



(21)申請案號：106133838

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 09 月 29 日

(51)Int. Cl. :

C12Q1/68 (2018.01)

C40B40/06 (2006.01)

C40B20/04 (2006.01)

C40B70/00 (2006.01)

(30)優先權：2016/10/01 美國 62/403,116

2016/10/01 美國 62/403,111

2017/02/10 美國 62/457,399

2017/02/10 美國 62/457,582

2017/03/13 美國 62/470,669

(71)申請人：美商伯克利之光生命科技公司 (美國) BERKELEY LIGHTS, INC. (US)

美國

(72)發明人：蘇米倫 瑪迦利 SOUMILLON, MAGALI (FR)；班尼特 海利 M BENNETT, HAYLEY M. (GB)；美加 功薩雷 亞拉 X MEJIA GONZALEZ, YARA X. (US)；托 麥肯錫 S TOH, MCKENZI S. (US)；拉曼娜妮 拉維 克什爾 RAMENANI, RAVI KISHORE (IN)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 2009/0081675A1

US 2015/0151298A1

US 2015/0267251A1

US 2015/0298091A1

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：31 項 圖式數：32 共 294 頁

(54)名稱

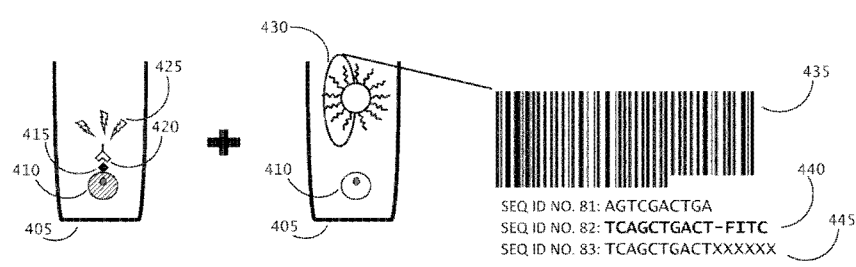
DNA 條碼組合物及於微流體裝置中原位識別之方法

(57)摘要

本文闡述用於 DNA 條碼去捲積之器具、組合物及方法。可使用 DNA 條碼以提供珠粒特異性標識符，其可使用雜交策略原位檢測。該 DNA 條碼提供藉由測序分析識別。雙重檢測模式可用於眾多應用中以將位置資訊與分析資訊(包括(但不限於)遺傳分析)相聯。闡述生成條碼化單細胞測序庫之方法。在微流體環境內自單細胞分離核酸可提供用於細胞特異性測序庫製備之基礎。

Apparatuses, compositions and processes for DNA barcode deconvolution are described herein. A DNA barcode may be used to provide a bead specific identifier, which may be detected in situ using hybridization strategies. The DNA barcode provides identification by sequencing analysis. The dual mode of detection may be used in a wide variety of applications to link positional information with assay information including but not limited to genetic analysis. Methods are described for generation of barcoded single cell sequencing libraries. Isolation of nucleic acids from a single cell within a microfluidic environment can provide the foundation for cell specific sequencing library preparation.

指定代表圖：



【圖 4A】

符號簡單說明：

- 405 . . . 隔離圍欄 (NanoPen™ 腔室)
- 410 . . . 具有完整細胞膜之細胞
- 415 . . . 細胞表面標記物
- 420 . . . 檢測試劑 (例如抗體)
- 425 . . . 檢測試劑之可檢測信號
- 430 . . . 具有複數個捕捉寡核苷酸之捕捉物體
- 435 . . . 條碼序列，僅顯示一個可盒化序列
- 440 . . . 雜交探針，與 435 之一個可盒化序列互補
- 445 . . . 自 SEQ 獲得之基因體序列



I835713

【發明摘要】

【中文發明名稱】

DNA條碼組合物及於微流體裝置中原位識別之方法

【英文發明名稱】

DNA BARCODE COMPOSITIONS AND METHODS OF IN SITU IDENTIFICATION IN A MICROFLUIDIC DEVICE

【中文】

本文闡述用於DNA條碼去捲積之器具、組合物及方法。可使用DNA條碼以提供珠粒特異性標識符，其可使用雜交策略原位檢測。該DNA條碼提供藉由測序分析識別。雙重檢測模式可用於眾多種應用中以將位置資訊與分析資訊(包括(但不限於)遺傳分析)相聯。闡述生成條碼化單細胞測序庫之方法。在微流體環境內自單細胞分離核酸可提供用於細胞特異性測序庫製備之基礎。

【英文】

Apparatuses, compositions and processes for DNA barcode deconvolution are described herein. A DNA barcode may be used to provide a bead specific identifier, which may be detected in situ using hybridization strategies. The DNA barcode provides identification by sequencing analysis. The dual mode of detection may be used in a wide variety of applications to link positional information with assay information including but not limited to genetic analysis. Methods are described for generation of barcoded single cell sequencing libraries. Isolation of nucleic acids from a single cell within a microfluidic

environment can provide the foundation for cell specific sequencing library preparation.

【指定代表圖】

圖4A

【代表圖之符號簡單說明】

- 405 隔離圍欄(NanoPen™腔室)
- 410 具有完整細胞膜之細胞
- 415 細胞表面標記物
- 420 檢測試劑(例如抗體)
- 425 檢測試劑之可檢測信號
- 430 具有複數個捕捉寡核苷酸之捕捉物體
- 435 條碼序列，僅顯示一個可盒化序列
- 440 雜交探針，與435之一個可盒化序列互補
- 445 自SEQ獲得之基因體序列

【發明說明書】

【中文發明名稱】

DNA條碼組合物及於微流體裝置中原位識別之方法

【英文發明名稱】

DNA BARCODE COMPOSITIONS AND METHODS OF IN SITU IDENTIFICATION IN A MICROFLUIDIC DEVICE

【技術領域】

【先前技術】

闡述用於在具有包括流動通道及隔離圍欄之外殼之微流體裝置上生成條碼化捕捉物體之組合物、套組及方法，該等條碼化捕捉物體可用於生成條碼化單細胞/群落RNA-seq庫及/或DNA-seq庫。此工作流程之一個優點在於，可選擇性佈置細胞以供在微流體環境中處理。此工作流程之另一優點在於，可原位檢測條碼以使得能將基因體資料與來源細胞之表型資訊相聯繫。

【發明內容】

在微流體環境內解密條碼之能力可使得能將基因體資料與表型相聯繫。

在一態樣中，本發明提供在微流體裝置內原位識別微小物體(例如，生物細胞、諸如微珠等捕捉物體或其他物體)以及將基因體資料與微流體裝置中之細胞相關聯之方法。所述方法採用DNA條碼，其可使用使用螢光個別解碼之可盒化(cassetable) (即，可變亞單元，其在一些實施例中可完全可互換)子條碼或「字組」設計。解碼過程可用包含影像擷取單元之系統來實施。影像擷取單元可包含具有流動區域及複數個流體連接至流動

區域之隔離圍欄之微流體裝置。該複數個隔離圍欄可各自容納一或多個微小物體。

在本文所述方法中，可將攜載至少兩個包括DNA條碼以及引子之捕捉寡核苷酸之捕捉物體(例如，珠粒)作為一種細胞/一種細胞群落之一個捕捉物體/一個條碼引入隔離圍欄中。在其他實施例中，在隔離圍欄中可存在係純系群體之多個細胞，且可將一個攜載如本文所述捕捉寡核苷酸之捕捉物體引入隔離圍欄中以捕捉自細胞之純系群體釋放之核酸。

可將細胞選擇性地且明確地引入隔離圍欄中，並記錄其來源群體。

可藉由使包括探針之溶液流入裝置之流動區域中將一或多個各自攜載螢光團之含有與「字組」互補之寡核苷酸序列之雜交探針引入隔離圍欄中。該等螢光探針可退火至捕捉寡核苷酸內之其靶互補序列，由此容許藉由因探針/珠粒互補觀察到之螢光將條碼化珠粒解密。對捕捉物體條碼之識別可在捕捉來自細胞之核酸之過程期間及核酸庫製備過程期間之多個點實施。識別過程可在將來自一種細胞/純系群體之核酸捕捉至捕捉寡核苷酸之前或之後或在轉錄/反轉錄之後實施。或者，對捕捉物體之識別可在將細胞佈置於微流體裝置之隔離圍欄中之前實施。

可藉由不同機制(例如PCR或反轉錄PCR (RT-PCR))將條碼納入所捕捉核酸之轉錄物內。

條碼化轉錄物可進一步處理並隨後測序。可將基因體資料解密以允許在特定來源隔離圍欄之間匹配且由此與細胞表型匹配。

識別捕捉寡核苷酸之條碼、且由此識別特定位置之捕捉物體之過程可為自動化過程。本文所述影像擷取單元可進一步包含成像元件，其經構形以捕捉微流體裝置之複數個隔離圍欄及流動區域之一或多個影像。該系

統可進一步包含通訊連接至影像擷取單元之影像處理單元。影像處理單元可包含目標區域測定引擎，其經構形以接收所捕捉每一影像並界定影像中所繪示每一隔離圍欄之目標區域。目標區域可包括對應於隔離圍欄內量測信號波動最靈敏、在量測信號時對生物微小物體在隔離圍欄中之位置最不靈敏、且沿隔離圍欄與流動區域之間之擴散軸延伸之區域之影像區域。影像處理單元可進一步包含評分引擎，其經構形以分析每一隔離圍欄之目標區域內之影像區域之至少一部分，以確定每一隔離圍欄中指示特定微小物體之存在之分數。本發明方法及微流體裝置可進一步包括使用至少一個經塗佈表面。在方法或微流體裝置之一些實施例中，微流體裝置之外殼可包括至少一個條件化表面。在一些實施例中，至少一個條件化表面可為共價鍵結表面。

本文闡述在具有包括流動通道及隔離圍欄之外殼之微流體裝置上生成條碼化單細胞/群落RNA-seq庫及/或DNA-seq庫之方法。此工作流程之優點在於，可將細胞選擇性佈置以供在微流體環境內處理。

在一態樣中，提供用於自生物細胞提供條碼化cDNA庫之方法，其包括：將生物細胞佈置在位於微流體裝置之外殼內之隔離圍欄內；將捕捉物體佈置在隔離圍欄內，其中捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，該複數個中每一捕捉寡核苷酸包括：結合引子之啟動序列；捕捉序列；及條碼序列，其中條碼序列包括三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，每一可盒化寡核苷酸序列與條碼序列之每一其他可盒化寡核苷酸序列不一致；裂解生物細胞並使自經裂解生物細胞釋放之核酸可被捕捉物體包含之複數個捕捉寡核苷酸捕捉；及轉錄所捕捉核酸，由此產生裝飾捕捉物體之複數個條碼化cDNA，每一條碼化cDNA包括(i) 與所捕捉核酸之相應寡核苷酸序列互補

之寡核苷酸序列，其共價連接至(ii) 該複數個捕捉寡核苷酸之一。

在一些實施例中，基因特異性引子序列可靶向編碼T細胞受體(TCR)之mRNA序列。在其他實施例中，基因特異性引子序列可靶向編碼B細胞受體(BCR)之mRNA序列。

在一些實施例中，該方法可進一步包括：在捕捉物體位於隔離圍欄內時，原位識別捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列。在一些其他實施例中，該方法可進一步包括自該微流體裝置輸出該捕捉物體或該複數個該等捕捉物體。

在多個實施例中，微流體裝置之外殼可進一步包括介電泳(DEP)構形，且其中佈置生物細胞及/或佈置捕捉物體係藉由在生物細胞及/或捕捉物體上或其附近施加介電泳(DEP)力來實施。

然後可輸出經條碼化cDNA裝飾之捕捉物體以供進一步庫製備及測序。可對條碼及cDNA進行測序且可將基因體資料與來源隔離圍欄編號及個別細胞/群落相匹配。此過程亦可在微流體裝置內藉由如本文所述之自動化方法來實施。

在另一態樣中，提供用於自生物微小物體提供條碼化基因體DNA庫之方法，其包括：將包括基因體DNA之生物微小物體佈置在位於微流體裝置之外殼內之隔離圍欄內；使生物微小物體與能破裂生物微小物體之核膜之裂解試劑接觸，由此釋放生物微小物體之基因體DNA；將所釋放基因體DNA標籤化(tagment)，由此產生複數個標籤化基因體DNA片段，該等片段具有由第一標籤化插入序列界定之第一末端及由第二標籤化插入序列界定之第二末端；將捕捉物體佈置在隔離圍欄內，其中捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，該複數個中每一捕捉寡核苷酸包括：第一啟動序列；

第一標籤化插入捕捉序列；及條碼序列，其中條碼序列包括三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，每一可盒化寡核苷酸序列與條碼序列之每一其他可盒化寡核苷酸序列不一致；使複數個標籤化基因體DNA片段中之多者與以下接觸：(i) 捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸中之多者之第一標籤化插入捕捉序列，(ii) 擴增寡核苷酸，其包括連接至第二標籤化插入捕捉序列之第二啟動序列、隨機化引子序列或基因特異性引子序列，及(iii) 酶混合物，其包括鏈置換酶及聚合酶；將經接觸複數個標籤化基因體DNA片段培育一段時間，由此同時擴增複數個標籤化基因體DNA片段中之多者並將捕捉寡核苷酸及擴增寡核苷酸添加至複數個標籤化基因體DNA片段中之多者之末端，以產生條碼化基因體DNA庫；及自微流體裝置輸出條碼化基因體DNA庫。

在一些實施例中，標籤化可包括使所釋放基因體DNA與加載有以下之轉位酶接觸：(i) 第一雙鏈DNA片段，其包括第一標籤化插入序列，及(ii) 第二雙鏈DNA片段，其包括第二標籤化插入序列。

在一些實施例中，第一雙鏈DNA片段可包括連接至第三啟動序列之第一鑲嵌末端序列，且其中第二雙鏈DNA片段可包括連接至第四啟動序列之第二鑲嵌末端序列。

在一些實施例中，該方法可進一步包括：在捕捉物體位於隔離圍欄內時，原位識別捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列。

在多個實施例中，微流體裝置之外殼進一步包含介電泳(DEP)構形，且其中佈置生物微小物體及/或佈置捕捉物體係藉由在生物細胞及/或捕捉物體上或其附近施加介電泳(DEP)力來實施。

在另一態樣中，提供用於自單一生物細胞提供條碼化cDNA庫及條碼

化基因體DNA庫之方法，其包括：將生物細胞佈置在位於微流體裝置之外殼內之隔離圍欄內；將第一捕捉物體佈置於隔離圍欄內，其中第一捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，該複數個中之每一捕捉寡核苷酸包含：第一啟動序列；第一捕捉序列；及第一條碼序列，其中第一條碼序列包含三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，每一可盒化寡核苷酸序列與第一條碼序列之每一其他可盒化寡核苷酸序列不一致；藉由實施如本文所述任何獲得cDNA庫之方法來獲得條碼化cDNA庫，其中實施裂解生物細胞使得生物細胞之質膜降解，自生物細胞釋放細胞質RNA，同時生物細胞之核膜保持完整，由此提供經來自生物細胞RNA之條碼化cDNA庫裝飾之第一捕捉物體；自微流體裝置輸出cDNA庫裝飾之第一捕捉物體；將第二捕捉物體佈置於隔離圍欄內，其中第二捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，各自包括：第二啟動序列；第一標籤化插入捕捉序列；及第二條碼序列，其中第二條碼序列包含三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，每一可盒化寡核苷酸序列與第二條碼序列之每一其他可盒化寡核苷酸序列不一致；藉由實施如本文所述獲得條碼化基因體DNA庫之任一方法來獲得條碼化基因體DNA庫，其中使來自生物細胞之複數個標籤化基因體DNA片段與第二捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸中之多者之第一標籤化插入捕捉序列接觸，由此自生物細胞之基因體DNA提供條碼化基因體DNA庫；及自微流體裝置輸出條碼化基因體DNA庫。

在一些實施例中，該方法可進一步包括：識別第一捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列。在一些實施例中，識別第一捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列可在將生物細胞佈置於隔離圍欄中之前；自生物細胞RNA獲得條碼化cDNA庫之前；或自微流體裝置輸出條碼化cDNA

庫裝飾之第一捕捉物體之前實施。在一些實施例中，該方法可進一步包括：識別第二捕捉物體之複數個寡核苷酸之條碼序列。

在另一態樣中，提供用於提供條碼化B細胞受體(BCR)測序庫之方法，其包括：自B淋巴球生成條碼化cDNA庫，其中該生成係根據如本文所述生成條碼化cDNA之任何方法來實施，其中條碼化cDNA庫裝飾包括複數個捕捉寡核苷酸之捕捉物體，該複數個中之每一捕捉寡核苷酸包括NotI限制位點序列；擴增條碼化cDNA庫；自條碼化cDNA庫選擇條碼化BCR序列，由此產生富含條碼化BCR序列之庫；使來自富含條碼化BCR序列之庫之序列環化，由此產生環化條碼化BCR序列之庫；使環化條碼化BCR序列之庫再線性化以提供重排條碼化BCR序列之庫，每一重排條碼化BCR序列將BCR序列3'之恆定(C)區呈遞至各別可變(V)子區及/或各別多變(D)子區；及添加測序接頭並對V子區及/或D子區進行次選擇，由此產生條碼化BCR測序庫。

在多個實施例中，該方法可進一步包括：使用如本文所述原位識別條碼之任何方法識別捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列。在一些實施例中，識別可在擴增條碼化cDNA庫之前實施。在其他實施例中，識別可在生成條碼化cDNA庫的同時實施。

【圖式簡單說明】

圖1A圖解說明根據本發明之一些實施例與微流體裝置及相連控制設備一起使用之系統之實例。

圖1B及1C圖解說明根據本發明之一些實施例之微流體裝置。

圖2A及2B圖解說明根據本發明之一些實施例之分離圍欄。

圖2C圖解說明根據本發明之一些實施例之詳細隔離圍欄。

圖 2D-F圖解說明根據本發明一些其他實施例之隔離圍欄。

圖2G圖解說明根據本發明實施例之微流體裝置。

圖2H圖解說明根據本發明實施例之微流體裝置之經塗佈表面。

圖3A圖解說明根據本發明之一些實施例與微流體裝置及相連控制設備一起使用之系統之具體實例。

圖3B圖解說明根據本發明之一些實施例之成像裝置。

圖4A圖解說明捕捉物體之原位可檢測條碼與來自生物細胞之核酸之測序資料之間之關係，其中核酸在微流體環境內時經捕捉用於測序。

圖4B係根據本發明實施例可能使用捕捉物體之原位可檢測條碼之多個核酸工作流程之示意性代表圖。

圖5係本發明之捕捉物體之捕捉寡核苷酸之實施例之示意性代表圖。

圖6係本發明之捕捉物體之捕捉寡核苷酸之實施例之示意性代表圖，其具有來自形成條碼之可盒化序列之組合之10,000之條碼多樣性。

圖7A係根據本發明之一實施例原位檢測捕捉物體之條碼之過程之示意性代表圖。

圖7B及7C係根據本發明之一實施例原位檢測捕捉物體之條碼之方法之照片代表圖。

圖8A-C係根據本發明另一實施例原位檢測捕捉物體之條碼之方法之示意性代表圖。

圖8D-8F係根據本發明另一實施例原位檢測捕捉物體之條碼之兩個或更多個可盒化序列之方法之照片代表圖。

圖9圖解說明根據本發明之一實施例用於單細胞RNA捕捉、庫製備及測序之工作流程之示意性代表圖。

圖10A-10D係根據本發明之一實施例用於裂解外層細胞膜隨後進行RNA捕捉之過程之一個實施例之照片代表圖。

圖11A係根據本發明實施例提供RNA庫之工作流程之部分之示意性代表圖。

圖11B及11C係根據本發明實施例之測序庫製備品質分析之實施例之圖形代表圖。

圖12A-12F係根據本發明實施例用於單細胞裂解、DNA庫製備及測序之工作流程之圖像代表圖。

圖12G係單細胞DNA庫製備之示意性代表圖。

圖13A及13B係用於單細胞B細胞受體(BCR)捕捉、庫製備及測序之工作流程之示意性代表圖。

圖14A係根據本發明原位檢測捕捉物體之條碼之方法之實施例之照片代表圖。

圖14B係根據本發明實施例輸出cDNA裝飾之捕捉物體之照片代表圖。

圖14C及14D係根據本發明實施例之測序庫製備之品質分析之圖形代表圖。

圖15A及15B係來自經由本發明實施例製備之庫之測序讀段之圖形代表圖。

圖16A-16D係經由根據本發明實施例之RNA測序庫製備方法獲得之測序結果之圖形代表圖。

圖17係在實驗之間所檢測條碼組中方差之圖形代表圖，該等實驗測試捕捉物體遞送之隨機化。

圖18係根據本發明方法之實施例，每個實驗之條碼讀段之回收率之圖形代表圖。

圖19係本發明實施例中微流體裝置內T細胞之照片代表圖。

圖20A及20B係根據本發明實施例在培養、針對抗原染色及原位條碼檢測期間特定細胞之照片代表圖。

圖21A及21B係根據本發明實施例在培養、針對抗原染色及原位條碼檢測期間特定細胞之照片代表圖。

圖22A及22B係根據本發明實施例在培養、針對抗原染色及原位條碼檢測期間特定細胞之照片代表圖。

圖23係根據本發明實施例在活化、活化抗原陽性及活化抗原陰性細胞之間之測序結果之圖形代表圖。

圖24係根據本發明實施例實質上單獨分佈細胞之照片代表圖。

圖25係根據本發明實施例用於裂解並釋放核DNA之過程之照片代表圖。

圖26A及26B係根據本發明實施例在裂解前及裂解後經染色之細胞之照片代表圖。

圖27係根據本發明實施例之測序庫中DNA分佈之圖形代表圖。

圖28係根據本發明之一實施例之樣品DNA中染色體預期長度之圖形代表圖且進一步包括針對每一染色體所觀察到之實驗覆蓋率。

圖29A-29D係根據本發明實施例之DNA庫品質之圖形代表圖。

圖30A-30F係根據本發明實施例自單細胞獲得RNA及DNA測序庫二者之方法之照片代表圖。

圖31A及31B係根據本發明實施例檢測捕捉物體上之條碼之方法之照

片代表圖。

圖32係根據本發明實施例原位測定條碼及測定條碼之測序結果與基因體資料之間之關聯之圖形代表圖。

【實施方式】

本申請係根據35 U.S.C. 119(e)主張以下案件之權益之非臨時申請案：2016年10月1日申請之美國臨時申請案第62/403,116號；2016年10月1日申請之美國臨時申請案第62/403,111號；2017年2月10日申請之美國臨時申請案第62/457,399號；2017年2月10日申請之美國臨時申請案第62/457,582號；及2017年3月13日申請之美國臨時申請案第62/470,669號，其各自之揭示內容係全文以引用方式併入本文中。

本說明書闡述本發明之實例性實施例及應用。然而，本發明並不限於該等實例性實施例及應用，或並不限於該等實例性實施例及應用操作或闡述於本文中之方式。此外，圖可顯示簡化或部分視圖，且圖中元件之尺寸可增大或以其他方式不成比例。另外，在術語「在……上」、「附接至」、「連接至」、「耦連至」或類似詞語用於本文中時，一個元件(例如，材料、層、基板等)可「在另一元件上」、「附接至」、「連接至」或「耦連至」另一元件，不管一個元件是否直接在另一元件上、附接至、連接至或耦連至另一元件或在一個元件與另一元件之間存在一或多個中間元件。同樣，除非上下文另外指示，否則若提供方向(例如，在……上方、在……下方、頂部、底部、側面、向上、向下、在……下、在……上、上部、下部、水平、垂直、「x」、「y」、「z」等)，則該等方向係相對方向且僅藉助實例且為便於說明及討論來提供，而不加以限制。另外，倘若提及元件列表(例如，元件a、b、c)，該提及意欲包括所列示元

件中之任一者自身、少於所有所列示元件之任一組合及/或所有所列示元件之組合。說明書中之章節劃分僅為了便於評審，且不限制所論述元件之任一組合。

倘若將微流體特徵之尺寸闡述為具有寬度或面積，則該尺寸通常相對於x軸及/或y軸維度來闡述，該二者皆在平行於微流體裝置之基板及/或蓋之平面內。微流體特徵之高度可相對於z軸方向來闡述，該方向垂直於平行於微流體裝置之基板及/或蓋之平面。在一些情況下，微流體特徵、例如通道或通路之橫斷面積可參考x軸/z軸、y軸/z軸或x軸/y軸面積。

如本文所用「實質上」意指對於既定目的足以起作用。因此術語「實質上」容許自絕對或理想狀態、尺寸、量測、結果或諸如此類之微小、不顯著差異，例如熟習此項技術者可預期，但其不顯著影響總體性能。在關於可表述為數值之數值或參數或特徵使用時，「實質上」意指在10%內。

術語「多個」意指多於一個。

如本文所用術語「複數個」可為2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個。

如本文所用： μm 意指微米， μm^3 意指立方微米，pL意指皮升，nL意指奈升，且 μL (或 uL)意指微升。

如本文所用術語「經佈置」在其含義內涵蓋「經定位」。

如本文所用「微流體裝置」或「微流體器具」係一裝置，其包括一或多個經構形以容納流體之離散微流體迴路，每一微流體迴路包括流體互聯迴路元件，包括但不限於區域、流動路徑、通道、腔室及/或圍欄；及至少一個埠，其經構形以容許流體(及視情況懸浮於流體中之微小物體)流

入微流體裝置中及/或流出微流體裝置。通常，微流體裝置之微流體迴路將包括流動區域(其可包括微流體通道)及至少一個腔室，且將容納少於約 1 mL (例如少於約750、500、250、200、150、100、75、50、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3或2 μ L)體積之流體。在某些實施例中，微流體迴路容納約1-2、1-3、1-4、1-5、2-5、2-8、2-10、2-12、2-15、2-20、5-20、5-30、5-40、5-50、10-50、10-75、10-100、20-100、20-150、20-200、50-200、50-250或50-300 μ L。微流體迴路可經構形以具有與微流體裝置第一埠(例如，入口)流體連接之第一末端及與微流體裝置中之第二埠(例如，出口)流體連接之第二末端。

如本文所用「奈米流體裝置」或「奈米流體器具」係一類微流體裝置，其具有含有至少一個迴路元件之微流體迴路，該迴路元件經構形以容納少於約1 μ L (例如少於約750、500、250、200、150、100、75、50、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 nL或更少)體積之流體。奈米流體裝置可包含複數個迴路元件(例如，至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、10,000或更多個)。在某些實施例中，至少一個迴路元件中之一或多個(例如，全部)經構形以容納約100 pL至1 nL、100 pL至2 nL、100 pL至5 nL、250 pL至2 nL、250 pL至5 nL、250 pL至10 nL、500 pL至5 nL、500 pL至10 nL、500 pL至15 nL、750 pL至10 nL、750 pL至15 nL、750 pL至20 nL、1至10 nL、1至15 nL、1至20 nL、1至25 nL或1至50 nL體積之流體。在其他實施例中，至少一個迴路元件中之一或多個(例如，全部)經構形以容納約20 nL

至200nL、100至200 nL、100至300 nL、100至400 nL、100至500 nL、200至300 nL、200至400 nL、200至500 nL、200至600 nL、200至700 nL、250至400 nL、250至500 nL、250至600 nL或250至750 nL體積之流體。

微流體裝置或奈米流體裝置在本文中可稱為「微流體晶片」或「晶片」；或「奈米流體晶片」或「晶片」。

如本文所用「微流體通道」或「流動通道」係指微流體裝置之流動區域，其長度顯著長於水平及垂直尺寸二者。舉例而言，流動通道可為水平或垂直尺寸之至少5倍長度，例如至少10倍長度、至少25倍長度、至少100倍長度、至少200倍長度、至少500倍長度、至少1,000倍長度、至少5,000倍長度或更長。在一些實施例中，流動通道之長度為約100,000微米至約500,000微米，包括其之間之任一值。在一些實施例中，水平尺寸為約100微米至約1000微米(例如，約150至約500微米)且垂直尺寸為約25微米至約200微米(例如，約40至約150微米)。應注意，流動通道可在微流體裝置中具有多種不同空間構形，且因此不受限於理想線性元件。舉例而言，流動通道可為或包括一或多個具有以下構形之斷面：曲線、彎曲、螺旋、傾斜、下傾、分叉(例如，多個不同流動路徑)及其任何組合。另外，流動通道可沿其路徑具有不同橫斷面積，變寬並收縮以在其中提供期望流體流動。流動通道可包括閥，且該等閥可為微流體領域已知之任何類型。包括閥之微流體通道之實例揭示於美國專利6,408,878及9,227,200中，其各自係全文以引用方式併入本文中。

如本文所用術語「障礙」通常係指凸塊或類似類型之結構，其足夠大以部分(但並非完全)阻礙目標微小物體在微流體裝置中之兩個不同區域

或迴路元件之間之移動。兩個不同區域/迴路元件可為例如微流體隔離圍欄之連接區域及分離區域。

如本文所用術語「收縮」通常係指微流體裝置中之迴路元件之寬度(或兩個迴路元件之間之界面)變窄。收縮可位於例如本發明之微流體隔離圍欄之分離區域與連接區域之間之界面處。

如本文所用術語「透明」係指容許可見光通過而不顯著改變如所通過之光之材料。

如本文所用術語「微小物體」通常係指可根據本發明分離及/或操作之任何微觀物體。微小物體之非限制性實例包括：無生命微小物體，例如微粒；微珠(例如，聚苯乙烯珠粒、Luminex™珠粒或諸如此類)；磁性珠粒；微棒；微絲；量子點及諸如此類；生物微小物體，例如細胞；生物細胞器；囊泡或複合物；合成囊泡；脂質體(例如，合成或衍生自膜製劑)；脂質奈米筏及諸如此類；或無生命微小物體與生物微小物體之組合(例如，附接至細胞之微珠、脂質體包被之微珠、脂質體包被之磁性珠粒或諸如此類)。珠粒可包括共價或非共價附接之部分/分子，例如可檢測標記、蛋白質、碳水化合物、抗原、小分子信號傳導部分或其他能用於分析中之化學/生物物質。脂質奈米筏已闡述於例如以下文獻中：**Ritchie**等人(2009)「**Reconstitution of Membrane Proteins in Phospholipid Bilayer Nanodiscs**」，**Methods Enzymol.**, 464:211-231。

如本文所用術語「細胞」可與術語「生物細胞」互換使用。生物細胞之非限制性實例包括真核細胞、植物細胞、動物細胞(例如哺乳動物細胞、爬行動物細胞、禽類細胞、魚類細胞或諸如此類)、原核細胞、細菌細胞、真菌細胞、原生動物細胞或諸如此類、自組織(例如肌肉、軟骨、

脂肪、皮膚、肝、肺、神經組織及諸如此類)解離之細胞、免疫細胞(例如T細胞、B細胞、天然殺手細胞、巨噬細胞及諸如此類)、胚胎(例如，合子)、卵母細胞、卵、精子細胞、雜交瘤、培養細胞、來自細胞系之細胞、癌細胞、感染細胞、經轉染及/或經轉變細胞、報導基因細胞及諸如此類。哺乳動物細胞可例如來自人類、小鼠、大鼠、馬、山羊、綿羊、牛、靈長類動物或諸如此類。

若群落中能繁殖之所有活細胞皆係衍生自單一親細胞之子細胞，則該生物細胞群落係「純系」。在某些實施例中，純系群落中之所有子細胞皆藉由不多於10次分裂衍生自單一親細胞。在其他實施例中，純系群落中之所有子細胞皆藉由不多於14次分裂衍生自單一親細胞。在其他實施例中，純系群落中之所有子細胞皆藉由不多於17次分裂衍生自單一親細胞。在其他實施例中，純系群落中之所有子細胞皆藉由不多於20次分裂衍生自單一親細胞。術語「純系細胞」係指同一純系群落之細胞。

如本文所用生物細胞「群落」係指2個或更多個細胞(例如約2至約20、約4至約40、約6至約60、約8至約80、約10至約100、約20至約200、約40至約400、約60至約600、約80至約800、約100至約1000或大於1000個細胞)。

如本文所用術語「維持細胞」係指提供包含流體及氣態組分二者及視情況表面之環境，其提供保持細胞存活及/或擴增所需之條件。

如本文所用術語「擴增」在涉及細胞時係指增加細胞數目。

流體介質之「組分」係存於介質中之任何化學或生物化學分子，包括溶劑分子、離子、小分子、抗生素、核苷酸及核苷、核酸、胺基酸、肽、蛋白質、糖、碳水化合物、脂質、脂肪酸、膽固醇、代謝物或諸如此

類。

如本文所用「捕捉部分」係提供微小物體之識別位點之化學或生物物質、官能基或基序。所選類別之微小物體可辨識原位生成之捕捉部分且可結合原位生成之捕捉部分或對其具有親和性。非限制性實例包括抗原、抗體及細胞表面結合基序。

如本文所用用於表示單一核苷酸之「B」係選自G (鳥苷)、C (胞苷)及T (胸苷)核苷酸之核苷酸，但不包括A (腺嘌呤)。

如本文所用用於表示單一核苷酸之「H」係選自A、C及T之核苷酸，但不包括G。

如本文所用用於表示單一核苷酸之「D」係選自A、G及T之核苷酸，但不包括C。

如本文所用用於表示單一核苷酸之「V」係選自A、G及C之核苷酸，且不包括T。

如本文所用用於表示單一核苷酸之「N」係選自A、C、G及T之核苷酸。

如本文所用用於表示單一核苷酸之「S」係選自G及C之核苷酸。

如本文所用用於表示單一核苷酸之「Y」係選自C及T之核苷酸。

如本文所用A、C、T、G及之後的「*」指示該核苷酸之磷酸酯鍵聯中之硫代磷酸酯取代。

如本文所用IsoG係異鳥苷；IsoC係異胞苷；IsodG係異鳥苷去氧核糖核苷酸且IsodC係異胞苷去氧核糖核苷酸。異鳥苷及異胞苷核糖或去氧核糖核苷酸各自含有通常納入RNA或DNA內之分別為鳥嘌呤核鹼基或胞嘧啶核鹼基之異構體之核鹼基。

如本文所用**rG**表示包括於原本含有去氧核糖核苷酸之核酸內之核糖核苷酸。含有所有核糖核苷酸之核酸可不包括標記以指示每一核苷酸係核糖核苷酸，但依據上下文應明確。

如本文所用「啟動序列」係寡核苷酸序列，其係較大寡核苷酸之一部分且在自較大寡核苷酸分離時使得啟動序列包括游離3'端，可在DNA(或RNA)聚合反應中用作引子。

如本文所用「抗體」係指免疫球蛋白(Ig)且包括多株及單株抗體二者；靈長類化(例如，人類化)；鼠類；小鼠-人類；小鼠-靈長類動物；及嵌合；且可為完整分子、其片段(例如scFv、Fv、Fd、Fab、Fab'及F(ab)'₂片段)，或完整分子及/或片段之多聚體或聚集體；且可存在於自然界中或例如藉由免疫、合成或遺傳工程化來產生。如本文所用「抗體片段」係指衍生自或關於抗體之片段，其結合抗原且其在一些實施例中可經衍生以例如藉由納入半乳糖殘基展現有利於清除及攝取之結構特徵。此包括例如F(ab)、F(ab)'₂、scFv、輕鏈可變區(VL)、重鏈可變區(VH)及其組合。

如本文所提及之抗原係可特異性結合至另一分子(例如Ag特異性受體)之分子或其部分。抗原可能夠在生物體(例如哺乳動物，例如人類、小鼠、大鼠、兔等)內誘導免疫反應，但抗原自身可能不足以誘導此一免疫反應。抗原可為分子之任一部分，例如構形表位或線性分子片段，且通常可由適應性免疫系統之高可變抗原受體(B細胞受體或T細胞受體)辨識。抗原可包括肽、多醣或脂質。抗原之特徵可為其結合至抗體可變Fab區之能力。不同抗體具有區分存於抗原表面上之不同表位之潛力，該抗原表面之結構可藉由可為小分子之半抗原之存在來調節。

在一些實施例中，抗原係癌細胞相關抗原。癌細胞相關抗原可為簡單或複雜抗原；該抗原可為蛋白質、碳水化合物基團或鏈、除蛋白質或碳水化合物以外之生物或化學試劑或其任一組合上之表位；該表位可為線性或構形。

癌細胞相關抗原可為僅識別癌細胞(例如，一或多個特定類型之癌細胞)或與其在正常細胞上之表現相比在癌細胞上上調之抗原。通常，癌細胞相關抗原存於癌細胞表面上，由此確保其可由抗體辨識。抗原可與任一類型之癌細胞相關，包括可在業內已知或本文所述之腫瘤中發現之任一類型之癌細胞。特定而言，抗原可與肺癌、乳癌、黑色素瘤及諸如此類相關。如本文所用術語「與癌細胞相關」在關於抗原使用時意指，該抗原係由癌細胞直接產生或源自癌細胞與正常細胞之間之相互作用。

如本文中參照流體介質所用「擴散(diffuse)」及「擴散(diffusion)」係指流體介質之組分沿濃度梯度向下熱力學運動。

片語「介質之流動」意指主要由於除了擴散以外之任何機制所致之流體介質之整體運動。舉例而言，介質之流動可涉及流體介質由於各點之間的壓差而自一點運動至另一點。該流動可包括液體之連續、脈衝式、週期性、隨機、間歇或往復流動或其任一組合。在一種流體介質流入另一種流體介質中時，可導致介質之湍流及混合。

片語「實質上不流動」係指流體介質隨時間平均化之流速小於材料(例如，目標分析物)之組分擴散至流體介質中或於流體介質中擴散之速率。此一材料之組分擴散之速率可取決於例如溫度、組分大小及組分與流體介質之間之相互作用之強度。

如本文參照微流體裝置內之不同區域所用片語「流體連接」意指，

在不同區域實質上充滿流體(例如流體介質)時，每一區域中之流體經連接以形成流體之單一體(single body)。此並不意指不同區域中之流體(或流體介質)需要相同組成。相反，微流體裝置之不同流體連接區域中之流體可具有不同組成(例如，不同濃度之溶質，例如蛋白質、碳水化合物、離子或其他分子)，其作為溶質在通量中沿其各別濃度梯度向下運動及/或流體流過微流體裝置。

如本文所用「流動路徑」係指一或多個流體連接之迴路元件(例如通道、區域、腔室及諸如此類)其界定或經歷介質流動之軌跡。因此，流動路徑係微流體裝置之波及區(swept region)。其他迴路元件(例如，未波及區(unswept region))可與迴路元件流體連接，其包含流動路徑但不經歷流動路徑中介質之流動。

如本文所用「分離微小物體」將微小物體限制於微流體裝置內之有限區域中。

微流體(或奈米流體)裝置可包含「波及」區及「未波及」區。如本文所用「波及」區包括微流體迴路之一或多個流體互聯迴路元件，其在流體流過微流體迴路時各自經歷介質流動。波及區之迴路元件可包括例如區域、通道及所有或部分腔室。如本文所用「未波及」區包括微流體迴路之一或多個流體互聯迴路元件，其在流體流過微流體迴路時實質上不經歷流體之流動。未波及區可流體連接至波及區，條件係流體連接經結構化以使得介質能擴散但實質上不在波及區與未波及區之間流動。微流體裝置可由此結構化以實質上分離未波及區與波及區中之介質流動，同時使得在波及區與未波及區之間實質上僅能擴散性流體連通。舉例而言，微流體裝置之流動通道係波及區之實例，而微流體裝置之分離區域(下文更詳細地闡述)

係未波及區之實例。

在微流體環境內自一或多個細胞生成gDNA測序庫。在對微流體裝置內培養、觀察或表型分析之細胞之物理位置交叉參考下生成DNA測序資料係對當前可用測序策略之高度期望的改良。對gDNA測序之原因包括表徵細胞DNA內之變異或突變，評價基因編輯事件及對純系性之過程驗證。當前尚未獲得將測序資料與自其分離DNA之特定細胞相關聯之能力。

本文中闡述在微流體裝置內自引入既可在微流體裝置內原位讀取亦可自所得測序資料讀取之條碼之細胞生成DNA測序庫之工作流程。在微流體環境內解密條碼之能力允許將基因體資料與表型相聯繫。如圖4中所示，可將生物細胞410佈置於微流體裝置外殼內之隔離圍欄405內，且在其中維持並分析。在分析(其可為但不限於檢測細胞表面標記物415之分析)期間，試劑420 (其可為抗體)可結合至細胞表面標記物415，且在該結合後允許檢測可檢測信號425。藉由使用本文所述方法將自細胞410釋放之核酸捕捉至捕捉物體430，可將此表型自該特定生物細胞410與基因體資料相連，該捕捉物體430包括包含三個或更多個可盒化寡核苷酸序列之條碼435。條碼435可在本文所述檢測方法中藉由螢光探針440原位檢測。捕捉至捕捉物體430之所釋放核酸可用於生成測序庫，其在測序後提供測序資料445，該測序資料445包括來自生物細胞405所釋放核酸之基因體資訊及相關條碼435之序列二者。由此提供表型與基因體資料之間之關聯。此能力使得可進入如圖4B中所示之一般化工作流程。例如，在細胞培養460之前、之後或期間經過路徑之細胞(其可包括基因編輯450、功能分析/表型分析或標記分析455)可使用條碼化捕捉珠粒470進入連接過程465，

以隨後捕捉RNA (475)及/或DNA (480)，並提供RNA-seq 482、T細胞受體(TCR)-seq 484、B細胞受體(BCR)- seq 486；或關聯回來源細胞之DNA seq (488)資料。若細胞係純系群體之一部分，則可導致陽性純系輸出490。

此外，使用本文所述用於RNA捕捉/庫製備及DNA捕捉/庫製備之方案，可自相同單細胞獲得RNA及DNA二者之測序結果，且可將該等測序結果與所測序RNA及DNA之特定單細胞來源在微流體裝置內之位置相關聯。

本文中闡述DNA條碼525，其係使用使用螢光個別解碼之可盒化(例如，可變亞單元435a、435b、435c、435d，其在一些實施例中可完全可互換)子條碼或「字組」來設計，如圖5中示意性顯示。條碼之檢測可藉由使用互補螢光標記之雜交探針檢測4個可盒化寡核苷酸序列中之每一者原位實施。如此處所示，可盒化寡核苷酸序列435a係藉由與包括螢光團Fluor 1之雜交探針440a雜交原位檢測。分別地，第二可盒化寡核苷酸序列435b可類似地藉由雜交探針440b (包括Fluor 2)來檢測；第三可盒化寡核苷酸序列435c可藉由具有Fluor 3之雜交探針440c來檢測，且第四可盒化寡核苷酸序列435d可藉由具有Fluor 4之雜交探針440c來檢測。螢光團Fluor 1、Fluor 2、Fluor 3及Fluor 4各自在光譜上可區分，從而允許明確識別每一各別可盒化寡核苷酸序列。

在圖5中圖解說明之方法中，對於一個細胞410 /一個細胞群落(未顯示)，可將包含攜載複數個各自包括DNA條碼525以及啟動序列520之捕捉寡核苷酸(顯示該複數個中之單一捕捉寡核苷酸550)之珠粒510之捕捉物體430以一個捕捉物體430 /一個條碼525引入每一隔離圍欄405。在一些其他

實施例中，可將多於一個捕捉物體置入隔離圍欄中以捕捉更大量之來自所檢查生物細胞之核酸。

圖5中呈現藉由包含經由連接體515連接至包括啟動序列520、條碼525、可選獨特分子標識符(UMI) 525及捕捉序列535之捕捉寡核苷酸550之珠粒510之捕捉物體430捕捉在裂解後自生物細胞410釋放之核酸之示意性代表圖(所釋放核酸可為RNA 505)。在此實施例中，條碼525包括4個可盒化寡核苷酸序列435a、435b、435c及435d。在此實施例中，捕捉寡核苷酸之捕捉序列535藉由與所釋放核酸505之多A區段雜交來捕捉所釋放核酸505。

可將欲裂解細胞輸入專用於庫製備及測序之微流體裝置中或可存在於微流體裝置內，維持任何期望時間段。

捕捉物體. 捕捉物體可包括複數個捕捉寡核苷酸，其中該複數個中之每一者包括：結合至引子之啟動序列；捕捉序列；及包含三個或更多個可盒化寡核苷酸序列之條碼序列，每一可盒化寡核苷酸序列與該條碼序列中之其他可盒化寡核苷酸序列不一致。在多個實施例中，捕捉物體可包括複數個捕捉寡核苷酸。每一捕捉寡核苷酸包含5'-最末端核苷酸及3'-最末端核苷酸。在多個實施例中，啟動序列可毗鄰或包含該5'-最末端核苷酸。在多個實施例中，捕捉序列可毗鄰或包含該3'-最末端核苷酸。通常，條碼序列可位於啟動序列之3'及捕捉序列之5'處。

捕捉物體組成. 通常，捕捉物體之組成使得其適用於使用介電泳(DEP)力(例如負DEP力)來運動。舉例而言，捕捉物體可為具有包括順磁性材料、聚合材料及/或玻璃之核心之珠粒(或類似物體)。聚合材料可為聚苯乙烯或任何其他可經官能化以連接捕捉寡核苷酸之塑膠材料。捕捉物體

之核心材料可經塗佈以提供適於將連接體附接至捕捉寡核苷酸之材料，其可包括官能化聚合物，但其他配置亦係可能的。用於將捕捉寡核苷酸連接至捕捉物體之連接體可為如業內已知之任何適宜連接體。連接體可包括烴鏈，其可未經取代或經取代，或夾雜或不夾雜有可提供期望物理化學性質之諸如鹼胺、醚或酮基-基團等官能基。連接體可具有足夠長度以允許處理酶到達連接至連接體之捕捉寡核苷酸末端附近之啟動位點。捕捉寡核苷酸可共價或非共價地連接至連接體，如業內已知。非共價連接至連接體之非限制性實例可係經由生物素/鏈黴抗生物素蛋白對來進行。

捕捉物體可具有任何適宜大小，只要其足夠小以通過流動區域之流動通道且進入/離開如本文所述任何微流體裝置之隔離圍欄即可。此外，捕捉物體可經選擇以具有足夠大數目之捕捉寡核苷酸與其連接，使得可以足夠量捕捉核酸以生成可用於測序之核酸庫。在一些實施例中，捕捉物體可為球狀或部分球狀珠粒且直徑大於約5微米且小於約40微米。在一些實施例中，球狀或部分球狀珠粒之直徑可為約5、約7、約8、約10、約12、約14、約16、約18、約20、約22、約24或約26微米。

通常，附接至捕捉物體之每一捕捉寡核苷酸具有相同條碼序列，且在多個實施例中，每一捕捉物體具有唯一條碼序列。私用在每一捕捉珠粒上具有唯一條碼之捕捉珠粒允許僅識別置入捕捉物體之隔離圍欄。在將複數個細胞置於隔離圍欄內之實驗中(通常單獨地)，亦將複數個捕捉物體遞送且置入經佔據隔離圍欄中，每個隔離圍欄一個捕捉珠粒。複數個捕捉珠粒各自具有唯一條碼，且該條碼與存於微流體裝置內之任何其他捕捉珠粒之任何其他條碼不一致。因此，隔離圍欄內之細胞(或在一些實施例中，多個細胞)將具有唯一條碼標識符納入其測序庫內。

條碼序列. 條碼序列可包括兩個或更多個(例如, 2、3、4、5或更多個)可盒化寡核苷酸序列, 其各自與條碼序列之其他可盒化寡核苷酸序列不一致。在條碼序列組中之任何一個條碼序列之 n 個(例如, 3或更多個)可盒化寡核苷酸序列與條碼序列組中之任何其他條碼序列之 n' 個(例如, 3或更多個)可盒化寡核苷酸序列不完全重疊時, 條碼序列與組中之其他條碼序列「不一致」; 可允許部分重疊(例如, 至多 $n-1$ 個), 只要組中之每一條碼序列與組中之每一其他條碼序列相差最少1個可盒化寡核苷酸序列即可。在某些實施例中, 條碼序列由兩個或更多個(例如, 2、3、4、5或更多個)可盒化寡核苷酸序列組成(或基本上由其組成)。如本文所用「可盒化寡核苷酸序列」係參照寡核苷酸序列, 其係參照寡核苷酸序列組(例如, 12或更多個寡核苷酸序列之組)中之一者, 其中, 對於組中之每一可盒化寡核苷酸序列, 互補寡核苷酸序列(其可為雜交探針之一部分, 如本文中別處所述)實質上不與參照寡核苷酸序列組中之任何其他可盒化寡核苷酸序列雜交。在某些實施例中, 組中之所有(或實質上所有)可盒化寡核苷酸序列將具有相同長度(或核苷酸數)。舉例而言, 組中之可盒化寡核苷酸序列可皆具有10個核苷酸之長度。然而, 其他長度亦適用於本發明, 介於約6個核苷酸至約15個核苷酸範圍內。因此, 例如, 組中之每一可盒化寡核苷酸序列(或組中之實質上所有可盒化寡核苷酸序列)可具有6個核苷酸、7個核苷酸、8個核苷酸、9個核苷酸、10個核苷酸、11個核苷酸、12個核苷酸、13個核苷酸、14個核苷酸或15個核苷酸之長度。在一些實施例中, 條碼序列之三個或更多個可盒化寡核苷酸序列係串聯連接, 無任何介入寡核苷酸序列。在其他實施例中, 三個或更多個可盒化寡核苷酸序列可在一個可盒化寡核苷酸與其相鄰可盒化寡核苷酸之間具有一或多個並非

直接連接之連接。三個或更多個可盒化寡核苷酸序列中任一者之間可存在該等連接以促進藉由連接而非藉由全合成來合成。然而，在多個實施例中，可盒化寡核苷酸之寡核苷酸序列未夾雜形成一或多個啟動序列、可選索引序列、可選獨特分子標識符序列或可選限制位點(包括但不限於Not1限制位點序列)之其他寡核苷酸序列中之任何其他序列。

選自參照寡核苷酸序列組(且因此在條碼序列中)之每一可盒化寡核苷酸序列可與組(及條碼序列)中之其他可盒化寡核苷酸序列「不一致」，此乃因每一可盒化寡核苷酸序列可基於其獨特核苷酸序列特異性識別為存在於條碼序列中，該獨特核苷酸序列可藉由以下兩種方式來檢測：(i) 對條碼序列進行測序，及(ii) 實施與探針(例如，雜交探針)之雜交反應，該探針含有與可盒化寡核苷酸序列互補之寡核苷酸序列。

如本文中結合可盒化寡核苷酸序列及其互補寡核苷酸序列(包括含有該等互補寡核苷酸序列之雜交探針)使用之術語「實質上雜交」意指，可盒化寡核苷酸序列與其互補寡核苷酸序列之間之雜交程度高於臨限程度，其中臨限程度大於且不同於互補寡核苷酸序列與參照寡核苷酸序列組中之任何其他可盒化寡核苷酸序列之間交叉雜交之程度。如熟習此項技術者可容易地理解，確定互補寡核苷酸序列是否與特定可盒化寡核苷酸序列實質上雜交之臨限值取決於多種因素，包括可盒化寡核苷酸序列之長度、其中進行雜交反應之溶液之組分、進行雜交反應之溫度及用於檢測雜交之標記(其可附接至互補寡核苷酸序列)之化學性質。

三個或更多個可盒化寡核苷酸序列可各自選自複數個至少12個可盒化寡核苷酸序列。舉例而言，該複數可包括至少12、15、16、18、20、21、24、25、27、28、30、32、33、35、36、39、40、42、44、45、

48、50、51、52、54、55、56、57、60、63、64、65、66、68、69、70、72、75、76、78、80、81、84、85、87、88、90、92、93、95、96、99、100或更多，包括前述任一數目之間之任一數目。

如表1中所示一組40個可盒化寡核苷酸序列SEQ ID. No. 1-40已經設計用於使用10聚體寡核苷酸之原位檢測方法中，其最佳允許螢光團探針在檢測期間雜交。10聚體之至少6個鹼基經差異化以防止在檢測方法中誤退火。該組係使用來自 Comai lab: (http://comailab.genomecenter.ucdavis.edu/index.php/Barcode_generator)之條碼生成器python腳本來設計，且針對所顯示序列之進一步選擇係基於選擇Tm（熔融溫度）等於或高於28℃之序列。Tm計算係使用IDT OligoAnalyzer 3.1(<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>)來實施。

表1. 納入條碼內之可盒化寡核苷酸序列及用於其原位檢測之雜交探針序列.

條碼名稱	SEQ ID No.	條碼序列	探針名稱	SEQ ID No.	探針序列	螢光通道
BC1_C1	1	CAGCCTTCTG	探針_C1	41	CAGAAGGCTG/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C2	2	TGTGAGTTCC	探針_C2	42	GGAAGTCACA/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C3	3	GAATACGGGG	探針_C3	43	CCCCGTATTTC/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C4	4	CTTTGGACCC	探針_C4	44	GGGTCCAAAG/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C5	5	GCCATACACG	探針_C5	45	CGTGTATGGC/3AlexF647N/	Cy5

BC1_C6	6	AAGCTGAAGC	探 針 _C6	46	GCTTCAGCTT/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C7	7	TGTGGCCATT	探 針 _C7	47	AATGGCCACA/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C8	8	CGCAATCTCA	探 針 _C8	48	TGAGATTGCG/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C9	9	TGCGTTGTTG	探 針 _C9	49	CAACAACGCA/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C10	10	TACAGTTGGC	探 針 _C10	50	GCCAACTGTA/3AlexF647N/	Cy5
BC2_D11	11	TTCCTCTCGT	探 針 _D11	51	/5AlexF405N/ACGAGAGGAA	Dapi
BC2_D12	12	GACGTTACGA	探 針 _D12	52	/5AlexF405N/TCGTAACGTC	Dapi
BC2_D13	13	ACTGACGCGT	探 針 _D13	53	/5AlexF405N/ACGCGTCAGT	Dapi
BC2_D14	14	AGGAGCAGCA	探 針 _D14	54	/5AlexF405N/TGCTGCTCCT	Dapi
BC2_D15	15	TGACGCGCAA	探 針 _D15	55	/5AlexF405N/TTGCGCGTCA	Dapi
BC2_D16	16	TCCTCGCCAT	探 針 _D16	56	/5AlexF405N/ATGGCGAGGA	Dapi
BC2_D17	17	TAGCAGCCCA	探 針 _D17	57	/5AlexF405N/TGGGCTGCTA	Dapi
BC2_D18	18	CAGACGCTGT	探 針 _D18	58	/5AlexF405N/ACAGCGTCTG	Dapi
BC2_D19	19	TGGAAAGCGG	探 針 _D19	59	/5AlexF405N/CCGCTTTCCA	Dapi
BC2_D20	20	GCGACAAGAC	探 針 _D20	60	/5AlexF405N/GTCTTGTCGC	Dapi

BC3_F21	21	TGTCCGAAAG	探 針_F21	61	CTTTCGGACA/3AlexF488N/	FITC
BC3_F22	22	AACATCCCTC	探 針_F22	62	GAGGGATGTT/3AlexF488N/	FITC
BC3_F23	23	AAATGTCCCG	探 針_F23	63	CGGGACATTT/3AlexF488N/	FITC
BC3_F24	24	TTAGCGCGTC	探 針_F24	64	GACGCGCTAA/3AlexF488N/	FITC
BC3_F25	25	AGTTCAGGCG	探 針_F25	65	CGCCTGAACT/3AlexF488N/	FITC
BC3_F26	26	ACAGGGGAAC	探 針_F26	66	GTTCCCCTGT/3AlexF488N/	FITC
BC3_F27	27	ACCGGATTGG	探 針_F27	67	CCAATCCGGT/3AlexF488N/	FITC
BC3_F28	28	TCGTGTGTGA	探 針_F28	68	TCACACACGA/3AlexF488N/	FITC
BC3_F29	29	TAGGTCTGCG	探 針_F29	69	CGCAGACCTA/3AlexF488N/	FITC
BC3_F30	30	ACCCATACCC	探 針_F30	70	GGGTATGGGT/3AlexF488N/	FITC
BC4_T31	31	CCGCACTTCT	探 針_T31	71	AGAAGTGCGG/3AlexF594N/	德克薩斯紅 (Texas Red)
BC4_T32	32	TTGGGTACAG	探 針_T32	72	CTGTACCCAA/3AlexF594N/	德克薩斯紅
BC4_T33	33	ATTCGTCGGA	探 針_T33	73	TCCGACGAAT/3AlexF594N/	德克薩斯紅
BC4_T34	34	GCCAGCGTAT	探 針_T34	74	ATACGCTGGC/3AlexF594N/	德克薩斯紅
BC4_T35	35	GTTGAGCAGG	探 針	75	CCTGCTCAAC/3AlexF594N/	德克薩斯

			_T35			紅
BC4_T36	36	GGTACCTGGT	探 針 _T36	76	ACCAGGTACC/3AlexF594N/	德克薩斯 紅
BC4_T37	37	GCATGAACGT	探 針 _T37	77	ACGTTCATGC/3AlexF594N/	德克薩斯 紅
BC4_T38	38	TGGCTACGAT	探 針 _T38	78	ATCGTAGCCA/3AlexF594N/	德克薩斯 紅
BC4_T39	39	CGAAGGTAGG	探 針 _T39	79	CCTACCTTCG/3AlexF594N/	德克薩斯 紅
BC4_T40	40	TTCAACCGAG	探 針 _T40	80	CTCGGTTGAA/3AlexF594N/	德克薩斯 紅

在多個實施例中，條碼序列之三個或更多個可盒化寡核苷酸序列各自具有SEQ ID NO: 1-40中任一者之序列，其中該三個或更多個可盒化寡核苷酸皆不一致。可盒化序列可以任何順序存於捕捉寡核苷酸內；順序不改變原位檢測且可盒化寡核苷酸序列各自之序列可自測序讀段去捲積。在一些實施例中，條碼序列可具有4個可盒化寡核苷酸序列。

在一些實施例中，條碼之第一可盒化寡核苷酸序列具有SEQ ID NO: 1-10中任一者之序列；條碼之第二可盒化寡核苷酸序列具有SEQ ID NO: 11- 20中任一者之序列；條碼之第三可盒化寡核苷酸序列具有SEQ ID NO: 21-30中任一者之序列；且條碼之第四可盒化寡核苷酸序列具有SEQ ID NO: 31-40中任一者之序列。在一些實施例中，在條碼之第一可盒化寡核苷酸序列具有SEQ ID NO: 1-10中任一者之序列；條碼之第二可盒化寡核苷酸序列具有SEQ ID NO: 11- 20中任一者之序列；條碼之第三可盒化寡核苷酸序列具有SEQ ID NO: 21-30中任一者之序列；且條碼之第四可盒化寡核苷酸序列具有SEQ ID NO: 31-40中任一者之序列時，第一、第二、第三及第四可盒化寡核苷酸序列各自自條碼序列之5’至3’，沿捕捉寡

核苷酸之長度按順序定位。亦即，第一可盒化寡核苷酸將位於第二可盒化寡核苷酸序列之5'處，第二可盒化寡核苷酸序列繼而定位於第三可盒化寡核苷酸序列之5'處，第三可盒化寡核苷酸序列定位於第四可盒化寡核苷酸序列之5'處。此示意性顯示於圖6中，其中可盒化寡核苷酸序列G1-G10中之一者定位於條碼之第一可盒化寡核苷酸序列位置中；Y1-Y10序列中之一者位於第二可盒化寡核苷酸序列位置中，R1-R10序列中之一者位於第三可盒化寡核苷酸序列位置中，且B1-B10序列中之一者位於第四可盒化寡核苷酸序列位置中。然而，順序並不重要，且測定存在或不存在之原位檢測及測序讀段不依賴於呈遞順序。

捕捉序列. 捕捉物體包括經構形以捕捉核酸之捕捉序列。捕捉序列係具有約6至約50個核苷酸之寡核苷酸序列。在一些實施例中，捕捉寡核苷酸序列藉由與自目標細胞釋放之核酸雜交來捕捉核酸。一個非限制性實例包括多T序列(具有約30至約40個核苷酸)，其可捕捉並雜交在其3'末端具有多A之RNA片段。多T序列可在其3'末端進一步含有兩個核苷酸VN。捕捉寡核苷酸之其他實例包括隨機六聚體(「隨機聚體(randomer)」)，其可用於混合物中以雜交並由此捕捉互補核酸。或者，基因特異性序列之補體可用於核酸之靶向捕捉，例如B細胞受體或T細胞受體序列。

在另一實施例中，捕捉寡核苷酸序列可用於藉由以下方式捕捉自細胞釋放之核酸：經由重組酶/聚合酶定向鏈延長引領(shepherd)可辨識末端序列以有效「捕捉」適當加標籤之所釋放核酸，以由此添加測序接頭、條碼及索引。此類型捕捉寡核苷酸序列之實例包括鑲嵌末端(ME)序列或其他標籤化插入序列，如業內已知。鑲嵌末端插入序列係轉位子易於辨識且可用於向核酸片段提供啟動/加標籤之短寡核苷酸。適用於此目的之寡核

核苷酸序列可含有約8個核苷酸至約50個核苷酸。在一些實施例中，ME加上額外插入序列可長約33個核苷酸，且可藉由使用市售標籤化套組(例如Nextera DNA庫製備套組，Illumina，目錄號15028212及諸如此類)來插入。在此實施例中，藉由捕捉序列實施之捕捉並非雜交事件，而係引領捕捉寡核苷酸、加標籤DNA及重組酶/聚合酶機構與啟動序列、條碼序列及任何其他索引、接頭或功能性位點(例如但不限於NotI限制位點序列(如下文所論述))之間之相互作用，並將其引導至標籤化DNA片段上。引領及引導相互作用使用雜交相互作用捕捉所釋放核酸來提供與上述cDNA產物等效之產物。在兩種情形中，自所釋放核酸提供經增大核酸片段，其現在包括至少測序接頭及條碼，從而允許擴增、進一步調整測序庫及獲得經測序條碼及樣品核酸讀段之能力。

啟動序列. 捕捉物體之捕捉寡核苷酸具有啟動序列，且啟動序列可毗鄰或包含捕捉寡核苷酸之5'-最末端核苷酸。啟動序列可為一般或序列特異性啟動序列。啟動序列可結合至引子，該引子在結合後啟動反轉錄酶或聚合酶。在一些實施例中，一般啟動序列可結合至 P7 (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-3' (SEQ ID. NO 107))或P5 (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-3' (SEQ ID NO. 108))引子。

在其他實施例中，一般啟動序列可結合至具有以下中之一者之序列之引子：

5'-Me-isodC//Me-isodG//Me-isodC/ACACTCTTTCCCTACACGACGCrGrGrG-3' (SEQ ID. NO. 103)；

5'- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3' (SEQ

ID. NO. 104) ;

5’-/5Biosg/ACACTCTTTCCCT ACACGACGC-3’ (SEQ ID. NO. 105) ;

5’-
AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGAC
GCTCTTC C*G*A*T*C*T-3’ (SEQ ID NO. 106) ;

5’-/5 生 物 素
TEG/CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCGCCTTAGTCTCGTGG-
GCTCG*G-3’ (SEQ ID No. 109) ;

5’ /5 生 物 素
TEG/CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTAGTACGGTCTCGTG-
GGCTCG*G-3’ (SEQ ID NO. 110 ; 及

5’-/5 生 物 素
TEG/CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTAGTACGGTCTCGTG-
GGCTCG*G (SEQ ID NO. 111) 。

額外啟動及/或接頭序列. 捕捉寡核苷酸可視情況具有一或多個額外啟動/接頭序列，其提供用於引子延長之著陸位點(landing site)或固定化位點以互補雜交大量平行測序陣列或流動槽內之錨位點。

可選寡核苷酸序列. 複數個捕捉寡核苷酸之每一捕捉寡核苷酸可視情況進一步包括獨特分子標識符(UMI)序列。該複數個中之每一捕捉寡核苷酸可具有與捕捉物體之其他捕捉寡核苷酸不同之UMI，從而允許識別與所擴增序列之數目相對之唯一捕捉物。在一些實施例中，UMI可位於啟動序列之3’及捕捉序列之5’處。UMI序列可為具有約5至約20個核苷酸之寡核

苷酸。在一些實施例中，UMI序列之寡核苷酸序列可具有約10個核苷酸。

在一些實施例中，複數個捕捉寡核苷酸之每一捕捉寡核苷酸亦可包括Not1限制位點序列(GCGGCCGC, SEQ ID NO. 160)。Not1限制位點序列可位於捕捉寡核苷酸之捕捉序列之5'處。在一些實施例中，Not1限制位點序列可位於捕捉寡核苷酸之條碼序列之3'處。

在其他實施例中，複數個捕捉寡核苷酸之每一捕捉寡核苷酸亦可包括其他標記，例如庫索引(pool Index)序列。索引序列係4至10個寡核苷酸之序列，其僅識別屬一個實驗之一組捕捉物體，從而允許多重測序，其組合來自若干個不同實驗之測序庫以節省測序運行成本及時間，同時仍允許使測序資料去捲積，且關聯回正確實驗及其中相關之捕捉物體。

一些實例性但無限制性之捕捉物體闡述於表2中，其中為清晰起見僅顯示一個捕捉寡核苷酸。包括啟動序列、條碼、UMI及用於捕捉RNA之捕捉序列之捕捉物體可為具有SEQ ID No. 97、SEQ ID No. 98、SEQ ID No. 99或SEQ ID No. 100之捕捉物體。包括啟動序列、條碼、UMI、Not1序列及用於捕捉RNA之捕捉序列之捕捉物體可為具有SEQ ID NO. 101或SEQ ID NO. 102之捕捉物體。

表2. 實例性捕捉物體.

