



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105745172 B

(45)授权公告日 2018.08.10

(21)申请号 201480034616.9

(22)申请日 2014.04.18

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105745172 A

(43)申请公布日 2016.07.06

(30)优先权数据

61/814,090 2013.04.19 US

61/903,156 2013.11.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.12.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/034728 2014.04.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/172688 EN 2014.10.23

(73)专利权人 加州理工学院

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 芝加哥大学 潘其超

米哈伊尔·卡雷莫夫 黄端

乔治·萨维茨基

斯特凡诺·贝格洛 杜文斌

(72)发明人 潘其超 米哈伊尔·卡雷莫夫

黄端 乔治·萨维茨基

斯特凡诺·贝格洛 杜文斌

卢斯特曼·F·伊斯马吉洛夫

马良

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 王玮玮 郑霞

(51)Int.Cl.

B81B 7/04(2006.01)

审查员 李立彦

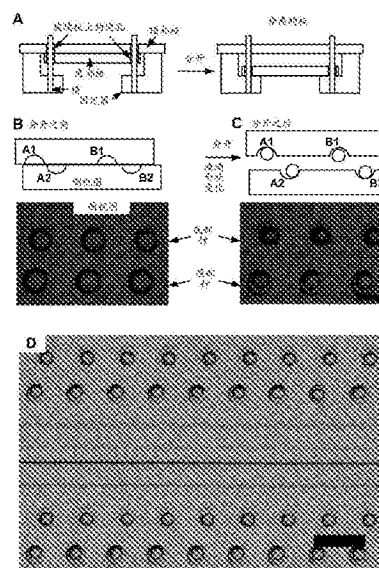
权利要求书2页 说明书31页 附图28页

(54)发明名称

平行化的样品操作

(57)摘要

本文提供了用于平行操作样品的方法、组合物以及装置,所述样品诸如细胞或者其他生物学样品。所述方法、所述组合物和所述装置适合于样品的多重水平的分析,包括遗传测定和功能测定。



1. 一种选择样品体积的亚组的方法,所述方法包括:

(a) 提供装置,所述装置包括:(i) 第一基体,所述第一基体包括多个第一界定的体积;和(ii) 第二基体,所述第二基体包括多个第二界定的体积,所述第一基体与所述第二基体偶联;

(b) 将样品分散在所述多个第一界定的体积中;

(c) 使所述多个第一界定的体积的每一个与所述多个第二界定的体积之一流体接触,以形成多个合并的体积;

将所述多个合并的体积分开为包含多个第一子体积和多个匹配的第二子体积的多个子体积的匹配对;

(d) 对所述多个第一子体积进行一种或更多种分析;以及

(e) 基于所述分析选择所述多个匹配的第二子体积的亚组。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述一种或更多种分析破坏或消耗所述样品。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述样品包括细胞。

4. 如权利要求1所述的方法,其中所述样品包括细菌细胞。

5. 如权利要求3所述的方法,其中方法还包括在所述多个合并的体积中孵育所述细胞的步骤。

6. 如权利要求1所述的方法,其中所述样品包括病毒。

7. 如权利要求1所述的方法,其中所述样品包括核酸。

8. 如权利要求1所述的方法,其中所述样品包括多个物种的细胞。

9. 如权利要求1所述的方法,其中所述样品包括抗生素。

10. 如权利要求1所述的方法,其中所述样品包括化学治疗剂。

11. 如权利要求1所述的方法,其中所述样品包括生长培养基。

12. 如权利要求1所述的方法,其中所述样品包括生长因子。

13. 如权利要求1所述的方法,其中所述样品包括抑制剂。

14. 如权利要求1所述的方法,其中所述样品包括胶凝剂。

15. 如权利要求1所述的方法,所述方法还包括在使所述多个第一界定的体积的每一个与所述多个第二界定的体积流体接触之前,将胶凝剂分散在所述多个第二界定的体积中。

16. 如权利要求1所述的方法,其中将所述多个合并的体积分开包括将所述第一基体与所述第二基体解偶联。

17. 如权利要求1所述的方法,其中将所述多个合并的体积分开包括相对于所述第二基体驱动所述第一基体。

18. 如权利要求1所述的方法,其中进行所述分开而不对所述多个合并的体积施加泵力。

19. 如权利要求3所述的方法,其中将所述样品分散在所述多个第一界定的体积中包括随机限制所述细胞。

20. 如权利要求19所述的方法,其中随机限制所述细胞包括相对于所述第二基体驱动所述第一基体。

21. 如权利要求3所述的方法,其中对所述多个第一子体积进行一种或更多种分析包括分析所述细胞中的一个或更多个。

22. 一种样品处理的方法,所述方法包括:

(a) 将包含一个或多个细胞的第一样品装载进入第一基体的一个或多个第一界定的体积;

(b) 使所述一个或多个第一界定的体积与第二基体的一个或多个第二界定的体积流体接触;

(c) 将所述一个或多个第一界定的体积的内容物与所述一个或多个第二界定的体积的内容物混合,因而产生包含一个或多个所述细胞的混合的样品;

(d) 将所述一个或多个第一界定的体积与所述一个或多个第二界定的体积分离,其中所述混合的样品的第一部分被所述一个或多个第一界定的体积包含并且所述混合的样品的第二部分被所述一个或多个第二界定的体积包含,其中所述第一基体保持与所述第二基体偶联;

(e) 对所述混合的样品的所述第一部分中一个或多个细胞进行至少一种分析;以及

(f) 基于所述至少一种分析确定是否保存所述混合的样品的所述第二部分中的一个或多个细胞。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述一个或多个第一界定的体积包括多个体积。

24. 如权利要求22所述的方法,其中所述一个或多个第二界定的体积包括多个体积。

25. 如权利要求1所述的方法,其中所述一种或更多种分析包括遗传测定。

26. 如权利要求1所述的方法,其中所述一种或更多种分析包括功能测定。

平行化的样品操作

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2013年4月19日提交的美国临时申请号61/814,090的权益、和2013年11月12日提交的美国临时申请号61/903,156的权益,这些申请通过引用并入本文。

[0003] 关于联邦政府赞助的研究的声明

[0004] 本发明在美国政府的支持下,根据美国国立卫生研究院合同号HG005826完成。美国政府对本发明具有一定的权利。

[0005] 发明背景

[0006] 采用小型化和分区化的培养方法可以增加通量,起始高密度行为并且消除来自快速生长的“杂草”细胞的竞争,所述小型化和分区化的培养方法包括但不限于凝胶微液滴(GMD)、小型化的培养皿以及微流体。然而,这些方法需要的设备对多数实验室通常是不可得到的并且操作是复杂的,这限制了它们在现实世界中用于生物测定的使用。

[0007] 微生物在范围从土壤和海洋至人类肠道的环境中起重要作用。虽然诸如宏观基因组学和单细胞基因组学的不依赖于培养的方法已经揭示了关于微生物群落的组成和功能的丰富的信息,获得这些微生物的纯培养物仍然是理解微生物基因组学和生理学的基础。由于细菌高度丰富和多样化,从环境中培养并且分离每一个菌株是不切实际的。

[0008] 发明概述

[0009] 本文公开了用于生成和操纵小体积的方法、装置、系统和试剂盒。在一些情况下,这些被用于控制微观环境,包括液体和气体环境两者。在一些情况下,本文公开的方法、装置、系统和试剂盒被用于平行化地样品操作。在一些情况下,这些被用于分离或者培养生物体。

[0010] 在一些实施方案中,方法包括:a)提供基体,所述基体包括第一界定的体积,所述第一界定的体积包括第一样品,所述第一体积被第二基体覆盖;b)提供第二基体,所述第二基体包括第二界定的体积,所述第二界定的体积包括第二样品,所述第二界定的体积被所述第一基体覆盖;并且c)将所述第一基体与所述第二基体分离基体基体,由此所述第二基体停止覆盖所述第一界定的体积并且所述第一基体停止覆盖所述第二界定的体积。在一些实施方案中,所述第一样品包括胶凝剂。在一些实施方案中,所述第二样品包括胶凝剂。在一些实施方案中,所述解偶联在设备上进行,其中所述设备在所述解偶联期间维持所述第一基体与所述第二基体对齐。在一些实施方案中,所述分离通过重力发生。在一些实施方案中,所述分离通过毛细管压力发生。在某些实施方案中,所述分离通过施加的力发生。在一些实施方案中,所述分离在所述第一基体和所述第二基体被浸入液体时发生。

[0011] 在一些实施方案中,方法包括:a)提供第一基体,所述第一基体包括第一界定的体积;b)提供第二基体,所述第二基体包括第二界定的体积,所述第二基体与所述第一基体偶联;c)将样品装载进所述第一界定的体积;d)允许所述第一界定的体积的内容物进入所述第二界定的体积,由此产生合并的样品;以及e)将所述第一基体与所述第二基体解偶联基体基体,其中所述合并的样品的第一部分保持被所述第一界定的体积包含,并且所述合并的样品的第二部分保持被所述第二界定的体积包含。在一些实施方案中,方法还包括,在所

述解偶联之前,将所述第一界定的体积与所述第二界定的体积分离,其中所述合并的样品的所述第一部分被所述第一界定的体积包含并且所述合并的样品的所述第二部分被所述第二界定的体积包含,其中所述第一基体保持与所述第二基体偶联。在一些实施方案中,使所述第一界定的体积与所述第二界定的体积流体接触在设备上进行。在一些实施方案中,所述解偶联在设备上进行,其中所述设备在所述解偶联期间维持所述第一基体与所述第二基体对齐。在一些实施方案中,所述解偶联在设备上进行,其中所述设备包括用于使所述第一界定的体积和所述第二界定的体积转位的板。在一些实施方案中,所述解偶联通过重力发生。在一些实施方案中,所述解偶联通过毛细管压力发生。在一些实施方案中,所述解偶联通过施加的力发生。在一些实施方案中,所述解偶联在所述第一基体和所述第二基体被浸入液体时发生。

[0012] 一些实施方案中,方法包括:a)提供第一基体,所述第一基体包括第一界定的体积;b)提供第二基体,所述第二基体包括第二界定的体积,所述第二基体与所述第一基体偶联;c)将第一样品装载进入第一界定的体积;d)使所述第一界定的体积与所述第二界定的体积流体接触,其中所述第一基体保持与所述第二基体偶联;e)将所述第一界定的体积的内容物与所述第二界定的体积的内容物混合,由此产生混合的样品;f)将所述第一界定的体积与所述第二界定的体积分离,其中所述混合的样品的第一部分被所述第一界定的体积包含并且所述混合的样品的第二部分被所述第二界定的体积包含,其中所述第一基体保持与所述第二基体偶联;并且g)将所述第一基体与所述第二基体解偶联,其中所述混合的样品的所述第一部分保持被所述第一界定的体积包含并且所述混合的样品的第二部分保持被所述第二界定的体积包含。在一些实施方案中,所述混合的样品还包括胶凝剂。在一些实施方案中,所述混合包括扩散。在一些实施方案中,所述混合包括超声处理。在一些实施方案中,所述使所述第一界定的体积与所述第二界定的体积流体接触在设备上进行。在一些实施方案中,所述解偶联在设备上进行,其中所述设备在所述解偶联期间维持所述第一基体与所述第二基体对齐。在一些实施方案中,所述解偶联在设备上进行,其中所述设备在所述解偶联期间维持所述第一基体与所述第二基体对齐。在一些实施方案中,所述解偶联通过重力发生。在一些实施方案中,所述解偶联通过毛细管压力发生。在一些实施方案中,所述解偶联通过施加的力发生。在一些实施方案中,所述解偶联在所述第一基体和所述第二基体被浸入液体时发生。

[0013] 在一些实施方案中,装置包括:a)第一基体,所述第一基体包括第一界定的体积和通道;b)第二基体,所述第二基体包括第二界定的体积,所述第二基体与所述第一基体偶联;和c)不相混流体层,所述不相混流体层布置在所述第一基体和所述第二基体之间。在一些实施方案中,包含在所述通道内的气体通过扩散穿过所述不相混流体层进入所述第一界定的体积和所述第二界定的体积。在一些实施方案中,包含在所述通道内的气体通过扩散穿过所述第一基体和所述第二基体进入所述第一界定的体积和所述第二界定的体积。在一些实施方案中,所述第二基体还包括通道。在一些实施方案中,装置还包括位于所述第一基体的桩,其定位于所述第一基体和所述第二基体之间。在一些实施方案中,装置还包括位于所述第二基体的桩,其定位于所述第一基体和所述第二基体之间。在一些实施方案中,装置还包括用于所述第一基体和所述第二基体的温度控制的工具。

[0014] 在一些实施方案中,方法包括:a)将样品分散在多个界定的体积中;b)基本上同时

将所述多个界定的体积分开为包含多个第一子体积和多个匹配的第二子体积的多个子体积的匹配对,其中进行所述分开而不对所述界定的体积施加泵力;c)对所述多个所述第一子体积进行至少一种分析;并且d)基于所述分析选择所述多个匹配的第二子体积的亚组。在一些实施方案中,所述分析包括遗传测定。在一些实施方案中,所述分析包括功能测定。在一些实施方案中,所述样品包括细胞。在一些实施方案中,所述样品包括细菌细胞。在一些实施方案中,所述样品包括哺乳动物细胞。在一些实施方案中,所述样品包括病毒。在一些实施方案中,所述样品包括核酸。在一些实施方案中,所述样品包括多个物种的细胞。在一些实施方案中,所述样品包括抗生素。在一些实施方案中,所述样品包括化学治疗剂。在一些实施方案中,所述样品包括生长培养基。在一些实施方案中,所述样品包括生长因子。在一些实施方案中,所述样品包括抑制剂。

[0015] 在一些实施方案中,方法包括:a)将流体装载进入容器;b)使在所述容器中的开口与样品流体体积接触;c)允许所述样品流体体积通过表面张力与所述容器中的所述流体融合,产生融合的液体体积;并且d)将所述融合的液体体积从所述容器中排出。

[0016] 在一些实施方案中,装置包括能够以自动化的方式进行以下方案的装配件(assembly):a)将流体装载进入容器;b)使所述容器中的开口与样品流体体积接触;c)允许所述样品流体体积通过表面张力与所述容器中的所述流体融合,产生融合的液体体积;并且d)将所述融合的液体体积从所述容器中排出。在一些实施方案中,所述方案对多个样品流体体积平行地进行。在一些实施方案中,所述方案对多个样品流体体积连续地进行。在一些实施方案中,所述样品流体体积的体积小于或者等于5微升。在一些实施方案中,所述样品流体体积的体积小于100纳升。

[0017] 在一些实施方案中,方法包括:a)提供多个界定的体积,所述多个界定的体积的每一个包括多个样品的一个;b)将所述多个样品从所述多个界定的体积转移至共用的容器中,由此生成汇集的样品;并且c)对所述汇集的样品进行分析。在一些实施方案中,所述多个界定的体积由一个基体界定。在一些实施方案中,所述多个界定的体积由多个基体界定。在一些实施方案中,所述分析包括遗传测定。在一些实施方案中,所述分析包括功能测定。

[0018] 在一些实施方案中,方法包括:a)提供多个界定的体积,所述多个界定的体积的每一个包括多个样品的一个;b)使所述多个样品经历条件的组;c)对所述多个样品进行处理;d)将所述多个样品从所述多个界定的体积转移至共用的容器中,由此生成汇集的样品;e)对所述汇集的样品进行分析;并且f)从所述分析确定所述条件的组使得所述处理能够或者不能够进行的程度。在一些实施方案中,所述条件的组包括抗生素的存在。在一些实施方案中,所述条件的组包括化学治疗剂的存在。在一些实施方案中,所述条件的组包括给定的温度。在一些实施方案中,所述条件的组包括给定的大气组成。在一些实施方案中,所述条件的组包括给定的生物体的存在。在一些实施方案中,所述条件的组包括生长因子的存在。在一些实施方案中,所述条件的组包括抑制剂的存在。在一些实施方案中,所述条件的组包括营养物的不存在。在一些实施方案中,所述处理包括细胞生长。在一些实施方案中,所述处理包括核酸扩增。在一些实施方案中,所述分析包括遗传测定。在一些实施方案中,所述分析包括功能测定。在一些实施方案中,所述分析包括检测与乳腺炎有关的生物体。在一些实施方案中,所述分析包括检测与IBD有关的生物体。在一些实施方案中,所述分析包括检测与硫酸盐还原有关的生物体。在一些实施方案中,所述分析包括检测可用作益生菌的生物

体。

[0019] 通过引用并入

[0020] 在此说明书中提及的所有出版物、专利、和专利申请为了任何和所有目的通过引用以其整体被并入本文,其程度与每个单独出版物、专利或者专利申请被具体和单独指明通过引用并入相同,所述出版物、专利、和专利申请包括:美国申请61//516,628、美国申请61/518,601、美国申请13/257,811、美国申请12/670,739、国际申请PCT/US2010/028361、美国申请61/262,375、美国申请61/162,922、美国申请61/340,872、美国申请13/440,371、美国申请13/467,482、美国申请13/868,028、美国申请13/868,009和国际申请PCT/US13/63594。

[0021] 附图简述

[0022] 本发明的新颖特征在附属的权利要求中具体提出。对本发明的特征和益处的更好的理解将通过参考列出利用了本发明的原理的示例性实施方案的以下详细描述和附图获得,附图为:

[0023] 图1示出具有三个对齐销(alignment pin)和两个玻璃垫片(spacer)的固定器。

[0024] 图2A示出用固定器分开的侧视的示意图。

[0025] 图2B示出分开前装置的侧视的示意图和俯视图的照片。

[0026] 图2C示出分开后装置的侧视的示意图和俯视图的照片。

[0027] 图2D示出分开后装置的照片。

[0028] 图3A示出包括液体样品的界定的体积和移液管吸头。

[0029] 图3B示出液体样品与移液管端中的液体的融合。

[0030] 图3C示出液体和样品被去除的界定的体积。

[0031] 图4A示出用于芯片洗涤的装置上的水性溶液的装载。

[0032] 图4B示出用于芯片洗涤的装置上的区室化。

[0033] 图4C示出用于芯片洗涤的装置上的残留水性溶液的去除。

[0034] 图4D示出使分区的样品进行芯片洗涤的装置的驱动。

[0035] 图5A示出表达GFP和DsRed基因的单个大肠杆菌(E.coli)的培养的示意图、大肠杆菌的PCR鉴定的示意图和照片以及大肠杆菌的荧光显微镜鉴定的示意图和照片。

[0036] 图5B示出显微镜术的剪辑和PCR结果。

[0037] 图5C示出大肠杆菌的显微镜检查和PCR鉴定的可视化。

[0038] 图6A示出用于数字PCR的滑动式芯片(SlipChip)。

[0039] 图6B示出具有气体供应通道的滑动式芯片。

[0040] 图7示出滑动式芯片装置上的多形拟杆菌(B.theta)的厌氧培养的插图和照片。

[0041] 图8A示出具有装载细菌培养物的垂直孔的装置的照片。

[0042] 图8B示出具有装载细菌培养物的垂直孔的装置的照片。

[0043] 图8C示出900nm高度的纳米桩。

[0044] 图8D示出在不具有纳米桩的滑动式芯片装置中的大肠杆菌的生长。

[0045] 图8E示出了在具有400nm高度的纳米桩的滑动式芯片装置中的大肠杆菌的生长。

[0046] 图8F示出了在具有900nm高度的纳米桩的滑动式芯片装置中的大肠杆菌的生长。

[0047] 图9A示出了在控制的大气瓶中的装置的示意图。

- [0048] 图9B示出了在三个具有不同氧气浓度的瓶中的装置。
- [0049] 图9C示出了在不同氧气条件下多形拟杆菌和大肠杆菌的生长。
- [0050] 图10A示出了分离的区室的行扫描(line scan)。
- [0051] 图10B示出了扩散性地连接的区室的行扫描。
- [0052] 图10C示出了分离的区室的横截面示意图。
- [0053] 图10D示出了扩散性地连接的区室的横截面示意图。
- [0054] 图11示出了*A.caccae*单独以及处于多形拟杆菌化学通讯中的生长。
- [0055] 图12A示出了具有重叠孔和通道的空的滑动式芯片。
- [0056] 图12B示出装载入滑动式芯片的样品。
- [0057] 图12C示出滑动式芯片滑动以重叠两个板中的孔。
- [0058] 图12D示出具有被空气冲洗过的通道的滑动式芯片。
- [0059] 图12E示出具有被油冲洗过的通道的滑动式芯片。
- [0060] 图12F示出滑动式芯片滑动以分离重叠的孔。
- [0061] 图13示出在滑动式芯片分开后不具有琼脂糖的流体体积。
- [0062] 图14A示出来自微生物群落的生长缓慢的菌株的随机限制条件下的培养。
- [0063] 图14B示出滑动和分离后在滑动式芯片的两面上细胞的分布。
- [0064] 图15A示出具有1x体积孔的稀释装置的顶层。
- [0065] 图15B示出具有9x体积孔的稀释装置的底层。
- [0066] 图15C示出装配的稀释装置的顶层和底层。
- [0067] 图15D示出装填样品的稀释装置。
- [0068] 图15E示出稀释装置的顶部板滑动以从将孔与管分离。
- [0069] 图15F示出稀释的第一步。
- [0070] 图15G示出五个稀释步骤后的100,000倍稀释。
- [0071] 图16示出用于总共八倍稀释的两倍连续稀释的三个步骤。
- [0072] 图17A示出用于制造亲水性孔的步骤。
- [0073] 图17B示出在亲水性孔中的水性溶液。
- [0074] 图18示出装置上稀释的结果。
- [0075] 图19示出在滑动式芯片装置的一半上包括1%琼脂糖的流体体积。
- [0076] 图20A示出在装置上用于靶向培养的测序以及微生物靶生物体的分离的示意图。
- [0077] 图20B示出在装置上用于靶向培养的芯片洗涤以及微生物靶生物体的分离的示意图。
- [0078] 图20C示出在装置上用于靶向培养和微生物靶生物体的分离的分开和PCR的示意图。
- [0079] 图21示出以大肠杆菌的芯片洗涤qPCR的结果。
- [0080] 图22A示出在滑动式芯片装置上的*C.scindens*的生长。
- [0081] 图22B示出在滑动式芯片装置上的粪肠球菌(*F.faecalis*)的生长。
- [0082] 图22C示出在琼脂平板上的*C.scindens*的生长。
- [0083] 图22D示出在琼脂平板上的粪肠球菌的生长。
- [0084] 图22E示出比较从非生长的阴性对照、芯片洗涤方法和板洗涤方法收集的

C.scindens和粪肠球菌的基因组DNA的图。

[0085] 图23示出样品收集和限制的示意图。

[0086] 图24示出用靶特异的引物和通用引物的qPCR结果。

[0087] 图25A示出在分开的滑动式芯片上阳性的和阴性的芯片上的菌落PCR。

[0088] 图25B示出“Candidatus Caecococcus microfluidicus”的规模放大的菌落。

[0089] 图25C示出“Candidatus Caecococcus microfluidicus”的单菌落的显微照片。

[0090] 图25D示出“Candidatus Caecococcus microfluidicus”的TEM图像。

[0091] 图26示出OTU158的光学显微镜术。

[0092] 图27A示出“Candidatus Caecococcus microfluidicus”的系统发生的归属。

[0093] 图27B示出通过FISH对“Candidatus Caecococcus microfluidicus”培养的验证。

[0094] 图28示出靶生物体的培养和分离的示意图。

[0095] 发明详述

[0096] I. 综述

[0097] 本公开内容提供用于平行操作样品的方法和组合物。平行的样品操作可以通过各种方法进行。例如,样品操作可以在滑动式芯片装置上发生。滑动式芯片装置可以包括两个面对面的板,每一个板包括一系列孔、室或者其他界定的体积。样品操作包括装载、混合、反应、分离、稀释、展示结果以及其他可以通过滑动式芯片板相对彼此的驱动发生的步骤。样品的平行化可以通过将两个板分开,在两个板的每一个板上产生空间上有序的匹配的样品组来发生。平行的样品组的进一步分析可以对样品的一个或两个组进行,包括对分析物具有破坏性或者消耗性的分析。

[0098] 本公开内容描述了用于以下的方法:a)从单个细胞随机限制和培养;b)生成微集落的复制物;c)使用基于基因的测定靶向分离微生物;以及d)使用基于功能的测定靶向分离微生物。方法可以例如在滑动式芯片装置上进行。滑动式芯片是可以操纵流体体积,例如皮升至纳升大小的流体体积的微流体装置,其在一些情况下可以不需要复杂的设备。在一些情况下,随机限制(例如,在1,000-区室的滑动式芯片中)和培养单个细胞以允许集落的生长。除限制以外,若期望,微生物周边的微环境可以通过控制微生物之间的相互作用的强度和方向来微调。在一些情况下,来自微装置的培养物可以被汇集到一起并且被收集进一个管中来运行高通量多重测定。在一些情况下,当分离装置的两个板时,每一个被区室化的流体体积分开成两部分,在相对的板的每一个上生成各自独立的集落的拷贝。对于基于基因的测定,可以在第一个板上进行反应,诸如PCR,来鉴定包含具有感兴趣的基因的集落的区室。之后可以从第二个板取回对应的集落用于其他的应用,包括但不限于对感兴趣的分离物的规模放大的培养。

[0099] II. 滑动式芯片

[0100] 本文公开的方法、组合物、装置和试剂盒可以与滑动式芯片装置一起使用。滑动式芯片装置被描述在例如2010年3月23日提交的国际专利申请PCT/US2010/028361“Slip Chip Device and Methods”;在2011年9月20日提交的美国申请13/257,811“Slip Chip Device and Methods”;在2009年11月18日提交的美国申请61/262,375“Slip Chip Device and Methods”;在2009年3月24日提交的美国申请61/162,922“Slip Chip Device and Methods”;在2010年3月22日提交的美国申请61/340,872“Slip Chip Device and

Methods”;在2011年4月5日提交的美国申请61/516,628“Digital Isothermal Quantification of Nucleic Acids Via Simultaneous Chemical Initiation of Recombinase Polymerase Amplification (RPA) Reactions on Slip Chip”;在2011年5月9日提交的美国申请61/518,601“Quantification of Nucleic Acids With Large Dynamic Range Using Multivolume Digital Reverse Transcription PCR (RT-PCR) On A Rotational Slip Chip Tested With Viral Load”。

[0101] 简略地,滑动式芯片装置是可以包括相互偶联的板的微流体装置。每一个板可以包括多个孔、区室或者其他界定的体积。板可以相对于彼此移动。板的运动可以引起多种芯片上的操作,诸如使一个板上的界定的体积与另一个板上的孔进行或者不进行流体接触,或者使界定的体积与入口或者出口通道进行或者不进行流体接触。

[0102] 滑动式芯片装置可以由多种材料制造,诸如玻璃、硅、聚合物(例如PMMA或者PDMS)或者金属。滑动式芯片装置可以通过多种方法,诸如光刻法、软刻蚀、热雕刻、激光烧蚀、湿蚀刻、等离子蚀刻(例如RIE或者DRIE),或者微模制来制造。

[0103] 滑动式芯片装置可以在组件之间包括各种润滑相,诸如全氟化合物、矿物油或者其他油。

[0104] 可以以各种表面处理制备滑动式芯片装置,诸如硅烷化、氧等离子激活、聚合物涂覆(例如PDMS或者聚对二甲苯)、亲和剂、金属、电极、电介质、蛋白质、亲水的涂覆和处理或者疏水的涂覆和处理。

