



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108603878 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201680081351.7

V·L·S·库尔兹 G·G·拉维厄

(22)申请日 2016.12.07

汪晓华 阿隆凡·卡卢那卡兰

(30)优先权数据

62/264,665 2015.12.08 US

62/333,821 2016.05.09 US

62/418,625 2016.11.07 US

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003

代理人 石海霞 金鹏

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.08.08

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

B01L 3/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/065426 2016.12.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/100347 EN 2017.06.15

(71)申请人 伯克利之光生命科技公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 K·G·博蒙特 P·J·比米勒

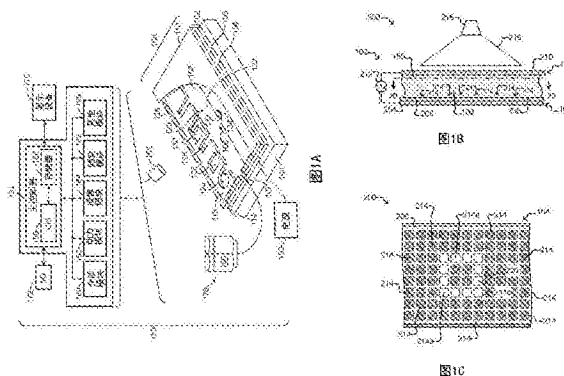
权利要求书6页 说明书64页 附图18页

(54)发明名称

微流体设备和试剂盒及其使用方法

(57)摘要

描述了包含固化的聚合物网络的原位生成的微流体捕获结构、制备和使用方法、组合物和试剂盒。微流体捕获结构可有利地用于在微流体环境内进行的测定,从而提供测定微物体(例如生物细胞)的灵活性。测定试剂和分析物可以包括在微流体捕获结构中。



1. 一种微流体设备, 包括:

封壳, 包括衬底和微流体回路材料, 所述封壳限定流动区域和至少一个隔绝围栏, 所述流动区域和所述至少一个隔绝围栏中的每个位于所述封壳内; 以及

至少一个原位生成的捕获结构, 设置在所述至少一个隔绝围栏内, 其中, 所述至少一个原位生成的捕获结构包括固化的聚合物网络。

2. 根据权利要求1所述的微流体设备, 其中, 所述固化的聚合物网络包括一个或更多个功能化位点。

3. 根据权利要求1或2所述的微流体设备, 其中, 所述固化的聚合物网络包括测定试剂或测定分析物。

4. 根据权利要求1所述的微流体设备, 其中, 所述至少一个隔绝围栏包括隔离区域和连接区域, 所述连接区域具有通向所述流动区域的近侧开口和通向所述隔离区域的远侧开口。

5. 根据权利要求4所述的微流体设备, 其中, 所述至少一个原位生成的捕获结构设置在所述隔绝围栏的所述隔离区域内。

6. 根据权利要求3所述的微流体设备, 其中, 所述测定试剂非共价连接至所述固化的聚合物网络。

7. 根据权利要求6所述的微流体设备, 其中, 所述测定试剂经由生物素/链霉抗生物素蛋白复合物非共价连接至所述固化的聚合物网络。

8. 根据权利要求3所述的微流体设备, 其中, 所述测定试剂包括蛋白质、核酸、有机分子和/或糖类。

9. 根据权利要求8所述的微流体设备, 其中, 所述测定试剂包括抗体。

10. 根据权利要求8所述的微流体设备, 其中, 所述测定试剂包含抗原。

11. 根据权利要求3所述的微流体设备, 其中, 所述测定分析物非共价地结合到所述至少一个原位生成的捕获结构的所述固化的聚合物网络。

12. 根据权利要求11所述的微流体设备, 其中, 所述测定分析物包含抗体或细胞因子。

13. 根据权利要求1或2所述的微流体设备, 其中, 两个或更多个原位生成的捕获结构设置在所述至少一个隔绝围栏中。

14. 根据权利要求13所述的微流体设备, 其中, 所述两个或更多个原位生成的捕获结构的第一原位生成的捕获结构结合到第一测定试剂或第一测定分析物, 并且所述两个或更多个捕获结构的第二原位生成的捕获结构结合到第二测定试剂或第二测定分析物, 其中, 第一测定试剂或第一测定分析物不同于第二测定试剂或第二测定分析物。

15. 根据权利要求13所述的微流体设备, 其中, 所述两个或更多个原位生成的捕获结构中的每个设置在所述至少一个隔绝围栏中的不同位置处。

16. 根据权利要求1或2所述的微流体设备, 其中, 所述微流体设备的盖对来自所述一个或更多个捕获结构的荧光、比色或发光信号基本上是透明的。

17. 根据权利要求1或2所述的微流体设备, 其中, 所述固化的聚合物网络包含光引发的聚合物。

18. 根据权利要求1或2所述的微流体设备, 其中, 所述固化的聚合物网络包括合成聚合物、改性合成聚合物、生物聚合物或其任何组合。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的微流体设备, 其中, 所述固化的聚合物网络包含聚乙二醇、改性聚乙二醇、聚乳酸PLA、改性聚乳酸、聚乙醇酸PGA、改性聚乙醇酸、聚丙烯酰胺PAM、改性聚丙烯酰胺、聚-N-异丙基丙烯酰胺PNIPAm、改性聚N-异丙基丙烯酰胺、聚乙烯醇PVA、改性聚乙烯醇、聚丙烯酸PAA、改性聚丙烯酸、聚己内酯PCL、改性聚己内酯、纤连蛋白、改性纤连蛋白、胶原蛋白、改性胶原蛋白、层粘连蛋白、改性层粘连蛋白、多糖、改性多糖或其任何共聚物组合中的至少一种。

20. 根据权利要求1或2所述的微流体设备, 其中, 所述设备包括多个隔绝围栏。

21. 根据权利要求1或2所述的微流体设备, 其中, 所述衬底被配置为在所述封壳内产生介电泳DEP力。

22. 根据权利要求21所述的微流体设备, 其中, 所述DEP力是光学致动的。

23. 一种在包括至少第一原位生成的捕获结构的微流体设备中测定微物体的方法, 包括:

将微物体设置在所述微流体设备内靠近所述至少第一原位生成的捕获结构的区域中, 所述至少第一原位生成的捕获结构包括固化的聚合物网络, 其中, 所述固化的聚合物网络包括测定试剂或测定分析物;

使所述测定试剂或测定分析物与微物体或微物体的生物产物接触; 以及

检测所述测定试剂或测定分析物与微物体或生物产物的相互作用。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中, 所述微流体设备包括封壳, 所述封壳包括衬底和微流体回路材料, 所述封壳限定流动区域和至少一个隔绝围栏; 并且

其中, 所述至少第一原位生成的捕获结构设置在所述至少一个隔绝围栏内。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中, 所述至少一个隔绝围栏包括隔离区域和连接区域, 所述连接区域具有通向所述流动区域的近侧开口和通向所述隔离区域的远侧开口。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中, 所述至少第一捕获结构设置在所述隔绝围栏的所述隔离区域内。

27. 根据权利要求23或24所述的方法, 其中, 所述测定试剂或测定分析物非共价连接至所述固化的聚合物网络。

28. 根据权利要求23或24所述的方法, 其中, 所述固化的聚合物网络包括测定试剂, 并且其中, 所述测定试剂包括蛋白质。

29. 根据权利要求28所述的方法, 其中, 所述测定试剂包括抗原或抗体。

30. 根据权利要求23或24所述的方法, 其中, 所述生物产物包括蛋白质、寡核苷酸、有机分子或糖类。

31. 根据权利要求23或24所述的方法, 其中, 所述微物体的生物产物是抗体或抗原。

32. 根据权利要求23或24所述的方法, 其中, 所述微物体是生物细胞。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中, 所述生物细胞是杂交瘤细胞、B细胞或T细胞。

34. 根据权利要求24所述的方法, 其中, 所述至少第一捕获结构设置在与所述隔绝围栏的第一壁相邻的第一位置处。

35. 根据权利要求23或24所述的方法, 其中, 使所述测定试剂或测定分析物与生物产物或微物体接触的步骤还包括: 形成非共价复合物。

36. 根据权利要求23或24所述的方法, 其中, 检测所述相互作用的步骤还包括: 将具有

可检测标记的检测试剂引入靠近所述至少第一原位生成的捕获结构的区域。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其中, 所述可检测标记被配置成: 当所述测定试剂或测定分析物与所述生物产物或所述微物体相互作用时, 集中至所述至少第一原位生成的捕获结构。

38. 根据权利要求36所述的方法, 其中, 所述检测试剂的可检测标记是荧光的、比色的或发光的。

39. 根据权利要求36所述的方法, 其中, 所述检测试剂包含至少第一抗体。

40. 根据权利要求23或24所述的方法, 其中, 检测的步骤包括: 检测来自所述至少第一原位生成的捕获结构的荧光信号。

41. 根据权利要求40所述的方法, 其中, 检测荧光信号的步骤还包括量化所述荧光信号。

42. 根据权利要求24所述的方法, 其中, 所述微流体设备还包括设置在所述至少一个隔绝围栏内的第二原位生成的捕获结构, 其中, 所述第二原位生成的捕获结构包括第二固化的聚合物网络。

43. 根据权利要求42所述的方法, 其中, 所述第二固化的聚合物网络包括第二测定试剂或测定分析物, 其中, 所述第一原位生成的捕获结构和所述第二原位生成的捕获结构中的每个包括不同的测定试剂或测定分析物, 并且其中, 检测的步骤包括: 检测微物体的第一生物产物和微物体的第二生物产物, 其中, 第一生物产物不同于第二生物产物。

44. 根据权利要求43所述的方法, 其中, 检测相互作用的步骤还包括: 将第一检测试剂和第二检测试剂引入靠近所述第一原位生成的捕获结构和所述第二原位生成的捕获结构的区域, 其中, 第一检测试剂和第二检测试剂中的每个包括可检测标记。

45. 根据权利要求44所述的方法, 其中, 检测相互作用的步骤还包括: 检测来自第一可检测标记的第一荧光信号和来自第二可检测标记的第二荧光信号。

46. 根据权利要求45所述的方法, 其中, 所述第一荧光信号和所述第二荧光信号在光谱上是不同的。

47. 根据权利要求45所述的方法, 其中, 所述第一荧光信号和所述第二荧光信号通过位置可区分。

48. 根据权利要求42所述的方法, 其中, 所述微流体设备还包括设置在所述至少一个隔绝围栏中的第三或更多原位生成的捕获结构, 其中, 所述第三或更多原位生成的捕获结构中的每个包括固化的聚合物网络, 并且进一步其中, 第三或更多固化的聚合物网络中的每个的固化的聚合物网络包括测定试剂或测定试剂。

49. 根据权利要求48所述的方法, 其中, 检测的步骤还包括检测第一、第二和第三或更多可检测信号, 所述第一、第二和第三或更多可检测信号是在所述至少一个隔绝围栏内在位置上不同的、在光谱上被不同地检测的、或其组合的。

50. 根据权利要求23或24所述的方法, 其中, 将所述微物体设置在所述微流体设备内靠近所述至少第一原位生成的捕获结构的区域中的步骤包括使用介电泳力移动所述微物体。

51. 根据权利要求50所述的方法, 其中, 所述介电泳力是光学致动的。

52. 一种包括微流体设备的试剂盒, 所述微流体设备包括:

封壳, 包括衬底和微流体回路材料, 所述封壳限定流动区域和至少一个隔绝围栏; 以及

功能化预聚物,能被可控地活化以形成固化的聚合物网络。

53.一种包括微流体设备的试剂盒,所述微流体设备包括:

封壳,包括衬底和微流体回路材料,所述封壳限定流动区域和至少一个隔绝围栏;以及至少一个原位生成的捕获结构,设置在所述至少一个隔绝围栏内,其中,所述至少一个原位生成的捕获结构包括固化的聚合物网络。

54.根据权利要求52或53所述的试剂盒,其中,所述固化的聚合物网络包含一个或更多个功能化位点。

55.根据权利要求52或53所述的试剂盒,还包括:测定试剂或测定分析物。

56.根据权利要求55所述的试剂盒,其中,所述测定试剂或测定分析物包括配置成与所述固化的聚合物网络的所述一个或更多个功能化位点缔合或结合的部分。

57.根据权利要求55所述的试剂盒,其中,所述固化的聚合物网络包括所述测定试剂或测定分析物。

58.根据权利要求52或53所述的试剂盒,还包括检测试剂。

59.根据权利要求52或53所述的试剂盒,其中,所述固化的聚合物网络包括合成聚合物、改性合成聚合物或生物聚合物。

60.根据权利要求59所述的试剂盒,其中,所述固化的聚合物网络包括改性合成聚合物,并且其中,改性包括尺寸改性基序、裂解基序、反应性末端部分或细胞识别基序。

61.根据权利要求52或53所述的试剂盒,其中,所述固化的聚合物网络包括聚乙二醇、改性聚乙二醇、聚乳酸PLA、改性聚乳酸、聚乙醇酸PGA、改性聚乙醇酸、聚丙烯酰胺PAM、改性聚丙烯酰胺、聚-N-异丙基丙烯酰胺PNIPAm、改性聚-N-异丙基丙烯酰胺、聚乙烯醇PVA、改性聚乙烯醇、聚丙烯酸PAA、改性聚丙烯酸、聚己内酯PCL、改性聚己内酯、纤连蛋白、改性纤连蛋白、胶原蛋白、改性胶原蛋白、层粘连蛋白、改性层粘连蛋白、多糖、改性多糖或任何组合的共聚物中的至少一种。

62.根据权利要求55所述的试剂盒,其中,所述测定试剂或测定分析物非共价连接到所述固化的聚合物网络。

63.根据权利要求62所述的试剂盒,其中,所述测定试剂或测定分析物通过生物素/链霉抗生物素蛋白复合物非共价连接到所述固化的聚合物网络。

64.根据权利要求55所述的试剂盒,其中,所述测定试剂或测定分析物是蛋白质、核酸、有机分子或糖类。

65.根据权利要求55所述的试剂盒,其中,所述测定试剂或测定分析物是抗体。

66.根据权利要求55所述的试剂盒,其中,所述测定试剂或测定分析物包括抗原。

67.根据权利要求58所述的试剂盒,其中,所述检测试剂包括可检测标记。

68.根据权利要求58所述的试剂盒,其中,所述检测试剂包括至少第一抗体。

69.根据权利要求53所述的试剂盒,其中,所述至少一个隔绝围栏包括设置在其中的两个或更多个原位生成的捕获结构,其中,第一原位生成的捕获结构的第一固化的聚合物网络包括第一测定试剂,第二原位生成的捕获结构的第二固化的聚合物网络包括第二测定试剂,并且进一步其中,所述第一测定试剂不同于所述第二测定试剂。

70.根据权利要求69所述的试剂盒,其中,所述第一捕获结构和所述第二捕获结构设置在所述隔绝围栏内的不同位置。

71. 根据权利要求69或70所述的试剂盒,还包括第一检测试剂和第二检测试剂,其中,所述第一检测试剂与所述第二检测试剂不同。

72. 根据权利要求71所述的试剂盒,其中,所述第一检测试剂的可检测标记和所述第二检测试剂的可检测标记在光谱上是不同的。

73. 根据权利要求52或53所述的试剂盒,其中,所述微流体设备还包括多个隔绝围栏,其中,所述多个隔绝围栏中的每个与所述流动区域流体连通。

74. 根据权利要求73所述的试剂盒,其中,所述多个隔绝围栏中的每个包括包含固化的聚合物网络的至少一个捕获结构。

75. 一种制备包括至少第一原位生成的捕获结构的微流体设备的方法,所述方法包括:
提供所述微流体设备,其中,所述微流体设备包括封壳和至少一个隔绝围栏,所述封壳包括衬底和微流体回路材料,所述封壳限定流动区域,所述至少一个隔绝围栏流体连接到所述流动区域;

将第一可流动的功能化预聚物引入所述流动区域;以及

在所述至少一个隔绝围栏的至少一个选定区域处激活所述第一可流动的功能化预聚物的固化,从而在其中形成所述至少第一原位生成的捕获结构。

76. 根据权利要求75所述的方法,其中,所述至少第一原位生成的捕获结构包括包含一个或更多个功能化位点的固化的聚合物网络。

77. 根据权利要求76所述的方法,其中,所述一个或更多个功能化位点包括生物素、抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白部分。

78. 根据权利要求76或77所述的方法,其中,所述一个或更多个功能化位点与所述第一可流动的功能化预聚物的至少一种组分共价结合。

79. 根据权利要求75或76所述的方法,还包括:使第一体积的第一流体介质流过所述微流体设备的所述流动区域,从而将未固化的第一可流动的功能化预聚物从所述至少一个隔绝围栏中扩散出。

80. 根据权利要求76所述的方法,还包括:

将第一功能化测定试剂或测定分析物引入所述至少一个隔绝围栏内的所述至少第一原位生成的捕获结构;以及

将所述第一功能化测定试剂或测定分析物与所述至少第一原位生成的捕获结构的所述固化的聚合物网络的功能化位点缔合。

81. 根据权利要求80所述的方法,还包括:使第二体积的第一流体介质流过所述微流体设备,从而将未缔合的第一功能化测定试剂或测定分析物扩散出所述至少一个隔绝围栏。

82. 根据权利要求80所述的方法,其中,所述第一功能化测定试剂或测定分析物包括抗体、抗原、有机分子或寡核苷酸。

83. 根据权利要求80所述的方法,其中,所述第一功能化测定试剂或测定分析物还包括配置成使所述第一功能化测定试剂或测定分析物与所述至少第一原位生成的捕获结构的所述固化的聚合物网络的功能化位点缔合的部分。

84. 根据权利要求83所述的方法,其中,配置成使所述第一功能化测定试剂或测定分析物缔合的部分包括生物素、抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白结合配偶体。

85. 根据权利要求80所述的方法,还包括:引入第二功能化测定试剂或测定分析物。

86. 根据权利要求85所述的方法, 其中, 所述第二功能化测定试剂或测定分析物与所述第一功能化测定试剂或测定分析物在检测上可区分。

87. 根据权利要求85所述的方法, 其中, 第二或更多功能化测定试剂或测定分析物与所述至少一个隔绝围栏中的第二或更多原位生成的捕获结构上的第二或更多功能化位点缔合。

88. 根据权利要求87所述的方法, 还包括在所述至少一个隔绝围栏中引入所述第二捕获结构, 其中, 引入第二或更多捕获结构包括以下步骤:

将第二可流动的功能化预聚物引入所述流动区域; 以及

在所述至少一个隔绝围栏的至少第二选定区域处激活所述第二可流动的功能化预聚物的固化, 从而在其中形成所述第二原位生成的捕获结构。

89. 根据权利要求85所述的方法, 其中, 所述第二功能化测定试剂或测定分析物与所述第一功能化测定试剂不同。

微流体设备和试剂盒及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是一项非临时申请,根据35 U.S.C 119(e) 要求2015年12月8日提交的第62/264,665号美国临时申请、2016年5月9日提交的第62/333,821号美国临时申请、2016年11月7日提交的第62/418,625号美国临时申请的权益,其中的每个公开内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 在生物科学和相关领域中,具有在微流体设备内测定微物体的能力可能是有用的。本公开的一些实施例包括用于原位生成微流体捕获结构的装置和方法。

发明内容

[0004] 在一个方面,提供了一种用于测定微物体的微流体设备,包括:具有衬底和微流体回路材料的封壳,该封壳限定了位于封壳内的流动区域;以及至少一个捕获结构,设置在所述封壳内,其中所述至少一个捕获结构包括固化的聚合物网络,并且其中所述固化的聚合物网络包括测定试剂和/或测定分析物。在各种实施例中,微流体设备的封壳可包括至少一个隔离围栏,并且至少一个捕获结构可设置在至少一个隔离围栏内。所述至少一个隔离围栏可以具有隔离区域和连接区域,其中所述连接区域可以具有通向所述流动区域的近侧开口和通向所述隔离区域的远侧开口。在一些实施例中,多个(例如,2、3、4个等)捕获结构设置在隔离围栏的隔离区域内。在各种实施例中,微流体设备可包括盖。

[0005] 在另一方面,提供了一种用于在具有至少第一原位生成的捕获结构的微流体设备中测定微物体的方法,所述方法包括:将微物体设置在微流体设备内靠近第一原位生成的捕获结构的区域中,其中原位生成的捕获结构包括固化的聚合物网络,并且进一步其中,固化的聚合物网络包括测定试剂。允许诸如生物细胞的微物体释放或产生分析物;并且允许分析物和测定试剂相互作用。检测分析物和测定试剂的相互作用。

[0006] 在另一方面,提供了一种用于制备至少第一原位生成的捕获结构的微流体设备的方法,所述方法包括:提供所述微流体设备,其中所述微流体设备包括封壳,所述封壳包括衬底、微流体回路材料和可选的盖,所述封壳限定流动区域;将第一可流动的功能化预聚物引入流动区域;在所述封壳内的至少一个选定区域处激活所述第一可流动的功能化预聚物的固化,从而在其中形成至少第一原位生成的捕获结构。可以在流动区域中形成原位生成的捕获结构。替代地或另外地,封壳可以包括与流动区域流体连接的至少一个隔离围栏,并且原位生成的捕获结构可以在隔离围栏(例如,隔离围栏内的隔离区域)中形成。激活第一可流动的功能化预聚物的固化的步骤可以在封壳内的多个选定区域进行,包括在多个隔离围栏内和/或在一个或更多个隔离围栏的每个内的多个选定区域处进行。

[0007] 在又一方面,提供了一种试剂盒,包括:微流体设备,其具有包括衬底、微流体回路材料和可选的盖的封壳,其中封壳限定流动区域;以及可被可控地活化以形成固化的聚合物网络的功能化预聚物。试剂盒可以进一步包括测定试剂,其可以是功能化预聚物的一部

分、与功能化预聚物混合、或与功能化预聚物分开提供(例如,在单独的小瓶、管等中)。或者,提供一种试剂盒,包括微流体设备,微流体设备具有封壳和至少一个原位生成的捕获结构,封壳包括衬底、微流体回路材料和可选的盖的封壳,其中封壳限定流动区域,至少一个原位生成的捕获结构设置在所述封壳内,其中所述至少一个原位生成的捕获结构包括固化的聚合物网络。试剂盒可以进一步包括测定试剂,其可以与原位生成的捕获结构成一体或相关,或者可以单独提供(例如,在小瓶、管等中)。任一试剂盒中的微流体设备可在封壳内包括至少一个隔离围栏。对于其中原位生成的捕获结构已经设置在微流体设备内的试剂盒,原位生成的捕获结构可以位于流动区域、微流体设备的隔绝围栏(例如,隔绝围栏内的隔离区域)、或两者内。

附图说明

[0008] 图1A示出了根据本公开的一些实施例的与微流体设备和相关联控制设备一起使用的系统的示例。

[0009] 图1B和1C示出了根据本公开的一些实施例的微流体设备。

[0010] 图2A和2B示出了根据本公开的一些实施例的隔离围栏。

[0011] 图2C示出了根据本公开的一些实施例的详细的隔绝围栏。

[0012] 图2D-F示出了根据本公开的一些其他实施例的隔绝围栏。

[0013] 图2G示出了根据本公开的实施例的微流体设备。

[0014] 图2H示出了根据本公开的实施例的微流体设备的涂覆表面。

[0015] 图3A示出了根据本公开的一些实施例的与微流体设备和相关联控制设备一起使用的系统的具体示例。

[0016] 图3B示出了根据本公开的一些实施例的成像设备。

[0017] 图4A-4B是原位生成的测定结构的实施例的示意图。

[0018] 图4C和4D是用于原位生成测定结构的方法的示意图。

[0019] 图5A至5E是本公开的原位生成的测定结构及其在检测由生物微物体分泌的细胞因子的测定中的用途的实施例的图解表示。

[0020] 图6A-6C是原位生成的测定结构的照片表示,其检测由生物微物体分泌的低、中和高分泌量的细胞因子。

[0021] 图7是隔绝围栏的实施例的图解表示,其包括多个原位生成的测定结构,用于生物细胞的多重测定。

具体实施方式

[0022] 本说明书描述了本发明的示例性实施例和应用。然而,本发明不限于这些示例性实施例和应用,也不限于示例性实施例和应用在此处操作或描述的方式。此外,附图可以示出简化或部分视图,并且附图中的元件的尺寸可能被夸大或者不成比例。另外,由于本文使用术语“在……上”、“附接到”、“连接到”、“耦合到”或类似的词,一个元件(例如,材料、层、衬底等)可以“在”另一元件“上”、“附接到”、“连接到”或“耦合到”另一元件,不管该一个元件是否直接在另一元件上、附接到、连接到或耦合到该另一元件,还是在该一个元件和该另一个元件之间存在一个或多个中间元件。此外,除非上下文另有规定,否则方向(例如,

上方、下方、顶部、底部、侧面、上、下、下侧、上侧、上部、下部、水平、垂直、“x”、“y”、“z”等等) (如果有的话) 是相对的并且仅通过示例的方式提供, 并且为了便于说明和讨论而不是限制。此外, 在提及元素列表 (例如, 元素a、b、c) 时, 这样的提及意图包括列出的元素中的任何一个、少于所有列出的元素的任何组合、以及/或所有列出的元素的组合。说明书中的章节划分仅为了便于查看, 并不限制所讨论元素的任何组合。

[0023] 如本文所用, “基本上”意指足以用于预期目的。因此, 术语“基本上”允许绝对或完美的状态、尺寸、测量、结果等的微小的、不显著的变化, 例如本领域普通技术人员所预期的, 但不会显著影响整体性能。当关于数值或参数或可以以数值表示的特征来使用时, “基本上”意味着在百分之十内。

[0024] 术语“多个”意味着不止一个。

[0025] 如本文所用, 术语“多个”可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个。

[0026] 如本文所用, 术语“设置”在其含义内包括“位于”。

[0027] 如本文所用, “微流体设备”或“微流体装置”是包括被配置成保持流体的一个或更多个离散微流体回路的设备, 每个微流体回路包括流体互连的回路元件, 包括但不限于区域、流动路径、通道、腔室和/或围栏, 以及被配置为允许流体 (以及可选地, 悬浮在流体中的微物体) 流动进入和/或离开微流体设备的至少一个端口。通常, 微流体设备的微流体回路将包括流动区域, 其可包括微流体通道和至少一个腔室, 并且将保持小于约1mL的流体体积, 例如, 小于约750、500、250、200、150、100、75、50、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3或2 μ L。在某些实施例中, 微流体回路保持约1-2、1-3、1-4、1-5、2-5、2-8、2-10、2-12、2-15、2-20、5-20、5-30、5-40、5-50、10-50、10-75、10-100、20-100、20-150、20-200、50-200、50-250或50-300 μ L。微流体回路可以配置成具有与微流体设备中的第一端口 (例如, 入口) 流体连接的第一端和与微流体设备中的第二端口 (例如, 出口) 流体连接的第二端。

[0028] 如本文所用, “纳米流体设备”或“纳米流体装置”是一种具有微流体回路的微流体设备, 所述微流体回路包含至少一个回路元件, 所述回路元件被配置为容纳少于约1 μ L体积的流体, 例如小于约750、500、250、200、150、100、75、50、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1nL或更少。纳流体设备可以包括多个回路元件 (例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、10,000或更多)。在某些实施例中, 至少一个回路元件中的一个或更多个 (例如全部) 被配置为容纳约100pL至1nL、100pL至2nL、100pL至5nL、250pL至2nL、250pL至5nL、250pL至10nL、500pL至5nL、500pL至10nL、500pL至15nL、750pL至10nL、750pL至15nL、750pL至20nL、1至10nL、1至15nL、1至20nL、1至25nL或1至50nL体积的流体。在其他实施例中, 至少一个回路元件中的一个或更多个 (例如全部) 被配置为容纳约20nL至200nL、100至200nL、100至300nL、100至400nL、100至500nL、200至300nL、200至400nL、200至500nL、200至600nL、200至700nL、250至400nL、250至500nL、250至600nL或250至750nL体积的流体。

[0029] 如本文所用的“微流体通道”或“流动通道”是指具有明显长于水平和垂直尺寸的长度的微流体设备的流动区域。例如, 流动通道可以具有是水平或垂直尺寸至少5倍的长度, 例如, 至少10倍的长度、至少25倍的长度、至少100倍的长度、至少200倍的长度、至少500倍的长度、至少1,000倍的长度、至少5,000倍的长度或更长的长度。在一些实施例中, 流动

通道的长度在约100,000微米至约500,000微米的范围内,包括其间的任何范围。在一些实施例中,水平尺寸在约100微米至约1000微米(例如,约150至约500微米)的范围内,并且垂直尺寸在约25微米至约200微米的范围内,例如,从约40到约150微米。应注意,流动通道可在微流体设备中具有各种不同的空间配置,因此不限于完美的线性元件。例如,流动通道可以是或包括具有以下配置的一个或更多个部分:曲线、弯曲、螺旋、倾斜、下降、叉支(例如,多个不同的流动路径)以及它们的任何组合。另外,流动通道沿其路径可具有不同的截面积,加宽和收缩以在其中提供所需的流体流动。流动通道可包括阀门,并且阀门可以是微流体领域中已知的任何类型。包括阀门的微流体通道的示例公开在美国专利6,408,878和9,227,200中,其每一篇通过引用整体并入本文。

[0030] 如本文所用,术语“障碍”通常指的是隆起物或类似类型的结构,其足够大而部分(但不完全)阻止目标微物体在微流体设备中的两个不同区域或回路元件之间的移动。两个不同区域/回路元件可以是例如微流体隔绝围栏的连接区域和隔离区域。

[0031] 如本文所用,术语“收缩”通常是指微流体设备中的回路元件(或两个电路元件之间的接口)的宽度变窄。收缩可以位于例如本公开的微流体隔绝围栏的隔离区域和连接区域之间的交界处。

[0032] 如本文所用,术语“透明”是指允许可见光通过但在通过时基本上不改变光的材料。

[0033] 如本文所用,术语“微物体”通常是指可根据本公开被隔离和/或操纵的任何微观物体。微物体的非限制性示例包括:无生命的微物体,诸如微颗粒、微珠(例如,聚苯乙烯珠粒、Luminex™珠粒等)、磁珠、微棒、微丝、量子点等;生物微物体,诸如细胞、生物细胞器、囊泡或复合物、合成囊泡、脂质体(例如,合成的或衍生自膜制备)、脂质纳米杆等;或无生命微物体和生物微物体的组合(例如,附着于细胞的微珠、脂质体包被的微珠、脂质体包被的磁珠等)。珠粒可以包括共价或非共价连接的部分/分子,诸如荧光标记、蛋白质、碳水化合物、抗原、小分子信号传导部分、或能够用于测定的化学/生物物质。例如,Ritchie等(2009)“Reconstitution of Membrane Proteins in Phospholipid Bilayer Nanodiscs(在磷脂双层纳米圆盘中重建膜蛋白)”,Methods Enzymol.,464:211-231中描述了脂质纳米杆。

[0034] 如本文所用,术语“细胞”可与术语“生物细胞”互换使用。“生物细胞”的非限制性示例包括真核细胞、植物细胞、动物细胞(诸如哺乳动物细胞、爬行动物细胞、禽类细胞、鱼细胞等)、原核细胞、细菌细胞、真菌细胞、原生动物细胞等、从组织(诸如肌肉、软骨、脂肪、皮肤、肝脏、肺、神经组织等)解离的细胞、免疫细胞(诸如T细胞、B细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞等)、胚胎(例如,受精卵)、卵母细胞、卵子、精子细胞、杂交瘤、培养细胞、来自细胞系的细胞、癌细胞、感染细胞、转染和/或转化细胞、报告细胞等。哺乳动物细胞可以来自例如人、小鼠、大鼠、马、山羊、绵羊、牛、灵长类动物等。

[0035] 如果集落中能够繁殖的所有活细胞是来自单个母细胞的子细胞,则生物细胞的集落是“克隆的”。在某些实施例中,克隆集落中的所有子细胞由单个母细胞通过不超过10次分裂而产生。在其他实施例中,克隆集落中的所有子细胞由单个母细胞通过不超过14次分裂而产生。在其他实施例中,克隆集落中的所有子细胞由单个母细胞通过不超过17次分裂而产生。在其他实施例中,克隆集落中的所有子细胞由单个母细胞通过不超过20次分裂而产生。术语“克隆细胞”是指相同克隆集落的细胞。

[0036] 如本文所用,生物细胞的“集落”是指2个或更多个细胞(例如,约2至约20、约4至约40、约6至约60、约8至约80、约10至约100、约20至约200、约40至约400、约60至约600、约80至约800、约100至约1000、或大于1000个细胞)。

[0037] 如本文所用,术语“维持(一个或更多个)细胞”是指提供包含流体和气体组分以及任选的表面的环境,其提供保持细胞存活和/或扩增所必需的条件。

[0038] 如本文所用,当用于细胞时,术语“扩增”指的是细胞数量的增加。

[0039] 流体介质的“组分”是介质中存在的任何化学或生物化学分子,包括溶剂分子、离子、小分子、抗生素、核苷酸和核苷、核酸、氨基酸、肽、蛋白质、糖、碳水化合物、脂质、脂肪酸、胆固醇、代谢物等。

[0040] 如本文所用,“捕获部分”是为微观物体提供识别位点的化学或生物物质、功能或基序。选定类型的微物体可以识别原位(就地)生成的捕获部分并且可以与捕获部分结合原位生成的捕获部分或对原位生成的捕获部分具有亲和力。非限制性示例包括抗原、抗体和细胞表面结合基序。

[0041] 如本文所用,“可流动聚合物”是可溶于或可分散在流体介质(例如,预聚物溶液)中的聚合物单体或大分子单体。可流动聚合物可以输入微流体流动区域并与其中的流体介质的其他组分一起流动。

[0042] 如本文所用,“光引发聚合物”是指这样的聚合物(或可用于产生聚合物的单体分子),其在暴露于光时能够共价交联,形成特定的共价键,改变围绕固定化学基序的区域选择性化学(regiochemistry),或形成导致物理状态变化的离子对,从而形成聚合物网络。在一些情况下,光引发聚合物可包括这样的聚合物片段,其与能够共价交联的一个或更多个化学部分键合,形成特定的共价键,改变固定化学基序周围的区域选择化学,或形成引起物理状态变化的离子对。在一些情况下,光引发聚合物可能需要可光活化的自由基引发剂以引发聚合物网络的形成(例如,通过聚合物的聚合)。

[0043] 如本文所用,“抗体”是指免疫球蛋白(Ig),并包括多克隆和单克隆抗体、灵长源化的(例如,人源化的)、鼠类、小鼠-人、小鼠-灵长类、和嵌合的;并且可以是完整分子、其片段(例如,scFv、Fv、Fd、Fab、Fab'和F(ab)'₂片段)、或完整分子和/或片段的多聚体或聚集体,并且可以自然地产生或者例如通过免疫、合成或基因工程产生。如本文所用,“抗体片段”是指衍生自抗体或与抗体相关的片段,其结合抗原并且在一些实施例中可衍生化以显示促进清除和摄取的结构特征,例如通过结合半乳糖残留物。这包括例如F(ab)、F(ab)'₂、scFv、轻链可变区(VL)、重链可变区(VH)及其组合。

[0044] 如本文所用,关于流体介质,“扩散(diffuse)”和“扩散(diffusion)”是指流体介质的组分沿浓度梯度的热力学运动。

[0045] 短语“介质流动”是指主要由于扩散以外的任何机制导致的流体介质的大量移动。例如,由于点之间的压力差,介质的流动可能涉及流体介质从一点移动到另一点。这种流动可以包括液体的连续、脉冲、周期性、随机、间歇或往复流动、或其任何组合。当一种流体介质流入另一种流体介质时,可能导致介质的湍流和混合。

[0046] 短语“基本上不流动”是指流体介质的随时间平均得到的流动速率小于材料(例如,感兴趣分析物)的组分扩散到流体介质中或流体介质内的速率。这种材料的组分的扩散速率可以取决于例如温度、组分的尺寸以及组分与流体介质之间相互作用的强度。

[0047] 如本文关于微流体设备内的不同区域所使用的,短语“流体连接”是指,当不同区域基本上充满流体(诸如流体介质)时,每个区域中的流体连接以形成一个单一的流体。这并不意味着不同区域中的流体(或流体介质)在组成上必然相同。而是,微流体设备的不同流体连接区中的流体可以具有不同的组成(例如,不同浓度的溶质,诸如蛋白质、碳水化合物、离子或其他分子),其在流动中作为溶质沿着其各自的浓度梯度下移和/或流体流过该设备。

[0048] 如本文所用,“流动路径”是指一个或更多个流体连接的回路元件(例如,通道、区域、腔室等),其限定并受制于介质流动的轨迹。因此,流动路径是微流体设备的被扫过的区域的示例。其他回路元件(例如,未被扫过的区域)可以与包括流动路径的回路元件流体连接,而不受流动路径中的介质流动的影响。

[0049] 如本文所用,“隔离微物体”将微物体限制在微流体设备内的限定区域。微物体仍然能够在原位生成的捕获结构内运动。

[0050] 微流体(或纳流体)设备可以包括“被扫过的”区域和“未被扫过的”区域。如本文所使用的,“被扫过的”区域包括微流体回路的一个或更多个流体互连的回路元件,当流体流过微流体回路时,每个回路元件经历介质流。被扫过的区域的回路元件可以包括例如区域、通道以及全部或部分腔室。如本文所使用的,“未被扫过的”区域包括微流体回路的一个或更多个流体互连的回路元件,当流体流过微流体回路时,每个回路元件基本上不经历流体通量。未被扫过的区域可以流体连接到被扫过的区域,只要流体连接被构造成能够使扩散进行但基本上没有介质在被扫过的区域和未被扫过的区域之间流动。因此,微流体设备可被构造成基本上将未被扫过的区域与被扫过的区域中的介质流隔离开,同时,在被扫过的区域和未被扫过的区域之间基本上仅允许扩散流体连通。例如,微流体设备的流动通道是被扫过的区域的示例,而微流体设备的隔离区(下面进一步详细描述)是未被扫过的区域的示例。

