

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580011555.5

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C12M 1/36 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

[43] 公开日 2007年4月4日

[11] 公开号 CN 1942590A

[22] 申请日 2005.2.18

[21] 申请号 200580011555.5

[30] 优先权

[32] 2004.2.18 [33] US [31] 60/545,435

[86] 国际申请 PCT/US2005/005389 2005.2.18

[87] 国际公布 WO2005/080606 英 2005.9.1

[85] 进入国家阶段日期 2006.10.17

[71] 申请人 周小川

地址 美国德克萨斯州

共同申请人 高晓莲 艾尔多甘 古拉里

[72] 发明人 周小川 高晓莲 艾尔多甘 古拉里

[74] 专利代理机构 北京元中知识产权代理有限责任
公司

代理人 王明霞

权利要求书4页 说明书21页 附图12页

[54] 发明名称

多元化学和生化反应的流体装置和方法

[57] 摘要

本发明公开一种具有新型流体结构的微流体装置用于分离流体到隔离和容积为皮升(pico-liter)的微室进行多元化学和生物反应。这种新型装置可用于生物分子合成、多核苷酸扩增,和生物结合分析。

1. 一个微流体反应装置，其特征是，该装置包括：
 - (a) 多个具有一个第一导管和一个第二导管的微室；
 - (b) 具有一个第一末端的第一传输通道，所述第一传输通道在第一末端处有一个旁路通道，所述第一传输通道通过第一导管与至少一个微室相连；
 - (c) 具有一个第一末端的第二传输通道，所述第二传输通道在第一末端处有一个旁路通道，所述第二传输通道通过第一导管与至少一个微室相连。
2. 根据权利要求1所述的微流体反应装置，其特征是：所述第一传输通道内表面涂有一层疏水膜。
3. 根据权利要求1所述的微流体反应装置，其特征是：还包括一个或多个分配通道。
4. 根据权利要求1所述的微流体反应装置，其特征是：还包括填充于所述第一及第二传输通道中的油和填充于所述微室中的水溶液。
5. 根据权利要求1所述的微流体反应装置，其特征是：还包括填充于所述第一及第二传输通道中的气体和填充于所述微室中的水溶液。
6. 根据权利要求1所述的微流体反应装置，其特征是：还包括填充于所述微室中的小球粒。
7. 靶核酸链扩增方法包括以下步骤：
 - (a) 将寡聚核苷酸连接到微室内固体支持面上，所述寡聚核苷酸是由一个第一引物、一个第二引物和一个结合探针组成，所述第一引物、第二引物、结合探针及微室内固体支持面相互间被一个可切割的连接片段所分隔；
 - (b) 将一个靶核酸链与所述寡聚核苷酸孵育，使互补的靶核酸序列与结合探针相互杂交；
 - (c) 清洗所述微室；
 - (d) 在所述微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs和二价阳离子的溶液，从而使所述第一引物、第二引物及结合探针相互分离并脱离固体支持面，从而在微室内产生一个含有所述第一引物、第二引物、结合探针、靶核酸链、聚合酶、dNTPs和二价阳离子的反应混合物；
 - (e) 对所述反应混合物进行两次或两次以上的加热和冷却循环，从而使靶核酸链得以扩增。
8. 根据权利要求7所述方法，其特征是：所述靶核酸链为DNA。
9. 根据权利要求8所述方法，其特征是：所述第一引物、第二引物及结合探针是DNA。
10. 根据权利要求7所述方法，其特征是：所述可切割的连接片段是选自于由尿嘧啶和反尿嘧啶组成的集合。
11. 根据权利要求7所述方法，其特征是：所述寡聚核苷酸是通过连接片段连接到所述固体支持面上。
12. 根据权利要求7所述方法，其特征是：所述切割物是RNase A。

13. 在含多个独立微室的微阵列上扩增多个靶核酸链的方法包括以下步骤:

(a) 将一个第一寡聚核苷酸连接到一个第一微室内固体支持面上, 所述寡聚核苷酸是由一个第一引物、一个第二引物和一个第一结合探针组成, 其特征是: 所述第一引物、第二引物、第一结合探针及固体支持面相互间被一个可切割的连接片段所分隔;

(b) 将一个第二寡聚核苷酸连接到一个第二微室内固体支持面上, 所述寡聚核苷酸是由一个第三引物、一个第四引物和一个第二结合探针组成, 其特征是: 所述第三引物、第四引物、第二结合探针及固体支持面相互间被一个可切割的连接片段所分隔;

(c) 将含两个或两个以上核酸序列的靶核酸链与所述第一及第二寡聚核苷酸孵育, 使互补的靶核酸序列与所述结合探针相互杂交;

(d) 清洗所述微室;

(e) 在所述第一及第二微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液, 从而使所述第一引物、第二引物、第三引物、第四引物、第一结合探针及第二结合探针相互分离并脱离固体支持面, 从而在第一微室内产生一个含有所述第一引物、第二引物、第一结合探针、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物, 并在第二微室内产生一个含有所述第三引物、第四引物、第二结合探针、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物;

(f) 对所述第一和第二反应混合物进行两次或两次以上的加热和冷却循环, 从而使多个靶核酸链得以扩增。

14. 根据权利要求 13 所述方法, 其特征是: 所述多个靶核酸链为 DNA。

15. 根据权利要求 13 所述方法, 其特征是: 所述第一、第二、第三、第四引物及结合探针是 DNA。

16. 根据权利要求 13 所述方法, 其特征是: 所述可切割的连接片段是选自于由尿嘧啶和反尿嘧啶组成的集合。

17. 根据权利要求 13 所述方法, 其特征是: 所述寡聚核苷酸是通过连接片段连接到所述固体支持面上。

18. 根据权利要求 13 所述方法, 其特征是: 所述切割物是 RNase A。

19. 根据权利要求 13 所述方法, 其特征是: 所述第一及第二寡聚核苷酸有 60-100 个核苷;

20. 根据权利要求 13 所述方法, 其特征是: 所述聚合酶是热稳定 DNA 聚合酶。

21. 靶核酸链扩增方法包括以下步骤:

(a) 将寡聚核苷酸合成到微室内固体支持面上, 所述寡聚核苷酸是由一个第一引物、一个第二引物和一个结合探针组成, 所述第一引物、第二引物、结合探针及微室内固体支持面相互间被一个可切割的连接片段所分隔;

(b) 将一个靶核酸链与所述结合探针孵育, 使互补的靶核酸序列与结合探针相互杂交;

(c) 清洗所述微室;

(d) 在所述微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液, 从而使所述第一引物、第二引物及结合探针相互脱离及脱离固体支持面, 从而在微室内产生一个含有所述第一引物、第二引物、结合探针、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物;

(e) 对所述反应混合液进行两次或两次以上的加热和冷却循环, 从而使靶核酸链得以扩

增。

22. 在含多个独立微室的微阵列上扩增多个靶核酸链的方法包括以下步骤：

(a) 将寡聚核苷合成到微室内固体支持面上，所述寡聚核苷是由一个第一引物、一个第二引物和一个结合探针组成，所述第一引物、第二引物、结合探针及微室内固体支持面相互间被一个可切割的连接片段所分隔；

(b) 将一个第二寡聚核苷合成到一个第二微室内固体支持面上，所述寡聚核苷是由一个第三引物、一个第四引物和一个第二结合探针组成，其特征是：所述第三引物、第四引物、第二结合探针及固体支持面相互间被一个可切割的连接片段所分隔；

(c) 将含两个或两个以上核酸序列的靶核酸链与所述第一及第二寡聚核苷孵育，使互补的靶核酸序列与所述结合探针相互杂交；

(d) 清洗所述微室；

(e) 在所述第一及第二微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液，从而使所述第一引物、第二引物、第三引物、第四引物、第一结合探针及第二结合探针相互分离并脱离固体支持面，从而在第一微室内产生一个含有所述第一引物、第二引物、第一结合探针、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物，并在第二微室内产生一个含有所述第三引物、第四引物、第二结合探针、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物；

(f) 对所述第一和第二反应混合物进行两次或两次以上的加热和冷却循环，从而使多个靶核酸链得以扩增。

23. 扩增靶核酸链的方法包括以下步骤：

(a) 将一个第一引物、一个第二引物和一个第一结合探针连接到一个第一微室内固体支持面上，所述第一引物、第二引物及第一结合探针当被一个切割物处理时会脱离所述固体支持面；

(b) 将一个核酸序列的靶核酸链与所述结合探针孵育，使互补的靶核酸序列与所述结合探针相互杂交；

(c) 清洗所述微室；

(d) 在所述微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液，从而使所述第一引物、第二引物、及结合探针脱离所述固体支持面，从而在微室内产生一个含有所述第一引物、第二引物、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物；

(e) 对所述反应混合物进行两次或两次以上的加热和冷却循环，从而使多个靶核酸链得以扩增。

24. 扩增靶核酸链的方法包括以下步骤：

(a) 将一个第一引物、一个第二引物和一个第一结合探针合成到一个第一微室内固体支持面上，所述第一引物、第二引物及第一结合探针当被一个切割物处理时会脱离所述固体支持面；

(b) 将一个核酸序列的靶核酸链与所述结合探针孵育，使互补的靶核酸序列与所述结合探针相互杂交；

(c) 清洗所述微室；

(d) 在所述微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液，从而使所述

第一引物、第二引物、及结合探针脱离所述固体支持面，从而在微室内产生一个含有所述第一引物、第二引物、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物；

(e) 对所述反应混合物进行两次或两次以上的加热和冷却循环，从而使多个靶核酸链得以扩增。

25. 在含多个独立微室的微阵列上扩增多个靶核酸链的方法包括以下步骤：

(a) 将一个第一引物、一个第二引物和一个第一结合探针连接到一个第一微室内固体支持面上，所述第一引物、第二引物及第一结合探针当被一个切割物处理时会脱离所述固体支持面；

(b) 将一个第三引物、一个第四引物和一个第二结合探针连接到一个第二微室内固体支持面上，所述第三引物、第四引物及第二结合探针当被一个切割物处理时会脱离所述固体支持面；

(c) 将含两个或两个以上核酸序列的靶核酸链与所述第一及第二结合探针孵育，使互补的靶核酸序列与所述结合探针相互杂交；

(d) 清洗所述微室；

(e) 在所述第一及第二微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液，从而使所述第一引物、第二引物、第三引物、第四引物脱离所述固体支持面，从而在第一微室内产生一个含有所述第一引物、第二引物、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物，并在第二微室内产生一个含有所述第三引物、第四引物、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物；

(f) 对所述第一和第二反应混合物进行两次或两次以上的加热和冷却循环，从而使多个靶核酸链得以扩增。

26. 在含多个独立微室的微阵列上扩增多个靶核酸链的方法包括以下步骤：

(a) 将一个第一引物、一个第二引物和一个第一结合探针合成到一个第一微室内固体支持面上，所述第一引物、第二引物及第一结合探针当被一个切割物处理时会脱离所述固体支持面；

(b) 将一个第三引物、一个第四引物和一个第二结合探针合成到一个第二微室内固体支持面上，所述第三引物、第四引物及第二结合探针当被一个切割物处理时会脱离所述固体支持面；

(c) 将含两个或两个以上核酸序列的靶核酸链与所述第一及第二结合探针孵育，使互补的靶核酸序列与所述结合探针相互杂交；

(d) 清洗所述微室；

(e) 在所述第一及第二微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液，从而使所述第一引物、第二引物、第三引物、第四引物脱离所述固体支持面，从而在第一微室内产生一个含有所述第一引物、第二引物、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物，并在第二微室内产生一个含有所述第三引物、第四引物、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物；

(f) 对所述第一和第二反应混合物进行两次或两次以上的加热和冷却循环，从而使多个靶核酸链得以扩增。

多元化学和生化反应的流体装置和方法

技术领域

本发明涉及的是可以进行多元化学和生化反应、并能进行多元化学和生化检测的流体装置。详细的说，此发明涉及到用于分配和隔离流体，进行多元化学和生化反应，并且具有检测多元化学和生物产物功能的装置和方法。

背景技术

现代医药的发展、疾病诊断、病原体检测、基因发现以及各种基因相关技术和研究越来越依赖于大量化学或生化产品的合成、筛选以及检测。传统的方法一次只能合成或检测一种物质，这已经远远无法满足需求。因此，具备高通量分析和合成功能的化学或生化反应体系和装置是必需的。

目前高通量多元反应和检测方法用的最多的是微孔板。每个微孔板有 96, 384 或 1536 个孔位或者微管，其中每个微孔或者微管中都可用于独立的化学或生化反应。标准形式的多孔板上，各个微孔或者微管中进行的反应是相互独立的。化学试剂和生化试剂通过移液管或者分配器加入到各个微孔或者微管中。标准的 96、384 和 1536 多孔板的两个相邻微孔或者微管之间的距离分别是 9.0mm、4.5mm 和 2.25mm。要提高总量处理能力就需要更用高密度的微孔。

另一种多元分析方法是采用微阵列。最常见的微阵列就是 DNA 微阵列，DNA 微阵列通常是一个表面包含二维阵列 DNA 物质的玻璃板。DNA 微阵列一般用于多元检测。阵列上的每个元件都含有一个特定的 DNA 序列，每个特定的 DNA 序列都能专一性地识别样品中与其互补的 DNA 序列。DNA 微阵列上的元件密度比常规多孔板上的微孔密度高很多。通常商业用途的 DNA 微阵列上相邻的两个元件之间的距离在 10 微米到 500 微米之间。DNA 微阵列已经迅速成为基因组、蛋白质组和其他相关生物学研究的基础工具(Fodor et al. *Science* 251, 767 (1991), Schena et al. *Science* 270, 467 (1995) and “The Chipping Forecast II” *Nat. Genet.* 32 (2002))。除了科研领域的用途外，DNA 微阵列也可用于临床诊断(Carr et al. *Nat. Oncogene.* 22, 3076 (2003) and “Microarrays in Cancer: Research and Applications” *BioTechniques Supplement* March 2003)。除 DNA 微阵列外，其他各种类型的微阵列，比如多肽微阵列(Gao et al. *Nature Biotechnol.* 20, 922 (2002))，蛋白质微阵列，和组织 (Tissue) 微阵列等也应用于各种研究和诊断中。

微阵列技术从根本上改变了研究生物体系的方法，从原先的一次只能研究一个或几个基因或者分子种类发展到观测大量基因和分子库之间的相互影响的途径、网络和分子机制等。当今的DNA微阵列芯片技术的基础是建立在液相中的DNA或者RNA靶分子与固定在固相基质（平板或者珠子）上的DNA探针（寡核苷酸序列或者cDNA）杂交的基础上⁶。从杂交结果可以分析基因表达水平、DNA序列、DNA突变、检测病原体，以及筛选和衡量配体分子（多肽、蛋白质、抗体和其他有机、无机分子等）活性等多个研究领域。

虽然 DNA 微阵列已经广泛应用于各个领域，但是对于很多应用来说，DNA 微阵列有很多性能及功能还远不够完善。特异性不够高是目前 DNA 微阵列技术的众多局限性的其中之一。这种特异性是由单一配对杂交决定的。杂交特异成度又决定于探针（固定的

