



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103403547 A

(43) 申请公布日 2013. 11. 20

(21) 申请号 201180064558. 0

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2011. 11. 09

代理人 孔青 权陆军

(30) 优先权数据

61/411, 893 2010. 11. 09 US

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

G01N 33/52(2006. 01)

2013. 07. 09

G01N 21/17(2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

C12M 1/34(2006. 01)

PCT/US2011/060041 2011. 11. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02012/064878 EN 2012. 05. 18

(71) 申请人 综合医院公司

地址 美国马萨诸塞州

申请人 麻省理工学院

伊利诺伊大学评议会

达克塔里诊断公司

(72) 发明人 N. 沃特金斯 R. 巴什尔

W. 罗德里格斯 X. 程 M. 托纳

G. 陈 A. 奥彭海默

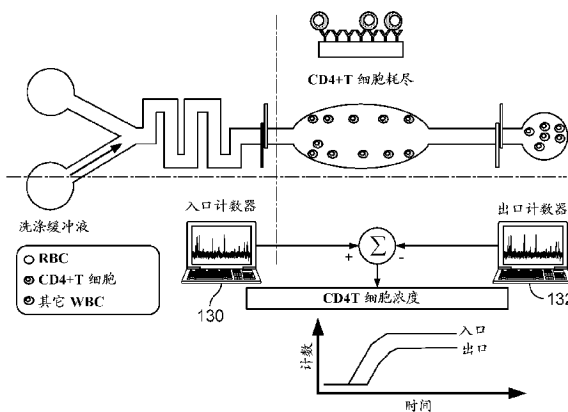
权利要求书2页 说明书19页 附图25页

(54) 发明名称

使用电差分计数器对颗粒计数

(57) 摘要

本公开内容涉及对目的颗粒(例如细胞)计数的方法和装置。所述方法包括得到可含有目的颗粒的流体样品;使用第一电差分计数器对一部分样品中的所有类型的颗粒计数,以产生第一总计;从该部分流体样品中除去任何目的颗粒;在除去目的颗粒之后,使用第二电差分计数器对保留在该部分流体样品中的任何颗粒计数,以产生第二总计;和通过从第一总计减去第二总计,计算最初在流体样品中的目的颗粒的数量,其中所述差异为在样品中的目的颗粒的数量。这些方法和相关的装置可例如用于生产在全血样品中用于CD4+T细胞计数的稳健的、廉价的诊断试剂盒。



1. 一种在包含两种或更多种不同类型的颗粒的样品中对目的颗粒计数的方法,所述方法包括:

得到可含有目的颗粒的流体样品;

使用第一电差分计数器对一部分样品中所有类型的颗粒计数,以产生第一总计;

从所述部分流体样品中除去任何目的颗粒;

在除去目的颗粒之后,使用第二电差分计数器对保留在所述部分流体样品中的任何颗粒计数,以产生第二总计;和

通过从第一总计减去第二总计,计算最初在流体样品中的目的颗粒的数量,其中所述差异为在样品中的目的颗粒的数量。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述第一和第二电差分计数器为相同的电差分计数器。

3. 权利要求 2 的方法,所述方法还包括在从所述部分流体样品中除去目的颗粒之后,使流体样品的流动方向反向。

4. 权利要求 2 的方法,所述方法还包括保持流体样品的流动方向,同时对所述部分样品中所有类型的颗粒计数;除去目的颗粒;和对保留在所述部分流体样品中的任何颗粒计数。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述目的颗粒为细胞。

6. 权利要求 1 的方法,所述方法还包括在对所述部分样品中所有类型的颗粒计数之前,从所述部分样品中耗尽所选的颗粒。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述流体样品包含全血,并且所述方法包括通过裂解耗尽红血球。

8. 权利要求 6 的方法,其中所述流体样品包含全血,并且所述方法包括通过免疫耗竭耗尽红血球、单核细胞、中性白细胞、CD8+ 淋巴细胞或血液的其它细胞组分。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述目的颗粒为 CD4+T 细胞,和除去目的颗粒包括在被抗-CD4 抗体功能化的俘获室中俘获 CD4+T 细胞。

10. 权利要求 9 的方法,所述方法还包括通过用磷酸盐缓冲盐水清洗俘获室,除去非特异性吸附的白细胞。

11. 一种装置,所述装置包含:

限定包括入口和出口的通道的微流体芯片;

沿着在入口和出口之间的通道排列的俘获室,其中所述室设置为从流动通过通道的流体俘获目的颗粒;

第一电差分计数器,其排列以在流入俘获室的流体中对所有类型的颗粒计数;

第二电差分计数器,其排列以对保留在流出俘获室的流体中的所有类型的颗粒计数;

和

与第一和第二电差分计数器电子连通的计算机构,其中所述计算机构基于来自第一和第二电差分计数器的信号计算目的颗粒的数量。

12. 权利要求 11 的装置,其中所述第一和第二电差分计数器为相同的电差分计数器。

13. 权利要求 12 的装置,所述装置还包含与通道流体连通的泵系统,其中所述泵系统可采用第一模式操作以引起流体在经过第一电差分计数器的通道中在第一方向流动,并且可采用第二模式操作以引起流体在通道中在与第一方向相反的第二方向流动并且返回第

一电差分计数器。

14. 权利要求 12 的装置,其中一部分通道限定在从第一电差分计数器通过俘获室并且返回第一电差分计数器的回路中延伸的流动路径。

15. 权利要求 1 的装置,其中所述俘获室包括被抗 -CD4 抗体功能化的表面。

16. 一种试剂盒,所述试剂盒包含:

权利要求 11 的装置;

包含对目的颗粒具有亲和力的结合部分的溶液;和

包含有效裂解所选颗粒而不裂解目的颗粒的裂解剂的溶液。

17. 权利要求 16 的试剂盒,其中所述第一和第二电差分计数器为相同的电差分计数器。

18. 权利要求 17 的试剂盒,所述试剂盒包含与通道流体连通的泵系统,其中所述泵系统可采用第一模式操作以引起流体在经过第一电差分计数器的通道中在第一方向流动,并且可采用第二模式操作以引起流体在通道中在与第一方向相反的第二方向流动并且返回第一电差分计数器。

19. 权利要求 18 的试剂盒,其中一部分通道限定在从第一电差分计数器通过俘获室并且返回第一电差分计数器的回路中延伸的流动路径。

20. 权利要求 16 的试剂盒,其中所述结合部分包括抗 -CD4 抗体。

21. 一种微流体芯片,所述微流体芯片包含:

多个俘获室,所述俘获室设置为从流动通过室的流体俘获目的颗粒;

电差分计数器,其可操作以对在流入俘获室的流体中的颗粒混合群中的颗粒计数和对保留在流出俘获室的流体中的颗粒计数;和

与电差分计数器电子连通的计算机构,所述计算机构可操作以基于来自电差分计数器的信号来计算目的颗粒的数量。

22. 权利要求 21 的微流体装置,所述微流体装置还包含:

与多个俘获室偶联的流体通道,其中所述流体通道包括第一通道区域和第二通道区域,其中第一通道区域设置为接受裂解溶液和样品流体,和将样品流体与裂解溶液混合,并且第二通道区域设置为接受淬灭溶液和来自第一通道区域的经裂解溶液,和将淬灭溶液与经裂解溶液混合。

23. 权利要求 1 的方法,所述方法还包括基于通过第一电差分计数器产生的脉冲信号的极性测定细胞流动方向。

使用电差分计数器对颗粒计数

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求 2010 年 11 月 9 日提交的美国临时申请号 61/411,893 的权益,其通过引用而全文结合到本文中。

技术领域

[0002] 本发明涉及对颗粒(例如细胞)计数,更具体地,本发明涉及使用电差分计数器(electrical differential counter)对颗粒计数。

[0003] 背景

对颗粒(例如细胞)计数在医学和公共健康中具有重要应用。一种广泛使用的细胞计数系统包括光学装置,例如流式细胞仪,和用光学标签(例如荧光标记物)标记目的细胞和用光源(例如激光)探测(interrogate)它们。

[0004] 基于阻力-脉冲传感,阻抗细胞计数的 Coulter 原理对于非光学计数细胞是充分建立的。在其最初的形式,Coulter 计数允许通过尺寸区分细胞,使得能够对混合群的单个亚组计数,例如白细胞差分。在初始 Coulter 原理上建立第二代阻抗光谱学方法,并且跨交流(AC)频率扫描探测细胞。

[0005] 微流体系统对于研究细胞功能、细胞和组织工程、疾病诊断、血液样品制备和药物发现已显示独特的希望。最近,使用微流体从全血分离白细胞亚组的纯群已在现场护理(point-of-care)诊断中引起重大关注。虽然细胞分离方法的原理可容易适用于广泛范围的临床应用,但检测这些分离的细胞仍是待解决的技术挑战。

[0006] 发明概述

本公开内容描述了使用简单的、低成本电方法在颗粒的混合群中对目的颗粒计数的系统和方法。使用用电差分计数器的差分计数方法,这些系统和方法可用于从起始样品(例如,全血)对颗粒的亚组(例如,白细胞)计数,超出当前的 Coulter 型系统和方法的能力。例如,具有两个电阻抗传感器的系统可用于从血液样品得到绝对 CD4+T 细胞计数。

[0007] 在一方面,本公开内容包括在包括两种或更多种不同类型的颗粒的样品(例如,全血)中对目的颗粒(例如细胞,例如,白细胞,例如,CD4+T 细胞)计数的方法。这些方法包括得到可含有目的颗粒的流体样品;使用第一电差分计数器对一部分样品中所有类型的颗粒计数,以产生第一总计(first total);从该部分流体样品中除去任何目的颗粒;在除去目的颗粒之后,使用第二电差分计数器对保留在该部分流体样品中的任何颗粒计数,以产生第二总计(second total);和通过从第一总计减去第二总计,计算最初在流体样品中的目的颗粒的数量,其中差异为在样品中的目的颗粒的数量。

[0008] 在这些方法中,第一和第二电差分计数器可为相同或不同的电差分计数器。在一些实施方式中,这些方法还可包括在从该部分流体样品中除去目的颗粒之后,使流体样品的流动方向反向。在其它实施方式中,所述方法还可包括保持流体样品的流动方向,同时对该部分样品中的所有类型的颗粒计数;除去目的颗粒;和对保留在该部分流体样品中的任何颗粒计数。在这些方法中,使用一种或多种例如与目的颗粒上特定的表面标记物特异性

结合的结合剂或部分（例如抗体），将目的颗粒（例如，细胞）从该部分流体样品中除去，所述目的颗粒例如白细胞，例如 CD4+T 细胞，或者微粒类型的白细胞，或血小板，或者样品中的其它特定的细胞，例如肿瘤细胞，例如，循环肿瘤细胞（CTC）。

[0009] 在其它实施方式中，所述方法还可包括在该部分样品中对所有类型的颗粒计数之前，从该部分样品中耗尽所选的颗粒。例如，如果样品为全血，所述方法可包括使用裂解技术在血液中耗尽红血球。在其它实施方式中，例如，流体样品可包括全血，并且所述方法可包括通过免疫耗竭，耗尽红血球、单核细胞、中性白细胞、CD8+ 淋巴细胞或血液的其它细胞组分。

[0010] 在某些实施方式中，目的颗粒为 CD4+T 细胞，并且除去目的颗粒包括在被抗 -CD4 抗体功能化（functionalized）的俘获室中俘获 CD4+T 细胞。所述方法还可包括通过用磷酸盐缓冲盐水清洗俘获室，除去非特异性吸附的白细胞。所述方法还可包括基于通过第一电差分计数器产生的脉冲信号的极性测定细胞流动方向。

[0011] 在另一方面，本公开内容包括装置，所述装置包括限定包括入口和出口的通道的微流体芯片；沿着在入口和出口之间的通道排列的俘获室，其中所述室设置为从流动通过通道的流体俘获目的颗粒；第一电差分计数器，其排列以对在流入俘获室的流体中的所有类型的颗粒计数；第二电差分计数器，其排列以对保留在流出俘获室的流体中的所有类型的颗粒计数；和与第一和第二电差分计数器电子连通的计算机构，其中所述计算机构基于来自第一和第二电差分计数器的信号计算目的颗粒的数量。

[0012] 在这些装置的不同实施方式中，第一和第二电差分计数器可为相同或不同的电差分计数器。所述装置还可包括与通道流体连通的泵系统，其中所述泵系统可采用第一模式操作以引起流体在经过第一电差分计数器的通道中在第一方向流动，并且可采用第二模式操作以引起流体在通道中在与第一方向相反的第二方向流动并且返回第一电差分计数器。

[0013] 在某些实施方式中，一部分通道可限定在从第一电差分计数器通过俘获室并且返回第一电差分计数器的回路中延伸的流动路径。

[0014] 在各种实施方式中，俘获室包括被结合剂（例如抗 -CD4 抗体）功能化的表面。

[0015] 在另一方面，本公开内容包括试剂盒，所述试剂盒包括：本文描述的装置；对目的颗粒具有亲和力的包括结合剂或部分（例如抗体）的溶液，所述结合剂或部分例如与白细胞（例如 CD4+T 细胞）上特定的表面标记物特异性结合；和包含有效裂解所选颗粒而不裂解目的颗粒的裂解剂的溶液。在这些试剂盒中的装置中，第一和第二电差分计数器可为相同或不同的电差分计数器，并且所述装置还可包括与通道流体连通的泵系统，其中所述泵系统可采用第一模式操作以引起流体在经过第一电差分计数器的通道中在第一方向流动，并且可采用第二模式操作以引起流体在通道中在与第一方向相反的第二方向流动并且返回第一电差分计数器。

[0016] 在一些实施方式中，一部分通道限定在从第一电差分计数器通过俘获室并且返回第一电差分计数器的回路中延伸的流动路径。

[0017] 在另一方面，本公开内容描述了微流体芯片，所述微流体芯片包括多个俘获室，其中所述俘获室设置为从流动通过室的流体俘获目的颗粒；电差分计数器，其可操作以对在流入俘获室的流体中的颗粒混合群中的颗粒计数和对保留在流出俘获室的流体中的颗粒计数；和与电差分计数器电子连通的计算机构，所述计算机构可操作以基于来自电差分计

数器的信号来计算目的颗粒的数量。

[0018] 这些微流体装置还可包括与多个室偶联的流体通道,其中所述流体通道包括第一通道区域和第二通道区域,其中第一通道区域设置为接受裂解溶液和样品流体,和将样品流体与裂解溶液混合,和其中第二通道区域设置为接受淬灭溶液和来自第一通道区域的经裂解溶液,和将淬灭溶液与经裂解溶液混合。

[0019] 在任何前述方面和实施方式中,结合剂或部分可选自抗体、抗体片段、寡肽或多肽、核酸、细胞受体、配体、适体、MHC-肽单体或寡聚物、生物素、抗生物素蛋白、寡核苷酸、配位络合物、合成的聚合物和碳水化合物。

[0020] 同样在任何前述方面,样品可为血液样品,结合部分可与 CD66、CD14、CD4、CDS、EpCAM、E-选择蛋白或 P-选择蛋白结合,并且期望的细胞可选自中性白细胞、单核细胞、淋巴细胞、循环肿瘤细胞 (CTC)、HIV 感染的 CD8 淋巴细胞、循环内皮细胞和血小板。在一些实施方式中,期望的目的细胞为 CD4+ 淋巴细胞。在该实施方式中,样品可由具有发展 AIDS 风险的患者得到。

[0021] “患者”是指活的多细胞生物。术语“患者”意指包括人类、小鼠、狗、猫、牛、绵羊、马、非人灵长类和鱼。

[0022] “结合部分”或“结合剂”是指与分析物(例如,细胞)特异性结合的分子。结合部分包括,例如,抗体、适体、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、四聚物、五聚物或其它寡聚物。

[0023] “细胞表面标记物”是指与暴露于细胞外环境的细胞结合的分子。细胞表面标记物可为蛋白质、脂质、碳水化合物或这三者的一些组合。术语“细胞表面标记物”包括天然存在的分子、作为一些疾病状况的结果异常存在的分子或者与细胞表面连接的分子。

[0024] “裂解”是指细胞膜的破裂。就本发明的目的而言,术语“裂解”是指包括细胞膜的完全破裂(“完全裂解”)、细胞膜的部分破裂(“部分裂解”)和细胞膜的透化。

[0025] “结合部分”是指细胞所结合的化学物类。结合部分可为与表面或组成表面的材料偶联的化合物。示例性结合部分包括抗体、抗体片段(例如,Fe 片段)、寡肽或多肽、核酸、细胞受体、配体、适体、MHC-肽单体或寡聚物、生物素、抗生物素蛋白、寡核苷酸、配位络合物、合成的聚合物和碳水化合物。

[0026] 术语“室”是指包括微流体通道的任何指定的部分,例如,其中横截面积大于、小于进入和离开室的通道或与其相同。

[0027] 本文描述的方法和装置提供若干益处和优点。特别是,比起目前存在的大的、昂贵的和复杂的流式细胞仪、Coulter 计数器和阻抗分光仪),本文描述的方法可用于提供较小、较不昂贵并且较简单使用的用于细胞分析的新装置。本文描述的装置可用于区分比目前已知的 Coulter 计数器和阻抗分光仪更大数量的细胞类型和亚型。本文描述的较小、较不昂贵的微制造的装置可需要小得多的体积的血液或血浆和昂贵试剂。它们的操作和维护可较不昂贵。这些装置代表可在现场护理使用的流动平台,独立于健康护理基础设施。作为用于处理血液和其它生物有害流体的封闭的一次性使用的一次性装置,这些装置降低系统风险和成本。因此,该新的方法和装置可用于诊断各种疾病,例如 HIV/AIDS 和癌症例如白血病,并且可用于监测患者的药物治疗进展,例如,用于确定用于给定患者的具体治疗方案的总体功效。

[0028] 与光学细胞计数方法相比,本文描述的电探测方法的简单性,并且延伸至多频率阻抗方法可用于创建用于便携的细胞分析的更加流线型、成本高效的和在机械上稳健的方案。本文描述的装置更简单并且较不昂贵,部分是因为它们不需要可为光学检测方法增加成本和复杂性的稳定的光路和关联的透镜、过滤和聚焦机构。此外,与光学检测装置相比,本文描述的装置可具有较高的处理量,光学检测装置由于单次可用的检测面积小而倾向于具有低处理量。

[0029] 本文描述的微制造的细胞计数器与 Coulter 计数器不同,在于它们可用于在简单的、手提型系统中对细胞的复杂亚组计数而无需外部细胞表面标签和其它试剂,外部细胞表面标签和其它试剂增加测定的复杂性和成本。此外,与细胞计数策略(如流式细胞术和阻抗测量)不同,本文描述的微制造的细胞计数器可与和表面连接的细胞一起使用,甚至对在相对大体积中的大表面积上的少量细胞计数。

[0030] 细胞检测和计数对于医疗诊断是必要的,尤其是对于 AIDS 和癌症诊断和病原体检测。虽然大多数现有的检测细胞的方法为光学的(即,显微术),但是电检测对于现场护理装置显著更简单、更廉价和更顺从。迄今为止,已证明基于阻抗光谱学(即,检测由于细胞的存在引起的电阻抗变化)的完整细胞的电检测和计数极其实用并且不昂贵,但是局限于大细胞群或均质细胞类型(例如,红细胞或总淋巴细胞的 Coulter 计数)。

[0031] 基于减法测定构思,使用受控的剪切流在微流体装置中选择性颗粒耗尽与双重计数的组合提供新的颗粒计数系统。微流体颗粒俘获方法和阻力脉冲颗粒计数方法均极其稳健和简单,并且因此可用于生产稳健的、廉价的诊断试剂盒,例如,用于 CD4 细胞计数。例如,参考图 1,可将由刺手指(finger stick)提供的一滴全血施用于结合本文描述的细胞计数技术的芯片的入口。可在芯片上进行红细胞裂解和绝对 CD4+T 细胞计数,以及芯片上的样品制备,用于随后的病毒负载测试。

[0032] 除非另外限定,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义。尽管与本文描述的那些类似或等价的方法和材料可用于实施或测试本发明,但是以下描述合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过引用而全文结合到本文中。在冲突的情况下,以本说明书为准,包括定义。此外,材料、方法和实施例仅为说明性的并且不旨在限制。

[0033] 由以下详细说明和权利要求书,本发明的其它特征和优点将显而易见。

[0034] 附图简述

图 1 为包括测试筒的细胞计数方法和装置的示意图,其包括本文描述的微流体芯片。

[0035] 图 2A-2E 为在细胞计数装置中使用微流体线路的示意图。

[0036] 图 3 为结合细胞计数装置的芯片的示意图。

[0037] 图 4 为说明细胞计数装置制造的示意图。

[0038] 图 5 为差分细胞计数器实验设置的示意图。

[0039] 图 6 为使用以 Wheatstone 桥构造连接的三个电极的自-参考电传感器的线路示意图。

[0040] 图 7 为比较估计的入口浓度与测量的芯片浓度的图示。

[0041] 图 8 为呈现对于钝化的俘获室实验的入口和出口计数的图示。

[0042] 图 9 为说明白细胞浓度与入口和出口计数之间的差异之间的关系关系的图示。

- [0043] 图 10A-10C 为说明在细胞计数器中包括剪切模块的作用的一系列图示。
- [0044] 图 11 为差分细胞计数器实验设置的示意图,其基于使用单对电极用于差分 CD4+T 细胞计数的反向流动构思。
- [0045] 图 12 为比较使用反向 - 流动差分计数器方案得到的计数与计数的细胞总数的误差的图示。
- [0046] 图 13 为呈现使用反向 - 流动差分计数器方案对于钝化的俘获室实验的入口和出口计数的图示。
- [0047] 图 14 为整个差分计数器芯片的一系列合并的图像,其中接近入口 (1)、中间部分 (2) 和出口 (3) 的区域放大。
- [0048] 图 15 为使用光学计数观察的在芯片上的圆形物体的面积直方图。
- [0049] 图 16 为呈现 CD4+T 细胞的向前和反向流动计数的图示。
- [0050] 图 17 为使用单一电极组用于流入和流出俘获室的细胞计数的装置的示意图。该装置包括计数装置,其中一部分通道限定在从第一电差分计数器通过俘获室并且返回第一电差分计数器的回路中延伸的流动路径,如图 17 所示。
- [0051] 图 18 为颗粒计数装置的示意图和显示通过以相反方向流动的颗粒引起的信号的阻抗信号作为时间的函数的图示。
- [0052] 图 19A 为比较使用反向 - 流动差分计数器方案得到的 % 误差与计数的细胞总数的 % 误差的图示。
- [0053] 图 19B 为说明使用反向 - 流动差分计数器方案,对于细胞累积向前和反向计数的图示。
- [0054] 图 20A 为比较电和光学计数的图。图 20A 显示使用由人全血样品纯化的白细胞的 14 个 CD4+T 细胞计数实验的结果以及电差分方法和光学对照之间的密切关联 ($y=0.994x$, $R^2=0.997$)。
- [0055] 图 20B 为描述在图 20A 中的数据的数据的 Bland-Altman 分析的图示。
- [0056] 图 21 为用 CD4+T 细胞计数比较 % 误差的图示。图 21 说明 % 误差 (光学和电计数的绝对差异,通过 CD4+T 细胞计数归一化) 如何与计数的 CD4+T 细胞总数相关。
- [0057] 图 22 为说明离散的阻抗信号触发阈值水平的产生的图示。
- [0058] 图 23A-23C 显示动态阈值分析程序的结果。图 23A 显示差分计数相对触发水平,并且显示在 8x 和 12x 触发水平之间的稳定性。斜率图 23B 和曲率图 23C 分析确定 12x 作为优化的触发水平,由于其为在曲线中最稳定区域 (regime) 的部分。
- [0059] 图 24 为说明使用 12x 触发阈值水平,细胞的累积向前和反向计数的图示。
- [0060] 图 25 为差分细胞计数器的示意图。
- [0061] 图 26 为对于全血样品,差分细胞计数的 % 误差的图。
- [0062] 在各个附图中相同的参考标记说明相同的元件。
- [0063] 发明详述