[0105] 滑动式芯片装置可以包括多种另外的功能组件,包括加热器、帕尔贴装置(Peltier device)、压电致动器(piezoelectric actuators)、泵、光源、光学传感器、CCD、磁体以及其他的组件。

[0106] III. 样品

[0107] 本公开内容中操作的样品可以包括细胞。样品可以包括单一类型的细胞、生物体或者病毒。样品可以包括多种类型的细胞、生物体或者病毒。样品可以包括多个物种的微生物或者微生物总群(microbial consortia)。样品可以包括细菌细胞。样品可以包括真菌细胞。样品可以包括哺乳动物细胞。样品可以包括昆虫细胞。样品可以包括肿瘤细胞。样品可以包括病毒。样品可以包括藻类。样品可以包括古细菌(archaea)。样品可以包括大肠杆菌、粪肠球菌、*A. caccae*、普通拟杆菌(*B. vulgatus*)、多形拟杆菌或者其他物种。样品可以包括人类细胞,诸如HeLa、NCI60、DU145、HUVEC、Jurkat、Lncap、MCF-7、MDA-MB-438、PC3、T47D、THP-1、U87、SHSY5Y或者Saos-2。样品可以包括非人类动物细胞,诸如Vero、GH3、PC12、MC3T3、斑马鱼ZF4、斑马鱼AB9、MDCK、或者非洲爪蟾A6。样品可以包括干细胞。样品可以包括以前没有发现的或者未表征的物种。样品可以包括植物细胞,诸如烟草BY-2。样品可以包括基于标志物或者功能,诸如基因、基因的组、遗传标志物或者遗传标志物的组、表型特征,或者诸如纤维素降解、木质素降解、发酵、感染、硫酸盐还原或者其他活性的感兴趣的活性选择的生物体或者生物体的群落。样品可以包括来自任何上述细胞或者生物体的分离物。

[0108] 样品可以包括试剂,诸如酶、核苷酸、寡核苷酸、引物、标签、探针、颗粒、裂解试剂、用于测序或者下一代测序的样品制备试剂、诱导剂(例如IPTG)、阻遏物(例如LacI)、信号转导分子(例如激素)或者其他试剂。样品可以包括反应产物,诸如PCR或者数字PCR产物。样品可以包括其他反应产物。样品可以包括核酸,诸如DNA、RNA、PNA、质粒、调节性或非编码

RNA或者其他核酸。

[0109] 样品可以包括培养基,诸如庖肉培养基、AM2培养基、LB培养基、LB Miller培养基、LB Lennox培养基、SOB培养基、SOC培养基、2x YT培养基、TB培养基、SB培养基或者其他商业上可得的培养基。

[0110] 样品可以包括缓冲液,诸如Bicine、Tris、Tricine、TAPSO、HEPES、TES、TAPS、PBS、MOPS、PIPES、甲次砷酸盐、SSC、MES、琥珀酸、Good's缓冲液或者其他的商业上可得的缓冲液。

[0111] 样品可以包括气体,诸如O₂、CO₂、CO、N₂、NO、NO₂、H₂O或者空气。

[0112] 样品可以包括生长因子或者细胞因子诸如肾上腺髓质肽 (AM)、血管生成素 (Ang)、自分泌运动因子、骨形成蛋白 (BMP)、脑源性神经营养因子 (BDNF)、表皮生长因子 (EGF)、红细胞生成素 (EPO)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、生长分化因子-9 (GDF9)、肝细胞生长因子 (HGF)、肝癌源生长因子 (HDGF)、胰岛素样生长因子 (IGF)、迁移刺激因子、肌生成抑制蛋白 (GDF-8)、神经生长因子 (NGF) 和其他神经营养因子、血小板源生长因子 (PDGF)、血小板生成素 (TPO)、转化生长因子 α (TGF- α)、转化生长因子 β (TGF- β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血管内皮生长因子 (VEGF)、Wnt信号通路、胎盘生长因子 (PGF)、胎牛生长激素 (FBS)、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7或者其他的生长因子。

[0113] 样品可以包括抗生素,诸如氨苄西林、羧苄西林、氯霉素、D-环丝氨酸、庆大霉素、潮霉素B、卡那霉素、春雷霉素、萘啶酸、新霉素、利福平、大观霉素、链霉素、四环素或其他抗生素。

[0114] 样品可以包括抗体、抗体片段或者适配体。样品可以包括能够结合特异性靶的结合剂。样品可以包括荧光团。

[0115] 样品可以包括流体体积。流体体积可以是液滴。流体体积可以被完全地或者部分地,包含在孔中、区室中或者其他结构中。流体体积可以在基体上。流体体积可以在乳液中。流体体积可以通过表面张力界定。流体体积可以通过一种或者更多种固体基体界定。流体体积可以通过一种或者更多种不相混液体界定。流体体积可以通过气相界定。流体体积可以通过固相、液相和/或气相的组合界定。

[0116] IV. 平行的样品操作

[0117] 许多测定提供有价值的信息但是可能在过程中破坏或者消耗它们的分析物。对于此类测定,本公开内容提供在界定的体积中平行的样品操作,从一个原始样品组产生两个匹配的样品组。在一些情况下,一组可以用来进行破坏或者消耗其分析物的分析并且另一组可以被保存用于参考、用于扩增或者用于生长或者用于进一步研究。在其他一些情况下,一组可以用来进行破坏或者消耗其分析物的第一分析并且另一组可以用来进行破坏或者消耗其分析物的第二分析。例如,诸如PCR或者FISH的遗传测定通常要求裂解细胞来分析它们的遗传物质,虽然期望的是获得活的生物体用于微生物分离。在一些情况下在原始的样品组中多个拷贝的分析物被提供给每一个界定的体积,并且产生的两个匹配的样品组的每一个包含比原始体积少的分析物。在一些情况下,原始的样品组中至少一个拷贝的分析物被提供至每一个界定的体积,并且在产生两个匹配的样品组之前进行分析物的扩增。扩增可以是细胞生长。扩增可以通过核酸扩增。

[0118] 平行的样品操作可以通过滑动式芯片装置进行。滑动式芯片装置可以包括相对的板,每一个具有给定数目的界定的体积。界定的体积可以是区室或者孔。孔可以被样品装载并且随之板可以相对于彼此滑动以使一个板上的区室或者孔与另一个板上的对应的区室或孔接触。例如细胞悬液可以被装载进两个板上的孔,并且可以随后通过滑动使孔在一起并且形成合并的孔。可选地,细胞悬液可以被装载至一个板上的孔并且不同的溶液,诸如生长培养基,可以被装载至另一个板上的孔中,并且可以随后通过滑动使孔在一起以形成合并的孔。合并的孔可以形成初始的样品组。可以随后通过滑动板以分离孔的组形成匹配的样品组。

[0119] 可以通过液滴微流体装置进行平行的样品操作。液滴可以是由不相混的油相分隔的水性液滴。液滴可以是由不相混的水相分隔的油液滴。包含原始的样品组的液滴的群可以经历顺序的液滴分开,在子液滴中产生两个匹配的样品组。

[0120] 平行的样品操作可以通过其他界定的体积的系统进行。在一些情况下,原始的样品组包括微孔板中的水性样品。通过将原始样品体积的一部分从原始的样品组中转移至第二个微孔板中可以产生样品的两个匹配的组。转移可以例如通过移液管进行。

[0121] V. 分开滑动式芯片

[0122] 可以通过滑动式芯片装置进行平行的样品操作,所述滑动式芯片装置可包括两个相对的板,每一个具有给定数目的界定的体积。如以上描述的,可以通过滑动两个板来分离两组界定的体积形成来自原始的样品组的两个匹配的样品组(例如图2B、图2C)。这两个匹配的样品组可以进一步通过分离滑动式芯片装置的两个相对的板来分离,使得能够接近每一个样品用于进一步的分析,同时基于它们在界定的体积的阵列中的物理位置,保留两个匹配的样品组的成员之间的配对的关系。

[0123] 板可以解偶联而不需要首先将第一界定的体积和第二界定的体积分离。在这种情况下,两个基体的解偶联提供两个体积的分离。样品内的内聚力可以小于样品和基体间的附着力。例如,全部或者部分的基体可以是亲水的并且样品可以是水性的。例如,参见图17,其中生成了在孔内具有亲水表面并且在孔外具有疏水表面的基体(图17A)并且水性样品被装载(图17B)。在另一个实例中,被疏水表面环绕的亲水性孔被用于蛋白质测定(参见 Weishan Liu, Delai Chen, Wenbin Du, Kevin P. Nichols, 和 Rustem F. Ismagilov, "SlipChip for Immunoassays in Nanoliter Volumes," *Analytical Chemistry* 2010 82: 3276-3282)。在一些情况下,体积内部的物质可以附着在基体上。例如,物质可以是附着至表面的哺乳动物细胞。

[0124] 在一些情况下,一个基体包括体积,另一个基体包括另一体积并且这些体积不是流体地相连并且可以具有相同的或者不同的内含物。可以解偶联两个基体。解偶联可以提供对体积的接近。这可以通过例如使用滑动式芯片来制备。此类体积可以通过将含有混合物的合并的体积滑动分开来制备。对于一个实例,参见图12。

[0125] 体积,包括流体地连接或者流体地断开的体积,可以是相似的或者不同的体积(参见 Feng Shen, Bing Sun, Jason E. Kreutz, Elena K. Davydova, Wenbin Du, Poluru L. Reddy, Loren J. Joseph, 和 Rustem F. Ismagilov, "Multiplexed Quantification of Nucleic Acids with Large Dynamic Range Using Multivolume Digital RT-PCR on a Rotational SlipChip Tested with HIV and Hepatitis C Viral Load," *JACS* 2011

133:17705-17712和Jason E.Kreutz,Todd Munson,Toan Huynh,Feng Shen,Wenbin Du和Rustem F.Ismagilov,"Theoretical Design and Analysis of Multivolume Digital Assays with Wide Dynamic Range Validated Experimentally with Microfluidic Digital PCR,"Analytical Chemistry 2011 83:8158-8168)。可以配置体积用于核酸扩增反应(参见Feng Shen,Elena K.Davydova,Wenbin Du,Jason E.Kreutz,Olaf Piepenburg,和Rustem F.Ismagilov,"Digital Isothermal Quantification of Nucleic Acids via Simultaneous Chemical Initiation of Recombinase Polymerase Amplification Reactions on SlipChip,"Analytical Chemistry 2011 83:3533-3540;Feng Shen,Bing Sun,Jason E.Kreutz,Elena K.Davydova,Wenbin Du,Poluru L.Reddy,Loren J.Joseph,和Rustem F.Ismagilov,"Multiplexed Quantification of Nucleic Acids with Large Dynamic Range Using Multivolume Digital RT-PCR on a Rotational SlipChip Tested with HIV and Hepatitis C Viral Load,"JACS 2011 133:17705-17712;Jason E.Kreutz,Todd Munson,Toan Huynh,Feng Shen,Wenbin Du和Rustem F.Ismagilov,"Theoretical Design and Analysis of Multivolume Digital Assays with Wide Dynamic Range Validated Experimentally with Microfluidic Digital PCR,"Analytical Chemistry 2011 83:8158-8168;和Feng Shen,Wenbin Du,Jason E.Kreutz,Alice Fok,和Rustem F.Ismagilov,"Digital PCR on a SlipChip,"Lab Chip 2010 10:2666-2672)。可以配置体积用于生物体的生长,所述生物体包括如本文所描述的微生物、细胞等等。可以配置体积用于结晶,包括但不限于蛋白质结晶(参见Liang Li和Rustem F.Ismagilov,"Protein Crystallization Using Microfluidic Technologies Based on Valves,Droplets,and SlipChip,Annu Rev.Biophys 2010 39:139-158和Liang Li,Wenbin Du和Rustem F.Ismagilov,"Multiparameter Screening on SlipChip Used for Nanoliter Protein Crystallization Combining Free Interface Diffusion and Microbatch Methods,"JACS 2010 132:112-119)。可以配置体积用于蛋白质测定(Weishan Liu,Delai Chen,Wenbin Du,Kevin P.Nichols,和Rustem F.Ismagilov,"SlipChip for Immunoassays in Nanoliter Volumes,"Analytical Chemistry 2010 82:3276-3282)。单一的细胞和分子可以被扩增并且取回。表面可以是亲水的或者疏水的(Weishan Liu,Delai Chen,Wenbin Du,Kevin P.Nichols,和Rustem F.Ismagilov,"SlipChip for Immunoassays in Nanoliter Volumes,"Analytical Chemistry 2010 82:3276-3282)。

[0126] 两个滑动式芯片的板的分离可以在流体下进行。流体可以包括不相混的油,诸如十四烷油、全氟化油或者任何其他适当的不相混的液体。在一些情况下,在滑动式芯片上可以减少或者不发生蒸发。

[0127] 被用于分离两个滑动式芯片的板的力可以是重力。被用于分离两个滑动式芯片的板的力可以是毛细管压力。被用于分离两个滑动式芯片的板的力可以是水动力。被用于分离两个滑动式芯片的板的力可以通过器具,诸如镊子、剃须刀片或者手指,来施加。

[0128] 滑动式芯片板可以在分离期间相对于彼此保持在适当位置以确保维持样品体积或者液滴的分离。滑动式芯片板可以手动保持在适当位置上。滑动式芯片板可以通过夹子保持在适当位置上。滑动式芯片板可以通过固定器保持在适当位置上(例如图1、图2A)。

[0129] 滑动式芯片板的分开可以通过增加样品的粘性进一步确保以防止样品体积或者

液滴在分开期间变得离开。可以通过添加聚合物来增加样品的粘性。可以通过添加凝胶来增加样品的粘性。可以通过添加高粘性液体来增加样品的粘性。可以通过温度改变来增加样品的粘性。在一些情况下,可以通过添加甘油来增加样品的粘性。在一些情况下,通过添加琼脂糖来增加样品的粘性。琼脂糖可以是极低胶凝温度的琼脂糖。琼脂糖的浓度可以是至少0.1%。琼脂糖的浓度可以是至少0.2%。琼脂糖的浓度可以是至少0.3%。琼脂糖的浓度可以是至少0.4%。琼脂糖的浓度可以是至少0.5%。琼脂糖的浓度可以是至少0.6%。琼脂糖的浓度可以是至少0.7%。琼脂糖的浓度可以是至少0.8%。琼脂糖的浓度可以是至少0.9%。琼脂糖的浓度可以是至少1.0%。琼脂糖的浓度可以是至少1.2%。琼脂糖的浓度可以是至少1.4%。琼脂糖的浓度可以是至少1.6%。琼脂糖的浓度可以是至少1.8%。琼脂糖的浓度可以是至少2.0%。在一些情况下,将琼脂糖以约0.3%和约2.0%之间的浓度添加至样品。可以降低样品的温度以使琼脂糖胶凝。滑动式芯片可以被随后分开以胶凝样品(例如图2D)。

[0130] 在一些情况下,将包含生物体的溶液装载至一个滑动式芯片板上的界定的体积并且将包括琼脂糖的溶液装载至另一滑动式芯片板上的界定的体积。可以在琼脂糖的不存在下培养生物体,并且在生物体生长之后可以组合两组体积。这些组合的体积可以形成原始的样品组。两个匹配的样品组的形成可以随后通过将两个板滑动以分离两组体积来形成。

[0131] VI. 样品的取回

[0132] 在平行化之后,样品可以被取回用于进一步分析。可以通过面对面转移取回样品。可以通过移液取回样品。移液可以通过首先将一定体积的缓冲溶液移液至界定的体积并且允许缓冲液与样品体积混合来进行。整个体积的缓冲液和样品可以之后被吸尽并转移。在滑动式芯片上的孔之间的间隔可比移液管吸头的外径大以防止孔之间的交叉污染。可选择地,移液可以通过使装填诸如缓冲液的溶液的移液管吸头与样品体积接触来进行,允许样品体积与移液管吸头中的液体融合(例如图3)。

[0133] 可以通过芯片洗涤方法来取回样品。芯片洗涤方法可以被用于在各种情况下监测装置上的反应或者其他的过程。包含在界定的体积中的样品可以被洗出诸如滑动式芯片装置的装置,并且聚集。随后可以对聚集的样品进行分析。分析可以确定检查的条件使得或者不使得反应或者其他的过程能够进行的程度。分析可以,例如,确定使得过程能够进行的最小条件,使得过程能够进行的最佳条件,使得过程能够进行的中间条件或者不使得过程能够进行的最小条件。例如,可以在装置或者芯片上将DNA分隔至界定的体积、扩增、洗至合并的体积,并且随后可以随后分析合并的产物以确定扩增条件是否支持期望的靶的扩增。在另一个实例中,为了确定使用的培养条件是否支持靶微生物的生长,可以将细胞分隔至装置或者芯片上的界定的体积、培养,从装置洗至合并的体积,并且随后可以通过测序、靶特异性的引物、或者两者分析来自汇集的细胞的DNA。可以顺序地或者平行地重复此芯片洗涤方法直到鉴定了用于靶的条件。例如,可以设计基于滑动式芯片的微流体装置用于此芯片洗涤方法使其能够进行高达3,200个微生物培养试验,每个试验的规模是~6nL。此类装置可以使得能够达到三种能力:随机限制来自样品的单个细胞、微生物培养和收集培养的细胞。此类装置可以允许以单一出口收集芯片洗涤溶液。设计在图4中阐明。此设计特征的实施方案可以使用桥接通道来引导水相的流(例如,至用于装载的管口(vent)或者用于收集的出口)。

[0134] 样品取回可以在不同的时间点进行。在一些情况下,诸如对于细胞的培养,由于样品中不同细胞的不同的生长速率,样品取回的时间点可以影响后面分析的结果。例如,细胞培养的生物量的最大产出可以出现在生长的后期指数期或者生长的早期停滞期。样品的分隔可以在诸如生物量的产出或者类似遗传DNA的标志物的量方面减少或者消除样品间的偏倚。此偏倚的减少或者消除可以减少等候特定的时间点取回样品的重要性。

[0135] 样品中细胞的起始浓度可以通过平板计数或者显微镜术估算。细胞可以被包封入体积内。存在可用于包封细胞的许多方法。例如,细胞可以通过随机限制被包封。例如,微生物悬液可以通过随机限制的方法首先被分入许多液体微区室 (microcompartments)。(参见 Meghan E.Vincent, Weishan Liu, Elizabeth B.Haney 和 Rustem F.Ismagilov, "Microfluidic stochastic confinement enhances analysis of rare cells by isolating cells and creating high density environments for control of diffusible signals," *Chem.Soc.Rev.* 2010 39:974-984. DOI:10.1039/b917851a; James Q.Boedicker, Liang Li, Timothy R.Kline 和 Rustem F.Ismagilov, "Detecting bacteria and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets using plug-based microfluidics," *Lab Chip* 2008 8:1265-1272. DOI 10.1039/b804911d; Weishan Liu, Hyun Jung Kim, Elena M.Lucchetta, Wenbin Du 和 Rustem F.Ismagilov, "Isolation, incubation, and parallel functional testing and identification by FISH of rare microbial single-copy cells from multi-species mixtures using the combination of chemistode and stochastic confinement," *Lab Chip* 2009 9:2153-2162. DOI:10.1039/b904958d)。例如,当微区室的数目大于微生物细胞的数目时,基于泊松统计,多数孔可以包含一个或者零个细胞。例如,1纳升的孔可以被用于随机限制浓度低于 10^6 或者 10^5 个细胞/毫升的样品。然而,例如当细胞可以通过主动地控制的细胞分选被包封时,或者当细胞可以通过自组织 (self-organizing) 被动地被包封时泊松限制 (Poisson limit) 可以被打破 (参见 Jon F.Edd, Dino Di Carlo, Katherine J.Humphry, Sarah Koster, Daniel Irimia, David A.Weitz 和 Mehmet Toner, "Controlled encapsulation of single cells into monodisperse picoliter drops," *Lab Chip* August 2008, 8(8):1262-1264. DOI 10.1039/b805456h)。此外,细胞可以被捕获在设计为比样品的其他组成部分优先捕获细胞的结构 (feature) 中 (例如,参见 Dino Di Carlo, Liz Y.Wu 和 Luke P.Lee, "Dynamic single cell culture array," *Lab Chip*, 2006, 6, 1445-1449, DOI:10.1039/B605937F 和 Alison M Skelley, Oktay Kirak, Heikyung Suh, Rudolf Jaenisch 和 Joel Voldman, "Microfluidic control of cell pairing and fusion," *Nature Methods* 6, 147-152 (2009), DOI:10.1038/nmeth.1290)。

[0136] VII. 来自样品的生物体的培养

[0137] 本公开内容中描述的方法、组合物和装置可以用来培养来自样品的生物体。例如,来自环境的生物体可以被取样以及被装载到装置上用于培养。包含生物体的样品可以被分隔为原始的样品组。可以孵育样品以允许生物体的集落或者群落的生长。集落或者群落生长之后,原始的样品组可以被分离为匹配的样品组,匹配的样品组的每一组含有生物体的集落或者群落。可以测定一组样品来鉴定包含基因、活性或者其他感兴趣的特征的那些。来自另一组的对应的样品可以随之被选择用于培养、规模放大或者其他的进一步研究。

[0138] 在本公开内容中描述的平行的样品操作可以被用于分离和培养来自样品的靶生物体。例如,来自环境的包含感兴趣的基因的生物体可以被鉴定和分离用于进一步研究。在另一个实例中,来自环境的具有感兴趣的活性的生物体可以被鉴定和分离用于进一步研究。包含生物体(其中至少一个被靶向)的样品,可以被分隔为原始的样品组。可以孵育样品以允许生物体的集落或者群落的生长。集落或者群落生长之后,原始的样品组可以被分离为匹配的样品组,匹配的样品组的每一组含有生物体的集落或者群落。可以测定一组样品来鉴定包含基因、活性或者其他感兴趣的特征的那些。来自另一组的对应的样品可以随之被选择用于培养、规模放大或者其他的进一步研究。

[0139] 包含生物体的样品可以被分隔在界定的体积中。可以通过在被分隔的样品中的细胞或者生物体的初始浓度来控制给定的界定的体积中的细胞或者生物体的数目。可以使用统计方法来确定界定的体积中生物体或者细胞的分布,诸如泊松统计。在培养或者孵育之前,界定的体积可以包含至少1个细胞或者生物体、至少2个细胞或者生物体、至少3个细胞或者生物体、至少4个细胞或者生物体、至少5个细胞或者生物体、至少6个细胞或者生物体、至少7个细胞或者生物体、至少8个细胞或者生物体、至少9个细胞或者生物体、至少10个细胞或者生物体、至少15个细胞或者生物体、至少20个细胞或者生物体、或至少25个细胞或者生物体。在培养或者孵育之前,界定的体积可以包含至多1个细胞、至多2个细胞或者生物体、至多3个细胞或者生物体、至多4个细胞或者生物体、至多5个细胞或者生物体、至多6个细胞或者生物体、至多7个细胞或者生物体、至多8个细胞或者生物体、至多9个细胞或者生物体、至多10个细胞或者生物体、至多15个细胞或者生物体、至多20个细胞或者生物体、或至多25个细胞或者生物体。

[0140] 可以培养包含生物体的样品。培养可以进行各种培养时间。培养时间可以是至少30分钟、至少1小时、至少2小时、至少3小时、至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少18小时、至少24小时、至少36小时、或至少48小时。培养时间可以是至多30分钟、至多1小时、至多2小时、至多3小时、至多4小时、至多5小时、至多6小时、至多7小时、至多8小时、至多9小时、至多10小时、至多11小时、至多12小时、至多18小时、至多24小时、至多36小时、或至多48小时。可以在各种温度下进行培养。培养温度可以是至少-10℃、至少-5℃、至少0℃、至少5℃、至少10℃、至少15℃、至少20℃、至少25℃、至少30℃、至少35℃、至少37℃、至少40℃、至少45℃、至少50℃、至少55℃、至少60℃或者至少65℃。培养温度可以是至多-10℃、至多-5℃、至多0℃、至多5℃、至多10℃、至多15℃、至多20℃、至多25℃、至多30℃、至多35℃、至多37℃、至多40℃、至多45℃、至多50℃、至多55℃、至多60℃或者至多65℃。培养可以在室温进行。培养可以在37℃进行。

[0141] VIII. 测定和鉴定方法

[0142] 感兴趣的生物体和其他样品可以被各种方法鉴定。鉴定可以在样品仍然在平行样品操作系统(例如,滑动式芯片装置、微流体液滴装置、微孔阵列或者其他平行的样品操作系统)之内时进行。微流体液滴装置被描述在,例如美国专利7,129,091中,通过引用以其整体被并入本文。鉴定可以对从平行样品操作系统中取出的样品进行。

[0143] 可以通过遗传标志物选择或者鉴定感兴趣的生物体。可以通过PCR进行经由遗传标志物的鉴定。可以使用靶向感兴趣的遗传区域(例如基因、基因的组、启动子或者基因构

建体)的PCR引物来进行PCR并且PCR产物的存在表明感兴趣的遗传区域的存在。例如,生物体可以被分散至滑动式芯片上的原始样品体积、培养并且分开(图5A)。滑动式芯片的一个板可以与包含PCR试剂的滑动式芯片板组合并且反应以形成PCR产物(图5B),PCR产物的存在表明感兴趣的遗传区域的存在。可以使用等温扩增方法。遗传标志物的鉴定可以通过FISH进行。可以将靶向感兴趣的遗传区域的荧光探针添加至样品并且允许其杂交。未结合的探针可以被洗掉,并且荧光探针的存在表明感兴趣的遗传区域的存在。可以通过测序进行遗传标志物的鉴定。可以测序来自每一个样品的单一核酸分子。可以扩增来自每一个样品的核酸分子,并且可以测序扩增产物。扩增和测序可以靶向特定的区域或者可以靶向整个基因组。

[0144] 也可以使用靶向功能的方法。功能测定可以共享基于基因的方法中开发的通用工作流程。可以使用包括(但不局限于)荧光的、比色的、化学发光的或者质谱测定的测定来鉴定可以进行特定功能的微生物。若需要,此类高通量功能测定还可以直接对临床样品进行。自分开滑动式芯片产生的微生物细胞微阵列,例如,可以与一块生物组织(诸如,例如,来自肠)组合来进行功能测定。在一些情况下,来自肠的组织可以从具有用于感兴趣的功能的GFP报告基因的转基因小鼠获得。在组织与微生物细胞阵列组合并且孵育之后,被定位的GFP表达可以通过使用标准的落射荧光显微镜技术可视化。若需要,对应的集落可以随后被从第二个板取回用于另一目的,诸如感兴趣的分离物的规模放大培养。

[0145] 在一些情况下,被鉴定或者靶向的功能活性是酶的。功能活性可以生成可见的或者UV-吸收的产物。酶法可以是用于检测胆固醇氧化酶活性的CHOD-PAP方法。酶法可以是用于检测葡萄糖氧化酶活性的GOD-Perid方法。酶法可以用于检测乳糖脱氢酶活性。酶活性可以是使用纤维素降解染料的纤维素的降解。酶活性可以是使用木质素降解染料的木质素的降解。在一些情况下,功能活性通过与荧光底物的相互作用来检测。例如,可以使用N,N-二丁基苯二胺(N,N-dibutyl phenylene diamine)检测H₂S以检测硫酸盐还原生物体的活性。

[0146] 在一些情况下,被鉴定或者靶向的功能活性是抗性或者抗性的组。抗性可以是对抗生素。抗性可以是对特定生长条件,诸如温度、大气、压力、其他生物体的存在或者其他条件。鉴定可以基于在选择的条件下生长的存在、不存在、量级或者速率。

