



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116507917 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 28

(21) 申请号 202180073283.0

(22) 申请日 2021.09.02

(30) 优先权数据

102020000020890 2020.09.02 IT

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.04.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2021/058024 2021.09.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/049520 EN 2022.03.10

(71) 申请人 美纳里尼硅生物系统股份公司

地址 意大利马焦雷堡

(72) 发明人 詹尼·梅多罗 阿累克斯·卡兰卡

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

专利代理师 金成哲 张会娟

(51) Int.Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

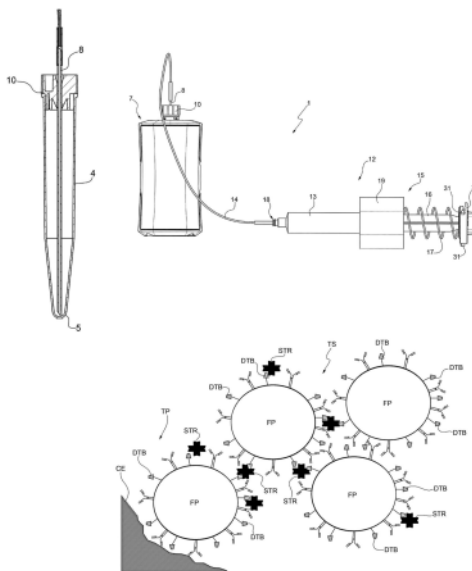
权利要求书3页 说明书13页 附图12页

(54) 发明名称

用于操纵样品的系统、套件、方法和过程

(57) 摘要

用于操纵包含与铁磁颗粒 (FP) 结合的颗粒 (CE) 的样品的系统和方法; 在其中设置有样品 (TS) 的容器 (3) 中产生磁场使得颗粒 (CE) 被吸引到容器 (3) 的侧壁 (4) 上; 样品 (TS) 的一部分通过插管 (8) 被抽吸, 而不抽出保持与侧壁 (4) 接触的颗粒 (CE), 所述插管在位置上被对准装置 (10) 保持成不与容器 (3) 的侧壁 (4) 接触。



1. 一种用于操纵经处理的样品 (TS) 的系统, 所述经处理的样品 (TS) 包含经处理的颗粒 (TP), 每个经处理的颗粒包含第一类型的颗粒 (CE) 和与所述第一类型的颗粒 (CE) 结合的至少一个铁磁颗粒 (FP);

所述系统 (1) 包括: 处理室 (2); 容器 (3), 所述容器被配置为容纳所述经处理的样品 (TS), 至少部分被放置在所述处理室 (2) 中, 并且具有至少一个侧壁 (4)、底部 (5) 和与所述底部 (5) 相对的开口 (6); 磁性装置 (7), 所述磁性装置被配置为在所述处理室 (2) 的至少一部分中产生至少一个磁场, 以便将所述经处理的颗粒 (TP) 的至少一部分移动到所述容器 (3) 的所述侧壁 (4) 上; 插管 (8), 所述插管具有被放置在所述容器 (3) 内部的开口端部 (9); 对准装置 (10), 所述对准装置以基本上固定的方式被放置在所述容器 (3) 的区域中并且具有通孔 (11), 所述插管 (8) 延伸穿过所述通孔 (11); 以及抽吸装置 (12), 所述抽吸装置被配置为在所述插管 (8) 内产生低压, 使得所述经处理的样品 (TS) 的一部分通过所述插管 (8) 被运送出所述容器 (3);

所述插管 (8) 和所述对准装置 (10) (特别地, 所述通孔) 被配置为使得所述开口端部 (9) 在所述容器 (3) 内被放置成与所述容器 (3) 的所述侧壁 (4) 间隔开。

2. 根据权利要求1所述的系统, 其中, 所述对准装置 (10) 被放置在所述容器 (3) 的所述开口 (6) 的区域中; 所述对准装置 (10) (特别地, 所述通孔) 和所述插管 (8) 被配置为使得所述插管 (8) 与所述侧壁 (4) 间隔开。

3. 根据权利要求1或2所述的系统, 其中, 所述对准装置 (10) 以可移除的方式被放置在所述容器 (3) 的区域中 (特别地, 在所述容器的所述开口 (6) 的区域中); 所述插管 (8) 以可移除的方式延伸穿过所述通孔 (11); 所述通孔 (11) 被配置为使得在使用中, 在所述插管 (8) 插入穿过所述通孔 (11) 时, 所述插管 (8) 的所述开口端部 (9) (特别地, 所述插管) 保持在距所述侧壁 (4) 一定距离处; 特别地, 所述插管 (8) 基本上是刚性的。

4. 根据前述任一项权利要求所述的系统, 其包括收集室 (13), 所述收集室以运送流体的方式与所述插管 (8) 连接并且被放置在所述处理室 (2) 的外部; 所述抽吸装置 (12) 被配置为在所述插管 (8) 内产生低压, 使得所述经处理的样品 (TS) 的所述部分通过所述插管 (8) 被运送到所述收集室 (13); 特别地, 所述系统 (1) 还包括导管 (14), 所述导管以运送流体的方式将所述插管 (8) 连接到所述收集室 (13)。

5. 根据前述任一项权利要求所述的系统, 其中, 所述抽吸装置 (12) 和所述插管 (8) (以及特别地, 所述导管) 被配置为获得至多为约30mL/min、特别地至多为约15mL/min的通过所述开口端部 (9) 的水流速; 特别地, 所述抽吸装置 (12) 和所述插管 (8) (以及特别地, 所述导管) 被配置为获得至少为约1mL/min、更特别地至少为约4mL/min的通过所述开口端部 (9) 的水流速。

6. 根据前述任一项权利要求所述的系统, 其中, 所述抽吸装置 (12) (以及特别地, 所述收集室 (13)); 更特别地, 所述插管 (8); 并且更特别地, 所述导管) 被配置为通过所述开口端部 (9) 抽吸至多约50mL (特别地, 至多约30mL) 的液体; 特别地, 所述处理室 (2) 和所述容器 (3) 各自具有至多约55mL (特别地, 至多约13mL) 的内部体积。

7. 根据前述任一项权利要求所述的系统, 其中, 所述通孔 (11) 具有内表面, 所述内表面沿着所述插管 (8) 的纵向延伸部的至少约0.5cm围绕所述插管 (8) 延伸。

8. 根据前述任一项权利要求所述的系统, 其中, 所述插管 (8) 基本上是直的; 所述通孔

(11)基本上是直的。

9.一种用于操纵经处理的样品(TS)的套件;所述套件被配置为获得根据前述任一项权利要求所述的系统(1);所述套件包括:

磁性装置(7),所述磁性装置具有处理室(2)并且被配置为在所述处理室(2)中产生磁场;

容器(3),所述容器被配置为容纳所述经处理的样品(TS),并且被容纳在所述处理室(2)内,并且具有至少一个侧壁(4)、底部(5)和与所述底部(5)相对的开口(6);

插管(8),所述插管具有开口端部(9);

对准装置(10),所述对准装置被配置为以基本上固定的方式安装在所述容器(3)的区域中,并且具有通孔(11),所述通孔被配置为由所述插管(8)接合并且将所述插管(8)以基本上固定的取向保持在基本上固定的位置并且使得所述插管(8)与所述容器(3)的所述侧壁(4)间隔开;以及

抽吸装置(12),该抽吸装置被配置为在所述插管(8)内产生低压,使得所述经处理的样品(TS)的一部分通过所述插管(8)被运送出所述容器(3)。

10.根据权利要求9所述的套件,其包括导管(14),所述导管被配置为以运送流体的方式连接所述插管(8)和所述抽吸装置(12);所述对准装置(10)被配置为被放置在所述容器(3)的所述开口(6)的区域中;特别地,所述导管(14)具有第一端部和第二端部,所述第一端部被配置为与所述插管(8)联接,所述第二端部被配置为与所述抽吸装置(12)联接;特别地,所述导管(14)是柔韧的。

11.根据权利要求9或10所述的套件,其中,所述插管(8)的内径至多为约12mm,特别地至多为约1cm;特别地,所述插管(8)的内径至少为约0.3mm,更特别地至少为约0.5mm。

12.根据权利要求9至11中任一项所述的套件,其包括铁磁颗粒(FP),所述铁磁颗粒具有至少一个抗体,所述抗体被配置为与第一类型的颗粒(CE)结合;

所述套件还包括从以下组成的组中选择的至少一种标记物:用于肿瘤细胞(特别地,CTC)的标记物、用于白细胞(WBC)的标记物、用于细胞的细胞核的标记物及它们的组合;特别地,所述标记物从以下组成的组中选择:细胞角蛋白、CD45(PTPRC—蛋白酪氨酸磷酸酶、受体类型C)、DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)及它们的组合。

13.一种操纵经处理的样品(TS)的方法;所述方法包括:

预备步骤,在所述预备步骤期间,包含经处理的颗粒(TP)的经处理的样品(TS)在容器(3)中,每个经处理的颗粒包含第一类型的颗粒(CE)和与所述第一类型的颗粒(CE)结合的至少一个铁磁颗粒(FP),所述容器(3)具有至少一个侧壁(4)、底部(5)和与所述底部(5)相对的开口(6);

插入步骤,在所述插入步骤期间,将所述容器(3)插入磁性装置(7)的处理室(2)中;

在所述预备步骤之后的联接步骤,在所述联接步骤期间,具有通孔(11)的对准装置(10)以稳定的方式与所述容器(3)联接;

在所述联接步骤之后的定位步骤,在所述定位步骤期间,使具有开口端部(9)的插管(8)穿过所述通孔(11)而不接触所述侧壁(4),直到所述插管(8)到达给定位置,在所述给定位置,所述开口端部(9)在所述容器(3)内被放置成与所述容器(3)的所述侧壁(4)分开;

在所述插入步骤之后的驱动步骤,在所述驱动步骤期间,所述磁性装置(7)产生磁场,

所述磁场使所述经处理的颗粒(TP)的至少一部分与所述侧壁(4)接触;以及

在所述定位步骤之后并且在所述驱动步骤之后的抽吸步骤,在所述抽吸步骤期间,抽吸装置(12)在所述插管(8)内产生低压,使得所述经处理的样品(TS)的一部分通过所述插管(8)被运送出所述容器(3),从而使所述经处理的颗粒(PT)的所述至少一部分中的至少一部分留在所述容器内。

14. 根据权利要求13所述的方法,其通过根据权利要求9至12中任一项所述的套件实施;特别地,所述经处理的样品(TS)包含第二类型的颗粒,在所述抽吸步骤期间,至少大部分所述第二类型的颗粒通过所述插管(8)被运送出所述容器(3);特别地,所述第一类型的颗粒(CE)是循环肿瘤细胞。

15. 根据权利要求13或14所述的方法,其中,所述第一类型的颗粒(CE)从以下组成的组中选择:CTC、CEC(循环内皮细胞)、CMC(循环黑色素瘤细胞)、CMMC(循环多发性骨髓瘤细胞)、tdEV(肿瘤衍生的外囊泡)、外泌体、胎儿细胞、干细胞、其它稀有细胞、病毒、细菌、FFPE(福尔马林固定石蜡包埋组织)、精子、血细胞、上皮细胞、DNA、RNA、微球。

16. 根据权利要求13至15中任一项所述的方法,其中,所述经处理的样品(TS)包含与所述第一类型的颗粒(CE)不同的另一类型的颗粒;所述方法包括标记步骤,在所述标记步骤期间,标记物以选择性的方式(特别地,相对于所述另一类型的颗粒)与所述第一类型的颗粒(CE)结合或以选择性的方式(特别地,相对于所述第一类型的颗粒(CE))与所述另一类型的颗粒结合;例如,所述标记物包括具有一种或多种给定波长的荧光分子。

