(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
2019 年 5 月 23 日 (23.05.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/096070 A1

(51) 国际专利分类号:
B01L 3/00 (2006.01) *C12M 1/34* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/114807

(22) 国际申请日: 2018 年 11 月 9 日 (09.11.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201711130429.2 2017年11月15日 (15.11.2017) CN

(71) 申请人: 中国科学院青岛生物能源与过程研究所(QINGDAO INSTITUTE OF BIOENERGY AND BIOPROCESS TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国山东省青岛市崂山区松岭路 189 号, Shandong 266101 (CN)。

(72) 发明人: 徐腾 (XU, Teng); 中国山东省青岛市崂山区松岭路 189 号, Shandong 266101 (CN)。 马波 (MA, Bo); 中国山东省青岛市崂山区松岭路 189 号, Shandong 266101 (CN)。 徐健 (XU, Jian); 中国山东省青岛市崂山区松岭路 189号, Shandong 266101 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958 号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,

(54) **Title:** METHOD FOR FORMING AND RESPECTIVELY EXPORTING DROPLET WRAPPING SINGLE PARTICLE IN MICRO-FLUIDIC CHIP

(54) **发明名称:** 单个微粒包裹液滴在微流控芯片中形成并分别导出的方法

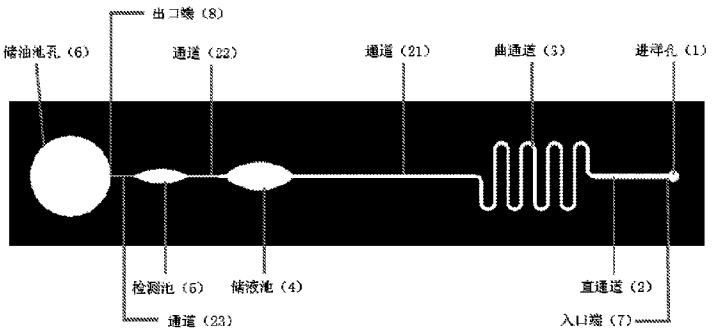

图 1

1 Sample introduction hole
2 Straight passage
3 Curved passage
4 Liquid storage pool
5 Detection pool
6 Oil storage pool hole
7 Inlet end
8 Outlet end
21, 22, 23 Passage

(57) **Abstract:** A micro-fluidic chip that can be used for screening a single particle and forming and exporting a droplet wrapping same. The micro-fluidic chip is connected to a liquid sample introduction apparatus, and can constitute a micro-fluidic chip apparatus for forming a droplet for wrapping a single particle. The micro-fluidic chip apparatus can further constitute, with a particle capture apparatus, a micro-fluidic operating system for forming a droplet wrapping a single particle. Further provided is a method for forming and respectively exporting a droplet wrapping a single particle in a micro-fluidic chip.

(57) **摘要:** 一种可用于单个微粒筛选并形成液滴包裹导出的微流控芯片，该微流控芯片与液体样品进样装置相连，可组成一种用于形成单个微粒包裹液滴的微流控芯片装置，该微流控芯片装置可进一步与微粒捕获装置组成可用于形成单个微粒包裹液滴的微流控操作系统。还提供了一种在微流控芯片中形成目标单个微粒包裹液滴并分别导出的方法。

WO 2019/096070 A1

[见续页]

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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, 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))。

单个微粒包裹液滴在微流控芯片中形成并分别导出的方法

技术领域

本发明涉及微流控技术领域，具体涉及一种利用微流控芯片形成单个微粒包裹液滴并导出的方法，可用于单细胞筛选、单细胞分离、单细胞测序、单细胞形态分析、单细胞培养、药物筛选等领域。

背景技术

众所周知，细胞多样性普遍存在于各细胞种群中，例如细菌、酵母、哺乳动物细胞等。即使是由同一母细胞分裂而来的子细胞，细胞个体间也会存在差异。单细胞分析(single-cell analysis)是指在细胞种群中，针对细胞个体间差异包括细胞尺寸、生长速度、化学组成(磷脂、蛋白、代谢物、DNA/RNA)，等方面的研究，以及细胞间差异产生的原因、机理。其研究内容涉及到肿瘤生物学、干细胞、微生物学、神经系统学和免疫学等领域。

单细胞分析中最大的挑战体现在细胞尺寸微小，以及小尺寸带来的化学组成复杂、组分痕量等问题。单个细胞的尺寸大都分布于微米尺度，在该尺度下对单个细胞的操纵、分析对仪器精度、灵敏度等方面提出了极高要求。因此要实现单细胞分析，首先要解决两个问题：单细胞捕获、分离提取；单细胞信号获取。

