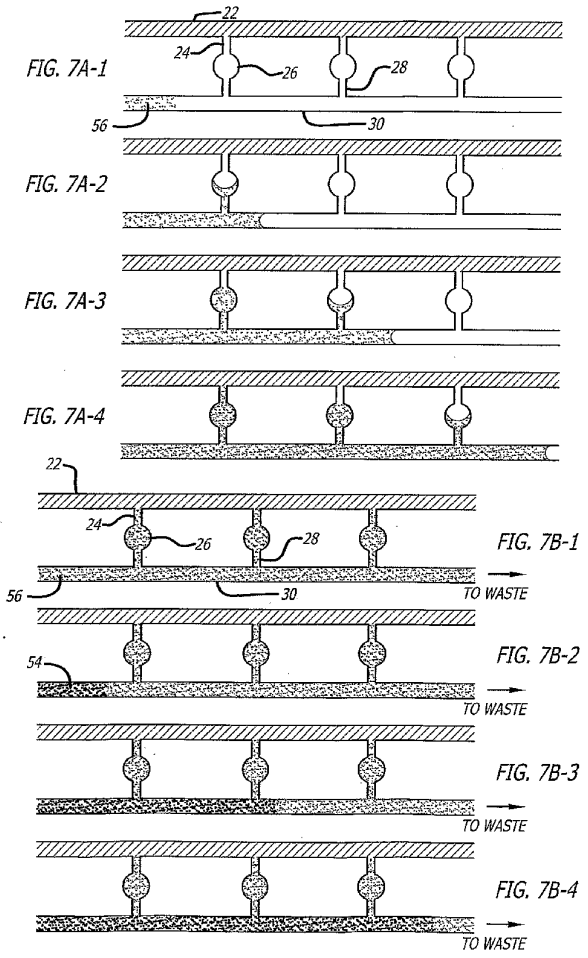


FIG. 7A-1

FIG. 7A-2

FIG. 7A-3

FIG. 7A-4

FIG. 7B-1

FIG. 7B-2

FIG. 7B-3

FIG. 7B-4

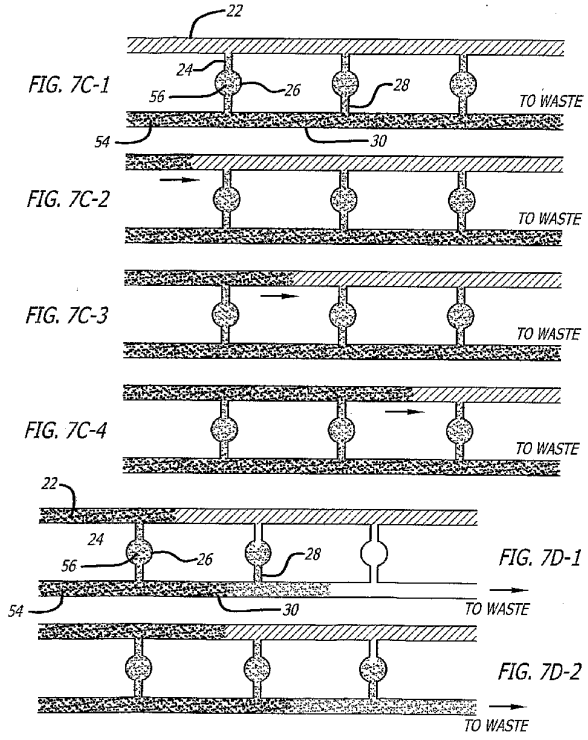


FIG. 7C-1

FIG. 7C-2

FIG. 7C-3

FIG. 7C-4

FIG. 7D-1

FIG. 7D-2

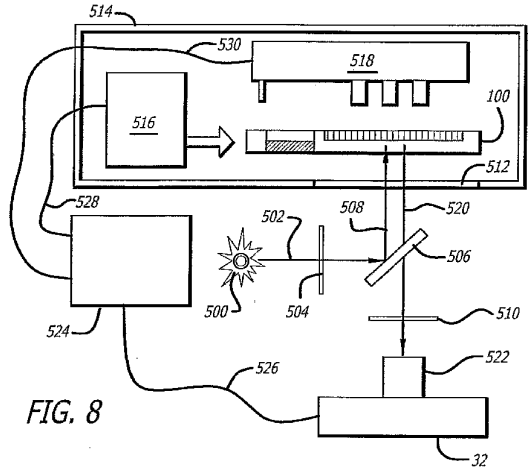


FIG. 8

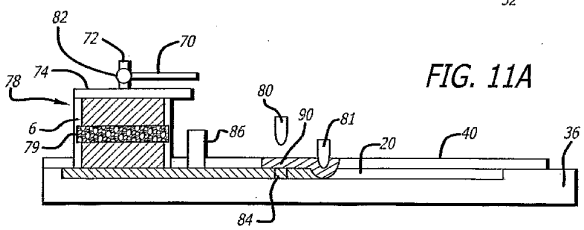


FIG. 11A

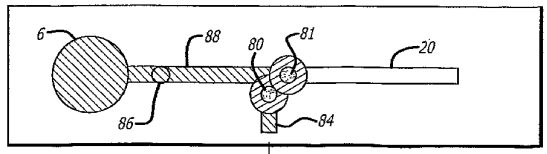


FIG. 11B

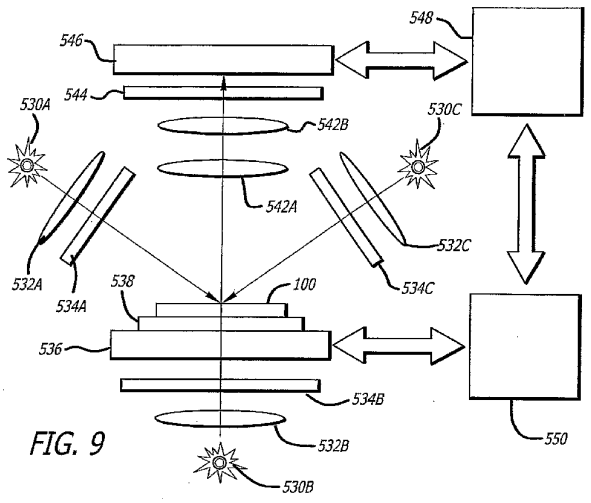

548
546
544
530A
542B
530C
542A
532C
532A
534A
538
100
534C
536
534B
550
532B
530B

FIG. 9

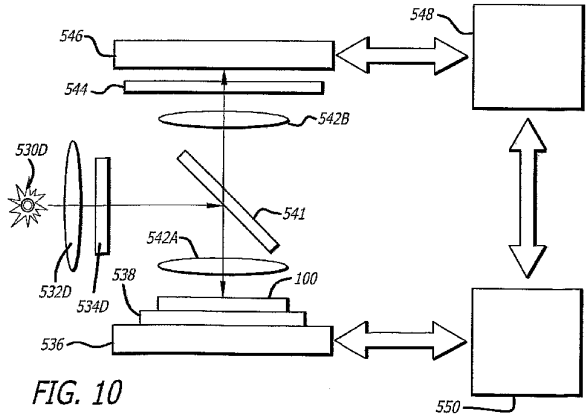

548
546
544
542B
530D
541
542A
538
100
532D
534D
536
550

FIG. 10

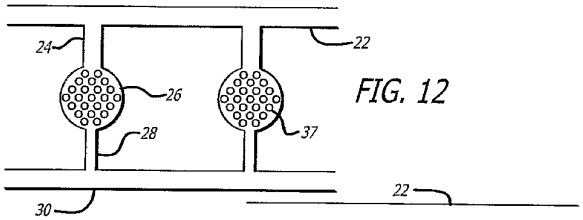


FIG. 12

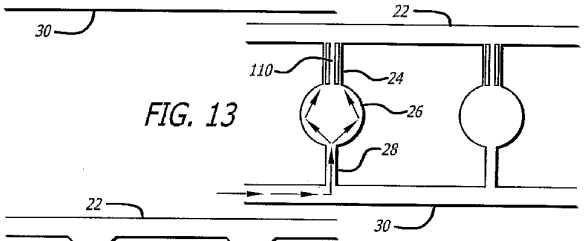


FIG. 13

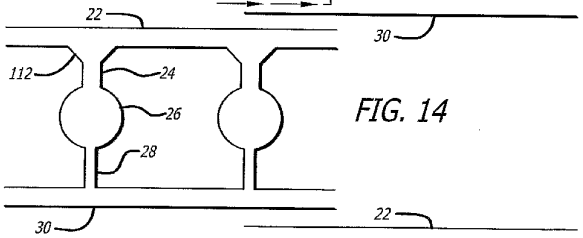


FIG. 14

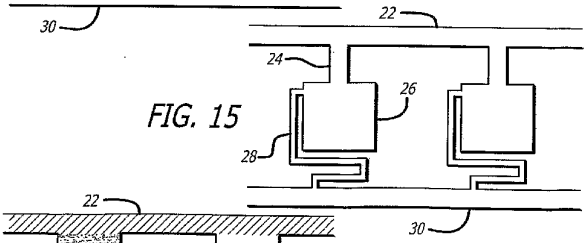


FIG. 15

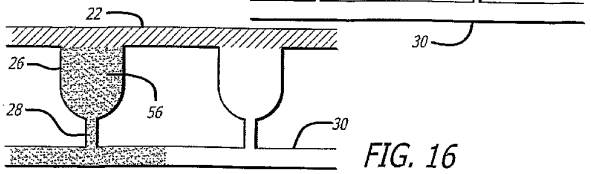


FIG. 16

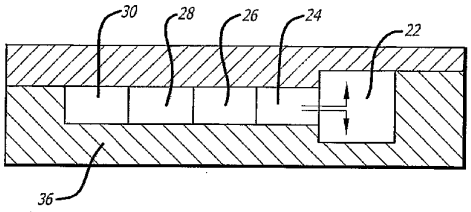


FIG. 17

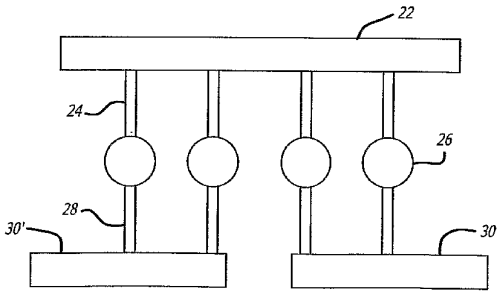


FIG. 18

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
1 May 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/035229 A3