17. 一种操纵包含第一类型的颗粒(CE)的初始样品的过程;所述过程包括:处理步骤,在所述处理步骤期间,将能够选择性地与所述第一类型的颗粒(CE)结合的铁磁颗粒(FP)与所述第一类型的颗粒(CE)混合,以便获得包含经处理的颗粒(TP)的经处理的样品(TS),每个经处理的颗粒包含第一类型的颗粒(CE)和与所述第一类型的颗粒(CE)结合的至少一个铁磁颗粒(FP);以及根据权利要求13至16中任一项所述的方法。

18. 根据权利要求17的过程,其中,所述初始样品包含从以下组成的组中选择的生物液体:血液、血浆、唾液、尿液、液体活检组织、含有悬浮的细胞的拭子、含有悬浮的细胞的培养基及它们的组合;特别地,所述过程还包括在所述处理步骤之前的移除步骤,在所述移除步骤期间,至少大部分所述初始样品被移除并与所述第一类型的颗粒(CE)分离。

用于操纵样品的系统、套件、方法和过程

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2020年9月2日提交的意大利专利申请第102020000020890号的优先权,其全部公开内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于操纵样品的系统、套件、方法和过程。

背景技术

[0004] 在操纵含有颗粒(特别地,细胞)的样品的领域中,感到需要获得富集一种或多种类型的颗粒的样品。

[0005] 在该上下文中,目前使用的方法之一需要在装有生物材料(例如,血液或至少一部分血浆已经被移除的血液)的样品的试管中手动加入含有铁磁颗粒的特定试剂,所述铁磁颗粒利用对于样品的具体颗粒是特异性的配体进行官能化,使得所述颗粒被选择性地标记。

[0006] 随后,施加磁场,使得被标记的颗粒集中在试管的壁上。此时,操作者将移液管插入到试管中,并手动吸出样品的不靠近壁的部分。这样,获得了富集被标记的颗粒的样品(在试管内), (随后)可以使用合适的试剂将其与铁磁颗粒分离。

[0007] 这种方法的特别感兴趣的例子在专利U6620627中以及文章“用于富集血液中的乳腺肿瘤细胞的铁磁流体(ferrofluid)和方案的优化”(Paul A.Liberti,Chandra G.Rao、Leon W.M.M.Terstappen,《磁学与磁性材料杂志》,225(2001),301-307)中有描述。

[0008] 然而,应当注意,上述方法是复杂的、长的、费力的和不精确的。事实上,所需的活动是耗时的:必须小心不要用移液管接触试管的壁,不要太多地摇动试管,并且不要太快地抽吸样品。

[0009] 这些方面中的一个或多个方面的误差增加了还吸出被标记的颗粒的一部分(或全部)的风险。

[0010] 此外,甚至受过最高训练的操作者也不能保证移液管(以及特别地,其尖端)保持在距壁足够的距离处并且应用正确的抽吸速度。

[0011] 为了弥补这些缺点,已经提出了使用完全自动化的系统,这些系统以更快和更加可重复的方式再现操作者的活动。

[0012] 然而,这些系统非常复杂和昂贵。

[0013] 本发明的目的是提供用于操纵样品的系统、套件、方法和过程,它们至少部分地克服了现有技术的缺点,同时生产容易和成本低廉。

发明内容

[0014] 根据本发明,提供了在所附独立权利要求中并且优选地在直接或间接地从属于独立权利要求的任一项权利要求中所述的用于操纵样品的系统、套件、方法和过程。

[0015] 根据一些非限制性实施方式,第一类型的颗粒(在权利要求中提及)从由以下组成的组中选择:CTC、CEC(循环内皮细胞)、CMC(循环黑色素瘤细胞)、CMMC(循环多发性骨髓瘤细胞)、tdEV(tumor derived Extra Vescicle,肿瘤衍生的外囊泡)、外泌体(exosome)、胎儿细胞、干细胞、其它稀有细胞、病毒、细菌、FFPE(Formalin-Fixed Paraffin-Embedded,福尔马林固定石蜡包埋组织)、精子、血细胞、上皮细胞、DNA、RNA、微球。

[0016] 特别地,第一类型的颗粒(在权利要求中提及)是细胞。

[0017] 在一些非限制性情况下,第一类型的颗粒从以下组成的组中选择:CTC、CEC(循环内皮细胞)、CMC(循环黑色素瘤细胞)、CMMC(循环多发性骨髓瘤细胞)、tdEV(肿瘤衍生的外囊泡)、外泌体、胎儿细胞、干细胞、其它稀有细胞、病毒、细菌、FFPE(福尔马林固定石蜡包埋组织)、精子、血细胞、上皮细胞、DNA和RNA。

[0018] 例如,第一类型的颗粒(在权利要求中提及)从以下组成的组中选择:肿瘤细胞、白细胞(WBC)、基质细胞、精子、循环肿瘤细胞(CTC)、孢子、胎儿细胞、脂质体、外泌体、上皮细胞、成红血细胞、营养细胞、病毒、细菌、红细胞(及它们的组合)。在一些特定的非限制性情况下,第一类型的颗粒是循环肿瘤细胞(CTC)。

[0019] 细胞可以是活的或是固定的。

[0020] 除非明确相反地指出,否则在本文本中,以下术语具有下文指示的含义。

[0021] 铁磁颗粒是指最大尺寸小于大约 $10\mu\text{m}$ (有利地,小于大约 $1\mu\text{m}$ —特别地,大约 100nm)的微粒。根据一些优选但非限制性实施方式,铁磁颗粒的最大尺寸为至少大约 40nm (特别地,至多大约 200nm)。

[0022] 颗粒的尺寸可以用刻度尺显微镜或与具有刻度尺的载玻片(其上沉积有颗粒)一起使用的普通显微镜在标准模式下测量。

[0023] 在本文本中,颗粒的尺寸是指颗粒的长度、宽度和厚度。

附图说明

[0024] 下面参照附图描述本发明,附图示出了本发明的非限制性实施方式的示例,其中:

[0025] 图1是根据本发明的系统的示意性侧视图;

[0026] 图2是图1的系统的立体图,为了清楚起见,一些部分被移除;

[0027] 图3是图1的系统的细节的前视图;

[0028] 图4是图3的细节的沿着线IV-IV的截面;

[0029] 图5是图3的细节的前视图,为了清楚起见,一些部分被移除;

[0030] 图6是沿着图5的细节的线VI-VI的截面;

[0031] 图7是图3的细节的前视图,为了清楚起见,一些部分被移除;

[0032] 图8是图7的细节的沿着线VIII-VIII的截面;

[0033] 图9是图3和图7的一部分的放大比例的平面图;

[0034] 图10是图9的部分的沿着线X-X的截面;

[0035] 图11示意性示出了前述附图的系统的可能使用的示例;

[0036] 图12至14示意性示出了被执行以验证前述附图的系统的操作的测试;以及

[0037] 图15示意性示出了在根据本发明的方法的步骤期间发生的情况。

具体实施方式

[0038] 在图1中,根据本发明的第一方面,附图标记1表示用于操纵包含经处理的颗粒TP的经处理的样品TS(特别地,生物来源的—参见图15)的系统的整体,每个经处理的颗粒TP包含第一类型的颗粒CE和与所述第一类型的颗粒CE结合的至少一个铁磁颗粒FP。

[0039] 系统1包括:处理室2(特别地参见图4和图6);容器3(特别地,试管),该容器被配置为(被设计为)容纳经处理的样品TS,并且(至少部分)被设置在处理室2中并且具有至少一个侧壁4(还参见图7和图8)、底部5(特别地,底壁5)和与底部5相对的(端部)开口6;以及磁性装置7,该磁性装置被配置为(被设计为)在处理室2的至少一部分中产生至少一个磁场,以便将经处理的颗粒TP的至少一部分移动到容器3的侧壁4上(特别地,以便与容器3的侧壁4接触并保持与容器3的侧壁4接触)。

[0040] 更确切地但非必须地,处理室2是磁性装置7的一部分,根据一些非限制性实施方式,磁性装置7包括磁四极子。

[0041] 根据一些非限制性实施方式,磁性装置7包括至少一个电磁体(特别地,四个电磁体)。

[0042] 替代地(或附加地),磁性装置7包括至少一个永磁体(特别地,四个永磁体)。

[0043] 有利地但非必须地,磁性装置7(特别地,每个电磁体和/或永磁体)被配置为(在其表面上一特别地在轴向对称点处)生成至少3000高斯的磁场(特别地,至少4000高斯;特别地,至多7000高斯;更特别地,磁场可以通过霍尔效应磁力计—例如通过Hirst Magnetic Instruments有限公司(Tesla House, Tregonigge, Falmouth, Cornwall)的仪器GM07来测量)。

[0044] 根据一些非限制性实施方式,容器3(特别地参见图6至图8)具有第一端部和第二端部,开口6设置在第一端部,第二端部与第一端部相对并且底部5设置在第二端部。特别地,侧壁4朝向第二端部(特别地,朝向底部5)渐缩。

[0045] 在一些非限制性情况下,在底部5与侧壁4之间没有中断。

[0046] 根据一些非限制性实施方式,容器3具有基本上圆形的(内)横截面(特别地,侧壁4围绕容器3的纵向延伸轴线A圆形地延伸)。

[0047] 系统1还包括:插管8,该插管具有设置在容器3内部的开口端部9;对准装置10,该对准装置以基本上固定的方式设置在容器3的区域中并且具有通孔11(特别地参见图9),插管8延伸穿过该通孔;以及抽吸装置12(图1和图2),该抽吸装置被配置为(被设计为)在插管8内产生低压,使得经处理的样品TS的一部分通过插管8被运出容器3(并且运出处理室2)。

[0048] 特别地,插管8延伸穿过容器3的开口6。

[0049] 插管8和对准装置10(特别地,通孔11)被配置为使得(插管8—至少部分地—延伸到容器3内部并且)开口端部9在容器3内设置成与容器3的侧壁4分离(间隔开)。

[0050] 应当注意,以这种方式,已经通过实验观察到,经处理的颗粒TP通过插管8被抽吸的可能性降低。更确切地说,已经观察到,由于对准装置10和插管8的结构,获得了该结果。在这些情况下,不需要复杂的机器人装置,并且操作者可以良好的速度将插管8通过对准装置10(特别地,通过通孔11)插入处理室2内(更确切地说,容器3内),从而插管与侧壁4接触并因此引起经处理的颗粒TP的移动(该经处理的颗粒TP随后可能通过插管8被抽吸)的风险

降低。

[0051] 换句话说,对准装置10(特别地,通孔11)出人意料地用作将插管8插入到处理室2中的引导件,使操作者的活动更快且更精确。

[0052] 根据一些非限制性实施方式,插管8和对准装置10(特别地,通孔11)被配置为使得插管8基本上平行于容器3的纵向延伸轴线A(特别是轴线A)延伸。

[0053] 有利地但非必须地,开口端部9与底部5接触。这样,通过底部5的支撑保证了插管8的竖直位置。

[0054] 特别地(例如参见图2、图4和图8),开口端部9相对于插管8的纵向延伸部斜着延伸(更特别地,端部9相对于轴线A斜着延伸)。

[0055] 这样,在端部9与底部5接触时,流体也可以穿过端部9。

[0056] 有利地但非必须地,插管8以可移除的方式延伸穿过通孔11。换句话说,可以通过使插管8穿过通孔11而将插管8插入对准装置10(更确切地说,容器3)中或从对准装置10(更确切地说,容器3)移除。