[0147] 在一些情况下,被鉴定的功能活性是对化学品的反应。反应可以是负向的,例如生长的抑制。反应可以是正向的,例如生长的促进。鉴定可以基于在选择的条件下生长的存在、不存在、量级或者速率。

[0148] IX. 气体控制

[0149] 虽然液体培养介质对于支持微生物的生长可以是重要的,控制气相的含量对于微生物培养也可以是重要的。一些微生物可以由于某些气体的存在不能生长。例如,专性厌氧菌对氧气敏感并且一旦暴露于空气中就不能生长。一些微生物需要某种类型的气体来生长。例如多数古细菌是会将CO₂同化为细胞内物质的自养生物并且在CO₂不存在时不生长。诸如来自热孢菌目(thermotogales)的氢或者来自硫酸盐还原细菌的硫化氢的废产物的积累对于它们的生长可以是抑制性的。

[0150] 可以通过将装置定位于具有受控的环境的室,诸如厌氧室,来实现气体控制。例如,在厌氧培养的情况下,气相中氧的分压通常被厌氧室或者亨盖特滚管技术(Hungate roll tube technique)控制。厌氧室的气相中的氧气可以利用钯催化剂被氢还原。此方法

与来自人类肠道的多数微生物的培养相容,并且允许琼脂板的使用。亨盖特滚管方法被广泛使用来培养更严格的厌氧菌诸如产甲烷菌,其中玻璃管和丁基橡胶瓶塞的使用可以有效地阻止氧气扩散入容器。可以使用任何类型的环境来提供用于培养的环境,所述环境可以是密封的容器或者瓶。例如,可以将装置放置在玻璃瓶内,可以随后将期望的一种或更多种气体注入其中。

[0151] 可以通过将气体供给通道合并并在装置自身上来实现气体控制。例如,滑动式芯片装置(图6A)可以具有具有油相和水相的孔。可以将滑动式芯片装置设计成包括气体供给通道(图6B)。通道和孔之间的距离可以是几百微米的量级,导致分钟量级的氧气通过装置基体的特征性扩散时间。

[0152] 气体控制可以通过增加装置的组件之间的空隙的大小来实现。具有相对的板的滑动式芯片装置可以具有通过添加或者装配垫片或者桩来增加的板之间的距离。例如,板基体可以被刻蚀以生成增加板之间的空隙距离的桩结构。可选择地,可以通过添加诸如金属、塑料、氧化物或者光阻材料等材料至板的表面来制造桩或者垫片。桩或者垫片的高度可以小于或者等于约100nm、小于或者等于约200nm、小于或者等于约400nm、小于或者等于约500nm、小于或者等于约700nm、小于或者等于约900nm、小于或者等于约1.5 μ m或者小于或者等于约2 μ m。桩的高度可以大于或者等于约100nm、大于或者等于约200nm、大于或者等于约400nm、大于或者等于约500nm、大于或者等于约700nm、大于或者等于约900nm、大于或者等于约1.5 μ m或者大于或者等于约2 μ m。可以通过湿法化学刻蚀(wet chemical etching)诸如用氢氟酸来制造垫片或者桩。可以通过等离子刻蚀(plasma etching)制造垫片或者桩,诸如通过反应性离子刻蚀或者深反应性离子刻蚀(reactive ion etching or deep reactive ion etching)。可以通过光刻、软刻蚀、激光烧蚀、微模制、雕刻或者其他微制造技术制造垫片或者桩。空隙可以允许增加气体从外部气氛、从芯片上气体供给通道或者两者的转移。基于由不同空隙距离造成的气体转移,细胞生长可以变化。

[0153] 可以通过对装置材料的选择来实现气体控制。不同的装置材料,诸如玻璃、PDMS、PMMA、其他塑料和金属,允许扩散穿过基体的不同速率。若使用油相,不同的油,诸如全氟化油、矿物油或者其他的油,允许不同速率的扩散。

[0154] 气体控制可以包括宽范围的单一气体或者气体的组合。气体的实例包括O₂、CO₂、CO、N₂、NO、NO₂、H₂O、空气或者其他气体。可以以不同的压强,包括大气压强、高于大气压强或者低于大气压强提供气体控制。

[0155] X. 化学通讯控制

[0156] 装置可以被设计为在界定的体积中包含分析物,同时允许界定的体积之间的化学通讯。例如,一对孔可以被桥接器(bridge)连接(图10B、图10D),允许扩散的化学连接同时保持细胞被包含在它们各自的孔中,而不是每个孔的内容物被完全分离(图10A、图10C)。

[0157] XI. 芯片上稀释

[0158] 稀释可以在芯片上进行。稀释可以是线性的。稀释可以是对数的。稀释可以包括单一的稀释步骤。稀释可以包括多重稀释步骤。

[0159] 稀释可以以滑动式芯片装置进行。稀释可以通过驱动滑动式芯片使样品的体积与稀释剂的体积接触来进行。稀释的多重步骤可以通过多次驱动滑动式芯片将样品的体积和稀释剂的一系列体积接触来进行。滑动式芯片孔表面可以是亲水的或者是疏水的。稀释可

以在一个装置或者多个装置上进行。

[0160] 混合可以发生在稀释步骤之间。混合可以是主动的,经由施加诸如超声、涡流、振荡、搅拌、电水动力的混合力,在体积内生成流或者其他手段。混合可以是被动的,诸如经由允许足够时间的扩散混合。样品的体积和稀释剂的体积可以在体积上相等,或者可以在体积上不同。

[0161] XII. 自动化

[0162] 本公开内容中提供的方法、装置和系统可与自动化设备或者机器人一起使用。用于平行样品操作的系统和装置(诸如滑动式芯片装置)的制造,可以是自动化的。将样品预处理和装载到装置上可以是自动化的。通过分开原始样品的样品的平行化可以是自动化的。分开或者驱动滑动式芯片组件以驱动装置上操作,诸如混合、分开、稀释,允许其间的化学通讯可以是自动化的。样品的培养或者扩增可以是自动化的。将滑动式芯片板分开以产生平行化的样品可以是自动化的。进行测定或者其他的技术来鉴定包含感兴趣的样品的界定的体积可以是自动化的。取回感兴趣的样品或者进行芯片洗涤来取回并且汇集所有样品可以是自动化的。控制包括气体气氛、温度以及其他参数的样品环境可以是自动化的。鉴定在不同的基体上匹配样品组可以是自动化的,例如使用计算机化的图像分析方法。

[0163] XIII. 病原体诊断

[0164] 本文的方法和装置可以用于检测、定量或者分析病原体微生物和诊断与这些病原体相关的状况。细菌病原体的实例包括但不限于嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和其他物种(spp.);炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*);蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*);产肉毒杆菌神经毒素的梭菌属(*Clostridium*)物种;流产布鲁氏杆菌(*Brucella abortus*);马耳他布鲁氏杆菌(*Brucella melitensis*);猪布鲁氏杆菌(*Brucella suis*);鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia mallei*) (旧称鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas mallei*));类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*) (旧称类鼻疽假单胞菌(*Pseudomonas pseudomallei*));空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*);鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*);肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*);肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*);产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*);粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*);*Coccidioides posadasii*;反刍动物考德里氏体(*Cowdria ruminantium*) (心水病);伯纳特氏立克次氏体(*Coxiella burnetii*);致泻性大肠杆菌群(Enterovirulent *Escherichia coli* group) (EEC群) 诸如产肠毒素的大肠杆菌(*Escherichia coli*-enterotoxigenic) (ETEC)、致肠病的大肠杆菌(*Escherichia coli*-enteropathogenic) (EPEC)、肠出血性大肠杆菌0157:1-17(*Escherichia coli*-0157:H7 enterohemorrhagic) (EHEC) 和肠侵入性大肠杆菌(*Escherichia coli*-enteroinvasive) (EIEC);埃立克体属(*Ehrlichia* spp.) 诸如查菲埃立克体(*Ehrlichia chaffeensis*);土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*);嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*);非洲柑橘黄龙病菌(*Liberobacter africanus*);亚洲柑橘黄龙病菌(*Liberobacter asiaticus*);单核细胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*);各种肠道细菌(miscellaneous enterics) 诸如克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、变形杆菌属(*Proteus*)、枸橼酸杆菌属(*Citrobacter*)、产气杆菌属(*Aerobacter*)、普罗维登斯菌属(*Providencia*) 和沙雷氏菌属(*Serratia*);牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*);结核分枝杆菌(*Mycobacterium*

tuberculosis);山羊支原体 (*Mycoplasma capricolum*);蕈状支原体丝状亚种 (*Mycoplasma mycoides ssp mycoides*);玉米霜霉病菌 (*Peronosclerospora philippinensis*);大豆锈菌 (*Phakopsora pachyrhizi*);类志贺毗邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*);青枯雷尔氏菌小种3生物变种2 (*Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2);普氏立克次氏体 (*Rickettsia prowazekii*);立氏立克次氏体 (*Rickettsia rickettsii*);沙门氏菌属 (*Salmonella spp.*);*Schlerophthora rayssiae varzeae*;志贺氏菌属 (*Shigella spp.*);金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*);链球菌属 (*Streptococcus*);马铃薯癌肿病菌 (*Synchytrium endobioticum*);非01型霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae non-01*);01型霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae 01*);副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)和其他弧菌属 (*Vibrios*);创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*);水稻黄单胞菌 (*Xanthomonas oryzae*);叶缘焦枯病菌 (*Xylella fastidiosa*) (柑橘杂色萎黄病菌株);小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*)和假结核耶尔森氏菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)和鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*)。

[0165] 生物体的其他实例包括病毒,诸如:非洲马瘟病毒;非洲猪瘟病毒;赤羽病病毒;禽流感病毒(高致病性);Bhanja病毒;蓝舌病毒(外来种);骆驼痘病毒;猕猴疱疹病毒1型;基孔肯雅病毒 (*Chikungunya virus*);经典猪瘟病毒;冠状病毒 (SARS);克里米亚刚果出血热病毒 (Crimean-Congo hemorrhagic fever virus);登革热病毒;杜比病毒;埃博拉病毒;脑炎病毒诸如东方马脑炎病毒、日本脑炎病毒、墨累谷脑炎 (Murray Valley encephalitis) 和委内瑞拉马脑炎 (Venezuelan equine encephalitis) 病毒;马源性麻疹病毒;Flexal病毒;口蹄疫病毒;杰米斯顿病毒 (*Germiston virus*);山羊痘病毒;汉坦病毒或其他汉坦病毒属病毒;亨德拉病毒 (*Hendra virus*);伊斯科考病毒 (*ssyk-kul virus*);科坦戈病毒 (*Koutango virus*);拉沙热病毒 (*Lassa fever virus*);羊跳跃病病毒 (*Louping ill virus*);结节性皮肤病病毒 (*Lumpy skin disease virus*);淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒;恶性卡他热病毒 (*Malignant catarrhal fever virus*, 外来种);马尔堡病毒 (*Marburg virus*);马亚罗病毒 (*Mayaro virus*);曼那角病毒 (*Menangle virus*);猴痘病毒;穆坎布病毒 (*Mucambovirus*);新城疫病毒 (*Newcastle disease virus*, WND);尼帕病毒 (*Nipah Virus*);诺瓦克病毒群 (*Norwalk virus group*);奥罗普切病毒 (*Oropouche virus*);奥轮谷病毒 (*Orungo virus*);小反刍动物瘟疫病毒 (*Peste Des Petits Ruminants virus*);皮里病毒 (*Piry virus*);洋李痘马铃薯Y病毒 (*Plum Pox Potyvirus*);脊髓灰质炎病毒;马铃薯病毒;玻瓦桑病毒 (*Powassan viru*);裂谷热病毒 (*Rift Valley fever virus*);牛瘟病毒 (*Rinderpest virus*);轮状病毒;塞姆利基森林病毒 (*Semliki Forest virus*);绵羊痘病毒;南美洲出血热病毒如Flexal、瓜纳瑞托、胡宁、马丘坡、和萨比亚病毒;斯庞德温尼病毒 (*Spondweni virus*);猪水疱病病毒;蜱媒脑炎群(黄病毒)病毒如中欧蜱媒脑炎、远东蜱媒脑炎、俄罗斯春夏脑炎、夸赛纳森林病 (*Kyasanur forest disease*), 和鄂木斯克出血热 (*Omsk hemorrhagic fever*) 病毒;重型天花病毒(天花病毒);轻型天花病毒(类天花);水泡性口炎病毒(外来种);韦塞尔斯布朗病毒 (*Wesselbron virus*);西尼罗病毒;黄热病病毒;和南美洲出血热病毒诸如胡宁、马丘坡、萨比亚、Flexal和瓜纳瑞托病毒。

[0166] 生物体的其他实例包括寄生原生动物和蠕虫,诸如:棘阿米巴属 (*Acanthamoeba*) 和其他独立生存的变形虫;异尖属 (*Anisakis sp.*) 和其他相关的蠕虫蛔虫 (*Ascaris*

lumbricoides) 和鞭虫 (*Trichuris trichiura*); 小球隐孢子虫 (*Cryptosporidium parvum*); 环孢子虫 (*Cyclospora cayetanensis*); 裂头属 (*Diphyllbothrium* spp.); 溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*); 真圆线虫属 (*Eustrongylides* sp.); 蓝氏贾第鞭毛虫 (*Giardialamblia*); 侏形吸虫属 (*Nanophyetus* spp.); 血吸虫属 (*Shistosoma* spp.); 刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*); 丝虫线虫 (*Filarial nematodes*) 和毛线虫属 (*Trichinella*)。分析物的其他实例包括过敏原诸如植物花粉和小麦谷蛋白。

[0167] 生物体的其他实例包括真菌, 诸如: 曲霉属 (*Aspergillus* spp.); 皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*); 念珠菌属 (*Candida*); 粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*); *Coccidioides posadasii*; 新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*); 荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*); 玉米锈病病菌 (*Maize rust*); 稻瘟病病菌 (*Rice blast*); 水稻褐斑病病菌 (*Rice brown spot disease*); 黑麦瘟病病菌 (*Rye blast*); 申克孢子丝菌 (*sporothrixschenckii*); 和小麦真菌。

[0168] XIV. 微生物组 (microbiome) 诊断和分离

[0169] 本文描述的方法学和装置可于基于微生物组的组成和功能的个人化的人类疾病诊断方面。影响数百万美国人的许多疾病也可以与微生物组相关, 所述疾病诸如IBD、感染、糖尿病、自身免疫性疾病和肥胖症与微生物组有关系。其他过程诸如过敏、痢疾、乳糖不耐受、胆固醇水平的控制、血压的控制、免疫功能和感染、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、炎症、压力下的细菌生长、肠易激综合征和结肠炎、HIV感染和其他病毒感染、坏死性小肠结肠炎、维生素生产、湿疹、细菌性阴道炎、药物代谢和副作用、艰难梭菌 (*Clostridium Difficile*) 感染、自闭症和其他复杂的神经系统失调。宿主的健康或者患病状态可以使用分类学的或者功能的谱 (profile) 来分类 (参见Shi Huang, Rui Li, Xiaowei Zeng, Tao He, Helen Zhao, Alice Chang, Cunpei Bo, Jie Chen, Fang Yang, Rob Knight, Jiquan Liu, Catherine Davis和Jian Xu, "Predictive modeling of gingivitis severity and susceptibility via oral microbiota," ISME J advance online publication, March 20, 2014; doi:10.1038/ismej.2014.32 [Epub ahead of print] 和 Nicola Segata, Jacques Izard, Levi Waldron, Dirk Gevers, Larisa Miropolsky, Wendy S Garrett和Curtis Huttenhower, "Metagenomic biomarker discovery and explanation," *Genom Biol.* 2011; 12 (6) :R60; doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60)。这可以通过以下来进行: 获得包含来自受试物的活的生物体的样品, 将这个样品分布在微制造的基体上, 使包括细菌、真菌、古细菌和病毒和原生生物的至少一种微生物能够生长, 进行遗传或者功能测定来检测标志分类群 (markertaxa) 或者功能的相对的和/或绝对的丰度, 并且使用这些信息来在后期确定或者预测宿主的健康和疾病状态。在一些情况下, 此方法和装置还可以用于确定宿主的历史并且可用于法医学应用方面 (参见Noah Fierer, Christian L. Lauber, Nick Zhou, Daniel McDonald, Elizabeth K. Costello和Rob Knight, "Forensic identification using skin bacterial communities," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010 Apr 6; 107 (14) :6477-81. doi:10.1073/pnas.1000162107)。

[0170] 通过本文描述的方法分离微生物可以在影响数以百万计的人的状况的背景中经由以治疗和预防的模式调节人类肠道失调来改善生活质量和减少医疗保健的成本 (参见

Elaine O Petrof, Gregory B Gloor, Stephen J Vanner, Scott J Weese, David Carter, Michelle C Daigneault, Eric M Brown, Kathleen Schroeter 和 Emma Allen-Vercocoe, "Stool substitute transplant therapy for eradication of *Clostridium difficile* infection: 'ReP00Pulating' the gut," *Microbiome*. 2013 Jan 9; 1(1):3. doi:10.1186/2049-2618-1-3), 所述状况包括但不限于 IBD、感染、糖尿病、自身免疫性疾病和肥胖症。许多状况与微生物组相关并且可以被以使用本文描述的方法学分离的微生物和微生物群落治疗性地和/或预防性地治疗。这些包括但不限于过敏、痢疾、乳糖不耐症、胆固醇水平的控制、血压控制、免疫功能和感染、幽门螺杆菌、炎症、压力下的细菌生长、肠易激综合症和结肠炎、HIV 感染和其他病毒感染、坏死性小肠结肠炎、维生素生产、湿疹、细菌性阴道炎、药物代谢和副作用, 艰难梭菌感染、自闭症和其他复杂的神经系统失调。这种方法学可以用于改善、稳定、治疗和/或预防、或减少或延迟感染、疾病、处理、中毒或具有肠功能障碍组成部分的状况或副作用的症状, 或者用于改善、治疗和/或预防便秘, 用于治疗腹痛、非特异性腹痛或痢疾、由药物副作用或心理状态或克罗恩病、中毒、毒素或感染造成的腹泻、毒素介导的旅行者腹泻或梭菌或产气荚膜梭菌或艰难梭菌感染或与梭菌感染有关的伪膜性结肠炎, 或者用于防止或减少或延迟以下疾病的症状或改善或治疗患有其的个体: 脊柱关节病、脊椎关节炎或骶髂关节炎(一个或两个骶髂关节的炎症); 肾炎综合征; 具有肠道或小肠组成部分的炎症或者自身免疫性疾病; 狼疮; 肠易激综合症(IBS 或痉挛性结肠); 或结肠炎; 溃疡性结肠炎和克罗恩病结肠炎; 便秘; 自闭症; 退行性神经系统疾病; 肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS), 多发性硬化症(MS) 或帕金森病(PD); 肌阵挛肌张力障碍; 斯坦纳特病; 近端肌强直的肌病; 自身免疫性疾病, 类风湿性关节炎(RA) 或幼年特发性关节炎(HA); 慢性疲劳综合症; 良性肌痛性脑脊髓炎; 慢性疲劳免疫功能紊乱综合症; 慢性传染性单核细胞增多; 流行性肌痛性脑脊髓炎; 肥胖; 低血糖, 前驱糖尿病综合症, I 型糖尿病或 II 型糖尿病; 特发性血小板减少性紫癜(ITP); 急性或慢性过敏反应; 荨麻疹(hives)、皮疹、风疹(urticaria) 或慢性风疹; 和/或失眠或慢性失眠、大发作癫痫或小发作癫痫。可以使用本文描述的方法治疗性地或者预防性地治疗人类和动物两者的状况。

[0171] 肠道微生物群的主要变化在如下疾病中显著减少人们的寿命和生活质量, 结直肠癌(A.C.Society Colorectal Cancer Facts and Figures 2008-2010; American Cancer Society: Atlanta, 2008.) 和炎性肠病(IBD), 仅该炎性肠病在美国影响多达140万人(E.V.Loftus. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004, 126, 1504-1517)。炎性肠病(IBD) 包括溃疡性结肠炎和克罗恩病两种。此外, 糖尿病、肥胖和自身免疫性疾病也与肠道微生物组中的变化关联(L.Wen, R.E.Ley, P.Y.Volchkov, P.B.Stranges, L.Avanesyan, A.C.Stonebraker, C.Hu, F.S.Wong, G.L.Szot, J.A.Bluestone, J.I.Gordon 和 A.V.Chervonsky. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. 2008, 455, 1109-1113)。微生物组的不良变化包括有益菌群的损失——例如, 那些产生为调节宿主上皮的基因表达的信号并且充当其主要营养物的丁酸盐的菌群的损失——以及病原微生物的爆发(bloom), 诸如产生显著影响宿主的强效信号硫化氢(H_2S) 的硫酸盐还原细菌。当前益生菌混合物的使用在临床试验中具有令人惊讶的有限的成功(Vogel, G. Clinical trials. Deaths prompt a review of experimental

probiotic therapy. *Science* 319,557 (2008). O'Mahony, L., Feeney, M., O'Halloran, S., Murphy, L., Kiely, B., Fitzgibbon, J., Lee, G., O'Sullivan, G., Shanahan, F. & Collins, J.K. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment Pharmacol Ther* 15,1219-1225 (2001)。

[0172] 微生物可以从诸如皮肤或肠道的身体部位或从诸如粪便、唾液、或生殖器擦拭样品 (genital swab sample) 的身体样本中分离。微生物可以从患者或与患者在一个或多个诸如遗传谱、年龄、性别、病史、饮食或环境的特征上匹配的捐赠者分离。微生物分离可以预防性地 (pre-emptively) (在疾病发展之前), 任选地保存微生物以供将来使用。微生物可以在疾病进展的任何阶段被分离。可以被分离用于这些目的的微生物包括细菌、真菌、古细菌和病毒、原生生物。微生物也可以从包括土壤环境、建筑环境、海洋环境的环境中分离。

[0173] 微生物的分离可以经由遗传测定指导。例如, 与微生物的特定的物种或者属相关的标记基因 (诸如16S rRNA基因) 可以用于靶向分离 (Schloss P, Handelsman J (2005) *Metagenomics for studying unculturable microorganisms: Cutting the gordian knot*. *Genome Biology* 6 (8):229. Fodor AA, DeSantis TZ, Wylie KM, Badger JH, Ye Y, Hepburn T, Hu P, Sodergren E, Liolios K, Huot-Creasy H, Birren BW, Earl AM (2012) The "most wanted" taxa from the human microbiome for whole genome sequencing. *PLoS ONE* 7 (7):e41294. Kennedy J, O'Leary ND, Kiran GS, Morrissey JP, O' Gara F, Selvin J, Dobson ADW (2011) Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. *J. Appl. Microbiol.* 111 (4):787-799. Rooks DJ, McDonald JE, McCarthy AJ (2012) Chapter twenty-metagenomic approaches to the discovery of cellulases. *Methods in enzymology*, ed Harry JG (Academic Press), Vol Volume 510, pp 375-394. Reddy BVB, Kallifidas D, Kim JH, Charlop-Powers Z, Feng Z, Brady SF (2012) Natural product biosynthetic gene diversity in geographically distinct soil microbiomes. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (10):3744-3752. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, Griffin NW, Lombard V, Henrissat B, Bain JR, Muehlbauer MJ, Ilkayeva O, Semenkovich CF, Funai K, Hayashi DK, Lyle BJ, Martini MC, Ursell LK, Clemente JC, Van Treuren W, Walters WA, Knight R, Newgard CB, Heath AC, Gordon JI (2013) Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341 (6150). Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (34):13780-13785)。例如, 功能基因 (例如, 与碳水化合物降解、粘膜粘附、短链脂肪酸产生、诸如多聚糖 A、PSA 的脂多糖的产生、维生素的产生、抗炎化合物的产生、非核糖体肽的产生、聚酮化合物天然产物的产生相关的基因) 可用于靶向生物体的分离和培养。此外, 可以使用功能测定, 包括用于酶活性的测定。

[0174] 靶基因可以通过宏观基因组分析来确定, 例如, 使用高通量测序技术。可以靶向其他的生物体, 诸如线虫和类似的生物体。在临床环境中用于个性化细菌分离的简单技术可

以为改进诊断疾病的能力创造机会和带来具有增强的预防和治疗性质的益生菌治疗的开发。这种方法使用细菌疗法以健康的或者期望的微生物群取代患者中的致病性或者不期望的生物体。

[0175] 粪便微生物群移植可以用于治疗疾病(诸如,例如艰难梭菌感染)。粪便微生物群移植将来自健康的捐赠者的粪便物质递送至患者来取代肠道微生物群中不期望的生物体。然而,这种方法可以是冒险的,因为病原体可能会存在于移植的粪便材料中并且对于免疫功能不全的患者可以是危险的。每一个个体具有可能包含健康的或者不期望的肠道微生物群的个性化的肠道微生物群。可以从人体获得含有活的生物体的样品。使用这种方法可以开发个性化的益生菌。在一个实例中,可以在疾病状态前从个体受试者或者患者获得生物体、将其分离以及储存并且递送回同一受试者并且将其用来治疗疾病或者改善个体的健康情况。生物体还可以从亲属获得并且施用于患者。由于在遗传、饮食和生活习惯上匹配,从亲属获得的生物体对患者可能是有利的。生物体还能够从与患者在例如,种族、遗传、饮食、体质指数和其他参数的某些方面匹配的捐献者获得。可以使用从患者、亲属或其他捐献者获得的生物体的任何组合用于本方法来治疗患者的疾病或者改善患者的健康状况。

[0176] 不依赖于培养的技术可以通过显露一个人的微生物的遗传特征为微生物生态学提供见解。它可以表明,某些微生物可能影响宿主表型,诸如肥胖、炎症和胃肠道的完整性。来自高通量测序的数据集表明了具有高生物学重要性的微生物靶。这些靶可包括但不限于,淤泥真杆菌(*Eubacterium limosum*)、*Roseburia intestinalis*、普拉氏梭杆菌(*F.prausnitzii*)、罗氏菌属(*Roseburia* spp.)、直肠真杆菌(*Eubacterium rectale*)、卵圆拟杆菌(*B.ovatus*)、*P.distasonis*、挑剔真杆菌(*Eubacterium eligens*)、凸腹真杆菌(*Eubacterium ventriosum*)、罗氏菌属(*Roseburia* spp.)、*Blautia* spp.、*Dorea* spp.、*R.torques*、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、庞大真杆菌(*Eubacterium hadrum*)、*Anaerostipes coli*、*Clostridium* spp.*aldenense*、*Clostridium* spp.*Hathewayi*、*symbiosum*、*orbiscindens*、*thermocellum*、*citroniae*、卵形瘤胃球菌(*Ruminococcus obeum*)、*Ruminococcus productus*、扭链瘤胃球菌(*Ruminococcus torques*)、布氏瘤胃球菌(*Ruminococcus bromii*)、*Roseburia inulinovorans*、*Blautia coccoides*、*Dorea* spp.、萨特氏菌属(*Sutterella* spp.)、*Dialister invisus*、*Blautia producta*和假链状双歧杆菌(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)。这些靶还可以是真菌、古细菌、病毒或原生生物。本文描述的方法可以用于从临床样本遗传靶向分离和培养这些微生物体。样品可能来自患者、亲戚和/或其他捐赠者,可以分布在含有体积的微制造基体上。通过使用以下两个方法的一个或者两者可以实现至少一个靶微生物体的生长:(i) 使用只有少量可用的生长基体鉴定微生物的培养条件以及使用“芯片洗涤”技术校正抽样偏倚;和(ii) 通过由分开技术来生成独立地可寻址的复制微生物培养物的阵列,能够进行芯片上的遗传测定同时也保存活的细菌细胞用于随后的期望的微生物的规模放大培养。使用本方法可以分离一种或更多种靶微生物体。所述感兴趣的微生物的至少一种可以被递送至人类以防治、治愈或者治疗疾病/改善健康,例如,一种实现的方式是通过结肠镜检查。例如,可以撤回抗生素治疗(例如,持续两天)并且可以使患者在结肠镜检查之前的傍晚接受标准的结肠清洁。第二天早晨在结肠镜检查期间,可以使一半(例如50mL)的包含至少一种所述感兴趣的微生物体的溶液沉积在盲肠/近端升结肠的区域并且另一半在撤回结肠镜时可以喷洒整个横结肠。可以指示