(51) International Patent Classification⁷: C12Q 1/68, B01L 3/00

(21) International Application Number: PCT/SG2002/000251

(22) International Filing Date: 25 October 2002 (25.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/335,875 26 October 2001 (26.10.2001) US
10/279,627 24 October 2002 (24.10.2002) US

(71) Applicants (*for all designated States except US*): **NTU VENTURES PTE LTD** [SG/SG]; Block 1 Unit 213, Innovation Centre, 16 Nanyang Drive, Singapore 637722 (SG). **DEFENCE SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY** [SG/SG]; 71 Science Park Drive #02-05, Singapore 118253 (SG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **YAP, Peng, Huat, Eric** [SG/SG]; 9 Taman Serasi, Unit #06-17, Singapore 257720 (SG). **GONG, Haiqing** [SG/SG]; 218 Westwood Avenue, #10-01 The Floravale, Singapore 648351 (SG). **CHEN, Longqing** [CN/SG]; Blk 945 #03-513, Jurong West Street 91, Singapore 640945 (SG).

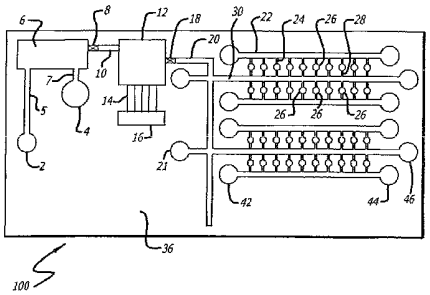
(74) Agents: **SHEENA, Jacob** et al.; Alban Tay Mahtani & De Silva, 39 Robinson Road #07-01, Robinson Point, Singapore 068911 (SG).

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: INTEGRATED FLUIDIC DEVICE FOR SAMPLE PREPARATION AND ASSAY



(57) Abstract: The present invention relates to an apparatus comprising a substrate having at least one assay station. The at least one assay station has at least a first assay station channel and at least a second assay station channel and the first and second assay station channels each separately being in communication with the at least one assay station. The apparatus has an arrangement of at least first and second multipurpose channels in communication with the first and second assay station channels, respectively. The first multipurpose channel and first assay station channel have internal surface characteristics conducive to conduction of a sample solution therethrough. There is at least one sample fluid inlet in communication with the at least first multipurpose channel,. and at least one isolation-medium inlet in communication with the at least first and second multipurpose channels. The at least one second multipurpose channel has an internal surface portion non-conducive to conduction of said sample solution.

