



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101443660 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 20

(21) 申请号 200780017396. 9

*G01N 15/06* (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 03. 15

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/782, 470 2006. 03. 15 US

WO 2004029221 A2, 2004. 04. 08,

US 2003219713 A1, 2003. 11. 27,

US 2006223195 A1, 2006. 10. 05,

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 11. 13

Sin等. Enrichment Using Antibody-Coated  
Microfluidic Chambers in Shear Flow:

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/006791 2007. 03. 15

Model Mixtures of Human Lymphocytes.

《Biotechnology and bioengineering》. 2005, 第  
91卷(第7期),

(87) PCT申请的公布数据

WO2007/106598 EN 2007. 09. 20

Sin等. Enrichment Using Antibody-Coated  
Microfluidic Chambers in Shear Flow:

(73) 专利权人 综合医院公司

地址 美国马萨诸塞州

Model Mixtures of Human Lymphocytes.

《Biotechnology and bioengineering》. 2005, 第  
91卷(第7期),

(72) 发明人 D·艾里米亚 X·程 M·托纳

U·德米尔奇 W·罗德里格斯

Murthy等. Effect of flow and surface

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公  
司 72001

代理人 段晓玲 黄可峻

conditions on human lymphocyte isolation  
using microfluidic chambers..《Langmuir: the  
ACS journal of surfaces and colloids》. 2004,  
第20卷(第26期),

(51) Int. Cl.

*G01N 33/53* (2006. 01)

*C12Q 1/68* (2006. 01)

*C12M 1/00* (2006. 01)

*C12M 1/34* (2006. 01)

*B01L 3/00* (2006. 01)

审查员 寇飞

权利要求书2页 说明书15页 附图11页

(54) 发明名称

用于检测细胞及其它分析物的装置和方法

(57) 摘要

本发明重点提供了用于分离分析物(例如细胞)方法、装置和试剂盒。将含有目的分析物的样品引入含有与所述目的分析物结合的部分的微流动装置中。施加剪切应力,其大到足以防止非目的分析物结合并小到足以使得目的分析物结合。一旦结合,就可以对目的分析物进行分析(例如计数)。本发明还重点提供了用于确定用于分离目的分析物的剪切应力的方法。

1. 一种用于从样品中分离 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞的方法,所述方法包括:
  - (a) 将所述样品引入涂布有结合所述 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞的细胞表面标记物的结合部分的微流动装置;
  - (b) 向所述微流动装置中的所述样品施加在约 1dyn/cm<sup>2</sup> 和约 3dyn/cm<sup>2</sup> 之间的受控的剪切应力,其中所述剪切应力小得足以使得所述结合部分与以第一浓度表达所述细胞表面标记物的所述 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞结合,并且大得足以抑制所述结合部分与非目的细胞的结合,所述非目的细胞含有低于所述第一浓度的第二浓度的所述细胞表面标记物。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述样品是血样。
3. 权利要求 1 所述的方法,其中所述结合部分结合 CD66、CD14、CD4、CD8、EpCAM、E 选择蛋白、或 P 选择蛋白,并且其中所述用于分离目的细胞的方法用于非诊断目的。
4. 权利要求 1 所述的方法,其中所述结合部分是抗 CD4 抗体。
5. 权利要求 4 所述的方法,其中所述样品来自具有 AIDS 发展风险的患者。
6. 权利要求 1 所述的方法,进一步包括 (c) 分析所述 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞的至少一种生物学性质。
7. 权利要求 6 所述的方法,其中所述生物学性质选自以下组:mRNA 表达、蛋白质表达、DNA 定量、DNA 序列、和染色体异常。
8. 权利要求 1 所述的方法,进一步包括 (c) 计数所述结合所述结合部分的 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞。
9. 权利要求 4 所述的方法,进一步包括 (c) 计数所述 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞,其中所述用于分离目的细胞的方法用于非诊断目的。
10. 权利要求 1 所述的方法,其中所述 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞与所述结合部分的结合与施加受控的剪切应力同时进行。
11. 一种用于从样品中分离目的细胞的方法,所述方法包括:
  - (a) 将所述样品引入含有对第一目的细胞具有特异性的第一结合部分的微流动装置,其中所述第一结合部分置于第一腔室中;
  - (b) 向所述微流动装置的第一腔室中的所述样品施加受控的第一剪切应力以使所述第一目的细胞保持结合而其它细胞不结合;
  - (c) 使剩余样品流入所述微流动装置的第二腔室中,其中所述第二腔室含有对第二目的细胞特异性的第二结合部分;以及
  - (d) 向所述第二腔室中的所述样品施加受控的第二剪切应力以使所述第二目的细胞保持结合而非目的细胞不结合,其中所述第一和第二结合部分各自结合所述第一和第二目的细胞群体的细胞表面标记物,和其中所述各自的第一和第二剪切应力小得足以使得以特定浓度表达所述各自的细胞表面标记物的所述各自的第一和第二目的细胞结合,并且大得足以防止非目的细胞的结合,所述非目的细胞含有浓度低于所述各自的第一和第二目的细胞群体的所述各自的第一和第二细胞表面标记物,并且其中所述受控的第一剪切应力在约 1dyn/cm<sup>2</sup> 和约 3dyn/cm<sup>2</sup> 之间或所述受控的第二剪切应力在约 1dyn/cm<sup>2</sup> 和约 3dyn/cm<sup>2</sup> 之间。
12. 权利要求 11 所述的方法,其中所述第一结合部分选自以下组:抗体、抗体片段、寡肽或多肽、核酸、细胞受体、配体、适配体、MHC 肽单体或寡聚体、生物素、抗生物素蛋白、寡核

苷酸、配位复合物、合成聚合物以及碳水化合物。

13. 权利要求 11 所述的方法,其中所述第二结合部分选自以下组:抗体、抗体片段、寡肽或多肽、核酸、细胞受体、配体、适配体、MHC 肽单体或寡聚体、生物素、抗生物素蛋白、寡核苷酸、配位复合物、合成聚合物以及碳水化合物。

14. 权利要求 11 所述的方法,其中所述第一剪切应力和所述第二剪切应力不同。

15. 权利要求 14 所述的方法,其中所述第一结合部分和所述第二结合部分相同。

16. 一种用于分离 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞的试剂盒,包括:

(a) 微流动装置,其包括涂布有结合所述 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞的细胞表面标记物的结合部分的腔室;以及

(b) 用于产生在约 1dyn/cm<sup>2</sup> 和约 3dyn/cm<sup>2</sup> 之间受控的剪切应力的泵,以使所述 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞优先于非目的细胞结合所述结合部分,

其中所述剪切应力小得足以使得以特定浓度表达所述细胞表面标记物的所述 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞结合,并且大得足以抑制非目的细胞的结合,所述非目的细胞以低于所述 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞的浓度表达所述细胞表面标记物。

17. 权利要求 16 的试剂盒,进一步包括对所述 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞具有特异性的标记试剂。

18. 权利要求 16 的试剂盒,进一步包括用于 AIDS 诊断的说明书。

19. 权利要求 1 的方法,其中所述非目的细胞包括 CD4<sup>+</sup> 单核细胞。

20. 权利要求 1 的方法,其中所述 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞和所述非目的细胞具有不同大小。

21. 权利要求 11 的方法,其中所述第一目的细胞和所述第二目的细胞具有与非目的细胞不同的大小。

22. 权利要求 16 的试剂盒,其中所述 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞具有与非目的细胞不同的大小。

23. 权利要求 11 的方法,其中所述第一目的细胞是 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞,或所述第二目的细胞是 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞,并且其中所述非目的细胞包括 CD4<sup>+</sup> 单核细胞。

24. 权利要求 16 的试剂盒,其中所述非目的细胞包括 CD4<sup>+</sup> 单核细胞。

## 用于检测细胞及其它分析物的装置和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2006 年 3 月 15 日提交的美国临时申请 No. 60/782, 470 的权益, 这里通过引用结合进来。

[0003] 发明背景

[0004] 本发明涉及医疗器械、医学诊断和细胞计数领域。

[0005] 在全球 40, 400, 000 感染 HIV 的人中, 35, 000, 000 以上生活在资源局限性显著的发展中国家, 他们中的许多迫切需要诊断、监测和抗逆转录病毒的治疗。在管理 HIV 感染的对象时, 对特定白细胞群体 CD4+T 淋巴细胞的计数被证实为重要的生物学指标。在成人中, 每微升血液中 CD4+T 细胞的绝对数量具有关键的预后和治疗意义, 并用于 HIV 分期和治疗决策中。常规的 CD4 计数监测——每年两到四次——被推荐用于所有的感染阶段。临床上, 低于 200 个细胞  $\text{mL}^{-1}$  的 CD4 计数用以确诊 AIDS, 并且在大多数情况下, 被用作启动抗逆转录病毒治疗 (ART) 和预防机会感染的标记物。较高的 CD4 计数阈值, 即 350 和 500 个细胞  $\text{mL}^{-1}$  被广泛用作增加监测强度的标记物, 并在一些情况下用以启动 ART。然而, 可以负担得起的和合适的用以确定 CD4 计数的实验室监测工具在资源有限的情况下进入量很少, 尽管国际社会在不断努力扩大 ART 在这些地区的可获得性。

[0006] 目前, CD4+T 细胞计数的黄金标准是采用单克隆抗体和商用多用途流式细胞计数仪或单用途 CD4 计数流式细胞计数仪对淋巴细胞亚群的流式细胞计数法。尽管这些仪器通量高而准确, 但其成本和对操作和维护的技术需要限制了其普及并大大制约了 HIV 治疗项目在世界范围内的资源局限地区实施。小型的仪器如 Guava EasyCD4 提供了有限的改进而并没有被广泛地采用。非细胞荧光光度法, 包括 ELISA 和胶珠式测定法, 被认为是 CD4+T 淋巴细胞定量的实用替代方式, 因为这些方法比流式细胞计数需要较少的设备并试剂成本低。然而, 它们的通量低得多, 劳动集约性更大并且准确度较低, 没有广泛使用或被世界卫生组织指南所推荐。

[0007] 此外, 对 CD4 计数后端方面的改进——诸如设备小型化——并没有解决资源局限情况下的最大问题, 即样品制备。在诊断测定的任何步骤中对静脉穿刺采集血液、裂解红细胞、离心样品或使用移液管的需要在这些情况下成为极大的问题。

[0008] 因此, 仍然需要一种诊断和监测 CD4 细胞种群的低成本方法。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明重点提供了一种用于从样品中分离目的细胞的方法, 其通过将所述样品引入含有对目的细胞具有特异性的结合部分的微流动装置, 使得样品中的目的细胞与所述结合部分结合, 并向所述微流动装置施加剪切应力以使目的细胞保持结合而非目的细胞不结合。在该实施方式中, 使目的细胞结合于所述结合部分的步骤和施加剪切应力的步骤可以同时进行。

[0011] 本发明还重点提供了一种用于从样品中分离目的细胞的方法, 其通过将所述样品引入含有对第一目的细胞具有特异性的第一结合部分的微流动装置, 其中所述第一结合部分置于第一腔室中。所述方法包括使得样品中的第一目的细胞与所述第一结合部分结合,

向所述微流动装置施加第一剪切应力以使第一目的细胞保持结合而其它细胞不结合,并使剩余样品流入含有针对第二目的细胞的结合部分的所述微流动装置第二腔室中。该方法进一步包括使得样品中的第二目的细胞与所述第二结合部分结合,并向所述第二腔室施加第二剪切应力以使第二目的细胞保持结合而非目的细胞不结合。在该实施方式中,第一剪切应力和第二剪切应力可以相同或不同。而且在该实施方式中,所述第一结合部分和第二结合部分可以相同或不同。如上所述,所述应力可以在结合发生的同时施加。

[0012] 本发明还重点提供了用于分离目的细胞的试剂盒。该试剂盒包括装置,其包含具有对目的细胞具有特异性的结合部分的腔室,和用于产生剪切应力以使所述目的细胞优先于非目的细胞结合的泵。该试剂盒还可以包括对目的细胞具有特异性的标记试剂。任选地,该试剂盒还可以包括用于 AIDS 诊断的说明书。

[0013] 另一方面中,本发明重点提供了确定在装置上分离目的细胞的剪切应力的方法。该方法包括将含有目的细胞的样品引入微流动装置的腔室中,所述腔室含有对目的细胞具有特异性的结合部分,使得样品中的目的细胞与所述结合部分结合,并向所述微流动装置施加剪切应力。在该方法中,所述剪切应力沿腔室长度变化,并确定目的细胞优先于其它细胞结合所述结合部分的剪切应力。在该方面中,剪切应力可以在结合发生的同时施加。

[0014] 在任何前述的方面中,所述结合部分可以选自抗体、抗体片段、寡肽或多肽、核酸、细胞受体、配体、适配体、MHC 肽单体或寡聚体、生物素、抗生物素蛋白、寡核苷酸、配位复合物、合成聚合物以及碳水化合物。

[0015] 同样在任何前述方面中,所述样品可以为血液样品,所述结合部分可以结合 CD66、CD14、CD4、CD8、EpCAM、E 选择蛋白、或 P 选择蛋白,所述目的细胞可以选自嗜中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞、循环肿瘤细胞、HIV 感染的 CD8 淋巴细胞、循环内皮细胞和血小板。

[0016] 在优选的实施方式中,目的细胞为 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞。在该实施方式中,所述样品可以来自具有 AIDS 发展风险的患者。

