(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104350374 B
(45)授权公告日 2018.04.27

(21)申请号 201380022521.0

(22)申请日 2013.02.28

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104350374 A

(43)申请公布日 2015.02.11

(30)优先权数据
61/605,016 2012.02.29 US
13/476,911 2012.05.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.10.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/028170 2013.02.28

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/130714 EN 2013.09.06

(73)专利权人 富鲁达公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 布赖恩·福勒 吉克·金保尔
貌妙杜 安德鲁·梅
迈克尔·C·诺里斯
多米尼克·G·托普帕尼
马克·A·恩格 王晶
詹森·A·A·韦斯特

(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 郑霞

(51)Int.Cl.
G01N 15/10(2006.01)

(56)对比文件
WO 03085379 A2,2003.10.16,
CN 101842159 A,2010.09.22,
CN 101208421 A,2008.06.25,
CN 1997454 B,2010.06.16,
WO 2008/130623 A1,2008.10.30,

审查员 王佳

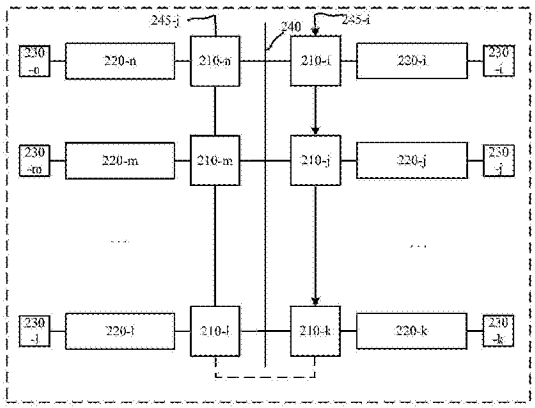
权利要求书6页 说明书46页 附图43页

(54)发明名称

用于使用微流体的多个单细胞捕获和处理的方法、系统和设备

(57)摘要

描述了使用微流体的多个单细胞捕获和处理的方法、系统和设备。提供了用于从较大的细胞群体中捕获、分配和/或操纵单个细胞同时产生基因信息和/或涉及每个单个细胞的反应，工具和技术被提供。不同的捕获配置可被利用以捕获单个细胞，且然后在多室反应配置中处理每个单个细胞。一些实施方案可提供已从细胞的较大群体中分配的多个单个细胞的特异性靶扩增、全基因组扩增、全转录组扩增、实时PCR制备、拷贝数变化、预扩增、mRNA测序和/或单体型分析。一些实施方案可提供其它应用。一些实施方案可被配置用于成像单个细胞或关联的反应产物作为处理的一部分。在一些情况下，反应产物可被收集和/或进一步分析。



CN 104350374 B

1.一种用于多个单细胞捕获和处理的微流体设备，所述微流体设备包括：

串联耦合的多个捕获配置，和

多个多室反应配置；

其中每个捕获配置包括：

输入通道，

输出通道，

捕获巢，其被配置以从多个细胞中捕获单细胞，所述捕获巢包括一个或更多个物理障碍物，

引流沟，以及

一个或更多个旁路通道；

其中每个各自捕获配置被配置以从流动通过所述输入通道的多个细胞中捕获单细胞，使得未被捕获的细胞被转移到所述一个或更多个旁路通道中的一个并且流向所述输出通道并且流动至串联的下一个捕获配置；

所述捕获巢与所述引流沟耦合，

所述捕获巢位于靠近所述输入通道和所述一个或更多个旁路通道的连接点，

所述引流沟与所述输出通道耦合，

所述旁路通道与所述输入通道和所述输出通道耦合，

所述捕获配置被配置以使得：

(i)当所述捕获巢未被细胞占用时，流体能够流动通过所述输入通道、通过所述引流沟和所述旁路通道两者，以及从所述引流沟和旁路通道两者流入所述输出通道，并且

(ii)当所述捕获巢被细胞占用时，流体流动通过所述旁路通道进入所述输出通道而不流动通过所述引流沟，

并且其中溶液仅能够通过所述输入通道和所述输出通道流入或流出所述捕获配置的所述捕获巢、引流沟和旁路通道部分；并且

其中所述多个多室反应配置的每个各自多室反应配置与来自所述多个捕获配置的各自捕获配置耦合，且被配置用于单细胞处理；

其中每个多室反应配置包括：

第一反应室，其被耦合至所述捕获配置，

第二反应室，其通过两个不重叠的流体流动路径被耦合至所述第一反应室，

被安置以使所述第一和第二反应室彼此流体上分离的阀门，以及

被安置以使所述捕获配置与所述多个多室反应配置流体上分离的阀门，

其中所述捕获配置和各自多室反应配置被布置使得溶液从所述捕获配置流动到第一反应室，并从所述第一反应室流动到第二反应室。

2.根据权利要求1所述的微流体设备，其中所述微流体设备包括第一旁路通道和第二旁路通道。

3.根据权利要求2所述的微流体设备，其中所述旁路通道为对称地配置的旁路通道对。

4.根据权利要求3所述的微流体设备，其中所述对称地配置的旁路通道对包括第一翼配置和第二翼配置。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的微流体设备，其中所述多个多室反应配置每个包

括通过两个不重叠的流体流动路径被耦合至所述第二反应室的第三反应室，和被安置以使所述第二和第三反应室彼此流体上分离的阀门。

6.根据权利要求1所述的微流体设备，其中所述第二反应室邻近所述第一反应室。

7.根据权利要求5所述的微流体设备，其中所述第二反应室邻近所述第一反应室。

8.根据权利要求1至4中任一项所述的微流体设备，其中至少所述输入通道或所述输出通道还被配置为集中通道。

9.根据权利要求8所述的微流体设备，其中所述集中通道包括在至少水平方向或垂直方向的缩小通道。

10.根据权利要求1至4中任一项所述的微流体设备，其中所述多个多室反应配置还被配置用于在各自多室反应配置中的一个或更多个阀门被驱动时热循环。

11.根据权利要求5所述的微流体设备，其中所述多个多室反应配置还被配置用于在各自多室反应配置中的一个或更多个阀门被驱动时热循环。

12.根据权利要求1至4中任一项所述的微流体设备，还包括：

一个或更多个成像特征，其中每个各自成像特征允许在各自捕获巢位点捕获的单细胞的成像。

13.根据权利要求1至4中任一项所述的微流体设备，还包括：

多个收集孔，其中每个各自收集孔与各自多室反应配置耦合，且配置以递送反应产物用于进一步分析。

14.根据权利要求1至4中任一项所述的微流体设备，还包括：

基因组分析配置，其与每个各自多室反应配置耦合以进一步分析来自每个各自多室反应配置的反应产物。

15.根据权利要求1至4中任一项所述的微流体设备，其中每个各自捕获配置包括配置以从有限稀释中捕获单细胞的捕获室。

16.根据权利要求1至4中任一项所述的微流体设备，其中每个捕获室被配置以利用随机捕获过程捕获单细胞。

17.根据权利要求1至4中任一项所述的微流体设备，其中每个各自捕获配置包括：

捕获区室；和

结合伴侣，其覆盖所述捕获区室的离散区域，其中所述离散区域被限定大小使得仅单细胞结合到所述离散区域。

18.根据权利要求1至4中任一项所述的微流体设备，还包括：

一个或更多个捕获支持物，其中每个捕获支持物包括分布在所述捕获支持物的至少一部分的结合伴侣。

19.根据权利要求18所述的微流体设备，其中所述一个或更多个捕获支持物包括一个或更多个珠结构。

20.根据权利要求19所述的微流体设备，还包括：

捕获特征，其被配置以捕获所述一个或更多个捕获支持物。

21.根据权利要求1至4中任一项所述的微流体设备，其中所述捕获巢包括一个或更多个物理障碍物，所述一个或更多个物理障碍物被配置以形成凹面表面并被限定大小以仅容纳单细胞。

22.一种使用微流体的用于多个单细胞捕获和处理的方法，所述方法包括：

装载多个细胞到根据权利要求1所述的微流体设备，和执行至少单细胞的多级处理。

23.根据权利要求22所述的方法，还包括：

流动所述多个细胞到所述微流体设备的第一捕获配置；

在所述第一捕获配置中从所述多个细胞捕获第一单细胞；

流动来自所述多个细胞的第一剩余多个细胞到所述微流体设备的第二捕获配置；

在所述第二捕获配置中从所述第一剩余多个细胞捕获第二单细胞；和

执行至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的多级处理，以产生关于所述微流体设备上的至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的各自收集产物；

其中：

a)利用一个或更多个限定大小以仅容纳单细胞的物理障碍物从所述第一捕获配置中的所述多个细胞捕获第一单细胞，并且其中所述第一捕获配置包括：

一个或更多个旁路通道，其与第一输入通道和第一输出通道耦合；

第一引流沟，其与所述第一输入通道和所述第一输出通道耦合；和

第一捕获巢，其与所述第一引流沟耦合并且被配置以从所述多个细胞捕获单个细胞；

当所述捕获巢被捕获的细胞占用时，通过所述第一引流沟的流动被阻塞并且使得未被捕获的细胞被转移到所述一个或更多个旁路通道中的一个并且流向所述第一输出通道；

以及

b)所述第二捕获配置包括：

多个旁路通道，其与第二输入通道和第二输出通道耦合，其中所述第二输入通道与所述第一捕获配置的所述第一输出通道耦合；

第二引流沟，其与所述第二输入通道和所述第二输出通道耦合；和

第二捕获巢，其与所述第二引流沟耦合，被配置以从所述第一剩余的多个细胞捕获单个细胞；以及

c)利用一个或更多个限定大小以仅容纳单细胞的物理障碍物从所述第二捕获配置中的所述第一剩余的多个细胞捕获第二单细胞；以及

d)其中执行至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的多级处理，以产生关于所述微流体设备上的至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的各自收集产物包括：

在所述微流体设备上裂解每个各自单独地捕获的细胞以释放每个各自细胞的一种或更多种成分；和

流动每个各自捕获的细胞的所述一种或更多种成分进入所述微流体设备的各自多室反应配置用于进一步处理。

24.根据权利要求23所述的方法，其中执行至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的多级处理，以产生关于所述微流体设备上的至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的各自收集产物包括：

当流动所述一种或更多种成分通过所述微流体设备的各自多室反应配置的一个或更多个方面时，执行热循环程序。

25.根据权利要求24所述的方法，还包括：在所述微流体设备内成像所述各自捕获的细

胞。

26.一种使用微流体的用于多个单细胞捕获和处理的方法，所述方法包括：

装载多个细胞到根据权利要求1-4中任一项所述的微流体设备；

流动所述多个细胞到所述微流体设备的第一捕获配置；

在所述第一捕获配置从所述多个细胞中捕获第一单细胞；流动来自所述多个细胞的第一剩余多个细胞到所述微流体设备的第二捕获配置；在所述第二捕获配置中从所述第一剩余多个细胞中捕获第二单细胞；和

执行至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的多级处理，以产生关于所述微流体设备上的至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的各自收集产物。

27.根据权利要求26所述的方法，其中捕获至少所述第一单细胞或所述第二单细胞包括：

利用一个或更多个限定大小以仅容纳单细胞的物理障碍物捕获至少所述第一单细胞或所述第二单细胞。

28.根据权利要求26所述的方法，还包括：

流动来自所述多个细胞的所述第一剩余多个细胞通过所述第一捕获配置的一个或更多个旁路通道到与第二捕获配置耦合的流动通道，所述第二捕获配置与所述第一捕获配置的第一输出通道耦合。

29.根据权利要求26所述的方法，还包括：

流动来自所述第一剩余多个细胞的第二剩余多个细胞通过一个或更多个第二旁路通道到所述第二捕获配置的出口，通过第二输出通道到第三捕获配置。

30.根据权利要求26所述的方法，其中所述第一捕获配置包括：

一个或更多个旁路通道，其与第一输入通道和第一输出通道耦合；

第一引流沟，其与第一输入通道和第一输出通道耦合；和

第一捕获巢，其与所述第一引流沟耦合，且被配置以从所述多个细胞捕获单个细胞。

31.根据权利要求30所述的方法，其中所述第二捕获配置包括：

多个旁路通道，其与第二输入通道和第二输出通道耦合，其中所述第二输入通道与所述第一捕获配置的所述第一输出通道耦合；

第二引流沟，其与所述第二输入通道和所述第二输出通道耦合；和

第二捕获巢，其与第二引流沟耦合，被配置以从所述第一剩余的多个细胞捕获单个细胞。

32.根据权利要求26所述的方法，其中执行至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的所述多级处理以产生关于所述微流体设备上的至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的各自收集产物，包括：

在所述微流体设备上裂解每个各自单独地捕获的细胞以释放每个各自细胞的一种或更多种成分。

33.根据权利要求32所述的方法，其中执行至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的所述多级处理以产生关于所述微流体设备上的至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的各自收集产物，包括：

流动每个各自捕获的细胞的所述一种或更多种成分进入所述微流体设备的各自多室

反应配置用于进一步处理。

34.根据权利要求33所述的方法，其中执行至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的所述多级处理以产生关于所述微流体设备上的至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的各自收集产物，包括：

当流动所述一种或更多种成分通过所述微流体设备的各自多室反应配置的一个或更多个方面时，执行热循环程序。

35.根据权利要求26所述的方法，其中执行至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的所述多级处理以产生关于所述微流体设备上的至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的各自收集产物，包括：

在所述微流体设备中用一种或更多种试剂洗涤每个各自捕获的细胞。

36.根据权利要求26所述的方法，其中执行至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的所述多级处理以产生关于所述微流体设备上的至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的各自收集产物，包括：

在所述微流体设备中用一种或更多种试剂给药每个各自捕获的细胞。

37.根据权利要求26所述的方法，还包括：

在所述微流体设备内成像所述各自捕获的细胞。

38.根据权利要求33所述的方法，其中执行至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的所述多级处理以产生关于所述微流体设备上的至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的各自收集产物，包括：

在所述微流体设备中执行预扩增处理。

39.根据权利要求33所述的方法，其中执行至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的所述多级处理以产生关于所述微流体设备上的至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的各自收集产物，包括：

在所述微流体设备中执行mRNA测序过程。

40.根据权利要求33所述的方法，其中执行至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的所述多级处理以产生关于所述微流体设备上的至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的各自收集产物，包括：

在所述微流体设备内执行至少特异性靶扩增、全基因组扩增、全转录组扩增、实时PCR制备、拷贝数变化或单体型分析。

41.根据权利要求33所述的方法，其中执行至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的所述多级处理以产生关于所述微流体设备上的至少捕获的所述第一单细胞和捕获的所述第二单细胞的各自收集产物，包括：

标记来自与各自捕获细胞相关联的所述进一步处理中的反应产物用于识别目的。

42.根据权利要求26所述的方法，还包括：

从所述微流体设备的多个收集孔收集所述收集产物。

43.根据权利要求42所述的方法，还包括：

处理所述收集产物。

44.根据权利要求26所述的方法，其中捕获至少所述第一单细胞或所述第二单细胞包括：

利用配置以从有限稀释中捕获单细胞的捕获室捕获至少所述第一单细胞或所述第二单细胞。

45.根据权利要求26所述的方法，其中捕获至少所述第一单细胞或所述第二单细胞包括：

利用随机捕获过程捕获至少所述第一单细胞或所述第二单细胞。

46.根据权利要求26所述的方法，其中捕获至少所述第一单细胞或所述第二单细胞包括：

利用以下捕获至少所述第一单细胞或所述第二单细胞：

捕获区室；和

结合伴侣，其覆盖所述捕获区室的离散区域，其中所述离散区域被限定大小使得仅单细胞结合到所述离散区域。

47.根据权利要求26所述的方法，其中捕获至少所述第一单细胞或所述第二单细胞包括：

利用一个或更多个捕获支持物捕获至少所述第一单细胞或所述第二单细胞，其中每个捕获支持物包括分布在所述捕获支持物的至少一部分上的结合伴侣。

48.根据权利要求47所述的方法，其中所述一个或更多个捕获支持物包括一个或更多个珠结构。

49.根据权利要求47所述的方法，还包括：

捕获特征，其被配置以捕获所述捕获支持物。

50.一种使用微流体的用于多个单细胞捕获和处理的方法，所述方法包括：

装载多个颗粒或细胞到根据权利要求1所述的微流体设备；

流动所述多个细胞到所述微流体设备的至少第一捕获配置，其中所述第一捕获配置包括：

第一对称地配置的旁路通道对，其与第一输入通道和第一输出通道耦合；

第一引流沟，其与所述第一输入通道和所述第一输出通道耦合；和

第一捕获巢，其与所述第一引流沟耦合，且被配置以从所述多个细胞捕获单个细胞；

在所述第一捕获巢，从所述多个细胞中捕获第一单个颗粒或细胞；

流动来自所述多个细胞的第一剩余多个细胞通过所述第一对称地配置的旁路通道对的至少一个到与所述第一捕获配置的所述第一输出通道耦合的至少第二捕获配置；

流动所述第一剩余多个细胞到所述微流体设备的至少所述第二捕获配置，其中所述第二捕获配置包括：

第二对称地配置的旁路通道对，其与第二输入通道和第二输出通道耦合，其中所述第二输入通道与所述第一捕获配置的所述第一输出通道耦合；

第二引流沟，其与所述第二输入通道和所述第二输出通道耦合；和

第二捕获巢，其与第二引流沟耦合，被配置以从所述第一剩余的多个细胞捕获单个细胞；和

在所述第二捕获巢从所述第一剩余多个细胞捕获第二颗粒或细胞；和

流动来自所述第一剩余多个细胞的第二剩余多个细胞通过所述第二对称地配置的旁路通道对的至少一个，通过所述第二输出通道到第三捕获配置。

用于使用微流体的多个单细胞捕获和处理的方法、系统和设备

技术领域

[0001] 本发明涉及用于使用微流体的多个单细胞捕获和处理的方法、系统和设备。

背景技术

[0002] 在过去的几十年，执行生物系统的分子和细胞分析的能力爆发式地增长。特别地，分子和细胞技术的出现和改善，诸如DNA测序、基因克隆、单克隆抗体产生、细胞转染、扩增技术(诸如PCR)和转基因动物的形成，已经加速了这种爆发增长。这些技术已经引起鉴定的基因、编码蛋白、工程化的细胞类型和研究这些基因、蛋白和细胞种类的分析的压倒性的数量。

发明内容

[0003] 因为样品、试剂和流程可能的组合的数量变得几乎无法估量，变得越来越明显的是，甚至新的方法可能是必要的以解决这种复杂性，尤其是在合理的时间和金钱的限制内。

[0004] 描述了用于使用微流体的多个单细胞捕获和处理的方法、系统和设备。实施方案可以提供用于从细胞的较大群体中捕获、分配和/或操纵单个细胞同时产生涉及每个单个细胞的遗传信息和/或反应产物。一些实施方案可提供用于已从细胞的较大群体中分配的多个单个细胞的特异性靶扩增(STA)、全基因组扩增(WGA)、全转录组扩增(WTA)、实时PCR制备和/或单体型分析。一些实施方案可提供其它应用。一些特定的实施方案提供多个单个细胞的mRNA测序或预扩增。一些实施方案可被配置用于成像单个细胞或相关的反应产物作为处理的一部分。在一些情形中，反应产物可被收集和/或进一步分析。

[0005] 方法、系统和设备可包括用于利用微流体捕获和处理多个单细胞的不同的微流体设备和/或控制器。一些微流体设备被提供，其可包括多个捕获配置和多个多室反应配置。每个捕获配置可被配置以从多个细胞中捕获单个细胞。然后，每个多室反应配置可被用于在细胞被裂解后处理每个细胞。反应产物可从每个多室反应配置收集。微流体控制器也被提供，其可被用于操作微流体设备以从多个细胞中捕获和处理单个细胞。

[0006] 一些实施方案包括用于多个单细胞捕获和处理的微流体设备。微流体设备可包括：多个串联耦合的捕获配置，其中每个各自捕获配置被配置以捕获单细胞；和多个多室反应配置，其中每个各自多室反应配置与来自多个捕获配置的各自捕获配置耦合，并被配置用于单细胞处理。

[0007] 在一些实施方案中，每个各自捕获配置包括一个或更多个限定大小以仅容纳单细胞的物理障碍物。在一些实施方案中，每个各自捕获配置包括：与输入通道和输出通道耦合的一个或更多个旁路通道；与输入通道和输出通道耦合的引流沟；和/或位于靠近输入通道和一个或更多个旁路通道的连接点且与引流沟耦合的捕获巢，其中捕获巢被配置以从多个细胞中捕获单细胞，使得当单细胞在捕获巢被捕获时，剩余的多个细胞被转移到一个或更多个旁路通道中的至少一个。一个或更多个旁路通道可包括第一旁路通道和第二旁路通

道。第一旁路通道和第二旁路通道可被对称地配置。对称地配置的第一旁路通道和第二旁路通道可包括第一翼配置和第二翼配置。

[0008] 在一些实施方案中，至少输入通道或输出通道被进一步配置为集中通道。集中通道可包括在至少水平方向或垂直方向的缩小通道。多个多室反应配置还可被配置用于在各自多室反应配置的一个或更多个阀门可被驱动时热循环。

[0009] 一些实施方案包括一个或更多个成像特征，其中每个各自成像特征允许在各自捕获巢位点捕获的单细胞的成像。一些实施方案多个收集孔，其中每个各自的收集孔与各自多室反应配置耦合，且配置以递送反应产物用于进一步分析。

[0010] 一些实施方案还包括基因组分析配置，其与每个各自多室反应配置耦合以进一步分析来自每个各自多室反应配置的反应产物。

[0011] 在一些实施方案中，每个各自捕获配置包括配置以从有限稀释中捕获单个细胞的捕获室。在一些实施方案中，每个捕获室被配置以利用随机捕获过程捕获单个细胞。

[0012] 在一些实施方案中，每个各自捕获配置包括：捕获区室；和/或覆盖捕获区室的离散区域的结合伴侣，其中离散部分被限定大小使得仅单细胞结合到离散区域。一些实施方案包括一个或更多个捕获支持物，其中每个捕获支持物包括分布在捕获支持物的至少一部分的结合伴侣。一个或更多个捕获支持物可包括一个或更多个珠结构。一些实施方案包括捕获特征，其被配置以捕获一个或更多个捕获支持物。

[0013] 一些实施方案包括用于使用微流体的多个单细胞捕获和处理的方法。所述方法可包括：装载多个细胞到微流体设备中；流动多个细胞到微流体设备的第一捕获配置；从第一捕获配置的多个细胞中捕获第一单细胞；流动来自多个细胞中的第一剩余多个细胞到微流体设备的第二捕获配置；在第二捕获配置中从第一剩余多个细胞中捕获第二单细胞；和/或执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理，以产生关于微流体设备上至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物。

[0014] 捕获至少第一单细胞或第二单细胞可包括利用一个或更多个限定大小以仅容纳单细胞的物理障碍物捕获至少第一单细胞或第二单细胞。一些实施方案包括流动来自多个细胞的第一剩余多个细胞通过第一捕获配置的一个或更多个旁路通道到与第二捕获配置耦合的流动通道，所述第二捕获配置与第一捕获配置的第一输出通道耦合。一些实施方案包括流动来自第一剩余多个细胞的第二剩余多个细胞，通过一个或更多个第二旁路通道到第二捕获配置的出口，通过第二输出通道到第三捕获配置。

[0015] 在一些实施方案中，第一捕获配置包括：与第一输入通道和第一输出通道耦合的一个或更多个旁路通道；与第一输入通道和第一输出通道耦合的第一引流沟；和/或与第一引流沟耦合且配置以从多个细胞中捕获单个细胞的第一捕获巢。第二捕获配置可包括：与第二输入通道和第二输出通道耦合的多个旁路通道，其中第二输入通道与第一捕获配置的第一输出通道耦合；与第二输入通道和第二输出通道耦合的第二引流沟；和/或与第二引流沟耦合且配置以从第一剩余的多个细胞中捕获单个细胞的第二捕获巢。

[0016] 在一些实施方案中，执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，包括在微流体设备上裂解每个各自单独捕获的细胞以释放每个各自细胞的一种或更多种成分。执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备

上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，可包括流动每个各自捕获的细胞的一种或更多种成分到微流体设备的各自多室反应配置用于进一步处理。执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物可包括当流动一种或更多种成分通过微流体设备的各自多室反应配置一个或更多个方面时执行热循环程序。执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，可包括在微流体设备中，用一种或更多种试剂洗涤每个各自捕获的细胞。执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，可包括在微流体设备中，用一种或更多种试剂给药每个各自捕获的细胞。

[0017] 执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，可包括在微流体设备内执行预扩增过程。执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，可包括在微流体设备内执行mRNA测序过程。执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，可包括在微流体设备内执行至少特异性靶扩增、全基因组扩增、全转录组扩增、实时PCR制备、拷贝数变化或单体型分析。执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，可包括标记来自与各自捕获的细胞相关联的进一步处理的反应产物用于识别目的。

[0018] 一些实施方案包括收集来自微流体设备的多个收集孔的收集产物。一些实施方案包括处理收集产物。一些实施方案包括在微流体设备内成像至少各自捕获细胞或收集的产物。

[0019] 在一些实施方案中，捕获至少第一单细胞或第二单细胞包括利用配置以从有限稀释中捕获单个细胞的捕获室捕获至少第一单细胞或第二单细胞。捕获至少第一单细胞或第二单细胞可包括利用随机捕获过程捕获至少第一单细胞或第二单细胞。捕获至少第一单细胞或第二单细胞可包括：利用以下捕获至少第一单细胞或第二单细胞：捕获区室；和/或覆盖捕获区室的离散区域的结合伴侣，其中离散部分被限定大小使得仅单细胞结合到离散区域。捕获至少第一单细胞或第二单细胞可包括：利用一个或更多个捕获支持物捕获至少第一单细胞或第二单细胞，其中每个捕获支持物包括分布在捕获支持物至少一部分上的结合伴侣。一个或更多个捕获支持物可包括一个或更多个珠结构。一些实施方案还包括捕获特征，其被配置以捕获捕获支持物。

[0020] 一些实施方案包括预扩增方法，其利用配置以从多个细胞中捕获和处理单个细胞的微流体设备。所述方法可包括：利用一种或更多种溶液启动微流体设备；流动多个细胞通过微流体设备，使得在微流体设备的单个捕获位点从多个细胞中捕获单个细胞；裂解在微流体设备的单个捕获位点的多个捕获的单个细胞；在微流体设备内，在多个单个裂解的细胞上执行逆转录以产生与每个各自单个细胞相关联的逆转录产物；和/或在微流体设备内，在与每个各自裂解的单个细胞相关联的各自逆转录产物上执行预扩增以产生与每个单个

捕获细胞相关联的预扩增产物。

[0021] 一些实施方案包括从微流体设备的多个收集入口递送与每个单个捕获细胞相关联的预扩增产物到各自收集入口。一些实施方案包括装载一种或更多种溶液到微流体设备。在一些实施方案中，一种或更多种溶液包括至少一种或更多种试剂或一种或更多种缓冲液。

[0022] 一些实施方案包括装载多个细胞到微流体设备。一些实施方案包括成像在微流体设备上的一个或更多个捕获的单个细胞。一些实施方案包括装载至少一种或更多种裂解试剂、一种或更多种逆转录试剂、或一种或更多种预扩增试剂到微流体设备。一些实施方案包括：移除一个或更多个收集入口的一个或更多个保护层；和/或从微流体设备的多个收集入口的每个各自收集入口收集预扩增产物。

[0023] 一些实施方案包括染色在微流体设备上的单个捕获细胞的一个或更多个。一些实施方案包括基于染色确定单个捕获细胞的一个或更多个为存活或死亡。一些实施方案包括基于成像确定单个捕获细胞的一个或更多个为存活或死亡。

[0024] 在一些实施方案中，利用的微流体设备包括串联耦合的多个捕获配置，每个各自捕获配置包括：与输入通道和输出通道耦合的多个旁路通道；与输入通道和输出通道耦合的引流沟；和/或位于靠近输入通道和多个旁路通道的连接点且与引流沟耦合的捕获巢，其中捕获巢被配置以从多个细胞中捕获单个细胞，使得当单个细胞在捕获巢被捕获时，剩余的多个细胞被转移到多个旁路通道中的至少一个，其中捕获巢包括单个捕获位点的一个。微流体设备还可以包括多个多室反应配置，其中每个各自多室反应配置与来自多个捕获配置中的各自捕获配置耦合，且被配置用于单细胞处理。

[0025] 一些实施方案包括预扩增方法，其利用配置以从多个细胞中捕获和处理单个细胞的微流体设备。所述方法可包括：装载一种或更多种溶液到微流体设备；利用一种或更多种溶液启动微流体设备；装载多个细胞到微流体设备；流动多个细胞通过微流体设备使得在微流体设备的单个捕获位点从多个细胞捕获单个细胞；成像在微流体设备上的捕获的单个细胞的一个或更多个；装载至少一种或更多种裂解试剂、一种或更多种逆转录试剂、或一种或更多种预扩增试剂到微流体设备；裂解在微流体设备的单个捕获位点捕获的多个单个细胞；在微流体设备内，在多个单个裂解的细胞上执行逆转录以产生与每个各自单个细胞相关联的逆转录产物；在微流体设备内，在与每个各自裂解的单个细胞相关联的各自逆转录产物上执行预扩增以产生与每个单个捕获细胞相关联的预扩增产物；从微流体设备的多个收集入口递送与每个单个捕获细胞相关联的预扩增产物到各自收集入口；移除一个或更多个收集入口的一个或更多个保护层；和/或从微流体设备的多个收集入口的每个各自收集入口收集预扩增产物。

[0026] 一些实施方案包括mRNA测序方法，其利用配置以从多个细胞中捕获和处理单个细胞的微流体设备。所述方法可包括：利用一种或更多种溶液启动微流体设备；流动多个细胞通过微流体设备，使得在微流体设备的单个捕获位点从多个细胞中捕获单个细胞；裂解在微流体设备的单个捕获位点的多个捕获的单个细胞；在微流体设备内，在多个单个裂解的细胞上执行逆转录以产生与每个各自单个细胞相关联的逆转录产物；和/或在微流体设备内，在与每个各自裂解的单个细胞相关联的各自逆转录产物上执行PCR以产生与每个单个捕获细胞相关联的PCR产物。

[0027] 一些实施方案包括从微流体设备的多个收集入口递送与每个单个捕获细胞相关联的PCR产物到各自收集入口。一些实施方案包括装载一种或更多种溶液到微流体设备。一种或更多种溶液可包括至少一种或更多种试剂或一种或更多种缓冲液。

[0028] 一些实施方案包括装载多个细胞到微流体设备。一些实施方案包括成像在微流体设备上的捕获的单个细胞的一个或更多个。一些实施方案包括装载至少一种或更多种裂解试剂、一种或更多种逆转录试剂、或一种或更多种PCR试剂到微流体设备。一些实施方案包括:移除一个或更多个收集入口的一个或更多个保护层;和/或从微流体设备的多个收集入口的每个各自收集入口收集PCR产物。

[0029] 一些实施方案包括染色在微流体设备上的单个捕获细胞的一个或更多个。一些实施方案包括基于染色确定单个捕获细胞的一个或更多个为存活或死亡。一些实施方案包括基于成像确定单个捕获细胞的一个或更多个为存活或死亡。在一些实施方案中,PCR产物包括扩增的cDNA。

[0030] 一些实施方案包括利用与每个单个捕获细胞相关联的PCR产物制备一个或更多个文库。制备一个或更多个文库可包括:确定来自与每个单个细胞相关联的每个各自收集产物的cDNA浓度;和/或稀释每个各自cDNA浓度到预先确定的浓度范围内。

[0031] 一些实施方案包括制备用于标签化的稀释的cDNA浓度以产生标签化产物。一些实施方案包括在标签化产物上执行PCR扩增以产生PCR产物。一些实施方案包括从PCR产物产生一个或更多个文库池。

[0032] 在一些实施方案中,利用的微流体设备包括串联耦合的多个捕获配置,每个各自捕获配置包括:与输入通道和输出通道耦合的多个旁路通道;与输入通道和输出通道耦合的引流沟;和/或位于靠近输入通道和多个旁路通道的连接点且与引流沟耦合的捕获巢,其中捕获巢被配置以从多个细胞中捕获单个细胞,使得当单个细胞在捕获巢被捕获时,剩余的多个细胞被转移到多个旁路通道中的至少一个,其中捕获巢包括单个捕获位点的一个。微流体设备还可以包括多个多室反应配置,其中每个各自多室反应配置与来自多个捕获配置中的各自捕获配置耦合,且被配置用于单细胞处理。

[0033] 一些实施方案包括mRNA测序方法,其利用配置以从多个细胞中捕获和处理单个细胞的微流体设备。所述方法可包括:装载一种或更多种溶液到微流体设备;利用一种或更多种溶液启动微流体设备;装载多个细胞到微流体设备;流动多个细胞通过微流体设备使得在微流体设备的单个捕获位点从多个细胞中捕获单个细胞;成像在微流体设备上的一个或更多个捕获的单个细胞;装载至少一种或更多种裂解试剂、一种或更多种逆转录试剂、或一种或更多种PCR试剂到微流体设备;裂解在微流体设备的单个捕获位点捕获的多个单个细胞;在微流体设备内,在多个单个裂解的细胞上执行逆转录以产生与每个各自单个细胞相关联的逆转录产物;在微流体设备内,在与每个各自裂解的单个细胞相关联的各自逆转录产物上执行PCR以产生与每个单个捕获细胞相关联的PCR产物;递送与每个单个捕获细胞相关联的PCR产物到来自微流体设备的多个收集入口的各自收集入口;移除一个或更多个收集入口的一个或更多个保护层;和/或从微流体设备的多个收集入口的每个各自收集入口收集PCR产物。

[0034] 一些实施方案包括微流体控制器,其被配置用于使用微流体设备的多个单细胞处理。微流体控制器可包括:壳体;微流体设备输入和输出模块,其被配置以加载和卸载微流

体设备到壳体内；压力模块，其被配置以与微流体设备耦合以提供控制器压力到微流体设备；密封模块，其被配置以提供一个或更多个压力密封圈(pressure seals)到微流体设备；和/或热循环模块，其被配置以热循环微流体设备。

[0035] 一些实施方案包括成像模块，其被配置以成像微流体设备的一个或更多个方面。成像模块可包括配置用以成像在微流体设备中的一个或更多个捕获的细胞的至少显微镜或照相机。成像模块可包括配置以成像在微流体设备中的一个或更多个反应产物的至少显微镜或照相机。在一些实施方案中，热循环模块被配置以当压力模块激活微流体设备内的一个或更多个阀门时，热循环微流体设备。

[0036] 一些实施方案包括输入模块，其被配置以从微流体控制器的用户接收输入。一些实施方案包括显示模块，其被配置以至少提供信息到微流体控制器的用户或从微流体控制器的用户接收输入。

[0037] 在一些实施方案中，配置以与微流体设备耦合以提供控制器压力到微流体设备的压力模块被配置以控制在微流体设备中的压力，以流动多个细胞通过微流体设备，并在微流体设备内在单个捕获配置捕获单个细胞。配置以与微流体设备耦合以提供控制器压力到微流体设备的压力模块可被配置以在微流体设备中控制压力以执行在微流体设备内捕获的多个单细胞的多级处理。

[0038] 在一些实施方案中，被配置以热循环微流体设备的热循环模块被配置以执行在微流体设备内捕获的多个单细胞的多级处理。

[0039] 在一些实施方案中，多级处理包括预扩增处理。多级处理可包括mRNA测序处理。

[0040] 在一些实施方案中，配置以与微流体设备耦合以提供控制器压力到微流体设备的压力模块被配置以控制在微流体设备中的压力以启动微流体设备。配置以与微流体设备耦合以提供控制器压力到微流体设备的压力模块可被配置以控制在微流体设备中的压力，以装载多个细胞进入微流体设备，并在微流体设备中从多个细胞中捕获多个单个细胞。

[0041] 在一些实施方案中，至少压力模块或热循环模块被配置以促进在微流体设备上执行至少裂解、逆转录、PCR或收集。在一些实施方案中，至少压力模块或热循环模块被配置以促进在微流体设备上执行至少裂解、逆转录、预扩增或收集。

[0042] 一些实施方案包括微流体设备，其被配置用于多个单细胞处理。微流体设备可包括串联耦合的多个捕获配置。每个各自捕获配置可包括：多个旁路通道，其与输入通道和输出通道耦合；引流沟，其与输入通道和输出通道耦合；和/或捕获巢，其位于靠近输入通道和多个旁路通道的连接点，且与引流沟耦合。捕获巢可被配置以从多个细胞捕获单个细胞，使得当在捕获巢中单个细胞被捕获时，剩余细胞被转移到多个旁路通道的至少一个中。微流体设备可包括多个多室反应配置。每个各自多室反应配置可与来自多个捕获配置的各自捕获配置耦合，并配置用于单细胞处理。

[0043] 在一些实施方案中，至少输入通道或输出通道被进一步配置为集中通道。集中通道可包括在至少水平方向或垂直方向的缩小通道。在一些实施方案中，多个旁路通道被对称地配置。在一些实施方案中，多室反应配置还被配置用于当各自多室反应配置的一个或更多个阀门被驱动时热循环。在一些实施方案中，微流体设备还被配置用于成像。

[0044] 一些实施方案包括用于使用微流体的多个单细胞处理的方法。所述方法可包括：装载多个细胞到微流体设备；和/或流动多个细胞到微流体设备的至少第一捕获配置。第一

捕获配置可包括：多个第一旁路通道，其与第一输入通道和第一输出通道耦合；第一引流沟，其与第一输入通道和第一输出通道耦合；和/或第一捕获巢，其与第一引流沟耦合，且被配置以从多个细胞捕获单个细胞。所述方法可包括：在第一捕获巢，从多个细胞中捕获第一单个细胞；流动来自多个细胞的第一剩余细胞集合通过多个第一旁路通道的至少一个到与第一捕获配置的第一输出通道耦合的至少第二捕获配置；和/或流动第一剩余细胞集合到微流体设备的至少第二捕获配置中。第二捕获配置可包括：与第二输入通道和第二输出通道耦合的多个第二旁路通道，其中第二输入通道与第一捕获配置的第一输出通道耦合；与第二输入通道和第二输出通道耦合的第二引流沟；和/或与第二引流沟耦合且配置以从第一剩余细胞集合中捕获单个细胞的第二捕获巢。所述方法可包括：在第二捕获巢从第一剩余细胞集合捕获第二颗粒或细胞；和流动来自第一剩余细胞集合的第二剩余细胞集合通过多个第二旁路通道的至少一个，通过第二输出通道到第三捕获配置。

[0045] 在一些实施方案中，所述方法还包括裂解每个各自单独捕获的细胞以释放每个各自细胞的一种或更多种成分。所述方法还可包括流动每个各自捕获的细胞的一种或更多种成分到各自多室反应配置用于进一步处理。所述方法还可包括，当流动一种或更多种成分通过各自多室反应配置的一个或更多个方面时，执行热循环程序。所述方法还可包括用一种或更多种试剂洗涤各自捕获的细胞。所述方法还可包括用一种或更多种药剂给药各自捕获的细胞。所述方法还可包括成像各自捕获的细胞。

[0046] 在一些实施方案中，方法的进一步处理可包括执行至少特异性靶扩增、全基因组扩增、全转录组扩增、实时PCR制备或单体型分析。所述方法可包括标记来自与各自捕获细胞相关联的进一步处理中的反应产物用于识别目的。反应产物可被输出并在例如下游系统被分析。

[0047] 一些实施方案可包括微流体控制器，其被配置用于使用微流体设备的多个单细胞处理。微流体控制器可包括：壳体；微流体设备输入和输出模块，其被配置以加载和卸载微流体设备到壳体内；压力模块，其被配置以与微流体设备耦合以提供控制器压力到微流体设备；密封模块，其被配置以提供一个或更多个压力密封圈到微流体设备；和/或热循环模块，其被配置以热循环微流体设备。

[0048] 在一些实施方案中，微流体控制器包括成像模块，其被配置以成像微流体设备的一个或更多个方面。在一些实施方案中，热循环模块被配置以当压力模块激活微流体设备内的一个或更多个阀门时，热循环微流体设备。微流体控制器可包括输入模块，其被配置以从微流体控制器的用户接收输入。微流体控制器可包括显示模块，其被配置以至少提供信息到微流体控制器的用户或从微流体控制器的用户接收输入。

