

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992355 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.20(51) Int. Cl. G01N 33/00 (2006.01)
G01N 21/00 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2018.04.05

(54) МИКРОЖИДКОСТНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СОРТИРОВЩИКИ КЛЕТОК (MICROFACS) ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

(31) 201741012180

(32) 2017.04.05

(33) IN

(86) PCT/IN2018/050194

(87) WO 2018/185781 2018.10.11

(71) Заявитель:

ИНДИАН ИНСТИТУТ ОФ
ТЕХНОЛОДЖИ МАДРАС (ИИТ
МАДРАС) (IN)

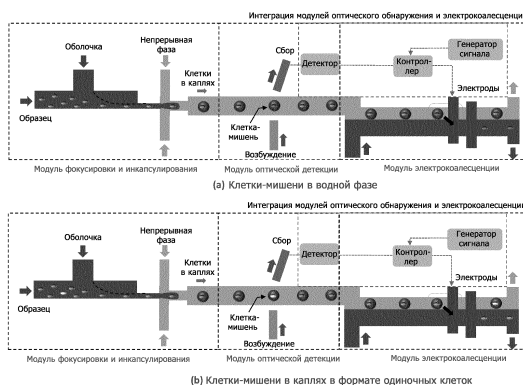
(72) Изобретатель:

Сен Ашиш Кумар, Сривастава
Абхишек, Гаиквад Равиндра, С
Картхик, К С Джайапракаш, Д
Абхишек Радж, М Снеха Мария,
Шивхаре Прийанкар (IN)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к обнаружению и выделению клеток-мишеней на основе микрожидкостной технологии и технологии сортировки клеток (MicroFACS). В этом способе биологические клетки и микрочастицы инкапсулируют внутрь гидродинамически генерируемых капель и анализируют с использованием подходящей оптики на основе сигналов флуоресценции и рассеяния. Как только клетки-мишени обнаружены, оптика запускает электрокоалесценцию для сортировки клеток-мишеней в водный поток.



A1

201992355

201992355

A1

МИКРОЖИДКОСТНЫЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СОРТИРОВЩИКИ КЛЕТОК (MICROFACS) ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к системам сортировки клеток, используемым в медицинской диагностике и биологических исследованиях, в которых применяются достижения в области микрожидкостной технологии. Более конкретно изобретение относится к быстрому извлечению клеток-мишеней из капель без какого-либо повреждения клеток.

Предшествующий уровень техники

Флуоресцентный сортировщик клеток (FACS) - это инструмент, который исследует небольшой объем жидкости для обнаружения и сортировки биологических клеток, присутствующих в образце жидкости [JS Kim, et al., PAN Stanford Publishing, Singapore, 2010]. В настоящее время благодаря его приспособленности к подробному анализу FACS является современным уровнем для биологического анализа образцов [RBL Gwatkin., Et al., Practical flow cytometry, 1994; Mol. Reprod. Dev., 1995]. FACS находит многочисленные применения, включая биомедицинские исследования для иммунологии, анализа отдельных клеток и молекулярной биологии. Однако традиционные системы FACS очень дороги и поэтому доступны только в централизованных исследовательских учреждениях и крупных медицинских центрах [RBL Gwatkin., Et al., Practical flow cytometry, 1994; Mol. Reprod. Dev., 1995]. Аналогичным образом, из-за его сложности, регулярное техническое обслуживание и квалифицированный опыт необходимы для эксплуатации машины, анализа данных и составления отчетов. Кроме того, для устранения любых функциональных сбоев и устранения неисправностей требуются квалифицированные специалисты. Эти факторы значительно увеличивают затраты на обслуживание машины и увеличивают стоимость теста при диагностике с использованием обычной системы FACS. В последние несколько лет проводились исследовательские работы по разработке экономически эффективной портативной системы MicroFACS с использованием достижений в области микрожидкостной технологии. Однако одним из основных препятствий в развитии MicroFACS являются сложные методы, необходимые для трехмерной фокусировки биологических клеток, протекающих внутри микроканала, и контроля взаимного расстояния между ними в оптическом окне [P. K. Shivhare, et al., Microfluid. Nanofluidics, 2016].

Еще одной проблемой при разработке MicroFACS является выделение клеток-мишеней после обнаружения. В литературе сообщалось о различных методах выделения

клеток-мишеней, таких как гидродинамика [A. Wolff et al., Lab Chip, 2003], диэлектрофорез [D. Holmes et al., Micro Total Anal. Syst, 2004], оптический [MM Wang et al., Nat. Биотехнология 2005] и пьезоэлектрический [A. Wolff et al., Lab Chip, 2003]. Однако такие методы требуют высокого напряжения или высокого сдвигового усилия, что влияет на жизнеспособность и свойства клеток, дает низкую пропускную способность, использует сложное оборудование и, следовательно, не позволяет разработать сортировщик на основе микрожидкостной технологии [SH Cho et al., Biomicrofluidics, 2010]. Кроме того, ни один из этих методов не подходит для экстракции и выделения клеток-мишеней в одноклеточном формате.

Во многих публикациях показано, что при коалесценции капель для выделения микрочастиц и сортировки капель использовалось электрическое поле [K. Ahn C et al., Appl. Phys. Lett., 2006; L. M. Fidalgo et al., Angew. Chemie, 2008; L. Mazutis et al., Lab Chip, 2012; T. Szymborski et al., Appl. Phys. Lett, 2011; A. R. Thiam et al., Phys. Rev. Lett, 2009]. Было исследовано слияние капель в эмульсии вдоль направления потока [Keunho Ahn et al., Appl. Phys. Lett, 2006]. Было также исследовано слияние водных капель с параллельным потоком водной фазы в направлении, перпендикулярном направлению потока [V. Chokkalingam et al., Lab Chip, 2014]. Однако более позднему устройству требуется очень высокое напряжение (тысячи вольт) и электрическое поле (10^7 В/м), таким образом, оно не подходит для биологических применений из-за проблемы жизнеспособности клеток.