[0057] 特别地,通孔11被配置为使得在使用中,当插管8插入穿过通孔11时,插管8的开口端部9(特别地—全部—插管8)保持与侧壁4间隔开。

[0058] 有利地但非必须地,通孔9具有内表面,该内表面围绕插管8(特别是与插管8的外表面接触)延伸,特别是延伸达插管8的纵向延伸部的至少大约0.5cm(更特别地,平行于轴线A)。

[0059] 附加地或替代地,通孔的内表面围绕插管8延伸达插管8的宽度(更确切地说,直径)的至少2.5倍。

[0060] 根据非限制性实施方式,通孔11的宽度(内径)比插管8的宽度(外径)大以下量:小于大约1mm(特别地,小大约0.5mm;更特别地,小大约0.3mm;甚至更特别地,至少大约0.1mm)。

[0061] 在一些非限制性情况下,通孔11具有基本上圆形的(特别地,基本上恒定的)横截面。

[0062] 特别地,由于通孔11的内表面和插管8的外表面之间的接触,插管8的位置基本上得到保持。特别地,如上所述,由于与底部5的接触,插管8的位置基本上在竖向上得到保持。

[0063] 有利地但非必须地,插管8基本上是刚性的(换句话说,其在使用期间不显著变形—参见下文描述的方法一和/或当其插入穿过通孔11时)。

[0064] 根据一些优选的非限制性实施方式,插管8基本上是直的。附加地或替代地,通孔11基本上是直的。

[0065] 特别地,插管8和通孔11在容器3的纵向延伸方向上延伸(特别地,平行于轴线A—更特别地,沿着轴线A)。

[0066] 有利地但非必须地,对准装置10设置在容器3的开口6处。这样,对准装置10(特别地,其通孔11)可以更容易地被插管8接近(并且因此便于操作者将插管8插入到容器3中)。

[0067] 特别地,对准装置10部分地封闭(以便不允许空气通过)开口6。

[0068] 有利地但非必须地,对准装置10以可移除的方式设置在容器3处(特别地,在开口6处)。这样,可以更容易地将经处理的样品TS(或待处理的样品)加入容器3中和从容器3中取出。

[0069] 根据一些非限制性实施方式,对准装置10(特别地,通孔11)和插管8被配置为使得插管8与侧壁4分开(间隔开)。

[0070] 有利地但非必须地,系统1(特别地,抽吸装置12)还包括收集室13(特别是参见图1和图2),该收集室以运送流体的方式与插管8连接并且被设置在处理室2(和容器3)的外部。抽吸装置12被配置为(被设计为)在插管8内产生低压,使得经处理的样品TS的上述部分通过插管8被运送到收集室13。

[0071] 根据一些非限制性实施方式,(生物来源的)经处理的样品TS包括(特别地,是)任何生物液体。

[0072] 有利地但非必须地,经处理的样品TS包括(特别地,是)血液、血浆、唾液、尿液、液体活检组织(liquid biopsy)、含有悬浮的(再悬浮的)细胞(特别地,组织的细胞)的拭子和/或含有悬浮的(再悬浮的)细胞(特别地,组织的细胞)的培养基。

[0073] 根据一些非限制性实施方式,经处理的样品TS包括(特别地,是)血液、血浆、唾液、尿液及它们的组合。

[0074] 在一些具体的非限制性情况下,经处理的样品TS包括(特别地,是)血液和/或血浆(特别地,血液)。

[0075] 根据一些非限制性实施方式,系统1(特别地,抽吸装置12)还包括导管14,该导管以运送流体的方式将插管8连接到收集室13。

[0076] 有利地但非必须地,抽吸装置12和插管8(以及在必要时,导管)被配置为获得(当开口端部9浸没在水中时)至多为(更确切地说,小于)大约30mL/min、特别地至多为(更确切地说,小于)大约15mL/min、更特别地至多为(更确切地说,小于)大约13mL/min的通过开口端部9(通过插管8)的水流速。

[0077] 这样,进一步降低了从容器3抽出经处理的颗粒TP的风险。

[0078] 根据一些非限制性实施方式,抽吸装置12和插管8(以及特别地,所述导管14)被配置为获得(当开口端部浸入水中时)至少为大约1mL/min、更特别地至少为大约3mL/min、甚至更特别地至少为大约4mL/min的通过开口端部9(通过插管8)的水流速。

[0079] 流速被计算为在环境温度(和1atm的外部压力)下抽吸10mL水时发生的平均流速。

[0080] 有利地但非必须地,抽吸装置12(并且特别地,插管8;并且更特别地,导管14)被配置为(被设计为)通过开口端部9(通过插管8)抽吸至多大约50mL(特别地,至多大约30mL;更特别地,至多大约15mL)液体。

[0081] 附加地或替代地,抽吸装置12(并且特别地,收集室13)被配置为(被设计为)通过开口端部9(通过插管8)抽吸至少大约20 μ L(特别地,至少大约1mL;更特别地,至少大约3mL)液体。

[0082] 根据一些非限制性实施方式,抽吸装置12包括(特别地,是)从以下组成的组中选择的装置:蠕动泵、真空泵、注射泵、由预加载弹簧驱动的注射器或由重力操作的注射器。

[0083] 在一些情况(与图1和图2所示的情况类似)下,抽吸装置12包括(特别地,是)由预加载弹簧驱动的注射器。

[0084] 特别地(在这些情况下一如图2更好地所示),抽吸装置12包括注射器15和弹簧17,注射器15又具有收集室13和活塞16(在收集室13内滑动),弹簧17被配置为(被设计为)向活塞16赋予运动,并且因此在收集室13内产生低压。所述低压被转移到插管8(特别地,通过导

管14),以便从容器3抽吸经处理的样品TS的上述部分。

[0085] 根据一些特定但非限制性实施方式,弹簧17(是圆形的并且)具有大约28-34mm(特别地,大约31mm)的内径、大约31-37mm(特别地,大约34mm)的外径、直径大约为1.2-1.7mm(特别地,大约1.5mm)和长度大约为100-115mm(特别地,大约为107mm)的线材。

[0086] 特别地,弹簧17由不锈钢制成。

[0087] 在一些情况下,弹簧17的弹性常数为大约220N/m至大约250N/m(特别地,为大约234N/m)。

[0088] 特别地,弹簧17被配置为(被设计为)向活塞16赋予远离收集室13的第一端部18的运动。

[0089] 特别地,导管14从第一端部18延伸。

[0090] 有利地但非必须地,抽吸装置12还包括邻接元件19,该邻接元件与收集室13的凸缘安装成一体,该凸缘设置在收集室13的与第一端部18相对的第二端部20处,以便限定用于弹簧17的端部的支撑件。特别地,抽吸装置12还包括第二邻接元件21,该第二邻接元件与活塞16的在收集室13外部的一个端部安装成一体,以限定用于弹簧17的另一个端部的支撑件。

[0091] 邻接元件19和21设置有凹槽22和销31,它们可以彼此联接以便保持邻接元件19和21彼此连结。

[0092] 特别地,在使用中,操作者可以向第一端部18推动活塞16,直到销31进入相应的凹槽22。此时,通过旋转邻接元件21,使邻接元件19和21之间的联接稳定并且获得弹簧17的预加载。

[0093] 这样,在适当的时候,操作者通过旋转邻接元件19将驱动弹簧17,弹簧17将如上所述使活塞16移动。

[0094] 根据一些非限制性实施方式,容器3具有至多大约55mL(特别地,至多大约30mL;更特别地,至多大约17mL;甚至更特别地,至多大约13mL;特别地,至少大约100 μ L;更特别地,至少大约1.5mL;甚至更特别地,至少大约8mL)的内部体积。

[0095] 根据一些非限制性实施方式,插管8的内径至多为大约12mm(特别地,至多为大约10mm;特别地,至多为大约1mm;更特别地,至多为大约0.9mm)。特别地,插管8的内径至少为大约0.3mm、更特别地,至少为大约0.5mm。

[0096] 附加地或替代地,导管14的内径至多为大约12mm(特别地,至多为大约10mm;特别地,至多为大约1mm;更特别地,至多为大约0.9mm)。特别地,导管14的内径至少为大约0.3mm,更特别地,至少为0.5mm。

[0097] 根据一些非限制性实施方式,(每个一经处理的颗粒TP的)至少一个(每个)铁磁颗粒FP通过(至少)抗体(对于该颗粒是特异性的)与(相应的)第一类型的颗粒CE结合。例如,如果第一类型的颗粒CE是CTC,则抗体(特别地,选择性地)与EPCAM(上皮细胞粘附分子)结合。

[0098] 特别是参照图15,有利地但非必须地,在经处理的颗粒TP中,若干铁磁颗粒FP彼此结合,以便增强所述经处理的颗粒TP对磁场的响应。例如,为此目的,可以利用脱硫生物素DTB与链酶亲和素STR之间的相互作用。

[0099] 根据本发明的另一方面,提供了一种用于操纵经处理的样品TS(特别地,如上文所

定义的)的套件。

[0100] 特别地,套件被配置为(被设计为)提供如上所述的系统1。

[0101] 套件包括:磁性装置7,该磁性装置具有处理室2并且被配置为(被设计为)在处理室2中产生磁场;容器3,该容器被配置为(被设计为)容纳经处理的样品TS,并且被容纳在处理室2内,并且具有至少一个侧壁4、底部5和与底部5相对的(端部)开口6;以及插管8,该插管具有开口端部9。

[0102] 该套件还包括对准装置10,该对准装置被配置为(被设计为)以基本上固定的(但特别地,可由操作者移除的)方式安装在容器3处,并且具有通孔11,该通孔被配置为(被设计为)由插管8接合并且将插管8以使得插管8与侧壁4间隔开的取向保持在基本上固定的位置;以及抽吸装置12,该抽吸装置被配置为(被设计为)在插管8内产生低压,使得经处理的样品TS的一部分通过插管8被运送出容器3并且被运出处理室2。

[0103] 根据一些非限制性实施方式,套件包括导管14,该导管被配置为(被设计为)以运送流体的方式连接插管8和抽吸装置12。

[0104] 根据一些非限制性实施方式,对准装置10被配置为(被设计为)被设置在容器3的开口6的区域中。

[0105] 特别地,导管14具有被配置为(被设计为)与插管8联接的第一端部和被配置为(被设计为)与抽吸装置12联接的第二端部。

[0106] 特别地,导管8是柔韧的。

[0107] 有利地但非必须地,套件包括铁磁颗粒FP,该铁磁颗粒FP被设计为(被配置为)(特别地,以选择性的方式)与第一类型的颗粒CE结合。

[0108] 特别地,铁磁颗粒具有至少一个抗体,该抗体被配置为(被设计为)(特别地,以选择性的方式)与第一类型的颗粒CE结合。例如,如果第一类型的颗粒CE是CTC,则抗体被设计为与EPCAM(上皮细胞粘附分子)结合(特别地,选择性地)。

[0109] 根据一些非限制性实施方式,套件还包括用于标记(特别地,基本上选择性地)一些颗粒(特别地,第一类型的颗粒CE)的标记物。

[0110] 更确切地但非必须地,标记物(特别地,是荧光的并且)以一种或多种给定波长(特别地,以紫外线)发射。

[0111] 有利地但非必须地,标记物从以下组成的组中选择:用于肿瘤细胞(特别地,CTC)的标记物、用于白细胞(WBC)的标记物、用于细胞的细胞核的标记物及它们的组合(即,它们的混合物)。

