



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201416452 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：102124143

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 05 日

(51)Int. Cl. : *C12Q1/24 (2006.01)*

B01D35/06 (2006.01)

G01N1/40 (2006.01)

(30)優先權：2012/07/06 美國

61/668,990

(71)申請人：騰隆科技公司 (美國) AVIVA BIOSCIENCES CORPORATION (US)
美國

(72)發明人：關 安東尼歐 GUIA, ANTONIO (US)；亞馬尼斯 道格拉斯 T YAMANISHI,
DOUGLAS T. (US)；佳堤 安卓雅 GHETTI, ANDREA (US)；陶國良 TAO,
GUOLIANG (CN)；陶慧敏 TAO, HUIMIN (CN)；楚翁 凱 TRUONG, KY (US)；
吳鐳 WU, LEI (US)；王小波 WANG, XIAOBO (US)

(74)代理人：郭雨嵐；呂紹凡

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：32 共 155 頁

(54)名稱

用於分離或富集化細胞的方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEPARATING OR ENRICHING CELLS

(57)摘要

本發明提供一過濾腔，其包含一容置於一外殼內的微加工過濾器；其中該過濾器及/或該外殼的內表面係經氣相沉積法、昇華作用、氣相表面反應、或粒子濺射修飾以製得一均勻的塗層。本發明並提供一方法，其係用以自一流體樣本中分離細胞，該方法包含：a)配送一流體樣本至於本文中所揭露的該過濾腔；及 b)提供該流體樣本一流體流通過該過濾腔；其中，依據前述流體樣本成份的尺寸、形狀、或形變性，該流體樣本中的成份係通過會被留置於該過濾器中。



第一圖



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201416452 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：102124143

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 05 日

(51)Int. Cl. : **C12Q1/24 (2006.01)**

B01D35/06 (2006.01)

G01N1/40 (2006.01)

(30)優先權：2012/07/06 美國

61/668,990

(71)申請人：騰隆科技公司 (美國) AVIVA BIOSCIENCES CORPORATION (US)
美國

(72)發明人：關 安東尼歐 GUIA, ANTONIO (US)；亞馬尼斯 道格拉斯 T YAMANISHI,
DOUGLAS T. (US)；佳堤 安卓雅 GHETTI, ANDREA (US)；陶國良 TAO,
GUOLIANG (CN)；陶慧敏 TAO, HUIMIN (CN)；楚翁 凱 TRUONG, KY (US)；
吳鐳 WU, LEI (US)；王小波 WANG, XIAOBO (US)

(74)代理人：郭雨嵐；呂紹凡

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：32 共 155 頁

(54)名稱

用於分離或富集化細胞的方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEPARATING OR ENRICHING CELLS

(57)摘要

本發明提供一過濾腔，其包含一容置於一外殼內的微加工過濾器；其中該過濾器及/或該外殼的內表面係經氣相沉積法、昇華作用、氣相表面反應、或粒子濺射修飾以製得一均勻的塗層。本發明並提供一方法，其係用以自一流體樣本中分離細胞，該方法包含：a)配送一流體樣本至於本文中所揭露的該過濾腔；及 b)提供該流體樣本一流體流通過該過濾腔；其中，依據前述流體樣本成份的尺寸、形狀、或形變性，該流體樣本中的成份係通過會被留置於該過濾器中。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

5 用於分離或富集化細胞的方法及組合物/Methods and
Compositions for Separating or Enriching Cells

【相關申請案】

10 本申請案請求項係主張美國臨時申請案第 61/668,990 號案
為優先權基礎案，該臨時申請案的發明名稱為「用於分離或富
集化細胞的方法及組合物」，其係於西元 2012 年 07 月 06 日提
出申請。前揭臨時申請案係以其全文併入於本文中作為參考文
獻。

15

【技術領域】

本發明原則上屬於生物性分離步驟的領域，且特別是處理
生物性樣本的領域。

20 【先前技術】

樣本處理 (Sample Preparation) 是眾多生物性或環境樣本
的基因學、生化、及生物分析的必要步驟。樣本處理往往需要
將樣本中的所需成份 (components of interest) 與樣本中的其他
成份分離。這樣的分離程序通常僅能在實驗室中進行且難以進
25 行自動化操作。

在許多情況中，分析樣本中相對含量低的成份是必須的。
在這樣的情況下，提高該含量低的成份的濃度，以及移除樣本
中不需要且會影響所需成份之分析結果的成份，可能都是必要

的。因此，一樣本必須被「減積 (debulked)」以減少其體積，並進一步經可以將所需成份富集化的分離技術處理。在生物性樣本如腹水、淋巴液或血液中尤其需要這樣的處理程序，因為這些樣本通常係以較大量的體積被採集而僅含有少量的目標細胞（如，經病毒感染的細胞、抗腫瘤的 T 細胞、發炎細胞、癌細胞、或胎兒細胞）。這些生物性樣本的分離步驟對於了解疾病狀態的根本，乃至於疾病的診斷及治療方法的發展皆有著非常關鍵的重要性。

過濾是一種用於減少樣本體積的方法，其係基於樣本成份於流經或保留於過濾器中的性質差異來分離樣本成份。膜過濾器通常被使用於這樣的應用中，其含有相互連接之纖維狀的結構分布。該膜上的孔洞並非相互獨立分離，而是具有不規則的外型且在該膜中相互連結。所稱「孔洞」的尺寸實際上係取決於膜中隨機彎曲的流體流動空間（例如，孔洞）。雖然膜過濾器可被應用多種分離需求，該孔洞尺寸的變異度及不規則外型限制了此種方法於更精準之依據粒子尺寸或其他特性的過濾需求。

微加工過濾器是被製造以供應用於特定細胞或分子的分。這些微加工結構並不具有孔洞，但藉由使用設置於晶片的表面上的「塊狀物 (bricks)」(如美國專利第 5,837,115 號所載，其係公告於西元 1998 年 11 月 17 日，專利權人為 Austin 等，此案係併入於此做為參考文獻) 或「屏障物 (dams)」(如美國專利第 5,726,026 號所載，其係公告於西元 1998 年 03 月 10 日，專利權人為 Wilding 等，此案係併入於此做為參考文獻) 而設有微蝕刻於一個或多個晶片上的通道 (channels)。由於這些微加工過濾器設有精細的幾何構造，過濾器具有的過濾區域狹小的缺點（因為受到過濾器的幾何構造的限制），因此這些過濾器僅能處理少量的流體樣本。

血液樣本在樣本處理及分析上特別具有難度。自一個體身上取得血液樣本並不困難，且該血液樣本可提供大量的代謝、診斷、預後、及基因資訊。然而，大量的無核紅血球及其中主要成份血紅素可能會妨礙基因、代謝及診斷測試。

5 可藉由使用多層不同密度的溶液來自周邊血液減積 (debluking) 紅血球 (如美國專利第 5,437,987 號，其係公告於西元 1995 年 08 月 01 日，專利權人為 Teng, Nelson N.H.等)。長鏈聚合物如六碳糖 (dextran) 被用於誘發紅血球的凝集，而形成長鏈聚集的紅血球 (Sewchand LS, Canham PB. (1979)，
10 「Modes of Rouleaux formation of human red blood cells in polyvinylpyrrolidone and dextran solutions」, Can. J. Physiol. Pharmacol. 57 (11) :1213-22)。然而，這些用來移除紅血球之方法的效率並不理想，尤其是在應用於稀少細胞的分離或富集化時，舉例來說，當需要自母親血液中分離出胎兒細胞、或自
15 一病人身上分離癌細胞時。

體液 (如，痰、尿液) 或腹水或其他滲出液中的脫落細胞 (exfoliated cells) 提供檢測癌前病灶及在腫瘤發育初期即根除癌症的可能性。舉例來說，尿液細胞學已廣泛地接受以作為一種非侵入性檢測法，其係用於診斷及監控移行上皮細胞癌的非
20 侵入性檢測法 (Larsson et al (2001) Molecular Diagnosis 6: 181-188)。然而，在許多案例中，異常之脫落細胞的細胞性辨識受到所分離之異常細胞的數量的限制。常規尿液細胞學中，整體敏感度係少於 50%，其係基於癌症等級、癌症階層、及尿液採集及所使用的處理方法而有所變化。基於分子及基因的生物標記分子而進行之體液中異常之脫落細胞的分子分析 (如，
25 使用原位雜合法、PCR、生物晶片等) 可以顯著地提升細胞分析學的靈敏度。不論是生物標記分子的研究或生物標記分子於臨床實務上的應用，都需要自不僅僅含有脫落細胞且尚含有正常細胞、細菌、體液、體蛋白、及其他細胞殘骸的體液中取得

經富集化而相對來說純化的脫落細胞群。因此，領域中迫切的需要研發一種有效率的富集化方法，以供自體液中富集並分離異常之脫落細胞。

5 Meye 等人發表的文獻 (Int. J. Oncol., 21 (3) :521-30
 (2002)) 記載使用半自動 CD45 消除 autoMACS 操作法
 (semi-automated CD45 depletion autoMACS protocol) 以自血液
 樣本中分離及富集化泌尿腫瘤細胞。Iinuma 等人發表的文獻
 (Int. J. Cancer, 89 (4) :337-44 (2000)) 記載使用 CD45 磁
10 性細胞分離法並接續使用 p53 及 K-ras 的突變等位基因特異擴
 增法 (nested mutant allele-specific amplification) 以偵測患有
 結腸直腸癌的病人的血液中的腫瘤細胞。在這兩個研究中，腫
 瘤細胞係混合與自血液樣本中經 Ficoll 梯度離心法分離而得的
 單核球 (MNCs)。接著使用抗 CD45 之抗體的負向消除法
 (negative depletion) 自 MNCs 富集化腫瘤細胞。

15 現行用於自體液，如血液樣本中富集化及製備脫落細胞的
 方法係使用媒介式分離法 (media-based separation)、抗體捕捉
 法、離心及薄膜過濾。雖然這些技術都簡單且易於操作，它們
 都具有不少的限制，包括，富集化含量少的細胞的效率並不理
 想、偵測含量少的細胞的靈敏度低、難以處理大量體積的樣
20 本、富集化結果不一致、及分離過程過於依賴人力。

 領域中需要用於樣本處理的方法及裝置，其具備效率及可
 自動化操作的特點，而可用於處理相對大量的樣本 (例如大量的
 生物性流體樣本) 及分離目標細胞。本發明提供了這些優點
 及其他效益。

25

【發明內容】

 本發明鑒於多種疾病狀態的診斷、預後及治療皆可基於自
 複雜成份的流體樣本中使含量低的細胞富集化來進行。富集化
 通常可經由一個或多個分離步驟來完成。特定而言，自母親血

液樣本中分離胎兒細胞對於胎兒異常或多種基因狀態的檢測有很大的助益。除此之外，本發明係有鑒於自病人樣本中富集化及分離含量低的惡性細胞，例如自病人體液樣本中分離癌細胞，可有助於該惡性細胞的檢測及分類，因此將有助於診斷及預後，乃至於規劃病人的治療計畫。

本發明也包含處理或修飾（如，化學性地）一包含本發明之過濾器的過濾腔的方法，以增加過濾流體樣本（如，一含有細胞的流體樣本）的效率。本發明亦包括一過濾腔，其含有經本發明方法處理過的過濾器。

本發明的第一面向是一種包含一微加工過濾器的過濾腔，該微加工過濾器係容置於一外殼中；其中，前述微加工過濾器的表面及/或前述外殼的內表面係經氣相沉積法、昇華作用、氣相表面反應、或粒子濺射修飾以產出一均勻之塗層。在許多實施態樣中，前述過濾器的表面及/或前述外殼的內表面的修飾是經由物理氣相沉積法來達成。在許多實施態樣中，前述過濾器的表面及/或前述外殼的內表面的修飾是經由電漿化學氣相沉積法來達成。在許多實施態樣中，前述氣相沉積法係沉積一金屬氮化物或一金屬鹵化物。在許多實施態樣中，前述金屬氮化物為氮化鈦、氮化矽、氮化鋅、氮化銮、及/或氮化硼。在許多實施態樣中，前述過濾器的表面及/或前述外殼的內表面的修飾是經由化學氣相沉積法來達成。在許多實施態樣中，前述化學氣相沉積法係透過一對二甲苯（*parylene*）或其衍生物達成。在許多實施態樣中，前述對二甲苯或其衍生物係選自對二甲苯、對二甲苯-N、對二甲苯-D、對二甲苯 AF-4、對二甲苯 SF、及對二甲苯 HT 所組成之群組。在許多實施態樣中，前述外殼的內表面的修飾是經由聚四氟乙烯（PTFE）來達成。在許多實施態樣中，前述外殼的內表面的修飾是經由非晶特氟隆

(amorphous Teflon) 或特氟隆-AF 來達成。本發明亦提供一濾匣，及一含有前述過濾腔的自動化系統。

本發明的第二面向包括一種自一流體樣本中分離細胞的方法，其包含：a) 配送一流體樣本至前述過濾腔；及 b) 提供前述流體樣本的流體流以通過前述過濾腔；其中，依據前述流體樣本成份的尺寸、形狀、或形變性，前述流體樣本成份流經或被保留於前述過濾器中。在許多實施態樣中，前述方法進一步包含：c) 以一物理作用力操作該流體樣本；其中前述操作係經由一前述過濾器以外的結構、及/或一內建於前述過濾器的結構來達成。在許多實施態樣中，前述物理作用力係選自介電泳力、旅波介電泳力、磁力、聲波力、靜電力、機械力、光輻射力、及熱對流力所組成的群組。在許多實施態樣中，前述介電泳力或前述旅波介電泳力係經由一電極所產生的電場來達成。在許多實施態樣中，前述磁力係經由一強磁性材料所產生的磁場來達成。在許多實施態樣中，前述磁力係經由一微電磁單元所產生的磁場來達成。在許多實施態樣中，前述聲波力係經由一駐波聲場或一旅波聲場來達成。在許多實施態樣中，前述聲波力係經由一壓電材料 (piezoelectric material) 所產生的聲場來達成。在許多實施態樣中，前述聲波力係經由一音圈或一音頻揚聲器來達成。在許多實施態樣中，前述靜電力係經由一直流電場來達成。在許多實施態樣中，前述機械力係為一射流流力 (fluidic flow force)。在許多實施態樣中，前述光輻射力係經由雷射鉗 (laser tweezer) 來達成。在許多實施態樣中，前述過濾步驟係進行於一自動化系統。在許多實施態樣中，前述樣本為血液、滲出液 (effusion)、尿液 (urine)、骨髓樣本、腹水 (ascitic fluid)、骨盆腔積液 (pelvic wash fluid)、肋膜腔積水 (pleural fluid)、脊髓液 (spinal fluid)、淋巴液

(lymph)、血清、黏液、痰、唾液、精液、眼內液(ocular fluid)、
鼻腔抽出液(extract of nasal)、咽喉或生殖道拭子、經分解之
組織的細胞懸浮液(cell suspension from digested tissue)、或排
泄物的萃取液(extract of fecal material)。在許多實施態樣中，
5 前述流體樣本為一血液樣本且經分離的前述細胞為紅血球。在
許多實施態樣中，前述流體樣本為一血液樣本且經分離的前述
細胞為非造血細胞(non-hematopoietic cells)、血液細胞的亞群
(subpopulation)、胎兒紅血球(fetal red blood cells)、幹細胞、
或癌細胞。在許多實施態樣中，前述流體樣本為一滲出液或一
10 尿液樣本且經分離的前述細胞為癌細胞或非造血細胞。

【圖式簡單說明】

第一圖係一上視圖，其顯示本發明示範性實施態樣之微加
工晶片的部份。該暗色區域為該過濾器中經精細製成之狹縫
15 (slots)，其具有 1 cm^2 的過濾區域。

第二圖係本發明示範性實施態樣之微加工過濾器的示意
圖。A) 上視圖，顯示 $18 \times 18\text{ mm}^2$ 的微加工過濾器具有 $10 \times 10\text{ mm}^2$
的過濾區域(1)。B) 該上視圖的部份放大，顯示大小為 4 微
米 \times 50 微米的複數個狹縫(2)及其相互平行的排列，其中每一
20 個狹縫的中央與中央之間的時間距離為 12 微米。C) 該微加工
過濾器的截面圖，顯示該狹縫延伸穿過該過濾器基材。

第三圖顯示本發明示範性實施態樣之微加工過濾器，其於
表面上設置有複數個電極。A) 微加工過濾器的 20 倍基團放大
圖，其具有 2 微米的狹縫寬度。B) 微加工過濾器的 20 倍基
25 團放大圖，其具有 3 微米的狹縫寬度。

第四圖顯示本發明示範性實施態樣之微加工過濾器的孔
洞的截面圖。該孔洞的深度係對應於該過濾器的厚度。Y 代表

該過濾器的表面與一垂直截穿該過濾器之孔洞的一側所夾的直角，而 X 為一錐角，有別於非錐形孔洞，一錐形孔洞穿過該過濾器的角度或方向因為該角度而有所不同。

第五圖顯示本發明示範性實施態樣之過濾單元，其具有一微加工過濾器（3），該微加工過濾器（3）將該過濾腔劃分為一上層的預置腔（antechamber）（4）及一後過濾的子腔室（subchamber）（5）。該單元具有控制流體流入及流出該單元的複數個閥：閥 A（6）控制樣本自注入室（loading reservoir）（10）流出至該過濾單元，閥 B（7）藉由連結一注射泵以控制流體流過該腔，及閥 C（8）係用於將清洗用溶液注入該腔。

第六圖係本發明示範性實施態樣之自動化系統的示意圖，其包含一入口（11）以供添加血液樣本、一過濾腔（12），其包含聲波混合晶片（acoustic mixing chips）（13）及微加工過濾器（103）、一磁捕捉管柱（magnetic capture column）（14），其包含相鄰之磁極（15）、一混合/過濾腔（112）、一磁分離腔（magnetic separation chamber）（16），其包含一電磁晶片（electromagnetic chip）（17）及一用以收集稀少細胞的槽（18）。

第七圖顯示本發明示範性實施態樣之過濾腔的三維透視圖，其具有兩個過濾器（203），該過濾器包含狹縫（202）及具有聲波元件（200）的晶片（該聲波元件可能無法從該晶片的表面上看到，但於此係為了示意的目的而使其顯示出來）。在這個簡易的圖式中，該狹縫的寬度並沒有被顯示出來。

第八圖顯示本發明示範性實施態樣之過濾腔的截面圖，其具有兩個過濾器（303）。此圖式係顯示於過濾完成且磁珠（19）以添加至該含有目標細胞（20）的樣本之後的狀態。該聲波元件係啟動於進行混合的期間。

第九圖顯示本發明示範性實施態樣之自動化系統的一個

特徵的截面圖：磁捕捉管柱 (magnetic capture column) (114)。磁極 (115) 係設置以相鄰於該分離管柱。

第十圖顯示本發明示範性實施態樣之自動化系統的一腔室 (416) 的三維透視圖，其包含多作用力晶片 (multiple force chip) 以自一流體樣本中分離稀少細胞。該腔具有一入口 (429) 即一出口 (430) 以供流體流經該腔室。切離圖 (cut-away view) 顯示該晶片具有一電極層 (427) 及一電磁層 (417) 於另一層上，該電極層 (427) 包含一電極矩陣以供介電泳分離 (dielectrophoretic separation)，且該電磁層 (417) 包含複數個電磁單元 (421)。目標細胞 (420) 係結合於磁珠 (419) 上以便進行電磁捕捉。

第十一圖顯示一照片，其說明當細胞懸浮於一導電度為 0.2 S/m 的介質中時，一 nRBC (Xs) 和一 RBC (圓圈) 之 DEP 圖譜的理論比對結果。

第十二圖顯示針對有核胎兒細胞進行的 FISH 分析，該有核胎兒細胞係以本發明示範性實施態樣之方法所分離，而該 FISH 分析係使用 Y 染色體標記分子，其係用以自母親血液樣本中偵測男性胎兒細胞。

第十三圖呈現自母親血液中富集化有核胎兒紅血球的流程圖。

第十四圖係本發明示範性實施態樣之過濾單元的示意圖。

第十五圖顯示本發明示範性實施態樣之自動化系統的一個模型。

第十六圖顯示本發明示範性實施態樣之自動化系統的過濾程序。A) 顯示該過濾單元具有一注入室 (510) 其係經由一閥 (506) 而連接至一過濾腔。該過濾腔包含一預置腔 (504)，且該預置腔 (504) 與一後過濾子腔室 (505) 之間以一微加工過濾器 (503) 隔開。一清洗幫浦 (526) 經由一閥 (508) 連

結至該底層的腔室以供汲送清洗緩衝液（524）通過該底層的子腔室。另一閥（507）則連至另一個負壓幫浦，該負壓幫浦係用於加強流體流通該過濾腔及流出一流出管（exit conduit）（530）。一收集槽（518）可反向地容置該上層腔室（504）中的內容物。B）顯示一血液樣本（525）導入該注入室（510）。C）開啟閥（507），其係連結至一負壓幫浦以加強流體流通該過濾腔。D）及 E）顯示該血液樣本被過濾通過該腔室。F）導入通過注入室的清洗緩衝液被過濾通過該腔室。G）當該注入室閥（506）關閉時，開啟閥（508），接著清洗緩衝液自清洗幫浦（526）被汲送至該底層腔室。H）關閉該過濾閥（507）及清洗幫浦的閥（508）。I）及 J）將該腔室旋轉 90 度。K）顯示該收集槽（518）容置該預置腔（504）的內容物，於此，清洗幫浦（526）產生的流體促使保留於預置腔中的稀少目標細胞（520）流入收集槽（518）中。

第十七圖顯示，經由微過濾而富集化之後，在未標示之血液細胞中經螢光標示的乳癌細胞。A）經過濾之血液樣本的相位差顯微鏡影像。B）與 A 圖同樣視野下的螢光顯微鏡影像。

第十八圖顯示兩個本發明示範性實施態樣之介電泳晶片。A）具有叉指型電極（interdigitated electrode geometry）的晶片；B）具有齒型電極（castellated electrode geometry）的晶片。

第十九圖顯示本發明示範性實施態樣之分離腔，其包含一介電泳晶片。A）該腔的截面圖；B）上視圖以顯示該晶片。

第二十圖係一圖式以呈現 MDA231 癌細胞（實線）、T 淋巴球（虛線）、及紅血球（短虛線）的 DEP 圖譜的理論上比對，其中該些細胞係懸浮於導電度 10 mS/m 的介質中。

第二十一圖顯示來自於一血液樣本（a spiked blood sample）的乳癌細胞，其係被留置於一示範性介電泳晶片的電

極中。

第二十二圖顯示來自於一血液樣本的白血球，其係被留置於一示範性介電泳晶片的電極中。

5 第二十三圖係本發明示範性實施態樣之自動化系統的過濾單元的概要示意圖。該過濾單元具有一經由一閥 A (606) 而連接至一過濾腔的注入室 (610)，該過濾腔包含一預置腔 (604)，該預置腔 (604) 與一後過濾子腔室 (605) 之間以一微加工過濾器 (603) 隔開。一吸引式幫浦可經由管路連結至該廢物口 (634)，該廢物口 (634) 為經過濾之樣本離開該腔的位置。一側開口 (632) 可用於連結一注射幫浦以汲送該清洗緩衝液通過底層子腔室 (605)。在過濾程序後，該過濾腔包括繪製於圖式之圓圈中的該預置腔 (604)、後過濾子腔室 (605)、過濾器 (603) 及側開口 (632)，且可於該過濾單元的該框架 (636) 中旋轉，而因此將該預置腔中富集化的細胞
10 透過收集口 (635) 而收集。
15

第二十四圖係一反應流程圖，其顯示自一血液樣本中進行胎兒細胞的富集化的整體過程，及該血液樣本之第二次清洗程序所得之懸浮液 (標示為懸浮液 (W2) 的方塊) 與過濾步驟後保留之細胞 (標示為經富集化之細胞的方塊) 中經富集化之胎兒細胞的存在。該反應流程圖顯示，自左上方至右下方，血球細胞歷經多個處理步驟：兩個清洗程序 (W1 及 W2)、選擇性沉澱紅血球及使用組合溶劑 (AVIPrep + AVIBeads + Antibodies) 以移除白血球、過濾沉澱作用後所得的懸浮液、及收集富集化的胎兒細胞。該反應流程圖顯示，在處理程序的過
20 程中各種樣本成份中所含有核細胞的富集化程度，及經 FISH 分析的樣本成份。
25

第二十五圖顯示一本發明所述之過濾濾匣 (右) 的圖片及其與習用碟型注射器過濾器 (左) 的比較，並顯示一微加工矽

過濾器的上視圖；其中暗色的狹縫為該過濾器的”孔洞”(a)，如美國專利第 6,949,355 號中描述的；及一過濾匣結構的草圖(b)。

5 第二十六圖顯示自全血中分離之白血球的點狀圖，該全血係經溶解不清洗(Lyse No Wash)、溶解清洗(Lyse Wash)、及過濾等程序(自最上列至最下列)。P1 為 Trucount™ 之技術微珠群，而 P2 為標記 CD45+細胞的白血球群體(gated on CD45+ cells)。

10 第二十七圖顯示數個點狀圖，其分別為經 Multitest™ 試劑染色且經溶解不清洗(Lyse No Wash; LNW)、溶解清洗(Lyse Wash; LW)、及過濾等程序處理的血液(a)；及比較總白血球、主要白血球群體、及主要淋巴球亞群經 LNW、LW、及過濾程序後的細胞回收度(cell recovery)。CD45+細胞、淋巴球、顆粒球、單核球的回收度係基於 ABX 血液分析儀(n=30)所得到的細胞計數資料，而 T 細胞、自然殺手細胞及 B 細胞的回收度則係與 LNW 樣本所得結果比較(n=15)。

15 第二十八圖顯示經存活試驗套組(Viability kit)之試劑染色的全血的點狀圖(a)，左邊的圖式是經氯化銨(ammonium chloride)溶解之全血的實驗結果，及右邊的圖式是經過過濾回收之細胞的實驗結果；及經 FITC Annexin V 細胞凋亡檢測套組之試劑染色的經過過濾回收之細胞的點狀圖(b)，左邊的圖式是在採集後一個小時內過濾的血液的實驗結果，及右邊的圖式是在採集後八個小時才過濾的血液的實驗結果。

第二十九圖顯示一濾匣的示範性實施態樣。

25 第三十圖顯示經氯化銨溶解後細胞的存活率。

第三十一圖顯示細胞於過濾後的存活率。

第三十二圖顯示一示範性的過濾程序。在這個示範性實施態樣的過濾程序中，具有兩個注射幫浦，其中一個設於右邊，

另一個設置於底部。自底部的注射幫浦抽吸將自動地形成推力，而較快地使血液汲送通過該過濾器。完成過濾之後，可關閉於底部之注射幫浦的抽吸，而該有核細胞將自該過濾器被回推，該過濾器於此時已被反置以直接將該細胞送至一細胞計數管（cytometry tube）（如同步驟 6 中所示者，但將該注射幫浦替換成一細胞計數管）。

【實施方式】

定義

10 除非特別定義，否則所有於此所用的技術及科學名詞皆具有發明所屬領域中具有通常知識者所習知的意涵。所有於此提及的專利、專利申請案、公開申請案、及其他公開文獻皆以其全文合併於此做為參考文獻。若於此章節中所用定義與本文所參考之專利、專利申請案、公開申請案、及其他公開文獻中所載定有所矛盾或不一致，則應以此章節中所用之定義為準。

一樣本的「成份（component）」或「樣本成份（sample component）」係指一樣本的任一組成，及可以是一離子、分子、化合物、分子複合物、胞器、病毒、細胞、聚集體、或任何型態的粒子，包括膠態、凝聚態、顆粒、結晶體、礦物體等。

20 一樣本的基團可為對於該樣本的基質、加入該樣本的緩衝液、或該樣本溶液是可溶性或不可溶性者。一樣本的基團可為氣態、液態、或固態。一樣本的基團成份可為一基團（moiety）或並非基團（moiety）。

一「基團（moiety）」或「目標基團（moiety of interest）」係指任何欲操作的物件。一「基團（moiety）」可以為一固體，包括一懸浮狀態下的固體，或可以為處於一溶解狀態。一「基團（moiety）」可以為一分子。可被操作的分子包括，但不限於：

無機分子（包括，離子及無機化合物）、或可以為有機分子（包括胺基酸、胜肽、蛋白質、醣蛋白、脂蛋白、醣脂蛋白、脂質、脂肪、固醇、糖、碳水化合物、核酸分子、小有機分子、或複合有機分子。一「基團（moiety）」也可以為一分子複合物，其
5 可以是一胞器、可以是一或多個細胞（包括原核及真核細胞）、或可以是一或多個致病因子（etiological agents）（包括，病毒、寄生蟲、或病毒性蛋白顆粒、或其基團）。一「基團（moiety）」也可以為一結晶體、礦物、膠體、片段、微胞、液滴、泡沫、或其類似物，及可包含一或多個無機材料，例如，聚合物材料、
10 金屬、礦物質、玻璃、陶瓷、及其類似物。「基團（moiety）」亦可以為分子、複合物、細胞、胞器、病毒、致病因子、結晶體、膠體、或片段的聚集體。細胞可以是任何細胞，包括原核及真核細胞。真核細胞可以是任何種類。特別有興趣的細胞例如但不限於：白血球、惡性腫瘤細胞（malignant cell）、幹細胞、前驅細胞、胎兒細胞、及經致病因子感染的細胞、及細菌。「基團（moiety）」亦可以為人造粒子，例如，聚苯乙烯微粒（polystyrene microbeads）、其他聚合性組合物之微粒、磁性微粒、及碳微粒。

於本文中所述「操作」，係指移動或處理該基團（moiety），
20 而形成該基團（moiety）在單一腔室中或在單一晶片上、或在多個晶片及/或腔室之間的一維、二維、或三維的位移。經本發明方法操作後之基團（moiety）可選擇性地與鍵結分子（binding partner；例如，微粒子）連結。該操作方法的例子例如，但不限於：運送、捕捉、集中、富集化、濃縮、凝聚、捕集、推斥、
25 磁浮（levitation）、分離、純化、線性或其他方向之移動該基團。為了有效地操作該基團以與該鍵結分子連結，該鍵結分子與所用方法中採用的物理作用力必須可以相互配合。舉例來說，具

有磁性的鍵結分子應配合磁力來使用。依此邏輯，具特定介電特性的鍵結分子（例如，塑膠顆粒、聚苯乙烯微粒）則應配合使用介電泳力。

5 「鍵結分子（binding partner）」係指任何可以相當之親和力或專一性連結於該基團（moieties），且可經所用物理作用力操作的物質。該鍵結分子的例子包括，但不限於：細胞、細胞胞器、病毒、微粒、或其聚集體、或其複合物、或分子的聚集體或複合物。

10 「連結（Coupled）」係指鍵結（bound、binding）。舉例來說，一基團可以藉由專一或非專一性的鍵結而連結至一微顆粒。如前所述，該鍵結可為共價鍵結或非共價鍵結、可逆鍵結或不可逆鍵結。

15 於本文中描述「欲進行操作的該基團係實質上連結至該鍵結分子的表面」意指，一比例之欲進行操作的該基團係連結至該鍵結分子的表面，且可媒介一合適的物理作用力，並經由操作該鍵結分子來操作該基團。通常而言，該欲進行操作的該基團的至少 0.1%係連結至該鍵結分子的表面。較佳地，該欲進行操作的該基團的至少 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或 90%係連結至該鍵結分子的表面。

20 於本文中描述「欲進行操作的該基團係完全地連結至該鍵結分子的表面」意指，該欲進行操作的該基團的至少 90%係連結至該鍵結分子的表面。較佳地，該欲進行操作的該基團的至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或 100%係連結至該鍵結分子的表面。

25 「專一性鍵結分子（specific binding member）」係指一對分子中的一個，其係於其表面或其凹部中具有一專一性鍵結至一

具特定空間或化學性質組合的另一個分子的區域，因而定義為與該具特定空間或化學性質組合的另一個分子互補。一專一性鍵結分子可為一免疫性配對關係中的一個成員，該免疫性配對關係例如：抗原-抗體、或抗體-抗體，其可為生物素-抗生物素蛋白、生物素-卵白素、或生物素-中性卵白素、受質-受器、核酸二聚體 (nucleic acid duplexes)、IgG-蛋白質 A、DNA-DNA、DNA-RNA、RNA-RNA、及其相似物。

5

10

一「抗體」係為一免疫球蛋白分子，且可以例如，但不限於是，IgG、IgM、或其他種類的免疫球蛋白分子。文中所指「抗體」亦可代表一抗體分子中具有該抗體之鍵結專一度的基團（例如，單鏈抗體、或 Fab 片段）。

15

20

一「核酸分子」係為一聚核苷酸。一核酸分子可為 DNA、RNA、或其組合。一核酸分子亦可包括不同於結合至骨架中的核糖及去氧核糖的糖，而因此為 DNA 或 RNA 以外的分子。一核酸分子可包含存在於自然界或不存在於自然界中的核酸基 (nucleobases)；該不存在於自然界中的核酸基例如：黃嘌呤 (xanthine)、核酸基的衍生物（例如 2-胺腺嘌呤 (2-aminoadenine)）、及其相似物。本發明所述之核酸分子可具有不同於磷酸二酯鍵的鍵結 (linkages)。本發明所述之核酸分子可為一胜肽核酸分子，其結構中的核酸基係連結至一胜肽骨架。一核酸分子可為任何長度、且可為單股、雙股、三股、或其組合。

25

「同相操作 (Homogeneous manipulation)」係指使用物理作用力操作一混合物中的複數個粒子，而該混合物中的該些粒子對於所施予的該作用力有相同的反應。

「選擇性操作 (Selective manipulation)」係指使用物理作

用力操作一混合物中的複數個粒子，而該混合物中不同的粒子對於所施予的該作用力有不同的反應。

「流體樣本 (fluid sample)」為任何其中含有欲分離或分析之成份的流體。樣本可來自於任何來源，例如，一生物體、
5 同種或不同種之生物群體、環境（例如，水源或土壤）、或食物來源、或工業來源。樣本可為氣體、液體、或半固體，且可以為溶液或懸浮液。樣本可為一萃取物，舉例來說，一來自土壤或食物樣本的萃取液、一來自咽喉或生殖道拭子的萃取物、或來自胎兒樣本的萃取物、或一個體之內部區域的清洗液。

10 於此所述之「血液樣本」可為經處理或未經處理之血液樣本，即，可以是經離心、過濾、萃取、或以其他方式處理過的血液樣本，包括已添加一過多種試劑（例如，但不限於：抗凝血劑或安定劑）的血液樣本。血液樣本的一個例子是一膚色血球層 (buffy coat)，其係經由處理人類血液以富集化白血球而獲得。
15 血液樣本的另一個例子是經「清洗」而去除其中血漿成份的血液樣本，其係藉由離心該樣本為細胞團 (pellet cells)、去除上澄清液之血漿、及使該些細胞重新懸浮於一溶液或緩衝液中而獲得。其他血液樣本包括臍帶血樣本、骨髓抽出物 (bone marrow aspirate)、內出血 (internal blood)、或周邊血液。一血液樣本可為任何體積，且可來自於任何個體，如動物或是人類。
20 一較佳態樣中，該個體為人類。

「稀少細胞 (rare cell)」係指一細胞，其具有以下兩者之一的特徵：1) 該種細胞佔一流體樣本中整體有核細胞群體的小於 1%，或 2) 該種細胞於每一毫升之流體樣本中的含量為小
25 於一百萬個細胞。「目標稀少細胞 (rare cell of interest)」係指欲對其進行富集化的細胞。

「白血球 (white blood cell)」或「WBC」係指白血球 (leukocyte) 或指存在於動物或人類血液中非屬紅血球或血小板的血源 (hematopoietic lineage) 細胞。白血球可包括自然殺手細胞 (nature killer cells “NK cells”) 及淋巴球 (如, B 淋巴球或 T 淋巴球)。白血球亦可包括吞噬細胞, 如, 單核球、巨噬細胞、及顆粒球 (包括, 嗜鹼性白血球、嗜酸性白血球、及嗜中性白血球)。白血球亦可包含肥大細胞 (mast cell)。