借助于荧光显微、单细胞拉曼、电化学技术、质谱以及近两年兴起的 qPCR 技术的发展，已实现对单细胞组分的多重分析。但是在单细胞捕获、分离提取方面进展缓慢，通过微流控芯片技术，目前大致可以分为单细胞阵列捕获、流式两种方法。阵列捕获的方法可实现单细胞的实时监控，并且方便改变实验条件，研究不同培养条件对单细胞的影响，但是通量较低。流式的方法通常基于单细胞液滴包裹技术，具有检测通量高，方便细胞分离的优势，但是由于检测时间短，一般难以获得单个细胞更详细的信息，目前大都还是以荧光流式筛选为主。然而如何将微流控芯片内分析筛选的细胞单个分离取出，接着进行下游分析，仍然是当前的难点。如单细胞基因谱测序，需要将当个目标细胞从捕获阵列或芯片中转移到试管中，并且避免转移过程中对细胞的损伤以及外界环境的污染。

发明内容

本发明的目的是提供一种将目标单个微粒分离并导出的技术，本发明实现了单个目标微粒在微流控芯片内的检测和捕获，以及从微流控芯片到外试管的转移。

本发明所称的“微粒”，是指能够悬浮在非有机相溶液(例如水相)、并在本发明微流控芯片内通过的颗粒，包括生物体来源的和非生物体来源的颗粒，例如真核细胞、原核细胞、单细胞生物、病毒颗粒、细胞器、生物大分子形成的颗粒、药物颗粒、药物载体颗粒、脂质体、多聚物粒子等。

本发明的第一方面，提供了一种微流控芯片，所述微流控芯片包括盖片层和基片层；所述基片层包括至少一条样品通道，所述样品通道包括微流体通道、检测池(5)；所述盖片层包括进样孔(1)、储油池孔(6)；所述储油池孔(6)与所述基片层形成储油池；所述样品通道的入口端(7)与进样孔(1)相连，所述样品通道的出口端(8)与储油池相连。

在另一优选例中，所述盖片层的材质选自但不限于石英、PDMS(聚二甲基硅氧烷)、PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)、硼硅玻璃、氟化钙，所述基片层的材质选自但不限于石英、PDMS、PMMA、硼硅玻璃、氟化钙。

在另一优选例中，所述储油池的表面为疏水亲油表面。

在另一优选例中，所述进样孔(1)连接有进样导管接口。

在另一优选例中，所述微流体通道包括直通道(2)和至少一段曲通道(3)。

本发明所述的曲通道，是指不是直线型的微流体通道。在一优选例中，所述微流体通道的宽度为 30～300 μm，高度为 15～50μm。

在另一优选例中，所述检测池(5)与所述储油池孔(6)通过通道(23)相连，所述通道(23)为直通道。

在另一优选例中，所述样品通道还包括至少一个储液池(4)，较佳的，在另一优选例中，所述检测池(5)的容量小于所述储液池(4)的容量。

在另一优选例中，所述检测池(5)位于所述储液池(4)和所述储油池孔(6)之间，所述储液池(4)与所述检测池(5)通过通道(22)相连，所述储液池(4)与所述曲通道(3)通过通道(21)相连，所述通道(21，22)包括至少一段直通道或至少一段曲通道。

本发明所述的检测池，可用于微粒特征信号的采集或单个微粒的捕获；本发明所述的储液池，用于储存待测样品液体。

在另一优选例中，所述通道(22)的宽度小于所述通道(21)的宽度；

在另一优选例中，所述通道(23)的宽度小于所述通道(22)的宽度；

在另一优选例中，所述通道(21)的宽度为200～300μm；优选200μm；

在另一优选例中，所述通道(22)的宽度为45～230μm；优选100μm；

在另一优选例中，所述通道(23)的宽度为30～100μm；优选45μm；

在另一优选例中，所述样品通道高度为15～50μm。

本发明的另一方面，提供了一种制备本发明第一方面提供的微流控芯片的方法，包括：①基片层依据样品通道设计做刻蚀，②盖片层打上进样孔与储油池孔，③盖片层与基片层对齐并低温键合，④ 表面疏水化处理。在一优选例中，所述样品通道高度为15～50μm。

本发明的另一方面，提供了一种用于形成单个微粒包裹液滴的微流控芯片装置，该装置包括本发明第一方面提供的微流控芯片和液体样品进样装置，所述液体样品进样装置与所述进样孔(1)连通，所述液体样品进样装置选自但不限于：重力驱动调节进样装置、注射器、蠕动泵、注射泵。

在一优选例中，所述重力驱动调节进样装置包含高度可调样品架、样品容器、导管，所述样品容器通过所述导管与所述进样孔(1)连通，所述样品容器可在所述高度可调样品架上上下移动。

在另一优选例中，所述样品容器上下移动的方式为手动调节。

在另一优选例中，所述样品容器上下移动的方式为电动调节。

在另一优选例中，所述高度可调样品架为滑轨设计，滑轨上具有可电动移动的滑块，用于固定样品容器；更佳的，所述高度可调样品架还包括高度调节控制器，所述高度调节控制器控制所述滑块在所述滑轨上进行上下移动。

本发明的另一方面，提供了一种用于形成单个微粒包裹液滴的微流控操作系统，包含本发明所提供的微流控芯片或微流控芯片装置，以及微粒捕获装置，所述微粒捕获装置选自光镊、磁镊。

