



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102395881 A

(43) 申请公布日 2012.03.28

(21) 申请号 201080017272.2

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2010.02.12

代理人 李进 郭文洁

(30) 优先权数据

61/152585 2009.02.13 US

(51) Int. Cl.

G01N 33/487(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61M 27/00(2006.01)

2011.10.13

G01N 33/48(2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

A61B 10/02(2006.01)

PCT/US2010/024010 2010.02.12

(87) PCT申请的公布数据

W02010/093861 EN 2010.08.19

(71) 申请人 加州大学评议会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·米特拉戈特里 M·奥古拉

S·帕利瓦尔

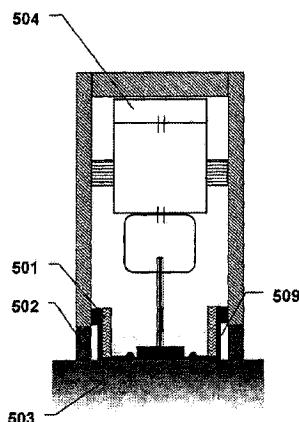
权利要求书 4 页 说明书 31 页 附图 27 页

(54) 发明名称

基于组织的诊断的系统、方法和装置

(57) 摘要

本发明提供装置、方法和系统，包括对关注的组织施加能量和 / 或液化促进介质，以产生包含组织成分的液化样品，从而提供快速组织取样、组织去污以及分析物的定性和 / 或定量检测，所述分析物可为组织成分（例如，数种生物分子、药物和微生物）的部分。另外，本发明提供所述液化促进介质的特定组合物，以促进液化、保存液化组织成分并能够将分子送入组织。测定液化组织样品中的组织组成可用于多种应用，包括诊断或预测局部以及全身疾病、评价药物给药后不同组织中治疗剂的生物利用率、法医学检测滥用药物、评价暴露于有害剂后组织微环境的变化和各种其它应用。所述方法、装置和系统用于将一种或多种药物送经或送入要液化的组织的部位。



1. 一种在组织上使用以得到液化样品的装置，所述装置包含：  
可操作地偶合到组织的能源，和  
可操作地偶合到所述组织的室，所述室能够将液化促进介质输送到所述组织和 / 或从所述组织收集所述液化样品。
2. 权利要求 1 的装置，其中该组织为活生物体的一部分。
3. 权利要求 1 的装置，其中该组织在诊断前从生物体切除。
4. 权利要求 1 的装置，其中该液化组织样品转移到用于监测存在或不存在至少一种分析物的试验。
5. 权利要求 1 的装置，其中该试验包括在取样装置中。
6. 权利要求 1 的装置，其中该室包含所述液化促进介质。
7. 权利要求 1 的装置，其中从所述能源发出的能量通过经过所述室的能量通道向所述组织施加。
8. 权利要求 1 的装置，其中该室为一次性筒。
9. 权利要求 1 的装置，其中该室为海绵 - 波纹管组合件，所述海绵能够储存所述液化促进介质和 / 或液化组织样品。
10. 权利要求 1 的装置，所述装置进一步包含连接到所述室的管 / 针，所述管 / 针能够将液化促进介质输送到组织和 / 或从组织吸出液化组织样品。
11. 权利要求 1 的装置，所述装置进一步包含可操作地连接到所述室的样品容器，所述样品容器能够储存液化促进介质和 / 或液化组织样品。
12. 权利要求 1 或 11 的装置，所述装置进一步包含泵抽部件，所述部件促进转移所述液化促进介质和 / 或液化组织样品。
13. 权利要求 1、11 或 12 的装置，所述装置进一步包含加压容器和 / 或真空容器，所述容器促进转移所述液化促进介质和 / 或液化组织样品。
14. 权利要求 1 的装置，其中从能源发出的能量为超声、机械、光、热或电能形式。
15. 权利要求 14 的装置，其中所述机械能通过磨料、真空、压力或剪切力向组织施加。
16. 权利要求 14 的装置，其中所述热能以射频能量形式向组织施加。
17. 权利要求 14 的装置，其中所述光能以激光形式向组织施加。
18. 权利要求 1 的装置，其中该能源包括连接到轴的垫。
19. 权利要求 18 的装置，其中该轴具有压力感应部件，所述压力感应部件在接触时保持对组织的预定压力分布。
20. 权利要求 18 的装置，其中该垫、轴或室为一次性。
21. 权利要求 18 的装置，其中所述垫选自磨料表面和包含许多微针的贴片。
22. 权利要求 21 的装置，其中该磨料表面为具有不均匀磨损性的盘。
23. 权利要求 21 的装置，其中该磨料表面具有非平面几何形状。
24. 权利要求 21、22 或 23 的装置，其中该磨料表面为磨料织物。
25. 权利要求 21、22 或 23 的装置，其中该磨料表面为包含许多刚毛的刷。
26. 权利要求 18 的装置，其中来自能源的能量通过垫与组织接触时将垫设置为运动而向组织施加。
27. 权利要求 21 的装置，其中来自能源的能量通过所述垫与组织接触时将微针设置为

运动而向组织施加。

28. 权利要求 1 的装置,所述装置进一步包含可操作地连接到室顶部的活塞。
29. 权利要求 1 的装置,其中该装置分成上部件和下部件,其中下部件可从所述上部件分离,其中上部件包含能源,下部件包含室。
30. 权利要求 1 的装置,所述装置进一步包含在室基部的可磨损片。
31. 权利要求 29 的装置,所述装置进一步包含在所述下部件基部的可磨损片。
32. 权利要求 1 或 11 的装置,所述装置进一步包含可操作地连接到所述室的分析部件。
33. 权利要求 32 的装置,其中该分析部件能够通过电化学、生物化学或光学方法进行组织样品的临时监测。
34. 权利要求 33 的装置,其中该临时监测通过电极或热电偶进行。
35. 权利要求 32 的装置,其中所述分析部件能够分析所述液化组织样品内的分析物。
36. 权利要求 35 的装置,其中所述分析通过电化学、生物化学或光学方法进行。
37. 权利要求 1 的装置,所述装置进一步包含连接到所述能源的电池组。
38. 权利要求 1 的装置,所述装置进一步包含另外的能源,所述另外的能源选自磨料致动器、机械电动机、电磁致动器、压电换能器、抽吸或压力装置。
39. 权利要求 1 的装置,其中该装置连接到诊断探测器或导管。
40. 权利要求 39 的装置,其中该诊断探测器选自内窥镜、结肠镜和腹腔镜。
41. 权利要求 1 的装置,由所述装置实现组织样品的原位液化。
42. 权利要求 1 的装置,其中该装置可向组织输送药物。
43. 权利要求 42 的装置,所述装置进一步包含用于使该装置起闭合回路药物输送作用的装置,其包括药物输送装置、分析物回收装置、用于测量分析物的传感装置和向药物输送装置提供信号的控制装置。
44. 权利要求 1 的装置,其中所述液化促进介质保持和提高蛋白、脂类和核酸的检测。
45. 权利要求 1 的装置,其中所述液化促进介质保持蛋白的生物活性免受机械和热损伤。
46. 权利要求 44 或 45 的装置,其中所述液化促进介质包含 :溶于缓冲溶液的 3-(癸基二甲基铵基)丙磺酸盐 (DPS) 和聚乙二醇十二烷基醚 (Brij 30)。
47. 权利要求 46 的介质,其中 3-(癸基二甲基铵基)丙磺酸盐和聚乙二醇十二烷基醚 (B30) 的浓度介于 0.01-10% (w/v)。
48. 权利要求 46 的介质,其中 3-(癸基二甲基铵基)丙磺酸盐和聚乙二醇十二烷基醚以 50 : 50 的比率存在。
49. 权利要求 46 的介质,其中该缓冲溶液包含磷酸盐缓冲盐水、Tris 缓冲盐水、Tris-HCl 或 EDTA。
50. 权利要求 49 的介质,其中该 Tris-HCl 在 0.1-100mM 的范围内。
51. 权利要求 50 的介质,其中该 Tris-HCl 为 10mM。
52. 权利要求 49 的介质,其中该 EDTA 在 0.05-5mM 的范围内。
53. 权利要求 52 的介质,其中该 EDTA 为 0.5mM。
54. 权利要求 1 的装置,其中所述液化促进介质包含磨料颗粒。
55. 权利要求 1 的装置,其中所述液化促进介质包含 :

非离子表面活性剂,其选自 Brij 系列表面活性剂、Triton-X 表面活性剂或脱水山梨糖醇表面活性剂;

阴离子或两性离子表面活性剂;

和亲水溶剂,

其中该介质具有约 0.01% -10% (w/v) 的总表面活性剂浓度。

56. 权利要求 55 的介质,其中该阴离子表面活性剂为肌氨酸表面活性剂,该两性离子表面活性剂选自 3-(癸基二甲基铵基)丙磺酸盐和 3-(十二烷基二甲基铵基)丙磺酸盐。

57. 权利要求 55 的介质,其中该介质适合于和能量施加装置使用。

58. 权利要求 55 的介质,其中该介质适合于提高物质的稳定性。

59. 权利要求 58 的介质,其中该物质为小分子、蛋白、疫苗、核酸、RNA、DNA 或诊断或治疗关注的任何其它分子。

60. 权利要求 58 的介质,其中针对热、压力、酶促降解、机械损伤、自由基或损害物质活性的任何其它作用提高稳定性。

61. 权利要求 55 的介质,其中该总表面活性剂浓度为 0.1% -2% (w/v)。

62. 权利要求 55 的介质,其中该非离子表面活性剂为聚乙二醇十二烷基醚 (Brij 30),该阴离子表面活性剂为 N-月桂酰基肌氨酸 (NLS)。

63. 权利要求 55 的介质,其中该非离子表面活性剂为聚乙二醇十二烷基醚 (Brij 30),该两性离子表面活性剂为 3-(癸基二甲基铵基)丙磺酸盐 (DPS)。

64. 权利要求 55 的介质,其中该非离子表面活性剂为聚乙二醇十二烷基醚 (Brij 30),该两性离子表面活性剂为 3-(十二烷基二甲基铵基)丙磺酸盐 (DDPS)。

65. 权利要求 63 和 64 的介质,其中该非离子表面活性剂与其它表面活性剂以 50 : 50 的比率存在。

66. 权利要求 55 的介质,所述介质包含溶解的组织成分。

67. 权利要求 55 的介质,所述介质包含脂肪酸、氮酮样分子、螯合剂或无机化合物。

68. 权利要求 11 的装置,其中该样品容器为可分离的筒。

69. 权利要求 11 的装置,其中该样品容器包含与所述液化组织样品混合以使液化组织样品的成分稳定的物质。

70. 权利要求 69 的装置,其中所述物质包含:蛋白稳定剂如蛋白酶抑制剂;核酸稳定剂如 EDTA、苯酚、非特异性蛋白酶、RNA 酶抑制剂和 DNA 酶抑制剂;消泡剂;表面活性剂如 Triton X-100、十二烷基硫酸钠、DMSO;和 / 或磨料颗粒如二氧化硅或氧化铝。

71. 权利要求 11 的装置,其中该样品容器包含调节对所述液化组织样品的成分进行的分析试验的灵敏性或特异性的物质。

72. 权利要求 71 的装置,其中所述物质包含:含水缓冲剂如磷酸盐缓冲盐水、tris-HCl、tris 缓冲盐水;蛋白稳定剂如蛋白酶抑制剂;核酸稳定剂如 EDTA、非特异性蛋白酶、RNA 酶抑制剂、DNA 酶抑制剂;阻断试剂如 Tween 20、Triton X-100、牛血清白蛋白、无脂奶粉、酪蛋白、酪蛋白酸盐、鱼胶;和 / 或表面活性剂如 Triton X-100、十二烷基硫酸钠和 DMSO。

73. 权利要求 1、11 或 18 的装置,其中所述室、所述样品容器或所述垫用捕获所述液化组织样品的成分的物质涂覆。

74. 权利要求 1 的装置,其中将该装置放在组织上以去除物质。

75. 权利要求 1 的装置,其中将该装置放在组织上以通过去除物质使组织去污。

76. 权利要求 74 和 75 的装置,其中该物质包括危险化学物质、生物毒素、杀虫剂、环境污染物、细菌成分、化妆剂或需要从生物体去除的任何其它物质。

77. 一种利用权利要求 1 的装置产生来自受试者的液化组织样品的方法,所述方法包含:

将装置放在组织上

激活能源;并且

收集所述液化组织样品。

78. 权利要求 77 的方法,所述方法进一步包含:

分析所述液化组织样品中存在或不存在至少一种分析物,

其中所述分析促进诊断关注的病况。

79. 权利要求 78 的方法,其中所述分析包含:

从所述液化组织样品产生分析物分布;并且

将所述分析物分布与参比分析物分布比较,

其中所述比较促进诊断关注的病况。

80. 一种通过加入介质提高物质的稳定性的方法,所述介质包含

非离子表面活性剂,其选自 Brij 系列表面活性剂、Triton-X 表面活性剂或脱水山梨糖醇表面活性剂;

阴离子或两性离子表面活性剂;和

亲水溶剂,

其中该介质具有约 0.01% -10% (w/v) 的总表面活性剂浓度。

## 基于组织的诊断的系统、方法和装置

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 2 月 13 日提交的美国临时专利申请 No. 61/152585 的优先权，所述申请通过引用整体并入。

[0003] 发明背景

[0004] 人组织的生物分子组成（以许多脂类、蛋白、核酸和其它各种各样的分子为代表），为局部病状（如癌症、过敏和湿疹）以及数种全身疾病（如心血管疾病、阿尔茨海默病和糖尿病）的敏感标志。另外，组织分子组成也保留关于身体暴露于外源化学和生物实体的重要信息。然而，此信息目前不用于诊断方法，因为缺乏从组织收集常规样品的患者友好和标准化方法。相反，临床诊断总是通过活组织检查的目视观察和组织病理分析进行，这些由于其定性性质受高度限制，导致增加的误诊和不合理应用。除了侵入性外，目前方法也不足以解释疾病的完全分子起源，并且不能在疾病之间作出区分。

[0005] 用物理和化学方法评价组织流体的现有方法主要集中在提取自由存在于间隙流体中的几种小分子量分子，如钙和葡萄糖。用胶带采用带剥离物理收获位于表面的组织成分已经报告；然而，已显示此技术受无效、缺乏标准化规程和组织取样的高不均匀性限制。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明描述系统、方法和装置以及可用于这些系统、方法和装置的组合物，包括对关注的组织施加能量，以产生包含组织成分的液化样品，从而提供快速组织取样以及分析物的定性和 / 或定量检测，所述分析物可为组织成分（例如，数种生物分子、药物和微生物）的部分。测定组织组成可用于多种应用，包括诊断或预测（prognosis）疾病、评价药物给药后不同组织中治疗剂的生物利用率、法医学检测滥用药物、评价暴露于有害剂后组织微环境的变化、组织去污和各种其它应用。

[0008] 本发明提供产生来自受试者（活的或患病的）的液化组织样品的方法和装置。该装置和方法包括对受试者的关注的组织施加能量和液化促进介质，该施加产生液化组织样品，并收集液化组织样品。在一些实施方案中，对液化组织样品中存在或不存在至少一种分析物进行分析，其中该分析促进诊断关注的病况。在某些实施方案中，该分析包括从液化组织样品产生分析物分布（profile），并将此分析物分布与参比分析物分布比较，其中该比较促进诊断关注的病况。

[0009] 在一些实施方案中，所述组织液化的目的是去除不需要的物质或使组织从不需要的物质去污。此不需要的物质的非限制性实例包括化学物质、环境污染物、生物毒素和通常认为对身体有毒或危险的物质。在某些实施方案中，通过在关注的组织上连续移动组织液化装置直至达到以优选水平去除不需要的物质，而进行所述去污方法。

[0010] 在一些实施方案中，液化促进剂包含以下一种或多种：氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、3-{[三（羟基甲基）甲基]氨基}丙磺酸、N, N- 双（2- 羟基乙基）甘氨酸、三（羟基甲基）甲基胺、N- 三（羟基甲基）甲基甘氨酸、4-2- 羟基乙基 -1- 哌嗪乙磺酸、2-{[三（羟基甲基）甲基]氨基}乙磺酸、3-(N- 吡啶代)丙磺酸、哌嗪-N,N' - 双(2- 乙磺酸)、二甲基次胂酸、盐水柠檬酸钠、2-(N- 吡啶代)乙磺酸。在某些实施方案中，液化促进

剂包含以下一种或多种：蛋白酶抑制剂、RNA 酶抑制剂或 DNA 酶抑制剂。在某些实施方案中，液化促进剂包含以下至少一种：自由基清除剂、消泡剂和蛋白稳定剂。在某些实施方案中，液化促进剂包含以下至少一种：Brij-30、3-(癸基二甲基铵基)丙磺酸盐 (DPS)、3-(十二烷基二甲基铵基)丙磺酸盐 (DDPS)、N-月桂酰基肌氨酸 (NLS)、Triton X-100、十二烷基硫酸钠、DMSO、脂肪酸、氮酮、EDTA 或氢氧化钠。在某些实施方案中，液化促进剂包含磨料颗粒的悬浮体。在某些实施方案中，磨料颗粒包含二氧化硅或氧化铝。

[0011] 在一些实施方案中，能量以超声、机械、光、热或电能形式施加。在某些实施方案中，机械能通过磨料施加。在某些实施方案中，热能以射频能量形式施加。在某些实施方案中，光能以激光形式施加。

[0012] 在一些实施方案中，分别对受试者的关注的健康组织和受试者的关注的疑似患病组织产生液化组织样品，并且分析包括将来自健康组织样品的分析结果与来自疑似患病组织样品的分析结果进行比较，其中该比较促进诊断关注的病况。在一些实施方案中，对多个组织部位产生液化组织样品，并且该分析包括比较来自该多个组织部位的分析结果，其中所述比较促进诊断关注的病况。在一些实施方案中，从多个组织部位收集液化组织样品，并且将样品组合，以作出诊断。

[0013] 在一些实施方案中，通过吸出 (aspiration) 而收集液化组织样品。在某些实施方案中，通过使液化剂保留在放置成与组织接触的壳中进行该收集。在某些实施方案中，通过使液化组织样品机械化转移到位于装置的壳中进行该收集。

[0014] 在一些实施方案中，使液化组织样品与帮助进一步液化和稳定关注的分析物的物质混合，用于储存或运输。在某些实施方案中，将来自样品容器的经转移的组织样品与在容器中预储存的物质混合。实例包括蛋白稳定剂，如蛋白酶抑制剂；核酸稳定剂，如 EDTA、苯酚、非特异性蛋白酶、RNA 酶抑制剂和 DNA 酶抑制剂；消泡剂；和表面活性剂，如 Triton X-100、十二烷基硫酸钠和 DMSO；及磨料颗粒，包括二氧化硅或氧化铝。

[0015] 在某些实施方案中，装置在液化过程之前、期间或之后评价关注的组织。在某些实施方案中，该评价通过电化学、生物化学或光学方法进行。在一些实施方案中，该评价包括测量组织的电导率。在一个示例性实施方案中，通过跨过关注的组织施加 AC 电信号的方法测量电导率。所述电信号具有 0.1mV 和 10V 之间的电压和 1Hz 和 100kHz 之间的频率。

[0016] 在一些实施方案中，装置包括在分析关注的分析物之前检测液化组织样品中的某些组织成分，如疾病制造者。在某些实施方案中，该检测通过电化学、生物化学或光学方法进行。在一些实施方案中，电化学检测装置为离子选择性电极。在一些实施方案中，光学检测装置测量液体溶液的吸收或散射系数。

[0017] 在一些实施方案中，能量以超声形式用 0.1 和 50 之间的机械指数施加到组织。在某些实施方案中，通过使组织与移动磨料表面接触而施加能量。在某些实施方案中，通过使组织与包含许多刚毛的移动刷装置接触而向组织施加能量。在某些实施方案中，通过将具有许多微针的贴片机械插入组织，并进一步通过微针将液化介质注入组织，而向组织施加能量。在一些实施方案中，通过在其插入组织后移动所述微针贴片而施加另外的能量。在某些实施方案中，通过机械搅拌液化剂而向组织施加能量。在某些实施方案中，通过使组织与包含液化促进介质的高速射流接触而向组织施加能量，在不同的实施方案中，该射流也可含有磨料颗粒。

[0018] 在一些实施方案中，组织包括乳房、前列腺、眼、阴道、膀胱、指甲、头发、结肠、睾丸或肠。在某些实施方案中，组织包括皮肤或粘膜。在某些实施方案中，组织包括肺、脑、胰、肝、心、骨或主动脉壁。

[0019] 在一些实施方案中，分析物包括小分子、药物或其代谢物、多肽、脂类、核酸或微生物。在某些实施方案中，分析物包括抗体、细胞因子、违禁品或癌生物标志。

[0020] 在一些实施方案中，将液化组织样品保存在容器中，并通过将液体容器与一个或多个分析装置整合而产生分析物分布。在某些实施方案中，组织液化装置包含用于测量校准器分析物浓度的装置，以提供用于校准分析物的分析的装置。

[0021] 在一些实施方案中，装置包括诊断受试者中的过敏疾病，并且装置包括用于分析液化组织样品存在或不存在 IgE 和 IgG 抗体、细胞因子（如 IL4、IL5、IL10、IL-12、IL13、IL-16、GM-CSF、RANTES、MCP-4、CTACK/CCL27、IFN- $\gamma$ 、TNFa、CD23、CD-40、Eotaxin-2 和 TARC）的装置，其中该分析促进诊断受试者的过敏疾病。

[0022] 在一些实施方案中，装置包括诊断受试者的癌症，并且装置包括用于分析液化组织样品存在或不存在一种或多种癌症标志的装置，其中该分析促进诊断受试者的癌症。在某些实施方案中，关注的组织为乳房、结肠、前列腺、皮肤、睾丸、肠或口。

[0023] 在一些实施方案中，装置包括诊断受试者的心脏病，并且装置包括用于分析液化组织样品存在或不存在胆固醇、甘油三酯、脂蛋白、游离脂肪酸和神经酰胺中的一种或多种的装置，其中该分析促进诊断受试者的心脏病。

[0024] 在一些实施方案中，装置包括检测受试者的违禁药物或其代谢物的存在，并且装置包括用于分析液化组织样品存在或不存在违禁药物或其代谢物的装置，其中该分析提供受试者的违禁药物的检测。

[0025] 在一些实施方案中，装置包括检测受试者的微生物，并且装置包括用于向受试者的关注的组织施加能量和液化介质，并分析液化介质存在或不存在微生物的装置，其中该分析提供存在或不存在微生物的检测。

[0026] 本发明的另一个目的是提供液化受试者的组织用于促进药物通过或进入组织的方法和装置。上面公开的方法和装置不仅适用于收集组织成分，而且适用于药物输送。该装置和方法包括对受试者的关注的组织施加能量和液化介质，并将药物送经或送入要液化的组织的部位。使用本发明的优点是 1) 提供较高通量的药物进入组织，和 2) 允许进入组织的通量的较大控制。在应用此方法时，迫使简单不通过组织（如，皮肤）的药物通过组织。

[0027] 在一些实施方案中，本发明提供将一种或多种药物送经要液化的组织进入循环系统的方法，这防止要由口服或通过注射常规给药的药物所遭受的胃肠道降解和肝快速代谢。在某些实施方案中，本发明提供将一种或多种药物局部输送到关注的组织，从而限制对健康组织的副作用的方法和装置。该方法和装置也可适用于提供到细胞膜的运输。

[0028] 特别地，本发明的装置由以下主要组件组成：1) 能量发生器；2) 液化促进介质；3) 保存要输送的药物和 / 或收集液化组织样品的储存器。

[0029] 在组织液化过程之前或期间，可将要给药的药物加入液化介质。在供选的实施方案中，可将能量的施加与不含药物的液化介质组合用于液化组织，随后，在适合载体（如贴片）中的药物可用于要液化的组织的部位上。

[0030] 通过同时或随后施加第二驱动力（如化学渗透性或运输增强剂、对流、渗透压梯

度、浓度梯度、离子电渗、电穿孔、磁场、超声或机械压力)，可进一步提高药物运输进入组织。在液化期间，驱动力可经一段时间连续施加或以间隔施加。

[0031] 在一些实施方案中，要给药的组织包括器官以及生物表面。在某些实施方案中，生物表面包括生物膜和细胞膜。在某些实施方案中，生物膜包括皮肤或粘膜。在某些实施方案中，生物膜包括口腔膜、眼、阴道、结肠或肠。在一些实施方案中，组织包括患病组织。

[0032] 在一个实施方案中，提供了可用在组织上以得到液化样品的装置，所述装置包括可操作地偶合到组织的能源，和可操作地偶合到所述组织的室，所述室能够将液化促进介质输送到所述组织和 / 或从所述组织收集所述液化样品。

[0033] 在另一个实施方案中，装置可用在组织上，所述组织为活生物体的部分，并且组织可在诊断前从生物体切除。

[0034] 在另一个实施方案中，权利要求 1 的装置，其中液化组织样品转移到用于监测存在或不存在至少一种分析物的试验。

[0035] 在另一个实施方案中，装置的室可以为海绵 - 波纹管组合件，其中海绵能够储存所述液化促进介质和 / 或液化组织样品。

[0036] 在另一个实施方案中，提供的装置包括可操作地偶合到组织的能源，和可操作地偶合到所述组织的室，所述室能够将液化促进介质输送到所述组织和 / 或从所述组织收集所述液化样品；装置还包括连接到所述室的管 / 针，所述管 / 针能够将液化促进介质输送到组织和 / 或从组织吸出液化组织样品。

[0037] 在另一个实施方案中，提供的装置包括可操作地偶合到组织的能源，和可操作地偶合到所述组织的室，所述室能够将液化促进介质输送到所述组织和 / 或从所述组织收集所述液化样品；装置还包括可操作地连接到所述室的样品容器，所述样品容器能够储存含分析物的吸出的液化组织样品，或者将所述吸出的液化组织样品转移到辅助室，其中辅助室只用于将液化促进介质输送到室。

[0038] 在另一个实施方案中，加压的容器和 / 或真空容器为装置的部分，此部分促进转移所述液化促进介质和 / 或液化组织样品。

[0039] 在一个实施方案中，从装置中能源发出的能量为超声、机械、光、热或电能形式。在一个特定实施方案中，机械能通过磨料、真空、压力或剪切力施加到组织。在另一个实施方案中，热能以射频能量形式施加到组织。在另一个实施方案中，光能以激光形式施加到组织。

[0040] 在另一个实施方案中，提供的装置包括可操作地偶合到组织的能源，和可操作地偶合到所述组织的室，所述室能够将液化促进介质输送到所述组织和 / 或从所述组织收集所述液化样品，所述装置还包括可操作地连接到所述室的样品容器，所述样品容器能够储存含分析物的吸出的液化组织样品，或者将所述吸出的液化组织样品转移到辅助室，其中辅助室只用于将液化促进介质输送到室。

[0041] 在另一个实施方案中，提供的装置包括可操作地偶合到组织的能源，和可操作地偶合到所述组织的室，所述室能够将液化促进介质输送到所述组织和 / 或从所述组织收集所述液化样品，其中能源包括连接到轴的垫。

