



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106573242 B

(45)授权公告日 2019.01.08

(21)申请号 201580041363.2

(22)申请日 2015.08.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106573242 A

(43)申请公布日 2017.04.19

(30)优先权数据
14306248.7 2014.08.06 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.01.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/068014 2015.08.05

(87)PCT国际申请的公布数据
W02016/020414 EN 2016.02.11

(73)专利权人 J·舒福莱企业公司
地址 法国塞纳河畔诺让
专利权人 巴黎城市物理化工高等学院

(72)发明人 J·I·加尼卡罗德里格斯
L·布瓦塔尔 A·S·D·德勒韦勒
N·P·布雷蒙 J·比贝特

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
代理人 程伟 周玉梅

(51)Int.Cl.
B01L 3/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 102483424 A,2012.05.30,
WO 2008079274 A1,2008.07.03,
CN 102787071 A,2012.11.21,
CN 103071550 A,2013.05.01,
JP 4777238 B2,2011.09.21,
CN 1737555 A,2006.02.22,
EP 1547677 A1,2005.06.29,

审查员 高秋菊

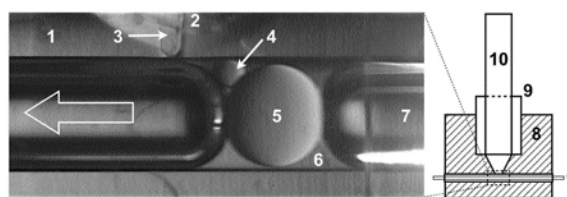
权利要求书2页 说明书11页 附图11页

(54)发明名称

在微米流体设备或毫米流体设备中使反应剂液滴和试剂液滴融合或接触的方法

(57)摘要

本发明公开了在三相微米流体体系或毫米流体体系(三相中的一个为连续相)中使反应剂液滴和试剂液滴融合或接触的方法,其中在液滴串中喷射试剂液滴,然后试剂液滴与反应剂液滴聚集或接触。更具体地,试剂液滴从试剂入口脱离然后与反应剂液滴接触。本发明的方法包括两个连续但是非伴行的步骤:首先在液滴串中产生从试剂储料器破碎的试剂液滴,然后进行第二合并步骤。本发明还公开了毫米/微米流体设备,所述毫米/微米流体设备的等效电路如图11所示。



1. 在微米流体设备或毫米流体设备中使反应剂液滴和试剂液滴融合或接触的方法,包括如下步骤:

(a) 在所述微米流体体系或毫米流体体系的通道中产生三相微米/毫米流体串,所述三相微米/毫米流体串包括连续相、至少两个反应剂液滴和两个反应剂液滴 A_n 和 A_{n+1} 之间的至少一个隔离剂塞,其中 n 为 ≥ 0 的整数;

(b) 借助于被称为喷射器的侧面入口在所述串中以非润湿单液滴 B 的形式注射试剂,其中所述液滴 B 在反应剂液滴 A_{n+1} 上游紧邻的隔离剂塞穿过喷射点的过程中原位产生,其中在反应剂液滴 A_{n+1} 到达喷射点之前液滴 B 与喷射点脱离,同时在喷射器端部形成试剂流体弯液面,并且其中当反应剂液滴 A_{n+1} 位于喷射点时,试剂流体弯液面在侧面入口内收缩;

(c) 然后使液滴 B 与离开喷射点的反应剂液滴 A_{n+1} 融合或接触;

(d) 当 $n > 1$ 时,重复步骤(b)和(c)。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中试剂液滴保持附接至喷射点并且当反应剂液滴 A_{n+1} 前方的毛细管桥到达试剂液滴时破碎。

3. 根据前述权利要求任一项所述的方法,其中比例 r/R 为0.1至1,其中 r 为试剂液滴的半径并且 R 为通道的半径。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤b)中喷射的液滴的体积为1pL以上。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中比例 d/D 为0.05至0.5,其中 d 为侧面入口的直径并且 D 为圆柱形几何形状的通道的直径,或者 D 为平面几何形状的通道的高度或宽度。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中喷射为不连续的。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中通过阀促使试剂液滴的喷射。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述阀为电磁阀。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中在步骤b)之前,反应剂液滴 A_{n+1} 通过脱离装置脱离,所述脱离装置选自光学装置、电装置、磁性装置、放射性装置、声学装置。

10. 根据前述权利要求9所述的方法,其中在使反应剂液滴 A_{n+1} 脱离的步骤之后但是在步骤c)之前,步骤b)进一步包括挑选脱离的液滴 A_{n+1} 并且相应地调节试剂液滴的体积的步骤,所述体积为零或为1pL以上。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中隔离剂为不与连续相和反应剂相和试剂相混溶的气体或液体。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中隔离剂为不混溶液体。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述不混溶液体为矿物油。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中设备为毫米流体设备。

15. 根据权利要求1所述的方法在组合化学、化学筛选、生物筛选、基因测序中的用途。

16. 一种毫米/微米流体设备,包括:

-毫米/微米流体通道管,所述毫米/微米流体通道管被三相微米/毫米流体串填充,所述三相微米/毫米流体串包括连续相、至少两个反应剂液滴和两个反应剂液滴 A_n 和 A_{n+1} 之间的至少一个隔离塞,其中 n 为 ≥ 0 的整数;

-在所述通道上打开的孔穴,所述孔穴连接至包括液相试剂的储料器;

-阀,所述阀联接所述储料器和所述孔穴;

-检测器,所述检测器设置在所述孔穴的上游。

17. 根据权利要求16所述的毫米/微米流体设备,所述毫米/微米流体设备的等效电路如下:

- 两个串联电阻R1和R2,所述两个电阻之间的接头连接至与电阻R3串联的元件IC;
- 元件IC由并联设置的电容C1和电阻R4组成。

在微米流体设备或毫米流体设备中使反应剂液滴和试剂液滴融合或接触的方法

[0001] 基于液滴的流动反应剂被证明特别可用于功能性材料的受控合成,所述功能性材料的性质受到反应条件的剧烈影响。例如,对于大范围的光电材料(包括金属纳米晶体、量子点和共轭聚合物),已经证实了产品控制(关于分批流动合成和连续流动合成)的明显改进。然而到目前为止,液滴合成很大程度上受限于简单的单级程序,其中一开始在液滴中装载所有试剂,这大大限制了可以使用的化学物质的范围。为了合适地开发液滴流动的益处并且拓宽可及化学物品/材料的范围,明显需要开发多级液滴反应剂,其中可以随着反应的进行将试剂依次加入流动液滴。

[0002] 在液滴流动过程中,连续相为优选润湿通道壁的液体,并且试剂相分成一串离散的几乎相同的小体积液滴,所述小体积液滴以共同速度穿过通道。当希望液滴具有不同活性成分时或者当液滴包含进化的(例如生长的)成分(例如微生物,通常为真菌孢子)时,液滴的组成可能彼此不同。由于其较小(通常为亚微升)的体积,液滴的化学组成和温度非常均匀,因此提供用于进行化学反应的高度受控的环境。此外,由于通过连续相使液滴保持远离通道壁,实际上消除了由于试剂或产物沉淀在通道壁上而造成的反应剂污染的可能性,保证了稳定不变的反应环境。

[0003] 液滴融合是用于数字微米/毫米流体的非常重要的操作,因为其允许试剂组合从而引发生物反应和/或化学反应。在流体通道中,液滴聚集需要除去连续相以使之分离。当两个液滴紧密接触时,在液滴之间形成薄的液体桥。围绕所述桥形成的高曲率弯液面造成聚集两个液滴的表面张力的失衡。对于临界最小时间量来说,液滴之间的紧密接触是聚集所必须的。为了实现液滴融合,需要空间同步性和时间同步性。现有的液滴融合技术呈现出不利的复杂通道设计和/或液滴间污染。本发明允许以简单的通道设计实现试剂液滴的自同步喷射及其在三相流体体系中与反应剂液滴的融合(有利地被动融合),而不会产生液滴间污染,并且不会产生试剂储料器的污染。

现有技术

[0004] 被动液滴融合

[0005] 几何介导的被动液滴融合基于以膨胀体积排出连续相(图1)。该方法的特征在于有利的低液滴间污染,但是需要设计复杂度升高的通道并且呈现出比主动融合方法更低的生产量。

[0006] 表面润湿性引发的被动液滴熔融(图2)基于使用亲水性贴剂从而引发成对含水液滴之间的融合。尽管不需要液滴同步性,该方法的主要缺点是在穿过润湿贴剂的过程中的高液滴间污染。

[0007] 在另一种被动方法中,加入试剂使其穿过液滴(图3)。尽管通过使用亲水性狭窄通道使得液滴间污染减少(但是并未停止),该方法对加入并且穿过液滴的试剂的特定量的控制程度较低,因为基材上的成功的试剂喷射需要小心地平衡连续相和分散相的体积流速。

[0008] 主动液滴融合

[0009] 主动液滴融合方法比许多被动液滴融合方案更为复杂,因为许多主动液滴融合方法需要制造电极并且需要电信号的精确正时才能融合液滴。这些方法使用电力从而产生液滴聚集所需的表面张力不稳定性。一种最先进的设计是图4中显示的皮米喷射器。当液滴穿过皮米喷射器时,电极活化,产生水/油界面薄膜不稳定性,允许试剂进入液滴。实现了高生产量(数千赫)和亚皮升的喷射精确度。该方法的主要不便之处在于,在与穿过液滴原位融合的过程中,喷射溶液储料器可能污染。从电力使用来看,需要考虑电信号在生物分子(例如DNA或蛋白质)上的生物相容性。

[0010] 三相微米流体体系

[0011] W02008/79274公开了三相微米流体体系,所述三相微米流体体系包括连续相、反应剂液滴和隔离剂。隔离剂由不混溶液体或疏水颗粒形成从而避免反应剂液滴聚集。该申请还公开了使用T形接头微米流体设备通过喷射加入试剂液滴,但是没有特别描述如何进行喷射。特别地,该申请没有教导或暗示在聚集之前破碎试剂液滴。该文献中使用的方法不能避免污染,特别是储料器的污染以及流动液滴之间的污染,特别是当串不规则时。视情况而定,该文献中使用的方法不能自同步并且不允许控制或调节试剂液滴的体积。此外,该文献中使用的方法不允许选择“目标”反应剂液滴。

