

(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
2014 年 7 月 3 日 (03.07.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/101575 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 35/00 (2006.01) *B01L 3/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/086729
- (22) 国际申请日: 2013 年 11 月 8 日 (08.11.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201210589055.1 2012 年 12 月 31 日 (31.12.2012) CN
- (71) 申请人: 浙江大学 (ZHEJIANG UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国浙江省杭州市余杭塘路 866 号, Zhejiang 310058 (CN)。
- (72) 发明人: 方群 (FANG, Qun); 中国浙江省杭州市余杭塘路 866 号浙大紫金港校区化学楼 101 房间, Zhejiang 310058 (CN)。 祝莹 (ZHU, Ying); 中国浙江省杭州市余杭塘路 866 号浙大紫金港校区化学楼 101 房间, Zhejiang 310058 (CN)。 张云霞 (ZHANG, Yunxia); 中国浙江省杭州市余杭塘路 866 号浙大紫金港校区化学楼 101 房间, Zhejiang 310058 (CN)。
- (74) 代理人: 杭州天勤知识产权代理有限公司 (HANGZHOU TIANQIN INTELLECTUAL PROPERTY

AGENCY CO., LTD); 中国浙江省杭州市西湖区竞舟路 1 号筑品金座 501 室, Zhejiang 310013 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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))。

(54) Title: APPLICATION METHOD FOR AUTOMATIC MICRO-DROPLET ARRAY SCREENING SYSTEM WITH PICO-LITER PRECISION

(54) 发明名称: 一种具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法

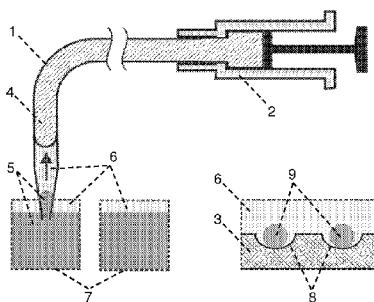


图 1 / Fig. 1

(57) Abstract: An application method for an automatic micro-droplet array screening system with picoliter precision. A liquid driving system (2) and a capillary tube (1) are filled with a liquid with a low thermal expansion coefficient as a carrier fluid (4), and bubbles in the capillary tube (1) are completely removed, then the sampling end of the capillary tube (1) is immersed in an oil phase (6) immiscible with a water phase sample (5) to suck a segment of the oil phase (6) into the capillary tube (1), for isolating the water phase sample (5) from the carrier fluid (4), the sampling end of the capillary tube (1) is immersed again in a sample/reagent storage tube (7) to suck a certain volume of the water phase sample (5) solution into the capillary tube (1), and finally the sampling end of the capillary tube (1) is transferred in the oil phase (6) above micropores (8) of a microporous array chip (3), and the sample (5) solution in the capillary tube (1) is pushed into the micropores (8) to form droplets (9) of the sample (5).

(57) 摘要: 一种具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法, 通过将液体驱动系统 (2) 和毛细管 (1) 中充满低热膨胀系数的液体作为载流 (4), 并完全排空毛细管 (1) 内的气泡, 然后将毛细管 (1) 取样端浸入与水相样品 (5) 不互溶的油相 (6) 中抽取一段油相 (6) 至毛细管 (1) 中, 用于隔离水相样品 (5) 和载流 (4), 再将毛细管 (1) 取样端浸入样品/试剂储存管 (7) 中抽取一定体积的水相样品 (5) 溶液进入毛细管 (1), 最后将毛细管 (1) 取样端移入微孔阵列芯片 (3) 的微孔 (8) 上方的油相 (6) 中, 将毛细管 (1) 中的样品 (5) 溶液推出至微孔 (8) 中形成样品 (5) 的液滴 (9)。

说明书

发明名称：一种具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法

技术领域

- [1] 本发明涉及的领域为高通量筛选领域，特别涉及一种具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法。

背景技术

- [2] 高通量筛选系统起源于药物筛选的研究，它主要以 96 或者 384 孔板为阵列化反应器，通过自动化机器人进行液体分配和试样混合，采用高灵敏、高速的检测装置和数据处理软件对实验结果进行分析和处理，实现每天至少 10,000 样的筛选通量。由于其强大的筛选和分析功能，高通量筛选技术的应用范围已从药物筛选扩展到生物学、医学、化学等多个科学领域。然而，随着新的靶标和样本量的迅速增加，基于多孔板的商品化高通量液体处理与筛选系统逐渐面临巨大的挑战。用于筛选的化合物主要来源于人工合成或从天然产物中分离纯化得到，成本较高。目前，基于多孔板的高通量筛选系统的试样消耗体积在 1-100 微升。如果能在皮升至纳升级的水平上操纵液体，来对样品进行筛选，则有可能将其成本降低 1000-100000 倍。因此，无论是在工业界还是在学术界，大量的研究均集中在高通量筛选系统的微型化。比如，英国 Douglas 公司研制 OryxNano 系列液体处理装置的最小液体处理体积是 100 纳升（<http://www.douglas.co.uk/oryxnano.htm>）。英国 TTP LabTech 公司研制的 Mosquito 系列液体处理装置的最小液体操纵体积达到 25 纳升（www.ttplabtech.com/products/mosquito/）。这些仪器的应用显著的降低了筛选和研发的成本。然而，目前仍然缺少可在几个纳升甚至皮升级体积上进行液体操纵和高通量筛选的技术和装置。
- [3] 皮升级高通量筛选的研究难点主要体现在：1）现有仪器设备难以在皮升级进行可靠的液体操纵，比如准确液体量取、液体转移、试样混合等；2）随着液体体积的缩小，蒸发效应显著增加。比如在典型实验室条件下，一个皮升级的

