



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 10625548 A

(43)申请公布日 2016.12.21

(21)申请号 201580012717.0

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

(22)申请日 2015.03.11

72002

代理人 白丽 陈建全

(30)优先权数据

2014-048037 2014.03.11 JP

(51)Int.Cl.

B01J 13/04(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 1/02(2006.01)

2016.09.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2015/057113 2015.03.11

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/137380 JA 2015.09.17

(71)申请人 凸版印刷株式会社

地址 日本东京都

申请人 国立大学法人东京工业大学

(72)发明人 泷之上正浩 森田雅宗 山下仁义

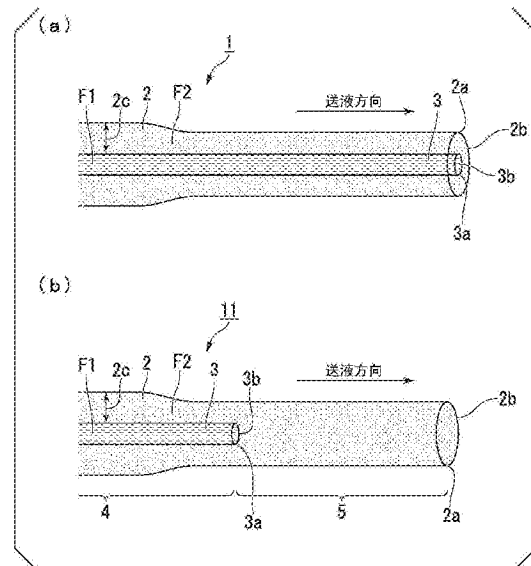
权利要求书2页 说明书11页 附图12页

(54)发明名称

液滴制造器件、液滴的制造方法、脂质体的制造方法、固定工具及液滴制造工具箱

(57)摘要

本发明的液滴制造器件(1)是具备外管(2)和配置在该外管(2)的内部、对液滴原料进行送液的内管(3)的液滴制造器件,其特征在于,内管喷吐口(3b)在流体的送液方向上形成于下游侧的内管前端部(3a)开口,外管喷吐口(2b)在同样在流体的送液方向上形成于下游侧的外管前端部(2a)开口,在所述外管(2)与内管(3)之间形成间隙(2c)。所述内管喷吐口(3b)优选设置在相比较于所述外管喷吐口(2b)、在流体的送液方向上更靠上游侧的外管内部。



1. 一种液滴制造器件,其具备外管和配置在该外管的内部、对液滴原料进行送液的内管,其特征在于,

内管喷吐口在流体的送液方向上形成于下游侧的内管前端部开口,外管喷吐口在同样在流体的送液方向上形成于下游侧的外管前端部开口,

在所述外管与所述内管之间形成间隙。

2. 根据权利要求1所述的液滴制造器件,其中,所述内管喷吐口设置于相比较于所述外管喷吐口、在流体的送液方向上更靠上游侧的外管内部。

3. 根据权利要求1或2所述的液滴制造器件,其中,所述外管前端部的内径 $b$ 是所述内管前端部的内径 $a$ 的2~30倍。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的液滴制造器件,其中,所述内管前端部的内径 $a$ 为 $0.1\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ 。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的液滴制造器件,其中,所述内管前端部的所述外管的内径 $c$ 是所述内管前端部的内径 $a$ 的2~100倍。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的液滴制造器件,其中,所述外管前端部的内径 $b$ 是 $1\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ 。

7. 根据权利要求2~6中任一项所述的液滴制造器件,其中,所述内管前端部与所述外管前端部的距离 $d$ 是所述内管前端部的内径 $a$ 的2~1000倍。

8. 一种液滴的制造方法,其为使用了权利要求1~7中任一项所述的液滴制造器件的液滴的制造方法,其中,

对处于在形成于所述外管与所述内管之间的间隙中导入有第2流体、在所述内管内部导入有第1流体的状态的液滴制造器件,同时地送液所述第1流体及所述第2流体,从而形成所述第2流体为外层、所述第1流体为内层的流体,形成液滴。

9. 根据权利要求8所述的液滴的制造方法,其中,所述送液使用离心力来进行。

10. 根据权利要求8或9所述的液滴的制造方法,其中,所述液滴通过瑞利-泰勒不稳定性形成。

11. 根据权利要求8~10中任一项所述的液滴的制造方法,其中,所述第1流体含有生物分子。

12. 一种脂质体的制造方法,其为使用权利要求8~11中任一项所述的液滴的制造方法的脂质体制造方法,其中,

与配置于溶液界面的双亲性分子相接触,使含有双亲性分子的膜多层地形成在所述液滴表面上。

13. 一种固定工具,其为用于将构成权利要求1~7中任一项所述的液滴制造器件的所述内管配置在所述外管内部的固定工具,

其具有用于固定所述外管的外管固定构件和用于固定所述内管的内管固定构件。

14. 根据权利要求13所述的固定工具,其中,

所述外管固定构件及所述内管固定构件是在中央部具有孔的板状构件,

所述外管固定构件及所述内管固定构件利用连接构件连接,

通过将所述外管及所述内管分别嵌入到所述外管固定构件所具有的所述孔及所述内管固定构件所具有的所述孔中,将所述内管配置在所述外管内部。

15. 根据权利要求14所述的固定工具,其中,所述连接构件是将所述外管固定构件与所述内管固定构件旋转自由地连接的螺丝。

16. 一种液滴制造工具箱,其为具备外管和内管的液滴制造工具箱,其中,通过将所述内管配置在所述外管内部,形成权利要求1~7中任一项所述的液滴制造器件。

17. 根据权利要求16所述的液滴制造工具箱,其进一步具备权利要求13~15中任一项所述的固定工具。

## 液滴制造器件、液滴的制造方法、脂质体的制造方法、固定工具及液滴制造工具箱

### 技术领域

[0001] 本发明涉及能够由少量的液滴原料制造单分散性优异的液滴的液滴制造器件、使用了该液滴制造器件的液滴制造方法、脂质体的制造方法、液滴制造器件的固定中使用的固定工具及液滴制造工具箱。本申请基于在2014年3月11日于日本申请的特愿2014-048037号主张优先权,在此援引其内容。

### 背景技术

[0002] 一直以来,在微小的液滴的制造中,使用利用光刻技术在基板上制作的微流路。实施如下方法:将液滴原料的溶液流入到该流路内,控制送液用的泵的动作,将液滴原料制成液滴。例如,在非专利文献1的图3所示的装置中,在液滴原料流过的流路的末端处,具备与该流路不同的其他流路呈直角地交叉于该流路的十字状流路形状。当液滴原料的溶液到达流路的末端时,利用泵控制将不与液滴原料的溶液混合的其他液体从垂直的流路向液滴原料的液流间歇地挤出,由此从液滴原料的液流中切取1个液滴量的液量来制造液滴。

[0003] 但是,在制作微流路时,需要备齐用于进行光刻的专用装置、专用的操作环境等的设备,为了制作液滴,难以重新地备齐这样的设备。另外,在想要在多个条件下制作液滴时,需要制作多个微流路,但微流路的制作具有高成本的问题。

[0004] 通常,向流路的送液使用注射泵。但是,使用注射泵时,由于需要将液滴原料的溶液填充到注射器内或注射器与流路的连接部中,因此需要准备比所制造的液滴量的液滴原料更多的液滴原料。当预成为液滴原料的样品稀少时,强烈要求减少这种原料的损失。

[0005] 另外,当想要制造单分散性优异的高品质的液滴时,必须准确地进行注射泵的动作,其调整是繁琐的。进而,由于要求准确的送液,因此还具有液滴的生产速度降低的缺点。

[0006] 现有技术文献

[0007] 非专利文献

[0008] 非专利文献1:Charles N.Baroud,Francois Gallaire and Remi Dangla《Dynamics of microfluidic droplets》Lab on a Chip,2010,10,p2032-2045

### 发明内容

[0009] 发明要解决的技术问题

[0010] 本发明鉴于上述事实而完成,其课题在于提供能够由少量的液滴原料制造、单分散性优异且液滴的生产率高的液滴制造器件。

[0011] 用于解决课题的方法

[0012] 本发明人们为了解决上述课题进行了深入研究,结果发现通过具有下述特征的液滴制造器件可解决上述课题,从而完成了本发明。

[0013] 即,本发明提供具有下述特征的液滴制造器件、液滴的制造方法、固定工具及液滴制造工具箱。

[0014] (1)一种液滴制造器件,其具备外管和配置在该外管的内部的对液滴原料进行送液的内管,其特征在于,

[0015] 内管喷吐口在流体的送液方向上形成于下游侧的内管前端部开口,外管喷吐口在同样在流体的送液方向上形成于下游侧的外管前端部开口,在所述外管与所述内管之间形成间隙。

[0016] (2)上述(1)所述的液滴制造器件,其中,所述内管喷吐口设置于相比较于所述外管喷吐口、在流体的送液方向上更靠上游侧的外管内部。

[0017] (3)上述(1)或(2)所述的液滴制造器件,其中,所述外管前端部的内径b是所述内管前端部的内径a的2~30倍。

[0018] (4)上述(1)~(3)中任一项所述的液滴制造器件,其中,所述内管前端部的内径a为 $0.1\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ 。

[0019] (5)上述(1)~(4)中任一项所述的液滴制造器件,其中,所述内管前端部处的所述外管的内径c是所述内管前端部的内径a的2~100倍。

[0020] (6)上述(1)~(5)中任一项所述的液滴制造器件,其中,所述外管前端部的内径b是 $1\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ 。

[0021] (7)上述(2)~(6)中任一项所述的液滴制造器件,其中,所述内管前端部与所述外管前端部的距离d是所述内管前端部的内径a的2~1000倍。

[0022] (8)一种液滴的制造方法,其为使用了上述(1)~(7)中任一项所述的液滴制造器件的液滴制造方法,其中,

[0023] 对处于在形成于所述外管与所述内管之间的间隙中导入有第2流体、在所述内管内部导入有第1流体的状态的液滴制造器件,同时地送液所述第1流体及所述第2流体,从而形成所述第2流体为外层、所述第1流体为内层的流体,形成液滴。