DNA) 序列的设计、探针序列的纯度、靶(样品 DNA) 序列的组成, 及杂交的条件。选择杂交探针是非常复杂的, 尤其是用于基因表达水平检测用途, 因为这些样品中含有成千上万个基因。理论上, 短的寡核苷酸探针具备更好的杂交特异性能力, 但是, 由于短寡核苷酸探针的杂交性能较弱, 从而导致灵敏度降低, 更不必说从庞大的基因组中找出特异的短寡核苷酸序列的难度(Shchepinov et al. *Nucleic Acids Res.* 25, 1155 (1997) and Hughes et al. *Nat. Biotechnology*, 19, 342 (2001))。如增加寡核苷酸探针的长度, 检测灵敏度会提高, 但杂交特异性能力则会降低。已有发现当探针长度达到 35 时, 杂交时至少需要 3 对错配才能可靠识别不同的 DNA 靶序列。这个特异性上的局限性导致了使用不同厂家和技术平台生产的芯片得到结果也不同(Kuo et al. *Bioinformatics* 18, 405 (2002))。

目前的 DNA 微阵列不适于定量分析。这很可能成为 DNA 微阵列技术应用于临床诊断的障碍(Dudley et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 7554 (2002))。与实时荧光定量 PCR 数据相比, 微阵列数据明显存在着表达差异(不同样品杂交强度的比值)的压缩。实时 PCR 是基因表达用途中最常用的, 被认为是检测 DNA 微阵列准确性的标准(Chuaqui et al. *Nat. Genet.* 32 Supplement 509 (2002))。根据已发表的数据来看, 当表达差异较高时 70% 左右的微阵列结果与实时 PCR 定性地保持一致, 但当表达差异小于 4 倍时微阵列结果则呈现出与实时 PCR 的非一致性。实验发现, 微阵列和实时 PCR 所得到的数据中存在着明显的数量上的差别(Mangalathu et al. *Journal of Molecular Diagnostics* 3, 26 (2001))。因此, 使用者常常只选择具有高表达差异的基因来进行深入研究。这样会导致遗漏一些重要的基因。因此, 人们迫切需要发展一种可靠、定量的微阵列平台, 从而达到对相对低基因表达差异的样品也可进行高可信度检测。

DNA 微阵列的第三个局限性就是检测灵敏度低。DNA 微阵列中用到的单一配对杂交分析不使用放大, 需要大量的样品。举例来说, 基因表达应用中的多数阵列, 每次分析需要 2 到 5 微克的 RNA 样品。然而, 有些临床上的活组织样品仅能提取不超过 1 微克的总 RNA 样品。对于病原体检测, 如果没有 PCR 扩增, 微阵列试验则不够灵敏(Call et al. *J Microbiol Methods* 53, 235 (2003))。为了提高样品量, 在使用芯片前样品分离的时候, 可以将 DNA 或者 RNA 样品进行扩增(Lockhart et al. *Nature Biotech.* 14, 1675 (1996))。然而, 这种方法可能会改变所含基因的比率。

以上提到的特异性、精确性以及灵敏度的不足都可以通过实时 PCR 得以解决。Higuchi 等人首次提出了实时荧光监控 PCR 扩增过程动力学(Higuchi et al. *Biotechnology* 10, 413 (1992))。这种方法已经发展成为一种有用的工具, 常作为标准, 用于多种应用中的核酸定量检测, 包括基因表达、病原体检测和 SNP(单核苷多态性)检测等。由于检测时间短并容易定量, 这种方法将对环境监测和用于核酸诊断产生很大的影响(Walker, *Science* 296, 557 (2002))。

实时 PCR 的工作原理是基于对 PCR 反应过程中的 PCR 积累产物进行实时检测。有几种检测系统, 其中最著名的也是常用的就是 Taqman 系统(Heid et al. *Genome Res.* 6, 986 (1996))。在检测每条靶序列时都需要一对 PCR 引物和荧光共振能量传递(FRET)探针。FRET 探针是与靶序列互补的短寡核苷酸片断。FRET 探针上含有一个荧光报告基团和一个荧光淬灭基团。扩增过程中使用 Taq 聚合酶。靶序列存在时, 探针从前引物位点开始拟合, 并在 Taq 酶的 5' - 3' 外切活性作用下被降解, 同时引物延伸。酶切作用使报

荧光报告基团和荧光淬灭基团分离，增加了报告荧光基团信号，并且使引物得以延长至模板 DNA 长度。每次循环时都有报告荧光基团从探针中被切割，实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。

实时 PCR 具有很强的特异性。在检测一条靶序列时，序列中需要 3 个分别与探针、正向引物和反向引物互补的片断。由任何一者在配对时产生的错误都很可能被其余两者过滤。例如，前引物引发一条错误的序列从而产生一个错误的扩增产物，那这条错误的 DNA 扩增产物只有很小的可能性被探针识别或被后引物引发扩增。与此相比，目前的 DNA 微阵列只依赖于单对核苷酸杂交配对，而且没有任何内置错误检测机制。即使像 Affymetrix(www.affymetrix.com)采用多探针的方法，其特异性也没有增强，只是数据统计的差异降低了¹⁸。这是由于多探针杂交的结果平均后使得差异减小，每个探针直接与样品序列发生杂交，与其它具有相同靶序列或靶基因的探针的杂交过程没有关系。

实时 PCR 可以进行高灵敏度的定量分析。PCR 是一个对数扩增过程。原理上，PCR 能够对单拷贝的靶序列进行扩增。在日常的 RNA 检测中，实时 PCR 需要纳克级的 RNA 样品，而目前的 DNA 微阵列则需要微克数量级 RNA 样品。而且，实时 PCR 具有定量分析功能，而目前的 DNA 微阵列则无法做到。

大部分 PCR 反应都在 96 或 384 微孔板中进行。样品通过手动或机械臂加入各个微孔中。目前 ABI 公司开始销售一种 384 孔的微型流体卡(www.appliedbiosystems.com)。使用这种微型卡可以减少样品和试剂的消耗，同时也避免了高劳动强度的移液过程。微型卡与传统的 96 或 384 微孔板具有相同的使用面积。然而，微型卡的流体设计以及操作原理从根本上限制了其小型化的程度达到在 DNA 微阵列中已经达到过的空间密度 (U.S. Patent 6,272,939)。

已经有越来越多的研究报道了微型 PCR 设备的发展，包括由硅材料或塑料制成的连续流型和微孔型设备(Kopp et al. *Science* 280, 1046 (1998), Nagai et al. *Anal. Chem.* 73, 1043 (2001), and Yang et al. *Lab on a Chip*, 2, 179 (2002))。一种低耗能、快速热循环的实时 PCR 硅芯片检测系统也见于此类报道(Belgrader et al. *Science*, 284, 449 (1999))。也有在 DNA 微阵列分析中采用 PCR 作为样品制备过程的微型芯片(US Patent 6,448,064)。在美国专利应用版 2001/0055765 A1 中，O'Keefe 等介绍了一种在阵列微孔中可以同时进行多元化学和生化反应的方法。该方法可用于实时 PCR 及其它用途。

为了适用于研究以及其它各种应用，要求微阵列应该能更加灵活地进行各种分子的多元合成，包括核酸和多肽，并且能进行各种快速检测。Gao 等人在美国专利 6,426,184 中提到了将 PGR (光活试剂)、微镜阵列投影仪和微孔板结合使用，得到一种更加灵活和高平行的微阵列合成各类分子的方法。关于该方法的详细介绍请参见参考文献。在 PCT WO 0202227 中，Zhou 介绍了一种具备动态分离机制的流体装置，可使用 PGR 以及改进的工艺进行平行化学合成。详细请参见参考文献。为了在微阵列中进行实时 PCR 以及一些其它生化分析，除了具备灵活的化学合成能力以外，还有必要在微阵列中加入一个固定的静态分离机制。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种能进行多元化学生化反应的微型流体装置。另一个目

的就是建立一种在该微型流体设备中植入化学和生物物质分子的方法。第三个目的是利用该微型流体设备进行多元生化分析。第四个目的就是利用该设备实现平行的化学和生化检测分析，包括实时 PCR、ELISA（酶联免疫吸附分析）和其它分析方法等。

1. 本发明所述一个微流体反应装置包括：

(a) 多个具有一个第一导管和一个第二导管的微室；

(b) 具有一个第一末端的第一传输通道，所述第一传输通道在第一末端处有一个旁路通道，所述第一传输通道通过第一导管与至少一个微室相连；

(c) 具有一个第一末端的第二传输通道，所述第二传输通道在第一末端处有一个旁路通道，所述第二传输通道通过第一导管与至少一个微室相连。

2. 靶核酸链扩增方法包括以下步骤：

(a) 将寡聚核苷连接到微室内固体支持面上，所述寡聚核苷是由一个第一引物、一个第二引物和一个结合探针组成，所述第一引物、第二引物、结合探针及微室内固体支持面相互间被一个可切割的连接片段所分隔；

(b) 将一个靶核酸链与所述寡聚核苷孵育，使互补的靶核酸序列与结合探针相互杂交；

(c) 清洗所述微室；

(d) 在所述微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液，从而使所述第一引物、第二引物及结合探针相互分离并脱离固体支持面，从而在微室内产生一个含有所述第一引物、第二引物、结合探针、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物；

(e) 对所述反应混合物进行两次或两次以上的加热和冷却循环，从而使靶核酸链得以扩增。

3. 在含多个独立微室的微阵列上扩增多个靶核酸链的方法包括以下步骤：

(a) 将一个第一寡聚核苷连接到一个第一微室内固体支持面上，所述寡聚核苷是由一个第一引物、一个第二引物和一个第一结合探针组成，其特征是：所述第一引物、第二引物、第一结合探针及固体支持面相互间被一个可切割的连接片段所分隔；

(b) 将一个第二寡聚核苷连接到一个第二微室内固体支持面上，所述寡聚核苷是由一个第三引物、一个第四引物和一个第二结合探针组成，其特征是：所述第三引物、第四引物、第二结合探针及固体支持面相互间被一个可切割的连接片段所分隔；

(c) 将含两个或两个以上核酸序列的靶核酸链与所述第一及第二寡聚核苷孵育，使互补的靶核酸序列与所述结合探针相互杂交；

(d) 清洗所述第一及第二微室；

(e) 在所述第一及第二微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液，从而使所述第一引物、第二引物、第三引物、第四引物、第一结合探针及第二结合探针相互分离并脱离固体支持面，从而在第一微室内产生一个含有所述第一引物、第二引物、第一结合探针、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物，并在第二微室内产生一个含有所述第三引物、第四引物、第二结合探针、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物；

(f) 对所述第一和第二反应混合物进行两次或两次以上的加热和冷却循环，从而使多个靶核酸链得以扩增。

4. 靶核酸链扩增方法包括以下步骤：

(a) 将一个第一引物、一个第二引物和一个结合探针连接到一个微室内固体支持面上，所述第一引物、第二引物及结合探针当被一个切割物处理时会脱离所述固体支持面；

(b) 将一个靶核酸链与所述结合探针孵育，使互补的靶核酸序列与结合探针相互杂交；

(c) 清洗所述微室；

(d) 在所述微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液，从而使所述第一引物、第二引物及结合探针脱离固体支持面，从而在微室内产生一个含有所述第一引物、第二引物、结合探针、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物；

(e) 对所述反应混合液进行两次或两次以上的加热和冷却循环，从而使靶核酸链得以扩增。

5. 在含多个独立微室的微阵列上扩增多个靶核酸链的方法包括以下步骤：

(a) 将一个第一引物、一个第二引物和一个第一结合探针连接到一个第一微室内固体支持面上，所述第一引物、第二引物及第一结合探针当被一个切割物处理时会脱离所述固体支持面；

(b) 将一个第三引物、一个第四引物和一个第二结合探针连接到一个第二微室内固体支持面上，所述第三引物、第四引物及第二结合探针当被一个切割物处理时会脱离所述固体支持面；

(c) 将含两个或两个以上核酸序列的靶核酸链与所述第一及第二结合探针孵育，使互补的靶核酸序列与所述结合探针相互杂交；

(d) 清洗所述第一及第二微室；

(e) 在所述第一及第二微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液，从而使所述第一引物、第二引物、第三引物、第四引物脱离所述固体支持面，从而在第一微室内产生一个含有所述第一引物、第二引物、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物，并在第二微室内产生一个含有所述第三引物、第四引物、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合物；

(f) 对所述第一和第二反应混合物进行两次或两次以上的加热和冷却循环，从而使多个靶核酸链得以扩增。

6. 靶核酸链扩增方法包括以下步骤：

(a) 在微室的固体支持面上接上一个第一引物、一个第二引物和一个第一结合探针，当用切割物处理时，第一引物、第二引物和就从固体支持面上分离下来；

(b) 靶核酸链与寡聚核苷酸在一定条件下培育后，互补靶序列和结合探针序列相互杂交；

(c) 清洗微室；

(d) 在微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液，因此第一引物、第二引物和结合探针序列就从固体支持面上各自独立的释放下来，微室中就形成了

一个含有第一引物、第二引物、结合探针序列、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合溶液；

(e)对该反应混合液进行两次或两次以上的加热和冷却循环，使靶核酸链得以扩增。

7.靶核酸链扩增方法包括以下步骤：

(a)在微室的固体支持面上合成一个第一引物、一个第二引物和一个结合探针，当用切割物处理时，第一引物、第二引物和就从固体支持面上分离下来；

(b)靶核酸链与寡聚核苷在一定条件下培育后，互补靶序列和结合探针序列相互杂交；

(c)清洗微室；

(d)在微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液，因此第一引物、第二引物和结合探针序列就从固体支持面上各自独立的释放下来，微室中就形成了一个含有第一引物、第二引物、结合探针序列、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的反应混合溶液；

(e)对该反应混合液进行两次或两次以上的加热和冷却循环，使靶核酸链得以扩增。

8.在含多个独立微室的微阵列上扩增大量靶核酸链的方法包括以下步骤：

(a)在第一微室的固体支持面上接上一个第一引物、一个第二引物和一个第一结合探针，当用切割物处理时，第一引物、第二引物和就从固体支持面上分离下来；

(b)在第二微室的固体支持面上接上一个第三引物、一个第四引物和一个第二结合探针组成的，当用切割物处理时，第三引物、第四引物和就从固体支持面上分离下来；

(c)含两个或两个以上核酸序列的靶核苷酸与第一、第二结合探针在一定条件下培育后，互补的靶核酸序列与结合探针序列相互杂交；

(d)清洗微室；

(e)在第一和第二微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液，这样第一引物、第二引物、第三引物、第四引物、第一结合探针和第二结合探针就从固体支持面上各自独立的释放下来，所以第一微室中就形成了一个含有第一引物、第二引物、结合探针序列、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的第一反应混合溶液，而第二微室中形成的是一个含有第三引物、第四引物、第二结合探针序列、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的第二反应混合溶液；

(f)对第一和第二反应混合液进行两次或两次以上的加热和冷却循环，使靶核酸链得以扩增。

9.在含多个独立微室的微阵列上扩增大量靶核酸链的方法包括以下步骤：

(a)在第一微室的固体支持面上合成第一引物、第二引物和第一结合探针序列，当用切割物处理时，第一引物、第二引物和就从固体支持面上分离下来；

(b)在第二微室的固体支持面上接上第三引物、第四引物和第二结合探针序列，当用切割物处理时，第三引物、第四引物和就从固体支持面上分离下来；

(c)含两个或两个以上核酸序列的靶核苷酸与第一、第二结合探针在一定条件下培育后，互补的靶核酸序列与结合探针序列相互杂交；

(d)清洗微室；

(e)在第一和第二微室中加入含有切割物、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的溶液，这样第一引物、第二引物、第三引物、第四引物、第一结合探针和第二结合探针就从固体支持面上各自独立的释放下来，所以第一微室中就形成了一个含有第一引物、第二引物、结合探针序列、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的第一反应混合溶液，而第二微室中形成的是一个含有第三引物、第四引物、第二结合探针序列、靶核酸链、聚合酶、dNTPs 和二价阳离子的第二反应混合溶液；