[0042] 在更特定的实施方案中，轴具有压力感应部件，压力感应部件在接触时将预定压力分布保持到组织上。

- [0043] 在另一个实施方案中,垫选自磨料表面和包含许多微针的贴片。
- [0044] 在另一个实施方案中,装置进一步包括可操作地连接到室顶部的活塞。
- [0045] 在另一个实施方案中,将装置分成上部件和下部件,其中下部件可从所述上部件分离,其中所述上部件包括能源,下部件包括室。
- [0046] 在另一个实施方案中,装置进一步包括可操作地连接到室的分析部件,其中分析部件能够通过电化学、生物化学或光学方法进行组织样品的临时监测,或者分析部件能够分析所述液化组织样品内的分析物。
- [0047] 在另一个实施方案中,装置连接到诊断探测器或导管,其中诊断探测器选自内窥镜、结肠镜和腹腔镜。
- [0048] 在另一个实施方案中,使用装置的结果是组织样品的原位液化。
- [0049] 在另一个实施方案中,装置含有可保持和提高蛋白、脂类和核酸的检测的液化促进介质,液化促进介质包括:溶于缓冲溶液的3-(癸基二甲基铵基)丙磺酸盐(DPS)和聚乙二醇十二烷基醚(Brij 30);其中3-(癸基二甲基铵基)丙磺酸盐和聚乙二醇十二烷基醚(Brij 30)的浓度介于0.01-10% (w/v),并且其中3-(癸基二甲基铵基)丙磺酸盐和聚乙二醇十二烷基醚以50:50的比率存在。
- [0050] 在另一个实施方案中,装置内的液化促进介质在溶液中缓冲,所述溶液包括磷酸盐缓冲盐水、Tris缓冲盐水、Tris-HCl或EDTA。
- [0051] 在另一个实施方案中,装置内的液化促进介质包括非离子表面活性剂(其选自Brij系列表面活性剂、Triton-X表面活性剂和脱水山梨糖醇表面活性剂);阴离子或两性离子表面活性剂;和亲水溶剂,其中介质具有约0.01%-10% (w/v)的总表面活性剂浓度。
- [0052] 通过阅读以下更完全描述的基于组织的诊断的系统、方法和装置的细节,本发明的这些和其他特征对本领域的技术人员将变得显而易见。
- [0053] 附图简述
- [0054] 通过结合附图阅读以下详述,可最好地理解本发明。应强调的是,按照一般习惯,绘图的各种特征未按比例。相反,为了清楚,各种特征的尺寸任意扩大或缩小。附图中包括以下图片:
- [0055] 图1(图片a-g)为说明不同的基于磨料能量的组织液化装置的结构、组件和功能的横截面图的集合。图片a-c和图片e-g显示两种单独的液化装置的依次操作。图片d为具有磨料头的压敏电动轴的示意图。
- [0056] 图2(图片a-b)为用于大面积组织连续取样的可移动组织液化装置的横截面图的集合。
- [0057] 图3(图片a-c)为说明不同的基于线性磨料运动的组织液化装置的结构和组件的横截面图的集合。图片c为具有齿轮的压敏支轴的示意图。
- [0058] 图4(图片a-g)为说明数种磨料头的横截面图的集合。
- [0059] 图5(图片a-d)为用于测量组织的电导率的横截面装置图和示意图的集合。
- [0060] 图6(图片a-g)为说明不同的基于微针的组织液化装置的结构、组件和功能的横截面图的集合。
- [0061] 图7(图片a-e)为示例性的基于磨料能量的组织液化装置的横截面图的集合。图片a显示装置的不同装配组件。图片b-d显示装置的依次操作步骤,包括转移要放置成与

组织接触的液化介质（图片 b-c），通过液化产生样品（图片 c），和在容器中收集样品（图片 d）。图片 e 显示在液化后从装置收回取样容器。

[0062] 图 8(图片 a-d) 为说明示例性的基于微针的组织液化装置的依次操作步骤的横截面图的集合：转移要放置成与组织接触的液化介质（图片 a-b）；通过液化产生样品（图片 c）；和在容器中收集样品（图片 d）。

[0063] 图 9(图片 a-d) 为说明取样容器的图的集合。图片 a-d 显示运输和 / 或分析所产生的样品的依次操作步骤。图片 a 显示，选择性结合关注的分析物的基质涂覆在容器的内侧表面上。液化组织样品中的分析物由经涂覆的基质选择性捕获（图片 b）。在充分培育组织样品时，将样品弃去，同时将分析物保存在容器中（图片 c）。分析物由缓冲剂洗脱，用于随后分析（图片 d）。

[0064] 图 10(图片 a-c) 为说明用于鉴别 LPM 的独特表面活性剂制剂的筛选方法的图的集合。图片 a 对 150 种表面活性剂制剂按它们保持蛋白生物活性的能力分级。图片 b 对来自图片 a 的最佳制剂按它们的组织溶解潜力分级。图片 c 将来自整个筛选的最佳 LPM-0.5% (w/v) DPS-Brij30 与其它常规表面活性剂按它们从皮肤组织取样功能蛋白的潜力作比较。

[0065] 图 11(图片 a-b) 为说明在超声暴露的机械应力下不同蛋白 (IgE- 图片 a；IgE、LDH 和 β-gal- 图片 b) 的 LPM 辅助生物活性保持的图的集合。

[0066] 图 12(图片 a-c) 为说明在 LPM(0.5% (w/v) DPS-B30 的盐水溶液) 存在下超声暴露从皮肤组织取样多种功能性疾病生物标志 (IgE- 图片 a；胆固醇 - 图片 b；细菌 - 图片 c) 的能力的图的集合。

[0067] 图 13 为说明 LPM 中的缓冲剂对与定量 PCR 的相容性的作用的图形。

[0068] 图 14 为说明表面活性剂混合物对与定量 PCR 的相容性的影响的图形。

[0069] 图 15 为说明超声强度和暴露时间对 E. Coli 生活力的作用的图形。样品暴露于 1.7W/cm<sup>2</sup>(•) 和 2.4W/cm<sup>2</sup>(■) 强度的超声。各个点代表来自三个独立样品的平均值。

[0070] 图 16 为来自 tris-HCl 中在不同条件超声处理的 E. coli 细胞的基因组 DNA 的琼脂糖凝胶 - 电泳的照片。通道 1, 分子标准；通道 2, 未处理细胞；通道 3, 1.7W/cm<sup>2</sup>, 2 分钟；通道 4, 1.7W/cm<sup>2</sup>, 3 分钟；通道 5, 2.4W/cm<sup>2</sup>, 3min。

[0071] 图 17(图片 a 和 b) 为说明通过与 tris-HCl 偶合的超声、拭取 (swab) 和表面活性剂擦洗技术取样的通过 (a) 培养试验和 (b) 定量 PCR 测量的细菌数的图片。各个点代表来自五个独立样品的平均值。

[0072] 图 18 为说明在 LPM 中加入不同的灵敏性增强剂，用于增强其中模型分析物 - 人 IgE 抗体的检测的图片。在分析中使用的灵敏性增强剂为磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中 10% w/v BSA 和 0.5% w/v Tween 20 的混合物 (中空菱形)；和 tris 缓冲盐水中 10% w/v BSA 和 0.5% w/v Tween 20 的混合物 (闭合圆形)。在分析前，各个灵敏性增强剂用含模型分析物的 LPM 以 1 : 10 比率稀释。作为对照，使用含模型分析物的 LPM (中空方块) 和一般使用的分析溶剂 (实心方块)，所述分析溶剂包含 tris 缓冲盐水中 1% w/v BSA 和 0.05% w/v Tween 20 的混合物。LPM 由 PBS 中 NLS 和 Brij 30 的 1% w/v 混合物的溶液组成。误差条指示标准偏差。

[0073] 图 19(图片 a-b) 为说明施加超声 (a) 或用许多刚毛磨损 (b) 后跨过猪皮肤体外输送菊粉和体外输送阿昔洛韦进入猪皮肤的图形的集合。

[0074] 发明详述

[0075] 定义

[0076] 本文所用“能量”是指可施加到组织以完成本文公开的方法的目的（例如，液化组织）的任何适合的能量。示例性的能量类型包括机械能（例如，磨损、剪切、真空、压力、抽吸）、超声、光（例如，激光）、磁、热和电能。

[0077] 本文所用“分析物”是指存在于组织中或组织上并且可从关注的组织（例如，皮肤、粘膜等）提取并检测、分析和 / 或定量的任何生物分子（例如多肽、核酸、脂类等）、药物（例如，治疗药物、滥用药物等）、小分子（例如，天然保湿因子、尼古丁等，同时应了解，小分子也可以为药物）、战剂、环境污染物（例如，杀虫剂等）、微生物（例如，细菌、病毒、霉菌、酵母等）等。

[0078] 术语“液化”用于描述一种过程，通过此过程，组织和 / 或组织成分通过暴露于足够能量和任选的液化促进介质转化成充分可溶状态，并且可包括至少一部分关注的组织结构转化成液体形态。已经过液化的组织样品在本文中有时被称为“液化”样品。

[0079] 术语“液化促进介质”(LPM) 用于描述一种物质，所述物质促进一种或多种组织成分的溶解、促进至少一部分组织结构在暴露于能量时转化成液体、和 / 或促进一种或多种溶解的组织成分的生物活性的保持。

[0080] 术语“液化促进剂”(LPA) 用于描述液化促进介质的组分，特别为促进一种或多种组织成分的至少溶解和 / 或生物活性保持，和 / 或随后诊断试验的分析的剂。

[0081] 本文所用“校准分析物”是指以已知浓度天然存在于关注的组织的任何分子，所述分子可作为参比分析物（例如，作为正对照保证实现所需液化度）。

[0082] 本文所用术语“生物分子”是指具有生物起源或功能的任何分子或离子。生物分子的非限制性实例包括蛋白（例如，疾病生物标志，如癌症生物标志、抗体：IgE、IgG、IgA、IgD 或 IgM 等）、肽、脂类（例如，胆固醇、神经酰胺或脂肪酸）、核酸（RNA 和 DNA）、小分子（例如，葡萄糖、尿素、肌酸）、小分子药物或其代谢物、微生物、无机分子、元素或离子（例如，铁、Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 等）。在一些实施方案中，生物分子为葡萄糖以外的和 / 或为癌症标志以外的。

[0083] 术语“滥用的药物”或“滥用药物”或“违禁药物”在本文中可互换地用于指受政府管制（例如，受联邦或州管制）的任何物质，其在人组织中存在和 / 或在人组织中高于特定水平存在不合法或者可对人类有害。滥用药物的实例包括可卡因、海洛因、甲基苯丙胺和超剂量服用或无处方服用的处方药（例如，止痛药，如鸦片样物质 (opioid)）。

[0084] 本文所用术语“战剂”是指可用作武器的生物或化学起源的任何分子、化合物或组合物。战剂的实例包括神经性毒气（例如，VX、沙林）、光气、毒素、孢子（例如，炭疽）等。

[0085] 本文所用“环境污染物”包括例如在提高到高于风险阈值的浓度时可对个体有害的任何分子、化合物或组合物。实例包括水污染物（例如，肥料、杀虫剂、杀真菌剂、农药、除草剂、重金属、卤化物）、土壤污染物（例如，肥料、杀虫剂、杀真菌剂、农药、除草剂、重金属、卤化物）、空气污染物（例如，NO<sub>x</sub>、SO<sub>x</sub>、温室气体、持续性有机污染物 (POP)、颗粒物质、烟雾）。

[0086] 本文所用术语“去污”包括从组织去除可对个体有害的任何不需要或不期望的分子、化合物或组合物。实例包括环境污染物（如上限定）、毒性化学物质和生物毒素。

[0087] 本文所用术语“天然保湿因子”(NMF)是指数种小分子(包括但不限于游离氨基酸、乳酸盐和尿素,它们是抗角蛋白微丝聚集蛋白的衍生物)的任何一种。NMF可作为分析物用于促进评价一般皮肤健康(例如,干性皮肤、片状皮肤、正常皮肤等)。本文所用术语“机械指数”是指超声场中峰负压的振幅和超声频率平方根的比率(机械指数=(压力(MPa))/(频率(MHz))<sup>0.5</sup>)。

[0088] 本文所用术语“药物输送”是指将一种或多种药物输入血液、淋巴、间质液、细胞或组织。

[0089] 本文所用术语“灵敏性增强剂”是指与LPM混合以稳定液化组织分析物并且就提高诊断分析试验的灵敏性和特异性而言促进其分析的物质或物质混合物。

[0090] 术语“阻断试剂”用于描述用于防止分析物和诊断试验中使用的基质非特异性结合的组分。

[0091] 在描述本发明和本发明的特定示例性实施方案之前,应了解,本发明不限于所述的特定实施方案,因为这些当然可以变化。还应了解,本文所用术语只用于描述特定实施方案的目的,且不旨在限制,因为本发明的范围只受权利要求的限制。

[0092] 在提供数值范围时,应了解,除非上下文清楚地指明,也明确公开了该范围的上限和下限之间到下限单位的十分之一的各个中间值。在指定范围内的任何指定值或中间值和该指定范围内的任何其它指定或中间值之间的各个较小范围包括在本发明之内。这些较小范围的上限和下限可独立地在该范围内被包含或排除,并且较小范围包括任一、不包括或包括两个该限值的各个范围也包括在本发明之内(适用于(subject to)在指定范围内任何明确排除的限值)。在指定的范围包括一个或两个该限值时,排除一个或两个这些被包括的限值的范围也包括在本发明之内。

[0093] 除非另外定义,本文所用的所有技术和科学术语均具有本发明所属领域的普通技术人员一般了解的相同含义。尽管在本发明的实施或试验中可使用和本文所述的那些相似或相当的任何方法和材料,现在描述一些潜在和优选的方法和材料。本文提到的所有出版物通过引用并入本文,以公开和描述方法和/或材料,引用所述出版物和这些方法和/或材料有关。应了解,本公开在有抵触的范围内代替并入本文的出版物的任何公开内容。

[0094] 应注意到,本文和权利要求中所用的单数形式“一”和“该”包括复数个讨论对象,除非上下文另外清楚地规定。因此,例如引用“一个组织”包括复数个这样的组织,引用“该液体”包括引用一种或多种液体等。还应注意,权利要求可撰写成排除任何任选元素。因此,此说明旨在作为前置基础,用于使用和权利要求元素的复述有关的诸如“唯一”、“仅”等专有术语,或使用“负”限制。

[0095] 本文讨论的出版物只提供本申请提交日之前的公开内容。在本文中,不理解为承认本发明由于在先发明而无权在日期上先于这样的出版物。另外,提供的出版日期可能不同于实际出版日期,实际出版日期可能需要单独确认。

[0096] 本发明提供系统、方法和装置以及可用于这些系统、方法和装置的组合物,包括对关注的组织施加能量以产生包含组织成分的液化样品,从而提供快速组织取样以及分析物的定性和/或定量检测,所述分析物可能为组织成分(例如,数种生物分子、药物和微生物—可能需要一个段落来正式定义组织成分的含义)的部分。组织组成或成分的测定可用于多种应用,包括诊断或预测局部以及全身疾病、评价药物给药后不同组织中治疗剂的生

物利用率、法医学检测滥用药物、评价暴露于有害剂后组织微环境的变化、去污和各种其它应用。

[0097] 本发明的另一个目的是提供用于液化受试者的组织，用于促进药物通过或通入组织的方法和装置。上面公开的方法和装置不仅适用于收集组织成分，而且适用于药物输送。该装置和方法包括对受试者的关注的组织施加能量和液化介质，并将药物送经或送入要液化的组织的部位。使用本发明的优点是 1) 提供较高通量的药物进入组织，和 2) 允许进入组织的通量的较大控制。在应用此方法时，迫使简单不通过组织（如，皮肤）和进入循环系统的药物通过组织。

[0098] 虽然可结合人用来描述本发明，但兽医应用也在本发明的预期和范围内。

[0099] 组织诊断

[0100] 能量施加装置

[0101] 本文公开的组织液化装置一般可描述为具有可操作地偶合到储存器部件 / 壳的能源 / 发生器，其中储存器容纳其中收集分析物的介质，并且在大多数实施方案中，介质促进能量转移到关注的组织，并因此在需要时可促进组织样品的液化。在使用中，储存器壳放置成与受试者的组织接触，以在介质和组织之间产生接触，并启动能源。装置可以可操作地偶合到另外的能源（例如，磨料致动器、压电换能器、抽吸或压力），此能源也可施加到组织以促进能量转移到组织。在能量施加到组织时，组织的成分由能量溶解，并收集在介质中。介质可保持在储存器壳中，或者转移到单独的容器。储存器壳或容器可以可操作地偶合到检测装置，检测装置可定量测量介质中存在的组织成分。

[0102] 能量可从单一能源或者作为源的组合施加到组织。示例性能源包括机械（例如，磨损、剪切、真空、压力等）、压电换能器、超声、光（例如，激光）、热和电能。能量施加强度以及能量施加时间可关于关注的特定组织和特定施加方法适当调节。施加的能量强度和时间可基于与能量相关使用的特定液化促进介质 (LPM) 适当调节。在一些实施方案中，为了产生适合的液化组织样品，提供大于 1 分钟、大于 90 秒或大于 2 分钟的能量暴露时间。能量的大小取决于关注的分析物和 LPM 的选择。在 LPM 中不存在表面活性剂或颗粒时，需要较高能量以液化组织。使用高能量受对组织或其成分的不利影响的限制。显著的不利影响是有害的组织损伤。因此，在一些实施方案中，可能有必要结合某些装置组件，这些组件提供组织性质变化或组织液化程度的临时监测（理想地，实时监测），以便一旦达到能量暴露的安全限度，可使装置停止。临时评价可在液化过程之前、期间和之后进行。在某些实施方案中，通过电化学（例如，组织的电导率、通过离子选择性电极测量某些离子等）、生物化学（例如，通过酶试验（如 ELISA）测量 LPM 中的某些组织组分等）或光学（例如，通过分光光度计测量 LPM 浊度等）方法，进行临时评价。在一个示例性实施方案中，通过用信号发生器跨过组织施加预定的 AC 电压，并通过万用表分析产生的电流，测量组织的临时电导率。高能量暴露的另一个显著不利影响归因于组织的温度提高，也被称为热效应。因此，在一些实施方案中，可能有必要结合温度感应元件（例如，热电偶），此元件允许监测组织和 / 或 LPM 的温度，促进判断暴露于组织的能量的安全量。

[0103] 通过适当选择 LPM，显著降低所需的能量水平。例如，单独使用盐水连同超声导致小于 0.1mg 蛋白 / cm<sup>2</sup> 皮肤的回收。另一方面，在 LPM 中加入 1% w/v 浓度的表面活性剂（如 DPS、NLS 和 Brij-30）使蛋白回收增加到大于 0.6mg/cm<sup>2</sup> 皮肤。

[0104] 在某些实施方案中,用能量使组织液化可导致溶解的组织成分的生物活性降低,使得需要选择充分保持组织分子的生物活性以及帮助组织溶解的LPM。例如,在LPM中加入1% w/v浓度的一种或多种表面活性剂(如DPS、NLS和Brij-30)促进在超声能量暴露下完全保持溶解的蛋白和核酸的生物活性。

[0105] 在某些实施方案中,能量可以用包括能量产生元件的能量输送室施加到组织。当放在组织上时,该室使组织暴露于能量产生元件,并使能量以最小干扰施加到组织。此室可含有LPM,并提供LPM与组织的接触,使得在施加能量时,组织成分可直接被收集进入溶液。

[0106] 在某些实施方案中,含有LPM的能量输送室也可包含诊断装置,例如分析物传感器,用于检测和任选定量可能存在于LPM的分析物。这些诊断装置可作为化学传感器、生物传感器,或者可提供其它测量,以形成完全取样和测量系统。具有用于流体转移的内部通道的元件可与传感器一起制造,以形成一次性部件。该装置也可改装成包括一次性部件或作为一次性部件提供,此部件提供在LPM中收集分析物用于分析。

[0107] 或者,诊断元件可位于别处(例如,与能量装置分离),并且可用机械力、毛细管力、超声、真空或电渗力将与组织接触的能量输送室的内容物泵送进入传感室并分析。

[0108] 在某些实施方案中,例如,在评价局部制剂或测定药理学参数时,可将部件构造成为闭合回路药物输送部件,其包括药物输送装置、分析物回收装置、用于测量分析物的传感装置和向药物输送装置提供信号的控制装置。

[0109] 在此描述能量辅助分析物装置的一般操作的实例。将便携式一次性部件插入便携式或台式能量发生器。能量发生器也可包括用于组织电阻测量、分析物浓度测量和分析物浓度测量显示的电路。将系统(例如,能量施放器和一次性部件)对着组织放置,并单独或作为与其它物理、机械、电和化学力的组合施加能量一段时间。使关注的组织液化,将来自液化组织的分析物收集在一次性部件中,并用适合的试验测量。

[0110] 本发明的优选实施方案及其优点通过参考附图的图1至19最好地理解,类似的数字用于不同附图的类似和对应的部件。

[0111] 参考图1a至1g,这些图显示基于磨料能量的组织液化装置的结构、组件和功能。图1的图片a-c显示装置的依次操作,该装置利用旋转磨料组件101作为向组织施加能量进行液化的装置。通过对着关注的组织107放置并设置磨料组件101为运动,可实现液化。磨料组件101连接到轴102,轴102进一步连接到装置中的旋转电动机103。在一些实施方案中,轴102设计成感应和控制磨料组件101对组织107施加的压力。在一个示例性实施方案中,轴102由通过压敏弹簧1023相互连接的轴1021和轴1022构成(图1d)。在另一个实施方案中,轴1021和轴1022在它们之间夹入压力感应压电晶体,用于监测和控制对组织107施加的压力。电池组104为电动机103提供动力,随后,在由装置操作者引导时电动机103可设置磨料组件101为旋转运动。在液化前,磨料组件101设计成用壳105(具体地讲,用位于壳105基部上的薄片106)保持和组织107分离(FIG.1a)。在开始液化过程时,在筒108中储存的LPM转移到壳105(图1a),在此,LPM接触片材106的表面,随后设置磨料组件101为对着片106运动。选择片106的材料,使得它能够被磨料组件101快速磨损,允许LPM和磨料组件101与组织107接触,导致组织液化(图1b)。片106的非限制性实例包括纸片、橡胶片、金属箔、塑料片或任何水溶性片。在液化过程完成时,电动机103停止,含组织成分的LPM转移到样品容器110(图1c)[不是在110中未清楚显示的液化样品,因

此需要修订的附图],或者直接转移到预抽真空的容器(因此,避免需要抽吸泵109和容器110)。在没有预抽真空的容器时,通过抽吸泵109促进样品的收集。

[0112] 在一些实施方案中,某些装置组件设计成为一次性部件,使得在装置每次使用后,可替换这些组件,以允许消毒使用。这些组件可包括壳105、磨料组件101、筒108、样品容器110和认为保持装置无菌必需的其它流体处理装置组件。或者,在一些实施方案中,可使整个装置为一次性。

[0113] 在某些实施方案中,LPM储存筒108可用海绵-波纹管组合件代替,用于储存和释放LPM。图1的图片e-g显示此装置的顺序操作。柔性波纹管形状的壳112包含用LPM填充的海绵111(图1e)。在对着组织107推动装置时,挤压海绵-波纹管壳,以释放LPM,并将磨料组件101设置为运动(图1f)。在完成液化过程时,电动机103停止,并使含有组织成分的LPM转移到样品容器110(图1g)。通过抽吸泵109促进收集样品。或者,在一些实施方案中,通过将装置升高回到其初始位置而将样品收集进入海绵,可避免抽吸泵109和容器110。

[0114] 参考图2a和2b,图2a和2b显示设计用于大面积组织连续取样的可移动组织液化装置的结构和组件。图2的图片a显示利用旋转磨料组件201作为向组织施加能量进行液化的装置的装置。通过对着关注的组织207放置磨料组件101并设置为运动,可实现液化。磨料组件201连接到轴202,轴102进一步连接到装置中的旋转电动机203。在一些具体实施方案中,轴202设计成感应和控制磨料组件201对组织207施加的压力。在一个示例性实施方案中,轴202由两个不同的轴构成,它们通过用于监测和控制对组织207施加的压力的压敏弹簧或压力感应压电晶体相互连接。电池组204为电动机203提供动力,随后,在由装置操作者引导时电动机203可设置磨料组件201为旋转运动。一旦装置对着组织207放置,通过进行三个关键过程启动连续液化步骤:将筒208中储存的LPM连续输送到装置-组织界面的壳212;将磨料组件201设置为对着组织207运动;并且用抽吸泵209将液化组织样品连续收集于样品容器210中。装置可来回移动,使得另外的组织表面暴露于装置并被液化。在需要时,可通过关闭电动机103停止液化过程,并从容器210取得累积的组织样品。

[0115] 在一些实施方案中,可用另外的装置组件防止由于装置在组织表面上运动造成的LPM从壳212渗漏。在一个示例性实施方案中,可用抽吸泵209在组织207和位于装置周围的凸缘壳205中的室206之间产生真空辅助的密封。

[0116] 图2的图片b显示利用压电元件251作为向组织施加机械能量进行液化的装置的装置。压电元件251放在与关注的组织259交界的壳252中,并且通过启动压电元件251,同时LPM作为组织259和压电元件251之间的偶合流体存在,而实现液化。压电元件251为电能的换能器,电能通过在软管253中放置的电路向它提供。在液化期间,LPM用操作者控制的注射系统256通过软管254供给壳252。可用软管255将液化组织样品同时从壳252收集进入样品容器257。样品收集通过抽吸泵258促进,抽吸泵258串联到样品容器257。在一些实施方案中,通过抽吸泵258在壳252中产生的抽吸压力可在壳252和组织259之间提供有效密封,用于防止LPM在液化期间从壳252渗漏。在一些实施方案中,通过抽吸泵258在壳252中产生的抽吸压力可提供另外的能源用于液化。

[0117] 在一些实施方案中,可移动壳252,以使另外的组织表面液化,并收集代表从不同组织表面累积的组织成分的样品。在此装置中,LPM通过管254连续供给壳252,并由管255

连续收集样品。

[0118] 在某些实施方案中,图 2b 中的装置可没有压电元件 251 而操作。在此实施方案中,从管 254 流入壳 252 的 LPM 与组织产生接触,并使组织液化。液化组织通过管 255 从壳收集。壳可连续或间歇移动,以从大组织面积收集样品。装置可具有允许装置在组织上移动、组织液化和收集液化组织实际所必需的另外装置。在某些实施方案中,可用压力或真空但非二者将 LPM 导向组织,并收集液化组织。

