



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102690786 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 26

(21) 申请号 201210181973. 0

*C12N 15/10* (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 06. 05

*C07K 1/14* (2006. 01)

(71) 申请人 武汉格蓝丽富科技有限公司

*C12M 1/42* (2006. 01)

地址 430075 湖北省武汉市东湖开发区高新大道 666 号

*C12Q 1/68* (2006. 01)

*G01N 33/53* (2006. 01)

(72) 发明人 邓亚光 张杰 田放

(74) 专利代理机构 北京市德权律师事务所  
11302

代理人 刘丽君

(51) Int. Cl.

*C12N 5/09* (2010. 01)

*C12N 5/095* (2010. 01)

*C12N 5/078* (2010. 01)

*C12N 5/073* (2010. 01)

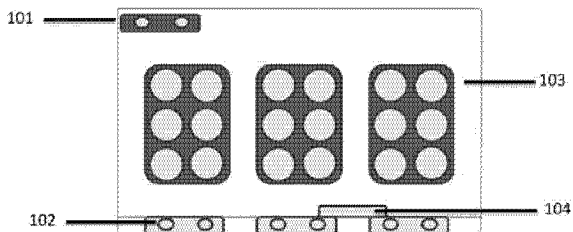
权利要求书 3 页 说明书 12 页 附图 7 页

## (54) 发明名称

一种细胞富集、分离、提取的方法和仪器及单细胞分析方法

## (57) 摘要

本发明公开了一种用阳性磁珠法,富集,提取靶细胞,分离单个细胞,并对单个细胞进行免疫和分子生物学鉴定和分析的方法和自动化仪器装置。这种方法和仪器装置,通过多种方法控制捕获磁铁和释放磁铁的开/关,完成单次或多次对靶细胞的搜索捕获,洗净和释放操作,从而达到提高靶细胞检测的灵敏度和检测的稳定性。捕获磁铁的搜索捕获靶细胞,其搜索线路可以是圆形,方形,梳形,S形或U形。此外,通过对捕获物的过滤处理,清除绝大部分游离的微磁珠,进一步提高产物的纯度,作为好的试验材料。使用特殊的过滤器和捕获磁铁的吸附相结合,可以有效清除 95% 以上的游离微磁珠。同时介绍用荧光免疫染色法和分子生物学方法来鉴定单个细胞的类型,分析其生物学特性,为癌症的临床诊断和治疗提供有效的生物学指标。



1. 一种细胞富集、分离、提取的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)将有特异性抗体结合的微磁珠(不同大小)和要检测靶细胞(或生物标记物)的生物样品相混合,使微磁珠上的抗体和靶细胞(或生物标记物)相结合;

(2)用一种非磁性材料的套子套在捕获磁铁上,避免磁珠,靶细胞或其他生物标记物被捕获磁铁的磁场吸附时,直接接触到磁铁上,当捕获磁铁磁场进入开启状态是,磁珠,靶细胞或生物标记物可以被吸附在磁铁套表面,当捕获磁铁的磁场被转换成关闭状态时,吸附在磁铁套表面的产物(磁珠,靶细胞或生物标记物)可以被释放下来;

(3)当释放磁铁处于开启,捕获磁铁磁场出入关闭或减微弱时,捕获磁铁套上的吸附物(磁珠,靶细胞或生物标记物)可以更有效地被释放下来。

2. 根据权利要求1所述的细胞富集、分离、提取方法,其特征在于,操作过程包括靶细胞的搜索捕获,洗净,释放步骤,通过这基本的步骤,以不同的组合,一次或多次的操作,达到提高检测灵敏度,检测的稳定性,和捕获产物的高纯度。

3. 根据权利要求1所述的细胞富集、分离、提取方法,其特征在于,靶细胞包括不同组织的癌细胞和血液循环癌细胞,不同体液的癌细胞和病原菌细胞等,可以通过特异性抗体富聚,分离和提取的细胞,也包括生物大分子(DNA, RNA 或蛋白质)等。

4. 根据权利要求1所述的细胞富集、分离、提取方法,其特征在于,捕获磁铁(或磁场)是指可以将有磁珠结合的靶细胞吸附起来的磁场;磁铁套是指套在捕获磁铁上的,可以让捕获磁铁捕获物吸附在套子的表面,不让捕获物直接接触磁铁的,非磁性薄物;释放磁铁(磁场)是用来让吸附在磁铁套表面的捕获释放下来的磁铁(磁场),靶细胞是通过捕获磁铁和释放磁铁的开或关而被捕获或释放的;这种磁铁(磁场)开或关,可以由不同的方法来达到,包括电动的开或关,机械性的移动,或位置的移动,或加间隔物,或通过磁场的同性相吸,异性相斥的原理,拉开距离,减弱磁场等方法。

5. 根据权利要求4所述的细胞富集、分离、提取方法,其特征在于,捕获磁铁在样品槽,洗净槽和释放槽中的搜索,移动,可以是多种形状(圆形,方形,直线形,U形线,S形线等),包括上下,左右,前后的移动。

6. 根据权利要求1所述的细胞富集、分离、提取方法,其特征在于,磁珠是指有特异性抗体结合在其表面,可以用来识别靶细胞,以便被磁铁的磁场吸附,达到富聚,分离和提取的目的。磁珠的大小可以是4.5微以下,也可以是按要求特定制作的大小。

7. 根据权利要求1所述的细胞富集、分离、提取方法,其特征在于,所述靶细胞包括癌细胞等不同癌症患者的病变细胞或要检测的细胞,病原菌,生物大分子(DNA或RNA)等生物标记物。

8. 根据权利要求4所述的细胞富集、分离、提取方法,其特征在于,结合在微磁球表面上的抗体,可以是能识别细胞(或生物大分子:DNA/RNA或蛋白质)各种特异性结合的抗体,例如,EpCAM和MUC1可用于循环肿瘤细胞(血液循环癌细胞)的富集和检测,CD45可用于血细胞分离,CD71可用于胎儿细胞的富集和分离提取,CD44/24可用于癌症干细胞富集和分离提取等。

9. 根据权利要求1所述的细胞富集、分离、提取,其特征在于,在所述方法中增加一步,在样品或捕获物上安上过滤装置,进一步纯化靶细胞的方法包括:

(1)安放过滤装置,过滤孔大于游离的磁珠,但小于靶细胞。这一过滤装置放在捕获磁

铁和产物(样品或捕获物)之间,便于捕获磁铁从产物中吸附游离磁珠,使捕获物更加纯化;

(2) 利用这过滤装置,一种方式是,捕获磁铁在过滤器的上方,样品或捕获物在过滤器的下方,这样捕获磁铁的磁场,可以从下向上将游离磁珠从产物中(捕获物或样品)吸走,通过过滤器,吸附到磁铁套上,然后除去;这种方法,可以清除捕获物中的 95% 以上的游离磁珠,也可以将捕获物放到过滤器上,由底下的释放磁铁将捕获产物中的游离磁珠,吸下,所用的过滤器的孔径比游离磁珠大,比靶细胞小,所以这种方法可以有效地清除磁珠,而又不影响靶细胞。

10. 根据权利要求 9 所述的细胞富集、分离、提取方法,其特征在于,过滤装置安放在试样上方,利用捕获磁铁的磁场透过过滤装置,捕获试样中的游离磁珠。

11. 根据权利要求 9 所述的细胞富集、分离、提取方法,其特征在于,过滤装置也可以安放在试样的下方,释放磁铁的磁场可以透过过滤装置吸收游离的磁珠。

12. 根据权利要求 9 所述的细胞富集、分离、提取方法,其特征在于,过滤装置可以做成圆桶形,让过滤装置旋转,将磁铁安放在侧面,利用磁场吸力,将试样中的游离磁珠清除掉。

13. 根据权利要求 9 所述的细胞富集、分离、提取方法,其特征在于,,清除游离微磁珠的过滤装置,其原则是,过滤孔比微磁珠大,比靶细胞小。举血液循环癌细胞一例,8 微米的过滤器孔径可以有效地清除 4.5 微米和以下的游离微磁珠。

14. 一种细胞富集、分离、提取的仪器装置,其特征在于,包括持有样品样品槽;洗净捕获物的洗涤槽;以及收集释放产物的释放槽;用非磁性材料制成的磁铁套,捕获磁铁的磁场能传送到套子外部的顶端;释放磁铁可以安放在释放槽的底部,产生的释放磁场让吸附在磁铁套表面的捕获物能够释放到释放槽中;在释放产物和捕获磁铁之间,安上过滤器,清除样品中的游离微磁珠。

15. 根据权利要求 14 所述的细胞富集、分离、提取的仪器装置,其特征在于,过滤器可以安放在一个或多个样品槽,洗净槽或释放槽中,将样品和捕获磁铁分开。过滤器的过滤孔比靶细胞要小,但比游离磁珠大。

16. 根据权利要求 14 所述的细胞富集、分离、提取的仪器装置,其特征在于,所有的容器槽(样品槽,洗净槽,释放槽)都至少比捕获磁铁探头宽。

17. 根据权利要求 14 所述的细胞富集、分离、提取的仪器装置,其特征在于,单个细胞的基因表达谱可用来鉴定细胞的类型和细胞的生物学特性。

18. 一种单细胞标记和识别方法,利用本发明的细胞富集提取仪器,收集到的单个靶细胞,可以利用包括免疫荧光标记和基因表达型方法来鉴定细胞的类型和分析其生物学特性:

(1) 收集靶细胞在溶液相培养皿槽中,或载玻片上风干,固定;

