



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112980667 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 17

(21) 申请号 202110225807.5

(22) 申请日 2018.08.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112980667 A

(43) 申请公布日 2021.06.18

(30) 优先权数据
62/551,575 2017.08.29 US
62/671,750 2018.05.15 US

(62) 分案原申请数据
201880071027.6 2018.08.28

(73) 专利权人 伯乐实验室有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 卡利安·翰迪克 维沙·沙玛
普里亚达诗尼·戈戈伊 威廉·周
奥斯丁·佩恩 布莱恩·博尼费斯

凯尔·格利森 约翰·康诺利
萨姆·塔克

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262
专利代理师 韦昌金 牛利民

(51) Int.Cl.
C12M 1/38 (2006.01)
C12M 1/02 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12Q 1/6816 (2018.01)
B01L 3/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 104508492 A, 2015.04.08
US 2016289669 A1, 2016.10.06

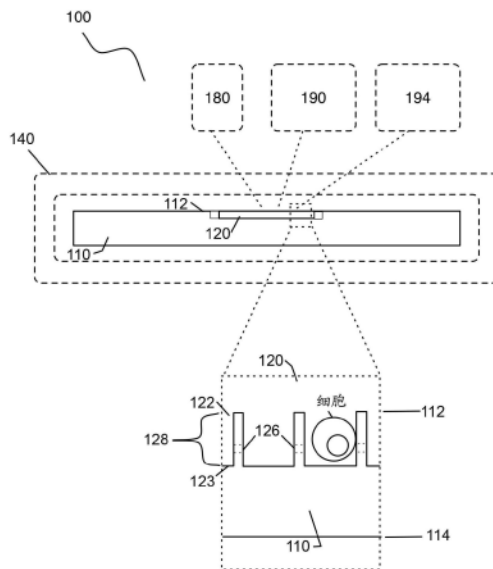
审查员 罗曼
权利要求书4页 说明书50页 附图35页

(54) 发明名称

用于分离和分析细胞的系统和方法

(57) 摘要

一种用于分离和分析单细胞的系统和方法,其中所述系统包括:在基板处限定的孔阵列,每个孔包括开放表面和孔腔,孔腔被配置成捕获单细胞形式和单簇形式中的一种形式的细胞;以及流体输送模块,所述流体输送模块包括在孔阵列之上的流体储器,流体流穿过流体储器沿着流体路径在平行于基板的宽面的方向上被控制;并且其中该方法包括:穿过流体储器对整个孔阵列分配细胞群体和非细胞颗粒群体以提高在孔阵列内的个体的细胞-颗粒对的捕获效率,以及在该组孔处处理所捕获的细胞-颗粒对。



1. 一种用于分离和分析靶细胞的集合的方法,包括:

将靶细胞的集合接收到在基板的表面平面处限定的孔阵列中,其中所述孔阵列中的每个孔垂直于所述表面平面并在所述表面平面下方延伸到所述基板中;

实现所述孔阵列的至少包括第一孔的孔的第一子集处以单细胞形式捕获的所述靶细胞的集合的颗粒可接近状态,其中靶细胞的集合的第一靶细胞被接收到所述第一孔的开口端;

将颗粒的集合分配到所述孔阵列,其中所述颗粒的集合中的每个颗粒与探针偶联,所述探针对与一个或更多个所述靶细胞的集合相关的靶组分具有结合亲和力;

在将所述颗粒的集合分配到所述孔阵列后,实现在所述颗粒可接近状态中的所述第一孔的理想状态,其中实现所述理想状态包括共同捕获所述颗粒的集合的第一颗粒和所述第一孔中的所述第一靶细胞;

处理所述孔阵列的至少包括所述第一孔的理想孔的集合,其中处理所述理想孔的集合包括向所述理想孔的集合递送处理试剂;

将流体路径中的不同流体相移置到所述孔阵列,其中移置不同流体相包括在所述孔阵列中执行裂解反应之前向所述孔阵列递送空气并递送油;和

提供在所述理想孔的集合的靶物质和热控制模块之间的通讯,用于使用所述理想孔的集合处理的靶物质的可控的加热和可控的冷却中的至少一项。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中提供在所述理想孔的集合的靶物质和所述热控制模块之间的通讯包括将所述理想孔的集合的靶物质从所述理想孔的集合通过所述颗粒的集合递送到处理容器中;和在所述处理容器和所述热控制模块之间建立热通讯。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中提供在所述理想孔的集合的靶物质和所述热控制模块之间的通讯包括建立在所述基板和所述热控制模块之间的热通讯。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述探针包括将所述探针偶联至所述颗粒的集合中的一个颗粒的颗粒接头区域、引物序列、细胞条形码序列和独特分子标识符区域。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述靶物质包括cDNA,并且其中所述方法还包括在执行核酸外切酶处理过程和用所述靶物质的聚合酶链式反应过程时从来源于所述靶细胞的集合的基因产物生成cDNA文库,并利用所述热控制模块对所述孔阵列进行温度调制。

6. 根据权利要求1所述的方法,还包括用所述热控制模块将所述孔阵列的内容物的温度在5°C和95°C之间调制。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中将所述处理试剂递送到理想孔的集合包括递送细胞裂解试剂和活化酶中的至少一种,其中所述活化酶被配制用于探针与来源于所述靶细胞的集合的靶物质的杂交。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中向所述孔阵列分配所述颗粒的集合包括:用耦合到跨越所述孔阵列的流体储器的流控制模块来控制所述颗粒分配流体中的所述颗粒的集合的流动方向,其中所述流动方向在第一方向和与所述第一方向相反的第二方向之间交替。

9. 一种用于分离和分析靶细胞的集合的方法,包括:

将靶细胞的集合接收到在基板的表面平面处限定的孔阵列中,其中所述孔阵列中的每个孔垂直于所述表面平面并在所述表面平面下方延伸到所述基板中;

实现所述孔阵列的包括至少第一孔和第二孔的孔的第一子集的颗粒可接近状态,其中

靶细胞的集合的第一靶细胞被接收在所述第一孔的开口端,并且所述靶细胞的集合的第二靶细胞被接收在所述第二孔的开口端;

将颗粒的集合分配到所述孔阵列,其中所述颗粒的集合的每个颗粒与探针偶联,所述探针与一个或多个所述靶细胞的集合相关的靶组分具有结合亲和力;

在将所述颗粒的集合分配到所述孔阵列后,

实现颗粒可接近状态的所述第一孔的理想状态,其中实现所述理想状态包括将所述颗粒的集合的第一颗粒与所述第一靶细胞共同捕获到所述第一孔中;以及

实现颗粒可接近状态的所述第二孔的颗粒饱和状态,其中实现所述颗粒饱和状态包括将所述颗粒的集合的至少第二颗粒和第三颗粒接收到所述第二孔中,其中所述第三颗粒横穿所述表面平面;

将所述第三颗粒重新分配至所述孔阵列的下游颗粒可接近孔,其中重新分配所述第三颗粒包括:使流体沿着所述表面平面并以平行于所述表面平面的方向接收到跨越所述孔阵列的流体储器中,

从而将所述第二孔从颗粒饱和状态转化为包括与所述第二颗粒共同捕获的第二靶细胞的理想状态;

处理所述孔阵列的至少包括所述第一孔和所述第二孔的理想孔的集合,其中处理所述理想孔的集合包括将处理试剂递送至所述理想孔的集合;

将流体路径中的不同流体相移置到所述孔阵列,其中移置不同流体相包括在所述孔阵列中执行裂解反应之前向所述孔阵列递送空气并递送油;以及

借助于所述颗粒的集合从所述理想孔的集合传输靶物质。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中传输靶物质包括将所述靶物质从所述孔阵列递送至处理容器;以及在所述处理容器和热控制模块之间建立热通讯,用于所述靶物质的可控的加热和可控的冷却中的至少一项。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述靶组分是核糖核酸,并且所述颗粒的集合中的至少一个颗粒的探针包含核苷酸序列,所述核苷酸序列被配置用于结合所述核糖核酸的一部分。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述颗粒的集合中每个颗粒的探针包括将所述探针偶联至所述颗粒的集合中的一个颗粒的颗粒接头区域、引物序列、细胞条形码序列和独特分子标识符区域。

13. 根据权利要求9所述的方法,还包括在所述理想孔的集合的所述第一孔内,用所述靶组分执行生物化学过程。

14. 根据权利要求12所述的方法,还包括在所述理想孔的集合的所述第一孔中执行逆转录,从而在所述第一孔中产生与第一遗传复合体相关的第一核苷酸序列。

15. 根据权利要求9所述的方法,其中递送所述处理试剂包括将所述处理试剂递送到所述孔阵列中,以及用偶联至所述基板的热控制模块将所述孔阵列的内容物的温度保持在低于15°C。

16. 根据权利要求9所述的方法,还包括在所述基板和热控制模块之间建立热通讯,以及用所述热控制模块将所述孔阵列的内容物的温度在5°C和95°C之间调制。

17. 根据权利要求16所述的方法,还包括用所述靶物质执行下游过程,其中所述靶物质

包括cDNA,并且其中所述方法还包括在执行核酸外切酶处理过程和用所述靶物质的聚合酶链式反应过程时从来源于所述靶细胞的集合的基因产物生成cDNA文库,并用所述热控制模块对所述孔阵列进行温度调制。

18.根据权利要求9所述的方法,其中将所述处理试剂递送至所述理想孔的集合包括递送细胞裂解试剂和活化酶中的至少一种,其中所述活化酶被配制用于探针与来源于所述靶细胞的集合的靶物质杂交。

19.根据权利要求9所述的方法,其中将所述靶细胞的集合接收至所述孔阵列中包括提供所述孔阵列,所述孔阵列中的每个孔具有20微米和75微米之间的长度以及20微米和30微米之间的宽度。

20.一种用于捕获和处理核酸材料的方法,包括:

在被限定在基板内的孔阵列中,从样品分离遗传材料,

其中所述孔阵列中的每个孔延伸到所述基板的平坦表面,所述基板还包括与所述孔阵列流体连通并穿过所述孔阵列的流体路径,所述流体路径至少部分地被限定在所述平坦表面,并且

其中所述孔阵列在所述基板的4平方英寸区域内包括至少10,000个孔;其中从所述样品分离遗传材料包括在所述孔阵列内用所述孔阵列处的探针偶联的颗粒的群体以大于80%捕获效率分离遗传材料;

将一种或更多种处理试剂递送到所述流体路径中并递送到所述孔阵列;

将流体路径中的不同流体相移置到所述孔阵列,其中移置不同流体相包括在所述孔阵列中执行裂解反应之前向所述孔阵列递送空气并递送油;将热传输到所述基板和所述孔阵列,从而处理所述遗传材料;

照射所述基板和所述孔阵列;和

光学询问所述孔阵列中的每个孔的内容物。

21.根据权利要求20所述的方法,其中所述孔阵列在所述基板的4平方英寸区域内包括至少100,000个孔,并且其中所述孔阵列中的每个孔是六边形棱柱的。

22.根据权利要求20所述的方法,其中递送所述一种或更多种处理试剂包括在由与入口连通的流量控制子系统的泵产生压力时递送所述一种或更多种处理试剂。

23.根据权利要求20所述的方法,其中所述一种或更多种处理试剂包括用于分子诊断测定的试剂。

24.根据权利要求20所述的方法,其中所述一种或更多种处理试剂包括用于cDNA扩增的试剂,包括聚合酶链式反应(PCR)主混合物、dNTP和引物组。

25.根据权利要求20所述的方法,其中移置所述油包括在由与入口连通的流量控制子系统的泵产生压力时在所述孔阵列的上方移置所述油。

26.根据权利要求20所述的方法,其中传输热包括执行探针杂交和所述孔阵列的内容物的热循环,并且其中传输热包括用热控制模块将所述孔阵列的内容物的温度在5°C和95°C之间调制。

27.根据权利要求26所述的方法,其中传输热包括将热从热控制子系统的加热表面传输到所述基板,其中所述加热表面是反射性的,从而将入射到所述加热表面上的光反射回到所述孔阵列中。

28. 根据权利要求20所述的方法,其中所述基板还包括在所述孔阵列上方的流体储器,所述流体储器由储器盖密封。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述储器盖包括被配置用于沿着所述流体路径移置不同流体相的一组沟槽。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中移置所述油包括从所述流体路径移置与油不混溶的液体。

31. 根据权利要求20所述的方法,其中光学询问所述孔阵列中的每个孔的内容物包括执行实时荧光成像和检测从在所述孔阵列处的目标对象发出的荧光信号。

32. 根据权利要求20所述的方法,其中在所述孔阵列中分离遗传材料包括将超过所述孔阵列中的孔的容量的内容物重新分配到所述孔阵列中的下游孔中。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中重新分配包括:用耦合到所述流体路径的流量控制子系统,使所述孔阵列上的流动方向在第一方向和与所述第一方向相反的第二方向之间交替。

34. 根据权利要求20所述的方法,还包括执行所述遗传材料的定量分析。

35. 根据权利要求20所述的方法,其中所述孔阵列中的每一个具有0.5微米至50微米的特征尺寸。

36. 根据权利要求20所述的方法,其中处理所述遗传材料包括对在所述孔阵列中分离的mRNA执行逆转录。

37. 根据权利要求20所述的方法,其中递送所述一种或更多种处理试剂包括将至少一种处理试剂递送到所述孔阵列中并用耦合到所述基板的热控制子系统将所述孔阵列的内容物的温度保持在低于15°C。

38. 根据权利要求20所述的方法,还包括:

在从所述样品分离遗传材料之前,将颗粒群体递送到所述孔阵列,所述颗粒群体中的每一个包括探针集;和

使所述探针集从所述颗粒群体脱离,并使所述探针集结合到所述孔阵列的内表面。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中在所述孔阵列中从所述样品分离遗传材料包括使所述遗传材料结合到在所述孔阵列的所述内表面处的探针集。

用于分离和分析细胞的系统和方法

[0001] 本申请是申请日为2018年08月28日,申请号为201880071027.6,发明名称为“用于分离和分析细胞的系统和方法”的申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2017年8月29日提交的美国临时申请号62/551,575和于2018年5月15日提交的美国临时申请号62/671,750的利益,这两个申请通过此引用被全部并入本文。

技术领域

[0004] 本发明总体上涉及细胞分选和分析领域,并且更具体地涉及细胞分选领域中用于捕获和分析细胞的新的和有用的系统和方法。

背景

[0005] 随着对细胞特异性药物测试、诊断和其他测定的增加的兴趣,允许个体(individual)细胞分离、识别和回收的系统在细胞分析的领域中变得更合乎需要。此外,随着个性化医学的出现,低成本、高保真度细胞分选和基因测序系统正变成高度合乎需要的。然而,细胞捕获系统的传统技术具有阻止细胞特异性测试的广泛采用的各种缺点。例如,流式细胞术要求细胞被同时识别和分选,并将细胞观察限制到细胞被分选的点。流式细胞术无法进行在单个流式细胞术工作流程中对同一细胞的多重分析,并且不允许任意的细胞亚群分选。在其他实例中,传统的微射流设备依赖于用于细胞选择的细胞特异性抗体,其中结合到微射流设备基板的抗体选择性地结合到表达期望抗原的细胞。传统的微射流设备可能也未能在没有细胞损伤的情况下允许后续的细胞移出,且只捕获表达特定抗原的细胞;也可能是所需的非表达细胞不被这些系统捕获。细胞生存力的这种丧失可以阻止对分选的或分离的细胞执行活细胞测定。细胞过滤器可以基于大小来分离样品成分而没有明显的细胞损伤,但遭受堵塞并且不允许特定的细胞识别、个体细胞的分离和已识别的个体细胞的回收。在这个领域中的其他技术在它们允许多重测定在个体细胞上被执行,同时将样品制备步骤和过于昂贵的仪器减到最少的能力方面被进一步限制。

[0006] 在单细胞分析领域中,稀有细胞例如癌症干细胞的分离、识别和遗传分析目前在准确性、速度和通量方面遭受限制。此外,许多系统不维持活细胞或从细胞中提取的生物材料的生存力和/或质量,因为用于在分离过程期间识别细胞的典型方法需要在更高的温度下的固定、染色或额外的生物化学过程,其除了减慢处理速度之外还可能损害细胞和/或它的遗传材料。因此,在细胞分选领域中需要创建用于分离和分析细胞的新的和有用的系统和方法,其能够最大化细胞及其细胞内成分,包括生物分子例如信使RNA的生存力用于下游分析。此外,还包括生物分子的分子索引和遗传转录物的加工的细胞分离工作流程可以为提高细胞分析的应用的通量和准确性提供若干益处,包括对全长mRNA、全基因组和/或单细胞外显子组的大规模平行RNA测序。迄今为止,还没有在单个统一设备上促进单细胞分离和DNA/RNA测序文库构建的系统 and/或方法。本文所述的系统和方法通过整合功能例如单细胞捕获、生物分子标记、流体输送和温度调制解决了这些限制,以便使更高级的生物化学过程

能够在用于捕获细胞的同一阵列的孔内在个体细胞上被执行(例如,逆转录、聚合酶链式反应、单细胞基因组(DNA/RNA)测序),从而极大地提高期望细胞的捕获效率并增加单细胞实验工作流程的速度和分析能力。

发明内容

[0007] 本发明提供了以下项目:

[0008] 1.一种用于分离和分析靶细胞群体的方法,包括:

[0009] • 将靶细胞群体接收到在基板的表面平面处限定的孔阵列中,其中所述孔阵列中的每个孔垂直于所述表面平面并在所述表面平面下方延伸到所述基板中,并且在未占据状态中;

[0010] • 实现所述孔阵列的至少包括第一孔和第二孔的孔的第一子集的颗粒可接近状态,其中靶细胞群体的第一靶细胞被接收在所述表面平面下方、穿过所述第一孔的开口端,并且所述靶细胞群体的第二靶细胞被接收在所述表面平面下方并穿过所述第二孔的开口端;

[0011] • 将颗粒群体分配到所述孔阵列中,其中所述颗粒群体中的每个颗粒与探针偶联,所述探针对与所述靶细胞群体相关的生物分子具有结合亲和力;

[0012] • 在将所述颗粒群体分配到所述孔阵列中后,

[0013] ○实现在所述颗粒可接近状态中的所述孔的第一子集的至少所述第一孔的理想状态,其中实现所述理想状态包括将所述颗粒群体的第一颗粒在所述表面平面下方接收到所述第一孔中,从而将所述第一颗粒与所述第一靶细胞共同定位在所述第一孔内;以及

[0014] ○实现在所述颗粒可接近状态中的所述孔的第一子集的至少所述第二孔的颗粒饱和状态,其中实现所述颗粒饱和状态包括将所述颗粒群体的至少第二颗粒和第三颗粒接收到所述第二孔中,其中所述第二颗粒被接收在所述表面平面下方,并且所述第三颗粒横穿所述表面平面;

[0015] • 对整个孔阵列重新分配部分地保留的颗粒的子集,所述部分保留的颗粒的子集至少包括所述第三颗粒,其中在部分地保留的颗粒的所述子集中的每个部分地保留的颗粒横穿所述表面平面,并且其中重新分配部分地保留的颗粒的所述子集包括:

[0016] ○使颗粒分配流体沿着流体路径穿过流体储器沿着所述表面平面并以平行于所述表面平面的方向跨越所述孔阵列流动,其中所述颗粒分配流体使横穿所述表面平面的至少所述第三颗粒从所述第二孔流出,从而将所述第二孔从所述颗粒饱和状态转变到理想状态;以及

[0017] • 处理所述孔阵列的至少包括所述第一孔和所述第二孔的理想孔的集合,其中在所述理想孔的集合中的每个孔在所述理想状态中,并且其中在所述理想状态中的每个孔包含恰好所述靶细胞群体中的一个靶细胞和恰好所述颗粒群体中的一个颗粒。

[0018] 2.一种用于分离和分析靶细胞群体的方法,包括:

[0019] • 将靶细胞群体接收到在基板的表面平面处限定的孔阵列中,其中所述孔阵列中的每个孔垂直于在所述基板内的表面平面并在所述表面平面下方延伸;

[0020] • 实现所述孔阵列的孔的第一子集的颗粒可接近状态,其中所述孔的第一子集的第一孔将所述靶细胞群体的第一靶细胞接收在所述表面平面下方、穿过所述第一孔的开口

端;

[0021] • 在将所述靶细胞群体接收到所述孔阵列中之后,将颗粒群体分配到所述孔阵列中,其中所述颗粒群体的每个颗粒与探针偶联,所述探针对与所述靶细胞群体相关的生物分子具有结合亲和力;

[0022] • 在将所述颗粒群体分配到所述孔阵列中后,

[0023] ◦实现所述孔的第一子集的至少所述第一孔的颗粒饱和状态,其中实现所述颗粒饱和状态包括将在所述表面平面下方的第一颗粒和横穿所述表面平面的部分地保留的颗粒接收到所述第一孔中;

[0024] • 对整个所述孔阵列重新分配部分地保留的颗粒的子集,其中部分地保留的颗粒的所述子集中的每个部分地保留的颗粒横穿所述表面平面,其中重新分配部分地保留的颗粒的所述子集包括:

[0025] ◦使颗粒分配流体沿着流体路径穿过流体储器沿着所述表面平面并以平行于所述表面平面的方向跨越所述孔阵列流动,其中所述颗粒分配流体使横穿所述表面平面的所述部分地保留的颗粒从所述第一孔流出,从而将所述第一孔从所述颗粒饱和状态转变到理想状态;以及

[0026] • 处理所述孔阵列的至少包括所述第一孔的理想孔的集合,其中所述理想孔的集合中的每个孔在所述理想状态中,并且包含恰好所述靶细胞群体中的一个靶细胞和恰好所述颗粒群体中的一个颗粒。

[0027] 3. 根据项目2所述的方法,还包括:

[0028] • 在使所述部分地保留的颗粒从所述第一孔流出后,将所述部分地保留的颗粒传输到所述流体路径的下游的整个所述孔阵列;以及

[0029] • 将所述部分地保留的颗粒接收到下游孔中,其中所述下游孔在颗粒可接近状态中,并且其中所述部分地保留的颗粒被接收在所述表面平面下方到所述下游孔中,从而将所述下游孔从颗粒可接近状态转变到理想状态。

[0030] 4. 根据项目2所述的方法,还包括在将所述颗粒群体分配到所述孔阵列中后,

[0031] • 实现所述孔的第一子集的至少第二孔的理想状态,包括将在所述表面平面之下的恰好所述颗粒群体中的一个颗粒接收到所述第二孔中。

[0032] 5. 根据项目2所述的方法,其中将所述靶细胞群体接收到所述孔阵列中还包括使细胞分配流体沿着所述流体路径流动,其中所述细胞分配流体使部分地保留的靶细胞的子集流出到整个所述孔阵列,其中在所述部分地保留的靶细胞的子集中的每个部分地保留的靶细胞横穿所述表面平面。

[0033] 6. 根据项目5所述的方法,还包括:

[0034] • 在将所述靶细胞群体接收到所述孔阵列中后,

[0035] ◦实现所述孔阵列的孔的第二子集的细胞饱和状态,其中实现所述细胞饱和状态包括将在所述表面平面下方的靶细胞和横穿所述表面平面的部分地保留的靶细胞接收到所述孔的第二子集的至少第一细胞饱和孔中;以及

[0036] ◦通过使所述细胞分配流体沿着所述流体路径流动来使至少所述第一细胞饱和孔从所述细胞饱和状态转变到所述颗粒可接近状态,其中所述细胞分配流体使所述部分地保留的靶细胞从所述第一细胞饱和孔流出。

[0037] 7. 根据项目6所述的方法,还包括:

[0038] • 在使所述部分地保留的靶细胞从所述第一细胞饱和孔流出后,将所述部分地保留的靶细胞传输到所述流体路径的下游的整个所述孔阵列;以及

[0039] • 将所述部分地保留的靶细胞接收到在所述第一细胞饱和孔下游的未占据孔中,其中所述部分地保留的细胞被接收在所述未占据孔的所述表面平面下方,从而将所述未占据孔从未占据状态转变到所述颗粒可接近状态。

[0040] 8. 根据项目2所述的方法,其中使所述颗粒分配流体沿着所述流体路径流动包括利用耦合到所述流体储器的流控制模块来控制所述颗粒分配流体的流动方向,其中所述流动方向在第一方向和与所述第一方向相反的第二方向之间交替。

[0041] 9. 根据项目2所述的方法,其中使所述颗粒分配流体沿着所述流体路径流动包括利用耦合到所述流体储器的流控制模块来控制所述颗粒分配流体的流速,其中所述流速大于0.5mL/min。

[0042] 10. 根据项目2所述的方法,其中所述生物分子是核糖核酸,并且所述颗粒群体中的每个颗粒的探针包括被配置为结合到核酸内容物的核苷酸序列。

[0043] 11. 根据项目2所述的方法,其中处理所述理想孔的集合包括:

[0044] • 在所述理想孔的集合的至少所述第一孔内,从所述第一靶细胞释放所述生物分子,包括:

[0045] ◦使处理试剂沿着所述流体路径流动并进入所述孔阵列内,其中所述孔阵列的温度用耦合到所述基板的热控制模块维持在15℃以下;以及

[0046] • 在从所述第一靶细胞释放所述生物分子后,使所述生物分子结合到所述第一颗粒的第一探针以产生与所述第一颗粒偶联的第一遗传复合体。

[0047] 12. 根据项目11所述的方法,还包括:

[0048] • 在所述理想孔的集合的所述第一孔内,对所述第一遗传复合体执行生物化学过程。

[0049] 13. 根据项目12所述的方法,其中执行所述生物化学过程包括在所述理想孔的集合的至少所述第一孔中执行逆转录,从而在所述第一孔中产生与所述第一遗传复合体相关的第一核苷酸序列。

[0050] 14. 根据项目11所述的方法,其中处理所述理想孔的集合还包括从所述理想孔的集合的第一孔至少移出所述第一遗传复合体的一部分。

[0051] 15. 根据项目14所述的方法,其中所述颗粒群体中的每个颗粒的所述探针通过可光解的接头偶联到所述颗粒群体中的颗粒,其中从所述理想孔的集合的第一孔至少移出所述第一遗传复合体的一部分包括用至少一个波长的光照射所述孔阵列以从所述第一颗粒释放所述第一遗传复合体的所述部分。

[0052] 16. 项目15的方法,其中光的波长在300和400nm之间。

[0053] 17. 根据项目11所述的方法,其中所述第一探针包括针对所述第一探针的第一独特标识符,并且其中产生所述第一遗传复合体将所述第一独特标识符与所述第一靶细胞相关联。

[0054] 18. 根据项目2所述的方法,其中所述孔阵列的每个孔被配置成实现所述理想状态,其中每个孔的长度在20和75微米之间,并且每个孔的宽度在20和30微米之间。

[0055] 19. 根据项目2所述的方法,其中所述孔阵列中的每个孔在所述基板内限定棱柱体积,并且其中所述孔跨越所述基板的所述表面平面以六边形紧密堆积配置布置。

[0056] 20. 根据项目2所述的方法,其中在所述孔阵列中的每个孔的开口端限定六边形,其中每个孔的所述开口端的水平横截面与所述表面平面对准。

[0057] 21. 一种用于以单细胞形式分析靶细胞群体的方法,包括:

[0058] • 对整个限定在基板的表面平面处的孔阵列分配颗粒群体,其中所述孔阵列的第一孔包括第一内表面和第一孔腔,所述第一孔腔垂直于所述表面平面并在所述表面平面下方延伸并进入所述基板内,并且其中所述颗粒群体中的每个颗粒可脱离地偶联到探针,所述探针包括对所述第一孔腔的第一内表面具有第一结合亲和力的第一区域和对与所述靶细胞群体相关的生物分子具有第二结合亲和力的第二区域;

[0059] • 通过将所述颗粒群体的第一颗粒接收在所述表面平面下方并穿过所述第一孔的开口端到至少所述第一孔中来将所述颗粒群体捕获到所述孔阵列中;

[0060] • 在所述孔阵列的所述第一孔中,从所述第一颗粒释放第一探针;

[0061] • 当从所述第一颗粒释放所述第一探针后,将所述第一探针的所述第一区域结合到所述第一孔的所述第一内表面;

[0062] • 在将所述第一探针偶联到所述第一孔后,从所述第一孔移出所述第一颗粒;

[0063] • 通过将所述靶细胞群体的第一靶细胞接收在所述表面平面下方并穿过所述第一孔的所述开口端到至少所述第一孔中来将所述靶细胞群体捕获到所述孔阵列中;

[0064] • 在所述孔阵列的所述第一孔内,从所述第一靶细胞释放第一生物分子,包括:

[0065] ○使处理试剂沿着流体路径穿过流体储器跨越所述孔阵列沿着所述表面平面并以平行于所述表面平面的方向流动;以及

[0066] • 产生第一遗传复合体,所述第一遗传复合体包括所述第一生物分子和偶联到所述第一孔的所述第一内表面的所述第一探针。

[0067] 22. 根据项目21所述的方法,其中将所述颗粒群体捕获到所述孔阵列中还包括使颗粒分配流体沿着所述流体路径流动,其中所述颗粒分配流体使部分地保留的颗粒的子集从所述孔阵列的颗粒饱和孔的子集流出,其中所述部分地保留的颗粒的子集中的第一部分地保留的颗粒穿过第一颗粒饱和孔的开口端横穿所述表面平面。

[0068] 23. 根据项目22所述的方法,还包括:

[0069] • 在使所述第一部分地保留的颗粒从所述第一颗粒饱和孔流出后,将所述第一部分地保留的颗粒传输到所述流体路径下游的整个所述孔阵列;以及

[0070] • 将所述第一部分地保留的颗粒接收到在第一颗粒饱和孔下游的未占据孔中,其中所述第一部分地保留的颗粒下降到所述未占据孔的所述表面平面下方。

[0071] 24. 根据项目22所述的方法,其中使所述颗粒分配流体流动包括利用耦合到所述流体储器的流控制模块来控制所述颗粒分配流体的流速,其中所述流速大于0.5mL/min。

[0072] 25. 根据项目22所述的方法,其中使所述颗粒分配流体流动包括利用耦合到所述流体储器的流控制模块来控制所述颗粒分配流体的流动方向,其中所述流动方向在第一方向和与所述第一方向相反的第二方向之间交替。

[0073] 26. 根据项目21所述的方法,其中将所述靶细胞群体捕获到所述孔阵列中还包括使细胞分配流体沿着所述流体路径流动,其中所述细胞分配流体使部分地保留的靶细胞的

子集从所述孔阵列的细胞饱和孔的子集流出,其中第一部分地保留的靶细胞穿过第一细胞饱和孔的开口端横穿所述表面平面。

[0074] 27.根据项目26所述的方法,还包括:

[0075] • 在使所述第一部分地保留的靶细胞从所述第一细胞饱和孔中流出后,将所述第一部分地保留的靶细胞传输到所述流体路径下游的整个所述孔阵列;以及

[0076] • 将所述第一部分地保留的靶细胞接收到在所述第一细胞饱和孔下游的未占据孔中,其中所述第一部分地保留的细胞下降到所述未占据孔的所述表面平面下方。

[0077] 28.根据项目21所述的方法,其中所述颗粒群体中的每个颗粒的所述探针通过可光解的接头可脱离地偶联到所述颗粒群体中的颗粒,并且其中从所述第一颗粒释放至少所述第一探针包括用至少一个波长的光照射所述孔阵列以从所述第一颗粒释放所述第一探针。

[0078] 29.根据项目28所述的方法,其中光的波长在300和400nm之间。

[0079] 30.根据项目21所述的方法,其中所述第一颗粒的所述第一探针通过可逆化学键偶联到所述第一颗粒。

[0080] 31.根据项目21所述的方法,其中所述第一生物分子是核糖核酸,并且所述第一颗粒的所述第一探针包括被配置为结合到核酸内容物的核苷酸序列。

[0081] 32.根据项目21所述的方法,其中所述第一探针包括针对所述第一探针的第一独特标识符,并且其中产生所述第一遗传复合体将所述第一独特标识符与所述第一靶细胞相关联。

[0082] 33.根据项目21所述的方法,其中产生第一遗传复合体还包括利用耦合到所述基板的热控制模块来将所述孔阵列的温度降低到10℃以下。

[0083] 34.根据项目21所述的方法,还包括对所述第一遗传复合体执行生物化学过程。

[0084] 35.根据项目34所述的方法,其中执行所述生物化学过程包括执行逆转录以在所述第一孔中至少产生与所述第一遗传复合体相关的第一核苷酸序列。

[0085] 36.根据项目34所述的方法,其中执行所述生物化学过程包括在至少所述第一孔中执行聚合酶链式反应(PCR)以在所述第一孔中产生与所述第一靶细胞相关的扩增的遗传内容物。

[0086] 37.根据项目21所述的方法,还包括从所述第一孔至少移出所述第一遗传复合体的一部分。

[0087] 38.根据项目21所述的方法,其中所述孔阵列中的每个孔被配置为保留下列项之一在所述表面平面下方:恰好所述靶细胞群体中的一个靶细胞和恰好所述颗粒群体中的一个颗粒,其中每个孔的长度在10和40微米之间,并且每个孔的宽度在20和40微米之间。

[0088] 39.根据项目21所述的方法,其中所述孔阵列中的每个孔在所述基板内限定棱柱体积,并且其中所述孔跨越所述基板的所述表面平面以六边形紧密堆积配置布置。

[0089] 40.根据项目21所述的方法,其中所述孔阵列中的每个孔的所述开口端限定六边形,其中每个孔的所述开口端的水平横截面与所述表面平面对准。

附图简述

[0090] 图1是用于分离和分析细胞的系统的一部分的实施方案的示意图;

- [0091] 图2A-2C描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形；
- [0092] 图3A-3B描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形；
- [0093] 图4A描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形；
- [0094] 图4B-4E描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的示例配置的示意图；
- [0095] 图5A-5C描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形；
- [0096] 图6A-6B描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形；
- [0097] 图7描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形的实例；
- [0098] 图8A-8B描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形；
- [0099] 图9A-9B描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的示例配置的示意图；
- [0100] 图10描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形的示意图；
- [0101] 图11A-11B描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形的示意图；
- [0102] 图12A-12B描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形；
- [0103] 图13A描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形；
- [0104] 图13B描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形；
- [0105] 图14描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形；
- [0106] 图15A-15B描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形的横截面视图；
- [0107] 图16描绘用于分离和分析细胞的系统的变形；
- [0108] 图17描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形；
- [0109] 图18描绘用于分离和分析细胞的方法的实施方案的流程图；
- [0110] 图19描绘用于分离和分析细胞的方法的一部分的变形的示意图；
- [0111] 图20描绘用于分离和分析细胞的方法的实施方案的一部分的变形的示意图；
- [0112] 图21描绘用于分离和分析细胞的方法的实施方案的一部分的变形的示意图；
- [0113] 图22描绘用于分离和分析细胞的方法的实施方案的一部分的变形的示意图；
- [0114] 图23描绘用于分离和分析细胞的方法的实施方案的一部分的变形的示意图；
- [0115] 图24描绘用于分离和分析细胞的方法的实施方案的流程图；
- [0116] 图25描绘用于分离和分析细胞的方法的实施方案的一部分的变形的示意图；
- [0117] 图26描绘用于分离和分析细胞的方法的实施方案的一部分的变形的示意图；
- [0118] 图27描绘用于分离和分析细胞的系统和方法的一部分的实施方案的实例；
- [0119] 图28A-28C描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的实施方案的实例；
- [0120] 图29描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形的实例；
- [0121] 图30A-30B描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形的实例；
- [0122] 图31A-31C描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形的实例；
- [0123] 图32A-32C描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形的实例；
- [0124] 图33描绘用于分离和分析细胞的系统的一部分的变形的实例；
- [0125] 图34描绘用于分离和分析细胞的方法的实施方案的一部分的三个变形的示意图；
- [0126] 图35描绘用于分离和分析细胞的系统的实施方案。
- [0127] 优选实施方案的描述
- [0128] 本发明的优选实施方案的下列描述并不意欲将本发明限制到这些优选实施方案，而更确切地使本领域中的任何技术人员能够制造和使用本发明。

[0129] 1. 系统

[0130] 如图1所示,用于分离和分析细胞的集合的系统100包括:具有宽表面的基板110;在基板的第一侧112(例如,上宽表面)限定的孔阵列120,孔阵列120中的每个孔128包括在第一侧112处限定的开放表面122、在基板内靠近直接与第一侧112相对的第二侧114(例如,下宽表面)限定的底表面124以及在底表面124和开放表面122之间延伸以形成孔128的孔腔128的一组壁(a set of walls)126。孔阵列120可以布置在基板的有源区(active region)116中或者在任何其他合适的布置中。为了便于将样品或流体40输送到孔阵列120,系统100还可以包括流体输送模块140,其被配置为耦合到基板110并将包含该细胞的集合的样品和/或另一种流体40转移到孔阵列120。此外或可选地,系统100可以包括流量控制子系统(例如,压力泵系统)180,其被配置为控制通过系统100的流体40(例如,生物样品、处理试剂、包含非细胞颗粒的溶液)的流动(例如,流体的方向、速度、体积)以及通过系统的需要控制和/或致动的任何其他合适的流体。此外或可选地,系统100可以包括用于控制系统100的部分的温度的热控制模块190。此外或可选地,系统100可以包括成像子系统194,其被配置为执行孔阵列120的内容物的光学成像、照明或辐射,并且实现被孔阵列120的孔保留的细胞的识别、定位和量化。此外或可选地,系统100可以包括提取模块,其可以从孔阵列中提取一个或更多个:靶细胞、颗粒、细胞-颗粒对、遗传复合体和/或遗传产物。然而,系统100的变形可以包括在任何适当的配置和/或组合中的任何其他适当的部件,如在标题为“Cell Capture System and Method of Use”且于2016年10月25日提交的美国申请号15/333,420、标题为“System for capturing and analyzing cells”且于2014年3月13日提交的美国申请号14/208,298和标题为“System and Method for Isolating and Analyzing Cells”且于2014年5月28日提交的美国申请号14/289,155中所述的,每个申请通过此引用被全部并入。