[0119] 在某些实施方案中,液化装置可与诊断探测器(例如内窥镜、结肠镜、腹腔镜等)整合。

[0120] 参考图 3a 至 3c,图 3a 至 3c 显示利用摆动磨料组件作为向组织施加能量进行液化的装置的液化装置的结构和组件。参考图 3a,通过对着关注的组织 311 放置磨料组件 101 并设置为运动,可实现液化。例如,通过支架和小齿轮排列,可实现线性运动(图 3a)。具体地讲,使磨料组件 301 连接到支架 302,支架 302 用圆形齿轮 303(小齿轮)以线性摆动运动滑动。齿轮 303 由电动机 304 以摆动圆形运动驱动。电池组 305 为电动机 304 提供动力。在一些实施方案中,电动机 304 为伺服电动机,其可能需要电子微芯片控制器 306 产生摆动圆形运动。在液化前,磨料组件 301 设计成用壳 307(具体地讲,位于壳 307 基部上的薄片 308)保持和组织 311 分离。例如,LPM 可预储存于壳 307 中,以便它与 308 接触。在一些实施方案中,LPM 可从位于装置别处的筒转移到壳 307。液化过程通过设置磨料组件 301 对着片 308 线性运动而启动。选择片 308 的材料,使得它能够被磨料组件 301 快速磨损,使 LPM 和磨料组件 301 与组织 311 接触,导致组织液化。片 311 的非限制性实例包括纸片、橡胶片、金属箔、塑料片或任何水溶性片。在完成液化过程时,电动机 304 停止,并使含有组织成分的 LPM 转移到样品容器 309。通过抽吸泵 310 促进收集样品。在某些实施方案中,样品可直接收集于预抽真空的容器中,避免需要抽吸泵 310 和容器 310。

[0121] 在一些实施方案中,某些装置组件设计成为一次性部件,使得在装置每次使用后,可替换这些组件,以允许消毒使用。这些组件可包括壳 307、磨料组件 301、样品容器 309 和认为保持装置无菌必需的其它流体处理装置组件。或者,在一些实施方案中,可使整个装置为一次性。

[0122] 在一些实施方案中,可通过其它机制产生磨料组件 301 的线性摆动运动,例如,使用线性电动机、线性运动致动器、滚珠螺旋组合件、导杆组合件、起重螺杆组合件和用于将旋转运动转变成线性运动的其它装置。

[0123] 在一些实施方案中,在图 3a 中所述的单一支架和小齿轮系统可用如图 3b 中示例的多个齿轮和带的排列代替。具体地讲,在齿轮 321、322、323、324、325 和 326 上安装带 327(不清楚图上的带在哪里 - 需要修订的附图)。磨料组件 328 连接到带 327,并且在齿轮 321 由电动机 304 以摆动旋转运动驱动时设置成线性摆动运动。虽然齿轮 321、322 和 326 固定到装置的壳,但齿轮 323、324 和 325 安装到轴 328 上。轴 328 固定到装置的壳。在一些实施方案中,轴 328 具有柔性长度,使得在磨料组件 328 压在不平的组织表面上时,与齿轮 323、324 和 325 连接的轴 328 能够调节其长度,以使磨料组件 328 与不平组织表面的轮廓相符。另外,轴 328 可设计成感应和控制磨料组件 328 对组织表面施加的压力。在一个示例性实施方案中,轴 328 由通过压敏弹簧 3283 相互连接的轴 3281 和轴 3282 构成(图 3c)。

[0124] 参考图 4a 至 4g,图 4a 至 4g 描述在本发明中公开的装置、方法和系统中使用的磨

料组件的几个设计。图 4a 说明包含具有均匀厚度的磨料片的磨料组件。具有均匀厚度的磨料的非限制性实例包括织物、磨料晶体（例如，石英、金属、二氧化硅、碳化硅、铝粉及衍生物（如 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>）、钻石沙、聚合海绵和天然海绵等。在一些实施方案中，可有利地设计具有不均匀磨损性的磨料组件，例如，具有磨损性空间变化的那些组件。在一个示例性实施方案中，磨料组件为盘，该盘具有从盘中心高磨损性到盘外围低磨损性变化的磨损性梯度（图 4b）。在一些实施方案中，磨料组件的形状可改变成非平面几何形状。在一个示例性实施方案中，图 4c 显示具有光滑和圆形的面向组织的表面（高宽比 - 定义为高度和宽度之比 - 可以从 10 至 0.1 变化）的磨料组件，图 4d 显示圆环形磨料组件。图 4e 至 4g 显示用刷作为组织磨损装置的磨料组件的实施方案。图 4e 说明包含具有均匀高度和磨损性的刚毛的刷的磨料组件。在一些实施方案中，磨料组件包含具有不同高度和 / 或磨损性的刚毛的刷。图 4f 显示圆盘形刷的示例性实施方案，中心的高磨损性刚毛被盘外围的低磨损性刚毛包围。图 4g 显示具有不同长度的刚毛的刷的示例性实施方案，刚毛形成光滑和圆形的面向组织的表面（高宽比 - 定义为磨料组件的高度和宽度之比 - 可以从 10 至 0.1 变化）。

[0125] 参考图 5a 至 5d，这些图公开用于测量组织电导率的装置组件。虽然高能量暴露有利于使组织液化，但其使用可导致显著的不利影响，如有害的组织损伤。因此，在一些实施方案中，可能有必要结合某些装置组件，这些组件提供组织性质（例如，组织电导率）变化的临时监测（理想地，实时监测），使得一旦达到能量暴露的安全限度，就可使装置停止。使用置于组织 503 上的测量电极 501 和置于组织 503 正被液化的区域附近的参比电极 502，通过跨过关注的组织 503 施加预定的 AC 电压，可完成液化过程期间临时测量和监测组织的电导率。通过电流表 504 测量得到的跨过两个电极的电流可作为组织电导率的度量。在一些实施方案中，保持测量电极 501 与 LPM，或者直接与组织 503 上正被液化的区域的电接触。在一个实施方案中，测量电极 501 放置为 LPM 壳 509 的内表面衬里（图 5a）。在某些实施方案中，测量电极为滑动接触 506，它固定到浸入 LPM 的电动轴 510（图 5b）。电流通过滑动接触 506 传输到固定在装置壳上的孤立杆桩（stud）505。在一些实施方案中，参比电极 502 为 LPM 壳 509 的延长，并置于组织 503 上正被液化的区域的外围附近（图 5a 和图 5b）。在一些实施方案中，参比电极为手持式圆柱形电极 507，它与位于液化装置中的电导率测量组件电连接（图 5c）。在一些实施方案中，参比电极为贴片电极 508，它与位于液化装置中的电导率测量组件电连接（图 5d）。

[0126] 参考图 6a 至 6g，这些图公开了利用基于微针的组织液化的装置的结构、组件和功能。基于微针的装置通过组织组分的机械破坏而向组织施加能量，这主要通过将微针推入组织来完成。图 6a 显示微针贴片 601 的基本设计，该微针贴片 601 具有许多用 LPM 613 预填充的微针 602。可将微针贴片 601 插入关注的组织，这使 LPM 613 中的组织组分破坏和溶解。LPM 613 可以稍后从贴片 601 吸出，用于诊断分析。

[0127] 通过组织内微针的插入后运动，可施加另外的液化能量。图 6b 说明可固定在微针贴片 601 上的振动组件 603，在贴片 601 插入组织后，可启动振动组件 603，以剧烈振动组织内的微针 602。振动组件 603 含有许多机械振动器 6031 和电池操作的电子电路板 6032，用于提供动力并控制机械振动器以所需方向运动。在一个示例性实施方案中，机械振动器 6031 可以平行于和垂直于微针 602 的轴的方向振动。

[0128] 在一些实施方案中，通过各个微针 602 相对于贴片 601 的运动，可产生微针插入后

的运动。图 6f 公开放在贴片 601 顶部的电磁铁 612。电磁铁 612 可用于产生各个微针 602 沿着其轴的摆动运动。这可通过在各个微针 602 顶部固定磁铁 611，使得磁铁 611 响应于电磁铁 612 的交变极性情况 (profile) 引起微针 602 的摆动线性运动而实现。在某些实施方案中，可能需要微针的旋转运动。电磁铁 6121、6122、6123 和 6124 对称地放在贴片 601 周围 (图 6g)。连接到各个微针 602 顶部的磁铁 611 响应于电磁铁 6121、6122、6123 和 6124 的交变极性情况引起微针 602 的旋转运动。

[0129] 在图 6b–6e 中，使用主动通过微针注射和抽取 LPM，通过 LPM 在组织中的强制运动，可进一步施加另外的液化能量。在装置中放置的壳 604 可含有压缩空气容器 605，可用此容器迫使贴片 601 中含有的 LPM 流到组织中。可用壳 604 中的抽吸泵 604 施加真空，用于从组织抽取 LPM。在一些实施方案中，压缩空气容器 605 和抽吸泵 606 可交替用于从组织重复注射和抽取 LPM，用于增强液化。在壳 604 中的电池操作的电子电路板 607 用于提供动力和控制压缩空气容器 605 和抽吸泵 606。在一些实施方案中，抽吸泵 606 可另外连接到样品容器，以将液化组织样品从贴片 601 吸出并转移到样品容器。在某些实施方案中，可由安装在贴片 601 顶部的柔性弹性帽 608 (见图 6d) 代替壳 604。例如通过用手指推，柔性帽 608 可重复推入和突出，以便通过微针 602 重复从组织注射和抽取 LPM。

[0130] 微针 602 可用物质 610 涂覆，以增强组织液化 (图 6e)。在一些实施方案中，物质 610 为磨料，其可帮助增强组织成分的破坏和它们在 LPM 中的较快溶解。在一些实施方案中，物质 610 为可分裂特定组织组分 (例如，具体胞外基质) 的酶，用于增强组织液化。在一些实施方案中，物质 610 为特异性结合关注的组织分析物的分子，以增强从组织回收分析物。在一个示例性实施方案中，物质 610 为抗体。

[0131] 参考图 6，在一些实施方案中，某些装置组件可设计成为一次性，使得在装置每次使用后，可替换这些组件，以允许消毒使用。这些组件可包括微针贴片 601、微针 602、压缩空气容器 605、抽吸泵 606 和认为保持装置无菌必需的其它流体处理装置组件。或者，在一些实施方案中，可使整个装置为一次性。

[0132] 液化促进介质 (LPM)

[0133] LPM 可设计成用于以下以下四种用途的一种或多种 :a) 它促进组织分散成其成分，b) 它作为收集液化组织成分的介质，和 c) 它抑制取样的成分降解，从而保持它们的化学或生物活性 (例如，通过保持各种分子的结构构造，和通过保持取样的微生物繁殖的能力)，和 d) 保证与随后分析技术的相容性。

[0134] 通常，LPM 包含溶剂，如水溶液 (例如，Tris-HCl、磷酸盐缓冲盐水等) 或有机 (“非含水”) 液体 (例如，DMSO、乙醇等)，溶剂可另外含有多种液化促进剂，包括但不限于表面活性剂 (非离子、阴离子或阳离子)、脂肪酸、氮酮样分子、螯合剂 (例如，EDTA 等)、无机化合物和磨料物质。本文所用“液化促进剂”是指可促进组织样品液化和 / 或组织成分溶解的 LPM 的组分。根据组织类型和关注的分析物，LPM 的成分可根据上述标准合理选择。例如，易损组织 (如粘膜) 可通过具有最小量或没有表面活性剂的盐水溶液液化，而角质化组织 (如皮肤) 需要另外的成分，如表面活性剂。

[0135] LPM 中的液化促进剂可包含多种适合的组分，包括但不限于 :水、tris-HCl、盐水 (磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 和 tris- 缓冲盐水 (TBS))、醇 (包括乙醇和异丙醇 (例如，在水溶液中 10–100% 的浓度范围))、磨料物质 (如二氧化硅、氧化铝或碳化硅的粉或衍生物) (例

如,在水基溶液中 0.01-99% (w/v) 的浓度范围)、表面活性剂(如 Brij(各种链长度,例如 Brij-30)、3-(癸基二甲基铵基)丙磺酸盐(DPS)、3-(十二烷基二甲基铵基)丙磺酸盐(DDPS)、N-月桂酰基肌氨酸(NLS)、Triton X-100、十二烷基硫酸钠(SDS)和月桂基硫酸钠(SLS)、HCO-60 表面活性剂、羟基聚乙氧基十二烷、月桂酰基肌氨酸、壬苯聚醇、辛苯聚醇、苯磺酸盐、Pluronic、聚油酸酯、月桂酸钠、油酸钠、脱水山梨糖醇二月桂酸酯、脱水山梨糖醇二油酸酯、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、脱水山梨糖醇单油酸酯、脱水山梨糖醇三月桂酸酯、脱水山梨糖醇三油酸酯、Span 20、Span 40、Span 85、Synperonic NP、Tween、烷基硫酸钠和烷基卤化铵)(例如,在水基溶液中 0.01-20%之间的浓度范围)、DMSO(例如,在水基溶液中 0.01-20%之间的浓度范围)、脂肪酸(例如,亚油酸)(例如,在乙醇:水(50:50)中 0.1-2%之间的浓度范围)、氮酮(例如,在乙醇:水(50:50)中 0.1-10%之间的浓度范围)、聚乙二醇(例如,在水基溶液中 10-50%之间的浓度范围)、组胺(例如,在水基溶液中 10-100mg/ml 的浓度范围)、EDTA(例如,1-100mM 的浓度范围)和氢氧化钠(例如,1-100mM 的浓度范围)。在一些实施方案中,LPM 可含有 TWEEN、CTAB、SPAN 或烷基硫酸钠以外的表面活性剂。在一些实施方案中,LPM 可含有阳离子表面活性剂以外的表面活性剂。在 LPM 包含表面活性剂时,LPM 中表面活性剂的总浓度(w/v)可以为至少 0.5%,至 10%的范围,并且可以为例如约 0.5%、约 1%、约 1.5%、约 2%、约 2.5%或约 3%。

[0136] LPM 可包含促进保持关注的分析物的生物活性的剂。例如,LPM 可含有自由基清除剂(例如,抗氧化剂(例如,多酚、β-胡萝卜素、叶黄素、番茄红素、硒等)、维生素A、维生素C、维生素E、α-生育酚、丁基化羟基甲苯、苯甲酸钠、甲酸钠等);消泡剂(例如,硅酮或非硅酮抗起泡剂,例如,二甲基聚硅氧烷、烃油、低级脂肪酸甘油二酯等);和剪切防护剂(例如,聚乙二醇、聚乙烯醇、pluronic F68 等)。在分析物的上下文中使用的“生物活性”是指促进检测(例如,由特异性抗体结合的表位或对变性敏感的其它结构特征)的结构构造,并且也可包括分析物的生物活性(例如酶活性)。

[0137] 特别关注的 LPM 为包含表面活性剂组合的那些 LPM,在与本文公开的装置、方法和系统相关使用时,此组合在 LPM 中提供所需组织成分水平,同时提供 LPM 中分析物生物活性的保持,以特别提供分析物的结构构造的保持(例如,避免蛋白分析物变性)。

[0138] 在 LPM 中使用表面活性剂的不同组合(包括非离子表面活性剂、两性离子表面活性剂和阴离子表面活性剂的组合),在用于本文所述装置、方法和系统后,可提供 LPM 中组织成分的高水平和 LPM 中含有的分析物的生物活性的良好保持这两者。

[0139] 关注的非离子表面活性剂的非限制性实例包括 Brij 系列表面活性剂(例如,聚乙二醇十二烷基醚(Brij 30)、聚氧乙烯 23-月桂基醚(Brij 35)、聚氧乙烯 2-鲸蜡基醚(Brij 52)、聚氧乙烯 10-鲸蜡基醚(Brij 56)、聚氧乙烯 20-鲸蜡基醚(Brij 58)、聚氧乙烯 2-硬脂基醚(Brij 72)、聚氧乙烯 10-硬脂基醚(Brij 76)、聚氧乙烯 20-硬脂基醚(Brij 78)、聚氧乙烯 2-油基醚(Brij 92)、聚氧乙烯 10-油基醚(Brij 96)、聚氧乙烯 100-硬脂基醚(Brij 700)、聚氧乙烯 21-硬脂基醚(Brij 721)等);Triton X(例如,Triton X-15、Triton X-45、Triton X-100、Triton X-114、Triton X-165、Triton X-200、Triton X-207、Triton X-305、Triton X-405 等);和脱水山梨糖醇(例如,Span-20、Span-40、Span-60、Span-65、Span-80、Span-85 等)。

[0140] 关注两性离子表面活性剂的非限制性实例包括 3-(癸基二甲基铵基)丙磺酸盐、

3-(十二烷基二甲基铵基)丙磺酸盐、肉豆蔻基二甲基铵基丙磺酸盐、十六烷基二甲基铵基丙磺酸盐、ChemBetaine C、ChemBetaine Oleyl、ChemBetaine CAS 和 3-(3-胆酰胺基丙基)-二甲基铵基-1-丙磺酸盐。

[0141] 关注阴离子表面活性剂的非限制性实例包括 N-月桂酰基肌氨酸、椰油酰基肌氨酸钠、肉豆蔻酰基肌氨酸钠、月桂酰基肌氨酸异丙酯、棕榈酰基肌氨酸钠和月桂酰基两性二乙酸月桂酰基肌氨酸二钠。

[0142] 在一些实施方案中，非离子表面活性剂与两性离子表面活性剂组合。在某些实施方案中，非离子表面活性剂与阴离子表面活性剂组合。在这些实施方案中，可调节 LPM 中存在的非离子表面活性剂与两性离子或阴离子表面活性剂的比率，以实现所需结果。关注的非限制性比率包括 25 : 75 非离子：两性离子表面活性剂、50 : 50 非离子：两性离子表面活性剂、75 : 25 非离子：两性离子表面活性剂、25 : 75 非离子：阴离子表面活性剂、50 : 50 非离子：阴离子表面活性剂和 75 : 25 非离子：阴离子表面活性剂。特别关注的混合物为 Brij 系列表面活性剂（例如，Brij-30）和 N-月桂酰基肌氨酸（NLS）的 50 : 50 表面活性剂混合物。特别关注的另一种混合物为 Brij 系列表面活性剂（例如，Brij-30）和 3-(癸基二甲基铵基)丙磺酸盐 (DPS) 的 50 : 50 表面活性剂混合物。如以下实施例中所说明的，当在 LPM 中包含 0.5-1% (w/v) 的总表面活性剂浓度时，这些表面活性剂的组合提供高组织成分水平的溶解（通过总蛋白浓度评价），并且提供生物活性的保持（通过 ELISA 技术评价）。

[0143] 在一些具体情况下，例如，收集活病原体，可用不同的 LPM 组合物实现所需结果。用盐水和 tris-HCl 作为 LPM 提供各种各样的皮肤驻留细菌的收集，另外，这些微生物保持有效体外繁殖和生长。在一些实施方案中，LPM 可含有富集肉汤培养基，以支持取样的微生物的生长。一些厌氧细菌对氧气敏感。因此，用于收集厌氧细菌的 LPM 可含有氮和氢气氛。在阅读本公开后，可以容易地生产具有不同组分的 LPM 组合物用于具体应用对于普通技术人员是显而易见的。

[0144] LPM 也可包括关注的分析物的稳定剂，例如蛋白酶抑制剂、RNA 酶抑制剂和 DNA 酶抑制剂，这些稳定剂可以最小量或没有可检测的降解或生物活性损失提供分析物的收集和至少临时储存。其它示例性液化促进剂描述于美国专利 No. 5,947,921，所述专利通过引用整体并入本文。例如，液化促进剂可包括表面活性剂、磨料颗粒和生物分子稳定剂。

[0145] 在一个示例性实施方案中，LPM 由无菌 PBS 中 NLS 和 Brij-30 的 1% w/v 混合物的溶液组成。在另一个示例性实施方案中，LPM 由无菌 PBS 中 DPS 和 Brij-30 的 0.5% w/v 混合物的溶液组成。在某些实施方案中，具体地讲，在分析物为一种或多种蛋白时，LPM 含有 1-10% v/v 蛋白酶抑制剂混合液（例如，目录编号 :P8340，由 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 提供）。在某些实施方案中，LPM 为盐水溶液。在某些实施方案中，LPM 为 tris-HCl 溶液。

[0146] LPM 也可包含定义为“灵敏性增强剂”的剂，其用于稳定液化组织分析物，并且就提高诊断分析试验的灵敏性和特异性而言促进它们的分析。灵敏性增强剂被认为是实现这些目标所必需的，灵敏性增强剂可在组织液化过程之前、期间或之后，或者在诊断分析之前或期间加入 LPM。例如，灵敏性增强剂可预先储存于容器中，然后可将液化组织样品混合。

[0147] 在典型实施方案中，灵敏性增强剂由与 LPM 的具体组分（如上所述）协同作用的物质配制，以提高关注的分析物的检测灵敏性和特异性。在一个示例性实施方案中，灵敏性

增强剂由防止组织样品中存在的蛋白分析物和各种诊断试验基质非特异性结合,导致它们的灵敏性和特异性检测的物质配制。在一些实施方案中,将灵敏性增强剂配置成通过使分子(如蛋白酶、RNA 酶和 DNA 酶)失活而稳定关注的分析物。在一些具体情况下,灵敏性增强剂可由使蛋白酶活化以防止某些关注的分析物与液化样品中存在的蛋白非特异性结合的物质配制。在一些实施方案中,用灵敏性增强剂调节液化样品的生理状态(例如,pH),以促进关注的分析物的下游分析。

[0148] 在一些实施方案中,灵敏性增强剂可包含溶剂,如水溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水、tris-缓冲盐水等)或有机液体(“非含水”)液体(例如,DMSO、乙醇、苯酚等),溶剂可另外含有但不限于阻断试剂(例如,Tween 20、Triton X-100、牛血清白蛋白、无脂奶粉、酪蛋白、酪蛋白酸盐、鱼胶、超声处理的-鲸蜡(sperm)-核酸等)、稳定剂(如蛋白酶、蛋白酶抑制剂、RNA 酶抑制剂和 DNA 酶抑制剂)、肉汤培养基。根据组织类型和关注的分析物,灵敏性增强剂的组分可合理选择。在一个示例性实施方案中,为了检测液化角化组织(如,皮肤)中的核酸,灵敏性增强剂包含 100mM NaCl、10mM Tris Cl(pH 8)、25mM EDTA(pH 8)、0.5% SDS 和 0.1mg/ml 蛋白酶 K。在此,蛋白酶 K 不仅可促进皮肤液化,而且可通过使样品中作为组织分析物存在的 DNA 酶和 RNA 酶分解而稳定核酸。

[0149] 在包括通过免疫试验检测分析物的一些实施方案中,灵敏性增强剂可包含多种适合的组分,包括但不限于:溶剂(例如,水、缓冲溶液(例如,磷酸盐缓冲盐水、tris-HCl、tris-缓冲盐水等)等)、稳定剂(如蛋白酶抑制剂)和阻断试剂(例如,Tween 20、Triton X-100、牛血清白蛋白(例如,1-5% 的浓度范围)、无脂奶粉(例如,0.1-0.5% 的浓度范围)、酪蛋白或酪蛋白酸盐(例如,1-5% 的浓度范围)、鱼胶(例如,1-5% 的浓度范围))。在一个示例性实施方案中,用于免疫试验的灵敏性增强剂由 Tris 缓冲盐水中 10% BSA 和 0.5% Tween 20 的溶液组成,并且与组织样品以 1 : 10 的比率混合。

[0150] 在包括检测核酸作为关注的分析物的一些实施方案中,灵敏性增强剂可包含多种适合的组分,包括但不限于:水、缓冲溶液(例如,TE、TAE、柠檬酸钠等)、螯合剂(如 EDTA)、稳定剂(如 RNA 酶抑制剂、DNA 酶抑制剂、蛋白酶、苯酚、硫酸铵、异硫代氰酸胍等)、表面活性剂(如十二烷基硫酸钠)和阻断试剂(例如,超声处理的-鲸蜡-核酸、Tween 20、Triton X-100、牛血清白蛋白(例如,1-5% 的浓度范围)、无脂奶粉(例如,0.1-0.5% 的浓度范围)、酪蛋白或酪蛋白酸盐(例如,1-5% 的浓度范围)、鱼胶(例如,1-5% 的浓度范围))。在一些实施方案中,在需要用聚合酶链反应(PCR)技术检测核酸时,LPM 必须选择为避免包含 PCR-抑制剂作为 LPA。在一个示例性实施方案中,PCR-相容性 LPM 为 Tris-HCl 缓冲剂或 EDTA 缓冲剂。

[0151] 在包括检测微生物作为关注的分析物的一些实施方案中,灵敏性增强剂可包含富集肉汤培养基,以促进微生物体外生长。一些厌氧细菌对氧气敏感。因此,用于收集厌氧细菌的灵敏性增强剂可含有氮和氢气。

[0152] 在阅读本公开后,用于具体试验系统或关注的具体分析物的灵敏性增强剂的其它制剂将对普通技术人员显而易见。

[0153] 在一些实施方案中,在组织液化之前或期间,可操纵 LPM 的热性质(例如,温度、热容量等),以减小能量暴露对组织和 / 或其成分的不利热影响。在一个实施方案中,将 LPM 的温度保持足够低,以免引起组织成分熔化。在另一个示例性实施方案中,具有低于环境温

度（约 25°C）的预冷却的 LPM 可用于超声液化。在另一个示例性实施方案中，通过将 LPM 的热量转移到预冷却的液体，可在能量暴露期间连续降低 LPM 的温度，所述预冷却的液体流经偶合到含 LPM 的储存器的传热夹套。

[0154] 分析物

[0155] 多种分析物可用本文公开的装置、方法和系统检测（定性或定量），并任选经表征以提供所讨论的组织的分析物分布。非限制性实例包括：结构和信号蛋白（例如，角蛋白（例如，碱性角蛋白、酸性角蛋白）、 $\beta$ -肌动蛋白、白介素、趋化因子、生长因子、集群刺激因子、干扰素、抗体（IgE、IgG、IgA、IgD、IgM）、癌生物标志（例如，CEA 等）、热休克蛋白（例如，Hsp-60、Hsp-70、Hsp-90 等）等、脂类（例如，胆固醇）、神经酰胺（例如，神经酰胺 1-6）、脂肪酸、甘油三酯、石蜡烃、角鲨烯、胆固醇酯、胆固醇二酯、游离脂肪酸、羊毛固醇、胆固醇、极性脂类（例如，葡萄糖基衍生物和磷脂）等、核酸（例如，RNA 和 DNA）、小分子（例如，游离氨基酸、乳酸盐、外源输送的药物分子、环境污染物、战剂等）和微生物（例如，细菌、真菌、病毒等）。这些分析物发现于组织自身内，并且可不只存在于组织周围的间质液中。分析物可以是与间质液相关的标志以外的，如肿瘤标志。因此，本文公开的装置、方法和系统可适用于检测肿瘤标志，所述肿瘤标志存在于组织结构，但也可或可不存在于间质液中。

[0156] 在一个特定实施方案中，使针对过敏原的抗体和细胞因子液化（是这些液化还是组织液化产生这些可溶分析物），并经表征以提供所讨论的组织和受试者的过敏分布。抗体的具体类型包括但不限于 IgE 和 IgG 抗体。细胞因子的具体类型包括但不限于 IL4、IL5、IL10、IL-12、IL13、IL-16、GM-CSF、RANTES、MCP-4、CTACK/CCL27、IFN- $\gamma$ 、TNFa、CD23、CD-40、Eotaxin-2 和 TARC。

[0157] 分析物可以很多方式分析，这些方式可容易地由普通技术人员根据要评价的分析物选择。可将储存器或收集容器施加到用于样品收集的部位，然后用分析技术测量样品。可优化能量的施加，以使分析物回收最大化。某些应用可能需要保持分析物对于样品其它组分的相对水平。示例性试验方法包括但不限于凝胶电泳、琼脂平板接种、酶促试验、基于抗体的试验（例如，蛋白质印迹试验、酶联免疫吸附试验（ELISA）、侧流试验等）、薄层色谱法、HPLC、质谱法、基于辐射的试验、DNA/RNA 电泳、(UV/Vis) 分光光度法、流动试验等。