水相液滴会在 1 秒内完全挥发； 3）微体系下的液体具有极大的比表面积，由于水 / 气界面和水 / 固界面上的分子自组装或者非特异性作用，容易引起生物活性分子的失活、损失以及交叉污染，从而导致筛选结果的假阳性或者假阴性。

- [4] 基于液滴的微流控技术是近年来高通量筛选微型化研究领域中的热点之一。它通过微米级通道中多相流体的控制，实现大批量油包水或水包油型液滴微反应器的生成、试样混合、反应、以及分析鉴定。液滴反应器的尺寸可在飞升级至纳升级灵活调节，从而可能实现超低消耗的高通量筛选。由于油相的包裹和保护作用，有效抑制了液滴反应器的溶剂蒸发和稀释作用，以及样品间的交叉污染。利用生物兼容性表面活性剂分子的自组装效应，可以给生化筛选反应提供一个温和均一的微环境，有利于提高分析筛选的准确性。同时，液滴反应器微小的体积有利于加速物质间的传质，提高反应效率。因此，基于液滴的微流控技术因其优异的特性有可能成为新一代的高通量筛选技术。

- [5] 目前，基于液滴的微流控筛选方法主要有三种，分别为液滴储存器方法、滑动芯片方法、以及液滴组装方法。液滴储存器是首先采用逐个抽取的方法将不同的待筛选样品溶液装载至毛细管中形成液滴，然后将该毛细管与微流控芯片通道连接，通过芯片上的 T 型接口将靶标溶液注入到液滴中触发反应，最后将形成的液滴反应器收集至另外一个毛细管中进行孵育反应和检测（Zheng B., Ismagilov R. F. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, 44, 2520）。滑动芯片方法则首先在下片的阵列化微孔中装入待筛选样品形成液滴，然后滑动上片使上片微通道中的靶标试剂溶液与下片的液滴混合，进行触发反应和筛选（Du W. B., Li L., Nichols K. P., Ismagilov R. F. *Lab Chip*, 2009, 9, 2286）。然而，上述两种方法均需要手动的液滴装载、毛细管和芯片通道的连接，以及精密的芯片滑动操作，难以应用于大规模样品的筛选。液滴组装方法利用自动化的样品管和试剂管的快速切换，在液滴形成的过程中完成待筛选样品和试剂的混合，然后将液滴储存至毛细管和芯片上进行反应和检测（Du W. B., Sun M., Gu S. Q., Zhu Y., Fang Q. *Anal. Chem.*, 2010, 82, 9941；方群，杜文斌，孙蒙，基于液滴顺序组装技术的微流控液滴生成系统和使用方法，中国发明专利，申请号：201010250945.0）。尽管液滴顺序组装技术解决了液滴筛选的自动化和大规模样品筛选的难题

，但是由于含有样品和试剂的液滴的生成采用了逐个组装方法，其筛选速度难以提高。另外，由于微型化带来的尺寸效应，上述几种液滴筛选方法都难以在皮升级体积进行生化筛选测定。

- [6] 在微流控液滴系统中，平行化的试剂加入方法主要可分为两类。第一类采用一个 T 型分支通道将一相同试剂注入到主通道中的不同的液滴中（Zheng B., Ismagilov R. F. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, 44, 2520）。这类方法经常与上述的液滴储存器方法进行联用，用于基于液滴的微量筛选。然而，这类方法的主要问题是 T 型通道交叉口存在较大的液滴样品残留，从而引起液滴间的交叉污染。另外一类方法采用液滴融合技术进行平行化的试剂加入。首先为微通道中生成互相配对的样品和试剂的液滴，然后利用流体动力辅助或者介电辅助的方法使配对好的液滴融合形成独立的微反应器（Teh S Y, Lin R. Hung L. H., Lee A. P., *Lab Chip*, 2008, 8:198）。然而此类方法结构较为复杂，加工难度大，并且难以用于具有大量不同样品的筛选系统中。并且，上述两类方法的实现都需要复杂的液体流速调节、液滴频率、液滴大小的控制、液滴位置的反馈等手动调节手段，难以实现可靠的自动化，在仪器产业化方面存在较大的困难。

对发明的公开

技术问题

- [7] 本发明的目的是提供一种具有皮升级分辨率的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法。该系统可进行全自动的皮升级液体的量取、不同样品液滴阵列的形成、靶标试剂的平行化定量加入、以及微量体积下的反应测定。该系统既可用于高通量药物筛选，也可用于催化剂筛选、酶动力学分析、疾病诊断、以及单细胞和单分子分析中。

问题的解决方案

- [8] 本发明的具体技术方案如下：
- [9] 一种具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法，系统包括毛细管、液体驱动系统、微孔阵列芯片、样品 / 试剂储存管和自动平移台，具体步骤为：
- [10] 1) 将液体驱动系统和毛细管中充满低热膨胀系数的液体作为载流，并完全排

空毛细管内的气泡；

[11] 2) 将毛细管取样端浸入与水相样品不互溶的油相中抽取一段油相至毛细管中，用于隔离水相样品和载流；

[12] 3) 将毛细管取样端浸入样品 / 试剂储存管中抽取一定体积的水相样品溶液进入毛细管；

[13] 4) 将毛细管取样端移入微孔阵列芯片的微孔上方的油相中，将毛细管中的样品溶液推出至微孔中形成样品的液滴。

[14] 本发明所述的步骤 4) 后还包括如下具体步骤：

[15] a) 在微孔阵列芯片上形成化学组成或者浓度不同的多个待筛选样品的液滴；

[16] b) 在毛细管中一次抽取大量的试剂，并将毛细管取样端分别插入至每个样品的液滴中，注入一定体积的试剂，形成液滴反应器，完成样品与试剂的混合、反应、检测和筛选。