新的系统和方法基于简单和低成本的电计数方法,并且可用于在样品 (例如流体样品,或在流体中分散的微粒样品) 中颗粒的混合群中对目的颗粒计数。使用用电差分计数器的差分计数方法,这些系统和方法可用于由全血的起始样品对白细胞亚组计数。例如,具有两个电阻抗传感器的系统可用于由血液样品得到绝对 CD4+T 细胞计数。

[0064] 使用新的减法阻抗探询技术操作新的微规模装置。在所描述的方法中,在起始样品中颗粒的复杂的混合物通过电极构造,用于阻力-脉冲或阻抗传感,并且可得到在共同的起始样品中颗粒的总计数。接着,通过在受控的剪切流下使用特定的、固定的俘获试剂,目的颗粒可在微通道中选择性保留。最后,剩余的悬浮中的颗粒群可通过第二电极构造用于阻力-脉冲传感,并且可得到耗尽目的颗粒的总群的第二计数。两个计数之间的差异代表俘获的颗粒的计数,因而是目的颗粒的计数。

[0065] 该方法可例如用于 CD4+T 细胞微-细胞计数器,其为用于 CD4+T 细胞计数的微规模装置并且可用作用于现场护理系统的试剂盒的一部分,用于监测 CD4+T 细胞计数。在该实施方式中,将全血通过电极传感区域,并且对于总共的起始样品,得到总颗粒计数。通过使用在受控的剪切流下,固定在微流体室或通道中的抗-CD4 抗体,选择性耗尽样品中的 CD4+T 细胞。在 CD4+T 细胞耗尽的全血中的剩余颗粒群随后通过第二电极传感区域,并且得到耗尽目的颗粒的总群的第二计数。两个计数之间的差异代表俘获的 CD4+T 细胞的计数。该试剂盒、装置和方法可用于在现场护理由刺手指的血液进行 CD4+T 细胞计数。

[0066] 如图 1 所示,装置可完全作为以下实现:(1) 一次性使用,含有本文描述的所有微流体和传感元件的一次性筒 10 和 (2) 手提式筒读数器 20,其提供电传感、刺激和流体控制(例如,泵送机构)。图 1 的顶部还显示一滴全血(例如,由刺手指提供)从施用于结合本文描述的细胞计数技术的装置(例如,样品筒和读数单元)的入口开始的路径的流程图。血液通过红细胞裂解站和绝对 CD4+T 细胞计数站,以及在芯片上的样品制备站和随后的病毒负载测试站。

[0067] 如图 1 所示,在将筒 10 插入读数单元 20 之后(或之前),将一滴血液 30(约 10-20 μL 体积)滴在筒的接受口上。除了向筒的传感区域施用电信号和读取由通过筒 10 的细胞通过(cell passage)引起的电信号变化的读数以外,读数单元 20 控制血液和其它流体通过筒的输注。读数单元 20 随后分析电信号并计算靶细胞的浓度,其将向操作者显示。如以下更详细讨论的,可设计不同的筒以简单地通过在芯片的俘获区域中改变结合剂(例如,抗体类型)来感测不同的疾病。

[0068] 操作的细胞计数装置

在图 2A-2E 中说明示例性细胞计数装置 100 的使用。细胞计数装置 100 包括两个阻抗传感器 110 和 111。细胞计数装置 100 限定微流体线路或通道 112,其从样品入口 114 通过选择性颗粒耗尽室或俘获室 116 延伸至样品出口 118。样品入口 114 接受待分析的未加工的或加工的样品。以下讨论描述细胞计数装置 100 对全血样品中 CD4+T 细胞计数的用途。本文描述的细胞计数装置还可用于分析其它样品,包括,例如,血浆、尿、痰或其它生物学或其它流体,例如,含有两种或更多种不同类型的颗粒的工业流体。

[0069] 细胞计数装置 100 包括任选的试剂入口 120,其中可引入一种或多种样品加工试剂并且与样品混合。在一些情况下,通过该方式引入的试剂可为红细胞裂解试剂、样品稳定试剂、颗粒表面标签或其它目的试剂。

[0070] 通道 112 可包括任选的样品加工区域 122,其中起始样品可进一步加工或纯化,使得颗粒计数更快、更精确或者更有效。在细胞计数装置 100 中,样品加工区域 122 为红细胞裂解区域和单核细胞耗尽区域。例如,样品加工区域 122 可包括涂布有单核细胞俘获试剂(例如抗-CD14 抗体)的表面。通常,俘获室被本文描述的结合剂或结合部分功能化或涂

布有该结合剂或结合部分。选择这些结合部分与颗粒特异性结合,例如,与在细胞上的表面标记物特异性结合,并且不与在样品中可能存在的其它颗粒特异性结合。样品加工区域 122 可为红细胞裂解区域或单核细胞耗尽区域或二者。

[0071] 阻抗传感器 110 和 111 位于俘获室 116 的每一侧上的通道 112 中。阻抗传感器 110 和 111 为电极构造,用于对流动通过通道 112 的流体中的颗粒计数。阻抗传感器 110 和 111 可为 Coulter 类型的两-电极或三-电极阻力脉冲传感器,用于血液细胞计数。当前的实施方式使用共平面电极构造,是指所有的电极在同一表面上,并且 AC 信号在电极之间通过。在其它实施方式中,阻抗传感器 110 和 111 可设置其中每个电极及其配对物彼此平行(仍垂直于流体流动方向),但是一个电极在室的底部,而另一个在室的顶部。电极还可彼此平行放置,但是在通道的侧面(仍垂直于细胞的流动)。另一个实施方式是流体电极,其中电信号通过垂直于细胞流动方向流动的传导溶液的小通道。在这种情况下,电线可为微制造的或者在流体电极通道的每一端中放置的金属丝。

[0072] 此外,AC(交流)或 DC(直流)信号可用于传感细胞通过。对于 DC 信号,可使用 Ag-AgCl(银/氯化银)电极,由于它们提供优良的氧化还原反应效率,即使在高电流下。在其它实施方式中,阻抗传感器 110 和 111 可例如为电容性传感器、阻力传感器(resistive sensor)或以无标签方式测量细胞的固有光学或磁性性质的其它传感器形式或测量与细胞关联的标签的传感器形式。

[0073] 俘获室 116 为选择性颗粒耗尽或俘获室,其中使用结合部分(例如分析物俘获或结合剂)和受控的剪切,将目的颗粒选择性俘获到室的一个或多个表面上,基本上如在 US 2009/0298067 A1,“Devices and Methods for Detecting Cells and Other Analytes(用于检测细胞和其它分析物的装置和方法)”(其通过引用而全文结合到本文中)中所述。在一些实施方式中,俘获室 116 被抗-CD4 抗体功能化并且用作选择性 CD4+T 细胞耗尽室。当然,俘获室 116 可被与特定颗粒或目的颗粒选择性结合的任何其它结合剂(例如,抗体、适体和结合对)功能化。对于给定的目的颗粒(例如,细胞),这样的结合剂为已知的,或者可容易确定。

[0074] 在一些实施方式中,细胞计数装置 100 包括用于将试剂送至俘获室 116 的任选的流体进入通道 124 和用于除去送至俘获室 116 的试剂的任选的流体出口通道 126。任选的流体进入通道 124 和任选的流体出口通道 126 可例如用于用结合部分选择性使室功能化。

[0075] 样品出口 118 收集流动通过的样品并且将其送至下游,例如送至自身含有的废物区域。在一些情况下,样品出口 118 收集流动通过的样品并且将其送至下游用于下游测定或者在微流体芯片上的其它加工区域。

[0076] 在一些实施方式中,细胞计数装置 100 还包括任选的选择性样品加工区域 128,其中将样品加工,随后与通过试剂进入入口 120 引入的试剂混合。例如,选择性样品加工区域 128 可为选择性过滤区域,其中将不需要的颗粒通过机械方法或化学方法过滤。

[0077] 在使用前,通过使用流体进入通道 124 和流体出口通道 126 以用结合剂选择性使俘获室 116 功能化,制备细胞计数装置 100,所述结合剂例如与停留在辅助性 T 细胞和单核细胞(但是含有比辅助性 T 细胞小 1 个数量级)的表面上的 CD4 抗原具有特异性的抗体。

[0078] 在使用中,将样品(例如,全血)通过样品入口 114 引入细胞计数装置 100 中,将用于细胞裂解红细胞的化学品通过试剂入口 120 引入细胞计数装置 100(参见图 2B)。红

细胞流动通过样品加工区域 122,当全血与红细胞裂解剂混合时,将红细胞裂解,并且单核细胞在涂布有单核细胞俘获试剂(例如抗-CD14 抗体)的表面上俘获(参见图 2C)。当所有的白细胞通过入口阻抗传感器 110 时进行计数。计数的细胞进入大的俘获室 116,其被对 CD4 抗原具有特异性的抗体功能化。俘获室 116 保留 CD4 T 细胞和单核细胞,而剩余的白细胞离开俘获室 116 并且通过出口计数器 111 计数(参见图 2D)。PBS 可随后通过试剂入口 120 引入,以洗去在俘获室 116 中非特异性结合的细胞。第一电子处理器 130 与第一电极构造 110 连接,并且记录单个颗粒信号作为阻力脉冲或其它电测量。第二电子处理器 132 与第二电极构造 111 连接,并且记录单个颗粒信号作为阻力脉冲或其它电测量。在已知样品体积的情况下,通过测定入口和出口计数之间的差异,可得到辅助性 T 细胞的浓度(参见图 2E)。

[0079] 仅通过选择针对特定细胞表面抗原的不同抗体,该方法可适用于对其它细胞类型计数。红细胞裂解区域可提高处理量,因为红血球在全血中的浓度为 $5 \times 10^9/\text{mL}$,证明其很难以总体健康诊断应用所需的及时方式计数。此外,由于存在红细胞,测定辅助性 T 细胞计数的灵敏度和准确度也严重减小。例如,如果分析 $10 \mu\text{L}$ 的血液样品,则将计数约 5×10^7 个红细胞、 1×10^5 个白细胞和 1×10^4 个辅助性 T 细胞(在健康的成人中)。仅 0.02 % 的计数细胞为辅助性 T 细胞,其可容易被在入口处计数的红细胞的非理想情况所掩蔽,但在出口(一个原因在于一些红细胞非特异性吸附于俘获室)。除去红细胞将使辅助性 T 细胞的百分比提高至占总计数细胞的 10%,大大提高芯片在提供细胞计数方面的准确度和精密度。

[0080] 设计和制造

图 3 显示不含红细胞裂解区域 122 的差分计数器装置 100。流体层 (a) 含有入口和出口(用于细胞样品流动),和两个口(用于用抗体使 $50 \mu\text{m}$ -高 ($6.6 \mu\text{L}$) 的俘获区域功能化)。两个阻抗传感区域由在三个 $10 \mu\text{m}$ -宽的铂电极(间隔 $10 \mu\text{m}$)之上传送 (funnel) 细胞的 $15 \mu\text{m}$ -宽和 $15 \mu\text{m}$ -高的通道制成 (b)。选择俘获区域的高度以提高样品的体积,并且确保在壁-流体界面处适当的剪切应力。根据 Cheng 等人(“Cell detection counting through cell lysate impedance spectroscopy in microfluidic devices(在微流体装置中通过细胞裂解物阻抗光谱学的细胞检测计数)” Lab on a Chip,第 7 卷,第 746-755 页,2007), $>3 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的剪切应力导致不太有效的 CD4 T 细胞俘获。公式

$$\tau_w = \frac{6\mu Q}{h^3 \omega_1}$$

可用于估计在具有恒定宽度 ω_1 的长方形微流体通道的壁处的剪切应力,其中 μ 为流体的动态粘度,Q 为体积流速,h 为通道的高度 (Usami 等人,“Design and construction of a linear shear stress flow chamber (线性剪切应力流动室的设计和结构)” Annals of Biomedical Engineering,第 21 卷,第 1 期,第 77-83 页,1993 年 1 月)。这显示在室底部和底部在通道高度和剪切应力之间的灵敏的、平方反比关系。 $15 \mu\text{m}$ 俘获通道将给出 $10 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的剪切应力,远超过前述最大剪切应力限度。该剪切应力将对 $10 \mu\text{m}$ 细胞的膜产生 -155 pN 的力,其具有与抗体-抗原相互作用的解离力相同的数量级(参见,例如,Hinterdorfer 等人,“Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy(通过原子力显微术检测和定位单个抗体-抗原识

别事件)” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 第 93 卷, 第 8 期, 第 3477-3481 页, 1996 ; Dammer 等人, “Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy (通过力显微术测量的特定的抗原/抗体相互作用)” Biophysical Journal, 第 70 卷, 第 2437-2441 页, 1996 年 5 月; 和 Harada 等人, “Specific and quantized antigen-antibody interaction measured by atomic force microscopy (通过原子力显微术测量的特定的和量子化的抗原-抗体相互作用)” Langmuir, 第 16 卷, 第 2 期, 第 708-715 页, 2000 年 11 月)。

[0081] 50 μm 俘获通道高度将平均剪切应力大大降低至 $0.45 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$, 导致在细胞上 -14 pN 的力, 并且用固定的 Ab 大大提高细胞的表面抗原相互作用以促进细胞俘获。34 mm 俘获通道长度确保足够的相互作用时间 (在 $5 \text{ jL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的样品流速下, 约 80 秒)。

[0082] 期望三维流体动力学聚焦, 但是将有效提高入口流速 (对于 $5 \mu\text{L}/\text{分钟}$ 细胞样品流速, $0.125 \mu\text{L}/\text{分钟}$) 和相应剪切应力 ($11.1 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$), 其远超过促进 CD4+T 细胞俘获的最大值。此外, 在该流速下通过 $15 \mu\text{m}\times 15 \mu\text{m}$ 计数器孔的细胞通过时间将导致快于 90 ns 的过渡时间, 其远低于使用在实验部分中描述的锁定放大器可分辨的 $\sim 2 \mu\text{s}$ 的最小过渡时间。

[0083] 随后对准流体和电传感层并且粘合, 以形成完全差分计数器 (c)。

[0084] 在图 4 中说明对于一个计数器区域的差分计数器的制造。可使用标准金属脱落 (lift-off) 过程制造电传感层。首先用 LOR2A 脱落抗蚀剂 (liftoff resist) 旋涂 4” 玻璃薄片 (wafer) (Pyrex® 7740), 在 183°C 下软烘焙 5 分钟, 并且涂布 S-1805。在 110°C 下再一次软烘焙 90 秒后, 在 Quintel Q7000 IR 后侧掩模对准器上将薄片对准电极掩模, 并且暴露 $2.8 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的总剂量。随后将薄片放置在 110°C 热板上 60 秒暴露后烘焙, 随后在 Microposit MF CD-26 显影剂中浸没 80 秒, 并且用去离子水漂洗 2 分钟 (图 4(a))。随后将薄片在 O_2 等离子体系统中去泡沫 20 秒, 随后放置在 CHA Evaporator 中用于沉积 25 nm 的 Ti 种子层, 接着 75 nm Pt 传导层 (图 4(b))。通过将薄片在 Microchem Remover PG 的 70°C 浴中放置 15 分钟, 使不期望的金属脱落, 产生用于参考计数器的所需的传导路径 (图 4(c))。

[0085] 通过使用 Microchem SU-8 25 光致抗蚀剂制造期望通道的负像, 产生多个 - 高度流体层。将 SU-8 25 在 4” Si 薄片上旋转至 $15 \mu\text{m}$ 的高度, 并且在两步中预烘焙: 65°C 下 2 分钟和随后 95°C 下 5 分钟。将薄片对准并且暴露于限定所有流体通道的掩模, 包括俘获区域、计数器、样品入口和出口和 Ab 功能化口 (图 4(d))。将 SU-8 的第二层旋转, 以得到对于整个薄片 50 μm 的总厚度, 并且在 65°C 下预烘焙 5 分钟并且随后在 95°C 下预烘焙 15 分钟。随后将薄片暴露于仅限定俘获室的第二掩模, 使其高度为 50 μm , 与之相比, 另一个流体区域的高度为 15 μm 。在室温下将薄片在 Microchem SU-8 显影剂中显影 2 分钟, 用异丙醇漂洗, 并且在 $125 \text{ } 65^\circ\text{C}$ 下硬烘焙 15 分钟 (图 4(e))。将聚二甲基硅氧烷 (PDMS)、1:10 的固化剂: 基质 (base) 倒在负模上, 在 65°C 下固化过夜 (图 4(f))。剥离聚合的模具, 使用钝的注射器针头对各口穿孔, 得到所有入口和出口。

[0086] 在桶形刻蚀机 (barrel etcher) 中氧等离子体活化之后, 通过对准和使电极传感层与流体层粘合, 完成密封的流体芯片 (图 4(g))。特氟隆微孔管 (Teflon microbore tubing) 用于在芯片和注射器泵之间产生流体连接。使用 Sethu 等人描述的技术可完成裂

解区域,已显示使用扩散混合产生微流体红细胞裂解装置是可行的(参见,例如, Sethu 等人的“Continuous flow microfluidic device for rapid erythrocyte lysis(用于快速红血球裂解的连续流动微流体装置)” *Analytical Chemistry*, 第 76 卷,第 6247-6253 页, 2004 和 Sethu 等人的“Microfluidic isolation of leukocytes from whole blood for phenotype and gene expression analysis(用于表型和基因表达分析的从全血微流体分离白细胞)” *Analytical Chemistry*, 第 78 卷,第 5453-5461 页,2006)。

[0087] 差分计数器设置

图 5 说明可用于差分计数 CD4+T 细胞的设置的一个实例。开始时,泵(例如 Harvard Apparatus PicoPlus 注射器泵)用于使已知体积的样品(例如,白细胞(来自具有裂解的红细胞的全血样品))流入芯片入口,并以稳定流速(例如,2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 $\mu\text{L}/\text{分钟}$)通过入口计数器、俘获室(例如,CD4 Ab- 功能化的俘获室)和出口计数器。在样品流动后,以较高的流速将 PBS 泵入芯片中,以从俘获室除去任何非特异性结合的细胞。放大器(例如, Zurich Instruments HF2LI 双锁定放大器)用于将 AC 信号(例如,5 V (rms) 1.1 MHz AC 信号)注入出口和入口传感器。使用两-电极排列测量相对阻抗,该排列为用电阻器和电容器(例如,10 k Ω 电阻器 (R) 和 68 pF 电容器)平衡的 Wheatstone 桥构造中的自参考。

[0088] 图 6 提供更近距离看平衡桥构造。当没有颗粒通过传感区域时,在两个分支上的电流大致相同,由于两个电极阻抗类似,并且两个分支的 R 相同。因此, $V_1 \approx V_2$ 并且 V_{out} 为 ~ 0 V。当细胞通过传感器区域(从左到右)时,将暂时提高在第一电极和中间电极之间的阻抗,降低在左分支中的电流并且降低跨 V_1 的压降,对于 V 产生负脉冲。细胞随后在中间电极和第三电极之间通过,并且相反地在 V 处引起正脉冲。结果是,各细胞通过产生由下至上(down-up)(或者由上至下(up-down),取决于 V_{out} 的定义)脉冲对。该桥平衡提供若干益处,包括提供随着流体传导性或流速的变化而变化很少的基线信号并且提供更敏感的检测方法以产生较大的阻抗脉冲信噪比。此外,可精确确定细胞是向前或反向方向流动经过传感器以分别确定总的向前和反向计数。当方向反向时,脉冲极性将反向。各细胞通过在向前流动方向产生由上至下(或者由下至上)脉冲标记,而在反向流动方向,所有细胞分别产生由下至上(或者由上至下)脉冲标记,使得直接的方法能够区分进入和离开芯片的细胞。

[0089] 将入口 ($V_{\text{out},1}$) 和出口 ($V_{\text{out},2}$) 的桥电位差异信号输入放大器,并且将阻抗量值和相角(分别为 R 和 θ) 输出至计算机用于实时观察并且记录数据,例如,以 115.2 kHz 取样速率,例如使用 Lab-VIEW® 软件。将数据输入 Clampfit 软件并且用其进行分析。可使用各种阈值水平对阻抗脉冲计数,并且比较入口和出口计数。在显微镜(例如 Nikon Eclipse E600FN 显微镜 (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY)) 上与数字照相机连接的另一个计算机可用于观察经由通道的细胞通过以及细胞与俘获区域的相互作用。

[0090] 反向-流动差分计数器

虽然剪切单元帮助改进差分计数器装置的操作,产生的另一个主要问题在于已证明对于每一个计数器难以客观地选择正确的触发水平以提供精确的计数。理想地,两个传感器应具有相同的电特性并且需要使用相同的触发阈值水平。然而,似乎应使用不同的阈值水平,但是客观地选择触发水平的若干系统方法已失败(例如,基于每个电极的基线噪声使

用触发和基于其它计数器的脉冲振幅分布的加权平均来计算一个计数器的触发水平)。这可起因于每个传感区域的电特性足够不同以引起细胞计数误差的可能性。虽然微制造可提供具有几乎相同的电极几何形状的入口和出口计数器,但其它因素可引起每个传感器具有不同的电化学性质。金属脱落程序可留下在各传感器之间不同的纳米级不完善度,产生可影响计数器对细胞通过的响应的不同的场边缘效应。由于不均匀的蒸发引起的非均质金属层厚度(有时通过金属层穿过整个模的颜色梯度观察到)将改变金属线和传感区域本身的传导性,尤其是在间隔 34 μm 的单一模上在两个计数器之间。连接的微操纵器探测末端和外部线路也可在每个分支之间具有不同的电特性。来自这些可能的来源的一些征兆为(1)计数器的信噪比不必与其基线的标准偏差成比例,(2)对于在相同的芯片上的两个传感器, V_{0,t_1} 和 V_{0,t_2} 之间的差异,其应相同,和(3)有时随着时间缓慢改变 V_{0,t_1} 或 V_{0,t_2} 值可指出在电极-电解质界面处发生电化学反应。

[0091] 为了解决该阈值模糊问题,可使用单一传感器。图 11 说明白细胞流动通过芯片入口并且流反向以将细胞推回入口的构思。将细胞注入入口并且流至功能化的俘获室中以俘获辅助性 T 细胞。当在出口计数器处观察到脉冲时,流体阀转换,让 PBS 经由出口流动通过芯片,迫使所有未连接的细胞通过入口计数器再次计数。继续洗涤,直至将所有未连接的细胞从芯片洗涤。由于该方法仅使用入口计数器对白细胞计数,找出客观阈值水平的困难显著降低。可简单地选择阈值作为其中基线噪声不作为细胞事件计数的最低水平。出口计数器仅用于定性查看细胞何时填充俘获区域体积并且开始反向洗涤过程。

[0092] 自身-参考传感器使得容易鉴别进入和离开入口计数器口的细胞。例如,取决于外部电构造,进入入口计数器的细胞可及时产生由上至下的阻抗脉冲对,而对于在经过入口计数器口的反向流动下离开的细胞,相同的构造将产生由下至上标记(参见,例如,图 18)。