[0158] 在液化组织样品中存在组织成分的定量测量可评价组织液化的程度。通过在被发射电磁波的源照射时测量液化组织样品的一个或多个光学性质（如吸收率、透射率、散射或荧光发射），可完成此内部校准。校准液化程度可使用另外的样品参数，如重量分析重量、总蛋白含量、pH 和电导。另外，可使用组织性质（如厚度、失水率和电导率）的测量。直接测量一种或多种取样的分析物（如  $\beta$ -肌动蛋白、 $\beta$ -微管蛋白、GAPDH（甘油醛 3-磷酸脱氢酶）、LDH（乳酸脱氢酶））或任何其它丰富存在的生物分子（预期其浓度在组织中保持恒定）的浓度，可用于校准组织液化程度。也可用基于免疫学的试验（即，放射免疫、Eliza、FACs）对分析物定量。

[0159] 组织细胞和微生物

[0160] 除了上述分析物外，可用本文公开的装置、方法和系统检测关注的组织中在分析下的组织的整个细胞和多种微生物。组织细胞和大多数微生物比上述分析物大得多，并且它们从关注的组织的提取可用本发明的不同实施方案完成。致病和非致病细菌、病毒、原生动物和真菌在各种感染疾病中起众所周知的作用，它们的检测可促进诊断微生物引起的

疾病（例如，结核病、疱疹、疟疾、癣菌病等）。病状显示为新微生物的存在，或者驻留微生物的比例变化。在怀疑受试者有此微生物的感染时，可用本文公开的装置、方法和系统定量或检测存在或不存在微生物，并促进病况的诊断。

[0161] 非致病微生物一般存在于健康组织（“正常菌群”），并且可在受试者的许多身体功能和健康保持中起作用。在关注的组织中检测这些正常菌群微生物（例如，细菌）也可用本方法和装置完成。受试者的组织可用本文公开的装置、方法和系统取样和分析，以检验天然存在的各种微生物。在怀疑受试者有异常病况时，可根据本文公开的装置、方法和系统对受试者的组织取样，以检测相对于正常的健康受试者，存在或不存在非致病微生物分布的变化。此微生物分布的变化可促进诊断受试者中关注的病况。

[0162] 在一些实施方案中，可使组织液化，以回收它们的细胞或其中驻留的微生物。用能量应用本发明装置、方法和系统提供从受试者的皮肤收集细菌进入可任选含有 LPA 的收集介质。例如，用 tris-HCl 或 PBS 向关注的组织施加超声能量足以收集细菌微菌群。通常，利用此方法的装置的使用包括施加足够的超声能量水平，以从组织移走微生物，并进入收集介质，然后收集该收集介质用于随后分析，该分析可包括培养该介质以确定是否存在某些微生物、直接试验该介质（例如，使用 ELISA 技术，例如，包括微生物特异性抗体，例如，包括乳胶凝集试验，例如，使用基于核酸的诊断试验，其包括聚合酶链反应杂交、DNA 测序法）或这些方法的组合。检测介质中的微生物促进诊断关注的病况。另外，高收率收集微生物可缩短或消除为了诊断而放大核酸数的过程。

[0163] 也可用本文所述发明从组织收集细胞。用使组织液化而不破坏细胞膜的适合的 LPM 施加能量可用于收获整个细胞，包括来自组织的活的整个细胞。在此情况下，LPM 可包含化学物质，所述化学物质包括但不限于离子螯合剂（如 EDTA）或酶（如胰蛋白酶），以移走细胞。类似地，通过改变如上讨论的能量参数和 / 或 LPM，可用本公开的装置、方法和系统收集细胞核或其它细胞器官。

#### [0164] 关注的组织

[0165] 多种组织良好地适用于本文公开的装置、方法和系统。这些组织包括但不限于皮肤、粘膜（鼻、肠、结肠、口腔、阴道等）或粘液、乳房、前列腺、眼、肠、膀胱、胃、食道、指甲、睾丸、头发、肺、脑、胰、肝、心、骨或主动脉壁。在一个实施方案中，组织为皮肤，该皮肤可以为脸、臂、手、腿、背或任何其它位置的皮肤。虽然皮肤和粘膜表面非常易于进行液化，但在本公开中描述的液化装置、方法和系统可设计成容易地适应以上所列的各种内部组织。可用于本文公开的方法的专用于内部组织的示例性装置包括 U. S. 5, 704, 361、U. S. 5, 713, 363 和 U. S. 5, 895, 397 中公开的那些，它们各自通过引用整体并入本文。

[0166] 在一些实施方案中，关注的组织是肿瘤或怀疑为肿瘤的组织以外的。在本文公开的装置、方法和系统应用于检测微生物时，关注的组织为怀疑含有微生物的组织（例如，怀疑有感染，特别是深组织感染（例如，皮肤的真皮和 / 或皮下层感染）的组织，包括粘膜的这样的层）。

#### [0167] 使用方法

[0168] 本文公开的方法可用于宽范围的组织评价，包括评价存在或不存在关注的分析物，以促进诊断关注的病况。在一些实施方案中，所述方法用于例如患者呈现暗示一种或多种病况的临床体征和症状的情况，此时，本文公开的方法可促进有差别的诊断。

[0169] 在某些实施方案中，本发明提供包括将从患者样品产生的试验分析物分布与参比分析物分布比较的方法。“参比分析物分布”或“参比组织的分析物分布”一般指所选择的分析物或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个分析物的集合的定性或定量水平，所述定性或定量水平是关注的病况的特征。可提供参比分析物分布的示例性关注病况包括但不限于正常参比分析物分布（例如，健康组织（即，没有疾病），一般组织健康，可接受或容许水平的分析物（例如，药物、环境污染物等））、疾病参比分析物分布（例如，存在例如微生物感染（例如，细菌、病毒、真菌或其它微生物感染）、组织的局部疾病（例如，皮炎、银屑病、癌症（前列腺、乳房、肺等）、荨麻疹等）、在组织中显现的全身疾病（例如，过敏、糖尿病、阿尔茨海默病、心血管疾病等）等的特征分析物分布）、环境污染物参比分析物分布（例如，存在不可接受的高环境污染物（例如，战剂、花粉、颗粒、杀虫剂等）水平的特征分析物分布）、药物参比分析物分布（例如，治疗水平的药物、滥用药物（例如，用以促进评价滥用药物）等的特征分析物分布）等。参比分析物分布可包括以下分析物，该分析物为一种或多种分析物（例如，蛋白（例如，抗体、癌症生物标志、细胞因子、细胞骨架/细胞质/胞外蛋白等）、核酸（RNA、DNA）、脂类（其包括神经酰胺、胆固醇、磷脂等）、生物衍生小分子、药物（例如，治疗药物、滥用药物）、环境污染物、战剂等）的成员，或分析物亚组（例如，抗体、磷脂）的成员。给定的关注病况的参比分析物分布可以是前在本领域已知的，或者可用本发明所述方法从组织得到。参比分析物分布可以电子形式储存（例如，在数据库中储存），以提供与试验分析物分布的快速比较，以促进分析和诊断。

[0170] “试验分析物分布”或“关注的组织的分析物分布”指所选择的分析物或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个分析物的集合的定性或定量水平，以促进诊断或预测关注的病况。试验分析物分布可包括以下分析物，该分析物为一种或多种分析物（例如，蛋白、核酸、脂类、生物衍生小分子、药物（例如，蛋白（例如抗体、癌症生物标志、细胞因子、细胞骨架/细胞质/胞外蛋白等）、核酸（DNA、RNA）、脂类（其包括神经酰胺、胆固醇、磷脂等）、生物衍生小分子、药物（例如，治疗药物、滥用药物）、环境污染物、战剂等）的成员，或分析物亚组（例如，抗体、磷脂）的成员。通常，为分析产生试验分析物分布所选择的分析物根据所需参比分析物分布的分析物而选择。例如，通过评价试验分析物分布和参比分析物分布之间是否有实质的“匹配”，试验分析物分布与适合的参比分析物分布的比较促进确定存在或不存在关注的病况或病状。

[0171] 产生所选择的分析物或分析物集合的参比和试验分析物分布的方法可使用本领域可用的方法完成，并且根据要评价的分析物选择。

[0172] 本方法可用于宽范围的组织评价。能量辅助的组织液化可提供正常组织的定量评价和分布。正常组织分布与研究中的组织分布的比较可促进诊断组织微环境的变化（例如，数种蛋白、脂类、核酸、小分子、药物等的上/下调节），组织微环境的变化可指示不同疾病病况，如过敏、心血管疾病、皮炎等。所述方法也可作为工具用于监测组织恢复和评价不同治疗的治疗功效（例如，治疗的监测，其可根据需要或要求与治疗的修改组合）。分析物分布分析方法也可为个人护理行业（例如，化妆品业）提供评价局部制剂的工具。此方法可用于通过将组织液化和测定其中的药物分子而测定药理学参数。以类似的方式，化学物质、生物危险污染物和滥用药物的快速和例行试验也可定量完成。这些方法也可用于致病微菌群的灵敏性检测和诊断。

[0173] 在某些实施方案中,本方法提供正常组织的分布,其中正常组织定义为不存在关注的异常组织病况。能量通过例如超声暴露或磨损,在液化促进剂存在下施加到正常组织。对液化组织样品进行各种试验,以分离和鉴别组织中存在的分析物。

[0174] 在某些实施方案中,可应用这些方法,以促进诊断各种组织疾病,所述疾病的特征是组织微环境变化的定量评价。该评价通过将参比组织的分析物分布(例如,参比分析物分布,其可储存于数据库中)与关注的组织的分析物分布(即,试验分析物分布)比较而进行。当与参比组织之中定量存在或不存在相同分析物比较时,存在于研究中的组织之中的定量存在或不存在某些分析物或分析物集合,将指示存在或不存在特定的疾病,因此促进病况的诊断。参比分析物分布可以是组织的一个特征,已知该特征不受所讨论的疾病影响,或者可以是所讨论的组织的所讨论的疾病的特征参比分析物分布。

[0175] 在一个实施方案中,研究中的组织为皮肤和/或粘膜,并将定量试验分析物分布与参比分析物分布比较,以确定存在或不存在疾病,如过敏、荨麻疹、微生物感染、自身免疫疾病、心血管疾病或癌症。

[0176] 在某些实施方案中,可用此方法监测组织恢复。此监测通过将参比组织的分析物分布与研究中的组织的分析物分布比较而进行。当与参比组织之中定量存在或不存在相同分析物比较时,存在于研究中的组织之中的定量存在或不存在某些分析物或分析物组合物,可以指示组织是否正在恢复到其健康状态。参比组织通常是处于健康状态的组织。

[0177] 在某些实施方案中,可用本方法评价不同治疗的治疗效果,包括关注的组织中治疗剂的生物利用率。可对液化组织样品中的分析物定量,以指示在组织中存在多少分析物。当与参比组织之中定量存在或不存在相同分析物比较时,存在于研究中的组织之中的定量存在或不存在某些分析物或分析物组合物,可以指示给药的治疗剂是否留在特定组织或体内足够长,以实现所需效果。参比组织通常为处于健康状态的组织。

[0178] 在某些实施方案中,可用本文公开的方法评价组织(例如,皮肤)上的治疗制剂,具体地讲,是否制剂(例如,洗剂、乳膏剂、药膏等)的组分在被组织吸收,和是否输送的量是治疗有效的。在某些实施方案中,本文公开的方法可包括闭合回路系统,其中同一系统可施加治疗制剂、使分析物液化、分析分析物分布并因此调节制剂的输送。在此情况下,参比组织为健康组织,或者处于治疗制剂正在治疗的病况的不同恢复水平的组织。

[0179] 在某些实施方案中,可用本方法测定用于测定药剂的药理学参数或功效的分析物分布。存在或不存在某些分析物(例如,免疫系统应答、细胞因子)可用于使药剂的某些剂量与生物参数(包括但不限于生物利用率、AUC、清除率、半衰期)关联。

[0180] 在某些实施方案中,可用本文公开的方法检测存在或不存在某些化学物质,包括但不限于生物危险污染物、战剂、违禁药物、已知药剂等。这些方法用于例如执法、竞技运动中兴奋剂服用的管理、由于暴露于毒素或污染物造成的疾病的暴露和/或风险的评价等。

[0181] 在某些实施方案中,可用本方法检测或诊断致病微生物(例如,细菌、真菌、病毒等)。由于大的变化性和低的提取物分散,导致降低的灵敏性和高的规程依赖性,目前用于组织中微生物诊断的方法(如复制平板接种、拭取和洗涤)没有吸引力。可对液化组织样品进行各种试验,以分离和鉴别组织中存在的微生物分析物。在某些实施方案中,这些试验包括在琼脂板上平板接种。

[0182] 药物输送

[0183] 本发明包括提供方法和装置,所述方法和装置包括组织的液化以控制和提高药物进入或经过组织的通量。该方法包括以下步骤:1) 对受试者需要运输的组织施加能量和液化促进介质;和2) 将一种或多种药物连续或重复送入或送经要液化的组织。该方法可进一步包括在该运输发生期间的时间内使组织重新液化。包括使组织液化的该方法可干扰组织或生物表面的屏障性质,导致降低药物通过的耐性。本发明的优点是提高和控制了转移的速率和效率两者。在施加能量与 LPM 组合时,迫使简单不通过生物表面或以不充分或随时间可变的速率通过的药物进入生物表面。通过控制能量施加的方式、强度和时间和 LPM 的制剂,可控制转移速率。

[0184] 通过同时或随后施加第二驱动力,如化学渗透性或运输增强剂、对流、渗透压梯度、浓度梯度、离子电渗、电穿孔、磁场、超声或机械压力,可调节或增强药物的运输。

[0185] 所公开的方法的增强由利用<sup>3</sup>H-标记的阿昔洛韦和菊粉的以下非限制性实施例证明。能量的所需类型、时间长度和强度及 LPM 的制剂取决于多种因素,包括组织类型和药物性质,这在物种与物种间随年龄、伤害或疾病和在身体上的位置而变化。

#### [0186] 要给予的药物

[0187] 要给予的药物包括多种生物活性剂,但优选为蛋白或肽。具体实例包括胰岛素、促红细胞生成素和干扰素。也可给予其它物质,包括核酸分子(如,反义、siRNA 和基因编码治疗蛋白)、合成有机和无机分子(包括抗炎剂、抗病毒剂、抗真菌剂、抗生素、局部麻醉剂和糖类)。药物一般在具有和水相似的吸收系数的适当药学可接受载体(如,含水凝胶)中给予。或者,可用贴片作为载体。药物可在凝胶、软膏剂、洗剂或悬浮剂中给予。

[0188] 在一个实施方案中,药物以输送装置的形式或封装于输送装置中给予,输送装置如脂质体、脂质囊泡、乳液或聚合的纳米颗粒、微颗粒、微囊或微球(统称为微颗粒,除非另外说明)。这些可由聚合物(如多羟基酸、聚原酸酯、聚酐和聚膦腈)或天然聚合物(如胶原蛋白、聚氨基酸、白蛋白和其它蛋白、藻酸盐和其它多糖和它们的组合)形成。微颗粒可用增强渗透的材料涂覆或形成,所述材料如亲脂材料或亲水分子,例如聚氧化烯聚合物和缀合物(如聚乙二醇)。

#### [0189] 药物的给予

[0190] 药物优先用提到的液化装置在基于对患者的便利以及实现所需的治疗结果而选择的部位给予患者。多种组织(包括生物表面)良好地适用于本方法。这些组织包括但不限于皮肤、粘膜(鼻、肠、结肠、口腔、肠、阴道等)。在一个实施方案中,本发明的方法优先给予脸、臂、手、腿、背或任何其它位置的皮肤。虽然皮肤非常易于进行液化,但在本公开中描述的装置可设计成容易地适应以上所列的各种内部膜。

[0191] 在一些实施方案中,要给药的组织是患病组织,如感染的器官、发炎的组织和实体瘤。在某些实施方案中,本发明包括对患病组织附近的健康组织和/或患病组织使用液化装置,并且使药物输送跨过健康组织和/或进入疾病部位。类固醇(如皮质类固醇)和很多化疗剂(包括磷酸雌莫司汀、紫杉醇和长春碱)具有潜在的严重副作用。因此,如果全身给药,它们可能引起不需要的副作用。此问题通过将这些药物局部输送到疾病组织而克服。其它指示包括将药物输入异常皮肤,如银屑病、特应性皮炎和疤痕。

[0192] 在一些实施方案中,本发明用于增强化合物(如大分子量或极性分子)经过组织(如皮肤、粘膜(鼻、肠、结肠、口腔、肠、阴道等))的通路。更大的控制和药物利用通过增大

所施加的药物的速率和方向控制而实现。快速进入血流的药物的百分数因此增大，并且避免不需要的副作用。经过上述组织的药物以最佳速率注入血流。

[0193] 用于药物输送的液化促进介质 (LPM)

[0194] LPM 也是用于药物输送的重要组分。用于药物输送的 LPM 的设计在某种程度上与用于样品收集的 LPM 重叠。LPM 可设计成用于以下五种用途中的一种或多种 :a) 它使能量偶合到组织, b) 它促进组织的液化, c) 它储存要输入组织的药物, d) 它增大药物的溶解性, 和 e) 它抑制药物的降解, 以便保持它们的生物或化学活性。

[0195] 在组织液化过程之前或期间, LPM 也可包含药物。在供选的实施方案中, 可将施加能量和排除药物的 LPM 用于将组织液化, 随后, 可将适当载体 (如贴片) 中的药物用于要液化的组织的部位上。

[0196] 试剂盒

[0197] 本公开还包括用于实施本方法的试剂盒。本主题试剂盒可包括例如使关注的组织液化的整个能量施加装置和液化促进剂, 用于进行试验以检测和分析 (定性或定量) 通过本文公开的方法产生的液化组织样品中存在或不存在组织分析物的试剂。试剂盒的不同组分可存在于单独的容器中, 或者某些相容的组分可根据需要在单一容器中预先组合。

[0198] 除了上述组分外, 试剂盒一般还包括用试剂盒的组分实施所述方法的说明书。用于实施主题方法的说明书一般记录在适合的记录介质上。例如, 说明书可印刷于基材 (如纸或塑料等) 上。因此, 说明书可作为包装插页存在于试剂盒中, 存在于试剂盒或其组分的容器的标签上 (即, 与包装或分包装结合) 等。在其它实施方案中, 说明书作为电子储存数据文件存在, 存在于适合的计算机可读存储介质 (例如 CD-ROM、软盘等) 上。在其它实施方案中, 实际说明书不存在于试剂盒中, 但是提供用于从远程源 (例如, 通过互联网) 得到说明书的方法。此实施方案的实例为包括网址的试剂盒, 在网址上可看到说明书和 / 或从网址可下载说明书。与说明书一样, 得到说明书的这种方法记录在适合的介质上。

## 实施例

[0199] 提出以下实施例是为了向本领域普通技术人员提供如何制造和使用本发明的完全公开和说明, 而不旨在限制发明人认为是其发明的范围, 它们也不旨在表示以下实验为进行的全部或唯一实验。虽然已努力保证关于所用数字 (例如量、温度等) 的精确度, 但应考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明, 份数为重量份, 分子量为重均分子量, 温度为°C, 压力在或接近大气压。

[0200] 虽然已参考其具体实施方案描述了本发明, 但本领域技术人员应理解, 在不脱离本发明的真实精神和范围下, 可进行各种变化并可用等价体代替。另外, 可作出很多修改以使特定情况、材料、物质组成、方法、方法步骤或步骤适应本发明的目的、精神和范围。所有这些修改旨在属于权利要求的范围内。

[0201] 实施例 1

[0202] 通过基于磨料能量的装置皮肤取样

[0203] 参考图 7a 至 7e, 这些图描述用于皮肤组织取样的基于磨料能量的组织液化装置。装置从以下三个组件组装 -751 (含有电动机 704 和电导率组件 705 和 706 的装置壳 701 的组合件) ;752 (LPM 筒 708、收集容器 707 和针 709 的一次性组合件) ; 和 753 (LPM 壳 712、磨

料垫 711 和轴 710 的一次性组合件)(图 7a)。将组装的装置对着皮肤 713 上预先鉴别的关注区域放置,使得磨料垫 711 面对皮肤 713(图 7b)。将位于装置顶部的滑动活塞 702 推向皮肤,这将针 709 推入 LPM 筒 708,破坏其无菌密封,并将 LPM 转移到壳 712 中。滑动活塞 702 也通过电池组 703 对电动机 704 供电,将轴 710 和磨料垫 711 设置为对着皮肤组织 713 旋转运动。由于皮肤组织液化,组织组分溶于壳 712 中所含的 LPM 中。皮肤组织 713 的电导率也同时用固定到轴 710 的滑动接触 705 作为测量电极和参比电极 706 测量。一旦通过阈值电导率测定达到安全能量暴露限度,电动机 704 停止。进一步将滑动活塞 702 推向皮肤,使得针 709 刺破预抽真空的样品容器 707,将样品从壳 712 吸到它里面(图 7d)。将装置从皮肤移走并拆开。将装置组件 752 进一步拆开,并处理样品容器 707 用于分析物的检测。

[0204] 实施例 2

[0205] 通过基于微针的装置皮肤取样

[0206] 参考图 8a 至 8d,这些图描述用于皮肤组织取样的基于微针的组织液化装置。将装置对着皮肤 807 上预先鉴别的关注区域放置,使得具有微针的贴片 805 面对皮肤 807(图 8a)。将位于装置顶部的滑动活塞 801 推向皮肤 807,以便挤压浸透 LPM 的海绵 804,并将 LPM 释放到壳 803 中(图 8b)。因此,贴片 805 中的微针和在皮肤界面的壳 803 用 LPM 填充。为了开始液化过程,将滑动活塞 801 进一步推入皮肤组织 807 中,导致微针 805 插入皮肤组织 807(图 8c)。由于皮肤组织液化,组织组分溶于壳 803 中所含的 LPM 中。在完成皮肤液化时,将预抽真空的样品容器 802 推向皮肤组织 807,使得针 806 刺破样品容器 802,导致样品从壳 803 吸到它里面(图 8d)。将装置从皮肤移走并拆开。收回样品容器 802 用于分析物分析,并将其余装置组件处理掉。

[0207] 实施例 3

[0208] 用于捕获组织分析物的储存器壳

[0209] 参考图 9(图片 a-d),图 9 描述用于从液化组织样品捕获组织分析物的储存器壳的设计。储存器壳(901)旨在与本文描述的能量施加装置一起使用,作为容器收集液化组织样品。该壳用捕获基质(902)涂覆,捕获基质(902)选择性结合样品中存在的组织分析物(903)。在充分培育组织样品后,将样品弃去,同时使分析物(903)保留在壳中。分析物由壳中的洗脱缓冲剂洗脱,用于随后捕获分析物作为单独的样品(904)。或者,可将壳整合在分析工具中用于分析结合的分析物(903)。

[0210] 实施例 4

[0211] 用于增强的组织溶解和蛋白功能性保持的表面活性剂制剂

[0212] 鉴别独特的表面活性剂制剂组成根据本文公开的定义的液化促进介质(LPM)。用属于以下四个不同种类的 19 种表面活性剂产生 153 种二元表面活性剂制剂库:(i) 阴离子表面活性剂(月桂基硫酸钠(SLS)、十二烷醇聚醚硫酸钠(SLA)、十三烷基磷酸钠(TDP)、去氧胆酸钠(SCD)、癸酰基肌氨酸钠(NDS)、月桂酰基肌氨酸钠(NLS)、棕榈酰基肌氨酸钠(NPS));(ii) 阳离子表面活性剂(辛基三甲基氯化铵(OTAB)、十二烷基三甲基氯化铵(DDTAB)、十四烷基三甲基氯化铵(TTAB));(iii) 两性离子表面活性剂(3-[3-胆酰胺基丙基]二甲基铵基]1-丙磺酸盐(CHAPS)、3-(癸基二甲基铵基)丙磺酸盐(DPS)、3-(十二烷基二甲基铵基)丙磺酸盐(DDPS));(iv) 非离子表面活性剂(聚乙二醇十二烷基醚(B30)、

聚氧乙烯 23- 月桂基醚 (B35)、聚氧乙烯 10- 鲸蜡基醚 (B56)、聚氧乙烯 2- 硬脂基醚 (B72)、聚乙二醇油基醚 (B93)、壬基苯酚聚乙二醇醚 (NP9))。只有来自这些种类的少数表面活性剂 (例如非离子表面活性剂) 已传统用于提取功能组织蛋白质组。另外, 这些表面活性剂高度受限于它们有效溶解组织成分的能力。因此, 在所有表面活性剂类型中, 组织成分的提取潜力和生物活性保持在很大程度上被认为是互相冲突的性质。通过使非离子表面活性剂与以前对其高溶解能力描述的其它类型表面活性剂 (阴离子、阳离子和两性离子表面活性剂) 组合, 我们显示了同时具有优良的溶解以及不变性能力的新的表面活性剂制剂家族的发现。

[0213] 首先筛选表面活性剂, 以鉴别保持提取物蛋白生物活性的不变性的表面活性剂制剂, 随后对制剂溶解组织蛋白的能力分级。图 10a 显示 153 种表面活性剂制剂保持模型蛋白-IgE 抗体的特异性功能性的效力。具体地讲, 试验 IgE 抗体与卵白蛋白的结合能力。此图中的 x 轴表示对各个二元制剂唯一的制剂序号。y 轴表示 % IgE 生物活性保持, 其定义为, 和表面活性剂在纯溶剂 (磷酸盐缓冲盐水, PBS) 中时的 IgE 结合活性相比, 在表面活性剂制剂中的分数 IgE 结合活性。制剂跨越宽范围的变性可能性。令人惊讶的是, 在与较温和的非离子表面活性剂组合时, 增大数量的变性表面活性剂得到 IgE 功能性保持的高度协同增加。发现在所有二元表面活性剂制剂中平均的不变性潜力显著高于它们的单一表面活性剂制剂成分 ( $p < 0.006$ ; 双尾异方差的斯氏 (student's) t- 试验); 进一步证明独特的协同相互作用。

[0214] 对于显示高生物活性保持 ( $> 90\%$ ) 的表面活性剂制剂, 进一步就它们与简短超声处理结合提取组织蛋白的能力进行筛选。用猪皮肤作为这些研究的模型组织。虽然大部分制剂显示接近  $0.1\text{mg 蛋白}/\text{cm}^2$  皮肤组织的提取能力, 但只有一对制剂达到超过  $0.3\text{mg}/\text{cm}^2$  的蛋白提取 (图 10b)。

[0215] 从表面活性剂库筛选的主要候选者总的来说得到异常不变性但比文献中报道的一些最广泛使用的提取表面活性剂更有效地溶解组织的制剂。图 10c 将主要表面活性剂制剂 -0.5% (w/v) DPS-B30 与 1% (w/v) SDS 对于皮肤取样进行了比较。尽管其提取能力适中 ( $0.16 \pm 0.07\text{mg}/\text{cm}^2$ ), 但 SDS 高度变性, 这导致低功能蛋白回收率 (保持的分数生物活性和总提取蛋白的乘积)。相反, 0.5% (w/v) DPS-B30 制剂不仅提取更多的皮肤蛋白 ( $0.48 \pm 0.12\text{mg}/\text{cm}^2$ ), 而且保持蛋白活性, 总计相对于 SDS 比预期功能蛋白回收提高超过 100 倍。类似地, 相对于一般使用的不变性表面活性剂 1% (w/v) Triton X-100 和 PBS, 实现了大于 10 倍的蛋白回收。