(f)对第一和第二反应混合液进行两次或两次以上的加热和冷却循环，使靶核酸链得以扩增。

本发明的有益效果是创造新型多功能微阵列，例如多肽微阵列，修饰短寡核苷酸和修饰短核苷酸微阵列，用于高特异性的多元化学和生化反应及检测。

附图说明

以下是本发明相关的图示。参照一个或多个图示和详细的本发明论述，将有助于对本发明更好地理解。

图 1A 是一个微室阵列创视透视图。

图 1B 是图 1A 微室和传输通道中都充满第一流体的创视透视图。

图 1C 是微室内充满第一流体、传输通道中充满第二流体的阵列创视透视图。

图 1D 是图 1A 的微室阵列截面图。

图 2A 是微室阵列透视图，显示本发明的流体旁路。

图 2B 是图 2A 的透视图，显示第二流体的流通过程。

图 3 是微室阵列的创视透视图，显示本发明流体装置的迂回旁路。

图 4A 是一个具有锥形通道的流体装置的示意图。

图 4B 是图 4A 中流体网络的一个阻力网络模式图。

图 5A 是本发明描述的具有边缘旁路的微室阵列创视透视图。

图 5B 是描述图 5A 微室阵列中第二流体的流通过程的示意图。

图 6A 是本发明描述的具有旁路的毛细管阵列透视图。

图 6B 是描述图 6A 毛细管阵列中第二流体的流通过程的截面图。

图 7 显示具有多链段的寡核苷酸表面固定示意图。

图 8 是实时 PCR 检测系统的示意图。

图 9 描述了使用不对称性双链磷酰胺酯正交合成两个引物和一个探针的过程。

图 10 是描述了一个可以在小球粒上进行平行合成的芯片结构。便于图示，仅显示一个含有小球粒的微室。

具体实施方式

“光活试剂前体”(PRP)是指当某一波长的光子照射后能产生一种或几种反应性化学物质的一种化合物。波长范围包括红外、可见光、紫外或者 X 射线。

“光活酸前体”(PGAP)是指当某一波长的光子照射后能产生酸的一种化合物。波长范围包括红外、可见光、紫外或者 X 射线。

“光活酸”(PGA)是指光活酸前体被某波长的光子照射后产生的一种酸。波长范围

包括红外、可见光、紫外或者 X 射线。

“光活试剂”（PGR）是指由光活试剂前体被照射后产生的化合物。在多数情况下，PGR 是某类化学或生化反应中的反应物。然而，这个术语一般泛指光活试剂前体被照射后产生的化合物，不管它是否参与化学或生化反应。

“探针分子”是指将一个配基分子结合其它化学实体上从而形成的一个结合化合物以便于检测。在适宜的化学或物理条件下，如 pH 值、盐浓度和温度等，探针分子会灵敏地和其它具有特异性序列、特异性构造以及其它特异性化学或物理物质等结合。

“体”是指一种液体或者气体物质。

“室”是指由一种或几种材料围成的三维中空结构。室有各种不同的形状，包括圆柱形、立方体、管状、盘状、球形、半球形或者其它规则或者不规则的三维形状。一个室包括一个或者多个出口。

“水溶液”是指一种以水为溶剂的溶液。这种水溶液可含有各种溶质，包括但不限于有机或无机盐、有机或无机酸、有机或无机碱、酶、蛋白质、核酸、表面活性剂以及其它有机或者无机分子等。

“油”是指一种不溶或基本不溶于水的液体。油可以从很多物质中选择，包括全氟化合物、液态氟化石蜡、液态氯化石蜡、液态氯-氟碳氢化合物、碳氢化合物、硅油、矿物油以及液态蜡等。同时，“油”也指不溶或基本不溶于水的液体，其而且通过聚合或者其它合适的化学反应可以转换成固体或者胶体。

“流体结构”是指一个用于操纵流体的结构。一个流体结构包括一个或多个基本部分，包括但不限于各种形状通道、管道、切口、室、导管和洞等等。一个流体结构可以由一种或者几种固体或柔性材料制成，包括但不限于玻璃、塑料、硅等。

“生物分子”是指具有生物重要性的分子，包括但不限于核酸、多肽、蛋白质、抗体、酶和抗生素等。

本发明为进行多元化学和生化反应提供了一个新型的方法和流体结构。图 1A 是本发明中一个微室阵列的分解图。这个装置是由流体模板 110 和与其相连的覆盖板 140 制成的。这个流体装置含有室 120，进口导管 121，出口导管 122 以及传输通道 130。至于本公开装置中各部分的尺寸、材料以及相互之间的关系，以下段落对各个组成部件及操作方法的讲解中将余予详细说明。

图 1B 和图 1C 描述了本公开装置的操作过程。第一步，如图 1B 所示，通入第一流体 150 使其填充微室 120 和传输通道 130。第二步，如图 1C 所示，通入不溶于第一流体的第二流体 160，选择性地取代了通道中第一流体 150，而微室内填充的仍是第一流体 150。因此，第一流体 150 就被分别隔离在微室 120 内。接下来将会解释这种选择性取代的原理以及具体的流体结构。

在一个对本发明的较佳实施中，第一流体 150 和第二流体 160 两者之间既不会发生化学反应也不会互相溶解。一方面，第一流体 150 是水溶液而第二流体 160 是油。水溶液中可能含有多种溶质，包括但不限于有机或无机盐、有机或无机酸、有机或无机碱、酶、蛋白质、核酸、表面活性剂和其它有机或无机分子等。油可以从多种材料中选择，包括但不限于全氟化合物、碳氢化合物、硅油、矿物油和液态蜡等等。从另一个角度来说，第一流体 150 是水溶液而第二流体 160 是气体。从第三角度来说，第一流体 150

是油而第二流体 160 是水溶液。从第四角度来说，第一流体 150 是油而第二流体 160 是气体。从第五角度来说，第一流体 150 是气体而第二流体 160 是水溶液。从第六角度来说，第一流体 150 是气体而第二流体 160 是油。显然，可以有更多的不溶性流体组合能够实现第一流体被分隔在微室 120 内。比如，第一流体 150 可以选择水溶液，而第二流体 160 可以选择汞。

在一个对本发明的较佳实施，微室 120 和传输通道 130 的内表面涂上了不同的亲合剂，如图 1A 所示。例如，当选择微室内的流体为水溶液时，在微室 120 内表面、包括图 1D 中的上表面 127、下表面 126 和侧表面 125 则应涂亲水性膜层，而在传输通道 130 的内表面，包括上表面 137、下表面 136 和侧表面 135 则应该涂疏水性膜层。另一方面，当微室 120 内流体为油时，微室 120 的内表面应该涂疏水性膜层，而传输通道 130 内表面则应该涂亲水性膜层。

图 2A 和图 2B 描述本发明一个典型的流体装置实施的结构和操作。为了看得更清楚，图中展示了装置的流体模板 210 部分，而略去了覆盖板。参考图 2A，当第一流体注入装置中，它沿着流入分布通道 271 形成入流 251，然后形成分流入分流通通道 230 形成分流 252，再分流成微室流 253，通过入流导管 221 流入微室 22，并从出口导管 222 流出，分流在流出通道 232 处合并为支流 254，最后在流出分布通道 272 处合并为出流 255，流出装置。支流 252 中的一部分流经旁路通道 231 而不经任何微室，合并出流 255。在流入分布通道中的第一流体 251 的一个分流，流经旁路通道 233 和流出传输通道 232，成为支流 254 的一部分。一方面，图 2A 中的流体装置的流体结构是对称的，因此可以在不影响流体特征的情况下转换入口和出口使流体反向流，而流体状态不变。在一个对本发明的最佳实施中，旁路通道 231 和 233 的横截面积应明显比微室 220 入口导管 221 的横截面积大。

图 2B 表明了第二流体在本发明装置中的流动路径。假设第一流体 250 是水溶液，并且在第二流体注入前已经充满这个流体装置。进一步假设微室 220 内表面是亲水性的。在这些假设下，第二流体可以是气体或者油，传输通道的内表面是疏水性的。当第二流体注入装置时，在合适的流速下进入流入分布通道 271 形成入流 261。入流 261 的一部分流进流入传输通道 230 形成支流 262，支流 262 流经旁路通道 231 在流出通道 272 处合并到出流 265。入流 261 的另一部分流经旁路通道 233，然后沿着流出传输通道 233 形成支流 264，并在流出通道 272 处合并到出流 265。在这个过程中，第二流体推动各处的第一流体（除了室 220 内）流出装置。其结果是第一流体被分隔在室 220 中。

本发明流体装置的操作原理是以交叉处的横截面改变产生压力屏障变化为基础的。假设室内表面为亲水性，横截面积为 A ，润湿周长为 L ，室内充满水。根据 1983 年 Butterworths 在“Introduction to Colloid and Surface Chemistry”中提出的，

$$p = \frac{\gamma \times L}{A}$$

将空气推入室内的最小压力约为 $\frac{\gamma \times L}{A}$ ，其中 $\gamma = 72.8 \text{ mN/m}$ 是水在水/空气界面的表面张力。

如图 2B 和 2A 中所示，微室 220 的入口导管 221 的润湿周长和流入传输通道 230 的旁路通道 231 的润湿周长分别为 $L_c = 2(W_c + H_c)$ 和 $L_b = 2(W_b + H_b)$ 。 W_c 、 W_b 和 H_c 、 H_b 分别指入口管 221 和旁路通道 231 的宽和高。因此，横截面积分别为 $A_c = W_c \times H_c$ 和 $A_b = W_b \times H_b$ 。假设 $W_c = 28 \mu\text{m}$ ， $H_c = 14 \mu\text{m}$ ， $W_b = 48.5 \mu\text{m}$ ， $H_b = 150 \mu\text{m}$ 。接着

就可以推导出将空气推入口管 221 和旁路通道 231 的最小压力分别为 $P_c=2.26 \text{ psi}$ 和 $P_b=0.57 \text{ psi}$ 。因此, 只要推动空气的压力在 0.57 psi 和 2.26 psi 之间, 就可以将水从旁路通道 231 推出流入传输通道 230, 而不是从入口导管 221 将水从室内推出。我们把这个压力范围定义为操作压力窗。显然, 一个较宽的操作压力窗是有利的。再假设旁路通道 233 和旁路通道 231 的横截面积相同, 那么在相同的压力范围下可以推动空气通过旁路通道 233, 将水推出流出传输通道 232。因此, 空气将从微室 220 的入口和出口处将微室 220 中的水隔离起来。为了便于解释, 以上分析是建立在简化的计算基础之上。更详尽的计算可以在 Man 等人的“Microfabricated capillarity-driven stop valve and sample injector”(1998 年 1 月, 德国海德堡 MEMS 大会, 25-29) 一文中找到。

基于以上提到的原理, 精通应用流体学的人就可以估算操作条件, 而且在使用不同流体时, 可以改变流体结构以达到将流体隔离在室内的目的。同样, 他们也非常熟悉流体流经涂有不同亲合膜层的流体结构的相关计算 (Man et al. in “Microfabricated plastic capillary systems with photodefinable hydrophilic and hydrophobic regions”, at the 1999 Transducers Conference, Sendai, Japan, June. 7-10 1999)。

图 3 所示为本发明的另一种流体装置。该装置采用了蛇型旁路通道 221, 是为了方便调节旁路通道 331 的总长度, 使流过微室 320 的流体 353 和流过旁路通道 331 的流体 356 达到一个合适的比率, 使得流体装置的尺寸最小化。在本发明涉及的流体装置的很多检测应用中, 其一些在之后的章节中将会提到, 需要将流过微室 320 的流量最大化, 或者将流过旁路通道 331 的流量最小化。另一方面, 在前面已经提到过的, 旁路通道 331 需要较大的横截面积以扩大操作压力窗。因此, 当旁路通道 331 的横截面积合适时, 需要增加旁路通道 331 的总长度来减小流过旁路通道 331 的流量。精通流体动力学的人对流体在本发明涉及的流体装置内的流动情况的计算是非常熟悉的。

图 4A 所示为本发明的又一种流体装置实施。这个装置的流体通道设计适于预先设定流体通道和微室 420 的流速分布。例如, 很多应用要求经过所有微室 420 的流体流动都应该是相同的。在图 4A 所示的流体装置中, 微室流体 461, 462, 463, 464, 465 的体积流速是相同或基本相同的。这是因为该装置采用了锥形的流体通道, 如图 4A 中所示。锥形流入分布通道 471 和流出分布通道 472 的设计适于根据预先设定的比率分配流入和流出传输通道 451, 455, 454 和 458 的流体。举例来说, 一个设计方法是 451 流的体积流速等于 458 流的体积流速, 为 454 流体积流速的一半。据此, 传输通道 430, 433, 434 和 437 的形状设计, 可以使得通过所有室 420 的体积流速都相同。

已知流体分布情况, 熟悉流体学的人就可以根据流体动力学计算或者数学建模来设计流体通道的形状。一个简单有效的模型就是电阻网络计算。这个方法适用于稳定状态的层流流动。图 4B 显示了图 4A 中流体装置的一个电阻网络模式图。每个电阻代表流体装置结构的一个部分。例如, 图 4B 中的电阻 RI1-1、RI1-2 到 RI1-8 表示图 4A 中的流入传输通道 430。电阻 RII-9 代表旁路通道 431。RC1-1、RC1-2 和 RCi-j ($i=1, 2, 3; j=1, 2, \dots, 8$) 代表图 4A 中的微室 420。阻力值定义为压力下降和体积流速之间的比率。精通流体动力学的人熟悉流体通过各种流体结构的压降的计算, 如长方形通道、平板和管道等, 而且可以查阅文献, 如 John Wiley 和 Sons 所著的 White “Fluid

Mechanics”第三版(1994)以及其中的参考文献等。已知流体流动条件,例如通过电阻 RC_{i-j} ($i=1, 2, 3; j=1, 2, \dots, 8$) 的体积流速相同,就可以建立一组线性方程。如果未知数的个数比方程要多,则不能得到唯一的解,也就是有多组的流体结构参数可以实现相同的流动条件,比如通过所有微室 420 (见图 4A) 的流速都相同。增加条件,如设定 RI_{3-9} 的值,并使 $RI_{3-9}=R_{02-1}$ 、 $RI_{3-8}=R_{02-2}$ 、 \dots , $RI_{1-9}=2 RI_{3-9}$ 、 $RI_{1-8}=2 RI_{3-8}$ 、 \dots , 就可以得到唯一确定的解,因此就可以确定图 4A 中流入和流出传输通道 430、434、433 和 437 的形状。根据以上所述,对于流自图 4A 得流体便可以确定流体装置的结构去实现预先设定而不是均匀分布的流速。商业化的计算流体动力学软件,如美国新罕布什尔州 Fluent 公司的 FLUENT、阿拉巴马州 CFD 研究机构的 CFD-ACE, 都可模拟流体流动情况,以确定本发明中的流体装置的结构设计。

为了进一步改进实现预先设定流体分布的功能,设计者需将制作过程的变化和特征考虑在内。例如,一个高纵横比的反应离子蚀刻(RIE)过程将产生不同的蚀刻深度,即具有不同的特征尺寸和特征密度(Madou, M., *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization, Second Edition, CRC Press, New York, (2002)*)。因此,由 RIE 过程制成的锥形通道,在通道方向上具有不同的深度。在多数情况下,通道的横截面越小,制成的通道深度就越浅。在一般设计原则中,需要一个反复的过程。在第一轮反复过程中,设计、制作装置,并测定特征尺寸和深度。测量过程可以采用各种工具,如 SEM (扫描电子显微镜)、3D 光学靠模机、台阶测量器,这些都是精通微制作工程的人所熟悉的。测量结果可以作为调整设计的反馈。例如,锥形通道的深度改变可以根据通道的宽度来补偿,实现预设流动分布。

