

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 3 月 24 日 (24.03.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/057797 A1

(51) 国际专利分类号:
C12M 1/42 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/118338

(22) 国际申请日: 2021 年 9 月 14 日 (14.09.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010979980.X 2020 年 9 月 17 日 (17.09.2020) CN

(71) 申请人: 厦门大学 (XIAMEN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路
422 号, Fujian 361000 (CN)。

(72) 发明人: 杨朝勇 (YANG, Chaoyong); 中国福建省
厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361000
(CN)。 阮庆宇 (RUAN, Qingyu); 中国福建省
厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361000
(CN)。 杨健 (YANG, Jian); 中国福建省厦门市
思明区思明南路 422 号, Fujian 361000 (CN)。
邹芬香 (ZOU, Fenxiang); 中国福建省厦门市思
明区思明南路 422 号, Fujian 361000 (CN)。 张
倩倩 (ZHANG, Qianqian); 中国福建省厦门市思

明区思明南路 422 号, Fujian 361000 (CN)。 许
醒 (XU, Xing); 中国福建省厦门市思明区思明
南路 422 号, Fujian 361000 (CN)。

(74) 代理人: 厦门市首创君合专利事务所有
限公司 (SHOUCHUANG JUNHE PATENT AGENT
CO., LTD. XIAMEN); 中国福建省厦门市思
明区软件园二期望海路 23 号之三 606
室, Fujian 361012 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,

(54) Title: FULL-AUTOMATIC SINGLE-CELL CAPTURE CHIP BASED ON DIGITAL MICROFLUIDIC TECHNOLOGY, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种基于数字微流控技术的全自动单细胞捕获芯片及其应用

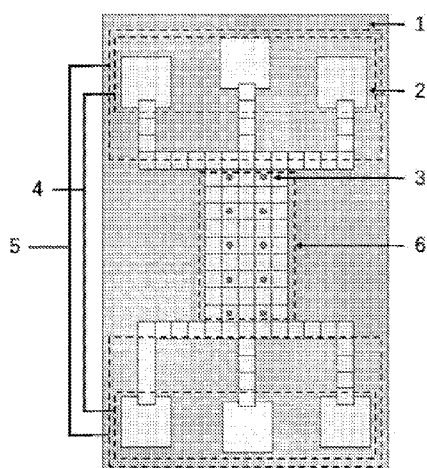


图 1

(57) Abstract: A full-automatic selective single-cell capture device based on digital microfluidic technology, and an application thereof. The device comprises three parts, namely, a digital microfluidic chip (1), an imaging system located above the digital microfluidic chip (1), and a control circuit separately connected to the digital microfluidic chip (1) and the imaging system. The full-automatic selective single-cell capture device based on digital microfluidic technology can implement full-automatic selective single-cell capture, the capture success rate is 100%, the obtained single cells are classified and identified by morphology and molecular biology, high specificity and high sensitivity are achieved, and the present application is suitable for single-cell separation of circulating tumor cells in blood and subsequent application.

(57) 摘要: 一种基于数字微流控技术的全自动选择性单细胞捕获装置及其应用, 包括数字微流控芯片 (1)、位于数字微流控芯片 (1) 上方的成像系统以及分别连接数字微流控芯片 (1) 和成像系统的控制电路三部分。基于数字微流控技术的全自动选择性单细胞捕获装置能够实现全自动的单细胞选择性捕获, 捕获成功率为 100%, 且获取的单个细胞经过形态学和分子生物学的分类鉴定, 具有高特异性和高灵敏度, 适用于完成血液中循环肿瘤细胞的单细胞分离及后续应用。

AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

一种基于数字微流控技术的全自动单细胞捕获芯片及其应用

技术领域

本发明属于数字微流控技术领域，具体为一种基于数字微流控技术的全自动单颗粒/单细胞捕获芯片及其应用。

背景技术

细胞是生物结构组成和功能行使的基本单元，细胞分析可以为新陈代谢和信号传导等生理过程提供重要的理论依据。传统的细胞分析大多是基于群体细胞进行的，其分析的是大量细胞平均下的结果，是群体状态的一个平均性数据。目前，越来越多的研究表明，细胞个体之间存在异质性，看似相同的一群细胞，其内部有可能存在本质的差别，其在基因组序列、酶活性、蛋白表达等方面都存在着差异。这些差异反映在细胞水平上就表现为细胞功能的异质性，在基础和临床医学研究中，这种异质性是无法忽视的。并且在癌症发生过程中，由于基因突变等事件具有一定的偶然性，癌症组织也具有非常大的异质性，这种异质性也常常会成为临床上癌症治疗的主要障碍之一。例如：表皮生长因子受体（EGFR）的突变辅助诊断，在酪氨酸激酶抑制剂靶向癌症的治疗中，被认为具有至关重要的作用。有效识别少量的 EGFR-突变细胞是当前临床治疗的迫切需求。但是，这些突变细胞信号往往被大部分正常细胞的噪声信号所掩盖，妨碍了突变细胞的有效识别。因此，近年来科学家们逐渐对单细胞产生了极大的研究兴趣，希望可以通过对这些参与生物体内反应的基本单元的深入地研究，从而更好地理解生物的本质。