[0051] 可以在这种微流体设备中测定生物微物体(例如,生物细胞)产生特定生物材料(例如,诸如抗体的蛋白质)的能力。在测定的一个具体实施例中,可以将包含待测定的用于产生感兴趣分析物的生物微物体(例如,细胞)的样品材料加载到微流体设备的被扫过的区域中。可以选择多个生物微物体(例如,诸如人细胞的哺乳动物细胞)用于特定特征并将其置于未被扫过的区域中。然后,剩余的样品材料可以从被扫过的区域流出,并且测定材料流入被扫过的区域。因为所选择的生物微物体处于未被扫过的区域,所选择的生物微物体基本上不受剩余样品材料流出或测定材料流入的影响。可以允许所选择的生物微物体产生感兴趣的分析物,其可以从未被扫过的区域扩散到被扫过的区域,其中感兴趣的分析物可以与测定材料反应以产生局部可检测的反应,每个反应可以是与特定的未被扫过的区域相关联。可以分析与检测到的反应相关的任何未被扫过的区域,以确定未被扫过的区域中的哪些生物微物体(如果有的话)是感兴趣分析物的足够生产者。

[0052] 具有原位生成的捕获结构的微流体设备。当对微流体设备内的微物体进行测定时,这样的测定可以包含固定到至微流体回路的特定区域和/或特征(诸如隔绝围栏、捕集器或流动区域的一部分,包括但不限于微流体通道)的测定分析物或测定试剂(例如通过粘附测定分析物或测定试剂,或限制测定分析物或测定试剂的运动和/或扩散),这可能是有利的。在一些情况下,可以使用聚合物网络将测定分析物或测定试剂固定到微流体设备的

特定部分(例如,隔绝围栏的一部分)。固化的聚合物网络可以在选定的位置原位生成。例如,结构光可用于通过光诱导的聚合/交联反应产生固化的聚合物网络,该反应通过将聚合物交联成网络来固化聚合物。固化的聚合物网络可以与(在固化的聚合物网络形成期间或之后)测定试剂或测定分析物反应,从而形成包含测定试剂或测定分析物的原位生成的捕获结构。以这种方式,测定试剂或测定分析物可以保持在固化的聚合物网络的表面内或至少非常接近固化的聚合物网络的表面,从而优化测定(例如,通过将测定信号浓缩在一个或更多个预限定的位置)。

[0053] 令人惊讶地发现,可以在如本文所述的微流体(或纳米流体)设备内原位生成多种捕获结构。本文描述了用于具有原位生成的捕获结构的这些类型的设备的微流体设备、组合物和方法。

[0054] 可以提供微流体设备400,包括:包含衬底和微流体回路材料260的封壳,该封壳限定流动区域(例如,流动通道410)和至少一个隔绝围栏430,每个位于封壳内(不是示出);以及设置在封壳内的至少一个原位生成的捕获结构404,其中至少一个捕获结构404包括固化的聚合物网络。微流体回路材料260可以限定流动区域的壁,并且可以在封壳内限定其他微流体回路元件。在一些实施例中,微流体设备400可包括盖(未示出)。在各种实施例中,微流体设备可包括至少一个隔绝围栏430,其也可由微流体回路材料260形成。在一些实施例中,至少一个原位生成的捕获结构404可以设置在至少一个隔绝围栏430内。微流体设备还可包括在封壳内的多个隔绝围栏。所述至少一个原位生成的捕获结构被配置为能够捕获微物体的生物产物和/或被微物体或微物体的生物产物作用。至少一种原位生成的捕获结构可以包括测定试剂或测定分析物,或者可以配置成接受测定试剂或测定分析物(例如,可以包括配置成与功能化测定试剂或测定分析物反应的功能化位点)。测定试剂可以配置成捕获微物体的生物产物。测定分析物可以被配置为捕获微物体的生物产物或者被微物体或微物体的生物产物作用。

[0055] 微流体设备400的一部分在图4A中示出。至少一个隔绝围栏430可以流体连接到流动区域(例如,流动通道410)。至少一个隔绝围栏430可以包括隔离区域和连接区域,并且具有如上所述的用于任何隔绝围栏124、126、128、130、224、226、228、266的任何组的尺寸,其中连接区域具有通向流动区域(例如,流动通道410)的近侧开口和通向隔离区域的远侧开口。微流体设备的流动区域(例如,流动通道410)可包括微流体通道410。隔绝围栏的通向流动区域(例如,流动通道410)的近侧开口可以基本上平行于流动区域(未示出)中的流体介质流动方向。流动区域中的流体介质与隔绝围栏的隔离区域内的流体介质之间的组分的交换可以基本上仅通过扩散发生。至少一个原位生成的捕获结构404可以设置在隔绝围栏430的隔离区域内。

[0056] 至少一个原位生成的捕获结构404可以位于隔绝围栏的连接区域或隔离区域内。原位生成的捕获结构404可以进一步选择性地形成为在隔绝围栏的隔离区域的位置处,使得可以无阻碍地将细胞导入隔离区域。至少一个原位生成的捕获结构404可以位于隔离区域内,使得细胞可以从隔离区域排出,而不受原位生成的捕获结构404的阻碍。微流体设备可以包括多个隔绝围栏430,其可以以任何组合以如本文所述的任何合适的布置来配置。当存在微流体通道和多个隔绝围栏时,多个隔绝围栏可以成排布置,多个隔绝围栏中的每个隔绝围栏从微流体通道410的一侧打开。多个隔绝围栏中的每个隔绝围栏的近侧开口可以

在共同方向上向微流体通道410打开。

[0057] 在另一个实施例中,提供微流体设备450,其一部分如图4B所示,包括:包含衬底和盖的封壳,该封壳限定流动区域(例如,流动通道410)和至少一个隔绝围栏430,每个位于封壳内(未示出);以及设置在至少一个隔绝围栏430内的至少一个原位生成的捕获结构406,其中至少一个原位生成的捕获结构406包括固化的聚合物网络,其进一步包括测定试剂或测定分析物(R/A,例如,图4C和4D的406B或406A)。

[0058] 衬底。微流体设备400、450的衬底可以进一步包括用于在封壳(未示出)内产生介电泳(DEP)力的配置。具有DEP配置的微流体设备衬底可包括如本文所述的任何DEP配置。DEP力可以是光学致动的。在其他实施例中,微流体设备400、450的衬底可以配置为包括光电润湿配置(未示出)。在一些实施例中,光电润湿衬底可以是光学致动的。在其他实施例中,微流体设备400、450可以包括被配置为产生DEP力的衬底和被配置为产生电润湿力的衬底的组合,其中每个是光学致动的。

[0059] 在一些实施例中,微流体设备400、450的盖可以对来自一个或更多个原位生成的捕获结构的荧光、比色或发光信号基本透明。

[0060] 在各种实施例中,具有至少一个捕获结构的微流体设备400、450可具有动态涂层或经调理的表面,其增强细胞生长、活力、便携性及其任何组合,如上所述。可以使用任何合适的动态涂层或经调理的表面。在一些实施例中,经调理的表面可包括共价改性的表面,其可为如本文所述的任何合适的共价改性的表面。在固化原位生成的捕获结构的聚合物网络之前可以存在共价改性的表面。如果使用动态涂层,则可以在固化原位生成的捕获结构的聚合物网络之前或之后引入。

[0061] 微流体设备400、450可以以任何组合具有针对如本文所述的微流体设备100、200、230、250、280、290、320、500、700而描述的任何其他组件、特征或配置。

[0062] 包括固化的聚合物网络的原位生成的捕获结构。原位生成的捕获结构404、406(图4A,4B)的固化的聚合物网络可以包括光引发的聚合物,并且可以原位(就地)固化。在一些实施例中,固化的聚合物网络不包括硅氧烷聚合物。在一些实施例中,固化的聚合物网络不包括硅。固化的聚合物网络可以由任何合适的聚合物制成,并且可以是如本文所述的任何聚合物。

[0063] 功能化位点。微流体设备400的至少一个原位生成的捕获结构404的固化的聚合物网络可包括一个或更多个功能化位点。在一些实施例中,原位生成的捕获结构的固化的聚合物网络可包括两个或更多个功能化位点。功能化位点可以与固化的聚合物网络粘附(其可以包括非特异性非共价结合或可以包括通过特异性结合对或基序的非共价结合)。在其他实施例中,固化的聚合物网络的功能化位点可以与固化的聚合物网络的聚合物共价结合。

[0064] 功能化位点可包括允许测定试剂或测定分析物引入其中的反应性部分 R_{fs} 。反应性部分 R_{fs} 可以提供共价或非共价反应模式,包括缔合(例如,对于一个非限制性示例的螯合)、结合(例如,非共价结合,例如生物素和链霉抗生物素蛋白之间的结合或抗体/抗原结合对)或反应(例如,形成共价键,例如点击反应对之间)。为简单起见,术语结合可用于包括所有三种类型的相互作用,但在特定实施例中可优选这些相互作用中的一种或更多种。在一些实施例中,一个或更多个功能化位点的反应性部分 R_{fs} 可以是生物素、抗生物素蛋白或链霉

抗生物素蛋白。在其他实施例中,一个或更多个功能化位点的反应性部分 R_{fs} 可包括螯合部分或寡核苷酸杂交序列。在一些实施例中,固化的聚合物网络的一个或更多个功能化位点可以在聚合物网络固化之后引入(例如,含有反应性部分 R_{fs} 的非特异性粘附物质可以流入隔绝围栏并且允许与固化的聚合物网络接触一段时间以粘附足够数量的含有反应性部分 R_{fs} 的物质以获得合适的测定条件),如示意性所示,用于将包括固化的聚合物网络的原位生成的捕获结构403转化为包括具有至少一个功能化位点的固化聚合物网络的原位生成的捕获结构404。在其他实施例中,在聚合物网络固化之前,将包括反应性部分 R_{fs} 的一个或更多个功能化位点引入预聚物401,如图4C和4D中示意性所示。

[0065] 至少具有包括测定试剂或测定分析物(例如,图4B的406的R/A)的原位生成的一个捕获结构406的微流体设备450可以包含一个或更多个功能化位点,每个功能化位点具有已经与测定试剂或测定分析物缔合、结合或反应的反应性部分 R_{fs} 。反应性部分 R_{fs} 可以选自如上针对微流体设备400和相应的原位生成的捕获结构404所述的任何反应性部分。如上所述,术语结合可以用于包括所有三种类型的相互作用,但是在特定实施例中可以优选这些相互作用中的一种或更多种。可以在固化聚合物网络之前或在固化之后进行测定试剂或测定分析物的结合,如下文所述和图4C中所示。

[0066] 在一些实施例中,原位生成的捕获结构404、406的固化聚合物网络的一个或更多个功能化位点可以全部包括相同的反应性部分 R_{fs} 。在其他实施例中,原位生成的捕获结构404、406的固化聚合物网络的一个或更多个功能化位点可包括不同的 R_{fs} 。在一些其他实施例中,可以使用多于一种类型的聚合物来形成固化的聚合物网络,并且每种聚合物可以具有相同或不同的功能化位点(例如,附着或粘附于其上的反应性部分 R_{fs})。

[0067] 测定试剂或测定分析物。至少一个原位生成的捕获结构406的固化的聚合物网络可以进一步包括测定试剂和/或测定分析物(图4B、4C、4D)。可以提供微流体设备450的原位生成的捕获结构406,其已经包括与固化的聚合物网络结合的测定试剂或测定分析物。或者,微流体设备400可具有原位生成的捕获结构404(图4A),其配置成与测定试剂或测定分析物缔合、结合或反应,以提供包括测定试剂或测定分析物(图4B的R/A)的原位生成的捕获结构406,并在图4C中以更多示意性细节示出。在另一个替代方案中,可以在测定实验本身开始之前引入固化的聚合物网络及其相关联的测定试剂或测定分析物。测定试剂或测定分析物可以配置成与固化的聚合物网络的一个或更多个功能化位点共价或非共价结合。可以在原位生成的捕获结构的初始形成期间引入测定试剂或测定分析物,例如,通过与可流动聚合物溶液共价结合(例如,已经掺入预聚物中)。一个非限制性示例可以是包括识别基序,例如RGD基序,其可以被目标生物细胞上的整联蛋白识别。

[0068] 或者,测定试剂或测定分析物可以流入具有原位生成的捕获结构404的微流体设备400,捕获结构404包括一个或更多个功能化位点(例如,在固化的聚合物网络已经固化之后的某个时间)。测定试剂或测定分析物可包括功能部分 M_{fs} ,其配置成与至少一个原位生成的捕获结构404的固化聚合物网络的功能化位点的 R_{fs} 缔合、结合或反应,以生成至少一个原位生成的捕获结构406。如上所述,术语结合可以用于包括所有三种类型的相互作用,但是在特定实施例中可以优选这些相互作用中的一种或更多种。可以使用任何合适的功能部分 M_{fs} 。例如,测定试剂或测定分析物的螯合底物 M_{fs} 可以通过捕获结构404的固化聚合物网络的功能化位点的螯合配体 R_{fs} 螯合。功能部分 M_{fs} 可包括生物素或链霉抗生物素蛋白,以与捕

获结构404的功能化位点的相应抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或生物素 R_{fs} 非共价结合。或者,功能部分 M_{fs} 可以配置成与固化的聚合物网络的功能化位点的 R_{fs} 共价反应。例如,功能部分 M_{fs} 可以是叠氮化物,并且可以与原位生成的捕获结构404的功能化位点的相应点击反应对的炔基官能团共价反应。

[0069] 在包括至少一种原位生成的捕获结构的微流体设备的一些实施例中,测定试剂或测定分析物可包括可检测标记。测定试剂或测定分析物的可检测标记可以是荧光标记、比色标记或发光标记。在一些实施例中,可检测标记可以是荧光标记。在一些实施例中,当测定试剂或测定分析物包括可检测标记时,在测定进行之前标记是不可检测的,并且可检测标记从测定试剂或测定分析物产生或释放。

[0070] 引入固化的聚合物网络的方法,其可包括反应性部分和/或测定试剂或测定分析物。可以不同地进行至少一种原位生成的捕获结构的固化聚合物网络的制备,如图4C和4D中示意性所示。在图4C中所示的一种途径中,可以改性一种或更多种预聚物401以提供预聚物405,预聚物405包含具有反应性部分 R_{fs} 的至少一个功能化位点。随后,可以使该未固化的预聚物405流入微流体设备的封壳中,并原位(就地)固化以提供原位生成的捕获结构404,其可以任选地包括将可流动预聚物引入隔绝围栏中。或者,具有包含反应性部分 R_{fs} 的至少一个功能化位点的预聚物405可以与具有功能部分 M_{fs} 的测定分析物反应,以提供已经含有测定分析物的预聚物407A。随后可以使已经包括测定分析物的该预聚物407A流入微流体设备,并且任选地流入隔绝围栏,并且可以原位固化以提供具有测定分析物的原位生成的捕获结构406A。

[0071] 在另一个实施例中,具有至少一个包含反应性部分 R_{fs} 的功能位点的预聚物405与具有功能部分 M_{fs} 的测定试剂反应,以提供已含有测定试剂的预聚物407B。随后,可以使预聚物407B流入微流体设备的封壳中,并任选地引入隔绝围栏,并原位固化,以提供包括测定试剂的原位生成的捕获结构406B。

[0072] 在另一个实施例中,可以使预聚物401本身流入微流体设备的封壳中,并且任选地流入隔绝围栏,并且可以原位固化以提供形成原位生成的捕获结构的一部分的固化的聚合物网络403。可以改性固化的聚合物网络以引入具有反应性基团 R_{fs} 的至少一个功能性位点,反应性基团 R_{fs} 通过流入材料以粘附或结合到固化的聚合物网络,从而提供包含至少一个反应性基团 R_{fs} 的固化的聚合物网络(例如,原位生成的捕获结构404)。原位生成的捕获结构404可以通过流入具有功能部分 M_{fs} 的测定分析物进一步改性,所述功能部分 M_{fs} 与捕获结构404的 R_{fs} 反应以提供包含测定分析物的原位生成的捕获结构406A。或者,可以通过流入具有功能部分 M_{fs} 的测定试剂来进一步改性原位生成的捕获结构404,所述功能部分 M_{fs} 捕获结构404的 R_{fs} 反应以提供含有测定试剂的原位生成的捕获结构406B。

[0073] 在另一个实施例中,如图4D所示,制备预聚物401',其具有已经包括到预聚物中的测定分析物或测定试剂,例如包含RGD或蛋白酶底物(例如,图4D中的PEP)基序的肽片段。可以使预聚物401'流入微流体设备的封壳中,并且任选地流入隔绝围栏,并原位固化以提供原位生成的捕获结构406C,其具有包括在固化的聚合物网络内的测定试剂或测定分析物。

[0074] 下面更详细地描述引入原位生成的捕获结构的方法。

[0075] 原位生成的捕获结构的测定试剂。测定试剂可包括蛋白质、核酸、有机分子和/或糖类。测定试剂可包括原位生成的捕获寡核苷酸,其可与感兴趣的核酸杂交。寡核苷酸可以

合成产生或可以由生物细胞产生。寡核苷酸可在生物学生产后可针对大小或为了引入其他功能而进一步加工。蛋白质测定试剂可包括但不限于抗体、结构蛋白、细胞表面标志物或细胞因子。有机分子测定试剂可包括合成的、半合成的或生物学上产生的有机分子,其分子量为约2000Da或更低。有机分子可包括螯合底物、螯合配体、肽或非肽有机分子。在一些实施例中,测定试剂可包括蛋白质、核酸、有机分子或糖类中的两种或更多种的组合。在一些实施例中,测定试剂可包括抗体或其片段。在其他实施例中,测定试剂可包括抗原。在一些实施例中,抗原测定试剂可以是细胞因子,包括但不限于肿瘤坏死因子 α (TNF α)、干扰素 α (IFN- α)、白细胞介素2 (IL-2) 或IFN γ 。

[0076] 在一些实施例中,当测定试剂包括抗体时,测定试剂抗体可以特异性结合肿瘤抗原,其可以是如本文所述的任何肿瘤抗原。在其他实施例中,测定试剂抗体可以特异性结合细胞因子,细胞因子可以是任何合适的细胞因子,包括但不限于肿瘤坏死因子 α (TNF α)、干扰素 α (IFN- α)、白细胞介素2 (IL-2) 或IFN γ 。

[0077] 在一些实施例中,当测定试剂包括抗原时,抗原试剂可以是肿瘤抗原。肿瘤抗原试剂可以是肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原。可用作测定试剂的肿瘤抗原的非限制性列表包括WT1、MUC1、LMP2、HPV E6 E7、EGFRvIII、HER-2/neu、MAGE A3、p53非突变体、NY-ESO-1、PSMA、GD2、CEA、MelanA/MART1、Ras突变体、gp100、p53突变体、蛋白酶3 (PR1)、bcr-able、酪氨酸酶、存活蛋白、PSA、hTERT、EphA2、PEP、ML-IAP、AFP、EpCAM、ERG (TMPRSS2ETS融合基因、NA17、PAX3、ALK、雄激素受体、细胞周期蛋白B1、聚唾液酸、MYCN、RhoC、TRP-2、GD3、岩藻糖基GM1、间皮素或PSCA。

[0078] 图5A示出了微流体设备500的一个示例,其具有至少一个对微流体通道264开口的隔绝围栏530。隔绝围栏530具有一个原位生成的捕获结构502,其具有固化的聚合物网络,固化的聚合物网络包括测定试剂504,在此显示为抗体。

[0079] 这些测定试剂的示例决不是限制性的,并且可以是技术人员可以选择的任何合适的测定试剂。

[0080] 原位生成的捕获结构的测定分析物。测定分析物可以通过与测定试剂的共价或非共价结合相互作用与原位生成的捕获结构的固化聚合物网络结合。在一些实施例中,当测定分析物结合/包括在原位生成的捕获结构内时,测定分析物还包括可检测的标记,例如荧光、发光或可见颜色的染料标记。测定分析物可包括蛋白质、核酸、有机分子(如上所述)和/或糖。在一些实施例中,测定分析物可包括蛋白质、核酸、有机分子或糖中的两种或更多种的组合。蛋白质测定分析物可包括但不限于抗体、结构蛋白、细胞表面标志物或细胞因子。

[0081] 在一些实施例中,测定分析物可包括抗体或其片段。在一个非限制性示例中,当研究抗体以筛选结合第一抗体的结合位点的“抗独特型”抗体时,并不罕见。抗独特型抗体可以模拟第一抗体结合的抗原,从而可以用于(1)模拟第一抗体结合的抗原,或(2)接种动物(从而产生类似于第一抗体的新抗体)。因此,抗独特型抗体可以在本文中被视为测定分析物,或者可以替代地被认为是测定试剂并相应地使用。

[0082] 在其他实施例中,蛋白质测定分析物可以是与原位生成的捕获结构非共价结合的抗原。有机分子测定分析物可包括肽或非肽有机分子。测定分析物的一个非限制性示例是蛋白酶的底物。底物可以是肽或非肽有机分子。该测定可以鉴定有效产生感兴趣蛋白酶的细胞,其可以用于商业生产。或者,底物可以是致病蛋白酶表达的靶标,并且可以用于鉴定

具有致病活性的细胞。

[0083] 例如,基质金属蛋白酶(MMP)底物(诸如例如,MMP-2,其可具有Gly-Pro-Gln-Gly-Trp-Gly-Gln的底物序列,(例如,PEP))可以通过诸如包括在预聚物(例如,401')中的任何合适的方式包括在原位生成的捕获结构中,或可以引入原位生成的捕获结构的功能化位点(例如,通过交联剂、产生预聚物407A、和/或原位生成的捕获结构406A)。某些金属蛋白酶的表达与转移潜能和癌症进展相关联。包括MMP底物基序的原位生成的捕获结构可用于鉴定表达MMP的细胞。如果MMP底物是原位生成的捕获结构406C的固化聚合物网络的一部分(参见图4D),则固化的聚合物网络可以被侵蚀并且可以监测网络的损失。例如,包括MMP底物基序的固化聚合物网络可以进一步包括随着蛋白酶活性的继续而释放的荧光标记。可以监测固化的聚合物网络内的信号损失,或者可以监测隔绝围栏内的液体介质内的信号增益。可以结合或包括在原位生成的捕获结构的固化聚合物网络内的底物不限于任何特定类型的底物,而可以是任何可能需要测定的合适底物。

[0084] 可以是待结合或包括在原位生成的捕获结构内的有用测定分析物的另一种蛋白酶底物可以是弗林蛋白酶底物。弗林蛋白酶(具有丝氨酸内切蛋白酶活性的前蛋白转化酶)可能参与T细胞向Th1表型的分化。可以使用如本文所述的原位生成的捕获结构以各种方式进行测定,但是在一个实施例中,肽可以包括:用于弗林蛋白酶的酶切基序;功能部分 M_{fs} ,例如生物素,其允许附接至在原位生成的捕获结构的固化聚合物网络内的功能位点;以及附接到肽内部位置的荧光团,其将在通过弗林蛋白酶来酶切后释放。细胞表达弗林蛋白酶活性将从原位生成的捕获结构释放荧光,并且可以检测并可以进一步定量信号损失。

[0085] 在另一个实施例中,荧光标记的抗原可以通过粘附或可能通过另一种非共价模式嵌入原位生成的捕获结构406的固化聚合物网络内。可以进行测定以测量B细胞的抗原提取。当B细胞与固化的聚合物网络缔合或结合时,如果B细胞表达对抗原特异的抗体,则可以从固化的聚合物网络中提取抗原。更高亲和力的抗体可以表现出更高水平的抗原提取,并因此来自原位生成的捕获结构的固化聚合物网络的荧光信号损失。

[0086] 测定分析物的这些示例决不是限制性的,并且测定分析物可以是任何合适的测定分析物,如技术人员可以选择的。

[0087] 检测试剂。可以通过检测试剂检测测定试剂(或分析物)与其预定目标之间的相互作用的结果。检测试剂可包括可检测标记。检测试剂的可检测标记可包括荧光标记、比色标记或发光标记。在一些实施例中,检测试剂可包括至少第一抗体。检测试剂可包括可检测地标记的第一抗体。在一些实施例中,检测试剂可包括第二抗体,其中第二抗体可包括可检测标记。在一些实施例中,其中标记的第二抗体是二级抗体并且与至少第一抗体结合。第一和/或第二抗体可以是IgG抗体。第一和/或第二抗体可以是抗体的片段。在其他实施例中,检测试剂可包括嵌入染料。在其他实施例中,检测试剂可包括FRET标记的寡核苷酸,其可包括但不限于分子信标、双杂交探针、**Scorpion®**或**Eclipse®**探针。FRET标记的寡核苷酸探针或探针对可包括荧光标记,其在发生杂交事件之前不发荧光。检测试剂可以是嵌入染料,包括但不限于菲啶或吡啶染料。

[0088] 用于多重测定的具有一个或更多个原位生成的捕获结构的微流体设备。所述封壳中的至少一个原位生成的捕获结构,以及可选地,其中所述至少一个原位生成的捕获结构可以设置在微流体设备400、450的至少一个隔绝围栏内,可以被配置为检测多于一种相互

作用(例如,可以具有与原位生成的捕获结构结合的两种、三种或更多种不同的测定试剂或分析物),从而提供一种进行多重测定的模式。在一些实施例中,封壳或至少一个隔绝围栏的单个原位生成的捕获结构被配置为包含检测两种不同分析物(例如,细胞的生物产物)的两种测定试剂。

[0089] 在其他实施例中,微流体设备400、450的封壳可包括设置在其中的两个或更多个原位生成的捕获结构。在一些实施例中,微流体设备400、450的至少一个隔绝围栏可包括设置在其中的两个或更多个原位生成的捕获结构。两个或更多个原位生成的捕获结构可以设置在隔绝围栏的隔离区域内。对于微流体设备450,第一原位生成的捕获结构的第一固化聚合物网络可包括第一测定试剂或测定分析物,第二原位生成的捕获结构的第二固化聚合物网络可包括的第二测定试剂或测定分析物,并且对于至少一个隔绝围栏中的每个另外的原位生成的捕获结构以此类推。对于微流体设备400,第一原位生成的捕获结构的第一固化聚合物网络可包括第一类型的功能化位点,第二原位生成的捕获结构的第二固化聚合物网络可包括第二类型的功能化位点,每个都可以接受不同种类的检测试剂或检测分析物。在微流体设备400、450的实施例中,在封壳内或在至少一个隔绝围栏内具有多个原位生成的捕获结构,第一测定试剂或测定分析物可以与第二测定试剂或测定分析物不同,并且对于每种另外的测定试剂或测定分析物,以此类推。第一原位生成的捕获结构和第二原位生成的捕获结构可以设置在封壳内的不同位置,或者可选地,设置在微流体设备的至少一个隔绝围栏内。第一原位生成的捕获结构和原位生成的第二捕获结构可以分别设置在封壳的第一壁和第二壁上,或者可以在同一壁上彼此相邻地定位。第一原位生成的捕获结构和原位生成的第二捕获结构可以分别设置在隔绝围栏的第一壁和第二壁上,或者可以在隔绝围栏的第一壁上彼此相邻地设置。

[0090] 图7中示出了包括至少一个隔绝围栏的微流体设备的示例,其中隔绝围栏包括多于一个的原位生成的捕获结构。示出了微流体设备700的一部分,其显示一个隔绝围栏730。微流体设备700可以具有微流体设备100、200、230、250、280、290、400、450、500中的任何组件和特征的任何组合,可以是本领域技术人员可以选择的任何合适的组合。隔绝围栏730可以由相同的微流体回路材料260构成,其也限定通道264。第一流体介质(未示出)可以与微流体通道264中的流278一起流动。隔绝围栏730具有三个捕获结构702、704、708,其设置在围栏730内的三个物理上可区分的位置中。有两个微物体706加载到围栏730中,在该实施例中,其产生生物产物716、718和720。可以存在少至一个微物体706,或者可以存在多个微物体706,这可以适合于所选择的测定。生物产物716、718、720可以全部不同,或者可以是相同的生物产物,其通过测定试剂710、712、714(或者可以是任何选择的测定试剂和/或测定分析物)测定三种不同的特征,测定试剂710、712、714分别包括在捕获结构702、704、708内和/或上,形成原位捕获结构(702加710)、(704加712)和(708加714),它们等同于图4B的原位生成的捕获结构406,或图4C的原位生成的捕获结构406A和/或406B。测定试剂710、712、714各自彼此不同,并测试不同的生物产物或生物产物的不同特征。如图7所示,测定试剂710、712、714显示为易于观察的抗体,但多重原位生成的捕获结构不限于仅包括抗体测定试剂,而可以是如本文所述的测定试剂(或测定分析物)的任何合适组合。

[0091] 至少一个捕获结构的其他性质。当原位生成的捕获结构位于封壳内并且任选地位于流动区域内时,原位生成的捕获结构的尺寸可以具有可允许流体介质流过流动区域的任

何合适的尺寸。在一些实施例中,原位生成的捕获结构的横跨流动区域(可以是微流体通道)的大小可以小于流动区域宽度的80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、1%或更小。微流体设备的隔绝围栏的隔离区域可具有约50微米至约250微米的宽度,并且其中产生的原位生成的捕获结构的宽度可在隔离区域宽度的约1/8至约3/4的范围内或其间的任何值。在具有约50微米的宽度或在约60微米至约190微米(或其间的任何值)的范围内的隔离区域中,在宽度约为250微米的隔离区域中,原位产生的捕获结构的跨隔离区域的宽度可以在约5微米至约35微米(或其间的任何值)的范围内。在各种实施例中,原位生成的捕获结构可以配置成允许微型物体离开,包括但不限于来自隔绝围栏的生物微型物体(例如,生物细胞或胚胎)或微珠。

[0092] 在一些实施例中,原位生成的捕获结构可以对流体介质流是透过的。固化的聚合物网络可能对多个微物体的至少一个子集不是透过的。在一些实施例中,固化的聚合物网络对于直径大于约1nm、2nm、10nm、100nm、250nm、500nm、600nm、700nm、800nm、900nm、1微米、2微米、3微米、4微米、5微米、6微米、7微米、8微米、9微米、10微米、11微米、12微米、13微米、14微米、15微米或更大的微物体基本上是不透过的。

[0093] 在一些实施例中,原位生成的捕获结构的至少一部分可以是可移除的。如下所述,原位生成的捕获结构可以通过水解、蛋白质水解、渗透变化、温度变化或光学照射至少部分地除去。

[0094] 具有至少一个原位生成的捕获结构的微流体设备的其他特征。微流体设备可以是本文所述的任何微流体设备,并且可以包括任何组合的以下描述的任何组件、特征或尺寸。

[0095] 在一些实施例中,微流体设备的封壳还可包括选择部。选择区域可包含至少一个原位生成的捕获结构和至少部分流动区域。选择部可以是微流体设备的封壳的不同区域,其中如本文所述进行测定。

[0096] 在一些实施例中,微流体设备的封壳还可包括隔离部。基于在测定部中获得的测定结果,隔离部可用于维持、生长和/或扩增所选择的微物体。隔离部可以包括至少一个隔绝围栏,其可以被配置为类似如上所述的选择部的隔绝围栏,但是可以不具有位于隔绝围栏内的任何捕获结构。隔离部可包括多个隔绝围栏。隔离部可以是微流体设备的封壳中的不同区域,其与选择部流体连接。隔离部可以进一步包括微流体通道,其是流动区域的一部分,并且其中至少一个隔绝围栏中的每一个都在微流体通道打开。隔离部的至少一个隔绝围栏的开口可以从微流体通道横向打开。

[0097] 用于原位生成的捕获结构的固化聚合物网络中的聚合物。在原位生成的捕获结构的固化聚合物网络的各种实施例中,固化的聚合物网络可以是合成聚合物、改性合成聚合物、或可光或温度活化的生物聚合物。用于形成固化聚合物网络的功能化预聚物可以是本文所述的用于固化的聚合物网络中的任何聚合物。生物聚合物可以配置成温度或光可活化以形成固化的聚合物网络。在一些实施例中,生物聚合物可被改性为包括提供可被温度或光活化的能力的部分。合成聚合物改性可包括大小改性基序、裂解基序、反应性末端部分和/或细胞识别基序。

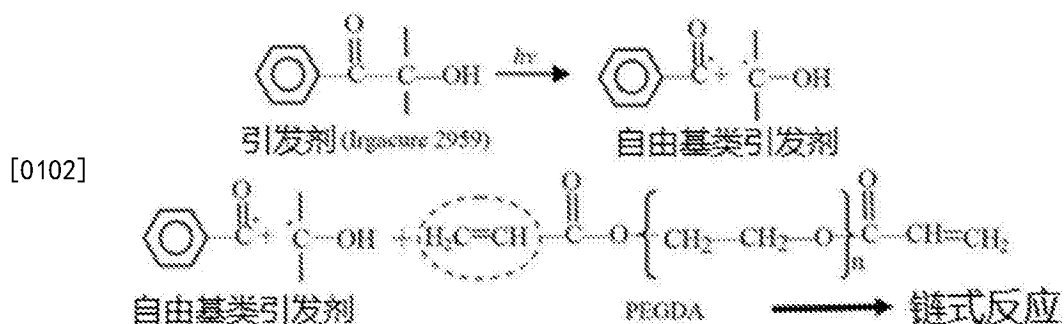
[0098] 在原位生成的捕获结构的固化聚合物网络的一些实施例中,固化的聚合物网络可包括聚乙二醇、改性聚乙二醇、聚乳酸(PLA)、改性聚乳酸、聚乙醇酸(PGA)、改性聚乙醇酸、聚丙烯酰胺(PAM)、改性聚丙烯酰胺、聚-N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAm)、改性聚-N-异丙基丙

烯酰胺、聚乙烯醇 (PVA)、改性聚乙烯醇、聚丙烯酸 (PAA)、改性聚丙烯酸、聚己内酯 (PCL)、改性聚己内酯、纤连蛋白、改性纤连蛋白、胶原蛋白、改性胶原蛋白、明胶、改性明胶、层粘连蛋白、改性层粘连蛋白、多糖、改性多糖或任何组合的共聚物中的至少一种。在其他实施例中, 聚合物可包括聚乙二醇、改性聚乙二醇、聚乳酸 (PLA)、改性聚乳酸、聚乙醇酸 (PGA)、改性聚乙醇酸、聚乙烯醇 (PVA)、改性聚乙烯醇、聚丙烯酸 (PAA)、改性聚丙烯酸、聚己内酯 (PCL)、改性聚己内酯、纤连蛋白、改性纤连蛋白、胶原蛋白、改性胶原蛋白、层粘连蛋白、改性层粘连蛋白、多糖、改性多糖或任何组合的共聚物中的至少一种。在其他实施例中, 聚合物可包括聚乙二醇、改性聚乙二醇、聚乳酸 (PLA)、改性聚乳酸、聚乙醇酸 (PGA)、改性聚乙醇酸、聚乙烯醇 (PVA)、改性聚乙烯醇、聚丙烯酸 (PAA)、改性聚丙烯酸、纤连蛋白、改性纤连蛋白、胶原蛋白、改性胶原蛋白、层粘连蛋白、改性层粘连蛋白或任何组合的共聚物中的至少一种。在一些实施例中, 固化的聚合物网络不包括硅氧烷聚合物。在一些实施例中, 固化的聚合物网络可以不包括聚乳酸 (PLA) 或改性聚乳酸聚合物。在其他实施例中, 固化的聚合物网络可以不包括聚乙醇酸 (PGA) 或改性聚乙醇酸聚合物。在一些实施例中, 固化的聚合物网络可以不包括聚丙烯酰胺或改性聚丙烯酰胺聚合物。在其他实施例中, 固化的聚合物网络可以不包括聚乙烯醇 (PVA) 或改性聚乙烯醇聚合物。在一些实施例中, 固化的聚合物网络可以不包括聚丙烯酸 (PAA) 或改性PAA聚合物。在一些其他实施例中, 固化的聚合物网络可以不包括聚己内酯 (PCL) 或改性聚己内酯聚合物。在其他实施例中, 固化的聚合物网络可以由纤连蛋白或改性纤连蛋白聚合物形成。在一些其他实施例中, 固化的聚合物网络可以由胶原蛋白或改性胶原蛋白聚合物形成。在一些其他实施例中, 固化的聚合物网络可以由层粘连蛋白或改性的层粘连蛋白聚合物形成。在一些实施例中, 固化的聚合物网络可仅包括一种聚合物。在各种实施例中, 仅包含一种聚合物的固化聚合物网络包括改性聚乙二醇聚合物。

[0099] 确定用于固化聚合物网络的聚合物的适合性的物理和化学特性可包括分子量、疏水性、溶解度、扩散速率、粘度 (例如介质的粘度)、激发和/或发射范围 (例如其中固有的荧光试剂的)、已知的背景荧光、影响聚合的特性和固化的聚合物网络的孔径。固化的聚合物网络在可流动聚合物 (例如, 预聚物溶液) 的聚合或热凝胶化时形成。

[0100] 在可以使用的许多聚合物中, 一种类型的聚合物是聚乙二醇二丙烯酸酯 (PEGDA), 其是改性聚乙二醇聚合物组中的成员。光引发聚合的机理如式1所示。自由基引发剂 Igracure® 2959 (BASF) 是一种高效的非黄化自由基 α -羟基酮光引发剂, 通常用于在UV区域的波长 (例如365nm) 下引发, 但也可以使用其它引发剂。用于聚合反应的另一种有用的光引发剂类的示例是酰基次膦酸锂类, 其中的苯基2,4,6,-三甲基苯甲酰次膦酸锂由于其在比 α -羟基酮类更长波长 (例如, 405nm) 处的更有效吸收而具有特别的实用性。

[0101] 式1



[0103] 可以光聚合的其他类型的PEG包括PEG二甲基丙烯酸酯和/或多臂PEG (n-PEG) 丙烯酸酯 (n-PEG-Acr)。可以使用的其他聚合物类包括聚乙烯醇 (PVA)、聚乳酸 (PLA)、聚丙烯酸 (PAA)、聚丙烯酰胺 (PAM)、聚乙醇酸 (PGA) 或聚己内酯 (PCL)。

[0104] 聚合物的分子量范围可以根据所公开的原位生成的捕获结构的性能的要求而变化。取决于聚合物的结构,宽范围的可流动聚合物的分子量可能是合适的。有用的星型聚合物的 M_w (重均分子量) 可以在约500Da至约20kDa (例如,四臂聚合物) 的范围内,或者对于每个臂或对于线性聚合物可以至多为约5kDa,或其间的任何值。

[0105] 可以使用各种共聚物类,包括但不限于:任何上面列出的聚合物,或生物聚合物,例如纤连蛋白、胶原蛋白或层粘连蛋白。可以使用如葡聚糖的多糖或改性胶原蛋白。也可以使用具有用于聚合的可光活化官能团的生物聚合物。