[0112] 根据一些非限制性实施方式,标记物从以下组成的组中选择:细胞角蛋白(特别地,用于标记肿瘤细胞—更特别地,用于标记CTC)、特别地用于标记白细胞(WBC)的CD45(PTPRC—蛋白酪氨酸磷酸酶、受体类型C)、特别地用于标记细胞的细胞核的DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)及它们的组合(即它们的混合物)。

[0113] 有利地但非必须地,上述套件的各种部件如上文关于系统1所定义的那样。

[0114] 根据本发明的另一方面,提供了一种用于操纵经处理的样品TS的操纵方法。

[0115] 该方法包括:预备步骤,在该预备步骤期间,包含经处理的颗粒TP的经处理的样品TS(生物来源的)在容器3内,每个经处理的颗粒TP包含第一类型的颗粒CE和与第一类型的颗粒CE结合的至少一个铁磁颗粒FP,容器3具有至少一个侧壁4、底部5和与底部5相对的(端

部)开口6;插入步骤,在该插入步骤期间,将容器3插入磁性装置7的处理室2中;以及在预备步骤之后的联接步骤,在该联接步骤期间,具有通孔11的对准装置10稳定地与容器3联接。

[0116] 有利地但非必须地,插入步骤在预备步骤之后。

[0117] 有利地但非必须地,预备步骤、插入步骤和联接步骤由操作者(特别地,用手)执行。

[0118] 该方法还包括在联接步骤之后的定位步骤,在该定位步骤期间,使具有开口端部9的插管8滑动穿过通孔11而不接触侧壁4,直到到达给定位置(特别地,从而与底部5接触),在该给定位置,开口端部9在容器3内被设置成与侧壁4分离(间隔开);在插入步骤之后的驱动步骤,在该驱动步骤期间,磁性装置7产生(特别地,被操作而产生)磁场,该磁场使经处理的颗粒TP的至少一部分与侧壁4接触;以及在定位步骤之后并且在操作步骤之后的抽吸步骤,在该抽吸步骤期间,抽吸装置12在插管8内形成低压,使得经处理的样品TS的一部分通过插管8被运送出容器3(并且被运送出所述处理室2),从而使经处理的颗粒TP的至少一部分(的至少一部分)留在容器3内(特别地,与侧壁4接触)。

[0119] 有利地但非必须地,定位步骤(操作步骤)和抽吸步骤由操作者(特别地,用手)执行。特别地,在抽吸步骤期间,操作者驱动抽吸装置12。

[0120] 有利地但非必须地,该方法借助于上述套件来实现。

[0121] 根据一些非限制性实施方式,经处理的样品TS包括第二类型的颗粒(未被示出),在抽吸步骤期间,至少大部分所述第二类型的颗粒通过插管8被运送出容器3。

[0122] 特别地,铁磁颗粒FP选择性地与第一类型的颗粒CE结合而不与第二类型的颗粒结合。

[0123] 在一些非限制性情况下,第一类型的颗粒CE是感兴趣的颗粒(特别地,它们被进一步操纵和/或分析)。在这些情况下,特别地,第二类型的颗粒被简单地丢弃。

[0124] 替代地,第二类型的颗粒是感兴趣的颗粒(特别地,它们被进一步操纵和/或分析)。在这些情况下,特别地,第一类型的颗粒CE被简单地丢弃。

[0125] 根据一些非限制性实施方式,(一个—每个—经处理的颗粒TP的)至少一个(每个)铁磁颗粒FP通过(至少)一个抗体(对于该颗粒是特异性的)与(相应的)第一类型的颗粒CE结合。

[0126] 根据一些非限制性实施方式,该方法还包括分离步骤,在该分离步骤期间,至少一部分铁磁颗粒FP与第一类型的颗粒CE分离。在这些情况下,例如,如果已经利用了脱硫生物素DTB与链酶亲和素STR之间的相互作用,则可以使用生物素。

[0127] 有利地但非必须地,经处理的样品TS包含与第一类型的颗粒CE不同的另一类型的颗粒。在这些情况下,该方法特别地包括标记步骤,在该标记步骤期间,标记物以基本上选择性的方式(特别地,相对于另一类型的颗粒)与第一类型的颗粒CE结合,或以基本上选择性的方式(特别地,相对于第一类型的颗粒CE)与另一类型的颗粒结合。标记物提高了第一类型的颗粒CE和另一类型的颗粒之间的差别。

[0128] 例如,标记物包括具有一种或多种给定波长(特别地,在紫外线中)的荧光分子。

[0129] 特别地,标记物包括被设计为选择性地与第一类型的颗粒CE或与另一类型的颗粒结合的抗体。更特别地,标记物包括(是)(各自)由(至少)抗体(被设计为选择性地与第一类型的颗粒CE或与另一类型的颗粒结合)和(至少)荧光团组成的分子。

[0130] 有利地但非必须地,标记物从以下组成的组中选择:用于肿瘤细胞(特别地,CTC)的标记物、用于白细胞(WBC)的标记物、用于细胞的细胞核的标记物及它们的组合(即,它们的混合物)。

[0131] 根据一些非限制性实施方式,标记物从以下组成的组中选择:细胞角蛋白(特别地,用于标记肿瘤细胞)、特别地用于标记白细胞(WBC)的CD45(PTPRC—蛋白酪氨酸磷酸酶、受体类型C)、特别地用于标记具有细胞核的细胞的DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)及它们的组合。

[0132] 有利地但非必须地,标记步骤在抽吸步骤之后。

[0133] 特别地,在标记步骤期间,将包含标记物的溶液放置在容器3中(在该容器内设置有经处理的颗粒TP—更确切地说,设置有经处理的样品TS)。

[0134] 有利地但非必须地,在包含标记物的溶液被放置在容器3中时,经处理的颗粒TP由于磁性装置7产生的磁场而保持与侧壁4接触。

[0135] 根据一些非限制性实施方式,在标记步骤期间,上述标记物以基本上选择性的方式(特别地,相对于另一类型的颗粒)与第一类型的颗粒CE结合,并且另一标记物(不同于上述标记物)以基本上选择性的方式(特别地,相对于第一类型的颗粒CE)与另一类型的颗粒结合。

[0136] 在这些情况下,特别地,另一标记物包括被设计为选择性地与第一类型的颗粒CE结合的抗体。更特别地,另一标记物包括(是)(各自)由(至少)抗体(被设计为选择性地与第一类型的颗粒CE结合)和(至少)荧光团组成的分子。此外,另一标记物包括被设计为选择性地与另一类型的颗粒结合的抗体。更具体地,另一标记物包括(是)由(至少)抗体(被设计为选择性地与另一类型的颗粒结合)和(至少)另一荧光团组成的分子。

[0137] 根据一些非限制性例子,另一标记物从以下组成的组中选择:细胞角蛋白(特别地,用于标记肿瘤细胞)、特别地用于标记白细胞(WBC)的CD45(PTPRC—蛋白酪氨酸磷酸酶、受体类型C)、特别地用于标记具有细胞核的细胞的DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)及它们的组合。

[0138] 根据一些非限制性实施方式,标记步骤包括渗透子步骤,在该渗透子步骤期间,增加第一类型(或另一类型)的颗粒CE的外部(细胞)膜的渗透性,以便允许标记物(或另一标记物)进入第一类型(或另一类型)的颗粒CE的内部。

[0139] 根据一些非限制性变型,通过使用适当的试剂获得膜的渗透性的增加。

[0140] 有利地但非必须地,该方法还包括在标记步骤之后或之前(或同时)的固定步骤(特别地,在驱动步骤之前)。通常但非必须地,固定步骤在预备步骤之后。

[0141] 根据一些非限制性变型,通过使用适当的试剂获得固定。

[0142] 有利地但非必须地,该方法还包括(至少部分地)在标记步骤之后的移除步骤,在该移除步骤期间,将包含标记物的溶液的至少一部分从容器3移除。

[0143] 特别地,在移除步骤期间,由于由磁性装置7产生的磁场,经处理的颗粒TP保持与侧壁4接触。

[0144] 根据一些非限制性实施方式,该方法还包括(至少部分地)在移除步骤之后的洗涤步骤,在该洗涤步骤期间,缓冲液被加入容器3中并且随后至少部分被移除。

[0145] 特别地,在洗涤步骤期间,由于磁性装置7产生的磁场,经处理的颗粒TP保持与侧

壁4接触。

[0146] 根据一些非限制性变型,另一类型的颗粒是第二类型的颗粒的一部分(例如,在抽吸步骤之后留在容器3内的)。替代地,另一类型的颗粒不同于第二类型的颗粒。

[0147] 根据本发明的另一方面,提供了一种用于操纵(生物来源的)初始样品的方法,该初始样品包含第一类型的颗粒CE(例如,CTC)。该方法包括:处理步骤,在该处理步骤期间,能够选择性地与第一类型的颗粒CE结合的铁磁颗粒FP与第一类型的颗粒CE组合,以便获得包含经处理的颗粒TP的经处理的样品TS,每个经处理的颗粒TP包含第一类型的颗粒CE和与第一类型的颗粒CE结合的至少一个铁磁颗粒FP;以及如上所述的处理方法。

[0148] 根据一些非限制性实施方式,铁磁颗粒FP具有至少一个抗体,该抗体被配置为(被设计为)(特别地,以选择性的方式)与第一类型的颗粒CE结合。特别地,在处理步骤期间,铁磁颗粒FP通过所述的抗体与相应第一类型的颗粒CE结合。

[0149] 有利地但非必须地,处理步骤在预备步骤之前。特别地,在处理步骤期间,铁磁颗粒FP被加入其中设置有颗粒CE(特别地,设置有初始样品)的容器3内。

[0150] 根据一些非限制性实施方式,(生物来源的)初始样品包括(特别地,是)任何生物液体。

[0151] 有利地但非必须地,初始样品包括(特别地,是)血液、血浆、唾液、尿液、液体活检组织、含有悬浮的(再悬浮的)细胞(特别地,组织的细胞)的缓冲液和/或含有悬浮的(再悬浮的)细胞(特别地,组织的细胞)的培养基。

[0152] 根据一些非限制性实施方式,初始样品包括(特别地,是)血液、血浆、唾液、尿液及它们的组合。

[0153] 在一些具体的非限制性情况下,初始样品包括(特别地,是)血液和/或血浆(特别地,血液)。

[0154] 有利地但非必须地,该方法还包括在处理步骤之前(并且特别地,在预备步骤之前)的移除步骤,在该移除步骤期间,至少大部分初始样品(包含在初始样品中的血浆)被移除并且与第一类型的颗粒CE(与容器3)分离。特别地,0.5至1mL血浆保留在容器3内。

[0155] 图11示意性示出了上述过程的非限制性示例,其中对添加了缓冲液的初始样品(血液)进行离心(以分离血浆)(A);移除(B)稀释的血浆;添加(C)铁磁颗粒FP(和另外的缓冲液),以便获得含有经处理的颗粒TP的经处理的样品TS;施加磁场(D),以便将经处理的颗粒运送到容器3的侧壁4上;移除(F)经处理的样品TS(包含未被标记的细胞)的一部分;对经处理的颗粒TP进行洗涤(G);将染料试剂添加到经处理的颗粒TP中(H),在新施加磁场(I)之后再次对经处理的颗粒TP进行洗涤;使经处理的颗粒TP在小体积中再悬浮(L)并装载到分析和/或计数装置中。

[0156] 根据上述内容,本发明的主题允许以简单、快速且廉价的方式富集(和标记)感兴趣的颗粒(特别地,细胞),并且允许移除负性颗粒(特别地,细胞)(可以使用正性样品部分—包括感兴趣的颗粒—和负性部分—具有负性颗粒—两者)。