[0017] 本发明的方法还可以包括分析目的细胞的至少一种性质(如生物学性质)(例如 mRNA 表达、蛋白质表达、DNA 定量、DNA 序列、和染色体异常);目的细胞(例如 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞)计数,例如,以诊断诸如 AIDS 的疾病状态。

[0018] 尽管是以细胞的形式进行的描述,但本发明的方法、装置和试剂盒也可用于其它的分析物,如本文中所述。

[0019] 在优选的实施方式中,目的细胞比在无剪切应力时能够与结合部分结合的其它细胞优先发生结合。

[0020] “患者”是指活的多细胞有机体。术语“患者”意在包括人、鼠、狗、猫、牛、羊、马、非人类灵长目和鱼。

[0021] “结合部分”是指特异性地结合于分析物(例如细胞)的分子。结合部分包括例如,抗体、适配体、受体、配体、抗原、生物素/抗生物素蛋白、金属离子、螯合剂、核酸、MHC 肽单体、四聚体、五聚体或其它寡聚体。

[0022] “细胞表面标记物”是指暴露在细胞外环境中的结合细胞的分子。所述细胞表面标记物可以是蛋白质、脂质、碳水化合物或上述三者的一些组合。术语“细胞表面标记物”包括天然存在的分子、由于某疾病状况而异常存在的分子、或者与所述细胞表面相连的分子。

[0023] “裂解”是指细胞膜破坏。为了本发明的目的,术语“裂解”意在包括完全破坏细胞

膜（“完全裂解”），部分破坏细胞膜（“部分裂解”），以及细胞膜的渗透。

[0024] “结合部分”是指细胞与其结合的化学物种。结合部分可以是偶联到表面或构成表面的物质上的化合物。结合部分的实例包括抗体、抗体片段（例如 Fc 片段）、寡肽或多肽、核酸、细胞受体、配体、适配体、MHC 肽单体或寡聚体、生物素、抗生物素蛋白、寡核苷酸、配位复合物、合成聚合物以及碳水化合物。

[0025] “渗透”是指破坏细胞膜使得特定胞内成分能够脱离细胞，而其它成分保留在细胞内。

[0026] 术语“腔室”意在包括微流动通道的任何指定部分，例如，横截面积大于、小于或等于进出所述腔室的通道的部分。

[0027] 通过以下说明、附图和权利要求，其它的特点和优点将更加显而易见。

[0028] 附图简要说明

[0029] 图 1A 是表示 CD4 计数装置操作步骤的图表。

[0030] 图 1B 是细胞计数装置的照片。具有一个入口和一个出口的微加工型 PDMS 装置被结合在载玻片上以形成封闭腔室。

[0031] 图 1C 是 Hele-Shaw 装置的几何形状图。该 Hele-Shaw 装置提供了沿其中线线性变化的剪切力。

[0032] 图 1D 是 1B 的细胞计数装置的图表。该装置具有 10  $\mu$  L 的容积用于样品体积计量。

[0033] 图 2A 是在 Hele-Shaw 腔室中捕获的一系列细胞的显微图像，其位点对应于 0.4 dyn  $\text{cm}^{-2}$ （左），1.7 dyn  $\text{cm}^{-2}$ （中），和 5 dyn  $\text{cm}^{-2}$ （右）的剪切应力。所述图像通过将相衬图像和对应的荧光图像重叠形成。

[0034] 图 2B 是在如上所述的剪切应力条件下染色 CD4（箭头）和 CD14 后一系列捕获细胞显微图像。淋巴细胞（CD4+CD14<sup>-</sup>）和单核细胞（CD4+CD14<sup>+</sup>）在 0.5 dyn  $\text{cm}^{-2}$  的剪切应力被捕获，而纯淋巴细胞在两个较高的剪切应力被捕获（Bar :100 $\mu$ m）。

[0035] 图 2C 是表示 CD4+T 细胞（实心圆）、单核细胞（空心圆）和其它细胞（实心三角）响应于剪切力的粘着性图表。观察到单核细胞和淋巴细胞响应于剪切力的区别捕获性能。1 到 3 dyn  $\text{cm}^{-2}$  的剪切应力窗口对 CD4+T 细胞的粘着来说是最佳的，而在高于 0.7 dyn  $\text{cm}^{-2}$  单核细胞的粘着性显著下降（小图）。其它细胞的粘着性在整个被测剪切应力范围最小。每个数据点在跨不同剪切应力范围的 3 个装置中重复；误差条表示每次实验中测量的标准偏差。

[0036] 图 2D 是表示表面捕获细胞的组成作为剪切应力函数的图表。当剪切应力高于 0.7 dyn  $\text{cm}^{-2}$  时，95% 的表面捕获细胞为 CD4+T 细胞（实心圆）。当剪切应力降低到低于 0.7 dyn  $\text{cm}^{-2}$  时，这些细胞的纯度迅速下降到低于 50%。每个数据点在跨不同剪切应力范围的 3 个装置中重复；误差条表示每次实验中测量的标准偏差。

[0037] 图 3A 是表示在 CD4+T 细胞分离之前流式细胞计数分析血液样品的图表。CD4+T 细胞（CD3+CD4<sup>+</sup>）占有所有淋巴细胞的 29.67%。

[0038] 图 3B 是表示 CD4+T 细胞在所述装置中捕获之后，相同血液样品的流式细胞计数分析的图表。在装置捕获之后样品流中的目标细胞组成下降到所有淋巴细胞群的 2.13%。将十微升的全血在 1.7 dyn  $\text{cm}^{-2}$  的剪切应力注入该线形装置中。细胞在门控淋巴细胞群中获得，所述象限提供有同种型匹配的对照。

[0039] 图 3C 是表示捕获细胞百分比产量作为剪切应力函数的图表,其通过流式细胞计数分析计算得到。利用 1 到  $3\text{dyn cm}^{-2}$  范围的剪切应力,接近 95% 的目的细胞可以从全血中分离。在该范围以外产量迅速降低到小于 85%。每个数据点在至少 3 个装置中重复。误差条表示每次实验中测量的标准偏差。

[0040] 图 4 是表示在两种剪切应力下采用线性细胞捕获腔室的捕获细胞密度作为距入口距离的函数的图表。在  $1.7\text{dyn cm}^{-2}$  (实心圆,产量接近 95%),捕获细胞密度在样品入口附近达到最大值。相比之下,在  $7\text{dyn cm}^{-2}$  (空心圆,产量 75%),沿所述装置的细胞分布相当均匀。所述试验采用  $10\ \mu\text{L}$  来自健康对象的全血实施。每个数据点在至少 3 个装置中重复。误差条表示每次实验中测量的标准偏差。

[0041] 图 5 是表示微流动芯片上计数的细胞作为采用来自 13 个 HIV+ 成年对象的全血通过流式细胞计数仪计数的 CD4+T 细胞数的函数。在 800 个细胞  $\text{mL}^{-1}$  ( $n = 11$ ) 以下绝对 CD4 计数的实验数据的线性回归表明两种测量(虚线)之间具有很好的相关度。所述虚线表示两者之间的理想相关度 1:1。

[0042] 图 6A 是表示表面捕获的 CD4+T 细胞的纯度作为绝对 CD4 计数的函数的图表。纯度高于 60% 并且对于绝对 CD4 计数大于 200 个细胞  $\mu\text{L}^{-1}$  来说相当一致。

[0043] 图 6B 是表示线性装置内 CD4+T 细胞产量作为绝对 CD4 计数的函数。观察到对于绝对 CD4 计数多达 800 个细胞  $\mu\text{L}^{-1}$  而言具有相当一致的产量。绘制的虚线作为视觉指导。

[0044] 图 7A 是具有多个平行腔室用于细胞分离的微流动装置示意图。

[0045] 图 7B 和 7C 是与注射泵相连的装置实例照片。

[0046] 图 7D 是利用压力驱动流从全血中自动化分离细胞的微流动站照片。

[0047] 图 8 是具有两个串联的细胞捕获腔室的微流动细胞分离装置的照片。第一个腔室(上部)捕获并去除杂质细胞,提高第二腔室内捕获的细胞纯度。

[0048] 图 9 是捕获的用 Wright-Giemsa 染色处理过的 CD66b+ 粒细胞照片。没有观察到明显的血小板杂质。

[0049] 图 10 是表示从利用微流动腔室分离的嗜中性粒细胞中分离的 RNA 的典型电泳图。从  $100\ \mu\text{L}$  血液中分离出的嗜中性粒细胞中分离出总量为 33ng 的总 RNA。RNA 质量非常好,表明了细胞捕获与 RNA 提取技术的相容性。图 11 是表示 pMHC 五聚体分子与微流动通道偶联的示意图。

[0050] 图 12 是表示加载有 A2-SL9 抗原性肽的 pMHC 五聚体示意图,由具有该抗原受体的 CD8+T 细胞所特异性识别,而非特异性 CD8+T 细胞(以及所有其它的细胞种群)将不与所述生物素化五聚体结合。

[0051] 图 13A 和 13B 是表示利用涂布有加载有 A2-SL9 抗原性肽的 pMHC 五聚体的 PDMS 微流动装置捕获的以下物质的纯克隆种群的照片:(A) A2-SL9CD8+T 细胞和 (B) A2-IV9CD8+T 细胞。

[0052] 图 14A-14C 是全血中捕获的细胞的照片。

[0053] 图 14D 是表示观察到图 14A-C 中所示细胞的通道示意图。

[0054] 图 14E 是表示剪切应力作为距离的函数图表,其来自用以测试实验可变性的协调试验的结果。利用相同的样品在相同条件下进行两次实验。

[0055] 图 14F 是表示附着细胞作为剪切应力的函数图表,其中对比了全血和裂解 RBC 血

液的捕获效率。

[0056] 发明详细说明

[0057] 总体来说,本发明重点提供了用于分离分析物(例如细胞)的方法、装置和试剂盒。将含有目的分析物的样品引入含有与该目的分析物相结合的部分的微流动装置中。施加剪切应力,其大得足以防止非目的分析物的结合且小得足以使得目的分析物结合。一旦结合,就可以对目的分析物进行分析(例如计数)。本发明还重点提供了用于确定分离目的分析物的剪切应力的方法。

[0058] 本发明的一个示例性实施方式中提供了在微流动模式下采用细胞亲和层析的全血 CD4+T 淋巴细胞计数测定。所述装置用于亲和选择目的细胞的特异性抗体进行功能化。施加到微流动通道中的可控剪切应力允许从小体积样品中相对于单核细胞和别的白血细胞特异地和有效地选择 CD4+T 细胞,所述小体积样品和指尖采血相容。为了进行 CD4 计数,将 10  $\mu$  L 未处理的全血以控制流速注入微流动通道中,利用光学显微镜确定 CD4+T 细胞计数作为所有捕获细胞数量。总测定时间少于 10 分钟。

[0059] 利用该方法准确计数 CD4 的一个关键因子在于细胞捕获的特异性。为了达到该目的,我们采用具有固定抗体的细胞亲和层析法,其进一步用 BSA 阻断以减少非特异性结合(Amiji 和 Park. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 4 :217(1993))。由于 CD4 同样在单核细胞上表达,我们使用剪切应力作为二次选择步骤来排除单核细胞。我们发现 CD4+T 淋巴细胞和单核细胞对官能化装置表面上的剪切应力反应不同,在 1-3 dyn  $\text{cm}^{-2}$  的窗口中淋巴细胞结合优先发生,相比之下,单核细胞在较低的剪切应力发生最佳结合。在该窗口内(1-3 dyn  $\text{cm}^{-2}$ )的选择性结合可能出于两个原因。第一,与淋巴细胞相比,单核细胞表达表面 CD4 要低大约一个数量级,这减少了抗体-抗原相互作用的机会,特别是在动态流动的条件之下(Lee 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 :5215(1999))。第二,单核细胞的大尺寸增加了作用在单个细胞上的剪切力(其与细胞直径的平方大致成比例),导致结合效力降低。这两个因素使得淋巴细胞相对于单核细胞有不同的结合性质。可控的剪切应力也表现出对有效的细胞捕获很关键。捕获效率通过延长的通道几何形状得到进一步提高,这增加了目标细胞与活性表面积之间的相互作用时间。

[0060] 在最佳淋巴细胞结合窗口内(1-3 dyn  $\text{cm}^{-2}$ ),施加在直径 10  $\mu$  m 的细胞上的剪切力为  $\sim$  8-25 pN。该数量级与单个抗体-抗原对的结合力大约相同(Harada 等, *Langmuir* 16 :708(2000) 和 Hinterdorfer 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 :3477(1996))。当剪切力大于该水平时,观察到细胞粘着性降低了多达两个数量级。该观察结果意味着当目标细胞与所述表面相接触时,通过形成单个抗体-抗原相互作用启动了细胞-基板的连接(Tissot 等, *Biophys. J.* 61 :204(1992)),而膜抗原的高密度将有利于这种相互作用的机率。有些令人惊讶的是,当剪切力降低到低于 1 dyn  $\text{cm}^{-2}$  时,粘着细胞的数量也有所下降。这种下降发生在用全血进行试验时,而用裂解血时则不会(数据未示出)。我们相信,在低剪切应力范围红细胞对目标细胞结合的减少起着重要的作用。红细胞已知在高于特定流速时引起毛细血管内白细胞流动边集(margination)。(Goldsmith 和 Spain, *Microvasc. Res.* 27 :204(1984) 以及 Shevkoplyas 等, *Anal. Chem.* 77 :933(2005)) 在我们的装置中,边集类似于将白细胞推到腔室的底面和顶面。在低流速下,边集效应不占优势,全血中的红细胞可占据大部分的官能表面并防止抗体-抗原相互作用。在裂解血中,细胞之间的相互作用大大降低,白细胞沉

