

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

B01J 4/02 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580009750.4

[43] 公开日 2007年4月25日

[11] 公开号 CN 1953802A

[22] 申请日 2005.1.26

[21] 申请号 200580009750.4

[30] 优先权

[32] 2004.1.26 [33] US [31] 60/539,358

[32] 2004.1.26 [33] US [31] 60/539,416

[32] 2004.4.26 [33] US [31] 60/565,866

[86] 国际申请 PCT/US2005/003514 2005.1.26

[87] 国际公布 WO2005/072858 英 2005.8.11

[85] 进入国家阶段日期 2006.9.26

[71] 申请人 哈佛大学

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 塞缪尔·K·西亚 文森特·林德

乔治·M·怀特塞兹

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 顾晋伟 刘继富

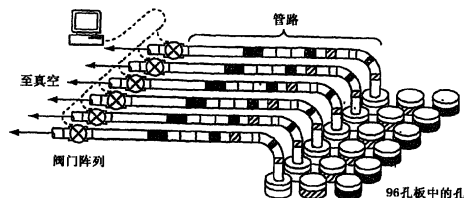
权利要求书 6 页 说明书 35 页 附图 12 页  
按照条约第 19 条的修改 7 页

[54] 发明名称

流体递送系统和方法

[57] 摘要

储存和/或递送流体的方法和装置，其中至少第一和第二流体，例如化学或生化试剂或漂洗溶液，互相分离地保持在共同的容器中并连续地从容器转移到反应部位来进行预定的化学或生物化学反应。可以通过在第一和第二流体之间插入第三流体来实现分离，所述第三流体例如气态的流体塞。



1. 一种方法，包括：

提供在共同容器中保持互相分离的第一和第二流体；

将第一和第二流体依序从容器转移到反应部位来进行预定的化学或生物化学反应；和

避免第一和第二流体的接触，至少直至流体已经施加到反应部位以后。

2. 权利要求 1 的方法，进一步包括将容器与包含反应部位的设备连接。

3. 权利要求 1 的方法，其中容器和反应部位是流体连通的。

4. 权利要求 3 的方法，其中容器和反应部位在共同平台上。

5. 权利要求 3 的方法，其中容器和反应部位整合性连接。

6. 权利要求 1 的方法，其中容器包含管。

7. 权利要求 1 的方法，进一步包括施加跨反应部位的压差。

8. 权利要求 7 的方法，其中通过在反应部位下游侧吸来提供压差。

9. 权利要求 1 的方法，其中通过在反应部位上游侧泵来提供压差。

10. 权利要求 1 的方法，其中第一和第二流体依次转移到反应部位，而不需开动阀。

11. 权利要求 1 的方法，其中第一和第二流体依次转移到反应部位，而不需开动任何设备，所述设备控制将第一和第二流体中任一个导入至反应部位的彼此相对的速率、顺序或时间。

12. 权利要求 1 的方法，其中所述方法不使用电能。

13. 权利要求 1 的方法，其中所述设备是微流体学设备。

14. 权利要求 1 的方法，其中所述容器由聚乙烯、聚丙烯或 PTFE 构成。

15. 权利要求 1 的方法，其中抗体或抗原中至少一种与反应部位结合。

16. 权利要求 1 的方法，其中第一和第二流体被第三流体分离。

17. 权利要求 12 的方法，其中第三流体是气体或气态混合物。

18. 权利要求 13 的方法，其中第二流体是漂洗溶液。

19. 权利要求 1 的方法, 进一步包括将第一和第二流体施加到反应部位之前将样品置于设备中。
20. 权利要求 1 的方法, 进一步包括将样品置于容器中。
21. 权利要求 16 的方法, 其中将容器与设备连接之前将样品置于容器中。
22. 权利要求 1 的方法, 其中通过组合第三流体和第四流体来产生第二流体。
23. 权利要求 18 的方法, 其中第四流体与第三流体反应。
24. 权利要求 19 的方法, 其中将容器连接至设备以后将第三和第四流体组合。
25. 权利要求 1 的方法, 其中所述容器包括密封。
26. 权利要求 25 的方法, 其中密封由融化、加帽或收缩容器内的开孔制成。
27. 权利要求 25 的方法, 其中密封通过向容器的开孔插入非挥发性流体制成。
28. 权利要求 5 的方法, 其中所述管的长度与内径比至少为 10: 1。
29. 权利要求 5 的方法, 其中所述管的内径小于 5 毫米。
30. 权利要求 5 的方法, 其中所述管的内径小于 1 毫米。
31. 权利要求 5 的方法, 其中所述管的内径小于 500 微米。
32. 权利要求 5 的方法, 其中所述管的内径小于 200 微米。
33. 权利要求 5 的方法, 其中所述管的内径小于 100 微米。
34. 权利要求 1 的方法, 其中所述流体之一包含偶联金的抗体。
35. 权利要求 1 的方法, 其中所述流体之一包含金属前体。
36. 权利要求 35 的方法, 进一步包括在金属部位非电沉积金属来制备不透明材料。
37. 权利要求 36 的方法, 进一步包括确定穿过不透明材料的光吸收或透射。
38. 权利要求 35 的方法, 进一步包括非电沉积金属和确定金属的电性能。
39. 一种装置, 包含:
  - 密封的容器;
  - 在容器中放置的第一静态流体;
  - 在容器中放置的第二静态流体; 和

在容器中放置的第三静态流体，其中第三流体分离开第一和第二流体，并且至少第一和第二流体被选择按照预定的顺序用在预定的化学或生物反应中。

40. 权利要求 39 的装置，其中第一和第二流体是液体。
41. 权利要求 39 的装置，其中第三流体是气体或气态混合物。
42. 权利要求 41 的装置，其中第三流体是空气。
43. 权利要求 41 的装置，其中第三流体是氮气。
44. 权利要求 39 的装置，进一步包含另外的不同流体。
45. 权利要求 44 的装置，其中另外的不同流体与与第一流体或第二流体是相同类型。
46. 权利要求 39 的装置，其中流体 1 或流体 2 中至少一种包含化学或生化试剂。
47. 权利要求 39 的装置，其中流体 1 或流体 2 中至少一种包含漂洗溶液。
48. 权利要求 39 的装置，其中选择容器和第一、第二和第三流体，使得容器和置于其中的流体可以储存至少一天并且可以在正常包装和运输条件下处理，同时维持流体在容器内相对于彼此的预定位置，而不损害流体参与预定的化学或生物反应的能力。
49. 权利要求 48 的装置，其中选择第一、第二和第三流体，使得容器和置于其中的流体可以储存至少一周。
50. 权利要求 48 的装置，其中选择第一、第二和第三流体，使得容器和置于其中的流体可以储存至少一个月。
51. 权利要求 48 的装置，其中选择第一、第二和第三流体，使得容器和置于其中的流体可以储存至少一年。
52. 权利要求 39 的装置，其中容器由聚合材料构成。
53. 权利要求 52 的装置，其中聚合材料选自聚乙烯、聚丙烯和 PTFE。
54. 权利要求 39 的装置，其中第一和第二流体中至少一种包含能够参与生物或化学测试的物质。
55. 权利要求 39 的装置，其中第一和第二流体中至少一种包含能够参与生物测试的

物质，且第三流体对测试是惰性的，选择第三流体来分离第一和第二流体并阻止它们混合。

56. 权利要求 39 的装置，其中容器是长度和内径比至少为 10: 1 的管。

57. 权利要求 56 的装置，其中管是旋绕的。

58. 权利要求 39 的装置，其中容器是可热封的。

59. 一种方法，包括：

使第一流体流入容器；

使第二流体流入容器，第二流体与第一流体基本上不相混溶；

使第三流体流入容器，其中第三流体与第二流体基本上不相混溶，并且其中第三流体不与第一流体接触；和

将流体密封在容器中。

60. 权利要求 59 的方法，其中容器包含管。

61. 权利要求 59 的方法，其中第一和第三流体的每一种在容器中形成流体塞。

62. 权利要求 61 的方法，进一步包括在容器中形成另外的流体塞。

63. 权利要求 59 的方法，其中第一和第三流体是液体，且第二流体是气体或气态混合物。

64. 权利要求 63 的方法，其中第一和第三流体中至少一种包含化学或生化试剂。

65. 权利要求 64 的方法，其中第一和第三流体中至少一种是生化试剂。

66. 权利要求 59 的方法，进一步包括储存密封的容器超过一天。

67. 权利要求 60 的方法，其中所述管由聚合物组成。

68. 权利要求 67 的方法，其中所述管的长度与所述管的内径的比至少为 10: 1。

69. 权利要求 67 的方法，其中所述管是旋绕的。

70. 一种装置，包含：

包含小室、定义连续的空间、含有第一流体和第二流体的密封的容器，构建并安排第一流体和第二流体可以分别从容器递送顺次用于预定的化学或生物反应中，其

中构建并安排密封的容器，使得在预定的化学或生物反应中使用第一和第二流体之前储存第一和第二流体至少一个小时。

71. 权利要求 70 的装置，其中构建并安排密封的容器，使得在预定的化学或生物反应中使用第一和第二流体之前储存第一和第二流体至少一天。

72. 权利要求 70 的装置，其中构建并安排密封的容器，使得在预定的化学或生物反应中使用第一和第二流体之前储存第一和第二流体至少一周。

73. 权利要求 70 的装置，其中构建并安排密封的容器，使得在预定的化学或生物反应中使用第一和第二流体之前储存第一和第二流体至少一年。

74. 权利要求 70 的装置，其中构建并安排密封的容器，以便从第一位置运输到第二位置。

75. 一种方法，包括提供权利要求 70 的装置并储存该装置超过一天。

76. 权利要求 75 的方法，其中所述装置在等于或小于 4 摄氏度的温度下储存。

77. 权利要求 75 的方法，其中至少一种流体被冷冻。

78. 一种测试试剂盒，包含：

包括微流体通道的表面；

与微流体通道的一部分结合的抗体或抗原中至少一种；

容器；

置于容器中的第一静态流体，第一静态流体包含与抗体或抗原结合的金属胶体；

置于容器中的第二静态流体，第二静态流体包含金属前体；

置于容器中的第三静态流体，其中第三流体分离开第一和第二流体，和进行测试的说明书。

79. 权利要求 78 的测试试剂盒，其中容器放置在表面上。

80. 权利要求 78 的试剂盒，其中构建并安排容器，以便能够放置成与微流体通道是流体连通的。

81. 一种方法，包括：

提供在共同容器中静止地保持彼此分开超过一分钟的第一和第二流体；

依次将第一和第二流体施加到反应部位；和

避免第一和第二流体之间的接触，至少直至流体已经施加到反应部位之后。

82. 权利要求 81 的方法，其中第一和第二流体被静止地保持超过一天。

83. 权利要求 81 的方法，其中第一和第二流体被分离开。

84. 权利要求 81 的方法，其中第一流体的组分与反应部位结合，且第二流体的组分与第一流体的该组分结合。

85. 一种方法，包括：

提供在共同容器中保持彼此分开的第一和第二流体；

将第一和第二流体依次从容器转移到反应部位来进行预定的化学和生化反应；

允许第一流体的组分与反应部位结合；和

允许第二流体的组分与第一流体的该组分结合。

86. 权利要求 85 的方法，进一步包括在共同容器中静止地保持第一和第二流体。

87. 权利要求 85 的方法，其中第一和第二流体至少被第三流体分离开。

88. 权利要求 85 的方法，其中第一流体包含抗体或抗原中一种，且第二流体包含抗体或抗原中另一种。

89. 权利要求 85 的方法，其中第一流体包含偶联金的抗体，且第二流体包含金属前体。

90. 权利要求 85 的方法，其中第一流体包含抗体，且第二流体包含信号实体。

## 流体递送系统和方法

### 关联申请

本申请依据 35 U.S.C.§119(e) 要求 2004 年 1 月 26 日提交的美国临时申请 No. 60/539,358、2004 年 1 月 26 日提交的美国临时申请 No. 60/539,416 和 2004 年 4 月 26 日提交的美国临时申请 No. 60/565,866 的权益，所有三个申请通过引用并入本文。

### 背景技术

#### 1. 发明领域

本发明涉及递送和/或储存一种或多种流体的方法和装置，具体而言，涉及储存和递送化学和生物试剂的方法和装置。

#### 2. 相关技术的讨论

流体的递送在一些领域例如化学、微生物和生化领域起到很重要的作用。这些流体可以包括液体或气体并可以向化学或生物过程提供试剂、溶剂、反应物或漂洗剂。通常，超过一种流体被递送到反应容器或部位来促进流体或流体组分之间的相互作用。间歇的漂洗流体还可以用于除去不希望的反应物或准备反应器、反应部位或测试部位。

尽管各种微流体学设备和方法例如微流体学测试能提供便宜的、灵敏的和准确的分析平台，向平台递送流体可以增加成本和复杂性水平，这可能需要在实验室进行而不是在可能最有用的现场进行检验。

由于在例如微流体学等领域的发展，化学和生化平台变得更小，进行类似数目的测试或反应需要试剂的量也变得更少。然而，典型地，较小尺寸的平台并不减少向反应部位供给多种试剂和漂洗液的需要。例如，一些微流体学测试可能需要小于 1 微升的试剂流体，但是可能需要以准确量和适当顺序供给两种、三种或更多不同流体。

对于微流体学测试和反应器，流体通常由操作者使用微量移液器来供给。流体可



以用移液器加入微流体学系统的入口，并可以通过在微流体学系统的出口端施加真空源使流体穿过系统。还可以将试剂泵入，例如通过使用填充了所需试剂的不同注射泵。一种流体被泵入微流体学设备后，通过断开第一泵的管线并连接第二泵的管线将第二流体吸入。作为选择，可以使用阀门从一种泵入的流体转换到另一种。对各种流体使用不同的泵来避免交叉污染。当两种流体含有的组分可以相互反应或当混合可能影响测试或反应的结果时，上述操作尤其适当。

连续流系统可以使用依次通过反应通道的一系列两种不同流体。流体可以串联方式经切换、通过阀、连接管道的流体源而被泵入通道。流体持续按顺序流过系统并可以在通道内反应。例如，PCR 反应可以使用连续流进行。见 **Obeid et al., "Microfabrication Device for DNA and RNA Amplification by Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction with Cycle Number Selection," *Analytical Chemistry*, 2003, 75, 288-295.**

系统中使用的任意试剂的储存时间或保存期限可以影响流体系统的实用性。便携式微流体学系统几乎可以被运送到任何场所，但是当试剂必须是新鲜制备时，系统在现场的可用性就减小了。这对生物和生化基础的系统尤其是真实的，这些系统可能依靠例如不稳定的试剂的，这些试剂具有短的保存期限或必须在特殊条件下例如冷藏储存。

准确的早期和当场确定疾病状况对预防和治疗人类和动物疾病是重要的。诊断技术的一个类型使用免疫测试反应来检测取自对象的样品中是否存在抗原或抗体。这些免疫测试方法包括，例如 **ELISA**、免疫层析测试（试条检验、浸条测试和侧向流测试）和三明治测试。已经改善了这些类型测试法的准确度、可靠性和易用性，但测试经常需要实验室条件、功率源和培训，这在期望进行测试的有些地方可能无法得到。

一种类型的三明治测试使用偶联金的抗体来增强检测。例如，见 **PCT 公开 WO/91/01003**。可以通过用银染金胶体达到金胶体信号的增强。首先将抗原固定在固体聚苯乙烯基质上。随后人抗-HIV 抗体被抗原捕获并因此自己也被固定在基质上。然后将抗体暴露给胶体金颗粒标记的抗-人 IgG，因此标记的 IgG 与抗体结合。然后

将抗原-抗体-IgG 复合物暴露给含银离子的溶液，这些围绕金颗粒成核，同时固体银颗粒用眼看是深色的。

微流体学和微流体学技术的发展已经提供了改进的化学和生物研究工具，包括进行化学反应、结合和分离流体、稀释样品和产生梯度的平台。例如，见美国专利 No. 6,645,432，在此通过引用并入本文。

### 发明内容

本发明提供了流体递送装置和生产与使用方法。所述装置可以用在很多分析测试上。

在一个方面提供了一种方法，该方法包括提供在共同容器中保持彼此分开的第一和第二流体，依次将第一和第二流体从容器转移到反应部位来进行预定的化学或生化反应，至少直到流体已经施加到反应部位之后避免第一和第二流体之间的接触。

在另一个方面提供一种装置，该装置包括密封的容器，位于容器中的第一静态流体，位于容器中的第二静态流体和位于容器中的第三静态流体，其中第三流体与第一和第二流体分开，并且至少选择第一和第二流体按预定顺序用在预定化学或生物反应中。

在另一个方面提供一种方法，该方法包括将第一流体流入容器，将第二流体流入容器，第二流体与第一流体基本上不混合，将第三流体流入容器，其中第三流体与第二流体基本上不混合并且其中第三流体不接触第一流体，并将流体密封在容器中。