[0157] 获得的结果可以用于制备用于分析/分选系统/装置的材料(例如,在由同一申请人生产的DEPArrayTM装置之前)或用于细胞培养、遗传分析、计数、血细胞计数等目的。

[0158] 除非另有明确指出,否则本文中引用的参考文献(文章、书籍、专利申请等)的内容全部引用到本文中。特别地,所提及的参考文献在此引入以供参考。

[0159] 通过下面对仅为说明性的非限制性实施例的描述,本发明的另外的特征将变得清楚。

[0160] 实施例1

[0161] 该实施例描述了进行的一些实验测试的结果

[0162] 测试了本发明的主题,并利用通过目前市场上的全自动的系统(称为CellSearch™的系统)获得的结果进行了对比测试。

[0163] 具体参照图12,从悬浮在缓冲溶液中的上皮细胞样品开始进行测试。结果示于下表1中。

[0164] 表1

	CM	CS1	CS2
测试次数	11	2	12
进入时用第一颜色标记的样品的平均类型	1088	1088	1108
进入时用第二颜色标记的样品的平均类型	50	50	57
[0165] 离开时用第一颜色标记的样品的平均类型	899(82.6%)	985(90.5%)	968(87.4%)
离开时用第二颜色标记的样品的平均类型	45.8(91.6%)	45(90%)	54.8(96.2%)
离开时用第一颜色标记的样品的平均值的 S.D.	16.60%	1.90%	2.60%
离开时用第二颜色标记的样品的平均值的 S.D.	29%	14.10%	14.80%

[0166] 应当注意,在上表1中,CM表示利用根据本发明的系统1获得的结果;CS1和CS2表示利用目前市场上的完全自动化的系统(CellSearch™)的两个不同版本获得的结果;S.D.表示标准偏差。

[0167] 在图12中,附图标记23表示细胞计数机器(特别地,Celltracks AnalyzerII®)。

[0168] 具体参照图13,从取自健康供体的血液(BL)获得的、添加了肿瘤细胞(PC3-9)的样品开始进行测试。结果示于下表2中。

[0169] 表2

	CM	CS1
测试次数	8	8
进入时的PC3-9的数量	1087	1087

离开时的PC3-9平均值	45.85%	42.04%
离开时的S.D.PC3-9平均值	7.44%	3.41%

[0171] 注意,在上表2中,CM表示利用根据本发明的系统1获得的结果。

[0172] 在图13中,附图标记23表示细胞计数机器(特别地,Celltracks Analyzer II®),附图标记24表示上述的目前市场上的完全自动化的系统(CELLTRACKS® AUTOPREP® 系统)。

[0173] 具体参照图14,从取自健康供体的血液(BL)获得的、添加了肿瘤细胞(SKBr3)的样品开始进行测试。结果示于下表3中。

[0174] 表3

	CM	CS1
测试次数	15	15
进入时的样品数量	用 542 进行 13 次测试 用 2168 进行 2 次测试	用 542 进行 13 次测试 用 2168 进行 2 次测试
离开时的平均样品	51.67%	61.25%
离开时的 S.D.平均样品	10.69%	15.67%

[0175] 注意,在上表3中,CM表示利用根据本发明的系统1获得的结果;CS1表示利用目前市场上的完全自动化的系统(CellSearch™)获得的结果;S.D.表示标准偏差。

[0177] 在上面的表1和表3中指出的事件表示单个SKBr3或SKBr3簇(其倾向于团聚)。

[0178] 在图13和图14中,附图标记23表示细胞计数机器(特别地,Celltracks Analyzer II®);附图标记24表示上述的目前市场上的完全自动化的系统;附图标记25表示洗涤系统(特别地,用于15ml试管和1.5ml PCR试管的离心机:任何供应商);附图标记26表示用于减少体积的系统(特别地,使用Menarini Silicon Biosystems的VRNxT™);附图标记27表示以商标名DEPArray™闻名的分选装置。

[0179] 从上面的实验数据可以容易地注意到,尽管本发明的主题的成本和复杂性明显较低,但是本发明的主题具有相当的精度,并且在一些情况下,比目前市场上的自动化系统的精度还高。

[0180] 在进行的测试中,使用以下试剂:

[0181] 在含有0.03%牛血清白蛋白(BSA)并且保存有0.05%的ProClin 300的缓冲液中的抗-EpCAM铁磁流体,该铁磁流体含有0.022%的与小鼠单克隆抗体结合的磁性颗粒的悬浮液,该小鼠单克隆抗体对于上皮细胞上存在的细胞表面标记物EpCAM是特异性的。

[0182] 含有具有0.1%叠氮钠的缓冲液的稀释缓冲液。

[0183] 遵循以下程序(表示方法的非限制性例子)。将7.5ml血液转移到试管中。用6.5ml缓冲液稀释,随后搅拌并离心大约10分钟(以大约800g)。通过移液管移除血浆(上清液),留下大约0.5-1ml,并且添加大约6ml稀释缓冲液。

[0184] 在短暂搅拌试管后,加入150μl试剂以改善捕获(用于受控的铁磁流体聚集的0.02%试剂、0.5%BSA、缓冲液中的0.1%叠氮钠)和上述铁磁流体(150μl)。

- [0185] 短暂搅拌后,将试管在磁性装置7的处理室2中(图1至图10)放置10分钟。
- [0186] 在进一步搅拌(在从室中移除试管的情况下)和在处理室2中固定停留大约20分钟之后,安装并操作抽吸装置12(将试管保持在磁性装置7内)以抽吸负性部分。
- [0187] 然后使用磁性装置7按照类似的方法用稀释缓冲液洗涤所获得的样品。
- [0188] 为了允许通过荧光图像识别靶细胞,进一步用渗透试剂、染料试剂(含有对于与藻红蛋白(PE)结合的细胞角蛋白是特异性的小鼠单克隆抗体和与别藻蓝素(APC)结合的小鼠单克隆抗体抗-CD45)和用于核酸的染料(含有4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(DAPI))处理样品,使样品再悬浮以允许试剂混合并在环境温度下在黑暗中孵育20分钟。
- [0189] 然后,通过用2ml稀释缓冲液进行稀释来洗涤样品,在通过抽吸装置12进行抽吸之前将试管在磁性装置7中保持大约15分钟。最后,样品通过细胞固定剂固定并再悬浮于最终体积中。
- [0190] DEPAarray™和CellSearch™根据相应的制造商说明书进行使用。
- [0191] 用DEPAarray™处理的样品用另外的缓冲液洗涤,之后再悬浮在最终体积中。

