



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104471077 B

(45)授权公告日 2017.05.24

(21)申请号 201380038636.9

(22)申请日 2013.05.21

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104471077 A

(43)申请公布日 2015.03.25

(30)优先权数据  
61/649,845 2012.05.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2015.01.20

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2013/042086 2013.05.21

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/177206 EN 2013.11.28

(73)专利权人 富鲁达公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 梅甘·安德森 陈佩林  
布赖恩·福勒 菲奥娜·卡佩尔  
罗纳德·列波夫斯基 安德鲁·梅

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 王思琪 郑霞

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

(56)对比文件

US 2009/0317798 A1,2009.12.24,  
CN 101750476 A,2010.06.23,  
US 2011143955 A1,2011.06.16,

Silke Hollants.Microfluidic

Amplification as a Tool for Massive  
Parallel Sequencing of the Familial  
Hypercholesterolemia Genes.《Clinical  
Chemistry》.2012,第58卷(第4期),全文.

Yina Kuang.Simultaneously Monitoring  
Gene Expression Kinetics and Genetic  
Noise in Single Cells by Optical Well  
Arrays.《Anal. Chem.》.2004,第76卷全文.

Sandra L. Spurgeon.High Throughput  
Gene Expression Measurement with Real  
Time PCR in a Microfluidic Dynamic Array.  
《Plos One》.2008,第3卷(第2期),全文.

审查员 孙谦

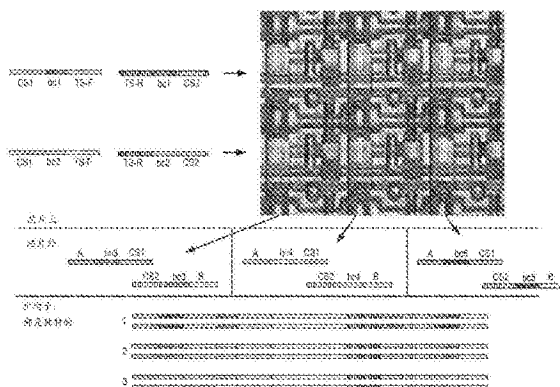
权利要求书2页 说明书48页 附图21页

(54)发明名称

颗粒群的单颗粒分析

(57)摘要

在某些实施方案中,本发明提供用于检验颗粒的群体中的单颗粒的方法和装置,其中针对每个颗粒测量至少两个参数。当颗粒在分别的反应体积中时,可以测量一个或更多个参数。可选择地或另外,可以在后分析步骤中测量一个或更多个参数,例如,当在分别的反应体积中进行反应并且回收和分析反应产物时。在特定的实施方案中,“平行”即在分别的反应体积中基本上同时地进行一个或更多个参数测量。



1. 一种检验多个颗粒中的单颗粒的方法, 其中每个颗粒包括所述颗粒中的或与所述颗粒相关的一个或更多个核酸, 所述方法包括:

在分别的反应体积中捕获所述多个颗粒以产生各自含有一颗粒的多个分别的反应体积以致各自具有仅一个颗粒的分别的反应体积的预计分数是分别的反应体积的总数目的至少35%;

确定每个分别的反应体积中的颗粒数目;

检验每个分别的反应体积中的每个颗粒的多个参数, 其中在每个分别的反应体积中检验至少一个所述参数, 并且其中所述检验包括:

对每个分别的反应体积中的每个颗粒进行多个反应以产生针对每个分别的反应体积中的每个颗粒的多种反应产物,

其中至少一种反应产物是扩增子, 所述扩增子通过包括使用至少两种扩增引物的核酸扩增的反应来产生, 其中每种扩增引物包含条形码序列;

其中所述分别的反应体积是微流体装置的分别的区室, 所述分别的区室被安置成由行和列界定的阵列, 其中每个扩增子中的第一条形码和第二条形码的组合辨识作为所述扩增子的来源的区室的行和列;

通过汇集来自行中或列中的区室的扩增子来回收所述分别的反应体积的内容物,

其中, 如果来自行中的所有区室的反应产物被汇集, 则行内的每一列具有独特的条形码组合, 或如果来自列中的所有区室的反应产物被汇集, 则列内的每一行具有独特的条形码组合;

分析所述反应产物以获得结果;

忽略来自不含有颗粒或含有多于单颗粒的任何反应体积的结果; 和

使所述检验的剩余结果与每个仅含有一个颗粒的分别的反应体积相关联以对处于分别的反应体积中的所述多个颗粒中的每个颗粒产生包含多个参数的数据集。

2. 根据权利要求1所述的方法, 所述方法另外包括优化所述捕获以致各自具有仅一个颗粒的分别的反应体积的预计分数是分别的反应体积的总数目的至少50%。

3. 根据权利要求1所述的方法, 所述方法另外包括优化所述捕获以致各自具有仅一个颗粒的分别的反应体积的预计分数是分别的反应体积的总数目的至少65%。

4. 根据权利要求1所述的方法, 所述方法另外包括优化所述捕获以致各自具有仅一个颗粒的分别的反应体积的预计分数是分别的反应体积的总数目的至少85%。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法, 其中在加入用于进行所述多个反应的一种或更多种试剂之前, 将所述颗粒捕获在分别的反应体积中。

6. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述颗粒是细胞。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述颗粒选自核酸、蛋白、碳水化合物、脂质及其组合。

8. 根据权利要求1所述的方法, 其中在所述方法中采用少于40,000个颗粒。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其中在所述方法中采用少于10,000个颗粒。

10. 根据权利要求1所述的方法, 其中被分配至分别的反应体积中的颗粒的数目大于10个。

11. 根据权利要求10所述的方法, 其中被分配至分别的反应体积中的颗粒的数目大于

100个。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中被分配至分别的反应体积中的颗粒的数目大于1000个。

13. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述捕获通过包括有限稀释的方法来进行。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中有限稀释包括:

制备颗粒悬浮液的一系列稀释液;

将来自每种稀释液的颗粒分配到微流体装置的分别的区室中;

确定每个区室中颗粒的数目; 和

选择产生最高数目的仅包含单颗粒的区室的稀释液, 用于在将单颗粒捕获在分别的反应体积中时使用。

15. 根据权利要求14所述的方法, 其中每个区室中的颗粒的数目通过亮视野显微术或荧光显微术来确定。

16. 根据权利要求14所述的方法, 其中采用染色剂、染料或标记物来检测每个分别的反应体积中的颗粒的数目, 其中所述染色剂是结合反应或检验混合物的组分以帮助检测该组分的有机分子或无机分子, 并且所述染料是在大于或等于340nm的波长处吸收电磁辐射的有机分子或无机分子。

## 颗粒群的单颗粒分析

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2012年5月21日提交的美国临时申请第61/649,845号的权益,其通过引用以其全部内容并入本文。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及用于分析颗粒的群体中基于单颗粒的多个参数的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 用于分析群体中单独颗粒的多个参数的方法在多种情况下是感兴趣的。特别地,分析在细胞群内基于单细胞的、任选地与一个或多个其它参数组合的多种核酸的能力对于商业实验室和学术实验室是广泛关注的。实现该目标的各种方法面临以下问题的一个或多个:所包括的步骤是冗长且劳动密集的,可能需要大量细胞(例如,以10,000的数量级或更多的细胞),从待分析的来源不可能得到这些细胞(例如组织活检),和/或可用技术可能不足以再现地从存在于单独细胞中的少量靶核酸产生可靠结果。

[0006] 发明概述

[0007] 在各方面,本文中所设想的发明可以包括但不必限于以下实施方案的任何一个或多个:

[0008] 实施方案1:一种检验多个颗粒中的单颗粒的方法,所述方法包括:(a)在分别的反应体积中捕获所述多个颗粒以产生各自含有一颗粒的多个分别的反应体积;(b)对每个颗粒检验多个参数,其中所述检验包括:对每个分别的反应体积中的每个颗粒进行多个反应以对每个颗粒产生多个反应产物,其中至少一个反应产物包含以下核苷酸序列,所述核苷酸序列被加入至靶核酸并且编码作为所述反应产物的来源的所述反应体积的身份;和分析所述反应产物以得到所述结果;和(c)使所述检验的结果与每个颗粒相关联以对处于分别的反应体积中的所述多个颗粒中的每个颗粒产生包含多个参数的数据集。

[0009] 实施方案2:实施方案1所述的方法,其中在每个分别的反应体积中检验至少一个所述参数。

[0010] 实施方案3:任一前述实施方案所述的方法,其中回收所述分别的反应体积的内容物。

[0011] 实施方案4:任一前述实施方案所述的方法,另外包括优化所述捕获以致各自具有仅一个颗粒的分别的反应体积的预计分数是分别的反应体积的总数目的至少35%。

[0012] 实施方案5:任一前述实施方案所述的方法,另外包括优化所述捕获以致各自具有仅一个颗粒的分别的反应体积的预计分数是分别的反应体积的总数目的至少50%。

[0013] 实施方案6:任一前述实施方案所述的方法,另外包括优化所述捕获以致各自具有仅一个颗粒的分别的反应体积的预计分数是分别的反应体积的总数目的至少65%。

[0014] 实施方案7:任一前述实施方案所述的方法,另外包括优化所述捕获以致各自具有仅一个颗粒的分别的反应体积的预计分数是分别的反应体积的总数目的至少85%。

[0015] 实施方案8:任一前述实施方案所述的方法,其中所述分别的反应体积存在于微流

体装置的单独区室内。

[0016] 实施方案9:实施方案1-8中任一项所述的方法,其中在加入用于进行所述多个反应的一种或更多种试剂之前,在分别的反应体积中捕获所述颗粒。

[0017] 实施方案10:任一前述实施方案所述的方法,其中所述颗粒是细胞。

[0018] 实施方案11:任一前述实施方案所述的方法,其中所述颗粒选自核酸、蛋白、碳水化合物、脂质及其组合。

[0019] 实施方案12:任一前述实施方案所述的方法,其中在所述方法中采用小于40,000个颗粒。

[0020] 实施方案13:任一前述实施方案所述的方法,其中在所述方法中采用小于10,000个颗粒。

[0021] 实施方案14:任一前述实施方案所述的方法,其中分配至分别的反应体积内的颗粒的数目大于10个、大于100个或大于1000个。

[0022] 实施方案15:实施方案1-3或8-14中任一项所述的方法,其中所述捕获通过有限稀释来进行。

[0023] 实施方案16:实施方案15所述的方法,其中有限稀释包括:制备颗粒悬浮液的一系列稀释液;将来自每种稀释液的颗粒分配至微流体装置的分别的区室内;确定每个区室中颗粒的数目;和选择产生最高数目的包含仅单颗粒的区室的稀释液,用于在分别的反应体积中捕获单颗粒时使用。

[0024] 实施方案17:实施方案16所述的方法,其中每个区室中的颗粒的数目通过亮视野显微术或荧光显微术来确定。

[0025] 实施方案18:实施方案16所述的方法,其中采用染色剂、染料或标记物以检测每个分别的反应体积中的颗粒的数目。

[0026] 实施方案19:实施方案18所述的方法,其中所述颗粒是细胞,并且所述染色剂、染料或标记物是膜透性染色剂、染料或标记物。

[0027] 实施方案20:实施方案18所述的方法,其中所述颗粒是细胞,并且采用细胞膜透性核酸染料以检测每个分别的反应体积中的细胞数目。

[0028] 实施方案21:实施方案18所述的方法,其中所述颗粒是细胞,并且所述染色剂、染料或标记物是细胞表面的染色剂、染料或标记物。

[0029] 实施方案22:实施方案18所述的方法,其中所述颗粒是细胞,并且采用特异于细胞表面标志物的标记的抗体以检测每个分别的反应体积中的细胞数目。

[0030] 实施方案23:任一前述实施方案所述的方法,其中所述捕获包括微流体装置中的多个捕获位点处的机械捕获。

[0031] 实施方案24:实施方案23所述的方法,其中每个捕获位点包括捕获特征,所述捕获特征尺寸为含有仅一个颗粒;和引流沟特征,其中当所述捕获特征未被颗粒占据时,所述引流沟特征允许流体流经所述捕获位点。

[0032] 实施方案25:实施方案23所述的方法,其中所述微流体装置包括集中特征以集中颗粒流动至每个捕获位点。

[0033] 实施方案26:任一前述实施方案所述的方法,其中所述方法包括基于亲和性的捕获并且采用结合颗粒组分的结合伴侣。

[0034] 实施方案27:实施方案26所述的方法,其中所述结合伴侣被附加至所述微流体装置的离散区域,其中每个离散区域允许结合仅一个颗粒。

[0035] 实施方案28:实施方案26所述的方法,其中所述基于亲和性的捕获包括:在微流体装置中的多个捕获位点处捕获包含所述结合伴侣的支持物以在每个捕获位点处产生固定化支持物,其中每个固定化支持物按允许将仅一个颗粒结合至每个固定化支持物的方式展示所述结合伴侣;和将颗粒结合至所述固定化支持物上的所述结合伴侣。

[0036] 实施方案29:实施方案28所述的方法,其中所述支持物通过机械捕获来捕获。

[0037] 实施方案30:实施方案28所述的方法,其中每个捕获位点包括:捕获特征,所述捕获特征尺寸为含有仅一个支持物;和引流沟特征,其中当所述捕获特征未被支持物占据时,所述引流沟特征允许流体流经所述捕获位点。

[0038] 实施方案31:实施方案28所述的方法,其中所述微流体装置包括集中特征以集中支持物和/或颗粒流动至每个捕获位点。

[0039] 实施方案32:实施方案23-25和27-31的任一项所述的方法,其中每个捕获位点位于所述微流体装置的分别的区室内。

[0040] 实施方案33:实施方案32所述的方法,其中所述捕获包括将包含所述颗粒的溶液穿过所述微流体装置的所述区室,由此35%或更多的所述区室包含仅单颗粒。

[0041] 实施方案34:前述实施方案的任一项所述的方法,其中所述分别的反应体积存在于微流体装置的单独区室内,并且所述方法包括确定每个分别的反应体积中的颗粒数目;和忽视来自不含有颗粒或含有多于单颗粒的任何反应体积的结果。

[0042] 实施方案35:实施方案3-34中任一项所述的方法,其中所述回收包括从分别的反应体积分别地回收反应产物。

[0043] 实施方案36:实施方案3-34中任一项所述的方法,其中所述回收包括汇集来自多个分别的反应体积的反应产物。

[0044] 实施方案37:任一前述实施方案所述的方法,其中至少一种检验选自DNA序列的检测;RNA序列的检测;选自由蛋白、碳水化合物、脂质及其任意组合组成的组的分子的检测;小分子的检测;活性的检测;离子浓度的检测;离子电势的检测;和氧化还原电势的检测。

[0045] 实施方案38:任一前述实施方案所述的方法,其中所述反应包括选自以下的一种或更多种反应:DNA的扩增、利用核酸酶的DNA的消化、DNA的连接、将衔接子序列连接至DNA分子上、转座酶介导的转座子向DNA分子的掺入、DNA测序、RNA的逆转录、RNA的扩增和利用核糖核酸酶的RNA的消化。

[0046] 实施方案39:任一前述实施方案所述的方法,其中所述反应包括全基因组扩增和/或全转录组扩增。

[0047] 实施方案40:任一前述实施方案所述的方法,其中所述至少一种反应产物通过包括使用至少两种扩增引物的核酸扩增的反应来生成,其中每种扩增引物包含条形码序列,并且条形码序列的组合编码作为所述反应产物的来源的所述反应体积的身份。

[0048] 实施方案41:实施方案40所述的方法,其中所述核酸扩增使用内侧引物对和外侧引物对,其中:所述内侧引物包含:正向、内侧引物,包含第一核苷酸标签、第一条形码核苷酸序列和靶特异性部分;和反向、内侧引物,包含靶特异性部分、第一条形码核苷酸序列和第二核苷酸标签;和所述外侧引物包含:正向、外侧引物,包含第二条形码核苷酸序列和第

一核苷酸标签特异性部分;和反向、外侧引物,包含第二核苷酸标签特异性部分和第二条形码核苷酸序列;其中所述外侧引物是比所述内侧引物过量的;和所述核酸扩增产生包含5'-第二条形码核苷酸序列-第一核苷酸标签序列-第一条形码核苷酸序列-靶核苷酸序列-第一条形码核苷酸序列-第二核苷酸标签序列-第二条形码核苷酸序列-3'的扩增子。

[0049] 实施方案42:实施方案40所述的方法,其中所述核酸扩增使用内侧引物对、填充引物对和外侧引物对,其中:所述内侧引物包含:正向、内侧引物,包含第一核苷酸标签和靶特异性部分;和反向、内侧引物,包含靶特异性部分和第二核苷酸标签;所述填充引物包含:正向、填充引物,包含第三核苷酸标签、第一条形码核苷酸序列和第一核苷酸标签特异性部分;和反向、填充引物,包含第二核苷酸标签特异性部分、第一条形码核苷酸序列、第四核苷酸标签;和所述外侧引物包含:正向、外侧引物,包含第二条形码核苷酸序列和第三核苷酸标签特异性部分;和反向、外侧引物,包含第四核苷酸标签特异性部分和第二条形码核苷酸序列;其中所述外侧引物是比所述填充引物过量的,所述填充引物是比所述内侧引物过量的;和所述核酸扩增产生包含5'-第二条形码核苷酸序列-第三核苷酸标签序列-第一条形码核苷酸序列-第一核苷酸标签序列-靶核苷酸序列-第二核苷酸标签序列-第一条形码核苷酸序列-第四核苷酸标签序列-第二条形码核苷酸序列-3'的扩增子。

[0050] 实施方案43:实施方案41所述的方法,其中所述分别的反应体积是微流体装置的分别的区室,所述分别的区室被安置成由行和列界定的阵列,其中每个扩增子中的所述第一条形码和第二条形码的组合辨识作为所述扩增子的来源的区室的行和列。

[0051] 实施方案44:实施方案43所述的方法,其中所述回收包括汇集来自行中或列中的区室的扩增子。

[0052] 实施方案45:实施方案41所述的方法,其中所述外侧引物另外包含能够被DNA测序引物结合的第一引物结合位点和第二引物结合位点,并且其中所述核酸扩增产生包含5'-第一引物结合位点-第二条形码核苷酸序列-第一核苷酸标签序列-第一条形码核苷酸序列-靶核苷酸序列-第一条形码核苷酸序列-第二核苷酸标签序列-第二条形码核苷酸序列-第二引物结合位点-3'的扩增子。

[0053] 实施方案46:实施方案45所述的方法,其中所述分析包括测序所述扩增产物。

[0054] 实施方案47:任一前述实施方案所述的方法,其中对完整的颗粒进行所述多个反应。

[0055] 实施方案48:任一前述实施方案所述的方法,其中对破裂的颗粒进行所述多个反应。

[0056] 实施方案49:实施方案48所述的方法,其中对溶解的细胞进行所述多个反应。

[0057] 实施方案50:任一前述实施方案所述的方法,其中在进行所述多个反应之前,利用引发生物响应的试剂(agent)处理所述颗粒。

[0058] 实施方案51:任一前述实施方案所述的方法,其中所述方法包括确定每个颗粒中或与每个颗粒缔合的一个或更多个靶核酸的存在或量。

[0059] 实施方案52:任一前述实施方案所述的方法,其中所述方法包括确定每个颗粒中或与每个颗粒缔合的一个或更多个DNA分子的拷贝数。

[0060] 实施方案53:任一前述实施方案所述的方法,其中所述方法包括确定每个颗粒中或与每个颗粒缔合的一个或更多个基因座处的基因型。

[0061] 实施方案54:任一前述实施方案所述的方法,其中所述方法包括确定用于每个颗粒中或与每个颗粒缔合的多个基因座的单体型。

[0062] 实施方案55:任一前述实施方案所述的方法,其中所述方法包括确定每个颗粒中或与每个颗粒缔合的一个或更多个RNA分子的表达水平。

[0063] 实施方案56:任一前述实施方案所述的方法,其中所述方法包括确定每个颗粒中或与每个颗粒缔合的一个或更多个RNA分子的核苷酸序列。

[0064] 实施方案57:任一前述实施方案所述的方法,其中所述方法包括确定每个颗粒中或与每个颗粒缔合的一个或更多个蛋白的表达水平。

[0065] 实施方案58:任一前述实施方案所述的方法,其中所述分析的结果指示存在:与表型相关的两种或更多种拷贝数变化;与表型相关的两种或更多种突变;或共同与表型相关的至少一种拷贝数变化和至少一种突变。

[0066] 实施方案59:实施方案58所述的方法,其中所述表型选自由疾病的风险、存在、严重性、预后、和对特定疗法的响应性组成的组。

[0067] 实施方案60:实施方案59所述的方法,其中所述表型包含对药物的耐药性。

[0068] 实施方案61:任一前述实施方案所述的方法,其中所述分析的结果指示基因组重组的发生。

[0069] 实施方案62:任一前述实施方案所述的方法,其中所述分析的结果指示特定剪接变体的共表达。

[0070] 实施方案63:任一前述实施方案所述的方法,其中所述分析的结果指示B细胞中特定的轻链和重链的共表达。

[0071] 实施方案64:任一前述实施方案所述的方法,其中所述分析的结果指示特定宿主细胞中特定病原体的存在。

[0072] 实施方案65:一种分离单颗粒的方法,所述方法包括:在基质上的捕获位点处捕获包含结合伴侣的支持物以在所述捕获位点处产生固定化支持物,其中所述结合伴侣结合颗粒组分,并且所述固定化支持物按允许将仅一个颗粒结合至每个固定化支持物的方式展示所述结合伴侣;和将颗粒结合至所述固定化支持物上的所述结合伴侣。

[0073] 实施方案66:实施方案65所述的方法,其中所述捕获包括支持物的机械捕获。

[0074] 实施方案67:实施方案65所述的方法,其中所述捕获位点包括:捕获特征,所述捕获特征的尺寸为含有仅一个支持物;和引流沟特征,其中当所述捕获特征未被支持物占据时,所述引流沟特征允许流体流经所述捕获位点。

[0075] 实施方案68:实施方案65所述的方法,其中所述底物包括集中特征以集中流动至每个捕获位点。

[0076] 实施方案69:实施方案65-68的任一项所述的方法,其中所述基质包括多个捕获位点。

[0077] 实施方案70:实施方案69所述的方法,其中每个捕获位点位于微流体装置的分别的区室内。

[0078] 实施方案71:实施方案70所述的方法,其中所述方法包括将包含所述颗粒的溶液穿过所述微流体装置的所述区室,由此35%或更多的所述区室包含仅单颗粒。

[0079] 附图简述

[0080] 图1:用于适于细胞操作的微流体装置的单元小室结构(“MA006”)的示意图,显示芯片上方法(on-chip processes)。

[0081] 图2:使用细胞悬液的有限稀释来获得每单独反应体积(微流体装置的“室”或“芯片”)单个细胞。显示了用于不同细胞密度的理论分布(泊松分布)。

[0082] 图3A-B:使用亮视野(A)成像,芯片中细胞计数的结果,与理论分布(B)比较。基于亮视野成像,芯片中的细胞密度接近但低于泊松分布,这一趋势在更高细胞密度时加剧。

[0083] 图4A-B:荧光细胞“鬼影(ghost)”图像(A)允许比PCR前(pre-PCR)亮视野成像检测更多细胞,从而细胞密度更接近地近似泊松分布(B)。

[0084] 图5:可以使用的检测芯片中细胞的特异性方法包括,例如,使用细胞膜透性核酸染色剂(stain)和/或用抗体的细胞特异性表面标志物检测。对 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞密度显示了这些更特异性的方法的结果。

[0085] 图6A-B:(A)使用RT-PCR前(pre-RT-PCR)核酸染色剂(Syto10DNA染色剂)检测芯片中细胞与RT-PCR后(post RT-PCR)鬼影图像(细胞鬼影)的比较。(B) Syto10不抑制GAPDH的RT-PCR。

[0086] 图7:在0.5% Tween 20或0.5% NP40(后者是细胞溶解剂)存在下进行的GAPDH的RT-PCR。二者都不显著抑制GAPDH的RT-PCR。

[0087] 图8:在MA006芯片中进行的11个基因的标准曲线扩增。这些结果证明, CellsDirect™一步qRT-PCR试剂盒可与0.5% NP40(用于细胞溶解和阻止芯片中的耗竭效应)一起使用来在MA006芯片中将细胞中基因特异性的RNA转化为扩增子。

[0088] 图9:四引物、组合条形码化方法用以将两个条形码的组合放到每个扩增子的任一末端上。内侧引物包含靶特异性部分(正向引物中的“TS-F”和反向引物中的“TS-R”)、条形码核苷酸序列(“bc2”)、和不同的核苷酸标签。外侧引物包含标签特异性部分(“CS1”和“CS2”)、不同的条形码核苷酸序列(“bc1”)、用于测序引物的引物结合位点(“A”和“B”)。

[0089] 图10A-B:4引物条形码化如何可在芯片诸如MA006上进行的图解。(A)在芯片上用内侧引物进行扩增,其中每行的室具有拥有相同的条形码的相同的内侧引物对。(B)来自每列的室的反应产物可作为池收获,并对每个池利用不同的外侧引物对进行扩增。这一扩增产生在扩增子的任一末端具有独特地辨识在其中进行初始扩增的室(以行和列)的条形码组合的扩增子。

[0090] 图11:比较测序来自单细胞的基因特异性扩增子获得的结果(实施例1),表示为对每个基因特异性扩增子的读取(read)的数目(红色),与总RNA的比较。如从该图明显的,这些RNA的代表当在单独细胞中测量时是不同的,与在总RNA中观察到的相比。

[0091] 图12A-B:带有捕获特征(capture feature)和引流沟(drain)的捕获位点。(A)无阻碍物(baffle)以集中流(flow)的位点。(B)带有阻碍物的位点。

[0092] 图13:图13中示出另外的捕获位点设计。

[0093] 图14A-C:可设计捕获结构(capture architecture)以使细胞接触表面标志物的可能性最大化。例如,一个或更多个通道壁(channel wall)上的阻碍物可用于引导珠朝向捕获特征。(A)示例性的捕获特征/阻碍物组合。(B)捕获特征的表现可通过调整一个或更多个变量来调整,所述变量包括阻碍物的角度、阻碍物与捕获位点的距离、阻碍物的长度、捕获特征的尺寸和形状、捕获特征中引流沟的尺寸(如果存在)。通道壁上的阻碍物用于引导

珠朝向捕获特征。(C) 捕获特征与通道壁上的阻碍物配对;单独的捕获特征/阻碍物组合可位于交替的壁上以将流集中朝向邻近的捕获特征/阻碍物组合。

[0094] 图15A-B:利用捕获特征来捕捉单个、包被亲和性试剂的珠的策略,该珠随后展示亲和性试剂(例如,抗体)以捕获单颗粒(例如,细胞)。(A-1)流在包含捕获特征的通道中开始。(A-2)抗体结合的珠流向捕获特征,直到珠安顿在捕获特征中。(A-3)然后洗涤通道以去除未捕获的珠。(B-1)带有抗体结合的细胞表面标志物的细胞流入包含捕获的珠的通道。(B-2)带有标志物的细胞与被捕获的珠展示的抗体相互作用和结合。展示区域的尺寸为使得结合的细胞将经由空间阻塞抑制其他细胞与捕获的珠相互作用,从而仅一个细胞结合每个捕获的珠。(B-3)然后洗涤通道以去除未结合的细胞,在每个捕获位点留下一个固定的细胞。

[0095] 图16A-G:(A)设计为在离散的位置(龛(niches))捕获单细胞的微流体装置的简图。单细胞捕获允许在单细胞水平分析生物事件。(B)流设计为在龛上方比经过溢流通道的强。龛包含小的缺口( $\sim 3\mu\text{m}$ 高)。当细胞进入龛时,它封闭龛并阻止任何更多的流进入龛。流穿过到下一个未被占据的龛,直到它也被细胞封闭。在细胞穿过溢流通道并离开废弃(out to waste)之前,每个龛应捕获一个细胞。(C)显示带有(D)-(F)中提供的另外的细节的(A)的简图。(D)缓冲液入口与细胞入口汇集(converge),从而迫使细胞向最接近一系列横向细胞捕获通道(transverse cell capture channel)的给料通道的一侧。(E)横向细胞捕获通道的阻力低于细胞溢流通道的,以引导细胞流优先进入龛而不是进入细胞溢流通道。(F)每个龛足够大以捕获仅一个细胞。龛中的细胞升高了该特定回路的阻力,流被导向无细胞的回路。(G) (A)的实际装置,捕获的人类脐静脉内皮细胞(HUVEC)位于龛中。

[0096] 详述

[0097] 在某些实施方案中,本发明提供用于检验颗粒的群体中的单颗粒的方法和装置,其中对每个颗粒测量至少两个参数。当颗粒在分别的反应体积中时,可以测量一个或更多个参数。可选择地或另外,可在后分析步骤中测量一个或更多个参数,例如,当在分别的反应体积中进行反应并且回收和分析反应产物时。在特定的实施方案中,在分别的反应体积中“平行”即基本上同时地进行一个或更多个参数测量。该方法比从作为整体的群体获取的测量提供了一些优势。特别地,以本文描述的方法,可能测量参数,例如,单独细胞中的两种基因的表达水平,这与群体测量不同,在群体测量中不可能确定两种基因在同一细胞中表达和/或不能确定单独细胞中的表达水平。这对于表征细胞的异质群体和/或对于确定同质群体内的细胞表型的范围是有帮助的。当例如两个或更多个参数与表型相关时,可以利用将单颗粒分析的结果与所检验的每个颗粒关联的能力。所测量的两个或更多个参数可以是不同类型的参数,例如,RNA表达水平和核苷酸序列。下面描述本文中所描述的单细胞分析方法的另外应用。

[0098] 该方法必需在分别的反应体积捕获群体的颗粒以产生各自含有仅一个颗粒的多个分别的反应体积。在说明性实施方案中,分别的反应体积存在于微流体装置的单独区室内,所述微流体装置诸如例如本文中所描述的那些的任一种。还参见通过引用以其全部内容被并入本文的、Daridon等人的于2004年11月18日公布的美国专利公布第2004/0229349号,特别是其对微流体颗粒分析系统的描述。对每个颗粒检验多个参数。将检验结果与每个颗粒关联对处于分别的反应体积中的群体中每个颗粒产生包含多个参数的数据集。在不同

的实施方案中,在每个分别的反应体积中检验至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个参数。

[0099] 在某些实施方案中,通过在每个分别的反应体积中进行诸如核酸扩增的反应来检验参数以产生一种或更多种反应产物,分析该反应产物以得到接下来与颗粒关联的且进入数据集的结果。与用于进行一个或更多个反应的一种或更多种试剂接触之前,颗粒可以在在分别的反应体积中被捕获。可选择地,或另外,颗粒可以与此类试剂的一种或更多种接触,并且可以将反应混合物分配至分别的反应体积内。在不同的实施方案中,在每个分别的反应体积中进行至少2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个反应。反应产物的分析可以在分别的反应体积中进行。然而,在一些实施方案中,回收分别的反应体积的内容物用于后续分析或其它目的是有利的。例如,当在分别的反应体积中进行核酸扩增时,例如通过PCR和/或核酸测序来回收用于后续分析的内容物可能是合意的。可以单独地分析分别的反应体积的内容物以及将结果与存在于原始反应体积中的颗粒关联。可选择地,例如,如下面关于多引物核酸扩增方法所讨论的,可以在反应产物中编码颗粒/反应体积身份。此外,可以组合这两种策略,以致分别的反应体积的集合被编码,以致该集合内的每个反应体积是独特地可识别的,然后汇集,接下来单独分析每个池。

#### [0100] 定义

[0101] 除非另外说明,权利要求书以及说明书中所使用的术语是如下面陈述所定义的。为了清楚起见而专门地定义这些术语,但是所有这些定义都与本领域技术人员如何理解这些术语的情况一致。