「紅血球 (red blood cell)」或「RBC」係指紅血球 (erythrocyte)。除非文中特別指明為「有核紅血球 (nucleated red blood cell” “nRBC”)」或「胎兒有核紅血球 (fetal nucleated red blood cell)」, 否則文中所指紅血球係為無核紅血球。

「瘤細胞 (Neoplastic cells)」或「腫瘤細胞 (tumor cells)」係指一種異常的細胞, 其具有不受控制的增生狀態且在誘發新生的刺激源移除之後仍會持續的增生。瘤細胞傾向表現出基團或完全喪失正常組織所具有的結構組成或功能上的協調度, 且可為良性或是惡性者。

「惡性細胞 (malignant cell)」係指具有區域性地侵入行為、破壞性的增生狀態及轉移之特性的細胞。「惡性細胞」的例子包括, 但不限於在各種體液 (包括, 血液、骨髓、腹水、糞便、尿液、支氣管灌洗液等) 中的血癌細胞、淋巴癌細胞、實體腫瘤之癌細胞、轉移之實體腫瘤細胞 (例如, 乳癌細胞、前列腺癌細胞、肺癌細胞、大腸癌細胞)。

「癌化細胞 (cancerous cell)」係指一種細胞, 其表現出無法調節之生長狀態, 且在多數案例中為喪失至少一個其分化特性, 例如, 但不限於: 特化之細胞外型、不具移動能力、細胞-細胞交互作用、及細胞訊息傳遞行為、蛋白質表現、及分泌型

態等。

「癌症 (cancer)」係指一種通常會造成個體死亡的腫瘤疾病。癌細胞，與良性腫瘤細胞不同的是，其會表現出侵入及轉移的特性，且具有高度的退化性變化 (anaplastic)。癌細胞包括兩種主要的分類：上皮細胞癌 (carcinoma) 及肉癌 (sarcoma)。

「幹細胞」係指一種未分化的細胞，其經過一或多個細胞分裂的循環後，可形成至少一種分化的細胞型態。

「前驅細胞 (progenitor cell)」係指一種具有分化的特定性但尚未分化的細胞 (committed but undifferentiated cell)，其經過一或多個細胞分裂的循環後，可形成至少一種分化的細胞型態。通常而言，一幹細胞在因應一特定的刺激或特定的多種刺激，且經過一或多個細胞分裂的循環後，會形成一前驅細胞；而一前驅細胞在因應一特定的刺激或特定的多種刺激後會形成一或多種分化的細胞型態。

「致病因子 (etiological agent)」係指任何因果因子，例如可以感染一個體的細菌、真菌、原生生物、病毒、寄生蟲、或病毒性蛋白顆粒。致病因子可以造成該受感染之個體產生症狀或疾病狀態。人類致病因子係指可以感染人類個體的致病因子。這些人類致病因子可能對人類具有專一性，即為專一性之人類致病因子 (specific human etiological agent)，或是可以感染多種物種，即為非專一性之人類致病因子 (promiscuous human etiological agent)。

「個體」泛指任何生物體，例如動物或人類。動物可包括任何動物，例如野生動物、寵物 (例如狗或貓)、農畜動物 (例如豬或牛)、或供娛樂的動物 (pleasure animal；例如馬)。

「腔/腔室 (chamber)」係指一個可以容納流體樣本的結構，於其中可進行至少一個處理步驟。該腔可具有各種規格且其具有 10 微升至 0.5 公升之不同的容積。

5 「過濾腔 (filtration chamber)」係指一個流體樣本可於其中被過濾的腔。

過濾器等係指一結構，其包含有一個或多個特定尺寸（其可界於特定範圍之中）的孔洞或狹縫，且基於樣本成份的尺寸、形狀、及/或形變性使某些樣本之成份得以自該過濾器的一側通過至另一側，而另一些成份則不能通過。過濾器可以由各種合適的材質（例如，金屬、陶瓷、玻璃、矽、塑膠、聚合物、纖維（例如紙或織物）等）來製作以阻止不可溶成份通過。

10 「過濾單元 (filtration unit)」係指一過濾腔及與其相連之用於將樣本或溶液導入該過濾腔及使樣本成份移出該過濾腔之入口 (inlet)、筏、及導管。一過濾單元較佳地也包含一注入室 (loading reservoir)。

15 「濾匣」係指一結構，其包含至少一腔室（其係屬於一手動或自動化系統的基團）及一個或多個導管以輸送流體進入或離開該至少一腔室。濾匣可包含或不包含一或多個晶片。

20 文中所述「用於自一流體樣本中分離稀少細胞的自動化系統」或「自動化系統」係指一裝置，其包含至少一個過濾腔、用於導送流體流過該過濾腔的自動化設備、及至少一動力以產生流體流且較佳地提供一訊號源以於主動式晶片 (active chip) 上產生作用力。本發明之自動化系統較佳地可包括一或多個主動式晶片、分離腔、分離管柱、或永久磁鐵。

25 「開口 (port)」係指一腔室之外殼中的開口，以供流體樣本進入或離開該腔室。一開口可以為任何尺寸，但較佳的形

狀及大小是有利於透過導管汲送流體的方式或藉由使用吸量管 (pipette)、注射器、或其他用於給送或輸送樣本的方法將樣本給送進入一腔室者。

5 「入口 (inlet)」係指供樣本、溶劑、緩衝液、或試劑進入一流體腔的進入點。入口可為一腔室的口，或可為一導管中的開口而可直接或間接連通至一自動化系統的腔室。

10 「出口 (outlet)」係指一開口，以供樣本、樣本成份、或藥劑於此離開一流體腔。離開腔室的該樣本成份及藥劑可能是廢物，即，於將不再被利用於後續階段的樣本成份，或可能是將被回收的樣本成份或藥劑，例如，可重複使用的藥劑或將於後續分析及操作的目標細胞。一出口可以為一腔室的口，但較佳地是一導管的開口以直接或間接地自一自動化系統的腔室連通。

15 「導管 (conduit)」係指用以將流體自一容器輸送到一本發明所述之腔室中的手段。較佳地，一導管係直接或間接與一腔室之外殼的開口接合。一導管可為任何材質以供一流體於其中輸送。導管可包含管，例如，橡膠管、特氟隆管、或泰貢管 (tygon)。導管亦可係模製自聚合物或塑膠、或經鑽、蝕刻、或機械加工至一金屬、玻璃、或陶瓷基材中。導管因此可整合
20 進結構中，例如，本發明之濾匣。導管可為任何尺寸，但較佳地其內徑 (internal diameter) 係界於 10 微米至 5 毫米的範圍內。導管較佳地是封閉的 (除了流體的進入及離開的位置)，或其上表面是開放的，如同一水道式導管。

25 「晶片 (chip)」係一實體基材，其上可進行一或多種程序，例如：物理性的、化學性的、生化性的、生物性的、生物物理性的程序；或是一實體基材，其包含或乘載一或多個作用力產

生元件 (force-generating element) 以產生一或多種物理性、化學性、生化性、生物性、或生物物理性的程序。這些程序可以是分析法 (assay)，包括生化、細胞、及化學分析；分離程序，包括由電性、磁性、物理性、及化學 (包括生化) 性的作用力或交互作用來進行的分離程序；或化學反應、酵素反應、及鍵結交互作用 (包括捕捉)。微結構 (micro structures) 或微尺度結構 (micro-scale structures) 例如，管道 (channel)、井 (well)、塊狀物 (brick)、屏障物 (dam)、過濾器、電極元件、電磁元件、或聲波元件可被設置於該基材中或製作於該基材上以供協助晶片上的物理、生物物理、生物、生化、化學反應或程序。該晶片可以是在一維度中是薄型的，且可在其他維度中具有各種形狀，舉例來說，矩形、圓圈、橢圓、或其他不規則形狀。本發明之晶片的主要表面的尺寸可具有相當的變化，例如，自約 1 mm^2 至約 0.25 m^2 。較佳地，該晶片的尺寸是自約 4 mm^2 至約 25 cm^2 且其一特定維度是自約 1 mm 至約 5 cm 。該晶片的表面可以是平整的或非平整的。具有非平整表面的該晶片可包括建置於該表面上的管道或牆。一晶片可以具有一或多個開口，例如孔洞或狹縫。

「主動式晶片 (active chip)」係指一晶片，其包含建置於該晶片上或於其上的微尺度結構，其當經外動力源供給能量後，可產生至少一種物理作用力以執行一處理步驟或工作或分析步驟或工作，例如，但不限於：混合、改變位置、集中、分離、濃縮、捕捉、純化、或富集化。

主動式晶片利用所施予的物理作用力 (applied physical forces) 來促進、加強、或協助所欲進行的生化反應或處理步驟或工作或分析步驟或工作。在一主動式晶片上，所謂「所施予的物理作用力 (applied physical forces)」係指一物理作用力，

其係於當一外源於該主動式晶片的動力源供給一能量時，由建置在該晶片之中或其上之微尺度結構所產生者。

「微尺度結構 (Micro-scale structures)」係指併入或貼附於一晶片、晶圓、或腔室的結構，其具有自約 0.1 微米至約 20 毫米之特定微度尺寸以用於微流體應用(that have characteristic dimensions of scale for use in microfluidic applications ranging from about 0.1 micron to about 20 mm)。適用於本發明之晶片上的微尺度結構的例子有：牆、管道、屏障物 (dam)、塊狀物 (brick)、過濾器、支架 (scaffold)、電極、電磁單元、聲波元件、或微加工幫浦或閥。發明名稱為「Apparatuses Containing Multiple Active Force Generating Elements and Uses Thereof」且申請於西元 2000 年 10 月 4 日的美國專利第 09/679,024 號 (代理人編號為 471842000400) 記載了多種微尺度結構，此專利係以其全文併入於此做為參考文獻。當供給能量，例如電力訊號時，微尺度結構可以本發明所需的產出物理作用力，因而可稱作「物理作用力產生元件」、「物理作用力元件 (physical force elements)」、「主動作用力元件 (active force elements)」、或「主動元件 (active elements)」。

發明名稱為「Apparatuses Containing Multiple Active Force Generating Elements and Uses Thereof」且申請於西元 2000 年 10 月 4 日的美國專利申請案第 09/679,024 號 (代理人編號為 471842000400) 記載了多種微尺度結構，此專利係以其全文併入於此做為參考文獻。當供給能量，例如電力訊號時，微尺度結構可以產出本發明所需的物理作用力，因而可稱作「物理作用力產生元件」、「物理作用力元件 (physical force elements)」、「主動作用力元件 (active force elements)」、或「主動元件 (active elements)」。

「多作用力晶片 (multiple force chip 或 multiforce chip)」係指產生複數個物理力場的晶片，其具有至少兩種內建結構而其分別在組合外源動力源之下可以產出一種物理場。多作用力晶片的完整描述係如美國專利申請案第 09/679,024 號案 (代理人編號為 471842000400；發明名稱：Apparatuses Containing Multiple Active Force Generating Elements and Uses Thereof；申請於西元 2000 年 10 月 4 日) 中所載，其全文係合併於此做為參考文獻。

「聲波力」為藉由聲波場而直接或間接施予基團 (moiety，例如，顆粒及/或分子) 的力。聲波力可以用於操作流體中的粒子 (如，捕捉、移動、導向、處理)。聲波，即，駐聲波 (standing acoustic wave) 及旅聲波 (traveling acoustic wave)，皆可直接對基團施予作用力，且該作用力稱作「聲輻射力 (acoustic radiation forces)」。聲波也可以施予作用力於該基團被放置、懸浮、或溶解的流體介質上而形成所謂的聲波流 (acoustic streaming)。該聲波流接著會施予作用力於放置、懸浮、或溶解於該流體介質中的基團。在這樣的情況下，該聲波場即間接地對該基團施予作用力。

「聲波元件」係因應一動力訊號而可產生一聲波場的結構。較佳的聲波元件是因應一施予之交流電壓而可以產生震動 (機械) 能的壓電式轉換器 (piezoelectric transducer)。該震動能可以被傳送至鄰近於該轉換器的流體，而使得聲波力被施予於該流體中的粒子 (例如，細胞)。美國專利申請案第 09/679,024 號案 (申請於西元 2000 年 10 月 4 日) 中載有關於聲波力及聲波元件的描述，該文獻全文係併入於此做為參考文獻。

「壓電式轉換器 (piezoelectric transducer)」係為可以因應一電子訊號而產生聲場的結構。該壓電式轉換器的例子例如，

但不限於：於其兩個表面上皆覆蓋有金屬薄膜電極的陶瓷盤（例如，鈦酸鉛銻（PZT；Lead Zirconium Titanate）、壓電薄膜（piezoelectric thin film）（例如，氧化鋅）。

5 文中所述「混合（mixing）」意指藉助物理作用力使一樣本、溶液、或混合物中的粒子移動，而因此使得該樣本、溶液、或混合物中的成份變得分散。本發明中較佳的用於混合的方法包括使用聲波力。

10 「處理（processing）」意指準備樣本以供分析，且可包含一或多個步驟及作業。一般而言，一個處理作業係指分離一樣本中的成份、濃縮一樣本中的成份、至少部份地純化一樣本中的成份、或結構上地改變一樣本中的成份（例如，溶解（lysis）或變性）。

15 文中所述「分離（isolating）」意指將欲取得的樣本成份與不欲取得的樣本成份分離，因此原樣本中，較佳地至少 15%，或更佳地至少 30%，再更佳地至少 50%，又更佳地至少 80%之欲取得的樣本成份係被保留；而在最後處理後，初始成份中，較佳地至少 50%，更佳地至少 80%，再更佳地至少 95%，又更佳地至少 99%的至少一種不欲取得的成份係被移除。

20 「富集化（enrich）」意指增加一樣本中一樣本成份相對於其他樣本成份的濃度（其可以是降低其他樣本成份後的結果），或增加一樣本中一樣本成份的濃度。舉例來說，如文中所述，自一血液樣本中「富集化」有核胎兒細胞意指增加有核胎兒細胞佔該血液樣本中總細胞數的比例，自一血液樣本中富
25 集化癌細胞可意指增加癌細胞於該樣本中的濃度（例如，藉由降低樣本的體積）或降低該血液樣本中其他細胞成份的濃度、

及自一尿液樣本中「富集化」癌細胞可意指增加其於該樣本中的濃度。

「分開 (separation)」係指一程序，其係使一樣本中的一或多個成份在空間上與該樣本中其他一或多個成份分離。可進行一分開程序以使得一或多個目標樣本成份被改變位置 (translocated) 至或保留於一分開設備中的一個或多個區域，並且，至少部分之其他成份被改變位置以離開那些目標樣本成份被改變位置的區域或那些目標樣本成份被改變及/或被保留的區域，或一或多個樣本成份係被保留於一或多個區域，而至少部分之其他的成份則被自該區域移除。從另一個角度來看，一樣本中的一或多個樣本成份係被改變位置至或被保留於一或多個區域，而一或多個成份則被自該區域移除。也有可能是使一或多個樣本成份被改變位置至一或多個區域而一或多個目標要本成份或一樣本的一或多個成份則被改變位置至一或多個其他區域。分開程序可藉由，例如，過濾、或使用物理性、化學性、電性、或磁性作用力。可用於進行分離的作用力的例子係，但不限於：重力、質量流 (mass flow)、介電泳力、旅波介電泳力、及電磁力。

「自一 (流體) 樣本中分離一樣本成份」意指，使一樣本成份與初始樣本中其他成份或與經過一次或多次處理步驟而保留於該樣本中的成份分離。「自一 (流體) 樣本中去除一樣本成份」意指，自初始樣本中其他成份或自經過一次或多次處理步驟而保留於該樣本中的成份中去除一樣本成份。

「捕捉 (capture)」係為一種形式的分離，其中，一或多個基團或樣本成份係被保留於一表面、腔室、晶片、管、或任何裝有一樣本的容器的一或多個區域，而該樣本的其他部分則被自該區域移除。

「分析法 (assay)」係指針對一樣本或一樣本的成份所進行的測試。一分析法可測試一成份的存在與否、一成份的含量或濃度、一成份的組成、一成份的活性等。可與本發明之組合物及方法併同使用的分析法包括，但不限於：細胞免疫染色法 (immunocytochemical assay)、休止期 FISH 分析法 (interphase FISH; fluorescence in situ hybridization; 螢光原位雜合反應)、核型分析 (karyotyping)、免疫分析法 (immunological assay)、生化分析、鍵結分析 (binding assay)、細胞分析、基因分析、基因表現分析、蛋白質表現分析。

「鍵結分析 (binding assay)」係指一種分析法，其係藉由偵測一待測定物與一專一性鍵結分子的鍵結以測試該待測定物的存在與否或其濃度，或測試一待測定物與另一待測定物鍵結的能力，或測試一待測定物與另一待測定物的鍵結親和力。待測定物可以是有機或無機分子、一分子複合物其包含有機分子、無機分子、或有機及無機分子的組合、胞器、病毒、或細胞。鍵結分析可使用可偵測的標記物或訊號產生系統以在存在有被鍵結之待鑑定物時產生可偵測的訊號。標準鍵結分析 (standard binding assay) 包括：憑藉核酸之雜合反應以偵測特定核酸序列的方法、憑藉抗體與待測定物地鍵結的方法、及憑藉受質鍵結至受器的方法。

「生化分析 (biochemical assay)」係指一種用於測試一樣本中一個或多個成份之存在、濃度、或活性的分析法。

「細胞分析 (cellular assay)」係指一種用於測試細胞反應 (cellular process) 的分析法，其例如，但不限於：代謝活性、酵解活性 (catabolic activity)、離子通道活性、細胞訊息傳遞活性 (intracellular signaling activity)、受器連結訊號傳遞活性 (receptor-linked signaling activity)、轉錄活性、轉譯活性、或

分泌活性。

「基因分析 (genetic assay)」係指一種用於測試一遺傳物質的存在或其序列的分析法，其中，一遺傳物質可以是 DNA 或 RNA 分子的任一片段，包括，但不限於：基因、重複單元、轉位子、調控子、端粒、中心體、或未知功能的 DNA 或 RNA。基因分析的例子可為，但不限於：基因表現分析、OCR 分析、核型分析 (karyotyping)、或 FISH。基因分析可使用核酸雜合技術，可包含核酸定序反應、或可使用一個或多個酵素如聚合酶，以使用於例如藉助 PCR 來進行的基因分析。基因分析可使用一個或多個可偵測的標記物，例如，但不限於：螢光染料 (fluorochrome)、放射性同位素 (radioisotope)、或訊號產生系統。

「免疫染色 (Immunostaining)」係指，以任何一種方法，使特定抗原或結構經複合有特定抗體之染劑 (或染劑產生系統) 染色。

聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction 或 PCR) 係指用於放大特定核苷酸序列 (增幅體; amplicon) 的方法。PCR 係憑藉核酸聚合酶的活性來延伸於一模板上之引子以取得一增幅體; 較佳地, 該核酸聚合酶係具熱穩定特性者 (thermostable)。RT-PCR 係指一種 PCR 反應, 其係以自 mRNA 反轉錄而得的模板 (cDNA) 來進行, 其中該 mRNA 係自一樣本製得。定量反轉錄 PCR (qRT-PCR) 或即時定量 RT-PCR 係指一種 RT-PCR 反應, 其中每一個反應循環的 RT-PCR 產物皆被定量。

「螢光原位雜合反應 (FISH 或 fluorescence in situ hybridization)」係指一種分析法, 其中一基因標記分子可藉由

雜合反應被定位至一染色體。一般來說，進行 FISH 需要將一經螢光標定的核酸探針與一備於玻片上之休止期（interphase）的染色體雜合。一雜合探針的存在及其位置可於螢光顯微鏡下察知。該探針也可以包括一酵素且可與一螢光酵素基質一同使用。

「核型分析（karyotyping）」係指染色體分析，其包括每一型態之染色體的存在與數量（例如，每一個單倍人類染色體的 24 個染色體（染色體 1-22、X 及 Y））及染色體存在之外型上的異常，例如位置變化或刪除。核型分析（karyotyping）通常涵蓋使一處於細胞分裂中期之細胞的染色體顯示出來，該些染色體可以藉由，例如但不限於，染色或使用得以辨識特定染色體的基因探針來顯現。

「基因表現分析（gene expression assay）（或稱，基因表現型分析「gene expression profiling assay」）」係指一種用於測試一或多種基因表現產物（即，訊息 RNAs）的存在或表現量的分析法。該一或多種 mRNAs 可以於一樣本中之目標細胞中同步被分析。基於不同的應用，於該基因表現分析中被分析之 mRNA 分子的數量及/或種類也可能不同。

「蛋白質表現分析（protein expression assay）（或稱，蛋白質表現型分析「protein expression profiling assay」）」係指一種用於測試一或多種蛋白質的存在或表現量的分析法。該一或多種蛋白質可以於一樣本中之目標細胞中同步被分析。基於不同的應用，於該基因表現分析中被分析之蛋白質的數量及/或種類也可能不同。

「組織學檢查（Histological examination）」係指，使用可以測定細胞種類、細胞的特定標記分子的表現量、或可以顯示

細胞的結構特徵（例如細胞核、細胞骨架等）或細胞的狀態或功能之組織化學法或染劑或特定的鍵結分子來檢查細胞。原則上來說，細胞可以準備於玻片上並直接或間接以連結有可偵測之標記物的染劑或特定鍵結分子來染色，以供進行組織學檢查。可使用於組織學檢查的染劑的例子為核染劑（nuclear stain，例如：Hoechst 染劑）、或細胞存活率染劑（例如：剛果藍（Trypan blue））、細胞結構染劑（例如：Wright 染劑或 Giemsa 染劑）、酵素活性之聯苯胺以供與 HRP 形成視野可見的沉澱。可使用於胎兒紅血球之組織學檢查的特定鍵結分子的例子為：專一性辨認胎兒或胚胎血紅素的抗體。

「電極」係指由高導電度材料製得的結構。高導電度材料係指其導電度高於周圍結構或材料者。合適之高導電度材料包括金屬，例如金、鉻、鉑、鋁、及其相似物；也可包括非金屬，例如碳及導電性聚合物。電極可以是任何形狀，例如矩形、圓形、齒型等。電極亦可包含摻雜半導體（doped semi-conductor），其係混雜有少量之其他「不純」材料的半導體材料。舉例來說，磷摻雜矽（phosphorous-doped silicon）可用於作為形成電極的導電材料。

「井（well）」係一晶片中的一種結構，其具有一底面，該底面的至少兩側被至少一或多個牆包圍，而該牆係自該井或管道之底面延伸。該牆可自一井或管道的底面以任何角度或任何方式向上延伸。該牆可以為一不規則的形狀，換句話說，它可以一 S 字型（sigmoidal）或曲線型或多角形的形式向上延伸。該牆或管道的底面可與一晶片的上表面位於同一高度或高於一晶片的上表面、或低於一晶片的上表面而使得該井係為一晶片表面中的凹陷區。該井或管道的側邊或牆可包含不同於形成一晶片之底面的材料。

「管道 (channel)」係一晶片中的一種結構，其具有一底面及至少兩個牆，該牆係自該管道的底面向上延伸，且該兩個相對的牆的長度係長於該兩個相對的牆之間的距離。一管道因此可容納一流體流順著其內部長度流動。管道可以是封閉式的
5 (如，隧道) 或開放式的。

「孔洞 (pore)」係指一表面 (例如本發明之過濾器) 上的開口，其係提供該表面兩側之間的液體流通。孔洞可以是任何尺寸及任何形狀，但較佳地，該孔洞的尺寸及形狀係設為可依據樣本成份的尺寸、形狀及形變性 (或缺乏形變性) 來限制至少一種不可溶之樣本成份自過濾器的一側流至該過濾器的另一側。
10

「狹縫 (slot)」係指一表面 (例如本發明之過濾器) 上的開口。狹縫的長度係長於其寬度 (狹縫長度及狹縫寬度係就該狹縫於該過濾器的平面或表面上，該樣本成份通過的維度而言，而狹縫深度係指該過濾器的厚度)。因此，所謂「狹縫」係描述一孔洞的形狀，在多數例子中，其係約略為矩形、橢圓形、或四邊形或平行四邊形。
15

「塊狀物 (bricks)」係指一可被設置於一表面之中或其上以限制樣本成份於其之間通過的結構。晶片上的一種型態之塊狀物 (稱作，障礙物) 的設計及使用係描述於美國專利第 5,837,115 號 (西元 1998 年 11 月 17 日核准，專利權人為 Austin et al)。全文係併入於此做為參考文獻。
20

「屏障物 (dam)」係指建置在一腔室的底面上而朝該腔室的上表面延伸，而在該屏障物的上方與該腔室的上表面之間留下一特定寬度的空間。較佳地，該界於該屏障物的上方與該腔室的上表面之間的空間的寬度是設為可依據樣本成份的尺
25

寸、形狀及形變性（或缺乏形變性）來使流體樣本通過但擋住至少一種樣本成份。晶片上的一種型態之屏障物的設計及使用係描述於美國專利第 5,928,880 號（西元 1999 年 07 月 27 日核准，專利權人為 Wilding et al）。全文係併入於此做為參考文獻。

5 「連續流（Continuous flow）」係指在分離程序的過程中，流體係持續地被汲送或注入本發明之腔室中。此將有助於使一樣本中未經選擇性保留於一腔室中的成份在一分離（separation）程序中被沖刷出該腔室。

10 「鍵結分子（Binding partner）」係指任何以所欲之親和力或專一性鍵結至該基團（moiety）且得以經所欲之物理作用力操作的物質，其例如，但不限於微粒（microparticle）。

15 「微粒（microparticle）」係指可經所欲之物理作用力操作之任何形狀及任何組成份的結構。於此方法中所用之微粒可具有約 0.1 微米至約 10 公分的尺寸。較佳地，於此方法中所用之微粒具有約 0.1 微米至約數百微米的尺寸。前揭粒子或微粒可由任何合適之材料所組成，例如玻璃或陶瓷、及/或一或多種聚合物（例如尼龍、聚四氟乙烯（特氟隆™）、聚苯乙烯、聚丙烯醯胺、sepharose、洋菜糖、纖維素、纖維素衍生物、或六碳醣（葡萄糖））、及/或可包含金屬。微粒的例子包括，但不限於：
20 磁珠、磁粒子、塑膠粒子、陶瓷粒子、碳粒、聚苯乙烯微珠、玻璃珠、中空玻璃球、金屬粒子、錯合組合物粒子（particles of complex compositions）、微加工自存微結構（microfabricated free-standing microstructures）等。微加工自存微結構的例子可包括 Hagedorn 等人之著作「Design of asynchronous dielectric micromotors」（in Journal of Electrostatics, Volume: 33, Pages
25 159-185（1994））中所記載者。錯合組合物粒子係指包含多種組合元素（compositional elements）或由多種組合元素所組成

的粒子，前述組合元素例如一覆蓋有一非傳導性聚合物膜之薄層的金屬球體。

文中所述「微粒調配物 (a preparation of microparticles)」係指一包含一種或多種微粒的組合物，且該組合物可選擇性地包括至少一種其他化合物、分子、結構、溶液、試劑、或化學品。舉例來說，一微粒調配物可為一於緩衝溶液中微粒懸浮液且可選擇性地包括特定的鍵結分子、酵素、惰性粒子、介面活性劑、配基 (ligand)、清潔劑等。

其他本文中所用技術用詞係，如許多技術辭典中所述，具有其所屬領域中所習知的含意。

前言

本發明體認到複雜成份之流體 (例如生物性流體樣本) 的分析可能受到樣本中眾多的成份干擾而影響分析的進行。當分析的標的屬於稀少細胞時，樣本分析可能會更難以進行；例如，當目標細胞為母親血液中的胎兒細胞或一患者血液或尿液中的惡性腫瘤細胞時。當處理該些種類的樣本時，通常必須藉由減量樣本的體積至一可操作的程度以及使分析標的之稀少細胞富集化來「單純化」該樣本 (參，例如美國專利第 6,949,355 及 7,166,443 號，美國公開專利申請案第 2006/0252054、2007/0202536、2008/0057505、及 2008/0206757 號)。處理流體樣本的程序通常是沒有效率的而需要耗費許多時間。在許多面向中，本發明提供有效率之用以自流體樣本中富集化稀少細胞的方法及自動化系統。

若從非限制性的角度來介紹本發明的廣度，本發明包括許多原則性且實用性的面向，包括：

1) 一過濾腔，其包含一容置於一外殼中的微加工過濾器；其中前述過濾器的表面及/或前述外殼的內表面係經氣相沉積法、昇華作用、氣相表面反應、或粒子濺射修飾以形成一均勻的塗層；

5 2) 一濾匣，其包含前述微加工過濾器；

3) 一自動化系統，其包含前述微加工過濾器；及

4) 一種分離一流體樣本之細胞的方法，其包含：a) 將一流體樣本導入前述過濾腔；及 b) 使前述流體樣本的流體流通過前述過濾腔；其中前述流體樣本中的成份係流經該過濾器、或基於該成份的尺寸、形狀或形變性而被保留於該過濾器中。

10

本發明的該些面向以及其他描述於此的面向，可經由描述於本文中的方法、製品、及組合物來達成。為了更全面地了解本發明的範疇，本發明之多種面向可相互結合而取得本發明之較佳實施態樣的內容將更進一步呈現。

15

I 過濾腔

本發明所述之過濾腔係指任何具有或裝有至少一容置於一外殼內的微加工過濾器的腔室。前述過濾器的表面及/或前述外殼的內表面係經氣相沉積法、昇華作用、氣相表面反應、或粒子濺射修飾以形成一均勻的塗層。

20

本發明所述之過濾腔可包含一或多個隔絕液體材料 (fluid-impermeable)，例如但不限於：金屬、聚合物、塑膠、陶瓷、玻璃、矽、或二氧化矽。較佳地，本發明所述之過濾腔具有自約 0.01 毫升至約 10 公升的體積容積；更佳地，自約 0.2 毫升至約 2 公升的體積容積。在本發明許多較佳實施態樣中，一過濾腔具有自約 1 毫升至約 80 毫升的體積。

25

本發明所述之過濾腔可包含或裝有任何數量的過濾器。在本發明的一個較佳實施態樣中，一過濾腔包含一個過濾器（請參，例如第五圖及第十四圖）。在本發明的另一個較佳實施態樣中，一過濾腔可包含不只一個過濾器，例如第六圖及第七圖

5 中所示例的腔室。各式的過濾腔的組成都是可能的。舉例來說，其中之一個或多個周壁包含一微加工過濾器的過濾腔是屬於本發明的範疇。其中設有一或多個過濾器的過濾腔也是屬於本發明的範疇；在此一例子中，該過濾器可以是永久地設置在該腔室中或是以可移除的方式來設置（例如，它們可以是被插

10 設於預設在腔室上的狹縫或軌道中）。一過濾器可以被設置為一腔室的周壁或內置於一腔室，並且，該過濾器可選擇性地以被串聯式地設置以提供連續的過濾效果。當過濾器係被插入一腔室中時，它們係被插設以與一腔室的周壁形成緊密的封閉結構，藉此於過濾程序中，液體流經該腔室（自該過濾器的一側

15 流向另一側）時勢必會流經該過濾器的孔洞。

在本發明的一個實施態樣中，一過濾器中包含一或多個微加工過濾器；該些微加工過濾器係內置於該腔室中，且該過濾器或該些過濾器可將該腔室分隔為多個子腔室（subchamber）。當一過濾腔包含一單一之內置微加工過濾器時，例如，該過濾

20 腔可以包含一前過濾程序的「預置腔（antechamber）」，或在合適情形下，一「上層子腔室」及一「過濾程序後之子腔室（post-filtration subchamber）」，或在合適情形下，一「下層子腔室」。在許多情況中，一微加工過濾器可形成一過濾腔的周壁，且在過濾的過程中，可過濾樣本的成份通過該過濾器而自

25 該腔室中流出。

在本發明的許多較佳實施態樣中，一本發明的過濾腔係具有至少一開口以利一樣本導入該腔室，及可自一本發明之過濾

腔傳輸樣本及傳輸樣本至一本發明之過濾腔的導管。當流體開始流動時，流經一或多個過濾係的樣本成份可流入該腔室中的一或多個區域，然後順著導管流出該腔室，且較佳地但是可選擇性地自該導管流入一槽（例如一廢液槽）。該過濾腔亦可選擇性的具有一或多個額外的口，以供添加一或多種試劑、溶液、或緩衝液。

在許多較佳實施態樣中，本發明之過濾腔是一過濾單元的一部分，在該過濾單元中，設有多個閥以控制流體流經該腔室。舉例來說，如第五圖中所示，一個本發明之較佳過濾單元包含一由閥控制的入口以供添加樣本（閥 A（6）），一連結之一導管的閥（閥 B（7）），透過該閥可提供一負壓以供過濾該樣本，及一控制清洗緩衝液流入該過濾腔以清洗該腔室的閥（閥 C（8））。在本發明的許多較佳實施態樣中，一過濾單元可包含多個閥，其可選擇性地被自動調控以使樣本進入該腔室、使廢液離開該腔室，及提供負壓以產生流體流來進行過濾。

可使用一針（但並不限於使用此類物品）來傳輸一溶液或上清液至該過濾腔。一針可係連結至一可容納一體積的容器（例如，一小管或一腔）。該注射針可自一含有一溶液的管中收集細胞，並藉由一裝置（例如，幫浦或注射筒）來推動或抽拉一溶液以將該溶液送入另一腔室。

該腔室可包括一或多個表面上的外形結構，以供影響一樣本、一溶液（例如清洗溶液或溶離溶液）、或該二者的流動。舉例來說，該外形結構可使一樣本轉向、散布、或導向以協助該樣本沿著該晶片（chip）分散。可行地，該外形結構可使一清洗溶液轉向、散布、或導向而致使該清洗溶液以較高的效率清洗該腔室或晶片。該些表面上的外形結構可為任何合適的構型。該些外形結構可包括逐漸地向該晶片凸出或可以是逐漸地

凸出而遠離該晶片的表面形狀。它們可以是逐漸地包圍該晶片。該些外形結構可包括但不限於：凸出物、凹陷部分、狹縫、轉向結構（例如球狀部分）、泡泡（bubbles；由例如空氣、清潔液、或聚合物所形成）、及其相似物。該些外形結構，例如
5 兩個或多個狹縫，可基本上地設置為相互平行、或是設置為當垂直觀察該腔室時，係彼此夾一夾角以使流體導向為一基本上為螺旋狀的路線。

在一本發明的較佳實施態樣中，舉例來說，一大小為 1 公分×1 公分×0.2 至 10 公分的過濾腔可具有一或多個過濾器，該
10 過濾器包含 4 至 1,000,000 個狹縫，較佳地包含 100 至 250,000 個狹縫。在此較佳實施態樣中，該狹縫較佳地係為矩形，且視其運用，該狹縫具有自約 0.1 至約 1,000 微米的狹縫長度而狹縫寬度較佳為自約 0.1 至約 100 微米。

較佳地，該些狹縫可允許成熟之紅血球細胞（無核）通過
15 該管道並因此離開該腔室，同時，不允許或僅僅少量允許具較大直徑或尺寸的細胞（例如但不限於有核細胞，如白血球細胞及有核之紅血球細胞）離開該腔室。一可藉由使流體流經該腔室而去除紅血球細胞並保留一血液樣本豬的其他細胞的過濾腔係如第七圖、第十四圖、及第十六圖中所示。舉例來說，為
20 了使成熟的紅血球與有核 RBCs 及白血球細胞分離，可使用狹縫寬度介於 2.5 之 6.0 微米之間，或較佳地介於 2.2 及 4.0 微米之間的狹縫。狹縫長度則可以在，例如，20 及 200 微米之間變動。狹縫深度（即，過濾膜的厚度）可以於 40 及 100 微米之間變動。介於 2.0 及 4.0 微米之間的狹縫寬度可允許該些雙盤
25 形狀的 RBCs 通過該狹縫，並首要地保留該些直徑或形狀大於 7 微米的有核 RBCs 及 WBCs。