[0049] 一些实施方案包括微流体系统，其被配置用于多个单细胞处理。微流体系统可包括微流体系统和/或与微流体设备耦合的微流体控制器。微流体设备可包括串联耦合的多个捕获配置。每个各自捕获配置可包括：多个旁路通道，其与输入通道和输出通道耦合；引流沟，其与输入通道和输出通道耦合；和/或捕获巢，其位于靠近输入通道和多个旁路通道的连接点，且与引流沟耦合。捕获巢可被配置以从多个细胞捕获单个细胞，使得当在捕获巢中单个细胞被捕获时，剩余细胞被转移到多个旁路通道的至少一个中。微流体设备可包括多个多室反应配置。每个各自多室反应配置可与来自多个捕获配置的各自捕获配置耦合，并配置用于单细胞处理。微流体控制器可包括：壳体；微流体设备输入和输出模块，其被配

置以加载和卸载微流体设备到壳体内；压力模块，其被配置以与微流体设备耦合以提供控制器压力到微流体设备；密封模块，其被配置以提供一个或更多个压力密封圈到微流体设备；和/或热循环模块，其被配置以热循环微流体设备。

[0050] 根据本公开，前述内容已相当广泛地概述了实例的特征和技术优势，以便使下面的详细描述可以更好地理解。附加的特征和优点将在以下描述。所公开的概念和特定实例可易于被利用，作为修改或设计其它用于实施本公开的相同目的的基础。这种等价的构造不脱离附加的权利要求的精神和范围。被认为是本文公开的概念的特点的特征，无论是作为其组织和操作方法，当联系附图考虑时，连同相关联的优点将被更好地从下面的描述中理解。每一个图被提供仅用于说明和描述的目的，且不是作为权利要求的范围的限定。

附图说明

[0051] 本公开的性质和优点的进一步理解可通过参考下面的附图来实现。在附图中，相似的组件或特征可具有相同的参考标记。此外，相同类型的各种组件可以由参考标记、之后的破折号和在相似的组件之间进行区分的第二标记来区分。如果只有第一参考标记被用在本说明书中，描述可应用于具有相同第一参考标记的相似组件的任何一个而不考虑第二参考标记。

[0052] 图1示出了根据各种实施方案的微流体系统的示意图；

[0053] 图2示出了根据各种实施方案的微流体设备的示意图；

[0054] 图3A示出了根据各种实施方案的微流体设备的捕获配置的示意图；

[0055] 图3B示出了根据各种实施方案的微流体设备的捕获配置的显微图片；

[0056] 图3C-3K示出了根据各种实施方案的微流体设备的不同捕获配置；

[0057] 图4示出了根据各种实施方案的微流体设备的串联耦合的多个捕获配置的显微图片；

[0058] 图5A示出了根据各种实施方案的微流体设备的多室反应配置的示意图；

[0059] 图5B示出了根据各种实施方案的微流体设备的多室反应配置的示意图；

[0060] 图5C示出了根据各种实施方案的微流体设备的几个多室反应配置的示意图；

[0061] 图6示出了根据各种实施方案，用于基于有限稀释和/或随机捕获的，适用于细胞处理的微流体设备的单元小室结构的示意图；

[0062] 图7示出了根据各种实施方案，使用细胞悬浮液的有限稀释以获取每个单独反应体积的单细胞；

[0063] 图8A和图8B示出了根据各种实施方案，与理论分布相比，使用明场成像的芯片中细胞计数的结果；

[0064] 图9示出了根据各种实施方案，荧光细胞“鬼影”的图像允许比预先PCR明场成像检测更多细胞；

[0065] 图10示出了根据各种实施方案的明场、荧光和泊松分布；

[0066] 图11A和图11B示出了根据各种实施方案的示例性的带捕获特征和引流沟的单细胞捕获配置位点；

[0067] 图12示出了根据各种实施方案的单细胞捕获配置的不同实例；

[0068] 图13A提供了根据各种实施方案的说明性的捕捉特征不同的挡板组合。

[0069] 图13B和图13C示出了根据各种实施方案的不同捕获特征/挡板组合的变量和性能；

[0070] 图14A和图14B示出了根据各种实施方案，用于使用捕捉功能捕捉单个、亲和试剂包被的磁珠，该磁珠然后可以展示亲和性试剂(例如，抗体)，以便捕捉单细胞的策略；

[0071] 图15A-15G示出了根据各种实施方案的用于单细胞捕获的另外的捕获配置；

[0072] 图16示出了根据各种实施方案的微流体载体的示意图；

[0073] 图16A示出了根据各种实施方案的微流体设备的方面；

[0074] 图17示出了根据各种实施方案的微流体控制器的示意图；和

[0075] 图18示出了根据各种实施方案，使用微流体用于处理多个单细胞的方法的流程图；

[0076] 图19示出了根据各种实施方案，使用微流体用于处理多个单细胞的方法的流程图；

[0077] 图20示出了根据各种实施方案，使用微流体用于捕获和处理多个单细胞的方法的流程图；

[0078] 图20A示出了根据各种实施方案，使用微流体用于捕获和处理多个单细胞的方法的流程图；

[0079] 图20B示出了根据各种实施方案，使用微流体用于捕获和处理多个单细胞的方法的流程图；

[0080] 图21示出了根据各种实施方案，使用微流体用于捕获和预扩增处理多个单细胞的方法的流程图；

[0081] 图21A示出了根据各种实施方案，使用微流体用于捕获和预扩增处理多个单细胞的方法的流程图；

[0082] 图22示出了根据各种实施方案，使用微流体用于捕获和mRNA测序多个单细胞的方法的流程图；

[0083] 图22A示出了根据各种实施方案，使用微流体用于捕获和mRNA测序多个单细胞的方法的流程图；

[0084] 图22B示出了根据各种实施方案，使用微流体用于捕获和mRNA测序多个单细胞的方法的流程图；

具体实施方式

[0085] 描述了用于使用微流体的多单细胞捕获和处理的方法、系统和设备。一些实施方案提供从细胞的较大群体中捕获、分配和/或操纵单个细胞，同时产生基因信息和/或涉及每个单个细胞的反应产物。一些实施方案可提供用于已从细胞的较大群体中分配的多个单个细胞的特异性靶扩增(STA)、全基因组扩增(WGA)、全转录组扩增(WTA)、实时PCR制备和/或单体型分析。一些实施方案提供其它应用。一些特定的实施方案提供多个单个细胞的mRNA测序或预扩增，例如。一些实施方案可被配置用于成像单个细胞或关联的反应产物作为处理的一部分。在一些情形中，反应产物可被收集和/或进一步分析。

[0086] 方法、系统和设备可包括用于利用微流体捕获和处理多个单细胞的不同的微流体设备和/或控制器。一些微流体设备被提供，其可包括多个捕获配置和多个多室反应配置。

每个捕获配置可被配置以从多个细胞中捕获单个细胞。然后，每个多室反应配置可被用于在细胞被裂解后处理每个细胞。反应产物可从每个多室反应配置收集。微流体控制器也被提供，其可被用于操作微流体设备以从多个细胞中捕获和处理单个细胞。

[0087] 不同的实施方案的进一步的方面可利用如在以下部分描述的方面：(I)微流体系统、(II)流体网络物理结构、(III)颗粒、(IV)输入机制、(V)定位机制、(VI)保留机制、(VII)处理机制、(VIII)测定机制、(IX)释放机制、(X)输出机制、(XI)细胞捕获机制、(XII)基于颗粒的操作、(XIII)实施方案。

[0088] (I)微流体系统

[0089] 在微流体系统中执行颗粒，诸如细胞的操纵和分析。微流体系统通常包括在其中非常小的体积的流体被储存和操作的任何系统，该非常小的体积通常小于约500μL，典型地小于约100μL，且更典型地小于大约10μL。微流体系统在预定义路径携带液体通过一个或更多个微流体通路。微流体通路可具有小于大约200、100或50μm的最小尺寸，通常高度或宽度。通路在以下部分II中被更详细地描述。

[0090] 微流体系统可包括一个或更多个通路集合，其互连以形成通常闭合的微流体网络。这样的微流体网络可以包括，在网络的末端或中间网络的，一个、两个或更多的开口，其与外部世界接合。这样的开口可以接收、存储和/或分配流体。分配流体可以直接进入微流体网络或到微流体系统外部位点。这些开口通常在输入和/或输出机制中起作用，更具体地在以下第IV和X部分描述，并且可以包括贮器，更详细地在以下第II部分描述。

[0091] 微流体系统还可以包括有助于流体、试剂和/或颗粒操纵或分析的任何其它合适的特征或机制。例如，微流体系统可包括确定流体流量和/或路径的各方面的调节机制或控制机制。可参与到这种调节机制的阀门和/或泵在以下第二部分被更详细的描述。可替换地，或此外，微流体系统可以包括确定、调节和/或感测流体的温度、流体压力、流体流速、光暴露、电场暴露、磁场强度和/或类似物的机制。因此，微流体系统可包括加热器、冷却器、电极、透镜、光栅、光源、压力传感器、压力变换器、微处理器、微电子器件(microelectronics)和/或等等。此外，每个微流体系统可以包括一个或更多个特征，其充当识别给定系统的编码。该特征可包括任何可检测的形状或符号，或形状或符号的集合，例如黑色和白色或彩色条形码、文字、数字和/或诸如此类，其具有独特的位置、身份和/或其它性质(诸如光学性质)。

[0092] 微流体系统可以由任何合适材料或合适材料的组合组成。合适的材料可以包括弹性体，诸如聚二甲基硅氧烷(PDMS)；塑料，如聚苯乙烯、聚丙烯、聚碳酸酯等；玻璃；陶瓷；溶胶-凝胶；硅和/或其它非金属；金属或金属氧化物；生物聚合物、混合物和/或颗粒，诸如蛋白(明胶、聚赖氨酸、血清白蛋白、胶原蛋白等)、核酸、微生物等；和/或诸如此类。

[0093] 用于微流体系统的示例性材料在以上列出的专利申请的交叉引用下进行更详细描述，被引入本文作为参考。

[0094] 微流体系统，也称作芯片，可具有任何合适的结构。这种系统可以被制造为单一组件的单一结构，或制造为两种或更多种组件的多组件结构。两个或更多个组件可以具有任何合适的相对空间关系，并且可以通过任何合适的粘合机制被彼此连接。

[0095] 在一些实施方案中，两个或多个组件可以被制造成相对薄的层，其可以被配置为面到面。基于功能，该相对薄的层可以具有不同的厚度。例如，一些层的厚度可以是大约10

到250μm，20到200μm，或大约50到150μm，等等。在某些情况下，其它层可以厚得多，给系统提供机械强度。这样的其它层的厚度可以是大约0.25到2cm，0.4到1.5cm，或0.5到1cm，等等。一个或更多个附加层可以是作为基底层起作用的基本平坦的层，在某些情况下，其提供一些或所有的微流体通道的下壁部分。

[0096] 微流体系统的组件可以基于用于系统的期望应用和基于制造中使用的材料，通过任何合适的机制来制造。例如，一个或更多个组件可以用合适的模具被模塑、冲压和/或轧花。这种模具可通过微加工、蚀刻、软光刻、材料沉积、切割和/或穿孔，等等，由任何合适的材料组成。可替换地或此外，微流体系统的组件可不用通过蚀刻、微加工、切割、穿孔和/或材料沉积的模具被制造。

[0097] 微流体组件可以被单独制造、接合并进一步适当地修改。例如，当制造不同层时，微流体组件可被，通常为面到面的，粘合。这些单独的组件可以是表面处理的，例如，用反应性化学物质表面处理以改善表面化学过程，用颗粒结合剂，用试剂以便于分析，和/或等等。这种表面处理可以被定位到表面的离散部分，或者可以相对非定位。在一些实施例中，单独的层可以被制造，且然后穿孔和/或切割以产生附加的结构。这种穿孔和/或切割可以在不同的组件已被接合之前和/或之后被执行。

[0098] 用于制造微流体系统的示例性方法在以上指出的专利申请的交叉引用下进行更详细描述，其通过参考被引入本文。

[0099] (II)流体网络的物理结构

[0100] 微流体系统可包括任何合适的结构用于流体小体积的整合操纵，包括移动和/或储存流体、以及与其相关联的颗粒，用于颗粒分析。结构可以包括通道、贮器和/或调节器等等。

[0101] 通路通常包含微流体系统中材料(例如，流体、颗粒和/或试剂)可从中穿过、在其上通过或沿其通过的任何合适的路径、通道或导管。流体交流通路的集合、通常地以通道的形式，可以被共同地称为微流体网络。在某些情况下，通路可以被描述为具有形成基底、顶部和壁的表面。通路可以具有任何合适的尺寸和几何形状，包括宽度、高度、长度和/或横截面形状等等，并且可以按照任何合适的路径，包括线形的、圆形的和/或曲线的等等。通路还可以具有任何合适的表面轮廓，包括凹部、凸部和/或孔，并可以在通道内的适当位置具有任何合适的表面化学过程或渗透。合适的表面化学过程可包括通道形成之前、期间和/或之后的，通过添加和/或用化学药品和/或试剂处理的表面改性。

[0102] 在某些情况下，通路，且更具体地通道，可以根据功能被说明。例如，在一个特定的应用中，通路可以根据材料流动的方向、与特定的参考结构，的关系和/或运送材料的类型被描述。因此，通路可以是入口通路(或通道)，其通常携带材料到位点，和出口通路(或通道)，通常携带材料离开位点。此外，通路可以被称为颗粒通路(或通道)、试剂通路(或通道)、集中通路(或通道)、灌注通路(或通道)、废物通路(或通道)和/或诸如此类。

[0103] 通路可分支、连接和/或闭端以形成任何合适的微流体网络。因此，通路可以在颗粒定位、分拣、保留、处理、检测、传输、存储、混合和/或释放等等中起作用。

[0104] 贮器通常包括用于存储在处理操作之前、期间、之间和/或之后(例如，测定和/或治疗)的材料的任何合适的接受器或室(例如，流体、颗粒和/或试剂)。贮器，也被称为孔，可以包括输入、中间和/或输出贮器。输入贮器可存储在输入材料到芯片的微流体网络部分之

前的材料(如流体、颗粒和/或试剂)。相比之下,中间贮器可存储在处理操作期间和/或之间的材料。最后,输出贮器可存储从芯片输出例如,到外部处理器或废物之前,或在芯片弃置之前的材料。

[0105] 贮器的其它方面被包括在以上在交叉引用下标出的专利申请中,其通过参考被引入本文。

[0106] 调节器通常包括用于产生和/或调节材料(例如,流体、颗粒和/或试剂)移动的任何合适的机制。适合的调节器可以包括阀门、泵和/或电极等等。调节器可以通过积极地促进流动和/或通过限制主动或被动的流动操作。调节器介导的合适的功能可以包括流体网络的混合、分拣、连接(或分离),和/或诸如此类。

[0107] (III)颗粒

[0108] 微流体系统可用于操纵和/或分析颗粒。颗粒通常包含小到足以在与流体相关联的微流体网络内部被输入和操纵,但足够大以从流体中区分开的物体。颗粒,如这里使用的,通常是微观的或接近微观的,并且可以具有直径约0.005至100μm、0.1至50μm或约0.5至30μm。可替换地,或另外地,颗粒可以具有约10^{-20}至10^{-5}克,10^{-16}至10^{-7}克或10^{-14}至10^{-8}克的质量。示例性颗粒可包括细胞、病毒、细胞器、珠和/或囊泡和其聚集体,诸如二聚体、三聚体等。

[0109] 颗粒的一个实例是细胞。细胞,如这里使用的,通常包括任何自我复制的、以膜为界的生物实体或其任何非复制、以膜为界的后代。非复制的后代可以是衰老细胞、终端分化的细胞、细胞嵌合体、血清饥饿的细胞、受感染的细胞、非复制的突变体、无核细胞等。

[0110] 在微流体系统中作为颗粒使用的细胞可具有任何合适的来源、遗传背景、健康状态、固定状态、膜的渗透性、预先处理和/或群体纯度,等等。细胞来源可以是真核、原核、古细菌等,并且可以是来自动物、植物、真菌、原生生物、细菌和/或诸如此类。细胞可以是野生型;天然、化学或病毒的突变体;工程改造的突变体(诸如,转基因);和/或诸如此类。此外,细胞可以是生长的、静止的、衰老的、转化的和/或永生的,等等,并且细胞可以是固定的和/或不固定的。活的或死的、固定的或不固定的细胞可以具有完整的膜、和/或通透的/破坏的膜以允许离子、标记、染料、配体等的摄取,或者允许细胞内物质的释放。在通过任何合适的处理步骤引入到微流体系统之前,细胞可能已被预先处理。这样的处理步骤可以包括调节剂处理,转染(包括感染、注射、颗粒轰击、脂质体转染、共沉淀物转染等),用分析试剂如染料或标记处理和/或等等。此外,细胞可能是单一培养物,通常作为从单细胞或非相似的细胞的小集合衍生的克隆群体;可通过任何合适的机制,诸如亲和结合、FACS、药物筛选等进行预先分类;和/或可以是不同的细胞类型的混合或异质群体。

[0111] 真核细胞,即,具有一个或更多个核的细胞,或其无核的衍生物,可以从任何合适的来源获得,包括原代细胞、建立的细胞和/或患者样品。这种细胞可来自任何细胞类型或细胞类型的混合,来自任何发育阶段和/或来自任何基因背景。此外,真核细胞可以是粘附和/或非粘附的。这种细胞可来自任何合适的真核有机体,包括动物、植物、真菌和/或原生生物。

[0112] 真核细胞可以是来自动物,即,脊椎动物或无脊椎动物。脊椎动物可以包括哺乳动物,即,灵长类(例如人、猿、猴等)或非灵长类(如牛、马、绵羊、猪、狗、猫、有袋动物、啮齿动物和/或诸如此类)。非哺乳动物的脊椎动物可以包括鸟类、爬行动物、鱼类(如鳟鱼、鲑鱼、

金鱼、斑马鱼等)，和/或两栖动物(如非洲爪蛙(Xenopus)，林蛙(Rana)等属的蛙)。无脊椎动物可以包括节肢动物(诸如蜘蛛纲动物、昆虫(例如果蝇)等)、软体动物(诸如蛤、蜗牛等)、环节动物(诸如蚯蚓等)、棘皮类动物(诸如各种海星，等等)、腔肠动物(诸如水母、珊瑚等)、多孔动物(海绵)、扁形动物(绦虫)、线形门动物(扁虫)等。

[0113] 真核细胞可以来自任何合适的植物，例如单子叶植物、双子叶植物、裸子植物、被子植物、蕨类植物、苔藓、地衣和/或藻类等。示例性的植物可包括植物作物(诸如稻、玉米、小麦、黑麦、大麦、马铃薯等)，用于研究的植物(例如，拟南芥、火炬松等)，有园艺价值的植物(观赏棕榈、玫瑰等)，和/或诸如此类。

[0114] 真核细胞可以是任何合适的真菌，包括以下门的成员：壶菌门、接合菌门、子囊菌门、担子菌门、半知菌纲和/或酵母。示例性的真菌可包括酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe)、巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoralis)，粗糙脉孢菌(Neurospora crassa)、蘑菇、马勃、半知菌、霉菌和/或诸如此类。

[0115] 真核细胞可以来自任何合适的原生生物(原生动物)，包括变形虫、纤毛虫、鞭毛虫、球虫、微孢子虫、和/或诸如此类。示例性的原生生物可能包括贾第鞭毛虫、溶组织内阿米巴(Entamoeba.histolytica)、隐孢子虫、和/或福氏耐格里阿米巴(N.fowleri)，等等。

[0116] 颗粒可包括为原代细胞，即，直接从生物体或自然界获取的，而没有后续扩展的体外培养的真核细胞。例如，细胞可以从患者样品中获得，诸如全血、包装细胞(packed cells)、白血细胞、尿、痰、粪便、粘液、脊髓液、肿瘤、病变组织、骨髓、淋巴、精液、胸水、产前样品、吸出物、活组织检查、分解组织(disaggregated tissue)、表皮细胞、角质形成细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、神经细胞、肾细胞、前列腺细胞、肝细胞、干细胞、成骨细胞和/或诸如此类。来自人类志愿者、人类群体的选定成员、法医样品、动物、植物和/或自然来源(水，土壤，空气等)等等的类似的样品可以被操纵和分析。

[0117] 可替换地，或此外，颗粒可以包括已建立的真核细胞。这种细胞可以通过任何合适的处理永生化和/或转化，包括病毒感染、核酸转染、化学处理、传代并选择、辐射暴露和/或诸如此类。这样建立的细胞可包括各种世系，诸如成神经细胞、神经细胞、成纤维细胞、成肌细胞、肌管、成软骨细胞、软骨细胞、成骨细胞、骨细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、上皮细胞、角质形成细胞、肾细胞、肝细胞、淋巴细胞、粒细胞和/或巨噬细胞，等等。示例性的建立的细胞系可包括Rat-1、NIH 3T3、HEK293、COS1、COS7、CV-1、C2C12、MDCK、PC12、SAOS、HeLa、Schneider细胞、Junkat细胞、SL2，和/或诸如此类。

[0118] 颗粒可以是原核细胞，即，自我复制的、缺乏膜结合细胞器的膜结合微生物，或其非复制的后代。原核细胞可以来自任何门，包括产水菌门(Aquificae)、类菌体(Bacteroids)、绿菌纲(Chlorobia)、Chrysogenetes、蓝细菌(Cyanobacteria)、纤维杆菌属(Fibrobacter)、厚壁菌(Firmicutes)、黄杆菌(Flavobacteria)、梭杆菌门(Fusobacteria)、变形菌(Proteobacteria)、鞘脂杆菌门(Sphingobacteria)、螺旋体(Spirochaetes)、热微菌门(Thermomicrobia)和/或Xenobacteria，等等。这种细菌可以是革兰氏阴性的、革兰氏阳性的、有害的、有益的和/或致病的。示例性的原核细胞可包括大肠杆菌(E.coli)、鼠伤寒沙门菌(S.typhimurium)、枯草芽孢杆菌(B subtilis)、金黄色葡萄球菌(S.aureus)、产气荚膜杆菌(C.perfiingens)、副溶血弧菌(V.parahaemolyticus)和/或炭疽杆菌(B.anthracis)，等等。

[0119] 病毒可以作为微流体系统中的颗粒被操纵和/或分析。病毒通常包括细胞(动物、植物、真菌、原生生物和/或细菌)的任何微观的/亚微观的寄生物,其包括蛋白质和/或膜衣,并且其没有宿主细胞不能复制。病毒可包括DNA病毒、RNA病毒、逆转录病毒、病毒粒子、类病毒、朊病毒等。示例性病毒可包括HIV、RSV、狂犬病毒、肝炎病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、鼻病毒、噬菌体、引起各种疾病(CJD(海绵状脑病、库鲁病、GSS(格-斯-施综合征)、FFI(致死性家族失眠症)、弥漫性进行性脑灰质变性)的朊病毒和/或诸如此类。

[0120] 细胞器可以在微流体系统中被操纵和/或分析。细胞器通常包括细胞的任何颗粒组分。例如,细胞器可包括核、高尔基体、溶酶体、内体、线粒体、过氧化物酶体、内质网、吞噬体、液泡、叶绿体等。

[0121] 颗粒分析可以用珠执行。珠通常包括任何合适的制造的颗粒。珠可以由无机材料或者化学、酶促和/或生物合成的材料制成。另外,珠可以具有任何合适的孔隙率,并且可以作为固体或作为凝胶形成。合适的珠组合成分可包括塑料(例如,聚苯乙烯)、葡聚糖、玻璃、陶瓷、溶胶-凝胶、弹性体、硅、金属和/或生物聚合物(蛋白质、核酸等)。珠可以具有任何合适的粒径或直径范围。因此,珠可以是具有窄的直径范围的基本上均匀的群体,或珠可以是具有宽的直径范围或两种或更多种不同的直径的异质群体。

[0122] 珠可以与任何合适的材料缔合。该材料可以包括化合物、聚合物、复合物、混合物、噬菌体、病毒和/或细胞,等等。例如,珠可以与特异性结合对的成员(见部分VI),如受体、配体、核酸、化合物文库的成员,和/或等等缔合。在某些情况下,珠可以是携带不同的材料的不同的珠的混合物。不同的珠可能在任何方面会有所不同,如大小、形状、相关联的代码和/或珠运送的材料。在一些实施方案中,该方面可识别相关联的材料。代码在下面部分XII进一步描述。

[0123] 颗粒可以是囊泡。囊泡通常包含由脂质包膜限定的任何非细胞的衍生颗粒。囊泡可在其包膜或内部部分包括任何合适的组分。适合的组分可以包括化合物、聚合物、复合物、混合物、聚集体和/或颗粒,等等。示例性的组分可以包括蛋白质、肽、小分子化合物、候选药物、受体、核酸、配体和/或诸如此类。

[0124] (IV)输入机制

[0125] 微流体系统可以包括与所述微流体网络接合的一个或更多个输入机制。输入机制通常包括用于输入材料(例如,颗粒、流体和/或试剂)到微流体芯片的微流体网络的任何合适的机制,包括选择性(即,组件经组件(component-by-component))和/或散装机制(bulk mechanisms)。

[0126] 输入机制可以从内部源,即,包含在微流体芯片的贮器,和/或外部源,即,与芯片分开,或在芯片外部的贮器接收材料。

[0127] 从内部源输入材料的输入机制可以使用任何合适的接受器来存储和分配材料。合适的接受器可以包括在芯片中形成的空间。这种空间可以直接从芯片外部访问,例如,通过孔从带流体网络的流体连通到芯片的外表面,诸如在顶部表面。接受器可具有相比于流体网络的流体容量是相对大的流体的容量,使得它们不会很快耗尽。例如,流体容量可以是至少约1、5、10、25、50或100μL。因此,材料可以被分配到使用标准实验室设备的接受器中,如果需要的话,诸如微量吸管、注射器等。

[0128] 从外部源输入材料的输入机制也可以使用任何合适的接受器和机制来存储和分

配材料。然而，如果外部源输入材料直接到流体网络中，外部源可能需要与流体网络有效接合，例如使用接触和/或非接触式分配机制。因此，来自外部源的输入机制可以使用毛细管或针来引导流体精确进入流体网络。可替换地，或此外，来自外部源的输入机制可以使用非接触式分配机制，如“喷溅”，这可以与喷墨打印机的动作相比。此外，来自外部源的输入机制可以使用颗粒的弹道推进，例如通过基因枪介导的。

[0129] 使用任何合适的促进机制可促进和/或调节材料到微流体系统的输入。这种促进机制可包括重力流，例如，当输入存储的流体高度比输出存储更高时。促进机制还可以包括正压力来推动材料进入的流体网络，诸如机械或气体压力，或者离心力；朝向输出机制拉动流体的在输出机制的负压力；和/或在流体网络内起作用的定位机制。定位机制可包括泵和/或电动机制。定位机制在下面的在部分V中进一步描述。在一些实施方案中，促进机制可包括悬浮机制，以在输入之前保持颗粒如细胞处于悬浮。

[0130] (V)定位机制

[0131] 微流体系统可包括一个或更多个定位机制。定位机制通常包括用于在输入之后放置颗粒在芯片上预先选定的位置的任何机制，例如，用于保持、生长、治疗和/或测定，等等。定位机制可以被分类但不限于通过各种方式，例如，以反映它们的起源和/或操作原理，包括直接和/或间接的，流体介导的和/或非流体介导的，外部的和/或内部的，等等。这些分类并不是相互排斥的。因此，给定的定位机制可以两种或更多种方式定位颗粒；例如，电场可直接定位颗粒(例如，通过电泳)和间接定位(如通过电渗)。

[0132] 定位机制可起作用以纵向和/或横向地限定颗粒定位。术语“纵向定位”表示平行于或沿着微流体通道的长轴和/或通道内流体流动流的定位。与此相反，术语“横向定位”表示正交于通道的长轴和/或相关联的主流体流动流。通过在弯曲通道中均衡“长轴”与“切线”，纵向和横向定位可以被局部限定。

[0133] 定位机制可单独和/或组合使用。如果组合使用，机制可以串联使用(即，顺序地)和/或并联使用(即，同时地)。例如，间接机制，诸如如流体流动，可被用于粗定位，和直接机制，如光镊子可用于最终定位(和/或随后的保留，如在别处所述)。

[0134] 本部分的其余部分描述但不限于各种示例性的定位机制，大致分为直接和间接机制。

[0135] 直接定位机制通常包括其中力直接作用于颗粒以在微流体网络内定位颗粒的任何机制。直接定位机制可基于任何合适的机制，包括光、电、磁和/或基于重力的力，等等。光学定位机制，使用光进行调解或至少促进颗粒的定位。合适的光学定位机制包括“光镊子”，其使用适当的集中的和可移动的光源给予定位力到颗粒上。电定位机制使用电力定位颗粒。合适的电机制包括“电控”，即，跨一些或全部微流体网络应用电压和/或电流，其可以，如上所述，直接(例如，通过电泳)和/或间接通过在流体中离子的运动(例如，经由电渗)移动带电颗粒。磁定位机制基于磁相互作用使用磁力定位颗粒。合适的磁性机制包括在流体内或周围应用磁场，通过它们与在颗粒内、上或周围的铁磁性和/或顺磁材料的缔合定位颗粒。基于重力定位机制使用重力以定位颗粒，例如，使粘附细胞与在细胞培养位置的基底接触。

[0136] 间接定位机制通常包括其中力间接作用于颗粒，例如，以在微流体网络内纵向和/或横向移动颗粒的任何机制。

[0137] 纵向间接定位机制通常可以通过沿通道和/或其它通路的流体流动被创建和/或调节。因此，纵向定位机制可通过调节流量和/或路径的阀门和/或泵被促进和/或调节。在一些情况下，纵向的定位机制可通过电渗定位机制被促进和/或调节。可替换地，或此外，纵向定位机制可以是基于输入的，即，通过输入机制，诸如压力或基于重力的机制，包括通过流体柱的不同高度产生的压力头，被促进和/或调节。

[0138] 横向间接定位机制通常可以通过在通道交叉点，流体流动减少的横向配置区域，和/或通道的弯曲的流体流动流被创建和/或调节。基于相对于运送流体离开位点的通道数量的运送流体到位点的通道数量，通道交叉点可以是统一位点或分开位点。横向间接定位机制可基于层状流、随机分配和/或离心力，等等。

[0139] 微流体系统中颗粒和/或试剂的横向定位，可以由基于层状流动的机制至少部分地介导。基于层状流动的机制通常包括其中输入流动流在通道内部的定位通过在通道内部附加流动流的存在、不存在和/或定位被确定的任何机制。这种基于层状流动的机制可以通过为统一位点的通道交叉点限定，在该处，来自两个、三个或更多个通道的入口流动流流向交叉点，统一以形成更小数量的出口流动流，优选地为一个，从交叉点流出。由于在微流体尺度上的流动流的层状流动属性，在它们统一为层状出口流动流后，统一位点可维护入口流动流的相对分配。因此，基于在其入口通道运送颗粒和/或试剂，颗粒和/或试剂可以保持定位于任意选择的一个或更多个层状流动流，从而横向定位颗粒和/或试剂。

[0140] 每个入口流动流的相对大小(或流量)和定位可确定运送颗粒和/或试剂的流动流的横向定位和相对宽度。例如，用于相对小的(窄的)、侧翼为两个较大的(较宽的)流动的颗粒/试剂入口流动流，可能在单一出口通道占据狭窄的中央位置。相比之下，用于相对大的(宽的)，侧翼为同等大小流动流和较小的(较窄的)流动流的颗粒/试剂的入口流动流，可能会占据横向地偏向较小的流动流的较宽的位置。在任一情况下，基于层状流动的机制可被称为集中机制，因为颗粒/试剂是“集中”到出口通道的横截面面积的子集。基于层状流动的机制可被用于单一地址的颗粒和/或试剂到多个相异的保留位点。

[0141] 基于层状流动的机制可以是可变机制以改变颗粒/试剂的横向定位。如上所述，每个入口流动流的相对贡献可以确定颗粒/试剂流动流的横向定位。任何入口流动流的改变流动可以改变其对出口流动流的贡献，相应地改变颗粒/试剂流动流。在极端的情况下，被称为灌注机制，基于来自相邻入口流动流的流动的存在或不存，试剂(或颗粒)流动流可被横向地移动，与保留颗粒(试剂)接触或隔开。这种机制还可以用于影响颗粒的可变的或调节的横向定位，例如，引导颗粒到具有不同的横向定位的保留位点。

[0142] 微流体系统中颗粒和/或试剂的横向定位，可以由随机的(或部分的流动)定位机制至少部分地介导。随机横向定位机制通常包括其中至少部分地被随机选择的输入颗粒或试剂的子集，远离主要流动流向通道内流体流动减少的区域(或者，潜在的，不同通道)侧向分布的任何定位机制。流动减少的区域可促进颗粒保留、治疗、检测、最小化颗粒损坏和/或促进颗粒与基底接触。随机定位机制可以通过分开的流动位点和/或局部加宽通道等等来确定。

[0143] 分开的流动位点可以通过形成流体流速减小的区域影响随机定位。分开的流动位点通常包括来自一个(优选地)或更多个入口通道的入口流动流被分成更多数量的出口通道，包括两个、三个、或更多通道的任何通道交叉点。这样分开的位点可递送随机地和/或基

于颗粒的特性(诸如质量)选择的颗粒的子集,到流速减小的区域或在交叉点或其附近形成的半停滞流动区域。由该子集表示的颗粒的部分可以依赖于出口通道相对于入口通道的相对流动方向。这些流动方向通常可以正交于入口流动流,朝向相反的方向,以形成"T型交叉点"。可替换地,出口流动方向可以形成小于和/或大于90度的角。

[0144] 具有两个或更多个出口通道的分开的流动定位机制,可以用作分配流动机制。特别地,运送到通道交叉点的流体、颗粒和或试剂可以根据通过两个或更多个出口通道的流体流动被分配。因此,进入到两个或更多个通道的颗粒或试剂的数量或容量比例,可以通过通道的相对大小和/或通过通道的流体的流速调节,流体的流速继而可被阀门或其它合适的流动调节机制调节。在第一组实施方案中,出口通道可以是非常不相等的大小,使得只有一小部分颗粒和/或试剂被引导到较小的通道。在第二组实施方案中,阀门可被用于形成试剂的所需稀释。在第三组实施方案中,阀门可被用于有选择地引导颗粒到两种或更多种流体路径中的一个。

[0145] 局部拓宽的通道可以通过产生主流动流的侧面的减小的流速的区域,促进随机定位。减小的流速可在减小的流速的区域沉积输入的颗粒的子集。这种拓宽的通道可包括以一定的角度弯或弯曲的非线性通道。可替换地,或此外,拓宽的区域可以通过在通道壁的凹部、交叉通道的室和/或类似物中形成,特别是在弯的或弯曲的通道的外边缘。

[0146] 颗粒和/或试剂的横向定位,也可以由基离心定位机制至少部分地介导。在离心定位机制下,颗粒可能会经历由速度的变化确定的离心力,例如,由移动通过弯曲的流体路径。颗粒的大小和/或密度可确定速度变化率,分配不同的颗粒大小和/或密度到不同的横向定位。

[0147] (VI)保留机制

[0148] 微流体系统可包括一个或更多个保留机制。保留机制通常包括用于保留(或保持、捕捉或俘获)在微流体网络的预先选择的位置或区域的颗粒的任何合适的机制,包括单个或串联和/或并联操作的多个机制。保留机制可作用以克服由流体流动施加的定位力。此外,保留机制,也称为捕获或俘获机制,可保留任何适当数量的颗粒,包括单个颗粒或颗粒团/群体。合适的保留机制可基于与流动耦合的物理障碍物、化学反应、真空力、循环流体流动、重力、离心力、磁力、电力和/或光学上产生的力,等等。

[0149] 保留机制可能是选择性或非选择性的。选择性的机制可能是部分选择性的,即,保留不超过全部(子集)的输入的颗粒。可替换地,或此外,选择性的机制可以是颗粒依赖性的,即,基于输入的颗粒的一个或更多个属性保留颗粒,例如大小、表面化学、密度、磁特性、电荷、光学属性(诸如折射率)和/或诸如此类。

[0150] 保留机制可至少部分上基于颗粒与在微流体网络配置的任何合适的物理障碍物的接触。这种颗粒-障碍物接触通常沿流体流动方向限制纵向的颗粒运动,产生流动辅助保留。流动辅助的颗粒-障碍物接触也可能限制边到边/正交(垂直)的运动。合适的物理障碍物可以通过从通道或其它通路(即,壁、顶部和/或底部)的任何部分的向内突起的内侧延伸形成。例如,突起可以是固定和/或可移动的,包括柱、杆、块、凸块、壁和/或部分/完全关闭的阀门,等等。一些物理障碍物,诸如阀门,可以是可移动或可调节的。可替换地,或此外,物理障碍物可以由形成在通道或其它通路中的凹部或者由流体可渗透膜限定。其它物理障碍物可以基于通道的横截面尺寸来形成。例如,大小可选择性的通道可保留太大无法进入通

道的颗粒。(大小可选择性的通道也可被称为过滤器通道、微通道或者颗粒限制性或颗粒选择性通道。)

[0151] 物理障碍物和大小可选择性通道的其它方面都在下面部分XIII中描述。

[0152] 化学保留机制可以基于化学相互作用保留颗粒。化学相互作用可以是共价和/或非共价的相互作用,包括离子的、静电的、疏水的、范德华力和/或金属配位相互作用,等等。化学相互作用可以选择性地和/或非选择性地保留颗粒。选择性和非选择性的保留可以基于颗粒和通道表面之间的特异性和/或非特异性的化学相互作用。

[0153] 化学相互作用可以是特异性的。特异性的机制可使用特异性结合对(SBP),例如,具有分别布置在颗粒和通道的表面的第一和第二SBP组分。示例性SBP可包括生物素/抗生物素蛋白、抗体/抗原、外源凝集素/碳水化合物等。这些和另外的示例性SBP在以下表1中被列出,且第一和第二的指定是任意的。SBP组分可以在网络形成之前、期间和/或之后被局部布置在微流体网内部。例如,在基底和流体层组件被接合之前,基底和/或流体层组件的表面可以用SBP组件的粘合/附着局部地修改。可替换地,或此外,在网络形成后,SBP组件可以被局部地与微流体网络相关联,例如,通过SBP组件与网络的局部化学反应(诸如通过局部光照明的催化)。

[0154] 化学相互作用也可以是相对非特异性的。非特异性相互作用机制可能依赖于微流体网络的表面化学的局部差异。如上所述,这种局部差异可以在通道/微流体网络形成之前、期间和/或之后被创建。局部差异可能由于局部化学反应,例如,以创建疏水性或亲水性区域,和/或材料的局部结合。结合的材料可包括聚-L-赖氨酸、聚-D-赖氨酸、聚乙烯亚胺、白蛋白、明胶、胶原蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、巢蛋白、玻连蛋白、原纤蛋白、弹性蛋白、肝素、硫酸角质素、硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素、透明质酸和/或细胞外基质提取物/混合物,等等。

[0155] 可替换地或此外,其它保留机制可以使用基于物理障碍物和/或基于化学相互作用的保留。这些机制的一些或所有,和/或上面描述的机制,可以至少部分地依靠颗粒和通道之间的摩擦,以协助保留。

[0156] 保留机制可基于真空力、流体流动和/或重力。基于真空的保留机制可施加拉颗粒与通道表面紧密接触的力,例如,使用朝向通道外部的力。真空的施加和/或颗粒保留,可以通过通道或其它通路的壁的孔径/孔口协助。相比之下,基于流体流动的保留机制可产生保留颗粒的流体流动路径,例如环。这些流体流动路径可以由不具有出口(例如,通过阀门关闭和活性泵)的封闭环形通道来形成,和/或通过诸如其在凹槽内部由通常环形流体流动产生的涡流来形成。基于重力的保留机制可保留靠住通路的底部表面的颗粒,从而结合摩擦来限制颗粒运动。基于重力的保留可通过凹部和/或减少的流速来促进。