附图说明

[0012] 图1:几何介导的被动液滴融合(现有技术)

[0013] 图2:表面润湿性引发的被动液滴融合(现有技术)

[0014] 图3:加入穿过液滴的试剂(现有技术)

[0015] 图4:使用电极的主动液滴融合体系中的皮米喷射器(现有技术)

[0016] 图5:本发明的三相微米/毫米流体体系

[0017] 图6:本发明的优选的自同步融合方案的主要阶段的照片:a:试剂液滴的产生;b:试剂液滴与喷嘴脱离;c:液滴接触和连续相排出;d:液滴融合

[0018] 图7:本发明的隔离剂塞的示意图,其中喷射区域为IZ,D为通道的直径,L为隔离剂塞的长度。

[0019] 图8:自同步融合模块的主要元件。1.Teflon管。2.试剂储料器。3.贯通孔。4.喷射的试剂液滴。5.反应剂液滴。6.氟化油连续相。7.压缩空气隔离剂。8.丙烯酸类歧管座。9.安装螺母。10.电磁阀。

[0020] 图9a:加入的真菌毫米流体串的荧光信号

[0021] 图9b:加入的真菌毫米流体串的荧光信号(图像放大)

[0022] 图10:黑曲霉(*A.niger*)突变体库的酶活性

[0023] 图11:设备的等效电路

[0024] 图12:脱离模型预测与最小液滴半径测量值的图表

[0025] 图13:可变体积喷射---荧光信号

[0026] 图14:可变体积喷射---喷射的液滴尺寸的增加

[0027] 图15:可变体积喷射---计算的 V_T/V_R 比

[0028] 图16a和图16b:通过引入电容器实现的弯液面收缩的增加。没有空气泡(16a)。具有空气泡(16b)。a:水,b:氟化油,c:弯液面,d:空气泡。

[0029] 本发明首次公开了在三相微米流体体系或毫米流体体系中使反应剂液滴和试剂液滴融合或接触的方法,其中借助于被称为喷射器的侧面入口以串的方式喷射的试剂液滴与试剂储料器脱离然后与反应剂液滴聚集。更具体地,试剂液滴脱离然后与反应剂液滴接触。本发明的方法包括两个连续但是非伴行的步骤:首先在串中产生脱离的试剂液滴,然后进行第二合并步骤。通过本发明的方法,原位形成试剂液滴,试剂液滴的形成可以是同步的并且(如果需要的话)是选择性的。试剂液滴原位形成,来自试剂储料器的所得液滴悬挂在喷射点(侧面入口)并且在反应剂液滴到达喷射点之前破碎。

[0030] 通过本发明的方法,即使在液滴中存在微生物的情况下,甚至在存在真菌的情况下,液滴融合而无污染,即储料器无污染并且液滴之间无交叉污染。

[0031] 本发明的方法可以用于主动融合或被动融合,表示任选使用电极从而融合液滴,更有利地不使用电极(被动融合)。此外,微米流体设备或毫米流体设备的通道可以是规则的。特别地,所述通道在加入试剂液滴的位置处不包括分叉几何形状,并且例如通道可以是不具有分叉几何形状的圆形通道。

[0032] 本发明的方法可以用于规则串或不规则串。特别地,通过本发明的方法,能够操作包含非等距反应剂的串。

[0033] 微米/毫米流体表示微米流体或毫米流体。微米流体表示在微米级通道/管中处理小体积流体的体系。毫米流体表示在毫米级通道/管中处理小体积流体的体系。

[0034] 本发明涉及在微米流体设备或毫米流体设备中使反应剂液滴和试剂液滴融合或接触的方法,包括如下步骤:

[0035] (a) 在所述微米流体体系或毫米流体体系的通道中产生三相微米/毫米流体串,所述三相微米/毫米流体串包括连续相、至少两个反应剂液滴和两个反应剂液滴 A_n 和 A_{n+1} 之间的至少一个隔离剂塞,其中 n 为 ≥ 0 的整数

[0036] (b) 借助于被称为喷射器的侧面入口在所述串中以非润湿单液滴B的形式注射试剂,其中所述液滴B在反应剂液滴 A_{n+1} 上游紧邻的隔离剂塞穿过喷射点的过程中原位产生,其中在反应剂液滴 A_{n+1} 到达喷射点之前液滴B与喷射点脱离同时在喷射器端部形成试剂流体弯液面,并且其中当反应剂液滴 A_{n+1} 位于喷射点时,试剂流体弯液面在侧面入口内收缩;

[0037] (c) 然后使液滴B与离开喷射点的反应剂液滴 A_{n+1} 融合或接触

[0038] (d) 当 $n > 1$ 时,重复步骤(b)和(c)。

[0039] 所述微米流体体系或毫米流体体系的通道具有圆柱形几何形状或平面几何形状。在如下描述中涉及圆柱形几何形状,因此参考直径限定通道的尺寸。对于平面几何形状,应当用通道(液滴串在通道中循环)高度和宽度进行限定。

[0040] 在本说明书中,“喷射点”表示对应于喷射器位置的液滴B的产生点。在下文中,液滴B也被称为试剂液滴。

[0041] 在本说明书中,术语“试剂液滴”、“试剂流体”用于分别限定包含试剂的液滴和流体。相似地,术语“反应剂液滴”、“反应剂流体”用于分别限定包含反应剂的液滴和流体。

[0042] 术语“塞”用于限定体积 V 大于 $\pi D^3/6$ 或大于 $\pi HW^2/4$ 的液滴,其中 D 为圆柱形几何形状的管(液滴串在所述管中循环)的直径,其中 H 和 W 分别代表平面几何形状的通道(液滴串在所述通道中循环)的高度和宽度。

[0043] 在本发明的方法中,微米/毫米流体体系包括至少三个相:连续相(2)、隔离剂相

(1) 和反应剂液滴相 (3) (图5)。位于隔离剂塞和试剂液滴之间的连续相的区域形成毛细管桥(图5中的阴影线区域)。在本发明的方法中,连续相润湿通道、隔离剂和试剂液滴和反应剂液滴,使得隔离剂塞和试剂液滴和/或反应剂液滴被连续相的薄膜围绕并且不接触通道。毛细管桥因此连续地联接至另一个毛细管桥。可以通过另外两种组分的界限推断靠近通道壁存在连续相,所述界限均在隔离剂塞/反应剂液滴的界面处远离通道壁切线地弯曲。

[0044] 存在至少三个相意味着可以分别测量连续相/隔离剂、连续相/反应剂流体、隔离剂/反应剂流体之间的界面力 γ 。相似地,可以分别测量连续相/试剂流体、隔离剂/试剂流体之间的界面力。

[0045] 隔离剂液滴和反应剂液滴优选被连续相完全润湿。Torza和Mason(1970, Three-Phase Interactions In Shear and Electrical Fields, S.TORZA AND S.G.MASON, Journal of Colloid and Interface Science, 第33卷, 第1期, 1970年5月)在图1中给出了扩展参数 $S_i = \gamma_{jk} - (\gamma_{ij} + \gamma_{ik})$ 的条件, 其中 $(i, j, k) = (1, 2, 3)$ 。

[0046] 从化学观点来看,

[0047] • 连续相基本上与反应剂液滴的流体和试剂液滴的流体不混溶

[0048] • 隔离剂流体基本上与连续相、反应剂液滴流体和试剂液滴流体不混溶

[0049] 所述方法的一个重要的特征在于,在步骤b)中试剂流体未润湿。这表示试剂流体不润湿通道壁和喷射壁。

[0050] 本发明的方法的步骤b)和c)优选包括如下后续主要阶段:

[0051] i) 产生具有受控体积的悬挂的(即仍然连接至试剂储料器的)试剂液滴(步骤b)

[0052] ii) 使试剂液滴与喷射点脱离(步骤b)

[0053] iii) 使试剂液滴与反应剂液滴接触并且排出连续相(步骤c)

[0054] iv) 进行主动或被动的液滴融合(步骤c)

[0055] 悬挂的试剂液滴的体积由喷射压力决定,所述喷射压力大于使串移动而施加的压力。

[0056] 图6中显示了优选的自同步融合方案的主要阶段的照片。

[0057] 在该段落中将参考图6描述所述方法。在该具体实施方案中,通过侧面入口加入试剂。图6的a中显示了本发明的自同步特征,其中试剂液滴保持附接至试剂储料器,并且因此在侧面入口处形成悬挂的液滴,直至隔离剂塞的末端到达悬挂的试剂液滴。因此,出现脱离并且最新形成的试剂液滴进入连续相毛细管桥,所述连续相毛细管桥由分离隔离剂塞的后端和反应剂液滴的前端的体积限定(因此产生移动的被动融合腔),如图6的b所示。图6的c中显示了该方法的无污染特征,其中试剂液滴在脱离之后保持其完整性。然后远离试剂液滴产生点出现液滴融合(图6的d),保持试剂溶液储料器不受污染。图6的c中显示了无污染特征的额外证据:当反应剂液滴在侧面出口的下方穿过时,试剂流体弯液面从侧面入口端部收缩,保证反应剂液滴和试剂储料器之间无接触。

[0058] 位于隔离剂塞和试剂液滴之间的连续相的区域形成毛细管桥。在优选的实施方案中,试剂液滴保持附接至喷射点并且当反应剂液滴 A_{n+1} 前方的毛细管桥到达试剂液滴时破碎。

[0059] 本发明的方法包括新的液滴形成机制:界面张力引发悬挂的液滴破碎。

[0060] 当作用在悬挂液滴上的毛细管力大于保持悬挂液滴的毛细管力时,试剂液滴脱

离。该机制限制了可以产生的最小试剂液滴的尺寸。

[0061] 注射流体的最小体积是获得将要破碎的悬挂液滴的必要体积。有利地，试剂液滴的最小半径 r_{\min} 通过下式定义： $r_{\min} \sim d \times \gamma_{12} / \gamma_{23}$

[0062] • 其中 d 为侧面入口直径(或者当入口为非圆形时,为宽度或高度)