在另一个方面提供一种装置，该装置包括密封的容器，该容器包括小室、限定连续空间、含有第一和第二流体，构建和安排第一和第二流体，使得可以从容器分开递送，顺次用在预定的化学或生物反应中，其中密封容器被构建和安排成在预定的化学或生物反应中使用第一和第二流体之前至少保存第一和第二流体一小时。

在另一个方面提供一种试剂盒，该试剂盒包含包括微流体学通道的表面，与微流体学通道的一部分结合的至少一种抗体或抗原，容器，位于容器中的第一静态流体，所述第一静态流体包含与抗体或抗原结合的金属胶体，位于容器中的第二静态流体，所述第二静态流体包含金属前体，位于容器中的第三静态流体，其中第三流体与第

一和第二流体分离，进行测试的说明书。

在另一个方面提供一种方法，该方法包括提供在共同容器中静止地保持彼此分开超过一分钟的第一和第二流体，顺次将第一和第二流体施加到反应部位，至少直到流体已经施加到反应部位之后避免第一和第二流体之间的接触。

在另一个方面提供一种方法，该方法包括提供在共同容器中保持彼此分开的第一和第二流体，顺次将第一和第二流体从容器转移到反应部位来进行预定的化学或生化反应，第一流体的组分可以与反应部位结合，第二流体的组分可以与第一流体的组分结合。

在一些情况下，本申请的主题可以涉及互相关联的产品，具体问题的替代性解决方案，和/或单一系统或物品的多种不同用途。

通过下面对本发明的非限制性实施方案的详细描述，并考虑结合附图，其中附图是示意性的并非按比例绘制，本发明的其它优点、特征和用途将变得显而易见。在图中，在各个图中描述的相同或几乎相同的组分通常由单个数字代表。为了清晰，不是每个组分在每个图中都被标记，在对于本领域普通技术人员理解发明不必要举例的地方也没有显示本发明的每个实施方案的每个组分。在本说明书和经引用并入的文件包括冲突内容的情况下，以本说明书为准。

## 附图说明

在附图中：

图 1 举例说明本发明的测试的一个实施方案；

图 2 举例说明包括检测器的测试；

图 3 是光学检测器的示意图；

图 4 是吸光度与分析物浓度关系的图表说明；

图 5 用图表和显微照片说明存在高和低分析物浓度时的不透明材料的量；

图 6 提供显示在各种分析物浓度下不透明材料的形成的显微照片；

图 7 提供关于四种不同测试技术的图解数据；

图 8 提供指示吸光度与暴露时间关系的图解数据并提供显示不透明材料的显微

照片；

图 9 提供测试检测系统的侧视图；

图 10 提供通过两种不同技术比较表观吸光度的图解数据；

图 11 提供通过两种不同技术比较吸光度的另外的图解数据；

图 12 是含有流体塞的容器的示意图；

图 13 举例说明填充容器的技术；

图 14 举例说明填充容器的另一种技术；

图 15 说明将一系列流体递送到测试设备的一个实施方案；

图 16a、b 和 c 图解说明对一系列顺序施加的流体塞的荧光反应；

图 17 提供容器中多种流体试剂塞的示意图；

图 18 举例说明制造微流体测试设备的一种方法；

图 19 提供来自图 17 容器的试剂流体的结合组分的示意图；

图 20 是在图 18 设备上完成的测试的荧光显微照片；

图 21 提供容器中多种流体试剂塞的另一种实例；

图 22 举例说明显示随抗体浓度变化而变化的反应变化的一种实施方案；

图 23 图解说明荧光对管路储存时间的变化。

### 具体实施方式

本发明的应用不限于下面的描述中列出的和在附图中说明的构造和结构的细节。本发明能够具有其它实施方案并可以多种方式实施和实现。在此使用的措辞和术语是用于描述目的，不应该被认为是限制。在此使用“包括”、“包含”或“具有”、“含有”、“涉及”和其变化形式使用意思包括其后列出的项目及其等同物以及另外的项目。

本发明涉及递送流体的方法和装置。在此使用的术语“流体”，通常对于本领域的技术人员，包括液体和气体，所述气体包括气态混合物。还包括水和非水溶剂、溶液和悬液。

“反应部位”是发生化学、物理或生化过程的位置。这些过程可以包括任意的，

例如化学反应、电化学光化反应、化学和生物测试例如疾病状况评估、免疫测试、核酸结合和/或鉴定、和蛋白质结合和/或鉴定。还包括结束（**finishing**）过程、表面处理和相改变反应。

如在此使用的，“不相混溶的”是根据其本领域内的通用含义来使用的。具体地说，如果第一流体基本上不可溶于第二流体中，则第一流体与第二流体不相混溶。在某些情况下，如果在流体储存或使用环境条件下第一流体在第二流体中溶解少于0.1%、少于1%、少于10%或少于50%，则第一流体可以是与第二流体不相混溶的。

“整合物品”指的是单片材料，或彼此整合连接的组分的装配物。如在此使用的术语“整合连接”，当用于两个或更多物体时，指的是在正常使用期间彼此不相分离的物体，例如不能人工分离；分离需要至少使用工具和/或通过引起至少一个组分的损坏，例如，通过断裂、剥离等（分离的组分通过粘合剂、工具等固定在一起）。

“说明书”可以且通常定义一种宣传的组分，典型地包括在本发明组合物的包装上或与其结合的书面说明，任选地作为试剂盒的一部分。说明书还可以包括任意方式提供的任意口头或电子说明书。所述“试剂盒”典型地且优选地定义为一种包装物，其包括任一种或组合的本发明组分或设备与说明书，但还可以包括本发明的组分或设备和任意形式的说明书，其以一定方式与组分或设备联系而提供，使得临床专业人员清楚的认识该说明书是与组分或设备有关的。

在某些但不是全部实施方案中，所有或一些在此描述的系统和方法的组分是微流体的。在此使用的“微流体”指的是包括至少一个流体通道的设备、装置或系统，所述流体通道的横截面尺寸小于1 mm，长度和最大横截面尺寸的比为至少3:1。在此使用的“微流体通道”是符合这些标准的通道。

通道的“横截面尺寸”是垂直于流体流动方向测量的。在本发明组分中的大多数流体通道具有最大横截面尺寸小于2 mm，在一些情况下，小于1 mm。在一组实施方案中，本发明的所有含流体通道的实施方案是微流体的或最大横截面尺寸不超过2 mm或1 mm。在另一个实施方案中，流体通道可以部分由单一组分形成（例如蚀刻的衬底或模制的单元）。当然，更大的通道、管、小室、储器等可以用来大量储存流体和递送流体到本发明的组分。在一组实施方案中，本发明的含通道的实施方案的

最大横截面尺寸小于 500 微米、小于 200 微米、小于 100 微米、小于 50 微米或小于 25 微米。

在此使用的“通道”指的是物品（衬底）上或其中的特征，至少部分地指导流体的流动。所述通道可以具有任意横截面形状（圆形、椭圆形、三角形、不规则形、正方形或矩形等）且可以是覆盖的或无盖的。在所述通道被完全覆盖的实施方案中，通道的至少一部分可以具有完全封闭的横截面，或者除了其入口和出口，整个通道可以沿着它的整个长度完全封闭。通道还可以具有长径比（长度比平均横截面尺寸）至少 2: 1，更典型地至少 3: 1、5: 1 或 10: 1 或更大。开放通道通常包括方便控制流体传输的特征，例如结构特征（延长的凹槽）和/或物理或化学特征（疏水性比亲水性）或可以对流体施加力的其它特征（例如包含力（**containing force**））。通道内的流体可以部分或完全填充通道。在使用开放通道的一些情况下，流体可以容纳在通道内，例如使用表面张力（即凹或凸液面）。

通道可以具有任意尺寸，例如具有垂直于流体流动的最大尺寸小于约 5 mm 或 2 mm、或小于约 1 mm、或小于约 500 微米、小于约 200 微米、小于约 100 微米、小于约 60 微米、小于约 50 微米、小于约 40 微米、小于约 30 微米、小于约 25 微米、小于约 10 微米、小于约 3 微米、小于约 1 微米、小于约 300 nm、小于约 100 nm、小于约 30 nm、小于约 10 nm。在某些情况下，可以选择通道的尺寸，使得流体能够自由地流经物品或衬底。还可以选择通道的尺寸，例如在通道中允许特定的体积或线性流速。当然，通道的数目和通道的形状可以通过本领域普通技术人员已知的任何方法来改变。在一些情况下，可以使用超过一个通道或毛细管。例如，可以使用两个或更多通道，彼此在内部放置、彼此相邻放置、彼此交叉放置等。

“塞（子）”在此定义为第一流体的连续体积，其边界通过容器的一或多个壁以及第二流体的一个或多个界面来限定，所述第二流体与第一流体基本上不混溶。所述塞子的实例是在一微升体积的两端由空气限定的毛细管中一微升体积的水溶液。塞子的另一个实例是在管的密封长度内 1 毫升体积的非水液体，非水液体在一端通过管的密封端限定，相反一端通过水性液体来限定。

如果流体是“静止保持”在容器中，所述流体相对于容器不改变其位置，尽管它

可以，例如，在它的静态保持位置扩张或收缩或振动。包含流体的容器可以被移动或重新定向，同时流体被静态保持。

如果流体具有与第二流体相同的“类型”，意味着两种流体在测试或反应中用于相同目的，尽管它们可以具有不同的体积。例如，两种不同的漂洗溶液被认为是相同类型的溶液，而包含试剂的溶液与漂洗溶液不是相同的类型。

如果两种流体彼此“截然不同”，它们不能相互混合并分别填充可区分的体积。例如，如果两种流体是不相混溶的或如果它们是物理分离的，例如通过分离流体，那么它们可以是截然不同的。

术语“结合”指的是显示相互亲合或结合能力的一对相应分子之间的相互作用，典型地特异性或非特异性结合或相互作用，包括生化、生理和/或药物相互作用。生物学结合定义了发生在包括蛋白质、核酸、糖蛋白、碳水化合物、激素等的成对分子之间的相互作用类型。具体实例包括抗体/抗原、抗体/半抗原、酶/底物、酶/抑制剂、酶/辅因子、结合蛋白质/底物、载体蛋白质/底物、凝集素/碳水化合物、受体/激素、受体/效应物、核酸的互补链、蛋白质/核酸阻遏物/诱导物、配体/细胞表面受体、病毒/配体等。

“不透明材料”是在一种或多种波长干扰光透射的物质。不透明物质不仅仅折射光，而且降低穿过材料的透光量，例如经吸收或反射光。不同的不透明材料或不同量的不透明材料可以允许透光度小于照射不透明材料的光的百分之 90、80、70、60、50、40、30、20、10 或 1。不透明材料的实例包括金属元素的分子层或聚合物层。

术语“结合伴侣”指的是可以与特定分子结合的分子。生物结合伴侣是实例。例如，蛋白 A 是生物分子 IgG 的结合伴侣，反之亦然。同样，抗体是其抗原的结合伴侣，反之亦然。

在此使用的“胶体”指的是纳米颗粒，即非常小的、可自悬浮的或可流体悬浮的颗粒，包括那些由例如无机或有机、聚合物、陶瓷、半导体、金属（例如金）、非金属、晶体、非晶或组合的材料制成的颗粒。典型地，根据本发明使用的胶体颗粒具有在任意方向上小于 250 nm 的横截面，更典型地在任意方向小于 100 nm 的横截面，在大多数情况下具有约 2-30 nm 的横截面。一类适用在本发明的胶体是 10-30 nm 的

横截面，另一类是约 **2-10 nm** 的横截面。胶体可以与结合伴侣例如抗体结合。在此使用的这个术语包括通常在生化领域使用的定义。

在此使用的，“相对于另一个组分而被固定化”的组分，或者被固定在其它组分上或间接固定在其它组分上，例如通过固定在第三组分上，该第三组分上同时还固定到其它组分，或者另外过度性与其它组分结合。例如，如果信号实体被固定到结合物；被固定到胶体颗粒，而胶体颗粒被固定在结合物上；被固定到 **dendrimer** 或聚合物，而其又被固定到结合物上；则信号实体相对于结合物被固定化。

“信号实体 (**signaling entity**)”指的是能够指示其在特定样品或特定位置存在的实体。本发明的信号实体可以是通过无辅助工具由人类肉眼可识别的那些，可以是不能分离地看到但如果有足够量可以被未借助工具的人眼检测到的那些（例如胶体颗粒），以一定水平或波长范围内吸收或发射电磁辐射使得它们可以容易地由视觉（未借助工具或借助显微镜包括电子显微镜等）、光学或用分光镜检测到的实体，可以被电子或电化学检测的实体，例如在暴露给适当活化能时显示特征性氧化/还原模式的氧化还原活性分子（“电子信号实体”）等。实例包括染料、色素、电活性分子例如氧化还原活性分子、荧光结构（包括，根据定义，磷光性结构）、上调磷光体、化学发光实体、电化学发光实体、或酶联信号结构，包括辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。“信号实体的前体”是其自身不具备发信号能力，但依靠与另一物的化学、电化学、电、磁或物理相互作用而成为信号实体的实体。实例包括仅当与另一分子化学相互作用时具有发射特定可检测波长内辐射的能力的发色团。信号实体的前体可以与在此使用的“信号实体”区分，但包括在其定义内。

在一个方面，本发明可以用于提供一系列流体给设备例如微流体设备。微流体设备可以是在此描述的那些之一或可以是任何其它微流体设备。这种微流体设备的实例描述于 **Samuel Sia, et al**, 标题为“**Assay Device and Method**”的 **PCT** 申请，其在 **2004 年 12 月 29 日** 提交，代理案号为 **H0498.70211**，该申请通过引用并入本文。流体可以依序流入微流体测试中的反应部位。流体可以是气体、水性液体或非水液体。流体和流体组分可以包括例如试剂、漂洗液、预漂洗液、固定液和染剂。流体可以流入一个或多个反应部位，不同试剂之间很少或没有混合。一系列漂洗溶液可以通



过分离塞分离，在第二漂洗溶液施加到反应部位之前允许第一漂洗溶液完全经过反应部位。

在一个方面，提供容器来容纳、储存、保护和/或运输两种或更多流体。如在此使用的，容器包括管路 (**cartridge**) 和管 (**tube**)。容器可以包含两种或多种由第三流体分离的截然不同的流体，所述第三流体与另两种不相混溶。容器中可以包含任何数目的截然不同的流体。例如，图 12 以纵向截面举例说明容器是管 10 的实施方案，所述管 10 包括试剂溶液塞 20，其后是空气塞 30，其后是漂洗溶液塞 40。另外的空气塞 50 可以将第一漂洗溶液塞 40 与第二漂洗溶液塞 60 分离。可以密封管 70 和 72 的末端，例如，以保持塞和防止外部源的污染。液体塞可以保持它们在管中的相对位置，可以相间的空气塞来防止彼此接触。可以选择管尺寸和构建材料来帮助流体塞保持它们的位置和保持不混合。

试剂和其它流体可以在容器中长时间储存。例如，试剂可以被储存超过 1 天、1 周、1 月或 1 年。通过阻止流体之间的接触，包含典型地彼此能反应或结合的组分的流体不能反应或结合，同时流体还保持在连续小室中。

流体可以从容器转移来用于过程中，例如，参与反应或测试。通过在端 70 和 72 除去或刺穿密封之后施加压力或真空可以使流体从容器中转移。在另一个实施方案中，容器不需要密封并且流体流动可以通过施加外部力例如压差来启动。容器的一端，例如端 70，可以是或可以放置使得与将接受容器中流体的另一设备流体连通。这种设备可以包括，例如，反应器或测试的反应部位。

包含流体塞的容器可以放置成与反应部位流体连通，并且流体可以从容器流到反应部位。例如，流体可以流到微流体免疫测试，在此描述了一些这种实施方案。包含流体塞的容器可以与包含反应部位的设备分离或可以是同一平台的一部分。流体可以流到反应部位，例如通过推或拉流体经过容器。流体可以被推到反应部位，例如使用泵、注射器、加压容器或任何其它压力源。作为替代，通过在反应部位的下游侧施加真空或降低压力，流体可被拉到反应部位。可以通过任何能够提供比反应部位上游存在的压力更低压力条件的源提供真空。这种源可以包括真空泵、文丘里管 (**venturis**)、注射器和真空容器。

在一组实施方案中，容器可以包含线性顺序的流体塞，使得流体从容器流到反应部位时它们可以按照预定顺序递送。例如，测试可以依次接受抗体流体、漂洗流体、标记抗体流体和漂洗流体。通过在这些测试流体之间保持不相混溶的流体（分离流体），测试流体可以按顺序从单个容器中递送，同时避免任何测试流体之间的接触。用于分离测试流体的任何不相混溶流体可以被施加到反应部位，而不改变反应部位的状态。例如，如果抗体-抗原结合已经在反应部位上发生，可以向部位施加空气，对已经发生的任何结合具有最小的影响或没有影响。