本发明采用的光镊和磁镊装置，为本领域的现有技术。

本发明所述的捕获，是指利用包括光镊和磁镊在内的微粒捕获装置固定住目标微粒，从而实现在移动本发明微流控芯片时、目标微粒不随芯片移动。

在另一优选例中，所述微流控操作系统进一步包括样品检测装置，所述样品检测装置包括但不限于拉曼检测装置、光学显微镜、荧光显微镜。

在另一优选例中，所述微流控操作系统进一步包括将单个微粒包裹液滴导出的装置，所述将单个微粒包裹液滴导出的装置选自毛细管、移液枪枪头。

本发明的另一方面，提供了一种形成单个微粒包裹液滴并导出的方法，该方法利用本发明提供的微流控芯片或微流控芯片装置或微流控操作系统，并包括步骤：①在储油池内注入油相；②将微粒相溶液通过进样口注入微流控芯片样品通道内，③调节样品通道内液体流动、使微粒相与储油池油相的界面在样品通道出口附近稳定静止；④用微粒捕获装置捕获目标微粒，移动微流控芯片、将目标微粒拖拽到水相与油相界面附近；⑤调节样品通道内液体流动、使目标微粒进入储油池并形成包裹有单个目标微粒的液滴；⑥将包裹有单个目标微粒的液滴导出；所述调节样品通道内液体流动的方式选自但不限于重力驱动调节法、注射泵驱动调节法、蠕动泵驱动调节法。

在一优选例中，所述微粒捕获装置从所述检测池中捕获目标微粒。

在另一优选例中，所述油相选自矿物油、硅油、氟碳油、植物油、石油醚。

在另一优选例中，所述微粒相含有微粒和与储油池中的油相液体互不相溶的液体；较佳的，所述微粒相为非有机相；更佳的，所述微粒相为水相或非有机缓冲液。

在另一优选例中，所述形成单个微粒包裹液滴并导出的方法还包括样品检测步骤，所述样品检测步骤位于步骤④之前，所述样品检测步骤采用的方法选自但不限于拉曼光谱分析、荧光检测、光学显微镜检测、电导检测；

在另一优选例中，所述将包裹有单个目标微粒的液滴导出的方法包括毛细管导出法、移液枪导出法；

在另一优选例中，所述形成单个微粒包裹液滴并导出的方法还包括对导出的目标微粒进行进一步操作，所述操作包含单细胞测序、单细胞形态分析、单细胞培养。

在另一优选例中，所述形成单个微粒包裹液滴并导出的方法包括步骤：①在储油池内注入油相，②将微粒相溶液通过进样口注入样品通道内，调节样品容器在高度可调样品架上的高度至 h0，使微粒相与出样口油相的界面在

样品通道出口附近稳定静止，③在检测池(5)内采集单个微粒的特征信号，并通过光镊捕获目标微粒，移动微流控芯片、将想要的目标微粒拖拽到水相与油相界面附近，④调节样品容器在高度可调样品架上的高度至 h，将微粒与一部分水依靠重力作用推进油相，形成油包水液滴，之后将样品容器高度重新调回 h0，使微粒相与油相之间的界面在样品通道出口附近再度达到稳定，⑤用毛细管接触微粒包裹液滴，由于油相对毛细管良好的浸润作用，依据毛细力，液滴随部分油自动进入毛细管内。

在另一优选例中，所述将微粒相溶液通过进样口注入样品通道内的方法为静压注射法。

在另一优选例中，所述在样品通道内采集单个微粒的特征信号的方法选自拉曼信号采集、荧光检测、光学显微镜检测；更佳的，采集单个微粒的特征信号的位置为检测池。

在另一优选例中，所述光镊的激光波长为 1064nm。

本发明的另一方面，提供了微流控芯片、微流控芯片装置或微流控操控系统的应用，包括单个微粒筛选、单个微粒包裹液滴的形成或单个微粒包裹液滴的导出。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

本发明具有以下技术优势：

1. 适用于各尺寸微粒，如数十微米的酵母细胞和 1 微米左右细菌细胞的拉曼检测并导出。

2. 实现了单个细胞的挑选并分离导出，该过程对细胞活性影响低，能成功与下游单细胞测序对接。

3. 单个微粒筛选移取速度快，单个微粒从芯片内到试管中移取操作时间为 1～2 分钟。

4. 芯片可重复利用，降低操作成本。

5. 操作简便。

附图说明

图 1 微流控芯片设计示意图。

图 2 微流控芯片实物图。

图 3 形成单个微粒包裹液滴的微流控芯片装置图。A 显示了由液体样品进样装置和微流控芯片组成的微流控芯片装置的示意图。B 显示了将微流控芯片置于显微镜平台上，微流控芯片装置与微粒捕获装置共同组成用于形成单个微粒包裹液滴的微流控操作系统的实物图。