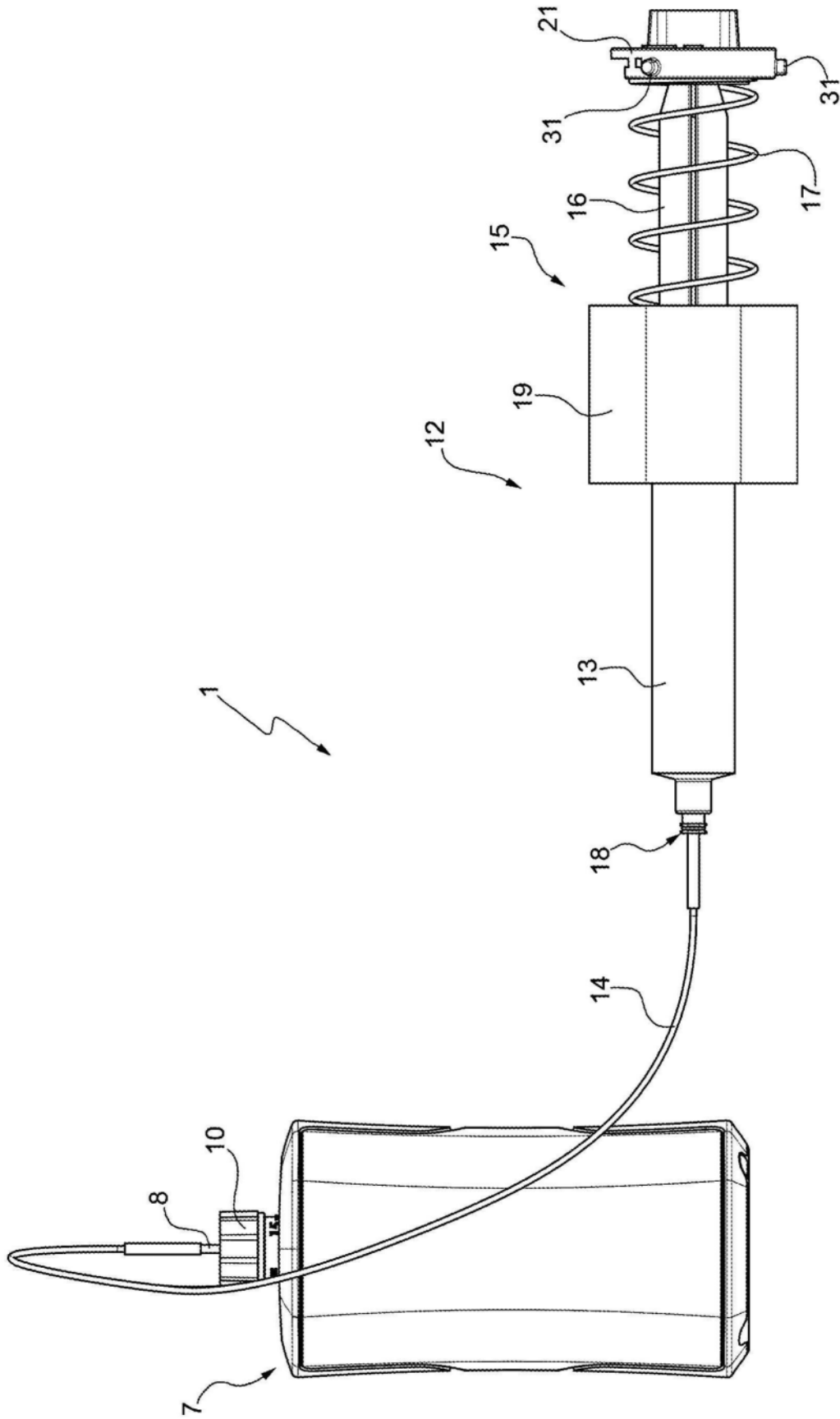


图1

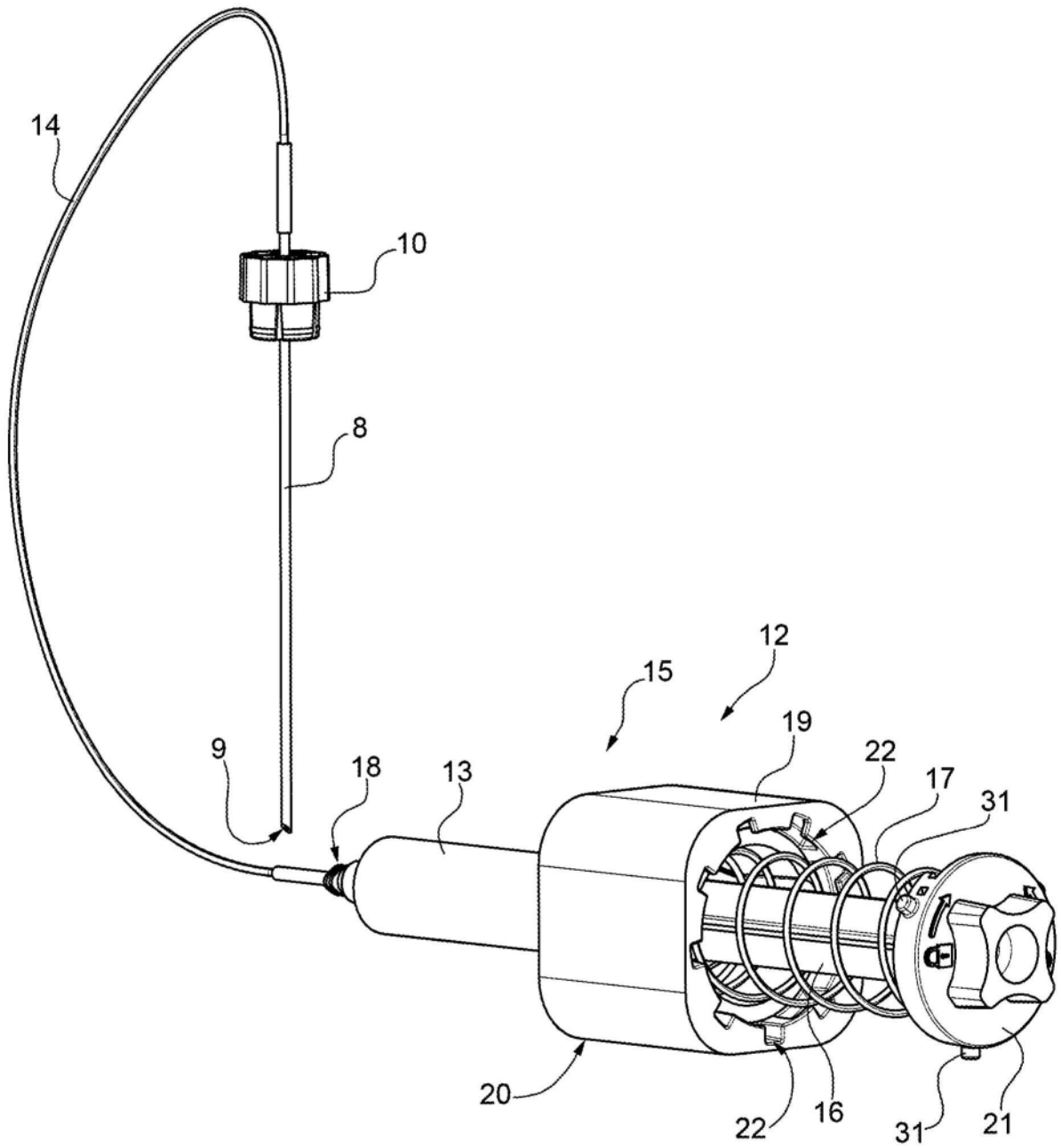


图2

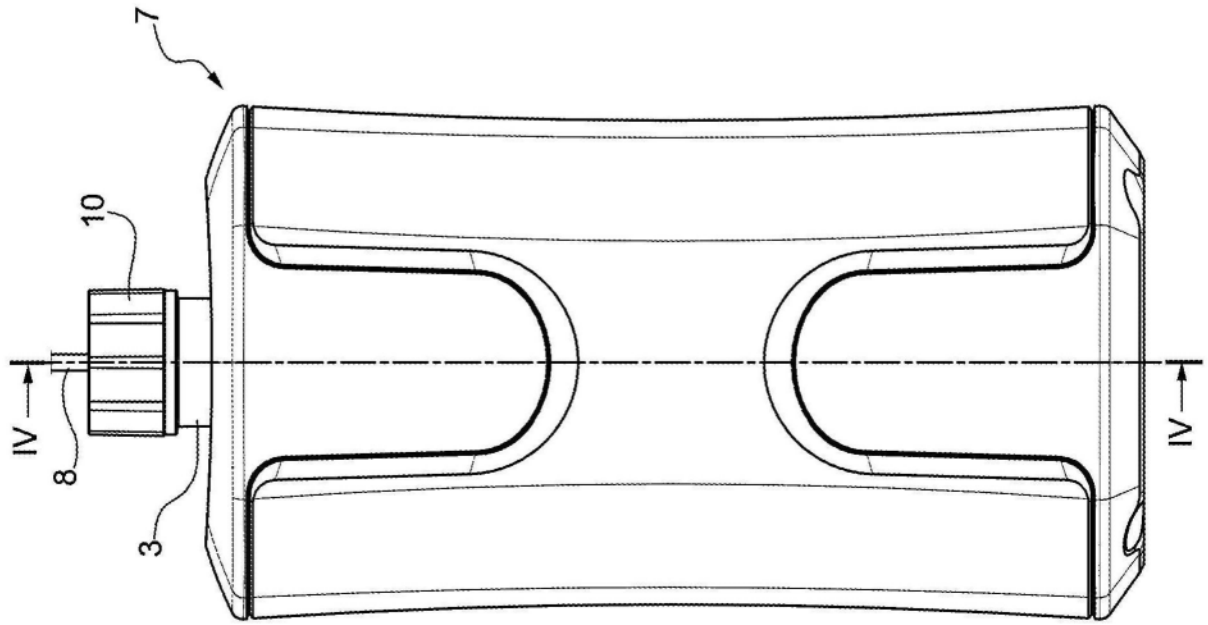


图3

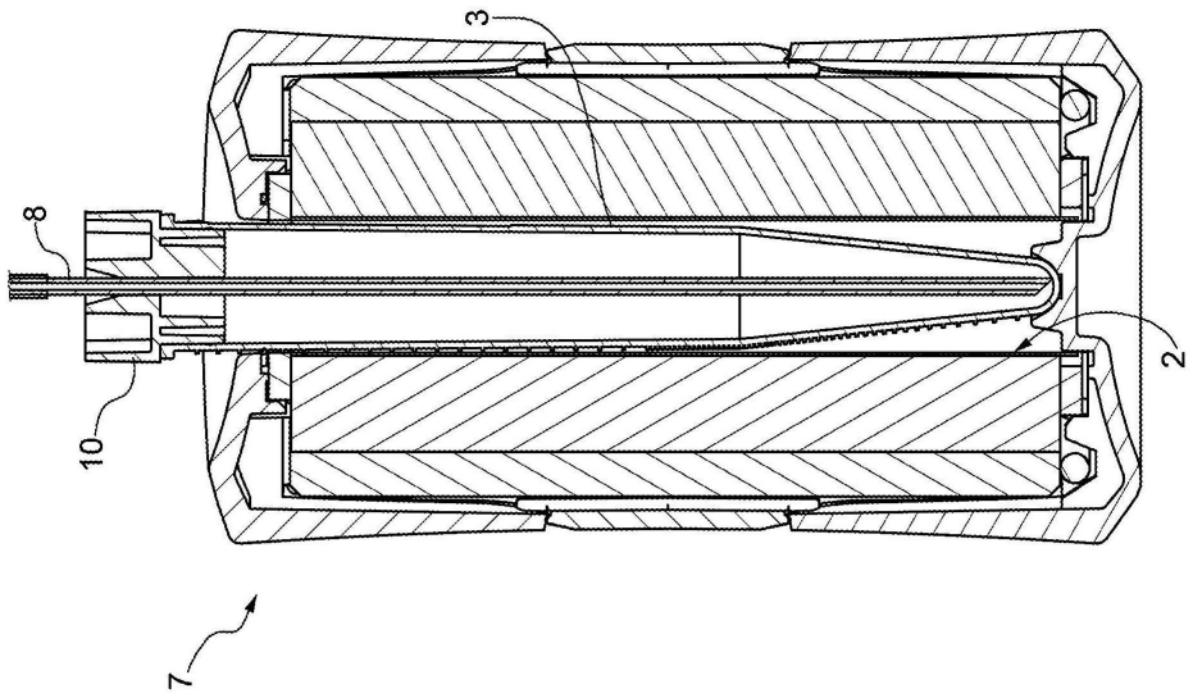


图4

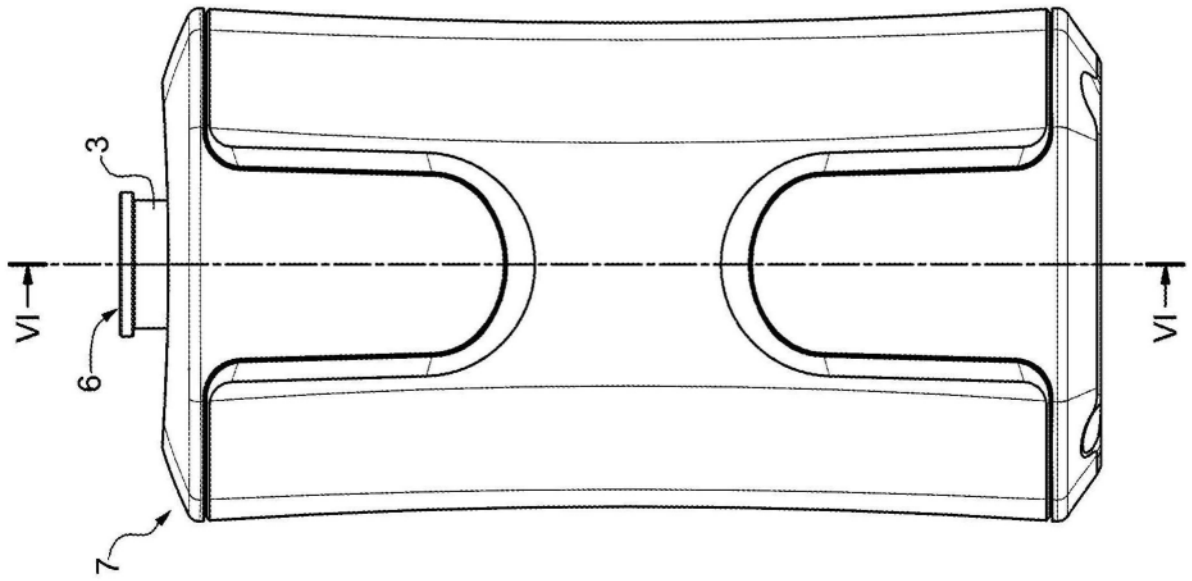


图5