[0106] 交联可以通过线性或分支PEG聚合物的辐射、PRG丙烯酸酯的自由基聚合、以及特定化学反应 (诸如迈克尔加成、缩合、点击化学、天然化学连接和/或酶促反应) 来进行。

[0107] 基于聚合物的性质 (例如星形、多臂或梳形聚合物的可流动聚合物的构型、可交联官能团之间的聚合物链段长度) 和聚合条件 (温度或光引发的程度、存在的可光活化的引发剂的量、存在的自由基终止剂的量等),可以选择聚合物以具有所需的交联范围。

[0108] 在一些实施例中,固化的聚合物网络的聚合物可以是改性的PEG聚合物。聚合物可以是星形、4臂或2臂PEG二丙烯酸酯聚合物。

[0109] 可溶胀的聚合物。PEG聚合物可以在各种条件下溶胀,并且可以通过回复到原始介质/温度来逆转。聚-N-异丙基丙烯酰胺 (PNIPAm) 可通过升高温度而溶胀,并通过冷却而去溶胀。

[0110] 尺寸改性基序。一些水凝胶,包括聚-N-异丙基丙烯酰胺 (PNIPAm) 或聚丙烯酰胺 (PAM),也可以包含特定部分,例如偶氮苯,其在功能化聚合物的表面暴露于光时改变顺式/反式方位。这种转变可以使聚合物的部分 (例如围栏内的原位生成的捕获结构) 的尺寸发生显著变化。或者,这些聚合物可包括在暴露于UV光时交联的肉桂酸官能团,其在除去光时是可逆转。与非交联状态相比,交联聚合物是伸长的。可以引入这些聚合物的另一部分包括无色三苯基甲烷 (triphenyl leucomethane),其在光照下在暴露于光时可逆地形成离子对。如果将叶绿酸铜钠包括在聚合物中,则活化光的波长可以进入可见光范围。

[0111] 功能化的其他修改。聚合物 (例如,PEG) 可以通过在 (PEG) 聚合物的一个或两个末端引入官能团来改性,所述官能团可以包括硫醇、马来酰亚胺、羧基、胺、甲氧基、叠氮化物、乙烯基砜、乙炔或丙烯酸酯功能。引入的官能团可以相同或不同。可以引入所需的肽基序、抗体或通过适当的化学精制的其他限定的分子功能化,使得该部分能够特异性地与聚合物上的相应官能团反应。可以引入生物素化用于随后与链霉抗生物素蛋白连接的另一物质反应,或反之亦然。

[0112] 聚合物可包括各种基序,包括裂解基序、反应性末端基序或细胞识别基序。裂解基序可包括插入聚合物中的肽序列,其是一种或更多种蛋白酶的底物,包括但不限于基质金属蛋白酶、胶原酶或半胱氨酸蛋白酶,例如半胱天冬酶或组织蛋白酶。另一类裂解基序可包括光可裂解基序,例如硝基苄基光可切割连接基,其可插入预聚物的选定位置。裂解基序可以用于去除原位生成的捕获结构的固化的聚合物网络,或者如所描述的,当包括在原位生成的捕获结构中时可以作为测定分析物本身。可以改性聚合物以包括化学反应性基序,例

如但不限于N-羟基琥珀酰亚胺基(NHS)、生物素、炔基或叠氮基部分,其可以用于将测定试剂或测定分析物引入如上所述的原位生成的捕获结构的固化的聚合物网络。在其他实施例中,聚合物可包括细胞识别基序,包括但不限于RGD肽基序,其被可用作测定分析物或测定试剂的整联蛋白或如上所述的弗林蛋白酶底物识别。

[0113] 反转/移除/最小化原位生成的捕获结构。当没有其他用途时,可以使用许多机制来移除或减少原位生成的捕获结构。例如,一旦完成测定并且已经鉴定了期望的生物细胞,可以有用的是,去除原位生成的捕获结构以继续培养和扩增证明了所需的活性或性质的生物细胞。

[0114] 机械力。如果原位生成的捕获结构的至少一部分位于流动区域内而不是围栏的隔离区域,则可以使用增加的流动。例如,当原位生成的捕获结构位于封壳的流动区域内时,可以增加通过流动区域的流体流动的速率,这可以将至少一个捕获结构从其所附着的表面分离,其所附着的表面包括但不限于衬底、流动区域的壁(可以由微流体回路材料形成)或盖。在一些实施例中,所述至少一个原位生成的捕获结构可以位于隔绝围栏的隔离区域内,并且在测定完成之后,可以修改隔绝围栏或其中的隔离区域以使流动通过隔离区域,类似地将原位生成的捕获结构从其附着的表面上分离。

[0115] 水解敏感性:当形成原位生成的捕获结构时,可以包括致孔剂,其可以包括不能与光引发的聚合物化学连接的聚合物。所形成的水凝胶内的开口的程度/大小可以通过原位生成的捕获结构内的可接近性来定制水解速率。在其他实施例中,形成的孔可用于允许分泌的物质或化学试剂通过原位生成的捕获结构,但防止细胞移动通过原位生成的捕获结构。在其他实施例中,通过将可降解链段如聚酯、缩醛、富马酸酯、聚(富马酸丙二醇酯)或多羟基酸引入聚合物(例如PEG聚合物)中,可以提高这些聚合物的降解性。

[0116] 还原剂:PEG可以沿着大裂球(macromere)以间隔形成二硫键,其可以是随机的或预定的。二硫键可以被二硫苏糖醇(DTT)、巯基乙醇或TCEP破坏。

[0117] 热:聚N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAm)或其他合适的LCST聚合物可用于在加热时引入捕获结构。可以通过降低形成的聚合物捕获结构的温度来除去它们。聚合物可包括ELP或其他基序,其也允许通过其他机制如水解或蛋白水解除去。特别是,PNIPAm可用于为粘着细胞创建表面,但随后切换为允许排出。其他聚合物也可以根据温度显示尺寸变化。例如,包括在原位生成的捕获结构中的PEGDA水凝胶在温度从约40℃冷却至约20℃时可溶胀约20%。通过使用指向原位生成的捕获结构下方的衬底或者在原位生成的捕获结构上的透明盖(例如可以是ITO)处的激光照射,可以局部地增加PEGDA水凝胶原位生成的捕获结构的尺寸。

[0118] 蛋白水解敏感性:水凝胶可以具有任何种类的肽序列,使得通过选择的蛋白酶对选定基序的选择性蛋白水解可以去除/逆转/或最小化水凝胶捕获结构。一些类别的经改性的PEG包括具有弹性蛋白样肽(ELP)基序和/或具有对多种蛋白酶(酶敏感性肽ESP)易感性的肽基序的PEG。已知大量这些基序。一个有用的基序是RGD,它可能被限制为循环。

[0119] 渗透敏感性:可以使用钙浓度/其他渗透策略来降解和去除原位生成的捕获结构。如上所述,使用介质变化在尺寸上溶胀或去溶胀捕获结构。

[0120] 光引发的光裂解:如上所述,光可裂解基序(诸如硝基苄基光可裂解的连接基)可以包括在原位生成的捕获结构的固化的聚合物网络中。包括光可裂解基序的原位生成的捕获结构可以通过暴露于光而易于去除或减小尺寸,所述光包括至少一些具有合适波长的光

以引发光可裂解基序的切割。

[0121] 在一些应用中,原位生成的捕获结构可能不会被去除,但可以使用光或介质/溶剂变化简单地溶胀或去溶胀。一些类型的水凝胶可以包含对光可逆地响应的部分(例如,改变关于刚性键的区域化学;在聚合物内形成可逆交联,或形成/断裂离子对)。

[0122] 微流体设备辅助加热。微流体设备还可包括金属垫,金属垫在衬底上设置在原位生成的捕获结构的位置处。可以通过将连续的金属形状或金属形状的图案沉积到衬底上来产生金属垫。导热垫可包括任何类型的金属,其可被光源激发以产生热量。合适的金属包括铬、金、银、铝、氧化铟锡或其任何组合。金属可以组合在多层导热垫中,例如铬层、钛层、金层。其他金属(和合金)在本领域中是已知的。导热垫可以包括连续的金属表面或者可以包括金属图案(例如诸如点、正方形、线、圆锥、不规则形状的金属形状)。在一些实施例中,金垫可以在将要/已经产生原位生成的捕获结构的位置处设置在衬底上。导热垫可用于产生热以凝胶化、溶胀、减少或移除原位生成的捕获结构。可以通过在需要这种胶凝化、溶胀、减小或移除的位置处将光引导到微流体设备中来产生热。在一些实施例中,固化的聚合物网络可包括热敏聚合物。当原位生成的捕获结构的固化聚合物网络包括热敏聚合物时,该设备可进一步包括设置在衬底上的导热垫,导热垫位于将被引入的至少一个原位生成的捕获结构下方的位置处。

[0123] 使用功能化捕获结构测定微物体的方法。提供了一种方法,用于在具有至少第一原位生成的捕获结构的微流体设备中测定微物体(例如,生物细胞或胚胎)或由微物体产生的生物产物,包括以下步骤:将微流体设备内的微物体设置在靠近第一原位生成的捕获结构的区域中,其中原位生成的捕获结构包括固化的聚合物网络,并且另外其中固化的聚合物网络包括测定试剂或测定分析物;使测定试剂或测定分析物与微物体或微物体的生物产物接触;以及检测测定试剂或测定分析物与微物体或生物产物的相互作用。在各种实施例中,提供了一种方法,用于测定具有至少第一原位生成的捕获结构的微流体设备中的微物体(例如,生物细胞),包括以下步骤:将微流体设备内的微物体设置在接近原位生成的捕获结构的区域中,其中原位生成的捕获结构包括固化的聚合物网络,并且另外其中固化的聚合物网络包括测定分析物;使测定分析物与微物体的生物产物接触;并检测测定分析物与生物产物的相互作用。

[0124] 在其他实施例中,提供了另一种方法,用于测定具有至少第一原位生成的捕获结构的微流体设备中的微物体(例如,生物细胞),包括以下步骤:将微流体设备内的微物体设置在接近第一原位生成的捕获结构的区域中,其中原位生成的捕获结构包括固化的聚合物网络,并且另外其中固化的聚合物网络包括测定分析物;使测定分析物与微物体接触;并检测测定分析物与微物体的相互作用。在其他实施例中,提供了一种方法,用于测定具有至少第一原位生成的捕获结构的微流体设备中的微物体(例如,生物细胞),包括以下步骤:将微流体设备内的微物体设置在接近第一原位生成的捕获结构的区域中,其中原位生成的捕获结构包括固化的聚合物网络,并且另外其中固化的聚合物网络包括测定试剂;使测定试剂与微物体或微物体的生物产物接触;检测测定试剂与微物体或生物产物的相互作用。

[0125] 任何上述方法的测定试剂或测定分析物可包括本文所述的任何测定试剂或测定分析物。

[0126] 在任何测定微物体的方法的各种实施例中,包含在原位生成的捕获结构内和/或

上的测定试剂或测定分析物可以以上述任何方式共价或非共价连接到原位生成的捕获结构的固化的聚合物网络上。测定试剂或测定分析物可包括蛋白质、寡核苷酸、有机分子或糖类。测定试剂或测定分析物可以分别是如上所述的任何测定试剂或测定分析物。

[0127] 在测定微物体的任何方法的各种实施例中,微物体的生物产物可包括蛋白质、寡核苷酸、有机分子或糖类。微物体的生物产物可以是如本文所述的任何生物产物,并且可以在方法中用作通过包含在原位生成的捕获结构内和/或上的测定试剂测量的分析物。或者,微物体的生物产物可以结合、反应和/或裂解包含在原位生成的捕获物体和/或上的测定分析物,由此生物产物在测定方法中充当试剂。

[0128] 在测定微物体(例如,生物细胞或胚胎)的任何方法的各种实施例中,微流体设备可包括封壳,所述封壳包括:衬底、微流体回路材料和位于所述封壳内的流动区域,其中至少一个原位生成的捕获结构设置在封壳内。在一些实施例中,微流体设备的封壳还包括至少一个隔绝围栏,其中至少一个原位生成的捕获结构可以设置在至少一个隔绝围栏内。隔绝围栏可包括隔离区域和连接区域,其中连接区域可具有通向流动区域的近侧开口和通向隔离区域的远侧开口。在一些实施例中,原位生成的捕获结构可以设置在隔绝围栏的隔离区域内。流动区域可包括通道。至少一个捕获结构可以设置在与隔绝围栏的第一壁相邻的第一位置处。

[0129] 在测定微物体的任何方法的各种实施例中,封壳可包括多个隔绝围栏。多个隔绝围栏可以成排排成,并且多个隔绝围栏中的每一个的近侧开口可以在流动区域内沿共同方向打开。在一些实施例中,流动区域可包括通道,并且多个隔绝围栏中的每一个的近侧开口可从微流体通道的一侧打开。

[0130] 在测定微物体的任何方法的各种实施例中,微流体设备的衬底可以配置成在封壳内的流体介质中的微物体上产生介电泳(DEP)力。将微流体设备内的微物体(例如,生物细胞)设置在接近至少第一原位生成的捕获结构的区域的步骤可包括:使用介电泳力移动一个或更多个微物体。介电泳力可以是光学致动的。或者,微流体设备的衬底可以配置成在封壳内的液滴上产生电润湿力。将微流体设备内的微物体设置到接近至少第一原位生成的捕获结构的区域的步骤可包括:使用电润湿力移动一个或更多个微物体。电润湿力可以是光学致动的。在一些实施例中,微流体设备可包括一个或更多个衬底,其可配置成在微流体设备的封壳内产生介电泳力和电润湿力两者,该两者中的每个可以是光致动的。或者,流动区域(例如,微流体通道)内的流体流动和/或重力可用于在微流体设备内设置一个或更多个微物体。在一些实施例中,介电泳力、电润湿力、重力和/或流体流的组合可用于设置一个或更多个微物体。在各种实施例中,微流体设备可具有包括涂层材料的至少一个表面。在一些实施例中,涂层材料可以共价改性至少一个表面以提供经调理的表面,其增强细胞生长、活力、便携性及其任何组合。经调理的表面可以选择为本文所述的任何合适的经调理的表面。

[0131] 在测定微物体的任何方法的各种实施例中,允许包含在原位生成的捕获结构内和/或上的测定试剂或测定分析物与微物体(例如,生物细胞或胚胎)或微物体的生物产物相互作用。在一些实施例中,相互作用可以是非共价的,例如,蛋白质(诸如抗原)或细胞因子(例如,分析物)(其是微物体的生物产物)与包含在原位生成的捕获结构内和/或上的抗体(例如,测定试剂)的结合。在非共价相互作用的另一个示例中,原位生成的捕获结构可以包括在微物体表面上表达的蛋白质的结合识别基序,其中如果微物体表达感兴趣的蛋白

质,它可以被结合到原位生成的捕获结构。在其他实施例中,化学键可以通过相互作用裂解,例如当原位生成的捕获结构包括蛋白酶识别基序,从而提供与原位生成的捕获结构结合的测定分析物时。在该实施例中,相互作用可以是由微物体分泌的或在微物体表面上表达的蛋白酶的相互作用,蛋白酶与识别基序相互作用以裂解包括在原位生成的捕获结构内的底物。在其他实施例中,相互作用可包括共价相互作用。例如,原位生成的捕获结构可以包括诸如抗体的测定试剂,其被配置为与生物产物(例如,抗原、细胞因子或任何分泌的生物产物)特异性结合,其中原位生成的捕获结构或抗体还包括反应性部分,例如交联部分(例如,羧酸、氨基部分、硫醇部分或其活化物质),其与非共价结合抗体测定试剂的生物产物共价结合。

[0132] 在测定微物体的任何方法的各种实施例中,检测步骤包括检测来自至少一个捕获结构的信号。在该方法的各种实施例中,可检测信号可以包含于在原位生成的捕获结构内和/或上所包括的测定试剂或测定分析物中。可检测信号可以集中到至少一个捕获结构的表面,或者可以在封壳内或可选地隔绝围栏内紧邻原位生成的捕获结构的区域中被检测。在其他实施例中,可检测信号可以集中到原位生成的捕获结构的内部部分,其可以通过穿过固化的聚合物网络而发生。可检测信号可以是荧光的、发光的或比色的。在一些实施例中,信号可以是荧光的。在一些实施例中,检测荧光信号的步骤还可包括将荧光信号量化。

[0133] 在测定微物体的任何方法的一些实施例中,检测来自至少一个捕获结构的信号的步骤可包括:检测至少一个捕获结构的初始荧光信号的损失。例如,原位生成的捕获结构可以包括固化的聚合物网络,其包含蛋白酶底物基序作为测定分析物,其中底物基序包括可检测信号,例如荧光标记。检测测定分析物和能够裂解它的蛋白酶之间的相互作用可以包括检测来自包含荧光蛋白酶底物基序的原位生成的捕获结构的荧光信号的损失程度。在另一个实施例中,该方法可包括检测荧光信号的增益,当包括蛋白酶底物基序作为测定分析物的原位生成的捕获结构包括猝灭荧光对(例如,FRET对,其可以在插入的底物基序中的适当间隔的不同氨基酸上具有双标记,或者可以包括分子信标或其他FRET探针构建体)。在该实施例中,原位生成的捕获结构的蛋白酶底物基序与由微物体产生的蛋白酶(例如,生物产物)之间的相互作用可以允许在通过蛋白酶裂解底物来增加猝灭荧光对之间的空间分隔时检测信号的增加。可以检测一种或更多种荧光信号。

[0134] 在测定微物体的任何方法的其他实施例中,荧光信号可以包含在生物产物或微物体体内,所述生物产物或微物体与包含在原位生成的捕获结构内和/或上的测定试剂或测定分析物相互作用。例如,由微物体(例如,生物产物)分泌的感兴趣蛋白质还可以包括诸如绿色荧光蛋白(GFP)的信号,因此当与包含在原位生成的捕获结构中和/或上的与感兴趣蛋白质特异性结合的抗体相互作用时可以被直接检测到。在其他实施例中,在其表面上表达感兴趣蛋白质的微物体也可以具有包含在微物体内的可检测信号(例如mCherry,一种具有与Discoma菌种相关的序列的插入蛋白质),于是与原位生成的捕获结构内和/或上包含的抗体(例如,测定试剂)结合时,可以直接检测细胞内蛋白质的荧光。

[0135] 在测定微物体的任何方法的其他实施例中,检测步骤还包括将具有可检测标记的检测试剂引入靠近原位生成的捕获结构的区域。可以使用本文描述的任何合适的检测试剂。引入检测试剂可包括使含有检测试剂的溶液流过微流体设备的流动区域。在一些实施例中,当至少一个原位生成的捕获结构位于隔绝围栏内时,检测试剂可以在流入微流体设

备的封壳后基本上或仅通过扩散进入包含原位生成的捕获结构的隔绝围栏。引入检测试剂可以在已进行将微物体设置到封壳中或者可选地隔绝围栏中的步骤之后进行。在一些实施例中,可以在将微物体引入封壳或隔绝围栏之前引入检测试剂。在一些实施例中,可以刚好在执行检测步骤之前执行引入检测试剂的步骤。在各种实施例中,当包含在原地生成的捕获结构内和/或上的测定试剂与生物产物或微物体本身(例如,测定的分析物)相互作用时,检测试剂被配置成集中至原位生成的捕获结构。可以通过任何合适的机制,例如形成结合对、与靶寡核苷酸杂交、插入或与生物产物或微物体共价反应,将检测试剂集中至原位生成的捕获结构(例如,被约束至原位生成的捕获结构的直接区域),其本身通过测定试剂或测定分析物/微物体或其生物产物之间的相互作用被约束到原位生成的捕获结构的直接区域。在一些实施例中,检测试剂/微物体或其生物产物/测定试剂或测定分析物/原位生成的捕获结构的固化的聚合物网络之间的相互作用可以形成复合物,其可以用于集中检测试剂的可检测信号。在一些实施例中,检测试剂的可检测标记在其集中至原位生成的捕获结构之前可能是不可检测的。例如,如果检测试剂是嵌入剂染料或分子信标(FRET淬灭发夹探针)、Scorpions(FRET淬灭探针/引物组合)或寡核苷酸的任何其他FRET标记,则检测信号可能直到检测试剂结合到微物体的生物产物或微物体本身后才进行,在一些实施例中,微物体的生物产物或微物体本身可以固定在原位生成的捕获结构上。在各种实施例中,检测试剂的可检测标记非共价附着于测定试剂或测定分析物。

[0136] 在测定微物体的任何方法的一些实施例中,检测试剂包含至少第一抗体。一种或更多种抗体可用于检测包含在原地生成的捕获结构内和/或上的测定试剂或测定分析物与微物体的生物产物或微物体本身之间的相互作用。在一些实施例中,该方法可包括引入对测定分析物/(生物产物或微物体)对或测定试剂/(生物产物或微物体)对具有特异性的第一检测抗体,然后引入被标记的并且可以与测定分析物/(生物产物或微物体)对或测定试剂/(生物产物或微物体)对的至少一部分结合的第二抗体。在一些实施例中,该方法可包括引入对第一检测抗体具有特异性的第二抗体。在其他实施例中,标记的第二抗体可以对测定分析物/(生物产物或微物体)对的复合物或测定试剂/(生物产物或微物体)对的复合物具有特异性。

[0137] 在测定微物体的任何方法的各种实施例中,该方法可以进一步包括从微流体设备排出微物体的步骤。可以基于测定结果(例如,在检测步骤中证明所需的信号水平)排出微物体。在该方法的各种实施例中,从微流体设备排出微物体还可包括将微物体移动到微流体设备的衬底的另一部分。例如,测定步骤可以在如本文所述的选择部内进行,并且由测定方法确定而显示选定特征的微物体可以通过DEP力、电润湿力、重力或流体流移动到微流体设备的隔离部用于进一步处理。

[0138] 在测定微物体的任何方法的各种实施例中,该方法可以进一步包括通过引入水解剂、引入蛋白水解剂、引入增加或减少流动区域和/或隔绝围栏内的流体介质的渗透压摩尔浓度的流体介质、改变原位生成的捕获结构的温度、或光学照射原位生成的捕获结构来减小或去除原位生成的捕获结构,从而减小或移除至少一个捕获结构。改变温度的步骤可以进一步包括光学照射衬底上的与原位生成的捕获结构相邻或在其下方的导热垫。在一些实施例中,减少(例如,减少原位生成的捕获结构的功能化位点的大小或数量)或去除原位生成的捕获结构可以将微物体从其集中/约束释放到原位生成的捕获结构。

[0139] 在其他实施例中,排出微物体的步骤可包括引入微物体已结合的测定试剂/测定分析物的竞争性结合配偶体,如上所述。测定试剂/测定分析物的竞争结合配偶体可以使微物体从其与阵列试剂/测定分析物的结合相互作用中释放,并允许排出微物体。

[0140] 图5A-E显示了在微流体设备中测定微物体(例如,生物细胞或胚胎)的方法的一个实施例,所述微流体设备在封壳内具有至少第一原位生成的捕获结构。在该实施例中,封壳包括隔绝围栏,隔绝围栏包括设置在其中的至少第一捕获结构,其中原位生成的捕获结构用作预选的测定区域。原位生成的捕获结构可以用例如测定试剂功能化,如图5A所示。该方法不限于此,并且原位生成的捕获结构可以代替地被功能化以包含测定分析物。

[0141] 在图5A中,显示了原位生成的捕获结构502,其具有例如引入固化的聚合物网络中的链霉抗生物素蛋白。可以使结构聚合物的预聚物溶液(例如链霉抗生物素蛋白改性的反应性预聚物)和可溶性引发剂流入微流体设备。原位生成的捕获结构的精确和选择性固化可以通过在隔绝围栏530的一个角落中进行照射来完成,类似于图4C中所示的用于将预聚物405转化为原位生成的捕获结构404的示意性过程。在该实施例中,原位生成的捕获结构502被生成在由微流体回路材料260形成的壁附近/处,位于隔离区域的远离隔绝围栏530的通向流体介质所流动的微流体通道264的开口的角落处(278)。在形成原位生成的捕获结构之后,可以通过冲洗微流体通道264并允许未使用的试剂扩散出隔绝围栏530,从系统中除去过量的聚合物溶液和引发剂。原位生成的捕获结构502可以在原位生成的捕获结构的表面上和整个固化的聚合物网络中呈现链霉抗生物素蛋白。

[0142] 可以将功能化抗体引入隔绝围栏530的隔离区域。功能化抗体可以具有生物素功能,其可以结合到原位生成的捕获结构502的表面上或内部的链霉抗生物素蛋白位点,从而提供包含在原位生成的捕获结构502的表面或内部的抗体504,提供与图4B的捕获结构406等效的原位生成的捕获结构(502加504)(其也等同于图4C的示意性的原位生成的捕获结构406B)。抗体504可以是对分泌的生物产物特异的任何抗体。在一些实施例中,抗体504可以是细胞因子,例如IL-2、IFN α/β 、TNF α 等。抗体504可用于检测分泌感兴趣细胞因子的细胞。不需要所有生物素化抗体504包括在至少一个原位生成的捕获结构内和/或上。生物素化抗体504的一些部分也可以在溶液中自由浮动。也可以使用反向配对,例如,原位生成的捕获结构502可以具有通过聚合物网络的光引发固化而包含的生物素化位点,并且可以改性抗体504以包括链霉抗生物素蛋白。链霉抗生物素蛋白功能可结合到原位生成的捕获结构502上的生物素位点,从而还提供包含在原位生成的捕获结构502表面处或之内的抗体504。

[0143] 而在图5A-5E中,为了方便和简单,将测定试剂显示为抗体,但该方法不限于此。测定试剂可以是如本文所述的任何合适的测定试剂。

[0144] 生物细胞506可以流入微流体通道264,并且通过本文所述的任何合适的方法设置到隔绝围栏530的隔离区域中。在引入链霉抗生物素蛋白功能化抗体之前或之后,可将感兴趣的细胞506引入具有链霉抗生物素蛋白功能化捕获结构的围栏中。可能存在一个或更多个感兴趣的细胞506。在一些实施例中,可以存在单个细胞506。

[0145] 可以培养细胞,并且细胞可以分泌生物产物。生物产物可以是蛋白质。细胞的蛋白质性生物产物的一个非限制性示例可以是细胞因子。可产生细胞因子的细胞的一个非限制性示例可以是T细胞。

[0146] 如图5B所示,随着细胞培养的继续,细胞506可以产生可以与抗体测定试剂504结

合的生物产物508。生物产物508将通过其与原位生成的捕获结构502上的测定试剂504的相互作用而被捕获,例如通过原位生成的捕获结构502内或表面上的抗体捕获。图5C显示了图5B的原位生成的捕获结构502的展开图,显示了通过生物产物508与原位生成的捕获结构502的测定试剂504(例如抗体)的相互作用(例如,结合)形成的复合物510。原位生成的捕获结构502可以位于围栏内的通向微流体通道的近侧开口附近,或者可以位于连接区域的更远端部分内或围栏的隔离区域内。

[0147] 包含在原位生成的捕获结构502的表面处或内部的抗体(测定试剂504)捕获并集中感兴趣的生物产物508(例如,分析物)。通过引入可以荧光标记的标记抗体512,可以使复合物510的集中的捕获的生物产物508/抗体504可检测,如图5D所示。对固定的抗体/细胞因子/抗体复合物514(其被集中至原位生成的捕获结构502/504的固化聚合物网络)的荧光信号的检测,可以允许检测和排序更多/更少活跃分泌的生物细胞。图5E示出了原位生成的捕获结构502所在的隔绝围栏的区域的展开图。显示了固定的抗体504/细胞因子(例如,生物产物508)/标记抗体512的复合物514。尽管为了简单起见,检测试剂在此显示为抗体,但检测试剂不限于此,但可以是如本文所述的任何合适的检测试剂。

[0148] 在一些其他实施例中,生物产物508本身可含有可检测的标记,例如但不限于绿色荧光蛋白。当生物产物508包括可检测标记时,可以不执行检测试剂的额外标记,但可以直接检测生物产物508的可检测标记的量。因此,在该方法的一些实施例中,分析物(例如,生物产物508)可以是可检测的分析物并且可以与测定试剂504相互作用并被捕获以形成可以被检测到的可检测复合物510'(未显示)。

[0149] 多重测定方法。在测定一种或更多种微物体(例如,生物细胞或胚胎)的方法的各种实施例中,可以进行多重测定。在一个实施例中,位于封壳内或任选地在隔绝围栏内的至少一个捕获结构可含有多于一种的测定试剂或测定分析物。在其他实施例中,封壳或可选地其中的隔绝围栏可包括第一捕获结构和第二捕获结构。第一捕获结构可以是如上所述的并且包括第一测定试剂或第一测定分析物。第二捕获结构可包括第二固化聚合物网络,第二固化聚合物网络可包括第二测定试剂或第二测定分析物。第二固化聚合物网络和第二测定试剂或第二测定分析物可包括任何组合的如上所述的任何特征。在一些实施例中,第一和第二捕获结构中的每一个包括不同的测定试剂或测定分析物。在一些实施例中,第一和第二捕获结构可包括彼此不同的第一测定试剂和第二测定试剂。在其他实施例中,第一和第二捕获结构可含有彼此不同的第一测定分析物和第二测定分析物。在其他实施例中,第一捕获结构和第二捕获结构可包括一个捕获结构上的测定试剂和第二捕获结构上的测定分析物。在多重测定的一些实施例中,第一捕获结构和第二捕获结构可以在可区分的位置处设置在封壳内,或者可选地,设置在隔绝围栏内。第一捕获结构和第二捕获结构的可区分位置可以与封壳的相同壁相邻或与其中的隔绝围栏的相同壁相邻,或者与封壳的不同壁相邻或与其中的隔绝围栏的不同壁相邻。

[0150] 在多重测定的各种实施例中,检测步骤包括检测第一分析物和第二分析物,其中第一分析物不同于第二分析物。第一分析物和第二分析物可以由微物体分泌的第一生物产物和第二生物产物。在其他实施例中,第一分析物和第二分析物可以是微物体分泌的生物产物,并且第二分析物可以是存在于微物体表面上的生物产物,并且可以彼此不同。在其他实施例中,检测步骤可包括检测与第一捕获结构上的第一测定分析物相互作用的第一

生物产物,和检测与第二捕获结构上的第二测定分析物相互作用的第二生物产物。在其他实施例中,检测步骤可包括检测与第一测定试剂相互作用的第一生物产物和检测与第二测定试剂相互作用的第二生物产物。

[0151] 检测相互作用的步骤可以进一步包括将第一检测试剂和第二检测试剂引入第一和第二捕获结构附近的区域,其中第一和第二检测试剂中的每一个包括可检测标记。第一检测试剂和第二检测试剂的可检测标记可各自独立地为荧光、比色或发光。检测步骤还可包括检测第一可检测标记的第一荧光信号和第二可检测标记的第二荧光信号。在一些实施例中,第一荧光信号和第二荧光信号可以是物理上可区分的,例如,位于封壳内的不同位置,或者可选地,位于其中的隔绝围栏内的不同位置。在其他实施例中,第一荧光信号和第二荧光信号可以是光谱上可区分的。在其他实施例中,第一或第二可检测信号中的一个可以是荧光的,而第一或第二可检测信号中的另一个可以不是荧光的。

[0152] 在多重方法的各种实施例中,第一和第二可检测试剂中的每一种可以非共价连接至相应的第一或第二测定试剂或测定分析物。在一些实施例中,第一和第二检测试剂中的每一种可包括抗体。在一些实施例中,第一和第二检测试剂中的每一种包括相应的第三和第四抗体,每个抗体可具有可检测的标记,其中第三抗体特异性结合到第一测定试剂或第一测定分析物/(生物产物或微物体)对并且第四抗体特异性结合到第二测定试剂或测定分析物/(生物产物或微物体)对。在一些实施例中,当第一测定试剂是抗体时,第三抗体可以是第一测定试剂的二级抗体。在一些实施例中,当第二测定试剂是抗体时,第四抗体可以是第二测定试剂的二级抗体。

[0153] 在多重测定的各种实施例中,可以量化第一和/或第二荧光信号。

[0154] 在该方法的各种实施例中,可以对生物产物的三种或更多种特征或微物体或微物体本身的三种或更多种不同生物产物或其任何组合进行多重测定。在封壳中或者可选地在其中的至少一个隔绝围栏内可以存在第三或更多捕获结构。第三或更多捕获结构中的每一个可包括固化的聚合物网络,并且第三或更多固化的聚合物网络中的每一个的固化的聚合物网络可包括测定试剂或测定分析物。第三或更多捕获结构中的每一个的测定试剂或测定分析物可以与第一捕获结构的第一测定试剂或测定分析物不同,和/或可以与第二捕获结构的第二测定试剂或测定分析物不同。第三或更多捕获结构的每种测定试剂或测定分析物可以彼此不同。在其他实施例中,第一和第二捕获结构中的一个或两个可替代地包括多于一种的测定试剂或测定分析物,可与第一捕获结构的第一测定试剂或测定分析物不同,并且可与第二捕获结构的第二测定试剂或测定分析物不同。

[0155] 在分析一个或更多个微物体的多重方法的各种实施例中,检测步骤还包括检测第一、第二、第三或更多可检测信号,第一、第二、第三或更多可检测信号是在至少隔绝围栏内的位置是不同的、可检测光谱是不同的、或者是前两者的组合。

[0156] 多重方法可包括上述用于单重方法的任何步骤,包括但不限于将一个或更多个微物体设置在微流体设备内,其中微流体设备包括配置成在封壳内或在其中的隔绝围栏内测定多于一种特性的至少一个捕获结构,或者可选地包括在封壳内的多于一个的捕获结构或在至少一个隔绝围栏内的多于一个的捕获结构,其中多于一个的捕获结构中的每一个被配置为测定一个特性;允许微物体释放或产生一种或更多种生物产物(其任何组合可以以任何组合来与如上所述的任何多重测定试剂和/或测定分析物的测定试剂或测定分析物一起

使用) ; 允许分析物或分析试剂与生物产物或微物体本身相互作用; 以及检测相互作用的任何方面。

[0157] 图7示出了根据本文所述方法的多重测定, 并显示了封壳(未示出)内的流动区域(微流体通道264)和微流体回路材料260, 微流体回路材料260形成限定通道264的壁。示出了微流体设备700内的一个隔绝围栏730, 其具有包围由微流体回路材料260制成的隔绝围栏的壁, 如上所述。隔绝围栏730具有三个捕获结构702、704、708, 其设置在围栏730内的三个物理上可区分的位置中。有两个微物体706加载到围栏730中, 在该实施例中, 其产生生物产物716、718和720。生物产物716、718、720可以全部不同, 或者可以是分别包括在捕获结构702、704、708内和/或上的测定试剂710、712、714测定三种不同特性的相同生物产物。测定试剂710、712、714各自彼此不同, 并测试不同的生物产物或生物产物的不同特性。如图7所示, 测定试剂710、712、714显示为易于观察的抗体, 但该方法不限于抗体测定试剂, 而可以是本文所述的测定试剂和/或测定分析物的任何合适组合。图7中所示的时间点是这样的时间点: 微物体706被允许产生生物产物716、718、720之后; 生物产物716、718、720已经与测定试剂710、712、714相互作用, 每个测定试剂固定到相应的捕获结构702、704、708; 并且在检测试剂722、724、726已经被引入隔绝围栏730并且已经特异性地结合到它们的目标716、718、720的时间点之后。为了便于观察, 检测试剂722、724、726表示为抗体, 但该方法不限于如上所述的抗体检测试剂。而且, 为了便于观察, 检测试剂722、724、726各自包括标记(未示出), 其中标记可以是直接附着于检测试剂722、724、726的可检测标记, 或者可选地, 标记可以附着于特异性结合到抗体722、724、726的第二抗体(未显示)。直接附着于检测试剂722、724、726的每个可检测标记可以通过在光谱上是可区分的而与每个其他可检测标记在检测上区分开, 或者可以通过检测试剂的可检测标记所结合的原位生成的捕获结构的位置来在检测上区分开。每个测定复合物可包括捕获结构、测定试剂或测定分析物(例如, 取决于所进行的测定)、微物体或生物产物(例如, 测定试剂或测定分析物是否与微物体或微物体的生物产物相互作用)和检测试剂的组合, 图7示出为(702/710/716/722)、(704/712/718/724)和/或(708/714/720/726), 其可以独立检测, 也可以同时检测。来自每个复合物的可检测信号可以通过与原位标准化信号比较、通过彼此归一化和/或任何合适的定量方法来量化。

[0158] 加载方法。将生物微物体(例如, 生物细胞)或微物体(包括但不限于珠粒)加载到封壳中或者替代地加载到隔绝围栏可以涉及使用流体流、重力、介电泳(DEP)力、电润湿、磁力或其任何组合, 如本文所述。DEP力可以光学地产生, 例如通过光电镊子(OET)配置, 和/或电学地产生, 例如通过以时间/空间模式激活多个电极/电极区域。类似地, 电润湿力可以光学地提供, 例如通过光电润湿(OEW)配置, 和/或可以电学提供, 例如通过以时间空间模式激活多个电极/电极区域。

[0159] 制备方法。提供了一种用于在微流体设备内制备至少一个捕获结构的方法。原位生成的捕获结构可以在将细胞引入微流体(或纳米流体)设备之前或之后引入。原位生成的捕获结构可以设计为临时的或可以保持在适当位置直到实验/测定/分选/培养过程结束。

[0160] 可以通过光活化、温度变化或渗透变化引入原位生成的捕获结构, 光活化、温度变化或渗透变化可以使微流体内存在的聚合物溶液形成原位生成的捕获结构, 其能够防止生物细胞或珠粒穿过原位生成的捕获结构。取决于原位生成的捕获结构的网孔尺寸, 可以允

许不同类别的化学物质通过原位生成的捕获结构。如果网孔尺寸选择为约2nm,则可以仅允许小分子组分通过,但蛋白质等可以被原位生成的捕获结构隔离。原位生成的捕获结构可以包括具有较大网孔尺寸的交联聚合物,其可以不阻止较小物质如蛋白质、核酸、细胞器或信号分子穿过原位生成的捕获结构。原位生成的捕获结构可以允许介质通过而不允许细胞或珠粒穿过原位生成的捕获结构。

