



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106795473 A

(43)申请公布日 2017. 05. 31

(21)申请号 201580023975.9

A·寇博 J·L·凯

(22)申请日 2015.06.11

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

(30)优先权数据

62/010,915 2014.06.11 US

代理人 张小勇

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.11.08

(51)Int. Cl.

C12M 1/34(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/035419 2015.06.11

G01N 35/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/191916 EN 2015.12.17

(71)申请人 精密公司

地址 美国华盛顿

(72)发明人 D·霍夫曼 A·博格达尔

M·库驰 R·瑞柏拉

M·S·布拉德 A·K·洛夫奎斯特

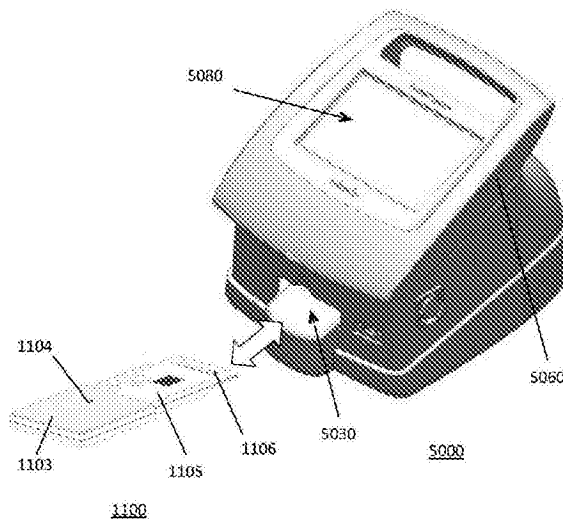
权利要求书4页 说明书31页 附图16页

(54)发明名称

用于核酸分析的具有集成的测定对照的微流体盒及设备

(57)摘要

本发明公开了微量测定测试系统,包括用于液体样品中的荧光测定的微流体盒和紧凑型微处理器控制的仪器,所述测试盒已经集成的过程对照以及阳性和阴性测定对照。该仪器具有包括多个光学通道的扫描检测器头。在优选的配置中,使用用于监测与靶分析物相关联的第一荧光团和与过程对照相关联的第二荧光团的双通道光学器件来验证测定。集成的阳性和阴性测定对照提供增强的测定验证能力并促进测试结果的分析。应用包括基于靶核酸的PCR扩增的分子生物学测定和通常的荧光测定。



1. 一种用于进行样品测定的微量测定盒,所述盒包含:
 - a) 具有被封闭在其中的气动回路的第一模制壳体;
 - b) 具有被封闭在其中的液压回路的第二模制壳体;
 - c) 用于接收测试样品的样品入口,其中所述样品入口与所述液压回路流体连通;
 - d) 插入在所述第一模制壳体与所述第二模制壳体之间的层压层,所述层压层包含与所述气动回路和所述液压回路流体连通的多个气动液压膜;
 - e) 与所述液压回路流体连通的测定孔组件;
 - f) 限定气动接口的气动端口阵列,每个端口用于接收施加到其上的气动脉冲,所述端口与所述气动回路流体连通,其中所述气动脉冲是正压脉冲或负压脉冲;以及其中所述盒能够使得所述气动液压膜由所述气动脉冲可操作地控制。
2. 权利要求1的微量测定盒,其中所述液压回路包含测试测定回路和对照测定回路。
3. 权利要求2的微量测定盒,其中所述测试测定对照回路与所述样品入口流体连通,并且所述对照测定回路不与所述样品入口流体连通。
4. 权利要求3的微量测定盒,其中所述对照测定回路包含阳性对照测定回路和阴性对照测定回路。
5. 权利要求4的微量测定盒,其中所述阳性对照测定回路和所述阴性对照测定回路流体连通。
6. 权利要求4的微量测定盒,其中所述阳性对照测定回路和所述阴性对照测定回路不流体连通。
7. 权利要求3的微量测定盒,其中所述测试测定回路、所述阳性对照测定回路和所述阴性对照测定回路中的每一个分别与多个测定孔各自流体连通。
8. 权利要求7的微量测定盒,其中所述多个测定孔的数目为至多3个。
9. 权利要求7的微量测定盒,其中所述多个测定孔的数目为3个。
10. 权利要求7-9的任一项的微量测定盒,其中所述多个孔中的每一个被配置来进行过程对照。
11. 权利要求7-9的任一项的微量测定盒,其中所述阳性对照测定孔包含阳性对照核酸模板。
12. 权利要求1的微量测定卡,其还包含与所述液压回路流体连通的核酸捕获组件。
13. 权利要求12的微量测定卡,其中所述核酸捕获组件包含中空壳体构件和设置在其中的核酸捕获膜。
14. 权利要求13的微量测定盒,其中所述核酸捕获膜包含氧化硅纤维。
15. 权利要求13的微量测定卡,其还包括设置在所述壳体构件内部的上部支持介质和下部支持介质,其中所述核酸捕获膜插入在所述上部支持介质与所述下部支持介质之间。
16. 权利要求15的微量测定盒,其中所述上部 and 下部支持介质是**POREX®**玻璃料。
17. 权利要求15的微量测定盒,其中所述上部 and 下部支持介质是聚丙烯垫圈。
18. 权利要求1的微量测定卡,其中所述测定孔组件包含配置有多个孔的PCR孔层,其中每个所述孔包含进行PCR扩增和任何所得扩增子的荧光检测所必需的所有试剂。
19. 权利要求18的微量测定卡,所述PCR孔层由高导热聚合物形成。
20. 权利要求18的微量测定卡,其中所述PCR孔层被配置用于终点PCR、实时PCR或解链

曲线分析。

21. 权利要求1的微量测定卡,其中所述第一模制壳体包括覆盖所述测定孔组件的光学检测窗口,其中所述光学检测窗口由所述第一模制壳体的上表面上的菱形开口和所述第一模制壳体的下表面上的较小菱形开口形成,并且其中光学窗口的侧面从所述第一模制壳体的上表面至下表面向内成角度。

22. 权利要求21的微量测定卡,其还包括插入在所述光学窗口与所述测定孔组件之间的光学透明盖层。

23. 权利要求1的微量测定卡,其中所述第一模制壳体包含与所述气动回路和所述液压回路流体连通的多个试剂储存器。

24. 权利要求23的微量测定卡,其中所述试剂储存器是双层箔包装件。

25. 权利要求24的微量测定卡,其中所述箔包装件通过气密粘合密封件固定地粘附至所述第一模制壳体。

26. 权利要求23的微量测定卡,其包含至多六个试剂储存器。

27. 权利要求24的微量测定卡,其还包括设置在所述箔包装件之下的尖锐物,所述尖锐物用于当通过向气动回路施加压力脉冲而迫使所述箔包装件与所述尖锐物接触时使所述箔包装件破裂。

28. 权利要求27的微量测定卡,其中所述尖锐物由金属形成。

29. 权利要求28的微量测定卡,其中所述尖锐物包括以相对于所述模制壳体低于垂直的角度突出的倒钩。

30. 权利要求29的微量测定卡,其中所述角度为约75度。

31. 权利要求20的微量测定卡,其还包含插入在所述试剂包装与所述尖锐物之间的弹簧,所述弹簧具有固有弹簧力,其中所述弹簧力防止在压力脉冲不存在的情况下所述试剂包装与所述尖锐物之间的接触。

32. 权利要求1的微量测定卡,其还包含设置在所述气动端口中的气雾过滤塞。

33. 权利要求25的微量测定卡,其中所述气雾过滤塞由液体可溶胀材料形成。

34. 权利要求1的微量测定卡,其中所述正压力状态和负压力状态选自+150kPa、+100kPa、+70kPa、0kPa、-35kPa或-50kPa。

35. 权利要求1的微量测定卡,其还包含被配置来将所述气动接口连接至主机仪器的单个使用的密封垫。

36. 一种用于进行样品测定的微量测定系统,所述系统包含:

a) 构造来用于与主机仪器对接的一次性微量测定盒,所述盒具有设置在其中的液压回路,其中所述液压回路被配置来在与其接口的气动回路的控制下操作,并且其中所述液压回路包含测试测定回路、阳性对照测定回路和阴性对照测定回路;

b) 限定气动接口的一个或多个气动端口的阵列,其中每个端口使得能够将气动压力状态从所述主机仪器传送至所述气动回路;

c) 设置在所述主机仪器中的气动歧管,所述歧管具有流体联接到其上的多个气动压力源,其中所述歧管被配置来在多个压力状态下被操作,并且其中所述歧管通过所述气动接口的端口流体连接至所述气动回路;和

d) 用于检测样品中的至少一个光学信号的检测器头,所述检测器头包括1至5个检测通

道。

37. 权利要求36的微量测定系统,其中所述主机仪器包括至少一个Peltier热泵。

38. 权利要求37的微量测定系统,其中所述微量测定盒包含与所述液压回路流体连通并与所述Peltier热泵热接触的测定孔组件。

39. 权利要求38的微量测定系统,其中所述主机仪器包含与所述液压回路热接触的至少一个热块。

40. 权利要求38的微量测定系统,其中所述盒包含与所述液压回路流体连通并与所述热块热接触的核酸捕获组件。

41. 权利要求36的微量测定系统,其中所述检测器头被配置来在横跨所述测试采样回路和所述对照采样回路的多个离散路径上扫描所述微量测定盒,其中每个所述离散路径由至少一个参考点界定,其中所述参考点是在主机仪器校准期间预先确定的空间坐标。

42. 权利要求36的微量测定系统,其还包括被配置来将所述气动接口端口阵列连接至所述气动歧管的单个使用的密封垫。

43. 权利要求36的微量测定系统,其还包括设置在所述气动端口中的气雾过滤塞。

44. 权利要求36的微量测定系统,其包含约20个气动端口。

45. 权利要求36的微量测定系统,其中所述检测器头的所述检测通道各自包括LED强度调制回路,其包括激发光采样镜、中性密度滤波器和LED强度检测器。

46. 权利要求36的微量测定系统,其中所述盒相对于接地平面保持在约15度的角度。

47. 一种对与致病性病症相关的靶荧光信号进行受控测定的方法,所述方法包括:

a) 用权利要求36的系统扫描测试测定回路中的样品孔,其中如果存在靶荧光信号,则在所述检测器头的第一光学通道中检测所述靶荧光信号,并且如果存在与内源组分相关的过程对照荧光信号,则在所述检测器头的第二光学通道中检测与内源组分相关的过程对照荧光信号;

b) 用权利要求36的系统扫描阳性对照测定回路中样品孔的阳性对照荧光信号,其中如果存在阳性对照荧光信号,则在所述检测器头的所述第一光学通道中检测所述阳性对照荧光信号;

c) 用权利要求36的系统扫描阴性对照测定回路中样品孔的阴性对照荧光信号,其中如果存在阴性对照荧光信号,则在所述检测器头的所述第一光学通道中检测所述阴性对照荧光信号;

d) 当且仅当检测到所述第二荧光过程对照信号,检测到所述阳性对照第一荧光信号,并且未检测到所述阴性对照第一荧光信号时,才将第一靶对照信号报告为所述测定的有效结果。

48. 权利要求47的方法,其中所述测试测定回路、所述阳性对照测定回路和所述阴性对照测定回路各自包含至多3个测定孔。

49. 权利要求48的方法,其中所述至多3个测定孔各自被配置来测定独特的靶荧光信号。

50. 权利要求47的方法,其还包括将所述靶荧光信号与所述阳性对照荧光信号和所述阴性对照荧光信号进行比较,以将所述样品评分为对于所述致病性病症是阳性或阴性的步骤。

51. 权利要求50的方法,其中所述比较步骤包括计算第一比率,其中所述第一比率是所述靶荧光信号与所述阳性对照荧光信号的比率,并计算第二比率,其中所述第二比率是所述靶荧光信号与所述阴性对照荧光信号的比率,并将所述第一和第二比率与验证比率进行比较。

52. 权利要求51的方法,其中如果所述第一比率大于所述验证比率,则所述样品评分为阳性,并且如果所述第二比率小于所述验证比率,则所述样品评分为阴性。

用于核酸分析的具有集成的测定对照的微流体盒及设备

[0001] 背景

技术领域

[0002] 本发明总体上涉及用于诊断测定的具有集成的测定对照的微量测定盒和具有光学、热、机械和气动液压系统的紧凑型荧光检测仪器。

[0003] 相关领域的描述

[0004] 分子诊断的作用在当今全球医疗保健环境中至关重要。在发展中国家,95%的死亡是由于缺乏对传染病的适当诊断和相关后续治疗造成的;例如急性呼吸道感染(ARI)、疟疾、HIV和结核病(TB) (Yager,P等,Annu Rev Biomed Eng 10:107-144,2008)。最近的流行病(诸如2009年H1N1流感大流行)强调了对有效检测和控制传染病的工具的需要。包括快速病原体突变率、非人病原体至人病原体的转化以及非人病原体与人病原体的重组的因素已经加大了管理新型传染病的挑战(Kiechle,FL等,Clin Lab Med 29(3):555-560,2009)。增加的全球流动性有助于传染病从原发地区迅速传播到世界其他地区,如2009年H1N1大流行期间所见。检测感染性病原体所需的当前实验室培养方法花费一天或更多时间来提供结果。这些问题突出了在入境口岸对快速、便携式诊断现场护理(point-of-care,POC)设备的需要,以防止感染的全球传播。

[0005] 在发达和发展中世界中,对某些类型的感染的诊断测试需要定期重复,以测量对治疗的反应和监测疾病状况。一个这样的情况是监测如HIV(人免疫缺陷病毒)和丙型肝炎的感染的病毒载量(每毫升血液的病毒颗粒数)。撒哈拉以南非洲是受艾滋病大流行严重影响的地区。该地区缺乏标准实验室设施和训练有素的实验室技术人员是严重的瓶颈。在美国医疗服务不足的地区也存在类似的问题。可以分散在整个社区(甚至可能家中)以方便获取的快速、低成本的诊断工具,将通过允许更快速地诊断和监测疾病和感染提供实质性的好处。

[0006] 自从其出现以来,微流体已显示出巨大的潜力成为体外诊断(IVD)的重要工具。基于微流体的IVD的“圣杯”是提供手持式或便携式,独立的,自校准的,自动化的和廉价的装置,其能够使用最少量的原始样品对多种分析物进行快速,特异性,灵敏的和定量的测试。然而,到目前为止,只有非常有限的微流体装置已被成功地开发并商业化用于此类应用。独立微流体装置的发展面临的一个显著技术挑战是系统集成,其需要将气动、流体、机械、电子和光学单元组合至有限的空间中。将这些功能单元接口和集成至可高效地制备测试样品以用于分析和精确检测靶分析物的单个稳健的微流体装置中仍然是一个持续的挑战。

[0007] 其他挑战涉及测定验证和质量控制。监管机构规定的当前标准要求通过使用对照来监测和验证基于诊断的健康护理决策中使用的所有测定程序的准确性和可靠性。这些对照包括过程对照和功能性验证提取、扩增和诊断过程的阳性和阴性对照。对相同样品并在与测试测定相同的测试孔中进行过程对照,但使用不同的引物和/或探针组来检测总是存在于测定样品中的对照靶。相反,阳性和阴性对照使用与测试样品相同的引物和/或探针以及嵌入孔中的已知量的测定靶(在阴性对照的情况下为零)在分开的测定孔中进行。虽然

几个商购可得的微流体诊断系统,诸如BD Diagnostics BC MAX™系统和Cepheid GeneXpert®系统运行在卡(on-card)过程对照,但是两个系统都不提供具有集成的阳性和阴性对照的测试卡。外部对照可由测试制造商作为附属对照试剂盒(来源于如产品包装插页中指定的第三方供应商)提供,或由采购实际样品的客户提供。

[0008] 在运行外部阳性和阴性测定对照的需要中存在几个显著的不利方面。当阳性和阴性测定对照不是集成测试盒的一部分时,固有的批次间试剂变化和/或降解可能损害测定结果的验证。对于终端用户,需要额外的成本和时间来获得另外的对照试剂和装置并进行分开的对照测定。此外,通常由终端用户决定对照测试的适当频率,这给用户带来额外的负担。当运行多重测定时,这些缺点变得越来越显著,并且在资源贫乏的环境中受到特别关注。

[0009] 另一个挑战是便携性。虽然使用荧光团作为体外诊断测定的探针的益处是众所周知的,但用于此类测定的最常见可用形式的装备是大的,使用复杂的,相对缓慢的并且依赖昂贵的共聚焦光学器件。这些属性使得许多设备不适合于偏远地区和现场护理的全面集成的“采样-应答”测试,在那里需要此类设备是坚固、快速、紧凑、便宜且易于使用的。

[0010] 这些连锁问题的同时解决只有通过通常在这种高度不可预测的技术中通过试错来指导的充分实验和开发来实现。因此,本领域需要许多改进,其要素是本文公开内容的主题。

[0011] 概述

[0012] 本发明的实施方案通过提供若干改进的盒特征并将过程对照以及阳性和阴性测定对照集成到盒设计中,来解决微流体盒中的荧光信号的可靠且有效的检测的问题。本发明的微流体盒通过消除对分子测试运行外部测定对照的需要,向终端用户提供了几个相当有利的方面。本发明的集成的阳性和阴性测定对照还提供了将针对一种或多种目标分析物的诊断测试结果作为阳性或阴性评分的更精确的方法。

[0013] 本文公开的一些实施方案总体上涉及微量测定盒,其由封装气动回路的第一模制壳体、封装液压回路的第二模制壳体、连接至液压回路的样品入口、第一与第二模制壳体之间的含有多个气动液压膜的层压层、连接到液压回路的测定孔组件以及用于接收气动脉冲的气动端口阵列(其连接至第一模制壳体中的气动回路并控制气动液压膜的操作)组装而来。已经有利地发现,将气动回路分隔至第一模制壳体中并将液压回路分隔至第二模制壳体中通过防止已被发现造成功能故障的气动管线与液压管线的交叉而增加了盒的稳健性。

[0014] 在本发明的一个方面,盒的液压回路包括连接至样品入口的测试测定回路和不连接至样品入口的对照测定回路。在一些方面,对照样品回路可被分成阳性对照测定回路和阴性对照测定回路。在一些方面,阳性对照测定回路连接至阴性对照测定回路,而在其它方面,它们不连接。每个测定和对照回路可被进一步连接至多个测定孔,在一些方面,每个回路连接至1至3个测定孔。在优选的方面,每个回路连接至3个测定孔。在另一方面,每个测定孔被配置来运行附加的过程对照。在另一方面,将阳性对照核酸模板嵌入阳性对照测定孔。

[0015] 在本发明的另一方面,微量测定盒包括核酸捕获组件,其由中空壳体和支撑在壳体内部的核酸捕获膜组装而成。在一些方面,核酸捕获膜由氧化硅纤维制造。在其它方面,核酸捕获组件还包括支持捕获膜的上表面和下表面的两种支持介质。支持介质可被称为“玻璃料”并且由**POREX®**制造。或者,支持介质可以是聚丙烯垫圈型结构。

[0016] 在其它方面,微量测定卡还包括并入具有多个测定孔的PCR孔层以用于进行靶序列的扩增和荧光检测的测定孔组件。在一些方面,PCR扩增是终点PCR,并且在其它方面,其是实时PCR,例如,用于进行定量PCR。

[0017] 在其它方面,微量测定卡的第一模制壳体包括覆盖测定孔组件的测定孔的光学检测窗口。光学检测窗口由壳体中的菱形切口形成,其中壳体的上表面中的切口大于壳体的下表面中的切口,以便形成从顶部到底部向内倾斜的成角度的侧面。已发现,从具有这种成角度的侧面的孔发射的荧光的检测显著得到增强。此外,已经发现孔的菱形几何形状有利地促进孔的润湿而不挟带气泡。微流体装置中的气泡形成是本领域中长期存在且相当大的技术问题。在另一方面,光学透明盖层放置在第一壳体中的测定孔和光学窗口之间。盖层有利地防止材料泄漏出测定孔,而不干扰光学检测。

[0018] 在本发明的另一方面,多个试剂包被装载到上模制壳体中。这些试剂包含有样品制备所需的所有液体试剂,诸如细胞裂解和核酸提取、洗涤和从捕获膜洗脱所需的那些试剂。本发明的微量测定卡被配置来保持一至六个试剂包。在一些方面,试剂包可由箔形成并且胶合至第一模制壳体中以形成气密密封。在其它方面,尖锐物被放置在每个试剂包下方,以便在需要时通过气动激活刺破包装件以释放试剂。尖锐物可由金属(例如钢等)形成并且具有相对于壳体的底部以大约75度的角度突出的倒钩。已经发现该构造实现了箔材料的优良剪切并且防止刺穿的边缘自身重新密封,这阻碍了液体内容物的释放。在其它方面,可将弹簧可放置在尖锐物与箔包装件之间以保护包装件免于过早或不适当的破裂。弹簧具有仅由源自主机仪器的气动力克服的内部弹簧力。一旦克服了该力,弹簧就突然“啪”地下降,这易于加速箔包装件的破裂。

[0019] 在本发明的另一方面,微量测定卡的气动端口与气雾过滤塞配合,所述气雾过滤塞可由液体可膨胀材料形成。这些塞捕获液体以及雾化材料(诸如核酸),因此大大降低了仪器-盒交叉污染的可能性。

[0020] 在另一方面,用于控制气动液压膜和液压回路功能的正和负压力状态的范围为+150kPa至-50kPa,例如在一些实施例中,正压状态和负压状态选自+150、+100、+70、0(环境)、-35和-50kPa。

[0021] 在另一方面,将微量测定卡通过固定至卡上的单个使用的密封垫密封至主机仪器。

[0022] 本发明的其它实施方案总体上涉及用于进行样品测定的微量测定系统,其包括一次性微量测定盒,该盒对接至主机仪器并具有液压回路,该液压回路包括测试测定回路和分成阳性对照测定回路和阴性对照测定回路的对照测定回路,其中液压回路受气动回路控制,该气动回路与气动端口接口,每个气动端口从主机仪器传送气动压力状态,主机仪器具有气动歧管,气动歧管连接至盒的气动回路和连接至气动流体源以将多个气动压力状态传送至盒以及具有1至5个检测通道的检测器头,用于检测测试样品中的光学信号。