患者食用富含纤维的饮食并且不消耗包含益生菌的产品。研究护士可以追踪患者获得其粪便样本并且严密监控他们的临床反应。

[0177] XV. 应用

[0178] 本公开内容中描述的方法和组合物可以用于感兴趣的生物体的鉴定。可以将样品分散在界定的体积中并且将其培养。可以平行化样品,并且可以分析一组平行化的样品以鉴定包含感兴趣的生物体的样品可以使用如本申请描述的各种方法来分析。鉴定感兴趣的样品后,可以从第二组平行化的样品选择对应样品。

[0179] 本公开内容中描述的方法和组合物可以用于鉴定生物体的生长条件。可以将样品分散在多重装置上的界定的体积中。每一个装置可以经历不同的条件,诸如生长培养基、温度、气体气氛和/或压力。在多种条件的培养之后,可以将样品平行化并且可以通过一组平行化的样品的分析鉴定在给定的条件的组之下表现出生长的那些样品。

[0180] 本公开内容中描述的方法和组合物可以用于遗传分析。例如,可以将包含核酸的样品分散在用于数字PCR的装置上的界定的体积内。可以进行数字PCR,并且可以将样品平行化。那些具有阳性信号的样品可以具有一组用于测序的平行化的样品。

[0181] 本公开内容中描述的方法和组合物可以用于乳腺炎(牛或者人类)的研究或者快速诊断。可以从乳腺组织、乳汁或者其他来源获取样品并且将其分散在界定的体积内并且将其培养。可以将样品平行化,并且可以分析一组平行化的样品来鉴定与乳腺炎相关的生物体。可以在抗生素的存在下进行培养来测试抗生素敏感性。

[0182] 在本公开内容中描述的方法和组合物可以用于对硫酸盐还原生物体和其他引起管道腐蚀(pipeline corrosion)的生物体的研究、快速生长、检测和/或鉴定。可以从管道、生物体的肠道或者另一来源取样,将其分散在界定的体积中,并且将其培养。可以将样品平行化,并且可以分析一组平行化的样品来鉴定与硫酸盐还原或者管道腐蚀相关的生物体。

[0183] 可以将来自样品(诸如环境样品或者临床样品)的混合的微生物群落中(例如细菌、古细菌、真菌、病毒、原生生物或者其他如本文描述的)的单一细胞或者许多细胞引入装置中并且将其包封入体积内。可以在体积内部扩增(例如,使用多重替换扩增或者PCR、RT-PCR或者等温扩增)遗传材料(例如DNA或者RNA)。可以分离两个基体以取回扩增的材料。此方法可以用于单细胞基因组学和转录组学。

实施例

[0184] 实施例1-用于多形拟杆菌的气体控制

[0185] 用玻璃基体制造具有用于细胞培养的孔的滑动式芯片装置。多形拟杆菌和庖肉培养基(Cooked Meat Medium)细胞培养基被装载至厌氧室内的装置上。将装置密封并且移出用于成像,随后放回室中孵育。在37℃下孵育装置持续8小时。多形拟杆菌细胞生长至密集的微菌落(图7)。

[0186] 实施例2-通过纳米桩对大肠杆菌的气体控制

[0187] 制造具有用于细胞培养的室的滑动式芯片装置(图8A、图8B)。通过将一些装置浸入稀的缓冲氢氟酸(HF)在其上制造亚微米级别的纳米-桩(图8C)。将荧光素标记的大肠杆菌菌株分别装载至无纳米桩、带有400nm的纳米桩和900nm的纳米桩的装置上(图8D-图8F),并且使用整合的荧光强度来定量生长。在此种特定的模型系统中,氧气的供应限制大肠杆

菌的生长。通过调整两个玻璃板之间的间隙并且因而控制通过油相的气体交换,实现更均一的大肠杆菌的生长。

[0188] 实施例3-通过密封容器的气体控制

[0189] 设计并且制造包含1600个孔,每孔6nL的滑动式芯片装置,使其适合于放入100-mL的Corning玻璃瓶(图9A、图9B)。装载了细胞和培养基的装置被放置于瓶中,并且将具有不同量的氧气(0%的 O_2 、1%的 O_2 和3%的 O_2)的混合气体注入瓶中。两种模型微生物被培养在此种设置中。培养严格的厌氧菌物种多形拟杆菌以测试缺氧瓶中的氧气的存在。在0%的氧气瓶中多形拟杆菌的生长确认容器被良好地密封(图9C,顶部行的第一列)。当注入氧气时多形拟杆菌不能生长。作为阳性对照,在这三种条件下培养粪肠球菌(图9C,底部行)。粪肠球菌在所有三种条件下生长。

[0190] 实施例4-A. *caccae*和多形拟杆菌在芯片上的共培养

[0191] 如在图10中所示设计用于共培养的滑动式芯片装置。此装置提供纳米深度的亲水桥接器,该亲水桥接器允许微孔之间通过扩散的化学通讯,但是足够窄以防止微生物细胞的混合。在以菊粉作为唯一碳源的最小培养基中培养的厌氧菌*Anaerostipes caccae* (A. *caccae*)在与多形拟杆菌共培养时生长,但是在单独培养时不生长。A. *caccae*和多形拟杆菌被装载至滑动式芯片装置的扩散地连接的孔中并且以最小培养基培养。为了比较, A. *caccae*被装载至一对扩散地连接的孔的两者中并且以最小培养基培养。与包含多形拟杆菌的孔扩散地相连的包含A. *caccae*的孔(图11,顶部),表现出比与包含A. *caccae*的孔扩散地相连的包含A. *caccae*的孔(图11,底部)显著地更多的生长。

[0192] 实施例5-分开不具有琼脂糖的滑动式芯片的操作

[0193] 设计并且制造含有1,000个区室的滑动式芯片装置。每一个区室包括在第一个板上的一个孔和在第二个(相对的)板上的重复孔。在培养期间,两个孔被合并以允许单一的区室内的菌落生长。随后分离两个板,并且每一个菌落被分开成两个,在分开的芯片的每一面上生成每一个菌落阵列的相同拷贝以致一个拷贝可以用于需要细胞裂解的破坏性的测定,并且另一个拷贝可以用于保存活的微生物体。

[0194] 为促使此种技术过程的可视化,以红色染料实验阐明培养滑动式芯片的操作(图12)。为了清晰起见,以下叙述既描述了在滑动式芯片的操作期间细胞和菌落发生了什么,并且还指出红色染料实验的相应图像。设计装置使滑动式芯片的一面上的孔与另一个板的通道重叠并且每一个板包括孔和通道两者(图12A)。首先,包含感兴趣的细胞的悬液被装载至通道和孔中。此装载在图12B中显示为红色染料的装载。之后,装载通道和孔通过滑动被分离,并且单一细菌细胞被随机限制在孔中。在芯片的两面上的重复孔合并为一个区室。此步骤被显示为红色染料溶液的流体体积的形成(图12C)。通过用真空吹扫移出装载通道中的样品以便空气会装填通道以支持细菌生长(图12D)。观察到,空气可以被引入通道并且水性溶液(例如,红色染料的水性溶液)被保留在孔中并且不被真空移出。之后孵育装置以使细菌菌落生长。为使在孵育期间油和水的损失最小化,将装置放置在以油和水的蒸汽饱和的培养皿中。在随后的分开之前,油被装载至装置通道中以代替空气(图12E)。两个板被随后滑动分开以分离组成每一个区室的两个孔(图12F)。芯片被设计使得顶部的板和底部的板上的穿过的孔在这个位置上是对齐的,由此装置可以被放置在固定器上用于控制的分开。

[0195] 通过用真空移出流体,将空气引入进装载通道。因为滑动式芯片是非绑定的,两个半分分(two halves)之间的间隙可以充当油的储器,并且观察到当释放真空,油会流回至通道。为了维持气体供应并且防止油回流至通道,进行重复的吹扫,在装载样品之前吹扫三次到五次(图12A)足够防止油在培养期间回流。

[0196] 在分离过程期间,流体体积可能从结构上被部分地释放。在同一时间,被用于防止流体体积的蒸发的不相混的油可能流进芯片的间隙中并且引起流体体积的融合和交叉污染。此外,滑动式芯片的顶部的板和底部的板可能被移动和未对齐。为了解决这些问题,设计了固定器(图1和图2A)来保持顶部的板和底部的板在分离期间不水平地移动。通过标准的机械加工制造固定器。用于对齐滑动式芯片的三个销被插入固定器内。固定器和顶部板之间的两个玻璃垫片是由1mm厚的显微镜载玻片切割成小片做成的并且被用5-min的环氧树脂粘至固定器的边缘来制备的。底部板的边缘还被移除以适合具有玻璃垫片的固定器的底部部分。固定器的中心部分被切掉以方便成像。制造滑动式芯片上的通孔以将滑动式芯片和固定器对齐。界定通孔的位置的标记被并入光掩模的设计中,并且随后通过光刻和湿刻蚀被转移至装置。为了制造通孔,首先使用蚀刻标记将装置与激光台对齐,随后使用75-mm镜头通过以100mJ的恒定能量模式和80Hz的重复速率的激光机械加工(Resonetics RapidX250system)将其烧蚀。在十四烷油浴下分离滑动式芯片以防止蒸发并且分离通过重力实现。

[0197] 在分开期间,油通过两个玻璃板之间的间隙进入滑动式芯片。由于此油流,滑动式芯片上的微结构不再能保持每一个流体体积的位置。虽然固定器可以保持两片玻璃板良好对齐,但微孔中的水性流体体积也许不会留在与分开之前同样的位置上(图13)。流体体积可以被油流推出微孔,或者被卡在装置的相对面上。

[0198] 实施例6-分开具有琼脂糖的滑动式芯片的操作

[0199] 为了保持微孔中的流体体积并且最小化来自油流的剪切的影响,添加极低胶凝温度的琼脂糖以增加如在实施例5中描述的滑动式芯片系统中流体体积的粘性。琼脂糖的添加不抑制细菌生长或者复制拷贝的生成,如图14B中所示。趁热(约37℃)将1%的琼脂糖水溶液装载至滑动式芯片来测试这一设置是否可以在分开期间将流体体积保持在微孔中。随后将装置在10℃冷却板上孵育使琼脂糖胶凝的同时保持其在十四烷的熔点(8℃)之上。随后在将滑动式芯片装置置于固定器上之后的3分钟之内进行分开。流体体积的形状在分开期间改变,表明流体体积从微结构中部分地释放(图2B和C)。此形状改变不是由于流体体积的蒸发,因为流体体积形状可以通过将两个板夹回到一起来恢复。整个装置的2,000个孔被用立体镜分析(图2D显示了装置的一部分)并且在分开期间未观察到损失的流体体积或者孔之间的交叉污染。随后以从0.3%至2%变化的琼脂糖的浓度进行以上步骤。尽管使用1%的琼脂糖进行一些预实验,发现0.5%是给出可靠结果的最小的浓度。

[0200] 实施例7-临床活检样本的培养

[0201] 在厌氧室中使用补充有0.5%超低胶凝温度琼脂糖的AM2培养基制备滑动式芯片装置并且使用来自获得自健康人类志愿者的结肠的粘膜活检的微生物悬液的微生物装载厌氧菌的多样的细菌群落。随后装置在厌氧室中37℃下孵育持续8天。之后,以显微镜对装置成像以将生长中的微生物菌落可视化。观察到来自获得自健康的人类志愿者的结肠的粘膜活检的微生物悬液的细菌在滑动式芯片上生长。并且,临床样品中生长迅速的和生长缓

慢的细菌在滑动装置上被成功地分离(图14A)。此外,若生长之后原始的单细胞产生由多于10个细胞组成的菌落,滑动即成功地生成两个子菌落(图14B)。

[0202] 实施例8-芯片上的稀释

[0203] 设计并且制造滑动式芯片来平行地进行5次连续稀释步骤(图15)。其包括两个组件:一行包含样品的浅孔和一个装填了用于稀释的缓冲溶液的深孔的阵列。使用滑动式芯片来进行连续稀释包括三个一般步骤:(a)装载缓冲液,(b)装载样品,并且(c)多重步骤滑动来稀释。通过移液装填滑动式芯片后,芯片的两个板被滑动以分离管道和孔。随着管道和孔分离,它们还被移动出滑动路径(图15D和图17e插入图)。使包含样品的孔与包含缓冲液的孔接触,并且样品被稀释。混合比率或者稀释因数由孔大小的比率来决定。以同样的原则进行滑动操作的进一步步骤,并且由此进行连续的稀释。

[0204] 滑动式芯片包括两层微加工的玻璃:顶层包含所有入口和出口、用于样品的管道和用于缓冲液的孔。此装置被设计来进行连续的2倍稀释。所有孔和管道都被刻蚀60 μm 深。顶部和底部孔是同样的尺寸,因此在滑动和混合的每一步后获得2倍稀释。红色染料(0.1M $\text{Fe}(\text{SCN})_3$)的水性溶液被装载至滑动式芯片上以将连续稀释装置的操作可视化。使用Millipore水作为稀释剂。在三个滑动步骤后,实现 2^3 倍的稀释,如在图16中的颜色变化观察到的。仅显示 2^3 倍的稀释,因为 $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ 溶液的颜色在稀释10倍后褪色。

[0205] 实施例9-芯片上的对数稀释

[0206] 设计诸如那些在实施例8中的滑动式芯片装置来进行跨越宽动态范围的对数的连续稀释。所有的孔深76 μm 并且管道深30 μm 。顶层包含所有入口和出口、用于样品的管道和用于缓冲液的孔。底层包括10 μm 的浅孔用于样品以及30 μm 深的管道用于缓冲溶液。将装置的表面硅烷化来使其成为疏水的同时保持10 μm 深的孔是亲水的。使用10 μm 的浅孔来减少进孔和出孔的扩散时间并且最小化用于稀释剂孔的体积。将玻璃板以piranha洗涤(一份体积30%的过氧化氢和3份体积硫酸)、以Millipore水洗涤两次并且随后在220 $^{\circ}\text{C}$ 的加热板上脱水持续多于2小时来使孔变得亲水。将板在室温下冷却并且以20 μm 厚的SU83010层旋涂(图17A)。接下来板与保护板上的将成为疏水的区域的光掩模对齐并且被其覆盖,以致在曝光后仅保留孔中的SU8。孔中的SU8用于保护孔并且防止它们成为疏水的。最后,通过在120 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤玻璃持续5分钟来干燥。清洁玻璃板并且使其在300mTorr经历空气等离子处理持续5分钟,并且随后通过在真空吸湿器中用十三氟-1,12,2-四氢辛基-1-三氯硅烷将其硅烷化5小时,使其表面疏水。硅烷化之后,将玻璃板用20ml的无水甲苯冲洗三次、30ml的无水乙醇3次、30ml的乙醇/水(50%:50%,v:v)3次和30ml的Millipore水3次。板在120 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烘烤持续15分钟。最后通过将玻璃板浸入Piranha持续少于1分钟使孔中的SU8剥离。随后将板用Millipore水洗涤两次并且在120 $^{\circ}\text{C}$ 干燥持续15分钟。孔被制成亲水性的来控制亲水性的孔内水性流体体积的形状和体积,并且还防止浅孔中的去湿(dewetting)(图17B)。

[0207] 使用荧光染料的溶液来定量在滑动式芯片上跨越宽动力范围的对数的连续稀释的成功。通过移液将PBS缓冲液(1x,pH 7.4)中的Alexa Fluor 488酰肼(2mM,Invitrogen)装载至样品通道内。1x PBS缓冲溶液被装载至缓冲液通道内。首先将滑动式芯片在Leica MZ 16立体镜下滑动以形成分离的流体体积。随后,样品孔与缓冲液孔顺序地合并。在每一个滑动步骤之后,存在10分钟的等待步骤来允许荧光染料的扩散。在5个滑动步骤之后,装置被迅速地转移至具有20x 0.7NA Leica目镜和Hamamatsu ORCAER相机的Leica DMI6000

显微镜 (Leica Microsystems) 下。为了获得跨越高动力范围的荧光图像,使用不同的设置用于低浓度和高浓度的Alexa Fluor 488溶液。使用具有30ms曝光时间和100%灯强度的L5滤镜来收集从20nM至2000nM的Alexa Fluor 488荧光。使用具有2ms曝光时间和30%灯强度的L5滤镜来收集从20 μ M至200 μ M的Alexa Fluor 488荧光。通过使用6.3r1版Metamorph成像系统 (Universal Imaging),获取和分析图像。从荧光强度来计算来自芯片上稀释的浓度。记录和使用用于L5滤镜的荧光参考片的荧光强度用于背景修正来校准显微镜。使用PBS缓冲液中的20nM、50nM、200nM、500nM和2000nM的Alexa Fluor 488酰肼溶液来获得校准曲线来确定较低端浓度范围中的荧光染料浓度。使用PBS缓冲液中的10 μ M、20 μ M、50 μ M、100 μ M和200 μ M Alexa Fluor 488酰肼溶液来获得另一个校准曲线来确定较高端浓度范围中的荧光染料浓度。用Veeco Dektak 150表面光度仪测量孔的深度并且在刻蚀是等向性的假设下计算孔的体积。在5个滑动步骤之后,实现 10^5 倍的稀释,且实验结果和理论计算之间良好的吻合 (图18)。

[0208] 实施例10-流体体积的取回

[0209] 在将滑动式芯片装置 (诸如那些在之前实例中描述的) 分开之后,装置的一个拷贝被安装到对齐固定器上 (例如图1、图2A)。用Eppendorf移液管吸入1 μ L的水性缓冲溶液。滑动式芯片上的孔之间的间隔被设计成大于移液管吸头的外径来防止孔之间的交叉污染。当此缓冲溶液体积与滑动式芯片上的2nL的流体体积接触时与其自发地融合来使总交界面积最小化 (图3)。合并的流体体积随后可以被吸回到移液管吸头中并且被用于涂布平板或者利用PCR和随后测序的测试。此方法可以被修改来适应诸如具有更高密度的孔或者在移液不能够被精确地控制的情况。在这种情况下,可以首先通过这种方法移出邻近孔的流体体积,这为随后靶流体体积的操作给出更多的空间。

[0210] 实施例11-靶菌落的PCR鉴定

[0211] 以200rpm在旋转震荡培养器上将大肠杆菌细胞LB中50 μ g mL⁻¹的氨苄西林于34℃下过夜 (12小时) 富集来达到稳定期。为使细胞同步化,每一个物种的过夜培养物被随后稀释100倍并且用LB培养基中10 μ g mL⁻¹的氨苄西林和40 μ mol L⁻¹的IPTG培养持续3小时。随后在3000xg持续5分钟使细胞成团并且用1mL的冰冷的1x PBS缓冲液洗涤5次。最终用LB培养基中10 μ g mL⁻¹的氨苄西林和40 μ mol L⁻¹的IPTG将细胞悬浮并且细胞悬液被用LB培养基中10 μ g mL⁻¹的氨苄西林和40 μ mol L⁻¹的IPTG以及0.5%超低胶凝温度琼脂糖连续稀释并且将其混合至对于具有GFP和DsRed基因的大肠杆菌菌株最终密度分别是 2×10^4 和 2×10^3 CFU mL⁻¹,并且将其装载至滑动式芯片装置上。个体细胞被区室化并且滑动式芯片被孵育在34℃持续3小时用于培养并且随后将其分开为子芯片 (图5A)。

[0212] 将一个芯片与包含靶向DsRed (图5B) 的质粒的引物的PCR试剂混合 (图19),并且另一个用荧光显微镜成像来检查荧光蛋白的存在或者不存在 (图5C)。用具有10x/0.4NA Leica目镜和具有1x连接器的Hamamatsu ORCA-ER相机的Leica DMI6000显微镜 (Leica Microsystems) 获得荧光图像。使用具有500ms曝光时间的L5滤镜收集图像。对于定量分析,记录L5滤镜的荧光参考片的荧光强度并将其用于背景修正。使用6.3r 1版Metamorph成像系统 (Universal Imaging) 和美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 的Image J获取和分析图像。包含表达DsRed的大肠杆菌的流体体积与不包含细菌的空白孔和包含GFP标记的大肠杆菌的孔相比是PCR阳性的 (图5B),表明只有靶基因被扩增。为了确认

PCR阳性孔确实是来自DsRed的质粒,使用荧光显微镜术监测表达的荧光蛋白。观察到125个包含具有GFP的菌落的孔,并且观察到12个包含红色荧光大肠杆菌的孔,这与PCR结果相符(图5D和5E)。在PCR结果中观察到一个孔显示了增加的荧光强度,但是未在另一个拷贝中检测到细菌菌落,这表明该孔中可能包含了非生长细胞或者来自溶液的游离DNA。

[0213] 实施例12-从临床样品分离普通拟杆菌

[0214] 使用细胞刮刀收集来自健康人类志愿者的结肠的粘膜活检获得的冷冻的微生物悬液的培养物至Wilkins-Chalgren厌氧(WCA)板上。使用QiaAmp DNA Mini试剂盒从汇集的细胞纯化DNA。使用50ng的DNA和普通拟杆菌特异性的引物用于PCR。通过Sanger测序验证阳性的PCR产物并且将其与来自GenBank的普通拟杆菌的序列比对。

[0215] 将用具有0.5%超低胶凝温度琼脂糖的WCA培养基适当稀释的样品装载至如前所描述的滑动式芯片装置。滑动式芯片孵育短至过夜(8小时)用于分离普通拟杆菌,因为滑动式芯片具有利用仅10个至100个细胞进行PCR测定的能力(图5E)。这与以下形成对比:需要数千至数百万细胞来在琼脂板上形成菌落,其中通常在琼脂平板上孵育三到五天来获得用于制备储备物和用菌落运行测定的足够的生物量。将滑动式芯片装置分开并且对来自一个板的样品进行PCR来鉴定阳性菌落。从PCR阳性孔的重复孔中选出五个菌落,并且它们中的三个可以在琼脂平板上放大规模。那两个假阳性结果可能来自于裂解的细胞或者非生长细胞,因为此实施例是用冷冻的样品进行并且微生物的活力在冻融循环期间被损害。利用测序来确认那些分离物确实是普通拟杆菌。

[0216] 实施例13-在滑动式芯片上的板洗涤(“芯片洗涤”)

[0217] 随机限制来自临床样品的单个细菌细胞,并且将其在如前述的滑动式芯片装置上培养。随后通过洗涤微孔将微菌落收集至单个管中用于DNA提取。为了确定芯片的培养条件是否允许靶微生物体的生长,可以通过测序或靶特异的引物分析生长在滑动式芯片上的培养物的组成。可以重复这种芯片洗涤方法直到发现靶的最佳生长条件(例如图20)。

[0218] 实施例14-具有大肠杆菌的滑动式芯片上的板洗涤(“芯片洗涤”)

[0219] 以200rpm在旋转震荡培养器上,用LB中 $50\mu\text{g mL}^{-1}$ 的氨苄西林在 37°C 下过夜(12小时)富集被DsRed荧光蛋白标记的大肠杆菌细胞。过夜培养物被随后稀释100倍并且用LB培养基中 $10\mu\text{g mL}^{-1}$ 的氨苄西林和 $40\mu\text{mol L}^{-1}$ IPTG培养持续3.5小时。随后用3000xg持续5分钟使细胞成团并且用1mL的1x PBS缓冲液洗涤3次。细胞被连续稀释至LB培养基中 $10\mu\text{g mL}^{-1}$ 的氨苄西林和 $40\mu\text{mol L}^{-1}$ IPTG或PBS缓冲液中终密度为 10^5 , PBS缓冲液不支持细菌的生长,其作为阴性对照,并且如前描述的被装载至滑动式芯片装置上。将滑动式芯片在 37°C 孵育过夜。根据制造商的方案使用QiaAmp微试剂盒纯化来自芯片洗涤溶液的基因组DNA。为了校准,通过Quanti-it DNA高灵敏度定量试剂盒定量纯化自宏观液体培养物的基因组DNA,并且将其在包含 0.01mg mL^{-1} 的BSA的AE缓冲液中连续地稀释。用27F和534R引物进行定量PCR(qPCR)。观察到DNA浓度增加了10,000倍(图21),表明对于此特定的模型系统,非生长细胞对从芯片洗涤回收的遗传物质贡献0.01%。

[0220] 实施例15-在具有两个物种模型群落的滑动式芯片上的板洗涤(“芯片洗涤”)

[0221] 将*Clostridium scindens*和粪肠球菌的混合物以5:1的比率培养在滑动式芯片装置上和琼脂平板上。起始接种物和芯片洗涤溶液的基因组DNA被提取并通过qPCR定量。在芯片上的培养之后,芯片洗涤导致与来自作为非生长对照使用的起始接种物的DNA相比,每个

菌株的DNA增加~1,000倍(图22E),显示芯片洗涤可以被用于检测微生物生长。

[0222] 根据在第一天观察到的菌落的大小的不同,在琼脂平板上的粪肠球菌比*C.scindens*生长迅速(图22C、图22D)。对于两种菌株,培养基具有相似的携带能力。在第一天两种菌株在芯片上生长至可比较的密度(图22A、图22B)。如从两种菌株回收的基因组DNA的数量所示,第一天的通过板洗涤的取样导致朝向快速生长的细菌的~1,000倍的偏倚,而芯片洗涤方法有效地校正了这个偏倚,由于基因组DNA对每种菌株是相当的(图22E)。

[0223] 实施例16-在具有四个物种模型群落的滑动式芯片上的板洗涤(“芯片洗涤”)

[0224] 选择由四种成员组成的模型群落:*Anaerostipes caccae*、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)、*Clostridium scindens*、和粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)。此群落代表了成年人类肠道末端微生物群的两个优势类群:厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。选择Schaedler厌氧菌肉汤培养基以支持所有四个物种的生长。为排除滑动式芯片不支持四个物种的生长的可能性,四个物种被分别装载至不同的装置中。在滑动式芯片上培养一天之后,所有四个物种生长为致密的微菌落。

[0225] 接下来,*Anaerostipes caccae*、婴儿双歧杆菌、*Clostridium scindens*、和粪肠球菌在Schaedler厌氧菌肉汤培养基中富集过夜并且随后被培养持续八个小时将细胞同步至指数中期。细胞在Schaedler厌氧菌肉汤培养基中被均匀地混合并稀释至 10^5 CFU mL⁻¹并且将其装载至滑动式芯片上。将滑动式芯片孵育持续24小时并且使用如实施例13或者实施例14中的芯片洗涤方法来分析。根据制造商的方案使用QiaAmp微型试剂盒纯化基因组DNA。从宏观液体培养物中纯化基因组DNA,通过Quanti-it DNA高灵敏度定量试剂盒定量并且连续稀释用于校准。通过使用起始接种物作为非生长对照,观察到生长扩增大约1,000倍。尽管当在第一天取样时板洗涤强烈地朝向粪肠球菌偏倚,芯片洗涤中并未观察到*Clostridium scindens*和粪肠球菌之间有显著的偏倚(图22B)。这说明,芯片洗涤方法可以可靠地检测在滑动式芯片上生长的物种。