[0063] • γ_{12} 为相1(试剂)和相2(连续相)之间的表面张力

[0064] • γ_{23} 为相2(连续相)和相3(隔离剂)之间的表面张力

[0065] 在优选的实施方案中,液滴B的体积有利地为5pL以上,更有利地为10pL以上。在优选的实施方案中,液滴B的体积为2nL以上。

[0066] 本领域技术人员将视情况确定最大直径。特别地,试剂液滴的最大尺寸为主要通道的尺寸从而避免喷射液滴将隔离剂切成两半的任何风险。

[0067] 当隔离剂流体为气体(特别是空气)时,通过界面张力引发的液滴形成而形成的最大直径主要取决于连续相的流速并且大致对应于管(串在所述管中移动)的尺寸。可以喷射的流体的最大体积为液滴变成塞的体积(即液滴的直径大于或等于通道直径)。事实上,当流体不再形成液滴而是形成塞时,存在喷射流体使隔离剂塞裂开的风险。

[0068] 另一方面,对于例如矿物油的粘性隔离剂来说,悬挂液滴可以经由粘性力脱离,所述粘性力是流体速度(即连续相流速)的递增函数。临界液滴尺寸(当大于所述临界液滴尺寸时出现剪切引发的破碎)与隔离剂的速度和连续相和隔离剂相的粘度成反比。然后液滴从隔离剂位置喷出并且可以最终以无污染的方式与反应剂液滴接触或融合。本领域技术人员可以例如通过改变引发主动融合的位置以及检测模块的位置容易地确定液滴形成和液滴逐出之间的延迟时间。

[0069] 步骤b)中喷射的液滴的体积主要取决于通道尺寸。在具体实施方案中,体积为190nL以下。

[0070] 在优选的实施方案中,比例 r/R 为0.1至1,有利地0.1至0.9,更有利地0.2至0.7,甚至更有利地0.25至0.60,其中 r 为试剂液滴的半径并且 R 为通道的半径(或者当通道为非圆形时,为半宽度或半高度)。

[0071] 侧面入口直径 d (或者当侧面入口为非圆形时,为宽度或高度)小于通道的直径 D (或者当通道为非圆形时,为宽度或高度)。具体地, $d < D$ 。在优选的实施方案中, $d/D < 0.5$,具体地 d/D 为0.05至0.5。

[0072] 因此 d 取决于通道尺寸 D 。在具体实施方案中,对于毫米流体条件 d 为200 μm 以下,有利地在50 μm 和200 μm 之间,或者对于微米流体条件 d 在10 μm 和50 μm 之间。

[0073] 试剂液滴尺寸和试剂液滴体积可以变化。事实上, $r_{\min}/d \approx 1$ (参见图12),因此 $r_{\min}/D \approx d/D$,并且 $r_{\max}/D \approx 0.5$ 。

[0074] 在本发明的方法中,对于这种新的破碎再聚集机制来说,需要存在隔离剂塞。

[0075] 隔离剂塞在喷射点处显示出平坦界面。隔离剂的长度 L 优选根据下式:

[0076] $L = D + \epsilon d$

[0077] 其中

[0078] • D 和 d 如上定义(或者当通道或侧面入口为非圆形时,可以由宽度 W 、 w 或高度 H 、 h 替代)

[0079] • ϵ 为大于2,特别是2至100的数值。该数值取决于比例 d/D 并且可以由本领域技术

人员调节。

[0080] 更优选地,隔离剂的长度 L 为至少两倍的 D ,更优选至少三倍的 D 。

[0081] 优选当喷射点位于隔离剂塞的平坦表面的前方时进行喷射。图7中示意性地显示了喷射区域:喷射区域 IZ 对应于隔离剂塞的平坦部段,其中 $a \geq D/2$ 并且 $b \geq D/2$ 。

[0082] 有利地,隔离剂的端部为球形。

[0083] 在喷射之后,如果连续薄膜的剪切不足以造成液滴颈部破裂,即当隔离剂的速度足够低或隔离剂速度如同气体隔离剂那么低时,产生的试剂液滴(在隔离剂流体穿过的过程中)保持附接至喷射器的端部(图6的a中的侧面入口)。捕捉视频的目视检查表明,当在三个相之间形成的连续的毛细管桥接触悬挂的试剂液滴时,出现液滴脱离(图6的b)。隔离剂相和连续相之间的界面张力提供用于引发试剂液滴脱离所需的力。在脱离之后,连续的毛细管桥充当移动的液滴融合腔(图6的c),所述液滴融合腔允许反应剂液滴和试剂液滴之间的接触以及对于液滴融合来说必要的两个液滴之间的连续相的排出(图6的d)。在融合之后,由于由反应剂液滴的移动引发的内部流动,试剂相和反应剂相随后混合(图6的d)。

[0084] 在步骤b)的过程中,当反应剂液滴从喷射点脱离时,试剂流体弯液面从喷射器端部收缩,保证反应剂液滴和试剂储料器之间无接触。在反应剂液滴 A_{n+1} 到达喷射点之前试剂流体弯液面从喷射器端部收缩,并且当反应剂液滴 A_{n+1} 处于喷射点时仍然收缩。

[0085] 为了增加弯液面的收缩,优选使用包括另一种可压缩流体和/或包括可压缩材料的喷射设备。例如,设置在试剂储料器和喷射点之间的喷射设备的腔(下文称为喷射腔)可以包括试剂流体和空气。当试剂液滴破碎时,出现脱离并且弯液面由于压力变化而从喷射器端部收缩。可以通过将喷射设备连接至电容器或电容从而强化该现象:结合电阻/电容,可以产生压力变化并且因此强化弯液面的收缩。

[0086] 在优选的实施方案中,通过在循环液滴串的通道或管中浮现的侧面入口喷射试剂液滴。喷射设备优选为皮米喷射器或纳米喷射器,但是也可以是任何合适装置。优选地,侧面入口为通道中的孔,并且通道在孔的两个侧面上被包含油的第一涂层环绕,所述第一涂层又被聚合物涂布。根据试剂流体的性质,聚合物可以是亲水聚合物(例如聚丙烯酸类)或疏水聚合物。

[0087] 喷射可以连续或不连续,但是优选不连续。不连续喷射允许视情况控制试剂液滴的体积。此外,通过不连续喷射,可以选择“目标”反应剂液滴,因此仅在需要时进行喷射。因此,在步骤b)之前,所述方法有利地包括使反应剂液滴 A_{n+1} 脱离的步骤。反应剂液滴 A_{n+1} 可以通过脱离装置脱离,所述脱离装置选自光学装置(例如激光束、荧光、拉曼光谱、成像)、电装置(例如阻抗)、磁性装置、放射性装置、声学装置。此外,在使反应剂液滴 A_{n+1} 脱离的步骤之后但是在步骤c)之前,所述方法可以包括挑选脱离的液滴 A_{n+1} 并且相应地调节试剂液滴的体积的步骤,所述体积为零(未喷射)或为 1pL 以上。

[0088] 通过不连续喷射,即使当反应剂液滴的串不规则时,也可以实施所述方法。不规则的串表示液滴的尺寸和/或构成串的液滴之间的距离变化。在本发明的方法中,串为完美串或不规则串。

[0089] 在优选的实施方案中,通过阀(特别是电磁阀)促使试剂相的喷射,所述阀通过聚合物歧管与侧面入口对齐并且连接至试剂储料器。所述设备可以进一步包括电容器或电容从而强化弯液面的收缩,和/或包括电阻从而精确控制喷射体积。

[0090] 隔离剂可以是不与试剂相、反应剂相和连续相混溶的气体或液体。在第一实施方案中,隔离剂为选自如下的气体:压缩空气、氩气、氮气、CO₂或前述的组合。

[0091] 在该实施方案中,包含试剂的液滴的流体可以为不溶于试剂液滴的流体,例如矿物油或硅油。在所述情况下,在喷射之后,体系为四相体系。为了进行特定试剂难以溶于反应剂相的试验,该四相串是引人注意的。

[0092] 在第二实施方案中,隔离剂是不与连续相和反应剂相和试剂相混溶的液体,例如矿物油。

[0093] 通常地,微米/毫米流体设备的通道优选由氟化聚合物(特别是Teflon®)制成。连续相优选包含氟化油并且可能包含表面活性剂。本领域技术人员常用这些组分。

[0094] 本领域技术人员将根据预期反应基于技术常识视情况选择反应剂液滴的流体和包含试剂的液滴的流体。反应剂液滴为以共同速度穿过通道的离散的小体积液滴,有时为几乎相同的小体积液滴。

[0095] 例如,可以使用如下试剂-反应剂:

[0096] 孢子产生:马铃薯葡萄糖琼脂板

[0097] 生长介质:蛋白胨-葡萄糖-盐,pH 4.6

[0098] 酶活性:Bodipy FL EnzChek试剂盒(在乙酸盐缓冲液中4.6):该试剂盒包括具有淬灭荧光的淀粉基质。该基质被淀粉酶有效分解,消解除淬灭并且产生高荧光片段。伴随的荧光增加与淀粉酶活性成比例并且可以用荧光进行监控。

[0099] 作为本发明的方法的实际应用的示例,可以提及组合化学、化学和生物筛选、基因测序。作为生物筛选的示例,可以提及微生物产生的代谢物(酶、药物)的筛选。因此本发明还涉及所述方法在组合化学、化学和生物筛选、基因测序中的用途。

[0100] 在毫米/微米通道管内通过使用T形接头通过本领域技术人员已知的方法产生三相串,使用泵控制液体流速并且使用压力控制器控制气体压力。

[0101] 在优选的实施方案中,设备为毫米流体设备。

[0102] 本发明还涉及毫米流体设备或微米流体设备,其包括:

[0103] -毫米/微米流体通道管,所述毫米/微米流体通道管被三相微米/毫米流体串填充,所述三相微米/毫米流体串包括连续相、至少两个反应剂液滴和两个反应剂液滴A_n和A_{n+1}之间的至少一个隔离塞,其中n为≥0的整数