表面處理或修飾

本發明提供針對一微加工過濾器之表面及/或一容納該微加工過濾器之外殼的內表面進行的處理或修飾，以加強其過濾效率。在許多實施態樣中，該表面處理提供該過濾器及該外殼一均質的塗覆層（a uniform coating）。在許多實施態樣中，該過濾器的一個表面或兩個表面皆經處理、或塗覆、或修飾以加強其過濾效率。在許多實施態樣中，在許多實施態樣中，該過濾器的一個表面或兩個表面皆經處理或修飾以減少樣本成份（例如但不限於：細胞）與該過濾器交互作用或吸附於該過濾器的可能性。

舉例來說，一過濾器及/或外殼可被物理性或化學性地處理以改變其表面特性（例如，疏水性、親水性）。舉例來說，氣相沉積法、昇華作用、氣相表面反應、或粒子濺射係幾個可以用來處理或修飾一過濾器及/或外殼之表面的方法。任何合適的氣相沉積法皆可使用，比如說：物理氣相沉積法、電漿化學氣相沉積法、化學氣相沉積法等。合適於進行物理氣相沉積法、化學氣相沉積法、電漿化學氣相沉積法、或粒子濺射的材料可包括，但不限於：金屬氮化物或金屬鹵化物（如氮化鈦、氮化矽、氮化鋅、氮化銮、氮化硼）、對二甲苯或其衍生物（如對二甲苯、對二甲苯-N、對二甲苯-D、對二甲苯 AF-4、對二甲苯 SF、及對二甲苯 HT）。聚四氟乙烯（PTFE）或特氟隆-AF 亦可用於進行化學氣相沉積法。

舉例來說，一過濾器及/或外殼可以在含有低氮（low nitrogen）或氮或亞硝酸氣體（nitrous gas）或其他氣體或其組合或其依序存在的腔室中被電漿（plasma）加熱或被處理，被氮化矽修飾或可被至少一酸或至少一鹼處理，以產生所欲之表面電荷及種類。舉例來說，一玻璃或二氧化矽材質的過濾器及/或外殼可在一氮氣或氬氣環境下被加熱以自該過濾器及/或該外殼的表面

去除氧。加熱的時間和溫度可視該過濾器及/或外殼的材質及欲反應的程度而變化。在一個實例中，一玻璃材質的過濾器及/或外殼可被加熱於約攝氏 200 至 1200 度的溫度中 30 分鐘至 24 個小時。

- 5 在另一個實例中，一過濾器及/或外殼可經一或多種酸或一或多種鹼處理以增加該過濾器表面的電正度 (electropositivity)。在一較佳實施態樣中，一包含有玻璃或二氧化矽的過濾器及/或外殼係經至少一酸處理。

10 用來處理一本發明之過濾器及/或外殼的酸可為任何酸。以非限制性的實例而言，該酸可以是甲酸、草酸、或抗壞血酸。該酸可以是約 0.1N 或更高的濃度；較佳係為約 0.5N 或更高的濃度；更佳係為高於約 1N 的濃度。舉例來說，該酸的濃度較佳地是自約 1N 至 10N。該處理時間可以自 1 分鐘至數天，但較佳地是自約 5 分鐘至約 2 個小時。

15 處理一微加工過濾器及/或外殼以增加其疏水性的最佳處理濃度和處理時間可依試驗經驗來決定。該微加工過濾器及/或外殼可以被放置在一酸溶液中一段時間；較佳地係大於 1 分鐘；更佳地係大於 5 分鐘。酸處理程序可進行於任何不會結凍也不會沸騰的溫度下；較佳地係於高於或等於室溫。

20 可行地，可利用一還原劑來取代一酸使用或併同一酸使用或接續於一酸之後使用，例如但不限於：聯氨、氫化鋰鋁、硼氫化鈉、亞硫酸鹽、亞磷酸鹽、二硫蘇糖醇、含鐵化合物例如硫酸亞鐵 (II)。該還原液可以係約 0.01M 或更高之濃度；較佳係為 0.05M 或更高；且更佳係 0.1M 或更高之濃度。該微加工過
25 濾器及/或外殼可被放置於一還原液中一段時間；較佳地係大於 1 分鐘；更佳地係大於 5 分鐘。處理程序可進行於任何不會結

凍也不會沸騰的溫度下；較佳地係於高於或等於室溫。

5 經一物理性或化學性處理以提升一過濾器及/或外殼之表面的疏水性的效能可藉由將水珠散佈於經處理及未經處理之過濾器及/或外殼的表面來測試，若相同體積之液滴的散佈程度增加則顯示一表面的疏水性係提升的（第五圖）。一過濾器及/或外殼處理的效能亦可藉由將一經處理之過濾器及/或外殼與細胞或生物性樣本共同培養以判定樣本成份部分吸附於該經處理之過濾器及/或外殼上的程度來測試。

10 在另一個實施態樣中，一過濾器及/或外殼的表面，例如但不限於一聚合物材質的過濾器及/或外殼，可經化學性處理以改變該過濾器及/或外殼的表面性質。舉例來說，一玻璃、二氧化矽、或聚合物材質之過濾器及/或外殼的表面可藉由任一種化學處理來衍生化(derivatized)以增加化學基團，藉此得以降低樣本成份與該過濾器及/或外殼的表面的交互作用。

15 一或多種化合物可以被吸附或共軛至一任何材質所製得之微加工過濾器及/或外殼的表面，該材質例如一或多種金屬、一或多種陶瓷、一或多種聚合物、玻璃、二氧化矽、氮化矽、或其組合。在一本發明的較佳實施態樣中，一微加工過濾器及/或外殼的一個或多個表面係經一化合物塗覆以降低樣本成份與該過濾器及/或外殼表面的交互作用而增加其過濾效率。

20 例如說，一過濾器及/或外殼的表面可經一分子塗覆，例如但不限於：蛋白質、胜肽、或聚合物（包括天然或合成之聚合物）。用於塗覆該過濾器及/或外殼的材質較佳係生物相容者，意即它不會對細胞或其他生物性樣本中的其他部分（例如蛋白質、核酸等）產生有害的影響。白蛋白，例如牛血清白蛋白，
25 即為可用於塗覆一本發明之微加工過濾器及/或外殼之蛋白質

的例子。用於塗覆一過濾器及/或外殼的聚合物可為任一種不會促使細胞粘附於該過濾器及/或外殼的聚合物，舉例來說，非疏水性聚合物，例如但不限於：聚乙二醇（PEG）、聚乙酸乙烯酯（PVA）、及聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、及纖維素或纖維素類衍生物。

一例如由金屬、陶瓷、聚合物、玻璃或二氧化矽所製得的過濾器及/或外殼可經任何可實施的手而被一化合物塗覆，舉例而言，吸附作用（adsorption）或化學共軛反應（chemical conjugation）。

在許多情形下，在塗覆一化合物或聚合物之前預先處理該過濾器及/或外殼的表面是有利的。表面處理可以增加該塗覆層的穩定度和均質度。例如，在以一化合物或聚合物塗覆一過濾器及/或外殼之前，該在以一化合物或聚合物塗覆一過濾器及/或外殼可預先經至少一酸或至少一鹼、或至少一酸及至少一鹼處理。在一本發明的較佳面向中，一由聚合物、玻璃、或二氧化矽製得的過濾器及/或外殼係經至少一酸處理並接著浸於該塗覆化合物的溶液中一段自數分鐘至數天的時間。舉例來說，一玻璃過濾器及/或外殼可淨泡於酸、以水潤濕、然後再淨泡於一 BSA、PEG、或 PVP 溶液中。

在本發明的許多面向中，在進行酸或鹼處理、或經一氧化劑處理及以一化合物或聚合物塗覆該過濾器及/或外殼之前，較佳地係使該過濾器及/或外殼潤濕於水（例如，去離子水）或一緩衝溶液中。在於一微加工過濾器及/或外殼上進行超過一種處理程序的情形中，較佳地該潤濕步驟可於處理程序之間進行，例如，在以氧化劑處理及酸處理之間、或在酸處理與鹼處理之間。一過濾器及/或外殼可被潤濕於 pH 值介於約 3.5 及約 10.5 之間的水或水溶液；更佳地係介於約 5 及約 9 之間。合適使用

於潤濕微加工過濾器及/或外殼的水溶液的非限制性例子可包括：鹽類溶液（該鹽類溶液可具有數微莫耳濃度至 5M 或更高之莫耳濃度的濃度）、生物性緩衝溶液、細胞培養液（cell media）、或其稀釋液、或其組合。該潤濕步驟可進行任何程度之時間，例如，數分鐘至數個小時。

一用於塗覆一過濾器及/或外殼的化合物溶液或聚合物溶液的濃度可自約 0.02% 至 20% 或更高之間變化，且其係部分取決於所使用的化合物。於塗覆溶液中的處理時間可為自數分鐘至數天；較佳地係自約 10 分鐘至 2 個小時。

於塗覆程序之後，該過濾器及/或外殼可經水或一緩衝液潤濕。

除了該些包含使用孔洞來進行過濾的例子，本發明的處理方法亦可被施行於晶片，例如，包含金屬、陶瓷、一或多種聚合物、矽、二氧化矽、或玻璃的晶片可藉由本發明之方法而經物理性或化學性處理。該些晶片可被使用於，例如，分離、分析、及偵測裝置，該些裝置係用於分離、偵測、或分析生物性樣本，如細胞、胞器、錯合物、生物分子（例如，核酸、蛋白質、小分子）。基於所使用的處理程序、進行操作之生物性樣本的性質、及操作的本質，對於該晶片的處理程序可以加強或降低生物性樣本與該晶片表面的交互作用。舉例來說，進行操作之生物性樣本的性質、及操作的本質，一晶片可以經一親水性或疏水性聚合物塗覆。又根據另一例子，於該晶片的表面塗覆一疏水性聚合物（例如但不限於：以 PVP 或 PVA 塗覆該晶片）可降低或最小化該晶片之表面與該細胞的交互作用。

含有電極的過濾器

在許多較佳實施態樣中，建構於一屬於一過濾腔之部分的晶片上的電極可產生旅波介電泳力，並可使用使樣本成份（例如細胞）自一過濾器中移動。在此情況中，該微電極係建置於該過濾器的表面，且該電極係被分布以使該旅波介電泳可以促使該樣本成份（例如細胞）於該電極平面上或於該過濾器表面上移動，並藉此進行過濾程序。關於旅波介電泳的完成描述係記載於美國專利申請案第 09/679,024 號案（其代理人標號為 471842000400），其發明名稱為：「Apparatuses Containing Multiple Active Force Generating Elements and Uses Thereof」，係申請於西元 2000 年 10 月 4 日。此文獻係完整地併入於此做為參考文獻。

在該過濾器的一個實施態樣中，叉指型（interdigitated）微電極係設置於該過濾器的表面，如第二圖中所示，或如 Docoslis 等人之著作：「Novel 介電泳(dielectrophoresis)-based device of the selective retention of viable cells in cell culture media」(Biotechnology and Bioengineering, Vol. 54, No. 3, pages 239 -250, 1997)，及 Docoslis 等人的美國專利第 5,626,734 號案（核准於西元 1997 年 5 月 7 日）中所記載者。在此實施態樣中，由該些電極所產生之該負介電泳力可以使該樣本成份（例如細胞）自該過濾器表面或自該過濾器狹縫中排出，藉此，在過濾程序中，於該過濾器中收集的細胞便不會堵塞該過濾器。當使用旅波介電泳或負介電泳來加強過濾時，在流體流停止或大幅度地降低速度的週期中，電極元件可以在過濾程序中被週期性的通電。

設有微米尺寸之狹縫且裝有產生介電泳力之電極的過濾器係如第三圖中所示（A 及 B）。舉例來說，將寬 18 微米且相互間隔 18 微米的複數個叉指型電極建構在以矽基材製成的過

濾器上。矩形之單一過濾器狹縫的尺寸為 100 微米（長度）乘以 2-3.8 微米（寬度）。每一過濾器具有特定的狹縫尺寸（如，長度乘以寬度係：100 微米乘以 2.4 微米、100 微米乘以 3 微米、100 微米乘以 3.8 微米）。沿著長度的方向，相鄰之過濾器狹縫之間的間隔為 20 微米。沿著寬度的方向，該相鄰之狹縫並非排成一直線，而是相互並列。相鄰之過濾器狹縫縱列之間的並列距離可行地為 50 微米或 30 微米。該過濾器狹縫係相對於該電極設置，以使該狹縫的中心線沿著長度方向對準電極的中心線、或電極邊緣、或電極之間。後續的討論及參考文獻可提供設計及使用電極以使樣本成份（如，無法過濾之細胞）移出過濾器而增進過濾能力的概念。

介電泳（dielectrophoresis）係指於一非均勻交流電場（non-uniform AC electrical field）中移動之極性粒子（polarized particles）。當一粒子被放置於一電場中時，如果該粒子的介電性與其所處環境之介質是相異的，該粒子將被介電極化。因此，在該粒子與介質的交界表面上會誘發電荷。若所施與者為一非均勻電場，則該非均勻電場與該誘發之極性化電荷之間的交互作用將會產生作用於該粒子上的淨力，以促使該粒子朝著具有強或弱電場強度的區域移動。該作用於該粒子上的淨力即稱為介電泳力，且該粒子的移動即為介電泳。介電泳力係基於該粒子的介電性、粒子所處介質、施予之電場的頻率、及該電場的分布。

旅波介電泳係相似於旅波電場與電場誘發之極性化交互作用而產生作用於該粒子的介電泳。粒子係被作用以順著或反向該旅波電場移動。旅波介電泳力係基於該粒子的介電性及其所處介質、施予之旅波電場的頻率及強度。介電泳及旅波介電泳的理論及運用介電泳於操作及處理為例子的內容可於眾多

出版文獻中找到(例如, Wang 等人所著之「Non-uniform Spatial Distributions of Both the Magnitude and Phase of AC Electric Fields determine Dielectrophoretic Forces」, 發表於 Biochim Biophys Acta Vol. 1243, 1995, pages 185-194 ; Wang 等人所著

5 之「Dielectrophoretic Manipulation of Particles」, 發表於 IEEE Transaction on Industry Applications, Vol. 33, No. 3, May/June, 1997, pages 660-669 ; Huang 等人所著之「Electrokinetic behavior of colloidal particles in traveling electric fields: studies using yeast cells」, 發表於 J. Phys. D: Appl. Phys., Vol. 26, pages

10 1528-1535 ; Fuhr 等人所著之「Positioning and manipulation of cells and microparticles using miniaturized electric field traps and traveling waves」, 發表於 Sensors and Materials. Vol. 7: pages 131-146 ; Wang, X-B. 等人所著之「Dielectrophoretic manipulation of cells using spiral electrodes」, 發表於 Biophys. J.

15 Volume 72, pages 1887-1899, 1997 ; Becker 等人所著之「Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity」, 發表於 Proc. Natl. Acad. Sci., Vol., 92, January 1995, pages 860-864)。使用介電泳及旅波介電泳操作微粒子包括濃縮/聚集、捕捉、排斥、線性或其他方向之

20 移動、懸浮、或分離粒子。該些粒子可被聚集、富集化、及捕捉於該電擊反應腔室中的特定區域。該些粒子可微觀地被分離至不同的亞群中。就本發明之過濾方法而言, 粒子可被移動特定的距離。供特定地操作粒子所需的電場分布係取決於微電極結構的尺寸及幾何分布, 且可依據介電泳理論或電場模擬法

25 (electrical field simulation method) 來設計。

作用於一非均勻電場中的半徑為 r 的粒子的介電泳力 F_{DEP} 可由以下公式計算：

$$F_{DEPz} = 2\pi\epsilon_m r^3 \chi_{DEP} \nabla E_{rms}^2 \cdot \underline{\underline{a}}_z,$$

其中， E_{rms} 代表電場強度的 RMS 值， ϵ_m 為該介質的介電係數。 χ_{DEP} 為該粒子介電極化因子或介電泳極化因子，可由以下公式求得：

5

$$\chi_{DEP} = \text{Re} \left(\frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right)$$

「Re」代表該「複數 (complex number)」的實數。該符號

$$\epsilon_x^* = \epsilon_x - j \frac{\sigma_x}{2\pi f}$$

係為複合介電係數 (complex permittivity；對粒子而言， $x=p$ ，且對介質而言， $x=m$)。參數 ϵ_p 及 σ_p 分別為該粒子的有效介電常數及導電性。該些參數可是具有頻率依賴性的。舉例來說，一典型的生物細胞至少因為細胞膜的極性化而具有頻率依賴性、有效導電性及介電常數。

10

前揭介電泳力的方程式可寫為：

15

$$F_{DEPz} = 2\pi\epsilon_m r^3 \chi_{DEP} V^2 p(z) \underline{\underline{a}}_z$$

其中 $p(z)$ 是電極上供 1 單位電壓激發 (unit-voltage excitation； $V=1V$) 的平方場分布 (square-field distribution)， V 為所施予之電壓。

20

一般來說有兩種介電泳，正介電泳及負介電泳。在正介電泳中，粒子被介電泳力驅使而朝向強電場區域移動。在負介電泳中，粒子被介電泳力驅使而朝向弱電場區域移動。粒子會呈現正或負介電泳係取決於該些粒子相較於其環境介質而言係較容易或不容易極性化。在本發明的過濾方法中，一過濾腔之一或多個過濾器上的電極的形態可被設計以促使樣本成份部分 (如細胞) 呈現負介電泳，而使得樣本成份部分 (如細胞)

25

被自該過濾器表面的電極排斥。

旅波 DEP 力係指於粒子或分子上因旅波電場而產生的作用力。一旅波電場的特徵在於交流電場分量之相位變化值 (phase value) 的非均勻分布。

- 5 於此，本發明分析一理想旅波電場的旅波 DEP 作用力。該作用於處於一旅波電場 $E_{TWD} = E \cos(2\pi(ft - z/\lambda_0)) \hat{x}$ (即，一 X 軸向的電場沿著 Z 軸向傳遞) 且半徑為 r 之粒子上的介電泳力 F_{DEP} 可由以下方程式計算：

$$F_{TWD} = -2\pi\epsilon_m r^3 \zeta_{TWD} E^2 \cdot \hat{a}_z$$

- 10 其中 E 係指該電場強度的量值， ϵ_m 係指該介質的介電係數。 ζ_{TWD} 係為該粒子極化因子，可由以下公式求得：

$$\zeta_{TWD} = \text{Im} \left(\frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right),$$

- 15 「Im」係指該「複數」的虛數部分 (imaginary part)。該符號

$$\epsilon_x^* = \epsilon_x - j \frac{\sigma_x}{2\pi f}$$

- 20 係為複合介電係數 (complex permittivity；對粒子而言， $x=p$ ，且對介質而言， $x=m$)。參數 ϵ_p 及 σ_p 分別為該粒子的有效介電常數及導電性。該些參數可是具有頻率依賴性的。

具有不同的介電性 (由其介電係數及導電度來定義) 的粒子，例如生物細胞，會承受程度不同的介電泳力。就以旅波 DEP 操作粒子 (包括生物細胞) 的情況來說，作用於直徑 10 微米的粒子的旅波 DEP 作用力可於 0.01 及 10000 pN 之間變化。

一旅波電場可藉由施予一適當的交流訊號至妥當地分布於一晶片上的微電極來建立。為了產生一旅波電場，必須要施予至少三種電子訊號，且該每一種皆具有不同的相位變化值。用以產生一旅波電場的例子是使用四相位訊號（four phase-quadrature signals；0、90、180、及 270 degrees）來供電至四個線形且平行排列於晶片表面的電極。該四個電極形成一基礎且重複的單元。視其運用，其可能具有兩個以上的比鄰設置的該單元。這樣的結構設計可以在該電極之上或其鄰近區域產生一旅波電場。只要該些電極元件係依據特定的空間順序來排列，則施予依序變化的相位訊號（phase-sequenced signals）便能在該電極的鄰近區域建立起旅波電場。

作用於粒子的介電泳力及旅波介電泳力除了係基於場分布（如，電場分量的強度、頻率及相位分布；為了強度及/或頻率所進行的電場調制）外，尚基於該粒子及該粒子所懸浮或容置之介質的介電性。就介電泳而言，如果粒子相較於該介質更容易極化（例如，依據所施予的頻率，具有較大的導電性及/或介電常數），則該些粒子將承受正介電泳力而被導向強電場區域。相較於所處之介質而言較不容易被極化的粒子則會承受負介電泳力並被導向負電廠區域。就旅波介電泳而言，依據極化因子 ζ_{TWD} ，粒子會承受介電泳力而驅使它們依循或反應電場傳遞的方向移動。以下所載科學文獻提供了介電泳及旅波介電泳的基礎理論：Huang 等人，J. Phys. D: Appl. Phys. 26:1528~1535（1993）；Wang 等人，Biochim. Biophys. Acta. 1243:185~194（1995）；Wang 等人，IEEE Trans. Ind. Appl. 33:660~669（1997）。

含有主動式晶片的過濾腔

一過濾腔亦可較佳地包含或容置至少一主動式晶片的至少一部分；其中一主動式晶片係指一晶片，其藉由經施予之物理作用力來促進、加強、或幫助樣本處理程序或所欲對樣本進行的生化反應，及/或降低或減少任何不利的效果以免其發生至或發生於一樣本中。本發明之過濾腔的主動式晶片較佳地係包含聲波元件、電極、或甚至電磁元件。一主動式晶片可被使用以供傳遞一物理作用力，以避免樣本中的成份堵塞該狹縫或堵塞在形成過濾器的結構（例如嵌在或嵌入該過濾器表面的塊狀物（block）、屏障物（dam）、通道、或狹縫）的周圍；該樣本成份係過大而無法通過孔洞或狹縫或開口的成份或是會在孔洞或狹縫或開口處聚集者。舉例來說，當施予一電子訊號時，聲波元件可促使成份在該腔室中混合，並因此使得無法過濾的成份移出該狹縫或孔洞。

在一可行地實施態樣中，於一晶片上的電極的分布形態可提供樣本成份負介電泳，以使得無法過濾的成份自該狹縫、通道、或開口的鄰近區域移動，並使得可以過濾的樣本成份通過該狹縫或開口。依據不同之「介電泳型選擇性保留」之操作機制以於一過濾器上建立電極矩陣的例子係如 Docoslis 等人所著之「Novel dielectrophoresis-based device of the selective retention of viable cells in cell culture media」（發表於 *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 54, No. 3, pages 239–250, 1997，併入於本文中作為參考文獻）及 Docoslis 等人之美國專利第 5,626,734 號案（公告於西元 1997 年 5 月 7 日，併入於本文中作為參考文獻）中所述。主動式晶片，包括可以用以藉由聲波力來混合樣本的晶片及可以用以藉由介電泳力來移動目標基團（包括樣本成份）的晶片，係如美國專利申請號第 09/636,104 號案所述（申請於西元 2000 年 8 月 10 日），其

發明名稱為「**Methods for Manipulating Moieties in Microfluidic Systems**」、美國臨時申請案第 60/239,299 號案所述（申請於西元 2000 年 10 月 10 日），其發明名稱為「**An Integrated Biochip System for Sample Preparation and Analysis**」、及係如美國專利申請號第 09/686,737 號案所述（申請於西元 2000 年 10 月 10 日），其發明名稱為「**Compositions and Methods for Separation of Moieties on Chips**」；前揭文獻皆併入於此作為參考文獻。

關於併同使用可以用於一本發明之過濾器上產生旅波介電泳的電極，以及介電泳及旅波介電泳的原理皆以描述於本文中的上述關於微加工過濾器的敘述。本發明之過濾腔中所用主動晶也可以併同電極使用，以提升過濾效率。

一過濾腔也可以包含有一含有電磁元件的晶片。該電磁元件可被使用於在過濾樣本之前或較佳地是在過濾樣本之後捕捉樣本成份。樣本成份在被鍵結至磁性微珠上後便可被捕捉。該被捕捉之樣本成份可為樣本中所需成份已自腔室中離開後，其他不欲保留於腔室中的成份，或該被捕捉的樣本成份係在過濾之後欲保留於腔室中的成份。

一聲波力晶片可容置或成為一過濾腔的一部份，或一過濾腔的一或一個以上的周壁可設有一或一個以上的聲波元件。藉由聲波力晶片的作用來混合樣本可施行於過濾程序中。較佳地，一電源供應器係被使用於將一電子訊號傳遞至一或多個聲波晶片（acoustic chip）上的聲波元件或一腔室之一或多個周閉上的一或多個聲波元件。一或多個聲波元件在過濾程序中可被連續地啟動，或被啟動於過濾程序中的休止時間。

添加至樣本中的樣本成份及可選擇性地添加至樣本中的溶液或溶劑，可藉由聲波力來混合；該聲波力係作用於在該腔

室中的該流體及其部分，包括但不限於：分子、複合物、細胞、及微粒子。聲波力可藉由產生流體的聲波流（acoustic streaming）來進行混合，其係發生於當聲波元件於電子訊號供能之後產生機械性的震動，進而將該震動傳至該流體。此外，

5 聲波能力可藉由產生聲波以引發作用於樣本成份（基團）或試劑上的聲輻射力來造成樣本成份及/或試劑的移動。

後續的討論及參考文獻可提供設計及使用聲波元件以提供混合效果的概念：

聲波力係指藉聲波場而產生於樣本之基團（如，粒子及/

10 或分子）的作用力（它亦可稱為聲輻射力（acoustic radiation forces））。該聲波力可用於操作，例如捕捉、移動、導向、處理、混合流體中的粒子。使用駐波型超音波中的聲波力來進行粒子操作的方法已被運用於濃縮紅血球（Yasuda et al, *J. Acoust. Soc. Am.*, 102（1）:642-645（1997））、聚集微米尺寸的聚苯

15 乙烯微粒（直徑為 0.3 至 10 微米，Yasuda and Kamakura, *Appl. Phys. Lett.*, 71(13):1771-1773（1997））、濃縮 DNA 分子（Yasuda et al, *J. Acoust. Soc. Am.*, 99（2）:1248-1251,（1996））、批次且半連續地聚集及沈澱細胞（Pui et al, *Biotechnol. Prog.*, 11:146-152（1995））。藉由電磁力及聲輻射力的競爭來達到分

20 離不同尺寸即電荷的聚苯乙烯微珠已被報導（Yasuda et al, *J. Acoust. Soc. Am.*, 99（4）:1965-1970（1996）；及 Yasuda et al., *Jpn. J. Appl. Phys.*, 35（1）:3295-3299（1996））。此外，就離子滲透率（以紅血球進行的試驗；Yasuda et al, *J. Acoust. Soc. Am.*, 102（1）:642-645（1997））或抗體產率（以融合瘤細胞進行的試驗；Pui et al, *Biotechnol. Prog.*, 11:146-152（1995））而言，使用聲輻射力來操作哺乳類細胞僅有少許或並未觀察到

25 損傷或有害的影響。

聲波場可以藉由一聲能轉換器來建立，例如，壓電陶瓷如 PZT 材質。該壓電式轉換器係由「壓電材料」所製得，其在被施予一機械力（壓電或發電機效應（generator effect））而改變尺寸時會產生一電場。反過來說，一施予之電場會於該材料中產生機械應力（電伸縮或電動機效應）。它們會將能量自機械能轉換為電能，反之亦然。當交流電壓（AC）被施予該壓電式轉換器時，該轉換器會產生振動且該振動會連動至容置於包含有該壓電式轉換器之腔室內的流體。

一聲波晶片可包含聲波轉換器因此當一適當頻率的交流訊號被施予至該聲波轉換器上的電極時，相應之機械應力便會於壓電材料中產生並被傳遞至腔室中的液體溶液。在該腔室係被設置以使一駐聲波係沿著波延伸及反射方向（如，Z 軸）產生的情況下，該沿著 Z 軸而有流體中有空間上之變化的駐波可以下列公式表達：

$$\Delta p(z) = p_0 \sin(kz) \cos(\omega t),$$

其中， Δp 係為在 Z 軸的聲壓， p_0 係為聲壓振幅， k 代表波數（ $2\pi/\lambda$ ，其中 λ 係為波長）， z 係指距離壓力節點（pressure node）的距離， ω 代表角頻率，且 t 係為時間。在一個實例中，該駐波聲場可係經由一形成一腔室之絕大部分面積的聲波轉換器所產生之聲波，與來自該腔室另一大部分與該聲波轉換器平行設置且反射該來自轉換器的聲波之面積的反射波重疊而產生。根據 Yosioka 及 Kawasima 所建立的理論（Acoustic Radiation Pressure on a Compressible Sphere by Yosioka K. and Kawasima Y. in *Acustica*, Volume 5, pages 167-173, 1955），於一穩定的駐波場中作用於一球形粒子的該聲波力 $F_{acoustic}$ 係由以下公式表示：

$$F_{acoustic} = -\frac{4\pi}{3} r^3 k E_{acoustic} A \sin(2kz) ,$$

其中 r 表示該粒子的半徑， $E_{acoustic}$ 表示聲波能量的平均密度， A 係指下列公式所示之常數：

$$A = \frac{5\rho_p - 2\rho_m}{2\rho_p + \rho_m} - \frac{\gamma_p}{\gamma_m} ,$$

其中 ρ_m 及 ρ_p 係指該粒子及該介質的密度， γ_m 及 γ_p 分別為該粒子及該介質的壓縮係數。一材料的壓縮係數係指該材料的密度與該材料中聲波的速率。該壓縮係數有時亦稱為聲波阻抗。 A 代表聲波極化因子 (acoustic-polarization-factor)。

10 當 $A > 0$ ，該粒子朝向該駐波的壓力節點 ($z=0$) 移動。

當 $A < 0$ ，則該粒子移動遠離該壓力節點。

作用於粒子的聲輻射力係取決於聲波能量的密度分布、粒子密度及壓縮係數。具有不同密度及壓縮係數的粒子在面臨相同駐聲波場時將會承受不同的聲輻射力。舉例來說，基於所建立之聲波能量的密度分布，作用於直徑為 10 微米之粒子的聲輻射力可於 < 0.01 及 > 1000 pN 之間變化。

前揭分析係評估作用於一駐聲波中的粒子的聲輻射力。進一步的分析可延伸至作用於一旅聲波中的粒子的聲輻射力的情況。通常來說，一聲波場可能同時由駐波及旅波所組成。在這樣的情況下，於該腔室中的粒子所承受的聲輻射力則非屬於前述方程式中所描述的形式。下列所述科學文獻提供了關於經旅聲波及駐聲波而施加於球狀粒子的聲輻射力的詳細分析：Yosioka 等人所著「Acoustic Radiation Pressure on a Compressible Sphere」(Acustica (1955) 5:167-173)；及 Hasegawa 所著「Acoustic-Radiation force on a solid elastic

sphere」(J. Acoust. Soc. Am. (1969) 46:1139)。

該作用於粒子的聲輻射力可係由多種不同情形的聲波所產生。舉例來說，聲波力可係經由一聚焦光束 (focused beam) (Wu 及 Du 所著之「 Acoustic radiation force on a small compressible sphere in a focused beam 」，發表於 J. Acoust. Soc. Am., 87:997-1003 (1990)) 或聲鉗 (acoustic tweezer) (Wu 所著之「 Acoustic tweezers 」，發表於 J. Acoust. Soc. Am., 89:2140-2143 (1991)) 所產生。

於一流體中所建立的聲波場亦可誘發一時間獨立之流體流 (time-independent fluid flow)，即稱為聲波流 (acoustic streaming)。這樣的流體流亦可被利用於生物晶片或微流體晶片之運用，以供運輸或吸汲流體。更甚之，該聲波流體流可被應用於操作流體中的分子或微粒。該聲波流係取決於聲場分布及流體的性質 (Rooney J.A 所著之「 Nonlinear phenomena 」，於「 Methods of Experimental Physics: Ultrasonics 」的 Chapter 6.4, pages 319-327，編者：P.D. Edmonds；Nyborg W.L.M. 所著「 acoustic streaming 」，於「 Physical Acoustics, Vol. II-Part B, Properties of Polymers and Nonlinear Acoustics 」的 Chapter 11, pages 265-330, 1965)。

因此，一或多個主動式晶片，例如一或多個聲波力晶片，亦可被使用於促進試劑、溶液、或緩衝液的混合，其係於樣本添加及過濾程序之前、當中、或之後添加至一過濾腔中。舉例來說，試劑，例如但不限於：可協助去除不欲之樣本成份或捕捉所述之樣本成份，且可於過濾程序完成且該導管已關閉後才添加至一過濾腔的專一性鍵結分子。該主動式晶片的該聲波元件可被用於促進一或多個專一性鍵結分子與該樣本的混合，其中該樣本的總體積已經因為過濾而減少。其中一個例子是使樣

本成份與含有抗體的磁珠混合，該抗體可鍵結至樣本中的特定細胞種類（如，白血球細胞或胎兒有核紅血球）。在本發明之方法的依序步驟中，該磁珠可分別被用於選擇性地移除或分離（捕捉）不欲或所欲之樣本成份。該聲波元件可被啟動以供一連續的或間隔的混合程序。

微加工過濾器

在一個面向中，本發明包括一微加工過濾器，該微加工過濾器包含至少一錐形孔洞，其中一孔洞為該過濾器中的一個開口。一孔洞可以為任何形狀及任何尺寸。舉例來說，一孔洞的形狀可以為四邊形、矩形、橢圓形、或圓形、或其它形狀。一孔洞可以具有自約 0.1 微米至約 1000 微米的直徑，較佳地係自約 20 至約 200 微米，其係取決於該過濾之應用。較佳地，一孔洞是在以機器製造一過濾器時製造，且係經微蝕刻或經鑿入該過濾器的材料；該材料包含一硬質且流體無法通過的材料，如玻璃、矽、陶瓷、金屬、硬塑膠（如丙烯酸系塑膠、聚碳酸酯、或聚亞醯胺）。使用一由一堅硬的固體支持物所支持之相對而言較不堅硬的表面來形成該過濾器也是可行的。本發明的另一面向係關於該材料的修飾（例如但不限於：化學性或加熱性地修飾該材料為二氧化矽或氮化矽）。然而，較佳地，該過濾器係包含一不會被使用於產生流通該過濾器之流體流的壓力（如，吸引壓）所變形的硬質材料。

一狹縫即為一長度長過其寬度的孔洞；其中「長度」及「寬度」係指其開口於該過濾器之表面上的尺寸（所謂狹縫的「深度」則係對應於該過濾器的厚度）。換句話說，「狹縫」係描述該開口的形狀，其在多數情況中是約為矩形或橢圓形，但也可以是約為四邊形或平行四邊形。在一本發明的較佳實施態樣中，狹縫的寬度是決定哪些樣本成份可以通過而哪些則會被該過

濾器所保留住的決定性因素，該狹縫的形狀可在其末端產生變化（例如，是規則或不規則的形狀、有曲度或有角度者），但較佳的情況是絕大部分之該狹縫的長邊與該狹縫的另一個長邊之間係維持一定的距離，此距離即為該狹縫的寬度。因此，

5 一狹縫的長邊的絕大部分係彼此平行或接近平行。

較佳地，本發明之用於過濾的過濾器係微加工或微製程之過濾器，以致使在一過濾器中的孔洞或狹縫可以具有精確且均一的尺寸。相較於習用之以如尼龍、聚碳酸酯、聚酯、混合纖維素酯、聚四氟乙烯、聚醚磺（polyethersulfone）等材料所製

10 得的膜狀過濾器，該精確且均一之孔洞或狹縫尺寸係本發明之微加工或微製成過濾器的顯著優點。在本發明的過濾器中，個別的孔洞係獨立、具有相似或幾近相同的特性尺寸、且係特定地分布（patterned）於一過濾器。該過濾器提供以粒子的尺寸及其他特性精準的將其分離。