(2) 利用免疫荧光标记识别法,用血细胞特异性结合的抗体(CD45 和 CD44 等),上皮细胞特异性结合的抗体(EPCAM,角蛋白),再加上核染色试剂(DAPI 染色)来鉴定癌细胞和血液细胞;

(3) 将收集的细胞混合物或拿起单个的靶细胞放入有 RNA 保护试剂的 PCR 管中;

(4) 将收集到的细胞混合物或单个细胞(步骤(二)),立即储存在 -20 度 /-80 度或直接用作基因表达分析;

(5) 利用基因表达标记物(DNA 和 RNA 的模式),确定细胞类型。

19. 根据权利要求 18 所述的单细胞标记和识别方法,其特征在于,包括单细胞裂解, cDNA 合成及基因扩增, 分析步骤, 以便能对单个细胞作多种基因的同时分析。

20. 根据权利要求 18 所述的单细胞标记和鉴定方法,其特征在于,用定量 qRT-PCR 的方法分析单细胞基因表达的步骤。

## 一种细胞富集、分离、提取的方法和仪器及单细胞分析方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于细胞的分离和分析领域,特别涉及一种细胞富集、分离、提取的方法以及细胞富集、分离、提取的装置和单细胞分析方法。

### 背景技术

[0002] 细胞学的研究,为人类许多疾病的原理解析,临床的诊断和处理提供了有效的方法和手段。某些疾病可以或必须要对一些病变的细胞(或靶细胞)进行鉴别,分析,以作为临床诊断,病患跟踪和患者预后的特定指标。血液循环癌细胞(Circulating tumor cells)就是一例。有关血液循环癌细胞,是由托马斯·阿什沃思(Thomas Ashworth)[1]一个多世纪前最先报道的。然而,在相当长的一段时间内,人们对血液循环癌细胞的研究很少,对其认识和理解的程度也相当有限。究其原因,其中之一主要是因为检测和抽取血液循环癌细胞的技术不成熟,因为血液循环癌细胞是以极少量的数量存在于血液之中,一般的血液检测方法基本上达不到检测血液中的癌细胞的灵敏度。近年来,新技术的应用已经证明,检测血液循环癌细胞是可以帮助医生对病患进行诊断,跟踪和预后的,同时也可以及时评估病患对临床治疗处理的效果,特别是对于癌症已经扩散的病人。血液中癌细胞的数量跟病患的总的生存率密切相关。一些临床研究表明,某些类型的癌症,如转移性乳腺癌,大肠癌,前列腺癌等,血液中癌细胞的数量越多,通常病人的死亡率也越高。因此,研究和解明血液循环癌细胞的特点和寻找相应的临床处理措施,对防止癌症的扩散和复发,有着非常重要的意义,因为血液循环癌细胞就是癌症扩散的重要途径之一,也是肿瘤干细胞(被认为与癌症复发密切相关)存在的主要形式之一。近年来,各种新的技术方法应用到细胞特别是血液循环癌细胞的检测上,以增加对这些稀有细胞的理解,从中,相信对防止癌症的扩散和复发会有突破性发现。因此,高灵敏度的细胞分离,提取方法和检测仪器的研究,开发,对生命科学,健康相关的研究和有效的医疗处理等,有时是必须的。经过富集,抽提和纯化了的靶细胞(癌细胞即为一例),是研究分析的好材料。如在单细胞水平上分析DNA突变和RNA/蛋白质表达变化,以帮助了解某些肿瘤的形成机制和转移过程,检测或跟踪各种病患,进行病理分析,确定各个病人的特异性,以及帮助细胞定性,分类等。在药物研究开发上,也有着重要的意义。比喻,在解明被药物杀死的癌细胞和有作用但未有杀死的细胞,以及完全没有作用的细胞个体之间的差别上,单细胞水平的研究(例:获取单个的特定细胞并加以分析),就具有特别重要的意义。

[0003] 为检测稀有的细胞,通常需要先富集,后抽提。最常用的方法之一是免疫磁珠富集法。该方法是使用有特异性抗体结合的磁珠去和有特异性表面抗原的靶细胞相结合,再用磁场来吸附,抽取靶细胞。所用样品包括血液,肿瘤组织活检,或骨髓等样本。将有抗体结合的磁珠和样品混合培养后,用磁铁吸附这些靶细胞-抗体-磁珠的复合体,经过洗净,然后释放靶细胞到目的容器里,获得高纯化的靶细胞,作为进一步生物研究分析的材料。

[0004] 目前,临床上检测血液循环癌细胞的医疗仪器有强生公司的细胞研究系统。细胞研究系统是用来专门检测血液循环癌细胞的半自动化检测仪器。最近的研究表明,血液循

环癌细胞是广泛存在于各种癌症病患的血液中的,并具有重要的临床价值。但由于缺乏高灵敏度的检测仪器和对检测到的血液循环癌细胞的认知有限,血液循环癌细胞的检测还没有被列入临床常规检测项目(美国临床肿瘤学会(ASCO)指南)。

[0005] 新的发明和正在研发的技术和产品也不少。新的专利发明有, Giaever 等美国专利 3970518,题为“生物粒子的磁分离”;Liberti 等,美国专利 5200084,题为“磁分离设备和测量方法”;Bienhaus 等,美国专利 5837144,题为“磁分离液成分的方法”;戴维斯等,美国专利 8071395,题为“细胞磁分离方法和装置”等。新研发的产品有,AutoMACS (美天旎生物技术),Ariol (微分析系统),RoboSep (干细胞),MagSweeper [3] 等。使用这些技术产品,可以不同程度地富集和检测 EPCAM 或角蛋白阳性细胞。

[0006] 然而,许多技术问题仍然需要解决。比喻说,用阳性磁珠富集法抽取的细胞产物中存在有大量的未与靶细胞结合的游离磁珠,这个问题,普遍存在于目前已知的阳性磁珠富集方法。这些未结合的磁珠,不仅妨碍靶细胞的清楚观察,同时也影响单个靶细胞的收集, DNA/RNA 的抽提效率,降低靶细胞一系列的分析数据的质量,并且,靶细胞越少,游离磁珠的影响相对越大。可以想象的另一个问题是,既然检测的灵敏度不足成为常规检测项目的障碍,那么,如何提高检测的灵敏度和拥有好的重复性,就是一极待解决的问题。普通的阳性磁珠富集法,离不开磁珠和磁铁的吸附效应。磁铁的大小规格,磁场强度,磁珠的大小选择都是很重要的。为了有效地捕获和收取靶细胞,需要在捕获磁铁上按上套子,这样,磁铁捕获靶细胞时,靶细胞是被吸附在套子的表面,而把靶细胞捕获到。当把磁铁从套子中抽去时,靶细胞可以从套子上释放下来,这样可以达到有效收集靶细胞,又不损伤靶细胞的目的。可想而知,这种情况下的捕获磁铁的磁场强弱,套子的厚薄以及磁珠的大小都将影响到靶细胞的捕获效率。作出上述努力后,样品中的靶细胞也不是一次搜索捕获就可以全部抓获到的。一些方法,试图在不更换磁铁套子又不释放被捕的靶细胞产物的情况下,从相同样品中,重复搜索捕获样品中的靶细胞,以提高靶细胞的检测灵敏度,其效果非常有限。原因是,一般的园柱形永久磁铁,磁场最强处是很集中的,靶细胞和游离的磁珠将首先占住此处,如果不预先腾出空间,将妨碍新的靶细胞的有效吸附,所以简单的重复搜索捕获,收获甚微,有时会压破已捕获的靶细胞,效果适得其反。如果每次都更换磁铁的套子,重复整个捕获,洗净和释放的全过程,所花的时间太长,加上又有释放效率的问题,不适合实际应用。显而易见,这是提高检测靶细胞灵敏度所需解决的问题。

[0007] 一种靶细胞,用一种(或多种)抗体结合的磁珠富集,收集后,还需要作进一步的细胞定性鉴定,以确定收集到的细胞是否为靶细胞以及获得靶细胞的纯度等指标。鉴定靶细胞,有不同的方法。如血液循环癌细胞的鉴定,目前多是用免疫荧光染色法,所用的荧光光谱的选择空间有限,由此限制了鉴定靶细胞特性的空间。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的是为解决上述问题而提供了一种细胞富集、分离、提取的方法以及细胞富集、分离、提取的仪器装置和一种单细胞分析方法。

[0009] 本发明所采用的技术方案是:

[0010] 一种细胞富集、分离、提取的方法,包括以下步骤:

[0011] (1)将有特异性抗体结合的微磁珠(不同大小)和要检测靶细胞(或生物标记物)的

生物样品相混合培养,使微磁珠上的抗体和靶细胞(或生物标记物)相结合;

[0012] (2)用一种非磁性材料的套子套在捕获磁铁上,避免磁珠,靶细胞或其他生物标记物被捕获磁铁的磁场吸附时,直接接触到磁铁上,当捕获磁铁磁场进入开启状态是,磁珠,靶细胞或生物标记物可以被吸附在磁铁套的表面,当捕获磁铁的磁场被转换成关闭状态时,吸附在磁铁套表面的产物(磁珠,靶细胞或生物标记物)可以被释放下来;

[0013] (3)当释放磁铁处于开启,捕获磁铁磁场处于关闭或减微弱时,捕获磁铁套上的吸附物(磁珠,靶细胞或生物标记物)可以被释放下来。

[0014] 进一步地,操作过程包括靶细胞的搜索捕获,洗净,释放步骤,通过这基本的步骤,以不同的组合操作,达到提高检测灵敏度,检测的稳定性,和捕获产物的高纯度的目的。