[0023] 在其它方面,主机仪器还包括至少一个Peltier热泵,其可向测定孔组件的孔提供热循环能力。在其它方面,主机仪器还包括可加热液压回路的区域的至少一个加热块。已经发现,在细胞裂解和核酸提取流程期间提供热显著提高效率。

[0024] 在其它方面,主机仪器的检测器头在由参考点限定的离散路径上扫描盒,所述参考点是在主机仪器校准期间预先确定的空间坐标。已经发现,沿着这样的短的离散路径扫

描,与穿过盒检测窗口的整个长度的连续路径相反,显著地减少了进行盒扫描所需的时间。随着系统中待扫描的测定孔的数目增加,这样增加的效率变得越来越重要。

[0025] 在其他方面,系统可包括单个使用的垫,以将盒的气动接口端口连接至主机仪器的气动歧管,并且将气雾过滤塞设置至端口中以防止污染。

[0026] 本发明的其它实施方案总体上涉及对与致病性病症相关的靶荧光信号进行受控测定的方法,所述方法包括用上述系统在测试测定回路中扫描样品孔,其中如果存在靶荧光信号则在检测器头的第一光学通道中检测靶荧光信号,并且如果存在与内源组分相关的过程对照荧光信号则在所述检测器头的第二光学通道中检测与内源组分相关的过程对照荧光信号,在阳性对照测定回路中扫描样品孔以利用所述系统检测阳性对照荧光信号,其中如果存在阳性对照荧光信号则在所述检测器头的第一光学通道中检测阳性对照荧光信号,在阴性对照测定回路中扫描样品孔以利用所述系统检测阴性对照荧光信号,其中如果存在阴性对照荧光信号则在所述检测器头的第一光学通道中检测阴性对照荧光信号;以及当且仅当检测到所述第二荧光过程对照信号,检测到所述阳性对照第一荧光信号,并且未检测到所述阴性对照第一荧光信号时,将所述第一靶对照信号报告为有效测定结果。

[0027] 在本发明的一个方面,测试测定回路、阳性对照测定回路和阴性对照测定回路各自包括至多三个测定孔,每个测定孔用于分析独特的靶。

[0028] 在本发明的另一方面,所述方法包括将靶荧光信号与阳性对照荧光信号和阴性对照荧光信号进行比较以将样品评分为对于致病性病症为阳性或阴性的步骤。在本发明的其他方面,比较步骤包括计算第一比率,其为靶荧光信号与阳性对照荧光信号的比率,并计算第二比率,其为靶荧光信号与阴性对照荧光信号,并将第一和第二比率与验证比率进行比较。在本发明的其它方面,如果第一比率大于验证比率,则样本被评分为阳性,如果第二比率小于验证比率,则样本被评分为阴性。

[0029] 在本发明的另一方面,所述方法包括将靶荧光信号与阳性对照荧光信号进行比较以定量样品靶的相对丰度。

[0030] 附图若干视图的简述

[0031] 图1是本发明的仪器和微流体盒的透视图,其示出了盒在对接仓中的动画插入。

[0032] 图2是提供装置的功能单元的概览的方框图。

[0033] 图3A和3B是与本发明的检测系统一起使用的可插入微量测定盒的透视图。

[0034] 图4是去除盖子的微量测定盒的透视图,其显示了各种集成特征。

[0035] 图5是微量测定量盒的分解图,其描绘了组件的分层结构。

[0036] 图6A是显示微量测定盒的第一模制壳体的下表面的细节的平面图。

[0037] 图6B是示出微量测定盒的中间层压层的下表面的细节的平面图。

[0038] 图6C是显示微量测定盒的第二模制壳体的上表面的细节的平面图。

[0039] 图7是将微量测定盒的功能特征集成至阀和流体逻辑的系统中的一个实施方案的示意图。

[0040] 图8A是描绘核酸捕获组件的部件的分解等轴视图。

[0041] 图8B是核酸捕获组件的横截面图。

[0042] 图9是测定孔组件的透视图。

[0043] 图10是具有对接仓、光具座和仪器底盘的浮台的简化图示,其概念性地显示了这

些部件可以相对于接地平面以角度“ θ ”安装。

[0044] 图11以分解图显示了加热块和Peltier热泵组件。

[0045] 图12是显示与仪器夹紧机构接合的微量测定盒的分解图。

[0046] 图13是具有双光通道的检测器头的透视图。移除壳体的一半以便观察内部部件。

[0047] 图14是具有双光通道和LED强度控制电路的荧光检测器的内部光学部件的示意图。

[0048] 图15是具有集成的测试测定回路和对照测定回路的通用微量测定装置的一个实施方案的示意图

[0049] 图16是具有集成的测试测定回路和对照测定回路的通用微量测定装置的另一个实施方案的示意图。

[0050] 发明详述

[0051] 定义

[0052] 测试样品:测试样品包括生物样品(biological sample或“biosample”),其可以是临床样本。可测试代表性的生物样品包括例如:血液、血清、血浆、血沉棕黄层、唾液、伤口渗出物、脓、肺和其它呼吸器官抽吸物、鼻抽吸物和洗液、窦引流物、支气管灌洗液、痰、中耳和内耳抽吸物、囊肿抽吸物、脑脊液、粪便、腹泻液、尿、眼泪、乳腺分泌物、卵巢内容物、腹水液、粘液、胃液、胃肠内容物、尿道排出物、滑液、腹膜液、胎粪、阴道液或排出物、羊水、精液、阴茎排出物等。从代表粘膜分泌物和上皮的拭子或灌洗液的测定是可接受的,例如咽喉、扁桃体、牙龈、鼻道、阴道、尿道、直肠、下结肠和眼睛的粘膜拭子,对于各种组织样本的匀浆物、裂解物和消化物也是可接受的。哺乳动物细胞是可接受的样品。除了生理或生物流体以外,水、工业排出物、食品、牛奶、空气滤液等的样品也是测试样本。在一些实施方案中,将测试样品直接置于装置中;在其它实施方案中,设想了预分析处理。

[0053] 生物测定靶分子:或“目标核酸”或“靶分子”或“测试分析物”包括一种或多种核酸。靶核酸包括基因、基因的部分、基因的调控序列、mRNA、rRNA、tRNA、siRNA、cDNA,并且可以是单链,双链或三链的。一些核酸靶具有多态性,缺失和选择性剪接序列。

[0054] 病原体:与感染或传染病相关的生物体。

[0055] 致病性病症:特征在于缺乏健康,即疾病、虚弱、发病或与潜在发病相关的遗传性状的哺乳动物宿主的病症。

[0056] 各种实施方案包括能够分析包含一种或多种靶传染剂的测试样品的微流体装置。示范性靶传染剂包括具有基于DNA的基因组或基于RNA的基因组的微生物和/或病毒。在一些实施方案中,合适的病毒包括但不限于乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、人免疫缺陷病毒(HIV) I和II、甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV) A和B、人偏肺病毒(MPV) 和/或单纯疱疹病毒(HSV) I和/或II。

[0057] 在其它实施方案中,存在于测试样品中的病毒传染剂包括但不限于甲型流感病毒、乙型流感病毒、RSV(呼吸道合胞病毒) A和B、人免疫缺陷病毒(HIV)、人T细胞淋巴细胞营养型病毒、肝炎病毒(例如,乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒)、EB病毒、巨细胞病毒、人乳头瘤病毒、正粘病毒、副粘病毒、腺病毒、冠状病毒、弹状病毒、脊髓灰质炎病毒、toga病毒、布尼亚病毒、沙状病毒、风疹病毒、reo病毒、诺罗病毒、人偏肺病毒(MPV)、单纯疱疹病毒1和2(HSV-1和HSV-2)、西尼罗河病毒、黄热病病毒、水痘带状疱疹病毒(VZV)、狂犬病病毒、鼻病

毒、立夫特山谷热病毒、马尔堡病毒、流行性腮腺炎病毒、麻疹病毒、EB病毒(EBV)、人乳头瘤病毒(HPV)、埃博拉病毒、科罗拉多蜱热病毒(CTFV)和/或鼻病毒。

[0058] 在不同的实施方案中,测试样品中的细菌传染剂包括但不限于,大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门菌属(*Salmonella*)、志贺菌属(*Shigella*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、克雷伯菌属(*Klebsiella*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、单核细胞增生利斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、鸟胞内分枝杆菌(*Mycobacterium avium-intracellulare*)、耶尔森菌属(*Yersinia*)、弗朗西丝菌属(*Francisella*)、巴斯德菌属(*Pasteurella*)、布鲁氏菌属(*Brucella*)、梭菌属(*Clostridia*)、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、B溶血链球菌(*B-Hemolytic strep.*)、棒状菌(*Corynebacteria*)、军团菌属(*Legionella*)、支原体属(*Mycoplasma*)、尿原体(*Ureaplasma*)、衣原体属(*Chlamydia*)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、加德纳菌属(*Gardnerella*)、阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoea*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、流感嗜血杆菌(*Hemophilus influenzae*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)、苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*)、布氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、回归热疏螺旋体(*Borrelia recurrentis*)、立克次氏体属(*Rickettsial*)病原体、诺卡菌属(*Nocardia*)、放线菌(*Actinomycetes*)和/或不动杆菌属(*Acinetobacter*)。

[0059] 在其它实施方案中,测试样品中的真菌传染剂包括但不限于新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)、藻状菌(根霉菌属(*Rhizopus*))、申克孢子丝菌(*Sporothrix schenckii*)、色素性真菌病(*Chromomycosis*)和/或马杜拉分支菌病(*Maduromycosis*)。

[0060] 在更多的实施方案中,存在于测试样品中的寄生虫剂包括但不限于恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、疟疾疟原虫(*Plasmodium malariae*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫(*Plasmodium ovale*)、盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)、利什曼原虫属(*Leishmania*)、锥虫属的某些种(*Trypanosoma spp.*)、血吸虫属的某些种(*Schistosoma spp.*)、溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、隐孢子虫(*Cryptosporidium*)、贾第虫属的某些种(*Giardia spp.*)、毛滴虫的某些种(*Trichomonas spp.*)、结肠小袋纤毛虫(*Balantidium coli*)、班氏丝虫(*Wuchereria bancrofti*)、弓形虫属的某些种(*Toxoplasma spp.*)、蛲虫(*Enterobius vermicularis*)、蛔虫(*Ascaris lumbricoides*)、鞭虫(*Trichuris trichiura*)、麦地那龙线虫(*Dracunculus medinensis*)、吸虫类(trematodes)、阔节裂头绦虫(*Diphyllobothrium latum*)、绦虫属的某些种(*Taenia spp.*)、卡氏肺囊虫(*Pneumocystis carinii*)和/或美洲板口线虫(*Necator americanus*)。

[0061] 测定对照或“运行”对照或“扩增”对照包括阳性对照和阴性对照。对照材料可以商购获得,内部制备或从其他来源获得。阳性对照材料可以是纯化的靶核酸,含有靶核酸的患者样本,或通过将目标生物体(优选灭活的)掺入已知不含靶的样本产生的对照。可构建阳

性对照以使得其浓度接近测定的检测下限。浓度应该足够高以提供一致的阳性结果,但是足够低以接近检测限的方式挑战检测系统。对于多重系统,包括每种分析物的阳性对照。阳性对照PCR反应使用与可能含有待测定的靶的测试样品相同的引物、探针和酶。阳性对照必须在与待测样品分开的反应孔中进行。

[0062] 空白非模板对照诸如水或缓冲液可用作阴性对照的形式。阴性对照也可用于补偿由试剂产生的背景信号。阴性对照可通过提取过程获取并含有所有反应试剂。阴性对照也可以是含有已知非靶核酸的样本,诸如来自非感染个体的患者样本或含有已知非靶生物体或核酸的样本。阴性对照PCR反应使用与测定靶相同的引物、探针和酶,并且必须在与待测样品分开的反应孔中进行。

[0063] 过程对照或“内部对照”或“流程对照”:是指总是存在于测定样品中或在核酸提取前加入测定样品的对照靶。该对照验证提取、扩增和检测过程的功能性。过程对照必须使用与测定靶不同的引物组。取决于系统,过程对照可能需要使用与测定靶不同的探针。

[0064] 核酸:本文使用的术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”包括任何长度的核苷酸聚合形式,包括但不限于核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸。相对短的核酸聚合物通常用作“引物”或“探针”。该定义包括来自天然来源的核酸,所述核酸可被甲基化或加帽,还可以是合成形式,其可含有取代或衍生的核碱基并且可基于肽主链。核酸通常是腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶及其“脱氧”形式的聚合物,但也可以含有其它嘧啶,诸如尿嘧啶和黄嘌呤,或间隔子和通用碱基,诸如脱氧肌苷。取决于互补序列的存在或不存在,以及pH、盐浓度、温度的条件以及某些有机溶剂诸如甲酰胺、*n*,*n*-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷和正甲基吡咯烷酮的存在或不存在,脱氧核酸可以是单链或双链的。

[0065] “靶核酸序列”或“模板”:如本文所用,术语“靶”是指在测定中待通过聚合酶扩增并检测的生物样品中的核酸序列。“靶”分子可作为“掺入物(spike)”或作为样品中的未表征的分析物存在,并且可由对生物体是合成或天然的DNA、cDNA、gDNA、RNA、mRNA、rRNA或miRNA组成。“生物体”不限于哺乳动物。靶核酸序列是用于在扩增期间合成互补序列的模板。基因组靶序列由按照常规从5'末端至3'末端列出的碱基顺序的列表表示。

[0066] 报告物(Reporter)、“标记”或“标签”:指可通过物理、化学、电磁和其他相关分析技术检测的生物分子或生物分子的修饰。可检测的报告物的实例包括但不限于放射性同位素、荧光团、生色团、质量标记、电子致密颗粒、磁性颗粒、染色颗粒、量子点(QDot)、自旋标记、发射化学发光的分子、电化学活性分子、酶、辅因子、连接至核酸探针的酶和酶底物。报告物在生物测定中用作试剂,并且通常共价连接至另一分子,吸附在固相上,或通过特异性亲和力结合。

[0067] 探针:“探针”是能够通过以足够互补性进行互补碱基配对而与靶核酸结合以在室温形成稳定双螺旋的核酸。探针可用报告基团标记。可以附接至探针的合适的标记包括但不限于放射性同位素、荧光团、生色团、质量标记、电子致密颗粒、磁性颗粒、自旋标记、发射化学发光的分子、电化学活性分子、酶、辅因子和酶底物。用于选择探针序列,长度和杂交条件的工具通常是本领域技术人员所熟悉的。

[0068] 扩增:如本文所用,术语“扩增”是指导致核酸序列的浓度相对于其初始浓度增加的“模板依赖性过程”。“模板依赖性过程”是涉及“引物”分子的“模板依赖性延伸”的过程。“引物”分子是指与靶序列的已知部分互补的核酸的序列。“模板依赖性延伸”是指RNA或DNA

的核酸合成,其中新合成的核酸链的序列由靶核酸与引物的互补碱基配对的规则规定。

[0069] 扩增子是指现有技术扩增工具的双链DNA产物,并且包括从DNA和RNA模板形成的双链DNA产物。

[0070] 双尾扩增子是指扩增工具的双链DNA产物,在所述扩增工具中加标签的引物对(与肽半抗原或表位缀合的第一引物,与亲和报告物、标签或“配体”缀合的第二引物)被共价掺入。如本文所用,双尾扩增子用作“异双功能”系链,并在固体基质上形成分子检测复合物。

[0071] 引物:如本文所用,是在合适的聚合酶和辅因子存在下能够作为模板指导的DNA合成的起始点的单链多核苷酸或多核苷酸缀合物。引物的长度通常为至少7个核苷酸,更通常地长度在10至30个核苷酸的范围内或更长。术语“引物对”是指一组引物,包括与待扩增的DNA模板的5'末端的互补序列杂交的5'“正向”或“上游”引物和与待扩增序列的3'端杂交的3'“反向”或“下游”引物。注意,两个引物均具有5'和3'末端,并且引物延伸总是以5'至3'的方向发生。因此,在5'端或其附近的化学缀合不会阻断通过合适的聚合酶进行的引物延伸。引物可被称为“第一引物”和“第二引物”,指示其中“正向”引物和“反向”引物的身份可以互换的引物对。其他引物可用于巢式扩增。

[0072] 聚合酶是通过其掺入核苷三磷酸或脱氧核苷三磷酸来延伸引物分子的3'羟基末端的功能定义的酶。关于聚合酶的一般讨论,参见Watson, J. D. 等, (1987) *Molecular Biology of the Gene*, 第4版, W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif. 聚合酶的实例包括但不限于大肠杆菌DNA聚合酶I、“Klenow”片段、Taq聚合酶、T7聚合酶、T4聚合酶、T5聚合酶和逆转录酶。逆转录酶的实例包括来自人免疫缺陷病毒1型的HIV-1逆转录酶、端粒酶、来自莫洛尼鼠白血病病毒的M-MuLV逆转录酶和来自禽成髓细胞瘤病毒的AMV逆转录酶。

[0073] 应当注意,逆转录酶通常在研究中用于将聚合酶链式反应技术应用于RNA靶。经典PCR技术只能直接应用于DNA,但通过使用逆转录酶从RNA合成cDNA, RNA靶的PCR分析是可能的。该技术统称为逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)。

[0074] 互补(针对核酸)是指可以杂交以形成双螺旋的两条单链核酸序列。两条互补链的双螺旋中的碱基对的匹配不一定是绝对的。杂交的选择性是退火温度、盐浓度和溶剂的函数,并且当在至少14-25个核苷酸的区段上存在少至55%同一性时,通常在低严格性条件下发生。严格性可以通过本领域熟知的方法增加。参见M. Kanehisa, *Nucleic Acids Res.* 12: 203 (1984)。关于引物的杂交,“完全互补”的引物具有在引物的整个长度上完全互补的序列,并且没有错配。“错配”是指引物中的碱基和其所比对的靶核酸中的碱基不互补的位点。

[0075] 预装载是指在装置最终使用之前,例如在装置制造期间将试剂添加到装置中的术语。因此,可将固体试剂沉积在装置上,例如通过使试剂中的溶剂蒸发来干燥试剂的溶液。或者,试剂可以以脱水形式预装载,如属于Battrell等的美国专利申请公开号2012/0156750(其全部内容通过引用并入本文)中所公开的。

[0076] 试剂广泛地指反应中使用的任何化学或生物化学试剂,包括酶。试剂可以包括本身可以被监测的单一试剂(例如,在其被加热时被监测的物质)或两种或更多种试剂的混合物。试剂可以是活的(例如,细胞)或非活的。用于核酸扩增反应的示例性试剂包括但不限于缓冲液、金属离子(例如镁盐)、螯合剂、聚合酶、引物、模板、核苷三磷酸、标记、染料、核酸酶抑制剂等。用于酶反应的试剂包括例如底物、生色体、辅因子、偶联酶、缓冲液、金属离子、抑制剂和活化剂。并非所有试剂都是反应物。

[0077] 特异性:指测定的可靠区分靶生物标志物的真阳性信号与任何背景、错误或干扰信号的能力。

[0078] 灵敏度:指其中阴性不再可靠地与阳性区分的测定的检测下限。

[0079] 稳定性:在储存期间,随时间流逝在参数(例如活性、浓度、降解、粘度、pH或颗粒组成)上测量到大于10%的任何组成变化表示不稳定性。小于或等于10%的变化意味着稳定性。测量稳定性所经历的时间段是相对的,取决于组合物的预期效用。在较高温度下的加速稳定性有时被认为是在比实际测量所经历的更长时间段内更快速的外推稳定性的方式。

[0080] 终点:“终点”或“数据点”在此处用作来自定性或定量测定的“结果”的速记,并且可指其中达到反应物的恒定平台或水平的稳定终点,以及速率反应,其中作为时间的函数的反应物或产物出现或消失的速率(即,斜率)是数据点。

[0081] 微流体盒:具有流体结构和具有微流体尺寸的内部通道的“装置”、“卡”或“芯片”。这些流体结构可以包括例如室、阀、通风口、通孔、泵、入口、接头(nipple)和检测工具。通常,微流体通道是具有至少一个小于约500 μm 并且通常在约0.1 μm 与约500 μm 之间的内部横截面尺寸的流体通道。微流体通道是具有至少一个小于600 μm 的内部横截面尺寸的流体通道。微流体流动状态的特征在于Poiseuille或“层流”流动。颗粒体积分数和通道直径与颗粒直径的比率(D/d)对流动特性具有可测量的影响。(参见例如Staben M E等2005. Particle transport in Poiseuille flow in narrow channels. Intl J Multiphase Flow 31:529-47,以及其中引用的参考文献,其通过引用整体并入本文)。

[0082] 微流体盒可使用技术(诸如激光雕刻、压印、冲压、注射模制、掩模、蚀刻和三维软光刻)由各种材料制造。层压微流体盒进一步用粘合剂中间层或通过热粘合剂粘合技术(例如通过定向聚丙烯的压力处理)来制造。层压和模制微流体盒的微架构可以不同。

[0083] 微流体通道:也称为“微通道”,是具有可变长度但横截面尺寸小于500 μm 的流体通道。微流体通道中的微流体流动行为是高度非理想和层流的,并且可能更多地取决于壁润湿性质、粗糙度、液体粘度、粘附性和内聚力,而不是端到端的压降或横截面面积。微流体流动状态通常与通道中“虚拟液体壁”的存在相关。然而,在较大的通道中,10psi或更大的压头压力可产生与湍流接界的过渡流动状态,这在测定的漂洗步骤中可能是重要的。

[0084] 由通过挤出成型形成的层构成的微通道可具有更圆的通道轮廓和每个“通孔”上的半径。注射模制部件的内部通道表面也稍微更光滑。由于微流状态的深刻的表面效应,通道的流动特性是显著的。表面张力和粘度复合表面粗糙度效应。通道的最窄尺寸对流动具有最深远的影响。因此,基于矩形或圆形横截面轮廓的通道中的流动由对角线宽度或直径控制,并且通常改变设计以利用该行为。在流动方向上的锥度减小导致对于200微米以下的直径的芯吸效应。相反,除非施加压力,否则可通过打开通道以形成球(bulb)来停止流动。通道中的通孔可以被设计成促进定向流,一种固态止回阀。