15 一過濾器的過濾區域係決定於該基材中包含有孔洞的區域。本發明之微加工過濾器的該過濾區域可以是介於約 0.01 mm^2 至約 0.1 m^2 的面積。較佳地，該過濾區域是介於約 0.25 mm^2 至約 25 cm^2 的面積，且更佳地，是該過濾區域是介於約 0.5 mm^2 至約 10 cm^2 的面積。大過濾區域使本發明之過濾器可以處理自

20 約 10 微升至約 10 升之體積的樣本。本發明之該過濾區域中自約 1% 至約 70% 可為孔洞所涵蓋，較佳地，是自約 10% 至約 50%，且更佳地，是自約 15% 至約 40%。本發明之微加工過濾器的過濾區域可包含任何數量的孔洞，較佳地是包含至少兩個孔洞，但更佳地，本發明之過濾器的過濾區域中所含的孔洞數

25 量係自約 4 至約 1,000,000，且又更佳地，是自約 100 至約 250,000。該過濾器於該過濾區域的厚度可為自約 10 至約 500 微米，但較佳地是介於約 40 及約 100 微米之間。

本發明之微加工過濾器具有蝕刻於該過濾器之基材本身的狹縫或孔洞。該過濾器的孔洞或開口可以經由於基材材料（包括但不限於：矽、二氧化矽、陶瓷、玻璃、聚合物如聚亞醯胺、聚醯胺等）上的微製程或微加工技術來製得。微影技術（microlithography）及微製程領域中習知的多種製程方法（參，例如，Rai-Choudhury P.（Editor），Handbook of Microlithography, Micromachining and Microfabrication, Volume 2: Micromachining and Microfabrication. SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Washington, USA（1997））可被使用。在許多情況中，可包含使用標準微製程及微加工方法及實驗流程（protocol）。合適之製造方法的一個例子是包含使用單一或多個光遮罩的光微影技術（photolithography）。微製程的實驗流程可包括許多基礎步驟，例如，光微影遮罩的生產、光阻的塗布、「犧牲」材料層塗布、以遮罩及顯影劑圖案畫光阻、或圖案化「犧牲」材料層。孔洞可係藉由特定遮罩程序以蝕刻該基材來製得，其係使被遮罩的區域不會被蝕刻而未被遮罩保護的區域則被蝕刻。該蝕刻方法可以為乾蝕刻（dry-etching）如深式反應離子蝕刻（deep reactive ion etching；RIE）、雷射剝蝕、或可以為包含使用化學液體（wet chemicals）的濕蝕刻。該基材材料可以是以正向製法來生成，藉此，該狹縫或孔洞看起來就像是該基材材料未形成的區域或圍繞著它們生成，或該基材材料可以圍繞著一遮罩電阻來生成，而該遮罩電阻在移除之後會產生孔洞或狹縫。

較佳地係選用合適的微製程或為加工技術來達成所欲之該過濾器孔洞的尺寸比。該尺寸比係指該狹縫深度（其係對應於該過濾器之具有該些孔洞的區域的厚度）與該狹縫寬度或狹縫長度的比例。高尺寸比（即，較長的狹縫深度）之過濾器狹

縫的製備可包含深式蝕刻法。許多合適於 MEMS (microelectronic mechanical systems; 微電子機械系統) 裝置之製造的方法, 例如深式反應離子蝕刻法, 可被使用或採用於製備該微加工過濾器。因為其高尺寸比及該蝕刻方法, 該所製得的孔洞可具有些微的錐形, 意即其開口於該過濾器的一側係較另一側來得狹窄。舉例來說, 在第四圖中, 一垂直地鑿穿該過濾器基材的示例孔洞的角度 γ 為 90 度, 而本發明之微加工過濾器之有別於該垂直孔洞的錐形孔洞的錐角, 依據該過濾器的厚度 (孔洞深度), 係介於約 0 度至約 90 度, 且較佳地係介於 0.1 度至約 45 度, 且更佳地係介於約 0.5 度至約 10 度。

本發明包括含有兩個或更多之錐形孔洞的微加工過濾器。該製備或加工有該過濾器之孔洞、狹縫或開口的基材可為矽、二氧化矽、塑膠、玻璃、陶瓷或其他固體材料。該固體材料可以多孔洞或非孔洞者。該些熟習微製程及微加工製造程序者可無歧異地選擇及確定可使用於製造特定之過濾器的構造的加工流程和材料。

藉由使用該微製程或微加工方法, 該過濾器的狹縫、孔洞、或開口可以被製為精確的構型。依據所使用的製造方法或材料, 該過濾器之狹縫的單一象限 (例如狹縫長度、狹縫寬度) 的精確度可以在 20% 以內、或低於 10%、或小於 5%。因此, 本發明之該過濾器孔洞之關鍵的單一象限的精確度可以被製為, 較佳地, 小於 2 微米之內; 更佳地, 小於 1 微米; 或又更佳地小於 0.5 微米。

本發明之過濾器較佳地是使用循跡蝕刻技術 (track-etch technique), 於其中, 該由玻璃、矽、二氧化矽、或聚合物如聚碳酸酯或聚酯所製得之具有個別獨立且均一尺寸的孔洞的過濾器可以被製得。舉例來說, 該過濾器可藉由採納及利用該循

跡蝕刻技術於過濾器材：其中該循跡蝕刻技術係被描述用以製備微孔洞循跡蝕刻膜（Nucleopore Track-etch membrane）。在使用於製備膜狀過濾器的技術中，一薄聚合物膜被高能重粒子撞擊（tracked）以於該膜上形成潛性的軌跡。該膜接著被放置於一蝕刻液中以製得孔洞。

本發明之用於細胞分離法及系統的較佳過濾器包括微加工或微機製的過濾器，其經精確的構型製備以具有該過濾器上的開口。個別的開口係以相似或幾近相同的特徵尺寸彼此獨立且特定地分布（patterned）於一過濾器上。該些開口可具有不同的形狀，例如，圓形、四邊形、或橢圓形。該過濾器可依據粒子的尺寸和其他特性精準地進行粒子的分離。

在微加工過濾器的一個較佳實施態樣中，個別之孔洞係彼此獨立且為圓柱狀，且其孔洞尺寸的差異度係在 20% 以內；其中該孔洞尺寸係量測該孔洞的最短及最長維度（分別為寬及長）。

II 使用微過濾以富集化一流體樣本中的稀少細胞的方法

在另一面向中，本發明提供一種使用微過濾以富集化一流體樣本之稀少細胞的方法，該微過濾係透過一本發明之過濾腔。該過濾器包含一容置於一外殼中的微加工過濾器；其中前述過濾器及/或前述外殼的內表面係經氣相沉積法、昇華作用、氣相表面反應、或粒子濺射修飾以產生一均勻塗層。該方法包括：將一樣本配送至一過濾器，該過濾器包含或裝設有一容置於一外殼中的微加工過濾器；其中前述過濾器及/或前述外殼的內表面係經氣相沉積法、昇華作用、氣相表面反應、或粒子濺射修飾以產生一均勻塗層；提供一通過該過濾腔之該樣本的流體流，藉此，依據成份的尺寸、形狀、或形變性，該流體樣本

的成份會流經或被一或多個微加工過濾器保留。在許多實施態樣中，該方法可進一步包含以一物理作用力來操作該流體樣本；其中前述操作係藉由一該過濾器以外的結構及/或一內建於該過濾器上的結構來產生。在許多實施態樣中，該方法可進一步包含自該過濾腔收集經富集化的稀少細胞。在許多實施態樣中，過濾程序可以將一樣本中可溶及微小的成份自該細胞中至少部分細胞分離，以濃縮該被保留的細胞，而有助於進一步的分離及分析。在許多面向中，過濾程序可以自一樣本中去除不欲的成份，例如但不限於：不欲保留的細胞類型。在過濾程序降低一樣本之至少 50%的體積或去除一樣本之大於 50%之細胞成份的情況下，該過濾程序可視為一減積步驟（debulking step）。本發明教示該過濾程序的運用於減積（debulking）及處理一樣本的其他功能，例如，濃縮樣本成份或分離樣本成份（包括，如去除不欲保留之樣本成份及保留所欲之樣本成份）。

15 樣本

一樣本可以為任何流體樣本，例如一環境樣本，包括空氣樣本、水樣本、食物樣本、及生物性樣本，包括環境樣本或生物性樣本的懸浮液、萃取液、或瀝取液。生物性樣本可為血液、一骨髓樣本、一任何形態的滲出液、腹水、骨盆腔積液、或肋膜腔積水、脊髓液、淋巴液、血清、黏液、痰、唾液、尿液、精液、眼內液、鼻腔、咽喉或生殖道拭子抽出物、經分解之組織的細胞懸浮液、或胎兒物質的抽出物。生物性樣本也可以是來自於器官或組織的樣本（包括腫瘤），如細針抽出物或來自於器官或組織之灌注液的樣本。生物性樣本也可以是細胞培養的樣本，包括初級培養或細胞株。一樣本的體積可以非常的小，例如在微升的範圍，且可甚至需要稀釋，或者，一樣本可以非常的大量，如約兩公升的腹水。一較佳的樣本為一血液樣

本。

一血液樣本可為任何血液樣本，其係剛剛取自於一個體、取自儲存庫、或自一個體以外的來源取得，例如衣物、傢俱襯墊 (upholstery)、器材等。一血液樣本因此可以是取自於一萃
 5 取物，例如，將一含有血液的物體浸濡於一緩衝液或溶液中。一血液樣本可以係未被處理或被部分的處理，舉例來說，一經透析 (dialyzed) 的血液樣本係含有試劑添加於其中等。一血液樣本可以為任何體積，例如，視其應用而定，一血液樣本可以是少於 5 微升，或大於 5 公升。然而，較佳地，一經本發明之
 10 方法處理過的血液樣本的體積係自約 10 微升至約 2 公升，更佳地，其體積係自約 1 毫升至約 250 毫升，且又更佳地，其體積係介於約 5 及 50 毫升之間。

一樣本中欲富集化的稀少細胞可以為任何細胞形態，其係於每毫升之流體樣本中具有少於 1 百萬個細胞，或於一流體樣
 15 本中佔有核細胞群體少於 1% 者。稀少細胞可為，例如，細菌細胞、真菌細胞、寄生生物細胞、受寄生生物、細菌、或病毒感染細胞、或真核細胞；該真核細胞例如，但不限於成纖維母細胞或血液細胞。稀少血液細胞可為 RBCs (如，如果該樣本是每一毫升含有少於 1 百萬個紅血球細胞的萃取液或瀝取
 20 液)、血液細胞的亞群及血球細胞類 (例如 WBCs 或 WBCs 的亞群，如，T 細胞或巨噬細胞)、有核紅血球細胞、或可以為胎兒細胞 (包括但不限於有核紅血球細胞、滋胚細胞、顆粒性白血球、或單核白血球)。稀少細胞可以為任何形態的幹細胞或先驅細胞。稀少細胞也可以為癌細胞，包括但不限於：瘤細胞、
 25 惡性細胞、及轉移細胞。一血液樣本中的稀少細胞亦可為非造血細胞，例如但不限於：上皮細胞。

將一樣本分配至過濾腔

一樣本可以任何便於操作的手段分配至一本發明的過濾腔。如非限制性實例中所示，樣本可以藉由使用一導管（如配送管）來導入（藉由該導管，一樣本係被汲送或注入該腔室，），或藉由重力供給（gravity feed）或機械直接地被灌入、注射，或手動地分配或以吸量管移送。將一樣本分配至一本發明的過濾腔可以是直接地分配至該過濾腔、經由一注入室以直接地或間接地分配至一過濾腔、或可以是進入一導入一過濾腔的導管、或進入一透過一或多個導管而導入一過濾腔的容器。一與配送管或一腔室流體連通的針（或任何流體提取裝置）亦可被使用於進入一管。該針可以自一含有一溶液的管中收集細胞並藉由使用一推或拉送一溶液的裝置（如幫浦或注射管）將該溶液分配至另一腔室。

過濾程序

將樣本添加入本發明之過濾腔之後，藉由產生流體流通該腔室來啟動過濾程序。可藉由任何手段來產生流體流，包括正壓或負壓（例如，透過一手動或機械操作的注視器系統）、汲送、或甚至重力。該過濾腔可具有連接至導管的閥，一緩衝液或溶液及該流體樣本或其成份可以於該導管中流動。一過濾單元也可以具有閥，其可控制流體流經該腔室。當該樣本被加入該過濾腔，且流體流被導向通過該腔室時，過濾器狹縫可允許流體、該樣本的可溶性成份、及一流體樣本的可過濾之不可溶成份經過過濾器，但，基於該狹縫的尺寸，可以阻止該流體樣本的其他成份通過該過濾器。

較佳地，流體流係自動地流經本發明之過濾腔，且係由一幫浦或正壓系統或負壓系統所驅動，但這並不是本發明的限制條件。最適合的流速係取決於欲過濾的樣本，包括該樣本中可過濾及無法過濾之成份的濃度及其會聚集及阻塞該過濾器的

程度。舉例來說，流經該過濾腔的流速可以為自低於每小時 1 毫升至高於每小時 1000 毫升，且流速並不是本發明之實施的限制條件。然而，一血液樣本之過濾程序的流速較佳地係自每小時 5 至 500 毫升，且更佳地係每小時自約 10 至約 50 毫升。

5 在製備穿過該過濾器基材之該過濾器狹縫時，可些微地隨著該狹縫深度的方向使該狹縫形成一尖端。藉此，一特定之狹縫寬度可以在該過濾器的厚度之間被維持一致，且該狹縫於該過濾器的一个表面上的寬度係特定地大於其於另一表面上的寬度。當運用該種具有錐形之狹縫寬度的過濾器時，較佳地係
10 使該過濾器中具有較狹窄之狹縫的一側面對該樣本，以使在過濾程序中，該樣本先通過該狹縫具有較狹窄之寬度的一側，然後經過濾的細胞於該狹縫具有較寬之寬度的一側離開。這樣可以避免使經過濾的細胞被困在漏斗狀的狹縫中。然而具有一或多個錐形狹縫個過濾器的方向並非使用本發明之過濾器的限制條件。基於特定的應用，該過濾器亦可使該較寬狹縫寬度的一側面對該樣本的方向來使用。
15

 在本發明的方法中，較佳地係使所需成份被該過濾器保留，該所需成份例如欲被富集化的稀少細胞。較佳地，在本發明的方法中，該樣本中所欲之稀少細胞係被該過濾保留而一或多個樣本中的無需成份則流過該過濾器，藉此使得該樣本中所欲之稀少細胞被富集化；其是藉著使該稀少細胞於該樣本被過濾器保留之部分的整體細胞中所佔的比例增加而達成，但這並非本發明的限制條件。舉例來說，在本發明的許多實施態樣中，過濾程序可以藉由降低一樣本的體積進而濃縮其中之稀少
20 細胞，而使該流體樣本中的稀少細胞被富集化。
25

 於過濾該樣本之後，可選擇性地使用一緩衝液來清洗該濾腔，以洗去任何殘留之可過濾細胞。該緩衝液可以與使用該樣

本相同的方式簡易地導入並流通該過濾，意即，較佳地係使用自動之流體流，如藉由一幫浦或壓力系統、或經由重力，或者該緩衝液可以使用與產生該樣本之流體流不同的手段。通常來說，該清洗緩衝液流經該腔室的速度會比樣本還要快，但這並非是一定的。可使用相同或不同的清洗緩衝液來進行一或多次清洗步驟。此外，可選擇性地例如藉由正壓或汲送使空氣通過該過濾腔，以推動殘餘的細胞通過該過濾腔。並且，也可以使一或多次清洗回沖進該過濾腔，以協助清洗該腔室或去除不欲之細胞或協助回收所欲之細胞。

10 額外之富集化步驟

本發明也揭露使用過濾程序於結合其他可以用於富集化一流體樣本之稀少細胞的步驟。例如，減積步驟或分離步驟可在過濾程序之前被使用，例如但不限於揭露於：美國專利申請號第 10/701,684 號案，發明名稱為「Methods, Compositions, and Automated Systems for Separating Rare Cells from Fluid Samples」，申請於西元 2003 年 11 月 4 日；美國專利申請號第 10/268,312 號案，發明名稱為「Methods, Compositions, and Automated Systems for Separating Rare Cells from Fluid Samples」，申請於西元 2002 年 10 月 10 日；該二者中關於可用於富集化一流體樣本中之稀少細胞的減積及分離程序，皆全部併入於本文中作為參考文獻。

III 用於自一血液樣本富集化稀少細胞的方法

在又另一個面向中，本發明包括新穎且改良之設計及方法以供自一血液樣本中分離稀少細胞。領域中習知且記載於美國專利申請號第 10/701,684 號案(申請於西元 2003 年 11 月 4 日)

及美國專利申請號第 10/268,312 號案（申請於西元 2003 年 10 月 10 日）的血液樣本製備及稀少細胞的富集化方法係併入於此作為參考文獻，且可以與本發明所揭露的方法及設計概念相互結合。

5 *母親血液樣本之篩選以分離胎兒細胞*

本發明包括用於自血液樣本中分離稀少細胞的方法，其包括選擇特定懷孕周齡的血液樣本以分離特定的胎兒細胞形態。

在本發明的一個較佳實施態樣中，一用於分離胎兒有核細胞的母親血液樣本係選自懷孕周齡為介於約 4 周及約 37 周之間者，較佳地係約 7 周至約 24 周者，且更佳地係介於約 10 周及約 20 周。在此實施態樣中，以用於分離胎兒有核細胞的母親血液樣本係自一懷孕周齡介於約 4 周及約 37 周的懷孕個體取得，較佳係約 7 周至約 24 周，且更加係且更佳地係介於約 10 周及約 20 周。於本文中所記載，一懷孕個體也可以包括一所指懷孕周齡之女性，其於採集血液樣本後的 24 小時內便發生流產。*使用第二清洗上澄清液於自一母親血液樣本分離胎兒細胞*

本發明也包括自一母親血液樣本中分離胎兒細胞的方法，於其中一第二離心步驟所得之上澄清液係用以作為該樣本的至少一部份，並於其中分離胎兒細胞；其中該第二離心步驟係在減積或分離步驟之前施行於該血液樣本以清洗其中的細胞。

使用抗體以去除一血液樣本中的血小板

本發明也包括使用一抗體或分子，其可以專一性地結合血小板或與血小板連結之分子。如一非限制性實例中所示，本發明所用之抗體或分子可專一性地鍵結至 CD31、CD36、CD41、

CD42 (a,b,c)、CD51、或 CD51/61。CD31 是一種內皮細胞及血小板的細胞標記分子，其對於胎兒細胞的鍵結能力極小。它應用於自一血液樣本分離血小板的內容係描述於實例中。

改良之磁性構型以捕捉樣本成份

5 一經減積的樣本，例如一經減積的血液樣本，可以與一或多種專一性鍵結分子作用；前述專一性鍵結分子例如但不限於：專一性辨識一流體樣本中一或多種無需成份(undesired component)的抗體。當一過濾器被使用於減積化該樣本，可選擇性地在一過濾腔中使一或多種專一性鍵結分子與該樣本混
10 合及作用。該一或多種無需成份可直接或間接地透過與該專一性鍵結分子的鍵結而被捕捉。舉例來說，一專一性鍵結分子可以被鍵結於一固體支持物（如一微珠、膜、或管柱基質），爾後與在該流體樣本與該專一性鍵結分子的作用中，含有不會產生鍵結之成份的該流體樣本則可以自該固體支持物被去除。可行地，一或多種第一專一性鍵結分子係與該流體樣本作用，然後，較佳地，於清洗以去除未鍵結的專一性鍵結分子後，該流體樣本可與一第二專一性鍵結分子接觸，該第二專一性鍵結分子可鍵結至固體支持物或被一固體支持物鍵結。在這樣的方式下，該一或多種樣本中的無需成份可鍵結至一固體支持物，而
15 使該無需成份自該流體樣本中分離。

在本發明的較佳面向中，一來自一懷孕個體之經減積的血液樣本係與覆蓋有抗體的磁珠作用；其中該抗體係專一性地與白血球鍵結且不會顯著地鍵結至胎兒有核細胞。該磁珠藉由啟動的電磁單元（如建構於一電磁晶片上者）來捕捉收集，或藉
25 由於一含有該流體樣本之容器（例如一管或管柱）的物理鄰近區的至少一個永久磁極來捕捉。藉由該磁極捕捉該磁珠後，便可將該容器中的剩餘流體樣本去除。可以手動的方式將該樣本

去除，例如藉由分量管吸取，或是藉由物理作用力如重力，或是藉由流過一分離管柱的流體流。在這樣的方式下，不要之白血球可以被選擇性地自一母親血液樣本中被移除。該樣本可選擇性地進一步被本發明之微加工過濾器過濾。過濾程序較佳地係去除該樣本中殘存的紅血球且亦可更進一步濃縮該樣本。

在一較佳實施態樣中，當與包含專一性鍵結分子之磁珠作用後（該專一性鍵結分子係專一性地鍵結至一樣本中的無需成份），該樣本將被移送以通過一分離管柱，該分離管柱包含或填充有至少一磁極。當該樣本流通該管柱時，鍵結至該磁珠之無需成份將吸附至該管柱鄰近該磁極的一或多個管壁。在一個可行的實施態樣中係使用一磁分離器（magnetic separator），例如 Immunicone 公司（Huntingdon Valley, PA）製造的磁分離器。磁性捕捉手段亦可包含使用一電磁晶片，其包含電磁物理作用力產生元件，如美國專利第 6,355,491 號案（發明名稱為「Individually Addressable Micro-Electromagnetic Unit Array Chips」，於西元 2002 年 3 月 12 日核准，由 Zhou 等人取得）、美國專利申請案第 09/955,343 號案（代理人編號：ART-00104.P.2，申請於西元 2001 年 9 月 18 日，發明名稱為「Individually Addressable Micro-Electromagnetic Unit Array Chips」）、及美國專利申請案第 09/685,410 號案（代理人編號：ART-00104.P.1.1，申請於西元 2000 年 10 月 10 日，發明名稱為「Individually Addressable Micro-Electromagnetic Unit Array Chips in Horizontal Configurations」）中所記載。在又另一較佳實施態樣中，一含有該樣本及磁珠的管子係被放置於一或多個磁極的旁邊，以供捕捉鍵結至磁珠的無需成份。該經去除該一或多個無需成份後的上澄清液，在該些微珠被收集於該管壁上後，便可自該管柱移出。

在本發明的許多較佳實施態樣中，自一樣本中去除白血球細胞的動作係與選擇性地沈澱紅血球而減積化該血液樣本的步驟同時進行。在這些實施態樣中，一選擇性地沈澱紅血球的溶液被添加至一血液樣本，且一專一性鍵結至白血球且係結合於一固體支持物（如磁珠）的專一性鍵結分子也被添加至該血液樣本。在混合之後，紅血球便被沈澱，且白血球則經由雌性捕捉手段而被捕捉。此可簡易地施行於一添加有沈澱溶液及該專一性鍵結分子（其較佳地係鍵結於磁珠）的管子中。該管子可以被搖動一段時間以使該樣本混合，然後再放置於一或多個磁極旁邊以捕捉該磁珠。在這樣的方式中，於單一次作用及沈澱步驟下，約 99% 的 RBCs 及 99% 的 WBCs 可以自一樣本中移除。該上澄清液可以自該管子中移出並導入本發明之微加工過濾器以進行過濾。過濾程序將移除殘存的 RBCs，而取得一其中之稀少細胞（如，胎兒細胞、癌細胞、或幹細胞）被富集化的樣本。

一樣本之無需成份可使用有別於使用專一性鍵結分子之方法的方法來去除。例如，特定細胞種類的介電特性可被利用於以介電泳法來分離無需成份。舉例來說，第二十二圖描繪，在紅血球被洗出該腔室後，一經稀釋之血液樣本中的白血球被保留於一介電泳晶片的電極上。

供沈澱紅血球及選擇性地移除一血液樣本中的無需成份的組合溶液

在本發明的較佳實施態樣中，一用於沈澱紅血球的溶液也可以包括一或多種額外的專一性鍵結分子，該專一性鍵結分子可以用於選擇性地自該血液樣本中移除紅血球以外的不欲樣

本成份。於此，本發明包括一組合之沈澱溶液，其係用於富集
化一血液樣本中的稀少細胞；前述溶液沈澱紅血球且提供去除
樣本中其他無需成份所需的試劑。因此，一用於處理一血液樣
5 本的組合溶液包含：六碳醣、至少一專一性鍵結分子（其可誘
發紅血球的凝集）、及至少一額外的專一性鍵結分子（其可專
一性地鍵結該樣本中紅血球以外的無需成份）。

用於移除無需成份的專一性鍵結分子

除了本發明之沈澱溶液中的成份，本發明之組合溶液可包
10 含至少一專一性鍵結分子，其可選擇性地鍵結一血液樣本中的
無需成份（例如但不限於：白血球、血小板、血清蛋白）且對
於所需成份僅有低的結合能力。一或多種可以選擇性地鍵結至
一血液樣本中的非 RBC 之無需成份的專一性鍵結分子可以被
使用於去除該樣本中的無需成份，而增加稀少細胞於該樣本中
15 所占的比例，並且可藉此對於富集化該樣本中的稀少細胞作出
貢獻。所述「選擇性鍵結（selectively binds）」意指本發明方法
中所用的專一性鍵結分子，其可移除一或多種不欲之樣本成份
而不會顯著地鍵結至該流體樣本中所欲之稀少細胞。所謂「不
會顯著地鍵結」意指一或多種所欲之稀少細胞中與該用以自該
20 流體樣本中移除非 RBC 之無需成份的專一性鍵結分子鍵結的
細胞量不超過 30%，較佳地係不超過 20%，更佳地係不超過
10%，且又更佳地係不超過 1.0%。在許多情形中，一血液樣本
的中的無需成份係為白血球。在本發明的較佳實施態樣中，一
本發明之組合溶液可以被使用於自一血液樣本中沈澱紅血球
25 及去除白血球。

在非限制性實例中，一可專一性地鍵結至白血球的專一性

鍵結分子可為一抗體、一受器、轉運蛋白 (transporter)、通道、或其他白血球表面之部分的受質、 或一外源凝集素 (lectin) 或其他可專一性鍵結至一白血球表面之特定醣部分的蛋白質 (例如，凝集素 (selectin))。

5 較佳地，一選擇性鍵結至白血球的專一性鍵結分子為一抗體，其鍵結至白血球但不會顯著地與胎兒有核細胞鍵結，例如，一辨識 CD3、CD11b、CD14、CD17、CD31、CD45、CD50、CD53、CD63、CD69、CD81、CD84、CD102、或 CD166 的抗體。抗體可自市面上的供應商購得，例如，Dako、BD
10 Pharmingen、Antigenix America、Neomarkers、Leinco Technologies、Research & Diagnostic Systems、Serotec、United States Biological、Bender Medsystems Diagnostics、Ansell、Leinco Technologies、Cortex Biochem、CalTag、Biodesign、Biomeda、Accurate Chemicals & Scientific、及 Chemicon
15 International。可使用領域中習知的捕捉試驗來測試抗體鍵結及有效地去除白血球並使一樣本中所欲之稀少細胞富集化的能力。

 選擇性地鍵結至一或多種無需成份之本發明專一性鍵結分子可被使用於捕捉一或多種非 RBC 之無需成份，藉此該流體
20 樣本中一或多種所需成份即可自該無需成份被鍵結住的區域或容器中被移出。如此一來，該無需成份便可以與該樣本中的其他成份 (包括欲被分離的稀少細胞) 分離。該捕捉程序可藉由將可辨識該無需成份的該專一性鍵結分子固著於一固體支持物來施行，或藉由鍵結可辨識該鍵結至該無需成份的專一性
25 鍵結分子的第二專一性鍵結分子至一固體支持物而使得該無需成份即等同於鍵結至該固體支持物來施行。在本發明的較佳實施態樣中，於一本發明之組合溶液中用於選擇性鍵結至無需

成份的專一性鍵結分子係結合至一固體支持物，例如微粒，但此特徵並非本發明的限制條件。

5 磁珠是使用於本發明方法中的較佳固體支持物，而選擇性鍵結至不欲樣本成份的專一性鍵結分子係與其結合。磁珠係領域中所習知且可於市面上所購得。結合分子（包括蛋白質如抗體或凝集素）至微粒（例如磁珠）的方法是領域中所習知的技術。本發明較佳使用的磁珠係具有自 0.02 至 20 微米的直徑，較佳地是自 0.05 至 10 微米的直徑，且更佳地係自 0.05 至 5 微米的直徑，又更佳地係自 0.05 至 3 微米的直徑，並且被提供於
10 本發明之一組合溶液且較佳地係覆蓋有第一專一性鍵結分子（例如一抗體，其可鍵結至一期能自該樣本被移除的細胞）、或可鍵結至第一專一性鍵結分子的第二專一性鍵結分子；該第二專一性鍵結分子例如為卵白素，該第一專一性鍵結分子例如為經標定生物素的第一專一性鍵結分子。

15 在本發明的較佳實施態樣中，該流體樣本為一母親血液樣本，該欲分離的稀少細胞為胎兒細胞，且該樣本中欲被去除的無需成份為白血球。在這些實施態樣中，一選擇性地鍵結至白血球的專一性鍵結分子係被使用以供藉由磁性捕捉法自該樣本中去除該白血球。較佳地，被提供之該專一性鍵結分子係固著於磁珠以供進行直接捕捉，或係被提供為被生物素標的的形式以供藉由卵白素覆蓋之磁珠來進行間接捕捉。
20

本發明之用於富集化一血液樣本中的稀有細胞的組合溶液亦可包括其他成份，例如但不限於：鹽類、緩衝試劑、用以維持特定滲透壓的試劑、螯合劑、蛋白質、脂質、小分子、抗凝劑等。舉例來說，在本發明的較佳實施態樣中，一組合溶液包含生理鹽溶液，如 PBS、不含鈣鎂的 PBS、漢克平衡鹽緩沖液（HBSS）。在本發明的較佳面向中，EDTA 或肝素係被使
25

用以避免紅血球凝集。

IV 使用自動化系統以富集化一流體樣本中的稀少細胞的方法

5 在又另一面向中，本發明亦包括使用本發明之自動化系統以富集化一流體樣本中的稀少細胞的方法。該方法包括但不限於：將一樣本導入一本發明的自動化系統；於該樣本被導入該系統之前或之後添加試劑至該樣本，混合該樣本及該試劑；使 RBCs 沈澱及去除無需成份；收集含有所欲細胞的上澄清液；過濾該樣本通過該自動化系統中的至少一個過濾腔；自該自動
10 化系統的至少一容器或至少一出口收集經富集化的稀少細胞。

樣本

一樣本可以為任何流體樣本，例如一環境樣本，包括空氣樣本、水樣本、食物樣本、及生物樣本，包括生物樣本的萃取
15 液。生物樣本可為血液、一骨髓樣本、一任何形態的滲出液、腹水、骨盆腔積液、肋膜腔積水、脊髓液、淋巴液、血清、黏液、痰、唾液、尿液、陰道或尿道洗滌液、精液、眼內液、鼻腔、咽喉或生殖道拭子抽出物、經分解之組織的細胞懸浮液、或胎兒物質的抽出物。生物性樣本也可以是來自於器官或組織
20 的樣本（包括腫瘤），如細針抽出物或來自於器官或組織之灌注液的樣本。生物性樣本也可以是細胞培養的樣本，包括初級培養或細胞株。一樣本的體積可以非常的小，例如在微升的範圍，且可甚至需要稀釋，或者，一樣本可以非常的大量，如約
25 10 公升的腹水。一較佳的樣本為尿液樣本。另一較佳樣本則為血液樣本。

一生物性樣本可為任何樣本，其係剛剛取自於一個體、取

自儲存庫、或自一個體以外的來源取得，例如衣物、傢俱襯墊（upholstery）、器材等。舉例而言，一血液樣本因此可以是取自於一萃取物，例如，將一含有血液的物體浸濡於一緩衝液或溶液中。一生物樣本係可以未被處理或被部分的處理，舉例來說，一經透析（dialyzed）的血液樣本係含有試劑添加於其中等。一生物樣本可以為任何體積，例如，視其應用而定，一血液樣本可以是少於 5 微升，或大於 5 公升。然而，較佳地，一經本發明之方法處理過的血液樣本的體積係自約 10 微升至約 2 公升，更佳地，其體積係自約 1 毫升至約 250 毫升，且又更佳地，其體積係介於約 5 及 50 毫升之間。

導入樣本

在本發明的較佳實施態樣中，一或多個樣本可以被放置於一或多個管子中，該管子可以被放置於該自動化系統的載架。該載架可以被自動地或手動地送入該自動化系統以供樣本操作程序。

可行地，藉由吸量管吸取或注射一樣本通過一自動化系統的入口，該樣本可以被配送至該自動化系統，或該樣本可以被灌入、被吸量管吸取至、或被汲送至該自動化系統的導管或注入室。在多數情形中，該樣本係於一最適合沈澱細胞之分離的管子，但也可以是任何形態之用於盛裝液體樣本的容器，例如一盆、盤、井、或腔室。

在將一樣本分配進入該自動化系統的容器或腔室之前，可選擇性地將溶液或試劑加入該樣本。溶液和試劑可選擇性地於該樣本被導入一本發明的自動化系統之前或之後被加至該樣本。如果一溶液或試劑係在一樣本被導入一本發明的自動化系

統之後才加至該樣本，其可以選擇性地在該樣本於一管子、容器、或注入室且係於混合或作用步驟、沈澱步驟、或導入一過濾腔前被添加至該樣本。可行地，一溶液或試劑可以透過一或多個導管（例如管道）而被添加至一樣本，且該樣本及一溶液或試劑的混合係於導管中產生。也可以是在該樣本被導入一本發明之腔室（例如但不限於，一過濾腔）後才添加一或多種溶液或試劑，其係直接添加該一或多種至該腔室，或透過導向該腔室的導管。

該樣本（及，選擇性地，任何溶液或試劑）可以是藉由正壓或負壓（如藉由一注射幫浦）而被導入該自動化系統。該樣本可以全部一次被添加至該自動化系統，或是被逐步地添加以使部分的樣本被過濾後才添加其他的樣本。一樣本也可以係被批次地添加，意即當一樣本的第一部分被添加且被過濾通過一腔室後，再接續地使一樣本的后續批次被加入及過濾。

15

供沈澱紅血球及選擇性地移除一血液樣本中的無需成份的組合溶液

在本發明的較佳實施態樣中，一用於沈澱紅血球的溶液也可以包括一或多種額外的專一性鍵結分子，該專一性鍵結分子可以用於選擇性地自該血液樣本中移除紅血球以外的不欲樣本成份。於此，本發明包括一組合之沈澱溶液，其係用於富集化一血液樣本中的稀少細胞；前述溶液沈澱紅血球且提供去除樣本中其他無需成份所需的試劑。因此，一用於處理一血液樣本的組合溶液包含：六碳醣、至少一專一性鍵結分子（其可誘發紅血球的凝集）、及至少一額外的專一性鍵結分子（其可專一性地鍵結該樣本中 RBCs 以外的無需成份）。

25

添加沈澱溶液至樣本

一紅血球沈澱溶液可以藉由任何習知的手段而被添加至一血液樣本，例如，以吸量管吸取 (pipeting)、自動化液體取/送裝置或系統、透過導管汲送等。添加至一血液樣本的沈澱溶液的
5 量可以變化，且絕大多數而言是依據該沈澱溶液中六碳醣及專一性鍵結分子的濃度而定 (及其他成份)，藉此它們的濃度可以是絕佳地適合與該血液樣本混合。最佳地，一血液樣本的體積係被用於評估，而該沈澱溶液被添加至該血液樣本的適合比例體積係介於自 0.01 至 100 倍於該樣本的體積，較佳地係
10 介於 0.1 倍至 10 倍於該樣本體積，且更佳地係自 0.25 至 5 倍於該樣本體積，且又更佳地係自 0.5 倍至 2 倍於該樣本體積。(也可以是將一血液樣本或其部分添加至一紅血球沈澱溶液中。在這樣的情形下，一確定體積之沈澱溶液係被放置於一管子或其他
15 容器中，然後將一量定體積的血液樣本加入該沈澱溶液中)。