[0131] 系统100起作用来在已知的可寻址的位置处分离、捕获、保留和分析处于单细胞形式和单簇形式中的至少一种形式的细胞群体20的细胞,并进一步便于可在个体的靶细胞(例如,在生物样品中的稀有细胞)或细胞簇(例如,双联体、三联体)上执行的多个单细胞测定的执行。在优选的实施方案中,系统100起作用来便于所捕获的单细胞的遗传文库的制备(例如,从来自裂解的靶细胞的所捕获的mRNA产生的cDNA、扩增的cDNA、扩增的DNA),用于在细胞捕获后紧接的(proximately following)和在同一设备内的测序。一旦细胞在由单细胞捕获孔确定的限定位置上被捕获,系统100的流体输送模块就可用于同时、顺序地和/或重复地提供和输送试剂以使各种细胞、亚细胞或分子反应能够在每个单细胞/细胞簇中被执行。此外或可选地,系统100可以起作用来捕获和处理非细胞颗粒(例如,核酸材料、其他生物材料、其他非生物材料、包含分子探针或试剂的颗粒等)以及单细胞和单个非细胞颗粒(例如,细胞-颗粒对)的组合。此外,系统100可以实现孔阵列以及此外或可选地被输送到孔阵列的流体40的受控和快速热调制(例如,从95°C到5°C的加热和冷却循环),以维持细胞或生物材料生存力,提高生物测定的效率,并在孔集合内执行各种生物化学过程。系统100还可以允许在单个细胞/单个簇级别对每个所捕获的细胞上的事件的光学询问和检测。系统100可以此外或可选地实现一个或更多个所捕获的细胞或非细胞颗粒的选择性释放和/或选择性移出,用于进一步的处理和分析。在一些实施方案中,系统100可以赋予在同一微射流芯片中或者在芯片外的实时细胞跟踪、活细胞回收、生物化学过程(例如,细胞裂解、细胞

固定、聚合酶链式反应、逆转录等)和选择性下游分子分析(例如电泳、测序、荧光成像)的益处。在一些实施方案中,系统100可以用于捕获循环肿瘤细胞(CTC)和CTC的亚群体,例如循环干细胞(CSC),但可以此外或可选地用于捕获可能令人感兴趣的任何其他合适的细胞(例如,红细胞、单核细胞、巨噬细胞、破骨细胞、树突细胞、小神经胶质细胞、T细胞、B细胞、巨核细胞、生殖细胞、哺育细胞(nurse cells)、神经细胞、干细胞等)或生物材料。系统100优选地被限定在基板110、更优选地微射流芯片上,但可以可选地位于任何合适的基板上或者由任何合适的基板限定。

[0132] 在特定的实例中,系统100可与可操作用于单细胞聚合酶链式反应(PCR)的方法一起使用,其中这种系统可便于在孔内以单细胞形式(或单簇形式)高效捕获细胞(例如,100个细胞、1000个细胞、10,000个细胞、100,000个细胞、1,000,000个细胞等)以及将试剂芯片上输送到孔、培养和热循环,以便提供细胞捕获到PCR工作流程。更详细地,系统的微射流和其他部分可以可操作地来使用PCR用具有单细胞或单细胞簇分辨率的样品(例如前列腺临床样品)来执行测定(例如,与ARV7 mRNA相关的测定)。在特定实例中,系统100可以在与孔阵列120相关联的流体储器160内容纳低至10 μ l至最多1mL数量级的样品体积,其中样品可以包含在500至100,000个靶细胞之间的范围,从而提供处理包含大量感兴趣细胞的较大样品体积的能力。

[0133] 系统100优选地不用涂有抗体的孔实现自包括细胞群体20的生物样品中的个体细胞捕获和保留,并且优选地在整个分离、捕获、保留和/或移出中保持细胞的生存力。优选地通过在平行于基板的宽表面(例如,实质上平行于基板的宽表面、在平行于基板的宽表面的0.1度内、在平行于基板的宽表面的1度内、在平行于基板的宽表面的45度内、完全平行于基板的宽表面等)的方向上在孔阵列120上方的流体层内使包含一组单细胞(a group of single cells)的样品流动或分配包含一组单细胞的样品并且一旦细胞在重力的影响下穿过流体层朝着孔阵列120下降就捕获细胞来实现个体细胞捕获。可选地,可以通过在孔阵列120上以垂直于基板的宽表面的方向将包含一组单细胞的样品输送到由流体储器160提供的流体层中并且一旦细胞在重力的影响下穿过流体层朝着孔阵列120下降就捕获细胞来实现个体细胞捕获。然而,在一些变形中,个体细胞捕获可以此外或可选地通过任何合适的机制来实现,以便于单细胞转移到孔集合中的孔内。此外,系统100优选地被配置成防止不期望的流体流,不期望的流体流可以从基板提起细胞或者从细胞被捕获并完全保留在其中的孔腔128移出细胞/细胞簇。然而,在一些变形中,系统100可以被配置成便于以任何合适的方式移动细胞/细胞簇。流体(例如,生物样品、处理试剂40)通过系统100的流动路径优选地是多方向的和均匀的,使得在系统100中的每个细胞/细胞簇经历一致的条件(例如,流动性质例如压力、密度、温度、溶液组成和其他合适的性质的沿着流动路径的梯度长度标度相对于系统的长度标度是大的);然而,流动路径可以可选地是单向的、双向的或者具有任何其他合适的特性。在特定实例的变形中,如图2A-2C所示,通过系统的流体的流动路径141包括相等长度(例如实质上相等长度、在可制造性公差内相等长度等)的(例如,耦合到孔阵列的歧管的)一组流体路径146,其被配置成使得在歧管入口440处供应到该组流体路径146的试剂在实质上相同的时间点(例如,同时、在1秒内、在1分钟内等)到达入口444的每个阵列(例如,单个孔、沿着储器的第一边缘的区域、沿着基板的有源区的第一边缘的区域等),并经过基板的有源区116(例如,包含孔阵列120)通过出口445的阵列传递到歧管出口442。可以此

外通过控制通过系统的样品流速(例如,通过调节流速,使得流动的特征长度标度具有与孔的特征长度标度相似的数量级,通过在高和低流动条件之间抖动(dithering)流速,等等)或者通过任何其他合适的手段来实现细胞运输、分离、分选和生存力维持。然而,通过系统100的流体的流动特性可以以另外方式被配置。

[0134] 在操作中,系统100优选地接收包括细胞群体20的生物样品,并便于生物样品均匀地分配在整个孔阵列120上(across the array of wells 120)(例如,使用均匀交叉流动、涂抹、细胞自旋程序、在阵列的不同区域处用移液管吸取样品的等分试样等)。然而,系统100可以此外或可选地便于使用由流量控制子系统180施加的正压力(例如,在阵列的入口处的正压力)和/或负压力(例如,在阵列的出口处的负压力)在整个孔集合上分配流体40(例如,生物样品、处理试剂、非细胞颗粒)。此外或可选地,便于样品分配的致动压力可以以脉宽调制方式或正弦方式循环以提供净致动压力,在入口处净正的或者在出口处净负的。因此,当生物样品在整个孔阵列120上流动时,具有限定特性(例如,基于尺寸的特性、基于密度的特性、基于粘附的特性等)的期望细胞可以被截留在孔128内。例如,在被配置为捕获CTC的系统100的变形中,优选地基于限定CTC细胞的形态特征来配置孔,以便便于单细胞或单簇形式的CTC的捕获和保留。然而,系统100可以此外或可选地被配置成以任何其他合适的形式保留和便于处理任何其他合适的感兴趣的颗粒。致动压力优选地由与系统100流体连通的流量控制子系统180(例如,手动操作的移液管、自动流体处理机器人、真空压力系统、机电微型泵等)提供,但可以可选地或此外由任何合适的机制提供。

[0135] 在图35中所示的系统100的优选实施方案中,多达两个个体的孔阵列可以并行地(同步地、异步地)被处理。然而,系统的部件可以以任何大数量被配置以容纳任何合适数量的阵列。

[0136] 1.1系统-基板

[0137] 如图3A-3B所示,基板110起作用来提供介质,孔阵列120(一组微孔、微孔、孔)可以被限定在该介质处。在变形中,基板110可以具有第一侧(例如,上宽表面)112和与第一侧直接相对的第二侧(例如,下宽表面)。基板110的上宽表面112优选地是平坦表面,使得系统100的微射流元件(例如,入口、出口、入口歧管、出口歧管、流体通道等)至少部分地被限定在平坦表面处。可选地,基板110的上宽表面112可以是非平坦表面,使得系统100的微射流元件至少部分地被限定在非平坦表面处。在变形中,非平坦表面可以是凹表面、凸表面或具有凹、平坦和/或凸表面的表面。这类变形可以便于在孔阵列120处沉积和分配样品的各种方法。在包括非平坦上宽表面112的基板110的任何变形中,非平坦部分优选地是浅的(例如,具有相对于宽表面的宽度的小深度)或短的(例如,具有相对于宽表面的宽度的小高度);然而,非平坦部分可以此外或可选地包括深(例如,具有相对于宽表面的宽度的大深度)或高(例如,具有相对于宽表面的宽度的大高度)的部分。然而,该表面可以可选地具有任何其他合适的轴或对称类型,或者可以是非对称的。在优选的应用中,基板的第一侧可以限定表面平面118的对准轴,其中表面平面118与基板的第一侧平行且共轴,并且在基板的第一侧和流体储器的底部之间对准,流体例如样品或处理试剂可以通过该流体储器流动以接近在基板处的孔阵列。

[0138] 基板110的组成可以提供与下列项中的任一个或更多个相关的期望特性:机械特性(例如,作为机械刺激的基板机械性质)、光学性质(例如,透明度)、电性质(例如,导电性

(conductivity))、热性质(例如,导热性(conductivity)、比热等)、物理特性(例如,润湿性、孔隙率等)以及任何其他合适的特性。基板110优选地由具有高透明度的刚性材料(例如,透明材料、半透明材料)组成,以便便于基板110的成像以分析所捕获的单细胞/细胞簇。高透明度材料优选地是光学透明的,但可以此外或可选地对电磁波谱的其他部分(例如,微波、近红外、紫外等)是透明的和/或半透明的。在几个这样的变形中,基板110可以由以下项中的任何一种或更多种组成:玻璃、陶瓷、基于硅酮的材料(例如,聚二甲基硅氧烷(PDMS))、聚合物(例如,琼脂糖、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚乙二醇等)、纸、多孔材料和具有高透明度的任何其他合适的材料,包括其复合物。可选地,基板110可以由具有任何其他合适的光学性质的任何其他合适的材料组成。此外或可选地,基板可以由以下项中的任何一种或更多种组成:陶瓷材料、半导体材料、聚合物和任何其他合适的材料。

[0139] 可以使用下列方法中的任一个或更多个来处理基板110:蚀刻方法、模制方法、印刷方法(例如,3D印刷工艺)、机械加工方法以及适合于脆性、弹性或易延展基板材料的任何其他合适的制造工艺。此外,可以通过下列工艺中的任一个或更多个来产生在上宽表面112处限定的特征,包括孔阵列:模制、抛光、在流动相中旋转材料然后使材料凝固、机械加工、印刷(例如3D印刷)、蚀刻和任何其他合适的工艺。在特定实例中,使用三掩模光刻工艺和深反应离子蚀刻(DRIE)工艺以将微射流元件蚀刻到硅模具中来在硅模具内限定孔阵列120。在该特定实例中,然后使用热压印工艺来将硅模具的所蚀刻的元件转印为聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)薄片作为基板110。在该特定实例中的基板110具有3英寸x 1英寸的尺寸,以便实质上匹配玻璃显微镜载玻片的尺寸。在该特定实例的变形中和/或对于孔阵列120的其他变形,环烯烃聚合物(COP)的热压印可以替代PMMA以形成孔阵列120的微射流结构。然而,基板110可以可选地是以任何其他合适的方式处理的任何其他合适的基板120。

[0140] 优选地,基板包括允许与系统100的其他子部件的相互作用(例如,可逆或不可逆的连接、耦合)的特征。在一个变形中,基板110可以耦合到流体输送模块140的部件,其中基板包括入口142和出口144以将流体40传输到基板的有源区116中和从有源区116传输出去。在这个变形的实例中,入口歧管的入口通道组和出口歧管164的出口通道组可以直接嵌在上宽表面和下宽表面之间的基板内,但可以此外或可选地被制造到基板的上宽表面的至少一部分内。在另一个实例中,如图28A-28C、图29以及图30A和30B所示,基板110可以与包含在基板的有源区上方的凹槽152的第一板150对准,其中当第一板150附着到基板时,第一板150的区域可以在孔阵列上方被对准以协作地限定流体储器160,以在系统100的操作期间将流体传送到整个孔阵列。流体储器160可由储器盖164密封,储器盖164可以可逆地附着到第一板150,使得组合的组件提供用于输送平行于孔阵列的表面流动的表面流动的试剂、空气、油或其它材料的流体路径162。为了便于沿着流体路径162的不混溶的液体的移置(水代替油,油代替水)以及此外或可选地不同流体相的移置(水代替空气或空气代替水),可重新密封的储器盖164可以包括在储器盖的底部处、在插入流体储器内的储器盖的区域处的一组沟槽165。储器盖164的沟槽165可以具有以下数量级的特征尺寸:大约25微米、50微米、100微米、150微米、200微米、250微米、300微米、350微米、400微米、500微米和/或1毫米。沟槽的数量和沟槽165的尺寸可以被调节以允许在系统中提供液体的特定死体积(dead-volume),例如大约:10微升、25微升、50微升、75微升、100微升、150微升和/或200微升。盖的材料可以是光

学透明的以允许在微孔阵列中捕获的细胞或珠的成像和/或UV辐射用于特定生物分子从微孔的表面、颗粒和/或遗传复合体的光裂解,如第2节中所述的。储器盖164还适应弹性表面(图33)以允许与射流歧管的适当密封。可再密封的盖可以在射流操作开始时、在过程的中间或在过程结束时根据需要被打开或关闭,以将细胞输送到孔阵列、将颗粒输送到孔阵列、将试剂输送到孔阵列和/或从孔阵列移出特定的细胞、颗粒和/或流体。储器盖164被设计成容易手动地或以自动方式附着或移出,然而可以被配置成以任何其他合适的方式操作以提供完整的射流系统。

[0141] 在第二变形中,基板110可以附着到基板平台105,该基板平台105起作用来可逆地将基板附着到平台、加热元件(例如,热控制模块194)和/或在其上执行测定的载物台并使基板与平台、加热元件和/或载物台对准,其中载物台可以用于物理地调节基板在系统100内的位置以改善孔阵列对系统的其他元件例如成像子系统194、热控制模块190和/或提取模块的接近。优选地,基板平台105可以被配置成容纳、固定和以高精度操纵具有各种阵列配置(例如,具有50,000个孔的阵列、具有1M个孔的阵列等)的基板,并且可以包括可选的基板附着机构110。如在图30A-30B、图31A-31C、图32A-32C和图33中描绘的实例中所示的,基板平台可以包括可以容纳和支撑储器盖164的平台盖115,其中平台盖115起作用来可逆地将储器盖164固定和密封到由附着到基板的第一板150形成的流体储器160中。在变形中,平台盖115可以包括弹性垫圈或密封元件和制动柱塞,该制动柱塞施加在1-4磅的范围内的压力,以便气密地密封流体储器。在特定的应用中,平台盖115可以允许孔阵列被观察到(例如,通过成像子系统194,通过肉眼),储器盖164在孔阵列上方的打开或关闭位置上。此外,基板平台的底表面可以包括光学透明和/或高导电性材料,其起接近固定在基板平台处的孔阵列120的区域的作用以实现基板110的光学询问和/或热调制。在优选的应用中,基板平台105可以用于精确地和可再现地将基板放置在热控制模块190的加热元件(例如,热循环器表面)上,以便更好地确保孔阵列的可靠和均匀地暴露于加热/冷却源。然而,基板可以以任何其他合适的方式配置成与系统的任何其他合适的部件接合。

[0142] 1.2系统-孔阵列

[0143] 孔阵列(一组微孔(set of microwells)、微孔、孔)120起作用来在可寻址的已知位置处捕获细胞的集合,使得细胞的集合可以被逐个地(individually)识别、处理和分析。因此,孔阵列120优选地被配置成便于单细胞形式和单簇(例如,细胞-颗粒对)形式中的至少一种形式的细胞捕获。然而,孔阵列120可以此外或可选地被配置成接收任何其他合适形式的任何其他合适类型的颗粒。例如,孔阵列120可以被配置(例如,依尺寸被制造、成形)为接收哺乳动物细胞、胚胎、微球、颗粒、细胞-颗粒对以及缀合到微球的细胞。

[0144] 如图1和图3A-3B所示,孔阵列120优选地被限定在基板110的上宽表面112处,孔阵列120中的每个孔128包括被限定在基板内并靠近第二侧(例如,下宽表面114)的底表面124、直接与底表面124相对并靠近上宽表面的开放表面122以及在限定孔的孔腔128的底表面和开放表面之间延伸的一组壁126。

[0145] 孔阵列120被限定在基板110的有源区116处,其中有源区可以是基板(图2A-2C)的任何合适的区域(例如,1平方英寸、10厘米、2平方英寸、3平方英寸、4平方英寸等)。优选地,基板的有源区(和孔阵列)是系统100的其他部件(包括成像子系统194、流体输送模块140、热控制模块190和/或提取模块)可接近的,以便执行单个所捕获的细胞的分离、处理和分

析。孔阵列120可以包括任何合适数量的孔(例如,在100、1,000、10,000个孔、50,000个孔、100,000个孔、100万个孔、200万个孔、300万个孔、400万个孔、500万个孔、600万个孔、700万个孔、900万个孔、1000万个孔等的规模)。在优选的变形中,孔阵列包括至少250,000个孔。在具体的实例中,孔阵列包括大约100万个孔(图28A-28C和图29)。然而,孔阵列可以以任何其它合适的方式被配置。

[0146] 开放表面122优选地是在基板110中的开口,其提供到孔128的底表面124的通路,并且被配置成从垂直于基板110的上宽表面112的方向接收单个细胞、单个颗粒和细胞或颗粒的单个簇(例如,细胞-颗粒对)中的一种。对于系统被配置为保留细胞-颗粒对的变形,如图3A所示,细胞-颗粒对的每个细胞和颗粒可以顺序地或同时被接收。因此,开放表面122可以具有大于、小于或等于底表面124的尺寸的特征尺寸(例如,宽度、直径、周长等)。在用于捕获循环肿瘤细胞(CTC)和以单个细胞-颗粒对形式的颗粒的实例中,底表面124或开放表面122的特征尺寸可以范围在20至40微米之间,以及孔隙的高度可以范围在20至75微米之间。在另一个变形中,其中系统被配置为保留单个细胞或单个颗粒,如图3B所示,底表面和/或开放表面的特征尺寸可以在20至40微米之间,并且孔隙的高度可以在10至40微米之间。然而,在其他变形中,在孔阵列内的孔的任何尺寸,包括孔隙高度和孔隙宽度可以是在0.5微米至50微米之间的任何值,并且可以任选地基于将由系统100执行的测定、靶细胞的尺寸和/或所使用的颗粒的尺寸来选择。孔阵列120的开放面积(即,在孔集合中的每个孔的开放表面的总面积)优选地大于孔被限定于的基板的区域的总面积的50%;更优选地,开放面积大于总面积的80%。然而,开放面积可以是基板的总面积的任何合适的分数面积或百分比。

[0147] 每个孔的开放表面优选地与基板的上表面齐平地对准(例如,在表面平面118处),但可以可选地在基板内稍微凹陷或者以其他方式被配置。优选地,如图3A和3B所示,孔阵列的孔的开放表面与基板的表面平面118对准,其中开放表面的水平轴与表面平面118同轴。在一个实例中,表面平面118可以是具有平行于基板的上宽表面的横向端面的平面,并且被限定在基板的上宽表面和基板的上宽表面上方的空间的区域的交点处。在特定实例中,表面平面118是布置在基板的上宽表面和位于孔阵列上方的流体储器的下部区域之间的空间边界,并且被限定在孔阵列的开放表面和在流体储器内的流体路径之间的界面处。在优选的应用中,被接收到在表面平面118下方的孔中的细胞和/或颗粒是在孔的开放表面处的流体流不可接近的,且因此被考虑为完全由孔的孔隙128保留,而穿过表面平面118或保持在表面平面118上方的细胞和/或颗粒是流体流可接近的并被传输到流体路径的下游,且因此被考虑为部分地和/或不被孔隙128保留。然而,表面平面118可以此外和/或可选地相对于基板和/或孔阵列的任何尺寸被布置。此外,每个孔的开放表面可以相对于基板、流体储器和/或流体路径的任何区域被定位。

[0148] 在优选的变形中,每个孔的开放表面直接流体地耦合到在孔阵列正上方和横向地在孔阵列之上的流体路径。为了增强经过孔阵列的开放表面的流体流动,每个孔的开放表面可以任选地包括涂层(例如,疏水的、亲水的、静电材料、化学吸引的等)或物理特征(例如,纹理化的、有缺口的、脊状的等)。此外,每个孔的开放表面可以任选地包括被动或主动保留特征以保留和保持单个细胞或单个细胞-颗粒对(例如,当孔隙128被占据时,被物理或化学触发以增加或减小孔的开放表面)。在其中开放表面122具有小于底表面124的尺寸的特征尺寸的一个实例中,如图4A所示,孔128可以具有形成开放表面122的边界的唇缘(lip),

以便提供小于底表面124的尺寸的特征尺寸。唇缘可以是平面的或非平面的,并且可以进一步便于单个细胞或细胞的单个簇保留在孔128处。图4B至4E描绘了每个孔的开放表面的变化,其可以限定用于将细胞和/或颗粒接收到孔腔中的任何几何形状,包括圆形开口、矩形开口、六边形开口或任何其他合适的形状。然而,开放表面122可以包括便于流体流动、细胞接收和/或从孔阵列120的孔128回收颗粒的任何其他合适的特征。

[0149] 底表面124优选地与开放表面122平行、对称和直接相对;然而在一些变形中,底表面124可以可选地不平行于开放表面122、与开放表面122不对称和/或偏离开放表面122。类似于基板110的上宽表面112,底表面124可以是平坦表面或非平坦表面,并且在具有非平坦表面的底表面124的变形中,非平坦表面可以包括具有任何合适的几何特性的凸和/或凹部分,如图5A所示。此外或可选地,如图5B和5C所示,底表面124可以是下列情况中的任何一个或更多个:被纹理化(例如,以便于期望的流体流动行为,吸引或排斥给定的颗粒类型,等等)、由期望多孔性表征、由期望表面处理表征、由固定的颗粒或生物化学部分表征以及由以任何其他合适的方式便于细胞接收和/或保留的任何其他合适的特征表征。尽管在优选的变形中,底表面是闭合的,使得没有流体从室的开放表面流过室的底面,但底表面可以可选地被配置成包括一个或更多个流体通道以允许具有小于靶细胞的特征尺寸的颗粒的流出,以便离开孔腔128。然而,底表面可以以任何其他合适的方式被配置。

[0150] 相对于底表面124和开放表面122,每个孔128优选地具有在底表面124和开放表面122之间延伸的至少一个壁(例如,一组壁)126。在一个变形中,如至少图1和图4A所示的,每个孔的壁126至少部分地将个体的孔128与至少一个其他相邻的孔物理地和流体地分开,限定孔的深度、宽度和/或横截面尺寸,并且优选地垂直于由开放表面122的水平轴限定的平面。优选地,壁126的壁厚在4-5微米之间,但可以是小于10微米的任何尺寸。壁126可以从由开放表面122限定的平面垂直延伸到底表面124以限定孔腔128;因此,在一些变形中,在孔阵列中的每个孔的孔腔128可以是棱柱的(例如,圆柱形棱柱的、六边形棱柱的、多边形棱柱的、非多边形棱柱的等)。在具体的实例中,每个孔的孔腔限定六边形棱柱。然而,如在图6A和6B中描绘的变形中所示的,壁126可以在其它变形中以任何其它合适的方式在开放表面122和底表面124之间延伸(例如,曲线形壁、直壁、弯曲壁等)。例如,壁126可以从开放表面到底表面逐渐减小孔的特征尺寸(例如,直径、水平横截面、垂直横截面)(例如,通过形成离散的台阶,通过以线性或非线性方式以任何合适的斜率逐渐调整特征尺寸等)。然而,在一些变形中,孔128可以没有垂直于由开放表面122限定的平面的明确限定的壁126(例如,底表面可以以某种方式直接延伸到开放表面,而不形成垂直于开放表面的壁)。在实例中,底表面124和开放表面122可以在有或没有壁的情况下分开在0.5微米至50微米之间的距离(例如,对于涉及单个CTC的捕获的应用是大约25微米,对于涉及单个细胞-颗粒对的捕获的应用是大约40微米)。然而,孔阵列的孔可以配置为任何其他物理特性和/或尺寸,以便执行在方法200中描述的分选、处理和分析步骤。在优选的应用中,方法200可以包括根据期望被捕获的靶细胞的尺寸、所利用的非细胞颗粒的尺寸以及使用系统100执行特定测定所需的其他参数来选择具有特定尺寸、数量、几何形状、空间布置和/或任何其他合适特征的孔阵列(如在方框S218中所述的)。此外或可选地,该组壁可以包括将每个孔流体地耦合到孔阵列120中的至少一个相邻孔的一组通道。在这类变形中,一组通道中的通道可以被限定在相邻孔之间的基板110的区域内,或者可以由相邻孔的重叠部分限定。在特定实例中,通道可

以具有5微米的特征尺寸,并且在特定实例的变形中,通道可以具有范围从0.5微米到75微米的特征尺寸。

[0151] 孔阵列的壁优选地由与基板材料相同的材料构成(如在前一节中所述的),但可以可选地由任何其他合适的材料构成以将期望物理或化学特性赋予孔阵列的孔腔。例如,壁可以被配置成对于已经进入孔腔的溶液中的各种颗粒或流体是不可渗透的或半渗透的,并且另外或可选地被配置成永久地或非永久地刚性的、柔性的或形状变化的(例如,膨胀打开或塌缩关闭的能力)以控制细胞和/或颗粒进入孔内。在方法200的实施方案中,其中系统100用于捕获单个细胞-颗粒对,其中细胞在第一步骤中被捕获,并且颗粒在第一步骤之后的第二步骤中被捕获,在孔阵列中的每个孔的壁的至少一部分可以由形状记忆聚合物制成,在第一打开状态和第二关闭状态之间可操作。在一个实例中,如果靶细胞在第一步骤被捕获在孔中,孔腔128的壁可以保持第一打开状态以允许颗粒在第二步骤被捕获到孔中,但如果靶细胞在第一步骤没有被捕获在孔中,孔腔128的壁可以被激活以转变到第二关闭状态,基本上关闭每个未被占据的孔的开放表面,这可以增加在孔内产生细胞-颗粒对的效率,并且可以帮助识别由期望靶细胞占据的阵列的孔。然而,孔的物理和化学性质可以以任何其他合适的方式被配置以针对在第2节中描述的方法200的任何合适的应用和/或变形增强系统的性能。

[0152] 在孔阵列中的每个孔的孔腔128的内表面(例如,面向孔腔128的内部的壁的侧壁)可以可选地被配置成与保持在孔腔128内的内容物(例如,所捕获的细胞、生物材料、非生物材料、非细胞颗粒、细胞-颗粒对等)相互作用。为了允许这种相互作用,内表面可以在孔腔128的所有侧壁上包括功能特征(物理的或化学的)或表面结合部分,但可以可选地被定位到孔腔128的任何合适的部分或特定区域(例如,在底表面处、靠近开放表面、沿着侧壁等)。在第一变形中,如图7所示,内表面包括功能性表面涂层131,其被配置为结合到从裂解的所捕获的细胞释放的核酸内容物、从非细胞颗粒释放的探针或探针组36和/或在孔内的任何其他合适的所捕获的实体。功能性表面涂层131可以是合成的、动物来源的、人来源的或植物来源的蛋白质,其可以结合到核酸探针36的功能性接头,如第2节中进一步描述的。在一个实例中,功能性表面涂层允许生物素化的表面化学(例如,生物素-链霉亲和素接头)以结合到包括功能性接头的探针上。然而,孔的内表面的功能性表面涂层可以被配置成以任何其他合适的方式结合到保持在孔腔128内的任何内容物。在第二变形中,功能性表面涂层被配置成物理地保留和/或操纵所捕获的内容物,例如将所捕获的靶细胞或颗粒定向在特定方向上用于下游分析(例如,光学成像)。在一个实例中,功能性表面涂层包括提供粘性层以粘附到所捕获的靶细胞的区域的聚合物或蛋白质(例如,聚合物粘合剂、邻苯二酚-聚苯乙烯、聚-D-赖氨酸、纤连蛋白、胶原蛋白、玻连蛋白等)。在另一个实例中,功能性表面涂层包括聚合物或蛋白质,其将细胞吸引向孔的开放表面或者是在孔的开放表面处的半永久性屏障以控制颗粒进入孔内。在第三变形中,孔的内表面被配置成添加化学剂(例如,与细胞相互作用的药物、控制在孔内的溶液的pH的试剂、控制在孔内的流体的密度的试剂等)、生物化学试剂(例如,荧光标记、抗体等)和/或处理试剂(例如,被包含在定时释放的递送赋形剂/微球中的裂解缓冲液等),以便执行所捕获的细胞的下游测定和分析。在第四变形中,孔的内表面可以包括增加、减少或改变表面积物理特征(例如,在孔腔128内的脊、突起、孔、凹痕(indentation))。此外,物理特征可以包括已经固定在孔内的功能化微粒、增强保留在

孔内的内容物的光学访问和光学询问的反射部件和/或操纵在孔内的细胞或颗粒的位置的磁性元件。

[0153] 虽然在孔阵列120中的每个孔128可以是实质上相同的,但孔阵列120可以可选地包括按照任何合适的特征(例如,形态特征、机械特征、表面涂层特征、热导特征、电导特征等)彼此不相同的孔。因此,系统100的一些变形可以被配置成在可寻址的位置上捕获多种颗粒类型和在多种类型的形式中的颗粒中的至少一种,用于处理和分析。在第一实例中,孔阵列120可以包括孔的第一子集,其具有有第一特征尺寸(例如,孔直径、孔深度、孔体积等)的孔,以便捕获以单细胞形式的第一细胞类型,以及第二子集,其具有有第二特征尺寸(例如,孔直径)的孔,以便捕获以单细胞形式的第二细胞类型。在第一实例中,第一子集可以位于孔阵列120的中心,以及第二子集可以外围地位于孔阵列120内,并且具有小于第一特征尺寸的第二特征尺寸,以便便于在孔阵列120的中心部分处的较大颗粒和在阵列100的外围部分处的较小颗粒的捕获(例如,在细胞离心涂片器应用中)。在第一实例的一个变形中,孔阵列120可以包括在径向方向上具有特征尺寸的梯度的孔(例如,朝着阵列中心的较大孔尺寸和朝着阵列周边的较小孔尺寸)。在第一实例的其他变形中,孔阵列120可以包括在径向方向上具有任何其他合适的特征特性(例如,形态特征、机械特征、表面涂层特征、热导率特征、电导率特征等)的梯度的孔。在其他实例中,孔阵列120可以包括沿着任何合适的方向(例如,线性方向、径向方向、圆周方向等)具有任何合适的特征特性(例如,形态特征、机械特征、表面涂层特征、热导率特征、电导率特征等)的分布(例如,梯度)的孔。

[0154] 在包括孔的子集的变形中,子集可以彼此分开。在第一变形中,每个子集可以通过其中没有孔被限定的基板部分(例如,宽表面的平坦区域)与其他子集分开。在第二变形中,子集可以是孔的邻接布置但流体隔离的区域(fluidically-isolated regions of a contiguous arrangement),其中特定子集的孔中没有一个孔流体地耦合到另一子集的孔。在特定的实例中,基限定以2x6网格布置的孔阵列120的十二个不同的子集,这些子集通过宽表面的平坦区域与相邻的子集分开,阵列边缘之间具有均匀间距(例如,1mm、100微米、3mm等)。孔的子集可以进一步分成组(例如,在250,000个孔的孔集合中20,000个孔的子集内的七个孔的组),以及在孔之间(例如,在子集当中、在组之间等)的任何合适的互连可以由每个孔的通道集合提供。这种配置可以允许由孔组(例如,由包括七个互连孔的组)的有效细胞捕获,同时允许孔集合暴露于多个不同的样品(例如,孔集合的每子集一个样品)。在一个实例中,孔可以是大约30微米直径、30微米深度、以及4-5微米的壁厚(例如,其提供更有效的细胞捕获)。然而,在相关的变形中,孔阵列120可以可选地以任何合适的方式被细分和/或互连。孔的子集和/或组可以以任何合适的方式被布置。例如,子集可以以直线方式(例如,孔子集的网格布局)被布置,并且组可以布置在压缩配置中(例如,六边形紧密压缩的、正方形网格等),反之亦然;组和子集的布置优选地独立于彼此,但可以可选地基于彼此(例如,子集以直线方式被布置,因为组以直线方式被布置)。此外,系统100的每个基板110可以具有单个孔阵列120,或者可以具有以任何合适的方式(例如,在径向配置中、在矩形配置中、在线性配置中、在曲线配置中、在随机配置中等)在基板上限定的孔的多个子集。

[0155] 在孔阵列的特定实例中,如图8A所示,可以使用光刻蚀刻工艺来将在 144mm^2 中的250,000个孔的阵列压印到塑料(例如,材料COP480R)中。然后可以在包含孔阵列的有源区周围提供(例如,胶合或以其他方式附着)流体储器160,有源区允许相对大的液体样品(例

如,0.5mL至5mL)在使用期间被放置。该特定实例还可以包括两个微通道,其用作流体地耦合到有源区处的孔阵列的储器的入口和出口。此外,如图8B所示,包含细胞的样品(例如,在体积上高达1ml)可以被分配到由围绕基板的有源区的流体输送模型的第一板150的凹进区域形成的流体储器160中。在样品中存在的细胞将随着时间的推移通过在储器中的流体层沉降下来(例如,重力引起的进入),并通过孔的开放表面进入到孔腔128的内部。在特定应用中,沉降时间取决于细胞的尺寸;在尺寸上10-25微米的典型癌细胞将在大约30分钟内沉降。一旦细胞进入孔腔使得细胞的整个体积完全被包含在孔腔128内(例如,完全保留,下降到表面平面118之下,下降到孔的开放表面之下),它们就以单细胞形式被捕获。因为在孔阵列中的每个孔之间的壁是薄的(例如,小于10微米厚、小于5微米厚等),大多数细胞倾向于沉降在孔内并完全保留在孔内,而不是在孔的顶部上或部分地保留在孔内。在细胞示踪剂染色的癌细胞(SKBR3)被掺入1ml PBS中的特定应用中,系统100展示超过90%的捕获效率。

[0156] 此外,阵列孔120优选地布置在压缩阵列中,但可以可选地以任何其他合适的方式被布置。在一个实例中,孔阵列120可以布置在六边形紧密压缩阵列中,如图9A所示。在另一个实例中,孔阵列可以布置在矩形阵列中,如图9B所示。在另一个实例中,孔阵列120可以以任何合适的不规则或不均匀的方式被布置,例如以便于流体从孔阵列120的一个部分流到孔阵列120的另一部分。在特定实例中,每个孔的中心到孔阵列的相邻孔的中心的最近距离是大约30微米。然而,孔阵列120可以可选地以在孔之间的任何合适的间距(例如,在压缩或非压缩配置中)以及以任何其他合适的方式被布置。

[0157] 在如图10所示的孔集合的特定示例配置中,孔阵列布置在六边形紧密压缩配置中,其中孔阵列的每个孔包括与基板的宽表面(例如,表面平面118)对准的六边形开放表面。此外,每个孔在与六边形开放表面相对的底表面处包括六边形覆盖区。孔阵列的每个孔具有形成六边形棱柱的孔腔128,包括大约5微米厚度、大约40微米的高度和大约25微米的特征宽度的壁集合。基板在大约150平方毫米的基板的有源区内限定267,000个这样的六边形孔。然而,孔阵列可以以任何其它合适的方式被配置。

[0158] 在系统100的一些变形中,孔阵列120的一个或更多个孔还可以包括便于在孔阵列120的孔处的参数(例如,细胞响应参数)的刺激和/或检测的任何其他合适的元件。在一个实例中,孔阵列120的一个或更多个孔可以包括在孔128的表面处嵌在基板110中的电极,以便便于来自孔128的内容物的生物电信号的检测,和/或便于孔128的内容物的刺激。在该实例的变形中,电极可以被嵌有孔128的底表面124和壁126中的至少一个的被暴露部分。在其他实例中,孔可以耦合到通道,其便于将处理试剂输送到在孔128处的细胞/细胞簇或者便于从孔128提取孔128的内容物(例如,经处理的细胞内内容物)。然而,系统100可以包括便于处理和/或分析处于单细胞形式和单簇形式中的至少一种形式的细胞的任何其他合适的元件。

[0159] 1.3系统-流体输送模块

[0160] 系统100可以包括流体输送模块140,流体输送模块140起作用来将包含细胞群体的样品、颗粒群体和/或另一种流体例如处理试剂和/或分配流体转移到孔阵列120,并且可以耦合到基板。因此,流体输送模块可以包括入口142、出口144和流体导向件和/或结构,其使流体能够转移到系统的各种部分中、从系统的各种部分中转移出以及穿过系统的各种部

分。如在至少图11A-11B、图28A-28C和图29中所示的,流体输送模块140可以包括布置在基板的上宽表面112附近的第一板150、布置在基板114的下宽表面附近的第二板156以及任选地配置成将第一板150耦合到第二板的夹紧模块,从而将基板110定位和/或对准在第一板150和第二板之间。然而可选地,第一板150可以直接耦合到基板110和/或系统100的任何其他合适的元件,使得流体输送模块140省略第二板。因此,流体输送模块140便于基板110的定位以在孔阵列120处接收和/或密封样品或流体(例如,利用压缩力、利用气密密封等)。此外或可选地,流体输送模块140可以包括流体储器160,其被限定在第一板和基板的宽表面之间,并且为流体路径162提供便于受控流体流过储器到整个孔阵列120的区域。

[0161] 在变形中,第一板150可以具有跨越基板110的上宽表面112的矩形覆盖区。然而,第一板150可以可选地具有被配置为跨越基板110的上宽表面112的全部或一部分的任何其他合适的覆盖区(例如,非矩形覆盖区、圆形覆盖区、椭圆形覆盖区等)。在优选的变形中,如图28A-28C和图29所示的,第一板150包括要定位在孔阵列120上的开口或凹槽152。当第一板150附着到基板110时,第一板150的凹槽152靠着孔阵列限定流体储器160。流体储器160可以由储器盖164密封,并且此外和/或可选地被放置在基板平台盖115内(如图30A-30B和图33所示),基板平台盖115可以任选地包括弹性垫圈和止动柱塞以将储器盖气密地密封到流体储器中。在图11A和11B所示的另一个变形中,第一板150包括在第一板的封闭表面的一侧处并面向基板110的上宽表面112的凹槽152,使得凹槽152和上宽表面112协作地限定可流体地连接到流体输送模块的入口142和出口144的内腔。凹槽152的内腔优选地起流体储器160的作用以将样品和/或处理试剂临时保持在孔阵列120附近(例如,在占据由凹槽和基板的宽表面限定的内腔的流体层和/或流体路径162中)。因此,凹槽152优选地跨越孔阵列120被限定于的基板的有源区,并且当第一板150耦合到基板110时与阵列对准。内腔(例如,流体储器)可以具有任何合适的体积,优选地由在凹槽的底表面和凹槽的投影区域之间的间隙距离的乘积限定。间隙距离(例如,流体储器的高度)优选地在25微米和5mm之间,但可选地可以是任何合适的距离。