图 4 形成单个微粒包裹液滴的过程。

图 5 微流控芯片装置分选单个细胞的过程对细胞活性影响低。A 为刚刚包裹生成的液滴，之后用毛细管将液滴从开放的储油池中吸出，这个过程无需外源动力，依据油相在毛细管中的毛细作用。将毛细管置于通道出口处 B，油相会靠毛细作用流入毛细管中，油相中的单细胞包裹液滴进而随着油相一同流入毛细管，C～F 为这一过程的视频截图。G、H 为 50X 物镜视野下包裹细胞的液滴，分别以大肠杆菌细胞和酵母细胞为模式细胞，发现两种不同大小的细胞都能成功的被包裹入液滴中并导出。

图 6 DNA 扩增结果。A 和 C 为 MDA 扩增结果，B 和 D 为 16S 鉴定结果，其中 N 为 MDA(多重置换)扩增的阴性对照。实验证明液滴能成功将细胞包裹并导出，导出后的细胞能成功用于下游扩增、测序分析。

具体实施方式

本发明提供的微流控芯片、微流控芯片装置、微流控操作系统和形成单个微粒包裹液滴并导出的方法，可用于分离生物体来源的和非生物体来源的单个微粒，例如用于真核细胞(如动物细胞、植物细胞、真菌细胞等)、原核细胞(如细菌细胞等)、单细胞生物、病毒颗粒、细胞器、生物大分子形成的颗粒、药物颗粒、药物载体颗粒、脂质体、多聚物粒子、其他天然或人工合成颗粒的单个微粒的分离。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

实施例 1

1、微流控芯片的制备：

①用超声打孔方法在上层石英玻璃打上进样孔与储液池孔，孔间距依照通道长度。上层石英玻璃为光滑平面，厚 0.5～1 毫米，无刻蚀图案。(上下层石英玻璃的顺序依据光镊光路而定，由于本实验采用的显微镜为正置显微镜，光镊光路由上而下通过芯片，所以要保证芯片上表面为光滑光学表面，故上层为光滑石英玻璃，刻有通道的石英玻璃在下层)

②下层石英玻璃表面依据通道设计做刻蚀，通道高度约 15～50 微米。

③两层玻璃对齐并低温键和。

④表面疏水化处理(用硅烷化试剂)，在储油池位置形成疏水亲油表面。

⑤单个微粒液滴包裹时，油相采用矿物油(含 2%wt 的表面活性剂司盘 80)。由于该油相密度小于水，生成的液滴位于储油池底部微通道出口处，方便观察并导出。

微流控芯片的设计示意图和实物图分别如图 1 和图 2 所示。

2、用于形成单个微粒包裹液滴的微流控芯片装置和系统的制备

此处选用的液体样品进样装置为重力驱动调节进样装置，将样品容器悬挂在高度可调样品架上，样品容器通过导管与微流控芯片上的进样孔相连。由液体样品进样装置和微流控芯片组成的微流控芯片装置的示意图见图 3A。将微流控芯片置于显微镜平台上，微流控芯片装置与微粒捕获装置共同组成用于形成单个微粒包裹液滴的微流控操作系统，实物图见图 3B。

实施例 2

目标单个微粒包裹液滴的形成和导出，步骤示意图见图 4。

①在样品通道出口端的储油池内注入油相(一般采用包含表面活性剂的矿物油)。

②采用静压注射的方法，将微粒相(本实施例采用细胞相)溶液通过进样口注入芯片通道内，调节样品架高度至 h0，使细胞相与出样口油相的界面在出样口附近稳定静止。

③在检测池内采集单个细胞的特征图谱(如拉曼光谱，532 nm 激光)，并通过光镊(例如 1064nm 激光)捕获想要的目标细胞，移动微流控芯片、将目标细胞拖拽到水相与油相界面附近。

④调节样品架高度至 h，将细胞与一部分水依靠重力作用推进油相，形成

油包水液滴，之后将样品架高度重新调回 h0，使细胞液与油相之间的界面在通道开口处再度达到稳定。

⑤用毛细管接触细胞包裹液滴。由于油相对毛细管良好的浸润作用，依据毛细力，液滴随部分油自动进入毛细管内。图 5A-F 显示单细胞包裹液滴可被毛细管成功导出。

样品架高度依据石英芯片内部流体阻力而定，本实验依据所用石英芯片通道尺寸以及显微镜平台高度，选用 1 米高样品架。样品架为滑轨设计，滑轨上具有可电动移动的滑块，用于固定样品容器，如图 3B 所示

实施例 3

对分离的单细胞进行 DNA 扩增和电泳检测。

实施例 2 分离得到的液滴在 50X 物镜下观察，能看到单细胞被成功包裹在液滴当中，此方法适用于不同尺寸的细胞，从一微米左右到数十微米左右，如图 5G 和图 5H 分别为大肠杆菌细胞和酵母细胞应用此方法在液滴中的包裹情况。由于此方法选用的矿物油密度小于细胞悬液(水)，所以液滴转移过程中，液滴会自动分布于毛细管的底部，仅需将装有液滴的毛细管触碰试管或离心管壁即可导出液滴，这使得转移过程成功率更高、方法更简单。