[0093] 关于反向流动实施方式,使用单一电极组对上述流入和流出俘获室的细胞计数的改进的准确度也可通过计数装置提供,其中一部分通道限定在从第一电差分计数器通过俘获室并且返回第一电差分计数器的回路中延伸的流动路径,如图 17 所示。如上关于图 18 所讨论的,脉冲形状可用于确定细胞何时进入芯片以及细胞何时离开芯片。

[0094] 由全血得到纯的白细胞样品

在细胞流动通过差分计数器芯片之前,可将红细胞裂解。裂解溶液(例如,0.12% (v/v) 甲酸和 0.05% (w/v) 皂草苷在去离子水中)用于红血球裂解。将大过量的裂解溶液(例如,12 mL 裂解溶液)加入到 1 mL 全血中(同一天取出,并且在室温下保持在旋转器上,并且搅拌下温育 6 秒)。通过加入淬灭溶液(例如 5.3 mL 0.6% (w/v) 碳酸钠和 3% (w/v) 氯化钠在去离子水中)裂解立即终止(参见,例如,D. Holmes, D. Pettigrew, C. Reccius, J. Gwyer, C. van Berkel, J. Holloway, D. Davies 和 H. Morgan, *Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry* (使用高速微流体单一细胞阻抗细胞计数的白细胞分析和区分) *Lab on a Chip*, 第 9 卷,第 2881-2889 页,2009)。在室温下,在 200 \times 重力下将溶液离心 5 分钟,将上清液吸出,将沉淀重悬于 5 mL PBS +1% (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA)。在室温下,在 200 \times 重力下将淬灭溶液离心 5 分钟,将上清液吸出,将沉淀重悬于 5 mL PBS +1% (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA)。将悬浮液再次离心,并且重悬于 1 mL PBS +1% BSA,得到生理学浓度的白细胞。

[0095] 在细胞计数装置 100 的现场护理实施方式中,如参考图 2A-2E 所述,可在芯片上进行红细胞裂解。

[0096] 用于客观细胞计数的动态阈值分析

阻抗信号阈值水平为在电差分计数中在细胞电计数中单一最重要的变量;找到客观方法来选择阈值同等重要。根据定义,该阈值水平确定阻抗脉冲为目的实体(细胞、珠粒,等)还是简单地碎片、电噪声或在分析期间应忽略的其它实体。通常,阈值水平可基于当没有细胞通过传感器区域时基线电信号的标准偏差的整倍数。采用这种方式,当阈值水平设定在或超过基线信号水平的标准偏差的 4-6 倍时,将大多数假阳性(false positives)从电噪声排除。然而,基于电信号的标准偏差选择阈值水平仅仍为主观分析方法。

[0097] 甚至阈值水平小的变化可导致细胞计数的大变化,尤其是在较低的阈值水平下。以下列举了可使得该阈值成比例方法不实用的一些另外的问题,由于当实施差分计数时的大的计数误差;无论使用具有两个计数电极的向前流动方法(图 5)、具有一个计数电极的反向-流动方法(图 9)或其它实施方式(例如,图 17)。

[0098] (1) 当在向前流动、两个-计数器设计中通过第二传感器时,或者当在反向-流动、一个-计数器设计中返回通过入口计数器时,细胞可能不产生相同的阻抗脉冲振幅。由于当进入俘获室时可对细胞计数但是当离开俘获室时不计数,这样引起计数误差。

[0099] (2) 如果仅选择静态阈值水平,在可能触发假阳性计数的分析期间或之间电噪声水平可充分变化。

[0100] (3) 碎片或小的实体(例如,死细胞的碎片、血小板等)可产生振幅超过阈值的阻抗脉冲,产生假阳性。

[0101] (4) 由于在制造的芯片中可能的物理和/或电差异,优化的阈值水平在各芯片之间可变化。对于所有芯片的一个静态阈值水平可导致不一致的测量,将严重损害微制造技术的优点。

[0102] 用于客观选择细胞计数触发阈值的任务的本方案为通过用一定范围的离散阈值水平分析阻抗信号来动态选择适当的阈值水平。在血液分析期间或分析后随即,针对其相应阈值触发水平绘制差分计数(即,入口计数-出口计数,或者向前计数-反向计数),并且基于曲线稳定性(即,“平坦度”)选择优化的阈值水平。该方法已显示具有 ~ 9 细胞 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的低固有计数误差(图 19A,表 2)。

[0103] 图 22、23 和 24 说明使用来自实际的差分计数实验数据的这一构思。

[0104] 首先,得到离散的阈值水平。产生这些水平的一种方法是得到基线阻抗信号的标准偏差(在细胞流动开始之前),以产生倍增的标准(即,“1x”为标准偏差)。触发水平可线性(例如,1x 标准的倍增)或通过更复杂的非线性方法计算。图 22 显示使用线性方法产生的一定范围的触发阈值水平,以及 6x 触发(噪声的标准偏差的 6 倍)如何与基线噪声信号相遇,这将导致假阳性细胞计数。可改变范围(例如,6x 至 20x)和倍增值(例如,6x、6.5x、7x,等),以确保分别用适当动态范围和分辨率的优化分析。

[0105] 第二,用产生的触发水平范围分析阻抗信号,和针对其相应的触发水平绘制差分计数。图 23A 显示对于一定范围的阈值触发水平(6x 至 20x),差分 CD4+T 细胞计数的变化。在其中对于进入和离开俘获室的每个实体的脉冲振幅相同的理想情况下,该图应为水平线,显示对于所有的触发水平差分计数恒定。然而,较小的阈值水平与信号的基线噪声水

平相遇,产生在统计学上隐蔽真阳性的许多假阳性。差分计数从 6x 到 8x 的突然提高说明该非理想性,由于 6x 阈值水平太低,在于其错误地将噪声峰计数为“细胞”。在 8x 下差分计数水平下降并且直到 12x 保持平坦,其中计数逐步下降。由于其最类似理想水平线,该平稳状态含有优化的阈值触发水平和相应的差分计数。通过在较大的触发水平下差分计数逐步降低,显示来自理想图的另一个偏差。这可能可以这样解释:离开实体的平均脉冲高度低于进入实体的平均脉冲高度(例如,以上列举的复杂化 #1)。

[0106] 第三,绘制在邻接触发水平之间的计数的变化,以进一步研究计数的最稳定的区域相对触发水平曲线。这与在图 23A 中求出曲线斜率类似,并且示于图 23B。具体地,由公式 1 计算斜率值 (s_x):

$$s_x = \frac{(c_x - c_{x-1})}{(t_x - t_{x-1})} \quad (1)$$

其中 c_x 为差分计数, t_x 为在指数 x 下的触发水平。在这种情况下, x 限定为指数 2 至 n , 其中 n 定义为用于分析的触发水平的总数。排除指数 1, 因为根据定义, 对于指数 1, 不可计算斜率。注意: s_x 给出紧接着在指数 x 处的触发值之前的斜率。

[0107] 第四,绘制在触发水平之间的斜率值的变化,以对计数相对触发水平曲线进行最终稳定性评价。这与在图 23a 中求出曲线曲率(或者同样地图 23b 中的曲线斜率)类似,并且示于图 23(c)。具体地,在两个邻接触发之间的斜率值 (v_x) 的变化:

$$v_x = \frac{(s_x - s_{x-1})}{(t_x - t_{x-1})} \quad (2)$$

在这种情况下, x 限定为指数 3 至 n 。这是由于对于指数 1 和 2, 不存在斜率值来计算斜率变化。注意: s_x 给出紧接着在指数 x 处的触发值之前的曲率。

[0108] 第五,对于相邻的触发水平得到平均曲率值,以得到在计数分析曲线的最稳定区域(region)内的阈值水平。最小平均曲率相应于优化的触发水平。具体地,使用公式 3 计算对于在指数 x 下的触发水平的两个相邻曲率值的平均曲率 (a_x):

$$a_x = \frac{|v_x| + |v_{x+1}|}{2} \quad (3)$$

在这种情况下, x 限定为指数 3 至 $n-1$, 由于对于指数 1、2 和 n , 不可得到曲率值。

[0109] 可在以下步骤中简要描述前述鉴定适当的触发阈值水平的方法:

1. 产生一定范围的离散阈值(图 22)。

[0110] 2. 对于一定范围的阈值得到差分计数, c_x (图 23A)。

[0111] 3. 得到计数变化相对触发水平, s_x (图 23B 和公式 1)。

[0112] 4. 得到曲率相对触发水平, v_x (图 23C 和公式 2)。

[0113] 5. 计算邻接 v_x 值的平均值(公式 3)。

[0114] 6. 寻找最小 v_x 值并记录其指数,其属于优化的阈值触发水平。选择对于该指数的计数为用于诊断结果的实际的差分计数。

[0115] 表 1 提供在图 22A-C 中显示的数据,并且用于说明上述动态阈值优化过程。在指数 4 下的平均曲率值 (a_4) 相应于 12x 触发水平,导致 1,804 个 CD4+ 细胞的差分计数(在

图 23C 中突出的选择)。图 24 显示对于实验的持续时间,使用 12x 触发水平的累积向前和反向计数。

[0116] 表 1

指数 (x)	触发水平 ($\times 1x$ 标准)	差分计数 (c_x)	斜率 (s_x)	曲率 (v_x)	平均曲线 (a_x)
1	6	-7	n/a	n/a	n/a
2	8	1810	908.5	n/a	n/a
3	10	1759	-25.5	-467.0	245.5
4	12	1804	22.5	24.0	31.5
5	14	1693	-55.5	-39.0	35.4
6	16	1455	-119.0	-31.8	28.9
7	18	1113	-171.0	-26.0	19.4
8(n)	20	720	-196.5	-12.8	n/a

该动态阈值分析方法已显示提供与光学计数方法 (图 20A) 紧密关联 ($y=0.994x$, $R^2=0.997$) 的计数。这显示其为使用电差分计数技术用于颗粒和细胞自动化计数的可行方法。图 15 为使用光学计数方法观察到的在芯片上的圆形物体的面积直方图。图 20B 显示在电差分和光学计数方法之间的 Bland-Altman 比较分析。仅约 9 个细胞偏倚证实对于整个范围的计数的 CD4+T 细胞的电差分计数方法的准确度。

[0117] 前述方法不限制动态阈值分析方法的范围,而是用作证实其可行性和有效性的一个实例。以下为关于动态阈值分析方法的其它实施方式的另外注释。首先,整数倍数用于产生离散的阈值,但是同样可使用整数的分数 (例如, $4.25x$)。第二,不必绘制不同的数据 (c_x 、 s_x 、 v_x 、 a_x),但是用于说明的目的。操作装置的微控制器或微处理器将仅需要原始差分计数数据 (c_x) 来计算平均曲率值 (a_x)。第三,分析不局限于公式 1-3,由于其它实施方式可用于更高效和 / 或有效地得到优化的阈值。第四,除了用于以上实例的线性方法以外,非线性方法也可用于产生阈值水平。第五,阈值分析不局限于脉冲振幅 (或者高度),而是可用于其它变量,例如脉冲宽度、脉冲面积或其它实施方式。第六,阈值分析不局限于具有正极性的脉冲,而是也可用于负向脉冲。第七,可调节阈值水平之间的数量和间距,以提供更准确的阈值水平相对差分计数曲线的绘制,以便以较高精密度定位优化的阈值水平。

[0118] 具有裂解和淬灭区域的细胞计数装置

在一些实施方式中,芯片上的裂解区域 (例如,红细胞裂解区域) 可包括在计数装置 (例如, CD4+T 细胞计数装置) 中。裂解区域的加入可不再需要芯片外 (off-chip) 裂解红细胞所需的另外实验室设备和人员,这增强装置的便携性。例如,图 25 是示意图,其说明结合细胞裂解区域 2502 (例如,用于裂解红细胞) 的 CD4+T 细胞计数装置 2500。在装置 2500 的操作期间,全血流入芯片中并且被裂解溶液围绕,其在螺旋形混合通道 2504 中混合并且在约 6- 约 10 秒内使红细胞快速破裂。不同的条件可用于裂解其它类型的颗粒 (例如,细胞)。为了确保在期望的时间段期间裂解,可控制裂解区域通道的体积和裂解和样品 (例如,血液、溶液) 的流速。例如,裂解区域的通道宽度可在约 $50 \mu\text{m}$ - 约 1 mm 范围,高度可在约 $10 \mu\text{m}$ - 约 $400 \mu\text{m}$ 范围,裂解和血液溶液合并流速在约 $1 \mu\text{L}/\text{分钟}$ - 约 $100 \mu\text{L}/\text{分钟}$ 范围。

[0119] 通过加入淬灭溶液,裂解快速终止,以保护剩余的细胞,例如白细胞,并且经由螺旋形混合通道 2506 延长淬灭持续时间,以确保裂解过程的淬灭,持续时间应大于约 10 秒。可控制淬灭通道尺寸和裂解、血液和淬灭溶液的合并流速,以确保淬灭持续时间超过该最

低值。例如,淬灭通道尺寸可形成以与裂解区域通道类似,并且裂解、血液和淬灭溶液的合并流速可在约 1 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ - 约 1000 $\mu\text{L}/\text{分钟}$ 范围。淬灭的溶液随后流动通过包含孔的过滤器 2508,以防止具有与过滤器孔相同尺寸的计数孔可能的堵塞。过滤器和计数孔的高度和宽度尺寸各自可在约 0.5 μm - 约 50 μm 范围。

[0120] 计数器 2510 的传感电极可由铂或金或其它高传导性金属的传导层与铬或钛的粘合层(任选)制成。传感电极的宽度和间隙可在小于约 1 μm - 约 1 mm 范围。通过观察临时阻抗变化(即,电脉冲),Coulter 原理可用于对细胞进行逐个电计数。白细胞随后通过相同的过滤器,随后在 8 个相同的俘获室 2516 中分布,该俘获室可为 10 μm - 100 μm 高和 0.5 mm - 10 mm 宽。俘获室 2516 的数量可从 1 到超过 32 变化。俘获室高度可适于在流体/室壁界面处控制剪切应力,用于优化俘获 CD4+T 细胞或其它目的细胞/颗粒。

[0121] 装置可用经由氧等离子体处理与 PDMS(聚二甲基硅氧烷)流体粘合的玻璃基材(具有微-图案化的铂或金电极)制成。另一种方法使用用于基材和流体的塑料(例如,注塑)与由激光消融或类似过程限定的传感电极。

[0122] 在不同类型的细胞之间区分的细胞计数装置

在一些实施方式中,仅基于使用多个探测频率,细胞计数装置可在不同类型的白细胞、红细胞和血小板之间区分。除了如已经描述的使用涂布抗体的俘获室对 CD4+T 细胞具体计数之外,该技术还能够对红细胞、血小板和白细胞亚型(单核细胞、中性白细胞、淋巴细胞等)计数。例如,参考图 2,不同频率的多个信号可同时施用于一个或多个阻抗传感器 110,提供离散的阻抗谱用于任何具体的细胞类型。

[0123] 细胞可基于其不同的阻抗谱区分。例如,Holmes 等人使用 503 kHz 频率以得到每个细胞的体积,但是也使用较高的频率(1.7 MHz)来同时检查细胞的膜电容。借助红细胞裂解溶液,经由观察细胞的不透明性(高频阻抗除以低频阻抗),它们能够在一些不同的白细胞亚组(单核细胞、中性白细胞和 T-淋巴细胞)中区分(参见 Holmes 等人,“Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry(使用高速微流体单一细胞阻抗细胞计数进行白细胞分析和区分)” Lab on a Chip,2009,9,2881-2889;还参见 Ledis 等人,“Lysing reagent system for isolation, identification and/or analysis of leukocytes from whole blood samples(用于由全血样品分离、鉴定和/或分析白细胞的裂解试剂系统)”美国专利号 5,155,044,1992 年 10 月)。此外,Cheung 等人使用 6 MHz 频率在红细胞和白细胞之间区分(参见,Chreung 等人“Microfluidic Impedance-Based Flow Cytometry(基于微流体阻抗的流式细胞术)” Cytometry: Part A,2010,77A,648-666)。

[0124] 因此,低频率(例如,从约 1 kHz 至高达约 1 MHz)可施用于阻抗传感器 110 以得到细胞的体积,而另外的较高频率(例如,从约 1 MHz 至超过 100 MHz)可施用于阻抗传感器 110 以提供离散的阻抗谱,用于在若干细胞类型之间区分。所用的频率越离散,在不同的细胞类型(其在所用的较小探测频率数值下不可区分)之间区分的分辨率越高。特别是,可简单地基于它们的尺寸在其它细胞类型中区分血小板,由于血小板的尺寸为约 1-2 μm ,远小于其它细胞类型。结果是,低频率测量单独可区分血小板与其它细胞类型。由于红细胞具有与较小的白细胞类似的体积,使用低频率(500 kHz)和高频率(6 MHz),红细胞可与白细胞区分。在一些实施方式中,除了低频率(500 kHz)用于在白细胞亚型中区分以外,不

同的白细胞类型可能需要一种或多种频率。

实施例

[0125] 以下实施例为说明性的并且不是限制性的。

[0126] 测试最大脉冲密度限度

期望差分计数器可对以期望范围 5-10 μL /分钟流动的生理学浓度的白细胞计数,以提供快速辅助性 T 细胞计数。当细胞的浓度随着恒定流速提高时,平均体积(和时间)的量在事件之间降低(即,由穿过传感区域的细胞通过引起的脉冲)。最终,浓度变得足够高,其中两个细胞将在相同的传感区域中,产生降低计数器准确度的重合事件。此外,对于有限的取样频率,即使细胞在传感区域中不重合,足够高的速度将最终引起来自两个随后的细胞通过的脉冲重叠。

[0127] 稀释的全血用于测试差分计数器的脉冲密度限度,由于其含有丰富的柔性颗粒(与聚苯乙烯和胶乳珠粒相对),其易于阻塞计数通道。5 μL /分钟的恒定流速用于将全血的不同稀释液(1:1000 至 1:100)注入芯片。仅对于入口计数器分析脉冲。通过在整个原始数据中在随机的时间在已知的持续时间窗口中的脉冲计数来计算脉冲密度。

[0128] 图 7 说明使用微流体芯片得到的细胞浓度(由对于已知的流动体积的脉冲数量计算)与每个稀释液的计算浓度(假定全血浓度为 5×10^9 细胞/mL)的比较的结果。在 5 μL /分钟流速下,微流体芯片可处理 1:200 稀释的全血($\sim 2.5 \times 10^7$ 细胞/mL),但是对于 1:100 稀释($\sim 5 \times 10^7$ 细胞/mL)不能对每一个脉冲计数。芯片可处理的最大脉冲密度为 2,236 个细胞/秒,等于在 5 μL /分钟流速下 2.68×10^7 细胞/mL 的浓度。这远超过健康成人中白细胞浓度的上限,确保没有重合事件,即使在 10 μL /分钟流速下。

[0129] 测试俘获室灵敏度和准确度

进行接下来的实验以证实对于钝化的俘获室入口计数与出口计数相同。10 μL 健康成人血液样品(具有裂解的红血球)可具有超过 100,000 个白细胞,其中 10,000 个或 10% 为辅助性 T 细胞。患有 AIDS 的患者的辅助性 T 细胞计数可小于 200 细胞/ μL ,其导致仅 2,000 个细胞/10 μL ,或者总白细胞的 2%。计数中的任何误差可负面影响该方法的灵敏度和准确度。

[0130] 在细胞流入微流体芯片之前,通过在 PBS +1% BSA 中流动并且在室温下孵育 30 分钟,使俘获室钝化,以防止细胞与玻璃和 PDMS 表面的非特异性吸附。BSA 为用于使表面钝化的众所周知的蛋白质,并且在 pH 7.4 下与亲水性玻璃基材容易结合(参见例如,Sweryda-Krawiec 等人,“A new interpretation of serum albumin surface passivation(血清白蛋白表面钝化的新的解释)” *Langmuir*, 第 20 卷,第 2054-2056 页,2004 年 9 月)。在该具体实验中,白细胞的三种稀释液以 5 μL /分钟流入芯片,接着 10 μL /分钟 PBS +1% BSA 洗涤,以确保所有的细胞通过出口计数器离开。在整个实验期间记录对于每个计数器的阻抗数据。

[0131] 图 8 说明负对照实验的典型结果。理想地,入口和出口总和在实验结束时相等,但是具有超过 -3,500 的差异。感兴趣的是注意到出口计数高于入口计数,这对于 1:1 稀释的白细胞是正确的,但是在较低稀释中没那么明显。图 9 显示对于各种触发水平的白细胞浓度与出口和入口计数之间的差异之间的关系。触发水平为确定阻抗脉冲是否为细胞并且

在 Clampfit 中手动设定的电压阈值。通常惯例是将触发水平基于基线信号的噪声（不存在细胞）的标准偏差。

[0132] 在该实验中,10 倍于噪声的标准偏差 (SD) 的触发水平为可用于确保基线噪声脉冲不作为细胞事件计数的最小阈值。入口和出口计数器的阈值水平相同。显著的趋势是,在提高触发水平值方向(从左到右),在较高的阈值 ($67 \times \text{SD}$ 对于 1:1 ; $40 \times \text{SD}$ 对于 1:2 ; $20 \times \text{SD}$ 对于 1:5) 下稀释较少的样品与 X- 轴交叉 (入口 - 出口 = 0)。结合出口计数高于入口计数的事实,可解释入口和出口计数的大的差异。由于在细胞表面之间存在更多的相互作用,当纯化的白细胞的浓度提高时,细胞聚集体更频繁的形成。这些聚集体通过入口计数器口,并且其相对高的剪切应力 ($1,320$ 达因/cm) 使聚集体分离回到单个细胞,其随后被出口计数器计数。聚集体作为单一实体被入口计数器计数,但是当其到达出口计数器时可能变为三个或四个实体。仅当阈值水平足够大以不计数较小的实体(例如单一细胞)并且仅计数在通过入口计数器后保持物理完整的较大的物体时,入口和出口计数相等。

[0133] 白细胞的聚集妨碍差分计数器的真实评价,并且可通过较大的稀释来补救。然而,稀释具有若干缺点,最重要的,仅分析所需的一部分细胞以提供更稳健的辅助性 T 细胞测试并且需要大得多的芯片体积。因此,期望具有生理学浓度的白细胞进入芯片,并且可能允许使用微制造的 $10 \mu\text{m} \times 13 \mu\text{m}$ PDMS/玻璃孔或者“剪切机 (shearer)”,以在芯片入口之前分离细胞聚集体。图 10A 显示对于 1:1 稀释的白细胞在重复钝化实验之后的结果。剪切机证明在进入差分计数器芯片之前降低聚集体的数量(对于直接注入芯片而没有剪切机的细胞样品,在 $9 \times \text{SD}$ 相对 $12.5 \times \text{SD}$ 下的 X- 截距 (intercept))。

[0134] 图 10B 显示当使用剪切机时细胞尺寸(脉冲振幅)和细胞通过持续时间的差异。在进入入口计数器之前,经历剪切的群在较低的脉冲持续时间下为更紧密的分布,具有与未剪切的群类似的脉冲高度振幅,由于较大的聚集体阻断较长的阻抗传感区域。由于甚至单一细胞足够大以阻挡在传感电极之间通过的大多数电流,振幅不会改变太多。