[0015] 进一步地,靶细胞包括不同组织的癌细胞和血液循环癌细胞,不同体液的癌细胞和病原菌细胞等,可以通过特异性抗体富聚,分离和提取的细胞,也包括生物大分子(DNA, RNA 或蛋白质)等。

[0016] 优选地,捕获磁铁(或磁场)是指可以将有磁珠结合的靶细胞吸附起来的磁场;磁铁套是指套在捕获磁铁上的,可以让捕获磁铁捕获物吸附在套子的表面,不让捕获物直接接触磁铁的,非磁性薄物;释放磁铁(磁场)是用来让吸附在磁铁套表面的捕获释放下来的磁铁(磁场),靶细胞是通过捕获磁铁和释放磁铁的开或关而被捕获或释放的;这种磁铁(磁场)开或关,可以由不同的方法来达到,包括电动的开或关,机械性的移动,或位置的移动,或加间隔物,或通过磁场的同性相吸,异性相斥的原理,拉开距离,减弱磁场等方法。

[0017] 优选地,捕获磁铁在样品槽,洗净槽和释放槽中的搜索,移动,可以是多种形状(圆形,方形,直线形,U形线,S形线等),包括上下,左右,前后的移动。

[0018] 进一步地,磁珠是指有特异性抗体结合在其表面,可以用来识别靶细胞,以便被磁铁的磁场吸附,达到富聚,分离和提取的目的。磁珠的大小可以是4.5微以下,也可以是按要求特定制作的大小。

[0019] 优选地,所述靶细胞包括癌细胞等不同癌症患者的病变细胞或要检测的细胞,病原菌,生物大分子(DNA或RNA)等生物标记物。

[0020] 优选地,结合在微磁球表面上的抗体,可以是能识别细胞(或生物大分子:DNA/RNA或蛋白质)各种特异性结合的抗体。例如,EpCAM和MUC1可用于血液循环癌细胞的富集和检测,CD45可用于血细胞分离,CD71可用于胎儿细胞的富集和分离提取,CD44/24可用于癌症干细胞富集和分离提取等。

[0021] 进一步地,在所述方法中增加一步,在样品或捕获物上安上过滤装置,进一步纯化靶细胞的方法包括:

[0022] (1)安放过滤装置,过滤孔大于游离的磁珠,但小于靶细胞。这一过滤装置放在捕获磁铁和产物(样品或捕获物)之间,便于捕获磁铁从产物中吸附游离磁珠,使捕获物更加纯化;

[0023] (2)利用这过滤装置,一种方式是,捕获磁铁在过滤器的上方,样品或捕获物在过滤器的下方,这样捕获磁铁的磁场,可以从下向上将游离磁珠从产物中(捕获物或样品)吸走,通过过滤器,吸附到磁铁套上,然后除去;这种方法,可以清除捕获物中的95%以上的游离磁珠,也可以将捕获物放到过滤器上,由底下的释放磁铁将捕获产物中的游离磁珠,吸下,所用的过滤器的孔径比游离磁珠大,比靶细胞小,所以这种方法可以有效地清除磁珠,

而又不影响靶细胞。

[0024] 进一步地,过滤装置安放在试样上方,利用捕获磁铁的磁场透过过滤装置,捕获试样中的游离磁珠。

[0025] 进一步地,过滤装置也可以安放在试样的下方,释放磁铁的磁场可以透过过滤装置吸收游离的磁珠。

[0026] 优选地,过滤装置可以做成圆桶形,让过滤装置旋转,将磁铁安放在侧面,利用磁场吸力,将试样中的游离磁珠清除掉。

[0027] 优选地,清除游离微磁珠的过滤装置,其原则是,过滤孔比微磁珠大,比靶细胞小。举血液循环癌细胞一例,8 微米的过滤器孔径可以有效地清除 4.5 微米和以下的游离微磁珠。

[0028] 一种细胞富集、分离、提取的仪器装置,包括持有样品的样品槽;洗净捕获物的洗涤槽;以及收集释放产物的释放槽;用非磁性材料制成的磁铁套,捕获磁铁的磁场能传送到套子外部的顶端;释放磁铁可以安放在释放槽的底部,产生的释放磁场让吸附在磁铁套表面的捕获物能够释放到释放槽中;在释放产物和捕获磁铁之间,安上过滤器,清除样品中的游离微磁珠。

[0029] 进一步地,其特征在于,过滤器可以安放在一个或多个样品槽,洗净槽或释放槽中,将样品和捕获磁铁分开,过滤器的过滤孔比靶细胞要小,但比游离磁珠大。

[0030] 优选地,所有的容器槽(样品槽,洗净槽,释放槽)都至少比捕获磁铁探头宽。

[0031] 进一步地,单个细胞的基因表达谱可用来鉴定细胞的类型和细胞的生物学特性。

[0032] 一种单细胞标记,识别和进一步进行分子生物学分析的方法,利用本发明的细胞富集提取仪器,收集到的单个靶细胞,可以利用包括免疫荧光标记和基因表达型方法来鉴定细胞,识别细胞的类型和生物学特性:

[0033] (1) 收集靶细胞在溶液相培养皿槽中,或载玻片上风干,固定;

[0034] (2) 利用免疫荧光标记识别法,用血细胞特异性结合的抗体(CD45 和 CD44 等),上皮细胞特异性结合的抗体(EpCAM,角蛋白),再加上核染色试剂(DAPI 染色)来鉴定癌细胞和血液细胞;

[0035] (3) 将收集的细胞混合物或拿起单个的靶细胞放入有 RNA 保护试剂的 PCR 管中;

[0036] (4) 将收集到的细胞混合物或单个细胞(步骤(二)),立即储存在 -20 度 /-80 度或直接用作基因表达分析;

[0037] (5) 利用基因遗传型和基因表达标记物(DNA 和 RNA 的模式),确定细胞类型。

[0038] 进一步地,包括单细胞裂解,cDNA 合成及基因扩增步骤,以便能对单个细胞作多种基因的同时分析。

[0039] 进一步地,用定量 qRT-PCR 的方法分析单细胞基因表达的步骤。

[0040] 本发明具有以下优点:

[0041] 本专利所介绍的稀有单细胞的富集、分离、提取的方法和仪器装置,可以弥补当今市场上的多处不足。本发明采用了磁探头,按照设计的运动范围和移动方式以预先确定的模式,自动执行从样品中搜索捕获,洗涤和释放靶细胞的操作。靶细胞的捕获机制是,磁珠表面的特异性抗体,可以识别靶细胞并与靶细胞结合,当把这些有抗体结合的磁珠与样品(如血液或其他生物材料)相混合,培养后,就可形成靶细胞-抗体-磁珠的复合体。这种

结合后的复合体，可以被磁场或磁铁所捕获，从而达到富集，抽提稀有靶细胞，并可用作单细胞分析的材料，对单个细胞作免疫和分子生物学方面的鉴定和分析。

[0042] 本发明首先采用磁吸附技术，通过自动控制捕获磁铁(或磁场)和释放磁铁(或磁场)的开和关，来完成搜索捕获，洗净和释放靶细胞的过程。这种磁铁或磁场的开和关的控制，可以通过机械性的插入，移动，或电磁铁的设计，或捕获磁铁的特殊设计来达到目的。操作过程包括，有特异性抗体结合的磁珠和样品的混合培养过程，仪器自动化的靶细胞搜索捕获，洗净和释放，游离磁珠的清除，收集到的靶细胞群或单个细胞的免疫和分子生物学的鉴定和分析。

[0043] 本发明方法和仪器装置用在捕获磁铁上加盖捕获磁铁套来达到捕获的靶细胞不是直接被吸附到磁铁上，而是被吸附到捕获磁铁套的表面，当捕获磁铁或磁场关闭时，捕获的靶细胞可以无损伤地从捕获磁铁套上释放下来，达到有效收集靶细胞的目的。在进行同一样品多次靶细胞搜索捕获时，可以在不更换捕获磁铁套的条件下，通过自动控制捕捉磁铁的磁场和释放磁铁的磁场的开和关，腾出空间，有效完成多次的靶细胞捕获，洗净和释放的过程，以达到提高靶细胞的检测灵敏度和提高检测重复性的目的。此外，带有套子的靶细胞捕获磁铁(或磁场)的搜索捕获运动模式，可以根据要求，作圆周，方形，S形，U形，梳形，或其他各种模式的上下，左右和前后的移动，以不同的模式完成有效的靶细胞捕获，洗涤和释放的步骤，以优化的总体仪器设计和方法，相配套试剂，达到高灵敏度和高效率检测和收集靶细胞的目的。此外，从捕获中，清除未结合的游离磁珠而又不影响靶细胞的收集，是通过在捕获磁铁和收获到的靶细胞之间放置一个过滤装置，该过滤装置的孔径比所用磁珠大，但比靶细胞小，当捕获磁铁的磁场接近时，游离磁珠可通过过滤装置被吸附上来，而有磁珠结合的靶细胞则不能通过过滤装置而停留在下面。这样，可以有效地清除未结合的游离磁珠，而又不丢失收集到的靶细胞，为后续的靶细胞的观察，免疫学和分子生物学的分析，提供高纯度的试验材料。这种过滤装置，可有效地清除 95% 以上的游离磁珠。本发明还以血液循环癌细胞为例，公开了一种直接明了的免疫和分子生物学的方法来鉴定所收集到的细胞的类型和生物特性，特别是基因水平的细胞鉴定方法，直接明了，比传统的免疫荧光分析法更有发展和利用空间。

[0044] 本发明提及的方法和仪器装置，包括捕获磁铁探头，释放磁铁和控制捕获磁铁和释放磁铁开和关的装置，捕获磁铁套，过滤装置，自动驱使磁铁探头，可作 X, Y, Z 三向运动的，由对应软件自动控制的机械臂，以及一个或多个位置空间用来放置装样品和缓冲液的细胞培养皿，包括放置样品槽，样品洗净槽和捕获样品释放槽。