在一个实施方案中，至少两种流体可以依次从共同容器流出，各种流体的组分可以参与共同反应。如在此使用的，“共同反应”指的是在流体已经从容器中递送之后每种流体的至少一种组分与其它反应，或者在流体从容器递送之后各种流体的至少一种组分与共同组分和/或在共同反应部位反应。例如，第一流体的组分可以与容器下游的化学或生物实体反应。化学或生物实体可以形成反应部位并可以例如是样品、生物或化学化合物、细胞、细胞的一部分、表面或衬底。化学或生物实体可以原位固定或可以移动。随后第二流体的组分可以与第一流体的所述组分反应和/或结合，所述组分已经与下游的化学或生物实体反应，或所述第二流体的组分自身可以与化学或生物实体反应或结合。随后可以向生物或化学实体依次施加另外的流体来进行另外的反应或结合事件或作为指示剂或信号增强剂。

用试剂预填充容器可以将试剂按预定顺序分配用于下游过程。在期望暴露于试剂预定时间的情况下，容器中各种流体的量可以与试剂暴露于下游部位的时间量成比例。例如，如果暴露于第一试剂的期望时间是暴露于第二试剂的期望时间的两倍，容器中第一试剂的体积可以是容器中第二试剂的体积的两倍。如果在试剂从容器流向反应部位中施加恒定的压差，并且如果流体的粘度是相同或相似的，那么各种流体暴露于特定点的时间，例如在反应部位，可以与流体的相对体积成比例。容器几何结构、压力或粘度等因素可以被改变以来改变特定流体从容器的流速。

本发明的另一个方面集中于用流体塞填充容器。在一个实施方案中，容器是管且所述管用一系列流体塞依次填充，所述流体塞通过不相混溶的分离流体的塞子而被分离。流体可以以任何允许用一或多种流体分离塞分离两种或多种流体塞的方式放

置在管中。例如，流体可以在压力下被泵入管或由真空拉入管。

在一个实施方案中，管的第一端可以与真空源连接。管可以用流体例如缓冲液预填充，所述流体比空气的粘度大并比只用空气填充可以更精确控制填充速率。用于预填充管的任何流体的一些或全部可以在填充过程中从管中排出。管的待填充部分和真空源之间可以放置阀，其可以开放或关闭以向管提供真空。管的相反端可以放置在储器中，其可以是例如小管或 96 孔板的孔。储器可以包含流体，例如缓冲液、试剂流体、漂洗溶液、前体或分离流体。阀可以开放足够长时间以便从储器吸入期望量的流体。阀可以人工或通过控制器例如计算机来控制。阀关闭后，管的相反端可以从流体储存器移除，第二流体塞可以被吸入管中。如果空气是第二流体，可以当管的末端悬在空气中而不是储器中时对阀进行动作。当适当长度的空气塞已经被吸入管时，可以关闭阀门，管的相反端可以放置在与第一流体储器相同或不同的流体储器中。随后可以将阀再次开放足够长时间来吸入期望的塞大小。随后可以吸入另一分离流体塞，其可以与第一流体塞相同或不同。可以重复上述程序直到将预定顺序和量的流体吸入管中。在一些情况下，然后可以在一端或两端密封管。可以使用共同控制器例如计算机平行地吸入多个管。当填充超过一个管时，流体可以从共同的或分离的容器吸入。

在另一个实施方案中，容器例如管可以不用真空泵或不用电源来填充。例如，手动注射器可以提供吸入流体的真空源。注射器柱塞可以抽出一定距离来提供吸入特定量的流体到管的相反端。可以不必要装设阀门。可以平行地填充多个管。

在一个方面，可以使用容器来保留两种或多种可以依次从容器递送的流体。容器可以是任何形状和大小，可以由任何适合保留期望保留的流体的材料制成。根据流体，这种材料可以是例如玻璃、金属或聚合物。聚合物可以包含例如热塑性材料例如聚乙烯和聚丙烯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、PTFE、PET 和本领域技术人员已知的其它材料。

在一些实施方案中，容器是管。管可以优选，因为容易获得不同直径、长度和材料的管。管可以是柔性的且可以是半透明的或透明的。管中的流体塞可以线性测量作为塞体积的指示。管可以具有恒定或可变的内径且可以具有长度/内径比大于 10:1、

大于 **50:1** 或大于 **100:1**。根据应用, 可以使用任何直径的管, 在许多应用中, 管的内径可以小于 **1 cm**、小于 **5 mm**、小于 **1 mm**、小于 **500 微米**、小于 **200 微米**、小于 **100 微米**或小于 **50 微米**。长度/内径比较大的管可用于视觉上指示管内包含的各种流体的量。例如, 已知内径的管内的流体塞的线性测量可以给出流体体积或相对体积的准确指示。

容器, 如果是管或另一种形状, 可以包括两个或多个分支或区段, 它们可以相互流体连通并与容器的内部其它部分流体连通。在一些实施方案中, 管可以具有两个、三个、四个或更多可以互相连接的分支。分支和分支接点可以包括或不包括阀。阀可以用于临时将一个或多个分支和其中包含的任何液体与管的其余部分隔离。

在一个实施方案中, 管可以在一端包括“Y”形分支, 例如在上游端。Y形的每个分支可以含有与另外分支中流体反应形成第三流体的流体。将各种流体从各个分支中驱动进入共同管中可以提供允许这两种流体反应的环境。两个分支可以在一个区段连接或通向一个区段, 所述区段具有足够的尺寸来促进湍流流动并因此混合两种流体。例如不同几何形状, 见美国专利 **No. 6,705,357**, 其全部通过引用并入本文。

在一些实施方案中, 用于容器的材料可以是高度可湿的。然而, 在其它实施方案中, 用于容器的材料, 尤其是用于容器内表面的材料可以显示低的可湿性。例如, 当容器中包含水溶液时, 容器的内表面可以显示对水溶液的低可湿性。如果容器的内表面可湿性越低, 流体越不可能沿着表面流动。在高度可湿的表面上, 水溶液可以沿着容器壁流动并可以更可能与包含在容器中的其它流体接触。越低可湿性的表面可以允许使用越高内径/长度比的管、管路或其它容器, 同时保持储存、运输和/或使用期间截然分开的流体塞。表面能是表面可湿性的指示, 容器或容器内表面可以优选具有的表面能小于 **40 达因/cm**、小于 **35 达因/cm**、小于 **32 达因/cm** 或小于 **30 达因/cm**。可以表现在这些范围内表面能的聚合物包括聚丙烯、聚乙烯和 **PTFE**。

在一些实施方案中, 优选更亲水性的内表面。例如, 如果流体塞具有或不具有某些性质, 在一些系统中流体塞的持续流动可以被分离流体干扰。例如, 在与分离流体相比较流体对容器内表面不具有足够高的亲合力的情况下, 流体流动可以受到影响。一个实例可以是液体/气体系统。如果流体是水性液体而分离流体是气体例如空

气，当流体通过容器前进时，分离流体可以依附于表面并引起流体流动的分裂或其它不持续。

提高流体对表面的相对亲合力可以是改善性能的一种方法，例如，通过降低不持续流动的趋势。在一些实施方案中这可以通过改变流体、分离流体、表面或其任何组合的性质来实现。改变容器内表面性质的一种方法是提高表面或表面的一部分的亲水性。例如可以通过用去污剂例如 **TWEEN 20** 处理表面或通过等离子体氧化作用或用气态或液态氧化剂例如臭氧或高锰酸盐氧化表面来实现，上述试剂可以流经容器来改变容器内表面的至少一部分的性质。其它技术包括硅烷化或将亲水性或双亲性聚合物结合至表面，例如通过共价键或物理吸附。

亲水性的增加可以产生更可湿的表面，这反映为更高的表面能。例如，内表面可以显示或经处理后显示表面能大于 **32 达因/cm**、大于 **35 达因/cm**、大于 **40 达因/cm** 或大于 **45 达因/cm**。

容器可以由对可以保留在容器中的流体组分具有低吸附特征的材料制成。例如，如果容器将保留包含蛋白质的流体，可以优选使用由不吸附蛋白质的材料制成。如果容器的内表面确实显示吸附流体中组分的趋势，可以预处理表面来降低这种趋势。例如，聚合物表面可以用表面活性剂例如 **Tween 20** 或封闭蛋白例如白蛋白和/或酪蛋白预处理来降低吸附蛋白质的趋势。处理表面的其它实例，见美国专利申请序号 **09/907,551**、公开号 **20020102405**，其全部通过引用并入本文。

容器可以是可抛弃的或可再用的，当是管的形式时可以是回旋状的，例如螺旋型式，来延长可以适合于给定空间内的长度。

可以密封容器的一或多端以保护和保留任何可以储存其中的液体。一些材料，尤其是热塑性材料和玻璃可以通过熔化端来密封。还可以通过卷边、加盖、塞塞子或安装任何材料来密封端，以阻止流体从容器中流出或蒸发。在一个实施方案中，具有低挥发性的流体，例如油或甘醇可以放置在管的末端来帮助阻止包含其中的其它流体的蒸发和/或移动。

在多种实施方案中，可以使用任何类型的流体。流体包括液体例如溶剂、溶液和悬液。流体还包括气体和气体混合物。当容器（例如管）中包含多种流体时流体可

以由另一种流体分离，其优选与前两种流体不相混溶。例如，如果管包含两种不同的水溶液，第三流体的分离塞可以是不混溶于这两种水溶液。当水溶液保持分开时，可用作分离器的不相混溶的流体可以包括气体例如空气或氮气、或与水流体基本不相混溶的疏水流体。流体还可以基于流体与相邻流体的反应性来选择。例如，惰性气体例如氮气可以用在一些实施方案中并可以帮助保存和/或稳定任何相邻的流体。分离水溶液的不相混溶液体的一个实例是全氟萘烷（perfluorodecalin）。分离流体的选择也可以基于其它因素，包括分离器流体可以具有的对相邻流体塞表面张力的任何作用。可以优选最大化任何流体塞的表面张力来促进流体塞在多种环境条件例如振动、冲击和温度变化下保留作为单个连续单元。分离流体还可以对向其供给流体的任何反应部位是惰性的。例如，如果反应部位包括生物结合伴侣，分离流体例如空气或氮气对结合伴侣的影响可以很小或没有。由于温度变化（包括冷冻）或压力变化容器中所含液体将膨胀或收缩，使用气体作为分离流体还提供了在容器内膨胀的空间。

流体可以从容器转移用于化学或生化过程。通过对容器施加外力例如压力、吸力或重力，流体可以以恒定或变化的流速从容器流动。流体还可以通过毛细作用从容器拉出。可以向待从容器中流动的流体的上游施加压力，压力源可以包括泵，例如电或手动泵、注射器或加压容器。可以通过使用真空或部分真空源向容器的下游侧施加吸力，例如泵、注射器、真空容器、文丘里管或其它降低压力的源。

在一个实施方案中，真空源用来从容器中流动液体。为了控制液体从容器的流动，例如，当液体准备以特定速率流过反应部位时，可以优选向容器的下游侧施加恒定的部分真空压力。可以通过真空泵、通过便携式电池供电的泵或通过注射器，提供准确的真空压力。可以使用小于 1.0、0.99、0.95、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.3、0.2 或 0.1 个大气压的真空压力。

在一些实施方案中，可以向容器施加真空或部分真空，而不使用电能。例如，包括注射器筒管和柱塞的注射器可以用来提供真空源。如果容器与反应部位连通，例如在微流体测试中，真空源，在此情况下，注射器，可以附加到反应部位的下游。可以通过注射器筒管的尖端流体连通地放置在保持流体的容器的下游侧来施加真

空。如果期望全真空或接近全真空，可以通过将注射器柱塞完全按到筒管底部随后将筒管与容器连接来从注射器中排除所有空气。为了提供小于全真空，在抽出柱塞产生真空之前可以将注射器筒管部分地用空气填充。例如，如果使用 **10 cc** 注射器，可以用空气将注射器筒管填充到 **5 cc** 并且将柱塞抽出 **10 cc** 的总体积来提供等于一半大气压的真空。同样，通过用 **7.5 cc** 空气填充 **10 cc** 注射器并且将柱塞抽出全部 **10 cc** 可以施加 **0.75** 个大气压。保持装置例如夹子或注射器筒管的刻痕可以用来抽出后将柱塞保持在恒定位置。如果使用的注射器的内部体积明显大于待从容器中吸出的流体的体积，施加到容器的真空压力可以从吸引过程开始到结束基本上恒定。在一些实施方案中，所用注射器的体积可以是大于流体或待吸出流体的 **10x**、**100x** 或 **1,000x**。

无论在何处进行过程，当用空气将注射器填充到特定体积时，注射器筒管中的空气可以在大气压下。与提供固定绝对压强的部分真空相比，例如用真空容器，这种手动注射器技术可以在不同环境压力条件下使用，例如不同高度，因为不管环境空气压力，该方法可以产生更持续的跨容器和/或反应部位的压力差。这可以帮助以预定速率吸流体并因此使反应部位对各种流体处于更准确的预定保留时间。

在另一个方面，容器可以用于储存流体。在多种实施方案中，流体可以储存在容器中超过 **10 秒**、**1 分钟**、**1 小时**、**1 天**、**1 周**、**1 个月** 或 **1 年**。储存时，流体可以由不相混溶的分离流体保持分离，使得当接触时彼此反应的流体可以在共同容器中储存延长的时间。流体可以储存使得它们保持静态并且在容器中相对于它们的位置不移动。流体可以轻微地移动或振动与膨胀和收缩，同时保持静态。共同容器可以没有内壁或保持流体分开的其它分隔物，流体只能由分离流体分离。当在静止状态下储存时，流体可以在降低的温度下储存，例如小于 **4°C**、小于 **0°C** 或小于 **-10°C**。流体还可以暴露在升高的温度下例如大于 **25°C**、大于 **35°C** 或大于 **50°C**。流体可以由表面或空气从一个位置运到另一个位置，而不允许混合容器中含有的试剂流体。不相混溶的分离流体的量的选择可以基于代使用流体的最终过程以及预期容器暴露的状态。例如，如果容器预期接受物理冲击或振动，可以使用不相混溶的分离流体的较大塞。以这种方式，可以避免容器中不同流体的混合。

在另一个实施方案中，包含流体的容器可以与包括反应部位的设备一起储存，例

如测试设备或化学或生化反应器。容器和设备可以整合连接或构建和安排成整合连接。因此，整个试剂组可以在容器中依次排成行并准备施用于反应部位，例如通过对容器或设备的适当端施加压力或真空。

包含一系列流体塞的容器可以与下游设备连接来参与化学或生化反应。容器的末端，例如管或管路的末端可以与设备连接，使得两者处于流体连通。可以直接地、通过将管端插入设备上入口来进行，或可以间接地通过中间连接器连接来进行，例如一段长度的管。在一些情况下，可以最小化连接点的死腔来降低例如延迟、混合或形成湍流。连接可以是真空密封的。在一些实施方案中，连接器的内径可以小于容器或设备内径的 **1X**、**3X** 或 **5X**。一些更软的聚合物可以比更硬的聚合物提供更好的连接。例如，由 **PDMS** 制成的设备可以提供安全的连接和最少的死体积。

在另一个实施方案中，包括流体塞的容器可以整合连接至包括反应部位的设备。例如，容器和设备可以在共同平台例如微流体芯片上形成。设备和容器可以流体连通，使得当对反应部位的下游施加真空或部分真空时，流体塞从容器中被拉出。同样，对流体塞的上游施加压力可以推动流体进入设备并将它们施加到反应部位。

超过一个容器可以被整合连接或非整合性连接至包括反应部位的设备。例如，如果两个容器连接至设备的上游侧，一个容器中的流体可以通过开启第一设备的上游端经过反应部位，同时保持第二设备的上游侧密封。施加到设备的下游侧的真空将试剂从第一而不是第二设备拉出。以相似的方式，两个或多个包括反应部位的设备可以连接至单个包含流体的容器，流体可以通过所选设备被拉出，例如通过向该设备施加真空同时保持其它设备密封。

所有类型的样品可以与不同的实施方案组合使用。样品可以包括化学样品例如水、溶剂、提取物和环境样品。样品还可以包括生物样品例如全血、血清、血浆、眼泪、尿和唾液。用测试检验或在反应器中反应的样品可以被转移到反应设备或包含试剂流体的容器中。例如，全血样品可以放置在测试设备的入口，并可以通过使用真空或压力流经反应部位。这可以在连接容器之前或试剂从容器流到反应部位之前发生。作为替代，样品可以放置在包含试剂流体的容器中。例如，已测量体积的全血样品可以注射到包含试剂流体的管的下游端。然后管可以与测试设备连接，通