[0024] (9)上述(8)所述的液滴的制造方法,其中,所述送液使用离心力来进行。

[0025] (10)上述(8)或(9)所述的液滴的制造方法,其中,所述液滴通过瑞利-泰勒不稳定性形成。

[0026] (11)上述(8)~(10)中任一项所述的液滴的制造方法,其中,所述第1流体含有生物分子。

[0027] (12)一种脂质体的制造方法,其为使用上述(8)~(11)中任一项所述的液滴的制造方法的脂质体制造方法,其中,与配置于溶液界面的双亲性分子相接触,使含有双亲性分子的膜多层地形成在所述液滴表面上。

[0028] (13)一种固定工具,其为用于将构成上述(1)~(7)任一项所述的液滴制造器件的所述内管配置在所述外管内部的固定工具,其具有用于固定所述外管的外管固定构件和用于固定所述内管的内管固定构件。

[0029] (14)上述(13)所述的固定工具,其中,所述外管固定构件及所述内管固定构件是在中央部具有孔的板状构件,所述外管固定构件及所述内管固定构件利用连接构件连接,通过将所述外管及所述内管分别嵌入到所述外管固定构件所具有的所述孔及内管固定构件所具有的所述孔中,将所述内管配置在所述外管内部。

[0030] (15)上述(13)或(14)所述的固定工具,其中,所述连接构件是将所述外管固定构件与所述内管固定构件旋转自由地连接的螺丝。

[0031] (16)一种液滴制造工具箱,其为具备外管和内管的液滴制造工具箱,其中,通过将内管配置在该外管内部,形成上述(1)~(7)中任一项所述的液滴制造器件。

[0032] (17)上述(16)所述的液滴制造工具箱,其进一步具备上述(13)~(15)中任一项所述的固定工具。

[0033] 发明效果

[0034] 根据本发明的液滴制造器件,可以由少量的液滴原料以高生产率制造单分散性优异的液滴。

## 附图说明

[0035] 图1(a)~(b)是表示本发明的液滴制造器件的实施方式之一例的立体图。

[0036] 图2(a)~(c)是使用本发明的液滴制造器件制造液滴的样子的图。

[0037] 图3是用于说明本发明的液滴制造器件的优选形状的立体图。

[0038] 图4是表示使用本发明的液滴制造器件制造人工细胞膜囊泡(脂质体)的样子的图。

[0039] 图5是表示本发明的固定工具的实施方式之一例的立体图。

[0040] 图6(a)~(c)是表示在本发明的固定工具的一例中将外管及内管配置成同心圆状的样子的正视图。

[0041] 图7(a)是表示将本发明的固定工具及液滴制造器件收纳在液滴回收用管中的样子的示意图;(b)是表示将本发明的固定工具及液滴制造器件收纳在液滴回收用管中的样子的照片。

[0042] 图8是表示实施例1中制造的油包水滴的样子的照片。

[0043] 图9(a)是表示实施例1中制造的油包水滴的样子的照片;(b)是表示实施例2中制造的油包水滴的样子的照片;(c)是表示实施例3中制造的油包水滴的样子的照片;(d)是表示实施例1~3中制造的水滴的尺寸分布的曲线图。

[0044] 图10是表示实施例1~3中制造的水滴的平均值与内管前端部内径的关系的曲线图。

[0045] 图11是表示实施例1~9中制造的水滴的单分散性评价的曲线图。

[0046] 图12是表示实施例10中在液滴内制造绿色荧光蛋白的样子的照片。

[0047] 图13是表示实施例11中制造的脂质体的样子的照片。

## 具体实施方式

[0048] 《液滴制造器件》

[0049] 本发明的液滴制造器件是具有外管和配置在该外管的内部、对液滴原料进行送液的内管的液滴制造器件,其中,内管喷吐口在流体的送液方向上形成于下游侧的内管前端部开口,外管喷吐口在同样在流体的送液方向上形成于下游侧的外管前端部开口,在所述外管与内管之间形成间隙。在间隙中,对不与液滴原料混合或者难以与液滴原料混合的流体进行送液。

[0050] 外管及内管的流路的截面形状并无特别限定,可以是圆形、椭圆形、多边形等。内管的形状优选是按照能够在内管周围没有间断地形成间隙的方式制成没有与外管内壁相

接触的部分的形状。

[0051] 另外,对于优选的流路内径的值在后叙述,但当流路的截面形状不是正圆时,流路的截面积可以作为大致相同的正圆进行换算来设为优选的内径的值。

[0052] <第一实施方式>

[0053] 本实施方式的液滴制造器件是具有配置成同心圆状的外管及内管的液滴制造器件,其中,内管喷吐口在流体的送液方向上形成于下游侧的内管前端部开口,外管喷吐口在同样在流体的送液方向上形成于下游侧的外管前端部开口,在所述外管与所述内管之间形成间隙。

[0054] 以下参照附图说明本发明的液滴制造器件的实施方式之一例。

[0055] 图1(a)是本发明的液滴制造器件的实施方式之一例。本实施方式的液滴制造器件1具有配置成同心圆状的外管2及内管3。外管及内管的流路的截面形状是正圆。如图1所示,内管3配置在外管2的内部,在外管2与内管3之间形成有间隙2c。更详细地说是在外管2的内壁与内管3的外壁之间形成有间隙2c。

[0056] 在内管3的内部填充有流体F1。在间隙2c中填充有流体F2。此外,流体F1及流体F2并非是本实施方式的液滴制造器件的构成要素。

[0057] 将上述流体F1及流体F2在外管2及内管3的轴方向上送液。外管2及内管3中的流体F1及流体F2的送液方向相互间相同。当将本实施方式的液滴制造器件1中的流体的送液方向设为图1中箭头所示的方向时,内管喷吐口3b在内管前端部3a开口,外管喷吐口2b在外管前端部2a开口。

[0058] <第二实施方式>

[0059] 本实施方式的液滴制造器件11是将上述第一实施方式的液滴制造器件的内管喷吐口设置于比上述外管喷吐口在流体的送液方向上更靠上游侧的外管内部。对于与第一实施方式的液滴制造器件共同的方面,将说明省略。

[0060] 如图1(b)所示,内管喷吐口3b设置在相比较于外管喷吐口2b更靠该送液方向的上游侧的外管2内部。如此,本实施方式的液滴制造器件11在较内管前端部3a更靠送液方向的上游侧处具有由外管2和内管3构成的复合管部4,在较内管前端部3a更靠送液方向的下游侧处具有由外管2构成的单管部5。

[0061] 图2示意地示出使用液滴制造器件11制造液滴的样子。液滴制造器件11处于分别将流体F2导入至复合管部4中形成于外管2与内管3之间的间隙2c、将流体F1导入至内管3内部的状态(图2(a))。流体F1为液滴原料。另外,在单管部中处于将流体F2导入至外管内部的状态。这里,沿图2(b)中的箭头所示的方向对流体F1及流体F2进行送液。如此,在维持同心圆状的外管2及内管3的位置关系的状态下对流体F1及流体F2进行送液,在单管部5中形成流体F2为外层、流体F1为内层的层流(图2(b))。进而,当流体F1及流体F2的送液进行时,作为内层的流体F1的流动变得不连续、由流体F1的液流前端(下游侧)形成流体F1的液滴。

[0062] 流体F1的流动变得不连续的原因认为是单管部5中流体F1及流体F2之间的流动因瑞利-泰勒不稳定性而变得不稳定。

[0063] 液滴制造器件1中,由于具有外管2及内管3、在外管2与内管3之间形成有间隙,因此将少量的液滴原料的溶液(流体F1)配置在内管3内部、将不与液滴原料混合或者难以与液滴原料混合的溶液(流体F2)配置在间隙2c中,通过仅进行送液,即可极为容易地由少量

的液滴原料制造流体F1的液滴。进而,所制造的液滴是单分散性优异的高品质者。

[0064] 液滴制造器件11中,通过形成被外管2包围的单管部5,效率良好地形成流体F2为外层、流体F1为内层的层流,因此可以更有效率地制造单分散性优异的液滴。对于制造流体F1的液滴所需的流体F1的量仅为导入内管3的量,根据本实施方式的液滴制造器件1,可以由少量的液滴原料制造液滴。另外,可以在不需要复杂的送液控制的情况下、在短时间内制造大量液滴。

[0065] <液滴制造器件的优选形状>

[0066] 接着,从能够更容易地制造单分散性优异的液滴的观点出发,参照图3说明本发明的液滴制造器件的优选形状。

[0067] 构成液滴制造器件11的内管3的内管前端部3a的内径a优选为 $0.1\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ 、更优选为 $1\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ 、进一步优选为 $5\mu\text{m}\sim 30\mu\text{m}$ 。根据内管前端部3a的内径a为上述范围的液滴制造器件11,由于所制造的液滴遵从微流体力学的法则,因此能够更容易地制造单分散性优异的液滴。另外,所制造的液滴的直径与内径a易于显示正相关,可以更容易地进行所制造的液滴的尺寸控制。

[0068] 内管前端部3a的内径a与外管前端部2a的内径b之比只要是可形成流体F2为外层、流体F1为内层的层流,则无特别限定,但从更容易地制造单分散性优异的液滴的观点出发,内径a与内径b之比优选内径b为内径a的 $2\sim 30$ 倍、更优选为 $3\sim 20$ 倍、进一步优选为 $4\sim 18$ 倍、更进一步优选为 $4.5\sim 15$ 倍、特别优选为 $5\sim 10$ 倍。