[0135] 图 10C 说明在入口传感器前已剪切并且在入口传感器处计数的细胞和不经历芯片前剪切但是通过入口计数器孔并且在出口计数器处计数的细胞的尺寸和通过持续时间类似性。这显示入口计数器实际上将聚集体剪切成为更小的实体,与芯片前剪切机实施相同的工作。因此需要在芯片之前放置剪切单元,以确保将大多数聚集体分离成为单一细胞。

[0136] 测试反向 - 流动差分计数器

使用反向 - 流动方案重复上述钝化的俘获室实验,14 个不同的实验的结果示于图 12 和图 19A。向前计数与在向前流动期间进入俘获室的白细胞的数量相等;绝对误差计数为与零的理想差分计数的差异;% 误差为通过向前计数归一化的绝对误差计数。图 12 显示对于整个向前计数范围,绝对误差计数如何保持大致恒定。这导致对于较大的向前计数降低的 % 误差(图 19A),这是期望的。图 13 为表示使用反向 - 流动差分计数器方案对于钝化的俘获室实验的入口和出口计数的图示。

[0137] 图 19B 说明在图 19A 中突出的实验期间累积的向前和反向计数。这证明反向计数如何最终呈平稳状态并且变得接近向前计数。如下表 2 显示,向前计数大于 2,000 导致小得多的误差。这确保在临床情况下得到的较大白细胞数量导致最小的误差。对于提高总的向前细胞计数,可通过以下事实解释降低的 % 误差:计数误差不与流动细胞的总数成比例并且保持相对恒定。

[0138] 表 2

数据范围	误差(%) (图 12 插图)		绝对计数误差(细胞) (图 12)		估计灵敏度 (细胞· μL^{-1})	
	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
所有的 WBC	2.91	3.93	44.2	31.3	8.84	6.26
WBC < 2000	7.25	5.37	38.8	25	7.76	5
WBC > 2000	1.18	1.02	46.4	34.5	9.28	6.9

表 2 汇总对于不同范围的总计数白细胞, 来自图 12 和图 19A 的数据。通过假定约 5 μL 的样品流入芯片 (大致由于电流计量方法需要改进), 可得到估计的灵敏度。结果是, 对于大于 2,000 个计数的白细胞的更实际的范围, 基础灵敏度为 ~ 9 个细胞 / μL , 其与在文献 (Cheng 等人, “Cell detection counting through cell lysate impedance spectroscopy in microfluidic devices (在微流体装置中通过细胞裂解产物阻抗光谱学的细胞检测计数)” Lab on a Chip, 第 7 卷, 第 746-755 页, 2007) 中在电 CD4+T 细胞计数中的最佳灵敏度类似。计数误差的主要来源由细胞非特异性吸附到室表面上引起, 尽管被 BSA 钝化。使用更多的温育时间和 / 或 pH 更接近 BSA 的等电位点 (5) 的 PBS 的更加成功的钝化将显著降低该误差, 并且说明差分计数方法将提供最灵敏的计数技术 (Freeman 等人, “Real time, high resolution studies of protein adsorption and structure at the solid-liquid interface using dual polarization interferometry (使用双重极化干涉测量在固-液界面处的蛋白质吸附和结构的实时、高分辨率研究)” Journal of Physics: Condensed Matter, 第 16 卷, 第 S2493-S2496 页, 2004)。误差的另一个可能的来源可为在向前计数之后在计数器通道中发现的在高剪切速率下的死细胞 / 垂死细胞破裂。

[0139] 使用反向-流动技术的 CD4+T 细胞计数

反向-流动技术用于对微流体芯片上俘获的 CD4+T 细胞的数量进行电计数。俘获区域首先通过吸附 30 分钟涂布抗-CD4 抗体 (Ab) (1:10 在 PBS 中), 接着在更多 Ab 中若干次重复流动并且在每个重复之间等待 10 分钟。通过用 PBS +1% BSA 漂洗室, 除去未结合的 Ab, 其也钝化不吸附 Ab 的任何表面。白细胞以 5 μL /分钟流入芯片, 直至出口计数器处电检测细胞。随后 PBS +1% BSA 起初以 5 μL /分钟通过出口计数器口注入, 以提高辅助性 T 细胞和 CD4 Ab 之间的相互作用时间。在大多数细胞已离开芯片之后, 将洗涤流速提高至 10 μL /分钟以洗去任何非特异性结合的细胞。

[0140] 在电计数之后, 通过对俘获的细胞成像用于随后使用图像加工软件计数, 得到光学对照。使用 Olympus IX81 倒置显微镜以 40x 总放大倍数取整个俘获区域的相差图像。使用 Adobe Photoshop 图像加工软件将 42 个图像对准和合并, 使用 ImageJ 软件计数细胞。图 14 显示合并的图像和整个俘获和计数器区域的合成图像。发现在俘获室的长度的中点之前发现俘获细胞的最高密度 (插图 2)。接近入口发现细胞的较小密度 (插图 1), 这是预期的, 由于细胞不具有足够的时间以与室表面上的 Ab 相互作用。接近室的出口发现最低密度, 在出口处附着非常少的细胞 (插图 3)。最可能的是, 在较高浓度的细胞到达出口之前开始洗涤过程, 但是也可能由于大多数辅助性 T 细胞具有充足的时间与固定的 CD4 Ab 结合。

[0141] 还注意到细胞路径不横跨俘获通道的整个宽度。产生此的原因是由于相对窄的计数器通道用作引起大多数细胞在通道长度的中线的 $\pm 850 \mu\text{m}$ 内行进的高度-集中的喷嘴。这可通过将入口和出口计数器彼此对角相对放置 (在俘获室的相对角落) 而解决, 这

将迫使细胞行进俘获室的对角线长度。通过使计数器出口弯曲或成为扇形,使得细胞一旦进入俘获室就不会这样集中,可简单地得到另一方案。

[0142] 图 15 显示具有各种内部面积的圆形物体的自动化计数。虚线表示对于辅助性 T 细胞假定的面积范围并且给出辅助性 T 细胞计数为 926。该范围包括 10–12.5 μm 的细胞直径,其稍大于在文献中报道的淋巴细胞的直径,但是这些细胞不处于优化的生理学条件并且可能已开始凋亡。另外,相差成像围绕细胞直径产生光环 (halo),其可引起显然较大的细胞,尤其是当在低放大倍数下,其中像素的尺寸相对较大并且不能精确代表细胞的周长。

[0143] 图 16 显示俘获的辅助性 T 细胞的反向 - 流动差分计数结果。得到的 931 个细胞的计数与通过图像加工得到的计数紧密匹配,并且显示差分计数器方法为在微流体芯片中对辅助性 T 细胞计数的可行方法。

[0144] 图 20 显示使用由人全血样品纯化的白细胞的 14 个 CD4+T 细胞计数实验的结果以及在电差分方法和光学对照之间的紧密关联 ($y=0.994x$, $R^2=0.997$)。图 21 说明 % 误差 (光学和电计数的绝对差异,通过 CD4+T 细胞计数归一化) 如何涉及计数的 CD4+T 细胞的总数。对于在芯片上俘获的小于 1,000 个细胞,平均误差为 4.5% ($n=3$)。假定 5 μL 样品体积,CD4+T 细胞浓度将小于 200 细胞 / μL ,这是定义 AIDS 的浓度限度。由于具有 100 细胞 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的实际的 CD4+T 细胞浓度的患者将具有仅 ± 4.5 细胞 / μL 的计数误差,显示为高度准确的。对于在整个芯片中俘获的超过 1,000 个细胞的计数,平均误差为 2.1% ($n=11$)。俘获的细胞与总计数细胞的 $25\pm 10\%$ ($n=14$) 比率与涉及 25–33% 的白细胞为 CD4+T 细胞的文献 (Daniels 等人,“Functional histology: A text and colour Atlas (功能组织学:文本和有色图谱)” Churchill Livingstone,1979) 一致。

[0145] 使用具有细胞裂解和淬灭区域的装置的细胞计数

用另外的红细胞裂解和淬灭区域建立实验以评价反向电差分计数方法,以确保其使用上述装置 2500 在诊断测试中的可行性。使用 1% BSA (牛血清白蛋白) 溶液 /PBS (pH 4.5) 达 3 小时,芯片的俘获区域和出口保持线圈 (holding coil) 由细胞相互作用钝化。保持线圈用于确保在向前流动方向期间离开芯片的细胞在流动反向之前不会丢失至废物。将各种样品尺寸的全血 (0.5–10 μL) 以 1.5 μL / 分钟的流速注入芯片。使用 HPLC 泵,分别以 17.5 μL / 分钟和 8.5 μL / 分钟注入裂解溶液 (0.12% (v/v) 甲酸和 0.05% (w/v) 皂草苷) 和淬灭溶液 (2x PBS 和 0.6% 碳酸钠)。一旦注射期望的血液体积并且实验持续时间结束,使流动反向,此时细胞从芯片和保持线圈完全洗涤。

[0146] 图 26 说明对于全血样品 23 个差分细胞计数的 % 误差。计算 % 误差作为向前和反向计数之间的绝对差异,通过向前计数归一化并且乘以 100。理想地,向前和反向计数相同,导致 % 误差为 0%。对于所有 23 个实验的平均 % 误差为约 3.3%,其与在不具有红细胞裂解和淬灭模块的先前实施方式中的约 2.9% 的 % 误差 (表 2) 类似。这显示加入红细胞裂解和淬灭模块的差分计数芯片导致可分析未加工的全血样品的具有低固有误差的可行装置,使其用作便携的诊断装置是实用的。

[0147] 其它实施方式

应理解的是,虽然已结合其详细说明描述了本发明,但是前述描述旨在说明性的并且不限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围来限定。其它方面、优点和修改在所附权利要求书的范围内。

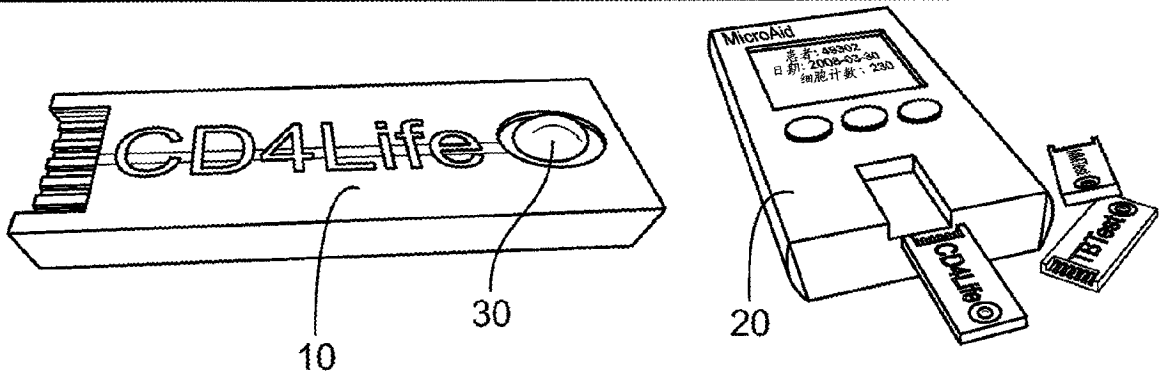
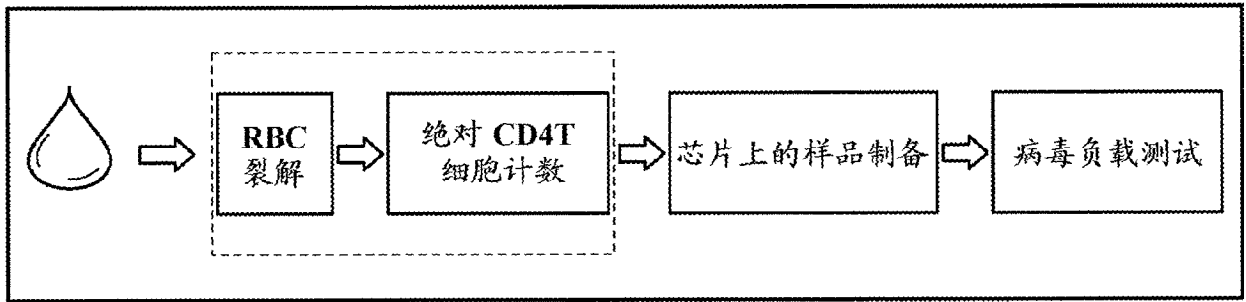


