



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115768863 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 07

(21) 申请号 202180047246.2

(22) 申请日 2021.06.17

(30) 优先权数据

2020-116432 2020.07.06 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2021/023036 2021.06.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/009642 JA 2022.01.13

(71) 申请人 索尼集团公司

地址 日本东京

(72) 发明人 松本真宽

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

专利代理师 沈丹阳

(51) Int.Cl.

G12M 1/00 (2006.01)

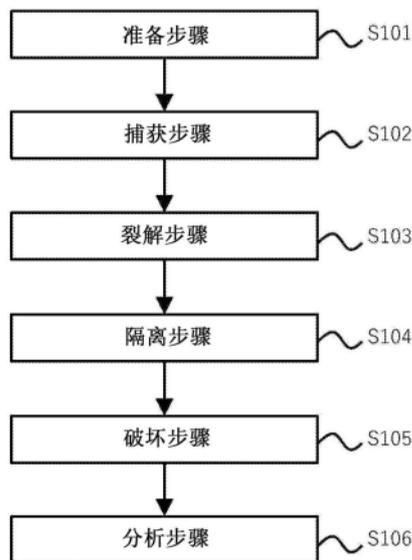
权利要求书2页 说明书30页 附图10页

(54) 发明名称

生物粒子分析方法和生物粒子分析系统

(57) 摘要

本发明的目的是提高使用条形码方法的单细胞分析的分析效率。本发明提供了一种生物粒子分析方法,包括:捕获步骤,用于在经由接头固定有包括生物粒子捕获部、条形码序列和可裂解接头的分子的表面上经由生物粒子捕获部捕获生物粒子;裂解步骤,用于裂解接头以使生物粒子从表面释放;以及隔离步骤,用于将生物粒子隔离在微小空间中。本发明还提供了一种用于实施所述生物粒子分析方法的生物粒子分析系统。



1. 一种生物粒子分析方法,包括:
捕获步骤,在经由接头固定有包括生物粒子捕获部、条形码序列和可裂解接头的分子的表面上经由所述生物粒子捕获部捕获生物粒子;
裂解步骤,裂解所述接头以使所述生物粒子从所述表面释放;以及
隔离步骤,将所述生物粒子隔离在微小空间中。
2. 根据权利要求1所述的生物粒子分析方法,其中,在所述捕获步骤中,结合至一个生物粒子的多个分子具有相同的条形码序列。
3. 根据权利要求1所述的生物粒子分析方法,进一步包括:破坏步骤,在所述微小空间中破坏所述生物粒子。
4. 根据权利要求3所述的生物粒子分析方法,其中,在所述破坏步骤中,所述分子从所述生物粒子解离。
5. 根据权利要求3所述的生物粒子分析方法,其中,所述分子进一步包括目标物质捕获部,并且
在所述破坏步骤中,通过所述目标物质捕获部捕获构成所述生物粒子的目标物质或结合至所述生物粒子的目标物质。
6. 根据权利要求5所述的生物粒子分析方法,进一步包括:分析步骤,在所述破坏步骤之后分析所述目标物质。
7. 根据权利要求6所述的生物粒子分析方法,其中,在所述分析步骤中,所述条形码序列与所述目标物质相关联。
8. 根据权利要求6所述的生物粒子分析方法,其中,所述目标物质具有碱基序列,并且在所述分析步骤中,对所述目标物质的碱基序列进行测序处理。
9. 根据权利要求1所述的生物粒子分析方法,其中,在所述裂解步骤中,基于所述生物粒子的标记或所述分子的标记来选择要从所述表面释放的生物粒子。
10. 根据权利要求1所述的生物粒子分析方法,其中,在所述裂解步骤中,通过化学刺激或光刺激裂解所述接头。
11. 根据权利要求1所述的生物粒子分析方法,其中,在所述裂解步骤中,维持所述生物粒子捕获部对所述生物粒子的捕获状态。
12. 根据权利要求1所述的生物粒子分析方法,其中,在所述裂解步骤中,仅使所选择的生物粒子从所述表面释放。
13. 根据权利要求1所述的生物粒子分析方法,其中,所述微小空间是乳液粒子中的空间或阱中的空间。
14. 根据权利要求1所述的生物粒子分析方法,进一步包括:确定步骤,确定是否将在所述裂解步骤中从所述表面释放的生物粒子隔离在所述微小空间中。
15. 根据权利要求14所述的生物粒子分析方法,其中,在所述确定步骤中,基于通过用光照射所述生物粒子而产生的光进行所述确定。
16. 根据权利要求1所述的生物粒子分析方法,其中,在所述捕获步骤中,所述生物粒子和所述生物粒子捕获部以特定或非特定方式彼此结合。
17. 根据权利要求1所述的生物粒子分析方法,其中,所述捕获步骤包括用于将所述生物粒子和所述生物粒子捕获部彼此结合的孵化步骤。

18. 一种生物粒子分析系统,包括:

捕获试剂盒,被配置为捕获生物粒子,所述捕获试剂盒具有经由接头固定有包括生物粒子捕获部、条形码序列和可裂解接头的分子的表面;

接头裂解装置,裂解所述接头以使所述生物粒子从所述表面释放;以及

隔离装置,形成微小空间或具有微小空间,从所述表面释放的所述生物粒子被隔离在所述微小空间中。

19. 根据权利要求18所述的生物粒子分析系统,进一步包括:分析装置,分析构成所述生物粒子的目标物质或结合至所述生物粒子的目标物质。

生物粒子分析方法和生物粒子分析系统

技术领域

[0001] 本技术涉及生物粒子分析方法和生物粒子分析系统。更具体地,本技术涉及包括将生物粒子隔离在微小空间中以分析该生物粒子的组分的步骤的生物粒子分析方法以及执行该方法的系统。

背景技术

[0002] 作为用于执行单细胞分析的方法,已经提出使用DNA序列的条形码技术。条形码技术的示例包括使用阱的方法和使用乳液的方法。

[0003] 在下面的非专利文献1中描述了使用阱的方法的示例。在非专利文献1中描述的大规模平行聚合酶克隆方法中,将单细胞随机放置在几百纳升至几千纳升的阱中,并且然后,同时扩增它们的遗传材料以进行鸟枪测序。此外,在下面的非专利文献2中描述了使用乳液的方法的示例。非专利文献2描述了一种用于高通量分析和分类单细胞的基于液滴的微流体方案。

[0004] 引用列表

[0005] 非专利文献

[0006] 非专利文献1:Jeff Gole et al.,Massively parallel polymerase cloning and genome sequencing of single cells using nanoliter microwells,Nature Biotechnology,Volume 31,Number 12,pages 1126-1132,December 2013.

[0007] 非专利文献2:Linas Mazutis et al.,Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics,nature protocols,Volume 8,Number 5,pages 870-891,May 2013.

发明内容

[0008] 本发明要解决的问题

[0009] 例如,上述使用阱的条形码技术可能花费时间来分析细胞,例如,因为用于将一个细胞放入一个阱中的处理花费时间。因此,期望提高使用阱的条形码技术的分析效率。此外,上述使用乳液的条形码技术,将一个细胞和一个条形码放入一个乳液粒子中的概率很低。因此,也存在对提高使用乳液的条形码技术的分析效率的需求。

[0010] 此时,本技术的目的是提高使用条形码技术的单细胞分析的分析效率。

[0011] 问题的解决方案

[0012] 本发明人已经发现,可以通过在将条形码分配到每个细胞之后将每个细胞隔离在微小空间中来提高分析效率。

[0013] 即,本技术提供了一种生物粒子分析方法,包括:

[0014] 捕获步骤,在经由接头(linker)固定有包括生物粒子捕获部、条形码序列和可裂解接头的分子的表面上经由生物粒子捕获部捕获生物粒子;

[0015] 裂解步骤,裂解接头以使生物粒子从该表面释放;以及

- [0016] 隔离步骤,将该生物粒子隔离在微小空间中。
- [0017] 在捕获步骤中,结合至一个生物粒子的多个分子可以具有相同的条形码序列。
- [0018] 在本技术的实施例中,该生物粒子分析方法可以进一步包括:破坏步骤,在微小空间中破坏该生物粒子。
- [0019] 在破坏步骤中,分子可以从生物粒子解离。
- [0020] 在本技术的实施例中,分子可以进一步包括目标物质捕获部,并且
- [0021] 在破坏步骤中,可以通过目标物质捕获部捕获构成生物粒子的目标物质或结合至生物粒子的目标物质。
- [0022] 在本技术的实施例中,生物粒子分析方法可以进一步包括:分析步骤,在破坏步骤之后分析目标物质。
- [0023] 在分析步骤中,条形码序列可以与目标物质相关联。
- [0024] 目标物质可以具有碱基序列,并且
- [0025] 在分析步骤中,可以对目标物质的碱基序列进行测序处理。
- [0026] 在裂解步骤中,可以基于该生物粒子的标记或该分子的标记来选择要从该表面释放的生物粒子。
- [0027] 在裂解步骤中,可以通过化学刺激或光刺激裂解接头。
- [0028] 在裂解步骤中,可以维持生物粒子捕获部对生物粒子的捕获状态。
- [0029] 在裂解步骤中,仅使所选择的生物粒子可以从表面释放。
- [0030] 在本技术的实施例中,该微小空间可以是乳液粒子中的空间或阱中的空间。
- [0031] 在本技术的实施例中,该生物粒子分析方法可以进一步包括:确定步骤,确定是否将在裂解步骤中从该表面释放的生物粒子隔离在微小空间中。
- [0032] 在确定步骤中,可以基于通过用光照射生物粒子而产生的光进行确定。
- [0033] 在捕获步骤中,该生物粒子和该生物粒子捕获部可以以特定或非特定方式彼此结合。
- [0034] 该捕获步骤可以包括用于将该生物粒子和该生物粒子捕获部彼此结合的孵化步骤。
- [0035] 此外,本技术还提供了一种生物粒子分析系统,包括:
- [0036] 捕获试剂盒,被配置为捕获生物粒子,该捕获试剂盒具有经由接头固定有包括生物粒子捕获部、条形码序列和可裂解接头的分子的表面;
- [0037] 接头裂解装置,裂解接头以使生物粒子从该表面释放;以及
- [0038] 隔离装置,形成微小空间或具有微小空间,从该表面释放的生物粒子被隔离在该微小空间中。
- [0039] 生物粒子分析系统可以进一步包括:分析装置,分析构成生物粒子的目标物质或结合到生物粒子的目标物质。

附图说明

- [0040] 图1是根据本技术的分析方法的流程图的示例。
- [0041] 图2是用于说明根据本技术的分析方法中包括的每个步骤中的操作的示意图。
- [0042] 图3是示出了在根据本技术的分析方法中使用的分析表面以及固定在该表面上的

分子的示意图。

[0043] 图4是用于说明粒子隔离步骤的示意图。

[0044] 图5是用于说明粒子隔离步骤的示意图。

[0045] 图6是示出在粒子隔离步骤中使用的微通道的示例的示意图。

[0046] 图7是示出核酸结合抗体的示例的示意图。

[0047] 图8A是示出在粒子隔离步骤中使用的生物粒子分类装置的示例的示意图。

[0048] 图8B是示出如何在微芯片中形成乳液粒子和生物粒子被隔离到所形成的乳液粒子中的示意图。

[0049] 图9是包括在生物粒子分类装置中的粒子分类部的放大图。

[0050] 图10是示出包括在生物粒子分类装置中的控制单元的框图的示例的图。

[0051] 图11是通过生物粒子分类装置进行的处理的流程图的示例。

[0052] 图12A是包括在生物粒子分类装置中的连接通道附近的放大图。

[0053] 图12B是包括在生物粒子分类装置中的连接通道附近的放大图。

[0054] 图13A是包括在生物粒子分类装置中的连接通道附近的放大图。

[0055] 图13B是包括在生物粒子分类装置中的连接通道附近的放大图。

[0056] 图14是与收集容器连接的生物粒子分类装置的示意图。

[0057] 图15是示出通过生物粒子分类装置形成乳液粒子的照片的复印件。

[0058] 图16是示出微芯片的另一示例的示意图。

具体实施方式

[0059] 在下文中,将描述用于执行本技术的优选实施例。注意,下面描述的实施例是本技术的代表性实施例,并且本技术的范围不仅限于这些实施例。注意,将按以下顺序描述本技术。

[0060] 1. 第一实施例(生物粒子分析方法)

[0061] (1) 发明问题的细节

[0062] (2) 第一实施例的描述

[0063] (3) 第一实施例的示例

[0064] (3-1) 准备步骤

[0065] (3-2) 捕获步骤

[0066] (3-3) 裂解步骤

[0067] (3-4) 隔离步骤

[0068] (3-5) 破坏步骤

[0069] (3-6) 分析步骤

[0070] 2. 第二实施例(生物粒子分析系统)

[0071] 3. 第三实施例(表面)

[0072] 1. 第一实施例(生物粒子分析方法)

[0073] (1) 发明问题的细节

[0074] 如上所述,为了进行单细胞分析,已经提出使用DNA序列的条形码技术。该方法使得可以检测大量分子(例如,细胞表面抗原、细胞内蛋白、以及mRNA)。在该方法中,将一个细

胞和一个条形码珠(或凝胶珠)放入微小空间中,例如阱或乳液,并且然后将该细胞裂解,使得条形码可以被分配给待测量的分子。

[0075] 例如,可以如下进行使用该方法的分析。即,不同的条形码分子存在于相应的微小空间中。然后,将细胞放入这些微小空间中,并且此后,将这些细胞裂解并且孵化,使得该条形码分子在每个微小空间中结合到待测量的分子以形成待测量的条形码分子。然后,将所有条形码化的待测量的分子混合,并且通过分析装置(例如,下一代测序仪(NGS))对待测量的分子的序列进行解密。基于包括在解密结果中的条形码信息,例如可以识别某种mRNA来源于哪个细胞,以进行单细胞分析。这里,例如,因为不存在作为荧光检测方法(例如,流式细胞术或荧光成像)的缺点的光谱重叠,所以即使在标记物的数量是 10^2 或更多的情况下,使用下一代测序仪的分析方法也能够进行检测。

[0076] 使用条形码技术的单细胞分析的分析效率取决于一个细胞和一个条形码珠(或凝胶珠)封装在一个微小空间中的概率。此外,由于分析方法特有的各种因素,分析效率可能降低。

[0077] 例如,在基于阱的方法中,使用细胞分类器将一个细胞放置在一个阱中,或者将比阱的数量更少数量的细胞接种在阱板中。此后,通过放置条形码珠(例如,凝胶珠)进行单细胞条形码化。为了选择性地获取能够进行单细胞分析的样品,例如,可以通过微量吸液管从满足一个细胞和一个条形码珠(或凝胶珠)包含在一个阱中的条件的阱中获取样品,或可替代地,可以排除源自不满足条件的阱的样品。然而,这样的处理是耗时且低效的。作为另一种方法,通过下一代测序仪进行分析,而不选择性地获取能够进行单细胞分析的样品,并且然后,排除来源于不是单细胞的样品的数据,但是这在分析中造成浪费。此外,在使用细胞分类器基于检测信号将单细胞分类在阱板上的情况下,例如,阱板中的阱的数量受到限制,导致分析规模和吞吐量较低。此外,因为在分类喷嘴在阱之间移动时不能进行分类,所以失去在此期间流动的目标细胞。

[0078] 另一方面,基于乳液的方法在增加分析规模上比基于阱的方法更容易。作为制备乳液的方法的示例,使含有要捕获的粒子的溶液(例如,亲水性溶液)和与其不混溶的溶液(例如,疏水性溶液)流过微通道,并且使用剪切力在疏水性溶液中捕获亲水性溶液。可替代地,可以通过在溶液流动时改变每种溶液的流速在疏水性溶液中捕获亲水性溶液。例如,可以在微通道中形成乳液,并且然后可以在乳液粒子中捕获粒子和条形码珠。

[0079] 在基于乳液的方法中,在许多情况下,将亲水性溶液掺入疏水性溶液中以在规则定时形成乳液粒子,并且掺入乳液粒子中的粒子和条形码珠以预定浓度的稀释状态包含在亲水性溶液中。这是为了避免双峰的形成,其中,在一个乳液粒子中捕获两个细胞或两个条形码珠。因此,在许多情况下,在乳液粒子中无法捕获细胞或条形码珠,并且乳液粒子通常是空的。在基于乳液的方法中,在乳液粒子中成功捕获细胞的机会不高,并且据说在一个乳液粒子中成功捕获一个细胞的机会最大约为65%。进一步降低了在一个乳液粒子中除了细胞之外捕获一个条形码珠的概率。

[0080] 没有、一个或两个或更多个细胞被放入一个乳液粒子中的概率基本上遵循泊松分布(参见以上非专利文献2)。在用于单细胞分析的样品中的细胞的数量较少的情况下,特别是在可以从其获得仅 10^4 至 10^5 个细胞的临床样品或稀少细胞样品诸如CTC中,重要的是在一种乳液中有效地捕获一个细胞和一个条形码珠或一个凝胶珠。

[0081] 此外,在基于乳液的方法中,在将两个或更多个细胞放入一个乳液粒子中的情况下,乳液粒子不是用于单细胞分析的目标。因此,即使乳液粒子经受分析处理(例如,下一代测序),其分析数据也被排除。因此,双峰的形成导致分析的浪费。