SEQ ID NO	序列
97	珠粒-5'-連接體- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGCCTTCTG TTCCTCTCGTTGTCCGAAAGCCGCACTTCTNNNNNNNNNNNTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTVN- 3'

98	珠粒-5'-連接體 ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGCAATCTCA CAGACGCTGTTCTGTGTGATGGCTACGATNNNNNNNNNNNTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN- 3'
99	珠粒-5'-連接體 ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGCCTTCTG TTCCTCTCGTTGTCCGAAAGCCGCACTTCTNNNNNNNNNNNTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN- 3'
100	珠粒-5'-連接體 ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGCCTTCTG TTCCTCTCGTTGTCCGAAAGCCGCACTTCTNNNNNNNNNNNTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN- 3'
101	珠粒-5'-連接體 ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGCCTTCTG TTCCTCTCGTTGTCCGAAAGCCGCACTTCTNNNNNNNNNNNAT CTCGTATGCCGTCTTCTGCTTGGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTVN
102	珠粒-5'-連接體 ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCGTTGTTG TGGAAAGCGGTAGGTCTGCGCGAAGGTAGGNNNNNNNNNNA TCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTGGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTVN- 3'

複數個捕捉物體. 提供複數個捕捉物體用於多重核酸捕捉。該複數個之每一捕捉物體係根據本文所述任一捕捉物體之捕捉物體，其中對於該複數個中之每一捕捉物體，該捕捉物體之每一捕捉寡核苷酸具有相同條碼序列，且其中該複數個中每一捕捉物體之捕捉寡核苷酸之條碼序列與該複數個中每一其他捕捉物體之捕捉寡核苷酸之條碼序列不同。在一些實施例中，複數個捕捉物體可包括至少256個捕捉物體。在其他實施例中，該複

數個捕捉物體可包括至少10,000個捕捉物體。顯示構築複數個捕捉物體之示意圖顯示於圖6中。捕捉物體630具有珠粒510，捕捉寡核苷酸550經由連接體515附接至該珠粒510。連接體515附接至捕捉寡核苷酸550之5'末端，且特定而言附接至啟動序列520之5'末端。在此實例中，連接體515及啟動序列520 (此處顯示為長度33 bp)為所有捕捉物體之所有捕捉寡核苷酸所共有，但在其他實施例中，該連接體及/或該啟動序列對於捕捉物體上之不同捕捉寡核苷酸可不同，或者該連接體及/或該啟動序列可對於該複數個中之不同捕捉物體而不同。捕捉寡核苷酸550之捕捉序列535位於或靠近捕捉寡核苷酸550之3'末端。在此非限制性實例中，捕捉序列535顯示為多T-VN序列，其一般性地捕捉所釋放RNA。在一些實施例中，捕捉序列535為複數個捕捉物體之所有捕捉物體630之所有捕捉寡核苷酸550所共有。然而，在其他複數個捕捉物體中，捕捉物體630之複數個捕捉寡核苷酸550之每一捕捉寡核苷酸上之捕捉序列535可不一定相同。在此實例中，存在可選獨特分子標識符(UMI) 530，且位於捕捉序列535之5'處及啟動序列520之3'處。在此特定實例中，UMI 530沿捕捉寡核苷酸位於條碼序列525之3'處。然而，在其他實施例中，UMI 530可位於條碼之5'處。然而，UMI 530位於啟動序列520之3'處，以被納入經擴增核酸產物內。在此實例中，UMI 530之長度為10bp。此處，顯示UMI 530具有序列NNNNNNNNNN (SEQ. ID NO 84)。通常，UMI 530可由任何核苷酸之隨機組合組成，條件係其與條碼525之可盒化寡核苷酸序列435a、435b、435c、435d中之任一者不一致，且其與啟動序列520亦不一致。在多個實施例中，UMI經設計以不包括可與捕捉序列535重疊之10個T之序列，如針對此情形中所示。UMI 530對於每一捕捉物體630之每一捕捉寡核苷酸

550係唯一的。在一些實施例中，捕捉物體630之每一捕捉寡核苷酸550之唯一UMI 530可用於複數個中之不同捕捉物體630之捕捉寡核苷酸550內，此乃因不同捕捉物體630之條碼525可允許測序讀段之去捲積。

捕捉寡核苷酸之條碼525在啟動序列之3'處，且含有4個可盒化序列435a、435b、435c及435d，各自長度為10 bp。單一捕捉物體630上之複數個捕捉寡核苷酸550之每一捕捉寡核苷酸具有一致條碼525，且該複數個捕捉物體之條碼525對於該複數個中之每一捕捉物體630而言不同。條碼525對於每一捕捉物體之多樣性可藉由對來自如下文所述參照寡核苷酸組之可盒化寡核苷酸進行選擇來獲得。在此實例中，可藉由選擇4組參照序列中每一組之一個來製備10,000個不同條碼，每組含有10個不同的可能選擇。

可盒化寡核苷酸序列。提供可盒化寡核苷酸序列用於如本文所述條碼內且可具有SEQ ID No. 1至40中任一者之寡核苷酸序列。

條碼序列。提供條碼序列用於本文所述之捕捉物體之捕捉寡核苷酸及方法內，其中條碼序列可包括三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，其中條碼序列之三個或更多個可盒化寡核苷酸序列各自具有SEQ ID NO: 1-40中任一者之序列，且其中條碼序列之每一可盒化寡核苷酸序列與條碼序列之其他可盒化寡核苷酸序列不一致。條碼序列包含兩個或更多個(例如，2、3、4、5或更多個)可盒化寡核苷酸序列，其各自與條碼序列之其他可盒化寡核苷酸序列不一致。在某些實施例中，條碼序列由兩個或更多個(例如，2、3、4、5或更多個)可盒化寡核苷酸序列組成(或基本上由其組成)。條碼序列之可盒化寡核苷酸序列可如本文中別處所述。舉例而言，兩個或更多個可盒化寡核苷酸序列可各自為來自參照寡核苷酸序列組(例

如，12或更多個寡核苷酸序列之組)之一者，其中，對於組中之每一可盒化寡核苷酸序列，互補寡核苷酸序列與組中之任何其他可盒化寡核苷酸序列實質上不雜交。在某些實施例中，兩個或更多個可盒化寡核苷酸序列可各自包含6至15個核苷酸(例如，長度為6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個核苷酸)。在其他實施例中，兩個或更多個可盒化寡核苷酸序列可各自由6至15個核苷酸(例如，長度為6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個核苷酸)組成(或基本上由其組成)。在具體實施例中，可盒化寡核苷酸序列可為SEQ ID NO: 1-40所界定組中之任一者。在一些實施例中，條碼可包括3或4個可盒化寡核苷酸序列。在多個實施例中，條碼之3或4個可盒化寡核苷酸序列係串聯連接，無任何介入寡核苷酸序列。在其他實施例中，3或4個可盒化寡核苷酸序列中之一或多者可使用可盒化寡核苷酸序列之間之1、2或3個中間核苷酸連接在一起。此在使用連接化學連接可盒化寡核苷酸序列時有用。在一些實施例中，在捕捉寡核苷酸內無具有其他功能之其他核苷酸序列中斷3或4個可盒化寡核苷酸序列之連接。

條碼序列組。提供條碼序列組，其包括至少64個不一致條碼序列，組中之每一條碼序列具有根據如本文所述任一條碼之結構。在條碼序列組中之任一個條碼序列之 n 個(例如，三個或更多個)可盒化寡核苷酸序列與條碼序列組中之任何其他條碼序列之 n' 個(例如，三個或更多個)可盒化寡核苷酸序列不完全重疊時，如本文所用條碼序列與組中之其他條碼序列「不一致」；可允許部分重疊(例如，至多 $n-1$ 個)，只要組中之每一條碼序列與組中之每一其他條碼序列相差最少1個可盒化寡核苷酸序列即可。在一些實施例中，條碼序列組可基本上由64、81、100、125、216、256、343、512、625、729、1000、1296、2401、4096、6561或10,000個條碼

序列組成。

雜交探針. 亦揭示雜交探針，其具有與可盒化寡核苷酸序列互補之寡核苷酸序列；及可檢測標記。可檢測標記可為例如螢光標記，例如但不限於螢光黃、青色素、玫瑰紅、苯基吡啶、香豆素或吡啶染料。一些非限制性實例包括Alexa Fluor染料，例如Alexa Fluor® 647、Alexa Fluor® 405、Alexa Fluor® 488；青色素染料，例如Cy® 5或Cy® 7；或如業內已知之任何適宜螢光標記。任何可區分螢光團組可經選擇存在於流入微流體環境中以供檢測條碼之雜交探針上，只要每種染料之螢光信號可檢測且可區分即可。或者，可檢測標記可為發光劑，例如螢光素酶報導基因、鐳系元素標籤或無機磷光體、量子點，其可為可調諧的且可包括半導體材料。可納入其他類型之可檢測標記，例如FRET標記，其可包括淬滅劑分子以及螢光團分子。FRET標記可包括暗淬滅劑，例如Black Hole Quencher® (Biosearch)；Iowa Black™或dabsyl。FRET標記可為以下中之任一者：TaqMan®探針、髮夾探針、Scorpion®探針、分子信標探針及諸如此類。

雜交條件之其他詳情闡述於下文中，且熟習此項技術者可確定適於獲得對多種條碼及其雜交探針對之結合特異性之該等條件之其他變化。

雜交探針. 提供雜交探針，其包括具有SEQ ID NO: 41至80中任一者之序列(見表1)之寡核苷酸序列；及可檢測標記。可檢測標記可為玫瑰紅、青色素或螢光黃螢光染料標記。在多個實施例中，雜交探針之寡核苷酸序列基本上由SEQ ID No. 41-80中任一者之一個序列組成，且不具有其他形成雜交探針之部分之核苷酸。

雜交試劑. 提供雜交試劑，包括複數個雜交探針，其中該複數個中之

每一雜交探針係如本文所述之雜交探針，且其中該複數個中之每一雜交探針(i) 包含與該複數個中之每一其他雜交探針之寡核苷酸序列不同之寡核苷酸序列，且(ii) 包含與該複數個中之每一其他雜交探針之可檢測標記在光譜上可區分之可檢測標記。亦揭示包含複數個(例如，2、3、4、5或更多個)雜交探針之試劑。雜交探針可為本文所揭示之任何雜交探針。該試劑可為液體，例如溶液。或者，該試劑可為固體，例如凍乾粉末。在以固體提供時，可添加適當體積水(或適宜溶液)之添加物以生成適於引入微流體裝置中之液體試劑。

在一些實施例中，複數個雜交探針由2-4個雜交探針組成。在複數個雜交探針之一些實施例中，該複數個中之第一雜交探針包括選自SEQ ID NO: 41-80之第一亞組之序列及第一可檢測標記；且該複數個中之第二雜交探針包括選自SEQ ID NO: 41-80之第二亞組之序列及與第一可檢測標記在光譜上可區分之第二可檢測標記，且其中SEQ ID NO: 41-80之第一及第二亞組係不重疊亞組。

第一雜交探針可包括包含SEQ ID NO: 41-80或其序列亞組中所述序列中之一者之全部或部分(例如，8至10個核苷酸)之序列。在某些實施例中，第一雜交探針可包括由SEQ ID NO: 41-80或其序列亞組中所述序列中之一者之全部或部分(例如，8至10個核苷酸)組成(或基本上由其組成)之序列。第二雜交探針可包括包含SEQ ID NO: 41-80或其序列亞組(例如，不包括存於第一雜交探針中之序列之亞組，或與自其選擇存於第一雜交探針中之序列之亞組不重疊之亞組)中所述序列中之一者之全部或部分(例如，8至10個核苷酸)之序列。在某些實施例中，第二雜交探針可包括由SEQ ID NO: 41-80或其序列亞組(例如，不包括存於第一雜交探針中之序

列之亞組，或與自其選擇存於第一雜交探針中之序列之亞組不重疊之亞組)中所述序列中之一者之全部或部分(例如，8至10個核苷酸)組成(或基本上由其組成)之序列。第三雜交探針(若存在)可包括包含SEQ ID NO: 41-80或其序列亞組(例如，不包括存於第一及第二雜交探針中之序列之亞組，或與自其選擇存於第一及第二雜交探針中之序列之亞組不重疊之亞組)中所述序列中之一者之全部或部分(例如，8至10個核苷酸)之序列。在某些實施例中，第三雜交探針(若存在)可包括由SEQ ID NO: 41-80或其序列亞組(例如，不包括存於第一及第二雜交探針中之序列之亞組，或與自其選擇存於第一及第二雜交探針中之序列之亞組不重疊之亞組)中所述序列中之一者之全部或部分(例如，8至10個核苷酸)組成(或基本上由其組成)之序列。第四雜交探針(若存在)可包括包含SEQ ID NO: 41-80或其序列亞組(例如，不包括存於第一、第二及第三雜交探針中之序列之亞組，或與自其選擇存於第一、第二及第三雜交探針中之序列之亞組不重疊之亞組)中所述序列中之一者之全部或部分(例如，8至10個核苷酸)之序列。在某些實施例中，第四雜交探針(若存在)可包括由SEQ ID NO: 41-80或其序列亞組(例如，不包括存於第一、第二及第三雜交探針中之序列之亞組，或與自其選擇存於第一、第二及第三雜交探針中之序列之亞組不重疊之亞組)中所述序列中之一者之全部或部分(例如，8至10個核苷酸)組成(或基本上由其組成)之序列。如對於熟習此項技術者將顯而易見，試劑可包括第五、第六等雜交探針，其可具有與第一、第二、第三及第四雜交探針類似之性質。

在一些實施例中，該複數個中之第三雜交探針可包括選自SEQ ID NO: 41-80之第三亞組之序列及與第一及第二可檢測標記中之每一者在光

譜上可區分之第三可檢測標記，其中SEQ ID NO: 41-80之第一、第二及第三亞組係不重疊亞組。

在其他實施例中，試劑可進一步包括該複數個中之第四雜交探針，其中第四雜交探針可包括選自SEQ ID NO: 41-80之第四亞組之序列及與第一、第二及第三可檢測標記中之每一者在光譜上可區分之第四可檢測標記，其中SEQ ID NO: 41-80之第一、第二、第三及第四亞組係不重疊亞組。

在雜交試劑之多個實施例中，SEQ ID NO: 41-80之每一亞組可包括至少10個序列。在雜交試劑之多個實施例中，第一亞組含有SEQ ID NO: 41-50，第二亞組含有SEQ ID NO: 51-60，第三亞組含有SEQ ID NO: 61-70，且第四亞組含有SEQ ID NO: 71-80。

套組. 提供用於檢測捕捉物體之條碼之可盒化寡核苷酸序列之套組，其中該套組包括如本文所述之複數種試劑，其中每種試劑之複數個雜交探針形成與該複數種中之每種其他試劑之雜交探針組不重疊之組。在一些實施例中，該套組可包括3、4、5、6、7、8、9或10種試劑。

原位識別捕捉物體之方法. 亦提供在微流體裝置內原位識別一或多個捕捉物體之方法，其中該方法包括：

將一或多個捕捉物體之單一捕捉物體佈置於位於微流體裝置外殼內之一或多個隔離圍欄之每一者中，其中每一捕捉物體具有複數個捕捉寡核苷酸，且其中該複數個中之每一捕捉寡核苷酸包括：啟動序列；捕捉序列；及條碼序列，其中條碼序列包括三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，每一可盒化寡核苷酸序列與條碼序列之其他可盒化寡核苷酸序列不一致；

使包括第一組雜交探針之第一試劑溶液流入微流體裝置外殼內之流

動區域中，其中流動區域流體連接至一或多個隔離圍欄中之每一者，且其中第一組之每一雜交探針具有與一或多個捕捉物體中任一者之任一捕捉寡核苷酸之任一條碼序列所包含可盒化寡核苷酸序列互補之寡核苷酸序列，其中第一組中每一雜交探針之互補寡核苷酸序列與第一組中雜交探針之每一其他互補寡核苷酸序列不一致；及選自一組在光譜上可區分之可檢測標記之可檢測標記，其中第一組中每一雜交探針之可檢測標記與第一組雜交探針中每一其他雜交探針之可檢測標記不同；

使第一組之雜交探針與一或多個捕捉物體之任一者中任一捕捉寡核苷酸之任一條碼序列中之相應可盒化寡核苷酸序列雜交；

針對第一組雜交探針之每一雜交探針，檢測與一或多個捕捉物體之任一者相關之相應可檢測信號；及

針對佈置於一或多個隔離圍欄之一者內之每一捕捉物體，生成記錄，包括(i) 隔離圍欄在微流體裝置外殼內之位置，及(ii) 第一組雜交探針中每一雜交探針之相應螢光信號與捕捉物體之相關性或非相關性，其中相關性及非相關性之記錄構成將捕捉物體與隔離圍欄相聯繫之條碼。

如此方法中所用一或多個捕捉物體可各自為如本文所述之任一捕捉物體。通常，所有條碼序列將具有相同數目之可盒化寡核苷酸序列，且特定捕捉物體所包含之複數個捕捉寡核苷酸之每一捕捉寡核苷酸將具有相同條碼序列。如上文所論述，每一條碼序列之三個或更多個可盒化寡核苷酸序列選自一組不一致可盒化寡核苷酸序列。該可盒化寡核苷酸序列組可例如包括12至100個(或更多個)不一致寡核苷酸序列。因此，該可盒化寡核苷酸序列組可包含之可盒化寡核苷酸序列數目大於在光譜上可區分之標記組中之在光譜上可區分之標記數目，該標記組可包括2或更多個(例如，2

至5個)在光譜上可區分之標記。

第一(或後續)組中之雜交探針數可與每一條碼序列中之可盒化寡核苷酸數相同。然而，該等數目並非必須相同。舉例而言，第一(或任何後續)組中之雜交探針數可大於每一條碼序列中之可盒化寡核苷酸數。

檢測每一雜交探針(或標記類別)包含識別第一組雜交探針中每一雜交探針(或標記)之可區分光譜特徵。此外，檢測給定雜交探針通常需要檢測超出與用於檢測可區分光譜特徵之系統(例如，光學元件串)相關之背景或臨限值之可區分光譜特徵值。在該識別後，可將檢測到之任何標記與可盒化寡核苷酸序列(與雜交探針之寡核苷酸序列互補)之存在相關聯。可檢測標記可為例如螢光標記，例如但不限於螢光黃、青色素、玫瑰紅、苯基吡啶、香豆素或吡啶染料。一些非限制性實例包括Alexa Fluor染料，例如Alexa Fluor® 647、Alexa Fluor® 405、Alexa Fluor® 488；青色素染料，例如Cy® 5或Cy® 7，或如業內已知之任何適宜螢光標記。任何可區分螢光團組可經選擇以存於流入微流體環境以供檢測條碼之雜交探針上，只要每一染料之螢光信號可檢測且可區分即可。或者，可檢測標記可為發光劑，例如螢光素酶報導基因、鏽系元素標籤或無機磷光體、量子點，其可為可調諧的且可包括半導體材料。可納入其他類型之可檢測標記，例如FRET標記，其可包括淬滅劑分子以及螢光團分子。FRET標記可包括暗淬滅劑，例如Black Hole Quencher® (Biosearch)；Iowa Black™或dabsyl。FRET標記可為以下中之任一者：TaqMan®探針、髮夾探針、Scorpion®探針、分子信標探針及諸如此類。

檢測及/或生成記錄可例如藉助控制器自動化。

原位識別方法可進一步包括使包含第n組雜交探針之第n種試劑溶液

流入微流體裝置之流動區域中，其中第 n 組之每一雜交探針可包括：與一或多個捕捉物體之任一者中任一捕捉寡核苷酸之任一條碼序列所包含可盒化寡核苷酸序列互補之寡核苷酸序列，其中第 n 組中每一雜交探針之互補寡核苷酸序列與第 n 組及流入微流體裝置流動區域中之任何其他組雜交探針中之雜交探針之每一其他互補寡核苷酸序列不一致；及選自一組在光譜上可區分之可檢測標記之可檢測標記，其中第 n 組中每一雜交探針之可檢測標記與第 n 組雜交探針中每一其他雜交探針之可檢測標記不同；

使第 n 組雜交探針與一或多個捕捉物體之任一者中任一捕捉寡核苷酸之任一條碼序列之相應可盒化寡核苷酸序列雜交；

針對第 n 組雜交探針之每一雜交探針，檢測與一或多個捕捉物體之任一者相關之相應可檢測信號；及

針對佈置於一或多個隔離圍欄中之一者內之每一捕捉物體，在記錄中補充第 n 組雜交探針之每一雜交探針之相應可檢測信號與捕捉物體之相關性或非相關性，其中 n 係一組值為 $\{2, \dots, m\}$ 之正整數，其中 m 係值為2或更大之正整數，且其中針對正整數組中 n 之每一值重複使第 n 種試劑流動、使第 n 組雜交探針雜交、檢測相應可檢測信號及補充記錄之前述步驟。

在多個實施例中， m 之值可大於或等於3且小於或等於20（例如，大於或等於5且小於或等於15）。在一些實施例中， m 之值可大於或等於8且小於或等於12（例如，10）。

在多個實施例中，使第一試劑溶液及/或第 n 種試劑溶液流入流動區域中可進一步包括允許第一試劑溶液及/或第 n 種試劑溶液藉由擴散至一或多個隔離圍欄中而平衡。

檢測與一或多個捕捉物體之任一者相關之相應螢光信號可進一步包

括：使不含雜交探針之清洗溶液流過微流體裝置之流動區域；及藉由使清洗溶液擴散至一或多個隔離圍欄中，由此容許第一組或任一第 n 組之未雜交的雜交探針擴散出一或多個隔離圍欄來平衡。在一些實施例中，使清洗溶液流動可在檢測螢光信號之前實施。

在原位檢測方法之一些實施例中，每一捕捉物體之每一捕捉寡核苷酸之每一條碼序列可包括三個可盒化寡核苷酸序列。在一些實施例中，第一組雜交探針及每一第 n 組之雜交探針可包括3個雜交探針。

在原位檢測方法之多個實施例中，每一捕捉物體之每一捕捉寡核苷酸之每一條碼序列可包括4個可盒化寡核苷酸序列。在一些實施例中，第一組雜交探針及每一第 n 組之雜交探針包含4個雜交探針。

佈置一或多個捕捉物體中之每一者可包括將一或多個捕捉物體中之每一者佈置於微流體裝置內之一或多個隔離圍欄之分離區域內。

在一些實施例中，該方法可進一步包括將一或多個生物細胞佈置於微流體裝置之一或多個隔離圍欄內。在一些實施例中，可將一或多個生物細胞中之每一者佈置於一或多個隔離圍欄之不同圍欄中。可將一或多個生物細胞佈置於微流體裝置之一或多個隔離圍欄之分離區域內。在該方法之一些實施例中，可將一或多個生物細胞之至少一者佈置於隔離圍欄內，該隔離圍欄中已佈置一或多個捕捉物體中之一者。在一些實施例中，一或多個生物細胞可為來自純系群體之複數個生物細胞。在該方法之多個實施例中，佈置一或多個生物細胞可在佈置一或多個捕捉物體之前實施。

在原位檢測方法之多個實施例中，微流體裝置之外殼可進一步包括介電泳(DEP)構形，且將一或多個捕捉物體佈置於一或多個隔離圍欄中可使用介電泳(DEP)力實施。在原位檢測方法之多個實施例中，微流體裝置

之外殼可進一步包括介電泳(DEP)構形，且將一或多個生物細胞佈置於一或多個隔離圍欄內可使用介電泳(DEP)力實施。微流體裝置可為本文所揭示之任一微流體裝置。舉例而言，微流體裝置可包含至少一個經塗佈表面(例如，共價鍵結表面)。至少一個經塗佈表面可包含親水或帶負電荷經塗佈表面。

在原位識別方法之多個實施例中，每一捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之至少一者可進一步包括藉由捕捉序列捕捉至其之靶核酸。

轉向圖7A，為了更好地理解在微流體裝置內原位識別捕捉物體之方法，顯示捕捉物體430之示意圖，其具有包括如本文所述條碼之捕捉寡核苷酸，使其暴露於包括如本文所述可檢測標記之雜交探針440a之流中。在探針440a與其捕捉寡核苷酸之靶可盒化寡核苷酸締合後，在捕捉寡核苷酸長度上形成雜交之探針:可盒化寡核苷酸序列755。此產生沿捕捉物體之至少一部分捕捉寡核苷酸具有多個雜交之探針:可盒化寡核苷酸對之捕捉物體730。圖7B顯示微流體裝置內之微流體通道之照片，該通道具有離開通道開口之隔離圍欄，其中捕捉物體(在此照片中未見到)已佈置於隔離圍欄內。另外，儘管在向所有三個通道長度開口之圍欄內都可見捕捉物體，僅置於最底部通道長度處之隔離圍欄內之捕捉物體具有包括探針440a之靶可盒化寡核苷酸之條碼。向最上部通道或中間通道開口之隔離圍欄中之捕捉物體在其各別捕捉寡核苷酸(其係探針440a之雜交靶)上不具有可盒化寡核苷酸。照片顯示包括雜交探針440a之試劑流流過流動通道且擴散至隔離圍欄中時之時間點。探針之可檢測標記之螢光在整個流動通道中及在隔離圍欄內可見。在允許試劑流動約20 min後，如本文所述實施不具有雜交探針440a之清洗流動。圖7B顯示在清洗流動完成後，在適於激發探針440a之

可檢測標記之螢光激發下之相同視野。見到離開最底部通道開口之隔離圍欄中之捕捉物體730，自與其雜交之雜交探針440a提供可檢測信號。亦見到，離開最上部及中間通道長度開口之隔離圍欄內之其他類別之捕捉物體在螢光照射下不可見。此闡釋使用雜交探針實施識別，微流體裝置內僅特異性及選擇性識別靶可盒化寡核苷酸序列。

圖8A-8C顯示可如何使用在此實例中具有4種不同雜交探針之試劑之多重化及多個流來識別微流體裝置之隔離圍欄內每一捕捉物體之每一條碼。圖8A顯示檢測所圖示4個隔離圍欄(圍欄編號84、圍欄編號12、圍欄編號126及圍欄編號260)中每一者之條碼之示意性代表圖，每一圍欄具有存於其內之捕捉物體。每一捕捉物體具有包括4個可盒化寡核苷酸序列之唯一條碼。圍欄編號84中之捕捉物體具有以下序列之條碼：GGGGGCCCCCTTTTTTTTTTCCGGCCGGCCAAAAATTTTT (SEQ ID NO. 89)。圍欄編號12中之捕捉物體具有以下序列之條碼：AAAAAAAAAATTTTTTTTTTGGGGGGGGGGGGCCCCCCCCCCC (SEQ ID NO. 90)。圍欄編號126中之捕捉物體具有以下序列之條碼：GGGGGCCCCCTTAATTAATTCCGGCCGGCCAAAAATTTTT (SEQ ID 91)。圍欄編號260中之捕捉物體具有以下序列之條碼：GGGGGCCCCCTTTTTTTTTTGGGGGGGGGGGGCCCCCCCCCCC (SEQ ID No. 92)。

第一試劑流820包括4個具有如下序列及可檢測標記之雜交探針：第一探針440a-1，其具有序列TTTTTTTTTT (SEQ ID 85) (對於此圖示說明，序列之選擇僅用於解釋，且不代表與多T之捕捉序列組合使用之探針序列)，具有選自一組4個可區分標記之第一可檢測標記(表示為具有圖案1

之圓形)；第二探針440b-1，其具有序列AAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO. 86)，具有選自可區分標記組之第二可檢測標記(表示為具有圖案2之圓形)；第三探針440c-1，其具有序列CCCCCCCCCCC (SEQ ID No. 87)及選自可區分標記組之第三可檢測標記(表示為具有圖案3之圓形)；及第四探針440d-1，其具有序列GGGGGGGGGGG (SEQ ID NO. 88)及選自可區分標記組之第四可檢測標記(表示為具有圖案4之圓形)。

在允許第一流810擴散至隔離圍欄中且探針已與存於任一條碼中之任何靶可盒化寡核苷酸序列雜交後，實施用無探針介質沖洗以移除未雜交探針，同時將已雜交探針保持就位。此係藉由使用不解離雜交之探針與其靶之對之介質(例如使用DPBS或Duplex緩衝液)來完成，如下文在實驗部分中所述。在沖洗含有過量未雜交探針之介質後，用適當激發波長激發允許檢測探針上仍與其靶雜交之可檢測標記。在此實例中，觀察到對於圍欄編號84，觀察到第二可區分檢測之波長之信號，且無其他信號。此由圍欄編號84旁邊之圖案化圓形標示，指示在流1 (810)中觀察到圖案2。對於圍欄編號12，觀察到所有4個可區分檢測波長中之信號，且由相應圖案1-4標示。對於圍欄編號126，未觀察到可檢測信號，且遵循該圖之圓形如此標示。最後，圍欄編號260，3個探針440b-1、440c-1及440d-1結合，且使所觀察到之可檢測信號之標示顯示圖案2、3及4。

可見，並非檢測到所有可盒化寡核苷酸序列，故隨後實施第二流815，如圖8B中所示。第二流含有4個不一致探針：探針440a-2，其具有序列CCCCCGGGGG (SEQ ID NO. 93)及可區分標記組之可檢測標記1(表示為圖案1)；第二探針440b-2，其具有序列AATTAATTAA (SEQ ID No. 94)，具有組中之可檢測標記2(表示為圖案2)；第三探針440c-2，其

具有序列GGCCGGCCGG (SEQ ID No. 95)，具有組中之第三可檢測標記(表示為圖案3)；及第四探針440d-2，其具有序列TTTTTAAAAA (SSEQ ID No. 96)及組中之第四可檢測標記(表示為圖案4)。

實施相同過程使試劑流2 (815)流動，允許擴散及結合，沖洗未雜交探針且隨後在4個可區分波長之每一者中檢測。如圖8B中所示，圍欄編號12不具有可檢測信號，此乃因第二流中之探針皆未經構形以與其中之任何可盒化序列雜交。此外，圍欄編號12中之捕捉物體之條碼之所有可盒化序列皆已檢測。另外，在該等方法中，應注意，在檢測到可檢測標記波長通道之一者中之信號時，可盒化序列經選擇以僅具有每一可檢測信號之一者且將無重複。後續流中該通道中之可檢測信號可忽視，此乃因已檢測到結合條碼之該可盒化寡核苷酸序列之探針。在一些情況下，可在後續流中見到信號，但該信號係來自較早流之仍保持與條碼序列雜交之探針之結果，而非結合至可盒化寡核苷酸序列之新流試劑之結果。

回到來自檢測第二流815之分析，注意到圍欄編號84中之捕捉物體在第一、第三及第四可檢測信號波長通道中具有信號，且由第一、第三及第四圖案標示。圍欄編號126中之捕捉物體具有所有4個探針結合，故由第一、第二、第三及第四圖案標示。圍欄編號260中之捕捉物體標示為在第一可檢測標記信號波長通道中具有信號，且由第一圖案標示。可如在圖8C中將第一流810、第二流815、第三流820等至第x流895之結果製表，直至可盒化序列之整個參照組皆已用相應雜交探針測試為止。

可如圖所示衍生特定隔離圍欄中捕捉物體上之每一條碼的序列，從而將所檢測信號圖案與每一可盒化寡核苷酸之互補序列相匹配，此乃因已知雜交探針之序列。隨後可如圖所示分配捕捉物體之序列，其中圍欄編號

12中之捕捉物體之條碼藉由原位檢測方法測定為具有SEQ ID NO. 90之序列；圍欄編號84中之捕捉物體之條碼具有SEQ ID NO. 89之序列；圍欄編號126中之捕捉物體之條碼具有SEQ ID No. 91之序列，且圍欄編號260中之捕捉物體之條碼具有SEQ ID NO. 92之序列。

圖8D-F圖解說明另一實驗，其顯示沿條碼序列同時雜交並檢測多個探針之能力。在此實驗中，用於所用雜交探針上之染料係Alexa Fluor® 647 (在Cy®5通道(例如檢測濾波器將檢測Cy®5染料，但亦可檢測Alexa Fluor® 647染料)中可檢測)及Alexa Fluor® 594 (在德克薩斯紅通道(亦可檢測Alexa Fluor® 594之檢測濾波器)中可檢測)。在此實驗中，使複數個皆具有相同的兩個彼此毗鄰位於條碼序列內之可盒化寡核苷酸序列之捕捉物體流入微流體裝置800內之微流體通道120中，且不試圖將其佈置於隔離圍欄中。然後製備一流，其包括具有結合捕捉物體之條碼之第一可盒化寡核苷酸之序列的第一雜交探針及Alexa Fluor® 594染料。該流亦含有具有結合捕捉物體之條碼之第二可盒化寡核苷酸之序列的第二雜交探針及Alexa Fluor 647®染料。在允許擴散後，雜交並沖洗以移除未雜交探針。

圖8D、8E及8F各自顯示不同波長區域之檢測通道(濾波器)。圖8D顯示德克薩斯紅檢測通道，暴露200 ms，且已激發並檢測捕捉物體830。此確認第一雜交探針之Alexa Fluor® 594標記存在(例如，結合至條碼之可盒化寡核苷酸序列)。圖8E顯示微流體裝置通道120內之相同視圖，且係Cy®5檢測通道，暴露800ms，其檢測結合至捕捉物體之Alexa Fluor 647標記。此通道中亦可檢測捕捉物體830，從而確認第二雜交探針與第一雜交探針同時結合至捕捉物體830，且兩個信號皆可檢測。圖8F係FITC檢測(濾波器)通道中之相同視圖，暴露2000 ms，其中未見到來自通道中捕捉

物體之信號。此實驗顯示在不損失檢測特異性之情況下雜交並列螢光探針之能力。

在多個實施例中，所用可檢測標記可包括Alexa Fluor® 647，其係在用於激發、觀察並記錄微流體裝置內之事件之光學系統之Cy®5螢光通道中檢測；Alexa Fluor® 405，其可在光學系統之Dapi螢光通道中檢測；Alexa Fluor® 488，其可在光學系統之FITC螢光通道中檢測；及Alexa Fluor® 594，其可在光學系統之德克薩斯紅螢光通道中檢測。螢光團可附接至如適於合成之雜交探針且可在探針之5'或3'末端。發現兩個探針(一個在5'末端標記且一個在3'末端標記)之雜交不受毗鄰標記(資料未顯示)之存在的影響。

使基因體資料與微流體裝置中之細胞相關聯之方法。 提供用於使基因體資料與微流體裝置中之生物細胞相關聯之方法，其包括：

將捕捉物體(其可為單一捕捉物體)佈置於微流體裝置之隔離圍欄中，其中捕捉物體包括複數個捕捉寡核苷酸，其中該複數個中之每一捕捉寡核苷酸包括：啟動序列；捕捉序列；及條碼序列，其中條碼序列包括三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，每一可盒化寡核苷酸序列與條碼序列之其他可盒化寡核苷酸序列不一致；且其中該複數個中之每一捕捉寡核苷酸包括相同條碼序列；

原位識別複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列並記錄所識別條碼序列與隔離圍欄之間之相關性(即，識別捕捉物體在微流體裝置內之位置)；

將生物細胞佈置於隔離圍欄中；

裂解生物細胞並使自經裂解生物細胞釋放之核酸可被捕捉物體包含之複數個捕捉寡核苷酸捕捉；

轉錄(例如，反轉錄)所捕捉核酸，由此產生複數個(其可為庫)經轉錄核酸，每一經轉錄核酸包括共價連接至一個捕捉寡核苷酸之互補的所捕捉核酸序列；

對經轉錄核酸及條碼序列進行測序，由此獲得與條碼序列之讀段序列相關之複數個經轉錄核酸之讀段序列；

基於讀段序列識別條碼序列；及

使用讀段序列識別之條碼序列及原位識別之條碼序列使複數個經轉錄核酸之讀段序列與隔離圍欄相聯繫，且由此使複數個經轉錄核酸之讀段序列與置於隔離圍欄中之生物細胞相關聯。

在一些實施例中，可將單一生物細胞佈置於隔離圍欄中且經歷上述方法。或者，可將多於一個生物細胞(例如，一組兩個或更多個來自相同純系細胞群體之生物細胞)佈置於隔離圍欄內並經歷上述方法。

前述方法中之佈置捕捉物體、識別捕捉物體之條碼、佈置生物細胞、裂解/轉錄/測序、及基於讀段序列識別條碼序列可按其書寫順序或按其他順序實施，限制條件係該等活動之順序之重排不違反邏輯順序(例如，在裂解前轉錄等等)。作為實例，條碼序列之原位識別可在將生物細胞引入隔離圍欄中之後、在裂解生物細胞之後、或在轉錄所捕捉核酸之後實施。同樣，將捕捉物體引入隔離圍欄中之步驟可在將至少一個生物細胞引入隔離圍欄中之後實施。

在多個實施例中，使基因體資料與生物細胞相關聯之方法可進一步包括觀察生物細胞之表型；及使複數個經轉錄核酸之讀段序列與生物細胞之表型相關聯。該方法可另外包括觀察生物細胞之表型，其中生物細胞代表純系群體；及使複數個經轉錄核酸之讀段序列與生物細胞之表型及純系

群體相關聯。在一些實施例中，觀察生物細胞之表型可包括觀察至少一個生物細胞之至少一個物理特徵。在其他實施例中，觀察生物細胞之表型可包括對生物細胞實施分析及觀察在分析期間生成之可檢測信號。在一些實施例中，該分析可為蛋白質表現分析。

舉例而言，觀察生物細胞之表型可包括觀察在生物細胞與分析試劑相互作用時生成之可檢測信號。可檢測信號可為螢光信號。或者，分析可基於可檢測信號之缺乏。可實施以提供關於生物細胞之表型之可檢測信號識別觀察之分析之其他實例可參見以下文獻之揭示內容：WO2015/061497 (Hobbs等人)；US2015/0165436 (Chapman等人)；及國際申請案第PCT/US2017/027795號(Lionberger等人)，其揭示內容係各自全文以引用方式併入本文中。

在多個實施例中，原位識別複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列及記錄所識別條碼序列與隔離圍欄之間之相關性可在將生物細胞佈置於隔離圍欄中之前實施。在一些其他實施例中，原位識別複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列及記錄所識別條碼序列與隔離圍欄之間之相關性可在將生物細胞引入隔離圍欄中之後實施。

在其他實施例中，佈置捕捉物體及視情況原位識別複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列及記錄所識別條碼序列與隔離圍欄之間之相關性可在觀察生物細胞之表型之後實施。在一些實施例中，原位識別複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列及記錄所識別條碼序列與隔離圍欄之間之相關性可在裂解生物細胞並容許捕捉物體所包含之複數個捕捉寡核苷酸捕捉自所裂解生物細胞釋放之核酸之後實施。在多個實施例中，原位識別複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列可包括實施如本文所述方法之任何變化形式。在將基因體資料

與微流體裝置中之生物細胞相關聯之方法之多個實施例中，捕捉物體可為如本文所述之任何捕捉物體。

在該方法之多個實施例中，微流體裝置之外殼可包括介電泳(DEP)構形，且將捕捉物體佈置於隔離圍欄中可包括使用介電泳(DEP)力移動捕捉物體。在該方法之一些其他實施例中，微流體裝置之外殼可進一步包括介電泳(DEP)構形，且將生物細胞佈置於隔離圍欄內可包括使用介電泳(DEP)力移動生物細胞。

在將基因體資料與微流體裝置中之生物細胞相關聯之方法之多個實施例中，該方法可進一步包括：將複數個捕捉物體佈置於微流體裝置之相應複數個隔離圍欄中(例如，此可包括每個隔離圍欄佈置單一捕捉物體)；將複數個生物細胞佈置於相應複數個隔離圍欄中，及根據該方法之其他步驟處理複數個捕捉物體及複數個生物細胞中之每一者。

產生核酸庫之套組. 亦提供用於產生核酸庫之套組，其包括：包含外殼之微流體裝置，其中外殼包括流動區域及複數個離開流動區域開口之隔離圍欄；及複數個捕捉物體，其中該複數個中之每一捕捉物體包括複數個捕捉寡核苷酸，該複數個中每一捕捉寡核苷酸包括：捕捉序列；及包含至少三個可盒化寡核苷酸序列之條碼序列，其中條碼序列之每一可盒化寡核苷酸序列與條碼序列之其他可盒化寡核苷酸序列不一致，且其中該複數個中之每一捕捉寡核苷酸包含相同條碼序列。

該複數個中之每一捕捉寡核苷酸可包括至少2個可盒化寡核苷酸序列(例如，3、4、5或更多個可盒化寡核苷酸序列)。可盒化寡核苷酸序列可如本文中別處所述。舉例而言，可盒化寡核苷酸序列可選自一組不一致可盒化寡核苷酸序列。該組可包括12或更多個(例如，12至100個)不一致可

盒化寡核苷酸序列。

微流體裝置可為如本文所述之任一微流體裝置。在多個實施例中，微流體裝置之外殼可進一步包括介電泳(DEP)構形。

在用於產生核酸庫之套組之多個實施例中，複數個捕捉物體可為如本文所述之任何複數個捕捉物體。在一些實施例中，複數個捕捉物體可各自單獨佈置於複數個中之相應隔離圍欄中。

在用於產生核酸庫之套組之多個實施例中，套組可進一步包括識別表，其中識別表將複數個捕捉物體中每一者之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列與複數個中之相應隔離圍欄相關聯。

在用於產生核酸庫之套組之多個實施例中，套組可進一步包括：複數個雜交探針，其中每一雜交探針包括：與複數個捕捉物體中任一者之複數個捕捉寡核苷酸之任一可盒化寡核苷酸序列互補之寡核苷酸序列；及標記，其中該複數個中之每一雜交探針之互補序列與不同可盒化寡核苷酸序列互補；且其中該複數個中之每一雜交探針之標記選自一組在光譜上可區分之標記。在多個實施例中，該複數個中之雜交探針之每一互補序列可包括包含SEQ ID NO: 41至80中任一者之序列之寡核苷酸序列。在多個實施例中，標記可為螢光標記。

用於產生捕捉物體之方法。亦提供用於產生具有複數個捕捉寡核苷酸之捕捉物體之方法，其包括：將複數個捕捉寡核苷酸中之每一者化學連接至捕捉物體，其中該複數個中之每一捕捉寡核苷酸包括：結合至引子之啟動序列；捕捉序列(例如，經構形以與靶核酸雜交)；及條碼序列，其中條碼序列包括三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，每一可盒化寡核苷酸序列與條碼序列之其他可盒化寡核苷酸序列不一致；且其中該複數個中之每一

捕捉寡核苷酸包含相同條碼序列。

在多個實施例中，捕捉物體可為珠粒。舉例而言，捕捉物體可為具有核心之珠粒(或類似物體)，該核心包括順磁性材料、聚合材料及/或玻璃。聚合材料可為聚苯乙烯或任何其他可經官能化以連接捕捉寡核苷酸之塑膠材料。捕捉物體之核心材料可經塗佈以提供適於將連接體附接至捕捉寡核苷酸之材料，其可包括官能化聚合物，但其他配置亦係可能的。

在多個實施例中，連接可包括將複數個捕捉寡核苷酸中之每一者共價連接至捕捉物體。或者，可將複數個捕捉寡核苷酸中之每一者非共價連接至珠粒，其可係經由鏈黴抗生物素蛋白/生物素連接來進行。條碼化珠粒可以如業內已知之任何適宜方式來合成。啟動序列/獨特分子標識符標籤/細胞條碼/引子序列可藉由全寡核苷酸合成、分開/合併合成、連接任何長度之寡核苷酸區段或其任一組合來合成。

複數個中之每一捕捉寡核苷酸可包括5'-最末端核苷酸及3'-最末端核苷酸，其中啟動序列可毗鄰或包含5'-最末端核苷酸，其中捕捉序列可毗鄰或包含3'-最末端核苷酸，且其中條碼序列可位於啟動序列之3'及捕捉序列之5'處。

在多個實施例中，每一條碼序列之三個或更多個可盒化寡核苷酸序列可串聯連接，無任何介入寡核苷酸序列。在一些其他實施例中，一或多個可盒化寡核苷酸可經由一個或兩個中間核苷酸連接至另一可盒化寡核苷酸序列以允許經由連接化學來連接。

在多個實施例中，該方法可進一步包括：經由分開/合併合成將三個或更多個可盒化寡核苷酸序列中之每一者引入複數個中之捕捉寡核苷酸中。

在產生捕捉物體之方法之多個實施例中，每一可盒化寡核苷酸序列可包括約6至15個核苷酸，且可包括約10個核苷酸。

在多個實施例中，該方法可進一步包括：自一組12至100個不一致可盒化寡核苷酸序列選擇每一條碼序列之三個或更多個可盒化寡核苷酸序列中之每一者。在一些實施例中，該方法可包括自SEQ ID NO: 1-40選擇每一條碼序列之三個或更多個可盒化寡核苷酸序列中之每一者。

在一些實施例中，細胞相關條碼序列可包括4個可盒化寡核苷酸序列。在多個實施例中，該方法可包括：自SEQ ID NO: 1-10中之任一者選擇第一可盒化寡核苷酸序列；自SEQ ID NO: 11- 20中之任一者選擇第二可盒化寡核苷酸序列；自SEQ ID NO: 21-30中之任一者選擇第三可盒化寡核苷酸序列；及自SEQ ID NO: 31-40中之任一者選擇第四可盒化寡核苷酸序列。

在產生捕捉物體之方法之多個實施例中，在啟動序列自該捕捉寡核苷酸分離時啟動DNA聚合酶。在一些實施例中，DNA聚合酶係反轉錄酶。在一些實施例中，啟動序列包含P7或P5引子之序列。

在一些實施例中，該方法可進一步包括：將獨特分子標識符(UMI)序列引入複數個中之每一捕捉寡核苷酸中，使得該複數個中之每一捕捉寡核苷酸包括不同UMI。UMI可為包含5至20個核苷酸(例如，8至15個核苷酸)之寡核苷酸序列。

在產生捕捉物體之方法之多個實施例中，捕捉序列可包括多-dT序列、隨機六聚體或鑲嵌末端序列。

在產生捕捉物體之方法之多個實施例中，該方法可進一步包括：將引子序列引入複數個中之每一捕捉寡核苷酸中，在捕捉寡核苷酸之5'末端

附近引入；及將捕捉序列引入複數個中之每一捕捉寡核苷酸中，在捕捉寡核苷酸之3'末端附近引入。在一些實施例中，該方法可進一步包括：在引入啟動序列之後及在引入捕捉序列之前，將條碼序列引入複數個中之每一捕捉寡核苷酸中。

在一些實施例中，該方法可進一步包括：在引入啟動序列之後及在引入捕捉序列之前，將UMI引入複數個中之每一捕捉寡核苷酸中。在其他實施例中，該方法可進一步包括：將包含NotI限制位點之序列引入複數個中之每一捕捉寡核苷酸中。在一些實施例中，該方法可進一步包括：在引入條碼序列之後及在引入捕捉序列之前，引入包含NotI限制位點之序列。

在產生捕捉物體之方法之多個實施例中，該方法可進一步包括：將一或多個接頭序列引入複數個中之每一捕捉寡核苷酸中。

生成測序庫之方法. 基於本文所述工作流程，可製備多個測序庫，其將允許將基因體資料與來源細胞之位置以及針對該細胞觀察到之表型資訊相關聯。此處所顯示方法針對最終用途藉由合成化學Illumina®測序加以調整，但並不限於此。任何分類之測序化學可適用於該等方法內且可包括乳液PCR、藉由合成測序、焦磷酸測序及半導體檢測。熟習此項技術者可調整該等方法以及捕捉寡核苷酸及相關接頭、引子及諸如此類之構築以在其他大量平行測序平臺及化學(例如PacBio長讀取系統(SMRT, Pacific Biosystems)、Ion Torrent (ThermoFisher Scientific)、Roche 454、Oxford Nanopore及諸如此類)中使用該等方法。

RNA捕捉及庫製備. 亦提供用於自生物細胞提供條碼化cDNA庫之方法，其包括：將生物細胞佈置在位於微流體裝置之外殼內之隔離圍欄內；

將捕捉物體佈置在隔離圍欄內，其中捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，該複數個中每一捕捉寡核苷酸包括：啟動序列；捕捉序列；及條碼序列，其中條碼序列包含三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，每一可盒化寡核苷酸序列與條碼序列之每一其他可盒化寡核苷酸序列不一致；裂解生物細胞並使自經裂解生物細胞釋放之核酸可被捕捉物體包含之複數個捕捉寡核苷酸捕捉；及

轉錄所捕捉核酸，由此產生裝飾捕捉物體之複數個條碼化cDNA，每一條碼化cDNA包含(i) 與所捕捉核酸之相應寡核苷酸序列互補之寡核苷酸序列，其共價連接至(ii) 該複數個捕捉寡核苷酸之一。捕捉物體可為單一捕捉物體。自經裂解生物細胞釋放之核酸可由捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸中每一者之捕捉序列捕捉。在一些實施例中，轉錄可包括反轉錄。捕捉物體及/或生物細胞可例如佈置於隔離圍欄之分離區域內。

在一些實施例中，生物細胞可為免疫細胞，例如T細胞、B細胞、NK細胞、巨噬細胞及諸如此類。在一些實施例中，生物細胞可為癌細胞，例如黑色素瘤癌細胞、乳癌細胞、神經癌細胞等。在其他實施例中，生物細胞可為幹細胞(例如，胚胎幹細胞、誘導多潛能(iPS)幹細胞等)或先驅細胞。在其他實施例中，生物細胞可為胚胎(例如，合子、2至200個細胞胚胎、囊胚等)。在多個實施例中，生物細胞可為單一生物細胞。或者，生物細胞可為複數個生物細胞，例如純系群體。

在多個實施例中，佈置生物細胞可進一步包括標記生物細胞(例如，用核酸標記物標記，例如Dapi或赫斯特染色(Hoechst stain))。

捕捉物體可為如本文所述之任何捕捉物體。

在一些實施例中，複數個捕捉寡核苷酸中一或多者(可為每一者)之捕

捉序列可包括寡-dT 引子序列。在其他實施例中，複數個捕捉寡核苷酸中一或多者(例如每一者)之捕捉序列可包括基因特異性引子序列。在一些實施例中，基因特異性引子序列可靶向(或可結合至)編碼T細胞受體(TCR)之mRNA序列(例如TCR α 鏈或TCR β 鏈，尤其編碼一可變區之mRNA區域或位於3'但靠近該可變區之mRNA區域)。在其他實施例中，基因特異性引子序列可靶向(或可結合至)編碼B細胞受體(BCR)之mRNA序列(例如BCR輕鏈或BCR重鏈，尤其編碼一可變區之mRNA區域或位於3'但靠近該可變區之mRNA區域)。

在多個實施例中，複數個捕捉寡核苷酸中一或多者(例如所有或實質上所有)之捕捉序列可結合至所釋放核酸中之一者並啟動所釋放核酸，由此容許聚合酶(例如反轉錄酶)轉錄所捕捉核酸。

在多個實施例中，捕捉物體可包括磁性組分(例如磁性珠粒)。或者，捕捉物體可為非磁性。

在一些實施例中，將生物細胞佈置於隔離圍欄內可在將捕捉物體佈置於隔離圍欄內之前實施。在一些實施例中，將捕捉物體佈置於隔離圍欄內可在將生物細胞佈置於隔離圍欄內之前實施。

在多個實施例中，該方法可進一步包括：在捕捉物體位於隔離圍欄內時，原位識別捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列。識別條碼可使用如本文所述任何識別條碼之方法實施。在多個實施例中，識別條碼序列可在裂解生物細胞之前實施。

在一些實施例中，微流體裝置之外殼可包括至少一個經塗佈表面。經塗佈表面可經Tris及/或聚合物(例如PEG-PPG嵌段共聚物)塗佈。在其他實施例中，微流體裝置之外殼可包括至少一個條件化表面。

該至少一個條件化表面可包括共價鍵結之親水部分或帶負電荷部分。共價鍵結之親水部分或帶負電荷部分可為親水或帶負電荷聚合物。

在多個實施例中，微流體裝置之外殼可進一步包括介電泳(DEP)構形。佈置生物細胞及/或佈置捕捉物體可藉由在生物細胞及/或捕捉物體上或其附近施加介電泳(DEP)力來實施。

微流體裝置可進一步包括複數個隔離圍欄。在多個實施例中，該方法可進一步包括將複數個生物細胞佈置於複數個隔離圍欄內。在多個實施例中，複數個生物細胞可為純系群體。在多個實施例中，將複數個生物細胞佈置於複數個隔離圍欄內可包括將複數個生物細胞中之實質上僅一個生物細胞佈置於複數個隔離圍欄中之相應隔離圍欄內。因此，複數個中之佈置有生物細胞之每一隔離圍欄通常將含有單一生物細胞。舉例而言，少於10%、7%、5%、3%或1%之經佔據隔離圍欄可含有多於一個生物細胞。

在多個實施例中，該方法可進一步包括：將複數個捕捉物體佈置於複數個隔離圍欄內。在一些實施例中，將複數個捕捉物體佈置於複數個隔離圍欄內可包括將實質上僅一個捕捉物體佈置於複數個隔離圍欄中之相應隔離圍欄內。在一些實施例中，將複數個捕捉物體佈置於複數個隔離圍欄內可在裂解生物細胞或複數個生物細胞之前實施。複數個捕捉物體可為如本文所述之任何複數個捕捉物體。

在多個實施例中，該方法可進一步包括：自微流體裝置輸出捕捉物體或複數個捕捉物體。在一些實施例中，一或多個捕捉物體係cDNA裝飾之捕捉物體。在一些實施例中，輸出複數個捕捉物體可包括個別地(即，一次一個地)輸出複數個捕捉物體中之每一者。在多個實施例中，該方法可進一步包括：將該複數個中之每一捕捉物體遞送至微流體裝置外部之單

獨目標容器。

在多個實施例中，以下中之一或多者可以自動化方式實施：佈置生物細胞或複數個生物細胞；佈置捕捉物體或複數個捕捉物體；裂解生物細胞或複數個生物細胞並容許捕捉自經裂解之生物細胞或複數個生物細胞釋放之核酸；轉錄；及原位識別捕捉物體或複數個中之每一捕捉物體之條碼序列(若實施)。

亦提供用於提供條碼化測序庫之方法，其包括：擴增藉由本文所述任一方法獲得之捕捉物體之cDNA庫或複數個捕捉物體中每一者之cDNA庫；及標籤化經擴增之DNA庫或複數個cDNA庫，由此產生一個或複數個條碼化測序庫。在多個實施例中，擴增cDNA庫或複數個cDNA庫可包括引入庫索引序列，其中庫索引序列包含4至10個核苷酸。在其他實施例中，該方法可進一步包括組合複數個條碼化測序庫，其中該複數個中之每一條碼化測序庫包含不同條碼序列及/或不同庫索引序列。

可藉由轉向圖9更全面地理解自所釋放核酸(例如RNA)獲得cDNA之過程，圖9係該過程之示意性代表圖。對於細胞分離及細胞裂解盒902，可將生物細胞410置於微流體裝置內之隔離圍欄內。可將可經構形為本文所述任何捕捉物體之捕捉物體930佈置於相同隔離圍欄中，此可在將細胞410佈置於隔離圍欄中之前或之後實施。細胞410可使用裂解細胞410之外層細胞膜但不裂解核膜之裂解試劑來裂解，如下文實例中所述。經裂解細胞410'自此過程獲得並釋放核酸905，例如RNA。捕捉物體930之捕捉寡核苷酸包括具有序列 5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT (SEQ ID NO. 104)之啟動序列520及可如本文所述任一條碼經構形之條碼序列525。捕捉物體

930之捕捉寡核苷酸可視情況包括UMI 530。捕捉物體930之捕捉寡核苷酸包括捕捉序列，其在此情形中包括多T序列，該多T序列可捕捉在其3'末端具有多A序列之所釋放核酸905。捕捉序列535捕捉所釋放核酸905。在細胞及分子條碼化盒904及反轉錄盒906中，捕捉寡核苷酸係在存在模板轉換寡核苷酸915的同時自所釋放核酸905反轉錄，該模板轉換寡核苷酸915具有序列 /5Me-isodC//isodG//iMe-isodC/ACACTCTTTCCCTACACGACGCrGrGrG (SEQ ID NO. 103)。識別條碼912可使用本文所述任一方法在RNA捕捉至條碼化珠粒之前、在將捕捉至珠粒之RNA反轉錄之前、或在將珠粒上之RNA反轉錄之後實施。在一些實施例中，識別細胞特異性條碼可在將捕捉至珠粒之RNA反轉錄之後實施。在反轉錄及原位識別捕捉物體之條碼二者已達成後，自微流體裝置輸出cDNA裝飾之捕捉物體。可同時輸出複數個cDNA捕捉物體且使用具有序列5'-/5Biosg/ACACTCTTTCCCT ACACGACGC-3' (SEQ ID NO. 105)之擴增引子實施合併及cDNA擴增盒912 (產生DNA擴增子92)。然後對經擴增DNA 920實施轉接、定大小及檢索盒916。此包括單側式標籤化盒914，其片段化DNA以將DNA 925定大小並插入標籤化接頭942。儘管本文闡釋標籤化，但此過程亦可藉由酶片段化來實施，例如使用片段化酶(NEB, Kapa)，之後進行末端修復。

盒0916中亦包括庫檢索盒(Pool Indexing box) 918，其中引子935a及935b作用於標籤化DNA 940。針對標籤化接頭942之第一引子935a引入具有以下序列之P7測序接頭932：

5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-3 (SESQ ID NO. 107)；

且亦引入可選庫索引934。具有序列

(5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACAC GACGCTCTTC C*G*A*T*C*T-3 (SEQ ID No. 106)之第二引子935b具有針對啟動序列520之部分且引入P5測序接頭序列936。經定大小、標引及調整之測序庫950可在測序盒922中經測序，其中第一測序讀段955（序列讀段起始點讀取條碼525及可選UMI 539。第二測序讀段960讀取庫索引934。第三測序讀段965讀取DNA庫本身內期望數目之bp，以生成基因體讀段。

圖10A-10D係根據本發明之一實施例裂解外層細胞膜且隨後進行RNA捕捉之過程之一實施例之照片代表圖。圖10A顯示明視野影像，其顯示裂解之前之捕捉物體430及細胞430，各自佈置於微流體裝置1000內之隔離圍欄內。圖10B顯示在裂解前之同一時間點來自完整細胞410之DAPI染色核之螢光。圖10C顯示裂解完成後捕捉物體930及剩餘未裂解核410'之明視野影像。圖10D顯示在裂解後與圖10C相同之時間點之螢光影像，其顯示來自未破裂核410'之DAPI螢光，其顯示該核係完整的。

圖11A係處理如圖9中所示自捕捉RNA獲得之cDNA之示意性代表圖，其係在微流體環境外部實施，包括cDNA擴增盒912、單側式標籤化盒914、庫檢索盒918及測序盒922，以及一些品質分析。圖11B中顯示經擴增DNA 920之cDNA擴增盒912之後之QC，顯示具有大量大小為700至遠超過1000 bp之產物之粒徑分佈。在標籤化步驟完成後，條碼化庫中所得片段之粒徑分佈顯示於圖11C中，且在300-800 bp內，其對於藉由合成方案測序係最佳的。藉由Qubit量測之定量顯示，約1.160 ng/微升之條碼化DNA樣品係自單細胞獲得。對於測序運行，且合併來自約100個單細胞之個別條碼化之材料以實施測序運行，從而提供約100個單細胞中每一者

之測序資料。

此工作流程亦可藉由處理上文獲得之條碼化cDNA調整至PacBio庫製備(SMRT系統，Pacific Biosystems)，且可將SMRTbell接頭直接連接至全長條碼化轉錄物。

DNA捕捉及測序庫之生成. 亦提供用於自生物微小物體提供條碼化基因體DNA庫之方法，其包括：將包含基因體DNA之生物微小物體佈置於位於微流體裝置之外殼內之隔離圍欄內；使生物微小物體與能破裂生物微小物體之核膜之裂解試劑接觸，由此釋放生物微小物體之基因體DNA；使所釋放基因體DNA標籤化，由此產生複數個標籤化基因體DNA片段，該等片段具有由第一標籤化插入序列界定之第一末端及由第二標籤化插入序列界定之第二末端；將捕捉物體佈置在隔離圍欄內，其中捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，該複數個中之每一捕捉寡核苷酸包含：第一啟動序列；第一標籤化插入捕捉序列；及條碼序列，其中條碼序列包含三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，每一可盒化寡核苷酸序列與條碼序列之每一其他可盒化寡核苷酸序列不一致；使複數個標籤化基因體DNA片段中之多者與以下接觸：(i) 捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸中之多者之第一標籤化插入捕捉序列，(ii) 擴增寡核苷酸，其包含連接至第二標籤化插入捕捉序列之第二啟動序列、隨機化引子序列或基因特異性引子序列，及(iii) 包含鏈置換酶及聚合酶之酶混合物；將經接觸複數個標籤化基因體DNA片段培育一段時間，由此同時擴增複數個標籤化基因體DNA片段中之多者並將捕捉寡核苷酸及擴增寡核苷酸添加至複數個標籤化基因體DNA片段中之多者之末端，以產生條碼化基因體DNA庫；及自微流體裝置輸出條碼化基因體DNA庫。