用於移除無需成份的專一性鍵結分子

除了本發明之沈澱溶液中的成份，本發明之組合溶液可包含至少一專一性鍵結分子，其可選擇性地鍵結一血液樣本中的
20 無需成份 (例如但不限於：白血球、血小板、血清蛋白) 且對於所需成份僅有低的結合能力。一或多種可以選擇性地鍵結至一血液樣本中的非 RBC 之無需成份的專一性鍵結分子可以被使用於去除該樣本中的無需成份，而增加稀少細胞於該樣本中所占的比例，並且可藉此對於富集化該樣本中的稀少細胞作出
25 貢獻。所述「選擇性鍵結 (selectively binds)」意指本發明方法中所用的專一性鍵結分子，其可移除一或多種不欲之樣本成份

而不會顯著地鍵結至該流體樣本中所欲之稀少細胞。所謂「不會顯著地鍵結 (does not appreciably bind)」意指一或多種所欲之稀少細胞中與該用以自該流體樣本中移除非 RBC 之無需成份的專一性鍵結分子鍵結的細胞量不超過 30%，較佳地係不超過 20%，更佳地係不超過 10%，且又更佳地係不超過 1.0%。在許多情形中，一血液樣本中的無需成份係為白血球。在本發明的較佳實施態樣中，一本發明之組合溶液可以被使用於自一血液樣本中沈澱紅血球及去除白血球。

在非限制性實例中，一可專一性地鍵結至白血球的專一性鍵結分子可為一抗體、一受器、轉運蛋白 (transporter)、通道、或其他白血球表面之部分的受質、或一外源凝集素 (lectin) 或其他可專一性鍵結至一白血球表面之特定醣部分的蛋白質 (例如，硫酸化之路易斯型碳水化合物 (sulfated Lewis-type carbohydrates)、醣脂質、蛋白多醣、或凝集素)。

較佳地，一選擇性鍵結至白血球的專一性鍵結分子為一抗體，其鍵結至白血球但不會顯著地與胎兒有核細胞鍵結，例如，一辨識 CD3、CD11b、CD14、CD17、CD31、CD45、CD50、CD53、CD63、CD69、CD81、CD84、CD102、或 CD166 的抗體。抗體可自市面上的供應商購得，例如，Dako、BD Pharmingen、Antigenix America、Neomarkers、Leinco Technologies、Research & Diagnostic Systems、Serotec、United States Biological、Bender Medsystems Diagnostics、Ansell、Leinco Technologies、Cortex Biochem、CalTag、Biodesign、Biomeda、Accurate Chemicals & Scientific、及 Chemicon International。可使用領域中習知的捕捉試驗來測試抗體鍵結及有效地去除白血球並使一樣本中所欲之稀少細胞富集化的能力。

選擇性地鍵結至一或多種無需成份之本發明專一性鍵結分子可被使用於捕捉一或多種非 RBC 之無需成份，藉此該流體樣本中一或多種所需成份即可自該無需成份被鍵結住的區域或容器中被移出。如此一來，該無需成份便可以與該樣本中的其他成份（包括欲被分離的稀少細胞）分離。該捕捉程序可藉由將可辨識該無需成份的該專一性鍵結分子固著於一固體支持物來施行，或藉由鍵結可辨識該鍵結至該無需成份的專一性鍵結分子的第二專一性鍵結分子至一固體支持物而使得該無需成份即等同於鍵結至該固體支持物來施行。在本發明的較佳實施態樣中，於一本發明之組合溶液中用於選擇性鍵結至無需成份的專一性鍵結分子係結合至一固體支持物，例如微粒，但此特徵並非本發明的限制條件。

磁珠是使用於本發明方法中的較佳固體支持物，而選擇性鍵結至不欲樣本成份的專一性鍵結分子係與其結合。磁珠係領域中所習知且可於市面上所購得。結合分子（包括蛋白質如抗體、凝集素、及抗生物素蛋白（avidin）、及其衍生物）至微粒（例如磁珠）的方法是領域中所習知的技術。本發明較佳使用的磁珠係具有自 0.02 至 20 微米的直徑，較佳地是自 0.05 至 10 微米的直徑，且更佳地係自 0.05 至 5 微米的直徑，又更佳地係自 0.05 至 3 微米的直徑，並且被提供於本發明之一組合溶液且較佳地係覆蓋有第一專一性鍵結分子（例如一抗體，其可鍵結至一期能自該樣本被移除的細胞）、或可鍵結至第一專一性鍵結分子的第二專一性鍵結分子；該第二專一性鍵結分子例如為卵白素或中性卵白素，該第一專一性鍵結分子例如為經標定生物素的第一專一性鍵結分子。

在本發明的較佳實施態樣中，該流體樣本為一母親血液樣本，該欲分離的稀少細胞為胎兒細胞，且該樣本中欲被去除的

無需成份為白血球及其它血清成份。在這些實施態樣中，一選擇性地鍵結至白血球的專一性鍵結分子係被使用以供藉由磁性捕捉法自該樣本中去除該白血球。較佳地，被提供之該專一性鍵結分子係固著於磁珠以供進行直接捕捉，或係被提供為被生物素標的的形式以供藉由卵白素覆蓋之磁珠來進行間接捕捉。

本發明之用於富集化一血液樣本中的稀有細胞的組合溶液亦可包括其他成份，例如但不限於：鹽類、緩衝試劑、用以維持特定滲透壓的試劑、螯合劑、蛋白質、脂質、小分子、抗凝血劑等。舉例來說，在本發明的較佳實施態樣中，一組合溶液包含生理鹽溶液，如 PBS、不含鈣鎂的 PBS、漢克平衡鹽緩沖液（HBSS）。在本發明的較佳面向中，EDTA 或肝素係被使用以避免紅血球凝集。

15 混合

該血液樣本和紅血球沈澱溶液係被混合以使該化學性 RBC 凝集試劑（如一聚合物，例如六碳醣）及該沈澱溶液中之一或多種專一性鍵結分子，以及該血液樣本的成份被均勻地分散於該樣本容器中。混合步驟可以藉由例如電動聲波混合（acoustic mixing）、攪拌、搖動、倒置、攪動等手段來達成。某些方法如搖動及倒置比較不容易損害細胞，因此是比較合適的。

血液樣本和沈澱溶液之間的作用

該混合有沈澱溶液的樣本係被置於產生作用以使紅血球沈澱。較佳地，該含有該樣本的容器於沈澱過程中係被穩定地放置以使該細胞有效地沈澱。該沈澱反應可以於約 5°C 至約

37°C 之間的任何溫度下施行。在大多數的情況中，可簡易地使該步驟於自約 15°C 至約 27°C 下進行。最佳的沈澱反應作用時間可依據所用之沈澱溶液並示經驗而定，其中係基於一些因素而有所變化，如六碳醣及專一性鍵結分子於該溶液中的濃度、該血液樣本於添加該沈澱溶液後的稀釋率、及作用進行的溫度。較佳地，該沈澱反應的作用時間係自 5 分鐘至 24 小時，更佳地係自 10 分鐘至 4 小時，且又更佳地係自約 15 分鐘至約 1 個小時。在本發明之許多較佳面向中，該作用時間係約 30 分鐘。

10

透過該自動化系統的腔室以過濾該樣本

一樣本可以在進行一或多個減積步驟或一或多個分離步驟之前或之後，於本發明的自動化系統中被過濾。該些減積或分離步驟可包括但不限於一 RBC 沈澱步驟或藉由專一性鍵結分子的去積步驟。該樣本可以被直接移送至一過濾腔（如經手動或自動化配送）或可以透過一導管進入一過濾腔。在一樣本被加入一過濾腔後，它將被過濾而減少該樣本的體積，且，可選擇性地去除一樣本中的無需成份。為了過濾該樣本，流體流係被導向通過該腔室。以自動化的方式導向流體流流經該腔室係較手動方式來得好，例如藉由自動之注射幫浦。透過導向該過濾腔之導管，該幫浦可以藉由施予之正壓或負壓來操作。該流體流流經一過濾腔的速度可以為任何有效過濾的速度，且就一全血樣本而言，其係較佳地為每小時約 1 至約 1000 毫升，更佳地係每小時約 5 至約 500 毫升，又更佳地係介於每小時約 10 至約 50 毫升之間。於添加一樣本至一過濾腔後，一幫浦或流體分配系統可以選擇性地導入一緩衝液或溶液的流體流進入該腔室以清洗該腔室中額外的可過濾樣本成份。

15

20

25

當該樣本被添加至該過濾腔，且流體流係被導向流經該腔室時，該過濾器中的孔洞或狹縫可以允許流體、該樣本的可溶成份、及一流體樣本之部分不可溶成份通過一或多個過濾器，但藉其尺寸，可以阻止該流體樣本中的其他成份通過該一或多個過濾器。

舉例來說，在一較佳實施態樣中，一流體樣本可以被配送進入一過濾腔，其包含至少一過濾器，而該過濾器包含複數個狹縫。該腔室可具有選擇性地連結至導管的孔洞，且透過該導管，一緩衝液或溶液及該流體樣本或其成份可以流通。當該樣本被加入該腔室且流體流係被導向流經該腔室時，該狹縫可以允許流體及，選擇性地，一流體中的部分成份流經該過濾器，但限制該流體樣本中的其他成份通過該過濾器。

在本發明的許多實施態樣中，一主動式晶片（其係該過濾腔的一部份）可以被使用於在過濾程序中混合該樣本。舉例來說，一主動式晶片可以為一聲波晶片（acoustic chip），其包含一過多個聲波元件。當一來自電源供應器的電子訊號啟動該聲波元件後，它們可以提供振動能以促使一樣本中的成份混合。一主動式晶片（其係為本發明之過濾腔的一部份）也可以為一介電泳晶片，其包含建構於一過濾器之表面上的微電極。當一來自電源供應器的電子訊號被傳遞至該電極時，它們可以提供一負介電泳力，以將一樣本中的成份推離該過濾器的表面。在此實施態樣中，建構於該過濾器/晶片之表面上的該電極係較佳地被間歇性地啟動，因應流體流停止或大幅度地減緩時。

於過濾程序中樣本的混合係被施行以避免過濾效率因為樣本成份的聚集而降低，尤其是當流體流經該腔室時，它們傾向於聚集在該些依據尺寸或形狀來進行過濾的位置，如屏障物、狹縫等。混合動作可以於過濾程序中連續式地施行，如透

過一連續啟動的聲波元件，或是可以間歇式地施行，如在該過濾程序中短暫地啟動聲波元件或電極。當使用介電泳於混合一過濾器中的樣本時，在過濾程序中，該介電泳力較佳地係在短間隔中被產生（舉例來說，自約 2 秒至約 15 秒，較佳地係自約 2 至約 30 秒）；例如，在該過濾程序中，可每 5 秒至約每 15 分鐘輸出一訊號，或較佳地係於過濾程序中介於約每 10 秒至約每 1 分鐘。所產生之該介電泳力係用於使樣本成份移動遠離該用於提供過濾功能的結構特徵，如但不限於，狹縫。

在過濾程序中，經過濾的樣本流可以藉由自動之流體流而被自該過濾器移除，該自動之流體流係透過連通至一或多個用以盛裝該經過濾之樣本的容器的導管來產生。在較佳實施態樣中，該些容器為廢液容器。於過濾之後，流體流可選擇性地被以一相反方向導入經過該過濾器以使保留且可能沈澱或卡塞於其中的成份懸浮。

在過濾程序之後（及選擇性地，一混合及與一或多種專一性鍵結分子作用），保留於該過濾腔中的樣本成份可以藉由額外的口及導管而被導出該腔室；該導管係連通至收集管或容器或該自動化系統的其他元件以進行更進一步的處理步驟，或可以藉由吸量管吸取或一流體取用手段自該過濾腔或一收集容器中移除。口可以設有閥或其他機制以供控制流體流。該口的開啟及關閉可以為自動化控制者。因此，可允許經減積（保留）之樣本流出一過濾腔（如其它腔室或收集容器）的口可以在過濾程序中被關閉，且可允許經過濾之樣本流出一過濾腔的導管亦可選擇性地在過濾程序中被關閉，以更有效地去除保留下來的樣本成份。

選擇性地去除一樣本中的無需成份

選擇性地，不論在該過濾程序之前、之中、或之後，保留於過濾腔中的樣本成份可以藉由流體流被導向該自動化系統的一個元件，而於其中，一樣本的無需成份可以自該樣本分離。在本發明的許多實施態樣中，不論在添加該樣本至該過濾腔之前或是去除經減積而保留於該過濾腔之樣本之前，一或多種專一性鍵結分子可以被添加至該經減積之樣本，且不論在於該過濾腔中混合之前或之後，可使用，例如一或多個主動式晶片（其係裝設於該過濾腔中或為該過濾腔的一部份）以產生物理作用力來進行混合。較佳地，一或多種專一性鍵結分子係被添加至過濾腔中的經減積之樣本，而當該經減積之樣本與該專一性鍵結分子作用時，該腔室的口係被關閉，且聲波元件係被連續式或間歇式地啟動。較佳地，一或多種專一性鍵結分子係抗體，其係結合於磁珠。該專一性鍵結分子可以為鍵結至所欲樣本成份的抗體，例如胎兒有核細胞，但較佳地，該專一性鍵結分子係鍵結至不欲之樣本成份的抗體，例如白血球，但對於所欲樣本成份僅具有最微量的鍵結能力。

在本發明的較佳實施態樣中，於過濾程序之後被保留於該過濾腔中的樣本成份係與磁珠作用，且在作用之後，係經由流體流被導向一分離管柱。較佳地，一使用於本發明方法的分離管柱係為圓柱形之玻璃、塑膠、或聚合物管柱，其具有介於約1毫升及10毫升的體積容積，且具有設於該管柱之相對兩端的進入及離開的口。較佳地，一使用於本發明的分離管柱包含或可以被沿著至少一磁極來設置，該磁極係沿著該管柱的長度分布。該磁極可以為永久磁極，或可以為一或多個設置於一或多個晶片上的電磁單元，且係由一電源來啟動。

於過濾程序後保留於該過濾腔中的樣本成份可以經由一

流體流被導入一分離管柱。於該樣本成份被加入該腔室之前或之後，試劑（較佳地包括一磁珠調製物）可以被添加至該樣本成份。較佳地，試劑可以在樣本成份被傳送至一分離腔室之前被添加。較佳地，一添加至該樣本成份的磁珠調製物包含至少一專一性鍵結分子，較佳地係可直接鍵結至該樣本中的至少一無需成份的專一性鍵結分子。然而，也可以添加一包含至少一專一性鍵結分子且該專一性鍵結分子係間接地鍵結至該樣本中的至少一無需成份的磁珠調製物。在這個情形中，也必須添加一第一專一性鍵結輔助物（**primary specific binding partner**），其可直接鍵結至該樣本中的無需成份。一第一專一性鍵結輔助物較佳地係先於該磁珠調製物而被添加至該樣本，該磁珠調製物係包含一第二專一性鍵結輔助物（**secondary specific binding partner**），但此並非本發明的限制條件。在將一樣本添加至一分離管柱之前或之後，微珠調製物及第一專一性鍵結輔助物可以分別或一同被添加至該樣本。

在磁珠包含第一專一性鍵結分子的實施態樣中，在進行磁性分離之前，該樣本及磁珠調製物較佳地係相互作用一介於約 5 及約 60 分鐘的時間。在一分離管柱包含或係鄰近於一或多個永久磁極的實施態樣中，該作用階段可以係進行於該樣本被添加至該分離管柱之前，且係進行於該自動化系統之導管、腔室或容器中。在一分離管柱包含或係鄰近於一或多個電流啟動之電磁元件的實施態樣中，該作用階段可以係進行於一分離管柱中，且係於啟動該一或多個電磁元件之前。然而，較佳地係在導通進入及離開一過濾腔的導管關閉後，使一樣本與包含專一性鍵結分子的磁珠於該過濾腔中作用，然後再進行該樣本的過濾。

在包含第二專一性鍵結分子之磁珠被使用的情況中，可選

擇性地進行超過一次的作用階段（例如，一樣本與第一專一性鍵結分子的第一作用階段，及一樣本與包含第二專一性鍵結分子之磁珠的第二作用階段）。分離一樣本中的無需成份可藉由磁力來達成，其係造成該直接或間接鍵結至該無需成份的磁珠。此程序可發生於該樣本與該磁珠被添加至該管柱，或，在使用一或多個電磁單元的實施態樣中，係發生於以一電源供應器啟動該電磁單元時。未被捕捉的樣本成份可以藉由流體流而被移出該分離管柱。較佳地，未被捕捉的樣本成份係透過一裝有導管的口離開該管柱。

10

分離所欲樣本

過濾之後，一樣本可選擇性地藉由一流體流被導入一過濾腔以供分離稀少細胞。

15

20

25

在一減積樣本之無需成份已於分離管柱中被移除的較佳面向中，在被移送至一分離腔以供分離該樣本之稀少細胞之前，該減積樣本較佳地但係選擇性地被移送到一第二過濾腔。一第二過濾腔可進一步減少一樣本的體積，且可選擇性地添加專一性鍵結分子及使一或多種專一性鍵結分子與一樣本混合，其中該專一性鍵結分子可被使用於分離稀少細胞。將一樣本自一分離管柱移送至一分離腔的動作可藉由透過連通一分離管柱與一第二過濾腔之導管的流體流來進行。一包含狹縫之過濾器，且以介於每小時約 1 及約 500 毫升，更佳地係每小時介於約 2 及約 100 毫升，又更佳地係介於每小時約 5 及約 50 毫升之速率通過該腔室的流體流係驅動該樣本的過濾程序。在這樣的方式中，一其中之無需成份已被選擇性地去除的經減積樣本的體積可進一步被減少。一第二過濾腔可包含或容置一或多

個主動式晶片。主動式晶片，例如聲波晶片或介電泳晶片，可以在該過濾程序之前、之中、或之後被用於混合樣本。

一第二過濾腔亦可選擇性地被使用於添加一或多種試劑，其係被用於分離一樣本中的稀少細胞。在過濾該樣本之後，該承載樣本或樣本成份離開該腔室的導管可被關閉，且一或多個連通進入該腔室的導管可被使用於添加一或多種試劑、緩衝液、或溶液，例如但不限於可鍵結至稀少細胞的專一性鍵結分子。該一或多種試劑、緩衝液、或溶液可以被混合於一經關閉的分離腔室，舉例來說，藉由啟動一或多個聲波元件或啟動複數個於一或多個主動式晶片上的電極來產生物理作用力以移動該樣本中的成份並因此產生一混合的效果。本發明的較佳面向中，覆蓋有至少一抗體（辨識一稀少細胞者）的磁珠係被添加至該過濾腔的該樣本中。該磁珠係透過一導管而被添加，且係藉由啟動一或多個主動式晶片來與該樣本混合；其中該主動式晶片係一體式地建構於一第二過濾腔或是容置於一第二過濾腔中。專一性鍵結分子與一樣本的作用時間可以係自約 5 分鐘至約 2 小時，較佳地係自 8 至約 30 分鐘，且混合動作可週期性或連續性地於整個作用的期間中進行。

一不是用於將一或多種試劑、溶液或緩衝液添加及混合至一樣本的第二過濾腔也是屬於本發明的範疇。一設計以使用於一用於分離稀少細胞之分離腔之前，且係用於將一試劑、溶液、或緩衝液添加及混合至一樣本，並不進行過濾功能的腔室也是屬於本發明的範疇。將一樣本自一分離管柱移送至一分離腔而中間未經過過濾或混合腔室也是屬於本發明的範疇。然而，就特定於自一血液樣本中分離稀少細胞的面向來說，使用一用於使一或多種試劑添加及混合至一樣本的第二過濾腔是較佳的。

樣本係藉由流體流而被移送至一分離腔。較佳地，一供分離稀少細胞的分離腔包含或裝設有至少一主動式晶片，其可產生一分離程序。該些晶片包含功能性元件，其可以，至少部分地，產生物理作用力以被使用於自一腔室的一個區域將樣本成份移動或操作至一腔室的另一區域。一晶片之使用於操作樣本成份的功能性元件較佳地係電極及電磁單元。在本發明之一主動式晶片上用於使樣本成份移動位置的作用力可為介電泳力、電磁力、旅波介電泳力、或旅波電磁力。一用於分離稀少細胞的主動式晶片較佳地係一腔室的一部份。該腔室可以為任何合適材料所製得且可為任何尺寸或大小，但一包含用於自樣本中分離稀少細胞之主動式晶片的腔室較佳地係具有自約 1 微升至 10 毫升，更佳地係自約 10 微升至約 1 毫升的體積容積。

在本發明的許多實施態樣中，該主動式晶片係為一包含電極的介電泳或旅波介電泳晶片。該些晶片及其應用係描述於美國專利申請號第 09/973,629 號案（發明名稱是「An Integrated Biochip System for Sample Preparation and Analysis」，申請於西元 2001 年 10 月 9 日）、美國專利申請號第 09/686,737 號案（發明名稱是「Compositions and Methods for Separation of Moieties on Chips」，申請於西元 2000 年 10 月 10 日）、美國專利申請號第 09/636,104 號案（發明名稱是「Methods for Manipulating Moieties in Microfluidic Systems」，申請於西元 2000 年 8 月 10 日）、及美國專利申請號第 09/679,024 號案（代理人編號：471842000400，發明名稱是「Apparatuses Containing Multiple Active Force Generating Elements and Uses Thereof」，申請於西元 2000 年 10 月 4 日），其係皆併入於此作為參考文獻。稀少細胞可以自本發明的一個樣本中被分離，其係藉由，例如，它們選擇性地停滯於介電泳晶片的差異，且流體流可以移除該樣本

中未被保留的成份。

在本發明的其他較佳實施態樣中，該主動式晶片係為一電磁晶片，其包含電磁單元，例如描述於美國專利第 6,355,491 號案（發明名稱是「Individually Addressable
5 Micro-Electromagnetic Unit Array Chips」，公告於西元 2002 年 3 月 12 日，由 Zhou 等人取得）、美國專利申請號第 09/955,343 號案（代理人編號：ART-00104.P.2，發明名稱是「Individually Addressable Micro-Electromagnetic Unit Array Chips」，申請於
10 西元 2001 年 9 月 18 日）、及美國專利申請號第 09/685,410 號案（代理人編號：ART-00104.P.1.1，發明名稱是「Individually Addressable Micro-Electromagnetic Unit Array Chips in Horizontal Configurations」，申請於西元 2000 年 10 月 10 日）中的電磁晶片。電磁晶片可被用於藉著磁泳（magnetophoresis）或旅波電磁泳來進行分離。在較佳實施態樣中，稀少細胞可以在被添加至一過濾腔之前或之後與磁珠作用，該腔室係包含一
15 電磁晶片，而磁珠係包含可直接或間接鍵結至該稀少細胞的專一性鍵結分子。較佳地，在稀少細胞被捕捉於一電磁晶片上的實施態樣中，該樣本可以與該包含有專一性鍵結分子的磁珠於一混合腔室中混合。較佳地係一包含一聲波晶片以供混合該樣
20 本及微珠的混合腔室。該細胞可以透過導管，自該混合腔室被導向該分離腔室。藉由該分離腔室之該主動式晶片表面上的磁性捕捉，該稀少細胞可以被自該流體樣本中被分離，且其他成份可以經由流體流被洗去。

本發明之方法亦包括一被使用於分離稀少細胞之主動式
25 晶片是多作用力晶片的實施態樣。舉例來說，一使用於分離稀少細胞的多作用力晶片可包含電極及電磁單元。此晶片可被提供於供分離大於一種的細胞成份。舉例來說，磁性捕捉可被用

於分離稀少細胞而負介電泳係用於自含有該多作用力晶片的腔室中去除不欲細胞。

藉由主動物理作用力（如負介電泳力）或流體流自該分離腔中去除不欲樣本成份後，藉由去除使該些稀少細胞吸附於該晶片表面的作用力可使該被捕捉的稀少細胞被回收，並使用收流體流以收集該細胞於一容器。

實例

實例 1

10 製備一用於自一血液樣本中去除紅血球的過濾器

一尺度為 1.8 公分 x 1.8 公分 x 500 微米的矽晶片係被使用於製備一 1 公分 x 1 公分 x 50 微米且具有狹縫的過濾區域，該狹縫的尺度為自約 0.1 微米至約 1000 微米，較佳地係自約 20 至 200 微米，較佳地係自約 1 至 10 微米，更佳地係 2.5 至 5 微米。該狹縫可以是垂直的且具有一小於 2% 的最大錐角，較佳地係小於約 0.5%，且鄰近之過濾狹縫列之間的距離為 1 至 500 微米，較佳地係自 5 至 30 微米。

製備程序包括提供一具有前揭尺度的矽晶片及於該矽晶片的上表面及下表面覆蓋一介電層。沿著該晶片之下表面部分的凹處（cavity）便接著被製得。該凹處的製備係藉由自該借電層去除一合適的凹處圖樣，然後原則上地依據該圖樣蝕刻該矽晶片，直至達到一所欲的厚度。

該晶片被再次氧化以覆蓋該輪廓區域（contoured region）。一過濾器圖樣接著被自該覆蓋於該矽晶片上表面的介電層中去除，其係原則上對齊該凹處（在其上方）。該矽晶片接著於

上述角度就該建立於該晶片之上表面的圖樣被蝕刻（如，經由深式 RIE 或 ICP 程序），直至該矽晶片被蝕刻穿透。該上表面及下表面的介電層接著被移除。藉由移除該凹處中的介電層，鑿穿的井，稱作為狹縫便可被製得。亦可藉由雷射切割（laser cut）鑿穿材料（包括但不限於二氧化矽或如塑膠之聚合物）以製得該些狹縫。

實例 2

微加工過濾器的化學處理

一依據實例 1 所示方法而製得的過濾器晶片係被放置於一烤箱中的陶瓷加熱盤，並在含氧環境（如空氣）下，於攝氏 800 度加熱 2 個小時。接著，關掉該加熱源，並使該晶片緩緩地隔夜降溫。此於該晶片的表面上形成一熱氧化層（thermally grown layer）。

也可以於該過濾器的表面沈積一氮化物層。一氧化物層係經由於溫度至 $\sim 900^{\circ}\text{C}$ 的反應器中的低壓化學氣相沉積法來形成於該晶片的表面。該沈積層是供給至該反應器之來源氣體之間之化學反應的產物。該製程通常是同時施行於該基材的兩側以形成一 Si_3N_4 層。

20

實例 3

聚乙烯吡咯烷酮（PVP）及聚乙酸乙烯酯（PVA）過濾器塗層

藉由實例 1 中所述之方法製得的過濾器晶片係被塗覆有 PVP 或 PVA。為了於該晶片上塗覆 PVP 或 PVA，該晶片係先以下列方法預處理：以去離子水浸濕該晶片，然後將其浸入 6N

25

的硝酸中。接著將該晶片放置於攝氏 50 度的振動器上 30 分鐘。於酸處理之後，以去離子水浸濕該晶片。

就塗覆 PVP 而言，於室溫下將晶片浸入 0.25 的聚乙烯吡咯烷酮 (K-30) 直至該晶片可以使用為止。接著以去離子水浸濕該晶片，並使其經加壓空氣乾燥。就塗覆 PVA 而言，於酸處理及經水浸濕之後，於進行塗覆之前，將該晶片存放於水中。為了製備 0.25% 的 PVA 溶液 (Mn 35,000-50,000)，將 PVA 溶於水中且緩慢地加熱至攝氏 80 度，並緩和地攪拌。將該晶片浸入一熱 PVA 溶液且加熱 1-2 小時已進行塗覆。接著以去離子水浸濕該晶片，並使其經加壓空氣乾燥。

實例 4

牛血清白蛋白 (BSA) 過濾器塗層

為了於過濾氣晶片上塗覆 BSA，該晶片係經以下步驟預處理：以去離子水浸濕該過濾器晶片並接著於室溫下將其浸入 95% 乙醇中 10 秒鐘，然後再次以去離子水浸濕。

於室溫下將該晶片浸入含有 2% BSA 的 PBS 溶液 2 分鐘。接著以去離子水浸濕該晶片，並使其經加壓空氣乾燥。

20

實例 5

PEG 過濾器塗層

為了在該晶片表面結合 PEG，使過濾器晶片浸入一於 5% 之二氯甲烷的 DBE-814 溶液 (一含有聚矽氧的 PEG 溶液，取自 Gelest, Morrisville, PA) 中。於真空中，使該浸入之晶片於攝氏 70 度加熱 3 個小時。於反應後，以去離子水浸濕該經 PEG

25

塗覆的晶片，並使其經加壓空氣乾燥。

實例 6

自母親血液富集化胎兒有核細胞的流程圖

5 第十三圖顯示一自母親血液樣本富集化胎兒有核細胞的流程圖。該整體製程包含以下步驟：

可將該血液樣本移送至一離心管。

可於添加至自動化單元前，清洗該樣本，但此並非必需步驟。

10 該處理程序起始於一體積為 10 ml 左右(係介於 3 至 40 ml) 的血液樣本，其係裝於一管子中。

使用一液位監測步驟 (fluidic level sensing step) 來測定欲進行處理之裝於管子中的血液樣本的確切體積。

15 添加一體積的組合試劑 (舉例來說，如，與實例 6 中所述之試劑相同體積) 至該管子中的該血液樣本。

旋轉/搖晃/振動/混合該溶液 0.5 小時左右的時間 (係介於 0.1 至 2 小時)。

20 使該溶液安置 30 分鐘左右 (介於 0.1 至 2 小時)，以使該凝集之 RBCs 沉澱至該管子的底部。在此期間內同時施加一磁場並將磁珠 (其可能已鍵結或尚未鍵結至血液成份) 吸引至管子的一側。

使用另一液位監測步驟來測定該管子中「未凝集」之細胞懸浮液的體積。

自該管子中抽吸適當體積之該流體進入該胎兒細胞過濾

腔（或稱為胎兒細胞卡匣處理程序（fetal cell cassette process））。

於該胎兒細胞過濾腔/卡匣中過濾該樣本 0.2 至 2 小時（更多該過濾程序的細節係記載於後續的實例 8）。

- 5 自該過濾卡匣的上層腔室中取出溶液，並將其配送至儲存測試管。

實例 7

矽膜過濾程序的流程圖

- 10 第十四圖提供一示意圖，其顯示該微過濾程序。該簡化之處理程序包含以下步驟：

(1) 關閉閥 B 及閥 D，開啟閥 A 及閥 C。

(2) 將測試樣本（源自實例 9 之處理程序中的第一步驟）裝入該 45 mL 的注入室。

- 15 (3) 開始廢液幫浦 1 個小時，以使儲存注入室中的該樣本被過濾通過該微加工過濾器。

(4) 導入 1 至 10 mL 的清洗溶液至該注入室。

(5) 關閉閥 A，開啟閥 B。

(6) 以 1 至 5 mL 的清洗溶液清洗該底部的子腔室。

- 20 (7) 關閉閥 C 及開啟閥 D。

(8) 將該卡匣及過濾腔旋轉 180 度。

(9) 自閥 B 沖洗該過濾腔。

(10) 自閥 D 收集樣本。

實例 8

使用一自動化系統以自母親血液中分離胎兒細胞

藉由以 PBE 稀釋樣本及於 470x g 左右的轉速離心 6 分鐘
5 左右（以介於 50-900x g 之轉速離心 3 至 20 分鐘）來清洗 10
毫升之來自懷孕女性（自 6 至 13 之懷孕週數）的血液樣本。
將上澄清液取出，加入 PBE 至該沉澱物（pellet）並加以混合。
接著再次使該樣本離心，並取出上澄清液。使用相同體積的 PBE
懸浮最後取得的沉澱物。手動將 10 毫升的組合試劑添加至該
10 樣本試管；該組合試劑含有不含鈣鎂的 PBS，其含有 5 毫升
EDTA、2%的六碳醣（分子量為自 70 至 200 千道耳吞）、每毫
升 0.05 微克的抗血型醣蛋白 A 之 IgM 抗體（介於 0.01 至微克）、
及約 1 至 10×10^9 個預經塗覆的磁微珠。

該稀少細胞分離自動化系統具有控制導管以供自動化操
15 作步驟，並使用 110 伏特的電源插座。將裝有該樣本的試管放
置於一稀少細胞分離自動化系統的載盤。該試管係於該自動化
系統的載盤中自動化地轉動 30 分鐘（介於 5 及 120 分鐘）。接
著使該試管直立，並將具有磁場的第二載盤自動化地放置於該
載有試管的載盤旁邊。其他形式的磁場也可以被使用，例如但
20 不限於電磁場。將該試管維持直立 30 分鐘（介於 5 至 120 分
鐘）以使該凝集之 RBCs 沉澱至該試管的底部，且 WBC-磁微
珠聚集體則貼附於每一個試管靠近磁場的管壁上。在該細胞沉
澱之後，使用一光穿透-透光度測量裝置（light transmission-light
sensor transparency measuring device）來測定上澄清液的體積。

25 該透光度測量裝置（transparency measuring device）係由
光源條（bar）及感光元件（light detector）所組成；每一該光

源條具有一校準光源，光源條的數目係與試管的數目相配合；該感光元件係放置於該試管的相對一側。該光源係使用一雷射束，其可射出遠紅外線區段（780 nm）的光線，且具有大於 3 毫瓦的強度。自光源射出的光線是聚焦以穿透該樣本試管，且
5 匯集於該樣本試管另一側的感光元件，該感光元件具有一強度偵測器（intensity measurement device），其係用於紀錄穿透該樣本的光量（雷射輸出測量）（the laser output measurement）。具有低瓦雷射源的該光源條及該感光元件係於該試管的底部向上移動。當每一雷射初次接觸到相配合的試管中的凝集細胞
10 時，該雷射輸出測量即被歸零。當於一試管上量測到的強度開始升高並超過一閾值時，該光源條的垂直移動便停止。接著該光源條便會移動去找尋到該傳導出的光線強度等同於閾值的垂直點。藉此便可以測定出該凝集之細胞與該細胞上澄清液之交界面的垂直點位置。一旦此高度被測定了，該流體控制單元
15 （fluid handling unit）便會移動到一預置的位置，並使用一電容感測程式去感測該光源條的高度（此係相對於交界面的高度）。利用此數值，該流體控制單元可精準地自該流體容器中移出該上澄清液。該上澄清液便可被直接地配送進入該過濾單元的注入室。

20 以下敘述是關於自動化分離程序，其係藉由該稀少細胞分離自動化系統來進行。該稀少細胞分離自動化系統使用一過濾單元（過濾腔、注入室、及相連通之口及閥），其係描繪於第二十三圖。在此設計中，該過濾腔可以於該過濾單元中旋轉 180 度以上的角度。

25 該過濾腔包含一預置腔（604）及一後過濾子腔室（605），其係以一單一過濾器（603）隔開。該微加工過濾器的尺寸為 1.8 cm×1.8 cm，且具有約為 1 cm 乘 1 cm 的過濾區域。該過濾

器具有約 94,000 個狹縫，其係分布為一如第二圖所示的平行構型。該狹縫具有 1 或 2 度的錐角且尺寸為 3 微米乘 100 微米；其中每一尺度的差異度是在 10% 以內。該過濾器狹縫可具有 1-10 微米×10-500 微米的尺寸，且其垂直錐角為 0.2 至 10 度，其係視其目標物而定。該過濾器的厚度是 50 微米（介於 10 至 200 微米）。該過濾器係放置於一兩件式過濾腔，其上半層（預置腔）是一大致為矩形的過濾預置腔，該過濾預置腔係朝上方逐漸縮小且具有約 0.5 毫升的體積。該底部的後過濾子腔室則是約為圓形且朝底度逐漸縮少，且也具有約 0.5 毫升的體積。該過濾器實質上覆蓋了該上層預置腔的全部底面積，且實質上覆蓋該下層後過濾子腔室的全部頂面積。