[0082] 此外,在乳化之前,可以使用细胞分类器等对要经受单细胞分析的目标细胞群进行分类和纯化。然而,在这种情况下,除了乳液形成装置之外,还需要被称为细胞分类器的装置,并且还添加被称为细胞分类的工作流程。因此,在时间和费用方面,成本增加。

[0083] 基于上述,本技术的目的是提供用于提高使用条形码序列的单细胞分析的分析效率的方法。

[0084] (2) 第一实施例的描述

[0085] 根据本技术的生物粒子分析方法包括:捕获步骤,在经由接头固定有包括生物粒子捕获部、条形码序列和可裂解接头的分子的表面上经由生物粒子捕获部捕获生物粒子;裂解步骤,裂解接头以使生物粒子从该表面释放;以及隔离步骤,将生物粒子隔离在微小空间中。通过执行这些步骤,条形码序列和生物粒子可以有效地隔离在一个微小空间中。因此,例如,包含在生物粒子中的目标物质可以有效地结合至条形码序列,并且此外,可以有效地分析每个生物粒子。以这种方式,根据本技术,可以提高使用条形码序列的单细胞分析的效率。

[0086] 在本技术的优选实施例中,该生物粒子分析方法可以进一步包括:破坏步骤,在微小空间中破坏该生物粒子。因此,包含在该生物粒子中的组分可以被有效地结合到该条形码序列,从而提高分析该生物粒子的效率。

[0087] 在本技术的优选的实施例中,生物粒子分析方法可以进一步包括分析包含在生物粒子中的目标物质的分析步骤。目标物质可以例如是结合到含有条形码序列的分子上的物质。目标物质可以是核酸,例如RNA或DNA,特别是mRNA。通过使用条形码序列,分析目标物质的结果可以与生物粒子相关联,从而使得可以分析单个细胞。

[0088] (3) 第一实施例的示例

[0089] 图1示出了根据本技术的生物粒子分析方法的流程图的示例。如图1所示,根据本技术的分析方法可以包括准备步骤S101、捕获步骤S102、裂解步骤S103、隔离步骤S104、破坏步骤S105和分析步骤S106。下面将描述这些步骤。

[0090] (3-1) 准备步骤

[0091] 在准备步骤S101中,准备经由接头固定有包括生物粒子捕获部、条形码序列和可裂解接头的分子的表面。例如,如图2A所示,准备其上固定有多个分子100的表面101的分析基板(例如,载玻片)102。

[0092] 分子100包括生物粒子捕获部、条形码序列、和可裂解接头。在本说明书中,包括生物粒子捕获部、条形码序列和接头的分子是用于捕获目标物质的分子,并且还可以被称为目标捕获分子。目标捕获分子是用于指在本技术中使用的分子的术语,并且还可以例如在本说明书中用于指在捕获目标物质之后的分子或在后面描述的裂解步骤中裂解接头之后的分子。目标捕获分子可以例如是单个分子或08或复合分子。单个分子可以例如指具有多种功能的一种类型的分子,并且可以例如是包括形成为接头的核酸部分、形成为条形码序列的核酸部分以及形成为目标物质捕获部的部分的一个核酸(例如,DNA或RNA)。复合分子可以例如是包括两种或更多种分子的分子组装件(例如,两种或更多种分子的复合物),并

且可以例如是包括形成接头部分的核酸部分和形成条形码序列的核酸部分的核酸以及形成目标物质捕获部的多肽(例如,蛋白质或其一部分,或低聚肽)的复合物。

[0093] 将参考图3描述分子100的结构示例。图3所示的分子100包括接头1、收集序列部2、扩增序列部3、条形码序列部4、唯一分子标识符(UMI)部5、目标物质捕获部6、以及生物粒子捕获部7。分子100经由接头1固定在表面101上。

[0094] 收集序列部2、扩增序列部3、条形码序列部4和UMI部5可以形成一系列核酸(特别是DNA)。当目标物质捕获部6是核酸时,目标物质捕获部6也可以与收集序列部2、扩增序列部3、条形码序列部4和UMI部5一起形成一系列核酸(特别是DNA)。在这种情况下,例如,靠近表面101与分子100之间的固定部分的一端可以是5'端,并且另一端可以是3'端。

[0095] 下面将描述分子100的组分。

[0096] 接头1可以通过刺激可裂解的接头,并且例如是通过光刺激或化学刺激可裂解的接头。光刺激特别适合于在后面描述的裂解步骤中选择性地刺激特定位置。

[0097] 例如,接头1可以包括选自芳基羰基甲基、硝基芳基、香豆素-4-甲基、芳基甲基、含金属基团和其他基团中的任一种作为通过光刺激可裂解的接头。作为这种基团,可以例如使用在Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology:Reaction Mechanisms and Efficacy,Chem.Rev.2013,113,119-191中描述的基团。

[0098] 例如,芳基羰基甲基可以是苯甲酰甲基、邻烷基苯甲酰基或对羟基苯甲酰基。硝基芳基可以例如是邻硝基苄基、邻硝基-2-苯乙氧基羰基或邻硝基苯胺。芳基甲基可以例如是引入羟基的芳基或未引入羟基的芳基。

[0099] 在接头1是通过光刺激可裂解的接头的情况下,接头可以优选地通过波长为360nm或更大的光裂解。接头可以是优选以 $0.5\mu\text{J}/\mu\text{m}^2$ 或更小的能量裂解的接头。(Light-sheet fluorescence microscopy for quantitative biology,Nat Methods.2015Jan;12(1):23-6.doi:10.1038/nmeth.3219.)。通过采用被上述波长的光或以上述能量裂解的接头,可以减少当施加光刺激时可能发生的细胞损伤(特别是DNA或RNA的裂解)。

[0100] 更优选地,接头可以是短波长区域内的光、特别是360nm至410nm的波长区域的光裂解的接头,或者可以是近红外区域或红外区域的光、特别是800nm或更大的波长区域的光裂解的接头。在接头是由可见光区域的波长的光有效裂解的接头的情况下,可能难以处理分析表面。因此,接头优选是被上述短波长区域的光或上述近红外区域或红外区域的光裂解的接头。

[0101] 接头1可以例如包括二硫键或限制性内切核酸酶识别序列作为通过化学刺激可裂解的接头。为了裂解二硫键,例如,使用诸如三(2-羧乙基)膦(TCEP)(tris(2-carboxyethyl)phosphine(TCEP))、二硫苏糖醇(DTT)(dithiothreitol(DTT))、或2-巯基乙醇(2-mercaptoethanol)的还原剂。例如,在使用TCEP的情况下,在50mM下进行反应约15分钟。为了解离限制性核酸内切酶识别序列,适当的限制性核酸内切酶(http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100003632)用于每个序列。1U的限制性内切核酸酶活性原则上是在50 μl 的每种内切核酸酶反应溶液中在37 $^{\circ}\text{C}$ 下1小时完全降解1 μg 的 λDNA 的内切核酸酶的量,并且内切核酸酶的量根据限制性内切核酸酶识别序列的量进行调节。

[0102] 为了增加随后描述的裂解步骤中的效率,分子100可以包括多个可裂解接头。优选

地,该多个接头可以彼此串联连接。例如,在一个接头具有0.8的裂解概率的情况下,通过将三个接头彼此串联连接将裂解概率提高至0.992 ($=1-0.2^3$)。

[0103] 收集序列部2包括用于收集当生物粒子在后面描述的破坏步骤中破坏时从该生物粒子释放的分子100的核酸。核酸可以是DNA或RNA,并且特别是DNA。注意,对于收集,可以使用其上固定有与该核酸互补的核酸的珠。这样的珠使得可以有效地收集具有收集序列部2的分子100。包括在收集序列部2中的核酸的碱基序列可以由本领域技术人员适当地设置。

[0104] 扩增序列部3可以例如包括具有用于扩增核酸的引物序列或用于在后面描述的分析步骤中转录核酸的启动子序列的核酸。核酸可以是DNA或RNA,并且特别是DNA。扩增序列部3可以具有引物序列和启动子序列两者。引物序列可以例如是PCR手柄(PCR handle)。启动子序列可以例如是T7启动子序列。

[0105] 条形码序列部4包括具有条形码序列的核酸。核酸可以具体地是DNA或RNA,并且更具体地是DNA。该条形码序列可以例如用于识别捕获的生物粒子(特别是细胞或外来体),并且具体地,可以用作区分离到一个微小空间中的生物粒子与隔离到另一微小空间中的生物粒子的标识符。此外,条形码序列可以用作用于区分包括一个条形码序列的目标捕获分子与包括另一条形码序列的目标捕获分子的标识符。条形码序列可以与生物粒子相关联,包括该条形码序列的目标捕获分子结合至该生物粒子。此外,该条形码序列可以与微小空间相关联,在该微小空间中,包括该条形码序列的目标捕获分子结合到其上的生物粒子被隔离,并且此外,可以与关于该微小空间的位置的信息(在下文中也称为“位置信息”)相关联。位置信息可以用于识别表面101上的位置,并且例如是关于XY坐标的信息,但是不限于此。ID号可以分配给与位置信息相关联的条形码序列。ID号可以在裂解步骤之后的步骤中使用。ID号可以一对一地对应于条形码序列,并且可以在裂解步骤之后的步骤中用作对应于条形码序列的数据。

[0106] 固定在表面101的特定区域内的多个目标捕获分子可具有相同的条形码序列。因此,特定区域和条形码序列彼此相关联。通过将特定区域的尺寸设置为小于生物粒子的尺寸,包括条形码序列的目标捕获分子可以与一个生物粒子所存在的位置相关联。例如,如在图2的A和B中示出的,固定有包括相同条形码序列的多个目标捕获分子100的区域R可以小于生物粒子(在图2中表示为细胞)的尺寸。

[0107] 以这种方式,在根据本技术的生物粒子分析方法中使用的表面可以具有多个区域,在每个区域中固定具有相同条形码序列的多个目标捕获分子。条形码序列对于每个区域可以是不同的。每个区域的尺寸(例如,作为区域的最大尺寸的直径、长径、长边的长度等)可优选地小于生物粒子的尺寸,例如,50 μm 或更小,优选地,10 μm 或更小,并且更优选地,5 μm 或更小。

[0108] 多个区域可以以一定间隔布置,例如,使得由固定在一个区域中的目标捕获分子捕获的生物粒子不被固定在另一区域中的目标捕获分子捕获。该间隔可以例如是等于或大于该生物粒子的尺寸的距离,并且可以优选地是大于该生物粒子的尺寸的距离。

[0109] 多个区域的数量优选地大于在捕获步骤中施加到表面101上的生物粒子的数量。这防止两个生物粒子被捕获在一个区域中。

[0110] 在本技术的实施例中,可以将其序列包括已知的条形码序列的目标捕获分子固定在预定区域中。例如,表面101具有多个区域,并且固定在多个区域中的每个区域中的多个

目标捕获分子可以包括相同的条形码序列。多个区域可以被设置为小于待捕获的生物粒子的尺寸。如上所述配置的表面101使得可以将多个区域中的每一个与固定在每个区域中的多个目标捕获分子中包括的条形码序列相关联。

[0111] 在本说明书中,如上所述的固定有包括相同条形码序列的目标捕获分子的区域也称为斑点。即,斑点的尺寸可以例如是50 μm 或更小,优选地10 μm 或更小,并且更优选地5 μm 或更小。

[0112] 如上所述配置的表面101使得在目标捕获分子固定在表面101上时的时间点,可以使包括在特定目标捕获分子中的条形码序列与特定目标捕获分子所存在的位置相关联。对于固定,例如,将生物素结合到目标捕获分子的接头1上,并且将链霉亲和素结合到固定有目标捕获分子的表面101上,使得生物素和链霉亲和素彼此结合,从而将目标捕获分子固定到表面101上。

[0113] 在本技术的另一实施例中,各自包括条形码序列的目标捕获分子可以随机地布置在表面101上。

[0114] 在这种情况下,在将各自包括条形码序列的目标捕获分子固定在表面101上之后,通过读取包括在固定的目标捕获分子中的条形码序列,将包括在特定目标捕获分子中的条形码序列与特定目标捕获分子所存在的位置相关联。该读取可以通过诸如通过合成测序、通过连接测序或通过杂交测序的方法进行。

[0115] 此外,包括在特定目标捕获分子中的条形码序列可以不与特定目标捕获分子存在的位置相关联。由于生物粒子和目标捕获分子通过后述的隔离步骤彼此隔离在微小空间中,因此生物粒子和目标捕获分子(特别是包括在目标捕获分子中的条形码序列)彼此一一对应。

[0116] 在该实施例中,例如,可以使用珠(例如,凝胶珠),包括相同条形码序列的多个目标捕获分子结合到该珠上,并且该珠(例如,凝胶珠)可以固定在表面101上。珠(例如,凝胶珠)的尺寸可以例如是50 μm 或更小,优选地10 μm 或更小,并且更优选地5 μm 或更小。为了将目标捕获分子结合至珠(例如,凝胶珠),例如,可以使用生物素和链霉亲和素的组合。例如,将生物素结合到目标捕获分子的接头1,并且将链霉亲和素结合到该珠上,使得该生物素和该链霉亲和素彼此结合,从而将该目标捕获分子固定在该珠上。

[0117] 表面101可以在其中具有多个凹部。在上述实施例中,可以在多个凹部中的每个凹部中布置一个斑点或一个珠。该斑点或珠可以通过多个凹部更容易地布置在表面101上。例如,该凹部优选地具有在其中放置一个珠的尺寸。凹部可以具有圆形、椭圆形、六边形或四边形,但是凹部的形状不限于此。

[0118] 此外,表面101的布置斑点或珠的一些部分可以处于与表面101的其他部分不同的状态。例如,其中布置斑点或珠的一些表面部分可以是亲水性的,并且其他表面部分可以是疏水性的,或者其他表面部分可以在分别具有突起的同时是疏水性的。作为赋予表面亲水性的方法的示例,可在氧存在下蚀刻反应性离子,或者可在臭氧存在下照射深紫外光。在这种方法中,掩模可以与在要赋予亲水性的部分中形成的通孔一起使用。此外,作为赋予表面疏水性的方法的示例,可以使用喷涂硅酮,例如Techspray 2101-12S。为了赋予疏水性,例如,掩模还可与在要赋予疏水性的部分中形成的通孔一起使用。

[0119] 例如,也可以使用DNA微阵列制备技术等,在基板上合成目标捕获分子。例如,可以

使用诸如用于光刻的数字微镜装置(DMD)、液晶快门或空间光相位调制器的技术在特定位置处合成目标捕获分子。例如在Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology, CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Oct. 2009, p. 611-633中描述用于合成的方法。注意,在通过上述合成方法在基板上合成目标捕获分子的情况下,当合成目标捕获分子时获取关于合成目标捕获分子的位置的信息,并且条形码序列与该位置信息相关联。此时,可以分配ID号。

[0120] 在本技术的实施例中,固定在表面上的所有目标捕获分子可以包括共同的寡核苷酸序列。通过使用荧光标记同时具有与寡核苷酸序列互补的序列的核酸,可以确认目标捕获分子固定的位置(特别是斑点的位置或珠的位置),特别是在暗视野中。此外,在表面上没有上述凹部或突起的情况下,可能难以掌握固定目标捕获分子的位置。在这种情况下,荧光标记使得容易掌握固定目标捕获分子的位置。

[0121] UMI部5可以包括核酸,特别是DNA或RNA,并且更特别是DNA。UMI部分可例如具有5至30个碱基,特别是6至20个碱基,并且更特别是7至15个碱基的序列。

[0122] UMI部5可以形成为具有固定在表面101上的目标捕获分子之间的不同序列。例如,在UMI部具有10个碱基的核酸序列的情况下,UMI序列的类型的数量是4的10次方,即,100万或更多。

[0123] UMI部5可以用于量化目标物质。例如,在目标物质是mRNA的情况下,例如,在后面将描述的分析步骤中,可以将UMI序列添加到通过反转录mRNA获得的cDNA中作为目标物质。通过扩增通过从一个mRNA分子逆转录获得的cDNA而获得的大量cDNA具有相同的UMI序列,但是通过扩增通过从具有与一个mRNA分子相同序列的另一mRNA分子转录而获得的cDNA而获得的大量cDNA具有与来自一个mRNA分子的UMI序列不同的UMI序列。因此,可以通过对具有相同cDNA序列的UMI序列的类型的数量进行计数来确定mRNA的拷贝数量。

[0124] 例如,UMI部5可以被形成为在被固定在一个区域R(例如,斑点或珠)中时在包括相同条形码序列的多个目标捕获分子之间具有不同的序列。即,固定在区域R(例如,斑点或珠)中的多个目标捕获分子可以具有不同的UMI,同时具有相同的条形码序列。

[0125] 目标物质捕获部6包括用于捕获包含在生物粒子中的分子的组分。该组分可以例如是核酸或蛋白质。在组分是核酸的情况下,核酸可以例如具有多聚T序列,以便全面地捕获包含在细胞中的mRNA。可替代地,该核酸可以具有与该目标序列互补的序列。在组分是蛋白质的情况下,蛋白质可以例如是抗体。该组分可以是适体或分子印迹聚合物。