淀主要是通过沉降作用驱动,这在减少的流量下不会减少。

[0061] 在用来自健康供体的血液优化了该单通道装置之后(95%+的纯度和90%+的产量),用来自HIV感染对象的全血来测试其性能。我们发现,采用来自这些对象的样品时装置性能有略微的下降,这可能是出于多个原因。干扰HIV感染患者血清中可溶因子,如可溶CD4,(Peakman等,J. Infect. Dis. 165 :799(1992))可能损害了捕获细胞的产量。其它可溶因子,包括细胞因子、趋化因子和免疫复合物(Trial等,J. Clin. Invest. 95 :1690(1995))可能影响血细胞的行为(Polo等,AIDS. 13 :447(1999), Vonsydow等,Aids Res. Hum. Retrov. 7 :375(1991),以及Clerici等,J. Clin. Invest. 91 :759(1993))。白细胞表面粘附分子也可能在HIV疾病进程中被改变,(Trial等,J. Clin. Invest. 95 :1690(1995)和Trial等,J. Immunol. 173 :2190(2004))这可能导致了我们的装置中升高的非特异性结合。

[0062] HIV感染对象中CD4+T细胞表面的改变,例如CD4受体的下调(Anderson等,J. Virol. 67 :4923(1993))和gp120结合(Thali等,J. Virol. 66 :5516(1992))可能也会减少受体-抗体的相互作用并减少产量。因此,当来自HIV感染对象的样品在所述线性腔室装置中测试时,看到纯度和产量都有所下降并不令人惊讶。尽管如此,从通过微芯片和通过流式细胞计数仪在200到800个细胞每mL的相关临床范围内获得的CD4计数中,观察到线性相关的关系(Sato等,Adv. Drug Deliv. Rev. 55 :379(2003))。因此,所述微流动装置可用于资源有限情况下的临床决策和疾病监测。纯度和产量的进一步优化应导致甚至更高的精度水平。

[0063] 用于CD4计数的微流动装置应用相对于常规的流式细胞计数设备具有减少样品体积、降低试剂使用、低制造成本、和便携性的优点。其采用直接体积方法并起着单平台的功能。而且,测定中无需象单平台流式细胞计数法和其它提议方法那样添加试剂。与劳动密集型胶珠式测定和以前记载的微型化流式细胞设计(flow cell design)相比(Rodriguez等,PLoS Med. 2 :663(2005)),本发明的这种微流动CD4计数装置直接解决了在大多数资源贫乏情况下面临的样品制备的问题。不需要样品制备过程,例如裂解红细胞、移液、或与抗体试剂混合,因此该装置可用作自包含系统。在基于显微计数的过程中,无须从CD4+T淋巴细胞中区分出单核细胞。

[0064] 基于在可控剪切应力下操作的微流动细胞亲和性色谱法,我们证明了一种简单、快速和廉价的CD4+T细胞计数装置。据我们所知,这是CD4计数可以用指尖采血的全血样品进行的首个装置,既不需要样品处理也无须添加试剂。最小化的处理步骤、快速的操作、简单的装置以及高通量检测潜能使得该方式成为在资源有限情况下管理HIV患者的有希望的候选方法。我们还注意到,CD4计数只是这种类型装置的一种应用。利用与细胞亲和性色谱法相结合的剪切应力来高效分离特定细胞的证明可以应用到多种需要特定和有效分离细胞的应用中。此外,本发明的应用不仅限于细胞,也可应用于任何能够与结合部分结合并可经受适当剪切力的分析物。这类分析物包括颗粒,例如磁性的、陶瓷的、或塑料的,病毒,以及分子复合物,例如细胞器和脂蛋白复合物。

[0065] I. 分离分析物的方法

[0066] 本发明重点提供了用于分离细胞和其它分析物的方法和装置。本发明的装置是具有至少一个腔室的微流动装置,所述腔室可以是微流动通道指定部分的一部分或整个通道。该腔室包含对目标分析物具有特异性的结合部分。通常,所述结合部分被置于所述通

道壁上,但通道中也可以包括其它的结构,例如柱子,以增加表面积。将含有目的分析物的样品在剪切应力下施加,所述剪切应力优选足够低以使得目的分析物可以结合,但足够高以防止非目的分析物结合,如上对 CD4<sup>+</sup> 细胞中所述。

[0067] 在一种实施方式中,所述腔室涂布有与目的细胞群体的细胞表面标记物相结合的结合部分。通过施加适当的剪切应力,本发明的方法使得以特定浓度表达这些细胞表面标记物的细胞选择性地分离。所施加的剪切应力优选大到足以防止含有浓度低于目的细胞群体的所述细胞表面标记物的非目的细胞的结合以及其它的非特异性结合相互作用。

[0068] 本发明的方法使得样品中例如 50%、60%、70%、80%、90%、95%、99% 或 100% 的目的分析物如细胞被分离,同时滞留例如,少于 20%、10%、5%、或 1% 的非目的分析物。此外,尽管结合的分析物被描述成“目的”而不结合的分析物被描述成“非目的”,但任一种或两种类型的分析物在特定实验中都可以是实际的目标。例如,本发明的方法可用于分离与所述装置结合或者流过所述装置的分析物。

[0069] 至少可以运用两个变量来控制施加到所述通道上的剪切应力:腔室的横截面积以及施加到腔室上的流体压力。也可以运用其它的因素来控制使得目的分析物结合并防止非目的分析物结合所需的剪切应力的大小,例如,所采用的结合部分以及通道中结合部分的密度。

[0070] 所述腔室可包括多种类型的结合部分(例如 1、2、3、4、5 或更多)。多种结合部分可以与相同或不同的分析物结合,并且可以位于相同或不同的腔室中。例如,针对存在于目的细胞上的多种细胞表面标记物的结合部分可以设置在一个腔室中。

[0071] 在另一种实施方式中,本发明重点提供了串联设置的腔室(例如 2、3、4、5 个或多个腔室)。在该实施方式中,每个腔室分离一种或多种类型的细胞,其可以是或者不是目的细胞。当多个腔室串联设置时,施加到每个腔室上的剪切应力可以不同(通过例如改变腔室的横截面积来实现)或者所述剪切应力可以相同。同样,当多个腔室串联设置时,每个腔室可以含有与不同细胞表面标记物或者相同细胞表面标记物结合的结合部分。当在不同腔室中采用相同的结合部分时,所述方法可用于连续地分离具有逐渐减少量的与结合部分结合的物质分析物。

[0072] 所述方法还可以用于并联分离各种类型的分析物,例如通过使同一样品的等分试样通过多个单独的装置或包含多个并联腔室的一个装置。不同的样品也可以并联测定。

[0073] 用于本发明方法中的装置可以仅仅是连接有结合部分并能够支持流体以所需剪切应力流动的微流动通道。所述装置的几何形状将根据测试而定。装置可以或者可以不包括允许光学或可视观察所述腔室的区域。能够产生所需剪切应力的流体泵也是本领域已知的。泵的实例包括注射泵、蠕动泵、真空泵。用于将泵偶联到装置上的方法是本领域已知的。所述装置可以构造成用于在任何给定腔室中提供基本上恒定的剪切应力或者在给定腔室中提供可变的剪切应力。示例性的装置在本文中有所描述。

[0074] 本发明的装置可以利用本领域已知的技术制造。所采用的制造技术将依赖于用来制作所述装置的材料。制造技术的实例包括模制、光刻、电成型、和机械加工。示例材料包括玻璃、聚合物(例如聚苯乙烯、硅氧烷类如聚二甲基硅氧烷、环氧树脂和尿烷)、硅和其它半导体、以及金属。

[0075] 结合部分可以利用本领域已知的方法连接到腔室上。所采用的方法将依赖于所述

结合部分和用来构建所述装置的材料。连接方法的实例包括到所述表面的非特异性吸附结合部分或者与所述结合部分连接或化学结合的化合物,例如通过自组装单层或硅烷化学处理。

[0076] 本发明的装置可以与流体、泵、和 / 或检测器结合。装置还可以结合试剂,例如裂解剂、标记试剂,以及使用说明书,例如针对疾病诊断的说明书。

[0077] II. 目标分析物

[0078] 表 1 提供了示例性的细胞群体,适用于本发明的方法和装置的细胞表面标记物,以及从血样中特异性地分离指定细胞的相应剪切应力。

[0079] 表 1 从全血中分离的血细胞

[0080]

	最佳剪切力 [dyne/cm <sup>2</sup> ]	洗涤 [dyne/cm <sup>2</sup> ]	捕获分子	纯度*	产量
嗜中性粒细胞	0.4	1.5	抗 CD66	93%	80%
单核细胞	0.3	0.7	抗 CD14	93%	
淋巴细胞	1.3-1.7	3	抗 CD4	99%	80%
			抗 CD8		
循环肿瘤细胞	8-9	35	抗 EpCAM	80%#	60%
嗜中性粒细胞群	1-7	-	E、P 选择蛋白	70%	80%
HIV 特异性 T 细胞	0.082	N/A	HLA A2-SL9 五 聚体	>99%	N/A
任何疾病特异性 T 细胞	0.07-0.1		五聚体		

[0081] \* 来自健康供体的血液

[0082] # 来自患有 III-IV 期癌症患者的血液

[0083] 适用于本发明方法和装置的其它示例性细胞表面标记物列于表 2 中。细胞类型还包括疾病特异性 T 细胞,或者是 CD4+ 或者是 CD8+,其可以利用 MHC 肽单体、四聚体或五聚体作为结合部分来分离。适用于分离表达列于表 2 中的细胞表面标记物的细胞的剪切应力可以如所记载那样确定。除了表 2 中所列的细胞之外,本发明也适用于例如,分离人和动物的病原体(例如原生生物、细菌、和真菌)、胎儿细胞(例如有核红细胞、羊膜细胞、和胚胎滋养层)、干细胞(胚胎或成人)、镰刀形红细胞、以及白细胞。

[0084] 表 2 细胞表面标记物

[0085]

目的细胞	结合部分	交叉反应性
树状细胞	抗 CD83	与类淋巴母细胞系和与一些生发中心 B 细胞弱交叉反应性
单核细胞	抗 CD14 抗体	在粒细胞表面弱;也通过大多数组织巨噬细胞表达

结核敏感性 CD8T 细胞	P MHC 五聚体 A2-SL9	与其它 MHC II 类分子弱交叉反应性
血小板	抗 CD41	在巨核细胞上不太丰富地表达
内皮前体细胞	抗 CD34	在小血管内皮细胞、胚胎成纤维细胞上较少表达
上皮前体细胞	抗 CD133	造血细胞
间叶前体细胞	骨形成蛋白受体 (BMPR)	基质细胞、成纤维细胞

[0086] 为了确定分离含目的细胞表面标记物的细胞的最佳剪切应力,可以将细胞样品应用到基于 Usami 等人推导的方程 (Murthy 等,Langmuir. 20 :11649 (2004) 和 Usami 等,Ann. Biomed. Eng. 21 :77 (1993)) 而设计的 Hele-Shaw 腔室中 (例如列于图 1C 中的装置)。该装置的腔室形状使得沿着腔室轴向的剪切应力沿腔室长度方向线性下降。Hele-Shaw 装置可用于确定细胞连接到微流动装置上的动力学,因为在不改变入口流速的情况下在各流动腔室中可以得到多个剪切速率。通过识别沿 Hele-Shaw 腔室轴向上目的细胞结合的最窄部位,利用上面所引用的方程可以计算出相应的剪切速率。

### [0087] III. 结合部分

[0088] 适用于本发明装置和方法的结合部分包括抗体、抗体片段 (例如 Fc 片段)、寡肽或多肽、核酸、细胞受体、配体、适配体、MHC 肽单体或寡聚体、生物素、抗生物素蛋白、寡核苷酸、配位复合物、合成聚合物以及碳水化合物。

### [0089] IV. 使用方法

[0090] 除了从样品中分离各种分析物的方法,本发明还提供了可以将所分离的分析物用于提供其它信息的方法。特别地,利用本发明方法和装置所分离的细胞可以进一步利用本发明的其它方法来测定。在一种实施方式中,利用本发明方法和装置分离的细胞进行了计数。细胞可以通过本领域已知的任何方法计数,包括光学,例如视觉观察,自动计数,基于显微镜的检测,以及 FACS 和电子计数,例如 Coulter 计数器。利用本发明方法和装置分离的细胞或者其它分析物的计数可用于诊断疾病、检测疾病进展、以及监测或确定治疗效力。细胞或其它分析物的计数也可以用于非医疗应用中,例如,用于确定环境样品 (例如水、空气和土壤)、药物、食品或化妆品中的污染物的含量、存在或种类。

[0091] 许多疾病的特征在于含有特定细胞表面标记物 (例如参见表 2) 的细胞异常水平。感染特定病原体的细胞也通常会表达独特的细胞表面标记物,独特的细胞表面标记物的组合,或者异常水平地表达细胞表面标记物。

[0092] 在另一种实施方式中,利用本发明方法和装置分离的细胞可以进行裂解,并且可以测量所述细胞或其部分的一种或多种性质。可以在分离的细胞中测量的生物学性质实例包括 mRNA 表达、蛋白质表达和 DNA 定量。此外,通过本发明方法分离的细胞 DNA 可以进行测序,或者利用标准技术例如 FISH 或 PCR 可以识别特定的序列特征 (例如多态性和染色体异常)。细胞和其它分析物的化学成分也可以在分离之后测定。

