



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104334275 B

(45) 授权公告日 2016. 08. 24

(21) 申请号 201380023088. 2

(22) 申请日 2013. 03. 15

(30) 优先权数据

61/612, 008 2012. 03. 16 US

61/612, 005 2012. 03. 16 US

61/612, 087 2012. 03. 16 US

61/723, 658 2012. 11. 07 US

61/723, 759 2012. 11. 07 US

61/723, 738 2012. 11. 07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 10. 31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/032107 2013. 03. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/138724 EN 2013. 09. 19

(73) 专利权人 生命技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 迈克尔·C·帕拉斯

詹姆士·讷尔斯 加里·利姆

西奥多·斯特劳博 埃文·福斯特

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

B01L 3/02(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2009086624 A1, 2009. 07. 16,

US 2003194353 A1, 2003. 10. 16,

审查员 王卫刚

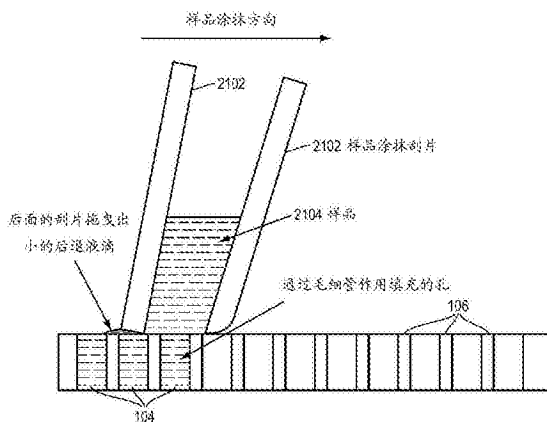
权利要求书1页 说明书14页 附图18页

(54) 发明名称

加载液体样品的系统和方法

(57) 摘要

提供了将液体样品加载至基底内的多个反应位点的样品加载器。所述样品加载器包括第一刮片, 和与第一刮片结合的第二刮片。所述样品加载器还包括第一刮片和第二刮片之间的流道, 其被配置用于将液体样品分配至包含多个反应位点的基底。而且, 在各种实施方案中, 所述液体样品与所述第一和第二刮片具有 85+/-15 度的前进接触角。此外, 可基于毛细管作用将从流道分配的液体样品加载至所述多个反应位点。



1. 用于将液体样品加载至基底内的多个反应位点的样品加载器,所述样品加载器包括:

第一刮片;

第二刮片,其中所述第一刮片与第二刮片结合;

所述第一刮片和所述第二刮片之间的流道,其被配置用于将液体样品分配至基底,其中所述基底包含多个反应位点,其中所述样品加载器被配置用于在多个反应位点上方横向移动,同时使样品加载器与所述基底接触,以便将液体样品置于所述多个反应位点上。

2. 如权利要求1所述的样品加载器,还包括:

与所述流道流体连通的储液器,其中所述储液器被配置用于接纳待加载至反应位点的阵列中的存放的液体样品。

3. 如权利要求1所述的样品加载器,其中所述第一和第二刮片由以下物质中的一种组成:聚烯烃、聚氨酯和硅氧烷。

4. 如权利要求1所述的样品加载器,其中所述第一和第二刮片一起呈锥形而形成尖端,其中在所述尖端处所述第一刮片和所述第二刮片之间的距离小于100 μm 。

5. 如权利要求1所述的样品加载器,其中所述液体样品与所述第一和第二刮片具有85 \pm 15度的前进接触角。

6. 如权利要求1所述的样品加载器,其中从所述流道分配的液体样品被配置为基于毛细管作用加载至所述多个反应位点。

7. 如权利要求1所述的样品加载器,其中前进接触角和后退接触角之间的滞后为0-30度。

8. 将液体样品加载至基底中的多个反应位点的方法,所述方法包括:

将液体样品存放于样品加载器的储液器中,其中所述样品加载器包括第一刮片和第二刮片,且所述第一和第二刮片被配置用于将所述第一和第二刮片之间的液体样品放至所述多个反应位点;

使所述样品加载器与包含多个反应位点的基底接触;以及

在所述多个反应位点上方横向移动所述样品加载器,同时使所述样品加载器与所述基底接触,以便将液体样品置于所述多个反应位点上。

9. 如权利要求8所述的方法,其中一定量的液体样品通过毛细管作用被吸入至每个反应位点中。

10. 如权利要求8所述的方法,其中所述液体样品与样品加载器具有85 \pm 15度的前进接触角。

11. 如权利要求8所述的方法,其中前进接触角和后退接触角之间的滞后为0-30度。

12. 如权利要求8所述的方法,其中所述样品加载器由以下材料中的一种组成:聚烯烃、聚氨酯和硅氧烷。

13. 如权利要求8所述的方法,其中所述液体样品从所述储液器流经所述第一和第二刮片之间的流道后被放至所述基底。

14. 如权利要求8所述的方法,其中所述基底和所述多个反应位点的表面为亲水性的。

加载液体样品的系统和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年3月16日递交的美国临时专利申请第61/612,005号、2012年3月16日递交的美国临时专利申请第61/612,087号、2012年11月7日递交的美国临时专利申请第61/723,759号、2012年3月16日递交的美国临时专利申请第61/612,008号、2012年11月7日递交的美国临时专利申请第61/723,658号和2012年11月7日递交的美国临时专利申请第61/723,738号的优先权,所有以上申请均通过引用整体并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 聚合酶链式反应(PCR)是扩增靶DNA序列的方法。以前,PCR通常在96孔或384孔微板中进行。如果期望更高的通量,微板中的常规PCR方法则不具成本效益或高效性。另一方面,减少PCR反应体积可降低试剂的消耗,并可从反应体积的热质减少而减少扩增次数。该策略可在阵列格式(m x n)中实施,产生大量的较小反应体积。此外,采用阵列允许进行具有增加的定量灵敏度、动态范围和特异性的可扩展高通量分析。

[0005] 阵列格式也被用于进行数字聚合酶链式反应(dPCR)。来自dPCR的结果可用于检测和定量稀有等位基因的浓度,以提供核酸样品的绝对定量,并测量在核酸浓度的低倍数变化。通常,增加重复数可增加dPCR结果的精确度和再现性。

[0006] 大多数定量聚合酶链式反应(qPCR)平台中的阵列格式被设计用于根据样品的分析(sample-by-assay)的实验,其中PCR结果需要为可寻址的以用于运行后分析。然而,对于dPCR,每个PCR结果的具体位置或小井可能是不重要的,且可仅分析每个样品的阳性和阴性重复的数目。

[0007] 在dPCR中,可将含有相对少量靶多核苷酸或核苷酸序列的溶液再分为大量的小测试样品,从而每个样品通常含有一个所述靶核苷酸序列分子或者没有靶核苷酸序列。当这些样品随后在PCR方案、程序或实验中进行热循环时,含有所述靶核苷酸序列的样品被扩增并产生阳性检测信号,而不含靶核苷酸序列的样品则不被扩增且不产生检测信号。

[0008] 对于如上所述的应用,持续降低反应体积可导致例如对涉及将样品体积加载至阵列并维持所述样品体积的物理分离的置信度的挑战。换句话说,将样品体积加载至尽可能多的小井或通孔并减少小井或通孔之间的交叉串扰非常重要。

[0009] 发明概述

[0010] 根据本文描述的各种实施方案,提供了用于将液体样品加载至基底内的多个反应位点的样品加载器。所述样品加载器包括第一刮片,和与第一刮片结合的第二刮片。所述样品加载器还包括第一刮片和第二刮片之间的流道,其被配置为将液体样品分配至包含多个反应位点的基底。而且,在各种实施方案中,所述液体样品与所述第一和第二刮片具有85+/-15度的前进接触角。此外,可基于毛细管作用将从流道分配的液体样品加载至所述多个反应位点。

[0011] 在本文描述的其他实施方案中,包括将液体样品加载至基底中的多个反应位点的方法。所述方法包括将液体样品存储在样品加载器的储液器中。然后将样品加载器与包含多个反应位点的基底接触。所述方法还包括在所述多个反应位点上方横向移动样品加载

器,同时使样品加载器与所述基底接触,以便将液体样品置于所述多个反应位点上。

附图说明

- [0012] 图1A显示了根据本文描述的各种实施方案,在基底中的示例性阵列;
- [0013] 图1B显示了根据本文描述的各种实施方案的基底中的阵列的剖视图;
- [0014] 图2显示了根据本文描述的各种实施方案,将样品体积加载至阵列中;
- [0015] 图3A为根据本文描述的各种实施方案,用于加载液体样品至阵列中的盒子;
- [0016] 图3B为根据本文描述的各种实施方案,用于以包含阵列的插入的基底加载液体样品的盒子的示例性视图;
- [0017] 图3C为根据本文描述的各种实施方案,用于以包含阵列的插入的基底加载液体样品的盒子的另一示例性视图;
- [0018] 图4显示了根据本文描述的各种实施方案,加载液体样品至阵列中的示例性方法;
- [0019] 图5A显示了根据本文描述的各种实施方案,用于加载液体样品的盒子的示例性组件;
- [0020] 图5B显示了根据本文描述的实施方案,用于加载液体样品的盒子的阵列托架部分;
- [0021] 图5C显示了根据本文描述的各种实施方案,用于加载样品的组合的盒子;
- [0022] 图6显示了根据本文教导的各种实施方案,用于加载液体样品至阵列中的一种示例性盒子;
- [0023] 图7显示了根据本文教导的各种实施方案,用于加载液体样品至阵列中的另一示例性盒子;
- [0024] 图8A显示了根据本文教导的各种实施方案,用于加载液体样品至阵列中的又一示例性盒子;
- [0025] 图8B显示了根据本文教导的各种实施方案的、图8A所示的用于加载液体样品至阵列中的示例性盒子的另一视图;
- [0026] 图9A显示了根据本文教导的各种实施方案的示例性导液漏斗的一个视图;
- [0027] 图9B显示了根据本文教导的各种实施方案的、图8A所示的示例性导液漏斗的横截面图;
- [0028] 图10显示了根据本文教导的各种实施方案,用于加载多于一个样品的示例性芯片;
- [0029] 图11显示了根据本文教导的各种实施方案的加载装置;
- [0030] 图12显示了根据本文教导的各种实施方案的另一加载装置;
- [0031] 图13显示了根据本文教导的各种实施方案的样品加载器;
- [0032] 图14A显示了根据本文教导的各种实施方案的样品加载器的侧视图;
- [0033] 图14B显示了根据本文教导的各种实施方案的样品加载器尖端的视图;
- [0034] 图15显示了根据本文教导的各种实施方案的另一样品加载器;
- [0035] 图16显示了根据本文教导的各种实施方案的另一加载装置;
- [0036] 图17显示了根据本文教导的各种实施方案的另一加载装置;
- [0037] 图18A-18C显示了根据本文教导的各种实施方案的载样方法;

- [0038] 图19A-19B显示了根据本文教导的各种实施方案的封盒方法；
- [0039] 图20显示了根据本文教导的各种实施方案的后退和前进接触角；
- [0040] 图21显示了根据本文教导的各种实施方案,通过样品加载器加载反应位点；
- [0041] 图22的方框图显示了可用于实施本文教导的实施方案的聚合酶链式反应(PCR)仪；和
- [0042] 图23显示了根据本文描述的各种实施方案加载的样品的热循环结果。
- [0043] 发明详述
- [0044] 为了提供对本发明更充分的理解,以下描述列举了很多具体细节如具体结构、参数、实例等。然而,应认识到这样的描述并非旨在限制本发明的范围,而是旨在提供对示例性实施方案的更好描述。
- [0045] 本发明涉及将样品、样品体积或反应体积加载至基底中的阵列的方法和系统,且更具体地,涉及将样品加载至基底中单个反应位点的阵列中。
- [0046] 在各种实施方案中,包括用于将样品加载至物件中的装置、仪器、系统和方法,所述物件用于检测大量小体积样品中的靶标。这些靶标可为任何合适的生物学靶标,包括但不限于,DNA序列(包括无细胞DNA)、RNA序列、基因、寡核苷酸、分子、蛋白、生物标记物、细胞(例如,循环肿瘤细胞)或任何其他合适的靶标生物分子。在各种实施方案中,这类生物学组分可结合各种PCR、qPCR和/或dPCR方法和系统用于一些应用如胎儿诊断、多重dPCR、病毒检测和定量标准、基因分型、测序校验、突变检测、遗传改良的动物的检测、稀有基因的检测和拷贝数变化。
- [0047] 尽管处理大量样品时通常可适用定量聚合酶链式反应(qPCR),但应认识到任何合适的PCR方法均可用于本文描述的各种实施方案。合适的PCR方法包括但不限于,例如数字PCR、等位基因特异性PCR、非对称PCR、连接介导的PCR、多重PCR、巢式PCR、qPCR、Cast PCR、基因组步移和桥式PCR。
- [0048] 如下文所述,根据本文描述的各种实施方案,反应位点可包括但不限于,例如通孔、样品保留区、小井、凹口、点、腔和反应室。
- [0049] 此外,如本文所用,热循环可包括例如,采用热循环仪、等温扩增、热转换、红外线介导的热循环或依赖解旋酶的扩增。在一些实施方案中,所述芯片可整合有嵌入式加热元件。在各种实施方案中,所述芯片可整合有半导体。
- [0050] 根据各种实施方案,靶标的检测可为,但不限于,例如单独或组合的荧光检测、正负离子检测、pH检测、电压检测或电流检测。
- [0051] 本文描述的各种实施方案尤其适用于数字PCR(dPCR)。在数字PCR中,含有相对少量靶多核苷酸或核苷酸序列的溶液可再分为大量小测试样品,从而每个样品通常含有一个分子的靶核苷酸序列或没有所述靶核苷酸序列。当这些样品随后在PCR方案、程序或实验中进行热循环时,含有所述靶核苷酸序列的样品被扩增并产生阳性检测信号,而不含靶核苷酸序列的样品则不被扩增且不产生检测信号。采用泊松(Poisson)统计,可将初始溶液中靶核苷酸序列的数目与产生阳性检测信号的样品数目相关联。
- [0052] 在根据本文描述的实施方案的芯片上进行的示例性dPCR结果如图23所示。
- [0053] 为了实施典型的dPCR方案、程序或实验,有利的是能够将初始样品溶液以简单且低成本的方式分为成千上万个或数十万个测试样品,每个样品具有几纳升、1纳升或约1纳