[0104] -在所述通道上打开的孔穴,所述孔穴连接至包括液相试剂的储料器

[0105] -阀,所述阀联接所述储料器和所述孔穴

[0106] -检测器,所述检测器设置在所述孔穴的上游。

[0107] 检测器允许阀的打开与反应剂液滴的进入同步。特别地,阀为电磁阀。注射试剂的体积由阀的打开时间(脉冲时间)决定。

[0108] 毫米流体设备或微米流体设备的等效电路可以如下:

[0109] 两个电阻R1和R2串联。所述两个电阻之间的接头连接至与电阻R3串联的元件IC。

[0110] 元件IC由并联设置的电容C1和电阻R4组成。

[0111] 图11中显示了等效电路。

[0112] 在如下描述中将参考设备(其中侧面入口为通道中的孔)以示例性但非限制性实施方案的方式描述所述设备。因此,本发明还涉及毫米流体设备或微米流体设备,所述设备

包括被孔穿通的通道管、通过在孔的两个侧面上环绕通道的涂层的内部空间形成的喷射腔、试剂储料器和任选的阀。通常地,管由Teflon®制成。孔的尺寸如上文对于侧面入口所述。

[0113] 优选地,所述设备包括设置在试剂储料器和喷射腔之间的阀。特别地,阀为电磁阀。注射试剂的体积由阀的打开时间(脉冲时间)决定。

[0114] 所述设备进一步包括设置在试剂储料器和喷射腔之间(更特别地设置在试剂储料器和阀之间)的电阻。特别地,电阻可以是连接试剂储料器和喷射腔(更特别地阀)的薄Teflon®管。电阻用于提供大的流阻,因此用于获得恒定增加的液滴体积。在毫米流体体系中,管例如具有100 μm 至300 μm ,更特别200 μm 的内径。

[0115] 在孔的两个侧面上通道被聚合物涂层环绕。涂层在此被称为歧管。聚合物可以是任何合适的聚合物并且由本领域技术人员基于技术常识根据试剂性质进行选择。在具体实施方案中,聚合物为丙烯酸类。在聚合物和通道之间,涂层有利地进一步包括油相。油的性质优选与连续相的油相同。

[0116] 歧管用于使试剂储料器和/或阀和孔对齐。试剂储料器和/或阀对齐并且通过合适的装置(例如安装螺母配件)附接至歧管。

[0117] 喷射腔为与穿孔对齐的歧管的特别位于阀和穿孔之间的内部空间。喷射腔的等效电路图为并联的电阻和电容。

[0118] 在优选的实施方案中,电容为喷射设备的腔中存在的可压缩流体。

[0119] 在另一个实施方案中,电容为充当人造气泡的柔性薄膜。所述膜可以密封至在腔中钻出的孔。

[0120] 在另一个实施方案中,电容为具有由低弹性模量材料制成的壁的管。

[0121] 图11中显示了设备的等效电路,其中R1和R2对应于液滴串在喷射点的两侧的流阻,R3为上述电阻并且R4为由试剂流体流动通过喷射腔所造成的电阻,而C1为喷射腔内的电容。

[0122] 本发明的主题是毫米/微米流体设备,其等效电路如图11所示。

[0123] 现在将参考图8所示的设备以示例性但非限制性实施方案的方式描述所述设备。

[0124] 因此,毫米流体设备或微米流体设备包括被孔(图8,3)穿通的通道管(图8,1)、通过在孔的两个侧面上环绕通道的丙烯酸类歧管(图8,8)的内部空间形成的喷射腔、试剂储料器(图8,2)和阀(图8,9)。

[0125] 将通过如下非限制性实施例说明本发明。

[0126] 实施例1:三相毫米流体串的产生

[0127] 三相串由连续相(氟化油Novec HFE 7500+0.5%v/v全氟辛醇表面活性剂)、反应剂液滴(蛋白胍-葡萄糖-盐介质,pH 4.6)和隔离剂流体(空气或矿物油)组成。在750 μm ID FEP Teflon®管内通过使用T形接头产生串,使用注射泵控制液体流速并且使用压力控制器控制气体压力。对于空气隔离剂的串,氟化油和介质的流速分别为6.5和7.5ml/h,并且空气压力为1巴。对于矿物油隔离剂的串,氟化油、介质和矿物油的流速分别为5、5和10ml/h。

[0128] 实验测量的表面值(悬挂液滴法)如下:

[0129] • γ (HFE+PF0 0.5%)/空气:12.5mN/m+/-0.5mN/m

[0130] • γ (HFE+PF0 0.5%)/矿物油:3.7mN/m+/-0.5mN/m

[0131] • γ (HFE+PFO 0.5%) /水:30.5mN/m+/-0.5mN/m

[0132] 对于液滴喷出机制的实验验证,使用荧光素异硫氰酸盐FITC1E-04M作为反应剂液滴流体。将水液滴喷入具有空气隔离剂或矿物油隔离剂的毫米流体串。通过反应剂液滴荧光检测触发喷射并且通过电磁阀促使喷射通过三个不同半径(30、50和90 μm)的贯通孔。 R_{min} 为遵守提出的脱离机制的最小液滴半径并且通过喷射过程的视频捕捉的图像分析进行确定。

[0133] 所述值列在下表中。

[0134]

	空气	矿物油
孔半径 (μm)	R_{min}	R_{min}
30	66	85
50	80	123
90	158	218

[0135] 误差:液滴半径 $\pm 4\mu\text{m}$,孔半径 $\pm 2\mu\text{m}$

[0136] 表1

[0137] 脱离模型预测与最小液滴半径测量值的图表

[0138] 结果列在图12中。

[0139] 材料和方法

[0140] 1.在750 μm ID FEP **Teflon**[®]管上产生毫米流体液滴串。(注射泵和/或压力控制器)。

[0141] 串成分:

[0142] a. 隔离剂流体:压缩空气或矿物油(长度为管内径的至少3倍)

[0143] b. 连续相:氟化油Novec HFE 7500+0.5%v/v全氟辛醇表面活性剂

[0144] c. 反应剂液滴:蛋白胨-葡萄糖-盐介质+BodipyFL(高度在管内径的80和85%之间)

[0145] 2.喷射反应剂液滴(亚甲基蓝水溶液或乙酸盐缓冲(pH 4.5)溶液+BodipyFL)。模块元件在图8中显示。

[0146] 阶段:

[0147] a. 反应剂液滴的荧光信号检测

[0148] b. 在反应剂液滴的前方(通过管中贯通的孔)喷射试剂液滴。通过电磁阀(VHS型, The Lee Co.)促使喷射,所述电磁阀通过丙烯酸类歧管(歧管安装试剂盒, The Lee Co.)与贯通孔对齐。经由图像捕捉(GuppyPro firewire摄影机+Nikon 10 \times 物镜)进行评估。图6的a。

[0149] c. 使试剂液滴与贯通孔附接。图6的a。

[0150] d. 同步:试剂液滴从贯通孔脱离进入连续相毛细管桥(移动的被动融合腔)。经由图像捕捉进行评估。图6的b。

[0151] e. 在移动的被动融合腔上使试剂液滴和反应剂液滴之间接触。经由图像捕捉进行评估。图6的c。

[0152] f. 在移动的被动融合腔上排出连续相。经由图像捕捉进行评估。图6的c。

[0153] g. 液滴融合。经由图片捕捉和荧光信号监控进行评估。图6的d。

[0154] 结果

[0155] 具有空气(图6)和矿物油作为隔离剂流体的毫米流体串中的试剂液滴喷射试验显示了自同步方案的四个典型阶段:试剂液滴产生,试剂液滴从喷嘴脱离,液滴接触和连续相排出和液滴融合。

[0156] 通过使用亚甲蓝溶液作为试剂溶液,可以观察液滴融合之后的混合流动模式。

[0157] 在加入BodipyFL 5x溶液之后,获得毫米流体串的荧光峰值轮廓。不存在间隙表明了所有液滴的剂量,而恒定的最大水平表明了加入液滴的恒定体积。

实施例

[0158] 在提取之后在PGS介质中稀释黑曲霉(*Aspergillus niger*)突变菌株的孢子从而获得0.000375的OD。该浓度允许在PGS介质反应剂液滴中封装单个孢子。在30m长的FEP Teflon®管(750um ID)中形成3105个反应剂液滴的具有空气隔离剂的微米流体串。对于串的产生,Novec 7500(具有0.5%v/v的全氟辛醇表面活性剂)氟化油和PGS介质的流速分别为6.5和7.5ml/h,并且空气压力为1巴。通过施加恒定压力(250毫巴)使串在前后方向上循环。在整个串穿过激光液滴检测器之后,液滴串流动方向自动转换。为了确定30°C真菌生长30h之后的酶活性,通过使用本发明的模块将5nL Bodipy FL液滴喷射至毫米流体串的每个液滴,对于半径为50μm的贯通孔,施加250毫巴的压力用于使串循环,施加300毫巴的压力用于加入试剂液滴,并且产生3ms的电磁阀开口脉冲。通过使加入和荧光模块以30cm定位分离,获得液滴加入和荧光检测之间的45s的延迟。该延迟保证酶活性曲线(正如通过大量预备试验显示)的线性部段内的每个液滴的单数据点的收集。加入的串的荧光信号在图9b中显示(图像放大)。在该曲线中,基线对应于空液滴的信号,而峰对应于由558个被真菌占据的液滴的淀粉酶活性造成的荧光。

[0159] 图9a和9b显示了加入模块的高品质,表现为空液滴的恒定的荧光强度。

[0160] 图10中显示了用微米流体体系分析的黑曲霉突变体库的淀粉酶活性,其中获得了空液滴和占据液滴之间的完美区别,以及突变体库的酶活性的宽分布。

[0161] 实施例2:可变体积喷射的实施例:

[0162] 为了通过荧光确定加入的液滴体积,将荧光素集中的液滴加入通过稀释的荧光素液滴与作为隔离剂的空气泡形成的毫米流体串。毫米流体串的产生条件与之前实施例1中所述的相同。电磁阀的启动基于通过荧光进行的液滴检测。通过使用本发明的模块(贯通孔半径:50μm),使用10ms的电磁阀(VHS型,The Lee Co.)开口脉冲,150毫巴的串循环压力和150至300毫巴的用于加热试剂液滴的可变压力,将FITC荧光素1E-04M液滴喷射至毫米流体串(FITC荧光素1E-06M液滴)的每个液滴。在完成毫米流体串的喷射之后,使流动反向从而记录加入液滴的荧光信号。喷射串的荧光信号显示在图13中,其中每个台阶对应于加入试剂液滴的不同压力。对应于捕捉视频的快照的图14中显示了试剂液滴的体积随着压力的增加而增加。质量平衡允许通过表达式 $V_T/V_R = (C_F - C_T) / (C_R - C_F)$ 量化目标液滴体积和试剂液滴体积的比例(V_T/V_R),其中 C_F 、 C_T 和 C_R 为加入液滴、目标液滴和试剂液滴的浓度。考虑到荧光素浓度和荧光峰高度之间的比例性, C_F 和 C_T 对应于加入液滴和目标液滴的荧光峰高度。对于 $C_R/C_T = 100$,图15中绘示了使用每个台阶的平均峰高度值计算的(V_T/V_R)值,其为用于加入

试剂液滴所施加的压力的函数。在所研究的压力范围中获得98至16的 V_T/V_R 比例,强调了开发模块以宽体积范围产生试剂液滴的灵活性。该特征有可能用于在微米流体体系和毫米流体体系中产生浓度梯度。

[0163] 实施例3:弯液面收缩的增加

[0164] 为了通过在喷射体系中引入电容证实弯液面收缩的增加,在试剂储料器内引入空气泡。通过视频捕捉记录在试剂液滴的形成过程中脱离之后的弯液面位置。图16a和图16b显示了通过半径为 $50\mu\text{m}$ 的孔的连续试剂流动(水,施加100毫巴的压力)下以 2.5ml/h 流动的氟化油Novec 7500+0.5%v/v全氟辛醇表面活性剂流上的最大弯液面收缩。相比于在不具有空气泡的条件下进行并且保持相同操作条件的平行试验(图16a),当存在空气泡时(图16b)弯液面收缩的程度更高。该效果的原因在于:在试剂液滴破碎之后由于空气泡的可压缩性造成压力变化的增加。