[0085] 如本文所用,术语“下游”是指在使用中,样品顺序通过装置的不同部分。虽然术语“下游”在其范围内包括装置的两个部分直接流体连通,但是当两个部分通过例如阀或装置的另一部分分开时,其也包括在其范围内。术语“集成的”是指装置的两个不同部分组合成单个单元,以使得例如装置的相同部分可用于过滤样品并用作裂解单元。当术语“集成的”应用于与核酸扩增单元组合的本发明的第一和第二方面的装置时,其意指系统的两个部分彼此连接,以使得在使用中,彼此流体连通。在另一方面,术语“集成的”意指装置的不同部

分优选地形成在公共基板上。当应用于装置的两个部分时,术语“连接的”意指两个部分可以彼此直接流体连通(例如通过直接连接在一起或通过通道连接),或者可以通过,例如,阀或装置的另一部分彼此分隔。优选地,术语“连接至”是指装置的两个部分彼此直接连接。

[0086] 微流体泵:包括例如旨在强制流体移动的球、波纹管、隔膜或气泡,其中泵的子结构具有小于1毫米的厚度或其它尺寸。此类泵包括属于Weigl的美国专利号6,743,399和属于Saltsman的U.S.2005/0106066(共同转让给本申请人并通过引用将其全文并入本文)中描述的机械致动的再循环泵。此类泵可以是机器人操作的或手动操作的。还提供了电渗泵。此类泵可以用于代替外部驱动以在基于微流体装置的测定中推进溶解的试剂和样品的流动。

[0087] 波纹管(“指状(Finger)”)泵:是形成为空腔的装置,通常为圆柱形,通过弹性隔膜在冠部截面中对分,以形成不流体连接的第一和第二半腔。隔膜由连接至第一半腔的气动脉冲发生器控制。隔膜上方的正压力使隔膜膨胀,使第二半腔的内容物移位,负压(抽吸)使其缩回,使第二半腔膨胀并将流体吸入。对于半腔,应当理解的是,隔膜的有效区域是在正压力下的体积位移和在吸入压力下的体积位移中的较小者,并且其因此当第一和第二半室在隔膜上方和下方的体积大致对称或相等时是最佳的。第二半腔室连接至流体进口和出口。流体进口和出口可以是分开的端口或单个端口,但在任一情况下,都在阀控制下。如上所述,气动脉冲发生器通常通过也是阀门控制的微通道气动地连接至第一半腔室。在完整的设备中,气动致动是可编程的。因此,脉冲发生器使用的可编程气动逻辑具有两个功能,以就信号而致动隔膜,以及就信号而打开和关闭阀门。当脉冲发生器是盒、接头或入口外时,提供气动歧管和电磁阀。

[0088] 在使用中,当将负压施加至隔膜时(或被动地,当液体被第二波纹管泵推入时),流体通过入口阀进入波纹管泵的第二半腔。随后,当将正压力施加至隔膜时,腔的流体内容物通过出口阀移出。类似地,正压力信号和负压信号控制阀打开和关闭。通过向隔膜提供一系列正和负压脉冲,流体可以移入和移出波纹管泵腔。通过应用同步阀逻辑(从而泵送动作),该流体运动变得定向。

[0089] 微流体阀:包括一类具有至少一个尺寸小于500 μm 的液压、机械、气动、磁性和静电致动器流动控制器。该类的代表性瓣阀描述于美国专利号6,431,212(其通过引用整体并入本文)中。还包括的是止回阀。一类阀是指其中流动通道和对照通道相交并且由弹性膜分开的构造,所述弹性膜可响应于对照通道中的致动力而偏转至流动通道中或从流动通道中缩回。描述微流体阀的种类的专利包括美国专利号5,971,355、6,418,968、6,518,99、6,620,273、6,748,975、6,767,194、6,901,949以及美国专利申请2002/0195152和2005/02005816,其中的几个专利或专利申请被共同转让给本申请人,并且所有这些申请通过引用并入本文。

[0090] 止回阀:是单向阀。球形弹簧阀(ball-spring valves)、瓣阀和触发阀的微型形式是止回阀。

[0091] 被动关闭阀:是微流体通道中的可润湿插入物或涂层,当被浸没时其膨胀,关闭微通道以进一步阻止在任一方向上流动。类似地,已经公开了延迟或停止试剂的流动的由微通道壁上的疏水材料环组成的“表面张力阀”。停止流动也可通过加宽微流体通道直径的锥度来实现。

[0092] 自引发:意指由材料制造或经处理,以使得通道是可润湿的并且通常在无需引发通道的情况下开始毛细管流的微流体通道。

[0093] 通孔:微流体通道中的台阶,其提供从一个基板层至上面或下面的另一基板层的流体路径,其特征不在于从层构建的层压装置。

[0094] 试剂包或储存器:用于通过对隔膜加压来递送试剂的板上试剂包,并且可以附加诸如金属V形元件的“尖锐物”,以使得隔膜上的压力能破裂“枕头(pillow)”(见枕头)。这些可以与止回阀或可关闭的通风口一起使用以产生定向流体流动和试剂递送。用于可变形膜的合适材料包括石蜡封口膜、乳胶、箔和聚对苯二甲酸乙二醇酯。选择可变形膜的关键因素包括屈服点和变形松弛系数(弹性模量)。

[0095] 废物室或“包”:是作用于隔离排出的样品、冲洗溶液和废试剂的容器的空腔或室。通常还包括芯吸材料(参见芯)或吸收垫。废物包也可密封在密封地附接于微流体装置的主体的弹性隔离膜下。该内膜随着吸水材料膨胀而膨胀,从而包围废料。隔离膜外部的空腔通向大气,以使得废物材料被容纳和隔离。废物包可以任选地含有干燥或液体灭菌剂。

[0096] 芯:是一种吸水材料,用于通过毛细管润湿代替微流体泵或与微流体泵一起推进流体流动。吸湿芯通常包括天然或合成纤维的纤维网或吸收垫,并且还通常包括通常称为“水凝胶”,“超级吸收剂”或“水胶体”材料的某些吸收胶凝材料。材料包括纸、海绵、尿布材料、Contec-Wipe等。还可单独地或与吸水材料组合地使用干燥剂,例如硫酸钙、硫酸钙、硅胶。

[0097] 陷阱:具有坝的流体阱,其进一步将废物储存器与通风口隔离。

[0098] 通风口:内腔和大气之间相互连通的孔。“卫生”或“隔离通风口”还含有可透气体但是疏水的并且抗湿的过滤元件。任选地,这些过滤元件具有0.45微米或更小的孔径。这些过滤器在正向和反向隔离中都起作用。该类型和构造的过滤元件也可以内部放置,例如以将阀或波纹管泵与控制其的气动歧管隔离。

[0099] “常规的”是指明在本发明涉及的现有技术中已知的术语。

[0100] “约”和“总体上”是不精确的宽泛表达,其在“差不多”的意义上描述了为“或多或少”或“大致”或“几乎”的条件,其中变化将是不显著的,明显的,具有等效效用或功能,并进一步表明针对规范、规则或限制存在明显的少数例外。例如,在各种实施方案中,前述术语是指在该术语之后的值的20%、10%、5%、1%或0.1%内的量。

[0101] 在本文中,在描述“用于功能的工具”的情况下,应当理解,本发明的范围不仅仅限于附图中所示的一个或多个模式,而且还包括用于进行行本说明书中描述的功能的所有工具,以及在本申请提交时本领域中通常已知的所有其它工具。“现有技术工具”包括用于进行在本申请提交时本领域技术人员已知的功能的所有工具,包括通过参考几个实例在本文引用的本领域中的累积知识。

[0102] 用于聚合的工具例如可以是指描述为聚合酶及其辅因子和底物的各种分子工具,例如逆转录酶和Taq聚合酶,并且包括本文通过参考几个实施例引用的酶学的累积知识。

[0103] 用于扩增的工具包括热循环和等温工具。第一热循环技术是聚合酶链式反应(称为PCR),其描述于美国专利号4,683,195、4,683,202和4,800,159,Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons,Baltimore,Md.(1989)和Innis等,("PCR Protocols",Academic Press,Inc.,San Diego Calif.,1990)(其公开内容通过

引用整体并入本文)中。聚合酶链式反应方法是本领域众所周知的。简言之,在PCR中,制备与靶序列的相反互补链上的区域互补的两个引物序列。将过量的脱氧核苷三磷酸与DNA聚合酶例如Taq聚合酶一起加入到反应混合物中。如果靶序列存在于样品中,则引物将结合靶,并且聚合酶将通过加入核苷酸而使引物沿着标记序列延伸。通过升高和降低反应混合物的温度,延伸的引物将与模板解离以形成反应产物,过量的引物将结合模板和反应产物,并重复该过程。通过添加荧光嵌入剂,可以实时或在热循环过程结束时检测PCR产物。

[0104] 一种等温技术是LAMP(环介导的DNA等温扩增),描述于Notomi,T.等Nucl Acid Res 2000 28中。

[0105] 链置换扩增(SDA)是进行核酸等温扩增的另一种方法,其涉及多轮链置换和合成,即切口平移(Walker等Nucleic Acids Research,1992:1691-1696,通过引用并入本文)。称为修复链式反应(RCR)的类似方法包括在整个被靶向以进行扩增的区域中对几个探针进行退火,然后进行其中仅存在四种碱基中的两种的修复反应。另外两种碱基可作为生物素化衍生物添加以便于检测。在SDA中使用类似的方法。还可以使用循环探针反应(CPR)来检测靶特异性序列。在CPR中,具有非特异性DNA的3'和5'序列以及特定RNA的中间序列的探针与样品中存在的DNA杂交。在杂交时,用核糖核酸酶H处理反应,并且探针的产物被鉴定为在消化后释放的独特产物。将原始模板对另一循环探针退火,并重复反应。

[0106] 另一种核酸扩增技术是逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)。首先,使用逆转录酶从RNA模板制备互补DNA(cDNA),然后对所得cDNA进行PCR。

[0107] 用于扩增的另一种方法是在EPO号320 308(其通过引用整体并入本文)中公开的连接酶链式反应("LCR")。在LCR中,制备两个互补探针对,并且在靶序列存在下,每对将结合靶的相反互补链,以使得它们邻接。在连接酶存在下,所述两个探针对将连接形成单个单元。通过如在PCR中的温度循环使结合的连接单元从靶解离,然后用作用于连接过量探针对的"靶序列"。美国专利号4,883,750(其公开内容通过引用整体并入本文)描述了类似于LCR的用于将探针对结合至靶序列的方法。

[0108] QB复制酶,也可以用作本发明中的另一种扩增方法。在该方法中,在RNA聚合酶存在下,将具有与靶序列互补的区域的RNA的复制序列添加到样品中。聚合酶将复制随后可被检测的复制序列。

[0109] 根据本发明,可以使用GB申请号2 202 328和PCT申请号PCT/US89/01025(其公开内容通过引用整体并入本文)中描述的其它扩增方法。在前一个申请中,"经修饰的"引物用于PCR样模板和酶依赖性合成。可通过用捕获部分(例如,生物素)和/或检测剂部分(例如,酶)标记来修饰引物。在后一个申请中,将过量的标记探针加入样品中。在靶序列存在下,探针结合并被催化切割。切割后,靶序列被完整释放以被过量探针结合。标记探针的切割信号表明靶序列的存在。

[0110] 其他核酸扩增流程包括基于转录的扩增系统(TAS),包括基于核酸序列的扩增(NASBA)和3SR(Kwoh等,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:1173;Gingeras等PCT申请W0 88/10315,其公开内容通过引用整体并入本文)。在NASBA中,可通过临床样品的标准苯酚/氯仿提取,热变性,利用裂解缓冲液和用于分离DNA和RNA的minispin柱处理或者RNA的氯化胍提取来制备核酸以用于扩增。这些扩增技术包括使具有靶特异性序列的引物退火。聚合后,用RNA酶H消化DNA/RNA杂交体,同时再次热变性双链DNA分子。在任一情况下,通过加入

第二靶特异性引物使单链DNA完全双链化,然后聚合。然后通过RNA聚合酶诸如T7或SP6多重转录双链DNA分子。在等温循环反应中,将RNA逆转录成单链DNA,然后将其转化为双链DNA,然后再次用RNA聚合酶诸如T7或SP6转录。所得产物,无论是截短的还是完全的,都表示靶特异性序列。

[0111] Davey等,EPO No.329,822(通过引用整体并入本文)公开了涉及循环合成单链RNA(“ssRNA”)、ssDNA和双链DNA(dsDNA)的核酸扩增方法,其可以根据本发明使用。ssRNA是第一引物寡核苷酸的模板,其通过逆转录酶(RNA依赖性DNA聚合酶)延伸。然后通过核糖核酸酶H(RNA酶H,一种对DNA或RNA双链体中的RNA特异的RNA酶)的作用从所得的DNA:RNA双链体中去除RNA。所得的ssDNA是第二引物的模板,其还包括与其模板同源的5'RNA聚合酶启动子(例如T7RNA聚合酶)的序列。然后通过DNA聚合酶(例如大肠杆菌DNA聚合酶I的大的“Klenow”片段)延伸该引物,得到双链DNA(“dsDNA”)分子,其在引物之间具有与原始RNA的序列相同的序列以及额外地在末端具有启动子序列。该启动子序列可由适当的RNA聚合酶用于制备DNA的许多RNA拷贝。然后这些拷贝可重新进入循环,从而导致非常迅速的扩增。通过适当地选择酶,该扩增可以等温地进行而无需在每个循环中添加酶。由于该方法的循环性质,起始序列可被选择为呈DNA或RNA的形式。

[0112] Miller等在PCT申请WO 89/06700(其通过引用整体并入本文)中公开了基于启动子/引物序列与靶单链DNA(“ssDNA”)杂交,随后进行序列的许多RNA拷贝的转录的核酸序列扩增方案。该方案不是循环的,即,不从所得的RNA转录物产生新的模板。其它扩增方法包括“RACE”和“单侧PCR”(Frohman,M.A.于“PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications”,Academic Press,N.Y.,1990;Ohara等,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,86:5673-567,其公开内容通过引用整体并入本文)。

[0113] 在具有所得的“二寡核苷酸”的序列的核酸存在下,基于两个(或更多个)寡核苷酸的连接,从而扩增二寡核苷酸的方法,也可用于本发明的扩增步骤。Wu等,(1989,Genomics 4:560,通过引用整体并入本文)。

[0114] “用于检测的工具”:如本文所用,是指用于显示终点,即测定结果的设备,并且可包括仪器光电二极管、nephelometer、光子计数器、电压表、电流表、pH计、电容传感器、射频发射器、磁电阻计(magnetoresistometer)或霍尔效应装置。盖板中的放大透镜、滤波器、有色流体和标记的探针可用于改进检测和测定结果的解释。“标记”或“标签”包括但不限于染料诸如生色团和荧光团;和化学发光,如现有技术中已知的。装饰在磁珠上的量子点,诸如涂覆有ZnS的CdSe,或者量子点和顺磁性Fe₃O₄微粒的融合,是改善本发明的测定法的灵敏度的方便方法。还预期了荧光猝灭检测终点。与酶联免疫测定相关的多种底物和产物生色团也是本领域众所周知的,并且提供了扩增检测信号以提高测定例如“上转换”荧光团灵敏度的工具。荧光和光学检测器可包括光电二极管、光伏器件、光电晶体管、雪崩光电二极管、光敏电阻器、CMOS、CCD、CID(电荷注入装置)、光电倍增管和反向偏压LED。检测系统任选地是定性的、定量的或半定量的。

[0115] “解链分析”或“解链曲线分析”或“高分辨率解链曲线分析(HRM)”或“FRET解链分析”是加热期间双链DNA的解离特性的评估。随着温度升高,双链开始解离。50%的DNA变性时的温度称为解链点。两条DNA链之间的温度依赖性解离可以使用DNA嵌入荧光团诸如SYBR green、EvaGreen或荧光团标记的DNA探针来测量。在SYBR green(其在插入DNA的两条链的

小沟中时荧光强度高出1000倍)的情况下,在加热过程中DNA的解离可通过所产生的荧光的大量减少来测量。或者,可使用并置的探针(一个特征为荧光团,另一个特征为合适的淬灭剂)来测定探针与靶序列的互补性。基于探针的技术可在PCR后用于检测单核苷酸多态性(SNP)、新突变和甲基化模式,并且还可通过所产生的解离模式区分纯合的野生型、杂合和纯合突变等位基因。

[0116] “分子信标”是设计用于报告溶液中特定核酸存在的单链发夹状寡核苷酸探针。分子信标由四个部分组成:茎、发夹环、末端标记的荧光团和相对末端标记的淬灭剂。当发夹样信标不与靶结合时,荧光团和淬灭剂靠近在一起并且荧光被抑制。在互补靶核苷酸序列的存在下,信标的茎打开以与靶杂交。这分离荧光团与淬灭剂,从而允许荧光团发荧光。或者,分子信标还包括在末端标记的供体附近发射的荧光团。“波长转移分子信标”包含额外的收集器荧光团,其使荧光团发射更强。目前对分子信标的综述包括Wang K等,2009, *Molecular engineering of DNA:molecular beacons*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(5): 856-870; Cissell KA等,2009, *Resonance energy transfer methods of RNA detection*, *Anal Bioanal Chem* 393(1):125-35以及Li Y等,2008, *Molecular Beacons:an optimal multifunctional biological probe*, *BiochemBiophys Res Comm* 373(4):457-61。最近的进展包括Cady NC,2009, *Quantum dot molecular beacons for DNA detection*. *Methods Mol Biol* 554:367-79。

[0117] 荧光核酸测定包括带有加标签的引物和基于探针的检测化学品的扩增。可在测定结束时测定或通过实时测量扩增产物的量来测定荧光产物。

[0118] 虽然是非限制性的,但依赖于3'淬灭构建体对5'报告染料的置换和聚合酶介导的水解的TaqMan Probe (Applied Biosystems)、FRET杂交探针、基于双寡核苷酸FRET的探针(Roche)、缀合有小沟结合剂的杂交探针(MGB探针, Applied Biosystems)、Eclipse探针、锁核酸探针(Exiqon/Roche)、Amplifluor引物化学品、Scorpions引物化学品、LUX引物、Qzyme引物、RT-PCR等均适用于本发明。也可以使用嵌入染料。反转录用于分析RNA靶,并需要分开的步骤来形成cDNA。最近的进展包括Krasnoperov LN等2010. *Luminescent probes for ultrasensitive detection of nucleic acids*. *Bioconjug Chem* 2010Jan 19epub。除了化学染料以外,探针还包括绿色荧光蛋白、量子点和纳米点,所有这些都是荧光的。可用荧光团加标签于分子诸如核酸和抗体以及对测定靶具有亲和力的其他分子,以形成用于本发明的荧光测定的探针。

[0119] 在一些实施方案中,“探针”是指寡核苷酸-小沟结合分子(MGB)缀合物(例如美国专利No.5,801,155(其内容全部公开于本文中)中公开的“MGB-Eclipse”探针)。MGB部分是结合双链DNA分子的小沟的合成分子。构建探针以使得MGB和淬灭剂部分在寡核苷酸的5'-末端,而荧光团在3'-末端。MGB的5'-定位保护MGB-Eclipse探针在PCR期间不被切割,并使探针可用于PCR后解链曲线分析。在与靶DNA杂交时,通过探针从随机卷曲到线性化状态的转变产生荧光增加。在实时PCR应用中,MGB增加双链DNA复合物的稳定性,特别是探针和扩增的DNA靶之间的杂交。增加的DNA-DNA杂交体稳定性允许设计具有较高特异性的较短的检测探针。与类似的无MGB的较长的对应探针相比,所述探针的特异性增强了区分完全匹配的序列与错配的靶的能力。

[0120] “FRET”(荧光共振能量转移)-是使得能够研究分子相互作用的荧光技术。当两个

分子在杂交时这样接近时,其取决于能量从一个荧光团至另一个荧光团(即,供体和猝灭剂)的转移。最近的进展包括Carmona AK等[2009,The use of fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes,An Acad Bras Cienc 81 (3):381-92]。

[0121] 用于加热和冷却的工具:在现有技术中已经描述了用于热循环液体填充室的许多工具。这些现有技术工具包括对流和导电加热元件,例如电阻器、热空气、激光、红外辐射、焦耳加热、TEC或Peltier装置、热泵、吸热反应物等,通常与用于在循环的冷却部分期间散热的散热器结合。加热工具还可以包括通过由高频磁场驱动的磁珠的运动进行的加热。

[0122] 用于热循环的加热和冷却装置分为两类:斜坡(ramped)温度和固定温度。固定温度装置在反应中保持相对恒定的温度,并且需要至少两个反应室用于热循环。斜坡加热装置将使至少两个设定点之间温度发生变化,因此热循环仅需要一个反应室。加热元件的组合是可能的。Peltier装置可用于固定温度和斜坡应用。水浴不太适用于热循环的斜坡温度的控制。

[0123] 通常,加热和冷却工具与流控构件接口,以便与液体内容物进行热交换。对于PCR,形成发生热交换的微流体通道或室的相关元件被称为“PCR流控和热接口”组件的一部分。

[0124] “高导热聚合物”(如美国专利号7,476,702中所公开的,其内容在本文中全部公开)是具有高热导率和介电强度的聚合物组合物。聚合物组合物包括基础聚合物基质和导热电绝缘材料。可以向组合物中加入增强材料诸如玻璃。聚合物组合物包括按重量计20%至80%的聚合物基质,按重量计20%至80%的导热电绝缘陶瓷材料。聚合物组合物还可包含按重量计3%至50%的增强材料。聚合物基质可以是热塑性或热固性聚合物。导热电绝缘陶瓷材料可以是氧化铝、氧化钙、氧化钛、氧化硅、氧化锌、氮化硅、氮化铝、氮化硼或其混合物。增强材料可以是玻璃、无机矿物或其它合适的材料。

[0125] 除非上下文另有要求,否则在整个说明书和随后的权利要求中,词语“包含(comprise)”及其变型(诸如“comprises”和“comprising”)应以开放、包含的意义来解释,即为“包括但不限于”。

[0126] 在整个说明书中对“一个实施方案”或“实施方案”的引用意味着结合实施方案描述的特定特性、结构或特征包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,贯穿本说明书的各个地方出现的短语“在一个实施方案中”或“在实施方案中”不一定都指代相同的实施方案。此外,特定特性、结构或特征可在一个或多个实施方案中以任何合适的方式组合。