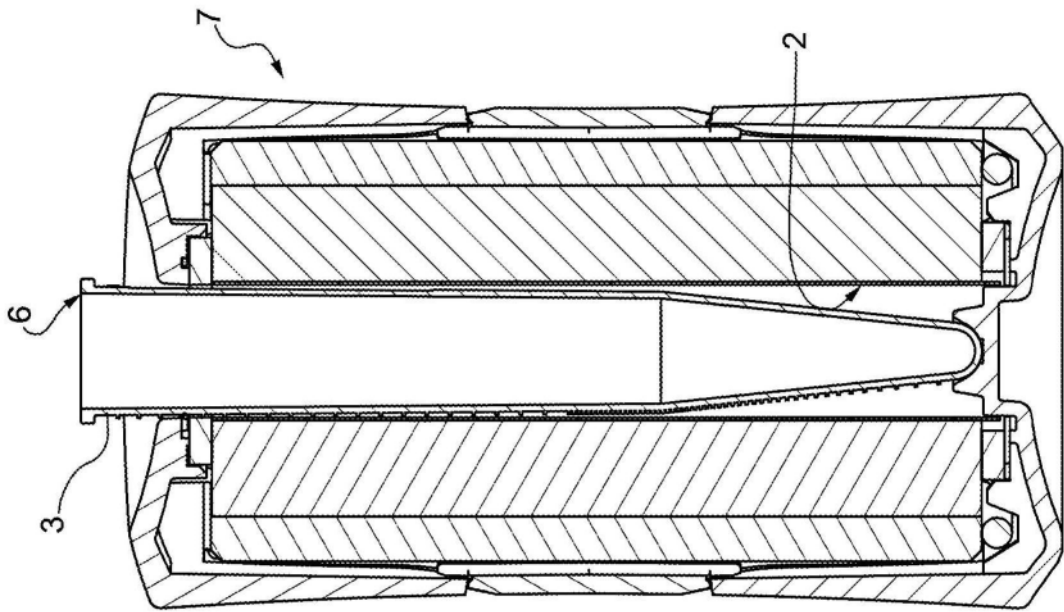


图6

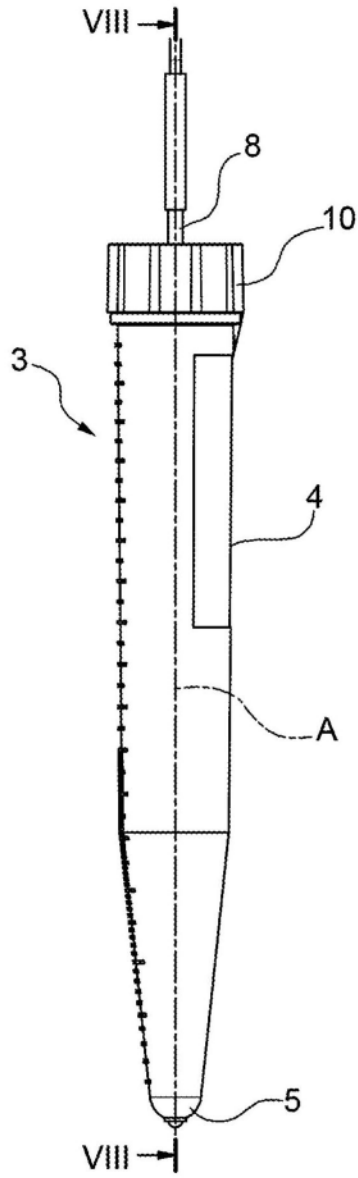


图7

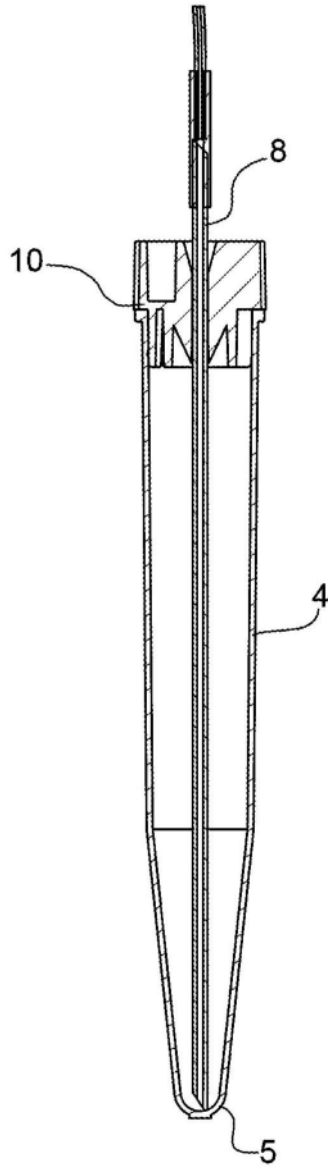


图8

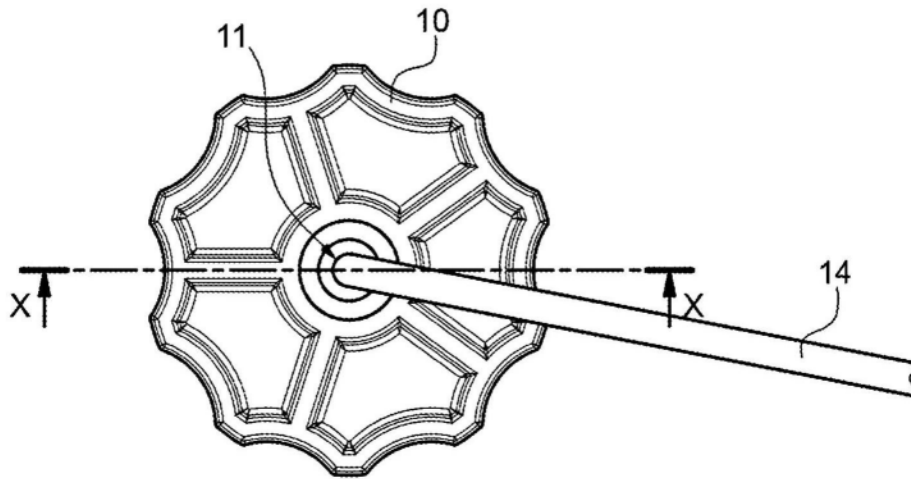


图9

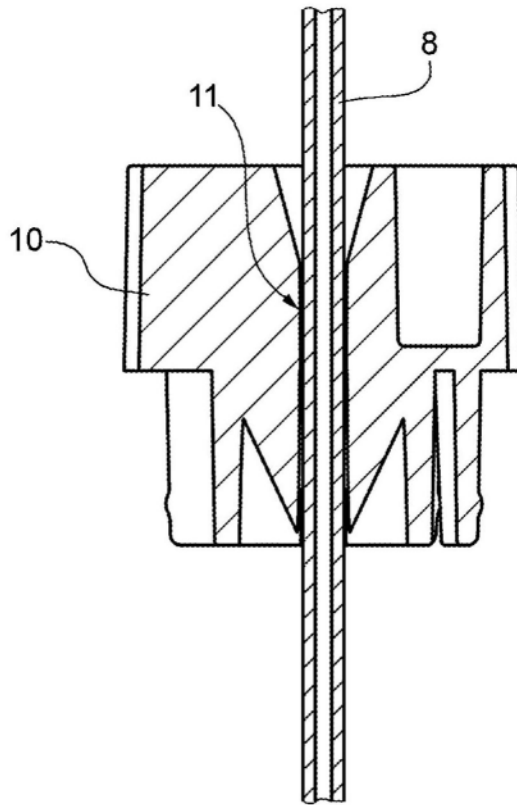


图10