[0102] 术语“核酸”是指核苷酸聚合物,并且除非另外限制,包括天然核苷酸的已知类似物,这些类似物能够以与天然存在的核苷酸类似的方式起作用(例如,杂交)。

[0103] 术语核酸包括任何形式的DNA或RNA,包括例如基因组DNA;互补DNA(cDNA),互补DNA(cDNA)是mRNA的DNA表示,通常通过信使RNA(mRNA)的逆转录或通过扩增而得到;合成地或通过扩增产生的DNA分子;和mRNA。

[0104] 术语核酸包括双链或三链核酸以及单链分子。在双链或三链核酸中,核酸链不必共同延伸(即,双链核酸不必沿着两个链的整体长度是双链的)。

[0105] 不是沿着两条链的完整长度为双链的双链核酸具有在本文中称为“粘末端”或“尾序列”的5'或3'延伸(extension)。术语“粘末端”通常用于指相对短的5'或3'延伸,诸如由限制性酶产生的,而术语“尾序列”通常用于指较长的5'或3'延伸。

[0106] 术语核酸还包括它们的任何化学修饰,例如通过甲基化和/或通过加帽。核酸修饰可以包括加入化学基团,这些化学基团将额外的电荷、可极化性、氢键、静电作用和官能性结合至单独的核酸碱基上或结合至作为整体的核酸上。这类修饰可以包括碱基修饰,例如2'-位置糖修饰、5-位置嘧啶修饰、8-位置嘌呤修饰、在胞嘧啶环外胺上的修饰、5-溴-尿嘧啶的取代、主链修饰、稀有碱基配对组合,例如异碱基异胞苷和异鸟嘌呤等。

[0107] 具体而言,在某些实施方案中,核酸可以包括多聚脱氧核糖核苷酸类(包含2-脱氧-D-核糖)、多聚核糖核苷酸(包含D-核糖)、以及任何其它类型的核酸,该核酸是嘌呤或嘧啶碱的N-或C-糖苷、以及其它包含非核苷酸主链的聚合物,例如聚酰胺(例如,核酸肽类(PNA))和聚吗啉代(可从Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oregon以Neugene商购)聚合物,以及其它合成的序列特异性核酸聚合物,条件是这些聚合物包含处于允许碱基配对和碱基堆

集的构型的核碱基,例如在DNA和RNA中发现的碱基配对和碱基堆集一样。术语核酸还包括锁核酸类(LNA),在美国专利号6,794,499、6,670,461、6,262,490和6,770,748中对这些锁核酸进行了描述,就它们的LNA的公开而言,这些专利通过引用以其全部内容并入本文。

[0108] 核酸可以从完全化学合成方法例如固相介导的化学合成、从生物来源例如通过从产生核酸的任何物种中分离、或从包括通过分子生物学工具例如DNA复制、PCR扩增、逆转录处理核酸的方法、或从这些方法的组合来获得。

[0109] 核酸分子中元件的顺序在本文中通常描述为5'至3'。在双链分子的情况下,根据约定,“上”链通常从5'至3'显示,本文中参考上链来描述元件的顺序。

[0110] 本文中使用术语“靶核酸”指的是本文描述的方法中待检测的特定核酸。

[0111] 如本文中所使用的术语“靶核苷酸序列”是指包括靶核酸的核苷酸序列的分子,诸如,例如,通过扩增靶核酸而得到的扩增产物或当将RNA靶核酸逆转录时所生成的cDNA。

[0112] 如本文中所使用的术语“互补”是指在两个核苷酸之间精确配对的能力。即,若在一个给定的位置上一个核苷酸能够与另一个核酸的核苷酸形成氢键,则这两个核酸被认为在该位置上是彼此互补的。两个单链核酸分子之间的互补性可以是“部分的”,其中仅一些核苷酸进行结合,或当单链分子之间存在完全互补性时,它可以是完全的。核酸链之间互补性的程度对于核酸链之间杂交的效率和强度具有显著影响。

[0113] “特异性杂交”是指在定义的严格条件下将核酸结合至靶核苷酸序列上,不实质性地结合至存在于杂交混合物中的其它核苷酸序列上。本领域技术人员应当知道,放松杂交条件的严格性将允许容忍序列错配。

[0114] 在特定的实施方案中,在严格杂交条件下进行杂交。短语“严格杂交条件”通常是指在定义的离子强度和pH下对于特定序列而言温度在低于解链温度( $T_m$ )的从约5℃至约20℃或25℃的范围。如本文中所使用的, $T_m$ 是双链核酸分子的群体被半解离成单链的温度。用于计算核酸的 $T_m$ 的方法在本领域中是熟知的(参见,例如,Berger和Kimmel (1987) METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 152: GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES, San Diego: Academic Press, Inc. 和 Sambrook等人 (1989) MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第二版, VOLS. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory), 二者都通过引用并入本文)。如标准参考文献所指出的,当核酸处于1M NaCl的水溶液中时,可以通过下面等式计算 $T_m$ 值的简单估计: $T_m = 81.5 + 0.41 (\%G+C)$ , (参见,例如,Anderson 和 Young, Quantitative Filter Hybridization in NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION (1985))。杂交体的解链温度(以及因此用于严格杂交的条件)受多种条件影响,例如引物或探针的长度和性质(DNA、RNA、碱基组成)以及靶核酸的性质(存在于溶液中或固定化的DNA、RNA、碱基组成等),以及盐和其它组分的浓度(例如,甲酰胺、硫酸葡聚糖、聚乙二醇的存在与否)。这些因素的影响是熟知的并且在本领域的标准参考文献中进行了讨论。适用于实现大多数序列的特异性杂交的说明性的严格条件是:在pH7下至少约60℃和约0.2摩尔的盐浓度。

[0115] 使用术语“寡核苷酸”指的是相对短的核酸,该核酸通常短于200个核苷酸、更特别地短于100个核苷酸、最特别地短于50核苷酸。通常,寡核苷酸是单链DNA分子。

[0116] 使用术语“衔接子”指的是在使用中变得附加至核酸的一个或两个末端的核酸。衔接子可以是单链、双链的或可以包含单链和双链的部分。

[0117] 术语“引物”是指在适宜条件下(即,在四种不同核苷三磷酸以及聚合试剂例如DNA

或RNA聚合酶或逆转录酶的存在下)在适宜的缓冲液中并且在适宜的温度下能够与核酸杂交(也称为“退火”)并且充当核苷酸(RNA或DNA)的聚合的起始位点的寡核苷酸。引物的适当的长度取决于引物的预期用途,但是引物典型地是至少7个核苷酸长度、更典型地从10个核苷酸至30个核苷酸、或甚至更典型地从15个核苷酸至30个核苷酸长度。其他引物可以是稍微更长的,例如30至50个核苷酸长度。在此上下文中,“引物长度”是指杂交到互补的“靶”序列上并且引发核苷酸合成的寡核苷酸或核酸的部分。短引物分子通常需要较冷的温度以与模板形成足够稳定的杂交复合体。引物不必反映模板的确切序列但是必须是足够互补的以与模板杂交。术语“引物位点”或“引物结合位点”是指引物杂交到其上的靶核酸的区段。

[0118] 如果引物或它的一部分杂交到另一个核酸中的核苷酸序列上,则引物被说成退火到另一个核酸上。引物杂交到特定核苷酸序列上的陈述不旨在暗示该引物完全地或唯一地杂交到该核苷酸序列上。例如,在某些实施方案中,本文中所使用的扩增引物被说成“退火到核苷酸标签上”。这种说明包括完全退火到核苷酸标签上的引物以及部分地退火到核苷酸标签上以及部分地退火到邻近核苷酸序列例如靶核苷酸序列上的引物。这类杂交引物可以增加扩增反应的特异性。

[0119] 如本文中所使用的,选择引物“以便避免实质性地退火到靶核酸上”是指选择引物以致在扩增之后检出的大多数扩增子在下面意义上是“全长的”,即它们是从在靶核酸的每个末端上的预期位点处引发而得到的,与从靶核酸内引发而得到的扩增子不同,后者生成比预期更短的扩增子。在不同的实施方案中,选择引物从而至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%是全长的。

[0120] 术语“引物对”是指一组引物,这组引物包括与待扩增的DNA序列的5'末端互补物杂交的5'“上游引物”或“正向引物”以及与待扩增的序列的3'末端杂交的3'“下游引物”或“反向引物”。如本领域技术人员应当知道,在特定实施方案中术语“上游”和“下游”或“正向”和“反向”不旨在进行限制,而旨在提供说明性的方向。

[0121] 在使用两个引物对的实施方案中,例如,在扩增反应中,引物对可以标示为“内侧”和“外侧”引物对以指示其相对位置;即,“内侧”引物被掺入到反应产物(例如,扩增子)中的外侧引物被掺入的位置之间的位置。

[0122] 在使用三个引物对的实施方案中,例如,在扩增反应中,术语“填充引物”可以用于指具有在内侧和外侧引物之间的位置的引物;即,“填充”引物被掺入到反应产物(例如,扩增子)中的内侧和外侧引物之间的中间位置。

[0123] “探针”是能够通过一个或更多个类型的化学键、通常通过互补碱基配对、经常通过氢键形成而结合到互补序列的靶核酸上,因此形成双链结构的核酸。探针结合或杂交到“探针结合位点”上。探针可以用可检出的标记物进行标记以允许容易地检出探针,特别是一旦探针杂交到它的互补靶上时。然而,作为替代方案,探针可以是未标记的,但是通过与直接地或间接地标记的配体特异性结合而可以是可检出的。探针在尺寸方面可以显著改变。通常,探针是至少7至15个核苷酸长度。其它探针是至少20、30或40个核苷酸长度。而其它探针是稍微更长的,为至少50、60、70、80或90个核苷酸长度。而其它探针仍然是更长的,并且是至少100、150、200个或更多的核苷酸长度。探针还可以是在由上述值中任何一项所限定的任何范围内的任何长度(例如,15-20个核苷酸长度)。

[0124] 引物或探针可以是与靶核酸序列完全互补的或可以是小于完全互补的。在某些实施方案中,在至少7个核苷酸的序列上、更典型地在10-30个核苷酸范围内的序列上、并且通常在至少14-25个核苷酸的序列上,引物与靶核酸序列的互补物具有至少65%同一性,并且更经常地具有至少75%同一性、至少85%同一性、至少90%同一性或至少95%、96%、97%、98%或99%同一性。应当理解的是,通常令人合意的是某些碱基(例如,引物的3' 碱基)是与靶核酸序列的相应的碱基完全互补的。在严格杂交条件下引物和探针典型地退火到靶序列上。

[0125] 本文中使用的术语“核苷酸标签”指的是被加入到靶核苷酸序列中的预定的核苷酸序列。核苷酸标签可以编码关于该靶核苷酸序列的一项信息,例如靶核苷酸序列的身份或从中得到靶核苷酸序列的样品的身份。在某些实施方案中,这类信息可以被编码到一个或多个核苷酸标签中,例如,两个核苷酸标签的组合,在靶核苷酸序列的两个末端任一上的一个可以编码靶核苷酸序列的身份。

[0126] 术语“转座子末端”是指能够被转座酶附加到核酸的寡核苷酸。

[0127] 如本文中所使用的术语“条形码引物”是指包括特异性条形码核苷酸序列的引物,该核苷酸序列编码了关于当条形码引物被用于扩增反应时所产生的扩增子的信息。例如,可以采用不同的条形码引物以从大量不同样品的每一个中扩增一个或多个靶序列,使得条形码核苷酸序列指示得到的扩增子的样品来源。

[0128] 如本文中所使用的,术语“编码反应”是指其中至少一个核苷酸标签被加入到靶核苷酸序列中的反应。例如可以通过“编码PCR”和第二引物加入该核苷酸标签,在编码PCR中至少一个引物包括靶特异性部分和位于靶特异性部分的5' 末端的核苷酸标签,并且第二引物包括仅靶特异性部分或靶特异性部分和位于靶特异性部分的5' 末端的核苷酸标签。关于可用于编码PCR的PCR方案的说明性实例,参见未决的WO申请US03/37808以及美国专利号6,605,451。还可以通过“编码连接”反应和第二引物来加入核苷酸标签,该反应可以包括连接反应,其中至少一个引物包括靶特异性部分和位于靶特异性部分的5' 末端上的核苷酸标签,并且第二引物包括仅靶特异性部分或靶特异性部分和位于靶特异性部分的5' 末端上的核苷酸标签。说明性的编码连接反应被描述于例如美国专利公布号2005/0260640中,该专利通过引用以其全部内容并入本文,并且特别是针对连接反应。

[0129] 如本文中所使用的“编码反应”可以生成“加标签的靶核苷酸序列”,该核苷酸序列包括连接到靶核苷酸序列上的核苷酸标签。

[0130] 如本文中所使用的,提及引物的部分,术语“靶特异性”核苷酸序列是指在适当的退火条件下能够特异性退火到靶核酸或靶核苷酸序列上的序列。

[0131] 如本文中所使用的,提及引物的部分,术语“核苷酸标签特异性核苷酸序列”是指在适当的退火条件下能够特异性地退火到核苷酸标签上的序列。

[0132] 根据本发明的教导的扩增包括使至少一个靶核酸的至少一部分再生的任何手段,典型地是以模板依赖性方式,包括但不限于,用于线性或指数地扩增核酸序列的广泛的技术。用于进行扩增步骤的说明性手段包括连接酶链式反应(LCR)、连接酶检测反应(LDR)、连接紧接着Q-复制酶扩增、PCR、引物延伸、链置换扩增(SDA)、超支化链置换扩增、多重置换扩增(M DA)、基于核酸链的扩增(NASBA)、两步多重扩增、滚环扩增(RCA)等,包括它们的多种形式以及组合,例如但不限于OLA/PCR、PCR/OLA、LD R/PCR、PCR/PCR/LDR、PCR/LDR、LCR/

PCR、PCR/LCR(也称为组合链反应-CCR)等。这类技术的说明可以在以下及其他来源中找到:Ausbel等人;PCR Primer:A Laboratory Manual,Diffenbach编著,Cold Spring Harbor Press(1995);The Electronic Protocol Book,Chang Bioscience(2002);Msuih等人,J.Clin.Micro.34:501-07(1996);The Nucleic Acid Protocols Handbook,R.Rapley,编著,Humana Press,Totowa,N.J.(2002);Abramson等人,Curr Opin Biotechnol.1993Feb.;4(1):41-7,美国专利号6,027,998;美国专利号6,605,451,Barany等人,PCT公布号W0 97/31256;Wenz等人,PCT公布号W0 01/92579;Day等人,Genomics,29(1):152-162(1995),Ehrlich等人,Science 252:1643-50(1991);Innis等人,PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications,Academic Press(1990);Favis等人,Nature Biotechnology 18:561-64(2000);和Rabenau等人,Infection 28:97-102(2000);Belgrader,Barany和Lubin,Development of a Multiplex Ligation Detection Reaction DNA Typing Assay,Sixth International Symposium on Human Identification,1995(在下面的互联网上可得到:[promega.com/geneticidproc/ussymp6proc/blegrad.html](http://promega.com/geneticidproc/ussymp6proc/blegrad.html));LCR Kit Instruction Manual,Cat.#200520,Rev.#050002,Stratagene,2002;Barany,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:188-93(1991);Bi和Sambrook,Nucl.Acids Res.25:2924-2951(1997);Zirvi等人,Nucl.Acid Res.27:e40i-viii(1999);Dean等人,Proc Natl Acad Sci USA 99:5261-66(2002);Barany和Gelfand,Gene 109:1-11(1991);Walker等人,Nucl.Acid Res.20:1691-96(1992);Polstra等人,BMC Inf.Dis.2:18-(2002);Lage等人,Genome Res.2003Feb.;13(2):294-307,和Landegren等人,Science 241:1077-80(1988),Demidov,V.,Expert Rev Mol Diagn.2002Nov.;2(6):542-8.,Cook等人,J Microbiol Methods.2003May;53(2):165-74,Schweitzer等人,Curr Opin Biotechnol.2001Feb.;12(1):21-7,美国专利号5,830,711,美国专利号6,027,889、美国专利号5,686,243、PCT公布号W00056927A3和PCT公布号W09803673A1。

[0133] 在一些实施方案中,扩增包括下面各项的连续步骤的至少一个循环:使至少一个引物与至少一个靶核酸中互补或基本上互补的序列一起退火;使用聚合酶以模板依赖性方式合成核苷酸的至少一个链;并且使新形成的核酸双链变性以分离这些链。该循环可以被重复或可以不被重复。扩增可以包括热循环或能够以等温方式完成。

[0134] 本文中使用的术语“qPCR”指的是定量实时聚合酶链式反应(PCR),该反应还被称为“实时PCR”或“动力学聚合酶链式反应”。

[0135] 如本文中所使用的提及参数的术语“大体上”意指该参数足以提供有用的结果。因此,“大体上互补”在应用于核酸序列时通常表示足够互补以在所描述的情景中起作用。通常,大体上互补表示足够互补以在所采用的条件下杂交。在本文中所描述的一些实施方案中,反应产物必须区分于未反应的引物。

[0136] “试剂”广义地是指除了分析物(例如,被分析的核酸)之外用于反应中的任何剂。用于核酸扩增反应的说明性试剂包括但不限于缓冲剂、金属离子、聚合酶、逆转录酶、引物、模板核酸、核苷酸、标记物、染料、核酸酶等。用于酶反应的试剂包括例如底物、辅因子、缓冲剂、金属离子、抑制剂以及活化剂。

[0137] 本文中使用的术语“通用检测探针”指的是鉴别扩增产物的存在的任何探针,无论产物中存在的靶核苷酸序列的身份如何。

[0138] 本文中使用的术语“通用qPCR探针”指的是在qPCR期间鉴别扩增产物的存在的任何这类探针。在特定的实施方案中,核苷酸标签可以包括检测探针例如通用qPCR探针结合到其上的核苷酸序列。当标签被加到靶核苷酸序列的两个末端上时,如果需要的话,每个标签可以包括被检测探针识别的序列。这类序列的组合可以编码关于加标签的靶核苷酸序列的身份或样品来源的信息。在其它实施方案中,一个或更多个扩增引物可以包括检测探针例如通用qPCR探针结合到其上的核苷酸序列。以这种方式,在本文描述的方法的扩增步骤期间一个、两个或更多个探针结合位点可以被加到扩增产物中。本领域技术人员知道在预扩增期间(如果执行的话)掺入多个探针结合位点的可能性,并且扩增有利于多重检测,其中可以在给定的扩增混合物或它的等份中检出两个或更多个不同的扩增产物。

[0139] 术语“通用检测探针”还旨在包括用可检出标记物标记的引物(例如,荧光标记物)以及非序列特异性探针,例如DNA结合染料,包括双链DNA(dsDNA)染料,例如SYBR Green和EVA Green。

[0140] 本文中使用的术语“靶特异性qPCR探针”指的是基于使qPCR探针杂交到存在于产物中的靶核苷酸序列上,在qPCR期间鉴定扩增产物的存在的qPCR探针。

[0141] 如本文中所使用的术语“染色剂”通常是指结合反应或检验混合物的组分以帮助检测该组分的任何有机分子或无机分子。

[0142] 如本文中所使用的术语“染料”通常是指在大于或等于340nm的波长处吸收电磁辐射的任何有机分子或无机分子。

[0143] 如本文中所使用的术语“标记物”是指能够用于提供可检出的和/或可定量的信号的任何原子或分子。具体地,可以将标记物直接地或间接地附加到核酸或蛋白上。可以附加到探针上的合适的标记物包括但不限于放射性同位素、荧光团、生色团、质量标记、电子致密颗粒、磁性颗粒、自旋标记物、发出化学发光的分子、电化学活性分子、酶、辅因子以及酶底物。

[0144] 如本文中所使用的术语“荧光染料”通常是指当通过电磁辐射来源例如灯、光电二极管或激光进行照射时通过荧光机理发出较长波长电磁辐射的任何染料。

[0145] 术语“弹性体”具有本领域所使用的一般含义。因此,例如Allcock等人(Contemporary Polymer Chemistry,第二版)描述了弹性体总体上作为聚合物存在于它们的玻璃转化温度与液化温度之间的温度下。弹性材料显示出弹性特性,因为这些聚合物链易于经受扭转移动从而允许使主链响应于力而解螺旋,在缺少该力时主链再螺旋从而呈现出先前的形状。总体上,当施加力时弹性体变形,但是然后当去除该力时,它们返回到它们的初始形状。

[0146] 如本文中所使用的术语“变化”用于指任何差异。变化可以指个体或群体之间的差异。变化涵盖与普通或正常情形的差异。因此,“拷贝数变化”或“突变”可以指与普通或正常拷贝数或核苷酸序列的差异。“表达水平变化”或“剪接变体”可以指对于特定的细胞或组织、发育阶段、状态等不同于普通或正常表达水平或RNA或蛋白的表达水平或RNA或蛋白。

[0147] “多态性标志物”或“多态性位点”是在其上出现核苷酸序列趋异的基因座。说明性标志物具有至少两个等位基因,每个以大于1%、并且更典型地大于10%或20%的选择群体的频率出现。多态性位点可以小至一个碱基对。多态性标志物包括限制性片段长度多态性(RFLP)、可变数目串联重复(VNTR)、超可变区、小卫星序列、双核苷酸重复、三核苷酸重复、

四核苷酸重复、简单序列重复、缺失以及插入元件,例如Alu。首先鉴定的等位基因形式被任意指定为参考形式并且其它等位基因形式被指定为替代的或变体的等位基因。在选择群体中最频繁出现的等位基因形式有时被称为野生型。对于等位基因形式而言,二倍体生物可以是纯合的或杂合的。双等位基因的多态性具有两种形式。三等位基因多态性具有三种形式。

[0148] “单核苷酸多态性”(SNP)出现在被单核苷酸占据的多态性位点,这个位点是等位基因序列之间变化的位点。该位点通常在等位基因的高度保守的序列(例如,在群体的小于1/100或1/1000的成员中发生变化的序列)之前或之后。SNP通常由于在多态性位点处一个核苷酸被取代成另一个核苷酸而出现。转变(transition)是一个嘌呤被替换成另一个嘌呤或者一个嘧啶被替换成另一个嘧啶。颠换(transversion)是嘌呤被替换成嘧啶或反之亦然。SNP还可以通过相对于参考等位基因缺失一个核苷酸或插入一个核苷酸而产生。

[0149] 如本文中所使用的术语“颗粒”是指可以从分子到细胞按尺寸和复杂性排列的实体。该术语涵盖这样的分子,例如核酸、蛋白、碳水化合物、脂质及其组合(例如,脂蛋白)以及病毒、染色体、细胞囊泡和细胞器、以及细胞。

[0150] 本文中使用的术语“捕获特征”指的是位于有利于捕获颗粒的微流体装置内的术语称为“捕获位点”的离散位点处的特征。捕获特征可以有利于通过结合亲和性和/或通过机械捕获或通过任何其它方式来捕获。在某些实施方案中,捕获特征的尺寸为/设计成以便仅一个颗粒可以占据捕获特征或者被捕获特征包含。

[0151] 本文中使用的术语“引流沟特征”指的是位于捕获位点中或附近的促进流体流过捕获位点的特征。例如捕获位点可以具有一个或多个特征,例如设计为在捕获位点保留颗粒的物理屏障。捕获位点中的引流沟特征确保了当位点是空的时(即,不含有颗粒)时,无颗粒流体可以以足够低的流体阻抗流过位点以提高颗粒朝向捕获位点的流动,而不是围绕它。

[0152] 如本文中所使用的,术语集中特征是指微流体装置的集中颗粒流动至每个捕获位点的任何特征。集中特征可以通过任何合适的方式集中颗粒流动,包括一个或多个物理特征,该物理特征根据需要、真空力、环中的流体流、重力、离心力、磁力、电力(例如,电泳力和/或电渗力)和/或光学产生的力、及其它来导引颗粒流动。

[0153] 如关于包括支持物的捕获的实施方案所使用的术语“支持物”是指不溶性基质,该不溶性基质被合适地成形并且尺寸为穿过微流体装置至捕获位点,在这里可以捕获支持物。

[0154] 如本文中关于反应、反应混合物、反应体积等所使用的术语“单独的”是指其中反应与其它反应分离地进行的反应、反应混合物、反应体积等。单独的反应、反应混合物、反应体积等包括在液滴中进行的那些(参见,例如,2007年11月13日授权的Quake等人的美国专利号7,294,503,题为“Microfabricated crossflow devices and methods”,其通过引用以其全部内容并入本文,尤其是关于形成和分析液滴的装置和方法的描述;2010年1月28日公布的Link等人的美国专利公布号20100022414,题为“Droplet libraries”,其通过引用以其全部内容并入本文,尤其是关于形成和分析液滴的装置和方法的描述;和2011年1月6日公布的Miller等人的美国专利公布号20110000560,题为“Manipulation of Microfluidic Droplets”,其通过引用以其全部内容并入本文,尤其是关于形成和分析液

滴的装置和方法的描述),其可以但不必是在乳液中,以及其中反应、反应混合物、反应体积等被机械屏障分隔的那些,例如单独的容器、微量滴定板的分别的孔、或矩阵型微流体装置的单独的区室。

#### [0155] 颗粒

[0156] 本文中所描述的方法可以用于分析任何类型的颗粒。在某些实施方案中,颗粒一般包括足够小以悬浮在流体中、但足够大以从流体区分开的任何物体。颗粒可以是微观的或接近微观的并可以具有约0.005至100 $\mu\text{m}$ 、0.1至50 $\mu\text{m}$ 或约0.5至30 $\mu\text{m}$ 的直径。可选择地或另外,颗粒可以具有约 $10^{-20}$ 至 $10^{-5}$ 克、 $10^{-16}$ 至 $10^{-7}$ 克或 $10^{-14}$ 至 $10^{-8}$ 克的质量。在某些实施方案中,颗粒是来自生物来源的颗粒(“生物颗粒”)。生物颗粒包括,例如分子,例如核酸、蛋白、碳水化合物、脂质及其组合或聚集物(例如,脂蛋白)、以及较大的实体,例如病毒、染色体、细胞囊泡和细胞器、以及细胞。可以如本文中所描述的分析的颗粒还包括具有不溶性组分的那些,例如在其上附加待分析的分子的珠。

[0157] 在说明性实施方案中,颗粒是细胞。适于在本文描述的方法中用作颗粒的细胞一般包括任何自复制的、结合膜的生物实体或其任何非复制的、结合膜的后代。非复制后代可以是衰老细胞、终末分化细胞、细胞嵌合体、剥夺血清的细胞(*serum-starved cells*)、感染细胞、非复制突变体、无核细胞等等。在本文描述的方法中使用的细胞可以具有任何来源、遗传背景、健康状态、固定状态、膜透性、预处理和/或群体纯度以及其它特征。合适的细胞可以是真核、原核、古细菌等等,并且可以来自动物、植物、真菌、原生生物、细菌和/或类似来源。在说明性实施方案中,分析人类细胞。细胞可以来自生物发育的任何阶段,例如,在哺乳动物细胞(例如,人类细胞)的情形中,可以分析胚胎、胎儿或成体细胞。在某些实施方案中,细胞是干细胞。细胞可以是野生型;天然的、化学的或病毒的突变体;改造的突变体(例如转基因);和/或类似物。另外,细胞可以是生长的、休眠的、衰老的、转化的和/或永生的以及其它状态。此外,细胞可以是单种培养(*monoculture*),一般从单细胞或非常相似的细胞的小组作为克隆群体获得;可以由任何合适的机制预分选,例如亲和性结合、FACS、药物筛选等等;和/或可以是不同细胞类型的混合的或混杂的群体。

[0158] 包括膜(例如,细胞或细胞囊泡或细胞器)、细胞壁或使一个或更多个内部组分与外部空间分隔的任何其它类型的屏障的颗粒可以是完整的或部分(例如,透性化)或完全破裂的(例如,以释放内部组分)。当颗粒是细胞时,可以使用固定的和/或未固定的细胞。活的或死的、固定或未固定的细胞可以具有完整的膜和/或可以是透性化的/破裂的膜以允许离子、染色剂、染料、标记物、配体等的获取,和/或被溶解以允许细胞内容物的释放。

[0159] 本文描述的方法的一个益处是,它们可以用于分析几乎任何数目的颗粒,包括充分低于其它方法所需的数百万颗粒的数目。在不同的实施方案中,分析的颗粒数目可以是约10、约50、约100、约500、约1000、约2000、约3000、约4000、约5000、约6000、约7,000、约8000、约9,000、约10,000、约15,000、约20,000、约25,000、约30,000、约35,000、约40,000、约45,000、约50,000、约75,000或约100,000。在具体实施方案中,分析的颗粒数目可以落入由以上列出的任何两个数值界定的范围中。

#### [0160] 颗粒捕获

[0161] 颗粒可以通过本领域中已知的或本文描述的任何手段被捕获在分别的反应体积中。含有颗粒的分别的反应体积可以形成于液滴中、乳液中、容器中、微量滴定板的孔中或

矩阵型微流体装置的区室中。在某些实施方案中,捕获特征保持一个或更多个细胞在分别的反应体积的捕获位点。在优选的实施方案中,捕获特征优先保持仅单细胞在捕获位点。在某些优选的实施方案中,每个捕获位点位于微流体装置的分别的区室中。本文中使用的术语“分别的区室”是指至少暂时地与微流体装置中的其它区室分隔的区室,以致该区室可以包含分别的反应体积。暂时分隔可以例如用阀实现,如从Fluidigm, Inc. (South San Francisco, CA) 可得到的微流体装置的情形。分隔程度必须使得检验/反应可以在区室中分别地进行。如本文中所使用的,术语“捕获特征”包括串联和/或平行操作的单个或多个机制。捕获特征可以用以克服由流体流施加的定位力。合适的捕获特征可以基于与流耦合的物理屏障(称为“机械捕获”)、化学相互作用(称为“基于亲和性的捕获”)、真空力、环中的流体流、重力、离心力、磁力、电力(例如,电泳力或电渗力)和/或光学产生的力、及其它。

[0162] 捕获特征可以是选择性的或非选择性的。选择性机制可以是分级选择性的,即,保持输入的颗粒的少于所有(亚组)。分级选择性机制可以至少部分地依赖于随机的集中特征(参见以下)。可选择地或另外,选择性机制可以是颗粒依赖性的,即,基于输入的颗粒的一个或更多个特性保持颗粒,所述特性例如尺寸、表面化学、密度、磁性特性、电荷、光学特性(例如折光率)和/或类似特性。

#### [0163] 机械捕获

[0164] 机械捕获可以至少部分地基于颗粒与例如微流体装置中布置的任何合适的物理屏障接触。这种颗粒-屏障接触一般限制沿着流体流方向的纵向颗粒移动,产生流动辅助的保持(flow-assisted retention)。流动辅助的颗粒-屏障接触还可以限制侧对侧/正交(横向)移动。合适的物理屏障可以由从通道或其它通路的任何部分(即,壁、顶和/或底)向内延伸的凸出物形成。例如,凸出物可以是固定的和/或可移动的,包括柱、杆、块、凸块、壁和/或部分地/完全地封闭的阀、及其它。一些物理屏障例如阀可以是可移动的或可调整的。可选择地,或另外,物理屏障可以由在通道或其它通路中形成的凹处(例如,龛)、或由流体可渗透膜界定。其它物理屏障可以基于通路的横截面尺寸形成。例如尺寸选择性通道可以保持过大不能进入通道的颗粒。(尺寸选择性通道还可以称为过滤通道、微通道、或颗粒限制性或颗粒选择性通道)。实施例2和4提供说明性机械捕获实施方案。

#### [0165] 基于亲和性的捕获

[0166] 基于亲和性的捕获可以基于一种或更多种化学相互作用保持颗粒,即,其中结合伴侣结合颗粒组分。化学相互作用可以是共价的和/或非共价的相互作用,包括离子、静电、疏水、范德华和/或金属配位相互作用、及其它。化学相互作用可以选择性地和/或非选择性地保持颗粒。选择性的和非选择性的保持可以基于颗粒和表面之间的特异性和/或非特异性化学相互作用,例如,在微流体装置中。