流体装置中实际的流体分布可以采用各种标记追踪和表达等非常成熟的方法进行测定。例如,可以将微型小球悬浮在与其密度相近的液体中,再将液体流过装置中。装置内的流体分布图就可以通过使用配有高速摄像机的显微镜来观察这些小球的运动而得到。流体分布的测量结果可以作为调整设计的反馈。所需的设计-制作-测量的反复次数依据具体的制作方法和测量方法以及具体的容差有所不同。在许多应用中需要均匀流体分布情况,所有微室内的流动速率变化保持在 10% 以内就足够了。在另外一些应用中,20% 的变化也是可以接受的。然而还有其它一些应用中,需要达到 5% 或者更小的速率变化。

图 5A 和 5B 所示为本发明中另一种流体装置的结构和操作方法。该装置主要流体结构包括微室 520、流入传输通道 530、流出传输通道 532 和旁路通道 522。它的旁路通道的排列与图 2A 和 2B 的有所差别。如图 5A 中所示,该装置中每个微室 520 都由旁路通道 523 包围,而图 2A 中的旁路通道 231 和 233 则位于流入和流出传输通道 230 和 232 的末端。然而,这两个装置的操作原理却是相同的。一般来说,旁路通道 523 的横截面积比微室 520 的入口导管 521 的横截面积大得多。

在操作图 5A 中的流体装置时,先将第一流体通过流入分布通道(图中没有显示)注入装置中。第一流体分成支流 552 沿着流入传输通道 530 流动,再分支并沿着旁路通道 523 通过入口导管 521 流入微室 520,然后从出口导管 522 流出微室 520,在流出传输通道 532 处合并为支流 554,最后在流出分布通道(图中没有显示)合并,流出该流体装置。根据图 5B,当第一流体 550 充满装置后,与第一流体 550 互不相溶的第二流

体注入装置中。第二流体分成支流 562, 沿着流入传输通道 530 流动; 然后再分支, 沿着旁路 523 流入, 流出通道 532, 合并到支流 564 中。再如下所述的较佳情况下, 第二流体不流经入口导管 521。首先, 第一流体为水溶液。第二, 微室 520 的内表面为亲水性。第三, 第二流体为气体或者油。第四, 旁路通道 523 的横截面积比入口导管的要大很多。第五, 流入传输通道 630、旁路通道 523 和流出通道 532 的内表面是疏水的。另外, 第二流体的流速非常小, 这样才能保证旁路通道 523 处入口导管 521 和出口通路 523 之间的压降比入口通路 521 入口端横截面的表面张力引起的压力屏障要小。其结果是第一流体 550 被隔离在微室 520 内。在本操作中, 对于第一流体和第二流体的流动方向没有限制。

图 6A 所示为又一种对本发明的较佳实施流体装置结构。它由流体模板 610、侧围栏 644、上围栏 640 和下围栏 642 所组成。流体模板 610 包括大量的毛细管微室 620 和旁路通道 631。在上、下围栏 640 和 642 上分别有入口孔 641 和出口孔 643, 以便流体的流入/流出。该流体装置的操作原理和以上提到的相同。一种情况就是第一流体为水溶液, 第二流体为气体, 毛细管室 620 的内表面是亲水的, 流体模板 610 的上表面 616 和下表面 617 则是疏水的, 旁路通道 631 的横截面积远大于毛细管室 620 的横截面积。如图 6B 所示, 当第一流体 650 充满装置后, 第二流体通过入口孔 641 流入装置中。上间隔 630、旁路通道 631 和下间隔 642 中的第一流体都被第二流体所取代, 使得第一流体 650 被分隔在毛细管室 620 中。

在一个本发明的较佳实施中, 图 1A 中的流体模板 110 可以由硅材料通过光刻、蚀刻和表面涂层等方法制成, 精通微制作技术的人应该熟悉这些制作过程 (Madou, M., *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization, Second Edition*, CRC Press, New York, (1997))。本发明一种情况下, 该装置的流体模板 110 最适合用二氧化硅做表面涂层, 这可以在制作过程中通过氧化或者蒸发来实现。

在另一个本发明的较佳实施中, 流体模板 110 是由塑料制成, 包括但不限于聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚二甲基硅氧烷、聚酰胺、有机玻璃、聚甲醛、环氧树脂、聚偏二氟乙烯和聚四氟乙烯等等。一块塑料的流体模板 110 可由一种或多种工艺过程制成, 例如, 塑造、浮雕、浇铸、激光刻蚀及机械加工等方法及组合方法制成。精通塑料制作过程 (Backer et al. *Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. Electrophoresis* 21, 12-26 (2000) 一文以及其参考文献中都有介绍) 的人应该熟悉这些制作方法。采用塑料原料具有降低成本及简化生产过程的优点。

许多其它材料, 如陶瓷、玻璃、金属, 和两种或者两种材料以上组成的复合材料, 以及相关的制作过程, 例如铸模、浮雕、浇铸和其它合适的方法, 都可以用于流体模板 110 的制作。

图 6A 中所示的毛细管流体模板 610 可以用硅材料采用商业化的机器, 如英国纽波特 Surface Technology Systems 提供的 ASE 蚀刻系统等高比例蚀刻过程制成, 也可以采用湿化学各向异性的蚀刻方法在硅片上制成毛细管流体模板 610。毛细管流体模板 610 也可以用玻璃通过超声波钻刻、激光钻刻和其它合适的微制作过程加工而成。金属材料, 如镍、钛、不锈钢和各类合金, 也可以用于制作毛细管流体模板 610。金属毛细

管流体模板 610 可以通过电铸、光化学蚀刻和其它合适的方法制作。

本发明的一种情况下，图 1A 中的盖板 140 是一块透明平板。当图 1A 中的装置作为多元光化学反应器或者光检测装置时，就要用到透明的盖板 140。如果流体模板是用硅材料制成的，与其结合的盖板 140 则最好采用玻璃材料。硅与玻璃间的结合可以采用阳极压焊工艺。典型的玻璃材料有 Corning7740 (Corning 公司, 纽约康宁, 14831) 和 Borofloat® (Schott 公司, 纽约扬克斯, 10701)。盖板 140 也可以用塑料板制成。塑料盖板 140 可以采用粘合、加热、激光焊接和层压等过程连接到流体模板 110 上。

[0129] 另一种情况下，在盖板 140 上可含有一些图 1A 中没有标出的流体结构。例如，图 1A 中微室 120 可以做在盖板 140 上面。在这种情况下，盖板 140 就变成第二块流体模板，再将盖板 140 和流体模板 110 相连后就组成了一个完整的流体结构。

熟悉表面化学和微制作技术的人可以用他们所熟悉的工艺对微室 120 和通道 130 流体结构内表面进行不同亲合剂膜层的涂层。例如，在使用硅材料时，图 1A 中的硅流体模板 110 先通过氧化过程涂上一层二氧化硅。然后，再涂上一层感光保护膜。在具有深的微结构的表面镀上均匀的感光保护膜可以采用喷雾涂料器，如德国慕尼黑 SUSS MicroTec 的 AltaSpray 涂料器。然后通过光刻法将通道 130 内表面的感光保护膜去掉，保留室 120、入口导管 121、出口导管 122 内表面的感光保护膜。接着把硅模板浸入氟化硅烷的醇溶液中，使通道 130 表面涂上一层疏水膜。然后，感光保护膜用丙酮洗去后，暴露的微室 120、导管 121 和 122 的二氧化硅内表面就带上了亲水性。其它方法，如光化学方法，也可以用于选择性地制作表面亲和性。Srivannavit 等在“Design and fabrication of microwell array chips for a solution-based, photogenerated acid-catalyzed parallel oligonucleotide DNA synthesis” (Sensors and Actuators, Volume 116, Issue 1, 4 October 2004, Pages 150-160) 一文中介绍了选择性涂上疏水膜的方法其它方法。

其它疏水材料以及加工过程也可用于疏水膜的选择性涂层。比如说，一种高疏水性的氟化高分子 Cytop (日本 Asahi Glass 公司) 可以在一块平板上自旋涂层或者在压花面上浸渍涂层。另一种情况，聚对二甲苯可以用气相沉积的方法进行涂层。光刻法可用于高分子膜的选择性蚀刻或者是选择性的去保护过程。精通微制作技术的人应该非常熟悉高分子涂层以及光刻过程。

本发明的另一种情况，氟化物可以通过气相沉积法进行涂层。这个过程可以在 DRIE (deep reactive ion etching) 仪器中进行，用于在本公开流体装置的硅片上制作流体结构。氟碳化合物高分子涂层可以在产生氟利昂的等离子体中进行。氟碳化合物高分子涂层是高疏水的。使用该涂层可以简化本公开流体装置的制作过程，涂层沉积可在完成蚀刻通道后在同一仪器中进行。精通微制作技术的人应该非常了解这个沉积过程以及所使用的仪器。

本发明的又一种情况，疏水膜可以化学合成法制得。举例来说，在本公开的装置(一个完整的装置有一块和流体模板 110 相连的盖板 140，见图 1A) 中采用 PGA (发光酸) 可进行选择性化学合成过程。在美国专利 6,426,184 中，Gao 等对 PGA 过程有详细的描述，见参考文献。在此过程中，先将本装置的整个内表面用胺连接物衍生化，这个连接物上偶联了一个酸不稳定分子，如 boc-甘氨酸。然后用 PGAP (光活酸前体) 充

满整个装置，并使微室处于光照使得微室内表面去保护，而通道内表面仍具有完整的 boc-甘氨酸层。碱不稳定化合物，如 fmoc-甘氨酸和微室内表面的未经保护的甘氨酸偶联。然后使用 TFA（三氟醋酸）将通道表面的 boc 保护基去保护，而微室表面的 fmoc 保护的二甘氨酸则是完整的。然后将一种全氟羧酸，如十七烷氟化壬酸，偶联到通道表面的去保护的甘氨酸上，从而使表面带上疏水性。接下来，可以活化被 fmoc 保护微室表面，从而进行寡核苷酸、多肽和其它合适的生物和化学分子的合成。以上提到的只是一个使用特殊的过程以及化合物的例子。那些精通有机化学的人可以非常容易的对该过程以及化合物的替代物进行修改，而不偏离本公开教的基本方法。

然后就可以将盖板 140 连接到流体模板 110（见图 1A）上得到一个完整的流体装置。阳极压焊可以用于将玻璃盖板连到一个硅流体模板上。如果通道的内表面要求涂层疏水膜，则玻璃盖板上的通道部分需进行选择性的疏水膜涂层。如果疏水膜是由氟化硅烷衍生得到的但曾全氟化合物，则压焊的温度最好低于 400°C，而且压焊过程最好在惰性气体，如氮气、氩气或真空的气氛中进行。如果疏水膜是如 Cytop 或者聚对二甲苯这样的高分子，则最好采用热焊过程。精通微制作技术的人应非常熟悉压焊或者热焊过程。

虽然对流体装置的尺寸没有基本限制，但相邻两个室 120 之间的适宜间距是 1-5,000 μm 。更适宜间距范围为 10-2,000 μm 。更加适宜间距范围为 10-5,000 μm 。甚至更加适宜间距范围为 10-200 μm 。根据本公开装置的应用，微室的适宜数量应多于 10 个。或者可以是多于 100 个、1,000 个，甚至是 30,000 个。

本发明的较佳应用实施是进行多元平行生物分析，包括实时 PCR、杂交、免疫分析、ELISA，以及多肽和蛋白质分析等等。本发明提供了比现有多元平行生物分析技术大大改进的新型装置和方法。

实时 PCR 是分子生物学中一种常见的生物分析方法（C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, P. M. Williams, (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986）。本发明的流体装置可用于实时 PCR 分析。用于实时定量 PCR 分析时，图 1A 盖板 140 应该是透明的。每个微室 120 先固定上一对特异性序列引物。对于一些分析，如 Taqman 实时 PCR，微室 120 中还需要一个探针序列。连接引物和探针的方法将在下文进行介绍。当微室接上引物后，将含有 DNA 或 RNA 的样品、聚合酶、dNTPs（脱氧核糖核酸）和其它必要试剂的样品溶液注入本发明的流体装置中。当样品溶液进入微室后，就可以注入分隔流体将样品溶液分隔在各个单独的微室内。这种分隔流体可以是疏水性液体或者惰性气体。分隔流体阻止了各个室内的分子在下一步的 PCR 反应的热循环过程中发生扩散或者交换。接着，就可以按照常规的实时 PCR 过程进行下面的步骤。

PCR 反应的热循环可以用 Peltier 热电装置，Peltier 热电装置带有的热电偶或热敏传感器可以进行温度测量和反馈控制。带有滤光器、激光或者发光二极管的水银灯或者氙灯可以作为激发荧光染料的光源。光电倍增管和 CCD 可以用于检测荧光。激光扫描仪或者其它相似仪器已经用于采集 DNA 及其它的微阵列的荧光图象，这些仪器也可用于采集从本发明流体装置发出的荧光图象。精通分析仪器和分子生物学的人应该非常熟悉实时 PCR 的仪器以及过程。

图 8 所示是一个包括流体循环、热循环和光学检测的实时 PCR 系统。这个系统是由

一个注入样品/PCR 混合物和分隔流体的流体站 810、一个用于微流体阵列装置 801 热循环的 Peltier 热电加热/冷却单元 820、一个激发微流体阵列装置 801 内荧光染料的过滤发光系统、一个检测从微流体阵列装置中发出的荧光的冷式 CCD 摄影机 838, 和一个计算机控制系统 840 所组成。流体站 810 通过管 811 和 812 将进入微流体阵列装置 801 的流体进行分配和循环。水银灯 831 可用作过滤发光器。光学激发/检测系统包括一个冷凝透镜 832、快门 833、激发过滤器 834、分色镜 835 和发射过滤器 836。精通荧光摄像的人应非常了解如何选择合适的过滤器。例如, SYBR Green I 和 FAM 的激发和检测可以采用中心波长为 475 nm 的通带过滤器作为激发过滤器, 中心波长为 535 nm 的通带过滤器作为发射过滤器。另一种情况下, 也可以使用带有蓝色的 LED 的光学系统来代替水银灯。又一种情况下, 可以使用基于激光-光电倍增管的扫描检测系统。

要将引物和探针连接到微室有很多方法。两种典型的方法是点样和原位合成。采用点样技术, 引物和探针可以与底物表面共价结合, 或者非共价连接到底物表面上。对于非共价结合的引物和探针, 需要采取措施防止 PCR 混合溶液注入微室时将引物和探针分子冲走。一种典型的方法就是将引物和探针和琼脂糖凝胶(超低温凝胶化温度)混合, 这样引物和探针就不会被 PCR 混合溶液冲走, 而且在 PCR 反应加热过程中, 引物和探针就可以溶到溶液体系中。在本发明的一个较佳实施中, 点样方法可用于图 6A 所示的毛细管阵列装置。

对于共价结合的引物和探针, 底物表面最好含有可切割位点, 在 PCR 反应前或者过程中, 就可以将引物和探针从底物表面上切割下来。本发明一种情况下, 可切割位点包括酶可切割位点、化学可切割位点和光化学可切割位点。酶可切割位点包括可以被 RNase A 切割的核苷酸等等。化学可切割位点包括可以被 DTT (DL-二硫苏糖醇) 切割的二硫基。光化学可切割位点则包括 1-(2-硝基苯)-乙基, 其中使用 Glen Research (Virginia, USA) 的 PC 生物素氨基磷酸酯或者 PC 氨基修饰的氨基磷酸酯寡聚成寡核苷酸也还有这个基团。引物具有 3'-OH 末端, 并与底物表面的含有氨基或者生物素基团的 5'末端共价结合。精通采用点样方法制作 DNA 芯片的人应非常熟悉这寡核苷酸与固体表面共价结合过程与化学原理, 而且这个过程也适用于将寡核苷酸连接到本发明的流体装置中(Mark Schena, DNA Microarrays: A Practical Approach, Oxford University Press, 1999)。