[0161] 引入光活化聚合的过程可在微流体设备内进行。扩散与聚合过程竞争,因此快速产生自由基的能力可能是有用的。此外,自由基可以快速与自由氧结合。虽然在介质中不存在氧气的情况下光聚合非常有效且快速,但是当存在生物细胞(因此需要存在氧)时,可以对起始自由基的数量进行调整以进行补偿。实际上,限制氧的影响是有帮助的,因为链终止发生得更快并且限制了形成的外来聚合物的量,特别是当引入少量有限量的聚合物以形成不完全阻止从围栏或通道进入或离开的小捕获结构时更是如此。

[0162] 在一些实施例中,引发可流动聚合物固化的步骤可包括光学照射流动区域的至少一个选定区域,并且进一步地,可流动聚合物的固化步骤可包括聚合可流动聚合物的聚合物以形成固化聚合物网络。引入可流动聚合物的步骤还可包括引入可光活化的聚合引发剂。

[0163] 在一些其他实施例中,引发可流动聚合物固化的步骤可包括改变衬底的至少一个选定区域的温度。聚合物固化步骤还可包括胶凝化聚合物以形成聚合物网络。改变衬底的所选区域处的温度的步骤还可包括光学照射衬底上的导热垫。

[0164] 原位生成的捕获结构可以通过共聚两个聚合物形成,一个聚合物具有例如RGD肽基序。在其他实施例中,前体预聚物(如图4D的预聚物401')可以被改性以具有这样的基序,并且原位聚合提供包括测定分析物的原位生成的捕获结构(例如,形成图4D的原位生成的捕获结构406C)。另一种替代方案是将抗体包括在预聚物(如图4C的407B)中,并原位固化聚合物网络以提供原位生成的捕获结构,其已包括抗体测定试剂(如图4C的406B)。另一种替代方案是在已经形成原位生成的捕获结构之后引入抗体(如在原位生成的捕获结构404转化为图4C的原位生成的捕获结构406B中那样)。在一个示例中,生物素化或链霉抗生物素蛋白位点可以在原位生成的捕获结构的整个固化聚合物网络中或仅在表面上引入,并且链霉抗生物素蛋白或生物素标记的抗体可以与相应的结合对缔合。或者,可以设计改性的抗体,其含有可光活化的官能团,例如二苯甲酮,其可以在形成原位生成的捕获结构的同时或之后光引发插入到原位生成的捕获结构的固化的聚合物网络的表面中,这将提供类似于原位生成的结构403(包括固化的聚合物网络)直接转化为原位生成的捕获结构406B的过程,其中捕获结构的固化的聚合物网络包括附着于图4C的功能化位点的测定试剂(过程未显示)。可以进行相同类型的转化策略以等效地引入包括测定分析物的原位生成的捕获结构。

[0165] 在微流体设备内引入聚合物捕获结构的过程的一个示例中,可以使含有10%w/v PEGDA (6Kd) 和1%光引发剂(IRGACURE 2959, 200Da)的溶液流入微流体设备。在允许平衡少于10分钟后,可以用约340nm(+/-20nm)的功率为400mW/cm²的UV光照射所需区域1秒,以引发创建原位生成的捕获结构的聚合,如图4-7所示。

[0166] 提供了一种用于制备微流体设备的方法,所述微流体设备包括至少第一原位生成的捕获结构,包括:提供微流体设备,其中所述微流体设备包括包含衬底和微流体回路材料的封壳,其中所述封壳限定流动区域;将第一可流动的功能化预聚物引入流动区域;在所述

封壳的至少一个选定区域中激活所述第一可流动的功能化预聚物的固化,从而在其中形成至少第一原位生成的捕获结构。引入第一可流动功能化预聚物的步骤可以进一步包括将可光活化聚合引发剂引入流动区域,其中引入可光活化聚合引发剂的步骤可以在引入第一可流动预聚物的步骤之前、同时或之后进行。在一些实施例中,微流体设备的封壳还包括与流动区域流体连接的至少一个隔绝围栏,并且激活固化的步骤包括在至少一个隔绝围栏的至少一个选定的区域中激活第一可流动的功能化预聚物的固化。至少第一原位生成的捕获结构可包括固化的聚合物网络,其包括一个或更多个功能化位点。一个或更多个功能化位点可包括生物素、抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白部分。一个或更多个功能化位点可以与第一可流动功能化预聚物的至少一种组分共价结合。未固化的可流动的功能化预聚物可以从微流体设备流出。在可流动的功能化预聚物已被引入至少一个隔绝围栏的实施例中,未固化的可流动的功能化预聚物可以从围栏中扩散出来,然后可以从微流体设备流出。

[0167] 该方法可以进一步包括使第一体积的第一流体介质流过微流体设备的流动区域,从而将未固化的第一可流动的功能化预聚物从所述至少一个隔绝围栏中扩散出来。该方法可以进一步包括将第一功能化测定试剂或测定分析物引入封壳内或者可选地在至少一个隔绝围栏内的至少第一捕获结构;以及将第一功能化测定试剂或测定分析物与至少第一捕获结构的固化聚合物网络的功能化位点缔合。第一功能化测定试剂或测定分析物可包括抗体、抗原、有机分子或寡核苷酸。第一功能化测定试剂或测定分析物的有机分子可包括酶的底物、抗原、细胞表面标志物、细胞因子或本文所述的任何合适的测定试剂或测定分析物。第一功能化测定试剂或测定分析物可以进一步包括配置成使第一功能化测定试剂或测定分析物与至少第一捕获结构的固化聚合物网络的功能化位点缔合的部分。在各种实施例中,配置成使第一功能化测定试剂或测定分析物缔合的部分可包括结合配偶体至至少第一捕获结构的固化聚合物网络的功能化位点的生物素、抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白。在各种实施例中,第一功能化测定试剂或测定分析物可以是第一测定试剂。该方法可以进一步包括使第二体积的第一流体介质流过微流体设备,从而将未缔合的第一功能化测定试剂或测定分析物扩散出至少一个隔绝围栏。一旦未缔合的功能化测定试剂或测定分析物已从围栏中扩散出来,其可从微流体设备中流出。

[0168] 该方法可以进一步包括引入第二或更多功能化的测定试剂或测定分析物的步骤。第二或更多功能化的测定试剂或测定分析物可以与至少第一捕获结构的固化的聚合物网络的第二或更多功能化的位点缔合。第二或更多功能化的测定试剂或测定分析物可以与第一功能化测定试剂或测定分析物不同和/或与第一功能化测定试剂或测定分析物在检测上可区分。第二或更多种功能化的测定试剂或测定分析物可以配置成用检测试剂检测,所述检测试剂可与与第一功能化测定试剂或测定分析物一起使用的检测试剂不同。第二或更多功能化的测定试剂或测定分析物可以与封壳内或者可选地在至少一个隔绝围栏内的第二或更多捕获结构上的第二或更多功能化位点相缔合。

[0169] 该方法可以进一步包括在封壳中或者在至少一个隔绝围栏内引入第二或更多捕获结构的步骤,其中引入第二或更多捕获结构可以包括以下步骤:引入另一体积的第一流体介质进入微流体设备的流动区域;将第二可流动的功能化预聚物引入流动区域;以及在所述封壳的至少第二选定区域内或者在所述至少一个隔绝围栏内,激活所述第二可流动的功能化预聚物的固化,从而在其中形成第二原位生成的捕获结构;以及使另一体积的第一

流体介质流入微流体设备的流动区域。引入第二可流动功能化预聚物的步骤可以进一步包括将可光活化聚合引发剂引入流动区域,其中引入可光活化聚合引发剂的步骤可以在引入第二可流动预聚物的步骤之前、同时或之后进行。在形成第二捕获结构后,可以使第二功能化测定试剂或测定分析物流入(类似于第一功能化测定试剂或测定分析物),并使其与第二捕获结构缔合。在第二功能化测定试剂和测定分析物的缔合完成之后,可以使过量的未缔合的功能化测定试剂或测定分析物从隔绝围栏中扩散出来,并且任选地,流出微流体设备。

[0170] 该方法可以进一步包括将第三或更多捕获结构引入至少一个隔绝围栏的步骤,其中引入第三或更多捕获结构可以包括:将另一体积的第一流体介质引入微流体设备的流动区域中;将第三可流动的功能化预聚物引入流动区域;在所述封壳的或者在所述至少一个隔绝围栏内的至少第三选定区域激活所述第三可流动的功能化预聚物的固化,从而在其中形成第三原位生成的捕获结构;并且使另一体积的第一流体介质流入微流体设备的流动区域。引入第三可流动功能化预聚物的步骤可以进一步包括将可光活化聚合引发剂引入流动区域,其中引入可光活化聚合引发剂的步骤可以在引入第三可流动预聚物的步骤之前、同时或之后进行。如上文针对第一和/或第二功能化测定试剂或测定分析物所述的,可以以类似方法将第三功能化测定试剂或测定分析物引入第三捕获结构。第三功能化测定试剂或测定分析物可以与第一或第二功能化测定试剂不同,和/或可以与第一或第二功能化测定试剂或测定分析物在检测上区分开。

[0171] 在一些实施例中,第一可流动的功能化预聚物可以不同于第二可流动的功能化预聚物。在其他实施例中,第一可流动功能化预聚物可以与第二可流动功能化预聚物相同。在各种实施例中,第一、第二和第三可流动的功能化预聚物中的每一个可以彼此不同。在其他实施例中,第一、第二和第三可流动功能化预聚物中的每一个可以是相同的功能化预聚物。在所述方法的各种实施例中,第一、第二或第三原位生成的捕获结构中的任何一种的固化聚合物网络可包括合成聚合物、改性合成聚合物或生物聚合物。在一些实施例中,合成聚合物改性包含尺寸改性基序、裂解基序、反应性末端部分和/或细胞识别基序。固化的聚合物网络可包括聚乙二醇(PEG)、改性聚乙二醇、聚乳酸(PLA)、改性聚乳酸、聚乙醇酸(PGA)、改性聚乙醇酸、聚丙烯酰胺(PAM)、改性聚丙烯酰胺、聚-N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAm)、改性聚-N-异丙基丙烯酰胺、聚乙烯醇(PVA)、改性聚乙烯醇、聚丙烯酸(PAA)、改性聚丙烯酸、聚己内酯(PCL)、改性聚己内酯、纤连蛋白、改性纤连蛋白、胶原蛋白、改性胶原蛋白、层粘连蛋白、改性层粘连蛋白、多糖、改性多糖或任何组合的共聚物中的至少一种。在其他实施例中,固化的聚合物网络可包括聚乙二醇、改性聚乙二醇、聚乳酸(PLA)、改性聚乳酸、聚乙醇酸(PGA)、改性聚乙醇酸、聚乙烯醇(PVA)、改性聚乙烯醇、聚丙烯酸(PAA)、改性聚丙烯酸、纤连蛋白、改性纤连蛋白、胶原蛋白、改性胶原蛋白、层粘连蛋白、改性层粘连蛋白或任何组合的共聚物中的至少一种。在一些实施例中,固化的聚合物网络的聚合物可以是改性的PEG聚合物。聚合物可以是星形、4-臂或2-臂PEG二丙烯酸酯聚合物。

[0172] 试剂盒。在又一方面,提供了一种试剂盒,包括:微流体设备,其具有包括衬底、微流体回路材料和任选的盖的封壳,其中封壳限定流动区域;和可被可控地活化以形成固化的聚合物网络的功能化预聚物。试剂盒可以进一步包括测定试剂或测定分析物,其可以是功能化预聚物的一部分,与功能化预聚物混合,或与功能化预聚物分开提供(例如,在单独的小瓶、管中等)。或者,提供一种试剂盒,包括:微流体设备,其具有包括衬底、微流体回路

材料和任选的盖的封壳,其中封壳限定流动区域;以及设置在封壳内的至少一个原位生成的捕获结构,其中至少一个原位生成的捕获结构包括固化的聚合物网络(例如,微流体设备400、700)。试剂盒可以进一步包括测定试剂,其可以与原位生成的捕获结构成一体或相关联,或者可以单独提供(例如,在小瓶、管等中)。任一试剂盒中的微流体设备可在封壳内包括至少一个隔绝围栏。对于其中原位生成的捕获结构已经设置在微流体设备内的试剂盒,原位生成的捕获结构可以位于流动区域、微流体设备的隔绝围栏(例如,隔绝围栏内的隔离区域)或两者内。固化的聚合物网络可以进一步包括一个或更多个功能化位点。固化的聚合物网络的功能化位点可以是如本文所述的任何功能化位点,并且可以包括生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或其任何组合。

[0173] 在包括具有原位生成的捕获结构的微流体设备的试剂盒的各种实施例中,固化聚合物网络可包括合成聚合物、改性合成聚合物或生物聚合物。在其中提供功能化预聚物的试剂盒的实施例中,功能化预聚物可包括合成聚合物、改性合成聚合物或生物聚合物。在一些实施例中,合成聚合物改性包含尺寸改性基序、裂解基序、反应性末端部分和/或细胞识别基序。固化的聚合物网络或功能化的预聚物可包括聚乙二醇(PEG)、改性聚乙二醇、聚乳酸(PLA)、改性聚乳酸、聚乙醇酸(PGA)、改性聚乙醇酸、聚丙烯酰胺(PAM)、改性聚丙烯酰胺、聚-N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAm)、改性聚-N-异丙基丙烯酰胺、聚乙烯醇(PVA)、改性聚乙烯醇、聚丙烯酸(PAA)、改性聚丙烯酸、聚己内酯(PCL)、改性聚己内酯、纤连蛋白、改性纤连蛋白、胶原蛋白、改性胶原蛋白、层粘连蛋白、改性层粘连蛋白、多糖、改性多糖或任何组合的共聚物中的至少一种。在其他实施例中,固化的聚合物网络或功能化的预聚物可包括聚乙二醇、改性聚乙二醇、聚乳酸(PLA)、改性聚乳酸、聚乙醇酸(PGA)、改性聚乙醇酸、聚乙烯醇(PVA)、改性聚乙烯醇、聚丙烯酸(PAA)、改性聚丙烯酸、纤连蛋白、改性纤连蛋白、胶原蛋白、改性胶原蛋白、层粘连蛋白、改性层粘连蛋白或任何组合的共聚物中的至少一种。在一些实施例中,固化的聚合物网络或功能化的预聚物的聚合物可以是改性的PEG聚合物。聚合物可以是星形、4臂或2臂PEG二丙烯酸酯聚合物。在各种实施例中,其中所述封壳或至少一个隔绝围栏包括多于一个的原位生成的捕获结构,每个捕获结构包括相同的聚合物,或者可替代地包括与第一原位生成捕获结构、第二原位生成的捕获结构、第三原位生成的捕获结构中每个不同的聚合物,等等。在提供功能化预聚物的试剂盒中,可以提供多于一种的功能化预聚物。试剂盒可包括多于一种的聚合物,其可与至少第一功能化聚合物组合在一起以形成配置成固化以形成固化的聚合物网络的可流动的聚合物溶液。所述至少第一功能化聚合物可以作为可流动的聚合物溶液提供,或者可以以凝胶、脱水或冻干形式提供,其中任何一种都可以配置成由最终用户通过用流体介质稀释而配制成可流动的聚合物溶液。试剂盒中提供的可以用于形成原位生成的捕获结构的其他聚合物可以在与至少第一功能化聚合物分开的一个或更多个容器中提供。

[0174] 试剂盒的测定试剂或测定分析物可以是本文所述的任何测定试剂或测定分析物。测定试剂或测定分析物可包括配置成与至少一个捕获结构的固化聚合物网络的功能化位点缔合的功能部分。可以在配置成准备引入微流体设备的流动区域的配方中提供测定试剂或测定分析物。或者,可以以固体或冻干形式提供测定试剂或测定分析物,其具有用于溶解到适当介质中以引入微流体设备中并随后与原位生成的捕获结构的固化聚合物网络的功能化位点缔合的说明。在试剂盒的一些实施例中,可以以任何合适的组合提供多于一种的

测定试剂或多于一种的测定分析物用于多重实验,并且可以提供如以下段落中描述的任何测定试剂或分析物。

[0175] 在包括包含至少一个原位生成的捕获结构的微流体设备的试剂盒的各种实施例中,原位生成的捕获结构的固化的聚合物网络可以已经包括测定试剂或测定分析物(例如,微流体设备450,其中测定试剂或测定分析物已经存在于所提供的微流体设备的至少一个捕获结构的固化聚合物网络内/上)。测定试剂或测定分析物可以与固化的聚合物网络的一个或更多个功能化位点共价或非共价结合。在一些实施例中,测定试剂或测定分析物可以通过生物素/链霉抗生物素蛋白或生物素/抗生物素蛋白复合物与固化的聚合物网络的一个或更多个功能化位点非共价结合。

[0176] 是否已提供测定试剂或测定分析物作为原位生成的捕获结构的固化聚合物网络的一部分或作为试剂盒的组分以制备具有这种测定试剂或测定分析物的原位生成的捕获结构,测定试剂或测定分析物可以是如本文所述的任何合适的部分。包括在或将要包括在原位生成的捕获结构中的测定试剂或测定分析物可以是蛋白质、核酸、有机分子或糖类。在包括具有至少一个原位生成的捕获结构的微流体设备的试剂盒的一些实施例中,所述测定试剂或测定分析物可以是抗体,并且可以是如本文所述的任何种类的抗体。在其他实施例中,包括在或将要包括在原位生成的捕获结构中的测定试剂或测定分析物可以是抗原。作为抗原的测定试剂或测定分析物可以是如本文所述的任何合适的抗原。在其他实施例中,包括在或将要包括在原位生成的捕获结构中的测定试剂可以是寡核苷酸。寡核苷酸测定试剂可以是如本文所述的任何合适的寡核苷酸。

[0177] 在试剂盒的一些实施例中,测定试剂或测定分析物可包括可检测标记。测定试剂或测定分析物的可检测标记可以是荧光标记、比色标记或发光标记。在一些实施例中,当测定试剂或测定分析物包括可检测标记时,在测定过程进行之前标记是不可检测的,并且从测定试剂或测定分析物产生或释放可检测标记。

[0178] 在试剂盒的其他实施例中,试剂盒可以进一步包括检测试剂。检测试剂可包括可检测标记。检测试剂的可检测标记可包括荧光标记、比色标记或发光标记。在一些实施例中,检测试剂的可检测标记可以是荧光的。在一些实施例中,检测试剂包括至少第一抗体。在一些实施例中,检测试剂可以包括第二抗体,其中第二抗体是测定过程的二级抗体,并且包含第一和第二抗体(包含检测试剂)的组合的可检测标记。在其他实施例中,检测试剂可包括嵌入染料。在其他实施例中,检测试剂可包括FRET标记的寡核苷酸,其可以是如本文所述的任何FRET标记的寡核苷酸。

[0179] 在试剂盒的各种实施例中,可以提供多于一种的检测试剂。多于一种的检测试剂的第一检测试剂可以在光谱上不同于第二检测试剂,对于每种不同的检测试剂或检测分析物以此类推。

[0180] 在试剂盒的其他实施例中,微流体设备可包括设置在封壳内或者替代地在其中的隔绝围栏内的两个或更多个捕获结构,其中第一捕获结构的第一固化聚合物网络已经包括/被设计成包含第一测定试剂或测定分析物,第二捕获结构的第二固化聚合物网络已经包括/或被设计成包含第二测定试剂或测定分析物,并且对于封壳中或者可选地至少一个隔绝围栏中的每个另外的捕获结构以此类推。第一测定试剂或测定分析物可以与第二测定试剂或测定分析物不同,并且对于包含在或设计成包含在至少一个隔绝围栏中的每个另外

的捕获结构内的每个另外的测定试剂或测定分析物以此类推。第一捕获结构和第二捕获结构可以设置在微流体设备的封壳内或其中的至少一个隔绝围栏内的不同位置。

[0181] 当第一捕获结构包含或被设计成包含第一测定试剂或测定分析物,并且第二捕获结构包含或被设计成包含第二测定试剂或测定分析物时,所述试剂盒可进一步包括相应的第一检测试剂和第二检测试剂,其中第一检测试剂可以与第二检测试剂不同。对于包含在或配置成包含在捕获结构上的任何另外的测定试剂或分析物,第一检测试剂和第二检测试剂等可以包括如本文所述的任何检测试剂,并且可以独立地选择。在一些实施例中,第一检测试剂可包括至少第一主抗体,并且第二检测试剂包含针对每种测定的相应生物学靶标的至少第二主抗体。包括主抗体的每种检测试剂可以进一步包括二级抗体,其本身可以包括用于执行的每种测定的可检测标记。当在封壳中或者在其中的至少一个隔绝围栏中提供多于一个的捕获结构时,各个检测试剂的每个标记在光谱上是不同的,或者各个检测试剂的标记在空间上是不同的。在一些实施例中,标记在光谱上和空间上都是不同的。

[0182] 在包括具有至少一个原位生成的捕获结构的微流体设备的试剂盒的各种实施例中,微流体设备可进一步包括多个隔绝围栏。在一些实施例中,多个隔绝围栏中的每一个可包括包含固化的聚合物网络的至少一个捕获结构。多个隔绝围栏可以如针对本文所述的任何隔绝围栏所描述的和任何组合那样配置。试剂盒的微流体设备可以进一步包括任何组合的如本文所述的任何微流体设备100、200、23、250、280、290、320、400、450、500、700的任何组件或特征。

[0183] 在试剂盒的一些实施例中,可以包括一种或更多种流体介质,并且可以进一步包括一种或更多种本文所述的添加剂以提供增强的生长、活力或便携性,包括用于微流体设备内的动态涂层的添加剂。在试剂盒的其他实施例中,封壳的一个或更多个表面可包括涂层。涂层可以是如本文所述的任何涂层。在一些实施例中,涂层是共价涂层,其提供经调理的表面。共价涂层可以存在于微流体设备的封壳的所有内表面上。在一些实施例中,提供调理表面的共价涂层可以是亲水的。

[0184] 在试剂盒的各种实施例中,试剂盒还可包含可光活化的聚合引发剂。可光活化的聚合引发剂可以在与流体介质和/或功能化的预聚物分开的容器中提供。

[0185] 示例1.水凝胶细胞因子测定

[0186] T细胞。来自A11Cells有限公司的CD3+细胞,并与抗CD3/抗CD28磁珠(Dynabeads®, ThermoFisher Scientific, 目录号11453D)混合,比例为1个珠粒/1个细胞。将混合物在与培养实验本身相同的培养基中于37℃、在5%CO₂培养箱中培养48小时。培养后,将T细胞/珠粒混合物重新悬浮使用。

[0187] 培养基。RPMI-1640 (GIBCO®, ThermoFisher Scientific, 目录号11875-127), 10%FBS, 2%人AB血清(50U/ml IL2; R&D Systems)。

[0188] 填充程序:以12微升/秒的速率流入250微升100%二氧化碳。然后以12微升/秒流入250微升含有0.1%Pluronic® F27 (Life Technologies® 目录号P6866)的PBS。填充的最后步骤包括以12微升/秒流入250微升PBS。随后介绍培养基。

[0189] 灌注方案(在芯片上细胞培养期间:灌注方法是以下两种方法之一):

[0190] 1.以0.01微升/秒灌注2小时;以2微升/秒灌注64秒;并重复。

[0191] 2.以0.02微升/秒灌注100秒;停止流动500秒;以2微升/秒灌注64秒;并重复。

[0192] 系统和微流体设备：系统和微流体设备：由伯克利之光生命科技公司制造。该系统至少包括流动控制器、温度控制器、流体介质调节和泵组件、用于光激活DEP配置的光源、微流体设备、安装台和相机。隔绝围栏具有约 7×10^5 立方微米的体积。

[0193] 水凝胶制剂。将N-吗啉代乙磺酸(MES)中的链霉抗生物素蛋白胺(Nanocs)在0.1M碳酸盐-碳酸氢盐(pH9.0的CBB缓冲液)中稀释,并与Ac-PEG-羟基琥珀酰亚胺以计算的比例反应,以提供5%wt百分比,其最终浓度为10mg/200微升。在4℃下继续反应至少过夜。

[0194] 制备在去离子超滤水(DIUF)中0.606wt%溶液的Igracure光引发剂。

[0195] 用于功能性水凝胶的预聚物通过在0.606%光引发剂溶液中溶解5wt%的Ac PEG星形固体溶液(来自Laysan Bio的4臂PEG丙烯酸酯(10k MW) (#4arm-PEG-ACRYL-10k-1g))来制备。

[0196] 通过组合28微升HS-PEG-链霉抗生物素蛋白缀合物和132微升Ac PEG星形丙烯酸酯/光引发剂溶液制备160微升预聚物总量。

[0197] 将填充的微流体设备以0.5微升/秒加载预聚物溶液,并在光引发之前温育至少1小时,以允许预聚物扩散到微流体设备的围栏中。温育完成后,使用曝光10秒在围栏的底角引发聚合物固化。

[0198] 在开始固化后,使用一组清洗液除去过量的可溶性聚合物和引发剂,包括8微升/秒的 2×250 微升PBS;0.2微升/秒的250微升PBS;在PBS中过夜清洗(250微升,0.005微升/秒)。

[0199] 水凝胶功能化。水凝胶制备的微流体设备加载1微克/mL捕获抗体(来自R&D Systems的生物素化山羊抗人TNF α) (#BAF210),其中原位生成的捕获抗体溶液以5微升/秒流入250微升内,接着以0.075微升/秒进行原位生成的捕获抗体溶液的250微升/秒的第二流入阶段。在完成原位生成的捕获抗体的引入后,用PBS(250微升,5微升/秒)X5冲洗微流体设备。

[0200] T细胞引入和检测TNF α 。引入T细胞并在37℃下过夜培养。在温育期结束后,通过使来自Abeam的兔抗人TNF α 溶液(#ab9635)以5微升/秒流入250微升内,然后以0.075微升/秒进行250微升第一种检测抗体溶液的第二流入阶段,来引入第一检测抗体。在完成第一检测抗体的引入后,用PBS(250微升,5微升/秒)X5冲洗微流体设备。

[0201] 然后通过以5微升/秒流入250微升溶液;接着以0.075微升/秒进行2微克/mL溶液的第二次250微升流入,从而以2微克/毫升的浓度引入二级检测抗体(来自Life Technologies的Alexa 488山羊抗兔IgG(#A11053))。

[0202] 图6A-C显示了区分高度分泌T细胞、中度分泌T细胞和低度分泌T细胞的能力。在图6A中,对于含有低度分泌T细胞的围栏,荧光仅是可检测的。左手图像是明场,可以看到四个细胞,而右手图像显示相同围栏的荧光图像,其中功能化水凝胶在围栏的左下角微弱可见。

[0203] 图6B显示了中度分泌的T细胞组。左手图像是不同围栏中的一至三个T细胞的图像,并且该同一围栏的右手荧光图像清楚地显示在围栏的左下角处在功能化水凝胶的表面处集中的显著荧光。

[0204] 图6C显示了第三围栏中高度分泌的T细胞组。图6C中的左手图像是明场,并且显示聚集的一组约4-5个T细胞以及一个单独的细胞。右手图像显示了在荧光检测下的同一第三围栏,其中功能化的水凝胶以及围栏中的聚集的细胞都被充分照射。

[0205] 该实施例清楚地证明可以在微流体围栏中检测到不同水平的TFT α 细胞因子的产生并对其进行等级划分。

[0206] 用于操作和观察这种设备的微流体设备和系统。图1A示出了可用于在体外产生胚胎(包括选择和评估卵细胞和/或卵母细胞和/或精子)的微流体设备100和系统150的示例。示出了微流体设备100的透视图,其具有其盖110的局部切割以提供微流体设备100的局部视图。微流体设备100通常包括微流体回路120,该微流体回路120包括流体路径106,流体介质180可通过该流体路径106流动,可选地将一个或多个微物体(未示出)携带到微流体回路120中和/或通过微流体回路120。尽管在图1A中示出了单个微流体回路120,但是合适的微流体设备可以包括多个(例如2个或3个)这样的微流体回路。无论如何,微流体设备100可以配置成纳米流体设备。如图1A所示,微流体回路120可以包括多个微流体隔绝围栏124、126、128和130,每个隔绝围栏可以具有与流动路径106流体连通的一个或多个开口。在图1A的设备的一些实施例中,隔绝围栏可以仅具有与流动路径106流体连通的单个开口。如下面进一步讨论的,微流体隔绝围栏包括各种特征和结构,这些特征和结构已经被优化用于将微物体保持在诸如微流体设备100的微流体设备中,即使当介质180流过流动路径106时。然而,在转向前述之前,提供微流体设备100和系统150的简要描述。

[0207] 如图1A中大体所示,微流体回路120由封壳102限定。虽然封壳102可以物理构造成不同的配置,但在图1A所示的示例中,封壳102被描绘为包括支撑结构104(例如基部)、微流体回路结构108和盖110。支撑结构104、微流体回路结构108和盖110可以彼此附接。例如,微流体回路结构108可以设置在支撑结构104的内表面109上,并且盖110可以设置在微流体回路结构108上方。与支撑结构104和盖110一起,微流体回路结构108可以限定微流体回路120的元件。

[0208] 如图1A所示,支撑结构104可以位于微流体回路120底部,并且盖110可以位于微流体回路120的顶部。或者,支撑结构104和盖110可以以其他方位配置。例如,支撑结构104可以位于微流体回路120的顶部,并且盖110可以位于微流体回路120的底部。无论如何,可以有一个或多个端口107,每个端口包括进入或离开封壳102的通道。通道的示例包括阀门、闸门、通孔等。如图所示,端口107是由微流体回路结构108中的间隙形成的通孔。然而,端口107可以位于封壳102的其他部件中,例如盖110。图1A中仅示出一个端口107,但微流体回路120可具有两个或多个端口107。例如,可以存在用作流体进入微流体回路120的入口的第一端口107,并且可以存在用作流体离开微流体回路120的出口的第二端口107。端口107作为入口还是出口可以取决于流体流过流动路径106的方向。

[0209] 支撑结构104可以包括一个或多个电极(未示出)和衬底或多个互连的衬底。例如,支撑结构104可以包括一个或多个半导体衬底,每个半导体衬底电连接到电极(例如,全部或部分半导体衬底可以电连接到单个电极)。支撑结构104还可以包括印刷电路板组件(“PCBA”)。例如,半导体衬底可以安装在PCBA上。

[0210] 微流体回路结构108可以限定微流体回路120的回路元件。这样的回路元件可以包括当微流体回路120充满流体时,可以流体上互连的空间或区域,诸如流动区(其可以包括或可以是一个或多个流动通道)、腔室、围栏、捕集器等。在图1A所示的微流体回路120中,微流体回路结构108包括框架114和微流体回路材料116。框架114可以部分地或完全封闭微流体回路材料116。框架114可以是例如基本上围绕微流体回路材料116的相对刚性的结构。

例如,框架114可以包括金属材料。

[0211] 可以用空腔等来图案化微流体回路材料116以限定微流体回路120的回路元件和互连。微流体回路材料116可以包括柔性材料,例如柔性聚合物(例如橡胶、塑料、弹性体、硅树脂、聚二甲基硅氧烷(“PDMS”)等),其可以是透气的。可构成微流体回路材料116的材料的其他示例包括模制玻璃、诸如硅树脂的可蚀刻材料(例如可光图案化聚硅氧烷或“PPS”)、光致抗蚀剂(例如SU8)等。在一些实施例中,这样的材料(并且因此微流体回路材料116)可以是刚性的和/或基本上不透气的。无论如何,微流体回路材料116可以设置在支撑结构104上并且设置在框架114内部。

[0212] 盖110可以是微流体回路材料116和/或框架114的整体部分。或者,盖110可以是结构上不同的元件,如图1A所示。盖110可以包括与框架114和/或微流体回路材料116相同或不同的材料。类似地,如图所示,支撑结构104可以是与微流体回路材料116或框架114分开的结构,或者是微流体回路材料116或框架114的整体部分。类似地,框架114和微流体回路材料116可以是如图1A所示的分离结构或相同结构的整体部分。

[0213] 在一些实施例中,盖110可以包括刚性材料。刚性材料可以是玻璃或具有相似性质的材料。在一些实施例中,盖110可以包括可变形材料。可变形材料可以是聚合物,例如PDMS。在一些实施例中,盖110可以包括刚性和可变形材料。例如,盖110的一个或多个部分(例如,位于隔绝围栏124、126、128、130上方的一个或多个部分)可以包括与盖110的刚性材料相接的可变形材料。在一些实施例中,盖110可以进一步包括一个或多个电极。该一个或多个电极可以包括导电氧化物,诸如氧化铟锡(ITO),其可以被涂覆在玻璃或类似的绝缘材料上。或者,所述一个或多个电极可以是嵌入可变形材料中的柔性电极,例如单壁纳米管、多壁纳米管、纳米线、导电纳米颗粒簇或其组合,所述可变形材料例如聚合物(例如,PDMS)。例如,在US2012/0325665(Chiou等人)中描述了可用于微流体设备的柔性电极,其内容通过引用并入本文。在一些实施例中,盖110可以被修改(例如,通过调节向内面向微流体回路120的表面的全部或部分)以支持细胞粘附、活力和/或生长。该修改可以包括合成或天然聚合物的涂覆。在一些实施例中,盖110和/或支撑结构104可以对光是透明的。盖110还可以包括至少一种气体可渗透的材料(例如,PDMS或PPS)。

[0214] 图1A还示出了用于操作和控制微流体设备(例如微流体设备100)的系统150。系统150包括电源192、成像设备194(包括在成像模块164中,其中设备194本身未在图1A中示出)和倾斜设备190(倾斜模块166的一部分,其中设备190未在图1A中示出)。

[0215] 电源192可以向微流体设备100和/或倾斜设备190提供电力,根据需要提供偏置电压或电流。例如,电源192可以包括一个或多个交流(AC)和/或直流(DC)电压或电流源。成像设备194(下面讨论的成像模块164的一部分)可以包括用于捕获微流体回路120内的图像的设备,例如数码相机。在一些情况下,成像设备194还包括具有快速帧速率和/或高灵敏度的检测器(例如,用于低光照应用)。成像设备194还可以包括用于将刺激辐射和/或光束引导到微流体回路120中并且收集从微流体回路120(或其中包含的微物体)反射或发射的辐射和/或光束的机构。发射的光束可以在可见光谱中,并且可以例如包括荧光发射。反射光束可以包括源自LED或宽光谱灯(例如汞灯(例如高压汞灯)或氙弧灯)的反射的发射。如关于图3B所讨论的,成像设备194可以进一步包括显微镜(或光学系列),其可以包括或不包括目镜。

[0216] 系统150进一步包括倾斜设备190(下面讨论的倾斜模块166的一部分),倾斜设备190被配置成围绕一个或更多个旋转轴线旋转微流体设备100。在一些实施例中,倾斜设备190被配置为围绕至少一个轴支撑和/或保持包括微流体回路120的封壳102,使得微流体设备100(并且因此微流体回路120)可以保持在水平方位(即相对于x轴和y轴成 0°)、垂直方位(即相对于x轴和/或y轴成 90°)或其间的任何方位。微流体设备100(和微流体回路120)相对于轴线的方位在本文中被称为微流体设备100(和微流体回路120)的“倾斜”。例如,倾斜设备190可以使微流体设备100相对于x轴倾斜 0.1° 、 0.2° 、 0.3° 、 0.4° 、 0.5° 、 0.6° 、 0.7° 、 0.8° 、 0.9° 、 1° 、 2° 、 3° 、 4° 、 5° 、 10° 、 15° 、 20° 、 25° 、 30° 、 35° 、 40° 、 45° 、 50° 、 55° 、 60° 、 65° 、 70° 、 75° 、 80° 、 90° 或其间的任何角度。水平方位(以及x轴和y轴)被定义为垂直于由重力定义的垂直轴。倾斜设备还可以使微流体设备100(和微流体回路120)相对于x轴和/或y轴倾斜任何大于 90° 的角度,或使微流体设备100(和微流体回路120)相对于x轴或y轴倾斜 180° ,以完全反转微流体设备100(和微流体回路120)。类似地,在一些实施例中,倾斜设备190使微流体设备100(和微流体回路120)围绕由流动路径106或微流体回路120的一些其他部分限定的旋转轴线倾斜。

[0217] 在一些情况下,微流体设备100倾斜成垂直方位,使得流动路径106位于一个或更多个隔绝围栏的上方或下方。如本文所用的术语“上方”表示流动路径106在由重力限定的垂直轴线上定位成高于一个或更多个隔绝围栏(即,位于流动路径106上方的隔绝围栏中的物体将具有比流动区/通道中的物体更高的重力势能)。本文使用的术语“下方”表示流动路径106在由重力限定的垂直轴线上定位成低于一个或更多个隔绝围栏(即,位于流动路径106下方的隔绝围栏中的物体将具有比流动路径中的物体更低的重力势能)。

[0218] 在一些情况下,倾斜设备190使微流体设备100围绕平行于流动路径106的轴线倾斜。此外,微流体设备100可以倾斜至小于 90° 的角度,使得流动路径106位于一个或更多个隔绝围栏的上方或下方,而不会位于隔绝围栏的正上方或正下方。在其他情况下,倾斜设备190使微流体设备100围绕垂直于流动路径106的轴线倾斜。在又一些情况下,倾斜设备190使微流体设备100围绕既不平行也不垂直于流动路径106的轴线倾斜。

[0219] 系统150还可以包括介质源178。介质源178(例如容器、储存器等)可以包括多个部分或容器,每个部分或容器用于容纳不同的流体介质180。因此,如图1A所示,介质源178可以是位于微流体设备100之外并与微流体设备100分离的设备。或者,介质源178可全部或部分位于微流体设备100的封壳102内。例如,介质源178可以包括作为微流体设备100的一部分的储存器。

[0220] 图1A还示出了构成系统150的一部分并且可以与微流体设备100结合使用的控制和监测设备152的示例的简化框图描绘。如图所示,这种控制和监测设备152的示例包括主控制器154,包括用于控制介质源178的介质模块160、用于控制微流体回路120中的微物体(未示出)和/或介质(例如,介质的液滴)的移动和/或选择的动力模块162、用于控制用于捕获图像(例如数字图像)的成像设备194(例如,照相机、显微镜、光源或其任何组合)的成像模块164、以及用于控制倾斜设备190的倾斜模块166。控制设备152还可以包括用于控制、监测或执行关于微流体设备100的其他功能的其他模块168。如图所示,设备152还可以包括显示设备170和输入/输出设备172。