WO 2003/035229 A3

WO 2003/035229 A3

Published:
— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report:
22 January 2004

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/SG 02/00251

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 B01L3/00

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)
IPC 7 C12Q 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, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01 41931 A (BRISCOE CYNTHIA G ;CHAN TONY (US); FOLEY BARBARA (US); TUGGLE TODD) 14 June 2001 (2001-06-14) page 29, paragraph 5 -page 38, paragraph 1 page 60, paragraph 6 -page 61, paragraph 1 page 66, paragraph 5 -page 77, paragraph 2	1-76
Y	WO 00 22436 A (MYRIAD GENETICS INC ;BIOMICRO SYSTEMS INC (US)) 20 April 2000 (2000-04-20) page 6, line 24 -page 8, line 21 figure 3; example 2	1-76
Y	WO 93 22053 A (UNIV PENNSYLVANIA) 11 November 1993 (1993-11-11) page 16, paragraph 1 -page 17, paragraph 2 page 25, paragraph 2; figures 8-18 page 6, paragraph 1	1-76

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in 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
21 July 2003	29/07/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bradbrook, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/SG 02/00251

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 235 471 B1 (KNAPP MICHAEL ET AL) 22 May 2001 (2001-05-22) column 4, line 54 -column 6, line 8 column 30, line 54 -column 32, line 16 column 43, line 21 -column 53, line 65; figure 11	1-76
Y	WO 00 46595 A (ACLARA BIOSCIENCES INC) 10 August 2000 (2000-08-10) page 1, line 31 -page 2, line 11 page 4, line 11 -page 8, line 9	1-76
Y	WO 00 60352 A (WHATMAN INTERNATIONAL PLC ;BUTT NEIL (GB); JONES PETER (GB); SUTTO) 12 October 2000 (2000-10-12) abstract; claims 1-83; figure 2	1-76
Y	BLANKENSTEIN G ET AL: "MODULAR CONCEPT OF A LABORATORY ON A CHIP FOR CHEMICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS" BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 13, no. 3/4, 1998, pages 427-438, XP000700154 ISSN: 0956-5663 the whole document	1-76
Y	WO 96 15450 A (SARNOFF DAVID RES CENTER) 23 May 1996 (1996-05-23) abstract; figures 7B,7C; example 2	1-76
Y	WO 00 67907 A (ACLARA BIOSCIENCES INC) 16 November 2000 (2000-11-16) page 31, line 25 -page 36, line 23 page 18, line 14-17; figure 3	1-76
P,Y	US 2002/153046 A1 (PATEL PAREN P ET AL) 24 October 2002 (2002-10-24) the whole document	1-76

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SG 02/00251

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.:
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:

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 II Observations where unity of invention *is lacking* (Continuation of item 2 of first sheet)

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

see additional sheet

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/SG 02/00251

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-31,40-68

Fluidic device in which the multipurpose channels have characteristics which are conducive or non-conducive to fluid flow; methods of use thereof.

2. Claims: 32-39,69-76

Fluidic device comprising multiple chambers and at least one flow control element.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/SG 02/00251

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0141931	A	14-06-2001	US	6527890 B1	04-03-2003
			US	6544734 B1	08-04-2003
			AU	2082701 A	18-06-2001
			CA	2393690 A1	14-06-2001
			EP	1237655 A2	11-09-2002
			JP	2003517591 T	27-05-2003
			WO	0141931 A2	14-06-2001
			US	2003118481 A1	26-06-2003
			US	2003129646 A1	10-07-2003
WO 0022436	A	20-04-2000	AU	6426899 A	01-05-2000
			BR	9914554 A	26-06-2001
			CA	2347182 A1	20-04-2000
			CN	1326549 T	12-12-2001
			EP	1125129 A1	22-08-2001
			JP	2002527250 T	27-08-2002
			WO	0022436 A1	20-04-2000
			US	6296020 B1	02-10-2001
			US	2002036018 A1	28-03-2002
WO 9322053	A	11-11-1993	US	5304487 A	19-04-1994
			US	5296375 A	22-03-1994
			AT	155711 T	15-08-1997
			AT	167816 T	15-07-1998
			AT	140025 T	15-07-1996
			AT	140880 T	15-08-1996
			AT	174813 T	15-01-1999
			AU	677780 B2	08-05-1997
			AU	4222393 A	29-11-1993
			AU	680195 B2	24-07-1997
			AU	4222593 A	29-11-1993
			AU	677781 B2	08-05-1997
			AU	4222693 A	29-11-1993
			AU	4222793 A	29-11-1993
			AU	677197 B2	17-04-1997
			AU	4223593 A	29-11-1993
			CA	2134474 A1	11-11-1993
			CA	2134475 A1	11-11-1993
			CA	2134476 A1	11-11-1993
			CA	2134477 A1	11-11-1993
			CA	2134478 A1	11-11-1993
			DE	69303483 D1	08-08-1996
			DE	69303483 T2	06-02-1997
			DE	69303898 D1	05-09-1996
			DE	69303898 T2	20-02-1997
			DE	69312483 D1	04-09-1997
			DE	69312483 T2	12-02-1998
			DE	69319427 D1	06-08-1998
			DE	69319427 T2	10-12-1998
			DE	69322774 D1	04-02-1999
			DE	69322774 T2	17-06-1999
			EP	0637996 A1	15-02-1995
			EP	0637997 A1	15-02-1995
			EP	0639223 A1	22-02-1995
			EP	0637998 A1	15-02-1995
			EP	0637999 A1	15-02-1995
			ES	2106341 T3	01-11-1997
			ES	2127276 T3	16-04-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/SG 02/00251