在本发明的最佳实施中, 引物和探针是通过原位合成连接到微室的内表面上。寡核苷酸的原位合成最好采用 PGR (光活试剂) 和程序控制的发光过程, 这在 Gao 的美国专利 6,426,184 有讲解, 请参见参考文献。实时 PCR 的一个特殊要求就是每个微室都要接上这 3 个寡核苷酸。这可以通过各种合成方法实现。第一种方法就是将这 3 个片断组合在一个序列中, 而 3 个片断之间由可切割的 rU 和 U 核苷酸所分隔, 见图 7。这个组合序列的长度应在 30 到 200 个核苷酸之间, 最好是 40-120 或者 60-100 个核苷酸。Gao 在“Linkers and co-coupling agents for optimization of oligonucleotide synthesis and purification on solid supports”(美国专利应用版 20030120035) 中介绍了一种优化寡核苷酸合成的方法, 详见参考文献。rU 很容易被 RNase A 所切割。当 RNase A 作用于一个含有两个 DNA 片断、中间用 rU 分隔的寡核苷酸片断时, rU 就被切割从而产生一个含有活性 3'-OH 端的 DNA 片断和另一个含有 5'端为 rU 残基的 DNA 片断。

图 9 表示的是另一种较佳原位合成方法。在该方法中,采用正交合成方法将连接这 3 个寡核苷酸片断接到微室的一个位点上。合成中使用不对称性的双链磷氨酸酯 980(由维吉尼亚 Glen Research 提供),含有一条被保护的酸不稳定的 DMT 支链和一条被保护的碱不稳定的 Fmoc 支链。在一条支链上,双引物-寡 DNA 片断 972 和 974 合成到同一序列中,这两条引物片断的 3' 末端都和 rU 971 和 973 相连。探针 DNA 976 合成到另一条支链上。

[0144] 控制表面合成的表面密度可以优化 PCR 条件。在标准的实时 PCR 过程中,最适引物浓度为 0.1 到 1.0 μM ,而探针的浓度大概为 0.05 μM 。从已知本公开流体装置(如图 1A 所示)的微室深度和 RNase A 切割效率,就可以计算出合适的寡核苷酸表面密度以达到微室内最佳引物浓度。例如,在一个深为 25 μm 的反应微室(注:每个微室含有一个上内表面和下内表面)里,RNaseA 的切割效率为 50%,寡核苷酸表面密度需为 0.025 pmole/mm^2 酶才可以保证室内引物浓度为 1 μM 。要降低寡核苷酸表面密度可以在第一次合成循环中采用一个已知混合比例的普通氨基磷酸酯和“终止”氨基磷酸酯混合物的混合液。“终止”氨基磷酸酯可以从缺乏 5' 反应端氨基磷酸酯中选择(寡核苷酸的合成是从 3' 到 5')。这些氨基磷酸酯包括 UniCop 氨基磷酸酯和 5' -OMe-dT (Glen Research, Virginia, USA)。显然,这种密度控制方法可用于单独控制引物和探针(图 7 和图 9 中的常规或正交合成)的密度,以优化实时 PCR 反应的条件。

本发明包括一种利用流体装置进行新型实时 PCR 分析的方法。这种分析方法是由杂交和 PCR 结合组成,从而实现高灵敏度和高特异性。含有多种核苷酸片断的探针分子被连接或者合成到底物 710 表面,如图 7 所示。在本发明的流体装置中,图 7 中底物 710 的表面即是图 1A 中微室 120 的内表面。一种情况下,探针分子是由 3 个核苷酸片断,包括一个正向引物 772、反向引物 774 和一个结合探针 776。每个探针分子的底部是一个连接片断 770,是连接探针分子和底物 710 的桥梁。以上片断是由可切割位点 771、773 和 775 连成的。前引物 772 和后引物 774 的序列设计可以根据常规实时 PCR 的引物设计原则,如 Bustin 在“Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays” (Journal of Molecular Endocrinology(2000),169-193)中所总结的一样。本发明中,结合探针的 T_m 值约比引物的 T_m 值高 10 $^{\circ}\text{C}$ 。线性片断 770 可以是烷基、聚乙二醇或者其它各种化学连接片断等固相合成和微阵列中常见的连接片断。可切割位点 771、773 和 775 可含有 U 核苷(尿嘧啶核苷)、反 U 核苷(反尿嘧啶)、无硫基团和其它化学基团等,可以被酶、化学试剂、光和其他任何不会对 PCR 反应引起反作用的工具所切割(Gao et al. US Patent Application Publication 20030120035 and the reference therein)

本发明的一种杂交-PCR 分析方法中,引物 772 和 774 以及结合探针 776 在探针分子上由从下游 3' 端定向指向上游 5' 端。探针的 3' 端和固体表面相连。可切割位点 771 和 773 是反 U 核苷,而 775 是 U 核苷。当以上结构的探针分子被 RNase A 作用时,引物 772 和 774 会产生 PCR 活性 3' 端羟基,而结合探针 776 则会产生 PCR 惰性的 3' 磷酸基。在分析过程中,含有单链 DNA 样品序列的溶液先在流体装置中流通,在合适的温度下,样品序列会和与其互补的结合探针 776 发生杂交从而留在室内,而没有特异性的样品序列则流出装置。接着,降低流体装置的温度,选择合适的缓冲液清洗装置,以

带走没有特异性的样品序列，而杂交的样品序列则留在室内。这个清洗步骤进一步加强了该 PCR 分析方法的特异性。然后，注入以 SYBR Green I 双链 DNA 结合染色分析的 PCR 混合物。RNase A 切割可切割位点 771、773 和 775，使引物 772、774 和结合探针 776 进入溶液中。为了避免酶切不完全，在 RNase A 和 PCR 混合物注入装置时，芯片应该保持较低的温度（如 4 °C）。然后，将分隔流体注入芯片中把所有的室分隔开即可进行实时 PCR 反应。杂交过程增加了留在小室内的特异性样品序列，因此分析的灵敏度明显提高。与此同时，非特异性序列被带出小室，所以分析的特异性也明显增强。值得注意的是，在分析过程中，结合探针 776 的 3' 端应该预先保护起来的，避免在 PCR 反应过程中被误认为是 PCR 引物。

当然本公开流体装置可以进行标准的实时 PCR 分析，其中不需要先 PCR 杂交。在实时 PCR 分析过程中，将含有样品序列的 PCR 混合液注入流体装置中。本发明中的流体装置也可以用于等温扩增反应，于传统的 PCR 的热循环系统相比，该过程的加热仪器更加简单。Van Ness 等在 PNAS 100, 4504 (2003) 中描述了这样的一个反应。

[0148] 精通分子生物学的人可以制定一个实时 PCR 装置和相关分析的操作窗口。变量包括探针的密度、结合序列（图 7 和 9）中引物/探针的顺序，以及反应室的几何构造。根据流体装置所使用的材料，可能有必要添加一种试剂或者是复合试剂，如 BSA（牛血清白蛋白）、PEG（聚乙二醇）和 PVP（聚乙烯吡咯烷酮）。

本发明的另一种应用就是包括化学发光和生物发光的平行分析，如 ELISA 和杂交。在这些应用过程中，含有酶（如辣根过氧化物酶）和样品（抗体、蛋白质、DNA 或者 RNA）的溶液先在连有探针（多肽、DNA 或 RNA）的微流体阵列装置中进行流通。然后注入含有鲁米诺、过氧化氢和增强因子的底物溶液。通入氮气，将各个反应室隔离。接着用冷式 CCD 摄影机或带有光电倍增管的测量工具采集化学发光信号。将各个反应室隔离阻止了在化学发光反应过程中底物的扩散。

本发明的又一种应用就是多元化学反应和合成。由于引入了新型简便的分离装置，本发明改进了之前的技术，如 Zhou 在“Fluidic Methods and Devices for Parallel Chemical Reactions” PCT WO 0202227 中提到的。其中一方面，溶液中含有发光物质，并且产用了预设的发光光照模式，使很多反应室 220（图 2A）中可同时进行化学反应。这种使用发光物质的方法和设备在 Gao 的“Method and Apparatus for Chemical and Biochemical Reactions Using Photo-Generated Reagents” US 6,426,184 中有提到。该方法的一个重点就是将活性发光物质隔离在反应微室 220（图 2A）内，从而防止一个光照反应微室内的活性物质通过扩散进入相邻的其它反应微室内。采用旁路通道可以使反应液隔离在各个反应室内。举例来说，首先将含有光活试剂前体的溶液注入本发明流体装置（如图 2A 所示）中。然后通入一种惰性气体（如氦气），将分布、传输和旁路通道 271、272、230、231、232 和 233 中的溶液推出装置，从而将溶液分别隔离在各个反应微室 220 中。然后，将一部分的反应微室进行光照，这些反应微室 220 中就会产生活性物质。反应足够长时间后，即可将清洗溶液通入装置，冲走活性物质。这种新的分离机制对要求在光照产生活性发光物质后还需延长反应时间的应用特别有用。本发明的这种流体装置适用于多种化学和生化分子的微阵列，如 DNA、RNA、多肽、碳氢化合物和这些物质的组合等等。

本发明的另一个优点就是易于清除泡沫和微粒。在大多数应用中，旁路通道 231 和 232 的横截面积明显大于入口管 221 和出口管 222，见图 2。因此，旁路通道更易于微粒和泡沫流出装置。

本发明中另一种情况，覆盖板 140 是一块不透明或者半透明的平板。因此选择图 1A 中的阵列装置作为多元反应器进行非光化学反应和非光学检测时，光就无法透过覆盖板 140。一种典型的非光化学反应就电化学反应，Montgomery 在美国专利 No. 6, 444, 111 中提到过。精通电化学的人可以在阵列的室内加入电极用于多元合成反应。一种典型的非光学检测分析就是基于电子传递的核酸检测，在 Meade 等的美国专利 No. 6, 013, 459 及其参考文献中介绍过。阵列室内加入电极后，就可以进行多元的核酸和其它分子检测。

本发明的另一个变种就是采用微孔板进行杂交-PCR 分析。一个微孔板上有大量的微孔，直径和深度在 1-500 微米范围内。微孔板可以用玻璃、硅、塑料和其它合适的材料制成。精通微制作的人对这样的微孔板制作非常熟悉。微孔板可以用围栏装配形成一个带有入口和出口的流体装置，可以注入流体进行流通。在 Leproust 等的“Digital light-directed synthesis. A microarray platform that permits rapid reaction optimization on a combinatorial basis” (J. Comb.Chem. 2, 349-354(2000))中提到了一个典型的玻璃微孔板的制作和用法。用于实时 PCR 时，微孔的底部连有含引物和结合探针的探针分子。一般情况下，这些微孔的内表面是亲水的，而外表面是疏水的。举例来说，含有单链 DNA 样品序列的溶液先在流体装置中流通，在合适的温度下，样品序列会和与其互补的结合探针 776 发生杂交并留在微孔内，而没有特异性的样品序列则不会留在微孔内。接着，降低流体装置的温度，用合适的缓冲液进行清洗步骤，带走没有特异性的样品序列，而杂交的样品序列仍留在微孔内。然后，注入以 SYBR Green I 双链 DNA 结合染色分析的 PCR 混合物。和前面提到过的一样，PCR 混合物含有 RNase A 或其它合适的切割物质。为了避免酶切不完全，在 RNase A 和 PCR 混合物注入装置时，芯片应该保持较低的温度（如 40°C）。然后通入分隔流体，例如油，将各个微孔隔离后即可进行实时 PCR 反应。

另一种形式的微孔板的分离机制也有所不同。每个微孔的边缘是突出的。这些微孔可以用高弹性的薄片或者与微孔吻合的涂有粘合剂的薄层进行密封或者隔离。这些突起的边缘有助于密封。根据 PCR 过程的温度，选择化学惰性的、弱荧光的薄片和薄层材料。

本发明中还在流体装置中添加了珠子，明显提高了平行合成的合成能力。一般情况下，这些珠子是由高负荷材料制成，包括部分交联和职能化的聚苯乙烯珠子、交联聚苯乙烯-PEG 共聚物珠子、CPG 和其它多种固相合成中常用和特殊的树脂材料。通常情况下，这些珠子都是球形的，而且尺寸分布范围窄。我们采用的是一种除反应室结构外其它部分都与图 2A 中相似的流体装置。一种情况下，反应室的出口处都设有一个栅栏防止珠子流出，而流体可以流过。旁路通道必须足够宽，以防传输通道被珠子堵塞。在装入反应室前，这些珠子悬浮在与其密度相同的液体中（排除珠子内的空隙）。然后，珠子悬浮液流入装置，直到所有的反应室都装有珠子。使用装有珠子的流体装置用于化学合成的过程与前面提到的常规装置的过程是类似的。

图 10 所示的是一种典型的装有珠子的芯片结构。为了便于说明，图中所示为 1 维阵列。标准芯片是 2 维阵列，在 1 维阵列的 y 轴方向重复 1 维阵列即可得到。在操作过

程中, 流体通过主流入通道 1071 进入芯片, 然后沿着各个分流入通道 1030 形成很多支流 (2 维阵列装置中有很多流入分支通道), 再分流进入各个反应微室 1020 内, 然后在分流通道 1032 中合并, 最后所有支流在主流出通道 1072 合并流出芯片。一部分流体经过流入或流出旁路通道 1031 和 1033 道从主流出通道 1072 流出, 而没有流经反应微室 1020 或分流入通道 1030。旁路通道 1031 和 1033 的作用将在下文进行介绍。这个芯片设计过程主要考虑流体流动分布、合成能力、珠子装填装置、化学和光化学反应效率、装置制作和生产成本等。

另一种情况, 我们采用了锥形的流体通道 1030 和 1032, 使流过各个反应微室 1020 的流动都相同。通道 1030 和 1032 形状的设计可以由电阻网络的数学建模推出。在大多操作条件下, 装置中的流体是层流流动, 经过通道和反应室的流动阻力可以用流体力学方程计算得出。(White, F. M. "Fluid Mechanics", 3rd ed. John Wiley and Sons, (1994))。

装置的合成能力是由反应室内的珠子的量和容量决定的。珠子的尺寸可以在 5 到 100 μm 范围内, 或者是 7-75 μm 和 10-50 μm 的范围内。一般情况下, 每个反应室内的珠子数量应相对较少。例如, 假设每步合成反应的产物得率为 99%、每粒珠子的负荷容量为 1.0 pmol, 则当每个反应室内装填 20-25 粒直径为 20 μm 的珠子时就可以生产 10 pmol 的 60 个核苷长的寡核苷酸。

由于每个反应微室内只能装有限数量的珠子, 因此我们希望改变珠子的装填密度和由于反应室内装有珠子而引起的流动阻力。我们通过在每个反应微室的上下表面开凹槽, 从而减小这些改变对流速分布的影响。反应微室 1020 下表面的凹槽如图 10 所示。这些凹槽能为流过珠子和反应室的流体提供一个固定的流动路径。每个反应室的阻力之和是由装填的珠子和微型凹槽的并联“电阻”所决定的。当凹槽的阻力足够小时, 装填珠子的阻力变化对整个反应室阻力影响就非常小。同时, 这些凹槽也能防止堵塞。凹槽的功能远不止于降低流动阻力, 它们还能为流向珠子的试剂提供一条临界传输途径。这些凹槽为反应室里的珠子提供了微反应条件, 就像常用于固相反应的浮动床反应器内的情况一样。最终评价整个芯片内反应条件一致性的标准就是每个反应室的寡核苷酸产物在质量和数量上的一致性。