[0226] 实施例17-OTU158生长条件的鉴定

[0227] 通过两种方法从人类盲肠(图23)收集样品:由刷检术(brushing technique)获得刷粘膜活检(brush mucosal biopsies)以及由灌洗法(lavage technique)获得灌洗液(wash fluid)。将灌洗液高压蒸汽处理并且将其加入培养基M2LC。将刷检样品以 10^5 CFU mL⁻¹装载到滑动式芯片上并且允许其孵育三天使菌落生长。随后使用前面如实施例13至15所描述的芯片洗涤方法收集培养物。同样的量的接种物也被培养在琼脂平板上用于比较。将瘤胃液(Rumen fluid)加入培养基M2GSC中。

[0228] 对培养物的两个区域V4和V1V3进行高通量16S测序调查。芯片洗涤和板洗涤的OTU表被二次取样至每个样品12599个读数并且在家族水平总结。生长在滑动式芯片装置上的培养物和生长在板上的培养物在微生物的组成和相对丰度上都不同。例如,从板洗涤中可以观察到更多的梭菌XIII和双歧杆菌,而一些低丰度成员诸如*Gordonibacter*、*Anaerostipes*、*Oscillibacter*和*Silanimonas*仅能从芯片洗涤方法中观察到。这个矛盾可能由于在琼脂平板上和芯片上的细菌生长动力学的差异以及不同的培养条件(腔液被用于芯片上培养,而瘤胃液被用于琼脂板)。被分类为*Oscillibacter*的读数能够被分配至OTU_158_V1V3。以对OTU158物种特异性的引物进行PCR,并且结果被Sanger测序验证,其确认了可以从培养物中发现OTU158。

[0229] 16S V4高通量测序的结果通过qPCR被进一步验证(图24)。虚假设是,在空白的水、培养基M2GSC的板洗涤液和培养基M2LC的芯片洗涤液中,OTU158的基因组DNA的浓度是相同的。OTU158的基因组DNA的浓度比空白阴性对照和板洗涤液的培养物高。为测试是否板洗涤液和芯片洗涤液两者包含细菌DNA,用16S V4通用引物进行qPCR。板洗涤液和芯片洗涤液两者具有比空白阴性对照高的DNA浓度并且板洗涤液具有略微低的Cq值。

[0230] 为了测试OTU158的生长是否需要腔液,通过芯片洗涤获得生长在M2GSC培养基上的培养物并且用qPCR测试。培养物和空白阴性对照之间的差异不是统计上显著的,以及表明用M2GSC培养基进行芯片洗涤不能恢复OTU158。确定M2LC是生长OTU158的合适的培养基。

[0231] 实施例18-“*Candidatus Caecococcus microfluidicus*”的分离

[0232] 用如实施例16中制备的M2LC培养基进行培养,如前面描述地装载至滑动式芯片装置上。在培养之后,如前面描述地分离两个滑动式芯片板并且用靶向感兴趣的OTU_158_V1V3(OTU158)区域的引物对每一个微菌落进行菌落PCR。从装载~500个微生物菌落的单个装置中观察到两个PCR阳性的命中(hit)(它们中的一个示于图25A中)。该命中的下一个的PCR阴性孔的图像被示于图25A的左边。虽然细胞物质被SYBR Green染色并且显示荧光,溶液相明显地是PCR阴性。阳性孔中的一个在M2GSC琼脂上被放大规模并且孵育三天之后的完整的“规模放大”培养物的照片被呈现在图25B中。如所示的,由于从滑动式芯片转移的多种种子的存在,培养物包含多种细胞。对此分离物用物种特异性的引物和通用引物进行菌落PCR,其确认OTU158的存在。

[0233] 将板用靶细胞的单一菌落(例如图25C)重复地划线用于纯化。五次将板划线后,使用16S rRNA基因确定培养物的纯度。使用QiaAmp试剂盒依据具有以下修改的制造商的方案分离用于PCR扩增的基因组DNA:添加珠击打步骤,该步骤使用以Mini-Beadbeater-16(BioSpec Products, Inc.)摇动的裂解基体B(MP Biomedicals 6911-500)持续1分钟。使用AccuPrimer Pfx DNA聚合酶(Invitrogen)通过PCR扩增16S rRNA基因。使用引物27F和1492R用于PCR扩增。通过Biorad热循环仪如下进行PCR扩增:在95℃孵育2分钟,随后进行在95℃持续15秒、在55℃持续30秒和在68℃持续90秒的34个循环。扩增的PCR产物被克隆进TOP0载体并且被转化进在LB/Smp+培养基上的TOP010大肠杆菌细胞中。在37℃孵育板过夜并且挑取单个菌落用于液体培养。使用Qiagen Miniprep试剂盒从细胞中纯化质粒。随后以与前面描述相同的方案通过PCR扩增质粒DNA。使用QIAquick PCR纯化试剂盒纯化PCR产物并且通过Laragen测序。

[0234] 以配备用于获取图像的Gatan 2K×2k CCD相机的TECNAI120keV TEM(FEI, Hillsboro, OR)上的200目formvar/碳网格进行TEM(图25D)。通过将细胞在PBS缓冲液中悬浮并且使用63x 1.2 NA Leica目镜和LeicaDMI6000显微镜(Leica Microsystems)以及Hamamatsu ORCAER相机获得分离物的光学显微术。从TEM图像(图25D)和光学显微术(图26)两者观察到棒状细菌细胞。

[0235] 从培养物中获得两种16S rRNA基因序列类型。它们与彼此99.4%相同并且附属于科瘤胃菌科(Ruminococcaceae),以前称为梭菌IV簇(*Clostridium* cluster IV)。依据已建立的方案进行靶向16S rRNA的FISH。简略地,使以甲醛和乙醇固定的样品于46℃与FAM-和Cy3-标记的寡核苷酸探针在含有甲酰胺的湿润的室中杂交持续16小时。为了测试细胞壁消化是否导致荧光检测和/或标记强度的增加,在杂交之前,将样品如下预处理:(i) TE缓冲液

中 10mg mL^{-1} 的溶菌酶(在 37°C 湿润室中1小时);(ii)TE缓冲液中 $15\mu\text{g mL}^{-1}$ 的蛋白酶K(在室温,即 23°C 下10分钟)随后浸在 0.01M HCl 中(在 23°C 下10分钟);或者(iii)1:1混合的丙酮:甲醇(在 23°C 下15分钟)。甲酰胺浓度在杂交缓冲液中的浓度推荐为:对于探针混合物EUB338I-III和对照探针NonEUB338是20-35%;对于探针Arch915是35%;对于探针EUK516是20%。两个新设计的探针Clostr183-I和Clostr183-II在15%杂交(在浓度 $>20\%$ 时未观察到荧光信号)。通过对同一结合位点的竞争,这些探针能够区分从我们的培养物中获得的两种16S rRNA基因序列类型。在杂交之后,载玻片在 48°C 在预热的洗涤缓冲液中洗涤10分钟。随后将它们浸在预冷的(4°C)去离子水中并且使用加压空气干燥。以DAPI/Citifluor来装备载玻片并且使用Olympus BX51落射荧光显微镜分析。使用由显微镜制造商提供的软件和Image J分析荧光图片。当应用对照探针NonEUB338至样品时,没有观察到非特异性的标记。

[0236] 所有FISH阳性的细胞结合两种序列类型特异性的FISH-探针(Clost183-SI和Clostr183-SII,图27),以及特异地检测细菌的大部分成员的通用混合探针EUB338I-III。虽然没有能在培养物中检测到古细菌或者真核生物细胞,一些被DAPI染色的细胞不能通过FISH染色。为了排除这是由于各细胞的有限的可接近性,测试了不同的细胞壁透化处理。然而,没有一个导致细胞成功地被FISH染色。因此,各细胞可能具有低于单-FISH检测限的核糖体内容物,这也许由于各细胞的孢子形成。此想法被以下发现支持:在稳定期的培养物的分析中,多数细胞不能使用FISH可视化,即使进行了透化步骤时。这些FISH结果证明了培养物中单一瘤胃菌科物种的存在。

[0237] 实施例19-肠道微生物的培养和分析

[0238] 来自人类或者小鼠的肠道活检的单个微生物细胞被随机地限制在装置上并且被孵育以允许菌落的生长。细胞系被装载至滑动式芯片装置上并且被孵育以允许菌落的生长。将细菌培养的装置的两个板分离,并且将每一个区室化的流体体积分开至两个,在相对的板的每一个上生成每一个个体菌落的相同的拷贝。在第一个板上通过将包含细菌细胞的玻璃板与包含哺乳动物细胞培养物的玻璃板重叠来鉴定包含具有感兴趣的功能的菌落的区室以进行功能性的测定。通过进行诸如,例如,荧光、比色、化学发光或者质谱测定的测定来可视化基因的表达。相应的菌落随后被从第二个板取回用于其他的目的,诸如感兴趣的分离物的规模放大培养。

[0239] 实施例20硫酸盐还原细菌的培养

[0240] 将疑似包含硫酸盐还原细菌的样品装载至滑动式芯片装置上并且随机地限制。将装置孵育并且使菌落生长。分离滑动式芯片装置的两个板,在每一板的配对孔中产生匹配的菌落。通过靶向相关基因的遗传测定(例如图28)或者通过用于硫酸盐还原活性的存在的功能测定(例如通过使用荧光底物N,N-二丁基苯二胺(DBPDA)来检测 H_2S)来测定来自一个板的样品的硫酸盐还原表现。指出发现对硫酸盐还原阳性的菌落,并且培养来自另一个滑动式芯片板的与其匹配的菌落用于进一步研究。在样品中发现了之前未知的硫酸盐还原细菌。

[0241] 虽然本文已经显示和描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员明显的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。本领域技术人员将会想到许多变更、变化和替代方案而不背离本发明。应当理解,在本发明的实践中可以采用本文所述的本发明的实施方

案的多种备选方案。以下权利要求意在限定本发明的范围,从而涵盖在这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

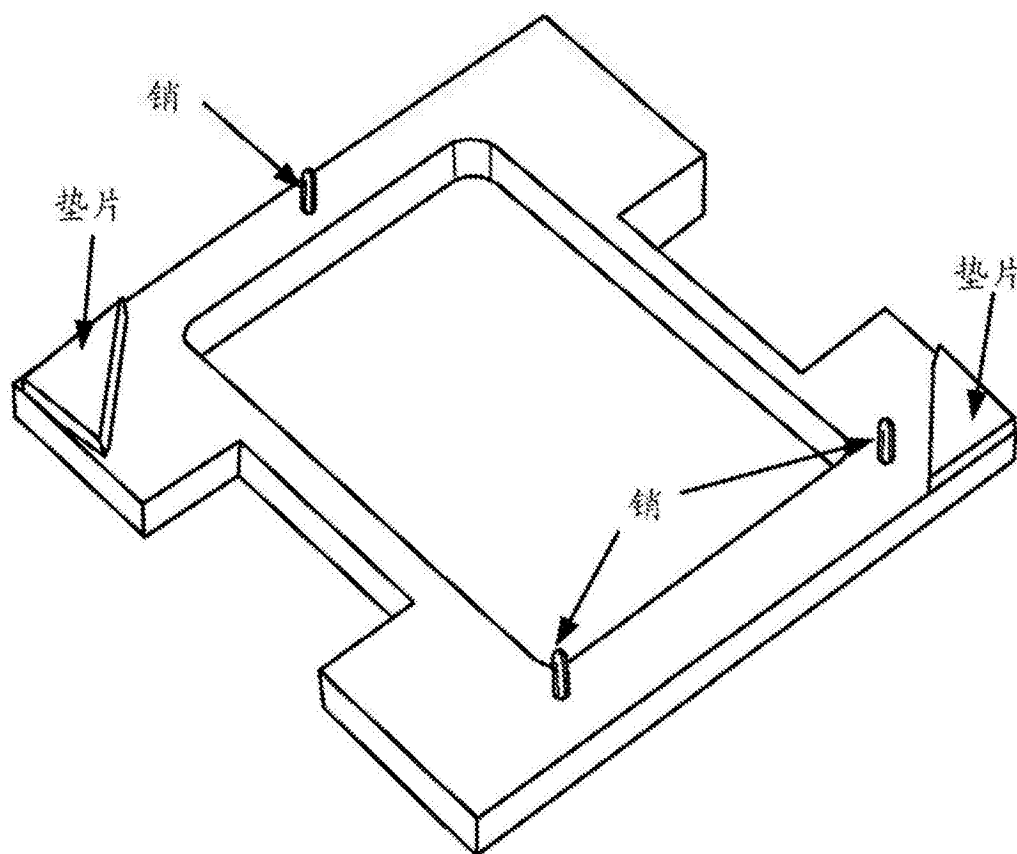


图1

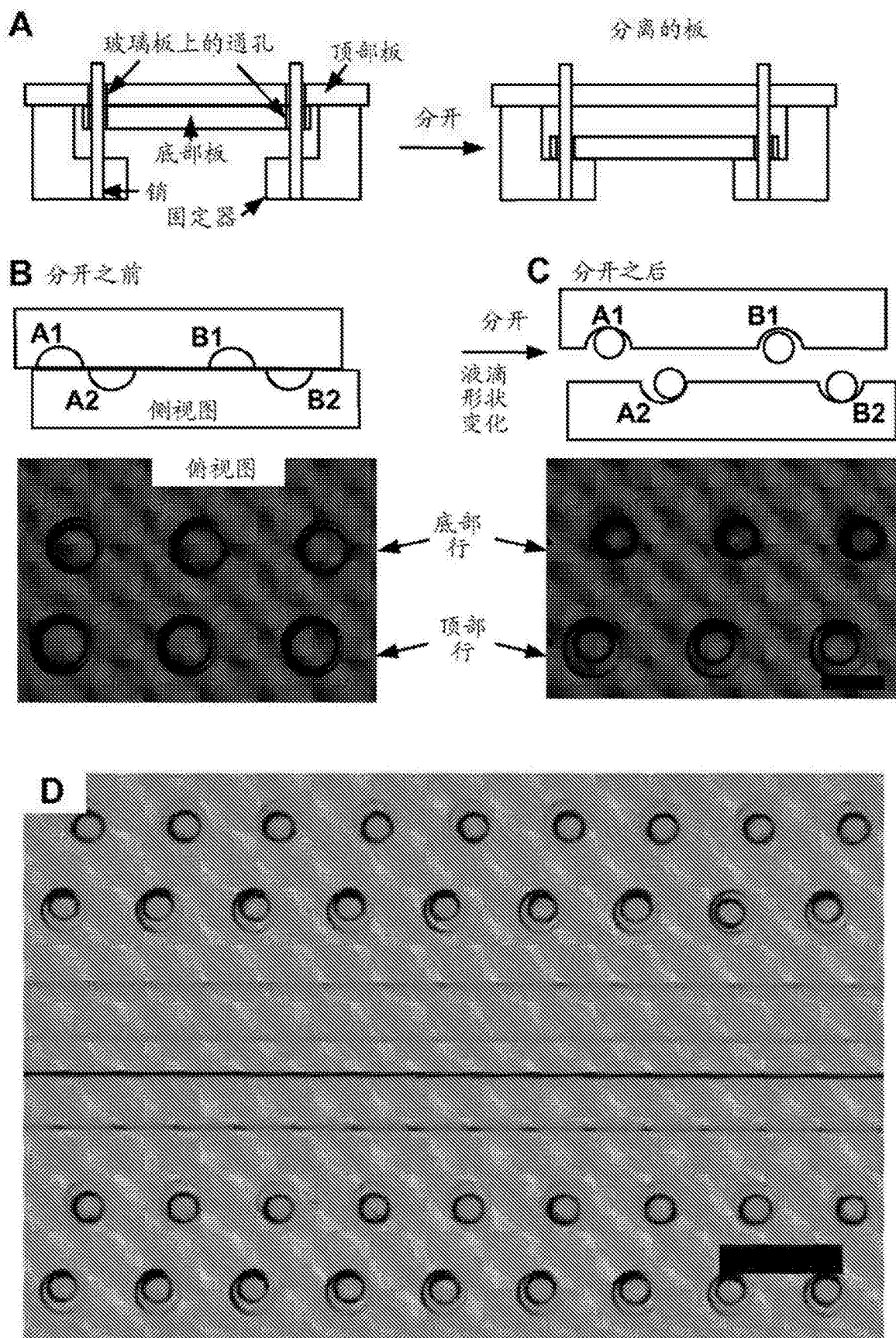


图2

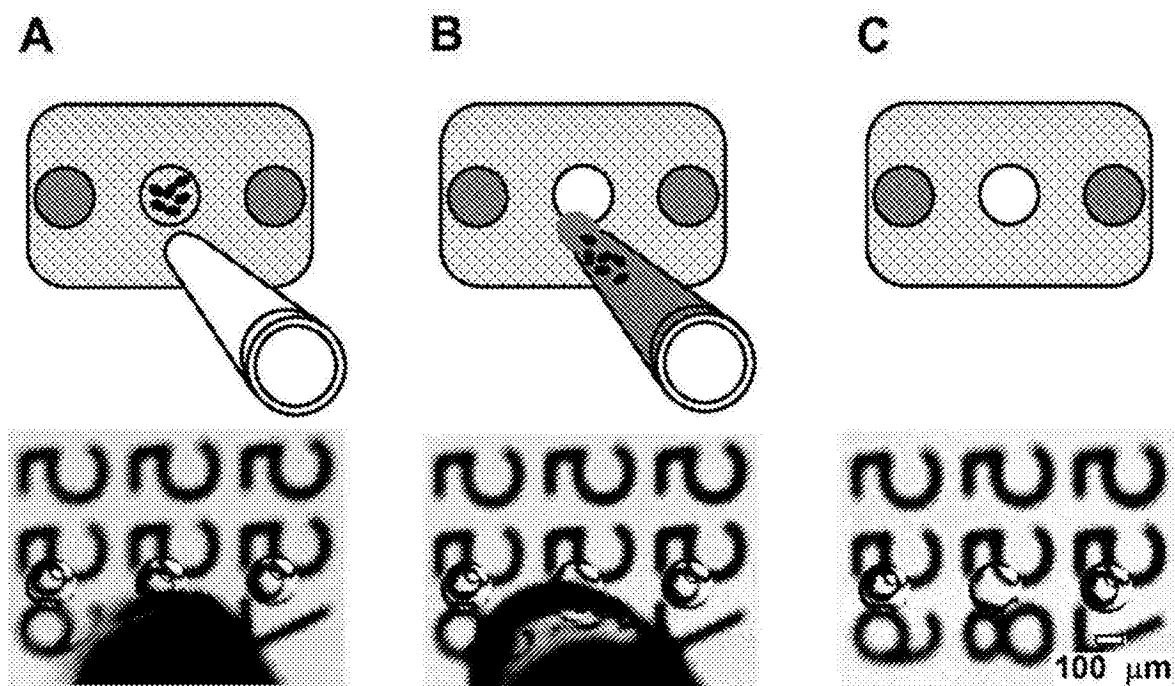
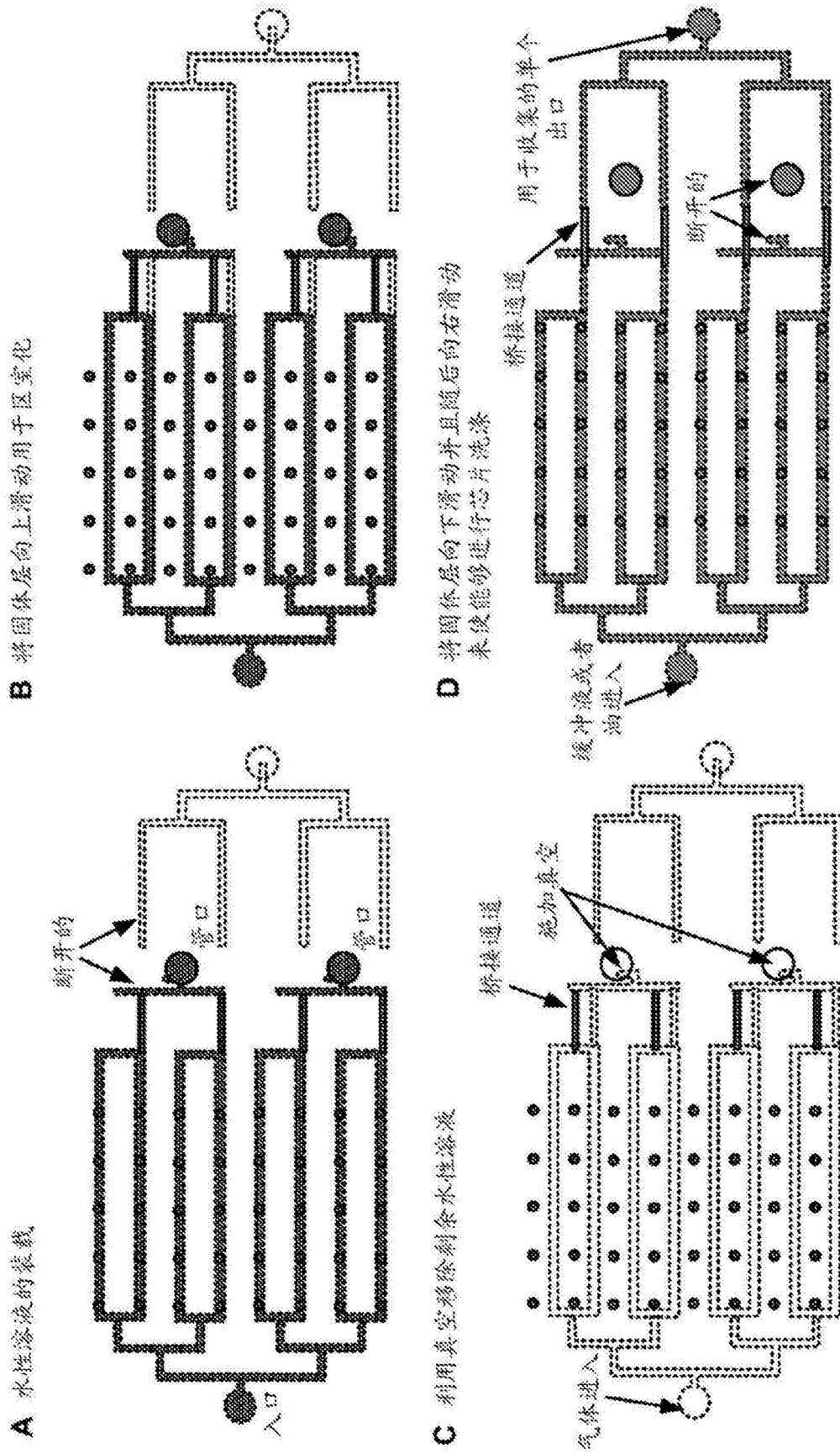