将毛细管中的包裹单细胞的液滴离心导入单独离心管中，加入扩增底物进行 DNA 扩增，扩增情况如图 6 所示。此次试验分别以大肠杆菌(图 6A 和图 6B)和酵母(图 6C 和图 6D)为模式细胞，另外移取了部分空液滴(E1 和 E2 为大肠杆菌样本对照空液滴，E3E4E5 为酵母对照空液滴)进行对照，发现空液滴中没有扩增产物出现，单细胞包裹液滴成功扩增，证明此方法分离的细胞能成功用于单细胞测序等下游分析，另外在单细胞筛选过程中能够成功避免污染发生。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1．一种微流控芯片，其特征在于，所述微流控芯片包括盖片层和基片层；所述基片层包括至少一条样品通道，所述样品通道包括微流体通道、检测池(5)；所述盖片层包括进样孔(1)、储油池孔(6)；所述储油池孔(6)与所述基片层形成储油池；所述样品通道的入口端(7)与进样孔(1)相连，所述样品通道的出口端(8)与储油池相连。

2．如权利要求 1 所述的微流控芯片，其特征在于，所述微流体通道包括直通道(2)和至少一段曲通道(3)。

3．如权利要求 1 或 2 所述的微流控芯片，所述检测池(5)与所述储油池孔(6)通过通道(23)相连，所述通道(23)为直通道。

4．如权利要求 1-3 中任一所述的微流控芯片，其特征在于，所述样品通道还包括至少一个储液池(4)，所述检测池(5)位于所述储液池(4)和所述储油池孔(6)之间，所述储液池(4)与所述检测池(5)通过通道(22)相连，所述储液池(4)与所述曲通道(3)通过通道(21)相连，所述通道(21，22)包括至少一段直通道或至少一段曲通道。

5．如权利要求 1-4 中任一所述的微流控芯片的制备方法，包括步骤：①基片层依据样品通道设计做刻蚀，②盖片层打上进样孔与储油池孔，③盖片层与基片层对齐并低温键合，④表面疏水化处理。

6．一种用于形成单个微粒包裹液滴的微流控芯片装置，其特征在于，所述微流控芯片装置包括如权利要求 1-4 中任一所述的微流控芯片和液体样品进样装置，所述液体样品进样装置与所述进样孔(1)连通，所述液体样品进样装置选自下组：重力驱动调节进样装置、注射器、蠕动泵、注射泵、或其组合。

7．如权利要求 6 所述的微流控芯片装置，其特征在于，所述重力驱动调节进样装置包含高度可调样品架、样品容器、导管，所述样品容器通过所述导管与所述进样孔(1)连通，所述样品容器可在所述高度可调样品架上上下移动。

8．一种用于形成单个微粒包裹液滴的微流控操作系统，包含如权利要求 1-4 中任一所述的微流控芯片或权利要求 6 或 7 所述的微流控芯片装置，以及微粒捕获装置，所述微粒捕获装置选自光镊、磁镊。

9．一种形成单个微粒包裹液滴并导出的方法，其特征在于，利用如权利要求 1-4 中任一所述的微流控芯片、权利要求 6 或 7 所述的微流控芯片装置或权利要求

8 所述的微流控操作系统，并包括步骤：①在储油池内注入油相；②将微粒相溶液通过进样口注入微流控芯片样品通道内；③调节样品通道内液体流动、使微粒相与储油池油相的界面在样品通道出口附近稳定静止；④用微粒捕获装置捕获目标微粒，移动微流控芯片、将目标微粒拖拽到水相与油相界面附近；⑤调节样品通道内液体流动、使目标微粒进入储油池并形成包裹有单个目标微粒的液滴；⑥将包裹有单个目标微粒的液滴导出；所述调节样品通道内液体流动的方式选自下组：重力驱动调节法、注射泵驱动调节法、蠕动泵驱动调节法、或其组合；所述将包裹有单个目标微粒的液滴导出的方法选自下组：毛细管导出法、移液枪导出法、或其组合。

10. 如权利要求 1-4 中任一所述的微流控芯片、权利要求 6 或 7 所述的微流控芯片装置或权利要求 8 所述的微流控操作系统的应用，其特征在于，用于单个微粒筛选、单个微粒包裹液滴的形成或单个微粒包裹液滴的导出。