过使用真空或压力，样品可以在依次从管流出的试剂之前施加到反应部位。在另一个实施方案中，一些试剂可以流到反应部位，然后是样品，接下来是另外的试剂。在另一个实施方案中，样品可以最后流入。

在一个实施方案中，包括反应部位的设备可以整合或非整合性连接到采样设备，例如采样管。采样管可以具有与持有反应部位的通道或小室相连的端。采样管的另一端可以浸入待分析或反应的样品源（可以是容器或可以是对象）。通过在反应部位下游施加真空，样品可以被吸入样品管并可以保持在样品管中或吸入反应部位。当获得预定量的样品时，样品管的端可以从样品源除去或停止真空。在一些实施方案中，相同的样品管可以用作设备和容纳试剂流体的容器之间的连接器。通过将采样管的末端放置成与含流体的容器的下游侧流体连通，在与样品被拉出类似的方法中流体可以被拉出设备的通道。在一些情况下，可以选择容器中的第一试剂流体来帮助携带样品、处理样品、稀释样品或漂洗来自管的样品。

本发明提供定性或定量地确定样品中组分存在的方法和装置。组分可以是可指示疾病状态的结合伴侣，例如抗体或抗原。

在一个方面，来自对象的样品可以在很少或没有样品准备的情况下分析。还可以非侵入性地获得样品，这样提供更安全和对患者更友好的分析方法。

在另一个方面，提供一种测试，与最敏感的 **ELISA** 测试相比，该测试提供高敏感性和低检测限。测试能很快地进行，而结果可以是持久的，可以在进行测试之后任何时间阅读测试。

在另一个方面，样品流过与样品组分的预期结合伴侣结合的表面。测试能在微流体设备的通道中完成，以允许样品流过结合伴侣例如抗原。形成的任何抗原-抗体复合物可以与金属胶体结合，所述金属胶体提供催化表面供沉积不透明材料，例如金属层。所以，如果抗体-抗原结合发生在微流体通道内，金属前体流经通道能导致形成不透明层，例如银层，因为存在与抗体-抗原复合物结合的催化性金属胶体。在微流体通道形成的任何不透明层能被光学检测，例如通过测量与不含抗体或抗原的通道部分相比穿过微流体通道的透光度减少。与不形成不透明层的技术相比较，不透明层可以增大测试的敏感性。

在此使用的“固定于或使之固定”，在相对于另一物质或相对于物品表面的物质情况下，意味着该物质通过共价结合、通过特异性生物结合连接（例如生物素/链亲合素）、配位键合例如螯合物/金属结合等而被化学或生化连接。例如在本文中“固定”包括多种化学连接、多种化学/生物连接等，包括但不限于结合物质例如在聚苯乙烯珠上合成的肽，特异性生物学偶联至与蛋白质结合的抗体的结合物质如蛋白 A，其被结合于珠上，形成分子例如 **GST** 或 **Phage**（噬菌体）的一部分（经由遗传工程）的结合物质，其依次特异性生物学结合至共价固定到表面的结合伴侣（例如 **GST** 情况下的谷胱甘肽）等。作为另一个实例，共价连接硫醇的结构被固定在金表面，这是由于硫醇共价结合金。同样地，携带金属结合标签的物质被固定在携带共价附着分子的表面（例如硫醇/金结合），该分子也提供与金属配位的螯合物。物质还被固定在表面，如果表面携带特定核苷酸序列并且该物质包括互补核苷酸序列。

本发明的微流体设备可以使用快速原型设计和软平版印刷由聚合物制造，例如弹性体材料如聚（二甲基硅氧烷）（**PDMS**）。例如，高分辨率激光打印机可以用来从 **CAD** 文件产生掩膜，所述 **CAD** 文件代表组成流体系统的通道。掩膜可以是透明性，其可以与光致抗蚀剂例如 **SU-8** 光致抗蚀剂（**MicroChem**）接触，以在硅片上产生光致抗蚀剂的阴性母版。**PDMS** 的阳性复本可以通过对该母版模制 **PDMS** 来制造，这是本领域技术人员熟知的技术。为了完成流体网络，平的衬底，例如玻片、硅片或聚苯乙烯表面可以面对 **PDMS** 表面放置，并可以由范德瓦尔斯力原位保持，或也可以用粘合剂来固定到 **PDMS**。考虑到流体从网络中的导入和接收，可以使用适当尺寸的针在 **PDMS** 形成孔（例如直径 1 毫米）。为了使流体网络与流体源连通，管例如聚乙烯可以被密封与孔连通而形成流体连接。为了避免渗漏，连接可以用密封剂或粘合剂例如环氧胶密封。

在一个实施方案中，如图 1 所示，微流体设备 110 可以用来提供进行测试的衬底。制造这种微流体设备的方法在美国专利申请 No. 6,645,432 中提供，其全部通过引用并入本文。

一系列微流体通道，120、122 和 124 可以用来使样品和金属前体流过微流体设备的表面 130。结合伴侣，例如抗原或抗体，可以放置在 130 表面上部分 140 处。部

分 140 可以包括结合伴侣的试条，如所示，横过两个或多个通道。作为选择，结合伴侣可以放置在限于单个通道的部分。多个结合伴侣可以放置在单个通道中并可以重叠或者彼此分离。

固定在区域或区域的一部分的结合伴侣基本上可以任何方式固定，适用于本发明的许多固定技术都是已知技术。见美国专利申请 No. 10/654,587(公开号 20040121066) 和美国专利 No. 6,686,184，其整体通过引用并入本文。可以一定方式进行固定，使得物质随机地相对于表面定向（即各个固定物质可以相对于表面随机地定向），或可以提供物质相对于表面定向的更大控制。例如，蛋白质固定在表面时，它们可以被定向，使得它们的测试结合部位通常定位成远离表面，以最大化它们的结合能力或可用性。这样做的一种技术在美国专利 No. 5,620,850 中描述，其通过引用并入本文，涉及合成具有多聚氨基酸标签例如 6 组氨酸序列的蛋白质，这通常在与蛋白质的相应结合部位相反的位置，提供金属螯合物，例如氮川三乙酸，以这种方式螯合金属离子例如镍，使得镍上的至少两个配位位点可自由用于结合多聚氨基酸标签，并允许标签与金属离子配位，从而将蛋白质以有利的方向固定在区域或区域的部分。这样的金属螯合物可以多种方式任意固定在区域。一种方式包括在区域中形成自组装单分子层 (SAM)，终止于金属螯合物，这已经在以上引用的美国专利 No. 5,620,850 中描述过。例如，薄的、基本上透明的薄金层可以沉积在这个区域，和 SAM 的烷基硫醇，终止于金属螯合物，可以沉积在金层如 SAM 上。本领域的普通技术人员已知的、在美国专利 No. 5,620,850 和其它参考文献中描述过的其它化学，可以用来在由多种基底材料定义的区域上形成 SAM。

为了进行测试，样品例如从对象提取的生物样品，按箭头显示方向流过一个或多个微通道 120、122 或 124。样品可以是液体样品，但是在一些实施方案中样品在分析以前不需要稀释、纯化或处理。样品可以在足够的速度下流过微通道，允许样品的组分与固定于部分 140 的结合伴侣结合。通过主动使样品流过通道，反应部分 140 重复暴露给样品的组分，改善了反应动力学并导致任何结合对的形成增加。在适当量的样品流经微通道 120 后，例如当已经形成可检测的结合对时，含有与样品组分的第二结合伴侣相连的金属胶体的流体流经微通道，允许金属胶体与已经与微通道

的部分 140 结合的任何样品组分结合。

在金属胶体已经被给予机会与部分 140 处任何结合伴侣结合之后,使金属前体能以金属胶体相似方式流过通道 120。金属前体以一定浓度和速率流经微通道,无论阈值数的金属胶体已经与表面结合,允许形成不透明层。因此,如果偶联金的抗体被当作金属胶体使用,硝酸银溶液可以用来在与偶联金抗体结合的通道部分非电沉积银层。在完成这部分测试时,微流体网络的表面 130 可以包括,在连续层中,抗原例如 HIV 抗原、从对象获得的 HIV 抗体的样品组分、金属胶体例如金标记的抗-人 IgG 和金属例如银的不透明层,其已经非电沉积在金属胶体上。漂洗溶液可以在每个步骤之前或之后流过通道。

除了将金属沉积在可与微通道 120 的部分 140 结合的任何金属胶体上以外,金属前体还可以在先前已经非电沉积在偶联金抗体上的金属上。以此方式,不透明材料可以在部分或全部的部分 140 上形成,这允许通过例如肉眼或光学检测设备来检测。不透明材料可以是连续材料,而不是例如独立颗粒,而且可以包括水平尺寸,在基本与表面 130 相同的平面测量的方向,测量大于 1 微米、大于 10 微米或大于 100 微米。

在一些情况下,不透明层可以形成网或蜂窝状材料,其包括允许光透过的通路。当沉积另外的材料时,这些通路可以变小,使越来越少的光透过材料。当通路消失,透光量可以减少为零,而提供完全不透明的材料。

在形成不透明层之后,检测不透明层和因此确定结合伴侣的存在,可以通过视觉检查微流体设备或通过使用检测器例如光学检测器来测定。光学检测器的一个实施方案在图 2、3 和 9 中描述。图 2 举例说明图 1 所示的微流体设备 110。还包括光源 210,在此是振荡器调制的激光二极管,和检测器 220,例如光学 IC。如在图 3 的示意图中说明的,检测器信号可以放大并通过集中在与控制光源的振荡器同样频率的带通滤波器。然后输出可以传给 A/D 转换器,转换器然后能够提供输出到读出器,例如 LCD 显示器。光源和检测器都可以用 9v 电池供电。

在一个方面,本发明提供使用连续流对样品进行分析的装置和方法。典型地,现有的方法例如 ELISA 和其它的三明治测试使用 96 孔板,或相似的,用于包含免疫

测试样品。这些方法可以将抗原或抗体暴露于流体的样品组分，但是流体不流过抗体或抗原，而且依靠扩散使结合伴侣彼此接近。本发明可以允许在与先前方法相比相似或更低浓度下增加样品组分与潜在结合伴侣结合的机会。通过使含有一种结合伴侣的样品流过提供其它结合伴侣的表面，比简单扩散更多的潜在结合伴侣被放置成彼此接近。在一个实施方案中，样品流过微通道有益于使一种结合伴侣流过第二结合伴侣，同时需要很少样品，例如少于 10 微升、少于 1 微升或少于 100 纳升的样品。微通道可以是透光材料，用来检测在通道中形成的不透明材料，使得通过通道一部分的任何光吸收或透射可以对形成不透明层有贡献。

因为免疫测试检测信号实体，例如溶解或悬浮在流体中的酶联第二抗体，为了获得最佳灵敏度需要相对长的路径长度。因此，免疫测试还没有应用于微流体学的一个原因是微流体设备典型提供的短路径长度。例如，微流体设备的通道厚度可以小于 250 微米、小于 100 微米或小于 40 微米。因此，填充该微流体设备中通道的任何流体将提供小于 250、100 或 40 微米的垂直光路。本发明方法可以不受这些限制，因为它可以使用固体状态的不透明层，而不是流体中的发色团。不透明层厚度可以小于 1 微米、小于 100 纳米或小于 10 纳米。即使在这些小的厚度，也可以获得可检测的透光度变化。

微流体通道的几何形状可以使流体的层流通过通道，甚至以相对高的流速。作为选择，可以通过使用更快的流速或例如微流体混合器等设备而使用湍流。这样的混合可以使潜在的结合伴侣之间有更多量的接触。

样品中分析物的存在、缺少以及量可以用不透明材料的形成来指示。虽然不透明材料可以折射光或可以被刺激而发出与照射激光相近或不同波长的光，测量光透射可以是优选的，例如由于较低的设备 and 操作成本以及易于使用。在一些微通道中，不透明层可以是肉眼可见的，尤其是如果反射，可以不使用设备就能检测。

形成的任何不透明材料可以是一系列不连续的独立颗粒，但是在一个实施方案中表现为普通平面形状连续材料。不透明材料的尺寸可以大于 1 微米或大于 10 微米。不透明材料可以是金属而且优选是可以非电沉积的金属。这些金属包括，例如铜、镍、钴、钨和铂。金属前体是提供金属元素源的材料，用来沉积在例如金属胶

体上。金属前体例如可以是金属盐溶液例如硝酸银。在一个实施方案中，金属前体可以含 0.1%硝酸银、1.7%对苯二酚和 pH 值为 3.5 的 0.1 M 柠檬酸缓冲液。非电沉积材料的一些其它实例可以发现于 **Modern Electroplating, 4<sup>th</sup> Edition, Schlesinger and Paunovic, Wiley, 2000**。金属前体可以被储存很长时间，而且在很多年以内都是稳定的，然而光活性化合物保存期限则短得多。

任何与表面结合的金属胶体可以广泛地散布在表面。例如，金偶联抗体可以结合到与表面的一部分结合的样品组分上，但在金偶联抗体之间可以存在间隔，使它们不连续。当金属前体首先暴露与金偶联抗体时，前体可以单个金属胶体为中心形成颗粒。当金属如银沉积在这些金属胶体上时，颗粒变大并且很快金属前体就不仅沉积金属在金胶体上而且沉积在先前非电沉积的金属上。例如，硝酸银溶液可以沉积银在先前已经沉积在金偶联抗体上的银颗粒上。因此，当银层继续在银以及金上生长时，先前是独立颗粒或金属岛的区域可以连接形成较大的、连续的容易检测的不透明材料。已经发现，微流体系统能够提供相对光滑、连续的金属层。不透明材料的厚度可以大于 1、10、100 或 1000 纳米。对于一些不透明材料，在厚度超过约 100 nm 时材料可以变成完全不透明。然而，在一些实施方案中，例如当形成蜂巢或相似结构时，一些部分的厚度可以大得多，而仍能允许一些光透过。

可以通过在此描述的方法和装置分析多种化学和生物材料。分析物可以包含化学物例如有机化合物和生物材料例如蛋白质、肽、核酸和抗体。

分析物包括可以发现其结合伴侣的任何分析物。可以被确定的分析物包括特异性蛋白质、病毒、激素、药物、核酸和多糖；特异性抗体，例如：HTLV-I、HIV、甲型、乙型和非甲非乙型肝炎、风疹、麻疹、人细小病毒 B19、腮腺炎、疟疾、水痘或白血病的 IgD、IgG、IgM 或 IgA 免疫球蛋白；人和动物激素，例如：人生长激素(hGM, 人绒毛膜促性腺激素 WM)；药物，例如：扑热息痛或茶碱；核酸标志物，例如：用于遗传指纹分析的标志物；多糖例如用于 HLA 组织分型的细胞表面抗原和细菌细胞壁物质。可以检测的化学物包括爆炸物如 TNT、神经毒剂和环境有害化合物例如多氯联苯 (PCB)、二恶英、烃和 MTBE。典型的样品流体包括生理性流体例如人或动物的全血、血清、血浆、精液、眼泪、尿、汗、唾液、脑脊液、阴道分泌物；用于

研究的体外流体或环境流体例如怀疑被分析物污染的水液体。

在分析抗原时，对应的抗体可以是与微流体通道的表面结合的结合伴侣。如果抗体是分析物，那么适当的抗原可以是与表面结合的结合伴侣。当要确定疾病状况时，可以优选把抗原放在表面上并检验对象已经产生的抗体。这样的抗体可以包括，例如 HIV 抗体。

生物样品可以非侵入地获得。本发明能实现的低水平检测允许样品中所含抗原或抗体的典型浓度低于血液。例如，有用的样品可以从唾液、尿、汗或粘液获得。通过允许非侵入地获得样品，本发明的方法能够增加的检测通量、更安全的取样和对对象更少担忧。

本发明的方法和设备能够获得与免疫层析测试以及 ELISA 相当的检测限 (LOD)。例如，可以检测到低于 1 nM 甚至在 100 pM 范围的浓度。测试可以是定性的、定量的或两者都是。如图 4 中说明的，随着分析物浓度增加，不透明材料的表观吸光率因此增加。在图 4 中，样品组分（分析物）是 HIV 抗原，样品是人血清。显示这些血清的不同稀释度，而且在图 6 中当与稀释度为 1:10 和 1:100 的对照比较时不透明层的形成显示了阳性结果。因此，除了存在/不存在类型测试之外，可以提供定量测试。这种定量测试可以是感兴趣的，例如，在治疗期间监测患者体内的抗体水平。

本方法的灵敏度和检测限 (LOD) 与用多种最新 ELISA 技术可得到的顺利地进行了比较。在测试兔 IgG 中当与使用化学发光、荧光和吸光度的 ELISA 技术比较时，使用银沉积的本发明的实施方案提供了相当的灵敏度和 LOD 数字。用 IUPAC 定义计算灵敏度和 LOD 并在下面的表 1 中示出。较高的灵敏度数字指示较好的灵敏度，较低的 LOD 数字指示较低的 LOD。