[0167] 特异性化学机制可以使用特异性结合伴侣(SBP),例如颗粒和装置表面上分别布置的第一和第二SBP。说明性SBP可以包括生物素/抗生物素蛋白、抗体/抗原、凝集素/碳水化合物等。SBP可以在装置形成之前、期间和/或之后被局部地布置在微流体装置中。例如基质和/或流体层组分的表面可以在基质和流体层组分被连接之前被SBP成员的粘附/附加来局部修饰。可选择地或另外,在已形成装置之后SBP可以局部地与微流体装置的部分缔合,例如通过SBP成员与装置的局部化学反应(例如用光的局部光照催化的化学反应)。还参见实施例3,其描述了一个实施方案,其中带有SBP成员的珠被机械捕捉在捕获位点以展示SBP

成员用于基于亲和性的捕获颗粒(即,细胞)。

[0168] 非特异性化学机制可以依赖于微流体装置的表面化学的局部差异。如上所述,此类局部差异可以在微流体装置形成之前、期间和/或之后产生。局部差异可以来自局部的化学反应,例如以产生疏水或亲水区和/或材料的局部结合。结合的材料可以包括聚-L-赖氨酸、聚-D-赖氨酸、聚乙烯亚胺、白蛋白、明胶、胶原、层粘连蛋白、纤连蛋白、巢蛋白、玻璃粘连蛋白、原纤维蛋白、弹性蛋白、肝素、硫酸角质素、硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素、透明质酸和/或细胞外基质提取物/混合物、及其它。

#### [0169] 其它捕获特征

[0170] 可选择地或除了基于亲和性的捕获或机械捕获之外,可以使用其它捕获特征。这些机制的一些或所有的和/或上述机制可以至少部分地依赖于颗粒与微流体装置通道或通路之间的摩擦来帮助保持。

[0171] 捕获特征可以基于真空力、流体流和/或重力。基于真空的捕获特征可以施加牵拉颗粒与通路表面更紧密接触的力,例如利用从通道向外的力。真空施加和/或颗粒保持,可以由通道或其它通路的壁中的孔/口来帮助。相反,基于流体流的捕获特征可以产生保持颗粒的流体流路径例如环。这些流体流路径可以由以下形成:无出口的闭合通道回路(例如,由阀关闭和主动泵送)和/或涡流,例如由凹处内一般环状流体流形成的。基于重力的捕获特征可以对通路的底表面保持颗粒,从而与摩擦组合来限制颗粒移动。基于重力的保持可以由凹处和/或减少的流体流速来帮助。

[0172] 捕获特征可以基于离心力、磁力和/或光学产生的力。基于离心力的捕获特征可以通过对通路表面推颗粒来保持颗粒,通常通过对颗粒施加一般垂直于流体流的力。这样的力通过离心微流体装置和/或通过在流体流路径中的颗粒移动来施加。基于磁力的捕获特征可以利用在微流体装置外部和/或内部产生的磁场来保持颗粒。磁场可以与颗粒的铁磁性和/或顺磁性部分相互作用。例如珠可以至少部分地由铁磁性材料形成,或者细胞可以包括表面结合的或内化的铁磁性颗粒。基于电力的捕获特征可以利用电场保持带电荷的颗粒和/或群体。相反,基于光学产生的力操作的捕获特征可以使用光来保持颗粒。此类基质可以基于光镊及其它的原理操作。

[0173] 捕获特征的另一种形式是盲填充通道,其中通道具有入口,但不变地或暂时地没有出口。例如当微流体装置由气透性材料例如PDMS制造时,当被经入口的液体的入流迫使离开时,死端通道中存在的气体可以逃逸,或被迫经气透性材料离开通道。这是盲填充的优选实例。盲填充可以与具有入口和被门控或装有阀的出口的通道或区室一起使用。在这一实例中,当关闭出口阀同时经入口填充通道或区室时,发生填充气体的通道或区室的盲填充。如果入口也具有阀,则在完成盲填充后可随后关闭该阀,然后可以打开出口以将通道或区室内容物暴露于另一通道或区室。如果第三入口与通道或区室连通,则该第三入口可以将另外的流体、气体或液体引入通道或区室以测量的量排出待从通道或区室排出的盲填充液体。

#### [0174] 集中特征

[0175] 在微流体装置中通过使用一个或更多个集中特征以集中颗粒流到每个捕获位点可以增强颗粒捕获。集中特征可以非限制性地以多种方式分类,例如以反映其来源和/或操作原理,包括直接和/或间接、流体介导的和/或非流体介导的、外部和/或内部的等等。这些

分类不是互相排除的。因此,给定的集中特征可以以两种或更多种方式定位颗粒;例如电场可以直接(例如,经由电泳)和间接(例如,经由电渗)定位颗粒。

[0176] 集中特征可以用以纵向地和/或横向地界定颗粒位置。术语“纵向位置”表示平行于或沿着微流体通道的长轴和/或通道中的流体流动流的位置。相反,术语“横向位置”表示垂直于通道的长轴和/或相关的主要流体流动流的位置。通过在弯曲通道中使“长轴”与“切线”相等,纵向和横向位置二者可以被局部地界定。集中特征可以用以在横向和纵向流之间、沿着相对于通道的长轴和/或流动流以任何角度的路径移动颗粒。

[0177] 集中特征可以单独地和/或组合地使用。如果组合使用,则各特征可以连续地(即,顺序地)和/或平行地(即,同时)使用。例如间接机制例如流体流可以用于粗略定位,直接机制例如光镊可以用于最终定位。

[0178] 直接集中特征一般包括其中力直接作用于颗粒以将颗粒定位在微流体网络中的任何机制。直接集中特征可以基于任何适合的基质,包括基于光、电、磁和/或重力的力,及其它。光学集中特征使用光来介导或至少帮助定位颗粒。合适的光学集中特征包括“光镊”,其利用适当集中的且可移动的光源来对颗粒给予定位力。电集中特征利用电来定位颗粒。合适的电机机制包括“动电学”,即,跨微流体网络的一些或全部施加电压和/或电流,如上所述的,其可以直接(例如,经由电泳)和/或间接地经由流体中离子的移动(例如,经由电渗)移动带电荷的颗粒。磁性集中特征使用磁性以基于磁性相互作用定位颗粒。合适的磁性机制包括在流体网络中或周围施加磁场,以经由其与颗粒中、颗粒上或颗粒附近的铁磁性和/或顺磁性材料的缔合定位颗粒。基于重力的集中特征利用重力来定位颗粒,例如,将附着细胞与在细胞培养物位置的基质接触。

[0179] 间接集中特征一般包括其中力间接作用于颗粒的任何机制,例如经由流体纵向地和/或横向地移动微流体网络中的颗粒。纵向间接集中特征一般可以由沿着通道和/或其它通路的流体流产生和/或调整。因此,纵向集中特征可以被调整流速和/或路径的阀和/或泵帮助和/或调整。在一些情形中,纵向集中特征可以被电渗集中特征帮助和/或调整。可选择地或此外,纵向集中特征可以是基于输入的,即,被输入机制帮助和/或调整,所述输入机制例如基于压力或基重力的机制,包括由流体柱的不等高度产生的压头(pressure head)。

[0180] 横向间接集中特征一般可以被在通道接头、侧面布置的减少的流体流区、通道弯曲和/或物理屏障(即,阻碍物)处的流体流动流产生和/或调整。基于携带朝向位点的流体的通道数目相对于携带离开位点的流体的通道数目,通道接头可以是统一的位点或分隔的位点。物理屏障可以具有任何适合的设计以引导颗粒朝向捕获位点流动。例如阻碍物可以从通道表面向外延伸,例如,以引导颗粒朝向捕获位点流动的角度。可以调整阻碍物长度、与通道表面的角度和与捕获位点的距离以增强颗粒朝向捕获位点的流动。阻碍物可以由从通道或其它通路的任何部分(即,壁、顶和/或底)向内延伸的凸出物形成。例如凸出物可以是固定的和/或可移动的,包括柱、杆、块、凸块、壁和/或部分地/完全地封闭的阀、及其它。一些物理屏障例如阀可以是可移动的或可调整的。

[0181] 在一些实施方案中,对每个捕获位点可以采用多个阻碍物。例如可以采用从通道的每个侧壁以一定角度向外延伸的阻碍物以引导颗粒朝向在通道中心定位的捕获位点流动。参见图14A-B。当采用机械捕获时,阻碍物可以与捕获位点中的物理屏障间隔。可选择地或另外,阻碍物可以接触捕获位点中的物理屏障或可以是捕获位点中的物理屏障的固有部

分。参见图14A和14C。例如,以一定角度从通道壁向外延伸的障碍物可以接触凹的捕获特征(例如,物理屏障)或可以是凹的捕获特征(例如,物理屏障)的固有部分。应理解的是,“凹的”捕获特征在捕获特征的一般面向流体流的方向的一侧是凹的。障碍物导引颗粒离开通道壁并朝向凹的捕获特征流动,促进颗粒捕获。沿着流路径的下一个捕获位点可以具有相似的障碍物-凹的捕获特征构造,障碍物从通道的相同的壁延伸。然而,在一些实施方案中,下一个障碍物-凹的捕获特征从相对的通道壁延伸是有利的。这一交替的构造作用以集中从一个障碍物到下一个障碍物的流,从而沿着每个障碍物的流增强进入每个凹的捕获特征的颗粒流。参见图14C。

[0182] 横向间接集中特征可以基于层流、随机分隔和/或离心力以及其它机制。微流体装置中颗粒和/或试剂的横向定位可以至少部分地被基于层流的机制介导。基于层流的机制一般包括其中输入流动流的位置由通道中另外的流动流的存在、不存在和/或相对位置来确定的任何集中特征。这种基于层流的机制可以由作为统一位点的通道接头界定,在统一位点处来自两个、三个或更多个通道的入口流动流流向接头,统一以形成流动离开接头的较少数目的出口流动流,优选1个。由于在微流体尺寸的流动流的层流特性,因此统一位点在入口流动流统一作为分层出口流动流后可以保持入口流动流的相对分布。因此,颗粒和/或试剂可以保持局限于任何所选的一个或更多个层流流,入口通道基于其而携带颗粒和/或试剂,从而横向地定位颗粒和/或试剂。参见,例如,图16D。

[0183] 每个入口流动流的相对尺寸(或流速)和位置可以决定携带颗粒和/或试剂的流动流的位置和相对宽度二者。例如,相对小的(窄的)、侧面为两个较大的(宽的)流动流的颗粒/试剂的入口流动流,可以占据单个出口通道中窄的中央位置。相反,相对大的(宽的)、侧面尺寸为尺寸相当的流动流和较小(较窄的)流动流的颗粒/试剂的入口流动流,可以占据横向地朝向较小流动流偏置的较宽的位置。在任一种情形中,基于层流的机制可以称为集中机制,因为颗粒/试剂被“集中”到出口通道的横截面积的亚组。基于层流的机制可以用于单独地运送(address)颗粒和/或试剂到多个不同的捕获位点。

[0184] 基于层流的机制可以是可变的机制以改变颗粒/试剂的横向位置。如上所述,每个入口流动流的相对贡献可以决定颗粒/试剂流动流的横向位置。任何入口流动流的改变的流可以改变其对出口流动流的贡献,相应地转变颗粒/试剂流动流。在称为灌注机制(perfusion mechanism)的极端情形中,试剂(或颗粒)流动流可以横向地移动,基于存在或不存在来自邻近的入口流动流的流,与保持的颗粒(试剂)接触或与保持的颗粒(试剂)分开。这样的机制还可以用于实现颗粒的可变的或调整的横向定位,例如以引导颗粒向具有不同横向位置的捕获位点。

[0185] 微流体装置中颗粒和/或试剂的横向定位可以至少部分地由随机(或分布流)集中特征介导。随机横向集中特征一般包括其中至少部分地随机选择的输入的颗粒或试剂的亚组被侧向分配离开主要流动流到通道中减少的流动流的区域(或可能的,到不同的通道)的任何集中特征。减少的流的区域可以促进颗粒保持、处理、检测、最小化颗粒损伤和/或促进颗粒与基质接触。随机集中特征可以由分隔流位点和/或局部加宽的通道以及其它的通道决定。

[0186] 分隔流位点可以通过形成减少的流体流速的区域来实现随机定位。分隔流位点一般包括任何通道接头,在此处来自一个(优选的)或更多个入口通道的入口流动流被分隔到

较大数目的出口通道中,包括两个、三个或更多个通道。这种分隔位点可以传递颗粒的亚组到在接头处或附近形成的减少的流速或准-停滞流的区域,所述颗粒的亚组可以随机选择和/或基于颗粒的特性颗粒(例如质量)选择。由亚组代表的颗粒的比例可以依赖于出口通道相对于入口通道的相对流方向。这些流方向可以一般正交于入口流动流,以相对方向被导向,以形成“T-接头”。可选择地,出口流方向可以形成小于和/或大于90度的角度。

[0187] 具有两个或更多个出口通道的分隔流集中特征可以用作分部流机制。具体地,被携带到通道接头的流体、颗粒、和/或试剂可以按照经过两个或更多个出口通道的流体流被分部。因此,进入两个或更多个通道的颗粒或试剂的部分数目或体积可以被通道和/或经过通道的流体流速调整,通道的相对尺寸和/或经过通道的流体流速转而可被阀或其它合适的流调整机制调整。在第一组实施方案中,出口通道可以是非常不等的尺寸,从而仅有小比例的颗粒和/或试剂被导向较小的通道。在第二组实施方案中,阀可以用于形成试剂的期望稀释。在第三组实施方案中,阀可以用于选择性地导向颗粒到两个或更多个流体路径之一。

[0188] 局部加宽的通道可以通过产生主要流动流侧向的降低流速的区域而促进随机定位。降低流速可以在降低流速的区域沉降输入的颗粒的亚组。这样的加宽的通道可以包括以一定角度弯曲或弯折的非直线通道。可选择地或另外,加宽的区域可以由在通道壁、横贯通道的室和/或类似物中形成的凹处形成,尤其在弯曲或弯折的通道的外侧边缘。

[0189] 颗粒和/或试剂的横向定位还可以至少部分地被离心集中特征介导。在离心集中特征中,颗粒可以经历由速度改变决定的离心力,例如通过移动经过流体路径中的弯道。颗粒的尺寸和/或密度可以决定速度改变的速率,分配不同尺寸和/或密度的颗粒到不同的横向位置。

#### [0190] 引流沟特征

[0191] 在某些实施方案中,捕获位点还包括引流沟特征。当采用机械捕获时,例如引流沟特征可以包括捕获特征中的一个或更多个障碍物,所述障碍物的尺寸为允许流体流动但不允许颗粒流动经过和/或围绕捕获特征。因此,例如捕获特征可以包括由空间(引流沟特征)间隔的两个物理屏障,其中空间足够大以允许无颗粒的流体以足够低的阻抗在屏障之间流动以引导细胞朝向屏障,从而增强颗粒捕获的概率。物理屏障之间的空间一般应当足够小和/或适当地构造,使得在捕获位点被捕获的颗粒将不穿过屏障。在具体的、说明性实施方案中,捕获特征包括带有第一和第二端的两个凹的物理屏障,其中屏障布置为在屏障的第一端之间带有小空间,形成引流沟特征,在屏障的第二端带有较大空间。参见图14B(其中 $d_3$ 大于 $d_1$ , $d_1$ 形成引流沟)。以该构造,屏障形成尺寸适合捕获颗粒的“杯”,在杯的基部带有引流沟。凭借引流沟,颗粒朝向杯流动,只要其未被占据。一旦颗粒流流入杯中,则引流沟被“塞上”,这倾向于增强颗粒围绕杯的流动并继续到微流体装置中的下一个捕获特征

#### [0192] 未优化的单颗粒捕获

[0193] 在特定的实施方案中,捕获技术例如有限稀释用于在分别的反应体积中捕获颗粒。在该类型的捕获中,例如在微流体装置中没有使用任何捕获特征,例如优先保持仅单细胞在捕获位点的结合亲和性或机械特征。例如有限稀释可以如下进行:通过制备一系列颗粒悬浮液的稀释液,并且将来自每个稀释液的小份分配到分别的反应体积中。确定每个反应体积中的颗粒的数目,然后选择产生具有仅单颗粒的反应体积的最高比例的稀释液并将其用于对本文描述的参数测量捕获颗粒。

#### [0194] 优化的单颗粒捕获

[0195] 在一些实施方案中,方法包括使用优化的捕获技术来增加高于利用诸如有限稀释的方法实现的具有仅一个颗粒的分别的反应体积的预计分数(即,高于约33%)。在这些实施方案的变化形式中,捕获被优化使得各自具有仅一个颗粒的分别的反应体积的预计分数为分别的反应体积的总数目的至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%。在具体实施方案中,各自具有仅一个颗粒的分别的反应体积的预计分数落入以上面列出的任何两个百分比为边界的范围内。各自具有仅一个颗粒的分别的反应体积的预计分数可以通过经验或统计学手段确定,取决于特定捕获技术(例如,有限稀释以与泊松分布一致的方式产生具有仅一个颗粒的反应体积)。如本文中所使用的术语“优化”不暗示实现最优的结果,而仅表示采用一些措施来增加具有仅一个颗粒的分别的反应体积的分数高于约33%。在特定的实施方案中,例如利用排除在每个反应体积(捕获位点)中多于一个颗粒的保持的基于尺寸的机制,可以实现优化的单颗粒捕获。

[0196] 在某些实施方案中,机械捕获单独使用或与一个或更多个其它捕获特征组合使用以在每个分别的反应体积(即,微流体装置内的每个捕获位点)中优先捕获单颗粒。例如,每个捕获位点可以包括尺寸为包含仅一个颗粒的一个或更多个物理屏障。物理屏障的形状可以设计成增强颗粒的保持。例如当颗粒是细胞时,物理屏障的尺寸和构造可以形成适合于保持仅一个细胞的凹的表面。在此类实施方案中,物理屏障可以被设计成以便允许流体流经过未被细胞占据时的捕获位点,和/或捕获位点可以包括促进该流动的引流沟特征。在特定的实施方案中,微流体装置包含多个适当地尺寸/构造的物理屏障,据此多个单独颗粒被保持在装置中,每个物理屏障保持一个颗粒。在说明性实施方案中,物理屏障可以位于微流体装置的分别的区室,每个区室一个区域。区室可以被布置为形成阵列,诸如例如,从Fluidigm Corp. (South San Francisco, CA) 可得的和本文描述的微流体阵列。还参见图16A-G。

[0197] 在某些实施方案中,基于亲和性的捕获单独使用或与一个或更多个其它捕获特征例如机械捕获组合使用以在每个分别的反应体积(即,微流体装置中的每个捕获位点)中优先捕获单细胞。例如微流体装置表面的包含对颗粒或颗粒组分的结合伴侣的离散区域的尺寸可以使得仅一个颗粒可以结合至该区域,后续颗粒的结合被空间位阻封闭。在特定的实施方案中,微流体装置包含多个适当地尺寸的区域,据此多个单独颗粒被保持在装置中,在每个区域一个颗粒。在说明性实施方案中,这些区域可以位于微流体装置中的分别的区室中,每个区室一个区域。区室可以被布置以形成阵列,诸如例如,从Fluidigm Corp. (South San Francisco, CA) 可得的和本文描述的微流体阵列。

[0198] 基于亲和性的、优化的单颗粒捕获的一种方法是基于捕获包含结合待检验的颗粒的结合伴侣的支持物。在说明性实施方案中,支持物可以是在其表面分布结合伴侣的珠。参见图15A。珠可以通过机械捕获利用杯形捕获特征捕获以在每个捕获位点产生单个固定化支持物(例如,珠)。除了固定化支持物之外,在某些实施方案中,捕获特征可以减少支持物(例如,珠)的展示结合伴侣的表面积。这一表面可能被足够地减少使得仅一个颗粒可以结合到固定化支持物(例如,珠)的展示结合伴侣的区域。为了促进颗粒-支持物结合,在一些实施方案中,固定化支持物的展示结合伴侣的区域面向颗粒的流动路径。在具体、说明性的

实施方案中,微流体装置的流动通道包含一系列捕获特征。将带有结合伴侣(例如,细胞特异性抗体)的珠的悬浮液输入通道以在捕获位点产生一系列固定化珠。然后洗涤通道以除去任何游离(即,未固定化的)珠。图15A。然后将细胞悬浮液输入通道。单独细胞可以结合每个珠的展示结合伴侣的部分。每个结合的细胞经过空间阻塞阻止任何其它细胞结合该珠。通道的洗涤除去未结合的细胞。参见图15B。然后可以关闭捕获位点之间的阀以产生分别的反应体积,各自包含一个捕获位点和一个接合的细胞。可以采用一个或更多个集中特征以引导珠以及颗粒流动朝向每个捕获位点。可选择地或另外,捕获特征可以各自包括当捕获特征未被珠占据时允许流体流经过捕获位点的引流沟特征。

#### [0199] 确定捕获的颗粒的数目

[0200] 在某些实施方案中,确定每个分别的反应体积中颗粒的数目是有利的。当利用有限稀释时,可以进行这一确定以鉴定产生具有仅单颗粒的区室的最高分数的稀释。这一确定还可以在任何捕获技术之后进行以鉴定包含仅一个颗粒的那些反应体积。例如在一些实施方案中,基于检验结果是否来自包含0、1、2或更多个细胞的反应体积,可以将该检验结果分选为多个“仓”,允许分别分析这些仓的一个或更多个。

[0201] 在一些实施方案中,每个分别的反应体积中颗粒的数目通过显微术确定。例如,当分别的反应体积是在足够透明或半透明的微流体装置的区室中时,简单的亮视野显微术可以用于显现和计数每个区室的颗粒例如细胞。参见实施例1。以下描述的和从Fluidigm Corp. (South San Francisco, CA) 可得的微流体装置适于用在这一亮视野显微术方法中。

[0202] 在某些实施方案中,可以采用染色剂、染料或标记物来检测每个分别的反应体积中的颗粒的数目。可以使用在分别的反应体积中可以检测的任何染色剂、染料或标记物。在说明性实施方案中,可以使用荧光染色剂、染料或标记物。采用的染色剂、染料或标记物可以针对特定应用而定制。当颗粒是细胞,且待测量的参数是细胞表面的特征时,染色剂、染料或标记物可以是不需要穿透细胞的细胞表面染色剂、染料或标记物。例如可以采用对细胞表面标志物特异性的标记的抗体来检测每个分别的反应体积中细胞的数目。当颗粒是细胞,且待测量的参数是细胞的内部特征(例如,核酸)时,染色剂、染料或标记物可以是膜透性染色剂、染料或标记物(例如,双链DNA结合染料)。参见实施例1。

#### [0203] 颗粒检验

#### [0204] 检验方法

[0205] 可以使用任何合适的检验方法检验颗粒的选择参数,该方法可以是定性的和/或定量的。合适的检测方法可以包括光谱法、电法、流体力学方法、成像法、和/或生物方法、及其它,特别是适用于或可适用于分析颗粒的那些。这些方法可以包括检测单个或多个值、时间依赖性 or 时间独立性(例如,稳定状态或端点)值、和/或平均的或(时间地和/或空间地)分布的值、及其它。这些方法可以测量和/或输出模拟和/或数字值。

[0206] 光谱法通常可以包括检测光(或波状的颗粒)的任何特性、特别是经由与样品相互作用而变化的特性。合适的光谱法可以包括吸收、发光(包括光致发光、化学发光和电化学发光)、磁共振(包括核自旋共振和电子自旋共振)、散射(包括光散射、电子散射和中子散射)、衍射、圆二色性和旋光性、及其它。合适的光致发光方法可以包括荧光强度(FILINT)、荧光偏振(FP)、荧光共振能量转移(FRET)、荧光寿命(FLT)、全内反射荧光(TIRF)、荧光相关光谱学(FCS)、荧光漂白恢复(FRAP)、荧光激活细胞分选术(FACS)及其磷光和其它类似物、及

其它。

[0207] 电法通常可以包括检测任何电参数。合适的电参数可以包括电流、电压、电阻、电容和/或电源、及其它。

[0208] 成像法通常可以包括检测空间分布的信号,典型地用于使样品或其组分可视化,包括光学显微术和电子显微术、及其它。

[0209] 生物方法通常可以包括检测由颗粒传导的、介导的和/或影响的一些生物活性。

#### [0210] 检验的位点

[0211] 颗粒参数可以在任何合适的位点检验。在采用微流体装置的实施方案中,颗粒参数可以在微流体装置的内部和/或外部的位点处检验。

[0212] 微流体装置内部的检验位点可以包括通道、区室、和/或阱、及其部分。颗粒或颗粒特性可以在颗粒(或释放的组分/检验产物)是静止的或正移动时进行检验。静止颗粒可以在颗粒捕获之后进行检验。移动着的颗粒可以在颗粒捕获之前和/或之后进行检验。特别地,颗粒可以通过任何合适的定位机制例如通过流体流(基于流的检测)而移动经过检测位点。

[0213] 合适的外部检验位点可以包括远离或独立于微流体装置的任何位点。外部检验位点可以用于在从微流体装置除去颗粒、颗粒组分、或反应产物之后检测颗粒或颗粒特性。可以替代地和/或除内部位点之外地使用这些外部位点的一个或更多个,允许颗粒、颗粒组分或反应产物被进一步操作和/或分析。这些进一步操作和/或分析方法可以与微流体装置中进行的操作和/或方法重叠,但是优选地互补,所述操作和/或方法包括质谱分析法、电泳、离心、PCR、核酸测序、和/或细胞培养、及其它。

#### [0214] 检验的参数

[0215] 检验方法可以直接地和/或间接地(例如,经由报告分子)检测和/或监测颗粒的任何合适的参数。合适的参数可以包括颗粒身份、数目、浓度、位置(绝对的或相对的)、组成、结构、序列、和/或活性、及其它。检测的参数可以包括分子或超分子特性,例如DNA、RNA、蛋白、酶、脂质、碳水化合物、离子、代谢物、细胞器、加入的试剂、和/或其复合物、及其它的存在/不存在、浓度、定位、结构(例如,序列)/修饰、构象、形态、活性、数目和/或移动。检测的参数还可以包括细胞特性,例如任何合适的细胞基因型或表型,包括形态、生长、凋亡、坏死、溶解、活着/死亡、细胞周期中的位置、信号路径的活性、分化、转录活性、基底附着、细胞-细胞相互作用、翻译活性、复制活性、转化、热休克反应、活动性、传播、膜完整性、和/或神经突增生、及其它。

#### [0216] 反应和反应产物的检验

[0217] 如上所述,在特定的实施方案中,颗粒检验可以要求在每个分别的反应体积中对每个颗粒或颗粒组分进行多个反应以对每个颗粒产生多个反应产物。如这一上下文所使用的,术语“反应”包括两个结合伴侣的结合以及其中分子被改变、产生或破坏的反应。然后可以定性和/或定量分析反应产物,从而得到接下来与每个颗粒相关联的结果。在某些实施方案中,分别的反应体积的内容物可以被回收,并且任选地,反应产物经历其它分析。

[0218] 说明性反应包括颗粒中的或与颗粒相关的一个或更多个核酸的多种操作。该类型的合适的反应包括,例如DNA的扩增、利用核酸酶的DNA的消化、连接DNA、将衔接子序列连接至一个或更多个DNA分子、转座酶介导的转座子末端向DNA分子的掺入、DNA测序、RNA的逆转

录、RNA的扩增和利用核糖核酸酶的RNA的消化。分别在颗粒中或与颗粒相关联的所有DNA或RNA的全基因组扩增和/或全转录组扩增可以被进行以产生颗粒的总DNA或总RNA互补物的代表。虽然这些术语通常关于细胞的总DNA或总RNA互补物而使用,但是它们在本文中更广泛地用于与任何颗粒相关(例如,染色体“全基因组扩增”旨在扩增全部染色体)。在某些实施方案中,在分别的反应体积中进行的反应加入一个或更多个核苷酸序列至靶核酸,例如经由扩增(参见下面的“Multi-Primer Methods for Incorporating Nucleic Acid Sequences into Target Nucleic Acids”)、连接(例如,作为衔接子的连接)或使用转座酶来掺入选择的转座子末端。

#### [0219] 试剂

[0220] 颗粒可以在参数测量之前、期间或之后暴露于一种或更多种试剂。合适的试剂包括任何化学物质、化合物、离子、聚合物、材料、复合物、混合物、聚集体和/或生物颗粒、及其它,其以本文描述的任何方法直接地或间接地接触颗粒。试剂可以在颗粒分析中起作用,包括作为化学/生物调节剂、检测/检验试剂、溶剂、缓冲剂、介质、洗涤液和/或诸如此类的操作。

[0221] 化学调节剂或生物调节剂可以包括被测试与颗粒相互作用的任何试剂。相互作用通常包括特异性结合至颗粒和/或颗粒(或调节剂)上的任何可检测的基因型作用和/或表型作用。化学/生物调节剂可以包括与受体相互作用的配体(例如,拮抗物、激动剂、激素等等)。配体可以是小分子、肽、蛋白、碳水化合物、脂质等等。

[0222] 可选择地或另外,化学/生物调节剂可以是核酸。核酸可以是DNA、RNA、核酸肽类、修饰的核酸、和/或其混合物,并且可以是单链的、双链的和/或三链的。核酸可以通过化学合成、酶合成和/或生物合成来产生,并且可以是质粒、片段、正义/反义表达载体、报告基因、用于基因组整合/修饰的载体(例如靶向核酸/载体(用于敲除/敲低/敲入))、病毒载体、反义寡核苷酸、dsRNA、siRNA、核酶、和/或类似物。核酸试剂还可以包括转染试剂以促进通过细胞摄取核酸,例如脂质试剂(例如, lipofectamine)、沉淀形成试剂(例如磷酸钙)、DMSO、聚乙二醇、包裹核酸的病毒包衣和/或诸如此类。

[0223] 化学/生物调节剂可以包括各种化学材料和/或生物实体。各种化学调节剂可以是离子(例如钙、钠、钾、锂、氢(pH)、氯、氟、碘等等)、溶解气体(NO、CO<sub>2</sub>、O<sub>2</sub>等等)、碳水化合物、脂质、有机物、聚合物等等。在一些实施方案中,生物调节剂可以被暴露至细胞,例如至感染细胞,以测量细胞-细胞相互作用等等。生物调节剂可以包括任何细胞、病毒或细胞器。

[0224] 当颗粒是细胞时,细胞可以在本文描述的方法中使用之前进行预处理,或者在这些方法期间或之后通过任何合适的加工步骤进行处理。这类加工步骤可以包括调节剂处理、转染(包括感染、注射、颗粒轰击、脂质转染、共沉淀转染等等)、利用检验试剂加工和/或诸如此类。

[0225] 本文描述的方法中采用的试剂可以包括检测/检验试剂。检测/检验试剂通常包括与颗粒接触以便于加工颗粒(或颗粒组分)用于检测颗粒(或组分)的预先存在的或新产生的参数的任何试剂。检测/检验试剂可以包括染色剂、染料、标记物、酶、底物、辅因子和/或特异性结合伴侣(SBP)、及其它。合适的标记物可以是发光基团、荧光团、发色团、生色团和/或类似物。染色剂、染料或标记物可以与SBP结合或可以是SBP;可以充当酶底物;可以固有地标记细胞或细胞结构(例如,DNA染料、膜染料、转运转染料等等);可以充当指示剂染料(例

如钙指示剂、pH指示剂等等) ;和/或类似物。酶可以通过将标记物掺入产物和/或通过产生随后可以被检测的产物而在颗粒检验中工作。合适的酶可以包括聚合酶(RNA和/或DNA)、热稳定的聚合酶(例如Taq、VENT等等)、过氧化物酶(例如HRP)、磷酸酶(例如碱性磷酸酶)、激酶、甲基酶、连接酶、蛋白酶、半乳糖苷酶(例如 $\beta$ -半乳糖苷酶、葡萄糖醛酸酶等等)、转移酶(例如氯霉素乙酰转移酶)、氧化还原酶(例如荧光素酶)、和/或核酸酶(例如脱氧核糖核酸酶、核糖核酸酶等等)、及其它。SBP例如抗体、洋地黄毒苷、核酸等等可以直接地结合至染色剂、染料、标记物、酶和/或其它SBP;可以与染料、标记物和/或酶(在另外的暴露步骤中预键合或键合)非共价键合;和/或诸如此类。