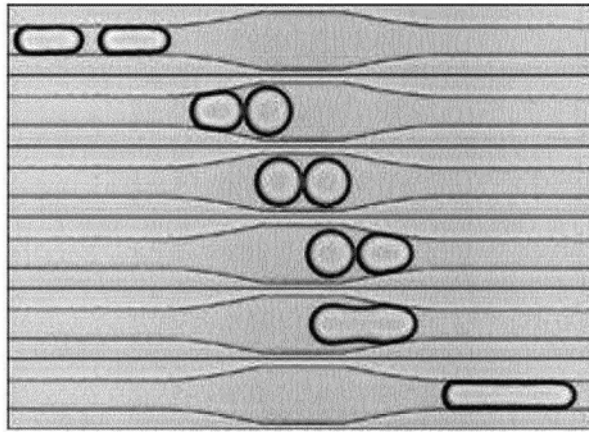


图1

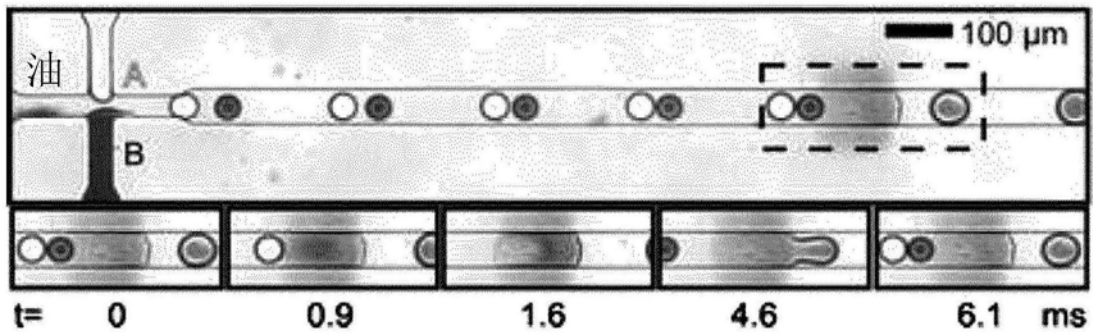


图2

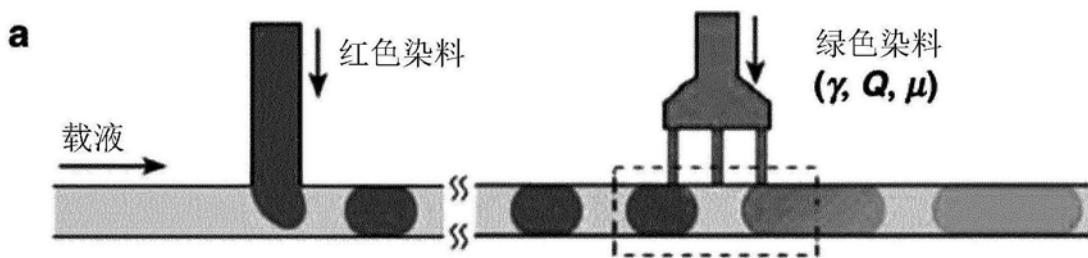


图3

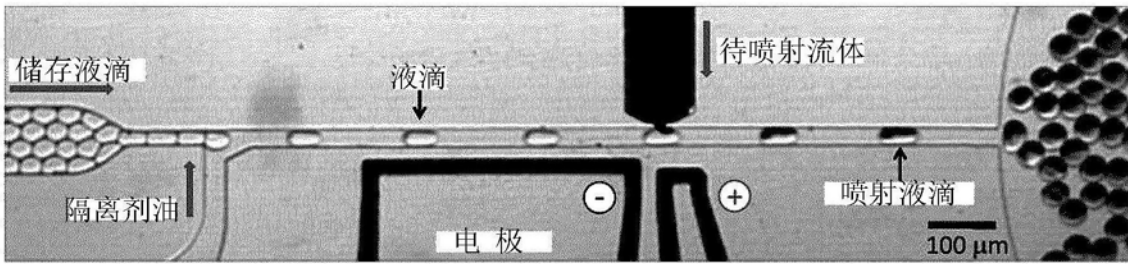


图4

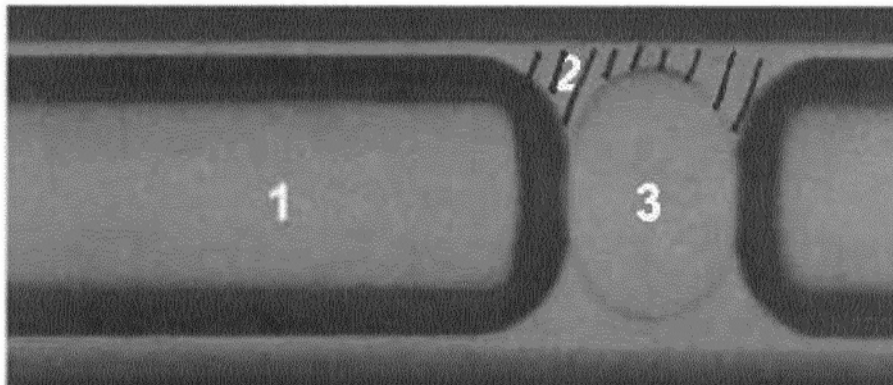


图5

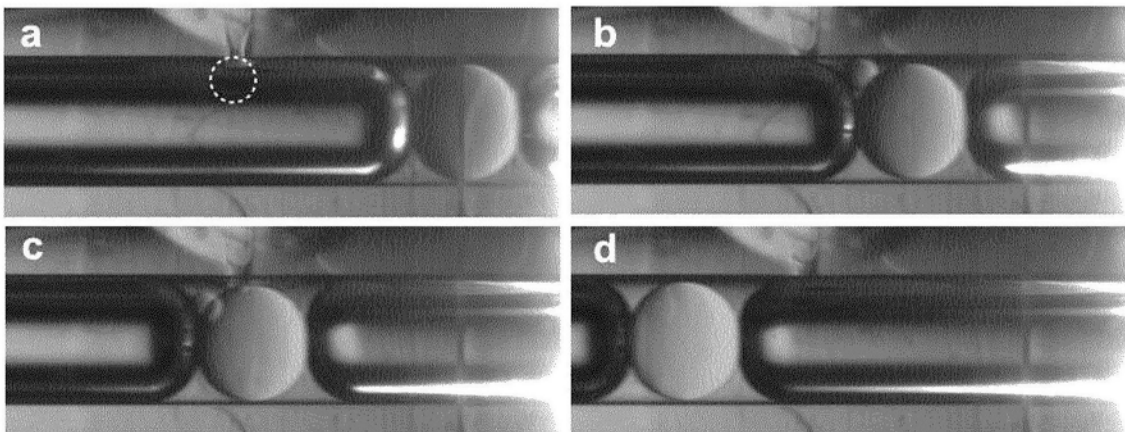


图6