表 1

方法	灵敏度（归一化）	LOD (pM)
银沉积	.08	89
化学发光	.19	22
荧光	.12	163
吸光度	.04	55

在另一个实施方案中，提供了所用时间比典型的基于免疫的测试如 **ELISA** 更少的测试。例如，使用本发明的微流体设备，各种试剂的保温时间可以少于 **10** 分钟。对于使用微孔的 **ELISA** 技术，各种试剂都典型地需要保温 **1-3** 小时。因此，本发明的方法可以提供减少 **6-18** 倍的保温时间。这种时间节省可以部分归因于直接分析样品而不需要纯化、稀释或另外制备样品。例如，唾液样品可以不经稀释、过滤、分离或另外制备而流过通道。从获得样品到得到结果，可以实现全部时间少于 **1** 小时、少于 **30** 分钟、少于 **20** 分钟或少于 **10** 分钟。这种速度增加的一个原因是结合伴侣之间结合的速率提高。这至少可以部分归结于本发明的流动体系。依赖扩散或毛细作用的体系受限于在给定时间内能彼此暴露的结合伴侣的数目。此外，因为扩散是温度依赖性的，本发明利用样品流动，与其它方法比较可以更不依赖于温度，在温度高于 **40°C**—低于 **0°C** 的范围都可以提供更稳定的测试。

在另一个实施方案中，可以进行两个或更多平行测试。单个样品可以使用微流体设备物理地分离成两个或更多样品。微流体设备可以具有单个输入通道，其分支成两个、三个或更多平行通道。平行分析可以在相似或同一分析物的不同阈水平进行，或在相同或不同阈对不同分析物进行。也可以平行进行对照分析。因此，进行单次样品测试，样品可以在任何数目的阈浓度下分析两个或更多分析物。也可以同时运行对照测试，对照可用于校准和/或验证所使用的检测方法。一旦形成不透明层，测试可以在长时间内保持稳定，例如，超过一个月或者一年，使得测试可以收集和分析或日后再分析。

试剂和样品可以使用本领域技术人员已知的方法或通过使用在此描述的方法供给测试。

可以使用多种测定技术。测定技术可以包括以光学为基础的技术，例如光透射、光吸收、光散射、光反射和视觉技术。测定技术还可以测量导电性 (**conductivity**)。例如，放置在微流体通道一部分相反端的微电极可以用来测量导电性材料的沉积，例如非电沉积的金属。随着越来越多的单个金属颗粒生长并彼此接触，导电性可以增加并指示已经沉积在该部分的导电材料例如金属的量。因此，导电性或电阻可以被用作对分析物浓度的定量测量。



另一种分析技术可以包括测量前体从进入微流体通道到导出通道的浓度变化。例如，如果使用硝酸银溶液，银敏感的电极可以能够测量银浓度损失，这种银浓度损失是由于前体通过通道时银在通道中沉积。

不同的光学检测技术为确定测试结果提供很多选项。在一些实施方案中，透光度或吸光度的测量意味着可以在光源发出的相同波长检测光。虽然光源可以是在单一波长发射的窄带源，也可以是发射一定范围波长的宽谱源，因为许多不透明材料能够有效地阻挡广泛的波长。系统可以用最小量的光学设备操作。例如，检测设备可以不需要光电倍增器、可以不需要波长选择器例如光栅、棱镜或滤波器，或可以不需要指引或 **columnate** 光的设备例如 **columnator**。消除或减少这些特征可以得到更便宜、更耐用的设备。

在一个实施方案中，光源可以是脉冲调制的，例如在频率 **1,000 Hz**。为了要配合脉冲调制光源，检测器可以包括在相同频率工作的滤波器。通过使用脉冲调制光源发现，该系统可以比外置光源灵敏度更低。因此，测试可以在各种光条件下进行，包括宽频日光，其可以使之使用现有技术不切实际。实验数据表明，通过使用脉冲调制的光源和滤波器，不管进行测试的光条件，结果是一致的。

光源可以是激光二极管。例如，可以使用在 **654 nm** 发射的 **InGaAlP** 红色半导体激光二极管。光检测器可以是能够检测光源发出光透射的任何设备。光检测器的一种类型是光学集成电路 (**IC**)，其包括具有峰值灵敏度在 **700 nm** 的光电二极管、放大器和电压调整器。如果光源是脉冲调节的，光检测器可以包括滤波器以去除不在选择频率处的光的影响。

## 实施例

### 实施例 1

#### 生产试剂管路一

通过将市售聚乙烯 (**PE**) 管切成 **30-cm** 长的单元来制备管或管路 (**cartridge**)。图 13 和 14 说明了研究的填充管路的两种方法。在图 14 所示的方法中，多达 **6** 个 **PE** 管路与电压-门控的阀阵列连接，所述阀门然后与 **-6 kPa** 真空源连接。通过自己写

的 **Labview** 程序产生的电压脉冲操作电压-门控阀门。开始加载试剂之前，用洗涤缓冲液（**0.05% Tween®20** 的 **PBS**）填充管路，开动阀门泵入 **2-cm** 空气塞进入管路。随后将管路浸入适当的液体中并通过开启阀门将液体塞吸入管路。**5** 秒的开启时间导致 **3-cm** 长的塞或约 **13.5  $\mu\text{L}$**  体积。各液体塞之间，将空气吸入管路来物理地分离各种试剂并避免管路中试剂的混合。将阀和管路固定在支架上，其适合 **96**-孔板，按适当的顺序将试剂母液放置在孔中。使用这个系统，试剂塞被准确地填充到 **6** 个平行管路中，塞长度的精确度低于 $\pm 14\%$ 。

在图 **14** 中描述的第二种方法，使用手工操作的 **Hamilton** 注射器，连接在单一长度的 **PE** 管的一端。这种方法技术上可以比上述方法更简单，并且可能更适合制备有限数目的管路。当完成管路制备时，将管末端热封，从阀/注射器拔出管路并热封另一端。制备包含多至 **10** 个塞子用于异源免疫测试的管路。

位于各流体塞之间的空气塞确保了在管路中不发生不同试剂之间的混合。使用染色的塞，观察到当塞移入管中时其留下小的残余物。发现拖尾的塞收集残余物。这个过程导致了塞-至-塞的交叉污染。多个、不同的塞可以更有效地除去这种残余物。为了定量交叉污染并确定多少漂洗塞可以将残余物降低到可接受水平，使用图 **14** 描述的方法用溶解在 **50 mM** 碳酸盐缓冲液（**pH9.5**）中的荧光素塞填充管路。以各种浓度加载荧光素塞，继之以一个或多个缓冲液塞。管路与 **25 mm** 长、**50x50- $\mu\text{m}$**  的微流体通道的入口连接，当塞子被泵过微流体通道时时记录通道中荧光强度。结果显示在图 **16b** 和 **16c** 中。检测器对荧光素的稀释系列显示出线形反应，指示数据可以用来定量处理。从 **31  $\mu\text{M}$**  荧光素溶液随后 **3** 个缓冲液塞的塞至塞拖尾污染程度的定量显示（背景扣除之后），相对于 **31  $\mu\text{M}$**  荧光素塞的 **7%、0.9%** 和 **0.1%** 荧光浓度。测量 **250  $\mu\text{M}$**  荧光素塞的交叉污染。确定 **250  $\mu\text{M}$**  荧光素溶液之后 **6** 个塞中荧光素的存在。尽管 **250  $\mu\text{M}$**  荧光素塞的信号使检测器饱和，只在前 **3** 个塞（荧光素塞之后）中检测到荧光。这些观察显示各个试剂塞之间三个缓冲液塞足以阻止交叉污染。因此，管路中引入三个或更多缓冲液塞可以有双重功能：**(i)** 阻止管路中塞至塞污染，和 **(ii)** 在洗涤步骤之前漂洗衬底，如可能在微量滴定等应用中这是期望的。

除了空气，作为分离流体评估全氟萘烷（**PFD**）。水溶液比 **PFD** 使亲水微通道更

湿润。当 **PFD** 塞进入微流体通道时，只部分将水溶液冲出微通道。所得保温时间和洗涤效率因此是可重复的。在给定压差下气体塞比 **PFD** 塞更快的穿过微通道。在环境温度下，空气的粘度为~20  $\mu\text{Pa}\cdot\text{s}$ ，而 **PFD** 的粘度为~5  $\text{mPa}\cdot\text{s}$  或者比空气粘度大 250 倍。当施加压力梯度时，穿过通道的体积流速与流体粘度成反比。因此空气塞比 **PFD** 塞传输快 250 倍。如图 15 中说明的，管路中的空气塞与试剂塞具有相似长度。然而，由于空气的快速传输，检测器的读出值指示两个荧光素塞之间经过的时间小于 10 秒。为了比较，由与水不相混溶的液体例如 **PFD** 制成的相似长度的分离塞，需要几分钟穿过微通道。因此当在试剂塞之间使用基于气体的分离器代替基于液体的分离器时，总测试时间可以显著降低。

## 实施例 2

设计和运行实验来评估与包含一系列流体塞的管路组合的异源免疫测试的用途。除了样品，所有需要的试剂都包含在管路中。管路如上面实施例 1 中描述的制备。

光刻光掩膜从 **PageWorks(Cambridge, MA)** 得到。负性光致抗蚀剂从 **Microchem (Newton, MA)** 得到。聚(二甲基硅氧烷) **Sylgard184 (PDMS)** 从 **Dow Corning (Midland, MI)** 获得。聚苯乙烯衬底购买自 **NUNC (Rochester, NY)**。兔、抗-兔和小鼠免疫球蛋白 **G (IgG)** 购买自 **Sigma (St-Louis, MO)**，**Alexa-488** 驴抗-绵羊 **IgG** 从 **Molecular Probes (Eugene, OR)** 得到。手动操作的真空泵和聚乙烯管 (**Intramedic PE-60, 0.76 mm** 内径和 **1.22 mm** 外径) 购买自 **VWR Scientific Products (Pittsburgh, PA)**。所有其它化学品是分析级的并可以从化学品供应公司得到。

### 制备微流体平台一

由快速原型设计制备具有微通道的 **PDMS** 复制品，其描述于美国专利 **No. 6,645,432** 和 **Samuel Sia et al**，标题为“**Assay Device and Method**”的 **PCT** 申请，在 2004 年 12 月 29 日提交，案号 **H0498.70211**，这两个都全部通过引用并入本文。微流体设计用于形成抗原试条模式（两个平行通道，**30-mm** 长，**200  $\mu\text{m}$**  宽和 **60- $\mu\text{m}$**  深），第二个设计用于进行免疫测试（6 个平行通道，**50-mm** 长，**63- $\mu\text{m}$**  深）。这些通道的每个由 **10 mm** 的 5 段组成，与入口和出口邻近的宽度为 **500  $\mu\text{m}$** ，中心为 **50  $\mu\text{m}$** （发

生异源免疫测试的地方)和过度段为  $250\ \mu\text{m}$ 。这种几何形状导致长通道(即6个入口和6个出口可以几何上彼此分离)而流动阻力有限(即流体可以以最小压力降泵入流体力学流)。用于形成模式的PDMS复制品被非永久性地密封(即无等离子体氧化)至聚苯乙烯衬底,并且两个平行通道用  $50\ \mu\text{g}$  兔 IgG 溶液和  $50\ \mu\text{g}$  鼠 IgG 溶液的PBS填充。在室温下培养90分钟之后,清空通道,用新鲜0.05% Tween的PBS溶液漂洗两次。剥离PDMS板,用去离子水(电导大于  $18\ \text{M}\Omega$ )漂洗聚苯乙烯衬底,并用氮气枪干燥。用磨尖的外径为  $1.6\ \text{mm}$  的医用针(16G1 1/2号)在第二PDMS板(用于免疫测试)上打出入口和出口。这种改进的针在PDMS上打的孔足够插入PE-60管并允许管路和微通道之间紧密密封。第二PDMS板被非永久性地密封在聚苯乙烯衬底上,其中微通道与抗原试条垂直定位。用新鲜0.05% Tween的PBS溶液填充6个微通道来封闭暴露表面至少两个小时。

#### 异源免疫测试一

将管路插入微流体通道的入口,出口与真空源连接。为了确保整个测试中稳定的真空源,手动操作泵与1L圆底烧瓶连接,起到稳定器作用。6个PE-60管依次连接在稳定器和微流体芯片之间。通过操作泵直到稳定器内达到  $-15\ \text{kPa}$  压差来启动测试,使管路的内容物分配到微流体通道中。定量抗原试条上(即形成免疫复合物处)和试条外部(即测量非特异性结合和噪音水平的地方)的荧光强度并扣除后得到信号强度。

图22中给出数据并补偿了每日变化,其中使用8-cm塞作为内标得到的滴定曲线。每个滴定曲线代表3次实验曲线的平均值,这些实验间隔一天时间获得。计算对内标的,用关系式  $y=a\cdot x + b$  的 $\Sigma$ 拟合转换数据。常数a和b的值需要获得这种拟合:在抗-兔IgG浓度最低时  $y=0$ ,最高时  $y=100$ 。所有实验数据使用关系式  $y=a\cdot x + b$  转换,计算三个数据点的平均值。图22中给出的数据补偿了每日变化,其中使用第三微流体芯片作为内标。校准器由4个平行通道(50 mm长,  $50\ \mu\text{m}$ 宽和  $50\ \mu\text{m}$ 深)组成,其中填充50 mM碳酸钠缓冲液pH 9.55中的0.5、1、2和  $4\ \mu\text{M}$ 荧光素溶液。对于各个测量的每日组,用新微流体芯片和适当的荧光素溶液制备新的校准器。荧光强度对荧光素浓度的关系得到一条经线性回归拟合的线。通过减去截距值并除

以斜率，免疫测试得到的各个荧光数据点单独地用线性拟合结果处理。

为了举例说明管路用于依序递送试剂的用途，进行检测抗兔 IgG（抗-兔）免疫球蛋白 G（IgG）的微流体异源免疫测试。如上所述制备管路，塞的顺序为包含绵羊抗-兔 IgG、0.05% Tween 的 PBS、Alexa488 标记的驴抗-绵羊 IgG 和 0.05% Tween 的 PBS，每个包含抗体的塞之后跟随 3 个 0.05% Tween 的 PBS 塞（见图 17）。PDMS 复制品被密封在未结构化的聚苯乙烯衬底上。填充两个平行的微通道，一个用兔 IgG 溶液，另一个用小鼠 IgG 溶液。培养后，除去 PDMS 板来显示物理吸附在聚苯乙烯衬底上的兔 IgG 和小鼠 IgG 带。为了进行免疫测试，将有 6 个微流体通道的第二 PDMS 板垂直地放置到抗原试条（见图 18），微通道中聚苯乙烯的表面用 0.05% Tween20 的 PBS 封闭。管路与微通道的入口连接，使用手动操作的真空泵对出口施加 -15 kPa 真空。试剂被顺序递送到微流体平台。通过荧光显微镜在微通道中观察显示了清晰的荧光信号，信号来源于建立在兔 IgG 试条上的荧光免疫复合物（见图 19 和 20），在小鼠 IgG 试条外部没有检测到荧光。当使用具有高浓度蛋白质的样品时，在小鼠 IgG 的表面观察到一些非特异性结合。根据管路中塞的长度，进行免疫测试的总测试时间可以调整到 2-8 分钟（见下）。

抗-兔 IgG 的异源免疫测试的动态范围通过在管路中对抗-兔 IgG 进行一系列 10-倍稀释的测试来确定。样品的保温时间对测试的性能有直接影响。使用上述技术达到的动态范围通过记录作为培养时间的函数的信号来确定。由于塞的长度可以与培养时间成正比，制备管路，其中包含抗体的塞长度从 2-4 和 8 cm 变化。在管路中，两种包含抗体的塞后面都跟随 3 个漂洗塞（0.5 cm、2.3  $\mu$ L）和一个包含 0.05% Tween 的 PBS 的洗涤塞（1 cm、4.5  $\mu$ L）（见图 21）。包含抗体的塞的具体培养时间和总测试时间在下面表 2 中给出。当使用较长培养时间时最大信号增强。与 2-cm 长的塞相比，使用 8-cm 长塞时的动态范围向低样品浓度移动约一个数量级。

表 2: 管路中塞长度和相应的测试时间

塞长度	塞体积	塞递送时间	总测试时间
2 cm	9 $\mu$ L	30 s	2' 00"
4 cm	18 $\mu$ L	67 s	3' 50"
8 cm	36 $\mu$ L	130 s	7' 45"