### [0093] V. 实施例

[0094] 实施例 1 :CD4+T 淋巴细胞的分离

[0095] 材料

[0096] 3-巯基丙基三甲氧基硅烷购自 Gelest (Morrisville, PA)。乙醇 (200 标准强度)、载玻片 (35x60mm, no. 1), 血细胞计数器和显微载玻片取景器购自 Fisher

Scientific (Fair Lawn, NJ)。为了制造腔室, SU-8 光刻胶和显影剂购自 MicroChem (Newton, MA); 硅氧烷弹性体和固化剂购自 Dow Corning (Midland, MI)。磷酸盐缓冲盐液 (PBS) 购自 Mediatech (Herndon, VA)。冻干牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)。偶联剂 GMBS (N- $\gamma$ -马来酰亚胺丁酰氧基琥珀酰亚胺酯) 和 NeutrAvidin 购自 Pierce Biotechnology (Rockford, IL)。生物素化鼠抗人抗 CD4 (13b8.2 克隆) 购自 Beckman Coulter (Somerset, NJ)。生物素化鼠抗人抗 CD36 (SMO 克隆) 购自 AnceCell (Bayport, MN)。Alexa Fluor1488 缀合鼠抗人 CD4 抗体 (AF488 抗 CD4, 289-14120 克隆)、Alexa Fluor1647-缀合鼠抗人 CD3 抗体 (AF647 抗 CD3, 289-13801 克隆) 以及 4'-6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 购自 Molecular Probes (Eugene, OR)。藻红蛋白 (PE) 缀合的鼠抗人 CD14 单克隆抗体 (PE-抗 CD14, M5E2 克隆) 购自 BD Bioscience (San Diego, CA)。低聚甲醛购自 Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA)。

#### [0097] 腔室设计与制造

[0098] 该工作中采用了两种类型的微流动装置。第一种是基于 Usami 等人推导的方程 (Murthy 等, Langmuir 20 :11649 (2004) 和 Usami 等, Ann. Biomed. Eng. 21 :77 (1993)) 而设计的 Hele-Shaw 腔室 (图 1C)。该腔室形状使得沿着腔室轴向的剪切应力沿腔室长度方向线性下降。所制造的流动腔室高度为  $43 \pm 1 \mu\text{m}$ , 入口宽度和总长度分别为 5mm 和 50mm。该 Hele-Shaw 装置可用于研究采用健康供体血液时淋巴细胞连接到微型装置的动力学, 因为在改变入口流速的情况下每个流动腔室中可以获得多个剪切速率。第二种类型的装置是直通道 (图 1d), 其提供了沿通道长度方向的恒定剪切应力并具有  $2\text{cm}^2$  的印记。所述通道的宽度、长度和高度分别为 4mm、51mm 和  $50 \pm 1 \mu\text{m}$ 。所述直通道装置用于实际细胞捕获和计数试验, 其采用由 Hele-Shaw 试验数据确定的工作剪切应力。所述装置在 PDMS 中制造并永久粘合以利用标准清洁室技术来清洁载玻片。(Murthy 等, Langmuir. 20 :11649 (2004) 和 Usami 等, Ann. Biomed. Eng. 21 :77 (1993))。

#### [0099] 表面改性

[0100] 利用前面所述的方法对新制成的装置进行改性。(Murthy 等, Langmuir. 20 :11649 (2004) 和 Usami 等, Ann. Biomed. Eng. 21 :77 (1993))。简而言之, 将所述腔室用乙醇中 4% (v/v) 的 3-巯基丙基三甲氧基硅烷在室温下预处理 30 分钟, 然后用乙醇中 0.01mmol/mL (Sato 等, Adv. Drug Deliv. Rev. 55 :379 (2003)) 的 GMBS 在室温下温育所述腔室 15 分钟。之后, 通过将所述腔室表面用  $10\text{mg mL}^{-1}$  NeutrAvidin 在 PBS 中的溶液在  $4^\circ\text{C}$  温育至少 1 小时来将 NeutrAvidin 固定到 GMBS 上。最后,  $10\text{mg mL}^{-1}$  (同前) 在 PBS 中的生物素化抗 CD4 溶液在室温下注入反应 15 分钟, 其中所述 PBS 含有 1% (w/v) BSA 和 0.09% (w/v) 叠氮化钠。在每个步骤之后, 用乙醇或者 PBS 冲洗所述表面, 根据前一步骤中所使用的溶剂而定, 以冲掉未反应的分子。

#### [0101] 研究对象和血液制备

[0102] 从 Boston 的 Massachusetts General Hospital (MGH) 征集 HIV 阴性的健康对象和感染 HIV 的对象。给所有对象提供书面通知同意书。在肝素或 EDTA 真空采血管 (Becton Dickinson) 中通过静脉穿刺采集 5mL 外周血样品。所有样品都在采血当天用于所述微流动装置。通过如前面所述的标准临床实验操作步骤来对 HIV 感染对象进行 CD4 计数的平行测量。(Rodriguez 等, PLoS Med. 2 :663 (2005))。简而言之, 在医院的临床试验室中采用

Becton Dickinson FACSCalibur 上的标准 4 色流式细胞计数仪, 并采用 MultiTEST 试剂和 TruCOUNT 胶珠处理患者样品, 利用 MultiSET 软件分析以获得 CD4 计数。

#### [0103] 微流体流动试验

[0104] 在用于开发所述微型装置原型的试验中, 利用注射泵 (HarvardApparatus PHD2000, Holliston, MA) 将来自健康供体的  $300\ \mu\text{l}$  未处理全血以所需的剪切速率 ( $5\text{--}40\ \mu\text{l}\ \text{min}^{-1}$ ) 引入 Hele-Shaw 腔室中。选择全血体积以使所述表面上的细胞粘附达到假稳态, 其中如同根据检测粘附在所述表面上的细胞数量和由所述装置出口收集的试样所确定的那样观察不到明显的捕获细胞增加。在样品输送之后立即将含 1% BSA (w/v) 和 1mM 的 EDTA 的 PBS 以  $40\ \mu\text{l}\ \text{min}^{-1}$  的速度流过所述腔室 5min, 以冲洗掉未结合的细胞。然后将细胞通过用 1% 的低聚甲醛温育然后用含 AF647- 抗 CD3/AF488- 抗 CD4/PE- 抗 CD14 的抗体混合物温育 15min 的方式固定在所述表面上。在用含 1% (w/v) BSA 和 1mM EDTA 的 PBS 冲洗去未结合的抗体之后, 通过将取景器放在腔室下面并利用倒置显微镜 (Nikon Eclipse TE2000, Nikon, Japan) 在沿装置轴的选择位点处计数细胞, 计数粘附细胞的数量。通过用针对 CD14 的抗体染色识别单核细胞, 通过 CD3+/CD4+/CD14- 染色来识别 CD4+T 细胞的抗体, 通过用 DAPI 染色或在相衬显微镜下直接观察来测定粘附性有核细胞的总数量。每个位点进行三次测量, 对应于其附近三个 1 平方 mm, 并取平均值。利用荧光素、罗丹明和 Cy5 激发 / 发射过滤器以  $10^6$  放大率获得图像。之后通过用在 PBS 中的 300nM DAPI 在室温下温育表面连接的细胞 5 分钟并用 PBS 冲洗来进行 DAPI 染色。手工或者利用 Image J 软件 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) 对细胞进行计数。为了避免捕获抗体和标记抗体之间的竞争型结合, 选择 CD4 抗体来结合不同的表位。

[0105] 在用以测试 CD4 细胞计数装置的试验中, 使  $10\ \mu\text{l}$  来自健康供体或 HIV 感染对象的全血以所需流速 ( $1\text{--}20\ \mu\text{l}\ \text{min}^{-1}$ ) 流到线形腔室中。在以  $20\ \mu\text{l}\ \text{min}^{-1}$  的流速冲洗之后, 粘附到所述表面上的细胞被染色并采用与上面对 Hele-Shaw 装置中所述的步骤类似的步骤进行计数。从装置出口收集流过的样品和冲洗缓冲液, 装到 Eppendorf 管中并离心以浓缩细胞用于流式细胞计数。

#### [0106] 流式细胞计数分析

[0107] 为了确定装置从全血中去除目标细胞的效率, 收集通过线性腔室装置前后的样品等份试样并利用标准流式细胞计数仪分析以定量 CD4+T 细胞的百分含量。在 FACSCalibur (Beckton Dickinson Immunocytometry System (BDIS), San Jose, CA) 仪器上采用 BD CellQuest Pro 软件进行流式细胞计数测量。通过在流过所述微流动装置制前后收集的样品中 CD3+CD4+T 细胞的百分含量来估算所述装置的捕获效率或产量。

#### [0108] 统计和数据分析

[0109] 用来自 HIV 阴性健康对象的血液进行试验, 在每种条件下在至少 3 个不同装置中重复。图 2、3 和 4 中所示的数据表示对这些装置平均化的细胞计数或流式细胞计数测量, 每个误差条表示平均值的标准误差。

#### [0110] 结果

[0111] 从全血中利用亲和性分离化学法分离 CD4+ 细胞的简单装置开发

[0112] 利用装置的简单性和准确性作为我们的关键目标, 我们在我们的设计标准中确定了两个关键的因素: 在无标记微流动装置中 CD4+T 细胞捕获的特异性 (纯度) 和效率 (产

量)。我们首先测试了抗 CD4 固定的、BSA 阻断的表面在捕获具有 CD4 的细胞方面的特异性。图 2A 表示了来自健康 HIV 阴性对象并粘附在抗 CD4 官能化表面上的全血的细胞的代表性重叠相衬图像和抗 CD4 染色的荧光图像。如图所示,几乎所有的捕获细胞(密度 $\sim 50\text{--}500$  个细胞  $\text{mm}^{-2}$ )对于表面 CD4 抗原而言都是阳性染色。缺少特异性细胞捕获抗体的对照装置对全血表现出低 1-2 两个数量级的细胞连接性(密度,5 个细胞  $\text{mm}^{-2}$ )。因此,看上去表面官能化方案能成功地从未标记全血样品中专一性捕获具有 CD4 的细胞。

[0113] 来自全血的单核细胞对 CD4+T 淋巴细胞的粘附性

[0114] 在循环细胞中,CD4 分子存在于淋巴细胞和单核细胞上,其不能仅仅通过固定的抗 CD4 区分开。这可以在图 2B 中观察到,其中一些具有 CD4 的细胞(染成绿色)也由单核细胞标记物 CD14 染色。因此,为了单独计数 CD4+T 细胞,必须采用二次选择机制来排除单核细胞结合。为此我们使用剪切应力,这是考虑了单核细胞相对于 CD4+T 细胞具有较低的 CD4 表达水平,以及其尺寸的差异。为了研究剪切应力对单核细胞和淋巴细胞粘附性的影响,我们采用抗体官能化的 Hele-Shaw 装置(图 1C),它可以在一次试验中分析细胞在剪切应力范围内的粘附性。(Murthy 等,Langmuir. 20 :11649(2004) 和 Usami 等,Ann. Biomed. Eng. 21 : 77(1993))。

[0115] 图 2C 比较了 0.15 到  $5\text{dyn cm}^{-2}$  的剪切应力范围内的单核细胞(空心圆)和 CD4+ 淋巴细胞(实心圆)的粘附性图表。CD4+ 淋巴细胞的粘附性出现在 1 到  $3\text{dyn cm}^{-2}$  的剪切应力窗口中。在该区域内,每平方毫米面积大概粘附了 500 个细胞。在该剪切应力窗口外 CD4+T 细胞的粘附性迅速下降。与淋巴细胞在抗 CD4 表面上的粘附性相比,单核细胞具有不同的剪切应力依赖性(图 2C 中的小图)。当剪切应力从 0.3 增加到  $0.7\text{dyn cm}^{-2}$ ,单核细胞粘附性从大约 40 个细胞  $\text{mm}^{-2}$  下降到大约 5 个细胞  $\text{mm}^{-2}$ ,而当剪切应力高于  $0.7\text{dyn cm}^{-2}$  时则保持低于 5 个细胞  $\text{mm}^{-2}$ 。我们还绘制了粘附到抗 CD4 表面的其它细胞的数量图(粘附细胞总数减单核细胞和 CD4+T 细胞)(图 2C 中实心三角)。在整个测试的剪切应力范围内,非特异性细胞数量保持在恒定的低水平上( $<5$  个细胞  $\text{mm}^{-2}$ )。

[0116] 当绘制装置表面上的细胞组成图时(图 2D),我们观察到当剪切应力高于  $0.7\text{dyn cm}^{-2}$  时,表面捕获的 CD4+T 淋巴细胞的纯度高于 95% (Chovan 和 Guttman. Trends Biotechnol. 20 :116(2002))。在剪切应力低于  $0.7\text{dyn cm}^{-2}$  时纯度下降,这主要是由于在低剪切力条件下单核细胞的粘附性;在高于  $4\text{dyn cm}^{-2}$  时纯度也稍微有所下降。因此,剪切应力是一种区分 CD4+T 淋巴细胞和单核细胞的特异性粘附的强大工具。

[0117] 细胞计数装置的研发和确定捕获效率

[0118] 在开始的试验中,我们证实了利用单克隆抗体官能化的表面在不同剪切应力下实施的对 CD4+T 细胞高选择性捕获。接着,我们设计了在固定的剪切应力下用于有效分离 CD4+T 淋巴细胞的直型通道装置,所述固定的剪切应力在针对纯的 CD4+T 细胞捕获而不掺杂单核细胞而最优化的剪切应力范围内(图 1D)。该简单装置具有  $10\ \mu\text{L}$  的内部容积,其用作样品体积的计量机构。该  $10\ \mu\text{L}$  的体积可以方便地输送从研究对象获得的小体积样品,并且样品大小足以统计有效细胞计数。延长的腔室设计增加了血液与官能性表面的相互作用时间。