尽管单细胞分析技术在很多应用领域中是至关重要的，然而单细胞体积小、所测组分含量低、偏差放大的特点使得单细胞的分离和分析面临着巨大的挑战。而且在细胞数目较多时，需要大量的重复操作，极其耗时，导致实验通量无法提升。

微流控芯片利用结构各异的微通道和形式多样的外加力场，对微量流体或样品在微观尺度上进行操纵、处理与控制，从而实现了传统实验室的部分乃至全部功能在一

块微芯片上的集成。相比于传统方法，其具有成本低、分析速度快、试剂消耗少等优势，代表着未来生物、化学分析走向微型化的发展方向。因此，微流控芯片作为单细胞分离和分析的最主要研究手段之一，被广泛应用于神经科学、干细胞生物学、发育生物学、癌症诊断和个性化药物筛选等领域中。然而，常规微流控芯片的局限性也是非常明显的，其需要机械泵、阀配合使用，集成化难度大，难以实现样品的连续多步处理；对多试剂位置和反应时间的精确控制捉襟见肘；并且无法实现对少量稀有细胞的单细胞俘获，在大量单细胞进行高效率高通量分析领域更是无能为力。

为了解决以上问题，我们提出了一种基于数字微流控技术的全自动单细胞捕获芯片。该芯片可以全自动地捕获单细胞，而且单细胞的捕获效率高。

发明内容

本发明的目的在于提供一种基于数字微流控技术的全自动单细胞捕获芯片，可以全自动高效率地捕获单细胞。

为了达到上述目的，本发明采用如下技术方案：

一种基于数字微流控技术的全自动选择性单细胞捕获装置，包括数字微流控芯片、位于所述数字微流控芯片上方的成像系统以及分别连接所述数字微流控芯片和所述成像系统的控制电路三部分。

所述的数字微流控芯片包括上、下极板两部分，下极板包括基底、电极层、介质层和局部亲水化的疏水层，上极板为疏水化的地电极，上下极板平行相对，被间隙层相隔；电极层包括电极接入口、贮液池电极单元、液滴生成通道电极阵列、单颗粒/单细胞捕获电极阵列和反应电极区，液滴生成通道电极阵列分别与贮液池电极单元一一相连，并以单颗粒/单细胞捕获电极阵列和反应电极区为中心对称分列于其两侧；

局部亲水化的疏水层是具有局部亲水化位点的疏水层，其经对准可在指定电极中央形成亲水化捕获位点，通过亲水结构的粘附作用捕获单细胞；

所述成像系统位于数字微流控芯片正上方，用于获取所述成像区域内亲水化捕获位点处的图像信息。在液滴到达亲水化捕获位检测点后，经明场、荧光场连续两次图

像识别后，输出图像信息进入控制电路与所设定的图像阈值进行比较，根据比较结果控制电路会输出对应的控制指令，控制指令控制电极驱动电路输出相应变化规律的电压程序，从而实现对单细胞捕获成功与否的判断；

所述控制电路分别连接所述数字微流控芯片和所述成像系统，用于分别输出数字
55 微流控芯片控制程序和成像系统操作程序。

本发明的一个优选的实施方式中，电极层包括 96 个电极接入口、八个贮液池电极单元、八个液滴生成通道电极阵列、10 个单颗粒/单细胞捕获电极阵列和反应电极区。

本发明的一个优选的实施方式中，液滴生成通道电极阵列分别与贮液池电极单元
60 一一相连，并以单颗粒/单细胞捕获电极阵列和反应电极区为中心对称分列于其两侧。

本发明的一个优选的实施方式中，疏水层中亲水化捕获位点的形状包括圆形、方形、半月形等，大小可由电极大小决定。一般的，用于捕获的亲水位点可以是 50-500 微米直径的圆形，例如 100 微米、150 微米、200 微米、250 微米、300 微米、350 微米或者 400 微米。

65 本发明的一个优选的实施方式中，所述的颗粒的直径可以是 5-200 微米，例如 5 微米、10 微米、15 微米、20 微米、30 微米、70 微米、80 微米或者 90 微米。

本发明的一个优选的实施方式中，所述的细胞的直径可以是 5-100 微米，例如 5 微米、10 微米、15 微米、20 微米、30 微米、70 微米、80 微米或者 90 微米。