[0126] 目标物质捕获部6可以包括用于捕获包含在细胞中的分子的两种或两种以上组分。目标物质捕获部6可以包括蛋白质和核酸两者,并且例如可以包括抗体和多聚T序列两者。这使得可以同时检测蛋白质和mRNA两者。

[0127] 生物粒子捕获部7包括用于捕获生物粒子的组分,并且具体地包括用于捕获细胞的组分。该组分可以例如是抗体、适体或油烯基(oley1 group)。该抗体可以是结合到存在于生物粒子(诸如细胞或外来体)的表面上的组分(特别是表面抗原)的抗体。适体可以是核酸适体或肽适体。该适体还可以结合到存在于生物粒子(诸如细胞或外来体)的表面上的组分(特别是表面抗原)。油烯基可以结合生物粒子(诸如细胞或外来体),该生物粒子包括脂质双层膜。

[0128] 表面101可以优选地是透明基板的表面。基板可以是完全透明的,或者可以仅在目

标捕获分子固定在其上的部分中是透明的。基板的表面优选是平面的,以使样品在良好条件下与其接触。透明基板可以例如是玻璃基板或树脂基板。基板可以例如是载玻片。透明性使得容易在后面描述的检测步骤和裂解步骤中选择待裂解的生物粒子。

[0129] 例如,通过增加表面101的表面面积,可以增加结合到表面101的分子100的数量和密度。此外,多个分子100可以彼此串联连接。在这种情况下,基板与分子100之间的裂解条件优选地不同于两个分子100之间的裂解条件。当分子在基板与分子100也彼此裂解的状态下彼此裂解时,裂解的分子可以结合至另一相邻的生物粒子。然而,不同的裂解条件使得可以防止裂解的分子结合到另一相邻的生物粒子上。例如,将分子100结合至基板的接头可以通过光刺激可裂解的接头,并且将分子100结合至另一分子100的接头可以通过化学刺激可裂解的接头。相反的情况也是可能的。可替代地,将分子100结合至基板的接头可以通过化学刺激可裂解的接头,并且将分子100结合至另一分子100的接头可以通过另一种类型的化学刺激可裂解的接头。例如,前者可以包括限制性内切核酸酶识别序列,而后者可以包括另一限制性内切核酸酶识别序列。可替代地,前者可以包括二硫键,而后者可以包括限制性内切核酸酶识别序列。此外,分子可以通过氨基酸彼此结合,并且可以通过用于细胞溶解的试剂(例如,蛋白酶K)在后面描述的破坏步骤中彼此裂解(特别是在细胞溶解的同时)。

[0130] (3-2) 捕获步骤

[0131] 在捕获步骤S102中,例如,如图2B所示,通过分子100捕获生物粒子(图2B中的细胞)。具体地,通过分子100的生物粒子捕获部7捕获生物粒子。在捕获步骤S102中,生物粒子和生物粒子捕获部7可以以特定或非特定方式彼此结合。

[0132] 例如,在生物粒子是细胞的情况下,细胞的表面抗原可以结合至生物粒子捕获部7中包含的抗体或适体,使得细胞被分子100捕获。抗体和适体可以是特异性或非特异性的。此外,在这种情况下,细胞的脂质双层膜可以结合到生物粒子捕获部7中包含的油烯基,使得细胞被分子100捕获。

[0133] 可替代地,例如,在生物粒子是外来体的情况下,生物粒子的表面成分(构成脂质双层膜的组分)可以结合至在生物粒子捕获部7中包含的油烯基,使得生物粒子被分子100捕获。可替代地,在这种情况下,外来体的表面成分可以结合到在生物粒子捕获部7中包含的抗体或适体,使得该生物粒子被分子100捕获。

[0134] 捕获步骤S102可以包括将生物粒子施加到表面101的施加步骤。例如,可以以使得包含生物粒子的样品(例如,包含生物粒子的液体)与表面101接触的方式执行施加步骤。例如,可以将包含生物粒子的样品滴在表面101上。

[0135] 在捕获步骤S102中,优选地,结合至一个生物粒子的多个分子可以具有相同的条形码序列。这使得可以将一个条形码序列与一个生物粒子相关联。此外,包含在多个分子中的UMI部优选具有不同的序列。例如,这使得可以确定mRNA的拷贝数。

[0136] 在本技术中,可以将标记分配给生物粒子。例如,在后面描述的裂解步骤中,该标记可以用于选择要从表面释放的生物粒子。分配给生物粒子的标记优选是具有标记的抗体。例如,标记有荧光染料的抗体(在下文中,也称为“荧光染料标记的抗体”)可以结合至生物粒子。图2B中示出了这种抗体的示例。

[0137] 如图2B所示,结合至生物粒子的表面抗原12(特别是特异性结合)的抗体10可以结

合至抗原。抗体10可以用例如荧光染料11标记。通过使用抗体10,例如,在后面描述的检测步骤中,基于从标记抗体的荧光染料产生的荧光,可以选择待裂解的生物粒子。此外,例如,在后面描述的确定步骤中,荧光还可以用于确定是否将生物粒子隔离在微小空间中。

[0138] 荧光染料标记的抗体可以在生物粒子被捕获在表面101上之前结合至生物粒子,或可以在生物粒子被捕获在表面101上之后结合至生物粒子。

[0139] 在本技术中,标记可以分配给分子100。例如,在后面描述的裂解步骤中,该标记可以用于选择要从表面释放的生物粒子。分配给分子100的标记例如是荧光染料。例如,构成分子100的一些核酸可以用荧光染料标记的核酸。

[0140] 此外,在本技术中,结合包括抗体条形码序列的核酸的抗体(在下文中,也称为“核酸结合抗体”)可以结合至生物粒子。抗体条形码序列是用于识别核酸结合抗体的条形码序列。例如,代替或除了参考图2B描述的荧光染料标记的抗体之外,图7所示的核酸结合抗体结合至生物粒子。

[0141] 图7所示的核酸结合抗体包括抗体10和与抗体结合的核酸。例如,如图7所示,核酸包括第一核酸21、第二核酸22和第三核酸23。这些核酸可以按图7所示的顺序排列,或可以按另一顺序排列。

[0142] 第一核酸21可以包括扩增引物序列。由于第一核酸21包括扩增引物序列,所以包括在分子100中的条形码序列部4、唯一分子标识符(UMI)部5等可以在扩增时被分配给后面描述的第二核酸22和第三核酸23。此外,可以分配用于序列处理的序列,例如适配器序列等。

[0143] 第二核酸22可以包括抗体条形码序列。该抗体条形码序列可以用于区分结合到一个生物粒子的核酸结合抗体与结合到另一生物粒子的核酸结合抗体。例如,抗体条形码序列对于每种类型的抗体可以是不同的,或抗体条形码序列对于每种类型的生物粒子可以是不同的。这使得可以识别核酸结合抗体在生物粒子在后面描述的破坏步骤中被破坏之后结合到其上的生物粒子。

[0144] 第三核酸23可以包括多聚A序列。因此,在后面描述的破坏步骤之后,可经由第三核酸23通过分子100的目标物质捕获部6中包括的多聚T序列捕获包括如上所述的第一核酸21和第二核酸22的核酸。然后,通过捕获步骤形成核酸和分子100的复合物。通过扩增复合物,例如,使用第一核酸21,在分子100中生成抗体条码序列指定为第二核酸22的核酸。通过扩增产生的核酸具有抗体条码序列,并且该抗体条码序列例如对于如上所述的每种类型的抗体是不同的,即,与抗体的类型相关联。因此,关于核酸结合抗体的类型和/或数量的信息以抗体条码序列的形式保持在扩增的产物中,并且与抗体条码序列相关联的核酸结合抗体的类型和/或数量可以例如从具有抗体条码序列的核酸的序列和/或数量来识别。这使得可以识别结合到生物粒子(即,细胞等)的核酸结合抗体的类型和数量。例如,可以在后面描述的分析步骤中执行识别。用于识别的扩增产物的序列分析可例如通过NGS进行。

[0145] 捕获步骤S102可以包括用于将生物粒子和生物粒子捕获部彼此结合的孵化步骤。可以根据要使用的生物粒子捕获部的类型来确定诸如孵化时间和温度的孵化条件。

[0146] 在捕获步骤S102之后,可以进行去除尚未结合至分子100的生物粒子的去除步骤。此外,在捕获步骤S102之后,可以进行去除在裂解步骤中不必要的物质(诸如未结合至生物粒子的抗体)的去除步骤。去除步骤可包括使用液体(例如,缓冲液)清洗表面101。

[0147] (3-3) 裂解步骤

[0148] 在裂解步骤S103中,接头1被裂解,并且在捕获步骤S102中捕获的生物粒子从表面101释放。优选地,在裂解步骤S103中,由生物粒子捕获部7维持该生物粒子的捕获状态。可维持捕获状态,直到生物粒子在后面描述的隔离步骤S104中完全隔离,并且例如,可维持捕获状态,直到生物粒子在后面描述的破坏步骤S105中完全破坏。

[0149] 裂解可以在表面101的整个部分上执行,或者可以在表面101的局部部分上执行。在后一种情况下,可以例如基于下面将要描述的检测步骤的检测结果来选择表面的局部部分。

[0150] 可替代地,可以进行裂解以使在表面101上捕获的所有生物粒子从该表面101释放,或者可以进行裂解以使在表面101上捕获的一些生物粒子从该表面101释放。在后一种情况下,可以例如基于下面将要描述的检测步骤的检测结果来选择一些生物粒子。

[0151] 例如,可以基于生物粒子的标记或分子100的标记来选择要从表面101释放的生物粒子。生物粒子的标记物可以例如是构成在上面的部分(3-2)中描述的荧光染料标记的抗体的荧光染料,或存在于生物粒子内部的标记(特别是荧光染料)。分子100的标记可以例如是被分配给在上面的部分(3-2)中描述的分子100的标记,特别是荧光染料。

[0152] 注意,在根据本技术的生物粒子分析方法中,可以在捕获步骤之后执行裂解步骤,而不执行检测步骤。

[0153] 在本技术的实施例中,裂解步骤S103可包括检测从生物粒子产生的光或来自结合至生物粒子的物质的光的检测步骤,以及基于检测步骤中的检测结果裂解接头以使生物粒子从表面101释放的接头裂解步骤。这使得可以例如根据检测结果来选择要从表面101释放的生物粒子。因此,可以在后面描述的分析步骤中从目标中排除不期望的生物粒子,从而提高分析效率。

[0154] 在本技术的另一实施例中,在裂解步骤S103中,可以执行接头裂解步骤,而不执行检测步骤。通过省略检测步骤,可以减少根据本技术的分析方法中的步骤的数量。

[0155] 在下文中,将单独地描述检测步骤和接头裂解步骤。

[0156] (3-3-1) 检测步骤

[0157] 裂解步骤S103可以包括检测源自生物粒子的光(例如,散射光和/或自发荧光)、源自目标捕获分子的光(例如,荧光)、源自结合至生物粒子的抗体的光(例如,荧光)、生物粒子的形式(例如,形态(在亮视野、相位差或暗视野中获取的图像和由图像处理表征的形式,特别是由形态处理获取的形式)、两个或更多个生物粒子(细胞等)彼此结合的状态等)和从关于生物粒子的形态信息预测的生物粒子的特征(例如,细胞类型或细胞状态(活细胞或死细胞))中的任何一个或者两个或两个以上的检测步骤。例如,光、形式、特征等可通过包括物镜的观察装置(具体地,显微镜装置)来检测。光、形式和特征可以例如通过成像元件或通过光检测器来检测。基于在检测步骤中检测光、形式、特征等的结果,可以选择将在后面描述的接头裂解步骤中裂解的目标捕获分子,或者可以选择在裂解步骤S104中从表面101释放的生物粒子。例如,成像元件可以获取表面101的图像或在表面101上捕获的生物粒子的图像,并且可以基于所获取的图像选择要释放的生物粒子。

[0158] (3-3-2) 接头裂解步骤

[0159] 裂解步骤S103包括裂解接头1的接头裂解步骤。通过裂解接头1,目标捕获分子结

合到其上的生物粒子从表面101释放。例如,如图2C所示,通过裂解分子100的接头1,分子100从表面101释放,因此,生物粒子也从表面101释放。

[0160] 在裂解步骤S103中,可以例如通过刺激(诸如化学刺激或光刺激)裂解接头。光刺激特别适合于选择性地刺激特定的窄范围。

[0161] 裂解步骤S103中的刺激可以由刺激施加装置提供。刺激施加装置的驱动可例如由信息处理装置(诸如通用计算机)控制。例如,信息处理装置可驱动刺激施加装置以选择性地将刺激施加至待释放的生物粒子的位置。下面将描述可以采用的刺激施加装置的示例。

[0162] 为了选择性地将光刺激施加到细胞的位置,可以使用光照射装置作为刺激施加装置。例如,光照射装置可以是数字微镜装置(DMD)或液晶显示装置。表面101上的选定位置可由构成DMD的微镜用光照射。液晶显示装置可以例如是反射液晶显示器,并且其具体示例可以包括SXRD(索尼公司)。通过控制液晶显示装置的液晶,表面101上的选定位置可以用光照射。

[0163] 可替代地,液晶快门或空间光调制器可以用于选择性地将光刺激施加到细胞的位置。液晶快门或空间光调制器还可以向选定的位置施加光刺激。

[0164] 本领域技术人员可根据目标捕获分子包括何种类型的接头适当地选择要照射的光的波长。

[0165] 可以通过使裂解接头1的试剂与表面101接触来施加化学刺激。如上所述,可以根据接头1的类型来确定试剂。

[0166] 例如,在接头1包括二硫键的情况下,试剂可以是能够裂解键的还原剂,并且其示例可以包括三(2-羧乙基)膦(TCEP)、二硫苏糖醇(DTT)、和2-巯基乙醇。例如,在使用TCEP的情况下,在50mM下进行反应约15分钟。

[0167] 例如,在接头1是包括限制性内切核酸酶识别序列的核酸的情况下,试剂可以是对应于每个限制性内切核酸酶识别序列的限制性内切核酸酶。1U的限制性内切核酸酶活性原则上是在50 μ l的每种内切核酸酶反应溶液中在37 $^{\circ}$ C下1小时完全降解1 μ g的 λ DNA的内切核酸酶的量,并且内切核酸酶的量可以根据限制性内切核酸酶识别序列的量进行调节。

[0168] 可以将通过裂解步骤S103中的裂解而释放的至少一种生物粒子收集在诸如缓冲液的液体中。液体可以例如是亲水性液体。通过收集获得的包含生物粒子的液体可用于后面描述的隔离步骤S104中。为了收集释放的生物粒子,可以使用当诸如缓冲液的液体流动时产生的流体力,在振动下,生物粒子可以漂浮在液体中,或者使用重力等,生物粒子可以漂浮在液体中。振动可以例如是分析基板102的振动或包含生物粒子的液体的振动。此外,为了使用重力将生物粒子漂浮在液体中,可以移动分析基板102,使得表面101面向重力的方向。

[0169] (3-4) 隔离步骤

[0170] 在隔离步骤S104中,在裂解步骤中从表面101释放的生物粒子被隔离在微小空间中。通过隔离,分子100可以结合到例如包括在生物粒子中的目标物质。这使得例如可以将目标物质与包括在分子100中的条形码序列相关联。使用条形码序列信息,可以分析目标物质,特别是单个细胞。

[0171] 微小空间可以例如是乳液粒子中的空间或阱中的空间。优选地,在隔离步骤S104中,在一个乳液粒子或一个阱中隔离一个生物粒子(特别是至少一个分子100结合至其上的

一个生物粒子)。

[0172] 在本技术的实施例中,隔离步骤S104可以包括确定是否将生物粒子隔离在微小空间中的确定步骤,以及隔离在确定步骤中被确定为隔离在微小空间中的生物粒子的粒子隔离步骤。这使得可以仅隔离预期的生物粒子。因此,例如,可以在后面描述的分析步骤中从目标中排除不期望的生物粒子,从而提高分析效率。

[0173] 该确定可以例如基于从生物粒子生成的光(例如,散射光和/或自发荧光)、从结合至生物粒子的物质生成的光、或形态图像来执行。结合至生物粒子的物质可以例如是目标捕获分子,或可以是结合至生物粒子的抗体(特别是荧光染料标记的抗体)。从生物粒子生成的散射光可以例如是前向散射光和/或侧向散射光。可以从通过检测散射光获取的信号的高度和/或区域值来检测双峰(doublet)。可以基于形态图像信息确定单个细胞。生物粒子是否是死细胞可以在用死细胞染色试剂染色死细胞之后由散射光和/或形态图像或荧光来确定,从而去除死细胞。在本技术中,确定步骤可以在隔离步骤之前立即执行,从而使得可以可靠地仅隔离被分配条形码的单个细胞。

[0174] 在本技术的另一实施例中,可以执行粒子隔离步骤,而不执行确定步骤。通过省略确定步骤,可以减少根据本技术的分析方法中的步骤的数量。

[0175] 在本技术的另一实施例中,确定步骤可以在上述部分(3-3-1)中描述的检测步骤或上述部分(3-3-2)中描述的接头裂解步骤中进行,而不是在隔离步骤中进行。在这种情况下,将作为检测步骤或接头裂解步骤中的确定结果而选择的生物粒子或生物粒子群进行后面描述的粒子隔离步骤。在这种情况下,不需要使用诸如细胞分类器的装置。