[0069] 为了制造单分散性优异的液滴,优选在单管部5中形成流体F2为外层、流体F1为内层的层流。该层流的形状也可通过内径c与内径a之比来决定。内径c与内径a之比只要是可形成层流则无特别限定,但作为优选的内径c与内径a之比,优选内管前端部3a的外管内径c是内管前端部3a的内径a的 $2\sim 100$ 倍左右、更优选为 $3\sim 50$ 倍左右、进一步优选为 $5\sim 10$ 倍左右。内径c与内径a之比为上述范围时,更易获得单分散性优异的液滴。

[0070] 另外,如上述液滴制造器件1那样内管前端部3a与外管前端部2a一致时,由于内径c和内径b是指相同部分,因此内径a与内径c之比和上述内径a与内径b之比相同。

[0071] 外管前端部2a的内径b优选为 $1\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ 、更优选为 $10\mu\text{m}\sim 400\mu\text{m}$ 、进一步优选为 $40\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ 、特别优选为 $40\mu\text{m}\sim 60\mu\text{m}$ 。当内径b为 $1000\mu\text{m}$ 以下时,所制造的液滴的直径与内径a易于显示正相关。特别是当内径b为 $60\mu\text{m}$ 以下时,自外管前端部2a喷吐的流体难以膨胀成水滴状,因此所制造的液滴的直径与内径a更易于显示正相关。因而,液滴的尺寸控制更容易。

[0072] 液滴自流体F1的液流前端(下游侧)依次形成。液滴制造器件11由于具有单管部5,因此利用构成单管部5的外管2效率良好地对流体进行送液。如此,优选液滴在单管部5中形成。通常,对于形成液滴所需的距离是液滴内径的 $10$ 倍左右。因此,内管前端部3a与外管前端部2a的距离d优选是内管前端部的内径a的 $2\sim 1000$ 倍左右、更优选为 $5\sim 500$ 倍左右、进一步优选为 $7\sim 300$ 倍左右。

[0073] 本发明的液滴制造器件优选是通过利用离心力对液滴原料进行送液、从而可以制造液滴的离心用液滴制造器件。离心用液滴制造器件是具有适于使用离心分离机等、利用离心力制造液滴的结构,例如具有即便施加能够制造液滴的离心力也不会破损的程度的强度。



[0074] 另外,从易于利用使用了离心分离机的离心力进行送液的观点出发,液滴制造器件11的长度优选为0.1~30cm的范围、更优选为0.5~15cm的范围、进一步优选为1~5cm的范围。

[0075] 外管2及内管3的构成材料并无特别限定,例如可以使用树脂、金属、玻璃等材料。其中,作为外管2及内管3的构成材料优选使用玻璃。玻璃管通过对市售的玻璃管进行加热、拉伸而易于制作微细内径的管,只要在具有所希望直径的部分处将玻璃管切断,即可容易地获得具有所希望直径的外管2及内管3。

[0076] 《液滴的制造方法》

[0077] 本发明的液滴的制造方法是使用本发明的液滴制造器件的液滴制造方法,其中,在处于在形成于上述外管与上述内管之间的间隙中导入有第2流体、在上述内管内部导入有第1流体的状态的液滴制造器件中,同时地送液上述第1流体及上述第2流体,从而形成上述第2流体为外层、上述第1流体为内层的流体。

[0078] 作为一例,为使用上述《液滴制造器件》所示第二实施方式的液滴制造器件11的液滴制造方法。第1流体相当于流体F1、第2流体相当于流体F2。对于使用了液滴制造器件11的液滴制造方法,由于与上述《液滴制造器件》的说明中参照图2所说明的重复,因此将说明省略。另外,当使用液滴制造器件11时,由于在上述内管前端部与上述外管前端部之间形成上述第2流体为外层、上述第1流体为内层的流体,因此送液变得有效率、可以更有效率地制造单分散性优异的液滴。

[0079] 根据使用了本发明液滴制造器件的液滴制造方法,对于制造单分散性优异的液滴所需的送液操作仅至少1个方向且1次即充分,不需要复杂的送液控制,可以实现高的液滴生产率。

[0080] 进行该送液的手段并无特别限定,可以利用使用泵等的常规方法来进行,但优选使用离心力来进行。使用了离心力的送液可以使用离心分离机等进行。作为离心分离机优选台式小型离心机。本发明的液滴制造方法从使用台式小型离心机可以简单地进行送液的方面出发也优选。以往使用了微流路的液滴制造方法中进行利用注射泵实施的送液时,需要将液滴原料的溶液填充到注射器内或者注射器与流路的连接部中。因此,需要在注射器内或注射器与流路的连接部中变成死容积的多余量的液滴原料,例如为了制造1万个直径10 $\mu$ m的液滴,通常需要数mL的液滴原料的溶液。与其相对,使用本发明的液滴制造器件利用离心力进行送液时,不需要准备多余量的液滴原料,仅将对于制造流体F1的液滴所需的液滴原料的量导入到内管3,因此例如可以由0.1 $\mu$ L的液滴原料制造1万个直径10 $\mu$ m的液滴。另外,在利用离心分离机进行的送液中,不需要复杂的送液控制,因而与使用泵的送液相比,可以极为容易地进行送液操作。

[0081] 第1流体和第2流体的组合(上述《液滴制造器件》的动作说明中流体F1和流体F2的组合)只要是作为二液相分离体系的组合或者二液难以混合的组合,则无特别限定。例如,作为流体F1和流体F2的优选组合,可举出油和水的组合。可以是流体F1为水、流体F2为油的组合(油包水滴),也可以是相反的流体F1为油、流体F2为水的组合(水包油滴)。作为油,可举出矿物油、橄榄油等植物油,硅油、癸烷等。作为上述水,可以是水溶液的状态,可举出缓冲液、细胞抽提液等生物试样来源的溶液等。

[0082] 液滴的界面还可以通过双亲性分子来进行区分。通过用双亲性分子将界面区分,

减少液滴之间发生融合的危险。作为双亲性分子,可举出表面活性剂、脂质等。作为表面活性剂,可例示出Span80、Tween80、Tween20、TritonX-100、十二烷基硫酸钠(SDS)等。作为脂质,可例示出二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、胆固醇、鞘磷脂、鞘糖脂神经节苷脂等。

[0083] 各液滴一个个可作为所谓的微小试管进行使用。通过在液滴内含有反应物,可以在各液滴内独立地引起多个化学反应。通过本发明的液滴制造方法制造的液滴由于单分散性优异,因此测定结果可作为均质的多样品的测定结果进行利用。这在获得反应结果的平均值时等是有用的。另外,由于还可以在每个液滴中含有不同的反应条件或样品等,因此可以一次性地进行多检体的筛选,或者可以一次性地试验各种条件。作为可以在液滴内实施的反应之一例,可举出化学合成、基因解析、PCR、蛋白质结晶化、酶活性测定等。

[0084] <人工细胞膜囊泡(脂质体)的制造方法>

[0085] 根据本发明的液滴制造方法,例如可以大量地制造直径为 $0.1\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ 左右的微小液滴。该直径为 $0.1\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ 的液滴尺寸由于包含作为一般的细胞尺寸的直径 $5\mu\text{m}\sim 30\mu\text{m}$ 左右,因此可以制造模拟细胞的结构的人工细胞膜囊泡(脂质体)。另外,本发明中,脂质体包含在液滴中。

[0086] 以下,图4示意地示出制造使用了液滴制造器件11的人工细胞膜囊泡(脂质体)的样子的一例。图4示出了利用液滴制造器件11制造液滴的过程。将水或缓冲液作为流体F1导入至内管3中。将矿物油作为流体F2导入至间隙2c中。流体F2中作为双亲性分子含有二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)。按照液滴制造器件11的外管前端部2a没入到与流体F2同样的矿物油中的方式进行配置。进而,这次在送液方向的下流侧配置水或缓冲液。在水或缓冲液与矿物油的界面处作为双亲性分子配置有DOPC。

[0087] 首先,将利用液滴制造器件11制造的液滴从外管前端部2a释放到矿物油内。此时所释放的液滴具有脂质的单分子层。在此状态下,该液滴在送液方向上直行,与配置于矿物油与水或缓冲液的界面上的DOPC相接触,一边被DOPC包裹、一边到达水或缓冲液内。此时,液滴具有脂质双分子层。如此,可获得与细胞同样具有脂质双分子层的人工细胞膜囊泡(脂质体)。

[0088] 进而,通过在流体F1内预先含有蛋白质、DNA、RNA等生物分子及/或生物物质,可以制成在功能上也类似于细胞的人工细胞。使用这些生物分子,可以在液滴内部发生在细胞内及细胞外通常发生的各种代谢反应。

[0089] 另外,通过使混合在流体F2内的脂质和混合在下游侧的矿物油内的脂质为不同种类,可以使脂质双分子层的外层和内层变得不对称。

[0090] 《固定工具》

[0091] 本发明的固定工具是用于将构成本发明液滴制造器件的上述内管配置在上述外管内部的固定工具,其具有用于固定上述外管的外管固定构件和用于固定上述内管的内管固定构件。

[0092] 图5是本发明的固定工具6的实施方式之一例。

[0093] 外管固定构件7及内管固定构件8是中央部具有孔的板状构件,外管固定构件7及内管固定构件8通过连接构件9连接。连接构件9是将外管固定构件7和内管固定构件8自由旋转地连接的螺丝。进而,在固定工具6中,为了支撑外管及内管、更有效果地保持同心圆状

的配置,具备在中央部有孔的板状构件即支撑体10、10'。

[0094] 图6表示使用固定工具6将外管2和内管3配置成同心圆状的步骤的一例。图6(a)所示的固定工具6中,将外管固定构件7、支撑体10、内管固定构件8及支撑体10'所具有的孔配置成同心圆状列。

[0095] 首先,旋转内管固定构件8及支撑体10',使外管固定构件7及支撑体10所具有的各孔的中心与内管固定构件8及支撑体10'所具有的各孔的中心错开,将外管2插入到外管固定构件7及支撑体10所具有的各孔中(图6(b))。这里,由于外管2在流体的送液方向上越靠近上游侧外径变得越大,因此通过通至设置于外管固定构件7的孔7a,外管2被嵌入且外管2被固定。