[0127] 现在转到附图,图1是主机仪器5000的透视图,其动画显示了将具有光学窗口1106的微流体盒1100的前鼻部1105插入到对接仓5030中。在操作期间,盒的样品端口1104和盖板1103保持在主机仪器外部。显示了触摸屏显示表面5080和紧凑的底盘或壳体5060。由于在微流体盒中提供了所有试剂和测定对照,所以仪器具有完全独立的可操作性。如下面将更详细地讨论的,对接仓是悬挂安装的并且可以相对于仪器底座成一定角度倾斜。

[0128] 图2是提供主机仪器测定设备的功能单元的概述的框图。机械、气动液压、温度控制、光学、和输入/输出(I/O)系统由两个数字处理器协调,第一个称为“主机控制器”,其接收用户命令并输出测定结果,并且还指导测定的机械、热和气动液压过程步骤,以及第二个称为“嵌入式微处理器”,其对光学系统进行局部控制,包括在检测器头内的信号采集和处理,并将数字数据传送至主机控制器。由嵌入式处理器控制的光学系统在检测器头内与设

备壳体内的噪声模拟电路屏蔽开来,从而允许在相对无噪声的环境中的高增益放大。每个处理器被提供以单独的时钟、易失性和非易失性存储器,并且彼此自主地进行。

[0129] 作为概述,仪器内的浮台(floating stage)(1000,虚线)支持用于接收和可逆地夹紧微流体盒的对接仓(此处为1001),并且被提供有扫描检测器头311。在主控制器的控制下,检测器头在微流体盒的光学窗口上扫描。检测器头含有用于提供激发的子组件和用于检测、放大和处理荧光发射信号的传感器。浮台架在安装至固定底板和仪器支架上的弹簧悬架上。

[0130] 固定至固定基板并定位成与浮台接口的是在主机控制器1003的控制下具有可单独控制的加热块和Peltier热泵的加热器模块,连接至安装在基板330上的气动伺服机构的气动接口,其也用作气动分配歧管,连接步进电机与主机控制器的线束,以及用于夹具电机和相关传感器(包括用于测量夹具和微流体盒的位置的压力开关)的线束,条形码读取器和温度监视器。电源从安装在仪器支架中的电池分配至所有系统,或通过直接连接至AC转换器或DC源(诸如自动)来分配。

[0131] 主机控制器1003安装在还含有用于操作仪器的触摸板面板和LCD显示面板的主板上。仪器可经由各种数字串行I/O链路(包括无线网卡或其他远程通信装置)将数据发送至外部网络或装置。提供了特殊的数字中继(Digital junction),用于访问RAM寄存器和编程的服务器,所述数字中继是在固态ROM中编码的软件。

[0132] 由与主机控制器相关联的可编程软件提供用于操作仪器的一般指令,诸如操作具有诊断来自液体样品的特定疾病或病理的能力的特定微量测定卡所需的气动脉冲和阀逻辑的序列,所述软件被提供以用于执行测定的易失性和非易失性存储器。如果例如条形码读取器检测特定的微量测定盒,则该装置被编程来进行由该条形码识别的特定测定,并以指定的格式解释和显示结果。

[0133] 然而,信号采集光学器件的操作,包括源强度的调制、信号放大和过滤,在驻留在检测器头311内的传感器PCB上的嵌入式微处理器1841中的守护进程的控制下。因此,对噪声高度敏感的电信号在检测器头中被与主机仪器中的更嘈杂的环境屏蔽开来,并且完全避免了从检测器头到主机A/D转换器的模拟信号的传输。该非常规的功能分离已经证实非常有利于降低仪器的噪声敏感性,这是完全可携带性和现场操作所需要的,并且出乎意料地允许在期望是嘈杂的电子环境中使用高增益三级放大器。

[0134] 图3A和3B是与本发明的设备一起使用的一次性的、单个使用的、采样-应答的微流体盒的透视图,该盒含有用于测定的所有试剂并仅需要引入测试样品。该盒还含有进行过程对照以及阳性和阴性测定对照所需的所有试剂。此处所示的盒由第一模制壳体1101和具有内部工作部分和盖板1103的第二模制壳体1102组成。端口1104用于接收测试样品,并且前鼻部1105用于插入主机仪器的对接仓。从下面显示的是具有测定孔组件1201的第二模制壳体。第一模制壳体中的窗口1106是在测定孔组件1201中的样品孔上方形成的光学窗口。垫1206用于与主机仪器的气动接口多端口密封地接口。核酸捕获组件1208用于从测试样品提取核酸。

[0135] 图4是显示微量测定盒1100的内部部件的分解图。该特定盒被设计用于利用FRET或分子信标检测的PCR。优选由本领域技术人员根据诊断应用和要满足的具体要求来确定待使用的盒设计和分析反应的细节,并且提供以下详细描述仅用于举例说明。

[0136] 通过入口端口1104添加测试样品。第一模制壳体1101的前鼻部上的光学窗口1106插入至主机仪器中并将其对准,以使得测定孔组件1201的孔被仪器检测器头扫描,所述仪器检测器头遵循纵向横切光学窗口的线性路径。通过波纹管式混合器1107A和1107B以及核酸捕获组件1208提供与测试样品制备相关的附加处理。样品制备所需的所有液体试剂被封闭在密封的可破裂的箔袋1205中,并且在需要时在气动控制下分配。在该实施方案中,第一模制壳体被配置来提供六个箔袋,但本领域技术人员仍然可以根据特定的目标测定的要求来确定所需的袋的数量。尖锐物1209由不锈钢制成,具有以相对于箔袋垂直向下的角度突出的刺穿边缘1211。通过弹簧1207防止箔袋的过早破裂或刺破,弹簧1207界于箔袋和尖锐物之间界面,保护袋不受尖锐物的刺穿边缘的刺穿。弹簧由聚氯乙烯(PVC)制成并且是被塑形以在尖锐物上形成“帐篷”式的可变形结构。在气动启动时,可变形弹簧的固有力被克服,弹簧“啪”地向下扣在尖锐物上。弹簧在顶部形成有孔,以使得尖锐物的刺穿边缘能够通过,这使箔袋破裂。有利地,钢刺穿边缘的角度有助于箔材料的剪切,同时防止剪切的材料界面重新密封。我们已经发现,该机制提供了液体试剂的更可靠和有效的递送。以干燥形式在卡上提供其它试剂(例如用于核酸扩增和检测)。流体废物被隔离在胶合至凹入区域1210中的吸附剂絮垫中,并被原位密封在塑料盖板1103下面。任何特定分子测定的细节不在本发明的范围内。在本实施方案中,具有内部微量测定通道和孔的测定孔组件1201提供通过热循环扩增核酸靶序列和任何所得扩增子的荧光检测。

[0137] 图5是描绘微流体盒1100的层组件的分解图。第一模制壳体1101与第二模制壳体1102之间的接合是层压层1301、1302和1303的层压堆叠,其提供例如阀门控制(valving)和混合功能,并整合在第一和第二模制壳体中形成的气动和液体回路,如下面进一步描述的。由主机仪器提供的气动供应被引导通过第二模制壳体中的气动端口1115。气动供应流体连接至第一模制壳体1101中的回路,其也可被称为“气动层”。如本文所使用的,术语“流体连接”是指两个特征形成用于任何类型的物质(例如气体、液体、溶液、固体的水性悬浮液等)的通过和/或输送的导管。液体通道由第二模制壳体1102和层压层1301中的回路形成,其也可以被称为“液体层”,并且与试剂包1205、核酸捕获组件1130和PCR组件1201流体连通。气动和液体回路平面分离,分别进入上模制壳体和下模制壳体中的,防止空气和流体管线的交叉,从而提供了有利地坚固的盒体系结构。多个气动液压膜或隔膜被焊接入层压层1302中以形成微流体盒的混合器、阀和分级室,如下面进一步描述的。层压层1301、1302和1303进一步被切割成具有孔和通道,以连接在第一和第二模制壳体中形成的气动和液体回路。层压层1303和1301用本领域已知的粘合材料制造,以将第一和第二模制壳体固定地结合至组装的微流体盒中。气雾过滤塞1125被装配至下模制壳体中的气动端口1115中,以在微流体与主机仪器之间产生物理屏障。气雾过滤塞1125可以由液体可膨胀或超可膨胀材料(诸如**POREX®**)制成,并且用于防止流体转移和吸收被雾化材料(诸如核酸)。通过试错,本发明人已发现,将气雾过滤塞装配至盒的气动端口中有效地将主机仪器与盒中的液体和固体物质隔离。这有利地防止污染主机仪器,主机仪器的污染可能危及后续的诊断测试结果并且引起相当大的调节问题的。核酸捕获组件1130被装配至第二模制主体中的凹陷室中并且与液体通道流体连通并且与主机仪器热接触,如下面进一步详细描述。

[0138] 图6A-C显示微流体盒1100的第一气动层1101、层压阀层1302和第二液体层1102的气动和液体回路以及焊接气动液压膜的进一步细节。图6A是第一模制外壳(即“气动层”)

1101的底表面的平面图。第一模制外壳通过注射模制聚合物材料(诸如聚对苯二甲酸乙二醇酯乙二醇(polyethylene terephthalate glycol, PETG))制成。气动层的一个功能是密封盒组件中的阀层1302的气动侧。第一模制壳体中的气动管线的网络控制阀(此处以管线1150A为例)、混合器(此处以管线1150B为例)和试剂包分配(此处以管线1150C为例)的操作。我们已经发现,在给定气动管线的控制下最小化“特征组”(例如,阀、混合器、试剂包)的数量是必要的。已经发现将特征组复用至单个气动管线促成较高水平的盒故障。通过试错,我们已发现连接至20个端口1160的20个气动管线,各自与泵、阀和通风口以单独的压力相关联,适用于大多数测定。然而,本发明不旨在限于这种构造,并且可以设想其它合适的气动构造。

[0139] 图6B是层压层(即“阀层”)1302的平面图,其描绘了进行微流体盒的阀门控制、混合和流体止动功能的气动液压隔膜或膜的构造的说明性示例。用于微流体盒中的微型阀、微型泵和其它气动流体元件的膜片技术及其制造和焊接的方法描述于本申请人的共同未决专利申请No. W02014100743和W02011/094577中,其通过引用整体并入本文。可将所有的膜焊接到单个基板材料中(例如**MELINEX®** PET膜)以形成层1302。在该示例性构造中,阀膜1310由**DURA-LAR®** PET膜制成;混合膜1320由**SARANEX™**膜制造;并且分级室1330和流体止动1340膜由微孔膜(诸如**PORELLE®**膜)制成。该视图示出了层压层的侧面,其中膜被焊接至其上并且接触图6A所示上模制壳体的表面。本领域技术人员将理解,可以在层压层1302中采用任何数量的替代阀门以及混合构造和材料。

[0140] 图6C是第二模制壳体1102的上表面(即“液体层”)的平面图。第二模制壳体的一个功能是密封盒组件中的阀层的液体侧。第二模制壳体中的流体管线1107在盒中的功能特征之间输送流体,以进行体外诊断测试,例如,分子测定。功能特征可包括在第一模制壳体和/或层压层和核酸捕获组件1130、分级室1180、测定孔1185和流体止动器1195内封装或形成的试剂包、阀和混合室。通孔1190A和1190B将第二模制壳体与测定孔组件流体连接。窗口1185在下模制壳体中被切割以与测定孔组件的孔匹配,用于检测测定信号。如上所述,空气端口1115与仪器气动歧管和第一模制外壳中的气动管线气动连接。第二模制壳体通过注射模制聚合物材料诸如聚碳酸酯(PC)或聚对苯二甲酸乙二醇酯乙二醇(PETG)来制造。

[0141] 图7是本发明的一个实施方案的示意图,其显示微流体盒的各种功能单元如何可由示例性的阀门控制和流体逻辑控制。显示了样品入口1104,填充有示例性试剂的箔包装件1205,混合器(即波纹管泵)1107A和1107B,核酸捕获膜1208,PCR孔1260和流体止动器1255。取决于特定目标测定,反转录孔是任选的。

[0142] 图8A和8B分别是显示核酸捕获组件1130的细节的分解等距图和横截面视图。核酸捕获组件包括壳体1131、捕获基质1132、基质支持介质1133和粘合剂垫1134。壳体1131是大致中空的不对称形状的圆柱形,其将组件的其他部件保持在中空内部中。壳体由诸如PC或PETG的聚合材料模制成不对称形状,该形状键入下部模制体中的互补形状的凹部中。捕获组件在第二模制壳体中的适当定向确保了液体通道的适当流体连通。捕获基质或膜1132用于结合和释放靶核酸,所述核酸可以是DNA和/或RNA。合适的基质或膜材料是本领域众所周知的,并且可包括氧化硅或玻璃纤维膜。核酸捕获膜进一步由两个捕获膜支持介质盘或玻璃料1133A和1133B支撑。如横截面视图7B所示,两个介质支撑玻璃料在捕获膜的顶表面和底表面上被设置为平行构造。该平行构造有助于维持捕获膜中的基质纤维的均匀分布,本

发明人已经发现,这对保持液体通过膜的均匀流动是重要的。这是对现有技术的过滤器或膜的明显改进,已知现有技术的过滤器或膜由于缺乏结构支持而在液体接触下塌陷,因此不能有效地结合靶核酸。捕获膜支持介质1133A和1133B可由任何合适的材料(诸如**POREX®**)制成。本发明也设想了替代的支持介质实施方案。在一个实施方案中,聚丙烯垫圈可为捕获膜提供支撑。垫圈还可被构造来密封壳体通道的边缘并且防止液体样品围绕捕获膜的边缘流动。在另一个实施方案中,聚合物壳体结构本身被模制以提供侧向膜支撑特征。捕获膜粘合剂垫1134用于将捕获组件粘附到下模制壳体,并且可由任何合适的粘合剂材料制成。

[0143] 图9显示了适于几种分子反应(包括但不限于反转录、终点PCR、实时PCR和定量PCR以及解链曲线分析)的测定孔组件1201的透视图。在该实施方案中,所示的组件被配置用于通过在相同测定孔中进行热循环和FRET检测的终点PCR。PCR孔层1250用于扩增洗脱的核酸靶分子,并且所述孔层由高导热聚合物(诸如聚丙烯)制成,用于最佳的热传递和减少的PCR循环时间。合适的聚合物的热导率范围优选为1.0W/mK至10W/mK。在一个实施方案中,高导热聚合物是**COOLPOLY®**D1201。液体样品通过与第二模制主体中的液体通道流体连通的通孔1280进入孔层。层1250的每个样品通道与两个孔流体连通:大致球形的孔1255和菱形孔1260。菱形孔1260是扩增和检测孔,并且含有核酸扩增和任何所得的扩增子的检测二者所必需的所有试剂。我们已经发现,菱形孔1260的几何形状有利地促进干试剂的润湿和再水合,而不形成气泡。菱形孔的成角度的侧面是相对于标准垂直或圆形边缘的改进,其增强了发射荧光的收集和检测。较小的半球形孔1255用作流体止动器并且与焊接至层压层1302中的透气不透液体的膜1346流体连通。在该实施方案中,PCR孔组件含有九个测定孔,用于检测至多三种个靶分析物。对于每个靶分析物,如上所述,存在用于相应的阳性和阴性集成对照的两个对照孔。用于靶分析物的扩增和检测的孔与核酸捕获膜流体连通,并接收含有洗脱核酸的液体样品。相反,集成的对照孔不与核酸捕获膜流体连通,而是接收空的洗脱缓冲液作为测试样品。空孔1299不与第二模制主体流体连通,并且在光学检测期间可以用作荧光标准,但是本发明可以设想其它用途。覆盖PCR孔层1250是用于将PCR孔组件固定地附着到第二模制壳体的粘合剂层1275。分析孔组件还包括在孔层1250与粘合剂层1275之间的帽盖层。帽盖层是光学透明的盖,其允许检测靶信号,同时防止液体试剂泄漏出PCR孔。

[0144] 主机仪器系统

[0145] 本发明主机仪器的机械、加热、夹持、光学、软件和固件、主机控制器和去耦光学功能的某些方面公开于整个申请人的共同未决的专利申请号W02014/100725(其通过引用整体并入本文)中。下面描述的特征代表某些替代实施方案和对现有技术的改进。

[0146] 具有在板(on-board)光具座和对接仓的浮台是仪器的显著特征。该特征在图10中被概念性地引入,其是仪器的主要光热机械子系统的概念表示。浮台由托盘样底盘301(虚线框)组成,所述托盘状底盘301通过四点弹簧安装的悬架悬挂在倾斜平面上并支撑用于接收微流体盒的对接仓103。浮台300上还支撑有安装在成对导轨上的检测器头311。盒不是仪器100的一部分,而是在插入浮动对接仓103之后与仪器接口。

[0147] 在操作期间,浮台相对于安装板(330)被夹紧,并且接合区域加热块和Peltier热泵以及相关电阻加热元件和电路的接触表面。提供风扇以在操作期间耗散仪器的过量热量。倾斜安装板还提供有用于密封地对接至微流体盒的基部的气动接口端口350。气动压

力通过气动接口端口从嵌入在倾斜安装板330中的整体气动分配“歧管”或系统传递至盒。气动歧管从安装在倾斜安装板上的源供应负压和正压。主板安装的可编程主机控制器通过底板330和气动接口端口350中的内部歧管将气动驱动压力、真空和控制脉冲引导至盒上的泵和阀。

[0148] 检测器头311被电机驱动化并且在主机控制器的控制下进行盒的扫描。为了沿着成对导轨扫描检测器头,主控制器接合由步进电机驱动的蜗轮。检测器头配备有具有物镜的外部窗口,其扫描微流体盒的前鼻部中的光学窗口并收集原始光学信号。检测器头311具有其自己的嵌入式微处理器,其独立于用于光学信号采集的主控制器而起作用。主控制器还调节加热块和Peltier热泵中的温度,并控制与气动接口连接的一组电磁阀以及正压和真空泵储存器。仪器配有用于用户交互的显示面板和触摸面板。电源输入灵活,任选地由交流适配器、汽车适配器或安装在仪器下面的可充电电池供电。还包括任选的无线I/O和数字I/O端口。

[0149] 图10概念性地显示浮台301、对接仓103、检测器头311并且微流体盒可相对于接地平面以限定的角度安装在仪器底盘中。以与接地平面成一定角度倾斜盒改善了在流体装载期间的排气并且在润湿和混合操作期间最小化了空气夹带。通过本文公开的这种和其他创新避免了干扰热传递和分析结果光学探测的气泡聚积。倾斜安装板330确定浮动台301、盒以及夹持和光学扫描子组件的机械部件的角度。我们发现气泡聚积干扰核酸扩增,并受到平台的角度底座的限制。已经发现该角度“ θ ”在距离接地平面的以下角度范围内是有利的:10-45度,更优选地是10-20度,最优选地是约15度。

[0150] 如图10所示,检测器头311包括具有配合半壳(312,313)的蛤壳式壳体。检测器头在侧向导轨308和309上滑动,并且在具有蜗杆传动的步进电机的主控下。将浮台底盘301弹簧形式地安装在四点悬挂件中,并且在被夹紧之前不与倾斜安装板330直接连接。两个扫描导轨308中的一个在该视图中是容易可见的,并且在任一端由浮台底盘或托盘301支撑。对接仓由虚线框(103)表示,并标记用于将微流体盒的鼻部插入检测器头311下方的开口,所述检测器头被使得能够如图所示(双箭头)从一侧扫描到另一侧。气动接口端口350在此处显示为在对接仓下方的升高平台。功率调节、交流适配器和电池存储功能被安装在倾斜安装板330下方,仪器底座329的下侧上方,其被设计来搁置在平坦表面上。

[0151] 图11是仪器底部的CAD视图,其显示细节的内部,包括具有Peltier热泵341和加热块342的加热器组件。加热器组件的优点在于由一个或多个加热块和Peltier热泵组成,其每一个与微流体盒的下侧上的限定区域形成热界面,用于在测定期间在盒的封闭通道和室中发生的分子生物过程和/或反应的正确操作。这些过程和/或反应可以与细胞裂解和核酸提取一样简单,或者如反转录和核酸扩增一样复杂,并且通常需要相对严格的温度控制以获得最佳反应性和特异性。Peltier热泵和加热块可以是弹簧安装的,并且与夹紧机构的向下压力相反地被向上推动,以建立用于热传递的高热扩散率接触区。还显示了气动接口端口350,每个独立地端口连接至来自主机仪器的气动分配歧管的正压或负压源,并且独立地在可编程主机控制器的控制下。该实施方案描绘了20个气动端口,但是本发明可以设想其它合适的构造。这些出口与微流体卡的下侧中的配合入口接口并密封,并且互通的气动压力、真空和压力脉冲的定时模式通过气动接口传送以驱动和控制盒中的测定。

[0152] 图12是描绘与主机仪器的夹紧机构500接合的微流体盒200的CAD视图。还显示了

齿轮400、弹簧301和检测器头支撑件311。如上所述,在盒第二模制壳体的下侧上的硅橡胶垫以弹簧力配合至主机仪器的气动歧管,并且当盒被加载至仪器中并施加弹簧压力时,在压缩下密封气动互连。垫1206用作单个使用的密封垫,并且有利地与一次性盒一起提供,而不是如传统知识那样作为仪器的一部分。通过将垫圈包括在一次性盒中,在气动接口处获得更好和更清洁的密封,并且消除了定期更换垫的需要。在该构造中,盒流体地接合在气动控制接口多端口上并且与热块342和Peltier热泵341热接触。仪器气动控制歧管通过气动接口多端口350向盒提供经调节的气动压力。在完整的仪器中,安装板330装有用于控制卡气动的压力调节器、蓄压器和螺线管。

[0153] 压力状态通常选自一系列正压和负压,包括但不限于+150kPa、+100kPa、+70kPa、0kPa、-35kPa和-50kPa,其中例如较高的压力用于破裂试剂包,负压用于打开阀等。这些压力可以从缓冲的压力储存器供应。也可以使用拨号可变压力供应。气动状态通过在微处理器控制下的歧管子电路供应至盒。每个测定由根据使流体移动通过液压回路所需的气动阀和泵逻辑执行的一系列步骤组成。通风孔也是回路的必要部分,并且根据每种个体测定类型的要求,加压、反转压力和通风都在仪器和相关微测定回路的能力范围内。

