



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110760571 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 01

(21) 申请号 201910790298.3

(22) 申请日 2019.08.26

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110760571 A

(43) 申请公布日 2020.02.07

(30) 优先权数据
62/723,455 2018.08.27 US

(73) 专利权人 浙江达普生物科技有限公司
地址 314113 浙江省嘉兴市嘉善县大云镇
创业路555号D6-2幢101室

(72) 发明人 许潇楠 宋汝渊 姚舒怀 周国辉

(74) 专利代理机构 杭州天昊专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33283
专利代理师 向庆宁

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6851 (2018.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106290279 A, 2017.01.04

CN 107064091 A, 2017.08.18

CN 106596487 A, 2017.04.26

CN 103429331 A, 2013.12.04

CN 104741158 A, 2015.07.01

审查员 李佳栋

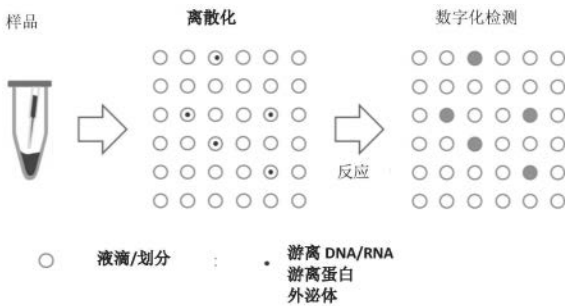
权利要求书1页 说明书22页 附图5页

(54) 发明名称

数字化定量的多靶标共同、生物检测

(57) 摘要

本发明包括的一些方法和装置,用于利用集成液滴微流体系统在单分子水平检测和量化多种生物分子。在一个实施例中,本发明提供样品中多种生物分子的实时和数字检测,从而以绝对和即时的方式量化多种生物分子。在一种实施例中,本发明提供一种疾病的诊断方法,包括使用这里所述的方法或装置对样品中的多种生物分子进行实时和数字检测。



1. 一种液滴微流体系统,包括:

液滴产生器和包括有储存液滴的存储器,其中,所述的存储器包括多个用于存储液体的微孔,其中,每一个微孔中能够存储一个液滴,其中,所述的液滴产生器和液滴存储器为一体结构,其中液滴产生器和液滴存储器流体连通,所述的每一个存储液滴的微孔之间为流体连通,其中,所述的液滴产生器所产生的液滴以单层或者多层配置的形式存在于存储器中,其中,所述的液滴产生器包括一个交叉流动结构,其允许连续相和分散相以特定角度 θ 相交。

2. 根据权利要求1所述的液滴微流体系统,其中,所述的液滴产生器包括入口,液滴的存储器包括出口。

3. 根据权利要求2所述的液滴微流体系统,其中所述的液滴产生器包括多个入口,每一个入口用来接收不同的试剂成分,其中一个入口用来接收样品。

4. 根据权利要求1所述的液滴微流体系统,液滴产生器和液滴存储器流体连通是通过微流体通道连通。

5. 根据权利要求4所述的液滴微流体系统,微流体通道的制作材料选自硅、玻璃、塑料和多聚二甲基硅氧烷(PDMS)中的一种或者几种。

6. 根据权利要求4所述的液滴微流体系统,微流体通道的直径是液滴直径的1-2倍。

7. 根据权利要求1所述的液滴微流体系统,所述的液滴产生器是一个基于表面张力的液滴产生装置。

8. 根据权利要求1所述的液滴微流体系统,所述的液滴产生器包括一个阶梯乳化结构。

9. 根据权利要求3所述的液滴微流体系统,当样品为细胞或者外泌体的时候,所述的一个入口用来接收细胞或者外泌体样品,另外的一个或者多个入口用来接收裂解试剂或者油性物质。

10. 根据权利要求1所述的液滴微流体系统,所述的液滴产生器还包括分拣液滴和分离单元。

11. 根据权利要求1所述的液滴微流体系统,所述的液滴贮藏的微孔的高度是液滴直径的1-1.5倍。

12. 根据权利要求1所述的液滴微流体系统,液滴贮藏室包括用于锚定液滴到液滴贮藏室的预设位置的多排锚定结构。

13. 根据权利要求12所述的液滴微流体系统,所述的锚定结构采用支柱形式如以捕获单个液滴的方式排列的柱。

14. 根据权利要求12所述的液滴微流体系统,锚定结合凹槽形式,通过表面张力捕获单个液滴。

15. 根据权利要求1所述的液滴微流体系统,所述的液滴包含不超过一个拷贝或者一个的后续步骤中待分析的靶标分子。

16. 根据权利要求15所述的液滴微流体系统,所述的靶标分子为核酸和蛋白。

17. 根据权利要求1所述的液滴微流体系统,所述的液滴包括单个的细胞或者单个的外泌体。

数字化定量的多靶标共同、生物检测

[0001] 本申请主张在美国临时申请,申请号:62/723,455,申请日为2018年8月27日的优先权。

发明领域

[0002] 本发明涉及使用集成液滴微流体系统在单分子水平检测和量化多种生物分子的方法和装置。

发明背景

[0003] 本发明的背景描述仅仅是为了一般性介绍本发明的现有先前的技术,并不能对本发明构成任何的限制。

[0004] 人类体液中存在很多生物标记物,例如在血液、尿液、唾液或精液中。存在于血液中的循环生物标记物包括游离DNA(cf-DNA)、蛋白质、细胞外囊泡和循环肿瘤细胞。准确量化生物标记物对于疾病或病症的正确和可靠的诊断、预知和进展监测是有重要意义的,特别是用于疾病的早期检测或以非侵入性产前检测(NIPT)的形式进行产前筛查。然而,在本发明时期,早期前列腺癌检测的唯一广泛使用的血液测试是基于前列腺特异性抗原(PSA)标记物的测量,并且该测试的适当用途仍然存在争议。以高灵敏度和特异性测量生物标记物的数量对于防止误诊是至关重要的,因为一方面太多健康个体将得到假阳性测试结果,导致不必要的定期复查流程;而在另一方面,错误的阴性检测结果可能导致治疗延误并对患者产生不利影响。此外,从科学发现的角度来看,生物标记物的准确量化对于了解生物标记物与相应疾病之间的关联性,以及建立可靠稳健的关联来用作疾病的临床指标是很重要的。

[0005] 在学术界和工业界已经进行了许多努力来量化不同类型的生物标记物。用于核酸量化的传统方法包括分析一些产物的凝胶条带,这些产物可以来自聚合酶链式反应(PCR),实时PCR和一些最近出现的技术例如下一代测序(NGS)和其他测序方法。已经广泛使用酶联免疫吸附测定(ELISA)方法用于蛋白质量化,并且也可以使用最近出现的蛋白质质谱法。对于外泌体量化,纳米粒子追踪分析(NTA)和ExoELISATM等方法被广泛采用。

[0006] 以上涉及的这些方法在实验室或临床被广泛采用。然而,这些方法不能为有效且敏感的诊断提供足够的灵敏度或者不能进行绝对量化,因此不能用于需要以高精度量化生物标记物以获得有效结果的诊断测试。在本发明时期,大多数需要量化标记物的传统诊断方法利用总体积测定进行标记物量化,并且只能给出定性或半量化结果,因为获得的分子信息是数千个总体积测定的平均信息。因此检测可能不是非常精确。另一方面,基于NGS或质谱(MS)的新方法能够实现标记物的高通量和准确测量,但实施起来相对耗时且昂贵。当这些方法生成大量不必要的数据使得后期数据分析更复杂时,这是尤其显得现实的问题。

[0007] 另一个重要的问题是大多数当前的诊断平台不能同时检测和/或量化不同类型的多种生物标记物,例如DNA和蛋白质标记物。然而,一些疾病可能需要共同检测两种或更多种标记物才能进行准确诊断。例如,临床研究表明,血浆DNA检测(“液体活检”)的最大灵敏

度仅限于局部癌症。遗传改变和蛋白质生物标记物的联合检测不仅有助于鉴定相对早期癌症的存在,而且还有助于定位这些癌症的起源器官。检测或诊断的准确性可以从本质上得到改善,因为测试需要共同检测多种生物标记物以及它们层次间的特异相关性,以便在临床上确定病症或疾病的存在。

[0008] 近年来,出现了利用微流体技术将样品分隔成数千个单独的等份液滴的数字技术,例如数字PCR和数字ELISA技术。成千上万的PCR或ELISA反应发生在独立空间而互不干扰,从而使检测被降低到单分子水平并且能进行绝对和准确地量化生物分子。其使得分子诊断具有前所未有的准确性,同时保留了PCR和ELISA试验的高特异性。然而,目前的数字平台仅限于终点检测(即反应结束后的检测)以及单一类型的反应和检测(例如,数字PCR反应和数字ELISA反应不能被整合到一个平台中,例如在不同的液滴中进行PCR反应和ELISA反应)。因此,这些当前的数字平台不能实时检测多种生物分子。

[0009] 这就需要对现有的设备和检测技术进行改进,期望可以更加准确、实时的提供检测结果对于过程的监测,也希望可以同时检测多种不同类型的多种生物标记物。

发明内容

[0010] 本发明首次引入了一个概念,这个概念是使用微流体装置的集成化液滴数字化平台,使多种生物分子检测降至单分子水平,并进行多靶标共同检测,或者/和以数字化定量的方法检测多个生物分子,从而允许有效且准确的测试或者诊断。

[0011] 一方面,本发明提供利用集成液滴微流体系统在单分子水平检测和量化多种生物分子的方法和装置。

[0012] 在一个实施例中,本发明提供了样品中的多种生物分子的实时和/或数字化测量,从而实现多种生物分子的绝对和同时量化。

[0013] 在一些实施例子中,用于测试的集成的液滴微流体生成和检测系统。所述的系统包括4个部分(从左至右):入口、液滴产生器、液滴储藏室和出口。入口被用来导入各种液体(如油、用于进行反应的样品和试剂)到液滴产生器,其中,这些液体可以通过不同的入口被分别加载,或预混合并作为混合物通过同一个入口被加载。含有生物分子的样品被制备并通过液滴产生器被划分为单独的液滴,然后产生的液滴被散布到液滴贮藏室中的单层装置中。划分样品后,在各个液滴中发生平行的原位反应,其中反应是用于分析靶标生物分子的反应测定的一部分,并且不同液滴中的反应可以相同或不同。一旦反应完成,指示存在靶标生物分子的信号可以通过,例如显微镜相机捕捉液滴贮藏室中的液滴的图像来检测。然后图像通过计算机处理来计数及数据分析。出口用于从系统中去除液体或气体。在一个实施例中,出口用来让空气或油排出。在另一个实施例中当反应后需要收集液滴时,他们可以通过出口从液滴贮藏室收集。