图 1

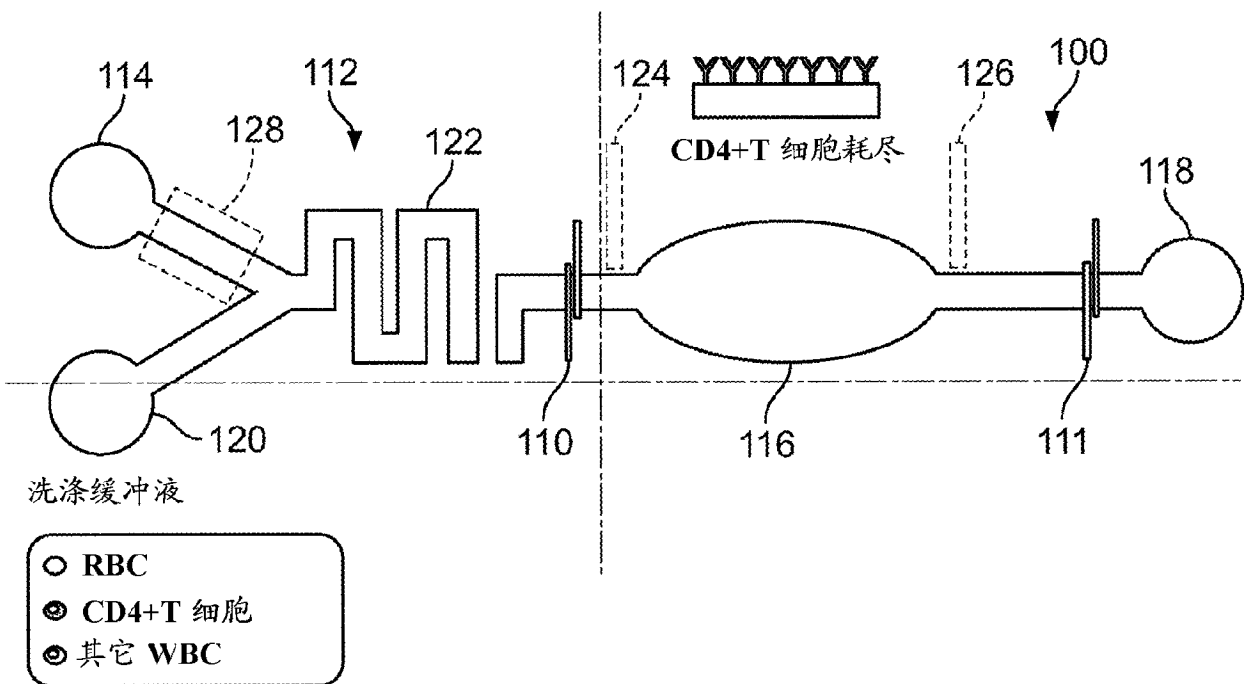


图 2A

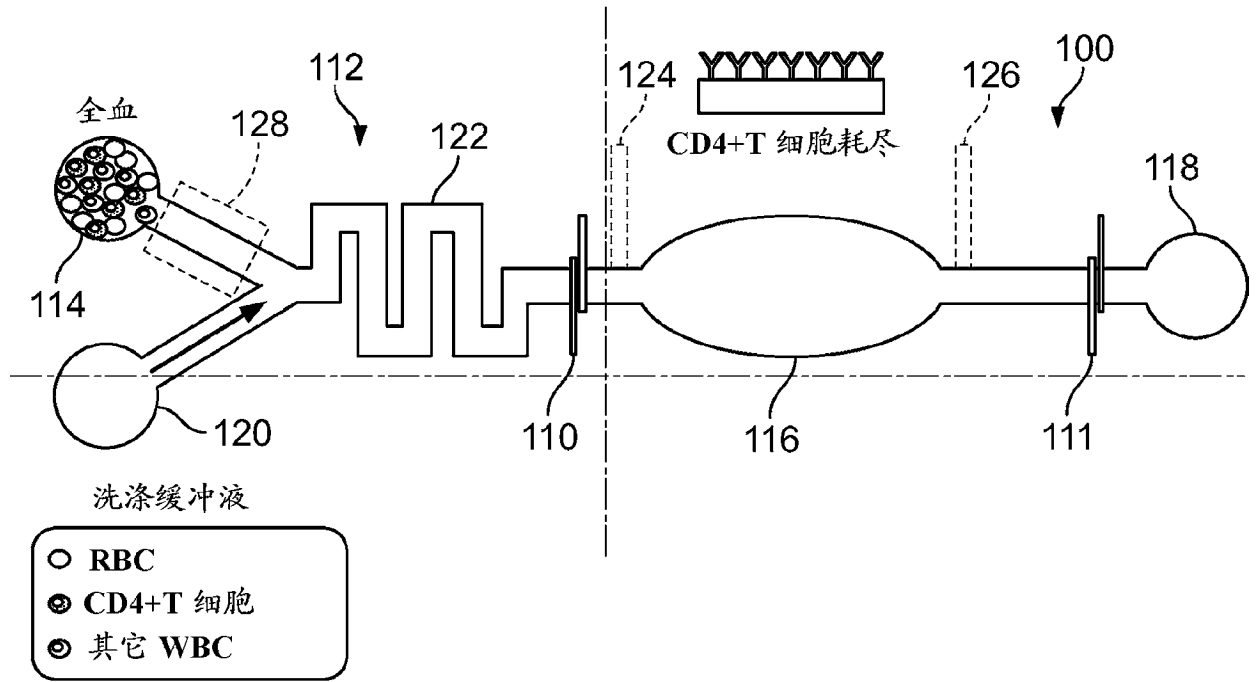


图 2B

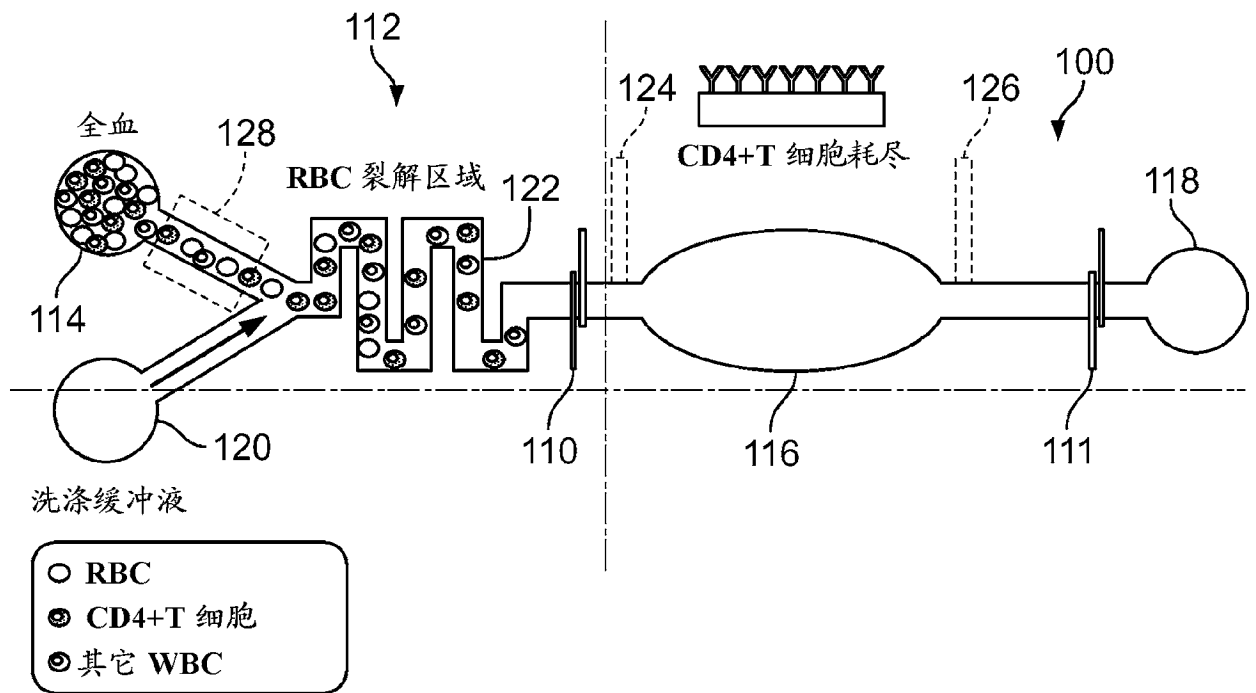


图 2C

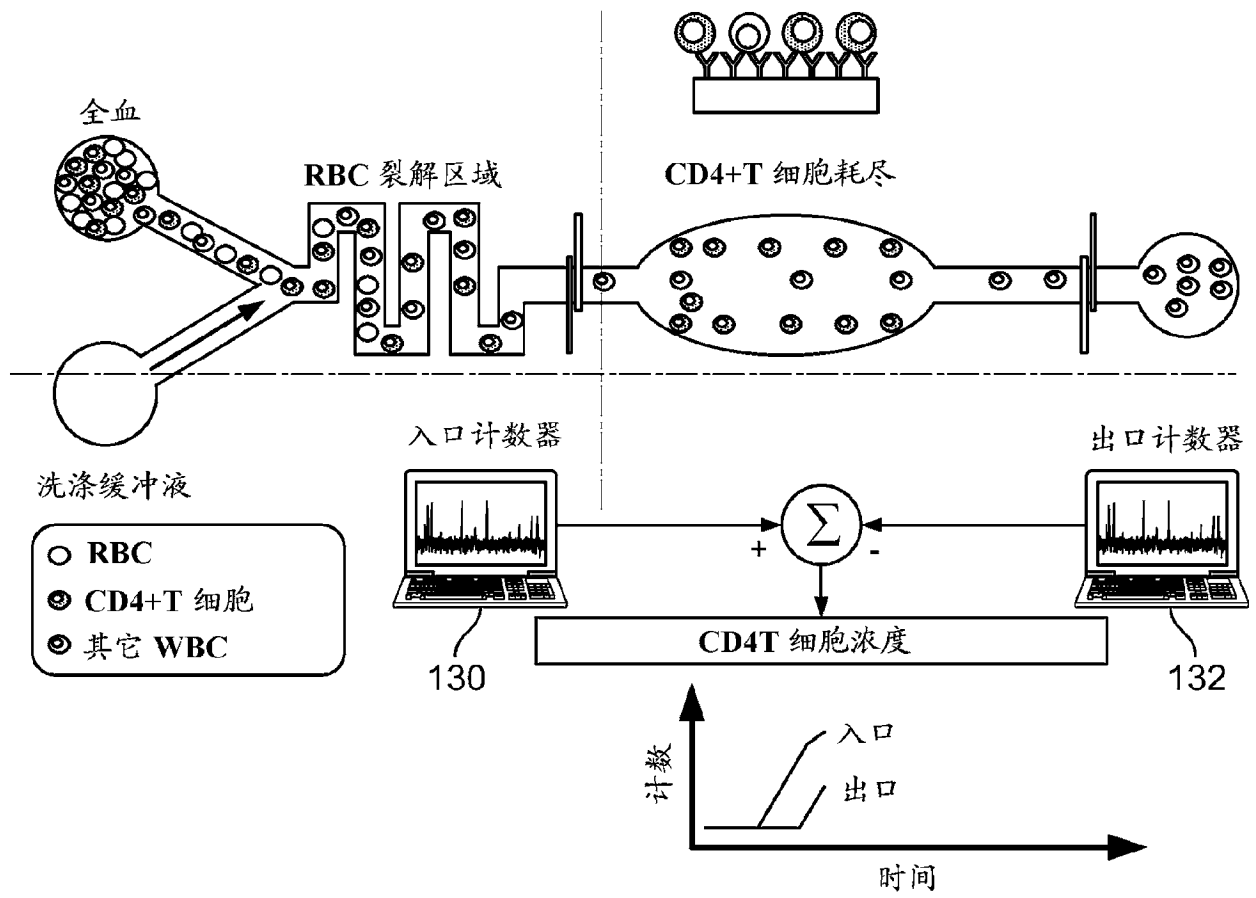


图 2D

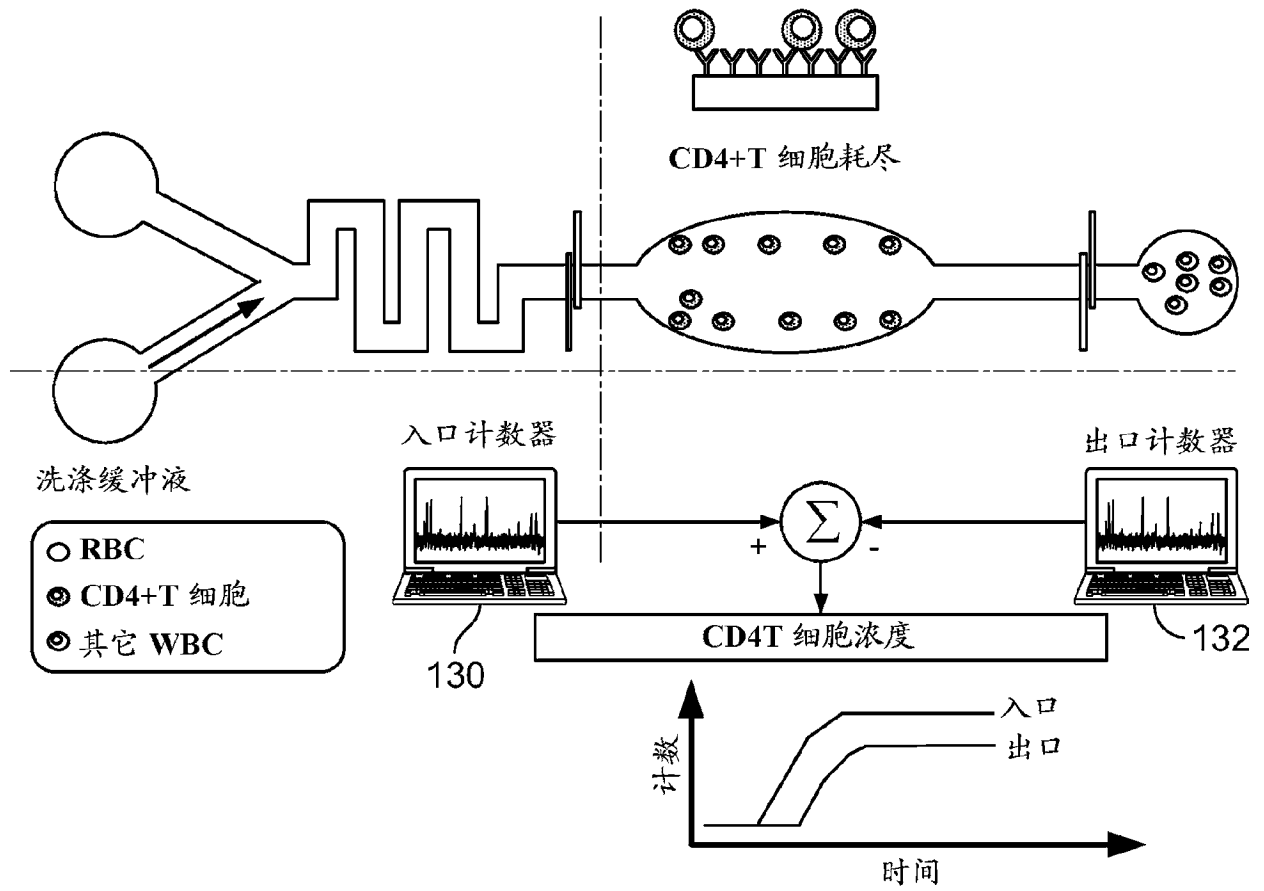


图 2E

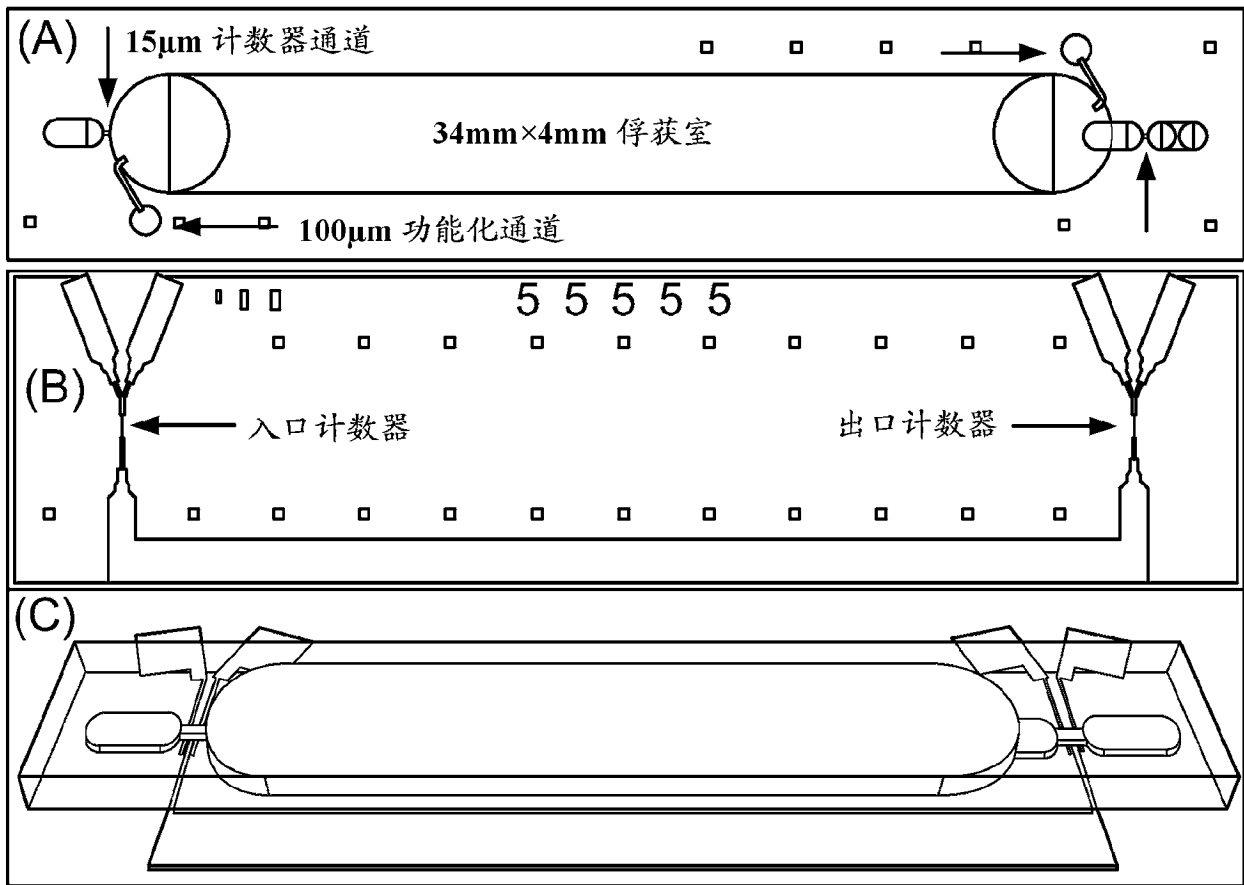


图 3

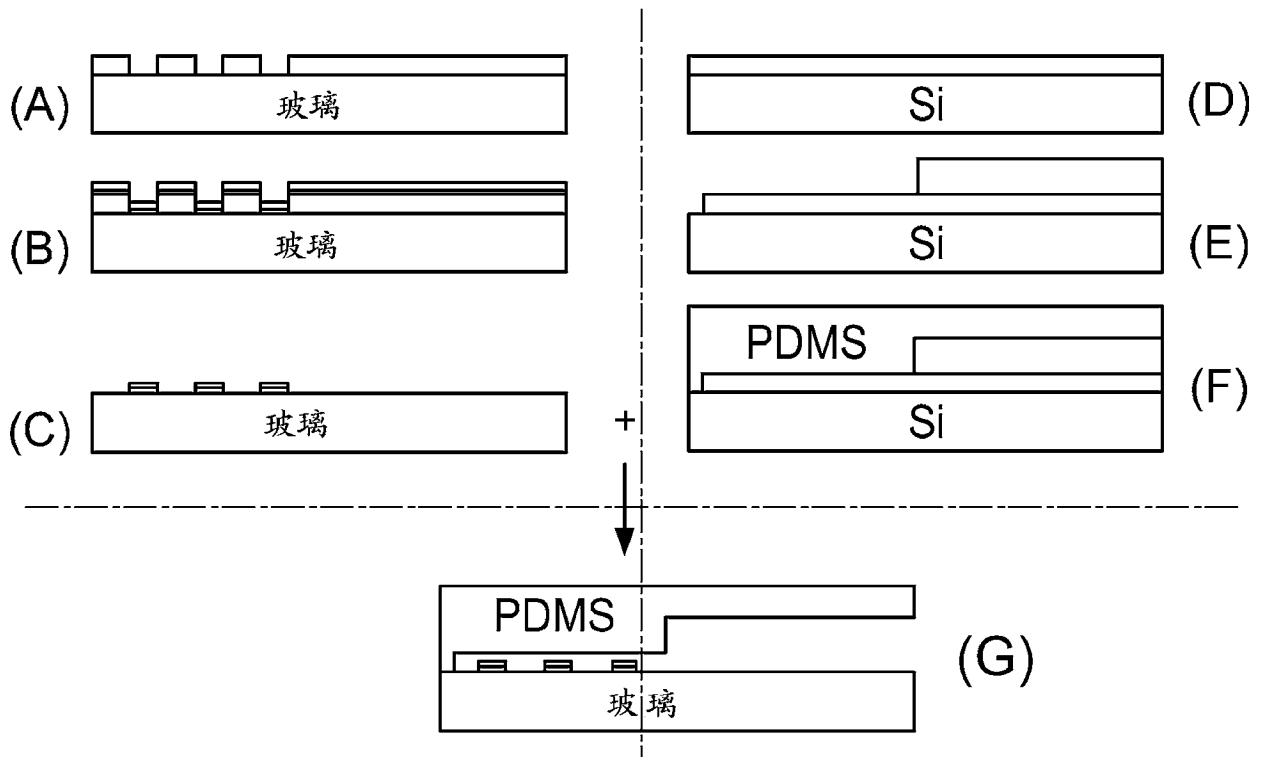


图 4

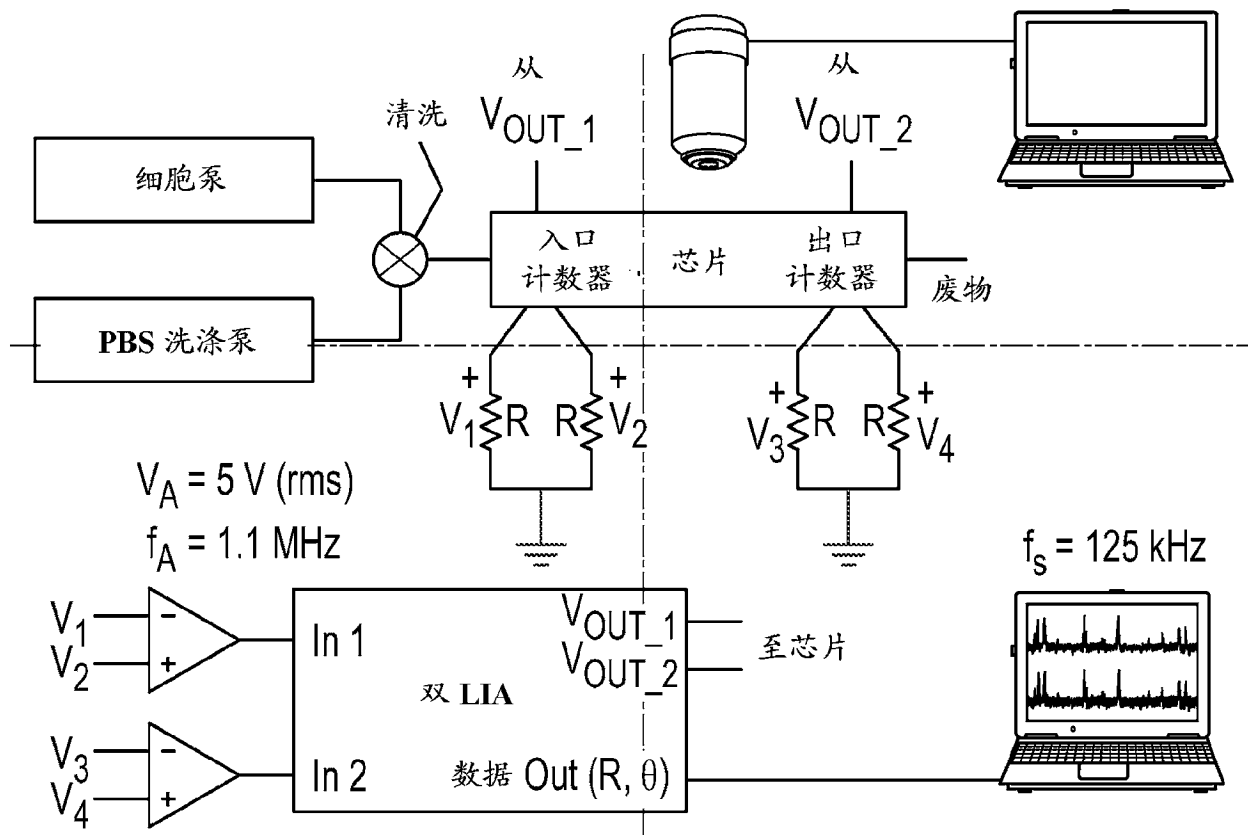


图 5