[0154] 光学系统

[0155] 图13是具有分别用于激发和发射检测的两个光学通道和电子绝缘电路板(1301, 1302)的双通道检测器头1300的透视图。在该视图中,壳体1303的上半部被移除,以便显示检测器头的内部部件。双通道由物镜(1310, 1330)以及光路A和B(空心箭头标记的A和B)标记。SMD LED激发光源(1311, 1331)安装在源LED印刷电路板(1301)上,其通过边缘型电阻引脚连接器(1304)与传感器PCB(1302)成直角连接。光电检测部件安装在传感器PCB(1302)上。法拉第笼元件(1306)用于屏蔽光电二极管(1317)和(1337)以及周围的高增益放大电路。

[0156] 通过表面安装的LED(1331)在靶通道(箭头A)中提供荧光激发,其被选择为匹配靶荧光团的激发光谱。源LED(1331)发射发散光束,然后辐射光束通过源激发透镜(1332)准直。源透镜(1332)是其平坦表面朝向LED的平凸透镜。然后,准直光束可以通过激发带通滤波器(1333)。检测器头具有在测定期间修改LED强度的能力,例如在测定期间随着系统的热增加或减少或当需要多个激发强度时随着时间保持恒定的LED强度。这通过闭环的直接LED强度调制电路来实现,其中约5%的准直的经滤波的激发光从光采样器反射镜通过中性密度滤波器反射至LED强度检测器。然后,准直的、经滤波的激发光束的剩余部分从安装在与入射光束成45度角的二向色镜元件或分束器(1334)反射,并且通过平凸物镜(1330)并通过检测器壳体中的外部窗口(箭头A)。在通过透镜1330之后,激发光被聚焦通过嵌入在微量测定盒中的检测室(未显示,参见图14-17),其含有具有任何靶荧光团的样品液体。通过使用微量测定盒后面的后反射镜使通过样品液体的激发光的路径长度加倍。靶荧光团被入射光束激发。荧光团的发射通常在比激发波长更长的波长处,并且偏移等于靶荧光团的斯托克斯位移的量。

[0157] 来自检测室中的靶荧光团的返回发射的一部分由平凸取样透镜1330收集并且在撞击二向色镜1334之前被准直。任选地,菲涅尔透镜可用于进一步减小透镜和样品之间的工作距离以优化发射光的收集,这通过安装在检测室后面的加热块上的后反射镜进一步增强。因为二向色分束器1334在激发与发射波长之间具有波长截止,所以二向色镜1334现在

用作发射的荧光光束的通带分束器和用于激发光的阻带滤波器。它透射发射的荧光,同时反射被反射的激发光和通过物镜窗口进入光路的任何环境光。通过二向色分束器1334的发射光然后通过发射滤波器1335,其目的在与图20相关的描述中进一步解释。然后,离开发射滤波器1335的光通过平凸传感器透镜1336,在那里其被聚焦至表面安装到PCB 1302的光传感器1337的表面上,并且被法拉第笼1306保护免受电噪声。

[0158] 上述光学路径可在多个(例如5个)通道中重复,具有检测任何荧光发射带的潜力。第二(对照)通道具有对照激发LED 1311、平凸激发透镜1312、激发滤波器1313、二向色分束器1314、物镜1310、对照发射滤波器1315、平凸传感器透镜1316和对照光电二极管1317。来自两个光电二极管的输出由三级跨阻抗放大器放大,所述放大器内置于光电二极管旁边的板中,并且经由来自放大器的仔细屏蔽的引脚接地至传感器PCB上的嵌入式微处理器。

[0159] 在一个实施方案中,如通过使用荧光素和德克萨斯红作为荧光团所示例的,激发LED 1331是用于靶通道的具有带通激发滤波器1333的470nm LED(用于传递基本上单色的 $485 \pm 12\text{nm}$ 的光),具有带通滤波器1313的590nm LED 1311用于对照通道。使用130Hz的选通率来调制或“选通”打开和关闭激发LED以在50或60Hz以及与荧光架空照明相关联的谐波频率处过滤与交流电源相关的噪声,还过滤与杂散环境光相关的幻像信号以及可能存在于30或60Hz的电噪声。如上所述,局部反馈传感器用于监测和稳定源LED输出强度。荧光团发射的检测监测与在由主机控制器控制的步进电机的功率下的检测器头的轨道上的移动协调。检测器头中的嵌入式微处理器和相关电路设有RAM存储器、ROM存储器、A-D转换器、三级跨阻抗放大器以及处理这些功能的信号处理和命令序列固件。

[0160] 光传感器1317和1337中的每一个安装在普通PCB 1302上。来自这些光传感器中的每一个的输出信号支路直接连接至各自三级跨阻抗放大器的前置放大器或第一级(未显示)。PCB 1302广泛使用硬件降噪部件,特别是嵌入式接地平面和法拉第笼1306,以最小化任何RF或电磁干扰对输入信号的不想要的影响。放大器通过法拉第笼、旁路电容器、信号调节前置放大器、单独的接地平面、金属化的探测器头壳体或其组合来屏蔽电子噪声,并且放大器紧密地电接近传感器。光学信号采集、预调节、放大和数字化由在屏蔽环境中操作的自主守护进程控制。这些硬件降噪元件与在检测头中的局部控制下的光学数据采集、数字化和处理方法的组合导致基本上免于不想要的噪声影响的检测器设计。三级放大器可被配置用于至多 10^{14} 的增益,并且根据需要可选择地被配置用于 10^2 、 10^3 、 10^6 、 10^{10} 或 10^{12} 的增益。

[0161] 我们惊奇地发现,在扫描头中封装信号处理通过最小化信号路径长度并允许在必要时有效使用法拉第屏蔽,诸如在传感器二极管周围以及在激发电路板和传感器电路板之间的接合处,实现具有改善的信噪比和灵敏度的隔离的低噪声环境。任选地,检测器壳体可由铝制成或涂覆有导电聚合物并且接地以进一步屏蔽内部电子装置来免受不期望的干扰。有利地,在该环境中实现较高的信号放大。

[0162] 图14是荧光检测器头1300的内部光学部件的示意图,显示了在微量测定盒中具有光学窗口的外部光学接口。非常规地,在单个检测头中形成多个独立的光学路径或“通道”,并且共享电子PCB和下游信号处理电路,但是激发光学器件安装在一个电路板上,而检测光学器件安装在另一个上,以减少噪声干扰。两个板通过角安装的引脚结电耦合,并且使用安装在分开的接地平面上的旁路电容器电隔离。

[0163] 图14中显示了用于激发嵌入在微量测定盒1402内的检测或样品孔(1403)中的荧

光团的光学跃迁。该头是扫描头并且跨过微量测定盒1402移动(双箭头)。来自PCB 1301上的激发LED 1331的光由透镜1332准直并且基本上由带通滤波器1333单色化。如上所述,通过将准直光从光采样器反射镜1338反射通过中性密度滤波器1339至LED强度检测器1340,来形成LED强度对照回路。检测孔1403中的任何一种或多种荧光团(无论是对照还是靶荧光团)都被物镜1330聚焦在样品上的入射光1420激发。在图X中,荧光团的发射由物镜1330收集,并在通过二向色分束器1334、发射滤波器1335和传感器透镜1336之后传输至传感器1337。传感器1337与高增益晶体管的基极直接接触,所述晶体管放大输出信号并在法拉第笼中屏蔽。发射的荧光通常根据荧光团的斯托克斯位移而处于更长的波长,使得发射的光能够无损地通过二向色带通镜1334和发射带通滤波器1335。因此,从样品室1403a返回到物镜1330的光是发射和反射荧光1421和反射激发光1420的混合光。提供光阱(未示出)以捕获杂散反射。反射光1420不通过二向色镜1334并且返回到源,并且不干扰传感器1337处的发射强度的测量。单个通道的光学元件(包括激发源、源准直透镜、激发滤波器、二向色镜、物镜、激发滤波器、传感器透镜和具有放大器的检测器)组成具有基本上单色源波长和用于检测靶(或对照)荧光团的特定波长特性处的荧光的高度特异性传感器的光学模块。一个光学模块或通道可以用于测定靶,另一个模块用于对照通道。串联安装的光学通道可用于收集多个荧光团上的数据,其中在传输到主机仪器之前,电处理通过嵌入式微处理器在常驻守护程序的控制下多路复用。如所显示的,两个通道中的每一个在两个电路板中的每一个上共享电路,但是具有分开的光学器件。任选地,可通过所示的光学元件的复制过程将附加通道加入检测器头中。

[0164] 微量测定盒1402相对于检测器头1300是可移动的(双箭头),并且检测器头或盒托盘或安装底盘的电机驱动化允许扫描:横跨过盒1402例如允许对样品室1403进行测量。通过使用并排安装在检测器头中的多个检测光学模块,可串联地扫描样品室的多个荧光团。

[0165] 根据一个实施方案,激发电子器件安装在印刷电路板(1301)上,并且检测电子器件安装在第二PCB(1302)上。边缘连接器1304电连接板。法拉第笼1306保护传感器和相关联的高增益放大器免受杂散电磁噪声。Peltier热泵的温度可在扫描期间被斜变,例如在具有在主控制器的控制下的温度和电机驱动作用的FRET解链测定中,同时在自主过程中由检测头中的嵌入式处理器获取光学数据。

[0166] 测定验证和质量控制

[0167] 偶然地,本发明的主机仪器的自主检测器头部功能可以被多路复用在含有用于检测个体荧光团的分开的光学通道的双头和多头检测器中,以使得每个通道包含用于照射激发光的LED,至少一个光路,所述光路具有激发滤波器、发射滤波器、调谐成能够检测来自限定通带中的荧光团的发射的二向色镜、用于会聚所述激发光并且用于收集所述发射的物镜、用于接收任何通带发射的传感器和用于放大来自传感器的输出的增益放大器,其中每个LED被配置来在一系列频率范围内照射光,以使得通道的照射频率不重叠,并且每个光学通道被配置来使得通道的发射通带不重叠。此外,如上所述,每个光学通道配置有LED强度控制电路,以在操作期间修改LED强度。

[0168] 对于测定验证,提供两个传感器通道(或更多个)用于监测两个或更多个荧光团,所述两个传感器通道被配置来使得来自每个荧光团的发射通带不重叠。在优选实施方案中,第一检测通道用于检测靶信号,第二检测通道用于检测内部过程对照信号,并且当且仅

当报告有效的内部过程对照信号时,报告测定结果。

[0169] 该系统已证明在验证测定操作方案时是有用的,该方案需要“双重”或更多重靶和过程对照信号的配对收集。其中,对于FDA CLIA豁免要求,靶和过程对照模板二者都被平行扩增,在测试样品的测定结果可以报告或记帐之前,必须存在阳性过程对照信号。在没有可检测的过程对照信号的情况下,检测到的任何靶信号不是有效的结果。如果满足这一条件,根据1988年临床实验室改进修正案(CLIA),可以免除关于简单的低风险试验的规定,并且在医生办公室和各种其他场所进行没有监督的测试。为了满足这些CLIA豁免要求,荧光检测器必须能够不仅检测例如通过PCR扩增的靶传染性生物体的存在,而且还检测与靶共存的内源人对照生物体或内源人基因的存在,并通过相同的PCR反应或在仪器中平行进行的PCR反应对其进行扩增。例如,过程对照可以是人线粒体基因,在本发明的优选实施方案中,过程对照是编码线粒体细胞色素c氧化酶亚单位2的MTOC2基因。

[0170] 可以针对UV、可见光区域和近红外光谱中的波长配置检测系统。有接近单色输出、滤波器、生色团和荧光团的可用光源允许调谐在300至900nm的范围内的激发和发射通带。对于在为本发明的优选操作模式之一的荧光检测模式中的应用,可针对在UV和可见光谱中具有激发光谱并且在UV、可见光和近红外光谱中发射的特定荧光染料配置装置。虽然红移是更典型的,但也可使用上转换荧光团。

[0171] 多路复用至嵌入式微处理器的输入,以使得可同时测定几种靶分析物和内部过程对照。检测器头提供有至少两个或更多个光学通道,每个光学通道具有在离散波长下操作的独立激发光学器件和发射光学器件。白色激发光不用于在多重测定中消除不同荧光团之间可能的串扰,诸如当靶荧光团和内部对照荧光团混合在共同的液体样品中时。

[0172] 良好的实验室规范标准还需要使用阳性和阴性测定对照来验证诊断测试结果,所述对照通常作为外部对照进行。在对现有技术的巨大改进中,本发明的微量测定盒提供有集成的阳性和阴性对照。图15和16举例说明了集成至通用微流体测定回路中的本发明的阳性和阴性对照回路的某些实施方案的细节。图15是显示本发明的一个实施方案的装置100的示意图。微流体装置100具有两个独立的测定回路:测试测定回路200和对照测定回路300。测试测定回路200包括与微流体通道215和样品提取室220流体连通的样品入口端口210。样品提取室220与下游通道235和一个或多个测试测定孔流体连通。在该实施方案中,微流体通道235与三个测试测定孔250a、250b和250c流体连通,但是本领域技术人员将理解,测试测定回路200可包括任何数目的测定孔。测定孔250a、250b和250c含有进行分子测定(例如PCR)以及检测测定信号(例如荧光信号)的存在或不存在所必需的所有试剂。每个测定孔含有酶混合物270a、270b或270c,其组成相同。酶混合物含有扩增靶模板和过程对照模板所需的酶和其它试剂。每个测定孔还含有过程对照引物/探针混合物275a、275b或275c,其组成也相同。过程对照引物/探针混合物含有适于扩增和检测过程对照模板的引物和探针。每个测定孔还含有适合于扩增和检测独特靶模板的独特靶引物/探针混合物,在图15中通过不同的颜色加以区分。在该实施方案中,测定孔250a包含靶序列1引物/探针混合物280,测定孔250b含有靶序列2引物/探针混合物285,并且测定孔250c含有靶序列3引物/探针混合物290。虽然该实施方案被配置来检测三个测试靶序列,但本领域技术人员应容易地理解,可通过增加或减少本发明的测定孔和靶序列引物/探针混合物的数目来测定任何数目的靶序列。

[0173] 微流体装置100的对照测定回路300包括与下游微流体通道325流体连通的对照缓冲液室320。在一个实施方案中,对照缓冲液室320含有不含任何生物材料(例如,核酸)的空缓冲溶液。微流体通道325分成两个对照通道,阴性对照通道335和阳性对照通道345。阴性对照通道335与阴性对照测定孔350a、350b和350c流体连通。在该实施方案中,阴性对照通道与三个测定孔流体连通,但是本领域技术人员将理解,阴性对照回路可包含任何数目的测定孔。每个阴性对照测定孔对应于独特的测试测定孔之一。如测试测定孔一样,阴性对照测定孔350a、350b和350c含有用于进行分子测定以及检测过程对照模板和靶模板的存在或不存在的相同试剂。阴性对照测定孔350a、b和c分别含有酶混合物370a、370b和370c。这些酶混合物中的每一种的组成在每个测定孔中是相同的。酶混合物含有用于扩增靶序列和过程对照序列所必需的酶和其它试剂。测定孔350a、b和c还含有过程对照引物/探针混合物375a、375b和375c。这些内部对照引物/探针混合物中的每一种的组成在每个测定孔中也是相同的。过程对照引物探针混合物含有适于扩增和检测过程对照序列的引物和探针。每个测定孔还含有独特的靶序列引物/探针混合物。在该实施方案中,测定孔350a含有靶序列1引物/探针混合物380a,测定孔350b含有靶序列2引物/探针混合物385a,并且测定孔350c含有靶序列3引物/探针混合物390a。靶序列引物/探针混合物380a、385a和390a中的每一个含有扩增和检测独特的目标靶序列所必需的引物和探针。混合物380a的引物/探针与混合物280的引物/探针相同,而混合物385a和390a的引物/探针分别与混合物285和290的相同。

[0174] 阳性对照通道345进而与阳性对照测定孔360a、360b和360c流体连通。在该实施方案中,阳性对照通道与三个测定孔流体连通,但是本领域技术人员将理解,阳性对照回路可包含任何数量的测定孔。每个阳性对照测定孔对应于独特的测试测定孔和独特的阴性对照测定孔。与其相应的测试测定孔一样,阳性对照测定孔360a、360b和360c含有进行分子测定以及检测靶标和过程对照序列的存在或不存在所必需的所有试剂。重要的是,用靶核酸模板的外源性样品嵌入阳性对照孔。每个阳性对照测定孔含有酶混合物370d、370e或370f,其组成在每个测定孔中相同。酶混合物含有扩增靶和过程对照序列所必需的酶和试剂。每个测定孔360a、b和c还含有过程对照引物/探针混合物375d、375e和375f,其组成在每个测定孔中也是相同的。过程对照引物/探针混合物含有适于扩增和检测过程对照靶的引物和探针。每个测定孔还含有独特的靶序列引物/探针混合物。在该实施方案中,测定孔360a包含靶序列1引物/探针混合物380b,测定孔360b包含靶序列2引物/探针混合物385b,并且测定孔360c包含靶序列3引物/探针混合物390b。每个靶序列引物/探针混合物380b、385b和390b含有扩增和检测独特的目标靶序列所必需的引物和探针。混合物380b的引物和探针与混合物280的引物和探针相同,而混合物385b和390b的引物和探针分别与混合物285和290的引物和探针相同。每个阳性对照测定孔还含有嵌入的过程对照模板样品,本文中称为395a、395b和395c。嵌入的过程对照模板样品含有已知量的过程对照模板核酸,并且在每个阳性对照测定孔中是相同的。每个阳性对照测定孔还含有嵌入的靶序列模板样品,在本文中命名为397a、397b或397c。在该实施方案中,靶序列模板样品397a含有已知量的靶序列1核酸模板,而靶序列模板样品397b和397c分别含有已知量的靶序列2和靶序列3核酸模板。虽然在本发明的该实施方案中,每个靶序列由单个相应的阳性对照测定孔表示,但是本领域技术人员应当理解,对于给定的靶序列可以考虑多个阳性对照测定孔,例如,含有不同浓度的给定靶模板的孔。这样的阳性对照可用于例如产生用于定量PCR分析的标准曲线。

[0175] 图16描绘了本发明的对照测定回路的替代构造。在该实施方案中,测试回路200的构造与图15中描述的构造相同,而阴性对照回路300和阳性对照电路400的构造的不同之处在于它们不是流体连通的,而是由独立的流体回路表示的。测试和阴性对照测定孔中含有的所有试剂与对于图15所述的试剂相同。阳性对照样品回路400包括与微流体通道415和下游样品提取室420流体连通的阳性对照样品端口410。阳性对照测定孔460a、460b和460c含有相同的酶混合样品(470d、e和f),过程对照引物/探针混合物(475d、475e和475f)和靶引物/探针混合物(480b、485b和490b)如图15中所述。然而,阳性对照测定孔不含有嵌入的核酸模板样品。在本发明的该实施方案的实践中,用户从外部样品源供应阳性对照模板,其通过样品端口410引入阳性对照通道400。在提取室420中处理阳性对照样品,通过本文所述的任何方法在测定孔460a、460b和460c中分析提取的核酸。在本发明的另一个实施方案中,在微流体盒的制造期间,将无活力的阳性对照模板样品预装载至样品端口410中。无活力的阳性对照样品可以包括灭活细菌、质粒DNA等。预加载的阳性对照样品经历如针对上述测试样品所述的相同的提取和扩增。

[0176] 在实践中,用户将要测定其目标靶序列的测试样品施加于微流体装置的样品端口。样品进入下游提取室,其中通过本领域已知的任何方法提取核酸用于PCR。提取的核酸样品进入测试测定孔,用于使用上述试剂和引物/探针混合物进行扩增和检测。本发明的该实施方案的装置被配置来平行地测定三个独特的测试序列的存在或不存在,并且每个独特的扩增反应被复合以用于靶和过程对照模板的共扩增。对于在装置上运行的每个独特的靶测定,相应的阳性和阴性对照在集成对照回路中平行运行,排除了运行额外的外部质量对照的需要。

[0177] 阳性和阴性对照测定的结果可用作测试测定结果验证的进一步标准。例如,为了验证阳性测试测定结果,可设置要求阴性对照测定孔中产生的荧光信号降至阈值以下的标准,指示阳性测试信号不是因外源模板的系统污染而产生。同样地,为了验证阴性测试测定结果,可设定要求阳性对照测定孔中产生的荧光信号超过阈值的标准,从而确认测试试剂、引物和探针的完整性。因此,本发明的方法包括用于验证测试测试结果的方法,其包括当且仅当满足以下三个标准时才报告测试测试为有效的:1) 过程对照信号为阳性,2) 阴性对照信号为阴性,以及3) 阳性对照信号为阳性。

[0178] 本发明的其它实施方案包括通过直接比较靶和测定孔中产生的荧光信号来验证测试结果和将结果评分为对于靶序列为阳性或阴性的方法。这些方法的进一步细节参考图15。在一个实施方案中,过程对照序列由装置100使用第一荧光信号检测,而测试靶序列使用第二荧光信号检测。第一和与二荧光信号之间的直接比较可以在用于诊断测定的以下五个验证或评分步骤中进行,其中每个步骤基于终端用户设置的任意有效性比率:1) 为了验证过程对照测定的完整性,将来自阳性对照孔360a、360b和360c的第一荧光信号(报告过程对照信号)与阴性对照孔350a、350b和350c的荧光信号进行比较。在一个实施方案中,仅当阳性对照信号约为阴性对照孔的测定信号2.5倍时才报告有效结果;2) 为了验证靶测定的完整性,将来自阳性对照孔360a、360b和360c的第二荧光信号(报告靶信号)与阴性对照孔350a、350b和350c的荧光信号进行比较。在一个实施方案中,仅当阳性对照信号约为阴性对照孔的测定信号5倍时才报告有效结果;3) 为了验证提取过程的完整性,将来自测试测定孔250a、250b和250c的第一荧光信号(报告过程对照信号)与阴性对照孔350a、350b和350c的