#### [0226] 分析单颗粒中的核酸

[0227] 在特定的实施方案中,本文描述的方法用于分析一个或更多个核酸。例如,可以确定特定靶核酸的存在和/或水平,也可以确定靶核酸的特征,例如,核苷酸序列。在说明性实施方案中,带有在颗粒中或与颗粒缔合的一个或更多个样品核酸的颗粒的群体被捕获在分别的反应体积中,分别的反应体积各自优选地包含仅单颗粒。进行反应,诸如连接和/或扩增DNA、或逆转录和/或扩增RNA,对包含一个或更多个靶核酸的任何反应体积产生反应产物。这些反应产物可以在反应体积中进行分析,或可以分别或以池回收反应体积,用于后续分析,例如DNA测序。

[0228] 在某些实施方案中,反应掺入一个或更多个核苷酸序列到反应产物中。这些序列可以通过任何合适的方法掺入,包括连接、转座酶介导的掺入或利用带有包括待掺入的序列的一个或更多个核苷酸标签的一个或更多个引物来扩增。这些掺入的核苷酸序列可以起到帮助本文所述的任何检验的任何功能。例如,一个或更多个核苷酸序列可以被掺入反应产物以编码有关反应产物的信息条目,诸如作为反应产物来源的反应体积的身份。在这种情形中,反应在本文中称为“编码反应”。为了这一目的可以采用将“条形码”核苷酸序列加入靶核酸的多引物方法并在以下描述。在具体实施方案中,核酸扩增利用至少两个扩增引物进行,其中每个扩增引物包括条形码核苷酸序列,且条形码核苷酸序列的组合编码作为反应产物来源的反应体积的身份(称为“组合条形码化”)。当分别的反应体积在矩阵型微流体装置的分别的区室中时方便地采用这些实施方案,所述矩阵型微流体装置例如,如从Fluidigm Corp. (South San Francisco, CA) 可得的并且在以下描述的那些(参见“微流体装置”)。每个分别的区室可以包含识别在其中进行编码反应的区室的行和列的条形码核苷酸序列的组合。如果反应体积被回收并进行包括检测条形码组合的进一步分析,可以将结果与特定区室关联,从而与区室中的颗粒关联。这一关联可以对包含单颗粒的所有区室进行以允许对颗粒群体的单颗粒(例如,单细胞)分析。

[0229] 以下部分讨论适合的核酸样品以及在其内的适于在本文描述的方法中分析的靶核酸。然后描述扩增引物设计和说明性扩增方法。其后是用于掺入核酸序列到靶核酸中的多引物扩增方法的描述。其余部分讨论多种标记策略和除去不想要的反应组分。这些部分是关于采用扩增来掺入核酸序列到靶核酸内和/或分析它们的方法来描述的。然而,基于本文的指导,本领域技术人员将认识到,扩增对于进行本文描述的许多方法不是关键的。例如,核酸序列可以利用其它手段掺入,诸如连接或利用转座酶。

#### [0230] 样品核酸

[0231] 核酸(“样品”)的制备可以从生物来源得到并且使用本领域已知的常规方法进行

制备。具体而言,可以从任何来源提取和/或扩增在本文中所描述的方法中有用的DNA或RNA,所述来源包括细菌、原生动物、真菌、病毒、细胞器以及高等生物例如植物类或动物类,具体地是哺乳动物类、且更具体地是人类。合适的核酸还可以获得自环境来源(例如,池塘水)、人造产物(例如,食物)、法医样品及类似物。核酸可以通过多种标准技术的任一种提取或扩增自细胞、体液(例如,血液、血液级分、尿液等)或组织样品。说明性样品包括血浆、血清、脊髓液、淋巴液、腹膜液、胸膜液、口腔液以及皮肤的外切片的样品;来自呼吸道、肠道生殖道和尿道的样品;眼泪、唾液、血细胞、干细胞或肿瘤的样品。例如可以从胚胎中或从母体血液中得到胎儿DNA的样品。样品可以获得自活的或死的生物体或体外培养物。说明性样品可以包括单细胞、福尔马林固定的和/或石蜡包埋的组织样品以及针吸活组织检查。本文所述的方法中有用的核酸还可以源自包括cDNA、粘粒、YAC、BAC、P1、PAC文库及类似物的一个或更多个核酸文库。

[0232] 可以使用本领域熟知的方法分离感兴趣的核酸,其中具体方法的选择取决于核酸的来源、性质以及类似因素。这些样品核酸不必是纯的形式,但是典型地是足够纯的以允许目标反应得以实施。当靶核酸是RNA时,RNA可以通过本领域已知的并且在例如Sambrook, J., Fritsch, E.F., 和Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989) 所描述的标准方法被逆转录成cDNA。

#### [0233] 靶核酸

[0234] 本文描述的方法中有用的靶核酸可以衍生自上述的任何样品核酸。在典型的实施方案中,对靶核酸而言,至少一些核苷酸序列信息将应是已知的。例如,如果采用PCR作为编码反应,则总体上对给定的靶核酸的每个末端而言可以得到足够的序列信息以允许设计适当的扩增引物。在可选择的实施方案中,引物中的靶特异性序列可以用随机或简并的核苷酸序列来替换。

[0235] 这些靶可以包括例如与病原体例如病毒、细菌、原生动物或真菌相关的核酸;RNA,例如,过表达或低表达指示疾病的那些,以组织特异性或发育特异性形式表达的那些;或由特定的刺激物诱导的那些;基因组DNA,其可以被分析特异性多态性(例如SNP)、等位基因或单体型,例如,在基因分型中。特别感兴趣的是在遗传疾病或其它病理学中发生改变的(例如,扩增、缺失、重排和/或突变)基因组DNA;与希望的或不希望的性状相关联的序列;和/或独特地识别单独的序列(例如,在法医或亲子鉴定中)。

[0236] 在不同的实施方案中,待扩增的靶核酸可以是,例如,25个碱基、50个碱基、100个碱基、200个碱基、500个碱基或750个碱基。在本文描述的方法的某些实施方案中,可以采用长片段扩增方法例如长片段PCR以从扩增混合物产生扩增子。长片段PCR允许扩增范围从一个或数千碱基(kb)至超过50kb的靶核酸。在不同的实施方案中,通过长片段PCR扩增的靶核酸长度是至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45或50kb。靶核酸还可以落入以这些数值的任一个作为端点的任何范围内(例如,25个碱基至100个碱基或5-15kb)。

#### [0237] 引物设计

[0238] 适用于核酸扩增的引物是足够长以在用于聚合的试剂存在下引发延伸产物的合成。引物的确切长度以及构成将取决于多种因素,包括例如退火反应的温度、引物的来源以

及构成,以及当使用探针时,探针退火位点与引物退火位点的接近程度以及引物:探针浓度的比率。例如取决于靶核酸序列的复杂性,寡核苷酸引物典型地包含在约15至约30个核苷酸的范围内,虽然它可以包含更多或更少的核苷酸。引物应当是足够互补的以选择性地退火到它们相应的链上并且形成稳定的双链体。本领域技术人员知道如何选择适当的引物来扩增感兴趣的靶核酸。

[0239] 例如,可以通过使用任何可商购的软件或开源软件例如Primer3(参见,例如, Rozen和Skaletsky (2000) *Meth. Mol. Biol.*, 132:365-386; [www.broad.mit.edu/node/1060](http://www.broad.mit.edu/node/1060) 等)或者访问Roche UPL网址来设计PCR引物。将扩增子序列输入Primer3程序中,其中UPL探针序列在括号中以确保Primer3程序将在被括起来的探针序列的任一侧上设计引物。

[0240] 可以通过任何合适的方法来制备引物,包括,例如适当序列的克隆以及限制性酶切或通过多种方法的直接化学合成,例如Narang等人(1979) *Meth. Enzymol.* 68:90-99的磷酸三酯法;Brown等人(1979) *Meth. Enzymol.* 68:109-151的磷酸二酯法;Beaucage等人(1981) *Tetra. Lett.*, 22:1859-1862的二乙基磷酰胺酸法;美国专利号4,458,066的固体载体法等,或可以从商业来源提供引物。

[0241] 可以通过使用Sephadex柱(Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ)或本领域技术人员已知的其它方法对引物进行纯化。引物纯化可以提高本发明方法的灵敏度。

#### [0242] 扩增方法

[0243] 核酸可以根据本文描述的方法为了任何有用的目的扩增,例如,以增加靶核酸的浓度用于后续分析和/或掺入一个或多个核苷酸序列、和/或检测和/或定量和/或测序一个或多个靶核酸。扩增可以在液滴中、在乳液中、在容器中、在微量滴定板的孔中、在矩阵型微流体装置的区室等等中进行。

#### [0244] 扩增以增加靶核酸的浓度

[0245] 扩增以增加靶核酸的浓度可以旨在扩增反应混合物中所有核酸、特定类型的所有核酸(例如,DNA或RNA)、或特定靶核酸。在具体、说明性实施方案中,可以进行全基因组扩增以增加基因组DNA的浓度;可以扩增RNA,任选地先进行逆转录步骤;和/或一般性或靶特异性预扩增。

#### [0246] 全基因组扩增

[0247] 为了分析基因组DNA,可以使用全基因组扩增(WGA)程序扩增样品核酸。合适的WGA程序包括引物延伸PCR(PEP)和改进的PEP(I-PEP)、简并寡核苷酸引物PCR(DOP-PCR)、连接介导的PCR(LMP)、基于T7的DNA线性扩增(TLAD)和多重置换扩增(MDA)。这些技术描述在2010年7月15日公布的美国专利公布号20100178655中(Hamilton等人),其通过引用以其全部内容并入本文,尤其是其可用于单细胞核酸分析的方法的描述。

[0248] WGA试剂盒可商购自例如,Qiagen, Inc. (Valencia, CA USA), Sigma-Aldrich (Rubicon Genomics; 例如, Sigma **GenomePlex®** Single Cell Whole Genome Amplification Kit, PN WGA4-50RXN)。本文描述的方法的WGA步骤可以根据制造商的说明使用任何可用的试剂盒进行。

[0249] 在特定的实施方案中,WGA步骤是限制的WGA,即,WGA在达到反应平台期之前停止。通常,WGA进行多于两个扩增循环。在某些实施方案中,WGA进行少于约10个扩增循环,例如,4和8个循环之间,包括4个和8个循环。然而,WGA可以进行3、4、5、6、7、8或9个循环或落入由

任意这些值限定的范围内的一些循环。

#### [0250] RNA扩增

[0251] 在某些实施方案中,可以分析来自单细胞或小细胞群的RNA的一个或更多个RNA靶。合适的RNA靶包括mRNA以及非编码RNA,例如小核仁RNA(snoRNA)、微小RNA(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)和与Piwi蛋白作用的RNA(Piwi-interacting RNA)(piRNA)。在特定的实施方案中,感兴趣的RNA被转化成DNA,例如,通过逆转录或扩增。

[0252] 例如,为了分析单细胞或小细胞群的mRNA,mRNA一般被转化成mRNA群的DNA表现形式。在某些实施方案中,采用的方法优选地产生cDNA群,其中每个cDNA的相对量与样品群中对应的mRNA的相对量大体上相同。

[0253] 在特定的实施方案中,可以采用逆转录以根据标准技术利用逆转录酶从mRNA模板产生cDNA。通过例如使用特异性引物、寡聚dT或随机引物可以启动细胞mRNA群的逆转录。为了合成代表细胞mRNA的cDNA库,可以使用逆转录酶合成与样品细胞RNA互补的cDNA的第一链。这可以使用商业可利用的BRL Superscript II试剂盒(BRL,Gaithersburg,Md.)或任何其它商业可利用的试剂盒来完成。逆转录酶优先使用RNA作为模板,但也可以使用单链DNA模板。因此,第二链cDNA合成可以使用逆转录酶和合适的引物(例如,多聚A、随机引物等等)来进行。第二链合成也可以使用大肠杆菌(E.coli)DNA聚合酶I来进行。可以在合成第二cDNA链的同时或之后移除所述RNA。这可以通过例如用降解RNA的核糖核酸酶例如大肠杆菌核糖核酸酶H处理混合物而进行。

[0254] 在其它实施方案中,采用扩增方法从mRNA模板产生cDNA。在这样的实施方案中,典型地采用产生代表mRNA群的cDNA群的扩增方法。

[0255] 单细胞或小细胞群的非编码RNA的分析典型地起始于感兴趣的RNA转化成DNA。该转化可以通过逆转录或扩增进行。在某些实施方案中,采用的方法优选地产生DNA群,其中每个DNA的相对量与样品群中对应的mRNA的相对量大体相同。可以使用优先与感兴趣的RNA退火的引物选择性地逆转录或扩增所述靶RNA。合适的引物可以商购得到或可以由本领域技术人员设计。例如Life Technologies出售用于微小RNA(miRNA)靶的MegaPlex™引物池。这些引物可以用于逆转录(RT)和特定靶扩增(STA)。参见,例如,实施例2B。

#### [0256] 预扩增

[0257] 可以进行预扩增来增加反应混合物中核酸序列的浓度,通常,例如利用随机引物组、对存在的多个或所有核酸共同的一个或更多个序列特异性的引物(例如,多聚dT来引发多聚A尾)、或随机引物组和特异性引物的组合。可选择地,预扩增可以利用对感兴趣的一个或更多个靶核酸特异性的一个或更多个引物对来进行。在具体、说明性的实施方案中,可以预扩增由WGA产生的扩增基因组或从RNA产生的DNA(例如,cDNA)以产生预扩增反应混合物,所述预扩增反应混合物包括特异于一个或更多个感兴趣的靶核酸的一个或更多个扩增子。预扩增通常使用预扩增引物、合适的缓冲液系统、核苷酸和DNA聚合酶(例如,修改为用于“热启动”条件的聚合酶)进行。

[0258] 在特定的实施方案中,预扩增引物是与在制备样品的扩增实验中使用的序列相同的序列,尽管通常是以减少的浓度。引物浓度可以是如比在扩增实验中使用的引物浓度少约10至约250倍。实施方案包括使用比在扩增实验中的引物浓度少约10、20、35、50、65、75、100、125、150、175和200倍的引物。

[0259] 在具体实施方案中,预扩增至少进行两个循环。在某些实施方案中,预扩增进行少于约20个循环,例如,8和18个循环之间,包括8和18个循环。然而,预扩增可以进行3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24个循环或者落入任何这些值限定的范围内的一些循环。在示例的实施方式中,预扩增可以进行约14个循环以将待检测的扩增子增加约16,000倍。

#### [0260] 扩增用于掺入核酸序列到靶核酸

[0261] 掺入一个或更多个核苷酸序列到靶核酸中的反应可以利用除了退火到靶核酸的部分之外还包含一个或更多个核酸序列的两个或更多个引物来进行。这些部分的一个或更多个可以包含随机序列以掺入核酸序列到样品中的基本上所有核酸中。可选择地或另外,这些部分的一个或更多个对存在的多个或全部核酸共有的一个或更多个序列可以是特异性的。在其它实施方案中,引物包括特异于一个或更多个特定靶核酸的部分。核酸序列可以利用少至两个引物被掺入。然而,多个实施方案采用三个、四个、五个或六个或更多个引物,如在以下更详细描述。

#### [0262] 三引物方法

[0263] 在特定的实施方案中,本发明提供了用于将多个(例如,至少三个)选择的核苷酸序列掺入到一个或更多个靶核酸中的扩增方法。在一些实施方案中,该方法包括扩增在多个样品中的多个靶核酸。在说明性实施方案中,可以在两个或更多个不同样品的每一个中扩增同一组靶核酸。这些样品可以在任何方面彼此不同,例如,这些样品可以是来自不同组织、受试者、环境来源等等。可以使用至少三个引物来扩增每个靶核酸,即:正向和反向扩增引物,每个引物包括靶特异性部分,以及包括核苷酸标签的一个或两个引物。这些靶特异性部分可以在适当的退火条件下被特异性地退火到靶上。用于正向引物的核苷酸标签可以具有与用于反向引物的核苷酸标签相同或不同的序列。通常,核苷酸标签是靶特异性部分的5'。第三引物是条形码引物,该条形码引物包含条形码核苷酸序列和第一和/或第二核苷酸标签特异性部分。条形码核苷酸序列是选择用于编码关于当条形码引物被用于扩增反应时所产生的扩增子的信息的序列。标签特异性部分可以特异性地退火到正向和反向引物中的一个或两个核苷酸标签上。条形码引物一般是标签特异性部分的5'。

[0264] 条形码引物通常以超过正向和/或反向或(内侧)引物的量存在于扩增混合物中。具体而言,如果条形码引物退火到正向引物中的核苷酸标签上,则条形码引物一般以超过正向引物的量存在。如果条形码引物退火到反向引物中的核苷酸标签上,则条形码引物通常以超过反向引物的量存在。在说明性实施方案中,在每种情况中,扩增混合物中的第三引物即反向引物或正向引物可以分别以大致相似于条形码引物的浓度存在。通常,条形码引物以大体上过量形式存在。例如,扩增混合物中条形码引物的浓度可以是相对于一个或更多个正向和/或反向引物的浓度的至少2倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍、至少35倍、至少40倍、至少45倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍、至少 $10^3$ 倍、至少 $5 \times 10^3$ 倍、至少 $10^4$ 倍、至少 $5 \times 10^4$ 倍、至少 $10^5$ 倍、至少 $5 \times 10^5$ 倍、至少 $10^6$ 倍或更高。另外,条形码引物的浓度超过量可以落入以上数值的任何一项作为端点的任何范围内(例如,2倍至 $10^5$ 倍)。在说明性实施方案中,当条形码引物具有对于正向引物上的核苷酸标签具有特异性的标签特异性部分时,该正向引物可以以皮摩尔至纳米摩尔的浓度存在,例如,约5pM至500nM、约5pM至100nM、约5pM至50nM、约5pM至10nM、约5pM至5nM、约10pM至

1nM、约50pM至约500pM、约100pM或以这些数值任何一项作为端点的任何其它范围(例如, 10pM至50pM)。适当地,可以与正向引物的这些浓度中任何一项相组合使用的条形码引物的示例性浓度包括约10nM至约10 $\mu$ M、约25nM至约7.5 $\mu$ M、约50nM至约5 $\mu$ M、约75nM至约2.5 $\mu$ M、约100nM至约1 $\mu$ M、约250nM至约750nM、约500nM或以这些数值任何一项作为端点的任何其它范围(例如, 100nM至500nM)。在使用正向和条形码引物的这类浓度的扩增反应中,反向引物具有与条形码引物处于同一数量级的浓度(例如,在约10倍之内、在约5倍之内或相等)。

[0265] 可以使每个扩增混合物经受扩增作用以产生包括加标签的靶核苷酸序列的靶扩增子,各自包含位于该靶核苷酸序列的侧翼的第一和第二核苷酸标签以及位于靶扩增子的5'或3'末端上的至少一个条形码核苷酸序列(相对于靶扩增子的一个链)。在某些实施方案中,选择第一和第二核苷酸标签和/或条形码核苷酸序列以便避免大体上退火到靶核酸上。在这类实施方案中,加标签的靶核苷酸序列可以包括具有下列元件的分子:5'-(条形码核苷酸序列)-(来自正向引物的第一核苷酸标签)-(靶核苷酸序列)-(来自反向引物的第二核苷酸标签序列)-3'或5'-(来自正向引物的第一核苷酸标签)-(靶核苷酸序列)-(来自反向引物的第二核苷酸标签序列)-(条形码核苷酸序列)-3'。

#### [0266] 四引物方法

[0267] 在一些实施方案中,可以采用多于三个引物以将期望元件加入靶核苷酸序列。例如,可以采用四个引物来产生具有如上讨论的相同元件加上任选的另外的条形码的分子,例如,5'-(条形码核苷酸序列)-(来自正向引物的第一核苷酸标签)-(靶核苷酸序列)-(来自反向引物的第二核苷酸标签)-(另外的条形码核苷酸序列)-3'。在说明性的四引物实施方案中,正向引物包括靶特异性部分和第一核苷酸标签,并且反向引物包括靶特异性部分和第二核苷酸标签。总之,这两个引物构成“内侧引物”。剩下的两个引物是“外侧引物”,其退火到存在于内侧引物中的第一和第二核苷酸标签上。如上所述,一个外侧引物是条形码引物。第二外侧引物可以包括第二标签特异性部分和另外的条形码核苷酸序列,即,其可以是第二条形码引物。

[0268] 在一个或更多个扩增反应中,可以进行扩增以掺入来自超过三个引物的元件。例如,可以在其中存在所有四个引物的一个扩增反应中进行四引物扩增。作为替代方案,可以例如在两个扩增反应中进行四引物扩增:一个用来掺入内侧引物并且一个不同的扩增反应用来掺入外侧引物。当所有四个引物存在于一个扩增反应中时,外侧引物一般是以过量形式存在于反应混合物中。在一步的、四引物扩增反应中,对于条形码引物相对于正向和/或反向引物而言如上给出的相对浓度值还应用到外侧引物相对于内侧引物的浓度。

#### [0269] 组合方法

[0270] 在四引物扩增反应的说明性实施方案中,外侧引物的每一个包含独特的条形码。例如一个条形码引物可以由以下元件构成:5'-(第一条形码核苷酸序列)-(第一核苷酸标签)-3',并且第二条形码引物将由以下元件构成:5'-(第二条形码核苷酸序列)-(第二核苷酸标签)-3'。在这个实施方案中,可以使一定数目(J)的第一条形码引物与一定数目(K)的第二条形码引物组合从而生成JxK个独特的扩增产物。

[0271] 在本发明的进一步说明性实施方案中,可以将多个四个引物结合到一个单一反应以附加条形码核苷酸序列和核苷酸标签的不同组合。例如,如上所述可以使包含以下元件的外侧条形码引物:5'-(第一条形码核苷酸序列)-(第一核苷酸标签)-3'、5'-(第一条形码

核苷酸序列)-(第二核苷酸标签)-3'、5'-(第一条形码核苷酸序列)-(第一核苷酸标签)-3'、5'-(第一条形码核苷酸序列)-(第二核苷酸标签)-3'与内侧靶特异性引物组合以生成包含形码引物与所期望的扩增子序列的所有组合的扩增产物池。

[0272] 在本发明的其它说明性实施方案中,可以使上述组合或对于本领域普通技术人员而言是明显的其它组合中的任何一项中的外侧条形码引物与多于一对的具有相同第一和第二核苷酸标签序列的靶引物序列组合。例如,如上所述,可以使包含与同一第一核苷酸标签组合的高达十个不同靶特异性正向引物序列以及与同一第二核苷酸标签组合的高达十个不同靶特异性反向引物序列的内侧引物与高达2个或高达4个外侧条形码引物组合从而生成多个扩增产物。在不同的实施方案中,可以使携带相同第一核苷酸标签和第二核苷酸标签的至少10个、至少20个、至少50个、至少100个、至少200个、至少500个、至少1000个、至少2000个、至少5000个或至少10000个不同靶特异性引物对与高达2个或高达4个外侧条形码引物组合以生成多个扩增产物。

#### [0273] 双向组合方法

[0274] 在四引物扩增反应的说明性实施方案中,内侧和外侧引物可以各自包含独特的条形码,以致扩增在所得的扩增子的每个末端产生条形码组合。当扩增子被测序时,该方法是有用的,因为条形码组合可以从序列的任一端读取。例如,可以采用四引物以产生具有以下元件的分子:5'-第二条形码核苷酸序列-第一核苷酸标签序列-第一条形码核苷酸序列-靶核苷酸序列-第一条形码核苷酸序列-第二核苷酸标签序列-第二条形码核苷酸序列-3'。在说明性的四引物实施方案中,两个内侧引物可以包含:

[0275] 正向、内侧引物,包含第一核苷酸标签、第一条形码核苷酸序列和靶特异性部分;和

[0276] 反向、内侧引物,包含靶特异性部分、第一条形码核苷酸序列和第二核苷酸标签。两个外侧引物可以包含:

[0277] 正向、外侧引物,包含第二条形码核苷酸序列和第一核苷酸标签特异性部分;和

[0278] 反向、外侧引物,包含第二核苷酸标签特异性部分和第二条形码核苷酸序列。如上所讨论的,如果内侧和外侧引物被包含在相同的反应混合物中,则外侧引物优选地以过量存在。

[0279] 除了内侧和外侧引物之外还在采用“填充”引物的六引物扩增中可以产生元件的类似组合。因此,例如两个内侧引物可以包含:

[0280] 正向、内侧引物,包含第一核苷酸标签和靶特异性部分;和

[0281] 反向、内侧引物,包含靶特异性部分和第二核苷酸标签。两个填充引物可以包含:

[0282] 正向、填充引物,包含第三核苷酸标签、第一条形码核苷酸序列和第一核苷酸标签特异性部分;和

[0283] 反向、填充引物,包含第二核苷酸标签特异性部分、第一条形码核苷酸序列、第四核苷酸标签。两个外侧引物可以包含:

[0284] 正向、外侧引物,包含第二条形码核苷酸序列和第三核苷酸标签特异性部分;和

[0285] 反向、外侧引物,包含第四核苷酸标签特异性部分和第二条形码核苷酸序列。核酸扩增产生包含以下元件的扩增子:5'-第二条形码核苷酸序列-第三核苷酸标签序列-第一条形码核苷酸序列-第一核苷酸标签序列-靶核苷酸序列-第二核苷酸标签序列-第一条形

码核苷酸序列-第四核苷酸标签序列-第二条形码核苷酸序列-3'。扩增可以在一个、两个、三个扩增反应中进行。例如所有三个引物对可以被包含在一个反应中。可选择地,可以进行两个反应,例如,第一反应包括内侧和填充引物,且第二反应仅包括外侧引物;或第一反应仅包括内侧引物,随后第二反应包括填充和外侧引物。如上所讨论的,当存在多于一个引物对时,相对于其它对作为“外侧”对的引物对优选地以过量存在。因此,如果内侧和填充引物被包含在反应混合物中,则填充引物优选地以过量存在,并且如果填充和外侧引物被包含在反应混合物中,则外侧引物优选地以过量存在。当所有三个引物对被包含在单个反应中时,填充引物可以以内侧引物和外侧引物的浓度之间的中间浓度存在。

#### [0286] 掺入核酸序列的反应

[0287] 可以采用任何方法以掺入核酸序列至靶核酸中。在说明性实施方案中,采用PCR。当使用三个或更多个引物时,扩增通常进行至少三个循环以掺入第一和第二核苷酸标签和条形码核苷酸序列。在不同的实施方案中,扩增进行5、10、15、20、25、30、35、40、45或50个循环或落入以这些值的任一个作为端点的范围中的任何数目的循环(例如,5-10个循环)。在特定的实施方案中,扩增进行足够数目的循环以将靶扩增子拷贝数跨靶和跨样品标准化(例如15、20、25、30、35、40、45或50个循环或落入以这些值的任一个作为端点的范围中的任何数目的循环)。

[0288] 上述方法的特定实施方案提供大体上均一的扩增,产生多个靶扩增子,其中多数扩增子以相对接近于针对多个靶扩增子所计算的平均拷贝数的水平存在。因此,在不同的实施方案中,靶扩增子的至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%以大于靶扩增子的平均拷贝数的50%和小于靶扩增子的平均拷贝数的2倍存在。

#### [0289] 条形码化应用

[0290] 在说明性实施方案中,条形码核苷酸序列辨识特定样品。因此,例如T个靶核酸的组可以在每个S个样品中扩增,其中S和T是整数,通常大于1。在此类实施方案中,扩增可以针对每个样品分别进行,其中相同的正向和反向引物的组用于每个样品,并且正向和反向引物的组具有该组中所有引物共有的至少一个核苷酸标签。不同的条形码引物可以用于每个样品,其中条形码引物具有不同的条形码核苷酸序列,但相同的可以退火到共同的核苷酸标签的标签特异性部分。该实施方案具有的益处是,减少针对多个靶序列产生的扩增子中编码样品来源需要被合成的不同的引物的数目。可选择地,不同的正向和反向引物的组可以用于每个样品,其中每组具有不同于另一组中的引物的核苷酸标签,且不同的条形码引物用于每个样品,其中条形码引物具有不同的条形码核苷酸序列和不同的标签特异性部分。在任一种情形中,扩增从每个样品产生带有样品特异性条形码的T个扩增子的组。

[0291] 在其中相同的正向和反向引物组用于每个样品的实施方案中,每个靶的正向和反向引物可以与样品分别地最初合并,且每个条形码引物可以与其响应的样品最初合并。然后将最初合并的正向和反向引物的小份加入到最初合并的样品和条形码引物的小份以产生S×T扩增混合物。这些扩增混合物可以在任何物品中形成,所述物品可以经受适于扩增的条件。例如,在扩增之前,扩增混合物可以被形成于或被分配至微流体装置的分别的区室中。在说明性实施方案中,合适的微流体装置包括矩阵型微流体装置,例如,以下描述

的那些。

[0292] 在某些实施方案中,在本文描述的任何方法中产生的靶扩增子可以从扩增混合物回收。例如,适于允许回收每个反应区室的内容物的矩阵型微流体装置(参见以下)可以用于扩增以产生靶扩增子。在这些实施方案的变化形式中,可以使靶扩增子经历进一步扩增和/或分析。在某些实施方案中,扩增混合物中所产生的靶扩增子的量可以在扩增期间定量,例如,通过定量实时PCR,或之后定量。

[0293] 在可用于单颗粒分析的实施方案中,组合条形码化可以用于编码反应体积的身份、以及因此作为扩增产物的来源的颗粒的身份。在具体实施方案中,核酸扩增利用至少两个扩增引物进行,其中每个扩增引物包含条形码序列,且条形码序列的组合编码作为反应产物的来源的反应体积的身份(称为“组合条形码化”)。当分别的反应体积在矩阵型微流体装置的分别的区室中时方便地采用这些实施方案,例如,如从Fluidigm Corp. (South San Francisco, CA) 可得的和以下描述的那些(参见“微流体装置”)。每个分别的区室可以包含辨识在其中进行编码反应的区室的行和列的条形码核苷酸序列的组合。如果反应体积被回收并经历包括检测条形码组合的进一步分析(例如,通过DNA测序),可以将结果与特定区室关联,并从而与该区室中的特定颗粒关联。当在回收过程期间或之后组合分别的反应体积时,从而合并(“汇集”)来自多个分别的反应体积的反应产物时,此类实施方案特别有用。在矩阵型微流体装置中,例如,可以汇集行中的所有区室、列中的所有区室或装置中的所有区室的反应产物。如果汇集行中的所有区室,则行内的每一列优选具有独特的条形码组合。如果汇集列中的所有区室,则列中的每一行具有独特的条形码组合。如果汇集装置中的所有区室,则装置中的每一个区室具有独特的条形码组合。

#### [0294] 扩增用于检测和/或定量靶核酸

[0295] 在本文所述的方法中可以使用检测和/或定量核酸的任何方法以检测扩增产物。在一个实施方案中,使用PCR(聚合酶链式反应)来扩增和/或定量靶核酸。在其它实施方案中,使用其它扩增系统或检测系统,包括例如,美国专利号7,118,910中所描述的系统(出于描述扩增/检测系统的目的,该专利通过引用以其全部内容并入本文)。在特定的实施方案中,使用实时定量方法。例如,可以使用“定量实时PCR”方法通过测量在扩增过程本身期间形成的扩增产物的量来确定存在于样品中的靶核酸的量。

[0296] 荧光生成核酸酶测定法是实时定量法的一个具体的实例,该方法可以成功地用于本文描述的方法中。监测扩增产物的形成的方法包括使用双标记的荧光生成寡核苷酸探针对于PCR产物累积进行连续测量,文献中通常称为“TaqMan®方法”的一种方法。参见美国专利号5,723,591; Heid等人,1996, Real-time quantitative PCR Genome Res. 6:986-94, 出于它们的说明荧光生成核酸酶测定法的目的,每个文件都通过引用以其全部内容并入本文。应理解的是,尽管“TaqMan®探针”最广泛用于qPCR,本文所描述的方法不限于这些探针的使用;可以使用任何合适的探针。