Таким образом, настоящее изобретение относится к технике, в которой клетки фокусируются в однорядовый поток и впоследствии инкапсулируются внутри капель в соединении каналов. Капли, инкапсулирующие клетки, самоцентрируются по направлению к центру канала благодаря неинерциальной подъемной силе и перемещаются в окно обнаружения в виде одного ряда, таким образом, решая задачи, указанные выше. После обнаружения клеток-мишеней, инкапсулированных в капли, используется электрокоалесценция для выделения этих клеток либо в виде единичных клеток внутри капель, либо в виде водной фазы для последующего анализа.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к системам сортировки клеток с использованием достижений в области микрожидкостной технологии. Наиболее конкретно изобретение относится к быстрому извлечению клеток-мишеней из капель без какого-либо повреждения клеток.

Обнаруженные капли, инкапсулирующие клетки-мишени, коалесцируют для извлечения этих клеток либо в виде одиночных клеток внутри капель, либо в водную фазу

для последующего анализа. При этом водные капли, содержащие клетки, находятся в постоянном контакте с границей раздела между непрерывной фазой и сопутствующей водной фазой перед тем, как войти в область электрического поля, поэтому требуется значительно более низкое напряжение и электрическое поле. Этот подход обеспечивает быстрое извлечение микрочастиц клеток-мишеней из капель в сопутствующий поток водной фазы или в формате одиночных клеток без нанесения каких-либо повреждений клеткам.

В одном воплощении настоящего изобретения разработан MicroFACS для выделения клеток-мишеней, в котором MicroFACS имеет три разных модуля, которые могут использоваться независимо для различных применений и вместе для анализа и сортировки биологических клеток и микрочастиц. Три различных модуля: (i) модуль фокусировки и инкапсуляции, (ii) модуль оптического обнаружения и (iii) модуль электрокоалесценции.

В другом воплощении настоящее изобретение предоставляет метод, в котором клетки фокусируются в однорядовый поток и впоследствии инкапсулируются внутри капель в соединении каналов. Инкапсулированные капли самоцентрируются по направлению к центру канала благодаря неинерционной подъемной силе и перемещаются в окно обнаружения в виде однорядового потока.

В еще одном воплощении настоящего изобретения показано, что инкапсулированные капли перемещаются к модулям обнаружения, где клетки-мишени обнаруживаются с использованием сигналов флуоресценции и сигналов рассеяния, полученных от меченых и немеченых клеток, соответственно. Обнаруженные капли движутся в направлении модуля электрокоалесценции. Электрокоалесценция используется для сортировки клеток-мишеней. Этот модуль состоит из микроканала с двумя входами, один для ввода несмешиваемой непрерывной фазы (масла), содержащей капли (содержащих клетки или микрочастицы), а другой - для ввода попутного водного потока, и одной или нескольких пар электродов, соединенных с источником переменного (АС) тока. Электрическое напряжение требуется для объединения капли в поток жидкости. При этом капли, протекающие в несмешиваемой непрерывной фазе (масле), вступают в контакт с поверхностью раздела вследствие расположения водного потока. Требуемое напряжение составляет 25 В или соответствующее электрическое поле (10^5 В/м), по меньшей мере, на два порядка меньше по сравнению с существующими способами.

В другом воплощении настоящее изобретение относится к способу непрерывной или проводимой по мере необходимости коалесценции водных капель, содержащих

клетки-мишени или микрочастицы, с водной фазой для выделения клеток и микрочастиц из дискретных капель и дальнейшей обработки таких клеток или микрочастиц ниже по потоку. Непрерывная коалесценция капель, содержащих клетки или микрочастицы, или капль (без каких-либо клеток или микрочастиц), может быть достигнута с помощью непрерывного электрического поля. Однако электрокоалесценция, проводимая по мере необходимости, требует активации электродов только тогда, когда в модуле оптического обнаружения обнаруживается клетка-мишень, микрочастица или капля.

В еще одном воплощении настоящее изобретение обеспечивает способ MicroFACS путем интеграции модулей оптического обнаружения и электрокоалесценции. Клетки-мишени или микрочастицы детектируются оптически, сортировка этих клеток-мишеней или микрочастиц в совместно протекающем потоке водной фазы достигается путем запуска электродов в модуле электрокоалесценции. Этот способ используется для проводимой по мере необходимости коалесценции капель, содержащих целевую жидкость, или капль определенного размера.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - (а) схема модуля фокусировки и инкапсуляции; (b) экспериментальные изображения, показывающие фокусировку клеток; (с) экспериментальные изображения, показывающие инкапсуляцию микрочастиц и клеток в каплях.

Фиг. 2 - (а) схема модуля оптического обнаружения; (b) экспериментальные результаты, показывающие обнаружение клеток на основе данных FSC, SSC и флуоресценции, также изображение капли, инкапсулирующей клетку, которая проходит через оптическое окно.

Фиг. 3 - (а) схема модуля электрокоалесценции; (b) экспериментальные результаты, показывающие электрокоалесценцию капли, инкапсулирующей клетку, перед коалесценцией клетка инкапсулируется внутри капли, после коалесценции клетка в водном потоке, напряжение 25 В.

Фиг. 4 - водная капль, контактирующая с плоской водной поверхностью раздела с обеими молекулами поверхностно-активного вещества.

Фиг. 5 - капль в контакте с плоской поверхностью раздела.

Фиг. 6 - схематическое представление клеток-мишеней MicroFACS; (а) отсортированных по клеткам-мишеням в водной фазе; (b) в каплях в формате одиночных клеток.

Со ссылкой на чертежи дополнительно описаны воплощения настоящего изобретения. Чертежи не обязательно выполнены в масштабе, и в некоторых случаях чертежи были преувеличены или упрощены только для иллюстративных целей.

Специалист в данной области техники может оценить множество возможных применений и вариаций настоящего изобретения на основании следующих примеров возможных воплощений настоящего изобретения.

Подробное описание изобретения

В последующем подробном описании дается ссылка на прилагаемые чертежи, которые составляют его часть, и в котором конкретные воплощения, которые могут быть осуществлены, показаны для иллюстрации. Воплощения описаны достаточно подробно, чтобы дать возможность специалистам в данной области техники применять воплощения, и следует понимать, что логические, механические и другие изменения могут быть сделаны без отхода от объема воплощений. Поэтому нижеследующее подробное описание не следует рассматривать в ограничивающем смысле.