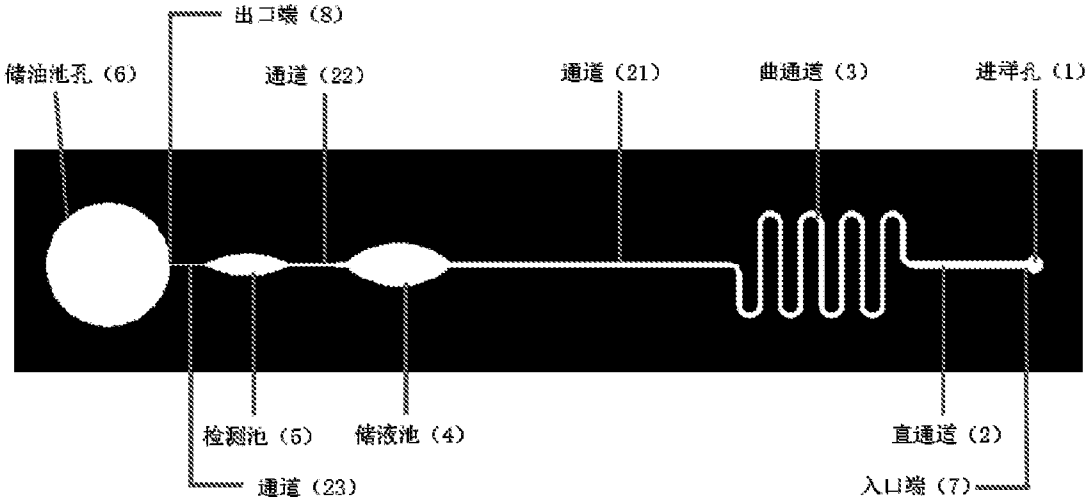
出口端（8）
储油池孔（6）
通道（22）
通道（21）
曲通道（3）
进样孔（1）
检测池（5）
储液池（4）
直通道（2）
通道（23）
入口端（7）

图 1

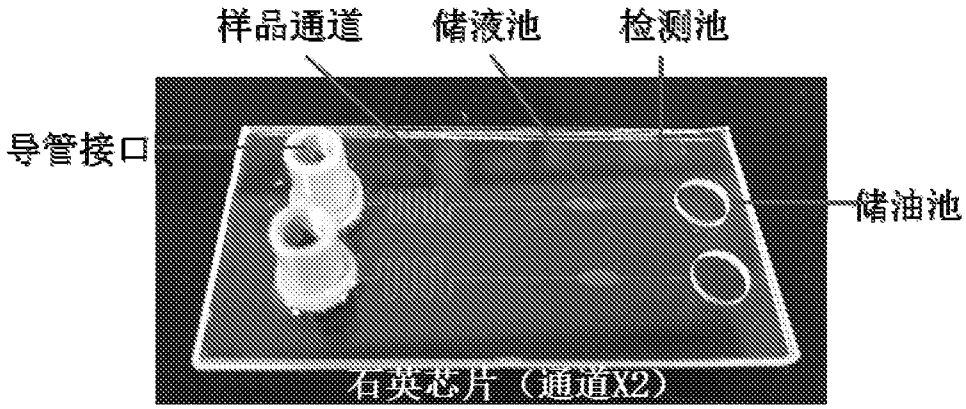
样品通道
储液池
检测池
导管接口
储油池
石英芯片（通道X2）

图 2

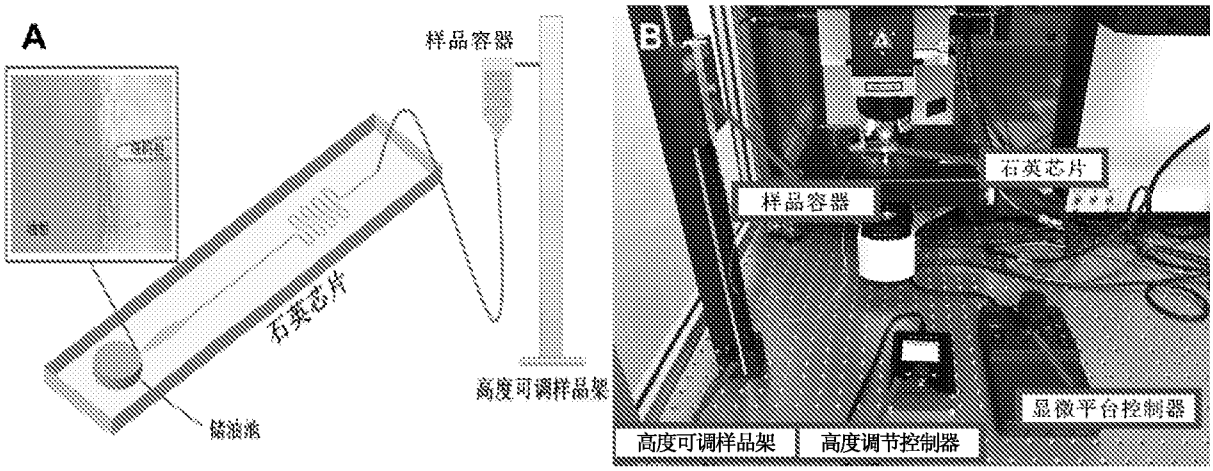
A
样品容器
石英芯片
储油池
高度可调样品架
B
石英芯片
样品容器
显微平台控制器
高度可调样品架
高度调节控制器