[0014] 在一个实施例中,本方法和装置包括能产生上千液滴的集成液滴微流体系统,从而划分样品为上千个单独的液滴用于后续的反应和每一个液滴的分析。

[0015] 在一个实施例中,本发明提供一种集成液滴微流体系统用于从样品中产生大量单独的液滴。

[0016] 在一个实施例中,本集成液滴微流体系统被配置作为一个单独的微流体芯片。

[0017] 在一个实施例中,本微流体系统由液滴产生器和一个液滴贮藏室组成。在一个实

施例中含有生物分子的样品被划分成单独的液滴穿过液滴产生器,然后产生的液滴被放置在单层配置的液滴贮藏室内。

[0018] 在一个实施例中,本发明的集成液滴微流体系统包括多重微流体通道用于传输流体到各种组件或从系统的各种组件传输流体。在一个实施例中,本液滴产生器、液滴贮藏室和/或出口包括一个或多个微流体通道,其设施了流体在这些组件内的流动途径。在一个实施例中在集成液滴微流体系统(如在液滴产生器和液滴贮藏室之间)的不同组件间提供了一个或多个微流体通道用于引导流体从一个组件到另一个组件。在一个实施例中,要用的微流体通道精确的型号或配置(如结构、长度、之间、分支数量和密度)取决于具有微流体通道的目的和独立组件想要的流动阻力。

[0019] 在一个实施例中,本发明通过量化和单独测量每一个液滴的特异信号,对样品产生的多个液滴进行实时和数字测量。

[0020] 在一个实施例中,本发明的集成液滴微流体系统与运动温度控制系统以及检测单元结合,通过使用本发明的集成液滴微流体系统,本发明能够指导数千个液滴进行多重反应,并且能够对这些液滴中的每一个液滴中的不同生物分子进行数字检测,从而获得样品中靶标分子的绝对量以用于诊断或其他分析目的。由于测量是实时且单个分子的,因此本发明提供了比现有的终点数字测量方法更有用更准确的信息。

[0021] 在一个实施例中,本发明提供了进行数字量化和分析生物测定的方法,包括四个步骤:1)样品制备,2)样品区划室,3)反应,以及4)如图1所示的数字检测。

[0022] 在一个实施例中,本发明提供了疾病的诊断方法,包括利用本文所述方法或装置对样品中的多种生物分子进行实时和数字测量。

[0023] 本发明提供一种液滴微流体系统,包括:液滴产生器和包括有储存多个液滴的存储器,其中,所述的每一个存储器的每一个微孔中存储一个液滴,其中,所述的液滴产生器和液滴存储器为一体结构,其中液滴产生器和液滴存储器流体连通,每一个微孔之间为流体连通。

[0024] 在一个实例中,所述的液滴产生器包括入口,液滴的存储器包括出口。

[0025] 在一个实施例中,其中所述的液滴产生器包括多个入口,每一个入口用来接收不同的试剂成分,其中一个入口用来接收样品。

[0026] 在一个实施例中,液滴产生器和液滴存储器流体连通通过微流体通道连通。

[0027] 在一个实施例中,微流体通道的制作材料选自硅、玻璃、塑料和多聚二甲基硅氧烷(PDMS)中的一种或者几种。

[0028] 在一个实施例中,微流体通道的直径是液滴直径的1-2倍。

[0029] 在一个实施例中,,所述的液滴产生器是一个基于表面张力的液滴产生装置。

[0030] 在一个实施例中,所述的液滴产生器包括一个交叉流动结构,其允许连续相和分散相以特定角度 θ 相交。

[0031] 在一个实施例中,所述的液滴产生器包括一个阶梯乳化结构。

[0032] 在一个实施例中,当样品为细胞或者外泌体的时候,所述的一个入口用来接收细胞或者外泌体样品,另外的一个或者多个入口用来接收裂解试剂或者油性物质。

[0033] 在一个实施例中,所述的液滴产生器包括分拣液滴和分离单元。

[0034] 在一个实施例中,所述的液滴液滴贮藏的微孔的高度是液滴直径的1-1.5倍。

[0035] 在一个实施例中,液滴贮藏室包括用于锚定液滴到液滴贮藏室的预设位置的多排锚定结构。

[0036] 在一个实施例中,所述的锚定结构采用支柱形式如以捕获单个液滴的方式排列的柱。

[0037] 在一个实施例中,锚定结合凹槽形式,通过表面张力捕获单个液滴。

[0038] 在一个实施例中,所述的液滴包含不超过一个拷贝或者一个的后续步骤中待分析的靶标分。

[0039] 在一个实例中,所述的靶标分子为核酸和蛋白。

[0040] 在一个实施例中,所述的液滴单个的细胞或者单个的外泌体。

附图说明

[0041] 图1显示了本发明的一个实施例,用于实施数字量化生物测定,包括4个步骤:1)样品制备,2)样品离散化(或者样品的区室分配),3)反应,和4)数字检测。

[0042] 图2显示了本发明的一个实施例,其包含用于数字量化生物测定的集成的液滴微流体系统。

[0043] 图3显示了本发明一个具体实施例子中的液滴产生的实施例。

[0044] 图4显示了本发明另一个具体实施方式中的液滴产生的实施例。

[0045] 图5显示了液滴储存室内的锚定结构的实施例,这个锚定结构将单个液滴捕捉到液滴贮藏室内的预设位置。

[0046] 图6显示液滴储藏室内锚定结构的另一个实施例。

[0047] 图7显示了液滴产生装置的一个实施例,该液滴产生装置具有下游与液滴储存室连接的流动聚焦结构。

[0048] 图8显示了通过CCD相机获得的液滴荧光图像。

[0049] 图9显示了本发明集成液滴微流体系统的一个实施例,该系统用于数字量化来自单个外泌体的RNA。

[0050] 图10显示了数字量化来自单个外泌体的RNA的过程。

[0051] 图11显示了两幅荧光信号图像,从使用本发明的靶标DNA分子的终点数字检测中的液滴上获得,这些液滴包含被扩增的DNA分子。

详细说明

[0052] 除非本发明特别的说明,本发明的词语都是按照普通的含义进行解释。

[0053] 检测

[0054] 检测表示化验或测试一种物质或材料是否存在。所述的物质或材料例如但并不限于化学物质、有机化合物、无机化合物、新陈代谢产物、药物或者药物代谢物、有机组织或有机组织的代谢物、核酸、蛋白质或聚合物。另外,检测还可以表示测试物质或材料的数量,化验还表示免疫检测、化学检测、酶检测和核酸检测等。

[0055] 本发明提供了利用集成液滴微流体系统在单分子水平检测和量化多种生物分子的方法和装置。在一个实施例中,本方法和装置包括能产生上千液滴的集成液滴微流体系统,从而划分样品为上千个单独的液滴用于后续的反应和每一个液滴的分析。

[0056] 在一个实施例中,本发明通过量化和单独测量每一个液滴的特异信号,对样品产生的多个液滴进行实时和数字测量。

[0057] 在一个实施例中,本发明提供一种疾病的诊断方法,包括利用这里所述的方法和装置对样品中的多种生物分子进行实时和数字测量。

[0058] 如本文所示,本发明首次引入了一个概念,即在微流体设置中使用数字平台以单分子水平共同检测多个生物分子并实时量化这些多个生物分子,从而允许有效和准确的诊断。

[0059] 本发明的集成液滴微流体系统与运动温度控制系统以及检测单元结合,通过使用本发明的集成液滴微流体系统,本发明能够指导数千个液滴进行多重反应,并且能够对这些液滴中的每一个液滴中的不同生物分子进行数字检测,从而获得样品中靶标分子的绝对量以用于诊断或其他分析目的。由于测量是实时且单个分子的,因此本发明提供了比现有的终点数字测量方法更有用更准确的信息。

[0060] 在一个实施例中,本发明提供了进行数字量化和分析生物测定的方法和装置,包括四个步骤:1)样品制备、2)样品区划室、3)反应、以及4)如图1所示的数字检测。

[0061] 图2显示了用于数字量化生物测定的集成液滴微流体系统的一个实施例。所述的系统包括4个部分(从左至右):入口、液滴产生器、液滴储藏室和出口。入口被用来导入各种液体(如油、用于进行反应的样品和试剂)到液滴产生器,其中,这些液体可以通过不同的入口被分别加载(如图2所示),或预混合并作为混合物通过同一个入口被加载。含有生物分子的样品被制备并通过液滴产生器被划分为单独的液滴,然后产生的液滴被散布到液滴贮藏室中的单层装置中。划分样品后,在各个液滴中发生平行的原位反应,其中反应是用于分析靶标生物分子的反应测定的一部分,并且不同液滴中的反应可以相同或不同。一旦反应完成,指示存在靶标生物分子的信号可以通过,例如液滴贮藏室中的显微镜相机捕捉液滴的图像来检测。然后图像通过计算机处理来数字计数及数据分析。出口用于从系统中去除液体或气体。在一个实施例中,出口用来让空气或油排出。在另一个实施例中当反应后需要收集液滴时,他们可以通过出口从液滴贮藏室收集。

[0062] 样品的制备

[0063] 本发明可以用于含有靶标生物分子的各种类型的样品。在一个实施例中,样品是液体样品直接从活的有机体获得,有机体包括但不限于人类、动物、植物、真菌、微生物如细菌和病毒。在一个实施例中,样品是含有靶标生物分子的溶液,其中溶液可以通过处理靶标生物分子的另一个单独过程获得。例如这个独立过程是对含有靶标生物分子的样品中的靶标生物分子分离、纯化或浓缩的过程,或预处理过程,即通过某些酶或试剂在某个温度或压力下预处理含有靶标生物分子的样品。这里的样品,还可是包括生物液体。样品或者样本的初始状态可以是液态、固态或半固态的、固态或半固态的样本可以通过任何适当的方法转化成液态样本,例如混合、捣碎、浸软、孵育、溶解以及酶解等,然后进行样品的液滴化加工,在进行液滴化过程中,过程前,都可以对样品进行一些处理,包括过滤、溶解等等,也可以混入其它试剂,以改善样品的一些性能,方便在后期形成微小液滴或者检测中提供更好的结果。样品可以取自人体、动物、植物和自然界等。取自人体的样本例如可以是血液、血清、尿液、脑脊髓液、汗液、淋巴液、唾液和胃液等液态样本;粪便、毛发、角质、牙垢、指/趾甲等固态或半固态的样本。取自植物的样本例如可以是根、茎、叶等固态样本;由根、茎、叶制备的

组织液、细胞液等液态或半固态样本。取自自然界的样本例如可以是雨水、河水、海水、地下水等液态样本；土壤、岩石、矿石、石油等固态或半固态样本。

[0064] 在一个实施例中，样品包括但不限于血液、血浆、血清、组织、尿液、唾液、粪便、可用于涂片的物质，以及排泄物例如眼泪、痰、鼻粘液、阴道分泌物和阴茎排泄物。在一个实施例中，样品包括但不限于细菌、病毒、细菌培养物、病毒培养物、细胞培养物、细胞悬浮液和贴壁细胞。在另一个实施例中，样品包括但不限于食物、饲料和植物。