[0176] 在下文中,将描述确定步骤和粒子隔离步骤。

[0177] (3-4-1) 确定步骤

[0178] 在确定步骤中,确定在步骤S104中释放的生物粒子是否被隔离在微小空间中。如上所述,可以基于从生物粒子生成的光或从结合至生物粒子的物质生成的光进行确定。

[0179] 确定步骤可以例如包括用光照射生物粒子的照射步骤和检测通过照射生成的光的检测步骤。

[0180] 照射步骤可例如通过用光照射生物粒子的光照射单元执行。光照射单元可例如包括发射光的光源。此外,光照射单元可包括将光会聚在生物粒子上的物镜。光源可以由本领域技术人员根据分析目的进行适当选择,其示例可以包括激光二极管、SHG激光器、固态激光器、气体激光器、高亮度LED、卤素灯及其两种或更多种的组合。如果有必要,除了光源和物镜之外,光照射单元还可以包括另一光学元件。

[0181] 检测步骤可例如通过检测单元进行,该检测单元检测从生物粒子或结合至生物粒子的物质生成的光。例如,检测单元可以检测通过光照射单元照射光(例如,散射光和/或荧光)生成的来自生物粒子或结合至生物粒子的物质的光。检测单元可例如包括会聚从生物粒子生成的光的聚光透镜和检测器。作为检测器,可以使用PMT、光电二极管、CCD、CMOS等,但是检测器不限于此。如果有必要,除了聚光透镜和检测器之外,检测单元还可以包括另一光学元件。例如,检测单元可以进一步包括分光单元。构成分光单元的光学组件的示例可包括光栅、棱镜和滤光器。分光单元可例如检测具有将被检测的波长的光和具有另一波长的光。检测单元可通过光电转换将检测到的光转换为模拟电信号。检测单元还可以进一步通过AD转换将模拟电信号转换为数字电信号。

[0182] 确定步骤可以由基于在检测步骤中检测的光执行关于是否确定生物粒子的确定处理的确定单元来执行。由确定单元执行的处理可以例如由诸如通用计算机的信息处理装置(具体地,包括在信息处理装置中的处理单元)实现。

[0183] (3-4-2) 粒子隔离步骤

[0184] 隔离步骤S104包括将生物粒子隔离在微小空间中的粒子隔离步骤。在本技术中,微小空间可以指具有能够容纳待分析的一个生物粒子的尺寸的空间。可以根据诸如生物粒子的尺寸的因素适当地确定尺寸。该微小空间可以具有能够容纳两个或更多个待分析的生物粒子的尺寸。然而,在这种情况下,不仅一个生物粒子而且两个或更多个生物粒子可以被容纳在一个微小空间中。容纳有两个或更多个生物粒子的微小空间中的生物粒子可在后面描述的破坏步骤中从要被破坏的目标中排除,或者可在将在后面描述的分析步骤中从要被分析的目标中排除。

[0185] 此外,例如,可以在后面描述的破坏步骤中生成目标捕获分子和目标物质的复合物。在本技术中使用的多个微小空间优选地彼此间隔开,使得在一个微小空间中生成的复合物不转移到另一微小空间。如上所述间隔开的微小空间的示例可以包括阱中的空间和乳液粒子中的空间。即,在本技术的优选实施例中,微小空间可以是阱中的空间和乳液粒子中的空间。在下文中,将单独描述在微小空间是阱中的空间的情况下的粒子隔离步骤的示例和在微小空间是乳液粒子中的空间的情况下的粒子隔离步骤的示例。

[0186] (3-4-3) 在微小空间是阱中的空间的情况下

[0187] 图4中示出了用于执行粒子隔离步骤的阱的示例的示意图。如图4所示,多个阱40,例如,每个具有能够容纳一个生物粒子的尺寸,可以形成在基板41的表面中。通过将以上部分(3-4)中描述的裂解步骤中获得的含有生物粒子的液体例如从任何类型的喷嘴42施加到基板41的表面上,生物粒子43被隔离在阱40中的空间中,如图4所示。以这种方式,一个生物粒子可以进入一个阱中的空间,使得该生物粒子被隔离在微小空间中。

[0188] 当如在图4所示的示例中将含有多个生物粒子的液体施加到其中形成阱的基板上时,可以进行粒子隔离步骤,而不进行在以上部分(3-4-1)中描述的确定步骤。

[0189] 另外,当进行以上部分(3-4-1)中描述的确定步骤时,例如,可以使用用于将一个生物粒子放入一个阱中的装置,诸如细胞分类器或单细胞分配器。对于该装置,其中形成多个阱的基板(例如,板)也可以用于隔离生物粒子。作为装置,可以使用市售的装置。该装置可以例如包括用光照射生物粒子的光照射单元、检测来自生物粒子的光的检测单元、基于所检测的光来确定是否将生物粒子放入阱中的确定单元、以及将被确定为放入阱中的生物粒子分配到阱中的分配单元。

[0190] 光照射单元和检测单元执行检测步骤,并且确定单元执行确定步骤。分配单元例如包括微流体芯片,该微流体芯片具有形成包含生物粒子的液滴的喷嘴。

[0191] 该装置根据确定单元的确定结果操作微流体芯片的位置,以将包含一个生物粒子的液滴放置在预定阱中。可替代地,该装置根据确定单元的确定结果使用施加到液滴的电荷来控制从喷嘴排放的包含生物粒子的液滴前进的方向。该控制使得可以将包含一个生物粒子的液滴放置在预定阱中。以这种方式,将一个生物粒子分配到一个阱中。

[0192] 例如,如图5所示,从设置在装置的微流体芯片中的喷嘴52排放包含生物粒子的液滴。通过光照射单元54利用光(例如,激光L)照射包含在液滴中的生物粒子,并且然后通过

检测单元55进行检测步骤,并且检测光(荧光F)。然后,确定单元(未示出)基于所检测的光执行确定步骤。然后,根据确定结果,分配单元使用施加至液滴的电荷控制液滴前进的方向。该控制使得可以将包含预期生物粒子的液滴收集在预定的阱中。因此,将一个生物粒子分配到一个阱中。

[0193] 通过进行该确定步骤,可以例如识别根据检测信号的生物粒子所属的细胞群、分配条形码的生物粒子、或包含单线态生物粒子的液滴。这使得可以仅收集包含预期生物粒子的液滴。因此,不需要在后面描述的分析步骤中排除数据,从而提高分析效率。

[0194] 设置在一个基板(板)中的阱的数量可以例如是1至1000,具体地10至800,并且更具体地30至500,但是可以由本领域技术人员适当地选择阱的数量。

[0195] (3-4-4)在微小空间是乳液粒子中的空间的情况下

[0196] 乳液粒子可以例如使用微通道生产。该装置例如包括形成乳液的分散体的第一液体流过的通道和形成分散介质的第二液体流过的通道。第一液体可以包含生物粒子。该装置还包括两种液体彼此接触以形成乳液的区域。下面将参考图6描述微通道的示例。

[0197] 图6所示的微通道包括通道61和通道62-1和62-2,含有生物粒子的第一液体流过通道61,第二液体流过通道62-1和62-2。第一液体形成乳液粒子(分散物),第二液体形成乳液的分散介质。通道61和通道62-1和62-2接合在一起,并且在该接合点处形成乳液粒子。然后,将生物粒子63隔离到乳液粒子中。例如,乳液粒子的尺寸可以通过控制这些通道中的流速来控制。

[0198] 第一液体和第二液体彼此不混溶以形成乳液。例如,第一液体可以是亲水性液体,第二液体可以是疏水性液体,或者反之亦然。

[0199] 此外,图6所示的微通道可以包括用于将生物粒子破坏物质引入乳液粒子的通道64。通过配置微通道,使得通道64在紧接在接合点之前接合通道61,可以防止在形成乳液粒子之前生物粒子被生物粒子破坏物质破坏。

[0200] 接下来,将参考图8A和图8B描述用于更有效地形成包含各自包含一个生物粒子的乳液粒子的乳液的装置的示例。该乳液形成装置使得可以以非常高的概率将一个生物粒子隔离在一个乳液粒子中,从而减少空乳液粒子的数量。此外,该乳液形成装置使得可以增大一个生物粒子与一个条形码序列一起被隔离在一个乳液粒子中的概率。

[0201] 图8A是用于在装置中形成乳液粒子的微芯片的示例。在图8A中示出的微芯片150包括生物粒子流过的主通道155和在生物粒子之中收集要收集的粒子通过的收集通道159。微芯片150包括粒子分类部157。图9中示出了粒子分类部157的放大图。如图9的A所示,粒子分类部157包括将主通道155和收集通道159彼此连接的连接通道170。能够将液体供应到连接通道170的液体供应通道161连接到连接通道170。如上所述,微芯片150具有包括主通道155、收集通道159、连接通道170、以及液体供应通道161的通道结构。

[0202] 图8B是示出了在图8A中所示的微芯片150中如何形成乳液粒子和如何将生物粒子隔离在所形成的乳液粒子中的示意图。

[0203] 此外,如图8A所示,微芯片150构成生物粒子分类装置200的一部分,该生物粒子分类装置200除了微芯片之外还包括光照射单元191、检测单元192和控制单元193。如图10所示,控制单元193可包括信号处理单元194、确定单元195和分类控制单元196。生物粒子分类装置200用作上述乳液形成装置。

[0204] 如图11所示,为了形成包含各自包含一个预期生物粒子的乳液粒子的乳液,例如,可以在微芯片150中执行以下步骤:使包含生物粒子的第一液体流过主通道155的流过步骤S201,确定流过主通道155的生物粒子是否是要收集的粒子的确定步骤S202,以及将要收集的粒子收集至收集通道159中的收集步骤S203。确定步骤S202对应于以上部分(3-4-1)中描述的确定步骤。收集步骤S203对应于在以上部分(3-4-2)中描述的粒子隔离步骤。

[0205] 下面将描述每个步骤。

[0206] (流过步骤)

[0207] 在流过步骤S201中,含有生物粒子的第一液体流过主通道155。第一液体在主通道155中从接合部162流向粒子分类部157。第一液体可以是包括含有生物粒子的样品液和鞘液(sheath liquid)的层流,并且具体地,可以是其中样品液的周边被鞘液包围的层流。下面将描述用于形成层流的通道结构。

[0208] 注意,鞘液可例如包含生物粒子破坏组分,例如细胞溶解组分。这使得可以掺入乳液粒子中的生物粒子破坏组分在后面描述的破坏步骤中破坏乳液粒子中的生物粒子。细胞溶解组分可以是细胞溶解酶,例如蛋白酶K。例如,在将细胞捕获在含有蛋白酶K的乳液粒子中之后,将乳液粒子放置在预定温度(例如,37°C至56°C),例如1小时或更短,特别是小于1小时,以裂解细胞。注意,尽管蛋白酶K甚至在37°C或更低温度下仍具有活性,但考虑到在采用这种较低温度的情况下蛋白酶K的细胞溶解特性降低,蛋白酶K可以例如被孵化一夜。此外,鞘液可包含表面活性剂(例如,SDS、Sarkosyl、Tween 20或Triton X-100)。表面活性剂使得可以增强蛋白酶K的活性。

[0209] 此外,鞘液可以不包含生物粒子破坏组分。在这种情况下,生物粒子可能被物理破坏。作为物理破坏方法,例如,可以采用光学处理(例如,光学裂解)或热处理(例如,热裂解)。例如,通过用激光照射粒子,在乳液粒子中形成等离子体或空化气泡,可以进行光学处理。粒子的热破坏可以通过加热乳液粒子来实现。

[0210] 微芯片150具有样品液入口151和鞘液入口153。将包含生物粒子的样品液和不包含生物粒子的鞘液从这些入口分别引入样品液通道152和鞘液通道154中。

[0211] 微芯片150具有样品液流过的样品通道152和鞘液流过的鞘液通道154在接合部162处接合在一起以变为主通道155的通道结构。样品液和鞘液在接合部162处接合在一起,例如,以形成样品液的周边被鞘液包围的层流。图8B中示出了形成层流的示意图。如图8B所示,形成层流,使得从样品通道152引入的样品液由从鞘液通道154引入的鞘液包围。

[0212] 优选地,生物粒子在层流中大致在一条线上对齐。例如,如图8B所示,生物粒子P可在样品液中大致在一条线上对齐。如上所述,根据本技术的通道结构形成包括大致在一条线上流动的生物粒子的层流。

[0213] 层流通过主通道155流向粒子分类部157。优选地,生物粒子在主通道155中并排流动。因此,当在下面要描述的检测区域156中照射光时,通过用光照射一个微粒生成的光和通过用光照射另一微粒生成的光可以被容易地区分。

[0214] (确定步骤)

[0215] 在确定步骤S202中,确定流过主通道155的生物粒子是否是要收集的粒子。该确定可以由确定单元195执行。确定单元195可以基于由光照射单元191用光照射生物粒子生成的光进行确定。以下将更详细地描述确定步骤S202的示例。

[0216] 在确定步骤S202中,光照射单元191用光(例如,激发光)照射在微芯片150中流过主通道155(特别是检测区域156)的生物粒子,并且检测单元192检测通过照射光生成的光。基于由检测单元192检测的光的特征,包括在控制单元193中的确定单元195确定生物粒子是否是要收集的粒子。例如,确定单元195可执行基于散射光的确定、基于荧光的确定、或基于图像(例如,暗视野图像、亮视野图像和相位差图像中的一个或多个)的确定。在后面描述的收集步骤S203中,控制单元193控制微芯片150中的流动以收集要被收集到收集通道159中的粒子。

[0217] 光照射单元191用光(例如,激发光)照射流过微芯片150中的通道的生物粒子。光照射单元191可包括发射光的光源和将激发光会聚到在检测区域中流动的微粒上的物镜。光源可以由本领域技术人员根据分析目的进行适当选择,其示例可以包括激光二极管、SHG激光器、固态激光器、气体激光器、高亮度LED、卤素灯及其两种或更多种的组合。如果有必要,除了光源和物镜之外,光照射单元还可以包括另一光学元件。

[0218] (基于荧光信号和/或散射光信号的分类目标的确定)

[0219] 在本技术的实施例中,检测单元192检测由光照射单元191照射光从微粒生成的散射光和/或荧光。检测单元192可包括收集从生物粒子生成的荧光和/或散射光的聚光透镜和检测器。作为检测器,可以使用PMT、光电二极管、CCD、CMOS等,但是检测器不限于此。如果有必要,检测单元192可包括除了聚光透镜和检测器之外的另一光学元件。例如,检测单元192可以进一步包括分光单元。构成分光单元的光学组件的示例可包括光栅、棱镜和滤光器。分光单元可例如检测具有要检测的波长的光和具有另一波长的光。检测单元192可通过光电转换将检测到的光转换为模拟电信号。检测单元192可进一步通过AD转换将模拟电信号转换成数字电信号。

[0220] 包括在控制单元193中的信号处理单元194可处理由检测单元192获得的数字电信号的波形,以生成关于用于由确定单元105确定的光的特征的信息(数据)。作为关于光的特征的信息,信号处理单元194可以例如从数字电信号的波形获取波形的宽度、波形的高度和波形的面积中的一个、两个或三个。此外,关于光的特征的信息可以例如包括检测光的时间。具体地,在检测散射光和/或荧光的实施例中,可执行由上述信号处理单元194执行的处理。

[0221] 基于通过用光照射流过通道的生物粒子而生成的光,包括在控制单元193中的确定单元195确定生物粒子是否是要收集的粒子。

[0222] 在检测散射光和/或荧光的实施例中,由控制单元193处理由检测单元192获得的数字电信号的波形,并且然后确定单元195基于关于通过处理生成的光的特征的信息确定生物粒子是否是要收集的粒子。例如,在基于散射光进行确定的情况下,可以指定生物粒子的关于其外部形状和/或内部结构的特征,并且可以基于该特征确定生物粒子是否是要收集的粒子。此外,例如,通过预先预处理诸如细胞的生物粒子,还可以基于与流式细胞术中使用的特征相似的特征来确定生物粒子是否是要收集的粒子。此外,例如,通过用抗体或染料(特别是荧光染料)标记诸如细胞的生物粒子,还可以基于生物粒子的表面抗原的特征确定生物粒子是否是要收集的粒子。

[0223] (基于亮视野图像和/或相位差图像的分类目标的确定)

[0224] 在本技术的另一实施例中,检测单元192可获取由光照射单元191照射光生成的亮

视野图像和/或相位差图像。在该实施例中,例如,光照射单元191可包括卤素灯,并且检测单元192可包括CCD或CMOS。例如,通过卤素灯用光照射生物粒子,使得CCD或CMOS可获取照射的生物粒子的亮视野图像和/或相位差图像。

[0225] 在获取亮视野图像和/或相位差图像的实施例中,包括在控制单元193中的确定单元195基于所获取的亮视野图像和/或相位差图像确定生物粒子是否是要收集的粒子。例如,可以基于该生物粒子(特别是细胞)的形式、尺寸、以及颜色中的一种或者两种或更多种的组合来确定该生物粒子是否是要收集的粒子。