为了确保在合成反应过程中珠子 1080 稳定地留在反应室 1020 内, 可以采取几种措施。初步结果表明, 栅栏 1024 能有效地阻止珠子 1080 沿着流体流动方向向前流动。还需要做的是阻止珠子 1080 反方向流出反应室 1020。因此, 首先保证在合成反应过程中有一股向前的流体流动, 这样就不存在推动珠子 1080 反方向流动的力。其次, 当珠子 1080 装进反应室 1020 后, 需对芯片进行一次彻底清洗, 以冲走反应室 1020 入口处松散的珠子 1080。然后, 在反应室 1020 入口处添加一道微型门 1023, 珠子 1080 可以自由进入而不能流出。如图 8 中所示的这种微型门结构, 就是一个圆柱状小棒, 缩小了反应室 1020 的入口。在实际的装置中, 其它形状的物体, 如人形结构, 能更有效阻止珠子流出。

微流体珠子芯片的另一个重要的流体结构就是旁路通道 1031 和 1033, 如图 10 所示。在装填珠子的过程中, 珠子悬浮液在芯片里流通, 一些珠子从分流入通道流入反应室、并在反应室 1020 内累积, 其它珠子则通过旁路通道 1031 流出芯片。直到所有反应室 1020 内都装有足够的珠子时停止。旁路通道 1031 的横截面积比珠子 1080 大, 避免

造成堵塞或者珠子在分通道 1030 上的累积。装珠子时，用不到旁路流出通道 1033。但是，它能调整流体的流动分布。例如，在合成反应时，应尽快将 PGA 冲出分流出通道，而足够多的流经旁路流出通道 1033 的流体能提高分流出通道 1032 里流体的流速。虽然图 10 中描述的旁路通道 1031 和 1033 是直的，但在实际的芯片中也可能用到蛇型旁路通道，这样可以增加旁路通道的长度从而降低通道里的流动，保证珠子流过所需的横截面积。

实例 1

微室的分离

一个微流体阵列装置是由一张厚为 500 μm 的硅片作为模板和一张厚为 500 μm 的玻璃片作为盖板而构成的。流体结构和图 2A 中所示的相似。结构中包括 $20 \times 6 = 120$ 个直径为 100 μm 、深 15 μm 的圆形微室。流入和流出导管长 40 μm 、宽 12 μm 、深 15 μm 。7 个锥形的传输通道长 2,400 μm 、深 150 μm ，锥形的宽度由 75 μm 缩小到 72 μm 。旁路通道宽 39 μm 、深 150 μm 、长 310 μm 。该流体结构是由 DRIE (Surface Technology Systems plc, Newport, UK) 蚀刻而成的。微室内表面的硅片面和覆盖板的玻璃面上都涂了一层二氧化硅。通道内表面的硅片面和玻璃面上采用 0.5% 的 (十七烷氟-1,1,2,2-四氢癸基) 三乙氧基硅烷(Gelest, Morrisville, Pennsylvania, USA)的正己烷溶液涂上单层的全氟化碳。玻璃覆盖板和硅片是由阳焊(EV Group, Schärding, Austria)连接起来的。这个装置的硅片上还带有一个直径为 500 μm 进口和出口，用于流体的注射和循环。

0.2% 的荧光溶液通过微型蠕动泵(Instech Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, Pennsylvania, USA)注入到以上的装置中。装置的荧光图像可以用冷式 CCD 摄影机拍摄(Apogee Instruments, Inc., Auburn, California, USA)。这个荧光图像显示出了整个装置的容量，包括填充有荧光溶液的微室和通道。然后注入全氟萘烷(Aldrich, Wisconsin, USA)可以得到另一个荧光图像。这个图像可以显示装置的通道内的荧光溶液都被全氟萘烷所取代，而所有的微室内填充的仍然是荧光溶液。

实例 2

用 RNase A 切割引物的 PCR 过程

PCR 反应是在一个 25 μL 的 MJ Research PTC-225 Peltier 热循环仪中进行的。PCR 反应中使用 JumpStart Taq 聚合酶和缓冲液(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)。缓冲液中添加了 200 μM dNTP、2.5 mM MgCl_2 (二价阳离子) 和 0.05% 的 BSA。1 pg 的链长为 78 个碱基的 DNA 作为模板，其序列如下所示。

#4126

GCATAGGATCCGCGATGAGCGATCGCATGACAACGAGCTAAGTCCAGCGATC
GCAGCTGGTTTTTTGAATTCATGCGT

复合引物含有两个 rU 位点，序列如下所示。使用浓度为 2 μM 。

#4148

ACCACGAGCATAGGATCCG(rU)CTCGTCCGACGCATGAATTC(rU)TTTTTTTTTT

所有 PCR 管中都加入以上物质。

温度程序为：94°C 维持 60 sec, 35 \times (94°C 维持 30 sec, 55°C 维持 30 sec, 72°C 维持 60 sec), 72°C 维持 60 sec, 保持在 4°C。

在管 1 中加入 0.1 mg/mL RNase A。作为对照，管 2 中不加 RNase A。

PCR 产物的分析采用高分辨率的琼脂糖凝胶。凝胶结果发现管 1 中含有一条 90 nt 的产物条带，而管 2 则没有这个产物条带。另外，在加入一对序列与复合引物中两个引物片段序列相同的常规引物的正对照管中也发现了一条和管 1 中差不多的产物条带。

以上叙述中提到的所有文献和专利都列在参考文献中。精通这些技术的人都知道，在不脱离本发明的范围和宗旨的条件下，对本发明中提到的方法和系统可以进行各种修改和变化。虽然本发明在特殊的例子中已经描述过，但是应当清楚本发明绝不仅仅局限于这些特殊的例子。确实，精通分子生物学、遗传学、化学或相关领域的人显然明白本发明的执行方式可以有各种不同的修改，以下的权力声明中就包括了这些修改。