[0221] 主控制器154可以包括控制模块156和数字存储器158。控制模块156可以包括例如

数字处理器,该数字处理器被配置为根据存储为存储器158中的非暂时性数据或信号的机器可执行指令(例如,软件、固件、源代码等)进行操作。可替代地或另外地,控制模块156可以包括硬连线数字电路和/或模拟电路。介质模块160、动力模块162、成像模块164、倾斜模块166和/或其他模块168可以类似地进行配置。因此,可以由如上配置的主控制器154、介质模块160、动力模块162、成像模块164、倾斜模块166和/或其他模块168中的任何一个或更多个来执行本文所讨论的针对微流体装置100或任何其他微流体装置所执行的功能、过程、动作、动作或过程步骤。类似地,主控制器154、介质模块160、动力模块162、成像模块164、倾斜模块166和/或其他模块168可以通信地耦接,以发送和接收本文讨论的任何功能、过程、动作、行动或步骤中所使用的的数据。

[0222] 介质模块160控制介质源178。例如,介质模块160可以控制介质源178以将选定的流体介质180输入到封壳102中(例如,通过入口端口107)。介质模块160还可以控制从封壳102中去除介质(例如,通过输出端口(未示出))。因此可将一个或更多个介质选择性地输入到微流体回路120中或从微流体回路120移除。介质模块160还可以控制微流体回路120内的流动路径106的流体介质180的流动。例如,在一些实施例中,介质模块160在倾斜模块166使倾斜设备190将微流体设备100倾斜期望的倾斜角度之前停止介质180在流动通路106中并且穿过封壳102的流动。

[0223] 动力模块162可以被配置为控制微流体回路120中的微物体的选择、捕集和移动。如下面针对图1B和图1C所讨论的,封壳102可以包括介电泳(DEP)、光电子镊子(OET)和光-电润湿(OEW)配置(在图1A中未示出),动力模块162可以控制电极和/或晶体管(例如,光电晶体管)的激活,以选择和移动流动路径106和/或隔绝围栏124、126、128、130中的介质的液滴(未示出)和/或微物体(未示出)。

[0224] 成像模块164可以控制成像设备194(未示出)。例如,成像模块164可以接收并处理来自成像设备194的图像数据。来自成像设备194的图像数据可以包括由成像设备194捕获的任何类型的信息(例如,微物体的存在或不存在、介质的液滴、标签(诸如荧光标签等)的积聚)。使用由成像设备194捕获的信息,成像模块164可以进一步计算物体(例如,微物体、介质液滴)的位置和/或这些物体在微流体设备100内的运动速率。

[0225] 倾斜模块166可以控制倾斜设备190的倾斜运动。可选择地或者另外,倾斜模块166可以控制倾斜速率和定时,以优化通过重力将微物体转移到一个或更多个隔绝围栏。倾斜模块166与成像模块164通信地耦合以接收描述微流体回路120中的微物体和/或介质液滴的运动的的数据。使用这个数据,倾斜模块166可以调整微流体回路120的倾斜,以便调整的微物体和/或介质液滴在微流体回路120中移动的速率。倾斜模块166还可以使用这个数据迭代地调整微流体回路120中的微物体和/或介质液滴的位置。

[0226] 在图1A所示的示例中,微流体回路120被图示为包括微流体通道122以及隔绝围栏124、126、128、130。每个围栏包括通向通道122的开口,除此而外被包围,使得围栏可以将围栏内的微物体与通道122的流动路径106中或其他围栏中的流体介质180和/或微物体基本上隔离。隔绝围栏的壁从基部的内表面109延伸到盖110的内表面而提供围壁。围栏到微流体通道122的开口相对于流体介质180的流动106成一定角度定向,使得流动106不被引导到围栏中。该流动可以与围栏的开口的平面相切或正交。在一些情况下,围栏124、126、128、130被配置为物理地围住微流体回路120内的一个或更多个微物体。根据本公开的隔绝围栏

可以包括为了与DEP、OET、OEW、流体流动和/或重力一起使用而优化的各种形状、表面和特征,如将在下面详细讨论的。

[0227] 微流体回路120可以包括任何数量的微流体隔绝围栏。尽管显示了五个隔绝围栏,但微流体回路120可以具有更少或更多的隔绝围栏。如图所示,微流体回路120的微流体隔绝围栏124、126、128和130各自包括不同的特征和形状,这些特征和形状可以提供对胚胎的生产有用的一个或更多个益处,诸如将一个卵子与相邻卵子隔离开来。测定、刺激和受精可以全部以个体基础来执行,并且在一些实施例中,可以以个体时间尺度来执行。在一些实施例中,微流体回路120包括多个相同的微流体隔绝围栏。

[0228] 在一些实施例中,微流体回路120包含多个微流体隔绝围栏,其中两个或更多个隔绝围栏包含不同的结构和/或特征,其在生产胚胎中提供不同的益处。一个非限制性示例可包括将卵子保持在一种类型的围栏中,同时将精子保持在不同类型的围栏中。在另一个实施例中,至少一个隔绝围栏配置成具有适于为卵子提供电激活的电触点。在又一个实施例中,不同类型的细胞(诸如例如,子宫细胞、子宫内膜细胞、源自子宫管的PEG(插入)细胞(例如,输卵管或法娄皮欧氏管)、卵丘细胞或其组合)可以设置在与包含卵子的隔绝围栏相邻的隔绝围栏中,使得来自周围隔绝围栏的分泌物可以从每个相应的围栏扩散出来并进入含有卵子的围栏中,这是大规模体外培养和受精所不可能实现的。可用于产生胚胎的微流体设备可包括任何隔绝围栏124、126、128和130或其变体,和/或可包括如图2B、2C、2D、2E和2F所示的那些类似地配置的围栏,如下所述。

[0229] 在图1A所示的实施例中,示出了单个通道122和流动路径106。然而,其他实施例可包含多个通道122,每个通道配置成包括流动路径106。微流体回路120还包括与流动路径106和流体介质180流体连通的入口阀或端口107,由此流体介质180可以经由入口端口107进入通道122。在一些情况下,流动路径106包括单个路径。在一些情况下,单个路径以Z字形图案布置,由此流动路径106在交替方向上两次或更多次穿过微流体设备100。

[0230] 在一些情况下,微流体回路120包括多个平行通道122和流动路径106,其中每个流动路径106内的流体介质180沿相同方向流动。在一些情况下,每个流动路径106内的流体介质在正向或反向中的至少一个方向上流动。在一些情况下,配置多个隔绝围栏(例如,相对于通道122),使得隔绝围栏可以并行地加载目标微物体。

[0231] 在一些实施例中,微流体回路120还包括一个或更多个微物体捕集器132。捕集器132通常形成在形成通道122的边界的壁中,并且可以与微流体隔绝围栏124、126、128、130中的一个或更多个隔绝围栏的开口相对地定位。在一些实施例中,捕集器132配置成从流动路径106接收或捕获单个微物体。在一些实施例中,捕集器132配置成从流动路径106接收或捕获多个微物体。在一些情况下,捕集器132包括大约等于单个目标微物体的体积的容积。

[0232] 捕集器132还可包括开口,该开口被配置为帮助目标微物体流入捕集器132。在一些情况下,捕集器132包括开口,该开口的高度和宽度近似等于单个目标微物体的尺寸,由此防止较大的微物体进入微物体捕集器。捕集器132还可以包括其他特征,其被配置为帮助将目标微物体保持在捕集器132内。在一些情况下,捕集器132相对于微流体隔绝围栏的开口与通道122的相对侧对齐并位于该相对侧,使得在使微流体设备100围绕平行于微流体通道122的轴线倾斜时,被捕集的微物体按照使得微物体落入隔离围栏的开口中的轨迹离开捕集器132。在一些情况下,捕集器132包括小于目标微物体的侧通道134,以便于通过捕集

器132的流动,从而增加在捕集器132中捕获微物体的可能性。

[0233] 在一些实施例中,介电泳(DEP)力经由一个或更多个电极(未示出)施加穿过流体介质180(例如,在流动路径和/或隔绝围栏中)以操纵、运输、分离和分选位于其中的微物体。例如,在一些实施例中,DEP力被施加到微流体回路120的一个或更多个部分,以便将单个微物体从流动路径106转移到期望的微流体隔绝围栏中。在一些实施例中,DEP力用于防止隔绝围栏(例如,隔绝围栏124、126、128或130)内的微物体从其移位。此外,在一些实施例中,使用DEP力来选择性地根据本公开的实施例从隔绝围栏移除先前收集的微物体。在一些实施例中,DEP力包括光电镊子(OET)力。

[0234] 在其他实施例中,光电润湿(OEW)力通过一个或更多个电极(未示出)被施加到微流体设备100的支撑结构104(和/或盖110)中的一个或更多个位置(例如,有助于限定流动路径和/或隔绝围栏的位置),来操纵、运输、分离和分选位于微流体回路120中的液滴。例如,在一些实施例中,OEW力被施加到支撑结构104(和/或盖110)中的一个或更多个位置,以便将单个液滴从流动路径106转移到期望的微流体隔绝围栏中。在一些实施例中,OEW力用于防止隔绝围栏(例如,隔绝围栏124、126、128或130)内的液滴从其移位。此外,在一些实施例中,OEW力用于根据本公开的实施例从隔绝围栏选择性地移除先前收集的液滴。

[0235] 在一些实施例中,DEP和/或OEW力与其他力(例如,流动和/或重力)组合,以便在微流体回路120内操纵、传输、分离和分选微物体和/或液滴。例如,封壳102可以倾斜(例如,通过倾斜设备190)以将流动路径106和位于其中的微物体定位在微流体隔绝围栏上方,并且重力可以将微物体和/或液滴传输进入围栏中。在一些实施例中,可以在其他力之前施加DEP和/或OEW力。在其他实施例中,DEP和/或OEW力可以在其他力之后施加。在其他情况下,DEP和/或OEW力可以与其他力同时施加或以与其他力交替的方式施加。

[0236] 图1B、1C和2A-2H示出了可用于实施本公开的实施例的微流体设备的各种实施例。图1B描绘了其中微流体设备200被配置为光学致动的电动设备的实施例。本领域中已知多种光学致动的电动设备,包括具有光电镊子(OET)配置的设备 and 具有光电润湿(OEW)配置的设备。在下列美国专利文献中说明了合适的OET配置的例子,每个专利文献的全部内容通过引用包含在此:第RE 44,711号美国专利(Wu等人)(最初作为第7,612,355号美国专利公布);和第7,956,339号美国专利(Ohta等人)。OEW配置的示例在第6,958,132号美国专利(Chiou等人)和公开号为2012/0024708的美国专利申请(Chiou等人)中示出,这两个专利的全部内容通过引用并入本文。光学致动的电动设备的又一个例子包括组合的OET/OEW配置,其示例见于公开号为20150306598(Khandros等人)和公开号为20150306599(Khandros等人)的美国专利及其相应的PCT公开文本W02015/164846和W02015/164847,所有这些都通过引用整体并入本文。

[0237] 已经描述了具有可以放置、培养和/或监测卵母细胞、卵子或胚胎的围栏的微流体设备的示例,例如,在US 2014/0116881(2013年10月22日提交的第14/060,117号申请)、US 2015/0151298(2014年10月22日提交的第14/520,568号申请)和US 2015/0165436(2014年10月22日提交的第14/521,447号申请),其每个的全部内容通过引用并入本文。第14/520,568和14/521,447号美国申请还描述了分析在微流体设备中培养的细胞分泌物的示例性方法。前述申请中的每一个进一步描述了微流体设备,其被配置为产生介电泳(DEP)力,例如光电镊子(OET),或被配置为提供光电润湿(OEW)。例如,US 2014/0116881的图2中所示的光电镊

子设备是可以在本公开的实施例中用于选择和移动单个生物微物体或一组生物微物体的设备的示例。

[0238] 微流体设备动力配置。如上所述,系统的控制和监测设备可以包括动力模块,用于在微流体设备的微流体回路中选择和移动物体,例如微物体或液滴。微流体设备可具有各种动力配置,这取决于被移动物体的类型和其他考虑因素。例如,介电电泳 (DEP) 配置可用于选择和移动微流体回路中的微物体。因此,微流体设备100的支撑结构104和/或盖110可包括DEP配置,用于选择性地在微流体回路120中的流体介质180中的微物体上引发DEP力,从而选择、捕获和/或移动单个微物体或微物体组。或者,微流体设备100的支撑结构104和/或盖110可包括电润湿 (EW) 配置,用于选择性地在微流体回路120中的流体介质180中的液滴上引发EW力,从而选择、捕获和/或移动单个液滴或液滴组。

[0239] 包含DEP配置的微流体设备200的一个示例在图1B和1C中示出。尽管为了简单起见,图1B和1C分别示出了具有开放区域/腔室202的微流体设备200的封壳102的一部分的侧剖视图和俯视剖视图,应当理解的是,区域/腔室202可以是具有更详细结构的流体回路元件的一部分,诸如生长腔室、隔绝围栏、流动区或流动通道。此外,微流体设备200可以包括其他流体回路元件。例如,微流体设备200可以包括多个生长腔室或隔绝围栏和/或一个或更多个流动区或流动通道,例如本文关于微流体设备100所描述的那些。DEP配置可以结合到微流体设备200的任何这种流体回路元件或其选择部分中。应该进一步理解的是,任何上述或下面描述的微流体设备部件和系统部件可以并入微流体设备200和/或与微流体设备200结合使用。例如,包括上述控制和监测设备152的系统150可以与微流体设备200 (包括介质模块160、动力模块162、成像模块164、倾斜模块166和其他模块168中的一个或更多个) 一起使用。

[0240] 如图1B所示,微流体设备200包括具有底部电极204和覆盖底部电极204的电极活化衬底206的支撑结构104、以及具有顶部电极210的盖110,其中顶部电极210与底部电极204间隔开。顶部电极210和电极活化衬底206限定区域/腔室202的相对表面。包含在区域/腔室202中的介质180因此在顶部电极210和电极活化衬底206之间提供电阻连接。还示出了被配置为连接到底部电极204和顶部电极210并在电极之间产生偏置电压的电源212,如在区域/腔室202中产生DEP力所需的那样。电源212可以是例如交流 (AC) 电源。

[0241] 在某些实施例中,图1B和1C中所示的微流体设备200可具有光学致动的DEP配置。因此,可以由动力模块162控制的来自光源216的光218的改变图案可以选择性地激活和停用电极活化衬底206的内表面208的区域214处的DEP电极的改变图案。(在下文中,具有DEP配置的微流体设备的区域214被称为“DEP电极区域”。) 如图1C所示,引导到电极活化衬底206的内表面208上的光图案218可以以诸如正方形的图案照射选择的DEP电极区域214a (以白色显示)。以下将未被照射的DEP电极区域214 (交叉影线) 称为“暗”DEP电极区域214。通过DEP电极活化衬底206 (即,从底部电极204直到电极活化衬底206的与流动区106中的介质180交界的内表面208) 的相对阻抗大于在每个暗DEP电极区域214处通过区域/腔室202中的介质180 (即,从电极活化衬底206的内表面208到盖110的顶部电极210) 的相对阻抗。然而,被照射的DEP电极区域214a呈现出通过电极活化衬底206的减小的相对阻抗,该相对阻抗小于在每个被照射的DEP电极区域214a处通过区域/腔室202中的介质180的相对阻抗。

[0242] 在激活电源212的情况下,上述DEP配置在被照射的DEP电极区域214a和相邻的暗

DEP电极区域214之间的流体介质180中产生电场梯度,这又产生吸引或排斥流体介质180中的附近的微物体(未示出)的局部DEP力。因此,可以在区域/腔室202的内表面208的许多不同的这种DEP电极区域214处通过改变从光源216投射到微流体设备200中的光图案218而选择性地激活和停用吸引或排斥流体介质180中的微物体的DEP电极。DEP力是吸引还是排斥附近的微物体可取决于诸如电源212的频率和介质180和/或微物体(未示出)的介电性质等参数。

[0243] 图1C中所示的被照射的DEP电极区域214a的正方形图案220仅是示例。可以通过投射到微流体设备200中的光图案218来照射(并由此激活)DEP电极区域214的任何图案,并且照射/激活的DEP电极区域214的图案可以通过改变或移动光图案218来重复改变。

[0244] 在一些实施例中,电极活化衬底206可以包括光电导材料或由光电导材料组成。在这样的实施例中,电极活化衬底206的内表面208可以是无特征的。例如,电极活化衬底206可以包括氢化非晶硅(a-Si:H)层或由其组成。a-Si:H可以包含例如约8%至40%的氢(按 $100 \times \text{氢原子数} / \text{氢原子和硅原子的总数}$ 计算)。a-Si:H层可具有约500nm至约2.0 μm 的厚度。在这样的实施例中,根据光图案218,DEP电极区域214可以在电极活化衬底206的内表面208上的任何地方以任何图案形成。因此,DEP电极区域214的数量和图案不需要是固定的,而是可以对应于光图案218。例如在第RE 44,711号美国专利(Wu等人)(最初作为第7,612,355号美国专利公开)中已经描述了具有包括如上所述的光电导层的DEP配置的微流体设备的示例,其全部内容通过引用并入本文。

[0245] 在其他实施例中,电极活化衬底206可以包括衬底,该衬底包括多个掺杂层、电绝缘层(或区域)和形成半导体集成电路的导电层,诸如在半导体领域中已知的。例如,电极活化衬底206可以包括多个光电晶体管,例如包括横向双极光电晶体管,每个光电晶体管对应于DEP电极区域214。或者,电极活化衬底206可以包括由光电晶体管开关控制的电极(例如,导电金属电极),每个这样的电极对应于DEP电极区域214。电极活化衬底206可以包括这种光电晶体管或光电晶体管控制电极的图案。例如,该图案可以是排列成行和列的基本上正方形的光电晶体管或光电晶体管控制电极的阵列,如图2B所示。或者,该图案可以是形成六方点阵的基本上六边形的光电晶体管或光电晶体管控制电极的阵列。不管何种图案,电路元件可以在电极活化衬底206的内表面208处的DEP电极区域214与底部电极210之间形成电连接,并且可以由光图案218选择性地激活和停用那些电连接(即,光电晶体管或电极)。当未被激活时,每个电连接可以具有高阻抗,使得通过电极活化衬底206(即,从底部电极204到与区域/腔室202中的介质180相交界的电极活化衬底206的内表面208)的相对阻抗大于在相应DEP电极区域214处通过介质180(即,从电极活化衬底206的内表面208至盖110的顶部电极210)的相对阻抗。然而,当被光图案218中的光激活时,通过电极活化衬底206的相对阻抗小于在每个被照射的DEP电极区域214处通过介质180的相对阻抗,从而激活相应DEP电极区域处的DEP电极,如上所述。因此,以由光图案218确定的方式,可以在区域/腔室202中的电极活化衬底206的内表面208处的许多不同的DEP电极区域214处选择性地激活和停用吸引或排斥介质180中的微物体(未示出)的DEP电极。

[0246] 在例如第7,956,339号美国专利(Ohta等人)中已经描述了具有包括光电晶体管的电极活化衬底的微流体设备的示例(参见例如图21和图22中所示的设备300及其描述),其全部内容通过引用并入本文。具有包括由光电晶体管开关控制的电极的电极活化衬底的微

流体设备的示例已经在例如公开号为2014/0124370的美国专利(Short等人)中描述(参见例如整个附图示出的设备200、400、500、600和900及其描述),其全部内容通过引用并入本文。

[0247] 在DEP配置的微流体设备的一些实施例中,顶部电极210是封壳102的第一壁(或盖110)的一部分,并且电极活化衬底206和底部电极204是第二壁(或支撑结构104)的一部分。区域/腔室202可位于第一壁和第二壁之间。在其他实施例中,电极210是第二壁(或支撑结构104)的一部分,并且电极活化衬底206和/或电极210中的一者或两者是第一壁(或盖110)的一部分。此外,光源216可以替代地用于从下方照射封壳102。

[0248] 利用图1B至图1C的具有DEP配置的微流体设备200,动力模块162可以通过将光图案218投射到微流体设备200中来选择区域/腔室202中的介质180中的微物体(未示出),以在围绕并捕获微物体的图案(例如,正方形图案220)中激活电极活化衬底206的内表面208的DEP电极区域214a处的第一组一个或更多个DEP电极。然后,动力模块162可以通过相对于微流体设备200移动光图案218来移动原位生成的捕获的微物体以激活在DEP电极区域214处的第二组一个或更多个DEP电极。或者,微流体设备200可以相对于光图案218移动。

[0249] 在其他实施例中,微流体设备200可以具有不依赖于在电极活化衬底206的内表面208处的DEP电极的光激活的DEP配置。例如,电极活化衬底206可以包括与包括至少一个电极的表面(例如,盖110)相对定位的选择性可寻址和可激励电极。开关(例如,半导体衬底中的晶体管开关)可以选择性地打开和闭合,以激活或钝化DEP电极区域214处的DEP电极,从而在激活的DEP电极附近的区域/腔室202内的微物体(未示出)上产生净DEP力。取决于诸如电源212的频率和介质(未示出)和/或区域/腔室202中的微物体的介电特性的这样的特性,DEP力可以吸引或排斥附近的微物体。通过选择性地激活和停用成组的DEP电极(例如,在形成正方形图案220的成组的DEP电极区域214处),区域/腔室202中的一个或更多个微物体可被捕获并在区域/腔室202内移动。图1A中的动力模块162可以控制这样的开关并因此激活和停用DEP电极中的单独的DEP电极以选择、捕获和移动围绕区域/腔室202的特定微物体(未示出)。具有包括选择性可寻址和可激励电极的DEP配置的微流体设备在本领域中是已知的,并且已经在第6,294,063号(Becker等)和第6,942,776号(Medoro)美国专利中已经描述,其全部内容通过引用并入本文。

[0250] 作为又一个示例,微流体设备200可以具有电润湿(EW)配置,其可以代替DEP配置,或者可以位于微流体设备200的与具有DEP配置的部分分离的部分中。EW配置可以是光电润湿配置或电介质上的电润湿(EWOD)配置,两者都是本领域已知的。在一些EW配置中,支撑结构104具有夹在介电层(未示出)和底部电极204之间的电极活化衬底206。介电层可包括疏水材料和/或可涂覆有疏水材料,如下所述。对于具有EW配置的微流体设备200,支撑结构104的内表面208是介电层的内表面或其疏水涂层。

[0251] 介电层(未示出)可包括一个或更多个氧化物层,并且可具有约50nm至约250nm(例如,约125nm至约175nm)的厚度。在某些实施例中,介电层可包括氧化物层,例如金属氧化物(例如,氧化铝或氧化铪)。在某些实施例中,介电层可包括除金属氧化物之外的介电材料,例如硅的氧化物或氮化物。无论确切的组成和厚度如何,介电层可具有约10k欧姆至约50k欧姆的阻抗。

[0252] 在一些实施例中,介电层的向内朝向区域/腔室202的表面涂覆有疏水材料。疏水

材料可包括例如氟化碳分子。氟化碳分子的示例包括全氟聚合物,例如聚四氟乙烯(例如TEFLON®)或聚(2,3-二氟亚甲基-全氟四氢呋喃)(例如CYTOP™)。构成疏水材料的分子可以共价键合到介电层的表面。例如,疏水材料的分子可借助于诸如硅氧烷基团、磷酸基团或硫醇基团的连接基团共价结合到介电层的表面。因此,在一些实施例中,疏水性材料可包含烷基封端的硅氧烷、烷基封端的磷酸或烷基封端的硫醇。烷基可以是长链烃(例如,具有至少10个碳或至少16、18、20、22或更多个碳的链)。或者,可以使用氟化(或全氟化)碳链代替烷基。因此,例如,疏水材料可包括氟代烷基封端的硅氧烷、氟代烷基封端的磷酸或氟代烷基封端的硫醇。在一些实施例中,疏水涂层的厚度为约10nm至约50nm。在其他实施例中,疏水涂层的厚度小于10nm(例如,小于5nm,或约1.5-3.0nm)。

[0253] 在一些实施例中,具有电润湿配置的微流体设备200的盖110也涂覆有疏水材料(未示出)。疏水材料可以是用于涂覆支撑结构104的介电层的相同疏水材料,并且疏水涂层可以具有与支撑结构104的介电层上的疏水涂层的厚度基本相同的厚度。此外,盖110可以包括以支撑结构104的方式夹在介电层和顶部电极210之间的电极活化衬底206。电极活化衬底206和盖110的介电层可以具有与电极活化衬底206和支撑结构104的介电层相同的组成和/或尺寸。因此,微流体设备200可具有两个电润湿表面。

[0254] 在一些实施例中,电极活化衬底206可包括光电导材料,例如上文所述。因此,在某些实施例中,电极活化衬底206可包括氢化非晶硅层(a-Si:H)或由其组成。a-Si:H可包含例如约8%至40%的氢(以100*氢原子数/氢和硅原子总数计算)。a-Si:H层可具有约500nm至约2.0μm的厚度。或者,电极活化衬底206可包括由光电晶体管开关控制的电极(例如,导电金属电极),如上所述。具有光电润湿配置的微流体设备在本领域中是已知的和/或可以用本领域已知的电极活化衬底构造。例如,第6,958,132号美国专利(Chiou等人,其全部内容通过引用并入本文)公开了具有诸如a-Si:H的光电导材料的光电润湿配置,而上面引用的公开号为2014/0124370的美国专利(Short等人)公开了具有由光电晶体管开关控制的电极的电极活化衬底。

[0255] 因此,微流体设备200可以具有光电润湿配置,并且光图案218可以用于激活电极活化衬底206中的光电导EW区域或光响应EW电极。电极活化衬底206的这种激活的EW区域或EW电极可以在支撑结构104的内表面208(即,覆盖的介电层或其疏水涂层的内表面)处产生电润湿力。通过改变入射在电极活化衬底206上的光图案218(或相对于光源216移动微流体设备200),接触支撑结构104的内表面208的液滴(例如,包含水性介质、溶液或溶剂)可以移动通过区域/腔室202中存在的不混溶流体(例如,油介质)。

[0256] 在其他实施例中,微流体设备200可具有EWOD配置,并且电极活化衬底206可以包括选择性可寻址和可激励的电极,其不依赖于光来激活。因此,电极活化衬底206可包括这种电润湿(EW)电极的图案。例如,图案可以是按行和列布置的基本上正方形的EW电极阵列,如图2B所示。或者,图案可以是形成六边形网格的基本上六边形的EW电极的阵列。无论图案如何,EW电极都可以通过电开关(例如,半导体衬底中的晶体管开关)选择性地激活(或停用)。通过选择性地激活和停用电极活化衬底206中的EW电极,接触覆盖的介电层或其疏水涂层的的内表面208液滴(未示出)可以在区域/腔室202内移动。图1A中的动力模块162可以控制这样的开关,从而激活和停用各个EW电极,以选择和移动区域/腔室202周围的特定液滴。具有选择性可寻址和可激励电极的EWOD配置的微流体设备在本领域中是已知的,并且

已在例如第8,685,344号美国专利(Sundarsan等人)中进行了描述,其全部内容通过引用合并于此。

[0257] 无论微流体设备200的配置如何,电源212都可用于提供为微流体设备200的电路供电的电势(例如,AC电压电势)。电源212可以与图1中参考的电源192相同或者是其组件。电源212可以被配置为向顶部电极210和底部电极204提供AC电压和/或电流。对于AC电压,电源212可以提供频率范围和平均或峰值功率(例如,电压或电流)范围,其足以产生足够强的净DEP力(或电润湿力)以捕集和移动区域/腔室202中的各个微物体(未示出),如上所述,和/或改变区域/腔室202中支撑结构104的内表面208(即,介电层和/或介电层上的疏水涂层)的润湿性质,也如上所述。这种频率范围和平均或峰值功率范围在本领域中是已知的。例如参见第6,958,132号美国专利(Chiou等人)、第RE44,711号美国专利(Wu等人)(最初作为第7,612,355号美国专利公布)以及公开号为US2014/0124370(Short等人)、US2015/0306598(Khandros等人)和US2015/0306599(Khandros等人)的美国专利申请。

[0258] 隔绝围栏。在图2A-2C所示的微流体设备230内示出了通用隔绝围栏224、226和228的非限制性示例。每个隔绝围栏224、226和228可以包括限定隔离区240的隔离结构232和将隔离区240流体连接到通道122的连接区236。连接区236可以包括通向微流体通道122的近侧开口234和通向隔离区240的远侧开口238。连接区236可以配置成使得从微流体通道122流入隔绝围栏224、226、228的流体介质(未示出)的流动的最大穿透深度不延伸到隔离区240中。因此,由于连接区236,设置在隔绝围栏224、226、228的隔离区240中的微物体(未示出)或其他材料(未示出)因此可以与微流体通道122中的介质180的流动分离并且基本上不受其影响。

[0259] 图2A-2C的隔绝围栏224、226和228各自具有直接通向微流体通道122的单个开口。隔绝围栏的开口从微流体通道122横向打开。电极活化衬底206位于微流体通道122和隔绝围栏224、226和228两者的下面。形成隔绝围栏的底面的隔绝围栏的封壳内的电极活化衬底206的上表面设置在形成微流体设备的流动通道(或流动区)的底面的微流体通道122(或者如果通道不存在则为流动区)内的电极活化衬底206的上表面的相同高度或基本上相同的高度处。电极活化衬底206可以是无特征的或者可以具有不规则或图案化的表面,该表面从其最高高度到最低的凹陷变化小于约3微米、2.5微米、2微米、1.5微米、1微米、0.9微米、0.5微米、0.4微米、0.2微米、0.1微米或更小。通过微流体通道122(或流动区)和隔绝围栏的衬底的上表面中的高度的变化可小于隔绝围栏壁或微流体设备的壁的高度的约3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.5%、0.3%或0.1%。虽然详细描述了微流体设备200,但这也适用于本文所述的任何微流体设备100、230、250、280、290、320、400、450、500、700。

[0260] 微流体通道122因此可以是被扫过的区域的示例,并且隔绝围栏224、226、228的隔离区240可以是未被扫过的区域的示例。如上所述,微流体通道122和隔绝围栏224、226、228可以被配置为包含一个或更多个流体介质180。在图2A-2B所示的示例中,端口222连接到微流体通道122并且允许流体介质180被引入微流体设备230或从微流体设备230移除。在引入流体介质180之前,微流体设备可以用诸如二氧化碳气体的气体填充。一旦微流体设备230包含流体介质180,微流体通道122中的流体介质180的流动242可被选择性地产生并停止。例如,如图所示,端口222可以设置在微流体通道122的不同位置(例如,相对的端部)处,并且可以从用作入口的一个端口222到用作出口的另一个端口222创建介质的流动242。

[0261] 图2C示出了根据本公开的隔绝围栏224的示例的详细视图。还示出了微物体246的示例。

[0262] 如已知的,流体介质180在微流体通道122中经过隔绝围栏224的近侧开口234的流动242可引起介质180进入和/或离开隔绝围栏224的二次流动244。为了将隔绝围栏224的隔离区240中的微物体246与二次流动244隔离,隔绝围栏224的连接区236的长度 L_{con} (即,从近侧开口234到远侧开口238)应该是大于二次流动244进入连接区236的穿透深度 D_p 。二次流动244的穿透深度 D_p 取决于在微流体通道122中流动的流体介质180的速度以及与微流体通道122的配置和连接区236到微流体通道122的近侧开口234有关的各种参数。对于给定的微流体设备,微流体通道122和开口234的配置将是固定的,而微流体通道122中的流体介质180的流动242的速率将是可变的。因此,对于每个隔绝围栏224,可以识别通道122中的流体介质180的流动242的最大速度 V_{max} ,其确保二次流动244的穿透深度 D_p 不超过连接区236的长度 L_{con} 。只要微流体通道122中的流体介质180的流动242的速率不超过最大速度 V_{max} ,则所产生的二次流动244可以被限制到微流体通道122和连接区236并且保持在隔离区240之外。因此,介质180在微流体通道122中的流动242不会将微物体246拉出隔离区240。相反,位于隔离区240中的微物体246将停留在隔离区240中,而与微流体通道122中的流体介质180的流动242无关。

[0263] 而且,只要微流体通道122中的介质180的流动242的速率不超过 V_{max} ,微流体通道122中的流体介质180的流动242将不会使混杂颗粒(例如,微米颗粒和/或纳米颗粒)从微流体通道122中移动进入隔绝围栏224的隔离区240。因此,连接区236的长度 L_{con} 大于二次流动244的最大穿透深度 D_p 可以防止来自微流体通道122或另一隔绝围栏(例如图2D中的隔绝围栏226、228)的混杂颗粒对一个隔绝围栏224的污染。

[0264] 因为微流体通道122和隔绝围栏224、226、228的连接区236可能受微流体通道122中的介质180的流动242影响,所以微流体通道122和连接区236可以被认为是微流体设备230的被扫过(或流动)区域。另一方面,隔绝围栏224、226、228的隔离区240可以被认为是未被扫过(或非流动)区域。例如,微流体通道122中第一流体介质180中的组分(未示出)可基本上仅通过第一介质180的组分的扩散从微流体通道122通过连接区236并进入隔离区240中的第二流体介质248而与隔离区240中的第二流体介质248混合。类似地,隔离区240中的第二介质248的组分(未示出)可以基本上仅通过第二介质248的组分的扩散从隔离区240穿过连接区236并且进入微流体通道122中的第一介质180而与微流体通道122中的第一介质180混合。在一些实施例中,隔绝围栏的隔离区与流动区之间通过扩散进行的流体介质交换程度大于流体交换的约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或大于约99%。第一介质180可以是与第二介质248相同的介质或不同的介质。此外,第一介质180和第二介质248可以开始是相同的,然后变得不同(例如,通过隔离区240中的一个或多个细胞对第二介质248的调节,或者通过改变流过微流体通道122的介质180)。

[0265] 如上所述,由微流体通道122中的流体介质180的流动242导致的二次流动244的最大穿透深度 D_p 可以取决于多个参数。这样的参数的示例包括:微流体通道122的形状(例如,通道可以将介质引导到连接区236中,使介质转移出连接区236,或者在基本上垂直于微流体通道122的连接区236的近侧开口234的方向上将介质引导到微流体通道122中);微流体通道122在近侧开口234处的宽度 W_{ch} (或截面积);和在近侧开口234处的连接区236的宽度

W_{con} (或截面积); 流体介质180在微流体通道122中的流动242的速度 V ; 第一介质180和/或第二介质248的粘度等。

[0266] 在一些实施例中, 微流体通道122和隔绝围栏224、226、228的尺寸可相对于微流体通道122中的流体介质180的流动242的矢量如下定向: 微流体通道宽度 W_{ch} (或微流体通道122的截面积) 可以基本上垂直于介质180的流动242; 连接区236在开口234处的宽度 W_{con} (或截面积) 可以基本平行于微流体通道122中的介质180的流动242; 和/或连接区的长度 L_{con} 可以基本垂直于微流体通道122中的介质180的流动242。以上仅是示例, 并且微流体通道122和隔绝围栏224、226、228的相对位置可以相对于彼此处于其他方位。

[0267] 如图2C所示, 连接区236的宽度 W_{con} 可以从近侧开口234到远侧开口238是均匀的。因此, 在远侧开口238处的连接区236的宽度 W_{con} 可以是本文为连接区236在近侧开口234处的宽度 W_{con} 所标识的任何范围内。或者, 远侧开口238处的连接区236的宽度 W_{con} 可以大于近侧开口234处的连接区236的宽度 W_{con} 。

[0268] 如图2C所示, 远侧开口238处的隔离区240的宽度可以与近侧开口234处的连接区236的宽度 W_{con} 基本相同。因此, 在远侧开口238处的隔离区240的宽度可以是本文为连接区236在近侧开口234处的宽度 W_{con} 所标识的任何范围内。或者, 远侧开口238处的隔离区240的宽度可以大于或小于近侧开口234处的连接区236的宽度 W_{con} 。而且, 远侧开口238可以小于近侧开口234, 并且连接区236的宽度 W_{con} 可以在近侧开口234和远侧开口238之间变窄。例如, 连接区236可以使用各种不同的几何形状 (例如倒角连接区, 斜切连接区) 而在近侧开口和远侧开口之间变窄。此外, 连接区236的任何部分或子部分 (例如, 连接区与近侧开口234相邻的一部分) 可以变窄。

[0269] 图2D-2F描绘了包含微流体回路262和流动通道264的微流体设备250的另一个示例性实施例, 其是图1A的相应微流体设备100、回路132和通道134的变型。微流体设备250还具有多个隔绝围栏266, 所述隔绝围栏266是上述隔绝围栏124、126、128、130、224、226或228的附加变型。特别地, 应该理解的是, 图2D-2F中示出的设备250的隔绝围栏266可以代替设备100、200、230、280、290、320、400、450、500、700中的任何上述隔绝围栏124、126、128、130、224、226或228。类似地, 微流体设备250是微流体设备100的另一种变型, 并且也可以具有与上述微流体设备100、200、230、280、290、320、400、450、500、700相同或不同的DEP配置以及本文描述的任何其他微流体系统部件。

[0270] 图2D-2F的微流体设备250包括支撑结构 (在图2D-2F中不可见, 但可以与图1A中描绘的设备100的支撑结构104相同或基本相似)、微流体回路结构256和盖 (在图2D-2F中不可见, 但可以与图1A中描绘的设备100的盖122相同或基本相似)。微流体回路结构256包括框架252和微流体回路材料260, 其可以与图1A中示出的设备100的框架114和微流体回路材料116相同或基本相似。如图2D所示, 由微流体回路材料260限定的微流体回路262可包括多个隔绝围栏266流体连接到的多个通道264 (示出两个, 但可以有更多)。

[0271] 每个隔绝围栏266可以包括隔离结构272、隔离结构272内的隔离区270和连接区268。从微流体通道264处的近侧开口274到隔离结构272处的远侧开口276, 连接区268将微流体通道264流体连接到隔离区270。通常, 根据图2B和2C的上述讨论, 通道264中的第一流体介质254的流动278可以产生第一介质254从微流体通道264进入和/或离开隔绝围栏266的相应连接区268的二次流动282。