升,或者小于1纳升的体积。由于靶核苷酸序列的数目可能很少,在这种情况下也很重要是初始溶液的全部内含物均被计数且被接纳到所述多个反应位点中。

[0054] 本文描述的实施方案,通过将初始样品溶液分配至多个反应位点中,以能计数所有或基本上所有样品溶液的方式,解决了这些和其他的dPCR设计局限。

[0055] 对于高通量PCR分析和dPCR方法,可实施用阵列格式来减少液体样品的反应体积同时增加同一时间进行的反应数目的策略。液体样品的反应体积的阵列可在基底的多个反应位点中。根据本文描述的各种实施方案,反应位点可为,但不限于,通孔、小井、凹口、点、腔、反应室或可容纳样品的任何结构。在一些实施方案中,所述通孔或小井可为直径上呈锥形的。

[0056] 减少液体样品的反应体积可允许更高密度的反应体积,从而可在给定的区域内进行更多的反应。例如,基底上由300 μm 直径的通孔组成的反应位点阵列可容纳约30nL的反应体积。例如,通过将阵列中每个通孔的大小降低至直径60-70 μm ,每个反应体积可为100pL的液体样品。根据本文描述的各种实施方案,反应体积的范围可为约1pL至30nL的液体样品。在一些实施方案中,反应位点阵列可由各种不同体积的反应位点组成以增加动态范围。此外,可通过采用对液体样品进行多于一次的稀释来增加动态范围。

[0057] 图1A显示了根据本文描述的各种实施方案的包含阵列的芯片100。芯片100可称为例如物件、装置、阵列、滑片(slide)或压板。芯片100包括基底110和反应位点的阵列120。基底110可为各种材料,包括但不限于,例如金属、玻璃、陶瓷和硅。阵列120包括多个反应位点104。所述多个反应位点104可为例如通孔、小井、凹口、点、腔或反应室。每个反应位点也可具有多种横截面几何形状,例如圆形、三角形或六边形。具有其他几何形状可允许更紧密地装填反应位点,以进一步增加在给定区域中的反应数目。

[0058] 图1B说明了根据各种实施方案的反应位点104的阵列的横截面图。芯片100具有第一表面112和第二表面114。每个反应位点104从第一表面112的开口延伸至第二表面114的开口。反应位点104可被配置用于通过毛细管作用提供足够的表面张力以容纳待处理或检测的各个含有生物样品的液体样品。芯片100可具有如以下任一专利中所公开的通用形式或结构:美国专利第6,306,578、7,332,271、7,604,983、7,682,565、6,387,331或6,893,877号,其通过引用整体并入本文,如同其在本文被完整陈述。在图1B所示的实例中,所述反应位点为通孔。

[0059] 在各种实施方案中,第一表面112和第二表面114包含亲水材料,且反应位点104的表面包含亲水材料。在这些实施方案中,毛细管作用有助于将液体样品加载至反应位点。而且,毛细管作用将液体样品保留在反应位点中。

[0060] 在各种实施方案中,第一表面112和第二表面114包含疏水材料,且反应位点104的表面包含疏水材料。在这些实施方案中,毛细管作用有助于将液体样品加载至反应位点。而且,毛细管作用将液体样品保留在反应位点中。

[0061] 在一些实施方案中,反应位点104的表面包含亲水材料,而第一表面112和第二表面114包含疏水材料。以这种方式,有助于将液体样品加载至反应位点104,因为所述液体样品倾向于亲水表面。而且,使得加载至反应位点104中的液体样品之间的交叉污染或串扰最小化。这类亲水区的阵列可在疏水表面上包含亲水岛,且可采用各种精密加工技术,包括但不限于,沉积法、等离子体、掩蔽法、转移印刷、网版印刷、合模法(spottting)等在基底102上

形成。

[0062] 在所示的实施方案中,基底110具有的第一表面112和第二表面114之间的厚度为300微米,从而每个反应位点104具有约1.3纳升的体积。可选择地,通过例如减小反应位点104的直径和/或基底102的厚度,每个反应位点的体积可为小于1.3纳升。

[0063] 因此,每个反应位点具有的体积可小于或等于1纳升、小于或等于100皮升、小于或等于30皮升,或者小于或等于10皮升。在其他实施方案中,一些或所有反应位点的体积的范围为1-20纳升。根据各种实施方案,所述多个反应位点可包括一系列的不同体积以增加动态范围。

[0064] 在某些实施方案中,反应位点104的密度可为至少100个反应位点/平方毫米。在其他实施方案中,可具有更高密度的反应位点。例如,芯片100内反应位点104的密度可为大于或等于150个反应位点/平方毫米、大于或等于200个反应位点/平方毫米、大于或等于500个反应位点/平方毫米、大于或等于1,000个反应位点/平方毫米,或者大于或等于10,000个反应位点/平方毫米。

[0065] 在某些实施方案中,通孔的密度可为至少100个反应位点/平方毫米。在其他实施方案中,可具有更高密度的通孔。例如,芯片100内通孔的密度可为大于或等于150个通孔/平方毫米、大于或等于200个通孔/平方毫米、大于或等于500个通孔/平方毫米、大于或等于1,000个通孔/平方毫米,或者大于或等于10,000个通孔/平方毫米。

[0066] 芯片100的其他实施方案还描述于以下文献中:2012年3月16日递交的临时申请第61/612,087号(案件编号LT00655PRO)和2012年11月7日递交的临时申请第61/723,759号(案件编号LT00655PRO 2),为所有目的将其并入本文。

[0067] 如上所述,减少反应位点的大小可导致与将液体样品加载至每个反应位点有关的挑战。

[0068] 如上所述,可取的是加载液体样品,以便很少或没有残留的液体样品。根据本文描述的各种实施方案,对于加载芯片,将用于加载芯片的液体样品的至少75%体积加载至所述多个反应位点。在一些实施方案中,将用于加载芯片的液体样品的至少90%体积加载至所述多个反应位点。在各种实施方案中,用于加载芯片的液体样品体积等于芯片上所述多个反应位点的总体积的体积。在一些实施方案中,施用于芯片的液体样品体积为芯片上所述多个反应位点的总体积的体积减去一个反应位点的体积。

[0069] 参照图2,根据本文描述的各种实施方案,可通过将一定量的液体样品放至芯片100上来加载反应位点104的阵列。由柔性材料组成的样品加载器206可用于接触阵列104,并以足够促进阵列104的毛细管作用加载的压力将液体样品散布于反应位点104的阵列上。当以横向涂抹(sweeping)方式加载时,足够的压力可为足以克服表面的疏水/亲水特性的力。在一些实施方案中,样品加载器206可保持静止,而芯片100移动以将液体样品散布于阵列104上。在其他实施方案中,芯片100可保持静止,而样品加载器206在阵列104上移动以加载反应位点104的阵列。此外,以这种方式,也可将过量液体样品从芯片100上去除。

[0070] 而且,根据本文描述的各种实施方案,当将所述芯片移入盒子或容器中时,所述多个反应位点可被加载。盒子可有助于防止液体样品的蒸发,也可增加热循环期间每个反应体积的稳定性。

[0071] 图3A、3B和3C显示了根据本文件公开的各种实施方案的用于加载反应位点阵列的

示范性盒子300的各种视图。盒子300可包括第一部分302和第二部分304。第一部分302和第二部分304被配置为可移动式连接以便第一部分302和第二部分304能在封闭的位置包裹住芯片100。

[0072] 根据本文教导的各种实施方案,加载芯片中的反应位点的方法如图4所示。在步骤402中,将液体样品放于样品加载器。在各种实施方案中,所述样品加载器可具有接入口来放入液体样品,以便将液体样品接纳在样品加载器内的储液器中。在其他实施方案中,将所述液体样品直接放至包含反应位点阵列的芯片上。在步骤404中,使所述样品加载器与芯片接触。在步骤406中,横向移动所述样品加载器跨越芯片表面,以便以足够允许反应位点的毛细管作用的压力将液体样品与反应位点接触,从而将液体样品加载至反应位点。可任选地进行步骤408。在步骤408中,通过进行加热,可有助于去除样品加载器放置于芯片表面上且没有加载至反应位点中的任何过量的液体样品。可通过加热表面来加热所述芯片。去除过量的液体样品可有助于降低例如扩增液体样品中的生物分子期间可能产生的误差。

[0073] 参照图5B,第一部分302可容纳芯片100。在一些实施方案中,芯片100可通过施加于端口310的粘合剂而容纳在盒子300的第一部分302中。所述粘合剂可为例如胶水或UV粘合剂类型。在其他实施方案中,芯片100可通过例如紧固件或夹持件而容纳在第一部分302中。

[0074] 根据各种实施方案,导液漏斗308与盒子300的第二部分304为连通的关系,以有助于将样品引入至芯片100的反应位点。导液漏斗308可为具有足够柔性的疏水材料以接触并施加压力于芯片100从而加载反应位点。导液漏斗308可由例如硅酮、RTV、聚氨酯、天然橡胶、其他弹性体或聚烯烃组成。导液漏斗308被配置用于将液体样品散布于芯片100上,以便在将芯片100移动经过导液漏斗308时加载单个反应位点。导液漏斗308也可配置为垫圈。

[0075] 以这种形式,按整个本文件中讨论的且尤其是图4中的方式,有助于引入样品材料,且可减少所需的样品的最小体积。在各种实施方案中,导液漏斗308被整合或结合至盒子中。可选择地,导液漏斗308可为分离的或可移动的物件。

[0076] 导液漏斗308可具有各种形状和大小。例如,在一个实施方案中,导液漏斗308可采用具有狭缝904的水槽形式,如图9A和9B所示。狭缝904的宽度足够窄,从而当液体样品被放于导液漏斗308中时,液体样品不会流过去。狭缝904允许芯片100通过进入位于盒子的第二部分304内的静止性容积(resting volume)312中。在一些实施方案中,可用薄膜覆盖狭缝904以保持静止性容积312封闭,以便例如隔绝杂物或空气。当插入芯片100而通过导液漏斗308时,芯片100可打破覆盖狭缝904的膜。

[0077] 同样结合至第二部分304的是样品端口306。可将液体样品放于样品端口306中以加载芯片100。放于样品端口306中的液体样品可被容纳在导液漏斗308中。另外,导液漏斗308可被配置为沿着其长度上的几个点来接收样品材料,从而有助于加载样品。沿着导液漏斗长度上的几个加样端口可有助于有效加载液体样品。沿着导液漏斗长度上的几个加样端口可被配置为与芯片100一起发挥作用。

[0078] 芯片100可被再分为单独的区以用于在芯片的单独部分中加载多个样品,从而增加通量。图10显示了被配置为包括至少两个样品的芯片1000。分隔区1004将反应位点的第一阵列1006与反应位点的第二阵列1008隔开。可用这种方式加载芯片,以便第一液体样品被加载至第一阵列1006,而第二液体样品被加载至第二阵列1008。在一些实施方案中,第一

液体样品可为样品的一种稀释液,而第二液体样品可为样品的另一种稀释液。

[0079] 在其他实施方案中,可例如通过如图3A-3C或图8A-8B所示的盒子,将所述第一和第二液体样品加载至芯片100。采用根据本文描述的各种实施方案的盒子,可将所述液体样品加载至导液漏斗,从而将其加载至芯片上期望的阵列中。相比之下,芯片1002图示了根据各种实施方案的包含多个样品区的单个阵列的芯片。

[0080] 如上所述,导液漏斗308可具有形成槽形小井的结构,以便所述液体样品被容纳并与芯片100接触。

[0081] 如上所述,第二部分304可包括静止性容积312。静止性容积312是当盒子300处在封闭位置时容纳芯片的地方。在各种实施方案中,静止性容积312中可装有浸液。浸液也可称为包封介质。包封介质可为不与反应位点104中容纳的液体样品混合的不混溶的流体(例如液体或凝胶),并被配置用于防止或减少反应位点104中容纳的液体样品的蒸发。

[0082] 根据各种实施方案,所述包封介质可为聚二甲基硅氧烷(PDMS)。PDMS可为交联不足的,以充分包封芯片100的反应位点而不污染加载至反应位点的液体样品。

[0083] PDMS具有一些特性使其适合用于PCR。例如,PDMS具有很低的自发荧光、在PCR温度下对热稳定且对聚合过程无抑制作用。此外,PDMS可容纳含水样品,但可允许水蒸气透过。

[0084] PDMS可在交联不足下但被充分固化。在一个实例中,所述包封介质为添加有0.8wt%交联剂的PDMS。通常,充分交联的PDMS添加有10wt%的交联剂。其他合适的包封介质可为其他的PCR相容性粘弹性材料。

[0085] 通过PDMS的交联不足,其可作为合适的包封剂同时保留所有通常与完全交联的材料相关的属性。例如,PDMS可通过使用小于10%的量的交联剂而为交联不足。例如,交联水平小于或等于1%符合某些PCR应用如dPCR某些应用的一些设计需要。已采用以小于或等于0.8%的量的交联剂包封的平板100显示了多重dPCR响应。而且,由于交联不足的PDMS材料具有比Fluorinert更高的粘性,PDMS封装介质可为自身提供包装需要和客户工作流程解决方案。

[0086] 当芯片100通过样品和导液漏斗308的狭缝时,所述反应位点将被灌注样品并进入至静止性容积312。如果在插入芯片100以前,用封装介质填充静止性容积312,那么填充的反应位点暴露于空气的时间量以及样品的蒸发量被最小化。

[0087] 可用与生物反应相容如与PCR相容的一系列材料制造所述盒子。例如,与PCR相容时,该盒子可具有低的自发荧光、对PCR反应无抑制作用、对PCR的激发和检测波长光学透明和在PCR温度下热稳定。用于盒子的材料实例可为,但不限于,聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚环烯烃、环烯烃或其他这类聚合物材料。

[0088] 在一些实施方案中,静止性容积312位于所述盒子的囊(pocket)中。所述囊被配置用于在静止性容积312内容纳包封介质。

[0089] 在一些实施方案中,可在插入芯片100之前,将所述包封介质预装载至所述囊中。可将芯片100按压至预装的容积中,这期间其被包封介质所包封。在所述盒子封闭期间,组装第一部分302和第二部分304,并在静止性容积312内将芯片100包封在包封介质中,可通过第一部分302进一步压实垫圈308以形成密封的静止性容积312。

[0090] 在其他实施方案中,静止性容积312中的囊可为密封的且没有空气,从而当芯片100被推进静止性容积312中时,所述囊被打开。以这种方式,将无油法和盒子用于所述芯

片。

[0091] 在各种实施方案中,导液漏斗308可由聚二甲基硅酮或类似材料组成。在一些实施方案中,硅酮油也可包含在导液漏斗308中。例如,所述硅酮油可为PD5。采用该聚合物材料,硅酮油随时间从所述聚合物基质中缓慢释放出来。所述硅酮油可赋予导液漏斗308润滑性,从而芯片100更容易被推送而经过导液漏斗308。在这些实施方案中,导液漏斗308被配置用于将液体样品散布于芯片100上,以便在移动芯片100通过导液漏斗308时加载单个反应位点。此外,所述硅酮油可在芯片100被载入至盒子300中时对其进行包被,以减少或防止样品蒸发。在这些实施方案的一些中,由于包被硅酮油足以防止样品损失而可能不需要包封介质。