[0226] (基于暗视野图像的分类目标的确定)

[0227] 在本技术的另一实施例中,检测单元192可获取由光照射单元191照射光生成的暗视野图像。在该实施例中,例如,光照射单元191可包括激光光源,并且检测单元192可包括CCD或CMOS。例如,通过激光用光照射生物粒子,使得CCD或CMOS可获取照射的微粒的暗视野图像(例如,荧光图像)。

[0228] 在获取暗视野图像的实施例中,包括在控制单元193中的确定单元195基于所获取的暗视野图像确定生物粒子是否是要收集的粒子。例如,可以基于该生物粒子(特别是细胞)的形式、尺寸、以及颜色中的一种或者两种或更多种的组合来确定该生物粒子是否是要收集的粒子。

[0229] 在上述“基于荧光信号或/和散射光信号的分类目标的确定”、“基于亮视野图像的分类目标的确定”和“基于暗视野图像的分类目标的确定”中的任一个中,检测单元192可以例如是成像元件,其中,层叠装备有CMOS传感器的基板和装备有数字信号处理器(DSP)的基板。通过将成像元件的DSP操作为机器学习单元,成像元件可操作为所谓的AI传感器。包括成像元件的检测单元192可例如基于学习模型来确定生物粒子是否是要收集的粒子。此外,可以在执行根据本技术的方法的同时实时更新学习模型。例如,DSP可在重置CMOS传感器的像素阵列单元的同时、在曝光像素阵列单元的同时、或在从像素阵列单元的每个单位像素中读出像素信号的同时执行机器学习处理。作为AI传感器操作的成像元件的示例可以包括在国际专利申请公开第2018/051809号中描述的成像装置。在AI传感器用作成像元件的情况下,从图像阵列获取的原始数据被原样学习,并且因此,以较快速度执行分类相关的确定处理。

[0230] 该确定可以例如基于关于光的特征的信息是否满足预先指定的标准来执行。该标准可以是指示该生物粒子是否是要收集的粒子的标准。该标准可以由本领域技术人员适当地设置,并且可以例如是与光的特征相关的标准,诸如在涉及流式细胞术等的技术领域中使用标准。

[0231] 可以朝向检测区域156中的一个位置照射光,或者可以朝向检测区域156中的多个位置中的每一个照射光。例如,微芯片150可被配置为使得光朝向检测区域156中的两个不同位置的每一个照射(即,检测区域156中存在用光照射的两个位置)。在这种情况下,例如,基于通过在一个位置用光照射生物粒子生成的光(例如,荧光和/或散射光),可以确定生物粒子是否是要收集的粒子。此外,基于通过在一个位置照射光而生成的光被检测的时间与通过在另一位置照射光而生成的光被检测的时间之间的差,可以计算生物粒子在通道中的速度。为了计算,可以预先确定两个照射位置之间的距离,并且可以基于两个检测时间和距离之间的差来确定生物粒子的速度。此外,可以基于速度精确地预测生物粒子到达下面将

描述的粒子分类部157的时间。通过精确地预测到达时间,可以优化形成进入收集通道159的流动的定时。此外,在特定生物粒子到达粒子分类部157的时间和在该特定生物粒子到达粒子分类部157之前或之后的生物粒子到达粒子分类部157的时间之间的差等于或小于预定阈值的情况下,可以确定没有收集该特定生物粒子。在特定生物粒子与该特定生物粒子之前或之后的生物粒子之间的距离较小的情况下,很有可能在吸入该特定生物粒子时,将该特定生物粒子之前或之后的微粒与该特定生物粒子一起收集。在很可能将生物粒子收集在一起的情况下,确定没有收集特定生物粒子,从而可以防止收集特定生物粒子之前或之后的生物粒子。因此,可以增大预期生物粒子与所收集的生物粒子的比率。例如,日本专利申请公开第2014-202573号中描述了朝向检测区域156中的两个不同位置中的每一个照射光的微芯片和包括该微芯片的装置的具体示例。

[0232] 注意,控制单元193可控制光照射单元191的光照射和/或检测单元192的光检测。此外,控制单元193可控制用于将流体供应至微芯片150中的泵的驱动。控制单元193可以例如包括存储有用于使装置执行隔离步骤的程序和OS的硬盘、CPU和存储器。例如,控制单元193的功能可以通用计算机实现。该程序可以记录在诸如微型SD存储卡、SD存储卡或闪存的记录介质中。记录在记录介质中的程序可以通过设置在生物粒子分类装置200中的驱动器(未示出)读出,并且然后控制单元193可以根据读出的程序使生物粒子分类装置200执行隔离步骤。

[0233] (收集步骤)

[0234] 在收集步骤S203中,将在确定步骤S202中确定为要收集的粒子的生物粒子收集到收集通道159中。在收集步骤S203中,当要收集的粒子包含在第一液体中时,将要收集的粒子收集在收集通道中与第一液体不可混溶的第二液体中。因此,可在收集通道159中形成包含第二液体作为分散介质和第一液体作为分散体的乳液,在乳液的每个乳液粒子中包含一个要收集的粒子。这使得可以将预期生物粒子隔离在乳液粒子中的空间中。

[0235] 例如,如图8B所示,当要收集的粒子P包含在由图16中的白色表示的第一液体中时,将要收集的粒子P收集在由图16中的灰色表示的第二液体中。因此,形成乳液粒子190,并且将要收集的一个粒子P隔离在一个乳液粒子190中的空间中。

[0236] 在下文中,将更详细地描述收集步骤。

[0237] 在微芯片150的粒子分类部157中执行收集步骤S203。在粒子分类部157中,通过主通道155的层流被划分为两个废料通道158。图8A中示出的粒子分类部157具有两个废料通道158,但是分支通道的数量不限于两个。例如,粒子分类部157可具有一个或多个分支通道(例如,两个、三个或四个分支通道)。分支通道可以被配置为在如图8A中的一个平面上以Y形状分支,或者可以被配置为三维地分支。

[0238] 仅当要收集的粒子流入粒子分类部157中时,形成从主通道155通过连接通道170进入收集通道159的流动,使得要收集的粒子被收集到收集通道159中。在图9中示出了粒子分类部157的放大图。如图9A所示,主通道155和收集通道159经由与主通道155同轴的连接通道170彼此连通。如图9B所示,要收集的粒子通过连接通道170流入收集通道159。如图9C所示,不是要收集的粒子的微粒流入废料通道158中。

[0239] 图12A和图12B是连接通道170附近的放大图。图12A是连接通道170附近的示意性透视图。图12B是在通过液体供应通道161的中心线和连接通道170的中心线的平面上的示

意性截面图。连接通道170包括接近检测区域156的通道170a(在下文中,也称为上游连接通道170a)、接近收集通道159的通道170b(在下文中,也称为下游连接通道170b)、以及连接通道170与液体供应通道161之间的连接部分170c。液体供应通道161被设置为大致垂直于连接通道170的轴线。在图12A和图12B中,两个液体供应通道161被设置为在连接通道170的大致中心位置处彼此面对,但是可以仅设置一个液体供应通道。

[0240] 上游连接通道170a的截面的形状和尺寸可以与下游连接通道170b的截面的形状和尺寸相同。例如,如图12A和图12B所示,上游连接通道120a的截面和下游连接通道120b的截面两者可以大致为圆形,同时具有相同的尺寸。可替代地,这两个截面都可以是四边形的(例如,正方形或矩形),同时具有相同的尺寸。

[0241] 第二液体从两个液体供应通道161供应到连接通道170,如图12B中的箭头所示。第二液体从连接部分170c流至上游连接通道170a和下游连接通道170b两者。

[0242] 在不执行收集步骤的情况下,第二液体如下流动。

[0243] 流入上游连接通道170a中的第二液体从连接至主通道155的连接通道170的表面出来,并且然后分开地流入两个废料通道158中。因为第二液体如上所述从连接表面出来,所以可以防止不需要被收集到收集通道159中的第一液体和微粒通过连接通道170进入收集通道159。

[0244] 流至下游连接通道170b的第二液体流入收集通道159中。因此,收集通道159填充有第二液体,并且第二液体用作例如用于形成乳液的分散介质。

[0245] 在也执行收集步骤的情况下,第二液体可从两个液体供应通道161供应到连接通道170。然而,由于收集通道159中的压力的变化,具体地,通过在收集通道159中生成负压,形成通过连接通道170从主通道155到收集通道159的流动。即,形成依次通过上游连接通道170a、连接部分170c、以及下游连接通道170b从主通道155至收集通道159的流动。因此,要收集的粒子在被第一液体包围时被收集在收集通道159中的第二液体中。通过执行收集步骤,例如,可以在收集通道159中或者例如经由通道在连接至收集通道末端163的容器中形成乳液。

[0246] 上游连接通道120a的截面的形状和/或尺寸可不同于下游连接通道120b的截面的形状和/或尺寸。图13A和图13B示出了这两个通道具有不同尺寸的示例。如图13A和图13B所示,连接通道180包括靠近检测区域156的通道180a(在下文中,也称为上游连接通道180a)、靠近收集通道159的通道180b(在下文中,也称为下游连接通道180b)、以及连接通道180与液体供应通道161之间的连接部分180c。上游连接通道180a的截面和下游连接通道180b的截面都具有大致圆形的形状,但是后者的截面具有比前者的截面更大的直径。通过使后者的截面的直径大于前者的截面的直径,与前者和后者的直径相同的情况相比,可以更有效地防止在微粒借助于如上所述的负压而被分类之后立即被分类到收集通道159中的要收集的粒子通过连接通道180被排放到主通道155。

[0247] 例如,在上游连接通道180a的截面和下游连接通道180b的截面两者都是四边形的情况下,后者的截面具有比前者的截面更大的面积,如上所述,从而可以更有效地防止已经收集的微粒通过连接通道180排放到主通道155。

[0248] 在收集步骤S203中,由于收集通道159中的压力的变化,通过连接通道将要收集的粒子收集到收集通道中。收集可例如通过如上所述在收集通道159中生成负压来进行。例

如,当通过附接至微芯片150的外部的致动器197(具体地,压电致动器)使限定收集通道159的壁变形时,可生成负压。进入收集通道159的流动可以由负压形成。为了生成负压,例如,致动器197可附接至微芯片150的外部,使得收集通道159的壁可以变形。壁的变形使得可以改变收集通道159的内部空间并生成负压。致动器197可以例如是压电致动器。当将要收集的粒子吸入收集通道159中时,构成层流的样品液或者构成层流的样品液和鞘液也可以流入收集通道159中。以这种方式,要收集的粒子在粒子分类部157中被分类并且被收集至收集通道159中。

[0249] 要收集的粒子在被第一液体包围时被收集在收集通道159中与第一液体不混溶的第二液体中。因此,如上所述在收集通道159中形成含有作为分散介质的第二液体和作为分散体的第一液体的乳液。

[0250] 为了防止不是要收集的粒子的生物粒子通过连接通道170进入收集通道159,连接通道170设置有液体供应通道161。与流过主通道155的液体(样品液和鞘液)不混溶的第二液体从液体供应通道161被引入到连接通道170。

[0251] 从连接通道170朝向主通道155的流动由被引入到连接通道170中的第二液体的一部分形成,以防止要收集的粒子之外的生物粒子进入收集通道159。从连接通道170朝向主通道155流动的第二液体与第一液体类似地流过废料通道158,而不是流入主通道155,这是由于第一液体通过主通道155流到废料通道158。

[0252] 注意,引入到连接通道170的第二液体的剩余部分流入收集通道159中。因此,收集通道159可填充有第二液体。

[0253] 收集通道159可以填充有与第一液体不混溶的第二液体。为了用第二液体填充收集通道159的内部,可将第二液体从液体供应通道161供应至连接通道170。通过供应第二液体,第二液体从连接通道170流到收集通道159,并且因此,收集通道159可填充有第二液体。

[0254] 以层流入废料通道158的液体可在废料通道端160被排放到微芯片。收集在收集通道159中的目标粒子可以在收集通道末端161被排放到微芯片。

[0255] 例如,如图14所示,容器171可经由诸如管172的通道连接至收集通道末端163。如图14所示,将包含第一液体和第二液体的乳液收集到容器171中,第一液体包含作为分散体的要收集的粒子,第二液体作为分散介质。以这种方式,根据本技术的实施例,生物粒子分类装置200可以包括用于收集包含要收集到容器中的粒子的乳液的通道。

[0256] 此外,当在关闭收集通道末端163的状态下执行收集操作时,多个乳液粒子可被保持在收集通道159中。在完成收集操作之后,可以在收集通道159中连续地执行测定,诸如单细胞分析。例如,可以在收集通道159中执行后面描述的破坏步骤。然后,在破坏步骤中,目标物质可以结合至目标捕获分子。

[0257] 如上所述,在本技术中使用的微芯片中,主通道可以分支为连接通道和至少一个废料通道。该至少一个废料通道是除要收集的粒子之外的生物粒子流过的通道。

[0258] 此外,如图8A、图8B和图9所示,在本技术中使用的微芯片中,主通道、连接通道和收集通道可以以直线排列。在这三个通道以直线排列(特别是同轴布置)的情况下,与例如连接通道和收集通道相对于主通道成角度排列的情况相比,可以更有效地执行收集步骤。例如,可以减少将要收集的粒子引导至连接通道所需的吸入量。

[0259] 此外,如图1和图2所示,在本技术中使用的微芯片中,生物粒子在主通道中大致排

列成一行的同时朝向连接通道流动。因此,可以减少收集步骤中的吸入量。

[0260] 注意,在本技术中使用的微芯片的通道配置不限于图8A所示的通道配置。例如,在本技术中使用的微芯片中,在引入液体的入口和从其排放液体的出口之中的两个或更多个入口和/或出口,优选地,所有入口和/或出口可形成在一个表面中。图16示出了如上所述形成入口和出口的微芯片。在图16所示的微芯片250中,所有的收集通道末端163和两个分支通道末端160均形成在形成样品液入口151和鞘液入口153的表面上。此外,用于将液体引入到引入通道161的引入通道入口164形成在表面中。以这种方式,在用于分类生物粒子的微芯片250中,所有液体引入的入口和液体排放的出口形成在一个表面中。这使得易于将该芯片附接到生物粒子分类装置200。例如,与进口和/或出口形成在两个或更多个表面中的情况相比,在入口和出口形成在一个表面中的情况下,容易将设置在生物粒子分类装置200中的通道和用于分类生物粒子的微芯片250中的通道彼此连接。

[0261] 注意,在图16中,鞘液通道154的一部分由虚线表示。由虚线表示的部分设置在低于由实线表示的样品液通道152的位置(在由箭头表示的光轴方向上偏移的位置),并且这些通道在由虚线表示的通道和由实线表示的通道相交的位置处彼此不连通。该描述还适用于由虚线表示的收集通道159的一部分和与收集通道159的该部分相交的分支通道158。

[0262] 此外,在本技术中,液体供应通道将液体(具体地,第二液体)供应至连接通道。因此,在连接通道中形成从液体供应通道和连接通道彼此连接的位置朝向主通道的流动,从而使得可以防止流过主通道的液体进入连接通道并且防止除要收集的粒子之外的微粒通过连接通道流入收集通道。当执行收集步骤时,如上所述,例如,由于在收集通道中产生的负压,包含要收集的一个粒子的第一液体通过连接通道被收集到收集通道中的第二液体中。因此,在第二液体中形成包含一个要收集的粒子的乳液粒子。

[0263] 此外,在本技术中,例如,通过在适当的定时(例如,在生物粒子到达粒子分类部157的时间)驱动压电致动器,将包括在确定步骤中被确定为要收集的微粒的生物粒子的疏水性溶液收集到收集通道159中,以形成乳液粒子。在确定步骤中,例如,通过使用峰值信号和面积信号确定粒子是否是要收集的粒子,还可以确定是否存在一个微粒(单峰)、两个生物粒子的复合物(双峰)或三个生物粒子的复合物(三重峰)。因此,可以避免形成各自包含两个或更多个生物粒子的乳液粒子。因此,可以以高概率和高效率形成包含一个生物粒子的乳液粒子。此外,由于可以避免形成包含两种或更多种生物粒子的复合物的乳液粒子,所以可以省略在形成乳液的操作之前去除两种或更多种生物粒子的复合物的操作,例如,通过细胞分类器等。

[0264] (示例)

[0265] 使用具有如图8A所示的通道结构的微芯片,如下形成包含一个微粒的乳液粒子。在下文中,将参考图15描述用于形成乳液粒子的操作。

[0266] 压电元件(压电致动器)附接至微芯片150的外表面(具体地,对应于靠近连接至连接通道170的收集通道159的一部分的突起的外表面)以改变收集通道159中的容积。

[0267] 包含具有10 μm 直径的珠的亲水性样品液从样品液入口151引入到样品液通道152中,并且亲水性鞘液从鞘液入口153引入到鞘液通道154中。被引入的亲水性样品液和亲水性鞘液在接合部162处接合在一起,并且然后,形成亲水性样品液被亲水性鞘液包围的层流。层流包括大致排列成一行的珠,并且层流形成在朝向连接通道170的主通道155中。