[0272] 如图2E所示,每个隔绝围栏266的连接区268通常包括在通向通道264的近侧开口274与通向隔离结构272的远侧开口276之间延伸的区域。连接区268的长度 L_{con} 可以大于二次流动282的最大穿透深度 D_p ,在这种情况下,二次流动282将延伸到连接区268中而不被重新引导到隔离区270(如图2D所示)。或者,如图2F所示,连接区268可以具有小于最大穿透深度 D_p 的长度,在这种情况下,二次流动282将延伸穿过连接区268并且朝向隔离区270重新引导。在后一种情况下,连接区268的长度 L_{c1} 和 L_{c2} 之和大于最大穿透深度 D_p ,使得二次流动282不会延伸到隔离区270中。无论连接区268的长度 L_{con} 是大于穿透深度 D_p 还是连接区268的长度 L_{c1} 和 L_{c2} 之和大于穿透深度 D_p ,不会超过最大速度 V_{max} 的第一介质254在通道264中的流动278都将产生具有穿透深度 D_p 的二次流动,并且在隔绝围栏266的隔离区270中的微物体(未示出,但可以与图2C中所示的微物体246相同或基本相似)将不会被通道264中的第一介质254的流动278从隔离区270中拉出。通道264中的流动278也不会将来自通道264的杂物(未示出)带入隔绝围栏266的隔离区270中。如此,扩散是微流体通道264中的第一介质254中的组分可以从微流体通道264移动到隔绝围栏266的隔离区270中的第二介质258中的唯一机制。类似地,扩散是隔绝围栏266的隔离区270中的第二介质258中的组分可以从隔离区270移动到微流体通道264中的第一介质254的唯一机制。第一介质254可以是与第二介质258相同的介质,或者第一介质254可以是与第二介质258不同的介质。或者,第一介质254和第二介质258可以开始相同,然后变得不同,例如通过隔离区270中的一个或多个单元对第二介质进行调节,或者通过改变流过微流体通道264的介质。

[0273] 如图2E所示,微流体通道264中的微流体通道264的宽度 W_{ch} (即,横向于通过图2D中的箭头278所指示的微流体通道的流体介质流动的方向所取的方向)可以基本垂直于近侧开口274的宽度 W_{con1} 并且因此基本平行于远侧开口276的宽度 W_{con2} 。然而,近侧开口274的宽度 W_{con1} 和远侧开口276的宽度 W_{con2} 不必基本上彼此垂直。例如,近侧开口274的宽度 W_{con1} 所定向的轴线(未示出)与远侧开口276的宽度 W_{con2} 所定向的另一轴线之间的角度可以不是垂直的,因此不是 90° 。可选方位角度的示例包括以下任何范围内的角度:约 30° 至约 90° ,约 45° 至约 90° ,约 60° 至约 90° 等。

[0274] 在隔绝围栏(例如124、126、128、130、224、226、228或266)的各种实施例中,隔离区(例如240或270)被配置为包含多个微物体。在其他实施例中,隔离区可以被配置为仅包含一个、两个、三个、四个、五个或类似的相对较少数量的微物体。因此,隔离区的容积可以是例如至少 1×10^6 、 2×10^6 、 4×10^6 、 6×10^6 立方微米或更多。

[0275] 在隔绝围栏的各种实施例中,近侧开口(例如,234)处的微流体通道(例如,122)的宽度 W_{ch} 可以在以下范围中的任何一个范围内:约50-1000微米、50-500微米、50-400微米、50-300微米、50-250微米、50-200微米、50-150微米、50-100微米、70-500微米、70-400微米、70-300微米、70-250微米、70-200微米、70-150微米、90-400微米、90-300微米、90-250微米、90-200微米、90-150微米、100-300微米、100-250微米、100-200微米、100-150微米、和100-120微米。在一些其他实施例中,近侧开口(例如234)处的微流体通道(例如,122)的宽度 W_{ch} 可以在约200-800微米、200-700微米或200-600微米的范围内。以上仅是示例,并且微流体通道122的宽度 W_{ch} 可以处于其他范围内(例如,由上面列出的任何端点限定的范围)。此外,在微流体通道的除了隔绝围栏的近侧开口处之外的区域中,微流体通道122的 W_{ch} 可以被选择为处于这些范围中的任何范围中。

[0276] 在一些实施例中, 隔绝围栏具有约30至约200微米或约50至约150微米的高度。在一些实施例中, 隔绝围栏的截面积为约 1×10^4 - 3×10^6 平方微米、 2×10^4 - 2×10^6 平方微米、 4×10^4 - 1×10^6 平方微米、 2×10^4 - 5×10^5 平方微米、 2×10^4 - 1×10^5 平方微米或约 2×10^5 - 2×10^6 平方微米。

[0277] 在隔绝围栏的各种实施例中, 近侧开口(例如, 234)处的微流体通道(例如, 122)的高度 H_{ch} 可以在以下范围中的任何一个范围内: 20-100微米、20-90微米、20-80微米、20-70微米、20-60微米、20-50微米、30-100微米、30-90微米、30-80微米、30-70微米、30-60微米、30-50微米、40-100微米、40-90微米、40-80微米、40-70微米、40-60微米或40-50微米。以上仅是示例, 并且微流体通道(例如122)的高度 H_{ch} 可以处于其他范围(例如, 由以上列出的任何端点所定义的范围)中。在微流体通道的除隔绝围栏的近侧开口处之外的区域中, 微流体通道122的高度 H_{ch} 可以被选择为在任何一个这些范围内。

[0278] 在隔绝围栏的各种实施例中, 近侧开口(例如, 234)处的微流体通道(例如, 122)的截面积可以在以下范围中的任何一个范围内: 500-50,000平方微米、500-40,000平方微米、500-30,000平方微米、500-25,000平方微米、500-20,000平方微米、500-15,000平方微米、500-10,000平方微米、500-7,500平方微米、500-5,000平方微米、1,000-25,000平方微米、1,000-20,000平方微米、1,000-15,000平方微米、1,000-10,000平方微米、1,000-7,500平方微米、1,000-5,000平方微米、2,000-20,000平方微米、2,000-15,000平方微米、2,000-10,000平方微米、2,000-7,500平方微米、2,000-6,000平方微米、3,000-20,000平方微米、3,000-15,000平方微米、3,000-10,000平方微米、3,000-7,500平方微米或3,000至6,000平方微米。前述仅仅是示例, 并且近侧开口(例如, 234)处的微流体通道(例如, 122)的截面可以处于其他范围(例如, 由以上列出的任何端点限定的范围)内。

[0279] 在隔绝围栏的各种实施例中, 连接区(例如, 236)的长度 L_{con} 可以处于以下范围中的任一个: 约1-600微米、5-550微米、10-500微米、15-400微米、20-300微米、20-500微米、40-400微米、60-300微米、80-200微米或约100-150微米。以上仅是示例, 并且连接区(例如236)的长度 L_{con} 可以处于与前述示例不同的范围(例如, 由上面列出的任何端点限定的范围)中。

[0280] 在隔绝围栏的各种实施例中, 在近侧开口(例如, 234)处的连接区(例如, 236)的宽度 W_{con} 可以处于以下范围中的任一个: 20-500微米、20-400微米、20-300微米、20-200微米、20-150微米、20-100微米、20-80微米、20-60微米、30-400微米、30-300微米、30-200微米、30-150微米、30-100微米、30-80微米、30-60微米、40-300微米、40-200微米、40-150微米、40-100微米、40-80微米、40-60微米、50-250微米、50-200微米、50-150微米、50-100微米、50-80微米、60-200微米、60-150微米、60-100微米、60-80微米、70-150微米、70-100微米和80-100微米。前述仅仅是示例, 并且近侧开口(例如, 234)处的连接区(例如, 236)的宽度 W_{con} 可以不同于前述示例(例如, 由以上列出的任何端点限定的范围)。

[0281] 在隔绝围栏的各种实施例中, 近侧开口(例如, 234)处的连接区(例如, 236)的宽度 W_{con} 可以至少与隔绝围栏所要用于的微物体(例如, 可以是T细胞、B细胞或卵子或胚胎的生物细胞)的最大尺寸一样大。例如, 在卵母细胞、卵子或胚胎将被放入的隔绝围栏的近侧开口234处的连接区236的宽度 W_{con} 可以处于以下范围中的任何一个范围: 约100微米、约110微米、约120微米、约130微米、约140微米、约150微米、约160微米、约170微米、约180微米、约190微米、约200微米、约225微米、约250微米、约300微米或约100-400微米、约120微米-350

微米、约140-200-200、300微米、或约140-200微米。前述仅仅是示例，并且近侧开口（例如，234）处的连接区（例如，236）的宽度 W_{con} 可以不同于前述示例（例如，由以上列出的任何端点限定的范围）。

[0282] 在隔绝围栏的各种实施例中，连接区的近侧开口的宽度 W_{pr} 可以至少与隔绝围栏所要用于的微物体（例如，诸如细胞的生物微物体）的最大尺寸一样大。例如，宽度 W_{pr} 可以是约50微米，约60微米，约100微米，约200微米，约300微米或者可以在约50-300微米，约50-200微米，约50-100微米，约75-150微米，约75-100微米或约200-300微米。

[0283] 在隔绝围栏的各种实施例中，连接区（例如236）的长度 L_{con} 与近侧开口234处的连接区（例如236）的宽度 W_{con} 的比率可以大于或等于以下任一比率：0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0或更大。前述仅是示例，并且连接区236的长度 L_{con} 与近侧开口234处的连接区236的宽度 W_{con} 的比率可以与前述示例不同。

[0284] 在微流体设备100、200、23、250、280、290、320、400、450、500、700的各种实施例中， V_{max} 可设定为约0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4或1.5微升/秒。

[0285] 在具有隔绝围栏的微流体设备的各种实施例中，隔绝围栏的隔离区（例如，240）的容积可以是例如至少 5×10^5 、 8×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 4×10^6 、 6×10^6 、 8×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或 8×10^8 立方微米或更大。在具有隔绝围栏的微流体设备的各种实施例中，隔绝围栏的容积可以是约 5×10^5 、 6×10^5 、 8×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 4×10^6 、 8×10^6 、 1×10^7 、 3×10^7 、 5×10^7 或约 8×10^7 立方微米或更大。在一些其他实施例中，隔绝围栏的容积可以是约1纳升至约50纳升、2纳升至约25纳升、2纳升至约20纳升、约2纳升至约15纳升或约2纳升至约10纳升。

[0286] 在各种实施例中，微流体设备具有如本文讨论的任何实施例中配置的隔绝围栏，其中微流体设备具有约5至约10个隔绝围栏、约10至约50个隔绝围栏、约100至约500个隔绝围栏；约200至约1000个隔绝围栏、约500至约1500个隔绝围栏、约1000至约2000个隔绝围栏或约1000至约3500个隔绝围栏。隔绝围栏不需要全部具有相同的尺寸，并且可以包括多种配置（例如，隔绝围栏内的不同宽度、不同特征）。

[0287] 图2G示出了根据一个实施例的微流体设备280。图2G中示出了微流体设备280是微流体设备100的程式化图。实际上，微流体设备280及其组成回路元件（例如通道122和隔绝围栏128）将具有本文讨论的尺寸。图2G中示出的微流体回路120具有两个端口107、四个不同通道122和四个不同流动路径106。微流体设备280进一步包括在每个通道122打开的多个隔绝围栏。在图2G所示的微流体设备中，隔绝围栏具有与图2C所示的围栏相似的几何形状，因此具有连接区和隔离区两者。因此，微流体回路120包括被扫过的区域（例如，通道122和连接区236的在二次流动244的最大穿透深度 D_p 内的部分）和未被扫过的区域（例如，隔离区240和连接区236不在二次流动244的最大穿透深度 D_p 内的部分）。

[0288] 图3A至图3B示出了可用于操作和观察根据本公开的微流体设备（例如100、200、230、250、280、290、320、400、450、500、700）的系统150的各种实施例。如图3A所示，系统150可以包括被配置为容纳微流体设备100（未示出）或本文描述的任何其他微流体设备的结构（“巢”）300。巢300可以包括能够与微流体设备320（例如，光致动电动设备100）接口并提供从电源192到微流体设备320的电连接的插座302。巢300可以进一步包括集成的电信号生成子系统304。电信号生成子系统304可以被配置为向插座302提供偏置电压，使得当微流体设备320由插座302保持时，偏置电压被施加在微流体设备320中的一对电极上。因此，电信号

生成子系统304可以是电源192的一部分。向微流体设备320施加偏置电压的能力并不意味着当微流体设备320由插座302保持时将始终施加偏置电压。而是,在大多数情况下,将间歇地(例如,仅在需要时)施加偏置电压,以便于微流体设备320中的电动力(例如介电电泳或电润湿)的产生。

[0289] 如图3A所示,巢300可以包括印刷电路板组件(PCBA) 322。电信号生成子系统304可以安装在并且电集成到PCBA 322中。示例性支撑件还包括安装在PCBA 322上的插座302。

[0290] 通常,电信号生成子系统304将包括波形发生器(未示出)。电信号生成子系统304还可以包括示波器(未示出)和/或被配置为放大从波形发生器接收的波形的波形放大电路(未示出)。示波器(如果存在的话)可以被配置为测量提供给由插座302保持的微流体设备320的波形。在某些实施例中,示波器测量在微流体设备320近侧(并且在波形发生器的远侧)的位置处的波形,从而确保更准确地测量实际施加到设备的波形。从示波器测量中获得的数据可以例如作为反馈提供给波形发生器,并且波形发生器可以被配置为基于这种反馈来调整其输出。一个合适的组合波形发生器和示波器的示例是Red Pitaya™。

[0291] 在某些实施例中,巢300还包括控制器308,诸如用于感测和/或控制电信号生成子系统304的微处理器。合适的微处理器的示例包括Arduino™微处理器,例如Arduino Nano™。控制器308可以用于执行功能和分析,或者可以与外部主控制器154(在图1A中示出)通信以执行功能和分析。在图3A所示的实施例中,控制器308通过接口310(例如插头或连接器)与主控制器154通信。

[0292] 在一些实施例中,巢300可以包括电信号生成子系统304,其包括Red Pitaya™波形发生器/示波器单元(“Red Pitaya单元”)和放大由Red Pitaya单元生成的波形并传递放大的电压到微流体设备100的波形放大电路。在一些实施例中,Red Pitaya单元被配置成测量微流体设备320处的放大电压,然后根据需要调整其自己的输出电压,使得微流体设备320处的测量电压是期望值。在一些实施例中,波形放大电路可具有由安装在PCBA 322上的一对DC-DC转换器产生的+6.5V至-6.5V电力供应,从而在微流体设备100处产生高达13Vpp的信号。

[0293] 如图3A所示,支撑结构300(例如,巢)可以进一步包括热控制子系统306。热控制子系统306可以被配置成调节由支撑结构300保持的微流体设备320的温度。例如,热控制子系统306可以包括帕尔贴(Peltier)热电设备(未示出)和冷却单元(未示出)。帕尔贴热电设备可具有配置成与微流体设备320的至少一个表面相交界的第一表面。冷却单元可以是例如冷却块(未示出),例如液体冷却铝块。帕尔贴热电设备的第二表面(例如,与第一表面相对的表面)可以被配置为与这种冷却块的表面相交界。冷却块可以连接到流体路径314,流体路径314配置成使冷却流体循环通过冷却块。在图3A所示的实施例中,支撑结构300包括入口316以及出口318,以接收来自外部存储器(未示出)的冷却流体,将冷却流体引入流体路径314并通过冷却块,然后将冷却流体返回到外部存储器。在一些实施例中,帕尔贴热电设备、冷却单元和/或流体路径314可以安装在支撑结构300的壳体312上。在一些实施例中,热控制子系统306被配置为调节帕尔贴热电设备的温度,以便实现微流体设备320的目标温度。帕尔贴热电设备的温度调节可以例如通过诸如Pololu™热电电源(Pololu机器人技术和电子集团)的热电电源来实现。热控制子系统306可以包括反馈电路,诸如由模拟电路提供的温度值。或者,反馈电路可以由数字电路提供。

[0294] 在一些实施例中,巢300可以包括具有反馈电路的热控制子系统306,该反馈电路是模拟分压器电路(未示出),其包括电阻器(例如电阻为 $1k\Omega$ +/−0.1%,温度系数+/−0.02ppm/°C)和NTC热敏电阻(例如标称电阻为 $1k\Omega$ +/−0.01%)。在一些情况下,热控制子系统306测量来自反馈电路的电压,然后使用所计算的温度值作为板载PID控制回路算法的输入。来自PID控制回路算法的输出可驱动例如Polo1u™马达驱动器(未示出)上的定向和脉冲宽度调制信号引脚,以致动热电电源,从而控制帕尔贴热电设备。

[0295] 巢300可以包括串行端口324,其允许控制器308的微处理器经由接口310(未示出)与外部主控制器154通信。另外,控制器308的微处理器可以与电信号生成子系统304和热控制子系统306通信(例如,经由Plink工具(未示出))。因此,通过控制器308、接口310和串行端口324的组合,电信号生成子系统304和热控制子系统306可以与外部主控制器154通信。以这种方式,主控制器154尤其可以通过执行用于输出电压调整的缩放计算来辅助电信号生成子系统304。经由耦合到外部主控制器154的显示设备170提供的图形用户界面(GUI)(未示出)可以被配置为绘制分别从热控制子系统306和电信号生成子系统304获得的温度和波形数据。可替代地或另外地,GUI可以允许更新控制器308、热控制子系统306和电信号生成子系统304。

[0296] 如上所述,系统150可以包括成像设备194。在一些实施例中,成像设备194包括光调制子系统330(参见图3B)。光调制子系统330可以包括数字镜设备(DMD)或微型快门阵列系统(MSA),其中的任一个都可以被配置为接收来自光源332的光并且将所接收的光的子组传输到显微镜350的光具组中。或者,光调制子系统330可以包括产生其自己的光(并因此不需要光源332)的设备,例如有机发光二极管显示器(OLED)、硅基液晶(LCOS)设备、铁电液晶硅设备(FLCOS)或透射式液晶显示器(LCD)。光调制子系统330可以是例如投影仪。因此,光调制子系统330能够发射结构化光和非结构化光。合适的光调制子系统330的一个示例是来自Andor技术™的Mosaic™系统。在某些实施例中,系统150的成像模块164和/或动力模块162可以控制光调制子系统330。

[0297] 在某些实施例中,成像设备194还包括显微镜350。在这样的实施例中,巢300和光调制子系统330可以被单独配置成安装在显微镜350上。显微镜350可以是例如标准研究级光学显微镜或荧光显微镜。因此,巢300可以被配置成安装在显微镜350的载物台344上和/或光调制子系统330可以被配置成安装在显微镜350的端口上。在其他实施例中,这里描述的巢300和光调制子系统330可以是显微镜350的整体部件。

[0298] 在某些实施例中,显微镜350可以进一步包括一个或更多个检测器348。在一些实施例中,检测器348由成像模块164控制。检测器348可以包括目镜、电荷耦合器件(CCD)、相机(例如数字相机)或其任何组合。如果存在至少两个检测器348,则一个检测器可以是例如快速帧速率相机,而另一个检测器可以是高灵敏度相机。此外,显微镜350可以包括配置成接收来自微流体设备320的反射光和/或发射光并且将反射光和/或发射光的至少一部分聚焦在一个或更多个检测器348上的光具组。显微镜的光具组还可以包括用于不同检测器的不同镜筒透镜(未示出),使得每个检测器上的最终放大率可以不同。

[0299] 在某些实施例中,成像设备194被配置为使用至少两个光源。例如,可以使用第一光源332来产生结构化光(例如,经由光调制子系统330),并且可以使用第二光源334来提供非结构化光。第一光源332可以产生用于光致电激励和/或荧光激发的结构化光,并且第二

光源334可以用于提供明场照明。在这些实施例中,动力模块164可以用于控制第一光源332并且成像模块164可以用于控制第二光源334。显微镜350的光具组可以被配置为(1)当设备被巢300保持时,接收来自光调制子系统330的结构化光并且将结构化光聚焦在微流体设备(例如光致电动设备)中的至少第一区域上,以及(2)接收来自微流体设备的反射光和/或发射光并且将这种反射光和/或发射光的至少一部分聚焦到检测器348上。光具组还可以被配置成当设备被巢300保持时接收来自第二光源的非结构化光并将非结构化光聚焦在微流体设备的至少第二区域上。在某些实施例中,微流体设备的第一区域和第二区域可以是重叠区域。例如,第一区域可以是第二区域的子组。

[0300] 在图3B中,第一光源332被示为将光提供给光调制子系统330,光调制子系统330向系统355(未示出)的显微镜350的光具组提供结构化光。第二光源334被示为经由分束器336将非结构化的光提供给光具组。来自光调制子系统330的结构化光和来自第二光源334的非结构化光从分束器336穿过光具组一起行进,到达第二分束器(或二向色滤波器338,取决于由光调制子系统330提供的光),其中光被反射向下通过物镜336到达样本平面342。然后,来自样本平面342的反射光和/或发射光向上返回穿过物镜340,穿过分束器和/或二向色滤光器338,并且到达二向色滤光器346。只有到达二向色滤光器346的一部分光穿过并且到达检测器348。

[0301] 在一些实施例中,第二光源334发射蓝光。利用适当的二向色滤光器346,从样品平面342反射的蓝光能够穿过二向色滤光器346并到达检测器348。相反,来自光调制子系统330的结构化光从样品平面342反射,但不穿过二向色滤光器346。在这个示例中,二向色滤光器346滤除波长大于495nm的可见光。如果从光调制子系统发射的光不包括短于495nm的任何波长,则来自光调制子系统330的光的这种滤除才算完成(如图所示)。实际上,如果来自光调制子系统330的光包括短于495nm的波长(例如,蓝色波长),则来自光调制子系统的一些光将穿过滤波器346到达检测器348。在这样的实施例中,滤波器346用于改变从第一光源332和第二光源334到达检测器348的光量之间的平衡。如果第一光源332明显强于第二光源334,则这可以是有益的。在其他实施例中,第二光源334可以发射红光,并且二向色滤光器346可以滤除除红光之外的可见光(例如具有短于650nm的波长的可见光)。

[0302] 涂覆溶液和涂覆试剂。不希望受理论限制,当微流体设备的至少一个或更多个内表面已得到调理或涂覆,以呈现提供微流体设备与其中维持的生物微物体之间的主要界面的有机和/或亲水分子层时,可以促进在微流体设备(例如,DEP配置的和/或EW配置的微流体设备)内维持(即,生物微物体在微流体设备内表现出增强的活力、更大的扩增和/或更大的便携性)生物微物体(例如,生物细胞)。在一些实施例中,微流体设备的一个或更多个内表面(例如,DEP配置的微流体设备的电极活化衬底的内表面、微流体设备的盖和/或回路材料的表面)可以用涂覆溶液和/或涂覆试剂处理或改性,以产生所需的有机和/或亲水分子层。

[0303] 涂覆可以在引入生物微物体之前或之后施加,或者可以与生物微物体同时引入。在一些实施例中,生物微物体可以在包含一种或更多种涂覆试剂的流体介质中输入微流体设备中。在其他实施例中,微流体设备(例如,DEP配置的微流体设备)的内表面在将生物微物体引入微流体设备之前用包含涂覆试剂的涂覆溶液处理或“涂底漆”。

[0304] 在一些实施例中,微流体设备的至少一个表面包括涂覆材料,其提供适于维持和/

或扩增生物微物体的有机和/或亲水分子层(例如提供如下面所述的经调理表面)。在一些实施例中,微流体设备的基本上所有内表面都包括涂覆材料。涂覆的内表面可包括流动区(例如,通道)、腔室或隔绝围栏的表面或其组合。在一些实施例中,多个隔绝围栏中的每一个具有至少一个内表面涂有涂覆材料。在其他实施例中,多个流动区或通道中的每一个具有至少一个内表面涂覆有涂覆材料。在一些实施例中,多个隔绝围栏中的每一个和多个通道中的每一个的至少一个内表面都涂覆有涂覆材料。

[0305] 涂覆试剂/溶液。可以使用任何方便的涂覆试剂/涂覆溶液,包括但不限于:血清或血清因子、牛血清白蛋白(BSA)、聚合物、去污剂、酶及其任何组合。

[0306] 聚合物类涂覆材料。至少一个内表面可包括包含聚合物的涂覆材料。聚合物可以与至少一个表面共价或非共价结合(或可以非特异性地粘附)。聚合物可具有多种结构基序,例如,嵌段聚合物(和共聚物)、星形聚合物(星形共聚物)和接枝或梳形聚合物(接枝共聚物)中发现的所有结构基序,所有这些都适用于本文公开的方法。

[0307] 聚合物可包括含有亚烃醚部分的聚合物。多种含亚烃醚的聚合物可适用于本文所述的微流体设备。一类非限制性示例性的含亚烃醚的聚合物是两亲性非离子嵌段共聚物,其包括聚合物链内不同比例和位置的聚环氧乙烷(PEO)和聚环氧丙烷(PPO)亚单元的嵌段。**Pluronic®**聚合物(BASF)是这种类型的嵌段共聚物,并且在本领域中已知适合与活细胞接触时使用。聚合物的平均分子量 M_w 可以为约2000Da至约20KDa。在一些实施例中,PEO-PPO嵌段共聚物可具有大于约10(例如,约12-18)的亲水-亲油平衡(HLB)。可用于产生涂覆表面的特定**Pluronic®**聚合物包括**Pluronic®**L44、L64、P85和F127(包括F127NF)。另一类含亚烃醚的聚合物是聚乙二醇(PEG $M_w < 100,000$ Da)或聚环氧乙烷(PEO, $M_w > 100,000$)。在一些实施例中,PEG可具有约1000Da、5000Da、10,000Da或20,000Da的 M_w 。

[0308] 在其他实施例中,涂覆材料可包括含有羧酸部分的聚合物。羧酸亚单元可以是含有亚单元的烷基、链烯基或芳族部分。一个非限制性示例是聚乳酸(PLA)。在其他实施例中,涂覆材料可包括含有磷酸酯部分(在聚合物主链的末端或在聚合物主链的侧基上)的聚合物。在其他实施例中,涂覆材料可包括含有磺酸部分的聚合物。磺酸亚单元可以是含有亚单元的烷基、链烯基或芳族部分。一个非限制性示例是聚苯乙烯磺酸(PSSA)或聚茴脑磺酸。在进一步的实施例中,涂覆材料可包括含有胺部分的聚合物。聚氨聚合物可包括天然聚氨聚合物或合成聚氨聚合物。天然聚氨的示例包括精胺、亚精胺和腐胺。

[0309] 在其他实施例中,涂覆材料可包括含有糖部分的聚合物。在非限制性示例中,诸如黄原胶或葡聚糖的多糖可适合于形成可减少或防止微流体设备中的细胞粘附的材料。例如,大小为约3kDa的葡聚糖聚合物可用于为微流体设备内的表面提供涂覆材料。

[0310] 在其他实施例中,涂覆材料可包括含有核苷酸部分的聚合物,即核酸,其可具有核糖核苷酸部分或脱氧核糖核苷酸部分,从而提供聚电解质表面。核酸可仅含有天然核苷酸部分或可含有非天然核苷酸部分,其包含碱基、核糖或磷酸酯部分的类似物,例如7-脱氮腺嘌呤、戊糖、甲基磷酸酯或硫代磷酸酯部分,但不限于此。

[0311] 在其他实施例中,涂覆材料可包括含有氨基酸部分的聚合物。含有氨基酸部分的聚合物可包括含天然氨基酸的聚合物或含非天然氨基酸的聚合物,其中任一种可包括肽、多肽或蛋白质。在一个非限制性示例中,蛋白质可以是牛血清白蛋白(BSA)和/或血清(或多种不同血清的组合),其包含白蛋白和/或一种或更多种其他类似蛋白质作为涂覆试剂。血

清可以来自任何方便的来源,包括但不限于胎牛血清、绵羊血清、山羊血清、马血清等。在某些实施例中,涂覆溶液中的BSA以约1mg/mL至约100mg/mL的形式的范围存在,包括5mg/mL、10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、80mg/mL、90mg/mL、或更多或介于之间。在某些实施例中,涂覆溶液中的血清可以以约20% (v/v) 至约50% v/v形式的范围存在,包括25%、30%、35%、40%、45%、或更多或介于其间。在一些实施例中,BSA可以作为涂覆试剂以5mg/mL存在于涂覆溶液中,而在其他实施例中,BSA可以作为涂覆试剂以70mg/mL存在于涂覆溶液中。在某些实施例中,血清作为涂覆试剂以30%存在于涂覆溶液中。在一些实施例中,可以在涂覆材料内提供细胞外基质 (ECM) 蛋白质,用于优化细胞粘附以促进细胞生长。可包含在涂覆材料中的细胞基质蛋白可包括但不限于胶原蛋白、弹性蛋白、含RGD的肽 (例如纤连蛋白) 或层粘连蛋白。在其他实施例中,可以在微流体设备的涂覆材料内提供生长因子、细胞因子、激素或其他细胞信号传导物种。

[0312] 在一些实施例中,涂覆材料可包括含有环氧烷烃部分、羧酸部分、磺酸部分、磷酸酯部分、糖部分、核苷酸部分或氨基酸部分中多于一种的聚合物。在其他实施例中,聚合物调理表面可包括多于一种聚合物的混合物,每种聚合物具有环氧烷烃部分、羧酸部分、磺酸部分、磷酸酯部分、糖部分、核苷酸部分和/或氨基酸部分,其可以是独立地或同时地掺入涂覆材料中。

[0313] 共价连接的涂覆材料。在一些实施例中,所述至少一个内表面包括共价连接的分子,所述分子提供适于维持/扩增微流体设备内的生物微物体的有机和/或亲水分子层,为这些细胞提供经调理表面。

[0314] 共价连接的分子包括连接基团,其中连接基团共价连接到微流体设备的一个或更多个表面,如下所述。连接基团还与被配置为提供适于维持/扩增生物微物体的有机和/或亲水分子层的部分共价连接。

[0315] 在一些实施例中,配置成提供适于维持/扩增生物微物体的有机和/或亲水分子层的共价连接部分可包括烷基或氟代烷基 (包括全氟烷基) 部分;单糖或多糖 (可包括但不限于葡聚糖);醇类 (包括但不限于炔丙醇);多元醇,包括但不限于聚乙烯醇;亚烃醚,包括但不限于聚乙二醇;聚电解质 (包括但不限于聚丙烯酸或聚乙烯膦酸);氨基 (包括其衍生物,例如但不限于烷基化胺、羟烷基化氨基、胍基和含有未芳香化的氮环原子的杂环基,例如但不限于吗啉基或哌嗪基);羧酸,包括但不限于丙炔酸 (可提供羧酸盐阴离子表面);膦酸,包括但不限于乙炔基膦酸 (可提供膦酸盐阴离子表面);磺酸根阴离子;羧基甜菜碱;磺酸甜菜碱;氨基磺酸;或氨基酸。

[0316] 在各种实施例中,配置成提供适于维持/扩增微流体设备中的生物微物体的有机和/或亲水分子层的共价连接部分可包括非聚合部分,例如烷基部分、诸如氟烷基部分的取代烷基部分 (包括但不限于全氟烷基部分)、氨基酸部分、醇部分、氨基部分、羧酸部分、膦酸部分、磺酸部分、氨基磺酸部分或糖部分。或者,共价连接的部分可包括聚合部分,其可以是上述任何部分。

[0317] 在一些实施例中,共价连接的烷基部分可包含形成直链的碳原子 (例如,至少10个碳或至少14、16、18、20、22或更多个碳的直链) 并且可以是无支链的烷基部分。在一些实施例中,烷基可包括取代烷基 (例如,烷基中的一些碳可被氟化或全氟化)。在一些实施例中,烷基可包括连接至第二片段的第一片段,第一片段可包括全氟烷基,第二片段可包括未取

代烷基,其中第一片段和第二片段可直接或间接连接(例如,通过醚键的方式)。烷基的第一片段可位于连接基团的远端,并且烷基的第二片段可位于连接基团的近端。

[0318] 在其他实施例中,共价连接部分可包括至少一个氨基酸,其可包括多于一种类型的氨基酸。因此,共价连接部分可包括肽或蛋白质。在一些实施例中,共价连接部分可包括氨基酸,其可提供两性离子表面以支持细胞生长、活力、便携性或其任何组合。

[0319] 在其他实施例中,共价连接部分可包括至少一个环氧烷部分,并且可包括如上所述的任何环氧烷聚合物。一类有用的含亚烃醚的聚合物是聚乙二醇(PEG $M_w < 100,000$ Da)或者聚环氧乙烷(PEO, $M_w > 100,000$)。在一些实施例中,PEG可具有约1000Da、5000Da、10,000Da或20,000Da的 M_w 。

[0320] 共价连接部分可包括一种或更多种糖。共价连接的糖可以是单糖、二糖或多糖。可以改性共价连接的糖以引入反应性配对部分,其允许偶联或精制以附着于表面。示例性的反应性配对部分可包括醛、炔烃或卤素部分。多糖可以以随机方式改性,其中可以改性每种糖单体或仅改性多糖内的一部分糖单体以提供可以直接或间接偶联至表面的反应性配对部分。一个示例可以包括葡聚糖多糖,其可以通过未支化的接头间接地偶联到表面。

[0321] 共价连接部分可包括一个或更多个氨基。氨基可以是取代的胺部分、胍部分、含氮杂环部分或杂芳基部分。含氨基的部分可以具有允许微流体设备内(并且任选地,在隔绝围栏和/或流动区(例如,通道)内)的环境的pH改变的结构。

[0322] 提供经调理表面的涂覆材料可以仅包含一种共价连接部分,或者可以包括多于一种的不同种类的共价连接部分。例如,氟烷基调理表面(包括全氟烷基)可具有全部相同的多个共价连接部分,例如具有相同的连接基团和与表面的共价附着、相同的总长度和相同数量的包含氟代烷基部分的氟亚甲基单元。或者,涂覆材料可具有附着于表面的多于一种的共价连接部分。例如,涂覆材料可包括具有共价连接的烷基或氟代烷基部分(具有指定数量的亚甲基或氟亚甲基单元)的分子,并且还可包括另一组分子,其具有共价附着到具有更多数量的亚甲基或氟亚甲基单元的烷基或氟代烷基链的带电荷部分,其可提供在涂覆表面上呈现较大部分的能力。在这种情况下,具有不同的、空间要求较低的末端和较少的主链原子的第一组分子可以帮助使整个衬底表面功能化,从而防止与构成衬底本身的硅/氧化硅、氧化钪或氧化铝的不期望的粘附或接触。在另一个示例中,共价连接部分可以提供在表面上以随机方式呈现交替电荷的两性离子表面。

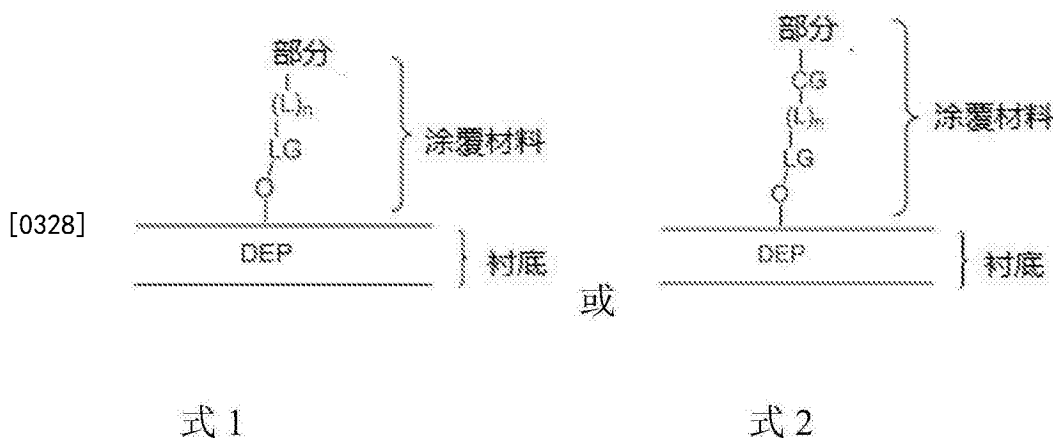
[0323] 经调理表面特性。除了经调理表面的组成之外,诸如疏水材料的物理厚度的其他因素可以影响DEP力。各种因素可以改变经调理表面的物理厚度,例如在衬底上形成经调理表面的方式(例如,气相沉积、液相沉积、旋涂、浸渍和静电涂覆)。在一些实施例中,经调理表面的厚度的范围为约1nm至约10nm;约1nm至约7nm;约1nm至约5nm;或其间的任何个别值。在其他实施例中,由共价连接部分形成的经调理表面可具有约10nm至约50nm的厚度。在各种实施例中,如本文所述制备的经调理表面具有小于10nm的厚度。在一些实施例中,经调理表面的共价连接部分可在共价连接至微流体设备的表面(例如,DEP配置的衬底表面)时形成单层,并且可具有小于10nm的厚度(例如,小于5nm,或约1.5至3.0nm)。这些值与CYTOP®(Asahi Glass公司,日本)含氟聚合物旋涂(其厚度在约30nm的范围内)形成鲜明对比。在一些实施例中,经调理表面不需要完美形成的单层,以适于在DEP配置的微流体设备内的操作。

[0324] 在各种实施例中,提供微流体设备的经调理表面的涂覆材料可提供所需的电性质。不受理论的限制,影响涂覆有特定涂覆材料的表面的鲁棒性的一个因素是固有电荷捕集。不同的涂覆材料可能捕集电子,这可能导致涂覆材料的破坏。涂覆材料中的缺陷可能增加电荷捕集并导致涂覆材料的进一步破坏。类似地,不同的涂覆材料具有不同的介电强度(即导致介电击穿的最小施加电场),这可能影响电荷捕集。在某些实施例中,涂覆材料可具有整体结构(例如,致密堆积的单层结构),其减少或限制电荷捕集量。

[0325] 除了其电性质之外,经调理表面还可具有有益于与生物分子一起使用的性质。例如,含有氟化(或全氟化)碳链的经调理表面可提供相对于烷基封端链的减少表面结垢量的益处。如本文所用,表面污垢是指在微流体设备的表面上不加区别材料的沉积量,其可包括例如蛋白质及其降解产物、核酸和相应降解产物等生物材料的永久或半永久沉积。

[0326] 单一或多部分经调理表面。共价连接涂覆材料可以通过已经含有以下部分的分子的反应来形成,该部分配置成提供适于维持/扩增微流体设备中的生物微物体的有机和/或亲水分子层,如同如下面所描述的。或者,共价连接涂覆材料可以通过将被配置成提供适于维持/扩增生物微物体的有机和/或亲水分子层的部分偶联至本身已与表面共价连接的表面改性配体而形成两部分序列。