[0119] 我们在  $0.2\text{--}7\text{dyn cm}^{-2}$  的剪切应力范围下将  $10\ \mu\text{L}$  全血注入所述线性装置中,在流过所述腔室前后收集样品,并通过流式细胞计数法分析它们以研究该装置内的捕获效率。

来自在  $1.7 \text{ dyn cm}^{-2}$  的剪切应力流过所述装置前后的血样的淋巴细胞窗口的代表性象限分析数据如图 3A 和 3B 中所示。在该代表性试验中, CD4+T 淋巴细胞 (CD3+CD4+) 占有进入了所述微流动通道中的全部淋巴细胞 29.7% (图 3A); 在选择性捕获之后, 该分数下降到流出所述装置的淋巴细胞的 2.1% (图 3B), 表明该剪切应力滞留了多于 90% 的目标 CD4+T 细胞在所述装置内。在不同的剪切应力下进行类似的试验以研究所述线性装置中剪切应力对 CD4+T 细胞捕获效率 (或产量) 的影响 (图 3C)。我们观察到在所述线性腔室中  $1-3 \text{ dyn cm}^{-2}$  的剪切应力窗口对 CD4+T 细胞捕获是最佳的, 与利用 Hele-Shaw 腔室获得的结果相当 (图 2C)。在该剪切应力窗口内, 分离了接近 95% 的 CD4+T 淋巴细胞, 纯度高于 95%。在窗口之外, 捕获效率迅速下降到 70-80%, 并且纯度也随之下降 (图 3C)。当我们估算在所述最佳窗口内外的两种剪切应力下操作时装置中的细胞分布时, 我们观察到有助于解释它们独特捕获效率机制的区别点 (图 4)。在  $1.7 \text{ dyn cm}^{-2}$  的剪切力, 获得 95% 的目标细胞, 在离装置入口 10mm 内观察到大约 200 个粘附细胞  $\text{mm}^{-2}$  的狭窄细胞密度峰值; 在离入口更大的距离处该密度迅速下降到低于 20 个细胞  $\text{mm}^{-2}$ 。相比之下, 在  $7 \text{ dyn cm}^{-2}$  的效率较低的剪切力下, 整个腔室长度范围内表面捕获细胞保持相对恒定的低密度。因此, 简单的抗 CD4 官能化装置中的受控剪切流动促进了有效和特异性的 CD4+T 细胞捕获。

[0120] 利用优化的简单微流动装置对来自 HIV 感染对象的进行 CD4 计数

[0121] 在使用来自健康供体的血液确定了该装置的最佳条件后, 我们接着使用来自 HIV+ 成人对象的样品测试了该装置。将十微升血样以  $5 \mu \text{ L min}^{-2}$  的速度在两分钟内引入, 这对应于  $1.7 \text{ dyn cm}^{-2}$  的剪切应力。接着, 将缓冲液以  $20 \mu \text{ L min}^{-2}$  引入, 这对应于  $\sim 7 \text{ dyn cm}^{-2}$  的剪切应力, 以去除单核细胞和非特异性细胞。然后从粘附细胞的总数量来确定 CD4 计数, 在相衬显微镜下手工计数, 总测定时间在 10 分钟以内。我们将来自我们的微型装置的这些 CD4 计数与通过流式细胞计数并行处理的样品所获得的结果 (图 5) 进行了比较。对于通过流式细胞计数的 CD4 计数范围在 26 到 1428 个细胞  $\mu \text{ L}^{-1}$  的 13 个成人研究对象, 我们的结果表明在 CD4 计数分别多达 800 个细胞  $\mu \text{ L}^{-1}$  ( $n = 11$ ,  $R^2 = 0.93$ ) 时两种方法之间具有密切的相关性。在 CD4 计数高于 800 个细胞  $\mu \text{ L}^{-1}$  时, 所述微型装置的细胞计数明显低于通过流式细胞计数获得的结果, 这可能反映了腔室内细胞结合的饱和度。

[0122] 为了证实这些发现, 我们采用来自 HIV 感染对象的全血评估了所述线性装置中 CD4+T 细胞的纯度和产量 (图 6A 和 B)。通过 CD4+T 细胞 (CD3+CD4+) 与捕获细胞总数量 (DAPI+) 之比来计算纯度 (或捕获特异性); 产量 (或捕获效率) 定义为捕获的 CD4+T 细胞与捕获 CD4+T 细胞加上流动过程中损失的细胞的总和之比。在 13 个研究对象中, 观察到 CD4 计数直至 800 个细胞  $\mu \text{ L}^{-1}$  时具有一致的产量 (>75%); 在具有更高的绝对 CD4 计数患者中产量开始下降。CD4 计数高于 200 个细胞  $\mu \text{ L}^{-1}$  时纯度在 60-90% 范围内。当绝对 CD4 计数低于 200 个细胞  $\mu \text{ L}^{-1}$  以下时, 观察到较弱的捕获特异性 (20-50%)。不过, 对于 200 个细胞  $\mu \text{ L}^{-1}$  左右的 CD4 计数观察到清晰截止, 这用于临床区分有关的 CD4 计数阈值。我们还观察到 >90% 的非目的细胞为单核细胞 (数据未示出), 其在 HIV 感染的情况下中可能比来自未感染血液的单核细胞更多地粘附到抗 CD4 官能化表面上。

[0123] 实施例 2: 捕获腔室的设置

[0124] 使用平面的微流动腔室 (图 7) 来从全血中分离各种目标细胞 (表 1)。特异性细胞捕获的原理是将特异性抗体、装置内良好受控的剪切应力条件、和有效的表面钝化以防

止不需要的细胞非特异性结合进行组合。在优化之后,细胞捕获的纯度可以高达99%,捕获产量高达80%。一种在不利情况下提高纯度的方法依赖于使用串联的分离腔室(图8),其中第一腔室去除掉如若不去除会污染第二腔室中目的样品的细胞。所捕获的细胞可以利用标准显微镜成像(图9)、计数、提取RNA和蛋白质(图10)以用于进一步的分析。

#### [0125] 实施例3:HIV特异性CD8T细胞分离

[0126] 我们开发了涂布有pMHC I类五聚体的PDMS微流动装置用以捕获疾病特异性的CD8+T细胞(图11)。在我们的试验中,我们使用了软光刻技术和SU-8制造技术在PDMS模内形成微通道。然后在其不可逆密封到一起之前将所述PDMS模和二氧化硅基板暴露于氧等离子体处理下。然后用无水乙醇中的3-巯基三甲氧基硅烷处理PDMS和二氧化硅表面上的羟基,从而形成硫醇末端基团。在用无水乙醇洗去未反应的硅烷溶液之后,用无水乙醇中的异双官能交联剂GMBS冲洗所述PDMS装置,在此过程中硅烷上的硫醇基与GMBS的马来酰亚胺区域特异并共价地反应。这留下了GMBS的琥珀酰亚胺残基可供蛋白质连接,并且在用1xPBS(pH7.4)冲洗掉未反应的GMBS之后,将NeutrAvidin溶液(PBS中)引入通道,使得GMBS琥珀酰亚胺基与NeutrAvidin的末端氨基相结合。在用1xPBS(pH7.4)冲洗掉未反应的NeutrAvidin之后,将生物素化的加载有A2-SL9抗原性肽(显性HIV gag表位)的pMHC I类五聚体引入所述装置中。然后用1xPBS(pH7.4)(具有1%的BSA(w/v))冲洗所述装置以便冲掉未反应的pMHC五聚体并最小化与通道表面的非特异性细胞相互作用(图12)。

[0127] 在将所述装置适当地设置成用于细胞捕获试验后,我们培养两个克隆的CD8+T细胞系——一个特异性地针对HIV A2-SL9(SLYNTVATL)肽,另一个特异性地针对不相关的A2-IV9(ILKEPVHGV)肽。在MHC I类分子环境下识别这些肽的T细胞存在于大多数感染了HIV的个体中。

[0128] 我们将500,000个A2-SL9CD8+T细胞(125微升,浓度为 $4 \times 10^6$ 个细胞/ml)以 $2 \mu\text{l}/\text{min}$ 的流速引入用A2-SL9加载的pMHC五聚体官能化处理的PDMS微流动装置中。作为阴性对照,将特异性识别A2-IV9的T细胞引入具有相同规格的同装置中。用1x PBS冲洗所述装置以去除通道表面上未连接的细胞,然后用1%的PFA溶液固定并在成像前用DAPI溶液荧光染色(图13)。我们观察到具有A2-SL9CD8+T细胞的装置中有高度的特异性捕获,而引入了A2-IV9特异性CD8+T细胞的装置中观察到低水平的非特异性T细胞捕获。特异性T细胞的结合很有效,这由通道中缺乏单层细胞覆盖来证实。这套试验证明了疾病特异性的T细胞可以利用pMHC复合物作为捕获剂来在微流动通道中分离。这些装置可应用于疾病诊断,或者用于需要识别疾病特异性T细胞的研究中,例如监测疫苗效价。

#### [0129] 实施例4:利用抗EpCAM抗体捕获肿瘤细胞

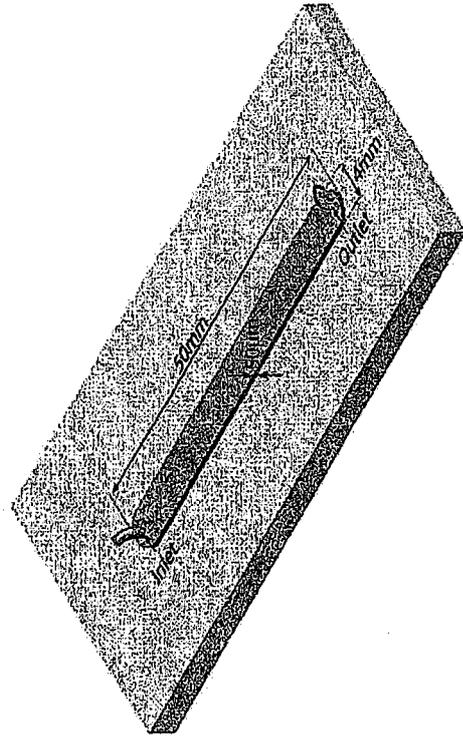
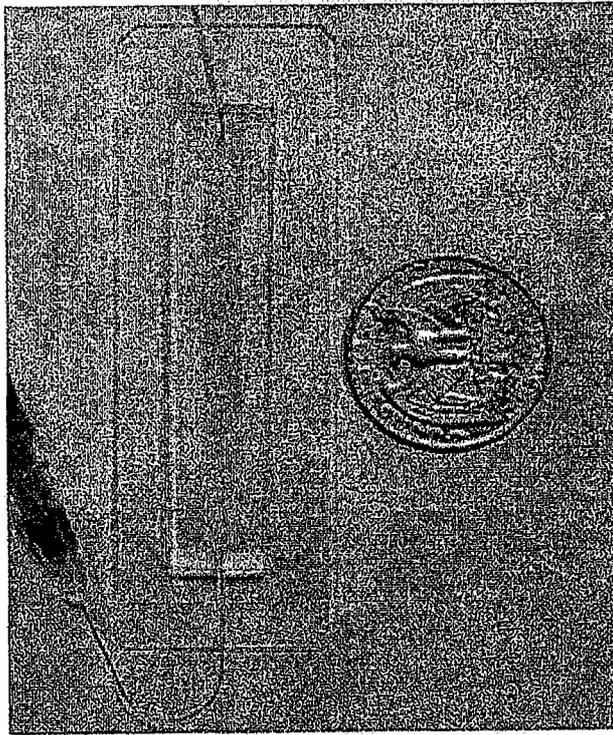
[0130] 剪切应力在细胞捕获中起着重要作用。最佳剪切应力应当施加以使得能够以足够高的流速捕获最大数量的癌细胞。为了找出最佳流速,我们利用沿腔室具有可变宽度和恒定高度的平坦微流动腔室研究了剪切应力对细胞捕获的影响。图14中所示的这些腔室的几何形状使得剪切应力沿着腔室长度方向线性改变(图14E),从而可以研究给定流速下宽范围的剪切应力。将培养的肺癌细胞加入PBS溶液中,然后以恒定的流速通过用EpCAM Ab官能化的Hele-Shaw腔室。随着剪切应力沿着通道降低,粘附到所述表面上的细胞密度增加(图14A-14C)。剪切应力对通过EpCAM抗体-抗原结合的细胞粘附性的影响绘制于图14F中,其表明 $8 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ 是最佳的剪切速率,导致捕获 $200 \text{ 个细胞}/\text{mm}^2$ 的官能化的捕获表