除了該過濾腔，該過濾單元包含一「框架（frame）」，其具有一注入室（610）、一控制樣本自該注入室流入該過濾腔的閥（閥 A，606）、及複數個分離口以供廢液或經過濾的樣本流出（該廢液口，634）及供收集經富集化的稀少細胞（該收集口，635）。該後過濾子腔室（605）包含一側開口（632），其可被用於添加緩衝液，及一出口其可接上該廢液口以供在過濾期間供廢液（或經過濾的樣本）流出。該預置腔（604）包含一入口，其在過濾期間可接上該樣本導入閥（閥 A，606）且在收集經富集化之細胞的期間，可以接上該收集口（635）。在一自動化系統的運轉中，該過濾腔（包含該預置腔（604）、後過濾子腔室（605）及側開口（632））係放置於該過濾單元的框架中。

在過濾期間，閥 A 係被開啟，且該後過濾子腔室的開口係對準該廢液口，而允許自該注入室的過濾樣本流通經過該過濾腔並至該廢液槽。一注射幫浦以一流速抽吸流體經過該腔室，該流速係自每小時 10 至 500 毫升，其係取決於該處理步驟。

在將合適體積的上澄清液自每一試管配送進入該過濾單

元的該注入室前，該過濾單元的側開口（632）及廢液口（634）係關閉的，且該閥 A（606）係開啟的（參第二十三圖）。（當該過濾單元處於導入/過濾期間，該過濾器不與該收集口（635）連接）。當該過濾單元的該側開口開啟時，自該側開口將 PBE 填充進入該單元，直至該緩衝液滿至該樣本注入室的底部。接著關閉該側開口，且將該血液樣本上澄清液導入該注入室。

雖然該稀少細胞分離自動化系統可以同時地分離多種樣本，為了更明確地說明，後續關於分離程序的敘述將描述單一

10 樣本的過濾程序。在過濾一樣本時，一過濾單元的該廢物口（634）係開啟的，且，使用一藉由管路連通該廢物口的注射幫浦將樣本上澄清液抽吸通過該過濾腔。當樣本通過該腔室時，體積較大的細胞會留在上層腔室（預置腔）且體積較小的細胞會通過該過濾器而進入下層腔室（後過濾子腔室），接著通過該廢物口直至該廢物槽。該過濾程序係以約每小時 2 至 100

15 毫升的流速來進行。

在一樣本通過一過濾腔後（通常是經過一個半小時至兩個小時的過濾程序），將 3 至 5 毫升的 PBE 加入該注入室（維持閥 A 開啟），且使用一連接至該廢物口的注射幫浦拉引通過該過濾腔以清洗該預置腔，並確認所有小細胞已實質上被清洗。

20 然後，將閥 A（606）關閉並打開該側開口（632）。以一經由管道連接至該廢物口（634）的注射幫浦將 5 至 10 毫升的緩衝液自該側開口（632）加入以清洗該下層後過濾子腔室。在殘留細胞自該後過濾子腔室（605）被洗去後，經由該側開口（632）推送空氣以進一步清洗該下層（後過濾）子腔室。

25 接著在該過濾單元中將該過濾濾匣旋轉約 180 度，以使該預置腔（604）位於該後過濾子腔室（605）的下方。當該腔室

旋轉進入收集位置時，該後過濾子腔室的出口則不連接該廢液口，且，由於該後過濾子腔室變為位於該預置腔的上方，該「出口」即變成處於該反置之過濾腔的上方，但其並未與任何該過濾單元的開口連接，因此係被堵住的。於此時，將該預置腔旋轉至該反置之過濾單元的底部，以使該預置腔開口不連接至閥A，而係連接至該過濾單元之底部的收集口。在這個自過濾位置旋轉至收集位置的操作間，該側開口並不改變位置。該側開口係對準該過濾腔旋轉的軸心，因此維持為該後過濾子腔室的一部份，為其功能性的開口。於該旋轉之後，該過濾腔即處於收集位置。因此，在該收集位置，具有一關閉之出口的側開口的該後過濾子腔室係於該預置腔的上方。該預置腔「入口」係對齊並對該收集口開啟。

透過該側開口將約 2 毫升的緩衝液汲送至該過濾腔以收集留在該預置腔中的細胞。將細胞收集於一瓶子中（該瓶子係連接至該過濾單元之該樣本收集口的位置），或透過連通自該樣本收集口的管道配送該樣本進入一收集管。透過該側開口汲送約 2 毫升之額外 PBE 及約 2 至 5 毫升的空氣以將該過濾器中的殘留細胞清入該收集瓶中。

該經富集化的稀少細胞可以經顯微鏡或使用任一分析法分析，或可以被儲存或培養。

實例 9

改良之磁構型(*magnet configurations*)以供磁性粒子捕捉

為了改良使用磁性粒子捕捉以自液體樣本中分離成份（如細胞）至一試管的一部分或其他容器中的效率，測試多種磁構型。

使用尺寸為 9/16x1.25x1/8”的磁極 (Forcefield (Fort Collins, Co) NdFeB block, item #27, Nickel Plate, Br max 12,100 Gauss, Bh max 35 MGOe) 來測試磁場強度。在這些實驗中，相較於商業上可取得之磁性細胞分離單元 MPC-1 (Dynal, Brown Deer, WI)，最強的場可以用於捕捉覆蓋有抗體的磁珠 (該抗體係專一性的鍵結至白血球)，並改良自一血液樣本中去除白血球的效率。

磁極係以多種構型及方向貼附在一聚丙烯基台，其係設置以乘置一 50 毫升的試管，如第十圖中所示。以 Gauss 儀量 (JobMaster Magnets (Randallstown, MD) 使用探針型 PT-70 的 GM1 模式，Cal # 373) 測量該試管右邊、中間、及左邊的磁場。

實例 10

以微加工過濾器自全血中分離白血球以供細胞分析

白血球可提供關於免疫系統的健康與否的診斷資訊且係以流式細胞儀及其它細胞分析儀器分析的首要樣本。當準備供流式細胞儀分析所用的全血樣本時，首先以經螢光標記的單株抗體染白血球，然後將該經標記的白血球與該紅血球分離。傳統上係使用密度梯度離心法來分離血球細胞，而使紅血球溶解則是近期常規使用的方法。

FICOLL™ HYPAQUE™ 密度梯度離心法係利用單核細胞與其他血液流體中的成份的密度差異來進行分離 (Boyum A. Scand J Clin Lab Invest (1968) 21 (Suppl 97) :77-89)。依據其密度，不同的細胞群體於離心後會分散於 ficoll 溶液中的不同層中。因此，可藉由收集特定層中的細胞而純化單核細

胞。含有檸檬酸鈉的 BD Vacutainer[®] (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) CPTTM 細胞調製管係簡化了 FICOLL HYPAQUE 法，且其結合一含有檸檬酸抗凝血劑及 FICOLL HYPAQUE 密度液的血液採集管與一聚酯膠阻隔層以分離兩種液體。然而，
5 內部研究顯示，即便謹慎的操作，仍有多達 7% 的白血球會在離心步驟中流失（數據未示），且該單核細胞帶可能會因為樣本來源或離心程序的因素而被擾動；因此，即便使用 CPT 管（參含檸檬酸鈉的 BD Vacutainer[®] CPTTM 細胞調製管的產品說明），也不法達到所欲之純度。

10 在許多樣本製備的實驗中，全血溶解法係被用於取代密度梯度分離法。雖然市面上已有需多種溶解試劑，BD FACS 溶解液是用於執行 Lyse Wash 分析法及 Lyse No Wash 分析法的標準試劑。然而，研究顯示，當使用於分離白血球時，溶解試劑可能會產生人為影響（Macey et al., *Cytometry* (1999)
15 38:153–160)。在紅血球被溶解之後存在於樣本中的游離血紅素也可能會刺激白血球是出某些細胞素（cytokine）而改變白血球的特性（McFaul et al., *Blood* (1994) 84:3175–3181)。

20 膜狀過濾器係廣泛地應用於樣本清潔，因為它們可以依據尺寸去除粒子或分子。然而，典型的過濾膜並不具有均一且精細地控制的孔洞大小，因此這種分離法的解析力受到侷限且僅能提供定量結果。使用典型過濾器時，被留置於該過濾器的粒子很難以高回收率回收。舉例來說，使用於自全血製備 RNA 的過濾膜會讓紅血球通過，但將白血球留置於該過濾器上。然而，該白血球會溶解於該過濾器上而無法被回收，且該 RNA
25 也會被留置在該過濾膜（Applied Biosystems, Instruction Manual: LeukoLOCKTM Total RNA Isolation System; Life Technologies）。最近，一供單核細胞富集化的過濾器式技術已

經上市，但其單核細胞的回收率僅有 70% (PALL Medica. Application Note: Performance Characterization of the Purecell™ Select System for Enrichment of Mononuclear Cells from Human Whole Blood; Pall Medical-Cell Therapy)。

- 5 可以完整地去除紅血球、以>95%的高回收率回收白血球、且沒有亞群偏差 (subpopulation bias) 之用於細胞分析的樣本製備技術是領域中所需者。我們提供一微加工矽過濾器裝置於製備供流式細胞儀分析所用之白血球的效能特性的評估 (Yu et al., Whole Blood Leukocytes Isolation with 微加工 filter for Cell Analysis. Manuscript submitted to Cytometry)。
- 10

材料及方法

血液樣本

- 血液樣本係取自 BD 捐血計劃的健康個體。所有樣本皆經 K₃EDTA (Vacutainer; Becton Dickinson) 進行抗凝血處理。除非另有指明，樣本係於靜脈切開放血術 (venesection) 後不超過 4 個小時即被進行處理。
- 15

過濾、Lyse/No Wash 及 Lyse/Wash 處理

- 該過濾晶片及濾匣係由 AVIVA Biosciences (San Diego, CA) 製造。該微加工過濾器係由矽晶圓所製得，其具有微蝕刻於該晶片上的通道。該過濾濾匣具有連接至樣本注入室、清洗注入室的閥及一控制流體進入及離開該濾匣的注射幫浦，如第二十五圖中所示。分兩個批次評估共 40 個裝置 (第一批次具有 30 個裝置且第二批次具有 10 個) 於自健康捐贈者之全血中
- 20
- 25

5 分離白血球的效能。主要係謹慎地評估過濾後白血球及亞群的回收、該過濾程序的耐用度、及細胞於過濾後的存活度。濾匣係建議僅作單次使用，然而，其被發現在以清洗程序間隔的連續性運轉中是可重複使用的（重複使用係僅限於用於相同的捐血者，以避免污染）。

10 首先將一市售清洗緩衝液（AVIWash-P）填入該濾匣，然後將經稀釋的全血（經 CD45-PerCP 或 Multitest™ 試劑標記的 10 µl 或 50 µl 樣本，稀釋至 250 µl）導入該上層過濾腔。使用一連接於該裝置之底出口腔室的注射幫浦，以 0.33 或 0.18 ml/min 的速率將緩衝液或樣本溶液吸拉通過該過濾晶片。接續進行兩個清洗步驟：潤濕該過濾器的上層及清洗該過濾器的底層。最後，將 2 ml 的溶離緩衝液（elution buffer）加入該過濾濾匣，且以一 3-ml 的注射器收集留置於該過濾膜之上的白血球（第三十二圖）。將所收集的白血球移到一 BD Trucount™ 絕對
15 計數管（cat. 340334）以供流式細胞儀分析。

以 ABX Micros 60 血液分析儀（Horiba ABX）檢視每一血液樣本以取得白血球（WBC）總數、紅血球（RBC）總數、及淋巴球、單核球、及顆粒球的比例。使用 ABX 計數作為評估自該過濾裝置回收整體白血球及其三個亞群的參考數。

20 參酌 BD Biosciences 網站上公開的實驗流程（<http://www.bdbiosciences.com/support/resources/flowcytometry/index.jsp#protocols>），以 1× FACS 溶解溶液（BD Biosciences, cat. 349202）使 50 µl 之每一血液樣本進行 Lyse No Wash 程序[以 CD45-PerCP（BD Biosciences, San Jose, CA, cat. 340665）或
25 BD Multitest CD3 FITC/CD16+56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC 試劑（BD Biosciences, cat. 340500, CD3 Clone SK7, CD16 Clone B73.1, CD56 Clone NCAM 16.2, CD45 Clone 2D1, and CD19

Clone SJ25C1) 染細胞]及 Lyse No Wash 程序之處理。Lyse No Wash 樣本係於 Trucount 絕對計數管中進行染色及溶解，且 Lyse Wash 樣本於清洗後便移入該計數管。

5 細胞存活率及細胞凋亡測試

以 BD™ 細胞存活率套組 (BD Biosciences, cat. 349480) 來檢測白血球於過濾程序後的存活率。也針對自過濾程序回收的白血球來進行細胞凋亡試驗以測試該細胞的持續性 (sustainability)。

10

流式細胞儀分析

15

於裝載有 BD FACSComp™ 及 BD CellQuest™ Pro 軟體的 Becton Dickinson FACSCalibur™ 流式細胞儀來進行樣本的分析。每天使用 BD Calibrite™ Calibrite 3 (cat. 340486) 及 APC (cat. 340487) 微珠以 FACSComp 程式進行該細胞儀的校準；其中該細胞儀的配置及調整 (表一) 係自動地調整以分別供 Lyse No Wash 樣本及 Lyse Wash 樣本使用。Lyse Wash 配置係供經過濾之樣本使用。表一：細胞儀的配置及調整

雷射	頻道	偵測器電壓	偵測器放大 倍數	模式
藍光雷射 488 nm	FSC	E00	2.00	線性
	SSC	346	1.00	線性
	FL1 (FITC)	649	1.00	對數
	FL2 (PE)	734	1.00	對數

	FL3 (PerCP)	610	1.00	對數
紅光雷射 635 nm	FL4 (APC)	591		對數

FL1-2.1%FL2, FL2-25.4%FL1, FL2-0.0%FL3, FL3-19.2%FL2, FL3-0.8%FL4,
FL4-50.4%FL3

該細胞儀的四個螢光頻道係特定為 FL1 FITC、FL2 PE、FL3
5 PerCP、及 FL4 APC。閾值係設定於 FL3 (PerCP)。除非另有
指明，每一次測試係收集總共 10000 的次數 (event)。定量微
珠係以其於 FL3 的強螢光訊號來選計 (gated)，而白血球群體
係以於 FL3 頻道的 CD45+次數來選計。淋巴球、單核球、及顆
粒球為白血球的「子群體 (daughter populations)」且係基於測
10 散射及螢光來選計。T 細胞、B 細胞、及 NK 細胞為淋巴球的
「子群體 (daughter populations)」且係依據特定的抗體-螢光共
軛物標記來選計。就經 Multitest 試劑染色的樣本，T 細胞係定
義為 CD3+淋巴球，NK 細胞係定義為 CD16+CD56+淋巴球、且
B 細胞係 CD19+CD3-淋巴球 (第二十七圖 a)。所有數據係以
15 BD FACSDiva™ 軟體分析。絕對細胞數係藉由比對細胞次數
(cell events) 與 Trucount 微珠次數，並由公式：每 μl 的細胞
數 = 細胞次數 \times 每一試管之微珠數/微珠次數 \times 樣本體積
(μl) 所求得。

20 結果

過濾程序所回收的白血球與全血溶解法之比較

以該微加工過濾器等自全血分離白血球有效率地去除紅血球，其淨化樣本以供流式細胞儀分析。第二十六圖顯示相同血液樣本之 FSC 對 SSC 及 FL3 及 SSC 的點狀圖，該血液樣本係依據 Lyse No Wash 程序、Lyse Wash 程序、及過濾程序所製得。

5 從點狀圖可以看到該 Lyse No Wash 樣本實質上被紅血球殘骸所污染，其顯示於整體取得次數中佔 91%。在 Lyse Wash 樣本中，紅血球殘骸透過離心被移除，而在該點狀圖中僅有 13% 的次數係來自殘骸。自過濾程序回收的白血球含有最低含量的背景粒子 (background particle)，佔整體次數的 4%，顯示紅血球

10 以有效地自白血球被分離。

在該過濾程序中沒有或僅有極少的白血球細胞流失。每一個樣本中的白血球計數係以 BD TruCount 內標準計數微珠作為基準，且整體回收率係為該計數結果與整體血液計數的比例 (該整體血液計數係由 ABX 血液分析儀所取得)。第二十七圖

15 顯示整體白血球、三個主要的白血球群組、及三個淋巴球亞群 (T、B、及 NK 細胞)。總共有 10 個過濾匣及 10 個不同捐贈者的血液被用來測試回收率，且每一樣本於該過濾器中係進行三重複的試驗。在最佳操作條件下 (係討論於表二)，該過濾器可提供平均 $98.6\% \pm 4.4\%$ 之整體白血球的回收率，相較 LNW 為 $100.2\% \pm 6.0\%$ 且 LW 為 $86.2\% \pm 7.8\%$ 。相較於血液溶解法，

20 經過過濾程序回收的細胞於淋巴球、單核球、及顆粒球之間並沒有偏差。在評估第二批次的過濾中，新鮮的血液樣本係經 Multitest 試劑染色以觀察淋巴球亞群 T、B、及 NK 細胞的回收。在五個樣本、五個過濾器、及每一樣本三重複通過每一過濾器的

25 實驗中，觀察到 T 細胞的回收率為 $106\% \pm 5.6\%$ 、NK 細胞的回收率為 $98.5\% \pm 19\%$ 、且 B 細胞的回收率為 $83.5\% \pm 12\%$ 。NK 細胞及 B 細胞的回收率具有較大偏差，其可能是因為血液

中這些細胞的所佔的比例較小且樣本數量有限所致。

表二：不同操作條件下白血球回收率的比較

細胞數 \ 流速	0.18 ml/min	0.33 ml/min
10 μ l (51.1 \pm 7.5) \times 1000 個細胞	0.98 \pm 0.04	0.92 \pm 0.07
50 μ l (350 \pm 14.1) \times 1000 個細胞	0.75 \pm 0.18	0.35 \pm 0.15

5

過濾程序後細胞的存活率及持續性

測試自該過濾器回收之白血球的存活率，並與該經氯化銨全血溶解所得之白血球比較。於此並不使用 FACS 溶解溶液，因為它含有甲醛且因此白血球會在紅血球溶解的過程中被固定。在兩個情況中，於紅血球被移除後，95%的白血球維持存活，且沒有白血球死亡（第 28 圖 a）。為了進一步測試過濾後細胞的耐受度 (tolerance)，使用與碘化丙啶 (propidium iodide ; PI) 相接之 FITC Annexin V 將細胞染色。Annexin V 陽性表示細胞膜崩解，其代表細胞凋亡的前期，並可能會導向細胞死亡 (PI 陽性)。結果顯示，當血液在 1 個小時內被過濾 (within an hour of draw)，自過濾中被回收的細胞中的 95% 不會有細胞凋亡的現象；當過濾係進行 8 個小時 (8 h after draw)，也仍然有 90% 的回收細胞維持健康。

20 操作條件最佳化

該樣本過濾程序係經進一步微調以達到最佳的回收率。使用一設定在「拉」模式的注射幫浦使全血細胞拉引通過該過濾器，並測試兩種不同的汲送速度。如表一中所示，在高流速(0.33 ml/min)下白血球回收率較低流速(0.18 ml/min)下來得低，且當填充較多數量至該過濾器的情況下，此影響會更明顯。於高流速下的拉力可能會產生足以誘發白血球物理性崩解的壓力而通過該過濾器的狹縫。即便當該幫浦設定在低流速(0.18 ml/min)且拉引平均具有350,000個白血球的50 µl全血(其係BD流式細胞儀分析的標準體積)通過該過濾器，此白血球回收率並沒有使用平均具有50,000個細胞的10 µl全血來得好。此現象意味著，在所測試的構型中，該過濾器可能具有一有限的留置容量，當超過時，便會造成細胞流失。表一所示結果係平均自每一種條件下至少五個過濾濾匣的測試結果。更進一步的研究將進行以測定在過濾器尺寸、流速、及整體回收率之間的最佳化關聯性。

利用紅血球溶解來進行的白血球分離方法具有快速且方便的優點，但如果後續分析法會需要活細胞，則會受到限制，例如FACS溶解液會固定細胞，且如果反應時間未能謹慎的控制，氯化銨溶解反應可能會造成樣本降解。因此，需要一種可行的樣本製備方法以供應用於流式細胞儀。於此評估的該微加工過濾器可執行快速且簡單的全血細胞分離程序，其具有高白血球回收率，且於不會於白血球亞群中產生偏差。該過濾器移除紅血球、血小板、血漿蛋白、及未鍵結的染劑。此溫和的過濾程序可產出非常乾淨之經染色的白血球以供細胞儀分析，且不會對白血球產生任何可見的傷害。此過濾濾匣具有處理一流式儀分析通常所需之細胞數量的能力，其於流式細胞儀之樣本製備的應用可以協助該方法的標準化、節省人力及材料、及最

小化人為操作。

自全血中的其他成份分離白血球對於流式細胞儀之細胞分析而言是非常重要的步驟。已知常規使用的方法，如 FICOLL HYPAQUE 密度梯度離心法及紅血球溶解法，於此應用上是受到限制的。本發明於此揭露一微製成過濾裝置於血液分離的評估結果，其極具潛力於提供一新穎方法，以製備經染色的乾淨活白血球供流式細胞儀分析使用。於此評估的該微加工過濾器可執行快速且簡單的全血細胞分離程序，其具有高白血球回收率，且於不會於白血球亞群中產生偏差。該過濾器移除紅血球、血小板、血漿蛋白、及未鍵結的染劑。於此提出的結果可提供流式細胞儀的操作者一樣本製備方法，其有助於流式細胞儀的標準化及更直覺化的操作程序。

所有於本申請案及書目及附件中引用的出版品（包括專利文獻及科學文獻）皆以其全文全面地併入於此作為參考文獻，且是以等同於為獨立之出版品的程度。

所有的標題都是為了方便閱讀而訂定，且不應被用於限定標題後文章中的意涵，除非特別指明。

前揭實例僅係為了示例目的而記載於此，且不應用於限制本發明的範圍。針對前揭內容的多種變化都是可能的。既然針對前揭實例的修飾與變化對於所屬領域具有通常知識者是顯而易見的，本發明應僅被限制於後續段落中所載之請求項的範圍。

前揭出版品或文件之引證文件並沒有承認任何前揭內容是屬先前技術的意圖，也沒有認同該些出版品或文件的內容及時間的意思。

【符號說明】

	1	過濾區域
5	2	狹縫
	3	微加工過濾器
	4	預置腔
	5	一後過濾子腔室
	6	閥 A
10	7	閥 B
	8	閥 C
	10	注入室
	11	入口
	12	過濾腔
15	13	聲波混合晶片
	14	磁捕捉管柱
	15	磁極
	16	磁分離腔
	17	電磁晶片
20	18	槽
	19	磁珠
	20	目標細胞
	103	微加工過濾器
25	112	混合/過濾腔
	114	磁捕捉管柱
	115	磁極
	200	聲波元件
	202	狹縫

	203	過濾器
	303	過濾器
	416	腔室
	417	電極層
5	421	電磁單元
	427	電極層
	429	入口
	430	出口
10	503	微加工過濾器
	504	預置腔
	505	後過濾子腔室
	506	閥
	507	閥
15	508	閥
	510	注入室
	518	收集槽
	520	稀少目標細胞
	524	清洗緩衝液
20	525	血液樣本
	526	清洗幫浦
	530	流出管
25	603	微加工過濾器
	604	預置腔
	605	後過濾子腔室
	606	閥 A
	610	注入室
	632	側開口

634 廢物

635 收集

636 框架

5

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

10

無

發明摘要

※ 申請案號：102124143

※ 申請日：102.7.5

※IPC 分類：C12Q 1/24 (2006.01)
B01D35/06 (2006.01)
G01N 1/40 (2006.01)

5 【發明名稱】(中文/英文)

用於分離或富集化細胞的方法及組合物/Methods and Compositions
for Separating or Enriching Cells

10 【中文】

本發明提供一過濾腔，其包含一容置於一外殼內的微加工過濾器；其中該過濾器及/或該外殼的內表面係經氣相沉積法、昇華作用、氣相表面反應、或粒子濺射修飾以製得一均勻的塗層。本發明並提供一方法，其係用以自一流體樣本中分離細胞，該方法包含：a) 配
15 送一流體樣本至於本文中所揭露的該過濾腔；及 b) 提供該流體樣本一流體流通過該過濾腔；其中，依據前述流體樣本成份的尺寸、形狀、或形變性，該流體樣本中的成份係通過會被留置於該過濾器中。

20 【英文】

The present invention provides a filtration chamber comprising a microfabricated filter enclosed in a housing, wherein the surface of said filter and/or the inner surface of said housing are modified by vapor deposition,
25 sublimation, vapor-phase surface reaction, or particle sputtering to produce a uniform coating; and a method for separating cells of a fluid sample, comprising: a) dispensing a fluid sample into the filtration chamber disclosed herein; and b) providing fluid flow of the fluid sample through the filtration chamber, wherein components of the fluid sample flow through or are retained by the filter based
30 on the size, shape, or deformability of the components.

申請專利範圍

1. 一種過濾腔，其包含一容置於一外殼的微加工過濾器；其中前述微加工過濾器的表面及/或前述外殼的內表面係經氣相沉積法、昇華作用、氣相表面反應、或粒子濺射修飾以產出一均勻之塗層。
5
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之過濾腔，其中前述過濾器的表面及/或前述外殼的內表面的修飾是經由物理氣相沉積法來達成。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之過濾腔，其中前述過濾器的表面及/或前述外殼的內表面的修飾是經由電漿化學氣相沉積法來達成。
10
4. 如申請專利範圍第 2 或 3 項所述之過濾腔，其中前述氣相沉積法係沉積一金屬氮化物或一金屬鹵化物。
5. 如申請專利範圍第 4 項所述之過濾腔，其中前述金屬氮化物為氮化鈦、氮化矽、氮化鋅、氮化銮、及/或氮化硼。
15
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之過濾腔，其中前述過濾器的表面及/或前述外殼的內表面的修飾是經由化學氣相沉積法來達成。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之過濾腔，其中前述化學氣相沉積法係透過一對二甲苯而達成。
- 20 8. 如申請專利範圍第 7 項所述之過濾腔，其中前述對二甲苯係選自對二甲苯、對二甲苯-N、對二甲苯-D、對二甲苯 AF-4、對二甲苯 SF、及對二甲苯 HT 所組成之群組。
9. 如申請專利範圍第 6 項所述之過濾腔，其中前述外殼的內表面的修飾是經由聚四氟乙烯（PTFE）來達成。
- 25 10. 如申請專利範圍第 6 項所述之過濾腔，其中前述外殼的內表面

的修飾是經由特氟隆-AF 來達成。

11. 如申請專利範圍第 1 項所述之過濾腔，其中前述過濾器及/或前述外殼包含矽、二氧化矽、玻璃、金屬、碳、陶瓷、塑膠、或一聚合物。
- 5 12. 如申請專利範圍第 11 項所述之過濾腔，其中前述過濾器及/或前述外殼包含氮化矽或氮化硼。
13. 如申請專利範圍第 11 項所述之過濾腔，其包含兩個以上的電極。
14. 如申請專利範圍第 13 項所述之過濾腔，其中前述電極係設置於
10 相對於前述過濾器的一邊。
15. 如申請專利範圍第 11 項所述之過濾腔，其包含至少一個聲波元件。
16. 一種濾匣，其包含如申請專利範圍第 1 項所述之過濾腔。
17. 一種自動化系統，其包含如申請專利範圍第 1 項所述之過濾腔。
- 15 18. 一種自一流體樣本中分離細胞的方法，其包含：
 - a) 配送一流體樣本至如申請專利範圍第 1 項所述之過濾腔；及
 - b) 提供前述流體樣本的流體流以通過前述過濾腔；其中，依據流體樣本成份之尺寸、形狀、或形變性，前述流體樣本成份流經或被保留於前述過濾器中。
- 20 19. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其進一步包含：
 - c) 以一物理作用力操作該流體樣本；其中前述操作係經由一屬前述過濾器以外的結構、及/或一內建於前述過濾器的結構來達成。
20. 如申請專利範圍第 19 項所述之方法，其中前述物理作用力係選

自介電泳力、旅波介電泳力、磁力、聲波力、靜電力、機械力、光輻射力、及熱對流所組成的群組。

21. 如申請專利範圍第 20 項所述之方法，其中前述介電泳力或前述旅波介電泳力係經由一電極所產生的電場來達成。
- 5 22. 如申請專利範圍第 20 項所述之方法，其中前述磁力係經由一強磁性材料所產生的磁場來達成。
23. 如申請專利範圍第 20 項所述之方法，其中前述磁力係經由一微電磁單元所產生的磁場來達成。
24. 如申請專利範圍第 20 項所述之方法，其中前述聲波力係經由一
10 駐波聲場或一旅波聲場來達成。
25. 如申請專利範圍第 20 項所述之方法，其中前述聲波力係經由一壓電材料所產生的聲場來達成。
26. 如申請專利範圍第 20 項所述之方法，其中前述聲波力係經由一音圈或一音頻揚聲器來達成。
- 15 27. 如申請專利範圍第 20 項所述之方法，其中前述靜電力係經由一直流電場來達成。
28. 如申請專利範圍第 20 項所述之方法，其中前述機械力係為一射流流力 (fluidic flow force)。
29. 如申請專利範圍第 20 項所述之方法，其中前述光輻射力係經由
20 雷射鉗 (laser tweezer) 來達成。
30. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中前述過濾步驟係進行於一自動化系統。
31. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中前述樣本為血液、滲出液 (effusion)、尿液 (urine)、骨髓樣本、腹水 (ascitic fluid)、
25 骨盆腔積液 (pelvic wash fluid)、肋膜腔積水 (pleural fluid)、

脊髓液 (spinal fluid)、淋巴液 (lymph)、血清、黏液、痰、唾
液、精液、眼內液 (ocular fluid)、鼻腔抽出液 (extract of nasal)、
咽喉或生殖道拭子、經分解之組織的細胞懸浮液 (cell
suspension from digested tissue)、或排泄物的萃取液 (extract of
5 fecal material)。

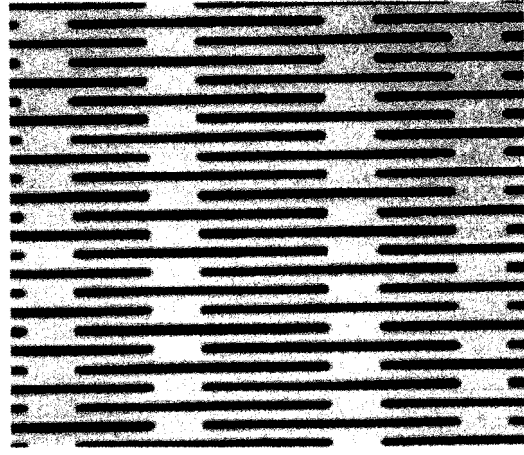
32. 如申請專利範圍第 31 項所述之方法，其中前述流體樣本為一血
液樣本且經分離的前述細胞為紅血球。

33. 如申請專利範圍第 31 項所述之方法，其中前述流體樣本為一血
液樣本且經分離的前述細胞為非造血細胞 (non-hematopoietic
10 cells)、血液細胞的亞群、胎兒紅血球 (fetal red blood cells)、
幹細胞、或癌細胞。

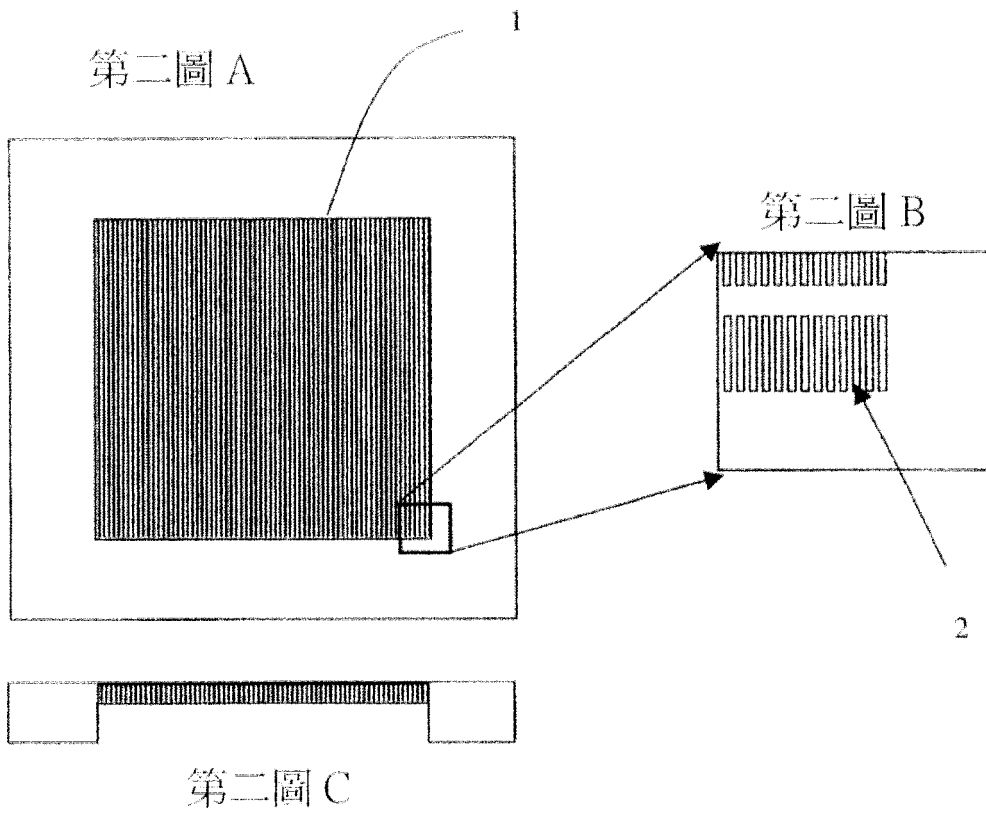
34. 如申請專利範圍第 31 項所述之方法，其中前述流體樣本為一滲
出液或一尿液樣本且經分離的前述細胞為癌細胞或非造血細
胞。