[0065] 在一个实施例中，样品可以直接从一个主体获得。在一个实施例中样品是那些来自主体的一种或多种生物分子，包括可以从各种分子试验如聚合酶链式反应 (PCR) 获得的即时或终产物。

[0066] 在一个实施例中，本发明包括提供或制备样品的步骤，该样品含有待检测或量化的靶标生物分子。这些靶标分子或者被分析物质是不同类型的，这里的类型是指在同一种样品中存在不同类型的被分析物质，例如不同的生物分子或者不同的生物标记物质，例如在一个细胞中存在核酸、蛋白、多糖以及小分子肽，这些不同的标记物质或者被分析物质的类型是不相同的。而本发明可以在一个载体上，例如芯片上同时进行多种不同类型的被分析物质的测试，例如同时检测蛋白和核酸，例如同时检测与某一个疾病关联的核酸和蛋白，例如某一种癌症或者肿瘤的核酸突变和蛋白分子的水平。这里的载体可以是指本发明的微流控芯片，也可以是让液滴产生器和液滴储存器结合在一体结构的装置中进行，例如液滴存储器中的单个小孔中，每一个液滴进行不同的测试或者在一种液滴中进行不同的反应，例如核酸结合反应、核酸扩增反应或者蛋白反应，这里的反应是结合反应、扩增反应或者其它任何反应。在这里，所谓的不同类型也可以是指分类相同，但是具体细分也是不同的含义，例如都是检测核酸，可以同时检测DNA水平，RNA水平，在这里，DNA水平和RNA水平可以被认为是不同类型的检测。再例如，都是蛋白水平，但是不同蛋白的生物表标记物质也可被认为是不同类型的检测，例如和某种疾病关联的具有多种蛋白分子，这些蛋白分子之间是不同的多肽序列，不同的蛋白三维空间结构，不同的位点中的一种或者多种。虽然都是称为蛋白水平，但是蛋白标记物是不同的，也可以利用本发明的检测装置或者检测方法进行不同类型的蛋白分子的同时检测，对某一种特定的疾病同时提供多种物质的含量，而且这些多种物质都来自同样的样本，这样减少了多次取样或者减少了样品的用量，同时可以出具多种测试结果，例如疾病的诊断。

[0067] 在一个实施例中，样品的大小是1微升至500微升。样品体积太大可能需要花费更长时间产生液滴。样品体积太小可能导致难以加载样品到液滴产生器。

[0068] 在一个实施例中，样品的黏度不大于 0.5Ns/m^2 。在一个实施例中，样品不含可导致液滴合并的溶剂组分，例如二甲基亚砜 (DMSO)。

[0069] 集成液滴微流体系统

[0070] 在一些具体的方式中，本发明提供一种集成的检测系统或者检测装置，该装置包括液滴产生装置和滴液储存装置。所谓的集成是指两个部件连接为一体结构，形成一个整体结构，可以同时完成不同的功能，但是这些功能的完成可能具有一定的顺序性，从而集成在一起，减少了非集成的操作步骤操作繁琐。例如，在传统的技術中，利用微流系统进行检测的时候，液体产生需要单独的液滴产生的系统来完成，然后等液滴产生完后，利用另外的装置来存储这些液滴，存储的液滴一般是多个液滴混合在一起进行存储，然后等需要反

应的时候,直接用存储容器进行反应或者转移到单独的反应设备中进行反应,例如进行孵育、循环加热扩增等等,等反应结束后,进行检测的时候,还需要把多个液滴单独分开,然后一个液滴一个液滴进行测试结果的读取,例如利用流式细胞仪器进行检测。这样不仅操作步骤繁琐,步骤多,而且给最终的检测结果带来很多的不确定性。例如操作步骤多,不同人员操作可能会有批次的区别,并增加影响最终测试结果的风险因素;例如频繁的转移液滴造成液滴损失、融合;例如把多个液滴混合在一起进行反应,可能因为传热不均匀的问题,特别需要注意对孵化温度的控制;例如多步转移还有可能造成交叉污染,出现假阳性情况,影响实验的准确性,特别在临床检验上尤为重要。而本发明把形成液滴的功能部件和反应和检测集合在一起,仅仅需要准备样品,然后一步操作就可以完成所有的步骤,极大的简化了操作步骤,而且减少了不同步骤给最终检测带来不利影响。另外,液滴存储器并不是把多个液滴混合在一起,而是单个液滴之间独立存在,例如一个孔中仅仅包括一个液体,液滴与液滴之间独立存在,这样保证了液滴之间反应的独立性。同时,在反应和检测的时候,相互之间不会互相干扰。

[0071] 所以,在一个具体的实施方式中,本发明提供一种检测系统,该系统包括液体产生系统和存储系统,存储系统用来存储液滴产生的液滴。在一些方式中,液滴产生系统能够产生多个单独的微小液滴,而存储系统包括多个存储单元,例如存储孔、腔,每一个单独的孔或者腔中存储有一个液滴。在一些方式中,液滴产生系统和存储系统通过微流通道形成液体连通。这里的存储系统包括液体的入口和出口,在入口和出口之间包括多个存储的孔、腔、洞等等结构。可以理解,这里的存储系统可以直接用来进行某种反应,例如图2中的系统,包括存储系统(图2的右边),该存储系统包括多个微孔结构,每一个微孔存贮一个液滴。当这些液体中包括反应所必须的物质时,例如当进行核酸扩增的时候,有引物,扩增的必要的酶等,可以直接让给存储系统进行反应,这个时候存储系统就是一个反应的容器,在该反应的容器中包括多个单独的孔,每一个孔包括单独的液滴,在每一个液滴中存在一个单独独立的反应,每一个液滴就会出现独立的反应最终结果,等反应结束后,就可以直接对存储系统进行反应结果的检测,一次可以同时检测多个独立反应(多个独立液滴)的结果。相比传统的多步骤测试,操作简单,可以进行多个不同或者相同的测试结果。

[0072] 所以,单独液滴的产生,也可以进行不同类型被分析物质的同时检测,例如进行核酸和蛋白的检测,后面有详细的说明。

[0073] 在一个具体的实施方式中,例如图2所示,用于数字量化生物测定的本发明的集成液滴微流体系统,包括入口、液滴产生器、液滴贮藏室和出口。

[0074] 在一个实施例中,本发明提供一种集成液滴微流体系统用于从样品中产生大量单独的液滴。

[0075] 在一个实施例中,本集成液滴微流体系统被配置作为一个单独的微流体芯片。

[0076] 在一个实施例中,本微流体系统由液滴产生器和一个液滴贮藏室组成。在一个实施例中,含有生物分子的样品被划分成单独的液滴穿过液滴产生器,然后产生的液滴被放置在单层配置的液滴贮藏室内。

[0077] 在这里,微流体芯片也可以是单层配置的液滴贮藏室内。

[0078] 入口被用来将各种液体导入(如油、用于开展反应的样品和试剂)到液滴产生器。如图2所示,油、样品和试剂1至试剂N(即后续反应所需的各种试剂,这些试剂可以相同也可

以不相同)通过不同的入口被导入液滴产生器。在一个实施例中,当样品和试剂不会产生化学反应,他们可以被预混合,并作为一种混合物通过一个入口加载到液滴产生器。在另一个实施例中,当样品和一种或多种试剂会发生反应,这些试剂和样品不能作为一种混合物被导入液滴,但可以穿过不同入口被加载到液滴产生器,然后在液滴产生器的连接处被划分成或者形成液滴。

[0079] 例如,在液滴中实施热启动扩增量化DNA的数字PCR时,包含靶标核苷酸的样品和用于进行热启动扩增的试剂(包括引物、聚合酶和其他缓冲液)可以被预混合,并加载到产生液滴的同一个入口,因为反应仅在温度升高到酶的工作温度才会开始。然而,假如室温时试剂中的酶能催化样品的任何底物,含有酶的试剂和样品需要通过不同的入口被加载到液滴产生器,然后在液滴产生器的连接处的每一个液滴内混合。

[0080] 图3和图4显示了使用本发明的液滴产生器的两个实施例。在图3中,待实施后续反应的原样和试剂被预混合,并且所得的混合物被置于液滴产生器用来生产液滴。在图4中,因为裂解缓冲液与细胞或外泌体预混合将会导致细胞或外泌体提前裂解,无法观测单细胞水平的表达。所以含有细胞或外泌体的原样和裂解缓冲液被通过不同的入口加载到液滴产生器内,这样它们被包裹进液滴前不会接触。至于包裹后产生的反应,也是在独立液滴下产生的,液滴之前不会相互影响。

[0081] 本发明的液滴产生器可以是能划分或者形成液体样品为大量多个液滴的任何结构或系统。在一个实施例中,液滴产生器包括但不限于流动聚焦、T-型接合和乳化试剂等等。

[0082] 本发明的液滴贮藏室可以是能持有由液滴产生器产生的液滴的任何模块。在一个实施例中本发明的液滴贮藏室的设计取决于特殊测定所需的液滴总数和体积。

[0083] 在一个实施例中,产生的液滴在单层配置的液滴贮藏室展开。样品被划分后,平行反应在液滴贮藏室的独立液滴中开展,接着检测并分析靶标生物分子。

[0084] 在一个实施例中,出口被用于从本发明集成的系统中去除液体或气体。在一个实施例中,出口用来排出空气或油。在另一个实施例中反应后需要收集液滴时,可以通过出口从液滴贮藏室收集,收集的液滴用于另外的反应或者别的用途。

[0085] 在一个实施例中,本发明的集成液滴微流体系统进一步包括用于分拣液滴和分离单元。例如,包括交流(AC)电场中的电极的分拣接头被包括在本集成液滴微流体系统中,以选择特定的液滴,例如,包含特定类型的靶标分子或从液滴中观察荧光信号具有如本文所示的特定性质(Baret, Jean-Christophe, 2009)。

[0086] 在一个实施例中,本发明的集成液滴微流体系统包括多重微流体通道用于传输流体到各种组件或从系统的各种组件传输流体。在一个实施例中,本液滴产生器、液滴贮藏室和/或出口包括一个或多个微流体通道,其设施了流体在这些组件内的流动途径。在一个实施例中在集成液滴微流体系统(如在液滴产生器和液滴贮藏室之间)的不同组件间提供了一个或多个微流体通道用于引导流体从一个组件到另一个组件。在一个实施例中,要用的微流体通道精确的型号或配置(如结构、长度、之间、分支数量和密度)取决于具有微流体通道的目的和独立组件想要的流动阻力。

[0087] 在一个实施例中,微流体通道的制作材料选自硅、玻璃、塑料和多聚二甲基硅氧烷(PDMS)。

[0088] 在一个实施例中,相同类型或配置的微流体通道可以被用于在本发明的集成液滴微流体系统的各种组件中。在另一个实施例中,各种类型或配置的微流体通道可以被用于本发明的集成液滴微流体系统的各种组件中。