[0297] 本发明中可以采用的其它检测/定量方法包括FRET和模板延伸反应、分子信标检测、蝎型探针检测(Scorpion detection)、侵入物检测(Invader detection)、锁式探针检测。

[0298] FRET和模板延伸反应使用利用供体/受体对的一个成员标记的引物以及利用该供

体/受体对的另一个成员标记的核苷酸。在模板依赖性延伸反应期间在将标记的核苷酸掺入到引物中之前,供体和受体被间隔足够开这样使得不能发生能量转移。然而,如果将标记的核苷酸掺入引物中并且该间距是足够近的,则发生能量转移并且可以被检出。这些方法在检测单核苷酸多态性中在进行单碱基对延伸反应中是特别有用的,并且在美国专利号5,945,283和PCT公布WO 97/22719中描述。

[0299] 关于分子信标,当探针杂交到扩增产物的互补区上时,它的构象改变导致形成可检出的信号。探针自身包括两个区段:一个区段在5'末端并且另一个区段在3'末端。这些区段位于退火到探针结合位点的探针区段的侧翼,并且彼此互补。一个末端区段被典型地附加到报告物染料(reporter dye)上并且另一个末端区段通常被附连到猝灭剂染料(quencher dye)上。在溶液中,两个末端区段可以彼此杂交从而形成发夹环。在这种构象中,报告物和猝灭剂染料是足够近的接近这样使得来自报告物染料的荧光被猝灭剂染料有效地猝灭。相反,杂交的探针导致其中猝灭程度被降低的线性构象。因此,通过监测这两种染料的发射变化,有可能间接地监测扩增产物的形成。这个类型的探针以及它们的使用方法进一步由例如Piatek等人,1998,Nat.Biotechnol.16:359-63;Tyagi和Kramer,1996,Nat.Biotechnology14:303-308;和Tyagi,等人,1998,Nat.Biotechnol.16:49-53(1998)描述。

[0300] 蝎型探针检测方法由例如Thelwell等人2000,Nucleic Acids Research,28:3752-3761和Solinas等人,2001,“Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications”Nucleic Acids Research 29:20描述。蝎型引物是荧光生成PCR引物,其中探针元件经由PCR终止剂被附加到5'端上。它们被用于均匀溶液中PCR产物的实时扩增子特异性检测。两种不同形式是可能的,即“茎环”形式和“双链体”形式。在两种情况下,探查机理是分子内的。在所有形式中蝎型探针检测的基本元件是:(i)PCR引物;(ii)用以防止PCR读通该探针元件的PCR终止剂;(iii)特异性探针序列;和(iv)包含至少一个荧光团以及猝灭剂的荧光检测系统。在蝎型引物的PCR延伸之后,得到的扩增子包含与探针互补的序列,这导致了每个PCR循环的变性阶段形成单链。当冷却时,探针是游离的以结合到这个互补序列上,造成荧光增加,因为猝灭剂不再位于该荧光团的附近。PCR终止剂防止探针被Taq DNA聚合酶不希望地读通。

[0301] 侵入物测定法(Third Wave Technologies, Madison, WI)特别地用于SNP基因分型并且使用称为信号探针的寡核苷酸,该寡核苷酸是与靶核酸(DNA或RNA)或多态性位点互补的。称为Invader Oligo的第二寡核苷酸包含相同的5'核苷酸序列,但是3'核苷酸序列包含核苷酸多态性。Invader Oligo干扰信号探针结合到靶核酸上,这样使得信号探针的5'末端在包含多态性的核苷酸上形成一个“悬垂片”。这个复合体被称为裂解酶的结构特异性内切核酸酶所识别。裂解酶裂解核苷酸的5'悬垂片。释放的悬垂片与携带FRET标记物的第三探针相结合,由此形成被裂解酶所识别的另一个双链体结构。这次该裂解酶裂解荧光团远离猝灭剂并且生成荧光信号。对于SNP基因分型而言,将设计信号探针以与参考(野生型)等位基因或变异体(突变体)等位基因之一相杂交。与PCR不同,存在信号的线性扩增而没有核酸的扩增。通过下面各项提供了足以指导本领域普通技术人员的进一步细节,例如Neri, B.P.,等人,Advances in Nucleic Acid and protein Analysis3826:117-125,2000)和美国专利号6,706,471。

[0302] 锁式探针 (PLP) 是长的 (例如, 约100个碱基) 线性寡核苷酸。在探针的3' 和5' 末端上的序列是与靶核酸中邻近序列互补的。在PLP的中央非互补区中, 存在可以被用于识别特异性PLP的“标签”序列。标签序列位于通用引发位点的侧翼, 引发位点允许PCR扩增该标签。当杂交到靶上时, PLP寡核苷酸的两个末端变成紧密接近并且可以通过酶连接作用进行连接。得到的产物是连锁到靶DNA链上的环形探针分子。通过核酸外切酶的作用除去任何未连接的探针 (即, 没有杂交到靶上的探针)。PLP的杂交和连接要求两个末端区段都识别靶序列。以这种方式, PLP提供了极其特异性的靶识别。

[0303] 然后将环化PLP的标签区扩增并且对得到的扩增子进行检测。例如可以进行TaqMan®实时PCR以对扩增子进行检测和定量。扩增子的存在和数目可能与样品中靶序列的存在和数目相关联。关于PLP的说明, 参见Landegren等人, 2003, Padlock and proximity probes for in situ and array-based analyses: tools for the post-genomic era, Comparative and Functional Genomics 4:525-30; Nilsson等人, 2006, Analyzing genes using closing and replicating circles Trends Biotechnol. 24: 83-8; Nilsson等人, 1994, Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection, Science 265:2085-8。

[0304] 在特定的实施方案中, 可以用作针对探针的检测标记物的荧光团包括但不限于罗丹明、菁蓝3 (Cy 3)、菁蓝5 (Cy 5)、荧光素、Vic™、Liz™、Tamra™、5-Fam™、6-Fam™和德克萨斯红 (Molecular Probes)。(Vic™、Liz™、Tamra™、5-Fam™、6-Fam™都是从Life Technologies, Foster City, Calif. 可得到的)。

[0305] 在一些实施方案中, 在足以表明样品中存在靶核酸序列的预定数目的循环之后技术人员可以简单地进行对扩增产物的量的监测。对于任何给定的样品类型、引物序列和反应条件, 本领域技术人员可以容易地确定多少个循环对于确定给定靶核酸的存在是足够的。在其它实施方案中, 在指数扩增结束时, 即在“平台”阶段期间进行检测, 或进行终点PCR。在不同的实施方案中, 扩增可以进行约2、4、10、15、20、25、30、35或40个循环或落入由这些值的任何一项界定的任何范围内的数目的循环。

[0306] 通过获得在不同温度下的荧光, 可能追踪杂交的程度。而且, PCR产物杂交的温度依赖性可以用于鉴定和/或定量PCR产物。因此, 本文描述的方法包括解链曲线分析在检测和/或定量扩增子中的应用。解链曲线分析是熟知的并在例如美国专利号6,174,670; 6,472,156; 和6,569,627中描述, 每一篇都通过引用的方式以全部内容并入本文, 并且特别是它们对于应用解链曲线分析以检测和/或定量扩增产物的描述。在说明性实施方案中, 使用双链DNA染料例如SYBR Green、Pico Green (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)、EVA Green (Biotinum)、溴化乙锭等等进行解链曲线分析 (参见Zhu等人, 1994, Anal. Chem. 66: 1941-48)。

[0307] 在某些实施方案中, 多路检测在单独扩增混合物中进行, 例如在微流体装置的单独反应区室中, 其可以用于进一步增加在单个检验中可被分析的样品的和/或靶的数目或用于进行比较性方法, 例如比较性基因组杂交 (CGH)。在不同的实施方案中, 在每个单独反应区室中进行高达2、3、4、5、6、7、8、9、10、50、100、500、1000、5000、10000或更多个扩增反应。

[0308] 根据某些实施方案, 技术人员可以采用内部标准来定量由荧光信号所指示的扩增

产物。参见,例如,美国专利号5,736,333。

[0309] 已经开发了可以用包含荧光染料的组合物进行热循环反应、发射特定波长的光束、读取荧光染料的强度、并在每个循环后展示荧光强度的装置。包含热循环仪、光束发射器和荧光信号检测仪的装置已经描述在例如美国专利号5,928,907;6,015,674;和6,174,670中。

[0310] 在一些实施方案中,这些功能的每一个可以由分别的装置进行。例如,如果技术人员采用Q-beta复制酶反应进行扩增,则反应可以不在热循环仪中进行,但是可以包括在特定波长发射的光束、检测荧光信号,并计算和展示扩增产物的量。

[0311] 在特定的实施方案中,组合的热循环和荧光监测装置可以用于准确定量靶核酸。在一些实施方案中,可以在一个或更多个热循环期间和/或之后检测和展示荧光信号,从而允许随着反应发生实时监测扩增产物。在某些实施方案中,技术人员可以使用扩增产物的量和扩增循环的数目来计算扩增之前样品中存在多少靶核酸序列。

#### [0312] 用于DNA测序的扩增

[0313] 在某些实施方案中,采用扩增方法以产生适用于自动DNA测序的扩增子。许多现有的DNA测序依赖于“通过合成测序”。这些技术包括文库产生、文库分子大型平行PCR扩增和测序。文库产生开始于转变样品核酸为适当尺寸的片段、连接衔接子序列到片段末端和选择适当地附带衔接子的分子。文库分子末端上衔接子序列的存在使得能够扩增随机-序列插入物。将核苷酸序列加标签的上述方法可以替代连接以掺入衔接子序列,如以下更详细描述。

[0314] 另外,上述方法提供靶核苷酸序列的大体上均匀的扩增能力有助于制备具有良好覆盖的DNA测序文库。在自动的DNA测序的上下文中,术语“覆盖”是指在测序时测量序列的次数。具有大体上均匀的覆盖的DNA测序文库可以产生其中覆盖大体上也是均匀的序列数据。因此,在不同的实施方案中,在进行如本文所描述地制备的多个靶扩增子的自动测序时,靶扩增子的至少50%的序列以大于靶扩增子序列的平均拷贝数的50%且小于靶扩增子序列的平均拷贝数的2倍存在。在这一方法的不同实施方案中,靶扩增子序列的至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%以大于靶扩增子序列的平均拷贝数的50%和小于靶扩增子序列的平均拷贝数的2倍存在。

[0315] 在某些实施方案中,可以采用至少三个引物以产生适用于DNA测序的扩增子:正向、反向和条形码引物。然而,正向引物、反向引物和条形码引物的一个或更多个可以包括至少一个另外的引物结合位点。在具体实施方案中,条形码引物包括条形码核苷酸序列的上游的至少第一另外的引物结合位点,条形码核苷酸序列在第一核苷酸标签特异性部分的上游。在某些实施方案中,正向引物、反向引物和条形码引物的两个包括至少一个另外的引物结合位点(即,以致基于扩增产生的扩增子包括核苷酸标签序列、条形码核苷酸序列、和两个另外的结合位点)。例如,如果条形码引物包括条形码核苷酸序列的上游的第一另外的引物结合位点,在具体实施方案中,反向引物可以包括第二核苷酸标签下游的至少第二另外的引物结合位点。然后扩增产生具有以下元件的分子:5'-第一另外的引物结合位点-条形码核苷酸序列-来自正向引物的第一核苷酸标签-靶核苷酸序列-来自反向引物的第二核苷酸标签-第二另外的引物结合位点-3'。在具体实施方案中,第一和第二另外的引物结合

位点能够被DNA测序引物结合,以帮助测序包含条形码的完整扩增子,如上所讨论的,条形码可以指示样品来源。

[0316] 在其它实施方案中,采用至少四个引物以产生适于DNA的扩增子。例如,内侧引物可与另外包含能够被DNA测序引物结合的第一和第二引物结合位点的外侧引物一起使用。扩增产生具有以下元件的分子:5'-第一引物结合位点-第二条形码核苷酸序列-第一核苷酸标签序列-第一条形码核苷酸序列-靶核苷酸序列-第一条形码核苷酸序列-第二核苷酸标签序列-第二条形码核苷酸序列-第二引物结合位点-3'。因为这一分子在任一末端包含条形码组合,可从分子的任一末端获得序列来辨识条形码组合。

[0317] 以类似的方式,可采用六个引物来准备用于测序的DNA。更具体地,如以上讨论的内侧和填充引物,可与另外包含能够被DNA测序引物结合的第一和第二引物结合位点的外侧引物一起使用。扩增产生具有以下元件的分子:5'-第一引物结合位点-第二条形码核苷酸序列-第三核苷酸标签序列-第一条形码核苷酸序列-第一核苷酸标签序列-靶核苷酸序列-第二核苷酸标签序列-第一条形码核苷酸序列-第四核苷酸标签序列-第二条形码核苷酸序列-第二引物结合位点-3'。因为这一分子在任一末端包含条形码组合,可从分子的任一末端获得序列来辨识条形码组合。

[0318] 本文描述的方法可以包括利用任何可得的DNA测序方法对至少一个靶扩增子进行DNA测序。在具体实施方案中,利用高通量测序方法测序多个靶扩增子。此类方法通常利用体外克隆步骤来扩增单独的DNA分子。乳液PCR(emPCR)分离油相中的含水液滴中的单独DNA分子连同引物包被的珠。PCR产生DNA分子的拷贝,其结合珠上的引物,随后固定用于后面的测序。emPCR用于Marguilis等人(由454Life Sciences,Branford,CT商品化)、Shendure和Porreca等人(也称为“聚合酶克隆测序”)和SOLiD测序(Life Technologies,Foster City,CA)的方法中。参见M.Margulies,等人(2005)“Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors”*Nature* 437:376-380;J.Shendure等人(2005)“Accurate Multiplex Polonysequencing of an Evolved Bacterial Genome”*Science* 309(5741):1728-1732。体外克隆扩增还可以通过“桥式PCR”进行,其中引物附加到固体表面后扩增片段。Braslavsky等人研发出省略该扩增步骤、直接将DNA分子固定至表面上的单分子方法(由Helicos Biosciences Corp.,Cambridge,MA商业化)。I.Braslavsky,等人(2003)“Sequence information can be obtained from single DNA molecules”*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:3960-3964。

[0319] 物理结合到表面的DNA分子可以平行地测序。“通过合成测序”如染料-终止电泳测序,使用DNA聚合酶以确定碱基序列。可逆的终止方法(由Illumina,Inc.,San Diego,CA和Helicos Biosciences Corp.,Cambridge,MA商业化)使用染料-终止剂的可逆形式,一次加入一个核苷酸,并且实时在每个位置处检测荧光,通过反复地除去封端基团以允许另一个核苷酸的聚合。“焦磷酸测序”也使用DNA聚合,一次加入一个核苷酸并且通过由释放所附加的焦磷酸盐而发出的光来检测和定量加入到给定位置的核苷酸的数目(由454Life Sciences,Branford,CT商业化)。参见M.Ronaghi,等人(1996)。“Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release”*Analytical Biochemistry* 242:84-89。

### [0320] 标记策略

[0321] 可以将任何适合的标记策略用于本文所述的方法中。当测定混合物被等分,并且分析每个等份的单一扩增产物的存在时,可以将通用检测探针用于扩增混合物中。在具体实施方案中,可以使用通用qPCR探针来进行实时PCR检测。适当的通用qPCR探针包括双链DNA染料,例如SYBR Green、Pico Green (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)、EVA Green (Biotinum)、溴化乙锭、以及类似物(参见Zhu等人,1994, Anal. Chem. 66:1941-48)。适当的通用qPCR探针还包括序列特异性探针,这些探针结合到所有扩增产物中存在的核苷酸序列上。在扩增期间,这类探针的结合位点可以被方便地掺入到加标签的靶核酸中。

[0322] 作为替代方案,可以将一个或更多个靶特异性qPCR探针(即对于有待检测的靶核苷酸序列具有特异性的)用于扩增混合物中以对扩增产物进行检测。靶特异性探针可能是有用的,例如当在大量的样品中仅少量靶核酸有待检测时。例如,如果仅3个靶有待检测时,可以使用对于每个靶具有不同荧光标记物的靶特异性探针。通过正确地选择标记物,可以进行分析,其中在单一反应中不同标记物在不同波长下被激发和/或检测。参见,例如Fluorescence Spectroscopy (Pesce等人编著) Marcel Dekker, New York, (1971); White等人, Fluorescence Analysis: A Practical Approach, Marcel Dekker, New York, (1970); Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 第2版, Academic Press, New York, (1971); Griffiths, Colour and Constitution of Organic Molecules, Academic Press, New York, (1976); Indicators (Bishop编著). Pergamon Press, Oxford, 19723; 和Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Eugene (1992)。

### [0323] 除去不想要的反应组分

[0324] 应当理解的是其中使用多个反应步骤的涉及核酸的复杂混合物的反应可能导致多个未掺入的反应组分,并且通过多个提纯步骤(clean-up procedure)中任何一项去除这类未掺入的反应组分或降低它们的浓度可以提高随后发生反应的效率和特异性。例如,在一些实施方案中,在进行在此所述的扩增步骤之前,去除预扩增引物、或降低预扩增引物的浓度可能是令人希望的。

[0325] 在某些实施方案中,可以通过简单地稀释来降低不希望的组分的浓度。例如,在进行扩增之前可以将预扩增的样品稀释约2倍、5倍、10倍、100倍、500倍、1000倍从而提高随后扩增步骤的特异性。

[0326] 在一些实施方案中,可以通过多种酶学方法来去除不想要的组分。作为替代方案,或除了上述方法之外,可以通过纯化来去除不想要的组分。例如,可以将纯化标签掺入到上述引物的任何一个中(例如条形码核苷酸序列中)以有助于对加标签的靶核苷酸进行纯化。

[0327] 在具体实施方案中,提纯包括选择性地固定希望的核酸。例如,可以优先地将希望的核酸固定到固相支持体上。在示例性实施方案中,亲和性部分,例如生物素(例如,光-生物素)被附加到希望的核酸上,并且得到的生物素标记的核酸被固定在固体支持物上,该固体支持物包括亲和部分-结合物(affinity moiety-binder),例如链霉抗生物素蛋白。可以用多个探针对固定的核酸进行查询,并且将未杂交的和/或未连接的探针通过洗涤去除(参见,例如,公布的P.C.T.申请WO 03/006677以及USSN 09/931,285)。作为替代方案,可以对固定的核酸进行洗涤以去除其它组分并且随后从该固体支持物中释放固定的核酸用于进

一步分析。这种方法可以被用于例如在加入用于DNA测序的引物结合位点之后从扩增混合物中回收靶扩增子。在具体实施方案中,可以将亲和性部分例如生物素附加到扩增引物上这样使得扩增生成亲和性部分标记的(例如生物素标记的)扩增子。因此,例如当使用三个引物以将条形码和核苷酸标签元件加入到靶核苷酸序列中时,如上所述,条形码或反向引物中至少一个可以包括亲和性部分。当使用四个引物(两个内侧引物以及两个外侧引物)来将希望的元件加入到靶核苷酸序列中时,外侧引物中至少一个可以包括亲和性部分。

#### [0328] 微流体装置

[0329] 在某些实施方案中,可以使用微流体装置来实现本文所述的方法。在示例性实施方案中,该装置是矩阵型的微流体装置,允许同时将多个底物溶液(substrate solution)与多个试剂溶液组合在分别分离的反应区室(separate isolated reaction compartment)中。应当理解的是底物溶液可以包含一个或更多个底物(例如靶核酸)并且试剂溶液可以包含一个或更多个试剂。例如,微流体装置可以允许同时配对地组合多个不同扩增引物和样品。在某些实施方案中,该装置被配置以在这些不同室的每一个中包含不同组合的引物和样品。在不同实施方案中,分离的反应区室的数目可以是大于50个、通常地大于100个、更经常地大于500个、甚至更经常地大于1000个、并且时常大于5000个、或大于10,000个。

[0330] 在具体实施方案中,矩阵型的微流体装置是Dynamic Array (“DA”)微流体装置。DA微流体装置是被设计用于分离配对组合的样品和试剂(例如,扩增引物、检测探针、等)并且适合用于进行定性以及定量PCR反应包括实时定量PCR分析的矩阵型微流体装置。在一些实施方案中,这种DA微流体装置至少部分是由弹性体制造的。DA微流体装置被描述于PCT公布号W005107938A2(Thermal Reaction Device and Method For Using The Same)和美国专利公布号US20050252773A1中,出于它们的DA微流体装置的说明的目的,这两者都通过引用以其全部内容并入本文。DA微流体装置可以并入多个高密度矩阵设计,这些设计使用该微流体装置的层之间的流体连通通路来编织穿过该装置并且在层之间的控制管线以及流体管线。通过弹性体块的多个层中的流体管线,高密度反应单元(reaction cell)安排是可能的。作为替代方案,可以设计DA微流体装置使得所有试剂以及样品通道都位于同一弹性体层中,控制通道在不同的层中。在某些实施方案中,DA微流体装置可用于将M个数目的不同的样品与N个数目的不同的试剂反应。

[0331] 虽然W005107938中所述的DA微流体装置非常适合用于进行在本文所述的方法,本发明不限于任何具体的装置或设计。可以使用分配样品和/或允许独立的配对组合试剂和样品的任何装置。美国专利公布号20080108063(该专利通过引用以其全部内容并入本文)包括说明了48.48Dynamic Array IFC(Integrated Fluidic Circuit),可以从Fluidigm Corp. (South San Francisco Calif.)得到的一种可商购的装置的图表。应当理解的是其它构型是可能的并且是被考虑的,例如48×96、96×96、30×120;等。

[0332] 在具体实施方案中,微流体装置可以是Digital Array微流体装置,该装置适于进行数字扩增。这类装置可以具有将样品和试剂的混合物分配到纳升体积反应区室中的整合的通道以及阀。在一些实施方案中,Digital Array微流体装置至少部分是由弹性体制造的。示例性的Digital Array微流体装置被描述于共同未决的属于Fluidigm Corp. (South San Francisco,CA)的美国申请中,例如标题为“Method and Apparatus for Determining

Copy Number Variation Using Digital PCR”的美国申请号12/170,414。一个示例性实施方案具有12个输入端口,这些端口相应于12个单独的样品输入该装置中。该装置可以具有12个嵌板(panel),并且这12个嵌板的每一个可以包含765个6nL的反应区室,每个嵌板总体积为4.59 $\mu$ L。微流体通道可以将嵌板上的不同的反应区室连接到流体来源上。可以将压力施加到一个累加器(accumulator)以开放和关闭将反应区室连接到流体来源上的阀。在示例性实施方案中,可以提供12个入口用于载入样品试剂混合物。可以使用48个入口来提供试剂来源,当将压力施加到累加器上时,试剂被供应到芯片上。另外地,可以提供两个或更多个入口以提供芯片的水合。

[0333] 尽管Digital Array微流体装置非常适合用于实现在本文所述的某些扩增方法,本领域普通技术人员应当认识到对于这些装置的多种变更和替代方案。给定的Digital Array微流体装置的几何形状将取决于具体应用。与适合用于在本文所述方法中的装置相关的另外的说明被提供于美国专利申请公布号20050252773中,出于它的披露Digital Array微流体装置的目的,通过引用将其并入本文。

[0334] 在某些实施方案中,可以使用提供反应产物的回收的微流体装置来实现在本文所述的方法。这类装置被详细描述于2009年4月2日提交的共同未决的美国申请号61/166,105中(该专利通过引用以其全部内容并入本文并且特别地是出于它的说明允许反应产物回收的微流体装置以及相关方法的目的),并由Fluidigm Corp.作为Access Array<sup>TM</sup> IFC(Integrated Fluidic Circuit)出售。

[0335] 在这一类型的示例性装置中,独立的样品输入与引物输入以M x N阵列构型组合。因此,每个反应是特定样品与特定试剂混合物的独特组合。在一个实现方式中,通过安排为列的样品输入管线将样品载入微流体装置的样品区室中。通过安排为横过所述列的行的测定液输入管线将测定试剂(例如引物)载入微流体装置的测定区室中。在加载期间样品区室和测定区室是处于流体隔绝的。在加载过程完成之后,将可操作以防止流体管线通过样品和测定区室的对之间的接口阀开放以使样品和测定液的配对组合能够自由地界面间扩散。样品和测定液的精确混合使不同配对组合之间能够发生反应,在每个区室中生成一个或更多个反应产物。收获反应产物并且然后可将其用于随后的过程。如在此使用的术语“测定液(assay)”和“样品”是这些装置在某些实施方案中的具体用途的说明。然而,这些装置的用途不限于在所有实施方案中使用样品”以及“测定液”。例如,在其它实施方案中,“样品”可以指“第一试剂”或多个“第一试剂”并且“测定液”可以指“第二试剂”或多个“第二试剂”。这些装置的M x N特征使有待组合的第一试剂的任何组能够与第二试剂的任何组相组合。

[0336] 根据具体实施方案,可以将来自M x N个配对组合的反应产物从微流体装置回收离散到离散的池中,例如,M个样品的每一个对应一个池。典型地,离散的池被包含在提供于载体(carrier)上的样品输入端口中。在一些方法中,出于归一化的目的,可以在“每个扩增子”的基础上收集这些反应产物。使用本发明的实施方案,有可能实现其中扩增产物的拷贝数在一个样品中改变不大于 $\pm 25\%$ 并且在样品间不大于 $\pm 25\%$ 的结果(针对从样品和测定液的同一输入溶液组装的重复实验)。因此,如通过特定已知基因型分布测量的,从微流体装置中回收的扩增产物将是输入样品的代表。在某些实施方案中,输出样品浓度将大于2,000个拷贝/扩增子/微升,并且反应产物的回收将在小于两小时内完成。

[0337] 在一些实施方案中,反应产物由膨胀泵送回收。膨胀泵送提供了使用常规技术通

常不可获得的益处。例如,膨胀泵送使得能够从微流体装置缓慢去除反应产物。在示例的实施方案中,以小于100 $\mu$ l/小时的流体流速回收反应产物。在这个示例中,为了将48个反应产物分配到每一列中的反应区室,每个反应产物的体积为约1.5 $\mu$ l,在约30分钟的时间段中去除反应产物将导致72 $\mu$ l/小时的流体流速。(即,48x 1.5/0.5小时)。在其它实施方案中,反应产物的去除速率以以下速率进行:小于90 $\mu$ l/hr、80 $\mu$ l/hr、70 $\mu$ l/hr、60 $\mu$ l/hr、50 $\mu$ l/hr、40 $\mu$ l/hr、30 $\mu$ l/hr、20 $\mu$ l/hr、10 $\mu$ l/hr、9 $\mu$ l/hr、小于8 $\mu$ l/hr、小于7 $\mu$ l/hr、小于6 $\mu$ l/hr、小于5 $\mu$ l/hr、小于4 $\mu$ l/hr、小于3 $\mu$ l/hr、小于2 $\mu$ l/hr、小于1 $\mu$ l/hr或小于0.5 $\mu$ l/hr。

[0338] 膨胀泵送导致清除微流体装置中存在的大致上高百分比的以及可能地所有的反应产物。一些实施方案去除微流体装置的反应区室(例如,样品区室)中存在的多于75%的反应产物。作为举例,一些实施方案去除反应区室中存在的反应产物的多于80%、85%、90%、92%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0339] 本文描述的方法可使用带有多个一般包括样品区室和检验区室的“单元小室”的微流体装置。此类单元小室可具有数百微米数量级尺寸,例如具有如下尺寸的单元小室:500x 500 $\mu$ m、525x 525 $\mu$ m、550x 550 $\mu$ m、575x 575 $\mu$ m、600x 600 $\mu$ m、625x 625 $\mu$ m、650x 650 $\mu$ m、675x 675 $\mu$ m、700x 700 $\mu$ m或类似尺寸。选择样品区室和测定区室的尺寸以提供当减少样品和测定液用量时足以完成希望过程的材料量。作为举例,样品区室可以具有100–400 $\mu$ m宽度x200–600 $\mu$ m长度x 100–500 $\mu$ m高度数量级的尺寸。例如,宽度可以是100 $\mu$ m、125 $\mu$ m、150 $\mu$ m、175 $\mu$ m、200 $\mu$ m、225 $\mu$ m、250 $\mu$ m、275 $\mu$ m、300 $\mu$ m、325 $\mu$ m、350 $\mu$ m、375 $\mu$ m、400 $\mu$ m或类似尺寸。例如,长度可以是200 $\mu$ m、225 $\mu$ m、250 $\mu$ m、275 $\mu$ m、300 $\mu$ m、325 $\mu$ m、350 $\mu$ m、375 $\mu$ m、400 $\mu$ m、425 $\mu$ m、450 $\mu$ m、475 $\mu$ m、500 $\mu$ m、525 $\mu$ m、550 $\mu$ m、575 $\mu$ m、600 $\mu$ m或类似尺寸。例如,高度可以是100 $\mu$ m、125 $\mu$ m、150 $\mu$ m、175 $\mu$ m、200 $\mu$ m、225 $\mu$ m、250 $\mu$ m、275 $\mu$ m、300 $\mu$ m、325 $\mu$ m、350 $\mu$ m、375 $\mu$ m、400 $\mu$ m、425 $\mu$ m、450 $\mu$ m、475 $\mu$ m、500 $\mu$ m、525 $\mu$ m、550 $\mu$ m、575 $\mu$ m、600 $\mu$ m或类似尺寸。测定区室可以具有类似尺寸范围,这典型地提供了比较小的区室体积更小的范围内类似的步长(step size)。在一些实施方案中,样品区室体积对于测定区室体积的比率是约5:1、10:1、15:1、20:1、25:1或30:1。比列出的范围更小的区室体积被包括在本发明的范围内并且易于使用微流体装置制造技术来制造。

[0340] 更高密度的微流体装置典型地将使用更小的区室体积以减少单元小室的覆盖区(footprint)。在其中可以得到非常小样品尺寸的应用中,减少区室体积将有助于对此类小的样品进行测试。

[0341] 对于单颗粒分析,可设计微流体装置以帮助上样和捕获待分析的特定颗粒。图1显示用于分析哺乳动物细胞的示例性的微流体装置的单元小室结构。每个单元小室具有“细胞通道”(即,样品区室)和“检验通道”(即,检验区室)。细胞通道是圆形的,用于上样哺乳动物细胞,尺寸为直径在数十微米级别至长度在一百数百微米。取决于被分析的细胞的尺寸,直径可以是约15 $\mu$ m、约20 $\mu$ m、约25 $\mu$ m、约30 $\mu$ m、约35 $\mu$ m、约40 $\mu$ m、或约45 $\mu$ m或更多,或可落入以这些值的任一个作为端点的范围内。取决于被分析的细胞的尺寸,长度可以是约60 $\mu$ m、约90 $\mu$ m、约120 $\mu$ m、约150 $\mu$ m、约170 $\mu$ m、约200 $\mu$ m、约230 $\mu$ m、约260 $\mu$ m、约290 $\mu$ m或更多,或可落入以这些值的任一个作为端点的范围内。在基于Access Array™ IFC平台(“MA006”)的示例性的微流体装置中,用于上样哺乳动物细胞的单元小室可以是约30 $\mu$ m x 170 $\mu$ m。这样的装置可配置为在上样后对细胞通道提供或帮助提供热来溶解细胞。如图1所示,装置可包括与细胞通道分开的检验通道用于进行反应诸如核酸扩增。170 $\mu$ m x 170 $\mu$ m封锁阀(containment valve)

可用于关闭细胞通道。

[0342] 2012年2月29日提交的题为“Methods, Systems, And Devices For Multiple Single-Particle or Single-Cell Processing Using Microfluidics”的共同待决的美国申请号61/605,016描述了用于利用微流体的多个单颗粒或单细胞处理的方法、系统和装置。多个实施方案提供从细胞颗粒的较大群体捕获、分隔、和/或操作单独颗粒或细胞,以及产生与每个单独颗粒或细胞相关的遗传信息和/或反应。一些实施方案可配置为成像单独颗粒或细胞或相关的反应产物作为处理的部分。这一申请通过引用全文并入本文,尤其是其对配置用于多个单颗粒或单细胞处理的微流体装置和相关系统的描述。