[0096] 接着,旋转内管固定构件8及支撑体10',使外管固定构件7及支撑体10所具有的各孔的中心与内管固定构件8及支撑体10'所具有的各孔的中心一致,将内管3插入到内管固定构件8及支撑体10'所具有的各孔中(图6(c))。这里,由于内管3在流体的送液方向也是越靠近上游侧外径变得越大,因此通过将内管3通至设置于内管固定构件8的孔8a中,内管3被嵌入且内管3被固定。如此,可以将外管2及内管3配置成同心圆状。

[0097] 固定工具6中,利用作为螺丝的连接构件9将外管固定构件7、支撑体10、内管固定构件8及支撑体10'连接。因此,可以旋转各构件来调节构件之间的距离。假设在外管固定构件7与内管固定构件8的距离变得过大、因而未将外管2和内管3配置成同心圆状时,可以减小外管固定构件7与内管固定构件8的距离,按照内管3在外管2内配置成同心圆状的方式进行调节。

[0098] 然而,利用液滴制造器件制造的液滴还可以储存在配置于液滴原料的送液方向下游侧的容器内。固定工具6除了用于将上述内管配置在上述外管内部之外,还可以用于将上述内管及上述外管安装在上述容器内。例如,将固定工具6的一部分或全部插入到容器内,使外管固定构件7、内管固定构件8、支撑体10、支撑体10'等固定工具6的构成构件的表面与容器内壁面相抵接,可以将上述内管及上述外管安装在上述容器内(也参照后述的图7)。

[0099] 《液滴制造工具箱》

[0100] 本发明的液滴制造工具箱具备外管和内管,通过将内管配置在外管内部,形成本发明的液滴制造器件。作为液滴制造器件,以上述液滴制造器件1及液滴制造器件11为代表。

[0101] 另外,本发明的液滴制造工具箱还可以进一步具备本发明的固定工具、液滴原料、双亲性分子等试剂类、用于储存所制造的液滴的容器等。作为固定工具,以上述固定工具6为代表。

[0102] 本发明的液滴制造工具箱中,为了能够制造多种尺寸的液滴,构成液滴制造器件的内管3还可以具备内管前端部3a的内径分别不同的多种内管3。根据具备内管前端部3a的内径不同的内管3的液滴制造工具箱,仅更换内管3即可简单地制造多个尺寸的液滴。

[0103] 接着,示出实施例更详细地说明本发明,但本发明并非限定于以下的实施例。

[0104] 实施例

[0105] <实施例1>

[0106] [制作使用固定工具固定有内管及外管的液滴制造器件]

[0107] (内管、外管)

[0108] 使用拉出器(制造商:Narishige、型号:PC-10)拉伸市售的玻璃管(制造商:Narishige、型号:G-1,制造商:World Precision Instruments、型号:1B200-6),制作具有以下形状的外管2及内管3。

[0109] 内管前端部3a的内径a:10 $\mu$ m

[0110] 外管前端部2a的内径b:60 $\mu$ m

[0111] (固定工具)

[0112] 对聚缩醛树脂进行加工,以直径为0.9cm、厚度为0.2cm制作4张在中心部设有直径为0.2cm的孔的板,分别作为外管固定构件7、支撑体10、内管固定构件8及支撑体10'。进而,将用于使2根螺丝(规格:M2 $\times$ 15)贯通的2处螺丝孔在各板的端部分别设置在相同位置上。按照图5及图6的顺序将第1根螺丝通入外管固定构件7、支撑体10、内管固定构件8及支撑体10'中。

[0113] (溶液的导入)

[0114] 在外管2内部密封9 $\mu$ L的含有2%(w/w)的Span80的十六烷。

[0115] 将内管前端部3a浸入到水中,通过毛细管现象将0.1 $\mu$ L的水吸入内管3内部。另外,在内管3内部可以密封10 $\mu$ L左右的水。

[0116] (内管及外管的固定)

[0117] 按照图6所示的步骤,使用固定工具6将外管2和内管3配置成同心圆状。由此变成在形成于外管2与内管3之间的间隙2c中导入有含有Span80的十六烷、在内管3内部导入有水的状态。内管前端部3a与上述外管前端部2a的距离d为2000 $\mu$ m、内管前端部3a处的外管的内径c为115 $\mu$ m。将第2根螺丝通入至外管固定构件7、支撑体10、内管固定构件8及支撑体10'中,将它们固定。

[0118] [液滴回收的准备]

[0119] 在市售的1.5mL管(制造商:日京Teknos株式会社、型号:MP-150HC)中注入100 $\mu$ L的十六烷,将固定有外管2及内管3的固定工具6收纳在管中(图7(a)、(b))。此时,外管前端部浸入在储存在管底的十六烷的溶液中。

[0120] [液滴的制造]

[0121] 将管安装在台式小型离心机(制造商:株式会社HITEC、型号:ATT-101),利用1200G(所使用的台式小型离心机的最大输出功率)的离心力离心3秒,同时送液十六烷和水,利用瑞利-泰勒不稳定性制造水滴。所制造的水滴被释放到储存在管底的十六烷中。

[0122] [液滴的确认]

[0123] 将实施例1中制造的水滴的图像示于图8及图9(a)中。利用3秒的送液操作制造了约5万个液滴。

[0124] <实施例2>

[0125] 在实施例1的液滴制造器件的制作中,除了使内管前端部3a的内径a为5 $\mu$ m之外,与实施例1同样地制作液滴制造器件并制造了液滴。

[0126] [液滴的确认]

[0127] 将实施例2中制造的水滴的图像示于图9(b)中。

[0128] <实施例3>

[0129] 在实施例1的液滴制造器件的制作中,除了使内管前端部3a的内径a为20 $\mu$ m之外,

与实施例1同样地制作液滴制造器件并制造了液滴。

[0130] [液滴的确认]

[0131] 将实施例3中制造的水滴的图像示于图9(c)中。

[0132] <实施例1~3中制造的水滴的比较>

[0133] 将对实施例1~3中制造的水滴的尺寸进行计测的结果示于图9(d)的曲线图中。由图9(d)的曲线图可知,在短时间内大量地制造了单分散性优异的液滴。

[0134] 关于内管前端部的内径(a)和油包水滴的直径尺寸(x),为以下的值。

[0135]  $a=5\mu\text{m}$ 、 $x=8.0\pm 3.0\mu\text{m}$

[0136]  $a=10\mu\text{m}$ 、 $x=13.0\pm 3.3\mu\text{m}$

[0137]  $a=20\mu\text{m}$ 、 $x=18.5\pm 4.2\mu\text{m}$

[0138] 将该值制成曲线的图示于图10中。可知内管前端部的内径与油包水滴的直径大致处于成比例关系。由此表明,通过仅改变内管前端部的内径(a)即可控制水滴的直径。

[0139] <对内管前端部的内径a与外管前端部的内径b之比的探讨>

[0140] 与实施例1~3同样地制造内径a分别为 $5\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 、 $20\mu\text{m}$ 的内管,并制造内径b分别为 $40\mu\text{m}$ 、 $60\mu\text{m}$ 、 $80\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m}$ 的外管。将这些外管和内管组合,制造具有以下形状的液滴制造器件。

[0141] 表1

[0142]

	内径(a) $\mu\text{m}$	内径(b) $\mu\text{m}$	内径(c) $\mu\text{m}$
实施例4	5	40	115
实施例2	5	60	115
实施例5	5	80	115
实施例1	10	60	115
实施例6	10	80	115
实施例7	10	100	115
实施例3	20	60	115
实施例8	20	80	115
实施例9	20	100	115

[0143] 接着,利用与实施例1所示相同的方法制造液滴,评价液滴的直径的单分散性。单分散性的评价以单分散性控制率=获得了单分散的结果的次数/总试验数来算出。若标准偏差为 $3\sim 4\mu\text{m}$ ,则设为“获得了单分散的结果”。总试验数在各实施例中均进行最低3次。

[0144] 将结果示于图11中。利用实施例1~9的液滴制造器件制造的液滴的单分散性控制率为60%以上,表明根据这些液滴制造器件可以制造单分散性优异的液滴。特别是利用实施例1、2、4~9的液滴制造器件制造的液滴的单分散性控制率为80%以上,表明根据这些液滴制造器件可制造单分散性极为优异的液滴。

[0145] <实施例10:荧光蛋白的合成>

[0146] 在使用液滴制造器件制造的液滴内进行蛋白质合成。首先,在内管内部导入含有蛋白质表达系统(绿色荧光蛋白(GFP)的模板DNA、氨基酸、蛋白质合成所需的各种因子)的缓冲液,制造液滴。所制造的液滴储存在1.5mL管中。

[0147] 接着,将该1.5mL管在37℃下进行孵育。由此,模板DNA的信息被转印,合成RNA,进而RNA的信息被翻译,合成蛋白质。将37℃孵育前和37℃孵育后的液滴的样子示于图12中。此次,由于所表达的蛋白质为GFP,因此仅在液滴内观察到绿色的荧光。表明在利用本发明的液滴制造器件制造的液滴内能够进行蛋白质的合成。

[0148] <实施例11:脂质体的制造>

[0149] 在上述实施例1所示的液滴制造器件及使用了该液滴制造器件的液滴的制造中,代替导入至间隙2c的含有Span80的十六烷而导入以终浓度5mM含有L- $\alpha$ -磷脂酰胆碱(Egg PC(100%))的矿物油,并且代替注入到1.5mL管中的十六烷而导入以终浓度5mM含有L- $\alpha$ -磷脂酰胆碱(Egg PC(100%))的矿物油和水,除此之外,与实施例1同样地制造脂质体。在上述1.5mL管内,将EggPC同样地配置在矿物油与水的界面上。