[0162] 在一个变形中,凹槽152可以是在面向基板110的第一板150的表面内限定的矩形凹槽。此外,凹槽可以具有如图11A和11B所示的实质上平坦的底表面或者任何其他合适的底表面(例如,非平坦的底表面)。然而,凹槽152可以可选地具有任何其他合适的形态。此外或可选地,凹槽152可以包括围绕凹槽152的靠近基板110的区域的密封元件157(例如,o形环、密封剂等),以便在第一板150耦合到基板110时提供气密密封。此外或可选地,密封元件可以位于基板平台盖115上,并且在闭合配置中固定到第一板(图33)。然而,第一板150可以可选地以任何其它合适的方式被配置。

[0163] 第二板被配置为靠近直接与基板110的宽表面相对的基板110的表面,并且起提供第一板150可以耦合到的基部的作用,从而将基板110定位在第一板150和第二板之间。第二板优选地提供互补表面,与上宽表面112相对的基板110的表面可以耦合到该互补表面。在一个变形中,第二板是实质上平坦的,以便提供基板110的平坦表面(例如,与基板的宽表面直接相对的平坦表面)可以耦合到的表面;然而,第二板可以以任何其他合适的方式相对于基板110被配置。此外,第二板可以包括便于第二板相对于基板110和/或第一板150的对准的对准元件。在变形中,对准元件可以包括下列项中的任一个或更多个:在第二板处的便于对准的突起和/或凹槽、便于对准的轨道、磁性元件和任何其他合适的对准元件。

[0164] 在一个变形中,第一板150优选地用耦合机构耦合到第二板,该耦合机构可以包括销、螺钉、磁耦合器、夹具和任何其他合适的耦合机构中的一个或更多个。为了防止阻塞,耦合机构可以位于系统的周边部分处(例如,在第一板150、第二板和/或基板110的周边部分处)或不干扰基板的功能的任何其他合适的位置处。可选地,系统100的一些变形可以省略第二板,并且以任何合适的方式具有在第一板150和基板110之间的直接耦合。

[0165] 如图2A-2C和图14所示,流体输送模块140的一些变形可以包括一组入口和出口通道(例如,与相应的歧管入口440和歧管出口442相关联的一组流体路径146),其将系统100的入口142连接到孔阵列120中的每个孔,并且此外或可选地,将孔阵列120连接到出口144,其中出口流体地连接到用于从孔阵列收集所移出的流体和/或样品流体(例如,以容纳废物、容纳过量试剂、收集期望的样品用于下游处理)的容器。该组流体路径146起作用来以实质上一致的流体流速和体积将期望的流体(例如,含试剂的流体、含样品的流体等)分配和按规定路线发送到孔阵列120。该组流体路径146可以具有与该组孔的任何合适的对应关系;例如,可以有每单个孔128一个流体路径、每单个孔128多个流体路径146和/或一个流体路径连接到多个孔。在另一个实例中,该组流体路径146是流体路径146的网络,其从连接到入口142的单个流体路径分支到被个体地连接到每个孔的一组流体路径146,使得在入口和孔之间的任何流体路径的总长度在长度上实质上相等(例如,确切地相等的长度,等于在10-100微米内,等于在给定流速和路径横截面的特征长度内,等于在任何合适的阈值长度内,等等)。该组流体路径146可以此外或可选地包括将孔的组和/或子集连接到入口以及连接到孔的其他组和/或子集的流体路径146。这样连接的每个子集可以包括相同数量的孔,但可以可选地具有在每个子集中由该组流体路径146连接的不同数量的孔。

[0166] 在一个实例中,流体输送模块包括第一板150,并且第一板150限定入口142和出口144。该板进一步限定凹进区域152,其流体连接到入口并且面向基板的宽表面,以便与孔阵列120协作地限定连续的内腔(例如,流体储器160)。流体输送模块在细胞捕获模式中是可操作的,其中包含细胞群体的流体样品和/或用于重新分配所沉积的细胞的分配流体流到入口和出口之间的流体储器160内(例如,通过压力差)。在该实例中,流体样品通过流体路径162实质上平行于基板的宽表面流动。样品以一定流速(例如,至少每秒0.5毫升、每秒1毫升、每分钟1毫升、每秒1微升、每秒10微升、每秒100微升等)流动,并且流速被选择(例如,控制)为使得在单细胞上的垂直力的组合(例如,重力、浮力等)被引导到宽表面,并且比来自周围流体的横向压力更大,以便促进单细胞从横向流动的样品沉降到该组孔内。

[0167] 流体储器160起作用来从流体输送模块140接收包括感兴趣的细胞的生物样品和至少一种流体,并且将生物样品和至少一种流体输送到该组流体路径146(例如,歧管、入口歧管、出口歧管的流体路径)以便于细胞捕获和/或分析。在第一变形中,流体储器160包括通向大气压力的开口,使得在入口到出口方向上从流体储器160的流体输送通过由泵施加的负压来实现,该泵与流量控制子系统180连通并且由该组流体路径146中的至少一个间接地耦合到流体储器160和废物室。在第一变形中,所施加的负压可以反转,以便便于在出口到入口的方向上的流动。在第二变形中,流体储器160可以不包括通向大气压力的开口,但可以可选地耦合到被配置为在流体储器160处提供正压力和负压力的泵,以便便于分别在入口到出口方向和出口到入口方向两个方向上的流动。在第二变形的特定实例中,流体储器160耦合到被配置为通过手动泵送来提供正压力和负压力的注射泵。然而,从流体储

器160到歧管的流体输送可以以任何可选的合适方式被执行。

[0168] 流体储器160还可以包括被配置成检测在流体储器160内的液位的液位传感器,其起作用来阻止气泡进入该组流体路径146。因此,液位传感器可以在检测到触发液位(例如,作为阈值的低液位)时产生信号,并将该信号传输到处理器,该处理器被配置成接收该信号并基于该信号来产生控制流体到该组流体路径146内的输送(例如,通过流量控制子系统180)的命令。该命令可用于自动停止从流体储器160到该组流体路径146内的流体流动,和/或可以起作用来以任何其他合适的方式实现流体流动的控制。在包括液位传感器的流体储器160的变形中,液位传感器可以是测压元件、超声波液位传感器或被配置成当流体储器160中的液位超过某个阈值时产生信号的任何合适的信号。信号的检测然后可以产生停止在系统100内的流体流动的响应和/或向流体储器160添加更多流体的响应,从而阻止气泡进入歧管。在特定实例中,流体储器160具有大于6mL的体积容量,被配置为通过螺纹公母联轴节(threaded male-female coupling)耦合到歧管入口160,并且包括通向大气压力的开口,其中该开口也可以耦合到注射泵。在该特定实例中,流体储器160还包括被配置成当在流体储器160中的液位超过某个阈值时产生信号的超声波液位传感器。系统100的其他变形可以完全省略流体储器160,并且使用具有或没有阀的流体输送导管的网络来将至少一种流体输送到该组流体路径146。

[0169] 1.3.1. 流体输送模块-筒

[0170] 流体输送模块140进一步起作用来容纳至少一种流体并将至少一种流体输送到流体储器160,以便便于在孔阵列内的细胞的捕获和/或分析。优选地,如图12A和12B所示,流体输送模块140包括具有一组试剂室172的试剂筒170,在该组试剂室中的每个试剂室176被配置成容纳一组流体中的流体以便于细胞的捕获和/或分析。筒170可以是圆柱形的、圆锥形的、截头圆锥形的、棱柱形的、金字塔形的或具有任何其他合适的形态。在该组试剂室172中的每个试剂室176优选地与其他室相同,但可以可选地基于流体储存要求(例如,体积要求、温度要求、曝光要求、压力要求)而与其他试剂室不同。该组流体优选地包括试剂,包括缓冲液(例如,引发、洗涤和透化缓冲液)、固定溶液(例如,固定前和固定后溶液)和混合液(例如,裂解、抑制剂、一级抗体和二级抗体混合液),并且可以另外或可选地包括染色剂(例如,荧光染色剂或组织染色剂)和用于细胞捕获或分析的任何其他合适的流体。在第一个实例中,该组流体可以包括用于从所捕获的mRNA执行芯片上cDNA合成的试剂,包括裂解缓冲液、RNA酶抑制剂和dNTP。在第二个实例中,该组流体可以包括用于执行在孔阵列内的内容物的核酸外切酶处理以移出任何单链寡核苷酸序列(例如,从所捕获的包含寡核苷酸探针的颗粒群体)的试剂。在第三个实例中,该组流体可以包括用于使用PCR主混合物、dNTP和引物组的cDNA扩增的试剂。在第四个实例中,该组流体可以包括用于靶向扩增来自从单细胞回收的核酸的产物(例如,遗传材料,在方法200的变形中产生的遗传复合体集(set of genetic complexes))的试剂。在第五个实例中,该组流体可以包括用于将特定的寡核苷酸序列连接到单细胞DNA或RNA的酶混合物和寡核苷酸序列。在第六个实例中,该组流体可以包括用于核酸的片段化和标记的酶混合物。在第七个实例中,该组流体可以包括包含用于特定碱基对长度的核酸的基于大小的纯化和洗脱的SPRI珠群体的试剂。然而,该组流体可以以其他方式被配置,并且可以包括用于可以由系统100和/或方法200执行的任何测定的试剂的任何其他合适的组合。在被配置为通过磁分离进一步促进所捕获的细胞的纯化的系

统100的变形中,该组流体还可以包括与亲和分子偶联的磁珠的溶液,亲和分子被配置为结合到在生物样品内的感兴趣的成分(例如,不希望有的细胞、片段、废物)。在一个实例中,试剂室176可以包含链霉亲和素涂覆的磁性微粒的溶液,链霉亲和素涂覆的磁性微粒被配置为结合到结合CD45的白血细胞(WBC)。在可选的变形中,流体输送模块140可以包括单个室,其被配置成便于单种流体或多种流体的输送以便于在生物样品中的细胞的捕获和/或分析。在其他变形中,流体输送模块140的室可以由任何合适的流体导管代替。

[0171] 流体输送模块140优选地被配置成被预先包装有在室内的至少一种流体(例如,试剂、缓冲液、混合液、染色剂、磁性颗粒溶液等),该室起作用来便于来根据特定的、预先定义的方案捕获和/或分析感兴趣的细胞。可选地,流体输送模块140可以在开放或半开放配置中被预先包装,使得用户可以将至少一种流体转移到流体输送模块140的至少一个试剂室176中以便于根据不同的方案捕获和/或分析感兴趣的细胞。优选地,流体输送模块140的至少一部分被配置为可消耗的,使得流体输送模块140的一部分可以在一次使用或多次使用之后被处置。可选地,流体输送模块140可以被配置为可重复使用的,使得流体可以被重复地转移到被配置为将流体转移到流体储器160的可重复使用的流体输送模块140。

[0172] 在包括具有一组试剂室172的筒170的流体输送模块140的实施方案中,每个室优选地被配置为与其他试剂室隔离并且是个体可接近的,这起作用来控制特定流体到流体储器160的输送。在第一变形中,流体输送模块140包括一组试剂室172,并且包括被配置成密封该组试剂室172的至少一个密封件,因而将在该组试剂室中的每个室与其他室隔离。在第一变形中的密封件是可刺穿的箔密封件,使得在室位置处刺穿密封件提供通向试剂室176的通路。在第一变形的实例中,每个室在两个位置处被密封,以及在这两个位置处刺穿密封件使室暴露于大气压力,便于在室内的流体通过穿刺位置借助于流体静压输送到流体储器160。在第一变形的另一个实例中,每个室被密封并且在穿刺位置处刺穿密封件,同时在穿刺位置处提供正压力(例如,使用皮下注射针、使用注射泵等)便于在室内的流体到流体储器160的输送。在第三变形的又一实例中,每个室被密封,并且在室位置处施加负压力(例如,通过阀或开口)便于在室内的流体到流体储器160的输送。在室处刺穿密封件、施加正压力和/或施加负压力可以手动地被执行,或者可以可选地使用被配置成实现对筒170的试剂室的内容物的接近的致动系统来自动被执行。流体输送模块140可以可选地使用任何其他合适的机构或元件的组合来便于试剂室176的个体接近和/或隔离。

[0173] 在第一特定实例中,如图12A和12B所示,流体输送模块140'包括实质上圆柱形的筒170,其包括十个相同的隔离的试剂室176,每个试剂室被配置成容纳流体或试剂以便于细胞捕获和/或分析。在第一特定实例中,圆柱形筒170可以具有包括开放室的开放配置、包括开放试剂室和具有预先包装的试剂的密封试剂室的半开放配置以及包括具有预先包装的试剂的密封试剂室的完全密封配置中的一个。在半开放或密封配置中,密封的试剂室在两端处用可刺穿的箔密封件密封,以及在开放或半开放结构中,开放的试剂室在一端处用可刺穿的箔密封件密封。十个试剂室中的每一个具有4-6毫升的体积容量,并且具有沿着2"长度的大部分实质上均匀的楔形横截面。在第一特定实例中,如图12B所示,筒170具有在筒170的下部区域处的斜面,以便便于流体靠近密封件朝着筒170的下部区域流动。

[0174] 第一特定实例的流体输送模块140'也可以连接到被配置成个体地访问圆柱形筒的每个室的致动系统,以便便于在每个室中的流体到流体储器160的自动输送。第一特定实

例的致动系统包括由步进电机驱动的旋转杆 (rotary shaft), 其中旋转杆安装到圆柱形筒。在第一特定实例中, 旋转杆沿着筒170的旋转轴 (axis of rotation) (例如, 垂直旋转轴) 安装, 使得十个试剂室172围绕旋转轴。这个配置连同步进电机一起起作用来在筒170在操作期间旋转时允许十个试剂室172的位置的确定。第一特定实例的致动系统还包括被配置成提供在第一穿孔器和筒170之间的相对移位的第一致动器, 以便便于筒170的单个试剂室176的密封件的穿透。在第一特定实例中, 第一穿孔器位于筒170的下方, 并且包括在筒170的不同旋转配置中与筒170的试剂室172对准的穿刺尖端, 其中穿刺尖端靠近第一穿孔器的孔的边界 (例如, 与其同心) 并且耦合到第一穿孔器的孔的边界 (例如, 与第一穿孔器的孔的边界邻接)。因此, 借助于穿刺尖端在室位置处穿透筒170的密封件便于室的内容物通过第一穿孔器的孔流动并进入配置成接收室内容物的流体储器160内。在一些变形中, 穿刺尖端还可以具有开口 (例如, 进入垂直通道、倾斜通道或具有任何其他合适的定向或路径的通道内的开口) 以允许流体从筒170流到流体储器160。此外或可选地, 穿刺尖端的结构可以在第一穿孔器的表面之下延伸以允许流体以被引导的方式朝着流体储器160滴下。

[0175] 在第一特定实例的一个变形中, 致动系统可以相对于筒170移动穿孔器 (例如, 在垂直方向上、在非垂直的上下方向上), 以便将穿孔器驱动到筒170的密封件中。在该变形中, 第一穿孔器可以耦合到便于流体输送到流体储器160中的滴流板。在第一特定实例的另一个变形中, 致动系统可以相对于穿孔器移动筒170 (例如, 在垂直方向上、在非垂直的上下方向上), 以便朝着穿孔器的穿刺尖端驱动筒的密封件。在第一特定实例的其他变形中, 致动系统可以在任何其他合适的方向 (例如, 垂直方向、从垂直方向成角度地移位的方向、水平方向) 上移动筒170和穿孔器中的一个或两个, 以便实现筒170的密封件的穿透。因此, 在第一特定实例的一些变形中, 筒170和/或穿孔器可以远离垂直或水平配置倾斜。在倾斜的变形中, 可以通过重力和/或对筒170的试剂室176施加正压力或负压力来便于流体流动。

[0176] 在流体输送模块140”的第二特定实例中, 致动系统包括第一致动器和第二致动器, 第一致动器被配置成驱动第一穿孔器以刺穿在试剂室176的第一端处的密封件, 以及第二致动器被配置成在试剂室176的第二端中产生开口。刺穿试剂室176的第一端起作用来在试剂室176的第一端上开孔通向大气压力, 以便便于从试剂室176输送流体, 并且在试剂室176的第二端中产生开口起作用来允许在试剂室176内的流体由于流体静压而从试剂室176流到流体储器160。在第二特定实例中, 第一致动器是螺线管致动器, 其被配置为相对于室线性地移动第一穿孔器并将第一穿孔器驱动到在室的第一端处的可刺穿的箔密封件内。第二致动器是旋转螺线管致动器, 其被配置成将旋转运动转换成线性运动, 使得耦合到旋转螺线管致动器的第二穿孔器通过在试剂室176的第二端处的可刺穿的箔密封件在室中产生开口。然而, 在第二特定实例的变形中, 第一致动器和第二致动器可以由任何合适的致动器 (例如, 气动或液压致动器) 或多个致动器代替或补充。此外, 第一和第二特定实例的变形可以包括使穿孔器能够提供对试剂室176的内容物的访问的任何合适的致动器。类似地, 第一和第二特定实例的步进电机可以由实现致动器位置的确定的任何合适的致动器或元件 (例如, 耦合到线性编码器的致动器) 代替或补充。因此, 第一和第二特定实例的致动系统便于筒170的旋转以使用步进电机将个体试剂室176定位成与至少一个穿刺元件对准, 并且使用一个或更多个致动器的子系统来便于个体试剂室的穿刺。

[0177] 在第一和第二特定实例中, 筒的旋转将期望的试剂室176定位成与流体入口142直

接对准(例如,直接在流体入口142之上),该流体入口142耦合到流体储器160并被配置成接收试剂室176的内容物并将内容物分配到歧管(例如,一组流体路径146)中,如图13A所示;然而,在第一和第二特定实例的变形中,筒170、试剂室176和/或流体储器160可以不对准(例如,偏移),而是以任何合适的方式流体地耦合以便于流体从试剂室176流到流体储器160。在一个实例中,如图13B所示,流体储器160可以不与筒的试剂室176对准,而是使用流体导管(例如,柔性流体导管)耦合到穿孔器(或试剂室176)。此外,第一和第二特定实例的还有其它变形可以省略筒170的旋转,或者可以此外或可选地包括筒的平移(例如,在X、Y和/或Z方向上)以对准期望的筒试剂室112,用于将处理流体输送到流体储器160。此外,还有其他变形可以包括保持试剂筒固定在一个位置处(例如,不旋转以访问穿孔器和/或入口),以及根据需要使用移液管或毛细管从期望试剂室的顶部提取流体来将流体抽吸和分配到射流歧管、入口、流体储器、流体路径和/或孔阵列的出口内。

[0178] 1.3.2流体输送模块-流量控制子系统

[0179] 系统100可以另外包括流量控制子系统180,其被配置为控制通过系统100的流体和/或样品流量以及通过系统的试剂流量或任何其他合适的流体的流量。流量控制子系统优选地在流动模式中可操作,其中流量控制系统在流体输送模块的入口和出口之间施加压力梯度。压力梯度可以是正压力梯度(如在入口和出口之间定义的)或负压力梯度,并且它可以连续地、周期性地、异步地、以往复方式(例如,在正和负之间)或以任何其他合适的方式被施加。在变形中,流量控制子系统包括被配置为提供正压力和负压力中的至少一个的泵,并且起作用来便于流体流过系统100。优选地,泵182被配置成提供正压力和负压力两者,使得流体可以在系统100的元件内在正向方向和反向方向上流动。在正向方向上流动优选地便于来自生物样品的感兴趣的细胞的捕获,以及在反向方向上流动优选地便于来自生物样品的感兴趣的细胞的回收和/或分析。优选地,泵182被配置成连接到废物室并且包括多路阀,其被配置成提供至少在泵182和大气之间以及在泵182和废物室之间的连接。然而,泵182可以此外或可选地耦合到系统的任何合适的元件以便于流体流动,包括被配置成提供任何合适的替代连接的阀,和/或可以不包括多路阀162。在一些变形中,泵182还可以包括压力传感器,其起作用来实现由泵182提供的压力的测量。在一个实例中,泵182是注射泵,然而泵182可以是被配置成提供正压力和负压力中的至少一个以便于在系统100内的流体流动的任何合适的泵。为了最小化对细胞的损伤,用于流体输送的压力是低的(例如,小于2psi或小于1psi)。在优选的变形中,泵送系统可以控制低至0.1psi的泵送压力。

[0180] 1.4系统-热控制模块

[0181] 系统100可以另外包括热控制模块190,其起作用来加热和/或冷却基板及其内容物,以便在系统100的操作期间控制这组孔和/或流体输送模块的内容物的温度。在变形中,热控制模块可以加热和/或冷却包含感兴趣的细胞的生物样品和/或流体以便于细胞捕获和分析,并且可以进一步起作用来便于需要从低温到高温的循环的反应,例如用于细胞裂解、用于探针杂交的酶激活和用于分子诊断方案的生物样品混合物的热循环,例如聚合酶链式反应(PCR)。热控制模块190可以包括加热器、散热器、传感器、风扇和一个或多个处理器,然而;热控制模块可以包括任何合适的部件以根据任何指令(例如,用户输入、自动地、预设温度时间表、根据特定的测定等)来感测和调节孔阵列的温度。在变形中,热控制模块的加热器192优选地为被配置为可控地加热和冷却生物样品和/或流体的薄加热器(例

如,珀耳帖设备)。热控制模块190可以此外和/或可选地包括温度传感器或者被配置成便于温度控制的任何其他合适的元件。例如,温度传感器可以耦合到导热基板、到加热元件或到板形加热器。可以通过模糊逻辑控制、比例积分微分算法或任何其他合适的手段使用脉宽调制来实现温度控制。温度控制可以被提供到1°C的分辨率或者给定应用时任何其他合适的分辨率。

[0182] 加热器192起作用来调节在基板110处的孔阵列120的温度,但可以此外或可选地包括任何合适的温度控制机构(例如,电热冷却板)。在变形中,加热器可以包括与基板110界面连接的低质量加热器用于(例如,PCR组分、试剂和/或样品的)热循环或温育,并且在特定实例中,加热器可以包括耦合到电阻功率电阻器(7欧姆)和2线100欧姆RTD的铝加热器,其中加热器元件连接到内部加热器驱动器和温度控制器。在加热元件两端提供12伏的PWM信号以加热铝加热器。RTD提供温度传感,并且控制算法用于调节温度。在冷却期间,加热被停止并且风扇被打开以移除热。因为热质量是小的,对特定的实例而言,在退火温度(~60°C)和变性温度(~94°C)之间的加热可以在20秒内实现以及从94°C到60°C的冷却可以在40秒内实现。在另一个特定的实例中,热控制模块可用于将孔阵列的温度保持在10°C温度以下(例如,5°C),以便保持从所捕获的细胞提取的mRNA的活力。

[0183] 加热器优选地为电阻电热加热元件,但可以可选地或此外包括感应加热元件、对流加热元件、光学加热元件或任何其他合适的加热机构。优选地,加热器优选地相邻于基板的底表面布置,其中加热元件的横向宽面直接耦合到在孔阵列下方的基板的下宽面114,但可选地加热器可以定位成相邻于基板112的顶表面,在基板的底表面或顶表面处在基板远侧(例如,在加热器包括非接触加热机构的变形中),或者在相对于基板的任何其他合适的位置上。

[0184] 在第一变形中,加热器170包括耦合到加热元件的导热基板。在第一变形中,导热基板优选地容纳加热元件;然而,加热元件可以可选地被配置为接触导热基板的表面。导热基板可以由导电材料(例如,硅、铝、铜、金、银)或用于从加热元件传递热的任何其他合适的材料组成。优选地,导热基板以在加热表面上的小于1°C的可变性保持在加热表面上的温度均匀性;然而,导热基板可以在加热表面上提供任何合适的温度分布。在第一变形中,导热基板优选地具有薄的轮廓(profile)(例如,具有小于4毫米厚的尺寸)以减少将导热基板加热到指定温度所需的能量。导热基板可以进一步配置成提供冷却。在第一变形的特定实例中,在适当量的时间内将导热基板从室温加热到100°C的温度需要小于50(例如,40、30、20、10)瓦的功率。

[0185] 在第一变形的实例中,通过一个面加热可以通过使用具有一个被暴露面和覆盖所有其他面的绝热层的板状电阻加热器来实现。在第二变形的另一个实例中,通过使用珀耳帖加热器通过加热器的一个面来提供加热。在使用珀耳帖加热器的加热器192的变形中,加热器192包括热电材料,并且响应于被置于热电材料两端的电压差在加热器192的相对面上产生不同的温度。因此,当电流流过珀耳帖加热器时,珀耳帖加热器的一个面温度降低,而珀耳帖加热器的另一面温度升高。然而,系统100还可以包括被配置成加热生物样品和/或流体的任何其他合适的加热器170。

[0186] 除了上面所述的加热器192之外和/或可选地,热控制模块还可以包括第二加热元件,其起作用来在试剂输送期间调节和控制提供到孔阵列的流体的温度。如图15A和15B所

示的,流体加热器154(例如,具有规定几何形状的铝加热器)可以被耦合在流体输送模块140的凹槽152内。流体加热板154优选地耦合到板(例如,流体输送模块140的第一板150),其中第一板150被配置成便于该组流体路径146(例如,经由歧管)到孔阵列的耦合。在一个变形中,流体加热器154耦合到第一板150的表面,以及在另一个变形中,流体加热器154嵌在第一板150内。板150优选地被配置成便于在流体加热器154和耦合到孔阵列的流体储器内的流体之间的热传递,使得在孔阵列内的生物样品和/或流体可以被适当地加热。板150可以进一步配置成通过流体路径162提供传导冷却;然而,冷却可以不被提供,或者可以使用任何其他合适的元件(例如,耦合的扇风机以在必要时提供强制空气冷却)来被提供。在板150被配置成提供冷却的变形中,冷却可以通过使冷却剂(例如,水、油、空气、复合液体)流过流体路径162来实现,并且使用受控流体泵来控制。

[0187] 因此,如图16所示的系统100的变形还可以包括在凹进区域内耦合到流体输送模块的第一板的流体加热器154,流体加热器154至少部分地限定流体层,由流体加热器154提供的对流可以通过该流体层在平行于宽表面的第二方向流动,其中利用流体加热器154,系统可以在扩散模式可操作,该扩散模式提供在对流和该组孔之间的扩散运输。更详细地,该组孔的开放表面与建立通过流体路径的对流试剂流的储器的区域相比非常小。试剂可以通过扩散运输从流体层运输到该组孔中。可以使用公式“扩散时间 \sim (扩散长度)²/扩散率”来估计试剂扩散到孔中(大约30-50微米深)所需的时间,并且多个试剂和/或连续试剂被分配到孔阵列时的时间、速度和温度可以适当地被调整和/或任选地被自动化以考虑在各种生物化学测定期间孔的内容物对试剂的适当均匀暴露。例如,小分子例如PCR引物(扩散率 10^{-6} cm²/s)将花费大约9秒钟来扩散到孔中。具有大约 4.7×10^{-7} cm²/s的扩散率的Taq聚合酶将需要大约19秒来扩散穿过孔腔。因此,为了将“全合一”(例如,顺序的、同时的、单个、多个、试剂的混合物)PCR试剂输送到孔阵列中,试剂被对流地运输到流体储器中,给定足够的时间(大约2-3分钟)用于使试剂扩散到孔阵列中。在变形中,对于具有大约40微米的孔腔高度的包含细胞-颗粒对的孔,在细胞的顶部上的不可渗透的非细胞颗粒的存在可阻碍在流体储器160内的流体路径162和下面的孔腔之间的扩散流体路径,从而需要比仅包含单个细胞的孔多至少两倍(例如,三倍、四倍、五倍、十倍)的扩散时间,用于使试剂到达所捕获的细胞。

[0188] 1.5系统-成像子系统194

[0189] 系统100可以另外包括成像子系统194,其起作用来对该组孔的内容物成像,并且可以进一步起作用来将在该组孔中捕获的目标对象(例如,CTC、被标记的细胞、微球)与被引入到系统100内的样品中的其他细胞或对象区分开。成像子系统194优选地包括荧光显微镜,但可以此外或可选地包括任何合适的成像机构(例如,光学显微镜、CCD照相机、光电二极管阵列、发光二极管、反射器、一个或更多个处理器等)。荧光显微镜优选地是可操作的(例如,在识别模式、检测模式等中)以检测从该组孔中的一个或更多个中的目标对象发出的荧光信号,并从而识别出孔包含目标对象。在特定的实例中,成像系统(例如,荧光成像系统)可以在用于提供根据测定来处理的样品的实时或近实时荧光成像的模式操作。成像子系统194优选地位于基板下方,并被定向成通过基板的透明(或半透明)材料对该组孔的内容物成像;可选地,成像子系统194可以位于基板上方,并且被定向成对不被基板本身的材料阻碍的该组孔的内容物成像。然而,成像子系统194可以以任何合适的方式另外地定位。

[0190] 此外或可选地,系统100可以包括便于细胞处理和/或分析的任何其他合适的元件。例如,系统100可以包括起作用来便于成像的光学元件(例如,嵌在基板110内,耦合到基板110)。光学元件起作用来调节入射光,优选地以便于成像。光学元件可以起作用来弯曲、反射、准直、聚焦、拒绝或以其他方式调节入射光。光学元件优选地被限定在基板110内,但可以可选地由系统100的任何其它合适的部件限定。光学元件可以包括下列项中的任一个或更多个:光反射器,其相邻于阵列110布置在基板厚度内,该阵列110在基板110的与限定孔阵列120的表面相对的表面上限定;微透镜,其靠近限定孔阵列120的表面被限定在基板110的宽表面上;光准直器;光偏振器;干涉滤波器;光反射器(例如,90°照明元件);使进入所收集的荧光发射光的路径内的激发射线最小化的元件;衍射滤波器;光扩散器;以及任何其他合适的光学元件。系统100可以此外或可选地包括起作用来将感兴趣的细胞10吸引到孔128的孔亲和机制。孔亲和机制可以包括电场陷阱、亲和部分(例如,被涂覆到孔表面)、将流引导到元件内的特征(例如,微射流特征)或者任何其他合适的孔亲和机制(pore affinity mechanism)。然而,系统100可以包括任何其他合适的元件。

[0191] 在一个变形中,如图17所示,成像子系统194可以包括紫外照明元件,其起作用来将孔消毒,并且此外或可选地辐射包含光反应成分例如可光解化学键的孔。紫外线照明元件可以包括发射在300至400nm之间的波长的一个或更多个发光二极管、汞蒸汽灯和/或金属卤化物灯。在特定的应用中,如在第2.4节中所述的,在~365nm波长处的UV照射可以在孔阵列处被执行5至20分钟,以通过使将探针集(a set of probes)36偶联到颗粒的光敏键分裂(例如生物素化化学性质)来将该探针集36与颗粒分离。在一些变形中,其中照明元件位于孔阵列上方,在孔阵列下方的热控制模块的加热元件可以包括反射表面,该反射表面可以增强在孔阵列中的每个孔内的颗粒的均匀照明。然而,可以以任何合适的方式并且通过照明元件的任何配置来执行孔阵列的内容物的光照射。此外,成像子系统和/或系统100的任何其他部件还可以包括相对于孔阵列位于不同位置处的反射表面,以便均匀地照亮每个孔腔的内部。在第2节中进一步描述的一个实例中,在基板下方的热控制模块190的加热表面可以是反射性的,因而允许UV光照射所捕获的颗粒的所有表面,用于使分子(例如,探针组、遗传复合体)从颗粒的外表面和/或孔腔的内表面光解。然而,从成像子系统到孔阵列中的入射光可以由系统100中的任何其他部件的任何其他特征修改、反射、折射、扩散和/或以其他方式操纵以改善每个孔的内容物的光学询问。

[0192] 成像子系统194还可以进一步包括标签识别系统,该标签识别系统包括检测模块和被配置成提供信息的至少一个标签。标签识别系统起作用来读取系统100的条形码、二维码和/或任何其他识别标签,并将来自识别标签的信息传递到处理器。标签识别系统可以耦合到照明模块110,以便于识别和读取位于耦合到平台的成像基板或者任何其他合适的系统元件上的标签。在其他变形中,标签识别系统可以不耦合到照明模块。标签识别系统优选地固定在位置上,但可以可选地可以被配置为相对于其他系统元件移动。在一个可选变形中,标签识别系统可以是配置为由用户操纵以扫描位于系统100的元件上的标签或标记的独立单元。标签识别系统可以包括条形码读取器、射频识别(RFID)读取器、二维码读取器、近场通信设备或实现可以识别位于成像基板或系统100的其他方面(例如,载玻片、筒、孔阵列等)上的独特标识符的机制的任何其他合适的元件。标签识别系统可以可选地或此外被配置成解析和解释在识别标签上的非编码信息(例如,文本)。在系统100的一些变形

中,成像子系统194的光学传感器可以另外起标签识别系统的作用。

[0193] 优选地,意图由标签识别系统识别和/或读取的标签优选地在被读取时向标签识别系统传递信息。该信息可以包括与成像基板(例如,孔阵列、载玻片)识别信息相关的信息、方案信息(例如,染色方案信息)、与实行方案所需的所建议的系统参数相关的信息、与系统100相对于特定成像基板的校准相关的信息、与成像基板的内容物相关的信息、被配置成便于成像基板或在成像基板内的位置的正位置识别的信息和/或任何其他合适类型的信息。该信息可以耦合到由光学传感器捕获的图像数据(例如,嵌在由光学传感器捕获的图像数据内),和/或可以使用任何其他合适的手段被传递到处理器。

[0194] 1.6系统-附加元件

[0195] 在被配置成促进所捕获的细胞的进一步纯化的系统100的实施方案中,系统100还可以包括使所捕获的细胞能够与不期望有的样品材料分离的磁体90。磁体90优选地是单个磁体,但可以可选地是多个磁体中的一个(例如,平行地排成一行),以便提供更大的磁通量以捕获磁性地结合的颗粒。优选地,磁体或磁体组90耦合到系统100的磁体保持器,其中磁体保持器被配置为使系统100的磁体的位置稳定以提供实验一致性。此外,磁体90优选地被配置成定位在流体储器160附近,使得在流体储器160内由磁体提供的磁场便于所捕获的细胞的纯化;然而,在可选的变形中,磁体可以相对于系统的任何合适的元件是不固定或固定的。在一个实例中,磁体90是矩形棱柱形磁体90,其固定到靠近流体储器160的歧管(例如,一组流体路径146)并接触流体储器160的壁,使得结合到磁珠的样品的颗粒可以在流体储器160内的壁处被可逆地捕获。在另一个实例中,磁体可以被配置成在歧管处、在孔阵列180处或在出口流体储器160处提供磁场,使得磁性地结合的颗粒可以在处理和/或纯化期间被捕获在歧管、孔阵列180和出口流体储器160中的至少一个内。

[0196] 系统100还可以包括起作用来从阵列的孔128提取单个细胞和细胞簇中的至少一个的提取模块(例如,细胞回收子系统)。虽然来自单个孔128的个体细胞优选地被选择性地移出,但提取模块可以便于从孔阵列120同时移出多个细胞/细胞簇。优选地通过向细胞施加移出力来移出细胞/细胞簇。优选地通过将内容物从孔128中吸出来施加移出力(即,使用负压);然而,可以此外或可选地通过泵送流体通过孔阵列120(例如,借助于周边通道150)来施加移出力以提供驱动细胞/细胞簇离开孔128的正压力。在一个变形中,在提取模块处由泵机构提供的泵压力小于10,000Pa,以及在特定变形中,所提供的泵压力为6,000Pa。在另一个具体的变形中,所提供的泵压力是1,000Pa。然而,可以使用任何其他合适的泵或吸入压力。

[0197] 在一些变形中,提取模块可以包括颗粒提取器。颗粒提取器起作用来从在系统100内的可寻址的位置选择性地移出一个或更多个分离的细胞和/或非细胞颗粒。颗粒提取器优选地被配置为从单个孔128移出细胞/颗粒簇,但可以可选地被配置为从多个孔同时移出多个细胞/颗粒簇。提取模块优选地在提取模式中可操作,其中在提取模式中提取模块沿着垂直于孔的底表面的方向从该组孔中的孔提取单个细胞的集合和非细胞颗粒的集合中的至少一个。在提取模式中,流体输送模块优选地从基板被移出;然而,当细胞移出模块在提取模式中操作时,流体输送模块可以可选地保持耦合到基板。然而,颗粒提取器可以包括任何其他合适的细胞移出工具,例如在标题为“Cell Capture System and Method of Use”且于2012年7月25日提交的美国申请号13/557,510中描述的,该美国申请通过此应用被全

部并入本文。

[0198] 在颗粒提取器的第一变形中,颗粒提取器被配置成从垂直于基板110的上宽表面112的方向访问孔阵列120。颗粒提取器优选地在实质上垂直的方向上从基板110的上宽表面112移出细胞/颗粒簇,但可以可选地在相对于基板110的上宽表面112成角度的方向移出细胞/颗粒簇。颗粒提取器优选地包括访问孔阵列120并限定与一个或更多个孔流体连通的实质上流体地隔离的体积的中空通道(例如,微量移液管、毛细管等)。中空通道可包括在尖端处的一个或更多个密封元件(例如,聚合物涂层或足够的几何形状),其便于与孔的流体密封形成。颗粒提取器优选地从近端到尖端逐渐变细,以便提供足够的几何形状来将孔的内容物接收到颗粒提取器中;然而,颗粒提取器可以可选地具有任何其他合适的形式。因此,中空针优选地被配置成在感兴趣的孔128内形成实质上流体地隔离的体积,且低压发生器(例如,泵)然后用于通过中空通道将所保留的细胞/细胞簇从孔128抽吸出并进入颗粒提取器的细胞收集体积内。在一个变形中,颗粒提取器是具有200微米的高度和25微米的中空通道直径的微量移液管;在另一个变形中,颗粒提取器是具有150微米的通道直径的毛细管。在另一个变形中,孔阵列120的孔被分组,以便每组可由在平行于基板的宽表面的平面中的闭合曲线划界,并且颗粒提取器具有小于闭合曲线的最大弦的内径。然而,这些特定实例的其他变形可以具有任何其他合适的限定尺寸。