面。

[0131] 其它实施方式

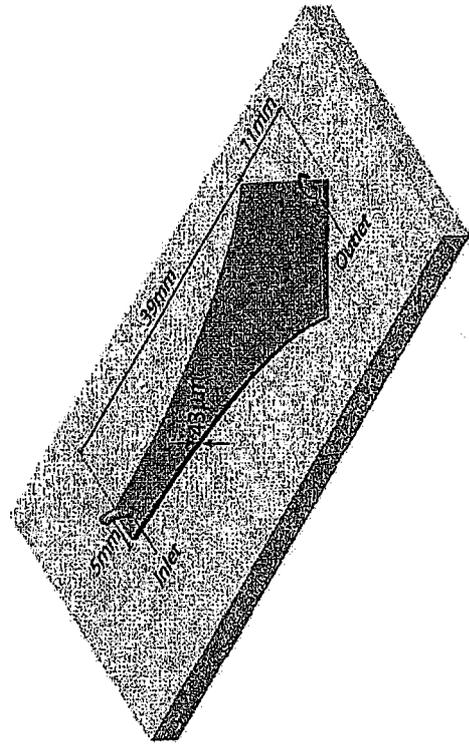
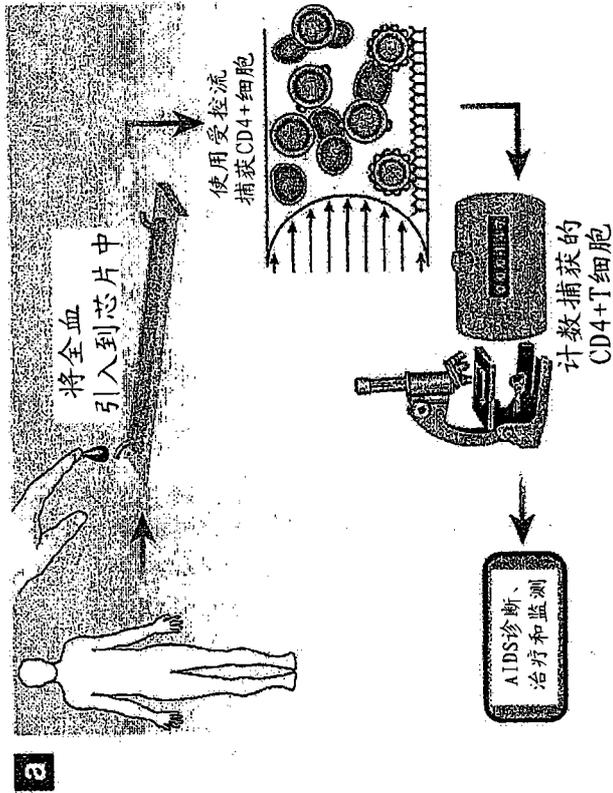
[0132] 上述说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请这里均引入作为参考。所述本发明的方法和系统的各种修饰和改变方式对于本领域技术人员来说是显而易见的,并没有背离本发明的范围和精神。尽管本发明是结合特定实施方式进行描述的。应当明白本发明如所要求的那样不应不适当地限制于这些特定的实施方式。的确,所描述的对本领域技术人员显而易见的实施本发明的方式的各种变形都打算包含在本发明的范围内。

[0133] 其它实施方式在权利要求中。



**b**

**d**



**c**

图 1

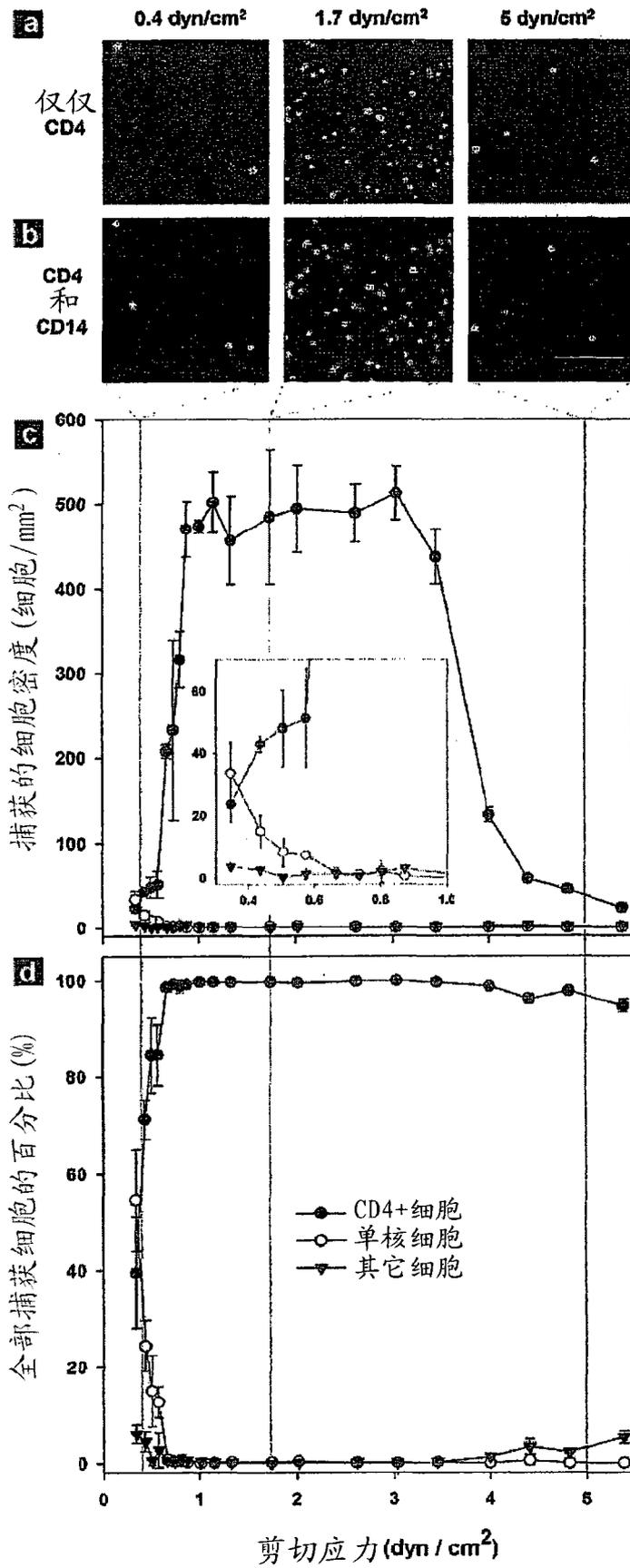


图 2

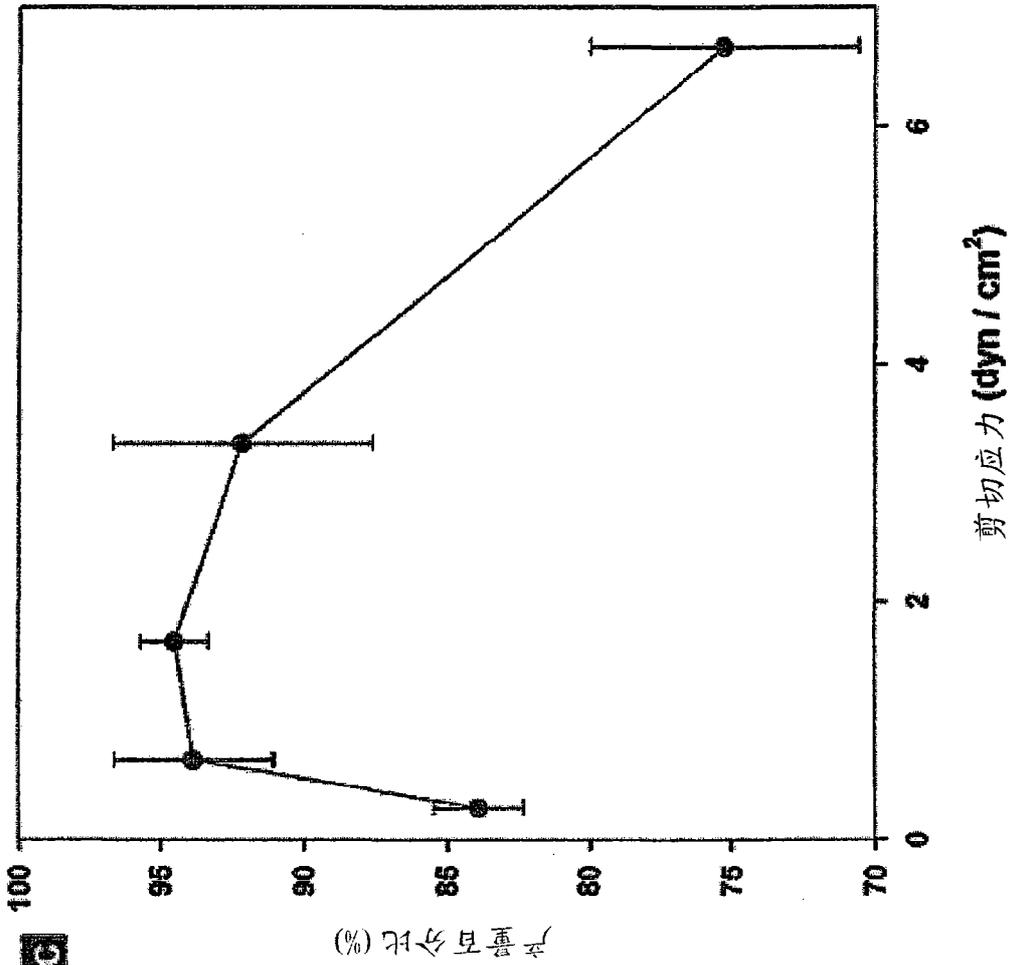
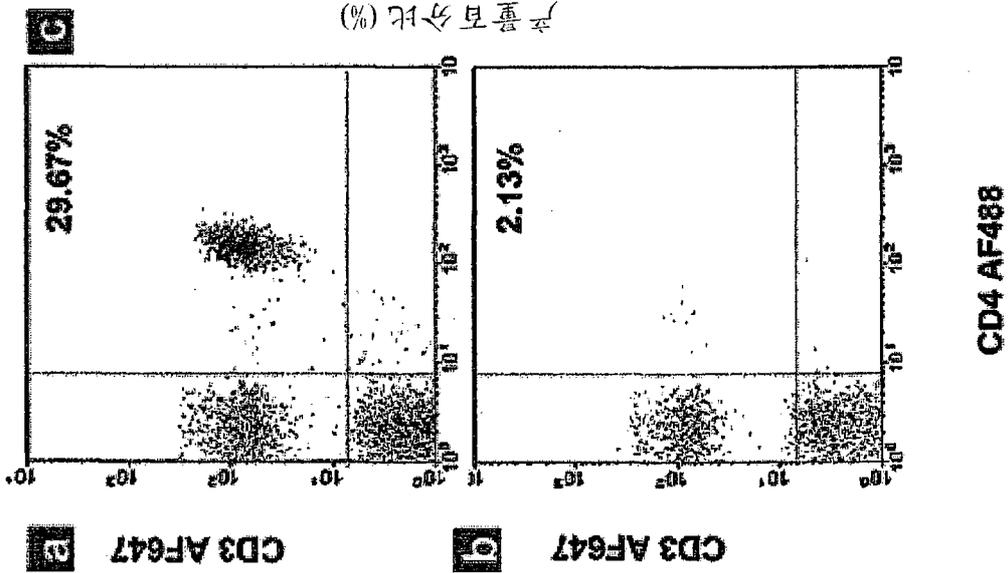