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9322053	A		GR	3025037 T3	30-01-1998
			GR	3029509 T3	28-05-1999
			HK	16897 A	13-02-1997
			HK	1001305 A1	16-11-2001
			JP	3298882 B2	08-07-2002
			JP	7506430 T	13-07-1995
			JP	7506431 T	13-07-1995
			JP	7506256 T	13-07-1995
			JP	3207424 B2	10-09-2001
			JP	7506257 T	13-07-1995
			JP	7506258 T	13-07-1995
			WO	9322053 A1	11-11-1993
US 6235471	B1	22-05-2001	US	2003087300 A1	08-05-2003
			US	2003104466 A1	05-06-2003
			US	6403338 B1	11-06-2002
			US	6391622 B1	21-05-2002
			US	6440722 B1	27-08-2002
			US	6444461 B1	03-09-2002
			US	6406893 B1	18-06-2002
			AU	746892 B2	02-05-2002
			AU	6884198 A	30-10-1998
			EP	0972082 A1	19-01-2000
			JP	2001521622 T	06-11-2001
			WO	9845481 A1	15-10-1998
WO 0046595	A	10-08-2000	CA	2361923 A1	10-08-2000
			EP	1157270 A1	28-11-2001
			JP	2002536640 T	29-10-2002
			WO	0046595 A1	10-08-2000
			US	2002153251 A1	24-10-2002
WO 0060352	A	12-10-2000	AU	3569700 A	23-10-2000
			EP	1166109 A2	02-01-2002
			WO	0060352 A2	12-10-2000
WO 9615450	A	23-05-1996	US	5585069 A	17-12-1996
			AT	240155 T	15-05-2003
			AU	705351 B2	20-05-1999
			AU	4152396 A	06-06-1996
			AU	705659 B2	27-05-1999
			AU	4233796 A	06-06-1996
			CA	2204912 A1	23-05-1996
			CA	2205066 A1	23-05-1996
			DE	69530796 D1	18-06-2003
			EP	0791238 A1	27-08-1997
			EP	0808456 A1	26-11-1997
			JP	11500602 T	19-01-1999
			JP	3398749 B2	21-04-2003
			JP	2001509727 T	24-07-2001
			WO	9615450 A1	23-05-1996
			WO	9615576 A1	23-05-1996
			US	5681484 A	28-10-1997
			US	5643738 A	01-07-1997
			US	5593838 A	14-01-1997
			US	5846396 A	08-12-1998
			US	5985119 A	16-11-1999
			US	5755942 A	26-05-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/SG 02/00251

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9615450 A		US 5863708 A	26-01-1999
		US 5858804 A	12-01-1999
WO 0067907 A	16-11-2000	US 6555389 B1	29-04-2003
		AU 4710900 A	21-11-2000
		CA 2337007 A1	16-11-2000
		CN 1354691 T	19-06-2002
		EP 1119412 A2	01-08-2001
		JP 2002544494 T	24-12-2002
		US 2002182749 A1	05-12-2002
		WO 0067907 A2	16-11-2000
US 2002153046 A1	24-10-2002	US 6418968 B1	16-07-2002
		WO 02086332 A1	31-10-2002
		US 2003005969 A1	09-01-2003