### 实施例 3

#### 管路储存一

管路可以用于在进行测试前长期储存试剂。通过制备约 70 个负载 167 nM 抗-兔 IgG 样品的管路，并在 12 天的过程中使用它们，评估管路中试剂的长期稳定性。包含抗体的塞是 8-cm 长。管路制备之后马上在两个有 6 个管路的平行芯片上进行测试，记录由免疫复合物产生的荧光信号。剩余的管路分成 3 批，分别储存在不同温度：4 °C、室温和 37°C。随后，从每批在两个新鲜准备的具有 4 个管路的芯片上重复免疫测试。图 18 所示的体系可以容纳多达 6 个平行管路。每个芯片上使用所有批的两个管路，平均荧光信号作为储存时间的函数来作图（见图 23）。观察到信号稍微减弱（见图 23 中的实线，代表记录的所有 12 个数据点的平均荧光强度）。在给定的芯片上，观察到从储存在不同温度的管路得到的信号之间的微小变化（即典型地小于 5%）。然而，芯片至芯片的变化比同一芯片上管路至管路的更大（有时高达 25%）。这表明制备微流体平台的程序可能是免疫测试结果重复性降低的根源。然而，从保存在不同温度但在同一芯片上使用的管路获得信号之间的比较可以可靠地评估与储存条件相关的信号丧失。从图 23 的图表，与储存在 4°C 或 20°C 比较，发现管路可以储存在高达 37°C 两周而没有明显的活性损失。4 周后，储存在 37°C 的管路与储存在 4 °C 或 20°C 比较显示活性降低。储存在 20°C 的管路中的免疫试剂的整体活性在更长时间内基本上保持不变。这是通过比较使用新鲜制备的管路和储存在 20°C、37°C 和 4 °C 4 周的管路对抗-兔 IgG 得到的滴定曲线确定的。

### 实施例 4

#### 测试评价一

为了比较本发明的方法与现有方法，设计了实验来测试 HIV 抗体，使用本发明方法以及应用化学发光、荧光和吸光度的 ELISA 技术。下面描述了过程和结果。

如下得到试剂和仪器。兔 IgG、抗-兔 IgG（偶联辣根过氧化物酶）、抗-兔 IgG（偶联碱性磷酸酶）、抗-兔 IgG（偶联金）、p-硝基苯磷酸（pNPP）和银增强试剂盒从 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 获得。AttoPhos 购买自 Promega Corp. (Milwaukee

WI)。SuperSignal ELISA Femto Max 购买自 Pierce (Rockford, IL)。BluePhos 磷酸酶底物购买自 KPL (Gaithersburg, MD)。HIV Env 抗原 (gp41) 购买自 Research Diagnostics (Flanders, NJ)。HIV 阳性血清和对照血清购买自 Golden West Biologicals Inc. (Temecula, CA)。

在 96-孔微滴定板中的免疫测试使用 Tecan Genesis 液体操作机器人 (Center for Genomics Research, Harvard University) 进行。下面的 Nunc Maxisorp 聚苯乙烯板用于银还原和 ELISA 测试：透明板用于银还原和吸光度，黑板用于荧光和白板用于化学发光。将 10-倍稀释 (10  $\mu\text{g/mL}$ -100  $\text{pg/mL}$ , 对应于 67 nM-670 fm) 的兔 IgG (每孔 70  $\mu\text{L}$ ) 加入微孔中，除了一排加入 PBS 作为阴性对照；培养时间为 2 小时。然后加入封闭缓冲液 (100  $\mu\text{L}$  0.05% Tween-20 和 1% BSA 的 PBS)，培养 30 分钟。对于第二抗体，使用 1: 300 抗-兔 IgG (偶联金)、1: 1000 抗-兔 IgG (碱性磷酸酶) 和 1: 1000 抗-兔 IgG (辣根过氧化物酶) 的稀释液 (30  $\mu\text{L}$  0.05% Tween-20 的 PBS)；培养时间为 1 小时。对于 ELISA 衬底，使用 pNPP (100  $\mu\text{L}$ ；培养 3 分钟)、AttoPhos (100  $\mu\text{L}$ ；打开 1 周内使用；培养 10 分钟) 和 SuperSignal Femto ELISA (100  $\mu\text{L}$ ；5 分钟后)。对于银增强，银和引发剂溶液以 1: 1 比率在显影前马上混合；通过 0.2  $\mu\text{m}$  过滤器过滤，每孔加入 100  $\mu\text{L}$ 。培养 20 分钟后，除去银增强溶液，用水洗涤每个孔。通常来说，将银增强溶液从 4 $^{\circ}\text{C}$  加温到室温提高银沉积的速率。加入每种新试剂之间，用 PBS 洗涤每个孔 3 次，但以下例外：与抗-兔 IgG (金) 培养之后和银增强之前用去离子水洗涤孔，以避免 AgCl 沉淀。使用的读板仪是用于吸光度测量的 Spectramax Plus 384 和用于荧光及化学发光测量的 Spectramax Gemini XS。

光学 IC 的输出是透光率；使用关系式  $A = -\log(T/T_0)$  计算表观吸光度值，其中  $A$  是吸光度， $T$  和  $T_0$  是通过样品和参照透射到光检测器的光。空气用作读板仪的参照，空白聚苯乙烯板用作便携式检测器的参照。

吸光度、荧光和化学发光读数 ( $y$ ) 拟合至  $\Sigma$  形曲线，其中使用 Kaleidagraph 软件和以下方程：  $y = Ax^n / (B + x^n) + C$ ，其中  $x$  是分析物的浓度， $A$ 、 $B$ 、 $C$  和  $n$  是不定 (floating) 参数。结果表示于图 7。该方程描述具有最少可能数的不定参数 (4) 的  $\Sigma$  形曲线。曲线拟合至全部 4 次滴定得到超过 0.99 的相关系数。通过线性变换各个数

组来实现  $A=1$  (当  $x$  接近无穷时的近似值) 和  $C=0$  ( $y$ -截距) 的值, 所有 4 次滴定的读数  $y$  被标准化到相同量度 (0-1)。

根据 IUPAC 定义计算检测限: 3 乘以空白样品 (“噪音”) 的标准偏差除以斜率 (“灵敏度”)。在没有兔 IgG 的样品 (即阴性对照) 中, 显示最小至最大噪音的方法是 (信号从 0 到 1 标准化以后): 0.006 对 pNPP 的吸光度, 0.014 对 SuperSignal ELISA Femto Max 的化学发光, 0.023 对银 (使用便携式检测器), 和 0.066 对 AttoPhos 的荧光。显示最高到最低灵敏度的方法, 其中灵敏度测量为在检测的线性工作范围 (信号为 0.50) 中间最佳拟合曲线的斜率, 是 (标准化单位/100 pM 分析物): 0.193 对化学发光, 0.121 对荧光, 0.078 对银, 和 0.035 对吸光度。

为了制备用 AFM 分析的免疫测试样品, 在 PDMS 板上打孔 (4 mm 直径), 将 PDMS 板放置在聚苯乙烯表面上。在单独的 PDMS 孔中进行免疫测试。银显影后, 除去 PDMS 板, 用轻拍 (tapping) 模式 AFM 分析平聚苯乙烯衬底上的样品。使用硅探针 (Si#MPP-111000; NanoDevices, Santa Barbara, CA) 以 0.35 Hz 扫描速率, 以轻拍模式用 Dimension 3100 Scanning Probe Microscope (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) 进行 AFM。AFM 显微图在图 8 中显示。具有最大银颗粒的样品观察到了条纹, 这表明银颗粒与表面松散地结合。

使用在软蚀刻 (lithography) 中公开的方法在 PDMS 中制造微流体设备。微通道的尺寸为 2 mm 宽, 130  $\mu\text{m}$  高。通过用抗原溶液填充 PDMS 通道 (完全匹配地 (conformally) 密封在聚苯乙烯板上) 在聚苯乙烯表面初步形成 HIV Env 抗原试条 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的模式。过夜培养之后, 清空通道, 从聚苯乙烯表面除去 PDMS 板, 用去离子水漂洗表面。抗原试条用未结构化的 PDMS 板覆盖, 用氧等离子体氧化聚苯乙烯的剩余表面。除去等离子体保护的 PDMS 板后, 垂直于抗原试条密封另一个微流体通道 (也被新鲜等离子体氧化)。这些微通道的尺寸为 2 mm 宽, 40  $\mu\text{m}$  高; 通道的宽必须足够大以使用便携式检测器记录信号。为了避免 PDMS 下垂, 在通道设计中包括支柱 (占 12% 表面积)。用下列培养时间在微流体通道中进行抗-HIV 抗体测试: 1-4 小时封闭, 10 分钟样品, 10 分钟金标记的抗-人 IgG, 13.5 分钟银增强溶液。银增强 6.5 分钟后, 用新鲜制备的银溶液替换。在测量银膜的光密度之前在初



始抗原试条上除去 PDMS 微通道。用以下保温时间在微孔中进行 HIV 测试：过夜 HIV Env 抗原，2 小时封闭，3 小时样品，1 小时金-标记的抗-人 IgG，10 分钟银增强溶液。

对于兔 IgG 的每个浓度和人血清的每个稀释度，重复免疫测试三次，计算平均值和标准偏差。

电路由发射器段和接受器段组成。在发射器段，1 kHz 振荡器调制激光二极管的光输出。使用红色半导体激光二极管 (Sharp GH06510B2A；通常用于光学数据储存应用例如 DVD)；其发射 654 nm 波长的光，最大功率为 10 mW。激光输出通过样品到接受器段。光学 IC (Sharp IS455；通常用于复印机) 检测和放大信号。IS455 提供与输入照度相关的线性输出电流 (1  $\mu$ A/勒克司)。(红色激光二极管和光学 IC 的尺寸和成本分别为 5.6 mm 和\$10, 5.0 mm 和\$2。)随后通过中心在 1 kHz 的二阶带通过滤器过滤信号，用峰值检测器记录其振幅。峰值检测器的输出连接至模拟/数字转换器，转换器也将输出编码为二元编码的十进制 (Intersil ICL7106)。信号通过 3.5 位液晶显示器显示，其提供读出范围为 0-1999 的输出。整个电路由 9V 电池或单极 5V 源操作，其用 CMOS 电压转换器 (Intersil ICL7660) 经逆变产生  $\pm 5$  V 输出。为了减少体系内的噪音，使用脉冲调制 1 kHz 光学信号来过滤频谱中的噪音功率；结果是，只有适合接受器过滤器的通带的光学噪音部分贡献了检测的整体噪音。还可以使用没有信号调制的体系 (即直流)。

激光二极管和光学 IC 放置在两个分开的保持固定方向的电路板上，以确保从光源至光检测器的光路是一致性匹配。在光源和光检测器之间放置玻璃板。具有与光路匹配的针孔的黑色片 (black transparency) 放置于玻璃板上，用来阻断未进入样品的杂散光透过。为了记录测量，将聚苯乙烯板 (96 孔板或具有微流体设备的板) 放置在玻璃板上。通过大致把样品放置在针孔上方，然后仔细调节聚苯乙烯板的 x 和 y 位置直至达到最大透光率，从而将样品对准光路。记录液晶显示器的读数。

为了独立于分析物比较两种检测方法，通过 IC 和商品读板仪读取 96 孔板的微孔。

包含不同浓度 BluePhos 的微孔的吸光度，其在 600 nm 有最大吸收，用紫外-可

见吸光度读板仪和本研究中描述的光学 IC 测量。对 0.67 pM 至 0.67 nM 兔 IgG 作为分析物，使用偶联碱性磷酸酶的抗-兔 IgG 和 BluePhos 作为磷酸酶底物，进行直接 ELISA。结果提供在图 10 和图 11 中。两种设备测量都在 654 nm。显示线性回归的最佳拟合线（相关系数为 0.998，斜率为 1.01，y 轴截距为 0.08）。误差条是三个不同微孔测量的标准偏差。

在这个测试中，其中比色产物是微孔中的均相溶液，两种检测方法几乎是完美的一致（相关系数为 0.998）。因此，银不均匀沉积在表面上可以对两种测量方法的不充分一致有贡献，使得相同孔的不同部分被激光二极管和读板仪取样（相关系数为 0.996）。

#### 实施例 5

图 9 中提供了一个实施方案和光学检测设备的示意图。（A）来自激光二极管的红光通过包含样品的银涂层微孔到达光学 IC。使用针孔阻断不通过样品的杂散光。激光二极管和光学 IC 由相同电路驱动，同时有整合的液晶显示器显示测出的透光度值。

#### 实施例 6

图 10 提供使用光学 IC 和使用紫外-可见读板仪的免疫测试之间的比较。使用银还原的免疫测试在 96 孔板上检测兔 IgG。各个样品显示微孔上银膜的光学显微照片。各个微孔的表观吸光度通过光学 IC 测量，并与紫外-可见读板仪的读数进行比较；两种测量都在 654 nm 进行。经线性回归的最佳拟合线的相关系数为 0.989，斜率为 1.12 和 y 轴-截距为 0.16。

如此描述了本发明的至少一个实施方案的一些方面，应该知道，本领域技术人员可以容易地进行各种改变、修正和改进。这些改变、修正和改进也被认为是本公开的一部分，而且被认为是在本发明的精神和范围内。因此，前面的描述和附图只是用于举例说明。