[17] 本发明所述的步骤 4) 后还包括如下具体步骤：

[18] m) 在微孔阵列芯片上形成大量的试剂的液滴；

[19] n) 在每个试剂的液滴中分别注入待筛选的样品溶液，形成液滴反应器，完成试剂与样品的混合、反应、检测和筛选。

[20] 本发明所述的液体驱动系统具有数纳升 / 分钟的液体驱动精度，其驱动液体的流速范围是 1 纳升 / 分钟至 500 纳升 / 分钟。

[21] 本发明为了消除液体驱动系统在转换液体驱动方向时，即从抽取转换至推出或者从推出转换至抽取这一期间所存在的机械回差，保证皮升级的液体量取精度，在抽取水相样品或试剂溶液之前先抽取一定额外体积的油相进入毛细管；在将样品或试剂溶液推出毛细管时，也将额外抽取的油相一并推出毛细管。

[22] 本发明所述的液体驱动系统和毛细管中充满低热膨胀系数的液体作为载流，来防止实验过程中温度波动对液体驱动精度的影响，载流的热膨胀系数范围为 0.00001/ 摄氏度至 0.0005/ 摄氏度。

[23] 本发明所述的毛细管采用较薄的管壁，有利于实现皮升级的液体量取以及降低液体在毛细管取样端的残留；毛细管的管壁厚度范围是 1 微米至 100 微米。

[24] 本发明所述的具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法，在使

用之前，对液体载流和油相进行脱气处理，防止在液体驱动过程中产生气泡。

[25] 本发明在使用时，微孔阵列芯片的微孔的上方，与样品 / 试剂储存管的上方均覆盖一层与水相不互溶的油相，以防止微量液滴、样品和试剂暴露在空气中挥发或受到污染，油相的厚度范围为 0.1 毫米至 10 毫米。

[26] 本发明在使用时，为了消除筛选反应过程中油相对微量生化反应的干扰，在油相中添加生物兼容性的表面活性剂，利用表面活性剂分子在油水界面的自组装效应，来降低生物分子在界面的吸附和失活，表面活性剂的浓度为 0.01% 至 10%。

发明的有益效果

[27] 本发明的优点主要在于：（1）液体的定量量取和液滴生成具有皮升级的体积精度，有效降低了高通量筛选中的样品 / 试剂消耗，节省了实验成本；（2）采用将毛细管插入待筛选样品液滴中，分别连续注入试剂来完成样品和试剂的混合、反应检测和筛选，有效提高了筛选的通量，并降低了产生交叉污染的风险；（3）液体量取、推出、液滴生成、以及试剂注入等过程完全自动化，有效降低了人为失误和误差，易于实现系统的产业化和广泛普及。

对附图的简要说明

[28] 图 1 是具有皮升级精度的液滴阵列筛选系统及其使用方法示意图；

[29] 图 2 是采用毛细管插入液滴的方法，在待筛选样品液滴中依次注入试剂的过程示意图；

[30] 图 3 是利用液滴阵列筛选系统进行 Caspase-1 酶抑制剂筛选的俯视荧光图片；

[31] 图 4 是对筛选得到的抑制剂 28 进行半抑制浓度测定结果记录图；

[32] 图 5 是将液滴阵列筛选系统用于纳升级蛋白质结晶条件筛选的测定结果图；

[33] 图 6 是将液滴阵列筛选系统用于基于细胞的药物活性研究的测定结果图。

[34] 图中：

[35] 1- 毛细管， 2- 液体驱动系统， 3- 微孔阵列芯片， 4- 液体载流， 5- 水相样品， 6- 油相， 7- 样品 / 试剂储存管， 8- 微孔， 9- 样品的液滴， 10- 试剂， 11- 液滴反应器。

发明实施例

[36] 下面对本发明的技术方案作详细阐述：

[37] 本发明涉及一种具有皮升级分辨率的微液滴阵列筛选系统，由毛细管、液体驱动系统、微孔阵列芯片、液体驱动系统、样品 / 试剂储存管和自动平移台组成。液体驱动系统与毛细管相连用于微量液体的定量抽取和推出，样品 / 试剂储存管和微孔阵列芯片固定在可三维移动的自动平移台上，样品 / 试剂储存管用于储存实验所需的样品和试剂，微孔阵列芯片用于微量液滴的储存、反应、检测和筛选。

[38] 根据本发明，所述的具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统，其使用方法是：首先将液体驱动系统和毛细管内充满低热膨胀系数的液体作为载流，并完全排空毛细管内的气泡；然后将毛细管取样端浸入与水相样品不互溶的油相中抽取一段油相至毛细管中，用于隔离水相样品和载流；再将毛细管取样端浸入样品 / 试剂储存管中抽取一定体积的水相样品溶液进入毛细管；最后将毛细管取样端移入微孔阵列芯片的微孔上方的油相中，将毛细管中的样品溶液推出至微孔中形成样品液滴。

[39] 根据本发明，为了提高筛选的通量，首先在微孔阵列芯片上形成化学组成或者浓度不同的多个待筛选样品液滴，然后在毛细管中一次抽取大量的试剂，并将毛细管取样端分别插入至每个样品液滴中，注入一定体积的试剂，形成液滴反应器，完成样品与试剂的混合、反应、检测和筛选。作为另外一种方案，也可首先在微孔阵列芯片上形成大量的相同化学组成和浓度的试剂液滴，然后在每个试剂的液滴中分别注入待筛选的不同化学组成和浓度的样品溶液，形成液滴反应器，完成试剂与样品的混合、反应、检测和筛选。