本发明的数字微流控芯片所用亲疏水层的材料为特氟龙或聚四氟乙烯 PTFE 水分
70 散液，通过局部剥离技术构建于电介层上，形成局部亲水化的捕获位点。

为了防止液滴的挥发，对液滴包裹油壳或将液滴浸润在油相中。

对于不同的单颗粒/单细胞捕获体系，所述贮液池电极单元可以实现液滴体积从 1 纳升至 10 微升的变化。

为了保证单颗粒/单细胞分析体系中液滴的移动，在液滴中加入表面活性剂用以

75 防止生物黏附。

为了选择性捕获单颗粒/单细胞，结合图像识别和全自动程序选择性捕获。

本发明的一个优选的实施方式中，所述的数字微流控芯片基本工作流程为：

步骤 A: 将带有和不带有荧光细胞的液体置于数字微流控芯片的贮液池内，加入适量的填充油将各液滴包裹住，使用集成电路对电极进行预通电，转入步骤 B；

80 步骤 B: 使用集成电路的控制电路控制电极驱动电路，按一定次序进行电极的通断电控制，从而从贮液池电极单元产生一个合适体积的含细胞液滴，通过与其连接的通道电极阵列将液滴移动至单细胞捕获电极处，重复这一过程使各捕获电极均负载含细胞液滴，转入步骤 C；

步骤 C: 集成电路的控制电路控制电极驱动电路，使液滴从单细胞捕获电极阵列
85 区通过，当单个细胞进入拥有亲水结构的捕获电极时，对单细胞捕获电极阵列区电极断电，液滴静置 1 分钟后，使细胞在重力作用下沉降于芯片表面，然后在电极驱动下使液滴移动到下一个电极，然后转入步骤 D；

步骤 D: 依次使用明场、荧光场进行拍摄并输出图像信息，转入步骤 E；

步骤 E: 经明场、荧光场连续两次图像识别后，输出图像信息进入控制电路与所
90 设定的图像阈值进行比较，根据比较结果控制电路会输出对应的控制指令，控制指令控制电极驱动电路输出相应变化规律的电压程序，从而实现对单细胞捕获成功与否的判断，若不为单颗粒/细胞或不是目标颗粒/细胞则控制指令重复步骤 C，若为目标单颗粒/细胞，则选择性捕获单细胞完成，转入步骤 F。

本发明与现有技术相比，其优势在于：

95 (1) 本发明数字微流控芯片包括具有多层图案的数字微流控芯片和集成电路两部分。所述的具有多层图案的数字微流控芯片由上、下极板两部分组成，下极板包括

基底、电极层、介质层和局部亲水化的疏水层，上极板包括疏水化的地电极；集成电路为数字微流控电路控制系统。具有全自动、易集成、可寻址的优点，体积小，消耗试剂少，节约成本；

100 (2) 该单细胞捕获装置可 100%选择性捕获单细胞；

(3) 基本没有细胞损失，在有限细胞数目的条件下可以使得全部捕获位点捕获有单细胞，能够根据芯片捕获位点的数目控制单细胞捕获数目，特别适用于稀有样品的分析，比如循环肿瘤细胞（CTC）、干细胞等稀有细胞的分析；

105 (4) 本发明可以实现对产生的离散微液滴更加直接和更大程度的时空控制，在全自动处理和完全集成化上具有优势。

附图说明

图 1 为本发明数字微流控芯片整体结构示意图。

图 2 为本发明进行单细胞选择性捕获流程示意图。

图 3 为本发明进行单细胞选择性捕获效果示意图。

110 图 4 为本发明在不同混合细胞比例（蓝色荧光：绿色荧光）下进行单细胞选择性捕获的捕获效率图。

具体实施方式

115 下面结合附图以数字微流控芯片上单细胞全基因组扩增为例，对本发明进行进一步细致描述。

参见图 1，该单细胞捕获装置，包括数字微流控芯片 1、位于所述数字微流控芯片上方的成像系统以及分别连接所述数字微流控芯片和所述成像系统的控制电路三部分。

120 所述数字微流控芯片包括上极板和下极板，所述上极板从下至上依次包括疏水层、接地导电层和上极板基底；

所述的下极板包括玻璃基底 1（在其它实施例中，也可以是其它材料基底）、电

极层、介质层和局部亲水化的疏水层，电极层由湿法刻蚀技术制作于玻璃基底表面(在其它实施例中，也可以是电路板印刷技术和打印技术等方法)，介质层均匀涂覆于电极层上表面，局部亲水化的疏水层用于单颗粒/单细胞捕获，通过局部剥离等技术在
125 介质层表面形成特定的亲水图案，在介质层的其余区域形成疏水图案；