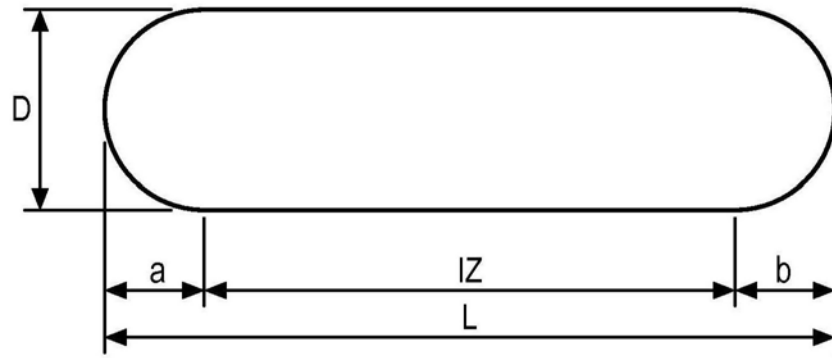


图7

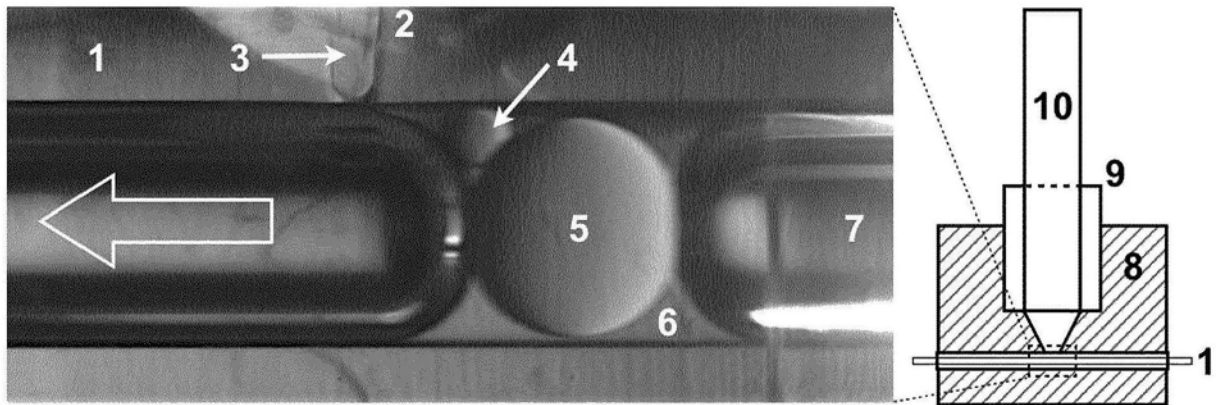


图8

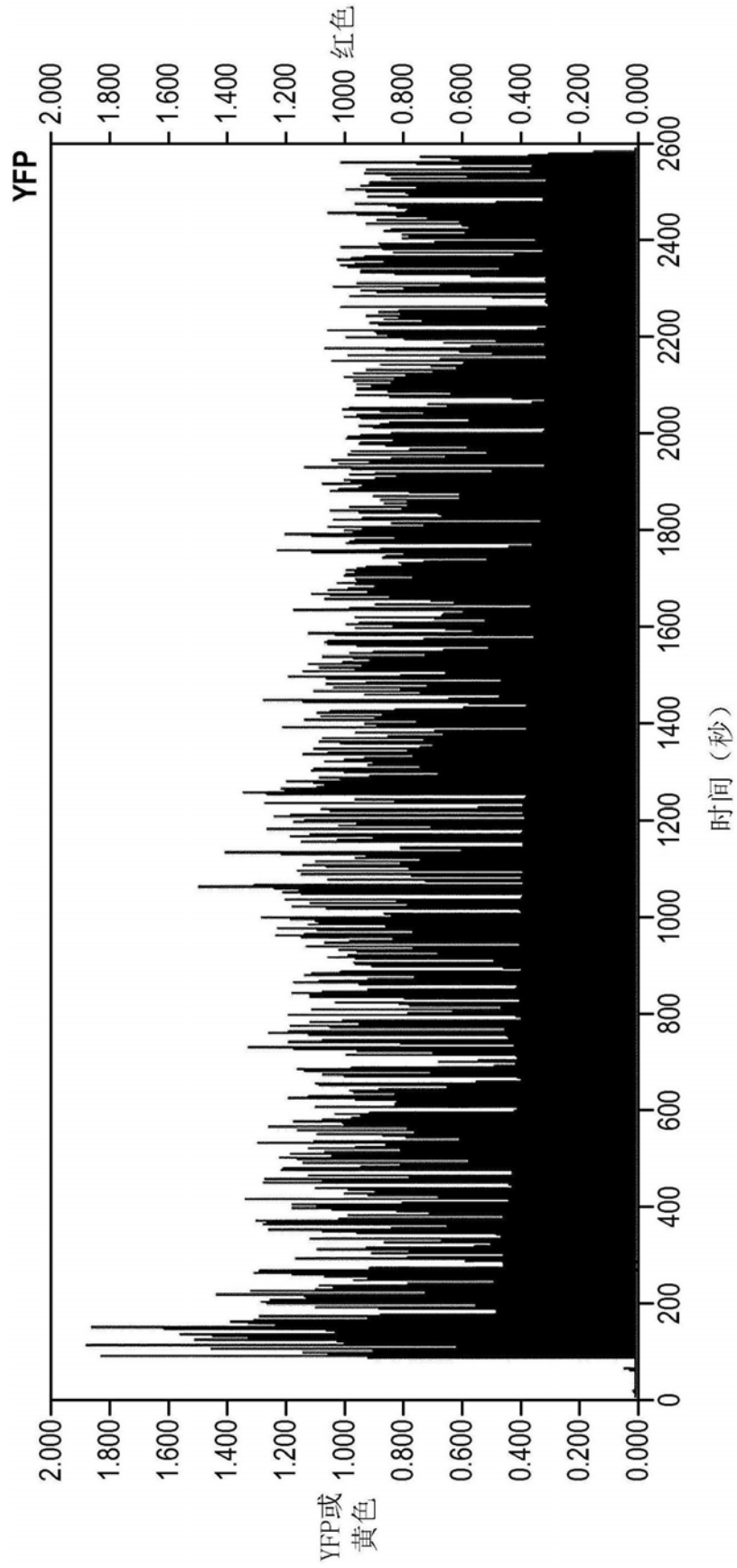


图9a

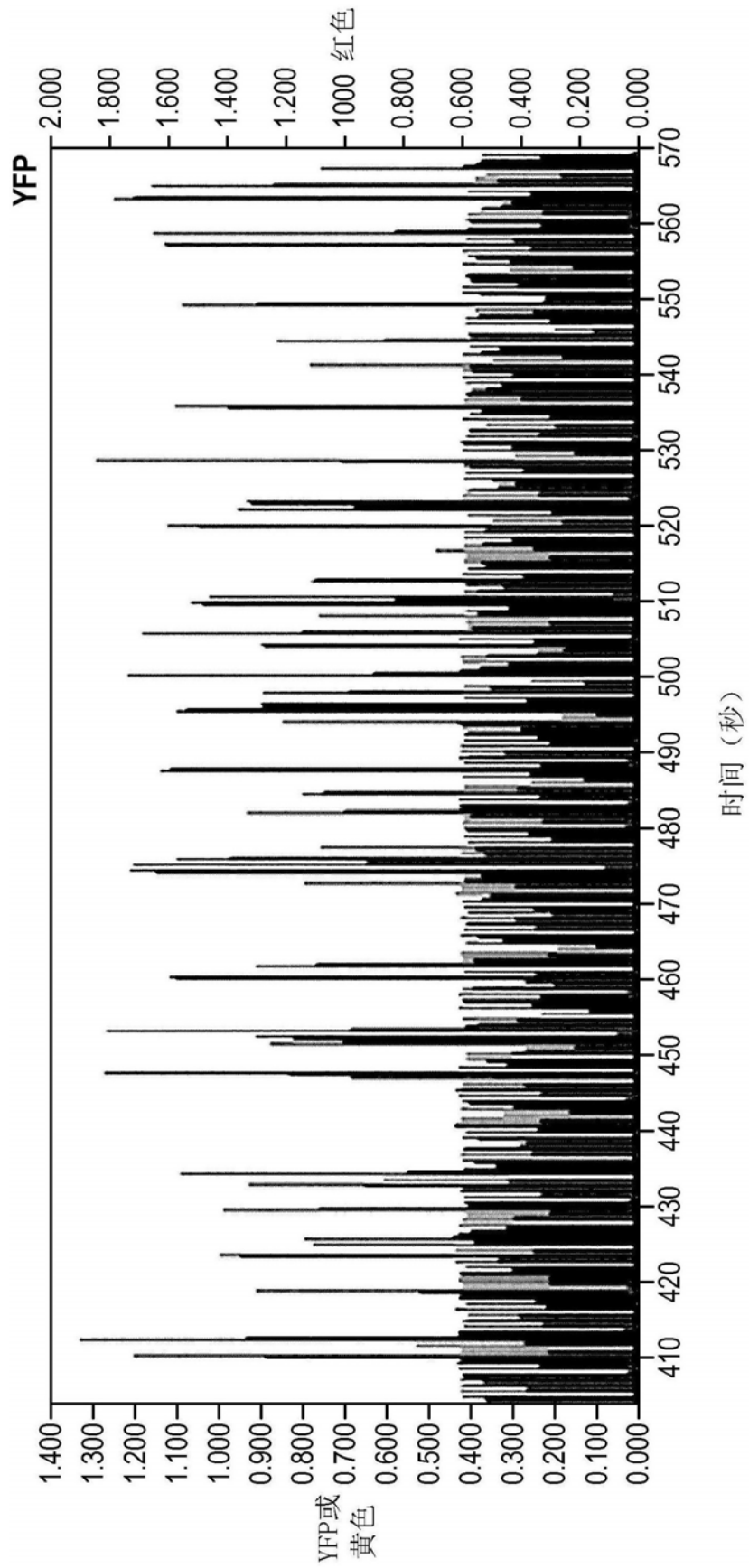


图9b

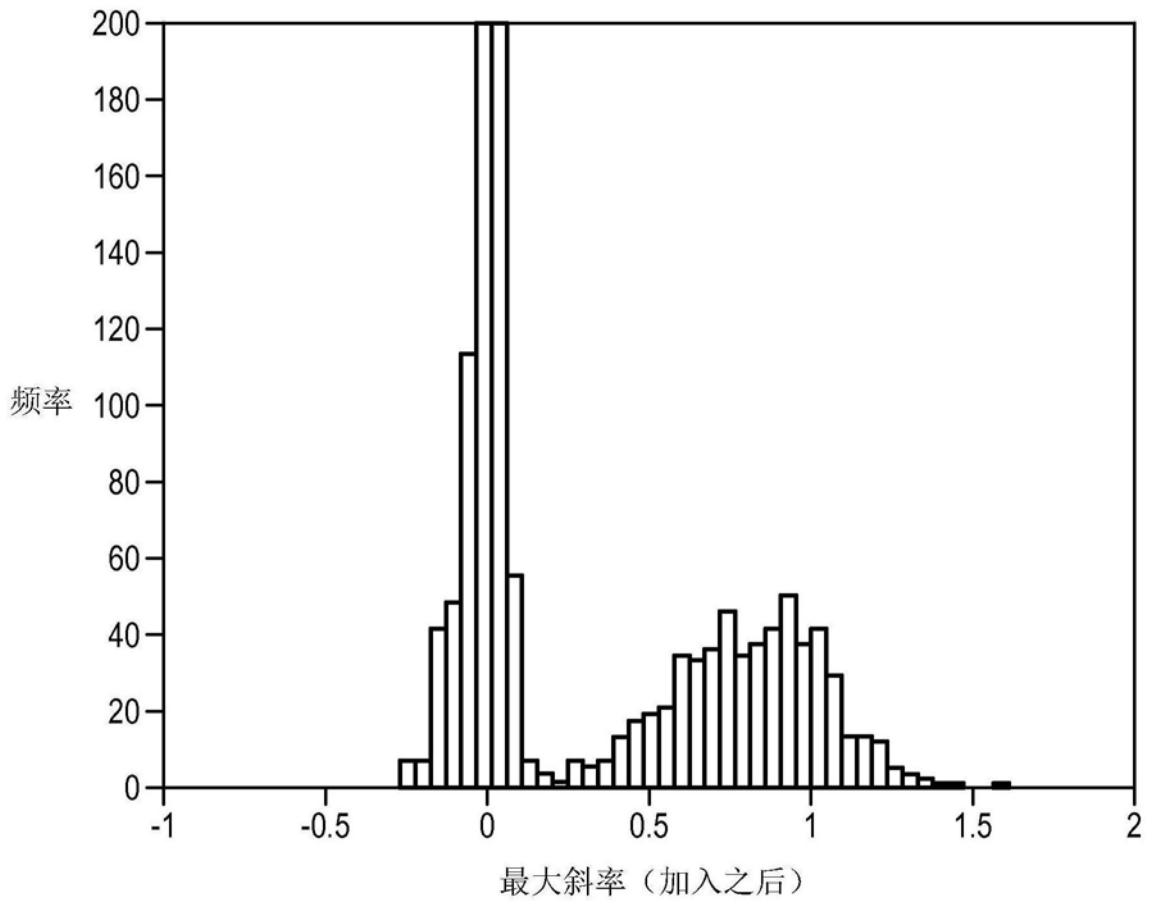


图10

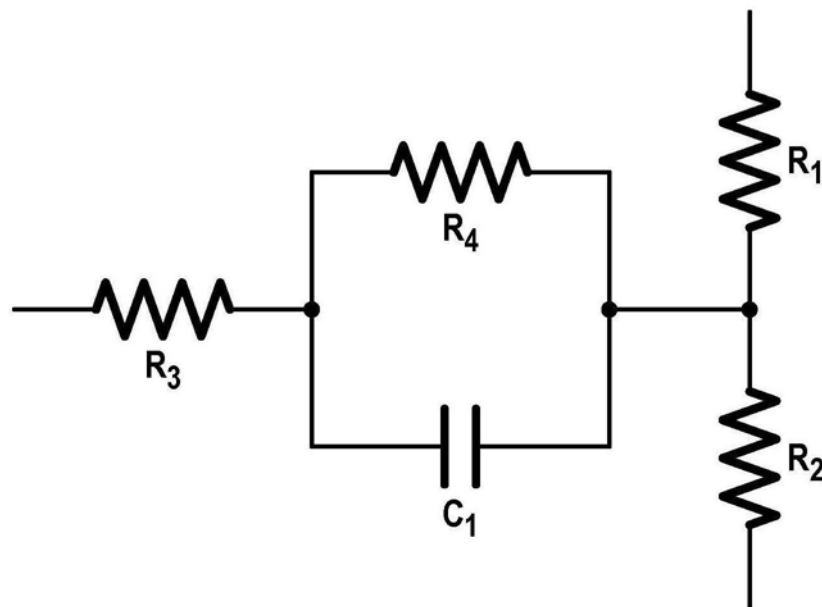


图11