[0089] 在一个实施例中,本发明的液滴产生器包括用于传输油的两种微流体通道和用于传输样品流体和/或试剂的一种或多种微流体通道。在一个实施例中,实际的配置取决于选择的乳剂类型和所需入口数量。

[0090] 在一个实施例中,微流体通道被用于连接液滴产生器和液滴贮藏室。在一个实施例中,微流体通道的直径是液滴直径的1-2倍。较大直径的微流体通道有助于在液滴通过通道时稳定液滴,并且压缩通道内的流体流动也将有助于稳定液滴。

[0091] 在一个实施例中,液滴贮藏室不具有任何微流体通道,产生的液滴将自组装以便在室内的平坦表面展开。在液滴贮藏室具有孔的情况下,液滴将在室内展开然后通过表面张力被导入孔内。

[0092] 在一个实施例中,本发明的出口包括一个微流体通道,其直径为几百微米。

[0093] 在一个实施例中,微流体通道为矩形(如具有矩形截面)。在另一个实施例中,微流体通道具有圆形截面。

[0094] 离散化——液滴产生和贮藏

[0095] 在一个实施例中,本发明包括任何结构或系统的液滴产生器,其能划分液体样品为大量液滴(如数千或百万液滴)。在一个实施例中,液滴产生器包括但不限于流动聚焦、交叉流动、共流动、阶梯乳化试剂和微通道乳化的结构。P. Zhu和L. wang (2017) 描述了一些产生液滴的技术,其内容被完整的参考引用。

[0096] 在一个实施例中,本发明的液滴产生器是基于剪切力原理的液滴产生装置,该装置利用剪切压力将流体挤压成小液滴。在一个实施例中,基于液滴产生装置的剪切液滴包括但不限于包括交叉流动结构、共流动结构和流动聚焦结构的装置。

[0097] 在一个实施例中,本发明的液滴产生器是一个基于表面张力的液滴产生装置,其中表面张力是液滴破碎过程中的主要驱动力。在一个实施例中,基于表面张力的液滴产生装置包括但不限于那些包含T-结构与阶梯乳化剂相结合的结构以及微通道乳化结构的装置。

[0098] 在一个实施例中,本发明的液滴产生器包含W02016189383A1所描述的液滴产生结构,该内容被完整的参考引用并入本发明内容中。

[0099] 在一个实施例中,能产生液滴的方法可以在本发明中使用以产生液滴。包括但不限于高剪切搅拌、超声乳化、高压均质化和膜乳化。

[0100] 在一个实施例中,本发明的液滴产生器包括一个流体聚焦结构,其压缩流体来强化聚焦效应。在一个实施例中,流动聚焦结构是一个2D平面流动聚焦结构。图4显示了一个液滴产生器的实施例,该液滴产生器包括流动聚焦结构和在其下游与液滴产生器结合的液滴贮藏室。在图4中,中央通道的样品被流体从侧通道剪切并分裂为小液滴,然后这些小液滴由于毛细作用力被液滴贮藏室吸进去。

[0101] 在一个实施例中,本发明的液滴产生器包括一个交叉流动结构,其允许连续相和分散相以特定角度 θ 相交。在一个实施例中,本发明的液滴发生器包括T型,Y型,双T型,K型或V型接合的结构。

[0102] 在一个实施例中,本发明的液滴产生器包括一个共流动结构,在这个结构中分散的流体线路被周围的流动连续相剪断。在一个实施例中,共流动结构是2D平面共流动结构。

[0103] 在一个实施例中,本发明的液滴产生器包括一个阶梯乳化结构。在一个实施例中,本发明的液滴产生器包括与水平或垂直的T型结构结合的一个阶梯乳化结构

[0104] 在一个实施例中,本发明的液滴产生器包括一个微通道乳化结构。

[0105] 在一个实施例中,本发明的液滴产生器包括W02016189383A1中描述的液滴产生结构,该发明内容被完整的参考引用作为本发明的内容。

[0106] 在一个实施例中,负责液滴产生的液滴产生器的组件或部件(如样品离散化)具有疏水表面。其可以通过在组件或部件的表面包被与疏水基团耦合的化学表面来实现。在一个实施例中,表面活性剂如司班80、吐温20或Abil EM 90被加入油相或水相来避免液滴聚结或防止分子如酶、DNA或RNA粘附到固体表面或水-油界面。

[0107] 在一个实施例中,产生的液滴为乳化液滴,并且不限于特殊类型的乳液。在一个实施例中,乳液,包括但不限于,水包油、油包水及水-油-水双乳液。

[0108] 在一个实施例中,油和表面活性剂被用于产生液滴。在一个实施例中,表面活性剂与油的比例是1~5%(重量百分比)。在一个实施例中油被用于产生液滴包括但不限于矿物油、硅油、氟化油、十六烷和植物油。在一个实施例中,使用的表面活性剂包括但不限于曲通80、吐温20/80, ABIL EM 90和磷脂质。Baret和Jean-Christophe (2012) 描述了表面活性剂可以用于液滴微流控中,该内容被完整的参考引用并入本发明内容。

[0109] 本发明的液滴贮藏室可以是能持有或保留液滴的任何模块,包括但不限于由液滴产生器产生的液滴。在一个实施例中,本发明液滴贮藏室的设计取决于后续步骤要进行的反应或测定所需的液滴总数和体积。

[0110] 在一个实施例中,本发明液滴贮藏室的大小大于所产生液滴的总体积。在一个实施例中,本发明液滴贮藏室的高度是所产生的液滴直径的1-1.5倍。如图3所示,液滴贮藏室的高度是液滴直径的1-1.5倍;液滴在单层配置的液滴贮藏室伸展。

[0111] 在一个实施例中,本发明的液滴贮藏室与本发明的液滴产生器连接,那样产生的液滴通过毛细作用被吸入液滴贮藏室。在一个实施例中,液滴以特殊方式堆积分散在液滴贮藏室中。在一个实施例中,液滴被松散的或无规则的堆积散布在液滴贮藏室内。

[0112] 在一个实施例中,液滴以特定或预定方式分散,液滴贮藏室包括用于锚定液滴到液滴贮藏室的预设位置的多排锚定结构。在一个实施例中,锚定结构采用支柱形式如以捕获单个液滴的方式排列的柱(图5)。当液滴穿过液滴储存室时,它们将被困在柱之间的空间中。在一个实施例中,锚定结合凹槽形式,通过表面张力捕获单个液滴(图6)。在一个实施例中,本发明的液滴贮藏室包括锚定结构或本领域所述的等同物,如Abbyad (2010) 和Huebner (2008) 所述的内容,这些内容被完整的参考引用并入本发明内容。

[0113] 在一个实施例中,液滴被随机分散排布,在液滴贮藏室内没有锚定结构。

[0114] 液滴的特征

[0115] 在一个实施例中,本发明产生的或使用的液滴数量、大小(如直径)、体积和乳剂类型取决于本发明使用后续所需的处理和分析。

[0116] 在一个实施例中,产生的液滴的数量范围为几百至几百万个。

[0117] 在一个实施例中,产生的液滴的大小范围为约5微米至约200微米。

[0118] 在一个实施例中,产生的液滴的体积范围为约0.65fL(飞升)至约4nL(纳升)。

[0119] 在一个实施例中,产生的液滴是统一直径的。在一个实施例中,产生的液滴具有变异系数小于5%的统一直径。在另一个实施例中,不同直径的液滴通过调整加载压力产生。

[0120] 总的来说,同时在一个特殊测定中待处理和分析的液滴的大小和体积是相当一致的,从而最小化由于液滴大小和体积差异导致的对结果的影响。

[0121] 在一个实施例中,通过本发明产生的每一个液滴包含不超过一个拷贝或者一个的后续步骤中待分析的靶标分子(如细胞、外泌体或某种类型的生物分子)。在一个实施例中,要产生的液滴的数量和导入的用于产生液滴的样品体积以某种方式被调整,那样每一个产生的液滴可以包含不超过一个靶标分子。分配靶标分子到大量液滴中的数字方法理论上遵循泊松分布原理(Majumdar, 2015)。因此通过计算包含一个或多个靶标分子拷贝的液滴数量可以量化靶标分子。为了实现绝对量化,每一个液滴应该包含不超过一个拷贝的靶标分子。一般,假如液滴的数量与靶标分子的数量比例不大于10,根据泊松分布原理,超过99%的液滴将包括不超过一个拷贝的靶标分子,而假如比例为3时百分率将会为96%。例如使用本发明来数字量化外泌体时,使用比预期的外泌体数量多10倍的抗体耦合珠子来确保每个珠子捕获不超过一个靶标外泌体用于绝对量化。或者,如果不保证每个液滴具有单个拷贝的靶标分子的情况下(即,一些液滴可能包含多于一个拷贝的靶标分子),则使用泊松统计学来计算靶标分子的绝对数量(Majumdar, 2015)。

[0122] 本发明所说的“拷贝”并不是仅仅是指通常意义的核酸的拷贝的含义,是指靶标分子的数量,例如一个样品中的一个蛋白分子可以成为一个拷贝,一个核酸分子可以成为一个拷贝的核酸,一个多肽链分子可以称之为一个拷贝的多肽,所以这里拷贝的一个单位量词,可以是按个数计量的单位。或者,一个细胞也可以称之为一个拷贝的细胞,实际上是指一个细胞的意思,当存在两个细胞的时候,可以称之为2拷贝的细胞,虽然每一个细胞不一样,但是仅仅是指两个细胞,仅仅是数量的意思。所以,当使用拷贝来衡量某一个特定的标记物质或者被分析物质(核酸,DNA or RNA)的时候,仅仅表示标记物质的数量,并不表明这些标记物质或者靶标分子是否是同一类型的物质。例如1拷贝的DNA或RNA的时候,仅仅表示DNA或者RNA存在的数量,并不一定表示他们是否是一样的。当说是2拷贝的DNA的时候,并不表示2个DNA是属于同样的DNA,DNA可以是同样的,也可以是不同的。例如,样品中一个是A病毒的DNA,另一个是B病毒的DNA,这个时候可以说2拷贝的DNA,例如一个液滴中包括1拷贝的A病毒的DNA,或者包括2拷贝的病毒DNA,这个时候2个病毒的DNA可以是2个A病毒的DNA,或者2个B病毒的DNA,在或者一个A病毒的DNA和一个B病毒的DNA。

[0123] 在一个实施例中,本发明的液滴产生器产生液滴的大小和数量足以精确量化样品中靶标分子来实现高动态范围。通常对于数字分析技术,该技术用于区分待检测的靶标分子,检测的动态范围(如用数字分析技术精确检测靶标分子的数量范围)是由两个主要参数决定的:液滴的大小和总数,其受产生液滴装置的区分能力限制。例如据报道典型的数字PCR的动态范围为0-10⁶,意味着如果靶标核酸分子超过10⁶copies/ μ L的限制,典型dPCR不能决定样品中靶标核酸分子的绝对数量。从统计来讲,超过靶标分子3-10倍的液滴在检测中具有更高的精确性,但动态范围更小。另一方面,利用泊松分布可以获得更大的动态范围(Majumdar, 2015)。