[0150] 将实施例11中制造的脂质体的图像示于图13中。根据本实施例,表明利用上述实施例1所示的液滴制造器件可以制造脂质体。

[0151] 关于内管前端部的内径(a)和脂质体的直径尺寸(x),为以下的值。

[0152]  $a=10\mu\text{m}$ 、 $x=10.0\pm 4.0\mu\text{m}$

[0153] 以上说明过的各实施方式各构成及它们的组合等只是一个例子,在不脱离本发明主旨的范围内可进行构成的附加、省略、置换及其他变更。另外,本发明并不受各实施方式的限定,仅受权利要求书的限定。

[0154] 产业上的可利用性

[0155] 本发明在化学相关领域、物理学相关领域、生物相关领域等中可广泛地进行利用,也可在化学合成、基因解析等中进行利用。另外,如实施例所示,本发明还可利用于液滴内的蛋白质合成或人工细胞膜囊泡(脂质体)的制造,因此特别在生物学相关领域、医学相关领域中优选利用。

[0156] 符号说明

[0157] 1,11液滴制造器件、2外管、2a外管前端部、2b外管喷吐口、2c间隙、3内管、3a内管前端部、3b内管喷吐口、4复合管部、5单管部、6固定工具、7外管固定构件、8内管固定构件、9连接构件、10,10'支撑体、F1,F2流体。