[0216] 实施例 5 :

[0217] 应力下的生物活性保持

[0218] 我们显示独特的表面活性剂制剂或 LPM (由实施例 1 中所述的方法鉴别) 另外在应力下保护多种分析物。我们具体显示通过使用独特的表面活性剂制剂, 机械能 (如超声暴露 (一般已知的对生物分子的变性剂)) 的变性作用可被抵消。

[0219] 在单独的实验中, 将球状蛋白 (IgE) 和两种代表性酶 (乳酸脱氢酶 (LDH) 和  $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -Gal)) 溶于 0.5% (w/v) DPS-B30 表面活性剂制剂, 并超声处理, 以测定随时间的蛋白生物活性保持。溶于盐水 (PBS) 的蛋白作为比较性对照制备。对溶于 PBS 的 IgE 观察到功能性的渐进式急剧减小, 然而令人惊讶的是, 0.5% (w/v) DPS-B30 制剂延长对 IgE

蛋白针对超声变性应力的保护（图 11a）。不考虑超声处理，溶于 SDS 的 IgE 显示完全变性状态。对在 0.5% (w/v) DPS-B30 制剂中制备的 LDH 和  $\beta$ -Gal 的酶活性延长保持观察到类似趋势（图 11b）。在 PBS 中的蛋白制品导致生物活性显著损失 ( $p < 0.006$ ; 双尾异方差的斯氏 t- 试验)，在 3 分钟超声处理后总计分数生物活性为 16.7% (IgE)、70.8% (LDH) 和 68.7% ( $\beta$ -Gal)。

[0220] 实施例 6

[0221] 组织取样和分子诊断

[0222] 本实施例证明在 LPM(0.5% (w/v) DPS-B30 的盐水溶液) 存在下超声暴露从组织取样多种功能疾病生物标志的能力。

[0223] 本实施例证明从对蛋过敏的小鼠的皮肤取样过敏特异性 IgE 抗体。从 Charles River Labs (Wilmington, MA) 购买 6 至 8 周大小的雌性 BALB/CJ 小鼠，并在无病原体的条件下供养。通过皮内 (epicutaneous) 暴露规程诱导小鼠的过敏反应。在用氧中的 1.25–4% 异氟烷麻醉后，削刮小鼠背上的皮肤，然后条剥 (tape strip) 10 次 (Scotch Magic 带, 3M Health Care, St Paul, MN)，以引入标准化皮肤伤害。将用 100  $\mu$ L 0.1% OVA 浸透的纱布贴片 (1cm  $\times$  1cm) 放在背部皮肤上，并用基于透气弹性布的粘合带固定。保持贴片固定 1 个星期。整个实验包括总共 3 次 1 周的暴露，在各个暴露周之间有 2 周间隔。利用最小量的基于氰基丙烯酸酯的粘合剂，通过使定制的凸缘室（皮肤暴露面积 1.33cm<sup>2</sup>）粘合到经削刮的皮肤区域，进行取样。该室用 1.8ml 0.5% (w/v) DPS-B30 表面活性剂制剂填充，并以 50% 占空系数，2.4W/cm<sup>2</sup> 施加 20kHz 超声 5 分钟。得到经超声处理或未经处理的湿疹皮肤部位的皮肤活组织检查，并制备皮肤均浆样品作为正对照。图 12a 显示与健康小鼠比较，超声辅助取样从过敏小鼠皮肤成功取样显著更大量的过敏特异性 IgE 抗体。如预料的，在来自过敏和健康小鼠皮肤的样品中 IgG 抗体的量见不到差异。

[0224] 本实施例也证明从小鼠皮肤取样胆固醇。利用以上段落中所述的类似程序，利用超声程序收集皮肤样品。从未经处理的皮肤收集的活组织检查制备皮肤均浆作为正对照。皮肤胆固醇为诊断心血管疾病 [I] 的重要生物标志。图 12b 显示超声辅助取样从皮肤成功取样胆固醇，取样的量可与皮肤均浆中存在的胆固醇相比。

[0225] 最后，证明从猪皮肤取样细菌基因组。通过不同的微生物组（包括细菌、真菌和病毒）[2–5] 拓殖组织，特别是皮肤和粘膜。精确诊断细菌感染导致适当的患者处理，为预测提供信息，并允许使用窄谱抗生素 [6–8]。因此，确定的微生物检测对诊断是十分重要的，该诊断用于感染的治疗和与微生物感染有关的疾病爆发的溯源。然而，精确得到代表皮肤上的微生物的样品是个主要挑战 [2]。最实际的收集方法是拭取，因为它简单、快速、非侵害 [3,9]。然而，拭取有几个限制，包括不良的微生物回收，并且缺乏标准化规程，这显示它不精确代表皮肤上的微生物，或者不提供定量数据。超声辅助取样可有效解决这些限制。特别地，通过用在盐水 (PBS) 中浸透的棉球拭取，并通过在单独的实验中用 0.5% (w/v) DPM-Brij30 作为 LPM 的超声辅助取样，可对切除的猪皮肤取样。通过标准苯酚 – 氯仿提取方法，从各个样品纯化细菌基因组。简而言之，首先在溶液中在 37°C 培育样品 30 分钟 [9]，所述溶液由 20mM Tris (pH 8.0) (BP154-1, Fisher Scientific)、2mM EDTA (BP120-500, Fisher Scientific)、1.2% Triton X-100 (BP151-100, Fisher Scientific) 和 20mg/ml 溶菌酶 (62970-1G-F, Sigma-Aldrich) 组成。随后，在溶液中在 37°C 培育该样品 3 小时，

所述溶液由 0.1mg/ml 蛋白酶 K(P2308-25MG, Sigma-Aldrich)、0.5% (w/v) 月桂基硫酸钠(S529, Fisher Scientific) 和 100mM 氯化钠(BP358-1, Fisher Scientific) 组成。然后，用相等体积的苯酚 (P4557, Sigma-Aldrich) 提取基因组 DNA，随后用苯酚 / 氯仿 / 异戊醇 25 : 24 : 1 (P2069, Sigma-Aldrich) 提取。通过用乙醇培育并离心 20 分钟使 DNA 沉淀。用 70% 乙醇洗涤 DNA 颗粒两次，使之干燥，并重新悬浮于 80 μl 的 tris 缓冲剂中。由各种方法取样的细菌量通过使用定量聚合酶链反应 (qPCR) 测定各个样品中保存的 16S 细菌基因的存在而评价。图 12c 显示，与常规棉拭取程序相比，超声辅助取样从皮肤取样至少 7 倍高的细菌基因组量。

[0226] 实施例 7

[0227] 与基于核酸的试验相容的 LPM 的缓冲剂设计

[0228] 为了保证液化组织样品与随后分析的相容性，必须小心选择 LPM 的组分。试验数种 LPM 组分与基于核酸的分析技术的相容性。具体地讲，通过测量试验使不同 LPM 中加入的质粒 DNA 放大的能力，评价 LPM 组分与 qPCR (最普通的基于基因的试验) 的相容性。

[0229] 将荧光素酶质粒 (E 1741, Promega Corp.) 的一千万个拷贝穿刺 (spike) 于 10 μl 不同的溶液中：(i) 水，(ii) 水中的 0.91% (w/v) 氯化钠 (BP358-1, Fisher Scientific)，(iii) PBS (P4417, Sigma-Aldrich)，(iv) 10mM Tris-HCl, pH7.9 (BP154-1, Fisher Scientific)，(v) 0.075M 磷酸钠缓冲剂，pH 7.9，衍生自磷酸二氢钠一水合物和磷酸氢二钠 (S9638-25G, S7907-100G, Sigma-Aldrich)，和 (vi) 水中的 0.5mM EDTA (BP120-500, Fisher Scientific)。将溶液与 10 μl PCR 反应缓冲剂混合。荧光素酶放大引物对于正向引物为 5' -GCC TGA AGT CTC TGA TTA AGT-3'，对于反向引物为 5' -ACA CCT GCG TCG AAG-3'，产生 96bp 的扩增子 [10]。放大反应在 20 μl 溶液中进行，所述溶液含有 1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 μM (各自) 引物和 PCR 缓冲剂中的 0.2mM dNTP 以及 0.025 单位 / μl Taq 聚合酶 (10966-034, Invitrogen) 和 1 : 45,000 的 SYBR- 绿 (S-7563, Invitrogen)。将质粒 DNA 的等分试样稀释于水中以产生标准曲线。使用光学级 96 孔板在 iCycler PCR 机 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 上进行分析。反应的热循环设置如下：最初在 95°C 变性 3 分钟，随后 40 个以下循环：在 95°C 变性 30 秒，在 60°C 退火 30 秒和在 72°C 伸长 30 秒，所有都随后在 72°C 最后延长 10 分钟。对各个样品进行三次重复。对于各个缓冲剂，通过与对照（在水中的质粒 DNA）比较而计算相容性。

[0230] 图 13 显示，与对照比较，氯化钠、PBS 和磷酸钠缓冲剂作为定量 PCR 试验的检测缓冲剂不相容。然而，用 tris-HCl 或 EDTA 作为缓冲剂增大分析试验的检测能力。

[0231] 实施例 8

[0232] LPM 与基于核酸的试验的相容性

[0233] 试验多种 LPM (实施例 1 中公开) 与现存的基于核酸的试验的相容性。具体地讲，将质粒 DNA 与不同的 LPM 混合，并评价 qPCR 放大 DNA 的能力。通过将不同浓度的表面活性剂加入 10mM Tris-HCl 缓冲剂中制备 LPM。为了模拟本文中公开的组织液化过程，将各个 LPM 与 0.2mg/ml 猪皮肤均浆混合，且每 10 μl LPM 穿刺荧光素酶质粒 (E1741, Promega Corp.) 的一千万个拷贝。将此溶液与 10 μl PCR 反应缓冲剂混合。根据实施例 4 中所述的规程进行 qPCR。将经纯化的质粒 DNA 稀释于 tris-HCl 溶液中以产生标准曲线。通过测定由 qPCR 放大的质粒量，并将它与对照缓冲剂 (tris-HCl 中的质粒 DNA，没有表面活性剂)

比较,计算各个 LPM 的相容性。

[0234] 图 14 显示, Triton X-100、Brij 30、DMSO、OTAB、OTAB-Brij 30 和 DPS-Brij 30 与定量 PCR 高度相容, 然而, 由 NLS 或 NLS-Brij30 组成的 LPM 不能放大 DNA。值得注意的是, DPS-Brij 30 作为 LPM 有效从组织取样生物分子, 保持蛋白活性, 并与分析方法(包括 ELISA、色谱法和 qPCR) 相容。因此, DPS-Brij 30 最合乎需要作为液化促进介质用于分析蛋白、脂类和核酸。已知作为 PCR 促进剂的 Triton X-100 和 DMSO[11] 一致显示有效地产生聚合酶链反应, 然而, 它们不得到令人满意的组织提取。

[0235] 实施例 9

[0236] 用于从组织取样有生活力且基因完整的微生物的超声参数的鉴别

[0237] 本实施例描述从组织有效收集活微生物的超声的非致死条件。通过向组织施加不同形式的能量, 可从组织收集微生物, 然而, 使用高能量对微生物的生活力非常有害。因此, 找到用于取样活微生物的非致死能量施加条件十分重要。我们描述用于从皮肤取样有生活力且基因完整的细菌的超声暴露条件。

[0238] 在 Luria-Bertani (BP1426, Fisher Scientific) 中在 37°C, 250rpm, 或者在琼脂板 (37°C) 上作为固体培养物, 生长 E.Coli 菌株 DH10  $\alpha$  (18290-015, Invitrogen) 的细菌培养物。通过离心收获培养物, 并使所得颗粒以  $10^9$  个细胞 /ml 的浓度悬浮于包含 10mM Tris-HCl, pH7.9 的 LPM。E.Coli 细胞用分光光度计 (Biophotometer, Eppendorf) 定量, 并将  $0.25 \times 10^9$  个细胞 /ml 的细菌培养物认为是相当于在 600nm 波长 0.25 的光密度吸光度值。将 1ml 重新悬浮的细胞放入经灭菌的圆筒形容器 (内径 20mm, 平底, 1.3mm 壁厚度, 31mm 高度)。所有实验用以 20kHz 频率在 50% 占空系数操作的 600 瓦超声仪 (Sonics & Materials, Newtown, CT) 进行。在此实验中改变超声暴露的功率设定和时间。将换能器降低进入容器, 直到探测器浸入流体距离底部 5mm。在对不同样品的超声处理程序之间通过 70% 乙醇对换能器灭菌。超声处理后, 在 10mM Tris-HCl (pH 7.9) 中制备各个样品的 10 倍连续稀释。将来自各个稀释步骤的 100ul 样品平板接种到 Luria-Bertani 琼脂上, 并用无菌扩散器扩散。将板在 37°C 培育 24 小时, 并在琼脂板的表面上进行活菌菌落计数。将结果表示为相对于非超声处理对照的生活力减小百分数。为了评价暴露于超声的样品中细菌基因组的完整性, 进行电泳。所有样品在 56°C 在蛋白酶 K (19131, Qiagen) 和 0.5% (w/v) 月桂基硫酸钠 (S529, Fisher Scientific) 中培育。在培育 1 小时后, 用 DNeasy DNA Extraction Kit (69504, Qiagen) 提取总基因组 DNA。所有随后步骤遵循试剂盒的标准规程。使经纯化的基因组 DNA 重新悬浮于 400  $\mu$ l Buffer AE, 并在 -20°C 储存, 直到分析。使经纯化的 DNA 在 100V 在 2% (w/v) Tris-乙酸盐-EDTA-琼脂糖凝胶中电泳 90 分钟。凝胶用 SYBR Gold (S11494, Invitrogen) 染色, 并在 UV 光下目视。

[0239] 图 15 显示, 暴露于强度为  $1.7\text{W}/\text{cm}^2$  的超声最多 2 分钟的 E.coli 的生活力对于未经处理的 E.coli 样品的生活力在统计上微不足道。这表明这些超声液化条件可用于取样细菌而没有较大生活力损失。然而, 在较高功率输出超声处理的样品随着施加时间显示较快的减小, 并且与未经处理的细胞比较, 细胞生活力显著不同。即使在较高强度暴露 1 分钟后, 生活力降低到 3.6% ( $p < 0.05$ )。此观察与通过电泳评价的细菌基因组完整性 (图 16) 一致。在  $1.7\text{W}/\text{cm}^2$  超声处理 2 分钟 (显示保持细胞生活力的条件) 时, 没有观察到对细菌基因组的伤害; 然而, 相反, 通过它们迁移到凝胶的较低分子量部分可以看到, 在  $1.7\text{W}/\text{cm}^2$

$\text{cm}^2$ (32% 生活力) 和  $2.4\text{W}/\text{cm}^2$ (8% 生活力) 强度超声处理 3 分钟的 E. coli 细胞的基因组 DNA 高度碎裂。这些结果表明, 收集活细菌应在  $1.7\text{W}/\text{cm}^2$  超声强度最多 2 分钟进行。

[0240] 实施例 10

[0241] 检测来自组织的活微生物

[0242] 与 LPM(tris-HCl 缓冲剂) 偶合的超声能量的简短暴露可从皮肤取样有活力的细菌。通过超声取样的皮肤细菌由常规菌落计数试验以及实时定量 PCR 定量, 并通过与标准取样方法(如拭取和表面活性剂擦洗技术)比较而评价。

[0243] 对猪皮肤进行体外实验以评价皮肤驻留细菌的取样。以  $10\text{cm} \times 25\text{cm}$  条从 Lampire Biological Laboratories Inc., PA 获得从 Yorkshire 猪的侧腹区域收获的预切割的冷冻全厚度猪皮肤。将皮肤在  $-70^\circ\text{C}$  储存直到实验。将没有可见缺陷(如擦痕和磨损)的皮肤片在室温解冻, 切成小片( $2.5\text{cm} \times 2.5\text{cm}$ ), 并安装在 Franz 浸出罐(Permegear, Hellertown, PA, USA) 上。将浸出罐的受体室用磷酸盐缓冲盐水(PBS)(P4417, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)填充, 供体室(皮肤暴露面积  $1.77\text{cm}^2$ )用  $1\text{ml}$   $10\text{mM}$  Tris-HCl 缓冲剂(pH 7.9)(这也作为超声换能器和皮肤之间的偶合流体)填充。将超声换能器放在距离皮肤表面  $5\text{mm}$ , 并施加  $1.7\text{W}/\text{cm}^2$  的超声强度 2 分钟。在对不同样品的实验之间用 70% 乙醇将探测器消毒。作为比较性对照, 通过对皮肤拭取而得到样品。在使用前, 将棉签(B4320115, BD Diagnostics)在经灭菌的磷酸盐缓冲盐水中浸透。通过将围绕  $3.3\text{cm}^2$  面积的经灭菌的金属环保持在皮肤表面上, 使样品部位的面积标准化。将皮肤表面轻轻地重复擦拭约 20 秒。各个棉签用  $1\text{mL}$  PBS 提取。也通过 Williamson 和 Kligman[2,12] 的表面活性剂擦洗技术取样皮肤细菌。将无菌金属环牢固地对着皮肤表面保持, 并将  $1\text{ml}$   $0.075\text{M}$  磷酸盐缓冲剂(pH 7.9)中的  $0.1\%$  Triton X-100 移液至其中。环内的皮肤表面用 Teflon 细胞刮刀稳固地擦拭 1 分钟, 并将所得样品收集在无菌离心管中。在相同皮肤部位重复此程序另外两次, 并将样品集中在一起。制备各个样品的连续 10 倍稀释, 将来自各个稀释样品的  $100\mu\text{l}$  等分试样放在 Tryptic Soy 琼脂板(90002, BD Diagnostics)上[12]。随后, 将板在有氧条件下在  $37^\circ\text{C}$  培育 24 小时, 并将菌落计数, 以通过计算菌落形成单位/单位面积取样皮肤(CFU/ $\text{cm}^2$ )得到提取效率的估计。为了对总细菌定量, 基于 16S rRNA 基因的扩增子进行实时定量 PCR。首先, 将所有生物样品在酶促裂解缓冲剂( $20\text{mM}$  Tris, pH 8.0,  $2\text{mM}$  EDTA,  $1.2\%$  Triton X-100)和溶菌酶( $20\text{mg}/\text{mL}$ )的制剂中在  $37^\circ\text{C}$  培育 30 分钟[9]。随后, 将样品在  $56^\circ\text{C}$  在 Buffer AL 和蛋白酶 K(来自 DNeasy DNA Extraction Kit(Qiagen))中培育 1 小时。所有随后步骤遵循试剂盒的标准规程。通过用相等体积的无水异丙醇培育, 然后离心 20 分钟, 使通过 Buffer AE 洗脱的 DNA 沉淀。用 70% 乙醇洗涤 DNA 颗粒一次, 使之干燥, 并重新悬浮于  $80\mu\text{l}$  Buffer AE 中。也在 PBS 中用未经处理的无菌棉签制备负对照。使用光学级 96 孔板, 在 iCycler PCR 机(Bio-Rad Laboratories, Inc.)上进行 16S 基因的分析。用正向引物 63F( $5' -\text{AGAGTTGATCCTGGCTCAG}-3'$ )和反向引物 355R( $5' -\text{GACGGCGGTGTGTRCA}-3'$ )放大部分细菌 16S 基因[9,13]。通过从  $10\mu\text{l}$  Buffer AE 中已知量的 E. Coli 细胞放大基因组 DNA 的连续稀释, 建立标准曲线。将  $10\mu\text{l}$  纯化的 DNA 与  $2\text{pmol}$  各个引物和 Platinum PCR Supermix(11784, Invitrogen)混合到  $20\mu\text{l}$  的最终反应体积。热循环设置如下:最初在  $94^\circ\text{C}$  变性 5 分钟, 随后 32 个以下循环:在  $94^\circ\text{C}$  变性 30 秒, 在  $66^\circ\text{C}$  退火 30 秒和在  $72^\circ\text{C}$  伸长 30 秒, 所有都随后在  $72^\circ\text{C}$  最后延长 10 分钟。对各个样品进行三次重复。

[0244] 图 17 显示不同技术的取样效力的比较。图 17a 显示,与棉签拭取相比,超声取样从皮肤回收约 17 倍高的细菌数 ( $p < 0.05$ )。值得注意的是,通过超声收集的细菌总数的计数不显著不同于正对照(表面活性剂刮擦法)。使用基于放大 16S rRNA 细菌基因的定量实时 PCR,进一步试验超声取样的效率(图 17b)。一致地,超声收集  $1.7 \times 10^4$  个细菌 /  $\text{cm}^2$ ,这显著高于拭取 ( $4.5 \times 10^3$  个细菌 /  $\text{cm}^2$ ),并相当于擦洗技术 ( $1.6 \times 10^4$  个细菌 /  $\text{cm}^2$ )。

[0245] 实施例 11

[0246] 用灵敏性增强剂促进检测 LPM 中的人 IgE。

[0247] 本实施例试验灵敏性增强剂促进检测模型分析物 - 人 IgE 抗体(它溶于模型 LPM-PBS 中的 1% w/v NLS-Brij 30)的能力。用 ELISA 试验评价 LPM 中存在或不存在灵敏性增强剂时人 IgE 抗体的检测。具体地讲,96 孔 ELISA 板的每个孔涂覆对人 IgE 抗体特异性结合的 1 微克抗体(A80-108A, Bethyl laboratory, TX)。将人 IgE(RC80-108, Bethyl laboratory, TX) 溶于具有或不具有 0-100ng/ml 浓度的灵敏性增强剂的 LPM。作为正对照,通过溶于标准稀释剂制备人 IgE 样品,所述标准稀释剂含有 50mM Tris 缓冲盐水(T6664, Sigma-aldrich, MO) 中的 1% w/v BSA 和 0.05% w/v Tween 20(P7949, Sigma-aldrich, MO), 它常用于免疫试验。配制两种灵敏性增强剂:PBS 中的 10% BSA 和 0.5% Tween 20, 和 50mM Tris 缓冲盐水中的 10% BSA 和 0.5% Tween 20。将这些灵敏性增强剂各自单独加入到含有 1 : 10 比率的 IgE 的 LPM 中。在用标准阻断缓冲剂在 ELISA 板培育 30 分钟后,将这些样品在单独孔中培育 1 小时。在洗涤孔后,在各个孔中培育 1 微克 / ml 浓度的 HRP-缀合 - 二级抗体 1 小时。在洗涤后,用分光光度计测量各个试验情况的基于 HRP 的化学发光信号(由基质 54-61-00, KPL, MD 诱导),该信号表示 ELISA 的 IgE 抗体检测能力。

[0248] 图 18 绘制来自不同试验情况的化学发光信号强度作为分析物浓度的函数。结果显示,与正对照比较,LPM 本身不是 ELISA 试验的适合检测试剂。然而,将灵敏性增强剂加入 LPM 增大分析试验的检测能力。另外显示,在将它们作为溶剂用于制备灵敏性增强剂时,与磷酸盐缓冲盐水比较,tris- 缓冲盐水提高信号强度。这些结果证明 LPM 本身不有效地促进通过 ELISA 检测分析物,然而,加入灵敏性增强剂可显著提高通过 ELISA 检测分析物的能力。

[0249] 前面仅说明本发明的原理。应理解,本领域的技术人员将能够设计各种安排,它们尽管未在本文明确描述或显示,但具体表达本发明的原理,且包括在本发明的精神和范围之内。另外,本文中所述的所有实施例和条件语言主要旨在帮助阅读者理解本发明的原理和发明人为促进此技术所贡献的概念,并且应理解为不限于这些具体叙述的实施例和条件。另外,本文中叙述本发明的原理、方面和实施方案及其具体实施例的所有陈述旨在包括它们的结构和功能等价体两者。另外,这些等价体旨在包括目前已知的等价体和在未来开发的等价体(即,不考虑结构,执行相同功能的研发的任何元素)两者。因此,本发明的范围不旨在受限于本文显示和描述的示例性实施方案。而是,本发明的范围和精神由权利要求具体表达。

[0250] 实施例 12

[0251] 菊粉和阿昔洛韦输入猪皮肤

[0252] 对猪皮肤进行体外药物输送实验。从 Lampire Biological Laboratories Inc., PA 得到从 Yorkshire 猪的侧腹区域收获的预切割的冷冻全厚度猪皮肤。在实验前,该皮肤

在-80°C冷冻箱中储存。使皮肤在室温解冻,将没有可见缺陷(如擦痕和磨损)的皮肤切成小片(2.5cm×2.5cm)。将皮肤片安装在Franz浸出罐(PermeGear, Inc., PA)上。在各个实验前,将受体室用LPM或磷酸盐缓冲盐水(PBS)填充。将PBS中NLS和Brij 30的1% w/v混合物选择为LPM的模型制剂。在各个实验前,测量皮肤的电导率,以保证其完整性。如果初始电导率大于2.2 μA/cm<sup>2</sup>,则认为皮肤受损。使用在20kHz频率和2.4W/cm<sup>2</sup>强度操作的超声仪(VCX 400, Sonics and Materials)施加超声5分钟。在去除LPM或PBS后,将供体室用PBS中的10 μCi/ml菊粉溶液(NET086L001MC, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., MA)填充。在施加超声后24小时,从受体室取出样品。在一个单独的实验中,将旋转磨料表面(具有塑料刚毛的圆刷)引入供体室,以便其直接接触皮肤样品。将10 μCi/ml阿昔洛韦溶液放在皮肤上24小时。皮肤用盐水洗涤并溶于Solvabile(PerkinElmer, MA)。通过闪烁计数器(Tri-Carb 2100 TR, Packard, CT)测量那些样品的浓度。所有实验在室温22°C进行。对对照既不施加超声也不施加磨料装置。误差条指示标准偏差。

[0253] 与完整皮肤上的单独超声和被动扩散两者相比,与LPM组合的5分钟超声照射增大药物运输,如图19(a)所示。在皮肤用包含许多刚毛的移动刷擦装置磨损时,观察到相同效果(图19(b))。总之,体外使用猪皮肤的实施例证明,用LPM施加能量有效促进分子通过或进入组织。可优化参数,如功率、施加时间和LPM的制剂,以相对于组织类型和要运输的物质两者适合个别情况。

[0254] 虽然已连同优选实施方案描述了本发明,但本领域技术人员易于理解,应理解在不脱离本发明的原理和范围下可利用修改和变化。因此,这些修改可在权利要求的范围内实施。