Предлагаемое изобретение относится к системам сортировки клеток с использованием достижений в области микрожидкостной технологии. Наиболее конкретно это относится к быстрому извлечению клеток-мишеней из капель без какого-либо повреждения клеток. В настоящем изобретении разработан MicroFACS для выделения клеток-мишеней, в котором MicroFACS имеет три различных модуля, которые могут использоваться независимо для различных применений и вместе для анализа и сортировки биологических клеток и микрочастиц. Три различных модуля: (i) модуль фокусировки и инкапсуляции, (ii) модуль оптического обнаружения и (iii) модуль электрокоалесценции.

Модуль фокусировки и инкапсуляции

Модуль гидродинамической фокусировки и инкапсуляции (фиг. 1) состоит из первого входа для введения жидкости образца (водной жидкости, содержащей клетки или микрочастицы), второго входа для введения жидкости оболочки (водной жидкости) для фокусировки клеток или микрочастиц в однорядовый поток и третьего входа для введения несмешивающейся фазы (биосовместимое масло с совместимым поверхностно-активным веществом) для образования стабильных капель при фокусировке потока, или Т-образного соединения. Гидродинамическая фокусировка обеспечивает требуемое расстояние между любыми двумя соседними клетками или микрочастицами путем регулирования соотношения скоростей потока оболочка-образец, чтобы предотвратить засорение соединения генератора капель и избежать инкапсуляции более чем одной клетки в одной капле. Отношение скоростей потока дискретной фазы (то есть образца + оболочки) и несмешивающейся непрерывной фазы (биосовместимого масла) регулируют, чтобы контролировать размер капель, равный порядку размера клеток или микрочастиц. Скорости потока образца, оболочки и непрерывной фазы регулируются таким образом,

чтобы скорость поступления клеток или микрочастиц в место соединения капель соответствовала скорости образования капель, в результате чего количество пустых капель (которые не содержат клеток или микрочастиц) снижается.

Модуль оптического обнаружения

Модуль оптического обнаружения состоит из жидкостного канала, ряда оптических канавок, размещенных под заданным углом с жидкостным каналом, лазерного источника, световодов, фильтра и высокоскоростных детекторов (фиг. 2). Микроканал содержит капли, инкапсулирующие клетки, и микрочастицы, текущие сфокусированным, выровненным образом. Капли, инкапсулирующие клетки, мигрируют к центру канала под действием жидкостных сил (включая неинерциальную подъемную силу) и самовыравниваются. Инкапсуляция клеток внутри капель и их самовыравнивание устраняют необходимость в сложных методах трехмерной фокусировки, которые часто ограничивают развитие MicroFACS. При исследовании клеток или микрочастиц, инкапсулированных внутри капель, для возбуждения используется лазер (или другой подходящий источник света). Световод связывает свет между источником лазера и областью обнаружения в устройстве. Размер пятна лазерного луча контролируется с помощью подходящих световодов различного размера для необходимой коллимации. Когда капли, инкапсулирующие клетки (или микрочастицы), пересекают лазерный луч, генерируются оптические сигналы, которые собираются приемными световодами и захватываются с помощью высокоскоростных детекторов (Single Photon Counting Module-SPCM, Photomultiplier tube-PMT). Если клетки или микрочастицы помечены или снабжены подходящими флуорофорами, сигнал флуоресценции регистрируется детекторами в качестве оптической сигнатуры инкапсулированных клеток или микрочастиц. В зависимости от клеток и флуорофора подходящий оптический фильтр соединяется с собирающей оптикой, чтобы максимизировать флуоресцентный сигнал. На основании сигнала флуоресценции обнаруживаются различные клетки или микрочастицы. Если клетки не помечены или не снабжены флуорофорами, принимаются рассеянные сигналы. Детектор получает сигналы прямого рассеяния инкапсулирующей капли, а также инкапсулированных клеток или микрочастиц. Сигнал прямого рассеяния капли вычитается из суммарного сигнала рассеяния, чтобы получить только сигнал рассеяния инкапсулированных клеток или микрочастиц. Сигнал прямого рассеяния предоставляет информацию о размере инкапсулированных клеток или микрочастиц. Сигнал бокового рассеяния, который представляет внутреннюю структуру клеток или микрочастиц, собирается и используется для различения клеток или микрочастиц для обнаружения. При использовании комбинации сигнатур флуоресценции, прямого рассеяния и бокового

рассеяния обнаруживаются клетки-мишени или микрочастицы.

Модуль обнаружения может использоваться для обнаружения целевых капель (без какой-либо клетки или микрочастицы), содержащих интересующую жидкость, на основании сигнатуры флуоресценции жидкости, содержащейся внутри капли.

Модуль электрокоалесценции

Модуль электрокоалесценции состоит из микроканала с двумя входами: один для введения несмешиваемой непрерывной фазы (масла), содержащей капли (содержащие клетки или микрочастицы), а другой для введения сопутствующего водного потока; и одной или нескольких пар электродов, подключенных к источнику переменного тока (фиг. 3).

Соотношение скорости потока сопутствующего водного потока регулируют так, чтобы капли, текущие в несмешиваемой непрерывной фазе (масло), вступали в контакт с поверхностью раздела. Если размер капель различается, расположение поверхности раздела регулируется таким образом, что соприкасается даже самая маленькая капля, а крупные капли автоматически контактируют с поверхностью.