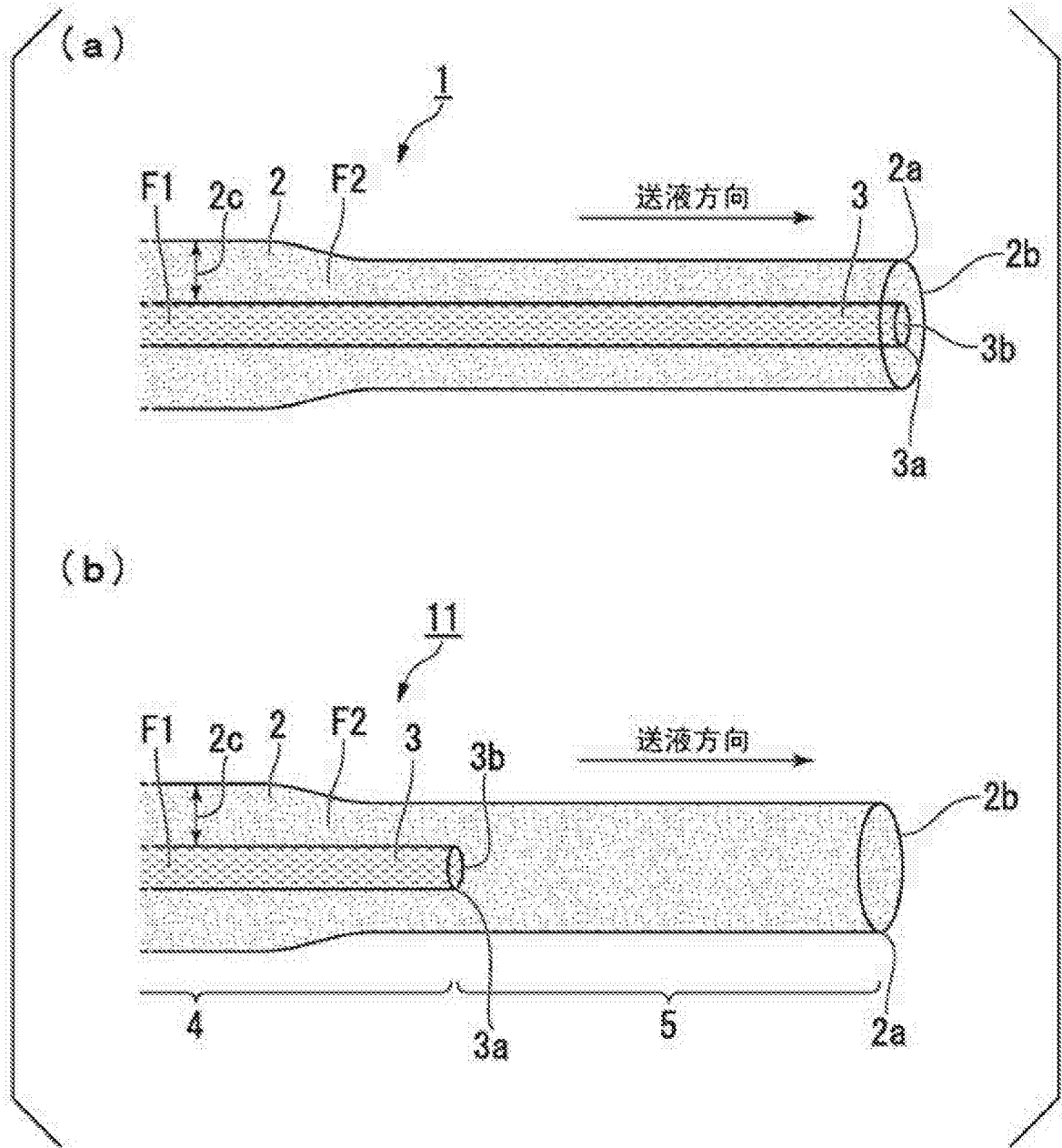


图1

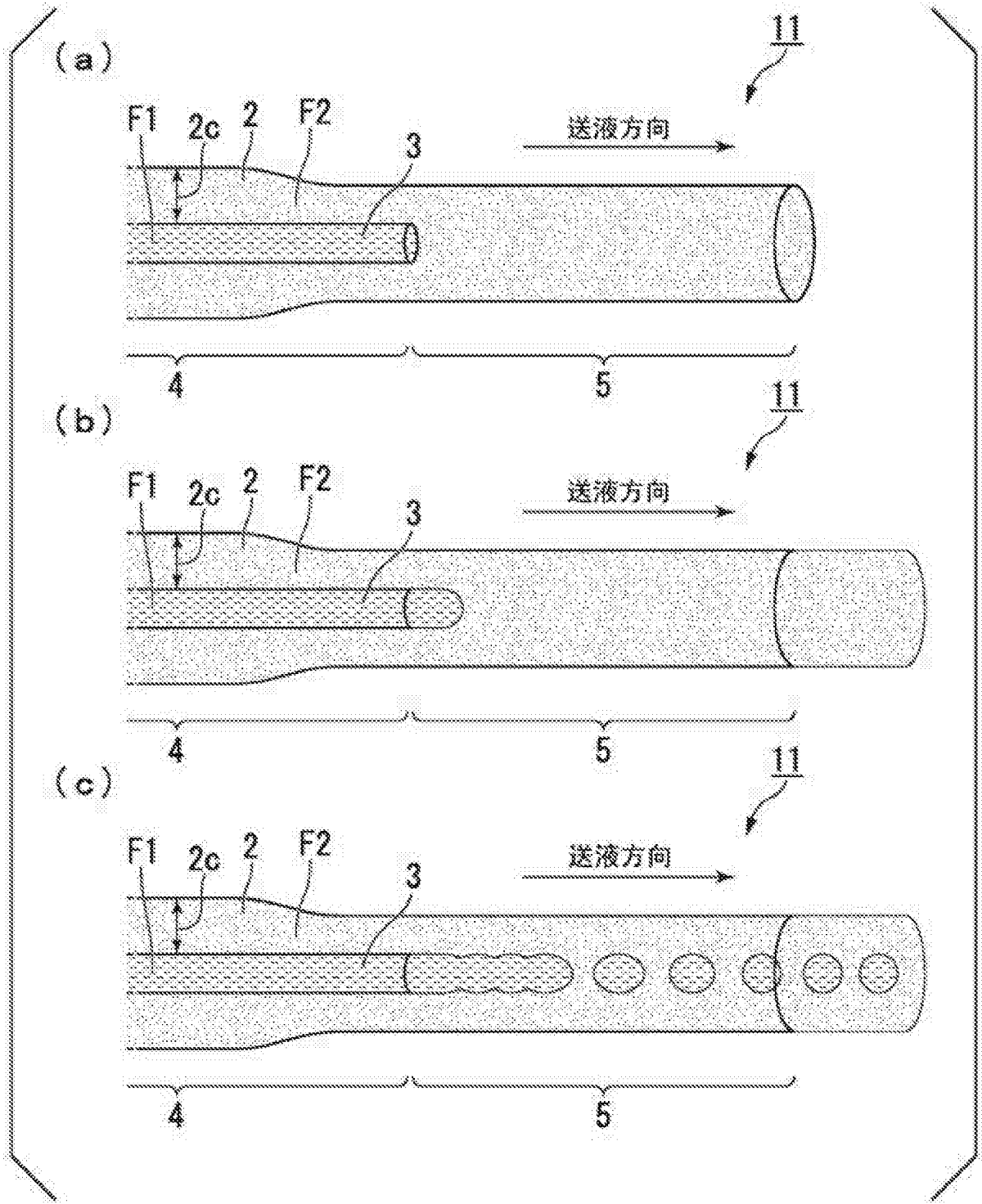


图2



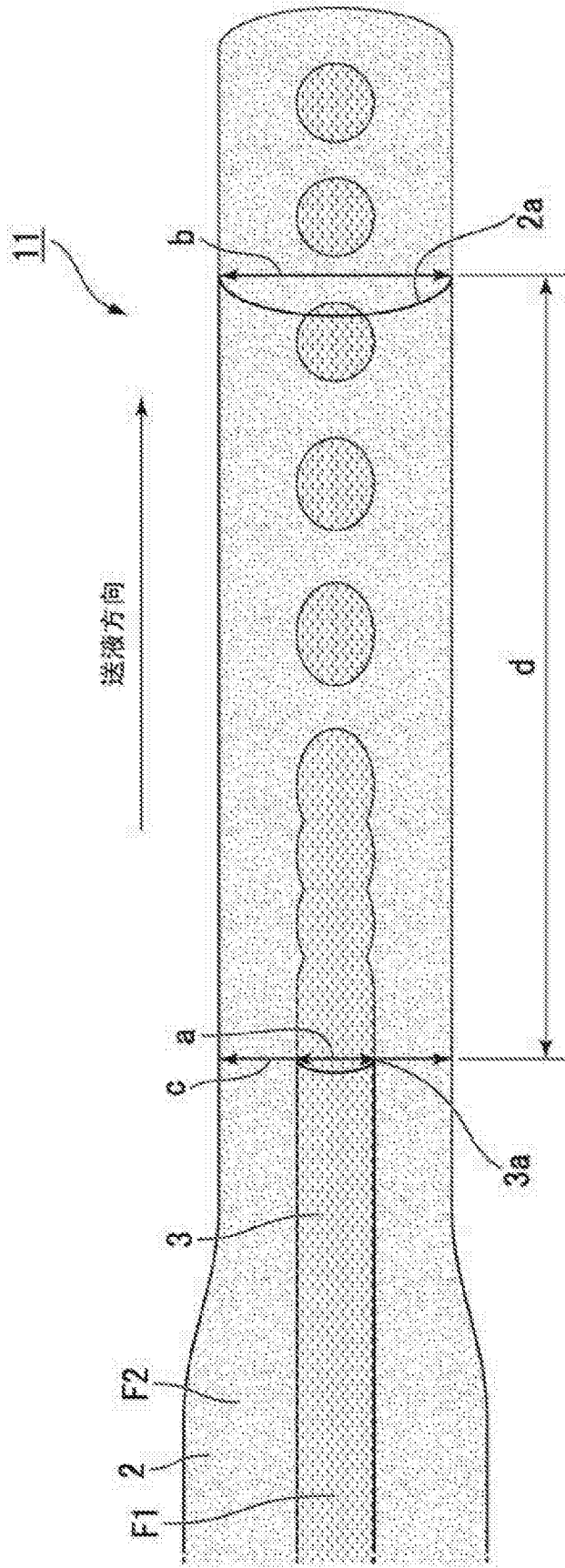


图3

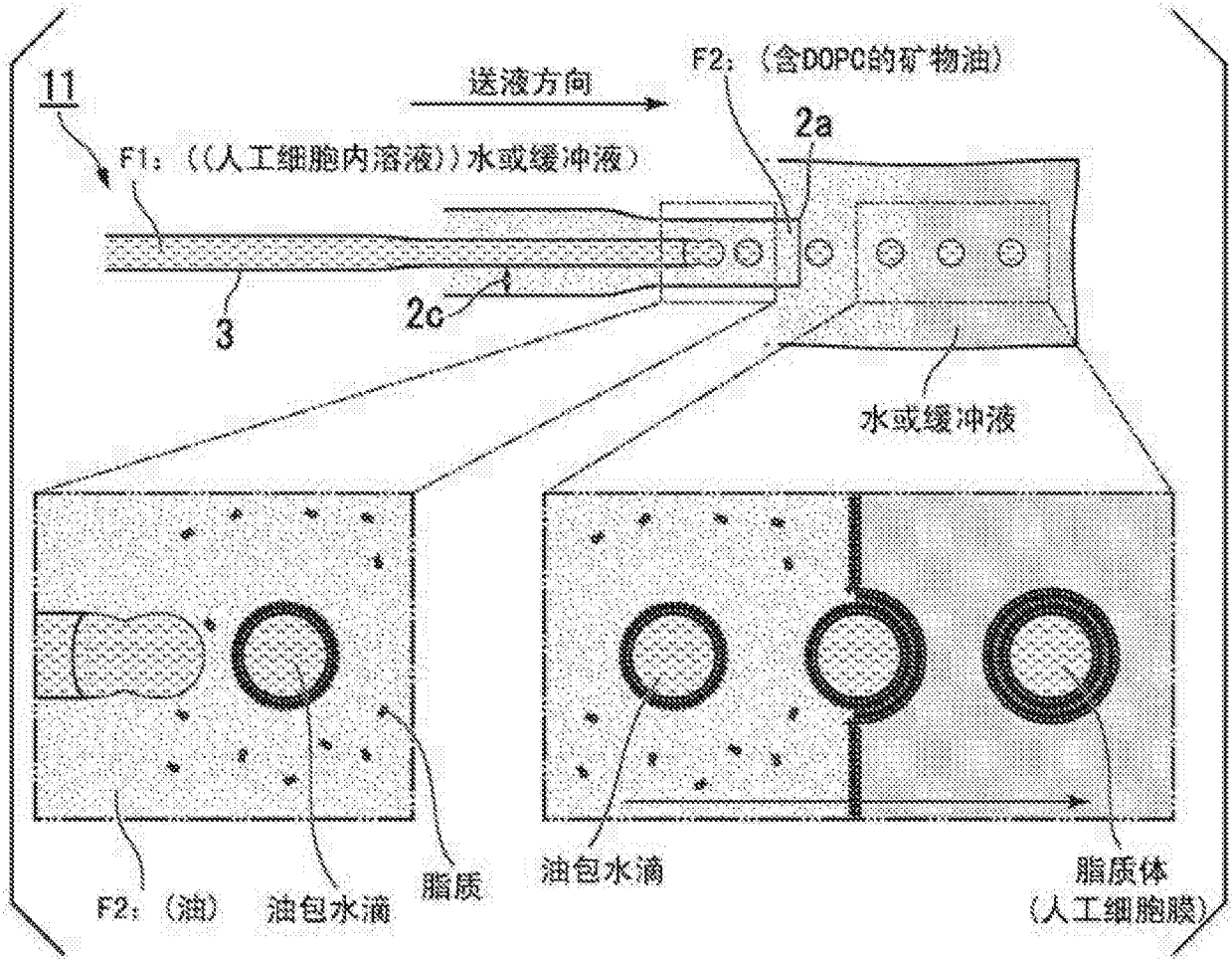


图4