[0157] 保留机制可基于离心力、磁力和/或光产生的力。基于离心力的保持机制可能通过推颗粒抵靠通路表面来保留颗粒,通常通过施加力在颗粒上,其通常与流体流动正交。这种力可通过微流体芯片的离心分离和/或通过流体流动路径内的颗粒运动被施加。基于磁力的保留机制可使用产生的外部和/或内部的到微流体系统的磁场保留颗粒。磁场可以与颗粒的铁磁性和/或顺磁性部分交互。例如,珠可以至少部分地由铁磁性材料组成,或者细胞可包括表面结合或内在化的铁磁性颗粒。基于电力的保留机制可使用电场保留带电颗粒和/或群体。相比之下,基于光产生力的操作的保留机制可以使用光来保留颗粒。这种机制

可以基于光学镊子的原理等等来操作。

[0158] 保留机制的另一种形式是盲填充通道，其中通道有入口，但是固定地或短暂地没有出口。例如，当微流体设备是由气体可渗透材料诸如PDMS制成时，存在于闭端通道的气体可以逸出，或当被通过入口的液体的流入敦促时被通过该气体可渗透材料强制到通道的外部。这是盲填充的优选实例。盲填充可以与具有入口和被阀门开关的出口的通道或室一起使用。在本实例中，当出口阀关闭而通过入口填充通道或室时，填充气体的通道或室的盲填充发生。如果该入口还具有阀门，然后在盲填充完成后该阀可以被关闭，并且然后所述出口可以被打开以暴露所述通道或室的内容于另一个通道或室。如果第三入口与该通道或室连通，该第三入口可引入另一种流体、气体或液体进入通道或室以使待排出的盲填充液体以测定数量从通道或室被排出。结果类似于HPLC的样品循环系统。保留机制的其他方面在部分V和XIII中被描述。

[0159] (VII)处理机制

[0160] 处理机制通常包括用于暴露颗粒于试剂和/或物理条件的任何合适的机制，包括流体介导的和非流体介导的机制。

[0161] 颗粒可被暴露于试剂。试剂通常包括在微流体系统中接触颗粒或颗粒群体的任何化学物质、化合物、离子、聚合物、材料、复合体、混合物、聚集体和/或生物颗粒，等等。试剂可以在颗粒分析中发挥作用，包括作为化学/生物调节剂(相互作用的试剂)、检测/分析试剂、溶剂、缓冲液、介质、洗涤液和/或等等进行操作。

[0162] 化学调节剂或生物调节剂可包括被测试用于与颗粒的相互作用的任何试剂。相互作用通常包括与颗粒的特异性结合和/或对颗粒(或调节剂)的任何可检测的基因型和/或表型效应。可能合适的相互作用和基因型/表型效应的其它方面在以下部分XII被描述。

[0163] 化学调节剂可包括与受体相互作用的配体(例如，拮抗剂、激动剂、激素等)。配体可以是小分子化合物、多肽、蛋白质、碳水化合物、脂质等。配体和受体的其它方面，以及它们在测定相互作用中的使用，或对信号转导途径的影响，在如下部分XII被描述。

[0164] 可替换地，或此外，化学调节剂可以是核酸。核酸可以是DNA、RNA、肽核酸、修饰的核酸和/或它们的混合物，并且可以是单、双和/或三链的。核酸可以通过化学合成、酶促合成和/或生物合成来生产，并且可以是质粒、片段、正义/反义表达载体、报告基因、用于基因组整合/修改的载体(如靶向核酸/载体(用于敲除/敲低/敲入(knockoutdownin))、病毒载体、反义寡核苷酸、dsRNA、siRNA、核酶和/或诸如此类。核酸试剂还可以包括促进核酸被细胞的摄取的转染试剂，诸如脂质体试剂(例如，lipofectamine)，沉淀形成剂(诸如磷酸钙)、DMSO、聚乙二醇、包装核酸的病毒外壳和/或等等。

[0165] 调节剂可以是各种各样的化学物质和/或生物实体。各种各样的化学调节剂可以是离子(如钙、钠、钾、锂、氢(pH)、氯、氟、碘等)、溶解的气体(NO、CO_2、O_2等)、碳水化合物、脂类、有机物、聚合物等。在一些实施方案中，生物调节剂可暴露于细胞，例如，以感染细胞、测定细胞-细胞相互作用等。生物调节剂可包括任何细胞、病毒或细胞器，如在以上部分III中所述。

[0166] 试剂可以是检测/分析试剂。检测/分析试剂通常包括与颗粒接触以促进处理颗粒(或颗粒组件)用于检测颗粒(或组件)的预先存在的或新创建的方面的任何试剂。检测/分析试剂可包括染料、酶、底物、辅因子和/或SBP组分(见上文部分VI的表1)，等等。染料，也称

为标记，通常包括任何光学可检测的试剂。适合的染料可以是发光体、荧光团、发色体、发色团和/或诸如此类。这种染料可以结合到，或者可以是，SBP组分；可作为酶的底物；可内在地标记细胞或细胞结构(例如，DNA染料、膜染料、运输染料(trafficking dye)等)；可以用作指示剂染料(诸如钙指示剂、pH指示剂等)；和/或诸如此类。酶可以在颗粒分析中通过将染料掺入到产物和/或通过产生随后可以用染料进行检测的产物，等等进行操作。合适的酶可包括聚合酶(RNA和/或DNA)，热稳定的聚合酶(诸如Taq、VENT等)、过氧化物酶(诸如HRP)、磷酸酶(诸如碱性磷酸酶)、激酶、甲基化酶、连接酶、蛋白酶、半乳糖苷酶(诸如β-半乳糖苷酶、葡糖醛酸酶等)、转移酶(诸如氯霉素乙酰转移酶)、氧化还原酶(诸如萤光素酶)和/或核酸(诸如DNA酶、RNA酶等)等等。SBP成员，如抗体、洋地黄毒苷、核酸等，可直接结合到染料、酶和/或其它SBP组分；可以非共价结合到染料和/或酶(预结合的或在附加的暴露步骤中结合的)；和/或等等。检测/分析试剂其它的方面，包括这些试剂可以在其中使用的分析的类型，在以下部分XII中描述。

[0167] 处理机制可使用流体介导机制以暴露颗粒于试剂。试剂可以被带到颗粒，例如，当颗粒被保留时，或颗粒可以被带到试剂，例如，当该试剂出现(并任选保留)在流体网络的特定部分时。

[0168] 流体介导机制可以是基于流动的、基于场的和/或被动的，等等。基于流动处理机制可以通过例如由重力流动或主动流动(泵送)介导的流体流动操作，以运送试剂到颗粒，或反之亦然。在一些实施方案中，基于流动处理机制可以通过横向调节(一侧到另一侧)的定位来操作，如以上/以下部分V和X中所述，以精确调节试剂(或颗粒)到颗粒(或试剂)的暴露。相比之下，基于场的机制可以通过移动带有电场的试剂(或颗粒)组合颗粒和试剂。电场可以产生任何适当的电动效应，诸如电泳、介电泳、电渗等。可替换地，或此外，试剂可以通过试剂的扩散与颗粒结合。

[0169] 在微流体系统中的颗粒可以暴露于使用非流体介导机制的物理调节剂/条件。然而，这些“非流体介导的”机制可以使用流体的属性，以帮助它们的操作，诸如通过流体热能或压力转移到颗粒。物理调节剂/条件可以被应用到来自微流体系统外部和/或内部源的颗粒。示例性的物理调节剂/条件可以包括热能(热)、辐射(光)、辐射(粒子)、电场、磁场、压力(包括声音)、重力场等。

[0170] 处理机制可以作用于任何合适的颗粒，包括在以上部分III描述的任何颗粒。颗粒可以是完整的、通透的和/或裂解的。因此，处理机制可作用于释放的细胞组分。颗粒可以在阵列中被处理，无论是串联，例如，使用共享的处理机制，和/或并联，例如，使用不同的和/或共享的处理机制。

[0171] 处理机制的其它方面在以上部分V中(定位试剂/液体/颗粒)及以下部分XIII中被描述。

[0172] (VIII)测定机制

[0173] 通过微流体系统操纵的颗粒可以在一个或更多个测定位点通过一个或更多个测定机制进行分析。测定机制通常包括用于检测预先选择颗粒或颗粒特性(例如，由颗粒、颗粒组分和/或分析产物等等提供的)的任何合适的装置或方法。测定位点通常包括在其中系统的内部和/或外部执行测定的任何合适的颗粒位置或多个位置。

[0174] 测定机制可以采用任何合适的检测方法来定性和/或定量的分析样品。合适的检

测方法可包括光谱法、电方法、流体动力学方法、成像方法和/或生物的方法，等等，特别是适于或适合于颗粒分析的那些。这些方法可以包括单个或多个值的检测，与时间有关或与时间无关的(例如，稳定状态或端点)的值，和/或平均的或(在时间上和/或空间上)分布的值，等等。这些方法可以测定和/或输出模拟和/或数字的值。

[0175] 光谱方法通常包括光(或波状粒子)的任何属性的检测，特别是通过样品相互作用而变化的属性。合适的光谱方法可包括吸收、发光(包括光致发光、化学发光和电化学发光)、磁共振(包括细胞核和电子自旋共振)、散射(包括光散射、电子散射和中子散射)、衍射、圆二色性和光学旋转，等等。合适的光致发光方法可以包括荧光强度(FLINT)、荧光偏振(FP)、荧光共振能量转移(FRET)、荧光寿命(FLT)、全内反射荧光(TIRF)、荧光相关光谱(FCS)、荧光漂白后恢复(FRAP)、荧光激活细胞分选(FACS)，以及它们的磷光和其它类似物，等等。

[0176] 电方法一般可包括任何电参数的检测。合适的电参数可包括电流、电压、电阻、电容和/或功率，等等。

[0177] 流体动力学方法通常可包括颗粒(或其组分或衍生物)和其邻居(例如，其它的颗粒)、溶剂(包括任何基质)和/或微流体系统等等之间的相互作用的检测，并可用于表征分子大小和/或形状，或用于分离样品为其组分。合适的流体动力学方法可以包括色谱法、沉淀、粘度测定法和电泳等等。

[0178] 成像方法通常可包括空间分布信号的检测，通常用于可视化样品或其组分，包括光学显微术和电子显微术，等等。

[0179] 生物方法一般可包括被颗粒转导、介导和/或影响的一些生物活性的检测，该检测通常使用如上文所述的另一种方法。合适的生物方法在以下部分XII中详细描述。

[0180] 测定机制可以被用于在微流体系统内部和/或外部的任何合适的检测位点检测颗粒和/或颗粒的特性。

[0181] 合适的内部检测位点可能包括微流体系统(芯片)内或上的任何位点。这些位点可包括通道、室和/或陷阱，及其部分。颗粒或颗粒特性可在颗粒(或释放的组分/分析产物)是静止的或移动时被检测。颗粒保留后，静止的颗粒可以被遇到，例如，在细胞室中生长的细胞。颗粒保留之前和/或之后，或在限制到区域时，移动颗粒可被遇到。特别地，颗粒可以通过任何合适的定位机制移动通过检测位点，例如，通过流体流动(基于流动的检测)。

[0182] 合适的外部检测位点可以包括任何远离或独立于微流体系统的位点。外部的检测位点可以用于在从微流体系统去除颗粒(或颗粒组分)之后，检测颗粒或颗粒的特性。这些外部位点可代替内部位点和/或除了内部位点以外使用，允许颗粒(或颗粒组分)被进一步操纵和/或检测。这些进一步的操纵和/或检测的方法可以与在微流体系统中所执行的操纵和/或方法重叠，但优选是补充的，包括质谱、电泳、离心分离、PCR扩增、导入生物体、在临床治疗中使用和/或细胞培养物，等等。

[0183] 测定方法可直接和/或间接(例如，经由报告分子)检测和/或监测颗粒的任何合适的特性。合适的特性可包括颗粒的身份、数目、浓度、位置(绝对或相对)、组成、结构、序列和/或活性等。所检测的特性可包括分子或超分子的特性，诸如存在/不存在、浓度、定位、结构/修饰、构象、形态、活性、数目和/或DNA、RNA、蛋白质、酶、脂类、碳水化合物、离子、代谢物、细胞器、添加的试剂(结合)和/或其复合物的运动，等等。所检测的特性还可以包括细胞

特性，诸如任何合适的细胞基因型或表型，包括形态、生长、凋亡、坏死、裂解、活/死、在细胞周期的位置、信号途径的活性、分化、转录活性、基底附着、细胞-细胞相互作用、翻译活性、复制活性、转化、热休克反应、运动性、铺展(spreading)、膜的完整性和/或神经突向外生长，等等。

[0184] 检测到的特性的其它方面和它们在颗粒分析中的使用在以下部分XII和XIII中被描述。

[0185] (IX)释放机制

[0186] 微流体系统可包括任何合适的数目的颗粒释放机制。释放机制通常包括，用于允许保留的颗粒从其被保留的预先选定的位点/区域移出的任何机制，包括移除、克服和/或使得保留颗粒的保留机制无效。适合的释放机制可至少基于保留力被选择。释放之后，颗粒(或颗粒组分)可具有任何合适的目的地。

[0187] 释放机制可由移除保留力来操作。因此，由特定机制保留的颗粒可通过终止该机制被释放。例如，通过化学相互作用/结合保留的颗粒可通过裂解键，诸如用蛋白酶(如胰蛋白酶)或以其它方式破坏相互作用，诸如用改变的离子性条件(例如，用EDTA)或pH，或与过量的SBP成员，而释放。相似地，通过物理障碍物保留颗粒，诸如关闭的阀门，可通过移动/移除障碍物而释放。此外，通过流体流动、真空、光、电场、磁场和/或离心力保留的颗粒可通过移除/重定向相关流动、力、场等被释放。

[0188] 释放机制可以通过克服有较大力量的保持力操作。因此，颗粒可通过施加大于保留力的力的任何定位机制被释放。例如，保留颗粒可通过释放流动被释放。释放流动可以是在散装流体流动的方向增加的流速，例如，当颗粒被弱保留(诸如通过重力/摩擦，或弱的化学相互作用)时。可替换地，释放流动可以与保留流动相反地起作用，例如与保留流动正交或相反。例如，释放流动可重新定位颗粒以在脱离与保留的物理障碍物的接触。可替换地，或此外，保留的颗粒可通过能够产生足够大的力的任何其它合适的定位机制被释放，如在以上部分V中所描述的其。

[0189] 释放机制可由使得颗粒上的保留力无效来操作。这样的释放机制可通过颗粒的释放组件来操作。例如，保留的细胞可被裂解以释放胞内组分，产生裂解液，或珠可被处理以释放相关联的材料和/或以破碎/分解珠。裂解通常包括细胞表面的膜的完整性的任何部分或完全的破坏，并且可以通过温度、洗涤剂、配体、化学处理、离子强度的变化、电场等产生。

[0190] 释放的颗粒和/或颗粒组分可具有任何合适的目的地。合适的直接目的地可包括围绕颗粒的定位机制和/或流体。释放之后，颗粒可用定位机制非选择性地或选择性地重新定位。选择性的定位可以基于测得的特性定位颗粒。定位可以是到第二保留机制(和/或培养室)，检测机制(诸如基于流动的机制)，和/或输出机制。围绕颗粒的流体对于颗粒组分(如细胞裂解物和/或珠组分)可以是合适的目的地以与检测/分析试剂接触。可替换地，细胞裂解物和/或珠组分可以作为完整颗粒被重新定位。

[0191] 释放机制和释放颗粒/组分的目的地的其它方面在以下部分XIII中被描述。

[0192] (X)输出机制

[0193] 微流体系统可以包括与微流体网络接合的一个或更多个输出机制。输出机制通常包括用于从微流体系统或其部分输出材料(例如，流体、颗粒和/或试剂)的任何合适的机制，包括选择性和/或散装机制。输出机制可以引导输出的材料到任何合适的位置，诸如内

部和/或外部沟渠(sink)。沟渠通常包括用于接收输出的材料以弃置(例如,废物位点)或用于进一步研究或操纵(例如,收集位点)的任何接受器或其它位点。来自微流体系统的材料的输出可以使用任何合适的促进机制促进和/或调节,诸如内部压力源和/或外部真空源。输出机制可以包括选择机制,例如过滤器,其基于一些标准选择输出的材料,诸如材料是颗粒或流体。

[0194] (XI)细胞培养机制

[0195] 细胞可以用在微流体系统中的细胞培养机制培养。细胞培养机制通常包括用于使细胞生长,包括维持和/或繁殖的任何合适的机制。合适的细胞在以上部分III中被描述。

[0196] 微流体系统的细胞培养机制可包括在其中培养细胞的一个或更多个培养室。基于被培养的细胞的数量、细胞的大小、在细胞上执行的分析和/或细胞的生长特点,等等,培养室可以具有任何合适的大小、形状、组成和/或与微流体系统的其它方面的关系。培养室的大小可以仅足够大以容纳给定细胞大小的一个细胞、几个细胞或更多(2到50),或许多细胞(50到1000或更多)。因此,培养室可以由通路的选定部分、整个通路或一组通路限定。在一些实施方案中,培养室可以由基本上扩大的通道来形成。培养室可以具有允许所关注的细胞进入室的任何合适的高度。这个高度可以大于、小于和/或等于微流体网络的其它部分。一些或所有的培养室的表面,诸如壁、顶部和/或基底,可被处理或修改以促进细胞培养的方面,特别是特异性或非特异性的细胞附着、细胞存活、细胞生长和/或细胞分化(或其缺乏),等等。通路处理的合适的方法和处理剂在以上部分VI中关于化学保留机制被描述。

[0197] 细胞培养机制可以使用任何适当的环境控制机制在任何合适的环境条件下培养细胞。合适的环境条件可包括所期望的气体组成、温度、介质交换的速度和频率,和/或诸如此类。环境控制机制可以在微流体系统的内部和/或外部操作。内部机制可包括随行的加热器、气体导管和/或介质贮器。外部机制可包括大气控制和/或温度控制的培养箱/热源,和/或系统外部的介质源。当系统是至少部分地由透气的材料如硅橡胶制成时,大气控制的培养箱可能更适合。介质,包括气体调节介质,可由任何合适的输入机制,包括手动移液、自动移液、非接触式喷吐(spitting)等从外部源引入。在一些实施方案中,芯片可以用介质进行预培养,然后可以在引入细胞和/或其它生物材料之前将介质丢弃。

[0198] (XII)基于颗粒的操作

[0199] 微流体系统可用于颗粒的操作。颗粒操作通常包括用于执行所期望的功能或分析单一操作的任何合适的序列。单一操作可以由每个上述部分IV到X中描述的机制等等执行。

[0200] 微流体系统可用于任何合适的细胞分析或方法,包括细胞、细胞的选择(通过选择性保留)、处理和/或测定的任何组合,如以上部分III、VI、VII和VIII中分别描述的。

[0201] 细胞分析可在添加或不添加调节剂下表征细胞。细胞分析可测定细胞的基因型、表型和/或与调节剂的相互作用。这些分析可表征单个细胞和/或细胞群体/任何合适尺寸的细胞团。细胞可以在添加的调节剂不存在时被表征以限定细胞本身的一个或更多个特性。可替换地,或此外,细胞可以在添加的调节剂的存在时,被表征以测定细胞和调节剂之间的相互作用。此外,细胞可以暴露于试剂的选定的浓度,或试剂的多个浓度。在其它实施方案中,细胞被暴露于试剂的浓度梯度以确定这些细胞是否会通过增加此类试剂的量被吸引或排斥。

[0202] 在其它实施方案中,细胞的数量可以通过第一填充具有至少一个入口的测定室被

测定出来，所述入口具有至少一个阀门，其中阀门被打开，细胞被引入到室，优选通过盲填充闭端室，或通过开放到与室连接的出口的出口阀门，所述出口具有用于防止细胞从室退出的保留机制。然后细胞数量的测定被转移到用于培养的培养区域。

[0203] 在其它实施方案中，第一类型的细胞在与第二类型的细胞流体连通下生长，其中第一类型的细胞受第二类型的细胞的存在的影响，优选作为共同培养或供给类型关系。第一类型的细胞和第二类型的细胞通过保留机制保持彼此分开，虽然流体，优选液体，被允许以与每个细胞类型接触连接，使得使亚细胞或生物化学材料在细胞类型之间可以互换。

[0204] 基因型分析可在微流体系统中的细胞上进行以测定细胞的基因组成。基因型分析可以在任何合适的细胞或细胞群体上进行，例如，患者样品、产前样品(如胚胎、胎儿、绒毛等)、实验操作的细胞(例如转基因的细胞)和/或等等。这种基因型方面可以包括细胞核和/或线粒体基因的拷贝数数量(诸如复制、缺失、扩增和/或诸如此类)和/或结构(诸如重排、融合、重复数量(诸如二核苷酸、三联体重复、端粒重复等)、突变、基因/假基因、特异性等位基因，单核苷酸多态性的存在/不存在/身份/频率、整合位点、染色体/附加体、和/或诸如此类)和/或基因组区域和/或染色体区域(如端粒、着丝粒、重复序列等)。用于基因型分析的方法可包括原位核酸杂交(在完整细胞/核上)或与从细胞中释放出来的DNA，例如，通过裂解细胞从细胞中释放出来的DNA杂交。核酸与核酸的杂交可以在杂交(诸如通过用聚合酶的引物延伸、用末端转移酶的修饰等)后用染料标记的探针、特异性结合对标记的探针(参见部分VI)、携带能量转移对(诸如“分子信标”)的茎环探针和/或用酶标记的探针执行。可替换地，或此外，用于基因型分析的方法可包括聚合酶介导的核酸扩增，例如，通过热循环(PCR)或通过等温链置换的方法。在一些实施方案中，基因型测定可使用电泳以协助对核酸的分析。相关基于基因的分析可采用相似的分析方法和合适的探针或DNA染料(诸如碘化丙啶、H echst等)，测定基因区域、基因、染色体区域、整个染色体或基因组的其它方面。这些其它方面可包括总DNA含量(例如2N、4N、8N等，以测定二倍体、四倍体或多倍体基因型和/或细胞周期分布)，特异性染色体的数量或位置，和/或特异性基因的位置(诸如靠近核膜、另一个细胞核结构，等等)。

[0205] 基于基因组成和/或环境影响，诸如调节剂的存在，可进行表型分析以在微流体系统中表征细胞。这些分析可以测定整个细胞、细胞器或细胞、和/或内源(天然)或外源(外来)细胞成分/组分的任何方面。

[0206] 整个细胞或整个细胞群体的方面可包括数量、大小、密度、形态、分化状态、铺展、运动、翻译活性、转录活性、有丝分裂活性、复制活性、转化、一种或多种信号通路的状态、处理的存在/不存在，完整的/裂解的、活/死，凋亡或坏死的频率/程度，附着到基底(或通路)的存在/不存在/效率、生长速率、细胞周期分布、修复DNA的能力、热休克反应、细胞-细胞接触的性质和/或频率，等。

[0207] 细胞器的方面可包括细胞的(或细胞群体的)细胞核、细胞表面的膜、溶酶体、线粒体、高尔基体、内质网、过氧化物酶体、核膜、核内体、分泌颗粒、细胞骨架、轴突和/或突起等等的数量、大小、形状、分布、活性等。

[0208] 细胞成分/组分的方面可包括任何核酸、多肽、碳水化合物、脂质、离子、小分子、激素、代谢物和/或其复合体等等的存在/不存在或水平、定位、移动、活性、修饰、结构等。可以，例如，使用和不使用调节剂测定相对于其它细胞或细胞群体的存在/不存在或水平。定

位可以是相对于整个细胞或单个细胞的细胞器或组分。例如，定位可以是细胞质、细胞核、膜缔合的、细胞表面缔合的、细胞外、线粒体、内体、溶酶体、过氧化物酶体和/或等等。示例性的细胞质/细胞核的定位可以包括在这两个定位之间易位的转录因子，诸如NF-κB、NFAT、类固醇受体、核激素受体和/或STAT等等。移动可以包括细胞内运输诸如蛋白靶向到特定的细胞器、内吞作用、胞吐作用、再循环等。示例性的移动可包括细胞表面受体或相关的蛋白质(诸如，GPCR、受体酪氨酸激酶、抑制蛋白和/或诸如此类)组成型的或响应于配体结合的内吞作用。活性可以包括功能性的或光学的活性，诸如酶活性、荧光性和/或诸如此类，例如，通过激酶、磷酸酶、甲基化酶、脱甲基酶、蛋白酶、核酸酶、脂肪酶、报告蛋白(例如半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、萤光素酶、葡糖醛酸酶、绿色荧光蛋白(和相关的衍生物)等)和/或等等。修饰可包括任何合适的共价连接基团的存在/不存在、定位和/或水平。这种修饰可以包括磷酸化、甲基化、泛素化、羧化和/或法尼基化，等等。结构可包括初级结构，例如加工(诸如切割或连接)后，二级结构或三级结构(例如，构象)，和/或四级结构(诸如，与细胞内、上或周围的伴侣的缔合)。测定修饰和/或结构的方法可包括特异性结合剂(诸如抗体等)，在体内或体外掺入标记的试剂，能量转移测定(诸如FRET)，表面等离子体共振和/或酶片段互补或双杂交分析，等等。

[0209] 核酸可以包括基因组DNA、线粒体DNA、病毒DNA、细菌DNA，噬菌体DNA、合成DNA、转染的DNA、报告基因的DNA等。可替换地，或此外，核酸可包括总RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、siRNA、dsRNA、snRNA、核酶、结构RNA、病毒RNA、细菌的RNA、基因特异性RNA、报告RNA(由报告基因表达)，和/或诸如此类。用于分析核酸的方法可包括任何以上列出的基因分析技术。此外，用于分析核酸的方法可包括核糖核酸酶保护分析。

[0210] 多肽可包括任何蛋白质、肽、糖蛋白、蛋白脂质等。示例性多肽包括受体、配体、酶、转录因子、转录辅因子、核糖体组分、调节蛋白、细胞骨架蛋白、结构蛋白、通道、转运蛋白、报告蛋白(诸如上文列出的由报告基因表达的那些)，和/或诸如此类。用于测定多肽的方法可包括酶测定法和/或使用特异性结合组分(例如抗体、凝集素等)，等等。特异性结合组分在部分VI中描述。

[0211] 碳水化合物、脂类、离子、小分子和/或激素可包括任何化合物、聚合物或复合物。例如，碳水化合物可以包括单糖、二糖和多糖、糖脂、糖蛋白、蛋白聚糖等。脂质可以包括胆固醇和/或肌醇脂质(例如，磷脂酰肌醇)，等等；离子可包括钙、钠、氯、钾、铁、锌、氢、镁、重金属、和/或锰，等等；小分子和/或激素可以包括代谢物和/或第二信使(诸如cAMP或cGMP，等等)和/或诸如此类。

[0212] 相互作用通常包括调节剂与细胞或细胞群体的任何特异性结合，或细胞特性响应于调节剂的任何可检测的变化。特异性结合是主要是与细胞中、上或周围的给定伴侣的任何结合。特异性结合可具有对给定伴侣的约10^{-3}M或更低的结合系数，优选的为约10^{-4}M、10^{-6}M或10^{-8}M和更低的特异性结合系数。可替换地，相互作用可以是响应于调节剂的表型或基因型特性的任何变化，如上面所描述的。

[0213] 相互作用分析可使用任何合适的测定方法执行。例如，调节剂可以被标记，诸如用光学可检测的染料，并且与细胞相互作用后可以二次标记。染料与细胞或多个细胞的结合从而可以被量化。可替换地，或此外，细胞可以被处理或以其它方式进行处理以实现由调节剂接触产生的表型特征的测定，如在以上部分VIII中所描述的。

[0214] 可用调节剂的文库筛选细胞和/或细胞群体，以确定相互作用调节剂和/或带期望的相互作用能力的调节剂，诸如期望的表型影响(诸如报告基因响应、改变天然基因/蛋白的表达水平、电生理影响等)和/或结合系数。文库通常包括共享共同的特点，诸如结构或功能的两个或更多个组分(调节剂)的集合。因此，文库可以包括两个或更多个小分子、两种或更多种核酸、两种或更多种病毒、两种或更多种噬菌体、两种或更多种不同类型的细胞、两种或更多种肽、和/或两种或更多种蛋白质，等等。

[0215] 细胞和/或群体的微流体分析可测定信号转导通路的活性。活性可以相对于活性的任意水平，相对于其它细胞和/或群体(见下文)和/或作为与细胞与调节剂相互作用的量度(参见上文)被测量。

[0216] 信号转导通路通常包括在细胞内的信息的任何流动。在许多情况下，信号转导通路通过膜传递配体或其它调节剂形式的细胞外信息，以产生细胞内信号。细胞外的信息可以至少部分地通过结合到细胞表面受体触发在膜上或膜附近的事件起作用，细胞表面受体诸如G蛋白偶联受体(GPCR)、通道-偶联受体、受体酪氨酸激酶、受体丝氨酸/苏氨酸激酶和/或磷酸酶受体，等等。这些事件可以包括通道活性、受体群集、受体的内吞作用、受体的酶活性(例如，激酶活性)和/或第二信使产生(例如cAMP、cGMP、甘油二酯、磷脂酰肌醇等)的变化。这种事件可能会导致调节事件级联，诸如磷酸化/去磷酸化、复合物形成、降解和/或等等，其可能最终地导致改变的基因表达。在其它情况下，调节剂通过膜并直接结合到细胞内受体，例如细胞核受体(诸如类固醇激素受体(GR、ER、PR、MR等)、类视黄酸受体、类视黄醇X受体(RXR)、甲状腺激素受体、过氧化物酶体增殖激活受体(PPAR)和/或外源性受体，等等)。因此，信息的这种流动的任何合适的方面可被测定以监测的特定信号转导通路。

[0217] 测量的活性可至少部分地基于分析的信号转导通路的类型。因此，信号转导分析可以测定配体结合；受体的内化；改变膜的电流；受体与另一因子诸如以下的缔合：抑制蛋白、小G-蛋白样蛋白诸如rac或rho和/或诸如此类；钙的水平；激酶，例如蛋白激酶A、蛋白激酶C、钙调蛋白激酶、肌球蛋白轻链激酶、细胞周期蛋白依赖性激酶、PI3激酶等；cAMP水平；磷脂酶C活性，蛋白质例如，NF-κB、核受体和/或STAT的亚细胞分布，等等。可替换地，或此外，信号转导分析可以测定报告信号转导通路的活性的天然靶基因和/或外来的报告基因的表达。如上所述，表达可以被测定为RNA、蛋白质、代谢物或酶活性的不存在/存在或水平，等等。

[0218] 基于细胞的分析可用于比较细胞和/或细胞群体的基因型、表型、和/或调节剂相互作用。细胞和/或群体可在不同的微流体系统或相同的微流体系统中被比较。在相同的微流体系统中的比较，可以使用并行配置来平行进行。

[0219] 微流体系统可用于执行单细胞分析，其通常包括优选地或必要地在一个细胞上一次执行的任何分析。单细胞分析的例子包括膜片钳分析、单细胞PCR、单细胞荧光原位杂交(FISH)、蛋白的亚细胞分布和/或分化分析(转变为不同的细胞类型)。在某些情况下，单细胞分析可以在两个或更多个细胞的保留组中，通过测定该组中的一个成员的个体特征执行。在其他情况下，单细胞分析可能需要单细胞的保留，例如，当分析之前细胞被裂解时。

[0220] 微流体系统可用于分选或选择单细胞和/或细胞群体。分选/选择的细胞或群体可通过随机机制、大小、密度、磁属性、细胞表面特性(即，附着到基底上的能力)、生长和/或存活的能力和/或基于细胞或群体的测定特性(诸如响应于配体、特异性表型和/或诸如此类)

来选择。在微流体系统中操纵和/或分析期间，细胞和/或群体可以进行不止一次分选。特别地，异质性的细胞群体，诸如血液样品或临床活检、部分转染或分化的细胞群体、分解组织、天然样品、法医样品等可被分选/选择。

[0221] 微流体系统可执行细胞的存储和/或维持功能。因此，细胞可以被引入到微流体系统，并被长时间培养，诸如超过一周、一个月、三个月和/或一年。使用用于细胞的存储和/或维持的微流体系统可消耗更少量的介质和空间，并且可以维持细胞处于比其它存储/维持方法生命力更强的状态。微流体系统中存储和维持细胞的其它方面包含在以上部分XI中。

[0222] 微流体系统可被用于任何合适的基于病毒、基于细胞器、基于珠和/或基于泡囊的分析和/或方法。这些分析可以测定调节剂(化合物、混合物、聚合物、生物分子、细胞等)与任何这些其它颗粒中/上存在或缔合的一种或多种材料(化合物、聚合物、混合物、细胞等)的结合(或效应)。可替代地，或此外，这些分析可测定活性(例如，酶活性)、光学性质(例如，化学发光、荧光或吸光，等等)的变化，和/或相互作用引起的构象变化。

[0223] 在一些实施方案中，珠可包括可检测的编码。这样的编码可以由具有可检测的性质的一种或更多种材料来赋予，可检测的性质诸如光学性质(例如，频谱、强度和或荧光激发/发射、吸收率、反射率、折射率等的程度)。一种或更多种材料可以提供非空间信息或可具有有助于编码每个编码的方面的离散空间位置。编码可以允许不同的样品，诸如细胞、化合物、蛋白质和/或诸如此类，与具有不同的编码的珠缔合。然后，不同的样品可被组合，一起分析，并通过读出每个珠上的编码来识别。用于细胞缔合的珠的合适的分析可包括任何上述的细胞分析。

[0224] 用于执行本部分中描述的一些分析的合适的方案被包括在Joe Sambrook和David Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(3rd ed.2000)，其在此引入作为参考。

[0225] (XIII)实施方案

[0226] 下面的实例描述选择的方面和实施方案，包括用于利用微流体的多个单颗粒诸如单细胞处理的方法、系统和设备。这些实例被包括，用于说明而不旨在限制或限定本发明的整个范围。

[0227] 转到图1，微流体系统100被示出，其被配置用于捕获多个单个细胞并处理它们。系统100包括微流体设备110，其可以与微流体控制器120耦合。系统100可以被配置以处理数量级范围从数十、数百甚至数千个细胞的细胞群体。系统100可以捕获来自细胞的更大群体的单个或单细胞。在一些实施方案中，这些单个细胞可以利用不同的试剂被成像和/或刺激。单个捕获的细胞可利用包括，但不限于以下的多种多步化学方法或过程进行处理:特异性靶序列扩增(STA)、逆转录特异性靶序列扩增(RT-STA)、基因组DNA的STA、全基因组扩增(WGA)、全甲基化组扩增、全转录组扩增(WTA)、实时PCR制备、预扩增、mRNA测序;RNA测序、拷贝数变化(CNV)、多模式应用(DNA/RNA;蛋白质/RNA)、蛋白质的应用、样品处理器的应用和/或单体型分析。然后反应产物可以输出用于附加的分析和/或处理。

[0228] 一些实施方案可以被配置以加载数百个细胞进入微流体设备。例如，在一个实施方案中，至少200个哺乳动物细胞(直径5-25um)可被加载和分配，使得96室的每个可以包含最多一个细胞。一些实施方案可以允许用于分配的细胞的成像。例如，其它实施方案可以包括更多或更少的室和分配更多或更少的细胞。细胞可以被限制或捕获，使得其基底溶液/介

质可以被替换为另一试剂。多步反应可在每一个96分配的样品上执行。靶应用包括但不限于:特异性靶扩增(STA);逆转录特异性靶扩增(RT-STA);基因组DNA的STA;全基因组扩增(WGA);全转录组扩增(WTA);全甲基化组扩增;预扩增;mRNA测序;RNA测序;实时荧光定量PCR准备;拷贝数变化(CNV);多模式应用(DNA/RNA、蛋白质/RNA);蛋白质应用;样品处理器的应用;或单体型分析。在一些实施方案中,微流体设备可被设计为使得单细胞或它们的组分(DNA、RNA、染色体等)可在多个步骤中进行化学操纵(例如:细胞裂解、RNA的逆转录和预扩增用于加载基因表达微流体设备)。经处理的样品可以从微流体设备中输出。

[0229] 一些实施方案可以被配置以加载具有定义的大小范围的最少200个哺乳动物细胞的群体。大小范围可以足够大以包括大多数哺乳动物细胞。不同类的微流体设备或集成流体回路(IFC)可被利用以覆盖分类的所有主要大小,例如,5-15um和15-25um。仅仅通过举例的方式,在200个细胞中,捕获效率可以是>50%,定义为96个捕获位点中超过4个将包含一个细胞。在500个细胞中,捕获效率可以>80%。在一些实施方案中,在应用释放的捕获方案可能需要处理来自组织培养的悬浮细胞(例如K562)和附着细胞(例如,HUVEC)。一些实施方案可包括ADP格式,其包括从组织样品中分离的细胞或从LCM或FFPE样品中分离的细胞或细胞核。在一些实施方案中,IFC可从用于单个反应的群体中捕捉96个单细胞。一些实施方案可被配置以验证每个反应中单细胞的存在。要求可以是分辨细胞的不存在和两个细胞对比一个细胞的存在。一些实施方案可以允许用户在裂解之前用至少单一生物试剂诱导长达某一时间周期,诸如6小时。在一些实施方案中,用户可具有裂解之前成像细胞的能力。一些实施方案可以被配置以执行WTA和/或WGA。这些可以使用商购的可用试剂。一些实施方案可以从每个细胞中收集数量充足的足以用于后续NGS文库制备的单个材料。

[0230] 一些实施方案可以被配置用于文库制备。实施方案可以使用商购的试剂自动地从gDNA和cDNA制备多个例如96个测序就绪的文库。每个文库可以使用NGS索引唯一地索引。总的试剂消耗可以等于或小于在宏观尺度的单个样品的制备。实施方案可包括:分配样品和试剂进入IFC;放置IFC在微流体控制器;后处理并用标准的移液管从IFC中收集产物;和/或在克隆扩增之前执行单一纯化和定量步骤。一些实施方案支持STA工作流程。

[0231] 一些实施方案可以被配置用于单体型分析。例如,一些实施方案可以以4个gDNA样品开始。起始材料可包括:基因组DNA;染色体悬浮液;F粘粒文库;和/或全细胞。一些实施方案可产生4个唯一的序列就绪文库,其允许研究者对人类基因组的至少90%进行单体型分析。对于非人类基因组可能需要附加的重复。

[0232] 图2示出了根据各种实施方案的微流体设备110-a的实例。微流体设备110-a可以是图1中的微流体设备110的实例。在一些实施方案中,微流体设备110-a可被称为微流体芯片。在一些实施例中,微流体设备110-a可以与微流体载体(未示出)耦合。

[0233] 微流体设备110-a可以包括多个捕获配置210,诸如特异性捕获配置210-i、210-j、210K、210-l、210-m和/或210-n。在一些实施方案中捕获配置210可被称为捕获模块。捕获配置210可彼此串联耦合或以菊花链方式连接。每个捕获配置210可以被配置以当细胞团或群体流动通过相应的捕获配置210时捕获单个细胞。未被特异性捕获配置例如诸如捕获配置210-i捕获的细胞,然后可以流动到随后的捕获配置,例如诸如捕获210-j,其中单个或单颗粒和/或细胞可被捕获,和等等,向下通过一系列捕获配置210。

[0234] 在一些实施方案中,相应的捕获配置210内的单独捕获的细胞可以利用不同的试

剂被洗涤和/或刺激。一些实施方案可以被配置为使得所捕获的细胞也可以被成像。微流体设备110-a可以包括一个或更多个流动通道240，其可用于引入不同的试剂到捕获配置210。一些实施方案可包括多个流动通道240。