В этом случае водная капля и поток водной фазы разделяются очень тонкой пленкой поверхностно-активного вещества для стабилизации капли (фиг. 4), и система подвергается воздействию электрического поля. В опубликованной литературе капли и поток жидкости одной и той же фазы (водной) разделяются второй фазой (масло без поверхностно-активного вещества), и когда система подвергается воздействию электрического поля, результирующие натяжения Максвелла имеют тенденцию деформировать каплю и поверхность раздела потока жидкости против конкурирующего межфазного натяжения. Как только деформированная поверхность капли и потока жидкости вступают в контакт друг с другом, происходит слияние. Однако в этом случае, поскольку капля стабилизируется поверхностно-активными веществами (в масляной фазе), электрическое давление необходимо для преодоления разрывающего давления, создаваемого из-за присутствия поверхностно-активных веществ для коалесценции, деформации капли или границы раздела не требуется. Электрическое напряжение, необходимое для объединения капли в поток жидкости, когда поверхность раздела капли и потока жидкости находится в контакте друг с другом, намного меньше, чем в случае, когда стабилизированная капля и поверхность раздела потока жидкости находятся на некотором расстоянии. Это потому что в более позднем случае электрическое напряжение сначала должно деформировать каплю и поверхность раздела потока жидкости, чтобы заставить каплю и поток жидкости контактировать друг с другом, а затем впоследствии преодолеть давление разрыва благодаря поверхностно-активному веществу. В нашем

случае, поскольку капли уже находятся в контакте с поверхностью раздела благодаря расположению водного потока, требуемое напряжение (25 В) или соответствующее электрическое поле (10^5 В/м) по меньшей мере на два порядка меньше по сравнению с существующими способами (тысячи вольт, 10^7 В/м) [B. Chokkalingam, Y. et al., Lab Chip, 2014].

Когда капля и плоская поверхность раздела, стабилизированные поверхностно-активным веществом, находятся в контакте друг с другом, как показано на фиг. 5, они не будут объединяться, поскольку молекулы поверхностно-активного вещества в двух каплях будут отталкивать друг друга. Чтобы объединить капли, сначала нужно преодолеть отталкивающее разъединяющее давление, создаваемое молекулами поверхностно-активного вещества.

Для достижения коалесценции электрическое поле должно деформировать каплю и плоскую поверхность раздела и установить контакт между поверхностями раздела. Как только контакт установлен, электрическое поле должно преодолеть отталкивающее разъединяющее давление, создаваемое молекулами поверхностно-активного вещества. Напряженность электрического поля, необходимая для деформации капель, очень высока по сравнению с напряженностью электрического поля, необходимой для преодоления разъединяющего давления. Таким образом, электрическое поле, необходимое для слияния капли, контактирующей с другой поверхностью раздела ($\sim 10^7$ В/м), на один-два порядка больше по сравнению с каплей, контактирующей с другой поверхностью раздела ($\sim 10^5$ В/м) [Liu, Z, et al., Lab on a Chip, 2014] [V. Chokkalingam Y, et al., Lab Chip, 2014]. Если капля находится в контакте с другой каплей или плоской поверхностью, ее можно легко коалесцировать, приложив меньшее электрическое поле ($\sim 10^5$ В/м). Проблемы повреждения клеток полностью предотвращаются при напряженности электрического поля менее 5×10^5 В/м [Gascoyne PR C et al., Cancers, 2014].

Предложенный в данном документе способ может быть использован для непрерывной или проводимой по мере необходимости коалесценции водных капель, содержащих клетки-мишени или микрочастицы, с водной фазой для выделения клеток и микрочастиц из дискретных капель и дальнейшей обработки таких клеток или микрочастиц ниже по потоку. Способ может быть использован для непрерывной или проводимой по мере необходимости коалесценции капель (без каких-либо клеток или частиц), присутствующих в несмешивающейся непрерывной масляной фазе с водной фазой для деэмульгирования или сортировки капель, что имеет значение в различных применениях. Непрерывная коалесценция капель, содержащих клетки или микрочастицы, или капель (без каких-либо клеток или микрочастиц), может быть достигнута с

использованием непрерывного электрического поля. Однако электрокоалесценция, проводимая по мере необходимости, требует активации электродов только тогда, когда в модуле оптического обнаружения обнаруживается клетка-мишень, микрочастица или капля.

Интеграция модулей оптического обнаружения и электрокоалесценции

Модули оптического обнаружения и электрокоалесценции интегрированы для обеспечения MicroFACS (фиг. 6). Как только клетки-мишени или микрочастицы обнаруживаются оптически, сортировка этих клеток-мишеней или микрочастиц в совместно протекающий поток водной фазы достигается путем запуска электродов в модуле электрокоалесценции (фиг. 6а). Блоки оптического обнаружения и электрокоалесценции синхронизируются с использованием микроконтроллера для управления включением или выключением электродов в области электрокоалесценции. Как только оптический детектор обнаруживает клетку-мишень или микрочастицу, сигнал подается в микроконтроллер, который обрабатывает сигнал и запускает электрод. Поскольку скорость капель в микроканале известна, временной интервал между захватом оптического сигнала и запуском электродов регулируется для точной коалесценции капель, которые содержат клетки-мишени или микрочастицы. Предложенный в данном документе способ может быть использован для проводимой по мере необходимости коалесценции капель, содержащих целевую жидкость, или капли определенного размера. Как только такие капли обнаружены в модуле оптического обнаружения, электроды могут быть активированы для электрокоалесценции этих целевых капель с сопутствующим потоком воды.

Точно так же для приложений, которые требуют анализа отдельных клеток, на выходе устройства могут быть получены клетки-мишени, инкапсулированные внутри капель в формате отдельных клеток (фиг. 6b). В этом случае клетки (кроме клеток-мишеней) могут непрерывно коалесцировать при непрерывном приложении электрического поля. Когда клетка-мишень обнаружена, модуль обнаружения отправляет сигнал в модуль электрокоалесценции для выключения поля, чтобы клетки-мишени не коалесцировали, а текли вниз по потоку инкапсулированные внутри капель и собирались на выходе в формате отдельных клеток.

Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что чертежи, примеры и подробное описание в данном документе должны рассматриваться в качестве иллюстрации, а не ограничительного характера.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Микрожидкостное устройство для анализа, сортировки и деэмульгирования биологических клеток и микрочастиц из сложной смеси, содержащее:

- a. модуль фокусировки и инкапсуляции,
- b. модуль оптического обнаружения,
- c. модуль электрокоалесценции,

где происходит быстрое извлечение клеток-мишеней или микрочастиц из капель в сопутствующий поток водной фазы или в виде отдельных клеток без повреждения клеток,

при этом модуль гидродинамической фокусировки и инкапсуляции содержит один вход для введения жидкости образца, второй вход для введения жидкости оболочки для фокусировки клеток или микрочастиц в однорядный поток и третий вход для введения несмешивающейся фазы, причем скорости потока образца, оболочки и непрерывной фазы регулируются в модуле инкапсуляции таким образом, чтобы скорость поступления клеток или микрочастиц в область пересечения с каплями соответствовала скорости образования капель, так чтобы количество пустых капель было уменьшено;

модуль оптического обнаружения содержит жидкостный канал, ряд оптических канавок, размещенных под заданным углом с жидкостным каналом, лазерный источник, световоды, фильтр и высокоскоростные детекторы, причем клетки-мишени или микрочастицы обнаруживаются с использованием комбинации сигнатур флуоресценции, прямого рассеяния и бокового рассеяния;

модуль электрокоалесценции содержит микроканал с двумя входами, в котором водные капли, содержащие клетки, находятся в постоянном контакте с границей раздела между указанной непрерывной фазой и сопутствующей водной фазой перед тем, как войти в область электрического поля, поэтому требуется очень низкое напряжение и электрическое поле.

2. Способ анализа, сортировки и деэмульгирования биологических клеток и микрочастиц из сложной смеси, включающий:

- a. обнаружение инкапсулированных в капли клеток-мишеней,
- b. извлечение инкапсулированных в капли клеток-мишеней либо в виде отдельных клеток внутри капель, либо в виде водной фазы для последующего анализа с использованием электрокоалесценции,

причем водные капли, содержащие клетки, находятся в постоянном контакте с границей раздела между непрерывной фазой и сопутствующей водной фазой до попадания в электрическое поле,

напряжение, требуемое для электрокоалесценции, является низким в диапазоне 20-

25 В;

при этом способ представляет собой проводимую по мере необходимости коалесценцию водных капель, содержащих клетки-мишени или микрочастицы, с водной фазой для экстракции клеток и микрочастиц из дискретных капель,

электроды активируют только тогда, когда в оптическом модуле обнаружения детектируют клетку-мишень, микрочастицу или каплю.

3. Способ по п. 2, в котором клетки, инкапсулированные в капли, самовыравниваются по направлению к центру канала благодаря неинерционной подъемной силе и перемещаются в модуль обнаружения однорядным образом.

4. Микрожидкостное устройство по п. 1, в котором сигнал прямого рассеяния в модуле оптического обнаружения предоставляет информацию, касающуюся размера инкапсулированных клеток или микрочастиц.

5. Микрожидкостное устройство по п. 1, в котором сигнал бокового рассеяния в модуле оптического обнаружения, представляющий внутреннюю структуру клеток или микрочастиц, собирают и используют для различения клеток или микрочастиц для обнаружения.

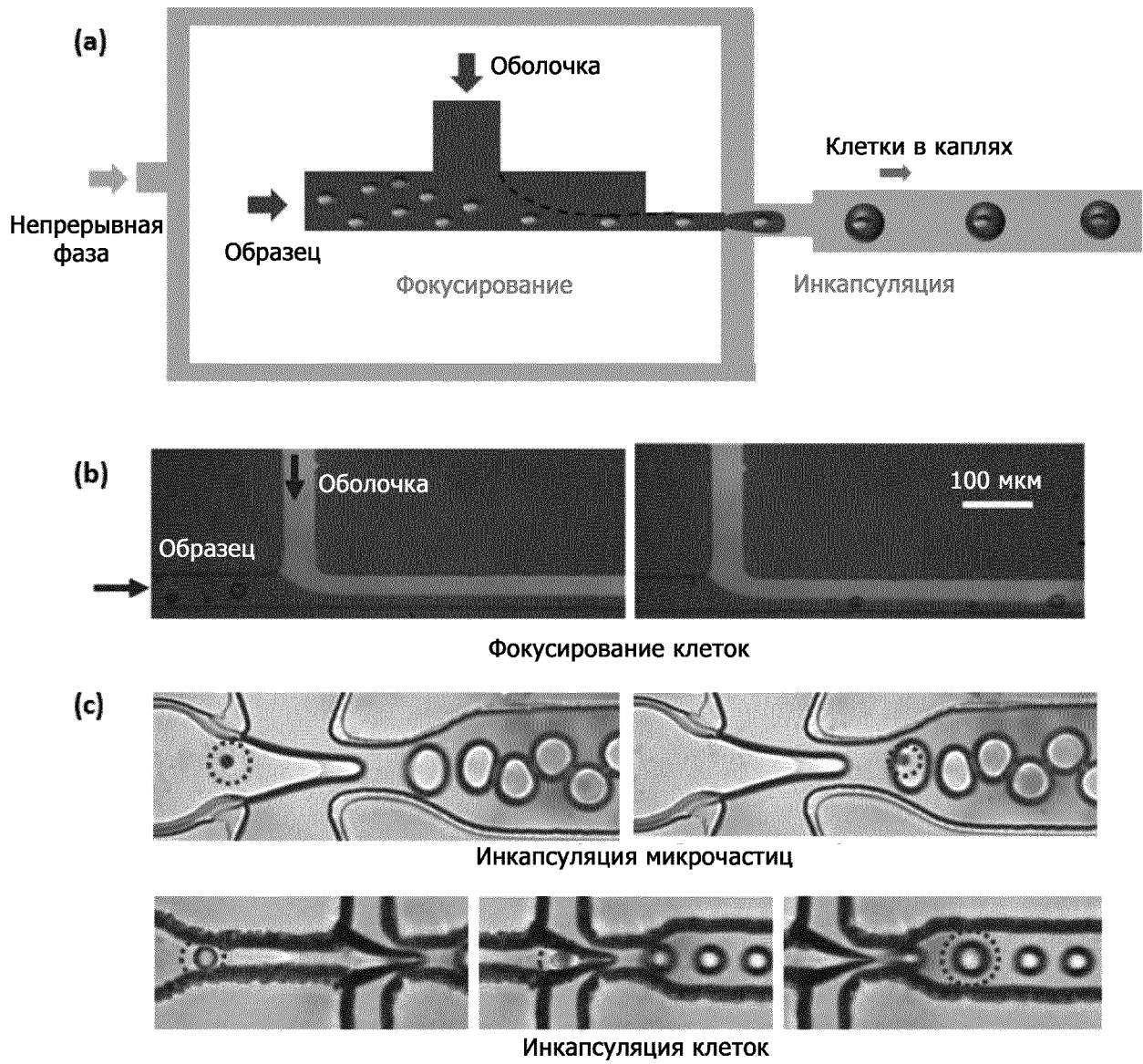
6. Микрожидкостное устройство по п. 1, в котором водную каплю и поток водной фазы разделяют очень тонкой пленкой поверхностно-активного вещества для стабилизации капли.