[0327] 制备共价连接涂覆材料的方法。在一些实施例中,共价连接至微流体设备表面(例如,包括隔绝围栏和/或流动区的至少一个表面)的涂覆材料具有式1或式2的结构。当在一个步骤中将涂覆材料引入表面时,它具有式1的结构,而当以多步骤过程引入涂覆材料时,它具有式2的结构。



[0329] 涂覆材料可以共价连接到DEP配置或EW配置的衬底的表面的氧化物。DEP或EW配置的衬底可包括硅、氧化硅、氧化铝或氧化铅。氧化物可以作为衬底的天然化学结构的一部分存在,或者可以如下所述引入。

[0330] 涂覆材料可以通过连接基团(“LG”)与氧化物附接,该连接基团可以是由硅氧烷或磷酸基团与氧化物反应形成的甲硅烷氧基或磷酸酯基团。配置成在微流体设备中提供适于维持/扩增生物微物体的有机和/或亲水分子层的部分可以是本文所述的任何部分。连接基团LG可以直接或间接连接到配置成提供适于维持/扩增微流体设备中的生物微物体的有机和/或亲水分子层的部分。当连接基团LG直接连接至该部分时,不存在任意的连接基(“L”)且n为0。当连接基团LG间接连接到该部分时,存在连接基L并且n为1。连接基L可以具有线性部分,其中线性部分的主链可以包括1至200个选自硅、碳、氮、氧、硫和磷原子的任何组合的非氢原子,其受到化学键合限制,如在本领域中已知的。它可以被从醚、氨基、羰基、酰氨基

或磷酸酯基团、亚芳基、亚杂芳基或杂环基团组成的组中选择一个或更多个的任意组合中断。在一些实施例中,连接基L的主链可包含10至20个原子。在其他实施例中,连接基L的主链可包含约5个原子至约200个原子;大约10个原子到大约80个原子;大约10个原子到大约50个原子;或大约10个原子到大约40个原子。在一些实施例中,主链原子都是碳原子。

[0331] 在一些实施例中,配置成提供适于维持/扩增生物微物体的有机和/或亲水分子层的部分可以在多步骤过程中添加到衬底的表面,并且具有式2的结构,如上所示。该部分可以是上述任何部分。

[0332] 在一些实施例中,偶联基团CG代表来自反应部分 R_x 和反应配对部分 R_{px} (即,配置为与反应部分 R_x 反应的部分)的反应的所得基团。例如,一个典型的偶联基团CG可以包括甲酰胺基,其是氨基与羧酸衍生物反应的结果,例如活化酯、酰基氯等。其他CG可包括三唑基、甲酰胺基、硫代酰胺基、肟基、巯基、二硫化物、醚或烯基,或可在反应部分与其各自的反应配对部分反应时形成的任何其它合适的基团。偶联基团CG可以位于连接基L的第二端(即,配置成提供适于维持/扩增微流体设备中的生物微物体的有机和/或亲水分子层的部分的近端),其可以包括如上所述的任何元素组合。在一些其它实施例中,偶联基团CG可以中断连接基L的主链。当偶联基团CG是三唑基时,它可以是Click偶联反应产生的产物并且可以进一步被取代(例如,二苯并环辛烯基稠合三唑基)。

[0333] 在一些实施例中,使用化学气相沉积将涂覆材料(或表面改性配体)沉积在微流体设备的内表面上。可任选地改进气相沉积工艺,例如,通过暴露于溶剂浴、超声处理或其组合来预清洁盖110、微流体回路材料116和/或衬底(例如,DEP配置衬底的电极活化衬底206的内表面208,或者EW配置衬底的支撑结构104的介电层)。替代地或另外地,这种预清洁可包括在氧等离子体清洁器中处理盖110、微流体回路材料116和/或衬底,其可去除各种杂质,同时引入氧化表面(例如,表面上的氧化物,其可以如本文所述进行共价改性)。或者,代替氧等离子体清洁器来使用液相处理,例如,盐酸和过氧化氢的混合物或硫酸和过氧化氢的混合物(例如,食人鱼溶液,其硫酸与过氧化氢的比率可以为约3:1至约7:1)。

[0334] 在一些实施例中,在微流体设备200已经组装以形成限定微流体回路120的封壳102之后,使用气相沉积来涂覆微流体设备200的内表面。不希望受理论限制,将这种涂覆材料沉积在完全组装的微流体回路120上可有益于防止由微流体回路材料116和电极活化衬底206介电层和/或盖110之间的弱化结合引起的分层。在采用两步工艺的实施例中,表面改性配体可以通过如上所述的气相沉积引入,随后引入配置为提供适于维持/扩增生物微物体的有机和/或亲水分子层的部分。随后的反应可以通过将表面改性的微流体设备暴露于溶液中的合适的偶联剂来进行。

[0335] 图2H描绘了微流体设备290的截面图,所述微流体设备290具有提供经调理表面的示例性共价连接涂覆材料。如图所示,涂覆材料298(示意性地示出)可包括单层密集填充的分子,其共价地结合到基底286(其可以是DEP衬底)的内表面294和微流体设备290的盖288的内表面292。涂覆材料298可以设置在邻近并向内朝向微流体设备290的封壳284的基本上所有内表面294、292上,在一些实施例中并且如上所述,包括用于限定微流体设备290内的回路元件和/或结构的微流体回路材料(未示出)的表面。在替代实施例中,涂覆材料298可以仅设置在微流体设备290的一个或一些内表面上。

[0336] 在图2H所示的实施例中,涂覆材料298可包括单层有机硅氧烷分子,每个分子经由

甲硅烷氧基连接体296共价键合到微流体设备290的内表面292、294。可以使用任何上述涂覆材料298(例如,烷基封端的、氟代烷基封端的部分、PEG封端的部分、葡聚糖封端的部分、或含有用于有机硅氧基部分的正电荷或负电荷的末端部分),其中末端部分设置在其面向封壳的末端(即,涂覆材料298的单层的未与内表面292、294结合并且靠近封壳284的部分)。

[0337] 在其他实施例中,用于涂覆微流体设备290的内表面292、294的涂覆材料298可包括阴离子、阳离子或两性离子部分,或其任何组合。不受理论的限制,通过在微流体回路120的封壳284的内表面上呈现阳离子部分、阴离子部分和/或两性离子部分,涂覆材料298可以与水分子形成强氢键,使得水合作用所得到的水充当将生物微物体与非生物分子(例如,衬底的硅和/或氧化硅)的相互作用分开的层(或“屏蔽”)。此外,在涂覆材料298与涂层剂结合使用的实施例中,涂覆材料298的阴离子、阳离子和/或两性离子可以在封壳284中与介质180(例如,涂覆溶液)中存在的非共价涂层剂(例如,溶液中蛋白质)的带电部分形成离子键。

[0338] 在其他实施例中,涂覆材料可在其面向封壳的末端处包括亲水性涂层剂,或者可被化学改性为在其面向封壳的末端处呈现亲水性涂层剂。在一些实施例中,涂覆材料可包括含亚烃醚的聚合物,例如PEG。在一些实施例中,涂覆材料可包括多糖,例如葡聚糖。与上面讨论的带电部分(例如,阴离子、阳离子和两性离子部分)类似,亲水性涂层剂可以与水分子形成强氢键,使得水合作用所得到的水充当将生物微物体与非生物分子(例如,衬底的硅和/或氧化硅)的相互作用分开的层(或“屏蔽”)。

[0339] 适当的涂层处理和改进的进一步细节可以在2016年4月22日提交的序号为15/135,707的美国申请中找到,并且其全部内容通过引用并入本文。

[0340] 用于维持微流体设备的隔绝围栏内的细胞活力的附加系统组件。为了促进细胞群的生长和/或扩增,可以通过系统的其他组件提供有利于维持功能细胞的环境条件。例如,这种附加的组件可以提供营养物质、细胞生长信号传导物质、pH调节、气体交换、温度控制和细胞废物除去。

[0341] 对微流体设备、方法和试剂盒的一些实施例的描述。

[0342] 1.一种微流体设备,包括:包括衬底和微流体回路材料的封壳,所述封壳限定流动区域;以及设置在封壳内并且可选地在流动区域内的至少一个原位生成的捕获结构,其中至少一个原位生成的捕获结构包括固化的聚合物网络。

[0343] 2.实施例1的微流体设备,其中固化的聚合物网络可包括一个或更多个功能化位点。

[0344] 3.实施例1或2的微流体设备,其中固化的聚合物网络可包括测定试剂或测定分析物。

[0345] 4.实施例1-3中任一个的微流体设备,其中微流体设备的封壳可以包括至少一个隔绝围栏,并且可选地,隔绝围栏通向流动区域的近侧开口可以基本上平行于流动区域中的流体介质流的平均方向定向。

[0346] 5.实施例4的微流体设备,其中所述至少一个隔绝围栏可包括隔离区域和连接区域,所述连接区域具有通向所述流动区域的近侧开口和通向所述隔离区域的远侧开口。

[0347] 6.实施例4或5的微流体设备,其中一个或更多个原位生成的捕获结构可以设置在隔绝围栏内,并且可选地设置在隔绝围栏的隔离区域内。

- [0348] 7. 实施例3-6中任一个的微流体设备,其中测定试剂可共价连接至固化的聚合物网络。
- [0349] 8. 实施例3-6中任一个的微流体设备,其中测定试剂可非共价连接至固化的聚合物网络。
- [0350] 9. 实施例8的微流体设备,其中测定试剂可以通过生物素/链霉抗生物素蛋白复合物非共价连接到固化的聚合物网络。
- [0351] 10. 实施例3-9中任一个的微流体设备,其中测定试剂可以是蛋白质、核酸、有机分子和/或糖类。
- [0352] 11. 实施例10的微流体设备,其中测定试剂可包括抗体。
- [0353] 12. 实施例10的微流体设备,其中测定试剂可包括抗原。
- [0354] 13. 实施例10的微流体设备,其中测定试剂可包括捕获寡核苷酸。
- [0355] 14. 实施例3-6中任一个的微流体设备,其中测定分析物可以非共价结合至至少一个原位生成的捕获结构的固化聚合物网络。
- [0356] 15. 实施例3-6或14中任一个的微流体设备,其中测定分析物可包括蛋白质。
- [0357] 16. 实施例3-6或14中任一个的微流体设备,其中测定分析物可包括寡核苷酸。
- [0358] 17. 实施例3-6或14中任一个的微流体设备,其中测定分析物可包括抗体或细胞因子。
- [0359] 18. 实施例3-6或14中任一个的微流体设备,其中测定分析物可包括有机分子。
- [0360] 19. 实施例1-18中任一个的微流体设备,其中两个或更多个原位生成的捕获结构可以设置在流动区域和/或至少一个隔绝围栏中。
- [0361] 20. 实施例19的微流体设备,其中两个或更多个原位生成的捕获结构的第一捕获结构可以结合到第一测定试剂或第一测定分析物,并且两个或更多个原位生成的捕获结构的第二捕获结构可以结合到第二测定试剂或第二测定分析物,其中第一测定试剂或第一测定分析物不同于第二测定试剂或第二测定分析物。
- [0362] 21. 实施例19或20的微流体设备,其中两个或更多个原位生成的捕获结构中的每一个可以设置在至少一个隔绝围栏中的不同位置。
- [0363] 22. 实施例1-21中任一个的微流体设备,其中微流体设备的盖可以对来自一个或更多个捕获结构的荧光、比色或发光信号基本透明。
- [0364] 23. 实施例1-22中任一个的微流体设备,其中固化的聚合物网络可包括光引发的聚合物。
- [0365] 24. 实施例1-23中任一个的微流体设备,其中固化的聚合物网络可包括合成聚合物、改性合成聚合物、生物聚合物或其任何组合。
- [0366] 25. 实施例24的微流体设备,其中改性合成聚合物可包括裂解基序、反应性末端部分和/或细胞识别基序。
- [0367] 26. 实施例1-25中任一个的微流体设备,其中固化的聚合物网络可包括聚乙二醇、改性聚乙二醇、聚乳酸(PLA)、改性聚乳酸、聚乙醇酸(PGA)、改性聚乙醇酸、聚丙烯酰胺(PAM)、改性聚丙烯酰胺、聚-N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAm)、改性聚-N-异丙基丙烯酰胺、聚乙烯醇(PVA)、改性聚乙烯醇、聚丙烯酸(PAA)、改性聚丙烯酸、聚己内酯(PCL)、改性聚己内酯、纤连蛋白、改性纤连蛋白、胶原蛋白、改性胶原蛋白、层粘连蛋白、改性层粘连蛋白、多糖、改

性多糖、或其任何共聚物组合中的至少一种。

[0368] 27. 实施例1-26中任一个的微流体设备,其中固化的聚合物网络包括改性的聚乙二醇聚合物。

[0369] 28. 实施例1-27中任一个的微流体设备,其中微流体设备可包括多个隔绝围栏。

[0370] 29. 实施例4-28中任一个的微流体设备,其中所述至少一个原位生成的捕获结构可以配置成允许微物体从隔绝围栏中离开。

[0371] 30. 实施例1-29中任一个的微流体设备,其中所述衬底可配置成在所述封壳内产生介电泳 (DEP) 力。

[0372] 31. 实施例30的微流体设备,其中DEP力可以是光学致动的。

[0373] 32. 实施例1-31中任一个的微流体设备,其中微流体设备的至少一个内表面可进一步包括经调理的表面。

[0374] 33. 一种测定微流体设备中的微物体的方法,所述微流体设备包括至少第一原位生成的捕获结构,所述方法包括:将微物体设置在微流体设备中靠近所述至少第一原位生成的捕获结构的区域中,所述原位生成的捕获结构包括固化的聚合物网络,其中固化的聚合物网络包括测定试剂或测定分析物;使测定试剂或测定分析物与微物体或微物体的生物产物接触;检测测定试剂或测定分析物与微物体或生物产物的相互作用。

[0375] 34. 实施例33的方法,其中微流体设备可包括封壳,所述封壳包括:衬底;流动区域;以及可选地,至少一个隔绝围栏,其中第一原位生成的捕获结构设置在流动区域或至少一个隔绝围栏内。

[0376] 35. 实施例33或34的方法,其中所述至少一个隔绝围栏可包括隔离区域和连接区域,所述连接区域具有通向所述流动区域的近侧开口和通向所述隔离区域的远侧开口。

[0377] 36. 实施例35的方法,其中至少第一原位生成的捕获结构可以设置在隔绝围栏的隔离区域内。

[0378] 37. 实施例33-36中任一个的方法,其中测定试剂或测定分析物可以非共价连接至固化的聚合物网络。

[0379] 38. 实施例33-37中任一个的方法,其中测定试剂或测定分析物可包括蛋白质、寡核苷酸、有机分子或糖类。

[0380] 39. 实施例33-38中任一个的方法,其中测定试剂可包括抗体。

[0381] 40. 实施例33-39中任一个的方法,其中生物产物可包括蛋白质、寡核苷酸、有机分子或糖类。

[0382] 41. 实施例40的方法,其中蛋白质生物产物可包括抗体或抗原。

[0383] 42. 实施例33-41中任一个的方法,其中微物体可包括生物微物体。

[0384] 43. 实施例33-42中任一个的方法,其中微物体可包括杂交瘤细胞、B细胞或T细胞。

[0385] 44. 实施例33-43中任一个的方法,其中所述第一原位生成的捕获结构可以设置在与所述隔绝围栏的第一壁相邻的第一位置处。

[0386] 45. 实施例33-44中任一个的方法,其中使测定试剂或测定分析物与生物产物或微物体接触的步骤可以进一步包括形成非共价复合物。

[0387] 46. 实施例33-45中任一个的方法,其中检测相互作用的步骤可以进一步包括将具有可检测标记的检测试剂引入所述靠近至少第一原位生成的捕获结构的区域。

- [0388] 47. 实施例46的方法, 其中当测定试剂或测定分析物与生物产物或微物体相互作用时, 可检测标记可以配置成集中至至少第一原位生成的捕获结构。
- [0389] 48. 46或47的方法, 其中检测试剂的可检测标记是荧光的、比色的或发光的。
- [0390] 49. 实施例46-48中任一个的方法, 其中检测试剂可包括至少第一抗体。
- [0391] 50. 实施例49的方法, 其中抗体检测试剂可以进一步包括二级抗体。
- [0392] 51. 实施例46-48中任一个的方法, 其中检测试剂可包括嵌入染料。
- [0393] 52. 实施例46-48中任一个的方法, 其中检测试剂可包括寡核苷酸。
- [0394] 53. 实施例46-53的方法, 其中检测测定试剂或测定分析物与微物体或生物产物的相互作用的步骤可以进一步包括量化结合至至少一个原位生成的捕获结构的可检测标记的量。
- [0395] 54. 实施例33-53中任一个的方法, 其中检测步骤可包括检测来自至少一个原位生成的捕获结构的荧光信号。
- [0396] 55. 实施例34-54中任一个所述的方法, 其中所述微流体设备还可包括设置在所述流动区域或所述至少一个隔绝围栏内的第二原位生成的捕获结构, 其中所述原位生成的第二捕获结构可包括第二固化聚合物网络, 并且进一步其中原位生成的第二固化聚合物网络可包括第二测定试剂或测定分析物。
- [0397] 56. 实施例55的方法, 其中第一和第二原位生成的捕获结构中的每一个可包括不同的测定试剂或测定分析物。
- [0398] 57. 实施例55或56的方法, 其中第一和第二原位生成的捕获结构可以在可区分的位置处设置在流动区域或隔绝围栏内。
- [0399] 58. 实施例55-57中任一个的方法, 其中检测步骤可包括检测微物体的第一生物产物和微物体的第二生物产物, 其中第一生物产物不同于第二生物产物。
- [0400] 59. 实施例55-58中任一个的方法, 其中检测相互作用的步骤可以进一步包括将第一检测试剂和第二检测试剂引入邻近第一和第二原位生成的捕获结构的区域, 其中第一和第二检测试剂中的每个可包括可检测标记。
- [0401] 60. 实施例59的方法, 其中检测步骤可包括允许第一和第二可检测标记中的每个非共价连接至相应的第一测定试剂或测定分析物和第二测定试剂或测定分析物。
- [0402] 61. 实施例59或60的方法, 其中检测相互作用的步骤还可包括检测来自第一可检测标记的第一荧光信号和来自第二可检测标记的第二荧光信号。
- [0403] 62. 实施例61的方法, 其中第一和第二荧光信号可以在光谱上不同。
- [0404] 63. 实施例61或62的方法, 其中第一和第二荧光信号可以通过位置区分。
- [0405] 64. 实施例61-63中任一个的方法, 还包括量化第一和/或第二荧光信号的步骤。
- [0406] 65. 根据实施例55-64中任一个的方法, 还包括设置在所述流动区域或所述至少一个隔绝围栏内的第三或更多原位生成的捕获结构, 其中所述第三或更多原位生成的捕获结构中的每个可以包括固化的聚合物网络, 并且进一步其中每个第三或更多固化的聚合物网络的固化的聚合物网络可以包括测定试剂或测定试剂。
- [0407] 66. 实施例65的方法, 其中检测步骤可以进一步包括检测在流动区域或至少一个隔绝围栏内在位置上不同的、在光谱上可彼此不同地检测的或其组合的第一、第二、第三或更多可检测信号。

[0408] 67. 实施例33-66中任一个的方法, 其中将微物体设置在微流体设备内靠近至少第一原位生成的捕获结构的区域中的步骤可包括使用介电泳力移动微物体。

[0409] 68. 实施例67的方法, 其中介电泳力可以是光学致动的。

[0410] 69. 实施例33-68中任一个的方法, 其中微流体设备的至少一个内表面可进一步包括经调理的表面。

[0411] 70. 一种试剂盒, 包括: 微流体设备, 其具有包括衬底、微流体回路材料和可选的盖的封壳, 所述封壳限定流动区域; 以及可被可控地活化以形成固化的聚合物网络的功能化预聚物。

[0412] 71. 一种试剂盒, 包括: 微流体设备, 其具有包括衬底、微流体回路材料和可选的盖的封壳, 所述封壳限定流动区域; 以及设置在封壳内的至少一个原位生成的捕获结构, 其中至少一个原位生成的捕获结构包括固化的聚合物网络。

[0413] 72. 实施例70或71的试剂盒, 其中微流体设备的封壳还包括至少一个与流动区域流体连通的隔绝围栏。

[0414] 73. 实施例70-72中任一个的试剂盒, 其中固化的聚合物网络可包括一个或更多个功能化位点。

[0415] 74. 实施例70-73中任一个的试剂盒, 还包括测定试剂或测定分析物。

[0416] 75. 实施例74的试剂盒, 其中测定试剂或测定分析物可进一步包括功能化测定试剂或测定分析物。

[0417] 76. 实施例75的试剂盒, 其中功能化测定试剂或测定分析物可包括配置成与固化的聚合物网络的一个或更多个功能化位点缔合或结合的部分。

[0418] 77. 实施例74-76中任一个的试剂盒, 其中固化的聚合物网络可包括测定试剂或测定分析物。

[0419] 78. 实施例77的试剂盒, 其中测定试剂或测定分析物可以共价连接至固化的聚合物网络。

[0420] 79. 实施例77的试剂盒, 其中测定试剂或测定分析物可以非共价连接至固化的聚合物网络。

[0421] 80. 实施例79的试剂盒, 其中测定试剂或测定分析物可以通过生物素/链霉抗生物素蛋白复合物非共价连接到固化的聚合物网络。

[0422] 81. 实施例70-80中任一个的试剂盒, 其中固化的聚合物网络可包括合成聚合物、改性合成聚合物或生物聚合物。

[0423] 82. 实施例81的试剂盒, 其中合成聚合物改性可包括尺寸改性基序、裂解基序、反应性末端部分和/或细胞识别基序。

[0424] 83. 实施例70-82中任一个的试剂盒, 其中固化的聚合物网络可包括聚乙二醇、改性聚乙二醇、聚乳酸(PLA)、改性聚乳酸、聚乙醇酸(PGA)、改性聚乙醇酸、聚丙烯酰胺(PAM)、改性聚丙烯酰胺、聚-N-异丙基丙烯酰胺(PNIPAm)、改性聚-N-异丙基丙烯酰胺、聚乙烯醇(PVA)、改性聚乙烯醇、聚丙烯酸(PAA)、改性聚丙烯酸、聚己内酯(PCL)、改性聚己内酯、纤连蛋白、改性纤连蛋白、胶原蛋白、改性胶原蛋白、层粘连蛋白、改性层粘连蛋白、多糖、改性多糖或任何组合的共聚物中的至少一种。

[0425] 84. 实施例70-83中任一个的试剂盒, 其中固化的聚合物网络包括改性的聚乙二

醇。

[0426] 85. 实施例74-84中任一个的试剂盒, 其中测定试剂或测定分析物可包括蛋白质、核酸、有机分子或糖类。

[0427] 86. 实施例74-85中任一个的试剂盒, 其中测定试剂或测定分析物可包括抗体。

[0428] 87. 实施例74-85中任一个的试剂盒, 其中测定试剂或测定分析物可包括抗原。

[0429] 88. 实施例74-85中任一个的试剂盒, 其中测定试剂可包括捕获寡核苷酸。

[0430] 89. 实施例70-88中任一个的试剂盒, 还包括检测试剂。

[0431] 90. 实施例89的试剂盒, 其中检测试剂可包括可检测标记。

[0432] 91. 实施例90的试剂盒, 其中检测试剂的可检测标记可包括荧光标记、比色标记或发光标记。

[0433] 92. 实施例89-91中任一个的试剂盒, 其中检测试剂可包括至少第一抗体。

[0434] 93. 实施例89-91中任一个的试剂盒, 其中检测试剂可包括嵌入染料。

[0435] 94. 实施例89-91中任一个的试剂盒, 其中检测试剂可包括FRET标记的寡核苷酸。

[0436] 95. 实施例71-94中任一个的试剂盒, 其中封壳可以包括设置在其中的至少第一和第二原位生成的捕获结构, 其中第一原位生成的捕获结构包括第一固化的聚合物网络, 并且其中第二个原位生成的捕获结构包括第二固化的聚合物网络。

[0437] 96. 实施例95的试剂盒, 其中第一和第二原位生成的捕获结构设置在流动区域内。

[0438] 97. 实施例95的试剂盒, 其中第一和第二原位生成的捕获结构设置在至少一个隔绝围栏内。

[0439] 98. 实施例95-97中任一个的试剂盒, 其中第一原位生成的捕获结构和第二原位生成的捕获结构可以设置在流动区域或隔绝围栏内的不同位置。

[0440] 99. 实施例70的试剂盒, 还包括第二功能化预聚物, 其可被可控地活化以形成第二固化聚合物网络。

[0441] 100. 实施例95-99中任一个的试剂盒, 其进一步包括第一测定试剂和第二测定试剂, 并且其中第一测定试剂可以不同于第二测定试剂。

[0442] 101. 实施例100的试剂盒, 其中第一固化的聚合物网络包括第一测定试剂, 第二固化的聚合物网络包括第二测定试剂。

[0443] 102. 实施例95-101中任一个的试剂盒, 还包括第一检测试剂和第二检测试剂, 其中第一检测试剂可以与第二检测试剂不同。

[0444] 103. 实施例102的试剂盒, 其中第一检测试剂包括第一可检测标记, 第二检测试剂包括第二可检测标记, 其中第一可检测标记和第二可检测标记可以在光谱上不同。

[0445] 104. 实施例70-103中任一个的试剂盒, 其中微流体设备的封壳可以进一步包括多个隔绝围栏。

[0446] 105. 实施例104的试剂盒, 其中所述多个隔绝围栏中的每个可包括至少一个捕获结构, 所述至少一个捕获结构包括固化的聚合物网络。

[0447] 106. 实施例70-105中任一个的试剂盒, 其中微流体设备的至少一个内表面可进一步包括经调理的表面。

[0448] 107. 一种制备包括至少第一原位生成的捕获结构的微流体设备的方法, 包括: 提供所述微流体设备, 其中所述微流体设备包括包含衬底和微流体回路材料的封壳, 所述封

壳限定流动区域;将第一可流动的功能化预聚物引入流动区域;在所述封壳的至少一个选定区域中激活所述第一可流动的功能化预聚物的固化,从而在其中形成至少第一原位生成的捕获结构。

[0449] 108. 实施例107的方法,其中所述封壳进一步限定至少一个隔绝围栏。

[0450] 109. 实施例107或108的方法,其中第一原位生成的捕获结构在流动区域中形成。

[0451] 110. 实施例108的方法,其中第一原位生成的捕获结构在隔绝围栏中形成。

[0452] 111. 实施例107-110中任一个的方法,其中所述至少第一原位生成的捕获结构可包括固化的聚合物网络,所述固化的聚合物网络包括一个或更多个功能化位点。

[0453] 112. 实施例110的方法,其中所述一个或更多个功能化位点可包括生物素、抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白部分。

[0454] 113. 实施例111或112的方法,其中一个或更多个功能化位点可以与第一可流动功能化预聚物的至少一种组分共价结合。

[0455] 114. 实施例107-113中任一个的方法,进一步包括使第一体积的第一流体介质流过微流体设备的流动区域,从而将未固化的第一可流动的功能化预聚物扩散出流动区域和可选的至少一个隔绝围栏的步骤。

[0456] 115. 实施例107-114中任一个的方法,进一步包括将第一功能化测定试剂或测定分析物引入至少第一捕获结构;以及将第一功能化测定试剂或测定分析物与至少第一捕获结构的固化聚合物网络的功能化位点缔合。

[0457] 116. 实施例115的方法,还包括使第二体积的第一流体介质流过微流体设备,从而将未缔合的第一功能化测定试剂或测定分析物扩散出流动区域和可选的至少一个隔绝围栏。

[0458] 117. 实施例115或116的方法,其中第一功能化测定试剂或测定分析物可包括抗体、抗原、有机分子或寡核苷酸。

[0459] 118. 实施例117的方法,其中第一功能化测定试剂或测定分析物的有机分子可包括酶的底物、抗原、细胞表面标志物或细胞因子。

[0460] 119. 实施例115-118中任一个的方法,其中第一功能化测定试剂或测定分析物可进一步包括配置成将第一功能化测定试剂或测定分析物与至少第一捕获结构的固化聚合物网络的功能化位点缔合的部分。

[0461] 120. 实施例119的方法,其中配置成使第一功能化测定试剂或测定分析物缔合的部分可以包括将配偶体结合至至少第一捕获结构的固化聚合物网络的功能化位点的生物素、抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白。

[0462] 121. 实施例115-120中任一个的方法,其中第一功能化测定试剂或测定分析物可以是第一测定试剂。

[0463] 122. 实施例107-121中任一个的方法,还包括引入第二功能化测定试剂或测定分析物的步骤。

[0464] 123. 实施例122的方法,其中第二功能化测定试剂或测定分析物可以与至少第一捕获结构的固化聚合物网络的第二功能化位点缔合。

[0465] 124. 实施例123的方法,其中第二功能化测定试剂或测定分析物可以与第一功能化测定试剂或测定分析物可检测地区分。

[0466] 125. 实施例123的方法, 其中第二功能化测定试剂或测定分析物可以与至少一个隔绝围栏中的第二捕获结构上的第一功能化位点缔合。

[0467] 126. 实施例125的方法, 进一步包括在流动区域或至少一个隔绝围栏中引入第二捕获结构, 其中引入第二捕获结构可以包括以下步骤: 将第二可流动的功能化预聚物引入流动区域; 在所述封壳的至少第二选定区域中激活所述第二可流动的功能化预聚物的固化, 从而在其中形成第二原位生成的捕获结构; 以及将另一体积的第一流体介质流入微流体设备的流动区域。

[0468] 127. 实施例126的方法, 还包括将第三捕获结构引入流动区域或至少一个隔绝围栏, 其中引入第三捕获结构可以包括: 将第三可流动的功能化预聚物引入流动区域; 在所述封壳的至少第三选定区域中激活所述第三可流动的功能化预聚物的固化, 从而在其中形成第三原位生成的捕获结构; 以及将另一体积的第一流体介质流入微流体设备的流动区域。

[0469] 128. 实施例122-127中任一个的方法, 其中第二功能化测定试剂或测定分析物可以不同于第一功能化测定试剂或测定分析物。

[0470] 129. 实施例126-128中任一个的方法, 其中第一可流动功能化预聚物不同于第二可流动功能化预聚物。

[0471] 130. 实施例127-129中任一个的方法, 其中第一、第二和第三可流动的功能化预聚物中的每个可以彼此不同。

[0472] 131. 实施例127-130中任一个的方法, 进一步包括引入第三功能化测定试剂或测定分析物的步骤。

[0473] 132. 实施例131的方法, 其中第三功能化测定试剂或测定分析物可以与至少一个隔绝围栏中的第三捕获结构上的第一功能化位点缔合。

[0474] 133. 实施例131或132的方法, 其中第三功能化测定试剂或测定分析物可以不同于第一功能化测定试剂或测定分析物并不同于第二功能化测定试剂或测定分析物。

[0475] 134. 实施例107-133中任一个的方法, 其中微流体设备的至少一个内表面还可包括经调理的表面。

[0476] 除了任何先前指出的修改之外, 本领域技术人员可以在不脱离本说明书的精神和范围的情况下设计出许多其他变型和替换布置, 并且所附权利要求旨在覆盖这些修改和布置。因此, 尽管上面已经结合目前被认为是最实用和优选的方面的特定性和细节描述了信息, 但是对于本领域普通技术人员来说, 显而易见的是, 在不脱离本文阐述的原理和概念的情况下, 可以进行许多修改, 包括但不限于形式、功能、操作方式和使用。此外, 如本文所用, 示例和实施例在所有方面都仅是说明性的, 不应被解释为以任何方式进行限制。此外, 在本文中引用元素列表(例如, 元素a、b、c)时, 这样的引用旨在包括所列元素中的任何一个、少于所有列出的元素的任何组合、和/或所有列出的元素的组合。如本文所使用的, 术语一(a、an)和一个可以各自与术语至少一个和一个或多个可互换。还应注意, 虽然本文使用术语步骤, 但该术语可用于简单地引起对所述方法的不同部分的注意, 并不意味着描绘方法的任何部分的起点或终点, 或以任何其他方式限制。