[0199] 从系统100移出细胞和/或非细胞颗粒优选地是自动的,但可以此外或可选地是半自动或手动的。此外,细胞和/或非细胞颗粒移出可以连同细胞识别一起被执行,细胞识别包括自动固定、渗透、染色、成像以及通过图像分析(例如,通过用处理器的视觉处理、通过使用光检测器等)或以任何其他合适的方式识别从孔阵列120移出的细胞。提取模块可以被配置成便于例如用致动子系统使颗粒提取器前进到包含感兴趣的细胞/颗粒簇的孔128。提取模块可以此外或可选地被配置成便于细胞和/或颗粒移出方法选择和/或细胞移出工具选择。在另一个变形中,在提取模块处的细胞识别可以是半自动的,并且细胞和/或颗粒回收可以是自动的。例如,细胞染色和成像可以自动地被完成,其中感兴趣细胞的识别和选择可以手动地完成。在另一个变形中,所有步骤都可以手动地执行。然而,可以使用自动或手动步骤的任何组合。

[0200] 系统100的变形可以可操作来以与在以下中描述的方法类似的方式便于测定:标题为“Cell Capture System and Method of Use”且于2016年10月25日提交的美国申请号15/333,420、标题为“System and Method for Capturing and Analyzing Cells”且于2014年1月24日提交的美国申请号14/163,185、标题为“System and Method for Capturing and Analyzing Cells”且于2015年9月23日提交的美国申请号14/863,191和标题为“System and Method for Isolating and Analyzing Cells”且于2014年5月28日提交的美国申请号14/289,155,这些美国申请每个通过这个应用被全部并入。该系统另外或可选地可操作来用于各种芯片上(例如,在基板处的原位)分析和测定,包括:芯片上免疫化学、芯片上DNA和/或mRNA FISH、芯片上mRNA和/或DNA PCR、芯片上等温扩增、芯片上活细胞测定、芯片上细胞培养和其它类似的测定。

[0201] 在特定的实例中,该系统可以根据下面的程序来操作:用等体积的0.4%PFA将4毫升全血样品部分地固定10分钟;样品富集癌细胞并用PBS洗涤;将包含约85%癌细胞和约20,000个全血细胞的细胞用1毫升PBS回流以产生包含细胞的回流溶液;回流溶液在系统

100的孔阵列120之上流动,且细胞被孔捕获;免疫染色试剂借助于流体输送模块流到该组孔的每个孔;使用荧光显微镜来识别癌细胞,该荧光显微镜检测由免疫染色试剂成功地标记的任何细胞发出的荧光信号;所识别的细胞使用系统的细胞移出模块(例如,在三轴横向移动台上的毛细管)从它们相应的孔被提取,并被转移到PCR管,其中单细胞基因组被扩增;所扩增的单细胞基因组被包装用于下游处理(例如,全基因组测序、靶向测序等)。

[0202] 此外,如在细胞分选领域中的技术人员将从前面的详细描述中和从附图和权利要求中认识到的,可以对上面描述的系统100的实施方案、变形、实例和特定的应用做出修改和变化而不偏离系统100的范围。

[0203] 2. 方法

[0204] 如图18所示,用于分离和分析靶细胞群体的方法200包括:在方框S210中将靶细胞群体接收到孔阵列中;在方框S220中将颗粒群体分配到孔阵列中,其中颗粒群体中的每个颗粒可以任选地与具有对与靶细胞群体相关联的生物分子的结合亲和力的探针集36偶联;在方框S230中在整个孔阵列上重新分配部分地保留的颗粒的子集;以及在方框S240中处理孔阵列。在一些变形中,方框S240可以包括:在方框S242中生成包括从靶细胞群体释放的核酸内容物和颗粒群体的部分(例如,该探针集36)的遗传复合体集70,以及在方框S244中此外或可选地在孔阵列处执行生物化学过程。此外,方法200可以此外或可选地包括在方框S250中从孔阵列移出在方框S240中产生的遗传复合体集70,用于下游分析。

[0205] 方法200起作用来在已知的、可寻址的位置处实现细胞的分离、捕获和保留,更优选地实现单细胞形式和/或单簇形式(例如,在同一孔内共同定位的一对单个细胞和单个颗粒)的细胞的有效捕获,并且进一步便于可在个体细胞或细胞簇(例如,在生物样品中的稀有细胞,细胞-颗粒对)上执行的多个单细胞/单簇测定的执行。在优选实施方案中,如图19所示,方法200起作用来实现孔阵列的子集的理想状态,其中在理想状态中的孔在方框S210中接收单个细胞,后面是在方框S220中接收单个颗粒,以便在孔阵列内以单簇形式捕获个体细胞-颗粒对。然而在变形中,方法200可以通过重新分配超过孔的容量的细胞和/或颗粒的群体(例如,横穿由基板的表面平面118限定的空间边界)实现已经接收了多于单个细胞和/或颗粒的孔阵列的子集的理想状态,从而校正方框S210和方框S230中的分配步骤中的误差(例如,聚集、过饱和)以提高在孔阵列内的单细胞和/或单簇捕获的效率。在另外的变形中,方法200可以重新分配作为前面的分配步骤的结果还没有进入孔阵列的细胞和/或颗粒的群体(例如,保持在表面平面118之上),从而允许未捕获的细胞和/或颗粒有另外的机会来被接收到可接近的孔中,并且增加所引入的细胞和/或颗粒群体的捕获效率。特别地,通过优选实施方案的变形的实现,方法200的步骤可以将单细胞-颗粒对的捕获效率增加到大于80%的捕获效率,相比之下通过其他方法的捕获效率小于20%。方法200的步骤可用于以重复的任何顺序或次数实现孔阵列的子集的理想状态,并且可以此外和/或可选地用于操纵孔阵列的内容物以容纳任何数量的细胞、非细胞颗粒和/或其任何组合(例如,一个或多个细胞、一个或多个颗粒的组合等)以便允许所捕获的细胞的群体的下游分析。

[0206] 在优选的应用中,方法200可以起作用来实现孔阵列的下游处理用于遗传分析。在一个变形中,如图20所示,在孔中捕获的单个细胞-颗粒对可以在孔中被处理以形成可识别的遗传序列,其中细胞的核酸内容物可以与偶联到颗粒的互补核苷酸探针结合。以这种方式,方法200可以提供增加在短时间内被处理的细胞的数量相当大的益处,细胞可以通过

快速分离和保留细胞-颗粒对并对细胞-颗粒对执行生物化学处理而不需要从孔阵列中移出来在短时间内被处理。在一些实施方案中,方法200可用于捕获和便于循环肿瘤细胞(CTC)和CTC的亚群体例如循环干细胞(CSC)的分析,但可另外或可选地用于捕获任何其他合适的可能感兴趣的细胞用于处理和分析。然而,方法200可以以任何其他合适的方式被实现用于需要高通量细胞/颗粒分离或配对的任何其他合适的应用。

[0207] 在方法200的变形中,可以根据用于根据不同的测定来处理细胞群体的方案以任何合适的重复次数来执行方框S210、S220和/或S230。此外,可以根据用于根据不同的测定来处理细胞群体的方案以任何合适的顺序或同时执行方框S210、S220、S230和S240。在方法200的替代实施方案中,在方框S220中的颗粒的分配以及此外或可选地在方框S230中的重新分配可以在方框S210中的靶细胞分配之前被执行。

[0208] 在方法200的该替代实施方案的变形中,如图24、图25和图26所示,可以在方框S210之前执行方框S220,其起作用来实现在孔阵列的每个孔内的颗粒群体的单颗粒捕获,其中颗粒群体可以用作输送载体以将标记探针集输送到每个孔。优选地,颗粒群体中的每个颗粒可脱离地偶联到一个探针或探针集36,该探针集36包括在该探针集36中的所有探针所共有的单位标识符(图7)。一旦单个颗粒被成功地捕获到孔中,该探针集36就可以从颗粒被释放,并且可以结合到每个孔腔的内表面。颗粒可以任选地被从孔移出,从而使单细胞能够容易地进入孔阵列用于单细胞捕获,如在方框S210中所述的。一旦单细胞在孔中被捕获,其中每个孔包含通过该探针集36的单元标识符对个体孔独特的探针集36,所捕获的细胞的生物分子,包括遗传内容物,可以被释放并结合到该探针集以产生遗传复合体,如在方框S240的变形中所述的(图24、25和26)。遗传复合体的移出、处理和/或分析可以在方框S250中被执行。如图24所示,用于分离和分析靶细胞群体的方法200'包括:将颗粒群体以单颗粒形式接收到孔阵列中,其中每个颗粒包括探针集36;将靶细胞群体以单细胞形式捕获到孔阵列中,其中每个细胞可以与在每个孔内的相应的探针集36相互作用;将处理试剂接收到孔阵列中以在孔阵列处执行生物化学过程;以及处理来自孔阵列的生物化学过程的产物。在一些变形中,方法200'可以包括:将颗粒群体的该探针集36结合到孔阵列;在每个孔内生成包括每个细胞的所释放的核酸内容物和该探针集36的遗传复合体集70;处理在孔阵列内的遗传复合体;以及从孔阵列移出该遗传复合体集70。方法200'可以起作用来实现单细胞的分离、捕获和标记,用于以高通量方式产生单细胞形式的遗传文库,而不需要从孔阵列的额外移出步骤用于下游处理。通过用包括独特标记(以单细胞形式捕获的颗粒)的探针集36标记每个孔,以单细胞形式捕获的细胞可以随后使用位于同一孔内的相应的该探针集36被处理。然而,方法200的步骤的变形可以以任何合适的顺序被执行以分离和标记源自单细胞的遗传材料,并实现可以容易被识别、处理和分析的遗传复合体的产生。

[0209] 优选地至少部分地使用在上面的第1节中描述的系统100来实现方法200;然而可以此外或可选地使用任何其它合适的系统100来实现方法200,用于细胞捕获和分析。如在上面的第1节的变形中所述的,孔尺寸可以被配置和选择为将细胞和/或颗粒保留在基板的表面平面118之下(例如,完全保留的细胞和颗粒),以及使横越基板的表面平面118的细胞和/或颗粒(例如,部分地保留的细胞和颗粒)流出。在这种变形中,未被相关孔完全保留的任何细胞和/或颗粒可以在随后的重新分配步骤中流出,如在下面的章节中所述的。在优选的变形中,选择孔尺寸以在孔腔128内和在表面平面118下方保留单个细胞和单个颗粒作为

细胞-颗粒对,然而,孔尺寸可以被配置成保留任何数量的细胞和非细胞颗粒或细胞和非细胞颗粒的组合,并且可以以任何其他合适的方式由方法200利用。

[0210] 2.1方法-接收靶细胞群体

[0211] 方框S210叙述了将靶细胞群体接收到孔阵列中。方框S210起作用来在上面的第1节中所述的系统100的实施方案处接收包括感兴趣的靶细胞的生物样品,并便于将靶细胞以单细胞形式和单簇形式中的至少一种形式分配到系统100的孔中。然而,方框S210可以可选地包括在被配置成以单细胞形式和单簇形式中的至少一种形式捕获细胞的任何其他合适的系统处接收生物样品。在方框S210的变形中,可以在阵列的变形处通过流体输送模块的第一板的变形(例如,通过由第一板的凹槽限定的流体储器160,从嵌在第一板内并与阵列流体连通的流体通道,等等)和/或以任何其他合适的方式直接接收生物样品(例如,通过用滴管吸取、通过借助于耦合到阵列的流体通道的流体输送等)。此外,在方框S210的变形中,细胞群体可以包括靶细胞的细胞群体(例如,CTC、CSC、免疫细胞)和/或以任何其他合适的感兴趣的颗粒。

[0212] 在方框S210的变形中,如图21所示,接收靶细胞群体可以包括将靶细胞群体分配到孔阵列,并且可以任选地包括在一个或多个附加步骤中重新分配靶细胞群体以校正初始分配步骤中的不准确性(例如,当孔的子集接收比期望的更多或更少的细胞时,当细胞的子集聚集在基板的区域处时,等等),这可以提高在每个孔中捕获期望数量的靶细胞的效率。在优选实施方案中,方框S210与孔阵列的孔腔的尺寸约束的协调可确定可被捕获并保留在孔内的细胞的数量和形状,如下面在方框S218中进一步描述的。例如,具有30微米的高度的孔可以在表面平面118下方接收具有在15-25微米之间的特征直径的一个靶细胞,并且超出第一靶细胞进入孔的任何另外的靶细胞横越表面平面118,并且超过由孔腔128的高度限定的边界。因此,没有被孔腔128完全保留而是更确切地横越表面平面118的任何细胞可以通过随后的细胞重新分配步骤从孔腔128流出,通过该步骤,接收多于一个细胞(例如,在细胞饱和状态中)的孔阵列的孔的子集可以通过重新分配步骤被校正以仅包含单个细胞。然而,接收靶细胞群体可以包括分配和重新分配步骤的任何方法或序列以获得在每个孔中的期望内容物。

[0213] 方框S210优选地作为方法200的第一步骤在任何其他细胞或颗粒分配步骤之前被执行,并且其中孔阵列在孔内没有其他细胞或非细胞颗粒(例如,在方框S210之前孔在未占据状态中)。然而,方框S210可以在任何其他合适的时间例如在方框S220中的颗粒群体的分配之后被执行,和/或在第一细胞分配步骤之后重复。此外,方框S210或在方框S210内的子步骤可以重复任何合适的次数,以便实现靶细胞到孔阵列内的期望分配。

[0214] 将靶细胞群体分配到孔阵列中还起作用来在将靶细胞捕获到孔中期间使细胞生存力最大化。在第一变形中,靶细胞群体的初始分配步骤可以包括通过重力引起的进入将细胞装载到孔中,而没有对细胞施加的额外的物理力。在一个实例中,重力引起的细胞进入到孔阵列内可以通过在阵列的不同区域处用吸取样品的小等分试样(例如,范围从每等分试样50到500 μ l)并且在阵列的开放表面(每个孔的开口端位于该开放表面处)处培养生物样品一段所分配的时间以允许靶细胞通过重力进入孔来实现。更特别地,可以将每个等分试样输送到在孔阵列之上的流体储器内的孔阵列的不同区域,以在跨每个孔的开放表面分配样品,在孔阵列上方产生流体层,细胞可以从该流体层下降到孔中。在变形中,为重力引

起的单靶细胞进入到孔阵列内分配的时间段对于1mL的体积可以范围从5分钟到60分钟(例如,对于K562细胞大约20分钟,以及对于PBMC大约30分钟)。然而,细胞的重力引起的进入也可以通过任何其他合适的方法来实现,例如:将生物样品涂抹在基板的阵列处、以一致的稳态速度将生物样品的稳定流体层保持在流体储器内和/或以最小化施加额外物理力到靶细胞上的任何其他合适的样品沉积和分配方式。

[0215] 在第二变形中,靶细胞群体的分配可以包括施加力以加速细胞捕获的速度,而不仅仅是重力。在一个实例中,靶细胞的分配可以通过围绕平行于基板的宽表面的轴用生物样品在基板上进行细胞离心涂片法、围绕垂直于基板的宽表面的轴用生物样品在基板上进行细胞离心涂片法或者围绕相对于基板的宽表面以任何合适的角度定向的轴用生物样品在基板上进行细胞离心涂片法来实现。此外,在包括细胞离心涂片法的方框S210的应用中,旋转轴可以以任何合适的方式从基板的任何合适的参考点偏移。在另一个变形中,样品在孔阵列的整个开放表面上的分配可以通过围绕穿过基板的中点的横轴或任何其他合适的旋转轴轻轻倾斜或摇动基板来实现。然而,捕获细胞可以包括任何其他合适的用于样品分配的方法以提高细胞进入孔内的效率和速度,同时最小化细胞损伤。

[0216] 方框S210可以任选地包括额外的重新分配步骤以确保细胞的最佳分配,并最大化以单细胞形式捕获的靶细胞的数量。在优选实施方案中,如图21所示,重新分配包括使细胞分配流体沿着流体路径流过平行于表面平面118的流体储器,其中流体储器沿着在表面平面118处的孔的开口端跨越孔阵列。在一个变形中,重新分配可以将来自细胞分配流体的力给予部分地保留的细胞的子集(横穿表面平面118),将部分地保留的细胞从它们各自的细胞饱和孔中流出,并将在孔阵列下游的部分地保留的细胞传输到能够接收细胞的孔(例如,在未占据状态、细胞可接近的状态中)。然而,重新分配可以此外和/或可选地起作用来在相对于孔阵列(例如,在表面平面118之上且远离在流体储器内的孔阵列的细胞)的任何位置的情况下将在整个孔阵列的任何细胞子集传输到在任何其他占据状态中的孔(例如,包含一个或更多个细胞的孔、包含一个或更多个非细胞颗粒的孔)。在优选的应用中,在方框S210中的重新分配可以提高单细胞捕获效率,其中在靶细胞群体中的至少50%的细胞以单细胞形式被捕获。

[0217] 用于细胞重新分配的细胞分配流体可以是任何合适的流体。在一个变形中,细胞分配流体具有小于在孔阵列的孔腔内的溶液的密度,使得当细胞分配流体穿过在孔阵列上方的流体路径流动时,细胞分配流体不容易进入孔的孔腔128,且因此可以只使穿越基板的表面平面118的细胞流出并伸入到流体路径内。然而,细胞分配流体可以具有可以协助在流体路径下游传输部分地保留的细胞或在基板的表面边界之上的细胞的任何合适的密度或特性。

[0218] 此外,可以调节和控制细胞分配流体的流速和流动方向。在优选的变形中,流速和流动方向可以由包括流量控制子系统的流体输送模块控制,该流量控制子系统可以在流体储器的任一侧处施加净正压力或净负压力,细胞分配流体可以流过该流体储器。流动方向可以沿着流体路径是单向的,但可以此外和/或可选地是双向的、多向的、随机的和/或相对于流体路径成任何角度,以允许在细胞分配流体中的细胞暴露于细胞可接近的孔的开口端。在一个实例中,重新分配可以包括细胞分配流体的至少一个流动循环,其中流动方向在第一正向方向和与正向方向相反的第二反向方向之间交替,其中通过在第一正向方向上的

流体流动从孔流出的部分地保留的细胞可以通过在第二反向方向上的流体流动被冲洗回到孔阵列,以便进入孔阵列的细胞可接近的孔。重新分配流动循环的数量可以是必要的循环的任何合适的数量,使得在细胞群体中的靶细胞的至少大部分被保留在孔阵列内的基板的表面平面118之下。在优选的应用中,重新分配导致在靶细胞群体中的最大数量的靶细胞以单细胞形式被捕获在孔阵列内。然而,细胞分配流体流速和流动方向可以以另外方式被配置。

[0219] 在优选的应用中,如图21所示,孔阵列的孔被配置成允许最多单个细胞被完全保留在表面平面118下方的孔中。因此,第一个完全保留的细胞之外进入孔的任何附加细胞将不被允许下降到表面平面118之下。替代地,附加细胞将从孔的开口端伸出,横越在孔腔128和流体路径之间的表面平面118,并从而在随后的重新分配步骤期间变得由细胞分配流体可接近。在第一变形中,其中方框S210作为方法200的第一步骤被执行,并且其中孔阵列的每个孔在不包含其他细胞或非细胞颗粒的未占据状态中,用于将细胞群体接收到孔阵列中的初始分配步骤可以导致在本文被定义为颗粒可接近状态或单个细胞状态的接收单个细胞的孔阵列的孔的第一子集、在本文被定义为细胞饱和状态的接收多于一个靶细胞的孔的第二子集以及在本文被定义为未占据状态的没有接收靶细胞的孔的第三子集的任何输出组合(图21)。在初始分配步骤完成之后,只有孔的第一子集成功地在每个孔中捕获了单个细胞,并且对于涉及单细胞捕获的优选应用的后续处理步骤是有用的。为了增加在孔的第一子集中的孔的数量(增加单个细胞捕获到孔阵列中的效率),可以任选地使用额外的重新分配步骤将位于颗粒饱和孔的第二子集中的额外的细胞重新分配到未被占据的孔的第三子集中的孔。在第二变形中,用于接收细胞群体的初始分配步骤可以导致其中细胞的亚群体保持在基板的表面平面118上方和流体储器内的输出状况。为了利用可用于填充孔阵列的细胞的亚群体并增加在孔的第一子集中的孔的数量,可以使用额外的重新分布步骤来任选地将细胞的亚群体重新分配到未被占据的孔的第三子集中的孔。

[0220] 可以使用在第1节中描述的热控制模块在低温下来执行方框S210。在优选的变形中,孔阵列的温度保持低于10°C,然而方框S210可以此外和/或可选地在任何其他合适的温度被执行以保持在孔阵列内的靶细胞群体的生存力。

[0221] 为了便于以单细胞形式的靶细胞群体的有效捕获,可以使用包含相对于在孔阵列中的孔的数量的特定比率的靶细胞的生物样品来执行方框S210。在一个变形中,在生物样品中的靶细胞的数量优选地小于在孔阵列中的孔的数量的20%。优选地,在样品中的细胞的数量与在阵列中的孔的数量的比率可以低至1:10,尽管该比率可以是任何其他合适的比率。在特定的实例中,对于包含200,000个孔的阵列,可以使用在生物样品溶液中的少于20,000个靶细胞(例如,大约2,500个细胞、5,000个细胞、10,000个细胞、15,000个细胞等)来执行方框S210。然而,可以使用与在孔阵列中的孔的数量相关的在样品中的任何合适数量的细胞例如在200,000个孔中的150,000个细胞或在200,000孔中的250,000个细胞来执行方框S210。此外,捕获细胞可以包括在样品中的任何其他合适浓度的细胞,以便促进单细胞捕获。

[0222] 方框S210可以另外包括在将生物样品分配到孔阵列之前制备包含靶细胞群体的生物样品S212。在变形中,方框S212起作用来通过增加在样品中的靶细胞的浓度来提高在孔阵列内的靶细胞捕获的效率,并且可以包括下列操作中的一个或多个:将细胞加入到

生物样品中,将预固定溶液与生物样品组合,将盐水添加到生物样品,以及将生物样品输送到孔阵列中;然而,方框S212可以此外或可选地包括任何其他合适的生物样品制备步骤。例如,生物样品可以包括感兴趣的细胞群体作为靶细胞群体,因此消除了对将细胞加入到生物样品内的需要。生物样品可以包括原始生物样品(例如,血液、尿液、组织)、富集细胞系(例如,从血液分离的)或扩增的靶细胞(例如,结合到小颗粒,用标记物预先标记)。在第一变形中,生物样品是从血液分离的癌症干细胞的富集群体。在第二变形中,靶细胞(例如,T细胞、B细胞、癌症干细胞)结合到小颗粒以选择性地增加有效细胞大小。在第三变形中,用荧光标记、金纳米颗粒或化学连接物预先标记靶细胞以帮助下游的细胞识别和/或量化。然而,生物样品可以包括任何其他合适的成分,并且可以以任何合适的方式被预处理。

[0223] 在一个实例中,使用上面所述的系统100的特定实例,方框S212可以包括将具有在有或没有细胞掺入的情况下制备的感兴趣的细胞群体(例如,MCF7乳腺癌细胞、SKBR3乳腺癌细胞、LnCAP前列腺癌细胞、PC3前列腺癌细胞、HT29结直肠癌细胞)的生物样品(例如,2mL的全血)输送到流体储器160以及旋转流体输送模块的圆柱形筒,使得包含合适的生物样品制备溶液的室可以被致动系统刺穿。生物样品制备溶液然后可以流到流体储器160内,与生物样品组合,且然后在由流量控制子系统的泵产生压力时被输送到孔阵列中。然而,方框S212可以包括任何其他合适的制备包括靶细胞群体的生物样品的方法,以由在基板处的孔阵列接收。

[0224] 方框S210可以另外包括在将生物样品分配到孔阵列之前在方框S214中灌注(priming)基板,这起作用来最小化在基板的流体通道内的夹带的空气和/或细胞团块,并使用于接收包括靶细胞群体的生物样品的系统准备好。灌注基板包括使灌注试剂或缓冲溶液流过基板的流体通道。在一个实例中,将缓冲溶液输送到孔阵列中包括输送包括在1x磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的1%牛血清白蛋白(BSA)和2mM乙二胺四乙酸(EDTA)的缓冲液;然而,输送缓冲溶液可以包括将任何其他合适的流体输送到孔阵列中。在该实例中,使用上面所述的系统100的特定实例,在方框S214中灌注基板可以包括旋转流体输送模块的圆柱形筒,使得包含缓冲溶液的室可以被致动系统刺穿。然后,缓冲溶液可以流到流体储器160内以在由泵产生压力时被输送到歧管内和微射流芯片内。然后,缓冲溶液可以在正向方向和反向方向上由泵驱动,以从孔阵列充分移出气泡。然而,方框S214可以包括将缓冲溶液输送到被配置为捕获靶细胞群体的孔阵列中的任何其他合适的方法。

[0225] 在另一个变形中,灌注基板可以起作用来将基板消毒。在一个实例中,基板的消毒可以包括将总共800 μ l的100%乙醇添加到基板,后面是在紫外光下(例如,通过如在第1节中描述的成像子系统194)培养基板大约5至20分钟以将基板消毒。然而,可以以任何其他合适的方式在分配细胞和/或非细胞颗粒之前灌注基板。

[0226] 在捕获靶细胞群之后,方框S210可以任选地包括从所捕获的细胞收集信息,包括在方框S216中识别、量化和定位所捕获的细胞。方框S216优选地使用第1节中描述的成像子系统194来实现,但可以使用系统100的任何其他方法和/或部件来实现。在方框S216中获得的信息还可以用于通知、修改和/或调整在方法200中的后续或并行步骤的设置。在一个变形中,可以通过用荧光抗体(例如,直接或间接地被标记)给所捕获的细胞染色来表型地表征和/或量化所捕获的靶细胞群体。例如,特定的染色剂可用于量化存活细胞的数量、细胞在它们的细胞周期中的特定状态和/或靶细胞的子类型。此外,通过成像子系统194对孔阵

列进行的成像也可以用于确定所捕获的细胞-颗粒对的确切数量,使得下游文库制备和/或下一代测序的合适参数可以被确定(例如,以确定PCR扩增循环的数量和/或测序深度)。在第一个实例中,关于以单细胞形式成功地捕获的细胞的数量信息可以在方框S220中用于确定和选择有效分配和单细胞-颗粒捕获所需的颗粒的数量(例如,增加或降低溶液中的颗粒的浓度)。在第二个实例中,指示样品中的大多数细胞已经以单细胞形式被成功地捕获的信息可以用于指示系统跳过和/或调整额外的重新分配步骤和/或处理步骤,从而减少处理时间并增强性能。可选地,指示细胞聚集或低效细胞捕获(例如,在流体储器中留下的大部分未捕获的细胞)的信息可以指示系统包括额外的重新分配步骤和/或处理步骤。在第二个变形中,关于所捕获的细胞的个体位置及它们在孔阵列中的相对分布的信息可用于指示在第1节中描述的流体输送模块的部件调整设置用于更有效的捕获。在一个实例中,指示与基板的第二侧相比大多数所捕获的细胞位于基板的第一侧处的信息可以通知流量控制子系统选择特定的流速和流动方向以在重新分配步骤期间使未捕获的和/或部分地保留的细胞流向基板的第二侧。在另一个实例中,包含单细胞的孔(例如,颗粒可接近的孔)的位置信息可以在方框S220中由流量控制子系统使用来选择用于分配颗粒群体的特定方案,以便提高颗粒可接近的孔接收颗粒以实现理想状态的概率。然而,关于所捕获的细胞的信息不限于在孔阵列内的量化和定位,并且可以用于指示和修改方法200中的任何步骤。此外,方框S216可以在整个方法200中重复任何次数,并且可以在方法200的任何步骤之前、之后和/或期间被执行,包括评估和指示在方框S210中的细胞分配、在方框S220中的颗粒分配和在方框S230中的颗粒重新分配的每个(individual)步骤的执行。

[0227] 方框S210可以任选地包括在方框S218中根据下列项中的至少一个选择在基板内的包括具有特定尺寸、几何形状、密度和/或空间布置的孔的孔阵列:期望的靶细胞的尺寸和数量、在方框S220中使用的颗粒的尺寸和数量、所执行的捕获测定或方案以及当方法200的至少一部分完成时孔状态的期望输出条件,包括被期望在每个孔中捕获的细胞和/或颗粒的数量。孔阵列的孔可以具有一系列可以在方框S210和/或方框S220完成时影响孔的输出状态的尺寸,包括水平横截面、垂直横截面、每个孔的开口端的宽度、孔腔128的高度以及孔腔128的总体积。在一个变形中,对于该变形,期望孔的理想状态包括将确切地一个细胞和一个颗粒接收到同一孔内,孔的尺寸可以大到足以将细胞和颗粒保持在表面平面118(例如,孔的开口端)之下,但未大到足以在第一个细胞在方框S210在被接收到之后保留第二个细胞(导致细胞饱和状态),或者在第一个细胞在方框S210在被接收到之后保留多于一个颗粒(导致颗粒饱和状态)。在特定实例中,对于包括具有在10-15微米之间的特征直径的靶细胞的靶细胞群体和具有在18-22微米之间的特征直径的颗粒群体,孔腔128的高度可以范围在20和50微米之间,并且每个孔的宽度(例如,水平横截面)可以范围在20和30微米之间。在另一个实例中,对于该实例,期望孔的理想状态包括接收确切地一个细胞(例如,在10-15微米之间)或一个颗粒(例如,在18-22微米之间)(但不是细胞和颗粒两者),每个孔腔128的高度可以范围在10和30微米之间,并且每个孔的宽度(例如,水平横截面)可以范围在20和30微米之间。然而,孔的尺寸可以基于任何其他合适的标准来被选择,并且可以与在方法200的任何步骤中使用的细胞群体的尺寸和/或颗粒群体的尺寸相匹配和相关。

[0228] 2.2方法-分配颗粒群体

[0229] 方框S220叙述:将颗粒群体分配到孔阵列中。方框S220优选地起作用来将颗粒群

中的单个颗粒与先前被保留在方框S210的变形中描述的颗粒可接近的孔中(例如,在孔的第一子集中)的单个靶细胞共同定位,从而在单个孔中捕获单个细胞-颗粒对。然而,方框S220可以在方法200中的任何其他步骤之前或之后被执行,并且可以用于将任何数量的颗粒分配到孔阵列的个体孔内,包括先前包含任何数量的细胞和/或非细胞颗粒的孔和/或分配到先前未被占据的孔内。在优选的应用中,作为在方框S210和方框S220中的连续步骤的结果,靶细胞和颗粒被孔的孔腔128完全保留(例如,细胞-颗粒对被保留在基板的表面平面118之下),使得包括细胞-颗粒对的颗粒在方框S230中的颗粒的重新分配期间不从孔腔128流出。然而,方框S220可以在方法200中以任何其他合适的方式实现,以便将颗粒群体分配在整个孔阵列上,并且控制被接收到并保留到孔阵列的个体孔中的颗粒的数量。

[0230] 优选地,在如在方框S210中所述的接收在孔阵列处的靶细胞群体之后执行方框S220,使得添加到当前由靶细胞占据的孔的颗粒沉降在靶细胞的顶部上并接近基板的开放表面,然而方框S220可以此外和/或可选地在捕获孔阵列处的靶细胞之前被执行,并且与方法200的任何其他合适的步骤处于时间关系中。为了确保颗粒群体均匀地分布到孔阵列中并促进每孔的靶细胞与颗粒的1:1比,方框S220后面可以是方框S230,其中颗粒重新分配在整个孔阵列上,且类似于在方框S210中描述的细胞的重新分配。然而,方框S220可包括任何其他合适的步骤。

[0231] 在方框S220中,被接收到孔阵列的颗粒(例如,微球、珠等)的群体可以由任何合适的材料制成以向颗粒传达理想的性质,包括物理性质(例如,不溶胀行为、溶解性)、磁性质、光学性质、化学性质(生物相容性、结合亲和力)和热性质。颗粒可以由聚苯乙烯、二氧化硅、无孔玻璃、多孔玻璃、涂层玻璃和/或一种或更多种合适材料的组合制成。颗粒的密度优选地大于包含溶液的缓冲液(例如,至少1.1g/cc),但可以可选地具有任何其他合适的密度。

[0232] 优选地,颗粒具有特征尺寸,该特征尺寸被配置成使得只有单个颗粒可以进入当前由在表面平面118下方的单个靶细胞占据的孔,以便在个体孔内共同定位单个细胞-颗粒对。在优选的变形中,在颗粒群体中的每个颗粒是包括外壳的球形颗粒,具有在10至30微米之间的直径。为了适应容易的分配和沉降到孔阵列中,可以产生具有实质上单分散几何形状的颗粒群体。在实例中,颗粒群体可以具有特征尺寸,包括20微米、15微米、30微米、35微米和/或40微米之一的直径,有小于20%或小于15%的标准偏差,从而将单个细胞-颗粒对捕获的效率提高到50%以上。此外,在完成单细胞测序制备生物化学过程的各个步骤时,颗粒群体的均匀性可以实现更高百分比的颗粒回收(在方框S250中)。为了最小化沉降并改善分配,包含颗粒群体的溶液可以任选地包括大约10%的甘油。

[0233] 在这个变形的一个特定实例中,颗粒是直径约20微米(例如15至25微米)的具有聚苯乙烯涂层的玻璃珠,但可以可选地和/或此外是任何其他合适的直径。此外,颗粒可以是任何其他合适的三维(例如,矩形、三角形、长方形、棒或任何其他多边形)或二维形状(例如,薄片)。在特定的实例中,其中孔的高度大约为40微米以及其中靶细胞具有范围在15-25微米内的特征尺寸,在步骤S220中可以使用具有在18-22微米之间的直径的颗粒以将单个颗粒与单个所捕获细胞共同定位在表面平面118下方。然而,方法200通过系统100的实现可以以任何其它合适的方式被配置。

[0234] 在方框S220的变形中,颗粒群体的外壳可以包括各种表面性质和/或表面特征,其

起作用来与所捕获的靶细胞、所捕获的靶细胞的生物分子、孔隙128的内表面130、在孔内的溶液和/或在本申请中描述的系统和/或方法的任何其他合适的部件相互作用。

[0235] 在第一变形中,如图20所示,颗粒的外壳可以缀合到探针和/或探针集36(例如,寡核苷酸、化学接头等),其优选地起作用来结合到从细胞释放的细胞内核酸内容物(例如,mRNA、DNA、蛋白质等),并且另外或可选地便于下游过程(例如,逆转录酶、聚合酶链式反应(PCR)等),如在方框S240的变形中所述的。然而,该探针集36可以以任何其他方式来实现,以便执行靶细胞的分析。在其中探针包括包含核苷酸序列的生物分子相互作用区的变形中,个体探针的生物分子相互作用区可以此外或可选地包含下列项中的至少一个的任何组合:引物序列(例如,PCR柄)、用于识别核酸内容物发源于的细胞的细胞条形码(例如,单元标识符)、标记同一细胞的不同分子(例如,遗传材料)的独特分子标识符(UMI)(例如,一个条形码可以具有多个UMI)、实现聚腺苷酸化的mRNA物类的捕获的poly-DT序列和与聚乙二醇(PEG)衍生物起反应以充当对寡聚物(oligo)合成的支持物的表面羟基。除了生物分子相互作用区之外,每个探针还可以包括:包括将探针偶联到颗粒的颗粒接头的颗粒连接区以及此外或可选地包括功能接头的底物连接区,该功能接头结合到细胞的一部分或孔的表面的一部分(例如,通过蛋白质、抗体亲和力、化学相互作用)(图20、图7)。在特定实例中,偶联到在颗粒的外壳上的单组探针36的单个颗粒在方框S220期间被接收到个体孔的孔隙128中。该探针集36通过颗粒接头偶联到颗粒的外壳,该颗粒接头包含可以使用紫外(UV)波长激活的可光解键。在UV照射下,该探针集36可以可控地从在孔内的颗粒脱离,并且颗粒可以任选地从孔隙128移出,从而允许该探针集36与在孔隙128内的环境相互作用而没有颗粒的物理约束。然而,该探针集36的生物分子相互作用区、颗粒连接区和底物连接区可以以其他方式被配置。

[0236] 在另一个变形中,每个颗粒的外壳可以被修改以将带条形码的寡核苷酸的接头密度调整到特定的数量,以便最大化从单细胞裂解物捕获的生物分子的数量,同时在使用探针形成的遗传复合体的下游处理期间(例如,在方框S240期间),例如在cDNA逆转录和/或PCR扩增期间,最小化空间位阻效应。对于单细胞RNA-seq,颗粒可以被调整为具有0.1至5微摩尔/克之间的接头密度。例如,可以调整在颗粒上的接头密度,使得来自单个细胞裂解物的生物分子的最大数量可以是下列项之一:大约100,000个分子、500,000个分子、750,000个分子、1,000,000个分子、2,000,000个分子、3,000,000个分子、4,000,000个分子和/或5,000,000个分子。在寡核苷酸结合之前,可以通过各种过程例如化学蚀刻、用化学方法使功能化表面的薄层(在厚度上最多几微米、0.1微米、1微米、2微米和/或3微米)生长来调整颗粒的外表面面积和/或孔隙率。在另一个变形中,颗粒的外壳可以包括预定密度的多个和不同的官能团,以能够结合来自单细胞或单细胞裂解物的不同类型的生物分子,例如DNA、mRNA、蛋白质、代谢物、聚糖、细胞酶等。然而,颗粒群体的外壳的特征和特性可以以任何其他方式合适的方式被配置。

[0237] 此外,颗粒群体的表面特征可以以其他方式被配置成在孔阵列内执行任何其他合适的功能或相互作用。在第二变形中,颗粒的外壳可以包括能够结合到在细胞上或在孔壁上的抗体或任何其他合适的蛋白质的表面结合部分。在第三变形中,颗粒的外壳可以包含改善颗粒的生物相容性的合成或有机材料(例如,PEG、胶原质等)。在第四变形中,颗粒的外壳可以包含允许颗粒进入并保持在孔内的物理特征,例如钩、粘合剂或可延伸体积。然而,

颗粒的外壳可以以其他方式被配置。

[0238] 此外,颗粒群体中的每个颗粒可以任选地在颗粒内包含可用于对所捕获的细胞进行生物化学测定的合成试剂、生物化学试剂和/或有机材料。在一个变形中,颗粒可以使用对在孔阵列中的单细胞上的高通量药物测试的应用被制造成包含可从颗粒释放的药物(例如,由时间、温度、pH等触发)。例如,颗粒的外壳可以由在某个温度下随着时间的过去溶解的可生物降解材料组成,从而在孔内的靶细胞的存在的情况下释放药物。然而,颗粒群体可以以任何其它合适的方式被配置。