7. Способ по п. 2, в котором для коалесценции капсулированной капли и водного потока прикладывают очень низкое напряжение, предпочтительно 25 В.

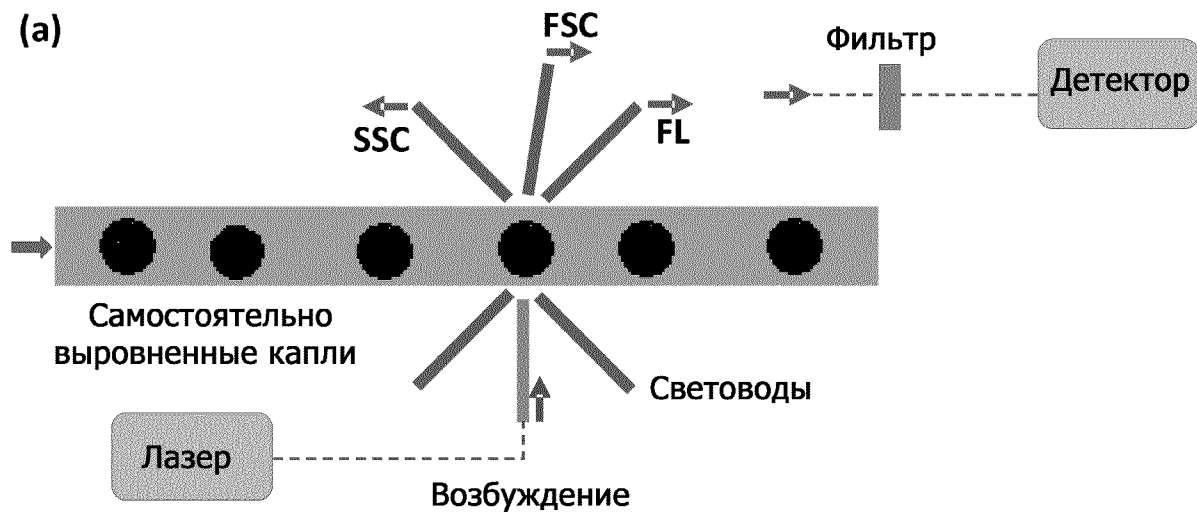
8. Способ по п. 2, в котором модуль оптического обнаружения интегрирован с модулем электрокоалесценции.

9. Способ по п. 2, в котором клетки-мишени или микрочастицы оптически обнаруживают и сортируют в совместный поток водной фазы путем запуска электродов в модуле электрокоалесценции.

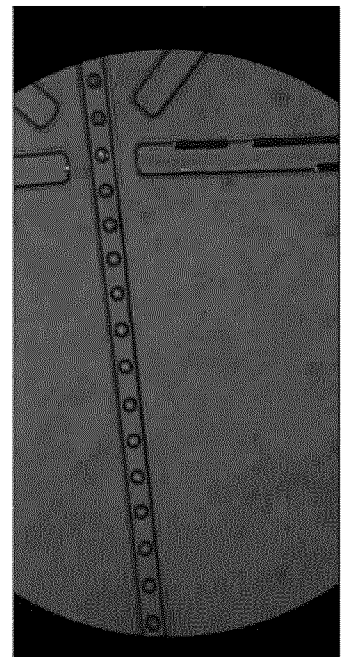
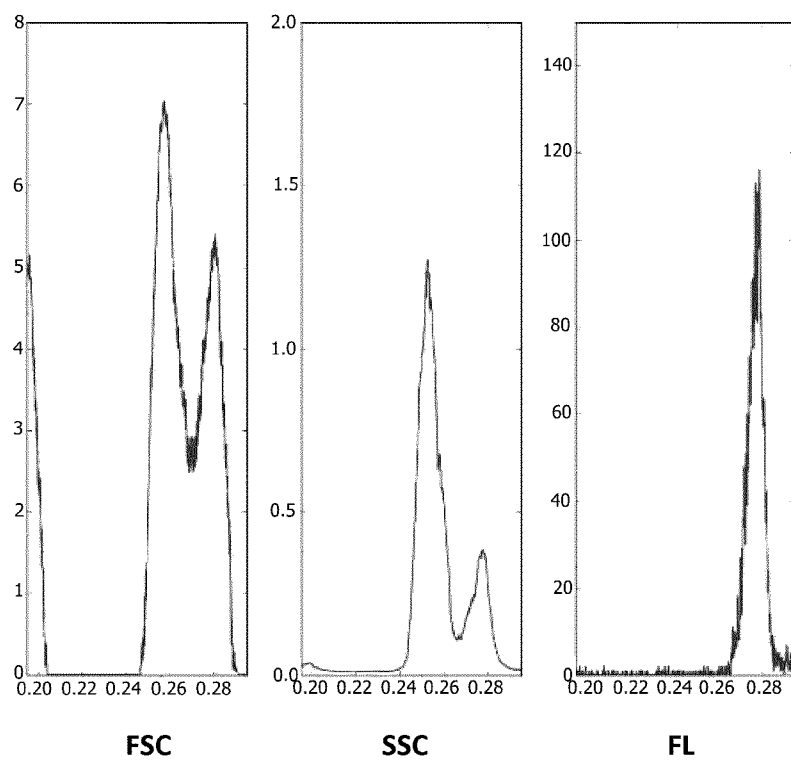
10. Способ по п. 2, который используют для выделения клеток-мишеней в одноклеточном формате без повреждения клеток.