#### 附图说明

[0045] 下面结合附图和实施方式对本发明作进一步详细的说明。

[0046] 图 1 是该细胞分离，提取仪器装置内部配置的顶视图。在这个特别的配置中，该细胞分离提取仪器装置，设有由机械臂驱动的两个磁铁探头(捕获磁铁探头 101)，三个标准的 6 孔细胞培养板(103)，6 个放置捕获磁铁探头套的套孔(102)，1 个废物收集箱(104)用于收集使用过的捕获磁铁套。磁探头运动控制系统和设置磁铁或磁场开/关的部件和控制磁铁开/关并完成靶细胞的捕获，洗净和释放的自动化控制系统没有在这里显示。

[0047] 图 2 是一个新设计的捕获磁铁探头的运动方式模式，包括搜索捕获，洗净和释放

靶细胞过程的平面和线路图。依据这个特殊的设计,细胞分离提取仪器装置可以同时处理两个样本。搜索捕获靶细胞的样品槽呈四齿梳形,洗净槽是呈 S 形,首次细胞释放槽是圆形,第二洗净槽是 U 形,终点细胞释放槽也是圆形。该图说明,大小未按比例。

[0048] 图 3 是描述的仪器装置捕获细胞和释放细胞的侧视图。当捕获磁铁处于开启的状态,释放磁铁切换为关的状态时,靶细胞和磁珠会被吸附在捕获磁铁套的表面,保持这种状态时,可以进入洗净槽清洗,进入释放槽后,释放磁铁处于开启的状况,捕获磁铁切换为关闭的状态,吸附在捕获磁铁套表面的靶细胞和磁珠就会被释放到释放槽内。这一过程是完全自动控制的。

[0049] 图 4 是在一个样本槽内捕获磁铁的搜索捕获靶细胞的运行模式一例。捕获磁铁进入样品槽时,基本上在中心位置,然后移向边缘。搜索运动可以是顺时针方向或逆时针方向运动。每一圈的间隔和捕获磁铁的高度(磁铁底部和培养皿底表面的距离)则随磁铁块的大小和磁场强弱而定。

[0050] 图 5 与细胞分离提取仪器装置配套的零部件实例。5A:磁铁可以上下自由移动的捕获磁铁探头;5B:捕获磁铁套,用于隔离靶细胞和磁铁,避免直接接触;5C:捕获磁铁套套在捕获磁铁上;5D:用于清除游离磁珠的过滤装置部件,其过滤孔大于磁珠,小于靶细胞。

[0051] 图 6 是细胞分离提取装置运作过程图。一次性的捕获,洗净和释放,可以在同一标准的 6 孔细胞培养皿进行,样品放在 C1 槽内,捕获操作也在 C1 槽内完成;洗净操作在 W1 槽内完成;释放在 R1 槽内完成;作为提高检测的灵敏度和提高靶细胞的纯度,捕获操作和释放再捕获的过程需要多次进行。这时,需要两个标准的 6 孔培养皿来完成这一操作。举一例,样品放在 C1,捕获也在 C1 进行,第一次洗净在 W1 (第 2 个培养皿内),释放在 R1/C2 进行;这时,捕获磁铁套表面腾出空间后,可按需要重复多次刚才的捕获,洗净和释放操作,捕获的产物都释放在 R1/C2 槽中;最后一次,可以更换捕获磁铁套(仪器自动操作),新的捕获磁铁套套上后,在 R1/C2 槽中,将第一次释放的靶细胞重新捕获(第一次夹进去的非靶细胞除外),在 W2 槽中洗净,最终释放靶细胞在 R2 槽中。这种操作,既可提高检测的灵敏度,又可提高收获的靶细胞的纯度,检测的重复性好。这只是一例,由这种组合,可以按需要,进行各种不同的操作程序。

[0052] 图 7 显示捕获磁铁移动和通过捕获磁铁的开/关来分离提取靶细胞的操作图。样品槽和洗净槽中,释放磁铁是关的状态,只有释放靶细胞槽底部,释放磁铁是开的。当捕获磁铁移到释放槽中,释放磁铁就会因磁性同极相斥,将捕获磁铁顶上去(捕获磁铁可以上下自由运动),捕获磁铁套表面的靶细胞就会释放下来。当需要再从释放槽中捕获靶细胞时,释放槽底下的释放磁铁可以自动关闭(电磁铁,或移走永久磁铁)。这种设计有利于多次捕获,洗净和释放操作,提高灵敏度,重复性和收获细胞的纯度,减少操作时间的优点。

[0053] 图 8 显示在捕获磁铁(装了套子)和捕获细胞之间,安装过滤装置后,清除游离的磁珠而又不影响收获的靶细胞的工作原理。过滤装置的孔径比磁珠大,但比靶细胞小。在捕获磁铁搜索捕获时,游离磁珠可以通过过滤孔而被除掉,但靶细胞则留在原处,不受影响。这种方法,过滤孔不会被堵塞,因为当捕获磁铁接近时,如果有靶细胞堵住过滤孔,也只是暂时的,当捕获磁铁移到别处时,靶细胞又会因重力,掉下来,为下一次磁珠留下通道。这种方法,可以进行多次的搜索捕获,以达到有效地清除游离的磁珠。这种方法,可以很容易地清除 95% 以上的游离磁珠,提高收集的靶细胞的纯度,为靶细胞的 DNA/RNA 和蛋白质等的分子

生物学分析提供好材料。

[0054] 图 9 显示在样品槽中安放过滤片,可以过滤部分比过滤片的孔径小的红细胞和血小板等,增加靶细胞的捕获效率。该搜索捕获,可以是一次性,也可以是多次性的。

[0055] 图 10 显示收集的捕获产物中,有大量的游离磁珠,直接在显微镜下,根本无法观察到靶细胞。但经过过滤装置清除游离的磁珠后,95% 以上的游离磁珠被清除,靶细胞则可清楚地被观察到。10A:刚释放的捕获物;10B:显微镜下观察的图象,是一团游离磁珠,完全看不到靶细胞;10C:游离磁珠被清除后,显微镜下,可清楚地观察到靶细胞。

[0056] 图 11 显示了使用特定的生物标志物免疫组织化学染色方法鉴定骨髓癌细胞的一例。11A:角蛋白阳性(FITC 标记)细胞;11B:DAPI 染色细胞核;11C:CD45 的(血细胞特异性标记物)阳性细胞;11D:角蛋白,DAPI 和 CD45 三种标记物的合并图像。癌细胞是角蛋白阳性,DAPI 阳性,但 CD45 是阴性;血细胞是 CD45 阳性,DAPI 阳性,角蛋白一般呈阴性。

[0057] 图 12 显示了癌细胞株和血液循环癌细胞,骨髓癌细胞等单个细胞中的基因表达的结果。

[0058] 图 13 总结了单细胞 qRT-PCR 的分析结果。

### 具体实施方式

[0059] 图 1 显示了该发明仪器装置的平面图。磁场探头支架与两个磁探头(部件 101),六个磁铁探头套放置孔(部件 102),可放置 3 个标准的 6 孔细胞培养板(部件 103),磁铁套收集箱(部件 104)。机械臂和软件控制系统,温度控制系统,UV 灯等部件,没有在此标示。生物样品拿到后,首先把磁珠和样品进行培养,然后,转移到 6 孔细胞培养皿中,在相关的槽中加上细胞缓冲液,放到仪器内部。将捕获磁铁套放到位。由软件控制的机械臂控制着捕获磁体探头,自动移动到磁铁套位置,将磁铁套套上,并调整好高度。捕获磁铁接着移动到样品槽,按照设计的方法,在样品槽的样品中搜索捕获靶细胞。搜索的途经,可以是多种模式,圆形,方形,梳形,U 形,S 形等。完成靶细胞搜索后,捕获磁铁连带捕获产物进入洗净槽,完成捕获产物的洗涤过程,然后进入产物释放槽,将捕获的产物释放在干净的缓冲液中。完成预定的靶细胞捕获,洗净和释放操作后,自动机械臂将捕获磁铁带到磁铁套回收箱处,自动拿掉磁铁套后,磁铁装置回归到本部,结束一套完整的操作。图中未显示的包括有 x, y, z 的三相自动控制,温度控制,UV 灯的控制等。

[0060] 图 2 显示了一种为 CI-101 细胞富集,提取仪器设计的新的迷宫式细胞容器和利用这种培养皿进行细胞富集,提取工作原理图。新设计的细胞容器,靶细胞捕获操作在梳形的样品槽中,以直线来回的搜索捕获模式,捕获靶细胞。完成搜索捕获操作后,进入洗净槽。洗净槽为 S 形,捕获的产物按图示方向,直线来回洗净后,将捕获物第一次释放到第一次释放槽。重复以上操作或直接进入下一过程。捕获磁铁更换磁铁套后,回到第一次释放槽中,将第一次释放的捕获物,重新捕获提取,然后进入第二次洗净槽中进行洗净,并将产物释放到最终的释放槽中,到此,一次的样品富集提取操作完成。该设计的细胞容器,一次可以同时处理两个样品。

[0061] 图 3 所示的是捕获磁铁和释放磁铁的开/关及其工作原理。磁探头座(101)可以装有两个磁铁探头(202),带有磁铁套(201)。当捕获磁铁进行搜索捕获靶细胞时,捕获磁铁的磁场是开的状况;该处的释放磁铁是关闭的(204)。此时,样品中的靶细胞被吸附在磁