[0239] 为了执行方框S220,颗粒的数量与孔的数量之比为至少1:1,且优选地至少1.5:1,但可以是任何其他合适数量的颗粒。在其中期望单细胞-颗粒对的捕获的变形中,在颗粒溶液中的颗粒的数量被选择为使得包含单个细胞的每个孔接收至少一个颗粒。在其中在阵列中的孔的数量是200,000的特定的实例中,添加到阵列的颗粒的数量优选地范围在300,000至400,000个颗粒之间。此外,如前所述,获得关于在完成方框S210时以单细胞形式捕获的细胞的数量信息可用于帮助选择在颗粒溶液中的颗粒的数量范围,以提高期望的捕获效率,并最小化孔阵列的颗粒欠饱和或颗粒过饱和。在一个实例中,在确定200,000个孔的阵列中的5000至6000个范围孔的在颗粒可接近状态时,在颗粒溶液中的颗粒的数量可以选择为在10,000至50,000个颗粒的范围内以最小化颗粒饱和状态的出现,从而提高单个颗粒到单个细胞的共定位效率和/或速度。然而,在方框S220中选择添加到孔阵列的颗粒的数量可以以任何其他合适的方式被执行。

[0240] 将颗粒群体分配到孔阵列中包括初始分配步骤,其起作用来将颗粒装载到孔阵列中,类似于细胞的初始分配,如方框S210中所述的。在变形中,颗粒群体可以通过重力引起的进入(例如,在多个等分试样中用滴管吸到阵列中)、用所施加的力(例如,用包含颗粒群体的溶液在基板上进行细胞离心涂片法)和/或通过如在第1节中所述的试剂输送模块流到流体储器160内来进入孔阵列。在具体的实例中,可以通过在孔阵列的不同区域处用滴管吸取溶液的小等分试样以在孔的开口端上方的流体储器内形成均匀的流体层、随后通过以330rpm使孔阵列离心4分钟来将包含在200,000至600,000个颗粒的范围的颗粒溶液分配到孔阵列。然而,可以使用系统100的任何适当的部件通过任何其他适当的方式来执行颗粒的初始分配。

[0241] 在其中方框S220在方框S210之后被执行的优选的应用中,用于将颗粒群体接收到孔阵列中的初始分配步骤可以导致如图22所示的任何输出组合,包括:在本文被定义为包含单细胞-颗粒对的理想状态的保留单个细胞、接收单个颗粒的孔阵列的孔的第一子集;在本文被定义为颗粒饱和状态的保留单个细胞、接收多于一个颗粒的孔阵列的第二子集;在本文被定义为细胞可接近状态的仅接收单个颗粒的未占据孔的第三子集;以及接收多于一个颗粒的未占据孔的第四子集(图22)。在完成初始分配步骤之后,只有在理想状态中的孔的第一子集在每个孔中成功地捕获单细胞-颗粒对,并且对于涉及单细胞和/或单细胞-颗粒对捕获的优选应用的后续处理步骤是有用的。为了增加在理想状态的孔的第一子集中的孔的数量(以增加到孔阵列内的单细胞-颗粒捕获的效率),位于颗粒饱和孔的第二子集中的额外颗粒可以任选地被重新分配到在初始分配步骤之后保持未被占据的孔和/或在初始分配步骤之后保持在颗粒可接近状态(例如,仅包含单个细胞)中的孔,如在方框S230中所述的。此外和/或可选地,部分地保留的颗粒和/或在流体储器中留下的多余的颗粒可以通

过耦合到废物室的出口从流体储器流出。然而,可以以任何其他合适的方式执行方框S220。

[0242] 2.3方法-重新分配颗粒群体

[0243] 在方框S230中,重新分配颗粒群体起作用来确保颗粒在整个孔阵列中的最佳分配,并使可访问孔阵列的颗粒的数量最大化,优选地在个体孔中实现单细胞捕获和/或单细胞-颗粒配对。方框S230可以重新分配添加到孔阵列但没有完全保留在个体孔内(例如,在孔腔128中,在表面平面118下方)的颗粒,包括在表面平面118上方的流体储器中留下的颗粒(例如,过量颗粒)以及已经进入个体孔但超过孔的体积容量并横穿表面平面118进入流体路径内的颗粒。在优选实施方案中,类似于方框S110的细胞重新分配步骤,颗粒重新分配包括使颗粒分配流体沿着流体路径穿过平行于表面平面118的流体储器流动,其中流体储器沿着在表面平面118处的孔的开口端跨越孔阵列。在一个变形中,如图22所示,重新分配可以将力从颗粒分配流体传递到部分地保留的颗粒的子集(横穿过表面平面118),使部分地保留的颗粒从它们各自的颗粒饱和孔流出,并在孔阵列的下游将部分地保留的颗粒传输到能够接收颗粒(例如,在未占据状态、颗粒可接近状态中)的孔。然而,重新分配可以此外和/或可选地起作用来将具有相对于孔阵列的任何位置的颗粒的任何子集(例如,在表面平面118上方的颗粒、在流体储器内远离孔阵列的颗粒)经过孔阵列传输到在任何其他占据状态中的孔(例如,包含一个或更多个细胞的孔、包含一个或更多个非细胞颗粒的孔)。

[0244] 用于颗粒和/或细胞重新分配的颗粒分配流体可以是流经过孔阵列的上表面的任何合适的流体或包含任何合适的成分的流体。在一个变形中,颗粒分配流体具有小于在孔阵列的孔腔内的溶液的密度,使得当颗粒分配流体穿过在孔阵列上方的流体路径流动时,颗粒分配流体不容易进入孔的孔腔128,且因此只使横穿基板的表面平面118并伸入流体路径内的颗粒流出。然而,分配流体可以具有任何其他合适的特性。在另一个变形中,其中流体储器包括一组磁性元件(例如,沿着流体路径),颗粒分配流体可以包含一组磁性颗粒,其可以用于控制和/或聚集相对于孔阵列经过特定空间区域(例如,仅穿过在流体储器中的磁性元件附近的流体路径)的分配流体的流动。然而,分配流体可以具有能够改变分配流体的流速和/或流动方向的任何其他功能成分(例如,静电、物理、化学、热性质)。此外,颗粒分配流体可以具有任何合适的密度、特性和/或包含可以帮助在流体路径下游传输部分地保留的颗粒或在基板的表面平面118上方的过量颗粒的成分。

[0245] 优选地,颗粒分配流体的流速和流动方向可以被调节和控制。类似于在方框S110中的优选变形,流速和流动方向可以由包括流量控制子系统的流体输送模块控制,该流量控制子系统可以在流体储器的任一侧处施加净正压力或净负压力,颗粒分配流体可以流过该流体储器。流动方向可以沿着流体路径是单向的,但可以此外和/或可选地是双向的、多向的、随机的和/或相对于流体路径成任何角度,以允许在颗粒分配流体中的细胞暴露于颗粒可接近孔的开口端。在一个实例中,重新分配可以包括颗粒分配流体的至少一个流动循环,其中流动方向在第一正向方向和与正向方向相反的第二反向方向之间交替,其中通过在第一正向方向上的流体流动从颗粒饱和孔流出的部分地保留的颗粒可以通过在第二反向方向上的流体流动被冲洗回到孔阵列,以便进入孔阵列的颗粒可接近的和/或未占据的孔。重新分配流动循环的数量可以是必要的任何合适的数量的循环,使得在颗粒群体中的至少大部分颗粒被保留在孔阵列内在基板的表面平面118之下。在优选的应用中,重新分配可以导致至少80%的颗粒可接近孔被填充有单个颗粒以达到孔的理想状态。然而,细胞分

配流体流速和流动方向可以以另外方式被配置。

[0246] 如在方框S216中所述的,在方框S210、方框S220和方框S230中的细胞和/或颗粒分配流体的流体流速和流动方向可以在方法200的同步或异步步骤期间根据在孔阵列内的所捕获的细胞的数量和位置相应地和/或实时地被修改和/或调整。在优选的变形中,光学子系统可以记录一组图像以获得关于颗粒可接近孔的丰度和分布的信息,并且可以将指令传递到流体输送模块和/或流量控制子系统以帮助选择下列项中的至少一个:在颗粒溶液中的颗粒的浓度、颗粒分配流体的流速、颗粒分配流体的方向、颗粒分配流体的温度和/或重新分配的重复循环的数量,以便提高捕获效率。然而,在方框S230中的重新分配的参数可以由用户输入(在方框S210、方框S220、方框S230之一之前、期间和/或之后)手动确定、静态地被设置(根据所存储的设置预先确定)和/或以其他方式确定。在另一个优选实施方案中,提取模块可以与成像子系统一起使用以基于成像反馈从包含多于一个颗粒的孔回收一个或更多颗粒并将它们分配到不包含珠的另一个孔中。

[0247] 2.4方法-处理孔阵列

[0248] 方框S240叙述:处理孔阵列,其可以包括下列操作中的一个或更多个:在阵列处接收至少单个处理试剂,从而促进一种或更多种处理试剂到处于单细胞形式和单簇形式中的至少一种形式的细胞群体的扩散输送,在孔阵列处执行生物化学过程,分析孔阵列的内容物,以及此外和/或可选地在孔阵列处执行任何其他合适的过程。方框S240起作用来实现在孔阵列内捕获的内容物的无缝和快速处理和分析而不需要从孔阵列移出所捕获的内容物(例如,细胞和/或非细胞颗粒),并且此外可以用于同时处理多个孔阵列(例如,一次2、4、6、10个阵列)。在优选实施方案中,方框S240的部分可以与系统100的部件协调地自动被执行,其中处理试剂输送的参数,包括多种试剂的顺序、定时(例如,分配时间、流动持续时间)、处理试剂的速度、方向和/或体积(例如,使用流体输送模块)、用于孔阵列和/或处理试剂的温度调节的参数(例如,使用热控制模块)和/或用于光学分析的参数(例如,使用光学子系统),可以使用所存储的设置、用户输入和/或自适应输入和系统100的一个或更多个处理器来确定、选择和/或协调。然而,处理孔阵列可以包括任何其他合适的步骤和/或参数,并且可以以任何其他合适的方式被执行。

[0249] 在变形中,将一种或更多种处理试剂输送到孔阵列可以起作用来执行下列操作中的一个或更多个:渗透靶细胞群体的所捕获的细胞,后固定靶细胞群体的所捕获的细胞,封闭靶细胞群体的所捕获的细胞,洗涤靶细胞群体的所捕获的细胞,用抗体混合物处理靶细胞群体的所捕获的细胞,培养靶细胞群体的所捕获的细胞,将靶细胞群体的所捕获的细胞染色,使靶细胞群体的所捕获的细胞裂解,分离在靶细胞群体的所捕获的细胞内的组分,以及加热孔阵列。步骤S240可以此外或可选地包括准备由孔阵列捕获的感兴趣的细胞用于分析的任何合适的步骤,例如向感兴趣的细胞输送杂交缓冲液,向感兴趣的细胞输送颗粒和/或对照探针,使感兴趣的细胞脱水,和/或使感兴趣的细胞变性。在一个变形中,步骤S240可以使靶细胞群体的细胞为需要染色(例如荧光染色或组织染色)的分析做准备。在另一个变形中,步骤S240可以使靶细胞群体的细胞为涉及电泳的分析做准备。在又一个变形中,步骤S240可以使靶细胞群体的细胞为分子诊断测定例如PCR做准备。

[0250] 在变形中,处理试剂可以以与在针对方框S210、方框S220和/或方框S230所描述的变形中在阵列处分配生物样品或分配流体的方式类似的方式被输送到孔阵列并在整个孔

阵列上被分配。在一个实例中,如在第1节中所述的,存储在流体输送模块的筒中的处理试剂可以从筒被分配,并通过流体储器160分配到孔阵列中,该流体储器160在孔阵列的上方并直接流体地耦合到孔阵列。为了提高在孔阵列处执行各种测定和处理的速度,多种处理试剂可以被存储(例如,预装载)在流体输送模块的试剂筒中,直到被需要为止。流体输送模块起作用来将适当体积的期望试剂通过流体入口输送到孔阵列中并到流体储器160中,其中流体流速由泵送系统控制,以防止对细胞的损伤并提高测定的效率(例如,试剂在孔内的分配、颗粒经过孔的分配等)。此外,可以使用系统的上盖来进一步控制穿过流体储器160的流体流动以在流体储器160处形成流体层,以增强流体穿过流体储器160并进入孔中的运输。为了将期望试剂分配到流体储器中,步骤S240可以包括旋转流体输送模块的圆柱形筒,使得包含期望试剂的室可以被致动系统刺穿。然后,处理试剂可以流入流体储器160内以在流控制模块(flow control module)的泵产生压力时被输送到整个孔阵列。然而,将处理试剂分配到孔阵列中可以由系统100的任何其他子部件、手动地由用户执行或者以其他方式被执行。

[0251] 此外,方框S240可以与热控制模块协同被执行以控制试剂穿过流体储器160的对流流动并保持孔阵列的温度(例如,保持细胞生存力,保持细胞内遗传内容物(例如,mRNA、cDNA)活力,帮助试剂扩散到孔中,提高试剂穿过流体储器160的流动速度等)。在变形中,方框S240可以包括通过基板将热传输到在阵列处捕获的细胞群体或移除热,这起作用来用在方框S240的变形中接收的处理试剂提供细胞群体的受控培养和/或热循环。加热优选地包括在阵列的该组孔中的每个孔处提供均匀的加热和/或冷却;然而,加热可以可选地包括在整个阵列上不均匀地提供加热和/或冷却(例如,提供具有梯度的加热以检查不同加热参数对细胞群体的影响)。在变形中,加热可以包括使基板与至少一个加热元件接触,调节基板的环境温度,和/或借助于耦合到基板或嵌在基板内的加热元件来将热传输到整个基板。在一个实例中,一个或更多个加热元件可以耦合到在孔阵列下方的基板的底部(图31A-31C),这起作用来向孔阵列提供快速加热和/或冷却。该系统可以此外和/或可选地包括嵌在基板的上盖内的一个或更多个加热元件,这起作用来调节流过流体储器的流体路径的处理试剂的温度并增强对孔内部的访问(图15A、15B和图16)。然而,将热传输到孔阵列和/或移除热可以此外或可选地以任何其他合适的方式被执行。在其中传输热包括在期望的温度下培养底物、细胞群体和处理试剂一段期望量的时间的变形中,传输热可以便于下列操作中的一个或更多个:使细胞群体裂解、固定细胞群体、渗透细胞群体、给细胞群体染色、对细胞群体执行免疫化学、将探针结合到细胞群体的细胞内核酸内容物、执行原位杂交测定(例如荧光原位杂交测定,FISH)、对细胞群体的核酸内容物执行聚合酶链式反应、培养细胞群体以及任何其他合适的应用。然而,接收处理试剂和/或调节处理试剂的流量(体积、速度、温度等)可以此外或可选地以任何其他合适的方式被执行,用于任何其他合适的应用。

[0252] 在方框S240的一个变形中,处理试剂可以是来自靶细胞群体释放至少一种生物分子例如核酸内容物(例如,mRNA)和/或蛋白质的裂解试剂。通过在低于15°C的温度将裂解试剂添加到孔阵列、后面是在大约25°C和/或在稍微升高的温度如50°C培养孔阵列以完成反应来使所捕获的细胞裂解。在一些变形中,使细胞裂解可以包括在执行裂解反应之前在孔的顶部上方分配一层油(或在孔腔内包含的溶液中不能混溶的其他溶液),以防止所释放的内容物转移到在孔阵列中的相邻孔。在另一个变形中,使细胞裂解可以包括在执行裂解反

应之前在孔的顶部上方分配一层空气,以防止所释放的内容物转移到在孔阵列中的相邻孔。

[0253] 在利用以理想状态捕获在孔阵列内的细胞-颗粒对的优选的应用中,孔阵列的温度可以在裂解反应后再次降低到15°C之下(大约5°C,以保存mRNA),并且从每个裂解的靶细胞释放的生物分子可以与相应颗粒的探针杂交(例如,与细胞-颗粒对相关联的与靶细胞一起定位在同一个孔中的颗粒),形成与每个所捕获的细胞相关的遗传复合体集70(来自细胞的mRNA与该探针集的核苷酸序列杂交)。优选地,如图23所示,该遗传复合体集70的每个遗传复合体可以至少包括探针和起源于靶细胞的生物分子(例如,mRNA),其中单组遗传复合体70(例如,与起源于同一细胞的生物分子相关的所有遗传复合体)被包含在孔阵列的每个个体的孔中。生成该遗传复合体集70可以在颗粒群体的每个颗粒包括探针集36时被实现,每个探针包括单位标识符(例如,每个颗粒的独特核苷酸序列)以及生物分子标识符(例如,针对每个探针的独特核苷酸序列,UMI),如在方框S220中进一步描述的。在细胞裂解时,可以通过将每个个体的生物分子结合和/或杂交到颗粒的该探针集36的相应探针(例如互补的核苷酸配对)来将从单个靶细胞释放的多个分子识别为源自细胞-颗粒对的细胞,从而用独特核苷酸序列来标记每个生物分子,所述核苷酸序列包括可以在下游处理(例如,RNA、DNA测序)期间容易识别的单元标识符和生物分子标识符。因此,在核苷酸序列中的具有相同单位标识符的遗传复合体可以被考虑为起源于在细胞-颗粒对中的相同靶细胞,使来自同一细胞的多个分子的个体分析能够并行地出现。为了减少mRNA对个体探针的非特异性标记,可以使用各种步骤,包括优化缓冲液洗涤速度、设定最佳结合时间以捕获在单个孔内的所有mRNA转录物、在裂解和杂交步骤期间的芯片上冷却以及增加探针密度。此外和/或可选地,可以将特定的分子和/或颗粒添加到裂解后洗涤溶液以捕获从细胞流出的未结合的细胞内容物,从而防止未结合的细胞内容物扩散到邻近的孔中。然而,该遗传复合体集70可以以另外方式被配置,并且可以包括与孔阵列的任何生物分子、细胞、颗粒和/或孔相关联的任何合适的子部件。

[0254] 在方法200的替代实施方案中,如图24、图25和图26所示,探针集36可以此外和/或可选地固定到个体孔腔的内表面130,在单个孔内的溶液中保持自由浮动,和/或以任何合适的方式被配置。在一个变形中,从靶细胞释放的生物分子可以结合到该探针集36,而没有在孔内的单个颗粒和单个细胞的共同定位。特别地,在如在方框S210中所述的捕获细胞之前,可以以与对方框S220和方框S230所述的方法类似的方法将颗粒以单颗粒形式分配到孔中,其中每个个体的颗粒包括包含共同单元标识符的探针集36。接收颗粒群体可以导致其中单个颗粒在每个孔中被捕获的输出状况,而不是接收颗粒群体以在每个孔中产生细胞-颗粒对。在方法200'的该实施方案的优选应用中,在单细胞捕获之前在每个孔内的单颗粒捕获可以实现探针组到每个个体孔的输送(图26)。在单颗粒捕获时,该探针集36可以从它们的相关颗粒脱离,并被释放到个体的孔腔中,从而允许每个孔的内容物由其中的该组颗粒的单元标识符可识别。被释放的每组探针36优选地固定到孔腔128的内表面130(例如,通过生物化学键、抗体-抗原反应性),用单位标识符有效地标记每个孔并允许颗粒从孔移出,因而允许孔阵列由靶细胞群体可接近。在将探针组添加到个体孔腔之后,可以将靶细胞群体分配到孔,如在方框S210中所述的,由此靶细胞可以以单细胞形式被捕获(例如,一个细胞到每个孔)(图25)。在单细胞捕获时,可以如上所述执行细胞裂解,其中包含所释放的生

物分子和该探针集36的遗传复合体集70被包含在每个孔内,并且偶联到孔腔128的内表面130而不是颗粒。以这种方式,用单位标识符直接标记每个孔可以提高从靶细胞群体产生多组遗传复合体的速度和效率。然而,孔阵列的内容物,包括遗传复合体、细胞、生物分子和/或非细胞颗粒,可以以任何其他合适的方式被处理。

[0255] 在方框S240的第二变形中,可以将处理试剂添加到孔阵列以执行靶细胞群体的遗传材料(例如,遗传复合体)的cDNA合成,从而产生与每个个体细胞相关联的遗传产物80,其可以在下游被进一步分析(例如,遗传测序)。通过逆转录从包含mRNA的遗传复合体合成cDNA可以通过以预定的顺序将一系列处理试剂添加到孔阵列来被执行,并且优选地通过系统100的至少一个子部件来被自动化。在优选的变形中,可以使用由流体输送模块的处理器执行的程序来在设定的时间、体积、速度和温度将一系列处理试剂添加到孔阵列。该方法还可以包括在方框S242中接收关于样品制备方案的信息。方框S242优选地在方框S240之前被执行,使得自动系统可以准备好基于该信息来处理和分析生物样品。例如,方框S242可以实现流体输送模块的一组试剂室中的试剂室与流体储器160的自动对准,流体储器160被配置成将处理试剂输送到孔阵列中。在特定的实例中,可以产生一系列对准命令,其控制包含分离的处理试剂的圆柱形筒的旋转,从而根据样品制备方案来使生物样品的处理自动化。方框S242可以可选地在方法200的任何合适的步骤之前或之后被执行,并且可以与从方法200和/或系统100的任何其他步骤收集的信息协调地被使用。例如,方框S242可以允许用户输入关于样品制备方案的信息,和/或可以使用成像子系统194来自动接收关于样品制备方案的信息,如以前在方框S216中所述。然而,方框S242可以包括接收关于样品制备方案的信息的任何其他合适的方法。然而,该系列处理试剂可以手动地或通过任何其他合适的方法添加到孔阵列以执行任何其他合适的生物化学过程。

[0256] 2.5方法-从孔阵列移出遗传材料

[0257] 方框S250叙述:从孔阵列移出遗传材料,这起作用来从孔收集遗传材料用于下游处理。在变形中,包括在方框S240中产生的遗传复合体和遗传产物的部分的遗传材料可以包括包含靶细胞的识别信息的任何生物材料(例如,合成蛋白质、天然蛋白质、核酸、生物标志物、生物化学反应的副产物等)。在从孔阵列移出之前,遗传材料可以偶联到颗粒群体、在孔腔128内的溶液中浮动、附着到孔腔128的内表面130的区域,或者在孔内的或相对于在孔内的任何其它合适的子部件的任何合适的位置上。在第一变形中,遗传材料包括来自裂解的细胞的原始细胞内遗传内容物(例如,蛋白质、mRNA、DNA、蛋白质)。在第二变形中,遗传材料包括该探针集36,或者从颗粒脱离,或者偶联到颗粒。在第三变形中,遗传材料包括遗传产物80(例如,在方框S240的变形中通过遗传复合体的逆转录形成的cDNA序列)。在第四变形中,遗传材料包括通过聚合酶链式反应扩增(例如,cDNA文库)的来自方框S240的遗传产物80。然而,遗传材料可以包括可以从孔阵列移出并随后被分析或处理的任何合适的生物材料。方框S250优选地在方框S240完成之后被执行,但可以相对于与方法200的其他步骤的任何其他合适的时间被执行。在另一个实施方案中,系统100可以实现方框S240和S250的多个循环,用于相似遗传产物的重复产生和洗脱,从而允许从单细胞衍生的遗传复合体的同一集合制备多个文库和/或执行测序。

[0258] 在其中遗传材料保持偶联到颗粒群体的第一变形中,遗传材料的移出可以通过从孔阵列移出颗粒群体来实现。在一个变形中,可以通过增加在孔阵列内的提取流体的流体

体积(例如,手动地用滴管吸取流体、使流体流到孔阵列内等)来将颗粒从孔阵列冲掉。在一个实例中,提取流体(例如,5-10mL PBS)可以在垂直于基板的上宽表面的方向上分配到孔阵列中,但可以此外和/或可选地通过使提取流体以平行于基板的上宽表面的方向沿着流体路径穿过流体储器流动而分配到孔阵列中,其中提取流体可以通过扩散通过孔的开放表面进入孔阵列。此外和/或可选地,将提取流体分配到孔阵列中可以包括将力施加到提取流体,从而改变提取流体的速度,以将颗粒重新定位在孔内(例如,通过用滴管向上和向下吸取到流体储器内,将净正压力或净负压力施加到流体等)。在一个实例中,以特定的流体速度(或至少第一和第二流体速度的循环)添加足够体积的提取流体可以将以前浸没在孔腔128内的颗粒通过孔的开放表面排出并进入流体储器内,颗粒可以被收集在流体储器内用于下游处理(例如,通过出口流到收集容器内,直接从储器回收等)。在第二变形中,可以通过使基板倒置(例如,使基板绕着它的穿过基板的中点的横轴旋转180°)并将基板培养最多60分钟(例如,大约10、20、30、40、50、60分钟)的时间段来从孔阵列移出颗粒。在其中流体储器由第一板150密封(如在前一节中所述的)的变形中,颗粒可以通过孔的开放表面离开孔阵列并通过重力进入流体储器内,然而,颗粒可以从孔阵列流出进入任何其他合适的收集容器内。在第三变形中,可以使用提取模块来从孔阵列直接提取颗粒。此外和/或可选地,颗粒的提取速度可以通过附加的步骤来加速,附加的步骤包括:使基板离心,物理地震动(agitating)基板(例如,摇动(shaking)、振动(vibrating)),增加和/或减少进入孔阵列内的流体体积,将力施加到颗粒(例如,磁性的、电的、物理的)或任何其他合适的移出方法。

[0259] 在其中遗传材料保持偶联到颗粒群体的第二变形中,可以通过将遗传产物80与孔内的颗粒分离并用滴管从孔中吸取流体、将颗粒留在孔内来移出遗传材料。在一个实例中,遗传复合体通过可逆的生物化学键例如可光解的接头来结合到颗粒,其中接头可逆地附着到颗粒并且可以通过将颗粒暴露于特定波长的光(例如可见光谱、紫外光谱)来被去除。然而,各种化学可用于从颗粒、孔或任何其他合适的表面可控地移出探针(或将探针附着到颗粒、孔或任何其他合适的表面)用于下游分析。在具体的实例中,源自在第1节中描述的光学子系统的均匀光可以提供孔阵列的从靠近基板的第一宽面的基板上方并通过孔的开放表面到孔腔内的均匀照明。在这个实例中,范围从300到400nm(例如,365nm)的紫外光可以被辐射到孔阵列中多达30分钟(例如,大约5、10、20、30分钟)。在优选的变形中,热控制模块可以包括与第一宽面直接相对的、在第二宽面(下表面)处设置在基板下方的反射表面,紫外光穿过反射表面,从而将入射光反射回到孔中并照射整个珠,用于来自颗粒群体的遗传复合体的均匀和同时的光解。然而,可以通过任何其他合适的方法来实现对在孔内包含的颗粒群体的均匀辐射,这些方法包括:通过在曝光期间轻轻摇动或旋转基板来旋转在孔内的珠以及使用穿过流体储器160的流体流与压力系统协同来操纵在孔内的珠的旋转。此外,任何波长或波长组合的光或可用于照射颗粒群体以进行对光敏感的化学反应。此外,入射光束的强度可以是任何合适的强度。在其中使用光学照明将遗传产物80与孔内的颗粒群体分离的该变形中,热控制模块可用于控制孔阵列的温度,以最小化加热具有孔腔的溶液的影响,从而保持遗传产物的质量。此外,可以向孔阵列添加提高效率或有助于光解化学作用的性能的额外的试剂,例如提高移出的速度和/或效率的试剂或在移出期间提高遗传材料的生存力的剂。

[0260] 在方框S250的替代变形中,使遗传材料与颗粒分离还可以包括不是从孔移出遗传

材料而是从孔移出裸颗粒,从而将遗传材料留在个体孔中用于进一步处理。在该变形中,遗传材料可以保持在孔腔128内自由地浮动,或者可以被固定在孔腔128内。可以通过在前面所述的变形中的方法(例如,磁体)移出颗粒,留下遗传材料偶联到孔腔128的内表面130。如在第1节中所述的,孔腔128的内表面130可包括其中小分子可物理地、在能量方面或化学地被俘获的表面特征,和/或其中小分子以高亲和力(比与颗粒的结合亲和力更高)结合的表面特征。在特定的实例中,遗传材料可以由在每个孔的壁内的一组脊或突起物理俘获。在另一个特定的实例中,遗传材料可以包括从缀合探针(例如生物素蛋白)掺入的功能性接头,并且可以被配置成结合到预先涂覆在孔的内表面130上的链霉亲和素。在另一个特定的实例中,遗传材料可以结合到作为孔的表面的衬里的亲和微球/剂。然而,遗传材料可以以任何合适的方式被处理。

[0261] 所捕获的靶细胞和/或起源于所捕获的靶细胞的遗传材料的下游分析可以包括下列操作中的任一个或更多个:收获该组孔的内容物(例如,细胞、胞内内容物),培养在该组孔处捕获的细胞,检测由细胞群体展示的生物标志物(例如,使用荧光检测),执行定量分析(例如,mRNA表达的定量分析),基于生物标志物表达来表征细胞表型(例如,癌细胞表型),基于细胞表型的表征来提供所推荐的治疗,用细胞群体的所捕获的细胞来执行流式细胞术,以及执行任何其他合适的分析。在优选的应用中,其中遗传材料、特别是在方框S240中产生的cDNA用于RNA测序,遗传材料可以被进一步处理以通过执行核酸外切酶处理、预扩增PCR、SPRI清除和标签化来产生包含特定片段大小和质量的遗传材料的cDNA文库。此外,使用系统100和通过实现方法200的变形收集的数据可用于产生和利用单细胞靶向组(single-cell targeted panels),包括:基因分型文库、CRISPR池、免疫谱、途径分析、药物筛选和谱系追踪(图34)。然而,方法200的变形可以此外或可选地包括便于以单细胞形式和单簇形式中的至少一种形式接收、处理和/或分析细胞群体的任何其他合适的步骤或块。

[0262] 优选实施方案及其变形的系统100和方法200可以被至少部分地体现和/或实现为被配置成接收存储计算机可读指令的计算机可读介质的机器。指令优选地由计算机可执行部件执行,计算机可执行部件优选地与该系统以及处理器和/或控制器的一个或更多个部分集成在一起。计算机可读介质可以存储在任何适当的计算机可读介质例如RAM、ROM、快闪存储器、EEPROM、光学设备(CD或DVD)、硬盘驱动器、软盘驱动器或任何适当的设备上。优选地,计算机可执行部件是通用或专用处理器,但任何合适的专用硬件或硬件/固件组合设备可以可选地或此外地执行指令。

[0263] 附图示出了根据优选的实施方案、示例配置及其变形的系统、方法和计算机程序产品的可能实现的架构、功能和操作。就这点而言,在流程图或框图中的每个块可代表代码的模块、段或部分,代码包括用于实现指定的逻辑功能的一个或更多个可执行指令。还应当注意,在一些可选的实现中,在块中提到的功能可以不按在附图中提到的顺序出现。例如,连续地显示的两个块事实上可以实质上同时被执行,或者块有时可以以相反的顺序被执行,取决于所涉及的功能。还应当注意,框图和/或流程图图示的每个块以及在框图和/或流程图图示中的块的组合可以由执行指定的功能或行动的专用的基于硬件的系统或专用硬件和计算机指令的组合实现。

[0264] 本发明还提供以下项目:

[0265] 1.一种用于分离和分析靶细胞群体的方法,包括:

[0266] • 将靶细胞群体接收到在基板的表面平面处限定的孔阵列中,其中所述孔阵列中的每个孔垂直于所述表面平面并在所述表面平面下方延伸到所述基板中,并且在未占据状态中;

[0267] • 实现所述孔阵列的至少包括第一孔和第二孔的孔的第一子集的颗粒可接近状态,其中靶细胞群体的第一靶细胞被接收在所述表面平面下方、穿过所述第一孔的开口端,并且所述靶细胞群体的第二靶细胞被接收在所述表面平面下方并穿过所述第二孔的开口端;

[0268] • 将颗粒群体分配到所述孔阵列中,其中所述颗粒群体中的每个颗粒与探针偶联,所述探针对与所述靶细胞群体相关的生物分子具有结合亲和力;

[0269] • 在将所述颗粒群体分配到所述孔阵列中后,

[0270] ○实现在所述颗粒可接近状态中的所述孔的第一子集的至少所述第一孔的理想状态,其中实现所述理想状态包括将所述颗粒群体的第一颗粒在所述表面平面下方接收到所述第一孔中,从而将所述第一颗粒与所述第一靶细胞共同定位在所述第一孔内;以及

[0271] ○实现在所述颗粒可接近状态中的所述孔的第一子集的至少所述第二孔的颗粒饱和状态,其中实现所述颗粒饱和状态包括将所述颗粒群体的至少第二颗粒和第三颗粒接收到所述第二孔中,其中所述第二颗粒被接收在所述表面平面下方,并且所述第三颗粒横穿所述表面平面;

[0272] • 对整个孔阵列重新分配部分地保留的颗粒的子集,所述部分保留的颗粒的子集至少包括所述第三颗粒,其中在部分地保留的颗粒的所述子集中的每个部分地保留的颗粒横穿所述表面平面,并且其中重新分配部分地保留的颗粒的所述子集包括:

[0273] ○使颗粒分配流体沿着流体路径穿过流体储器沿着所述表面平面并以平行于所述表面平面的方向跨越所述孔阵列流动,其中所述颗粒分配流体使横穿所述表面平面的至少所述第三颗粒从所述第二孔流出,从而将所述第二孔从所述颗粒饱和状态转变到理想状态;以及

[0274] • 处理所述孔阵列的至少包括所述第一孔和所述第二孔的理想孔的集合,其中在所述理想孔的集合中的每个孔在所述理想状态中,并且其中在所述理想状态中的每个孔包含恰好所述靶细胞群体中的一个靶细胞和恰好所述颗粒群体中的一个颗粒。

[0275] 2.一种用于分离和分析靶细胞群体的方法,包括:

[0276] • 将靶细胞群体接收到在基板的表面平面处限定的孔阵列中,其中所述孔阵列中的每个孔垂直于在所述基板内的表面平面并在所述表面平面下方延伸;

[0277] • 实现所述孔阵列的孔的第一子集的颗粒可接近状态,其中所述孔的第一子集的第一孔将所述靶细胞群体的第一靶细胞接收在所述表面平面下方、穿过所述第一孔的开口端;

[0278] • 在将所述靶细胞群体接收到所述孔阵列中之后,将颗粒群体分配到所述孔阵列中,其中所述颗粒群体的每个颗粒与探针偶联,所述探针对与所述靶细胞群体相关的生物分子具有结合亲和力;

[0279] • 在将所述颗粒群体分配到所述孔阵列中后,

[0280] ○实现所述孔的第一子集的至少所述第一孔的颗粒饱和状态,其中实现所述颗粒饱和状态包括将在所述表面平面下方的第一颗粒和横穿所述表面平面的部分地保留的颗

粒接收到所述第一孔中；

[0281] • 对整个所述孔阵列重新分配部分地保留的颗粒的子集,其中部分地保留的颗粒的所述子集中的每个部分地保留的颗粒横穿所述表面平面,其中重新分配部分地保留的颗粒的所述子集包括:

[0282] o使颗粒分配流体沿着流体路径穿过流体储器沿着所述表面平面并以平行于所述表面平面的方向跨越所述孔阵列流动,其中所述颗粒分配流体使横穿所述表面平面的所述部分地保留的颗粒从所述第一孔流出,从而将所述第一孔从所述颗粒饱和状态转变到理想状态;以及

[0283] • 处理所述孔阵列的至少包括所述第一孔的理想孔的集合,其中所述理想孔的集合中的每个孔在所述理想状态中,并且包含恰好所述靶细胞群体中的一个靶细胞和恰好所述颗粒群体中的一个颗粒。

[0284] 3. 根据项目2所述的方法,还包括:

[0285] • 在使所述部分地保留的颗粒从所述第一孔流出后,将所述部分地保留的颗粒传输到所述流体路径的下游的整个所述孔阵列;以及

[0286] • 将所述部分地保留的颗粒接收到下游孔中,其中所述下游孔在颗粒可接近状态中,并且其中所述部分地保留的颗粒被接收在所述表面平面下方到所述下游孔中,从而将所述下游孔从颗粒可接近状态转变到理想状态。

[0287] 4. 根据项目2所述的方法,还包括在将所述颗粒群体分配到所述孔阵列中后,

[0288] • 实现所述孔的第一子集的至少第二孔的理想状态,包括将在所述表面平面之下的恰好所述颗粒群体中的一个颗粒接收到所述第二孔中。

[0289] 5. 根据项目2所述的方法,其中将所述靶细胞群体接收到所述孔阵列中还包括使细胞分配流体沿着所述流体路径流动,其中所述细胞分配流体使部分地保留的靶细胞的子集流出到整个所述孔阵列,其中在所述部分地保留的靶细胞的子集中的每个部分地保留的靶细胞横穿所述表面平面。

[0290] 6. 根据项目5所述的方法,还包括:

[0291] • 在将所述靶细胞群体接收到所述孔阵列中后,

[0292] o实现所述孔阵列的孔的第二子集的细胞饱和状态,其中实现所述细胞饱和状态包括将在所述表面平面下方的靶细胞和横穿所述表面平面的部分地保留的靶细胞接收到所述孔的第二子集的至少第一细胞饱和孔中;以及

[0293] o通过使所述细胞分配流体沿着所述流体路径流动来使至少所述第一细胞饱和孔从所述细胞饱和状态转变到所述颗粒可接近状态,其中所述细胞分配流体使所述部分地保留的靶细胞从所述第一细胞饱和孔流出。

[0294] 7. 根据项目6所述的方法,还包括:

[0295] • 在使所述部分地保留的靶细胞从所述第一细胞饱和孔流出后,将所述部分地保留的靶细胞传输到所述流体路径的下游的整个所述孔阵列;以及

[0296] • 将所述部分地保留的靶细胞接收到在所述第一细胞饱和孔下游的未占据孔中,其中所述部分地保留的细胞被接收在所述未占据孔的所述表面平面下方,从而将所述未占据孔从未占据状态转变到所述颗粒可接近状态。

[0297] 8. 根据项目2所述的方法,其中使所述颗粒分配流体沿着所述流体路径流动包括

利用耦合到所述流体储器的流控制模块来控制所述颗粒分配流体的流动方向,其中所述流动方向在第一方向和与所述第一方向相反的第二方向之间交替。

[0298] 9. 根据项目2所述的方法,其中使所述颗粒分配流体沿着所述流体路径流动包括利用耦合到所述流体储器的流控制模块来控制所述颗粒分配流体的流速,其中所述流速大于0.5mL/min。

[0299] 10. 根据项目2所述的方法,其中第一生物分子是核糖核酸,并且所述颗粒群体中的每个颗粒的探针包括被配置为结合到核酸内容物的核苷酸序列。

[0300] 11. 根据项目2所述的方法,其中处理所述理想孔的集合包括:

[0301] • 在所述理想孔的集合的至少所述第一孔内,从所述第一靶细胞释放所述生物分子,包括:

[0302] o使处理试剂沿着所述流体路径流动并进入所述孔阵列内,其中所述孔阵列的温度用耦合到所述基板的热控制模块维持在15°C以下;以及

[0303] • 在从所述第一靶细胞释放所述第一生物分子后,使所述第一生物分子结合到所述第一颗粒的第一探针以产生与所述第一颗粒偶联的第一遗传复合体。

[0304] 12. 根据项目11所述的方法,还包括:

[0305] • 在所述理想孔的集合的所述第一孔内,对所述第一遗传复合体执行生物化学过程。

[0306] 13. 根据项目12所述的方法,其中执行所述生物化学过程包括在所述理想孔的集合的至少所述第一孔中执行逆转录,从而在所述第一孔中产生与所述第一遗传复合体相关的第一核苷酸序列。

[0307] 14. 根据项目11所述的方法,其中处理所述理想孔的集合还包括从所述理想孔的集合的第一孔至少移出所述第一遗传复合体的一部分。

[0308] 15. 根据项目14所述的方法,其中所述颗粒群体中的每个颗粒的所述探针通过可光解的接头偶联到所述颗粒群体中的颗粒,其中从所述理想孔的集合的第一孔至少移出所述第一遗传复合体的一部分包括用至少一个波长的光照射所述孔阵列以从所述第一颗粒释放所述第一遗传复合体的所述部分。

[0309] 16. 项目15的方法,其中光的波长在300和400nm之间。

[0310] 17. 根据项目11所述的方法,其中所述第一探针包括针对所述第一探针的第一独特标识符,并且其中产生所述第一遗传复合体将所述第一独特标识符与所述第一靶细胞相关联。

[0311] 18. 根据项目2所述的方法,其中所述孔阵列的每个孔被配置成实现所述理想状态,其中每个孔的长度在20和75微米之间,并且每个孔的宽度在20和30微米之间。

[0312] 19. 根据项目2所述的方法,其中所述孔阵列中的每个孔在所述基板内限定棱柱体积,并且其中所述孔跨越所述基板的所述表面平面以六边形紧密堆积配置布置。

[0313] 20. 根据项目2所述的方法,其中在所述孔阵列中的每个孔的开口端限定六边形,其中每个孔的所述开口端的水平横截面与所述表面平面对准。

[0314] 21. 一种用于以单细胞形式分析靶细胞群体的方法,包括:

[0315] • 对整个限定在基板的表面平面处的孔阵列分配颗粒群体,其中所述孔阵列的第一孔包括第一内表面和第一孔腔,所述第一孔腔垂直于所述表面平面并在所述表面平面下

方延伸并进入所述基板内,并且其中所述颗粒群体中的每个颗粒可脱离地偶联到探针,所述探针包括对所述第一孔腔的第一内表面具有第一结合亲和力的第一区域和对与所述靶细胞群体相关的生物分子具有第二结合亲和力的第二区域;

[0316] • 通过将所述颗粒群体的第一颗粒接收在所述表面平面下方并穿过所述第一孔的开口端到至少所述第一孔中来将所述颗粒群体捕获到所述孔阵列中;

[0317] • 在所述孔阵列的所述第一孔中,从所述第一颗粒释放第一探针;

[0318] • 当从所述第一颗粒释放所述第一探针后,将所述第一探针的所述第一区域结合到所述第一孔的所述第一内表面;

[0319] • 在将所述第一探针偶联到所述第一孔后,从所述第一孔移出所述第一颗粒;

[0320] • 通过将所述靶细胞群体的第一靶细胞接收在所述表面平面下方并穿过所述第一孔的所述开口端到至少所述第一孔中来将所述靶细胞群体捕获到所述孔阵列中;

[0321] • 在所述孔阵列的所述第一孔内,从所述第一靶细胞释放第一生物分子,包括:

[0322] o使处理试剂沿着流体路径穿过流体储器跨越所述孔阵列沿着所述表面平面并以平行于所述表面平面的方向流动;以及

[0323] • 产生第一遗传复合体,所述第一遗传复合体包括所述第一生物分子和偶联到所述第一孔的所述第一内表面的所述第一探针。

[0324] 22. 根据项目21所述的方法,其中将所述颗粒群体捕获到所述孔阵列中还包括使颗粒分配流体沿着所述流体路径流动,其中所述颗粒分配流体使部分地保留的颗粒的子集从所述孔阵列的颗粒饱和孔的子集流出,其中所述部分地保留的颗粒的子集中的第一部分地保留的颗粒穿过第一颗粒饱和孔的开口端横穿所述表面平面。

[0325] 23. 根据项目22所述的方法,还包括:

[0326] • 在使所述第一部分地保留的颗粒从所述第一颗粒饱和孔流出后,将所述第一部分地保留的颗粒传输到所述流体路径下游的整个所述孔阵列;以及

[0327] • 将所述第一部分地保留的颗粒接收到在第一颗粒饱和孔下游的未占据孔中,其中所述第一部分地保留的颗粒下降到所述未占据孔的所述表面平面下方。

[0328] 24. 根据项目22所述的方法,其中使所述颗粒分配流体流动包括利用耦合到所述流体储器的流控制模块来控制所述颗粒分配流体的流速,其中所述流速大于0.5mL/min。

[0329] 25. 根据项目22所述的方法,其中使所述颗粒分配流体流动包括利用耦合到所述流体储器的流控制模块来控制所述颗粒分配流体的流动方向,其中所述流动方向在第一方向和与所述第一方向相反的第二方向之间交替。

[0330] 26. 根据项目21所述的方法,其中将所述靶细胞群体捕获到所述孔阵列中还包括使细胞分配流体沿着所述流体路径流动,其中所述细胞分配流体使部分地保留的靶细胞的子集从所述孔阵列的细胞饱和孔的子集流出,其中第一部分地保留的靶细胞穿过第一细胞饱和孔的开口端横穿所述表面平面。

[0331] 27. 根据项目26所述的方法,还包括:

[0332] • 在使所述第一部分地保留的靶细胞从所述第一细胞饱和孔中流出后,将所述第一部分地保留的靶细胞传输到所述流体路径下游的整个所述孔阵列;以及

[0333] • 将所述第一部分地保留的靶细胞接收到在所述第一细胞饱和孔下游的未占据孔中,其中所述第一部分地保留的细胞下降到所述未占据孔的所述表面平面下方。

[0334] 28. 根据项目21所述的方法,其中所述颗粒群体中的每个颗粒的所述探针通过可光解的接头可脱离地偶联到所述颗粒群体中的颗粒,并且其中从所述第一颗粒释放至少所述第一探针包括用至少一个波长的光照射所述孔阵列以从所述第一颗粒释放所述第一探针。

[0335] 29. 根据项目28所述的方法,其中光的波长在300和400nm之间。

[0336] 30. 根据项目21所述的方法,其中所述第一颗粒的所述第一探针通过可逆化学键偶联到所述第一颗粒。

[0337] 31. 根据项目21所述的方法,其中所述第一生物分子是核糖核酸,并且所述第一颗粒的所述第一探针包括被配置为结合到核酸内容物的核苷酸序列。

[0338] 32. 根据项目21所述的方法,其中所述第一探针包括针对所述第一探针的第一独特标识符,并且其中产生所述第一遗传复合体将所述第一独特标识符与所述第一靶细胞相关联。

[0339] 33. 根据项目21所述的方法,其中产生第一遗传复合体还包括利用耦合到所述基板的热控制模块来将所述孔阵列的温度降低到10°C以下。

[0340] 34. 根据项目21所述的方法,还包括对所述第一遗传复合体执行生物化学过程。

[0341] 35. 根据项目34所述的方法,其中执行所述生物化学过程包括执行逆转录以在所述第一孔中至少产生与所述第一遗传复合体相关的第一核苷酸序列。

[0342] 36. 根据项目34所述的方法,其中执行所述生物化学过程包括在至少所述第一孔中执行聚合酶链式反应(PCR)以在所述第一孔中产生与所述第一靶细胞相关的扩增的遗传内容物。

[0343] 37. 根据项目21所述的方法,还包括从所述第一孔至少移出所述第一遗传复合体的一部分。

[0344] 38. 根据项目21所述的方法,其中所述孔阵列中的每个孔被配置为保留下列项之一在所述表面平面下方:恰好所述靶细胞群体中的一个靶细胞和恰好所述颗粒群体中的一个颗粒,其中每个孔的长度在10和40微米之间,并且每个孔的宽度在20和40微米之间。

[0345] 39. 根据项目21所述的方法,其中所述孔阵列中的每个孔在所述基板内限定棱柱体积,并且其中所述孔跨越所述基板的所述表面平面以六边形紧密堆积配置布置。

[0346] 40. 根据项目21所述的方法,其中所述孔阵列中的每个孔的所述开口端限定六边形,其中每个孔的所述开口端的水平横截面与所述表面平面对准。

[0347] 如本领域中的技术人员从前面的详细描述及从附图和权利要求将认识到的,可以对本发明的优选实施方案做出修改和变化而不偏离在下面的权利要求中限定的本发明的范围。