[0235] 每个相应的捕获配置210可以与多室反应配置220耦合，并且更具体地多室反应配置220-i、220-j、220K、220-l、220-m和/或220-n。捕获细胞和/或颗粒在特异捕获配置，诸如捕获配置210-i可以被传输到相关联的多室反应配置220-i用于处理。对于多室反应配置220可能发生的处理可包括，但不限于，特异性靶扩增、RT-STA、mRNA-SEQ、预扩增、WMA、多模式应用、蛋白应用、样品处理器的应用、全基因组扩增、全转录组扩增、实时PCR制备、拷贝数变化或单体型分析。在一些实施方案中，可存在多室反应配置220的一个或更多个室之间的活性混合。热循环也可能作为处理的一部分出现，其可能作为室之间可能发生的活性混合而发生。然后，所得的反应产物可被提供给输出配置230，并且更具体地输出配置230-i、230-j、230-k、230-l、230-m和/或230-n。在某些情况下，输出配置230可能被称为收集配置、收集孔和/或收集入口。各自多室反应配置220、各自捕获配置210和/或流动通道240的不同室之间的流动，可以利用不同的阀和/或泵结构(未示出)来控制。流动通道240可被用于引入溶液，诸如试剂和/或缓冲液进入微流体设备110-a。流动通道245-i可被用于引入细胞到微流体设备110-a。在一些情况下，流动通道245-i可被耦合到捕获配置210的两侧。在某些情况下，附加的流动通道245-j可以被用于提供捕获配置210、多室反应室220和输出配置的两个单独的组。

[0236] 在一些实施方案中，微流体设备110可以被配置用于多个单细胞捕获和处理。在一些实施方案中，微流体设备110-a可以包括串联耦合的多个捕获配置210捕获配置。每个各自捕获配置210可以被配置以捕获单细胞。微流体设备110-a可以包括多室反应配置220。每个各自多室反应配置220可与来自多个捕获配置210的各自捕获配置210耦合，并可配置用于单细胞处理。

[0237] 在一些实施方案中，每个各自捕获配置210包括一个或更多个限定大小以仅容纳单细胞的物理障碍物。在一些实施方案中，每个各自捕获配置210包括：与输入通道和输出通道耦合的一个或更多个旁路通道；与输入通道和输出通道耦合的引流沟；和/或位于靠近输入通道和一个或更多个旁路通道的连接点且与引流沟耦合的捕获巢，其中捕获巢被配置以从多个细胞中捕获单细胞，使得当单细胞在捕获巢被捕获时，剩余的细胞的收集被转移到一个或更多个旁路通道中的至少一个。在一些情况下，一个或更多个旁路通道包括第一旁路通道和第二旁路通道。第一旁路通道和第二旁路通道可被对称地配置。对称地配置的第一旁路通道和第二旁路通道可包括第一翼配置和第二翼配置。在一些实施方案中，至少输入通道或输出通道被进一步配置为集中通道。集中通道可包括在至少水平方向或垂直方向的缩小通道。

[0238] 在一些实施方案中，当各自多室反应配置220的一个或更多个阀门被驱动时，多室反应配置220还被配置用于热循环。在某些情况下，微流体设备110-a可以包括一个或更多个成像特征。每个各自成像特征可以允许捕获的单细胞在各自捕获巢位点的成像。一些实施方案包括多个收集孔。例如，每个输出配置230可以包括收集孔。每个各自收集孔可与各自多室反应配置220耦合，并且可被配置以递送反应产物用于进一步分析。

[0239] 微流体设备110-a的一些实施方案可包括基因组分析配置，其与每个各自多室反

应配置220耦合以进一步分析来自每个各自多室反应配置220的反应产物。

[0240] 在一些实施方案中，每个各自捕获配置210包括配置以从有限稀释中捕获单个细胞的捕获室。每个捕获室可被配置以利用随机捕获过程捕获单个细胞。

[0241] 在一些实施方案中，每个各自捕获配置210可包括：捕获区室；和/或覆盖捕获区室的离散区域的结合伴侣，其中离散部分被限定大小使得仅单颗粒结合到离散区域。

[0242] 在一些实施方案中，每个各自捕获配置210可以包括一个或更多个捕获支持物。每个捕获支持物可以包括分布在至少捕获支持物的部分的结合伴侣。一个或更多个捕获支持物可包括一个或更多个珠结构。一些实施方案可包括捕获特征，其被配置以捕获支持物。

[0243] 一般而言，本文所描述的不同的微流体设备可用弹性材料诸如硅橡胶制造，以及用于微流体设备及其组件的设计的方法已被在科学和专利文献中详细地描述。见，例如Unger等(2000)Science 288:113-116;U.S.Pat.Nos.US 6,960,437(Nucleic acid amplification utilizing microfluidic devices);6,899,137(Microfabricated elastomeric valve and pump systems);6,767,706(Integrated active flux microfluidic devices and methods);6,752,922(Microfluidic chromatography);6,408,878(Microfabricated elastomeric valve and pump systems);6,645,432(Microfluidic devices including three-dimensionally arrayed channel networks);美国专利申请号2004/0115838;2005/0072946;2005/0000900;2002/0127736;2002/0109114;2004/0115838;2003/0138829;200210164816;2002/0127736;和2002/0109114;PCT公布号WO 2005/084191;WO 05/030822A2;和WO01101025;Quake&Scherer,2000,"From micro to nanofabrication with soft materials"Science 290:1536-40;Unger等,2000,"Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography"Science 288:113-116;Thorsen等,2002,"Micro fluidic large-scale integration"Science 298:580-584;Chou等,2000,"Microfabricated Rotary Pump"Biomedical Microdevices3:323-330;Liu等,2003,"Solving the"world-to-chip"interface problem with a microfluidic matrix"Analytical Chemistry 75,4718-23,Hong等,2004,"A nanoliter-scale nucleic acid processor with parallel architecture"Nature Biotechnology 22:435-39,全部为了所有目的通过参考并入。

[0244] 图3A示出了根据各种实施方案的捕获配置210-a的实例。捕获配置210-a可以是图2中的一般捕获配置210和/或具体捕获配置210-i、210-j、210k、210-l、210-m和/或210-n的实例。捕获配置210-a可以包括不同的组件或方面。例如，捕获配置210-a可以包括输入通道310和输出通道350。输入通道310可以被配置以集中含有细胞的溶液，使得它们可以集中和/或引向捕获位点，诸如捕获巢330。这可以被称为前端集中。一些实施方案可以包括用于输出通道350的后端集中。捕获配置210-a可以包括捕获位点335和/或捕获巢330。当在捕获巢330和/或捕获位点335捕获时，捕获巢330和/或捕获位点335可以被配置为使得可保护捕获细胞和/或颗粒不被流动流体包括其它细胞或颗粒抛下。捕获结构210-a也可以被配置以创建围绕捕获位点335的停滞点，以促进捕获单个细胞。捕获配置210-a可以包括引流沟340。引流沟340可以是足够小的通道，其中细胞不穿过它，但足够大以允许液体流过它。引流沟340可以耦合到捕获巢330、输入通道310和/或输出通道350，以促进在捕获巢330捕获单个细胞。一些实施方案中包括多个旁路通道，诸如旁路通道320-a和320-b。旁路通道320

可允许溶液，其可包括其它细胞，流动到已被捕获细胞和/或颗粒占用的捕获巢330的任一侧，并进入旁路通道320的至少一个，其可促进保护单个捕获细胞和/或颗粒不被从捕捉巢330抛弃。通过旁路通道320的流动还可促进单个细胞和/或颗粒在捕获巢330被捕获，而不是允许多个细胞在细胞巢330被捕获。在一些实施方案中，旁路通道320可以对称地进行配置。旁路通道320可被配置成不同的安排，包括但不限于与旁路通道320-a和320-b显示的“翼”形安排。

[0245] 捕获配置210-a可被用于捕获单个细胞和/或颗粒。例如，细胞可以流动从右到左通过输入通道310进入捕获配置210-a。细胞可获得集中到捕获位点335的中央。在捕获位点335一些液体可以流动通过引流沟340，一些围绕侧面流动进入旁路通道320-a/320-b中。如果细胞进入捕获巢330和/或引流沟340，它可被捕获并填充引流沟通道，仅仅停止通过引流沟通道的流动。剩下的细胞和/或颗粒的溶液可以绕过阻挡的捕获位点335、通过旁路通道320-a/320-b，并进入下一个捕获配置210的下游。

[0246] 图3B示出了捕获配置诸如图3A的捕获配置210-a的显微照片210-b。特别值得注意的是，细胞337被示出为在捕获位点335和/或捕获巢330被捕获。

[0247] 图3C-3K示出了根据不同的实施方案的不同的捕获配置210-k-c、210-k-d、210-k-e、210-k-f、210-k-g、210-k-h、210-k-i、210-k-j和/o或210-k-k。这些捕获配置210-k通常可包括捕获巢(或捕获位点)、引流沟和/或一个或更多个旁路通道。

[0248] 图4示出了多个捕获配置210的系统400的显微图片。根据不同的实施方案，捕获配置210被示出为彼此串联耦合或以菊花链方式连接。系统400可以是图1的微流体设备110和/或图2的微流体设备110-a的方面的实例。

[0249] 设计捕获配置210作为微流体装置110的一部分时，不同的考虑可能需要考虑。例如，在流动流的中心的细胞可以最有效地捕获。这可能会影响输入通道的设计，诸如图3A或图3B的输入通道310。较短的引流沟通道，诸如图3A或图3B的引流沟340，可以更有效地捕获。在一些情况下，小细胞可挤过捕获引流沟340。在一些实施方案中，更窄的集中通道或输入通道310可提高效率。深的捕获巢330可以捕获多个细胞，而在浅的捕捉巢330被捕捉的细胞可以轻松移动。在一些实施方案中，当停滞点或捕获位点335可以是被捕获的单个细胞直径的近似1.5倍时，效率可被达到。在一些实施方案中，通过引流沟的流动比例可以被调整以促进捕获各个细胞。

[0250] 图5A示出了根据各种实施方案的多室反应配置220-c的实例。多室反应配置220-c可以是图2的多室反应配置220的实例。图5A还示出了捕获配置210-c，其可以与多室反应配置220-c耦合。根据各种实施方案，多室反应配置220-c可以包括不同组件或方面。多室反应配置220-c可被配置以执行不同的处理，包括，但不限于，STA、RT-STA、mRNA-SEQ、预扩增、WMA、多模式应用、蛋白的应用、样品处理器的应用、WTA、WGA、实时PCR制备、CNV和/或单体型分析。多室反应配置220-c可被配置以执行多个反应步骤，其可包括活性混合。

[0251] 多室反应配置220-c可以包括大量的阀门520，其可以被用来控制溶液通过多室反应配置220-c的流动。在一些实施方案中，泵530，诸如蠕动泵，可以被包括在多室反应配置220-c中，以促进溶液通过多室反应配置220-c的传输。泵530可以包括多个阀门520；在本实例中，泵530可包括三个阀门。一个或更多个泵530可位于不同的位置。

[0252] 多室反应配置220-c也可包括多个反应室510。在一些实施方案中，捕获配置210-c

可考虑反应室510的一个。仅仅通过举例的方式，阀门520-d、520-e、520-f和520-g可分别用于控制反应室510-a、510-b、510-i和510-j之间的直接流动。附加的阀门，诸如阀门520-h-520-o，以不同的组合，可用于混合和/或循环来自一个或更多个反应室510的溶液。附加阀门520-a和/或520-b可以控制不同的捕获配置之间的流动。阀门520-b可以被用来控制溶液诸如试剂到捕获配置210-c的流动。多室反应配置220-c可被配置以在热循环期间混合和/或循环溶液。在某些情况下，反应产物可被递送540到输出配置(未示出)可被称为收集配置、收集孔和/或收集入口。

[0253] 图5B示出了根据各种实施方案的多室反应配置220-d的另一个实例。多室反应配置220-d可以是图2的多室反应配置220和/或图5的多室反应配置220-c的一个实例。图5B还示出了捕获配置210-d，其可以与多室反应配置220-d耦合。根据各种实施方案，多室反应配置220-d可以包括不同组件或方面。多室反应配置220-d可被配置以执行不同的处理，包括，但不限于，STA、RT-STA、mRNA-SEQ、预扩增、WMA、多模式应用、蛋白的应用、样品处理器的应用、WTA、WGA、实时PCR制备、CNV和/或单体型分析。多室反应配置220-d可被配置以执行多个反应步骤，其可包括活性混合。

[0254] 多室反应配置220-d可以包括大量的阀门520，其可以被用来控制溶液通过多室反应配置220-d的流动。一些实施方案可以包括一个或更多个泵作为多室反应配置220-d的一部分，以促进溶液通过多室反应配置220-d的传输。例如，阀门520-z可以包括多个阀门520以形成蠕动泵。一个或更多个泵可位于不同的位置。

[0255] 多室反应配置220-d也可包括多个反应室510。在一些实施方案中，捕获配置210-d可考虑反应室510的一个。仅仅通过举例的方式，阀门520-p、520-q、520-z、520-s、520-t和/或520-u可分别用于控制反应室510-c、510-d、510-e、510-k和/或510-l之间的直接流动。附加的阀门，诸如阀门520-v、520-w、520-x和/或520-y，以不同的组合，可用于混合和/或循环来自一个或更多个反应室510的溶液。附加的阀门520可以控制不同的捕获配置之间的流动。阀门520-p可以被用来控制溶液诸如试剂到捕获配置210-d的流动。多室反应配置220-d可被配置以在热循环期间混合和/或循环溶液。在某些情况下，反应产物可被递送540到输出配置(未示出)可被称为收集配置、收集孔和/或收集入口。

[0256] 此外，反应室510和/或捕获配置210-d包括各种尺寸或体积。在一个实施方案中，捕获配置210-d可以是4.5nl，反应室510-c可以是9nl，反应室510-d可以是9nl，反应室510-e可以是9nl，反应室510-k可以是135nl，和/或反应室510-l可以是135nl。

[0257] 图5C示出了根据各种实施方案的几个多室反应配置220-i、220-j的实例。多室反应配置220-i/220-j可以是图2的多室反应配置220的实例。图5C还示出了捕获配置210-i/210-j，其可以与多室反应配置220-i/220-j耦合。根据各种实施方案，多室反应配置220-i/220-j可以包括不同组件或方面。多室反应配置220-i/220-j可被配置以执行不同的处理，包括，但不限于，STA、RT-STA、mRNA-SEQ、预扩增、WMA、多模式应用、蛋白的应用、样品处理器的应用、WTA、WGA、实时PCR制备、CNV和/或单体型分析。多室反应配置220-c可被配置以执行多个反应步骤，其可包括活性混合。

[0258] 多室反应配置220-i/220-j可以包括大量的阀门520-i/520-j，其可以被用来控制溶液通过多室反应配置220-i/220-j的流动。在一些实施方案中，泵530-i/530-j，诸如蠕动泵，可以被包括在多室反应配置220-i/220-j中，以促进溶液通过多室反应配置220-i/220-

j的传输。泵530-i/530-j可以包括多个阀门;在本实例中,泵530-i/530-j可包括三个阀门。一个或更多个泵530-i/530-j可位于不同的位置。

[0259] 多室反应配置220-i/220-j也可以包括多个反应室510-i-a、510-i-b、510-i-c、510-i-d、510-i-e、510-j-a、510-j-b、510-j-c、510-j-d、510-j-e。在一些实施方案中,捕获配置210-i/210-j可考虑反应室510-i/510-j的一个。仅仅通过举例的方式,阀门520-i-a、520-i-b、520-i-c和520-i-d可分别用于控制反应室510-i-a、510-i-b、510-i-c和510-j-d之间的直接流动。相似地,阀门520-j-a、520-j-b、520-j-c和520-j-d可分别用于控制反应室510-j-a、510-j-b、510-j-c和510-j-d之间的直接流动。附加的阀门,诸如以不同的组合的阀门520-i/520-j,可用于混合和/或循环来自一个或更多个反应室510-i/510-j的溶液。附加阀门520-i-m和/或520-j-m可以控制不同的捕获配置之间的流动。阀门520-i-n/520-j-n可以被用来控制溶液诸如试剂到捕获配置210-i/210-j的流动。多室反应配置220-i/220-j可被配置以在热循环期间混合和/或循环溶液。在某些情况下,反应产物可被递送输出通道560-i/560-j可被称为收集配置、收集孔和/或收集入口。一些实施方案可包括水合作用室570-i/570-j。

[0260] 一些实施方案利用单细胞捕获技术,其在单独的反应体积中利用有限稀释来捕获细胞。在这种类型的捕获中,在优先在捕获位点仅保留单细胞的微流体设备中,可能没有使用任何捕获特征,例如诸如亲和结合或机械特征。例如,有限稀释可通过制备一系列的细胞悬浮液的稀释执行,并将来自每个稀释的等分分布到单独的反应体积。细胞在各反应体积的数量被确定,且然后产生仅具有单细胞的反应体积的最高比例的稀释被选择并用于捕获细胞以用于本文所描述的参数测定。

[0261] 在一些实施方案中,该方法需要使用捕获技术以增加仅具有一个细胞的期望的单独反应体积的比例高于使用诸如有限稀释的方法实现的比例(即,高于约33%)。在这些实施方案的变型中,捕获被优化,使得仅具有一个细胞的单独反应体积的期望比例各自为单独反应体积的总数的至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少15约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%。在具体实施方案中,仅具有一个细胞的单独反应体积的预期比例每个落在由以上列出的任何两个百分数界定的范围内。仅具有一个细胞的单独反应体积的期望比例每个可通过经验或统计方法来确定,取决于特定的捕获技术(例如,有限稀释以符合泊松分布的方式产生仅具有一个细胞的反应体积)。一些实施方案采用一些措施以增加仅具有一个细胞的单独反应体积的期望比例高于约33%。在特别的实施方案中,优化的单细胞捕获可以被实现,例如,使用在每一反应体积(捕获位点)排除多于一个细胞的保留的基于大小的机制。

[0262] 图6示出了显示在芯片上过程的适用于基于有限稀释和/或随机捕获的细胞处理的微流体设备的单元小室结构的示意图。对于单细胞分析,微流体设备可被设计以促进被分析的特定颗粒的加载和捕获。图6示出用于分析细胞诸如哺乳动物细胞的说明性的微流体设备的单元小室或捕获结构。每个单元小室可具有“细胞通道”(即,样品区室)和“分析通道”(即,分析区室)。细胞通道可围绕装载的细胞,尺度为直径几十微米到长度为几百微米。取决于被分析细胞的大小,直径可以是约15μm、约20μm、约25μm、约30μm、约35μm、约40μm或约45μm或更多,或可落入具有这些值作为端点的范围。依靠被分析细胞的大小,长度可以是

约60μm、约90μm、约120μm、约150μm、约170μm、约200μm、约230μm、约260μm、约290μm或更多，或可落入具有这些值作为端点的范围。在说明性的微流体设备中，用于装载细胞诸如哺乳动物细胞的单元小室，可以是约30μm×170μm。这种设备可被装备以提供，或促进提供在装载之后加热细胞通道以裂解细胞。如图6所示，设备可包括从用于进行反应诸如核酸扩增的细胞通道分离出的分析通道。170μm×170μm封锁阀门可被用于关闭细胞通道。

[0263] 图7示出获取每个单独反应体积(微流体设备或“芯片”的室)的单细胞的细胞悬浮液的有限稀释的使用。细胞密度的理论的分布(泊松分布)被示出。图8A和图8B示出了与理论分布(图8B)相比，使用明场(图8A)成像的芯片中的细胞计数的结果。基于明场成像，在芯片中的细胞密度接近但低于泊松分布，这个趋势在更高细胞密度加剧。图9显示了荧光细胞“鬼影”的图像，允许比预先PCR明场成像检测更多细胞，使细胞密度更接近于图10所示的泊松分布。

[0264] 在某些实施方案中，机械捕获被单独使用或与一个或更多个捕获特征结合以在每个单独反应体积中(即，微流体设备中的每个捕获位点)优先捕获单细胞。例如，每个捕获位点可包括限制大小以仅包括一个细胞的一个或更多个物理障碍物。物理障碍物的形状可被设计以加强细胞的保留。例如，物理障碍物可被限制大小并配置以形成合适于仅保持一个细胞的凹面表面。在这种实施方案中，物理障碍物可被设计以便当捕获位点没有被细胞占用时允许流体流动通过捕获位点，和/或捕获位点可包括促进这种流动的引流沟特征。在特别的实施方案中，微流体设备包含多个适合的大小/配置的物理障碍物，借以多个单个细胞被保留在设备内部，每个物理障碍物保留一个细胞。在说明性的实施方案中，物理障碍物可位于微流体设备的单独区室内部，每个区室一个区域。区室可被安排以形成阵列。

[0265] 在某些实施方案中，基于吸引力的捕获被单独使用或与一个或更多个捕获特征例如机械捕获组合使用，以在每个单独反应体积中(即，微流体设备中的每个捕获位点)优先捕获单细胞。例如，包含用于细胞组分的结合伴侣的微流体设备表面的离散区域可被限制大小使得仅一个细胞可结合到区域，使得随后细胞的结合被空间位阻阻挡。在特别的实施方案中，微流体设备包含多个合适大小的区域，由此多个单个细胞，每个区域一个，在设备内部被保留。在说明性的实施方案中，这些区域可位于微流体设备的单独区室内部，每个区室一个区域。区室可被安排以形成阵列。

[0266] 一种基于亲和的、优化的单细胞捕获方法基于捕获包括结合被分析的细胞的结合伴侣的捕获支持物。在说明性的实施方案中，支持物可以是具有分布在其表面的结合伴侣的珠，例如如图14A所示。珠可被使用杯形捕获特征的机械捕获在每个捕获位点捕获以产生单个固定支持物(例如，珠)。除了固定支持物，在特定实施方案中，捕获特征可减少展示结合伴侣的支持物(例如，珠)的表面区域。这个表面可以被充分减少，使得仅一个细胞可结合到展示结合伴侣的固定支持物(例如，珠)的区域。在一些实施方案中，为促进细胞支持物结合，展示结合伴侣的固定支持物的区域面对细胞的流动路径。在具体的、说明性的实施方案中，微流体设备的流动通道包含一系列捕获特征。承载结合伴侣(例如细胞特异性抗体)的珠的悬浮液被输入到通道以在捕获位点产生一些列固定的珠。然后，通道被洗涤以移除如在图14A上示出的任何自由(即，非固定的)的珠。然后，细胞悬浮液可被输入到通道。单个细胞可结合到展示结合伴侣的每个珠的部分。每个结合的细胞可通过空间位阻防止任何其它细胞结合到珠。如图14B所示，通道的洗涤可移除非结合细胞。然后，在捕获位点之间的阀门

可以关闭以创建单独的反应体积，每个包含一个带一个结合细胞的捕捉位点。一个或更多个集中特征可以被用来引导珠以及细胞朝向每个捕获位点流动。可替换地或此外，捕获特征可各自包括引流沟特征，当捕获特征没被珠占用时，其允许流体流动通过捕获位点。

[0267] 在细胞流动通过微流体设备时离散地从悬浮液中捕获单细胞的一些实施方案是限定以使得捕获位点抓住单细胞、有效地捕获单细胞(例如，捕获通过捕获位点附近的细胞的概率是高的)、和/或引导围绕捕获位点的剩余的悬浮液的方式引导捕获位点上细胞(诸如细胞或珠)的悬浮液流动的微流体几何形状。几何形状可以是基于大小的，即，捕获位点是刚好足够大以包含一个细胞(且没有更多的)，但是仍然允许无细胞的悬浮液以相当低的流动流体阻抗通过位点，使得空的捕获位点将引导细胞朝向而不是周围它流动。这可以通过引流沟的使用完成。附加的几何形状也可以以增加细胞靠近到捕获位点足够近的可能性的方式集中细胞的流动以获得高的成功捕获可能性。这些几何形状的变形都集中在捕获位点和引流沟附近包括引流沟本身控制流体的流动阻力，以及改变集中几何形状的孔，以试图定位靠近到捕获位点的细胞的流动。图11A和图11B说明了带捕获特征和引流沟的捕获位点的单细胞捕获配置的实例。图11A示出了没有挡板来集中流动的位点，然而图11B示出了带有挡板的位点。附加的带有捕获位点设计的捕获配置被在图12中示出。

[0268] 在微流体结构内部的单细胞研究可包括隔离单个细胞进入单个反应分区(室、液滴、小室)。有限稀释是用于完成这种隔离的一种方法。细胞可以以平均每个分区少于一个细胞的浓度被装载，并由泊松统计描述的模式分配到这些分区。另一个方法是依靠机械陷阱以捕获细胞。这些陷阱可被设计以捕获给定大小范围的细胞。这可能导致来自在该大小内的群体的细胞的偏向选择。

[0269] 对于一些应用，捕获方法可使用在细胞表面表达的生物标志物。抗体可以在微流体设备的具体位置被模式化，虽然取决于微流体设备的结构这种方法可能不是简单的。一些实施方案包括用于基于在微流体设备特定位置初始捕获单个的、亲和试剂涂覆的珠的单细胞捕获的方法。在捕获位点的开口通过这个珠提供的表面区域可提供细胞结合可接近的亲和试剂的限定表面。珠的大小和捕获位点可被选择/设计，使得一旦单细胞结合到珠，珠的可接近表面区域的剩余部分被第一结合细胞空间阻塞。适当大小的珠捕获位点的选择也提供宽的细胞大小范围的捕获。只要细胞大于暴露的捕获区域，并表达适当的表面标志物或用于亲和试剂的结合伴侣，它应该有可能捕获该细胞。

[0270] 捕获几何形状可被设计以最大化细胞与表面标志物接触的可能性。例如，在一个或更多个通道壁上的挡板可被用于引导珠朝向捕获特征。图13A提供不同挡板的组合的说明性捕获特征。捕获特征的性能可以通过调整一个或更多个变量被调整，包括挡板的角度、从捕获位点到挡板的距离、挡板的长度、捕获特征的尺寸和形状、捕获特征中引流沟的大小(如果存在)。图13B和图13C示出了捕获特征/挡板组合的变量和性能。在图13B中，在通道壁上的挡板可被用于引导珠朝向捕获特征。在图13C中，捕获特征可被耦合到在通道壁上的挡板；单个捕获特征/挡板组合可位于替换的壁以集中流动朝向临近的捕获特征/挡板组合。这些组合可位于在使用中可分离(例如，使用阀门)以形成单独反应室的位点。

[0271] 图14A和图14B示出了(以简化的形式，缺乏挡板)用于使用捕获特征捕捉单个、亲和试剂包被的磁珠，然后可以展示亲和性试剂(例如，抗体)，以便捕捉单个细胞的策略。在图14A-1中，流动可在包含捕获特征的通道开始。在图14A-2中，抗体结合珠可朝向捕获特征

流动直到珠容纳在捕获特征中，如图14A-3中所示。然后，通道被洗涤以移除未捕获的珠。随后，如在图14B-1中所示承载细胞表面标志物，其与抗体结合，可被流入到包含捕获珠的通道。图14B-2说明了承载标志物的细胞可如何与被捕获的珠展示的抗体相互作用或结合。展示区域可以被限定，使得结合的细胞通过空间位阻抑制其它细胞与捕获的珠相互作用，使得只有一个细胞结合到每个捕获的珠。然后，通道可被洗涤以移除未结合细胞，如在图14B-3中所示，在每个捕获位点留下一个固定的细胞。

[0272] 图15A示出了设计以在离散位置(龛)捕获单细胞的微流体设备的原理图。流动可以被设计成通过龛比通过溢流通道更强。龛包含小的间隙(～3μm高)；例如，见图15B。当细胞进入龛时，其可阻塞龛并阻止任何更多流动进入龛。流动可穿过下一个未占用龛，直到其也可以被细胞阻塞。在理论上，在细胞通过移除通道并出到废物前每个龛可捕获一个细胞。例如，对于更多的细节参照图15C、图15D、图15E、图15F和图15G，缓冲液入口可与细胞入口收敛以便推动细胞到最靠近如图15D中所示的一系列横向细胞捕获通道的供给通道的一侧。如在图15E中所示的，横向细胞捕获通道的阻力可低于细胞溢流通道的阻力以引起相对于进入细胞的溢流通道优先的细胞流动进入龛。如在图15F中所示，每个龛可足够大以刚好捕获一个细胞。龛间隙可足够小以便可在操作的压力/流动水平下捕获细胞。如果后者可能太高和/或龛间隙可能太大，细胞可能变形或可能被推动通过龛间隙。在龛中细胞的存在可提高特定回路的阻力，且因此流动可能被引导到没有细胞的回路。图15G示出了在龛中单独捕获的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)。

[0273] 图16示出了根据各种实施方案的微流体设备1600的实例。微流体设备1600可被称为微流体载体和微流体芯片组合。微流体设备1600包括可以配置用于装载微流体设备1600和/或从微流体设备1600输出产物和/或控制微流体装置1600的一个或更多个方面的操作的很多端口。其它实施方案可包括不同的配置。微流体设备1600可包括控制区610-a和610-b，其可被用于控制微流体设备1600的压力。微流体设备1600可包括样品特异性入口和/或输出620-a和/或620-b。一些实施方案可包括一个或更多个收集试剂端口，诸如630-a、630-b、630-c和/或630-d。一些实施方案可包括一个或更多个水合作用端口，诸如640-a、640-b、640-c和/或640-d。废物端口650-a和/或650-b可被提供。此外，细胞进入端口660和/或细胞排出端口670可被提供。此外，一个或更多个试剂端口可被提供，诸如680-a、680-b、680-c、680-d、680-e、680-f、680-g和/或680-h。微流体设备1600也可包括微流体芯片或设备110-b，例如，其可以是图1和/图2的微流体设备的实例。

[0274] 图16A示出了微流体设备1600的方面的实例，其可包括载体通道1610、载体孔1620和/或芯片上通道1630。在一些情况下，细胞密度和/或介质密度可导致细胞下沉。为了避免在载体孔1620中细胞从溶液中脱落，一些实施方案可使用Percol。一些实施方案可使用更小的载体孔以避免细胞从溶液中脱落。

[0275] 图17示出了根据各种实施方案的微流体控制器1700。微流体控制器1700可以是图1中的微流体控制器120的实例。微流体控制器1700可被配置以与在本申请中公开的许多微流体设备工作，例如，微流体设备包括图1和/或图2的微流体设备110，和/或图16的微流体设备1600。

[0276] 微流体控制器1700可包括壳体1705，其可包括多种组件。例如，微流体控制器1700可包括微流体设备输入和输出模块1710。输入和输出模块1710可被配置以控制传输微流体

设备进入微流体控制器1700和从其中出来。微流体控制器1700可包括用于从用户接收输入的输入模块1720和/或用于显示信息给用户的显示模块。输入模块1720和显示模块1725可被彼此集成，诸如通过触摸屏显示。微流体控制器1700可包括热循环模块1730，其可被用于热循环微流体设备。微流体控制器1700可包括压力模块1740，其可被用于提供受压力的流体，包括空气，到微流体设备以驱动阀门或以其它方式控制微流体设备的操作。压力模块1740和热循环模块1730可一起工作，使得当热循环发生时流体设备可被操作，诸如通过混合程序。微流体控制器1700可包括密封模块1750以提供一个或更多个对应于微流体设备的压力密封。在一些实施方案中，密封模块1750可包括接口板。

[0277] 微流体控制器1700可包括一个或更多个计算机处理器模块1770和/或一个或更多个存储器模块1780，其被用于操作微流体控制器1700的不同方面。

[0278] 在一些实施方案中，微流体控制器1700可包括成像模块1760，其可用于成像微流体控设备的一个或更多个方面或在微流体控制器内部的材料。成像模块1760可被配置以成像微流体设备的一个或更多个方面。成像模块1760可包括至少显微镜或照相机，配置用以成像在微流体设备中的一个或更多个捕获的细胞。成像模块1760可包括至少显微镜或照相机，配置以成像在微流体设备中的一个或更多个反应产物。

[0279] 在一些实施方案中，热循环模块1730被配置以当压力模块1740激活微流体设备内部的一个或更多个阀门时，热循环微流体设备。在一些实施方案中，配置以与微流体设备耦合以提供控制器压力到微流体设备的压力模块1740被配置以控制在微流体设备中的压力，以流动多细胞通过微流体设备，并在微流体设备内部以单个捕获配置捕获单个细胞。

[0280] 配置以与微流体设备耦合以提供控制器压力到微流体设备的压力模块1740可被配置以在微流体设备中控制压力以执行在微流体设备内部捕获的多个单细胞的多级的处理。被配置以热循环微流体设备的热循环模块1730可被配置以执行在微流体设备内部捕获的多个单细胞的多级的处理。

[0281] 在一些情况下，被微流体控制器1700促进的多级处理可包括预扩增处理。在一些情况下，多级处理可包括mRNA测序处理。

[0282] 配置以与微流体设备耦合以提供控制器压力到微流体设备的压力模块1740可被配置以控制在微流体设备中的压力以启动微流体设备。配置以与微流体设备耦合以提供控制器压力到微流体设备的压力模块1740可被配置以控制在微流体设备中的压力，以装载多个细胞进入微流体设备，并以从在微流体设备中的多个细胞中捕获多个单个细胞。至少压力模块1740或热循环模块1730可被配置以促进在微流体设备上执行至少裂解、逆转录、PCR或收集。在一些实施方案中，至少压力模块1740或热循环模块1730可被配置以促进在微流体设备上执行至少裂解、逆转录、预扩增或收集。

[0283] 转到图18，根据各种实施方案，使用微流体用于多个单细胞处理的方法1800被示出。方法1800可使用多种不同的系统和/或设备执行，其中系统/或设备包括但不限于例如图1和/或图2的微流体设备110，和/或图16的微流体设备1600，和/或图1和/或图17的系统100的微流体控制器120。

[0284] 在方框1805，细胞群体可被装载到微流体设备中，其可包括微流体芯片和载体组合。在一些实施方案中，细胞群体可包括细胞群体。在方框1810，来自细胞群体的单细胞可被捕获、洗涤和/或分配。在一些实施方案中，单捕获细胞可被刺激或以其它方式操纵，诸如

方框1815中所见。在一些实施方案中，单捕获细胞可被成像，诸如方框1815中所见。

[0285] 在方框1825，单捕获细胞可被处理。在模块1830，来自处理的单捕获细胞的反应产物和/或文库可被输出。在一些实施方案中，反应产物和/或文库还可被分析。

[0286] 转到图19，根据各种实施方案，使用微流体用于多个单细胞处理的方法1900被示出。方法1900可使用多种不同的系统和/或设备执行，其中系统/或设备包括但不限于例如图1和/或图2的微流体设备110，和/或图16的微流体设备1600，和/或图1和/或图17的系统100的微流体控制器120。

[0287] 在方框1905，多细胞可被装载到微流体设备中。在方框1910，来自多细胞的单个细胞可被捕获，并在微流体设备中洗涤。在方框1915，在微流体设备中，单个地捕获和洗涤细胞可被分配。在方框1920，多个单个地捕获、洗涤和分配细胞可被裂解。

[0288] 在方框1925，关于在微流体设备中的多个单个地捕获和裂解细胞，多步骤化学过程可执行。例如，多步骤化学过程可包括执行第一反应(例如，RT-PCT)。在一些实施方案中，多步骤化学过程可包括第二反应(例如，预扩增)。在方框1930，在微流体设备中，来自多步骤化学过程的产物可被收集。

[0289] 在一些情况下，方法1900可包括细胞输入和多种不同试剂，其可被连续递送到不同的反应室。

[0290] 转到图20，根据各种实施方案，使用微流体用于多个单细胞捕获和处理的方法2000被示出。方法2000可使用多种不同的系统和/或设备的执行，其中系统/或设备包括但不限于例如图1和/或图2的微流体设备110，和/或图16的微流体设备1600，和/或图1和/或图17的系统100的微流体控制器120。

[0291] 在方框2005，多细胞可被装载到微流体设备中。在方框2010，多细胞可被流动到微流体设备的第一捕获配置。在方框2015，来自多细胞的第一单细胞可在第一捕获配置被捕获。在方框2020，来自多细胞的第一剩余细胞可被流动到微流体设备的第二捕获配置。在方框2025，来自第一剩余细胞的第二单细胞可在第二捕获配置被捕获。在方框2030，至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理，可被执行以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物。

[0292] 在一些实施方案中，在方框2015的捕获至少第一单细胞或第二单细胞可包括利用一个或更多个限定大小以仅容纳单细胞的物理障碍物捕获至少第一单细胞或第二单细胞。一些实施例包括流动来自多细胞的第一剩余多个细胞通过第一捕获配置的一个或更多个旁路通道到与第二捕获配置耦合的流动通道，其中第二捕获配置与第一捕获配置的第一输出通道耦合。一些实施方案包括流动来自第一剩余细胞的第二剩余细胞，通过一个或更多个第二旁路通道到第二捕获配置的出口，通过第二输出通道到第三捕获配置。

[0293] 在一些实施方案中，第一捕获配置包括：与第一输入通道和第一输出通道耦合的一个或更多个旁路通道；与第一输入通道和第一输出通道耦合的第一引流沟；和/或与第一引流沟耦合且配置以从多细胞中捕获单个细胞的第一捕获巢。在一些实施方案中，第二捕获配置包括：与第二输入通道和第二输出通道耦合的多个旁路通道，其中第二输入通道与第一捕获配置的第一输出通道耦合；与第二输入通道和第二输出通道耦合的第二引流沟；和/或与第二引流沟耦合且配置以从第一剩余的细胞中捕获单个细胞的第二捕获巢。

[0294] 在一些实施方案中，在方框2030的执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细

胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，包括裂解微流体设备上的每个各自单独捕获的细胞以释放每个各自细胞的一种或更多种成分。在方框2030的执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，可包括流动每个各自捕获的细胞的一种或更多种成分到微流体设备的各自多室反应配置用于进一步处理。在方框2030的执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，可包括当流动一种或更多种成分通过微流体设备的各自多室反应配置一个或更多个方面时执行热循环程序。

[0295] 在一些实施方案中，在方框2030的执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，可包括在微流体设备中用一种或更多种试剂洗涤每个各自捕获的细胞。在一些实施方案中，在方框2030的执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，包括在微流体设备中用一种或更多种试剂给药每个各自捕获的细胞。

[0296] 方法2000的一些实施方案包括成像在微流体设备内的各自捕获的细胞。关于捕获细胞，成像可发生不同的次数。

[0297] 在一些实施方案中，在方框2030的执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，可包括在微流体设备内部执行预扩增过程。在方框2030的执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，可包括在微流体设备内部执行mRNA测序处理。

[0298] 在一些实施方案中，在方框2030的执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，可包括执行微流体设备内部的至少特异性靶扩增、全基因组扩增、全转录组扩增、实时PCR制备、拷贝数变化或单体型分析。在方框2030的执行至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物，可包括标记来自与各自捕获的细胞相关联的进一步处理的反应产物用于识别目的。

[0299] 方法2000的一些实施方案可包括收集来自微流体设备的多个收集孔中的收集产物。

[0300] 在一些实施方案中，捕获至少第一单细胞或第二单细胞可包括利用配置以从有限稀释中捕获单个细胞的捕获室捕获至少第一单细胞或第二单细胞。在一些实施方案中，捕获至少第一单细胞或第二单细胞可包括利用随机捕获过程捕获至少第一单细胞或第二单细胞。

[0301] 在一些实施方案中，捕获至少第一单细胞或第二单细胞包括：利用捕获区室和/或覆盖捕获区室的离散区域的结合伴侣捕获至少第一单细胞或第二单细胞，其中离散部分被限定大小使得仅单细胞结合到离散区域。

[0302] 捕获至少第一单细胞或第二单细胞可包括利用一个或更多个捕获支持物捕获至少第一单细胞或第二单细胞，其中每个捕获支持物包括分布在捕获支持物的至少一部分上的结合伴侣。一个或更多个捕获支持物可包括一个或更多个珠结构。一些实施方案包括捕获特征，其被配置以捕获捕获支持物。

[0303] 转到图20A，根据各种实施方案，使用微流体用于多个单细胞捕获和处理的方法2000-a被示出。方法2000-a可使用多种不同的系统和/或设备执行，其中系统/或设备包括但不限于例如图1和/或图2的微流体设备110，和/或图16的微流体设备1600，和/或图1和/或图17的系统100的微流体控制器120。方法2000-a可以是方法2000的实例。

[0304] 在方框2005-a，多细胞可被装载到微流体设备中。在方框2010-a，多细胞可被流动到微流体设备的第一捕获配置。在方框2015-a，来自多细胞的第一单细胞可在第一捕获配置被捕获，其中第一捕获配置包括一个或更多个物理障碍物，诸如限定大小以容纳仅单细胞的巢。在方框2040，来自多细胞的第一剩余多个细胞可被流动通过第一捕获配置的一个或更多个第一旁路通道到与第二捕获配置耦合的流动通道，其中第二捕获配置与第一捕获配置的第一输出通道耦合。在方框2020-a，来自多细胞的第一剩余细胞可被流动通过与第二捕获配置耦合的流动通道，到微流体设备的第二捕获配置。在方框2025-a，来自第一剩余细胞的第二单细胞可在第二捕获配置被捕获，其中第一捕获配置包括一个或更多个物理障碍物，诸如限定大小以容纳仅单细胞的巢。在方框2045，来自第一剩余细胞的第二剩余细胞可被流动通过第二捕获配置的一个或更多个第二旁路通道到与第三捕获配置耦合的流动通道，其中第三捕获配置与第二捕获配置的出口耦合。在方框2030-a，至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理，可被执行以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物。