[0124] 多个液滴的多重反应

[0125] 如图10所示,本发明提供了用于在所有液滴开展多重反应以及对每一个液滴中的靶标分子进行实时检测和量化的平台。与现有基于液滴的技术中的终点测量不同,本发明可以提供更高效精确的诊断。

[0126] 在一个实施例中,本发明包括在由集成液滴微流体系统产生的液滴中开展多重反应的步骤。

[0127] 在一个实施例中,本发明允许在不同液滴中以平行的方式大规模同时进行相同类型或不同类型的测定。

[0128] 在一个实施例中,同样的平台可以用于液滴贮藏、开展后续反应或测定及检测靶标分子。例如,当液滴分散到本发明的液滴贮藏室时反应就可以进行了。在另一个实施例中,用于开展后续反应或测定的平台,与用于检测靶标分子的平台是不同的。如当需要检测DNA的时候,本发明使用液滴产生器产生液滴,PCR管来贮藏液滴然后置于PCR热循环仪进行反应,最后液滴读取器检测靶标分子并产生可读出的荧光信号。

[0129] 当然,存储液滴和反应可以在同一个存储装置中进行,例如存储是微孔芯片的形式存在,则进行反应的时候,也用同样的存储芯片进行扩增反应,然后对芯片反应的结果进行检测。

[0130] 在一个实施例中,划分样品为很多单独的液滴并分散到液滴贮藏室后,本发明方法和装置在液滴贮藏室的每一个液滴中同时开展一个反应,反应可以是相同或不同类型。本发明允许在一个液滴中开展的反应独立于其他液滴中的任何其他反应,因此为执行各种生物测定时提供了很高的灵活性。

[0131] 这里所说的“反应”是指单独一个液滴的反应,具体是指液滴中包括反应所必须的物质,可以用来表明一个或者多个靶标分子是否存在,例如具有多个液滴的时候,每一个液滴的反应是不同,所针对的靶标分子也是不同的,例如一个液滴进行核酸的测试,另一个液滴进行抗体抗原的反应,在另外一些液滴存在化学显色反应。当然,也可以认为,在一些单独的液滴中存在A类特定目的DNA片段的DNA的扩增反应,在另外一些单独的液滴中进行B类特定目的DNA片段的扩增反应,还可以是在不同的液滴中进行不同的RNA的反应,例如一个液滴中进行信使RNA扩增,另一个液滴中进行转录RNA的反应。这样可以在单独的液体中进行单独的不同反应,可以实现不同靶标分子的测试。

[0132] 在一个实施例中,离散化后开展的反应是靶向靶标分子的反应,这样靶标生物分子可以在后续步骤中被检测或量化。在一个实施例中,反应是本领域任何可兼容的生物测定。在一个实施例中,选择要开展的反应取决于靶标生物分子的属性。

[0133] 在一个实施例中生物分子是核酸、蛋白或小分子。

[0134] 在一个实施例中,生物分子是游离分子包括但不限于游离DNA(cfDNA),游离蛋白、外泌体和液体中循环的游离分子。在一个实施例中,生物分子是附着于细胞表面或在细胞内的分子。

[0135] 在一个实施例中,生物分子是源自一个主体或外源体的各种类型(如DNA包括cDNA, RNA包括mRNA和rRNA)、形式(如单链、双链、螺旋的、作为质粒载体、非编码的或编码的)、长度(如寡核苷酸、基因、染色体及基因组DNA)的核酸。

[0136] 在一个实施例中,生物分子是一种蛋白,即肽或多肽蛋白,包括完整蛋白质分子、降解的蛋白质分子和蛋白质分子的消化片段。在一个实施例中,生物分子包括但不限于源

自一个主体或外源体的抗原、受体和抗体。

[0137] 在一个实施例中,生物分子是小分子如代谢物。在一个实施例中,代谢物是疾病相关代谢物能指示存在疾病或健康状态的程度。在一个实施例中,代谢物是药剂相关代谢物,如主体服药后其药物水平改变的药物副产品。

[0138] 在一个实施例中,靶标生物分子是由肿瘤或癌症产生的分子,或由主体的身体应答肿瘤或癌症产生。

[0139] 在一个实施例中,靶标生物分子不常在健康主体中发现。在一个实施例中,靶标生物分子是常在健康主体中发现的但其水平指示特殊疾病或健康状态。

[0140] 例如,核酸生物分子可能需要用聚合酶链式反应 (PCR) 用互补引物扩增,而蛋白生物分子可能需要用识别某种蛋白表位的抗体杂交。

[0141] 在一个实施例中,核酸可以被检测和量化的情况下,反应包括但不限于聚合酶链式反应 (PCR),反转录PCR (RT-PCR)、实时PCR和实时RT-PCR、反转录、标记、消化、印迹过程、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、放射免疫分析 (RIA)、免疫分析和酶促测定。例如ddPCRTMEGFR外显子19缺失筛选试剂盒 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 用于筛选EGFR基因外显子19中缺失的突变15。此试剂盒也可检测EGFR外显子19的这个区域的其他缺失。EGFR外显子19缺失通常与黑素瘤,结肠直肠癌和肺癌相关。

[0142] 在一个实施例中,要检测和量化蛋白质属性的生物分子(如蛋白、肽、抗体),反应包括但不限于基于ELISA的反应,通过靶标特异信号基团标记靶标蛋白,以及通过靶标蛋白催化或抑制的反应。例如 α -突触核蛋白发现试剂盒 (QuanterixTM) 可用于检测 α -突触核蛋白(α -突触核蛋白)的存在,其具有形成毒性可溶性寡聚体(即原纤维)的倾向,其最终聚集成不溶性原纤维。据报道, α -突触核蛋白与帕金森病,帕金森病痴呆,路易体痴呆和可能的阿尔茨海默病的发病机制有关。

[0143] 在一个实施例中,要检测和量化外泌体的情况下,反应包括但不限于那些用于标记、检测或量化具有特异外泌体的生物分子。例如用靶标蛋白多糖 (GPC-1) 量化外泌体,一个外泌体膜蛋白,其在癌症外泌体上的表达更高于非癌症外泌体上的,从各种外泌体分组蛋白生物标记物就能区分来自乳腺癌患者和健康人群的血清样品 (Liu, 2018)。在一个实施例中,携带一种或多种特异生物分子的外泌体的绝对数量可以从数字上通过ExoELISA方法确定。在一个实施例中,使用的方法如Liu (2018) 所述,该内容被完整的参考引用如本发明内容。

[0144] 在一个实施例中,靶标分子(可选择与非靶标分子一起)从外泌体中被提取然后利用本发明检测和量化 (Chen, 2013; Li 2018),代替样品中外泌体的检测和量化。然而在另一个实施例中,利用本发明方法同时检测和量化外泌体和靶标分子,包括但不限于例2所述方法。对于特殊疾病或鉴于本发明公开的和本领域公知的内容,本领域技术人员将有能力选择适当的分析方法。

[0145] 在一个实施例中,当病原菌要被检测和量化时,反应包括但不限于那些用于标记、检测或量化病原特异生物分子如DNA、RNA或病毒/细菌抗原的反应。例如可以通过使用适当的试剂盒及液滴数字PCR来量化人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的DNA,从而检测和量化HIV。可以相信HIV的DNA与抗逆转录病毒治疗 (cART) (Strain 2013) 相结合对患者中残留的感染提供了最敏感的测量。

[0146] 在一个实施例中,反应在产生的每一个液滴中实施进行。

[0147] 在一个实施例中,在每一个液滴中进行的反应是相同的类型。在另一个实施例中,在每一个液滴中进行的反应是不同的类型。然而在另一个实施例中,在部分液滴中进行的反应是相同类型,而在其他液滴中进行的反应是不同类型。

[0148] 在一个实施例中,用于在每一个液滴中进行反应的操作条件(如温度、压力和持续时间)是相同的。在一个实施例中,在每一个液滴中进行反应的一种或多种操作条件是不同的。

[0149] 在一个实施例中,为了识别并标记液滴中的靶标生物分子,靶标特异的组分被包括在反应中。在一个实施例中,靶标特异组分是能特异识别靶标生物分子的分子,其可以通过结构识别、功能识别或两者兼有。

[0150] 在一个实施例中靶标特异组分被用来识别和标记液滴中生物分子的特异类型和种类。在一个实施例中靶标特异组分是包括核酸的引物或探针,这些核酸包含与靶标核酸互补的序列。在一个实施例中靶标特异组分是探针、抗体或能识别靶标生物分子如蛋白、肽和病毒颗粒具有的特异表位或空间配置的等同体。

[0151] 在一个实施例中,靶标特异组分是被靶标生物分子加工过(如消化、降解、氧化或其他修饰)的分子。例如酶是靶标生物分子的情况下,靶标特异组分可以是小分子底物,经受酶的酶促反应催化。

[0152] 在一个实施例中,靶标特异组分包括一种或多种信号产生基团,能产生可检测信号,那样可以在后续的检测和分析中检测并量化靶标生物分子。

[0153] 在一个实施例中,产生信号基团包括但不限于化学发光、荧光和发色底物,以及能转换出可检测产物的其他底物。

[0154] 数字检测和量化靶标生物分子

[0155] 在一个实施例中,本发明包括使用能指示靶标分子的可检测信号的方法或装置检测靶标分子。

[0156] 在一个实施例中,本发明方法包括指示信号的绝对数测量步骤,该信号指示靶标生物分子的存在,然后量化靶标生物分子绝对数。在一个实施例中,本发明测量如本文所述的信号产生基团产生的信号。

[0157] 在一个实施例中,本发明的方法包括来自大量液滴中特殊信号的单独的数字测量步骤。数字的意味着信号要么是一要么是零。例如具有荧光的液滴被称为“阳性”(即液滴包含靶标分子),不具有荧光的液滴为“阴性”(即液滴中不存在靶标分子)。

[0158] 在一个实施例中,待测的信号是荧光信号,使用能捕获荧光信号并测量荧光信号强度的系统或装置。在一个实施例中,电荷耦合器件(CCD)被用来捕获荧光信号,在室内或芯片上产生荧光液滴图像。通过计算荧光液滴数量和每一滴液滴的荧光信号强度,荧光信号可以被处理和分析。在一个实施例中,使用专有的图像处理代码处理和分析测出的荧光信号。图8显示了通过CCD相机获得的液滴的荧光图像。

[0159] 在一个实施例中,每个单独液滴中仅检测和量化一种类型的生物分子。

[0160] 在一个实施例中每个单独液滴中检测和量化两种或多种类型的生物分子。例如在一个单独液滴中可以一个接一个的测量和量化蛋白、核酸、外泌体和/或其他类型的生物分子。