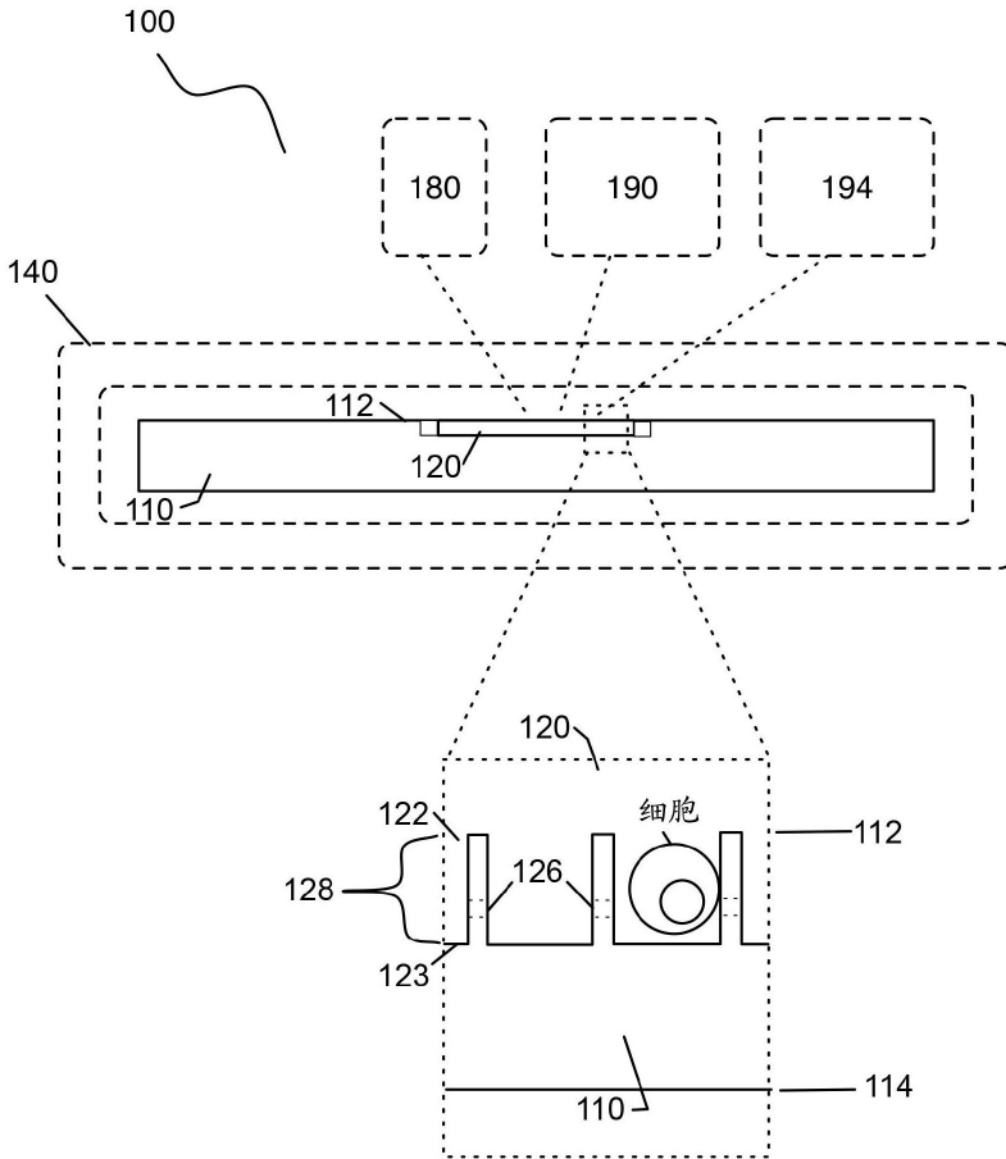


图1

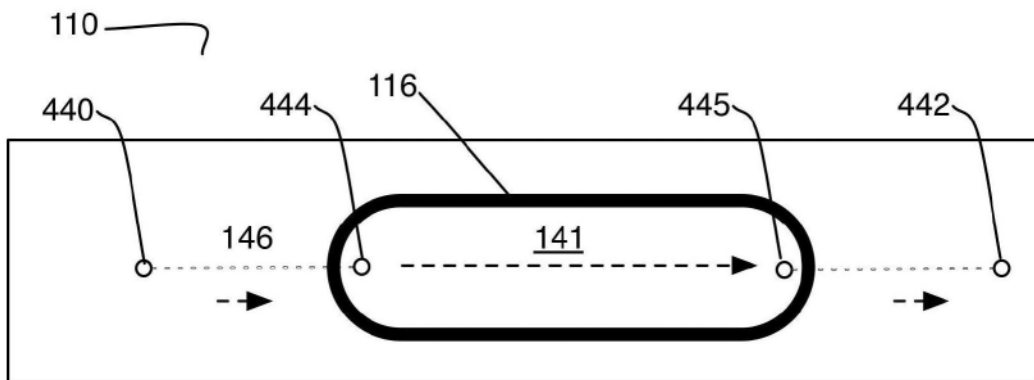


图2A

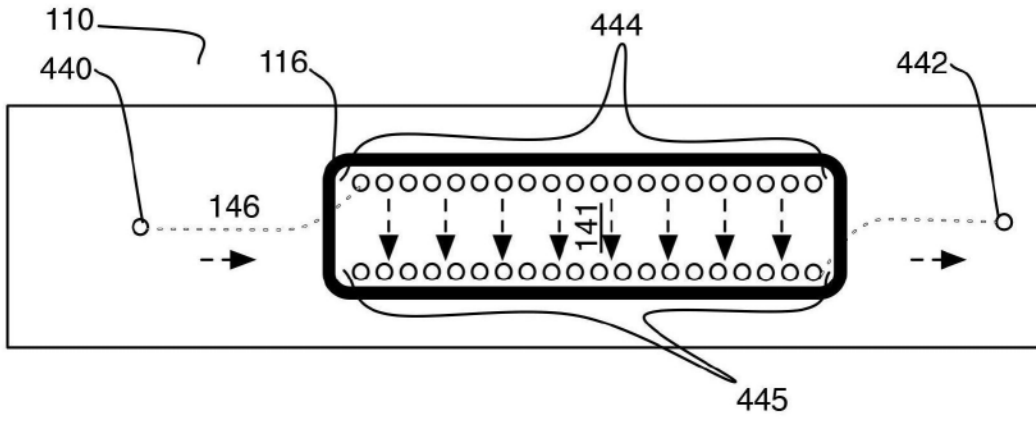


图2B

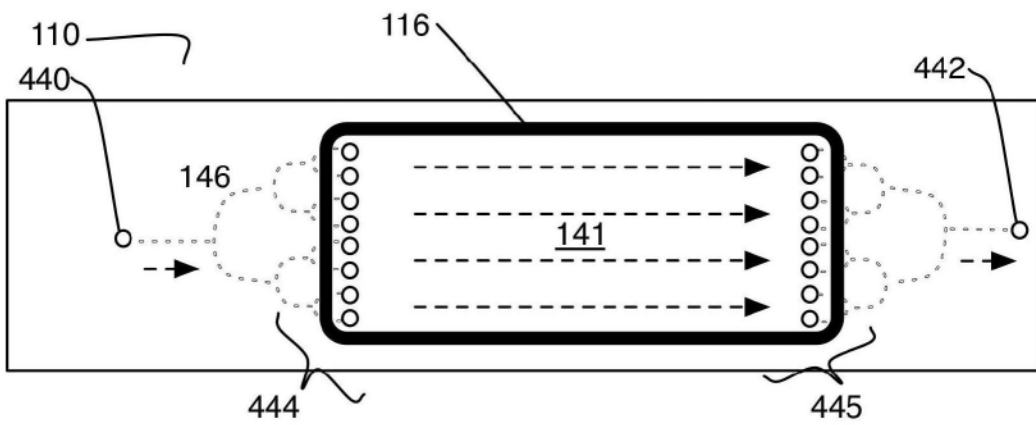


图2C

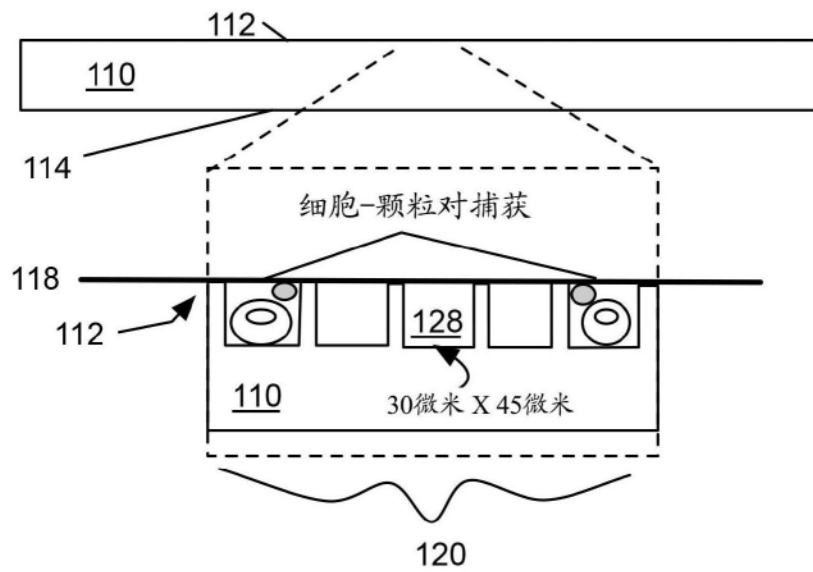


图3A

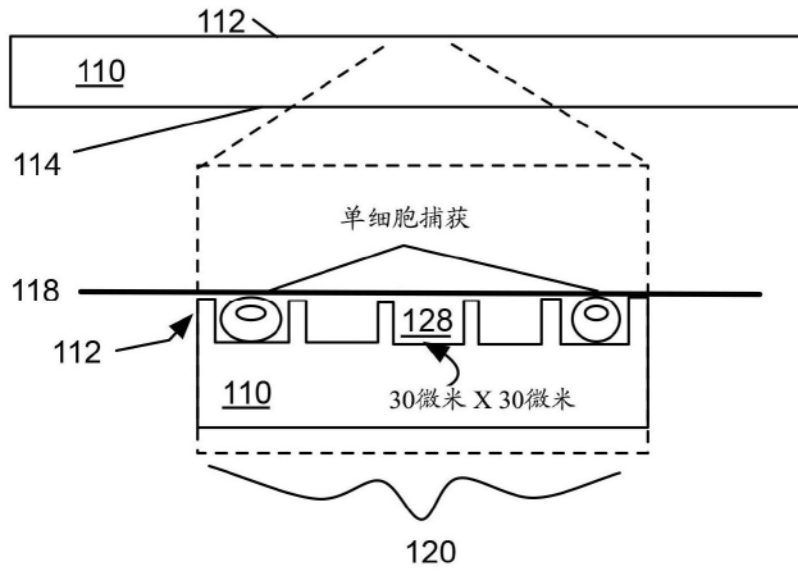


图3B

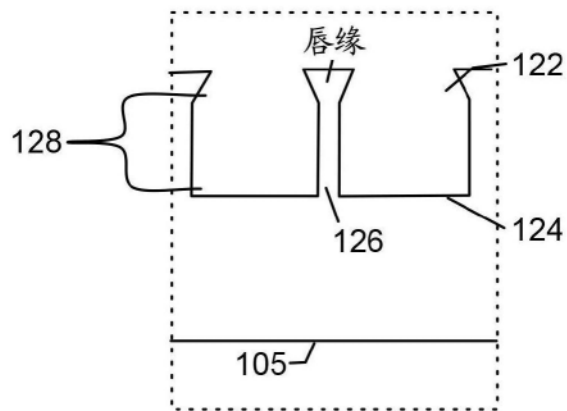


图4A

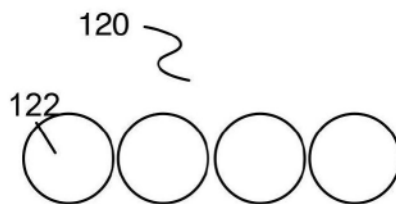


图4B

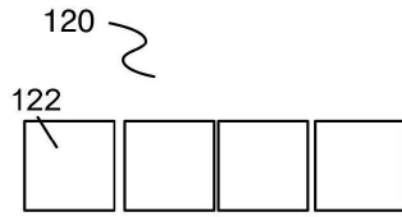


图4C

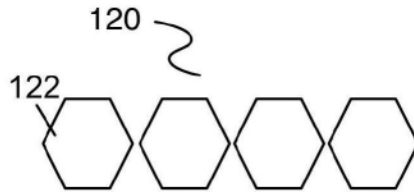


图4D

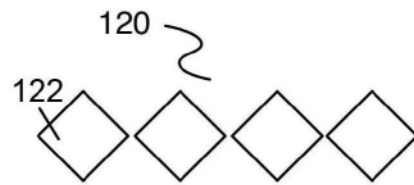


图4E

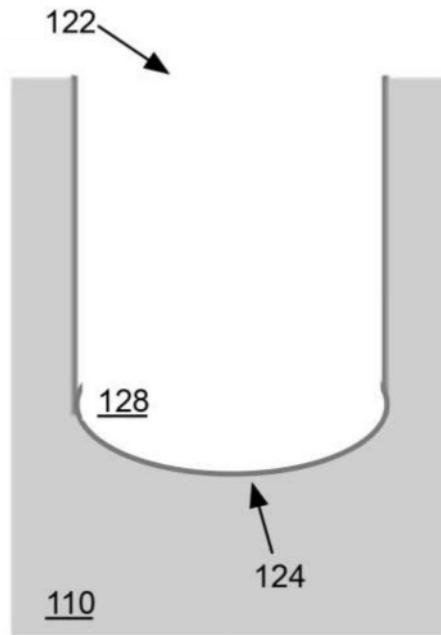


图5A

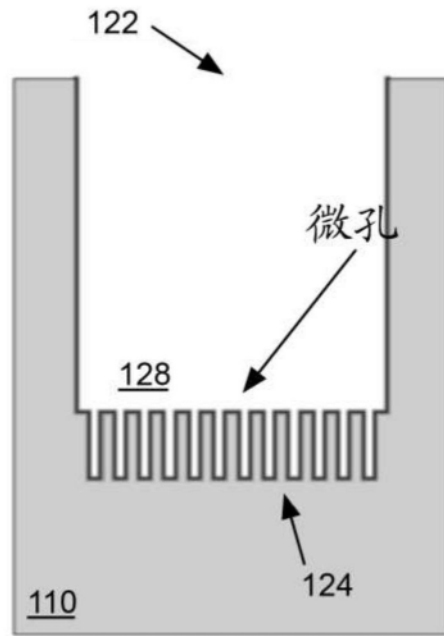


图5B

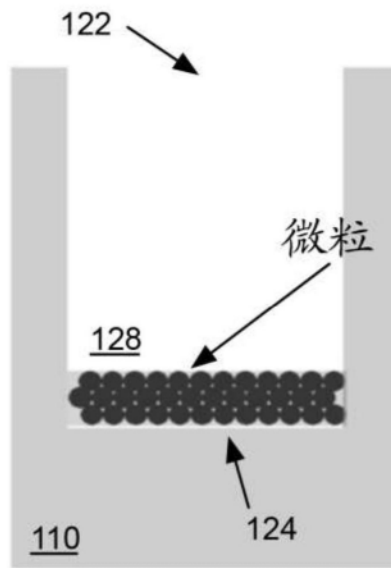


图5C

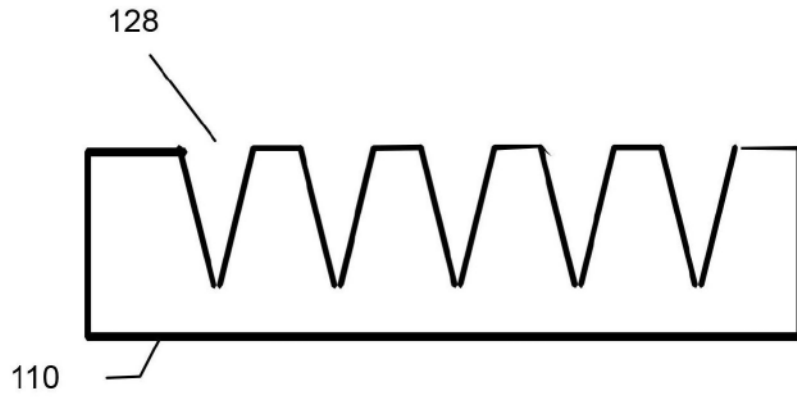


图6A

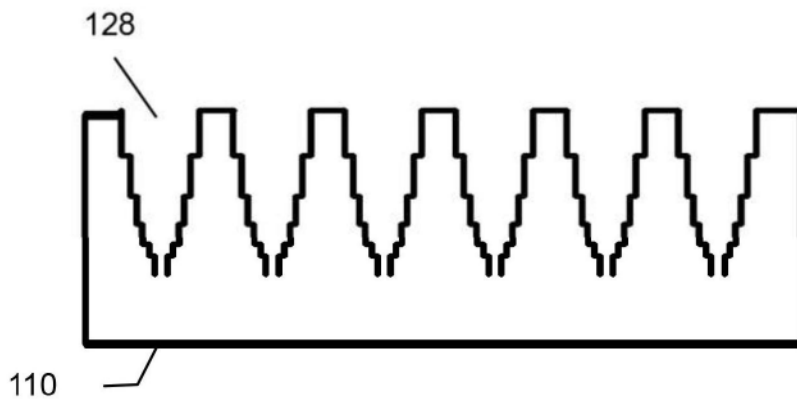


图6B

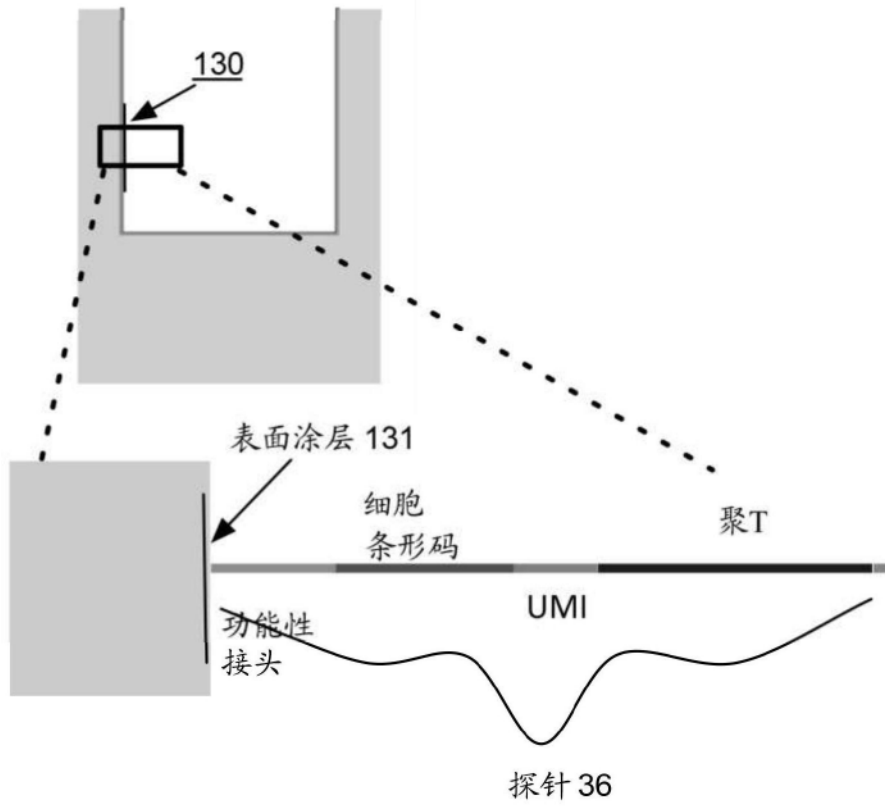


图7

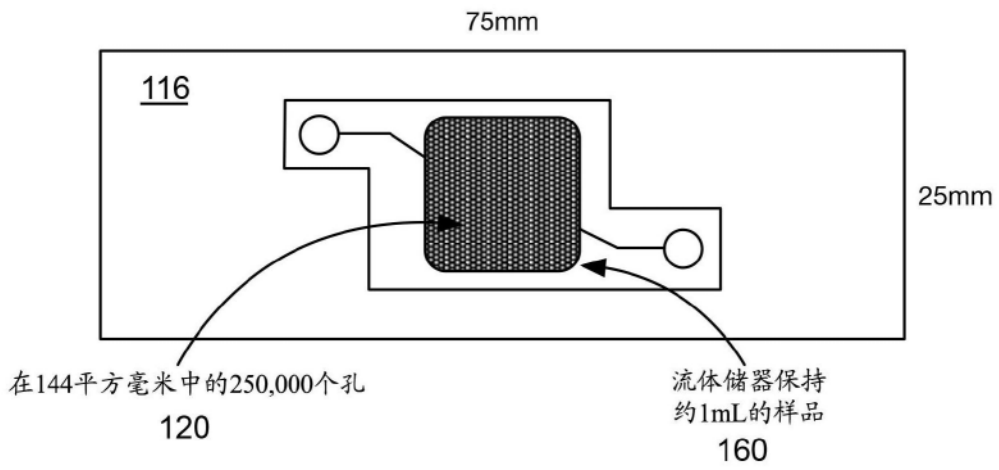


图8A

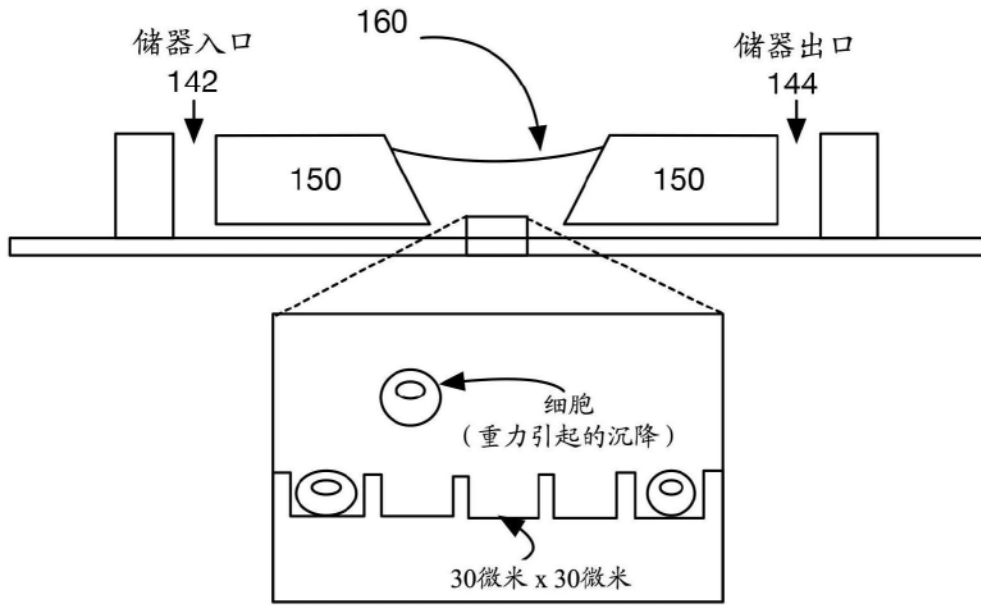


图8B

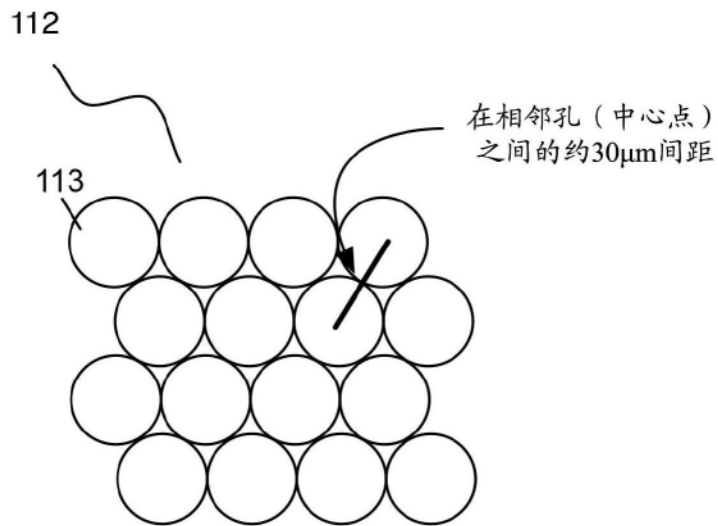


图9A

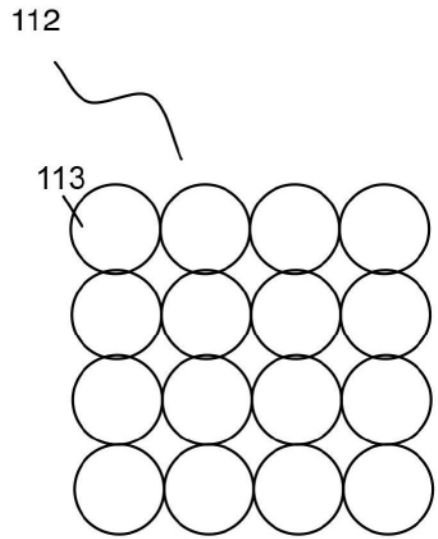


图9B

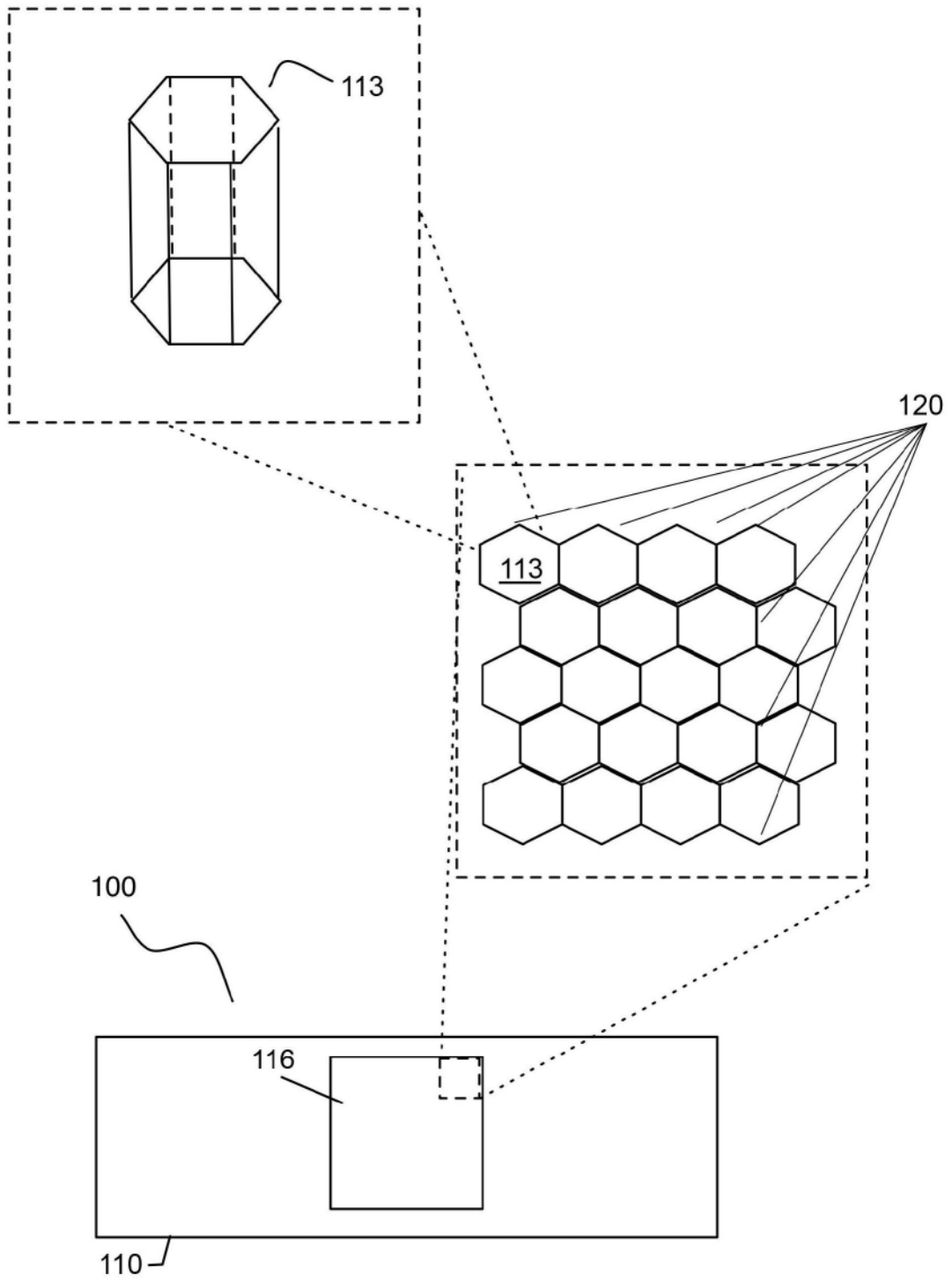


图10

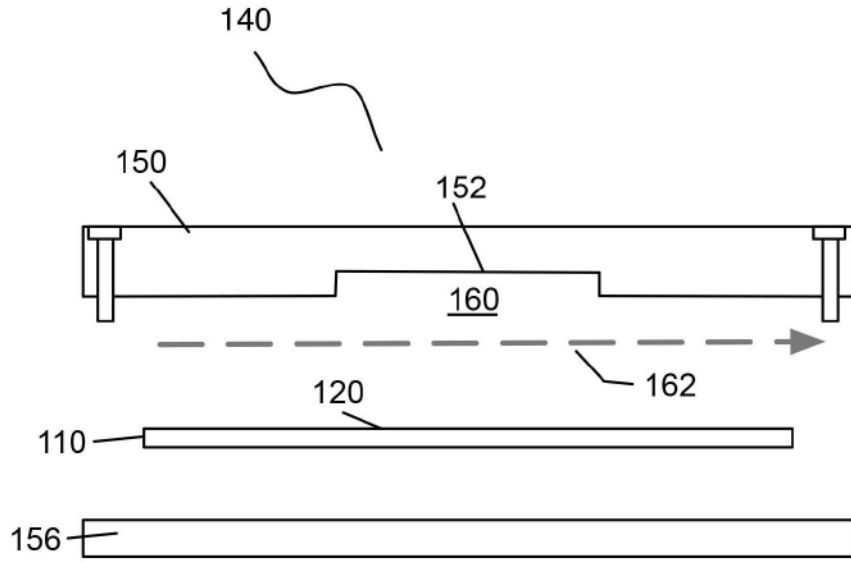


图11A

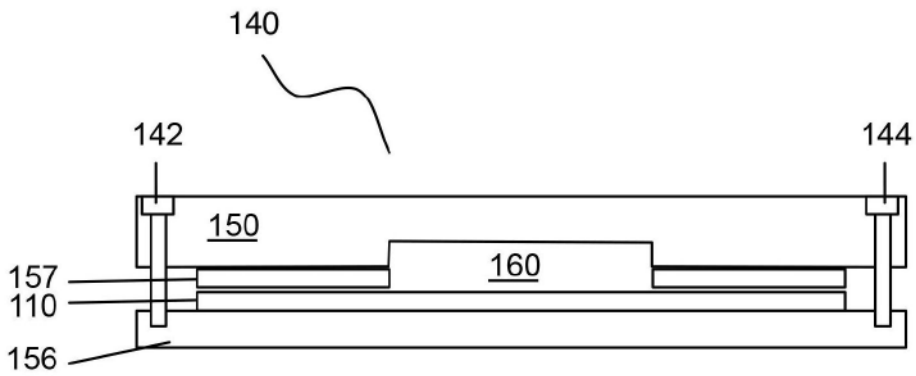


图11B

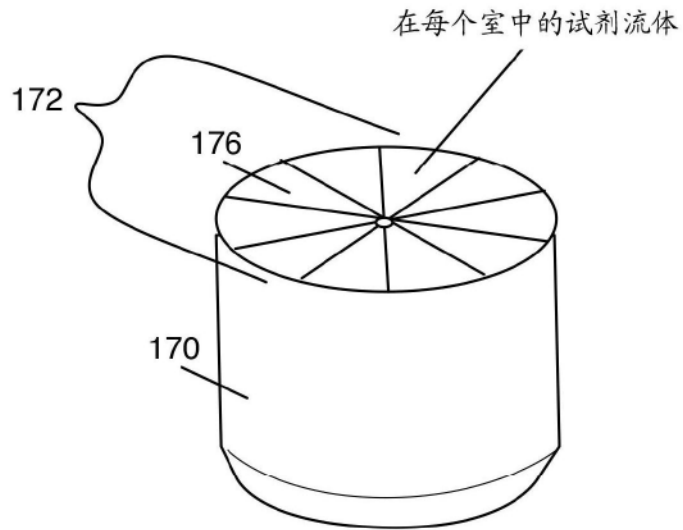


图12A

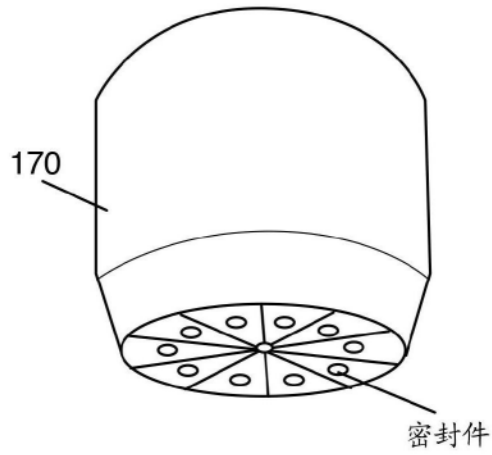


图12B

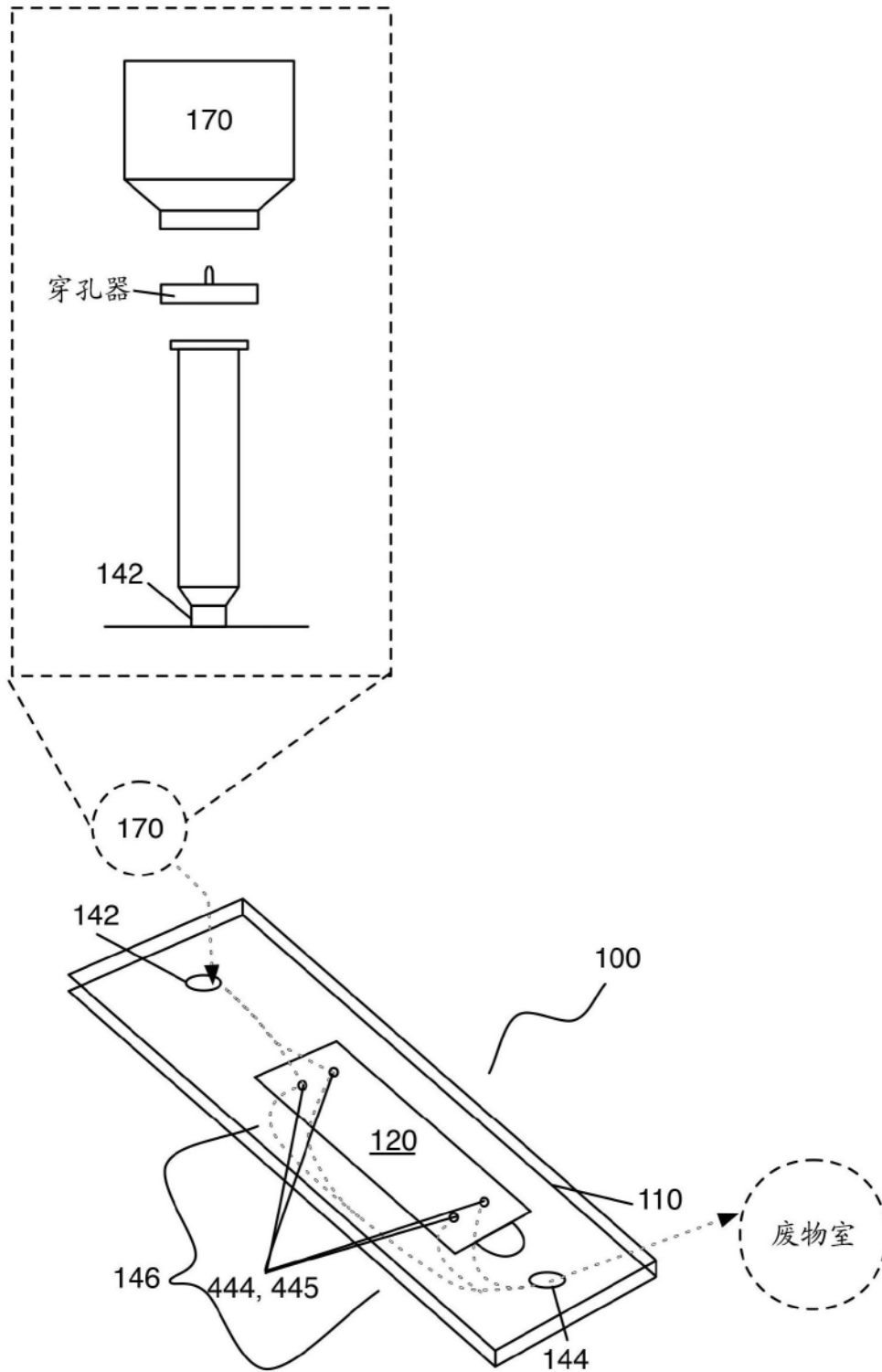


图13A

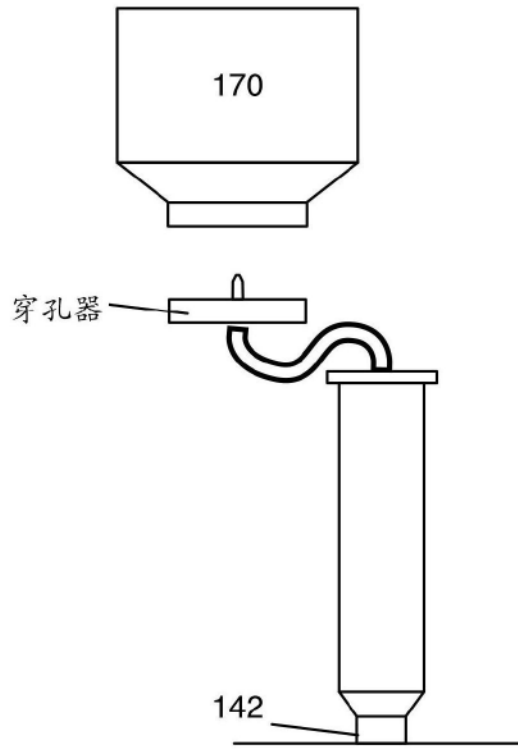


图13B

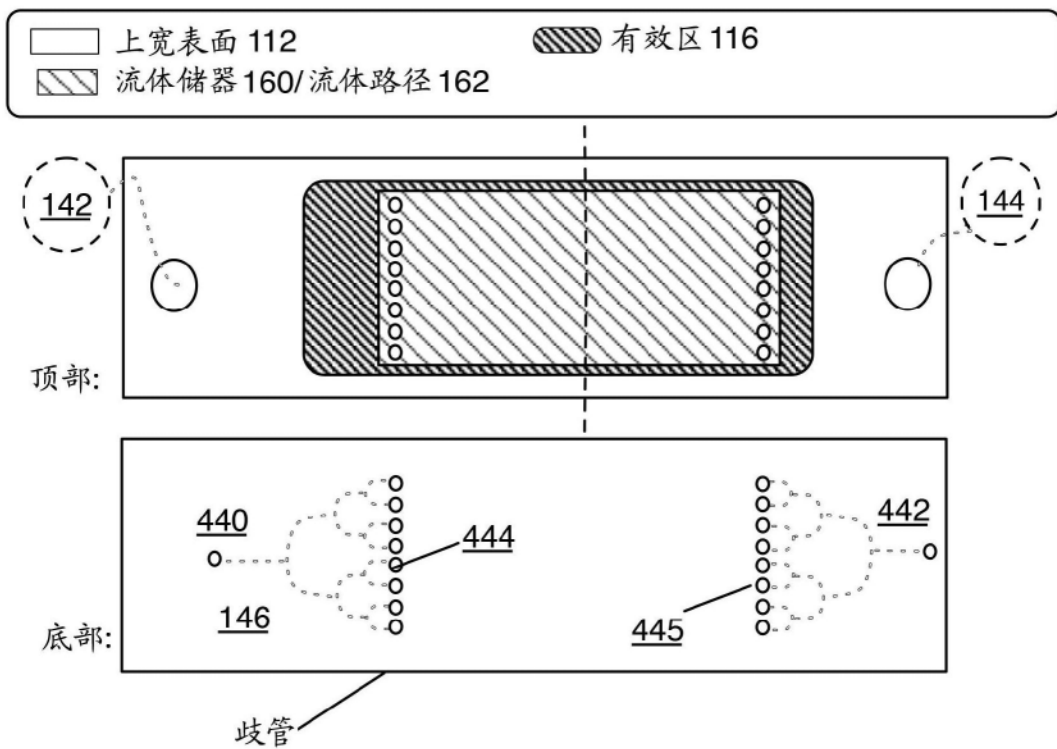


图14

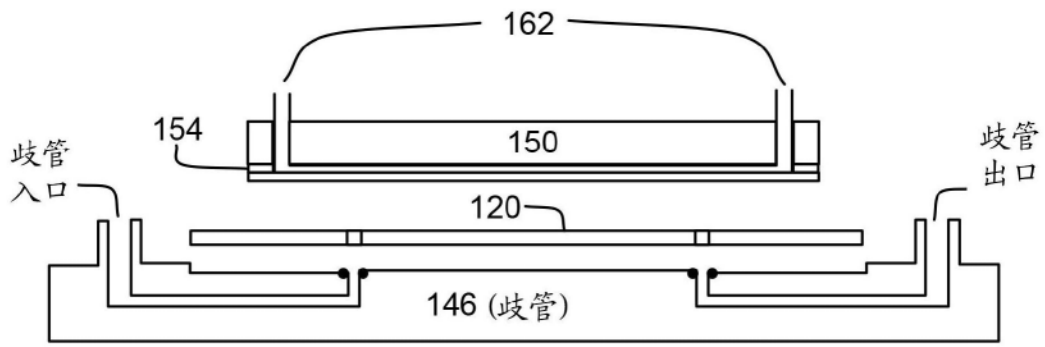


图15A

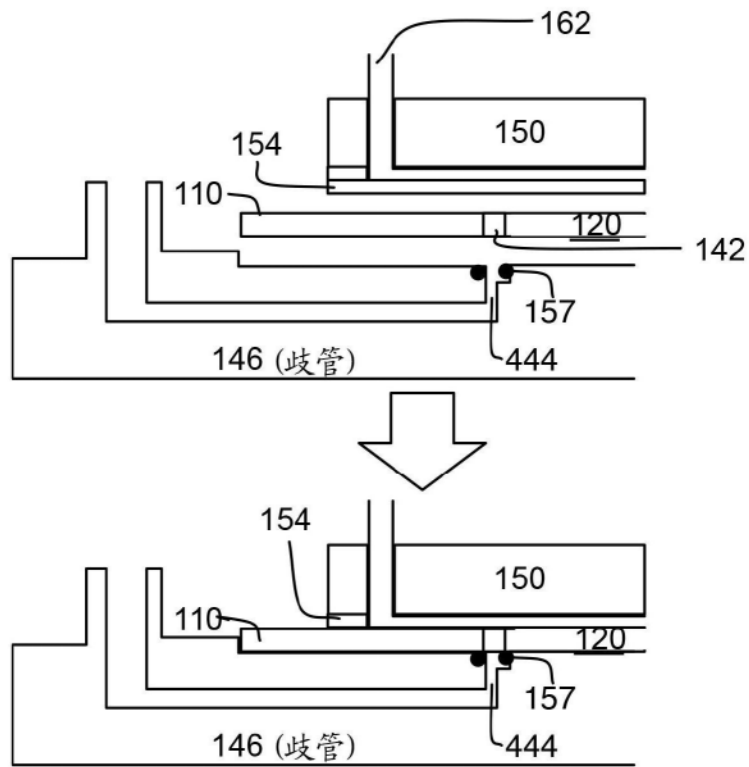


图15B

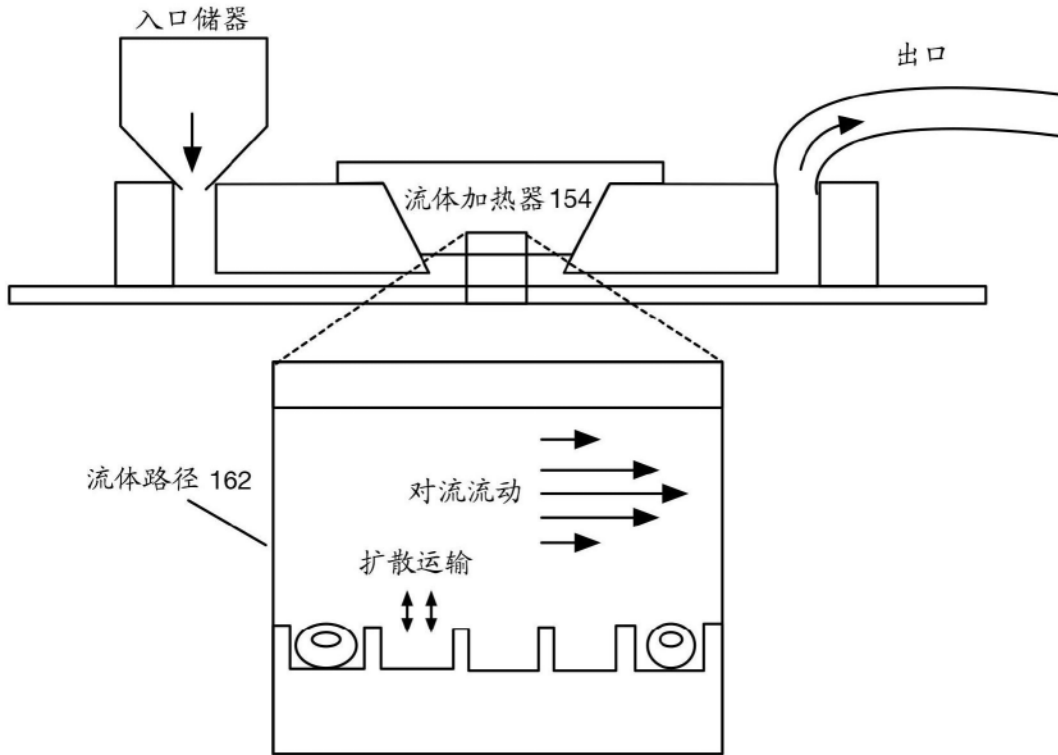


图16

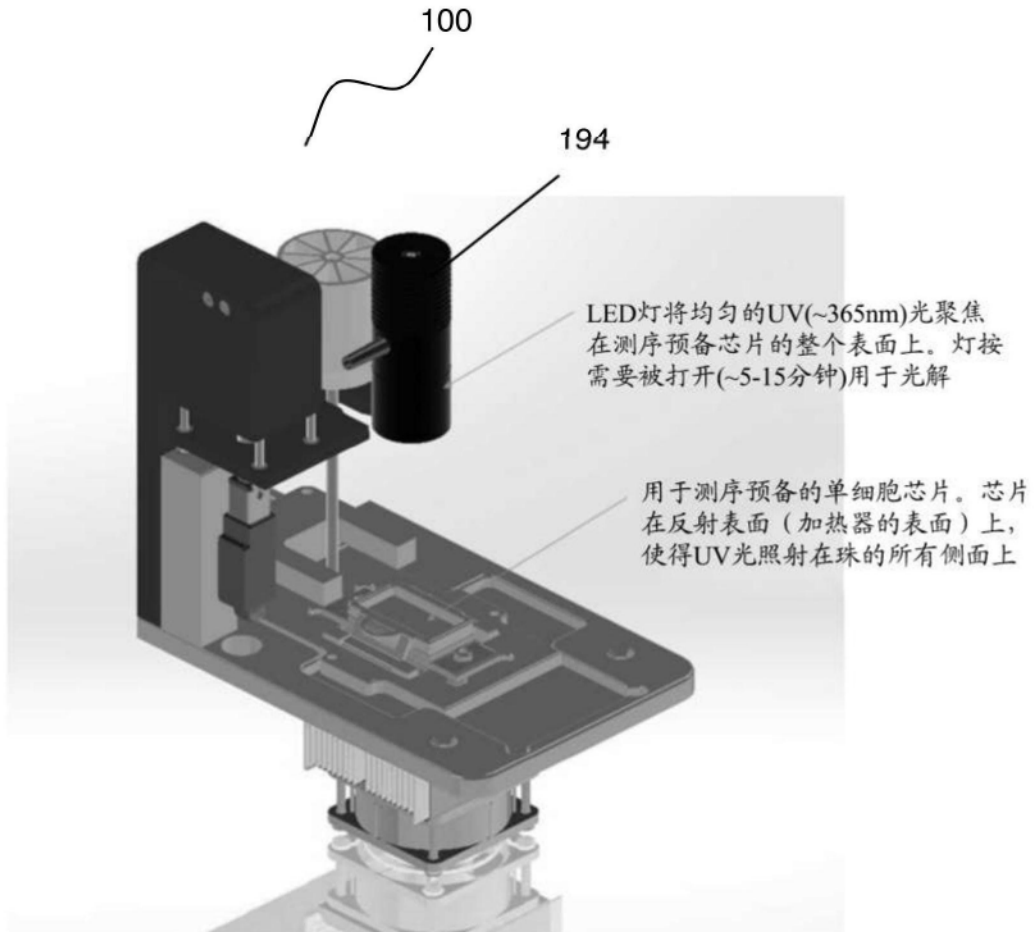


图17

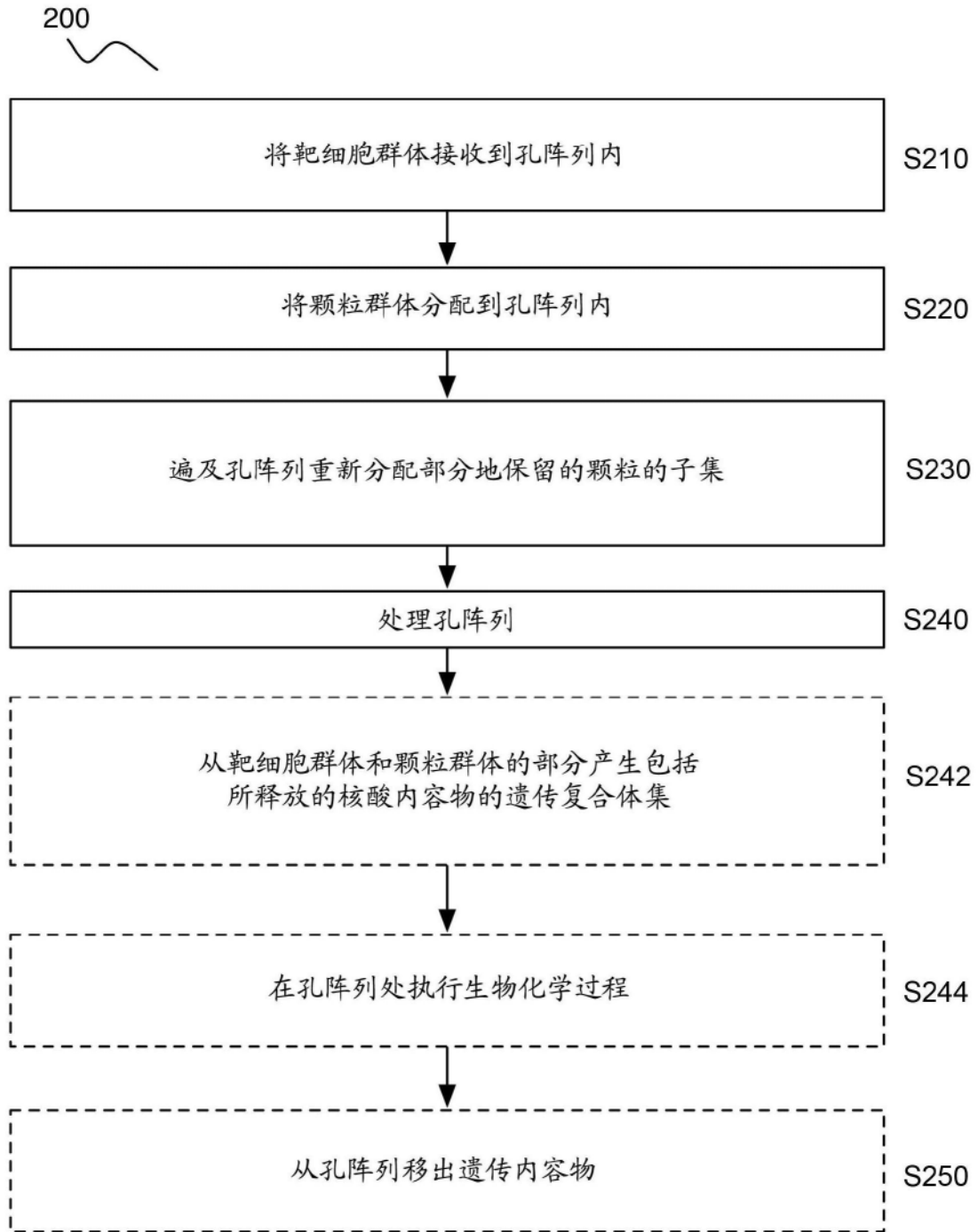


图18

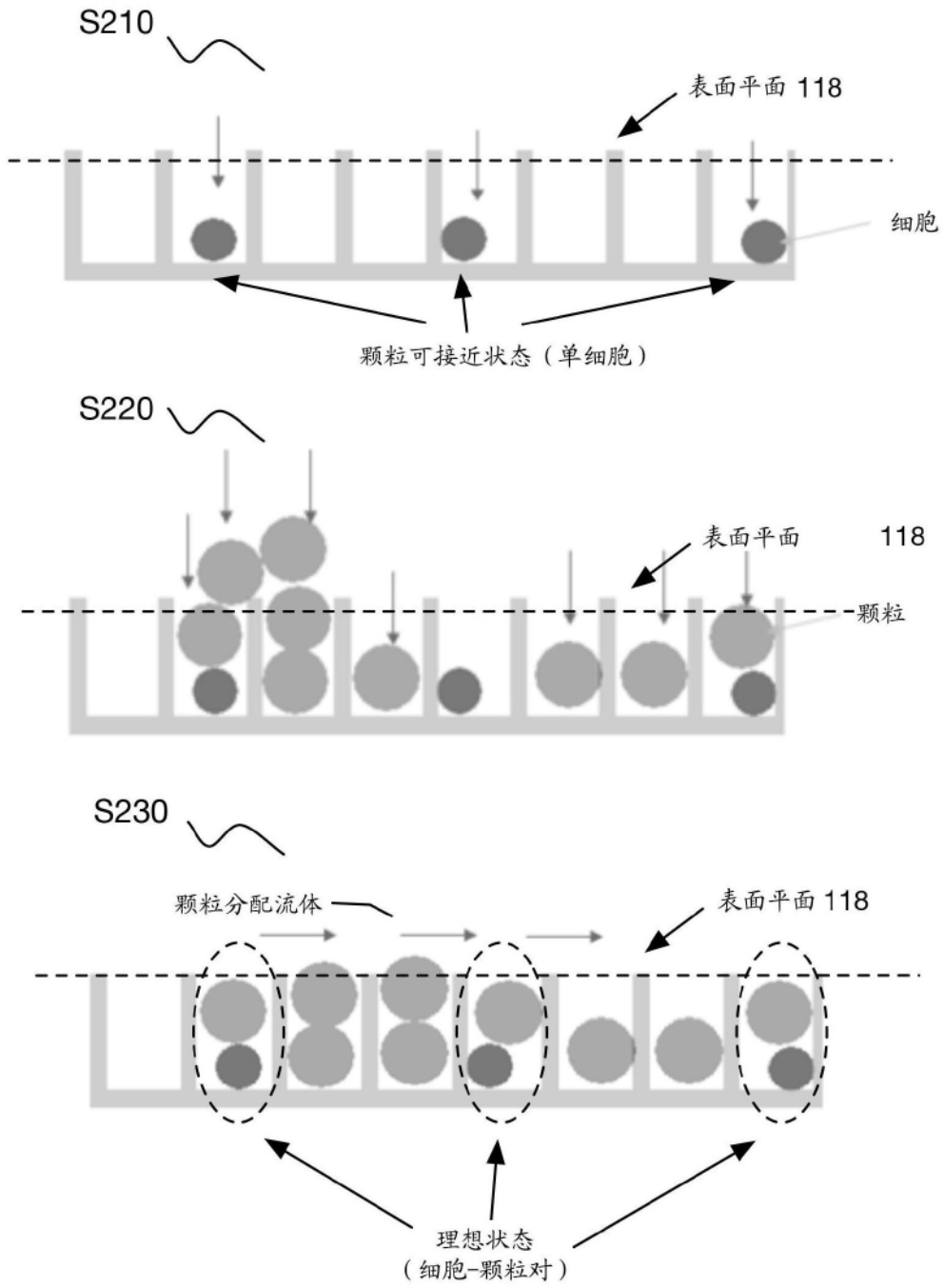
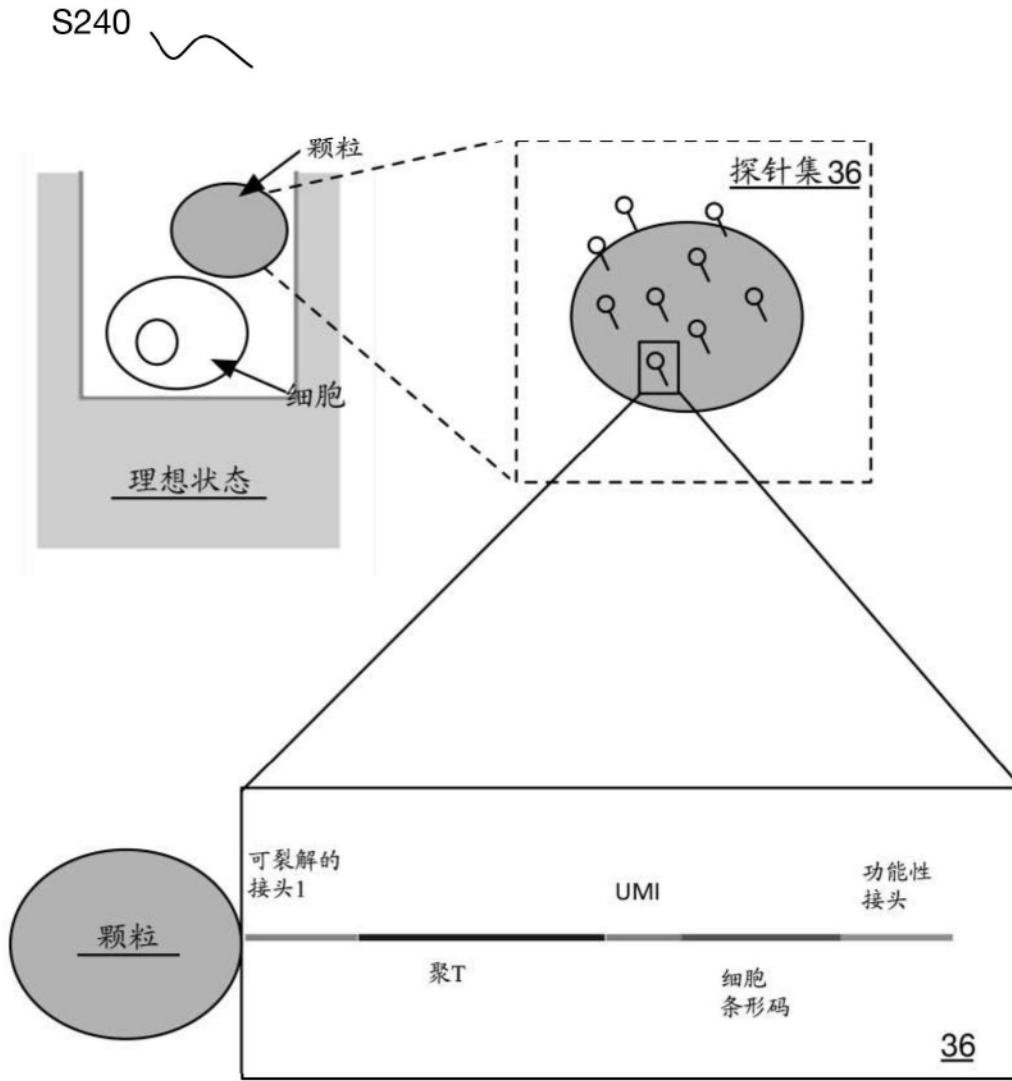