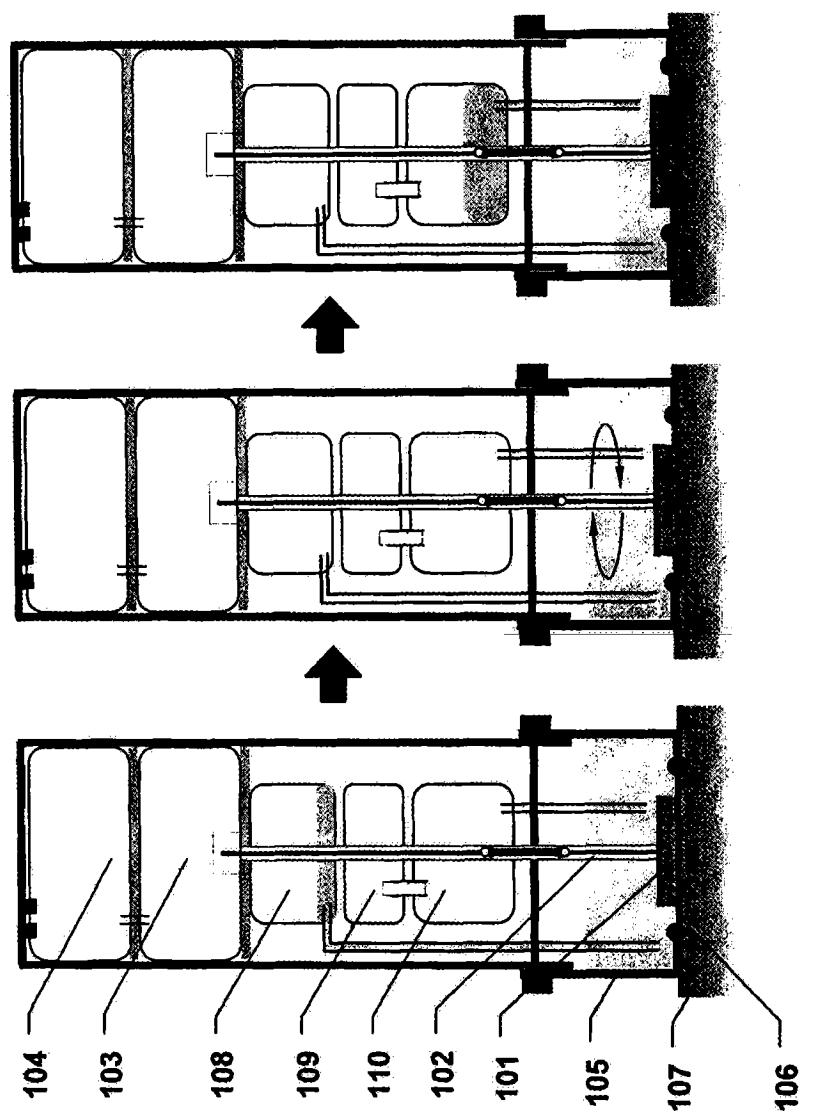


图1c

图1b

图1a

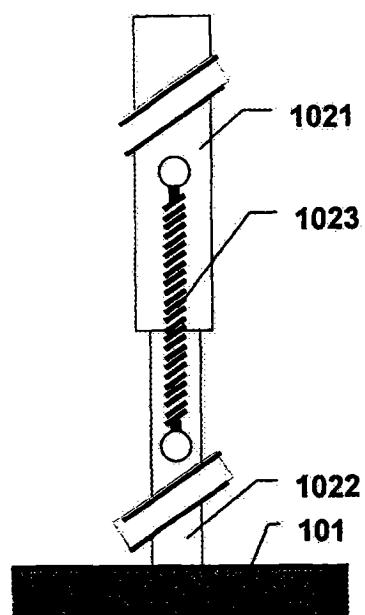


图 1d

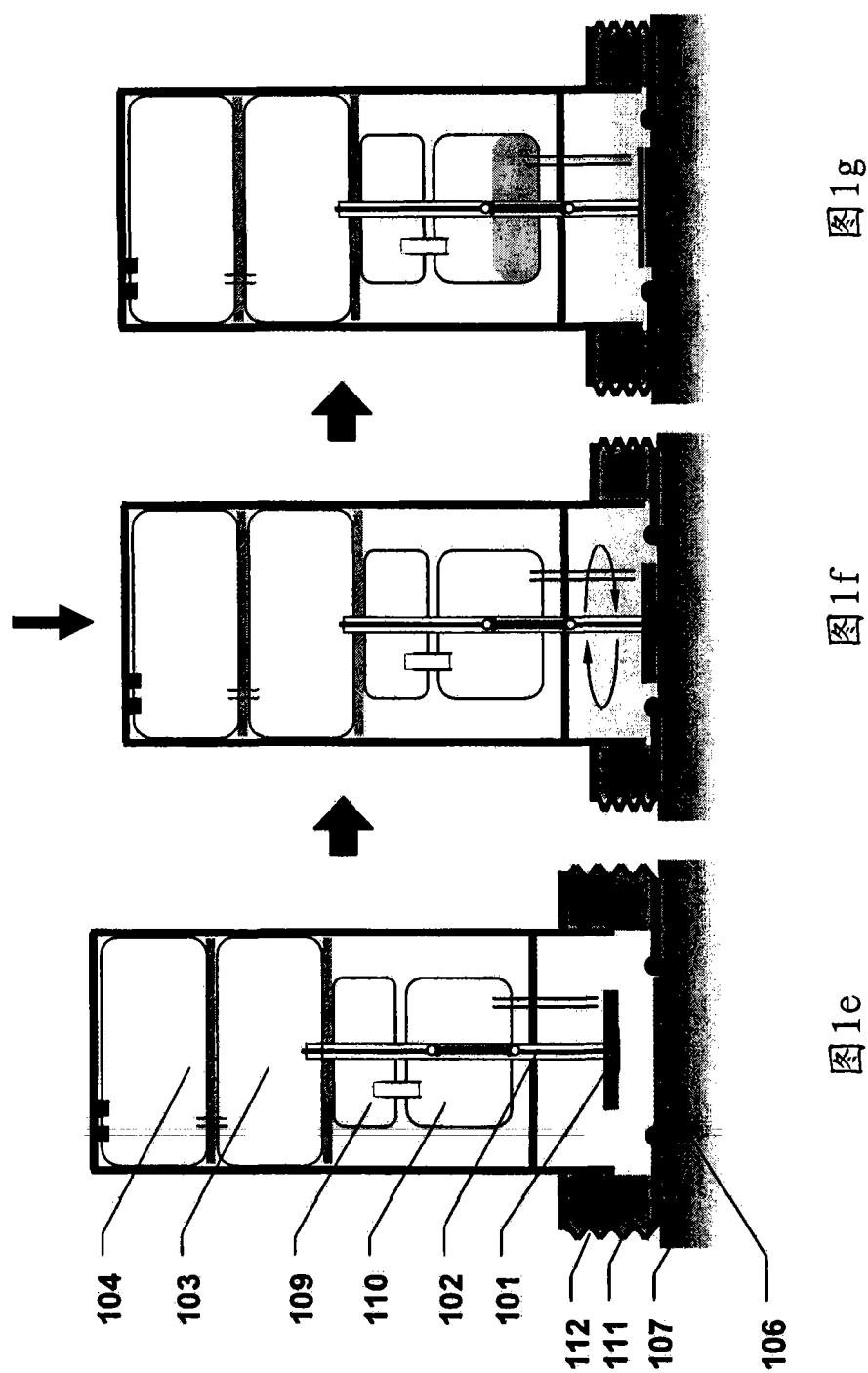


图1g

图1f

图1e

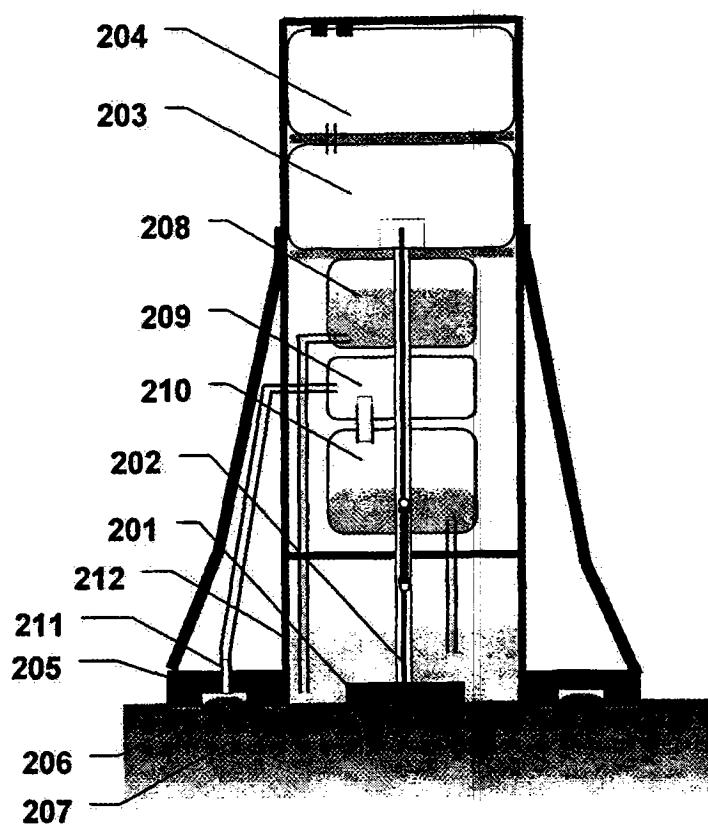


图 2a

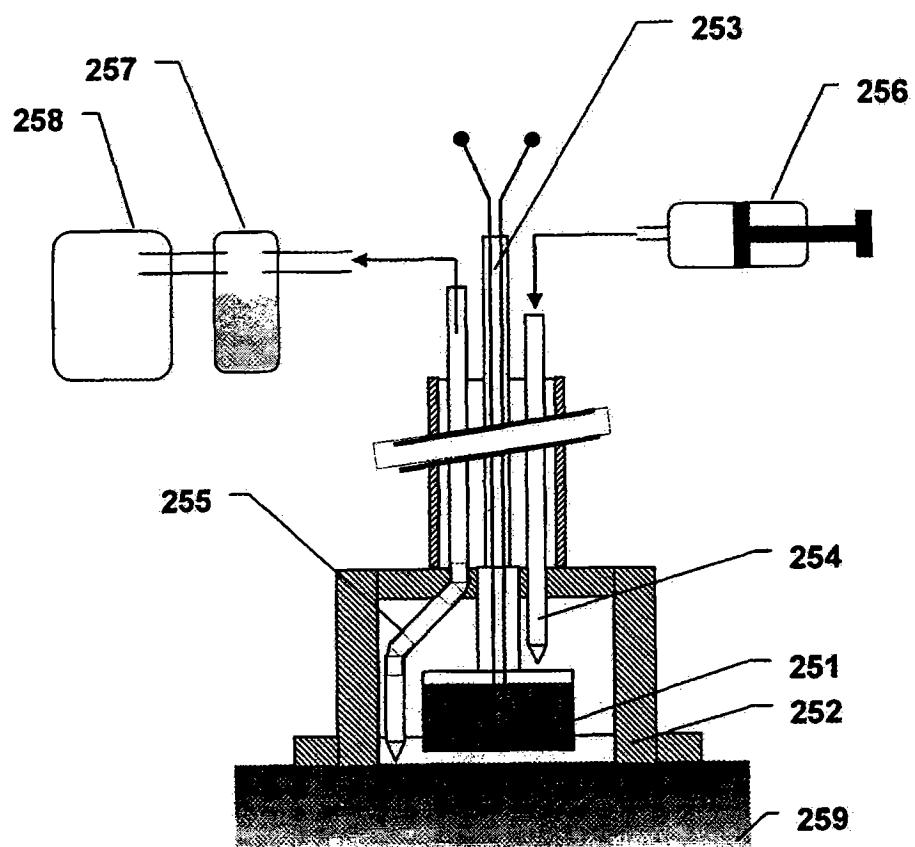


图 2b

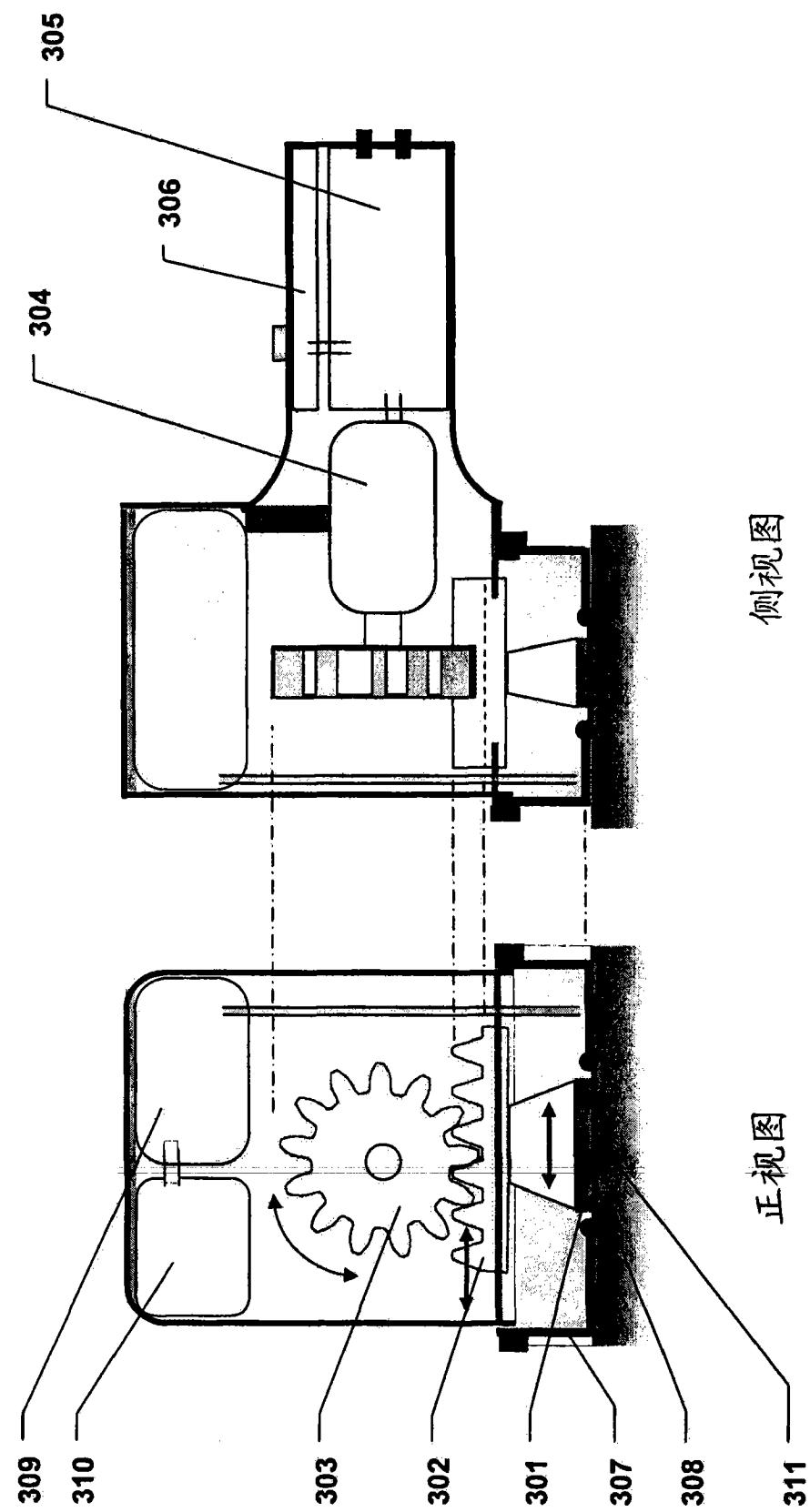


图 3a

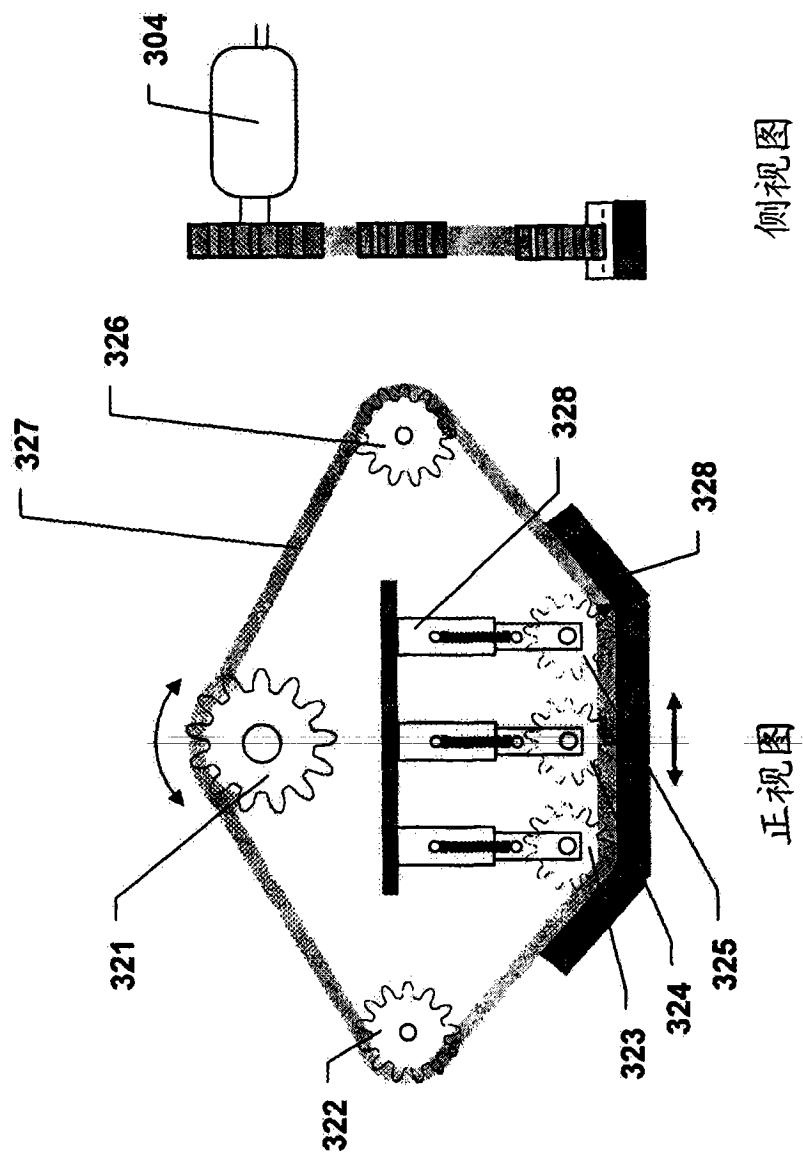
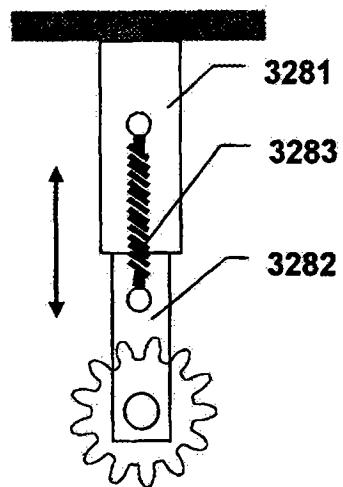