荧光信号相比较。仅当测试测定信号至少约为阴性对照孔的测定信号2倍时才报告有效结果;4) 为了验证阳性测试测定结果的完整性(即排除由于污染引起的假阳性),将阴性对照孔350a、350b和350c的第一荧光信号和/或第二荧光信号与来自扩增前(即背景)的相同孔的信号水平相比较,并且仅当扩增后的测定信号不显著超过背景时才报告有效结果;5) 为了将测试测定信号评分为对于测试分析物是阳性或阴性的,将测试测定孔250a、250b和250c中的第二荧光信号与阴性对照孔350a、350b和350c的荧光信号进行比较。如果测试信号至少约为阴性对照孔的3倍,则测试测定被报告为阳性,如果测试信号小至阴性对照孔的约1/3,则测试测定被报告为阴性。本领域技术人员应当理解,上面设置的有效性比率是任意的,并且许多替代值可适用于任何给定的诊断测定,这取决于特定测定所独有的许多因素。

[0179] 在本发明的另一个实施例中,扫描数据可用于确定测定孔是否已经成功地填充有测试样品。在扩增之前,将测定孔扫描为“填充前”,同时干燥,和“填充后”。“填充前”和“填充后”荧光信号的比较可用于确定孔是否已经充分地填充有测试样品。例如,显示较低的填充后荧光信号的孔可能未能充分填充,表明任何测定结果可能无效。

[0180] 有利地,我们已经发现,通过预先检测盒中每个孔的位置的工厂校准过程,可以大大减少扫描盒所需的时间。在工厂校准期间,对盒进行连续扫描,并且将从“原始位置”定位每个孔位置所需的步进电机脉冲的数量作为校准数据存储存储在检测器头固件中的非易失性存储器中。在操作中,检测器头通过步进到这些校准位置中的每一个来执行“离散扫描”,仅在在这些位置处获取光学数据。通过消除检测器头在扫描期间定位每个个体孔的需要,对所有九个孔进行扫描的时间减少至大约小于1秒,这是对现有技术的明显改进。

[0181] 示例性实施方案包括以下实施方案:

[0182] 实施方案1.用于进行样品测定的微量测定盒,所述盒包含:

[0183] a) 具有被封闭在其中的气动回路的第一模制壳体;

[0184] b) 具有被封闭在其中的液压回路的第二模制壳体;

[0185] c) 用于接收测试样品的样品入口,其中所述样品入口与所述液压回路流体连通;

[0186] d) 插入在所述第一模制壳体与所述第二模制壳体之间的层压层,所述层压层包含与所述气动回路和所述液压回路流体连通的多个气动液压膜;

[0187] e) 与所述液压回路流体连通的测定孔组件;

[0188] f) 限定气动接口的气动端口阵列,每个端口用于接收施加到其上的气动脉冲,所述端口与所述气动回路流体连通,其中所述气动脉冲是正压脉冲或负压脉冲;以及

[0189] 其中所述盒能够使得所述气动液压膜由所述气动脉冲可操作地控制。

[0190] 实施方案2:实施方案1的微量测定盒,其中所述液压回路包含测试测定回路和对照测定回路。

[0191] 实施方案3.实施方案2的微量测定盒,其中所述测试测定对照回路与所述样品入口流体连通,并且所述对照测定回路不与所述样品入口流体连通。

[0192] 实施方案4.实施方案3的微量测定盒,其中所述对照测定回路包含阳性对照测定回路和阴性对照测定回路。

[0193] 实施方案5.实施方案4的微量测定盒,其中所述阳性对照测定回路与所述阴性对照测定回路流体连通。

[0194] 实施方案6.实施方案4的微量测定盒,其中所述阳性对照测定回路和所述阴性对

照测定回路不流体连通。

[0195] 实施方案7.实施方案3的微量测定盒,其中所述测试测定回路、所述阳性对照测定回路和所述阴性对照测定回路中的每一个分别与多个测定孔各自流体连通。

[0196] 实施方案8.实施方案7的微量测定盒,其中所述多个测定孔的数目为至多3个。

[0197] 实施方案9.实施方案7的微量测定盒,其中所述多个测定孔的数目为3个。

[0198] 实施方案10.实施方案7-9的任一项的微量测定盒,其中所述多个孔中的每一个被配置来进行过程对照。

[0199] 实施方案11.实施方案7-9的任一项的微量测定盒,其中所述阳性对照测定孔包含阳性对照核酸模板。

[0200] 实施方案12.实施方案1-11的任一项的微量测定卡,其还包含与所述液压回路流体连通的核酸捕获组件。

[0201] 实施方案13.实施方案12的微量测定卡,其中所述核酸捕获组件包含中空外壳构件和设置在其中的核酸捕获膜。

[0202] 实施方案14.实施方案13的微量测定盒,其中所述核酸捕获膜包含氧化硅纤维。

[0203] 实施方案15.实施方案13的微量测定卡,其还包括设置在所述壳体构件内部的上部支持介质和下部支持介质,其中所述核酸捕获膜插入在所述上部支持介质与所述下部支持介质之间。

[0204] 实施方案16.实施方案15的微量测定盒,其中所述上部和下部支持介质是**POREX®**玻璃料。

[0205] 实施方案17.实施方案15的微量测定盒,其中所述上部和下部支持介质是聚丙烯垫圈。

[0206] 实施方案18:实施方案1-17的任一项的微量测定卡,其中所述测定孔组件包含配置有多个孔的PCR孔层,其中每个所述孔包含进行PCR扩增和任何所得扩增子的荧光检测所必需的所有试剂。

[0207] 实施方案19.实施方案18的微量测定卡,所述PCR孔层由高导热聚合物形成。

[0208] 实施方案20:实施方案18的微量测定卡,其中所述PCR孔层被配置用于终点PCR、实时PCR或解链曲线分析。

[0209] 实施方案21.实施方案1-20的任一项的微量测定卡,其中所述第一模制壳体包括覆盖所述测定孔组件的光学检测窗口,其中所述光学检测窗口由所述第一模制壳体的上表面上的菱形开口和所述第一模制壳体的下表面上的较小菱形开口形成,并且其中光学窗口的侧面从所述第一模制壳体的上表面至下表面向内成角度。

[0210] 实施方案22:实施方案21的微量测定卡,其还包括插入在所述光学窗口与所述测定孔组件之间的光学透明盖层。

[0211] 实施方案23:实施方案1-22的任一项所述的微量测定卡,其中所述第一模制壳体包含与所述气动回路和所述液压回路流体连通的多个试剂储存器。

[0212] 实施方案24:实施方案23的微量测定卡,其中所述试剂储存器是双层箔包装件。

[0213] 实施方案25.实施方案24的微量测定卡,其中所述箔包装件通过气密粘合剂密封件固定地粘附至所述第一模制壳体。

[0214] 实施方案26.实施方案23的微量测定卡,其包含至多六个试剂储存器。

[0215] 实施方案27.实施方案24的微量测定卡,其还包括设置在所述箔包装件之下的尖锐物,所述尖锐物用于当通过向气动回路施加压力脉冲而迫使所述箔包装件与所述尖锐物接触时使所述箔包装件破裂。

[0216] 实施方案28.实施方案27的微量测定卡,其中所述尖锐物由金属形成。

[0217] 实施方案29:实施方案28的微量测定卡,其中所述尖锐物包括以相对于所述模制壳体低于垂直的角度突出的倒钩。

[0218] 实施方案30.实施方案29的微量测定卡,其中所述角度为约75度。

[0219] 实施方案31:实施方案20的微量测定卡,其还包含插入在所述试剂包装与所述尖锐物之间的弹簧,所述弹簧具有固有弹簧力,其中所述弹簧力防止在压力脉冲不存在的情况下所述试剂包装与所述尖锐物之间的接触。

[0220] 实施方案32.实施方案1-31的任一项的微量测定卡,其还包含设置在所述气动端口中的气雾过滤塞。

[0221] 实施方案33.实施方案25的微量测定卡,其中所述气雾过滤塞由液体可溶胀材料形成。

[0222] 实施方案34:实施方案1-33的任一项的微量测定卡,其中所述正压力状态和负压力状态的范围为+150至-50kPa,例如+150kPa、+100kPa、+70kPa、0kPa、-35kPa或-50kPa。

[0223] 实施方案35.实施方案1-34的任一个的微量测定卡,其还包含被配置来将所述气动接口连接至主机仪器的单个使用的密封垫。

[0224] 实施方案36.一种用于进行样品测定的微量测定系统,所述系统包含:

[0225] a) 构造来用于与主机仪器对接的一次性微量测定盒,所述盒具有设置在其中的液压回路,其中所述液压回路被配置来在与其接口的气动回路的控制下操作,并且其中所述液压回路包含测试测定回路、阳性对照测定回路和阴性对照测定回路;

[0226] b) 限定气动接口的一个或多个气动端口的阵列,其中每个端口使得能够将气动压力状态从所述主机仪器传送至所述气动回路;

[0227] c) 设置在所述主机仪器中的气动歧管,所述歧管具有流体联接到其上的多个气动压力源,其中所述歧管被配置来在多个压力状态下被操作,并且其中所述歧管通过所述气动接口的端口流体连接至所述气动回路;和

[0228] d) 用于检测样品中的至少一个光学信号的检测器头,所述检测器头包括1至5个检测通道。

[0229] 实施方案37.实施方案36的微量测定系统,其中所述主机仪器包括至少一个Peltier热泵。

[0230] 实施方案38.实施方案37的微量测定系统,其中所述微量测定盒包含与所述液压回路流体连通并与所述Peltier热泵热接触的测定孔组件。

[0231] 实施方案39.实施方案38的微量测定系统,其中所述主机仪器包含与所述液压回路热接触的至少一个热块。

[0232] 实施方案40.实施方案38的微量测定系统,其中所述盒包含与所述液压回路流体连通并与所述热块热接触的核酸捕获组件。

[0233] 实施方案41.实施方案36-40的任一项的微量测定系统,其中所述检测器头被配置来在横跨所述测试采样回路和所述对照采样回路的多个离散路径上扫描所述微量测定盒,

其中每个所述离散路径由至少一个参考点界定,其中所述参考点是在主机仪器校准期间预先确定的空间坐标。

[0234] 实施方案42.实施方案36-41的任一个的微量测定系统,其还包括被配置来将所述气动接口端口阵列连接至所述气动歧管的单个使用的密封垫。

[0235] 实施方案43.实施方案36-42的任一项的微量测定系统,其还包括设置在所述气动端口中的气雾过滤塞。

[0236] 实施方案44.实施方案36-43的任一项所述的微量测定系统,其包含约20个气动端口。

[0237] 实施方案45.实施方案36-44的任一个的微量测定系统,其中所述检测器头的所述检测通道各自包括LED强度调制回路,其包括激发光采样镜、中性密度滤波器和LED强度检测器。

[0238] 实施方案46.实施方案36-45的任一个的微量测定系统,其中所述盒相对于接地平面保持在约15度的角度。

[0239] 实施方案47.一种对与致病性病症相关的靶荧光信号进行受控测定的方法,所述方法包括:

[0240] a) 用实施方案36的系统扫描测试测定回路中的样品孔,其中如果存在靶荧光信号,则在所述检测器头的第一光学通道中检测所述靶荧光信号,并且如果存在与内源组分相关的过程对照荧光信号,则在所述检测器头的第二光学通道中检测与内源组分相关的过程对照荧光信号;

[0241] b) 用实施方案36的系统就阳性对照荧光信号扫描阳性对照测定回路中的样品孔,其中如果存在阳性对照荧光信号,则在所述检测器头的所述第一光学通道中检测所述阳性对照荧光信号;

[0242] c) 用实施方案36的系统变阴性对照荧光信号扫描阴性对照测定回路中的样品孔,其中如果存在阴性对照荧光信号,则在所述检测器头的所述第一光学通道中检测所述阴性对照荧光信号;

[0243] d) 当且仅当检测到所述第二荧光过程对照信号,检测到所述阳性对照第一荧光信号,并且未检测到所述阴性对照第一荧光信号时,才将所述第一靶标对照信号报告为所述测定的有效结果。

[0244] 实施方案48.实施方案47的方法,其中所述测试测定回路、所述阳性对照测定回路和所述阴性对照测定回路各自包含至多3个测定孔。

[0245] 实施方案49.实施方案48的方法,其中所述至多3个测定孔各自被配置来测定独特的靶荧光信号。

[0246] 实施方案50.实施方案47-49的任一项的方法,其还包括将所述靶荧光信号与所述阳性对照荧光信号和所述阴性对照荧光信号进行比较,以将所述样品评分为对于所述致病性病症是阳性或阴性的的步骤。

[0247] 实施方案51.实施方案50的方法,其中所述比较步骤包括计算第一比率,其中所述第一比率是所述靶荧光信号与所述阳性对照荧光信号的比率,并计算第二比率,其中所述第二比率是所述靶荧光信号与所述阴性对照荧光信号的比率,并将所述第一和第二比率与验证比率进行比较。

[0248] 实施方案52.实施方案51的方法,其中如果所述第一比率大于所述验证比率,则所述样品评分为阳性,并且如果所述第二比率小于所述验证比率,则所述样品评分为阴性。

[0249] 虽然上面是本发明的某些实施方案的描述,但是有可能使用各种替代、修改和等同物。因此,本发明的范围不应当参考上述描述来确定,而是相反应当参考所附权利要求书以及它们的等同物的全部范围来确定。所附权利要求书不应被解释为包括工具加功能的限制,除非使用短语“用于...的工具”在给定权利要求中明确地叙述了这种限制。在本说明书中引用和/或在随附的申请数据表中引用的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物,包括但不限于2014年6月11日提交的美国临时申请号62/010,915,通过引用整体并入本文。如果必要,可以修改实施方案的方面以采用各种专利、申请和出版物的概念,以提供另外的实施方案。