电极层为具有特定图案的铬电极阵列 2 (在其它实施例中，也可以是其它导电金属)，包括六个贮液池电极单元 4、六个液滴生成通道电极阵列 5、十个单颗粒/单细胞捕获电极阵列和反应电极区 6 (图 1 中，3 为亲水位点，单颗粒/单细胞捕获电极阵列和反应电极区 6 位于亲水位点 3 下面)，液滴生成通道电极阵列 5 分别与贮液池电极单元 4 一一相连，并以单颗粒/单细胞捕获电极阵列和反应电极区为中心对称分列
130 于其两侧(在其它实施例中，也可以是其它数目、其它形状的电极阵列)；

局部亲水化的疏水层是由局部剥离技术形成的具有局部亲水化位点的疏水层，其经对准可在指定电极的中心处形成圆形的亲水化捕获位点(在其它实施例中，也可以是其它形状的亲水化捕获位点)。

135 所述成像系统位于数字微流控芯片正上方，用于获取所述成像区域内亲水化捕获位点处的图像信息。在液滴到达亲水化捕获位检测点后，经明场、荧光场连续两次图像识别后，输出图像信息进入控制电路与所设定的图像阈值进行比较，根据比较结果控制电路会输出对应的控制指令，控制指令控制电极驱动电路输出相应变化规律的电压程序，从而实现对单细胞捕获成功与否的判断；

140 所述控制电路分别连接所述数字微流控芯片和所述成像系统，用于分别输出数字微流控芯片控制程序和成像系统操作程序。

本发明的数字微流控制作工艺如下：

下极板的制作：

(a) 下极板玻璃基底使用磁控溅射方法蒸镀 300 纳米厚铬层，通过湿法刻蚀形成具有特定结构的铬电极阵列；
145

(b) 介质层材料为具有高介电常数、厚度均匀、抗击穿能力强的绝缘材料，本实施案例中使用光刻胶通过旋涂的方式形成；

(c) 疏水层材料一般为特氟龙，本实施案例中使用聚四氟乙烯 PTFE 水分散液通过局部剥离和套刻技术使疏水层局部剥落，暴露出下方较为亲水的表面，在指定电极中心形成局部亲水化的位点形成。在其它实施例中，也可以通过其它现有方式形成局部亲水化位点。

上极板的制作：

(a) 上极板基底为任意绝缘透明材料，如玻璃；

(b) 接地导电层材料选择透光率高、可见性好的材料，如 ITO 等，通过沉积形成；

(c) 上极板疏水材料一般与下极板疏水材料一致，一般为 Teflon，本实施案例中使用聚四氟乙烯 PTFE 水分散液通过旋涂退火工艺形成。

上下极板之间使用具有一定厚度的间隙层分隔开来，与其中的液滴形成三明治结构，液滴通过对应下极板贮液池电极上方的上极板位置开孔，通过自动进样引入。进样完成后，将数字微流控芯片进行油封，起到隔绝污染和促进液滴移动的作用。

作为本发明的优选实施方式，所选用的细胞为 EGFR 表达的 H1975 细胞，细胞直径为 10-20 微米。

作为本发明的优选实施方式，本发明的具体工作过程为：

步骤 A：将各试剂分别负载于数字微流控芯片的贮液池电极单元内，加入适量的填充油将各液滴包裹住，使用集成电路对电极进行预通电，转入步骤 B；

步骤 B：使用集成电路的控制电路控制电极驱动电路，按一定次序进行电极的通断电控制，使液滴在电极的牵引下断裂从而从贮液池电极单元产生一个合适体积的含细胞液滴，通过与其连接的通道电极阵列将液滴移动至单细胞捕获电极处，重复这一过程使各捕获电极均负载含细胞液滴，转入步骤 C；

170 步骤 C: 集成电路的控制电路控制电极驱动电路, 使液滴从单细胞捕获电极阵列区通过, 当单个细胞进入拥有亲水结构的捕获电极时, 对单细胞捕获电极阵列区电极断电, 液滴静置 1 分钟后, 使颗粒/细胞在重力作用下沉降于芯片表面, 然后在电极驱动下使液滴移动到下一个电极, 结合图像识别判断亲水区是否为单个细胞, 若是则捕获完成; 若为多个颗粒/细胞或没有颗粒/细胞则重复上述操作, 即可实现该芯片上
175 多路单细胞的捕获, 然后转入步骤 D。

步骤 D: 对于稀有样品, 将移走的液滴驱动回贮液池电极中可以实现几乎无损捕获; 对于普通样品, 直接将移走的液滴驱动至废液池中, 转入步骤 E。

步骤 E: 控制电极驱动电路从另一贮液池电极单元中引出细胞裂解液(0.2% Triton X-100), 将细胞裂解液驱动至单细胞捕获结构处, 使细胞裂解, 细胞裂解后其含有的
180 细胞内含物释放于该液滴中, 转入步骤 F。