[0305] 转到图20B，根据各种实施方案，使用微流体用于多个单细胞捕获和处理的方法2000-b被示出。方法2000-b可使用多种不同的系统和/或设备执行，其中系统/或设备包括但不限于例如图1和/或图2的微流体设备110，和/或图16的微流体设备1600，和/或图1和/或图17的系统100的微流体控制器120。方法2000-b可以是方法2000的实例。

[0306] 在方框2005-b，多细胞可被装载到微流体设备中。在方框2010-b，多细胞可被流动到微流体设备的第一捕获配置。在方框2015-b，来自多细胞的第一单细胞可在包括配置以从有限稀释中捕获第一单细胞的捕获室的第一配置中被捕获。在方框2020-b，来自多细胞的第一剩余细胞可被流动到微流体设备的第二捕获配置。在方框2025-b，来自第一剩余细胞的第二单细胞可在包括配置以从有限稀释中捕获第一单细胞的捕获室的第二捕获配置中被捕获。在方框2030-b，至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的多级处理，可被执行以产生关于微流体设备上的至少第一捕获的单细胞和第二捕获的单细胞的各自收集产物。在方框2050，可收集来自微流体设备中的收集产物。

[0307] 转到图21，根据各种实施方案，使用配置以从多细胞捕获和处理单个细胞的微流体设备的预扩增方法2100被示出。方法2100可使用多种不同的系统和/或设备执行，其中系统/或设备包括但不限于例如图1和/或图2的微流体设备110，和/或图16的微流体设备1600，和/或图1和/或图17的系统100的微流体控制器120。

[0308] 方法2100可允许用户捕获细胞并使用如本文公开的微流体设备和/或控制器执行靶向预扩增。方法2100可提供捕获细胞、生命力染色、成像细胞、裂解细胞、执行逆转录和/

或预扩增和最后收集扩增产物。方法2100可提供评价细胞的RNA内容，并收集产生的产物。然后，预扩增的扩增子的基因表达分析可用基因组阵列执行。

[0309] 预扩增可富集感兴趣的位点的样品，维持位点之间的相对丰度，和/或允许推导定量Cq信息。然后，在DNA结合染料(EvaGreen)存在下，定量PCR可被执行。定量PCR后立即获得熔解曲线以允许反应质量的评估。

[0310] 在方框2105，微流体设备可被使用一种或更多种溶液启动。在方框2110，流动多个细胞通过微流体设备使得在微流体设备的单个捕获位点从多个细胞中捕获单个细胞。在方框2115，多个捕获的单个细胞可在微流体设备的单一捕位点被裂解。在方框2120，在微流体设备内，可在多个单个裂解的细胞上执行逆转录以产生与每个各自单个细胞相关联的逆转录产物。在方框2125，在微流体设备内，可在与每个各自裂解的单个细胞相关联的各自逆转录产物上执行预扩增以产生与每个单个捕获细胞相关联的预扩增产物。

[0311] 方法2100的一些实施方案包括从微流体设备的多个收集入口递送与每个单个捕获细胞相关联的预扩增产物到各自收集入口。

[0312] 方法2100可包括准备一种或更多种溶液以装载到微流体设备。方法2100可包括装载一种或更多种溶液到微流体设备。一种或更多种溶液可包括至少一种或更多种试剂或一种或更多种缓冲液。方法2100可包括装载多个细胞到微流体设备。

[0313] 方法2100的一些实施方案包括成像在微流体设备上的一个或更多个捕获的单个细胞。

[0314] 方法2100可包括装载至少一种或更多种裂解试剂、一种或更多种逆转录试剂、或一种或更多种预扩增试剂到微流体设备。方法2100可包括：移除一个或更多个收集入口的一个或更多个保护层；和/或从微流体设备的多个收集入口的每个各自收集入口收集预扩增产物。

[0315] 一些实施方案包括染色在微流体设备上的单个捕获细胞的一个或更多个。一些实施方案包括基于染色确定单个捕获细胞的一个或更多个为存活或死亡。方法2100可包括基于成像确定单个捕获细胞的一个或更多个为存活或死亡。

[0316] 转到图21A，根据各种实施方案，使用配置以从多细胞捕获和处理单个细胞的微流体设备的预扩增方法2100-a被示出。方法2100-a可使用多种不同的系统和/或设备执行，其中系统/或设备包括但不限于例如图1和/或图2的微流体设备110，和/或图16的微流体设备1600，和/或图1和/或图17的系统100的微流体控制器120。方法2100-a可以是方法2100的实例。

[0317] 在方框2130，一种或更多种溶液可被制备以装载到微流体设备。一种或更多种溶液可包括多种试剂和/或缓冲液，包括但不限于：RNA钉(RNA spike)、混合引物、裂解试剂、逆转录试剂、预扩增试剂和/或细胞染色溶液。RNA钉可包括，但不限于，阵列对照RNA钉(ArrayControl RNA spike)和/或RNA存储溶液。混合引物可包括，但不限于，引物母液和/或DNA稀释试剂。裂解试剂可包括，但不限于，单细胞裂解溶液和/或裂解试剂。RT试剂可包括，但不限于，终止液、单细胞VILO RT、单细胞超级脚本RT(single cell super script RT)和/或装载试剂。预扩增试剂可包括，但不限于，单细胞预扩增试剂、预扩增稀释试剂。细胞染色溶液可包括，但不限于细胞洗涤缓冲液、乙锭同二聚体-1和/或钙黄绿素AM。一些实施方案也可使用启动药剂，诸如封闭试剂和/或预加载试剂。一些实施方案还可以利用悬浮

试剂。

[0318] 在方框2135，一种或更多种溶液可被装载到微流体设备。一种或更多种溶液可包括至少一种或更多种试剂或一种或更多种缓冲液。溶液可以用移液器吸取通过不同的端口，诸如在图16中所示的那些进入微流体设备中。溶液可包括但不限于收集试剂、预先装载试剂、封闭试剂和/或细胞洗涤缓冲液。在方框2105-a，微流体设备可被使用一种或更多种溶液启动。

[0319] 在方框2140，多细胞可被装载到微流体设备中。在混合悬浮试剂并装载微流体设备之前，可产生可包括天然介质的细胞悬浮液。例如，浓度可以是166-250K/ml；其它浓度可被利用。细胞混合物可与悬浮试剂组合。例如，试剂与细胞可以是以一定比例的，诸如4:6。例如，细胞混合物可被用移液器吸取进入不同的端口，诸如那些在图16中所示的。染色溶液和/或封闭试剂也可被装载到微流体设备。在方框2110-a，流动多个细胞通过微流体设备使得在微流体设备的单个捕获位点从多个细胞中捕获单个细胞。例如，控制器，诸如图17的控制器可被利用以流动细胞通过微流体设备，使得细胞在单个捕获位点被捕获。

[0320] 在方框2145，一个或更多个捕获的单个细胞可在微流体设备上被成像。例如，可使用可与微流体设备兼容的显微镜和/或照相机成像细胞。可以在不同的时间成像捕获细胞，诸如被洗涤之前或之后，或被着色之前或之后。

[0321] 在方框2150，至少一种或更多种裂解试剂、一种或更多种逆转录试剂、或一种或更多种预扩增试剂可被装载到微流体设备。例如，收集试剂、裂解试剂、RT试剂和预扩增试剂可被装载到设备。图16可示出包括这些不同试剂可被装载到微流体设备的端口的载体的实例。

[0322] 在方框2115-a，多个捕获的单个细胞可在微流体设备的单一捕位点被裂解。在方框2120-a，在微流体设备内，可在多个单个裂解的细胞上执行逆转录以产生与每个各自单个细胞相关联的逆转录产物。在方框2125-a，在微流体设备内，可在各自与每个各自裂解的单个细胞相关联的逆转录产物上执行预扩增以产生与每个单个捕获细胞相关联的预扩增产物。在方框2155，从多个微流体设备的多个收集入口，与每个单个捕获细胞相关联的预扩增产物可被递送到各自收集入口。在一些情况下，控制器，诸如图17的控制器，可被利用以促进执行这些步骤。

[0323] 在方框2160，从微流体设备的多个收集入口的每个各自收集入口可收集预扩增产物。一些实施方案包括移除一个或更多个收集入口的一个或更多个保护层。保护层可被利用以躲避污染。收集产物，这可被称为收集扩增子，可在随后的分析中被分析，诸如利用一个或更多个基因组分析阵列和/或控制器的不同基因组分析。在一些情况下，基因组分析阵列可被与微流体设备集成。

[0324] 转到图22，根据各种实施方案，使用配置以从多细胞捕获和处理单个细胞的微流体设备的mRNA测序方法2200被示出。方法2200可使用多种不同的系统和/或设备执行，其中系统/或设备包括但不限于例如图1和/或图2的微流体设备110，和/或图16的微流体设备1600，和/或图1和/或图17的系统100的微流体控制器120。

[0325] 例如，方法2200可允许用户捕获细胞、转化多聚A+RNA为全长cDNA，和/或然后执行通用cDNA的扩增。在cDNA合成期间执行的一些实施方案，包括：捕获细胞、生命力染色、成像细胞、裂解细胞、进行逆转录和长距离PCR和/或收集扩增的cDNA。为了通过mRNA Seq进行分

析，全长cDNA可以首先被转化成测序文库，并且从cDNA的文库产生的最后步骤在mRNA Seq Library Preparation for Sequencing Protocol中被描述。例如，如果需要，也可以通过qPCR执行全长cDNA的直接基因表达分析。

[0326] 一些实施方案可使用的修改的寡聚物(dT)引物以启动第一条链的合成，并且因此可在样品中选择用于多聚A+RNA。当逆转录酶(RT)到达mRNA的5'端时，酶的末端转移酶的活性可增加一些非模板脱氧胞苷到cDNA的3'端。模板转换引物可包括在其3'端的一些鸟嘌呤核苷，其与在cDNA上非模板脱氧胞苷碱基配对以创建延伸的模板。然后，RT可延伸到模板转换引物的末端，产生可包含通用标签序列、mRNA的3'端、多至mRNA的5'端的全长转录本，和/或最后的通用标签序列的反向互补物的单链cDNA。不成熟地终止的cDNA、污染的基因组DNA或从不带多聚A尾的RNA转录的cDNA在两端可不包含通用标签，且在长距离PCR期间将不被指数地扩增。然而，在仍然具有多聚A尾部的低质量RNA中出现的分解的RNA可被扩增，产生不完全覆盖转录本的5'端的更短的cDNA片段。因为例如在cDNA的5'端发现的通用标签可与在短cDNA的3'端发现的其自身反向互补物配对，这可预防短cDNA的扩增，全长转录本在PCR期间可被富集。

[0327] 在方框2205，微流体设备可被使用一种或更多种溶液启动。在方框2210，流动多个细胞通过微流体设备使得在微流体设备的单个捕获位点从多个细胞中捕获单个细胞。在方框2215，多个捕获的单个细胞可在微流体设备的单一捕位点被裂解。在方框2220，在微流体设备内，可在多个单个裂解的细胞上执行逆转录以产生与每个各自单个细胞相关联的逆转录产物。在方框2225，在微流体设备内，可在与每个各自裂解的单个细胞相关联的各自逆转录产物上执行PCR以产生与每个单个捕获细胞相关联的PCR产物。

[0328] 方法2200的一些实施方案包括从微流体设备的多个收集入口递送与每个单个捕获细胞相关联的PCR产物到各自收集入口。方法2100可包括装载一种或更多种溶液到微流体设备。一种或更多种溶液可包括至少一种或更多种试剂或一种或更多种缓冲液。

[0329] 方法2200可包括装载多个细胞到微流体设备。一些实施方案包括成像在微流体设备上的一个或更多个捕获的单个细胞。方法2200的一些实施方案包括装载至少一种或更多种裂解试剂、一种或更多种逆转录试剂、或一种或更多种PCR试剂到微流体设备。

[0330] 方法2200的一些实施方案包括移除一个或更多个收集入口的一个或更多个保护层。从微流体设备的多个收集入口的每个各自收集入口可收集PCR产物。

[0331] 方法2200可包括染色在微流体设备上的单个捕获细胞的一个或更多个。方法2200可包括基于染色确定单个捕获细胞的一个或更多个为存活或死亡。方法2200可包括基于成像确定单个捕获细胞的一个或更多个为存活或死亡。

[0332] 在一些情况下，PCR产物包括扩增的cDNA。一些实施方案包括利用与每个单个捕获细胞相关联的PCR产物制备的一个或更多个文库。制备的一个或更多个文库可包括确定来自与每个单个细胞相关联的每个各自收集产物的cDNA浓度，和/或稀释每个各自cDNA浓度到预先确定的浓度范围内。一些实施方案包括准备用于标签化的稀释的cDNA浓度以产生标签化产物。一些实施方案包括在标签化产物上执行PCR扩增以产生PCR产物。方法2200可包括产生来自于PCR产物的一个或更多个文库池。

[0333] 转到图22A，根据各种实施方案，使用配置以从多细胞捕获和处理单个细胞的微流体设备的mRNA测序方法2200-a被示出。方法2200-a可使用多种不同的系统和/或设备执行，

其中系统/或设备包括但不限于例如图1和/或图2的微流体设备110，和/或图16的微流体设备1600，和/或图1和/或图17的系统100的微流体控制器120。方法2200-a可以是方法2200的实例。

[0334] 在方框2230，一种或更多种溶液可被制备以装载到微流体设备。一种或更多种溶液可包括至少一种或更多种试剂或一种或更多种缓冲液。例如，溶液可包括，但不限于：RNA钉、裂解试剂、逆转录试剂、PCR试剂、细胞染色溶液和/或细胞混合试剂。在一些实施方案中，RNA钉可包括RNA存储溶液和/或阵列对照RNA钉。RNA钉可作为热循环的正对照。裂解试剂可包括，但不限于，装载试剂、RNA抑制剂、3'CDS引物和/或稀释缓冲液。在一些实施方案中，RT试剂可包括5X第一链缓冲液、二硫苏糖醇、dNTP试剂和/或逆转录酶试剂。PCR试剂可包括，但不限于，PCR水、10X优势2PCR缓冲液(10X advantage 2PCR buffer)、50X dNTP试剂、IS PCR引物和/或50X优势2聚合酶试剂。细胞试剂可包括，但不限于，细胞和/或悬浮试剂。例如，细胞染色溶液可包括细胞洗涤缓冲液、乙锭同二聚体-1和/或钙黄绿素AM。

[0335] 在方框2235，一种或更多种溶液可被装载到微流体设备。仅仅通过示例的方式，在微流体载体中溶液可通过端口被装载到微流体芯片，诸如在图16中所示。在方框2205-a，微流体设备可被使用一种或更多种溶液启动。启动剂可包括，但不限于，预装载试剂、收集试剂和/或封闭试剂。

[0336] 在方框2240，多细胞可被装载到微流体设备中。在一些情况下，细胞可在可包括悬浮试剂的悬浮液中被制备。在一些实施方案中，在用悬浮试剂混合之前，天然介质中浓度可以是在166-250K/ml之间。在微流体载体中细胞可通过端口被装载到微流体设备，例如，诸如在图16中所示。

[0337] 在方框2210-a，流动多个细胞通过微流体设备使得在微流体设备的单个捕获位点从多个细胞中捕获单个细胞。这可利用控制器，例如，诸如图17的控制器。

[0338] 在方框2245，捕获的单个细胞的一个或更多个可在微流体设备上被成像。细胞可用可与微流体设备兼容的显微镜和/或照相机成像。

[0339] 在方框2250，至少一种或更多种裂解试剂、一种或更多种逆转录试剂、或一种或更多种PCR试剂可被装载到微流体设备。例如，这可包括，例如，装载收集试剂、裂解试剂、RT试剂和/或PCR试剂到载体的不同端口，诸如在图16中所示。

[0340] 在方框2215-a，多个捕获的单个细胞可在微流体设备的单一捕位点被裂解。在方框2220-a，在微流体设备内，可在多个单个裂解的细胞上执行逆转录以产生与每个各自单个细胞相关联的逆转录产物。在方框2225-a，在微流体设备内，可在与每个各自裂解的单个细胞相关联的逆转录产物上执行PCR以产生与每个单个捕获细胞相关联的各自PCR产物。控制器，诸如图17的控制器，可被用于控制这些方框的每个性能。

[0341] 在方框2255，与每个单个捕获细胞相关联的PCR产物可从多个微流体设备的多个收集入口被递送到各自收集入口。在方框2260，从微流体设备的多个收集入口的每个各自收集入口可收集PCR产物。一些实施方案包括移除一个或更多个收集入口的一个或更多个保护层以促进收集PCR产物。

[0342] 转到图22B，根据各种实施方案，使用配置以从多细胞捕获和处理单个细胞的微流体设备的mRNA测序方法2200-b被示出。方法2200-b可使用多种不同的系统和/或设备执行，其中系统/或设备包括但不限于例如图1和/或图2的微流体设备110，和/或图16的微流体设

备1600，和/或图1和/或图17的系统100的微流体控制器120。在一些情况下，方法2200-b可被与方法2200和/或方法2200-a相结合。

[0343] 方法2200-b可包括准备利用与每个单个捕获细胞相关联的PCR产物的一个或更多个文库。例如，在方框2265，可确定来自与每个单个细胞相关联的每个各自收集产物的cDNA浓度。

[0344] 在方框2270，每个各自cDNA浓度可被稀释到预先确定的浓度范围内。在方框2275，稀释的cDNA浓度可被制备用于标签化以产生标签化产物。在方框2280，PCR扩增可被在标签化产物上执行以产生PCR产物。在方框2285，一个或更多个文库池可从PCR产物中被产生。

[0345] 以上结合附图的详细描述阐述描述了示例性实施方案，且不代表可被执行或在权利要求范围内的仅有实施方案。贯穿这些描述使用的术语“示例性”指“作为实例、例子或说明”，而不是“首选的”或“相对其它实施方案有利的”。详细描述包括用于提供描述技术的理解的目的的特殊细节。然而，没有这些详细细节这些技术也可被实践。在一些例子中，众所周知的结构和设备以框图形式显示，以便避免模糊描述的实施方案的概念。

[0346] 信息和信号可以使用任何各种不同的技术学和技术代表。例如，贯穿以上描述可被参考的数据、说明、命令、信息、信号、位、符号和芯片，可通过电压、电流、电磁波、磁场或颗粒、光场或颗粒或其任何组合表示。

[0347] 与本文公开有关的描述的各种说明性方框和模块的一些可用设计以执行本文描述功能的通用处理器、数字信号处理器(DSP)、专用集成电路(ASIC)、现场可编程门阵列(FPGA)或其它可编程逻辑设备、离散门或晶体管逻辑、离散硬件组件或其任何组合被实施或执行。通用处理器可以是微处理器，但可替换地，处理器可以是任何传统的处理器、控制器、微控制器或状态机。处理器也可以作为计算设备的组合来实施，例如，DSP和微处理器、多个微处理器、与DSP核心连接的一个或更多个微处理器，或任何其它此类配置的组合。

[0348] 本文描述的一些功能可在硬件、被处理器执行的软件、固件或其任何组合中实施。如果在被处理器执行的软件中实施，可存储或传输功能为计算机可读介质的一种或更多种指令或代码。其它实例和实施方案在公开和附带的权利要求的范围和精神内。例如，由于软件的性质，以上描述的功能可以使用被处理器执行的软件、硬件、固件、硬接线或这些的任何组合实施。实现功能的特征也可能是物理地位于不同的位置，包括被分布使得部分功能在不同物理位置实施。同时，如本文所用的，包括在权利要求中，如在以“至少一个”开始的项目列表中使用的“或”表明分隔列表，使得，例如，“至少A、B或C中的至少一个”的列表指A或B或C或AB或AC或BC或ABC(即，A和B和C)。

[0349] 计算机可读介质同时包括计算机存储介质和通信介质，其中通信介质包括任何促进计算机程序从一个位置到另一个位置的传输的介质。存储介质可以是任何可被通用或特殊计算机访问的可用介质。通过示例且不限制的方式，计算机可读介质可包括以指令或数据结构形式的手段，和可被通用或特殊计算机，或通用或特殊处理器访问的RAM、ROM、EEPROM、CD-ROM或其它光盘存储、磁盘存储设备或其它磁性存储介质，或任何可被用于执行或存储所需的程序代码的其它介质。同时，任何连接被恰当地称为计算机可读介质。例如，如果软件从网站、服务器或其它远程源使用同轴电缆、光纤电缆、双绞线、数字用户线(DSL)、或无线技术(诸如红外、无线电、微波)传输，然后同轴电缆、光纤电缆、双绞线、DSL或无线技术诸如红外、无线电、微波被包含在介质的定义中。如本文使用的磁盘和光盘包括光

盘(CD)、激光光盘、光学光盘、数字通用光盘(DVD)、软盘和蓝光光盘，其中磁盘通常磁力地再生数据，而光盘用激光光学地再生数据。以上的组合也包括在计算机可读介质范围。

[0350] 先前公开的描述被提供以实现本领域技术人员制作和使用本公开。本公开的各种修改对于本技术领域的那些技术人员将是很明显的，且本文限定的一般原则被应用到其它变化而不脱离本公开的精神和范围。贯穿本公开的术语“实例”或“示例性的”表明实例或例子，且不意味着或需要对记录的实例的任何偏好。因此本公开不是被限制到本文描述的实例和设计，而是符合与本文公开的原则和新特征一致的最宽泛的范围。

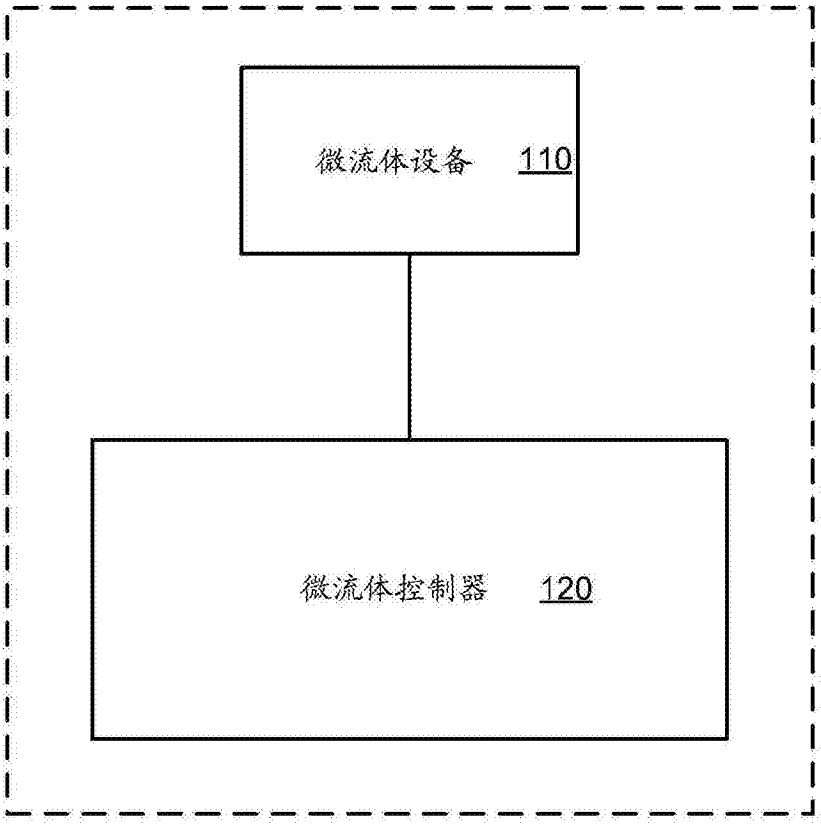


图1

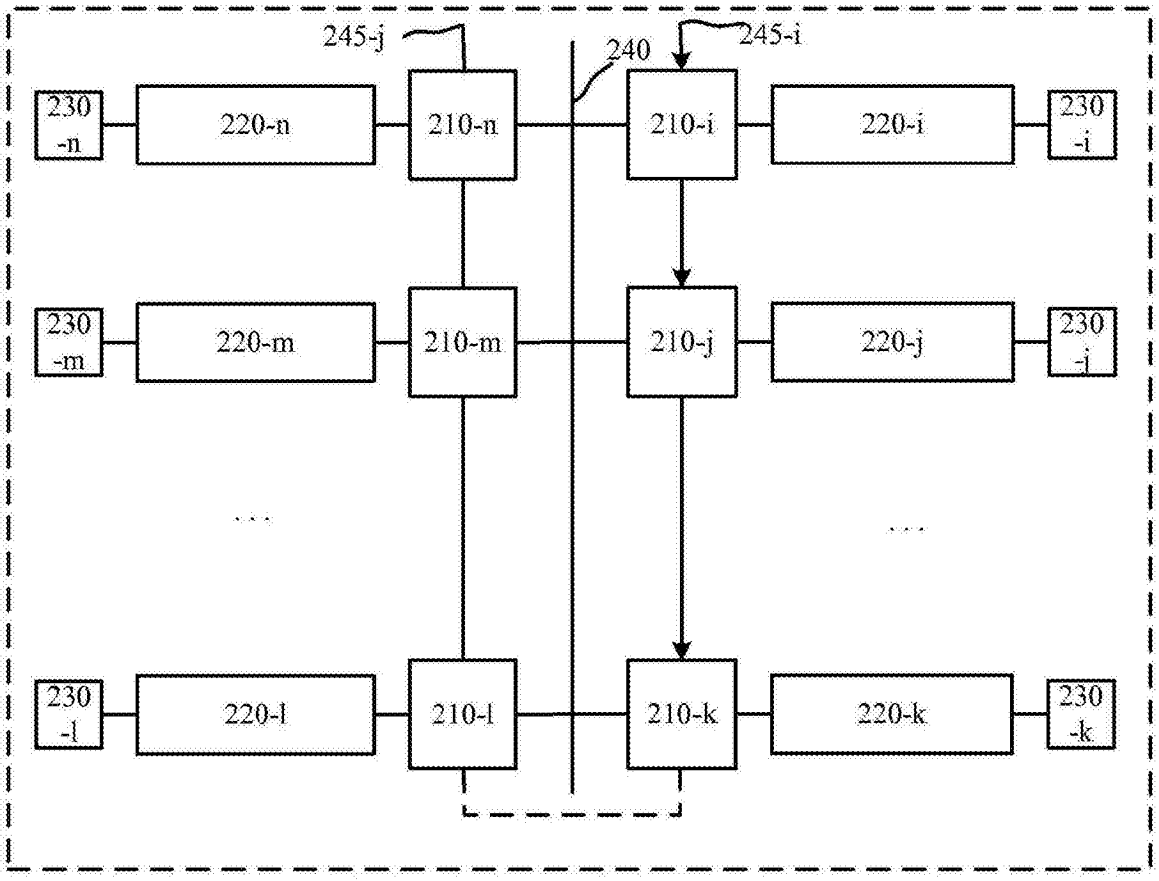

245-j
240
245-i
230 -n
220-n
210-n
210-i
220-i
230 -i
230 -m
220-m
210-m
210-j
220-j
230 -j
230 -l
220-l
210-l
210-k
220-k
230 -k
110-a