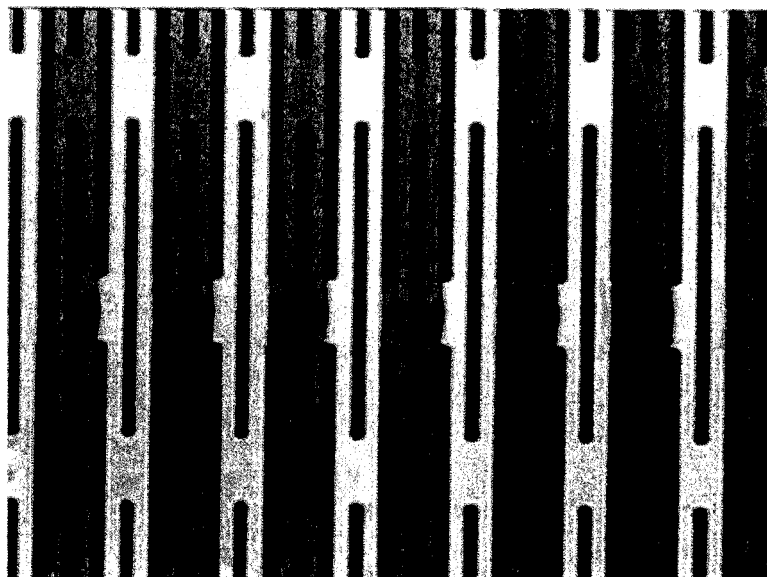
15

圖式

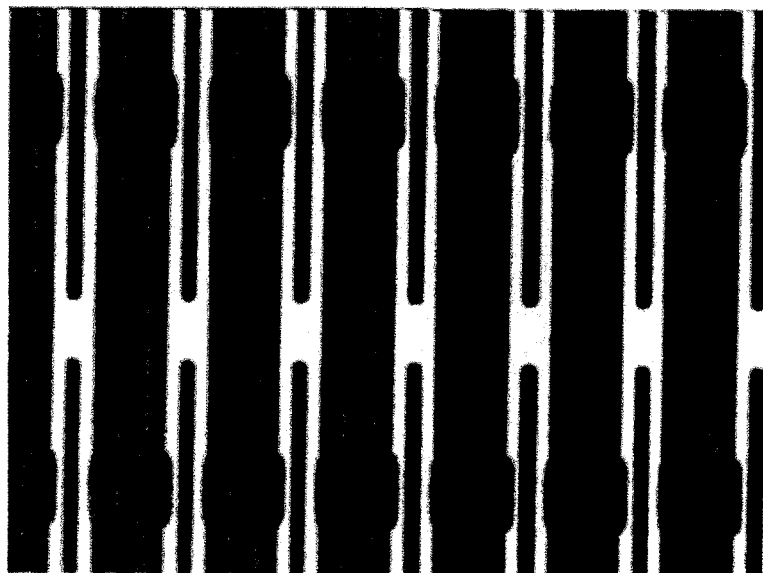


第一圖

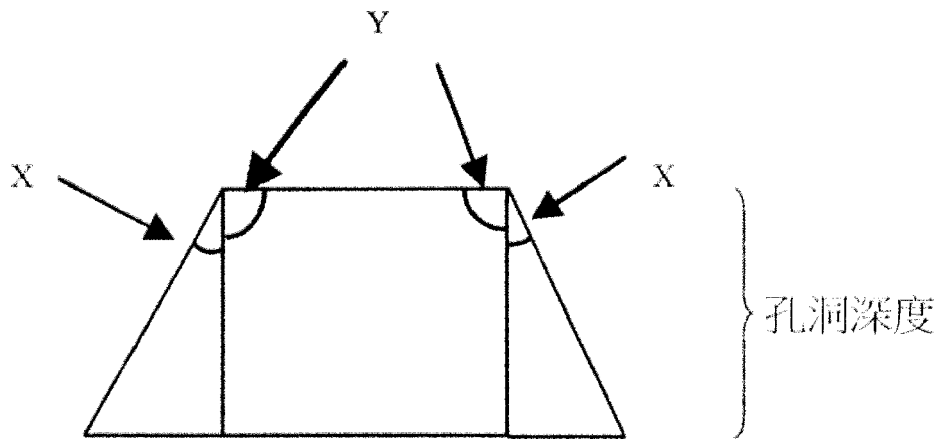




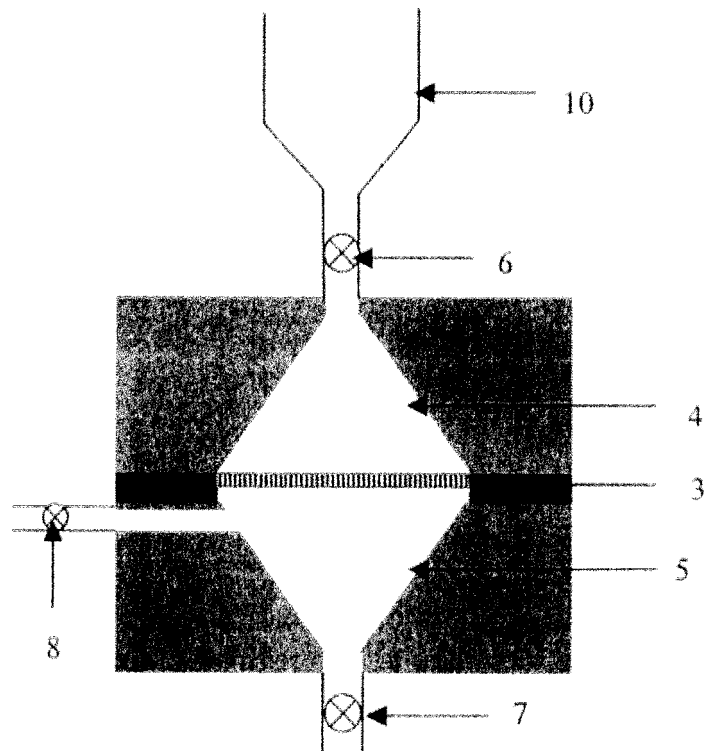
第三圖 A



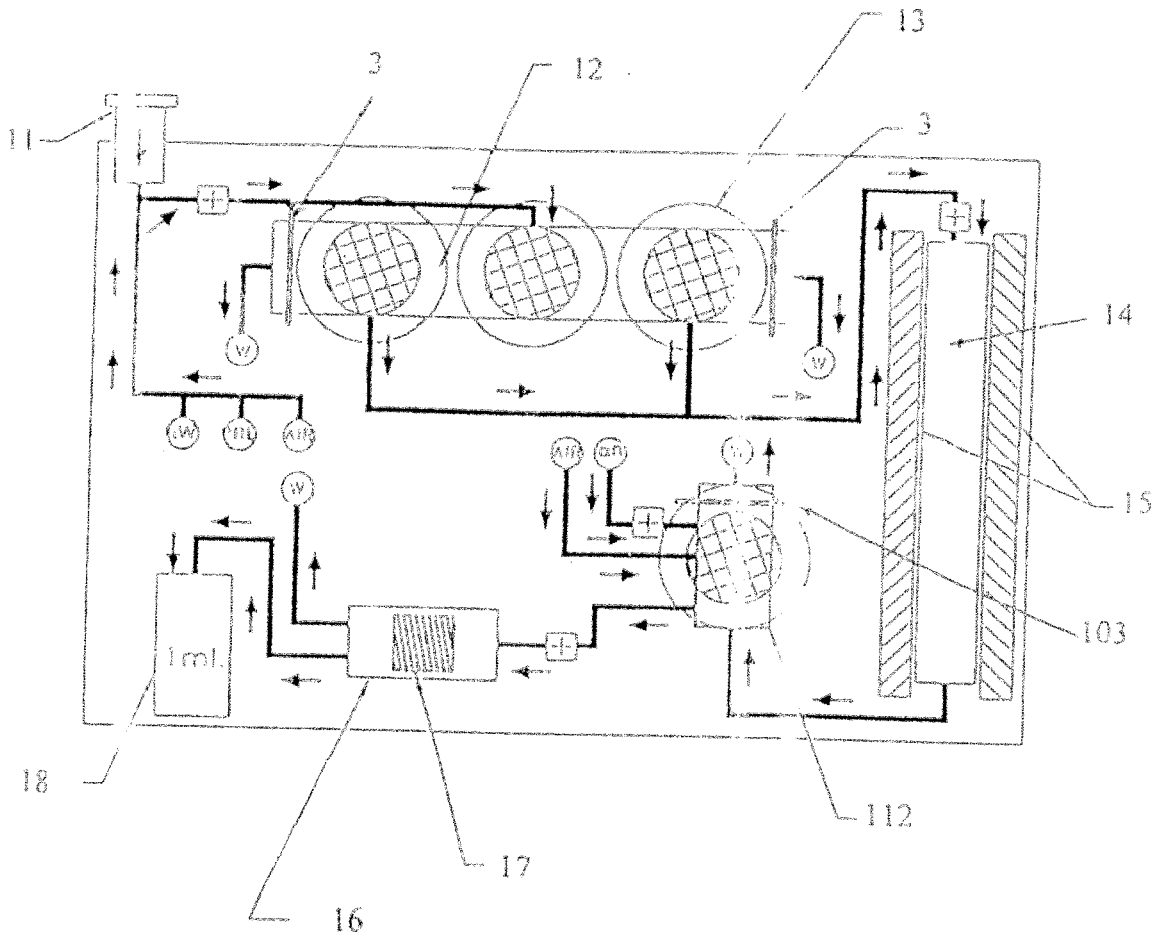
第三圖 B



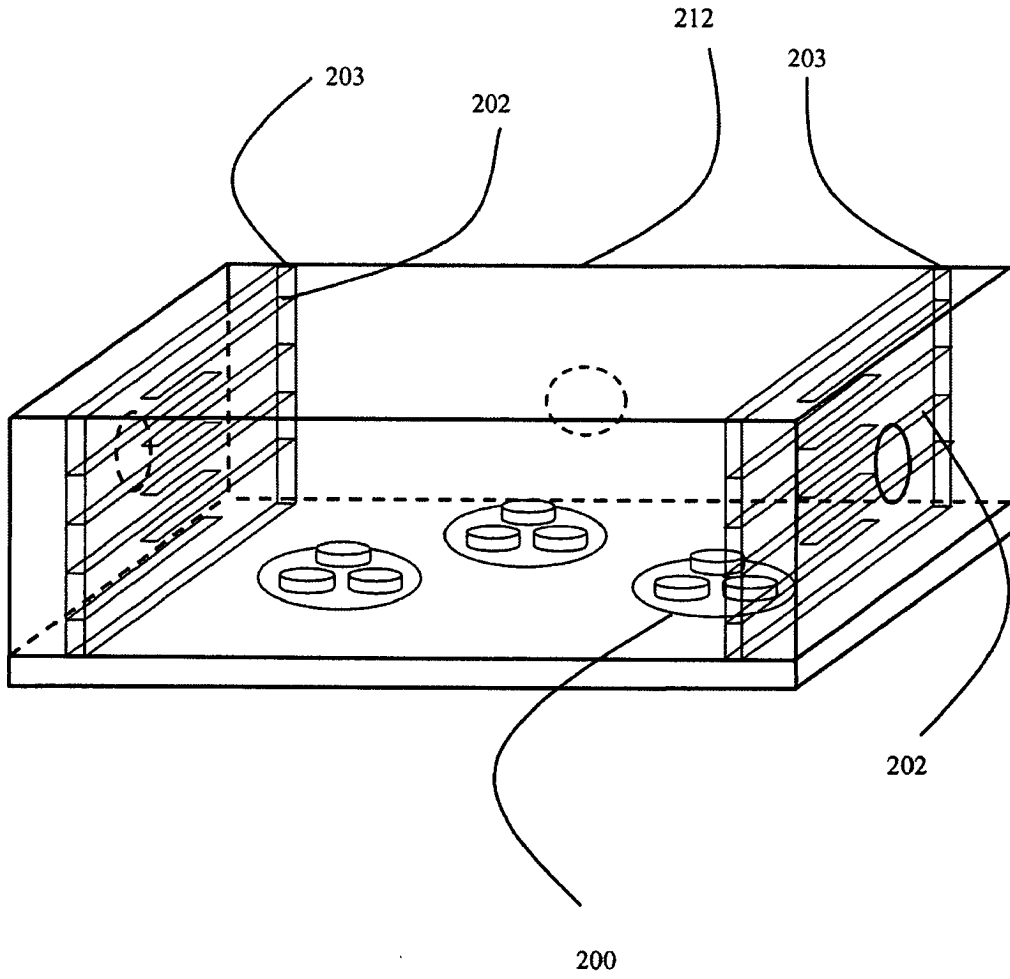
第四圖



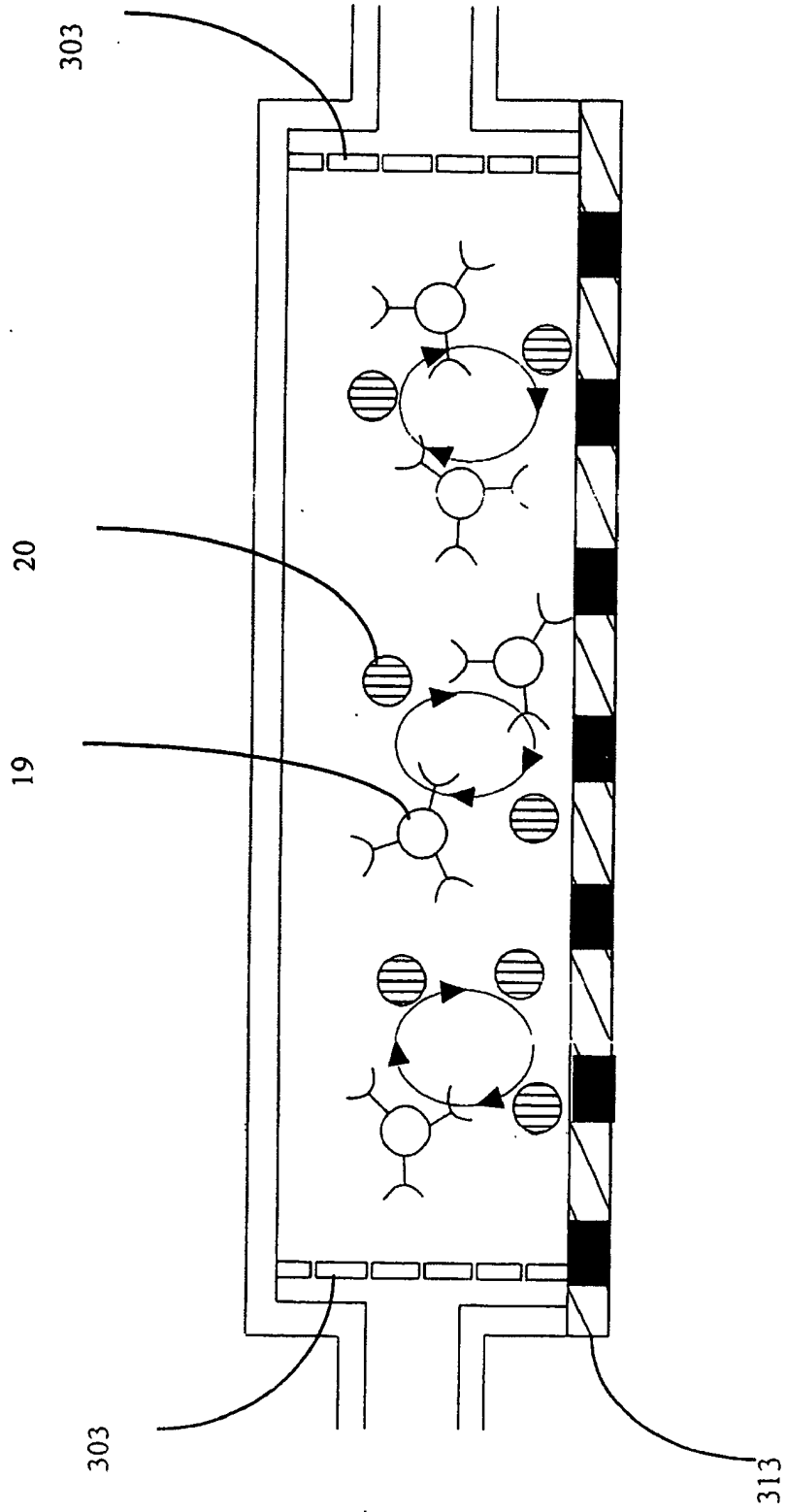
第五圖



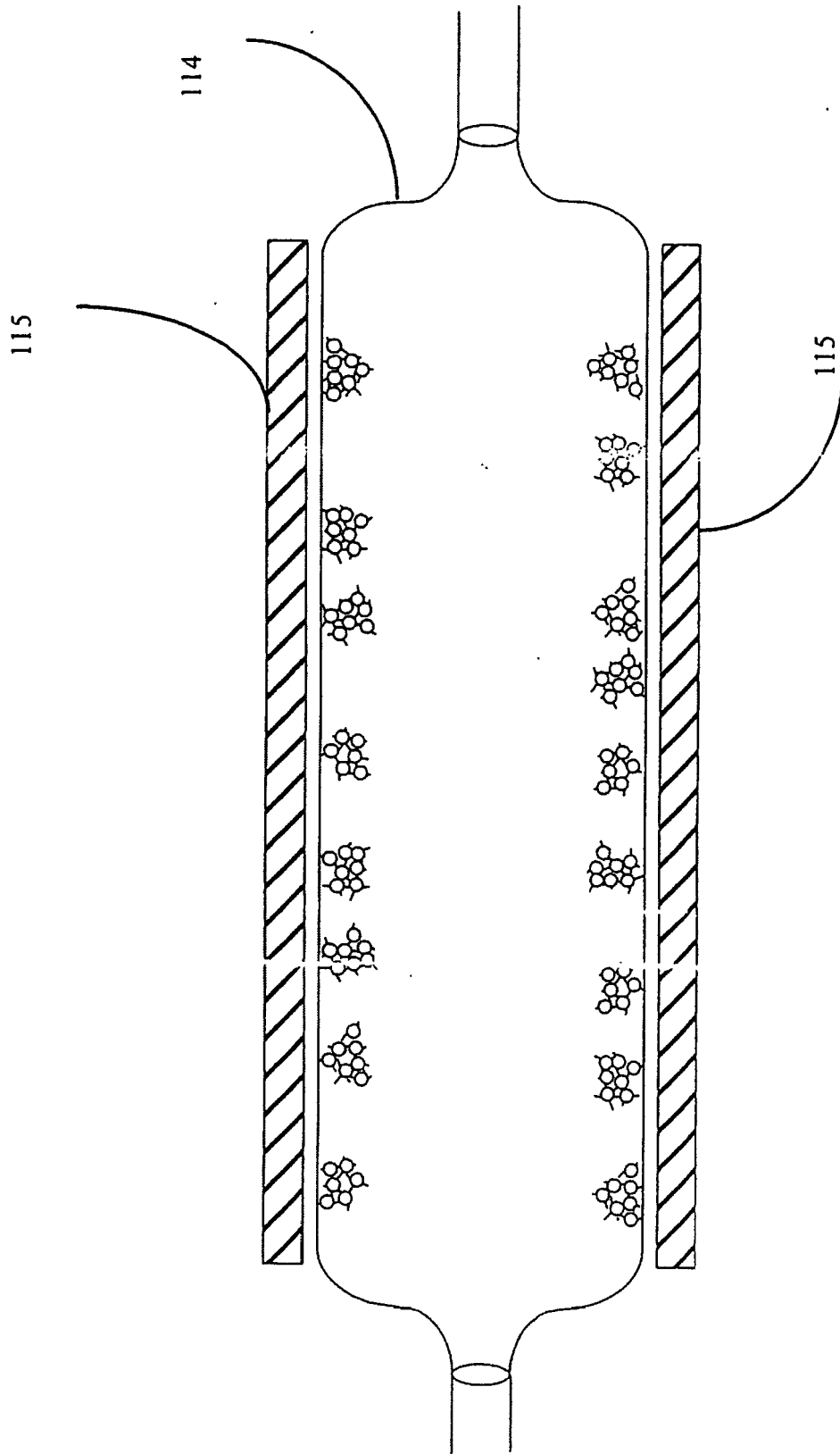
第六圖



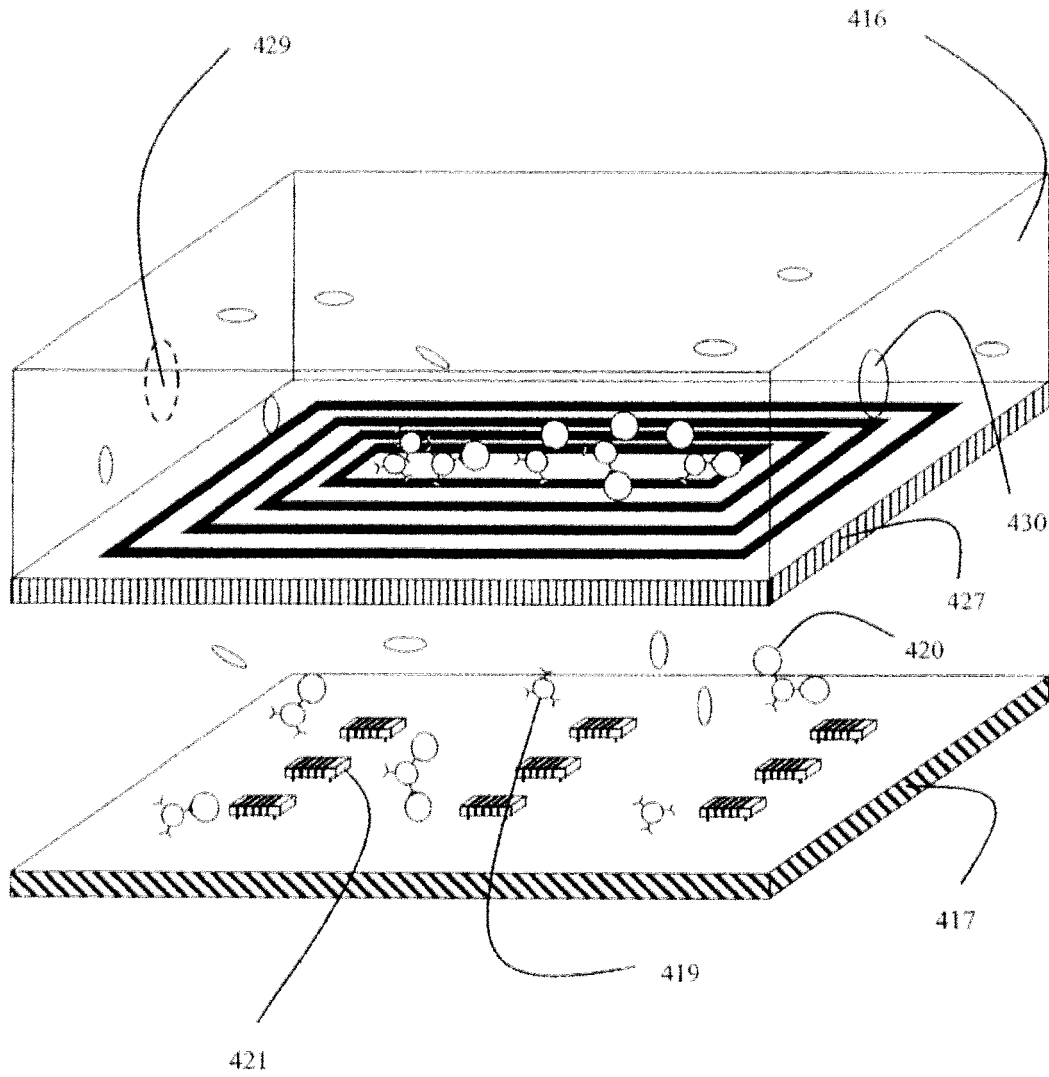
第七圖



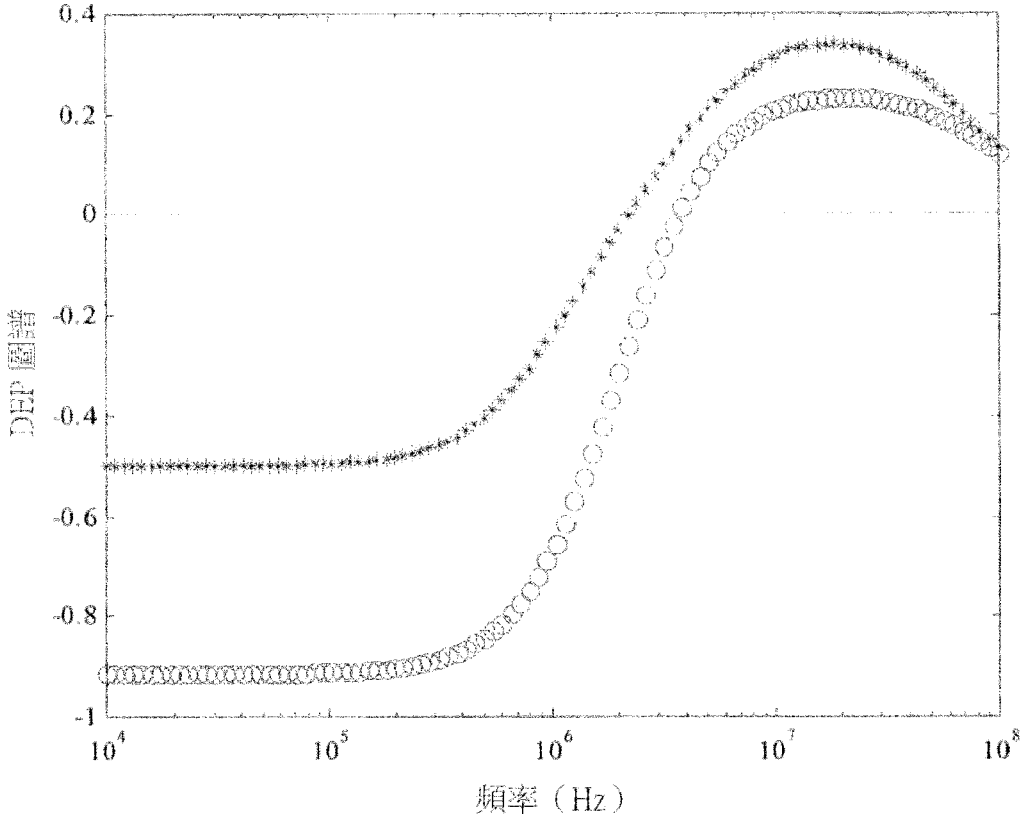
第八圖



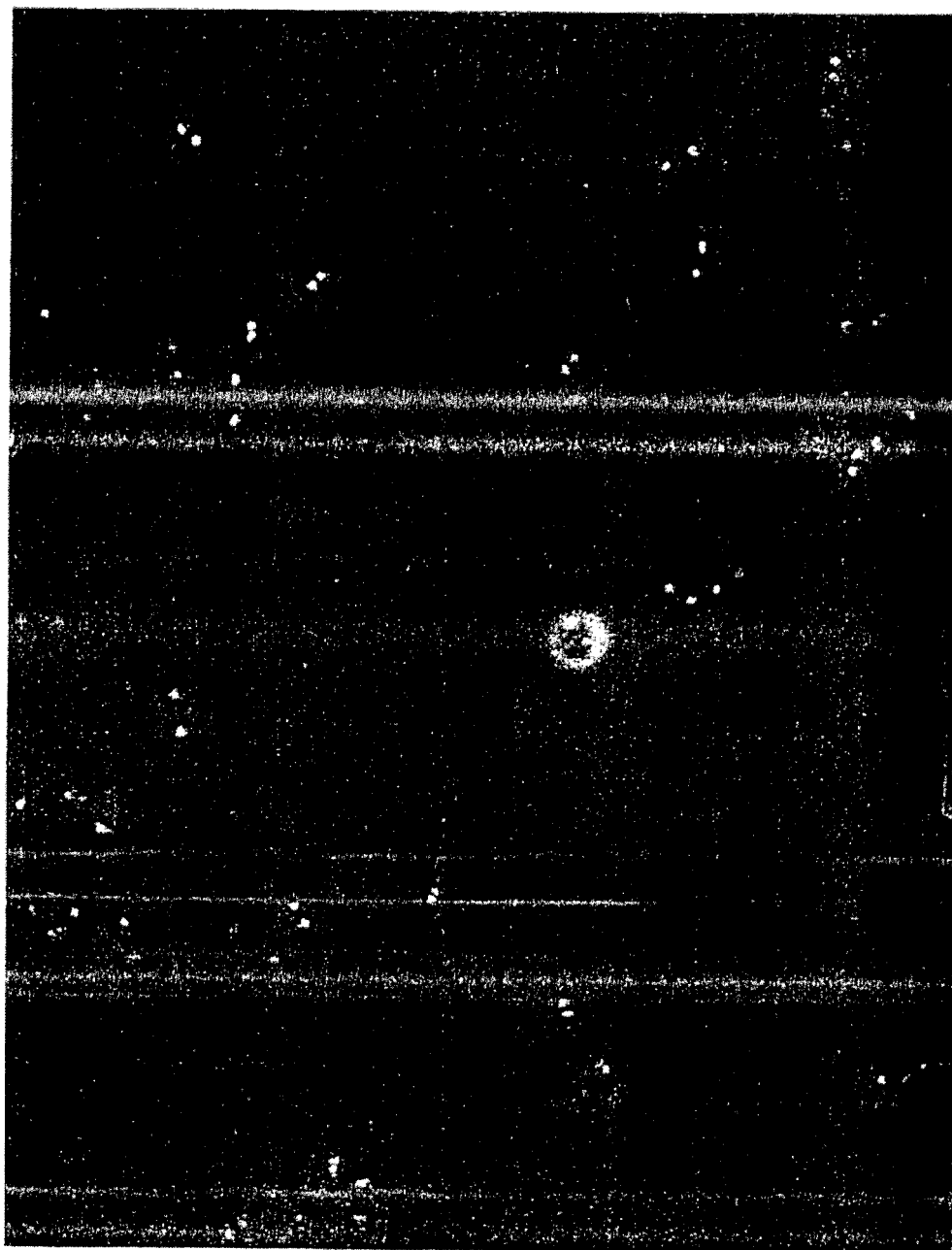
第九圖



第十圖

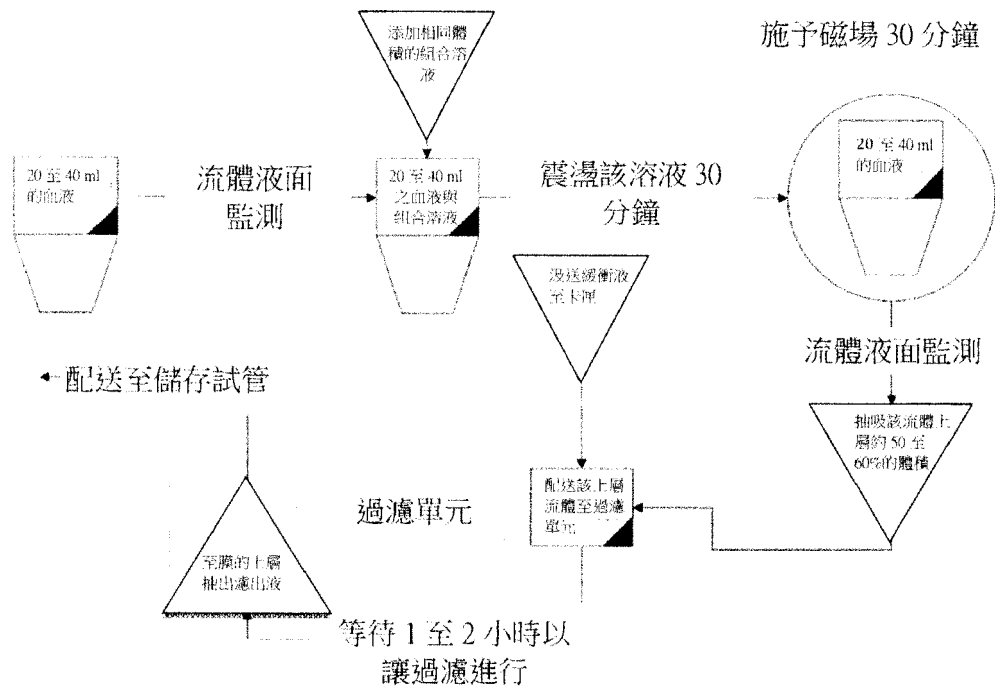


第十一圖

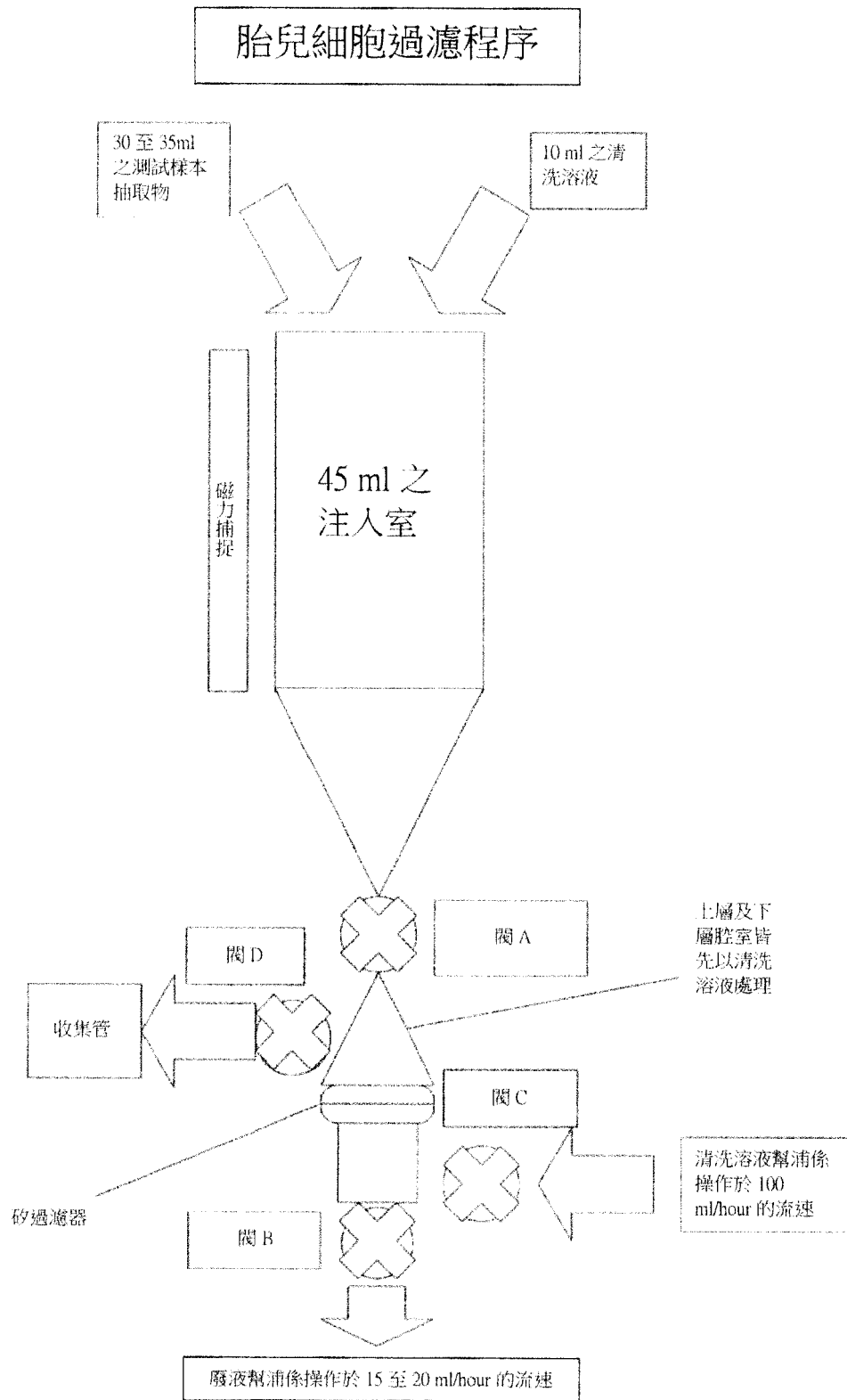


第十二圖

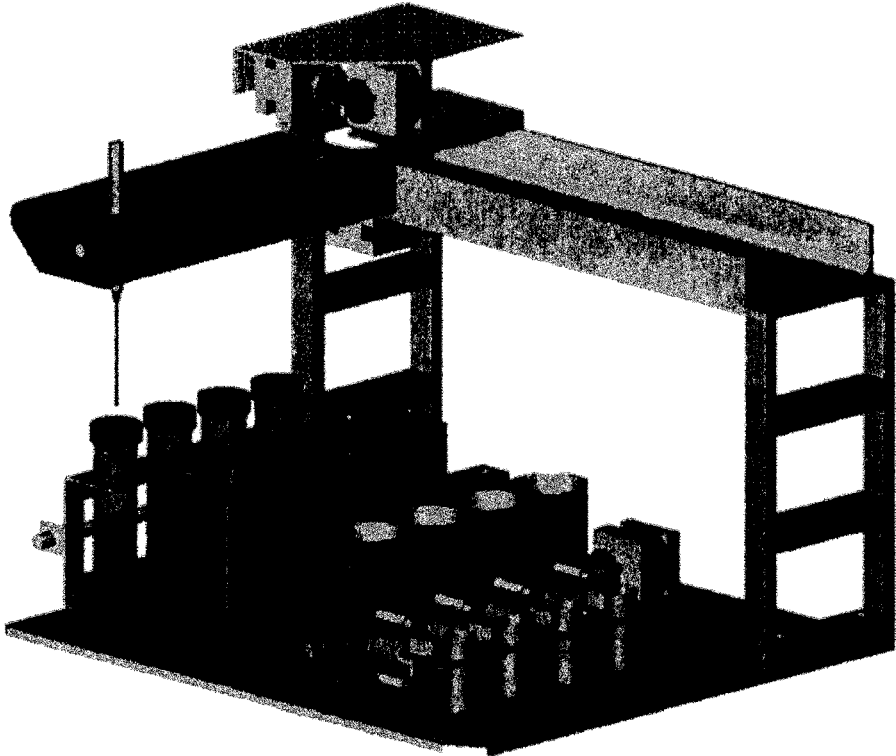
胎兒細胞處理流程圖



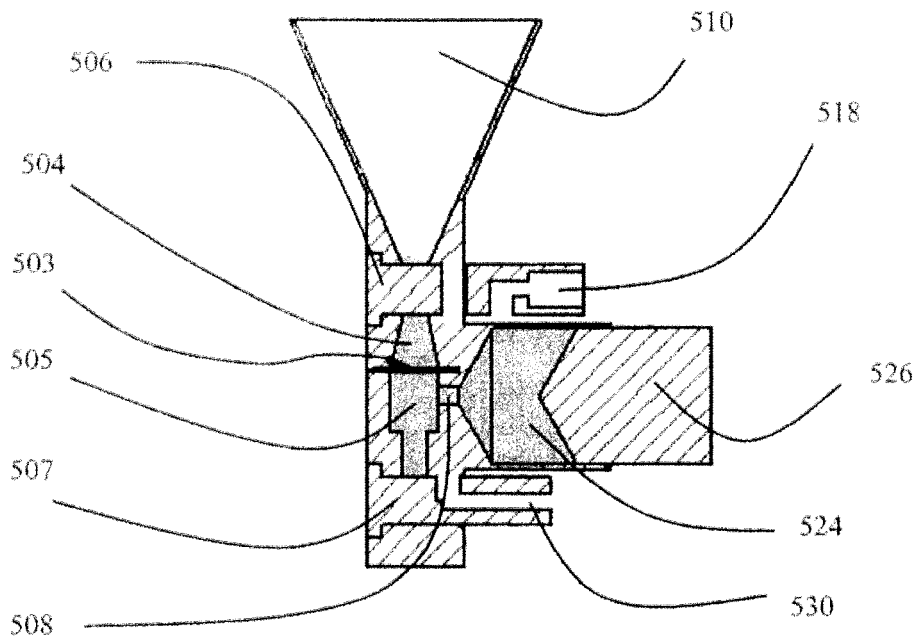
第十三圖



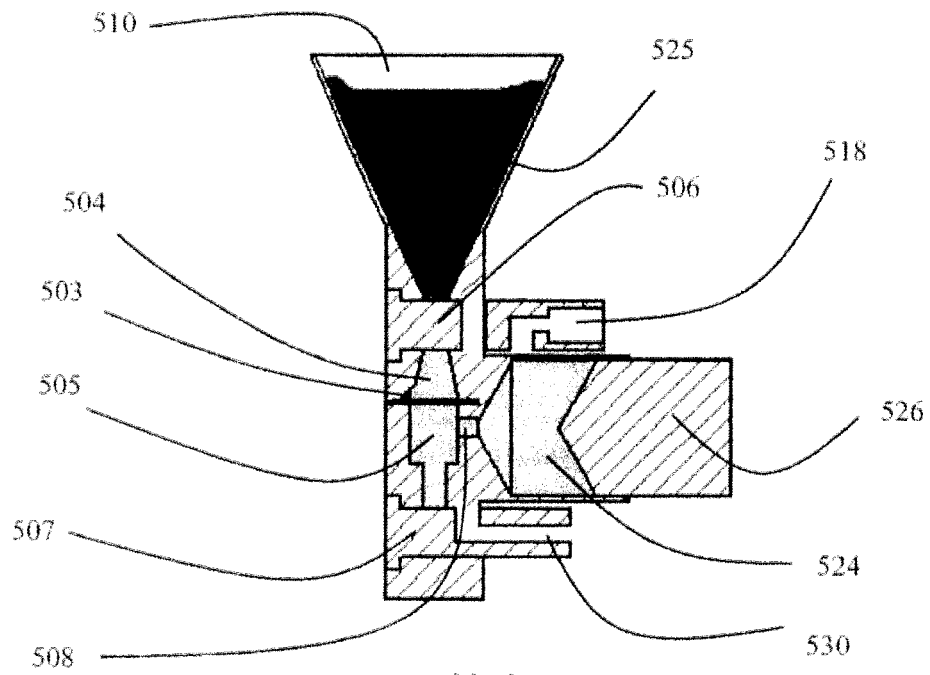
第十四圖



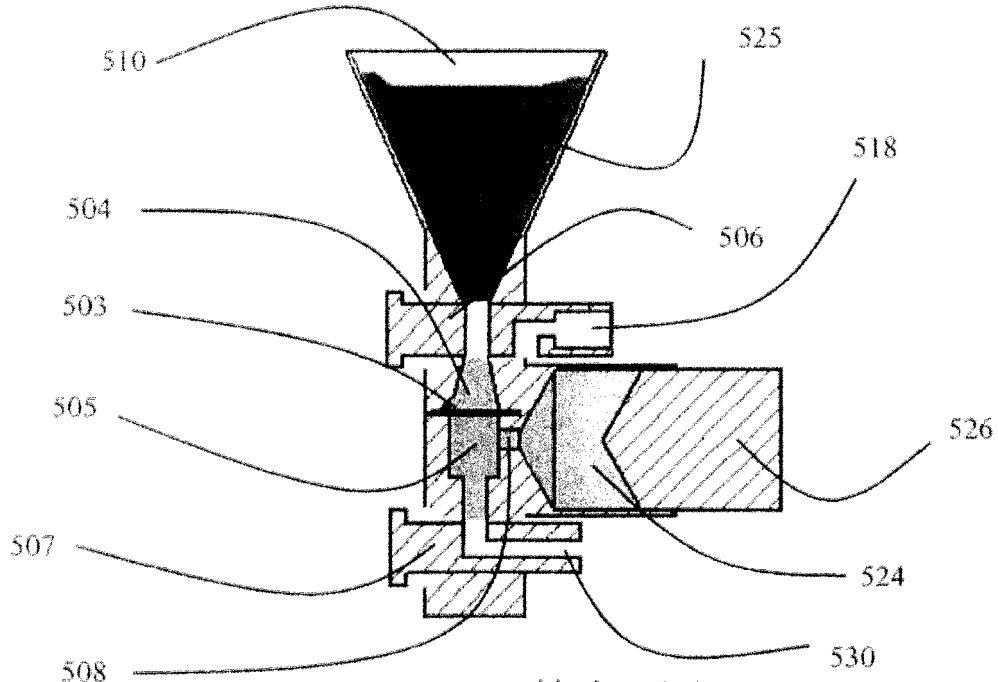
第十五圖



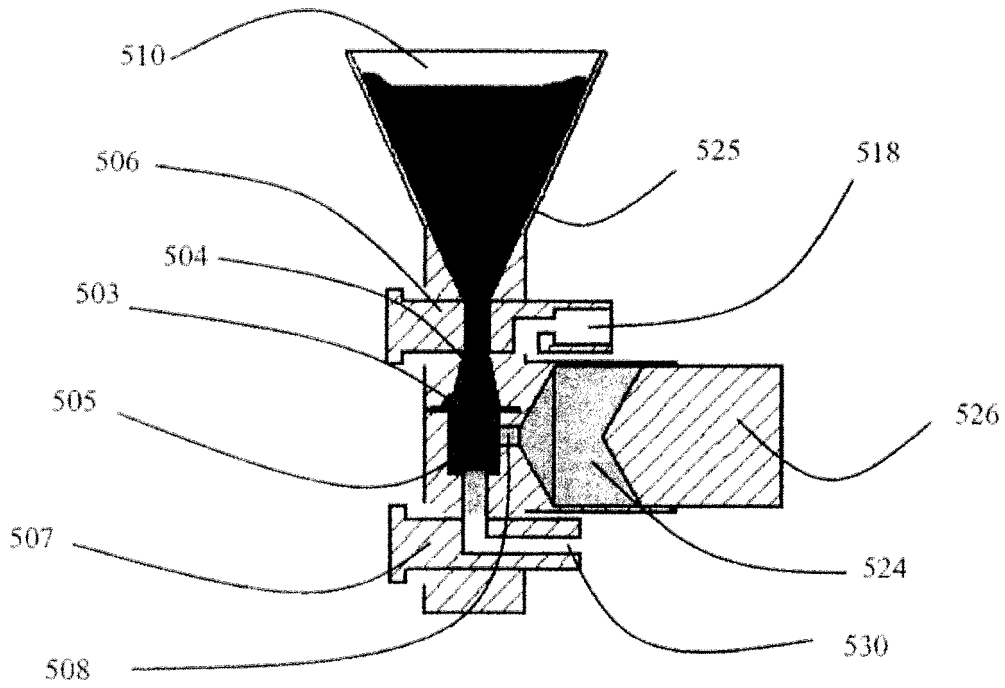