[0268] 除了引入亲水性样品液和亲水性鞘液之外,还将疏水性液体从液体供应通道161供应到连接通道170。通过将疏水性液体从液体供应通道161供应至连接通道170,防止层流通过连接通道170进入收集通道159,并且收集通道159填充有疏水性液体。

[0269] 当珠穿过照射主通道155的检测区域156的激光束的位置时,珠被激光束照射,并且生成光。检测所生成的光,并且基于所检测的光的特征来确定是否收集每个珠。

[0270] 在确定要收集的珠到达连接通道170附近的定时,压电元件被驱动以使收集通道159的内腔变形,并且因此,珠通过连接通道170被收集到收集通道159中。收集操作如下:(i)收集通道159变形超过 $10\mu\text{s}$ 以将负压施加至收集通道159,(ii)变形状态维持 $10\mu\text{s}$,以及(iii)负压消除超过 $10\mu\text{s}$ 以恢复变形。通过重复上述操作(i)至(iii),在收集通道159中形成在疏水性液体中包含各自包含一个珠的乳液粒子的乳液。在该乳液中,疏水性液体为分散介质,包含亲水性液体的乳液粒子为分散体。

[0271] 图15示出通过执行上述操作(i)至(iii)在收集通道159中形成包含一个珠的乳液粒子。下面将描述图15。

[0272] 图15的(a)是示出珠(由白色箭头指示)朝向连接通道170流动的状态的照片。在图15的时间点,亲水性液体在主通道155中流向粒子分类部157,然后流向从主通道155分支的两个废料通道158,而不流向连接通道170。疏水性液体从液体供应通道161供应到连接通道170,并且流向主通道155和收集通道159两者。由于亲水性液体的流动,已经流入主通道155中的疏水性液体在离开连接通道170之后立即划分为两个废料通道158流动(疏水性液体在图15的a中示出的连接通道附近沿着废料通道158的壁流动)。

[0273] 图15的(b)是当珠进一步接近连接通道时的时间点的照片。此时,开始用于收集珠的操作。即,通过驱动压电元件开始使收集通道159的内腔变形。

[0274] 图15的(c)是示出亲水性液体朝向收集通道159前进的状态的照片。从照片可以看出,在图15的时间点,珠被亲水性液体包围,并且亲水性液体被疏水性液体包围。即,形成包含一个珠的乳液粒子P。

[0275] 图15的(d)是紧接在乳液粒子P从连接通道170进入收集通道159之前的照片。

[0276] 图15的(e)是紧接在乳液粒子P进入收集通道159之后的照片。可以确认在乳液粒子P中包含一个珠。

[0277] 图15的(f)是示出乳液粒子P进一步在海洋通道159的下游流动的照片。

[0278] 如上所述,已经形成包含一个珠的乳液粒子。从该结果可以看出,生物粒子分类装置200可以形成包含高比例的乳液粒子的乳液,每个乳液粒子包含一个生物粒子。

[0279] (3-5)破坏步骤

[0280] 在破坏步骤S105中,在微小空间中破坏该生物粒子。通过进行破坏,例如,经由生物粒子捕获部7结合到生物粒子的分子100可以与生物粒子隔离。

[0281] 注意,在被破坏的生物粒子的组分中,即使在破坏之后,结合到生物粒子捕获部7的组分也可以经由生物粒子捕获部70结合到分子100。

[0282] 在破坏步骤S105中,构成生物粒子的目标物质或结合至生物粒子的目标物质可被包括在分子100中的目标物质捕获部6捕获。因此,形成分子100和目标物质的复合物,使得在后面描述的分析步骤中,目标物质可以与包括在分子100中的条形码序列相关联。这样形成的复合物在后面描述的分析步骤中进行分析。

[0283] 破坏步骤S105优选地在保持微小空间中的生物粒子的隔离状态的同时执行。因此,分子100和目标物质的复合物被有效地形成。此外,可以防止目标物质结合到微小空间外的目标捕获分子。

[0284] 在微粒是指乳液粒子中的空间的情况下,维持隔离状态可意味着维持乳液粒子,并且特别地,可意味着乳液粒子未被破坏。

[0285] 在微小空间是指阱中的空间的情况下,维持隔离状态可以意味着该阱中的组分(特别是该阱中的生物粒子、该生物粒子的组分以及目标捕获分子)保留在该阱中,并且可以进一步意味着另一阱中的组分(特别是另一阱中的生物粒子、该生物粒子的组分以及另一阱中的目标捕获分子)不侵入该阱。

[0286] 此外,当如以上部分“(3-2)捕获步骤”所述将核酸结合抗体结合至生物粒子时,在破坏步骤S105中,将核酸结合抗体与生物粒子解离。然后,将核酸结合抗体结合至目标物质,使得可以形成核酸结合抗体和目标物质的复合物。例如,构成第一核酸21的多聚A序列可以结合至作为目标物质的生物粒子中的mRNA。因为包括抗体条形码序列的第二核酸2结合至第一核酸21,所以目标物质可以与抗体条形码序列相关联。这样形成的复合物在后面描述的分析步骤中进行分析。

[0287] 破坏步骤S105可以通过化学地或物理地破坏该生物粒子来进行。

[0288] 为了化学地破坏该生物粒子,可以使生物粒子破坏物质与该生物粒子在微小空间中接触。可以由本领域技术人员根据生物粒子的类型适当地选择生物粒子破坏物质。在生物粒子是细胞或外来体的情况下,例如,脂质双层膜破坏组分可以用作生物粒子破坏物质,并且具体地,可以使用表面活性剂、碱组分、酶等。作为表面活性剂,可以使用阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂、两性表面活性剂或阳离子表面活性剂。阴离子表面活性剂的示例可包括十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)和月桂酰肌氨酸钠(sodium lauroyl sarcosine)。非离子表面活性剂的示例可包括Triton X-100、Triton X-114、Tween 20、Tween 80、NP-40、Brij-35、Brij-58、辛基葡糖苷(octyl glucoside)、辛基硫代葡糖苷(octylthiogluco side)和辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(octylphenoxypolyethoxyethanol)。两性表面活性剂的示例可包括CHAPS和CHAPSO。阳离子表面活性剂的示例可包括十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)。此外,碱组分的示例可包括OH⁻离子。此外,酶的示例可包括蛋白酶K、链霉亲和素、溶菌酶、溶葡萄球菌素、酶解酶、纤维素酶、聚糖酶和蛋白酶。酶的类型可以例如取决于细胞的类型(动物细胞、植物细胞、细菌、酵母等)适当地选择。

[0289] 在微小空间是阱中的空间的情况下,可以例如通过向每个阱中添加生物粒子破坏物质来进行破坏步骤。由于阱彼此隔离,因此即使发生破坏,阱中的组分也保持在阱中。

[0290] 在微小空间是乳液粒子中的空间的情况下,例如,可以在形成乳液粒子的同时将生物粒子破坏物质引入乳液粒子中。然后,在形成乳液粒子之后,可以进行通过生物粒子破坏物质破坏生物粒子的步骤。

[0291] 为了物理地破坏该生物粒子,可以向生物粒子施加用于破坏该生物粒子的物理刺激。作为用于向生物粒子施加物理刺激的处理,例如,可以采用光学处理、热处理、电处理、声学处理、冻融处理或机械处理。通过这样的处理,细胞或外来体可以被破坏。光学处理的示例可包括通过激光照射的等离子体形成或空化气泡形成。热处理的示例可包括加热处

理。声学处理的示例可包括使用超声波的超声处理。机械处理的示例可包括使用均质器或珠磨机的处理。通过这样的处理,生物粒子的物理破坏可应用于微小空间是阱中的空间的情况和微小空间是乳液粒子中的空间的情况两者。在微小空间是乳液粒子中的空间的情况下,在上述处理中特别适合光学处理、热处理、电处理和冻融处理。为了在通过声学处理防止乳液粒子被破坏的同时破坏生物粒子,例如,可以将表面活性剂添加到乳液粒子中,并且此外,可以调节表面活性剂的浓度。

[0292] 在破坏步骤S105中,可以使用分子100中包括的收集序列部2。目标物质可以结合至分子100,并且可以通过使用收集序列部2有效地收集目标物质。即,破坏步骤S105包括使用收集序列部2收集分子100(具体地,结合至分子100的目标物质)的步骤。

[0293] (3-6)分析步骤

[0294] 在分析步骤S106中,分析生物粒子。具体地,在分析步骤S106中,分析目标物质。例如,可以根据目标物质的类型和分析的目的确定分析方法。

[0295] 在本技术中,在分析步骤S106中,条形码序列和目标物质可以彼此相关联。更具体地,条形码序列可以与分析目标物质的结果相关联。分析结果可例如包括关于目标物质的顺序信息和/或量信息。在隔离步骤中,将一个生物粒子隔离在一个微小空间中,并且捕获该一个生物粒子的多个分子100都具有相同的条形码序列。因此,通过执行上述关联与一个条形码序列相关联的所有分析结果源自一个生物粒子,并且可以用于分析该一个生物粒子。

[0296] 在分析步骤S106中,由于在破坏步骤中将包括条形码序列的分子100结合至目标物质,所以即使当对多个微小空间中存在的不同生物粒子进行共同分析时,也可以基于条形码序列将分析结果与每个生物粒子相关联。

[0297] 例如,在微小空间是阱中的空间的情况下,可以分开分析阱中的每个生物粒子破坏产物,或者可以收集多个阱中的生物粒子破坏产物作为一个样品,并且作为一个样品共同分析。在前者的情况下,容易将生物粒子与分析结果相关联。同样在后者的情况下,因为每个生物粒子破坏产物中的目标物质与包括条形码序列的分子100(或包括抗体条形码序列的核酸结合抗体)形成复合物,所以每个生物粒子可以与其分析结果相关联。

[0298] 在微小空间是乳液粒子中的空间的情况下,可以共同分析多个乳液粒子,并且例如,可以作为整体共同集中分析所获得的乳液。因为每个生物粒子破坏产物中的目标物质与包括条形码序列的分子100(或包括抗体条形码序列的核酸结合抗体)形成复合物,所以每个生物粒子可以与其分析结果相关联。因此,可以提高分析效率。

[0299] 在分析步骤S106中,例如,分析生物粒子。例如,可以对在破坏步骤S105中形成的分子100和目标物质的复合物和/或核酸结合抗体和目标物质的复合物进行分析。因为分子100和核酸结合抗体分别包括条形码序列和抗体条形码序列,所以可以基于条形码序列识别目标物质从其衍生的生物粒子。

[0300] 在目标物质具有碱基序列的情况下,例如,在目标物质是RNA(特别是mRNA)或DNA的情况下,可以在分析步骤S106中例如通过下一代测序仪对目标物质的碱基序列进行测序处理。

[0301] 例如,可以使用分子100中包括的扩增序列部3执行分析步骤S106中的分析。例如,分析步骤S106包括使用扩增序列部3扩增核酸的步骤。因此,例如,可以扩增结合到分子100

的核酸(特别是mRNA)。然后,关于核酸的信息可以通过对该核酸的序列进行测序处理而获得。

[0302] 此外,通过执行扩增,包括在条形码序列部分中的条形码序列也可以扩增。因此,关于核酸的信息可以与分子100中包括的条形码序列相关联,并且此外,可以与生物粒子相关联。

[0303] 可以使用如图3F所示的分析装置120执行分析步骤S106。分析装置120可以例如是对复合物执行测序处理的装置。例如,在目标物质是核酸,特别是DNA或RNA,并且更特别是mRNA的情况下,可以进行测序处理。测序处理可以通过测序仪进行,或者可以通过下一代测序仪或基于桑格法的测序仪进行。为了以更高的速度全面地分析多个生物粒子(特别是细胞群),可以通过下一代测序仪进行测序处理。

[0304] 为了在分析步骤S106中进行测序处理,分析步骤可进一步包括制备要进行测序处理的核酸(例如,cDNA)的步骤和纯化核酸的步骤。通过这些制备和纯化步骤,例如可以制备用于进行下一代测序处理的文库。

[0305] 在文库的制备中,可以使用收集序列部2。可以使用珠来收集目标物质所结合的分

子100,在该珠上固定有具有与包括在收集序列部2中的核酸序列互补的序列的核酸。
[0306] 制备步骤可以例如包括从mRNA合成cDNA的cDNA合成步骤。此外,制备步骤可以包括扩增合成的cDNA的扩增步骤。在制备步骤之后,可以进行纯化在制备步骤中获得的核酸的纯化步骤。纯化步骤可以例如包括用于使用酶(诸如蛋白酶K)降解除核酸之外的组分的处理。此外,在纯化步骤中,可以进行核酸收集处理。在核酸收集处理中,例如,可以使用用于纯化核酸的可商购的试剂,并且其示例可以包括磁珠,诸如AMPure XP。注意,在纯化步骤中,还可以收集细胞内dsDNA,但是可以防止dsDNA在测序过程中被测序。

[0307] 例如,用于测序处理(特别是下一代测序处理)的适配器序列包括在目标捕获分子中,从而使得可以仅对包括适配器序列的核酸进行测序。

[0308] 在分析步骤S106中,可以基于测序处理结果分析每个生物粒子的组分。例如,在分析步骤S106中,可以针对每个生物粒子确定包括在细胞中的mRNA的序列和/或每个mRNA的拷贝数。此外,在分析步骤S106中,可以针对每个生物粒子确定抗原的类型和/或数量或转录因子的类型和/或数量。对每个生物粒子的组分的此类分析可以基于由序列处理所确定的序列中的条形码序列进行。例如,从通过序列处理确定的大量序列中选择包括相同条形码序列的序列。包括相同条形码序列的序列基于由一个细胞摄取的目标捕获分子。因此,针对每一个条形码序列的组分的分析意指针对每一个生物粒子分析组分。

[0309] 2. 第二实施例(生物粒子分析系统)

[0310] 本技术还提供了一种生物粒子分析系统,包括用于捕获生物粒子的捕获试剂盒,该捕获试剂盒具有经由接头固定有包括生物粒子捕获部、条形码序列和可裂解接头的分子的表面。该生物粒子分析系统可以进一步包括:接头裂解装置,裂解该接头以使生物粒子从该表面释放;和/或隔离装置,形成或具有微小空间,从该表面释放的生物粒子被隔离到该微小空间中。

[0311] 捕获试剂盒可以例如包括具有经由接头固定有包括生物粒子捕获部、条形码序列和可裂解接头的分子的表面的基板。基板可以是如上面的“1、第一实施例(生物粒子分析方法)”的部分(3-1)中描述的分析基板102,并且其描述也适用于本实施例。

[0312] 接头裂解装置可以例如是如以上“1、第一实施例(生物粒子分析方法)”的部分(3-3-2)中描述的刺激施加装置,并且其描述也适用于本实施例。

[0313] 根据本技术的生物粒子分析系统可以进一步:包括成像元件,其对表面101或在表面101上捕获的生物粒子进行成像。接头裂解装置可施加刺激,使得基于通过成像元件获取的图像选择的生物粒子与表面101解离。

[0314] 隔离装置可以包括如在以上“1、第一实施例(生物粒子分析方法)”的部分(3-4-3)中描述的阱,并且可以例如包括包含阱的基板(例如,板)。此外,该隔离装置可以包括喷嘴,该喷嘴将含有生物粒子的液滴施加到如以上部分(3-4-3)中描述的阱。该隔离装置可以包括将一个生物粒子放置到一个阱中的装置,诸如细胞分类器或单细胞分配器,如以上(3-4-3)部分中所描述的。

[0315] 可替代地,隔离装置可以包括如在以上“1、第一实施例(生物粒子分析方法)”的部分(3-4-4)中描述的微通道,或者可以包括如在以上部分(3-4-4)中描述的微芯片150。该隔离装置可以是如在以上部分(3-4-4)中描述的生物粒子分类装置200。

[0316] 根据本技术的生物粒子分析系统可以进一步包括分析构成生物粒子的目标物质或结合至生物粒子的目标物质的分析装置。该分析装置可以是执行如以上“1、第一实施例(生物粒子分析方法)”的部分(3-6)中描述的分析的装置,例如,测序仪。

[0317] 根据本技术的生物粒子分析系统可以执行在以上“1、第一实施例(生物粒子分析方法)”中描述的生物粒子分析方法。因此,关于生物粒子分析方法的说明也适用于本实施例。

[0318] 例如,根据本技术的生物粒子分析系统可以执行如上所述的捕获步骤S102、裂解步骤S103和隔离步骤S104。此外,根据本技术的生物粒子分析系统可以在隔离步骤S104之后执行破坏步骤S105,并且可以在破坏步骤S105之后进一步执行分析步骤S106的一部分,例如,制备要进行分析步骤S106的样品的样品制备步骤。例如,在目标分子是mRNA的情况下,样品制备步骤可包括从mRNA合成cDNA的cDNA合成步骤。

[0319] 例如,系统可以被配置为自动执行捕获步骤S102、裂解步骤S103和隔离步骤S104,可以具体地被配置为自动执行捕获步骤S102、裂解步骤S103、隔离步骤S104和破坏步骤S105,并且可以更具体地被配置为自动执行捕获步骤S102、裂解步骤S103、隔离步骤S104、破坏步骤S105和分析步骤S106(或作为其一部分的样品制备步骤等)。

[0320] 3. 第三实施例(表面)