[0161] 在一个实施例中,每个单独液滴有两种或多种相同类型的生物分子需要测量和量化,例如每个单独液滴有两种或多种核酸(即DNA分子和RNA分子)需要被测量和量化。

[0162] 在一个实施例中,当每个单独液滴有两种或多种生物分子要被测量和量化时,首先测量和量化每个单独液滴中的一个类型的生物分子,然后测量和量化每个单独液滴中的另一个类型的生物分子,等等。例如首先测量和量化每一个单独液滴中的一种或多种核酸,然后测量和量化每一个单独液滴中的一种或多种肽。

[0163] 在一个实施例中,一个液滴中测量和量化的生物分子的类型不同于其他液滴中测量和量化的生物分子类型。

[0164] 在一个实施例中,本发明每次运行检测1-5个生物分子类型。在另一个实施例中,本发明每次运行检测6-10种生物分子类型。然而在另一个实施例中,本发明每次运行检测11-20种生物分子类型。

[0165] 在一个实施例中,本发明每次运行检测1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种类型的生物分子。

[0166] 下游用途

[0167] 在一个实施例中,可任意收集产生的液滴用于后续的贮藏或下游分析。在一个实施例中,从本发明的集成液滴微流体系统的出口收集液滴。可以裂解收集的液滴来提取和回收液滴中的生物材料。例如之前反应中扩增的DNA产物可以从液滴中回收,并用于进一步处理如新一代测序。

[0168] 在一个实施例中,从出口收集所有产生的液滴,裂解来获得他们内含物的悬浮液。然后利用这里所述方法和装置划分悬浮液为液滴并进行分析。

[0169] 在一个实施例中,从出口收集所有产生的液滴,然后分选含有靶标分子的液滴。例如,收集的液滴可以被加载到微流体分选装置用来筛选。简单的说,收集的液滴被注入分选装置作为单分散乳液,液滴乳液与不含表面活性剂的氟化油保持分离。当液滴通过具有交流电电场(AC)的分选结点时液滴被转向(Baret, Jean-Christophe, 2009)。

[0170] 在一个实施例中,进一步处理从出口收集的或分拣的液滴,例如添加试剂并在适当条件下孵化。

[0171] 实例2-5描述了利用本发明检测不同类型的生物分子。接下去的实例显示了本发明是如何用于检测或量化许多各种不同的指示疾病状态的生物分子。然而本领域技术人员将容易理解,本发明所提供的实施例和描述仅用于说明目的,并不意味着限制本发明的范围,本发明的范围有后面的权利要求界定。

[0172] 通过DNA和RNA的共检测和量化来检测微生物

[0173] 在一个实施例中,本发明提供了样品如食物、饲料和植物或任何从中衍生的溶液或悬浮液中存在的病原微生物的检测方法。本方法对于确保食品安全以及预防微生物传播有着重要作用。

[0174] 在一个实施例中,用于检测病原微生物的方法包括检测和量化指示疑似病原微生物存在的生物分子的步骤,其中该方法划分样品为液滴,并利用这里所述方法和装置对靶标病原微生物进行数字检测和分析。在一个实施例中,待测的生物分子是靶标病原微生物具有的核酸和/或蛋白。

[0175] 在一个实施例中,通过本发明检测和量化靶标病原微生物的多种核酸类型。因为

病原物的基因组组成为DNA、RNA或两者兼有,能同时高效敏感扩增并检测靶标RNA和DNA的多功能检测或诊断工具在临床实践中非常有用。例2提供了在单分子水平共同检测DNA和RNA的实例。通过检测或量化DNA或RNA相关的生物标记物,本发明可以用于检测任何包含这些DNA或RNA生物标记物的活的或死的生物、组织、细胞和基团。

[0176] 在一个实施例中,通过本发明同时检测和量化病原微生物的核酸和蛋白。

[0177] 共同检测与量化核酸与蛋白

[0178] 在一个实施例中,本发明提供了共同检测样品中核酸和蛋白的方法

[0179] 在一个实施例中,本发明提供了用于共检测和/或量化指示某种疾病或健康状态的一种或多种蛋白标记物和一种或多种核酸标记物的方法,从而决定主体中存在某种疾病或健康状态。

[0180] 例3提供了共检测和量化某种蛋白标记物和核酸标记物的实例,用于实体瘤转移之前检测。

[0181] 例如,据报道四种蛋白生物标记与一个基因标记(KRAS突变体)结合可增加胰腺癌检测的敏感性(Cohen,2017),血液测试可以通过循环蛋白水平(8个蛋白)和游离DNA的突变(16个基因)的评估检测八种普遍的癌症类型(卵巢、肝、胃、胰腺、食道直肠、肺和乳腺)(Cohen,2018)。

[0182] RNA(mRNA)共同检测和量化蛋白和信使RNA(mRNA)

[0183] 在一个实施例中,本发明提供样品中蛋白和mRNA的共同检测方法。例4提供了样品中蛋白和信使RNA的共同检测和量化的方法。

[0184] 来自同一细胞的蛋白和mRNA的集成共检测可能不仅揭示了两类重要的生物分子间的联系,也有助于转录和翻译水平上了解基因调控的机制共同检测和量化外泌体中DNA、RNA和蛋白

[0185] 在一个实施例中,本发明提供了外泌体中DNA、RNA和蛋白的共同检测和量化方法。在另一个实施例中,本发明提供了以绝对方式定量样品中外泌体的方法。

[0186] 例5提供了单个外泌体中DNA、RNA和蛋白的共同检测和量化的实例,以及样品中外泌体的绝对数量。

[0187] 含有生物分子的外泌体在其内腔和脂质膜上具有DNA、RNA和蛋白。这些分子可以从样品如血清中分离的外泌体中提取。利用本发明,可以通过ExoELISA方法从数字上获得外泌体的绝对数,或利用数字PCR或数字ELISA获得单个生物分子如DNA、RNA或蛋白的绝对数。关于生物分子的数量信息可以被耦合或合并以用于诊断目的或其他用途。

[0188] 生物测定结果的有效性评估

[0189] 在一个实施例中,根据上述步骤确定的靶标生物分子的数量,本发明提供了评价生物测定结果有效性的方法。例如发现样品中靶标生物分子的数量低于分子测定的检测限制,或样品中DNA和RNA分子的相对数量被发现低于正常范围的情况下,通过生物测定获得的结果可能不准确。可能需要最新收集的样品或原样的浓度来证实该结果。

[0190] 确定和评估主体的健康状态

[0191] 在一个实施例中,根据本文所述方法或装置确定的靶标生物分子的数量,本发明提供用于确定或评估主体健康状态的方法。

[0192] 由于本发明以高特异性和敏感性方式对靶标分子提供了精确量化,本发明能显著

感觉生物标记诊断测定的敏感性、特异性和准确性,特别是那些依赖于生物标记绝对数量的测定。例如通过对主体中的癌细胞类型或病原物提供精准的绝对计数,本发明能区分各种风险水平,感染水平或不同癌症阶段的患者。

[0193] 在一个实施例中,根据本文所述的方法或装置确定的靶标生物分子的数量,本发明方法包括明确存在或不存在指示主体疾病或健康状况的状态的步骤。

[0194] 在一个实施例中,根据本文所述的方法或装置确定靶标生物分子的数量,本发明方法包括确定疾病进展阶段的步骤。

[0195] 在一个实施例中,根据本文所述方法或装置确定靶标生物分子的数量,本发明方法包括评估主体的药物反应步骤。

[0196] 在一个实施例中,利用本发明方法或装置可以被检测或诊断的疾病包括,但不限于癌症、传染基本、内分泌基本、带线基本、遗传基本、神经系统和感觉器官疾病、循环系统疾病、呼吸系统疾病、消化系统疾病、泌尿生殖系统疾病、皮肤和皮下组织疾病、肌肉骨骼系统和结缔组织疾病,以及先天性异常。

[0197] 在一个实施例中,本发明提供了对含有所述靶标生物分子的样品中靶标分子的实时和数字计数方法。该方法包括以下步骤:

[0198] b) 为液滴产生器提供所述样品和适合所述方法的试剂;

[0199] c) 用所述液滴产生器产生液滴,其中一些液滴含有所述试剂和所述靶标生物分子;

[0200] d) 允许所述试剂标记所述靶标生物分子,产生荧光信号;

[0201] e) 从所有液滴中检测荧光信号;并

[0202] f) 转换所述信号为数值来获得样品中靶标生物分子的总数。

[0203] 在一个实施例中,本发明提供对样品中含有靶标生物分子的细胞或外泌体的实时和数字计数方法,该方法包括以下步骤:

[0204] a) 为液滴产生器提供所述样品和适合所述方法的试剂;

[0205] b) 用所述液滴产生器产生液滴,其中一些液滴含有所述试剂和所述细胞或外泌体;

[0206] c) 允许一些试剂裂解所述细胞或外泌体来释放靶标生物分子,然后一些试剂用来标记靶标生物分子,产生荧光信号;

[0207] g) 从所有液滴中检测荧光信号;并

[0208] h) 转换所述信号为数值来获得样品中细胞或外泌体的总数。

[0209] 在本发明方法的一个实施例中,其中步骤b中所述一些液滴的每一滴包含不超过一个拷贝的相同类型靶标生物分子。在一个实施例中,其中所述一些液滴中的每一滴包含不超过一个拷贝的细胞或外泌体。

[0210] 在本发明方法的一个实施例中,其中在步骤c中待标记的靶标生物分子是相同类型或不同类型。

[0211] 在本发明方法的一个实施例中,其中该方法可检测1-10种类型的靶标生物分子。

[0212] 在本发明方法的一个实施例中,其中靶标生物分子可以从由核酸、肽、蛋白、酶、病毒和微生物组成的群组中选择。

[0213] 在本发明方法的一个实施例中,其中核酸可以从由编码DNA,非编码DNA,信使RNA,

核糖体RNA,小RNA和转录RNA组成的群组中选择。

[0214] 在本发明方法的一个实施例中,其中在实时情况下步骤c和d可以同时进行来检测荧光信号。

[0215] 在本发明方法的一个实施例中,其中当靶标生物分子在步骤c中被标记时,步骤d可以连续或间歇的进行。

[0216] 在本发明方法的一个实施例中,步骤c-e的任意一步之后,该方法进一步包括收集液滴步骤。

[0217] 在本发明方法的一个实施例中,收集的液滴被分裂来获得含有标记靶标生物分子的悬浮物。

[0218] 在本发明方法的一个实施例中,收集的液滴被导入液滴分拣单元来选择含有特殊类型的或具有特殊性质的靶标生物分子。

[0219] 在本发明方法的一个实施例中,该结构选自自由流动聚焦结构,交叉流动结构,共流动结构,阶梯乳化乳剂结构和微通道乳化结构组成的群组。

[0220] 在本发明方法的一个实施例中,样品和试剂通过相同入口或不同入口被导入液滴产生器。

[0221] 在本发明方法的一个实施例中,其中荧光信号通过一种电荷耦合装置来检测。

[0222] 在本发明方法的一个实施例中,液滴的直径范围为 $5\mu\text{m}$ 至 $200\mu\text{m}$ 。

[0223] 在本发明方法的一个实施例中,产生液滴的数量范围为数百至数百万。

[0224] 在本发明方法的一个实施例中,其中该方法在集成液滴微流体系统中进行,该集成液滴微流体系统包括所述液滴产生器、液滴储存室,检测单元和多个微流体通道。

[0225] 在本发明方法的一个实施例中,其中所述靶标生物分子的总数指示一种疾病的不存在和严重程度。

[0226] 在一个实施例中,本发明提供了用来诊断主体疾病的方法,该方法包括确定主体样品中所述疾病生物标记物的绝对数量,其中所述绝对数量是通过使用本文所述任何一种方法确定的,其中所述生物标记物是样品中或样品的细胞或外泌体中存在的靶标生物分子,其中与对照相比,所述标记物的绝对数量指示所述主体中疾病的存在、严重程度或不存在情况。