铁套的表面。当需要释放靶细胞时,捕获磁铁的磁场处于关闭的状态,释放磁铁的磁场处于开的状态(206),吸附在磁铁套表面的靶细胞就会释放到释放槽中(205)。

[0062] 图4举例说明捕获磁铁在搜索靶细胞时的运行路线。当捕获磁铁进入样品槽时,是从槽的中心位置进入(202),然后,走到槽的边缘(203),以顺时针或反时针,搜索捕获靶细胞。技术指标上,捕获磁铁的高度(套子的底部和槽的内表面之间的距离,捕获磁铁做圆形搜索捕获细胞时,每圈的间隔,是由磁铁和磁场的大小,强弱和微磁珠的大小来决定。

[0063] 图5展示了细胞富集提取仪器装置的相关部件。捕获磁铁探头(5A)中的磁铁部分可以上下自由移动。磁铁套(5B)可以刚好套在捕获磁铁部分的表面(5C),使捕获磁铁进入工作状态。当需要清除游离的微磁珠时,过滤装置(5D是一例)将被放在收集的捕获物上(但又不碰到捕获物),再用捕获磁铁搜索吸附游离的微磁珠,转移到别的槽中,以达到清除游离磁珠的目的。这种操作,将可以有效清除捕获物中的95%以上的磁珠。使捕获物高度纯化。

[0064] 图6是细胞分离提取装置运作过程图。一次性的捕获,洗净和释放,可以在同一标准的6孔细胞培养皿进行,样品放在C1槽内,捕获操作也在C1槽内完成;洗净操作在W1槽内完成;释放在R1槽内完成;作为提高检测的灵敏度和提高靶细胞的纯度,捕获操作和释放再捕获的过程需要多次进行。这时,需要两个标准的6孔培养皿来完成这一操作。举一例,样品放在C1,捕获也在C1进行,第一次洗净在W1(第2个培养皿内),释放在R1/C2进行;这时,捕获磁铁套表面腾出空间后,可按需要重复多次刚才的捕获,洗净和释放操作,捕获的产物都释放在R1/C2槽中;最后一次,可以更换捕获磁铁套(仪器自动操作),新的捕获磁铁套套上后,在R1/C2槽中,将第一次释放的靶细胞重新捕获(第一次夹进去的非靶细胞除外),在W2槽中洗净,最终释放靶细胞在R2槽中。这种操作,既可提高检测的灵敏度,又可提高收获的靶细胞的纯度,检测的重复性好。这只是一例,由这种组合,可以按需要,进行各种不同的操作程序。

[0065] 图7显示捕获磁铁移动和通过捕获磁铁的开/关来分离提取靶细胞的操作图。样品槽和洗净槽中,释放磁铁是关的状态,只有释放靶细胞槽底部,释放磁铁是开的。当捕获磁铁移到释放槽中,释放磁铁就会因磁性同极相斥,将捕获磁铁顶上去(捕获磁铁可以上下自由运动),捕获磁铁套表面的靶细胞就会释放下来。当需要再从释放槽中捕获靶细胞时,释放槽底下的释放磁铁可以自动关闭(电磁铁,或移走永久磁铁)。这种设计有利于多次捕获,洗净和释放操作,提高灵敏度,重复性和收获细胞的纯度,减少操作时间的优点。

[0066] 图8显示在捕获磁铁(装了套子)和捕获细胞之间,安装过滤装置后,清除游离的磁珠而又不影响收获的靶细胞的工作原理。过滤装置的孔径比磁珠大,但比靶细胞小。在捕获磁铁搜索捕获时,游离磁珠可以通过过滤孔而被除掉,但靶细胞则留在原处,不受影响。这种方法,过滤孔不会被堵塞,因为当捕获磁铁接近时,如果有靶细胞堵住过滤孔,也只是暂时的,当捕获磁铁移到别处时,靶细胞又会因重力,掉下来,为下一次磁珠留下通道。这种方法,可以进行多次的搜索捕获,以达到有效地清除游离的磁珠。这种方法,可以很容易地清除95%以上的游离磁珠,提高收集的靶细胞的纯度,为靶细胞的DNA/RNA和蛋白质等的分子生物学分析提供好材料。

[0067] 图9显示在样品槽中安放过滤片,可以过滤部分比过滤片的孔径小的红细胞和血小板等,增加靶细胞的捕获效率。该搜索捕获,可以是一次性,也可以是多次性的。

[0068] 图 10 显示收集的捕获产物中,有大量的游离磁珠,直接在显微镜下,根本无法观察到靶细胞。但经过过滤装置清除游离的磁珠后,95% 以上的游离磁珠被清除,靶细胞则可清楚地被观察到。10A :刚释放的捕获物 ;10B :显微镜下观察的图象,是一团游离磁珠,完全看不到靶细胞 ;10C :游离磁珠被清除后,显微镜下,可清楚地观察到靶细胞。

[0069] 图 11 显示了使用特定的生物标志物免疫组织化学染色方法鉴定骨髓癌细胞的一例。11A :角蛋白阳性(FITC 标记)细胞 ;11B :DAPI 染色细胞核 ;11C :CD45 的(血细胞特异性标记物)阳性细胞 ;11D :角蛋白,DAPI 和 CD45 三种标记物的合并图像。肿瘤细胞是角蛋白阳性,DAPI 阳性,但 CD45 是阴性 ;血细胞是 CD45 阳性,DAPI 阳性,角蛋白一般呈阴性。

[0070] 图 12 显示了癌细胞株和血液循环癌细胞,骨髓癌细胞等单个细胞中的基因表达的结果。以四种基因(UBB, CD45, CKs, EpCAM)的表达为例,在单个的癌细胞株(T47D, SKBR 3,MDA 231,MCF7)的细胞,血液白细胞,血液循环癌细胞,骨髓癌细胞进行了单细胞的检测。根据 CD45 的表达,癌细胞不表达 CD45,但表达 UBB, CKs(角蛋白),除了血液循环癌细胞之外,其他癌细胞都表达 EpCAM,由此可以区分血细胞和癌细胞。

[0071] 图 13 记述了四种基因(UBB, CD45, CKs, EpCAM) RT-QPCR 检测结果。以不表达基因水平为 0,表达基因的 DELTA CT 来表示个基因的表达水平,DELAT CT 高,表示基因的表达水平高。Ref :人类参考 RNA ;NTC :无地物 PCR 反应 ;T47D :癌细胞株 ;SKBR3 :癌细胞株 ;MDA231 :癌细胞株 ;MCF7 :癌细胞株 ;N-wbc :正常人的血液白细胞 ;CTC :乳腺癌患者的血液循环癌细胞 ;DTC :乳腺癌患者的骨髓癌细胞。UBB :对照的结构基因 ;CD45 :血液白细胞特异性表达基因 ;EpCAM :上皮组织细胞特异性表达基因 ;CKs :角蛋白基因群。

[0072] 本发明是针对一个富集,分离,提取和分析靶细胞的方法和仪器装置,包括多细胞和单细胞水平的细胞学,免疫和分子生物学方面的鉴定和分析。这里所描述的仪器装置主要是为富集,分离,提取,纯化各种靶细胞,如血液循环癌细胞或骨髓癌细胞等。该装置可用于各种稀有细胞的富集,分离和净化,自动并有效地完成捕获,洗净和释放靶细胞的操作过程,这个操作过程可以自由组合,可以是单次的,也可以是多次的。整个过程中,磁铁套可按需要不更换,或少量次数的自动更换(防止污染)。这种方便的,高度自动化操作程序,具有更多的灵活性,并提高了检测靶细胞的灵敏度,提高了检测的重复性。该仪器设备,不仅是适用于稀少或其他的靶细胞上,也可以用在制药,食品等行业的检测上。

[0073] 以下详细介绍了用于细胞分析仪器设备的配置和相关程序的运作。基本的操作程序是,将有识别靶细胞的抗体结合在表面的磁珠和生物样品进行混合,培养半到一小时。之后,将这混合样品放入 6 孔的细胞培养皿的样品槽中,将其他需要用的培养皿的槽中,加入适当的缓冲液。启动仪器的操作程序。机械臂带动捕获磁铁探头,移动到磁铁套位置,将磁铁套自动套上,并调整磁铁探头的高度。然后,捕获磁铁探头移入样品槽,按照程序编制,在样品中以设计好的线路搜索捕获靶细胞,搜索完了后,捕获磁铁探头带着磁铁套上的捕获物,进入洗净槽,以不同的位置和速度,在洗净槽中转动,达到洗掉非特异性结合的杂质的目的。清洗后,捕获磁铁探头继续带着洗过的捕获物,进入释放槽。一般情况下,释放磁铁在释放槽的底部。当捕获磁铁进入释放槽后,释放磁铁此时是开启的,捕获磁铁此时是关闭或在捕获物吸附的部位减到很弱的程度,磁铁套上的靶细胞和一些游离的微磁珠,就被释放磁铁吸下来,留在释放槽中。收集到的捕获物,可以以细胞群的方式进行 DNA, RNA 或蛋白质分析,鉴定特殊细胞的存在(例如 :病变细胞等)。也可以单个细胞吸取后,放到 PCR 试管

中,加上 RNA 保存试剂,立即作分子生物学分析或保存在 -80 度或 -20 度冰箱中,备用。单个细胞 DNA 或 RNA 分析是,先将单细胞的 DNA 或 RNA 进行扩增(不学先抽提 DNA 或 RNA,而是直接由细胞裂解后,扩增 DNA 或 RNA)。在用扩增后的产物,作基因突变分析或特定基因 RNA 表达谱的分析。由 DNA 或 RNA 图谱的分析结果,鉴定所捕获的细胞的种类和生物学特性。当中,细胞的鉴定,也可以在捕获后,直接作免疫荧光识别法来鉴定细胞。