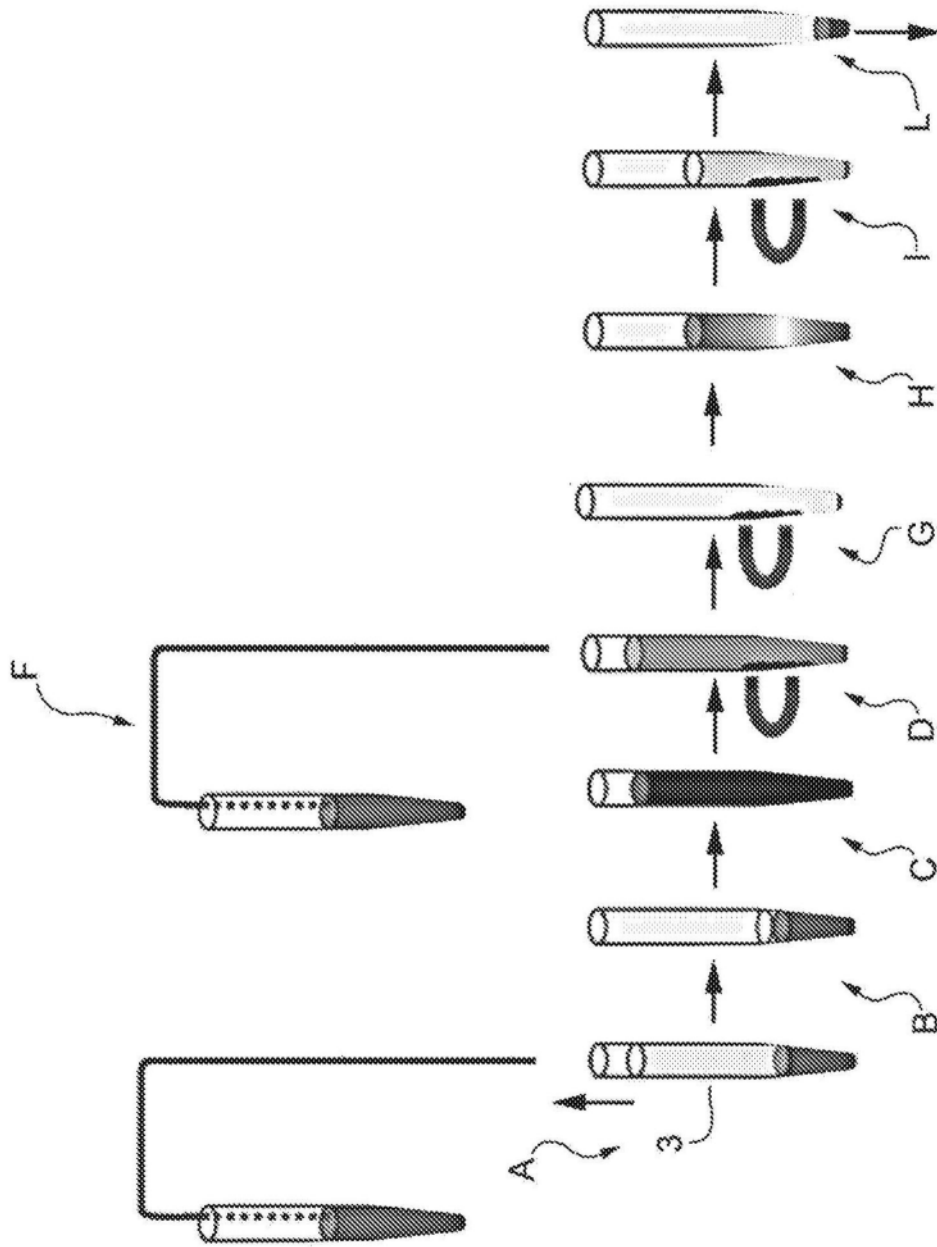


图11

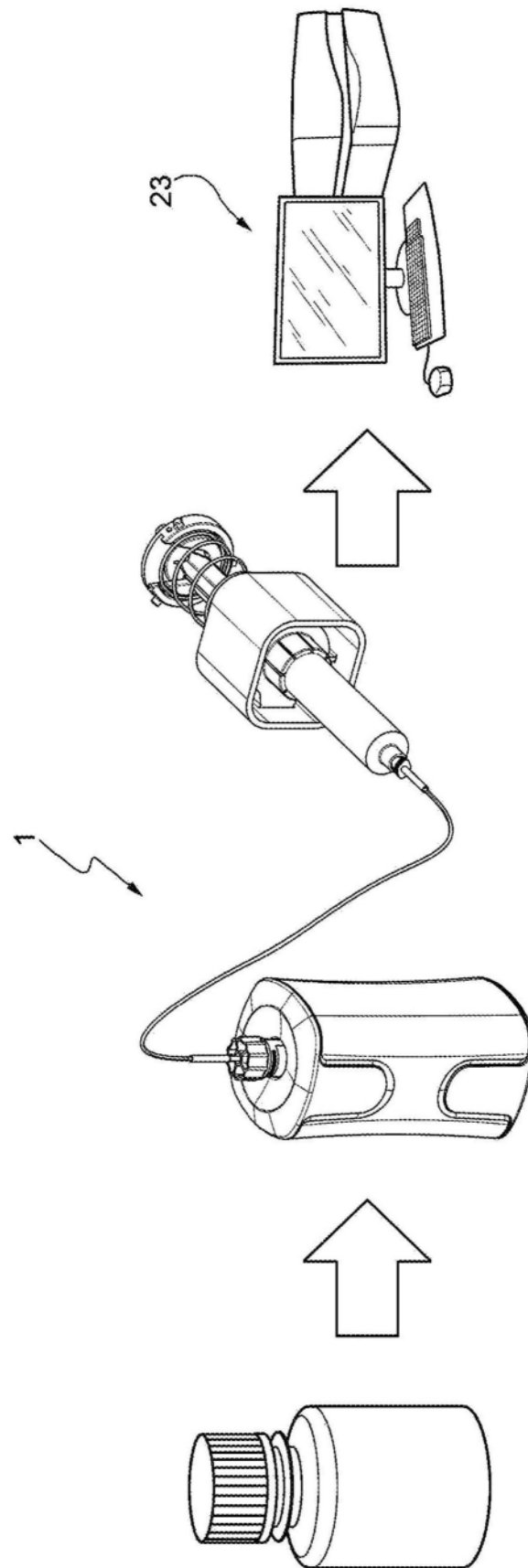


图12

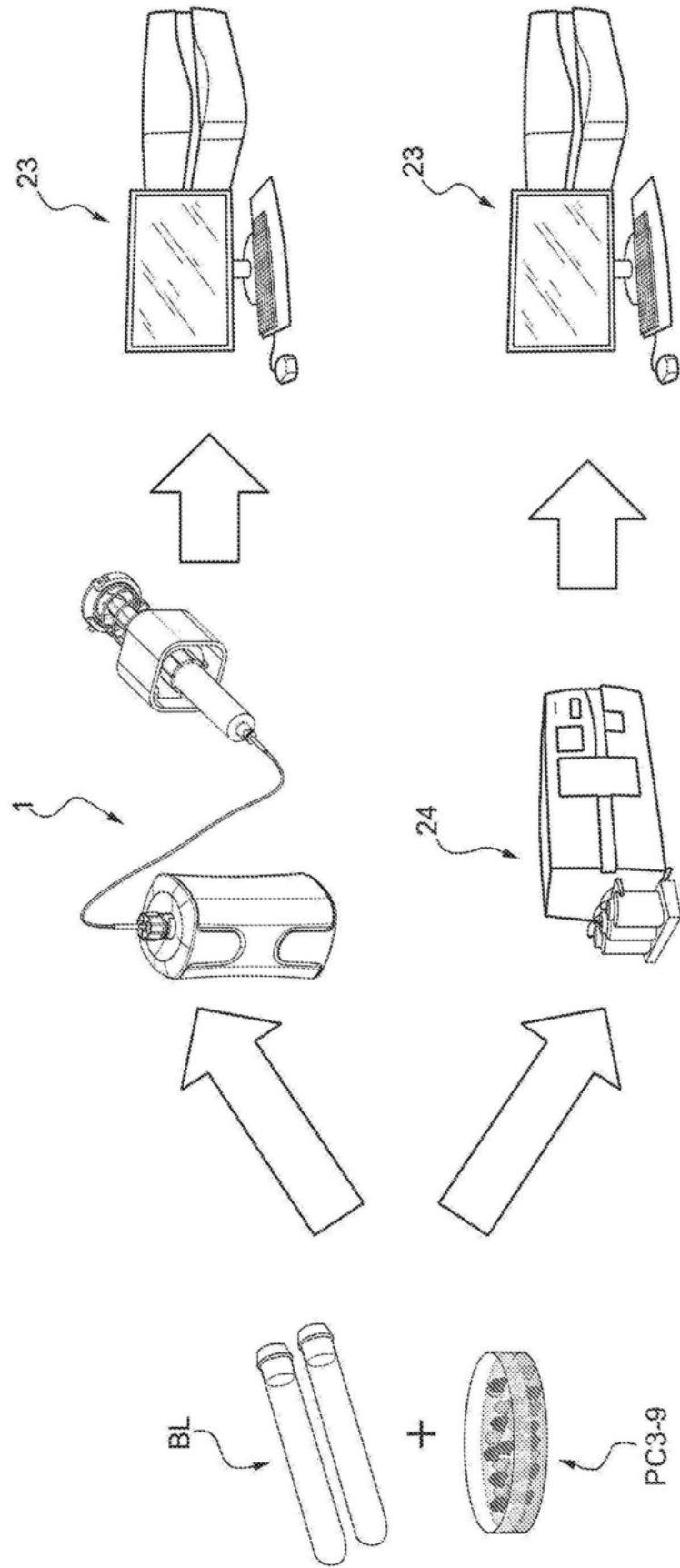


图13

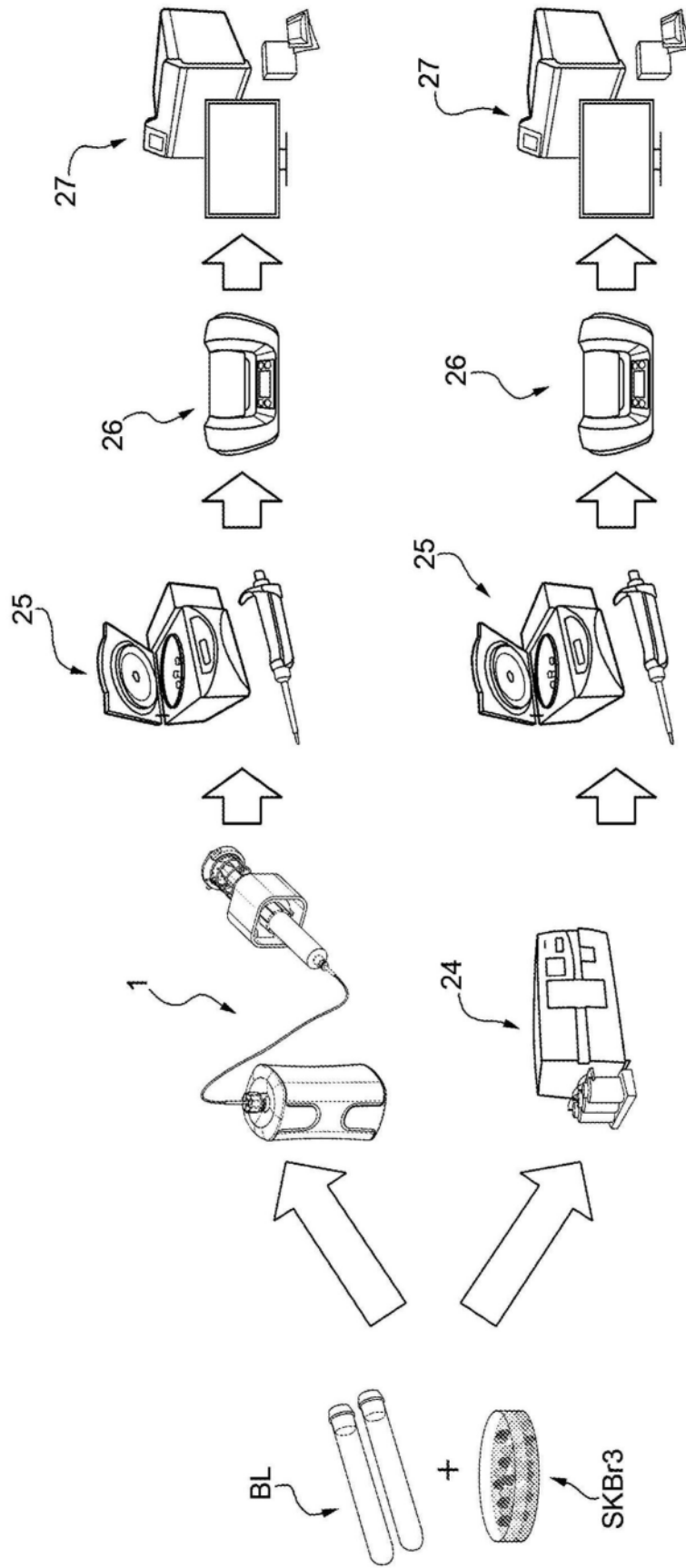


图14

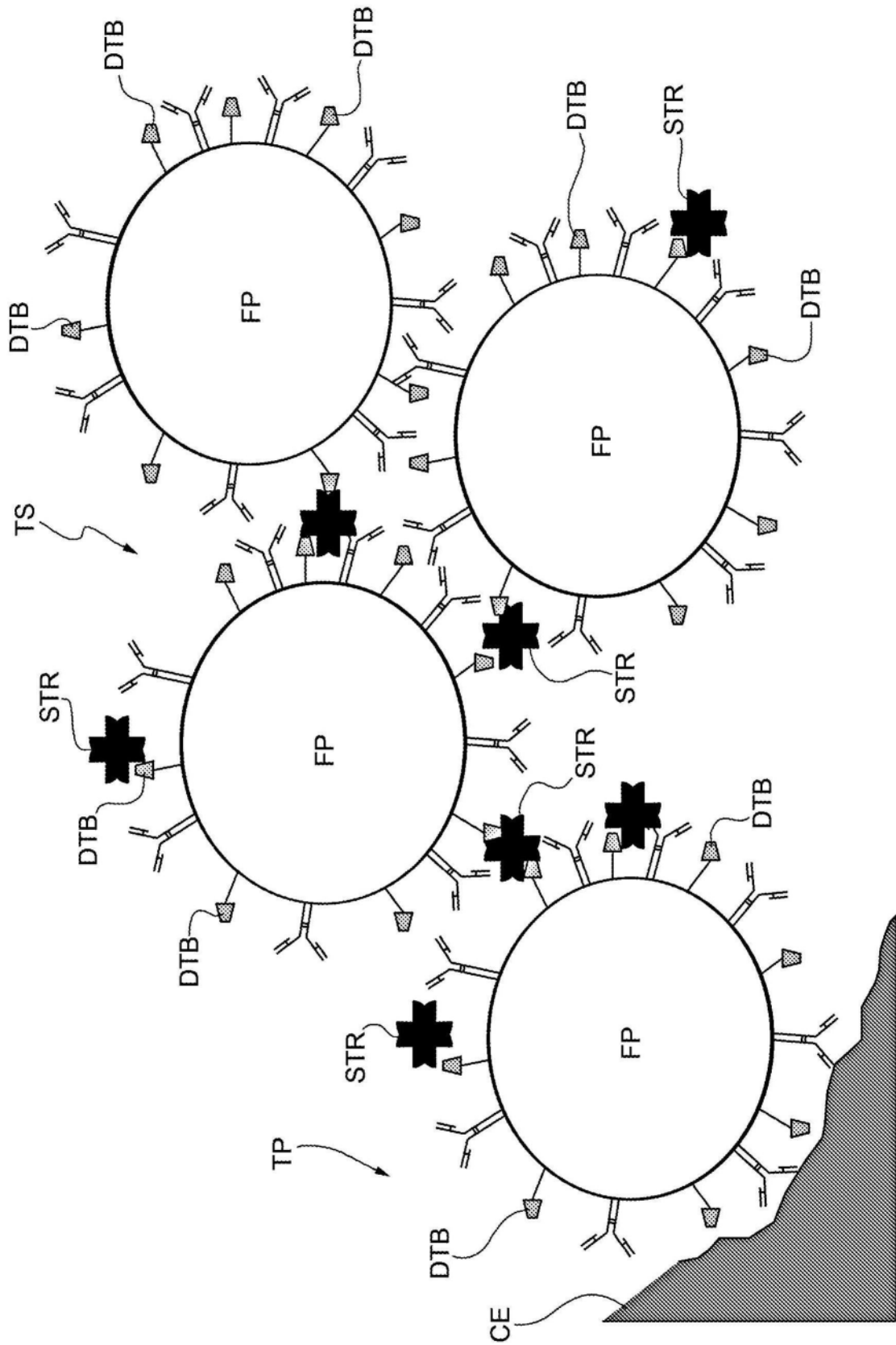


图15