[0092] 根据各种实施方案,所述浸泡流体可为,但不限于,弹性体、聚合物或油。所述浸泡流体可有助于样品加载、减少其蒸发和防止产生气泡。盒子中的空气可能干扰例如样品的生物反应或成像误差。

[0093] 一些应用的浸泡流体实例为Fluorinert,由3M公司出售。然而,对于某些PCR应用来说Fluorinert可能存在问题,因为Fluorinert具有易于吸收空气的习性,这些空气随后会在PCR循环期间释放出来,导致形成不期望的气泡。

[0094] 图3B显示了在芯片静止性容积312内包含有芯片100的盒子。第一部分和第二部分处在封闭的位置。图3C是根据本文描述的各种实施方案的封闭盒子的另一透视图。

[0095] 图4显示了根据本文描述的各种实施方案,描述加载多个反应位点的方法400的流程图。在步骤402,将液体样品放入导液漏斗中。如图9A和9B所示,导液漏斗可为槽形以容纳液体样品。根据各种实施方案,所述导液漏斗可由疏水材料组成。

[0096] 在步骤404中,所述芯片被插入至导液漏斗,其中所述芯片包括如上所述的基底和多个反应位点。所述导液漏斗配置为在芯片经过导液漏斗时接触所述芯片。

[0097] 在步骤406中,使所述芯片经过导液漏斗以将液体样品加载至所述多个反应位点。接触导液漏斗有助于将所述液体样品加载至反应位点。如上文所述,当使用横向涂抹(sweeping)方式时,导液漏斗以足够克服表面的疏水/亲水特性的压力接触芯片。以这种方式,所述导液漏斗通过将过量的液体样品保留在导液漏斗中,也可减少可能残留在基底上的过量液体样品。

[0098] 根据本文描述的各种实施方案,对于加载芯片,将施用于所述芯片用于加载的液体样品的至少75%体积加载至所述多个反应位点。在一些实施方案中,将施用于所述芯片用于加载的液体样品的至少90%体积加载至所述多个反应位点。在各种实施方案中,施用于芯片的待加载的液体样品体积等于芯片上所述多个反应位点的总体积的体积。在一些实施方案中,用于加载芯片的液体样品体积为芯片上所述多个反应位点的总体积的体积减去一个反应位点的体积。

[0099] 此外,在各种实施方案中,所述反应位点和基底可包被有疏水材料或由其组成。以这种方式,反应位点的毛细管力是将液体样品加载至反应位点和将所述液体样品接纳在反应位点中的主要因素。

[0100] 在一些实施方案中,所述反应位点可包被有亲水材料或由组成,而基底可包被有疏水材料或由其组成。如此,结合由导液漏斗提供的力,液体样品的加载可能会更加有效。所述芯片可用各种包被方法来包被,如沉积法、等离子体、掩蔽法、转移印刷、网版印刷、合

模法等。包被方法和特性还描述于2012年11月7日递交的案件编号为LT00668PRO的临时申请,为所有目的将其并入本文。

[0101] 图8A和8B显示了根据本文描述的各种实施方案,用于加载包含反应位点阵列的芯片的盒子的另一实例。盒子802包括导液漏斗806和芯片静止性容积808。将芯片100插入至芯片静止性容积808。通过导液漏斗806促进芯片100的样品加载。如以上所述,可将浸泡流体或包封介质灌注于芯片静止性容积808中,以促进将样品蒸发、样品之间的串扰和气泡产生最小化。图8B显示了8B盒子处在芯片100被加载并位于芯片静止性区域808中的位置。在该盒子的实例中,盒子802的顶部和底部可移动部分被预先组装以减少与在关闭盒子和加载芯片100期间将所述顶部和底部滑动到一起有关的误差。盒子802可增加加载和包封芯片100的便利性。

[0102] 根据本文教导的各种实施方案,可使用其他方法加载芯片100中的多个反应位点104。例如,所述多个反应位点104可进行真空加载。例如,芯片可以存在于负压的盒子或材料中。通过使用填充有样品的针管刺破充满负压的盒子来加载所述多个反应位点,从而所述液体样品被从针管中吸出而进入反应位点。

[0103] 此外,根据一些实施方案,可通过离心力来加载所述芯片。例如,可将所述芯片安装到旋转盘上。所述盘的旋转会迫使样品通过芯片的通孔沉积在芯片上。

[0104] 另一示例性加载装置如图11所示。通过使用该装置,所述芯片的几次加载的加载动作可更加一致。采用该加载装置,用户可手工加载芯片。可选择地,所述加载装置可为自动化的。所述加载装置可包括芯片托架1102,其上可放置待加载的芯片。所述芯片托架可容纳在加载基座1104中。样品加载器1106可放置于样品加载器托架1108中。以这种方式,样品加载器1106被坚实地放置以加载所述芯片。如上所述,通过在所述芯片上横向移动所述样品加载器托架1108,所述样品加载器将在芯片上方推动样品体积并加载反应位点。

[0105] 在各种实施方案中,用户可将液体样品放置于芯片上。然后,用户可握住所述样品加载器并在芯片上方横向移动样品加载器,以将液体样品加载至反应位点。对于手动和自动的加载方法,当所述样品加载器在芯片上方横向移动以加载反应位点时可处在与芯片成0-90度角的位置。

[0106] 应认识到,根据本文描述的各种实施方案,样品加载器可由各种材料组成。例如,样品加载器可由聚烯烃、聚氨酯、硅氧烷等组成。在一些实施方案中,所述样品加载器可由低密度聚乙烯Dow 722组成。然而,应认识到,能在样品加载器材料和液体样品之间产生5-179度水接触角的任何材料均可作为样品加载器的可接受材料。

[0107] 根据本文教导的各种实施方案,液体样品特性、样品加载器材料特性和样品加载器的物理几何形状,以及反应位点的物理特性和反应位点以及芯片表面的疏水/亲水特性均为相互作用的,且必须作为用于加载样品的装置的完整系统来考虑。

[0108] 从样品加载器进行液体样品散布取决于液体样品的水接触角。所述水接触角由样品加载器的材料特性和液体样品特性之间的关系造成。当水接触角小于90度时,液体样品和基底表面之间的关系为亲水性的,且样品展现出与基底表面紧密结合的相互作用,其对于毛细管作用将样品牵引至通孔中是必需的。过于亲水的基底,例如水接触角小于50度,会导致例如过量液体样品在基底表面的增加的积聚或低效的反应位点加载。而且,低接触角会导致液体样品过快移动至一些反应位点,引起液体样品在所述多个反应位点中分配不

均。

[0109] 相反,当水接触角大于90度时,基底表面和液体样品之间的关系为疏水性的,且液体样品不会移至反应位点,因为毛细管作用力为负(negative)的。这种情况也会导致液体样品在基底表面的积聚,并阻止将液体样品加载至一些反应位点。如此,基底和反应位点的表面被设计为平衡基底和反应位点表面针对液体样品的疏水性和亲水性。

[0110] 根据各种实施方案,考虑到这些特性,通过将样品加载器配置为使得与液体样品的前进接触角类似于与液体样品的后退接触角,可实现有效的加载。参照图20,所示为前进和后退接触角。水滴2002显示于基底2000上。如果基底倾斜,水滴2002将具有前进接触角2006和后退接触角2004。

[0111] 根据各种实施方案,所述前进接触角为 85 ± 15 度,而所述后退接触角为 85 ± 15 度。

[0112] 样品加载器对于芯片的向下力可取决于材料类型、样品加载器厚度以及芯片厚度和材料。然而,所述向下力的范围可为接触芯片的力至打破芯片所需的力(硅的厚度应作为考虑的因素)。此外,在各种实施方案中,样品加载器在所述芯片上的涂抹速率可为2.0秒/mm至0.2秒/mm。

[0113] 在如图12所示的加载装置的另一示例性实施方案中,双样品加载器1208可用于加载。该加载装置可包括如图11所示的芯片托架1202、加载底座1204和样品加载器托架1208。芯片托架1402容纳待加载的芯片。芯片托架1202可被容纳于加载底座1204中。样品加载器托架1208可容纳所述双样品加载器1206。在一些实施方案中,用户可手动推进样品加载器托架1208横向经过芯片托架1202中的芯片。在其他实施方案中,样品加载器托架1208的移动可通过使用电机来自动化。

[0114] 双样品加载器1206可增加加载至所述多个反应位点的样品体积。在各种实施方案中,可将待加载的样品体积放置于双样品加载器1206的两个样品加载器之间。以这种方式,双样品加载器1206中的每个样品加载器有助于引导待加载于芯片上的样品体积将所述样品体积加载至多个反应位点。

[0115] 如上所述,用双样品加载器加载样品体积可将至少75%的放置于芯片上的样品体积加载至反应位点内。在其他实施方案中,用双样品加载器加载样品体积可将至少90%的放置于芯片上的样品体积加载至反应位点内。在其他实施方案中,用双样品加载器加载样品体积可将100%的放置于芯片上的样品体积加载至反应位点内。

[0116] 图13显示了根据本文描述的各种实施方案的另一样品加载器1300。样品加载器1300可包括第一刮片1302和第二刮片1304。样品加载器1300还可包括接入口1306,可将待加载至容纳于基底中的反应位点阵列如芯片的液体样品放置于此。可将放置于接入口1306的液体样品存放于第一刮片1302和第二刮片1304之间的储液器1308内,直到样品被加载至反应位点。所述液体样品可在流道1310内流动至样品加载器1300尖端的流道末端而被分配。

[0117] 如上所述,根据一些实施方案,样品加载器1300可由用户手握,以手动加载反应位点。在其他实施方案中,样品加载器1300可被安装在加载装置中并被用于加载反应位点。

[0118] 第一刮片1302和第二刮片1304被配置为彼此呈锥形,以便所述液体样品沿着第一刮片1302和第二刮片1304的宽度边缘湿润。以这种方式,可在芯片表面上均匀分配所述液

体样品,以便在挥动样品加载器1300跨越芯片时,液体样品被有效地加载至反应位点。

[0119] 参照图21,显示了根据本文描述的各种实施方案,通过样品加载器加载反应位点。待加载至反应位点104的液体样品2104在样品加载器2102内。将样品加载器2102横向移动跨越表面106。当其移动时,通过毛细管作用将液体样品2104加载至反应位点104。

[0120] 图14A显示了样品加载器1300的侧视图。在该视图中显示了储液器1308。如以上所述,当将液体样品放于样品加载器1300中时,所述液体可被存放于储液器1308直到所述液体样品被加载至反应位点。可存放于储液器1308的液体样品体积可为10-20 μ L。在其他实施方案中,加载至反应位点的液体样品体积可为0.5-100 μ L。在另外的其他实施方案中,加载至反应位点的液体样品体积可大于100 μ L。如以上所述,加载至反应位点的液体样品体积可取决于例如样品加载器材料的特性、液体样品的特性以及样品加载器和液体样品之间的关系。

[0121] 图14B显示了样品加载器1300的第一刮片1302和第二刮片1304的放大视图。显示了第一刮片1302和第二刮片1304之间的锥形。在各种实施方案中,锥角可为0.1-15度。在一些实施方案中,锥角可为1.5-2度。在各种实施方案中,锥形可使得尖端第一刮片1302和第二刮片1304之间的距离为0.5-100 μ m。在一些实施方案中,第一刮片1302和第二刮片1304之间的距离可为100 μ m至2mm。

[0122] 而且,根据各种实施方案,样品加载器1300的尖端可以65+/-3度的角度接触芯片。根据各种实施方案,当接触芯片时,样品加载器1300的尖端可偏斜0-0.004英寸。另外,样品加载器1300跨越芯片的涂抹动作可为直线移动。换句话说,使其倾斜、起伏或偏离最小化。涂布器1300可以例如2-3mm/秒的速率移动而跨越芯片。

[0123] 图15显示了根据本文描述的各种实施方案的另一样品加载器1500。如图16所示,样品加载器1500可连接至加载装置。类似于图13,样品加载器1500也可具有第一刮片1502和第二刮片1504。同样类似于图13,可将待加载至反应位点的液体样品放置于接入口1508。液体样品可经流道1512流向样品加载器1500的尖端。通过第一刮片1502和第二刮片1504形成流道1512。

[0124] 示例性加载装置1600如图16所示。加载装置1600包括安装于样品加载器托架1606上的样品加载器1604。样品加载器托架1606和样品加载器1604组件被配置用于将液体样品加载至包含反应位点阵列的芯片1602。在各种实施方案中,样品加载器托架1606可手动移动,从而将样品加载器1604横向移动跨越芯片1602来将液体样品放置于芯片1602,如此,加载芯片1602内的反应位点。在其他实施方案中,可通过控制系统机械控制样品加载器托架以在芯片1602上移动样品加载器1604。

[0125] 如参照图4所描述的,在一些实施方案中,可加热芯片以促进过量液体样品的去除。去除过量液体样品可有助于降低反应位点之间的交叉污染或桥连。在各种实施方案中,可调节其他环境因素如相对湿度以有助于将液体样品加载至反应位点。

[0126] 图17显示了根据本文教导的各种实施方案的另一加载装置1700。加载装置1700包括加载芯片1704上的反应位点的组件和将芯片密封于盒子中的组件,从而将芯片1704包被以防止污染且便于处理芯片1704。加载装置1700包括芯片底座1702,其被配置为可将芯片1704放置于芯片底座1702上。因而,芯片1704所处的位置使得样品加载器1708可将液体样品放置于容纳在芯片1704内的反应位点。样品加载器1708通过样品加载器连接器1706来安

装。样品加载器连接器1706可为夹子,其被配置为将样品加载器1708夹持在能接触芯片1704的位置。使用一次或多次以后,可能需要更换样品加载器1708以防止样品污染。

[0127] 样品加载器连接器1706与机械壳体1710结合。机械壳体1710可包裹有用于移动样品加载器1708跨越芯片1704以将液体样品加载至反应位点的机械。包裹于机械壳体1710内的机械可包括弹簧和齿轮,其被配置用于放置样品加载器1708以接触芯片1704并横向移动样品加载器1708跨越芯片104。在一些实施方案中,启动杠杆1712可将样品加载器1708定位于起始位置以开始加载。根据各种实施方案,启动控制杆释放按钮1714,从而开始移动样品加载器1708跨越芯片以开始加载液体样品。当释放控制杆1712后,所述机械被配置用于移动样品加载器1708跨越芯片1704。将液体样品加载至反应位点的实例如图18A-18C所示。