[0343] 在具体实施方案中,采用微流体装置以有助于具有下面的动态范围的测定法:至少3个数量级、更经常是至少4个、至少5个、至少6个、至少7个或至少8个数量级。

[0344] 使用弹性体材料的制造方法以及用于设计装置以及它们的部件的方法已经详细地描述于科学以及专利文献中。参见,例如,Unger等人.(2000) Science 288:113-116;美国专利号US 6,960,437 (Nucleic acid amplification utilizing microfluidic devices);6,899,137 (Microfabricated elastomeric valve and pump systems);6,767,706 (Integrated active flux microfluidic devices and methods);6,752,922 (Microfluidic chromatography);6,408,878 (Microfabricated elastomeric valve and pump systems);6,645,432 (microfluidic devices including three-dimensionally arrayed channel networks);美国专利申请公布号2004/0115838;2005/0072946;2005/0000900;2002/0127736;2002/0109114;2004/0115838;2003/0138829;2002/0164816;2002/0127736;和2002/0109114;PCT公布号WO 2005/084191;WO 05/030822A2;和WO 01/01025;Quake&Scherer,2000,“From micro to nanofabrication with soft materials” Science 290:1536-40;Unger等人.,2000,“Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography” Science 288:113-116;Thorsen等人.,2002,“Microfluidic large-scale integration” Science 298:580-584;Chou等人.,2000,“Microfabricated Rotary Pump” Biomedical Microdevices 3:323-330;Liu等人.,2003,“Solving the“world-to-chip” interface problem with a microfluidic matrix” Analytical Chemistry 75,4718-23,Hong等人,2004,“A nanoliter-scale nucleic acid processor with parallel architecture” Nature Biotechnology 22:435-39。

#### [0345] 数据输出和分析

[0346] 在某些实施方案中,当在矩阵型的微流体装置上执行本文所述的方法时数据能够作为热矩阵(也称为“热图”)输出。在热矩阵中,每个正方形(代表DA矩阵上的反应区室)已经被指定颜色值,该颜色值能够以灰度形式显示,但更典型地以颜色显示。在灰度中,黑色正方形指示未检测出扩增产物,而白色正方形指示扩增产生的最高水平,其中灰度阴影指示其间扩增产物的水平。在进一步方面中,可以使用软件程序来对将热矩阵中生成的数据编译成读者更友好的形式。

#### [0347] 应用

[0348] 在具体实施方案中,本文所述的方法用于分析一个或更多个核酸,例如,颗粒中或与颗粒缔合的一个或更多个核酸。因此,例如,这些方法适用于鉴别特定多态性(例如SNP)、等位基因、或单体型、或染色体异常例如扩增、缺失、重排、或非整倍性的存在。这些方法可

以被用于基因分型中,基因分型可以在多种背景中实现,这些背景包括对遗传疾病或疾患、癌症进行诊断、药物基因组学(单独化用药)、农业中质量控制(例如用于种子或家畜)、对植物或动物的种群进行研究和(例如,水产养殖或渔业管理中或确定种群多样性中)、或亲子或法医鉴定。本文所述的方法可以用于在生物或环境样品中鉴别指示特定条件或生物体的序列。例如,所述方法可以用于测定中以鉴别病原体例如,病毒、细菌、以及真菌。所述方法还可以被用于旨在表征环境或微环境的研究中,例如表征人肠中的微生物物种。

[0349] 在某些实施方案中,这些方法还可以用于确定DNA或RNA拷贝数。确定基因组DNA中异常DNA拷贝数是有用的,例如,在诊断和/或预后遗传缺陷和疾病,例如癌中。对于感兴趣的基因,例如在不同条件下(例如,不同外部刺激或疾病状态)和/或在不同发育阶段下,例如不同单独、组织、或细胞中的表达监控而言,确定RNA“拷贝数”,即表达水平,是有用的。

[0350] 此外,可以使用所述方法来制备核酸样品用于进一步分析,例如像DNA测序。

[0351] 而且,在随后分析之前,作为第一步骤,可以将核酸样品加标签,从而降低样品的错误标记或交叉污染将损害结果的风险。例如,在收集之后任何医师办公室、实验室、或医院可以立即对样品进行加标签,并且在分析时可以对标签进行确认。类似地,可以对包含在犯罪现场收集的核酸的样品尽快加标签,以确保样品不被错误标记或被篡改。样品从一方到另一方的每次传递时的标签检测可以用于建立样品的保管链。

[0352] 如以上讨论的,除了核酸以外,本文描述的方法还可用于分析颗粒的其它参数,诸如例如,每个颗粒中或与每个颗粒缔合的一个或更多个蛋白的表达水平。在一些实施方案中,对每个颗粒分析一个或更多个核酸连同或更多个其它参数。

[0353] 将多个参数的检验结果与颗粒群体中每个颗粒相关联的能力可在多种不同类型研究中开发。在不同的实施方案中,本文描述的方法可以用于鉴定两种或更多种拷贝数变化、两种或更多种突变或至少一种拷贝数变化和至少一种突变,其一起与表型关联。表型可以是,例如,疾病的风险、存在、严重度、预后、和/或对具体疗法的响应性或对药物的耐药性。本文描述的方法还可用于检测特定核酸序列的共存在,其可指示基因组重组、特定剪接变体的共表达、B细胞中特定轻链和重链的共表达。该方法还可适用于检测特定宿主细胞中特定病原体的存在,例如,当病原体特异性和宿主细胞特异性核酸二者(或其它参数)共同存在于相同的细胞中时。该方法还可用于从循环中的肿瘤细胞靶向再测序,例如,在不同癌症中的突变热点。

#### [0354] 试剂盒

[0355] 根据本发明的试剂盒可包括对于实践本文描述的一个或更多个测定方法有用的一个或更多个试剂。总体上试剂盒包括包装,其中一个或更多个容器容纳试剂(例如引物和/或探针)作为一个或更多个单独组合物,或任选地,当试剂的相容性将允许时,作为混合物。该试剂盒还可以包括从使用者的观点来看可以是合意的其它物质,例如缓冲剂、稀释剂、标准品、和/或在样品处理、洗涤、或进行该测定的任何其它步骤中有用的任何其它物质。

[0356] 试剂盒通常上包括用于实现本文所述的一种或多种方法的说明书。试剂盒中包括的说明书可以被附着在包装材料上或可以作为包装插入物(package insert)而包括。虽然这些说明书典型地是书面或打印的材料,它们不限于此。能够存储这类说明书并且使它们与最终用户进行交流的任何介质是本发明考虑的。这类介质包括但不限于电子存储介质

(例如,磁盘、磁带、盒带、芯片)、光学介质(例如CD ROM)、RF标签,等。如在此使用的,术语“说明书”可以包括提供该说明书的互联网的地址。

[0357] 应当理解,本文所述的实例及实施方案仅是为说明目的且并且根据其的不同的修饰或变化将对本领域中的普通技术人员进行建议,并将包括于本申请的精神及范围以及随附权利要求的范围内。

[0358] 此外,出于所有的目的,在此引用的所有其他出版物、专利、以及专利申请都通过引用以其全部内容并入本文。

## 实施例

### [0359] 实施例1

[0360] 利用适于细胞操作的AccessArray™ IFC(“MA006”)从单细胞制备用于测序的核酸的方法

#### [0361] 一般方法的概述

[0362] “芯片”在本文称为MA006,已经利用AccessArray™ IFC平台开发,还开发了利用MA006、整合细胞操作和用于核酸测序的样品制备的方法。参见图1的MA006单元小室结构的示意图,显示芯片上方法。这一整合简化了执行实验所需的步骤。而且,上样芯片需要仅数百细胞。

[0363] MA006芯片具有以下特征:

[0364] 单元小室具有170x 30pm圆形通道来上样哺乳动物细胞

[0365] 48.48矩阵格式;

[0366] 在细胞通道中利用热溶解细胞;

[0367] 用于扩增反应的分别的反应区室;

[0368] 170x 170pm封锁阀以关闭细胞通道;

[0369] 额外的阻力层:PourOB-30gm圆形阻力;

[0370] 芯片制造:使用现有的AA48.48方法;

[0371] 65pm准直容差;

[0372] 130pm冲孔直径;

[0373] 65x 85pm阀尺寸;和

[0374] 3层设计方法。

[0375] MA006芯片上没有细胞捕获特征。结果是有限稀释策略用于获得每室期望数目的细胞。然而,细胞捕获特征可被设计到芯片中。它们可以是物理(例如,杯或盏结构)、生物(例如,布点的肽)、或化学的(例如,带电荷离子)。

[0376] 芯片外的细胞操作:将待分析的细胞准备到使得获得每样品室(图1中的“细胞通道”)期望数目的细胞的密度。因为MA006芯片使用有限稀释策略,每室细胞的数目在理论和实际上都遵循泊松分布。在第一种情况中,因为包含单细胞的最大数目的室是期望的,最佳细胞密度是每微升300-600细胞。1至2微升的最小体积可被施加到入口。因此,实验可用仅数百细胞进行。可使用来自任何来源(即,活生物体、组织培养物等等)的任何细胞类型(即,哺乳动物、细菌等等)。可使用制备、洗涤、和/或染色的任何形式或程度,只要其与下游应用相容。

[0377] 芯片中的细胞追踪:在任何聚合酶/扩增依赖性化学反应不存在下,可利用亮视野或荧光显微术监测芯片中细胞的位置、身份、和/或内容物。细胞可用任何染色剂染色(即,核酸特异性染色,诸如SYTO10;免疫检测,诸如Cy5共轭的抗CD19;等等),只要其与下游应用相容。这可用于例如在混杂的细胞群体中鉴定罕见细胞,即,癌症干细胞。

[0378] 化学反应:在将细胞上样到MA006后,将检验上样到检验室(图1中的“检验通道”),释放界面阀以混合样品和检验室的内容物。对芯片进行根据所选化学反应的热循环和如果化学反应需要和/或支持,实时或在终点成像。这一程序不限于基因特异性扩增,即可使用非特异性简并引物,或可进行RNA特异性扩增。在基因特异性扩增的情形中,可利用“多路”策略同时靶向多于一个基因。化学反应是灵活的,条件是输出是测序的底物(substrate),并且化学反应不应限于聚合酶链式反应或甚至扩增。

#### [0379] 细胞操作

#### [0380] 细胞计数:亮视野成像

[0381] 如下操作RAMOS细胞:

[0382] (1) 收获细胞。

[0383] (2) 在冰冷的Tris盐水BSA缓冲液中洗涤2-3X。

[0384] (3) 计数和进行适当的稀释。不同细胞密度的理论分布(泊松分布)显示在图2。

[0385] (4) 将细胞推入MA006芯片。

[0386] (5) 通过亮视野成像。

[0387] 图3A-B显示使用亮视野成像,芯片中细胞计数的结果(A),与理论分布(B)比较。基于亮视野成像,芯片中的细胞密度接近但低于泊松分布,这一趋势在更高细胞密度时加剧。这可部分地由于芯片特征产生的“遮蔽”,其可减少利用亮视野成像可检测其中的细胞的可测量面积。

#### [0388] 细胞计数:PCR后荧光

[0389] 将细胞以 $0.15 \times 10^6$ /ml上样到MA006芯片并利用Cells-Direct™ RT-PCR组分、Rox和EVA green进行RT-PCR。图4A-B显示荧光细胞“鬼影”图像(A)允许比PCR前亮视野成像检测更多细胞,从而细胞密度更接近地近似泊松分布(B)。基于这些结果,如果对MA006芯片的每入口施加4000细胞(例如,4 $\mu$ l,1000细胞/ $\mu$ l)并遍布,2304 (48x 48)或800室的大约1/3具有单细胞。

#### [0390] 更特异性的方法

[0391] 可使用的用于检测芯片中细胞的更特异性的方法包括,例如,使用细胞膜透性核酸染色剂和/或用抗体检测细胞特异性表面标志物。如此,例如,可如下操作RAMOS细胞:

[0392] (1) 收获细胞。

[0393] (2) 在冰冷的Tris盐水BSA缓冲液中洗涤2-3X。

[0394] (3) 用Syto10DNA染色剂和/或Cy5-标记的抗CD19抗体染色。

[0395] (4) 在冰冷的Tris盐水BSA缓冲液中洗涤2-3X。

[0396] (5) 计数并进行适当的稀释。

[0397] (6) 将细胞推入MA006芯片。

[0398] (7) 成像。

[0399] 在图5中,这些更特异性的方法的结果对 $1 \times 10^6$ /ml的细胞密度显示。图6A显示RT-PCR

前核酸染色剂 (Syto10DNA染色剂) 与RT-PCR后鬼影图像 (细胞鬼影) 的比较,图6B显示, Syto10不抑制GAPDH的RT-PCR。提出的芯片中细胞检测的工作流可包括用DNA染色剂和/或抗体染色细胞,随后RT-PCR前计数和然后RT-PCR后计数细胞鬼影作为备份 (back-up)。

[0400] 化学反应:一步基因特异性RT-PCR

[0401] 研究了不同的化学反应以寻找在MA006芯片中转化细胞中的基因特异性RNA为扩增子的有效化学反应。将细胞推入细胞通道的Tris盐水BSA (0.5 $\mu$ g/ml) 缓冲液中。上样到检验通道的试剂包括:

[0402] 引物 (500nM终浓度)

[0403] CellsDirect™一步qRT-PCR试剂盒组分 (从Life Technologies,Foster City,CA可得)

[0404] 反应混合物

[0405] 酶混合物:Superscripte III+Platinum Taq聚合酶

[0406] 缓冲液

[0407] Rox

[0408] EVA Green

[0409] 上样试剂-AA或GE (从Fluidigm Corp.,South San Francisco,CA可得) 以阻止被PDMS非特异性吸收 (“耗竭效应”) 并溶解细胞。

[0410] 带有或不带有AA或GE上样试剂地进行GAPDH的RT-PCR。结果显示,两种上样试剂都抑制RT-PCR。上样试剂包含:Prionex (AA) 或BSA (GE) 和0.5% Tween-20。GAPDH的RT-PCR在Prionex或BSA存在下进行。发现Prionex但不是BSA抑制RT-PCR。GAPDH的RT-PCR在0.5% Tween 20或0.5% NP40 (后者是细胞溶解剂) 存在下进行。这一研究的结果显示在图7。0.5% Tween 20和0.5% NP40都不显著抑制GAPDH的RT-PCR。

[0411] 为了确定为来自细胞的GAPDH的RT-PCR开发的反应条件将允许以不同的水平表达的其他基因的RT-PCR,覆盖一定范围表达水平的11个基因的RT-PCR用10ng/ $\mu$ l RNA和上述试剂进行,除了0.5% NP40代替AA/GE上样试剂。热循环方案是:50 $^{\circ}$ C 30分钟;55 $^{\circ}$ C 30分钟;95 $^{\circ}$ C 2分钟;然后45个循环:95 $^{\circ}$ C 15秒、60 $^{\circ}$ C 30秒、和72 $^{\circ}$ C 60秒。图8中显示在MA006芯片中进行的这些11个基因的标准曲线扩增。这些结果证明,CellsDirect™一步qRT-PCR试剂盒可与0.5% NP40 (用于细胞溶解和阻止芯片中的耗竭效应) 一起使用来在MA006芯片中将细胞中基因特异性的RNA转化为扩增子。

[0412] 测序

[0413] 为了帮助测序在MA006芯片中产生的基因特异性扩增子,采用条形码化方法以区分来自不同的室 (例如,细胞) 的扩增子。更具体地,采用四引物、组合条形码化方法以将两个条形码的组合放到每个扩增子的任一末端上。这一方法在图9中图解显示。内侧引物包含靶特异性部分 (正向引物中的“TS-F”和反向引物中的“TS-R”)、条形码核苷酸序列 (“bc2”)、和不同的核苷酸标签。外侧引物包含标签特异性部分 (“CS1”和“CS2”)、不同的条形码核苷酸序列 (“bc1”)、和用于测序引物的引物结合位点 (“A”和“B”)。图10A-B图解4引物条形码化如何可在芯片诸如MA006上进行。在芯片上用内侧引物进行扩增,其中每行的室具有拥有相同的条形码的相同的内侧引物对。来自每列的室的反应产物可作为池收获,并对每个池利用不同的外侧引物对进行扩增。这一扩增产生在扩增子的任一末端具有独特地辨识在其中

进行初始扩增的室(以行和列)的条形码组合的扩增子。测序反应产物并确定每个反应区室的每个序列的读取的数目。这一确定对RAMOS细胞和对脾RNA进行。图11显示对获得的结果的比较,表示为与总RNA的读取的数目相比,对每个基因特异性扩增子的读取的数目(红)。如从该图明显的,与在总RNA中观察到的相比,这些RNA的代表当在单独细胞中测量时是不同的。

#### [0414] 实施例2

##### [0415] 基于尺寸的微流体单颗粒捕获

[0416] 当悬液流经微流体装置时从悬液离散地捕获(discretely capturing)单细胞的一个方法是界定以以下方式导引颗粒(诸如细胞或珠)的悬液流过捕获位点的微流体几何形状:捕获位点捕捉单颗粒、有效捕获单颗粒(例如,捕获经过捕获位点附近的颗粒的概率高)、和/或导引围绕捕获位点的剩余悬液。提出的几何形状可以是基于尺寸的,即,捕获位点仅仅足够大以包含一个颗粒(且不多于),但仍允许无颗粒悬液以适当低的流体阻抗流经该位点,从而空的捕获位点将导引颗粒的流朝向它而不是围绕它。这一目的可通过使用引流沟来实现。另外的提出的几何形状还可以以下方式集中颗粒的流:为了成功捕获的高概率,增加颗粒去到足够接近捕获位点的可能性。对这些几何形状的变化集中在控制围绕捕获位点和引流沟、包括引流沟自身的流体的流阻,以及改变集中几何形状的孔以试图定位接近捕获位点的颗粒的流。图12A-B示例带有捕获特征和引流沟的捕获位点。图A显示无阻碍物以集中流的位点,而图B显示带有阻碍物的位点。另外的捕获位点设计显示在图13。

#### [0417] 实施例3

##### [0418] 基于表面标志物捕获颗粒

[0419] 微流体结构中的单细胞研究要求分离单独细胞到单独反应区隔(室、液滴、颗粒)中。有限稀释是实现这一分离的一个方法。细胞被以平均每区隔小于一个细胞的浓度上样,并以泊松统计学描述的方式分配到那些区隔中。另一种方法是依赖于机械陷阱来捕获细胞。这些陷阱设计为捕获给定尺寸范围的细胞(参见实施例2)。这导致从群体偏置地选择在该尺寸范围中的细胞。

[0420] 对于一些应用,理想的捕获方法将利用在细胞表面上表达的生物标志物。抗体可以在微流体阵列上的特定位置排列,尽管取决于微流体阵列的结构,这一方法可能不简单。

[0421] 这一实施例描述了基于最初捕获在微流体装置中特定位置的单个、亲和性试剂包被的珠来捕获单颗粒(例如,细胞)的方法。在捕获位点开口处被该珠占据的表面积提供了细胞结合可及的亲和性试剂的确定表面。珠尺寸和捕获位点可被选择/设计使得单细胞结合到珠后,珠的其余可及表面积被先结合的细胞空间封闭。尺寸适当的珠捕获位点的选择还提供宽范围细胞尺寸的捕获。只要细胞大于暴露的捕获面积,并表达适当的表面标志物或亲和性试剂的结合伴侣,捕获该细胞就应是可能的。

[0422] 捕获结构可被设计为使得细胞接触表面标志物的概率最大化。例如,一个或更多个通道壁上的阻碍物可用于引导珠朝向捕获特征。参见图14A的示例性的捕获特征/阻碍物组合。捕获特征的表现可通过调整一个或更多个变量来调整,所述变量包括阻碍物的角度、阻碍物与捕获位点的距离、阻碍物的长度、捕获特征的尺寸和形状、捕获特征中引流沟的尺寸(如果存在)。参见图14B和C,示例捕获特征/阻碍物组合的变量和表现。在图14B中,通道壁上的阻碍物用于引导珠朝向捕获特征。在图14C中,捕获特征与通道壁上的阻碍物配对;

单独的捕获特征/障碍物组合可位于交替的壁上以将流集中朝向邻近的捕获特征/障碍物组合。这些组合可位于在使用中可分隔(例如,利用阀)的位点以形成分别的反应区室。

[0423] 图15A和B示例(以简化形式,缺少障碍物)利用捕获特征捕捉单个、亲和性试剂包被的珠的策略,该珠随后展示亲和性试剂(例如,抗体)以捕获单颗粒(例如,细胞)。在图15A-1中,流在包含捕获特征的通道中开始。在图A-2中,抗体结合的珠流向捕获特征,直到珠安顿在捕获特征中,如图A-3所示。然后洗涤通道以去除未捕获的珠。随后,如图15B-1所示,带有抗体结合的细胞表面标志物的细胞流入包含捕获的珠的通道。图B-2示例带有标志物的细胞如何与被捕获的珠展示的抗体相互作用和结合。展示区域的尺寸为使得结合的细胞将经由空间阻塞抑制其他细胞与捕获的珠相互作用,从而仅一个细胞结合每个捕获的珠。如图B-3所示,然后洗涤通道以去除未结合的细胞,在每个捕获位点留下一个固定的细胞。

#### [0424] 实施例4

##### [0425] 用于细胞捕获("CCap")的微流体装置

[0426] 图16A显示设计为在离散的位置(龕)捕获单细胞的微流体装置的简图。流设计为在龕上方比经过溢流通道的强。龕包含小的缺口( $\sim 3\mu\text{m}$ 高)。参见图16B。当细胞进入龕时,它封闭龕并阻止任何更多的流进入龕。流穿过到下一个未被占据的龕,直到它也被细胞封闭。理论上,在细胞穿过溢流通道并离开废弃之前,每个龕应捕获一个细胞。参考图16C-F的更多细节,缓冲液入口与细胞入口汇集,从而迫使细胞向最接近一系列横向细胞捕获通道的给料通道的一侧。参见图16D。横向细胞捕获通道的阻力低于细胞溢流通道的,以引导细胞流优先进入龕而不是进入细胞溢流通道。参见图16E。如图16F所示,每个龕足够大以捕获仅一个细胞。龕缺口足够小,使得细胞在操作压力/流水平被捕获。如果后者过高和/或龕缺口过大,细胞可变形并被推动穿过龕缺口。龕中细胞的存在升高了该特定回路的阻力,因此流被导向无细胞的回路。图16G显示实际装置,捕获的人类脐静脉内皮细胞(HUVEC)位于龕中。

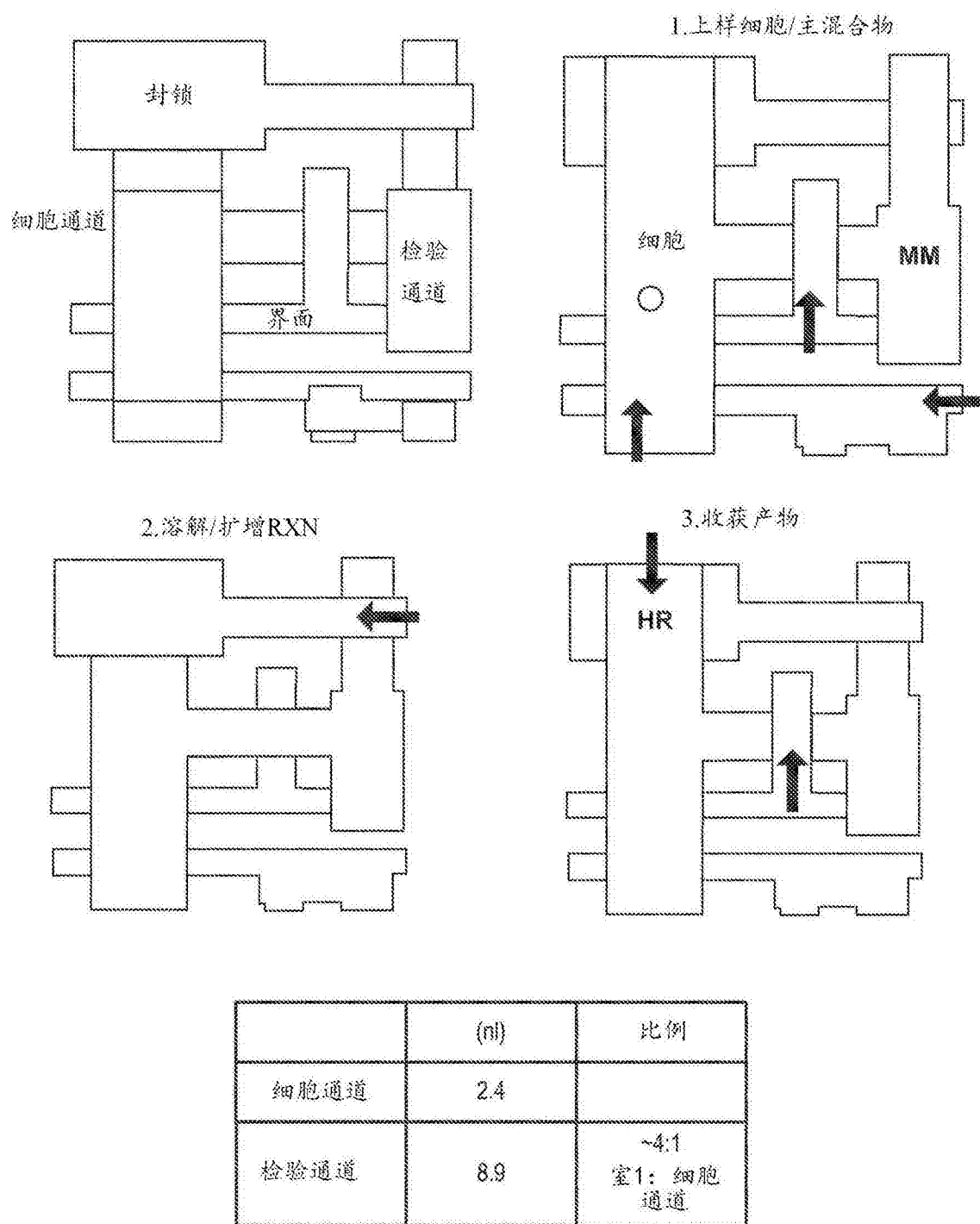
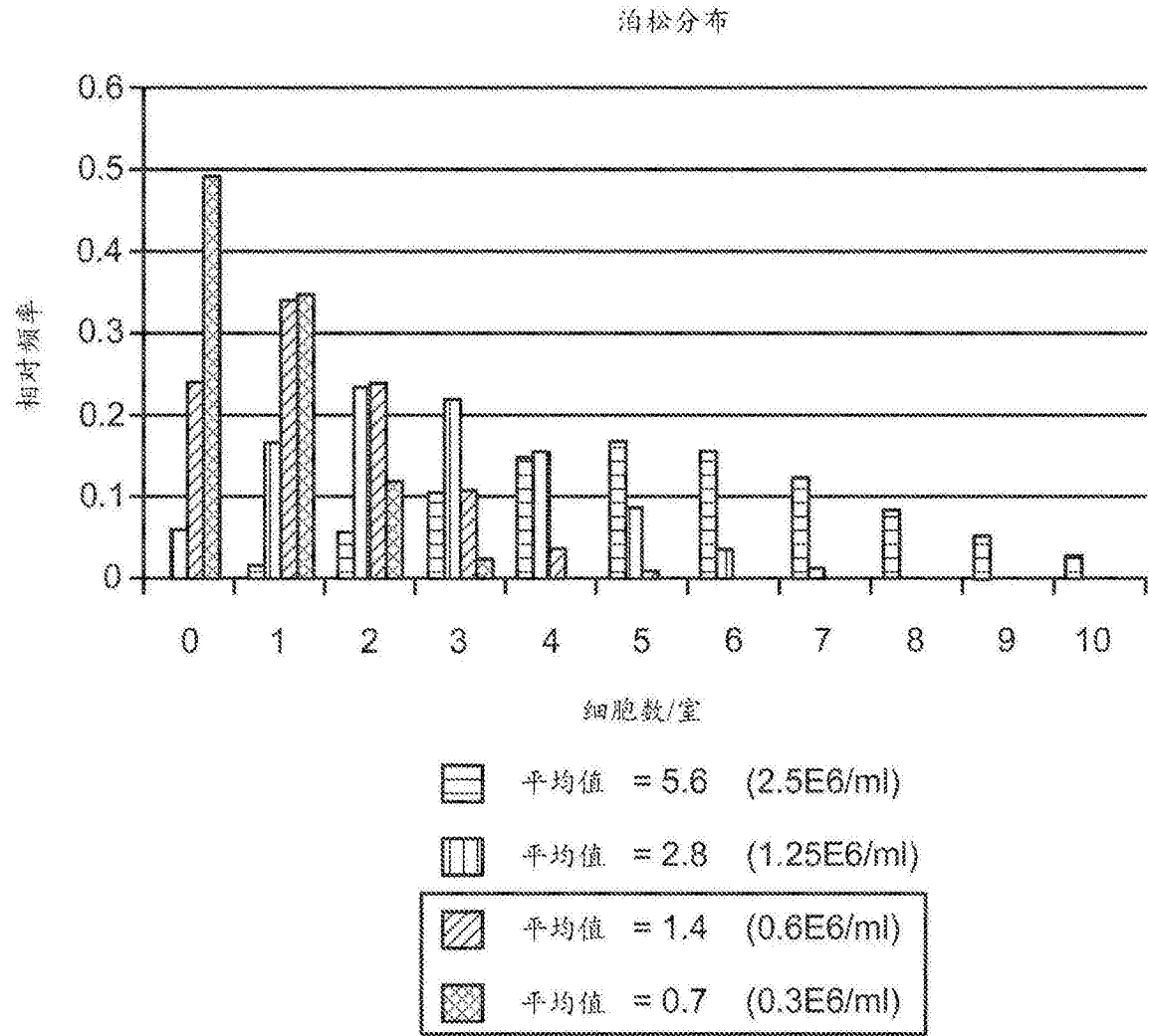


图1



对于单细胞的“最佳”理论细胞密度：  
 每室平均 $\sim 1 = 1/2.4 \text{ nl} \sim 0.5 \text{ E6/ml}$

图2

测量的:

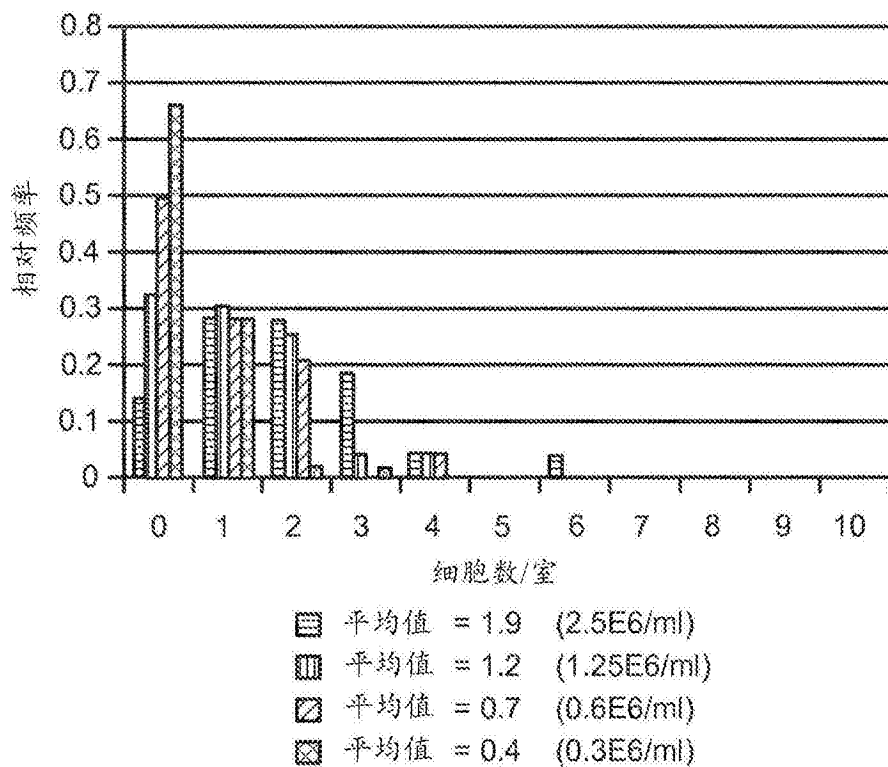


图3A

理论的:

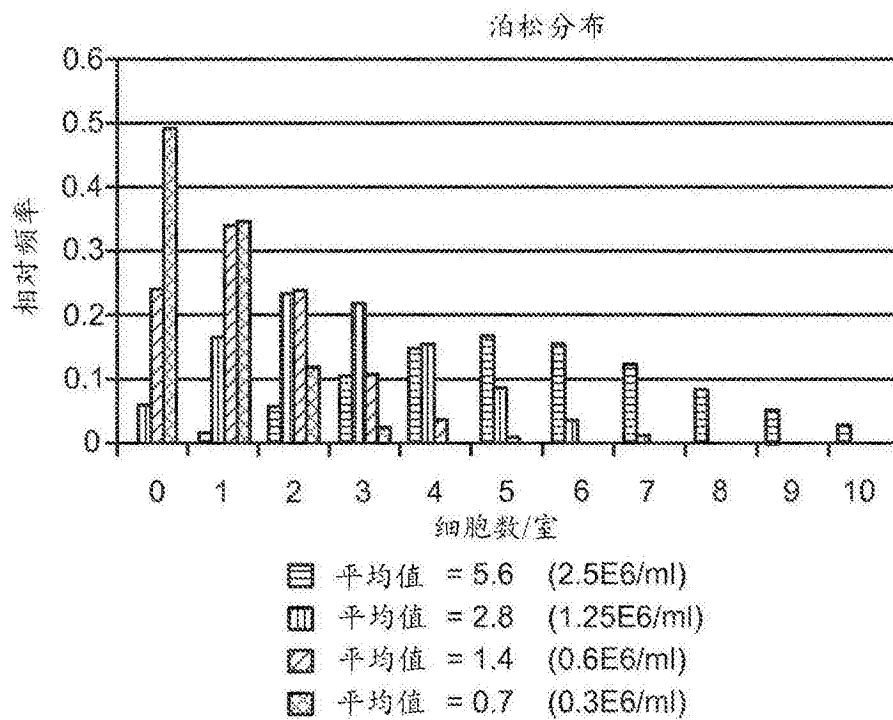
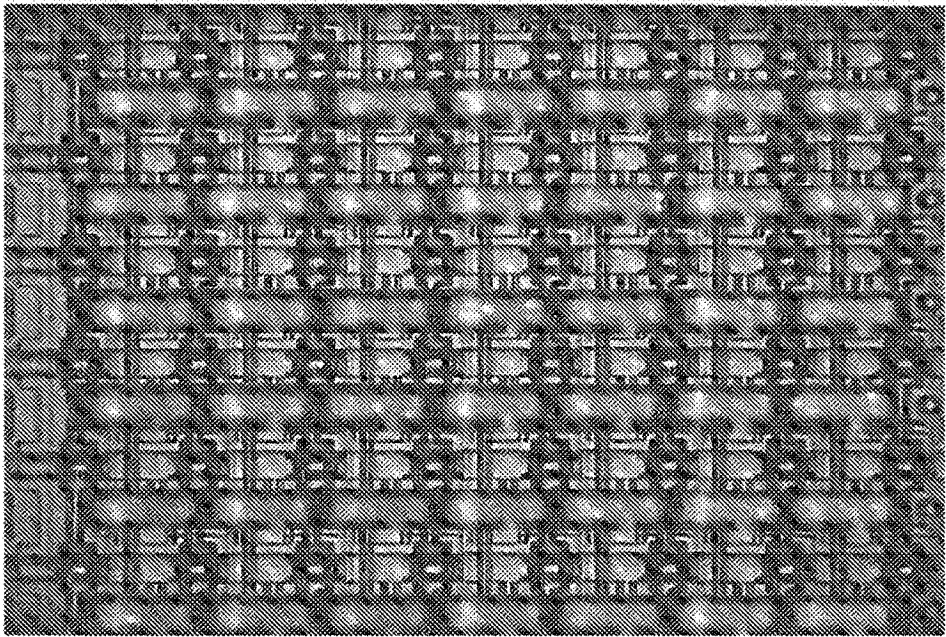