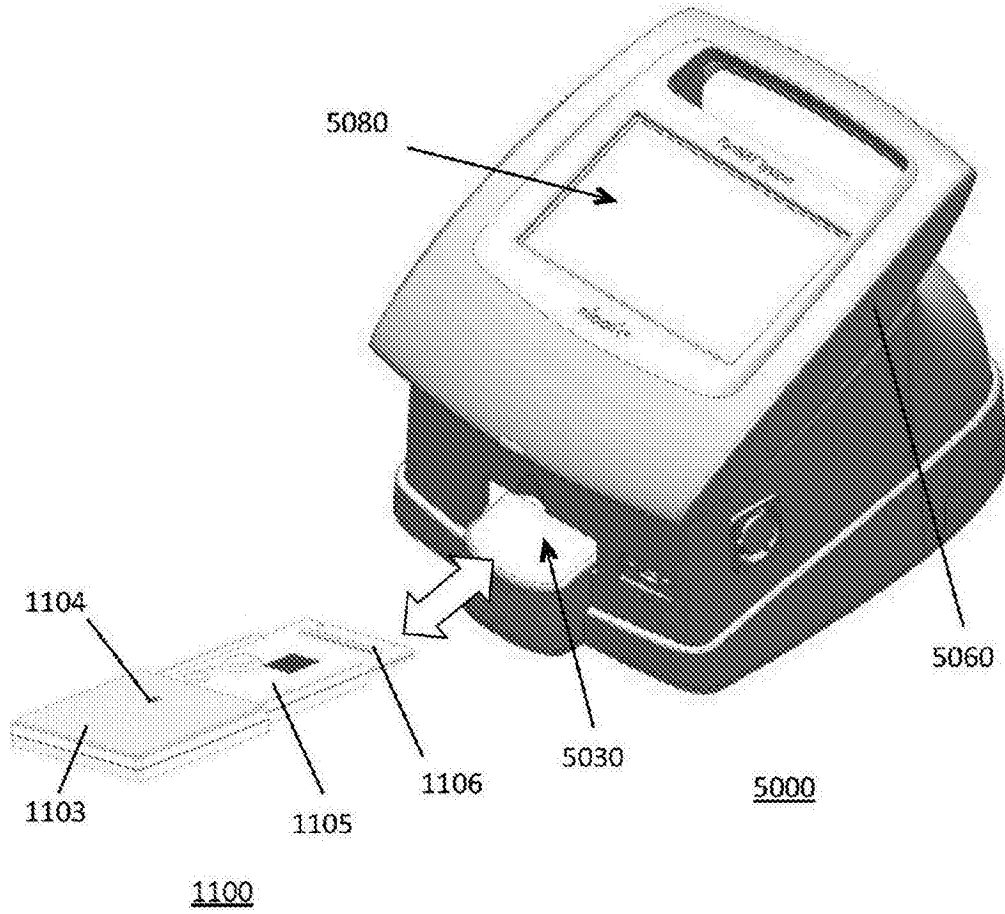


图1

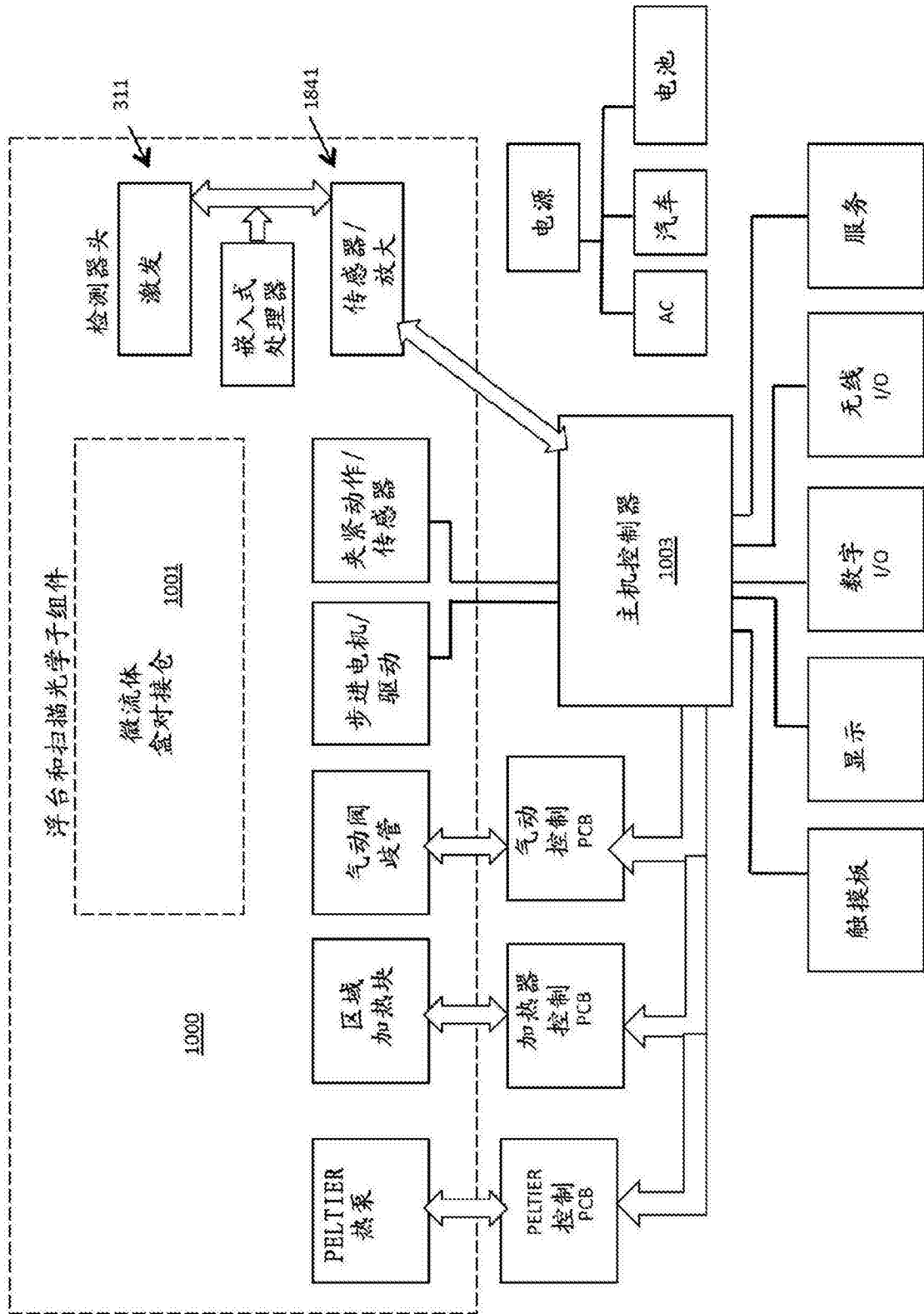


图2

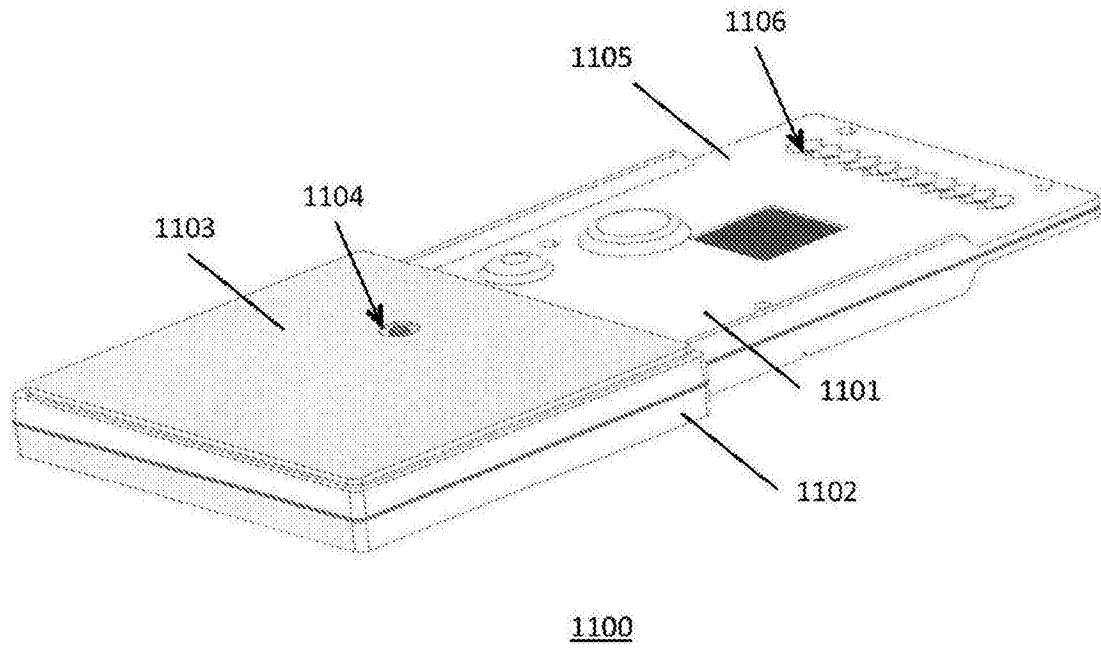


图3A

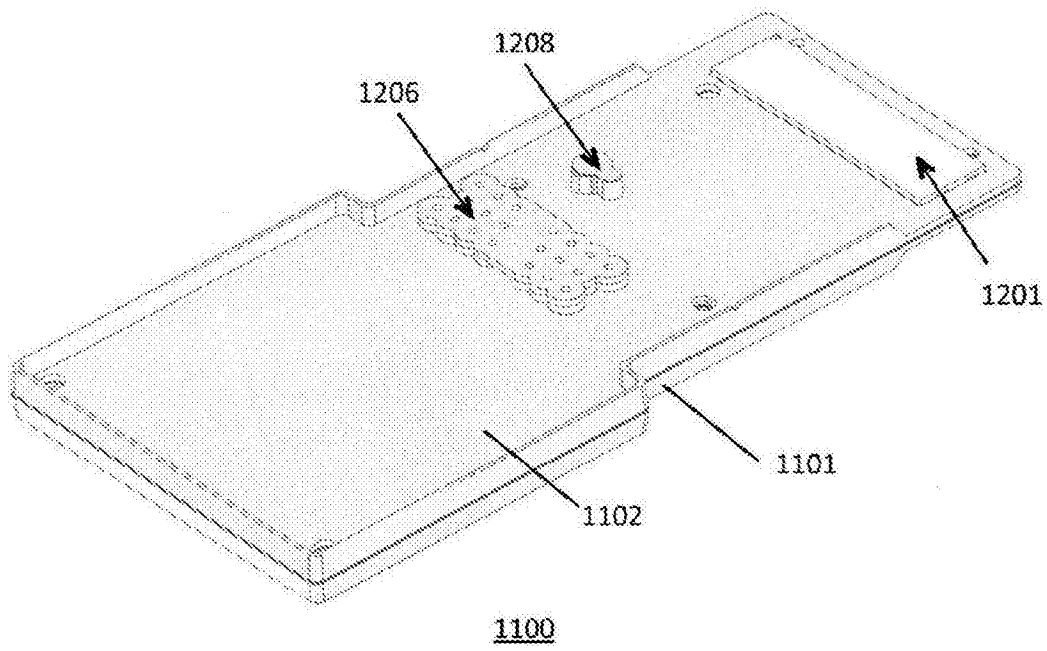


图3B

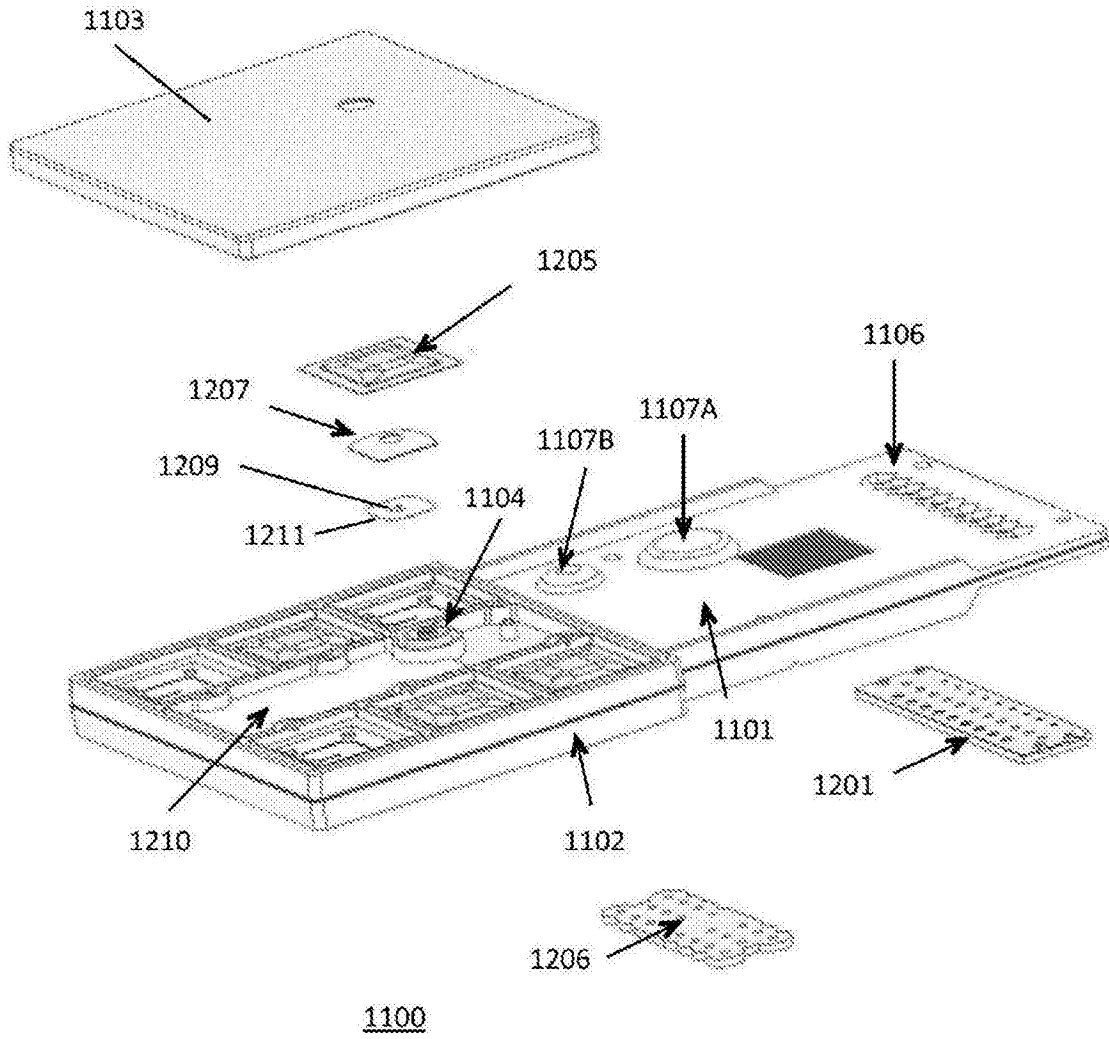


图4

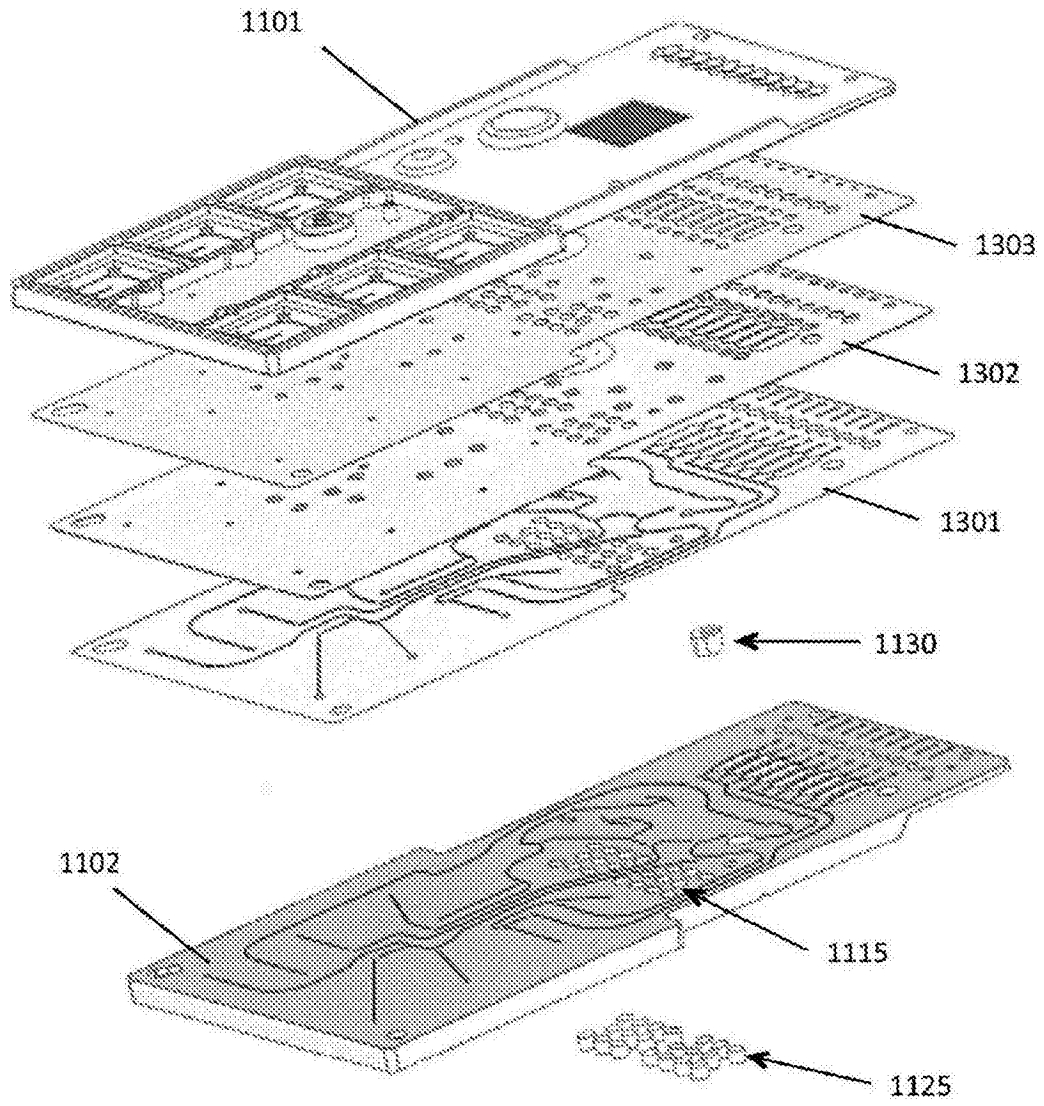


图5

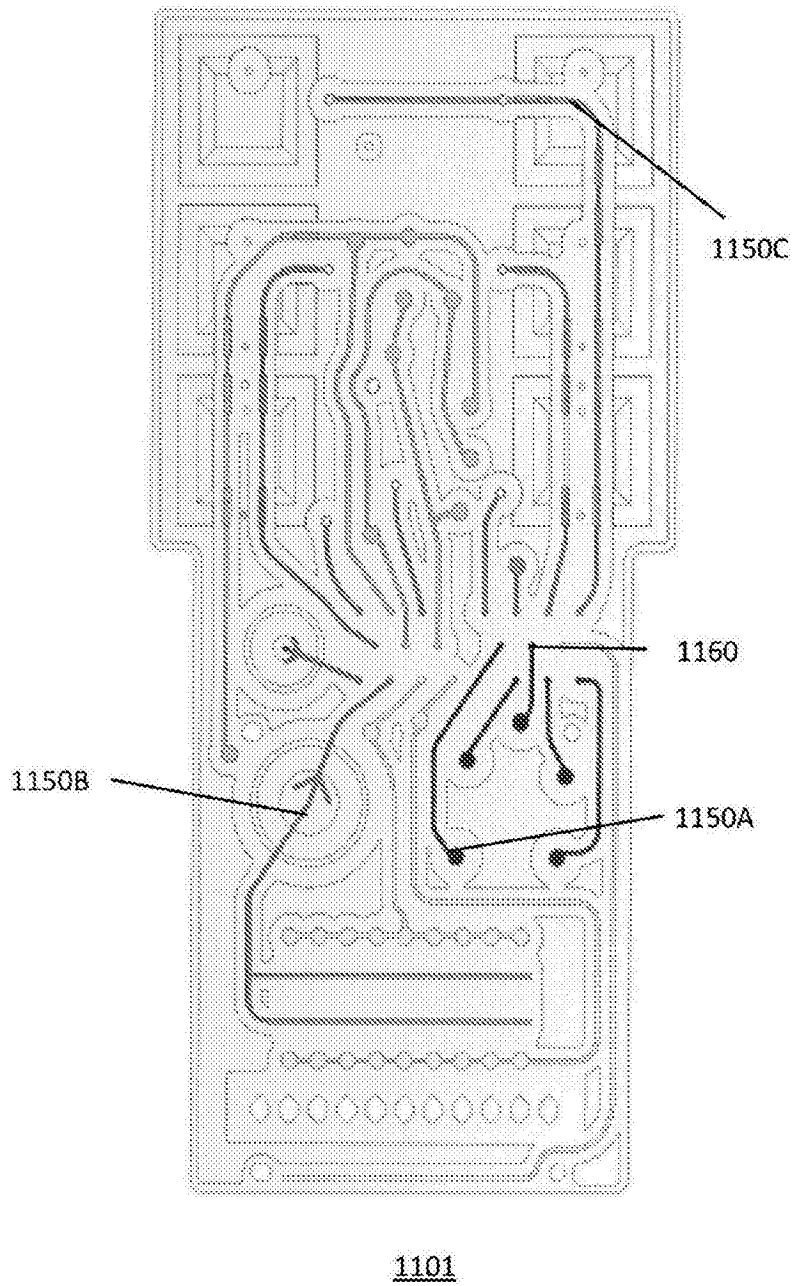


图6A

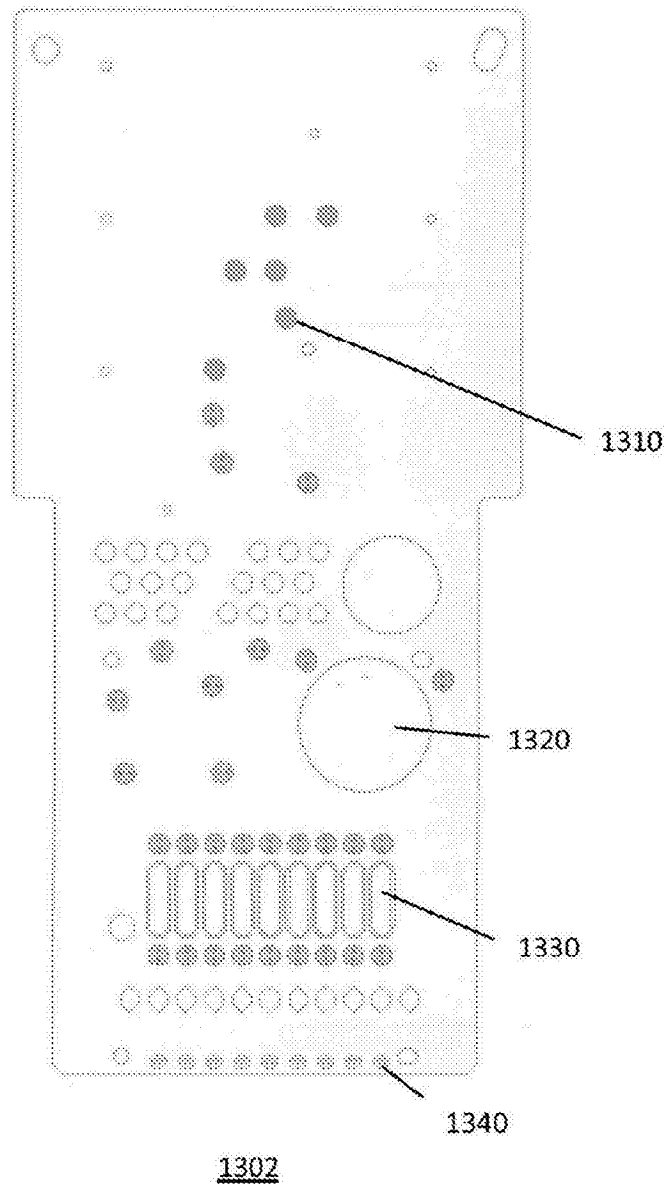


图6B

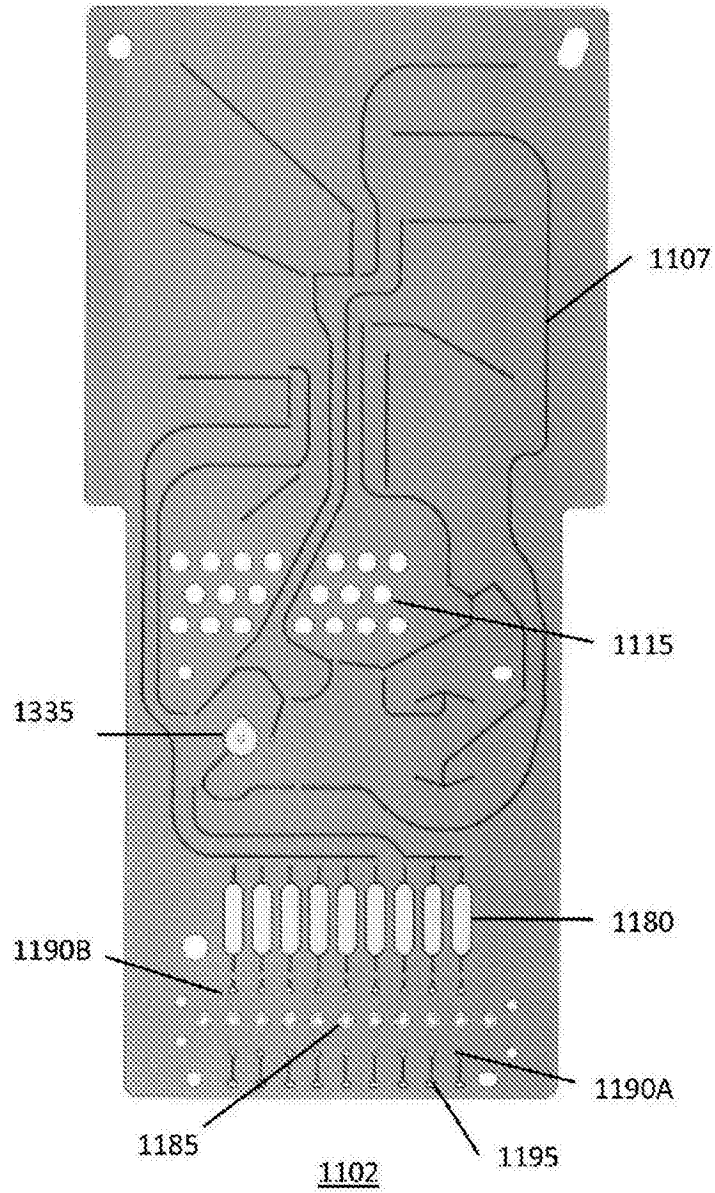


图6C

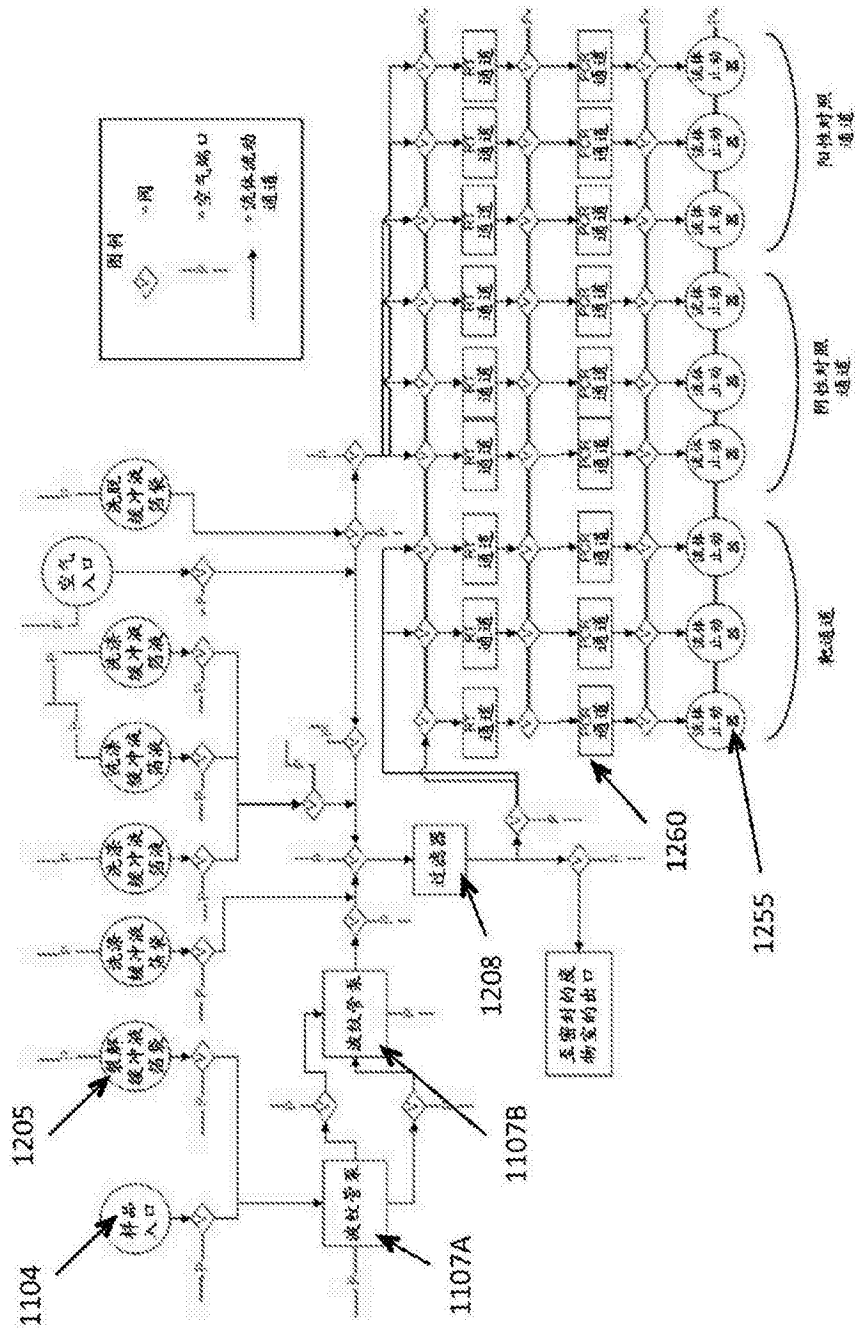