图2

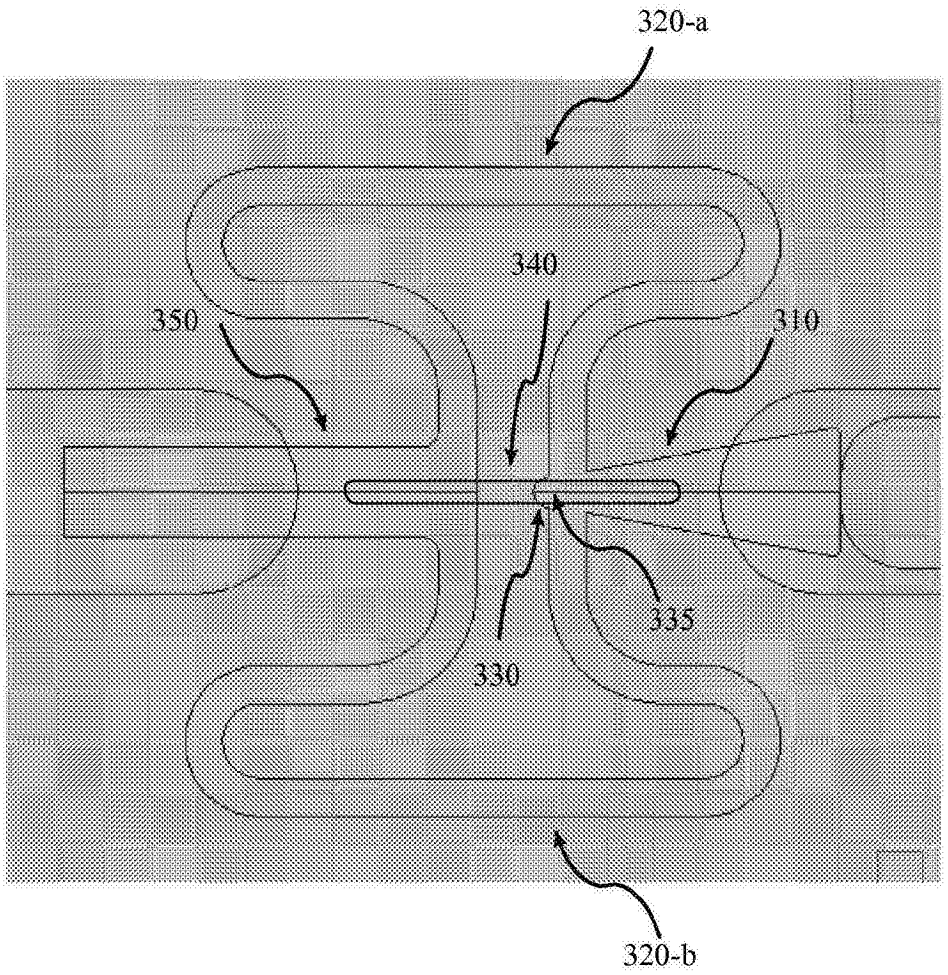


图3A

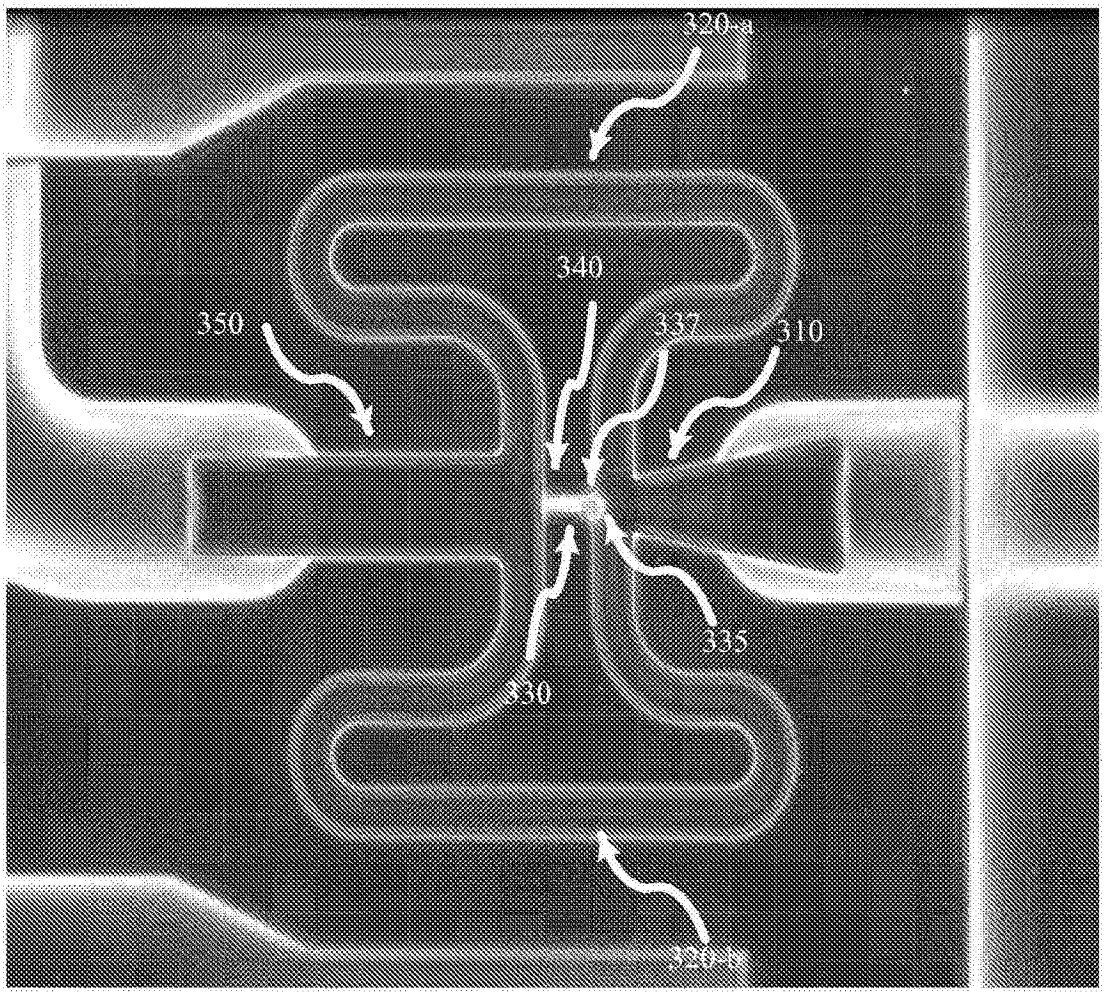


图3B

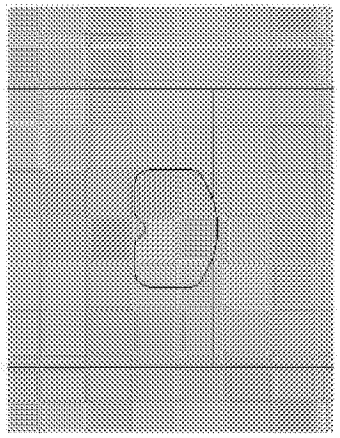


图3C

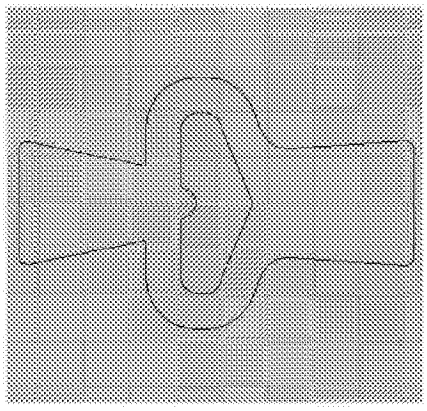


图3D

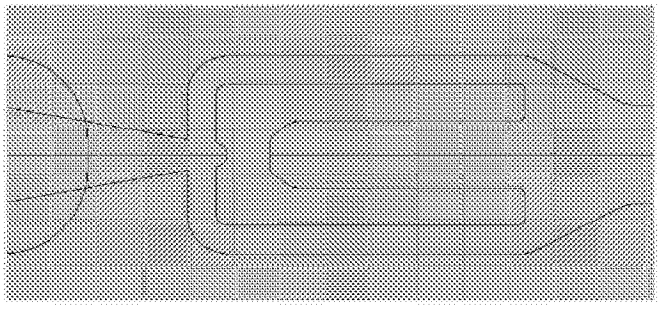


图3E

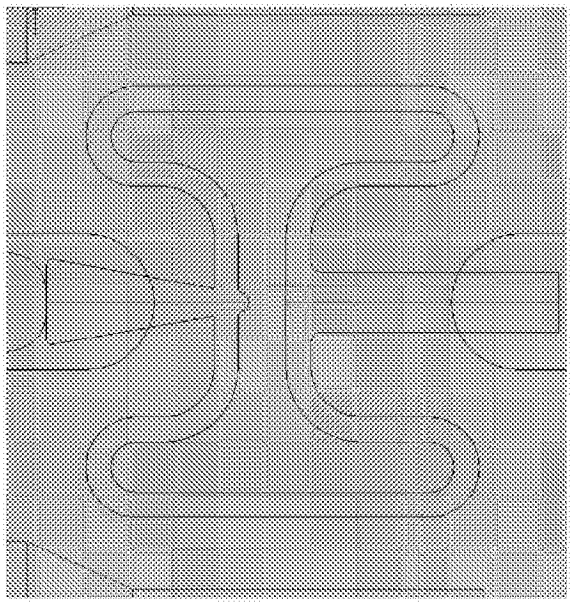


图3F

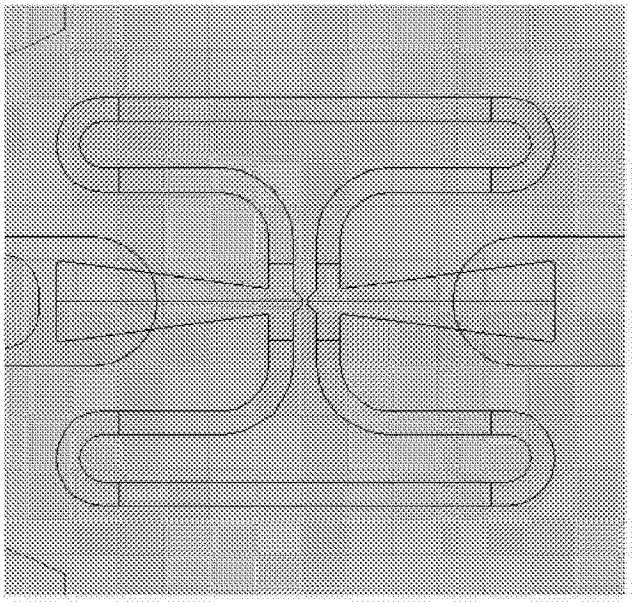


图3G

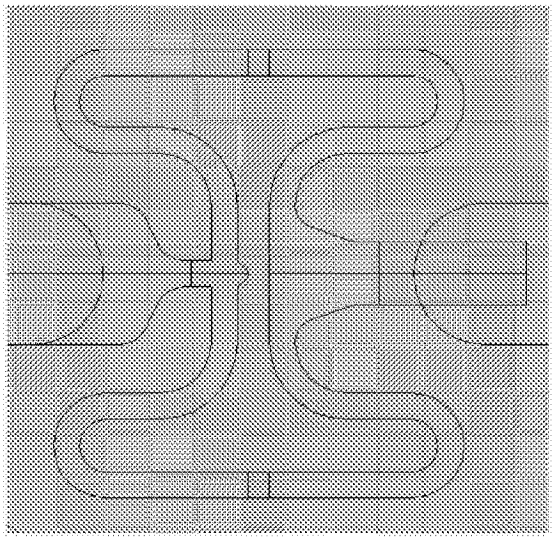


图3H

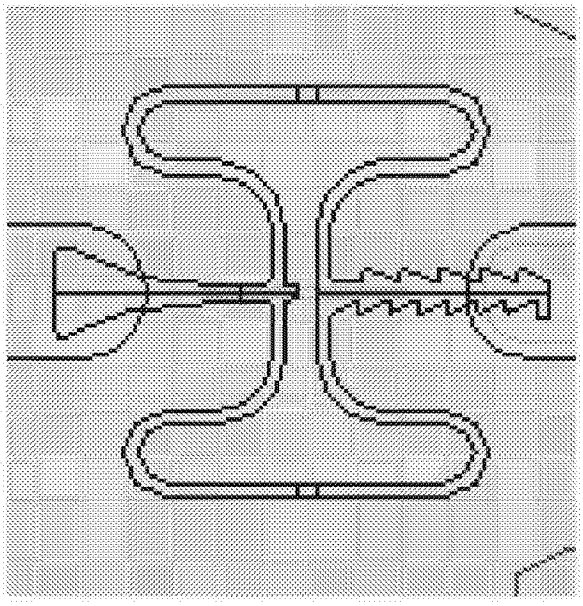


图3I

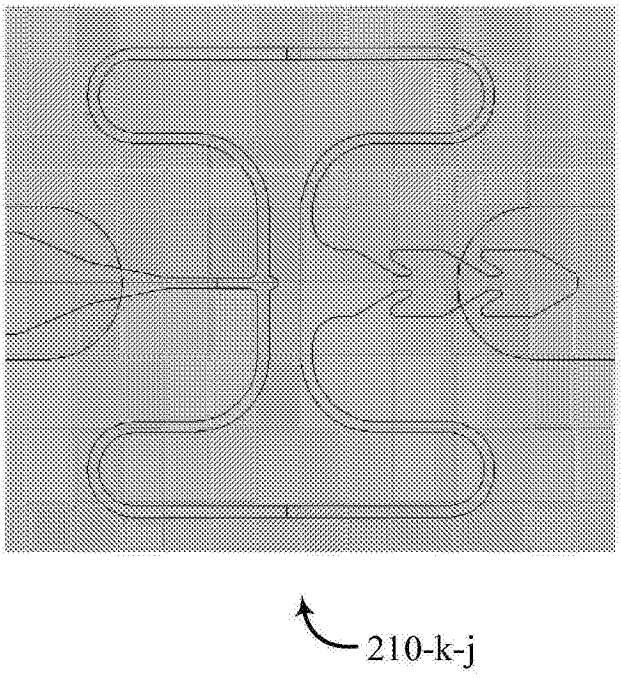


图3J

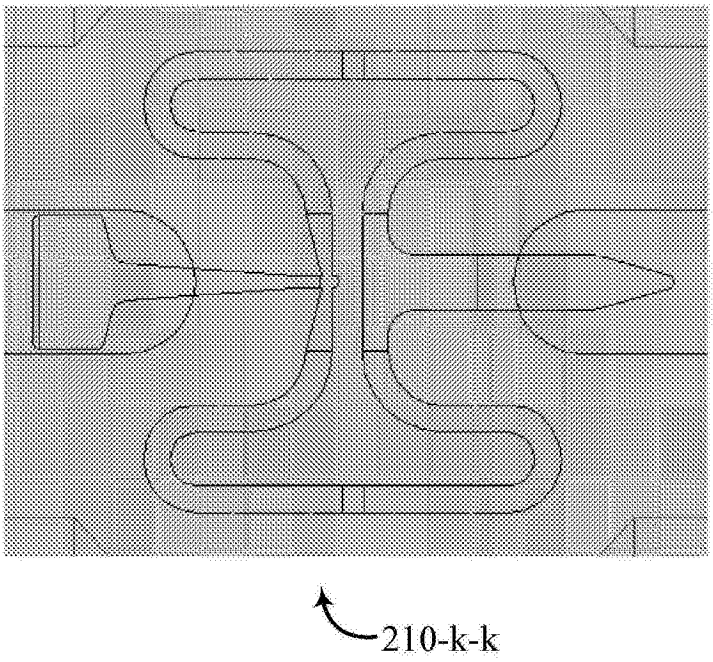


图3K

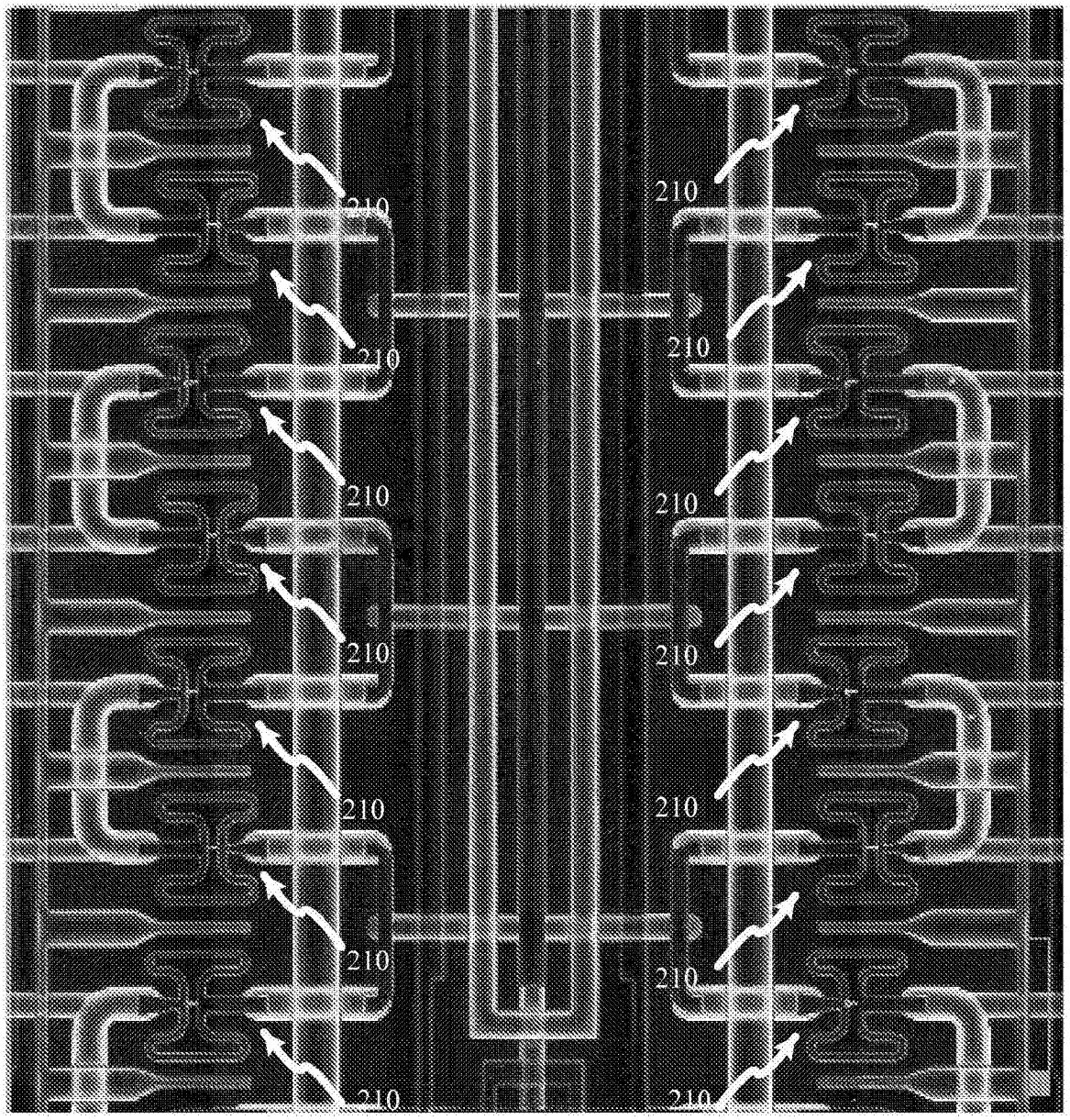


图4

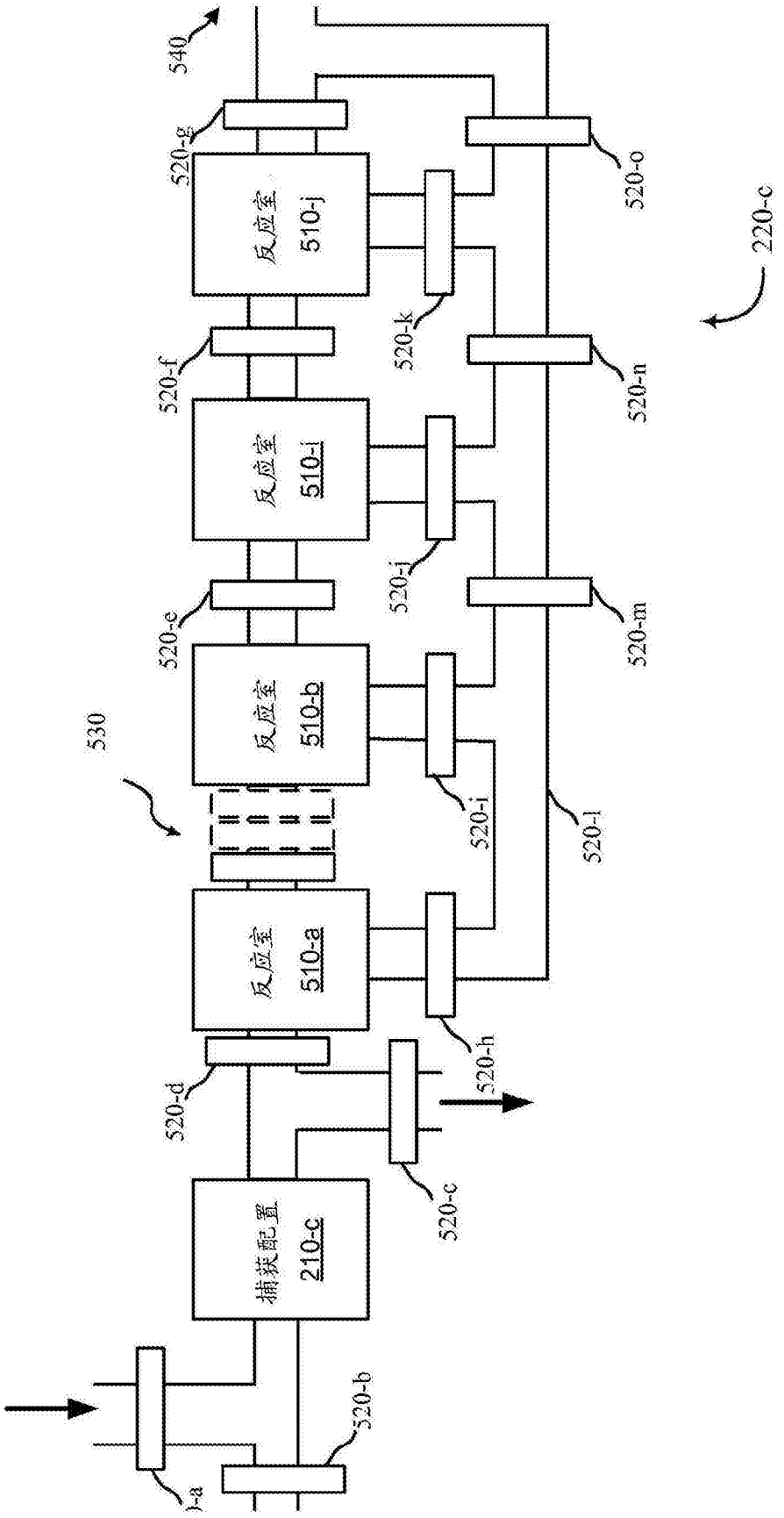

540
520-g
520-o
220-c
反应室 510-j
520-k
520-f
520-n
反应室 510-i
520-j
520-e
520-m
530
反应室 510-b
520-i
520-l
反应室 510-a
520-h
520-d
520-c
捕获配置 210-c
520-b
520-a

图5A

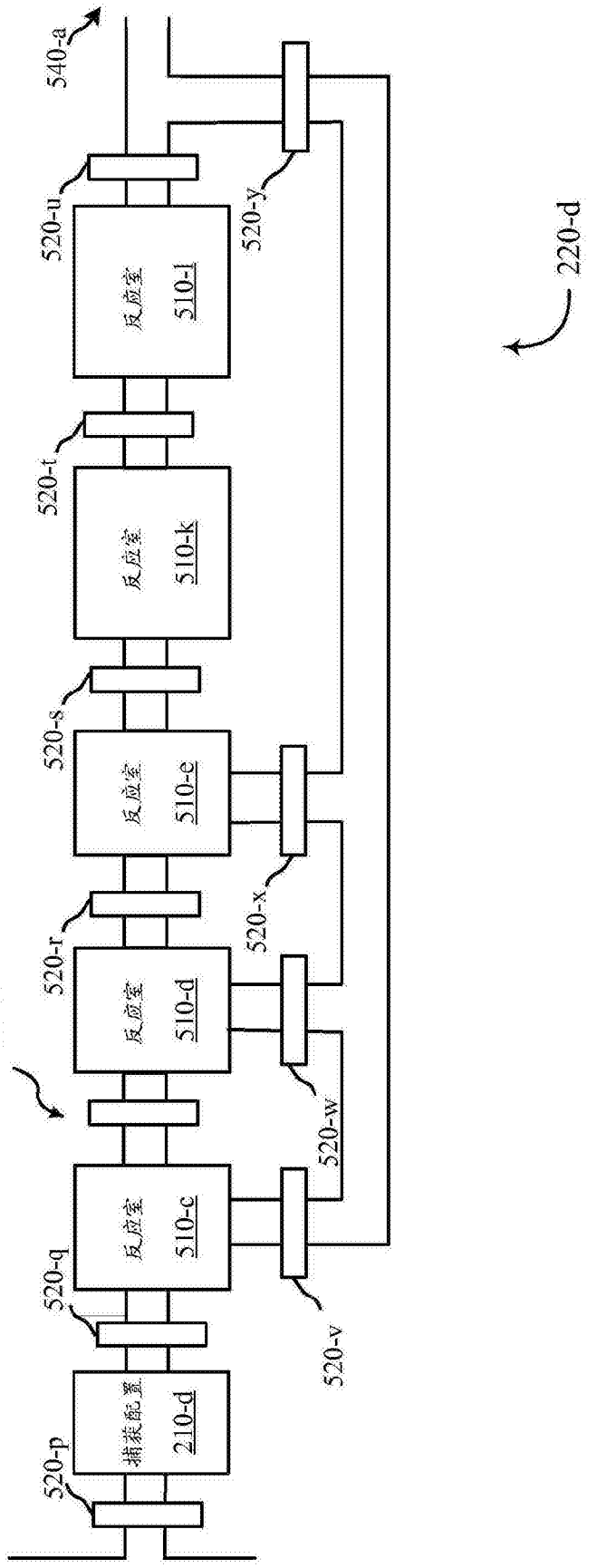

540-a
520-u
520-y
220-d
反应室 510-l
520-t
反应室 510-k
520-s
反应室 510-e
520-x
520-r
520-z
反应室 510-d
520-w
反应室 510-c
520-q
520-v
捕获配置 210-d
520-p

图5B

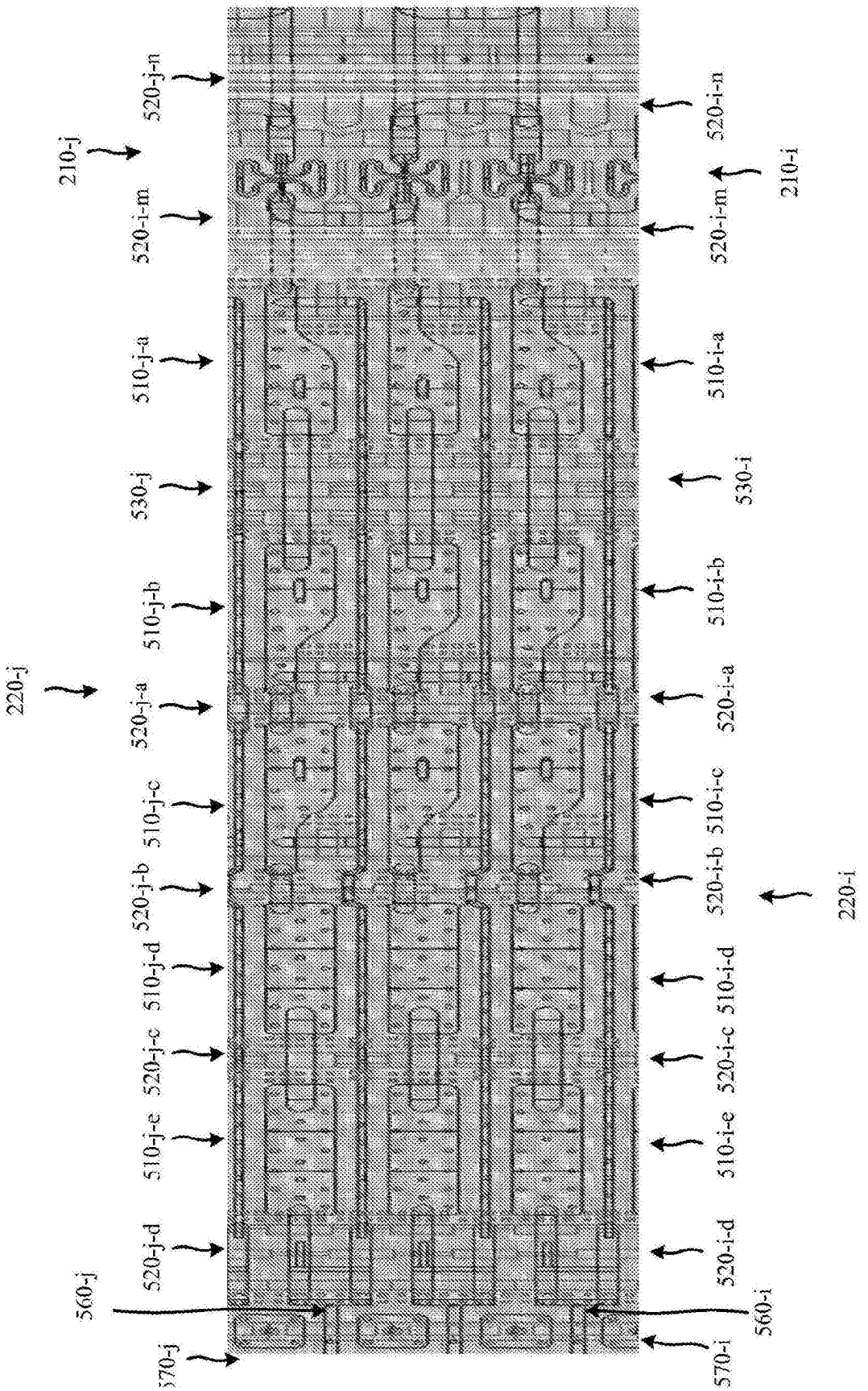
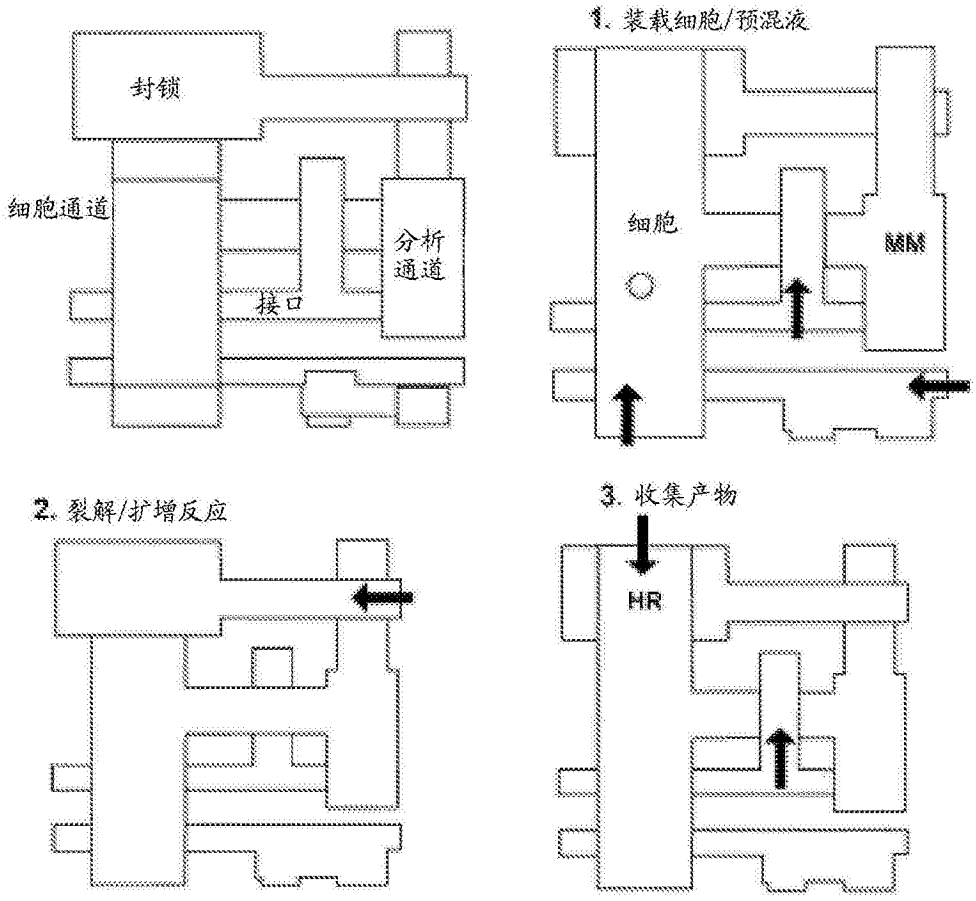

220-j
210-j
520-j-n
520-i-m
510-j-a
530-j
510-j-b
520-j-a
510-j-c
520-j-b
510-j-d
520-j-c
510-j-e
520-j-d
560-j
570-j
210-i
520-i-n
520-i-m
510-i-a
530-i
510-i-b
520-i-a
510-i-c
520-i-b
510-i-d
520-i-c
510-i-e
520-i-d
560-i
570-i
220-i

图5C



	[illegible]	比例
细胞通道	2.4	
分析通道	8.9	[illegible] 室1: 细胞通道

图6

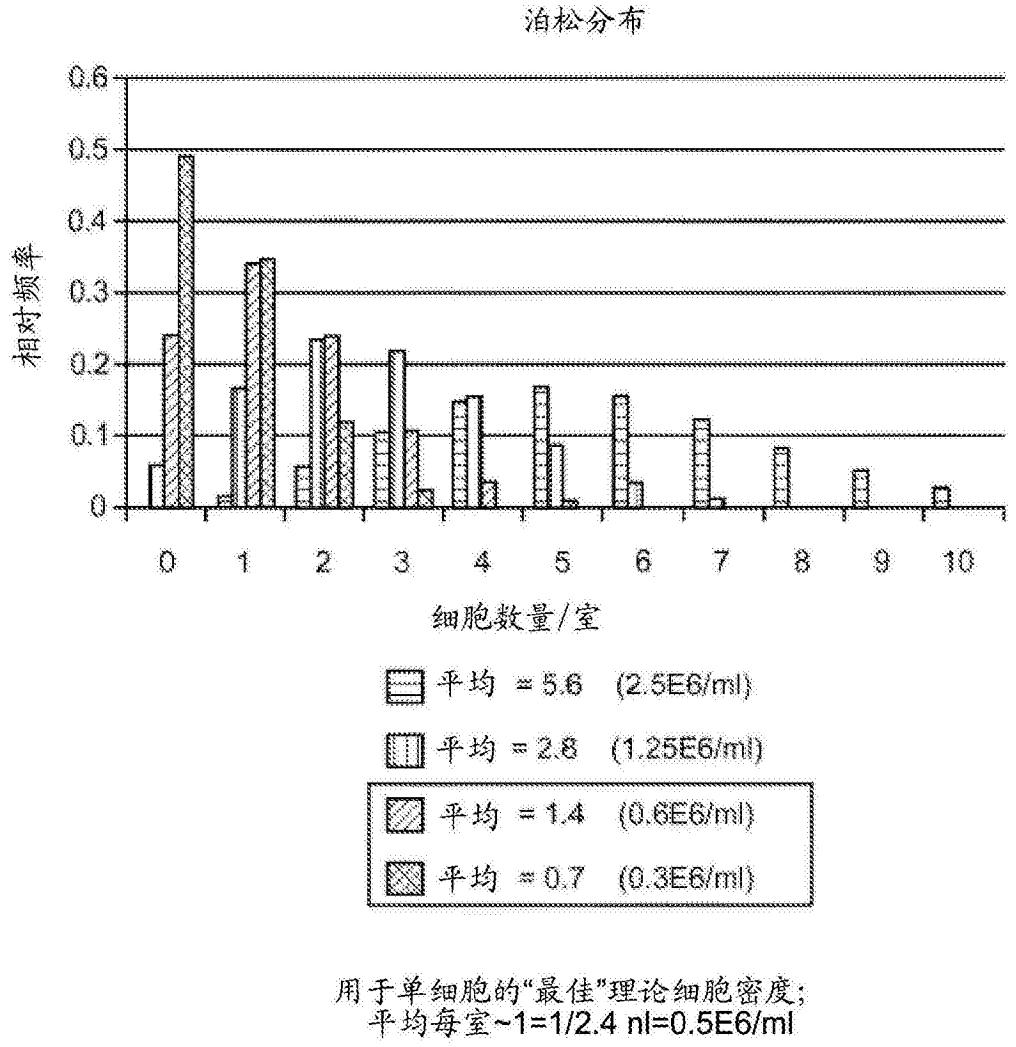

泊松分布
相对频率
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
细胞数量/室
平均 = 5.6 (2.5E6/ml)
平均 = 2.8 (1.25E6/ml)
平均 = 1.4 (0.6E6/ml)
平均 = 0.7 (0.3E6/ml)
用于单细胞的"最佳"理论细胞密度;
平均每室~1=1/2.4 nl=0.5E6/ml

图7

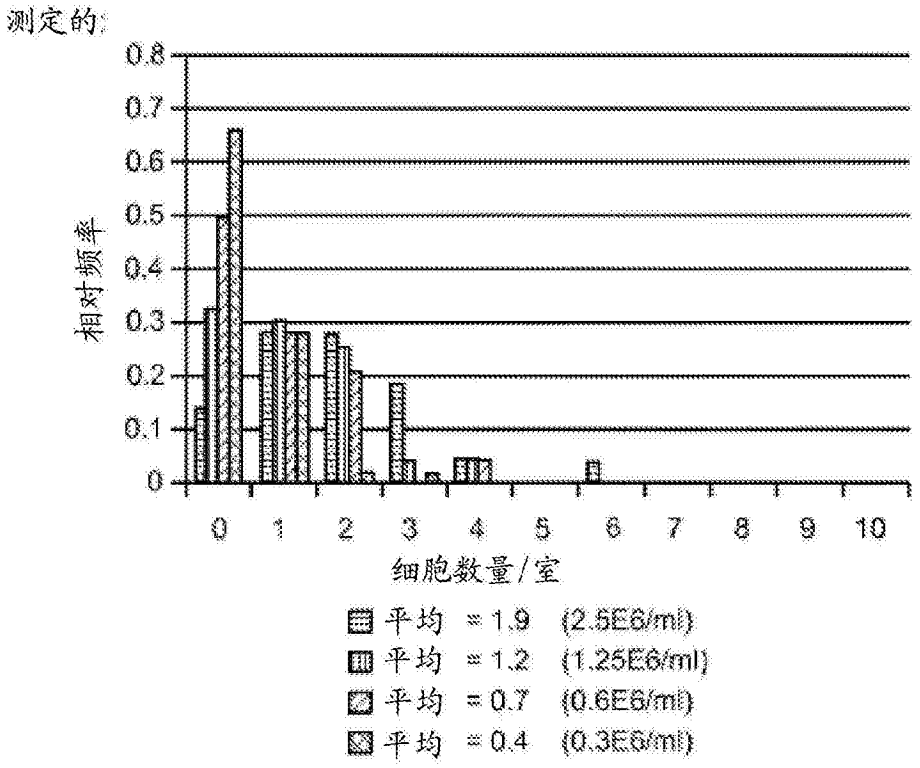

测定的:
相对频率
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
细胞数量/室
平均 = 1.9 (2.5E6/ml)
平均 = 1.2 (1.25E6/ml)
平均 = 0.7 (0.6E6/ml)
平均 = 0.4 (0.3E6/ml)

图8A

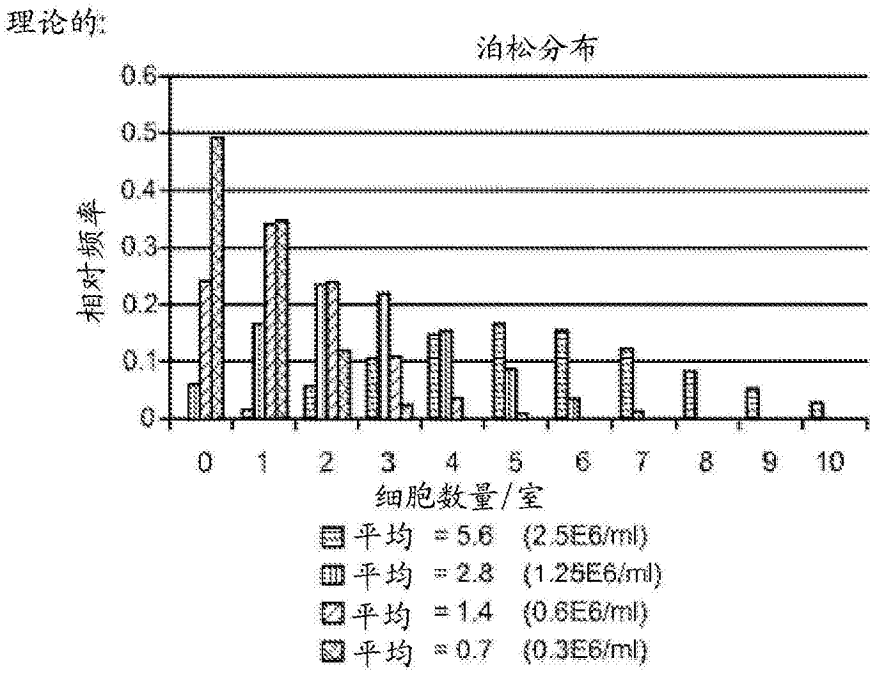
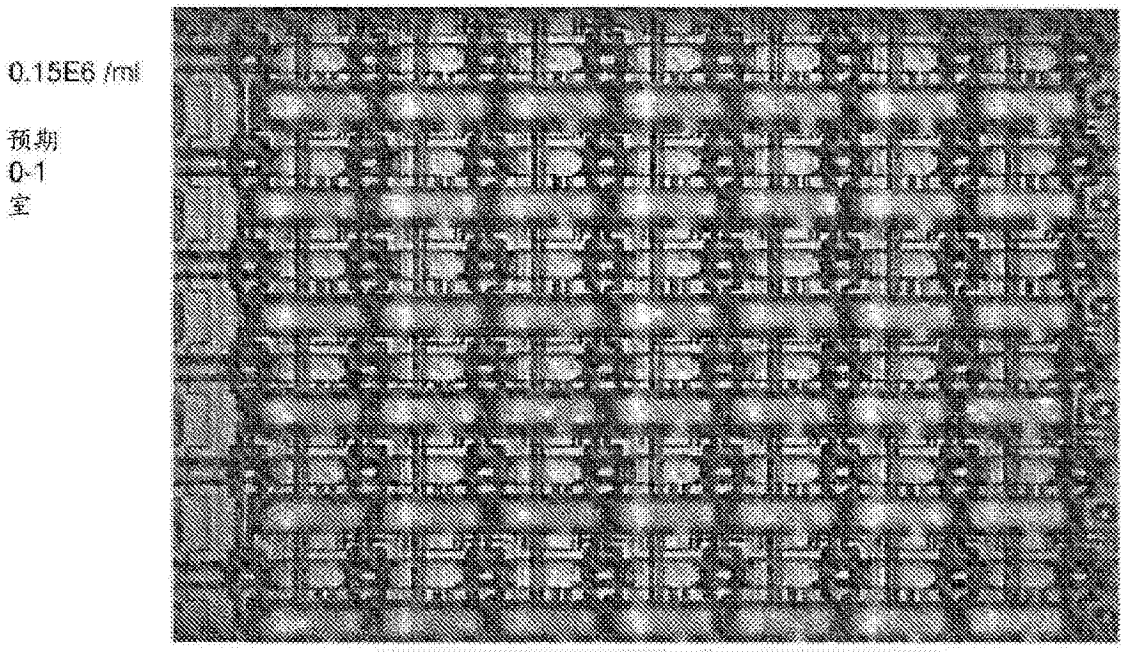

理论的:
泊松分布
相对频率
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
细胞数量/室
平均 = 5.6 (2.5E6/ml)
平均 = 2.8 (1.25E6/ml)
平均 = 1.4 (0.6E6/ml)
平均 = 0.7 (0.3E6/ml)

图8B



	明场	荧光
平均细胞/室	0.29	0.52

图9

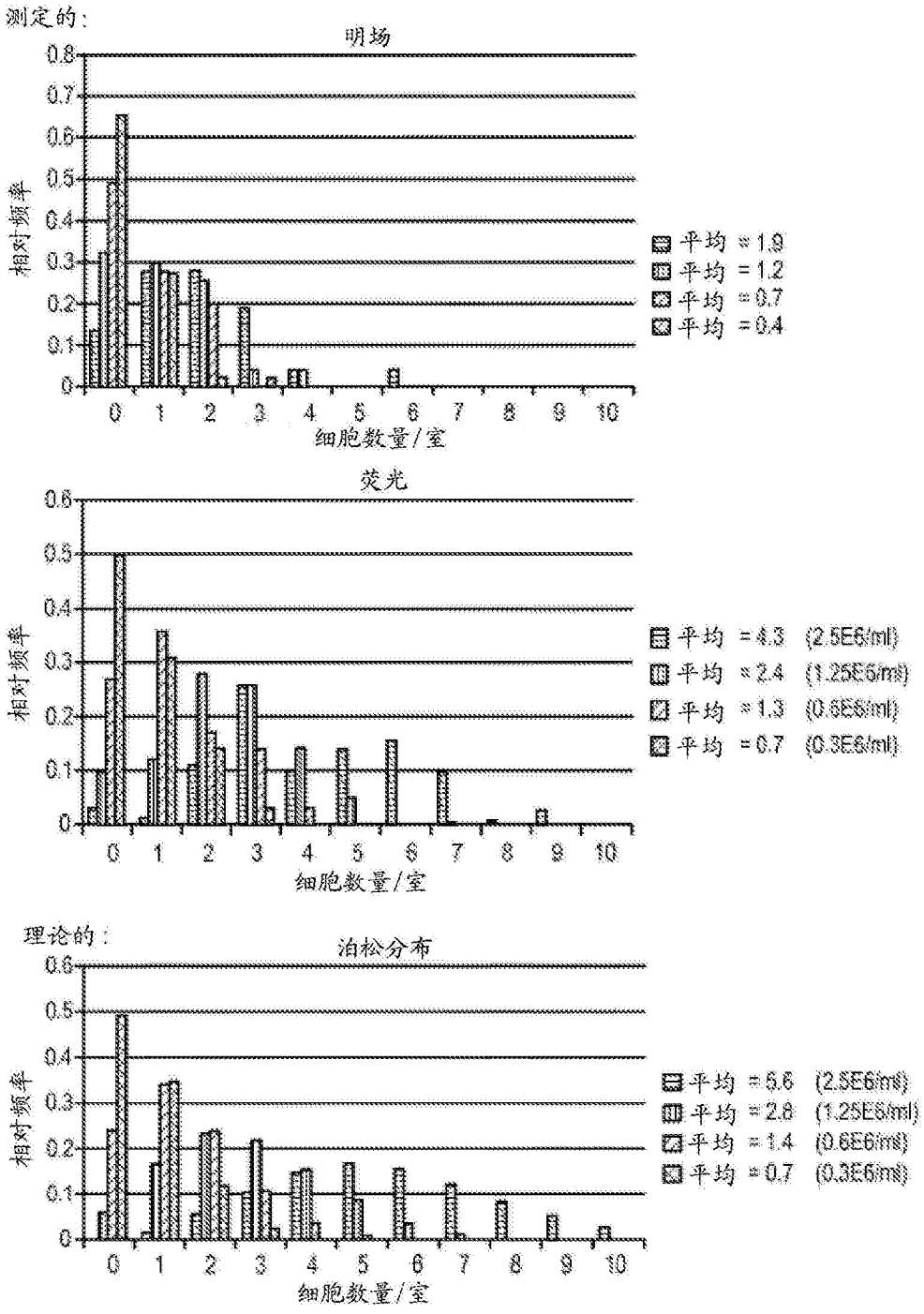

测定的：
明场
相对频率
细胞数量/室
平均 = 1.9
平均 = 1.2
平均 = 0.7
平均 = 0.4
荧光
相对频率
细胞数量/室
平均 = 4.3 (2.5E6/ml)
平均 = 2.4 (1.25E6/ml)
平均 = 1.3 (0.6E6/ml)
平均 = 0.7 (0.3E6/ml)
理论的：
泊松分布
相对频率
细胞数量/室
平均 = 6.6 (2.5E6/ml)
平均 = 2.8 (1.25E6/ml)
平均 = 1.4 (0.6E6/ml)
平均 = 0.7 (0.3E6/ml)