图3



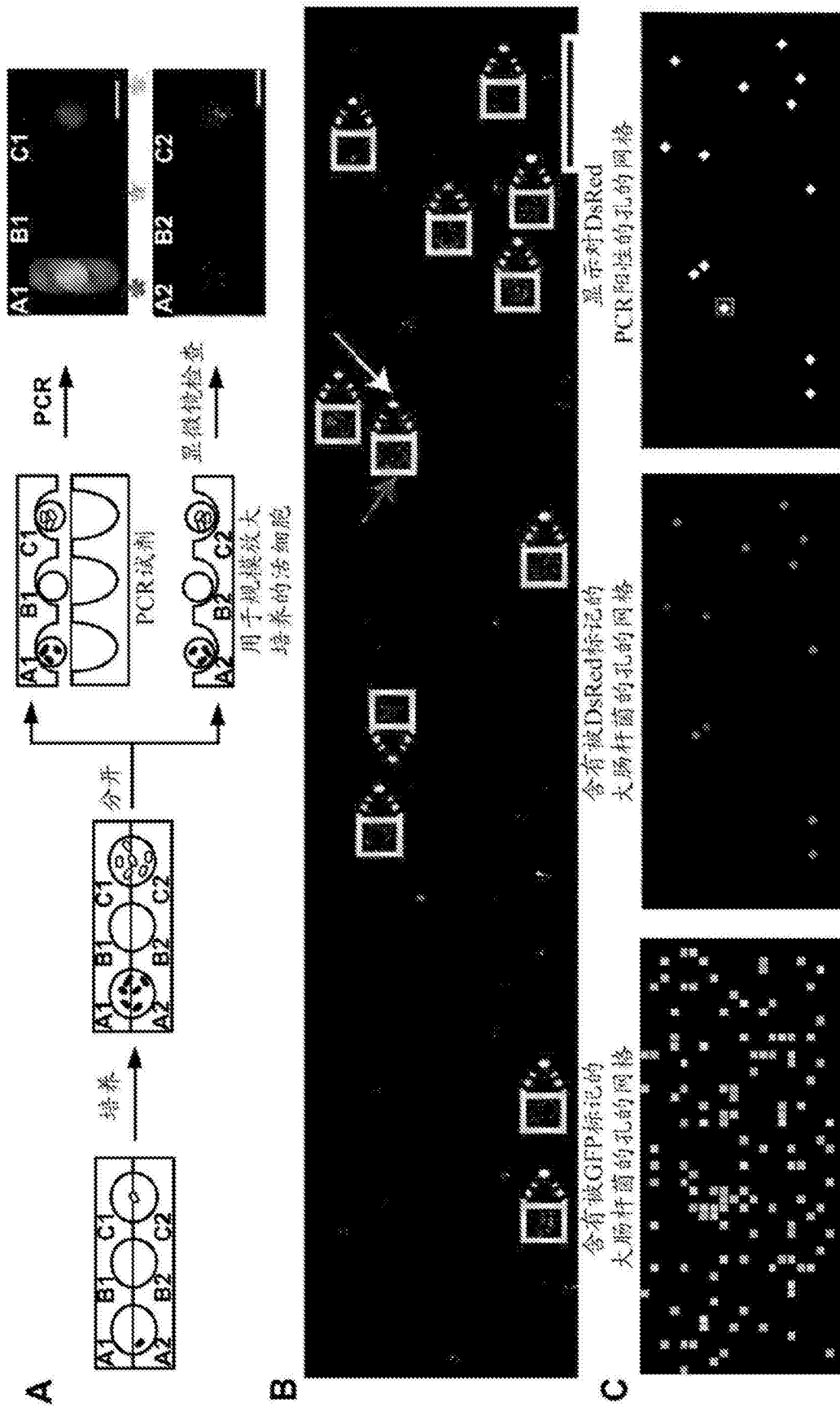


图5

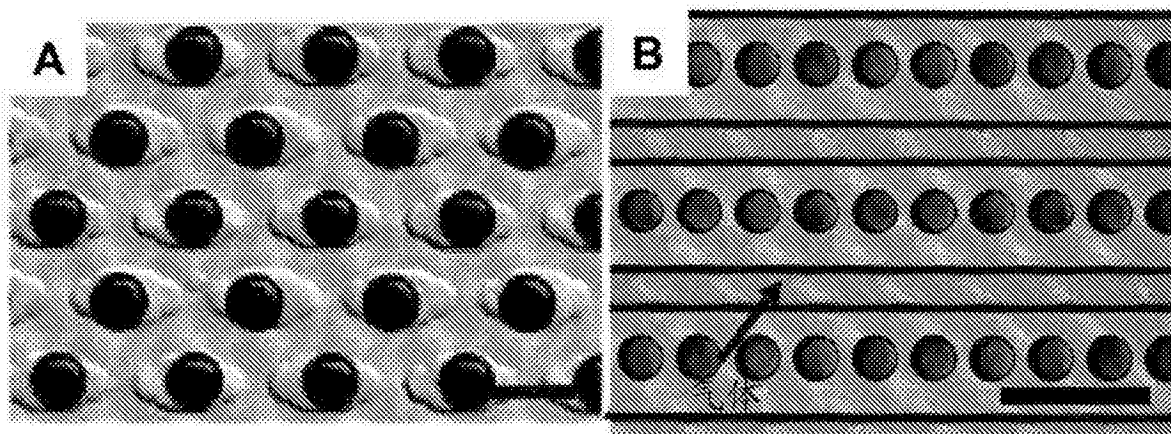


图6

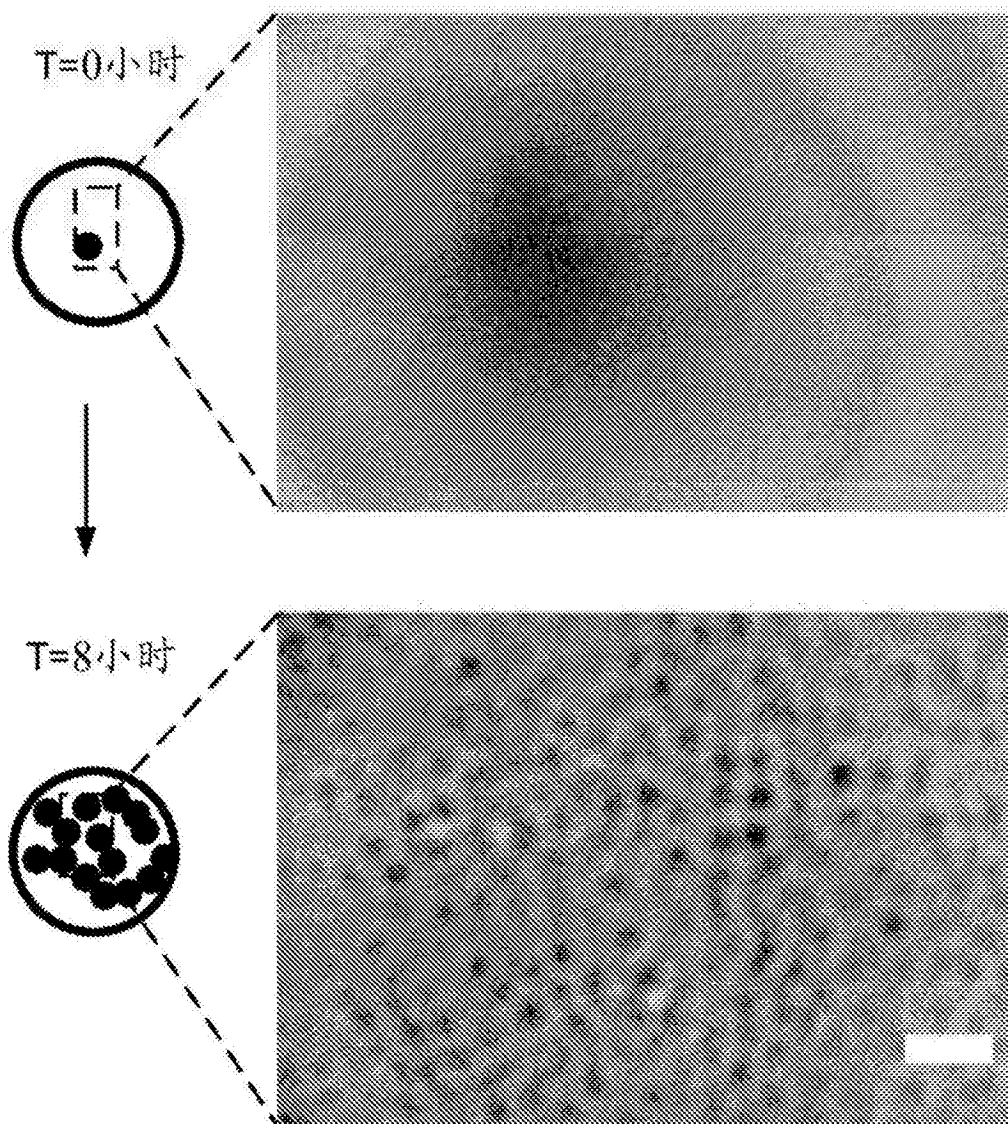


图7

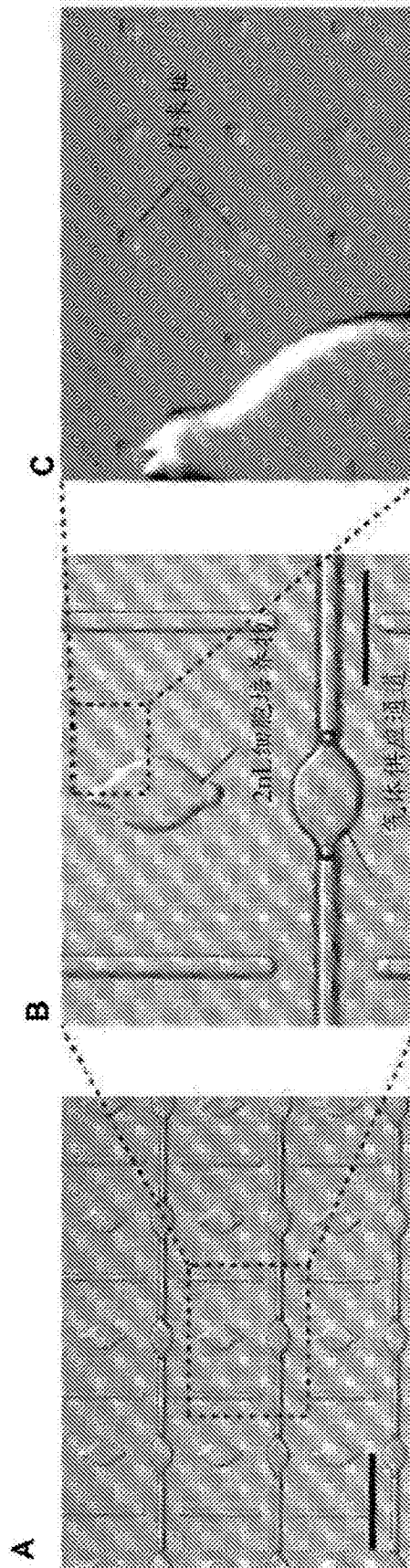


图8

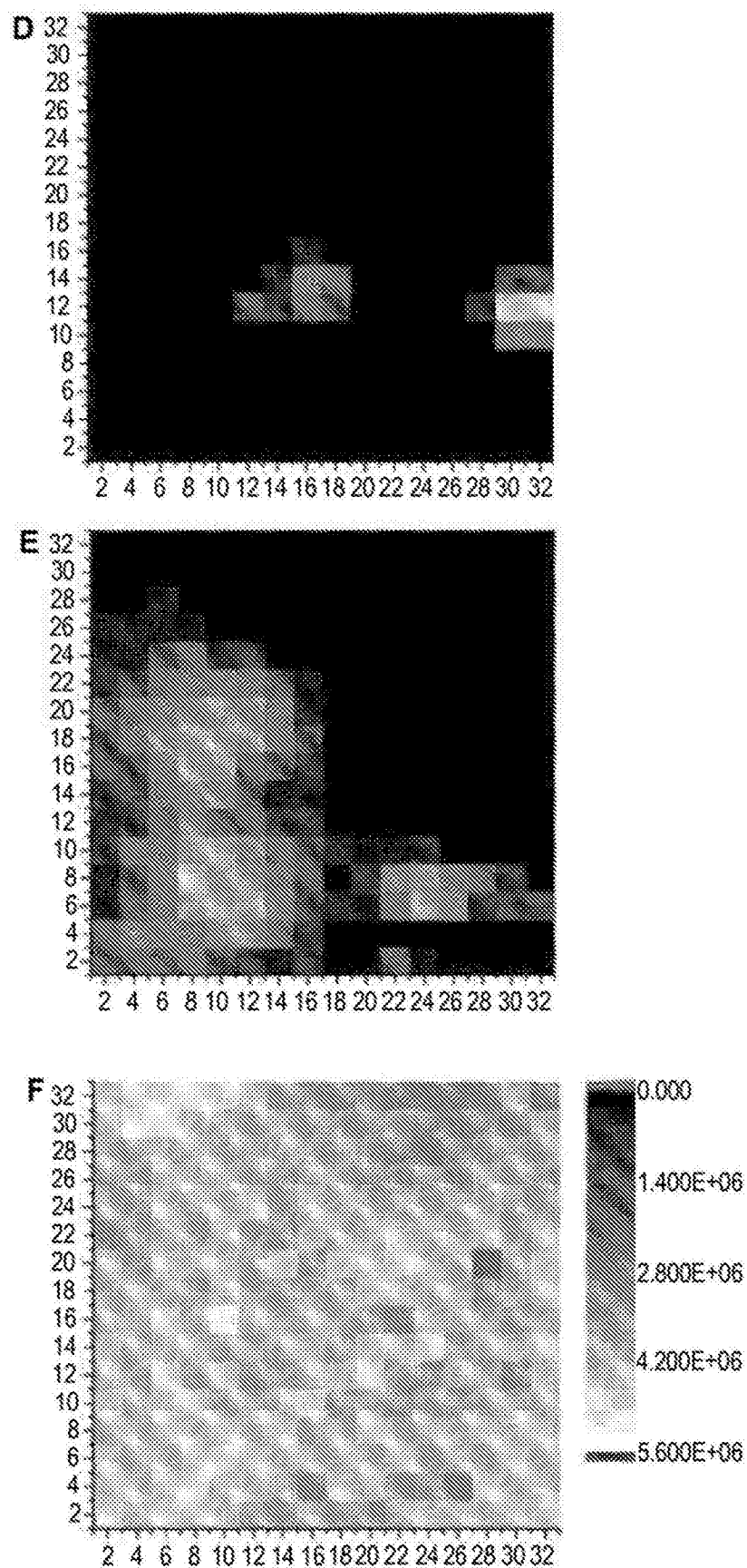


图8(续)