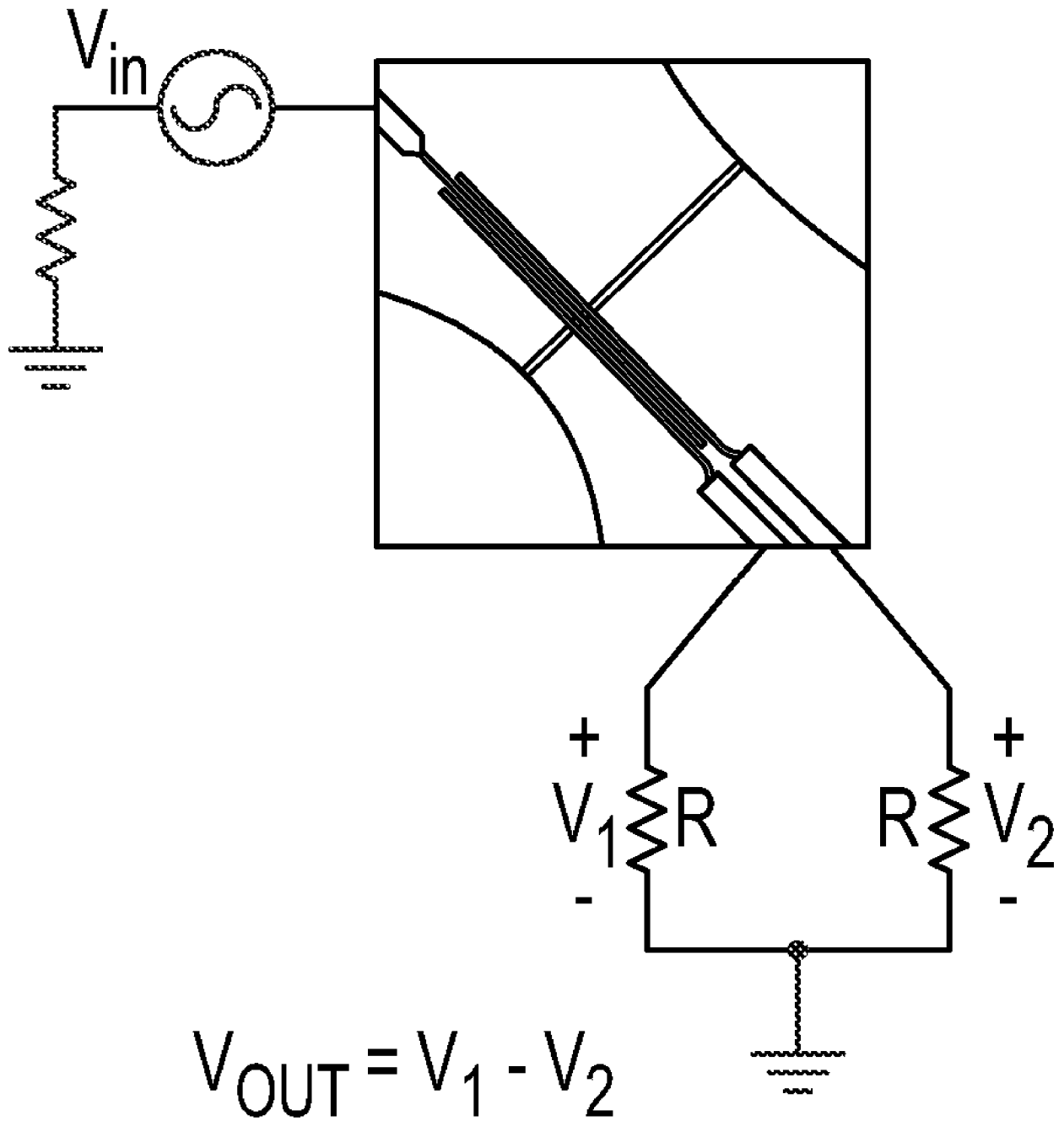


图 6

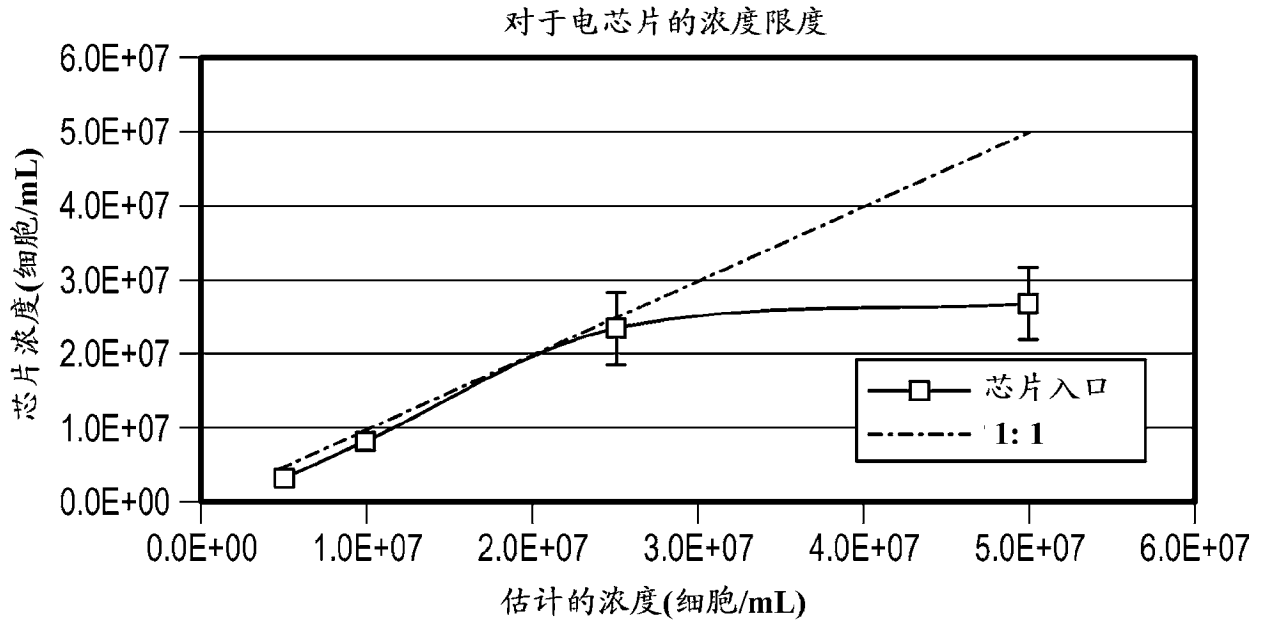


图 7

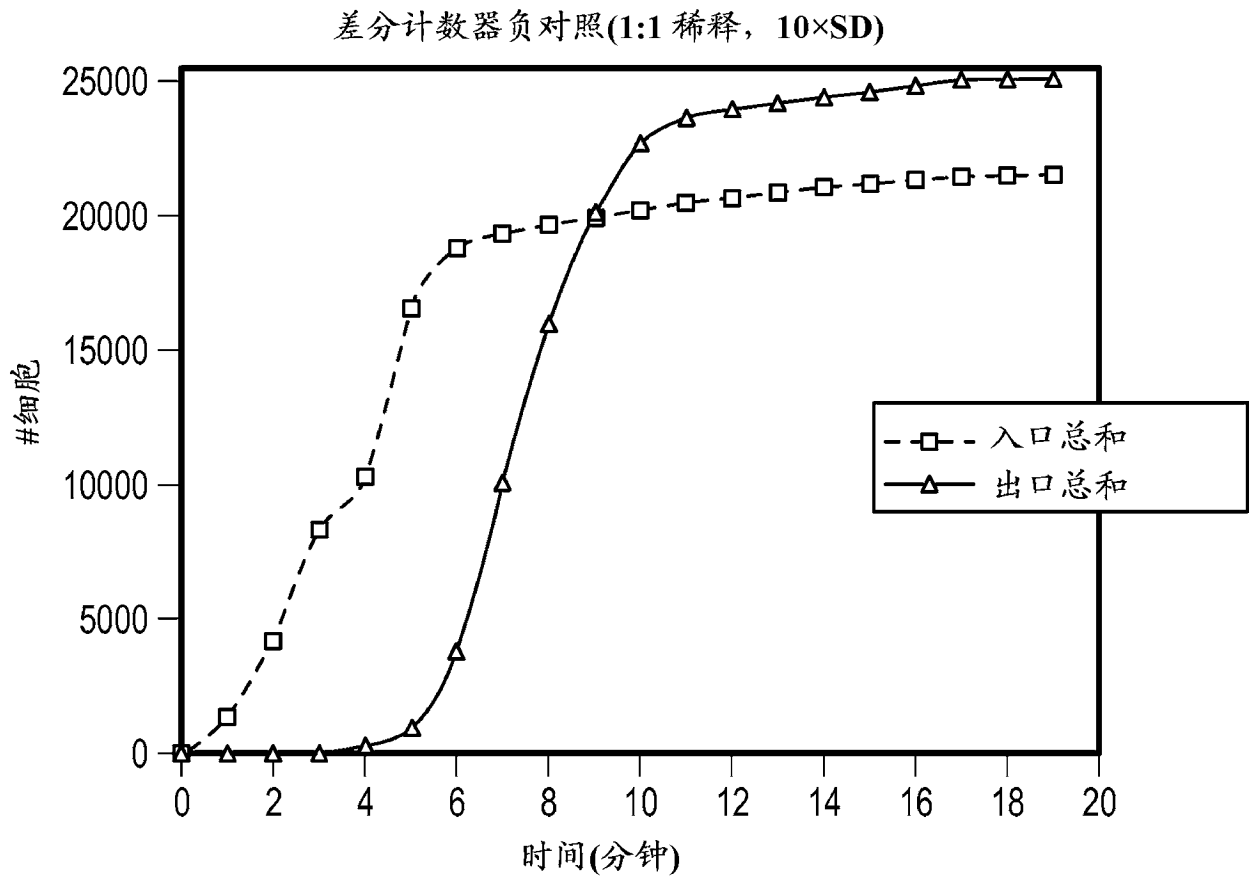


图 8

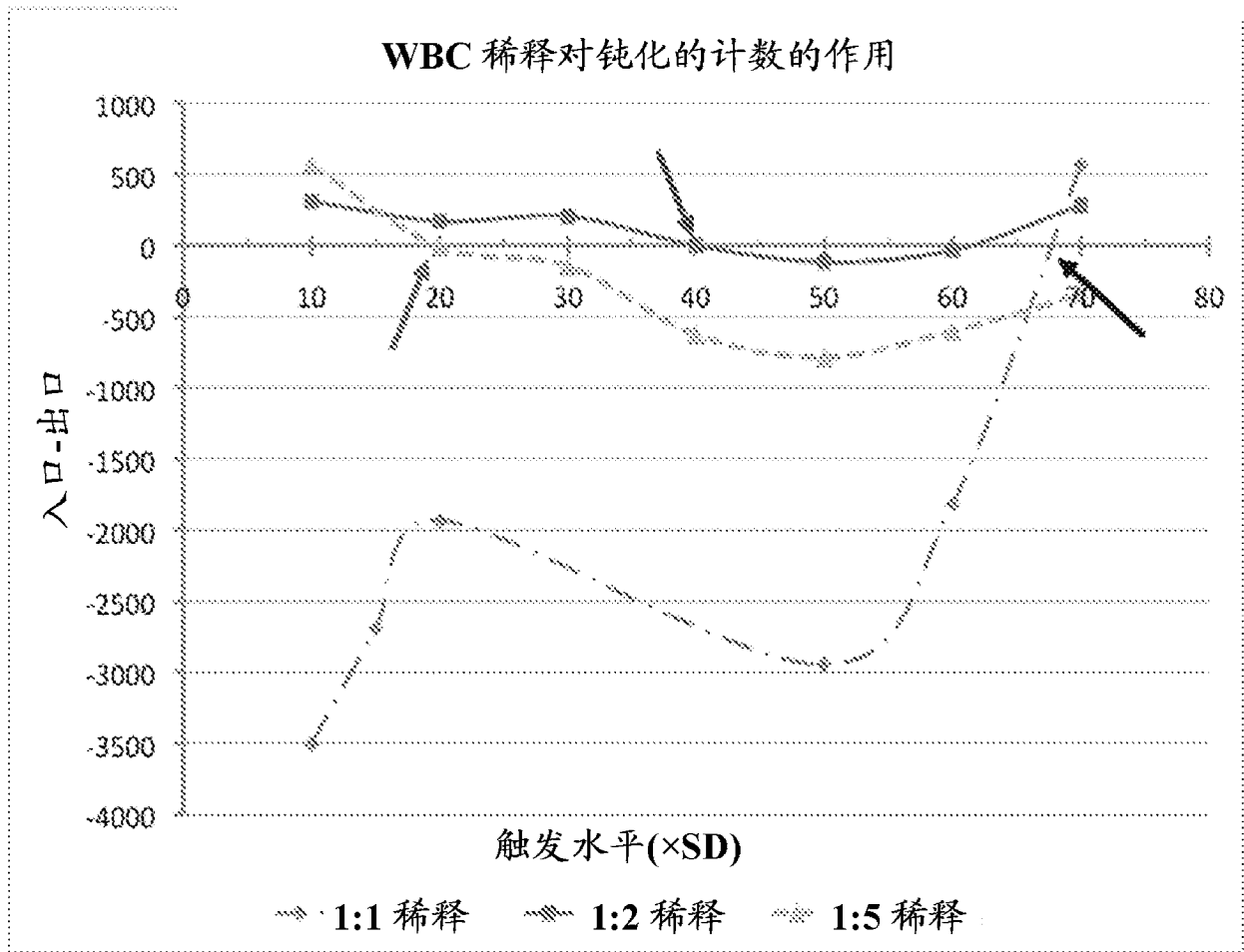


图 9

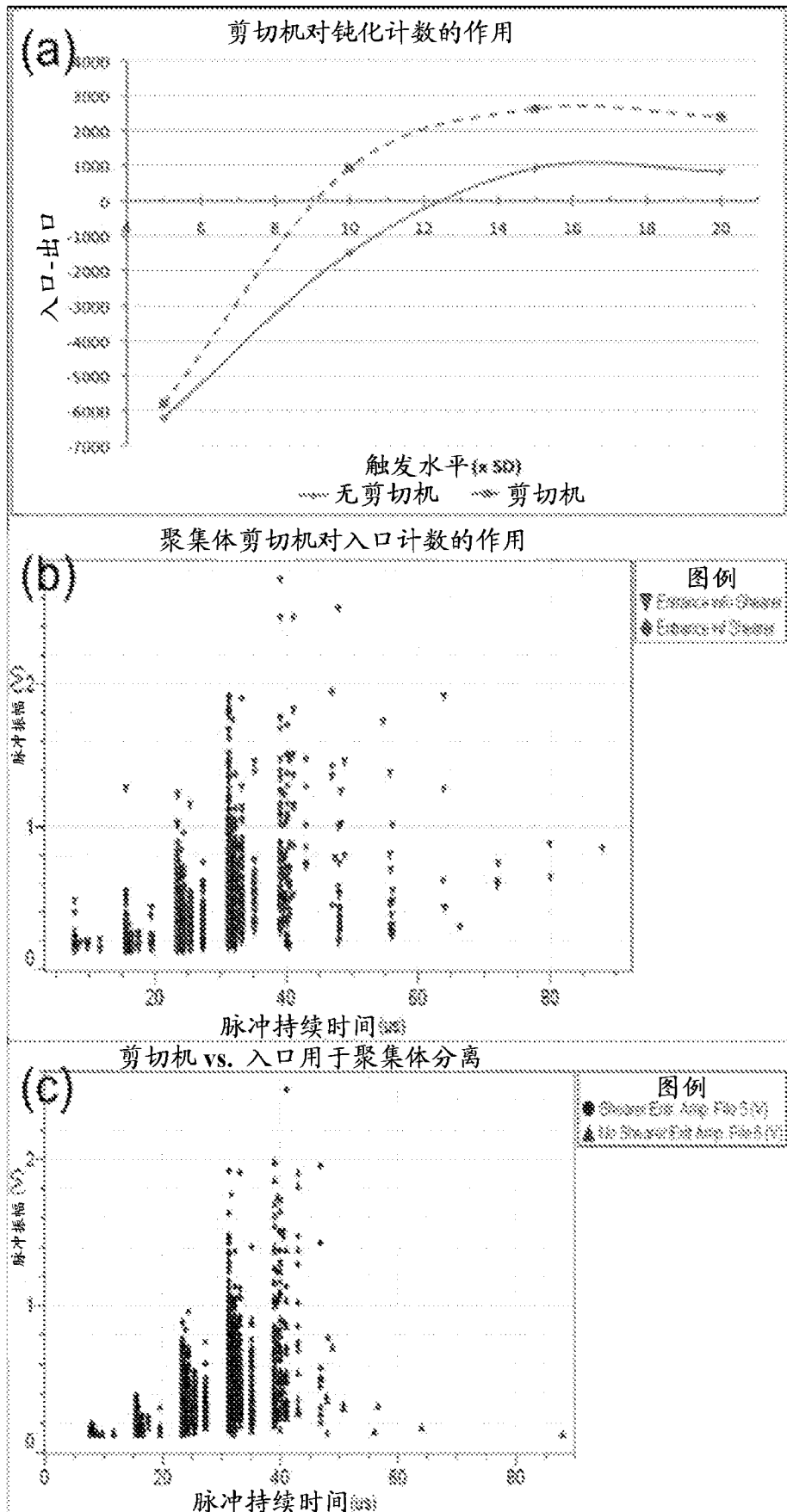


图 10

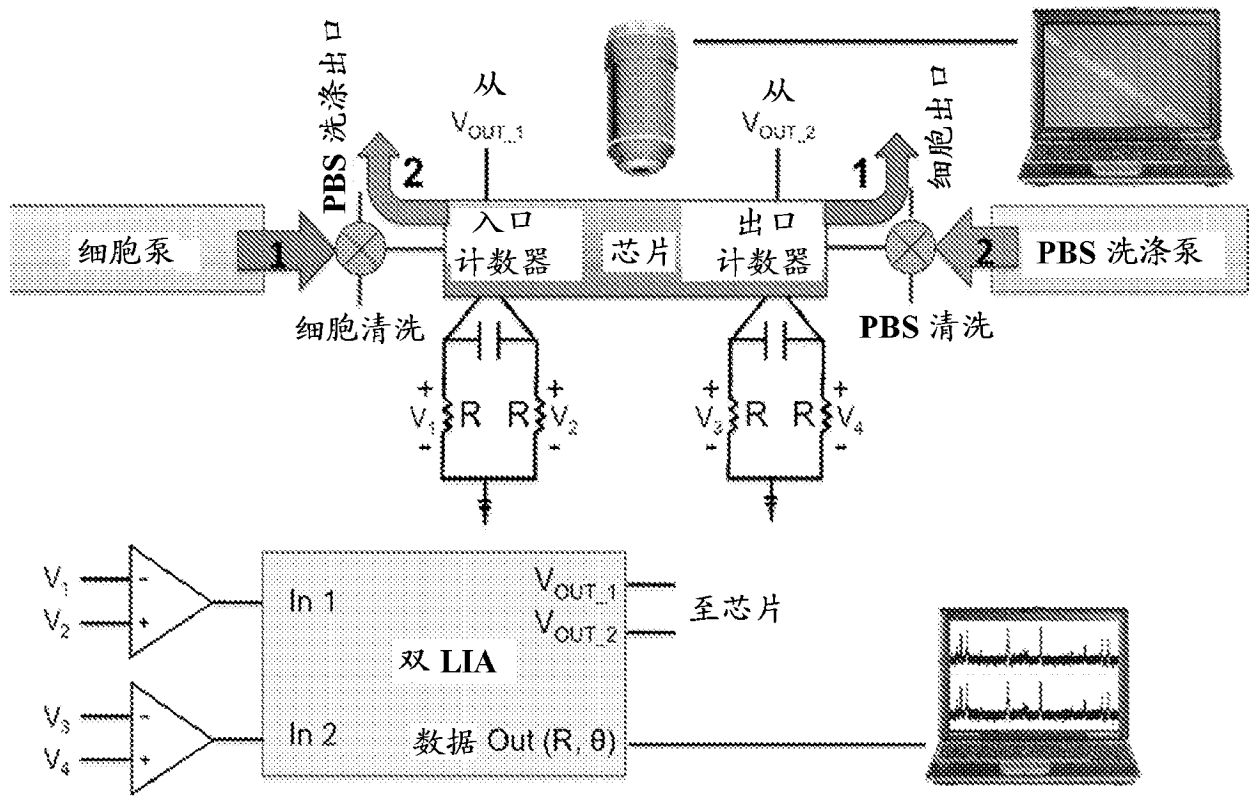


图 11

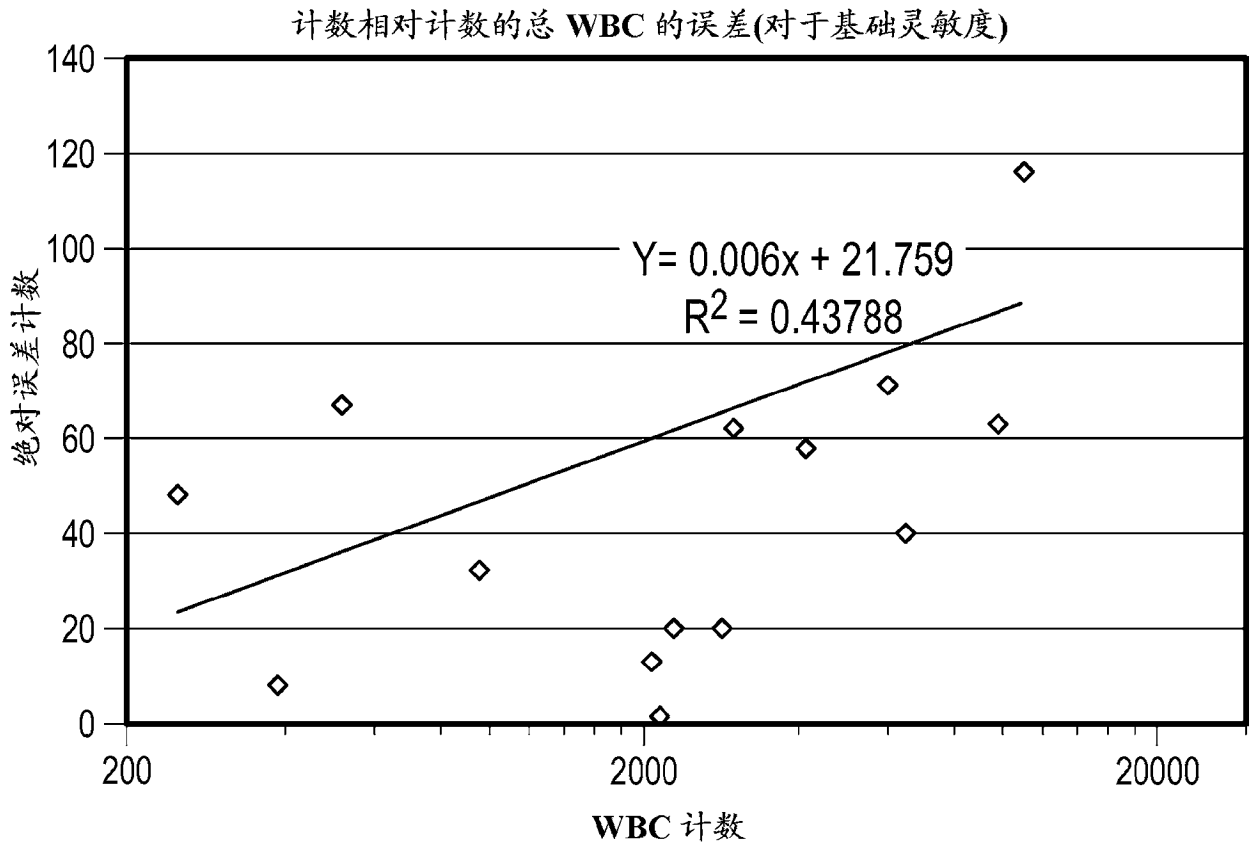


图 12

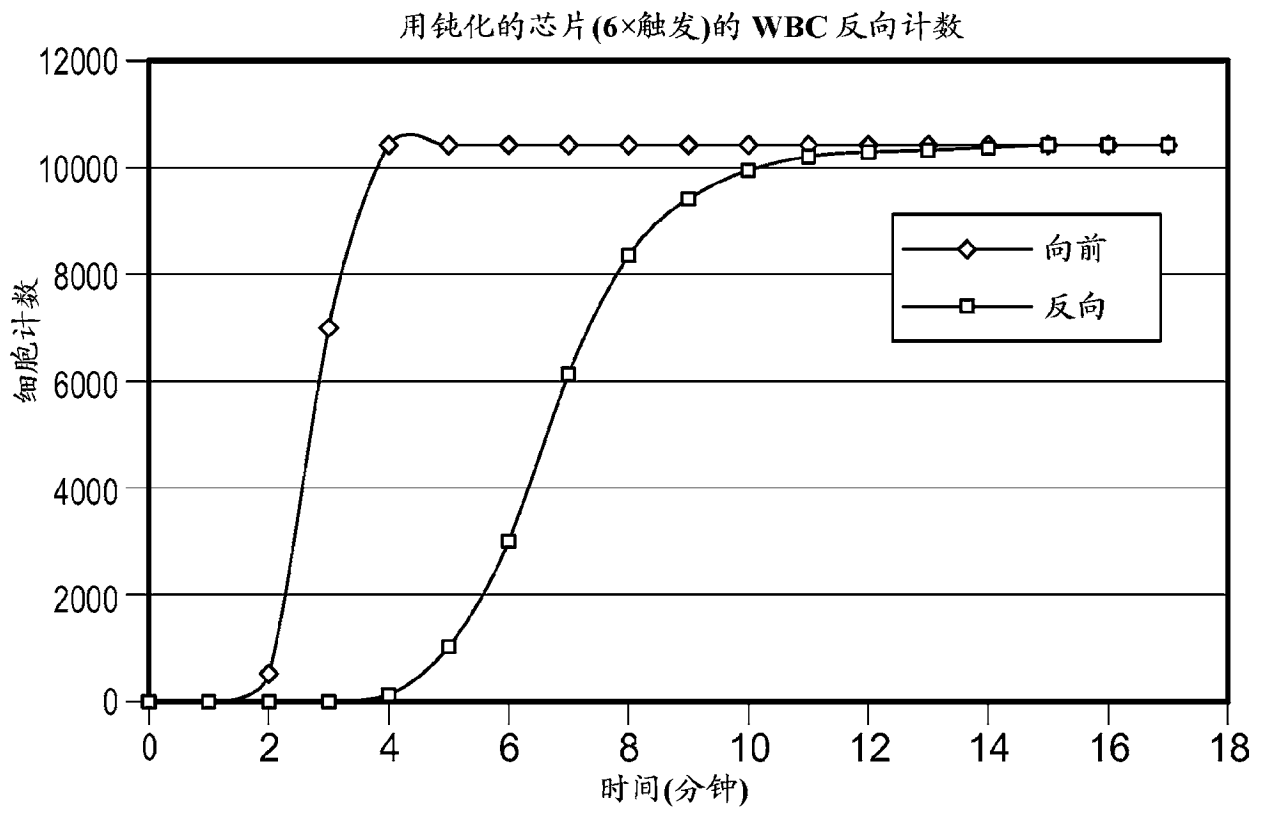


图 13

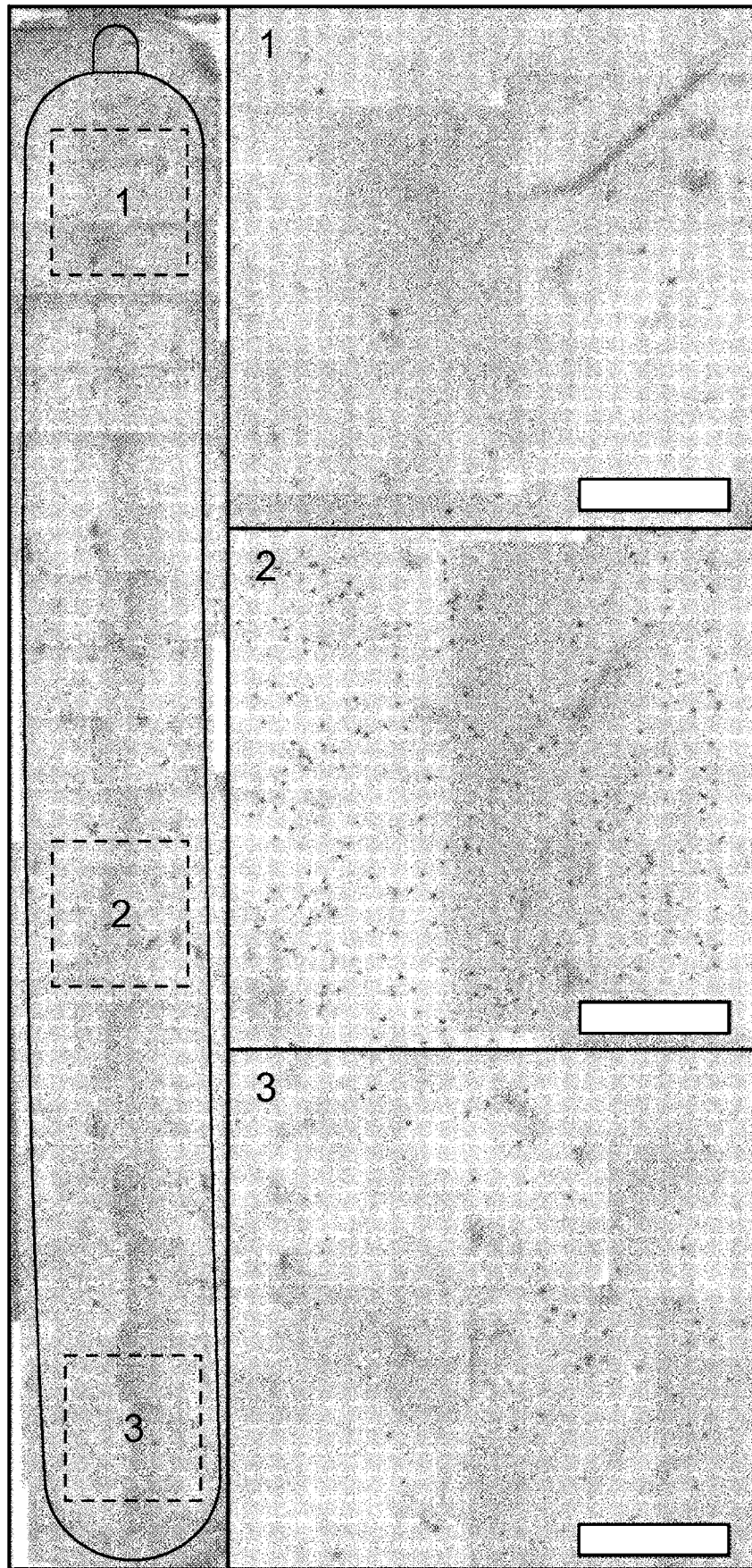