[0128] 加载装置1700还可包括包含与巢(nest)1716结合的臂1718的组件。巢1716被配置用于容纳盖子1720以密封芯片1704。机械壳体1710内的机械将移动臂1718,从而使得加载后盖子1720覆盖芯片1704。覆盖芯片1704的方法如图19A-19B所示。

[0129] 如上所述,图18A-18C显示了使样品加载器1708移动而跨越芯片1704以加载包含于芯片1704内的反应位点阵列的过程。为开始该加载过程,如图18A所示,将样品加载器1708定位,使其与芯片1704的一端接触。将液体样品放置于样品加载器1708中。如图18B所示,启动容纳于机械壳体1710中的加载机械,并使样品加载器1708移动而跨越芯片1704。如图18C所示,一旦样品加载器已经移动而跨越了芯片1704而将所述液体样品放至反应位点,即提升样品加载器1708以脱离芯片1704。在各种实施方案中,可一次完成加载液体样品的加载方法。在其他实施方案中,图18A-18C的加载方法可重复两次以确保将液体样品基本上完全加载至反应位点。在其他实施方案中,如图18A-18C所示的加载方法可多次完成。

[0130] 根据各种实施方案,样品加载器1708的尖端可以 65 ± 3 度的角度接触芯片。根据各种实施方案,当接触芯片时样品加载器1708的尖端可偏斜0-.004英寸。另外,样品加载器1708跨越芯片的涂抹动作可为直线移动。换句话说,使其倾斜、起伏或偏离最小化。样品加载器1708可以例如2-3mm/秒的速率移动而跨越芯片。然而,也可能以其他速率移动样品加载器1708而加载反应位点。而且,在各种实施方案中,样品加载器1708可在反应位点上方移动超过一次,以继续加载更多反应位点。

[0131] 图19A-19B显示了定位盖子1720和用盖子1720密封芯片1704。图19A显示了臂1718向芯片1704移动。图19B显示了臂1718和巢1716的组件,包括盖子1720,其接触芯片下的底座(未示出),以密封在由底座和盖子1720组成的盒子中的芯片1704。臂1718提供足够的向下力以使盖子1720覆盖在芯片1704上。盖子1720可通过例如条带或搭扣结合至底座来包裹芯片1704。当使用搭扣时,在一些实施方案中,臂1718可传递足够的力至搭扣以将盖子1720覆盖在底座上。

[0132] 如以上所述,加载装置1700可包括加热元件以加热芯片而有助于去除没有加载至反应位点的过量液体样品。在各种实施方案中,加热元件可被容纳在芯片底座中。去除过量液体样品可减少反应位点之间的交叉污染和桥连。

[0133] 如上所述,可使用的根据各种实施方案的仪器为,但不限于聚合酶链式反应(PCR)仪。图20的方框图显示了可用于实施本文教导的实施方案的PCR仪2000。PCR仪2000可包括加热的盖子2010,其覆盖在容纳于样品支架装置(未示出)中的多个样品2012上。在各种实施方案中,样品支架装置可为具有多个反应位点的芯片、物件、基底或者玻璃或塑料滑片,

所述反应位点具有在反应位点和加热的盖子2010之间的盖。样品支架装置的一些实例可包括但不限于,多孔板如标准微量滴定的96孔、384孔板或缩微卡或基本上为平面的支架如玻璃或塑料滑片。在各种实施方案中,所述反应位点可包括凹陷、凹口、脊和它们的组合,其在基底表面上形成规则或不规则阵列的图案。

[0134] 一旦液体样品体积被加载至所述多个反应位点,就可在反应位点中启动生物反应。在各种实施方案中,所述生物反应可为PCR反应。如此,所述芯片可在PCR仪上进行热循环。

[0135] PCR仪的各种实施方案包括样品区块2014、用于加热和冷却的元件2016、热交换器2018、控制系统2020和用户界面2022。根据本文教导的热区块组件的各种实施方案包括图20的PCR仪2000的部件2014-2018。

[0136] 在配置用于某种样品支架的仪器中,可提供适配器以便PCR仪2000可使用根据各种实施方案的芯片100。所述适配器被配置为允许有效地将热传递至芯片100内的样品。

[0137] 对于图20中PCR仪2000的实施方案,可使用控制系统2020来控制检测系统、加热盖和热区块组件的功能。控制系统2020可通过图20中的PCR仪2000的用户界面2022为终端用户接近。同样,计算机系统(未示出)可用于提供对图20中PCR仪2000功能和用户界面功能的控制。此外,计算机系统可提供数据处理、显示和报告制作功能。所有这些仪器控制功能均可局部地专用于PCR仪,或者计算机系统可提供部分或所有的控制、分析和报告功能的远程控制,其将在随后详细讨论。

[0138] 为了说明和描述的目的,提供了以下本教导不同实施的描述。其为非穷举性的且并非将本教导限制在公开的具体形式。基于以上教导可进行各种修饰和改变,或者通过对本教导的实施可获得各种修饰和改变。此外,已描述的实施例包括软件,但本教导可结合硬件和软件实施或者仅在硬件中实施。本教导可在面向对象的和非面向对象的程序系统中实施。

[0139] 用于涉及本文件中描述的各种实施方案的方法的示例性系统包括以下美国临时专利申请中所描述的那些:

[0140] • 2012年3月16日递交的美国临时专利申请第61/612,087号;和

[0141] • 2012年11月7日递交的美国临时专利申请第61/723,759号;和

[0142] • 2012年3月16日递交的美国临时专利申请第61/612,005号;和

[0143] • 2012年3月16日递交的美国临时专利申请第61/612,008号;和

[0144] • 2012年11月7日递交的美国临时专利申请第61/723,658号;和

[0145] • 2012年11月7日递交的美国临时专利申请第61/723,738号;和

[0146] • 2012年6月13日递交的美国临时专利申请第61/659,029号;和

[0147] • 2012年11月7日递交的美国临时专利申请第61/723,710号;和

[0148] • 2013年3月7日递交的美国临时专利申请第61/774,499号;和

[0149] • 2013年3月15日递交的生命技术公司(Life Technologies)案件编号LT00655PCT;和

[0150] • 2013年3月15日递交的生命技术公司案件编号LT00656PCT;和

[0151] • 2013年3月15日递交的生命技术公司案件编号LT00657PCT;和

[0152] • 2013年3月15日递交的生命技术公司案件编号LT00668PCT;和

[0153] • 2013年3月15日递交的生命技术公司案件编号LT00699PCT。

[0154] 所有这些申请也通过引用整体并入本文。

[0155] 尽管针对某些示例性实施方案、实例和应用描述了各种实施方案,对本领域技术人员来说显而易见的是,可在不背离本教导下进行各种修饰和改变。

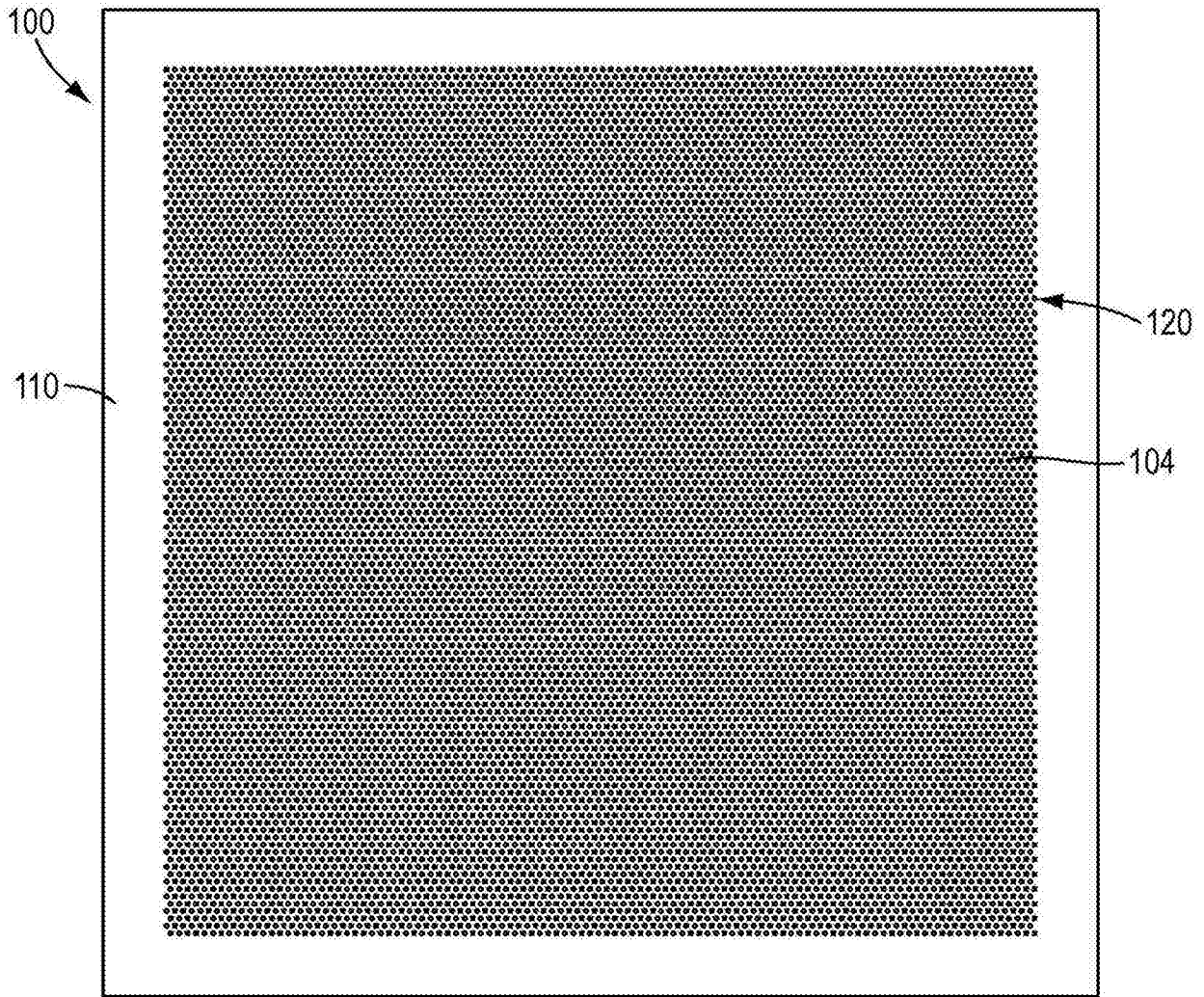


图1A

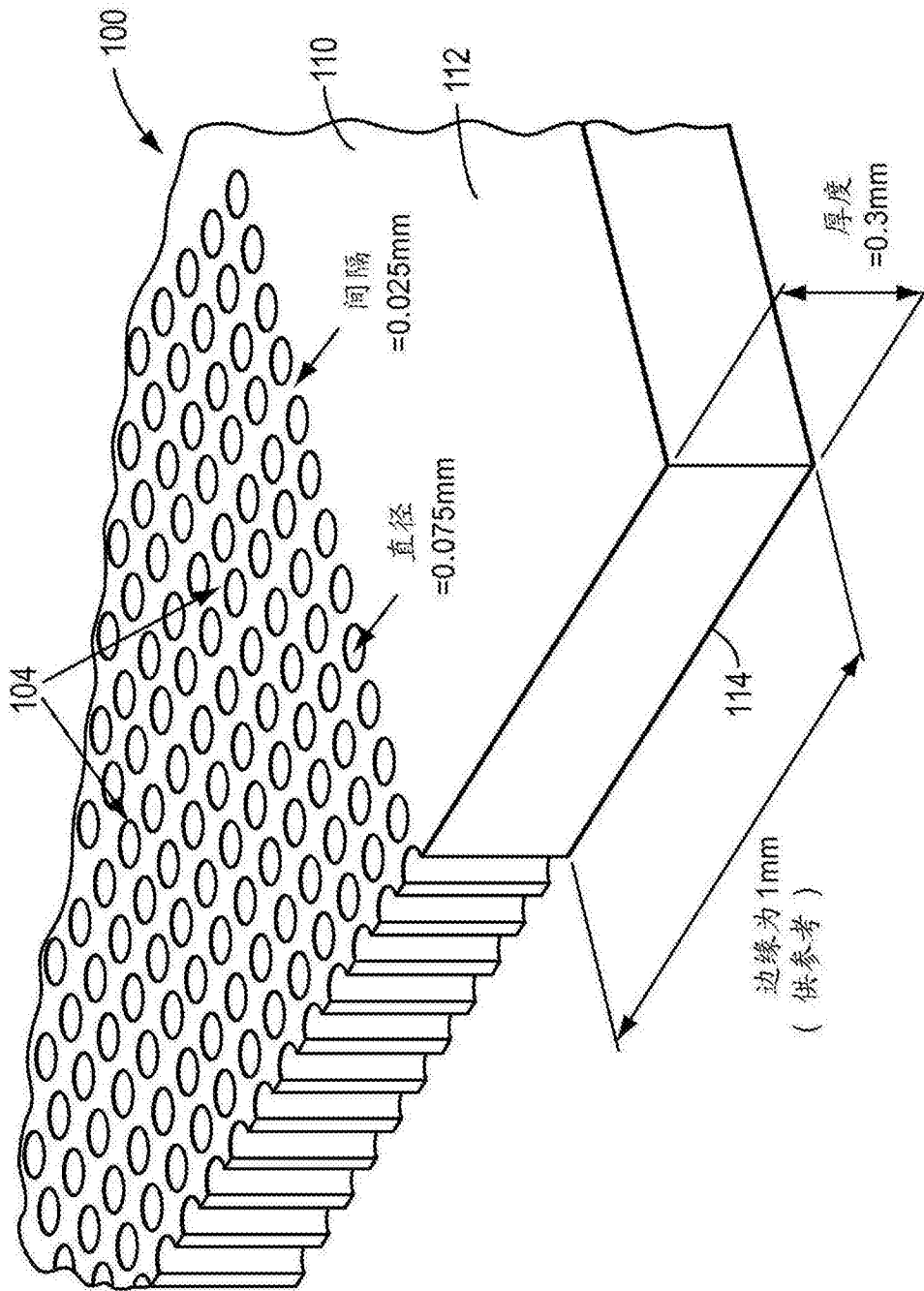


图1B

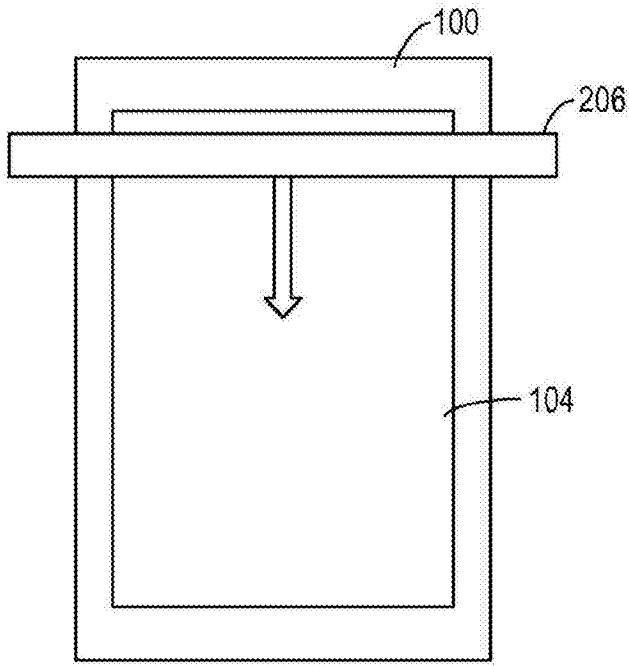


图2

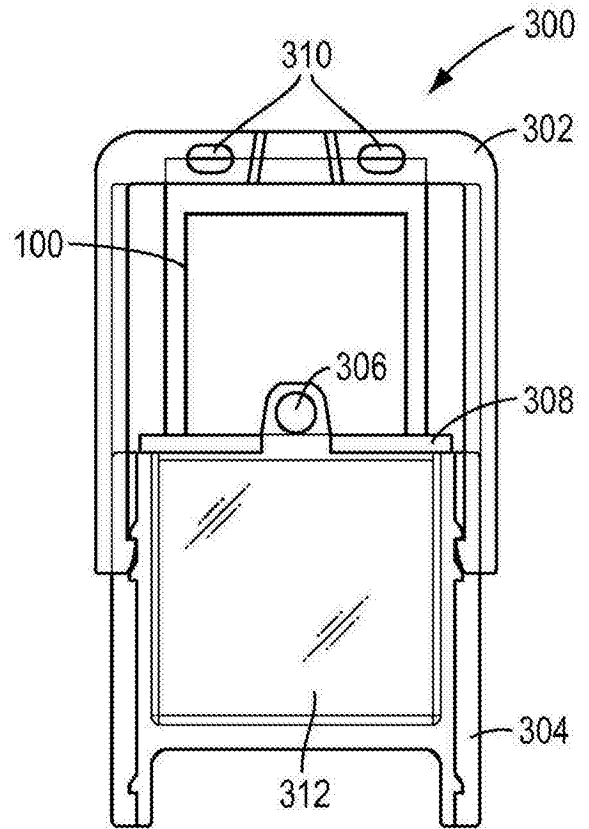


图3A

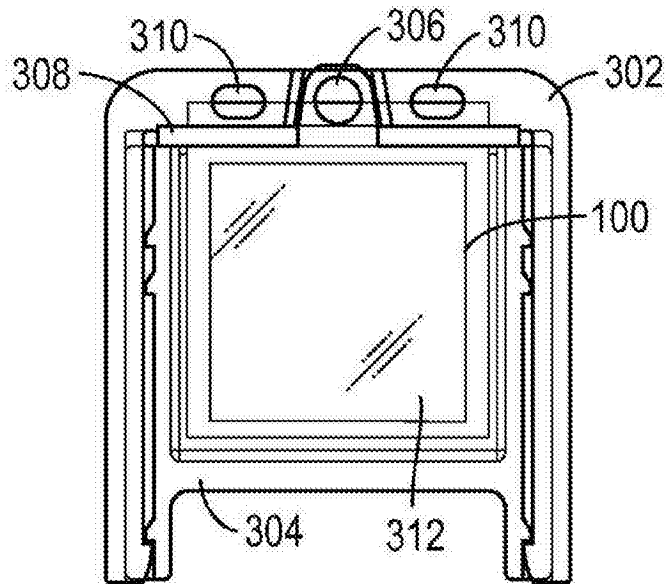


图3B

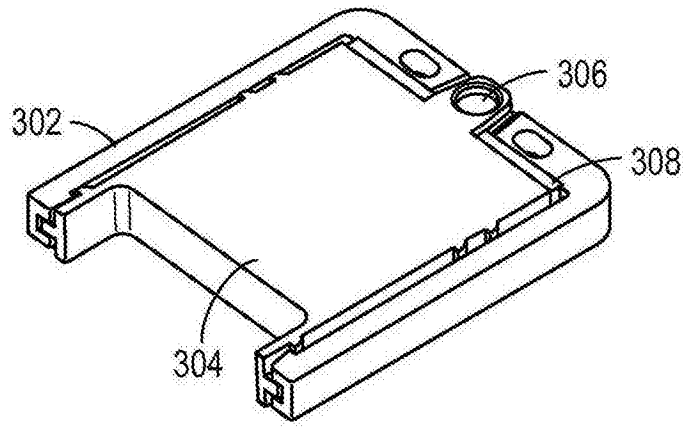


图3C

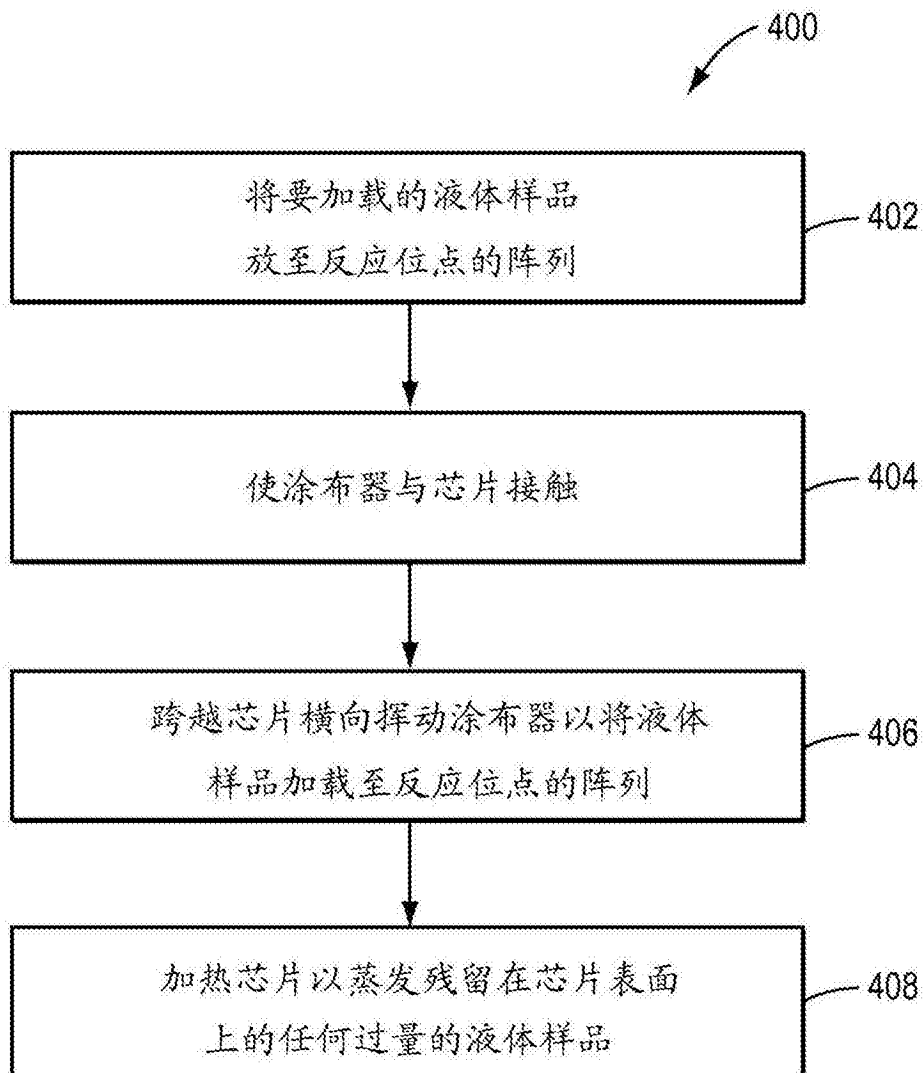


图4

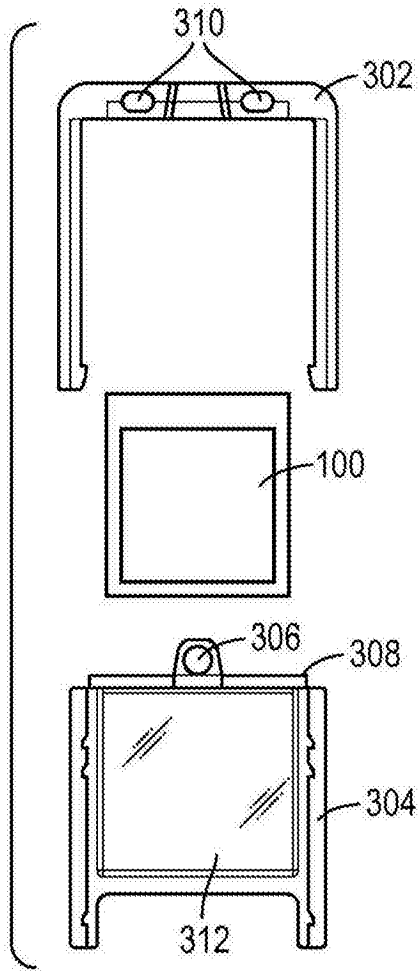


图5A

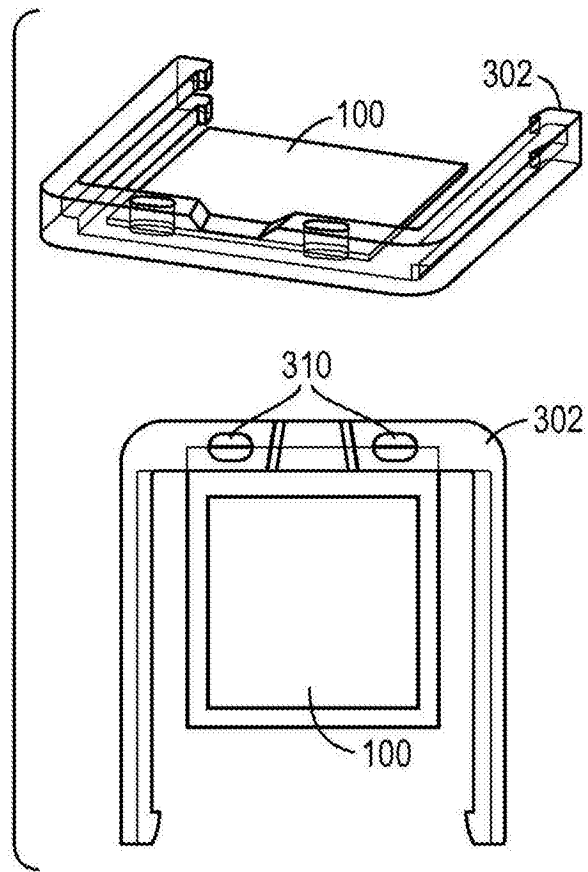