在一些實施例中，基因體DNA可包括粒線體DNA。

在多個實施例中，可在標籤化步驟之前或之後將捕捉物體置於隔離圍欄中。在多個實施例中，培育可在等溫條件(例如，約30°C至約45°C，通常約37°C)下實施。

輸出可包括容許經擴增基因體DNA自隔離圍欄擴散至該隔離圍欄所連接之流動區域(例如，通道)中，隨後使介質(例如，擴增緩衝液、輸出緩衝液或諸如此類)流過流動區域，流出微流體裝置，且流入適當容器(例如，孔板之孔、管，例如微量離心管或諸如此類)。

在一些實施例中，將生物微小物體佈置於隔離圍欄內可在將捕捉物體佈置於隔離圍欄內之前實施。

在一些實施例中，生物微小物體可為生物細胞。在其他實施例中，生物微小物體可為生物細胞(例如，真核細胞)之核。

在一些實施例中，生物細胞係免疫細胞(例如，T細胞、B細胞、NK細胞、巨噬細胞等)。在一些實施例中，生物細胞可為癌細胞(例如，黑色素瘤細胞、乳癌細胞、神經癌細胞等)。

在一些實施例中，裂解試劑可包括至少一種核糖核酸酶抑制劑。

在多個實施例中，標籤化可包括使所釋放基因體DNA與加載有以下之轉位酶接觸：(i) 第一雙鏈DNA片段，其包含第一標籤化插入序列，及(ii) 第二雙鏈DNA片段，其包含第二標籤化插入序列。在一些實施例中，第一雙鏈DNA片段可包括連接至第三啟動序列之第一鑲嵌末端序列，且第二雙鏈DNA片段可包括連接至第四啟動序列之第二鑲嵌末端序列。

在一些實施例中，捕捉物體之每一捕捉寡核苷酸之第一標籤化插入捕捉序列可包括與第一標籤化插入序列至少部分(或在一些實施例中，其

可為完全)互補之序列。在一些實施例中，擴增寡核苷酸之第二標籤化插入捕捉序列包含與第二標籤化插入序列至少部分(或在一些實施例中，其可為完全)互補之序列。舉例而言，每一捕捉寡核苷酸之第一標籤化插入捕捉序列可與第一鑲嵌末端序列及/或第一標籤化插入序列之第三啟動序列至少部分(例如，完全)互補。在其他實施例中，擴增寡核苷酸之第二標籤化插入捕捉序列可與第二鑲嵌末端序列及/或第二標籤化插入序列之第四啟動序列至少部分(例如，完全)互補。

在多個實施例中，捕捉物體可為如本文所述之任何捕捉物體。在一些實施例中，捕捉物體可包括磁性組分(例如，磁性珠粒)。或者，捕捉物體可為非磁性。

在提供條碼化基因體DNA庫之方法之多個實施例中，該方法可進一步包括：在捕捉物體位於隔離圍欄內時，原位識別捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列。在一些實施例中，識別條碼序列可使用如本文所述之任何方法來實施。在一些其他實施例中，識別條碼序列係在裂解生物細胞之前實施。或者，識別條碼序列可在使所釋放基因體DNA標籤化之前或在輸出條碼化基因體DNA庫之後實施。

在一些實施例中，微流體裝置之外殼可包括至少一個經塗佈表面。經塗佈表面可經Tris及/或聚合物(例如PEG-PPG嵌段共聚物)塗佈。在一些其他實施例中，微流體裝置之外殼包含至少一個條件化表面。如技術方案141之方法，其中至少一個條件化表面包含共價鍵結之親水部分或帶負電荷部分。在一些實施例中，共價鍵結之親水或帶負電荷部分可為親水或帶負電荷聚合物。

在多個實施例中，微流體裝置之外殼可進一步包括介電泳(DEP)構

形，且佈置生物微小物體及/或佈置捕捉物體可藉由在生物細胞及/或捕捉物體上或其附近施加介電泳(DEP)力來實施。

在一些實施例中，微流體裝置可進一步包括複數個隔離圍欄。在多個實施例中，該方法可進一步包括將複數個生物微小物體佈置於複數個隔離圍欄內。在一些實施例中，將複數個生物微小物體佈置於複數個隔離圍欄內可包括將複數個生物微小物體中之實質上僅一個生物微小物體佈置於複數個隔離圍欄中之相應隔離圍欄中。

因此，複數個隔離圍欄中佈置有生物微小物體之每一隔離圍欄通常將含有單一生物微小物體。舉例而言，少於10%、7%、5%、3%或1%之經佔據隔離圍欄可含有多於一個生物微小物體。在一些實施例中，複數個生物微小物體可為生物細胞之純系群體。

在多個實施例中，該方法可進一步包括：將複數個捕捉物體佈置於複數個隔離圍欄內。在一些實施例中，將複數個捕捉物體佈置於複數個隔離圍欄內可包括將實質上僅一個捕捉物體佈置於複數個隔離圍欄中之相應隔離圍欄內。在其他實施例中，將複數個捕捉物體佈置於複數個隔離圍欄內可在裂解生物微小物體或複數個生物微小物體之前實施。

在一些實施例中，複數個捕捉物體可為如本文所述之任何複數個捕捉物體。

在多個實施例中，對於含有複數個生物微小物體中之一者之每一隔離圍欄，標籤化、接觸及培育步驟可實質上同時實施。

在一些實施例中，以下中之一或多者可以自動化方式實施：佈置生物微小物體或複數個生物微小物體；佈置捕捉物體或複數個捕捉物體；裂解生物微小物體或複數個生物微小物體且容許捕捉自經裂解之生物細胞或

複數個生物細胞釋放之核酸；使所釋放基因體DNA標籤化；接觸複數個標籤化基因體DNA片段中之多個；培育經接觸複數個標籤化基因體DNA片段；輸出條碼化基因體DNA庫或複數個DNA庫；及原位識別捕捉物體或複數個捕捉物體中之每一者之條碼序列。

在一些實施例中，該方法可進一步包括：自微流體裝置輸出捕捉物體或複數個捕捉物體。輸出複數個捕捉物體可包括個別地輸出複數個捕捉物體中之每一者。在一些實施例中，該方法可進一步包括：將該複數個中之每一捕捉物體遞送至微流體裝置外部之單獨目標容器。

該等方法可藉由轉向圖12A-G及下文實例3及4更好地理解。圖12A-12F圖解說明用於獲得如本文所述之具有原位可檢測條碼之測序庫之工作流程。將生物細胞410佈置於微流體裝置內向微流體通道(未顯示)開口之隔離圍欄405內(圖12A)。細胞經裂解以破裂細胞膜以及核膜二者，並釋放基因體DNA 1220，如圖12B中。圖12C圖解說明下一過程標籤化，其用於產生具有適當大小之片段並插入標籤，從而提供允許捕捉及擴增之標籤化DNA 1225。在圖12D中，將具有複數個捕捉寡核苷酸捕捉物體1230引入含有標籤化DNA 1225之圍欄405中。複數個捕捉寡核苷酸各自包括原位可檢測條碼、啟動序列及捕捉序列。在圖12E中，使用重組酶/聚合酶擴增使標籤化DNA 1225經歷等溫擴增，其中捕捉寡核苷酸之捕捉序列在重組酶/聚合酶機構存在下將標籤化DNA引領並引導(捕捉物體1230')至所提供經擴增DNA 1235，其包括測序接頭、條碼及可選索引，例如UMI或庫索引。在整個擴增期間及此後，經擴增經調整之條碼化DNA 1235擴散出隔離圍欄405並擴散至隔離圍欄向其開口之微流體通道122中，且使用流體介質流242自微流體裝置輸出(圖12F)。在輸出後，對經擴增經調整之

條碼化DNA 1235進行定量用作測序庫，且可與其他庫合併用於測序運行。在輸出DNA 1235完成後，原位測定捕捉物體1230之捕捉寡核苷酸之條碼係使用本文所述任一方法來實施(圖12F)。

圖12G顯示自細胞DNA生成測序庫之方法中之捕捉寡核苷酸及DNA處理之示意性代表圖。捕捉物體1230之每一捕捉寡核苷酸經由連接體1215共價或非共價連接，且自捕捉寡核苷酸之5'末端包括：啟動序列/接頭1240；條碼1245、可選UMI 1250及捕捉序列1255，該捕捉序列1255具有標籤化插入捕捉序列且可捕捉(例如，引領並引導)鑲嵌末端插入序列。條碼序列1245可為如本文所述含有至少三個可盒化寡核苷酸序列之任何條碼序列。標籤化DNA 1225具有標籤化插入序列1255 (其可為鑲嵌末端序列插入物)及DNA片段1260。其在等溫重組酶聚合酶驅動之擴增期間藉由具有P5接頭/啟動序列1270、可選庫索引1265及標籤化插入捕捉序列1255之一般引子1275啟動。或者，可使用基因特異性引子1275'，其中引導引子1261之一部分以選擇DNA亞組，例如基因特異性序列。

形成測序庫之等溫擴增之產物係經擴增及調整之DNA 1280或1280'。經擴增及調整之DNA 1280係一般引子1275之產物，且包括DNA片段1260之一般庫，而經擴增DNA 1280'具有DNA片段區1262 (藉由基因特異性啟動序列啟動之基因特異性DNA之其餘部分)加上1261(基因特異性啟動序列)，其包括基因特異性擴增產物。

自相同細胞生成條碼化cDNA庫及條碼化基因體DNA庫. 亦提供用於自單一生物細胞提供條碼化cDNA庫及條碼化基因體DNA庫之方法，其包括：將生物細胞佈置在位於微流體裝置之外殼內之隔離圍欄內；將第一捕捉物體佈置於隔離圍欄內，其中第一捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，

該複數個中之每一捕捉寡核苷酸包含：第一啟動序列；第一捕捉序列(例如，經構形以捕捉所釋放核酸)；及第一條碼序列，其中第一條碼序列包含三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，每一可盒化寡核苷酸序列與第一條碼序列之每一其他可盒化寡核苷酸序列不一致；藉由實施如本文所述任何獲得cDNA庫之方法來獲得條碼化cDNA庫，其中實施裂解生物細胞使得生物細胞之質膜降解，自生物細胞釋放細胞質RNA，同時生物細胞之核膜保持完整，由此提供經來自生物細胞RNA之條碼化cDNA庫裝飾之第一捕捉物體；自微流體裝置輸出cDNA庫裝飾之第一捕捉物體；將第二捕捉物體佈置於隔離圍欄內，其中第二捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，各自包括：第二啟動序列；第一標籤化插入捕捉序列；及第二條碼序列，其中第二條碼序列包含三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，每一可盒化寡核苷酸序列與第二條碼序列之每一其他可盒化寡核苷酸序列不一致；藉由實施如本文所述獲得條碼化基因體DNA庫之任一方法來獲得條碼化基因體DNA庫，其中使來自生物細胞之複數個標籤化基因體DNA片段與第二捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸中之多者之第一標籤化插入捕捉序列接觸，由此自生物細胞之基因體DNA提供條碼化基因體DNA庫；及自微流體裝置輸出條碼化基因體DNA庫。

在一些實施例中，該方法可進一步包括：識別第一捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列。在一些實施例中，識別第一捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列可在將生物細胞佈置於隔離圍欄中之前；自生物細胞RNA獲得條碼化cDNA庫之前；或自微流體裝置輸出條碼化cDNA庫裝飾之第一捕捉物體之前實施。在一些實施例中，該方法可進一步包括：識別第二捕捉物體之複數個寡核苷酸之條碼序列。

在多個實施例中，識別第二捕捉之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列可在獲得條碼化基因體DNA庫之前或自微流體裝置輸出條碼化基因體DNA庫之後實施。

在多個實施例中，識別第一或第二捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列可使用如本文所述原位識別條碼之任何方法來實施。

在多個實施例中，第一捕捉物體及第二捕捉物體可各自為如本文所述之任何捕捉物體。

在一些實施例中，第一捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之第一啟動序列可與第二捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之第二啟動序列不同。在其他實施例中，第一捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之第一捕捉序列可與第二捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之第一標籤化插入捕捉序列不同。

在多個實施例中，第一捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列可與第二捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列相同。在其他實施例中，第一捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列可與第二捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列不同。

B細胞受體測序庫之生成.

提供用於提供條碼化B細胞受體(BCR)測序庫之方法，其包括：自B淋巴球生成條碼化cDNA庫，其中該生成係根據如本文所述生成條碼化cDNA庫之任何方法來實施，其中條碼化cDNA庫裝飾包括複數個捕捉寡核苷酸之捕捉物體，該複數個中之每一捕捉寡核苷酸包括Not1限制位點序列；擴增條碼化cDNA庫；自條碼化cDNA庫選擇條碼化BCR序列，由此產生富含條碼化BCR序列之庫；使來自富含條碼化BCR序列之庫之序列環化，由此產生環化條碼化BCR序列之庫；使環化條碼化BCR序列之

庫再線性化以提供重排條碼化**BCR**序列之庫，每一重排條碼化**BCR**序列將**BCR**序列3'之恆定(C)區呈遞至各別可變(V)子區及/或各別多變(D)子區；及添加測序接頭並對V子區及/或D子區進行次選擇，由此產生條碼化**BCR**測序庫。

在多個實施例中，該方法可進一步包括擴增**BCR**測序庫以提供條碼化**BCR**子區序列之經擴增庫。在一些實施例中，擴增條碼化cDNA庫可使用通用引子來實施。

在一些實施例中，選擇**BCR**序列區可包括實施對**BCR**序列具有選擇性之聚合酶鏈式反應(PCR)，由此產生條碼化**BCR**區域選擇性擴增DNA之庫。在一些實施例中，選擇條碼化**BCR**序列可進一步包括添加至少一個測序引子序列及/或至少一個索引序列。在多個實施例中，使來自富含條碼化**BCR**序列之庫之序列環化可包括將每一條碼化**BCR**序列之5'末端連接至其各別3'末端。在多個實施例中，使環化條碼化**BCR**序列之庫再線性化可包括在NotI限制位點消化環化條碼化**BCR**序列之每一庫。

在其他實施例中，添加測序接頭及對V及/或D子區進行次選擇可包括實施PCR，由此添加測序接頭並對V及/或D子區進行次選擇。

在一些其他實施例中，捕捉物體係如本文所述之任何捕捉物體。

在多個實施例中，該方法可進一步包括：使用如本文所述原位識別條碼之任何方法識別捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列。在一些實施例中，識別可在擴增條碼化cDNA庫之前實施。在其他實施例中，識別可在生成條碼化cDNA庫的同時實施。

在多個實施例中，以下中之任一者可在位於微流體裝置之外殼內之隔離圍欄內實施：擴增條碼化cDNA庫；實施對條碼化**BCR**序列具有選擇

性之聚合酶鏈式反應(PCR)；使序列環化；在NotI限制位點使環化條碼化BCR序列之庫再線性化；及添加測序接頭並對V及/或D子區進行次選擇。

可藉由轉向圖13A-B更好地理解用於生成B細胞受體(BCR)測序庫之方法。圖13A-B係生成如本文及實例7中所述之BCR測序庫之過程之示意性代表圖。捕捉物體1330包括珠粒1310，為清晰起見僅顯示複數個捕捉寡核苷酸之一個捕捉寡核苷酸。捕捉物體1330之捕捉寡核苷酸經由連接體1315連接至珠粒1310，該連接可為共價或非共價連接。連接體1315連接至捕捉寡核苷酸之5'末端，其中啟動序列1 (1320)沿捕捉寡核苷酸之長度定位。捕捉寡核苷酸亦包括條碼1325，其可為如本文所述之任何原位可檢測條碼；可選UMI 1335；測序接頭序列1340；NotI限制位點序列及捕捉序列1350，該捕捉序列1350在此實例中係用於RNA之一般捕捉序列，多T (其可在3'末端具有兩個額外核苷酸VN)。NotI序列1345位於捕捉序列1350之5'且位於條碼1325、啟動序列1320、測序接頭1340及任何UMI 1335之3'。捕捉寡核苷酸經構形以捕捉RNA 505，該RNA 505具有目標RNA序列1301 (並非多A序列1350')，係在來源細胞之細胞膜裂解後釋放。藉由使RNA之多A序列1350'與捕捉物體之多T捕捉序列1350雜交來將RNA捕捉至捕捉物體，由此形成經改性捕捉物體1330'。反轉錄盒1365在模板轉換寡核苷酸1306存在下提供cDNA裝飾之捕捉物體，其中捕捉寡核苷酸現在含有反轉錄核酸1355之一區域。經由PCR使用針對啟動序列1 (1320)且針對納入cDNA中之模板轉換寡核苷酸1307之部分之一般引子1311、1312 (見表6，SEQ ID NO. 113)擴增cDNA提供經擴增DNA庫1370。選擇PCR 1375使用引子1302 (其具有針對DNA 1370之啟動序列1(1320)之序列1320；可選庫索引1305及測序啟動序列2 (1304))及BCR選

擇性引子1303，其僅對BCR序列具有選擇性且為物種特異性。BCR選擇性引子1303可為引子混合物，其可靶向重鏈或輕鏈區域(1356)。參見表6，SEQ ID No. 114-150)。產物選擇之DNA 1380具有如上文針對擴增1370之產物所列示之啟動序列、UMI、條碼序列，但DNA片段現在僅含有BCR區域1357，其中BCR區域1357之5'最末端區域係BCR之全長恆定(C)子區1351，之後係接合(J)區1352 (若在所研究物種中存在)；多變(D)子區1353且最終至3'末端可變(V)區1354。

為使更受關注之BCR子區(V、D、J)更適用於測序分析，實施重排。經由連接使所選DNA 1380環化，以產生圖13B中之環化DNA庫1385。隨後在Not1限制位點1345 (黑色箭頭)消化環化DNA庫1385，以產生再線性化DNA庫1390。環化及再線性化之效應係使更受關注之BCR子區(V、D、J)更靠近測序啟動位點，使得可達成更高品質讀段。在再線性化DNA庫1390中，5'至3'之BCR子區序列順序已逆轉，且可變(V)區1354現在朝向所有BCR子區之5'末端佈置，之後在3'方向上按順序為多變(D)子區1353；接合(J)區1352 (若在所研究物種中存在)；及最終在BCR區域序列1357之3'最末端部分之BCR之全長恆定(C)子區1351。

隨後實施次選擇PCR 1394，其中朝向恆定(C)子區之序列1351'引導引子1308 (包括引子序列1360及選擇區域1351'')。序列135'經選擇靠近C子區之5'末端以切除大部分C子區。此產生次選擇之DNA庫1395，其亦已添加啟動序列1360。次選擇之BCR區域現在藉由使其與測序啟動位點更佳地並置及藉由以下方式允許更高品質讀段及讀段長度進入V、D及J區：1) 完全移除多T序列1350，及2) 移除BCR C子區之大部分區域。測序1396係在次選擇之DNA庫1395之後實施，且產生條碼1325及可選UMI

1335之第一讀段。測序1392讀取可選庫索引。測序1393及1397讀取次選擇之BCR 1357’。

用於生成測序庫之任何方法亦可藉由將兩個或更多個捕捉物體引入隔離圍欄來實施。兩個或更多個捕捉物體可各自具有兩個或更多個捕捉寡核苷酸，該等捕捉寡核苷酸具有包括一或多個如上文所述可盒化亞單元之細胞相關條碼以及啟動序列。在一些實施例中，兩個或更多個捕捉物體可各自具有相同條碼。在一些其他實施例中，在將兩個或更多個捕捉物體引入相同圍欄時，每一捕捉物體可具有不同細胞相關條碼。在其他實施例中，兩個或更多個捕捉物體可各自具有相同細胞相關條碼。使用多於一個捕捉物體可允許更大的核酸捕捉能力。本文所述原位識別方法可易於擴展至識別一個隔離圍欄內之兩個或更多個捕捉物體。

微流體裝置及用於操作及觀察該等裝置之系統。 圖1A圖解說明微流體裝置100及系統150之實例，其可用於維持、分離、分析或培養生物微小物體。顯示微流體裝置100之透視圖，部分切除其蓋110以提供微流體裝置100內部之部分視圖。微流體裝置100通常包含微流體迴路120，其包含流動路徑106，流體介質180可流過該流動路徑106，視情況攜載一或多個微小物體(未顯示)至微流體迴路120中及/或通過微流體迴路120。儘管圖1A中圖解說明單一微流體迴路120，但適宜微流體裝置可包括複數個(例如，2個或3個)該等微流體迴路。無論如何，微流體裝置100可經構形為奈米流體裝置。如圖1A中所圖解說明，微流體迴路120可包括複數個微流體隔離圍欄124、126、128及130，其中每一隔離圍欄可具有一或多個與流動路徑106流體連通之開口。在圖1A裝置之一些實施例中，隔離圍欄可僅具有與流動路徑106流體連通之單一開口。如下文進一步論述，微流

體隔離圍欄包含多個特徵及結構，其已經最佳化用於即使在介質180流過流動路徑106時亦將微小物體保持在微流體裝置(例如微流體裝置100)中之。然而，在轉向前述內容之前，提供微流體裝置100及系統150之簡單說明。

如圖1A大體圖解說明，微流體迴路120係由外殼102來界定。儘管外殼102可在物理上以不同構形結構化，在圖1A中所示之實例中，將外殼102繪示為包含支撐結構104（例如，基底）、微流體迴路結構108及蓋110。支撐結構104、微流體迴路結構108及蓋110可附接至彼此。舉例而言，微流體迴路結構108可佈置於支撐結構104之內表面109上，且蓋110可佈置於微流體迴路結構108上方。微流體迴路結構108可與支撐結構104及蓋110一起界定微流體迴路120之元件。

支撐結構104可在微流體迴路120之底部且蓋110在微流體迴路120之頂部，如圖1A中所圖解說明。或者，支撐結構104及蓋110可以其他定向經構形。舉例而言，支撐結構104可在微流體迴路120之頂部且蓋110在微流體迴路120之底部。無論如何，可存在一或多個埠107，各自包含進入或離開外殼102之通路。通路之實例包括閥、閘、通孔或諸如此類。如圖解說明，埠107係由微流體迴路結構108中之間隙產生之通孔。然而，埠107可位於外殼102之其他組件中，例如蓋110中。圖1A中僅圖解說明一個埠107，但微流體迴路120可具有兩個或更多個埠107。舉例而言，可存在用作入口供流體進入微流體迴路120之第一埠107，且可存在用作出口供流體離開微流體迴路120之第二埠107。埠107用作入口或出口可取決於流體流過流動路徑106之方向。

支撐結構104可包含一或多個電極(未顯示)及基板或複數個互聯基

板。舉例而言，支撐結構104可包含一或多個半導體基板，其各自電連接至電極(例如，半導體基板之所有或亞組可電連接至單一電極)。支撐結構104可進一步包含印刷電路板總成(「PCBA」)。舉例而言，半導體基板可安裝在PCBA上。

微流體迴路結構108可界定微流體迴路120之迴路元件。該等迴路元件可包含在微流體迴路120經流體填充時可流體互聯之空間或區域，例如流動區域(其可包括或係一或多個流動通道)、腔室、圍欄、阱及諸如此類。在圖1A中圖解說明之微流體迴路120中，微流體迴路結構108包含框架114及微流體迴路材料116。框架114可部分或完全封閉微流體迴路材料116。框架114可為例如大體上圍繞微流體迴路材料116之相對剛性結構。舉例而言，框架114可包含金屬材料。

微流體迴路材料116可經空腔或諸如此類圖案化以界定微流體迴路120之迴路元件及互聯。微流體迴路材料116可包含撓性材料，例如撓性聚合物(例如橡膠、塑膠、彈性體、聚矽氧、聚二甲基矽氧烷(「PDMS」)或諸如此類)，其可為透氣性。可構成微流體迴路材料116之材料之其他實例包括模製玻璃、可蝕刻材料(例如聚矽氧(例如可光圖案化聚矽氧或「PPS」))、光阻劑(例如，SU8)或諸如此類。在一些實施例中，該等材料、且因此微流體迴路材料116可為剛性及/或實質上不透氣。無論如何，微流體迴路材料116可佈置於支撐結構104上及框架114內部。

蓋110可為框架114及/或微流體迴路材料116之整體部件。或者，蓋110可為結構上分離之元件，如圖1A中所圖解說明。蓋110可包含與框架114及/或微流體迴路材料116相同或不同之材料。類似地，支撐結構104可為如圖解說明與框架114或微流體迴路材料116分離之機構，或框架114或

微流體迴路材料116之整體部件。同樣，框架114及微流體迴路材料116可為如圖1A中所示之分離結構或相同結構之整體部分。

在一些實施例中，蓋110可包含剛性材料。剛性材料可為玻璃或具有類似性質之材料。在一些實施例中，蓋110可包含可變形材料。可變形材料可為聚合物，例如PDMS。在一些實施例中，蓋110可包含剛性及可變形材料二者。舉例而言，蓋110之一或多個部分(例如，定位於隔離圍欄124、126、128、130上方之一或多個部分)可包含與蓋110之剛性材料介接之可變形材料。在一些實施例中，蓋110可進一步包括一或多個電極。一或多個電極可包含導電氧化物，例如銦-錫-氧化物(ITO)，可將其塗佈於玻璃或類似絕緣材料上。或者，一或多個電極可為撓性電極，例如單壁奈米管、多壁奈米管、奈米線、導電奈米顆粒簇或其組合，其包埋於可變形材料(例如聚合物(例如，PDMS))中。可用於微流體裝置中之撓性電極已闡述於例如U.S. 2012/0325665 (Chiou等人)中，其內容係以引用方式併入本文中。在一些實施例中，蓋110可經改性(例如，藉由使向內面向微流體迴路120之全部或部分表面條件化)以支持細胞黏著、存活及/或生長。該改性可包括塗佈合成或天然聚合物。在一些實施例中，蓋110及/或支撐結構104可對光透明。蓋110亦可包括至少一種透氣性材料(例如，PDMS或PPS)。

圖1A亦顯示用於操作及控制微流體裝置(例如微流體裝置100)之系統150。系統150包括電源192、成像裝置及傾斜裝置190 (傾斜模組166之部分)。

電源192可向微流體裝置100及/或傾斜裝置190提供電力，從而視需要提供偏置電壓或電流。電源192可例如包含一或多個交流電(AC)及/或直

流電(DC)電壓或電流來源。成像裝置(下文所論述成像模組164之部分)可包含用於捕捉微流體迴路120內部影像之裝置，例如數位照相機。在一些情況下，成像裝置進一步包含有高幀率及/或高靈敏度(例如用於低光應用)之檢測器具。成像裝置亦可包括用於將刺激輻射及/或光束引導至微流體迴路120中並收集自微流體迴路120 (或其中所含之微小物體)反射或發射之輻射及/或光束之機構。所發射光束可在可見光譜中且可例如包括螢光發射。反射光束可包括源自LED或寬譜燈(例如汞燈(例如高壓汞燈)或氬弧燈之反射發射。如關於圖3B所論述，成像裝置可進一步包括可包括或可不包括目鏡之顯微鏡(或光學元件串)。

系統150進一步包含傾斜裝置190 (下文所論述傾斜模組166之部分)，其經構形以使微流體裝置100繞一或多個旋轉軸旋轉。在一些實施例中，傾斜裝置190經構形以繞至少一個軸支撐及/或固持包含微流體迴路120之外殼102，使得微流體裝置100 (且因此微流體迴路120)可按水平定向(即相對於x-軸及y-軸為0°)、垂直定向(及相對於x-軸及/或y-軸為90°)或其之間之任何定向來固持。微流體裝置100 (及微流體迴路120)相對於軸之定向在本文中稱為微流體裝置100 (及微流體迴路120)之「傾斜」。舉例而言，傾斜裝置190可使微流體裝置100相對於x-軸以0.1°、0.2°、0.3°、0.4°、0.5°、0.6°、0.7°、0.8°、0.9°、1°、2°、3°、4°、5°、10°、15°、20°、25°、30°、35°、40°、45°、50°、55°、60°、65°、70°、75°、80°、90°或其之間之任何角度傾斜。水平定向(及因此x-軸及y-軸)定義為法向於依照重力所界定之垂直軸。傾斜裝置亦可使微流體裝置100 (及微流體迴路120)相對於x-軸及/或y-軸傾斜至大於90°之任何角度，或使微流體裝置100 (及微流體迴路120) 相對於x-軸或y-軸傾斜180°以完全倒置微

流體裝置100 (及微流體迴路120)。類似地，在一些實施例中，傾斜裝置190使微流體裝置100 (及微流體迴路120)繞由流動路徑106或微流體迴路120之另外某一部分界定之旋轉軸傾斜。

在一些情況下，使微流體裝置100傾斜至垂直定向，使得流動路徑106定位於一或多個隔離圍欄之上方或下方。如本文所用術語「在……上方」表示，在依照重力界定之垂直軸上，流動路徑106定位高於一或多個隔離圍欄(即在流動路徑106上方之隔離圍欄中之物體之重力勢能可高於流動路徑中之物體)。如本文所用術語「在……下方」表示，在依照重力界定之垂直軸上，流動路徑106定位低於一或多個隔離圍欄(即在流動路徑106下方之隔離圍欄中之物體之重力勢能低於流動路徑中之物體)。

在一些情況下，傾斜裝置190使微流體裝置100繞平行於流動路徑106之軸傾斜。此外，可使微流體裝置100傾斜至小於90°之角度，使得流動路徑106位於一或多個隔離圍欄上方或下方，而不位於隔離圍欄之正上方或正下方。在其他情況下，傾斜裝置190使微流體裝置100繞垂直於流動路徑106之軸傾斜。在其他情況下，傾斜裝置190使微流體裝置100繞既不平行於也不垂直於流動路徑106之軸傾斜。

系統150可進一步包括介質來源178。介質來源178 (例如，容器、儲存器或諸如此類)可包含多個部分或容器，各自用於容納不同流體介質180。因此，介質來源178可為在微流體裝置100外部且與其分離之裝置，如圖1A中所圖解說明。或者，介質來源178可全部或部分位於微流體裝置100之外殼102內部。舉例而言，介質來源178可包含係微流體裝置100之部分之儲存器。

圖1A亦圖解說明控制及監測設備152之實例之簡化方塊圖繪示，其

構成系統150之部分且可結合微流體裝置100使用。如圖所示，該控制及監測設備152之實例包括主控制器154，其包含：介質模組160，用於控制介質來源178；動力模組162，用於控制微流體迴路120中微小物體(未顯示)及/或介質(例如，介質微滴)之移動及/或選擇；成像模組164，用於控制用於捕捉影像(例如，數位影像)之成像裝置(例如，照相機、顯微鏡、光源或其任一組合)；及傾斜模組166，用於控制傾斜裝置190。控制設備152亦可包括其他模組168，用於控制、監測或實施關於微流體裝置100之其他功能。如圖所示，設備152可進一步包括顯示裝置170及輸入/輸出裝置172。

主控制器154可包含控制模組156及數位記憶體158。控制模組156可包含例如數位處理器，其經構形以根據在記憶體158中儲存為非暫時性資料或信號之機器可執行指令(例如，軟體、韌體、原始碼或諸如此類)來操作。或者或另外，控制模組156可包含固線式數位電路及/或模擬電路。介質模組160、動力模組162、成像模組164、傾斜模組166及/或其他模組168可經類似構形。因此，如關於微流體裝置100或任何其他微流體器具實施之本文所述過程之功能、過程動作、作用或步驟可藉由如上文所論述經構形之主控制器154、介質模組160、動力模組162、成像模組164、傾斜模組166及/或其他模組168中之任何一或多者來實施。類似地，主控制器154、介質模組160、動力模組162、成像模組164、傾斜模組166及/或其他模組168可通訊耦連以傳送並接收本文所論述任何功能、過程、動作、作用或步驟中所用之資料。

介質模組160控制介質來源178。舉例而言，介質模組160可控制介質來源178以將所選流體介質180輸入外殼102 (例如，經由入口埠107)中。

介質模組160亦可控制自外殼102 (例如，經由出口埠(未顯示))移除介質。由此可將一或多種介質選擇性輸入微流體迴路120中並自其移除。介質模組160亦可控制流體介質180在微流體迴路120內部之流動路徑106中之流動。舉例而言，在一些實施例中，介質模組160停止介質180在流動路徑106中及穿過外殼102之流動，之後傾斜模組166引起傾斜裝置190使微流體裝置100傾斜至期望傾斜角度。

動力模組162可經構形以控制微流體迴路120中微小物體(未顯示)之選擇、截留及移動。如下文關於圖1B及1C所論述，外殼102可包含介電泳(DEP)、光電鑷子(OET)及/或光電潤濕(OEW)構形(圖1A中未顯示)，且動力模組162可控制電極及/或電晶體(例如，光電晶體)之活化以在流動路徑106及/或隔離圍欄124、126、128、130中選擇並移動微小物體(未顯示)及/或介質微滴(未顯示)。

成像模組164可控制成像裝置。舉例而言，成像模組164可接收並處理來自成像裝置之影像資料。來自成像裝置之影像資料可包含成像裝置捕捉之任何類型之資訊(例如，微小物體、介質微滴之存在或不存在、可檢測標記(例如螢光標記)之累積等)。使用成像裝置捕捉之資訊，成像模組164可進一步計算物體(例如，微小物體、介質微滴)之位置及/或該等物體在微流體裝置100內之運動速率。

傾斜模組166可控制傾斜裝置190之傾斜運動。或者或另外，傾斜模組166可控制傾斜速率及定時以最佳化微小物體經由重力轉移至一或多個隔離圍欄。傾斜模組166與成像模組164通訊耦連以接收說明微小物體及/或介質微滴在微流體迴路120中之運動之資料。使用此資料，傾斜模組166可調節微流體迴路120之傾斜以調節微小物體及/或介質微滴在微流體

迴路120中之移動速率。傾斜模組166亦可使用此資料反覆調節微小物體及/或介質微滴在微流體迴路120中之位置。

在圖1A中所示實例中，將微流體迴路120圖解說明為包含微流體通道122及隔離圍欄124、126、128、130。每一圍欄包含至通道122之開口，但在其他方向上封閉，使得圍欄可實質上分離圍欄內部之微小物體與通道122之流動路徑106或其他圍欄中之流體介質180及/或微小物體。隔離圍欄之壁自基底之內表面109延伸至蓋110之內側表面以提供封閉。圍欄至微流體通道122之開口相對於流體介質180之流106以一角度定向，使得流106不會被引導至圍欄中。該流可與圍欄開口之平面相切或正交。在一些情況下，圍欄124、126、128、130經構形以在物理上將一或多個微小物體圍在微流體迴路120內。根據本發明之隔離圍欄可包含多個形狀、表面及特徵，其經最佳化用於DEP、OET、OEW、流體流動及/或重力，如下文將詳細論述及顯示。

微流體迴路120可包含任一數目之微流體隔離圍欄。儘管顯示5個隔離圍欄，但微流體迴路120可具有較少或較多隔離圍欄。如圖所示，微流體迴路120之微流體隔離圍欄124、126、128及130各自包含不同特徵及形狀，其可提供一或多種可用於維持、分離、分析或培養生物微小物體之益處。在一些實施例中，微流體迴路120包含複數個相同微流體隔離圍欄。

在圖1A中圖解說明之實施例中，顯示單一通道122及流動路徑106。然而，其他實施例可含有多個通道122，各自經構形以包含流動路徑106。微流體迴路120進一步包含與流動路徑106及流體介質180流體連通之入口閥或埠107，藉此流體介質180可經由入口埠107到達通道122。在一些情況下，流動路徑106 包含單一路徑。在一些情況下，單一路徑係以

之字形圖案配置，藉此流動路徑106以交替方向行進越過微流體裝置100兩次或更多次。

在一些情況下，微流體迴路120包含複數個平行通道122及流動路徑106，其中每一流動路徑106內之流體介質180在相同方向上流動。在一些情況下，每一流動路徑106內之流體介質在前進或倒退方向中之至少一個方向上流動。在一些情況下，複數個隔離圍欄經構形(例如，相對於通道122)使得隔離圍欄可平行加載靶微小物體。

在一些實施例中，微流體迴路120進一步包含一或多個微小物體阱132。阱132通常在形成通道122之邊界之壁中形成，且可與微流體隔離圍欄124、126、128、130中一或多者之開口相對定位。在一些實施例中，阱132經構形以自流動路徑106接收或捕捉單一微小物體。在一些實施例中，阱132經構形以自流動路徑106接收或捕捉複數個微小物體。在一些情況下，阱132包含大致等於單一靶微小物體之體積之容積。

阱132可進一步包含開口，該開口經構形以幫助所靶向微小物體流入阱132中。在一些情況下，阱132包含開口，其高度及寬度大致等於單一靶微小物體之尺寸，藉此防止較大微小物體進入微小物體阱中。阱132可進一步包含其他經構形以幫助將所靶向微小物體保留在阱132內之特徵。在一些情況下，阱132相對於微流體隔離圍欄之開口與通道122對齊且位於通道122之相對側上，使得在繞平行於微流體通道122之軸使微流體裝置100傾斜後，所截留微小物體以使微小物體落入隔離圍欄開口中之軌跡離開阱132。在一些情況下，阱132包含小於靶微小物體之側面通路134以促進流過阱132且由此增加在阱132中捕捉微小物體之可能性。

在一些實施例中，經由一或多個電極(未顯示)橫跨流體介質180 (例

如，在流動路徑中及/或在隔離圍欄中)施加介電泳(DEP)力，以操作、輸送、分離並分選位於其中之微小物體。舉例而言，在一些實施例中，將DEP力施加至微流體迴路120之一或多個部分以將單一微小物體自流動路徑106轉移至期望微流體隔離圍欄中。在一些實施例中，使用DEP力防止隔離圍欄(例如，隔離圍欄124、126、128或130)內之微小物體自其轉移。此外，在一些實施例中，使用DEP力自隔離圍欄選擇性移除先前根據本發明實施例收集之微小物體。在一些實施例中，DEP力包含光電鐳子(OET)力。

在其他實施例中，經由一或多個電極(未顯示)將光電潤濕(OEW)力施加至微流體裝置100之支撐結構104 (及/或蓋110)中之一或多個位置(例如，有助於界定流動路徑及/或隔離圍欄之位置)，以操作、輸送、分離並分選位於微流體迴路120中之微滴。舉例而言，在一些實施例中，將OEW力施加至支撐結構104 (及/或蓋110)中之一或多個位置以將單一微滴自流動路徑106轉移至期望微流體隔離圍欄中。在一些實施例中，使用OEW力防止隔離圍欄(例如，隔離圍欄124、126、128或130)內之微滴自其轉移。此外，在一些實施例中，使用OEW力自隔離圍欄選擇性移除先前根據本發明實施例收集之微滴。

在一些實施例中，將DEP及/或OEW力與其他力(例如流力及/或重力)組合，以操作、輸送、分離並分選微流體迴路120內之微小物體及/或微滴。舉例而言，可使外殼102傾斜(例如，藉由傾斜裝置190)以將流動路徑106及位於其中之微小物體定位於微流體隔離圍欄上方，且重力可將微小物體及/或微滴輸送至圍欄中。在一些實施例中，DEP及/或OEW力可在其他力之前施加。在其他實施例中，DEP及/或OEW力可在其他力之後施

加。在其他情況下，DEP及/或OEW力可與其他力同時施加或與其他力以交替方式施加。

圖1B、1C及2A-2H圖解說明可用於實踐本發明實施例之微流體裝置之多個實施例。圖1B繪示一實施例，其中微流體裝置200經構形為光學致動之電動力學裝置。業內已知多種光學致動之電動力學裝置，包括具有光電鑷子(OET)構形之裝置及具有光電潤濕(OEW)構形之裝置。適宜OET構形之實例闡釋於以下美國專利文件中，其各自全文以引用方式併入本文中：美國專利第RE 44,711號(Wu等人) (最初以美國專利第7,612,355號授予)；及美國專利第7,956,339號(Ohta等人)。OEW構形之實例闡釋於美國專利第6,958,132號(Chiou等人)及美國專利申請公開案第2012/0024708號(Chiou等人)中，該兩個案件係全文以引用方式併入本文中。光學致動之電動力學裝置之另一實例包括組合OET/OEW構形，其實例顯示於以下案件中：美國專利公開案第20150306598號(Khandros等人)及第20150306599號(Khandros等人)及其相應PCT公開案WO2015/164846及WO2015/164847，其皆係全文以引用方式併入本文中。

具有其中可置放、培養及/或監測生物微小物體之圍欄之微流體裝置之實例已闡述於例如以下案件中：US 2014/0116881 (申請號14/060,117，2013年10月22日申請)、US 2015/0151298 (申請號14/520,568，2014年10月22日申請)及US 2015/0165436 (申請號14/521,447，2014年10月22日申請)，其各自全文以引用方式併入本文中。美國申請案第14/520,568號及第14/521,447號亦闡述分析微流體裝置中培養之細胞之分泌之實例性方法。前述申請案各自進一步闡述微流體裝置，其經構形以產生介電泳(DEP)力，例如光電鑷子(OET)；或經構形以

提供光電潤濕(OEW)。舉例而言，US 2014/0116881之圖2中圖解說明之光電鑷子裝置係可用於本發明實施例中以選擇並移動個別生物微小物體或生物微小物體群組之裝置之實例。

微流體裝置動力構形.如上所述，系統之控制及監測設備可包含動力模組用於選擇並移動微流體裝置之微流體迴路中之物體(例如微小物體或微滴)。微流體裝置可具有多種動力構形，端視所移動物體之類型及其他考慮因素而定。舉例而言，可利用介電電泳(DEP)構形選擇並移動微流體迴路中之微小物體。因此，微流體裝置100之支撐結構104及/或蓋110可包含DEP構形用於在微流體迴路120中之流體介質180中之微小物體上選擇性誘導DEP力，且由此選擇、捕捉及/或移動個別微小物體或微小物體群組。或者，微流體裝置100之支撐結構104及/或蓋110可包含電潤濕(EW)構形用於在微流體迴路120中之流體介質180中之微滴上選擇性誘導EW力，且由此選擇、捕捉及/或移動個別微滴或微滴群組。

包含DEP構形之微流體裝置200之一個實例圖解說明於圖1B及1C中。儘管出於簡單性目的，圖1B及1C分別顯示微流體裝置200之外殼102之具有區域/腔室202之一部分之橫斷面側視圖及橫斷面俯視圖，應理解，區域/腔室202可為具有更詳細結構之流體迴路元件之部分，例如生長腔室、隔離圍欄、流動區域或流動通道。此外，微流體裝置200可包括其他流體迴路元件。舉例而言，微流體裝置200可包括複數個生長腔室或隔離圍欄及/或一或多個流動區域或流動通道，例如本文中關於微流體裝置100闡述之彼等。可將DEP構形納入微流體裝置200之任何該等流體迴路元件或其選擇部分中。應進一步瞭解，上文或下文所述之任何微流體裝置組件及系統組件可與微流體裝置200組合納入及/或使用。舉例而言，上述包括

控制及監測設備152之系統150可與包括介質模組160、動力模組162、成像模組164、傾斜模組166及其他模組168之微流體裝置200一起使用。

如在圖1B中可見，微流體裝置200包括具有底部電極204及與底部電極204重疊之電極活化基板206之支撐結構104，及具有頂部電極210之蓋110，其中頂部電極210與底部電極204隔開。頂部電極210及電極活化基板206界定區域/腔室202之相對表面。含於區域/腔室202中之介質180由此提供頂部電極210與電極活化基板206之間之電阻連接。亦顯示電源212，如在區域/腔室202中生成DEP力所需要，該電源212經構形連接至底部電極204及頂部電極210且在該等電極之間產生偏置電壓。電源212可為例如交流電(AC)電源。

在某些實施例中，圖1B及1C中圖解說明之微流體裝置200可具有光學致動之DEP構形。因此，來自光源216 (其可受動力模組162控制)之變化光圖案218可選擇性活化及去活化在電極活化基板206之內表面208之區域214處DEP電極之變化圖案。(下文中將具有DEP構形之微流體裝置之區域214稱為「DEP電極區域。」)如圖1C中圖解說明，引導至電極活化基板206之內表面208上之光圖案218可以一圖案(例如正方形)照射選擇DEP電極區域214a (以白色顯示)。未照射DEP電極區域214 (交叉陰影)在下文中稱作「暗」DEP電極區域214。在每一暗DEP電極區域214，經由DEP電極活化基板206 (即，自底部電極204向上至與流動區域106中之介質180介接之電極活化基板206之內表面208)之相對電阻抗大於相對電阻抗經由區域/腔室202中之介質180 (即，自電極活化基板206之內表面208至蓋110之頂部電極210)。然而，經照射DEP電極區域214a在每一經照射DEP電極區域214a展現降低之經由電極活化基板206之相對阻抗，其小於經由區域/腔

室202中之介質180之相對阻抗。

隨著電源212活化，前述DEP構形在經照射DEP電極區域214a與毗鄰暗DEP電極區域214之間之流體介質180中產生電場梯度，其繼而產生吸引或排斥附近流體介質180中之微小物體(未顯示)之局部DEP力。可由此藉由改變自光源216投射至微流體裝置200中之光圖案218，在區域/腔室202之內表面208，在多個不同的該等DEP電極區域214，選擇性活化及去活化吸引或排斥流體介質180中之微小物體之DEP電極。DEP力是否吸引或排斥附近微小物體可取決於諸如以下等參數：電源212之頻率及介質180及/或微小物體(未顯示)之介電性質。

圖1C中圖解說明之經照射DEP電極區域214a之正方形圖案220僅係實例。可藉由投射至微流體裝置200中之光圖案218照射(且由此活化)DEP電極區域214之任何圖案，且可藉由改變或移動光圖案218反覆改變經照射/活化DEP電極區域214之圖案。

在一些實施例中，電極活化基板206可包含光導材料或由其組成。在該等實施例中，電極活化基板206之內表面208可無特徵。舉例而言，電極活化基板206可包含氫化非晶矽(a-Si:H)層或由其組成。a-Si:H可包含例如約8%至40%氫(如下計算： $100 * \text{氫原子數} / \text{氫原子及矽原子總數}$)。a-Si:H層可具有約500 nm至約2.0 μm 之厚度。在該等實施例中，DEP電極區域214可在電極活化基板206之內表面208上根據光圖案218在任何位置且以任何圖案產生。因此DEP電極區域214之數目及圖案無需固定，但可對應於光圖案218。具有包含光導層之DEP構形(例如上文所論述)之微流體裝置之實例已闡述於例如美國專利第RE 44,711號(Wu等人)(最初以美國專利第7,612,355號授予)中，其全部內容係以引用方式併入本文中。

在其他實施例中，電極活化基板206可包含基板，其包含複數個經摻雜層、電絕緣層(或區域)及形成半導體積體電路之導電層(例如半導體領域中已知)。舉例而言，電極活化基板206可包含複數個光電晶體，包括例如橫向雙極性光電晶體，每一光電晶體對應於DEP電極區域214。或者，電極活化基板206可包含由光電晶體開關控制之電極(例如，導電金屬電極)，且每一該等電極對應於DEP電極區域214。電極活化基板206可包括該等光電晶體或光電晶體控制之電極之圖案。該圖案例如可為呈列及行排列之大體正方形之光電晶體或光電晶體控制之電極之陣列，例如如圖2B中所示。或者，該圖案可為形成六角形晶格之大體六角形光電晶體或光電晶體控制之電極之陣列。不論圖案如何，電路元件可在電極活化基板206之內表面208之DEP電極區域214與底部電極210之間形成電連接，且彼等電連接(即，光電晶體或電極)可藉由光圖案218選擇性活化及去活化。未活化時，每一電連接可具有高阻抗，使得在相應DEP電極區域214，經由電極活化基板206(即，自底部電極204至與區域/腔室202中之介質180介接之電極活化基板206之內表面208)之相對阻抗大於經由介質180(即，自電極活化基板206之內表面208至蓋110之頂部電極210)之相對阻抗。然而，在藉由光圖案218中之光活化時，在每一經照射DEP電極區域214，經由電極活化基板206之相對阻抗小於經由介質180之相對阻抗，由此在相應DEP電極區域214活化DEP電極，如上文所論述。由此可在區域/腔室202中電極活化基板206之內表面208，在多個不同DEP電極區域214，以藉由光圖案218確定之方式選擇性活化及去活化吸引或排斥介質180中之微小物體(未顯示)之DEP電極。

具有包含光電晶體之電極活化基板之微流體裝置之實例已闡述於例

如美國專利第7,956,339號(Ohta等人)中(例如，參見圖21及22中圖解說明之裝置300及其說明)，其全部內容係以引用方式併入本文中。具有包含受光電晶體開關控制之電極之電極活化基板之微流體裝置之實例已闡述於例如美國專利公開案第2014/0124370號(Short等人)中(例如，參見在所有圖中圖解說明之裝置200、400、500、600及900及其說明)，其全部內容係以引用方式併入本文中。

在DEP構形之微流體裝置之一些實施例中，頂部電極210係外殼102之第一壁(或蓋110)之部分，且電極活化基板206及底部電極204係外殼102之第二壁(或支撐結構104)之部分。區域/腔室202可位於第一壁與第二壁之間。在其他實施例中，電極210係第二壁(或支撐結構104)之部分且電極活化基板206及/或電極210中之一者或二者係第一壁(或蓋110)之部分。此外，光源216可替代地用於自下方照射外殼102。

對於圖1B-1C中具有DEP構形之微流體裝置200，藉由在電極活化基板206之內表面208之DEP電極區域214a以圍繞並捕捉微小物體之圖案(例如，正方形圖案220)將光圖案218投射至微流體裝置200中以活化第一組之一或多個DEP電極，動力模組162可選擇區域/腔室202中之介質180中之微小物體(未顯示)。動力模組162隨後可藉由在DEP電極區域214相對於微流體裝置200移動光圖案218以活化第二組之一或多個DEP電極來移動原位生成之所捕捉微小物體。或者，可相對於光圖案218移動微流體裝置200。

在其他實施例中，微流體裝置200可具有不依賴於電極活化基板206之內表面208之DEP電極之光活化之DEP構形。舉例而言，電極活化基板206可包含與包括至少一個電極之表面(例如，蓋110)相對定位之選擇性可

定址且可供能之電極。可選擇性打開及關閉開關(例如，半導體基板中之電晶體開關)以活化或不活化在DEP電極區域214之DEP電極，由此對區域/腔室202中在活化DEP電極附近之微小物體(未顯示)產生淨DEP力。端視諸如電源212之頻率及區域/腔室202中之介質(未顯示)及/或微小物體之介電性質等特徵，DEP力可吸引或排斥附近的微小物體。藉由選擇性活化及去活化一組DEP電極(例如，在形成正方形圖案220之一組DEP電極區域214處)，可在區域/腔室202內截留並移動區域/腔室202中之一或多個微小物體。圖1A中之動力模組162可控制該等開關且由此活化及去活化個別DEP電極以選擇、截留並移動區域/腔室202周圍之特定微小物體(未顯示)。具有包括選擇性可定址且可供能之電極之DEP構形之微流體裝置為業內已知且已闡述於例如美國專利第6,294,063號(Becker等人)及第6,942,776號(Medoro)中，其全部內容係以引用方式併入本文中。

作為另一實例，微流體裝置200可具有電潤濕(EW)構形，其可代替DEP構形或可位於微流體裝置200之與具有DEP構形之部分分離之一部分中。EW構形可為光電潤濕構形或介電潤濕(EWOD)構形，該兩種構型皆為業內已知。在一些EW構形中，支撐結構104具有夾在介電層(未顯示)與底部電極204之間之電極活化基板206。介電層可包含疏水材料及/或可經疏水材料塗佈，如下文所述。對於具有EW構形之微流體裝置200，支撐結構104之內表面208係介電層或其疏水塗層之內表面。

介電層(未顯示)可包含一或多個氧化物層，且可具有約50 nm至約250 nm (例如，約125 nm至約175 nm)之厚度。在某些實施例中，介電層可包含氧化物、例如金屬氧化物(例如，氧化鋁或二氧化鈣)之層。在某些實施例中，介電層可包含並非金屬氧化物之介電材料，例如氧化矽或氮化

矽。不論確切組成及厚度如何，介電層可具有約10千歐姆至約50千歐姆之阻抗。

在一些實施例中，介電層之向內面向區域/腔室202之表面經疏水材料塗佈。疏水材料可包含例如氟化碳分子。氟化碳分子之實例包括全氟聚合物，例如聚四氟乙烯(例如，TEFLON®)或聚(2,3-二氟亞甲基-全氟四氫呋喃)(例如，CYTOP™)。構成疏水材料之分子可共價鍵結至介電層之表面。舉例而言，疏水材料之分子可藉助連接體(例如矽氧烷基團、膦酸基團或硫醇基團)共價鍵結至介電層之表面。因此，在一些實施例中，疏水材料可包含烷基封端之矽氧烷、烷基封端之膦酸或烷基封端之硫醇。烷基可為長鏈烴(例如，具有至少10個碳、或至少16、18、20、22或更多碳之鏈)。或者，氟化(或全氟化)碳鏈可代替烷基使用。因此，例如，疏水材料可包含氟烷基封端之矽氧烷、氟烷基封端之膦酸或氟烷基封端之硫醇。在一些實施例中，疏水塗層之厚度為約10 nm至約50 nm。在其他實施例中，疏水塗層之厚度小於10 nm (例如，小於5 nm，或約1.5至3.0 nm)。

在一些實施例中，具有電潤濕構形之微流體裝置200之蓋110亦經疏水材料(未顯示)塗佈。疏水材料可為用於塗佈支撐結構104之介電層之相同疏水材料，且疏水塗層之厚度可與支撐結構104之介電層上之疏水塗層之厚度大體相同。此外，蓋110可以支撐結構104之方式包含夾在介電層與頂部電極210之間之電極活化基板206。蓋110之電極活化基板206及介電層可具有與支撐結構104之電極活化基板206及介電層相同之組成及/或尺寸。因此，微流體裝置200可具有兩個電潤濕表面。

在一些實施例中，電極活化基板206可包含光導材料，例如上文所述。因此，在某些實施例中，電極活化基板206可包含氫化非晶矽(a-

Si:H)層或由其組成。a-Si:H可包含例如約8%至40%氫(如下計算： $100 * \text{氫原子數} / \text{氫原子及矽原子總數}$)。a-Si:H層可具有約500 nm至約2.0 μm 之厚度。或者，電極活化基板206可包含受光電晶體開關控制之電極(例如，導電金屬電極)，如上所述。具有光電潤濕構形之微流體裝置為業內已知及/或可用業內已知之電極活化基板來構築。舉例而言，美國專利第6,958,132號(Chiou等人，其全部內容係以引用方式併入本文中)揭示具有光導材料(例如a-Si:H)之光電潤濕構形，而上文所提及之美國專利公開案第2014/0124370號(Short等人)揭示具有受光電晶體開關控制之電極之電極活化基板。

微流體裝置200由此可具有光電潤濕構形，且光圖案218可用於活化電極活化基板206中之光導EW區域或光反應EW電極。電極活化基板206之該等經活化EW區域或EW電極可在支撐結構104之內表面208 (即，疊加介電層或其疏水塗層之內表面)生成電潤濕力。藉由改變在電極活化基板206上入射之光圖案218 (或相對於光源216移動微流體裝置200)，接觸支撐結構104之內表面208之微滴(例如，含有水性介質、溶液或溶劑)可移動穿過存於區域/腔室202中之不可混溶流體(例如，油性介質)。

在其他實施例中，微流體裝置200可具有EWOD構形，且電極活化基板206可包含不依賴於活化用光之選擇性可定址且可供能之電極。電極活化基板206由此可包括該等電潤濕(EW)電極之圖案。該圖案例如可為呈列及行排列之大體正方形之EW電極之陣列，例如圖2B中所示。或者，該圖案可為形成六角形晶格之大體六角形EW電極之陣列。不論圖案如何，EW電極可藉由電開關(例如，半導體基板中之電晶體開關)選擇性經活化(或去活化)。藉由選擇性活化及去活化電極活化基板206中之EW電極，接

觸疊加介電層或其疏水塗層之內表面208之微滴(未顯示)可在區域/腔室202內移動。圖1A中之動力模組162可控制該等開關且由此活化及去活化個別EW電極以選擇並移動區域/腔室202周圍之特定微滴。具有含有選擇性可定址且可供能之電極之EWOD構形之微流體裝置為業內已知且已闡述於例如美國專利第8,685,344號(Sundarsan等人)中，其全部內容係以引用方式併入本文中。

不論微流體裝置200之構形如何，電源212可用於提供為微流體裝置200之電路供電之電位(例如，AC電壓電位)。電源212可與圖1中所提及之電源192相同或係其組件。電源212可經構形以向頂部電極210及底部電極204提供AC電壓及/或電流。對於AC電壓，電源212可提供頻率範圍及平均或峰值功率(例如，電壓或電流)範圍，該等範圍足以生成強至足以截留並移動區域/腔室202中之個別微小物體(未顯示)之淨DEP力(或電潤濕力)，如上文所論述；及/或足以改變區域/腔室202中支撐結構104之內表面208(即，介電層及/或介電層上之疏水塗層)之潤濕性質，亦如上文所論述。該等頻率範圍及平均或峰值功率範圍為業內已知。例如，參見美國專利第6,958,132號(Chiou等人)、美國專利第RE44,711號(Wu等人)(最初以美國專利第7,612,355號授予)及美國專利申請公開案第US2014/0124370號(Short等人)、第US2015/0306598號(Khandros等人)及第US2015/0306599號(Khandros等人)。

隔離圍欄。一般隔離圍欄224、226及228之非限制性實例顯示於圖2A-2C中所繪示之微流體裝置230內。每一隔離圍欄224、226及228可包含界定分離區域240之分離結構232及將分離區域240與通道122流體連通之連接區域236。連接區域236可包含至微流體通道122之近端開口234及

至分離區域240之遠端開口238。連接區域236可經構形，使得自微流體通道122流入隔離圍欄224、226、228中之流體介質流(未顯示)之最大滲透深度不延伸至分離區域240中。因此，由於連接區域236，佈置於隔離圍欄224、226、228之分離區域240中之微小物體(未顯示)或其他材料(未顯示)可由此自微流體通道122中介質180之流分離且實質上不受其影響。

圖2A-2C之隔離圍欄224、226及228各自具有直接向微流體通道122開口之單一開口。隔離圍欄之開口自微流體通道122橫向開口。電極活化基板206放布於微流體通道122及隔離圍欄224、226及228二者之下。隔離圍欄之外殼內形成隔離圍欄底板之電極活化基板206之上表面佈置於與微流體裝置之微流體通道122 (或若不存在通道，流動區域)內形成流動通道(或分別流動區域)底板之電極活化基板206之上表面相同之位準或實質上相同之位準。電極活化基板206可無特徵或可具有不規則或圖案化表面，其最高隆起與其最低凹陷相差小於約3微米、2.5微米、2微米、1.5微米、1微米、0.9微米、0.5微米、0.4微米、0.2微米、0.1微米或更小。橫跨微流體通道122 (或流動區域)及隔離圍欄二者之基板上表面中隆起之變化可小於隔離圍欄之壁或微流體裝置之壁的高度的約3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.5%、0.3%或0.1%。儘管針對微流體裝置200詳細闡述，但此亦適用於本文所述微流體裝置100、230、250、280、290、300、700、800、1000中之任一者。

微流體通道122可由此係波及區之實例，且隔離圍欄224、226、228之分離區域240可係未波及區之實例。如所注意，微流體通道122及隔離圍欄224、226、228可經構形以含有一或多種流體介質180。在圖2A-2B中所示實例中，埠222連接至微流體通道122且容許將流體介質180引入微

流體裝置230中或自其移除。在引入流體介質180之前，微流體裝置可用諸如二氧化碳氣體等氣體來啟動。一旦微流體裝置230含有流體介質180，微流體通道122中流體介質180之流242可選擇性生成及停止。舉例而言，如圖所示，埠222可佈置於微流體通道122之不同位置(例如，相對末端)，且介質之流242可自用作入口之一個埠222產生，流至用作出口之另一埠222。

圖2C圖解說明本發明隔離圍欄224之實例之詳細視圖。亦顯示微小物體246之實例。

如已知，經過隔離圍欄224之近端開口234之微流體通道122中流體介質180之流242可引起介質180流入及/或流出隔離圍欄224之次級流244。為自次級流244分離隔離圍欄224之分離區域240中之微小物體246，隔離圍欄224之連接區域236之長度 L_{con} (即，自近端開口234至遠端開口238)應大於流入連接區域236之次級流244之滲透深度 D_p 。次級流244之滲透深度 D_p 取決於流體介質180在微流體通道122中流動之速度及關於微流體通道122及連接區域236至微流體通道122之近端開口234之構形之多種參數。對於給定微流體裝置，微流體通道122及開口234之構形將係固定的，而流體介質180在微流體通道122中之流242之速率將係可變的。因此，對於每一隔離圍欄224，可確定通道122中流體介質180之流242之最大速度 V_{max} ，其確保次級流244之滲透深度 D_p 不超過連接區域236之長度 L_{con} 。只要流體介質180在微流體通道122中之流242之速率不超過最大速度 V_{max} ，即可將所得次級流244限制於微流體通道122及連接區域236且保持在分離區域240以外。介質180在微流體通道122中之流242將因此不將微小物體246拉出分離區域240。相反，不論流體介質180在微流體通道

122中之流242如何，位於分離區域240中之微小物體246將停留在分離區域240中。

此外，只要介質180在微流體通道122中之流242之速率不超過 $V_{\max}$ ，流體介質180在微流體通道122中之流242不會將混雜顆粒(例如，微粒及/或奈米顆粒)自微流體通道122移動至隔離圍欄224之分離區域240中。使連接區域236之長度 L_{con} 大於次級流244之最大滲透深度 D_p 可由此防止一個隔離圍欄224被來自微流體通道122或另一隔離圍欄(例如，圖2D中之隔離圍欄226、228)之混雜顆粒污染。

由於隔離圍欄224、226、228之微流體通道122及連接區域236可受介質180在微流體通道122中之流242影響，可將微流體通道122及連接區域236視為微流體裝置230之波及(或流動)區域。另一方面，可將隔離圍欄224、226、228之分離區域240視為未波及(或非流動)區域。舉例而言，實質上僅藉由第一介質180之組分自微流體通道122經由連接區域236擴散至分離區域240中之第二流體介質248中，微流體通道122中第一流體介質180中之組分(未顯示)可與分離區域240中之第二流體介質248混合。類似地，實質上僅藉由第二介質248之組分自分離區域240經由連接區域236擴散至微流體通道122中之第一介質180中，分離區域240中之第二介質248之組分(未顯示)可與微流體通道122中之第一介質180混合。在一些實施例中，流體介質在隔離圍欄之分離區域與流動區域之間藉由擴散交換之程度大於流體交換之約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或大於約99%。第一介質180可為與第二介質248相同之介質或不同之介質。此外，第一介質180及第二介質248可在開始時相同，隨後變得不同(例如，經由藉由分離區域240中之一或多個細胞或藉由改變流過微流體