图7

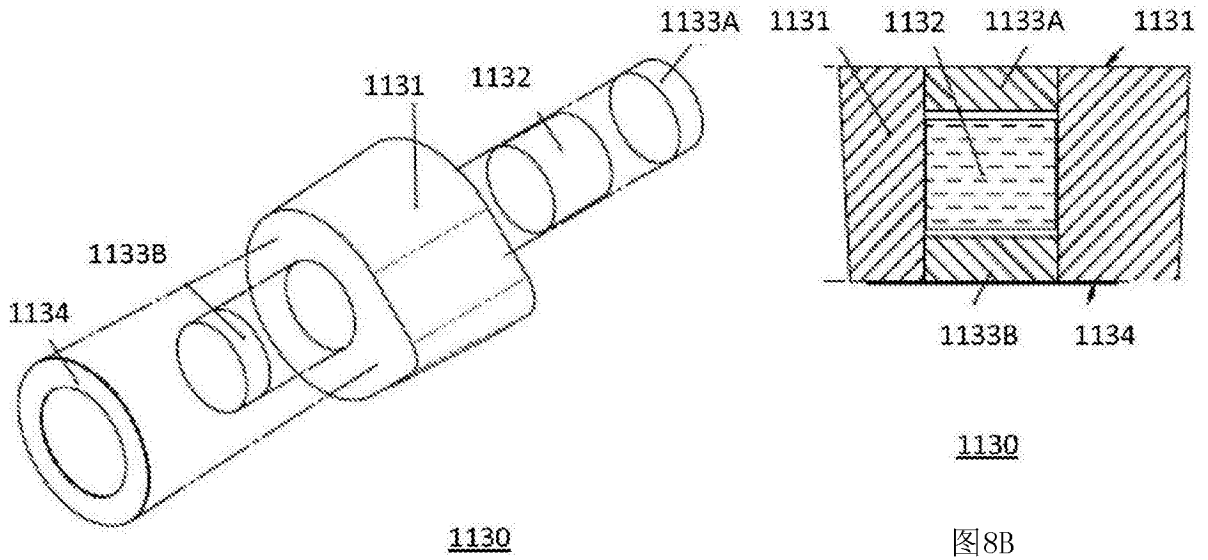


图8A

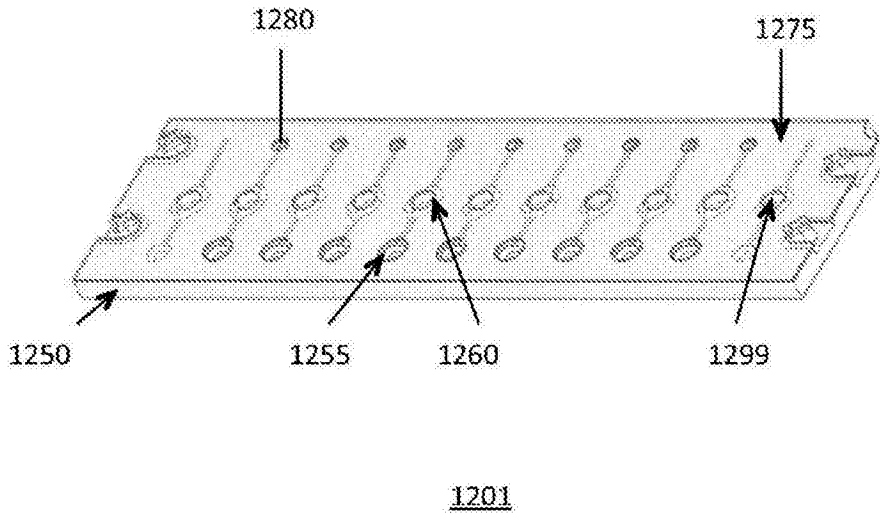


图9

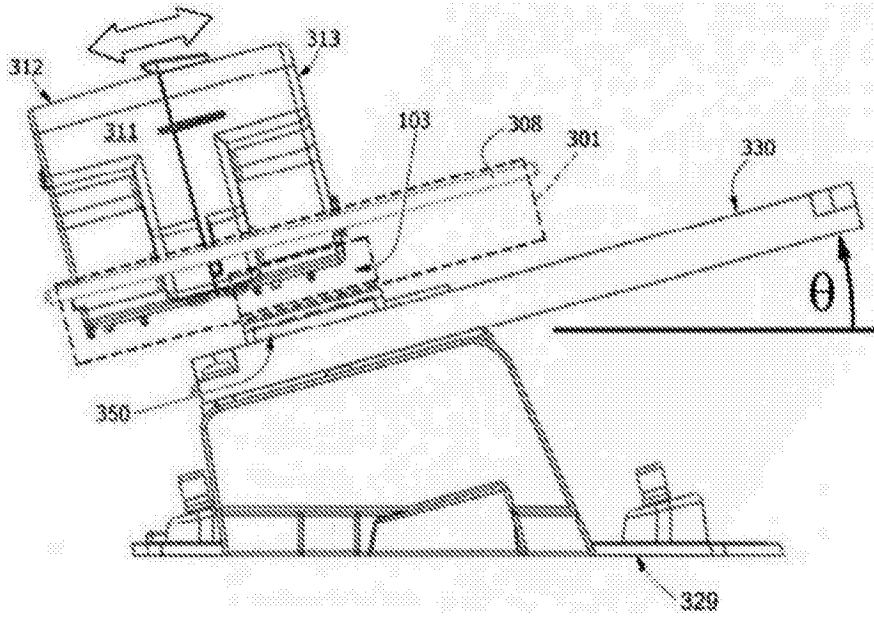


图10

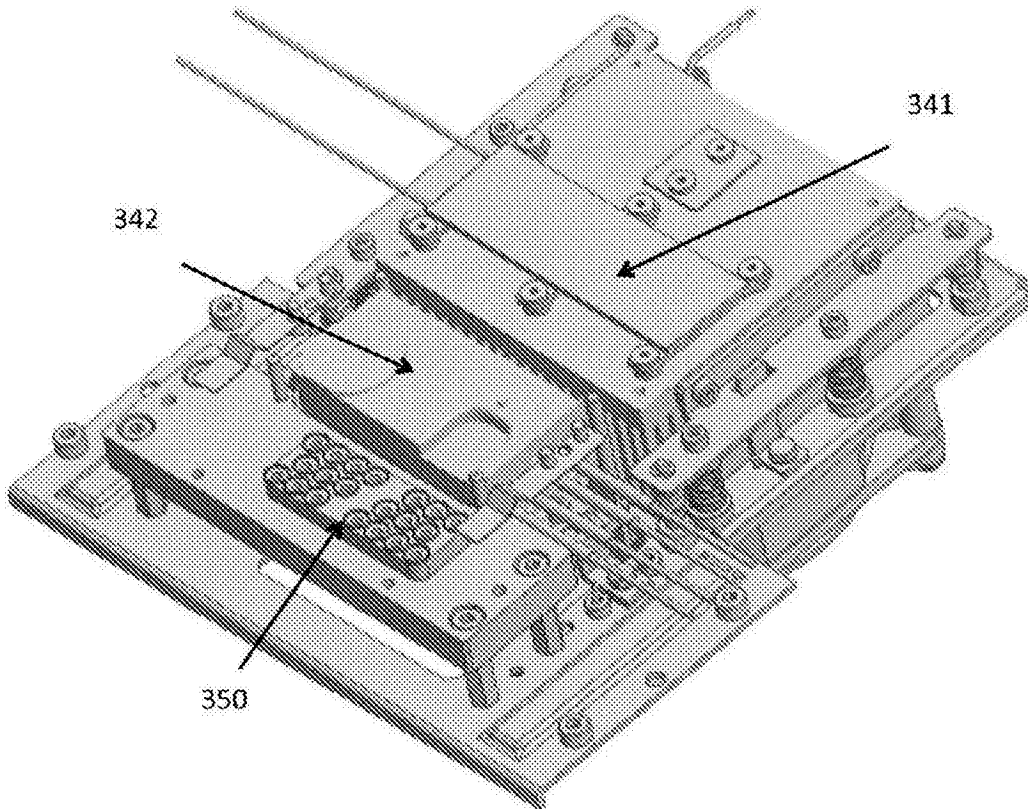


图11

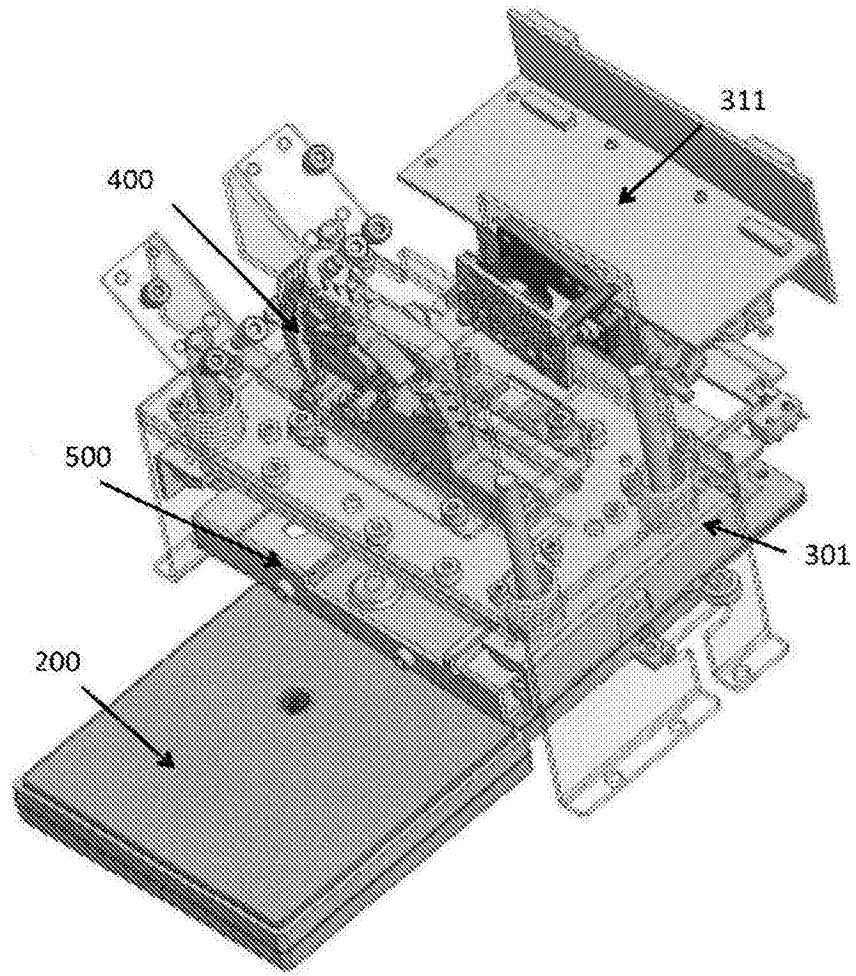


图12

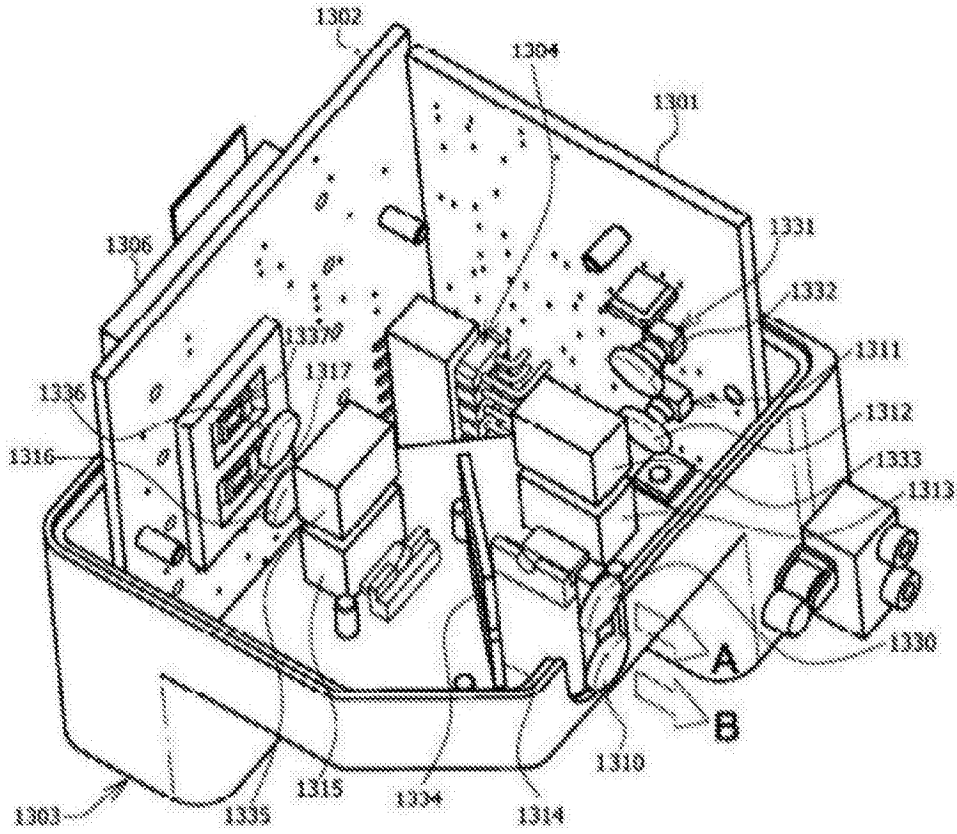


图13

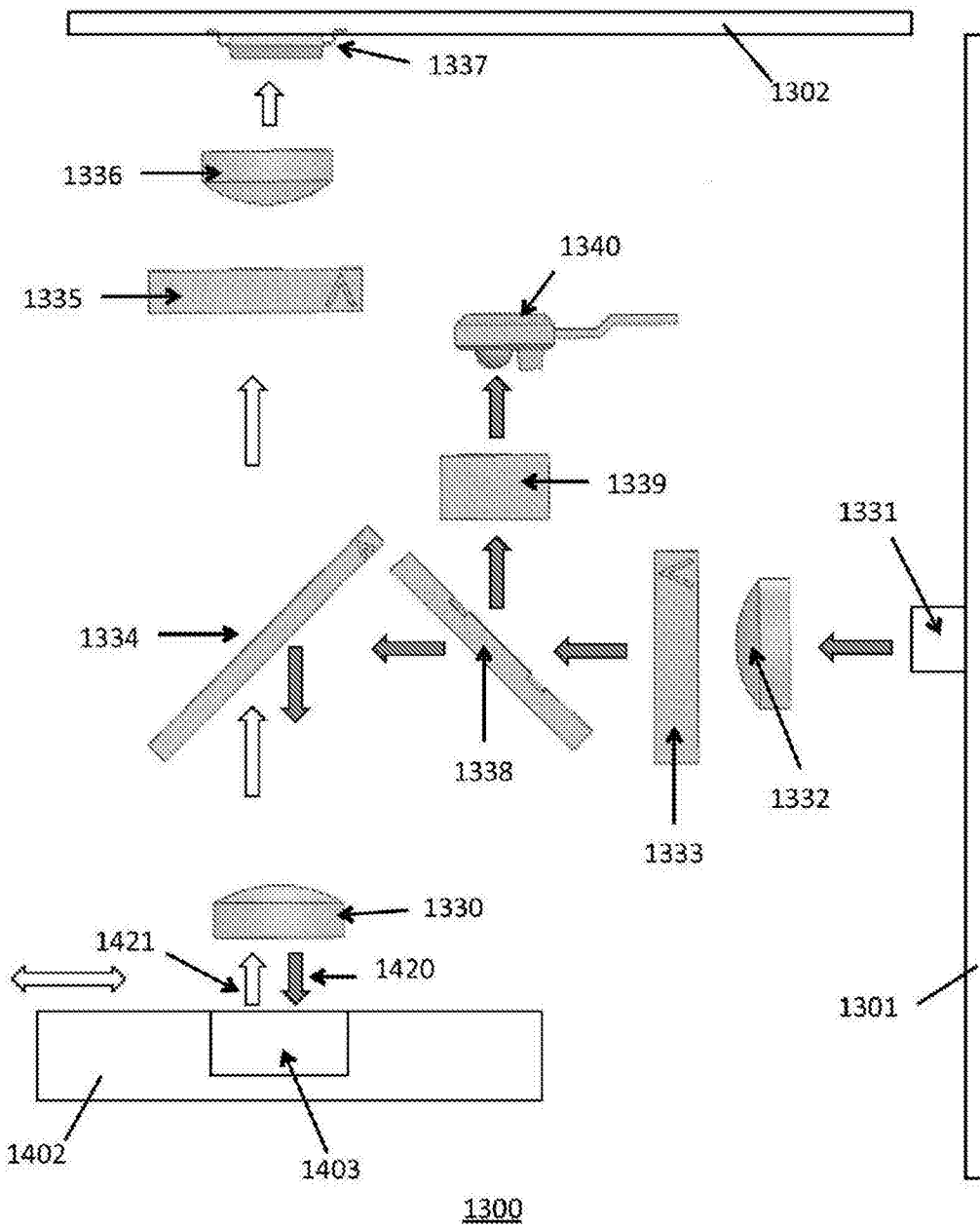


图14

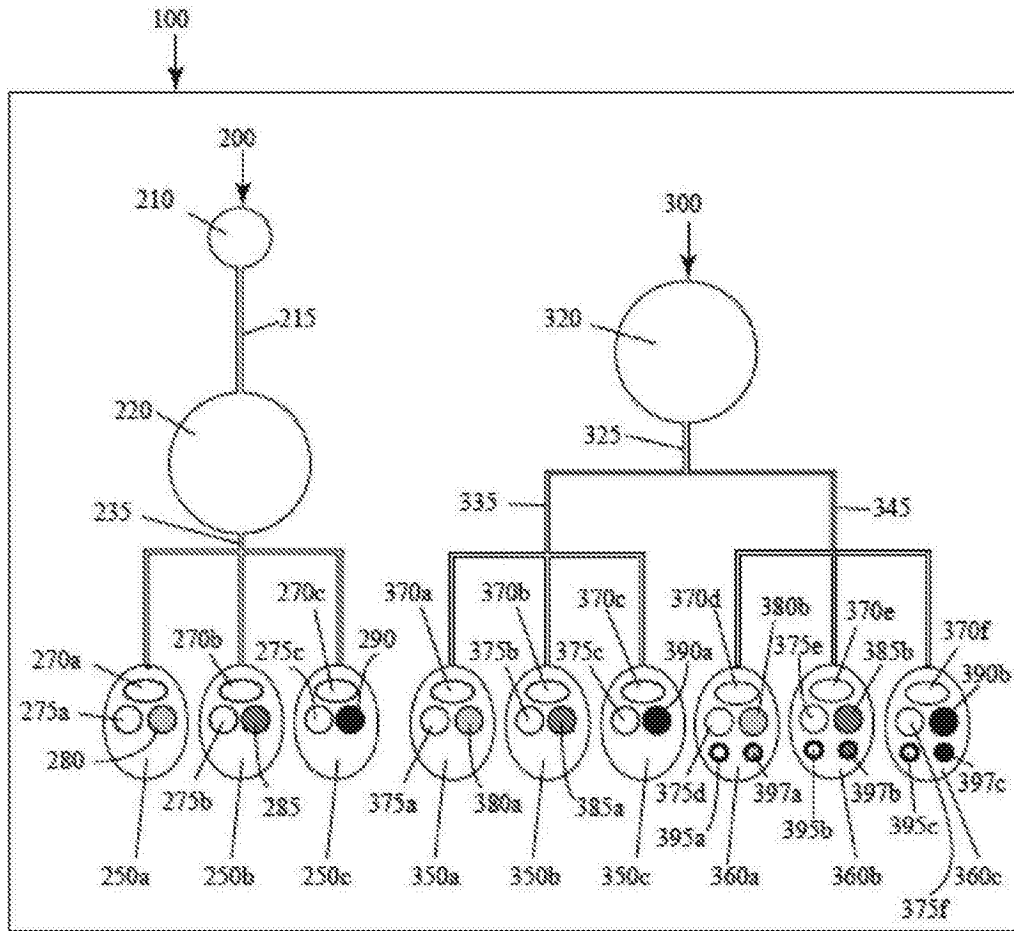


图15

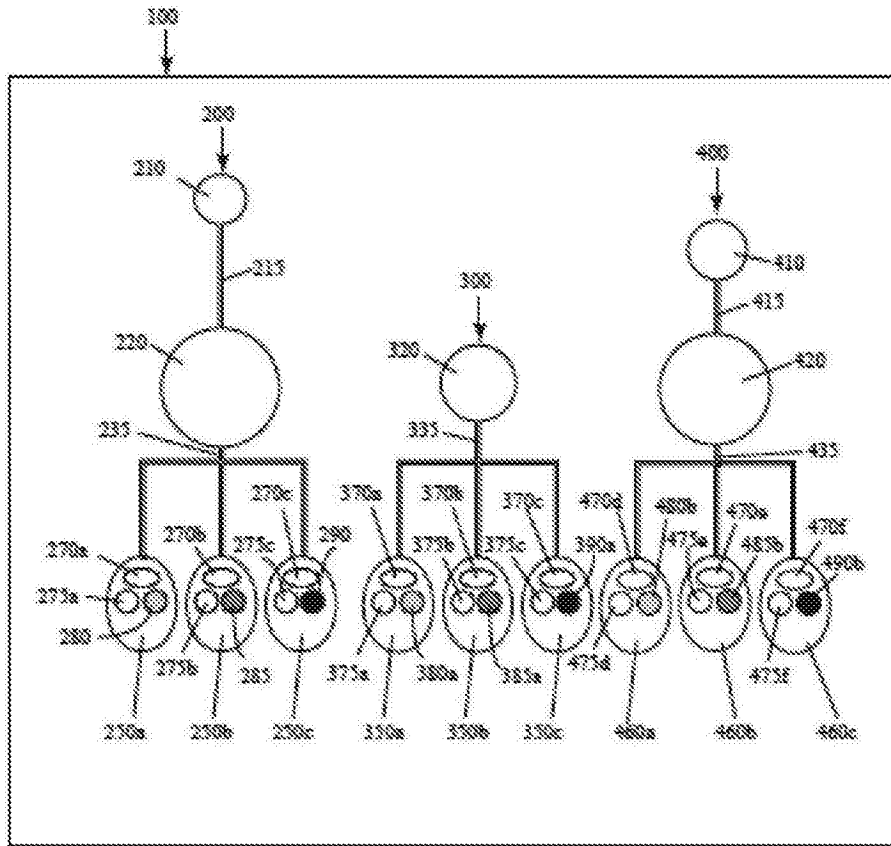


图16