[0074] 阳性磁珠富聚细胞的方法,在收获到的产物中,有很多游离的未与靶细胞结合的微磁珠,极大地影响了靶细胞的观察和后续的各种生物学分析。本专利利用过滤器和捕获磁铁相结合,在捕获产物和捕获磁铁之间,加上一过滤器,磁场可以透过过滤器将游离磁珠吸附走,该方法可以清除 95% 以上的游离磁珠,使捕获产物大大地纯化。

[0075] 该细胞分析仪器具有 X, Y, Z 三向自动控制移动的机械臂,可以作上下,左右和前后运动。作为富聚,分离,提取细胞的附加的部件有捕获磁铁,捕获磁铁套,释放磁铁,细胞培养皿用来作为样品槽,洗净槽和释放槽。通过设计软件的编辑,搜索捕获,洗净和释放等

[0076] 操作可以作各种组合,以达到高检测灵敏度,高稳定性和细胞的高纯度。通过自动调节捕获磁铁和释放磁铁的开和关,可以让捕获磁铁探头有效地捕获靶细胞和释放靶细胞。通过在捕获磁铁和捕获产物之间加上过滤器,可以有效地清除游离的未和靶细胞结合的微磁珠。从而获得更高纯度的捕获产物,为细胞的进一步的免疫和分子生物学分析,提供更好的试验或检测材料。

[0077] CI-101 参数

[0078] 捕获磁铁棒的磁力强度,决定着捕获磁铁探头和靶细胞之间的距离和靶细胞的捕获效率。如使用标准的直径为 0.5cm,长度为 2.5cm 的永磁磁棒,探头扫描速度需要调整在每秒 1-5mm,捕获步骤和洗涤步骤中的移动速度为每秒 2.5-3.0mm,同时保持探头和容器底面的距离为 0.5 到 1mm。每个扫描线路的路径间距为 1-3mm,保证有足够的重叠以不错过潜在的靶细胞。这些参数,也和磁珠的大小相关。磁珠大小在 1-4.5 微米时,可以参照上述参数。

[0079] 单细胞分析

[0080] 用本细胞仪器捕获的靶细胞,可以通过过滤器清除游离的未和靶细胞结合的微磁珠。然后,仔细的吸取单细胞,作 DNA 和 RNA 标记物的分析之用。例如,在分析鉴定血液循环癌细胞时,EpCAM,CK8/18/10 和 CD45 等生物标志物常被使用。使用定量 PCR 鉴定血液循环癌细胞时,一般认为,CD45 (血细胞标记物)是阴性,EpCAM 和 CK8/18/19 为阳性表达。

[0081] 下面的例子原则上是为解释这项发明提供参考所用,不是全部内容

[0082] 实施例 1

[0083] 靶细胞捕获,洗净和释放操作在一个标准的,单一的,6 孔细胞培养板中完成完成(适用于培养细胞的提纯):

[0084] 用 TRIPLE (Life Tech) 收获 DMEM (Invitrogen) 培养的细胞。吸取近 1000 个 MCF 细胞加到含 10 毫升 DMEM 的 15mL 试管中,加入 10 微升的 EpCAM 微磁珠(DYNAL),在室温下,混合旋转培养 30 分钟到 1 小时。然后,将该混合样品倒入 6 孔细胞培养板中的样品槽中,在其他槽中,加入 10 毫升的 PBS 缓冲液(pH 值 =7.2)(可以是任何其他符合细胞试验的缓冲液)。用该细胞仪器 CI-101,执行捕获捕获,洗涤和释放操作。以上操作,可以是一次性的或多次性的。如果是一次性的话,整个操作会在 10 分钟内完成。这种方法适用于背景

细胞较少的靶细胞的分离提纯,并获得相对较纯的表达 EpCAM 的 MCF7 细胞。该细胞释放到 PBS 缓冲液中,单个细胞可以用来作单细胞 DNA 或 RNA 分析(图 12,图 13)。

[0085] 实施例 2

[0086] 多次及不同组合的靶细胞的捕获,洗净和释放:

[0087] 取约 1000MCF7 细胞放入 10 毫升的正常人的血液中,添加 10 微升的 EpCAM 微磁珠 (DYNAL)的,在 4 度下旋转培养 1 小时(温度可以根据需要调整)。将该混合血液样本倒入第一个标准 6 孔板的一端样品槽中,其他槽(包括第一和第二个标准 6 孔板)则加入 10 毫升的 PBS 缓冲液。用细胞仪器 CI-101 执行靶细胞的捕获,洗净和释放的操作。CI-101 机自动进行三次捕捉,洗净和释放靶细胞的操作,并将每次捕获的靶细胞等产物释放到第一次释放槽中。此时,CI-101 机械臂带着空的用过的磁铁套到退磁铁套箱,将用过的磁铁套换下,套上新的磁铁套,移动到第一次释放槽中,靶细胞搜索捕获,洗净和释放操作,最后将捕获的靶细胞释放到终端释放槽内。在显微镜下可以观察到释放在释放槽中的靶细胞,可单独吸取作单细胞的分子生物学分析(图 6,图 10)。样品槽,洗净槽和释放槽等位置,可以按需要,在设定方法是作调整。

[0088] 实施例 3

[0089] 从阳性磁珠富聚法的捕获物中清除未和靶细胞结合的游离微磁珠:用 EDTA 血液收集管收集 10 毫升乳腺癌患者的血液样本,并短期放置在室温条件下。添加 10 微升 EpCAM 微磁球 (DYNAL) 到该血液样本中,在室温下旋转培养 1 小时。将此混合血液样本倒入第一个标准的 6 孔板的样品槽中。将其他需要用的槽中,均加入 10 毫升的 PBS 缓冲液。启动 CI-101,执行超净细胞分离方法。CI-101 仪器将自动执行三轮捕获,洗净和释放靶细胞的操作,并将捕获物释放到第一释放槽内。为避免磁铁套的污染,CI-101 会自动更换磁铁套,回到第一次释放槽中,执行最后一次靶细胞的捕获,洗净和释放操作。然后,将一孔径为 8 $\mu$ m 过滤器放置在捕获物上(充分接近,但又不碰到捕获物),用捕获磁铁探头,在过滤器的上方,搜索捕获游离磁珠。在此,过滤器的孔径比所用磁珠大小的 4.5 微米大,但比靶细胞(血液循环癌细胞一般在 10-50 微米直径)小。所以,微磁珠可以通过过滤器被清除掉,但不影响靶细胞。这种方法,可以清除 95% 以上的游离微磁珠(图 6,图 10)。这些靶细胞也可用来作单细胞的分子生物学分析(图 12,图 13)。同样,样品槽,洗净槽和释放槽的位置和捕获,洗净和释放的操作可以按需要作各种组合。

[0090] 实施例 4

[0091] 免疫荧光标记法和基因表达谱鉴定单细胞的方法:

[0092] 将乳腺癌患的 3 毫升的骨髓样本,用 100 微米孔径的过滤膜滤去碎骨。剩余的样本,添加 5 微升的 EpCAM 微磁球 (DYNAL),4 度下轻度旋转培养 1 小时。然后将混合样品倒入第一个标准的六孔板的样品槽中。在第一和第二标准 6 孔板的其他槽中,添加 10 毫升的 PBS 缓冲液。用 CI-101 执行超净化细胞分离方法。CI-101 机将自动执行三轮的捕获,洗净和释放靶细胞的操作,并将捕获到的捕获物释放到第一释放槽中。为避免磁铁套的污染,CI-101 会自动更换磁铁套,从第一释放槽开始,完成新一轮的捕获,洗净和释放操作,将靶细胞释放到终端的释放槽中。调整容积后,加入 DNase I,处理 30 分钟(根据厂家建议)。收集一个部分的肿瘤细胞,直接进行液态的免疫荧光标记分析或放置到细胞玻片,空气干燥,固定处理后,作免疫细胞识别分析。CD45 抗体 (TexasRed 标记),角蛋白抗体 (FITC 标记),

和 DAPI (细胞核标记)封片试剂被用来作免疫荧光染色,以鉴定肿瘤细胞或血细胞(图 11)。例如,CD45 和 DAPI 阳性的细胞将被视为血细胞,CD45 阴性,DAPI 和角蛋白阳性的细胞将被定为癌细胞(图 11)。

[0093] 收集的另一部分癌细胞被用于单个癌细胞分子生物学分析和鉴定。收集到的细胞,用 PBS 缓冲液,在它的细胞培养板中散开。用试验枪吸取单个的 EpCAM 微珠阳性(有磁珠结合)细胞,分别放入 100 微升的 PCR 管中。然后,直接由细胞进行 RNA 的转录和 cDNA 基因扩增(Cell Direct,Life Tech)。扩增的 cDNA 用于多个基因的检测,包括但不限于 CD45 (血细胞的特定基因),细胞角蛋白,EpCAM,UBB(对照基因)。依基因表达的特征,可以决定细胞类型。例如,细胞表达 CD45 和 UBB 的,将考虑为血细胞;细胞表达 UBB,角蛋白或 EpCAM,但不表达 CD45 的,可确认为癌细胞(图 12, DTC1-3)。