通道122之介質180使第二介質248條件化)。

由流體介質180在微流體通道122中之流242引起之次級流244之最大滲透深度 D_p 可取決於多個參數，如上文所提及。該等參數之實例包括：微流體通道122之形狀(例如，微流體通道可將介質引導至連接區域236中，使介質轉向遠離連接區域236，或在大體垂直於連接區域236之近端開口234之方向上將介質引導至微流體通道122)；微流體通道122在近端開口234之寬度 W_{ch} (或橫斷面積)；及連接區域236在近端開口234之寬度 W_{con} (或橫斷面積)；流體介質180在微流體通道122中之流242之速度 V ；第一介質180及/或第二介質248之黏度或諸如此類。

在一些實施例中，微流體通道122及隔離圍欄224、226、228之尺寸可如下關於流體介質180在微流體通道122中之流242之向量來定向：微流體通道寬度 W_{ch} (或微流體通道122之橫斷面積)可大體垂直於介質180之流242；連接區域236在開口234之寬度 W_{con} (或橫斷面積)可大體平行於介質180在微流體通道122中之流242；及/或連接區域之長度 L_{con} 可大體垂直於介質180在微流體通道122中之流242。前述內容僅為實例，且微流體通道122及隔離圍欄224、226、228之相對位置可關於彼此呈其他定向。

如圖2C中所圖解說明，連接區域236之寬度 W_{con} 殼子近端開口234之遠端開口238一致。連接區域236在遠端開口238之寬度 W_{con} 可由此為本文中針對連接區域236在近端開口234之寬度 W_{con} 確定之任一值。或者，連接區域236在遠端開口238之寬度 W_{con} 可大於連接區域236在近端開口234之寬度 W_{con} 。

如圖2C中所圖解說明，分離區域240在遠端開口238之寬度可與連接區域236在近端開口234之寬度 W_{con} 實質上相同。分離區域240在遠端開口

238之寬度由此可為本文針對連接區域236在近端開口234之寬度 W_{con} 確定之任一值。或者，分離區域240在遠端開口238之寬度可大於或小於連接區域236在近端開口234之寬度 W_{con} 。此外，遠端開口238可小於近端開口234且連接區域236之寬度 W_{con} 可在近端開口234與遠端開口238之間變窄。舉例而言，連接區域236可使用多種不同幾何學(例如將連接區域去角、將連接區域斜切)在近端開口與遠端開口之間變窄。此外，連接區域236之任何部分或子部分可變窄(例如連接區域毗鄰近端開口234之一部分)。

圖2D-2F繪示含有微流體迴路262及流動通道264之微流體裝置250之另一實例性實施例，其係圖1A中各別微流體裝置100、迴路132及通道134之變化形式。微流體裝置250亦具有複數個隔離圍欄266，其係上述隔離圍欄124、126、128、130、224、226或228之其他變化形式。特定而言，應瞭解，圖2D-2F中所示裝置250之隔離圍欄266可替代裝置100、200、230、280、290、300、700、800、1000中之上述隔離圍欄124、126、128、130、224、226或228中之任一者。同樣，微流體裝置250係微流體裝置100之另一變體，且亦可具有與上述微流體裝置100、200、230、280、290、300、700、800、1000以及本文所述其他微流體系統組件中任一者相同或不同之DEP構形。

圖2D-2F中之微流體裝置250包含支撐結構(圖2D-2F中不可見，但可與圖1A中所繪示裝置100之支撐結構104相同或大體相同)、微流體迴路結構256及蓋(圖2D-2F中不可見，但可與圖1A中所繪示裝置100之蓋122相同或大體相同)。微流體迴路結構256包括框架252及微流體迴路材料260，其可與圖1A中所示裝置100之框架114及微流體迴路材料116相同或

大體相同。如圖2D中所示，微流體迴路材料260界定之微流體迴路262可包含與多個隔離圍欄266流體連接之多個通道264（顯示兩個，但可存在更多個）。

每一隔離圍欄266可包含分離結構272、分離結構272內之分離區域270及連接區域268。自微流體通道264之近端開口274至分離結構272之遠端開口276，連接區域268將微流體通道264流體連接至分離區域270。通常，根據圖2B及2C之上文論述，第一流體介質254在通道264中之流278可產生自微流體通道264流入及/或流出隔離圍欄266之各別連接區域268之第一介質254之次級流282。

如圖2E中所圖解說明，每一隔離圍欄266之連接區域268通常包括在至通道264之近端開口274與至分離結構272之遠端開口276之間延伸之區域。連接區域268之長度 L_{con} 可大於次級流282之最大滲透深度 D_p ，在此情形中次級流282將延伸至連接區域268中而不被重引導至分離區域270（如圖2D中所示）。或者，如圖2F中所圖解說明，連接區域268可之長度 L_{con} 可小於最大滲透深度 D_p ，在此情形中次級流282將延伸穿過連接區域268且被重引導至分離區域270。在此後一情況下，連接區域268之長度 L_{c1} 及 L_{c2} 之和大於最大滲透深度 D_p ，使得次級流282不會延伸至分離區域270。不論連接區域268之長度 L_{con} 大於滲透深度 D_p ，或連接區域268之長度 L_{c1} 及 L_{c2} 之和大於滲透深度 D_p ，第一介質254在通道264中之不超過最大速度 V_{max} 之流278將產生具有滲透深度 D_p 之次級流，且隔離圍欄266之分離區域270中之微小物體（未顯示，但可與圖2C中所示微小物體246相同或大體相同）不會被第一介質254在通道264中之流278拉出分離區域270。通道264中之流278亦不會將混雜材料（未顯示）自通道264拉入隔離圍欄266之

分離區域270中。因此，擴散係微流體通道264中之第一介質254中之組分可自微流體通道264移動至隔離圍欄266之分離區域270中之第二介質258中之唯一機制。同樣，擴散係隔離圍欄266之分離區域270中之第二介質258可自分離區域270移動至微流體通道264中之第一介質254中之唯一機制。第一介質254可係與第二介質258相同之介質，或第一介質254可為與第二介質258不同之介質。或者，第一介質254及第二介質258可在開始時相同，隨後變得不同，例如經由藉由分離區域270中之一或多個細胞或藉由改變流過微流體通道264之介質使第二介質條件化來實現。

如圖2E中所圖解說明，微流體通道264之寬度 W_{ch} (即，圖2D中箭頭278所指示之流過微流體通道之流體介質之方向之橫向)在微流體通道264中可大體垂直於近端開口274之寬度 W_{con1} 且由此大體平行於遠端開口276之寬度 W_{con2} 。然而，近端開口274之寬度 W_{con1} 及遠端開口276之寬度 W_{con2} 無需大體垂直於彼此。舉例而言，近端開口274之寬度 W_{con1} 所定向之軸(未顯示)與遠端開口276之寬度 W_{con2} 所定向之另一軸之間之角度可並非垂直且因此並非 90° 。替代定向角之實例包括以下角度：約 30° 至約 90° 、約 45° 至約 90° 、約 60° 至約 90° 或諸如此類。

在隔離圍欄(例如124、126、128、130、224、226、228或266)之多個實施例中，分離區域(例如240或270)經構形以含有複數個微小物體。在其他實施例中，分離區域可經構形以含有僅1個、2個、3個、4個、5個或類似相對小數目之微小物體。因此，分離區域之體積可為例如至少 1×10^6 、 2×10^6 、 4×10^6 、 6×10^6 立方微米或更大。

在隔離圍欄之多個實施例中，微流體通道(例如，122)在近端開口(例如234)之寬度 W_{ch} 可為約50-1000微米、50-500微米、50-400微米、50-

300微米、50-250微米、50-200微米、50-150微米、50-100微米、70-500微米、70-400微米、70-300微米、70-250微米、70-200微米、70-150微米、90-400微米、90-300微米、90-250微米、90-200微米、90-150微米、100-300微米、100-250微米、100-200微米、100-150微米或100-120微米。在一些其他實施例中，微流體通道(例如，122)在近端開口(例如234)之寬度 W_{ch} 可為約200-800微米、200-700微米或200-600微米。前述內容僅為實例，且微流體通道122之寬度 W_{ch} 可為在上文所列示任一終點內之任何寬度。此外，微流體通道122之 W_{ch} 可經選擇以在並非隔離圍欄之近端開口之微流體通道區域中之該等寬度之任一者中。

在一些實施例中，隔離圍欄之高度為約30至約200微米或約50至約150微米。在一些實施例中，隔離圍欄之橫斷面積為約 $1 \times 10^4 - 3 \times 10^6$ 平方微米、 $2 \times 10^4 - 2 \times 10^6$ 平方微米、 $4 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ 平方微米、 $2 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ 平方微米、 $2 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ 平方微米或約 $2 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ 平方微米。

在隔離圍欄之多個實施例中，微流體通道(例如，122)在近端開口(例如，234)之高度 H_{ch} 可為在以下高度中之任一者內之高度：20-100微米、20-90微米、20-80微米、20-70微米、20-60微米、20-50微米、30-100微米、30-90微米、30-80微米、30-70微米、30-60微米、30-50微米、40-100微米、40-90微米、40-80微米、40-70微米、40-60微米或40-50微米。前述內容僅為實例，且微流體通道(例如，122)之高度 H_{ch} 可為在上文所列示任一終點內之高度。微流體通道122之高度 H_{ch} 可經選擇以在並非隔離圍欄之近端開口之微流體通道區域中之該等高度之任一者中。

在隔離圍欄之多個實施例中，微流體通道(例如，122)在近端開口(例如，234)之橫斷面積可為約500-50,000平方微米、500-40,000平方微米、

500-30,000平方微米、500-25,000平方微米、500-20,000平方微米、500-15,000平方微米、500-10,000平方微米、500-7,500平方微米、500-5,000平方微米、1,000-25,000平方微米、1,000-20,000平方微米、1,000-15,000平方微米、1,000-10,000平方微米、1,000-7,500平方微米、1,000-5,000平方微米、2,000-20,000平方微米、2,000-15,000平方微米、2,000-10,000平方微米、2,000-7,500平方微米、2,000-6,000平方微米、3,000-20,000平方微米、3,000-15,000平方微米、3,000-10,000平方微米、3,000-7,500平方微米或3,000至6,000平方微米。前述內容僅為實例，且微流體通道(例如，122)在近端開口(例如，234)之橫斷面積可為在上文所列示任一終點內之任一面積。

在隔離圍欄之多個實施例中，連接區域(例如，236)之長度 L_{con} 可為約1-600微米、5-550微米、10-500微米、15-400微米、20-300微米、20-500微米、40-400微米、60-300微米、80-200微米或約100-150微米。前述內容僅為實例，且連接區域(例如，236)之長度 L_{con} 可在上文所列示任一終點內之任一長度中。

在隔離圍欄之多個實施例中，連接區域(例如，236)在近端開口(例如，234)之寬度 W_{con} 可為約20-500微米、20-400微米、20-300微米、20-200微米、20-150微米、20-100微米、20-80微米、20-60微米、30-400微米、30-300微米、30-200微米、30-150微米、30-100微米、30-80微米、30-60微米、40-300微米、40-200微米、40-150微米、40-100微米、40-80微米、40-60微米、50-250微米、50-200微米、50-150微米、50-100微米、50-80微米、60-200微米、60-150微米、60-100微米、60-80微米、70-150微米、70-100微米或80-100微米。前述內容僅為實例，且連接區

域(例如，236)在近端開口(例如，234)之寬度 W_{con} 可不同於前述實例(例如，在上文所列示任一終點內之任一值)。

在隔離圍欄之多個實施例中，連接區域(例如，236)在近端開口(例如，234)之寬度 W_{con} 可至少與隔離圍欄既定用於之微小物體(例如，生物細胞，其可為T細胞、B細胞或卵子或胚胎)之最大尺寸一樣大。前述內容僅為實例，且連接區域(例如，236)在近端開口(例如，234)之寬度 W_{con} 可不同於前述實例(例如，在上文所列示任一終點內之寬度)。

在隔離圍欄之多個實施例中，連接區域之近端開口之寬度 W_{pr} 可至少與隔離圍欄既定用於之微小物體(例如，生物微小物體，例如細胞)之最大尺寸一樣大。舉例而言，寬度 W_{pr} 可為約50微米、約60微米、約100微米、約200微米、約300微米，或可為約50-300微米、約50-200微米、約50-100微米、約75-150微米、約75-100微米或約200-300微米。

在隔離圍欄之多個實施例中，連接區域(例如，236)之長度 L_{con} 對連接區域(例如，236)在近端開口234之寬度 W_{con} 之比率可大於或等於以下比率中之任一者：0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0或更大。前述內容僅為實例，且連接區域236之長度 L_{con} 對連接區域236在近端開口234之寬度 W_{con} 之比率可不同於前述實例。

在微流體裝置100、200、230、250、280、290、300、700、800、1000之多個實施例中， V_{max} 可設定為約0.2、0.5、0.7、1.0、1.3、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.7、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、10、11、12、13、14或15微升/sec。

在具有隔離圍欄之微流體裝置之多個實施例中，隔離圍欄之分離區

域(例如, 240)之體積可為例如至少 5×10^5 、 8×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 4×10^6 、 6×10^6 、 8×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或 8×10^8 立方微米或更大。在具有隔離圍欄之微流體裝置之多個實施例中, 隔離圍欄之體積可為約 5×10^5 、 6×10^5 、 8×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 4×10^6 、 8×10^6 、 1×10^7 、 3×10^7 、 5×10^7 或約 8×10^7 立方微米或更大。在一些其他實施例中, 隔離圍欄之體積可為約1 奈升至約50奈升、2奈升至約25奈升、2奈升至約20奈升、約2奈升至約15奈升或約2奈升至約10奈升。

在多個實施例中, 微流體裝置具有如本文所述任一實施例經構形之隔離圍欄, 其中微流體裝置具有約5至約10個隔離圍欄、約10至約50個隔離圍欄、約100至約500個隔離圍欄; 約200至約1000個隔離圍欄、約500至約1500個隔離圍欄、約1000至約2000個隔離圍欄、約1000至約3500個隔離圍欄、約3000至約7000個隔離圍欄、約5000至約10,000個隔離圍欄、約9,000至約15,000個隔離圍欄或約12,000至約20,000個隔離圍欄。隔離圍欄無需皆具有相同大小且可包括多種構形(例如, 不同寬度、隔離圍欄內之不同特徵)。

圖2G圖解說明根據一個實施例之微流體裝置280。圖2G中圖解說明之微流體裝置280係微流體裝置100之程式化圖。在實踐中, 微流體裝置280及其構成迴路元件(例如通道122及隔離圍欄128)可具有本文所論述之尺寸。圖2G中圖解說明之微流體迴路120具有兩個埠107、4個不同通道122及4個不同流動路徑106。微流體裝置280進一步包含複數個離開每一通道122開口之隔離圍欄。在圖2G中圖解說明之微流體裝置中, 隔離圍欄之幾何學類似於圖2C中圖解說明之圍欄, 且因此具有連接區域及分離區域二者。因此, 微流體迴路120包括波及區(例如通道122及連接區域236

在次級流244之最大滲透深度 D_p 內之部分)及非波及區(例如分離區域240及連接區域236不在次級流244之最大滲透深度 D_p 內之部分)二者。

圖3A至3B顯示系統150之多個實施例，其可用於操作並觀察本發明之微流體裝置(例如100、200、230、250、280、290、300、700、800、1000)。如圖3A中所圖解說明，系統150可包括結構(「巢(nest)」) 300，其經構形以容納微流體裝置100 (未顯示)或本文所述之任何其他微流體裝置。巢300可包括插座302，其能與微流體裝置320介接(例如，光學致動之電動力學裝置100)且提供電源192至微流體裝置320之電連接。巢300可進一步包括積體電信號生成子系統304。電信號生成子系統304可經構形以將偏置電壓供應至插座302，使得其在由插座302容納時橫跨微流體裝置320之電極對施加偏置電壓。因此，電信號生成子系統304可為電源192之部分。向微流體裝置320施加偏置電壓之能力不意味著將在插座302容納微流體裝置320時之所有時刻皆施加偏置電壓。相反，在多數情形中，在微流體裝置320中，偏置電壓將間歇式施加，例如僅視需要施加以促進生成電動力學力(例如介電電泳或電潤濕)。

如圖3A中所圖解說明，巢300可包括印刷電路板總成(PCBA) 322。電信號生成子系統304可安裝於PCBA 322上且電集成至其中。實例性載體亦包括安裝於PCBA 322上之插座302。

通常，電信號生成子系統304將包括波形發生器(未顯示)。電信號生成子系統304可進一步包括示波器(未顯示)及/或經構形以放大自波形發生器接收之波形之波形放大電路(未顯示)。示波器若存在可經構形以量測供應至插座302所容納之微流體裝置320之波形。在某些實施例中，示波器量測靠近微流體裝置320 (且在波形發生器之遠端)之位置的波形，由此確

保量測實際施加至裝置之波形之更高準確度。自示波器量測獲得之資料可例如作為反饋提供給波形發生器，且波形發生器可經構形以基於該反饋調節其輸出。適宜組合波形發生器及示波器之實例係Red Pitaya™。

在某些實施例中，巢300進一步包含控制器308，例如用於感測及/或控制電信號生成子系統304之微處理器。適宜微處理器之實例包括Arduino™微處理器，例如Arduino Nano™。控制器308可用於實施功能及分析，或可與外部主控制器154（顯示於圖1A中）通訊以實施功能及分析。在圖3A中所圖解說明之實施例中，控制器308經由介面310（例如，插塞或連接器）與主控制器154通訊。

在一些實施例中，巢300可包含電信號生成子系統304，其包含Red Pitaya™波形發生器/示波器單元（「Red Pitaya單元」）及放大Red Pitaya單元所生成的波形且將放大電壓傳送至微流體裝置100之波形放大電路。在一些實施例中，Red Pitaya單元經構形以量測在微流體裝置320之放大電壓，隨後視需要調節其自身輸出電壓，使得所量測微流體裝置320之電壓係期望值。在一些實施例中，波形放大電路可具有由安裝在PCBA 322上之一對DC-DC轉化器生成之+6.5V至-6.5V電源，在微流體裝置100產生高達13 Vpp之信號。

如圖3A中所圖解說明，支撐結構300（例如，巢）可進一步包括熱控制子系統306。熱控制子系統306可經構形以調控由支撐結構300容納之微流體裝置320之溫度。舉例而言，熱控制子系統306可包括Peltier熱電裝置（未顯示）及冷卻單元（未顯示）。Peltier熱電裝置可具有經構形與微流體裝置320之至少一個表面介接之第一表面。冷卻單元可為例如冷卻區塊（未顯示），例如液體冷卻之鋁塊。Peltier熱電裝置之第二表面（例如，與第一表

面相對之表面)可經構形以與此一冷卻區塊之表面介接。冷卻區塊可連接至經構形以使經冷卻液體經由冷卻區塊循環之流體路徑314。在圖3A中所圖解說明之實施例中，支撐結構300包含入口316及出口318以自外部儲存器(未顯示)接收經冷卻流體，將經冷卻流體引入流體路徑314中且經過冷卻區塊，隨後使經冷卻流體返回外部儲存器。在一些實施例中，Peltier熱電裝置、冷卻單元及/或流體路徑314可安裝在支撐結構300之外罩312上。在一些實施例中，熱控制子系統306經構形以調控Peltier熱電裝置之溫度，以達成微流體裝置320之目標溫度。Peltier熱電裝置之溫度調控可例如藉由熱電裝置電源來達成，例如 Pololu™ 熱電裝置電源 (Pololu Robotics and Electronics Corp.)。熱控制子系統306可包括反饋電路，例如由模擬電路提供之溫度值。或者，反饋電路可由數位電路提供。

在一些實施例中，巢300可包括具有反饋電路之熱控制子系統306，該反饋電路係模擬分壓電路(未顯示)，其包括電阻器(例如，電阻為1千歐姆 $\pm 0.1\%$ ，溫度係數 ± 0.02 ppm/C0)及NTC熱阻器(例如，標稱電阻為1千歐姆 $\pm 0.01\%$)。在一些情況下，熱控制子系統306量測來自反饋電路之電壓，隨後使用所計算溫度值作為輸入進行板上(on-board) PID控制環路算法。來自PID控制環路算法之輸出可驅動例如Pololu™馬達驅動器(未顯示)上之定向及脈衝寬度調節信號銷二者，以致動熱電裝置電源，由此控制Peltier熱電裝置。

巢300可包括串聯埠324，其容許控制器308之微處理器與外部主控制器154經由介面310 (未顯示)通訊。另外，控制器308之微處理器可 (例如，經由Plink工具(未顯示))與電信號生成子系統304及熱控制子系統306通訊。因此，經由控制器308、介面310及串聯埠324之組合，電信號生成

子系統304及熱控制子系統306可與外部主控制器154通訊。以此方式，主控制器154尤其可藉由實施用於輸出電壓調節之縮放計算來幫助電信號生成子系統304。經由耦連至外部主控制器154之顯示裝置170提供之圖形使用者介面(GUI) (未顯示)可經構形以將分別自熱控制子系統306及電信號生成子系統304獲得之溫度及波形資料繪圖。或者或另外，GUI可容許更新至控制器308、熱控制子系統306及電信號生成子系統304。

如上文所論述，系統150可包括成像裝置。在一些實施例中，成像裝置包含光調變子系統330 (參見圖3B)。光調變子系統330可包括數位鏡裝置(DMD)或微光閘陣列系統(MSA)，其任一者可經構形以自光源332接收光並將所接收光之亞組傳送至顯微鏡350之光學元件串中。或者，光調變子系統330可包括產生其自身之光(且由此免除對光源332之需求)之裝置，例如有機發光二極體顯示器(OLED)、矽基液晶(LCOS)裝置、矽基鐵電液晶裝置(FLCOS)或透射式液晶顯示器(LCD)。光調變子系統330可為例如投影機。因此，光調變子系統330可能夠發射結構化及未結構化之光二者。在某些實施例中，系統150之成像模組164及/或動力模組162可控制光調變子系統330。

在某些實施例中，成像裝置進一步包含顯微鏡350。在該等實施例中，巢300及光調變子系統330可個別經構形以安裝在顯微鏡350上。顯微鏡350可為例如標準研究級光學顯微鏡或螢光顯微鏡。因此，巢300可經構形以安裝在顯微鏡350之台344上及/或光調變子系統330可經構形以安裝在顯微鏡350之埠上。在其他實施例中，本文所述巢300及光調變子系統330可為顯微鏡350之整體組件。

在某些實施例中，顯微鏡350可進一步包括一或多個檢測器348。在

一些實施例中，檢測器348受成像模組164控制。檢測器348可包括目鏡、電荷耦合裝置(CCD)、照相機(例如，數位照相機)或其任一組合。若存在至少兩個檢測器348，一個檢測器可為例如高幀率照相機，而另一檢測器可為高靈敏度照相機。此外，顯微鏡350可包括光學元件串，其經構形以接收自微流體裝置320反射及/或發射之光且將所反射及/或發射之光之至少一部分聚焦於一或多個檢測器348上。顯微鏡之光學元件串亦可包括用於不同檢測器之不同鏡筒透鏡(未顯示)，使得每一檢測器上之最終放大率可不同。

在某些實施例中，成像裝置經構形以使用至少兩個光源。舉例而言，第一光源332可用於產生結構化光(例如，經由光調變子系統330)且第二光源334可用於提供未結構化光。第一光源332可產生結構化光用於光學致動之應電運動(electrokinesis)及/或螢光激發，且第二光源334可用於提供明視野照明。在該等實施例中，動力模組164可用於控制第一光源332，且成像模組164可用於控制第二光源334。顯微鏡350之光學元件串可經構形以(1) 自光調變子系統330接收結構化光並在微流體裝置(例如光學致動之電動力學裝置)由巢300容納時將結構化光聚焦於該裝置之至少第一區域上，且(2) 自微流體裝置接收反射及/或發射之光並將該反射及/或發射光之至少一部分聚焦至檢測器348上。光學元件串可進一步經構形以自第二光源接收未結構化光並在微流體裝置由巢300容納時將未結構化光聚焦於該裝置之至少第二區域上。在某些實施例中，微流體裝置之第一及第二區域可為重疊區域。舉例而言，第一區域可為第二區域之亞組。在其他實施例中，第二光源334可另外或替代地包括雷射，其可具有任何適宜光波長。圖3B中所示光學系統之代表圖僅係示意性代表圖，且光學系統

可包括額外濾波器、陷波濾波器、透鏡及諸如此類。在第二光源334包括一或多個光源用於明視野及/或螢光激發以及雷射照明時，光源之物理配置可自圖3B中所示變化，且可在光學系統內之任何適宜物理位置引入雷射照明。光源334及光源332/光調變子系統330之示意性位置亦可互換。

在圖3B中，顯示第一光源332向光調變子系統330供應光，該光調變子系統330將結構化光提供至系統355之顯微鏡350之光學元件串(未顯示)。顯示第二光源334經由光束分離器336將未結構化光提供至光學元件串。來自光調變子系統330之結構化光及來自第二光源334之未結構化光自光束分離器336一起行進經過光學元件串到達第二光束分離器(或二色性濾波器338，端視光調變子系統330提供之光而定)，其中光經由物鏡336向下反射至樣品平面342。隨後自樣品平面342反射及/或發射之光向上行進回至物鏡340，經由光束分離器及/或二色性濾波器338且行進至二色性濾波器346。到達二色性濾波器346之光僅一部分通過並到達檢測器348。

在一些實施例中，第二光源334發射藍光。使用適當的二色性濾波器346，自樣品平面342反射之藍光能通過二色性濾波器346並到達檢測器348。與之相比，來自光調變子系統330之結構化光自樣品平面342反射，但不通過二色性濾波器346。在此實例中，二色性濾波器346濾出波長長於495 nm之可見光。若自光調變子系統發射之光不包括任何短於495 nm之波長，則來自光調變子系統330之光之該濾出可僅為完全的(如圖所示)。在實踐中，若來自光調變子系統330之光包括短於495 nm之波長(例如，藍光波長)，則一些來自光調變子系統之光可通過濾波器346到達檢測器348。在此一實施例中，濾波器346作用於改變自第一光源332及第二光源334到達檢測器348之光量之間的平衡。此在第一光源332顯著強於第二

光源334時係有益的。在其他實施例中，第二光源334可發射紅光，且二色性濾波器346可濾出非紅光可見光(例如，波長短於650 nm之可見光)。

塗佈溶液及塗佈劑. 不欲受限於理論，在微流體裝置之至少一或多個內表面已經條件化或塗佈，以呈遞有機及/或親水分子層，提供微流體裝置與其中所維持生物微小物體之間之主要界面時，將生物微小物體(例如，生物細胞)維持在微流體裝置內(例如，DEP構形及/或EW構形之微流體裝置)可經促進(即，生物微小物體在微流體裝置內展現增加之存活率、更大擴增及/或更大可攜性)。在一些實施例中，微流體裝置之一或多個內表面(例如DEP構形之微流體裝置之電極活化基板之內表面、微流體裝置之蓋及/或迴路材料之表面)可經塗佈溶液及/或塗佈劑處理或改性，以生成期望有機及/或親水分子層。

塗層可在引入生物微小物體之前或之後施加，或可與生物微小物體同時引入。在一些實施例中，可在包括一或多種塗佈劑之流體介質中將生物微小物體輸入微流體裝置中。在其他實施例中，微流體裝置(例如，DEP構形之微流體裝置)之內表面在將生物微小物體引入微流體裝置之前經包含塗佈劑之塗佈溶液處理或「塗底漆」。

在一些實施例中，微流體裝置之至少一個表面包括塗佈材料，其提供適於維持及/或擴增生物微小物體之有機及/或親水分子層(例如提供如下文所述之條件化表面)。在一些實施例中，微流體裝置之實質上所有內表面包括塗佈材料。經塗佈內表面可包括流動區域(例如，通道)、腔室或隔離圍欄或其組合之表面。在一些實施例中，複數個隔離圍欄各自具有至少一個內表面經塗佈材料塗佈。在其他實施例中，複數個流動區域或通道各自具有至少一個內表面經塗佈材料塗佈。在一些實施例中，複數個隔離圍

欄中之每一者及複數個通道中之每一者之至少一個內表面經塗佈材料塗佈。

塗佈劑/溶液. 可使用任何便捷塗佈劑/塗佈溶液，包括但不限於：血清或血清因子、牛血清白蛋白(BSA)、聚合物、清潔劑、酶及其任何組合。

基於聚合物之塗佈材料. 至少一個內表面可包括包含聚合物之塗佈材料。聚合物可共價或非共價鍵結(或可非特異性黏著)至至少一個表面。聚合物可具有多個結構基序，例如在嵌段聚合物(及共聚物)、星形聚合物(星形共聚物)及接枝或梳形聚合物(接枝共聚物)中發現者，其皆可適用於本文所揭示之方法。

聚合物可包括包含伸烷基醚部分之聚合物。眾多種含有伸烷基醚之聚合物可適用於本文所述微流體裝置中。含有伸烷基醚之聚合物之一個非限制性實例性類別係兩親性非離子型嵌段共聚物，其以不同比率及在聚合物鏈內之不同位置包括聚氧化乙烯(PEO)及聚氧化丙烯(PPO)亞單元之嵌段。Pluronic®聚合物(BASF)係此類型之嵌段共聚物且業內已知其在與活細胞接觸時適於使用。聚合物之平均分子質量 M_w 可介於約2000Da至約20KDa範圍內。在一些實施例中，PEO-PPO嵌段共聚物可具有大於約10(例如12-18)之親水性-親脂性平衡(HLB)。可用於產生經塗佈表面之特定Pluronic®聚合物包括Pluronic® L44、L64、P85及F127 (包括F127NF)。另一類別之含有伸烷基醚之聚合物係聚乙二醇(PEG $M_w < 100,000$ Da)，或者聚氧化乙烯(PEO, $M_w > 100,000$)。在一些實施例中，PEG之 M_w 可為約1000Da、5000Da、10,000Da或20,000Da。

在其他實施例中，塗佈材料可包括含有羧酸部分之聚合物。羧酸亞

單元可為含有烷基、烯基或芳香族部分之亞單元。一個非限制性實例係聚乳酸(PLA)。在其他實施例中，塗佈材料可包括含有磷酸酯部分之聚合物，該磷酸酯部分在聚合物主鏈之末端或自聚合物主鏈側接。在其他實施例中，塗佈材料可包括含有磺酸部分之聚合物。磺酸亞單元可為含有烷基、烯基或芳香族部分之亞單元。一個非限制性實例係聚苯乙烯磺酸(PSSA)或聚茴香腦磺酸。在其他實施例中，塗佈材料可包括包含胺部分之聚合物。多胺基聚合物可包括天然多胺聚合物或合成多胺聚合物。天然多胺之實例包括精胺、亞精胺及腐胺。

在其他實施例中，塗佈材料可包括含有醣部分之聚合物。在非限制性實例中，多醣(例如黃原膠或聚葡萄糖)可適於形成可減少或防止微流體裝置中之細胞黏附之材料。舉例而言，可使用大小為約3kDa之聚葡萄糖聚合物來提供用於微流體裝置內之表面之塗佈材料。

在其他實施例中，塗佈材料可包括含有核苷酸部分之聚合物，即核酸，其可具有核糖核苷酸部分或去氧核糖核苷酸部分，提供高分子電解質表面。核酸可含有僅天然核苷酸部分或可含有非天然核苷酸部分，該等非天然核苷酸部分包含核鹼基、核糖或磷酸酯部分之類似物，例如但不限於7-去氫腺嘌呤、戊醣、甲基膦酸酯或硫代磷酸酯部分。

在其他實施例中，塗佈材料可包括含有胺基酸部分之聚合物。含有胺基酸部分之聚合物可包括含有天然胺基酸之聚合物或含有非天然胺基酸之聚合物，其任一者可包括肽、多肽或蛋白質。在一個非限制性實例中，蛋白質可為牛血清白蛋白(BSA)及/或包含白蛋白之血清(或多種不同血清之組合)及/或一或多種作為塗佈劑之其他類似蛋白質。血清可來自任何便捷來源，包括但不限於胎牛血清、綿羊血清、山羊血清、馬血清及諸如此

類。在某些實施例中，塗佈溶液中之BSA係以約1 mg/mL至約100 mg/mL之濃度存在，包括5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mL、50 mg/mL、60 mg/mL、70 mg/mL、80 mg/mL、90 mg/mL或更多或其之間之任一值。在某些實施例中，塗佈溶液中之血清可以約20% (v/v)至約50% v/v之濃度存在，包括25%、30%、35%、40%、45%或更多或其之間之任一值。在一些實施例中，BSA可作為塗佈劑以5 mg/mL存於塗佈溶液中，而在其他實施例中，BSA可作為塗佈劑以70 mg/mL存於塗佈溶液中。在某些實施例中，血清作為塗佈劑以30%存於塗佈溶液中。在一些實施例中，細胞外基質(ECM)蛋白可在塗佈材料內提供用於最佳化細胞黏著以促進細胞生長。可包括於塗佈材料中之細胞基質蛋白可包括但不限於膠原、彈性蛋白、含RGD肽(例如纖連蛋白)或層黏蛋白。在其他實施例中，微流體裝置之塗佈材料內可提供生長因子、細胞介素、激素或其他細胞信號傳導物質。

在一些實施例中，塗佈材料可包括含有環氧烷部分、羧酸部分、磺酸部分、磷酸酯部分、醣部分、核苷酸部分或胺基酸部分中之多於一種之聚合物。在其他實施例中，聚合物條件化之表面可包括多於一種聚合物之混合物，各聚合物具有環氧烷部分、羧酸部分、磺酸部分、磷酸酯部分、醣部分、核苷酸部分及/或胺基酸部分，其可獨立地或同時地納入塗佈材料中。

共價連接之塗佈材料. 在一些實施例中，該至少一個內表面包括共價連接之分子，其提供適於維持/擴增微流體裝置內之生物微小物體之有機及/或親水分子層，為該等細胞提供條件化表面。

共價連接之分子包括連接基團，其中該連接基團共價連接至微流體

裝置之一或多個表面，如下文所述。該連接基團亦共價連接至一個經構形以提供適於維持/擴增生物微小物體之有機及/或親水分子層之部分。

在一些實施例中，該經構形以提供適於維持/擴增生物微小物體之有機及/或親水分子層之共價連接部分可包括烷基或氟烷基(其包括全氟烷基)部分；單醣或多醣(其可包括(但不限於)聚葡萄糖)；醇(包括(但不限於)炔丙醇)；多元醇，包括(但不限於)聚乙烯醇；仲烷基醚，包括(但不限於)聚乙二醇；高分子電解質(包括(但不限於)聚丙烯酸或聚乙烯基膦酸)；胺基(包括其衍生物，例如(但不限於)烷基化胺、羥基烷基化胺基、鈷及含有非芳基化氮環原子之雜環基團，例如(但不限於)嗎啉基或六氫吡嗪基)；羧酸，包括(但不限於)丙炔酸(其可提供羧酸根陰離子表面)；膦酸，包括(但不限於)乙炔基膦酸(其可提供膦酸根陰離子表面)；磺酸根陰離子；羧基甜菜鹼；磺基甜菜鹼；胺磺酸；或胺基酸。

在多個實施例中，該經構形以提供適於維持/擴增微流體裝置中之生物微小物體之有機及/或親水分子層之共價連接部分可包括非聚合部分，例如烷基部分，經取代之烷基部分，例如氟烷基部分(包括(但不限於)全氟烷基部分)，胺基酸部分、醇部分、胺基部分、羧酸部分、膦酸部分、磺酸部分、胺磺酸部分或醣部分。或者，共價連接部分可包括聚合部分，其可為上述部分中之任一者。

在一些實施例中，共價連接之烷基部分可包含形成直鏈(例如，至少10個碳、或至少14、16、18、20、22或更多碳之直鏈)之碳原子且可為無支鏈烷基部分。在一些實施例中，烷基可包括經取代烷基(例如，烷基中的一些碳可經氟化或全氟化)。在一些實施例中，烷基可包括接合至第二區段(可包括未經取代烷基)之第一區段(其可包括全氟烷基)，其中第一及

第二區段可直接或間接(例如，藉助醚鍵)接合。烷基之第一區段可位於連接基團遠端，且烷基之第二區段可位於連接基團近端。

在其他實施例中，共價連接之部分可包括至少一個胺基酸，其可包括多於一種類型之胺基酸。因此，共價連接之部分可包括肽或蛋白質。在一些實施例中，共價連接之部分可包括可提供兩性離子型表面以支持細胞生長、存活、可攜性或其任一組合之胺基酸。

在其他實施例中，共價連接之部分可包括至少一個環氧烷部分，且可包括如上所述之任一環氧烷聚合物。含有伸烷基醚之聚合物之一個有用類別係聚乙二醇 (PEG $M_w < 100,000\text{Da}$)，或者聚氧化乙烯 (PEO, $M_w > 100,000$)。在一些實施例中，PEG之 M_w 可為約1000Da、5000Da、10,000Da或20,000Da。

共價連接之部分可包括一或多個醣。共價連接之醣可為單醣、二醣或多醣。共價連接之醣可經修飾以引入允許偶合或精製以附接至表面之反應性配對部分。實例性反應性配對部分可包括醛、炔或鹵基部分。多醣可以隨機方式經修飾，其中每一醣單體可經修飾或多醣內之僅一部分醣單體經修飾，以提供可直接或間接偶合至表面之反應性配對部分。一個實例可包括聚葡萄糖多醣，其可經由無支鏈連接體間接偶合至表面。

共價連接之部分可包括一或多個胺基。胺基可為經取代胺部分、胍部分、含氮雜環部分或雜芳基部分。含胺基部分可具有允許微流體裝置內及視情況隔離圍欄及/或流動區域(例如，通道)內的環境的pH改性之結構。

提供條件化表面之塗佈材料可包含僅一個種類之共價連接之部分或可包括多於一個不同種類之共價連接之部分。舉例而言，氟烷基條件化表

面(包括全氟烷基)可具有複數個共價連接之部分，該等部分皆相同，例如具有相同連接基團且共價附接至表面，相同總長度及相同數目之包含氟烷基部分之氟亞甲基單元。或者，塗佈材料可具有多於一個種類之附接至表面之共價連接之部分。舉例而言，塗佈材料可包括具有共價連接之烷基或氟烷基部分之分子，該等部分具有指定數目之亞甲基或氟亞甲基單元，且可進一步包括具有共價附接至烷基或氟烷基鏈之帶電荷部分之另一組分子，該等部分具有更大數目之亞甲基或氟亞甲基單元，其可提供在經塗佈表面呈遞更龐大部分之能力。在此情況下，第一組具有不同的、較低空間需求之末端及較少主鏈原子之分子可有助於官能化整個基板表面，且由此防止與構成基板本身之矽/氧化矽、二氧化鈣或氧化鋁之不期望黏著或接觸。在另一實例中，共價連接之部分可提供兩性離子型表面，在表面上以隨機方式呈遞交替電荷。

條件化表面性質. 除了條件化表面之組成以外，諸如疏水材料之物理厚度等其他因素可影響DEP力。多種因素可改變條件化表面之物理厚度，例如在基板上形成條件化表面之方式(例如氣相沈積、液相沈積、旋塗、溢流及靜電塗佈)。在一些實施例中，條件化表面之厚度為約1nm至約10nm；約1 nm至約7 nm；約1nm至約5nm；或其之間之任何個別值。在其他實施例中，由共價連接之部分形成之條件化表面之厚度可為約10 nm至約50 nm。在多個實施例中，如本文所述製備之條件化表面之厚度小於10nm。在一些實施例中，條件化表面之共價連接之部分在共價連接至微流體裝置之表面(例如，DEP構形之基板表面)時可形成單層，且厚度可小於10 nm (例如，小於5 nm或約1.5至3.0 nm)。該等值與藉由旋塗製備之表面相差較大，例如後者厚度通常可為約30nm。在一些實施例中，條件

化表面無需理想地形成的單層即可適當發揮功能以在DEP構形之微流體裝置內操作。

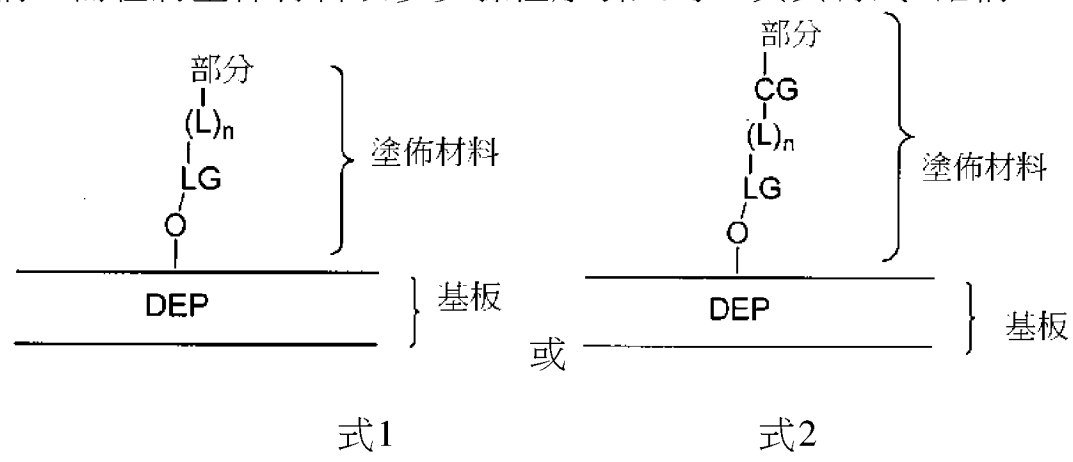
在多個實施例中，提供微流體裝置之條件化表面之塗佈材料可提供期望電性質。不欲受限於理論，影響經特定塗佈材料塗佈之表面的穩健性之一個因素係固有電荷截留。不同塗佈材料可截留電子，其可導致塗佈材料斷裂。塗佈材料中之缺陷可增加電荷截留且導致塗佈材料進一步斷裂。類似地，不同塗佈材料具有不同介電強度(即導致介電質斷裂之最小施加電場)，其可影響電荷截留。在某些實施例中，塗佈材料可具有減少或限制電荷截留量之整體結構(例如，密集壓緊之單層結構)。

除了其電性質以外，條件化表面之性質亦可有益於與生物分子一起使用。舉例而言，含有氟化(或全氟化)碳鏈之條件化表面可在減少表面結垢量方面提供相對於烷基封端之鏈之益處。如本文所用之表面結垢係指微流體裝置之表面上之無差別材料沈積之量，其可包括生物材料(例如蛋白質及其降解產物、核酸及各別降解產物及諸如此類)之永久性或半永久性沈積。

單式或多部分條件化表面. 共價連接之塗佈材料可藉由已含有部分之分子之反應來形成，該部分經構形以提供適於在微流體裝置中維持/擴增生物微小物體之有機及/或親水分子層，如下文所述。或者，共價連接之塗佈材料可以兩部分順序藉由將經構形以提供適於維持/擴增生物微小物體之有機及/或親水分子層之部分偶合至自身已共價連接至表面之表面改性配體來形成。

製備共價連接之塗佈材料之方法. 在一些實施例中，共價連接至微流體裝置之表面(例如，包括隔離圍欄及/或流動區域之至少一個表面)之塗佈

材料具有式1或式2之結構。在以一個步驟將塗佈材料引入表面時，其具有式1結構，而在將塗佈材料以多步驟程序引入時，其具有式2結構。



塗佈材料可共價連接至DEP構形或EW構形之基板之表面之氧化物。DEP或EW構形之基板可包含矽、氧化矽、氧化鋁或二氧化鉛。氧化物可作為基板之天然化學結構之部分存在，或可如下文所論述來引入。

塗佈材料可附接至氧化物經由連接基團(「LG」)，該連接基團可為自矽氧烷或膦酸基團與氧化物之反應形成之矽氧基或膦酸酯基團。經構形以提供適於在微流體裝置中維持/擴增生物微小物體之有機及/或親水分子層之部分可為本文所述之任一部分。連接基團LG可直接或間接連接至經構形以提供適於在微流體裝置中維持/擴增生物微小物體之有機及/或親水分子層之部分。在連接基團LG直接連接至該部分時，可選連接體(「L」)不存在且n為0。在連接基團LG間接連接至該部分時，連接體L存在且n為1。連接體L可具有直鏈部分，其中該直鏈部分之主鏈可包括1至200個選自矽、碳、氮、氧、硫及/或磷原子之任一組合之非氫原子，其具有如業內已知之化學鍵結限制。其可夾雜有一或多個部分之任一組合，該等部分可選自醚、胺基、羰基、醯胺基及/或膦酸酯基團、伸芳基、伸雜芳基或雜環基。在一些實施例中，連接體L之主鏈可包括10至20個原子。在其他實施例中，連接體L之主鏈可包括約5個原子至約200個原子；約10個原子

至約80個原子；約10個原子至約50個原子；或約10個原子至約40個原子。在一些實施例中，主鏈原子皆為碳原子。

在一些實施例中，可以多步驟程序將經構形以提供適於維持/擴增生物微小物體之有機及/或親水分子層之部分添加至基板之表面，且其具有如上文所示之式2結構。該部分可為本文所述任一部分。

在一些實施例中，偶合基團CG代表自反應性部分 R_x 與反應性配對部分 R_{px} (即，經構形與反應性部分 R_x 反應之部分)之反應所得之基團。舉例而言，一種典型偶合基團CG可包括甲醯胺基，其係胺基與羧酸衍生物(例如活化酯、醯氯或諸如此類)反應之結果。其他CG可包括伸三唑基、甲醯胺基、硫代醯胺基、肟、巰基、二硫化物、醚或烯基，或任何其他可在反應性部分與其各別反應性配對部分反應後形成之適宜基團。偶合基團CG可位於連接體L之第二末端(即，靠近經構形以提供適於在微流體裝置中維持/擴增生物微小物體之有機及/或親水分子層之部分之末端)，該連接體L可包括如上所述元件之任一組合。在一些其他實施例中，偶合基團CG可中斷連接體L之主鏈。在偶合基團CG為伸三唑基時，其可為得自卡扣(Click)偶合反應之產物且可進一步經取代(例如，二苯并環辛烯基稠合之伸三唑基)。

在一些實施例中，使用化學氣相沈積使塗佈材料(或表面改性配體)沈積於微流體裝置之內表面上。氣相沈積製程可視情況例如藉由以下方式加以改良：預清潔蓋110、微流體迴路材料116及/或基板(例如，DEP構形之基板之電極活化基板206之內表面208，或EW構形之基板之支撐結構104之介電層)，暴露於溶劑浴、超聲處理或其組合。或者或另外，該預清潔可包括在氧電漿清潔器中處理蓋110、微流體迴路材料116及/或基板，該

氧電漿清潔器可以出各種雜質，同時引入氧化表面(例如在表面之氧化物，其可如本文所述經共價修飾)。或者，可使用液相處理(例如鹽酸與過氧化氫之混合物或硫酸與過氧化氫之混合物(例如，食人魚洗液(**piranha solution**)，其硫酸對過氧化氫之比率可為約3:1至約7:1))代替氧電漿清潔器。

在一些實施例中，在微流體裝置200已經裝配以形成界定微流體迴路120之外殼102後，使用氣相沈積塗佈微流體裝置200之內表面。不欲受限於理論，將此一塗佈材料沈積於完全裝配之微流體迴路120上可有益於防止由於微流體迴路材料116與電極活化基板206之介電層及/或蓋110之間之黏結變弱引起之脫層。在其中採用兩步式製程之實施例中，可經由如上所述之氣相沈積引入表面改性配體，隨後引入經構形以提供適於維持/擴增生物微小物體之有機及/或親水分子層之部分。後續反應可藉由使表面經改性之微流體裝置暴露於適宜偶合劑溶液中來實施。

圖2H繪示微流體裝置290之橫斷面視圖，其具有提供條件化表面之實例性共價連接之塗佈材料。如圖解說明，塗佈材料298 (示意性顯示)可包含密集壓緊之分子之單層，該等分子共價鍵結至基底286 (其可為DEP基板)之內表面294及微流體裝置290之蓋288之內表面292二者。塗佈材料298可佈置於靠近且向內面朝微流體裝置290之外殼284之實質上所有內表面294、292上，在一些實施例中且如上文所論述，包括用於界定微流體裝置290內之迴路元件及/或結構之微流體迴路材料(未顯示)之表面。在替代性實施例中，塗佈材料298可佈置於微流體裝置290之僅一個或一些內表面上。

在圖2H中所示之實施例中，塗佈材料298可包括有機矽氧烷分子之

單層，每一分子經由矽氧基連接體296共價鍵結至微流體裝置290之內表面292、294。可使用上文所論述之任一塗佈材料298 (例如烷基封端、氟烷基封端之部分、PEG封端之部分、聚葡萄糖封端之部分、或有機矽氧基部分之含有正或負電荷之末端部分)，其中該末端部分佈置於其面向外殼之末端(即塗佈材料298之單層中未結合至內表面292、294且靠近外殼284之部分)。

在其他實施例中，用於塗佈微流體裝置290之內表面292、294之塗佈材料298可包括陰離子型、陽離子型或兩性離子型部分或其任一組合。不欲受限於理論，藉由在微流體迴路120之外殼284之內表面呈遞陽離子型部分、陰離子型部分及/或兩性離子型部分，塗佈材料298可與水分子形成強氫鍵，使得水合之所得水用作使生物微小物體不與非生物分子(例如，基板之矽及/或氧化矽)相互作用之層(或「屏障」)。另外，在其中結合塗佈劑使用塗佈材料298之實施例中，塗佈材料298之陰離子、陽離子及/或兩性離子可與存於外殼284中之介質180 (例如塗佈溶液)中之非共價塗佈劑(例如溶液中之蛋白質)之帶電荷部分形成離子鍵。

在其他實施例中，塗佈材料可包含或經化學改性以在其面向外殼之末端呈遞親水塗佈劑。在一些實施例中，塗佈材料可包括含有伸烷基醚之聚合物，例如PEG。在一些實施例中，塗佈材料可包括多醣，例如聚葡萄糖。如同上文所論述之帶電荷部分(例如，陰離子型、陽離子型及兩性離子型部分)，親水塗佈劑可與水分子形成強氫鍵，使得水合之所得水用作使生物微小物體不與非生物分子(例如，基板之矽及/或氧化矽)相互作用之層(或「屏障」)。

適當塗佈處理及改性之其他細節可參見2016年4月22日申請之美國申

請案第15/135,707號，其係全文以引用方式併入。

用於在微流體裝置之隔離圍欄內維持細胞存活之其他系統組件，為促進細胞群體生長及/或擴增，可藉由其他系統組件提供有助於維持功能細胞之環境條件。舉例而言，該等其他組件可提供營養物、細胞生長信號傳導物質、pH調節、氣體交換、溫度控制及自細胞移除廢產物。

用於在微流體裝置之隔離圍欄內維持細胞存活之其他系統組件，為促進細胞群體生長及/或擴增，可藉由其他系統組件提供有助於維持功能細胞之環境條件。舉例而言，該等其他組件可提供營養物、細胞生長信號傳導物質、pH調節、氣體交換、溫度控制及自細胞移除廢產物。

加載方法. 生物微小物體或微小物體(例如但不限於珠粒)之加載可涉及使用如本文所述之流體流動、重力、介電電泳(DEP)力、電潤濕、磁力或其任一組合。DEP力可以光學方式生成，例如藉由光電鑷子(OET)構形生成，及/或以電方式生成，例如藉由以時間/空間模式活化電極/電極區域來生成。類似地，電潤濕力可以光學方式來提供，例如藉由光電潤濕(OEW)構形提供，及/或以電方式來提供，例如藉由以時間/空間模式活化電極/電極區域來提供。

實驗

系統及微流體裝置. 系統及微流體裝置：由Berkeley Lights, Inc.製造。該系統包括至少流量控制器、溫度控制器、流體介質調節及幫浦組件、用於光活化DEP構形之光源、用於微流體裝置之安裝台及照相機。微流體裝置係OptoSelect™裝置(Berkeley Lights, Inc.)，其用OptoElectroPositioning (OEP™)技術構形。微流體裝置包括微流體通道及複數個與其流體連接之NanoPen™腔室，該等腔室之容積為約 7×10^5 立

方微米。

啟動方案. 使250微升100%二氧化碳以12微升/sec之速率流入。此後流入250微升構成如下之啟動培養基：1000 ml Iscove氏改良Dulbecco氏培養基(ATCC® 目錄號30-2005)、200 ml胎牛血清(ATCC® 目錄號30-2020)、10 ml青黴素-鏈黴素(Life Technologies® 目錄號15140-122)及10 mL Pluronic F-127 (Life Tech目錄號50-310-494)。啟動之最終步驟包括250微升啟動培養基，以12微升/sec流入。之後引入培養基。

灌注方案. 灌注方法係以下兩種方法中之任一者：

- 1. 以0.01微升/sec灌注2h；以2微升/sec灌注64 sec；並重複。
- 2. 以0.02微升/sec灌注100 sec；停止流動500 sec；以2微升/sec灌注64 sec；並重複。

條碼化核酸捕捉珠粒：珠粒係聚苯乙烯(16微米)或磁性(22微米)，Spherotech編號SVP-150-4或編號SVM-200-4。珠粒經改性以包括具有如本文所述條碼之寡核苷酸。條碼化珠粒可以如業內已知之任何適宜方式合成。

表3. 用於此實驗中之引子.

SEQ ID No.	
103	/5Me-isodC//isodG//iMe-isodC/ACACTCTTTCCCTACACGACGCrGrGrG
104	5'- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
105	5'-/5Biosg/ACACTCTTTCCCT ACACGACGC-3'
106	5'- AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTC C*G*A*T*C*T-3'
107	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-3'
108	5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'

RNA測序：珠粒經修飾以顯示寡(dT)捕捉序列/獨特分子標識符序列/條碼/啟動序列。條碼經選擇對於每一珠粒係唯一的。寡(dT)引子/獨特分子標識符標籤/細胞條碼/引子序列可藉由全寡核苷酸合成、分開/合併合成、連接任何長度之寡核苷酸區段或其任一組合來合成。寡(dT)引子/獨特分子標識符標籤/細胞條碼/引子序列可直接或間接共價附接至珠粒或可非共價(例如經由鏈黴抗生物素蛋白/生物素連接體或諸如此類)附接。在此實驗中，將包括捕捉序列、UMI、條碼及啟動序列之完全合成之寡核苷酸經由非共價生物素/鏈黴抗生物素蛋白連接附接至珠粒。

實例1. 如針對OKT3細胞所示之RNA捕捉、測序庫製備及測序結果。

細胞：OKT3細胞(鼠類骨髓瘤雜交瘤細胞系)係自ATCC獲得(ATCC®目錄號CRL-8001™)。該等細胞係作為懸浮細胞系來提供。藉由接種約 1×10^5 至約 2×10^5 個活細胞/mL且使用空氣中之5%二氧化碳作為氣態環境在37°C下培育來維持培養物。每2-3天分割細胞。計數OKT3細胞數及存活率且將細胞密度調節至 5×10^5 /ml以供加載至微流體裝置。

培養基：合併1000 ml Iscove氏改良Dulbecco氏培養基(ATCC®目錄號30-2005)、200 ml胎牛血清(ATCC®目錄號30-2020)及10 ml青黴素-鏈黴素(Life Technologies®目錄號15140-122)以製備培養基。經由0.22µm過濾器過濾完整培養基並在4°C下遠離光儲存直至使用為止。

當在培育期間灌注時，在引入OptoSelect裝置中之前用空氣中之5%二氧化碳使培養基連續條件化。

實驗：將OKT3細胞之樣品以2E6之密度以200微升引入OptoSelect裝置中。藉由光學致動之介電泳力移動250個細胞以加載1個細胞/NanoPen腔室。每個細胞定位於腔室之離至微流體通道之開口最遠之部分(例如，

分離區域)內。隨後將單一唯一性條碼化珠粒加載至每一經佔據腔室中。加載至具有單一生物細胞之NanoPen腔室之珠粒總數為223，且每一珠粒亦定位於每一腔室之未經歷滲透性流體流之部分內。在此實驗中，產生256個唯一性條碼化珠粒，其各自具有總計4個可盒化序列。藉由以下方式產生多樣性：在條碼內在第一位位置中選擇4個可能序列中之一；在第二位位置中選擇第二組不同的4個可能序列之4個中之一；在第三位位置中選擇第三組不同的4個可能序列之4個中之一；及在第四位置中選擇第四組不同的4個可能序列之4個中之一。

使裂解試劑(單細胞裂解套組, Ambion目錄號4458235)流至微流體通道中且允許其擴散至NanoPen腔室中。使個別入欄OKT3細胞暴露於裂解緩衝液10分鐘。藉由在停止裂解緩衝液(單細胞裂解套組, Ambion目錄號4458235)中流動並在室溫下培育2分鐘來停止裂解，同時微流體通道中無流動。使用其他裂解緩衝液可獲得類似結果，包括但不限於Clontech裂解緩衝液, 目錄號635013，其不需要停止裂解處理步驟。在所用條件下，核膜不破裂。將所釋放mRNA捕捉至存於相同NanoPen腔室內之條碼化珠粒上。

藉由在RT試劑混合物(Thermo Scientific™ Maxima™ H Minus RT (Thermofisher，目錄號EP0751)：4微升RT緩衝液；2微升10毫莫耳之每種dNTP (New England Biolabs 目錄號NO447L)；2微升10微莫耳E5V6引子 (5Me-isodC//iisodG//iMe-isodC/ACACTCTTTCCCTACACGACGCrGrGrG；SEQ ID No. 103)；1微升H Minus RT酶；11微升水)中流動將所捕捉RNA反轉錄為cDNA。或者，可使用Clontech SMARTscribe™反轉錄酶套組(目錄號639536) (包

括酶、緩衝液及DTT)自所捕捉核酸獲得cDNA。在16°C下之20分鐘階段及之後在42°C下之90分鐘反應期期間，允許試劑混合物擴散至NanoPen腔室中。

在反轉錄後，以3微升/sec實施12微升之空白輸出作為陰性對照。隨後單獨地但與如下文所述處置珠粒輸出組類似地處理此對照。

隨後藉由如上所述螢光標記之雜交探針之多重化流來識別每一珠粒之唯一細胞條碼。使螢光標記之探針(以4個探針/試劑流之組提供，每個探針含有與流中其他探針中之任一者不同之螢光團及不一致之寡核苷酸序列，每組4個探針具有可區分螢光標記)以稀釋於來自100 mM原液之1 × DPBS中之1微莫耳流入微流體裝置之微流體通道中，且允許在16°C下經20 min階段擴散至NanoPen腔室中，隨後允許在42°C下雜交90分鐘。(或者，亦順利使用不同緩衝溶液(IDT Duplex緩衝液，目錄號11-05-01-12)。此緩衝液(其不含核酸酶，且含有30 mM Hepes及100 mM乙酸鉀，pH7.5)之使用亦促進該等條件下之優良雙重形成。)在雜交期完成後，使新鮮培養基(DPBS或Duplex緩衝液)流過微流體裝置20 min (300微升，0.25微升/sec)，以將未結合雜交探針沖洗出微流體裝置之流動區域。沖洗期經選擇足夠長，使未雜交的雜交探針可擴散出每一NanoPen腔室。隨後激發每一可區分螢光波長(Cy5、FITC、DAPI及德克薩斯紅通道)，且其識別(若任一NanoPen腔室)顯示螢光信號。記錄定位至NanoPen腔室之每一探針之螢光標記之位置及色彩，且與第一試劑流之雜交探針之已知序列及螢光標記相關聯，並分配珠粒上之條碼之相應可盒化序列之標識。使其他組螢光標記之雜交探針(各自具有彼此不一致且與第一及任何其他在先試劑流之序列不同之寡核苷酸序列)之其他連續試劑流如上文流入並繼續

檢測。在每輪試劑流及檢測之間，使用100微升1X DPBS (Dulbecco's PBS)之第一沖洗液及之後相同培養基之50微升第二沖洗液實施沖洗，二者皆以0.5微升/sec實施。為使第二或其他試劑流中之可盒化序列之錯誤識別降至最低，僅使用每一可區分螢光團之第一次識別之螢光信號來分配條碼之可盒化序列標識。在完成總計微流體裝置內所有珠粒之條碼中所用所有可盒化序列之試劑流後，將NanoPen腔室中所有珠粒之條碼分配至每一各別單一NanoPen腔室。使用藉由此方法分配之特定條碼序列之所分配位置來識別自哪個特定細胞將RNA捕捉至珠粒，例如來源核酸在微流體裝置之Nanopen腔室內之位置。圖14A顯示該方法中一個NanoPen腔室470號之連續點。每一可區分螢光信號區域如標記為A-D之每一行之頂部所示。每一流係垂直顯示，標記為1-4。在容許流1之探針雜交且沖洗完成後，NanoPen腔室470中之珠粒僅在色彩通道B中具有螢光信號。在引入第二試劑流，允許雜交，並沖洗之後檢測，未檢測到其他標記。應注意，儘管470號NanoPen腔室在第二流期間在「B」螢光通道中顯示信號，但每一條碼及每一探針經設計使得每一條碼僅具有一個具有每一可區分螢光標記之可盒化序列。未記錄此第二信號傳導，此乃因其代表保持結合至珠粒之第一流探針。試劑流2之探針及試劑流3皆未識別其他可盒化序列。然而，對於其他三個螢光通道中之每一者，在第四流中識別螢光信號。因此，對於NanoPen腔室470中珠粒之條碼，將該條碼識別為具有與A4B1C4D4可盒化序列相關之序列。在檢測後，在進一步操作之前，藉由用10mM Tris-HCl (200微升，0.5微升/sec)兩次沖洗微流體裝置之流動區域來移除剩餘雜交探針。

隨後使用光學致動之介電泳力將條碼化珠粒自NanoPen腔室輸出至

流動區域(例如，流動通道)中之置換緩衝液10微莫耳Tris中，如圖14B中所示。使用流將自NanoPen腔室輸出之珠粒自微流體裝置輸出併合併。陽性對照珠粒存於輸出組中。在藉由在80°C下培育10分鐘使反轉錄酶不活化及用Exo I緩衝液(17微升輸出珠粒，1微升外核酸酶溶液及2微升Exo I緩衝液)中之外核酸酶I (NEB，目錄號M0293L)處理後，將珠粒輸出組(20微升體積)添加至5微升10× Advantage 2 PCR緩衝液、dNTP、10微莫耳SNGV6引子(5'-/5Biosg/ACACTCTTTCCCT ACACGACGC-3'；SEQ ID No. 105)、1微升Advantage 2聚合酶混合物；及22微升水中。此序列既存於E5V6引子上亦存於珠粒上之寡聚物內，且用於經由單一引子PCR擴增cDNA，以相對於較短片段富集全長cDNA。使cDNA經歷18個DNA擴增週期(Advantage® 2 PCR套組，Clontech，目錄號639206)。

用於輸出組之粗擴增混合物之初始純化係使用0.6 × SPRI (固相可逆固定化)珠粒(Agencourt AMPure XP珠粒(Beckman Coulter，目錄號A63881)根據供應商說明來實施。以電泳方式及/或螢光方式(Qubit™, ThermoFisher Scientific)實施量化(Bioanalyzer 2100, Agilent, Inc.) (圖14C)，且顯示經擴增DNA之可接受回收率用於在進一步庫製備之前根據供應商說明書實施單側式標籤化(Nextera XT DNA庫製備套組，Illumina®, Inc.)。在第二0.6× SPRI純化後，實施大小選擇(預澆鑄瓊脂醣凝膠電泳系統. 梯帶：50 bp梯帶(ThermoFisher，目錄號10488-099)。E-gel®：2%瓊脂醣(Thermofisher，目錄號G501802)。凝膠萃取套組：QIAquick凝膠萃取套組(Qiagen，編號28704)。如上文實施量化，提供具有適當300-800 bp大小之庫用於測序。(圖14D)

測序係使用MiSeq測序儀(Illumina®, Inc.)實施。測序結果之初始分

析指示，自空白對照輸出獲得之資料看起來與帶有DNA之珠粒之輸出組不同，其測序讀段似乎與陽性對照序列相關。(資料未顯示)。分析空白對照輸出內之條碼標識，可見大多高表示條碼源自陽性對照珠粒。(資料未顯示)。由於條碼可與特定NanoPen腔室相聯繫，對細胞條碼之比較顯示，來自經檢測且經輸出之珠粒(「出欄」)之細胞條碼之表示遠高於經檢測但未自其特定NanoPen腔室位置輸出(「未出欄」)之細胞條碼。如圖15A中所示，熱圖代表圖顯示經檢測條碼之大組，該等條碼來自已知自NanoPen腔室輸出(「出欄」)之標記為「DU」之珠粒。大多數經檢測DU條碼位於熱圖之較高y-軸位置，顯示更頻繁識別之序列。已知與未輸出珠粒相關之經檢測條碼之較小組顯示於標記為「DN」(例如，經檢測但未出欄)之柱中。同樣，每一DN條碼之垂直位置指示其條碼序列識別之相對頻率。使用MiSeq測序儀(Illumina®, Inc.)實施測序。在讀段1上實施55個測序週期以對40bp條碼及10bp UMI進行測序。在全長條碼之最初兩個「字組」與隨後兩個之間需要4個額外週期，此乃因在該特定實驗中使用4bp進行條碼連接。最後一個週期用於鹼基調用目的。對另一8bp進行測序，其代表在Nextera庫製備期間添加且容許在相同測序運行中多重化若干個晶片/實驗之庫索引。最後，對讀段2實施另外46個測序週期(末端配對運行)，其提供cDNA (轉錄物/基因)之序列。可能實施額外週期，端視所用測序套組及期望資訊而定。圖15B顯示繪示相同資料之盒狀圖。不受限於理論，來自經檢測但未出欄位置之該等細胞條碼可作為引子及/或珠粒合成之人造物產生。對在測序資料中發現之條碼之代表之比較顯示，珠粒輸出樣品看起來與自空白輸出收回之條碼顯著不同。

圖16A及B圖解說明使用該等方法對測序資料及庫製備之其他品質評

估。圖16A列示兩個不同實驗A及B，其係如上文來實施，實施反轉錄步驟之時間長度不同(60 min、90 min)。實驗A包括自輸出108個珠粒獲得(自108個細胞捕捉RNA)之DNA庫之資料。實驗B包括自輸出120個珠粒獲得(自120個細胞捕捉RNA)之DNA庫之資料。在圖16B中，「總數」欄顯示自每一實驗之測序資料獲得之讀段總數。「分配」欄代表如下讀段數，其：1) 定位至條碼，且2) 具有高於預選品質臨限值之測序品質。「比對」欄顯示定位至目標基因體之讀段數。移除定位至參照中不存在之偽基因、錯誤注釋基因及基因間區域之經分配讀段以獲得此總數。「Mito總數」欄包括定位至粒線體參照之讀段數，其係關於在較差生理條件下之細胞，其通常表現增加數目之粒線體基因。「Mito UMI」欄代表具有定位至粒線體參照之不同獨特分子標識符之讀段數。「Refseq總數」欄代表比對至mRNA Refseq參照之讀段數，而「Refseq UMI」欄代表具有比對至mRNA Refseq參照之不同UMI之讀段數，且代表細胞裂解後捕捉珠粒所捕捉之分子之原始數目。該等數目皆指示，該等方法提供之DNA庫產生代表細胞譜系之良好品質之測序資料。

使用一些其他分析來評估測序樣品庫之品質。使用1 ng自相同細胞之集合提取之總RNA實施晶片外實驗。使用含有所有256個條碼組合之珠粒混合物製備cDNA。如上所述實施下游處理，提供整體對照，無需識別條碼。自該等輸入中之每一者對等量之輸入DNA進行測序。對自該等樣品獲得之測序資料之比較顯示於圖16C及D中。在比對至參照轉錄體時，測序資料內可識別條碼讀段之百分比介於總讀段數之約78%至約87%範圍內，且測序讀段覆蓋之序列介於約49%至約61%範圍內。(圖16C)。最後，表現最多之5個基因包括RP128 (核糖體蛋白)；Emb (B細胞特異性)；

Rpl24 (B細胞特異性)；Dcun1d5 (B細胞特異性)、Rp35a (核糖體蛋白)及Ddt (B細胞特異性)，其與細胞類型及來源一致。(圖16D)。圖17顯示，在實驗100、98、105、106之間，使用90分鐘反轉錄反應期，在每個實驗之間檢測之條碼組變化，指示遞送至NanoPen腔室之珠粒之良好隨機化。對4個實驗(實驗100、98、105、106)中每一者之晶片外實驗(標記為256)、空白(XXX-bl)及輸出珠粒資料之比較顯示於圖18中。圖18顯示多個NanoPen腔室之經測序讀段之收回。對於每一實驗，XXX-E1係cDNA裝飾之珠粒之第一輸出，且XXX-E2係來自相同圍欄之後續第二輸出。圖18之小提琴圖之y軸係每一樣品之條碼讀段之量。微流體裝置外對照256之所有條碼皆同等表示。所輸出珠粒資料(XXX-E1或XXX-E2)顯示少於所有條碼經代表且條碼讀段之量亦較少同等表示。意料之中地，樣品XXX-E2顯示甚至更少之讀段，但彼等讀段之數目更可變。最後，如上文所論述，空白讀段顯示極低數目之條碼讀段，但一個或兩個讀段具有合理出現頻率。

實例2. T細胞表型分型、培養、分析及RNA測序. 表型與基因體資訊之聯繫.