图5B

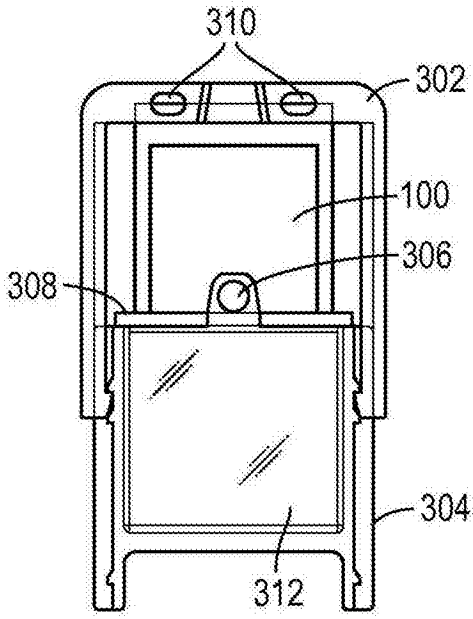


图5C

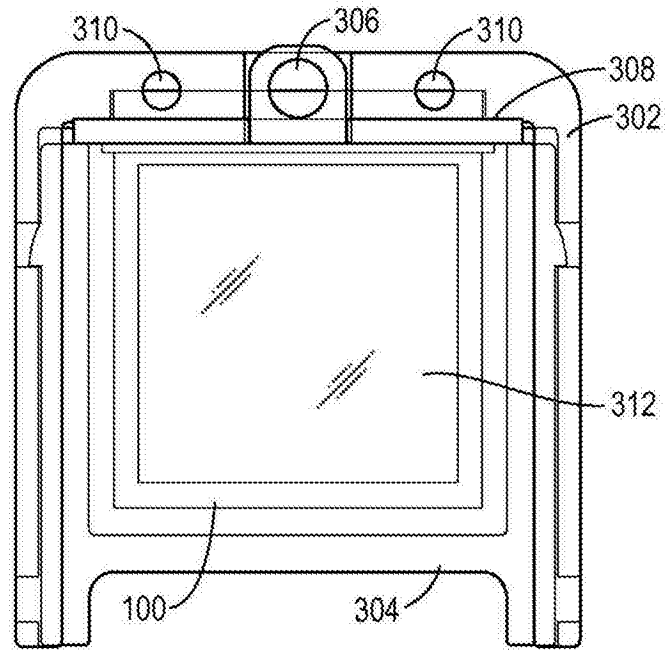


图6

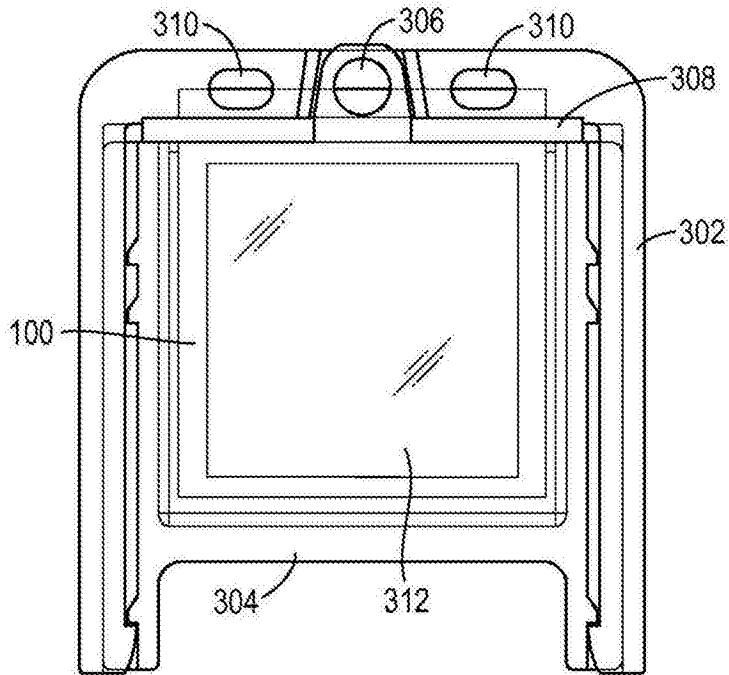


图7

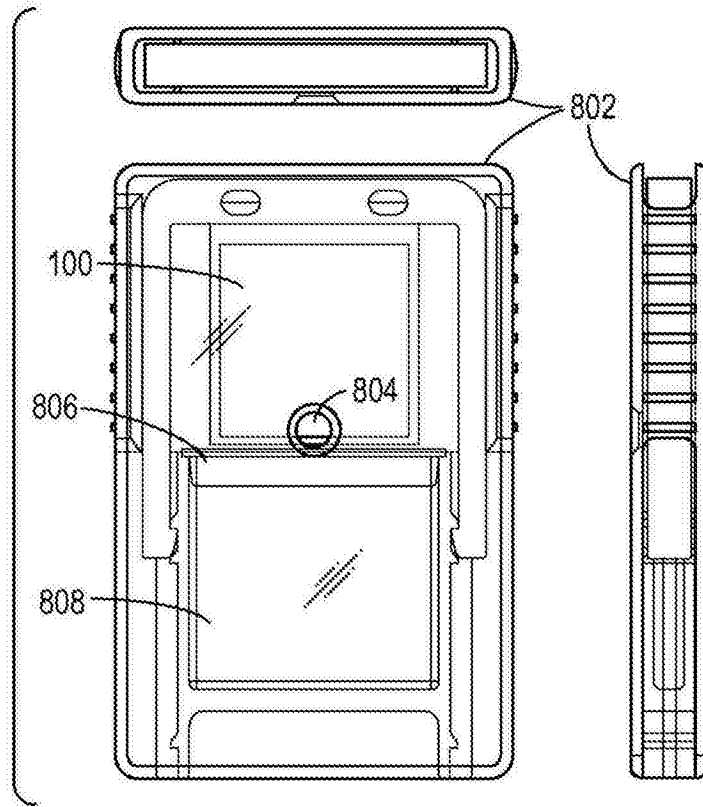


图8A

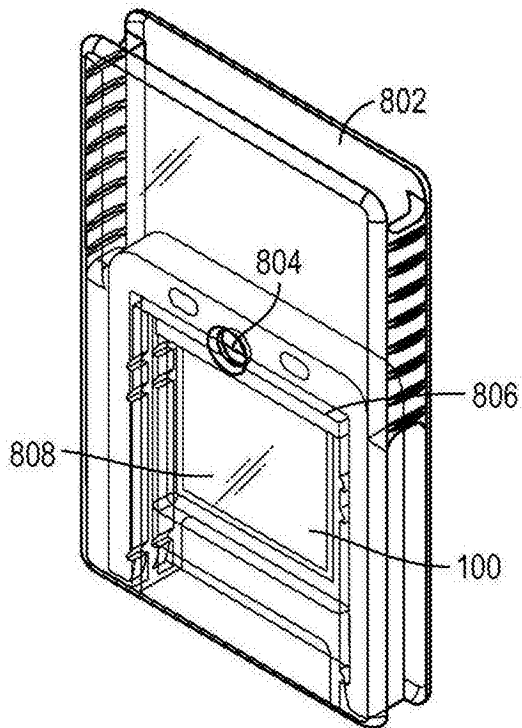


图8B

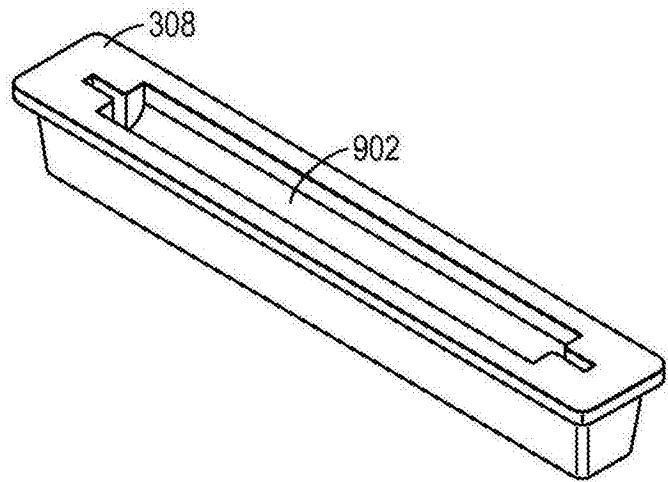


图9A

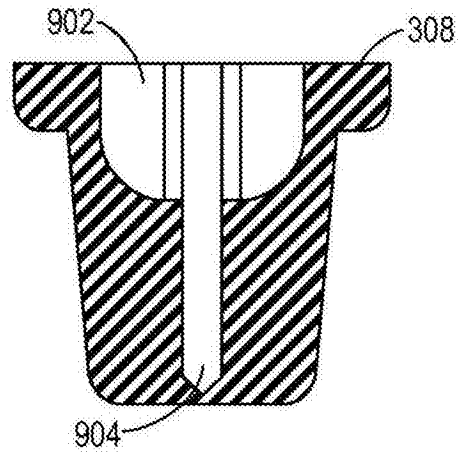


图9B

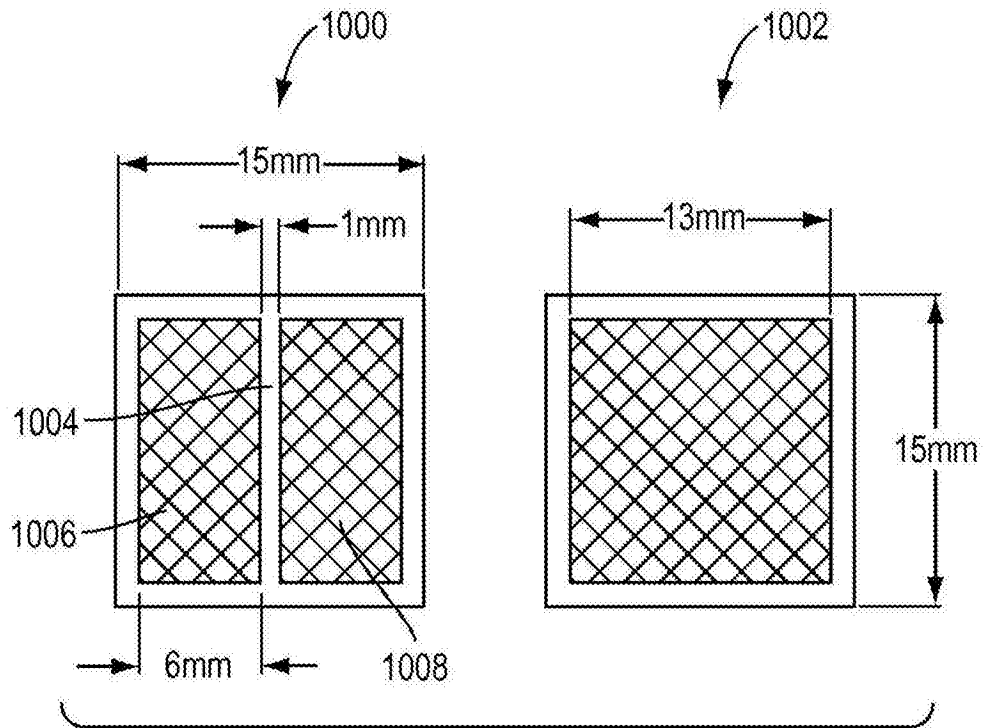


图10

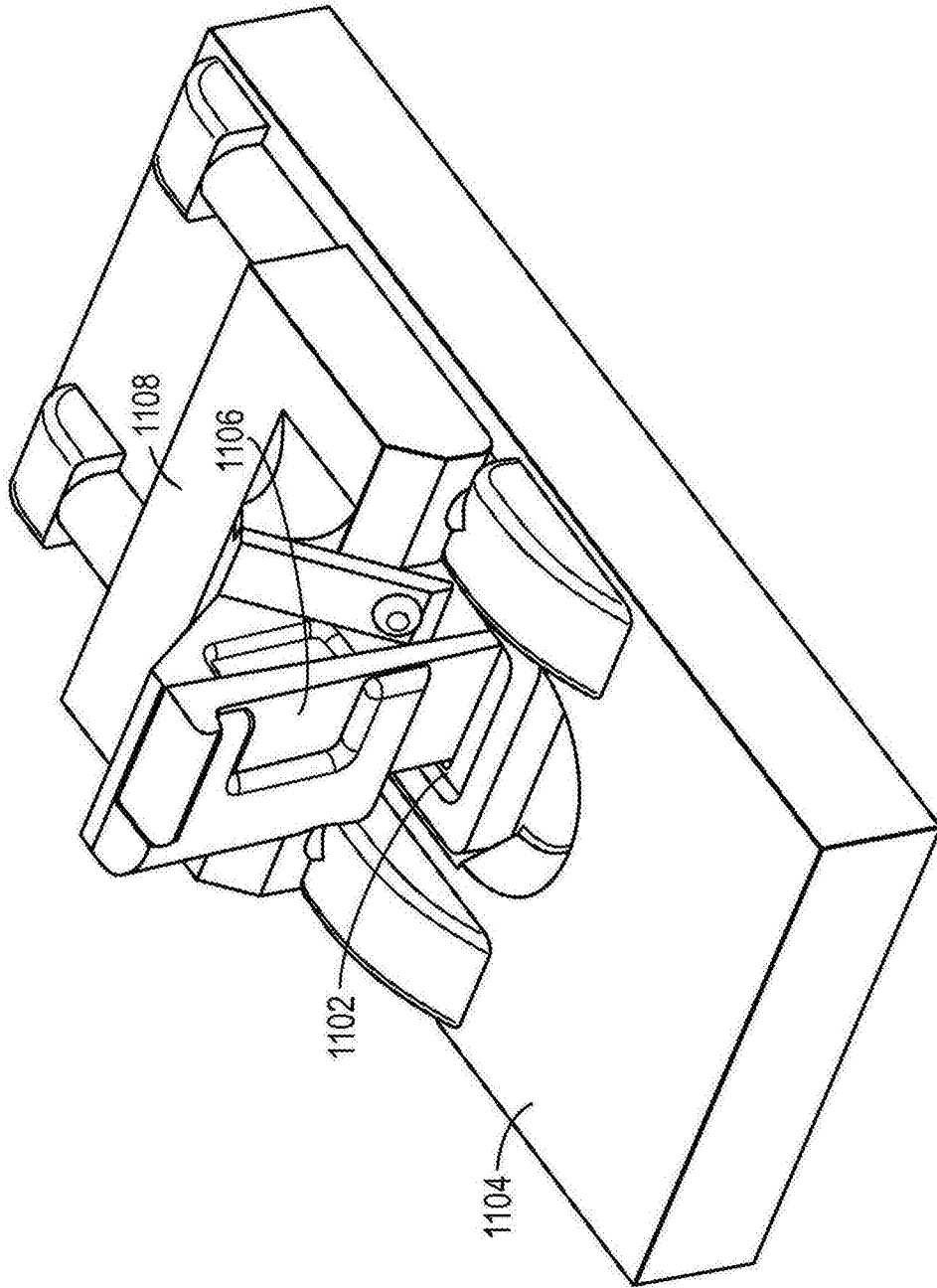


图11

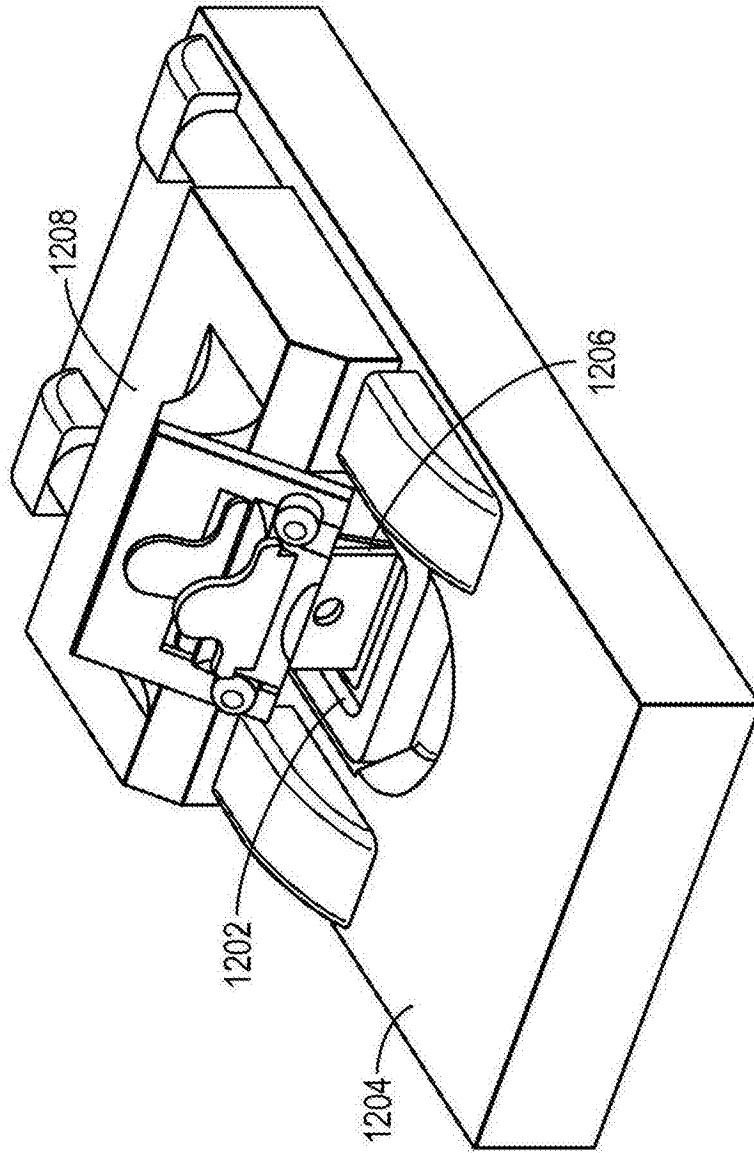


图12

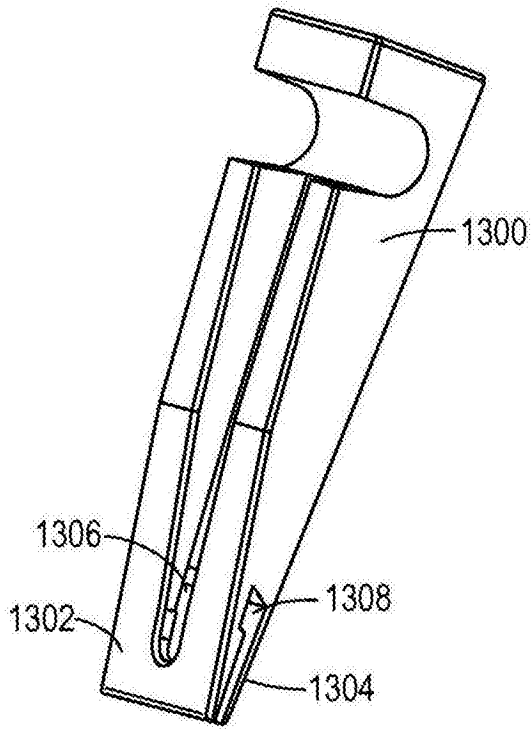


图13



图14A

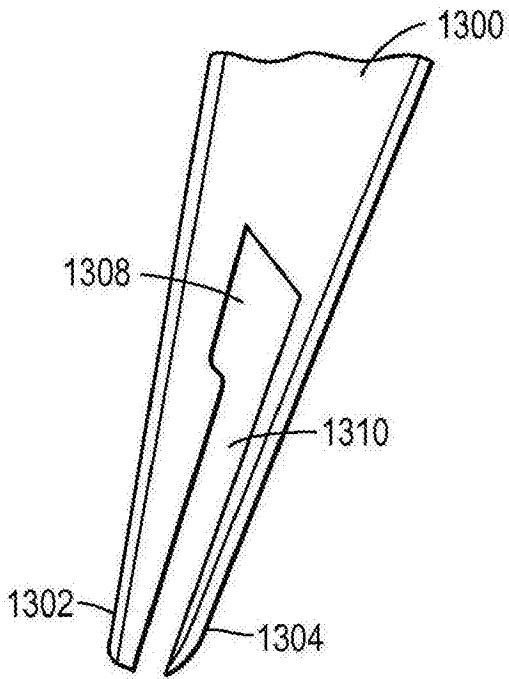