图 3

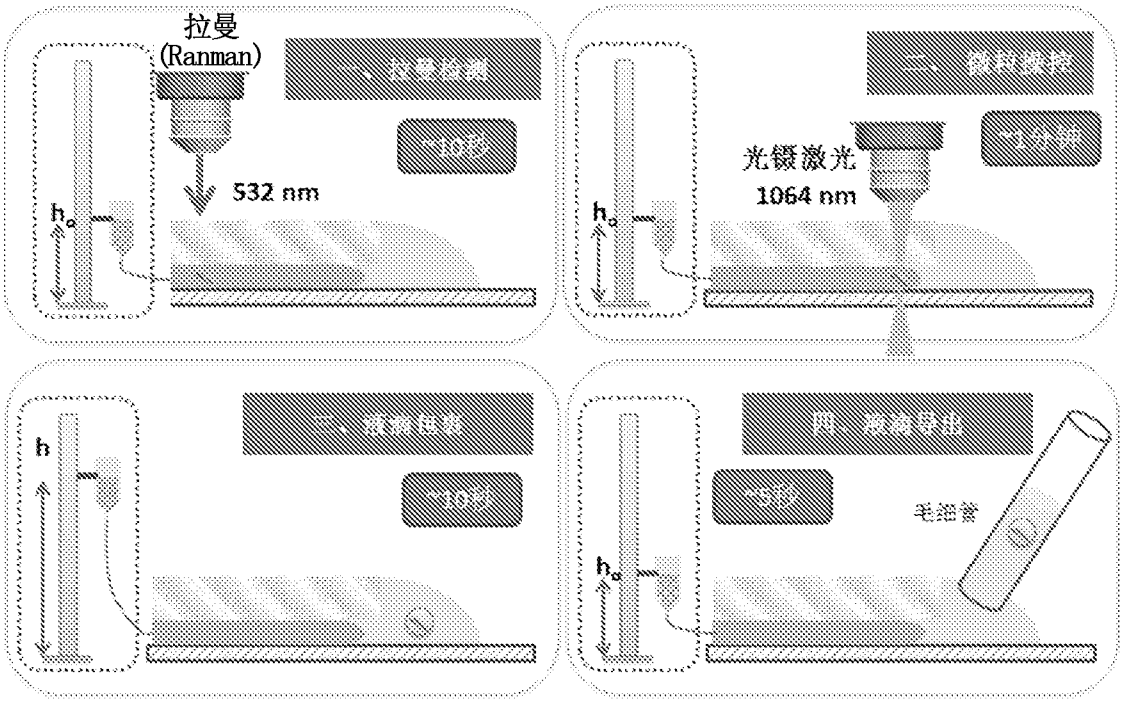
拉曼
(Ranman)
一、拉曼检测
~10秒
532 nm
h_o
二、微粒拨控
~1分钟
光镊激光
1064 nm
h_o
三、液滴包裹
~10秒
h
四、液滴导出
~5秒
毛细管
h_o