[40] 根据本发明，液体驱动系统具有正向推出和反向抽取的液体驱动能力，流速为 1 皮升 / 分钟至 100 微升 / 分钟，量取液体的体积在 1 皮升至 100 微升。作为优选，为完成皮升级液体的量取，所述的液体驱动系统具有数纳升 / 分钟的液体驱动精度，其驱动液体的流速范围是 1 纳升 / 分钟至 500 纳升 / 分钟，量取液体的体积范围在 1 皮升至 1000 皮升。

[41] 根据本发明，为了消除液体驱动系统在转换液体驱动方向时（从抽取转换至推出状态时或者从推出转换至抽取状态时）存在的机械回差，保证皮升级的液体

量取精度，在抽取水相样品或试剂溶液之前先抽取一定额外体积的油相进入毛细管；在将样品或试剂溶液推出毛细管时，也将额外抽取的油相一并推出毛细管。

- [42] 根据本发明，液体驱动系统和毛细管中充满低热膨胀系数的液体作为载流，来防止实验过程中温度波动对液体驱动精度的影响，作为优选，载流的热膨胀系数范围为0.00001/ 摄氏度至 0.0005/ 摄氏度。
- [43] 根据本发明，为实现皮升级的液体量取以及降低液体在毛细管取样端的残留，对毛细管的取样端进行拉尖处理来降低取样端尖端的直径和横截面积，作为优选，取样端尖端的直径范围是 1 微米至 100 微米；同时对毛细管的内壁和取样端外壁进行疏水化处理。
- [44] 根据本发明，采用管壁较薄的毛细管，有利于实现皮升级的液体量取以及降低液体在毛细管取样端的残留，减小量取不同液体时产生的交叉污染。作为优选，毛细管的管壁厚度范围是 1 微米至 100 微米。
- [45] 根据本发明，在使用之前，对液体载流和油相进行（真空或者超声）脱气处理，防止在液体驱动过程中产生气泡。气泡的存在会显著降低对微量皮升级液体的量取精度。
- [46] 根据本发明，在抽取样品（或试剂）溶液之前，毛细管中预先抽取一段与样品（或试剂）溶液不互溶的油相来隔离样品（或试剂）和低热膨胀系数的液体载流；作为优选，油相的长度范围为 50 微米至 20 毫米。
- [47] 根据本发明，微孔阵列芯片上加工多个用于盛载微量液体的小坑。每个小坑的体积范围是 1 皮升至 100 微升。
- [48] 根据本发明，使用时，芯片上的微孔阵列与样品 / 试剂储存管的样品 / 试剂管上覆盖一层油相，以防止微量液滴和样品暴露在空气中挥发或受到污染，油膜的厚度为 0.1 毫米至 10 毫米。使用时，微孔阵列芯片上的微孔的上方，与试样样品 / 试剂储存管的上方，均覆盖一层与水相不互溶的油相，以防止微量液滴、样品和试剂暴露在空气中挥发或受到污染，作为优选，油相的厚度范围为 0.1 毫米至 10 毫米。
- [49] 根据本发明，作为一种优选方案，为了消除筛选反应过程中油相对生化反应的

干扰，在油相中添加生物兼容性的表面活性剂，利用表面活性剂分子在油水界面的自组装效应，来降低生物分子在界面的吸附和失活，作为优选，表面活性剂的浓度范围为 0.01% 至 10%。

[50] 根据本发明，采用多个毛细管或者多个液体驱动装置，同时进行多种液体样品 / 试剂的量取、推出和液滴生成操作。

[51] 下面结合具体实施例对本发明的技术方案作进一步说明：

[52] 参照附图，以下将详细描述根据本发明的优选实施例。

[53] 图 1 是具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统及使用方法示意图。其使用方法如下：使用毛细管 1 作为取样探针，将其尾部与液体驱动系统 2 相连。毛细管 1 和液体驱动系统 2 内均充满低热膨胀系数的液体作为载流 4，并在毛细管 1 的取样端引入一段与水相不互溶的油相 6 来分隔水相样品 5 和载流 4。移动毛细管 1 或者样品 / 试剂储存管 7，使毛细管 1 取样端浸入油相 6 中抽取一定额外体积的油相 6 进入毛细管 1 取样端；再将毛细管 1 取样端浸入样品 5 中定量抽取一定体积的样品 5 进入毛细管。然后再次移动毛细管 1 或者微孔阵列芯片 3，使毛细管 1 取样端置于芯片 3 上微孔 8 上方的油相 6 中。启动液体驱动系统 2 将毛细管 1 中的微量液体样品 5 和额外抽取的油相 6 推出至微孔 8 中，形成微量水相样品 5 的液滴 9。

[54] 在利用该系统生成微液滴阵列前，毛细管 1 的取样端进行拉尖处理，并对毛细管 1 的内外壁、以及微孔阵列芯片 3 的表面进行疏水化表面处理。对液体载流 4 和油相 6 进行真空脱气或者超声脱气处理，防止在液体驱动过程中产生气泡。

[55] 图 2 是采用毛细管插入液滴的方法，在待筛选样品液滴中依次注入试剂的过程示意图。根据图 1 所述的方法，在微孔阵列芯片 3 上生成含有不同化学组成或浓度的样品液滴 9 的阵列。在取样毛细管 1 中抽取大量体积的试剂 10，然后移动毛细管 1 或者微孔阵列芯片 3，使毛细管 1 取样端插入样品液滴 9 中，启动液体驱动系统 2，推出一定体积的试剂 10 进入样品液滴 9 中，完成样品 / 试剂的混合，形成液滴反应器 11。