图 3



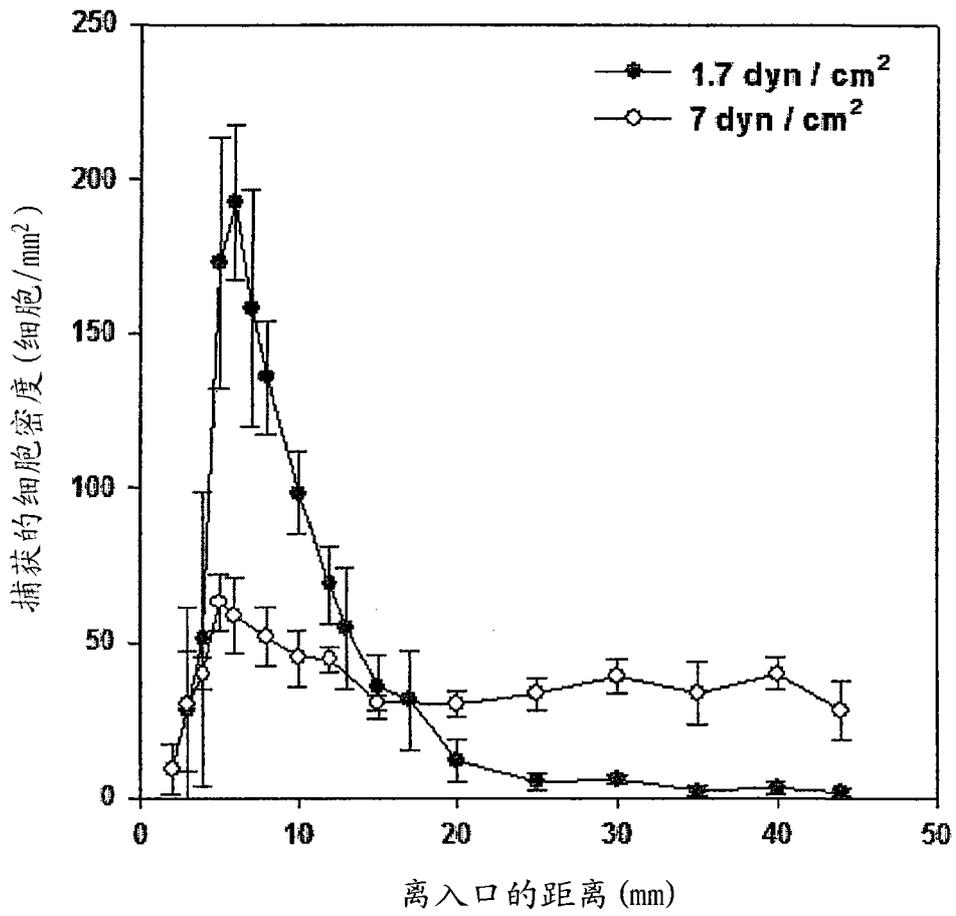


图 4

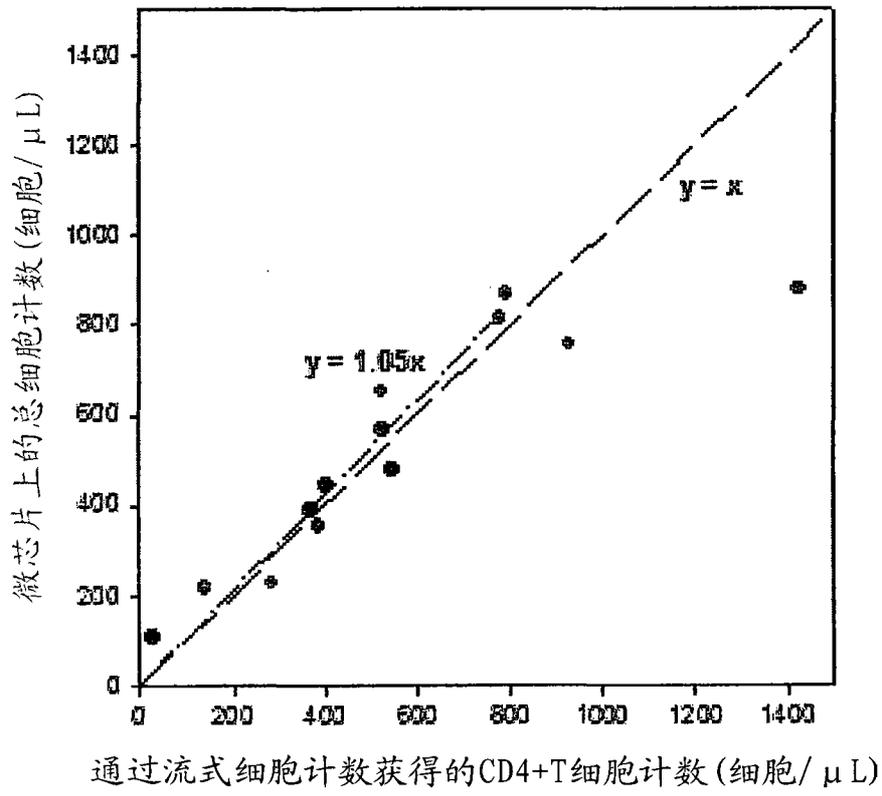


图 5

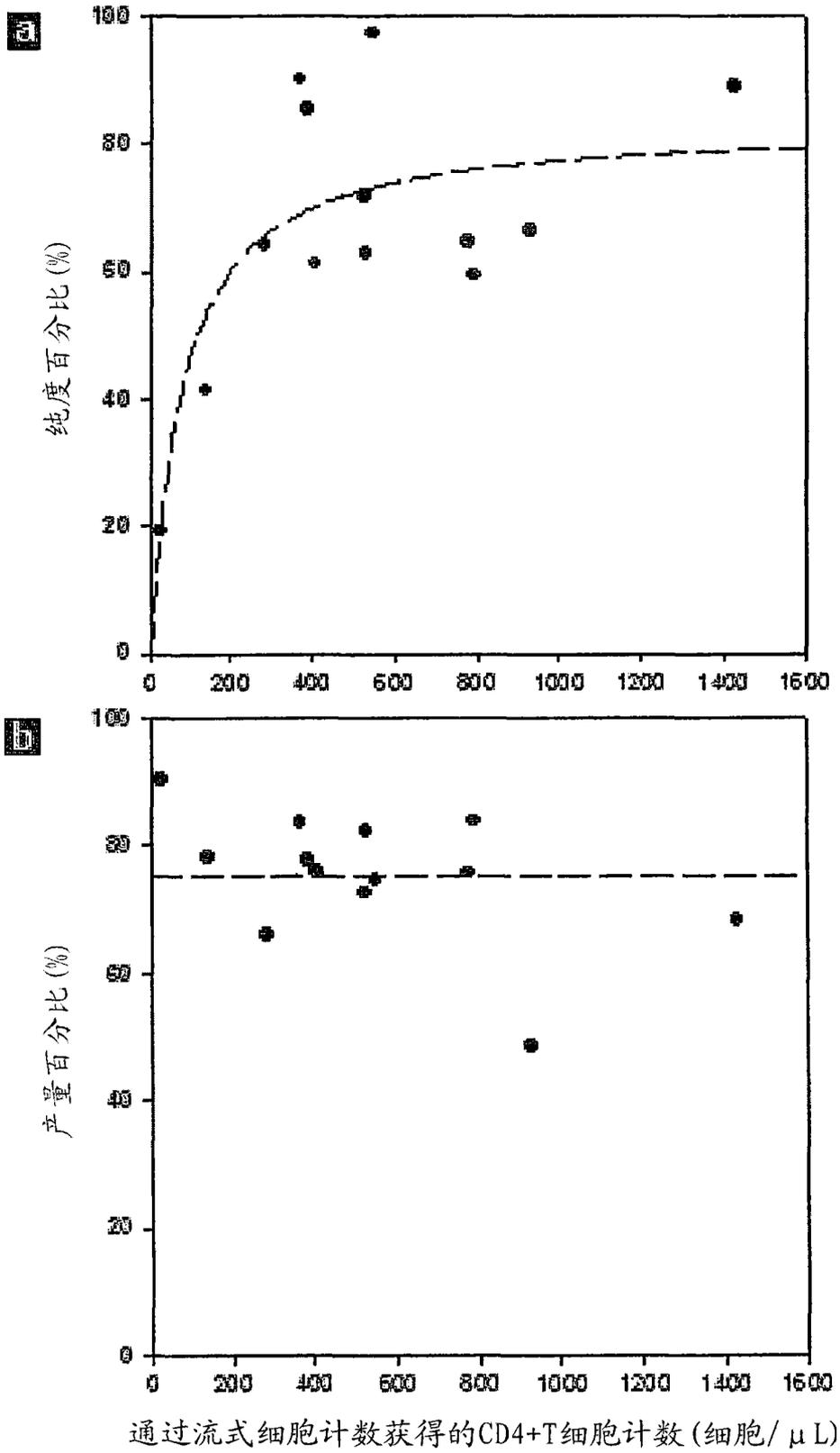
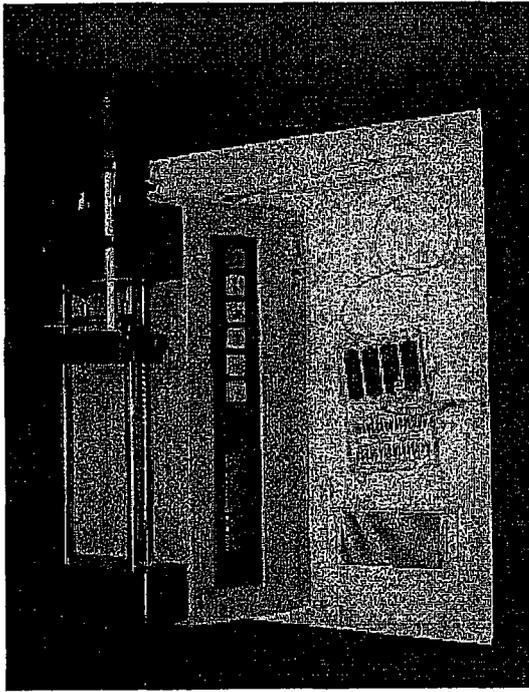
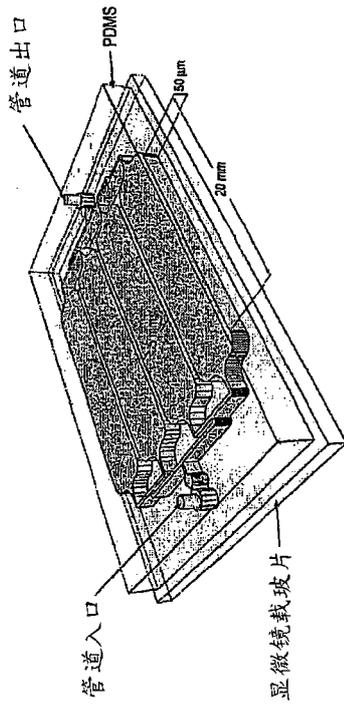