步骤 F: 控制电极驱动电路从下一贮液池电极单元中引出单细胞全基因组扩增试剂, 通过液滴驱动的方式对反应过程进行混合, 反应结束后将液滴取出进行后续的分析研究。

185 实施例 1:

将染有蓝色荧光和绿色荧光的两种细胞按一定比例混合, 置于数字微流控芯片的贮液池电极单元内。芯片下极板上排列有孔径为 200 μm 的 10 个亲水微孔阵列。将细胞液滴通入芯片上并驱动至亲水位点区域进行细胞负载, 通过流体的动态调控使得特定荧光染色的单个细胞进入亲水位点, 而其他细胞不进入该区域。拉动细胞远离该亲
190 水位点, 通过负向生成使得生成一个含有单细胞的亲水液滴, 实现特定细胞单细胞分离 (图 2)。

通过上述选择性捕获操作, 在 10 个亲水微孔阵列的第一排全部捕获绿色荧光染色的细胞, 在第二排全部捕获蓝色荧光染色的细胞, 如图 3。

调整两种不同染色细胞的混合比例，连续不断重复上述单细胞选择性捕获操作，
195 计算不同纯度下的靶细胞捕获效率，得图 4。实验证明在极低纯度情况下仍能实现高效的靶细胞捕获。

申请人声明，本发明通过上述实施例来说明本发明的详细特征以及详细方法，但
本发明并不局限于上述详细特征以及详细方法，即不意味着本发明必须依赖上述详细
200 特征以及详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明白，对本发明的任何改进，对本发明选用组分的等效替换、具体方式的选择等，均属于本发明的保护范围和公开范围之内。

工业实用性

本发明公开了一种基于数字微流控技术的全自动选择性单细胞捕获装置及其应
205 用，包括数字微流控芯片、位于所述数字微流控芯片上方的成像系统以及分别连接所述数字微流控芯片和所述成像系统的控制电路三部分。该单细胞捕获装置能够实现全自动的单细胞选择性捕获，捕获成功率为 100%，且获取的单个细胞经过形态学和分子生物学的分类鉴定，具有高特异性和高灵敏度，适用于完成血液中循环肿瘤细胞的单细胞分离及后续应用,具有工业实用性。

权利要求书

1.一种基于数字微流控技术的全自动选择性单细胞捕获装置，其特征在于：包括数字微流控芯片、位于所述数字微流控芯片上方的成像系统以及分别连接所述数字微流控芯片和所述成像系统的控制电路三部分；

5 所述的数字微流控芯片包括上、下极板两部分，下极板包括基底、电极层、介质层和局部亲水化的疏水层，上极板为疏水化的地电极，上下极板平行相对，被间隙层相隔；电极层包括电极接入口、贮液池电极单元、液滴生成通道电极阵列、单颗粒/单细胞捕获电极阵列和反应电极区，液滴生成通道电极阵列分别与贮液池电极单元一一相连；

10 局部亲水化的疏水层是具有局部亲水化位点的疏水层，其经对准可在指定电极中央形成亲水化捕获位点，通过亲水结构的粘附作用捕获单细胞；

 所述成像系统位于数字微流控芯片正上方，用于获取所述成像区域内亲水化捕获位点处的图像信息；在液滴到达亲水化捕获位检测点后，经明场、荧光场连续两次图像识别后，输出图像信息进入控制电路与所设定的图像阈值进行比较，

15 根据比较结果控制电路输出对应的控制指令，控制指令控制电极驱动电路输出相应变化规律的电压程序，从而实现对单细胞捕获成功与否的判断；

 所述控制电路分别连接所述数字微流控芯片和所述成像系统，用于分别输出数字微流控芯片控制程序和成像系统操作程序。

2.根据权利要求1所述的基于数字微流控技术的全自动选择性单细胞捕获装置，其特征在于：电极层包括96个电极接入口、八个贮液池电极单元、八个液滴生成通道电极阵列、10个单颗粒/单细胞捕获电极阵列和反应电极区。

3.根据权利要求1所述的基于数字微流控技术的全自动选择性单细胞捕获装置，其特征在于：液滴生成通道电极阵列分别与贮液池电极单元一一相连，并以单颗粒/单细胞捕获电极阵列和反应电极区为中心对称分列于其两侧。

- 25 4.根据权利要求1所述的基于数字微流控技术的全自动选择性单细胞捕获装置，其特征在于：局部亲水化的疏水层由局部剥离技术形成。
- 5.根据权利要求1所述的基于数字微流控技术的全自动选择性单细胞捕获装置，其特征在于：所述的亲水化捕获位点直径为50-500微米。
- 6.根据权利要求1所述的基于数字微流控技术的全自动选择性单细胞捕获装置，其特征在于：对于不同的单颗粒/单细胞捕获体系，所述贮液池电极单元能够实现液滴体
- 30 积从1 nL至10 μ L的变化。
- 7.根据权利要求1所述的基于数字微流控技术的全自动选择性单细胞捕获装置，其特征在于：所述上极板采用透明状导电膜。
- 8.一种基于数字微流控技术的全自动选择性单细胞捕获方法，采用权利要求1至7任
- 35 一项所述的装置，包括如下步骤：