[56] 实施例 1

[57] 图 3 是根据图 1 和图 2 所述的液滴阵列筛选系统和使用方法，以 32 个小分子

化合物作为待筛选样品，以 Caspase-1 酶作为筛选靶标进行酶抑制剂筛选得到的荧光图片。首先将 100 μM 的小分子化合物装入样品 / 试剂储存管中。采用图 1 所述的液滴阵列生成方法在微孔阵列芯片上生成 32 个小分子化合物的液滴，每个液滴的体积为 180 皮升。然后按照图 2 所述的靶标试剂注入方法，分别向每个液滴中注入 180 皮升的 Caspase-1 酶溶液（6 $\text{mU}/\mu\text{L}$ ）以及 180 皮升的底物（Z-YVAD-R110）溶液（20 μM ）来触发反应。将微孔阵列芯片在 35 摄氏度条件下孵育 1 个小时，采用荧光成像的方法获取实验结果。分析实验结果，化合物对 Caspase-1 酶的抑制能力越强，酶活性就弱，在相同反应条件下，催化底物反应的速度就低，对应图 3 中荧光信号就越弱。因此，编号为 28、30、和 32 化合物为筛选鉴定出的抑制剂。

[58] 实施例 2

[59] 图 4 是对图 3 所述的筛选实验得到的 28 号化合物进行 Caspase-1 酶半抑制浓度测定结果记录图。首先在样品 / 试剂储存管中分别装入浓度为 0.1 nM 、1 nM 、10 nM 、100 nM 、1 μM 、10 μM 、以及 100 μM 的 28 号化合物溶液。根据图 1 和图 2 所述的液滴阵列筛选系统和使用方法，在微孔阵列芯片上生成含有不同浓度 28 号化合物溶液的液滴（180 皮升），再向每个液滴中注入 180 皮升的 Caspase-1 酶溶液（6 $\text{mU}/\mu\text{L}$ ）以及 180 皮升的底物（Z-YVAD-R110）溶液（20 μM ）来触发反应。按照实施例 1 的方法获得结果荧光图片，对荧光亮度值进行提取并进行归一化处理。对化合物 28 的浓度进行取对数处理，并将处理得到的结果与浓度对应的归一化荧光亮度值进行作图。利用数据处理软件对结果图进行 Sigmoidal 拟合，得到半抑制浓度为 $31.6 \pm 3.4 \text{ nM}$ 。

[60] 实施例 3

[61] 图 5 是将该液滴阵列筛选系统用于纳升级蛋白质结晶条件筛选的测定结果图。首先在样品 / 试剂储存管中分别装入 50 mg/mL 的溶菌酶样品溶液和含有 51 种不同化学组分的沉淀剂溶液（美国 Hampton 公司 Crystal I 结晶试剂盒）。采用图 1 所述的液滴阵列生成方法在微孔阵列芯片上生成 51 个体积为 2 nL 不同沉淀剂的液滴，每个沉淀剂条件重复 5 次。然后向每个液滴中分别注入 2 nL 的溶菌酶样品溶液，形成结晶反应器。将芯片置于温度为 16 摄氏度的恒温箱中进行

孵育反应。为了防止长时间孵育过程中的微液滴蒸发问题，实验中选择透气性较差的石蜡油或者矿物油作为油相。最后采用显微镜对液滴阵列进行成像检测，鉴定出适合溶菌酶结晶的沉淀剂条件。

[62] 实施例 4

[63] 图 6 是将该液滴阵列筛选系统用于基于细胞的药物活性研究的测定结果图。实验中选择透气性较强的全氟油 FC40 作为油相，来满足细胞培养需要的气体交换。首先采用图 1 所述的液滴阵列生成方法将非小肺癌细胞 A549 悬浮液点样至阵列芯片中，每个液滴体积为 500 nL，包含 80 ± 20 个细胞。然后将液滴阵列芯片置于细胞培养箱培养 24 小时，使细胞贴壁生长。将细胞贴壁后的液滴阵列芯片取出，移除旧培养液并用 PBS 对细胞培养液滴中残余的培养液进行清洗后，向每个液滴中加入 500 nL 不同浓度的 5-Fluorouracil 药物溶液。将加药后的液滴阵列芯片重新放入培养箱中继续培养 24 小时，然后利用 PBS 清洗液滴并加入新鲜培养液进行细胞的后培。最后，用毛细管移除液滴中的细胞培养液并用 PBS 对液滴进行清洗，然后加入 500 nL 用于细胞活性检测的混合荧光染料试剂 Calcein AM 与 Ethidium homodimer-1。将液滴阵列芯片放入培养箱中孵育 30 分钟后，在荧光显微镜下进行成像检测，对每个液滴中活细胞和死细胞的个数进行计数，计算出药物刺激后的细胞存活率。

权利要求书

[权利要求 1]

一种具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法，所述的系统包括毛细管（1）、液体驱动系统（2）、微孔阵列芯片（3）、样品/试剂储存管（7）和自动平移台，其特征在于，具体步骤为：

- 1）将液体驱动系统（2）和毛细管（1）中充满低热膨胀系数的液体作为载流（4），并完全排空毛细管（1）内的气泡；
- 2）将毛细管（1）取样端浸入与水相样品（5）不互溶的油相（6）中抽取一段油相（6）至毛细管（1）中，用于隔离水相样品（5）和载流（4）；
- 3）将毛细管取样端浸入样品/试剂储存管（7）中抽取一定体积的水相样品（5）溶液进入毛细管（1）；
- 4）将毛细管（1）取样端移入微孔阵列芯片（3）的微孔（8）上方的油相（6）中，将毛细管（1）中的样品（5）溶液推出至微孔（8）中形成样品（5）的液滴（9）。

[权利要求 2]

根据权利要求 1 所述的具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法，其特征在于，所述的步骤 4）后还包括如下具体步骤：