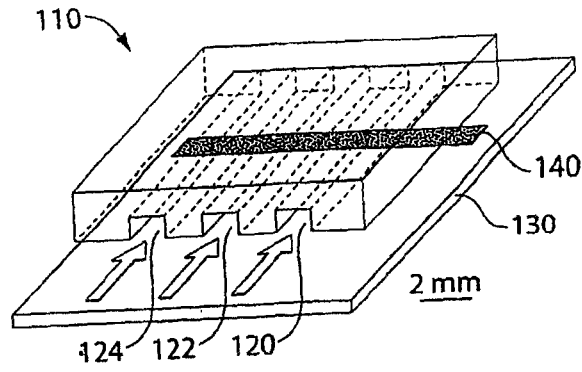


图1

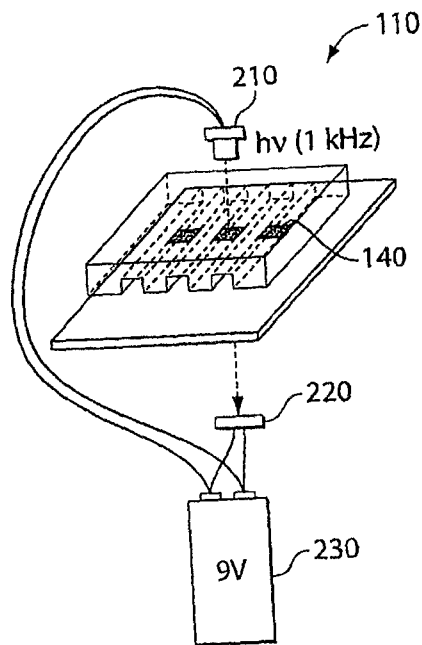


图2

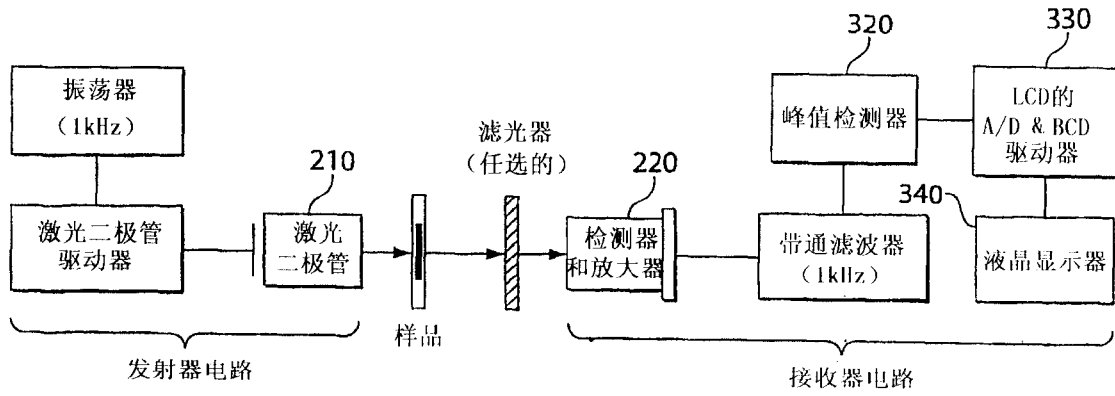


图3

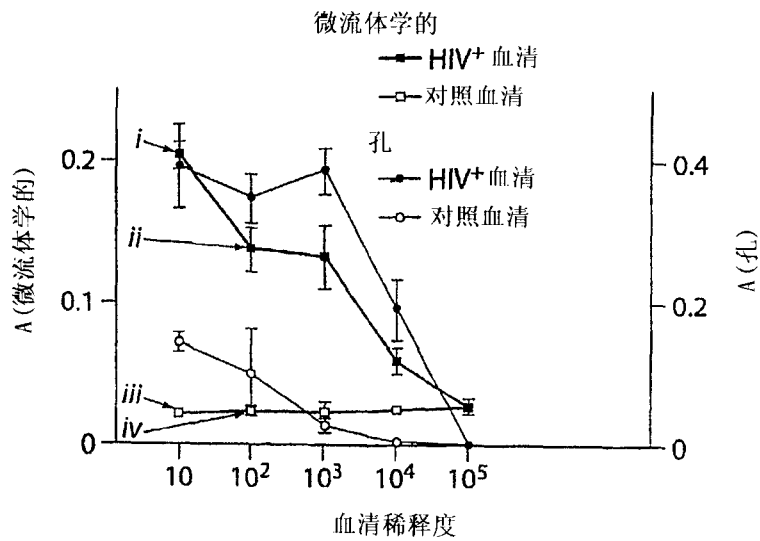


图4

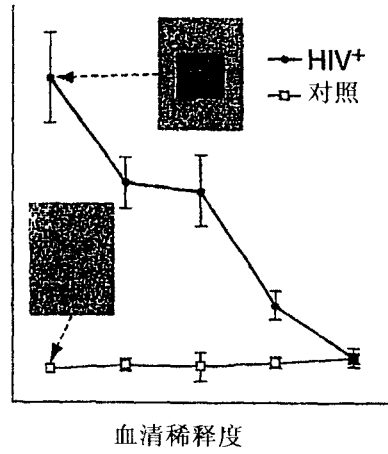


图5

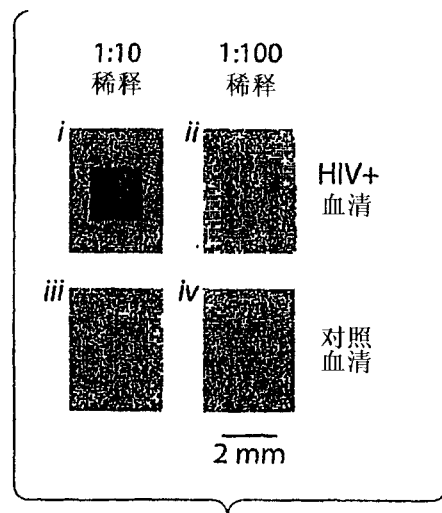


图6

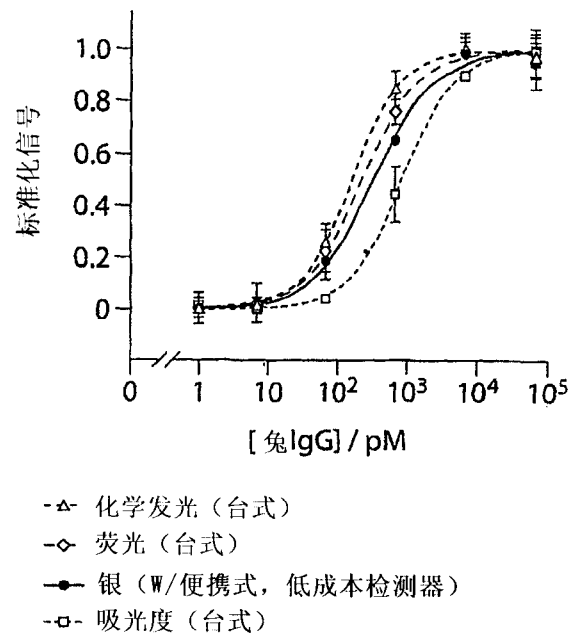


图7

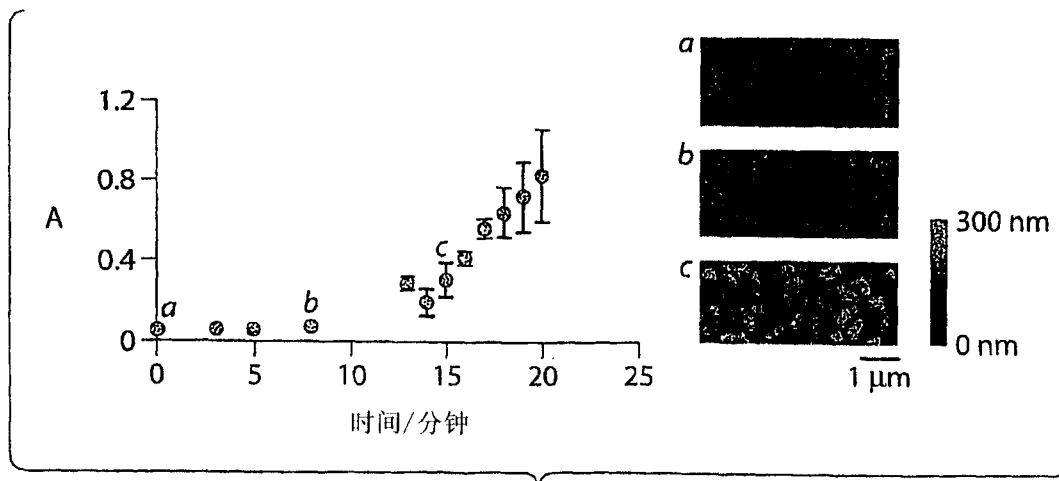


图8

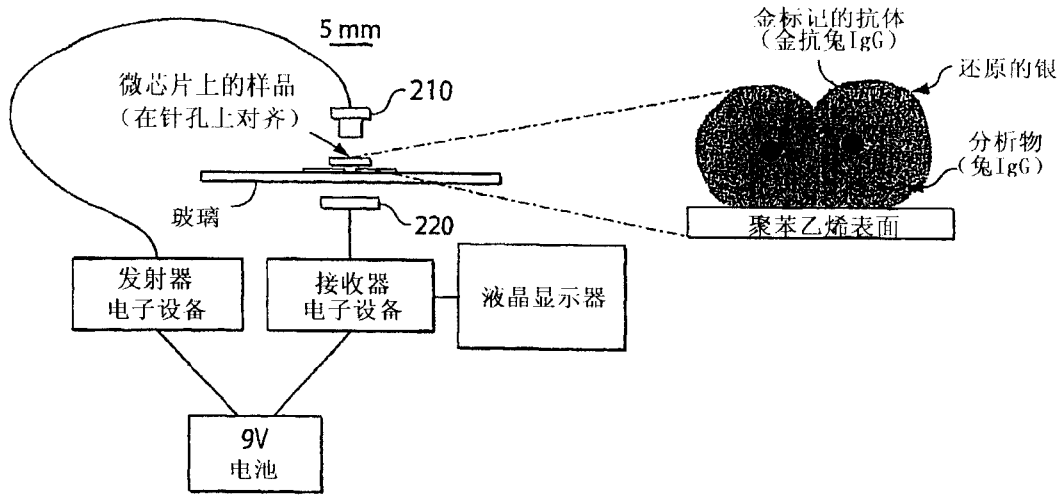


图9

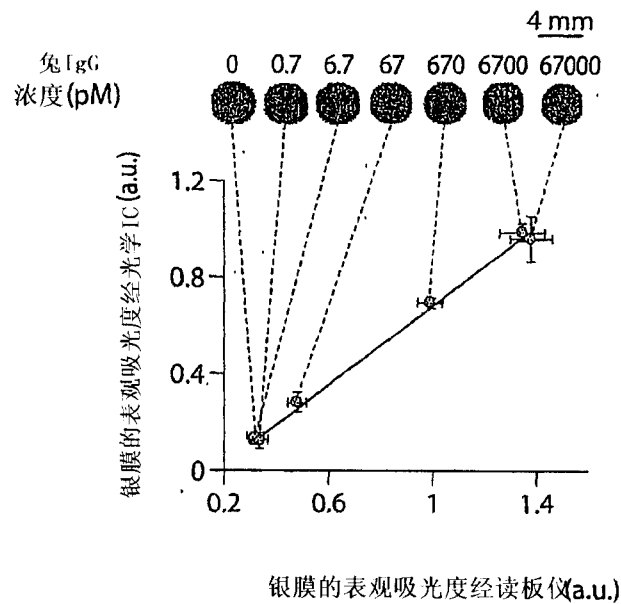


图10

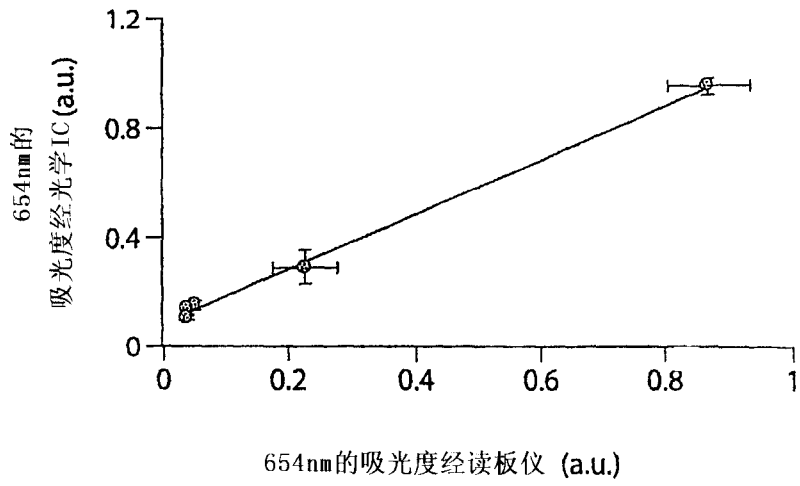


图11

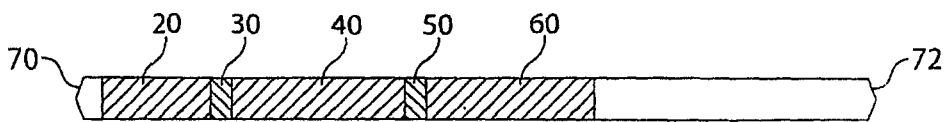


图12



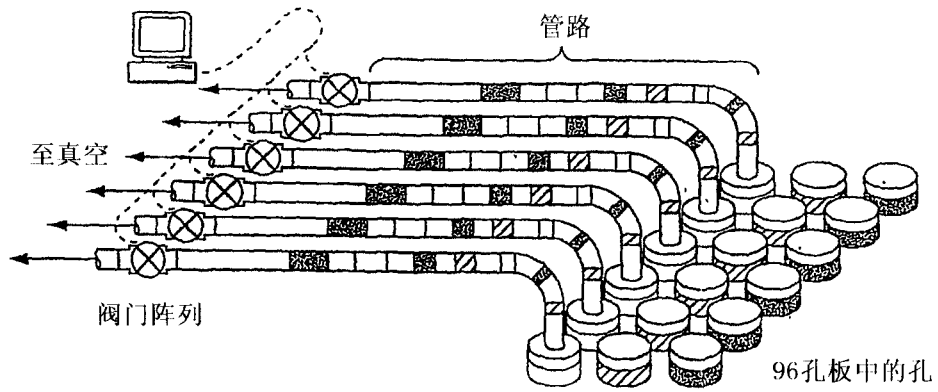


图13

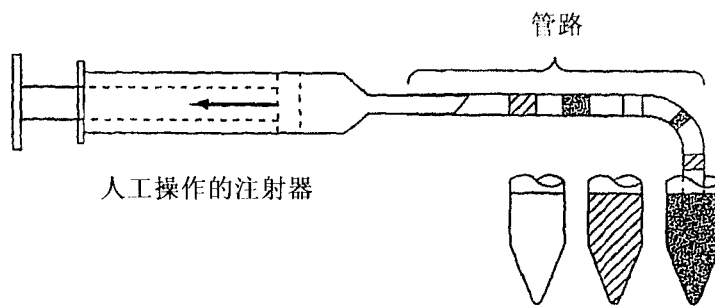


图14

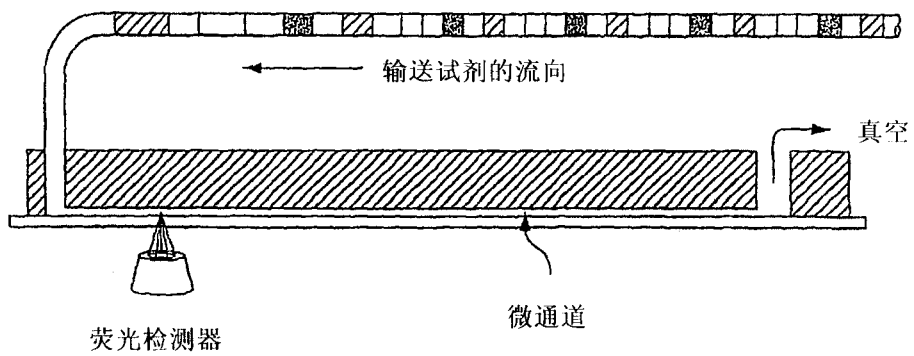


图15

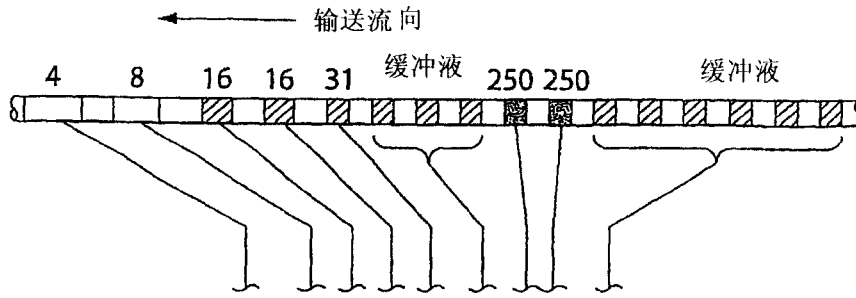


图16A

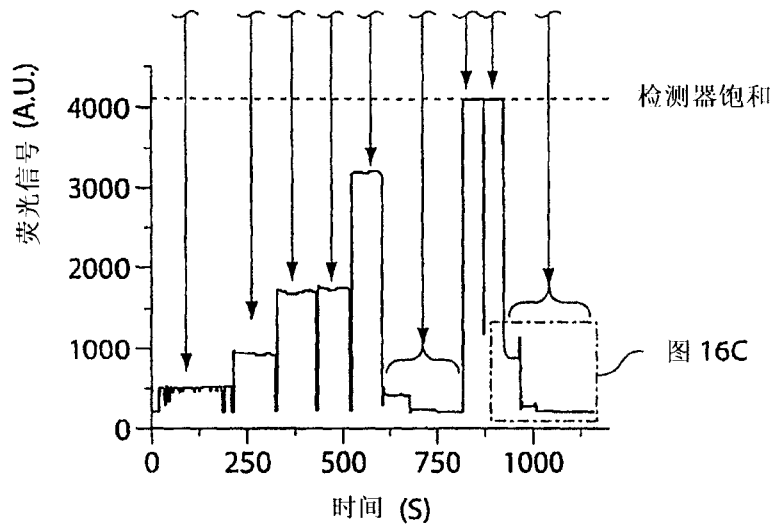


图16B

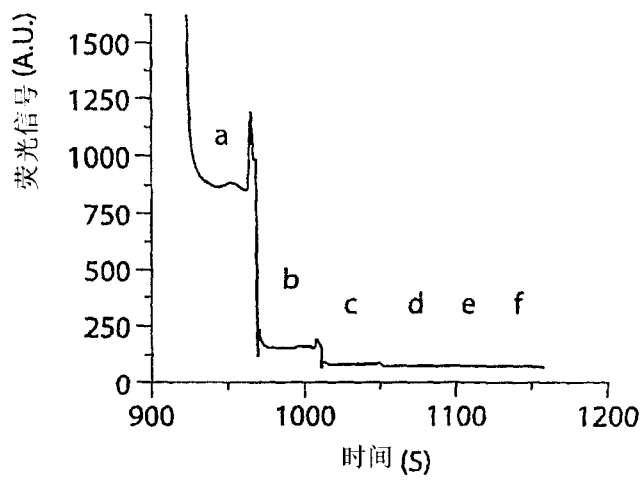


图16C

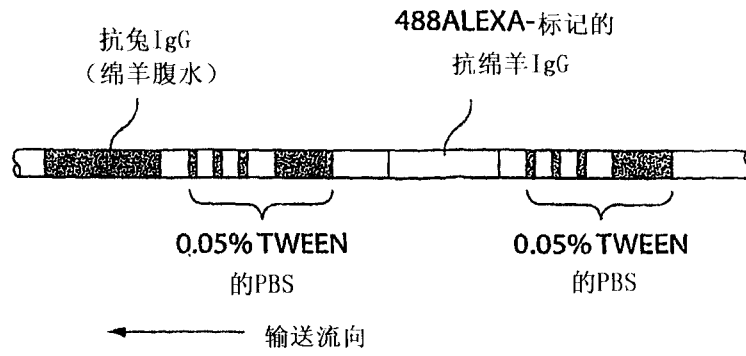


图17

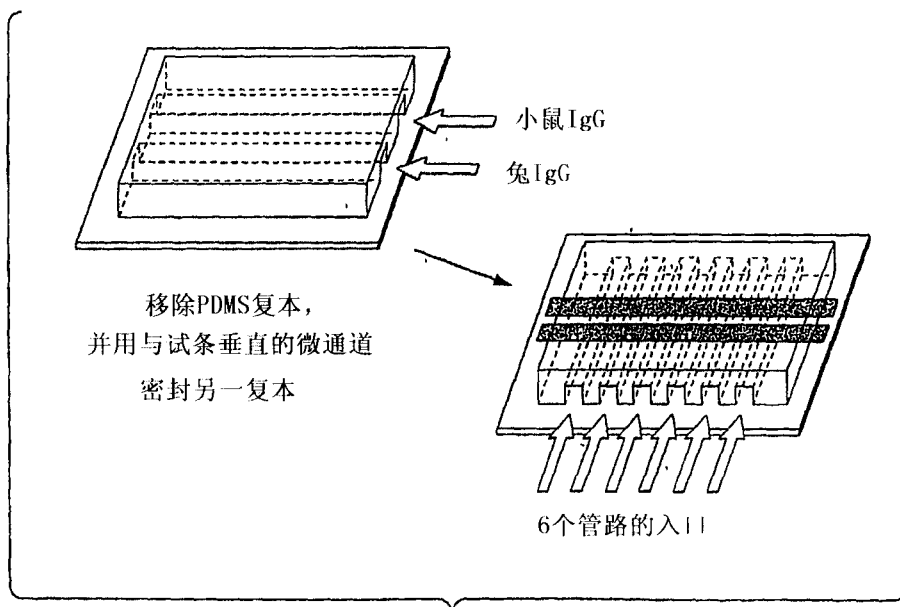


图18

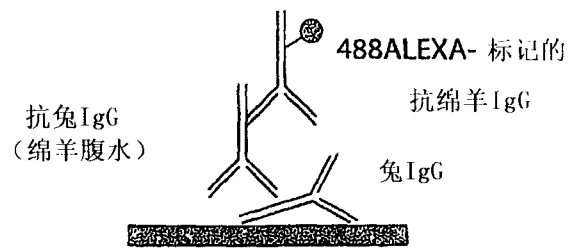


图19

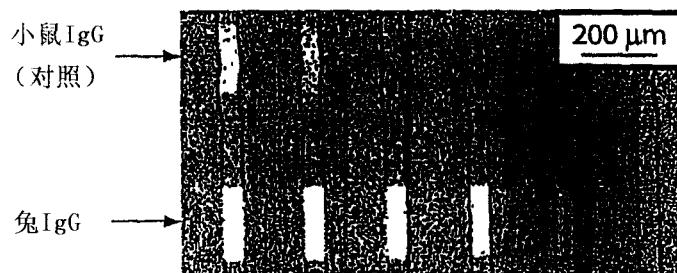


图20

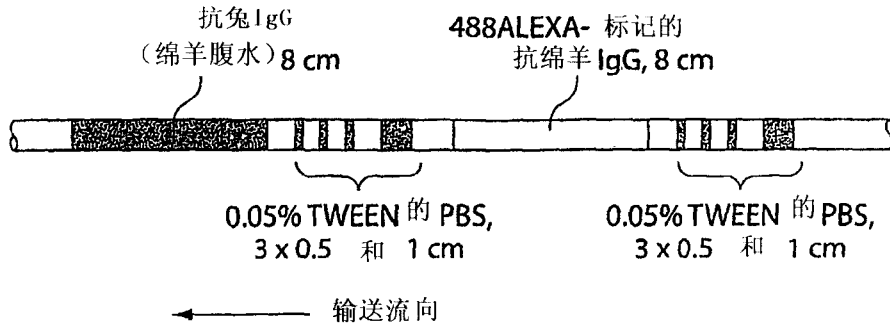


图21

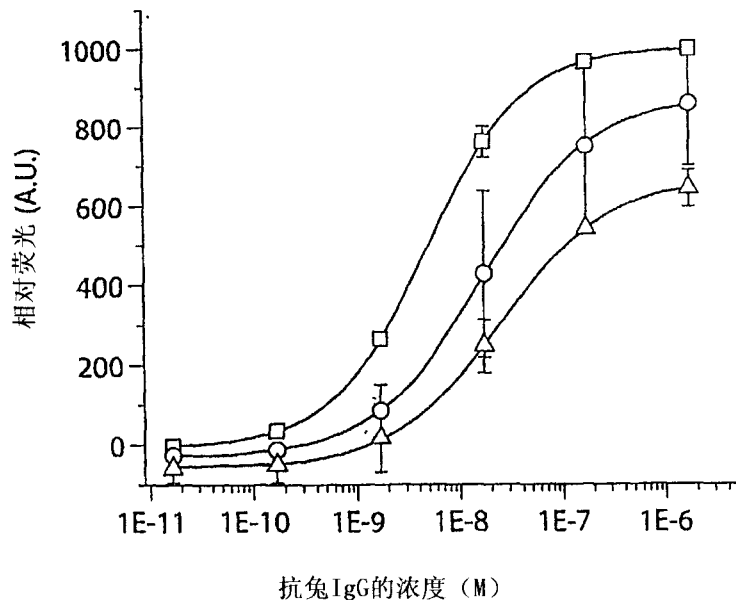


图22

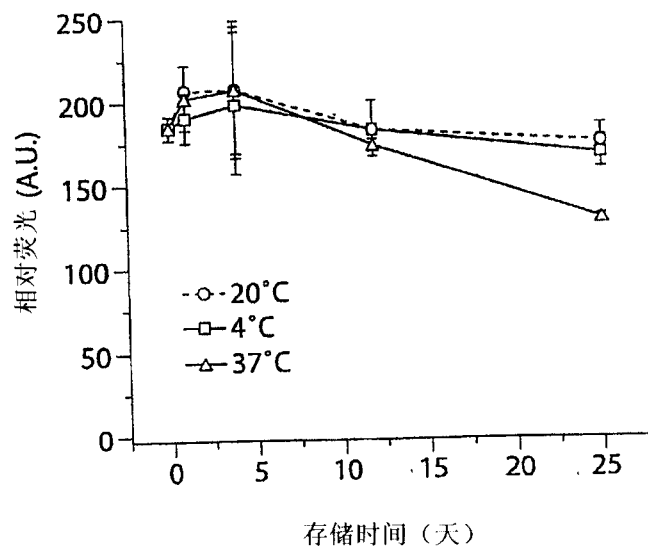


图 23

## 根据 PCT19 条修改的声明

根据专利合作条约第十九条规定,对本专利申请进行如下修改:

用新提交的权利要求第 1-92 项替换原权利要求书第 1-90 项。

1. 一种方法, 包括:

提供在共同容器中保持互相分离的第一和第二流体;

将第一和第二流体依序从容器转移到反应部位来进行预定的化学或生物化学反  
应; 和

避免第一和第二流体的接触, 至少直至流体已经施加到反应部位以后。

2. 权利要求 1 的方法, 进一步包括将容器与包含反应部位的设备连接。
3. 权利要求 1 的方法, 其中容器和反应部位是流体连通的。
4. 权利要求 3 的方法, 其中容器和反应部位在共同平台上。
5. 权利要求 3 的方法, 其中容器和反应部位整合性连接。
6. 权利要求 1 的方法, 其中容器包含管。
7. 权利要求 1 的方法, 进一步包括施加跨反应部位的压差。
8. 权利要求 7 的方法, 其中通过在反应部位下游侧吸来提供压差。
9. 权利要求 1 的方法, 其中通过在反应部位上游侧泵来提供压差。
10. 权利要求 1 的方法, 其中第一和第二流体依次转移到反应部位, 而不需开动阀。
11. 权利要求 1 的方法, 其中第一和第二流体依次转移到反应部位, 而不需开动任何设备, 所述设备控制将第一和第二流体中任一个导入至反应部位的彼此相对的速率、顺序或时间。
12. 权利要求 1 的方法, 其中所述方法不使用电能。
13. 权利要求 1 的方法, 其中所述设备是微流体学设备。
14. 权利要求 1 的方法, 其中所述容器由聚乙烯、聚丙烯或 PTFE 构成。
15. 权利要求 1 的方法, 其中抗体或抗原中至少一种与反应部位结合。
16. 权利要求 1 的方法, 其中第一和第二流体被第三流体分离。
17. 权利要求 12 的方法, 其中第三流体是气体或气态混合物。
18. 权利要求 13 的方法, 其中第二流体是漂洗溶液。



19. 权利要求 1 的方法, 进一步包括将第一和第二流体施加到反应部位之前将样品置于设备中。
20. 权利要求 1 的方法, 进一步包括将样品置于容器中。
21. 权利要求 16 的方法, 其中将容器与设备连接之前将样品置于容器中。
22. 权利要求 1 的方法, 其中通过组合第三流体和第四流体来产生第二流体。
23. 权利要求 18 的方法, 其中第四流体与第三流体反应。
24. 权利要求 19 的方法, 其中将容器连接至设备以后将第三和第四流体组合。
25. 权利要求 1 的方法, 其中所述容器包括密封。
26. 权利要求 25 的方法, 其中密封由融化、加帽或收缩容器内的开孔制成。
27. 权利要求 25 的方法, 其中密封通过向容器的开孔插入非挥发性流体制成。
28. 权利要求 5 的方法, 其中所述管的长度与内径比至少为 10: 1。
29. 权利要求 5 的方法, 其中所述管的内径小于 5 毫米。
30. 权利要求 5 的方法, 其中所述管的内径小于 1 毫米。
31. 权利要求 5 的方法, 其中所述管的内径小于 500 微米。
32. 权利要求 5 的方法, 其中所述管的内径小于 200 微米。
33. 权利要求 5 的方法, 其中所述管的内径小于 100 微米。
34. 权利要求 1 的方法, 其中所述流体之一包含偶联金的抗体。
35. 权利要求 1 的方法, 其中所述流体之一包含金属前体。
36. 权利要求 35 的方法, 进一步包括在金属部位非电沉积金属来制备不透明材料。
37. 权利要求 36 的方法, 进一步包括确定穿过不透明材料的光吸收或透射。
38. 权利要求 35 的方法, 进一步包括非电沉积金属和确定金属的电性能。
39. 一种装置, 包含:
  - 密封的容器;
  - 在容器中放置的第一静态流体;
  - 在容器中放置的第二静态流体; 和