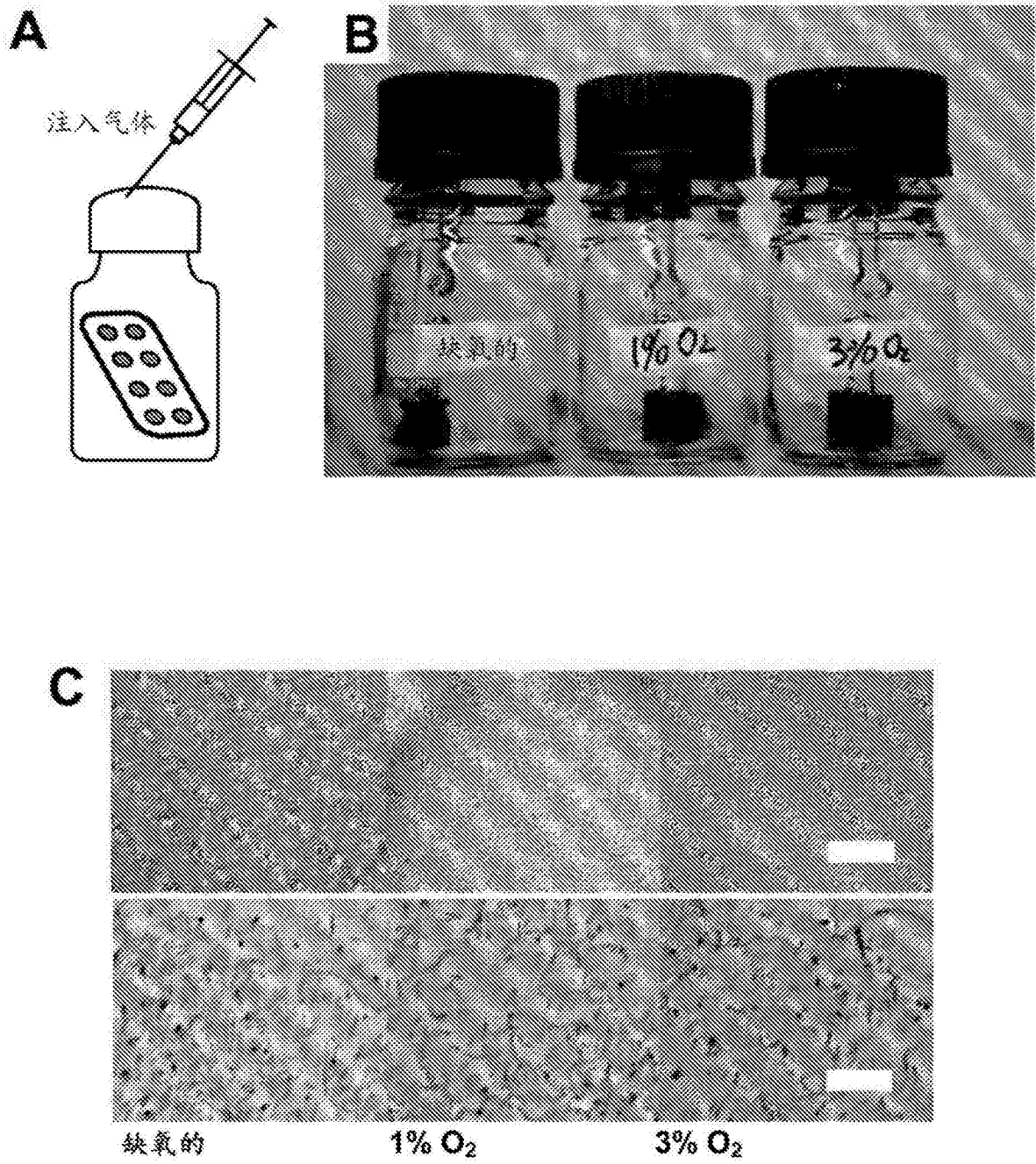


图9

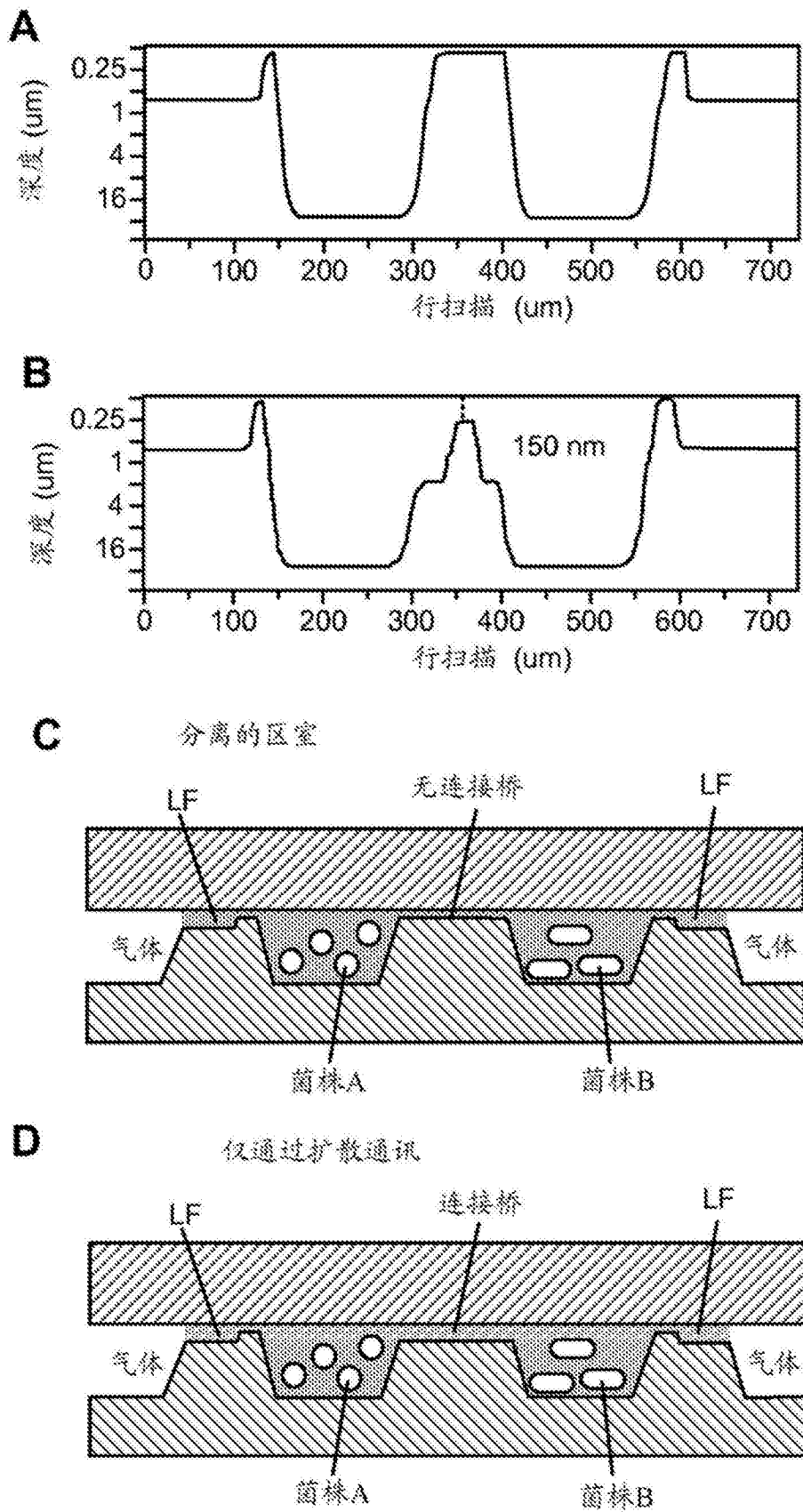


图10

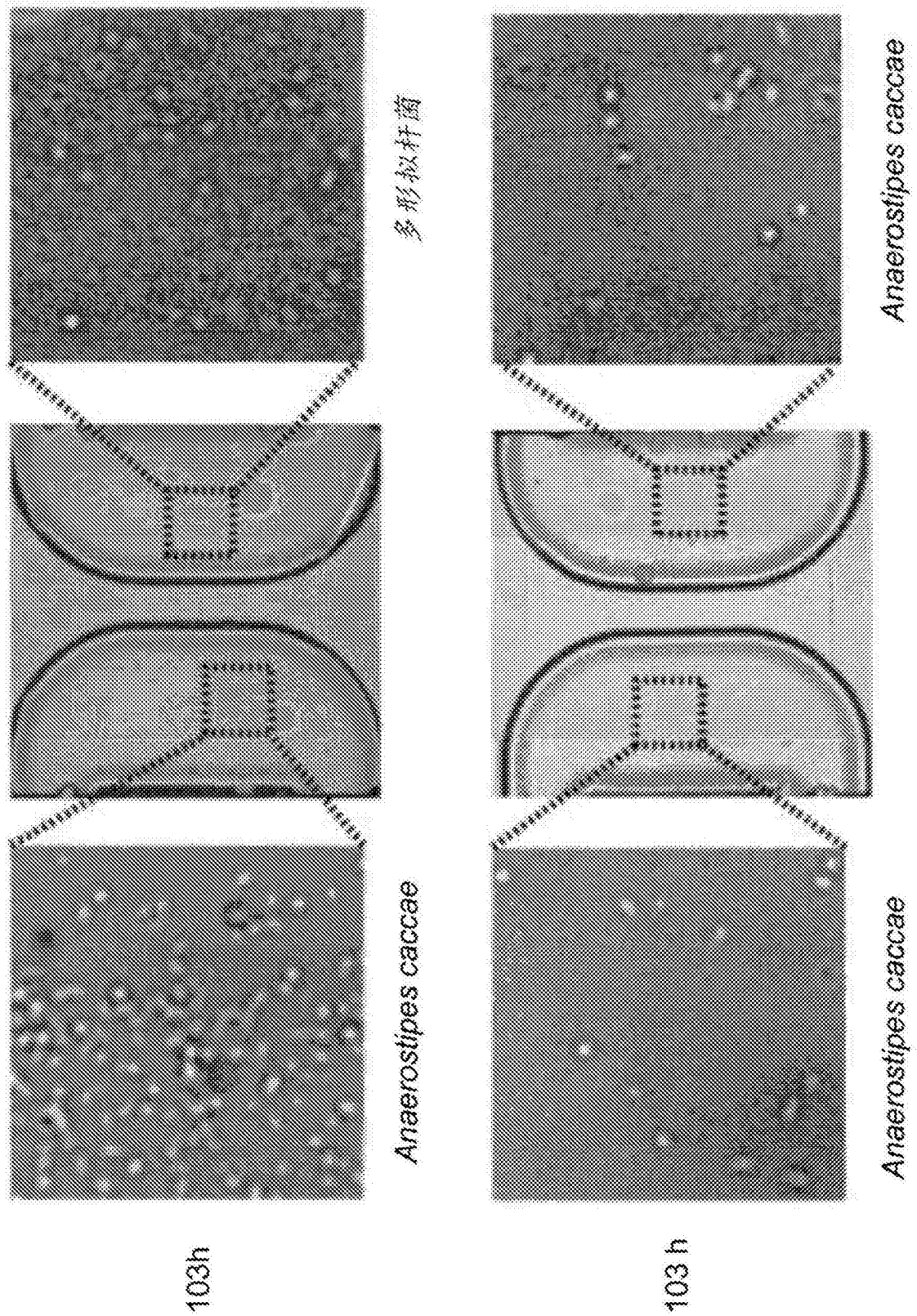


图11

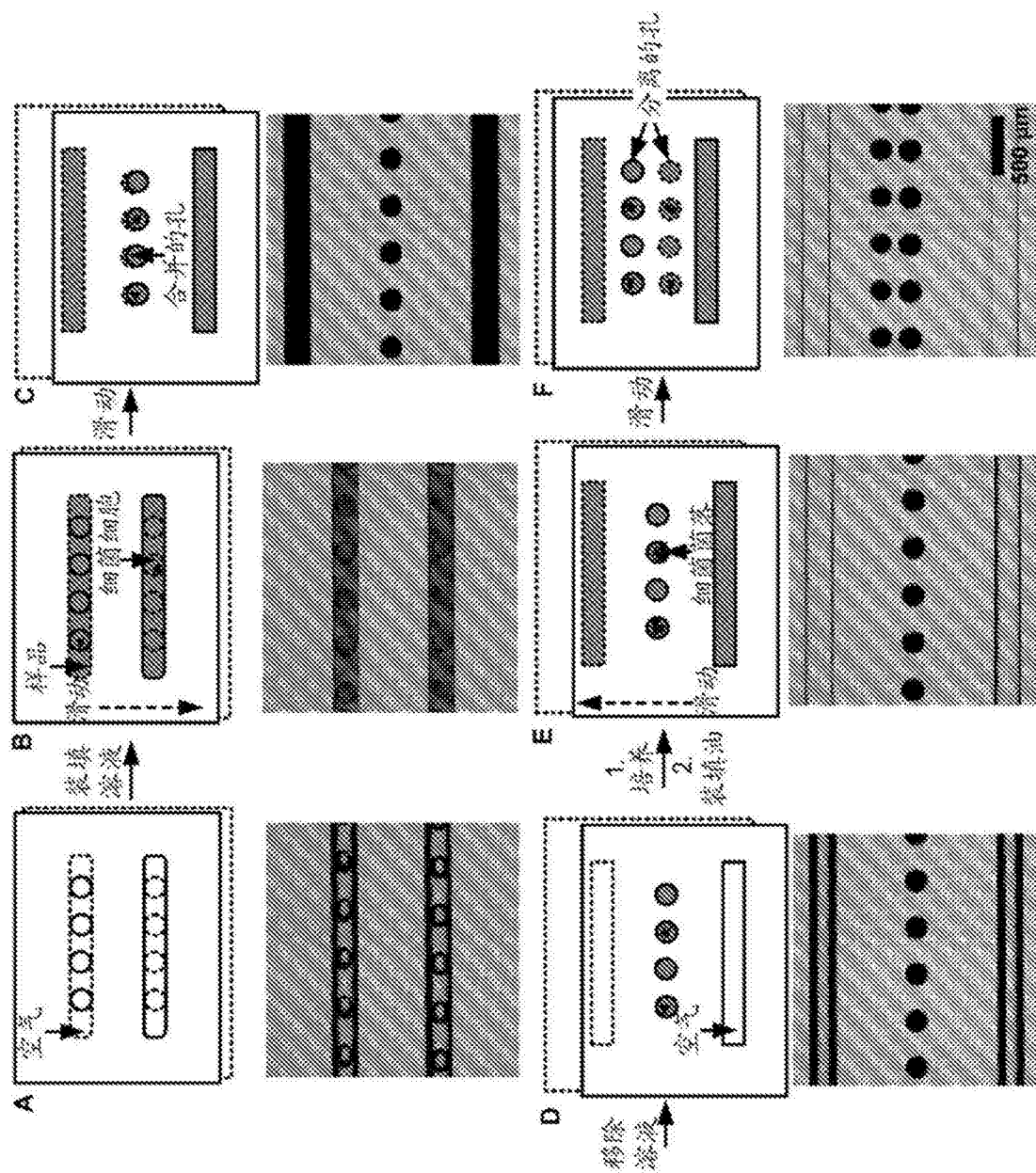


图12

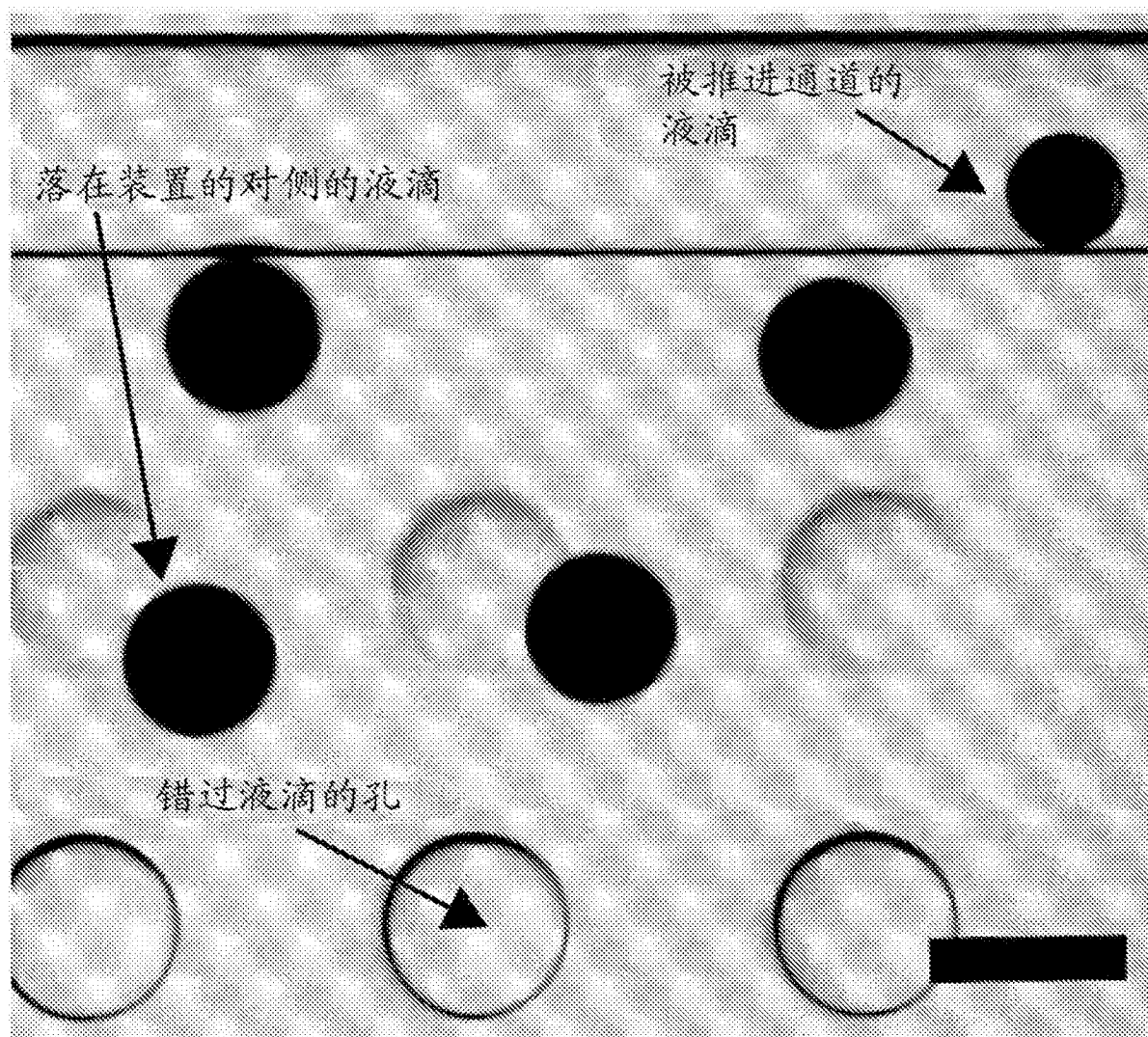


图13

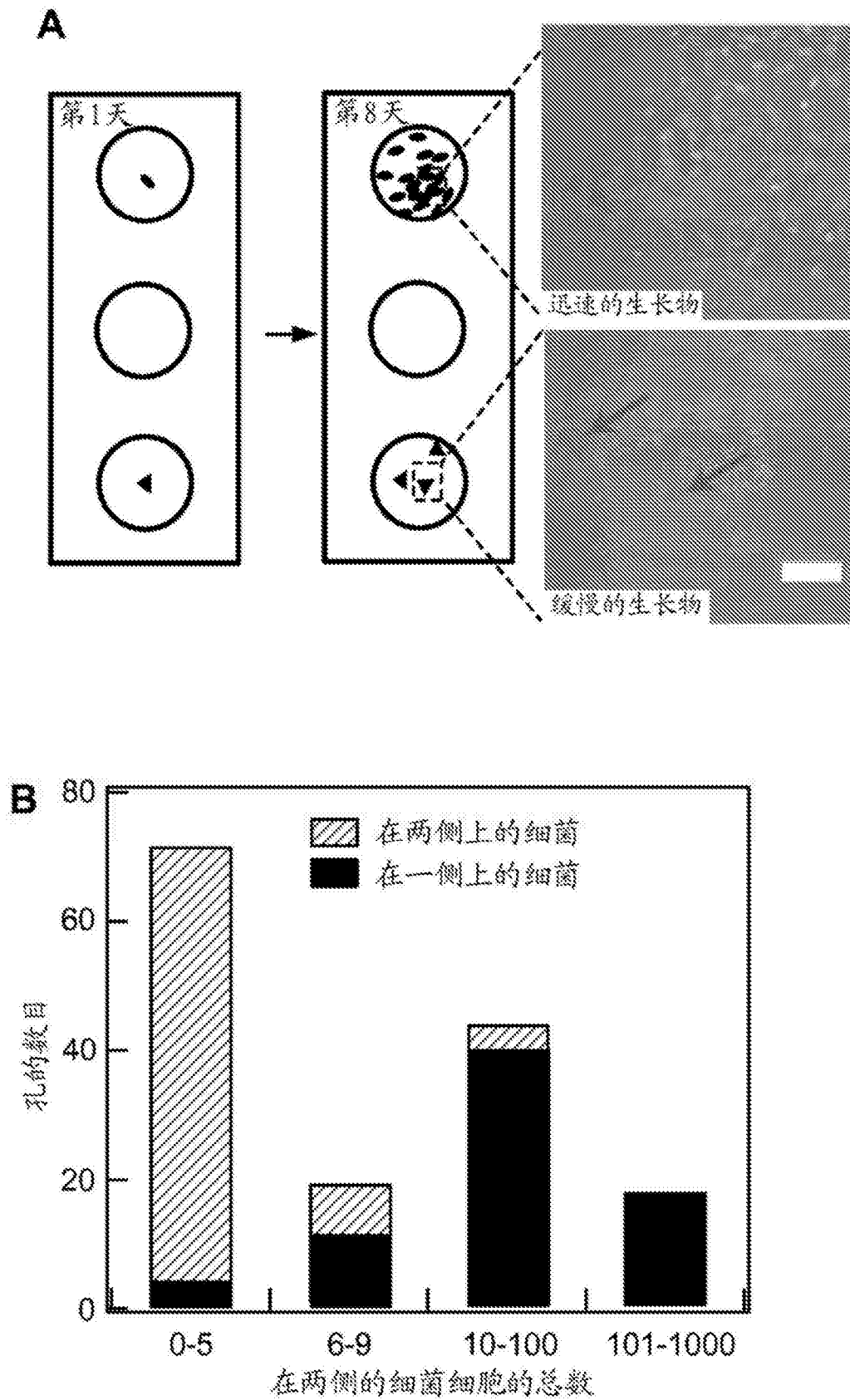


图14

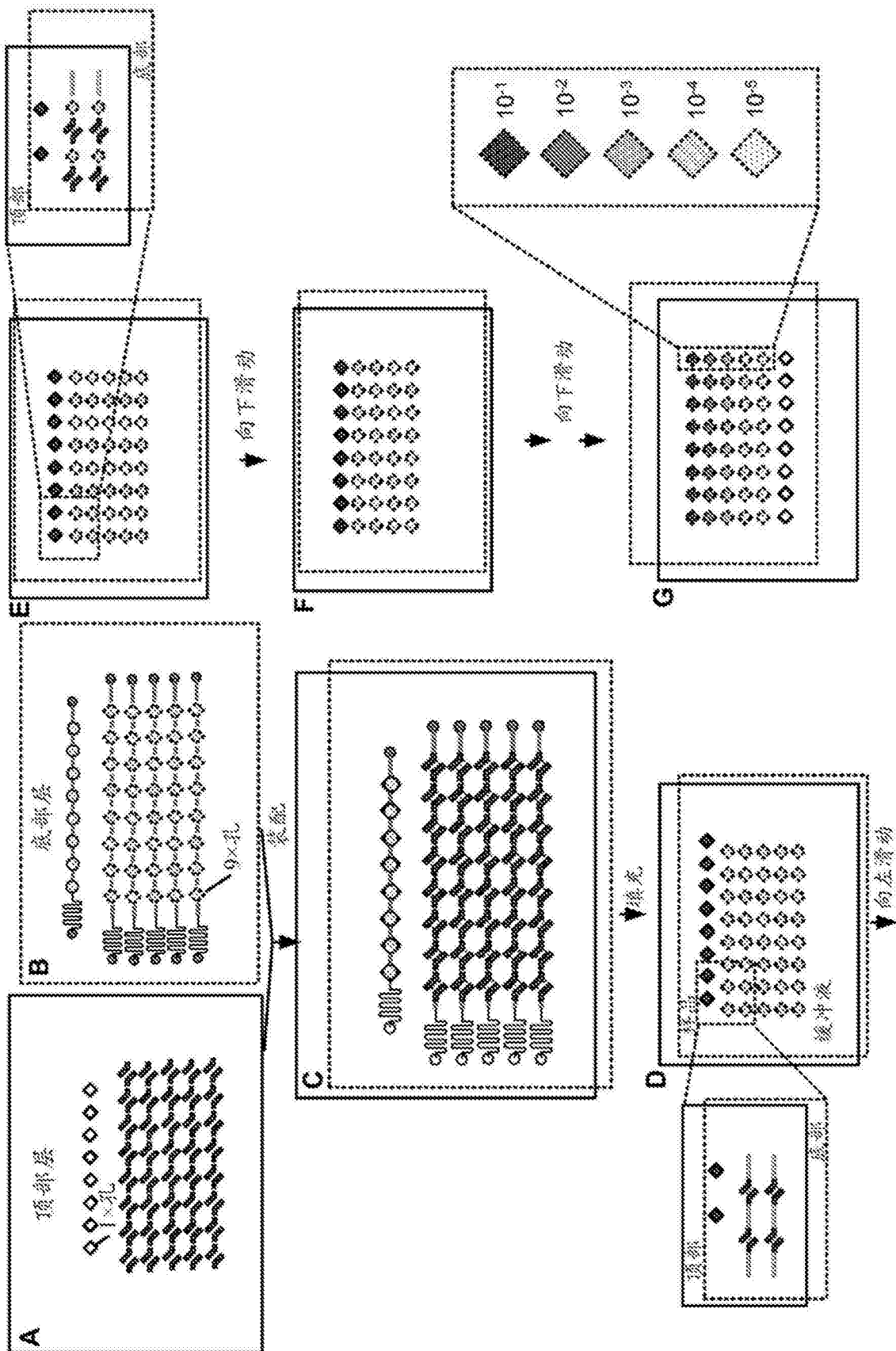


图15

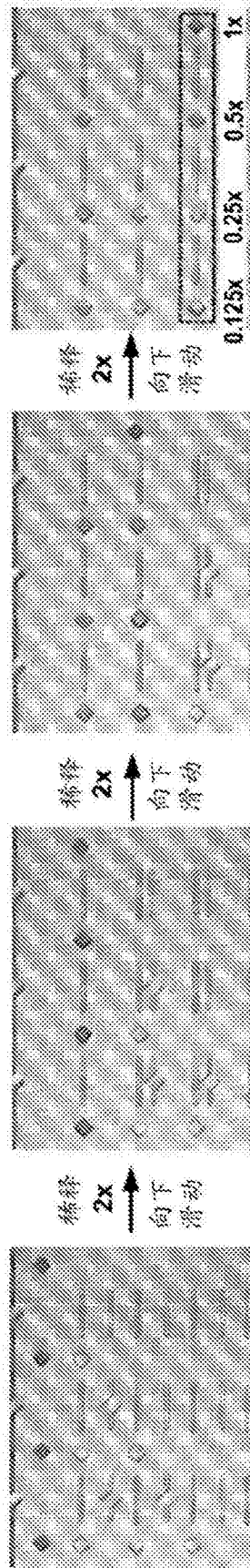


图16

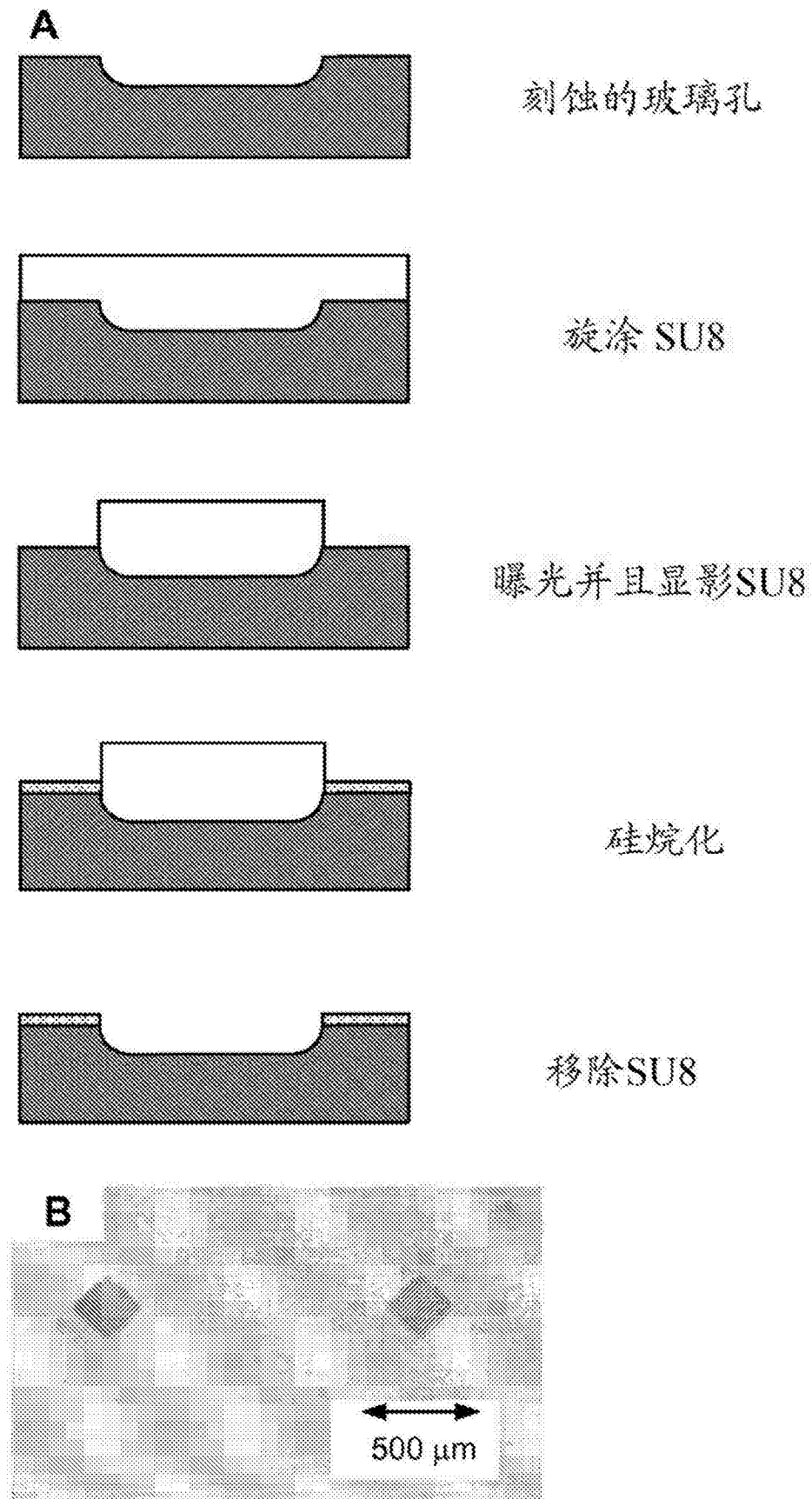


图17

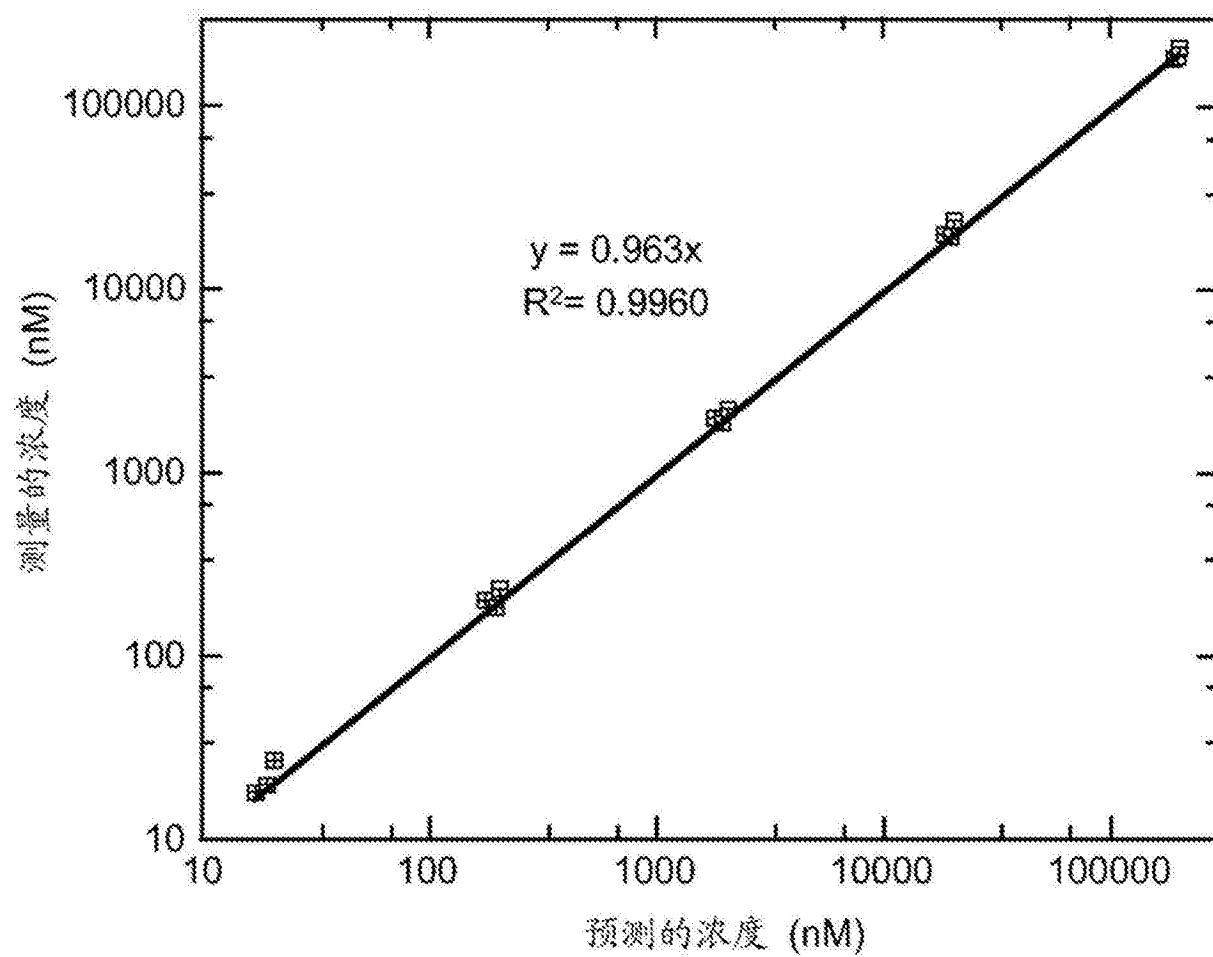


图18