图10

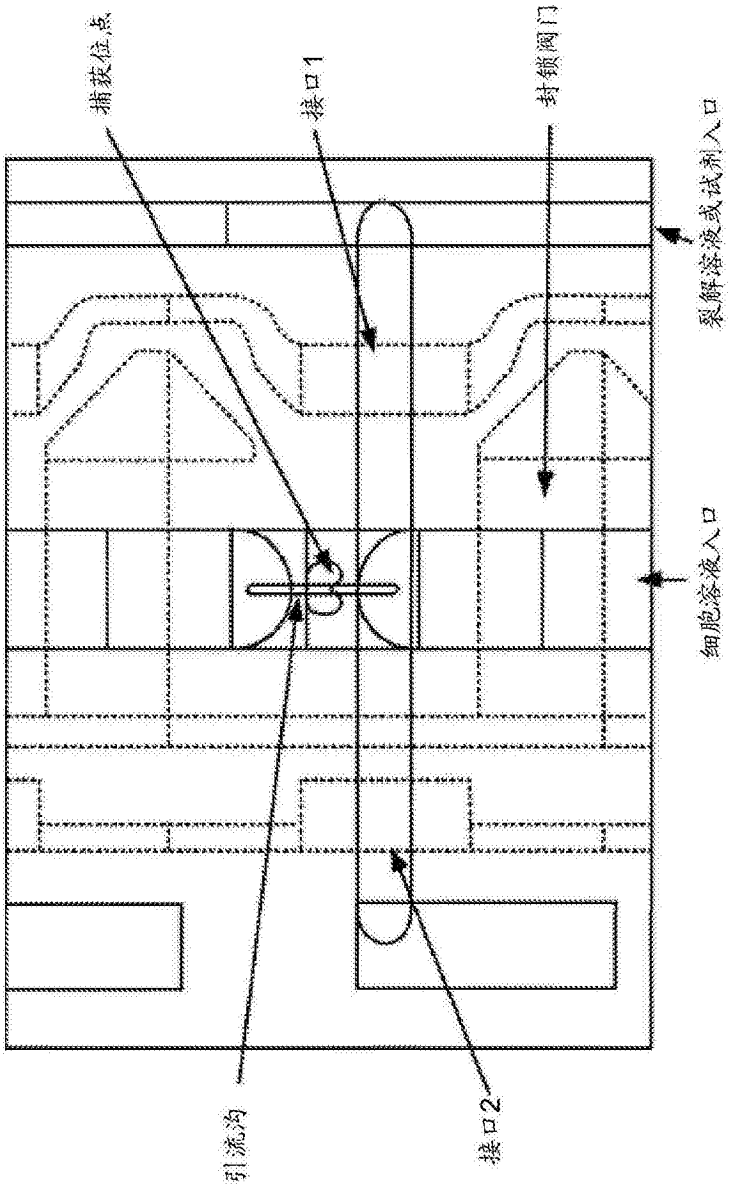


图11A

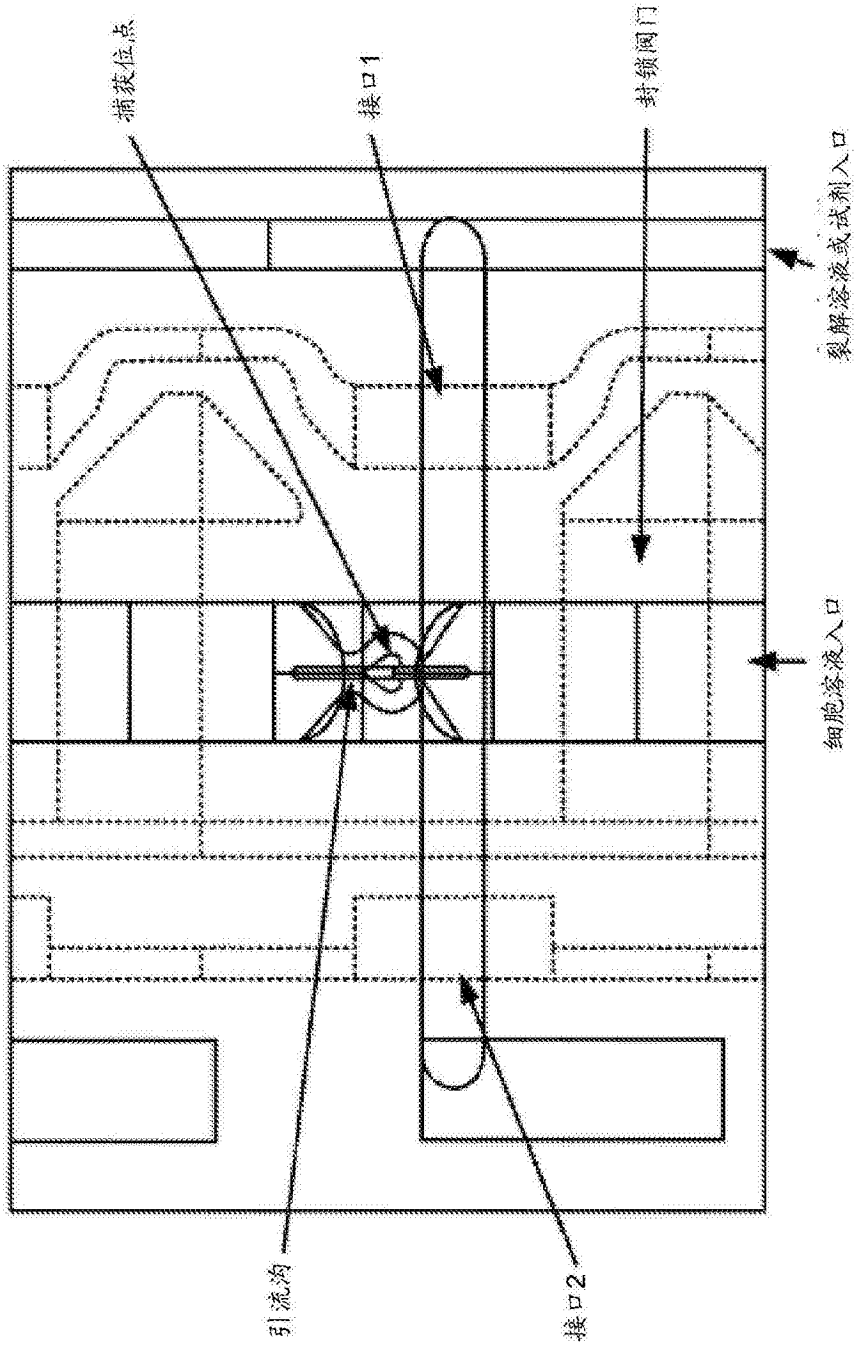


图11B

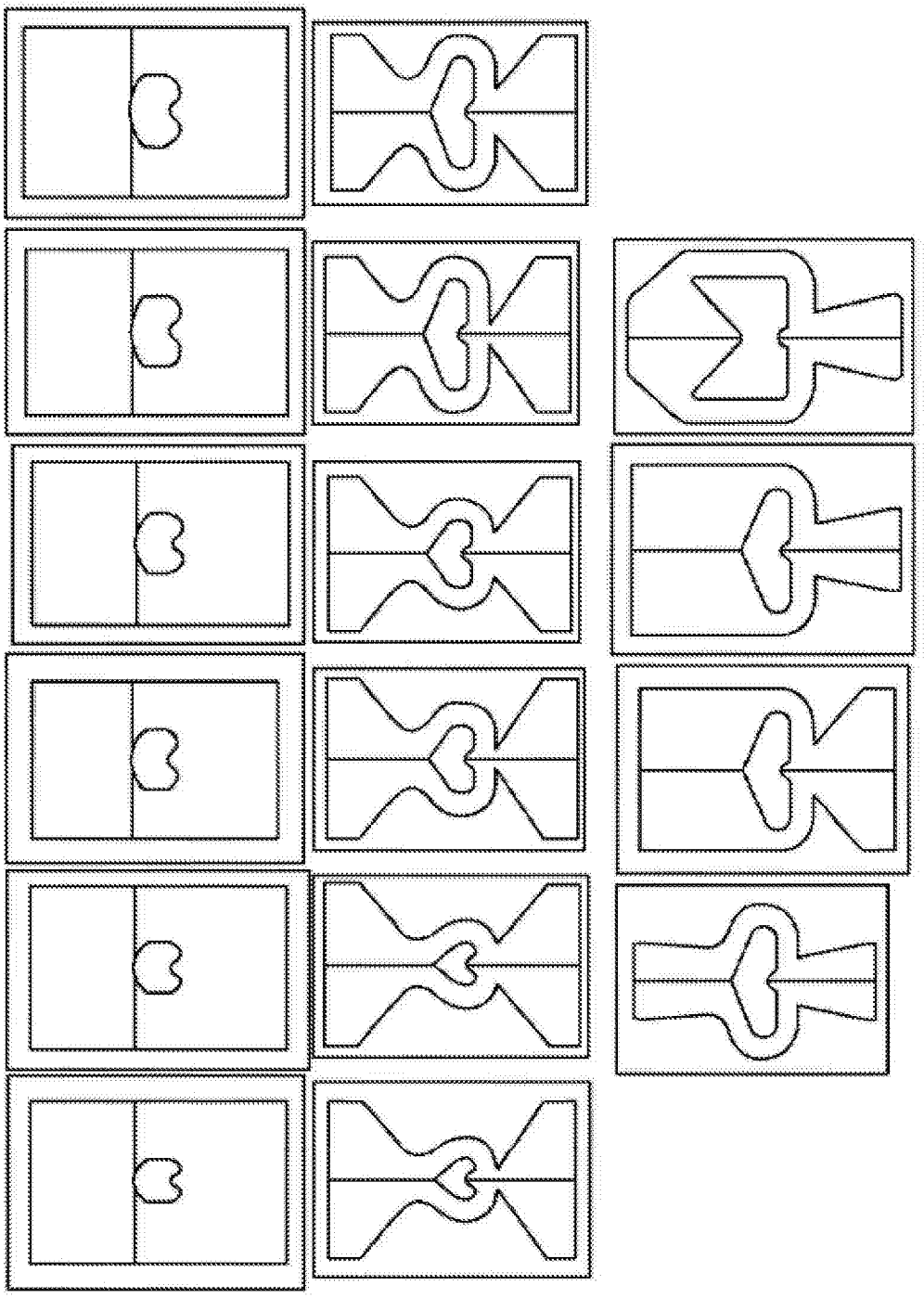


图12

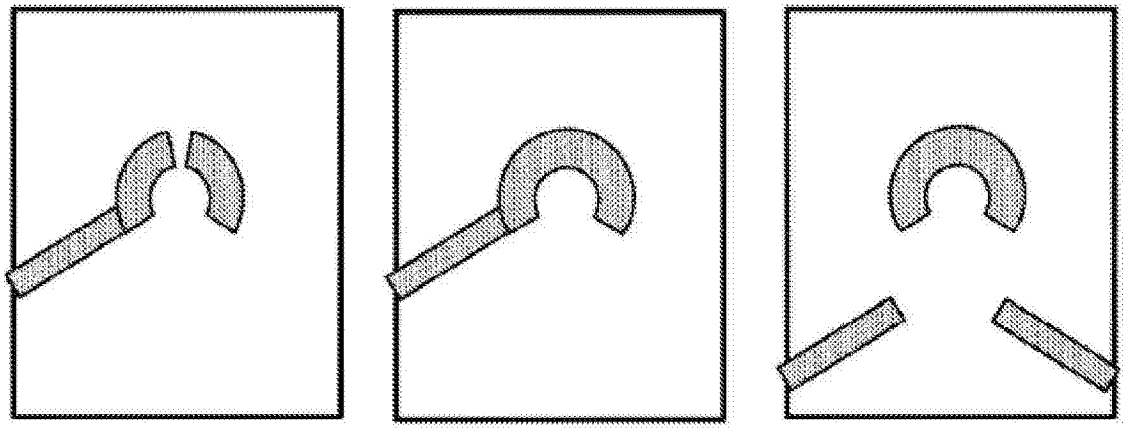


图13A

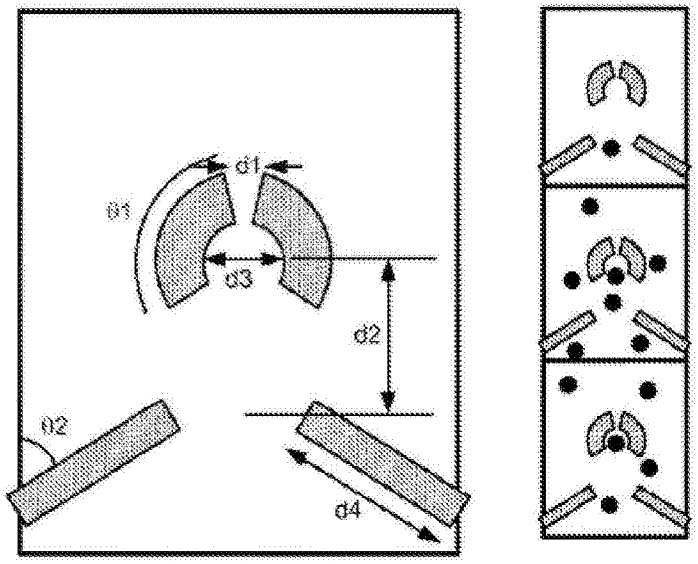


图13B

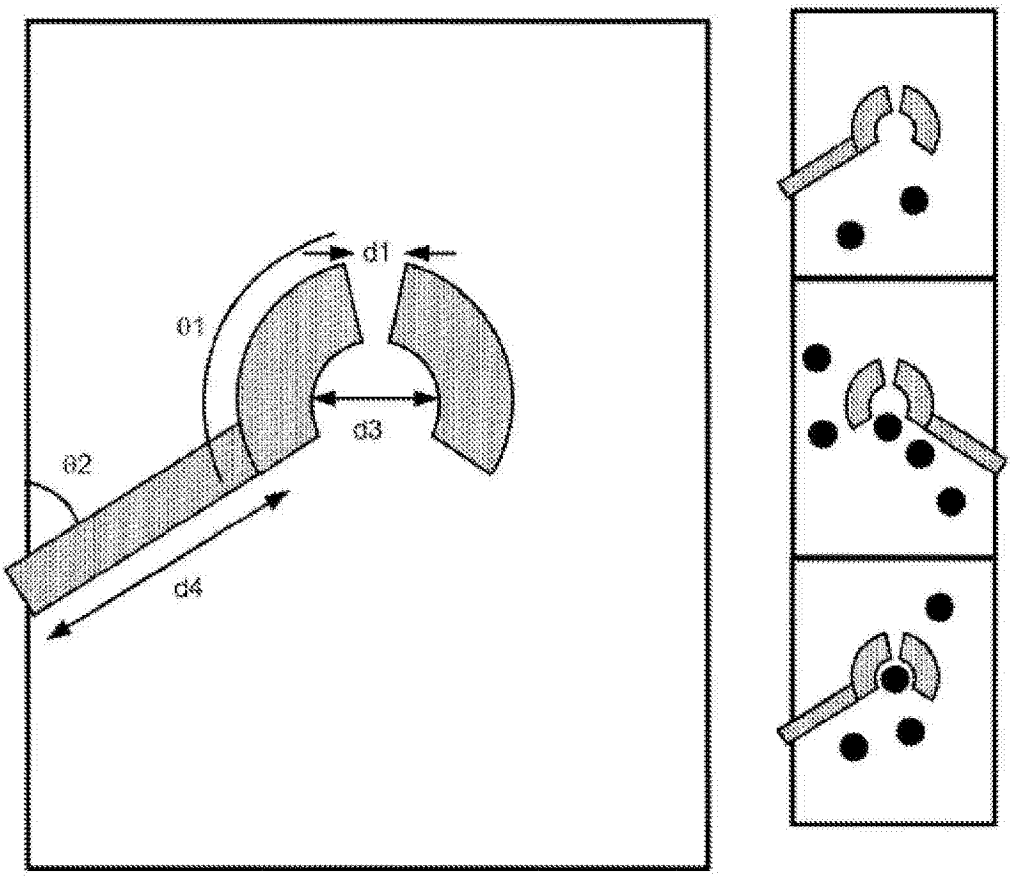


图13C

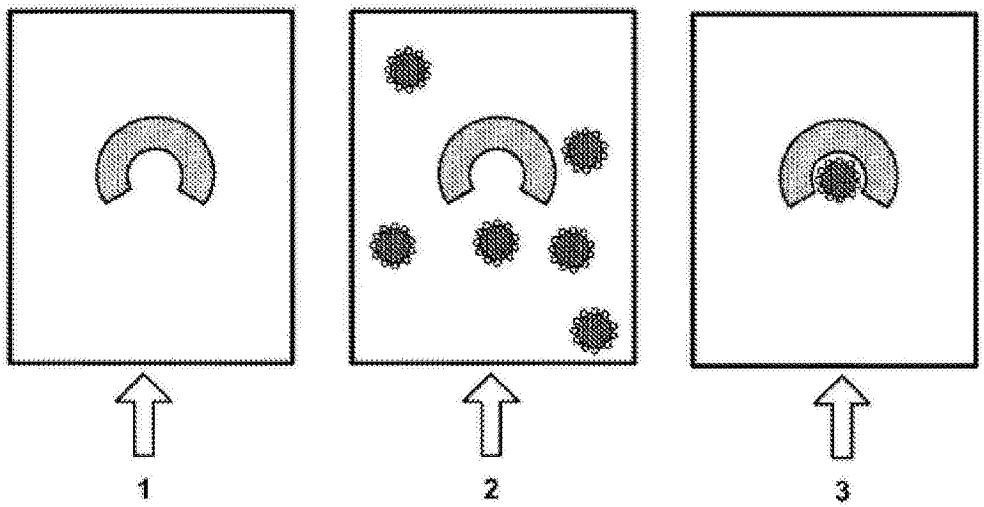


图14A

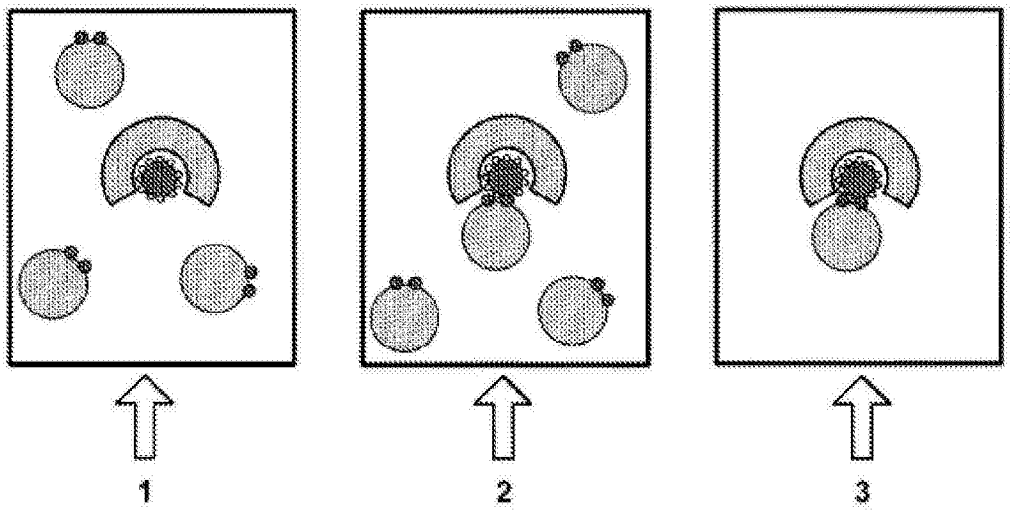


图14B

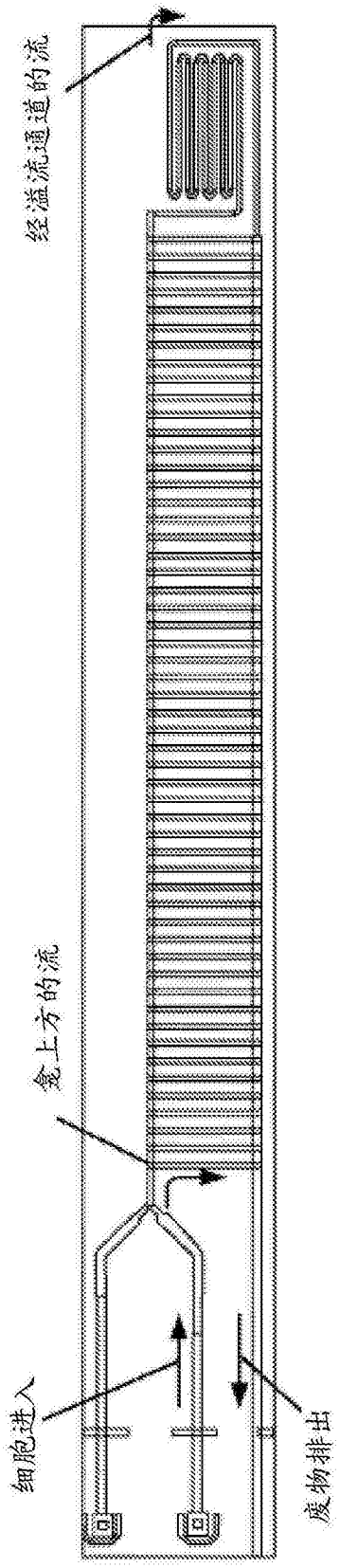


图15A

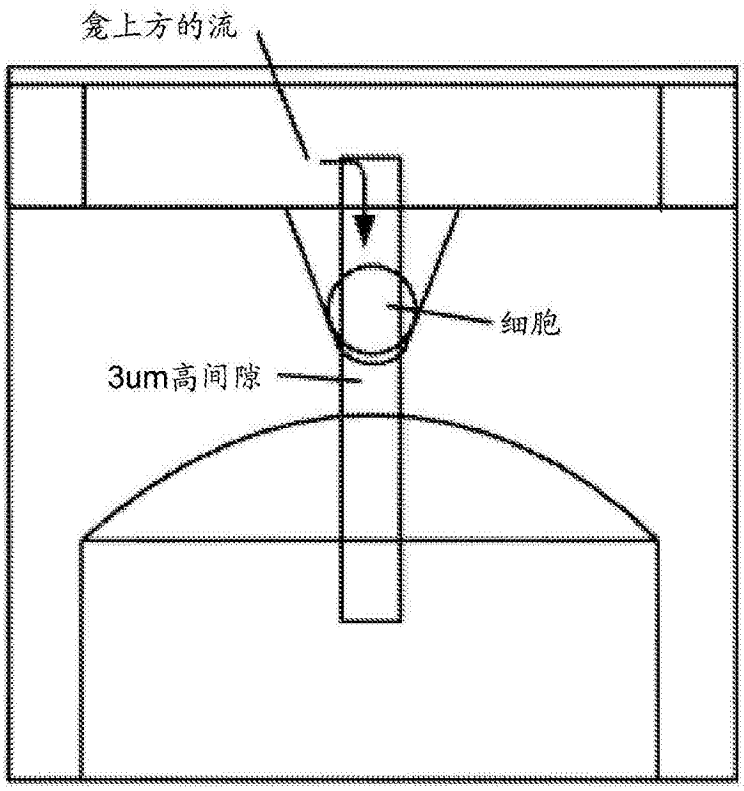


图15B

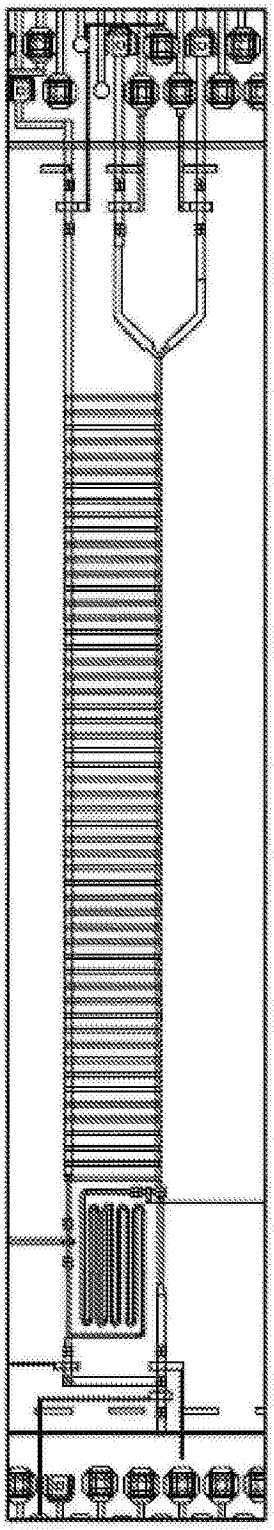


图15C

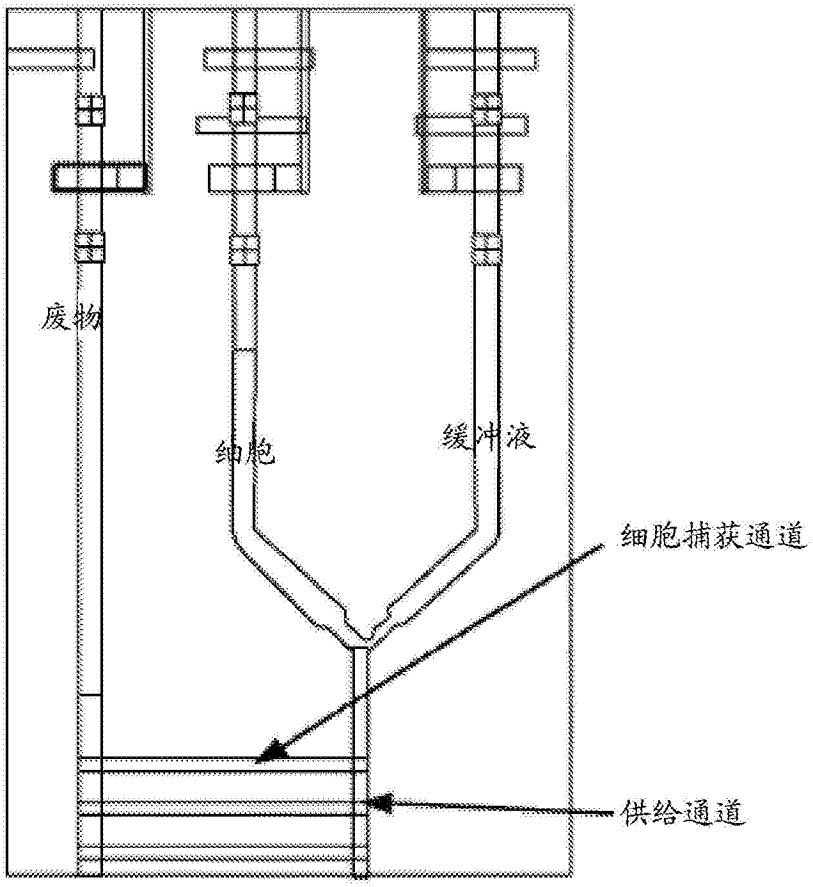


图15D

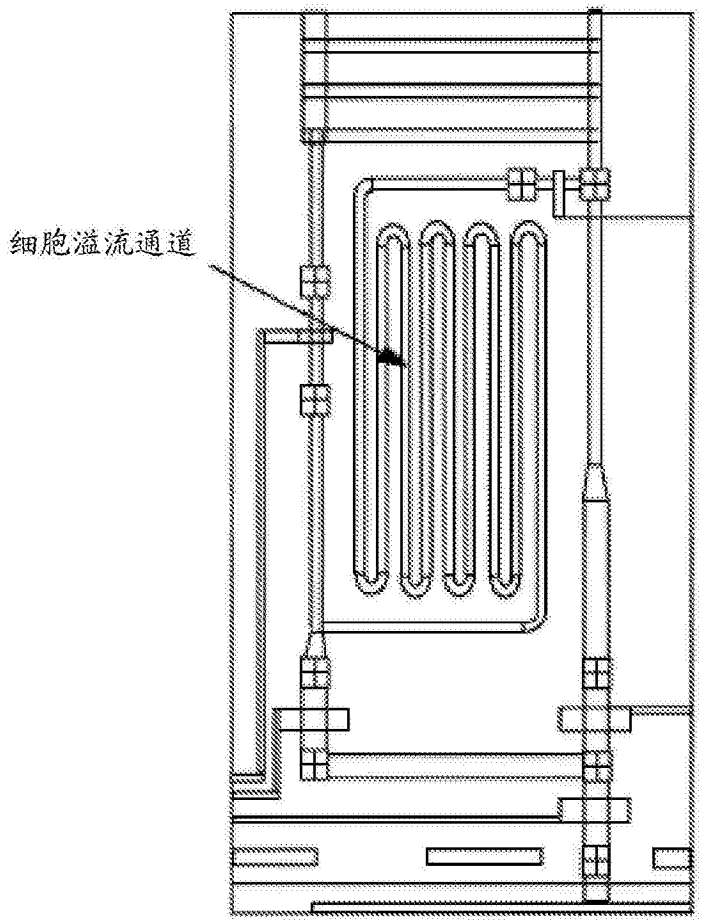


图15E

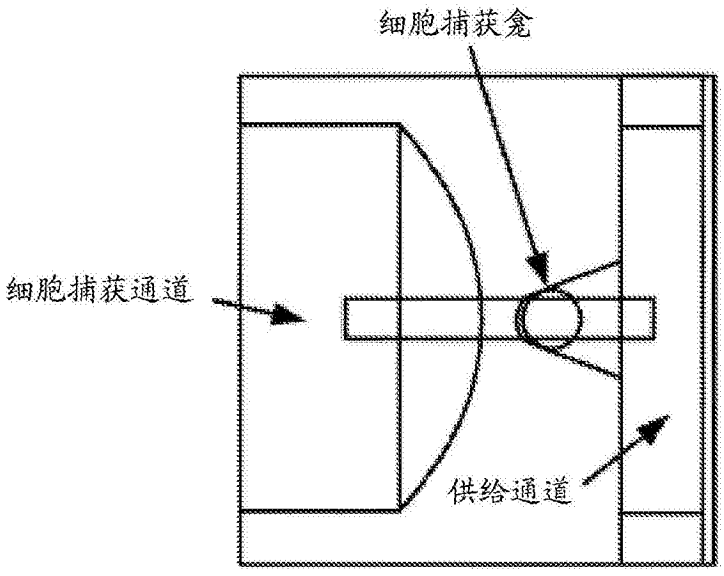


图15F

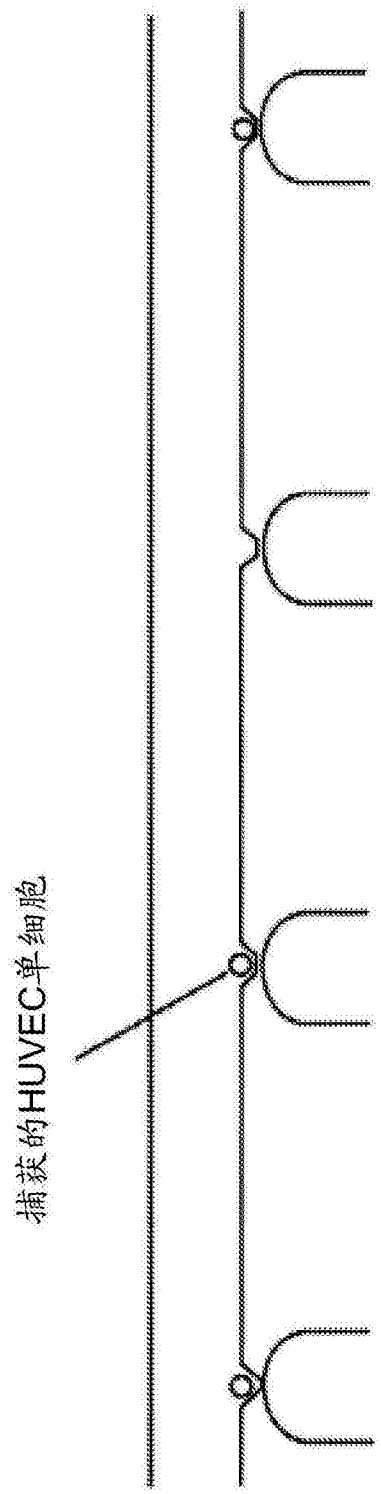


图15G

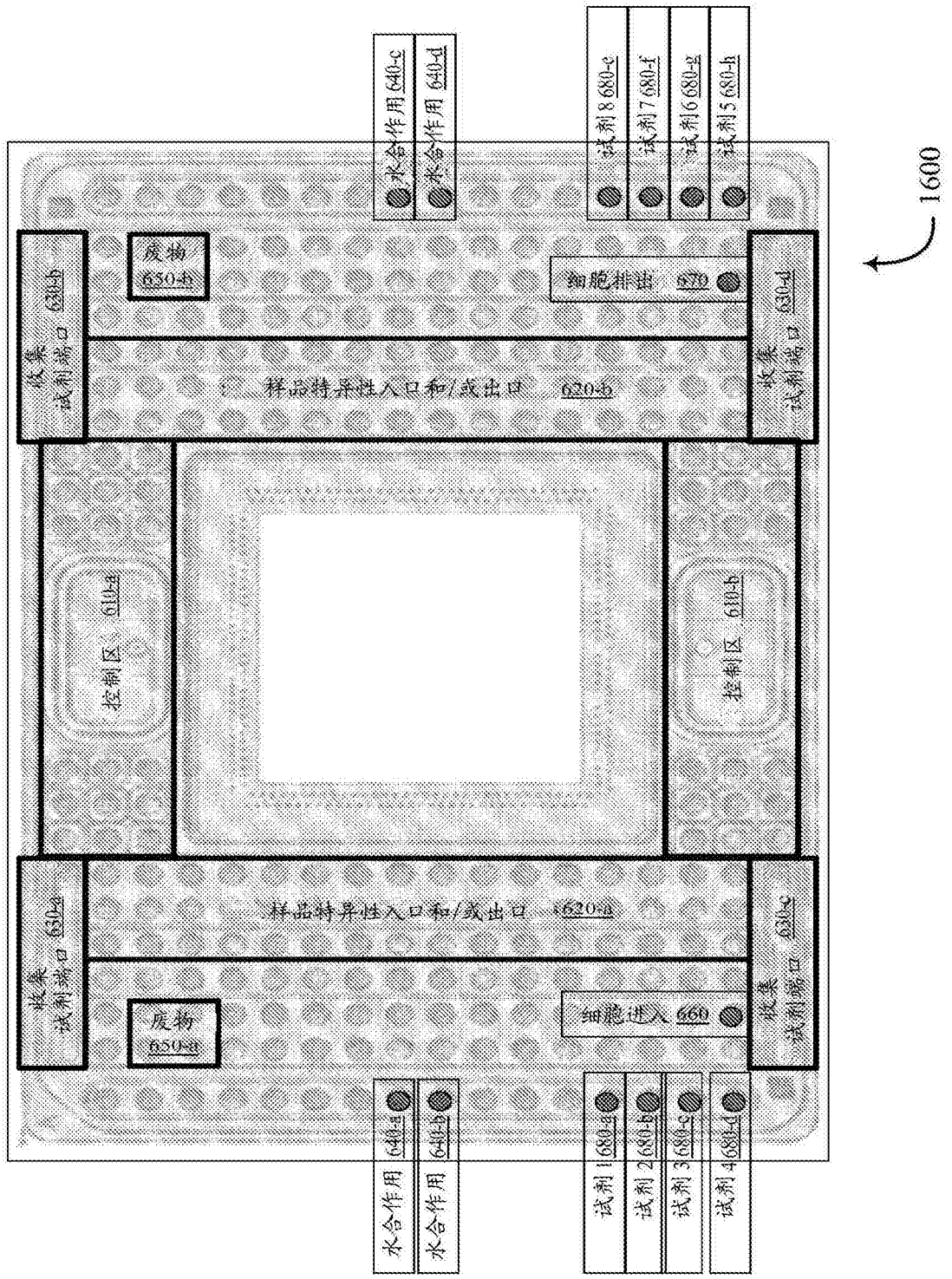

1600
水合作用 640-c
水合作用 640-d
试剂 8 680-e
试剂 7 680-f
试剂 6 680-g
试剂 5 680-h
废物 650-b
细胞排出 670
收集试剂端口 630-b
样品特异性入口和/或出口 620-b
收集试剂端口 630-d
控制区 610-a
控制区 610-b
收集试剂端口 630-a
样品特异性入口和/或出口 620-a
收集试剂端口 630-c
废物 650-a
细胞进入 660
水合作用 640-a
水合作用 640-b
试剂 1 680-a
试剂 2 680-b
试剂 3 680-c
试剂 4 680-d

图16

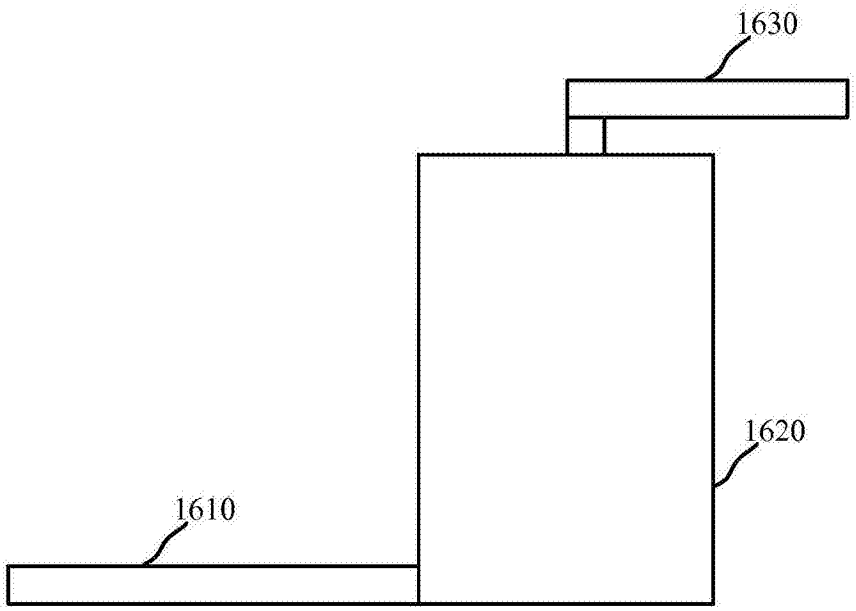


图16A

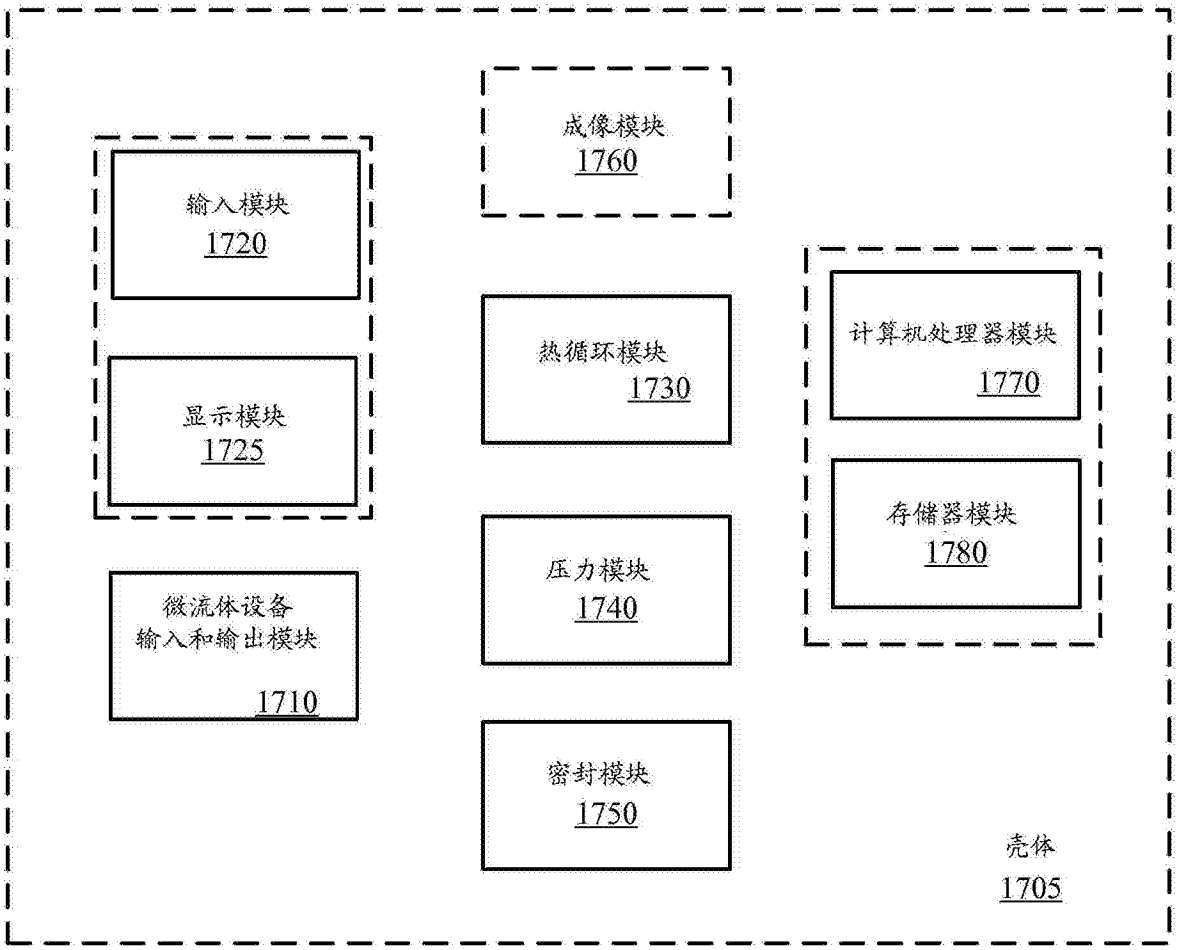

成像模块
1760
输入模块
1720
显示模块
1725
热循环模块
1730
计算机处理器模块
1770
存储器模块
1780
微流体设备
输入和输出模块
1710
压力模块
1740
密封模块
1750
壳体
1705
1700

图17

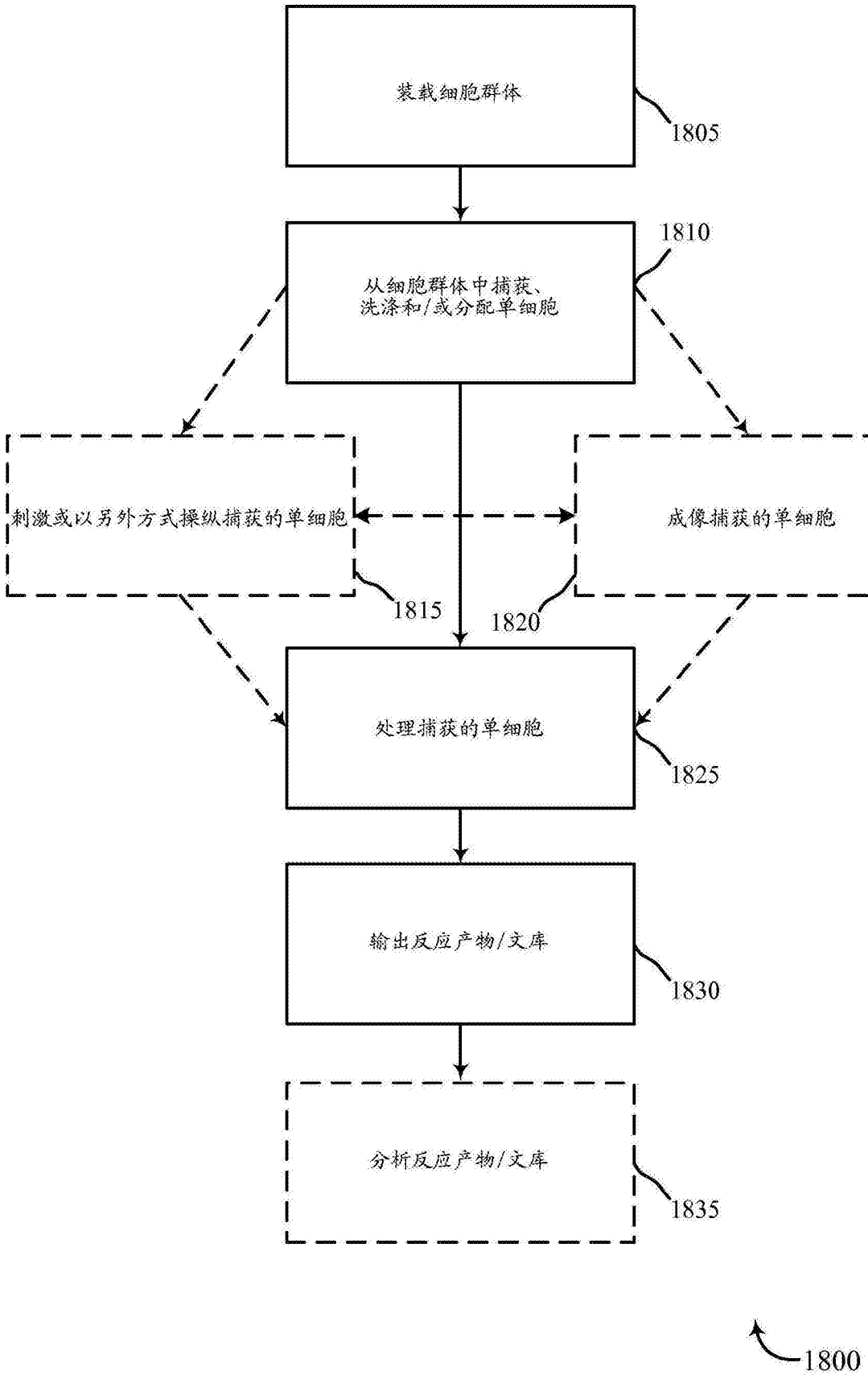

装载细胞群体
1805
从细胞群体中捕获、
洗涤和/或分配单细胞
1810
刺激或以另外方式操纵捕获的单细胞
1815
成像捕获的单细胞
1820
处理捕获的单细胞
1825
输出反应产物/文库
1830
分析反应产物/文库
1835
1800