在容器中放置的第三静态流体,其中第三流体分离开第一和第二流体,并且至少第一和第二流体被选择按照预定的顺序用在预定的化学或生物反应中,并且其中选择容器和第一、第二和第三流体,使得容器和置于其中的流体可以储存至少一天并且可以在正常包装和运输条件下处理,同时维持流体在容器内相对于彼此的预定位置,而不损害流体参与预定的化学或生物反应的能力。

40. 权利要求 39 的装置,其中第一和第二流体是液体。
41. 权利要求 39 的装置,其中第三流体是气体或气态混合物。
42. 权利要求 41 的装置,其中第三流体是空气。
43. 权利要求 41 的装置,其中第三流体是氮气。
44. 权利要求 39 的装置,进一步包含另外的不同流体。
45. 权利要求 44 的装置,其中另外的不同流体与与第一流体或第二流体是相同类型。
46. 权利要求 39 的装置,其中流体 1 或流体 2 中至少一种包含化学或生化试剂。
47. 权利要求 39 的装置,其中流体 1 或流体 2 中至少一种包含漂洗溶液。
48. 删除
49. 权利要求 48 的装置,其中选择第一、第二和第三流体,使得容器和置于其中的流体可以储存至少一周。
50. 权利要求 48 的装置,其中选择第一、第二和第三流体,使得容器和置于其中的流体可以储存至少一个月。
51. 权利要求 48 的装置,其中选择第一、第二和第三流体,使得容器和置于其中的流体可以储存至少一年。
52. 权利要求 39 的装置,其中容器由聚合材料构成。
53. 权利要求 52 的装置,其中聚合材料选自聚乙烯、聚丙烯和 PTFE。
54. 权利要求 39 的装置,其中第一和第二流体中至少一种包含能够参与生物或化学测试的物质。
55. 权利要求 39 的装置,其中第一和第二流体中至少一种包含能够参与生物测试的

物质，且第三流体对测试是惰性的，选择第三流体来分离第一和第二流体并阻止它们混合。

56. 权利要求 39 的装置，其中容器是长度和内径比至少为 10: 1 的管。

57. 权利要求 56 的装置，其中管是旋绕的。

58. 权利要求 39 的装置，其中容器是可热封的。

59. 一种方法，包括：

使第一流体流入容器；

使第二流体流入容器，第二流体与第一流体基本上不相混溶；

使第三流体流入容器，其中第三流体与第二流体基本上不相混溶，并且其中第三流体不与第一流体接触；

将流体密封在容器中；和

储存密封的容器超过一天。

60. 权利要求 59 的方法，其中容器包含管。

61. 权利要求 59 的方法，其中第一和第三流体的每一种分别在容器中形成流体塞。

62. 权利要求 61 的方法，进一步包括在容器中形成另外的流体塞。

63. 权利要求 59 的方法，其中第一和第三流体是液体，且第二流体是气体或气态混合物。

64. 权利要求 63 的方法，其中第一和第三流体中至少一种包含化学或生化试剂。

65. 权利要求 64 的方法，其中第一和第三流体中至少一种是生化试剂。

66. 删除

67. 权利要求 60 的方法，其中所述管由聚合物组成。

68. 权利要求 67 的方法，其中所述管的长度与所述管的内径的比至少为 10: 1。

69. 权利要求 67 的方法，其中所述管是旋绕的。

70. 一种装置，包含；

包含小室、定义连续的空间、含有第一流体和第二流体的密封的容器，构建并安

排第一流体和第二流体可以分别从容器递送顺次用于预定的化学或生物反应中，其中构建并安排密封的容器，使得在预定的化学或生物反应中使用第一和第二流体之前储存第一和第二流体至少一个小时。

71. 权利要求 70 的装置，其中构建并安排密封的容器，使得在预定的化学或生物反应中使用第一和第二流体之前储存第一和第二流体至少一天。

72. 权利要求 70 的装置，其中构建并安排密封的容器，使得在预定的化学或生物反应中使用第一和第二流体之前储存第一和第二流体至少一周。

73. 权利要求 70 的装置，其中构建并安排密封的容器，使得在预定的化学或生物反应中使用第一和第二流体之前储存第一和第二流体至少一年。

74. 权利要求 70 的装置，其中构建并安排密封的容器，以便从第一位置运输到第二位置。

75. 一种方法，包括提供权利要求 70 的装置并储存该装置超过一天。

76. 权利要求 75 的方法，其中所述装置在等于或小于 4 摄氏度的温度下储存。

77. 权利要求 75 的方法，其中至少一种流体被冷冻。

78. 一种测试试剂盒，包含：

包括微流体通道的表面；

与微流体通道的一部分结合的抗体或抗原中至少一种；

容器；

置于容器中的第一静态流体，第一静态流体包含与抗体或抗原结合的金属胶体；

置于容器中的第二静态流体，第二静态流体包含金属前体；

置于容器中的第三静态流体，其中第三流体分离开第一和第二流体，和

进行测试的说明书。

79. 权利要求 78 的测试试剂盒，其中容器放置在表面上。

80. 权利要求 78 的试剂盒，其中构建并安排容器，以便能够放置成与微流体通道是流体连通的。

81. 一种方法, 包括:

提供在共同容器中静止地保持彼此分开超过一分钟的第一和第二流体;

依次将第一和第二流体施加到反应部位; 和

避免第一和第二流体之间的接触, 至少直至流体已经施加到反应部位之后。

82. 权利要求 81 的方法, 其中第一和第二流体被静止地保持超过一天。

83. 权利要求 81 的方法, 其中第一和第二流体被分离开。

84. 权利要求 81 的方法, 其中第一流体的组分与反应部位结合, 且第二流体的组分与第一流体的该组分结合。

85. 一种方法, 包括:

提供在共同容器中保持彼此分开的第一和第二流体;

将第一和第二流体依次从容器转移到反应部位来进行预定的化学和生化反应;

避免第一和第二流体之间的接触, 至少直至流体已经被施加到反应部位之后;

允许第一流体的组分与反应部位结合; 和

允许第二流体的组分与第一流体的该组分结合。

86. 权利要求 85 的方法, 进一步包括在共同容器中静止地保持第一和第二流体。

87. 权利要求 85 的方法, 其中第一和第二流体至少被第三流体分离开。

88. 权利要求 85 的方法, 其中第一流体包含抗体或抗原中一种, 且第二流体包含抗体或抗原中另一种。

89. 权利要求 85 的方法, 其中第一流体包含偶联金的抗体, 且第二流体包含金属前体。

90. 权利要求 85 的方法, 其中第一流体包含抗体, 且第二流体包含信号实体。

91. 权利要求 81 的方法, 包括将第一和第二流体从容器施加到反应部位, 而不需容器组分的动作。

92. 权利要求 81 的方法, 包括通过将气压施加到容器和/或将真空施加到反应部位的支持物上来将第一和第二流体从容器施加到反应部位。