图 4

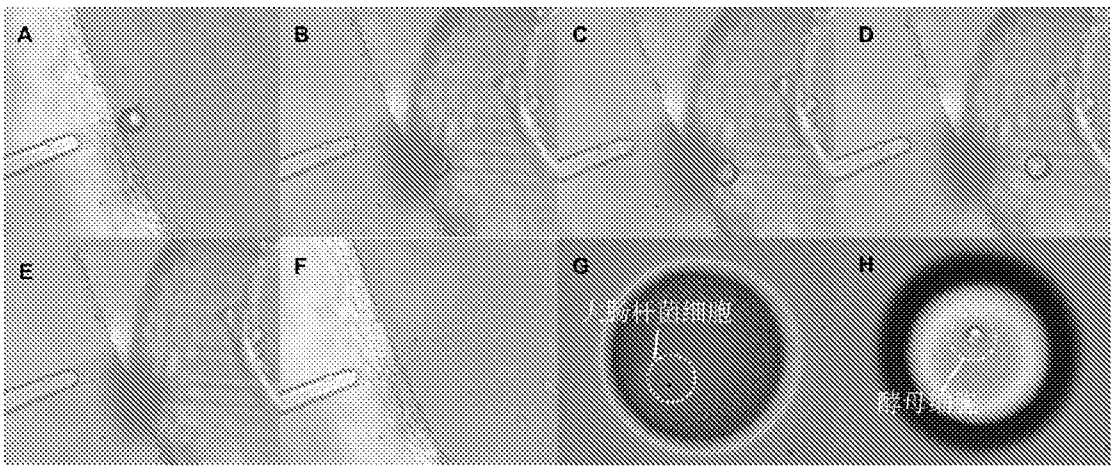
A
B
C
D
E
F
G
H
人脱杆的细胞
酵母细胞

图 5

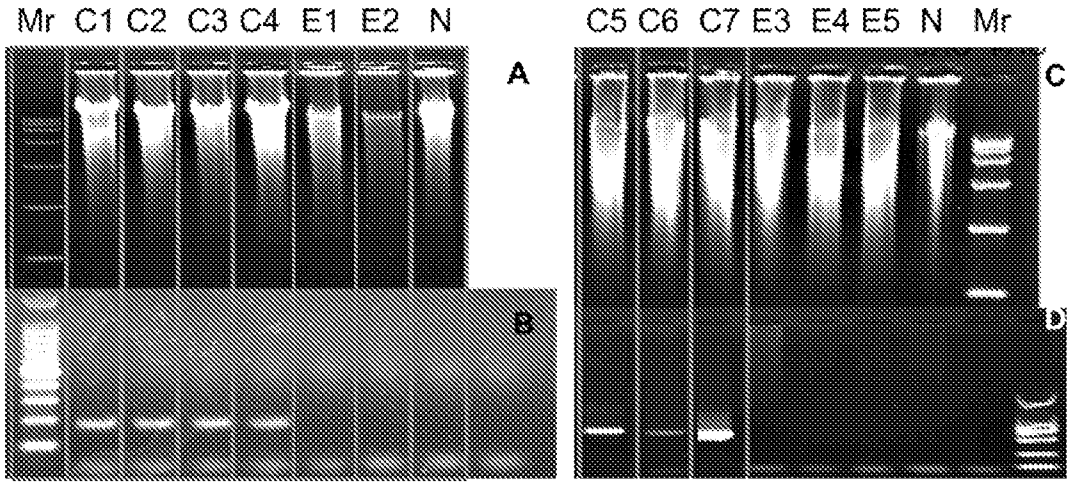
Mr C1 C2 C3 C4 E1 E2 N
A
B
C5 C6 C7 E3 E4 E5 N Mr
C
D

图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/114807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B01L 3/00(2006.01)i; C12M 1/34(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)

B01L; C12M

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)

CNABS, VEN, CNTET, CNKI: 微流控, 通道, 检测, 储油, 进样, 微流体, 微滴, 液滴, microfluidic, chip, channel, passage, detect+, oil, sample, drop, liquid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105259163 A (SHENZHEN HUAMAIXINGWEI MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 20 January 2016 (2016-01-20) claim 1	1-10
A	CN 205103262 U (INSTITUTE OF ELECTRONICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 23 March 2016 (2016-03-23) entire document	1-10
A	CN 205379906 U (CAPITALBIO CORPORATION) 13 July 2016 (2016-07-13) entire document	1-10
A	CN 103831140 A (CAPITALBIO CORPORATION ET AL.) 04 June 2014 (2014-06-04) entire document	1-10

☐ 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	Date of mailing of the international search report
25 January 2019	**31 January 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R. China **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/114807

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 105259163 A	20 January 2016	CN 105259163 B	04 May 2018
CN 205103262 U	23 March 2016	None	
CN 205379906 U	13 July 2016	None	
CN 103831140 A	04 June 2014	EP 3113886 A4	25 October 2017
		JP 2017514686 A	08 June 2017
		SG 10201807524Y A	27 September 2018
		WO 2015131662 A1	11 September 2015
		SG 11201607270P A	29 September 2016
		US 2017014818 A1	19 January 2017
		CN 103831140 B	30 December 2015
		EP 3113886 A1	11 January 2017

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/114807

A. 主题的分类

B01L 3/00(2006.01)i; C12M 1/34(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)

B01L; C12M

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））

CNABS, VEN, CNTET, CNKI: 微流控，通道，检测，储油，进样，微流体，微滴，液滴，microfluidic, chip, channel, passage, detect+, oil, sample, drop, liquid

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	CN 105259163 A (深圳华迈兴微医疗科技有限公司) 2016年 1月 20日 (2016-01-20) 权利要求1	1-10
A	CN 205103262 U (中国科学院电子学研究所) 2016年 3月 23日 (2016-03-23) 全文	1-10
A	CN 205379906 U (博奥生物集团有限公司) 2016年 7月 13日 (2016-07-13) 全文	1-10
A	CN 103831140 A (博奥生物集团有限公司等) 2014年 6月 4日 (2014-06-04) 全文	1-10

☐ 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	国际检索报告邮寄日期
2019年 1月 25日	2019年 1月 31日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
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	徐雪锋
传真号 (86-10)62019451	电话号码 62084843

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/114807

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	105259163	A	2016年 1月 20日	CN	105259163	B	2018年 5月 4日
CN	205103262	U	2016年 3月 23日		无		
CN	205379906	U	2016年 7月 13日		无		
CN	103831140	A	2014年 6月 4日	EP	3113886	A4	2017年 10月 25日
				JP	2017514686	A	2017年 6月 8日
				SG	10201807524Y	A	2018年 9月 27日
				WO	2015131662	A1	2015年 9月 11日
				SG	11201607270P	A	2016年 9月 29日
				US	2017014818	A1	2017年 1月 19日
				CN	103831140	B	2015年 12月 30日
				EP	3113886	A1	2017年 1月 11日