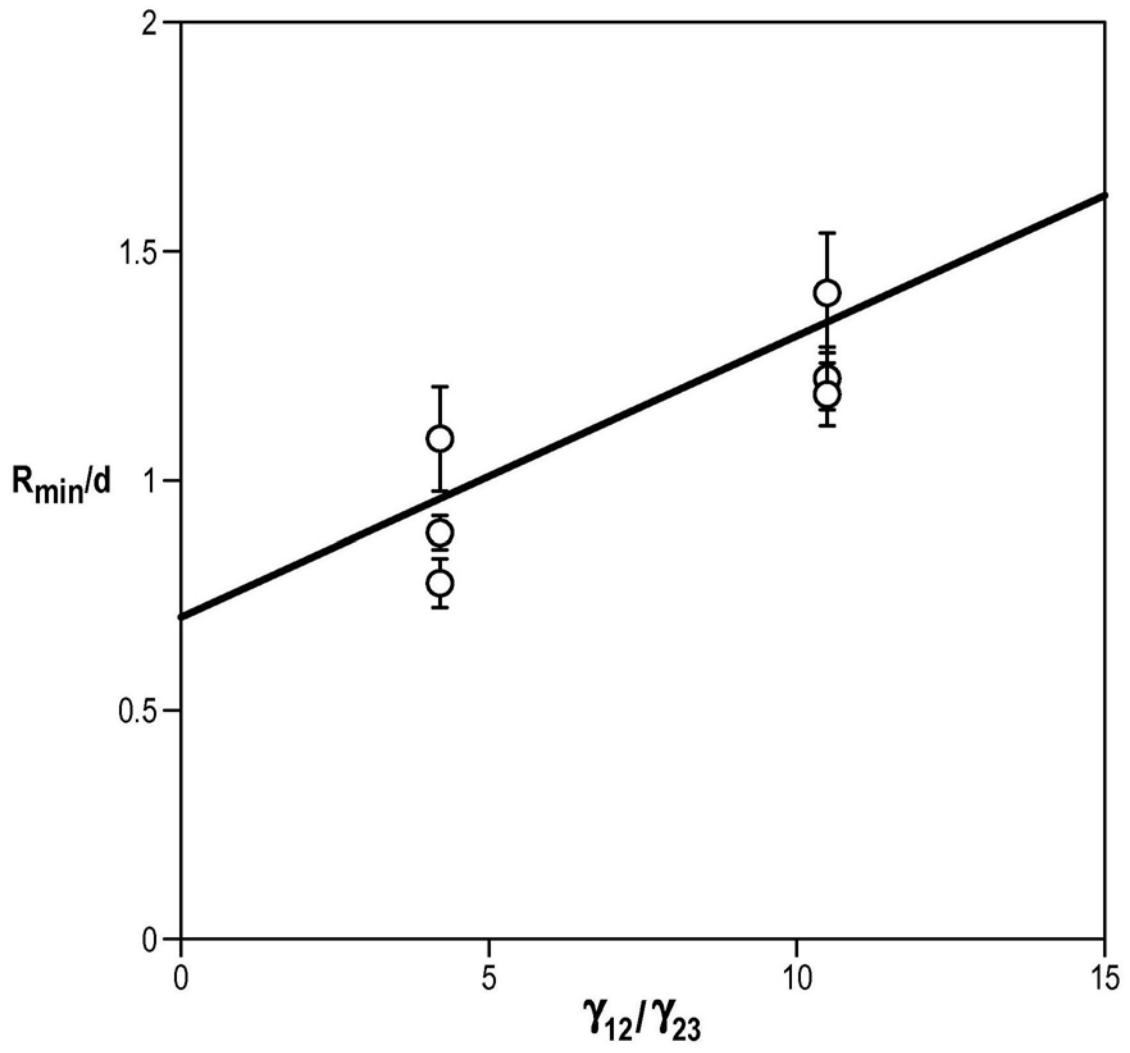


图12

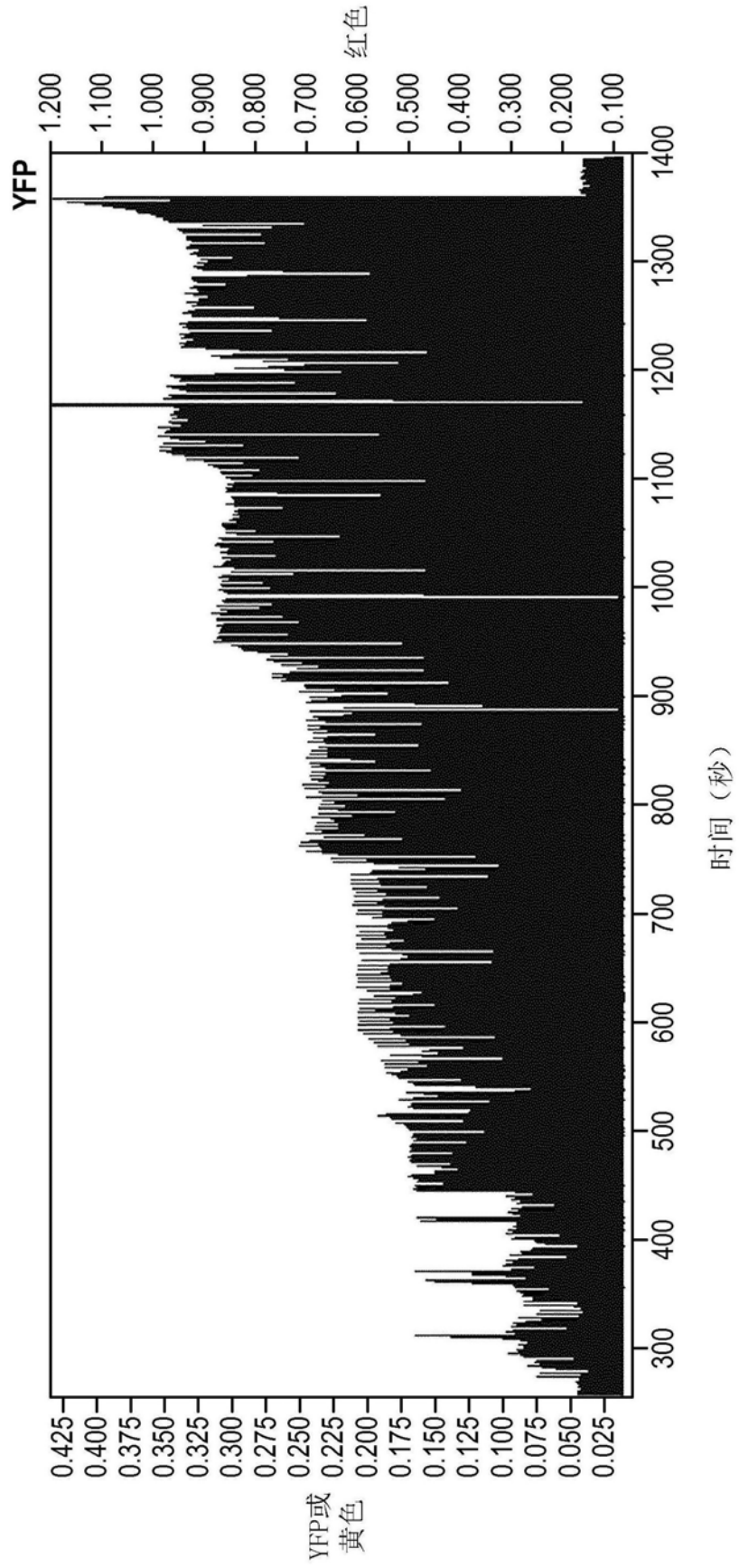


图13

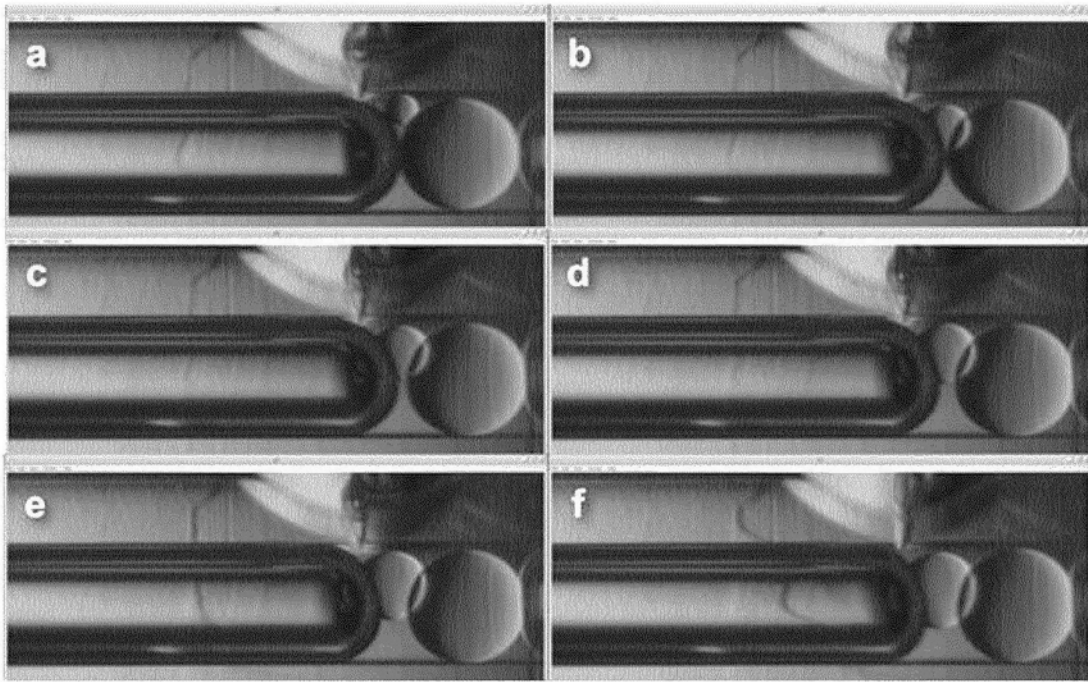


图14

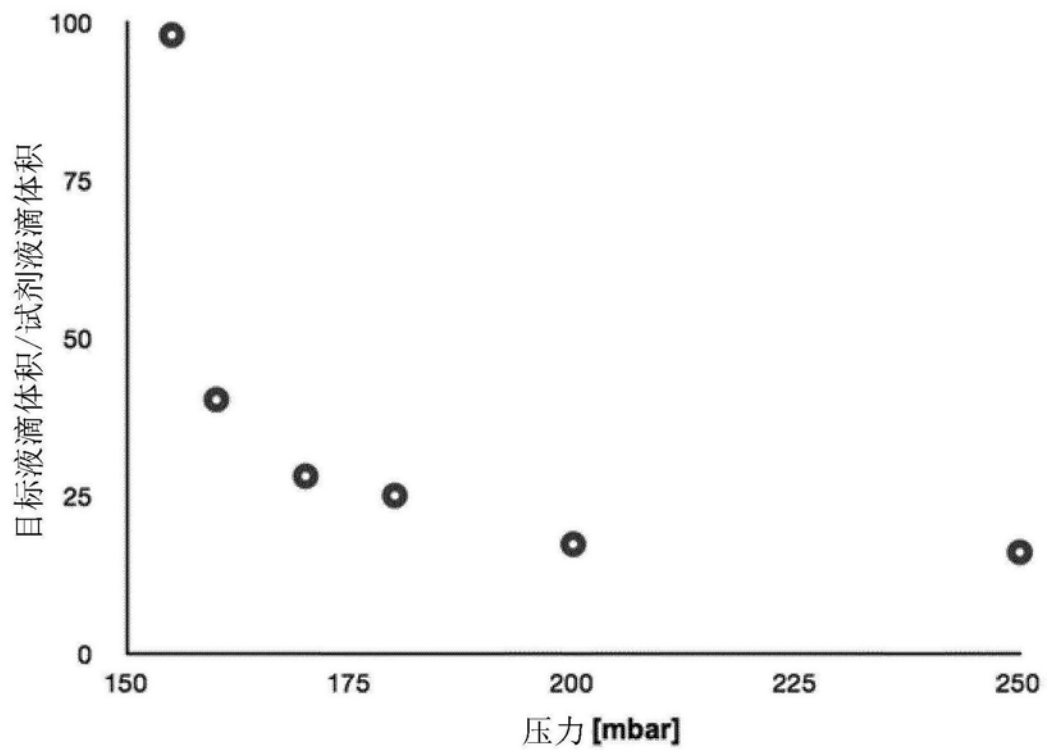


图15

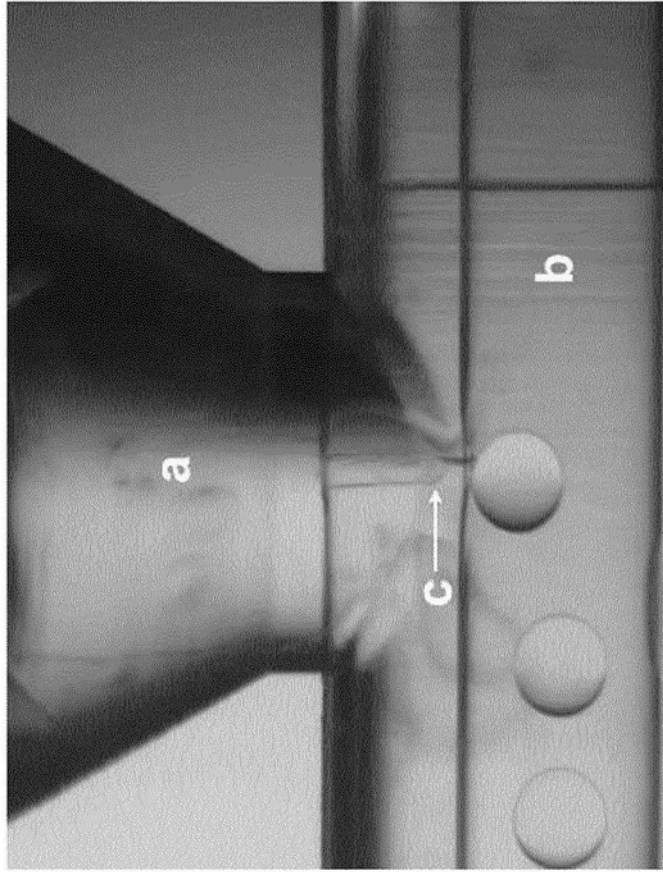


图16a

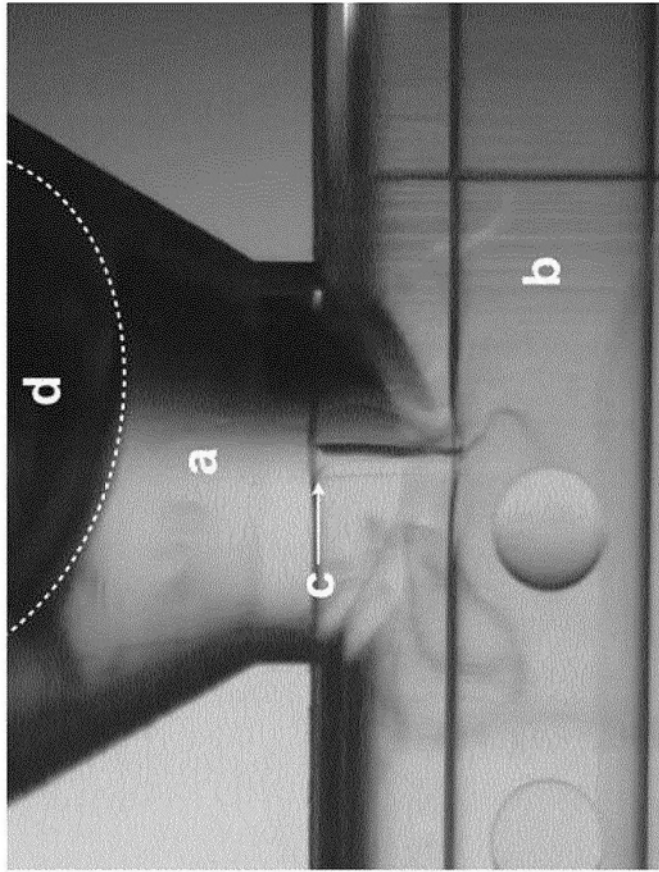


图16b