微流體系統、材料及方法與實驗1中相同，以下除外：

細胞：對照細胞係人類外周血T細胞。樣品細胞係源自人類腫瘤樣品之人類T細胞。

培養基：RPMI 1640培養基(Gibco, 編號12633-012)、10%胎牛血清(FBS)、(Seradigm, 編號1500-500)；2%人類AB血清(Zen-bio, 編號HSER-ABP100ml)、IL-2 (R&D Systems, 202-IL-010) 2U/ml；IL-7 (PeproTech, 編號200-07) 10ng/ml；IL-15 (PeproTech, 編號200-15)

10ng/ml、1× Pluronic F-127 (Life Tech目錄號50-310-494)。

用晶片外抗原對源自人類腫瘤樣品之人類T細胞進行染色，然後以5×E6細胞/ml之密度引入OptoSelect裝置之微流體通道中。抗原陽性T細胞(P-Ag)及抗原陰性細胞(N-Ag)二者皆藉由光學致動之介電泳力移動以將單一T細胞分離至個別NanoPen腔室中，形成複數個群體化NanoPen腔室。

人類外周血T細胞在CD3/28珠粒(Dynabeads®人類T-活化劑CD2/CD28, ThermoFisher No. Gibco™編號11131D)存在下在4天培養期間活化(圖19)，形成活化但非抗原特異性群體。用經標記抗原處理未產生經標記對照，即活化T細胞。將該等對照活化T細胞之群體以5×E6細胞/ml之密度引入微流體通道中且所選複數個對照活化T細胞藉由光學致動之介電泳力移動以將單一對照活化T細胞置入複數個Nanopen腔室之每一個中，該等Nanopen腔室與含有源自腫瘤樣品之T細胞組之NanoPen腔室組不同。

向每一經佔據腔室添加經由連接合成之單一條碼化珠粒(在此具體實驗中)。每一珠粒包括如上所述之啟動序列、條碼序列、UMI序列及捕捉序列。隨後進行裂解及RNA捕捉，如上所述。在所用條件下，核膜不破裂。將所釋放mRNA捕捉至存於相同NanoPen腔室內之條碼化珠粒上。

在圖20A、21A及22A中，一組4張照片影像圖解說明代表性經佔據Nanopen腔室。每組照片自左至右顯示：1) 在使用光學致動之介電泳力置入NanoPen腔室後，T細胞之明視野照明；2) 探測抗原特異性染色之螢光檢測(德克薩斯紅通道)；3) 在使用光學致動之介電泳力輸入一個條碼化捕捉珠粒後，Nanopen腔室之明視野照明；及4) 裂解後之明視野照明。如上

文，裂解條件使細胞膜破裂但不擾亂核膜。

在圖20A中，顯示位置標識符為1446之NanoPen腔室被一個細胞佔據。此細胞為抗原陽性染色細胞(P-Ag)，如圖20A之組中之第二張照片所示，具有螢光信號(顯示於NanoPen腔室內之白色圓圈內)。圖20A之組之第三張照片顯示，將單一珠粒置於NanoPen腔室內，且圖20A之組之第四張照片顯示，珠粒及剩餘核仍位於NanoPen腔室內。在圖21A中，顯示類似地將細胞(第二組之第一張照片)及珠粒(第二組之第三張照片)置入NanoPen腔室547號中。然而，此細胞未經抗原染色；且在圖21A之照片組之第二張照片中未檢測到螢光信號。因此，將此細胞識別為抗原陰性T細胞(N-Ag)。在圖22A中，顯示含有對照活化T細胞之NanoPen腔室3431之同等照片組。如所預期，在組中之第二張照片中無螢光信號，確證此細胞並非抗原陽性。

RNA釋放、捕捉、庫製備及測序. 實施實例1中針對微流體環境內之反轉錄及條碼讀取闡述之方案並記錄每一NanoPen腔室之條碼之識別。在圖20B、21B及22B中，顯示各別NanoPen腔室之條碼檢測過程之影像。NanoPen腔室1446經測定具有含有條碼A1B1C1D4之珠粒；NanoPen腔室547具有含有條碼A1B3C3D4之珠粒；且NanoPen腔室3431具有含有條碼A2B3C4D4之珠粒。如實例1中所述實施珠粒輸出及來自所輸出經裝飾珠粒之cDNA之晶片外擴增、標籤化、純化及大小選擇。

使用MiSeq測序儀(Illumina®, Inc.)實施測序。第一測序讀段在讀段1上測序55個週期以對40bp條碼及10bp UMI進行測序。在全長條碼之最初兩個可盒化序列與最後兩個可盒化序列之間需要4個額外週期，此乃因在此特定實驗中使用額外4 bp進行條碼連接。使用最後一個週期用於鹼基

調用目的。第二測序讀段對代表在Nextera庫製備期間添加之庫索引之8bp進行測序，容許在同一測序運行中對若干個實驗之多重化。最後，在讀段2上進行另外46個測序週期(末端配對運行)，其提供cDNA (轉錄物/基因)之測序。若期望可獲得較長讀段，但在此實驗中未使用。

圖23顯示此實驗之測序結果之熱圖，具有多行測序讀段，每行代表自NanoPen腔室中之一個細胞捕捉至單一珠粒之RNA，該細胞1) 暴露於腫瘤抗原，對抗原呈陽性；2) 暴露於腫瘤抗原，對抗原呈陰性；或3) 陰性對照，活化T細胞，但未暴露於抗原。各行係根據其測序讀段之相似性來排列，此與基因表現資訊相關聯。色彩(深色帶相對於淺色帶)代表表現程度。與行15-36相比，行1-14彼此更密切相關。由於可識別每行(每個珠粒，來自一個細胞)之可讀條碼，確定收回珠粒之位置及RNA之來源細胞之表型。舉例而言，上述識別之來自 NanoPen 腔室 1446 (標記為 2EB1p_1466 (P-Ag)，參見組A內之第6行)、547 (2EB1n_547 (N-Ag)，參見組A內之第8行)及3431 (標記為EA1NC_3431 (NC)，參見組B中之第33行)之3個珠粒提供在各別突出顯示且經標記行顯示之基因表現概況。見到行15-36 (群集於組B中，在熱圖頂部之關係框架中)之基因表現與行1-14 (組A)之基因表現之間之差異實質上依賴於對腫瘤抗原之暴露。不論對於抗原染色呈陽性或陰性，組A中實質上所有行1-14之來源細胞皆已暴露於腫瘤抗原。與之相比，行15-36之所有來源細胞皆為陰性對照細胞，且尚未暴露於腫瘤抗原。每行代表一個實驗之測序讀段，且色彩代表表現程度。每一珠粒活化之非抗原特異性對照T細胞(NC)之測序讀段可與抗原陽性腫瘤源T細胞(P-Ag)或抗原陰性腫瘤源(N-Ag) T細胞之測序讀段明顯區分。顯示特異性且可區分之單細胞RNA測序。此外，顯示表型資訊可與

單細胞之基因表現概況相聯繫。

實例3. 如針對OKT3細胞所示之DNA捕捉、測序庫製備及測序結果.

除非此實例中明確註明，否則如上文一般方法使用/實施器具、啟動及灌注方案、細胞來源及製劑。除非另外指明，否則將培養基及OptoSelect裝置維持在37°C。

表4. 用於此實驗中之引子。

SEQ ID No.	序列/s
109	生物素TEG_N701 /5 生 物 素 TEG/CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCGCCTTAGTC TCGTGGGCTCG*G
110	生物素TEG_N702 /5 生 物 素 TEG/CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTAGTACGGT CTCGTGGGCTCG*G
111	生物素TEG_S506 /5 生 物 素 TEG/AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACTGCA TATCGTCGGCAGCGT*C

此實驗顯示，Nextera測序庫(Illumina)可用等溫PCR使用一個附接至珠粒之生物素化啟動序列(攜載條碼)及一個游離於溶液中之引子來生成。將OKT3細胞(150)輸入OptoSelect裝置中，且使用光學致動之介電泳力加載至NanoPen腔室中。圖24顯示遞送至NanoPen腔室之後之細胞。光學致動之介電泳力對於7個NanoPen腔室將1個細胞遞送至每個NanoPen腔室，將1個細胞誤遞送至一個NanoPen腔室，且將2個細胞遞送至一個NanoPen腔室，由此將實質上僅1個細胞遞送至每個NanoPen腔室。

裂解. 使用自動化序列實施裂解程序，但可經由手動控制每一步驟適當地實施。使裂解緩衝液流入OptoSelect裝置(Buffer TCL (Qiagen, 目錄號1031576))中且隨後停止流動2 min以允許緩衝液擴散至圍欄中。實現細胞膜及核膜二者之裂解。然後用50微升培養基將OptoSelect裝置沖洗三次，包括每次50微升沖洗後暫停30秒。蛋白酶K (Ambion 目錄號AM2546, 20 mg/ml)以800微克/毫升之濃度引入OptoSelect裝置中且在不灌注之情況下維持20 min。蛋白酶K擴散至NanoPen腔室中且蛋白水解不期望蛋白質並破裂染色質以允許gDNA提取。完成後，用50微升PBS將OptoSelect裝置沖洗3個循環，包括每次流動後保持10 min階段。

用SYBR® 綠色I染色劑(ThermoFisher Scientific, 目錄號S7585)以1:1000於1×PBS中實施染色，顯示存在核之壓縮DNA 2510，如圖25中所示。另外，實施使用光學致動之介電電泳力之掃描，其經過NanoPen腔室在兩個方向(上及下，交叉)上垂直掃描。在圖25中，顯示兩個光圖案(「OEP棒」)，其用於產生垂直「交叉」掃描。此產生來自核之所釋放DNA 2515之螢光信號之模糊放大區域，顯示將壓縮DNA自壓縮形式拖至更大更分散區域之能力，指示核膜之裂解。圖26A顯示一組特定NanoPen腔室之照片，各自含有裂解前經染色OKT3細胞，且圖26B顯示在OEP掃描後相同NanoPen腔室之照片，顯示在腔室內染色(例如，DNA)分散至更大區域。

標籤化. 用轉位酶將DNA標籤化。藉由將包括3.3微升標籤化DNA緩衝液(TD)之15微升體積之轉座體試劑(Nextera DNA庫製備套組, Illumina, 目錄號15028212)；16微升標籤化DNA酶混合物(TDE1緩衝液)；及14微升無核酸酶H₂O (Ambion 目錄號AM9937)引入OptoSelect裝置中來遵循

標籤化方案。標籤化試劑經15分鐘階段擴散至NanoPen腔室中。隨後廣泛沖洗OptoSelect裝置，包括用100微升PBS清潔入口及出口管線，且用50微升PBS沖洗裝置本身。圖27顯示經由此方案獲得之標籤化產物之大小之圖形分佈(Bioanalyzer, Agilent)，分佈最大值正在300bp下且極少標籤化產物之大小大於約600 bp，此顯示適合於大量平行測序方法。

DNA捕捉至珠粒. 生物素化16微米聚苯乙烯捕捉珠粒(Spherotech)係藉由鏈黴抗生物素蛋白標記之寡核苷酸改性。寡核苷酸按5'至3'順序包括啟動序列、條碼序列及捕捉序列(例如，鑲嵌序列)。條碼序列含有至少一個子條碼模組，允許識別OptoSelect裝置之特定NanoPen腔室內之來源細胞。在此實驗中，納入寡核苷酸內之啟動序列為P7 (P7接頭序列)。(然而，可利用其他啟動序列，例如P5或啟動序列，其經特殊設計以供與RPA過程之重組酶及聚合酶相容。在高達約300rpm之速度攪動(VWR模擬渦旋混合器)之包括1M NaCl、20 mM TrisHCl、1 mM EDTA及0.00002% Triton-X之結合緩衝液中與過量SA-寡核苷酸結合15 min後，用三個等份之新鮮結合緩衝液、隨後用50微升PBS洗滌珠粒。將剛製備之含有P7啟動序列(測序接頭)/條碼/捕捉序列寡核苷酸之珠粒遞送至已含有裂解前細胞之NanoPen腔室。使用自動化序列實施此步驟，包括OEP遞送至NanoPen腔室，但若期望亦可手動實施。在此實驗中，所用特定自動化方法耗時1h完成。更快遞送可係有利的。另外，低於37℃之降低溫度對於有效DNA捕捉可係有利的。

等溫擴增. 使用重組酶聚合酶擴增(RPA)反應實施珠粒上所捕捉DNA之等溫擴增(TwistAMP TABA S03, TwistDX)，該反應亦包括單鏈DNA(ss-DNA)結合蛋白，其穩定在該過程期間形成之置換環(D-環)。反應混合

物中亦存在P5-鑲嵌序列、P7及P5引子(IDT)。將以下混合物：TwistDx套組之乾酶糰粒；27.1微升再懸浮緩衝液；2.4微升10微莫耳P5引子；2.4微升10微莫耳P7引子；及2.4微升10微莫耳P5末端索引引子(例如S521)添加至2.5微升280毫莫耳乙酸鎂(MgOAc)中並在微量離心管內渦旋。將15微升之此溶解且旋轉之溶液以1微升/秒之速率輸入OptoSelect裝置之微流體通道中，且允許擴散至NanoPen腔室中並接觸珠粒上所捕捉DNA 40至60分鐘。

在等溫擴增期完成後，使用PBS自OptoSelect裝置輸出50微升流體介質。使用1× AMPure® 珠粒(Agencourt Bioscience)淨化含有已擴散出NanoPen腔室之經擴增DNA之所輸出溶液(「直接輸出」)，移除引子及其他大小小於100bp之核酸材料。

將仍含有珠粒及未擴散至通道中之經擴增DNA之OptoSelect裝置在4℃下維持過夜，且使用50微升PBS進行第二輸出，捕捉隨後存於微流體通道中之擴增產物，即「第2輸出」。經由PCR進一步分開擴增兩個樣品以供量化及大小分析，各自在25微升反應中使用5個PCR週期，該反應使用KAPA HiFi Hotstart (KAPA Biosystems)、1微升10微莫耳P5引子及1微升10微莫耳P7引子。藉由用1× AMPure® 珠粒反覆處理各自淨化直接輸出及第2輸出樣品以移除引子。直接輸出樣品產生40 ng總量，其片段大小適於測序，平均大小為約312 bp (資料未顯示)。第2輸出樣品產生85 ng總量，平均大小為約760 bp (資料未顯示)，其不適於藉由NGS平行技術進一步測序。

在共享Miseq大量平行測序實驗(Illumina)中對直接輸出樣品進行測序。覆蓋率低(平均值= 0.002731)，但讀段在整個小鼠基因體中定位，如

圖28中所示。在圖28中，沿x軸顯示每一染色體。左側淺色棒代表每一染色體之預期長度，而右側深色棒代表在來自直接輸出樣品之資料中所見之總定位讀段之百分比。儘管一些染色體在資料中過度表示(chr 2、chr 16)，其他染色體表示不足(chr 8、chr 12、chr 15)。應注意，如所預期，未獲得Y染色體之讀段，此乃因細胞源自雌性小鼠。識別可接受低含量之接頭污染物(0.000013%)。另外，在資料中亦發現特定目標序列（例如 CXCR4序列，資料未顯示）。

實例4. OKT3細胞及來自人類B-淋巴球之人類LCL1細胞之混合物之DNA分離、庫製備及測序. LCL1細胞之來源：Coriell研究所. 目錄號：GM128781C. 用於培養之培養基為RPMI-1640 (Life Technologies, 目錄號11875-127), 10% FBS, 1% Pen/Strep (1000 U/ml), 2 mM Glutamax。

實驗使用150個OKT3細胞:150個Hu LCL1細胞或75個OKT3細胞:75個Hu LCL1細胞。使用OEP力將細胞特異性遞送至個別NanoPen腔室，一個細胞至一個腔室，使得每一OKT3及每一Hu LCL1細胞之位置已知。

裂解及標籤化之過程係如在實驗3中實施，但使用鑲嵌末端加藉由轉位酶附加至片段化DNA之插入序列，該插入序列具有以下序列中之一：

Tn5ME-A (Illumina FC-121-1030), 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' (SEQ ID No. 161)；

Tn5ME-B (Illumina FC-121-1031), 5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3' (SEQ ID NO.162)

將第一組僅具有第一唯一條碼之條碼化珠粒特異性遞送至含有OKT3

細胞之NanoPen，之後將第二組僅具有第二唯一條碼之條碼化珠粒特異性遞送至含有Hu LCL1細胞之NanoPen。此提供自每組珠粒擴增之DNA之特異性標識符，使得鼠類DNA讀段可定位回至鼠類細胞，且Hu LCL1細胞DNA讀段可定位回至人類細胞。在標籤化步驟後將珠粒遞送至NanoPen腔室。等溫擴增係如在實驗3中實施，產生5.67ng（來自總計300個細胞）或2.62ng（來自總計150個細胞）。對每一庫實施如上所述運行之兩個PCR循環，以確保P5、P7之存在用於NGS測序，且以類似方式實施淨化。圖29A（來自150個細胞）及29B（來自300個細胞）分別顯示在後續兩個PCR循環擴增及淨化後之兩個(OKT3/hu LCL1) DNA庫。可將該等結果與對照庫之粒徑分佈跡線相比，對照庫係自以標準孔板模式個別處理之OKT3細胞亦及hu LCL1細胞生成，如圖29C (OKT3)及圖29D (hu LCL1)中所示。該比較指示，可期望進一步最佳化以在微流體方案內獲得更理想片段分佈。來自混合OKT3/hu LCL1 DNA庫之測序結果顯示，獲得具有兩個條碼中之每一者之讀段(資料未顯示)。

原位條碼檢測. 在輸出經擴增DNA產物後，如上所述螢光標記之雜交探針之連續流識別條碼位置。

實例5. 在DNA分離、庫製備及擴增工作程序列內，條碼化珠粒之引入及條碼化珠粒之原位檢測. 不期望受限於理論，轉位子之活性係針對雙鏈核酸，而非單鏈結合寡聚物。捕捉珠粒對該等條件之穩健性顯示於推論實驗中。使如針對實驗3製備之20微升珠粒在用於該相同實驗之條件下暴露於標籤化反應試劑中。使轉位子暴露之珠粒及未暴露之對照珠粒二者與1.4 ng人類標準DNA接觸。2.4微升每一珠粒組用於使用2.4微升RPA (S521)中之成對引子(S521, Illumina)之等溫擴增，且提供實質上相似量

之經擴增DNA。結果顯示，在用於DNA捕捉中之前暴露於轉位子之捕捉珠粒產生適當等效量之經擴增產物，指示轉位子未降解捕捉珠粒上之捕捉寡核苷酸。

表5. 在等溫擴增後對暴露於標籤化反應條件之珠粒與未暴露珠粒之間之產率的比較。

條件	等溫產率(ng/微升)
轉位子暴露	36.4
未暴露(對照)	33.4
轉位子暴露	24.4
未暴露(對照)	31.8

實例6. 對來自已對其實施RNA測序之相同細胞之核DNA進行測序.

圖30A-F各自顯示OptoSelect裝置之一列4個NanoPen腔室，其含有OKT3細胞及捕捉珠粒。在其中已如實驗1中實施RNA捕捉、標籤化及輸出之方案的過程期間拍攝一系列照片。在輸入前將NucBlue® LiveReady Probes®試劑(Molecular Probes, R37605)染色劑添加至細胞(在即將輸入之前將兩滴添加至200微升細胞溶液中)。在整個方案過程中不添加其他染色劑。對每個細胞之核dsDNA進行染色並在RNA捕捉、標籤化及反轉錄之整個步驟期間維持染色。圖30A-30C係在明視野條件下拍攝，且圖30D至30F係在UV激發照射(在結合至DNA時在360 nm下激發，發射最大值為460 nm)下拍攝且經由DAPI濾波器在400-410 nm下可視化。圖30A及30D係含有在裂解之前之時間點之細胞之相同Nanopen腔室之成對影像，分別在明視野及DAPI濾波器曝露下。3002係條碼化珠粒且3004係相同NanoPen腔室內之生物細胞。在該等圖4個NanoPen腔室之其他腔室中之其他珠粒及其他細胞亦係可見的，但未經標記。圖30B及30E係如圖30A

及30C中所示相同NanoPen腔室之成對影像，分別在明視野及400 nm照射下。該等照片係在如實驗1中所述外膜裂解完成後拍攝。核DNA 3004在400nm激發照射下仍係可見的(圖30E)，以及核3004之形狀仍與珠粒3002一起保持在明視野下。圖30C及30F係如圖30A-30D之4個NanoPen腔室之相同組內的相同細胞之成對影像，分別在明視野及400nm激發照射下。圖30C及30F係在反轉錄完成且cDNA裝飾之條碼化珠粒3002'自每一NanoPen腔室輸出後拍攝(見照片頂部微流體通道內之3002)。緻密核3006在明視野下仍係可見的，且圖30F顯示，核3006仍含有核DNA。由於未添加額外染料，在珠粒上產生之cDNA未經染色。

圖30A-30F指示，藉由使用本文針對RNA捕捉/庫製備及DNA捕捉/庫製備所述之方案，緻密核仍係用於DNA庫產生之核dsDNA之可行來源。因此，RNA及DNA二者之測序結果可自相同單細胞獲得，且可與經測序RNA及DNA之特定單細胞來源在OptoSelect裝置內之位置相關聯。此關聯RNA/DNA測序結果之單細胞來源之位置之能力可進一步與相同單細胞(例如產生針對特定抗原之抗體之細胞)之表型觀察相關聯。

顯示引入帶有條碼化啟動序列之珠粒之步驟係在標籤化步驟之前或在標籤化之後適當實施(如在實驗3中)。

另外，讀取置於NanoPen腔室內之條碼化珠粒上之條碼之步驟可在標籤化之前、在等溫擴增之前、在輸出經擴增DNA之前或在輸出經擴增DNA之後實施(如實驗4中所示)。或者，可在輸入生物細胞之前將珠粒置於NanoPen腔室內。在該實施例中，亦可在將生物細胞帶入微流體環境之前檢測條碼。

實例7. 如針對OKT3細胞及OKT8細胞所示之B細胞受體(BCR)捕捉、測

序庫製備及測序結果.

細胞：OKT3細胞(鼠類骨髓瘤雜交瘤細胞系)係自ATCC獲得(ATCC®目錄號CRL-8001™)。該等細胞係作為懸浮細胞系提供。藉由接種約 1×10^5 至約 2×10^5 活細胞/mL及使用空氣中之5%二氧化碳作為氣態環境，在37℃下培育來維持培養物。每2-3天分割細胞。計數OKT3細胞數及存活率且將細胞密度調節至 5×10^5 /ml以供加載至微流體裝置。

OKT8細胞(鼠類骨髓瘤雜交瘤細胞系)係自ATCC獲得(ATCC®目錄號CRL-8014™)。該等細胞係作為懸浮細胞系提供。藉由接種約 1×10^5 至約 2×10^5 活細胞/mL及使用空氣中之5%二氧化碳作為氣態環境，在37℃下培育來維持培養物。每2-3天分割細胞。計數OKT8細胞數及存活率，且將細胞密度調節至 5×10^5 /ml以供加載至微流體裝置。

培養基：將Iscove氏改良Dulbecco氏培養基(對於OKT3；ATCC®目錄號30-2005，對於OKT8；ATCC®目錄號30-2005)，10%胎牛血清(ATCC®目錄號30-2020)及10 ml青黴素-鏈黴素(Life Technologies®目錄號15140-122)合併以製備培養基。經由0.22µm過濾器過濾完整培養基並在4℃下遠離光儲存直至使用為止。

當在培育期間灌注時，在引入OptoSelect裝置中之前用空氣中之5%二氧化碳使培養基連續條件化。

表6. 用於實驗中之寡核苷酸序列.

SEQ ID No.	序列/s	名稱
112	5'-Me-isodC//Me-isodG//Me-isodC/ACACTCTTTCCCTACACGACGCrGrGrG-3	
113	5'-ACACTCTTTCCCT ACACGACGC-3'	

114	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA KGT RMA GCT TCA GGA GTC	YarivH-FOR 1
115	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT BCA GCT BCA GCA GTC	YarivH-FOR 2
116	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT BCA GCT BCA GCA GTC	YarivH-FOR 3
117	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT CCA RCT GCA ACA RTC	YarivH-FOR 4
118	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT YCA GCT BCA GCA RTC	YarivH-FOR 5
119	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT YCA RCT GCA GCA GTC	YarivH-FOR 6
120	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT CCA CGT GAA GCA GTC	YarivH-FOR 7
121	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA SST GGT GGA ATC	YarivH-FOR 8
122	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA VGT GAW GYT GGT GGA GTC	YarivH-FOR 9
123	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GCA GSK GGT GGA GTC	YarivH-FOR 10
124	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA KGT GCA MCT GGT GGA GTC	YarivH-FOR 11
125	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA GCT GAT GGA RTC	YarivH-FOR 12
126	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GCA RCT TGT TGA GTC	YarivH-FOR 13
127	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA RGT RAA GCT TCT CGA GTC	YarivH-FOR 14
128	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA AGT GAA RST TGA GGA GTC	YarivH-FOR 15

129	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT TAC TCT RAA AGW GTS TG	YarivH-FOR 16
130	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT CCA ACT VCA GCA RCC	YarivH-FOR 17
131	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA TGT GAA CTT GGA AGT GTC	YarivH-FOR 18
132	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA GGT CAT CGA GTC	YarivH-FOR 19
133	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TCC AGC TGA CTC AGC C	YarivL-FOR1
134	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCW CCC AGT C	YarivL-FOR2
135	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGM TMA CTC AGT C	YarivL-FOR3
136	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGY TRA CAC AGT C	YarivL-FOR4
137	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TRA TGA CMC AGT C	YarivL-FOR5
138	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTM AGA TRA MCC AGT C	YarivL-FOR6
139	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTC AGA TGA YDC AGT C	YarivL-FOR7
140	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TYC AGA TGA CAC AGA C	YarivL-FOR8
141	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCA WCC AGT C	YarivL-FOR9
142	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG WGC TSA CCC AAT C	YarivL-FOR10
143	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTS TRA TGA CCC ART C	YarivL-FOR11

144	AGC CGG CCA TGG CGG AYR TTK TGA TGA CCC ARA C	YarivL-FOR12
145	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CBC AGK C	YarivL-FOR13
146	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TAA CYC AGG A	YarivL-FOR14
147	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CCC AGW T	YarivL-FOR15
148	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CAC AAC C	YarivL-FOR16
149	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTT TGC TGA CTC AGT C	YarivL-FOR17
150	AGC CGG CCA TGG CGG ARG CTG TTG TGA CTC AGG AAT C	YarivL-FOR 1λ
151	R702_Opt3_R2R1_combo AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCA GTCACCGATGTACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCT	
152	R709_Opt3_R2R1_combo AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCA GTCACGATCAGACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTTCCGATCT	
153	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-3'	針對1390之5'末端之引子序列 (圖13B)
154	P5部分為粗體： P5_IG_GEN1-3_a_rv AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CGGATAGACHGATGGGGSTGTYGTT	重鏈

155	P5部分為粗體： P5_IG_KCon_rv AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACA CCTGGATGGTGGGAAGATGGATACAG	輕鏈
-----	---	----

實驗：將OKT3細胞之樣品以2E6之密度以200微升引入OptoSelect裝置中。藉由光學致動之介電泳力移動約150個細胞以每個NanoPen腔室加載一個細胞。每個細胞定位於腔室之離至微流體通道之開口最遠之部分(例如，分離區域)內。隨後用50微升啟動培養基將OptoSelect裝置沖洗一次。獲取OptoSelect裝置之明視野影像用於識別入欄OKT3細胞之位置(未顯示)之目的。將OKT8細胞之樣品以2E6之密度以200微升引入OptoSelect裝置中。藉由光學致動之介電泳力移動約150個細胞以在其中OKT3細胞未入欄之視場中每個NanoPen腔室加載一個細胞。隨後用50微升啟動培養基將OptoSelect裝置沖洗一次。獲取OptoSelect裝置之明視野影像用於識別入欄OKT8細胞之位置(未顯示)之目的。將如本文所述具有捕捉寡聚物(兩個實例性而非限制性序列係SEQ ID No. 101及102，見表2)之條碼化珠粒之樣品以2E6之密度以200微升引入OptoSelect裝置。隨後將單一唯一性條碼化珠粒加載至每一經佔據腔室中。加載至具有單一生物細胞之NanoPen腔室之珠粒總數為126個，其中57個珠粒分配至OKT3細胞且69個珠粒分配至OKT8細胞，且每一珠粒亦定位於每一腔室之未經歷滲透性流體流之部分內。隨後用50微升1 × DPBS將OptoSelect裝置沖洗一次。

使裂解試劑(單細胞裂解套組，Ambion目錄號4458235)流至微流體通道中且允許其擴散至NanoPen腔室中。使個別入欄OKT3及OKT8細胞暴露於裂解緩衝液10分鐘。隨後用30微升1 × DPBS將OptoSelect裝置沖洗

一次。藉由在停止裂解緩衝液(單細胞裂解套組, Ambion目錄號4458235)中流動並在室溫下培育2分鐘來停止裂解, 同時微流體通道中無流動。或者, 裂解緩衝液(例如10×裂解緩衝液, 目錄號635013, Clontech/Takara)可用於提供類似結果, 且優點為不需要使用停止裂解緩衝液。隨後用30微升1 × DPBS將OptoSelect裝置沖洗一次。在所用條件下, 核膜不破裂。將所釋放mRNA捕捉至存於相同NanoPen腔室內之條碼化珠粒上。

藉由在RT試劑混合物(Thermo Scientific™ Maxima™ H Minus RT (Thermofisher, 目錄號EP0751))及模板轉換寡核苷酸(SEQ ID NO.112)中流動將所捕捉RNA反轉錄為cDNA。在16°C下在20分鐘階段期間允許酶擴散至NanoPen腔室中, 之後係在42°C下90分鐘之反應期。在反轉錄後, 隨後用30微升1 × DPBS將OptoSelect裝置沖洗一次。

隨後藉由如本文所述之螢光標記之雜交探針之多重化流識別每一捕捉珠粒之唯一條碼。使每組螢光標記之探針之連續試劑流以稀釋於1 × DPBS中(或者, 可使用IDT Duplex緩衝液)之1微莫耳流入微流體裝置之微流體通道中, 且允許擴散至NanoPen腔室中。在雜交後, 藉由用150微升1× DPBS沖洗OptoSelect裝置來移除背景信號。記錄如此識別之每一細胞條碼之位置(例如, 經該細胞條碼標記之珠粒之NanoPen位置)且用於識別自哪個特定細胞將BCR序列捕捉至珠粒。在圖31A及31B中, 顯示兩個個別NanoPen腔室3441及1451之條碼檢測之影像及結果。NanoPen腔室3441之條碼經測定為C3D11F22T31, 其中該條碼係自4個可盒化序列GAATACGGGG (SEQ ID NO. 3) TTCCTCTCGT (SEQ ID NO. 11) AACATCCCTC (SEQ ID NO. 22) CCGCACTTCT (SEQ ID NO. 31)形成。NanoPen腔室1451之條碼經測定為C1D11F24T31, 其中該條碼係自4

個可盒化序列CAGCCTTCTG (SEQ ID NO. 1) TTCCTCTCGT (SEQ ID NO. 11) TTAGCGCGTC (SEQ ID NO. 24) CCGCACTTCT (SEQ ID NO. 31)形成。

在檢測後，在輸出cDNA裝飾之捕捉珠粒之前，用10 mM Tris-HCl (200微升，0.5微升/sec)將晶片洗滌兩次。

使用光學致動之介電泳力自NanoPen腔室於置換緩衝液10 mM Tris-HCl中輸出所選條碼化cDNA裝飾之珠粒。一個輸出含有47個來自OKT3分配孔之珠粒及69個來自OKT8分配孔之珠粒。隨後使用流自微流體裝置輸出已自NanoPen腔室輸出之珠粒併合併。

在用外核酸酶I (NEB，目錄號M0293L)處理後，珠粒之輸出組經歷22個使用引子5'-ACACTCTTTCCCT ACACGACGC-3' (SEQ ID NO. 113)之DNA擴增循環(Advantage® 2 PCR套組，Clontech，目錄號. 639206)。輸出組之粗擴增混合物之初始純化係使用1× SPRI (固相可逆固定化)珠粒(Agencourt AMPure XP 珠粒(Beckman Coulter，目錄號A63881))根據供應商說明書來實施。

隨後將粗擴增混合物分為兩個部分，其中兩個部分中之第一部分經歷18個使用用於重鏈之BCR特異性正向引子(SEQ ID NO 114-132, 表6)之混合物之PCR循環，且其中第二部分經歷18個使用用於輕鏈之BCR特異性正向引子(SEQ ID NO 133-150, 表6)之混合物之PCR循環(Q5®高保真度DNA聚合酶, NEB，目錄號M0491S)。反向引子(SEQ ID No. 151及152)添加具有分配至珠粒輸出組之索引及重鏈或輕鏈之啟動序列。使用降落PCR方案(其中退火溫度在連續循環中下降)增加擴增特異性。含有BCR序列之擴增子之初始純化係使用1× SPRI (固相可逆固定化)珠粒(Agencourt

AMPure XP珠粒(Beckman Coulter, 目錄號A63881))根據供應商說明書來實施, 且隨後依據2%瓊脂醣凝膠(E-gel™ EX瓊脂醣凝膠2%, 目錄號G401002, ThermoFisher Scientific)上之大小加以選擇。凝膠萃取係根據供應商說明書(Zymoclean™凝膠DNA回收套組, 目錄號D4001, Zymo Research)來實施。

用T4多核苷酸激酶(T4多核苷酸激酶, NEB, 目錄號M0201)處理經純化且經大小選擇之含有BCR序列之擴增子, 隨後使用1× SPRI (固相可逆固定化)珠粒(Agencourt AMPure XP 珠粒(Beckman Coulter, 目錄號A63881))根據供應商說明書純化反應物。以螢光方式實施量化(Qubit™, ThermoFisher Scientific)。

使用小於或等於10 ng BCR擴增子之經純化T4多核苷酸激酶處理之含有BCR序列之擴增子隨後經自連接以產生環化DNA分子(T4 DNA連接酶, 目錄號EL0011, ThermoFisher Scientific)。對於超過檢測極限之任何量之DNA, 大致約0.5 ng將足以進行環化反應。不超過約10 ng可用於驅動自環化而非交叉連接至另一擴增子分子。

使用1× SPRI (固相可逆固定化)珠粒(Agencourt AMPure XP 珠粒(Beckman Coulter, 目錄號A63881))根據供應商說明書純化連接反應物, 且隨後依據2%瓊脂醣凝膠(E-gel™ EX瓊脂醣凝膠2%, 目錄號G401002, ThermoFisher Scientific)上之位置選擇經環化DNA分子。根據供應商說明書實施凝膠萃取(Zymoclean™凝膠DNA回收套組, 目錄號D4001, Zymo Research)。

隨後根據製造商指導藉由實施Not1限制酶消化(Not1-HF, NEB, 目錄號R3189S)使經純化之環化DNA分子再線性化, 且隨後使反應不活化。

使用 1× SPRI (固相可逆固定化)珠粒(Agencourt AMPure XP 珠粒(Beckman Coulter, 目錄號A63881))根據供應商說明書純化經再線性化之 DNA。

使再線性化之DNA經歷16個使用P7接頭序列正向引子(SEQ ID NO. 153, 表6)及含有P5接頭序列之BCR恆定區引子(SEQ ID NO. 154, 表6)之PCR循環(KAPA HiFi HotStart ReadyMix, KK2601, KAPA Biosystems/Roche)。使用1 × SPRI (固相可逆固定化)珠粒(Agencourt AMPure XP 珠粒(Beckman Coulter, 目錄號A63881))根據供應商說明書純化經擴增DNA分子。隨後使經擴增DNA產物經歷PCR, 7個循環用於重鏈且6個循環用於輕鏈, 使用P7及P5接頭序列引子(SEQ ID No. 153及155, 表6) (KAPA HiFi HotStart ReadyMix, KK2601, KAPA Biosystems/Roche)。使用1 × SPRI (固相可逆固定化)珠粒(Agencourt AMPure XP 珠粒(Beckman Coulter, 目錄號A63881))根據供應商說明書純化所得測序庫, 且隨後依據2%瓊脂醣凝膠(E-gel™ EX瓊脂醣凝膠2%, 目錄號G401002, ThermoFisher Scientific)上之大小(550-750 bp)加以選擇。根據供應商說明書實施凝膠萃取(Zymoclean™凝膠DNA回收套組, 目錄號D4001, Zymo Research)。

以螢光方式實施純化測序庫之量化(Qubit™, ThermoFisher Scientific)。使用MiSeq測序儀(Illumina®, Inc.)實施測序。

將測序結果去重化以單獨生成序列資料之FASTQ文檔, 對於每一集合(包括重鏈或輕鏈)經由讀段1及讀段2引子中包括之索引來生成, 且對於如依據唯一條碼序列所識別之每一細胞來生成。將OKT3及OKT8細胞系之可變區之針對抗原結合位點且含有關鍵子區之已知CDR3 BCR序列與每

一細胞之讀段資料向比對，且用於識別如來自OKT3或OKT8細胞之讀段。圖32內之右側欄顯示，來自細胞1-8之讀段匹配OKT3序列身份(SEQ ID NO. 157, 表6)，其具有以下之CDR3序列：

TGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGG
(SEQ ID NO.156)。

來自細胞9-12之讀段匹配OKT8序列身份(SEQ ID 159)，其具有以下之CDR2序列：

TGTGGTAGAGGTTATGGTTACTACGTATTTGACCACTGG (SEQ ID No. 158)。

每一細胞之條碼亦係藉由測序來測定，且顯示細胞1-12各自之條碼。將藉由測序測定之條碼與藉由上述試劑流方法測定之條碼相匹配，允許細胞與基因體之間之明確關聯。舉例而言，上文針對NanoPen腔室1451經由流動試劑測定之條碼匹配至細胞1，其具有匹配OKT3細胞表型之CDR3序列。上文針對NanoPen 3441所述之其他條碼匹配細胞9之條碼，其具有匹配OKT8表型之CDR3序列。由於此係原理實驗之證據，何種類型之細胞佈置於特定NanoPen腔室內係已知的，且測序結果顯示，條碼流動試劑檢測與藉由測序測定且具有預期CDR3序列之條碼全面相關。此顯示，BCR序列資料可與來源細胞之物理位置相聯繫。

除了先前指示之任何修改以外，熟習此項技術者可在不背離本說明之精神及範圍之情況下涉及多種其他變化及替代性配置，且隨附申請專利範圍意欲涵蓋該等修改及配置。因此，儘管上文已結合目前似乎最實用且較佳之態樣特定且詳細地闡述資訊，但熟習此項技術者將瞭解，可在不背離本文所述之原理及概念的情況下進行多種修改，包括但不限於形式、功

能、操作方式及用途。同樣，如本文所用，實例及實施例在所有方面中皆意欲僅具有說明性，且不應以任何方式視為具有限制性。此外，倘若在本文中提及一系列要素(例如，要素a、b、c)，則該提及意欲包括任一所示要素本身、少於所有所示要素之任一組合及/或所有所示要素之組合。同樣，如本文所用術語一(a)、一(an)及一個(one)可各自與術語至少一個及一或多個可互換。亦應注意，儘管在本文中使用的術語步驟，該術語可用於僅將注意力吸引至所述方法之不同部分，且不欲描繪方法任一部分之開始點或停止點，或不欲以任何其他方式加以限制。

非正式SEQ ID NO.列表

SEQ ID No.	序列	類型
1	CAGCCTTCTG	人工序列
2	TGTGAGTTCC	人工序列
3	GAATACGGGG	人工序列
4	CTTTGGACCC	人工序列
5	GCCATACACG	人工序列
6	AAGCTGAAGC	人工序列
7	TGTGGCCATT	人工序列
8	CGCAATCTCA	人工序列
9	TGCGTTGTTG	人工序列
10	TACAGTTGGC	人工序列
11	TTCCTCTCGT	人工序列
12	GACGTTACGA	人工序列
13	ACTGACGCGT	人工序列
14	AGGAGCAGCA	人工序列
15	TGACGCGCAA	人工序列
16	TCCTCGCCAT	人工序列

17	TAGCAGCCCA	人工序列
18	CAGACGCTGT	人工序列
19	TGGAAAGCGG	人工序列
20	GCGACAAGAC	人工序列
21	TGTCCGAAAG	人工序列
22	AACATCCCTC	人工序列
23	AAATGTCCCG	人工序列
24	TTAGCGCGTC	人工序列
25	AGTTCAGGCG	人工序列
26	ACAGGGGAAC	人工序列
27	ACCGGATTGG	人工序列
28	TCGTGTGTGA	人工序列
29	TAGGTCTGCG	人工序列
30	ACCCATACCC	人工序列
31	CCGCACTTCT	人工序列
32	TTGGGTACAG	人工序列
33	ATTCGTCGGA	人工序列
34	GCCAGCGTAT	人工序列
35	GTTGAGCAGG	人工序列
36	GGTACCTGGT	人工序列
37	GCATGAACGT	人工序列
38	TGGCTACGAT	人工序列
39	CGAAGGTAGG	人工序列
40	TTCAACCGAG	人工序列
41	CAGAAGGCTG/3AlexF647N/	人工序列
42	GGAAC TCACA/3AlexF647N/	人工序列
43	CCCCGTATTC/3AlexF647N/	人工序列
44	GGGTCCAAAG/3AlexF647N/	人工序列
45	CGTGTATGGC/3AlexF647N/	人工序列

46	GCTTCAGCTT/3AlexF647N/	人工序列
47	AATGGCCACA/3AlexF647N/	人工序列
48	TGAGATTGCG/3AlexF647N/	人工序列
49	CAACAACGCA/3AlexF647N/	人工序列
50	GCCAACTGTA/3AlexF647N/	人工序列
51	/5AlexF405N/ACGAGAGGAA	人工序列
52	/5AlexF405N/TCGTAAACGTC	人工序列
53	/5AlexF405N/ACGCGTCAGT	人工序列
54	/5AlexF405N/TGCTGCTCCT	人工序列
55	/5AlexF405N/TTGCGCGTCA	人工序列
56	/5AlexF405N/ATGGCGAGGA	人工序列
57	/5AlexF405N/TGGGCTGCTA	人工序列
58	/5AlexF405N/ACAGCGTCTG	人工序列
59	/5AlexF405N/CCGCTTTCCA	人工序列
60	/5AlexF405N/GTCTTGTCGC	人工序列
61	CTTTCGGACA/3AlexF488N/	人工序列
62	GAGGGATGTT/3AlexF488N/	人工序列
63	CGGGACATTT/3AlexF488N/	人工序列
64	GACGCGCTAA/3AlexF488N/	人工序列
65	CGCCTGAACT/3AlexF488N/	人工序列
66	GTTCCCCTGT/3AlexF488N/	人工序列
67	CCAATCCGGT/3AlexF488N/	人工序列
68	TCACACACGA/3AlexF488N/	人工序列
69	CGCAGACCTA/3AlexF488N/	人工序列
70	GGGTATGGGT/3AlexF488N/	人工序列
71	AGAAGTGCGG/3AlexF594N/	人工序列
72	CTGTACCCAA/3AlexF594N/	人工序列
73	TCCGACGAAT/3AlexF594N/	人工序列
74	ATACGCTGGC/3AlexF594N/	人工序列

75	CCTGCTCAAC/3AlexF594N/	人工序列
76	ACCAGGTACC/3AlexF594N/	人工序列
77	ACGTTCATGC/3AlexF594N/	人工序列
78	ATCGTAGCCA/3AlexF594N/	人工序列
79	CCTACCTTCG/3AlexF594N/	人工序列
80	CTCGGTTGAA/3AlexF594N/	人工序列
81	AGTCGACTGA	人工序列
82	TCAGCTGACT-FITC	人工序列
83	TCAGCTGACTXXXXXX	人工序列
84	NNNNNNNNNN	人工序列
85	TTTTTTTTTT	人工序列
86	AAAAAAAAAA	人工序列
87	CCCCCCCCC	人工序列
88	GGGGGGGGGG	人工序列
89	GGGGGCCCCCTTTTTTTTTTCCGG CCGGCCAAAATTTTT	人工序列
90	AAAAAAAAAATTTTTTTTTTGGG GGGGGGGGCCCCCCCCC	人工序列
91	GGGGGCCCCCTTAATTAATCCG GCCGGCCAAAATTTTT	人工序列
92	GGGGGCCCCCTTTTTTTTTTGGG GGGGGGGGCCCCCCCCC	人工序列
93	CCCCCGGGGG	人工序列
94	AATTAATTAA	人工序列
95	GGCCGGCCGG	人工序列
96	TTTTTAAAAA	人工序列

SEQ ID NO	序列	類型
97	珠 粒 -5'- 連 接 體 - ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC TCAGCCTTCTGTTCCCTCTCGTTGTCCGAAAGC CGCACTTCTNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTVN- 3'	人工序列
98	珠 粒 -5'- 連 接 體 - ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC TCGCAATCTCACAGACGCTGTTTCGTGTGTGA TGGCTACGATNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTVN- 3'	人工序列
99	珠 粒 -5'- 連 接 體 - ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC TCAGCCTTCTGTTCCCTCTCGTTGTCCGAAAGC CGCACTTCTNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTVN- 3'	人工序列
100	珠 粒 -5'- 連 接 體 - ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC TCAGCCTTCTGTTCCCTCTCGTTGTCCGAAAGC CGCACTTCTNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTVN- 3'	人工序列
101	珠 粒 -5'- 連 接 體 - ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC TCAGCCTTCTGTTCCCTCTCGTTGTCCGAAAGC CGCACTTCTNNNNNNNNNNATCTCGTATGCC GTCTTCTGCTTGGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTVN	人工序列

102	珠 粒 -5'- 連 接 體 - ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATC TTGCGTTGTTGTGGAAAGCGGTAGGTCTGCG CGAAGGTAGGNNNNNNNNNNATCTCGTATG CCGTCTTCTGCTTGGCGGCCGCTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTVN- 3'	人工序列
-----	---	------

SEQ ID NO.	序列/s	類型
103	/5Me-isodC//isodG//iMe- isodC/ACACTCTTTCCCTACACGACGCrGrGrG	人工序列
104	5'- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGAT CT	人工序列
105	5'-/5Biosg/ACACTCTTTCCCT ACACGACGC-3'	人工序列
106	(5'- AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTC TTTCCCTACACGACGCTCTTC C*G*A*T*C*T- 3'	人工序列
107	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-3'	人工序列
108	5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'	人工序列
109	/5 生 物 素 TEG/CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCG CCTTAGTCTCGTGGGCTCG*G	人工序列
110	/5 生 物 素 TEG/CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTA GTACGGTCTCGTGGGCTCG*G	人工序列
111	/5 生 物 素 TEG/AATGATACGGCGACCACCGAGATCTAC ACACTGCATATCGTCGGCAGCGT*C	人工序列

112	5'-Me-isodC//Me-isodG//Me-isodC/ACACTCTTTCCCTACACGACGCrGrGrG-3	人工序列
113	5'-ACACTCTTTCCCT ACACGACGC-3'	人工序列
114	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA KGT RMA GCT TCA GGA GTC	人工序列
115	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT BCA GCT BCA GCA GTC	人工序列
116	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT BCA GCT BCA GCA GTC	人工序列
117	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT CCA RCT GCA ACA RTC	人工序列
118	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT YCA GCT BCA GCA RTC	人工序列
119	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT YCA RCT GCA GCA GTC	人工序列
120	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT CCA CGT GAA GCA GTC	人工序列
121	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA SST GGT GGA ATC	人工序列
122	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA VGT GAW GYT GGT GGA GTC	人工序列
123	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GCA GSK GGT GGA GTC	人工序列
124	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA KGT GCA MCT GGT GGA GTC	人工序列
125	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA GCT GAT GGA RTC	人工序列
126	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GCA RCT TGT TGA GTC	人工序列

127	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA RGT RAA GCT TCT CGA GTC	人工序列
128	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA AGT GAA RST TGA GGA GTC	人工序列
129	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT TAC TCT RAA AGW GTS TG	人工序列
130	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT CCA ACT VCA GCA RCC	人工序列
131	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA TGT GAA CTT GGA AGT GTC	人工序列
132	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA GGT CAT CGA GTC	人工序列
133	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TCC AGC TGA CTC AGC C	人工序列
134	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCW CCC AGT C	人工序列
135	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGM TMA CTC AGT C	人工序列
136	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGY TRA CAC AGT C	人工序列
137	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TRA TGA CMC AGT C	人工序列
138	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTM AGA TRA MCC AGT C	人工序列
139	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTC AGA TGA YDC AGT C	人工序列
140	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TYC AGA TGA CAC AGA C	人工序列
141	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCA WCC AGT C	人工序列

142	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG WGC TSA CCC AAT C	人工序列
143	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTS TRA TGA CCC ART C	人工序列
144	AGC CGG CCA TGG CGG AYR TTK TGA TGA CCC ARA C	人工序列
145	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CBC AGK C	人工序列
146	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TAA CYC AGG A	人工序列
147	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CCC AGW T	人工序列
148	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CAC AAC C	人工序列
149	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTT TGC TGA CTC AGT C	人工序列
150	AGC CGG CCA TGG CGG ARG CTG TTG TGA CTC AGG AAT C	人工序列
151	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAG TCACCGATGTACACTCTTTCCCTACACGACG CTCTTCCGATCT	人工序列
152	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAG TCACGATCAGACACTCTTTCCCTACACGACG CTCTTCCGATCT	人工序列
153	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-3'	人工序列
154	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACG GATAGACHGATGGGGSTGTYGTT	人工序列
155	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCT GGATGGTGGGAAGATGGATACAG	人工序列

156	TGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGCC TTGACTACTGG	人工序列
157	--- GCAAGATATTATGATGATCATTACTGCCTTG ACTAC---	天然 生物體：人 類 OKT8, CDR3
158	TGTGGTAGAGGTTATGGTTACTACGTATTTG ACCACTGG	人工序列
159	--- GGTAGAGGTTATGGTTACTACGTATTTGACC AC---	天然 生物體：小 鼠： OKT3, CDR3
160	GCGGCCGC	人工序列
161	5’- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AG-3’	人工序列
162	5’GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGA GACAG-3’	人工序列

100	微流體器具
102	外殼
104	支撐結構
106	流動路徑
107	埠
108	微流體迴路結構
109	內表面
110	蓋

114	框架
116	微流體迴路材料
120	微流體迴路
122	通道
124	隔離圍欄
126	隔離圍欄
128	隔離圍欄
130	隔離圍欄
132	阱
134	側面通路
150	系統
152	控制及監測設備
154	主控制器
156	控制模組
158	數位記憶體
160	介質模組
162	動力模組
164	成像模組
166	傾斜模組
168	其他模組
170	顯示裝置
172	輸入/輸出裝置
178	介質來源
180	流體介質
190	傾斜裝置
192	電源
	圖2A-2G
200	微流體器具/裝置
202	區域

204	底部電極
206	電極活化基板
208	基板內表面
210	頂部電極
212	電源
214	DEP電極區域
216	光源
218	光之圖案
220	正方形圖案
222	埠
224	隔離圍欄
226	隔離圍欄
228	隔離圍欄
230	微流體裝置
232	分離結構
234	近端開口
236	連接區域
238	遠端開口
240	分離區域
242	介質流
244	次級流
246	微小物體
248	第二介質
250	微流體裝置
252	框架
254	第一流體介質
256	微流體迴路結構
258	第二流體介質
260	微流體迴路材料
262	微流體迴路

264	流動通道
266	隔離圍欄
268	連接區域
270	分離區域
272	分離結構
274	近端開口
276	遠端開口
278	第一介質流
280	2G之微流體裝置
282	次級流
284	封閉區域
286	基底，其可包括DEP基板
288	蓋
290	微流體裝置
292	第一DEP基板之內表面
294	第二DEP基板之內表面
296	矽氧基連接基團
298	條件化/經塗佈表面
	圖3A 3B
300	支撐結構(「巢」)
302	插座
304	電信號生成子系統
306	熱控制子系統
308	控制器
310	界面(未顯示)
312	外罩
314	流體路徑
316	入口
318	出口

320	微流體裝置
322	印刷電路板總成
324	串聯埠
330	光調變子系統
332	(第一)光源
334	第二光源
336	光束分離器
338	第二光束分離器或二色性濾波器
340	物鏡
342	樣品平面
344	台
346	二色性濾波器
348	檢測器
350	顯微鏡
355	系統

發明具體零件列表

參照編號	說明
405	隔離圍欄(NanoPen™腔室)
410	具有完整細胞膜之細胞
410'	未裂解核
415	細胞表面標記物
420	檢測試劑(例如抗體)
425	檢測試劑之可檢測信號
430	具有複數個捕捉寡核苷酸之捕捉物體
435	條碼序列，僅顯示一個可盒化序列
435a	條碼序列之可盒化序列1
435b	條碼序列之可盒化序列2
435c	條碼序列之可盒化序列3
435d	條碼序列之可盒化序列4
435a (1-10)	選自G1-G10之第一可盒化序列

435b (1-10)	選自Y1-Y10之第二可盒化序列
435c (1-10)	選自R1-R10之第三可盒化序列
435d (1-10)	選自B1-B10之第四可盒化序列
440	雜交探針，與435之一個可盒化序列互補
440a	雜交探針1 (經Fluor 1標記)
440b	雜交探針2 (經Fluor 2標記)
440c	雜交探針3 (經Fluor 3標記)
440d	雜交探針4 (經Fluor 4標記)
440a-1	經Fluor 1標記之第一雜交探針，具有與G1-G10之第一可盒化序列互補之序列
440b-1	經Fluor 2標記之第一雜交探針，具有與Y1-Y10之第二可盒化序列互補之序列
440c-1	經Fluor 3標記之第一雜交探針，具有與R1-R10之第三可盒化序列互補之序列
440d-1	經Fluor 4標記之第一雜交探針，具有與B1-B10之第四可盒化序列互補之序列
440a-2	經Fluor 1標記之第二雜交探針，具有與G1-G10第一可盒化序列互補之序列，且不同於440a-1
440b-2	經Fluor 2標記之第二雜交探針，具有與Y1-Y10之第二可盒化序列互補之序列，且不同於440b-1
440c-2	經Fluor 3標記之第二雜交探針，具有與R1-R10之第三可盒化序列互補之序列，且不同於440c-1
440d-2	經Fluor 4標記之第二雜交探針，具有與B1-B10之第四可盒化序列互補之序列，且不同於440d-1
445	自SEQ獲得之基因體序列
450	基因編輯盒
455	功能分析/表型/標記分析盒
460	細胞培養盒
465	將圍欄/細胞與條碼 / 珠粒盒相聯繫
470	條碼化珠粒盒

475	RNA捕捉盒
480	DNA捕捉盒
482	RNA測序盒
484	TCR測序盒
486	BCR測序盒
488	DNA測序盒
490	陽性純系輸出盒
505	所釋放核酸(RNA)
510	捕捉物體之珠粒
515	與珠粒之連接體
520	啟動序列
525	條碼
530	獨特分子標識符(UMI)
535	經設計與靶核酸(例如，寡(dT))雜交之捕捉序列
550	捕捉物體之捕捉寡核苷酸
630	捕捉物體，其另一實施例可如430
700	微流體裝置之另一實施例，關於100、200、400等
730	具有與每一捕捉寡核苷酸雜交之雜交探針之捕捉物體
755	730之捕捉寡核苷酸，顯示與其雜交之440a
800	微流體裝置之另一實施例，關於100、200、400等
810	4個雜交探針之第一流
815	4個雜交探針之第二流
820	440a-3、440b-3、440c-3及440-d-3之雜交探針之第三流，其中序列不同於針對810、815所選之彼等
830	捕捉物體，具有兩個同時結合至可盒化序列之不同雜交探針
895	440a-X、440b-X、440c-X及440-d-X之雜交探針之第X流，其中序列不同於針對810、815、820等選擇之彼等
902	細胞分離及細胞裂解盒(方法，可具有多於一個步驟)
904	細胞及分子條碼化(方法，可具有多於一個步驟)
905	所釋放核酸(在此情形中，RNA)