[0321] 本技术还提供了经由接头固定有包括生物粒子捕获部、条形码序列和可裂解接头的分子的表面。该表面是如在以上“1、第一实施例(生物粒子分析方法)”中描述的表面,并且其描述也适用于本实施例。本技术还提供了一种具有该表面的基板。表面和基板可以是如在以上“1、第一实施例(生物粒子分析方法)”中使用的表面和基板。

[0322] 注意,本技术还可以具有以下配置。

[0323] [1]一种生物粒子分析方法,包括:

[0324] 捕获步骤,在经由接头固定有包括生物粒子捕获部、条形码序列和可裂解接头的分子的表面上经由生物粒子捕获部捕获生物粒子;

[0325] 裂解步骤,裂解接头以使生物粒子从该表面释放;以及

[0326] 隔离步骤,将该生物粒子隔离在微小空间中。

- [0327] [2]根据[1]的生物粒子分析方法,其中,在该捕获步骤中,结合至一个生物粒子的多个分子具有相同的条形码序列。
- [0328] [3]根据[1]或[2]的生物粒子分析方法,进一步包括:破坏步骤,在微小空间中破坏生物粒子。
- [0329] [4]根据[3]的生物粒子分析方法,其中,在破坏步骤中,分子从生物粒子解离。
- [0330] [5]根据[3]或[4]的生物粒子分析方法,其中,分子进一步包括目标物质捕获部,并且
- [0331] 在破坏步骤中,通过目标物质捕获部捕获构成生物粒子的目标物质或结合至生物粒子的目标物质。
- [0332] [6]根据[5]的生物粒子分析方法,进一步包括:分析步骤,在破坏步骤之后分析目标物质。
- [0333] [7]根据[6]的生物粒子分析方法,其中,在该分析步骤中,条形码序列与目标物质相关联。
- [0334] [8]根据[6]或[7]的生物粒子分析方法,其中,目标物质具有碱基序列,并且
- [0335] 在分析步骤中,对目标物质的碱基序列进行测序处理。
- [0336] [9]根据[1]至[8]中任一项的生物粒子分析方法,其中,在裂解步骤中,基于生物粒子的标记或分子的标记选择要从表面释放的生物粒子。
- [0337] [10]根据[1]至[9]中任一项的生物粒子分析方法,其中,在裂解步骤中,通过化学刺激或光刺激裂解接头。
- [0338] [11]根据[1]至[10]中任一项的生物粒子分析方法,其中,在裂解步骤中,维持生物粒子捕获部对该生物粒子的捕获状态。
- [0339] [12]根据[1]至[11]中任一项的生物粒子分析方法,其中,在裂解步骤中,仅使所选择的生物粒子从该表面释放。
- [0340] [13]根据[1]至[12]中任一项的生物粒子分析方法,其中,微小空间是乳液粒子中的空间或阱中的空间。
- [0341] [14]根据[1]至[13]中任一项的生物粒子分析方法,进一步包括:确定步骤,确定是否将在裂解步骤中从该表面释放的生物粒子隔离在微小空间中。
- [0342] [15]根据[14]的生物粒子分析方法,其中,在确定步骤中,基于通过用光照射生物粒子而产生的光进行确定。
- [0343] [16]根据[1]至[15]中任一项的生物粒子分析方法,其中,在捕获步骤中,该生物粒子和该生物粒子捕获部以特定或非特定方式彼此结合。
- [0344] [17]根据[1]至[16]中任一项的生物粒子分析方法,其中,捕获步骤包括用于将生物粒子和生物粒子捕获部彼此结合的孵化步骤。
- [0345] [18]一种生物粒子分析系统,包括:
- [0346] 捕获试剂盒,被配置为捕获生物粒子,该捕获试剂盒具有经由接头固定有包括生物粒子捕获部、条形码序列和可裂解接头的分子的表面;
- [0347] 接头裂解装置,裂解接头以使生物粒子从该表面释放;以及
- [0348] 隔离装置,形成微小空间或具有微小空间,从该表面释放的生物粒子被隔离在该微小空间中。