- a）在微孔阵列芯片（3）上形成化学组成或者浓度不同的多个待筛选样品的液滴（9）；
- b）在毛细管（1）中一次抽取大量的试剂（10），并将毛细管（1）取样端分别插入至每个样品的液滴（9）中，注入一定体积的试剂（10），形成液滴反应器（11），完成样品（5）与试剂（10）的混合、反应、检测和筛选。

[权利要求 3]

根据权利要求 1 所述的具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法，其特征在于，所述的步骤 4）后还包括如下具体步骤：

- m）在微孔阵列芯片（3）上形成大量的试剂（10）的液滴；

n) 在每个试剂 (10) 的液滴中分别注入待筛选的样品 (5) 溶液, 形成液滴反应器 (11), 完成试剂 (10) 与样品 (5) 的混合、反应、检测和筛选。

[权利要求 4] 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法, 其特征在于, 所述的液体驱动系统 (2) 具有数纳升 / 分钟的液体驱动精度, 其驱动液体的流速范围是 1 纳升 / 分钟至 500 纳升 / 分钟。

[权利要求 5] 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法, 其特征在于, 在抽取水相样品 (5) 或试剂 (10) 溶液之前先抽取一定额外体积的油相 (6) 进入毛细管 (1); 在将样品 (5) 或试剂 (10) 溶液推出毛细管 (1) 时, 也将额外抽取的油相 (6) 一并推出毛细管 (1)。

[权利要求 6] 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法, 其特征在于, 所述的液体驱动系统 (2) 和毛细管 (1) 中充满低热膨胀系数的液体作为载流 (4), 所述的载流 (4) 的热膨胀系数范围为 0.00001/ 摄氏度至 0.0005/ 摄氏度。

[权利要求 7] 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法, 其特征在于, 所述的毛细管 (1) 的管壁厚度范围是 1 微米至 100 微米。

[权利要求 8] 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法, 其特征在于, 在使用之前, 对液体载流 (4) 和油相 (6) 进行脱气处理。

[权利要求 9] 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法, 其特征在于, 使用时, 微孔阵列芯片 (3) 的微孔 (8) 的上方, 与样品 / 试剂储存管 (7) 的上方均覆盖一层与水相不互溶的油相 (6), 所述的油相 (6) 的厚度范围为 0.1 毫米至 10 毫米。

[权利要求 10] 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的具有皮升级精度的自动化微液滴阵列筛选系统的使用方法，其特征在于，使用时，在油相（6）中添加生物兼容性的表面活性剂，表面活性剂的浓度为 0.01% 至 10%。