图 3c



正视图

侧视图

图 3b

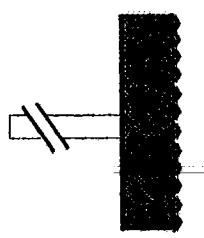


图 4a

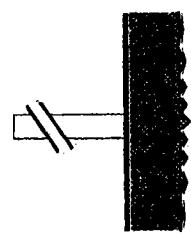


图 4b

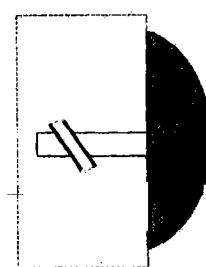


图 4c

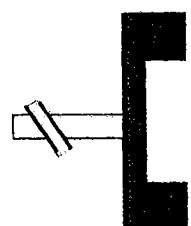


图 4d

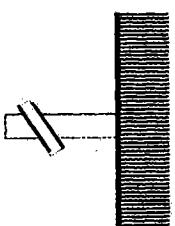


图 4e

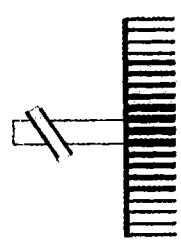


图 4f

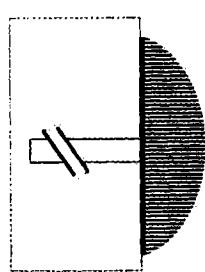


图 4g

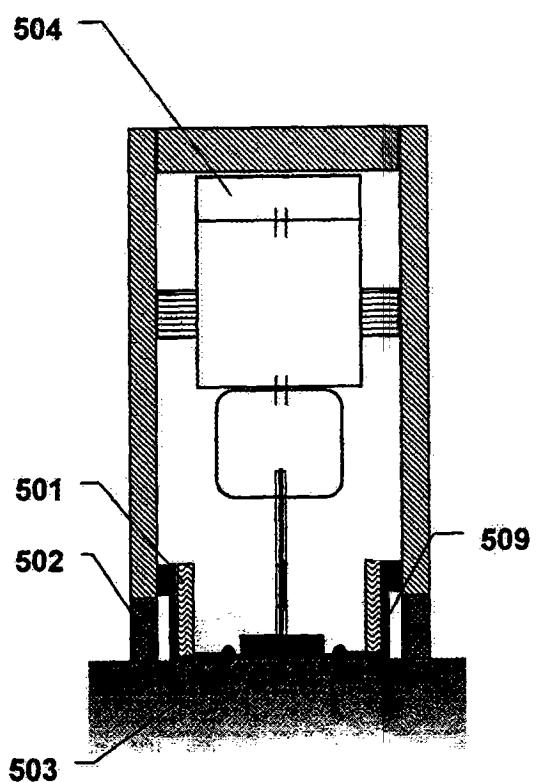


图 5a

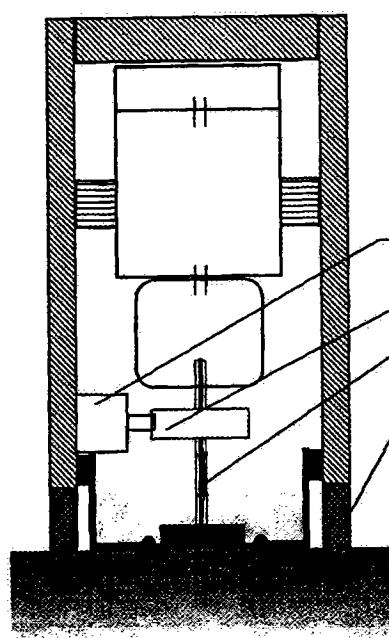


图 5b

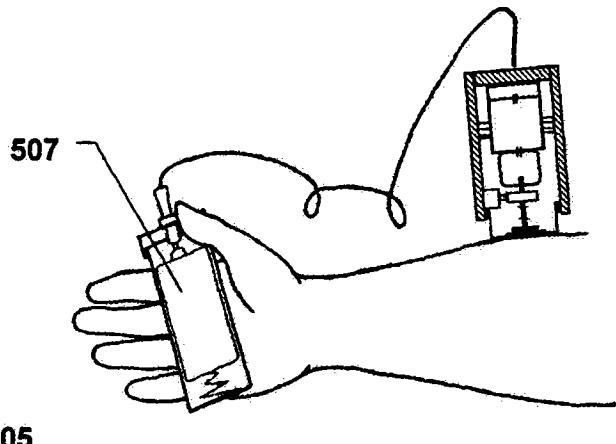


图 5c

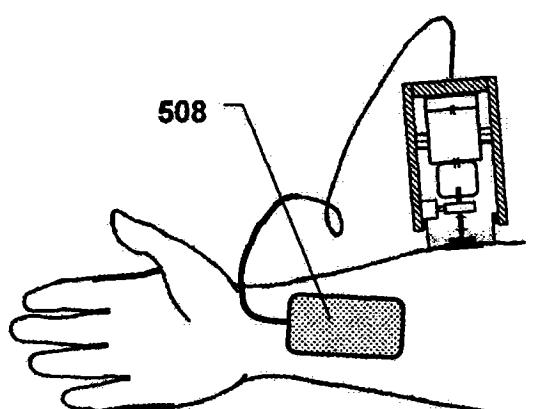


图 5d

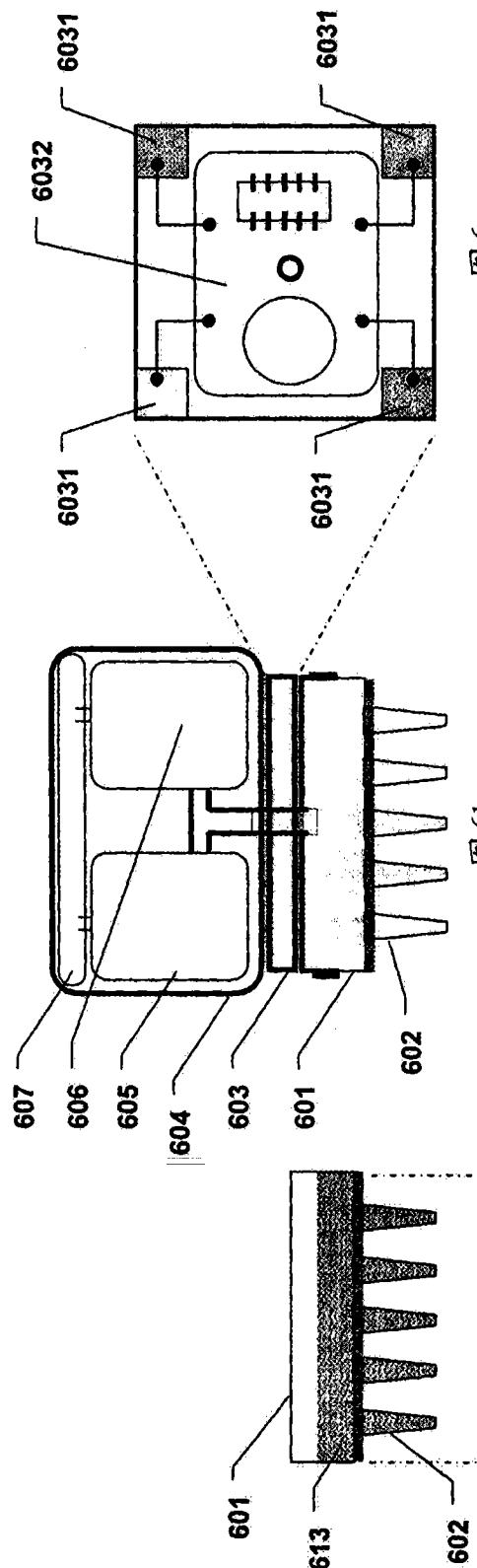


图 6c

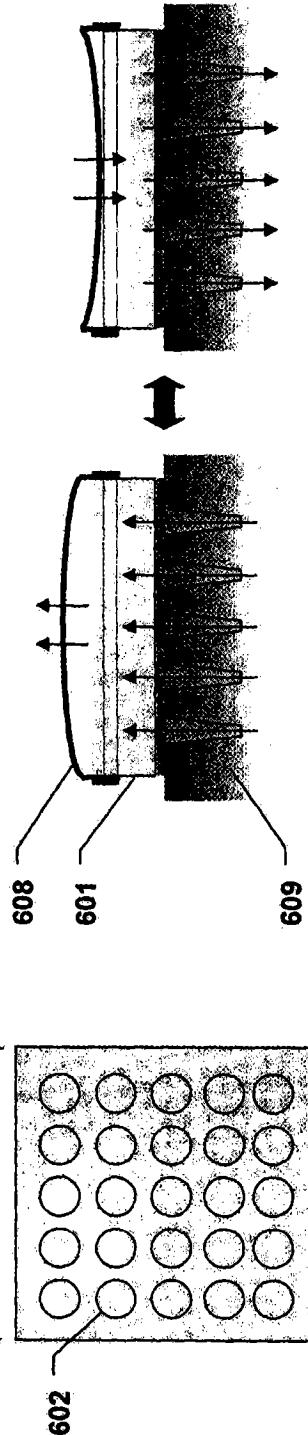


图 6c

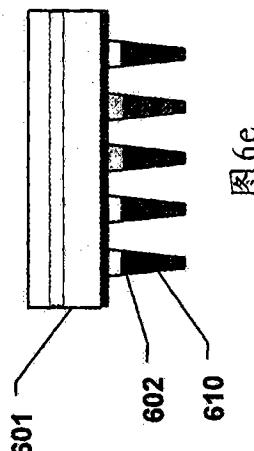


图 6a

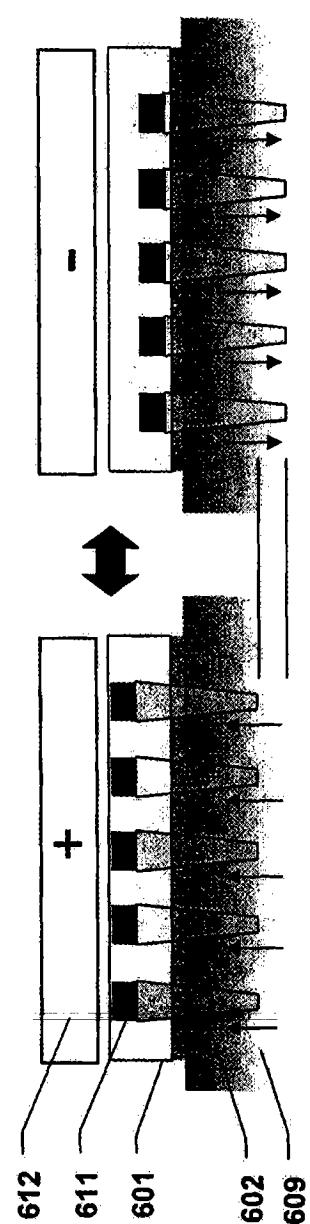


图 6f

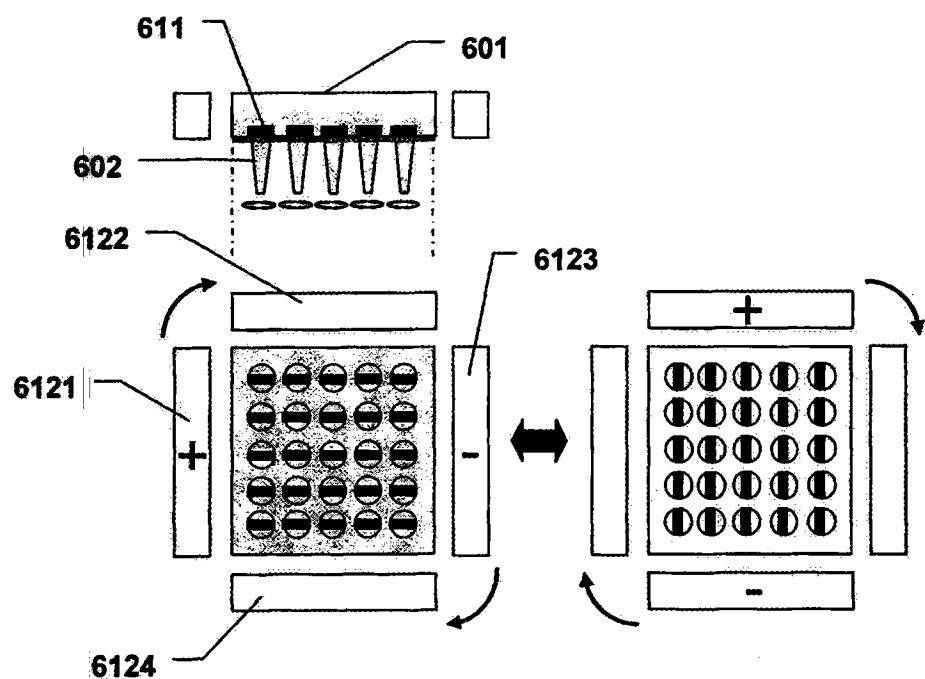


图 6g

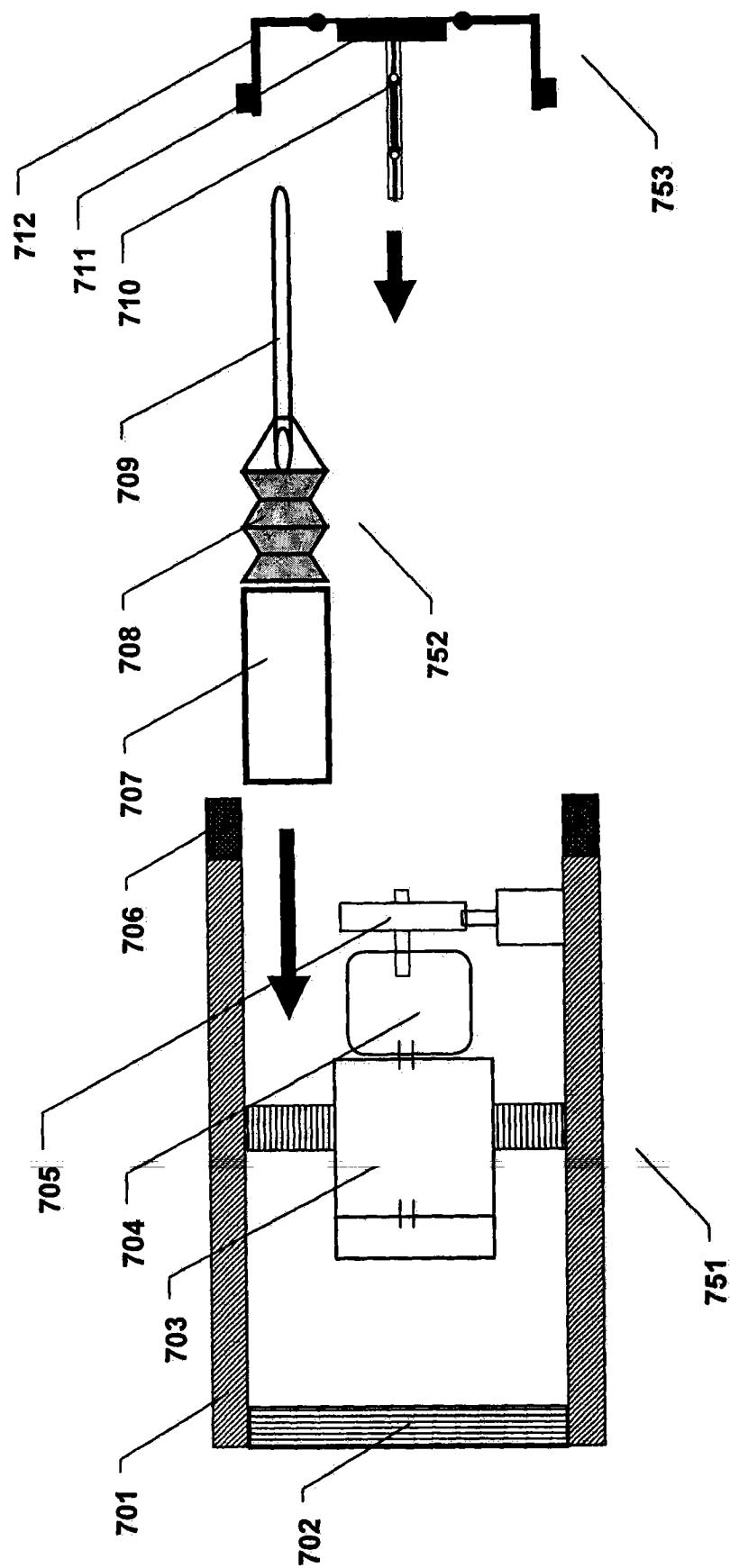


图 7a

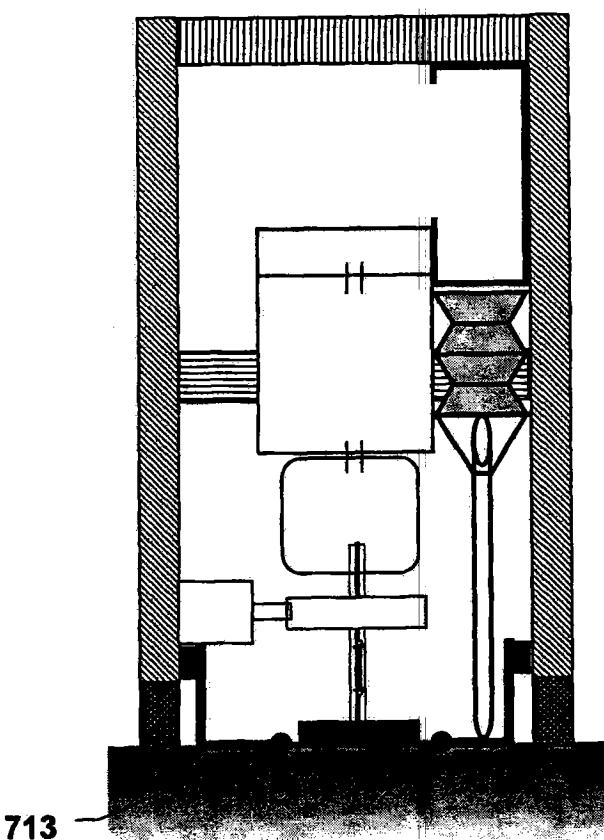


图 7b

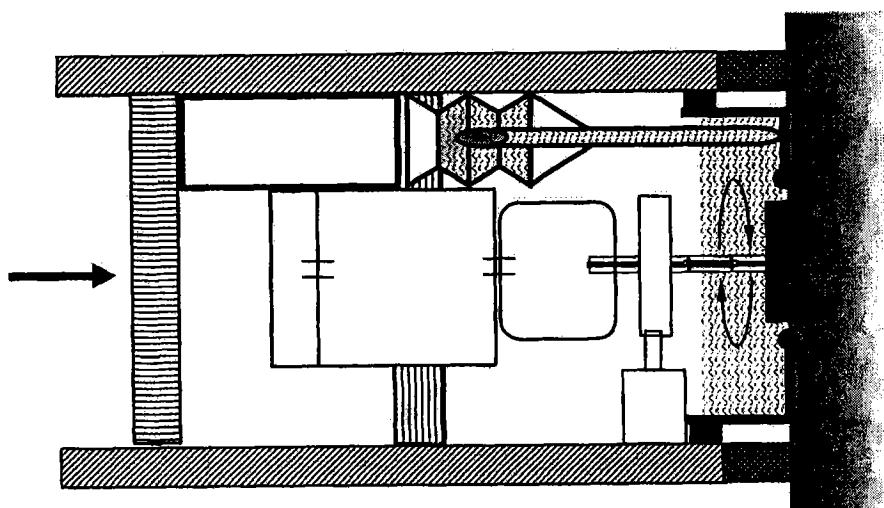


图 7c

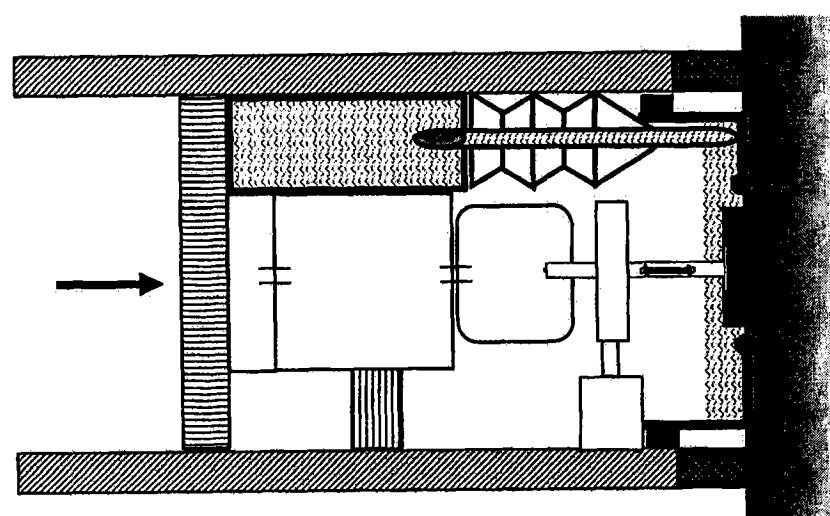


图 7d

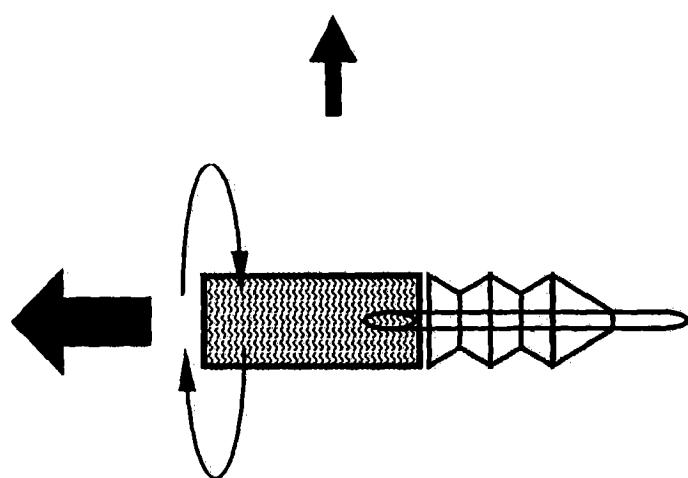
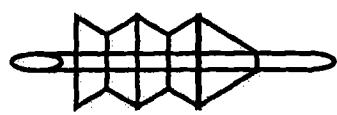
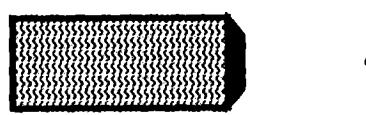