图 14

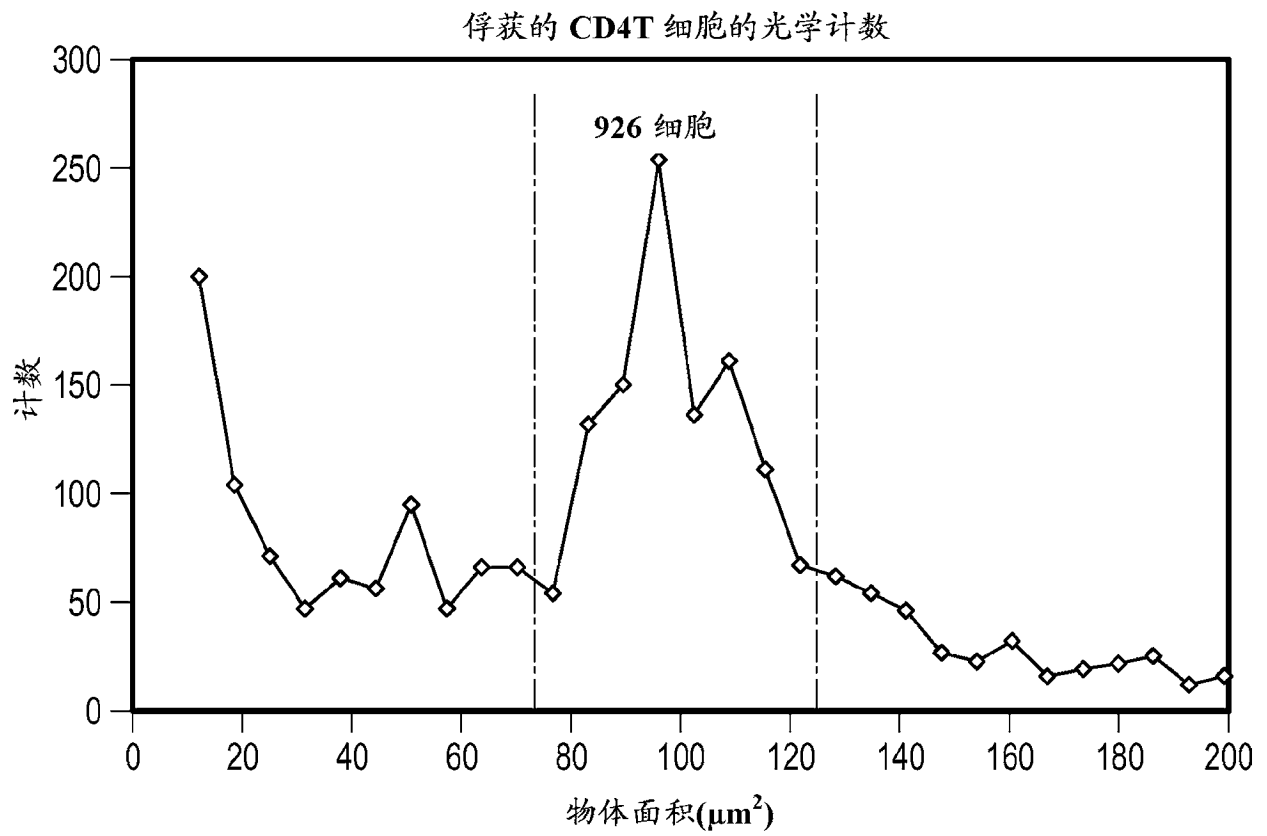


图 15

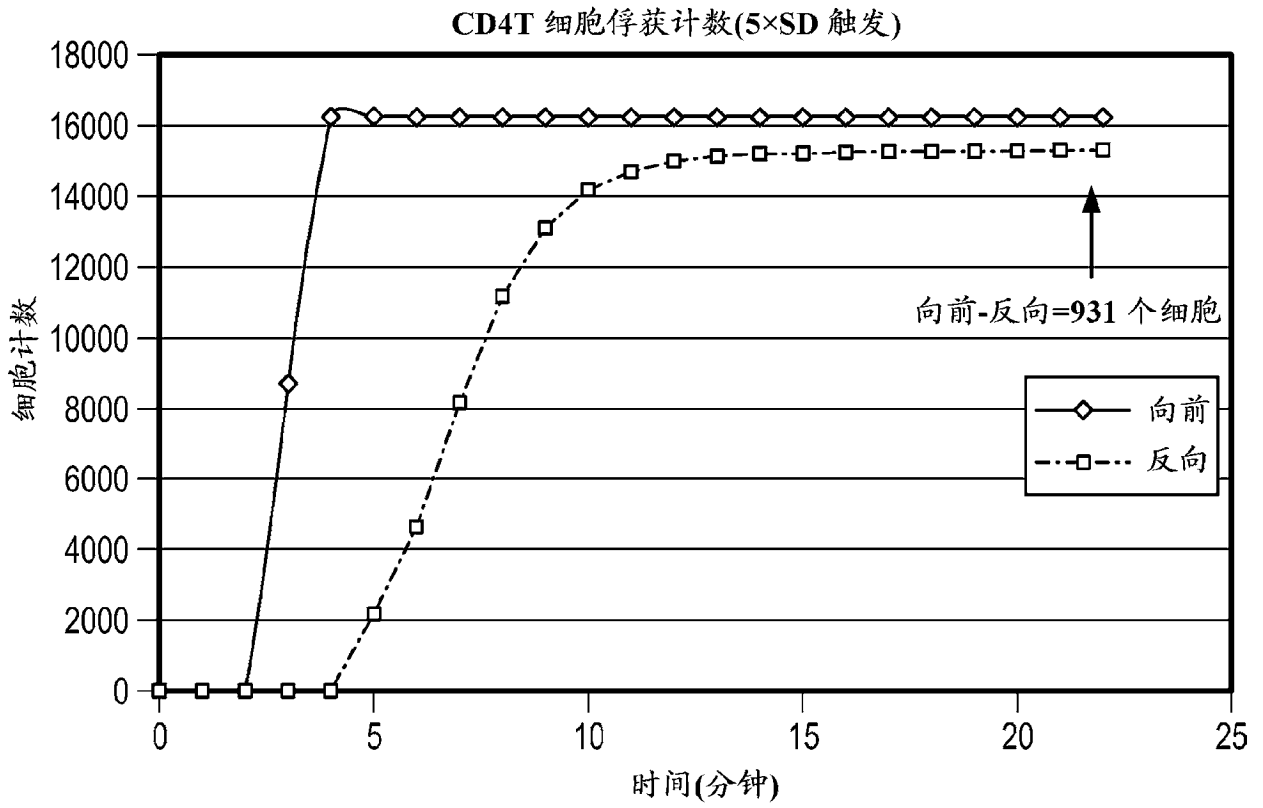


图 16

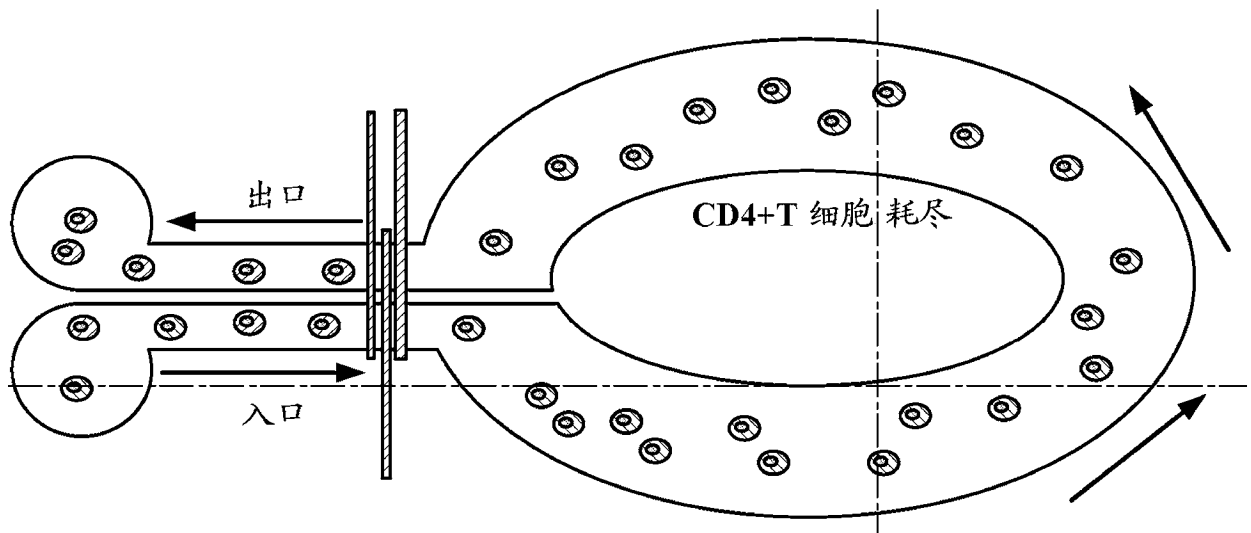


图 17

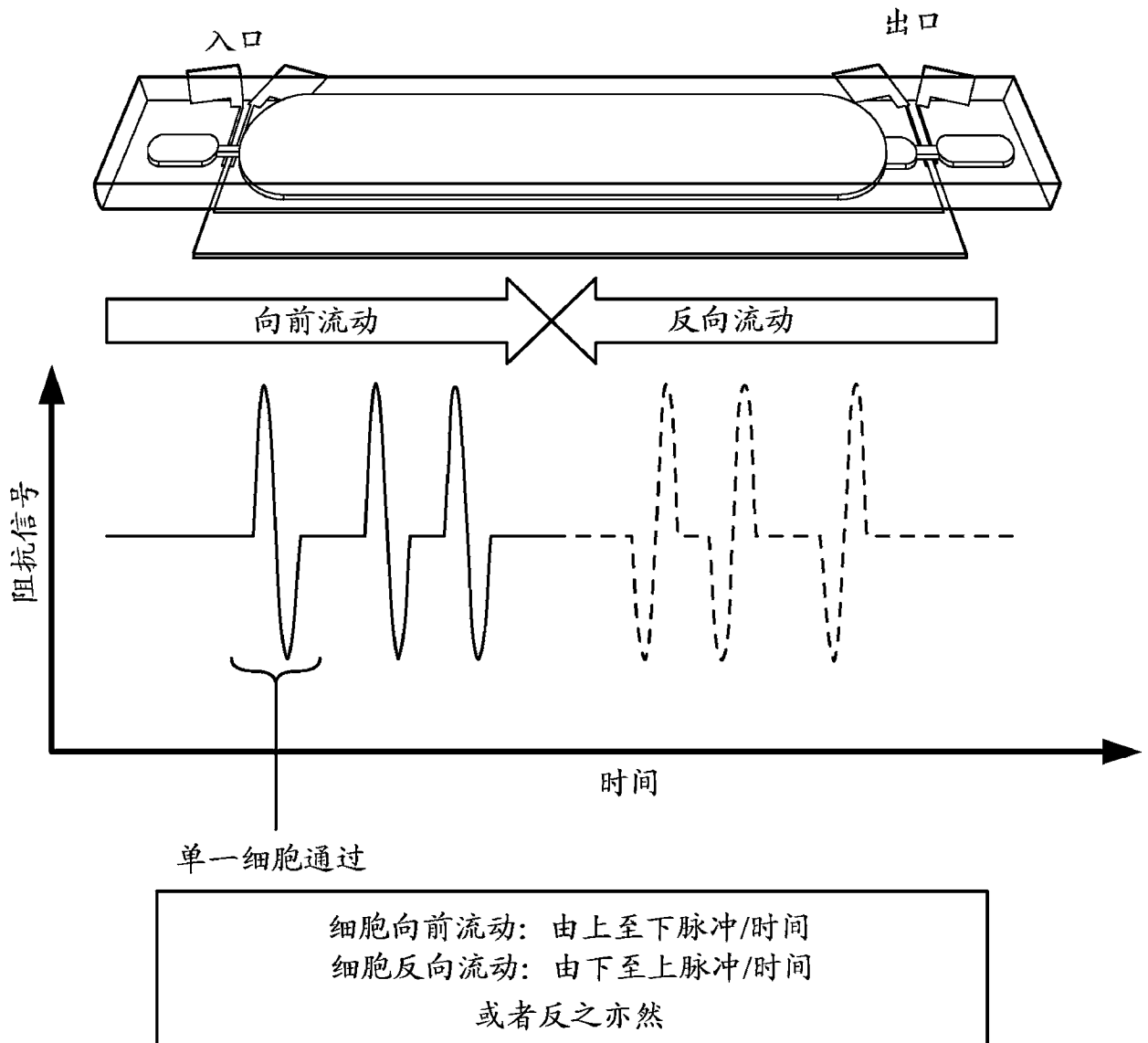


图 18

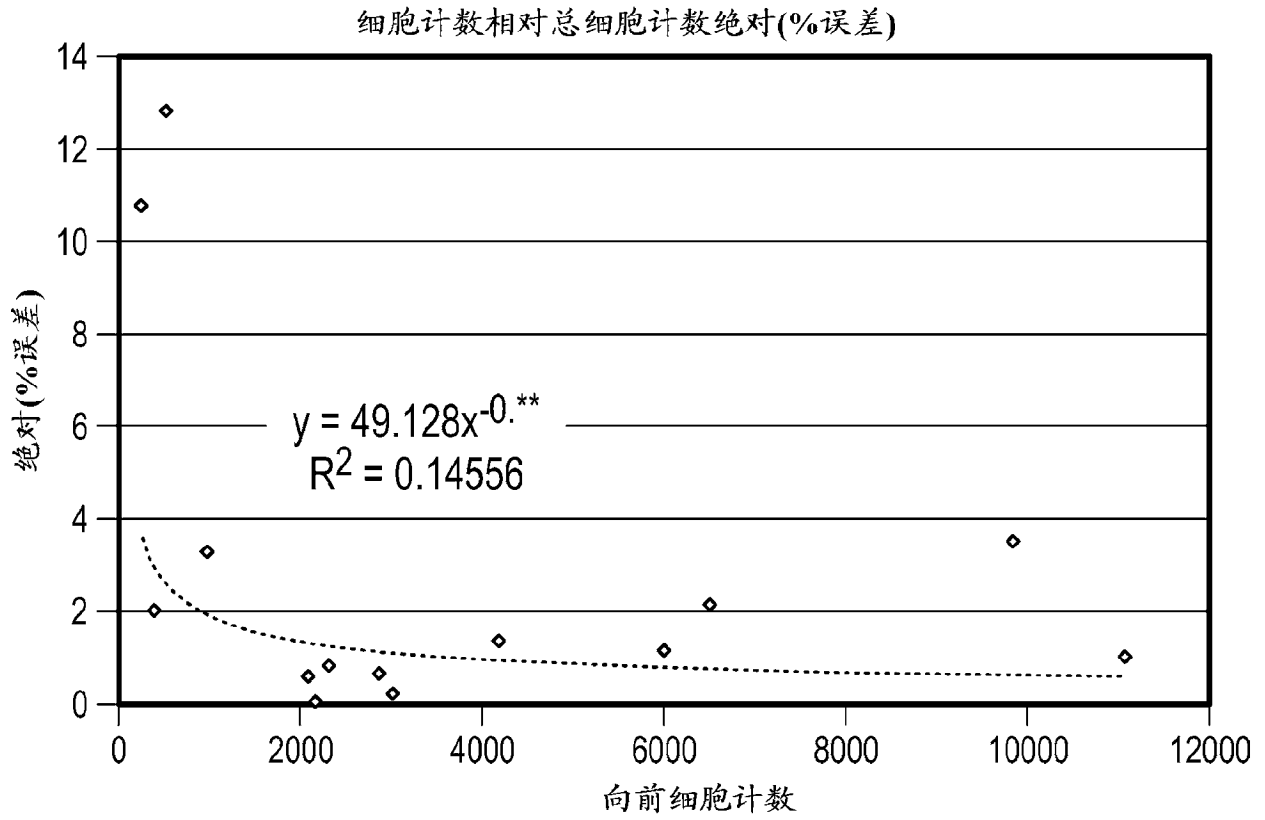


图 19 (A)

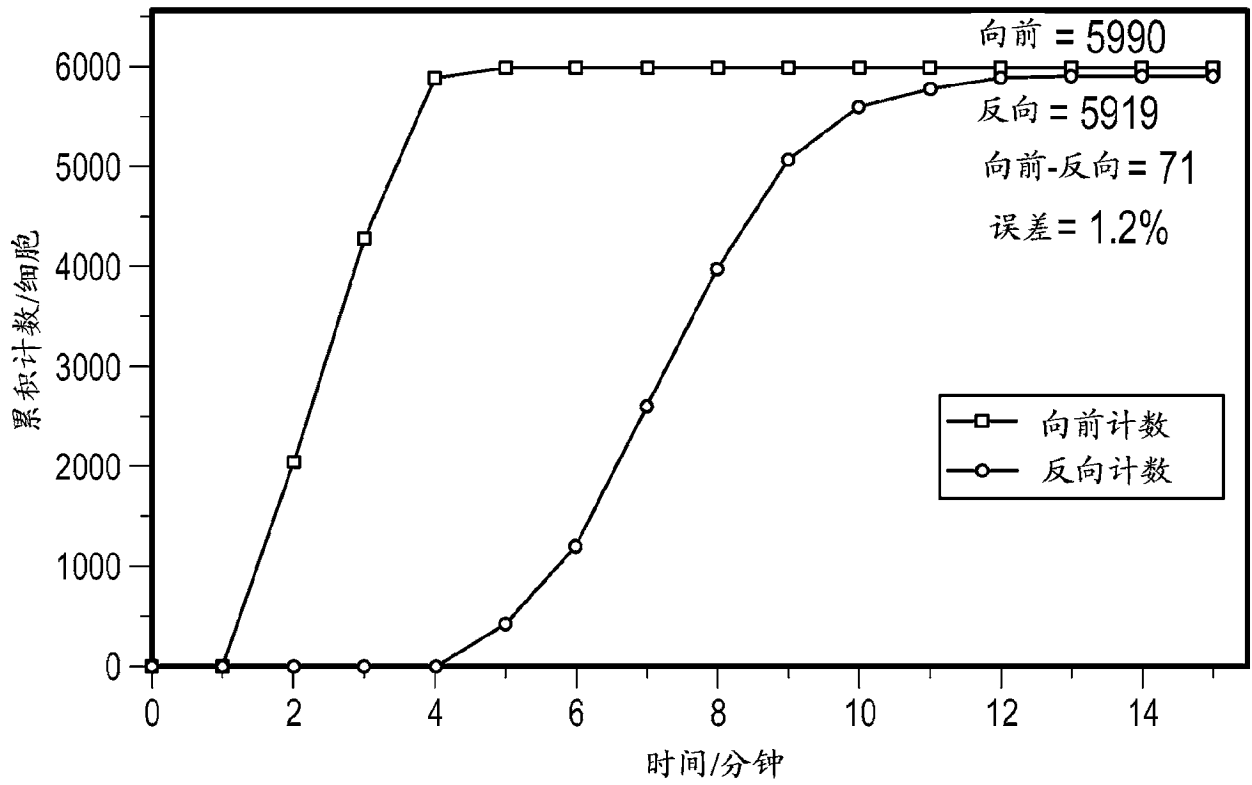


图 19 (B)

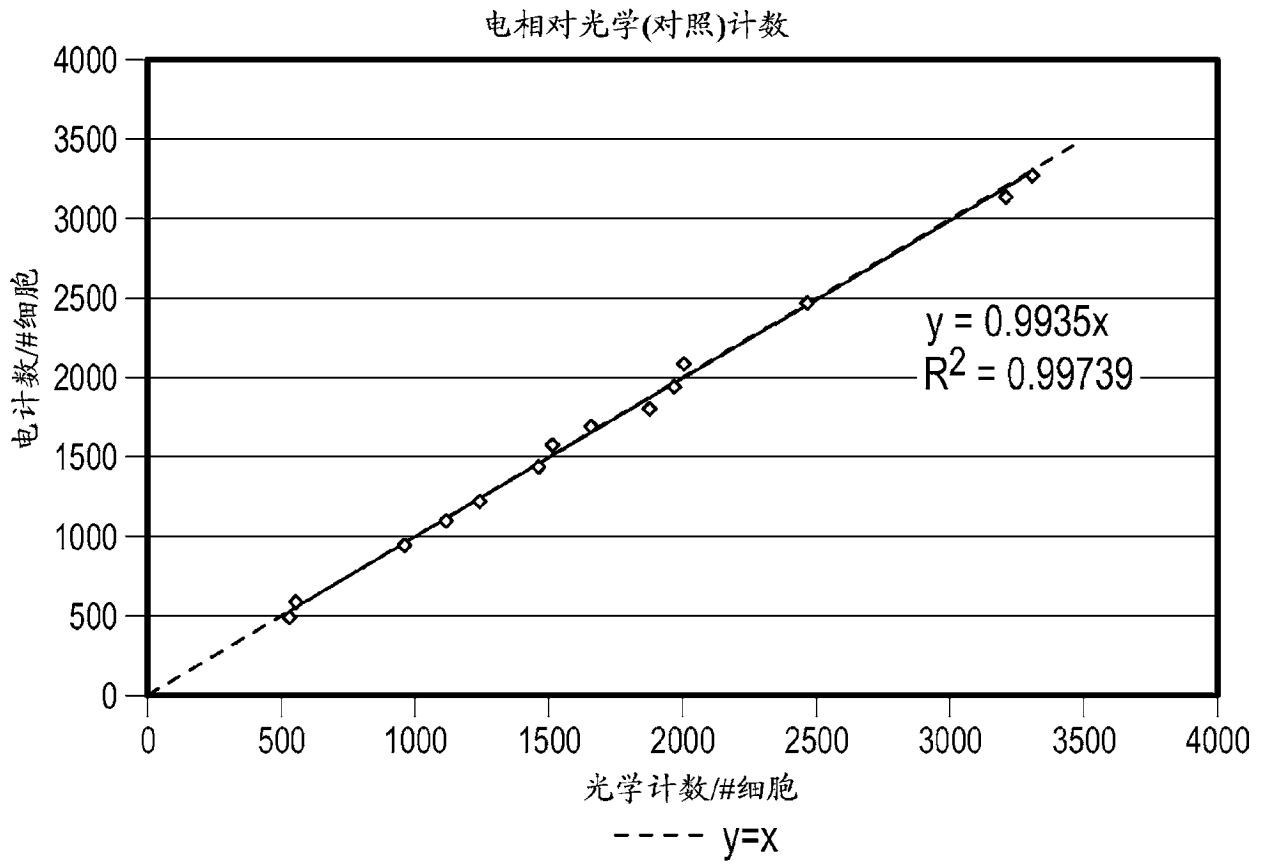


图 20 (A)

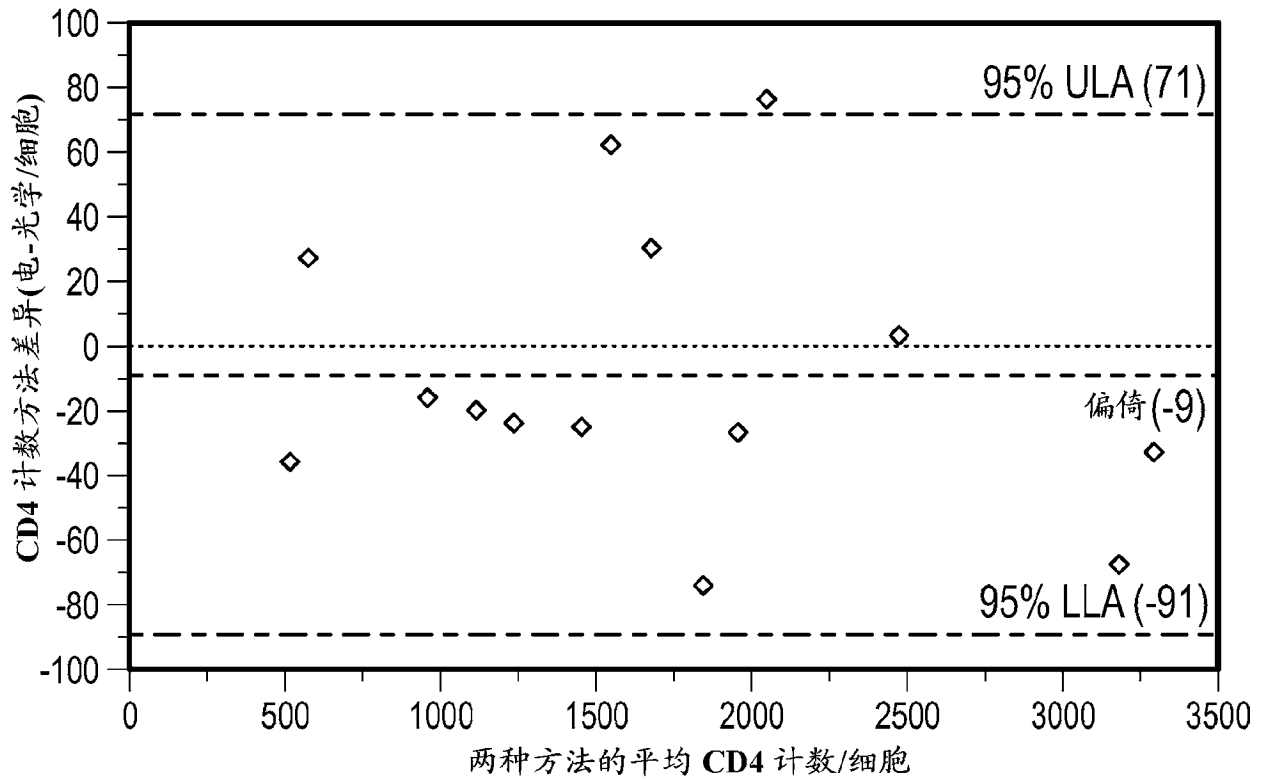


图 20 (B)