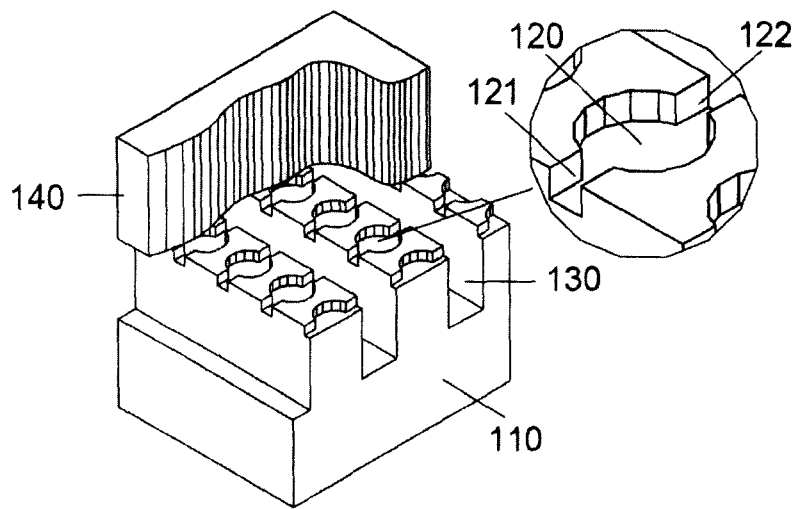


图 1A

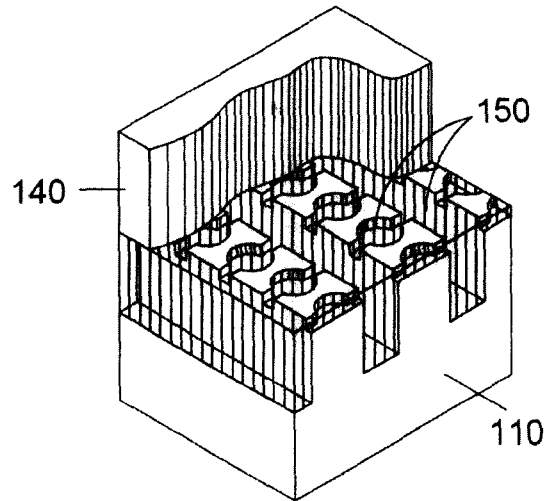


图 1B

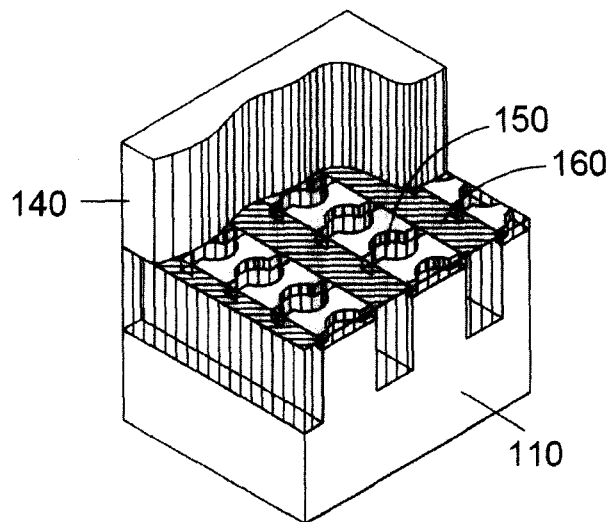


图 1C

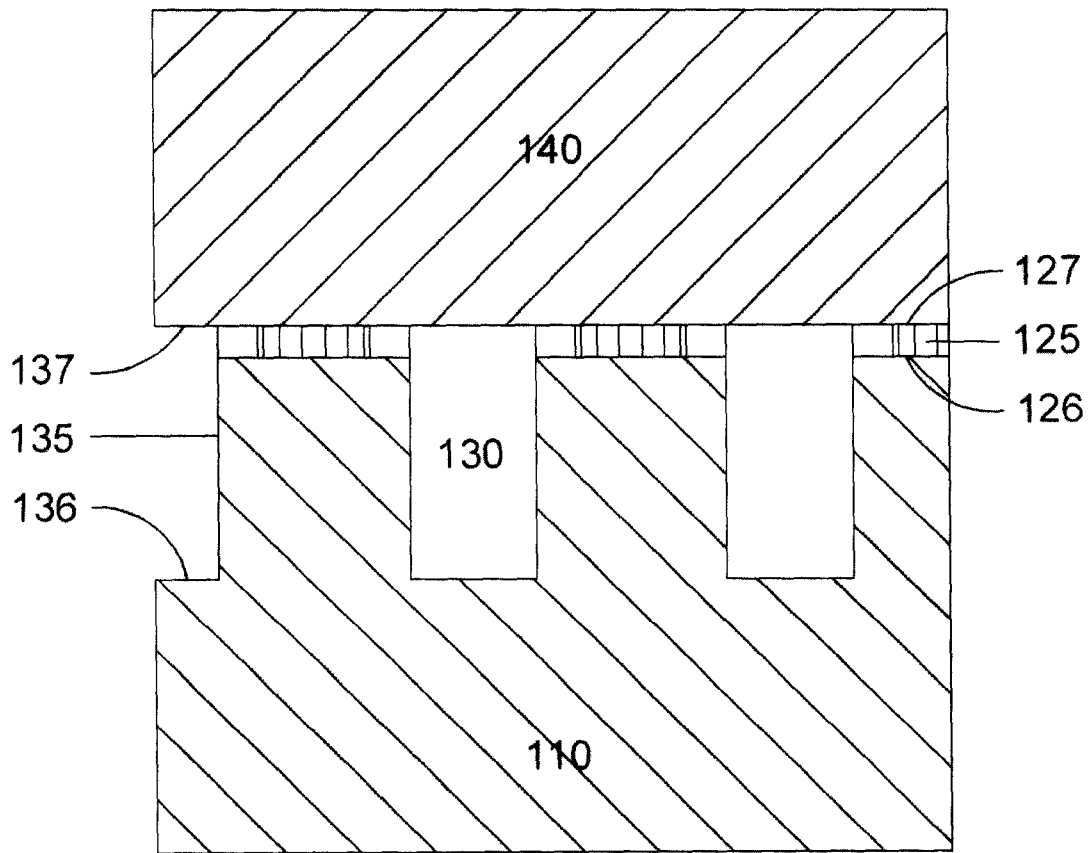


图 1D

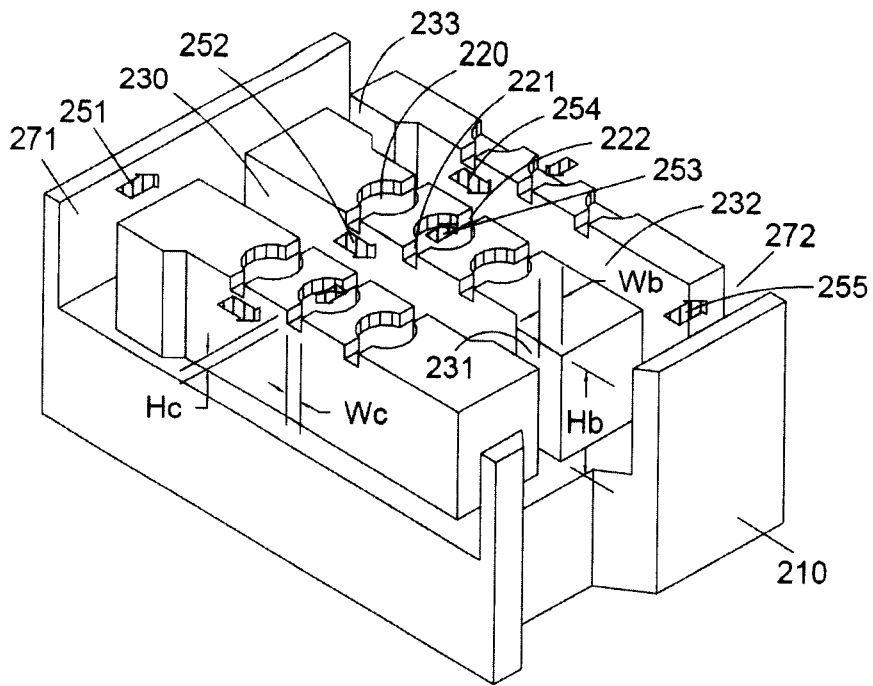


图 2A

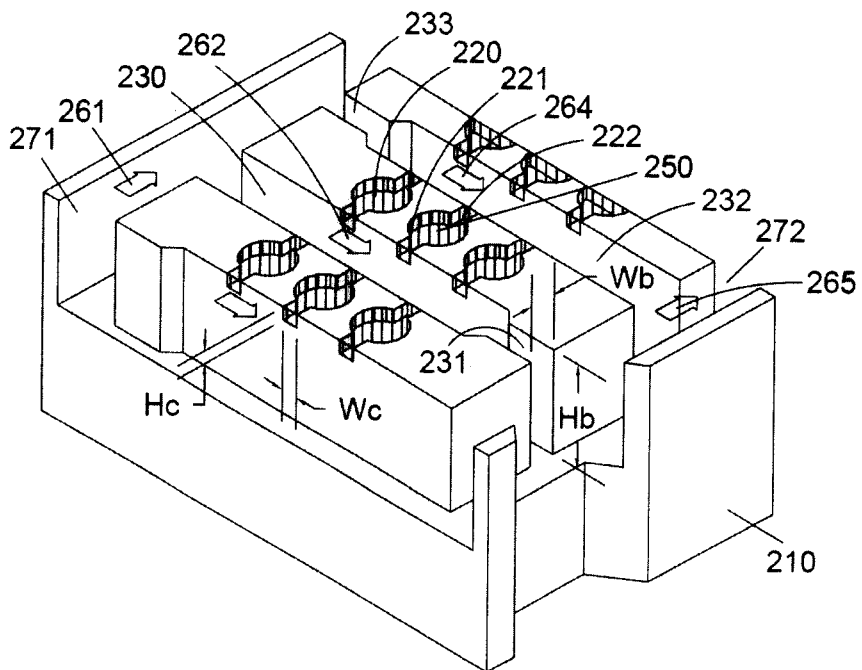


图 2B

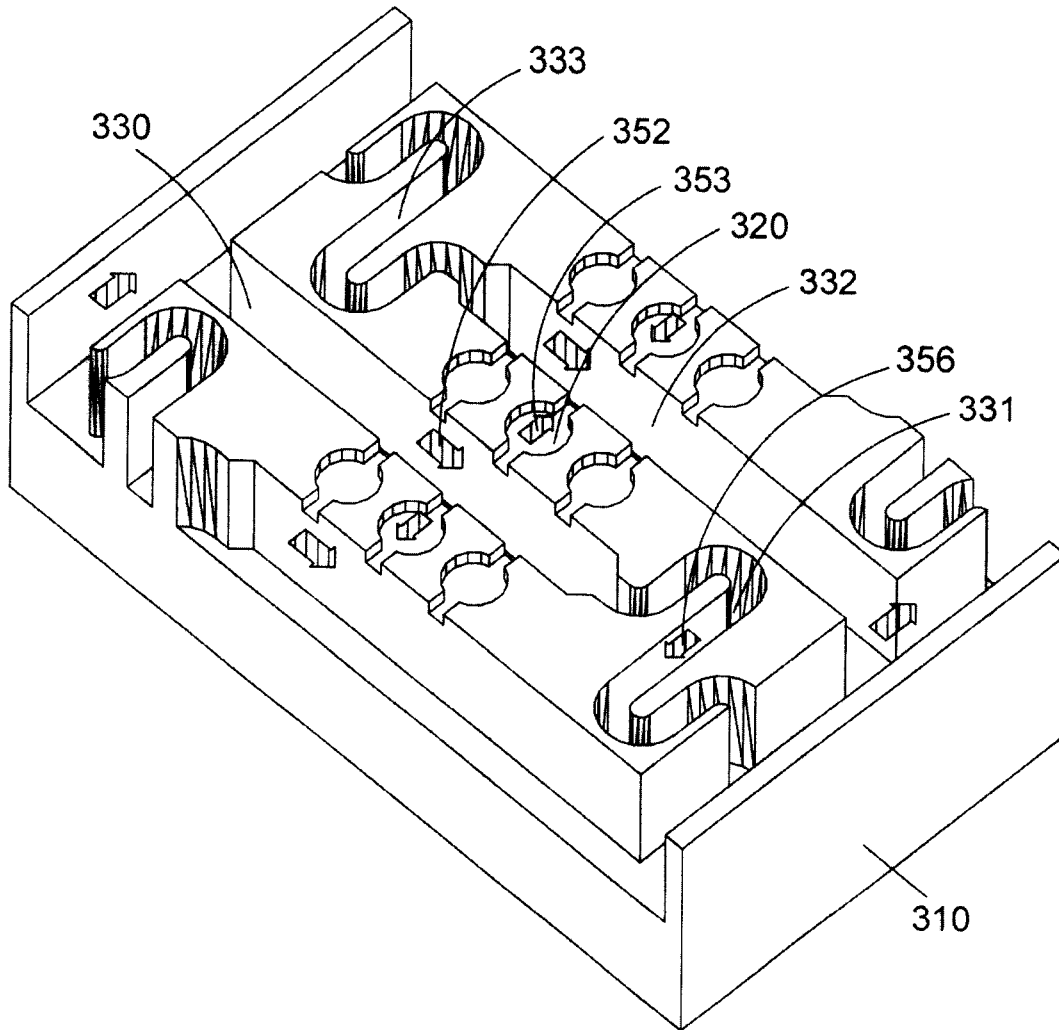


图 3

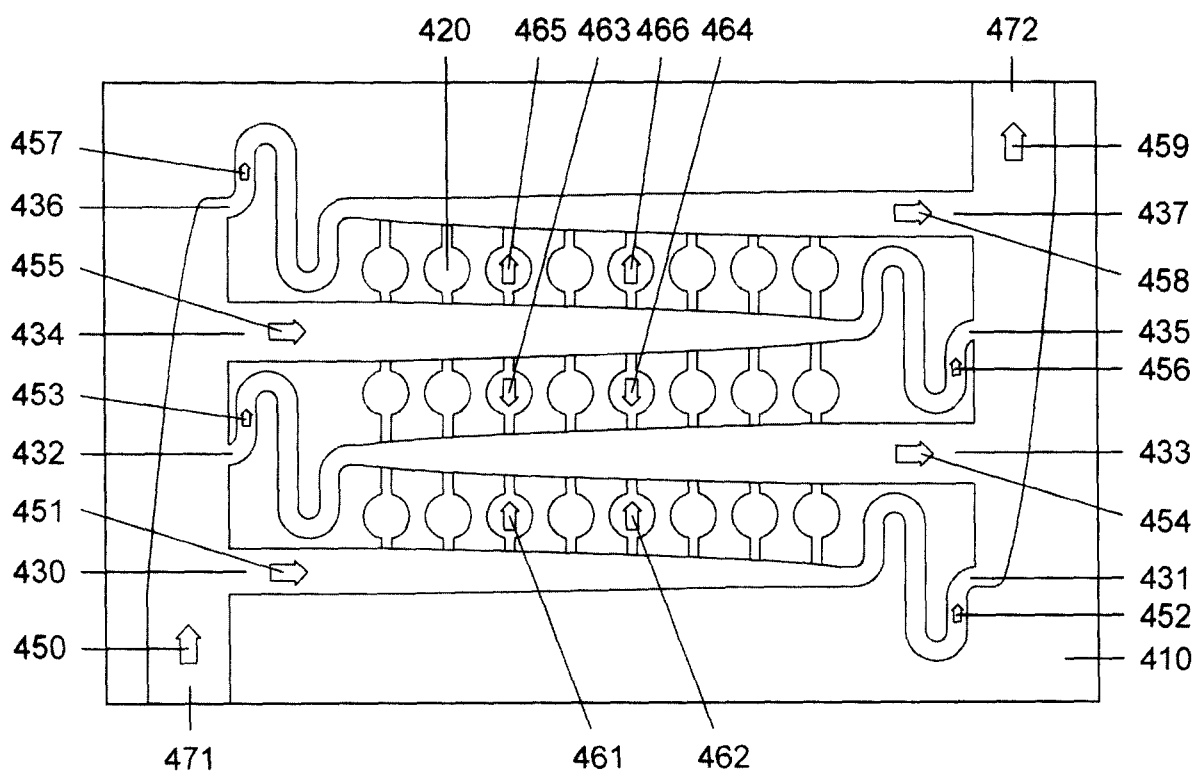


图 4A

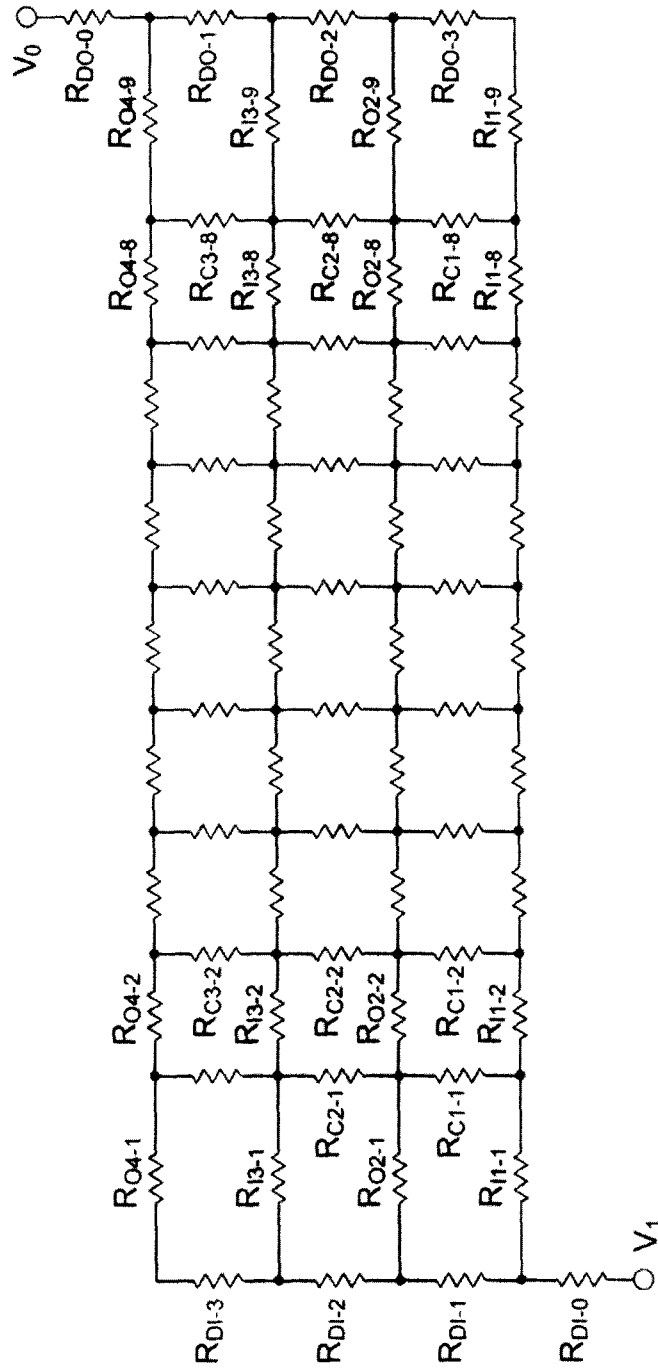