906	反轉錄盒(方法，可具有多於一個步驟)
908	原位細胞相關條碼識別盒(方法，可具有多於一個步驟)
910	第一鏈及反轉錄
912	合併及cDNA擴增盒(方法，可具有多於一個步驟)
914	單側式標籤化盒(方法，可具有多於一個步驟)
916	轉接、定大小、檢索盒(方法，可具有多於一個步驟)，914及918之組合代表更一般過程
918	庫檢索盒(方法，可具有多於一個步驟)
920	合併cDNA擴增產物
922	測序盒(方法，可具有多於一個步驟)
925	標籤化
930	具有所捕捉核酸之捕捉物體
932	測序接頭
934	庫索引
936	測序接頭
940	
942	標籤化接頭
950	測序庫
955	第一測序起始點
960	第二測序起始點
965	第三測序起始點
1000	微流體裝置之實施例，關於100、200、400等
1210	珠粒
1215	連接體
1220	所釋放核DNA
1225	標籤化DNA
1230	具有至少兩個寡核苷酸之捕捉物體
1230'	具有所捕捉核DNA之捕捉物體 - 在重組酶存在下

1235	在5’具有條碼、索引、UMI(若存在)、測序啟動序列且在3’具有測序啟動序列之DNA擴增子
1240	啟動序列/接頭
1245	具有至少三個可盒化序列之條碼
1250	獨特分子標識符，可選
1255	標籤化插入序列、捕捉序列
1260	DNA片段
1261	針對DNA亞組(例如基因特異性序列)之引子部分
1262	藉由基因特異性引子擴增之基因特異性DNA之其餘部分
1265	庫索引’可選
1270	P5接頭/啟動序列
1275	索引 P5引子(針對一般序列)
1275’	索引 P5引子(針對基因特異性序列)
1280	提供全基因體擴增子之擴增產物，例如一般啟動
1280’	基因特異性擴增產物
1301	除了多A以外之所釋放RNA序列
1302	添加測序啟動序列2及視情況庫索引之引子
1303	用於BCR區域之物種及基因選擇性選擇引子
1304	測序啟動序列2
1305	可選庫索引
1306	模板轉換寡核苷酸TSO
1307	添加至cDNA之TSO部分，啟動序列
1308	用於BCR區域之次選擇之引子
1310	珠粒
1311	cDNA擴增
1312	cDNA擴增
1315	連接體
1320	測序啟動序列1
1325	條碼

1330	具有至少兩個捕捉寡聚物之捕捉物體
1330'	具有至少兩個與所釋放RNA雜交之捕捉寡聚物之捕捉物體
1335	可選UMI
1340	測序接頭序列(P7)
1345	Not1限制位點序列
1350	聚TVN
1350'	多A
1351	BCR之全長恆定(C)區
1351'	BCR之縮短恆定(C)區
1351''	用於在PCR之C子區內選擇之引子1308之部分
1352	BCR之接合(J)區(若存在)
1353	BCR之多變(D)區
1354	BCR之可變(V)區
1355	反轉錄RNA
1356	選擇引子1302之部分，其僅啟動基因選擇性序列
1357	完整BCR區域
1360	測序/接頭序列
1365	反轉錄-延長以納入來自TSO之引子
1370	使用正向1311及1312反向擴增自cDNA擴增之DNA
1375	對BCR區域之選擇，及添加額外測序引子及可選庫索引
1380	含有擴增DNA之所選擇及調整之BCR
1385	環化DNA
1390	再線性化DNA
1391	用於條碼及可選UMI之讀段1
1392	用於可選庫索引之索引讀段
1393	用於BCR區域之讀段索引2
1394	使用引子1308之BCR區域之次選擇，及測序接頭之添加
1395	經次選擇且經擴增之DNA
1396	測序讀段

1397	用於BCR區域之反向索引 2讀段
2510	壓縮DNA
2515	所釋放DNA
3002	捕捉珠粒
3002’	cDNA裝飾之捕捉珠粒
3004	細胞
3006	細胞之完整核

【符號說明】

- 100 微流體器具
- 102 外殼
- 104 支撐結構
- 106 流動路徑
- 107 埠
- 108 微流體迴路結構
- 109 內表面
- 110 蓋
- 114 框架
- 116 微流體迴路材料
- 120 微流體迴路
- 122 通道
- 124 隔離圍欄
- 126 隔離圍欄
- 128 隔離圍欄
- 130 隔離圍欄
- 132 阱

134	側面通路
150	系統
152	控制及監測設備
154	主控制器
156	控制模組
158	數位記憶體
160	介質模組
162	動力模組
164	成像模組
166	傾斜模組
168	其他模組
170	顯示裝置
172	輸入/輸出裝置
178	介質來源
180	流體介質
190	傾斜裝置
192	電源
200	微流體器具/裝置
202	區域
204	底部電極
206	電極活化基板
208	基板內表面
210	頂部電極

212	電源
214	介電泳電極區域
216	光源
218	光之圖案
220	正方形圖案
222	埠
224	隔離圍欄
226	隔離圍欄
228	隔離圍欄
230	微流體裝置
232	分離結構
234	近端開口
236	連接區域
238	遠端開口
240	分離區域
242	介質流
244	次級流
246	微小物體
248	第二介質
250	微流體裝置
252	框架
254	第一流體介質
256	微流體迴路結構

258	第二流體介質
260	微流體迴路材料
262	微流體迴路
264	流動通道
266	隔離圍欄
268	連接區域
270	分離區域
272	分離結構
274	近端開口
276	遠端開口
278	第一介質流
280	微流體裝置
282	次級流
284	封閉區域
286	基底，其可包括介電泳基板
288	蓋
290	微流體裝置
292	第一介電泳基板之內表面
294	第二介電泳基板之內表面
296	矽氧基連接基團
298	條件化/經塗佈表面
300	支撐結構(「巢」)
302	插座

304	電信號生成子系統
306	熱控制子系統
308	控制器
310	界面
312	外罩
314	流體路徑
316	入口
318	出口
320	微流體裝置
322	印刷電路板總成
324	串聯埠
330	光調變子系統
332	(第一)光源
334	(第二)光源
336	光束分離器
338	第二光束分離器或二色性濾波器
340	物鏡
342	樣品平面
344	台
346	二色性濾波器
348	檢測器
350	顯微鏡
355	系統

- 405 隔離圍欄(NanoPen™腔室)
- 410 具有完整細胞膜之細胞
- 410' 未裂解核
- 415 細胞表面標記物
- 420 檢測試劑(例如抗體)
- 425 檢測試劑之可檢測信號
- 430 具有複數個捕捉寡核苷酸之捕捉物體
- 435 條碼序列，僅顯示一個可盒化序列
- 435a 條碼序列之可盒化序列1
- 435b 條碼序列之可盒化序列2
- 435c 條碼序列之可盒化序列3
- 435d 條碼序列之可盒化序列4
- 435a 選自G1-G10之第一可盒化序列
- 435b 選自Y1-Y10之第二可盒化序列
- 435c 選自R1-R10之第三可盒化序列
- 435d 選自B1-B10之第四可盒化序列
- 440 雜交探針，與435之一個可盒化序列互補
- 440a 雜交探針1 (經Fluor 1標記)
- 440b 雜交探針2 (經Fluor 2標記)
- 440c 雜交探針3 (經Fluor 3標記)
- 440d 雜交探針4 (經Fluor 4標記)
- 440a-1 經Fluor 1標記之第一雜交探針，具有與G1-G10之第一可盒化序列互補之序列

- 440b-1 經Fluor 2標記之第一雜交探針，具有與Y1-Y10之第二可盒化序列互補之序列
- 440c-1 經Fluor 3標記之第一雜交探針，具有與R1-R10之第三可盒化序列互補之序列
- 440d-1 經Fluor 4標記之第一雜交探針，具有與B1-B10之第四可盒化序列互補之序列
- 440a-2 經Fluor 1標記之第二雜交探針，具有與G1-G10第一可盒化序列互補之序列，且不同於440a-1
- 440b-2 經Fluor 2標記之第二雜交探針，具有與Y1-Y10之第二可盒化序列互補之序列，且不同於440b-1
- 440c-2 經Fluor 3標記之第二雜交探針，具有與R1-R10之第三可盒化序列互補之序列，且不同於440c-1
- 440d-2 經Fluor 4標記之第二雜交探針，具有與B1-B10之第四可盒化序列互補之序列，且不同於440d-1
- 445 自SEQ獲得之基因體序列
- 450 基因編輯盒
- 455 功能分析/表型/標記分析盒
- 460 細胞培養盒
- 465 將圍欄/細胞與條碼 / 珠粒盒相聯繫
- 470 條碼化珠粒盒
- 475 RNA捕捉盒
- 480 DNA捕捉盒
- 482 RNA測序盒

484	T細胞受體測序盒
486	B細胞受體測序盒
488	DNA測序盒
490	陽性純系輸出盒
505	所釋放核酸(RNA)
510	捕捉物體之珠粒
515	與珠粒之連接體
520	啟動序列
525	條碼
530	獨特分子標識符(UMI)
535	經設計與靶核酸(例如，寡(dT))雜交之捕捉序列
550	捕捉物體之捕捉寡核苷酸
630	捕捉物體，其另一實施例可如430
700	微流體裝置之另一實施例，關於100、200、400等
730	具有與每一捕捉寡核苷酸雜交之雜交探針之捕捉物體
755	730之捕捉寡核苷酸，顯示與其雜交之440a
800	微流體裝置之另一實施例，關於100、200、400等
810	4個雜交探針之第一流
815	4個雜交探針之第二流
820	440a-3、440b-3、440c-3及440-d-3之雜交探針之第三流， 其中序列不同於針對810、815所選之彼等
830	捕捉物體，具有兩個同時結合至可盒化序列之不同雜交探 針

- 895 440a-X、440b-X、440c-X及440-d-X之雜交探針之第X
流，其中序列不同於針對810、815、820等選擇之彼等
- 902 細胞分離及細胞裂解盒(方法，可具有多於一個步驟)
- 904 細胞及分子條碼化(方法，可具有多於一個步驟)
- 905 所釋放核酸(在此情形中，RNA)
- 906 反轉錄盒(方法，可具有多於一個步驟)
- 908 原位細胞相關條碼識別盒(方法，可具有多於一個步驟)
- 910 第一鏈及反轉錄
- 912 合併及cDNA擴增盒(方法，可具有多於一個步驟)
- 914 單側式標籤化盒(方法，可具有多於一個步驟)
- 916 轉接、定大小、檢索盒(方法，可具有多於一個步驟)，914
及918之組合代表更一般過程
- 918 庫檢索盒(方法，可具有多於一個步驟)
- 920 合併cDNA擴增產物
- 922 測序盒(方法，可具有多於一個步驟)
- 925 標籤化
- 930 具有所捕捉核酸之捕捉物體
- 932 測序接頭
- 934 庫索引
- 936 測序接頭
- 940 標籤化DNA
- 942 標籤化接頭
- 950 測序庫

- 955 第一測序起始點
- 960 第二測序起始點
- 965 第三測序起始點
- 1000 微流體裝置之實施例，關於100、200、400等
- 1210 珠粒
- 1215 連接體
- 1220 所釋放核DNA
- 1225 標籤化DNA
- 1230 具有至少兩個寡核苷酸之捕捉物體
- 1230' 具有所捕捉核DNA之捕捉物體 - 在重組酶存在下
- 1235 在5'具有條碼、索引、獨特分子標識符(若存在)、測序啟動序列且在3'具有測序啟動序列之DNA擴增子
- 1240 啟動序列/接頭
- 1245 具有至少三個可盒化序列之條碼
- 1250 獨特分子標識符，可選
- 1255 標籤化插入序列、捕捉序列
- 1260 DNA片段
- 1261 針對DNA亞組(例如基因特異性序列)之引子部分
- 1262 藉由基因特異性引子擴增之基因特異性DNA之其餘部分
- 1265 庫索引，可選
- 1270 P5接頭/啟動序列
- 1275 索引P5引子(針對一般序列)
- 1275' 索引P5引子(針對基因特異性序列)

- 1280 提供全基因體擴增子之擴增產物，例如一般啟動
- 1280' 基因特異性擴增產物
- 1301 除了多A以外之所釋放RNA序列
- 1302 添加測序啟動序列2及視情況庫索引之引子
- 1303 用於B細胞受體區域之物種及基因選擇性選擇引子
- 1304 測序啟動序列2
- 1305 可選庫索引
- 1306 模板轉換寡核苷酸TSO
- 1307 添加至cDNA之模板轉換寡核苷酸部分，啟動序列
- 1308 用於B細胞受體區域之次選擇之引子
- 1310 珠粒
- 1311 cDNA擴增
- 1312 cDNA擴增
- 1315 連接體
- 1320 測序啟動序列1
- 1325 條碼
- 1330 具有至少兩個捕捉寡聚物之捕捉物體
- 1330' 具有至少兩個與所釋放RNA雜交之捕捉寡聚物之捕捉物體
- 1335 可選獨特分子標識符
- 1340 測序接頭序列(P7)
- 1345 Not1限制位點序列
- 1350 聚TVN
- 1350' 多A

- 1351 B細胞受體之全長恆定(C)區
- 1351' B細胞受體之縮短恆定(C)區
- 1351'' 用於在聚合酶鏈式反應之C子區內選擇之引子1308之部分
- 1352 B細胞受體之接合(J)區(若存在)
- 1353 B細胞受體之多變(D)區
- 1354 B細胞受體之可變(V)區
- 1355 反轉錄RNA
- 1356 選擇引子1302之部分，其僅啟動基因選擇性序列
- 1357 完整B細胞受體區域
- 1360 測序/接頭序列
- 1365 反轉錄-延長以納入來自模板轉換寡核苷酸之引子
- 1370 使用正向1311及1312反向擴增自cDNA擴增之DNA
- 1375 對B細胞受體區域之選擇，及添加額外測序引子及可選庫索引
- 1380 含有擴增DNA之所選擇及調整之B細胞受體
- 1385 環化DNA
- 1390 再線性化DNA
- 1391 用於條碼及可選獨特分子標識符之讀段1
- 1392 用於可選庫索引之索引讀段
- 1393 用於B細胞受體區域之讀段索引2
- 1394 使用引子1308之B細胞受體區域之次選擇，及測序接頭之添加
- 1395 經次選擇且經擴增之DNA

- 1396 測序讀段
- 1397 用於B細胞受體區域之反向索引2讀段
- 2510 壓縮DNA
- 2515 所釋放DNA
- 3002 捕捉珠粒
- 3002' cDNA裝飾之捕捉珠粒
- 3004 細胞
- 3006 細胞之完整核

【補充序列表】

<110> 美商伯克利之光生命科技公司(Berkeley Lights, Inc.)

<120> DNA條碼組合物及於微流體裝置中原位識別之方法

<130> 098702-000100PC-1061388

<140> TW 106133838

<141> 2017-09-29

<150> US 62/470,669

<151> 2017-03-13

<150> US 62/457,582

<151> 2017-02-10

<150> US 62/457,399

<151> 2017-02-10

<150> US 62/403,111

<151> 2016-10-01

<150> US 62/403,116

<151> 2016-10-01

<160> 162

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 1

cagccttctg 10

<210> 2

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>	合成構築體	
<400>	2	
tgtgagttcc		10
<210>	3	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	3	
gaatacgggg		10
<210>	4	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	4	
ctttggaccc		10
<210>	5	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	5	
gccatacacg		10
<210>	6	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	

<400> 6	
aagctgaagc	10
<210> 7	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成構築體	
<400> 7	
tgtggccatt	10
<210> 8	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成構築體	
<400> 8	
cgcaatctca	10
<210> 9	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成構築體	
<400> 9	
tgcgttggtg	10
<210> 10	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成構築體	
<400> 10	
tacagttggc	10

<210>	11	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	11	
ttcctctcgt		10
<210>	12	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	12	
gacgttacga		10
<210>	13	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	13	
actgacgcgt		10
<210>	14	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	14	
aggagcagca		10

<210> 15
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 15
tgacgcgcaa 10

<210> 16
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 16
tcctcgccat 10

<210> 17
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 17
tagcagccca 10

<210> 18
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 18
cagacgctgt 10

<210> 19
<211> 10

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 19
tggaaagcgg 10

<210> 20
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 20
gcgacaagac 10

<210> 21
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 21
tgtccgaaag 10

<210> 22
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 22
aacatccctc 10

<210> 23
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 23
aaatgtcccg 10

<210> 24
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 24
ttagcgcgtc 10

<210> 25
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 25
agttcaggcg 10

<210> 26
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 26
acaggggaac 10

<210> 27
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 27
accggattgg 10

<210> 28
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 28
tcgtgtgtga 10

<210> 29
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 29
taggtctgcg 10

<210> 30
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 30
accataccc 10

<210> 31
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400>	31	
ccgcacttct		10
<210>	32	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	32	
ttgggtacag		10
<210>	33	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	33	
attcgtcgga		10
<210>	34	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	34	
gccagcgat		10
<210>	35	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	35	
gttgagcagg		10

<210> 36
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 36
ggtacctggt 10

<210> 37
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 37
gcatgaacgt 10

<210> 38
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 38
tggctacgat 10

<210> 39
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 39
cgaaggtagg 10

<210> 40
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 40
ttcaaccgag 10

<210> 41
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF647N染料3'修飾

<400> 41
cagaaggctg 10

<210> 42
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF647N染料3'修飾

<400> 42
ggaactcaca 10

<210> 43
<211> 10

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF647N染料3'修飾

<400> 43
ccccgtattc 10

<210> 44
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF647N染料3'修飾

<400> 44
gggtccaaag 10

<210> 45
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF647N染料3'修飾

<400> 45
cgtgtatggc 10

<210> 46
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF647N染料3'修飾

<400> 46
gcttcagctt 10

<210> 47
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF647N染料3'修飾

<400> 47
aatggccaca 10

<210> 48
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)

<223> 經AlexF647N染料3'修飾

<400> 48

tgagattgcg10

<210> 49

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 經AlexF647N染料3'修飾

<400> 49

caacaacgca10

<210> 50

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> 經AlexF647N染料3'修飾

<400> 50

gccaaactgta10

<210> 51

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 經AlexF405N染料5'修飾

<400> 51
acgagaggaa 10

<210> 52
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 經AlexF405N染料5'修飾

<400> 52
tcgtaacgtc 10

<210> 53
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 經AlexF405N染料5'修飾

<400> 53
acgcgtcagt 10

<210> 54
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 經AlexF405N染料5'修飾

<400> 54
tgctgctcct 10

<210> 55
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 經AlexF405N染料5'修飾

<400> 55
ttgcgcgtca 10

<210> 56
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 經AlexF405N染料5'修飾

<400> 56
atggcgagga 10

<210> 57
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 經AlexF405N染料5'修飾

<400> 57
tgggctgcta 10

<210> 58
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 經AlexF405N染料5'修飾

<400> 58
acagcgtctg 10

<210> 59
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 經AlexF405N染料5'修飾

<400> 59
ccgctttcca 10

<210> 60
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 經AlexF405N染料5'修飾

<400> 60
gtcttgtcgc 10

<210> 61
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF488N染料3'修飾
<400> 61
ctttcggaca 10

<210> 62
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature

<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF488N染料3'修飾
<400> 62
gagggatgtt 10

<210> 63
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF488N染料3'修飾
<400> 63
cgggacattt 10

<210> 64
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF488N染料3'修飾
<400> 64
gacgcgctaa 10

<210> 65
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>

<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF488N染料3'修飾
<400> 65
cgcctgaact 10

<210> 66
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF488N染料3'修飾
<400> 66
gttcccctgt 10

<210> 67
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF488N染料3'修飾
<400> 67
ccaatccgt 10

<210> 68
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF488N染料3'修飾
<400> 68
tcacacacga 10

<210> 69
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF488N染料3'修飾
<400> 69
cgcagaccta 10

<210> 70
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF488N染料3'修飾
<400> 70
gggtatgggt 10

<210> 71
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF594N染料3'修飾

<400> 71
agaagtgcgg 10

<210> 72
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF594N染料3'修飾

<400> 72
ctgtacccaa 10

<210> 73
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF594N染料3'修飾

<400> 73
tccgacgaat 10

<210> 74
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF594N染料3'修飾

<400> 74
atacgctggc 10

<210> 75
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF594N染料3'修飾

<400> 75
cctgctcaac 10

<210> 76
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF594N染料3'修飾

<400> 76
accaggtacc 10

<210> 77
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF594N染料3'修飾

<400> 77
acgttcatgc 10

<210> 78
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF594N染料3'修飾

<400> 78
atcgtagcca 10

<210> 79
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF594N染料3'修飾

<400> 79
cctaccttcg 10

<210> 80
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經AlexF594N染料3'修飾

<400> 80
ctcggttgaa 10

<210> 81
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 81
agtcgactga 10

<210> 82
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> 經FITC 3'修飾

<400> 82
tcagctgact 10

<210> 83
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(16)
<223> n係a、t、c或g

<400> 83
tcagctgact nnnnnn 16

<210> 84
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(10)
<223> n係a、t、c或g

<400> 84
nnnnnnnnnn 10

<210> 85
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 85
tttttttttt 10

<210> 86
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 86
aaaaaaaaaa10

<210> 87
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 87
ccccccccc10

<210> 88
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 88
gggggggggg10

<210> 89
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 89
ggggggcccc tttttttttt ccggccggcc aaaaattttt40

<210> 90
<211> 40

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	90	
aaaaaaaaa	ttttttttt	gggggggggg ccccccccc
		40
<210>	91	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	91	
gggggcccc	ttaattaatt	ccggccggcc aaaaatttt
		40
<210>	92	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	92	
gggggcccc	ttttttttt	gggggggggg ccccccccc
		40
<210>	93	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	93	
cccccgggg		10
<210>	94	
<211>	10	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>
<223> 合成構築體

<400> 94
aat1aat1aa 10

<210> 95
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 95
ggccggccgg 10

<210> 96
<211> 10
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 96
tttttaaaaa 10

<210> 97
<211> 105
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 附接至珠粒之5'連接體

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(83)
<223> n係a、t、c或g

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)..(105)
<223> n係a、t、c或g

<400> 97
acactctttc cctacacgac gctcttccga tctcagcctt ctgttcctct cgttgtcga 60

aagccgcact tctnnnnnnn nnnttttttt tttttttttt tttvn 105

<210> 98
<211> 105
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 附接至珠粒之5'連接體

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(83)
<223> n係a、t、c或g

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)..(105)
<223> n係a、t、c或g

<400> 98
acactctttc cctacacgac gctcttccga tctcgcaatc tcacagacgc tgttcgtgtg 60

tgatggctac gatnnnnnnn nnnttttttt tttttttttt tttvn 105

<210> 99
<211> 105
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 附接至珠粒之5'連接體

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(83)
<223> n係a、t、c或g

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)..(105)
<223> n係a、t、c或g

<400> 99
acactctttc cctacacgac gctcttccga tctcagcctt ctgttcctct cgttgtccga 60

aagccgcact tctnnnnnnn nnnttttttt tttttttttt tttvn 105

<210> 100
<211> 105
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 附接至珠粒之5'連接體

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(83)
<223> n係a、t、c或g

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)..(105)
<223> n係a、t、c或g

<400> 100
acactctttc cctacacgac gctcttccga tctcagcctt ctgttcctct cgttgtccga 60

aagccgcact tctnnnnnnn nnnttttttt tttttttttt tttvn 105

<210> 101
<211> 137
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 附接至珠粒之5'連接體

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)..(83)
<223> n係a、t、c或g

<220>
<221> misc_feature
<222> (137)..(137)
<223> n係a、t、c或g

<400> 101
acactctttc cctacacgac gctcttccga tctcagcctt ctgttcctct cgttgtccga 60

aagccgcact tctnnnnnnn nnnatctcgt atgccgtctt ctgcttggcg gccgcttttt 120

tttttttttt tttttvn 137

<210> 102
<211> 137
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 附接至珠粒之5'連接體

<220>
<221> misc_feature

<222>	(74)..(83)	
<223>	n係a、t、c或g	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(137)..(137)	
<223>	n係a、t、c或g	
<400>	102	
acactctttc cctacacgac gctcttccga tcttgcgttg ttgtggaaag cggtagggtct		60
gcgcgaaggt aggnnnnnnn nnnatctcgt atgccgtctt ctgcttggcg gccgcttttt		120
tttttttttt tttttvn		137
<210>	103	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<220>		
<221>	modified_base	
<222>	(1)..(1)	
<223>	n係甲基-異胞苷去氧核糖核苷酸	
<220>		
<221>	modified_base	
<222>	(2)..(2)	
<223>	n係異鳥苷去氧核糖核苷酸	
<220>		
<221>	modified_base	
<222>	(3)..(3)	
<223>	n係甲基-異胞苷去氧核糖核苷酸	
<220>		
<221>	modified_base	
<222>	(26)..(28)	
<223>	n係鳥苷	
<400>	103	
nnnacactct ttccctacac gacgcnnn		28
<210>	104	

<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 104
acactctttc cctacacgac gctcttccga tct 33

<210> 105
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> 經生物素5'修飾

<400> 105
acactctttc cctacacgac gc 22

<210> 106
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)..(53)
<223> 磷酸酯鍵聯中之硫代磷酸酯取代

<220>
<221> misc_feature
<222> (53)..(54)
<223> 磷酸酯鍵聯中之硫代磷酸酯取代

<220>
<221> misc_feature

<222>	(54)..(55)	
<223>	磷酸酯鍵聯中之硫代磷酸酯取代	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(55)..(56)	
<223>	磷酸酯鍵聯中之硫代磷酸酯取代	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(56)..(57)	
<223>	磷酸酯鍵聯中之硫代磷酸酯取代	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(57)..(58)	
<223>	磷酸酯鍵聯中之硫代磷酸酯取代	
<400>	106	
aatgatacgg cgaccaccga gatctacact ctttccttac acgacgtct tccgatct		58
<210>	107	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	107	
caagcagaag acggcatacg agat		24
<210>	108	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	108	
aatgatacgg cgaccaccga		20
<210>	109	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n係5'生物素-TEG

<220>
<221> misc_feature
<222> (47)..(48)
<223> 磷酸酯鍵聯中之硫代磷酸酯取代

<400> 109
ncaagcagaa gacggcatatc gagattcgcc ttagtctcgt gggctcgg 48

<210> 110
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> n係5'生物素-TEG

<220>
<221> misc_feature
<222> (47)..(48)
<223> 磷酸酯鍵聯中之硫代磷酸酯取代

<400> 110
ncaagcagaa gacggcatatc gagatctagt acggtctcgt gggctcgg 48

<210> 111
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1)..(1)	
<223>	n係5'生物素-TEG	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(51)..(52)	
<223>	磷酸酯鍵聯中之硫代磷酸酯取代	
<400>	111	
	naatgatacg gcgaccaccg agatctacac actgcataatc gtcggcagcg tc	52
<210>	112	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(1)..(1)	
<223>	n係甲基異胞苷去氧核糖核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(2)..(2)	
<223>	n係甲基異鳥苷去氧核糖核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(3)..(3)	
<223>	n係甲基異胞苷去氧核糖核苷酸	
<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(26)..(28)	
<223>	n係鳥苷	
<400>	112	
	nnnacactct ttccctacac gacgennn	28
<210>	113	
<211>	22	

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 113
acactctttc cctacacgac gc 22

<210> 114
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 114
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggakgtmag cttcaggagt c 51

<210> 115
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 115
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggaggtbcag ctbcagcagt c 51

<210> 116
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 116
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggaggtbcag ctbcagcagt c 51

<210> 117
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 117

gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggaggtccar ctgcaacart c 51

<210> 118

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 118

gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc gcaggtycag ctbcagcart c 51

<210> 119

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 119

gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc gcaggtycar ctgcagcagt c 51

<210> 120

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 120

gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc gcaggtccac gtgaagcagt c 51

<210> 121

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 121
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggaggtgaas stggtggaat c 51

<210> 122
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 122
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggavgtgawg ytggtggagt c 51

<210> 123
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 123
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggaggtgcag skggtggagt c 51

<210> 124
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 124
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggakgtgcam ctggtggagt c 51

<210> 125
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 125
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggaggtgaag ctgatggart c 51

<210> 126
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 126
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggaggtgcar cttgttgagt c 51

<210> 127
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 127
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggargtraag cttctcgagt c 51

<210> 128
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 128
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggaagtgaar sttgaggagt c 51

<210> 129
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 129
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc gcaggttact ctraaagwt stg 53

<210> 130
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 130
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc gcaggtccaa ctvcagcacc c 51

<210> 131
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 131
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggatgtgaac ttggaagtgt c 51

<210> 132
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 132
gttattgcta gcggctcagc cggcaatggc ggaggtgaag gtcacgcagt c 51

<210> 133
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 133
agccggccat ggccggayac cagctgactc agcc 34

<210> 134
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 134
agccggccat ggcggayatt gttctcwccc agtc 34

<210> 135
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 135
agccggccat ggcggayatt gtgmtmactc agtc 34

<210> 136
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 136
agccggccat ggcggayatt gtgytracac agtc 34

<210> 137
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 137
agccggccat ggcggayatt gtratgacmc agtc 34

<210> 138
<211> 34

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	138	
agccggccat ggcggayatt magatramcc agtc		34
<210>	139	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	139	
agccggccat ggcggayatt cagatgaydc agtc		34
<210>	140	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	140	
agccggccat ggcggayaty cagatgacac agac		34
<210>	141	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	141	
agccggccat ggcggayatt gtctcawcc agtc		34
<210>	142	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	142	
agccggccat ggcggayatt gwgctsaccc aatc		34
<210>	143	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	143	
agccggccat ggcggayatt stratgaccc artc		34
<210>	144	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	144	
agccggccat ggcggayrtt ktgatgaccc arac		34
<210>	145	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	145	
agccggccat ggcggayatt gtgatgacbc agkc		34
<210>	146	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223>	合成構築體	
<400>	146	
agccggccat	ggcggayatt gtgataacyc agga	34
<210>	147	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	147	
agccggccat	ggcggayatt gtgatgaccc agwt	34
<210>	148	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	148	
agccggccat	ggcggayatt gtgatgacac aacc	34
<210>	149	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	149	
agccggccat	ggcggayatt ttgctgactc agtc	34
<210>	150	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	

<400> 150
agccggccat ggcggargct gttgtgactc aggaatc 37

<210> 151
<211> 73
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 151
agatcggaag agcacacgtc tgaactccag tcaccgatgt acactctttc cctacacgac 60

gctcttccga tct 73

<210> 152
<211> 73
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 152
agatcggaag agcacacgtc tgaactccag tcacgatcag acactctttc cctacacgac 60

gctcttccga tct 73

<210> 153
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 153
caagcagaag acggcatacg agat 24

<210> 154
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223>	合成構築體	
<400>	154	
aatgatacgg cgaccaccga gatctacacg gatagachga tggggstgty gtt		53
<210>	155	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	155	
aatgatacgg cgaccaccga gatctacacc tggatggtagg gaagatggat acag		54
<210>	156	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	156	
tgtgcaagat attatgatga tcattactgc cttgactact gg		42
<210>	157	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	157	
gcaagatatt atgatgatca ttactgcctt gactac		36
<210>	158	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成構築體	
<400>	158	
tgtggtagag gttatggtta ctacgtatTT gaccactgg		39

<210> 159
<211> 33
<212> DNA
<213> 家鼯鼠

<400> 159
ggtagagggt atggttacta cgtatttgac cac 33

<210> 160
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 160
gcggccgc 8

<210> 161
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 161
tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga cag 33

<210> 162
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 162
gtctcgtggg ctccgagatg tgtataagag acag 34

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種複數個捕捉物體，其中該複數個捕捉物體之各捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，其中該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸包含：

啟動序列；

捕捉序列；及

包含三個或更多個可盒化(casetable)寡核苷酸序列之條碼序列，各可盒化寡核苷酸序列與該條碼序列之其他可盒化寡核苷酸序列不一致，

其中，對於該複數個捕捉物體之各捕捉物體，該捕捉物體之該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸包含相同條碼序列，

其中該複數個捕捉物體之各捕捉物體之該捕捉寡核苷酸之該條碼序列與該複數個捕捉物體之各其他捕捉物體之捕捉寡核苷酸之條碼序列不同，及

其中，對於該複數個捕捉物體中之每一可盒化寡核苷酸序列，互補寡核苷酸序列與該複數個捕捉物體中之任何其他可盒化寡核苷酸序列實質上不雜交。

【請求項2】

如請求項1之複數個捕捉物體，其中各捕捉寡核苷酸包含5'-最末端核苷酸(5'-most nucleotide)及3'-最末端核苷酸(3'-most nucleotide)，

其中該啟動序列毗鄰或包含該5'-最末端核苷酸，

其中該捕捉序列毗鄰或包含該3'-最末端核苷酸，且

其中該條碼序列位於該啟動序列之3'及該捕捉序列之5'。

【請求項3】

如請求項1之複數個捕捉物體，其中該三個或更多個可盒化寡核苷酸序列各具有8至12個核苷酸之長度。

【請求項4】

如請求項1之複數個捕捉物體，其中該條碼序列之三個或更多個可盒化寡核苷酸序列係串聯連接，無任何介入寡核苷酸序列。

【請求項5】

如請求項1至4中任一項之複數個捕捉物體，其中該條碼序列之三個或更多個可盒化寡核苷酸序列各具有SEQ ID NO: 1-40中任一者之序列。

【請求項6】

如請求項1至4中任一項之複數個捕捉物體，其中該條碼序列包含4個可盒化寡核苷酸序列。

【請求項7】

如請求項1至4中任一項之複數個捕捉物體，其中該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸進一步包含獨特分子標識符(UMI)序列。

【請求項8】

如請求項7之複數個捕捉物體，其中該UMI位於該啟動序列之3'及該捕捉序列之5'。

【請求項9】

如請求項1之複數個捕捉物體，其中各捕捉寡核苷酸進一步包含限制位點，該限制位點包含8個鹼基對之辨識序列。

【請求項10】

如請求項1至4中任一項之複數個捕捉物體，其中該捕捉序列包含多-dT序列、隨機六聚體序列、基因特異性序列或鑲嵌末端序列。

【請求項11】

如請求項1至4中任一項之複數個捕捉物體，其中用於該複數個捕捉物體之各捕捉物體的該條碼序列之三個或更多個可盒化寡核苷酸序列係各選自12至100個可盒化寡核苷酸序列之限定組，其中，對於該限定組中之每一可盒化寡核苷酸序列，互補寡核苷酸序列與該限定組中之任何其他可盒化寡核苷酸序列實質上不雜交。

【請求項12】

一種在微流體裝置內原位識別一或多個捕捉物體之方法，該方法包含：

將該一或多個捕捉物體之單一捕捉物體佈置於位於該微流體裝置之外殼內之一或多個隔離圍欄之每一者之分離區域中，其中各捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，且其中該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸包含：

啟動序列；

捕捉序列；及

條碼序列，其中該條碼序列包含三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，各可盒化寡核苷酸序列與該條碼序列之其他可盒化寡核苷酸序列不一致，

其中，對於該一或多個捕捉物體之各捕捉物體，該捕捉物體之該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸包含相同條碼序列；

其中，對於該一或多個捕捉物體中之每一可盒化寡核苷酸序列，與該可盒化寡核苷酸序列互補之寡核苷酸序列與該一或多個捕捉物體中之任何其他可盒化寡核苷酸序列實質上不雜交；

使包含第一組雜交探針之第一試劑溶液流入該微流體裝置之外殼內之流動區域中，其中該流動區域以流體連接至該一或多個隔離圍欄中之每一者，且其中該第一組之各雜交探針包含：

寡核苷酸序列，其與該一或多個捕捉物體中任一者之該等捕捉寡核苷酸中任一者之該等條碼序列中任一者所包含之可盒化寡核苷酸序列互補，其中該第一組中各雜交探針之互補寡核苷酸序列與該第一組中該等雜交探針之各其他互補寡核苷酸序列不一致；及

螢光標記，其選自在光譜上可區分之螢光標記組，其中該第一組中各雜交探針之螢光標記與該第一組雜交探針中各其他雜交探針之螢光標記不同；

使該第一組之該等雜交探針與該一或多個捕捉物體中任一者之該等捕捉寡核苷酸中任一者之該等條碼序列中任一者中之相應可盒化寡核苷酸序列雜交；

對於該第一組雜交探針之各雜交探針，檢測與該一或多個捕捉物體中任一者相關之相應螢光信號；及

針對佈置於該一或多個隔離圍欄之一內之各捕捉物體生成記錄，該記錄包含(i) 該微流體裝置之外殼內之隔離圍欄之位置，及(ii) 該第一組雜交探針中各雜交探針之相應螢光信號與該捕捉物體之相關性或非相關性，其中該相關性及非相關性之記錄構成該捕捉物體與該隔離圍欄相聯之條碼。

【請求項13】

如請求項12之方法，其進一步包含：

使包含第n組雜交探針之第n種試劑溶液流入該微流體裝置之流動區

域中，其中該第 n 組之各雜交探針包含：

寡核苷酸序列，其與該一或多個捕捉物體中任一者之該等捕捉寡核苷酸中任一者之該等條碼序列中任一者所包含可盒化寡核苷酸序列互補，其中該第 n 組中各雜交探針之互補寡核苷酸序列與流入該微流體裝置之流動區域中之該第 n 組及任何其他組雜交探針中該等雜交探針之各其他互補寡核苷酸序列不一致；及

螢光標記，其選自在光譜上可區分之螢光標記組，其中該第 n 組中各雜交探針之螢光標記與該第 n 組雜交探針中各其他雜交探針之螢光標記不同；

使該第 n 組之該等雜交探針與該一或多個捕捉物體中任一者之該等捕捉寡核苷酸中任一者之該等條碼序列中任一者中之相應可盒化寡核苷酸序列雜交；

對於該第 n 組雜交探針之各雜交探針，檢測與該一或多個捕捉物體中任一者相關之相應螢光信號；及

對於佈置於該一或多個隔離圍欄之一內之各捕捉物體，用該第 n 組雜交探針之各雜交探針之相應螢光信號與該捕捉物體之相關性或非相關性補充該記錄，

其中 n 係一組正整數，其值為 $\{2, \dots, m\}$ ，

其中 m 係正整數，其值為2或更大，且

其中對於該組正整數 $\{2, \dots, m\}$ 中之各 n 值，重複上述使該第 n 種試劑流動、使該第 n 組雜交探針雜交、檢測該等相應螢光信號及補充該等紀錄之步驟，及

其中 m 值大於或等於3且小於或等於20。

【請求項14】

如請求項12之方法，其中各捕捉物體之各捕捉寡核苷酸之各條碼序列包含三個或四個可盒化寡核苷酸序列。

【請求項15】

如請求項13之方法，其中該第一組雜交探針及該等第n組雜交探針之每一者包含3個或4個雜交探針。

【請求項16】

如請求項12至15中任一項之方法，其進一步包含將一或多個生物細胞佈置於該微流體裝置之一或多個隔離圍欄內，其中將該一或多個生物細胞中之每一者佈置於該一或多個隔離圍欄之不同圍欄中。

【請求項17】

如請求項12至15中任一項之方法，其中該微流體裝置之外殼進一步包含介電泳(DEP)構形，且其中將該一或多個捕捉物體佈置於一或多個隔離圍欄中係使用介電泳(DEP)力實施。

【請求項18】

如請求項16之方法，其中該微流體裝置之外殼進一步包含介電泳(DEP)構形，且該將該一或多個生物細胞佈置於該一或多個隔離圍欄內係使用介電泳(DEP)力實施。

【請求項19】

一種將基因體資料與微流體裝置中之生物細胞相關聯之方法，其包含：

將捕捉物體佈置於微流體裝置之隔離圍欄中，其中該捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，其中該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸包

含：

啟動序列；

捕捉序列；及

條碼序列，其中該條碼序列包含三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，各可盒化寡核苷酸序列與該條碼序列之其他可盒化寡核苷酸序列不一致；

其中該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸包含相同條碼序列；且

其中，對於該捕捉物體之每一可盒化寡核苷酸序列，與該可盒化寡核苷酸序列互補之寡核苷酸序列與該捕捉物體之任何其他可盒化寡核苷酸序列實質上不雜交；

原位識別該複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列並記錄該識別條碼序列與該隔離圍欄間之相關性；

將該生物細胞佈置於該隔離圍欄中；

裂解該生物細胞且容許該捕捉物體所包含之複數個捕捉寡核苷酸捕捉自該裂解生物細胞釋放之核酸；

反轉錄該等捕捉核酸，由此產生複數個條碼化cDNA，各條碼化cDNA包含共價連接至該捕捉物體之該複數個捕捉寡核苷酸之一者之互補性捕捉核酸序列；

對該複數個條碼化cDNA進行測序，由此獲得與該捕捉物體之該複數個捕捉寡核苷酸之該一者之該條碼序列相關之各互補性捕捉核酸序列之讀段序列；

基於該等讀段序列識別該條碼序列；及

使用該讀段序列識別之條碼序列及該原位識別之條碼序列以將該互補性捕捉核酸序列之讀段序列與該隔離圍欄相聯，且由此將該互補性捕捉核酸序列之讀段序列與置於該隔離圍欄中之生物細胞相關聯。

【請求項20】

如請求項19之方法，其進一步包含：

觀察該生物細胞之表型；及

使該互補性捕捉核酸序列之讀段序列與該生物細胞之表型相關聯。

【請求項21】

如請求項19之方法，其中原位識別該複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列包含實施如請求項12之方法。

【請求項22】

如請求項19至21中任一項之方法，其進一步包含：

將複數個捕捉物體佈置於該微流體裝置之相應複數個隔離圍欄中；

將複數個生物細胞佈置於該等相應複數個隔離圍欄中，及

根據該方法處理該複數個捕捉物體及複數個生物細胞中之每一者。

【請求項23】

一種用於產生核酸庫之套組，其包含：

微流體裝置，其包含：

外殼，其中該外殼包含流動區域及離開該流動區域開口之複數個隔離圍欄；及

介電泳(DEP)構形；及

複數個捕捉物體，其中該複數個捕捉物體之各捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸包含：

捕捉序列；及

條碼序列，其包含至少三個可盒化寡核苷酸序列，其中該條碼序列之各可盒化寡核苷酸序列與該條碼序列之其他可盒化寡核苷酸序列不一致，且

其中該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸包含相同條碼序列；及其中該複數個捕捉物體係如請求項1至11中任一項之複數個捕捉物體。

【請求項24】

如請求項23之套組，其進一步包含：

複數個雜交探針，各雜交探針包含：

寡核苷酸序列，其與該複數個捕捉物體中任一者之複數個捕捉寡核苷酸之可盒化寡核苷酸序列中任一者互補；及

標記，

其中該複數個雜交探針之各雜交探針之互補序列與不同的可盒化寡核苷酸序列互補；且

其中該複數個雜交探針之各雜交探針之標記係選自在光譜上可區分之標記組。

【請求項25】

一種自生物細胞提供條碼化cDNA庫之方法，其包含：

將該生物細胞佈置於位於微流體裝置之外殼內之隔離圍欄內；

將捕捉物體佈置於該隔離圍欄內，其中該捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸包含：

結合引子之啟動序列；

捕捉序列；及

條碼序列，其中該條碼序列包含三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，各可盒化寡核苷酸序列與該條碼序列之各其他可盒化寡核苷酸序列不一致；其中該捕捉物體之該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸之條碼序列相同；及

其中，對於該捕捉物體之每一可盒化寡核苷酸序列，與該可盒化寡核苷酸序列互補之寡核苷酸序列與該捕捉物體之任何其他可盒化寡核苷酸序列實質上不雜交；

裂解該生物細胞且容許該捕捉物體所包含之該複數個捕捉寡核苷酸捕捉自該裂解生物細胞釋放之核酸；及

反轉錄該等捕捉核酸，由此產生複數個條碼化cDNA裝飾該捕捉物體，各條碼化cDNA包含(i) 與該等捕捉核酸中之相應核酸互補之寡核苷酸序列，其共價連接至(ii) 該複數個捕捉寡核苷酸中之一者。

【請求項26】

如請求項25之方法，其中該複數個捕捉寡核苷酸中一或多者之捕捉序列包含基因特異性引子序列，其中該基因特異性引子序列靶向編碼T細胞受體(TCR)或B細胞受體(BCR)之mRNA序列。

【請求項27】

如請求項25或26之方法，其進一步包含：在該捕捉物體位於該隔離圍欄內時，原位識別該捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列，其中識別該條碼序列係使用如請求項12至18中任一項之方法實施。

【請求項28】

如請求項25或26之方法，其中該微流體裝置之外殼進一步包含介電泳(DEP)構形，且其中佈置該生物細胞及/或佈置該捕捉物體係由在該生物

細胞及/或該捕捉物體上或其附近施加介電泳(DEP)力來實施。

【請求項29】

一種自生物微小物體提供條碼化基因體DNA庫之方法，其包含：

將包含基因體DNA之生物微小物體佈置於位於微流體裝置之外殼內之隔離圍欄內；

使該生物微小物體與能破裂該生物微小物體之核膜之裂解試劑接觸，由此釋放該生物微小物體之基因體DNA以提供釋放基因體DNA；

標籤化該釋放基因體DNA，由此產生複數個標籤化基因體DNA片段，該等片段具有由第一標籤化插入序列界定之第一端及由第二標籤化插入序列界定之第二端；

將捕捉物體佈置於該隔離圍欄內，其中該捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸包含：

第一啟動序列；

第一標籤化插入捕捉序列；及

條碼序列，其中該條碼序列包含三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，各可盒化寡核苷酸序列與該條碼序列之各其他可盒化寡核苷酸序列不一致，其中該捕捉物體之該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸之條碼序列相同；及

其中，對於該捕捉物體之每一可盒化寡核苷酸序列，與該可盒化寡核苷酸序列互補之寡核苷酸序列與該捕捉物體之任何其他可盒化寡核苷酸序列實質上不雜交；

使該複數個標籤化基因體DNA片段中之多者接觸：(i) 該捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸中之多者之該第一標籤化插入捕捉序列，(ii) 擴增寡

核苷酸，其包含連接至第二標籤化插入捕捉序列之第二啟動序列、隨機化引子序列或基因特異性引子序列，及(iii) 包含鏈(strand)置換酶及聚合酶之酶混合物；

將該接觸之複數個標籤化基因體DNA片段培育一段時間，由此同時擴增該複數個標籤化基因體DNA片段中之多者及將該捕捉寡核苷酸及該擴增寡核苷酸添加至該複數個標籤化基因體DNA片段中之多者之末端，以產生該條碼化基因體DNA庫；及

自該微流體裝置輸出該條碼化基因體DNA庫。

【請求項30】

如請求項29之方法，其進一步包含：在該捕捉物體位於該隔離圍欄內時，原位識別該捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸之條碼序列，其中識別該條碼序列係使用如請求項12至18中任一項之方法實施。

【請求項31】

一種自單一生物細胞提供條碼化cDNA庫及條碼化基因體DNA庫之方法，其包含：

將該生物細胞佈置於位於微流體裝置之外殼內之隔離圍欄內；

將第一捕捉物體佈置於該隔離圍欄內，其中該第一捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸包含：

第一啟動序列；

第一捕捉序列；及

第一條碼序列，其中該第一條碼序列包含三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，各可盒化寡核苷酸序列與該第一條碼序列之各其他可盒化寡核苷酸序列不一致，其中該複數個捕捉寡核苷酸中之各者之條碼序列相同；

及

其中，對於該捕捉物體之每一可盒化寡核苷酸序列，與該可盒化寡核苷酸序列互補之寡核苷酸序列與該捕捉物體之任何其他可盒化寡核苷酸序列實質上不雜交；

藉由實施如請求項25至28中任一項之方法來獲得該條碼化cDNA庫，其中實施裂解該生物細胞，使得該生物細胞之質膜降解，自該生物細胞釋放細胞質RNA，而該生物細胞之核膜保持完整，由此提供經來自該生物細胞之RNA之條碼化cDNA庫裝飾之第一捕捉物體；

自該微流體裝置輸出該cDNA庫裝飾之第一捕捉物體；

將第二捕捉物體佈置於該隔離圍欄內，其中該第二捕捉物體包含複數個捕捉寡核苷酸，各包含：

第二啟動序列；

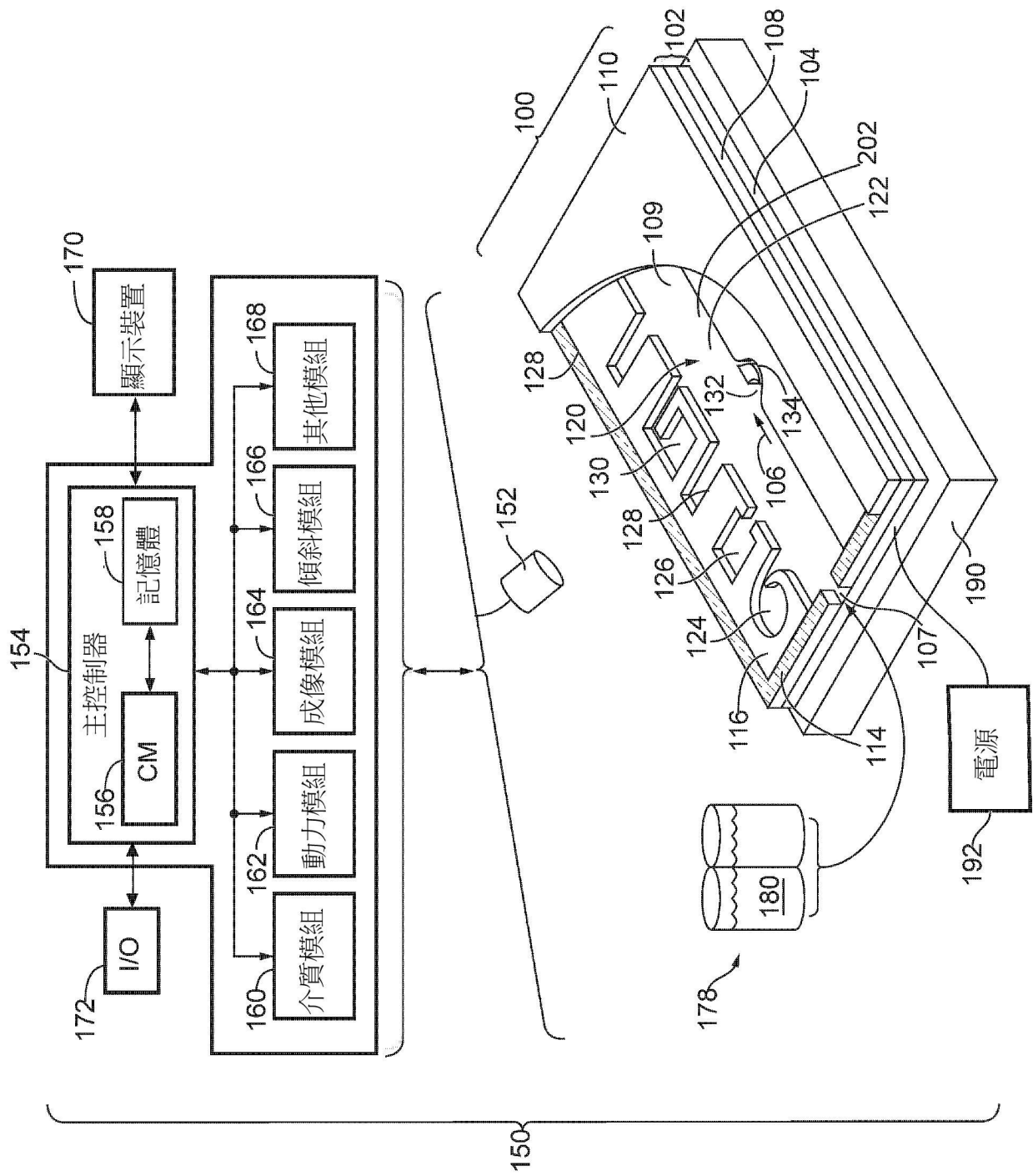
第一標籤化插入捕捉序列；及

第二條碼序列，其中該第二條碼序列包含三個或更多個可盒化寡核苷酸序列，各可盒化寡核苷酸序列與該第二條碼序列之各其他可盒化寡核苷酸序列不一致，及其中該複數個捕捉寡核苷酸之各捕捉寡核苷酸之條碼序列相同；

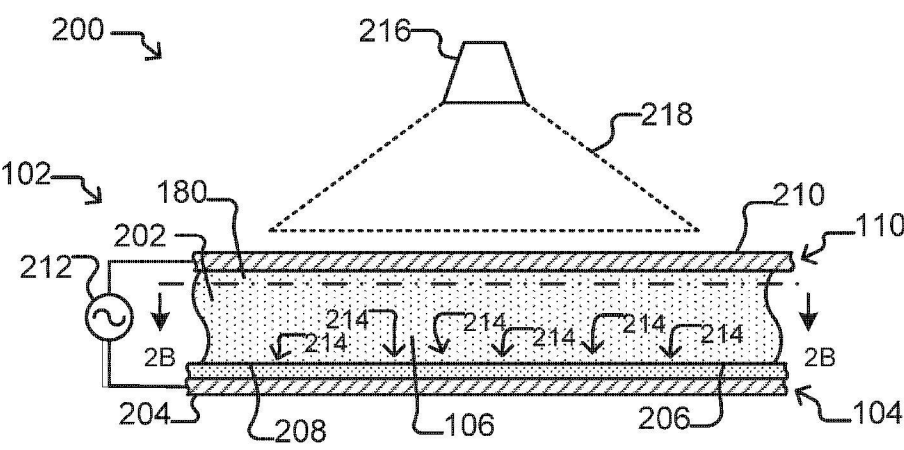
藉由實施如請求項29或30之方法來獲得該條碼化基因體DNA庫，其中使來自該生物細胞之複數個標籤化基因體DNA片段與該第二捕捉物體之複數個捕捉寡核苷酸中之多者之該第一標籤化插入捕捉序列接觸，由此自該生物細胞之基因體DNA提供該條碼化基因體DNA庫；及