[0094] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

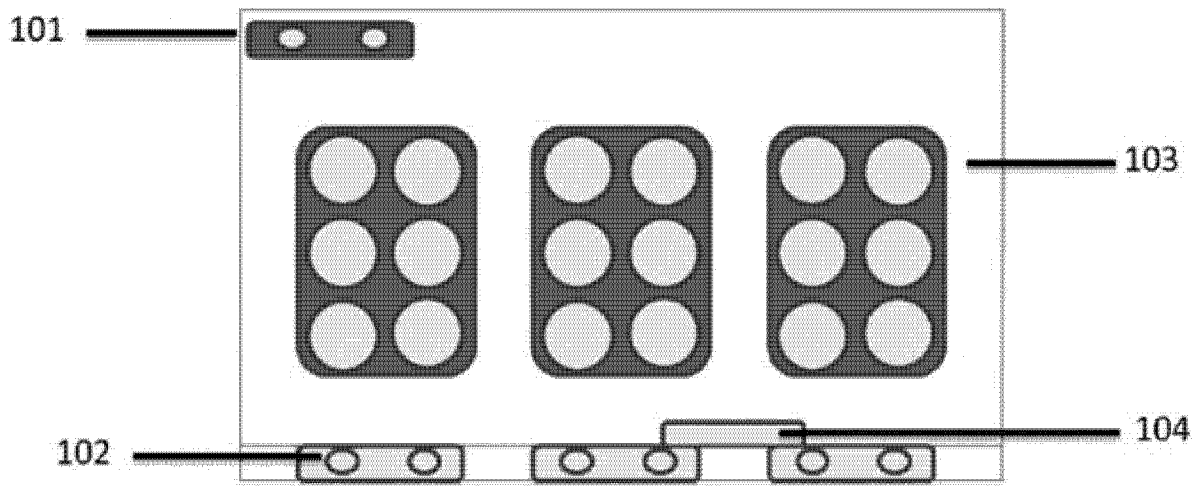


图 1

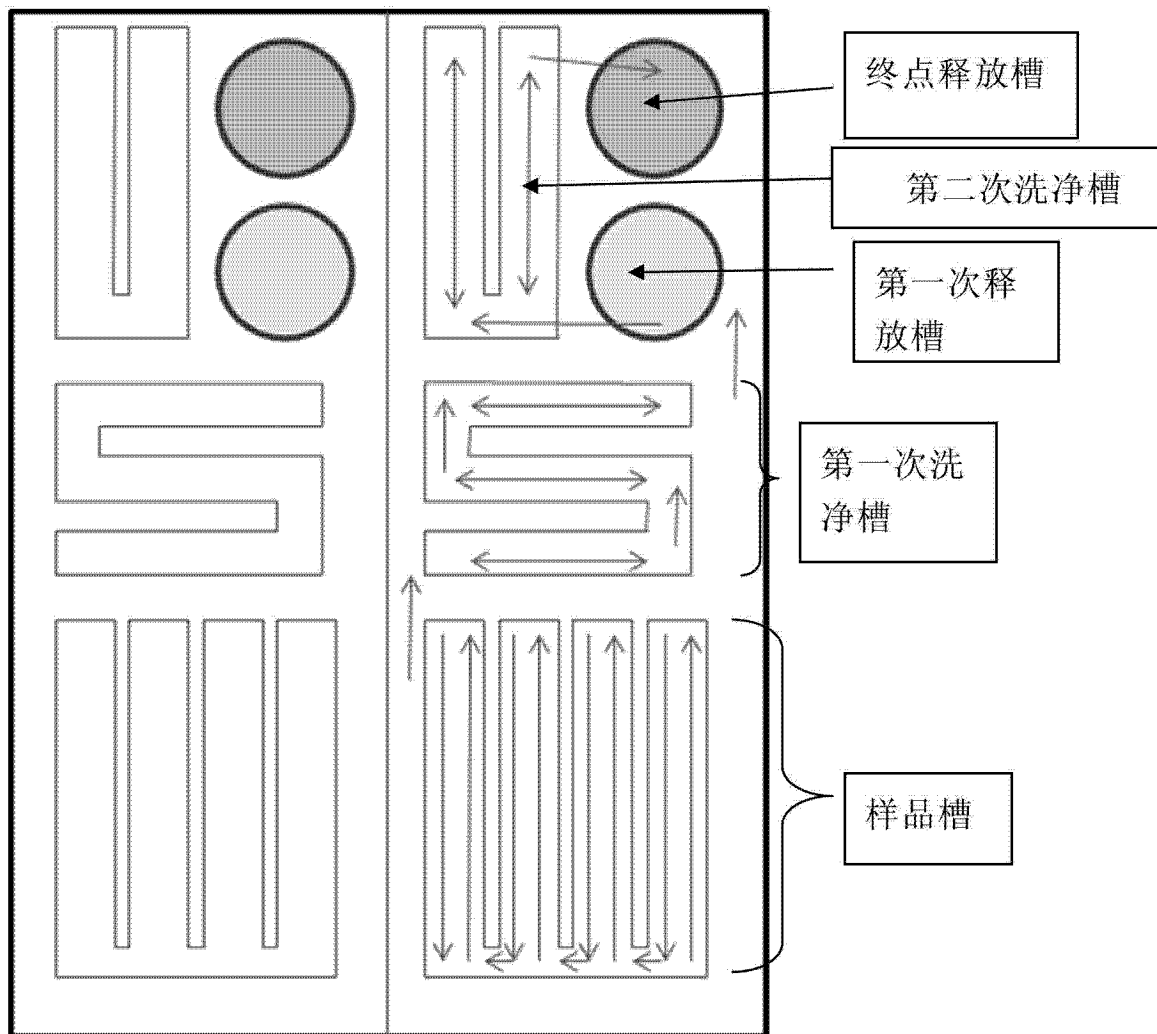


图 2

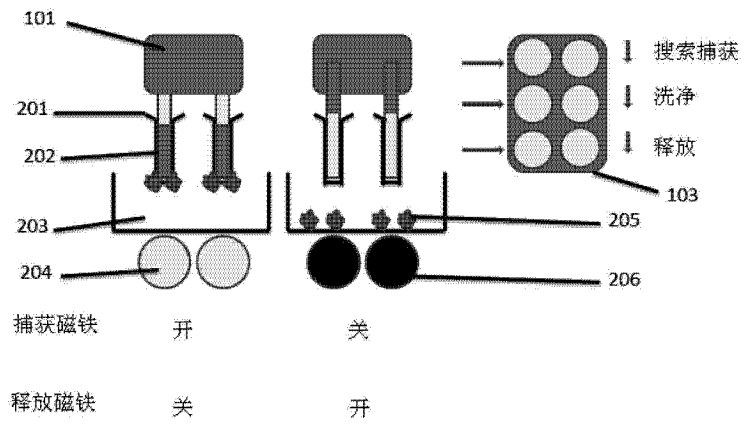


图 3

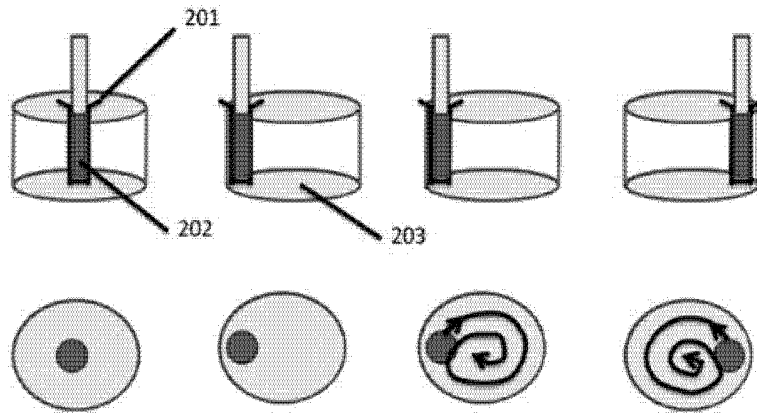


图 4



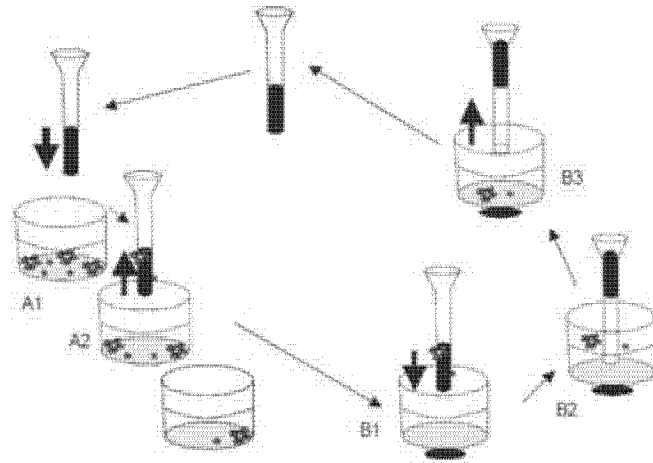


图 7

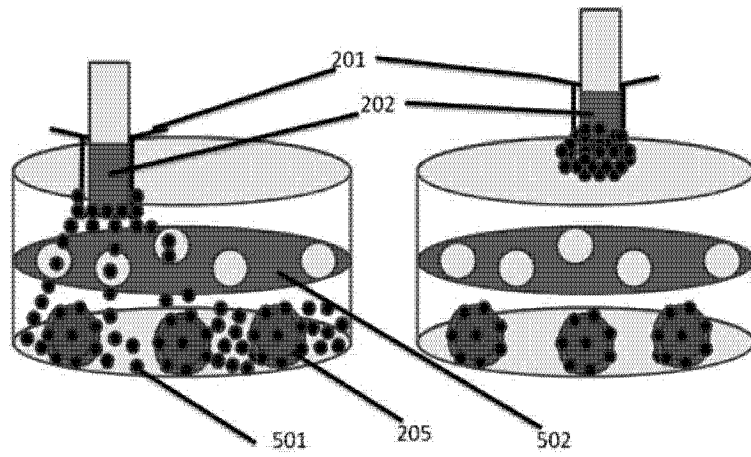


图 8

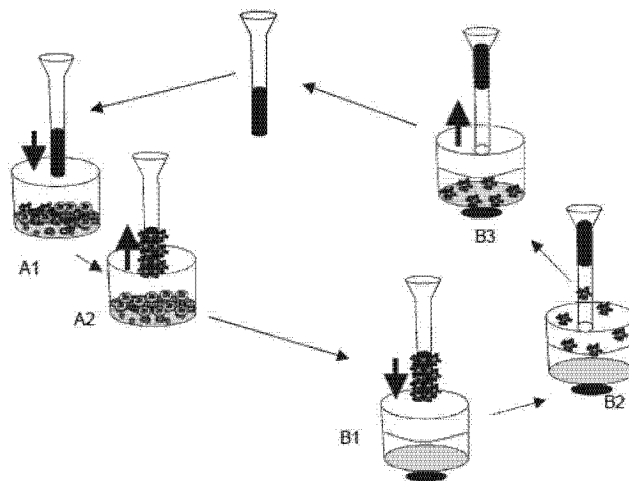


图 9

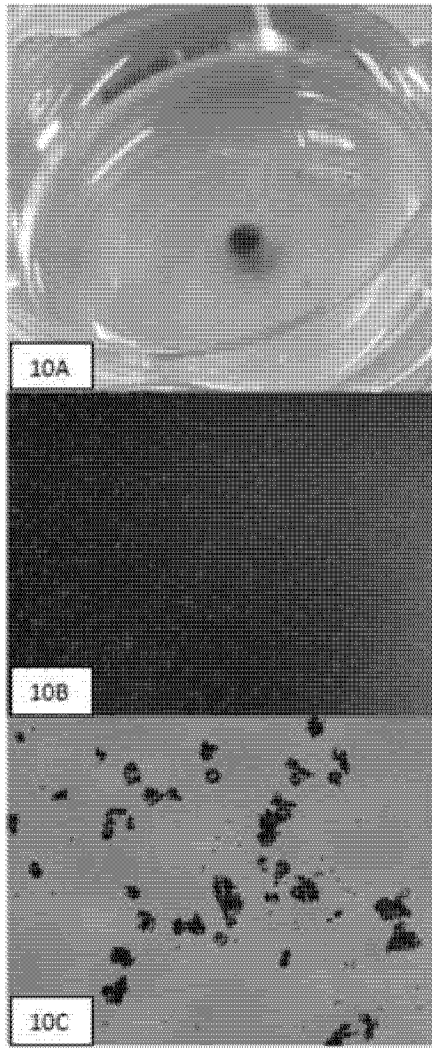


图 10

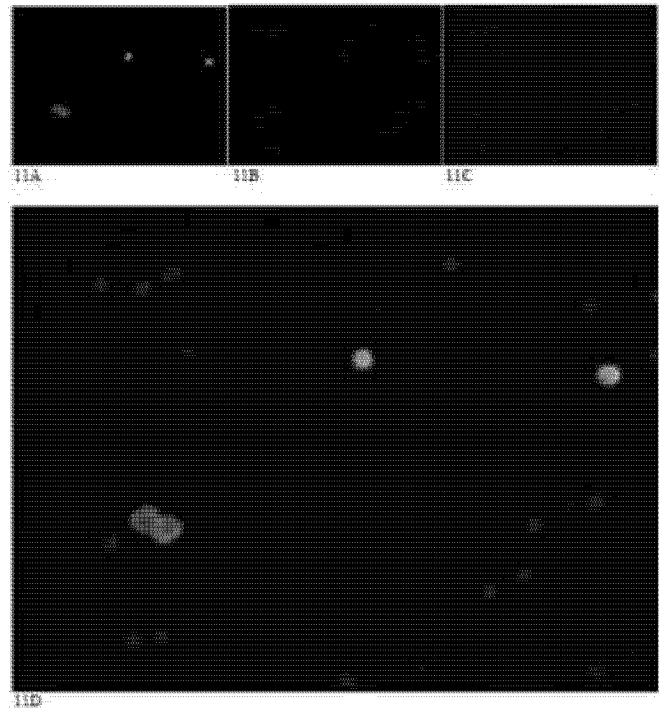


图 11

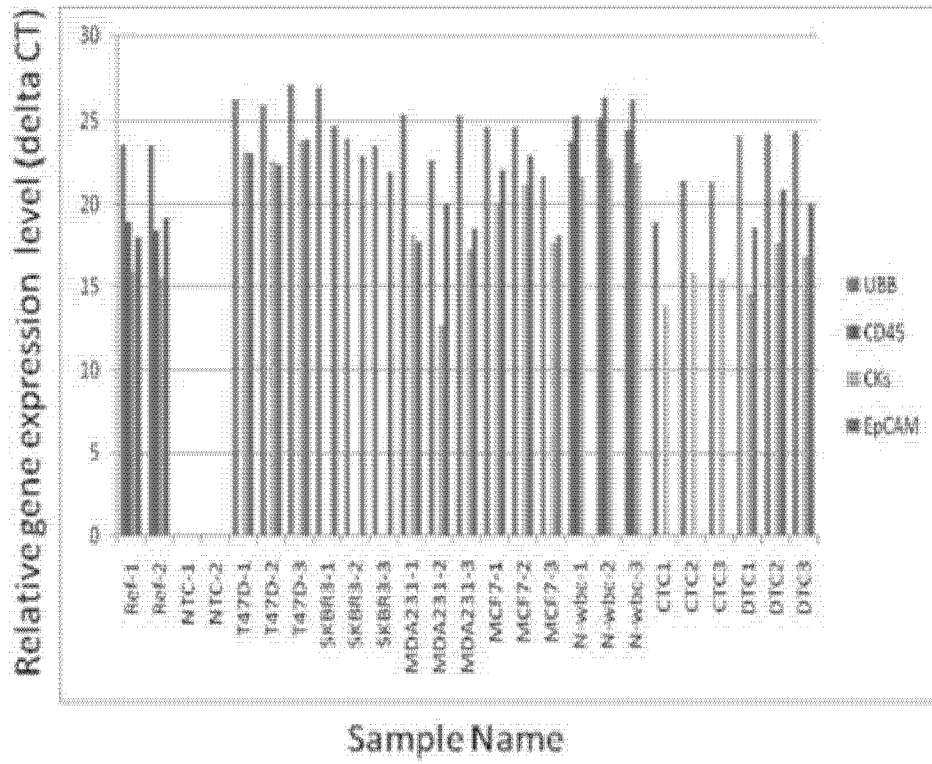


图 12

Sample Name	UBB	CD45	CKs	EpCAM
Ref-1	23.52	18.91	15.87	17.98
Ref-2	23.47	18.36	15.56	19.09
NTC-1	0	0	0	0
NTC-2	0	0	0	0
T47D-1	26.28	0	23.09	23.06
T47D-2	25.95	0	22.54	22.32
T47D-3	27.18	0	23.78	23.86
SKBR3-1	27.01	0	0	24.65
SKBR3-2	23.91	0	0	22.87
SKBR3-3	23.46	0	0	21.87
MDA231-1	25.35	0	18.17	17.67
MDA231-2	22.61	0	12.66	20
MDA231-3	25.24	0	17.17	18.48
MCF7-1	24.61	0	20.13	22.05
MCF7-2	24.63	0	21.12	22.9
MCF7-3	21.65	0	17.63	18.06
N-wbc-1	23.8	25.24	21.6	0
N-wbc-2	25.12	26.42	22.73	0
N-wbc-3	24.46	26.27	22.42	0
CTC1	18.91	0	13.87	0