图3B

0.15E6 /ml  
预计  
0-1  
室



|        | 亮视野  | 荧光   |
|--------|------|------|
| 平均细胞/室 | 0.29 | 0.52 |

图4A

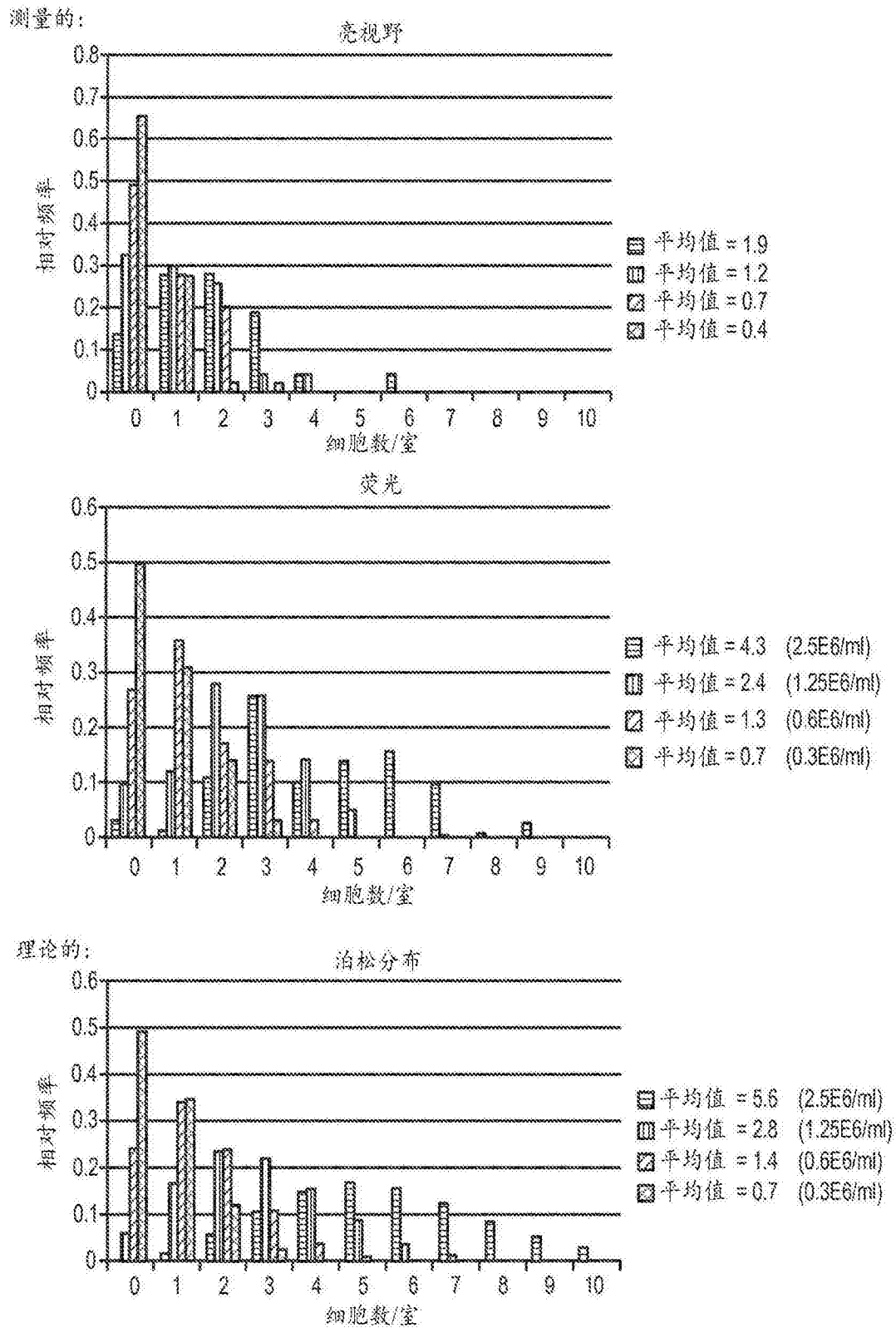


图4B

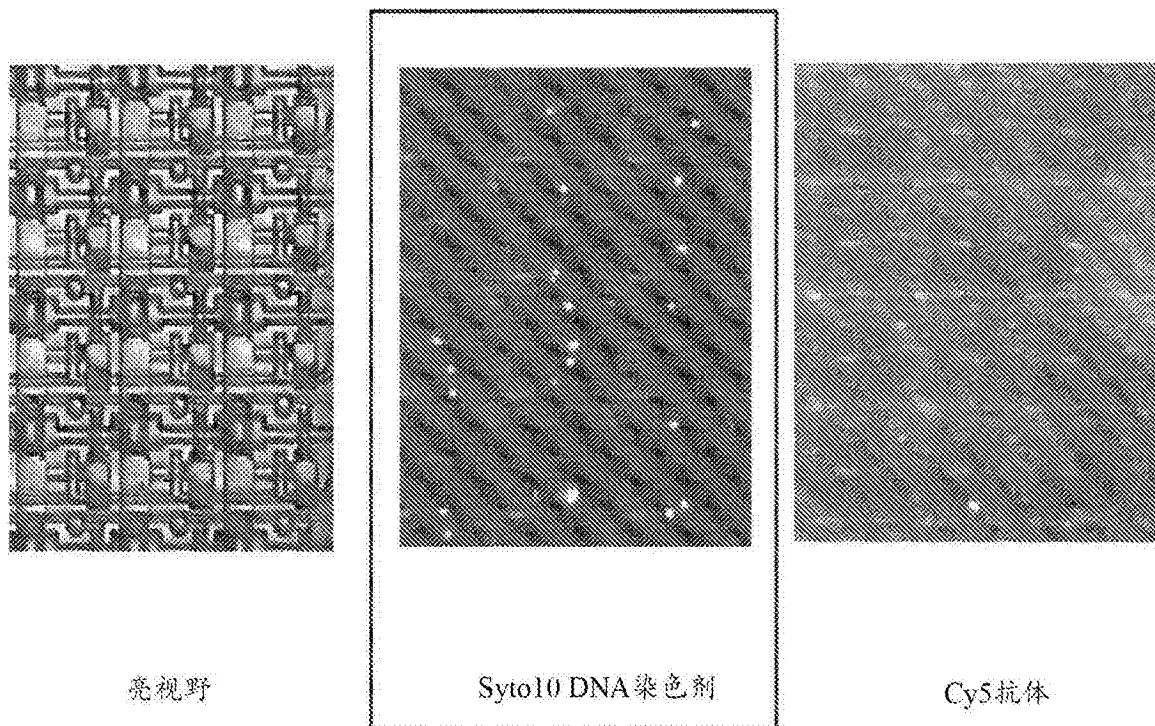


图5

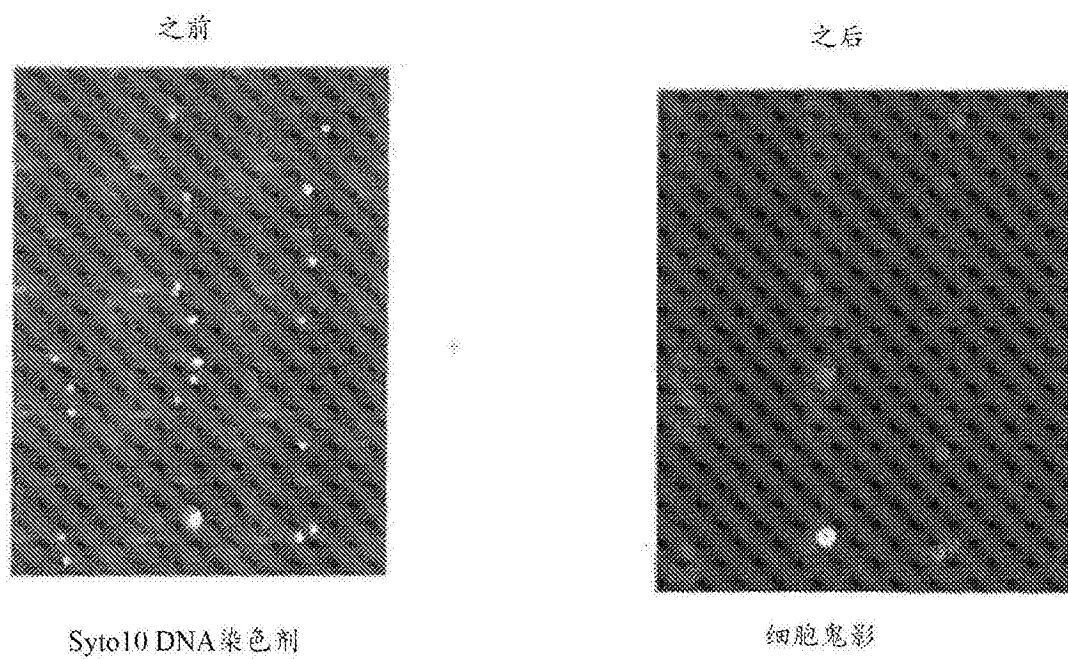


图6A

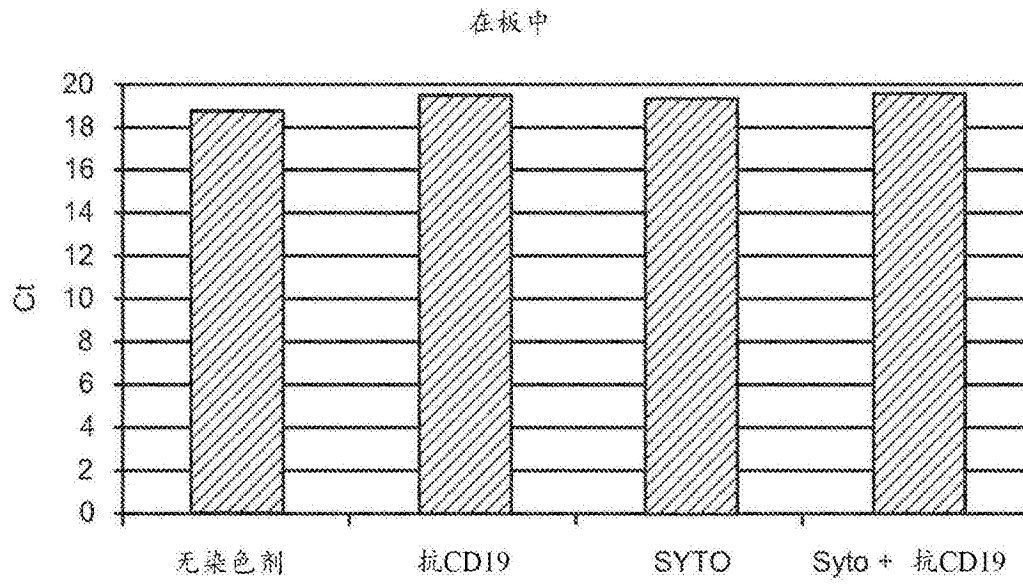


图6B

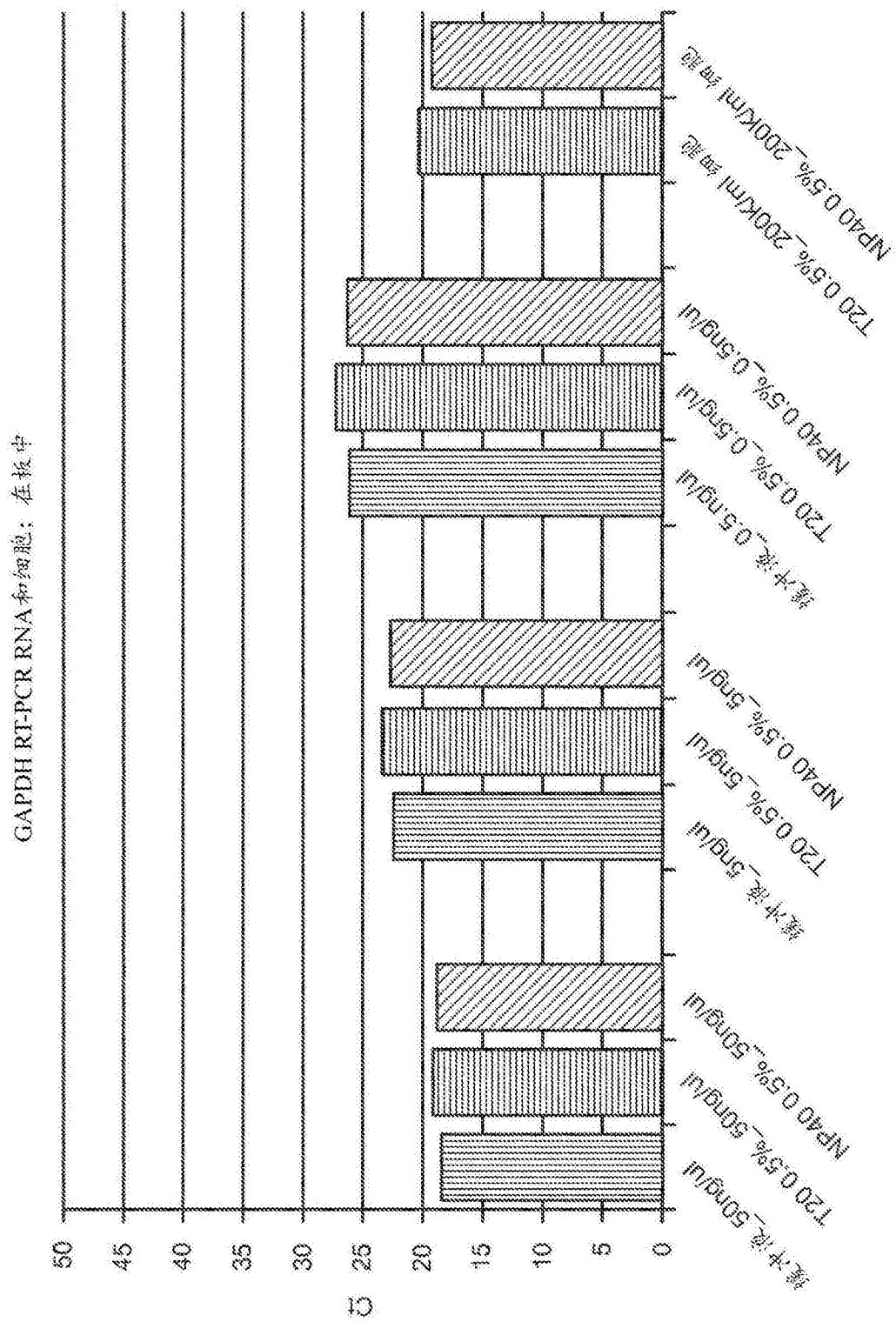


图7

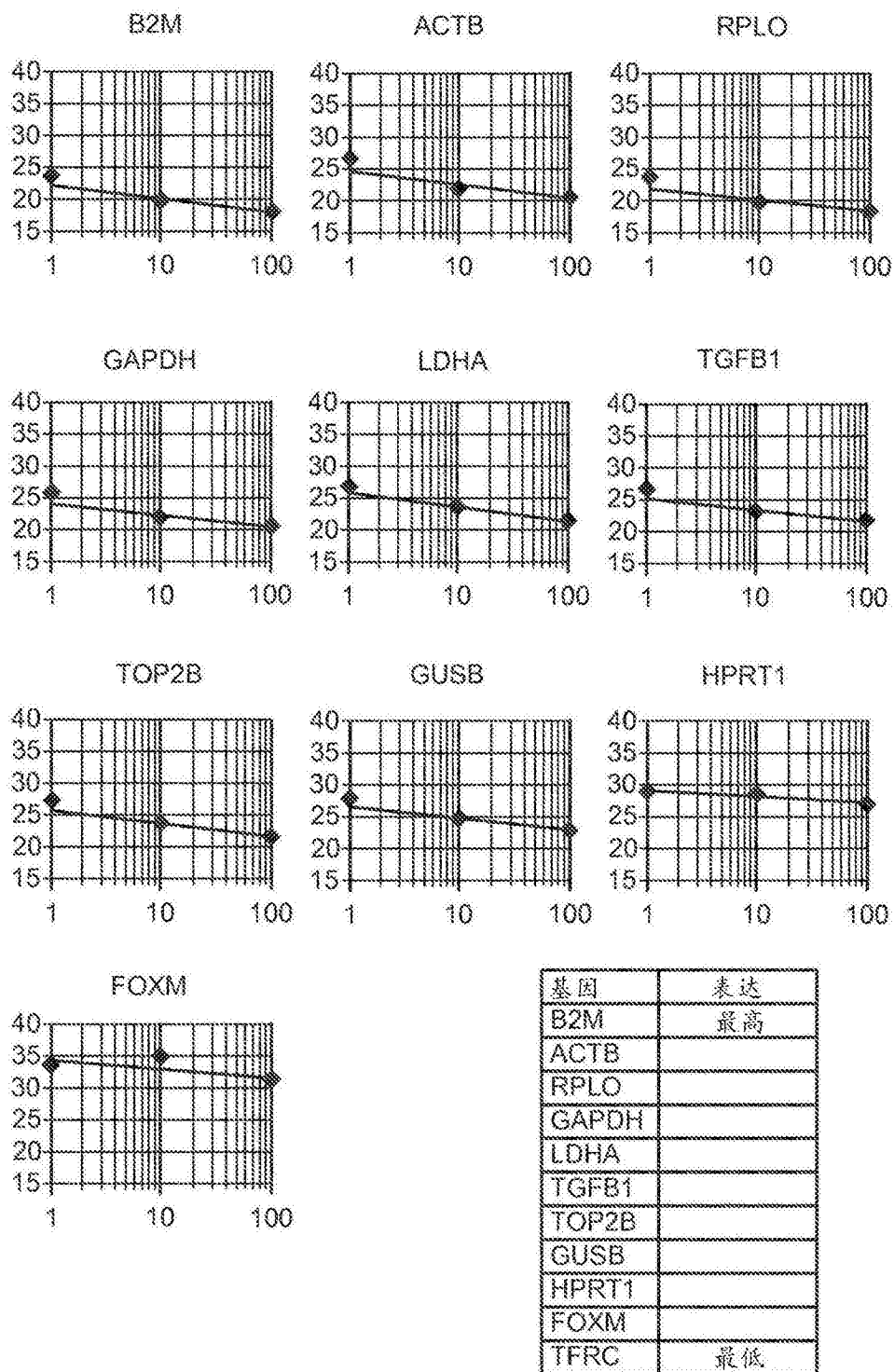


图8

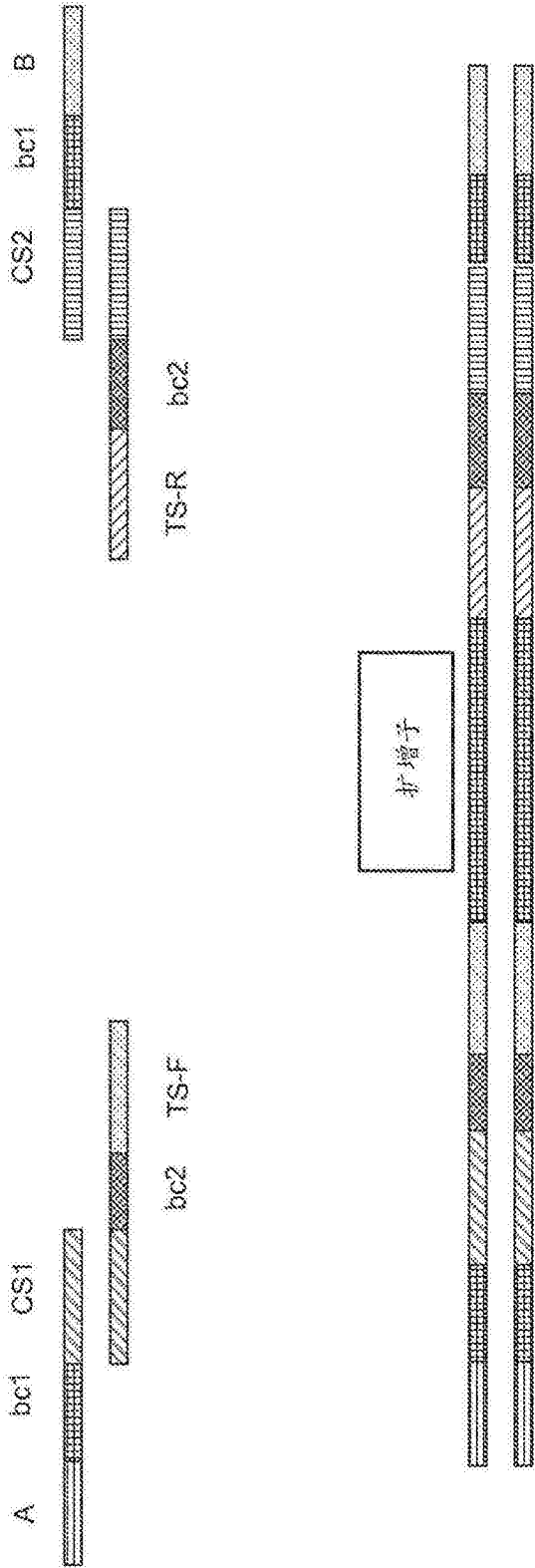


图9

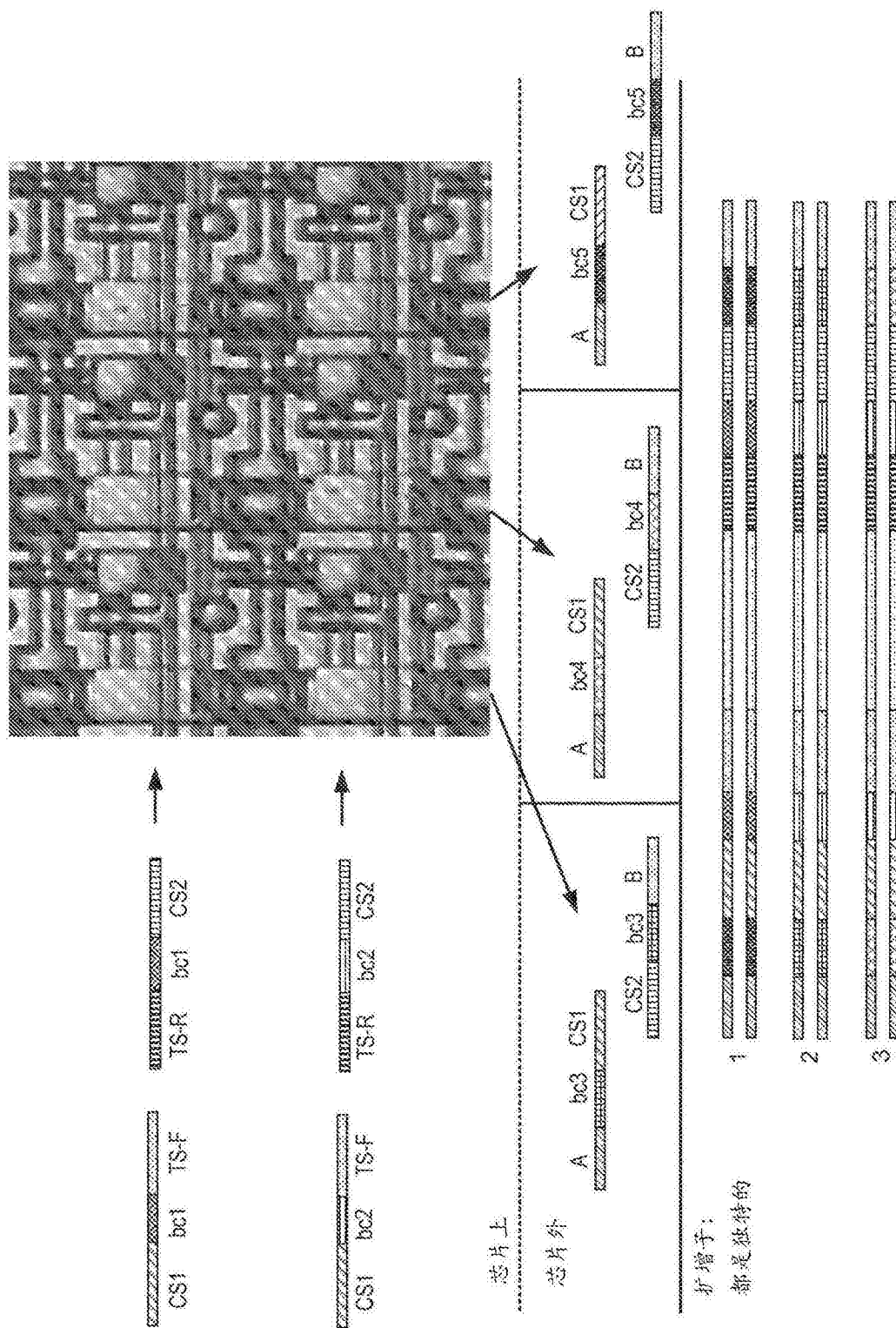


图10A

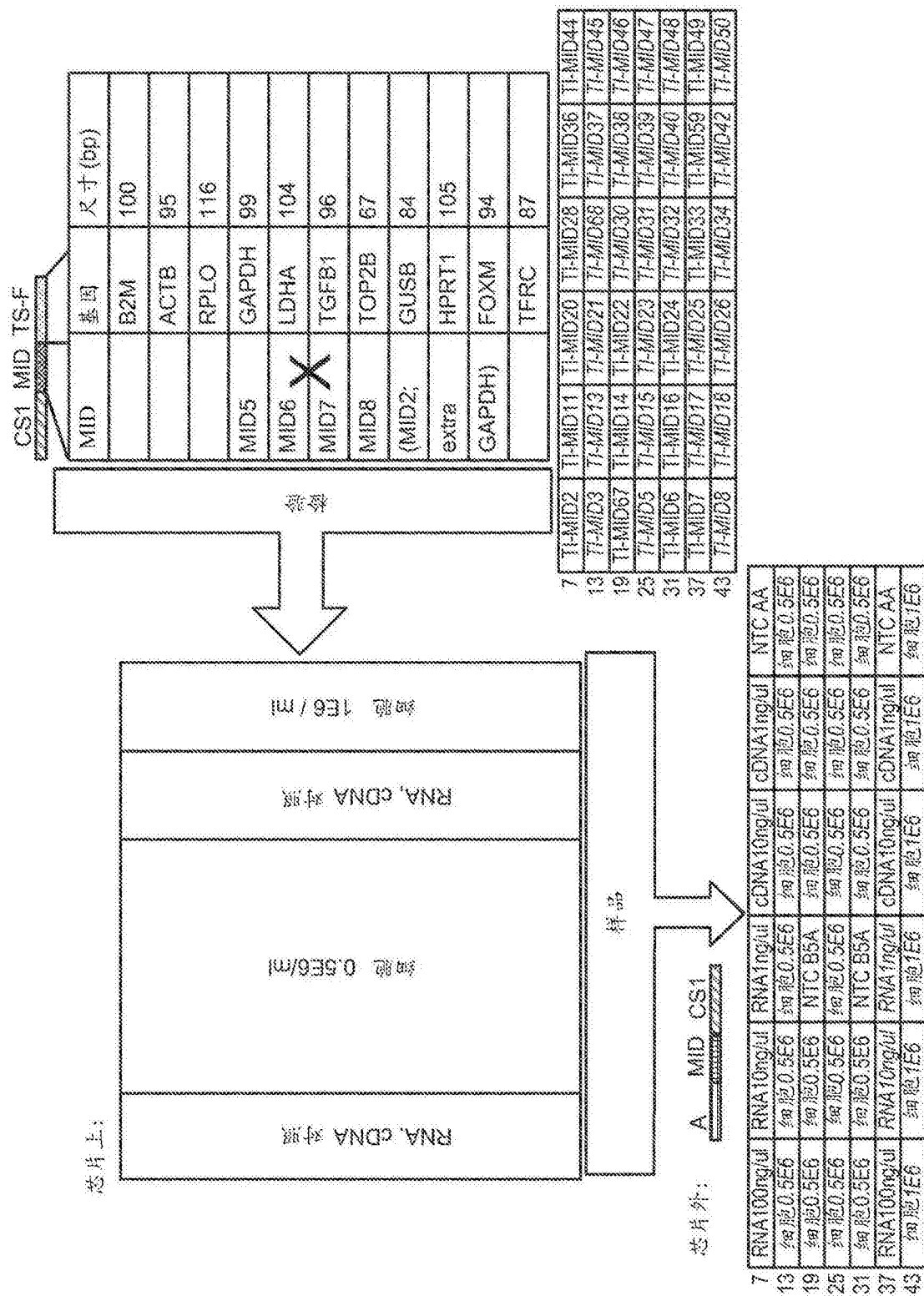


图 10B

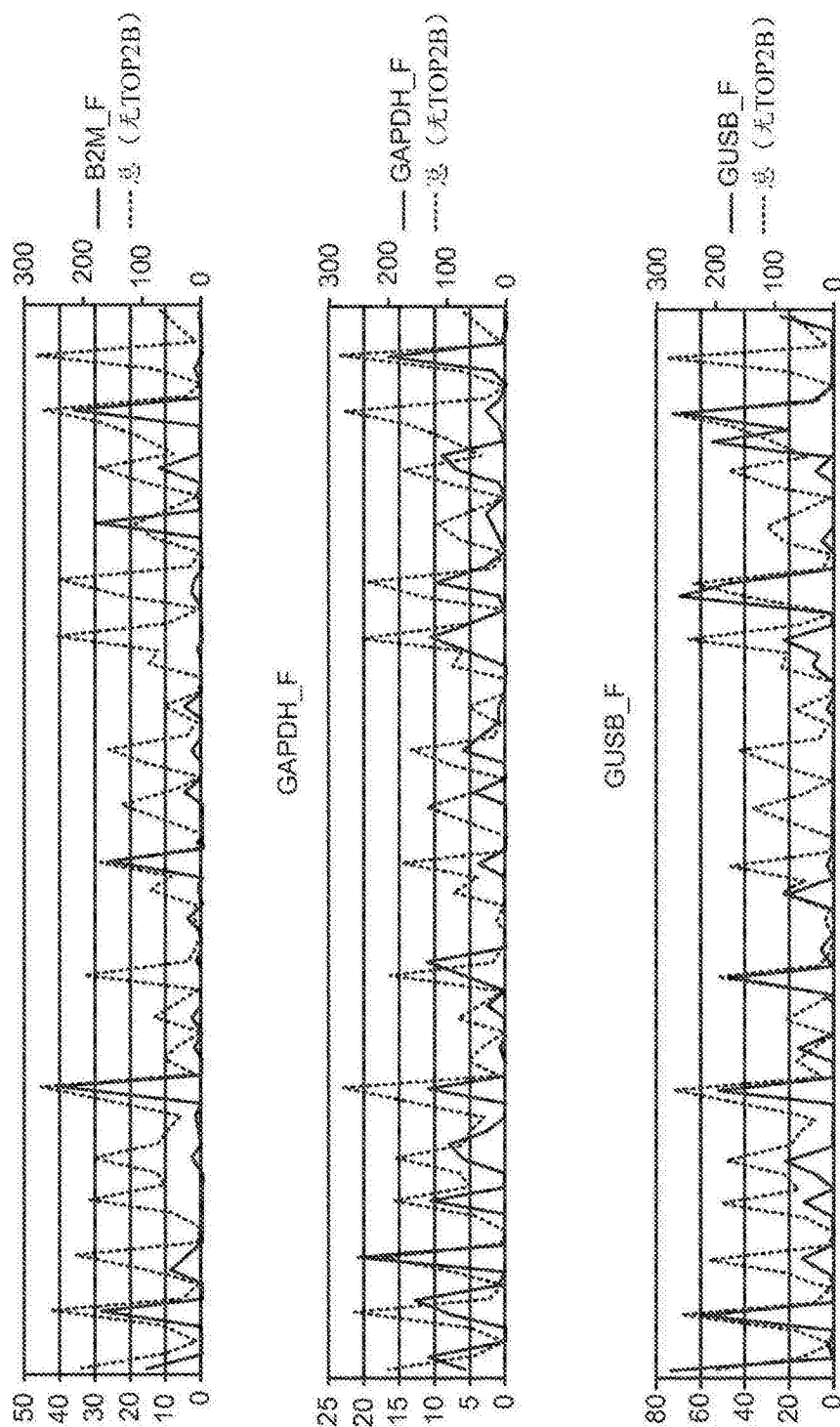


图11

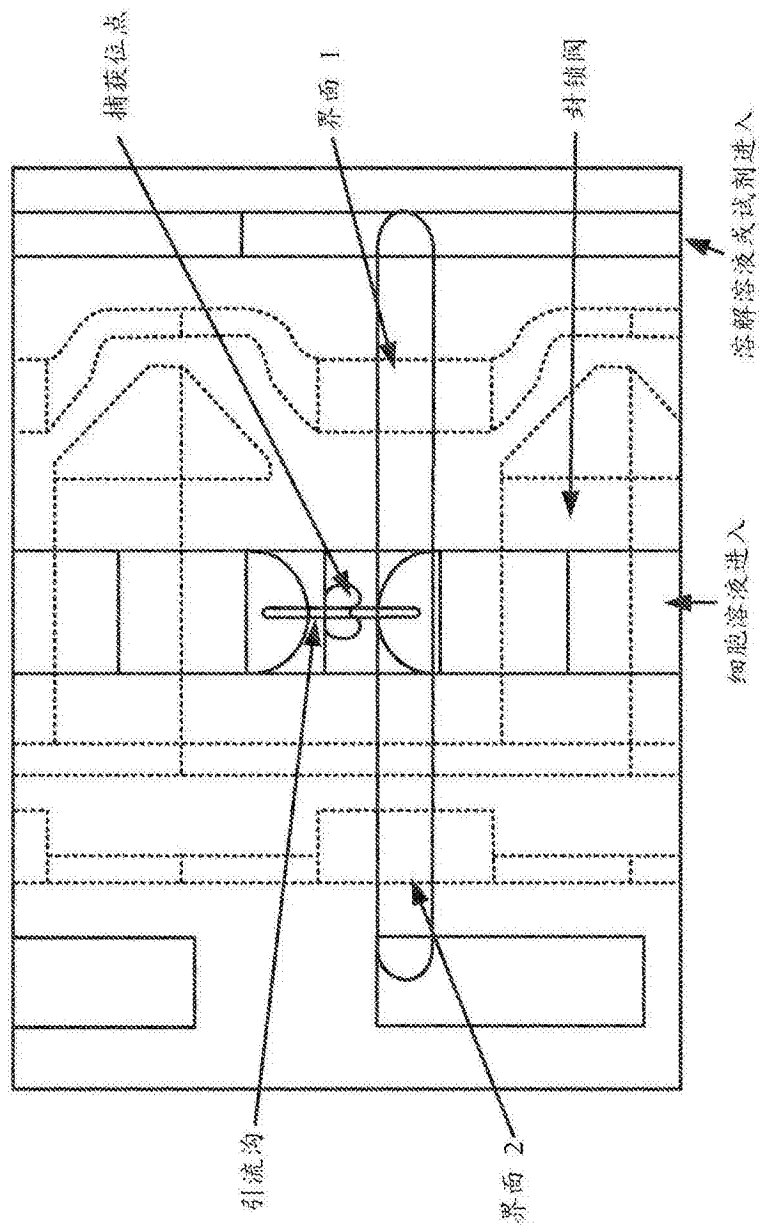


图12A

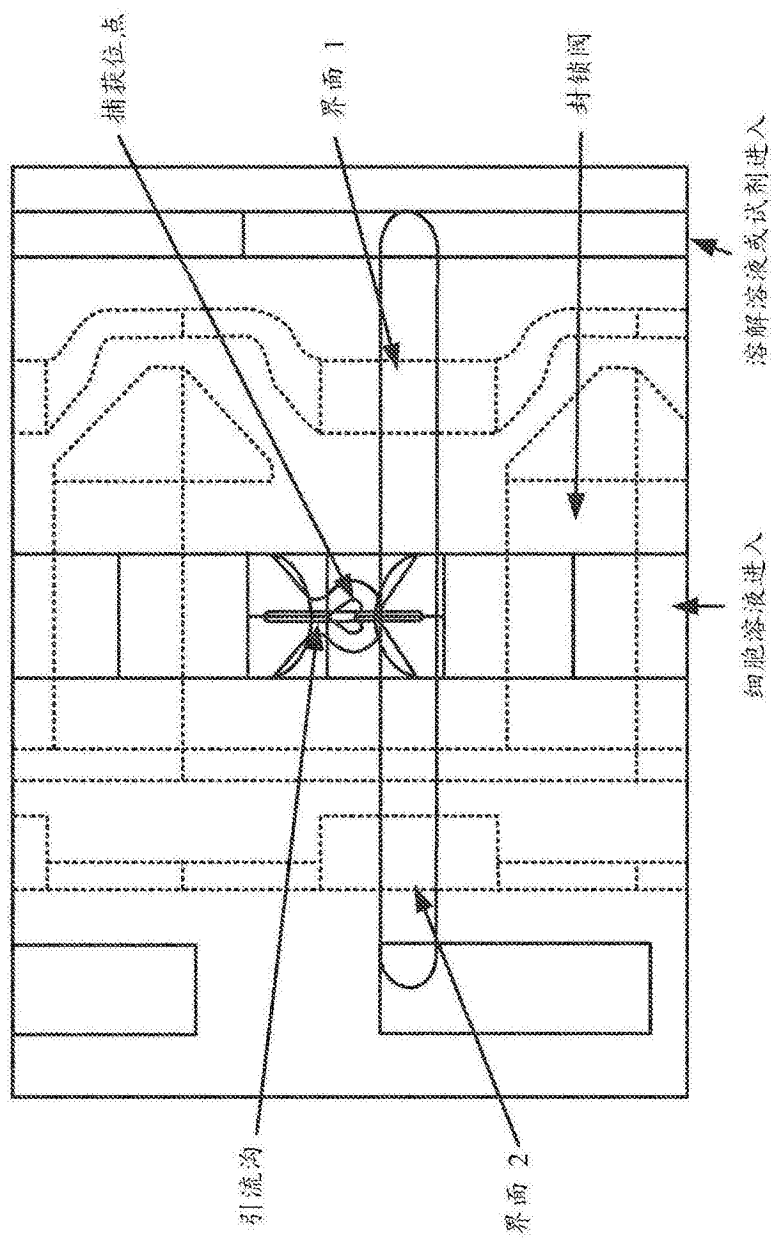


图12B

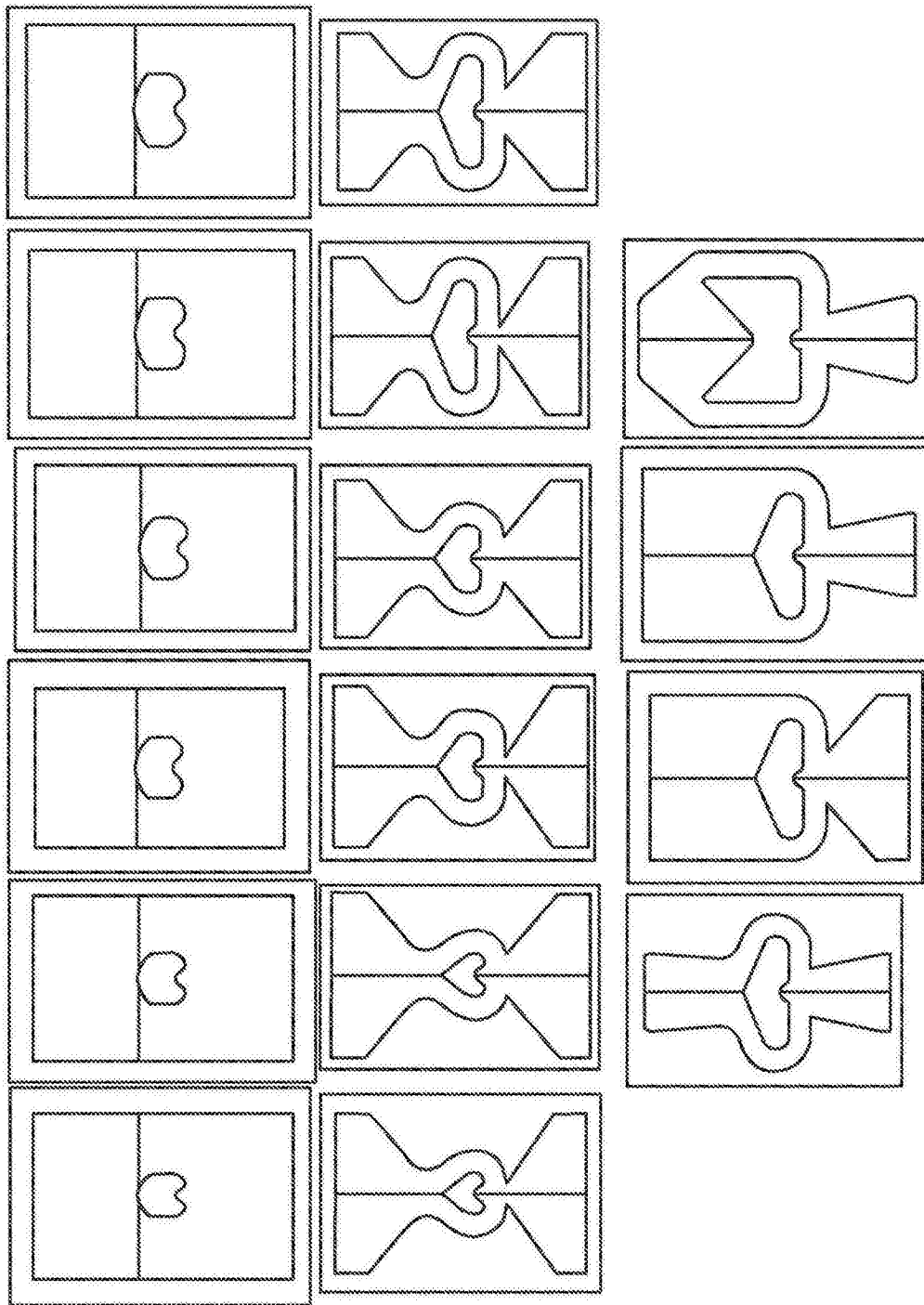


图13

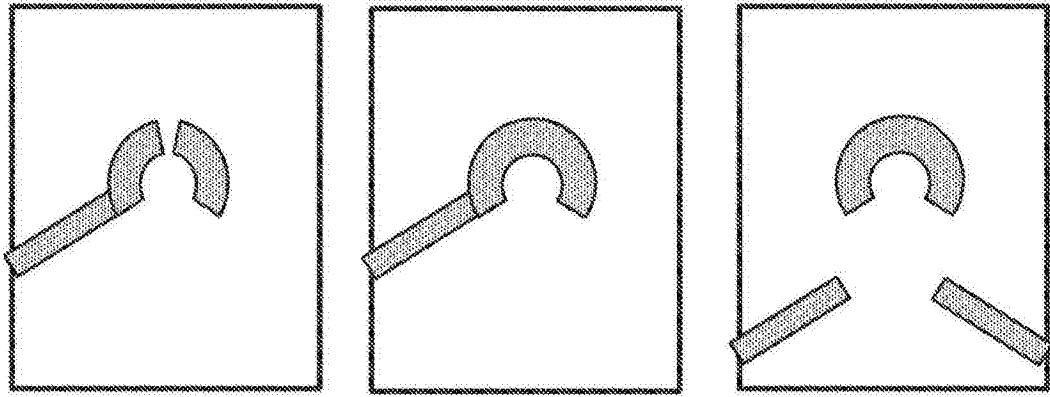


图14A

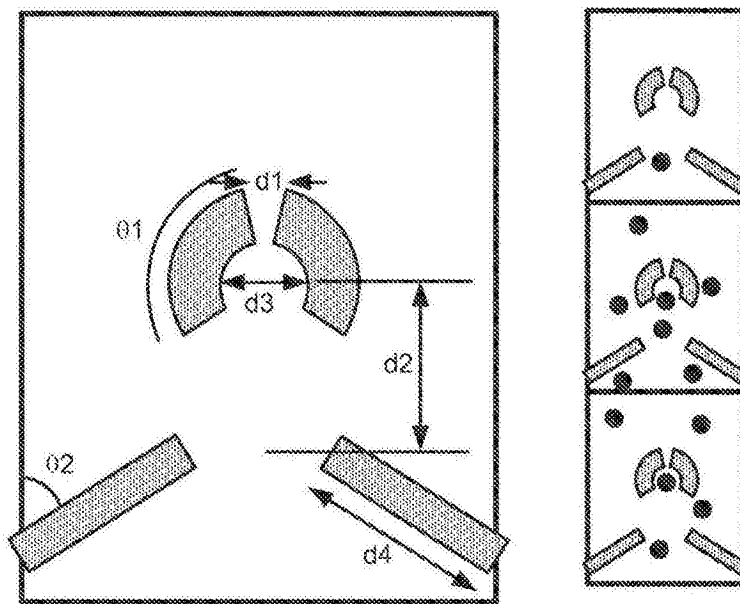


图14B

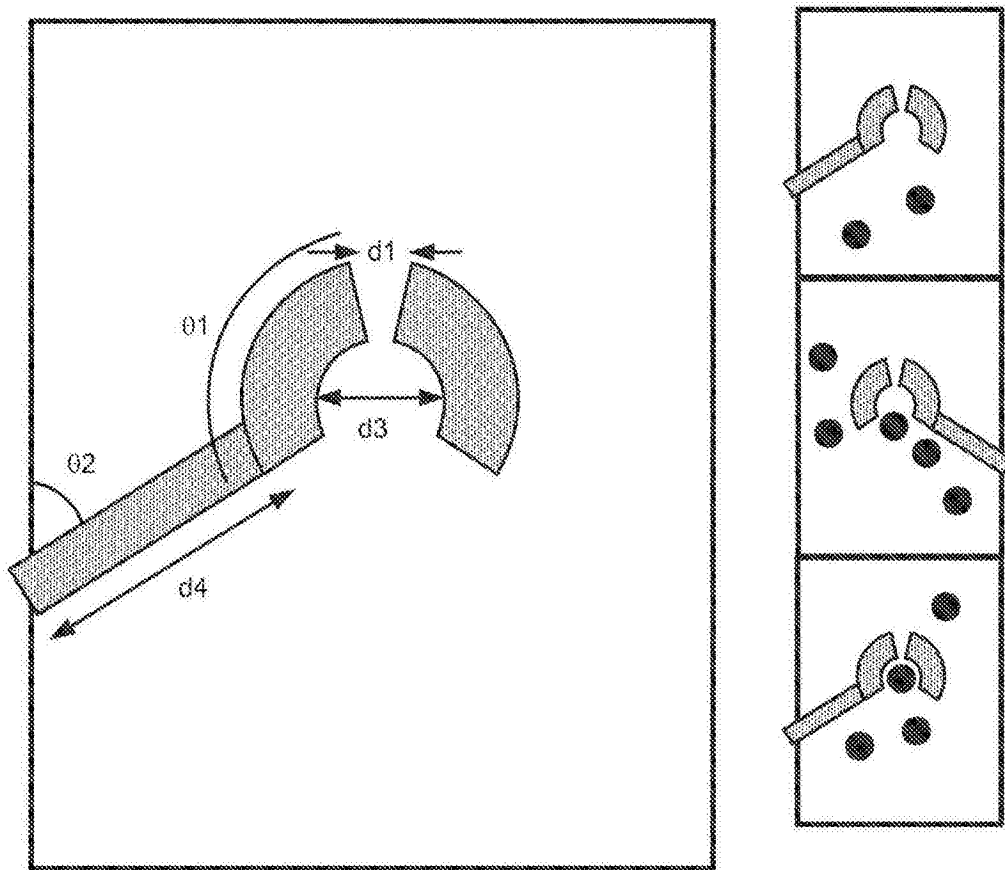


图14C

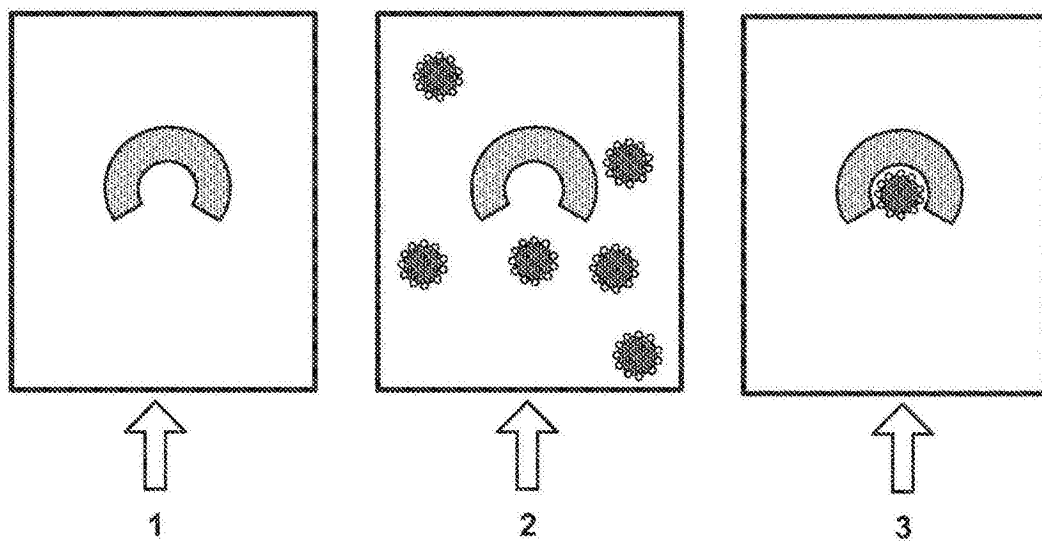


图15A

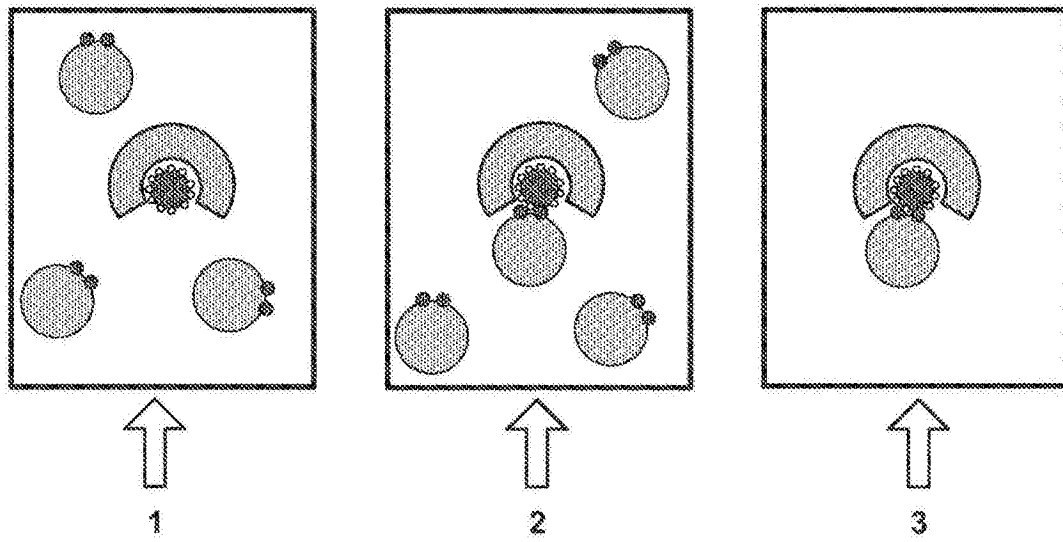


图15B

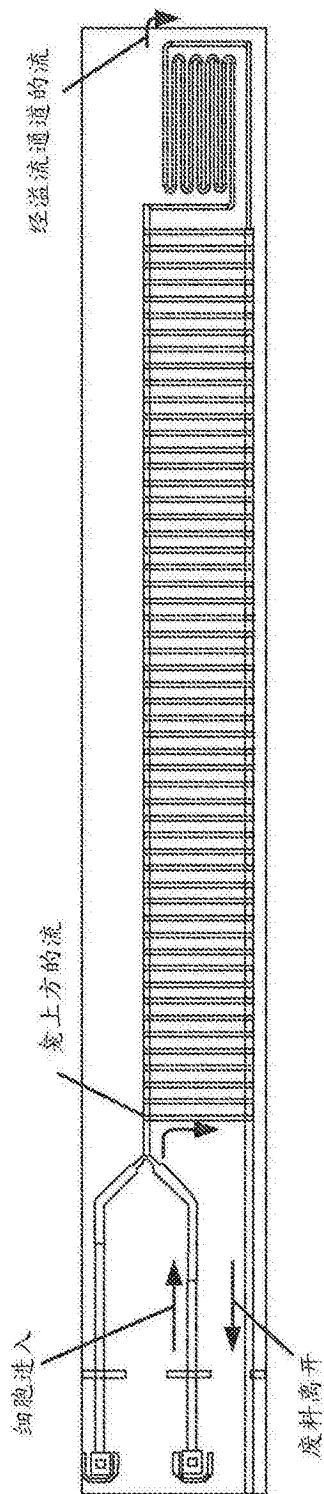


图16A

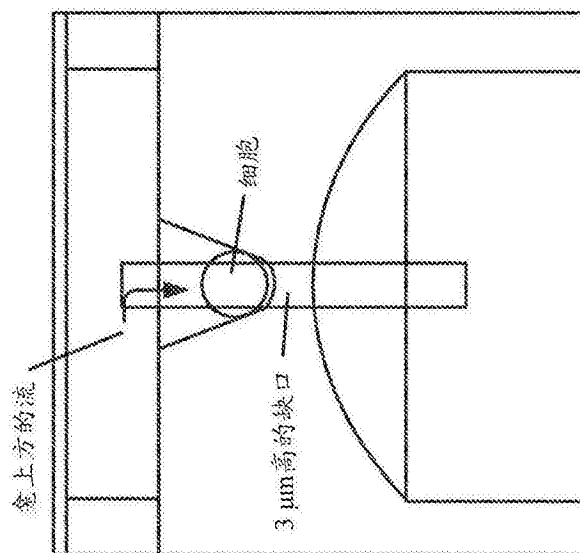


图16B

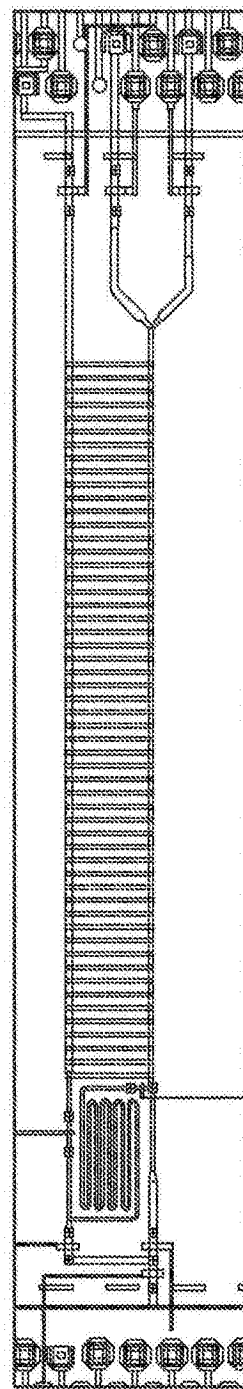


图16C

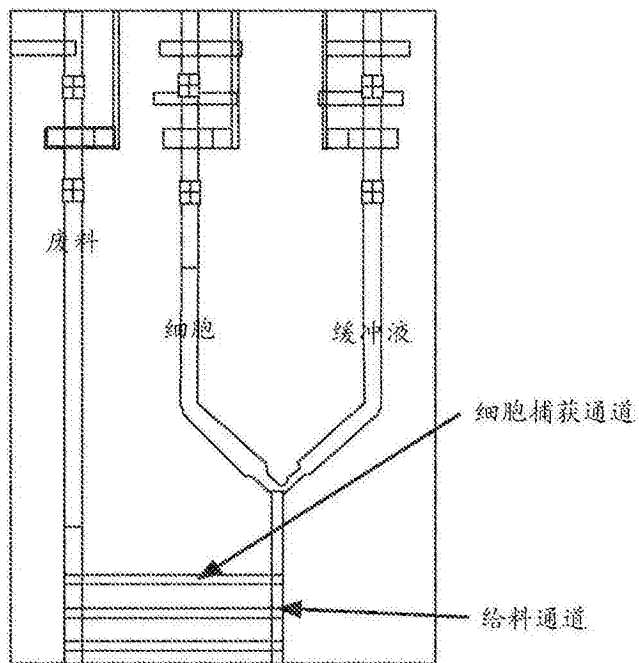


图16D

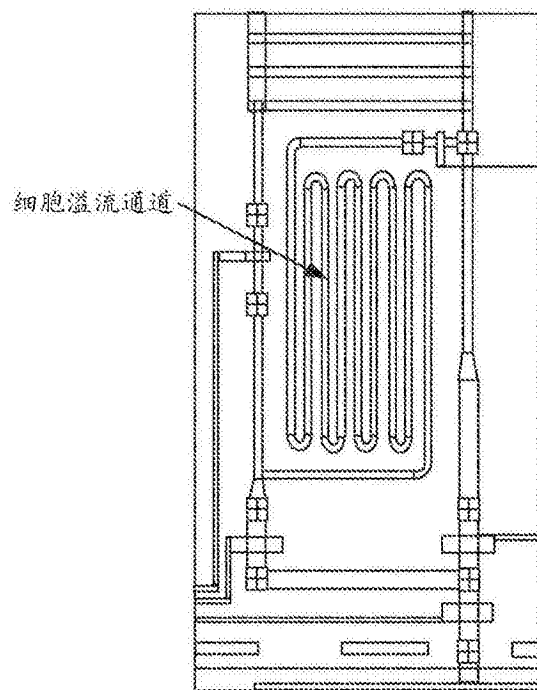


图16E

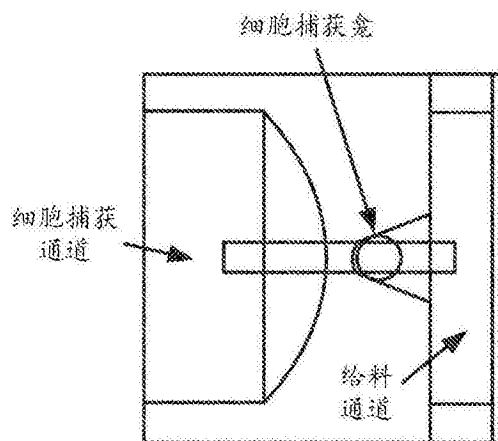


图16F

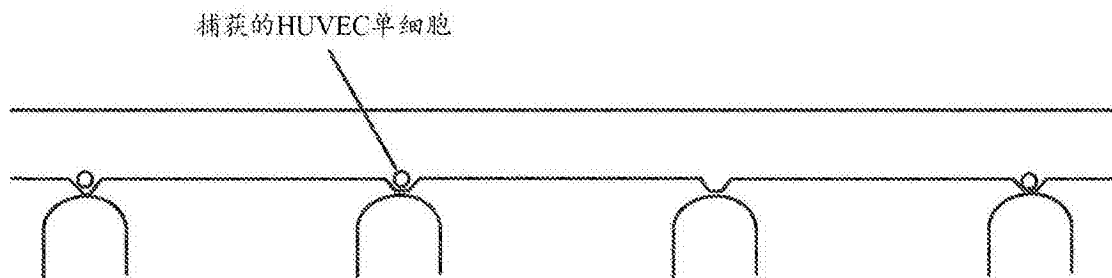


图16G