自該微流體裝置輸出該條碼化基因體DNA庫。

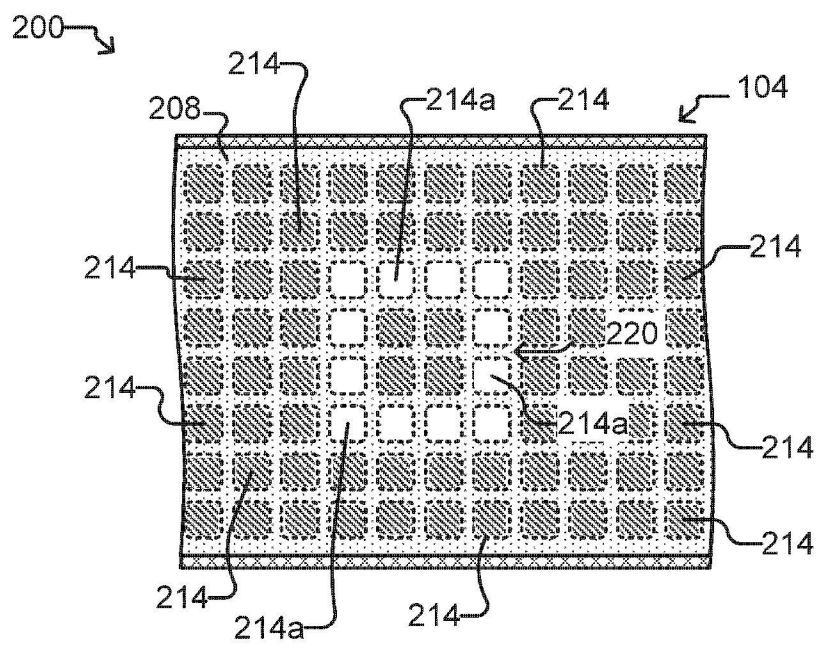
【發明圖式】



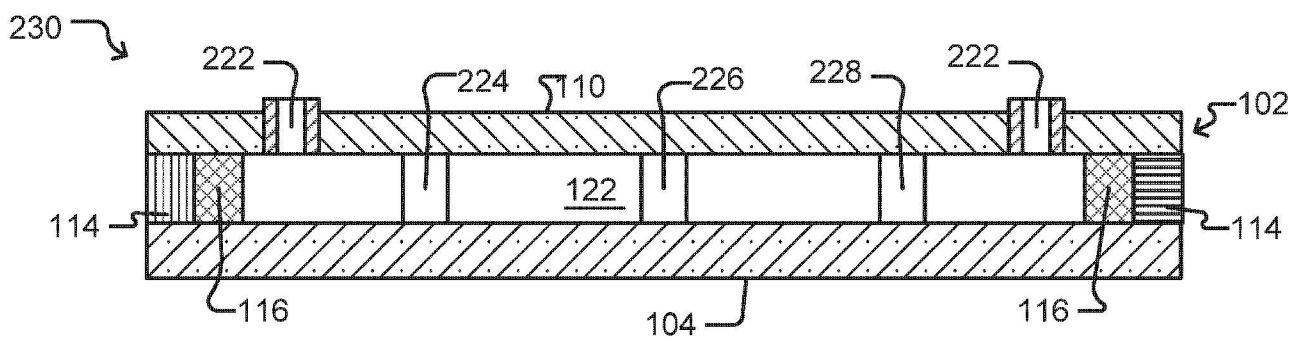
【圖 1A】



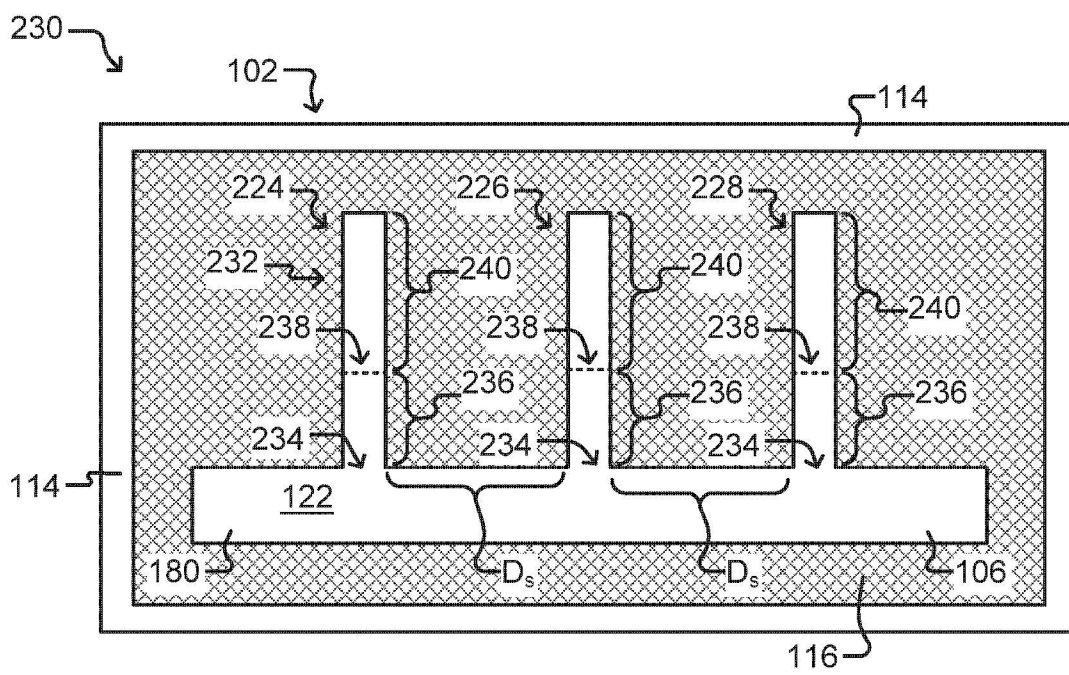
【圖 1B】



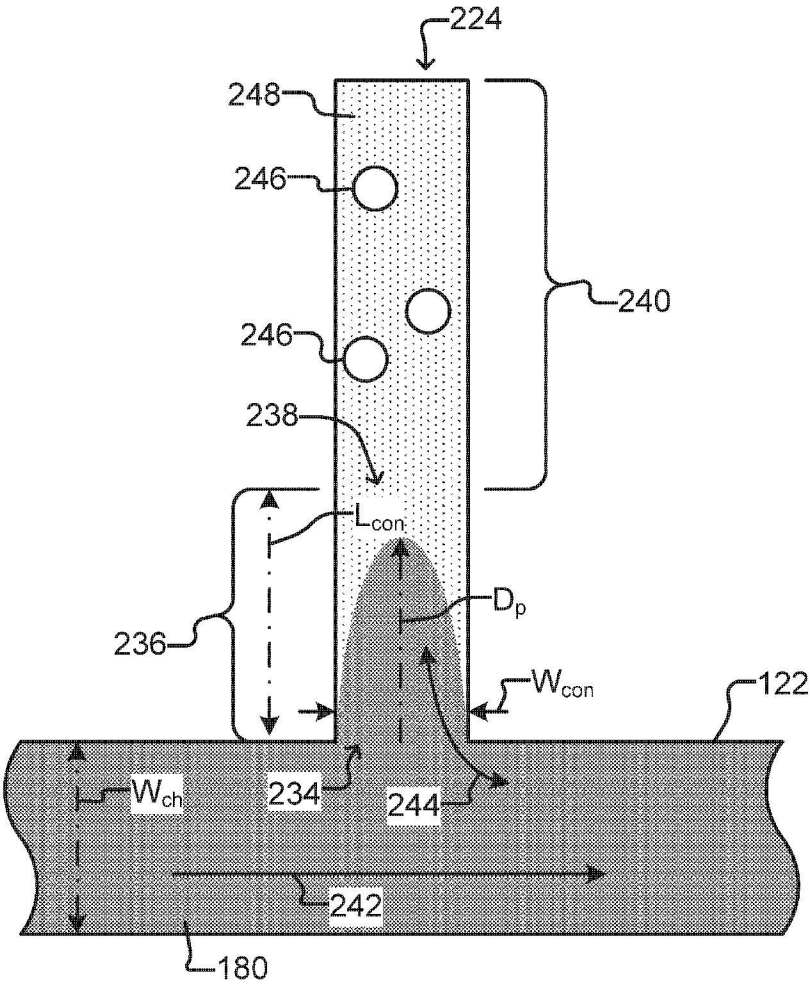
【圖 1C】



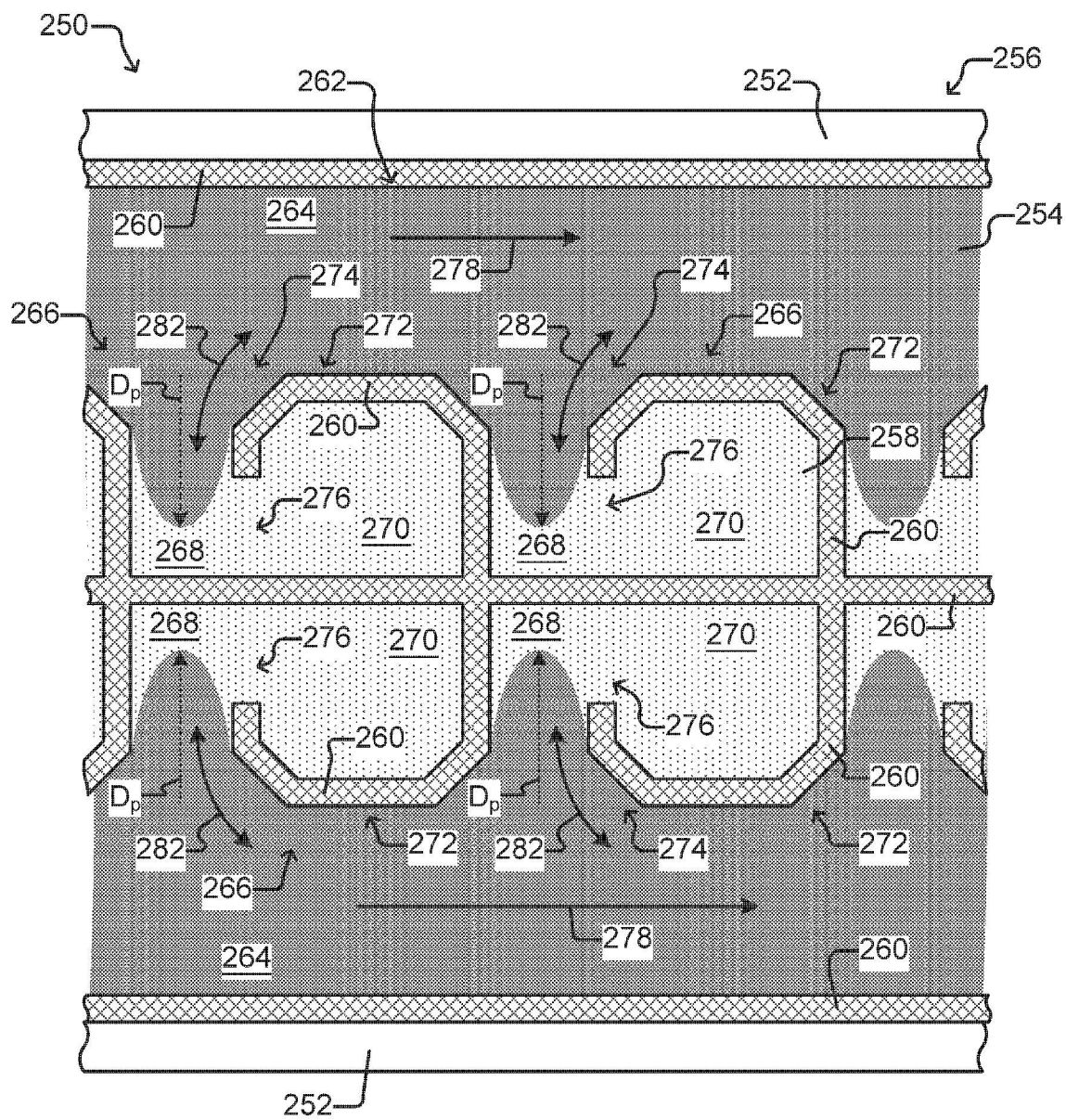
【圖 2A】



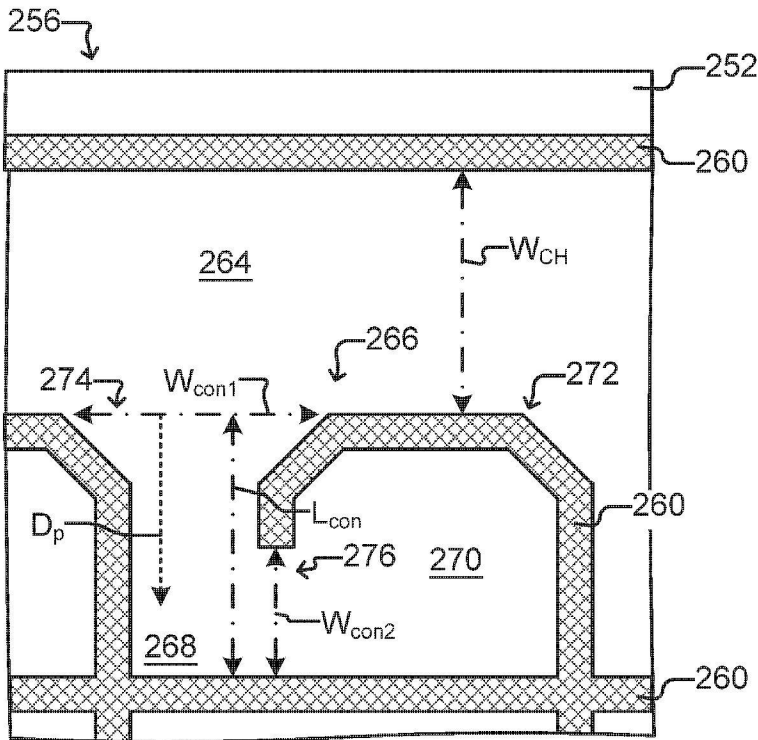
【圖2B】



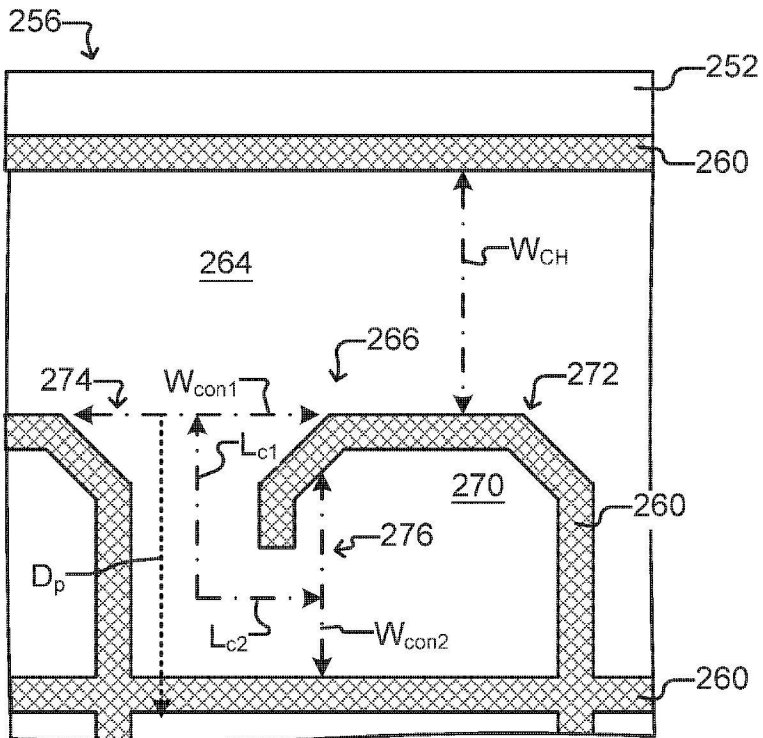
【圖2C】



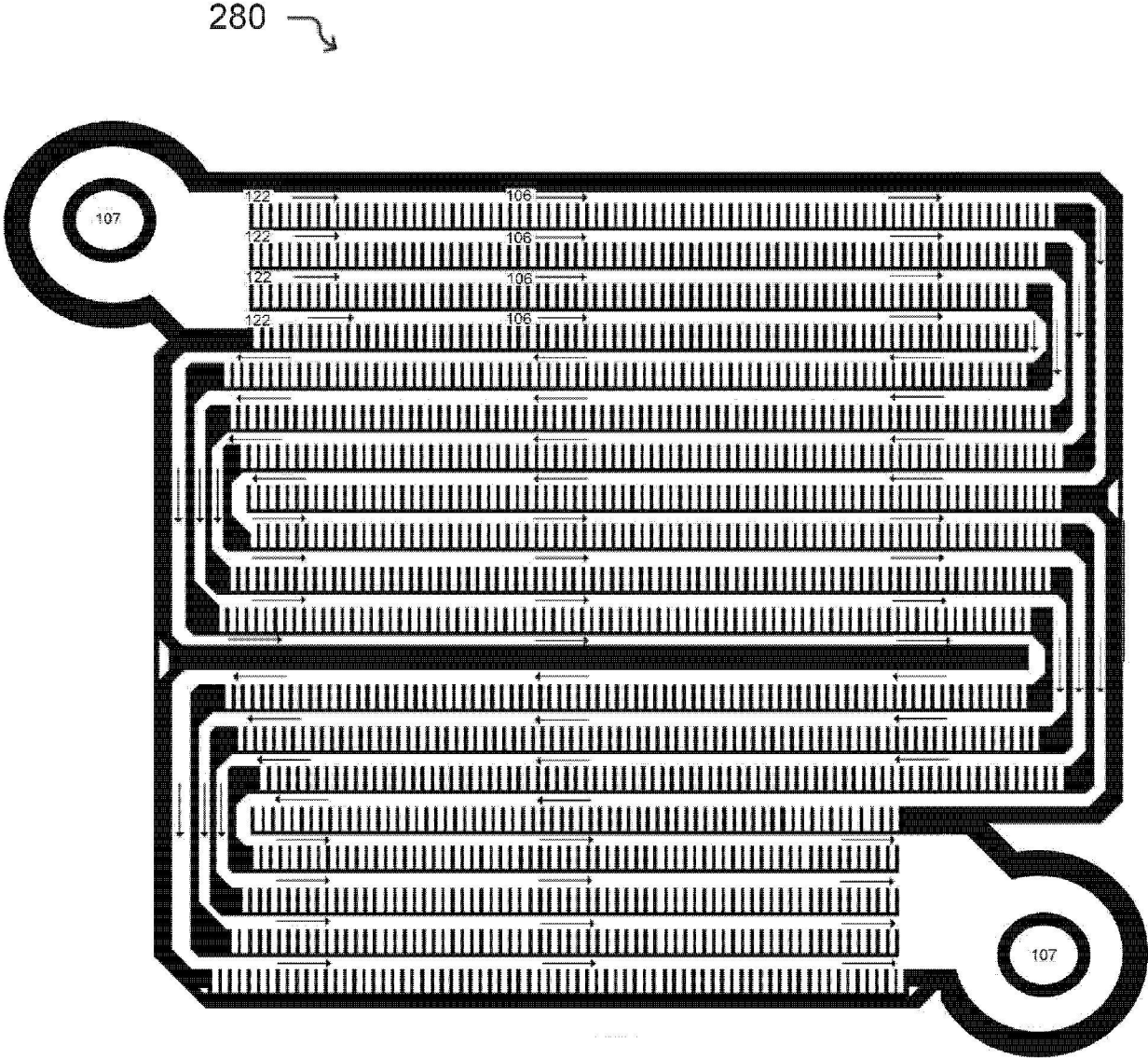
【圖2D】



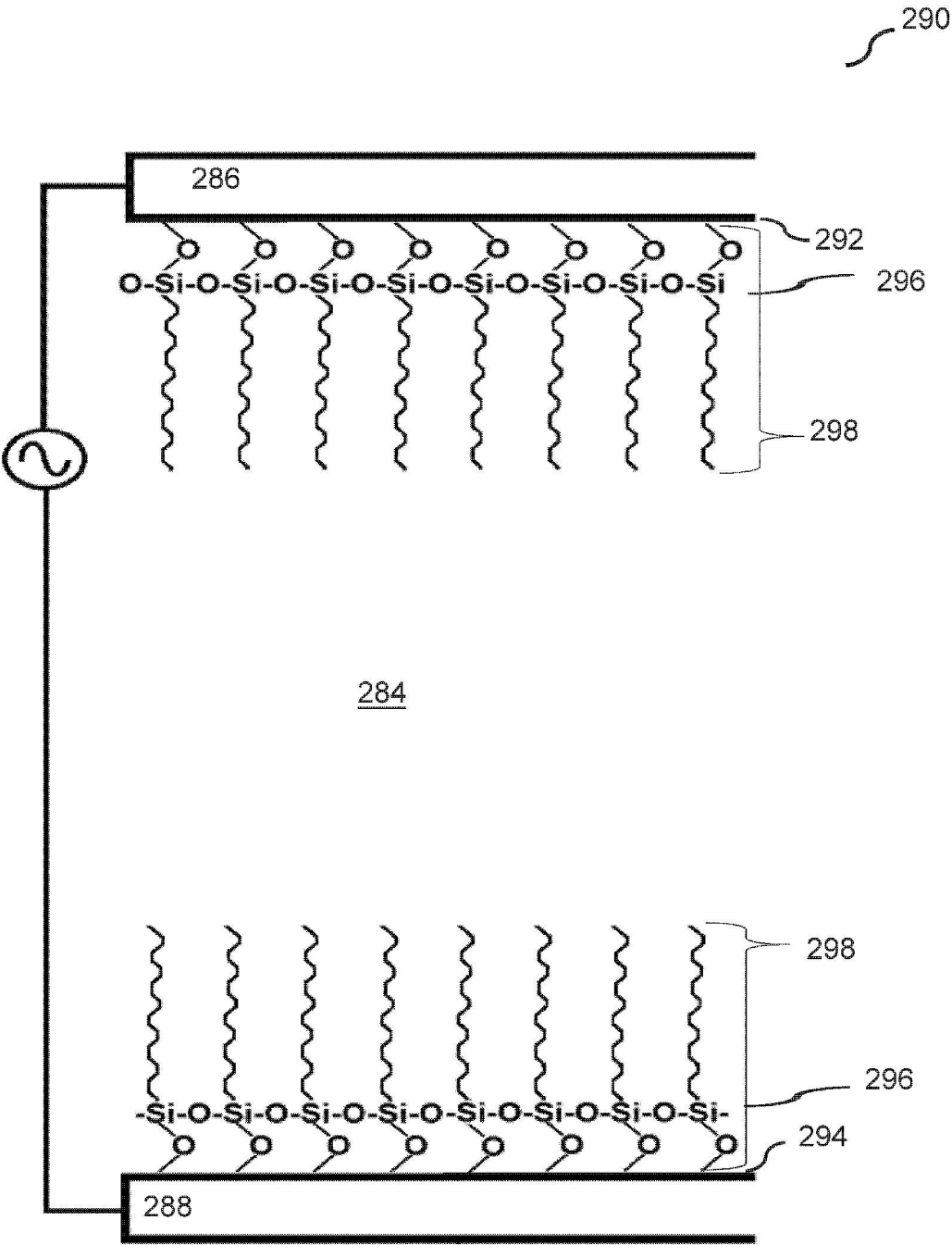
【圖 2E】



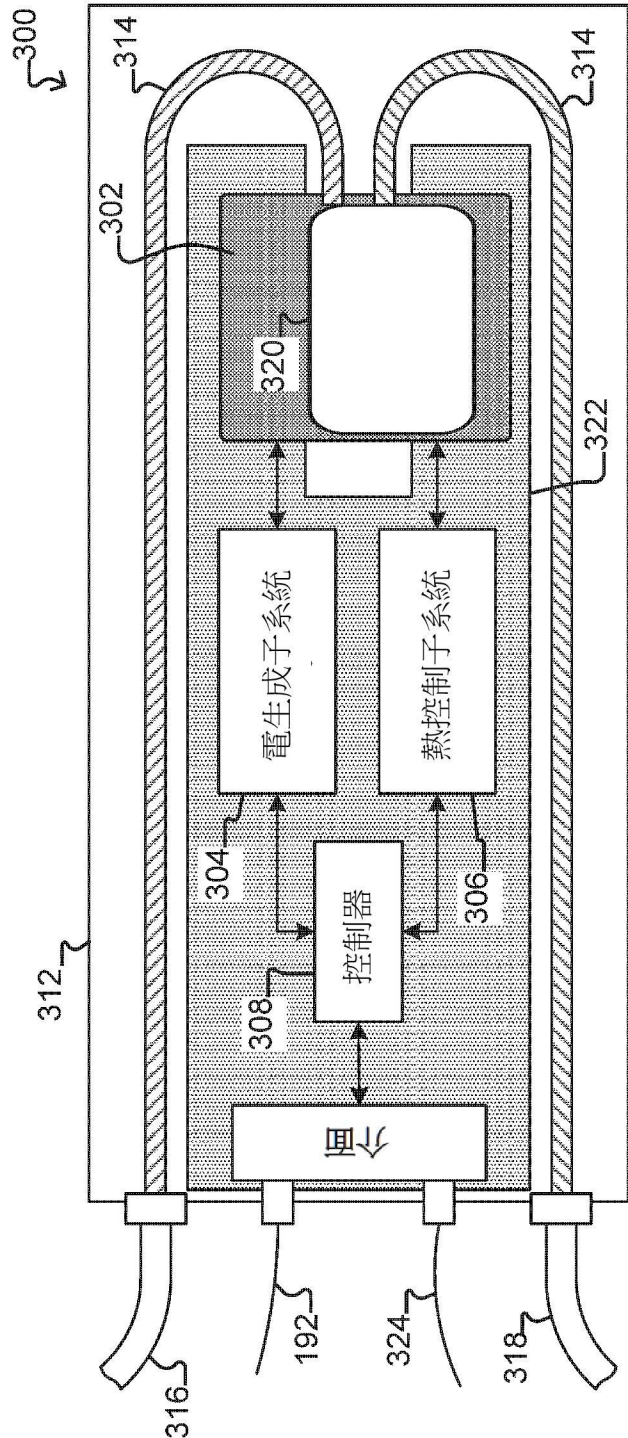
【圖 2F】



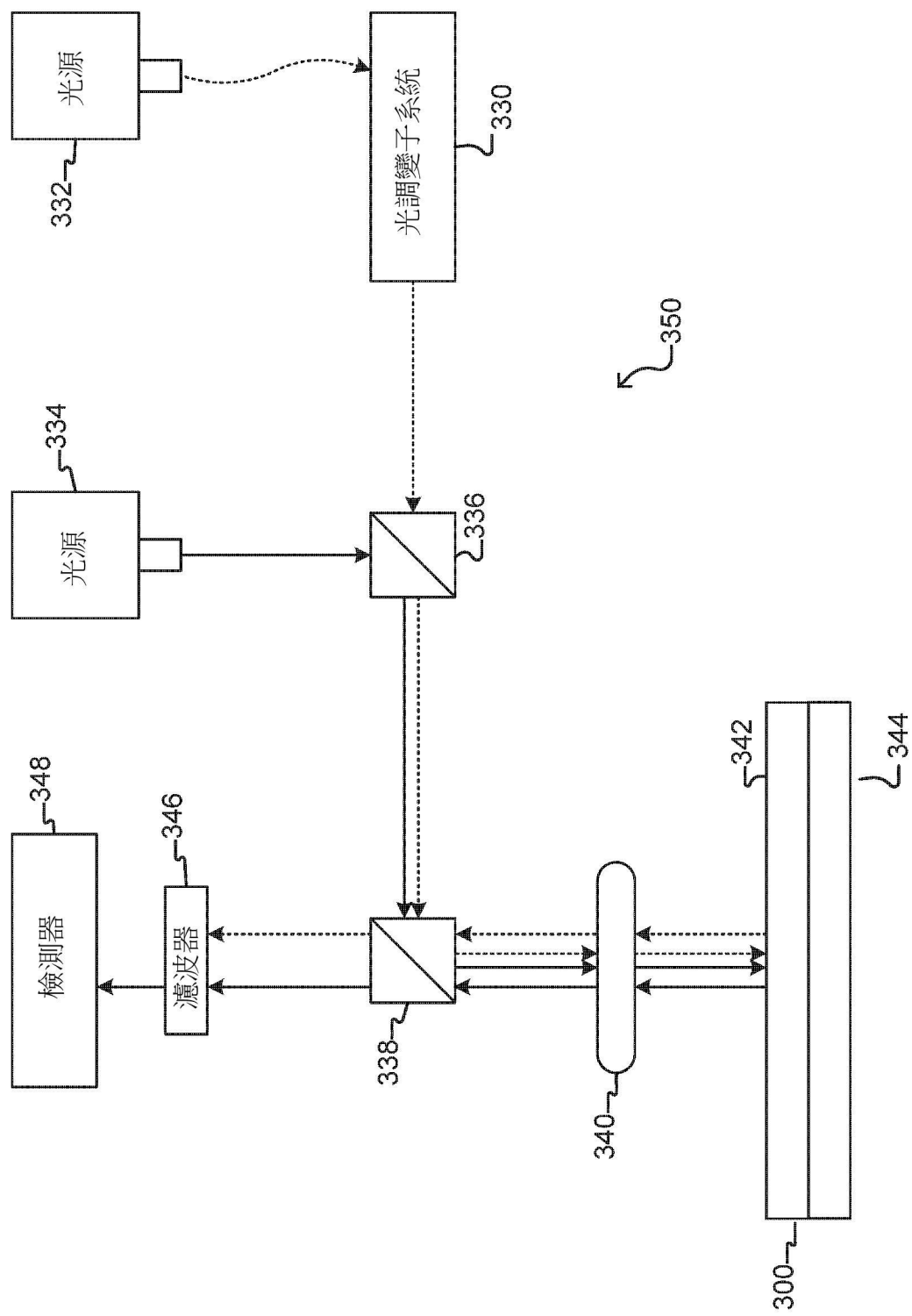
【圖2G】



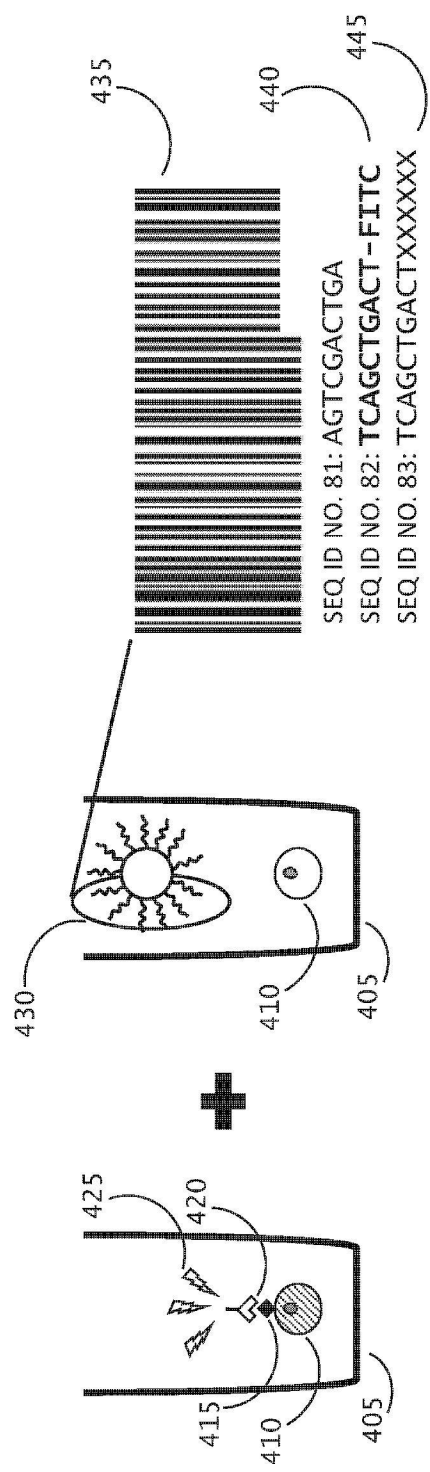
【圖2H】



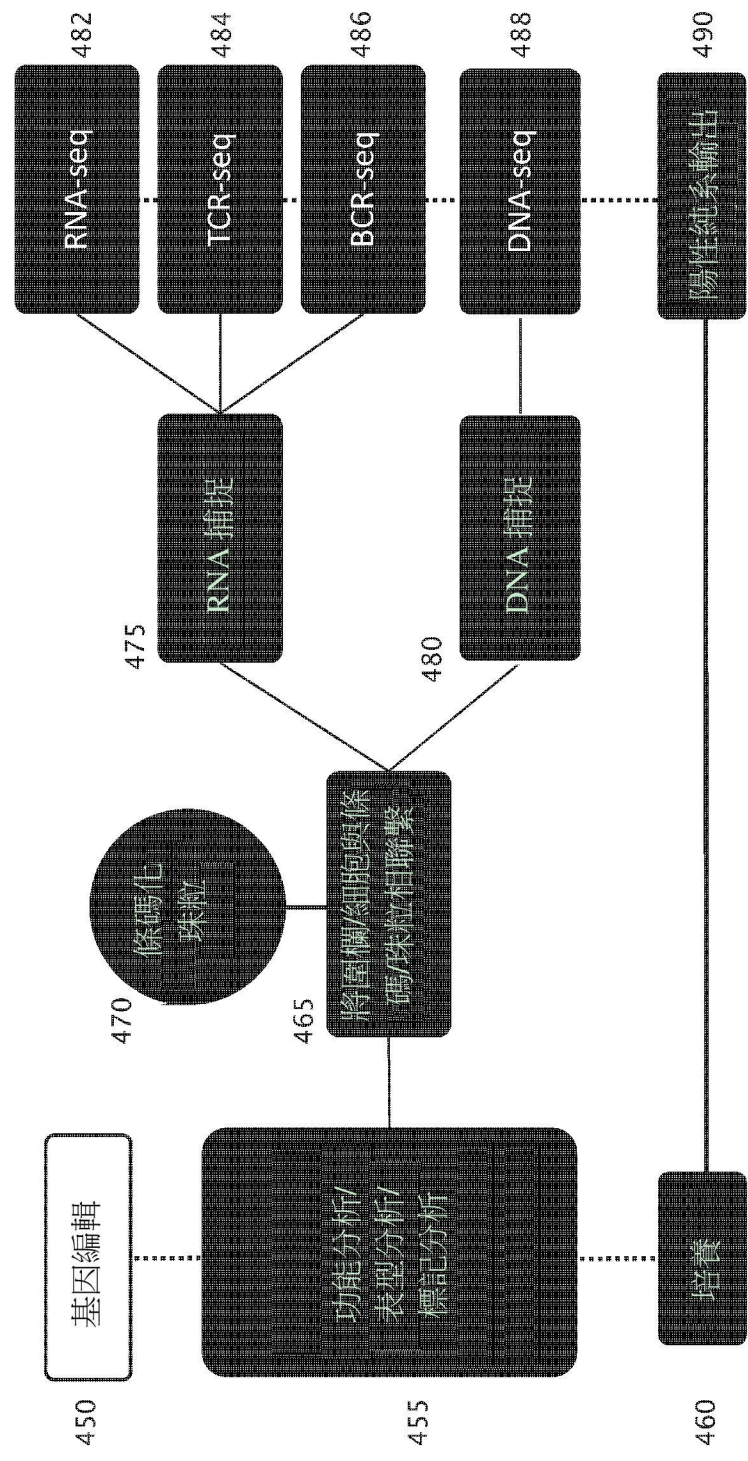
【圖 3A】



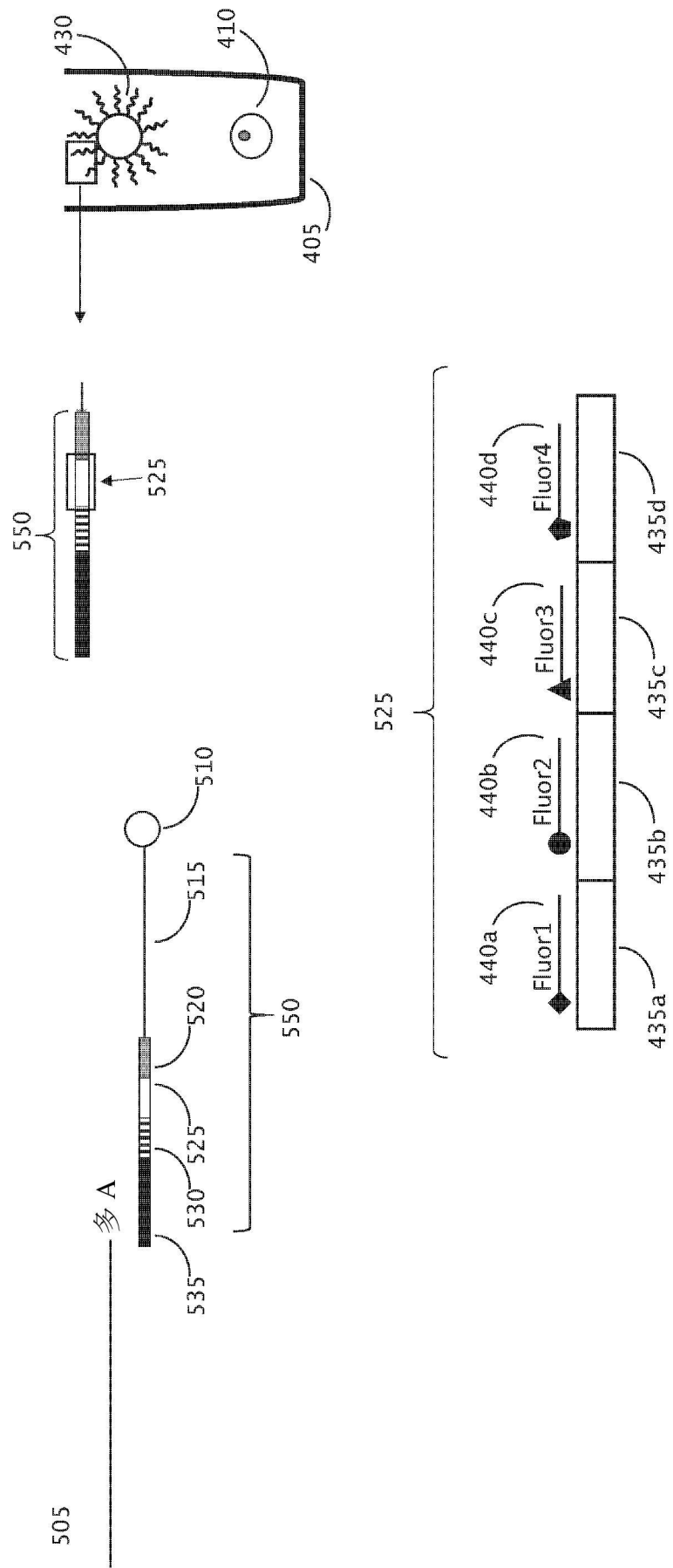
【圖 3B】



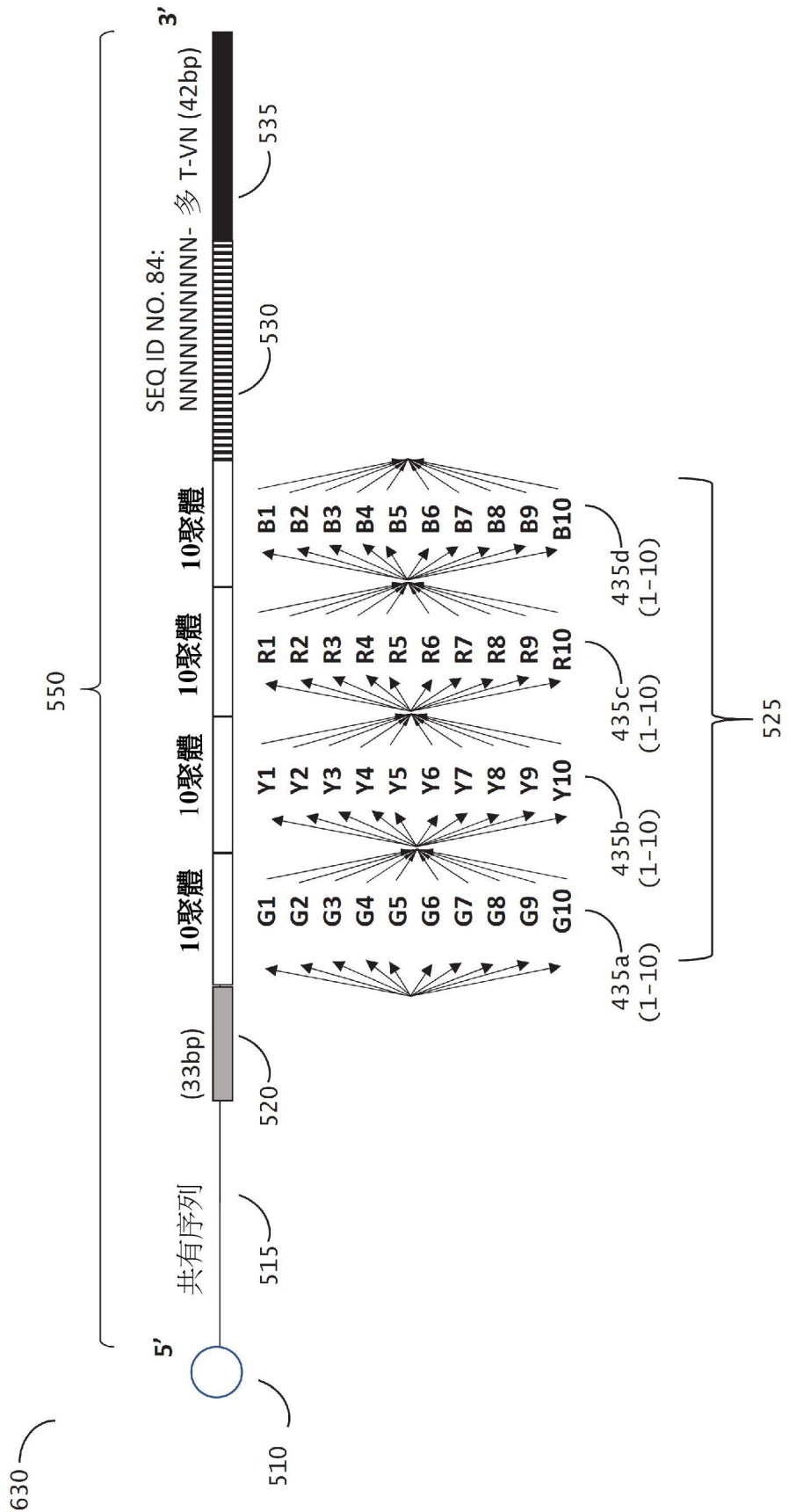
【圖 4A】



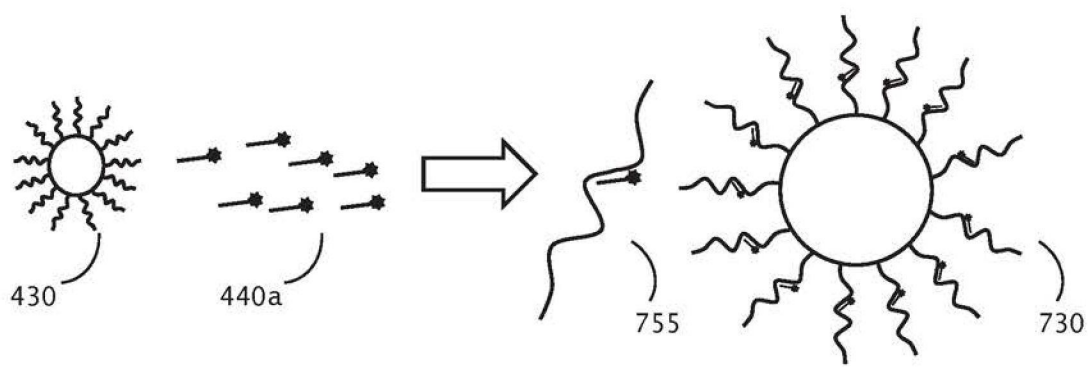
【圖 4B】



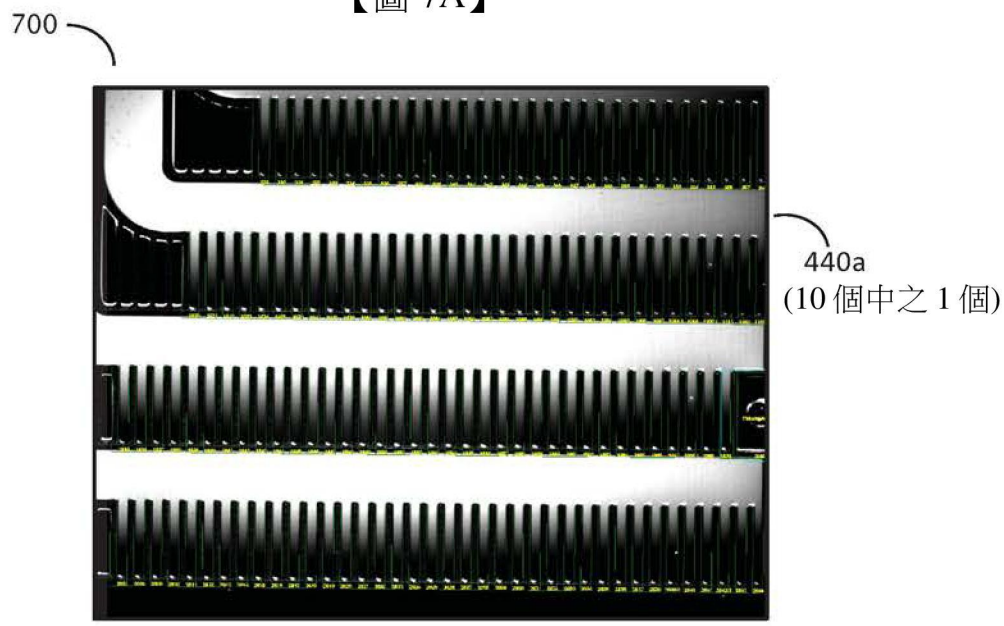
【圖5】



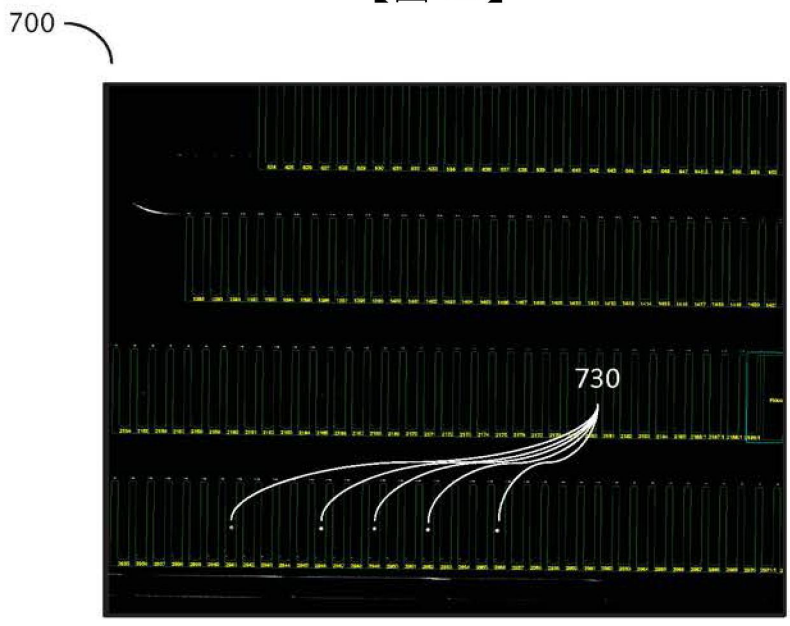
【圖 6】



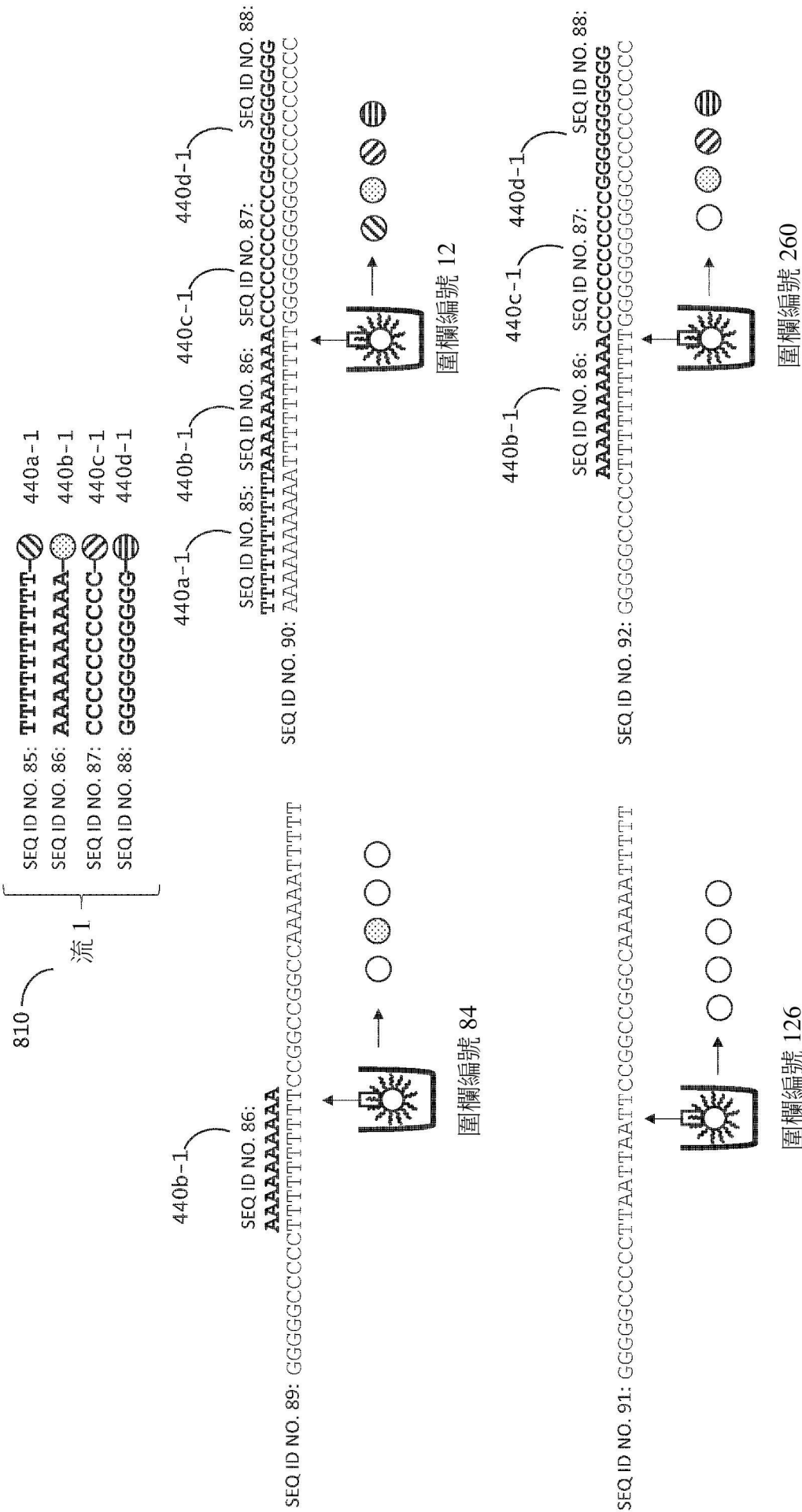
【圖 7A】

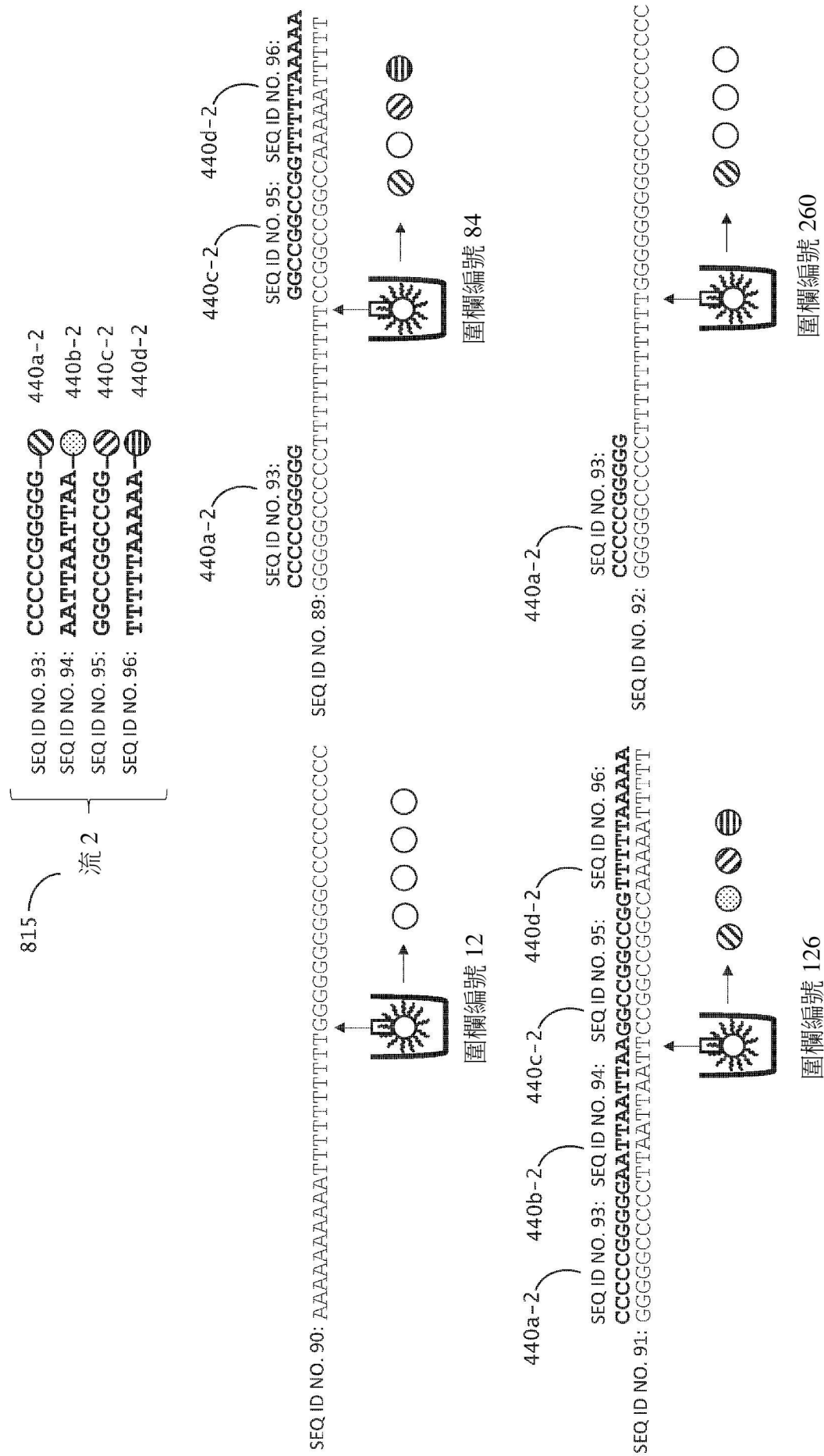


【圖 7B】

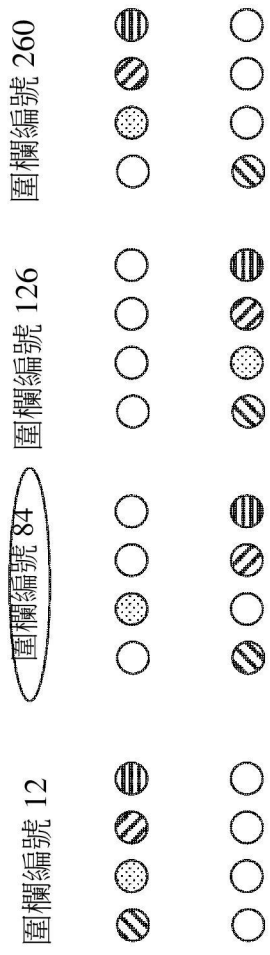
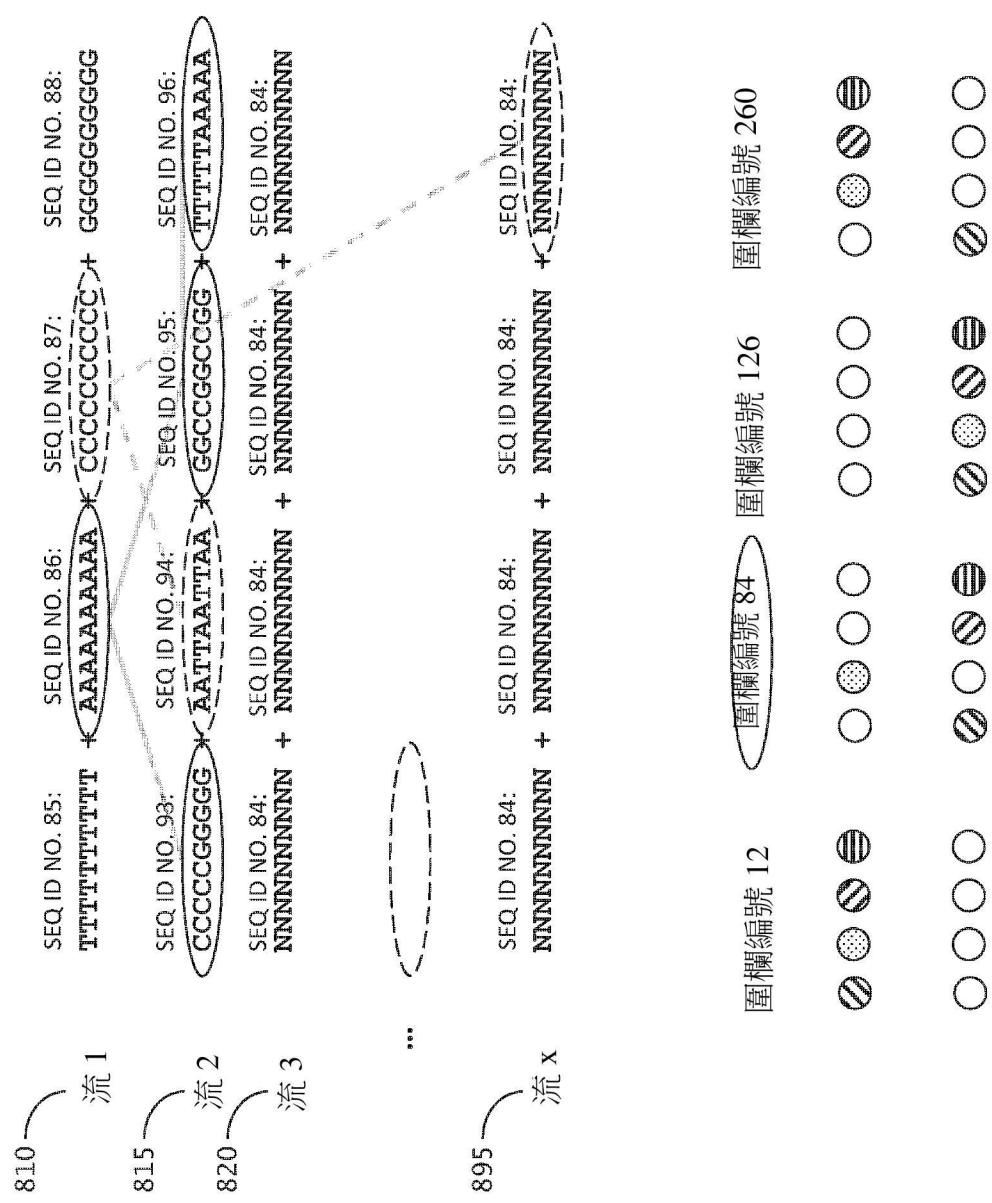