[0349] [19]根据[18]的生物粒子分析系统,进一步包括:分析装置,分析构成生物粒子的目标物质或结合至生物粒子的目标物质。

[0350] 参考标记列表

[0351] 100 分子

[0352] 101 表面

[0353] 102 基板。

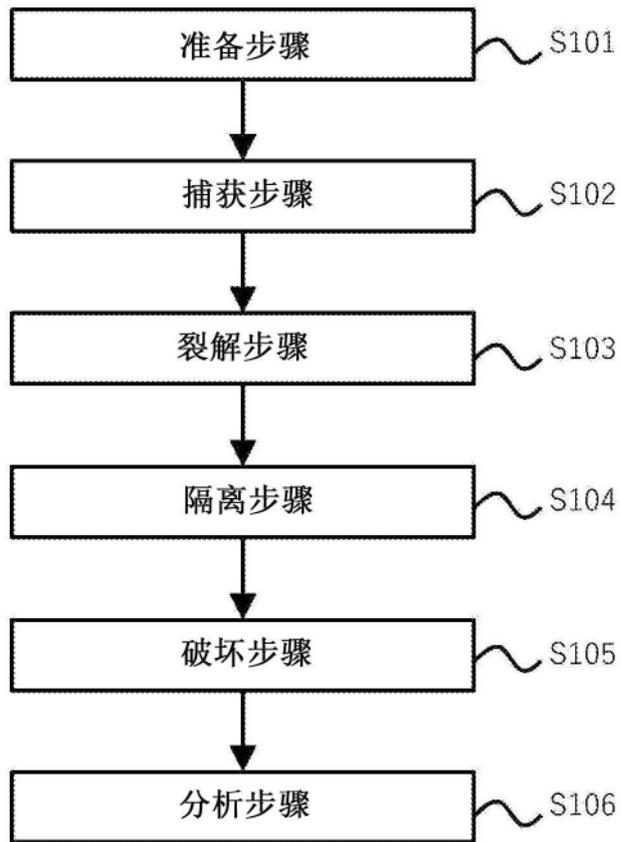


图1

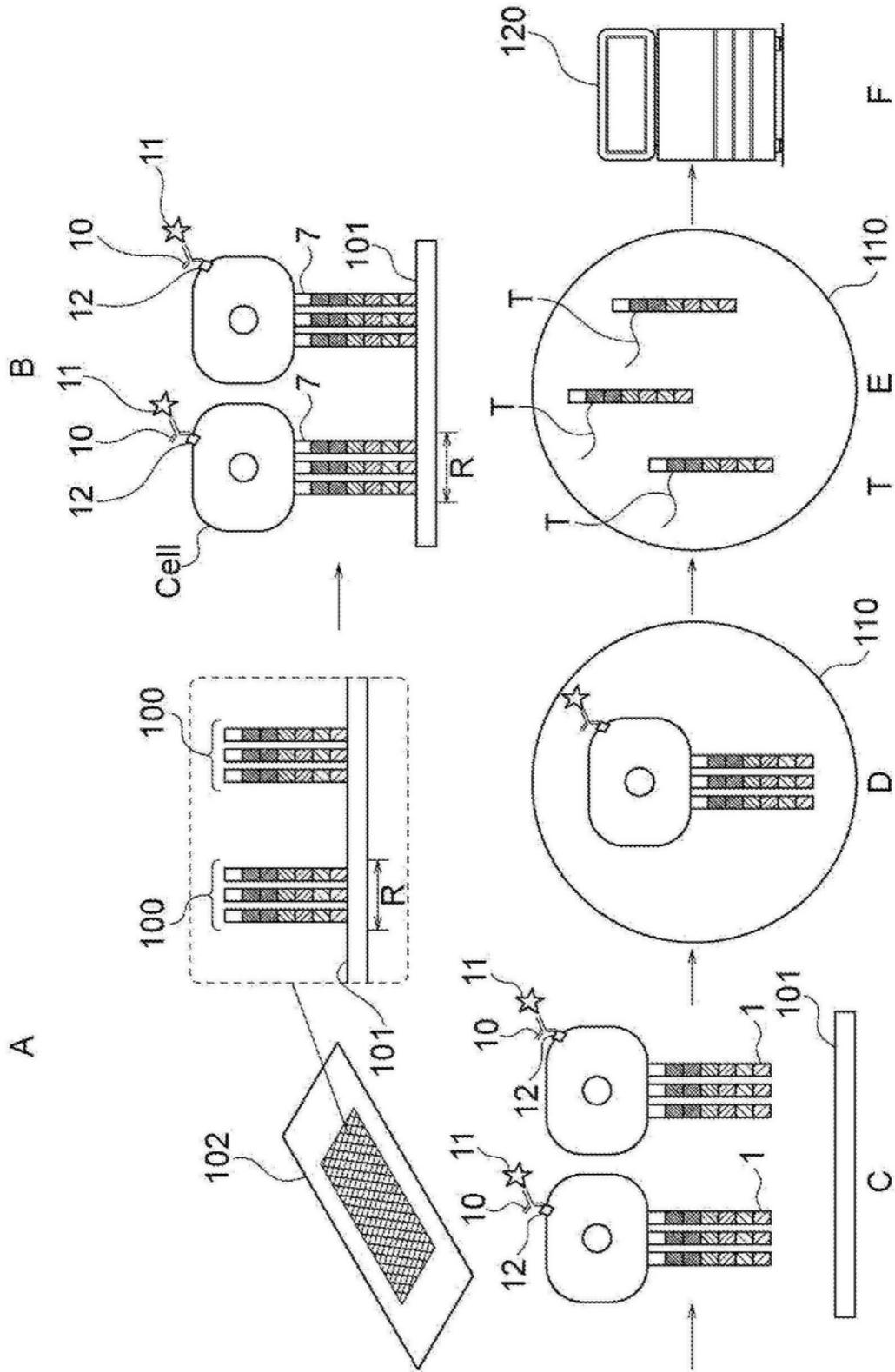


图2

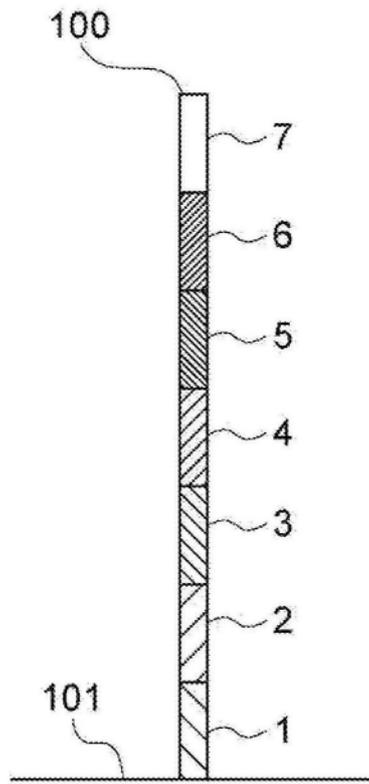


图3

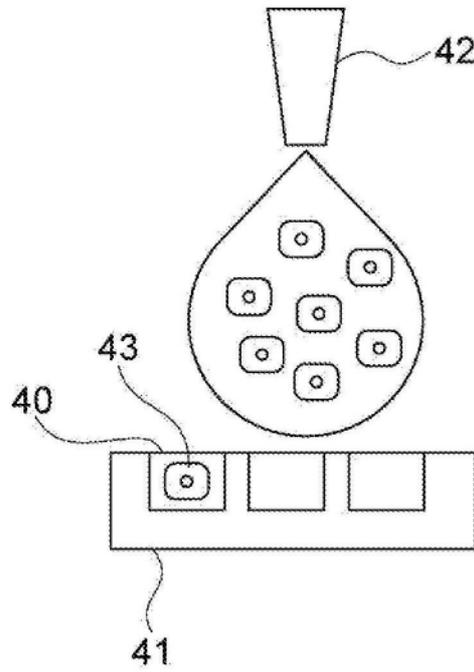


图4

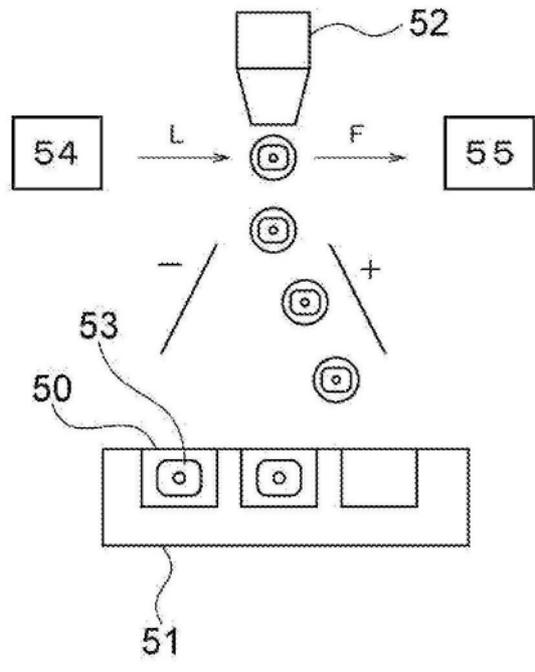


图5

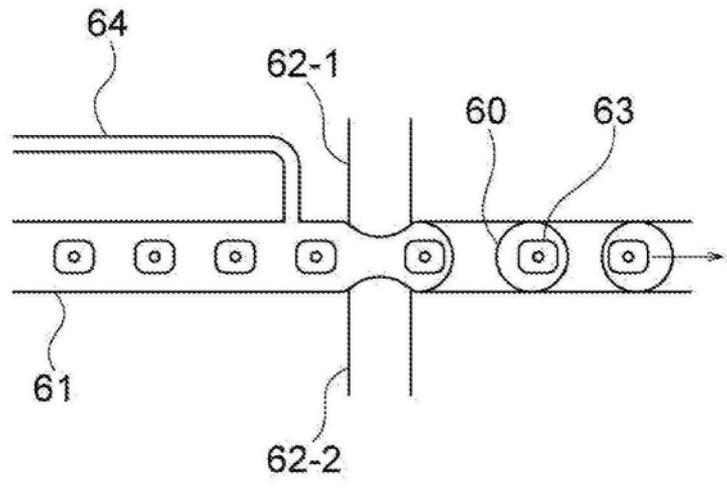


图6

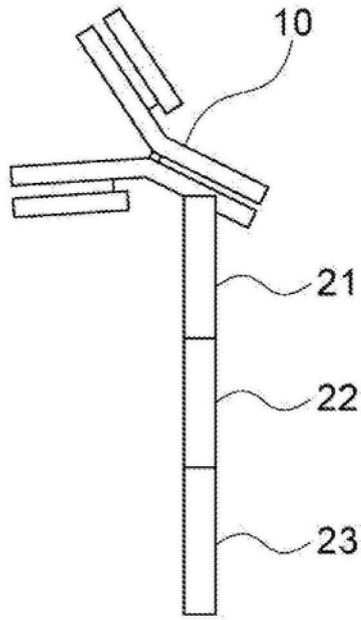


图7

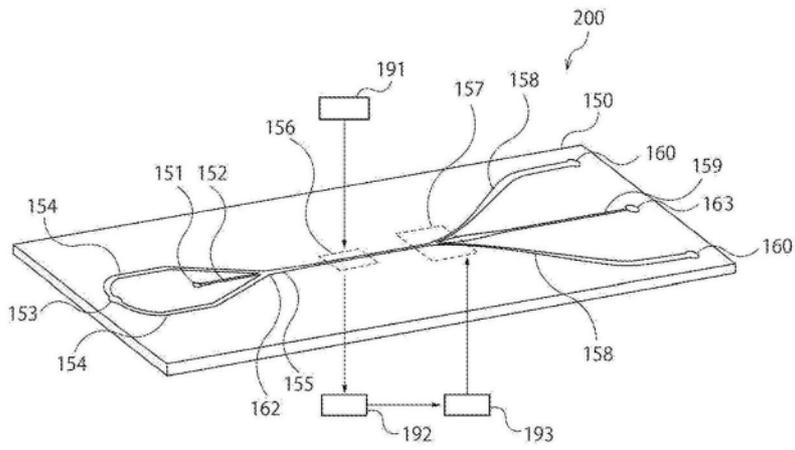


图8A

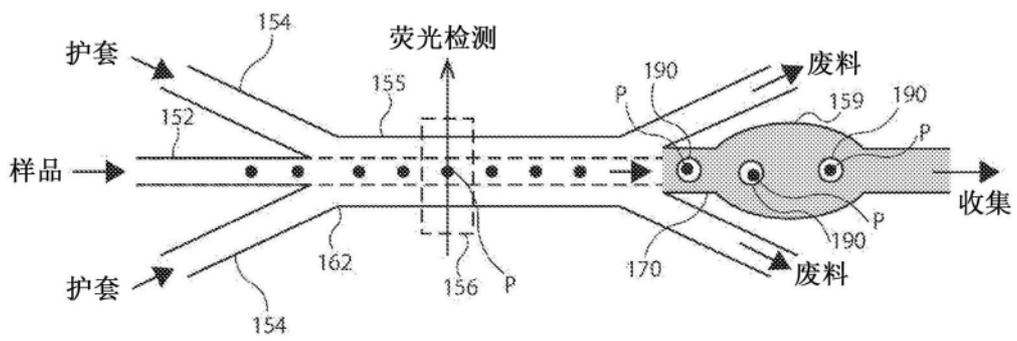


图8B

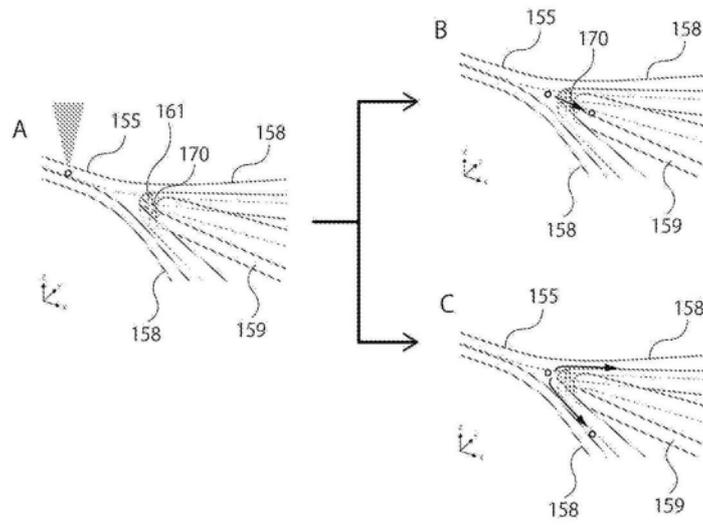


图9

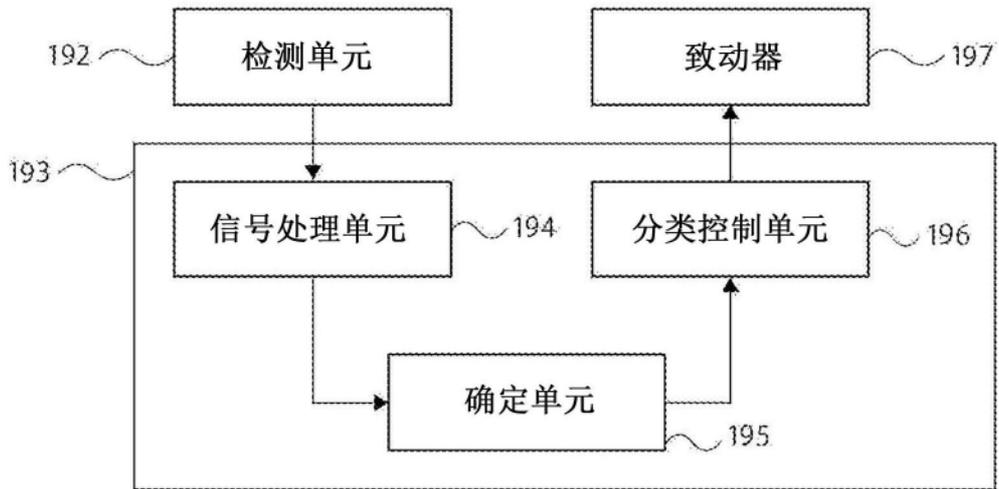


图10

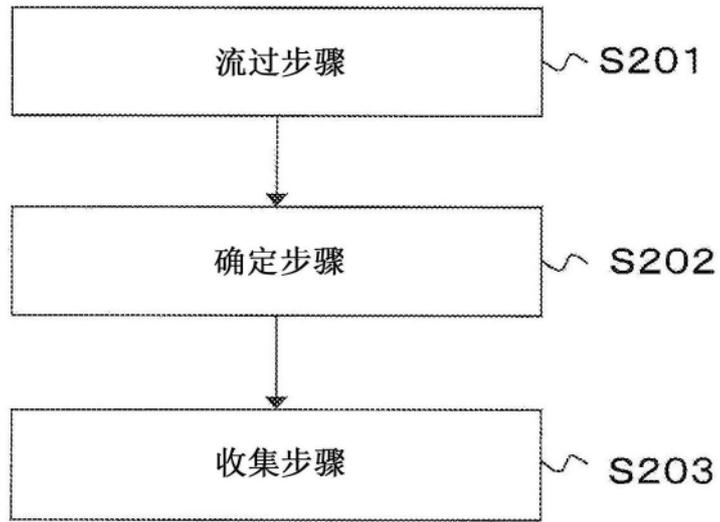


图11

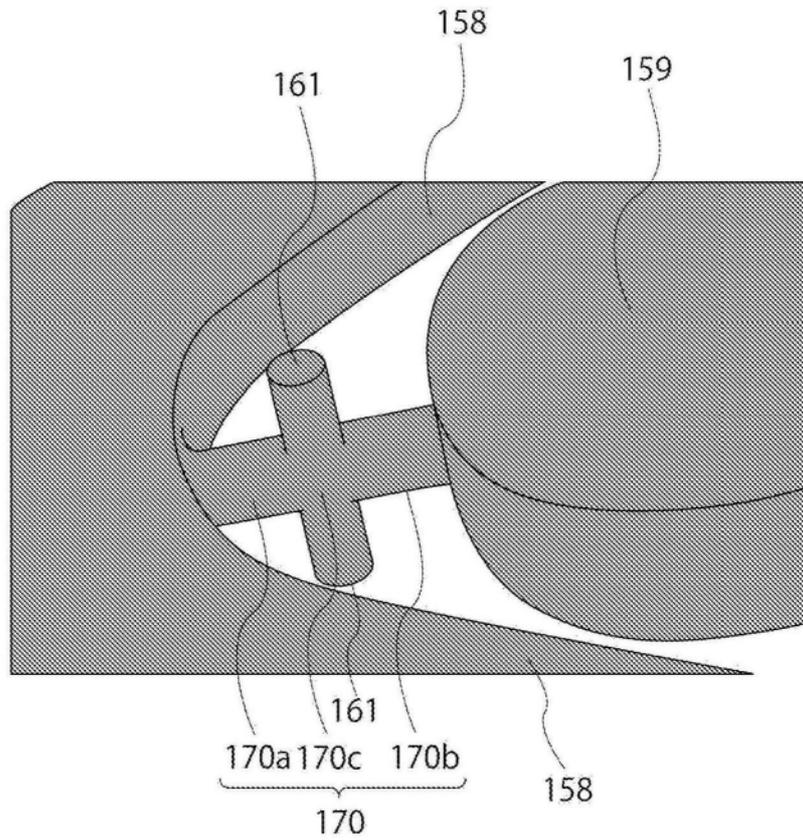


图12A

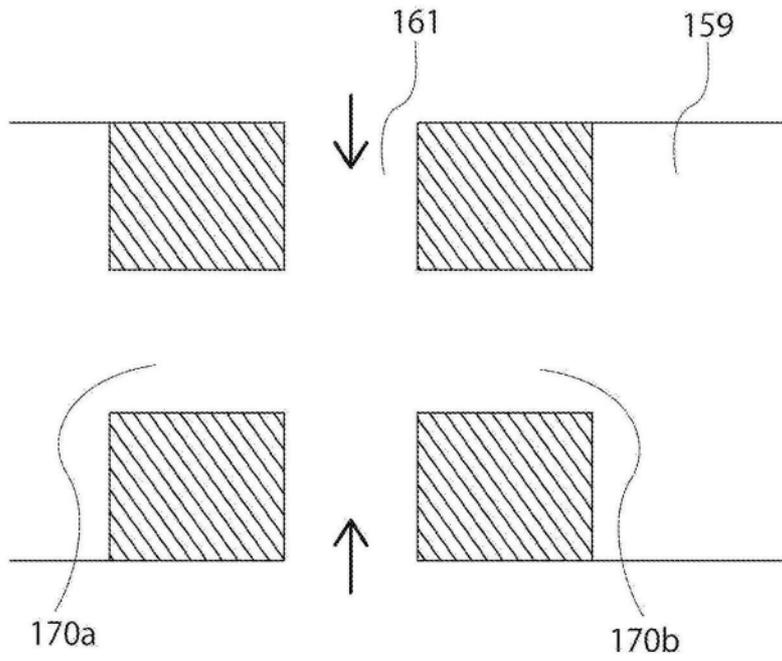


图12B

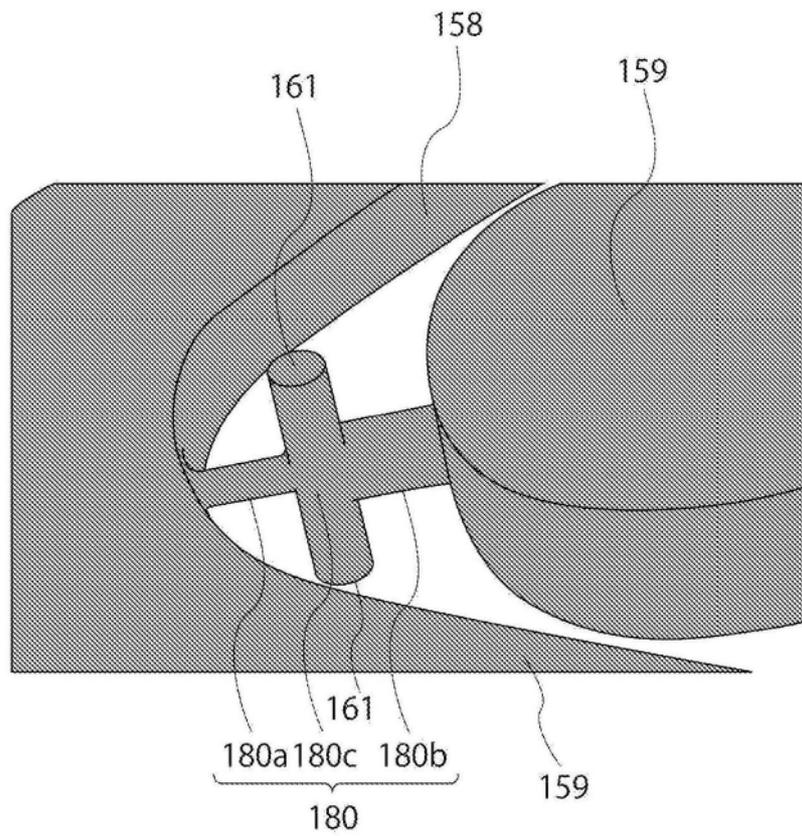


图13A

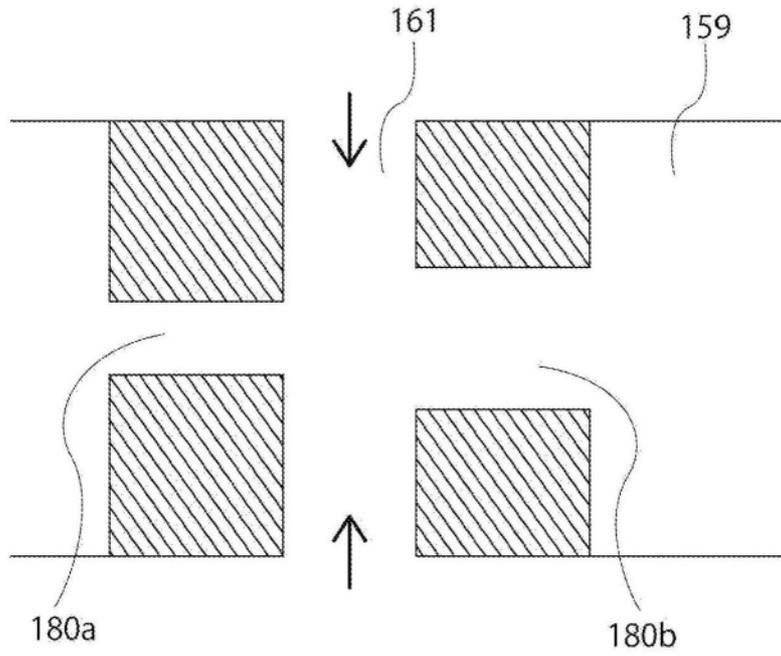


图13B

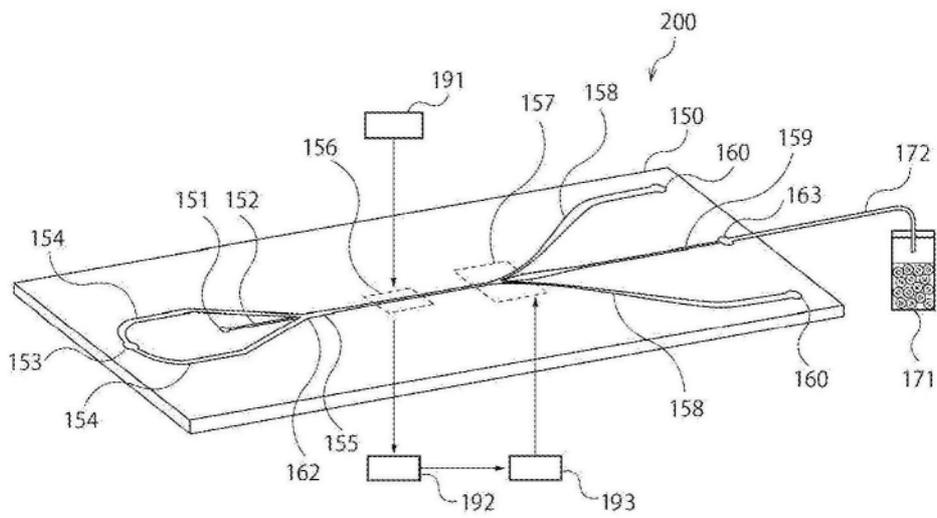


图14

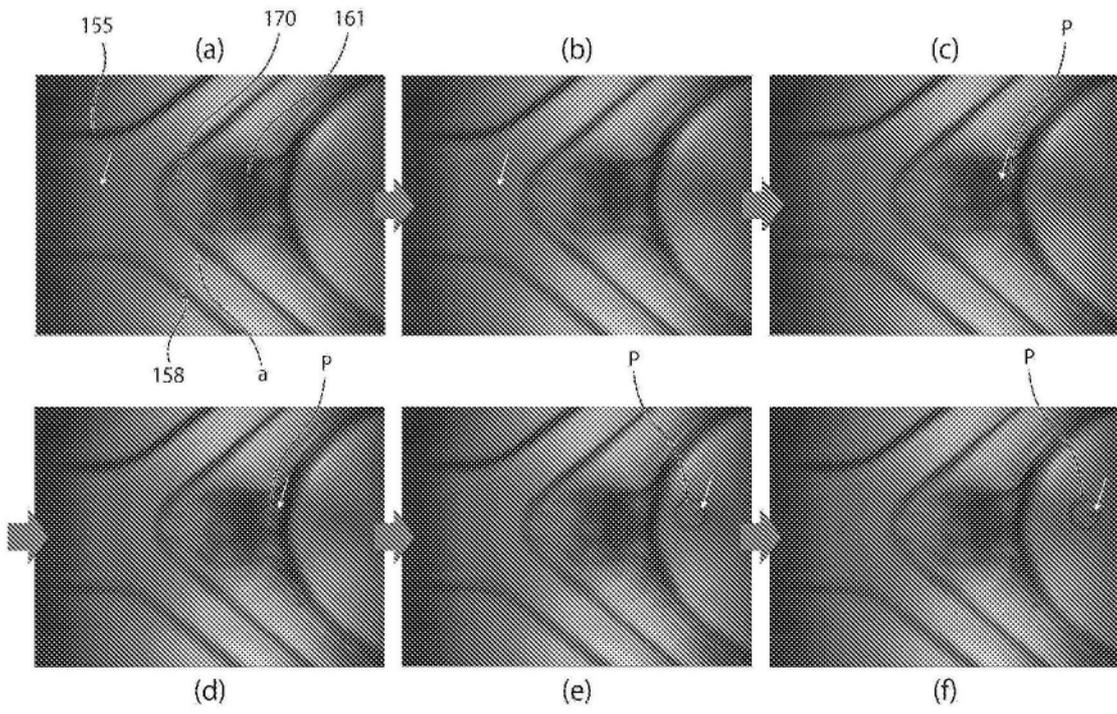


图15

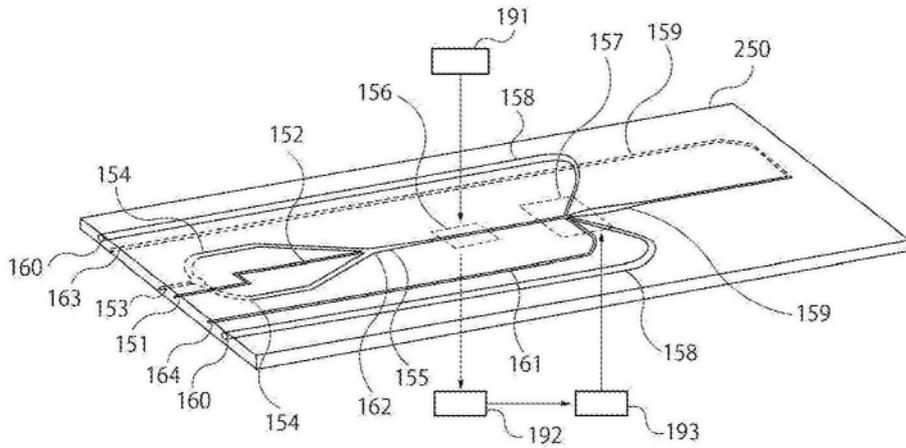


图16