步骤A：将带有和不带有荧光细胞的液体置于数字微流控芯片的贮液池内，加入适量的填充油将各液滴包裹住，使用集成电路对电极进行预通电，转入步骤B；

40 步骤B：使用集成电路的控制电路控制电极驱动电路，按一定次序进行电极的通断电控制，从而从贮液池电极单元产生一个合适体积的含细胞液滴，通过与其连接的通道电极阵列将液滴移动至单颗粒/单细胞捕获电极处，重复这一过程使各捕获电极均负载含颗粒/细胞液滴，转入步骤C；

步骤C：集成电路的控制电路控制电极驱动，使液滴从单细胞捕获电极阵列区通过，当细胞进入拥有亲水结构的捕获电极时，对单颗粒/单细胞捕获电极阵列区电极断电，液滴静置后，使颗粒/细胞在重力作用下沉降于芯片表面，然后

45 在电极驱动下使液滴移动到下一个电极，然后转入步骤D；

步骤D：依次使用明场、荧光场进行拍摄并输出图像信息，转入步骤E；

步骤E：经连续两次图像识别后，输出图像信息进入控制电路与所设定的图

像阈值进行比较，根据比较结果控制电路会输出对应的控制指令，控制指令控制
50 电极驱动电路输出相应变化规律的电压程序，从而实现对单细胞捕获成功与否的
判断，若不为单颗粒/细胞或不是目标细胞则控制指令继续重复步骤 C，若为目
标单细胞，则选择性捕获单细胞完成。

9.根据权利要求 8 所述的基于数字微流控技术的全自动选择性单细胞捕获方法，其特征
在于：步骤 A 中，在带有和不带有荧光细胞的液体中加入表面活性剂用以防止生
55 物黏附。促进单颗粒/单细胞分析体系中液滴的移动。