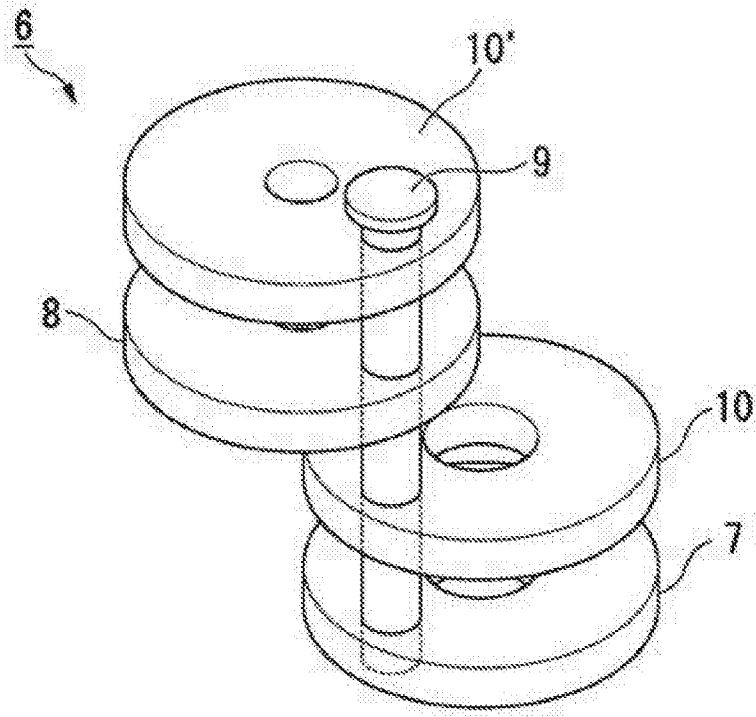


图5

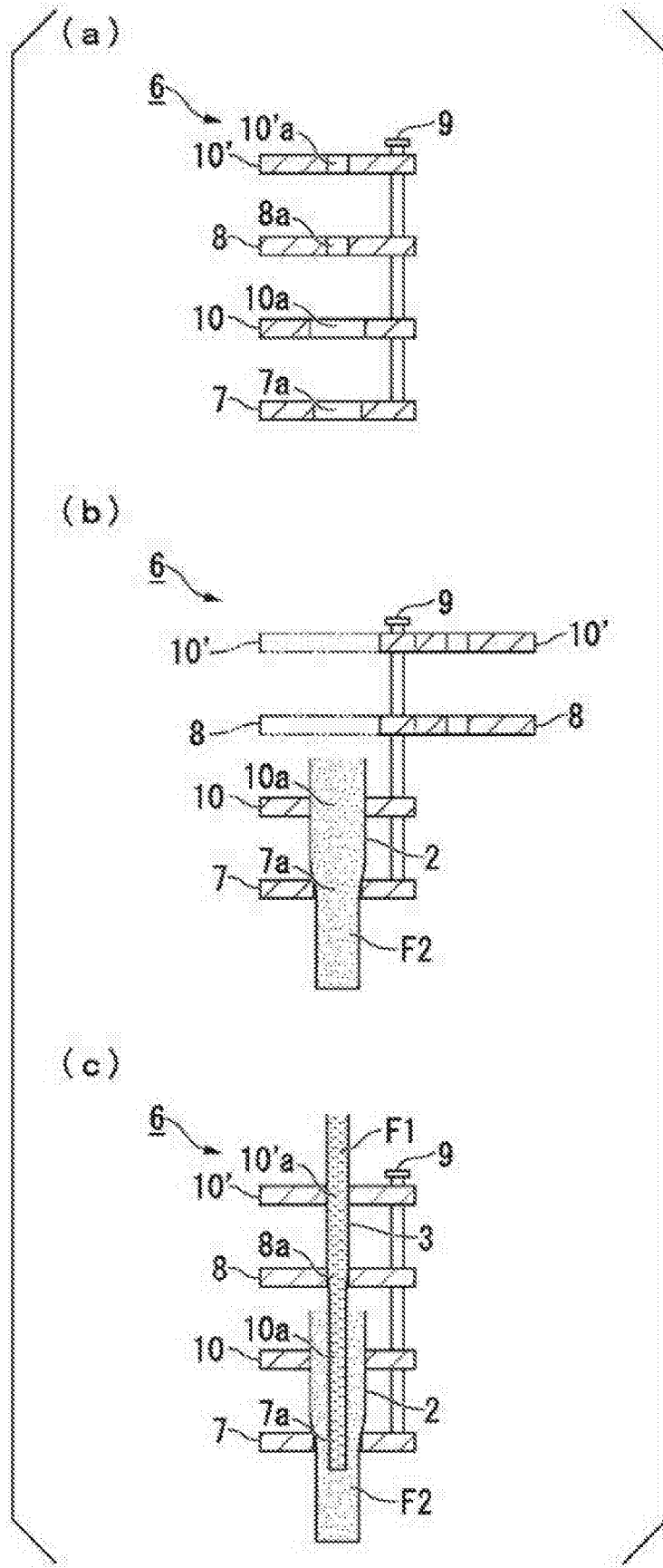


图6

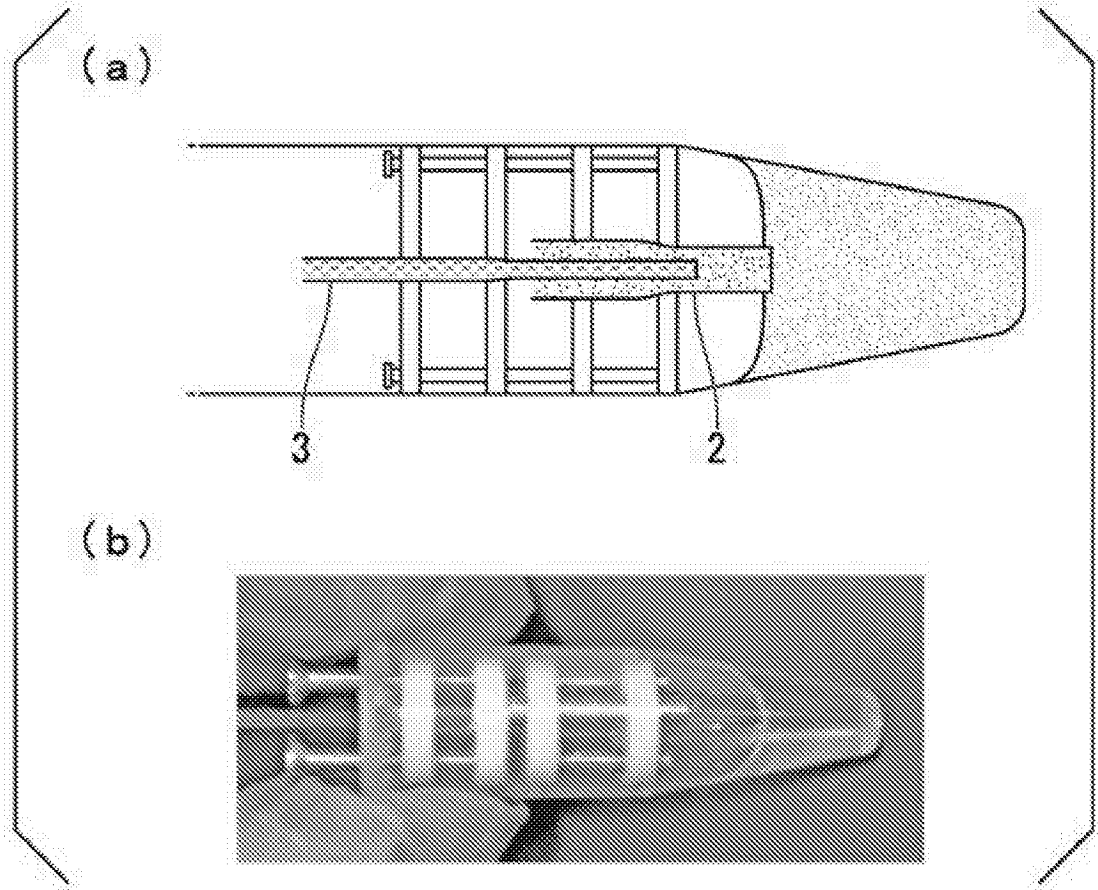


图7

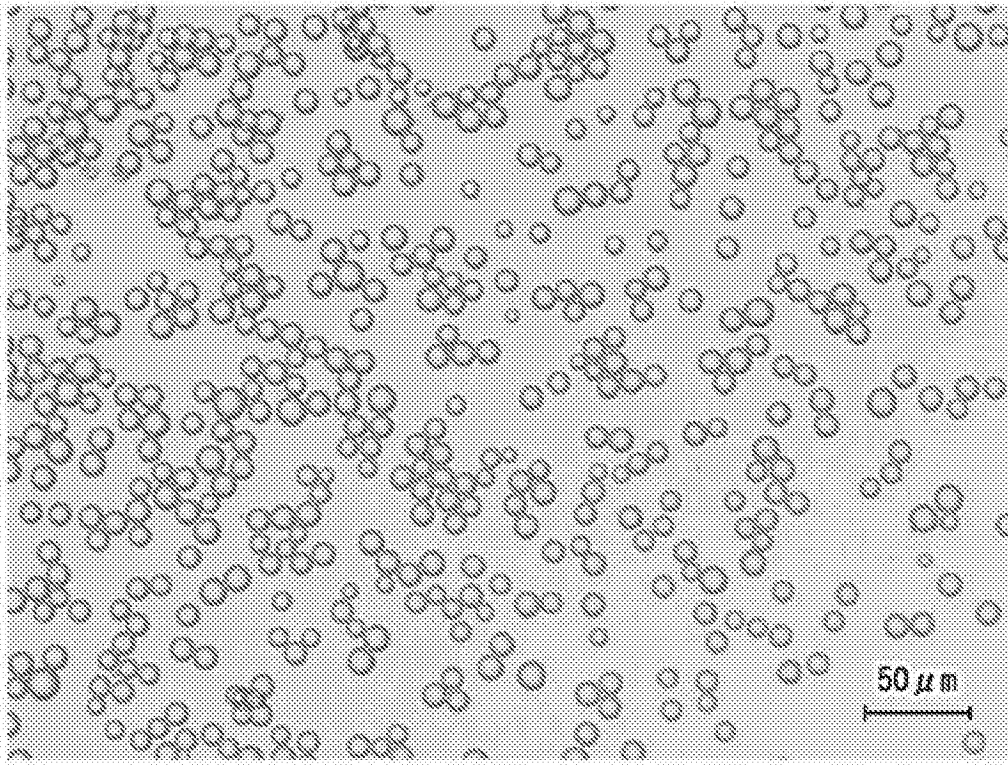


图8

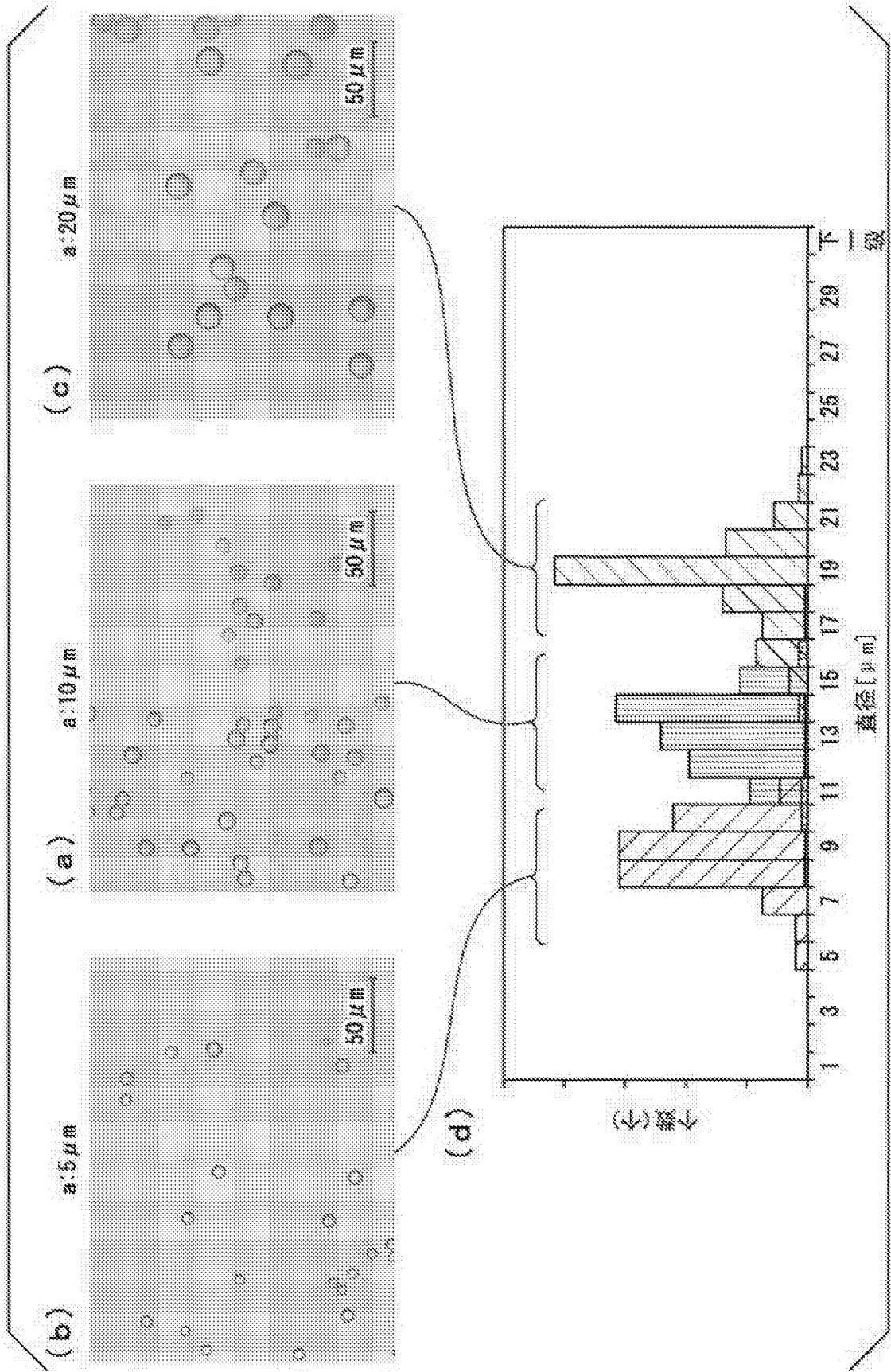