[0227] 纵观本申请,各种出版物被引用。这些出版物的公开内容被完整的参考引用结合到本发明中,以更全面的描述本发明现有的技术。

[0228] 纵观本申请,应注意,与“包括”,“含有”或“特征在于”同义的过渡术语“包括”是兼容性的或开放式的,并且不排除其他的,未记载的原理或方法步骤。

[0229] 通过参考以下实施例将更好地理解本发明。然而,本领域技术人员将容易理解,所提供的实施例仅用于说明本发明的目的,并不意味着限制本发明的范围,本发明的范围由其后的权利要求界定。

[0230] 实施例子

[0231] 实施例子1-集成液滴微流体系统

[0232] 这个例子显示了集成在一个微流体芯片里的数字量化系统的一个实施例。这个微流体芯片由一个液滴产生器和一个液滴贮藏室组成。这个液滴产生器具有流体聚焦结构、T型或阶梯乳化乳剂结构。液滴贮藏室设计依赖于特殊测定所需的液滴总数和体积。室的高

度通常是液滴直径的1-1.5倍,室的大小大于液滴总体积。生成的液滴在微粒体芯片上的单层配置中展开。样品划分结束后,在所有的液滴中进行平行的原地反应。一旦反应结束,显微相机和一个X-Y运动站耦合在一起获取整个微流体芯片上的液滴图像。图像通过计算机处理进行数字计数和数据分析。

[0233] 单层配置意思是指在芯片上含有一层载体,在载体上分布有多个微孔,这些微孔中的每个孔中包括一个液滴。当然,并不是所有的微孔中都包括有液滴,可以部分具有或者部分微孔不具有。这里可以理解,芯片上含有多层载体,每层载体上包括多个微孔,部分微孔或者全部微孔中的每一个孔中包括一个液滴。多层载体之间、微孔之间通过毛细通道构成液体连通。所谓的液体连通就是指液体可以从一个地方流动到另外一个地方。

[0234] 图1显示了本发明的集成液滴微流体系统的一个实施例。

[0235] 图2显示了本发明的一个实施例,包括用于每一个液滴内生物分子的数字量化的集成液滴微流体系统。本微流体系统包括四个部分(从左至右):入口、液滴产生器、液滴贮藏室和出口。入口被用来把各种液滴(如油、用于开展反应的样品和试剂)导入液滴产生器,其中这些液体可以通过不同入口分别加载(如图2所示),或预混合为一种混合物通过同一个入口加载。准备好含有生物分子的样品,并通过液滴产生器划分成单个液滴;然后产生的液滴在液滴贮藏室(或者芯片上)的单层配置中展开。样品划分后,在单个液滴中进行平行的单独原地反应,其中,这些反应用来分析靶标生物分子测定中的一部分,不同液滴中的反应可以是相同的或不同的。一旦反应结束,如通过用显微相机捕获液滴贮藏室内液滴的图像,检测指示靶标生物分子存在的信号。然后计算机处理信号用来数字计数和数据分析。出口用来从系统中去除液体或气体。在一个实施例中,出口用来排出空气或油。在另一个实施例中,当反应后需要收集液滴时,可以通过出口从液滴贮藏室收集。

[0236] 例2-在分子水平共同检测和量化来自单个细胞/外泌体的DNA和RNA

[0237] 这个例子显示了用本发明来检测食品、饲料、植物或其他样品中存在的病原微生物的例子。这对提供安全食品以及防止微生物的传播是有重要意义的。由于病原物的基因组由DNA和/或RNA构成,能高效敏感扩增和检测DNA和RNA靶标的多功能诊断工具在临床实践中特别有用。

[0238] 对于DNA靶标,使用特异引物和共同封装在液滴中的试剂,数字PCR可以用于DNA分子的绝对计数。

[0239] 对于RNA靶标,数字RNA计数虽然可以通过反转录从细胞提取的RNA之后进行数字PCR来实现RNA的数字计数。然而这种RNA的绝对计数方法仅提供了细胞总和的平均值,因此仅揭示了细胞群体的平均基因型/表型性状。对于单个细胞或外泌体的RNA的绝对计数,可以使用如图9所示的系统,包括两个封装圈:一个用于单个细胞或外泌体,另一个用于单个mRNA分子。

[0240] 如图9的上图所示,单个外泌体(或也可以是单个细胞的情况下),磁珠上连接着对靶标RNA特异的引物,以及被液滴产生器封装在一个液滴中的用来裂解外泌体或细胞的裂解缓冲液。产生的液滴如图4所示。液滴产生后,他们被贮藏到右边的液滴贮藏室内。在每一个单独的液滴中,单个外泌体被裂解,然后其中包含的RNA被释放,与磁珠上靶标特异引物配对。然后从出口收集液滴用于后续分析。接着所有收集的液滴用溶剂(如全氟-1-辛醇)裂解来溶解油相,并获得带有单个细胞/外泌体RNA的水性磁珠悬浮液。加入洗脱溶液(如PBS)

到悬浮液,涡旋混合。然后混合物被置于磁性架,对后续的RT-PCR无用的组分与洗脱液一起被移液去除,同时那些与靶标RNA结合的磁珠被保留。

[0241] 如图10所示,外泌体裂解后来自外泌体的mRNA分子被释放,mRNA分子将与磁珠上的靶标引物结合。不必要的组分通过清洗步骤去除。生成的样品包含磁珠,其上具有与mRNA结合的引物,然后被封装进液滴用于mRNA的数字量化。

[0242] 如图9的下部所示,引物结合mRNA的磁珠与反转录混合物及PCR混合物混合(统称为rt-PCR混合物),然后加载到集成液滴微流体系统用于原位反转录以及PCR变温循环。如图3所示形式产生液滴,由于反转录和PCR是热启动反应,因此mRNA样品和rt-PCR反应混合物可以在封装之前预混合。然后通过显微相机数字检测荧光信号(如图9下部中液滴贮藏室里黑色的点所示),就可以计算来自单个细胞或外泌体的RNA靶标的绝对计数。

[0243] 图11显示了使用本发明的终点数字检测DNA的数据。实施PCR变温循环来扩增样品的靶标DNA。然后产生的混合物被划分成100000个液滴,后面这些液滴会在单层配置的液滴贮藏室内展开。指示存在靶标DNA的荧光信号通过照相机记录,用图像处理程序测量每一个液滴中的荧光信号强度。左侧图像记录了液滴贮藏室一个区域的液滴上检测到的荧光信号,接着右侧图像显示了液滴贮藏室另一个区域的每一个液滴产生的荧光信号的强度(每一个圆圈代表一个滴液,更高数值意味着更高水平的荧光信号)。然后根据检测到的信号计数靶标DNA的绝对计数。

[0244] 从细胞或外泌体群体检测多种RNA分子的情况下,一些细胞或外泌体可能不包含每一个种类的靶标RNA分子,或一些细胞或外泌体可能比其他细胞或外泌体包含更少或更多种类的靶标RNA分子。通过这里所述的两轮封装过程,本发明方法能从细胞或外泌体群体中提取单个分子,分析来自每一个细胞或外泌体的靶标RNA分子。群体中细胞或外泌体的数量,包含靶标RNA的细胞或外泌体的数量,来自每一个细胞或外泌体的靶标RNA分子的数量均可以用本文所述的测定确定(如ExoELISA和rt-PCR反应)。

[0245] 例3-共同检测和量化核酸和蛋白

[0246] 这个例子显示了利用本发明的集成液滴微流体系统检测核酸和蛋白的一个使用本发明的例子。

[0247] 在这个例子中,评估了一组用于检测多种实体瘤转移前的蛋白标记物和基因标记物。以蛋白标记物和基因标记物为基础的诊断通常会提供更加精确的诊断。

[0248] 数字PCR测定旨在对多种相关的DNA突变体,或在各种癌症类型中通常发生突变的驱动基因的多个区域同时量化评估。为了确认下游的应用,用于量化相关游离的蛋白标记物被设计用于测定。液滴数字ELISA可以与本发明的集成液滴微流体系统结合使用,用于游离蛋白的绝对计数。

[0249] 与单独使用任意一种标记物相比,蛋白标记物和基因标记物组合运用量化的结果将给出更精确更敏感的诊断。

[0250] 例4-共同检测和量化蛋白和信使RNA (mRNA)

[0251] 这个例子显示了使用本发明来检测蛋白和mRNA。

[0252] 对相同细胞的蛋白和mRNA的集成共检测不仅揭示两类重要的生物分子间的关联,而且有助于从转录和翻译水平了解基因调控的机制。

[0253] 例2所述的过程可以运用于本实例,用来检测和量化mRNA。例3所述的过程可以运

用于本实例,使用液滴数字ELISA来检测和量化蛋白。

[0254] 例5-共同检测和绝对计数外泌体中DNA、RNA和蛋白

[0255] 这个例子显示使用本发明内容来检测单个外泌体中的DNA、RNA和蛋白。

[0256] 外泌体在其内腔或其脂质膜上包含生物分子如DNA、RNA和蛋白。这些生物分子可以从分离自血清样品的外泌体中提取。根据本发明,具有特殊靶标的外泌体的绝对计数可以使用ExoELISA方法数字确定,或使用数字PCR或数字ELISA确定单个生物分子如DNA、RNA或蛋白的绝对计数。关于这些生物分子的技术信息可以被联合或汇总用于癌症类型的诊断分析。

[0257] 例2所述的过程可以运用于本实例,来检测和量化单个外泌体的DNA和RNA,例3所述的过程可以运用于本实例,使用液滴数字ELISA来检测和量化蛋白。

[0258] References:

[0259] 1.P.Zhu and L.Wang,“Passive and active droplet generation with microfluidics:a review”Lab Chip,2017,17,34-75.