CTC2	21.36	0	15.81	0
CTC3	21.32	0	15.42	0
DTC1	24.08	0	14.62	18.52
DTC2	24.24	0	17.64	20.88
DTC3	24.29	0	16.81	20.05

图 13

专利名称(译)	一种细胞富集、分离、提取的方法和仪器及单细胞分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102690786A</a>	公开(公告)日	2012-09-26
申请号	CN201210181973.0	申请日	2012-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	武汉格蓝丽富科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉格蓝丽富科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉格蓝丽富科技有限公司		
[标]发明人	邓亚光 张杰 田放		
发明人	邓亚光 张杰 田放		
IPC分类号	C12N5/09 C12N5/095 C12N5/078 C12N5/073 C12N15/10 C07K1/14 C12M1/42 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	C12M47/12 C12M35/06 C12M25/16 C12M29/04 C12M47/04		
代理人(译)	刘丽君		
其他公开文献	CN102690786B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种用阳性磁珠法，富集，提取靶细胞，分离单个细胞，并对单个细胞进行免疫和分子生物学鉴定和分析的方法和自动化仪器装置。这种方法和仪器装置，通过多种方法控制捕获磁铁和释放磁铁的开关，完成单次或多次对靶细胞的搜索捕获，洗净和释放操作，从而达到提高靶细胞检测的灵敏度和检测的稳定性。捕获磁铁的搜索捕获靶细胞，其搜索线路可以是圆形，方形，梳形，S形或U形。此外，通过对捕获物的过滤处理，清除绝大部分游离的微磁珠，进一步提高产物的纯度，作为好的试验材料。使用特殊的过滤器和捕获磁铁的吸附相结合，可以有效清除95%以上的游离微磁珠。同时介绍用荧光免疫染色法和分子生物学方法来鉴定单个细胞的类型，分析其生物学特性，为癌症的临床诊断和治疗提供有效的生物学指标。