【圖 7C】

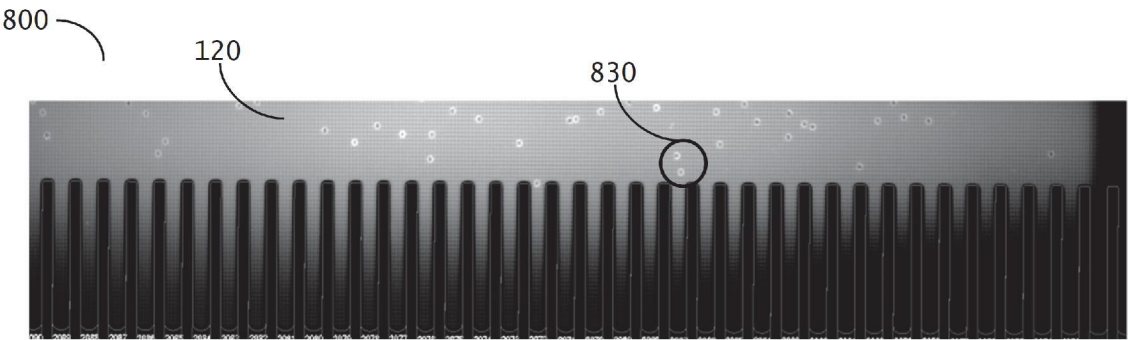




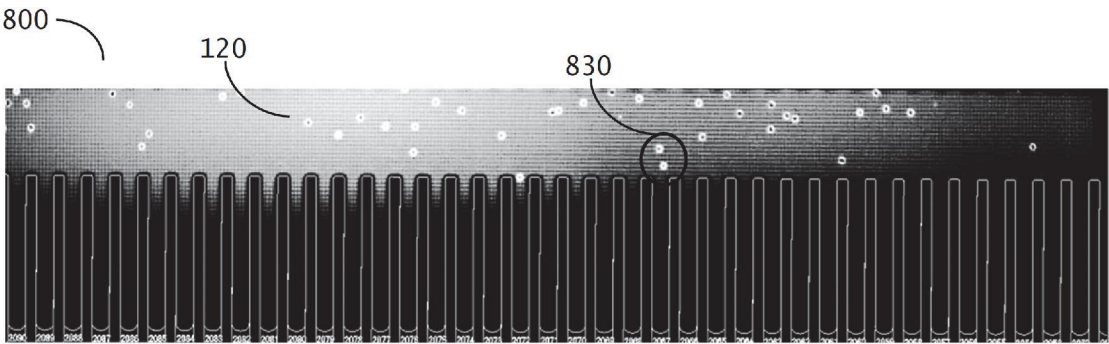
【圖 8B】



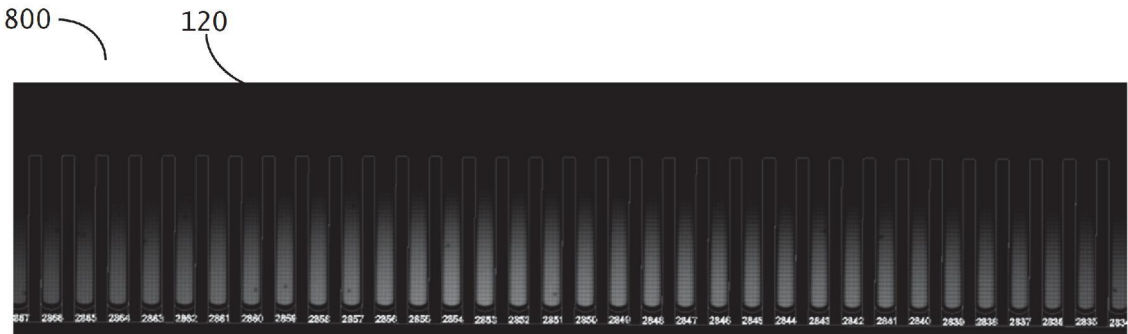
【圖 8C】



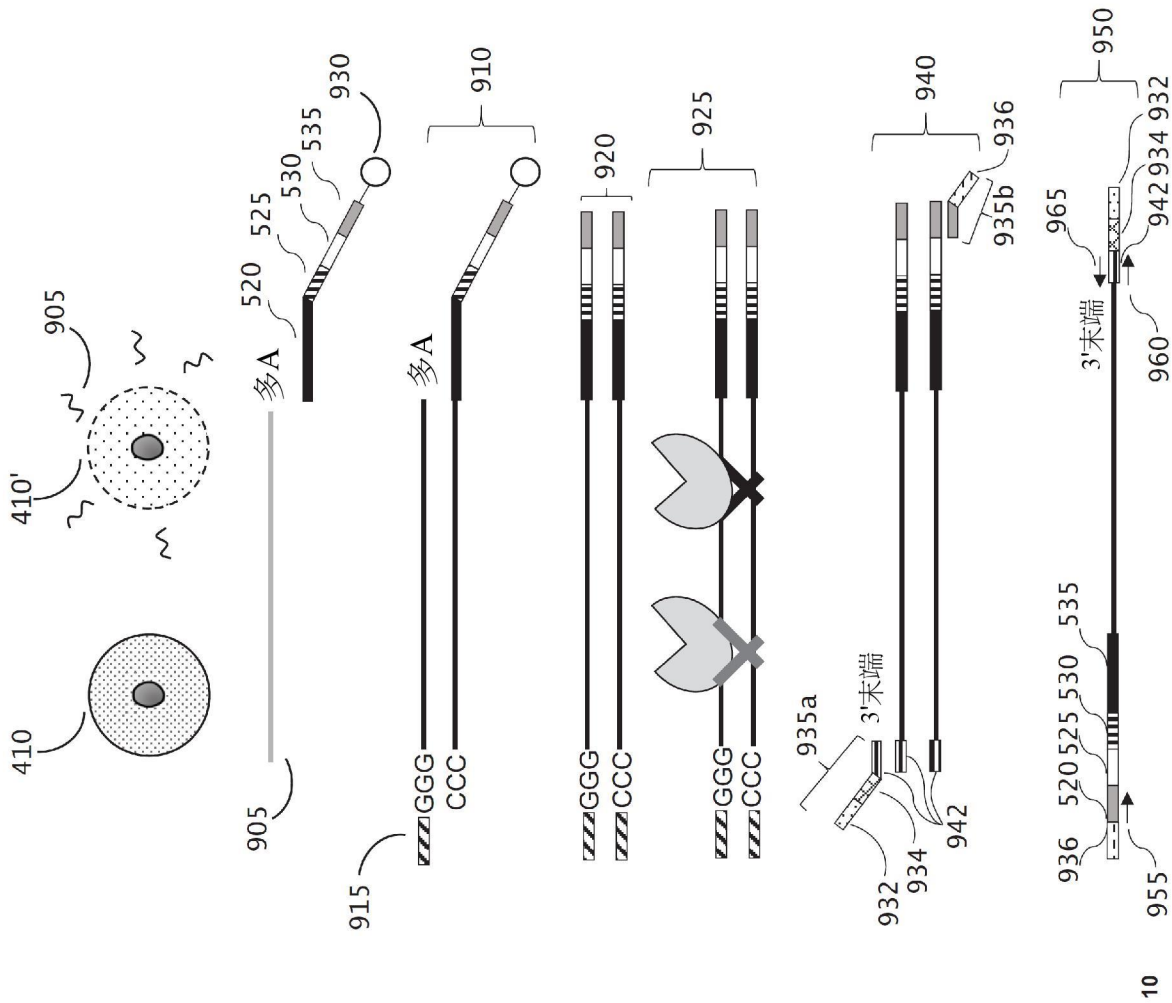
【圖 8D】



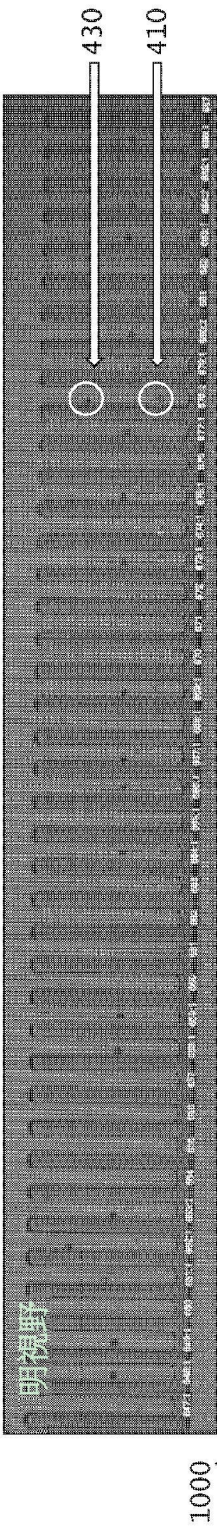
【圖 8E】



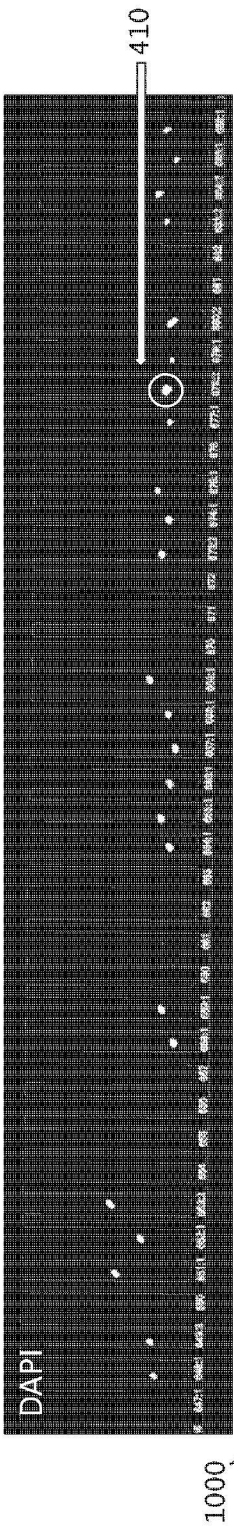
【圖 8F】



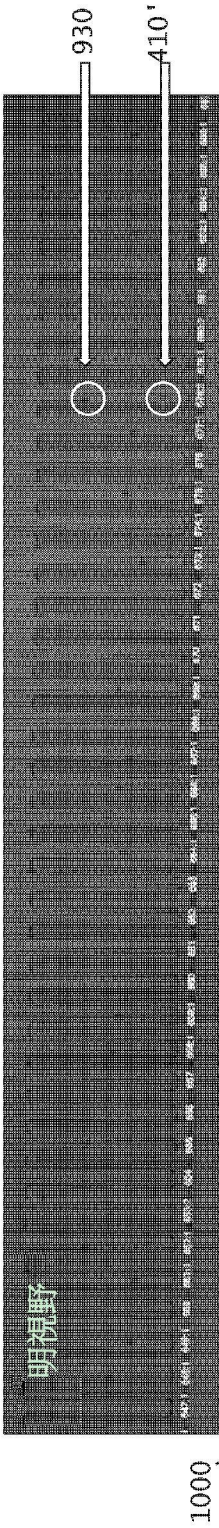
【圖 9】



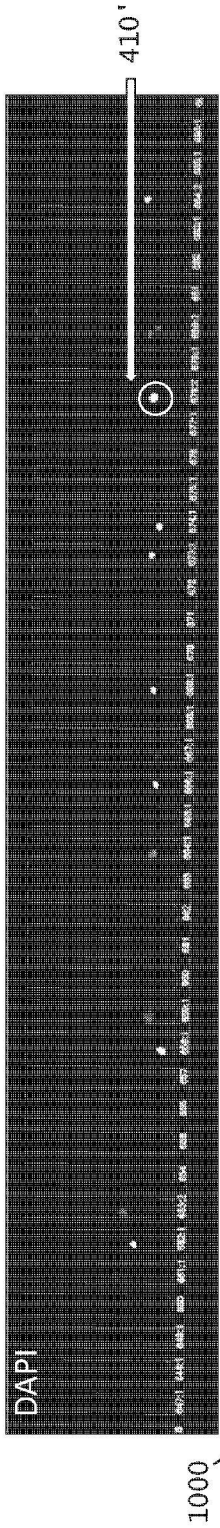
【圖 10A】



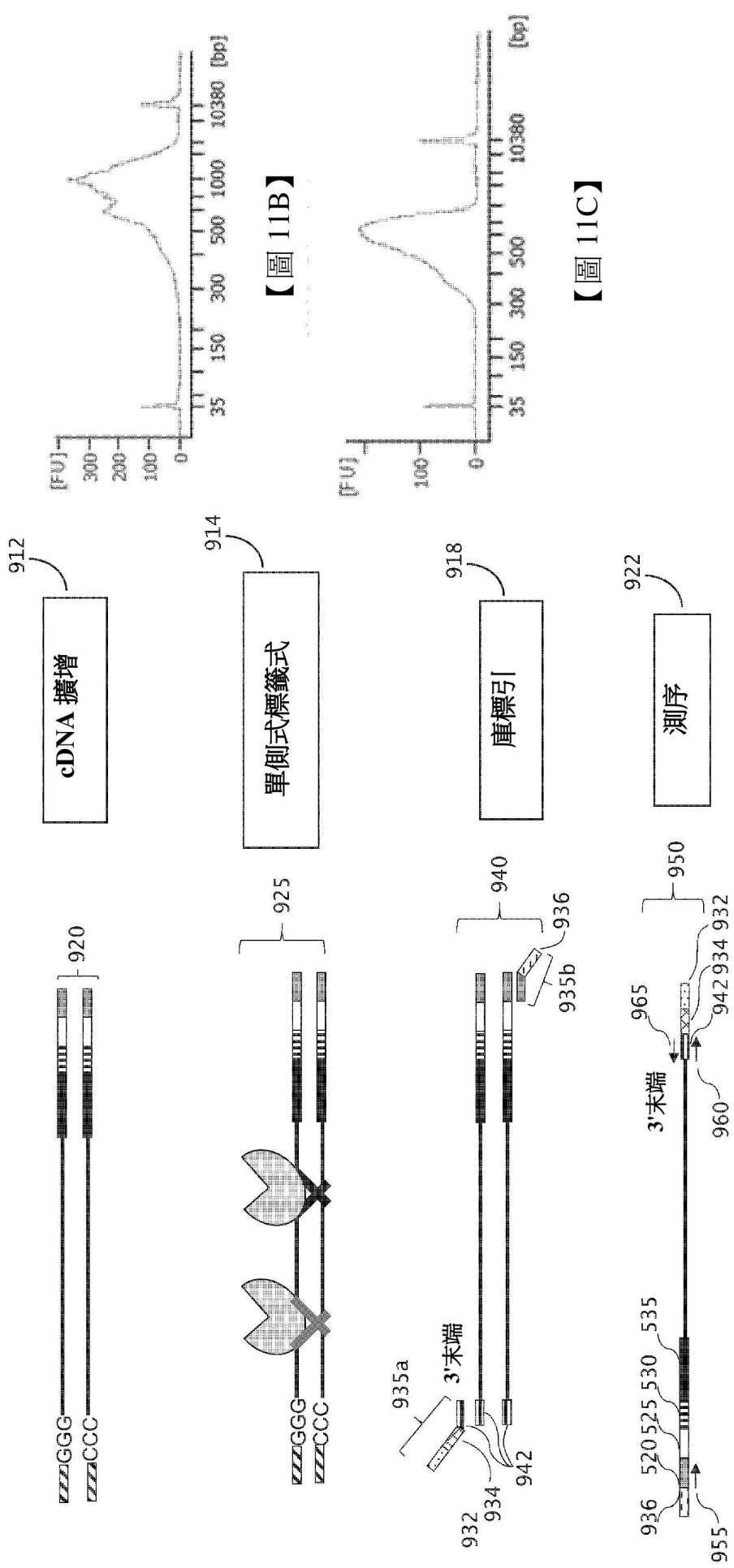
【圖 10B】



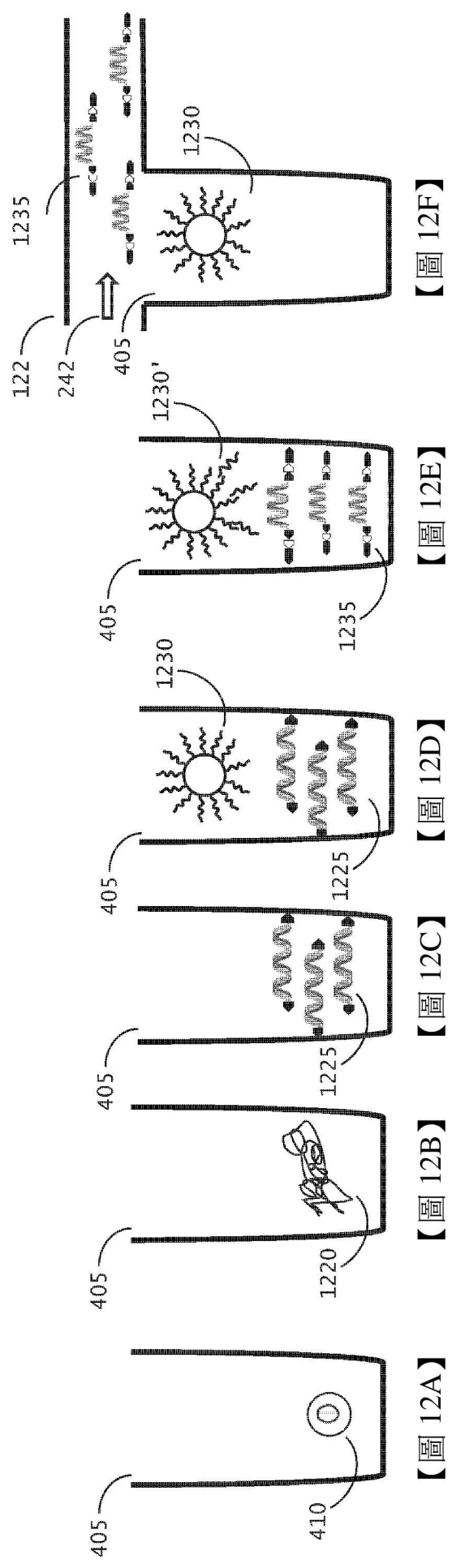
【圖 10C】

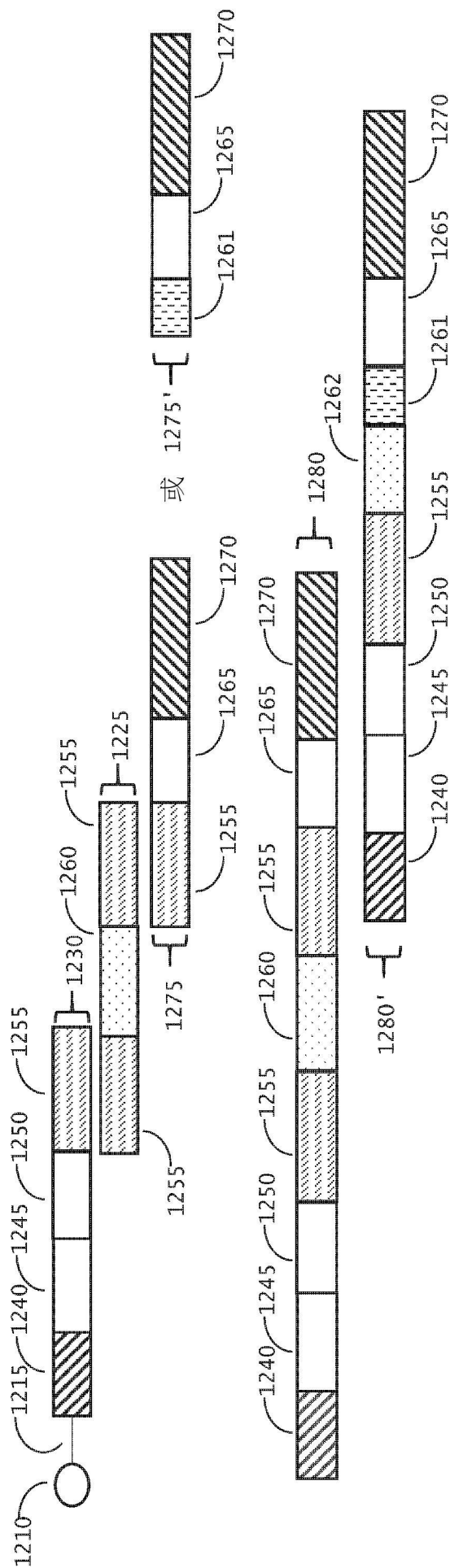


【圖 10D】

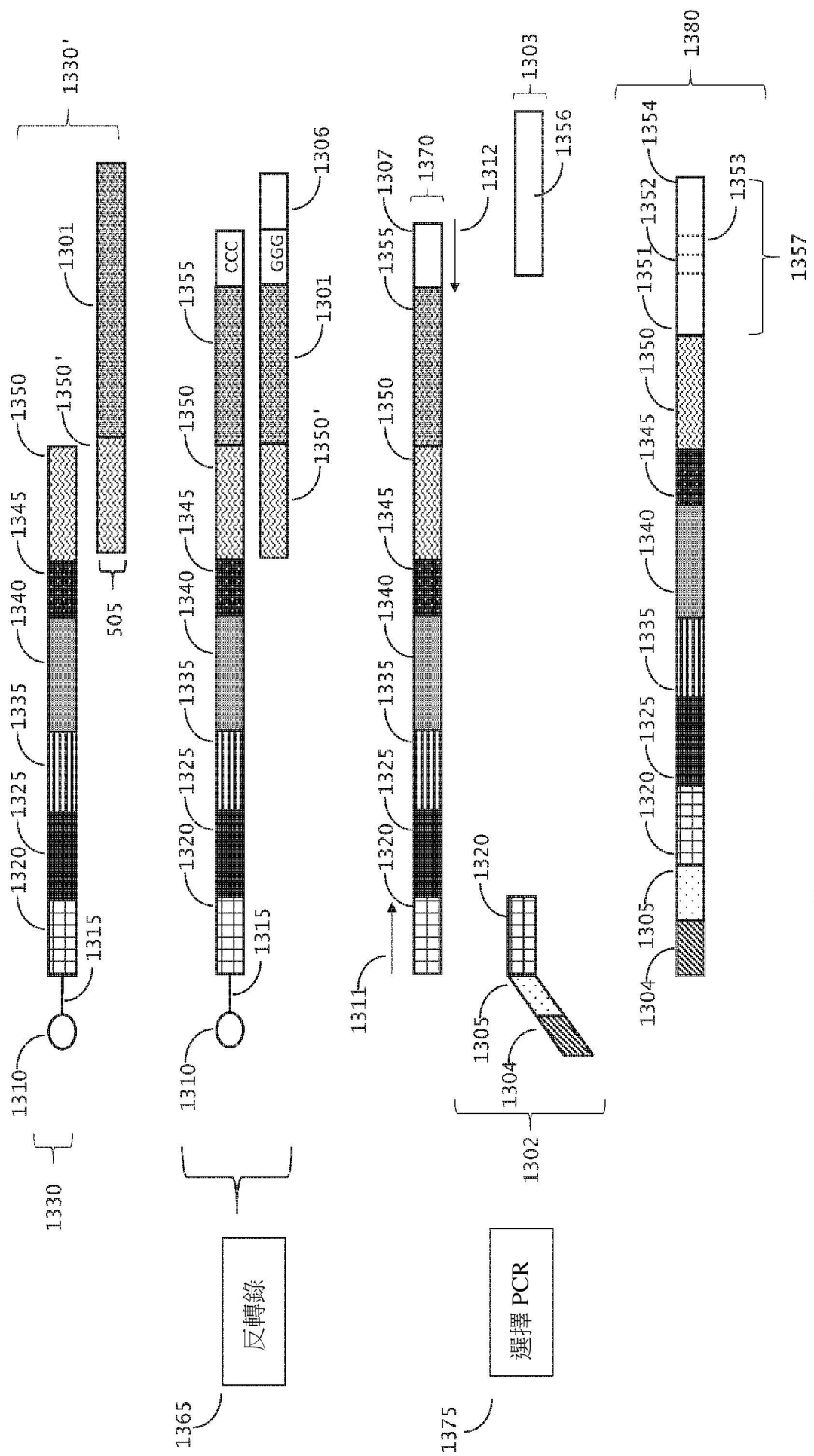


【圖 11A】

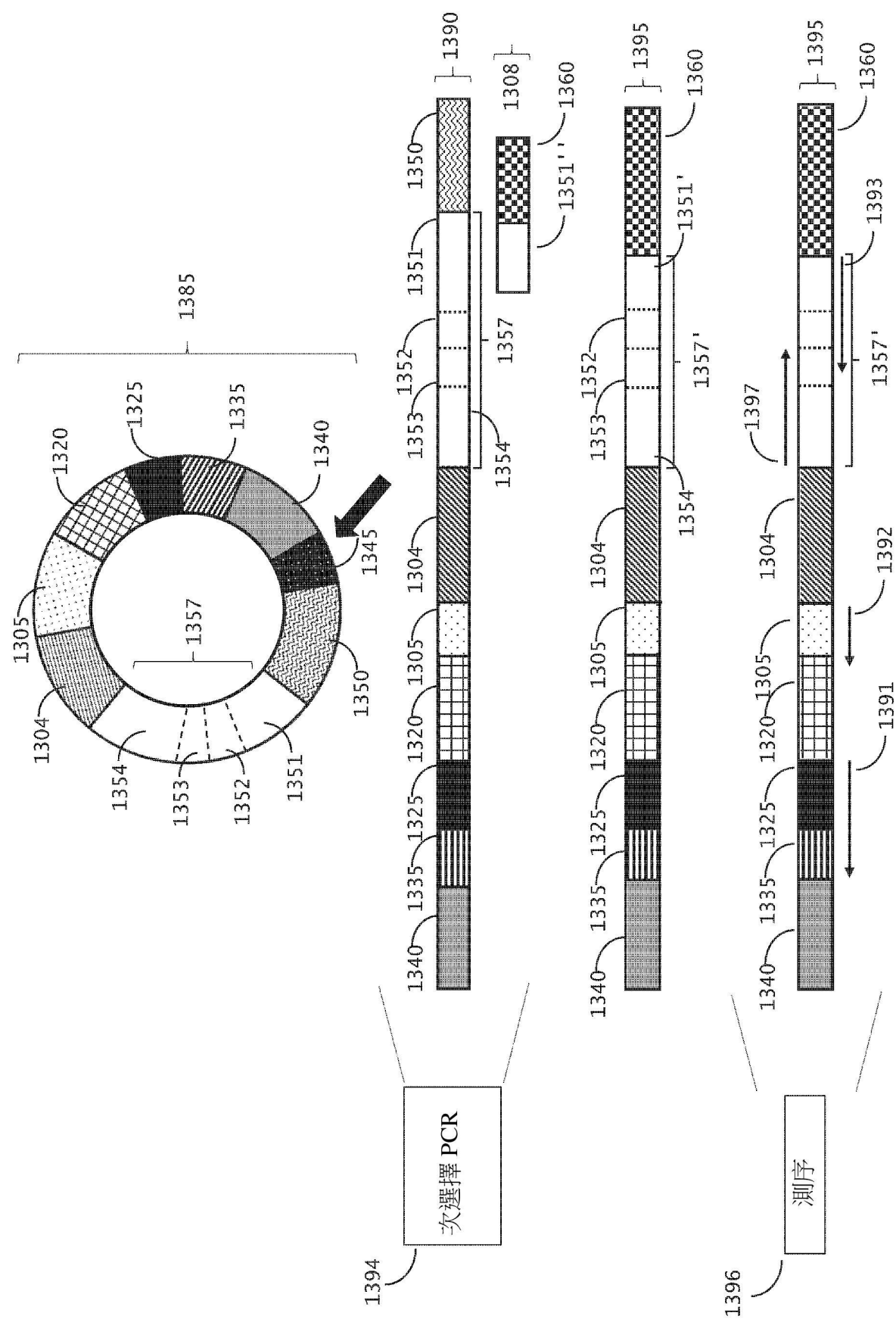




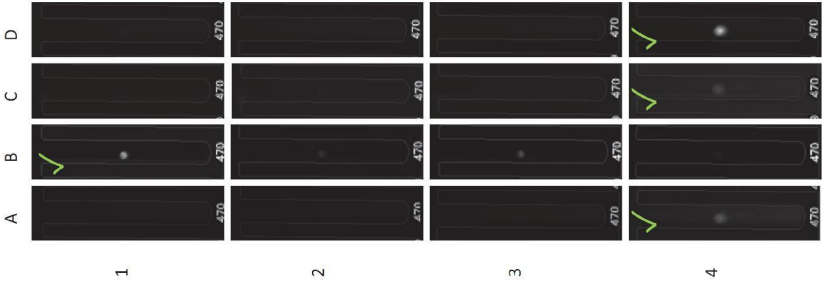
【圖 12G】



【圖 13A】



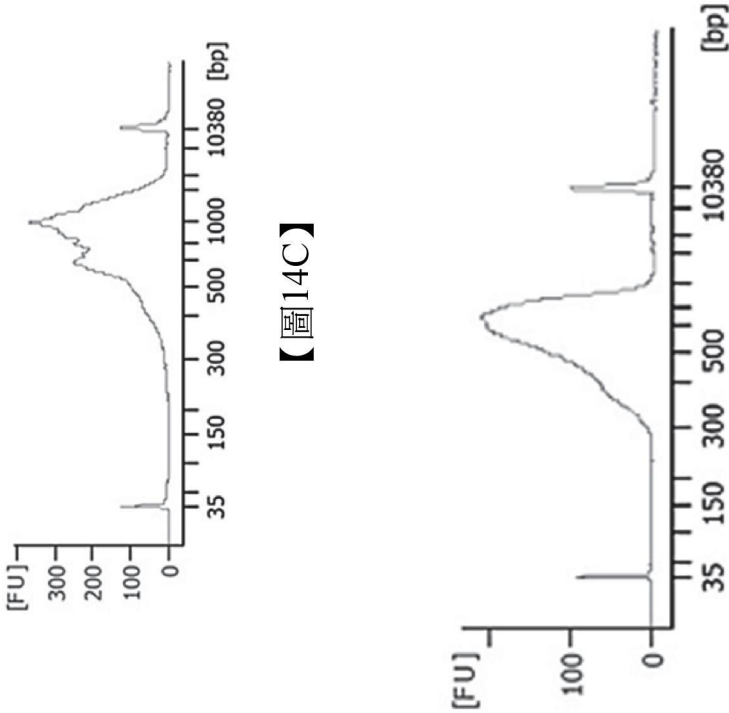
【圖 13B】



【圖14A】

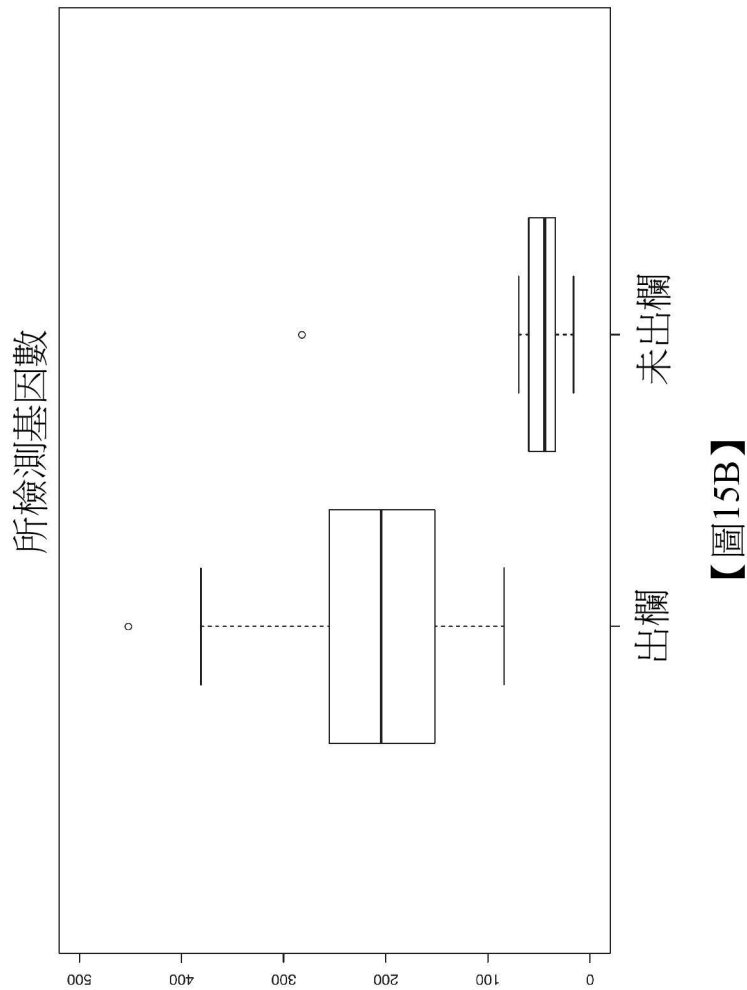
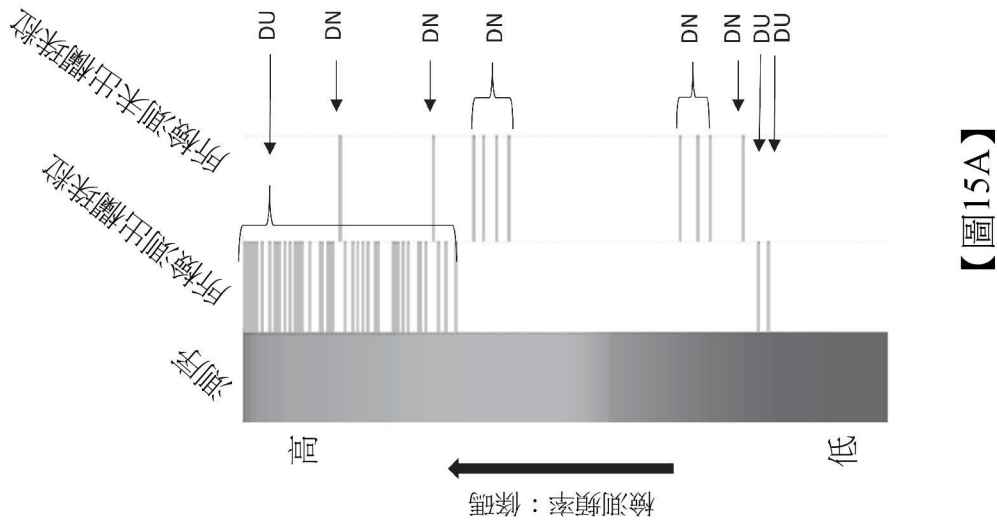


【圖14B】



【圖14C】

【圖14D】



實驗		每次輸出之珠粒數
A- 60 min RT		108
B- 90 min RT		120

【圖 16A】

樣品_ID	總數	分配	比對	Mito_總數	Mito_UMI	Refseq_總數	Refseq_UMI
A	4383109	4139242	2538580	7810	711	2114803	281990
B	3313847	3154752	1813561	13489	1875	1540667	332634

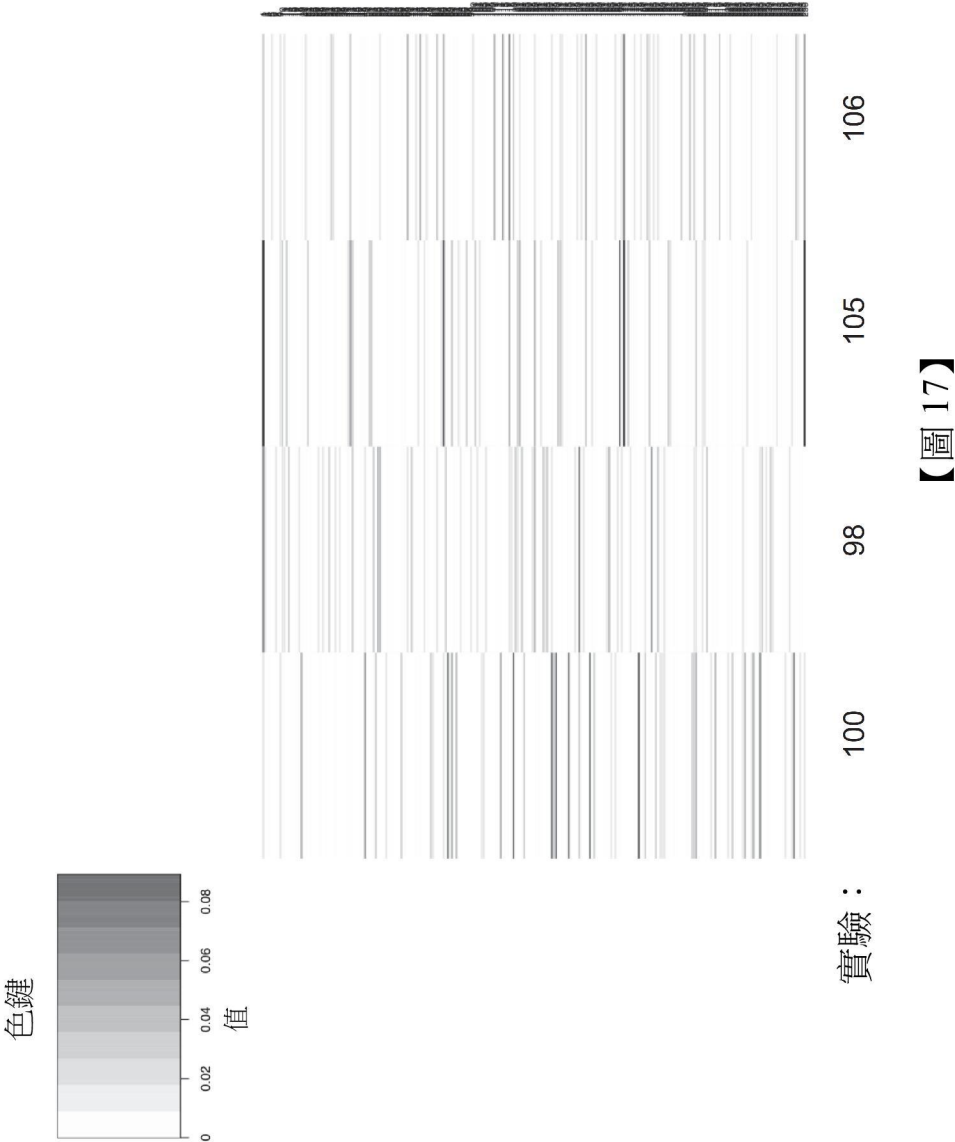
【圖 16B】

樣品_ID	條碼化 讀段	Refseq 轉錄體比對
1	87%	61%
2	84%	49%
3	86%	53%
4	86%	62%
5	78%	55%
6	83%	57%

【圖 16C】

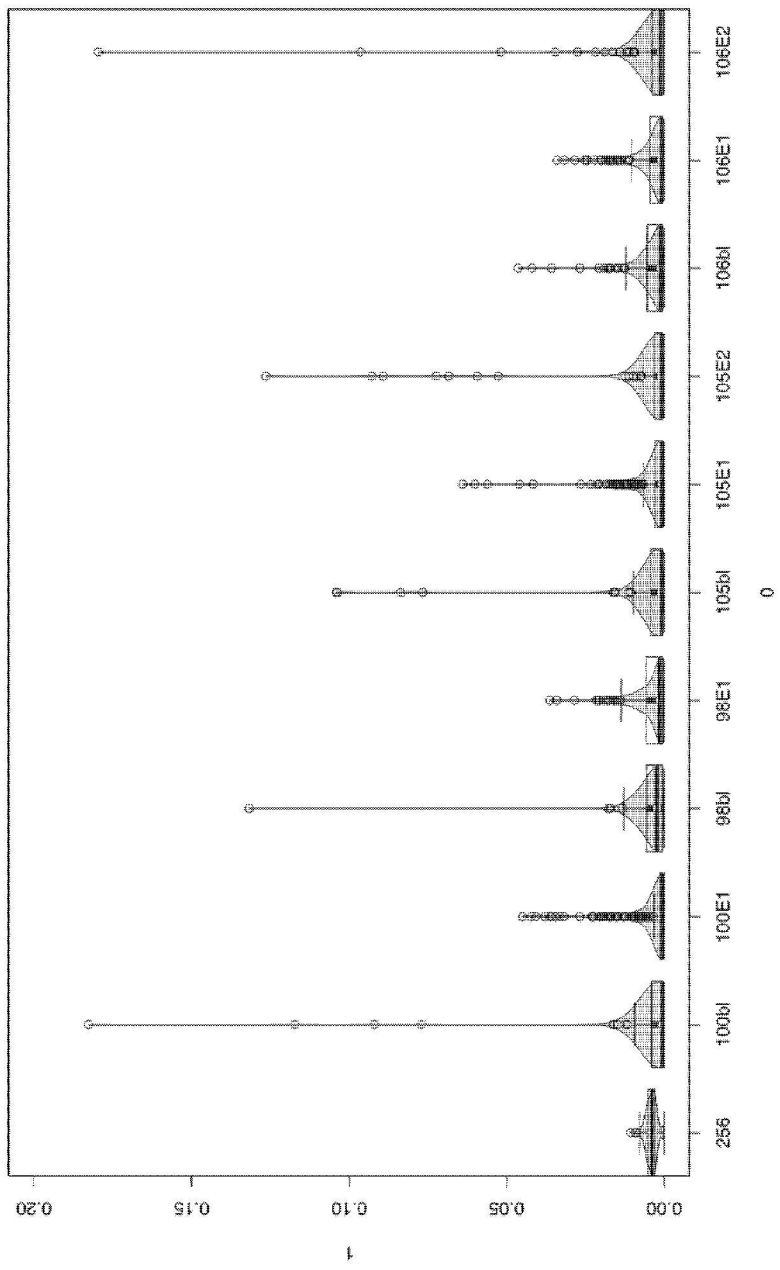
表現最多之 5 個基因(OKT3)	說明
Rpl28	核糖體蛋白
Emb	B 細胞特異性
Rpl24	B 細胞特異性
Dcun1d5	B 細胞特異性
Rpl35a	核糖體蛋白
Ddt	B 細胞特異性

【圖 16D】

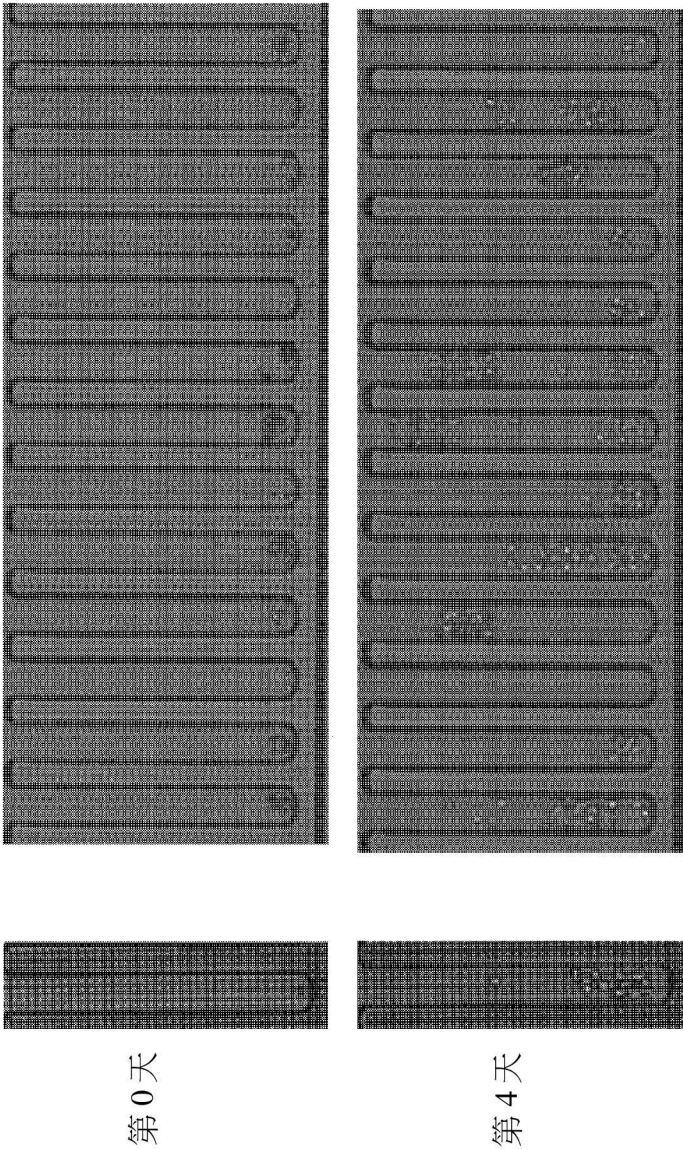


【圖 17】

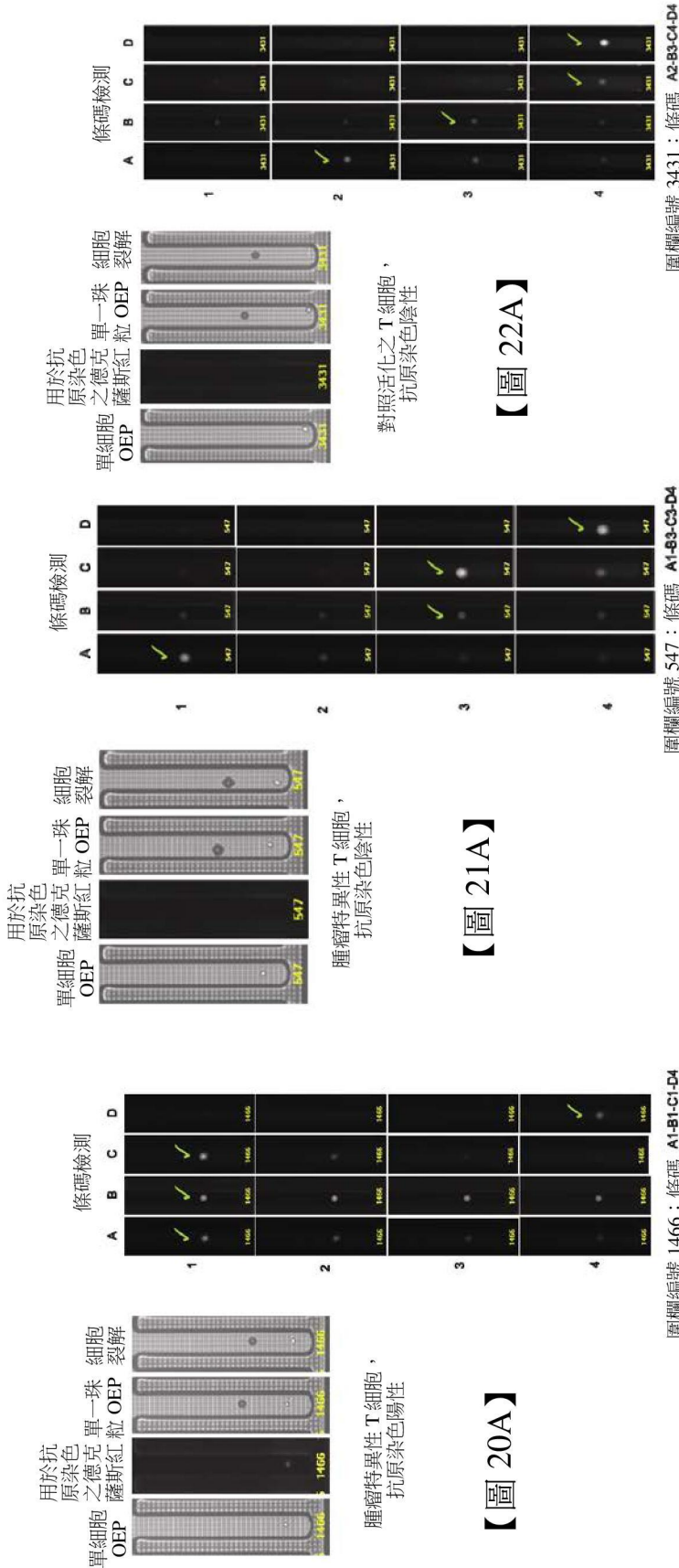
實驗：



【圖 18】



【圖 19】



用於抗
原染色
單細胞
OEP

之德克
薩斯紅

單一粒
細胞
裂解

547

547

547

547

條碼檢測

A B C D

1

2

3

4

547

547

547

547

547

547

547

547

547

547

547

547

腫瘤特異性 T 細胞，
抗原染色陰性

【圖 21A】

圍欄編號 547：條碼 A1-B3-C3-D4

用於抗
原染色
單細胞
OEP

之德克
薩斯紅

單一粒
細胞
裂解

3431

3431

3431

3431

條碼檢測

A B C D

1

2

3

4

3431

3431

3431

3431

3431

3431

3431

3431

3431

3431

3431

3431

對照活化之 T 細胞，
抗原染色陰性

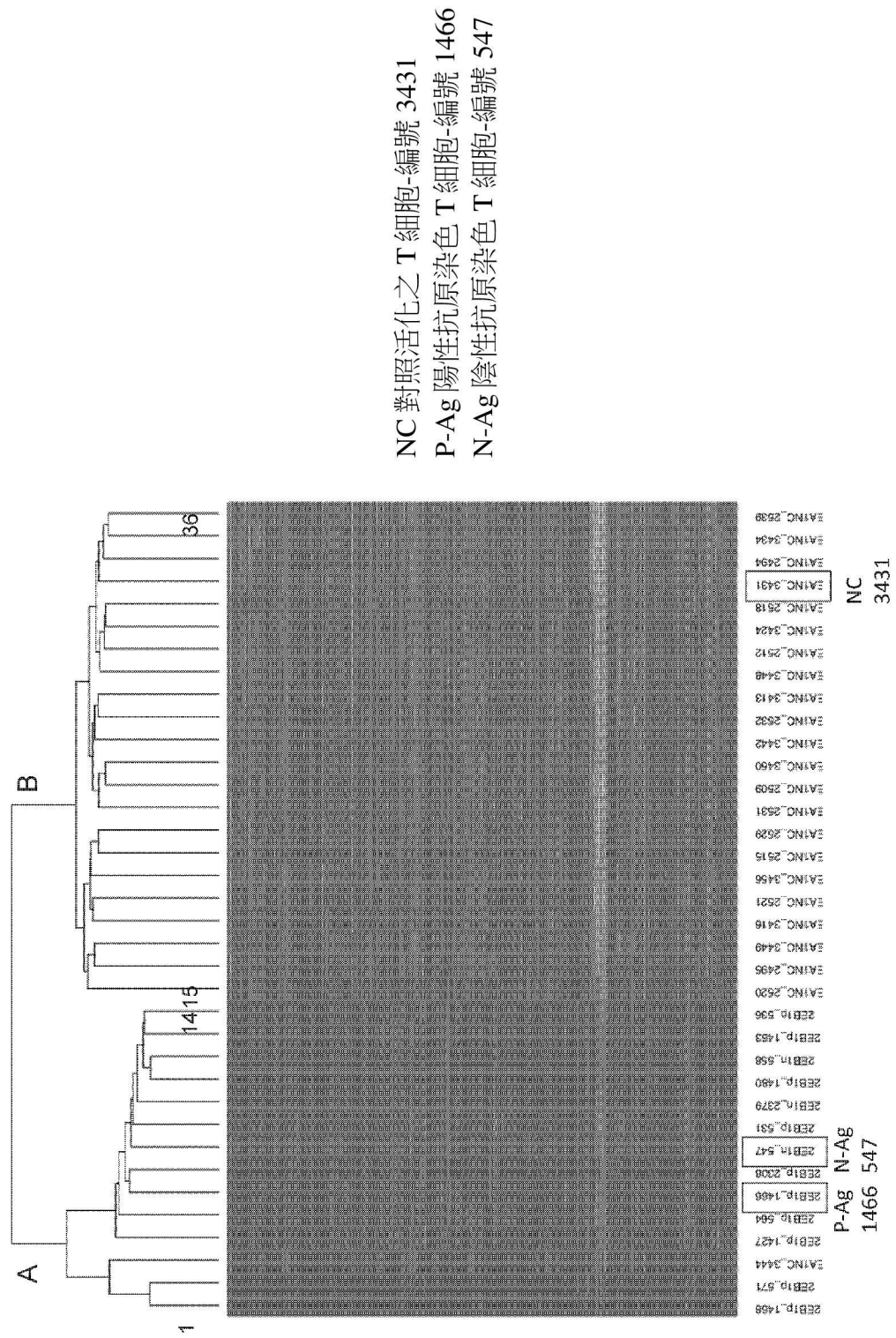
【圖 22A】

圍欄編號 3431：條碼 A2-B3-C4-D4

【圖 22B】

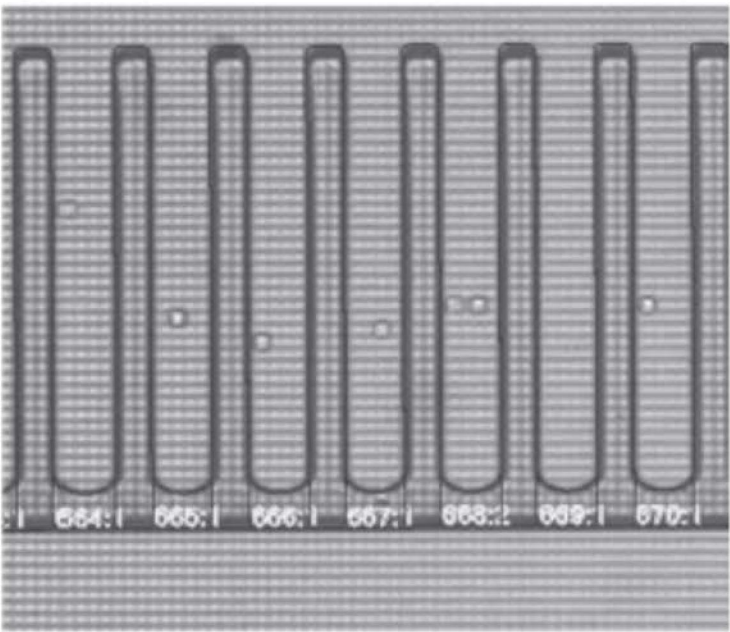
【圖 21B】

【圖 20B】

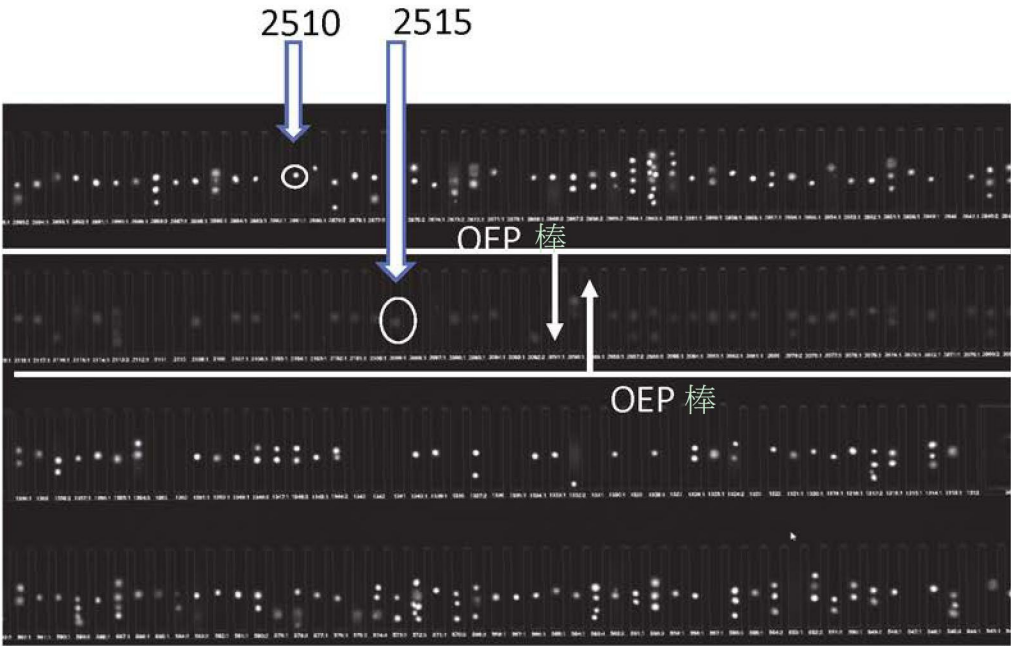


NC 對照活化之 T 細胞-編號 3431
P-Ag 陽性抗原染色 T 細胞-編號 1466
N-Ag 陰性抗原染色 T 細胞-編號 547

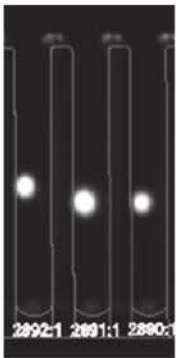
【圖 23】



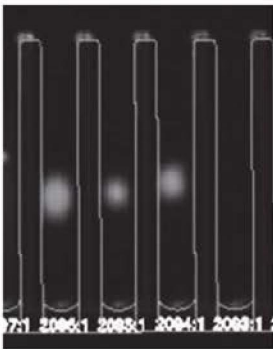
【圖 24】



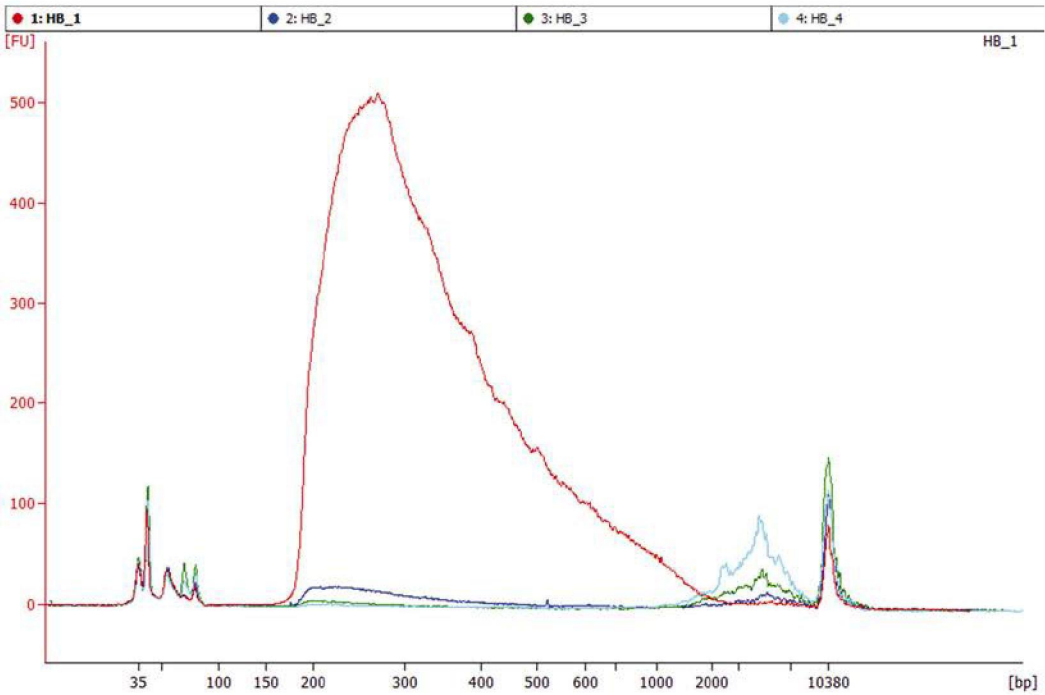
【圖 25】



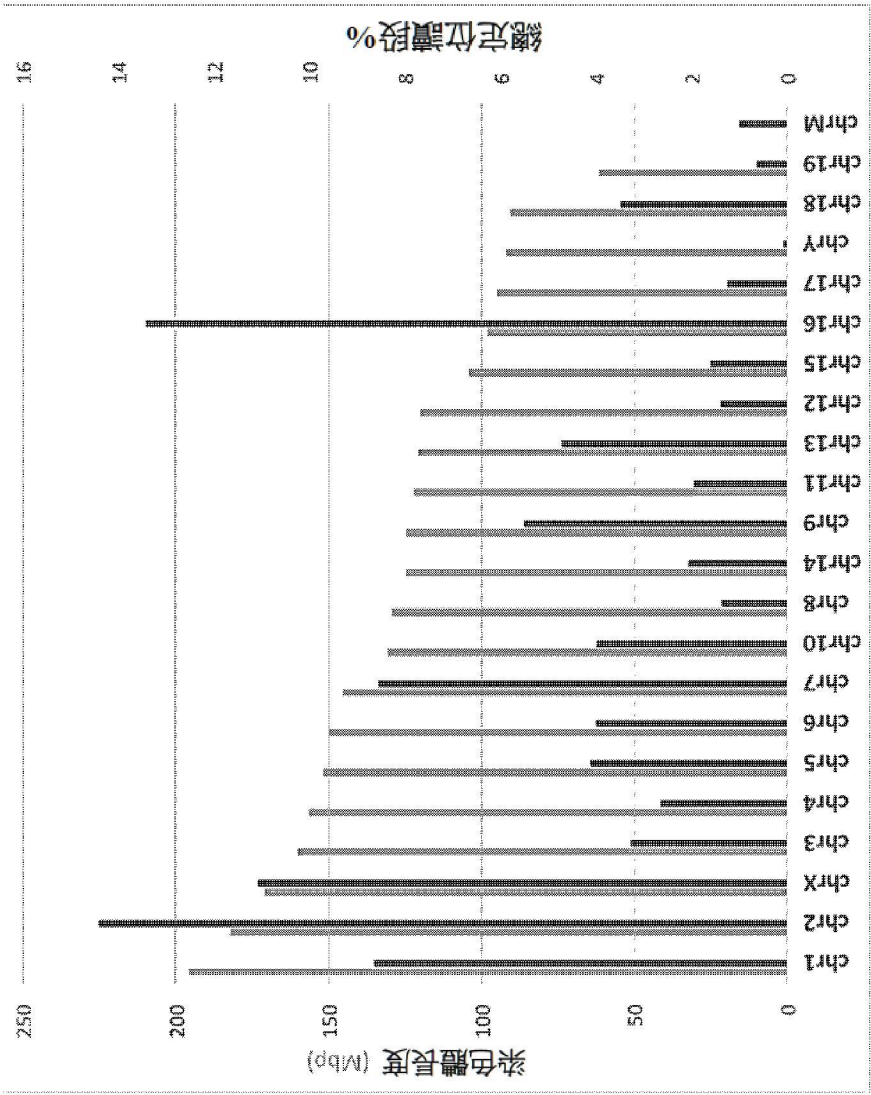
【圖 26A】



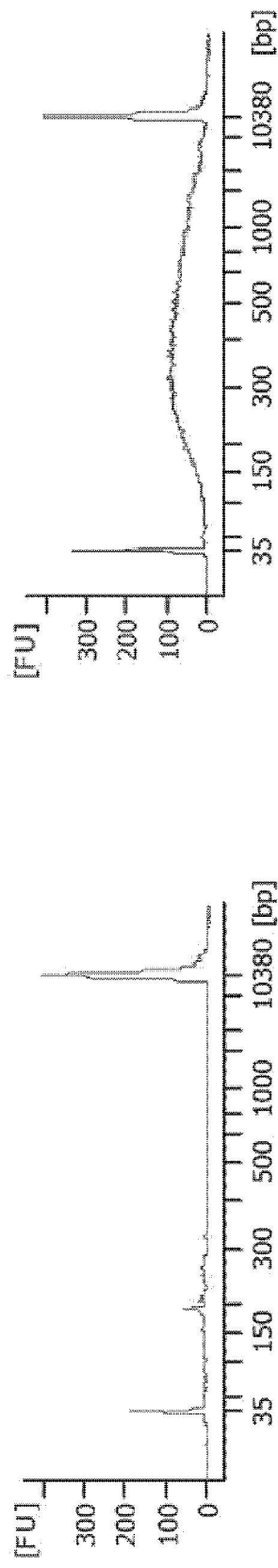
【圖 26B】



【圖 27】

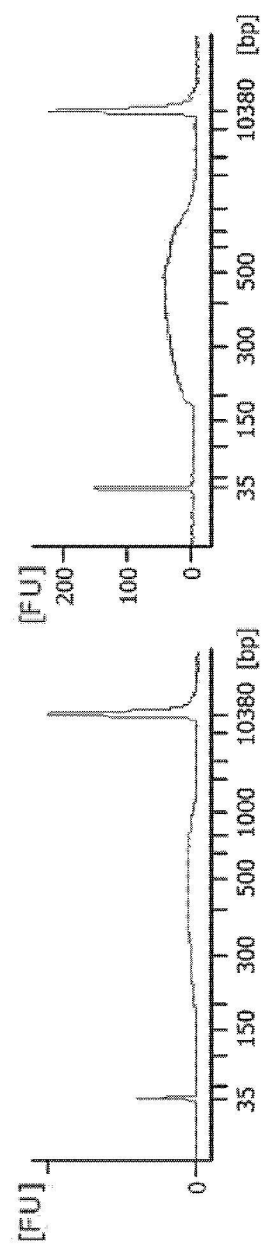


【圖 28】



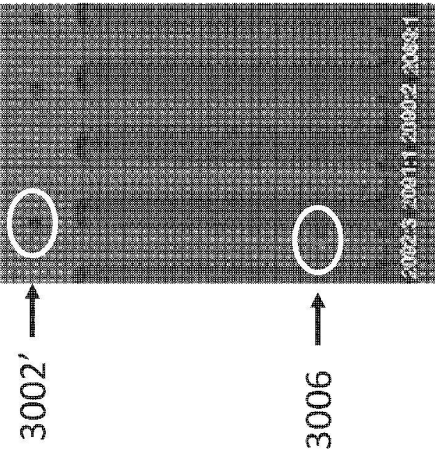
【圖 29B】

【圖 29A】

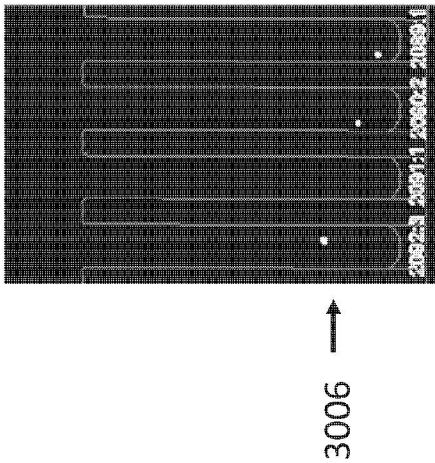


【圖 29D】

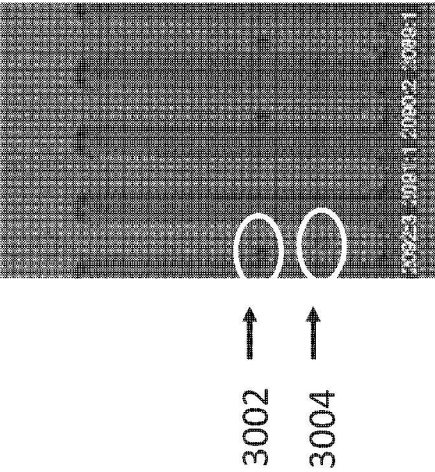
【圖 29C】



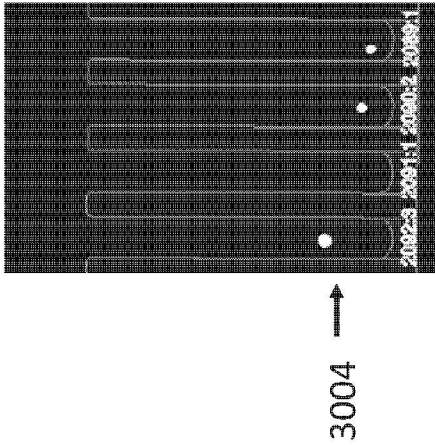
【圖 30C】



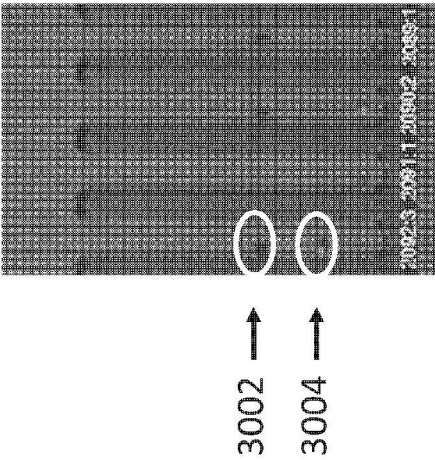
【圖 30F】



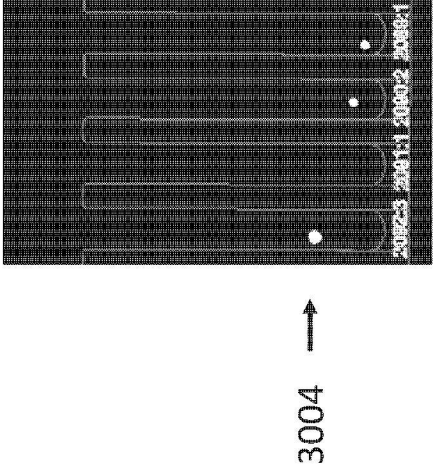
【圖 30B】



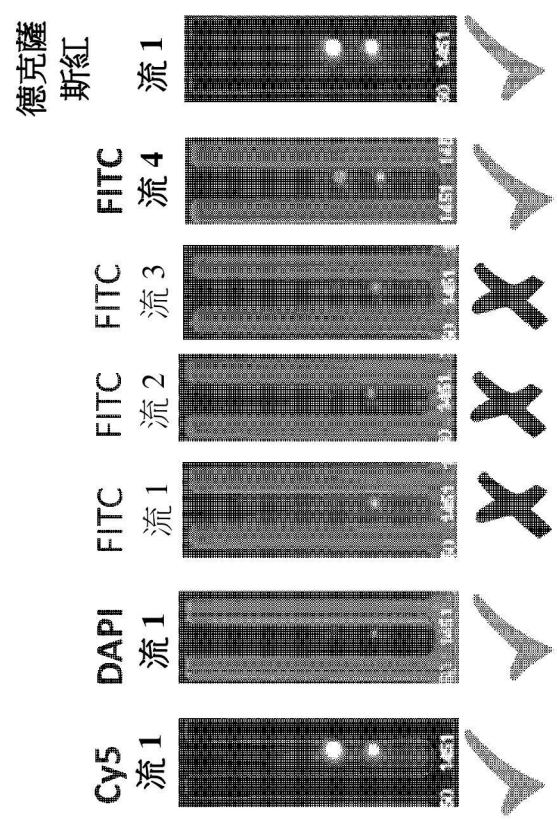
【圖 30E】



【圖 30A】

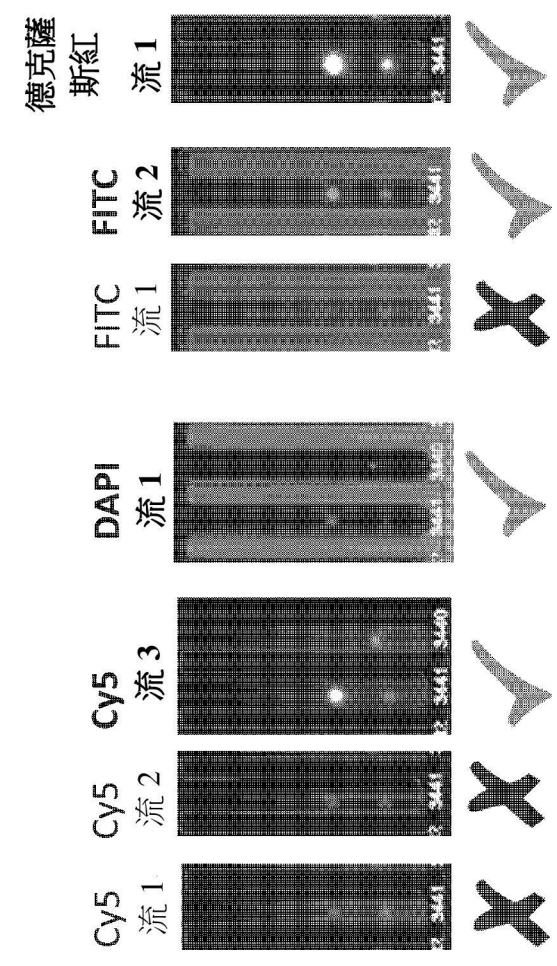


【圖 30D】



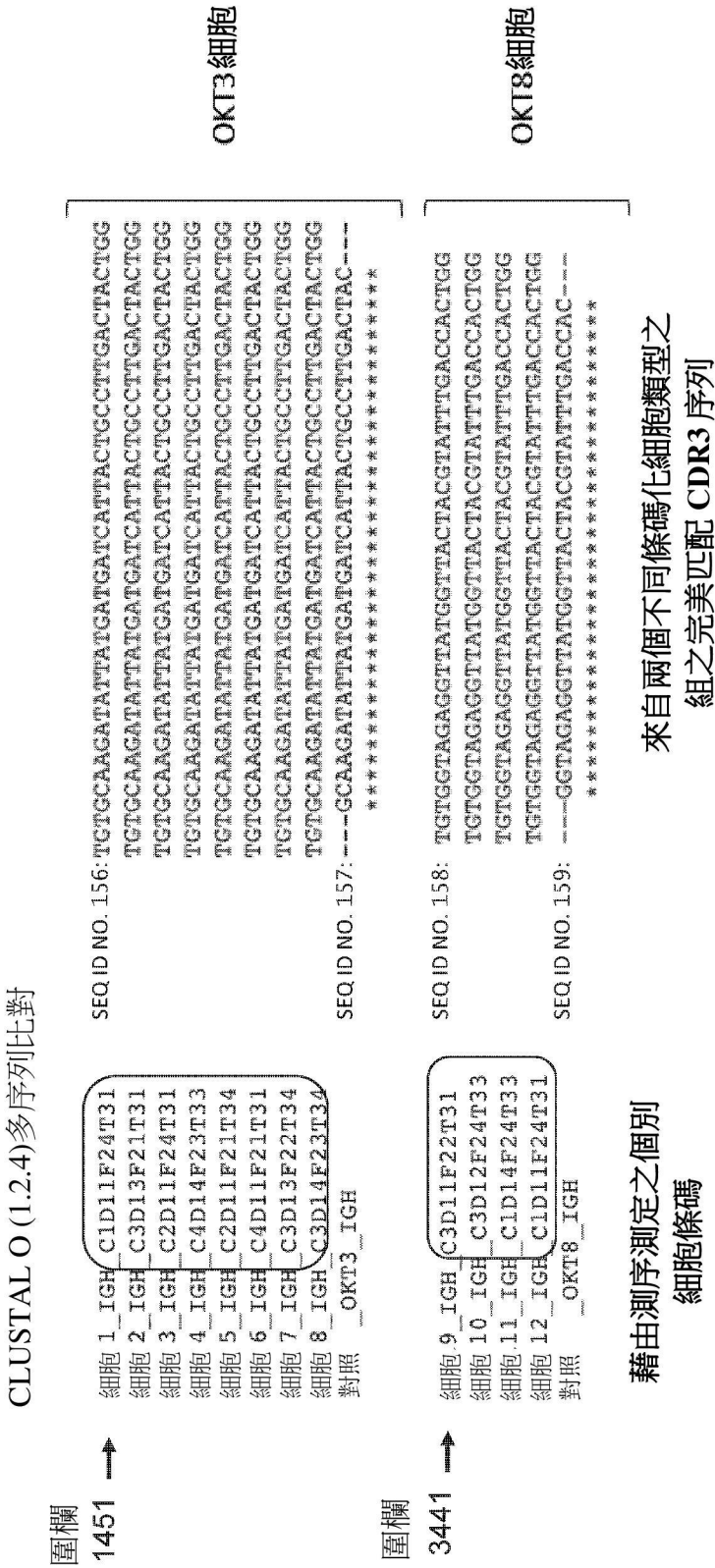
圖欄 1451
條碼 : C1D11F24T31
SEQ ID NO. 1/SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 24/SEQ ID NO. 31

【圖 31B】



圖欄 3441
條碼 : C3D11F22T31
SEQ ID NO. 3/SEQ ID NO. 11/SEQ ID NO. 22/SEQ ID NO. 31

【圖 31A】



【圖 32】