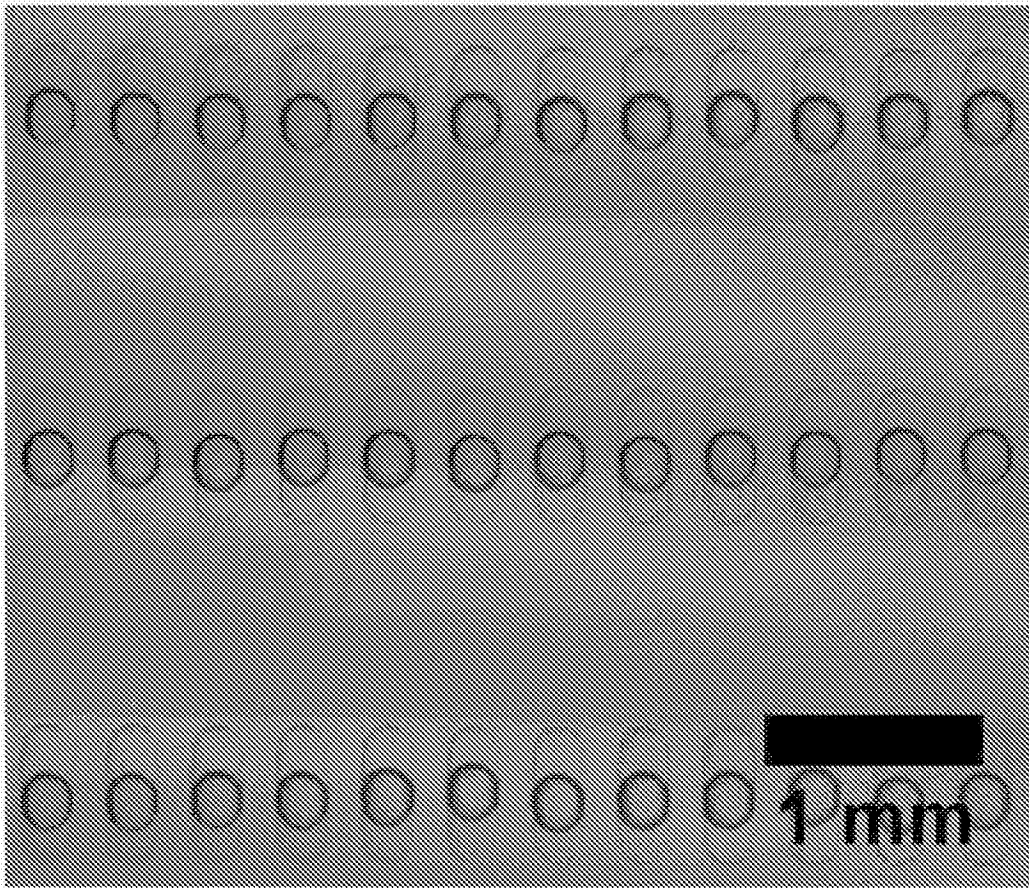


图19

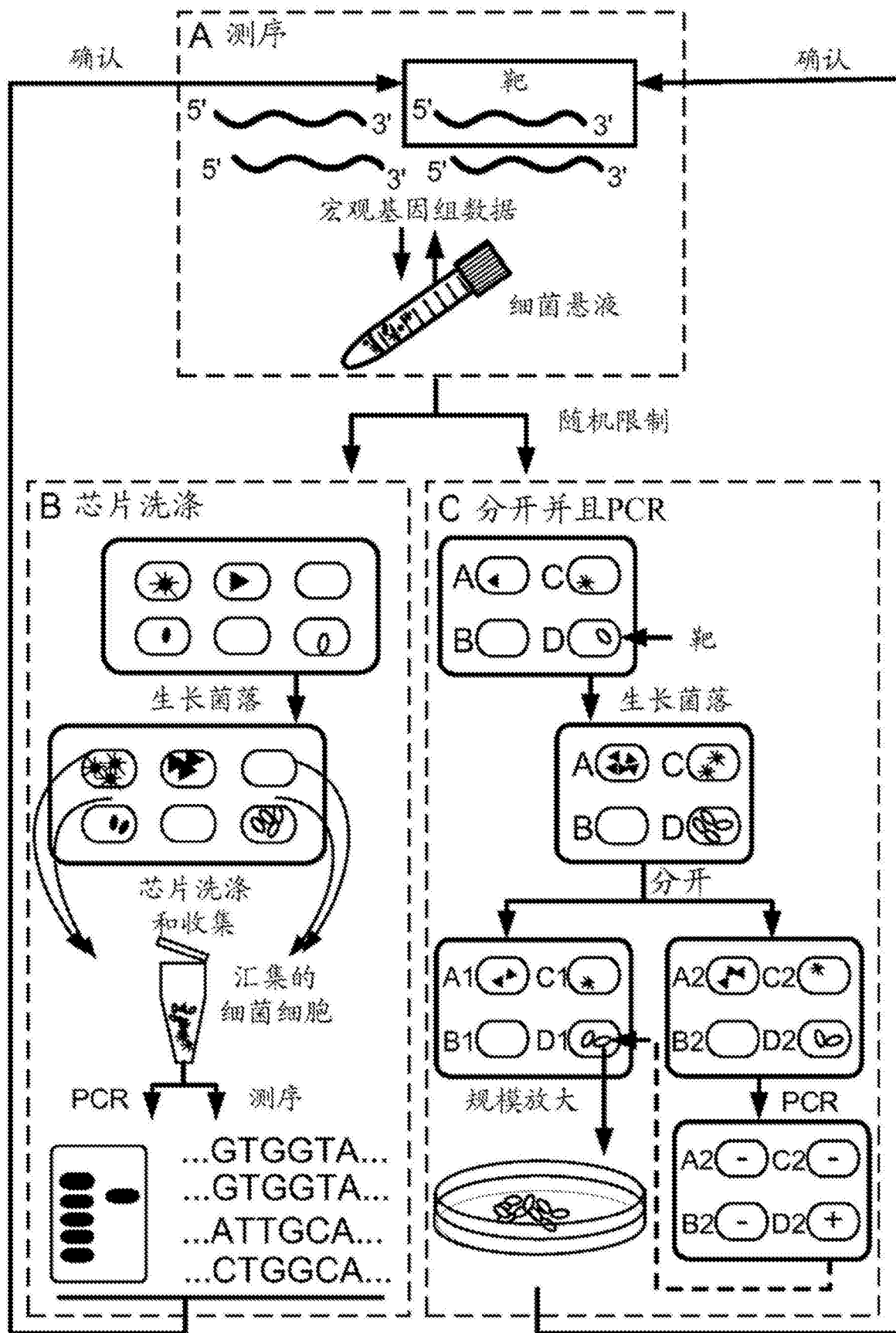


图20

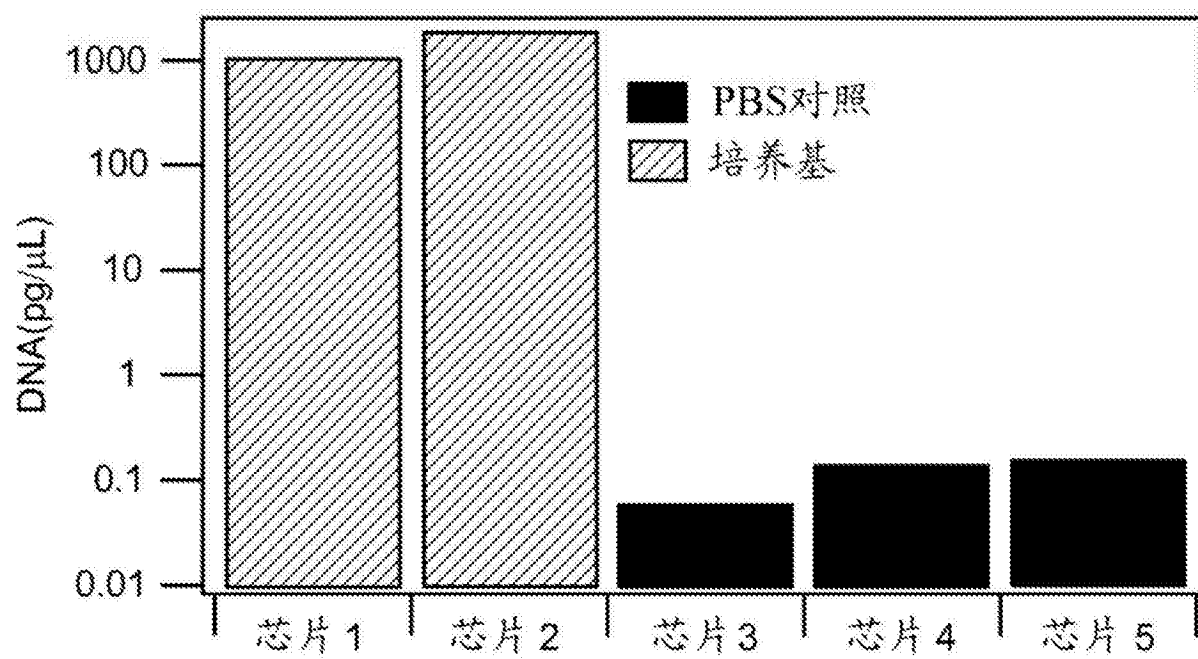


图21

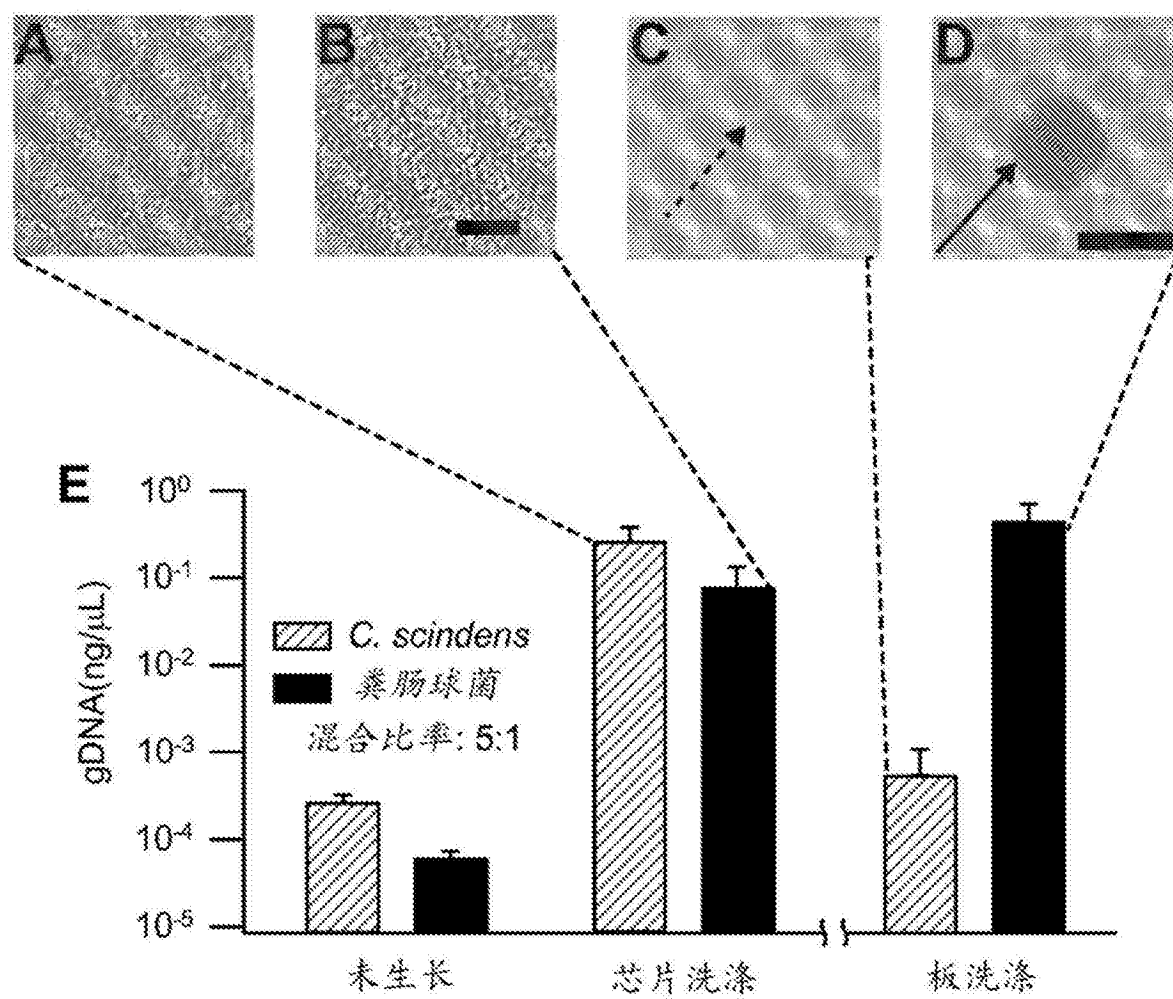


图22

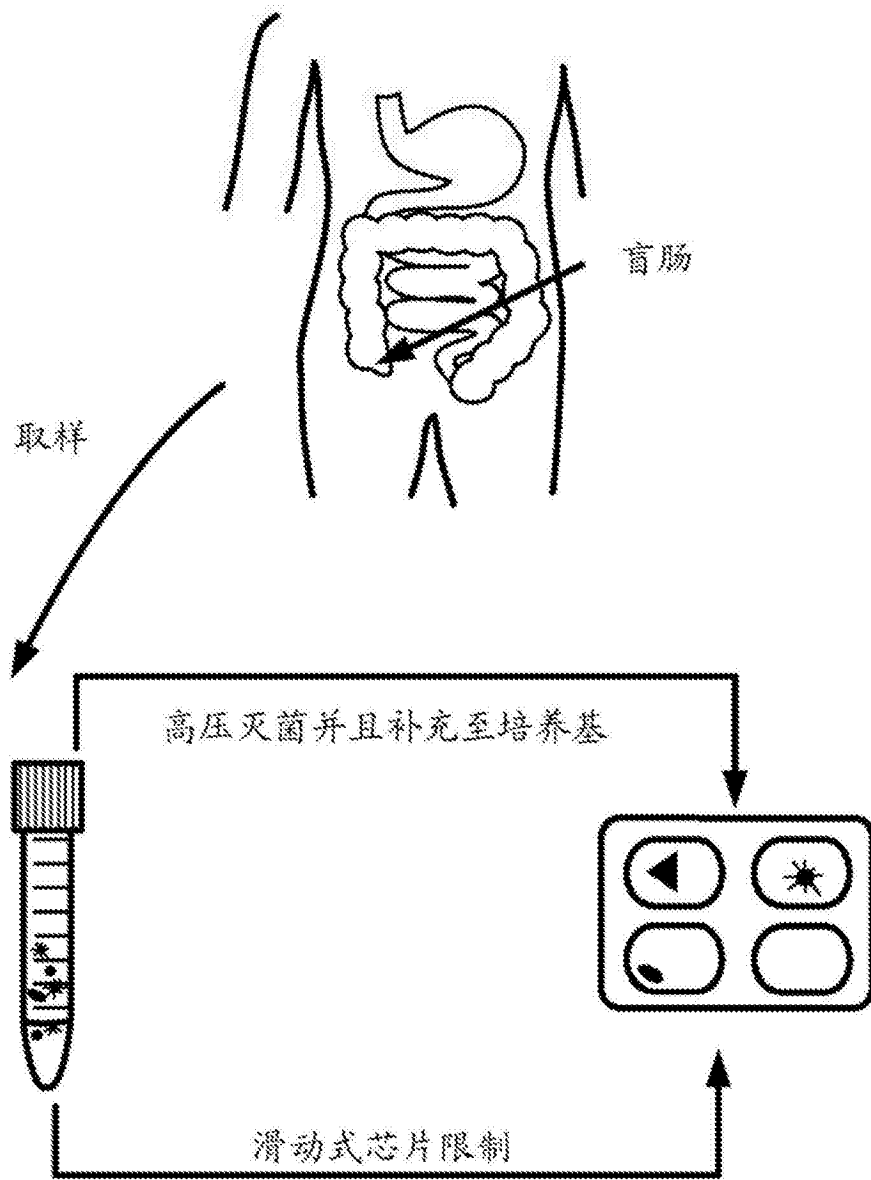


图23

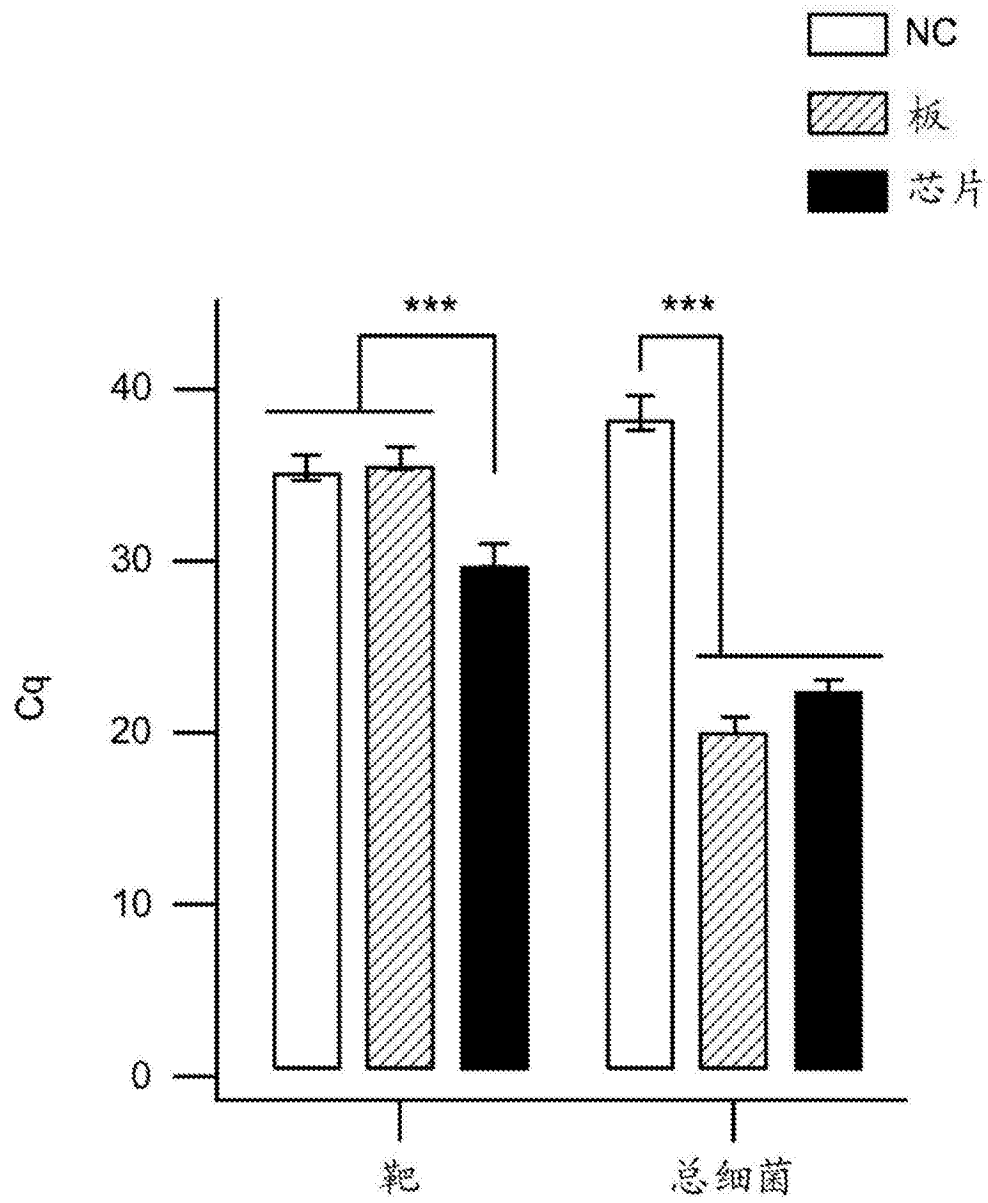


图24

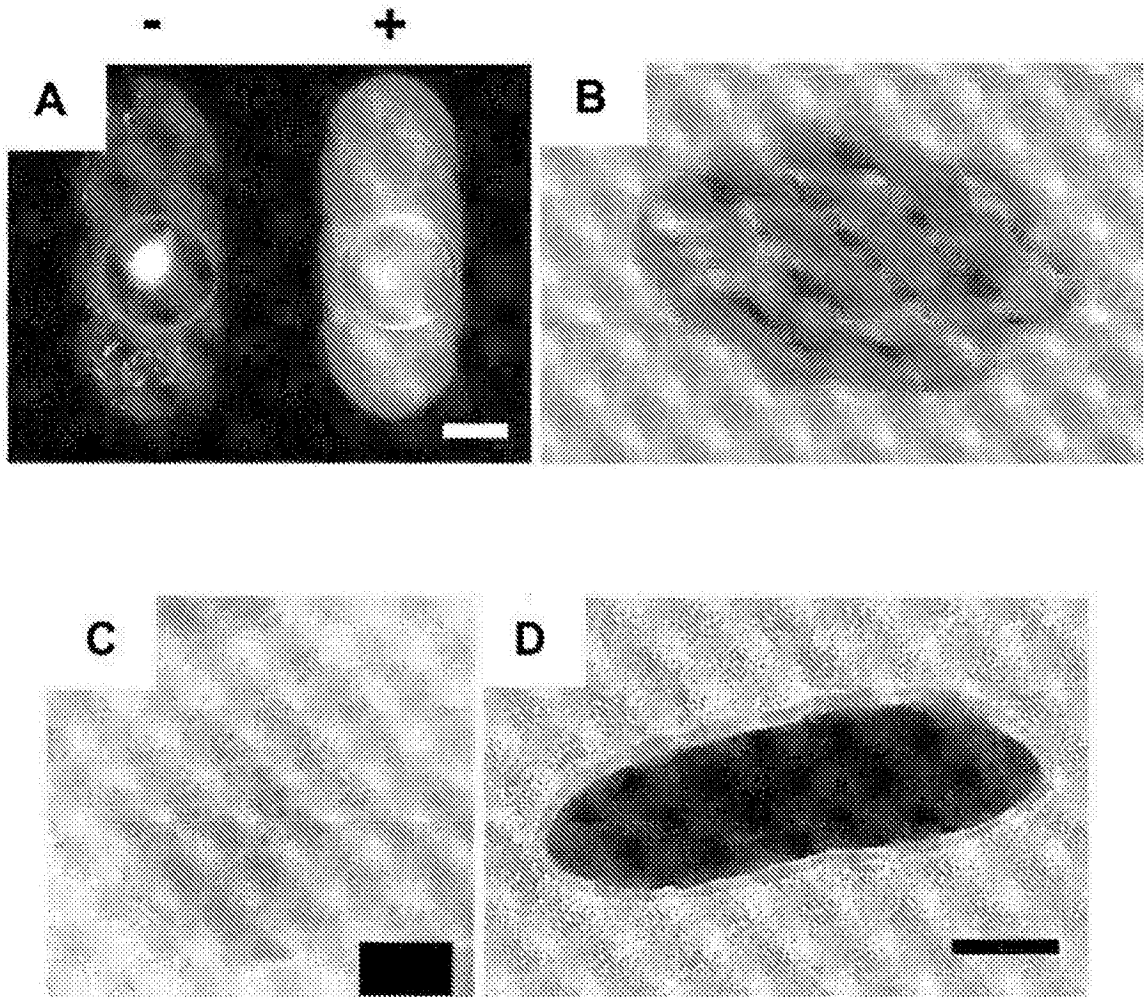


图25

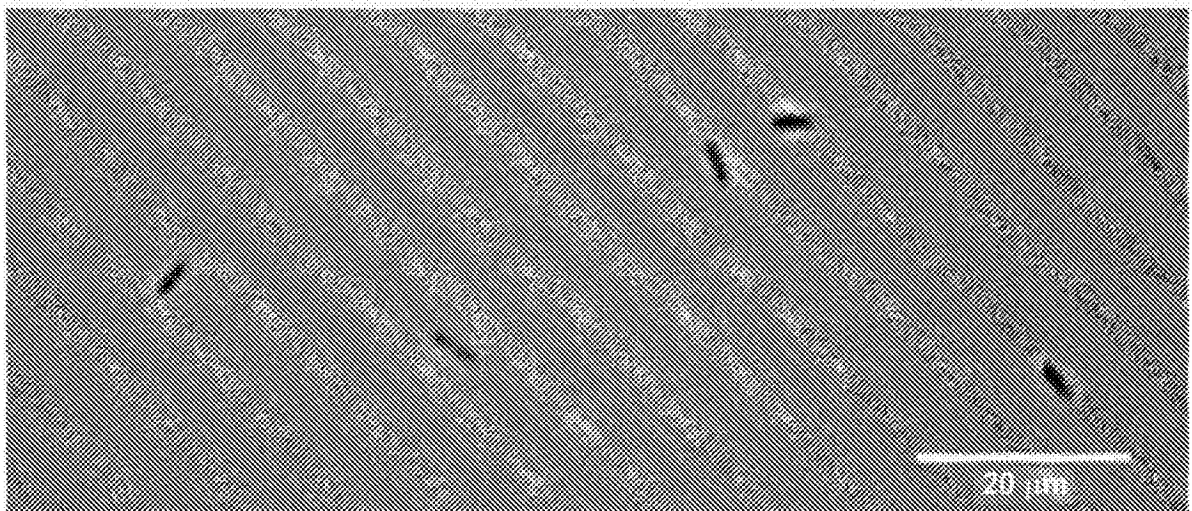
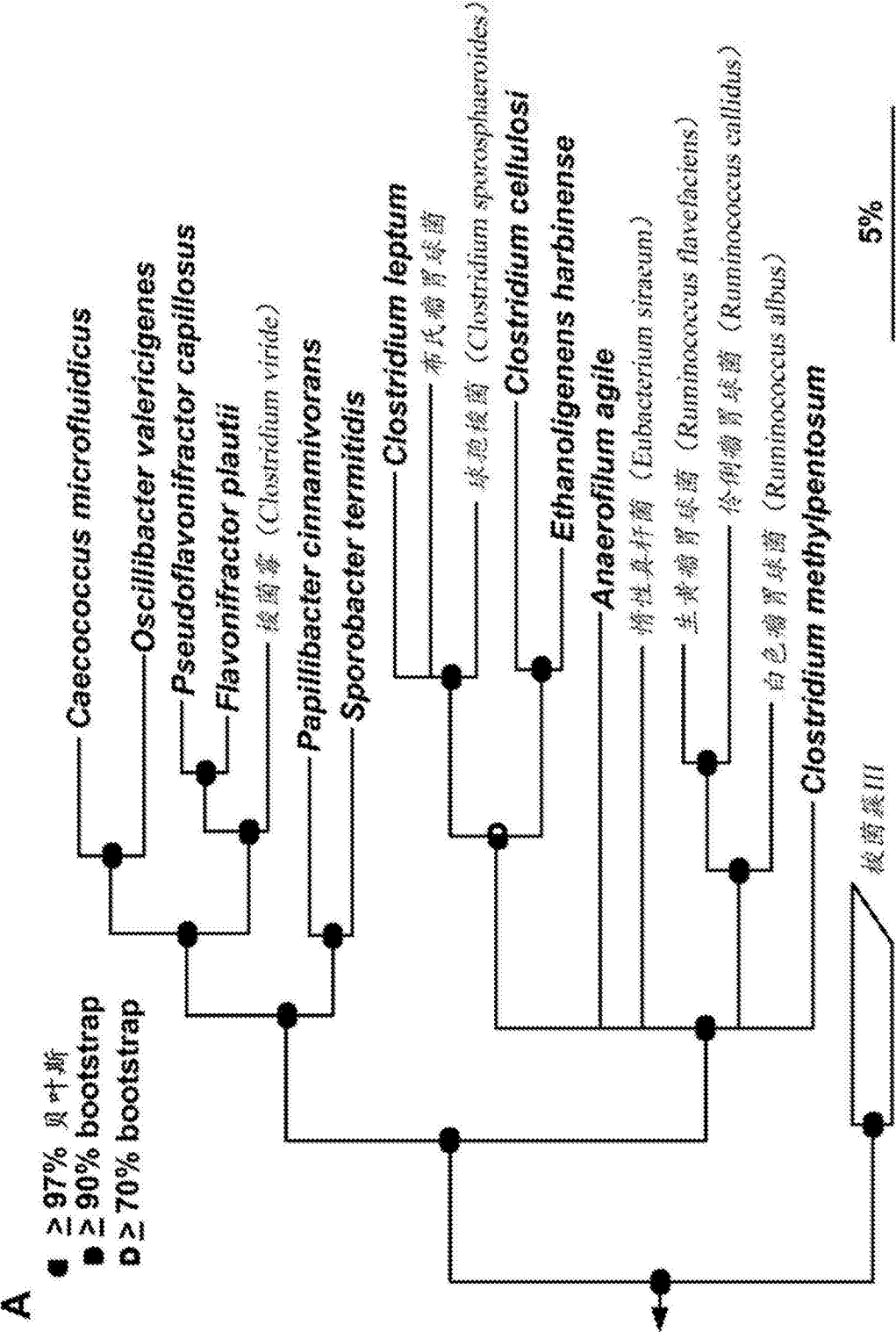


图26



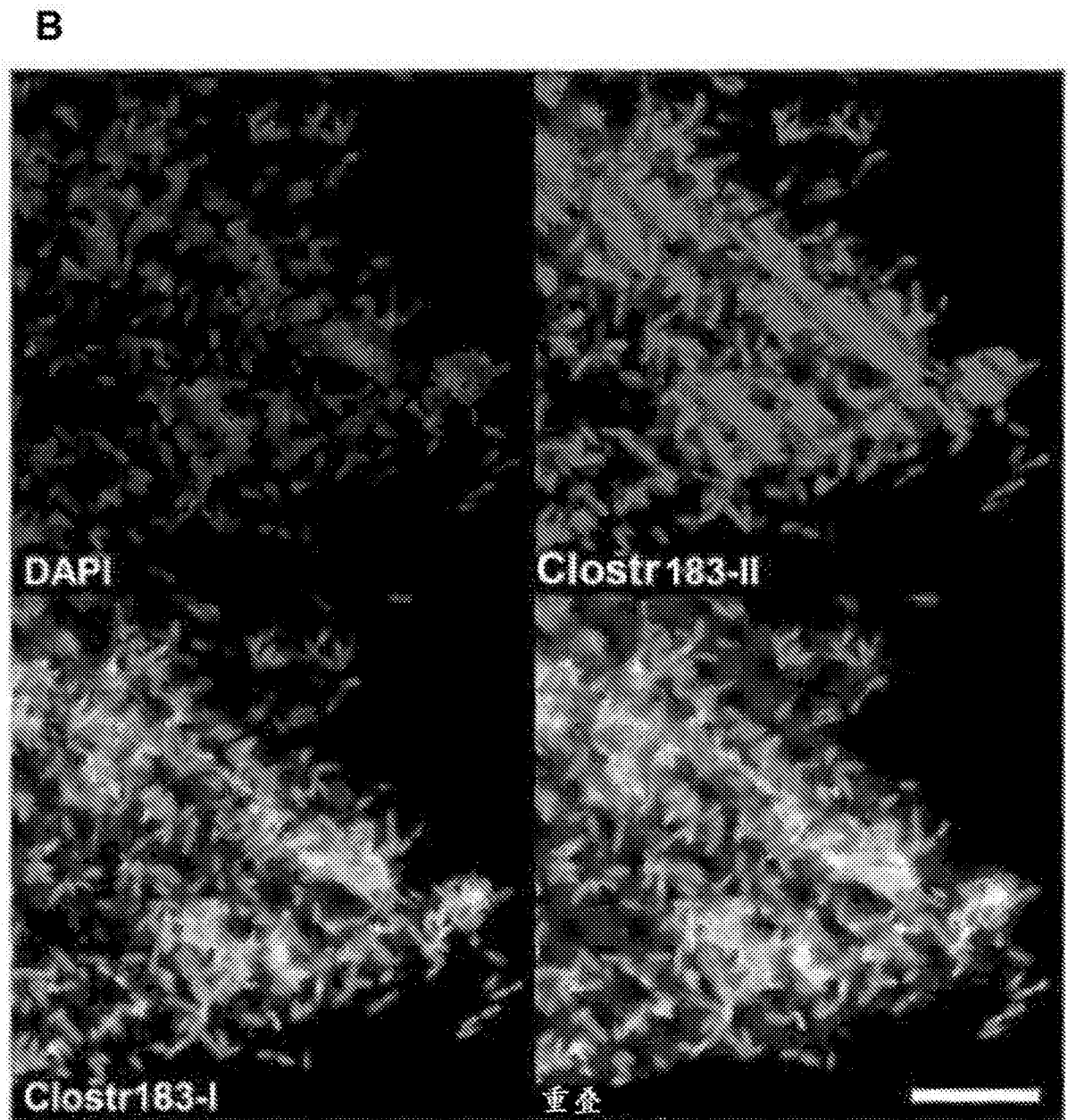


图27

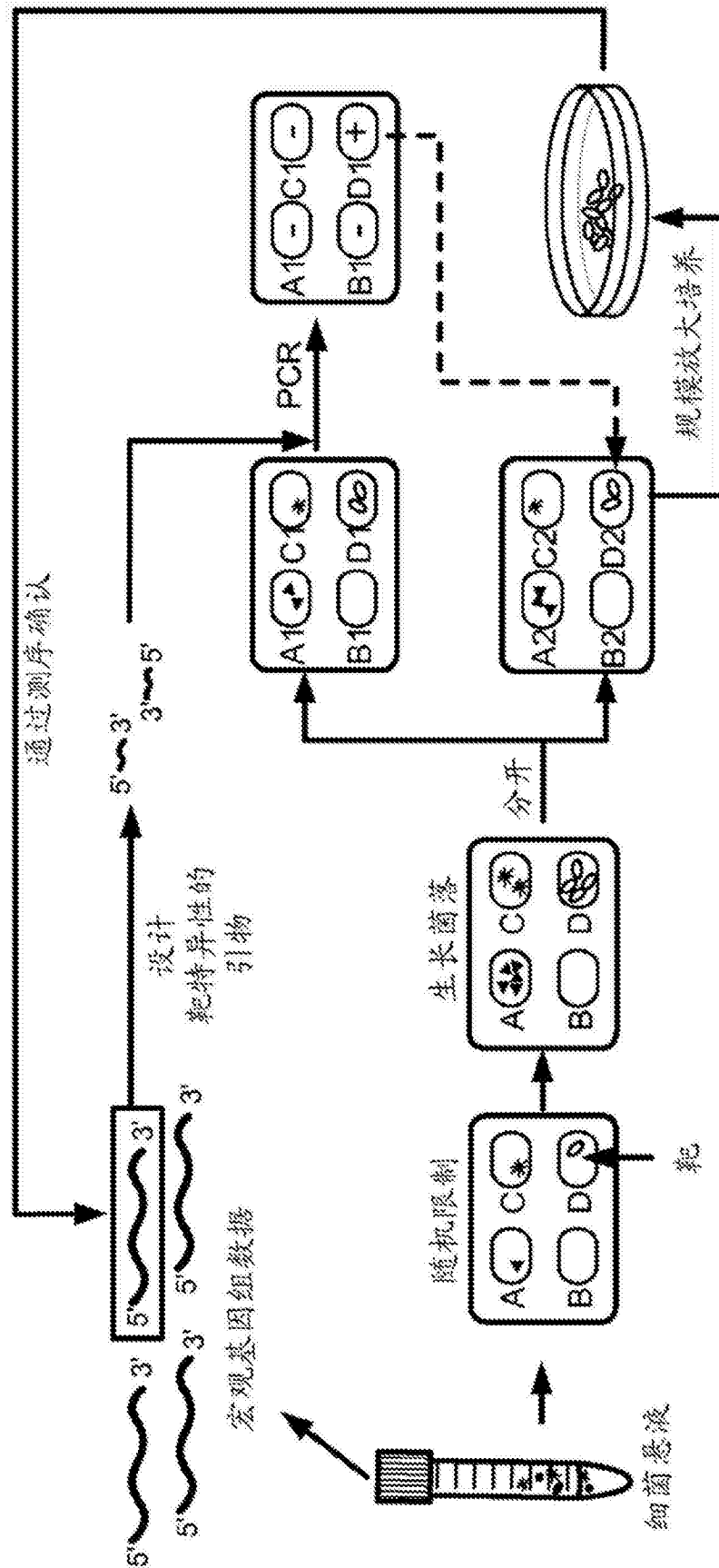


图28