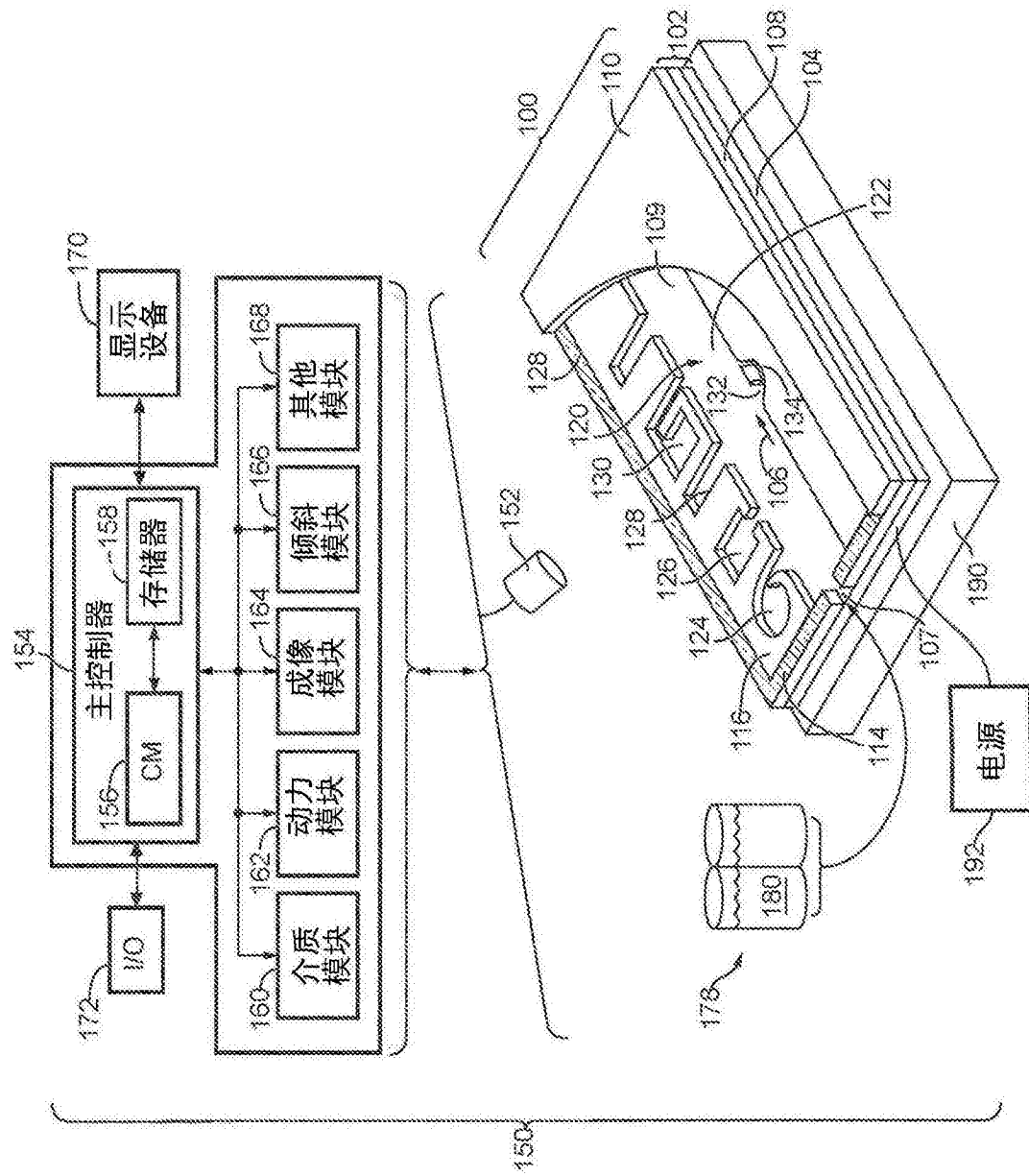


图1A

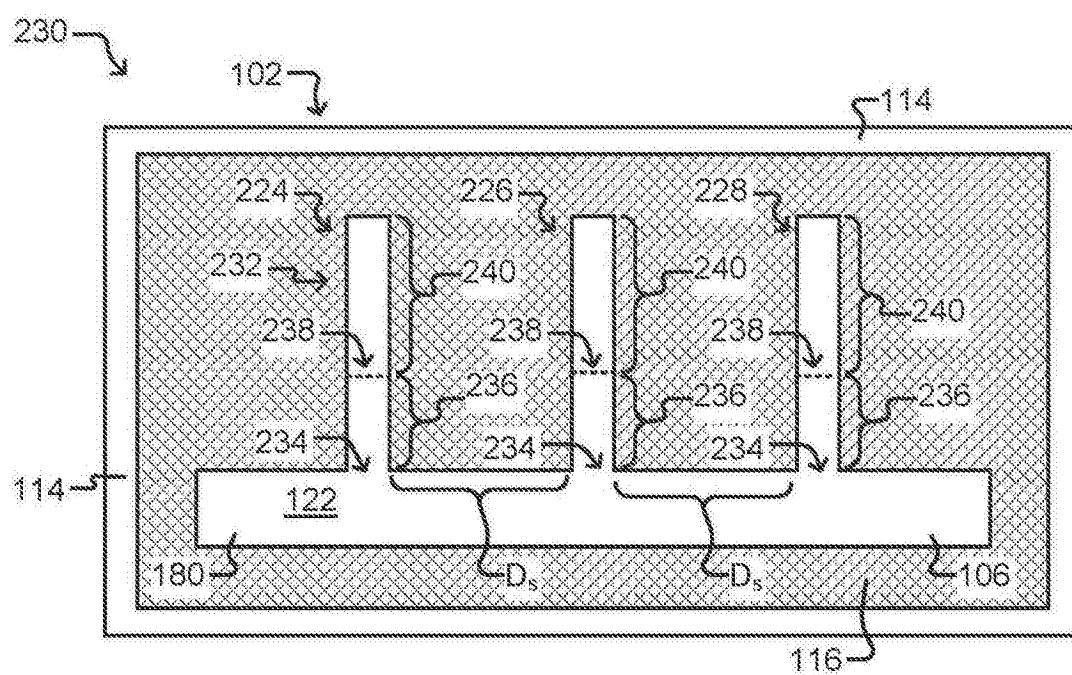


图 2B

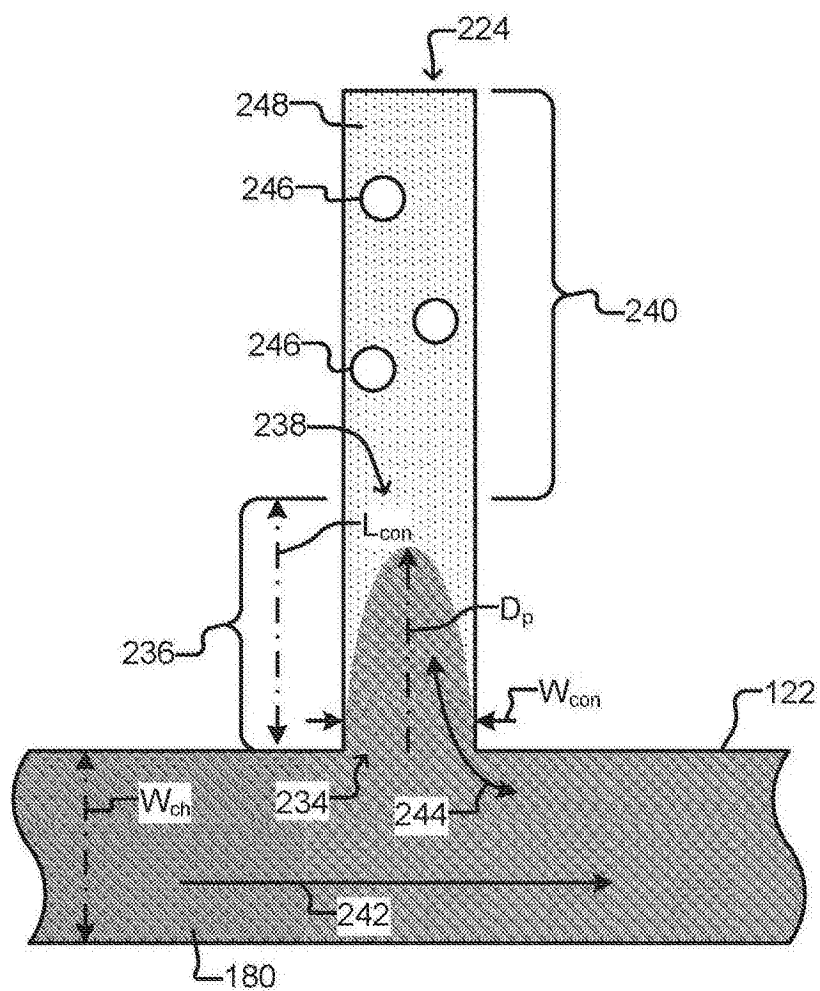


图2C

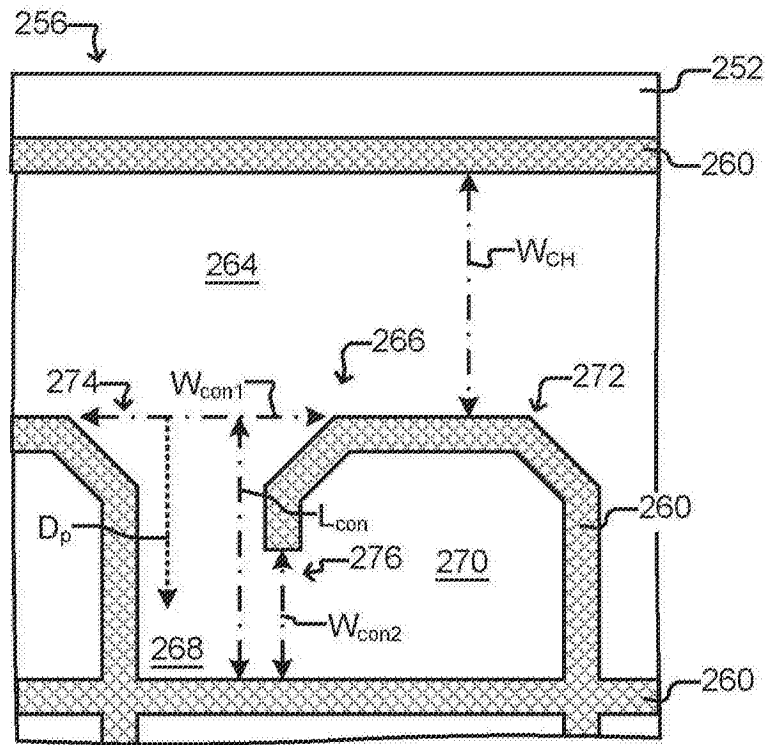


图2E

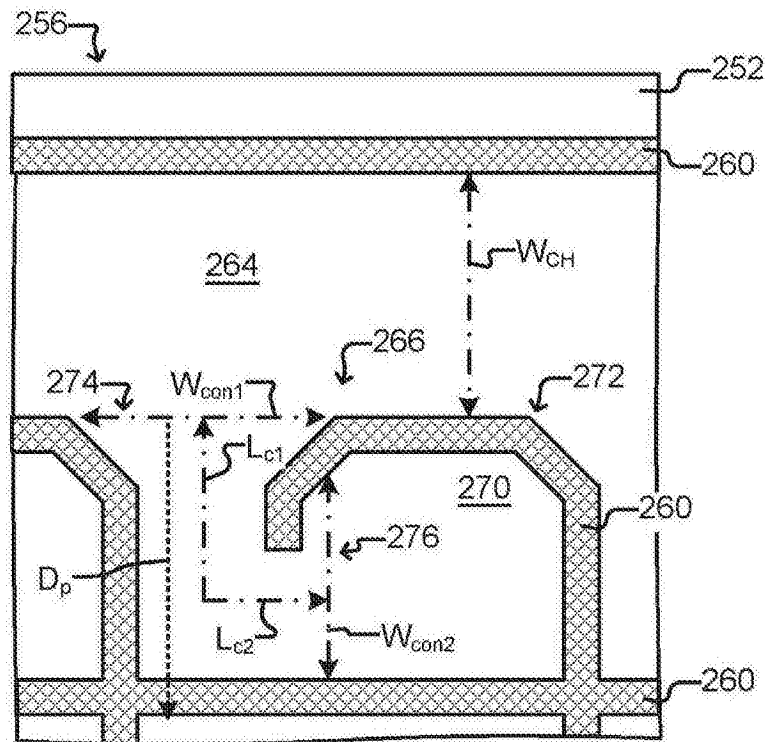


图2F

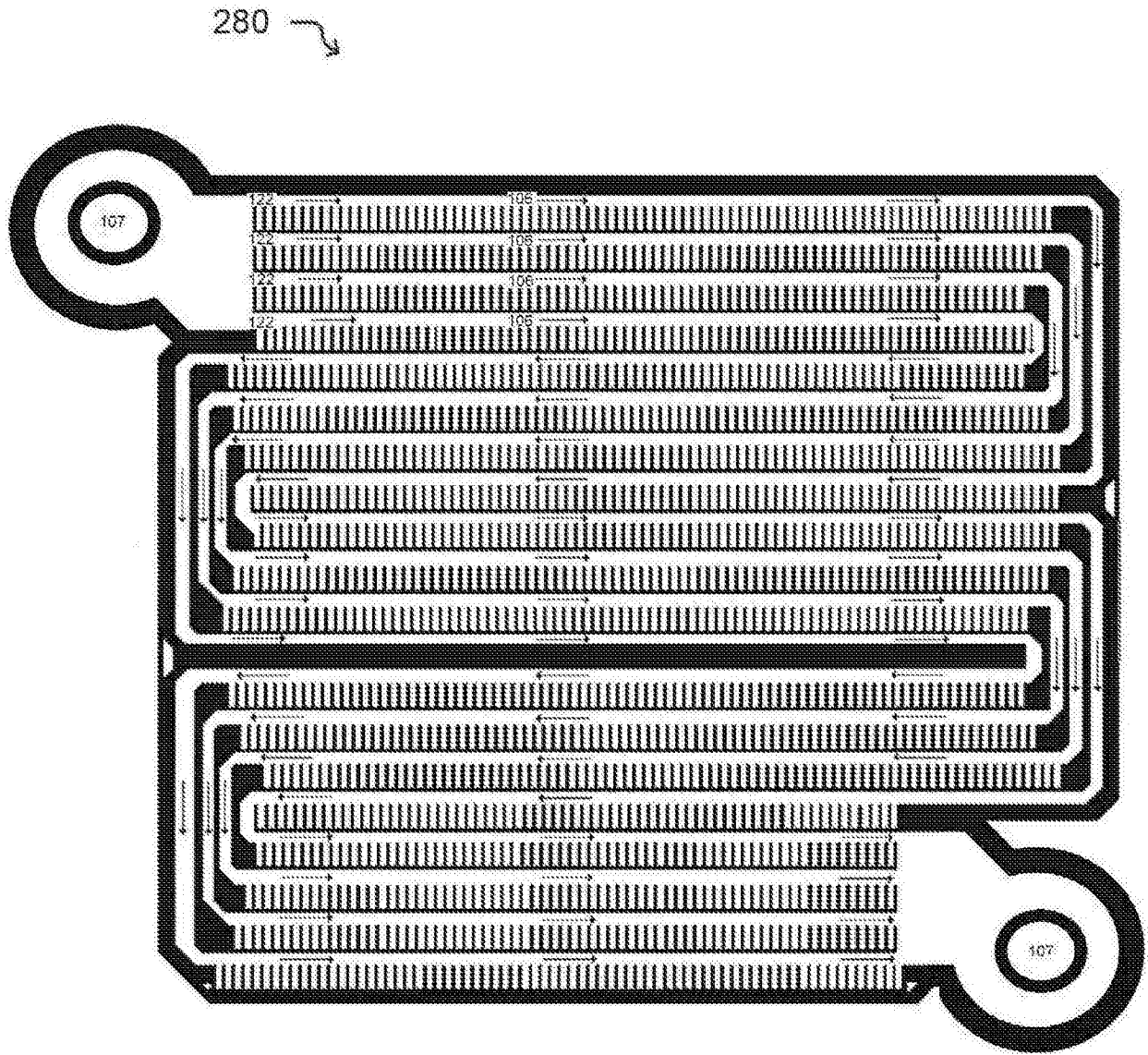


图2G

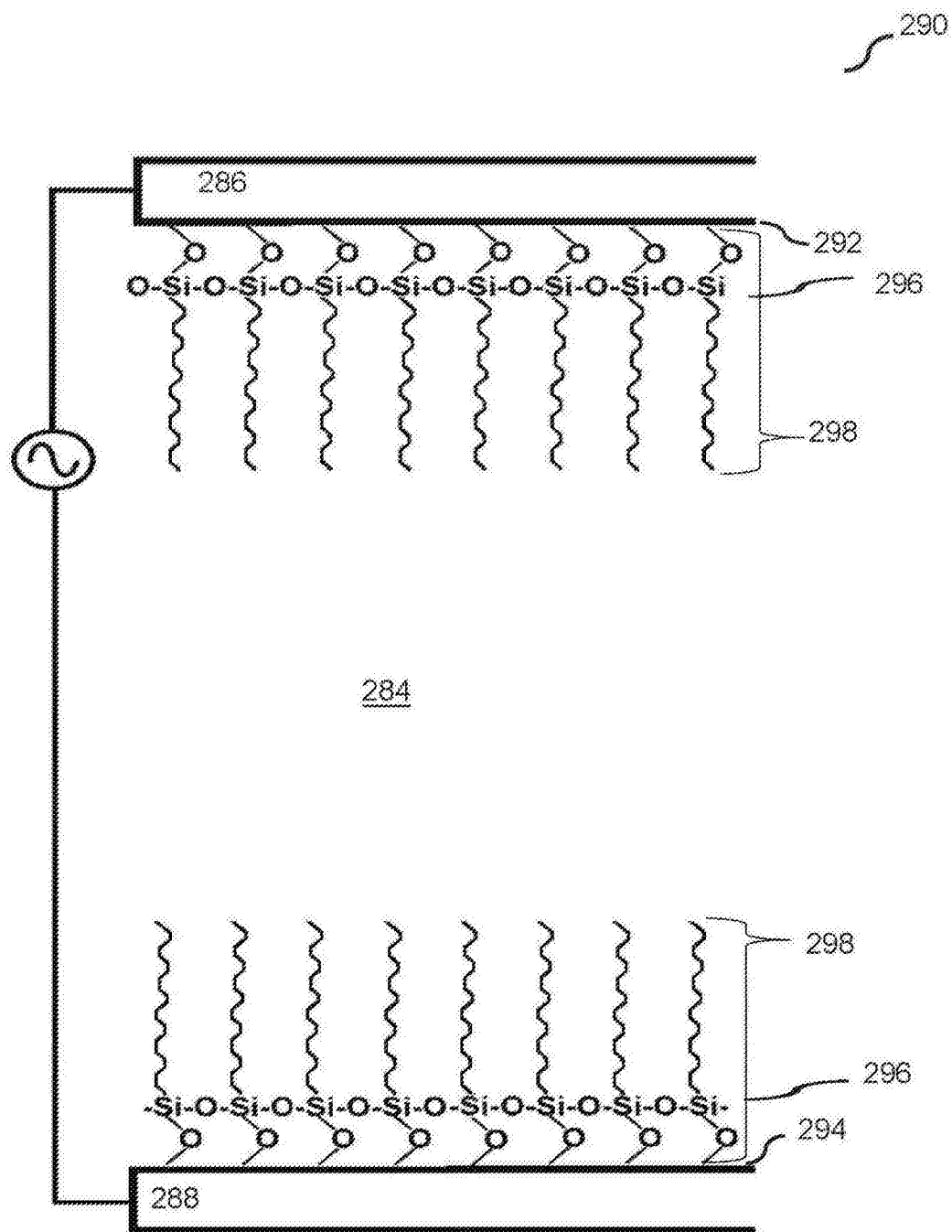


图2H

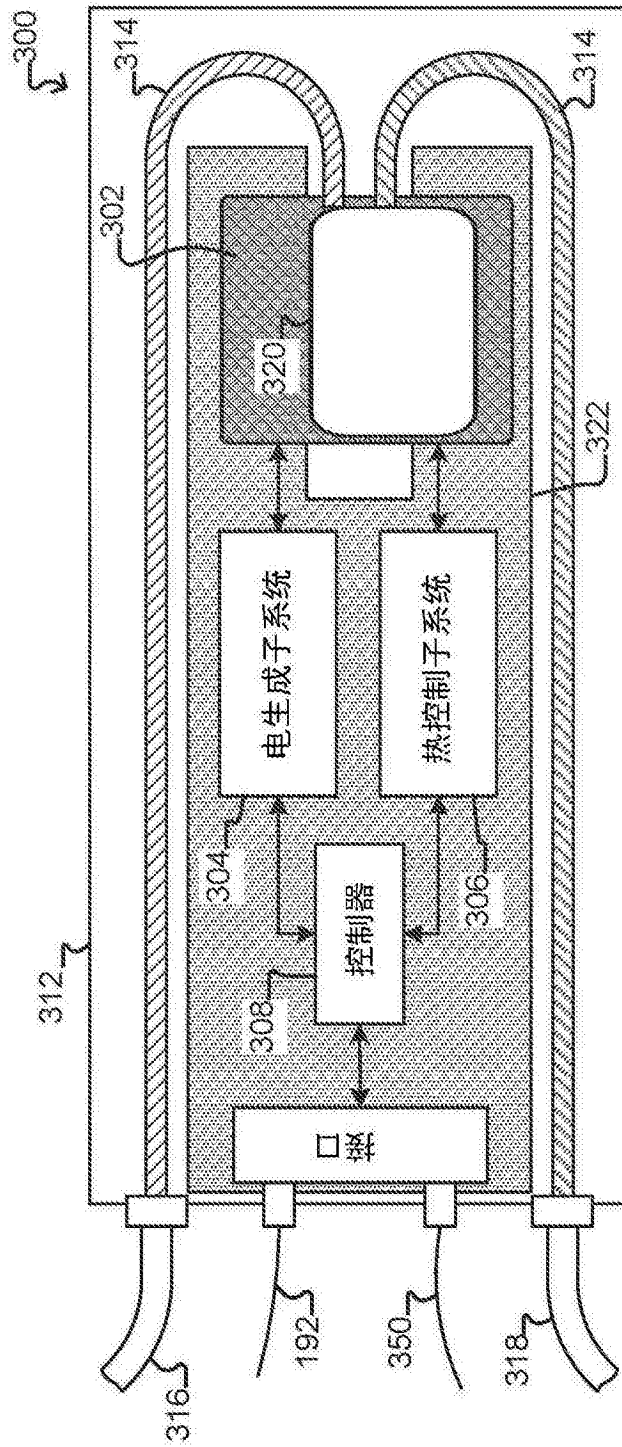


图3A

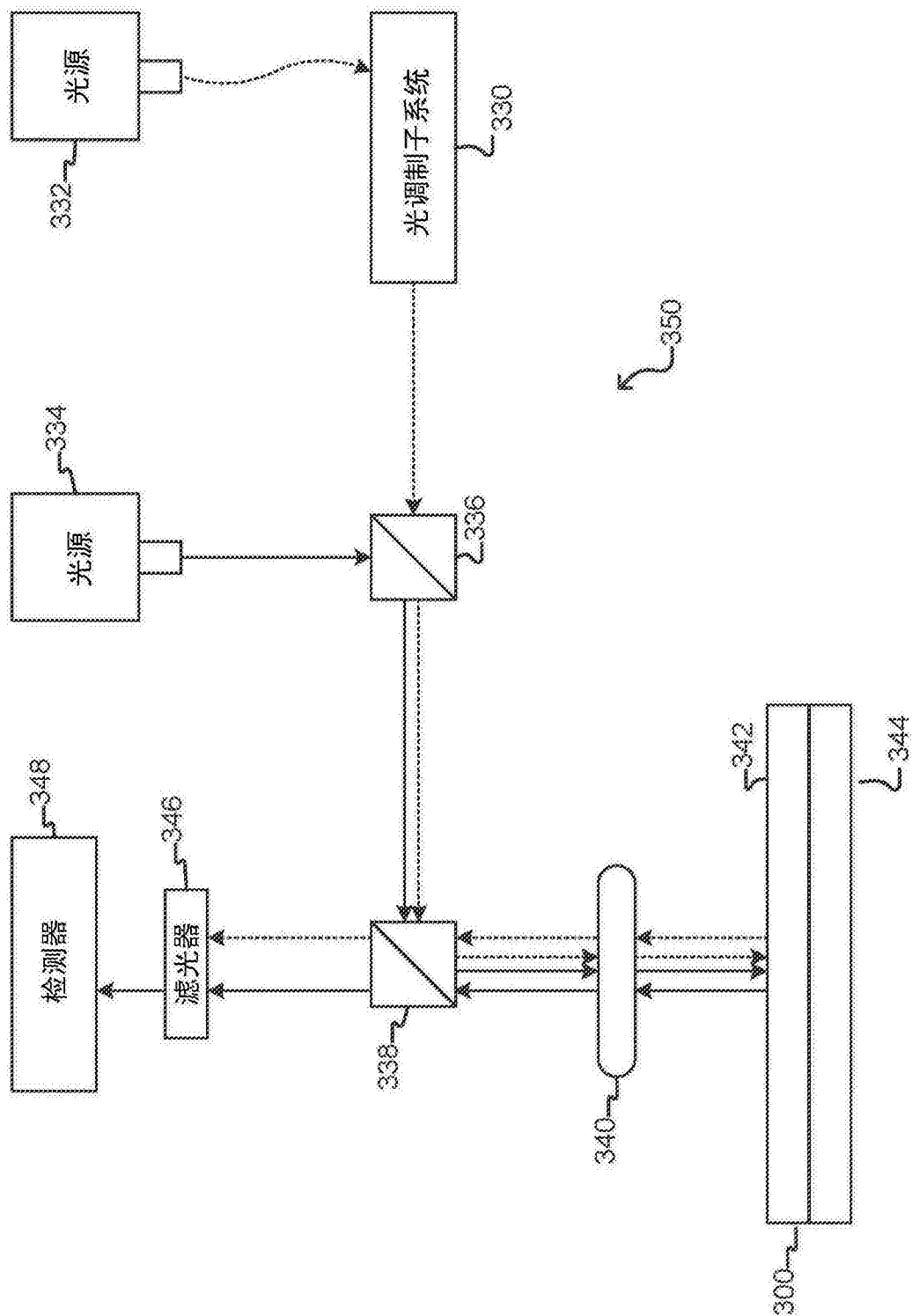


图3B

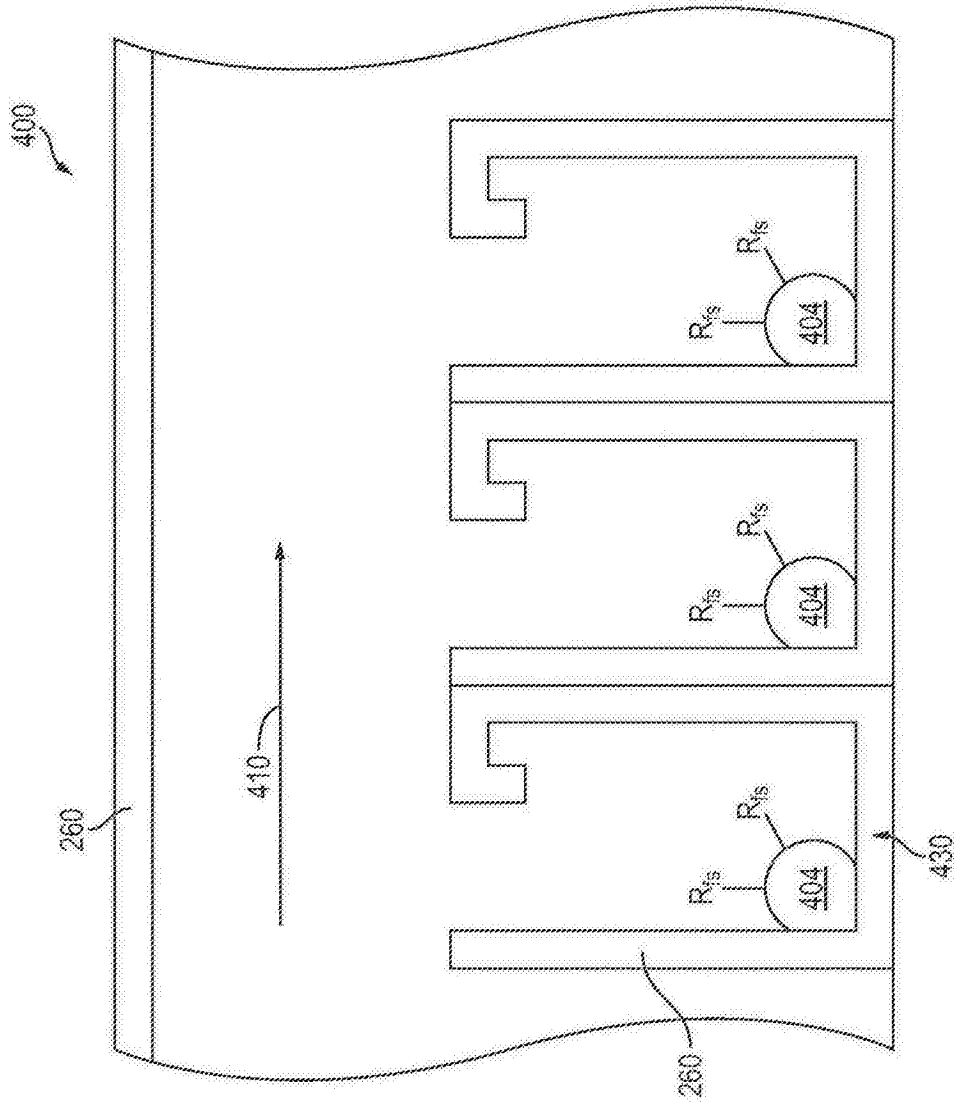


图4A

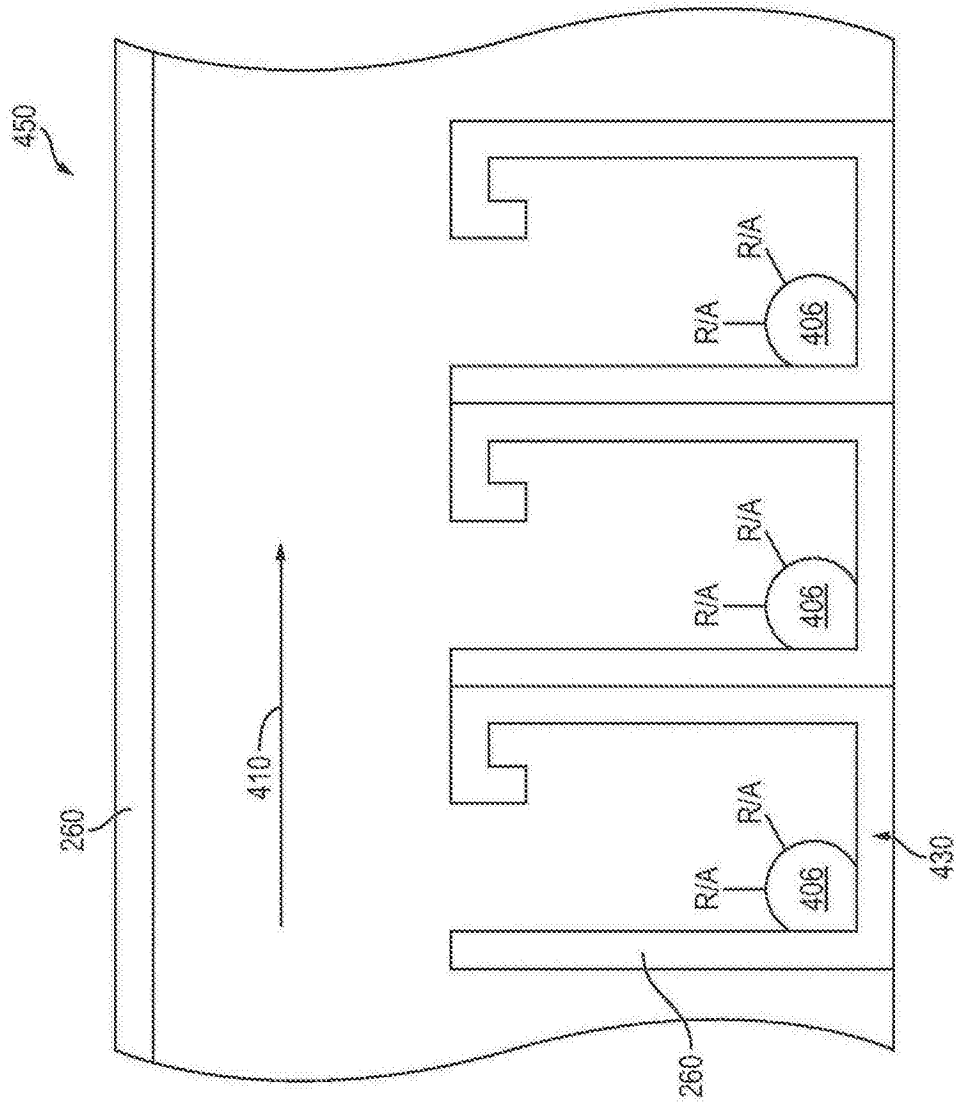


图4B

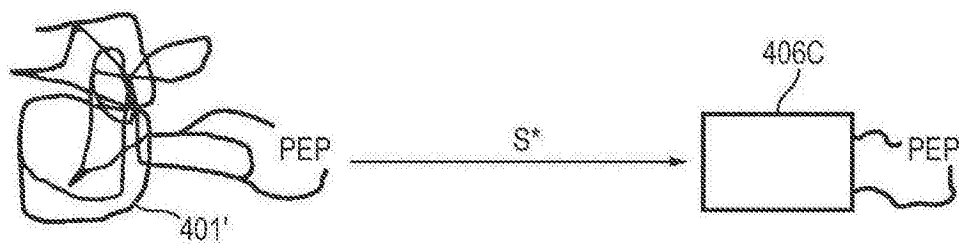


图4D

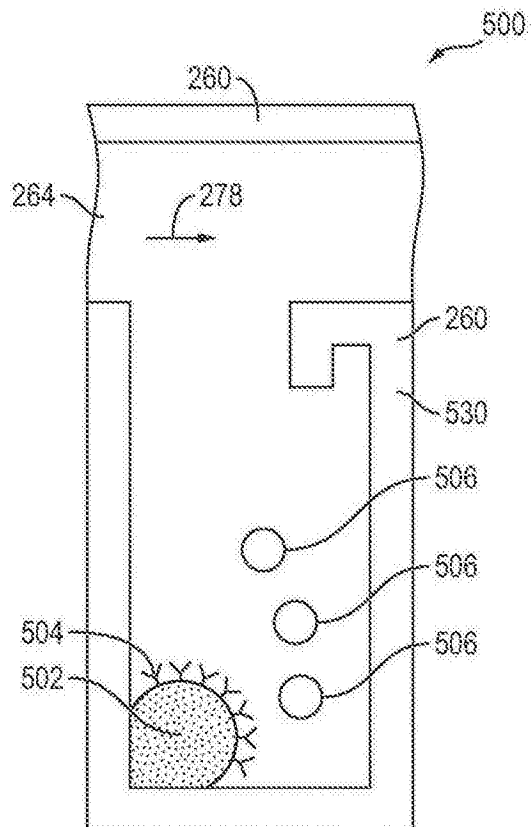


图5A

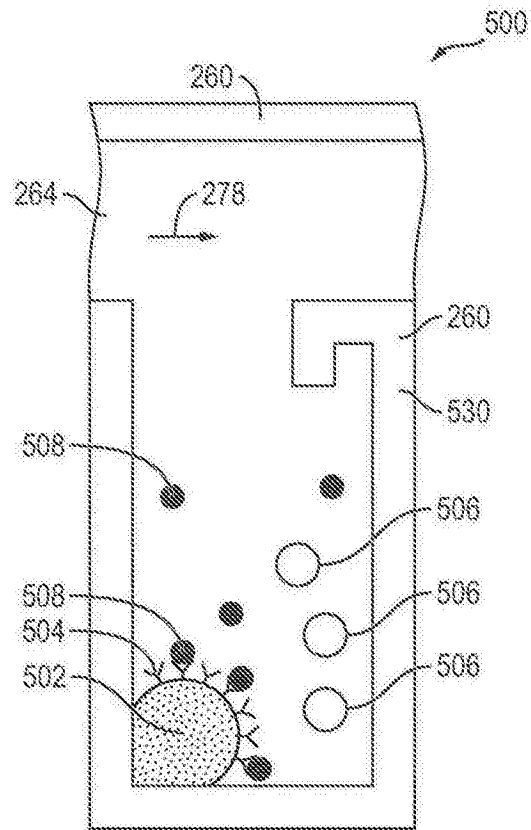


图5B

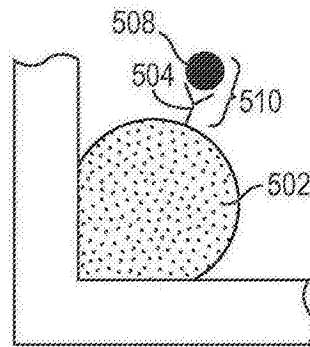


图5C

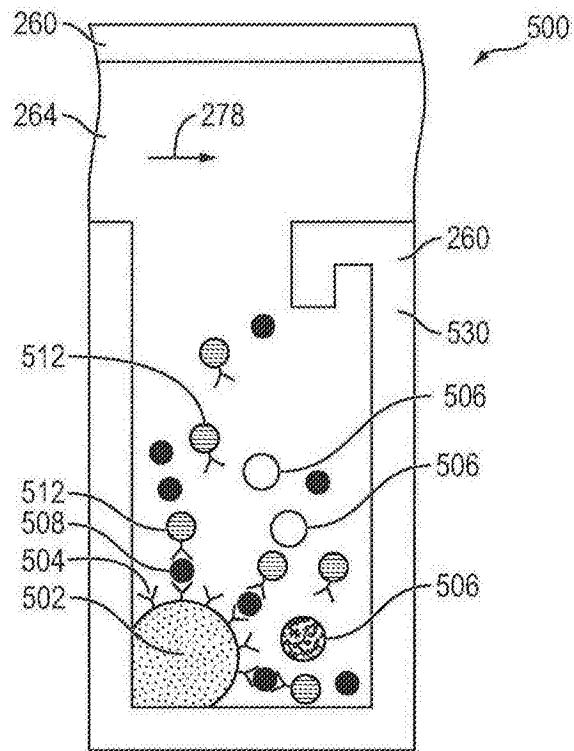


图5D

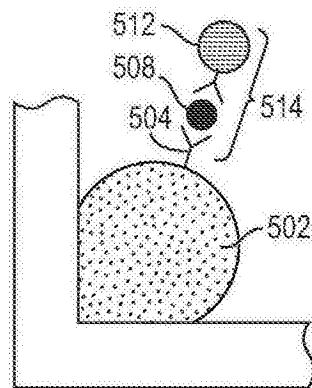


图5E

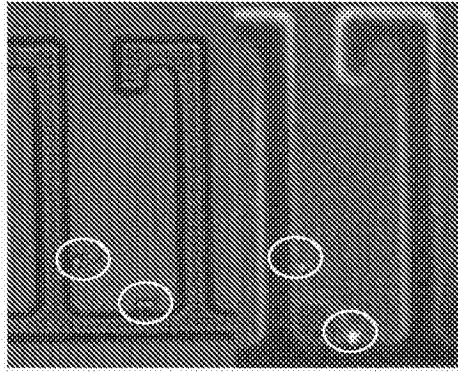


图6A

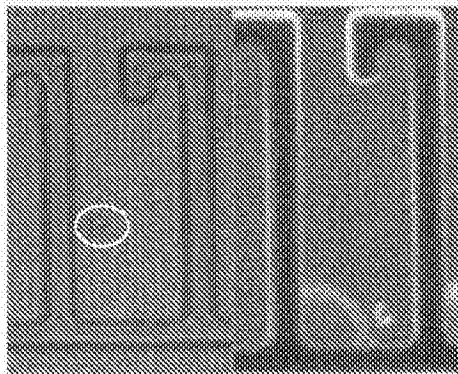


图6B

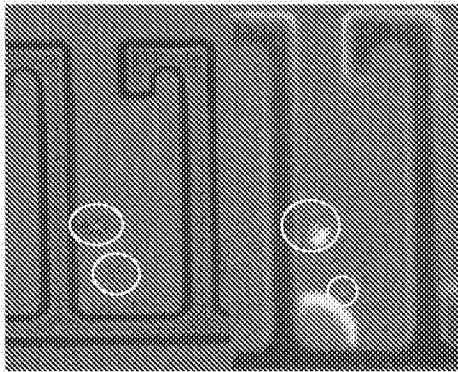


图6C

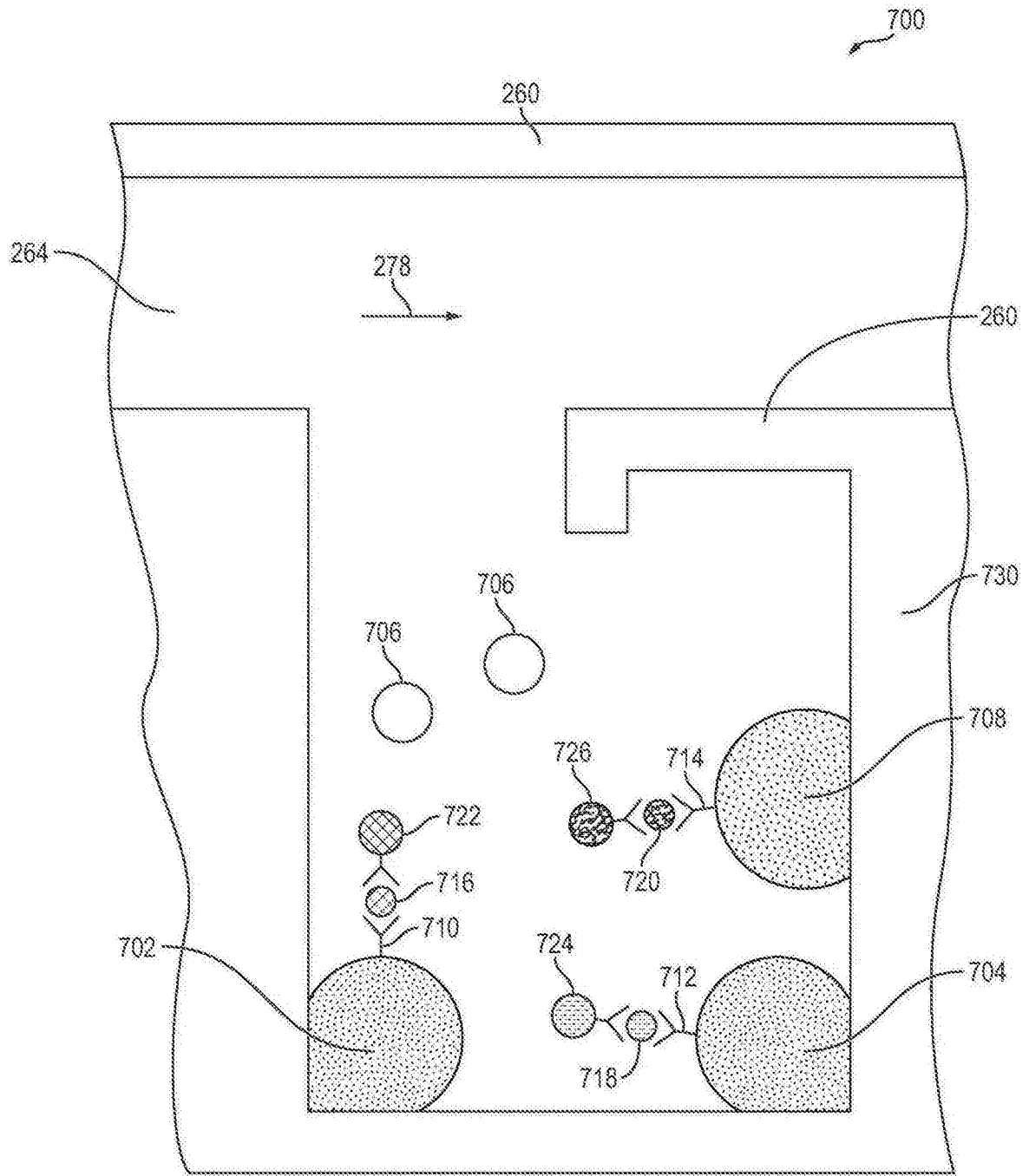


图7