Фиг. 1

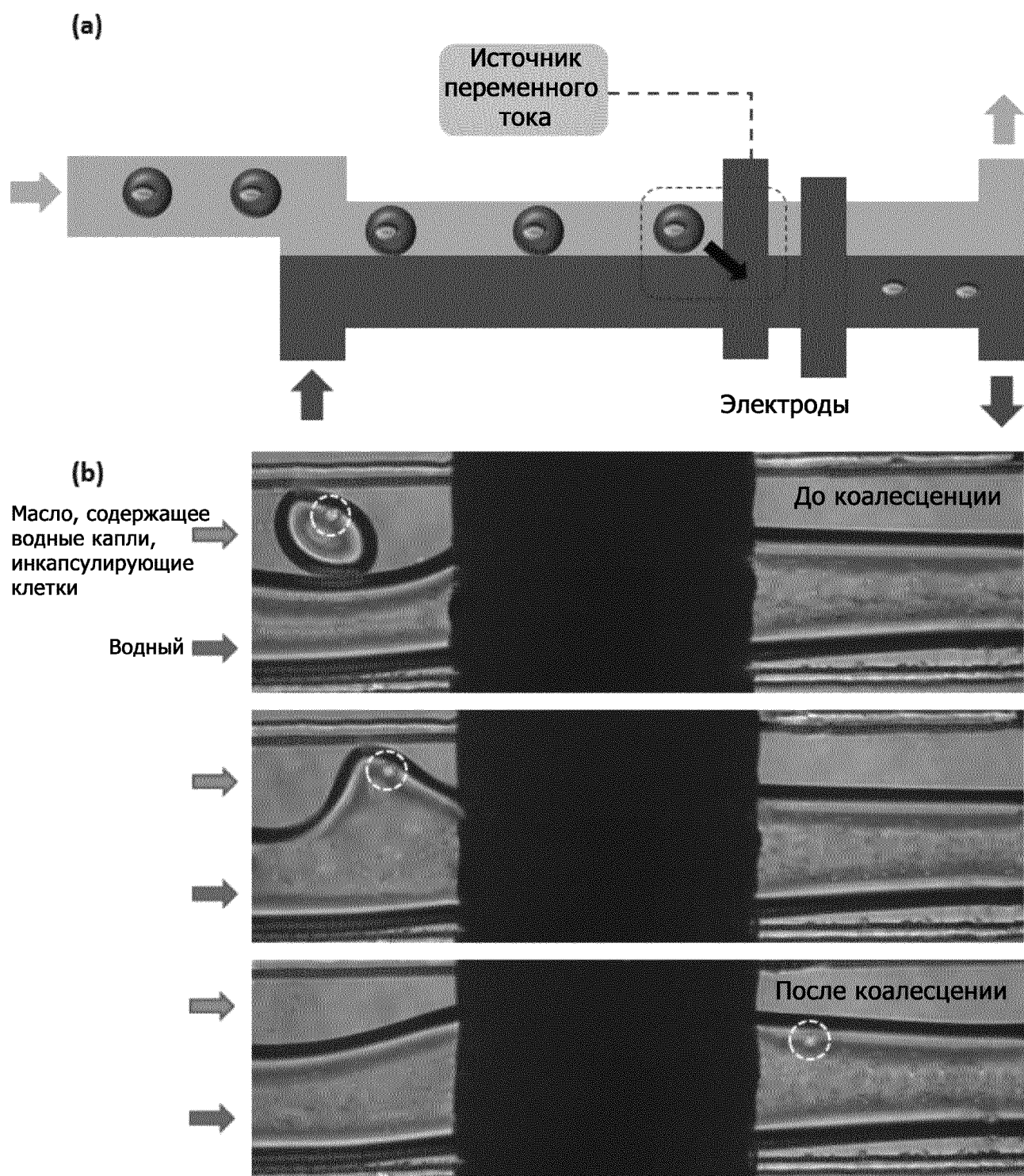


(b)