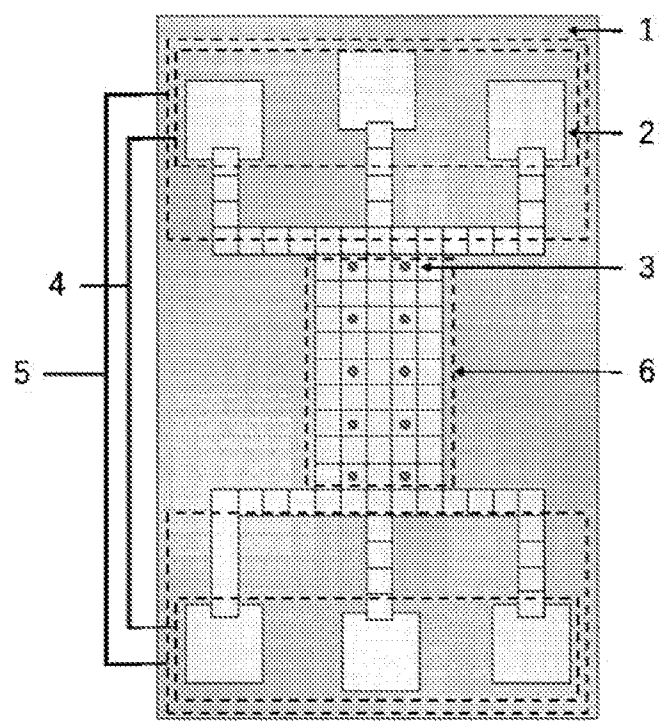


图 1

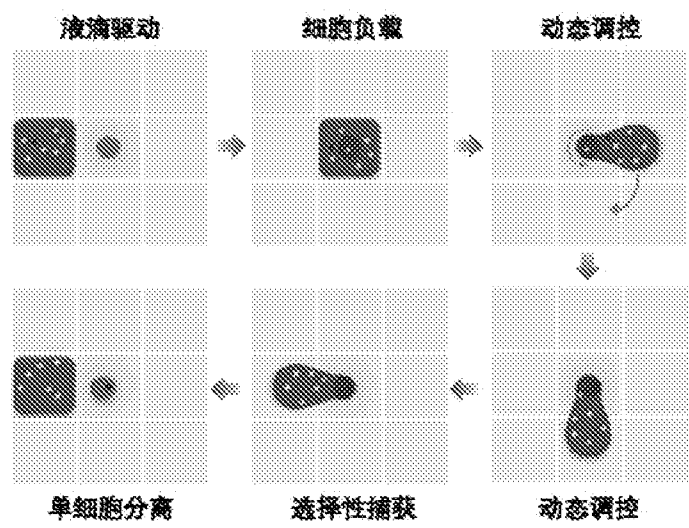


图 2

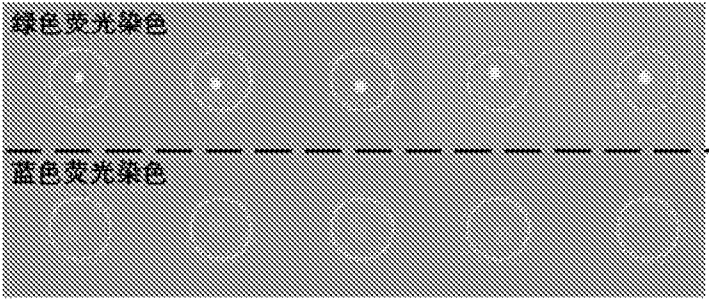


图 3

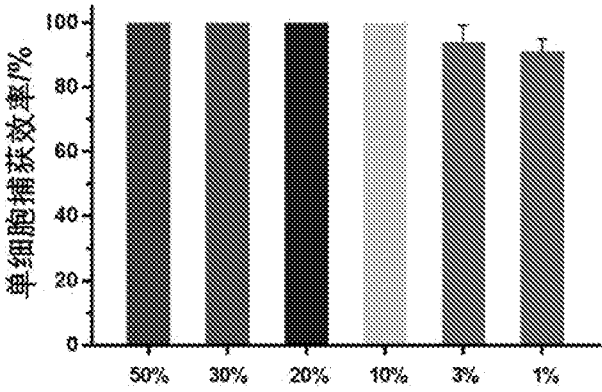


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/118338

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 1/42(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M1/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI: EPODOC; CNKI; CNPAT: 厦门大学, 杨朝勇, 阮庆宇, 杨健, 邹芬香, 张倩倩, 许醒, 微流控, 微流体, 芯片, 自动, 捕获, 获取, 单细胞, 颗粒, 粒子, 微粒, 电极, 极板, 池, 位点, 亲水, 疏水, 亲油, 疏油, 成像, 影像, 图像, 荧光, 明场, 阈值, 参考, 比较, 对比, 标准, 电位, 电压, 电信号, 液滴, microfluid???, chip, automatic, capture, electrode?, cell, monoplast, unicell, particle?, tank, site, hydrophilic, hydrophobic, imag???, picture, graphic, fluorescence, light, bright, threshold, compar???, contrast, standard, drop, drip, potential, signal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 112175824 A (XIAMEN UNIVERSITY) 05 January 2021 (2021-01-05) claims 1-9	1-9
Y	CN 107904163 A (XIAMEN UNIVERSITY) 13 April 2018 (2018-04-13) description, paragraphs [0007]-[0074], and figures 1-5	1-9
Y	US 2020001302 A1 (VALORBEC, SOCIÉTÉ EN COMMANDITE) 02 January 2020 (2020-01-02) description paragraphs [0006]-[0172], figure 4	1-9
A	CN 107389642 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY BEIJING) 24 November 2017 (2017-11-24) entire document	1-9
A	CN 110268414 A (BERKELEY LIGHTS, INC.) 20 September 2019 (2019-09-20) entire document	1-9
A	CN 108472649 A (BERKELEY LIGHTS, INC.) 31 August 2018 (2018-08-31) entire document	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 November 2021

Date of mailing of the international search report

14 December 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/118338**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2014199719 A1 (THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY OF TORONTO) 17 July 2014 (2014-07-17) entire document	1-9
A	US 2005273995 A1 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 15 December 2005 (2005-12-15) entire document	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/118338

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112175824	A	05 January 2021	None			
CN	107904163	A	13 April 2018	CN	107904163	B	26 November 2019
US	2020001302	A1	02 January 2020	WO	2019153067	A1	15 August 2019
				CN	112041659	A	04 December 2020
CN	107389642	A	24 November 2017	None			
CN	110268414	A	20 September 2019	WO	2018102748	A1	07 June 2018
				IL	267009	D0	31 July 2019
				KR	20190091298	A	05 August 2019
				TW	201830332	A	16 August 2018
				US	2019384963	A1	19 December 2019
				AU	2017368268	A1	20 June 2019
				EP	3549099	A1	09 October 2019
				CA	3045333	A1	07 June 2018
				JP	2019537157	A	19 December 2019
CN	108472649	A	31 August 2018	AU	2016344171	A1	10 May 2018
				TW	1714656	B	01 January 2021
				EP	3370868	A1	12 September 2018
				TW	201726540	A	01 August 2017
				WO	2017075295	A1	04 May 2017
				IL	258851	D0	28 June 2018
				JP	2018535088	A	29 November 2018
				JP	6891169	B2	18 June 2021
				EP	3370868	B1	09 December 2020
				KR	20180072812	A	29 June 2018
				CA	3001616	A1	04 May 2017
				SG	11201802968V	A	30 May 2018
				EP	3862088	A1	11 August 2021
				AU	2016344171	B2	23 September 2021
				JP	2021126656	A	02 September 2021
				TW	202126571	A	16 July 2021
US	2014199719	A1	17 July 2014	US	9448223	B2	20 September 2016
				CA	2830810	A1	14 July 2014
US	2005273995	A1	15 December 2005	CA	2500747	A1	14 December 2005