图18

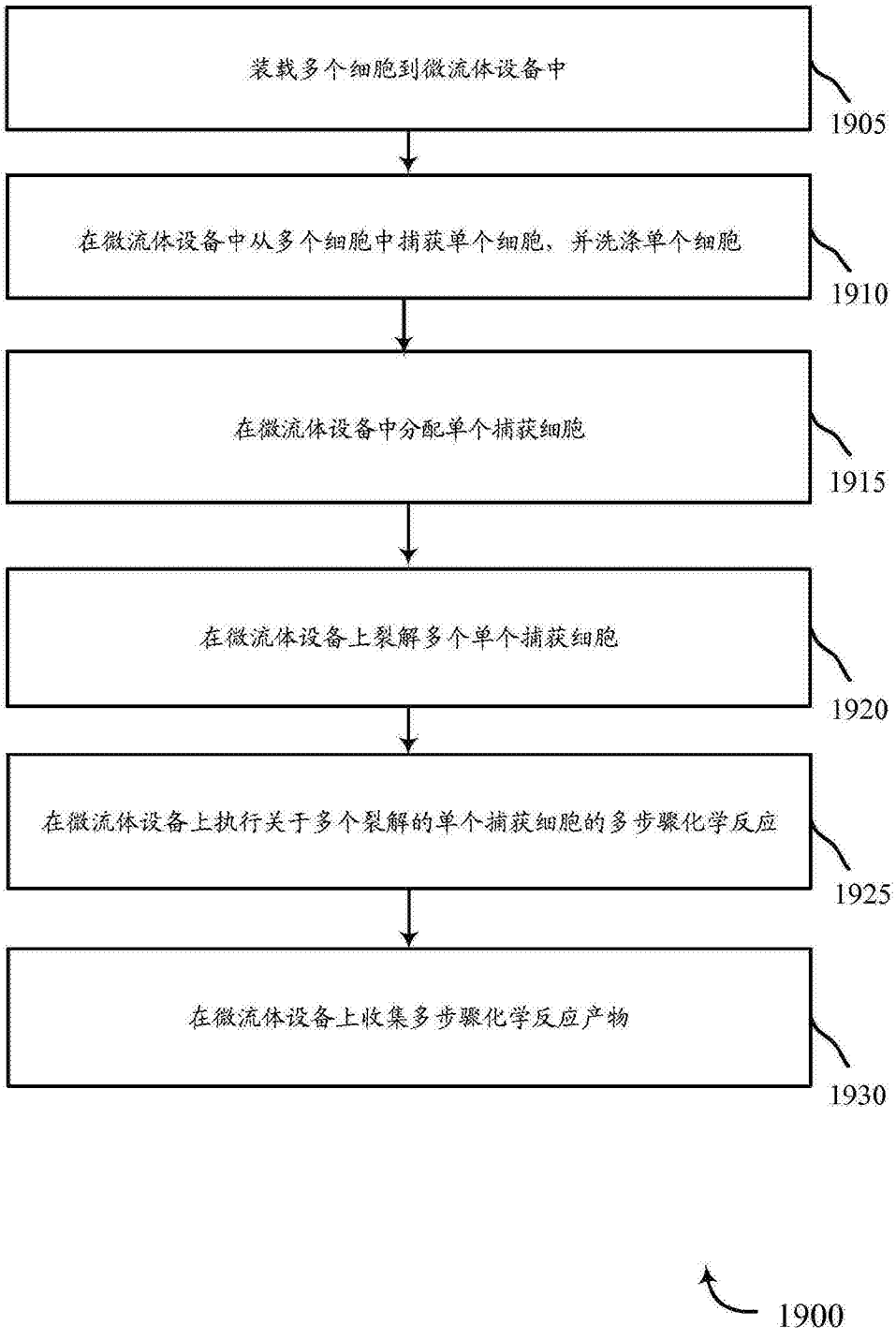

装载多个细胞到微流体设备中
1905
在微流体设备中从多个细胞中捕获单个细胞、并洗涤单个细胞
1910
在微流体设备中分配单个捕获细胞
1915
在微流体设备上裂解多个单个捕获细胞
1920
在微流体设备上执行关于多个裂解的单个捕获细胞的多步骤化学反应
1925
在微流体设备上收集多步骤化学反应产物
1930
1900

图19

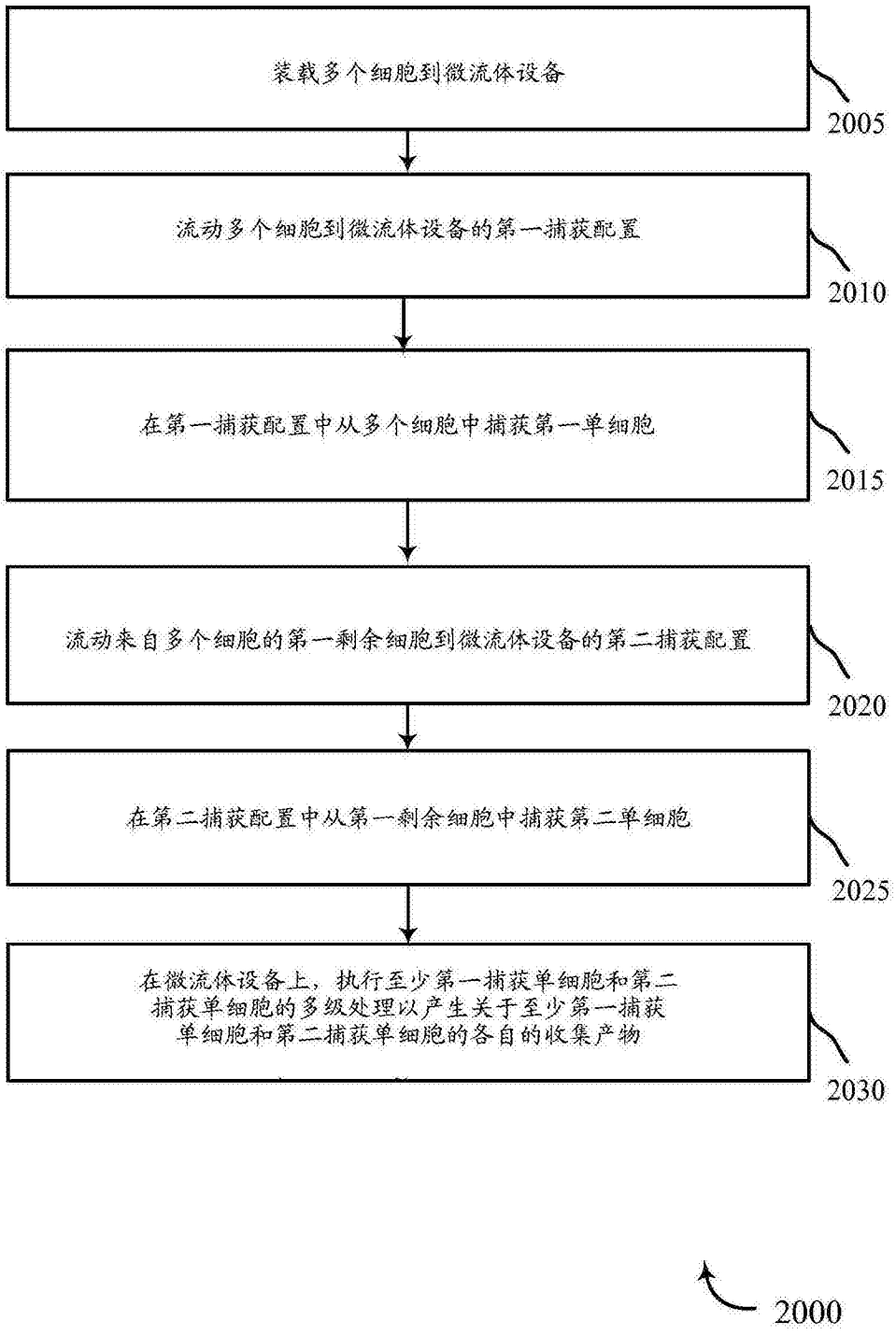

装载多个细胞到微流体设备
2005
流动多个细胞到微流体设备的第一捕获配置
2010
在第一捕获配置中从多个细胞中捕获第一单细胞
2015
流动来自多个细胞的第一剩余细胞到微流体设备的第二捕获配置
2020
在第二捕获配置中从第一剩余细胞中捕获第二单细胞
2025
在微流体设备上，执行至少第一捕获单细胞和第二捕获单细胞的多级处理以产生关于至少第一捕获单细胞和第二捕获单细胞的各自的收集产物
2030
2000

图20

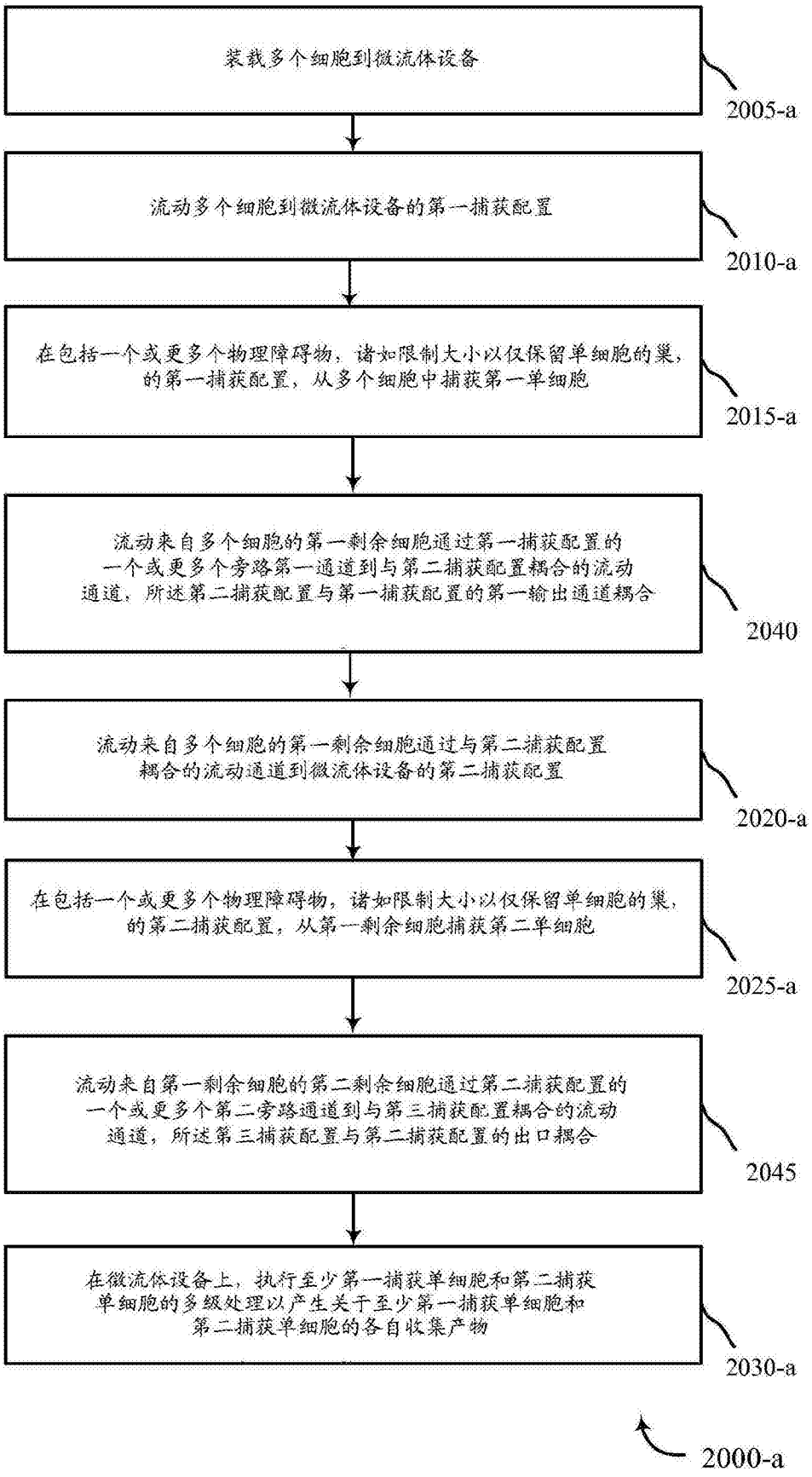

装载多个细胞到微流体设备
2005-a
流动多个细胞到微流体设备的第一捕获配置
2010-a
在包括一个或更多个物理障碍物，诸如限制大小以仅保留单细胞的巢，的第一捕获配置，从多个细胞中捕获第一单细胞
2015-a
流动来自多个细胞的第一剩余细胞通过第一捕获配置的一个或更多个旁路第一通道到与第二捕获配置耦合的流动通道，所述第二捕获配置与第一捕获配置的第一输出通道耦合
2040
流动来自多个细胞的第一剩余细胞通过与第二捕获配置耦合的流动通道到微流体设备的第二捕获配置
2020-a
在包括一个或更多个物理障碍物，诸如限制大小以仅保留单细胞的巢，的第二捕获配置，从第一剩余细胞捕获第二单细胞
2025-a
流动来自第一剩余细胞的第二剩余细胞通过第二捕获配置的一个或更多个第二旁路通道到与第三捕获配置耦合的流动通道，所述第三捕获配置与第二捕获配置的出口耦合
2045
在微流体设备上，执行至少第一捕获单细胞和第二捕获单细胞的多级处理以产生关于至少第一捕获单细胞和第二捕获单细胞的各自收集产物
2030-a
2000-a

图20A

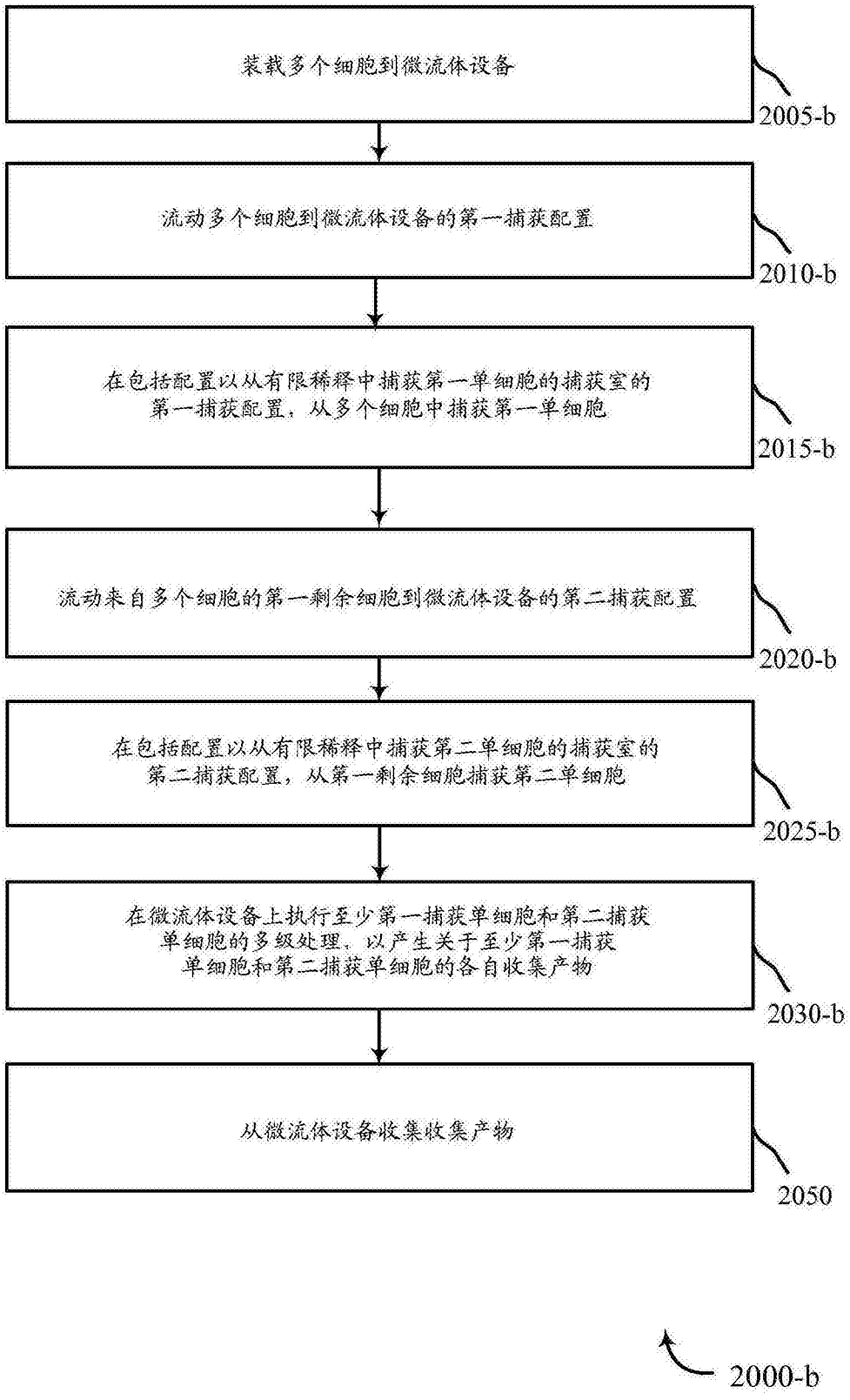

装载多个细胞到微流体设备
2005-b
流动多个细胞到微流体设备的第一捕获配置
2010-b
在包括配置以从有限稀释中捕获第一单细胞的捕获室的第一捕获配置，从多个细胞中捕获第一单细胞
2015-b
流动来自多个细胞的第一剩余细胞到微流体设备的第二捕获配置
2020-b
在包括配置以从有限稀释中捕获第二单细胞的捕获室的第二捕获配置，从第一剩余细胞捕获第二单细胞
2025-b
在微流体设备上执行至少第一捕获单细胞和第二捕获单细胞的多级处理，以产生关于至少第一捕获单细胞和第二捕获单细胞的各自收集产物
2030-b
从微流体设备收集收集产物
2050
2000-b

图20B

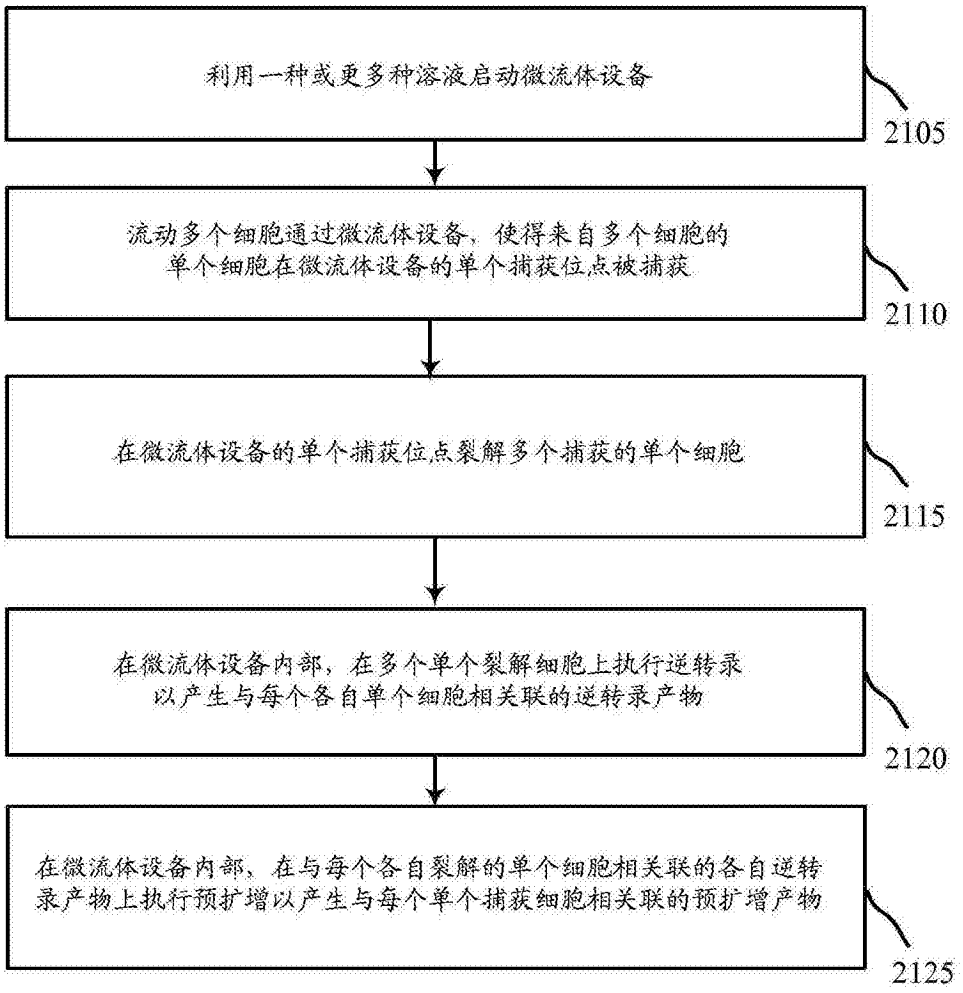

利用一种或更多种溶液启动微流体设备
2105
流动多个细胞通过微流体设备，使得来自多个细胞的单个细胞在微流体设备的单个捕获位点被捕获
2110
在微流体设备的单个捕获位点裂解多个捕获的单个细胞
2115
在微流体设备内部，在多个单个裂解细胞上执行逆转录以产生与每个各自单个细胞相关联的逆转录产物
2120
在微流体设备内部，在与每个各自裂解的单个细胞相关联的各自逆转录产物上执行预扩增以产生与每个单个捕获细胞相关联的预扩增产物
2125
2100

图21

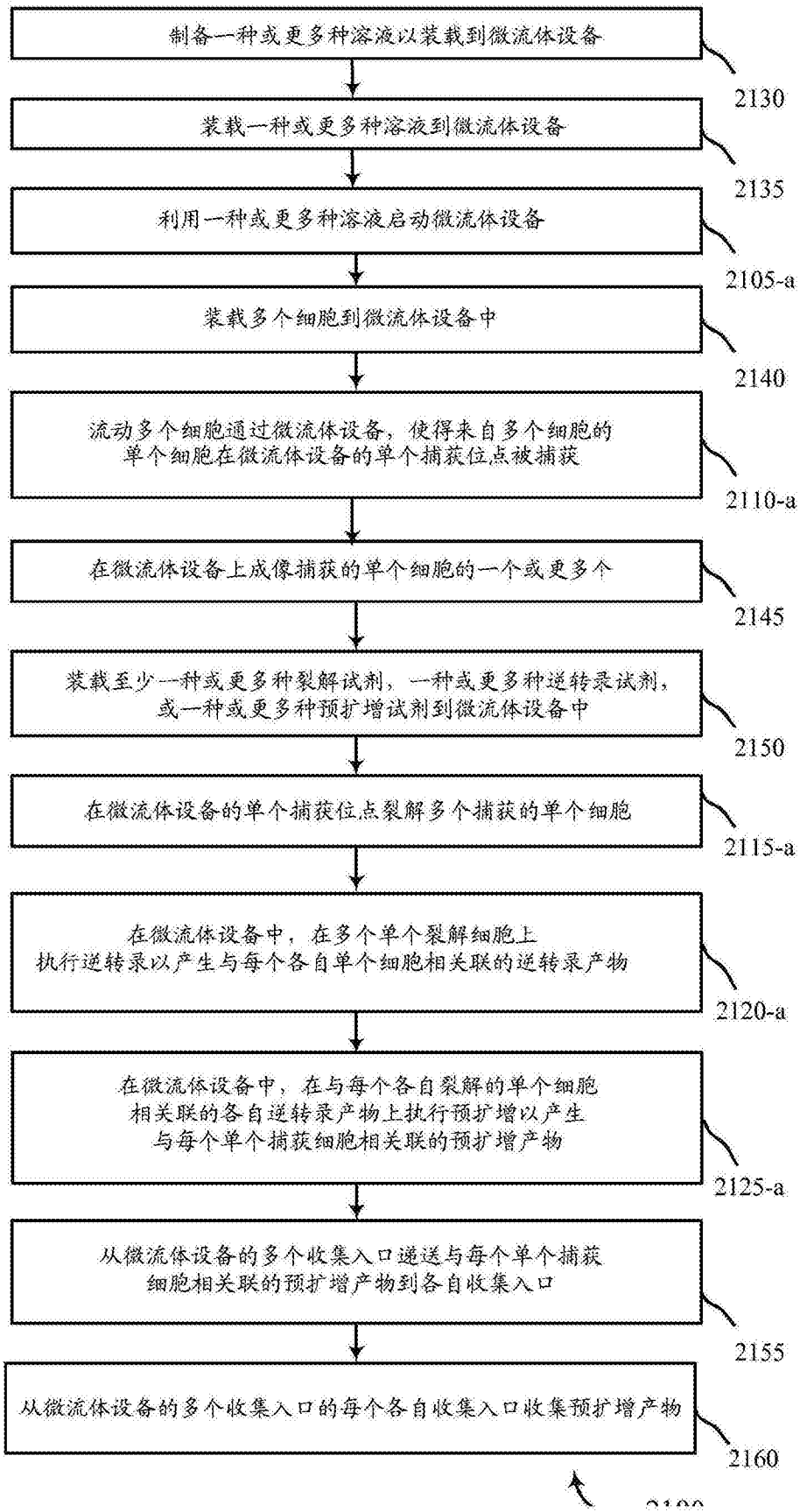

制备一种或更多种溶液以装载到微流体设备
2130
装载一种或更多种溶液到微流体设备
2135
利用一种或更多种溶液启动微流体设备
2105-a
装载多个细胞到微流体设备中
2140
流动多个细胞通过微流体设备，使得来自多个细胞的单个细胞在微流体设备的单个捕获位点被捕获
2110-a
在微流体设备上成像捕获的单个细胞的一个或更多个
2145
装载至少一种或更多种裂解试剂，一种或更多种逆转录试剂，或一种或更多种预扩增试剂到微流体设备中
2150
在微流体设备的单个捕获位点裂解多个捕获的单个细胞
2115-a
在微流体设备中，在多个单个裂解细胞上执行逆转录以产生与每个各自单个细胞相关联的逆转录产物
2120-a
在微流体设备中，在与每个各自裂解的单个细胞相关联的各自逆转录产物上执行预扩增以产生与每个单个捕获细胞相关联的预扩增产物
2125-a
从微流体设备的多个收集入口递送与每个单个捕获细胞相关联的预扩增产物到各自收集入口
2155
从微流体设备的多个收集入口的每个各自收集入口收集预扩增产物
2160

图21A

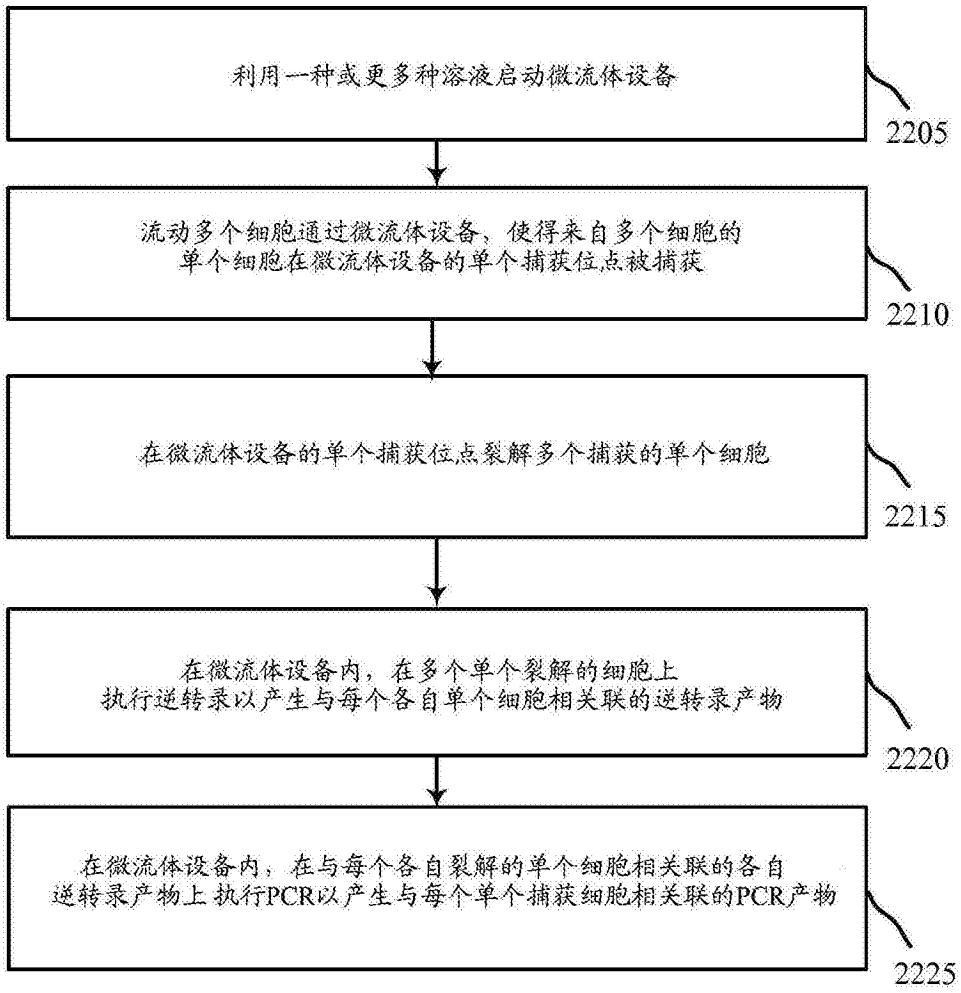

利用一种或更多种溶液启动微流体设备
2205
流动多个细胞通过微流体设备，使得来自多个细胞的单个细胞在微流体设备的单个捕获位点被捕获
2210
在微流体设备的单个捕获位点裂解多个捕获的单个细胞
2215
在微流体设备内，在多个单个裂解的细胞上执行逆转录以产生与每个各自单个细胞相关联的逆转录产物
2220
在微流体设备内，在与每个各自裂解的单个细胞相关联的各自逆转录产物上执行PCR以产生与每个单个捕获细胞相关联的PCR产物
2225
2200

图22

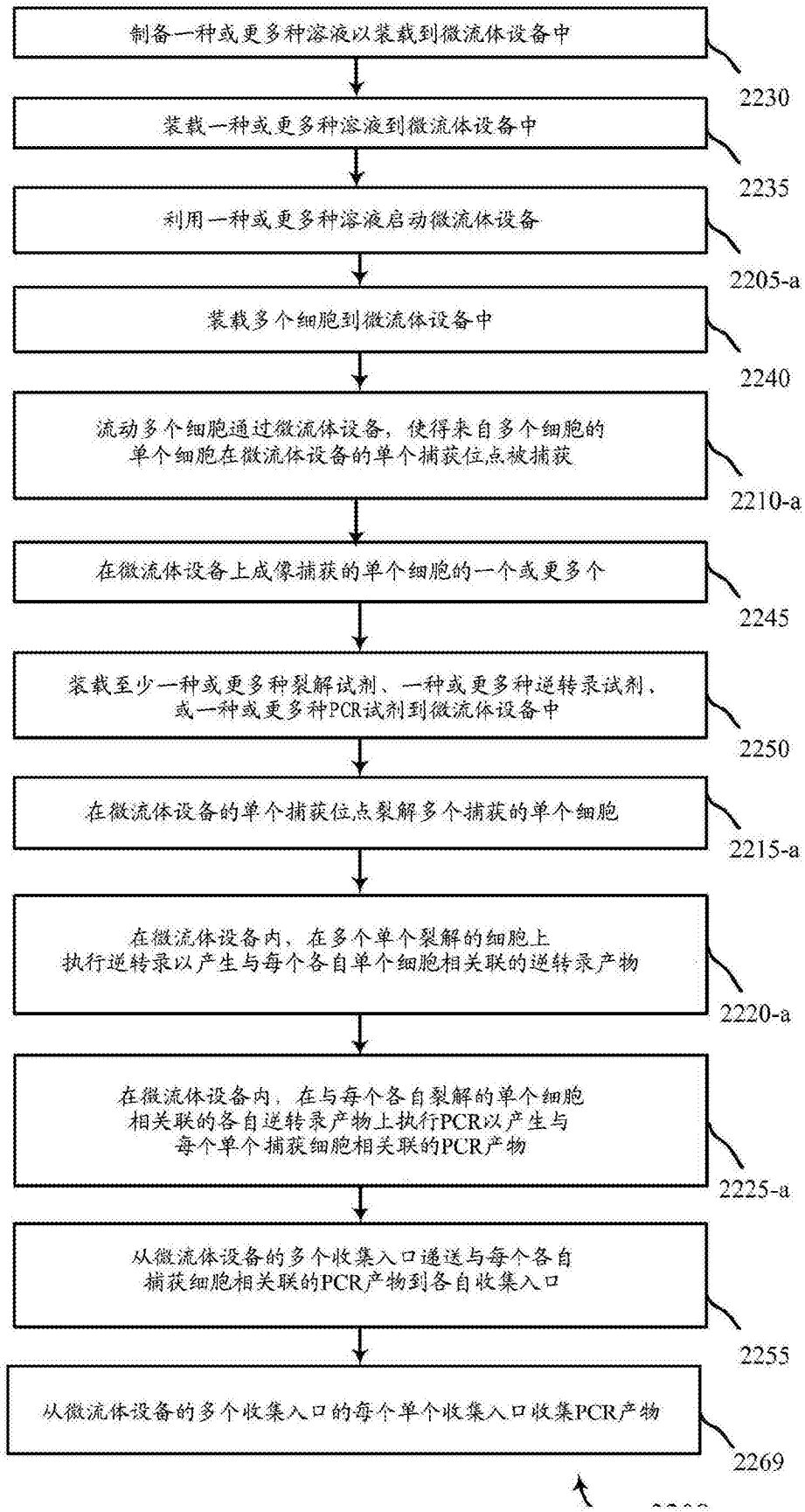

制备一种或更多种溶液以装载到微流体设备中
2230
装载一种或更多种溶液到微流体设备中
2235
利用一种或更多种溶液启动微流体设备
2205-a
装载多个细胞到微流体设备中
2240
流动多个细胞通过微流体设备，使得来自多个细胞的单个细胞在微流体设备的单个捕获位点被捕获
2210-a
在微流体设备上成像捕获的单个细胞的一个或更多个
2245
装载至少一种或更多种裂解试剂、一种或更多种逆转录试剂，或一种或更多种PCR试剂到微流体设备中
2250
在微流体设备的单个捕获位点裂解多个捕获的单个细胞
2215-a
在微流体设备内，在多个单个裂解的细胞上执行逆转录以产生与每个各自单个细胞相关联的逆转录产物
2220-a
在微流体设备内，在与每个各自裂解的单个细胞相关联的各自逆转录产物上执行PCR以产生与每个单个捕获细胞相关联的PCR产物
2225-a
从微流体设备的多个收集入口递送与每个各自捕获细胞相关联的PCR产物到各自收集入口
2255
从微流体设备的多个收集入口的每个单个收集入口收集PCR产物
2269

图22A

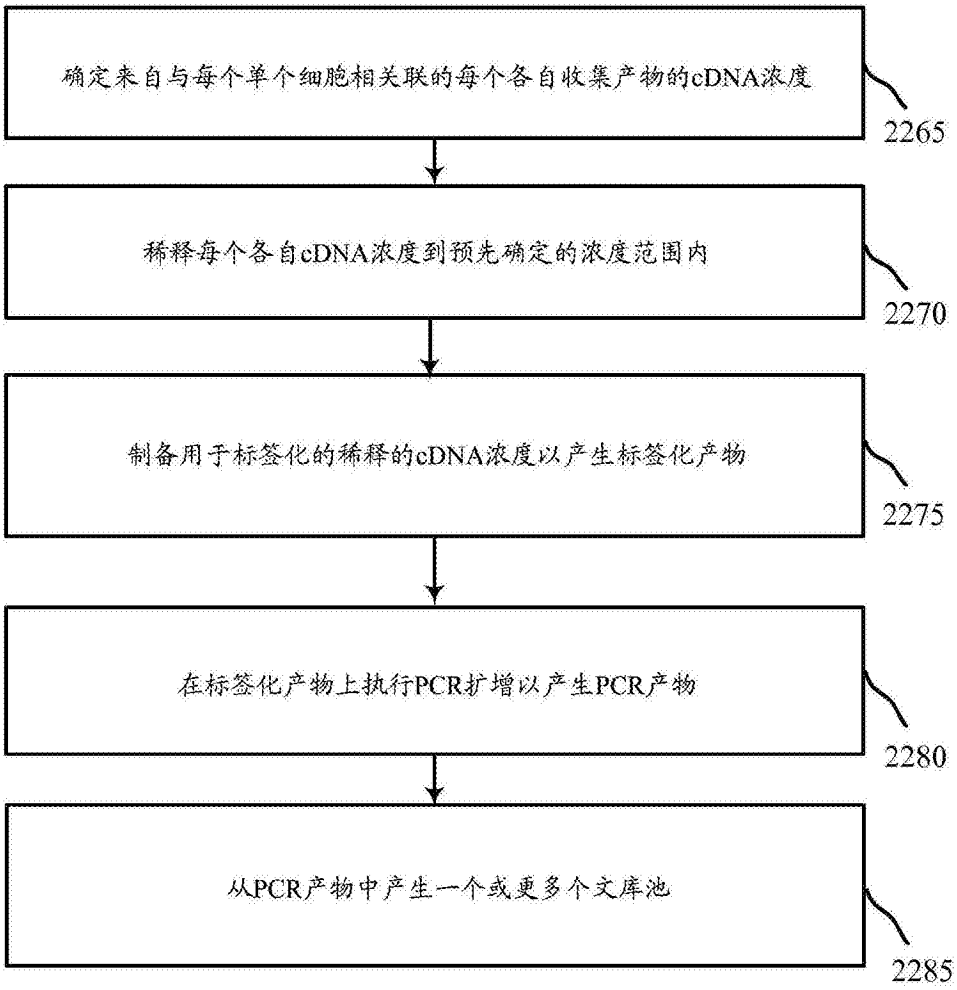

确定来自与每个单个细胞相关联的每个各自收集产物的cDNA浓度
2265
稀释每个各自cDNA浓度到预先确定的浓度范围内
2270
制备用于标签化的稀释的cDNA浓度以产生标签化产物
2275
在标签化产物上执行PCR扩增以产生PCR产物
2280
从PCR产物中产生一个或更多个文库池
2285

图22B