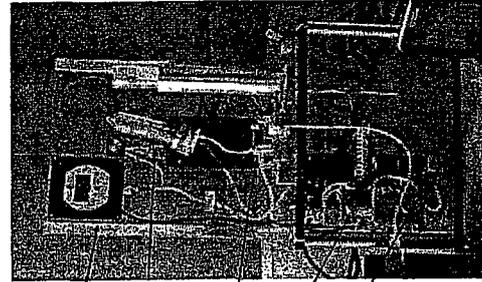
图 6



b

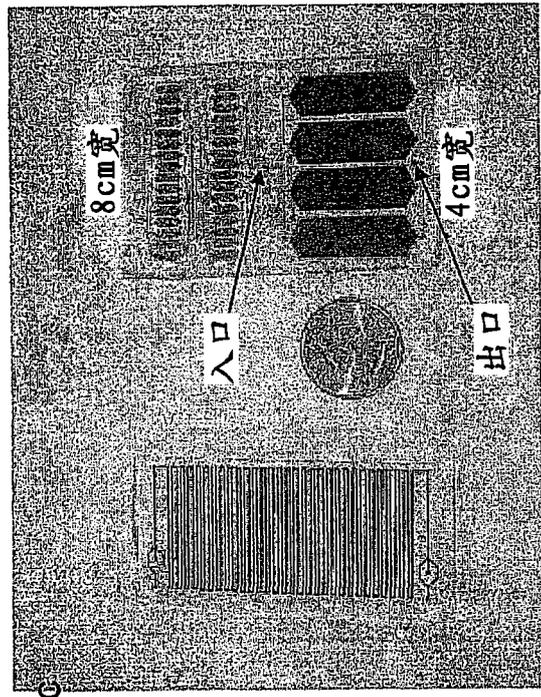


a



压力控制  
 全血样品  
 微流动  
 设备歧管  
 压力源  
 调压器

d



c

图 7

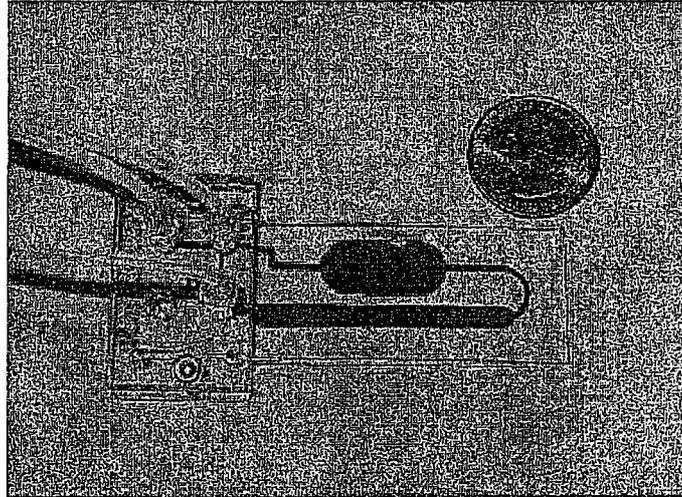


图 8

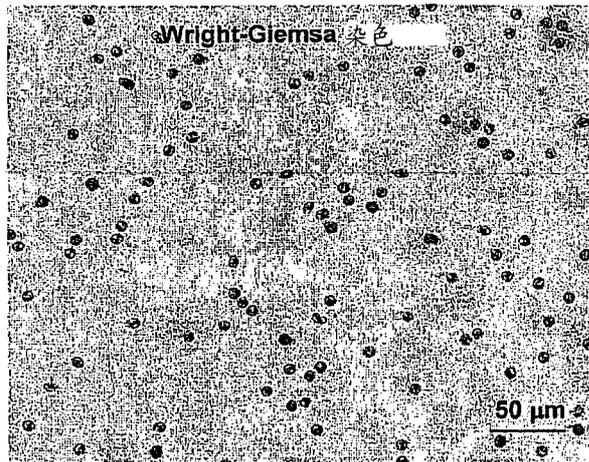


图 9

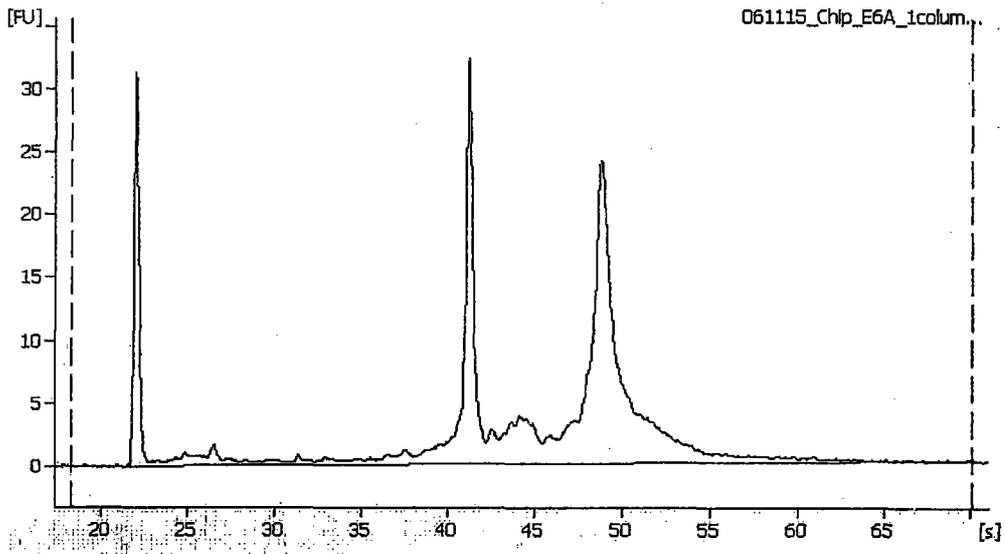


图 10

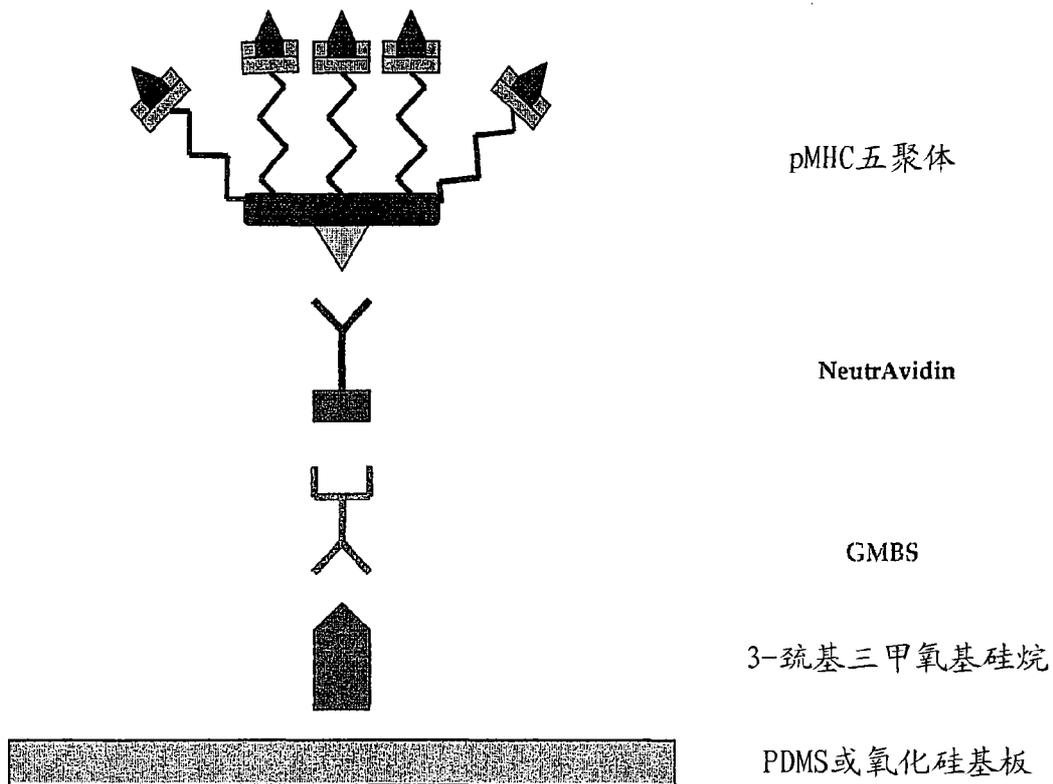


图 11

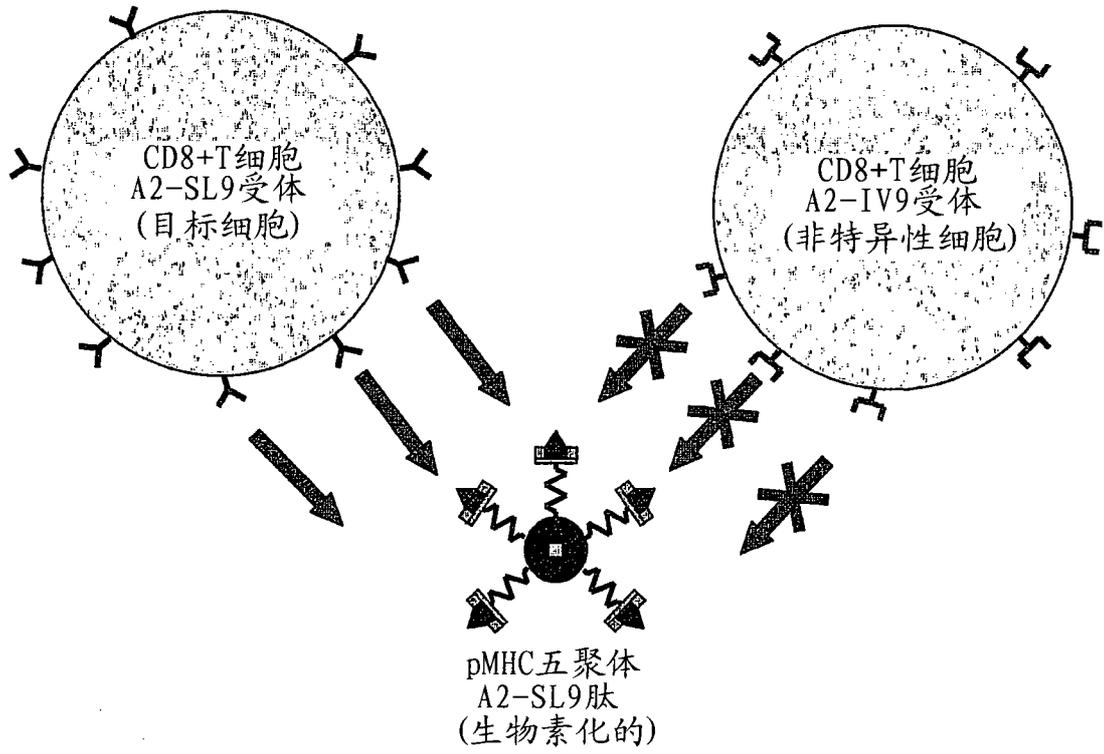


图 12

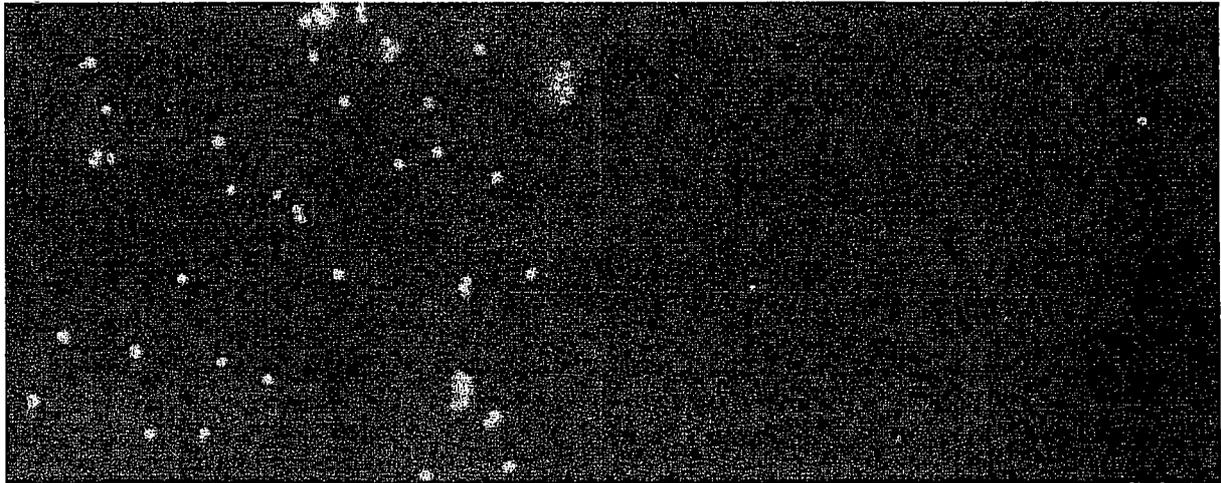


图 13

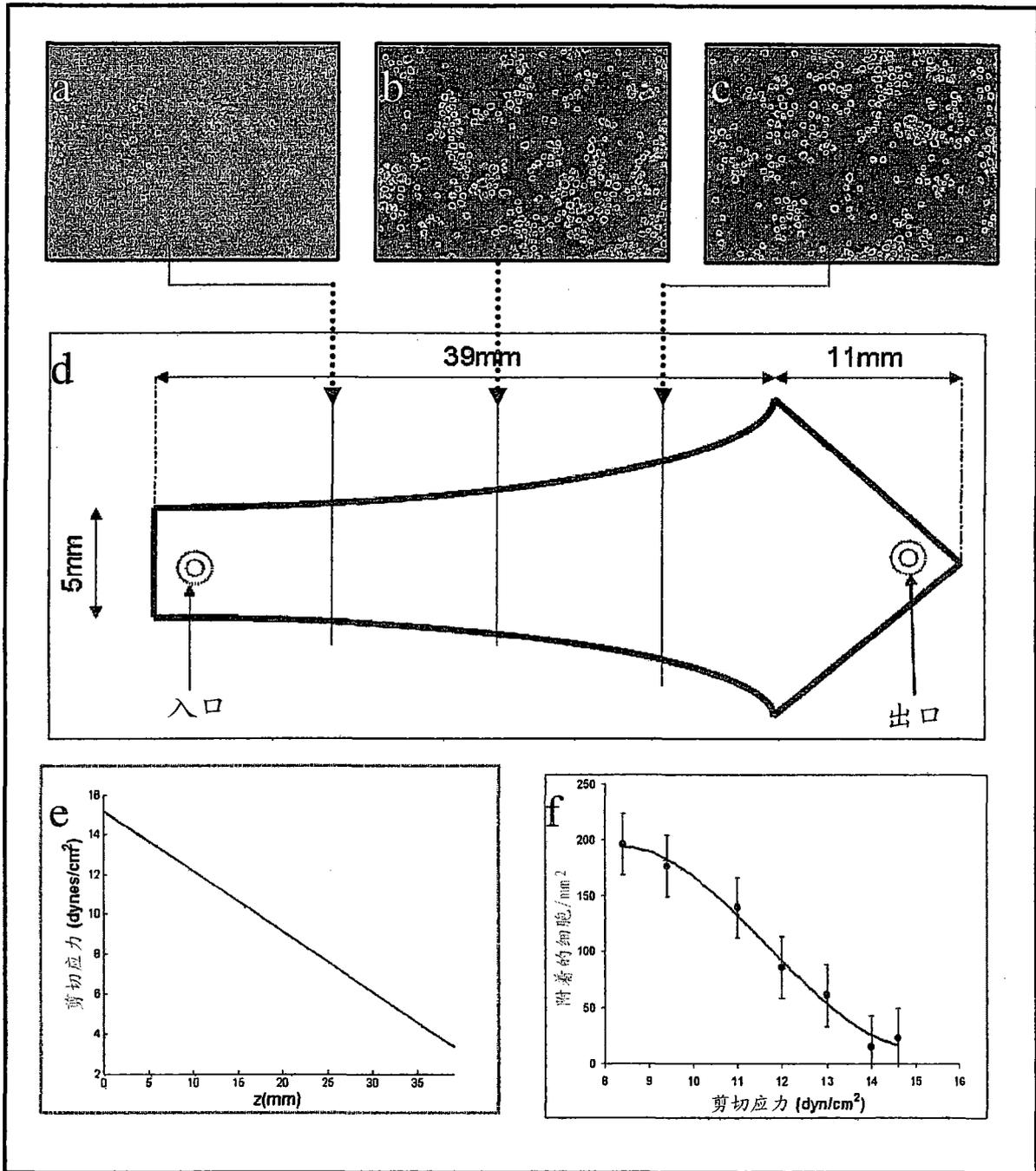


图 14

专利名称(译)	用于检测细胞及其它分析物的装置和方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101443660B</a>	公开(公告)日	2013-11-20
申请号	CN200780017396.9	申请日	2007-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
申请(专利权)人(译)	综合医院公司		
当前申请(专利权)人(译)	综合医院公司		
[标]发明人	D艾里米亚 X程 M托纳 U德米尔奇 W罗德里格斯		
发明人	D·艾里米亚 X·程 M·托纳 U·德米尔奇 W·罗德里格斯		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 C12M1/00 C12M1/34 B01L3/00 G01N15/06		
CPC分类号	G01N33/56972 G01N33/56966 Y10S436/824		
代理人(译)	段晓玲		
审查员(译)	寇飞		
优先权	60/782470 2006-03-15 US		
其他公开文献	CN101443660A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明重点提供了用于分离分析物(例如细胞)方法、装置和试剂盒。将含有目的分析物的样品引入含有与所述目的分析物结合的部分的微流动装置中。施加剪切应力，其大到足以防止非目的分析物结合并小到足以使得目的分析物结合。一旦结合，就可以对目的分析物进行分析(例如计数)。本发明还重点提供了用于确定用于分离目的分析物的剪切应力的方法。

	最佳剪切力 [dyne/cm <sup>2</sup> ]	洗涤 [dyne/cm <sup>2</sup> ]	捕获分子	纯度*	产量
嗜中性粒细胞	0.4	1.5	抗 CD66	93%	80%
单核细胞	0.3	0.7	抗 CD14	93%	
淋巴细胞	1.3-1.7	3	抗 CD4	99%	80%
			抗 CD8		
循环肿瘤细胞	8-9	35	抗 EpCAM	80%#	60%
嗜中性粒细胞群	1-7	-	E、P 选择蛋白	70%	80%
HIV 特异性 T 细胞	0.082	N/A	HLA A2-SL9 五 聚体	>99%	N/A
任何疾病特异性 T 细胞	0.07-0.1		五聚体		