说明书附图

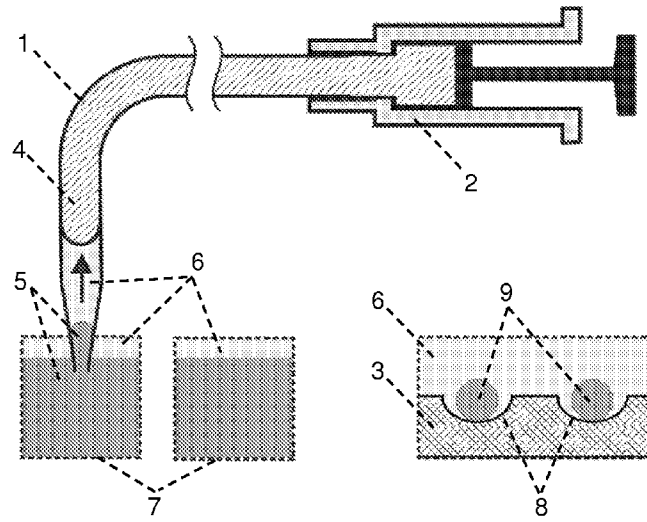


图 1

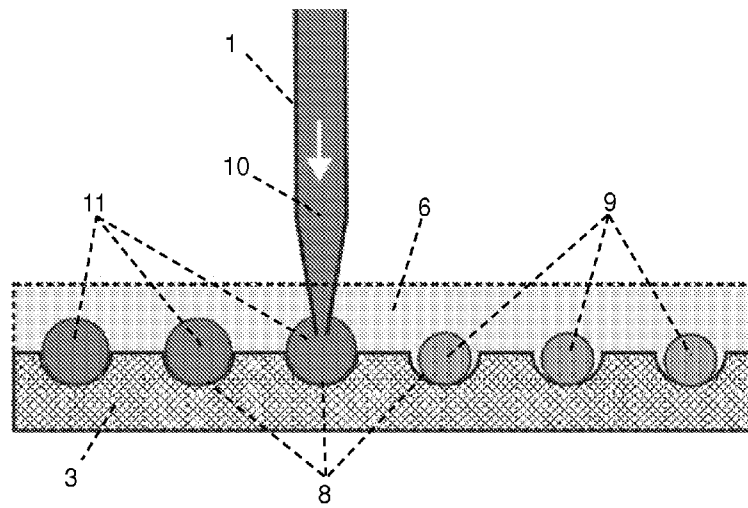


图 2

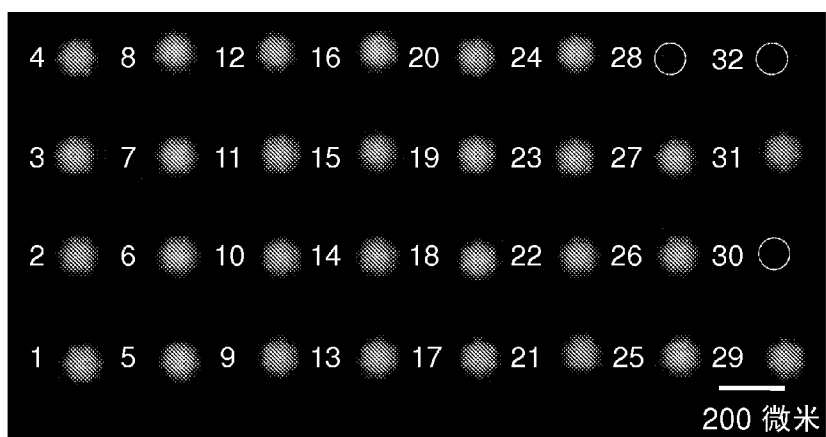


图 3

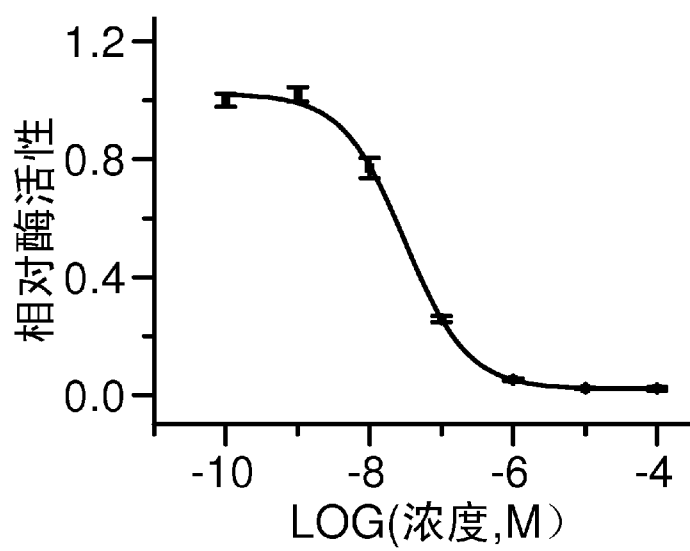


图 4

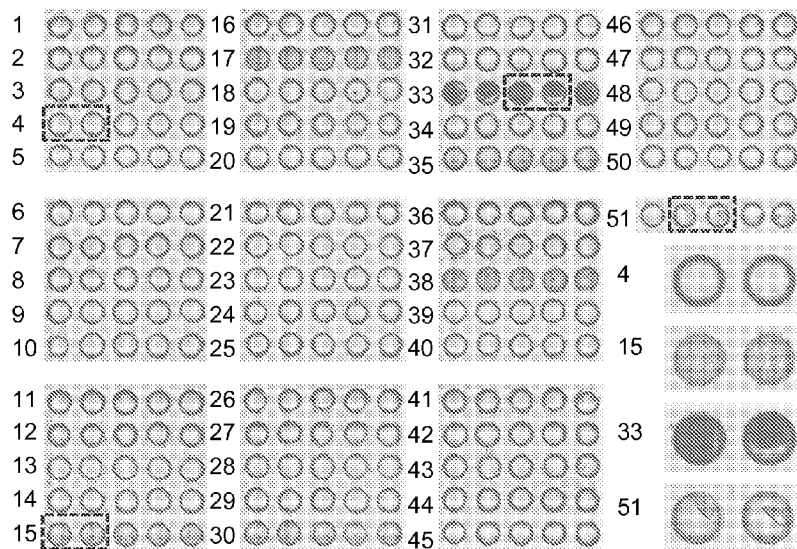


图 5

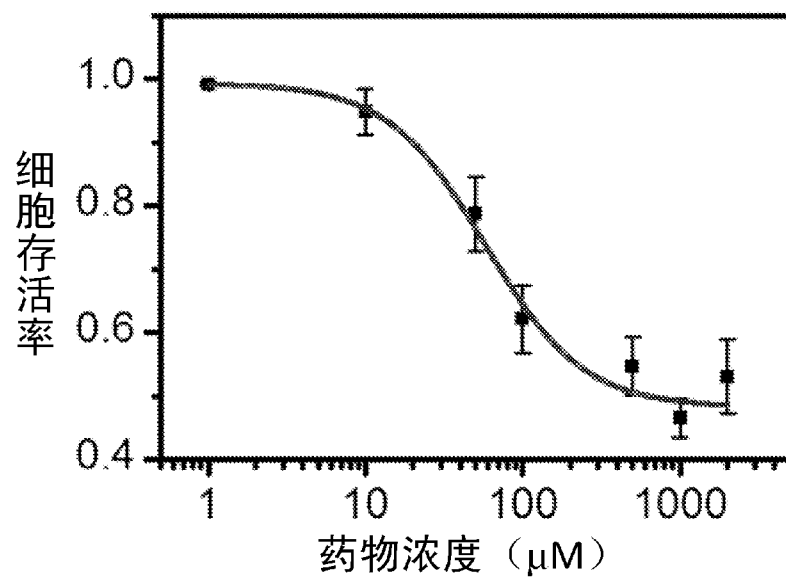


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/086729

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

IPC: B01L, G01N, G12B, C12

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)

CNPAT, CNKI: miniflow, array, drop, pipet, capillary tube, dropper, drip emitter, suction head, thin tube, needle, picoliter, nanoliter, drive, liquid drive, pump, injection, sample injection, expansion, expansion coefficient, seal, separate, cover, oil, inertia

WPI, EPODOC: array, microfluid+, droplet, nanoliter, nanolitre, picoliter, picolitre, pliter, plitre, oil, cover+, seal+, airproof, blanket, evaporat+, vapour, loss, vapor, volatiliz+, thermal, expansion