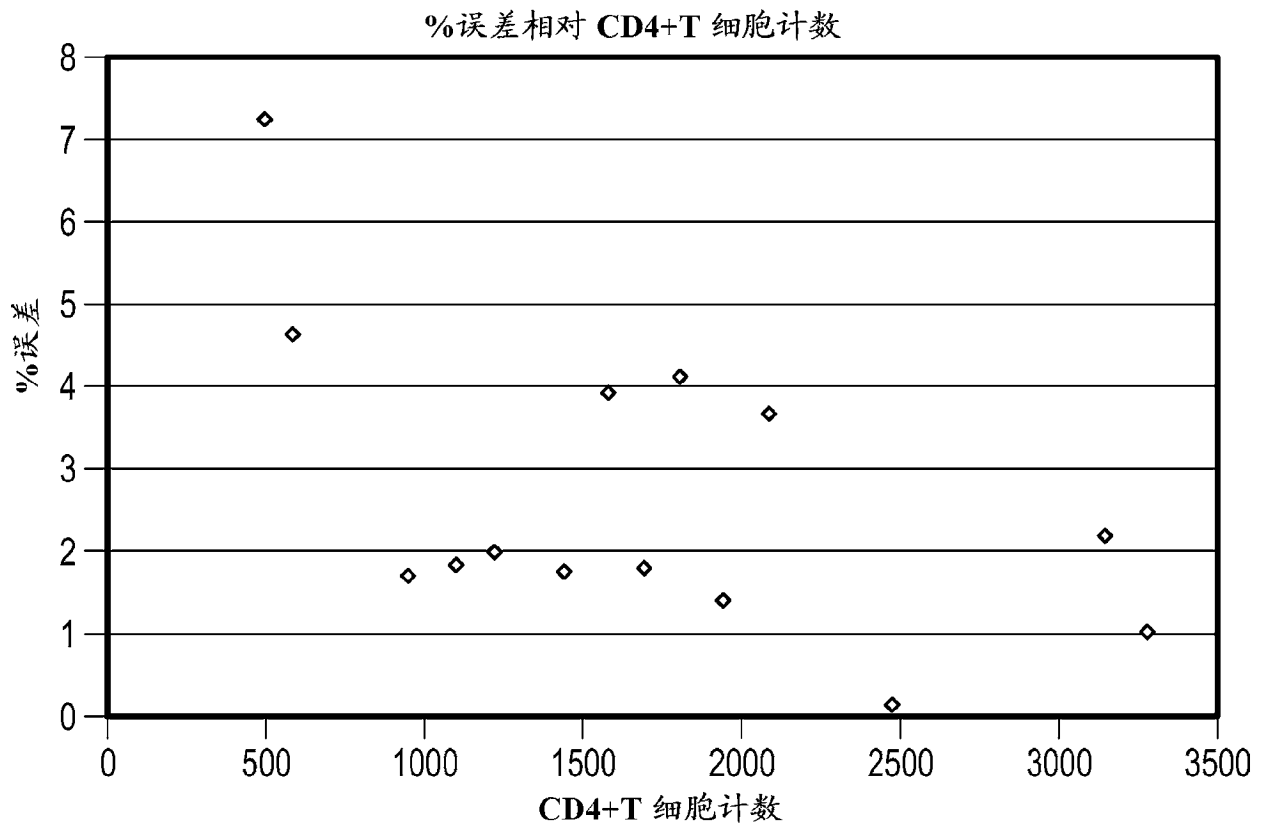


图 21

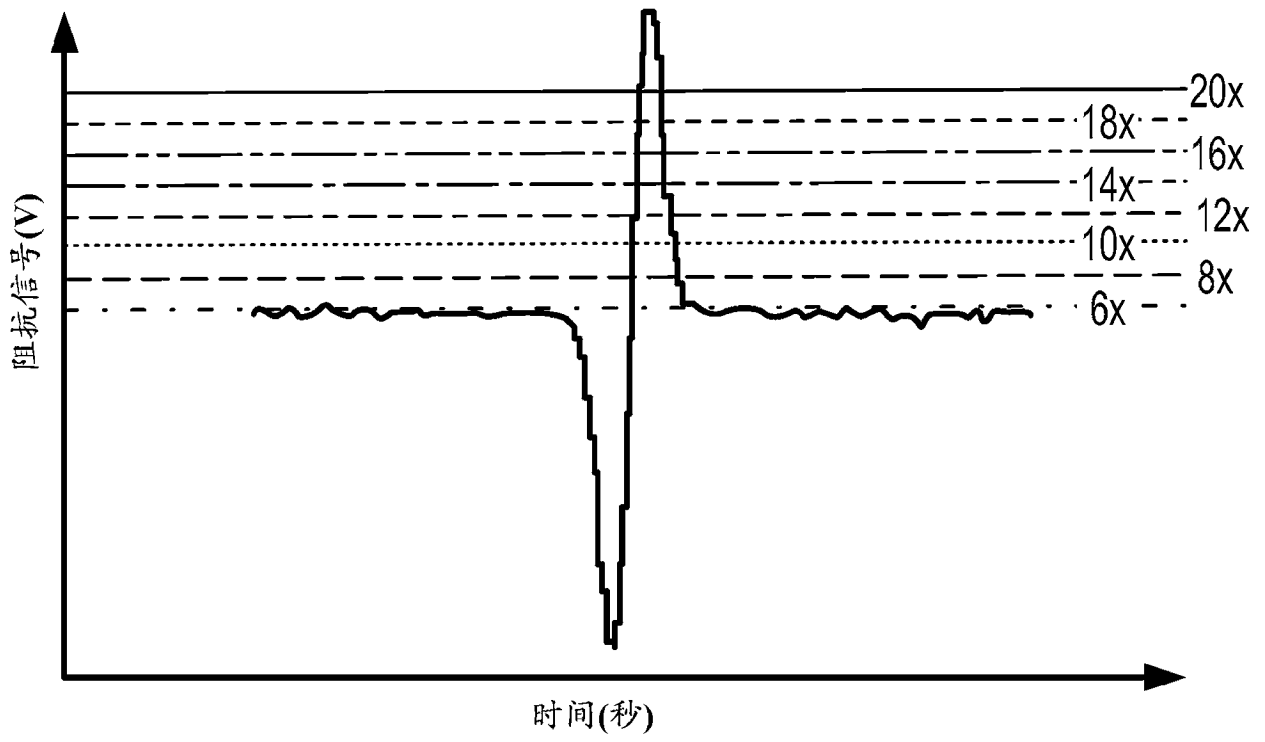


图 22

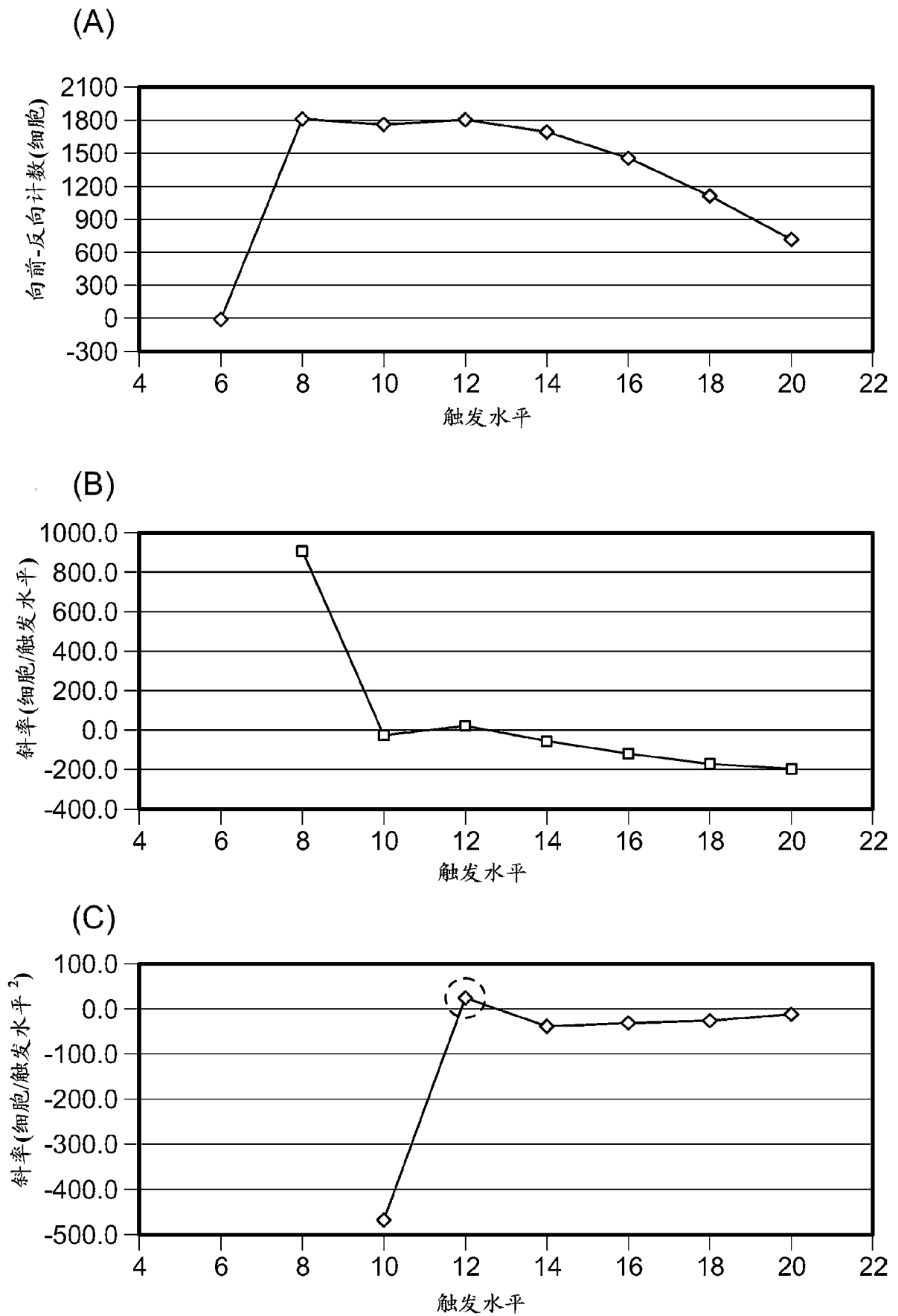


图 23

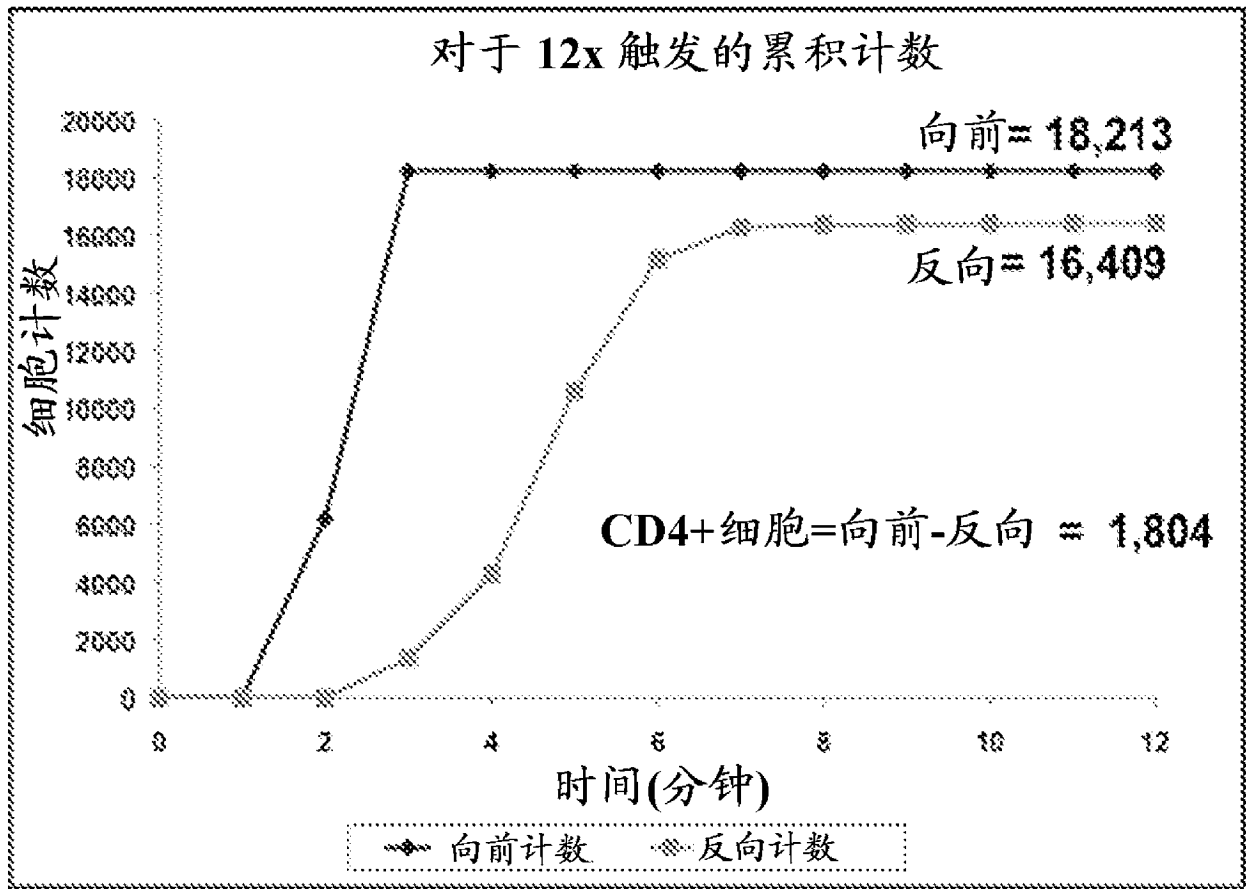


图 24

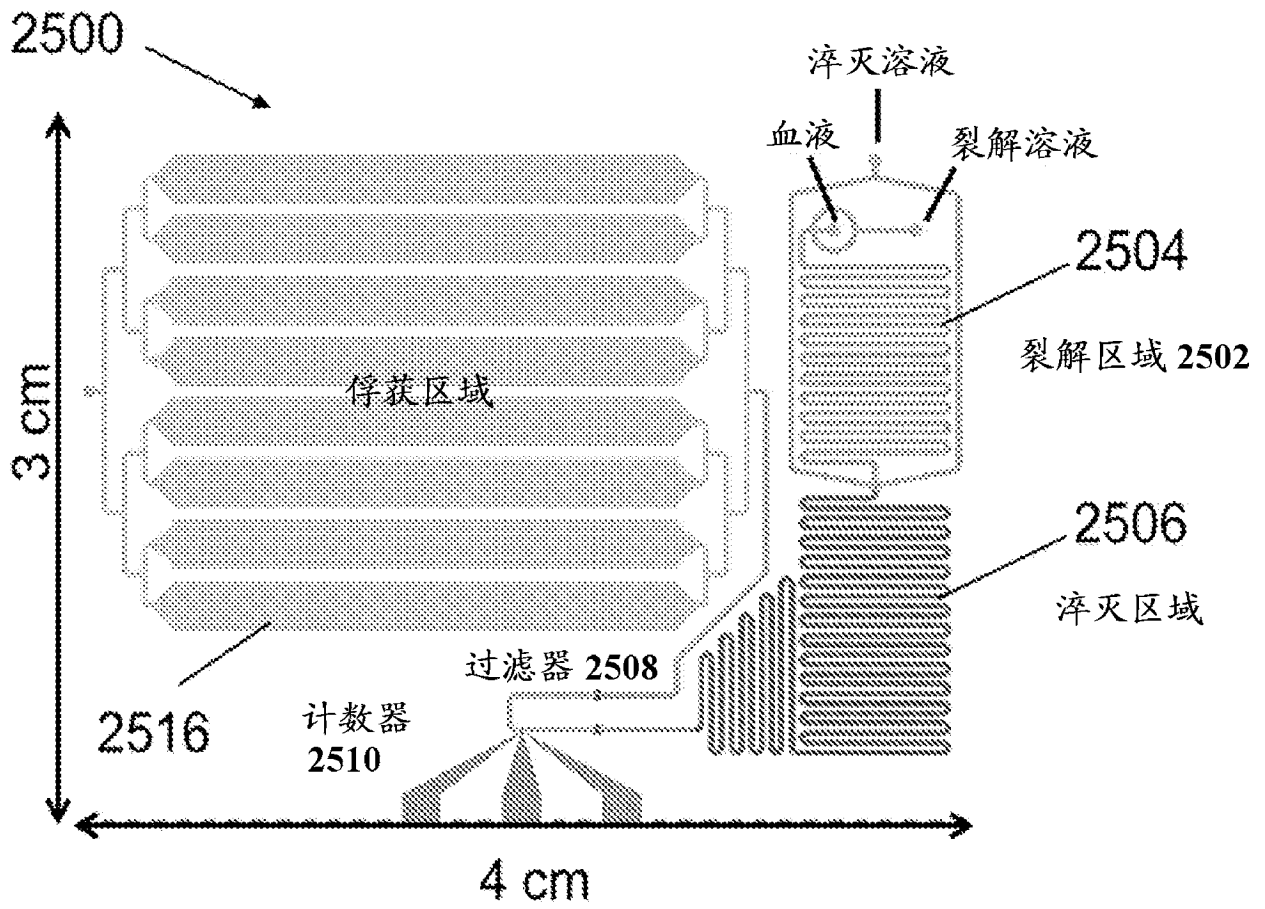


图 25

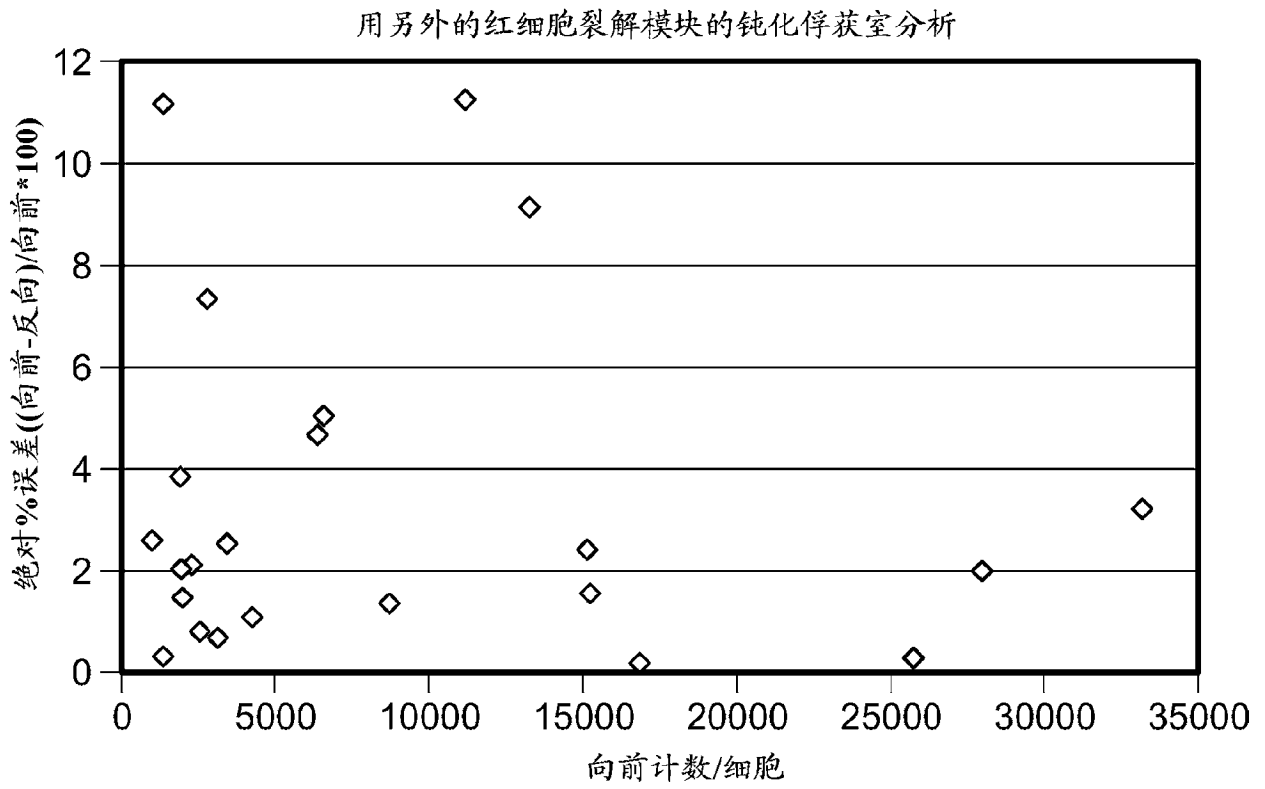


图 26

专利名称(译)	使用电差分计数器对颗粒计数		
公开(公告)号	CN103403547A	公开(公告)日	2013-11-20
申请号	CN201180064558.0	申请日	2011-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	通用医疗公司 麻省理工学院		
申请(专利权)人(译)	综合医院公司 麻省理工学院 伊利诺伊大学评议会		
当前申请(专利权)人(译)	综合医院公司 麻省理工学院 伊利诺伊大学评议会		
[标]发明人	N 沃特金斯 R 巴什尔 W 罗德里格斯 X 程 M 托纳 G 陈 A 奥彭海默		
发明人	N.沃特金斯 R.巴什尔 W.罗德里格斯 X.程 M.托纳 G.陈 A.奥彭海默		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/52 G01N21/17 C12M1/34		
CPC分类号	G01N33/56972 G01N15/12 G01N2015/1062 B01L2300/0877 B01L2200/0652 G01N2015/0069 C12M41/36 G01N27/02 G01N15/1245 G01N2015/1006 G01N2015/1486		
代理人(译)	孔青		
优先权	61/411893 2010-11-09 US		
其他公开文献	CN103403547B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本公开内容涉及对目的颗粒(例如细胞)计数的方法和装置。所述方法包括得到可含有目的颗粒的流体样品；使用第一电差分计数器对一部分样品中的所有类型的颗粒计数，以产生第一总计；从该部分流体样品中除去任何目的颗粒；在除去目的颗粒之后，使用第二电差分计数器对保留在该部分流体样品中的任何颗粒计数，以产生第二总计；和通过从第一总计减去第二总计，计算最初在流体样品中的目的颗粒的数量，其中所述差异为在样品中的目的颗粒的数量。这些方法和相关的装置可例如用于生产在全血样品中用于CD4+T细胞计数的稳健的、廉价的诊断试剂盒。