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

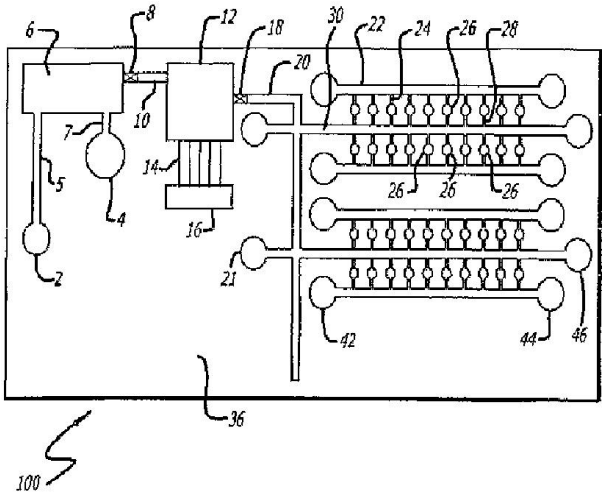
(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100091351
弁理士 河野 哲
(74)代理人 100088683
弁理士 中村 誠
(74)代理人 100108855
弁理士 蔵田 昌俊
(74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司
(74)代理人 100109830
弁理士 福原 淑弘
(74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
(74)代理人 100092196
弁理士 橋本 良郎
(72)発明者 ヤップ、ペン・フアト・エリク
シンガポール国、シンガポール ２５７７２０、ユニット・ナンバー０６－１７、タマン・セラシ ９
(72)発明者 ゴン、ハイクィン
シンガポール国、シンガポール ６４８３５１、ザ・フロラベール、ナンバー１０－０１、ウェストウッド・アベニュー ２１８
(72)発明者 チェン、ロンクィン
シンガポール国、シンガポール ６４０９４５、ジュロン・ウェスト・ストリート ９１、ナンバー０３－５１３、ブロック ９４５

Ｆターム(参考) 2G052 AA28 AA30 AA33 AA35 AA36 AB20 AD26 CA39 DA09 DA13
DA26 EC16 ED06 FB05 FB06 FB09 FC02 FC03 FC15 FD02
FD06 FD09 FD20 GA11 GA21 GA30 HB06 HB10 HC24 JA13
JA15 JA16

【要約の続き】
【選択図】図１

专利名称(译)	样品制备集成芯片		
公开(公告)号	JP2005506541A	公开(公告)日	2005-03-03
申请号	JP2003537788	申请日	2002-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	ディーエス参加国际清洁实验室		
申请(专利权)人(译)	NTT茶宇创业投资私人有限公司 Diesuo国家实验室		
[标]发明人	ヤップペンフアトエリク ゴンハイクィン チェンロンクィン		
发明人	ヤップ、ペン·フアト·エリク ゴン、ハイクィン チェン、ロンクィン		
IPC分类号	G01N33/53 B01L3/00 B01L7/00 C12Q1/68 G01N1/00 G01N1/28 G01N33/543 G01N37/00		
CPC分类号	B01L3/5027 B01L7/52 B01L2200/0605 B01L2200/10 B01L2300/044 B01L2300/0681 B01L2300/0861 B01L2300/0864 B01L2400/0403 B01L2400/0406 B01L2400/0448 B01L2400/0475 B01L2400/0487 B01L2400/06 B33Y80/00 C12Q1/68 G01N1/28 Y02A50/54 C12Q2565/629		
FI分类号	G01N33/53.M G01N1/00.101.F G01N33/543.597 G01N37/00.101 G01N37/00.102		
F-TERM分类号	2G052/AA28 2G052/AA30 2G052/AA33 2G052/AA35 2G052/AA36 2G052/AB20 2G052/AD26 2G052/CA39 2G052/DA09 2G052/DA13 2G052/DA26 2G052/EC16 2G052/ED06 2G052/FB05 2G052/FB06 2G052/FB09 2G052/FC02 2G052/FC03 2G052/FC15 2G052/FD02 2G052/FD06 2G052/FD09 2G052/FD20 2G052/GA11 2G052/GA21 2G052/GA30 2G052/HB06 2G052/HB10 2G052/HC24 2G052/JA13 2G052/JA15 2G052/JA16		
代理人(译)	河野 哲 中村诚		
优先权	60/335875 2001-10-26 US 10/279627 2002-10-24 US		
其他公开文献	JP2005506541A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

类型代码： 本发明涉及一种包括具有至少一个测定站的基底的装置。其中，所述的至少一个化验站具有至少一个第二测定台信道和至少一个第一测定台信道，所述第一和第二测定台信道，分别独立地，至少1正在与其中一个检测站进行通讯。该装置至少具有分别与第一和第二测定站通道连通的第一和第二多用途通道。第一多用途通道和第一检测站通道具有能够传导样品溶液的内表面特征。至少一个样品流体入口与所述至少第一多用途通道和至少一个与所述至少第一和第二多用途通道连通的隔离介质入口连通。所述至少一个第二多用途通道具有不传导样品溶液的内表面部分。