图19



探针可在与来自裂解的细胞的 mRNA 杂交之前或之后从颗粒裂解

图20

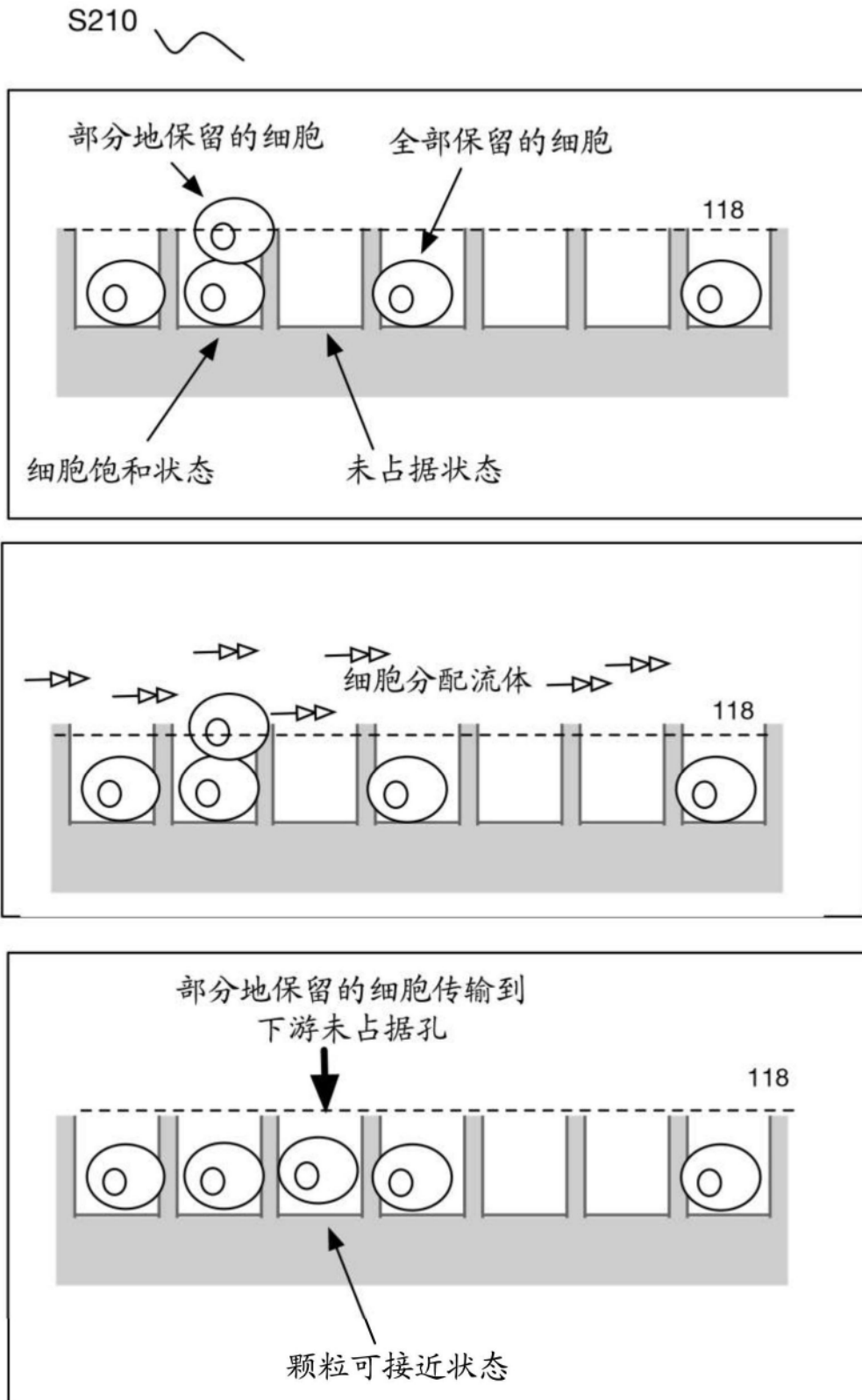


图21

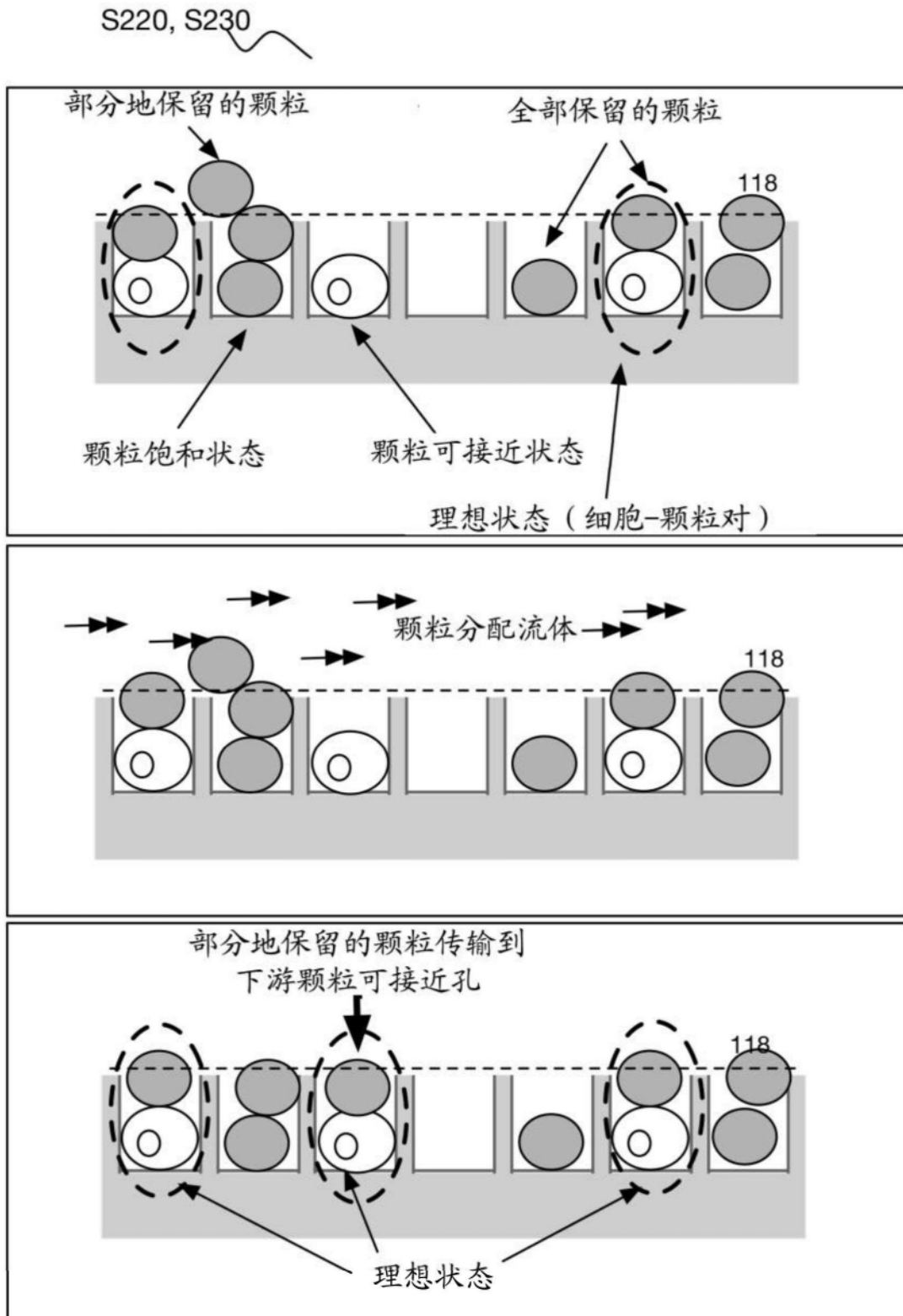


图22

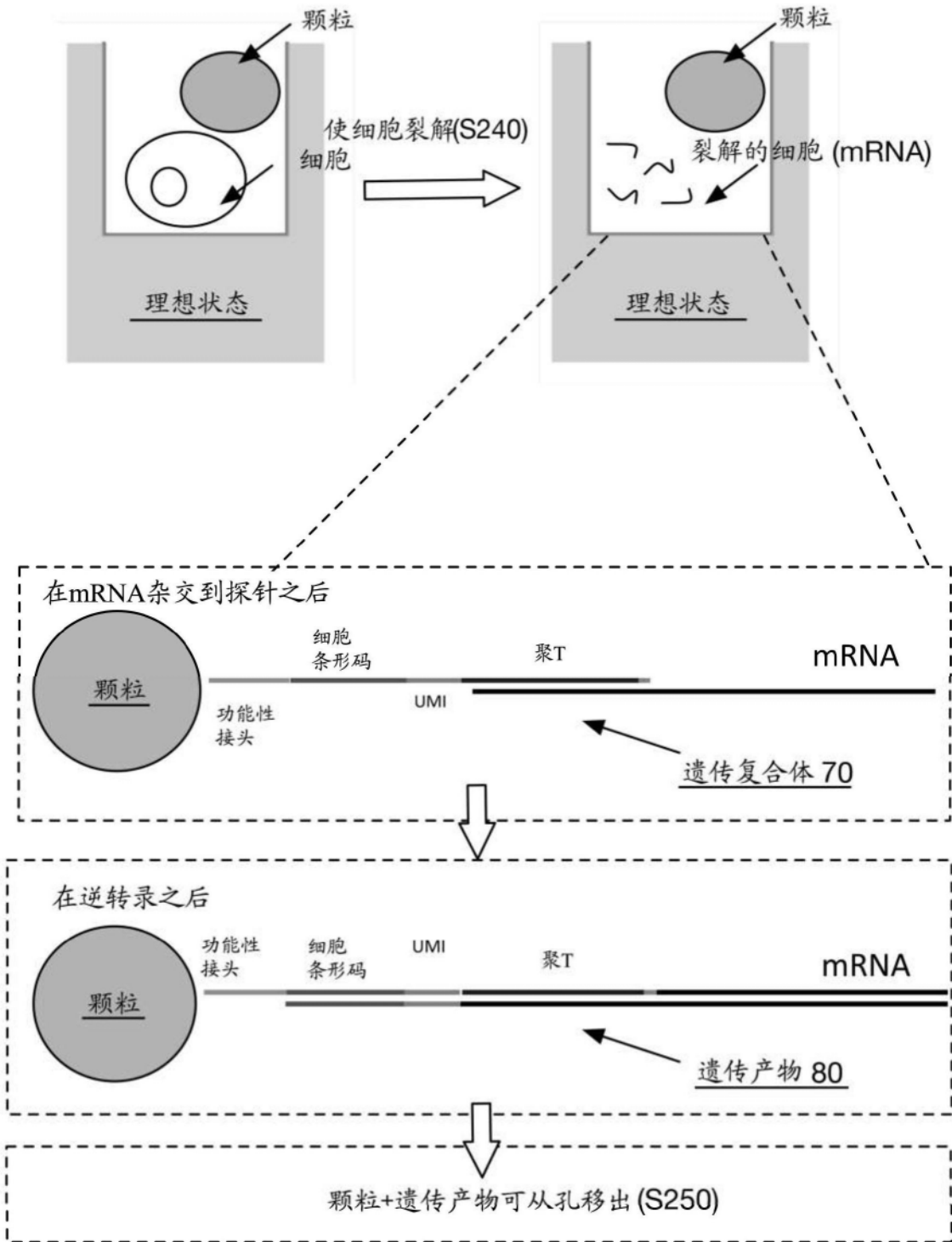


图23

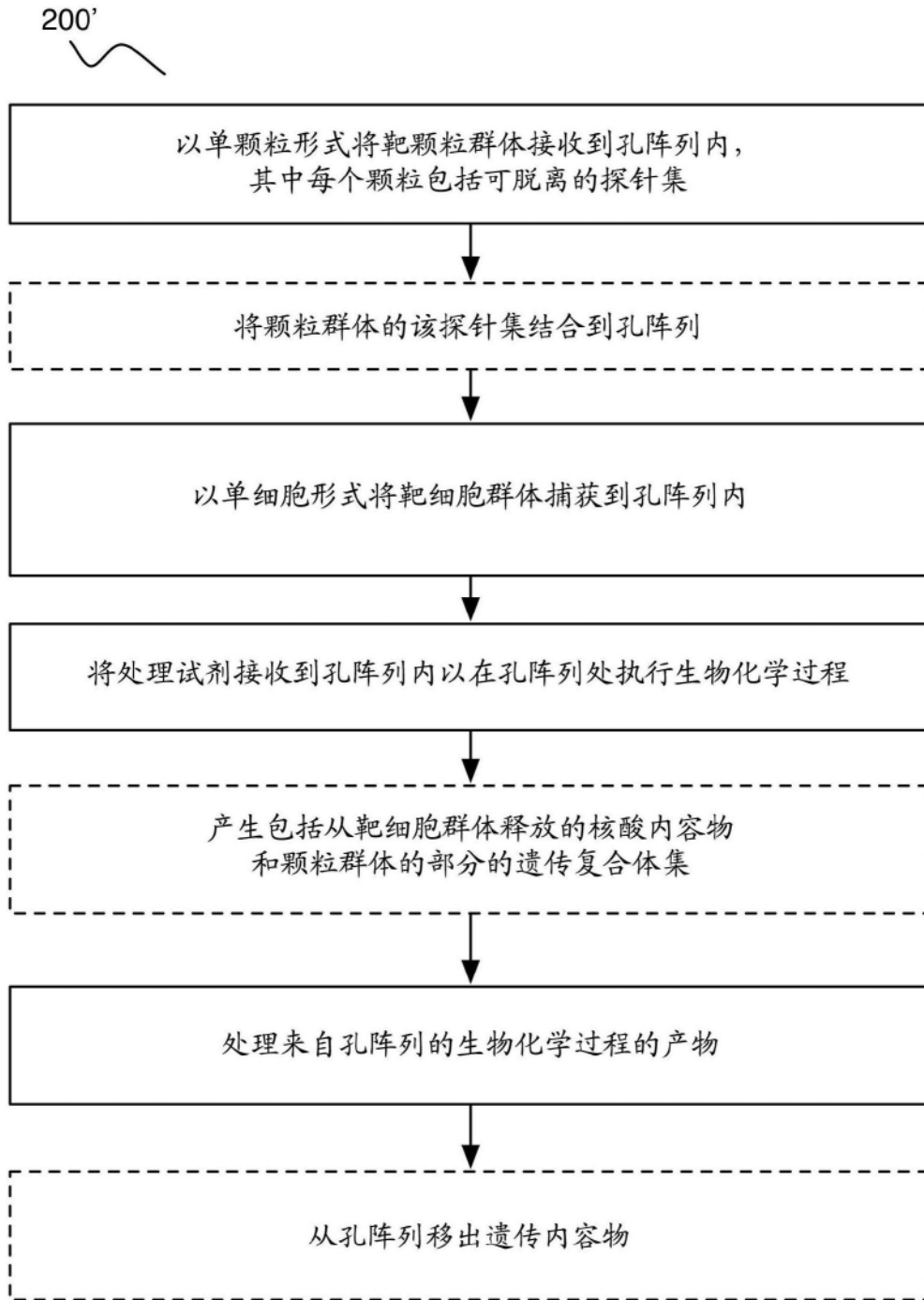


图24

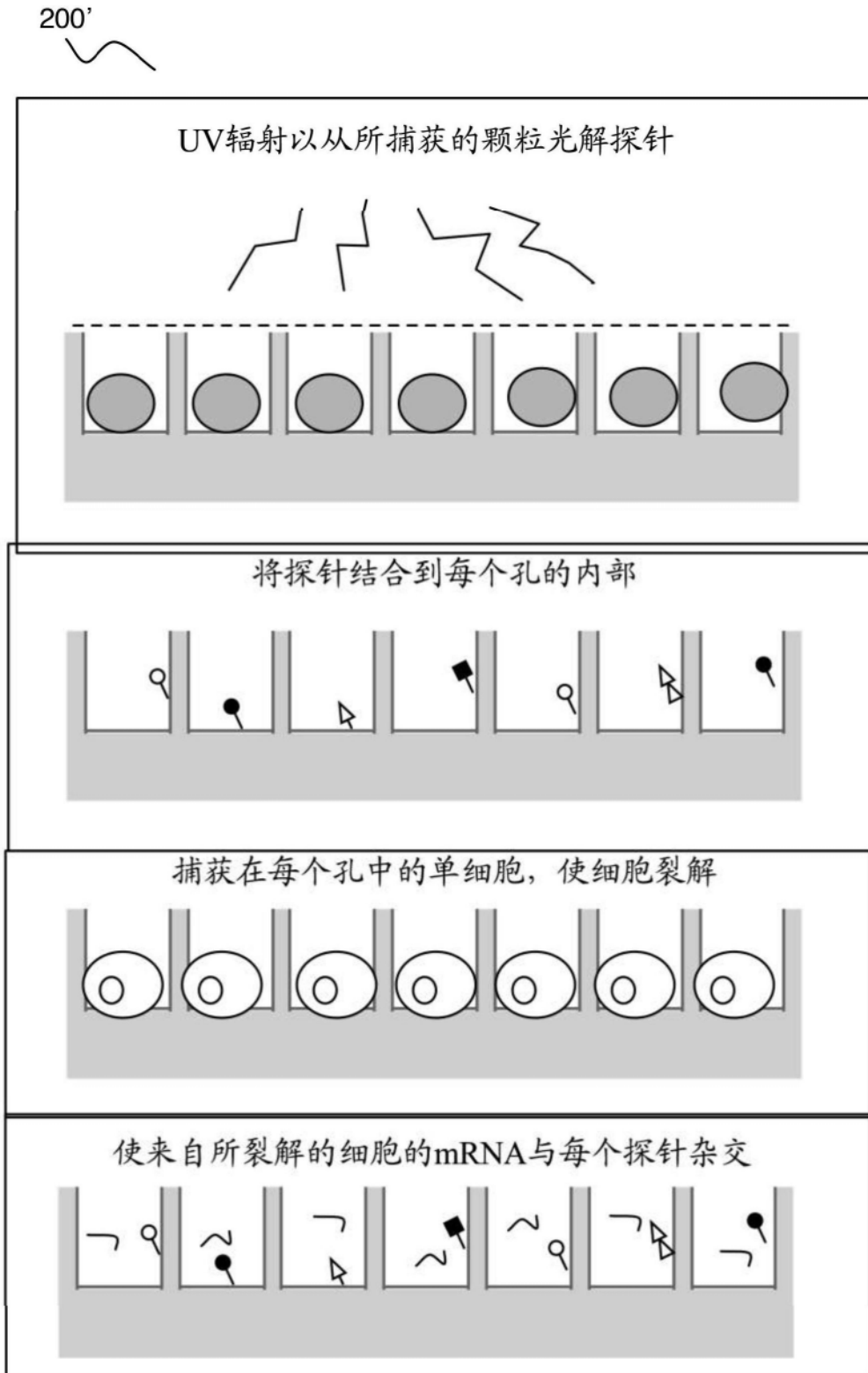


图25

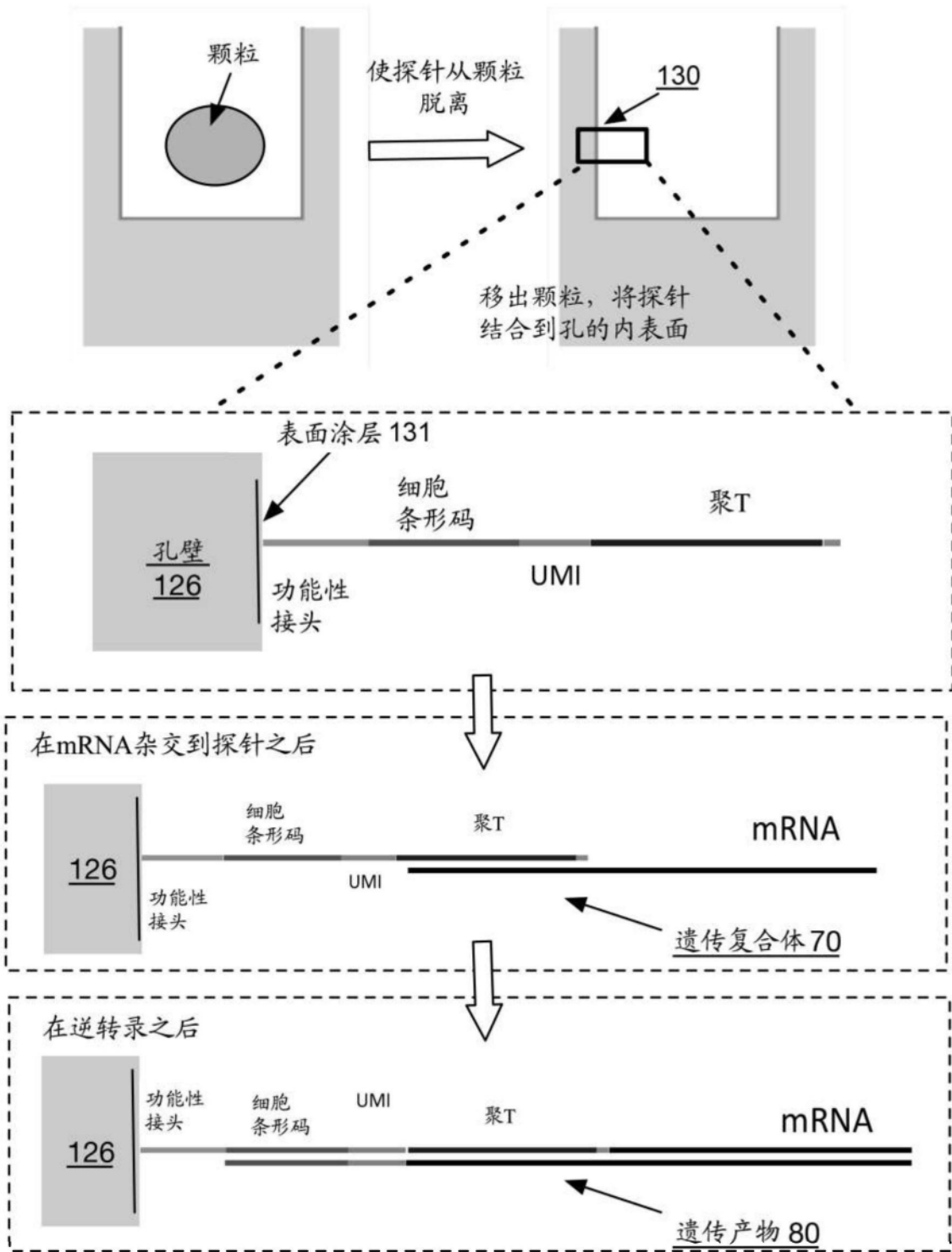


图26

单细胞综合分析

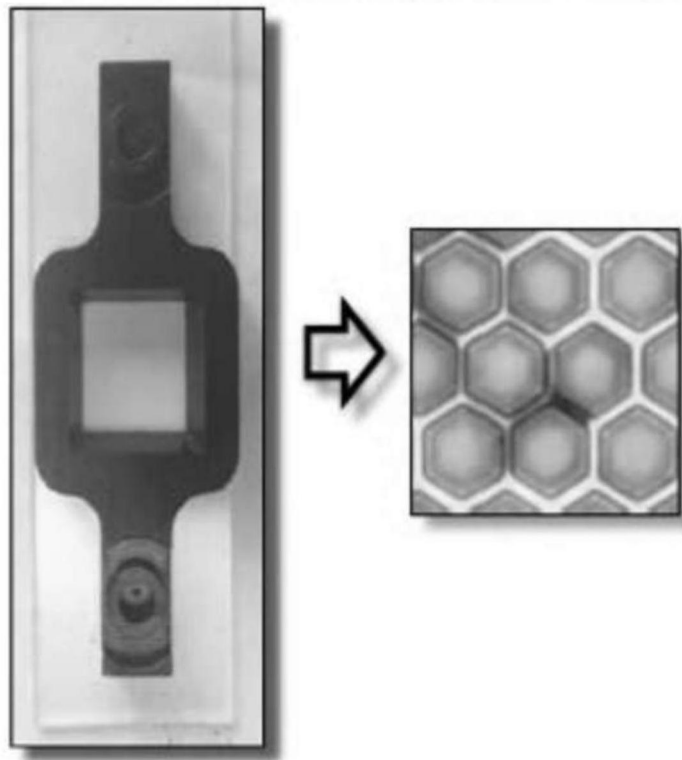


图27

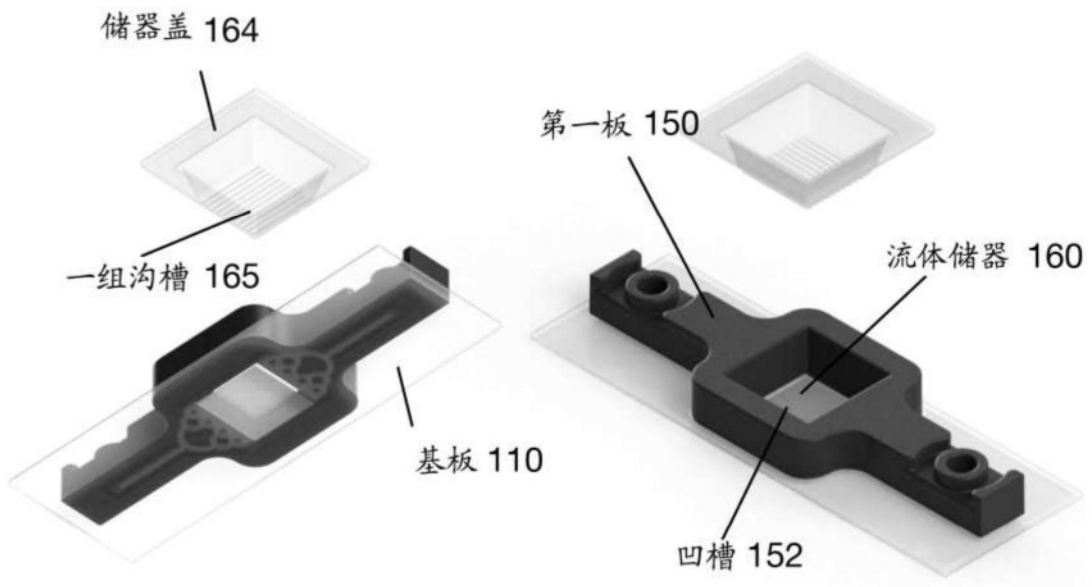


图28A

图28B

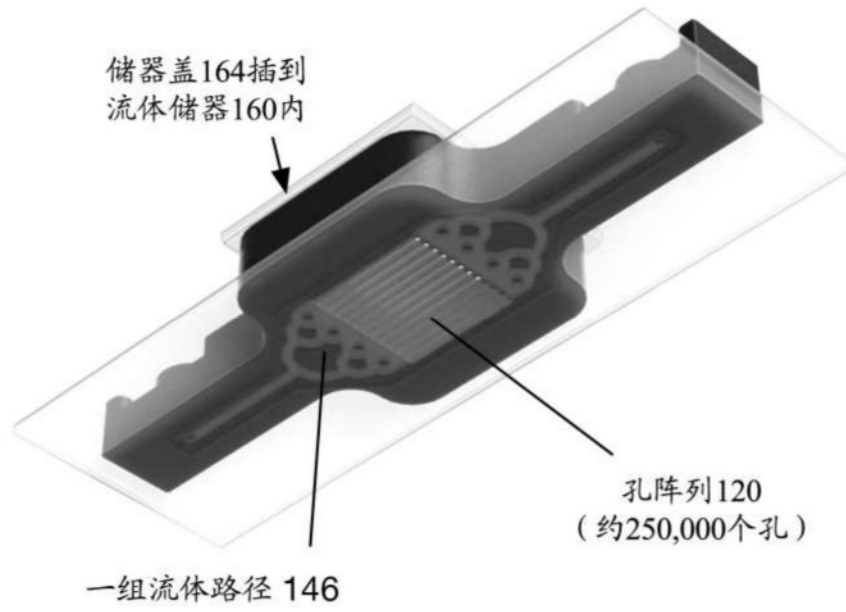


图28C

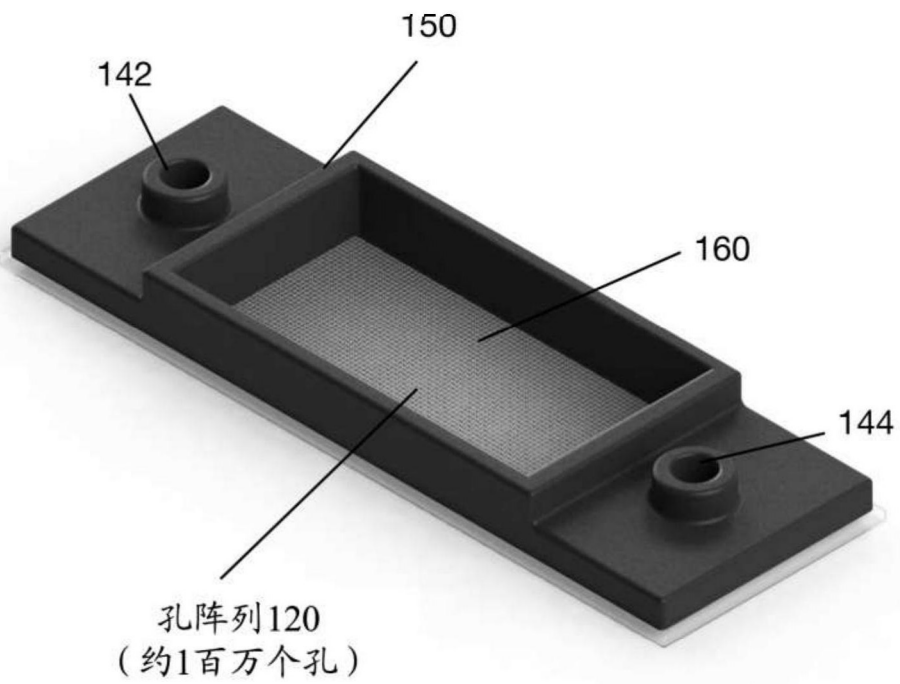


图29

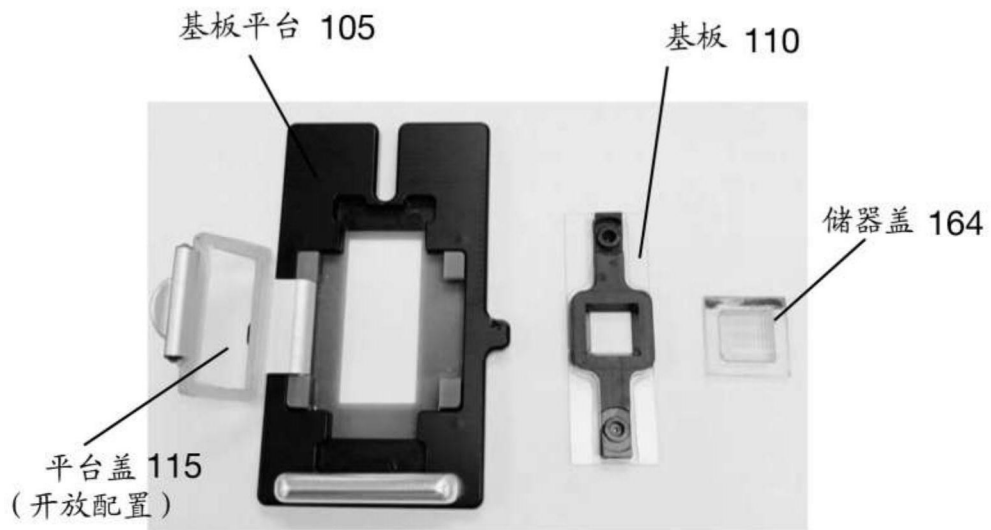


图30A

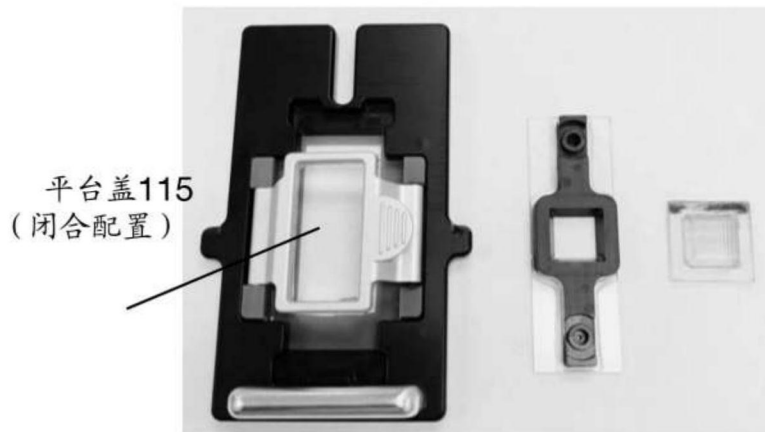


图30B

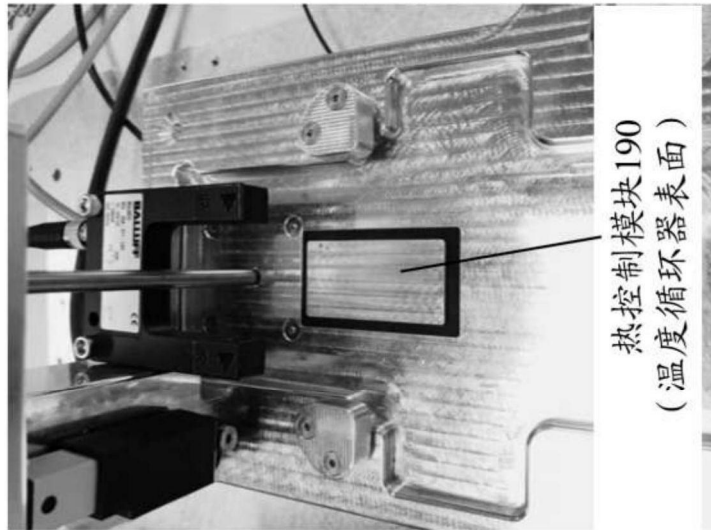


图31A

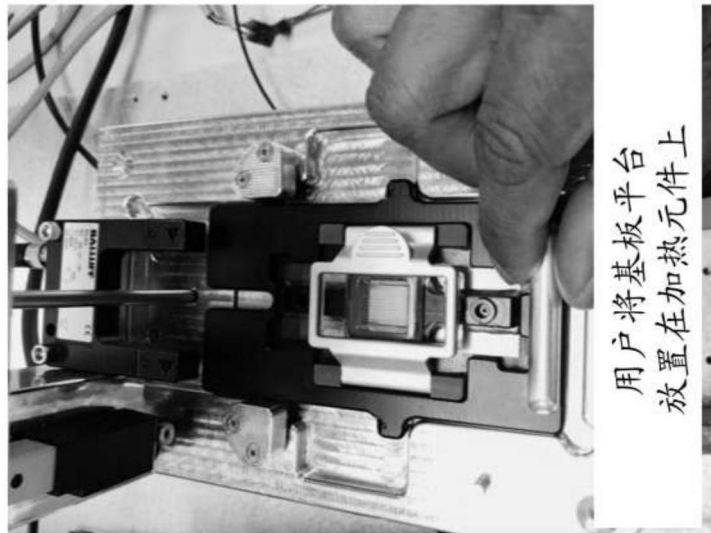


图31B

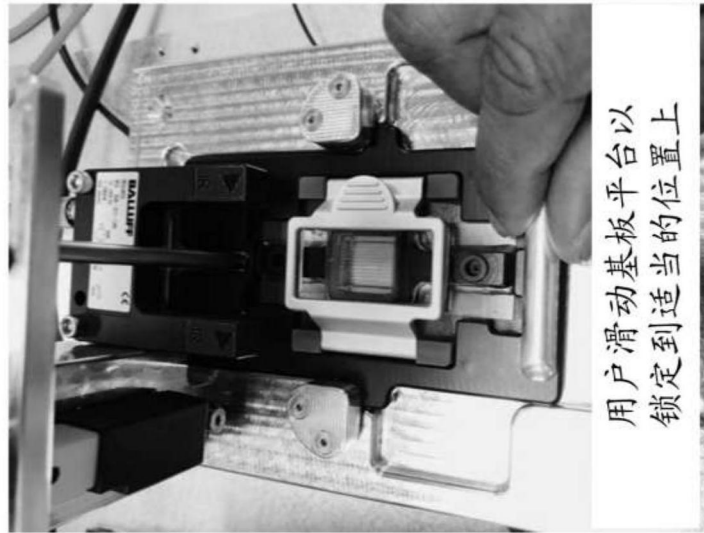


图31C

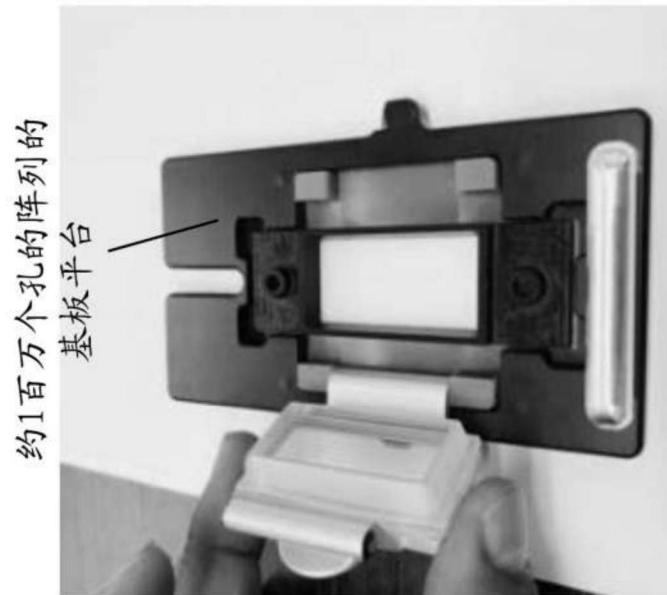


图32A

基板平台，平台盖处于
闭合配置

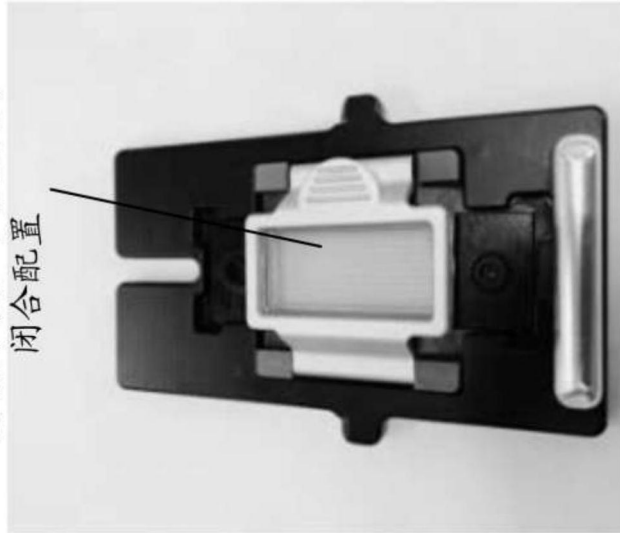


图32B

与热控制模块和成像子系统
通过接口连接的窗口

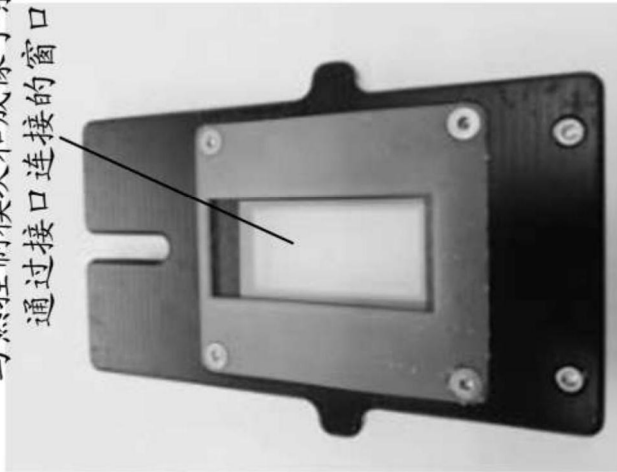


图32C

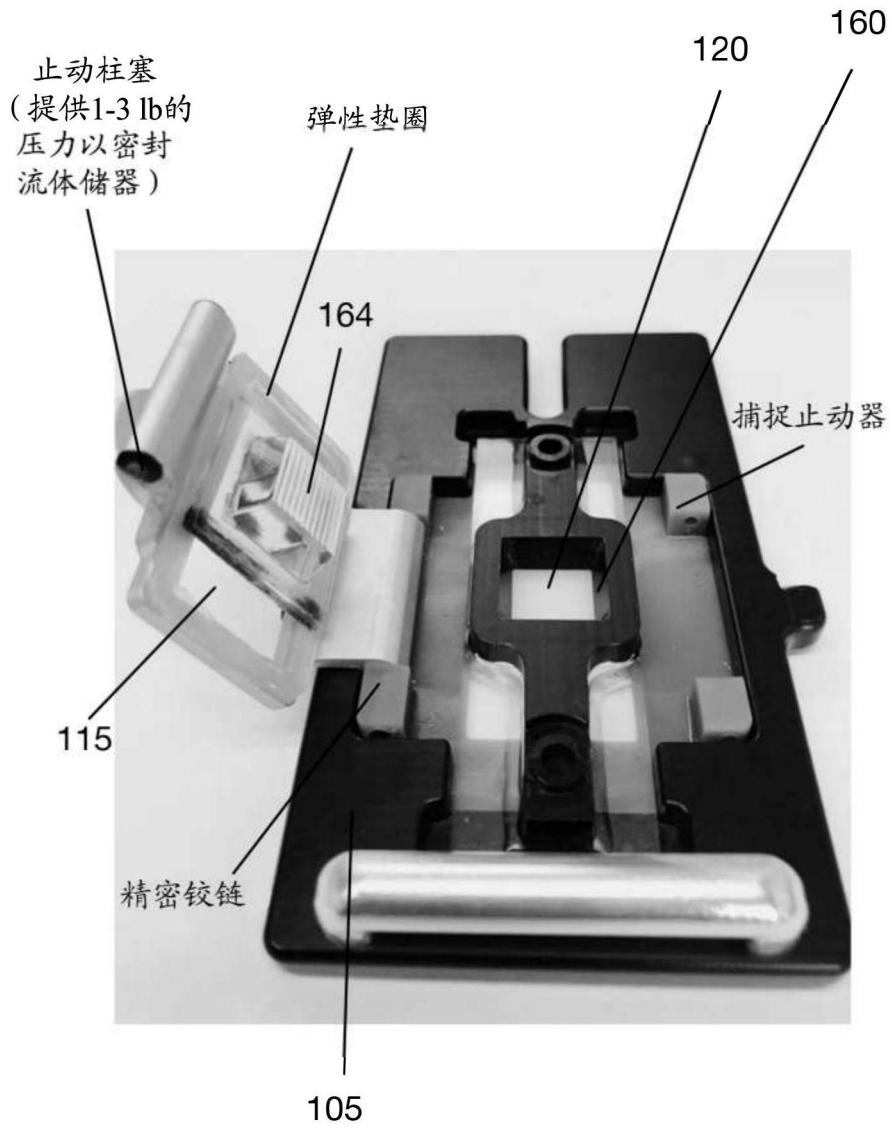


图33

重力引起的综合性单个分析 workflow

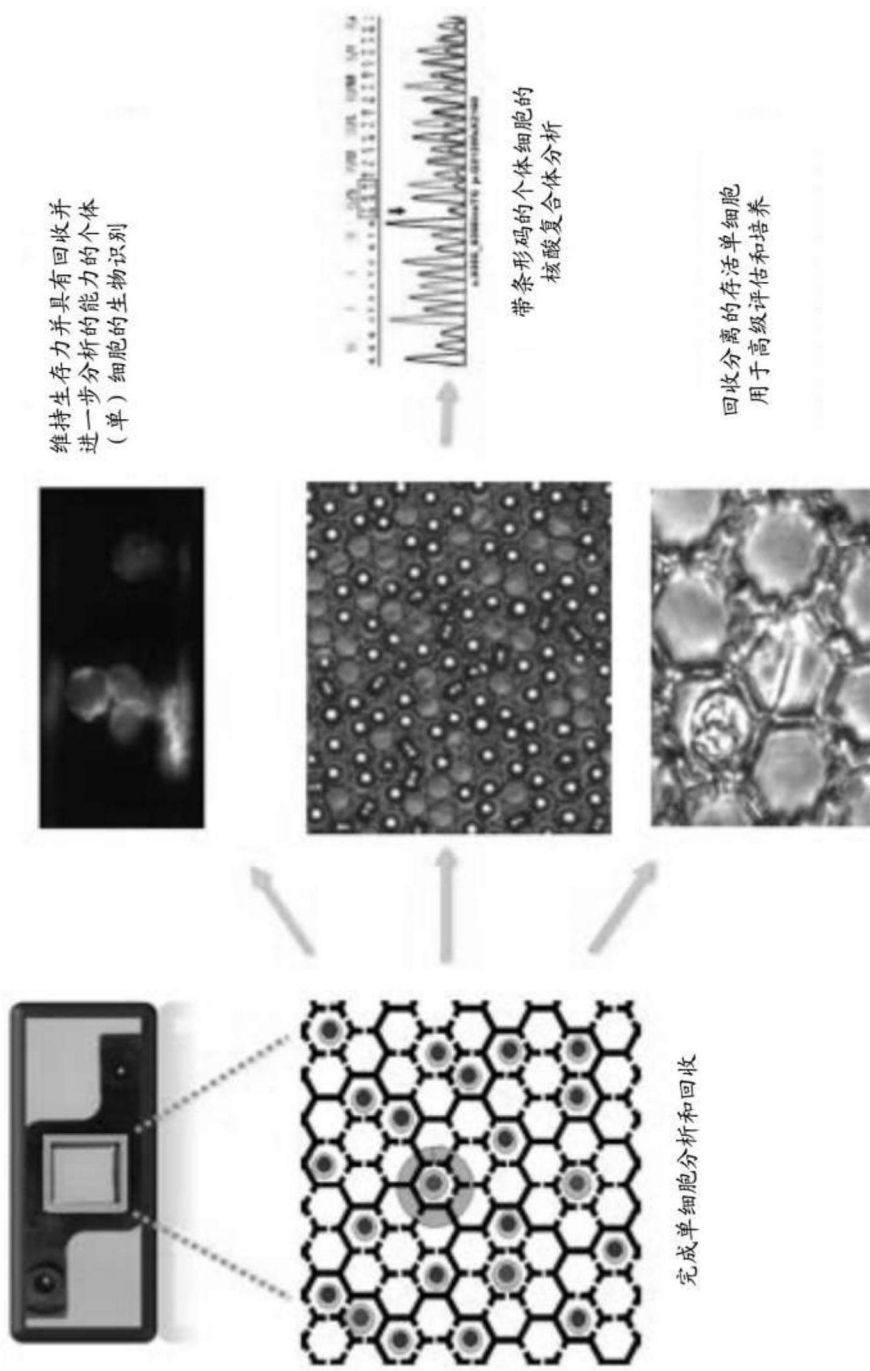


图34

可并行地运行两个阵列



图35