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 103008037 A (ZHEJIANG UNIVERSITY), 03 April 2013 (03.04.2013), claims 1-10	1-10
A	CN 101957383 A (ZHEJIANG UNIVERSITY), 26 January 2011 (26.01.2011), claims 1-7, description, particular embodiments, and figure 1	1-10
A	CN 1818662 A (ZHEJIANG UNIVERSITY), 16 August 2006 (16.08.2006), the whole document	1-10
A	CN 1422185 A (BASF CORP. et al.), 04 June 2003 (04.06.2003), the whole document	1-10
A	CN 101151370 A (SHIMADZU CORP. et al.), 26 March 2008 (26.03.2008), the whole document	1-10
A	CN 102553665 A (ZHEJIANG UNIVERSITY), 11 July 2012 (11.07.2012), the whole document	1-10
A	WO 2012/100205 A2 (BIODOT INC. et al.), 26 July 2012 (26.07.2012), the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 16 January 2014 (16.01.2014)	Date of mailing of the international search report 20 February 2014 (20.02.2014)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WU, Limin Telephone No.: (86-10) 62084789

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2013/086729

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103008037 A	03.04.2013	None	
CN 101957383 A	26.01.2011	None	
CN 1818662 A	16.08.2006	None	
CN 1422185 A	04.06.2003	DE 10017791 A1	11.10.2001
		WO 0176745 A1	18.10.2001
		AU 5626701 A	23.10.2001
		NO 20024875 A	04.11.2002
		CA 2405866 A1	18.10.2001
		AT 273754 T	15.09.2004
		EP 1274511 A1	15.01.2003
		KR 20030003718 A	10.01.2003
		CZ 20023371 A3	16.04.2003
		US 2003138358 A1	24.07.2003
		JP 2003530549 A	14.10.2003
		EP 1274511 B1	18.08.2004
		DE 50103326 G	23.09.2004
		ES 2227181 T3	01.04.2005
		CN 1172747 C	27.10.2004
		RU 2280507 C2	27.07.2006
		IL 151850 A	01.08.2006
CN 101151370 A	26.03.2008	WO 2006104213 A1	05.10.2006
		US 2010028985 A1	04.02.2010
		JPWO 2006104213 A1	11.09.2008
		JP 4619403 B2	26.01.2011
CN 102553665 A	11.07.2012	None	
WO 2012100205 A2	26.07.2012	WO 2012100205 A3	27.12.2012
		US 2012304929 A1	06.12.2012
		US 2013206857 A1	15.08.2013
		EP 2665557 A2	27.11.2013
		CN 103429348 A	04.12.2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/086729

CONTINUATION: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 35/00 (2006.01) i

B01L 3/00 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2013/086729

A. 主题的分类

见附加页

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)

IPC: B01L, G01N, G12B, C12

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))

CNPAT, CNKI: 微流, 阵列, 滴, 移液, 移液管, 毛细管, 滴管, 滴头, 吸头, 细管, 针, 皮升, 纳升, 驱动, 液体驱动, 泵, 注射, 进样, 膨胀, 膨胀系数, 封, 隔, 盖, 油, 惰性,

WPI, EPODOC: array, microfluid+, droplet, nanoliter, nanolitre, picoliter, picolitre, pliter, plitre, oil, cover+, seal+, airproof, blanket, evaporat+, vapour, loss, vapor, volatiliz+, thermal, expansion

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
P X	CN 103008037 A (浙江大学) 03.4 月 2013 (03.04.2013) 权利要求 1-10	1-10
A	CN 101957383 A (浙江大学) 26.1 月 2011 (26.01.2011) 权利要求 1-7, 说明书具体实施方式, 附图 1	1-10
A	CN 1818662 A (浙江大学) 16.8 月 2006 (16.08.2006) 全文	1-10
A	CN 1422185 A (巴斯福股份公司等) 04.6 月 2003 (04.06.2003) 全文	1-10
A	CN 101151370 A (株式会社岛津制作所等) 26.3 月 2008 (26.03.2008) 全文	1-10
A	CN 102553665 A (浙江大学) 11.7 月 2012 (11.07.2012) 全文	1-10
A	WO 2012/100205 A2 (BIODOT INC 等) 26.7 月 2012 (26.07.2012) 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

16.1 月 2014 (16.01.2014)

国际检索报告邮寄日期

20.2 月 2014 (20.02.2014)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

授权官员

武立民

电话号码: (86-10) **62084789**

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/086729

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 103008037 A	03.04.2013	无	
CN 101957383 A	26.01.2011	无	
CN 1818662 A	16.08.2006	无	
CN 1422185 A	04.06.2003	DE 10017791 A1	11.10.2001
		WO 0176745 A1	18.10.2001
		AU 5626701 A	23.10.2001
		NO 20024875 A	04.11.2002
		CA 2405866 A1	18.10.2001
		AT 273754 T	15.09.2004
		EP 1274511 A1	15.01.2003
		KR 20030003718 A	10.01.2003
		CZ 20023371 A3	16.04.2003
		US 2003138358 A1	24.07.2003
		JP 2003530549 A	14.10.2003
		EP 1274511 B1	18.08.2004
		DE 50103326 G	23.09.2004
		ES 2227181 T3	01.04.2005
		CN 1172747 C	27.10.2004
		RU 2280507 C2	27.07.2006
		IL 151850 A	01.08.2006
CN 101151370 A	26.03.2008	WO 2006104213 A1	05.10.2006
		US 2010028985 A1	04.02.2010
		JP WO2006104213 A1	11.09.2008
		JP 4619403 B2	26.01.2011
CN 102553665 A	11.07.2012	无	
WO 2012100205 A2	26.07.2012	WO 2012100205 A3	27.12.2012
		US 2012304929 A1	06.12.2012
		US 2013206857 A1	15.08.2013
		EP 2665557 A2	27.11.2013
		CN 103429348 A	04.12.2013

续: **A. 主题的分类**

G01N 35/00 (2006.01) i

B01L 3/00 (2006.01) i