[0260] 2.Baret,Jean-Christophe.”Surfactants in droplet-based microfluidics.”Lab on a Chip 12.3(2012):422-433.

[0261] 3.Liu,Chunchen,Xiaonan Xu,Bo Li,Bo Situ,Weilun Pan,Yu Hu,Taixue An,Shuhuai Yao,and Lei Zheng.”Single-exosome-counting immunoassays for cancer diagnostics.”Nano letters(2018).

[0262] 4.Matthew C.Strain,Steven M.Lada,Tiffany Luong,Steffney E.Rought,Sara Gianella,Valeri H.Terry,Celsa A.Spina,Christopher H.Woelk,and Douglas D.Richman”Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR.”PloS one 8.4(2013):e55943.

[0263] 5.Baret,Jean-Christophe,et al.”Fluorescence-activated droplet sorting (FADS):efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity.”Lab on a Chip 9.13(2009):1850-1858.

[0264] 6.Cohen,Joshua D.,et al.”Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers.”Proceedings of the National Academy of Sciences 114.38(2017):10202-10207.

[0265] 7.Cohen,Joshua D.,et al.”Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test.”Science(2018):eaar3247.

[0266] 8.Xu,X.,Yuan,H.,Song,R.,Yu,M.,Chung,H.Y.,Hou,Y.,Shang,Y.,Zhou,H.and Yao,S.,2018.”High aspect ratio induced spontaneous generation of monodisperse picolitre droplets for digital PCR”.Biomicrofluidics,12(1),p.014103.

[0267] 9.Liu,C.,Xu,X.,Li,B.,Situ,B.,Pan,W.,Hu,Y.,An,T.,Yao,S.and Zheng,L.,2018.”Single-exosome-counting immunoassays for cancer diagnostics”.Nano letters.

[0268] 10.Cohen,Limor,and David R.Walt.”Single-molecule arrays for protein and nucleic acid analysis.”Annual Review of Analytical Chemistry 10(2017):

345-363.

[0269] 11. Abbyad, Paul, et al. "Rails and anchors: guiding and trapping droplet microreactors in two dimensions." *Lab on a Chip* 11.5(2011): 813-821.

[0270] 12. Huebner, Ansgar, et al. "Static microdroplet arrays: a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays." *Lab on a Chip* 9.5(2009): 692-698.

[0271] 13. Nivedita Majumdar, Thomas Wessel, Jeffrey Marks, 'Digital PCR Modeling for Maximal Sensitivity, Dynamic Range and Measurement Precision' (2015), *PLoS ONE* 10(3): e0118833.

[0272] 14. Chen, Walter W., et al. BEAMing and droplet digital PCR analysis of mutant IDH1 mRNA in glioma patient serum and cerebrospinal fluid extracellular vesicles. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 2(2013).

[0273] 15. Li, Tianwen, et al. Plasma circular RNA profiling of patients with gastric cancer and their droplet digital RT-PCR detection. *Journal of Molecular Medicine* 96.1(2018): 85-96.

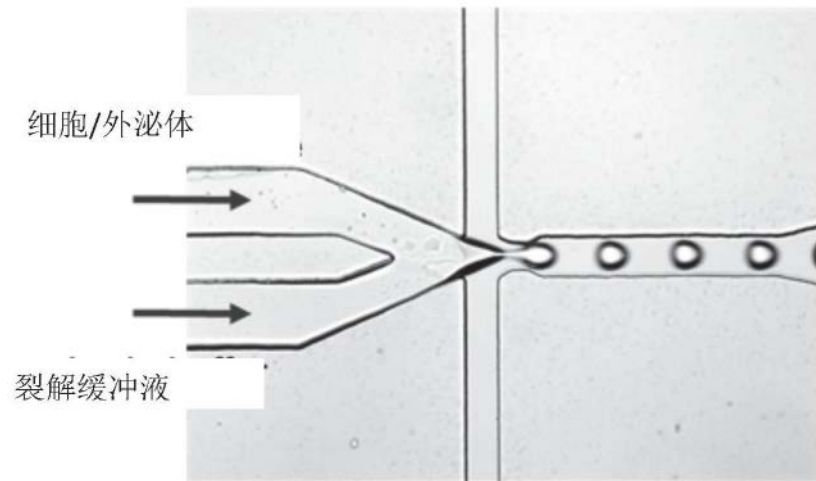


图4

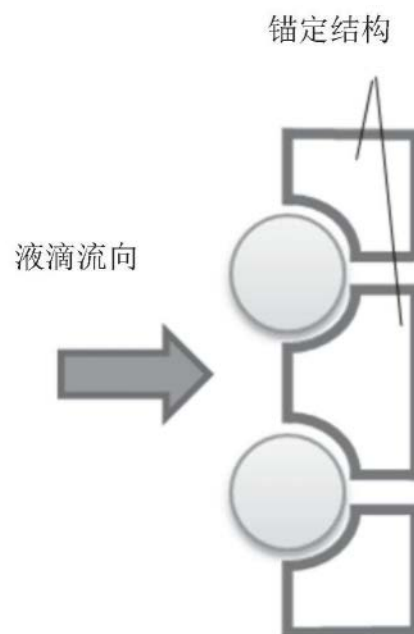


图5

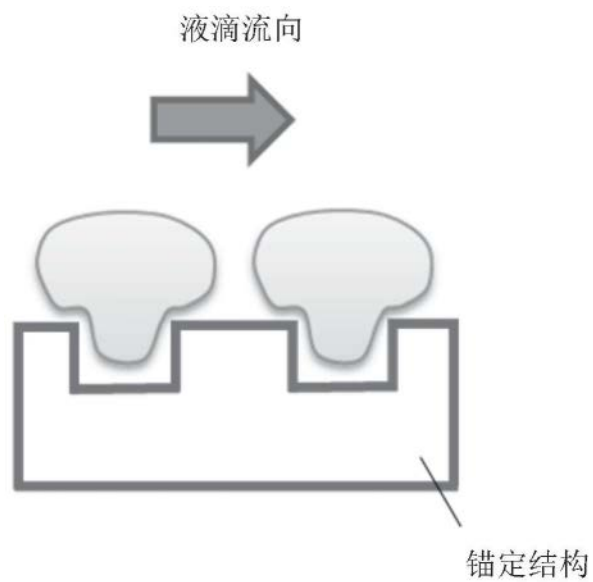


图6



图7

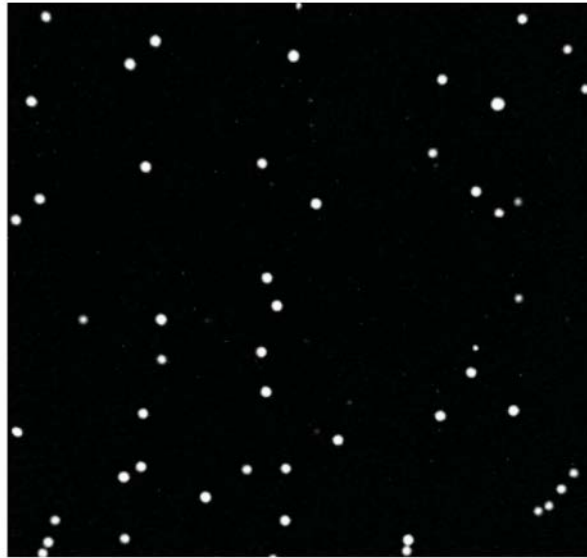


图8

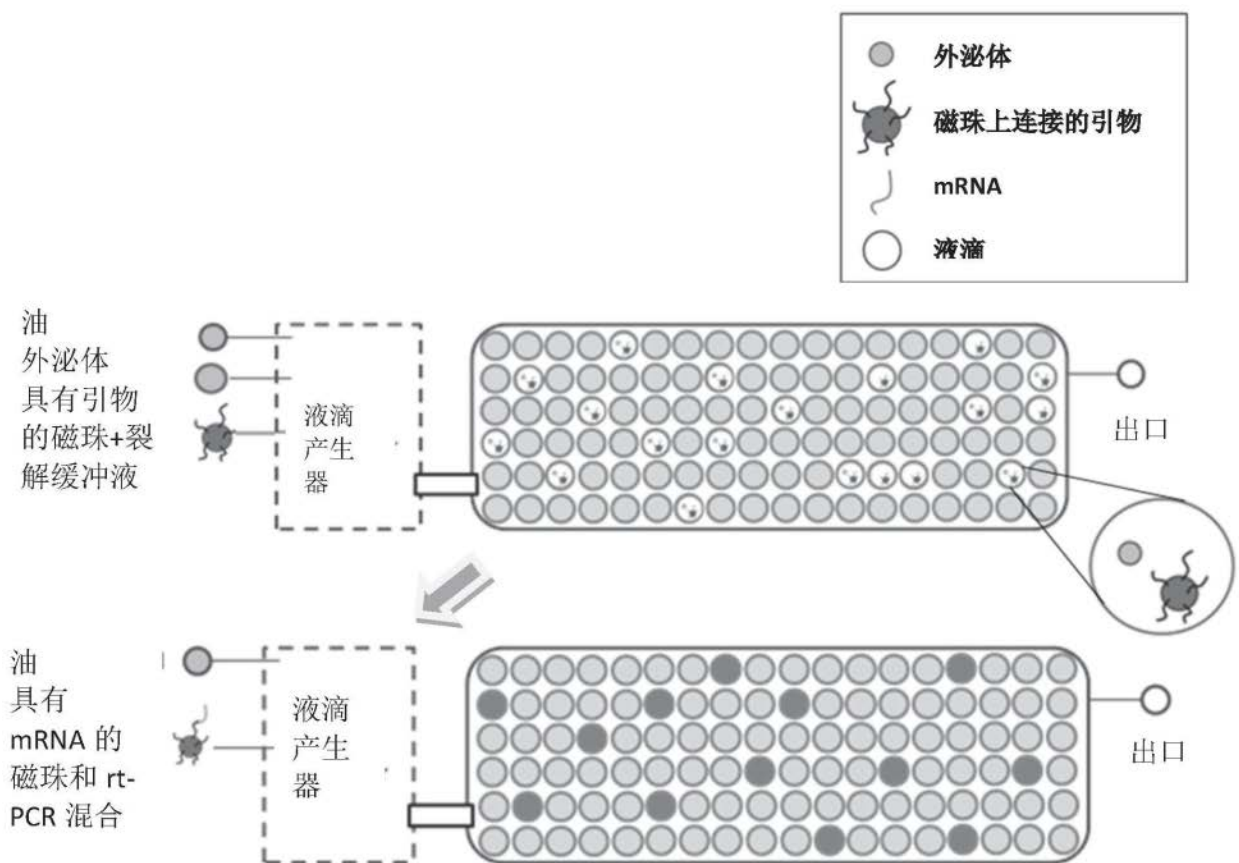


图9