图14B

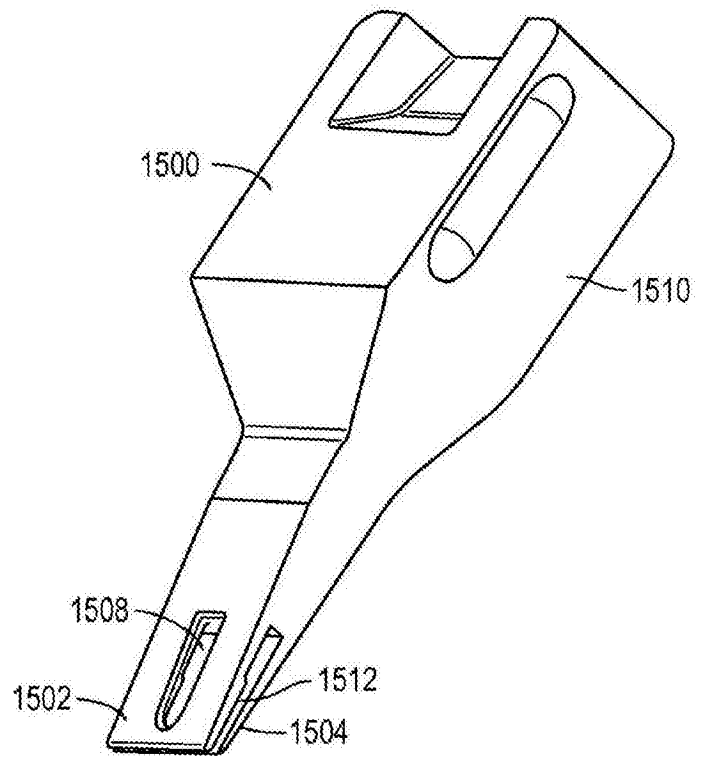


图15

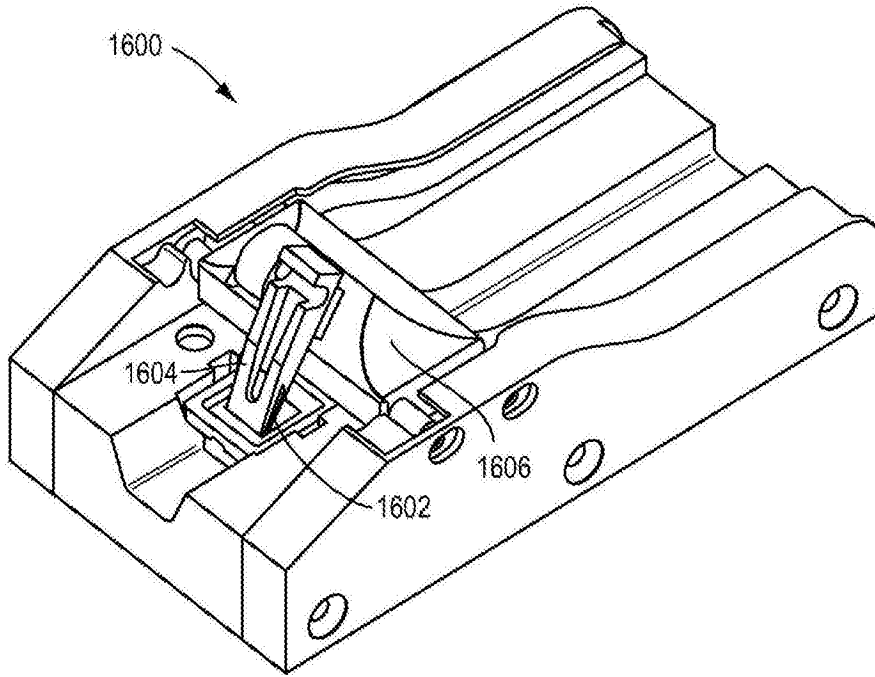


图16

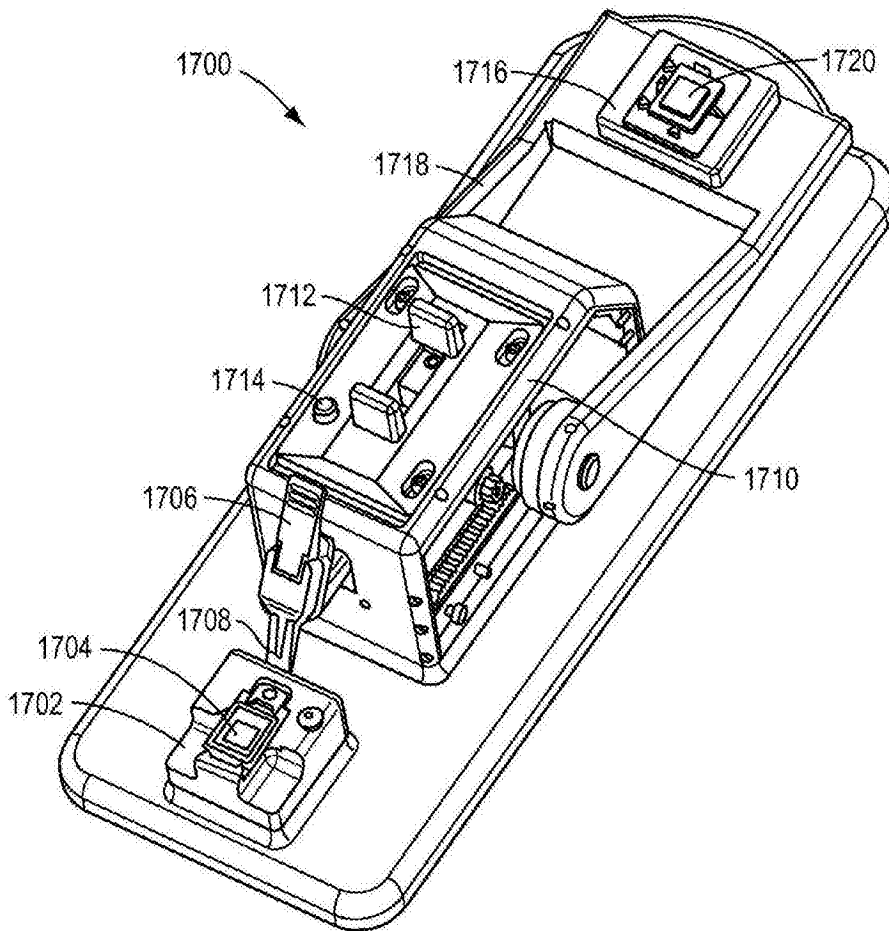


图17

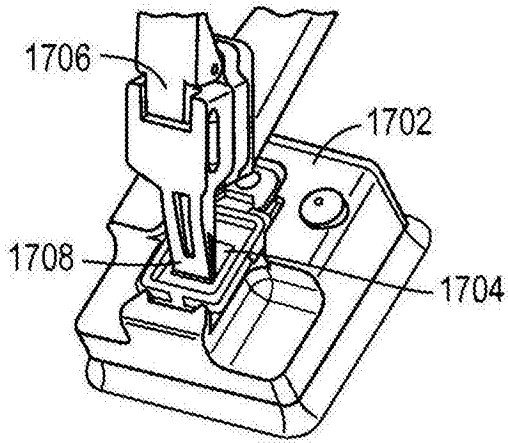


图 18A

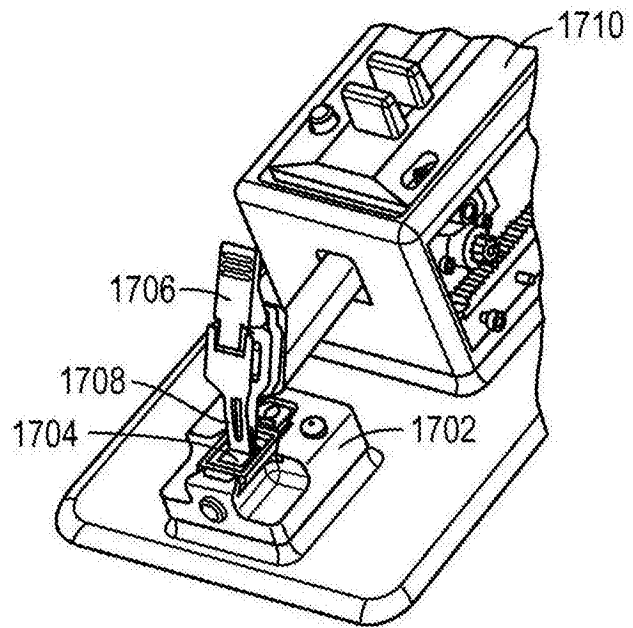


图 18B

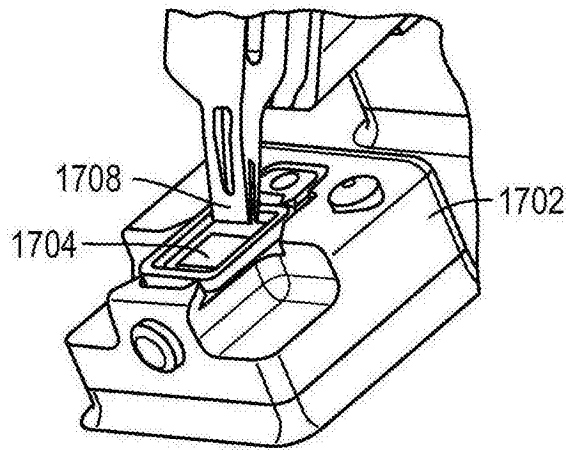


图18C

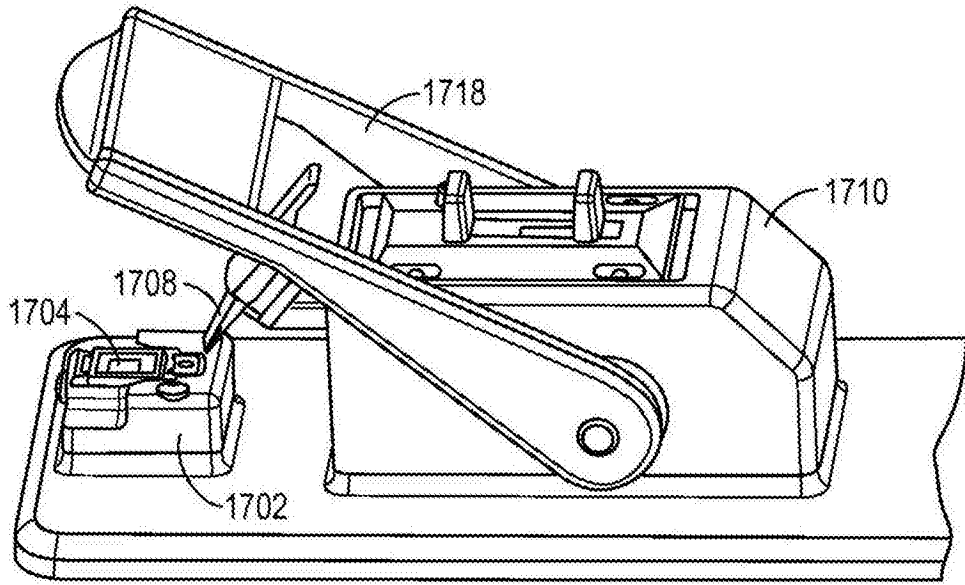


图19A

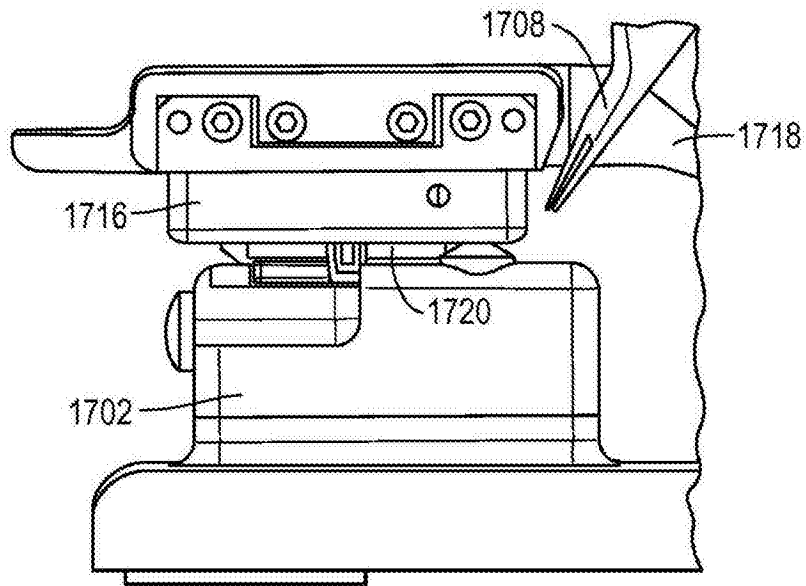


图19B

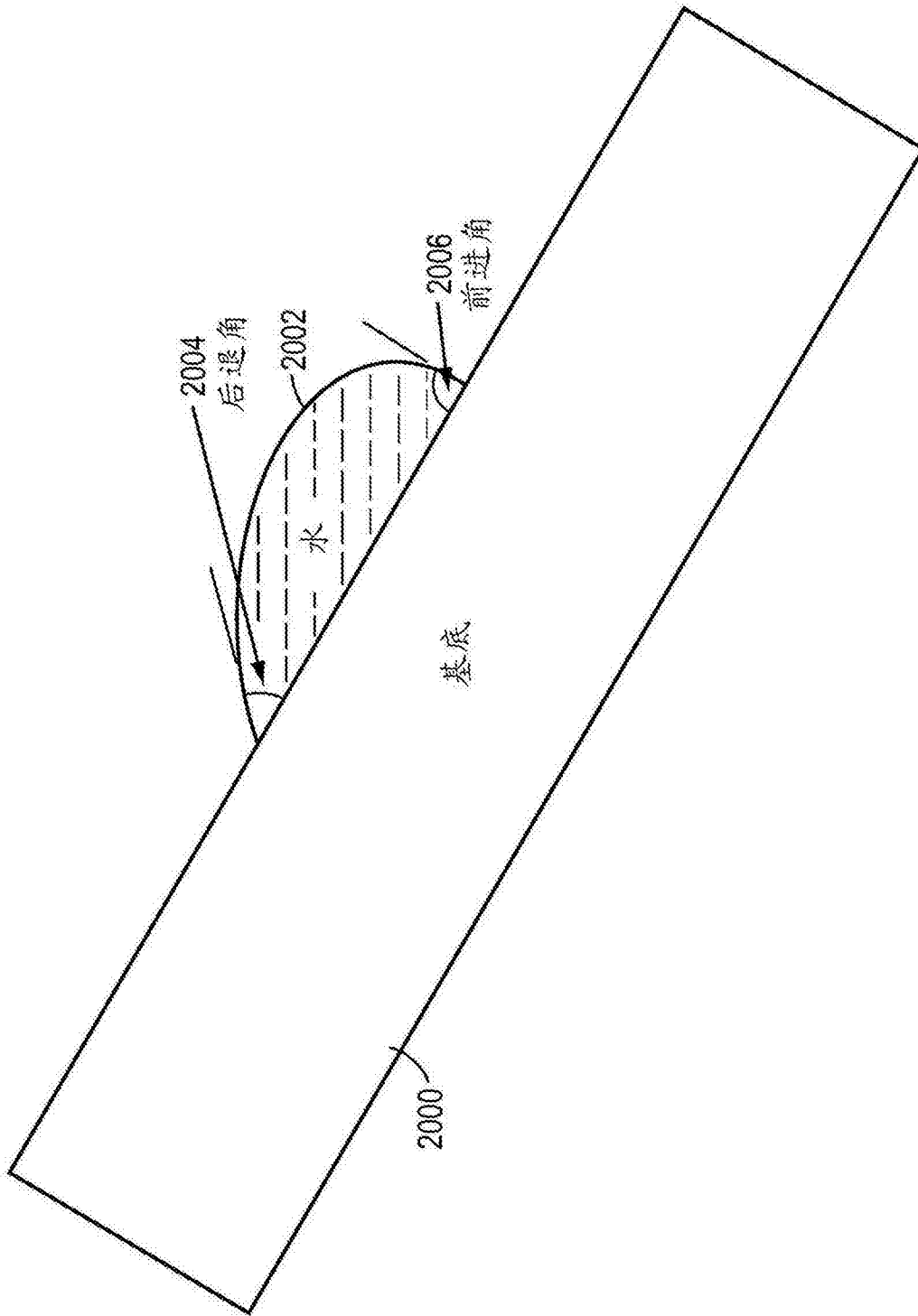


图20

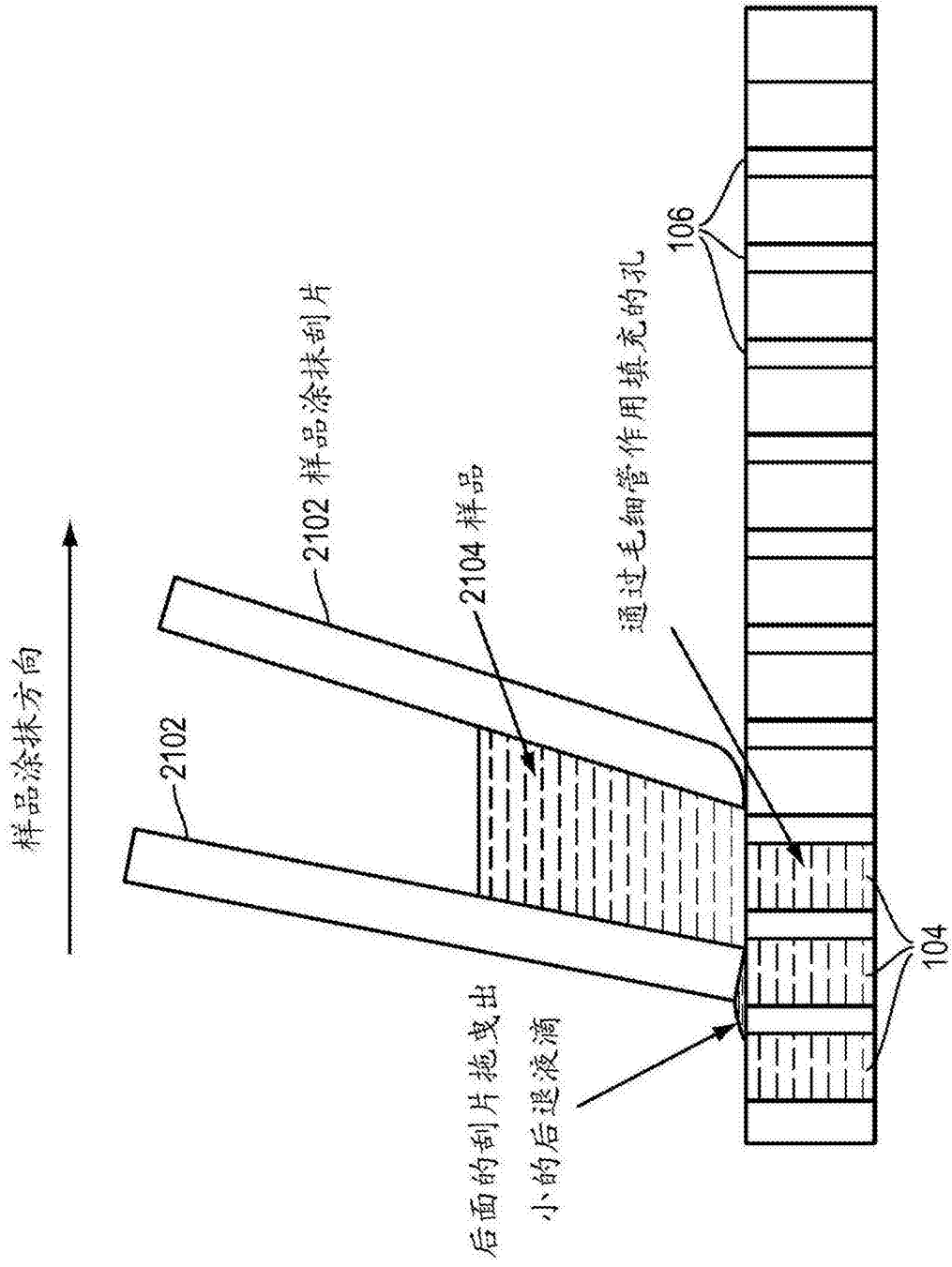


图21

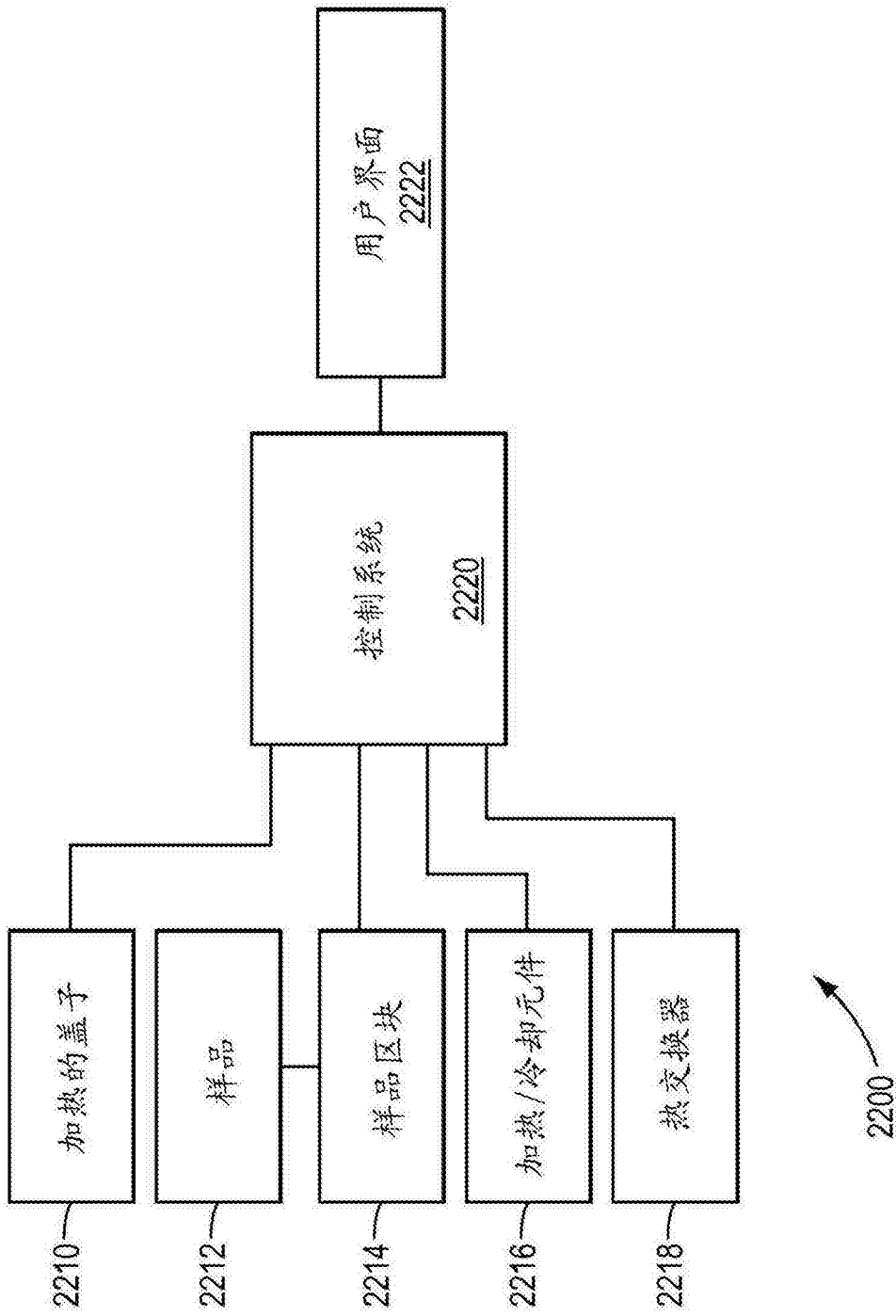


图22

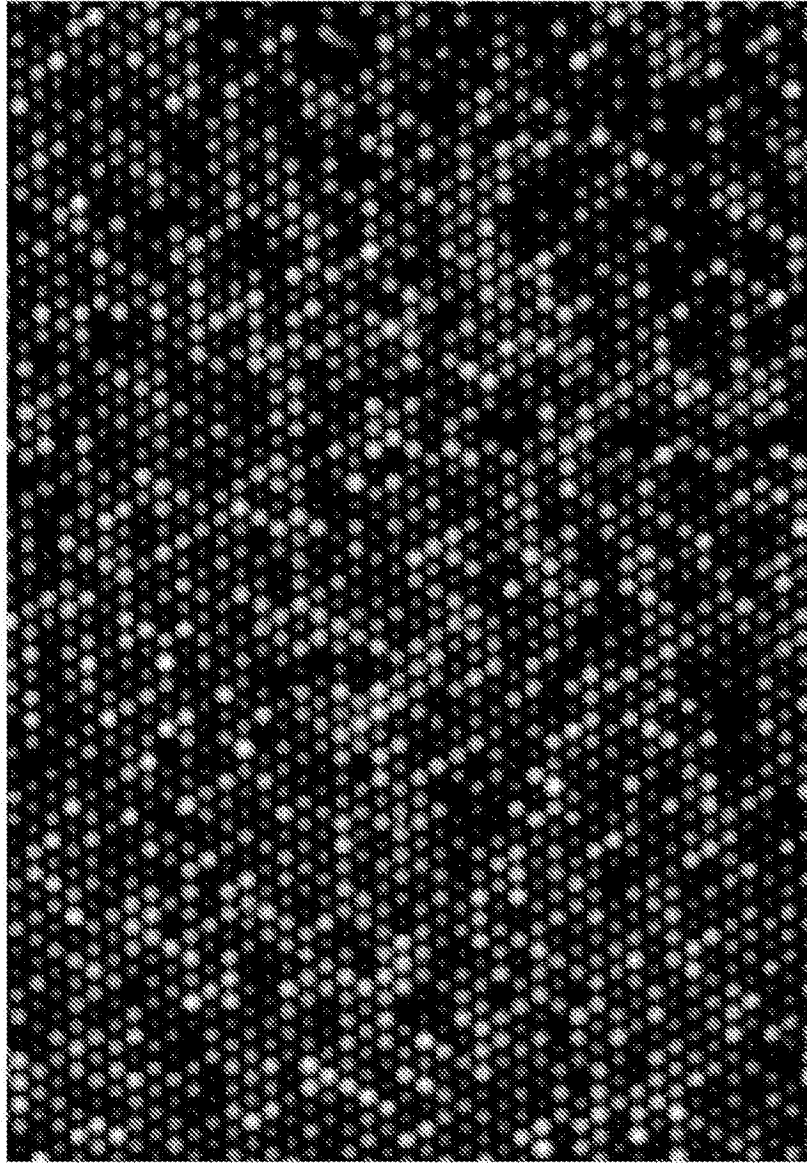


图23