图 7e

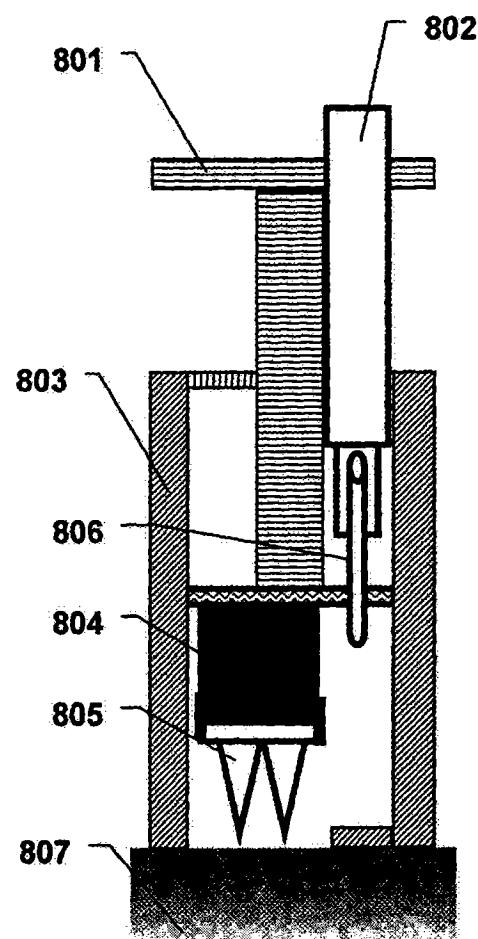


图 8a

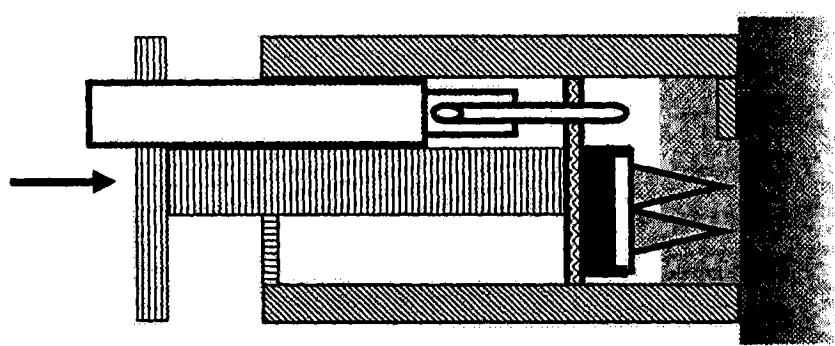


图 8b

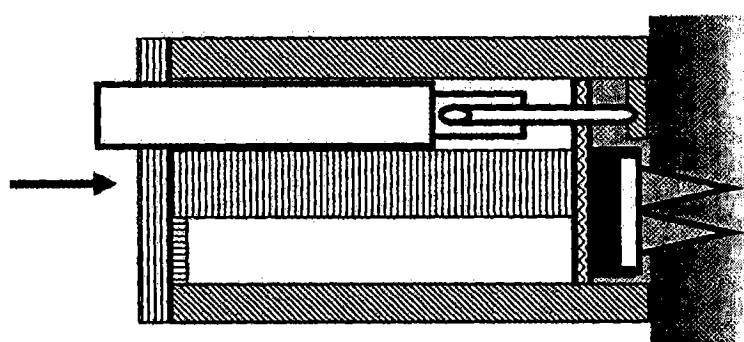


图 8c

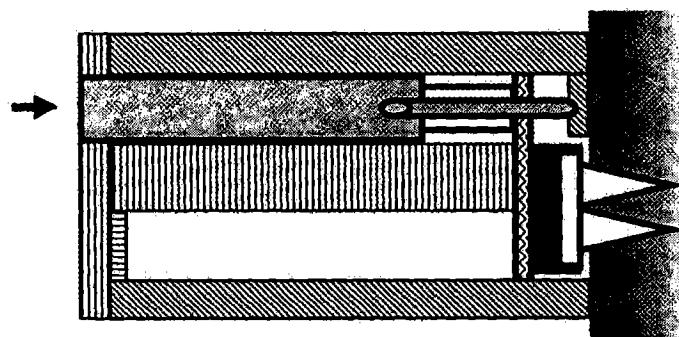


图 8d

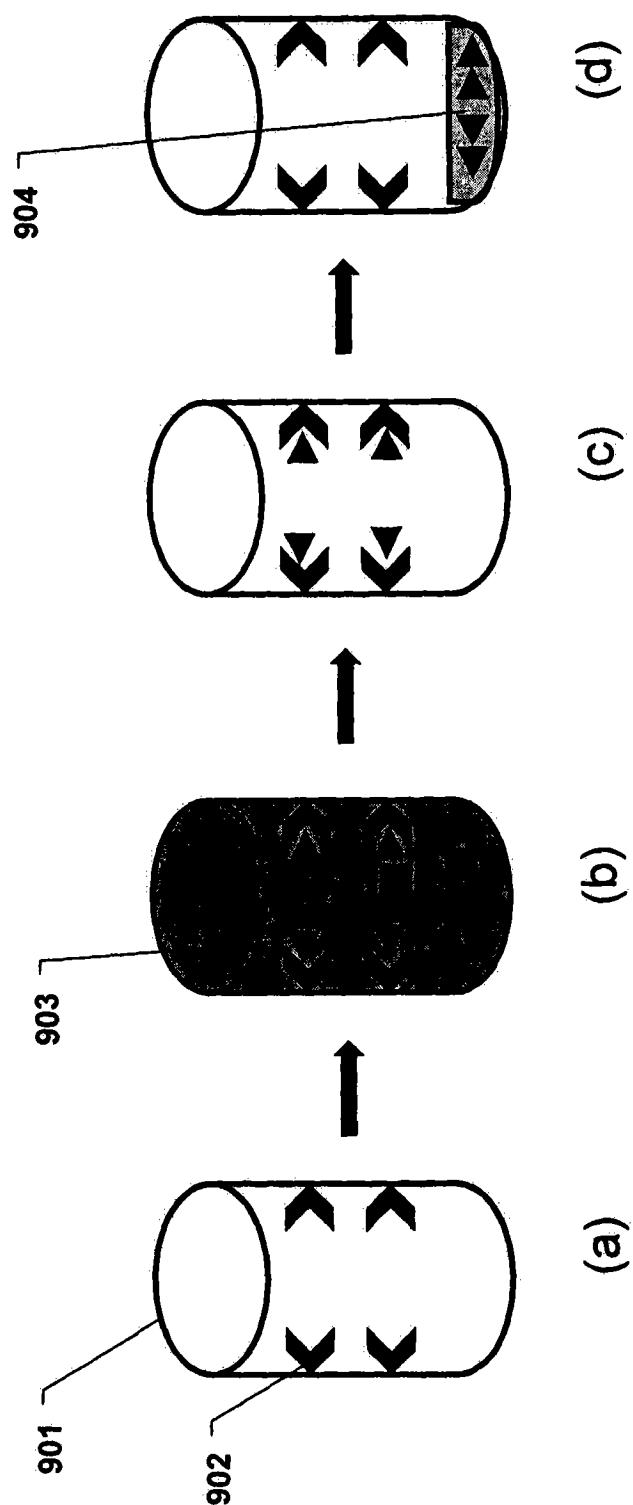


图 9

步骤1：最大化生物活性  $\rightarrow$  步骤2：最大化提取  $\rightarrow$  最大生物标志回收的主要设计

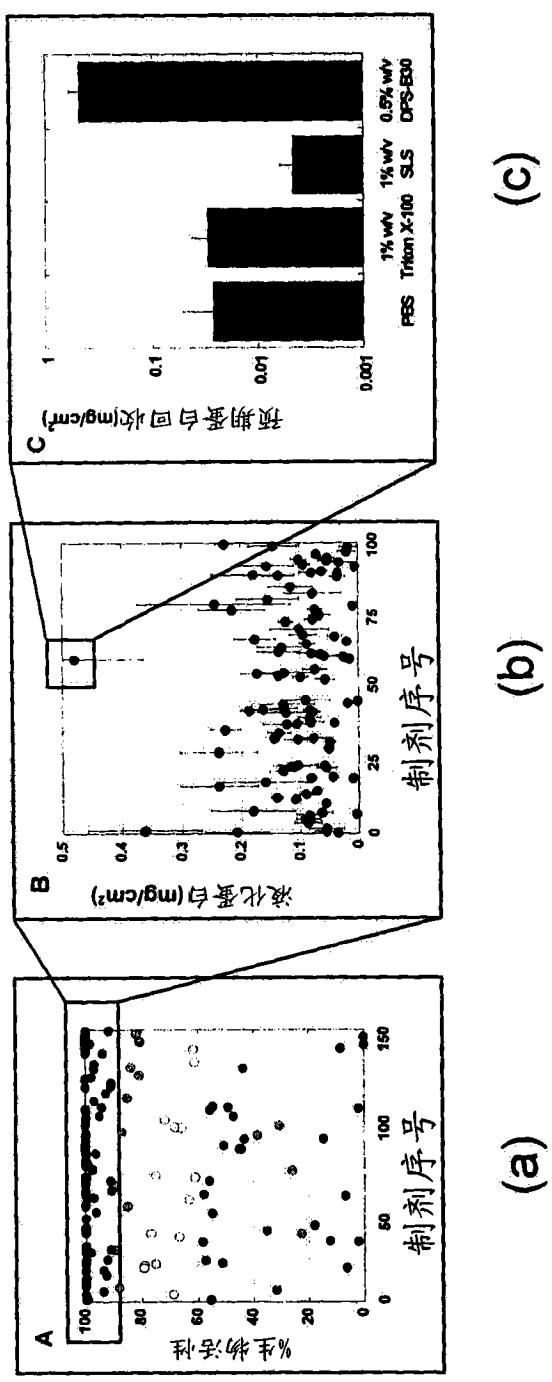


图 10

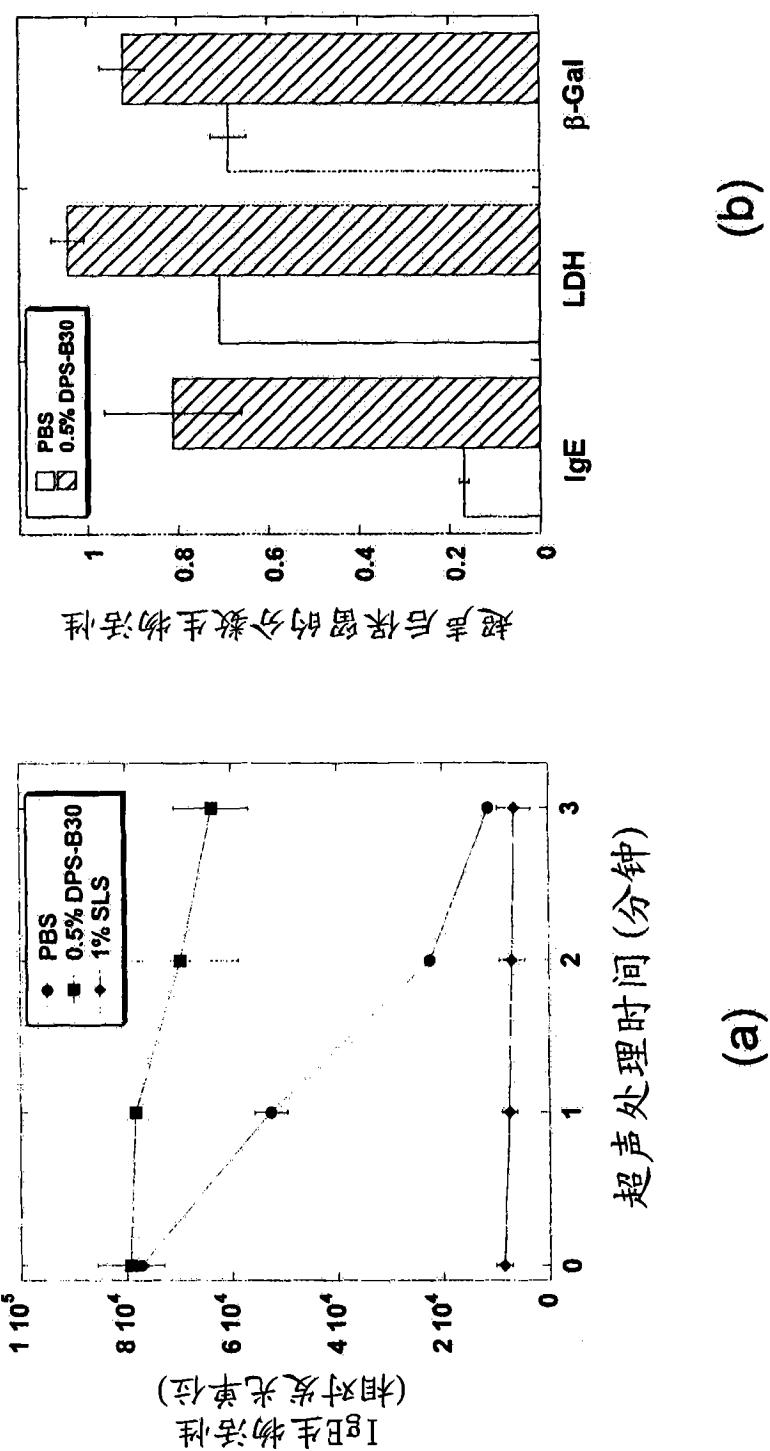


图 11

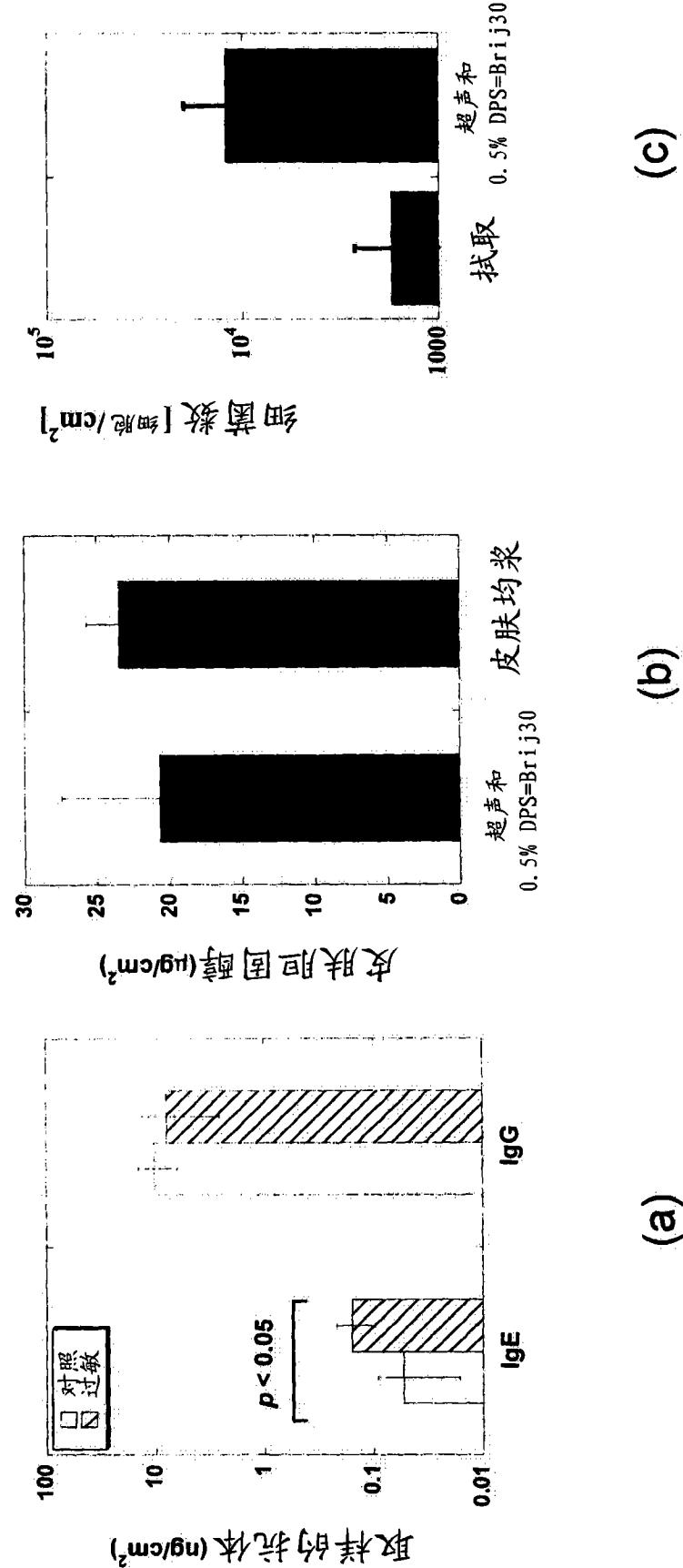


图 12

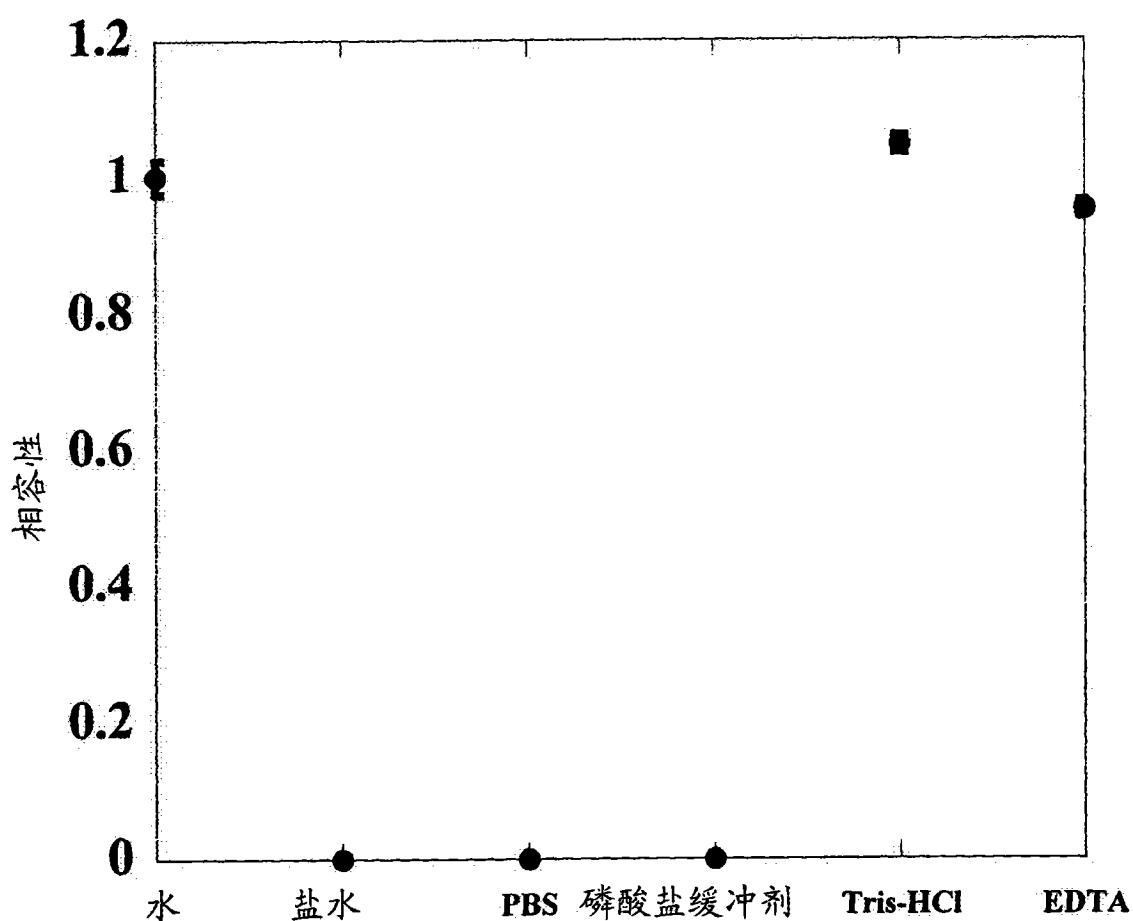


图 13

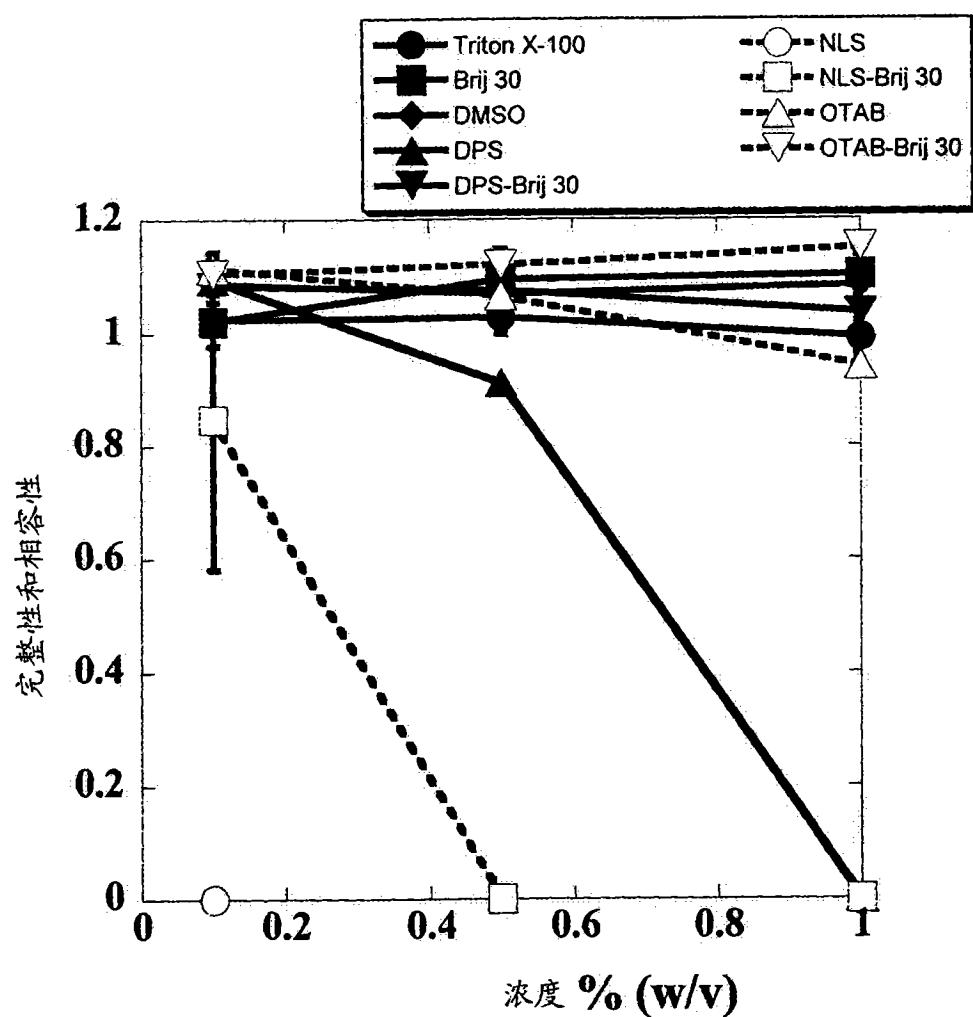


图 14

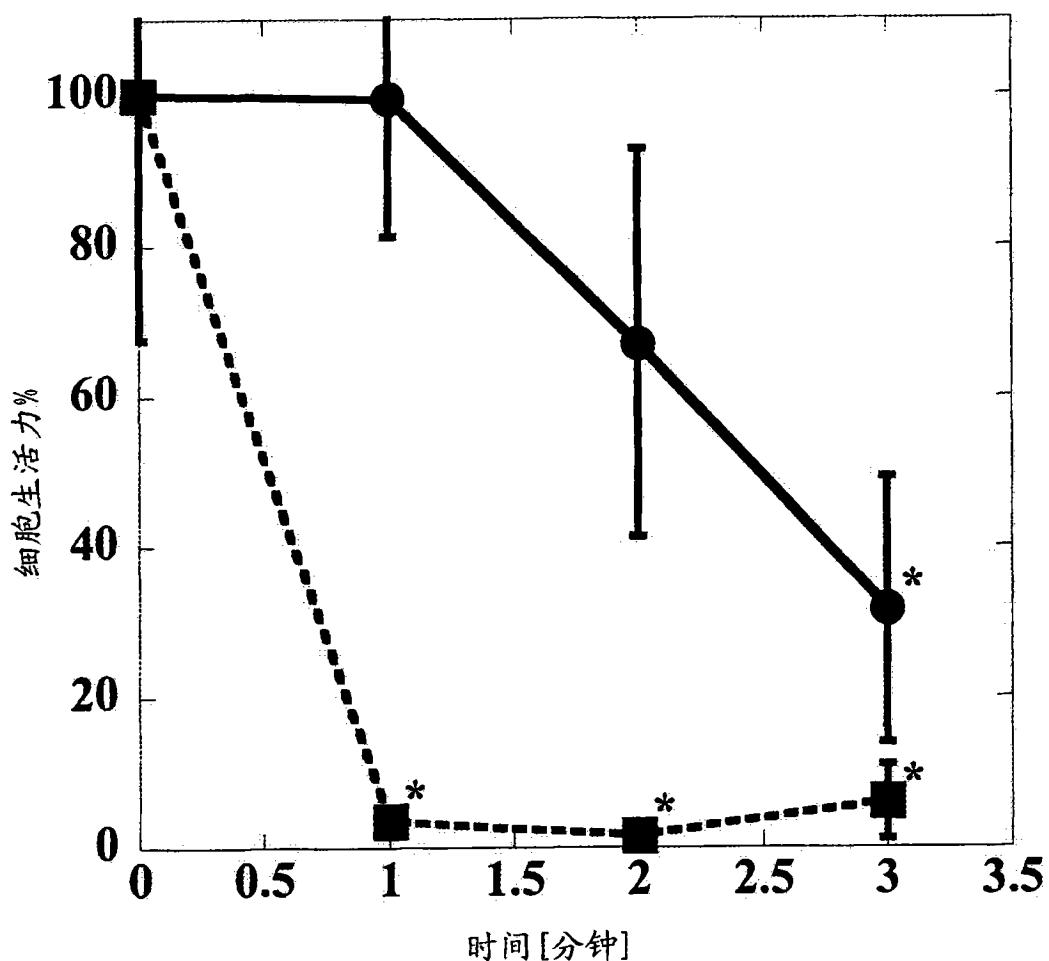


图 15

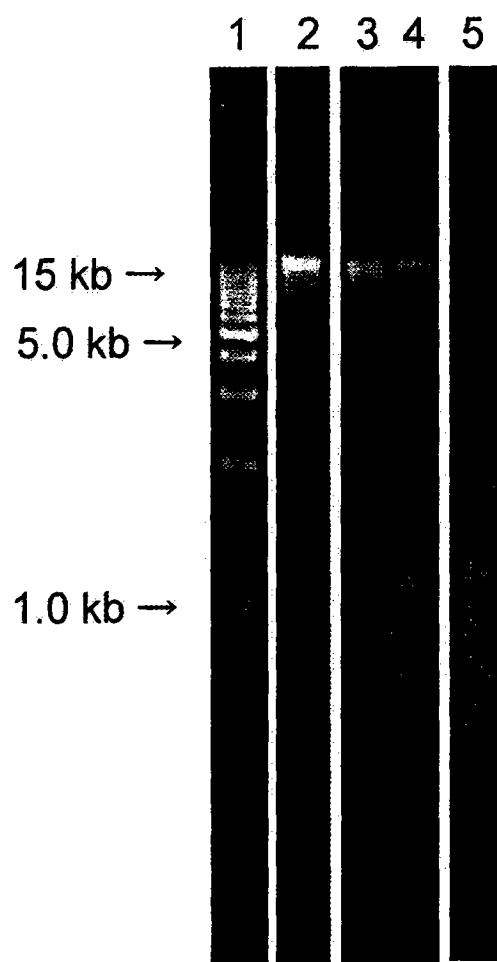
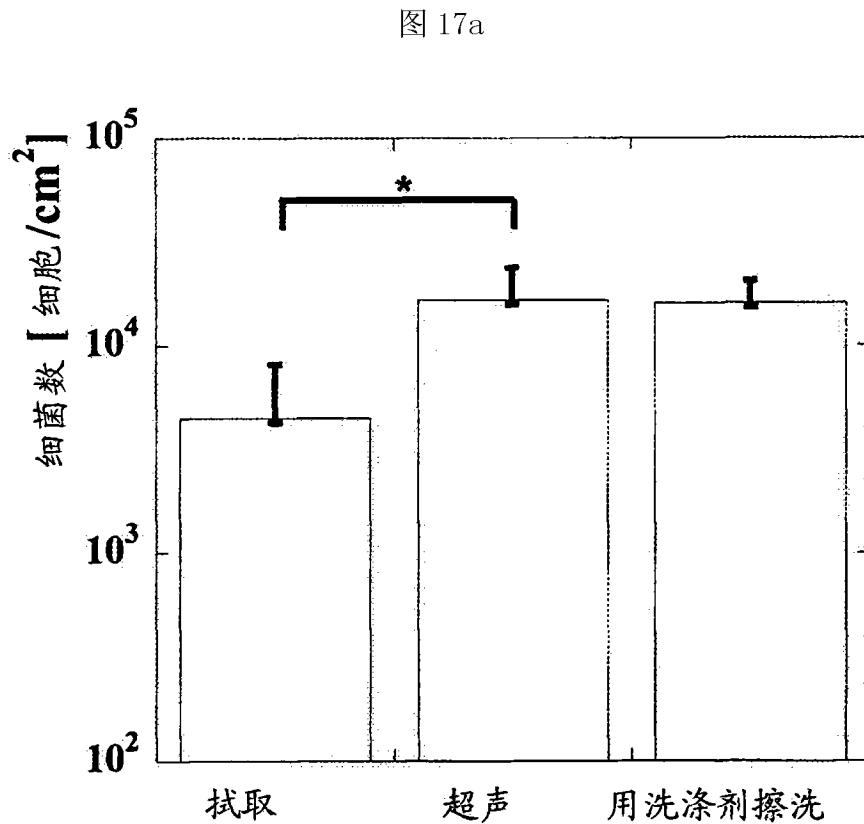
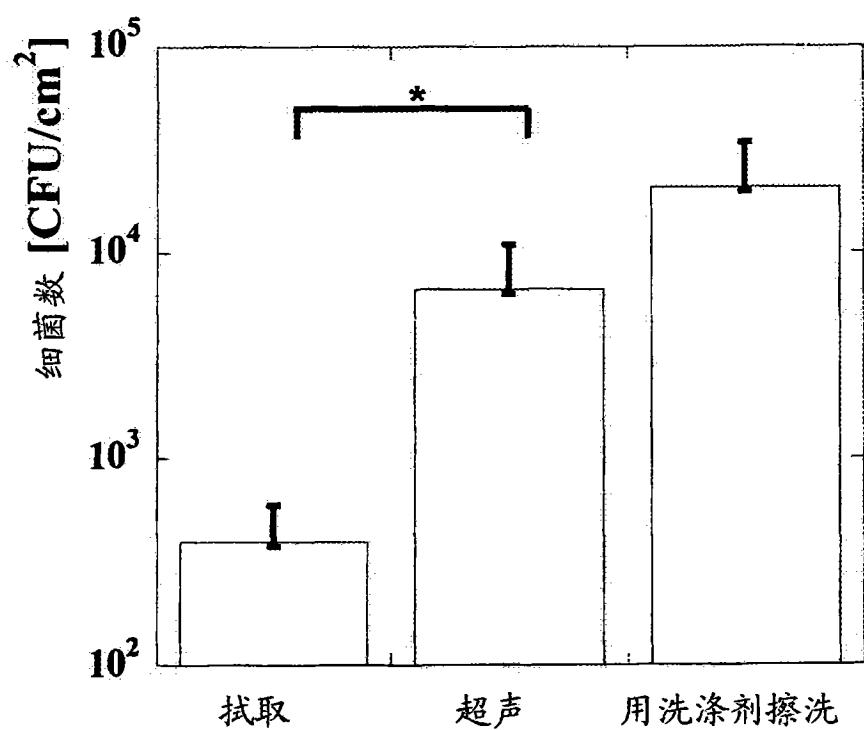
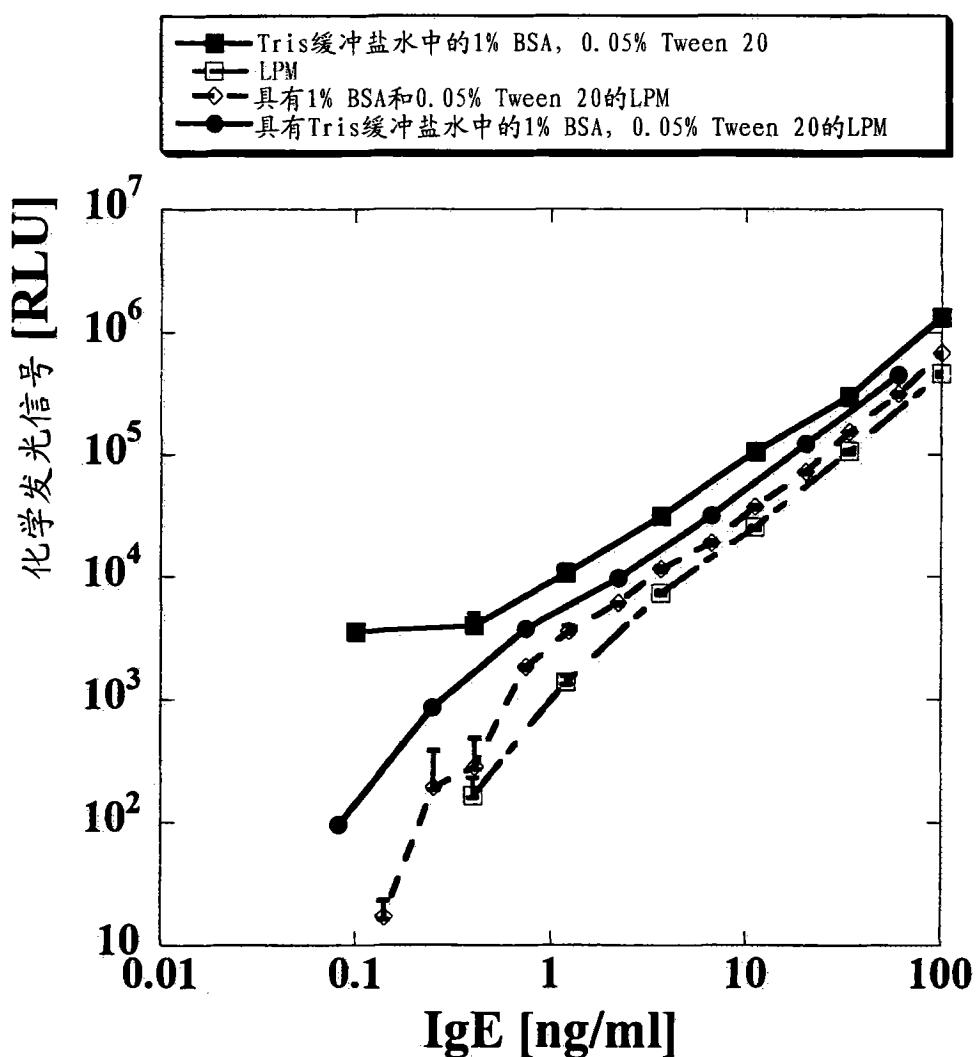


图 16





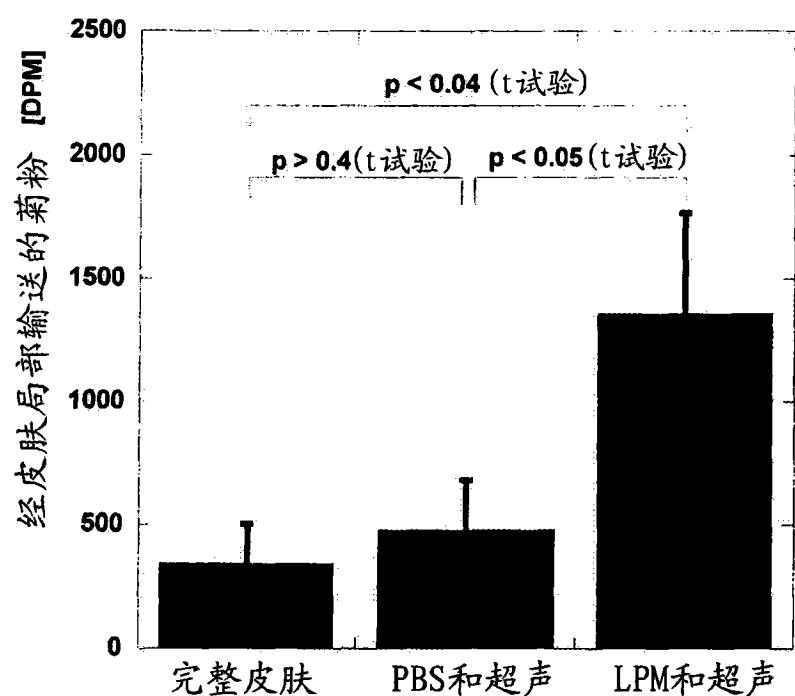


图 19a

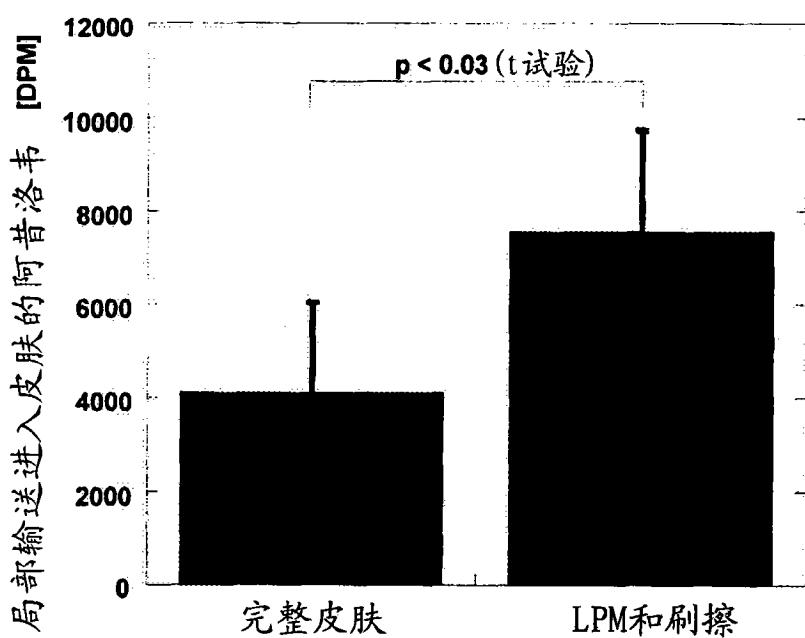


图 19b

专利名称(译)	基于组织的诊断的系统、方法和装置		
公开(公告)号	<a href="#">CN102395881A</a>	公开(公告)日	2012-03-28
申请号	CN201080017272.2	申请日	2010-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学评议会		
当前申请(专利权)人(译)	加州大学评议会		
[标]发明人	S·帕利瓦尔		
发明人	S·米特拉戈特里 M·奥古拉 S·帕利瓦尔		
IPC分类号	G01N33/487 A61M27/00 G01N33/48 A61B10/02		
CPC分类号	A61N7/02 A61B18/20 A61B10/0283 A61M37/0015 A61B10/04 A61B2017/00761 A61M2037/0046 G01N1/44 A61B10/0096 A61B2018/00452 G01N1/4044 G01N1/286 A61M2037/0023 A61B10/0045 A61B10/02 A61B2017/320004 A61B2010/0208 A61K38/28 Y10T436/2575 A61B18/04 A61K31/522 A61N7/00 A61N2007/0034 C12M23/28 C12M31/00 C12M35/08		
代理人(译)	李进 郭文洁		
优先权	61/152585 2009-02-13 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供装置、方法和系统，包括对关注的组织施加能量和/或液化促进介质，以产生包含组织成分的液化样品，从而提供快速组织取样、组织去污以及分析物的定性和/或定量检测，所述分析物可为组织成分(例如，数种生物分子、药物和微生物)的部分。另外，本发明提供所述液化促进介质的特定组合物，以促进液化、保存液化组织成分并能够将分子送入组织。测定液化组织样品中的组织组成可用于多种应用，包括诊断或预测局部以及全身疾病、评价药物给药后不同组织中治疗剂的生物利用率、法医学检测滥用药物、评价暴露于有害剂后组织微环境的变化和各种其它应用。所述方法、装置和系统用于将一种或多种药物送经或送入要液化的组织的部位。