图9

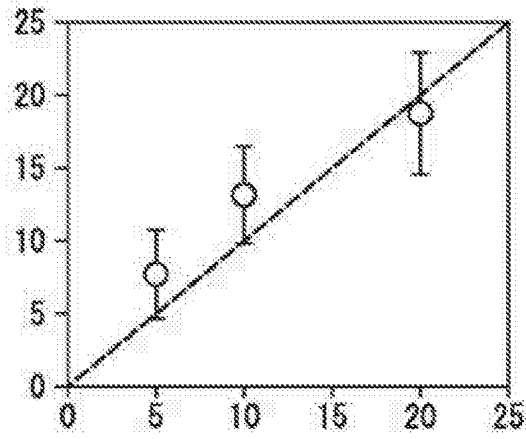


图10

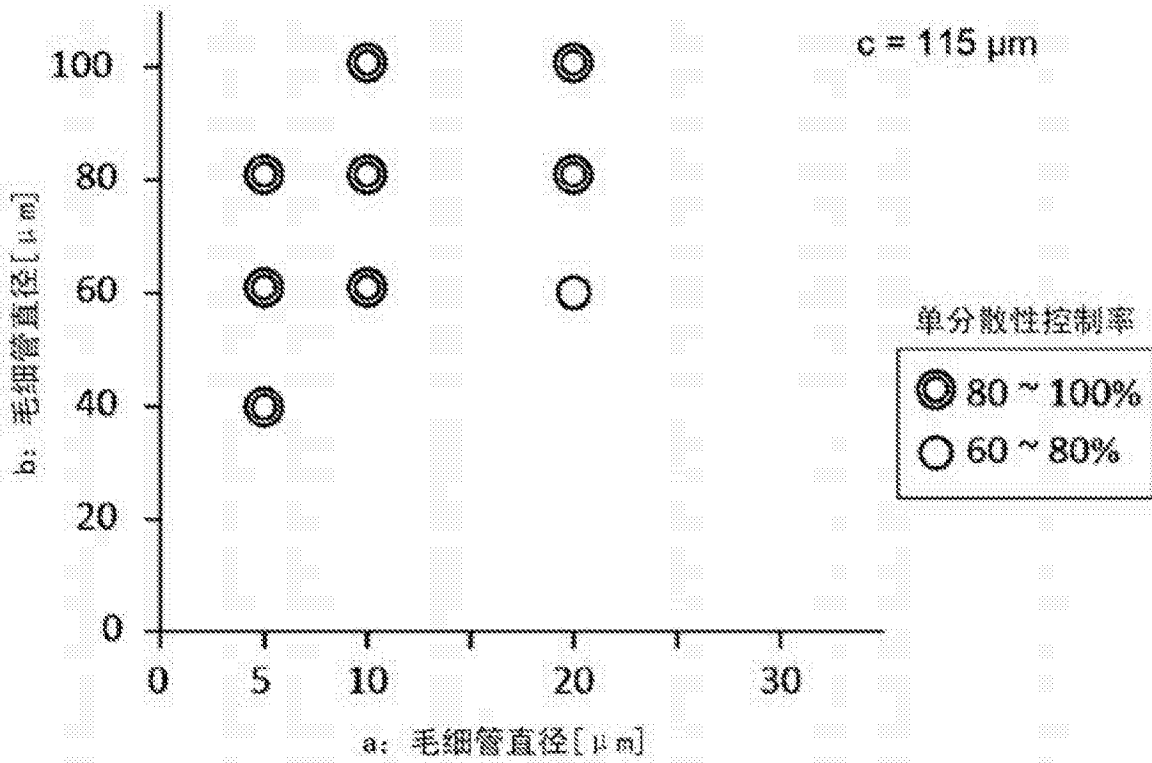


图11



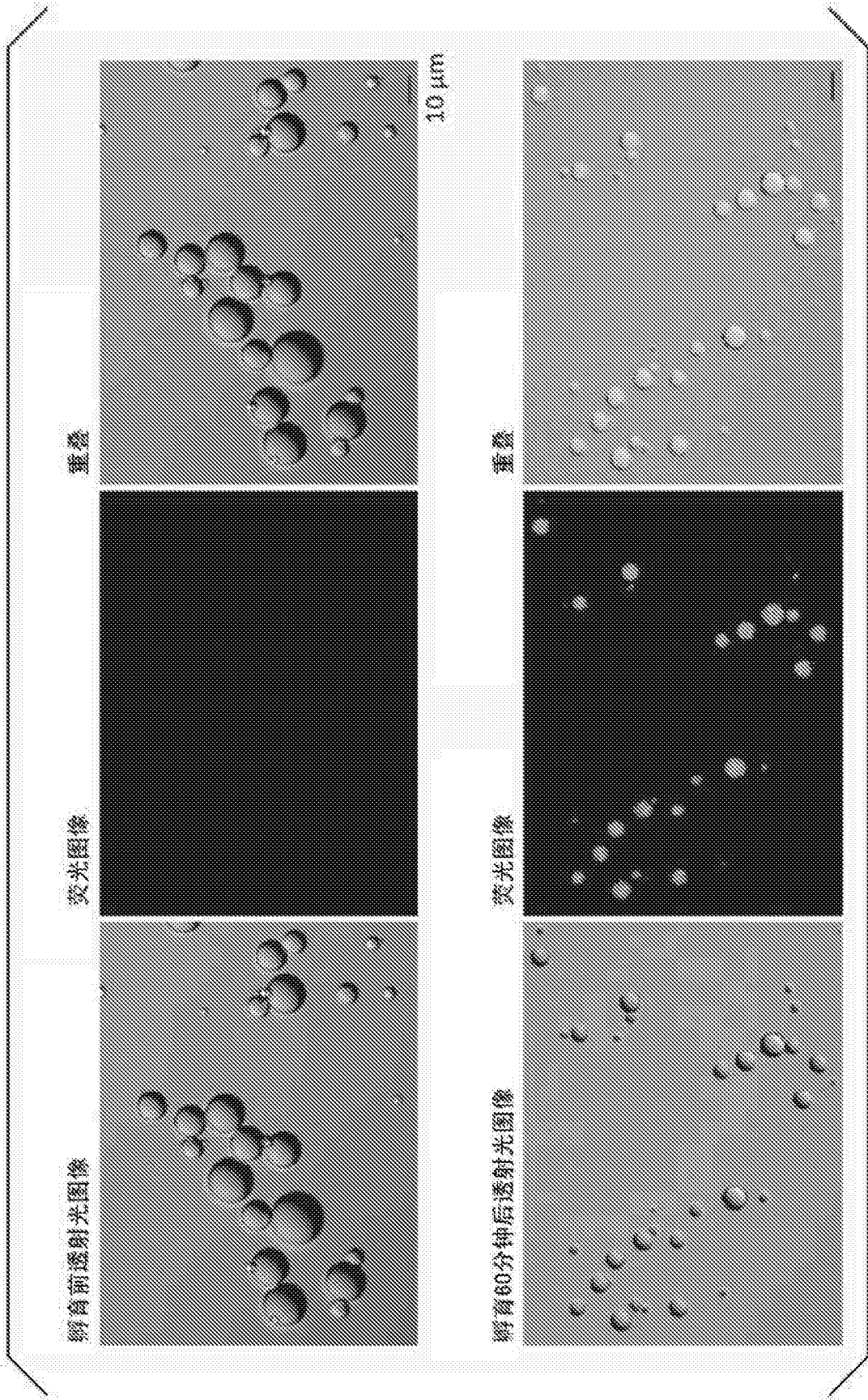


图12

脂质体

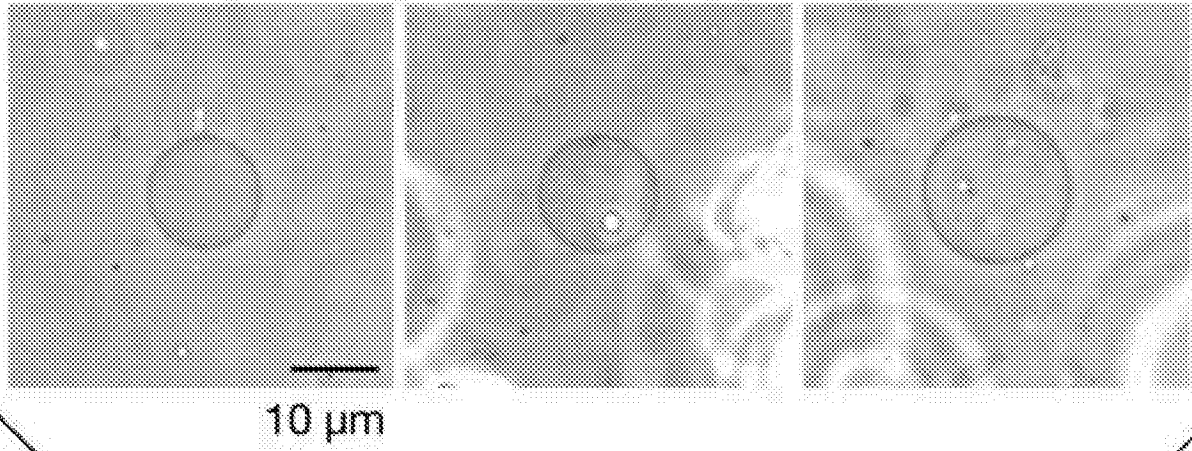


图13