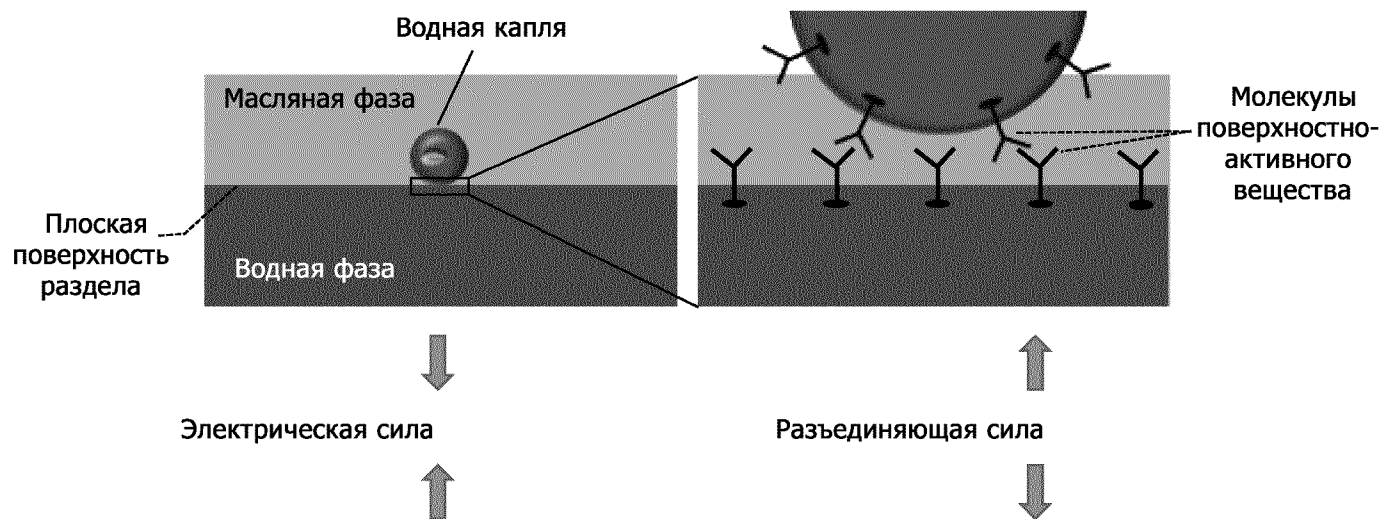


Клетка в капле

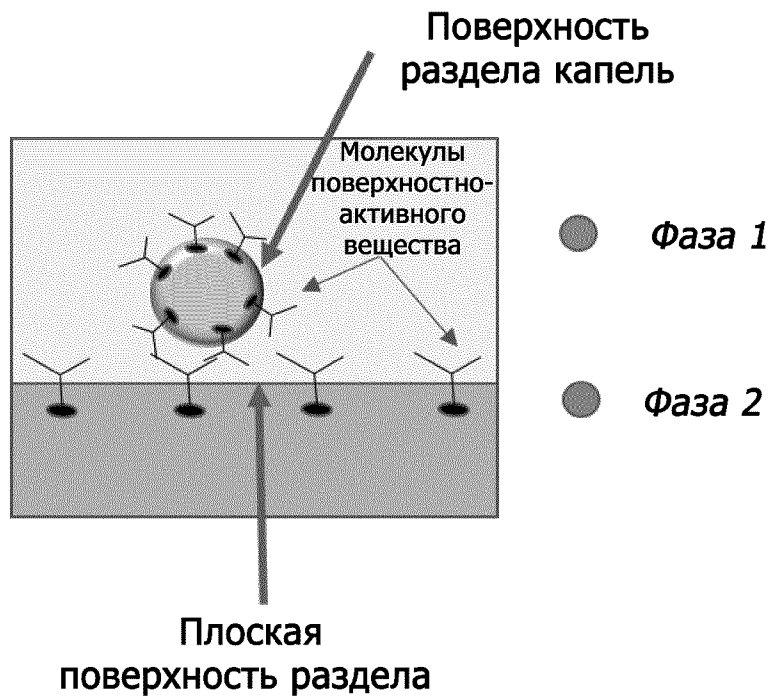
Фиг. 2



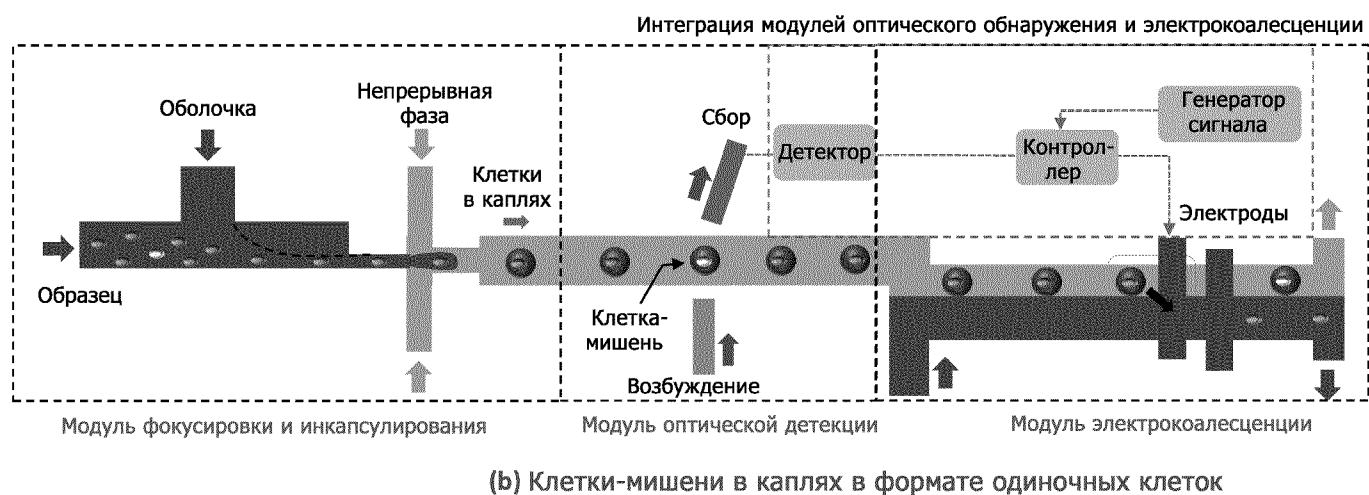
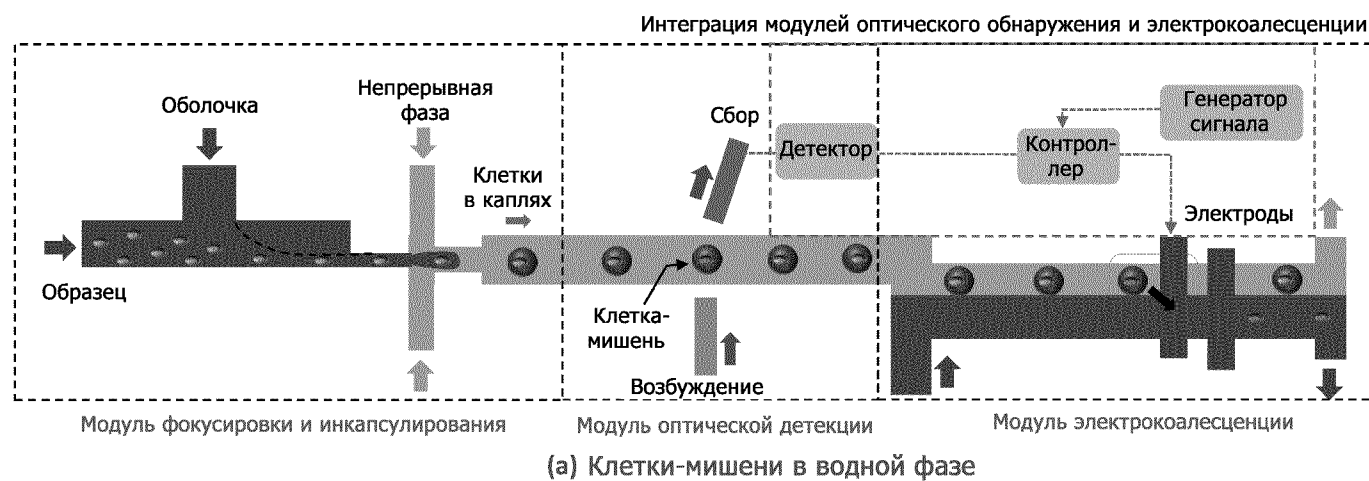
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6