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/118338

A. 主题的分类

C12M 1/42 (2006.01) i

按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)

C12M1/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))

WPI;EP0D0C;CNKI;CNPAT: 厦门大学, 杨朝勇, 阮庆宇, 杨健, 邹芬香, 张倩倩, 许醒, 微流控, 微流体, 芯片, 自动, 捕获, 获取, 单细胞, 颗粒, 粒子, 微粒, 电极, 极板, 池, 位点, 亲水, 疏水, 亲油, 疏油, 成像, 影像, 图像, 荧光, 明场, 阈值, 参考, 比较, 对比, 标准, 电位, 电压, 电信号, 液滴, microfluid???, chip, automatic, capture, electrode?, cell, monoplast, unicell, particle?, tank, site, hydrophilic, hydrophobic, imag???, picture, graphic, fluorescence, light, bright, threshold, compar???, contrast, standard, drop, drip, potential, signal

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 112175824 A (厦门大学) 2021年1月5日 (2021 - 01 - 05) 权利要求1-9	1-9
Y	CN 107904163 A (厦门大学) 2018年4月13日 (2018 - 04 - 13) 说明书第[0007]-[0074]段, 图1-5	1-9
Y	US 2020001302 A1 (VALORBEC, SOCIÉTÉ EN COMMANDITE) 2020年1月2日 (2020 - 01 - 02) 说明书第[0006]-[0172]段, 图4	1-9
A	CN 107389642 A (北京科技大学) 2017年11月24日 (2017 - 11 - 24) 全文	1-9
A	CN 110268414 A (伯克利之光生命科技公司) 2019年9月20日 (2019 - 09 - 20) 全文	1-9
A	CN 108472649 A (伯克利之光生命科技公司) 2018年8月31日 (2018 - 08 - 31) 全文	1-9

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2021年11月24日

国际检索报告邮寄日期

2021年12月14日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

瓮龙明

电话号码 86-(10)-53962423

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	US 2014199719 A1 (THE GOVERNING COUNCIL OF THE UNIVERSITY OF TORONTO) 2014年7月17日 (2014 - 07 - 17) 全文	1-9
A	US 2005273995 A1 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 2005年12月15日 (2005 - 12 - 15) 全文	1-9

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/118338

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	112175824	A	2021年1月5日	无			
CN	107904163	A	2018年4月13日	CN	107904163	B	2019年11月26日
US	2020001302	A1	2020年1月2日	WO	2019153067	A1	2019年8月15日
				CN	112041659	A	2020年12月4日
CN	107389642	A	2017年11月24日	无			
CN	110268414	A	2019年9月20日	WO	2018102748	A1	2018年6月7日
				IL	267009	D0	2019年7月31日
				KR	20190091298	A	2019年8月5日
				TW	201830332	A	2018年8月16日
				US	2019384963	A1	2019年12月19日
				AU	2017368268	A1	2019年6月20日
				EP	3549099	A1	2019年10月9日
				CA	3045333	A1	2018年6月7日
				JP	2019537157	A	2019年12月19日
CN	108472649	A	2018年8月31日	AU	2016344171	A1	2018年5月10日
				TW	1714656	B	2021年1月1日
				EP	3370868	A1	2018年9月12日
				TW	201726540	A	2017年8月1日
				WO	2017075295	A1	2017年5月4日
				IL	258851	D0	2018年6月28日
				JP	2018535088	A	2018年11月29日
				JP	6891169	B2	2021年6月18日
				EP	3370868	B1	2020年12月9日
				KR	20180072812	A	2018年6月29日
				CA	3001616	A1	2017年5月4日
				SG	11201802968V	A	2018年5月30日
				EP	3862088	A1	2021年8月11日
				AU	2016344171	B2	2021年9月23日
				JP	2021126656	A	2021年9月2日
				TW	202126571	A	2021年7月16日
US	2014199719	A1	2014年7月17日	US	9448223	B2	2016年9月20日
				CA	2830810	A1	2014年7月14日
US	2005273995	A1	2005年12月15日	CA	2500747	A1	2005年12月14日