图 4B

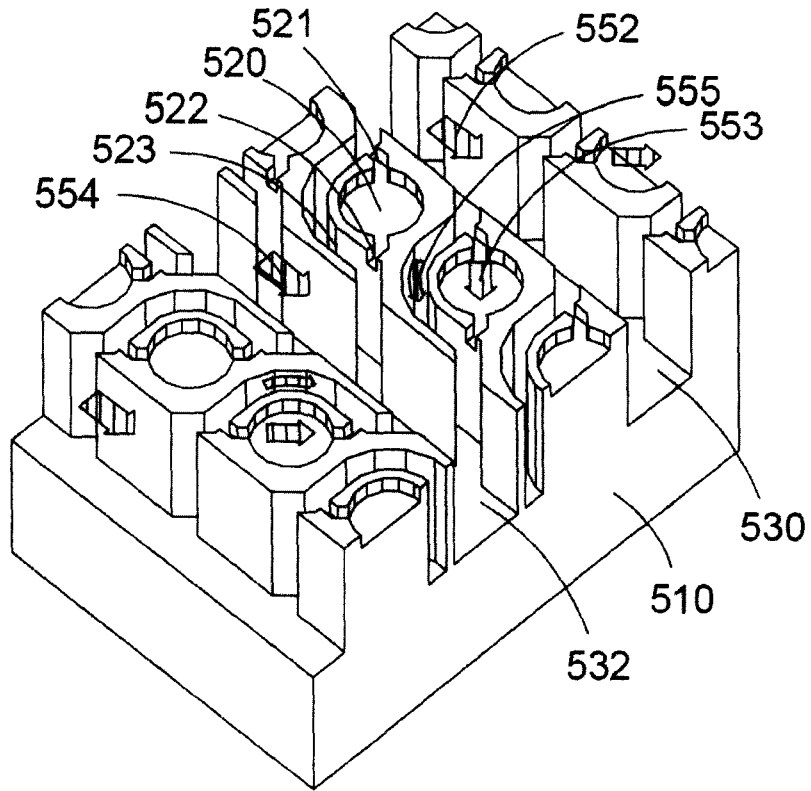


图 5A

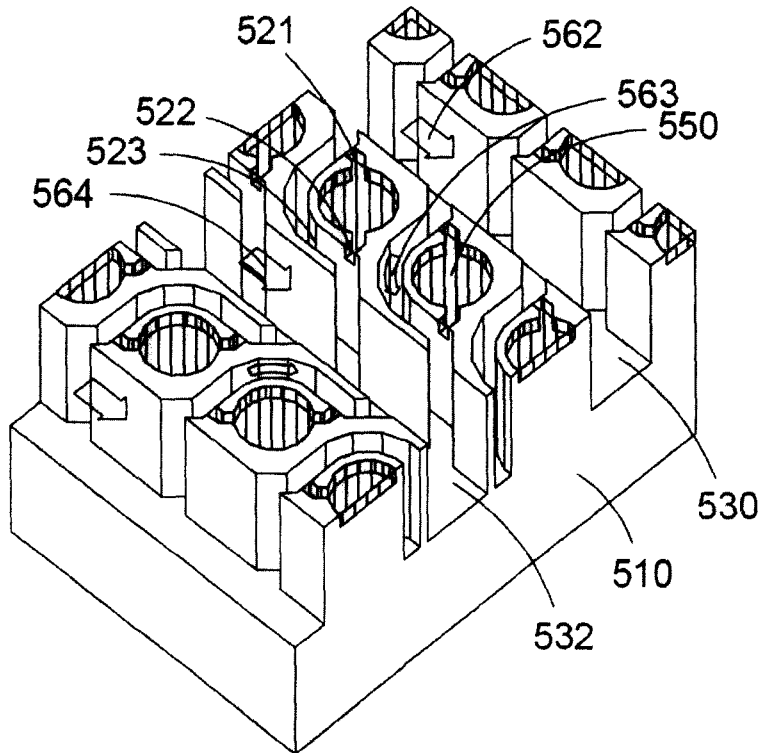


图 5B

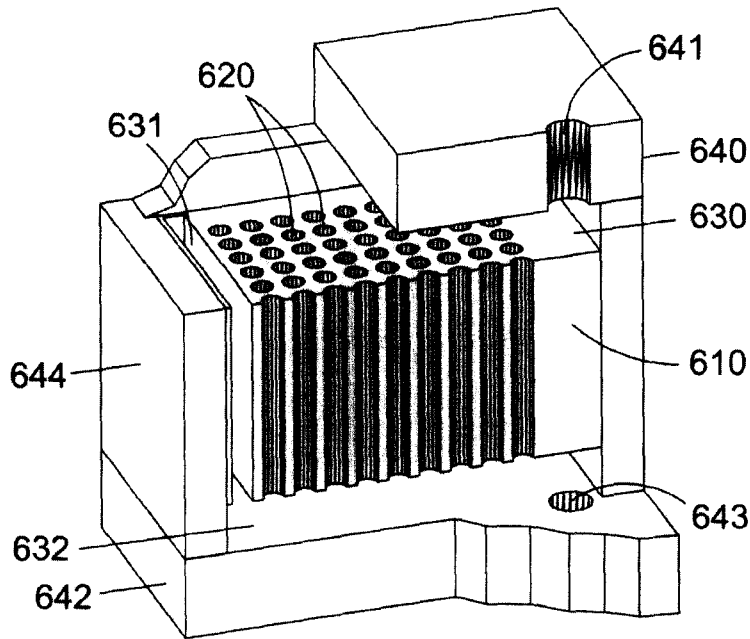


图 6A

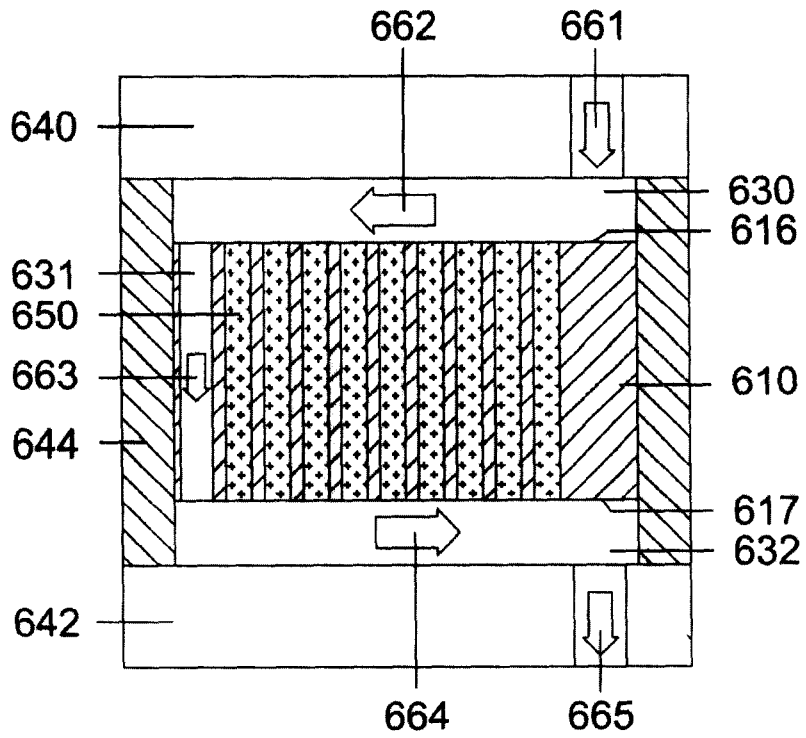


图 6B

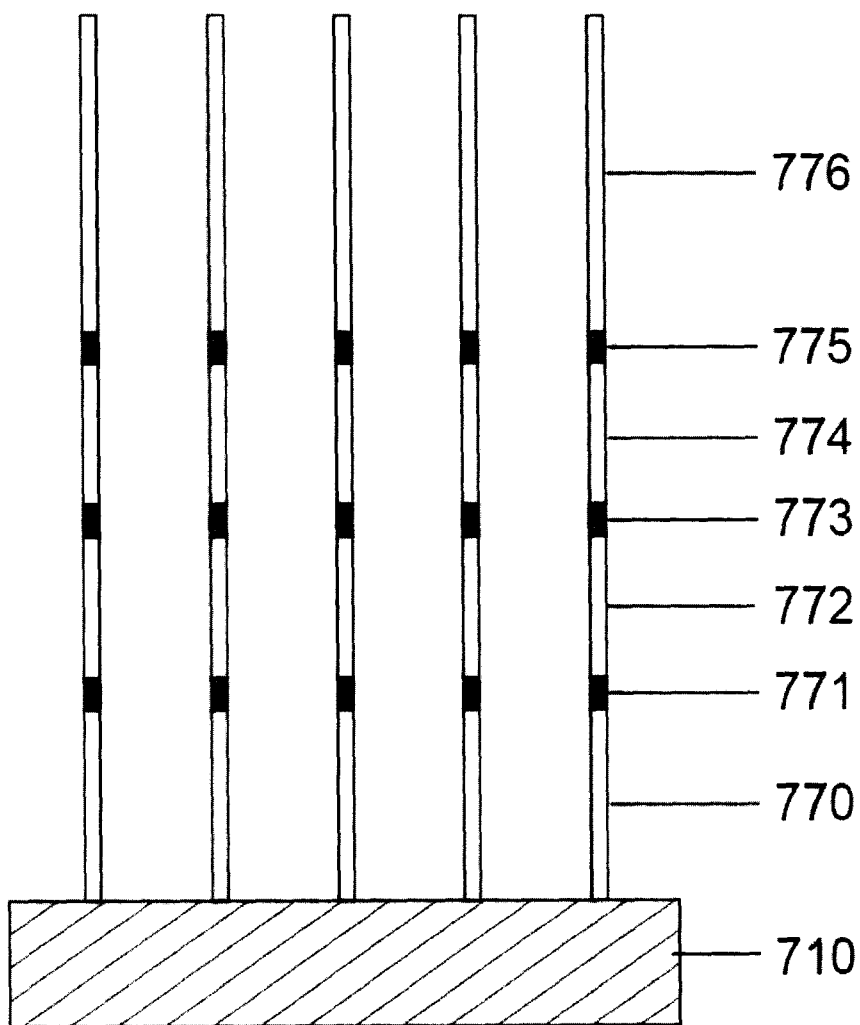


图 7

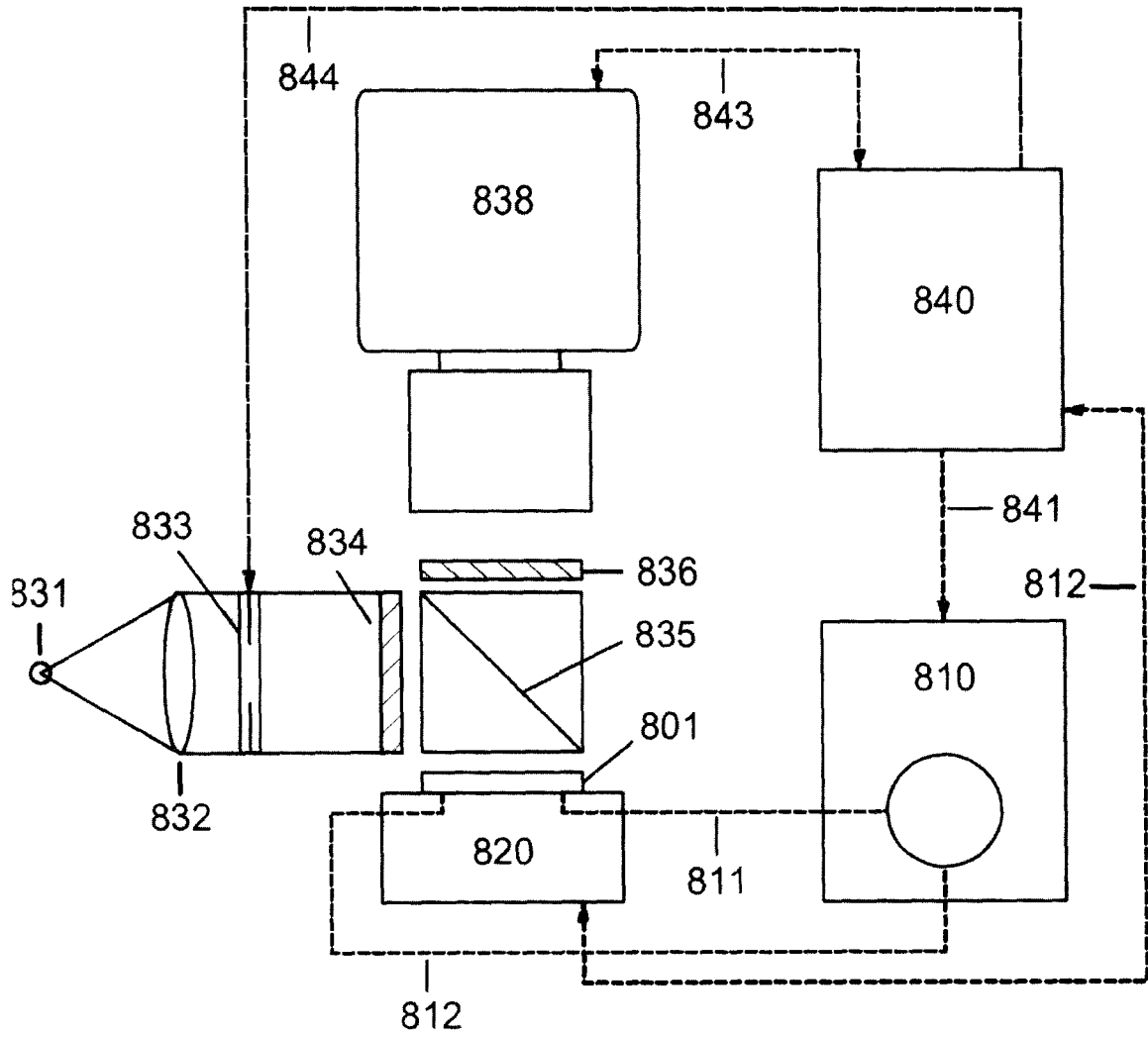


图 8

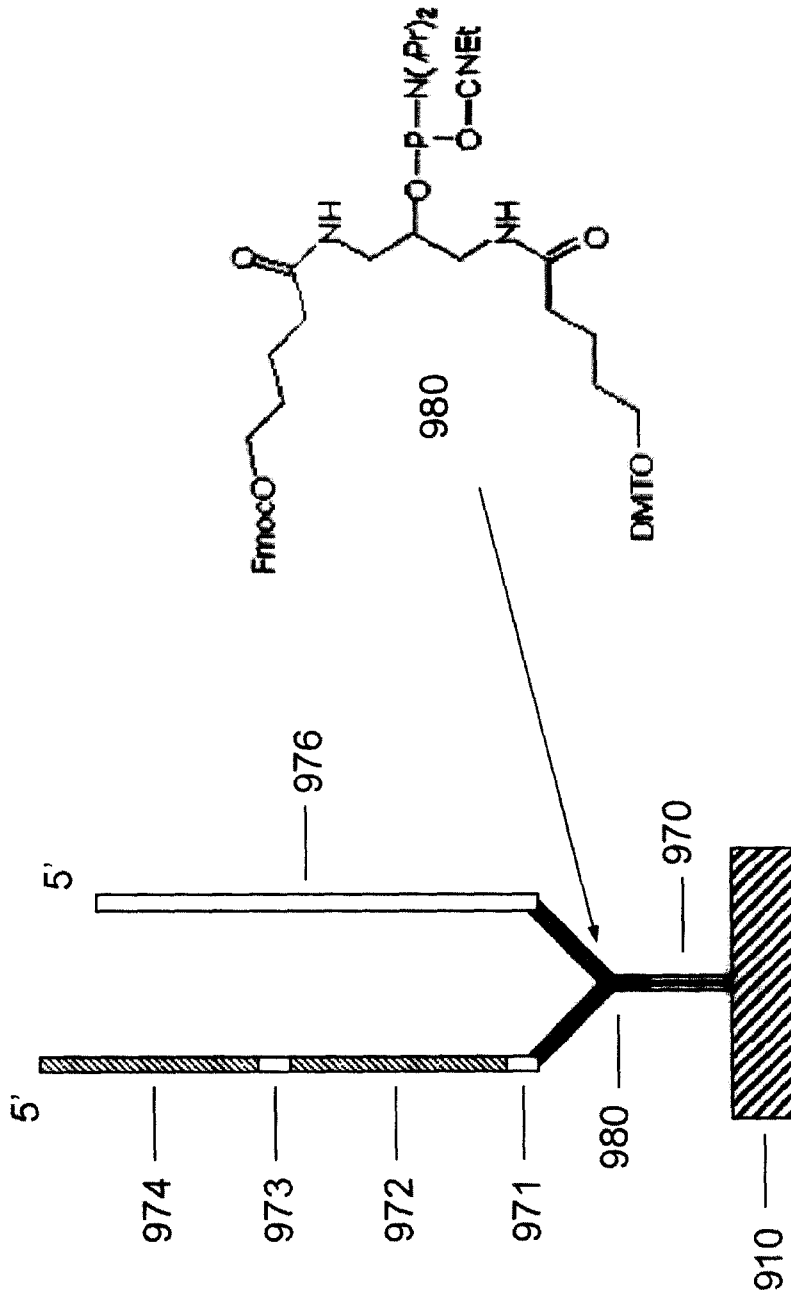


图 9

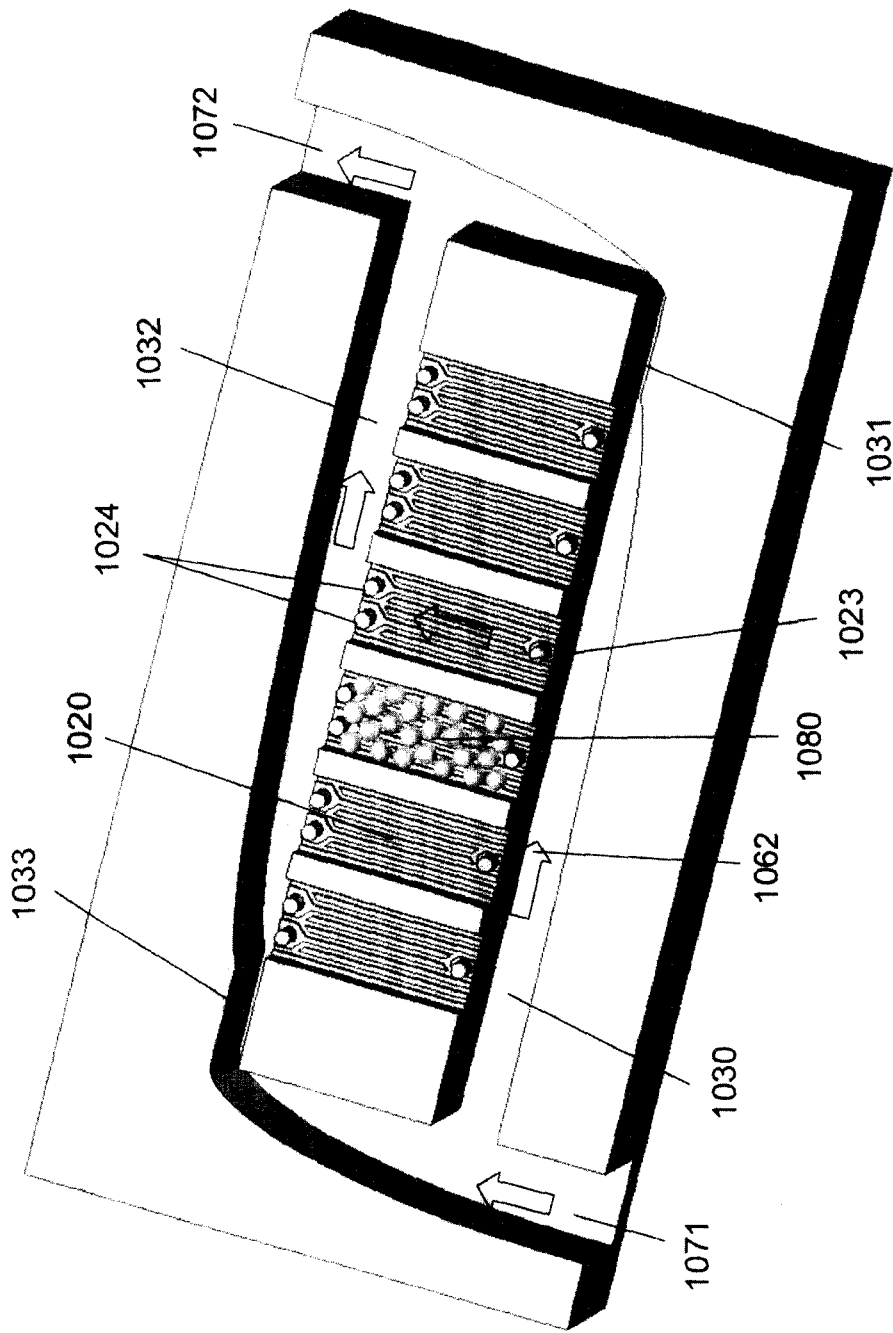


图 10