第十六圖 A



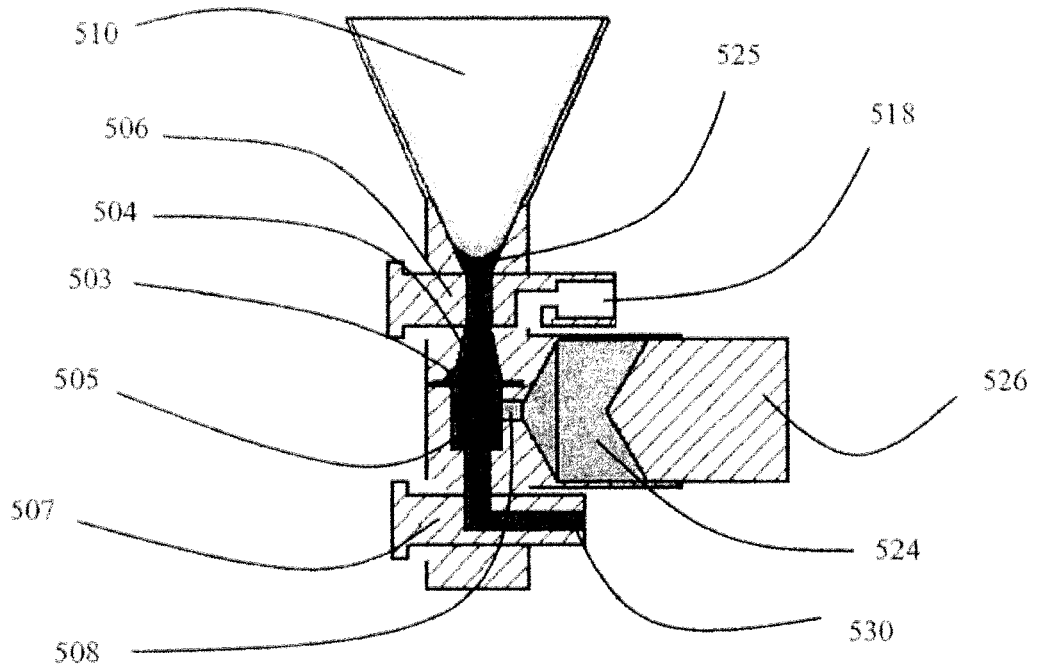
第十六圖 B



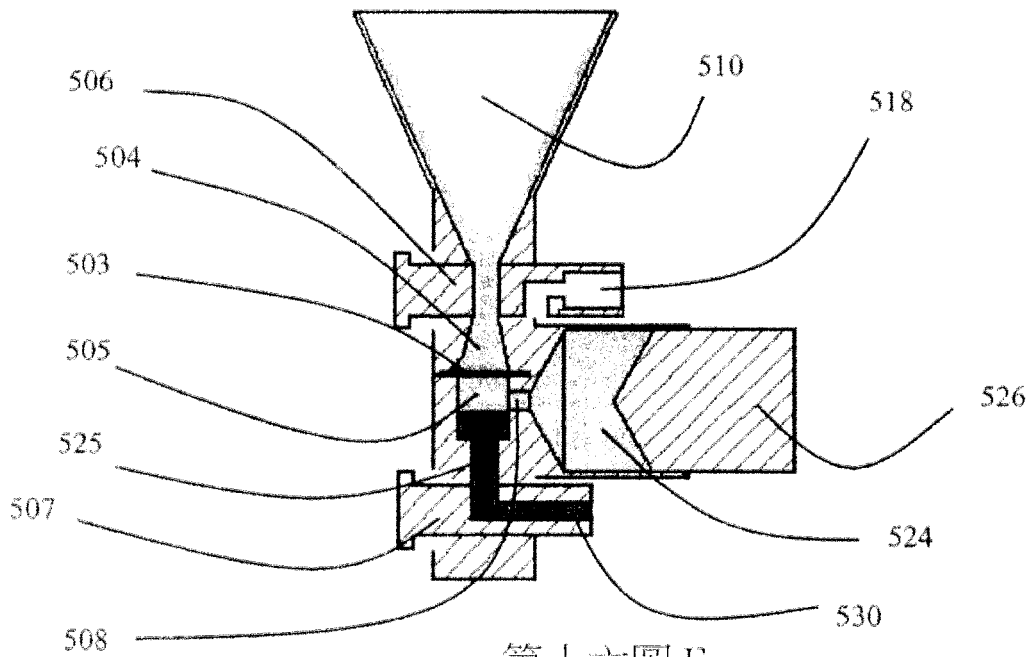
第十六圖 C



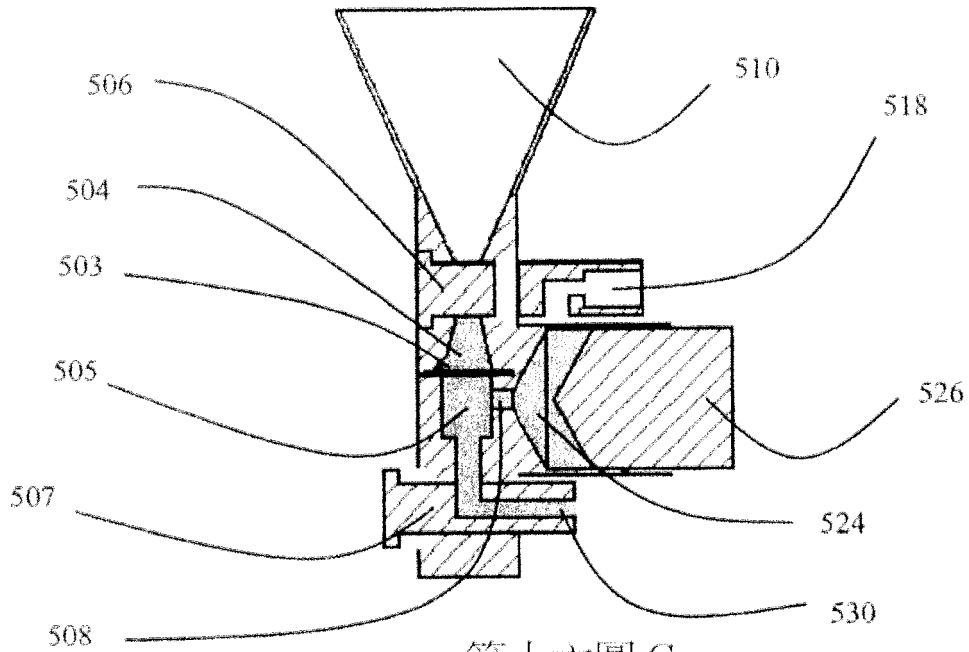
第十六圖 D



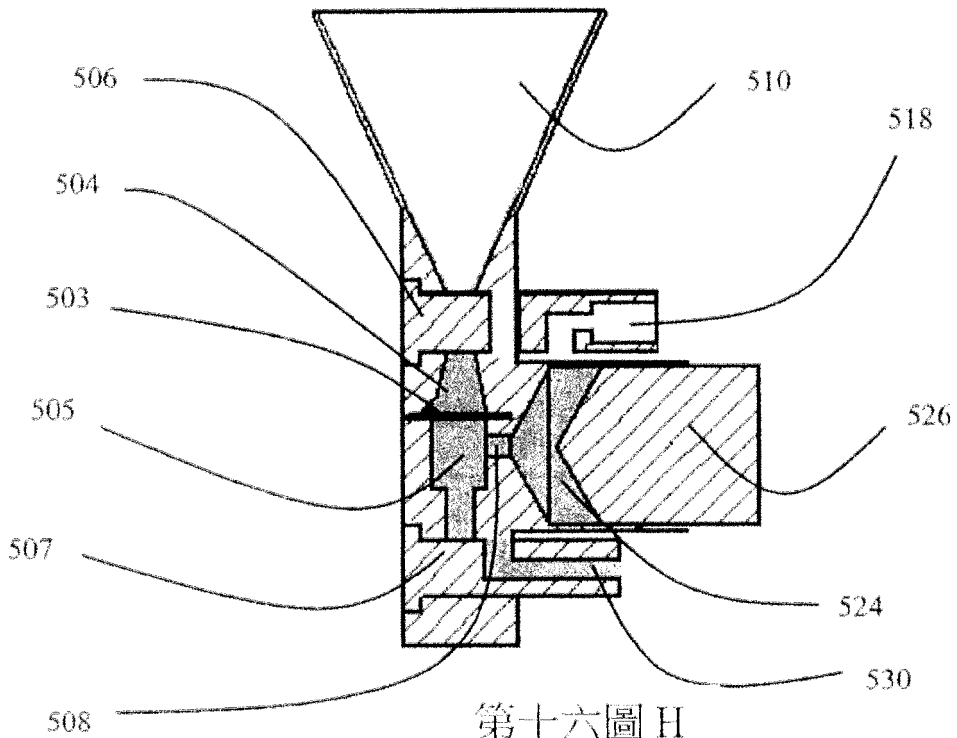
第十六圖 E



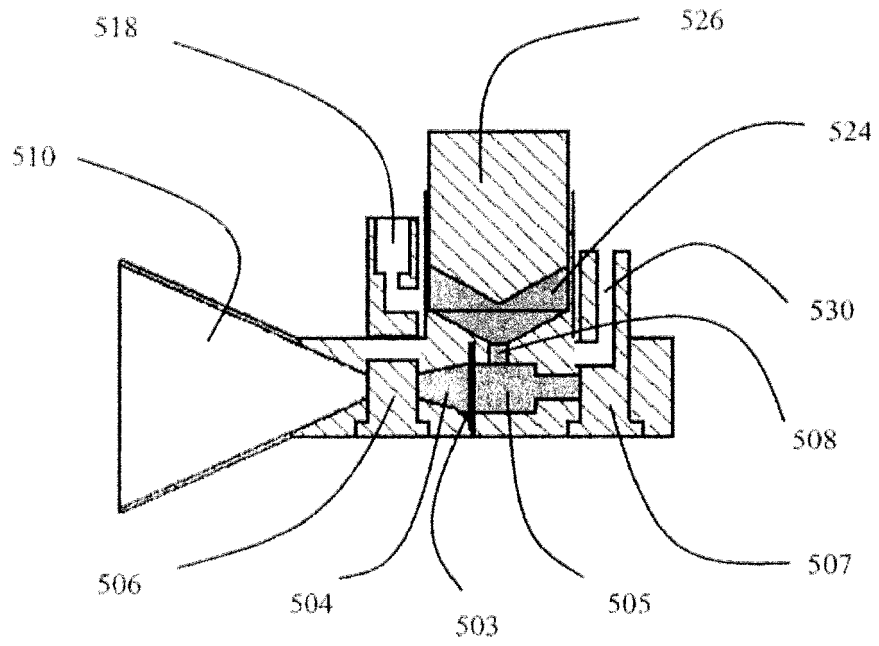
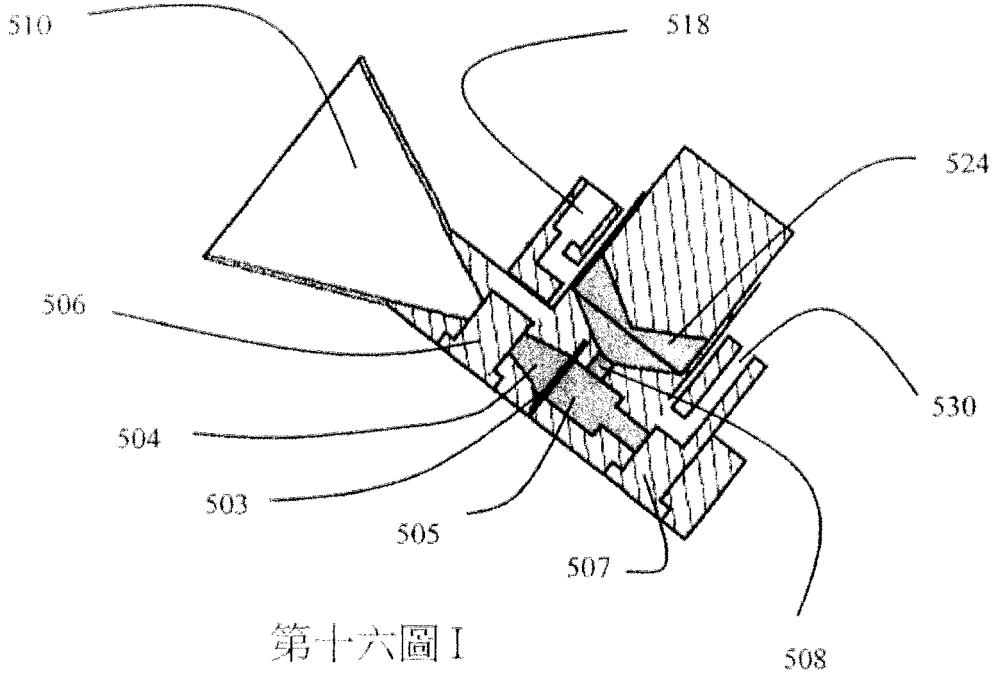
第十六圖 F

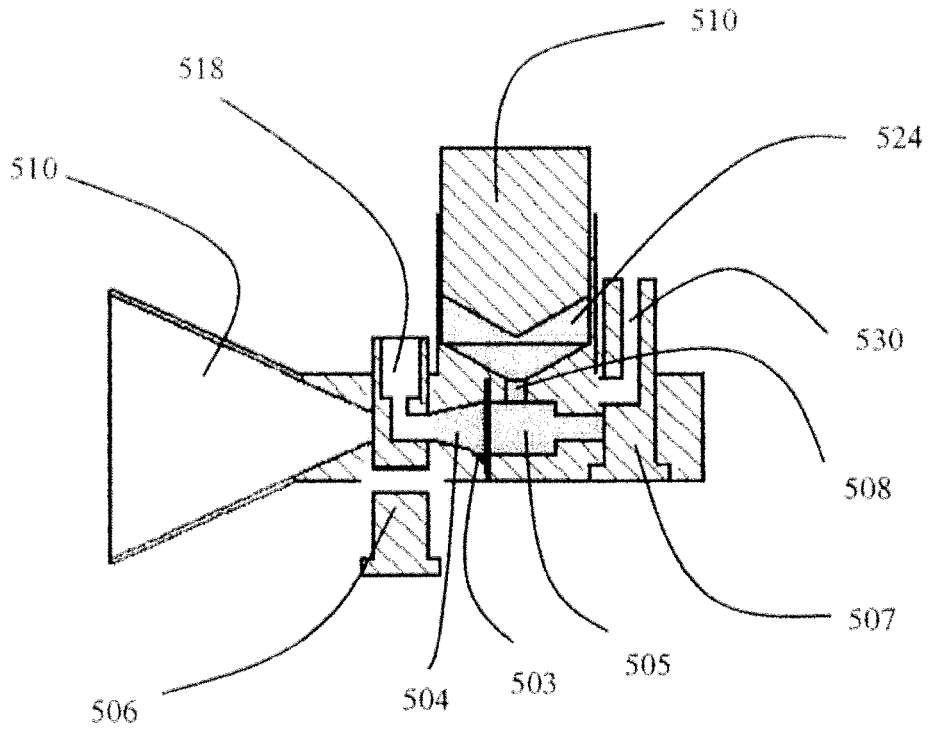


第十六圖 G

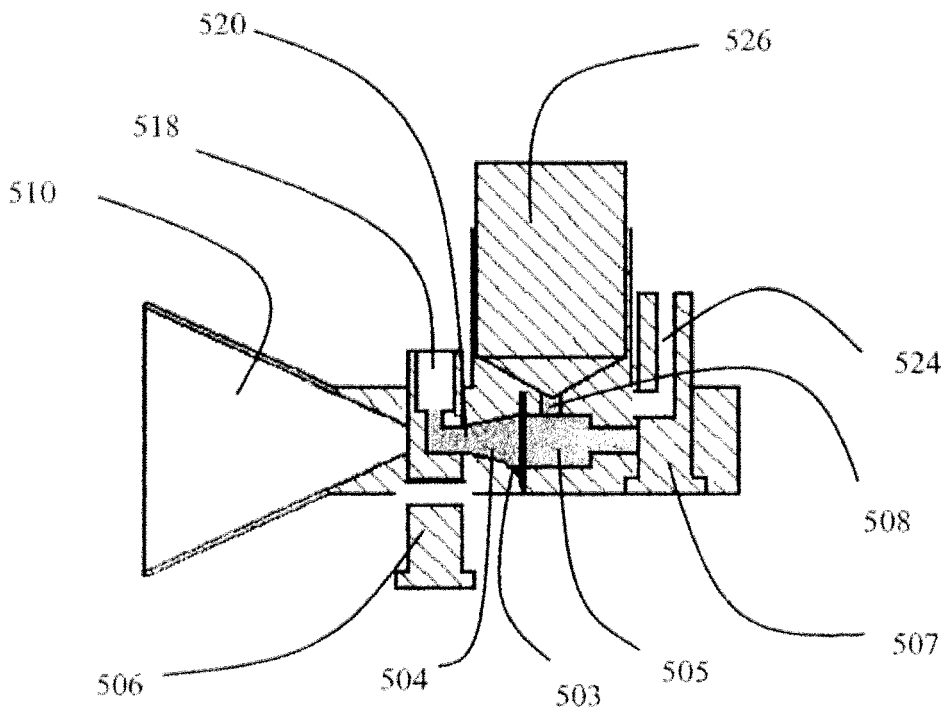


第十六圖 H

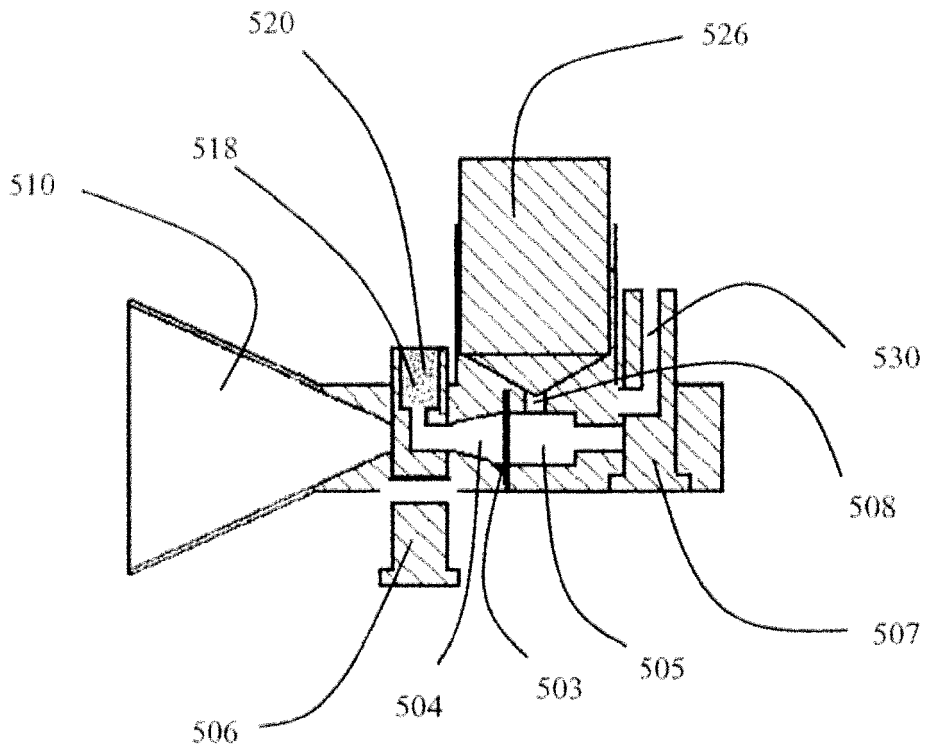




第十六圖 K



第十六圖 L



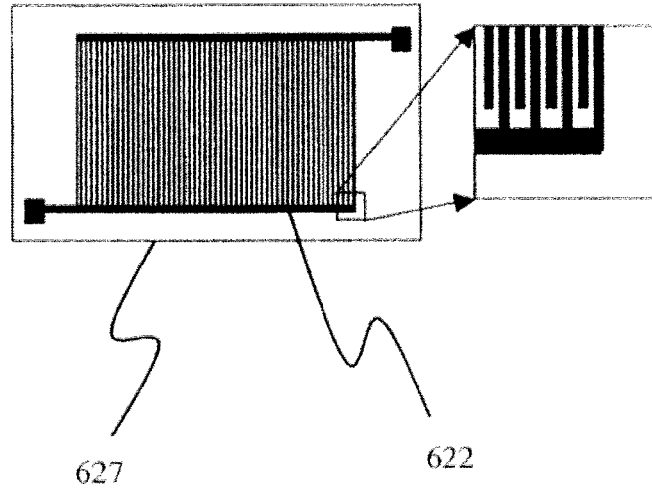
第十六圖 M



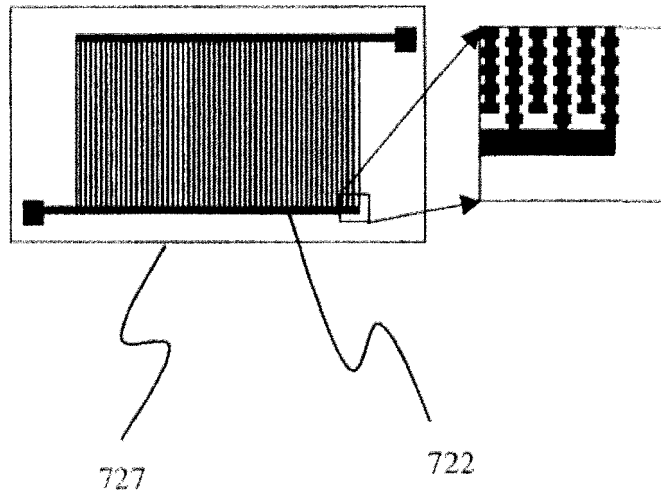
第十七圖 A



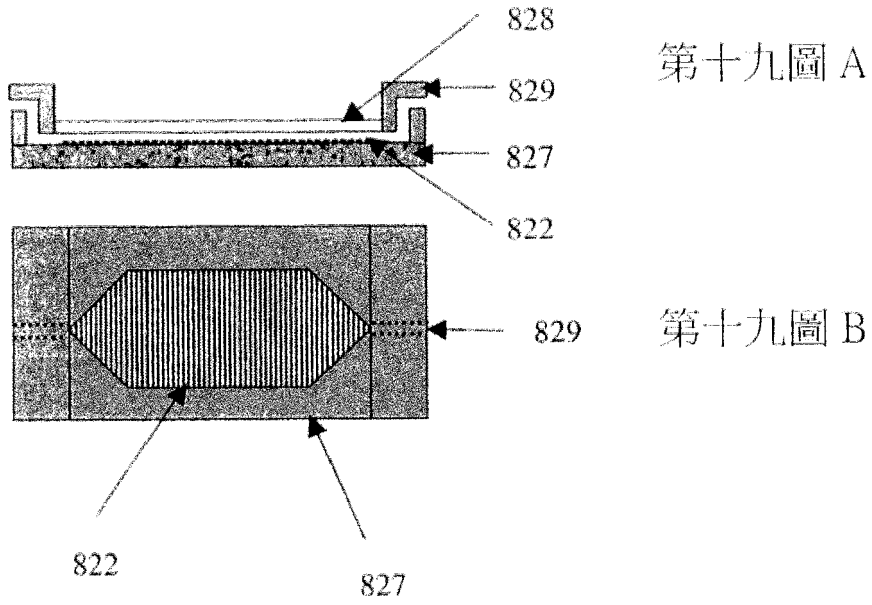
第十七圖 B



第十八圖 A

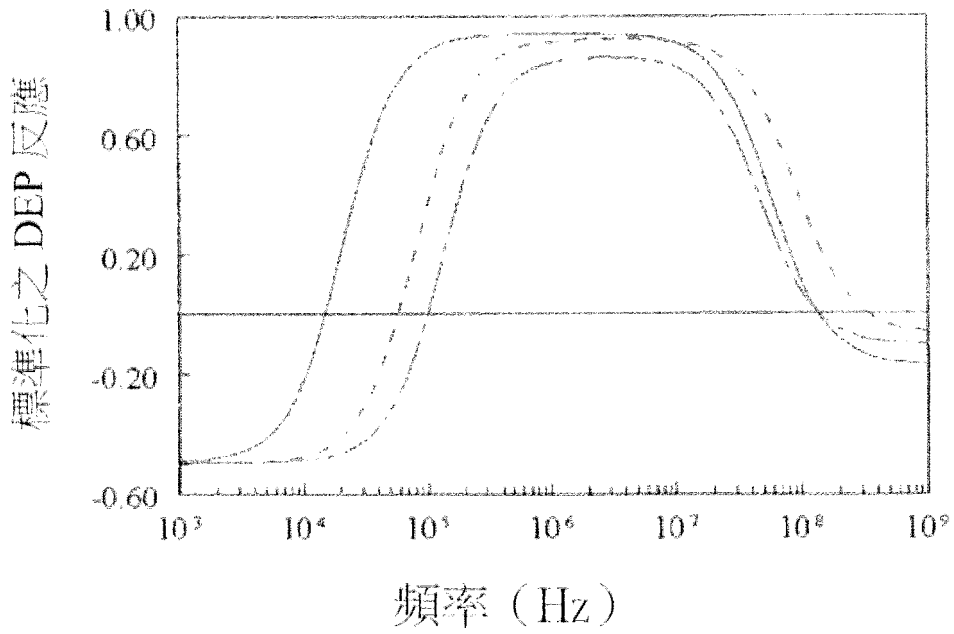


第十八圖 B

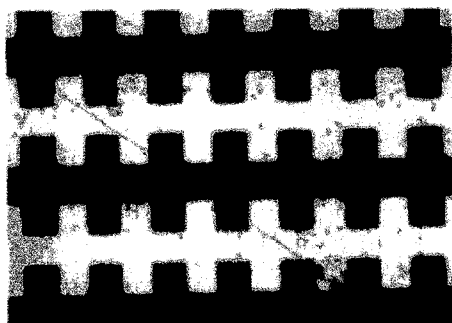


第十九圖 A

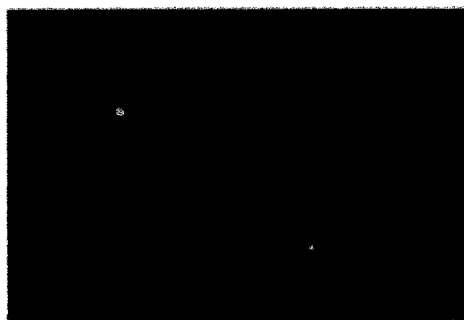
第十九圖 B



第二十圖

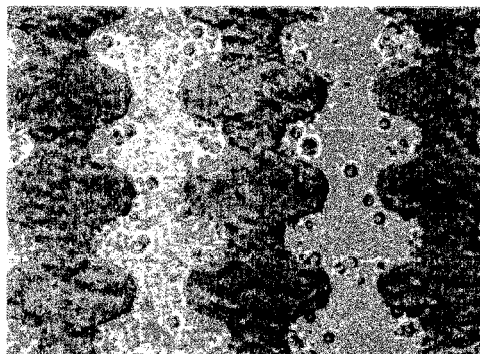


第二十一圖 A

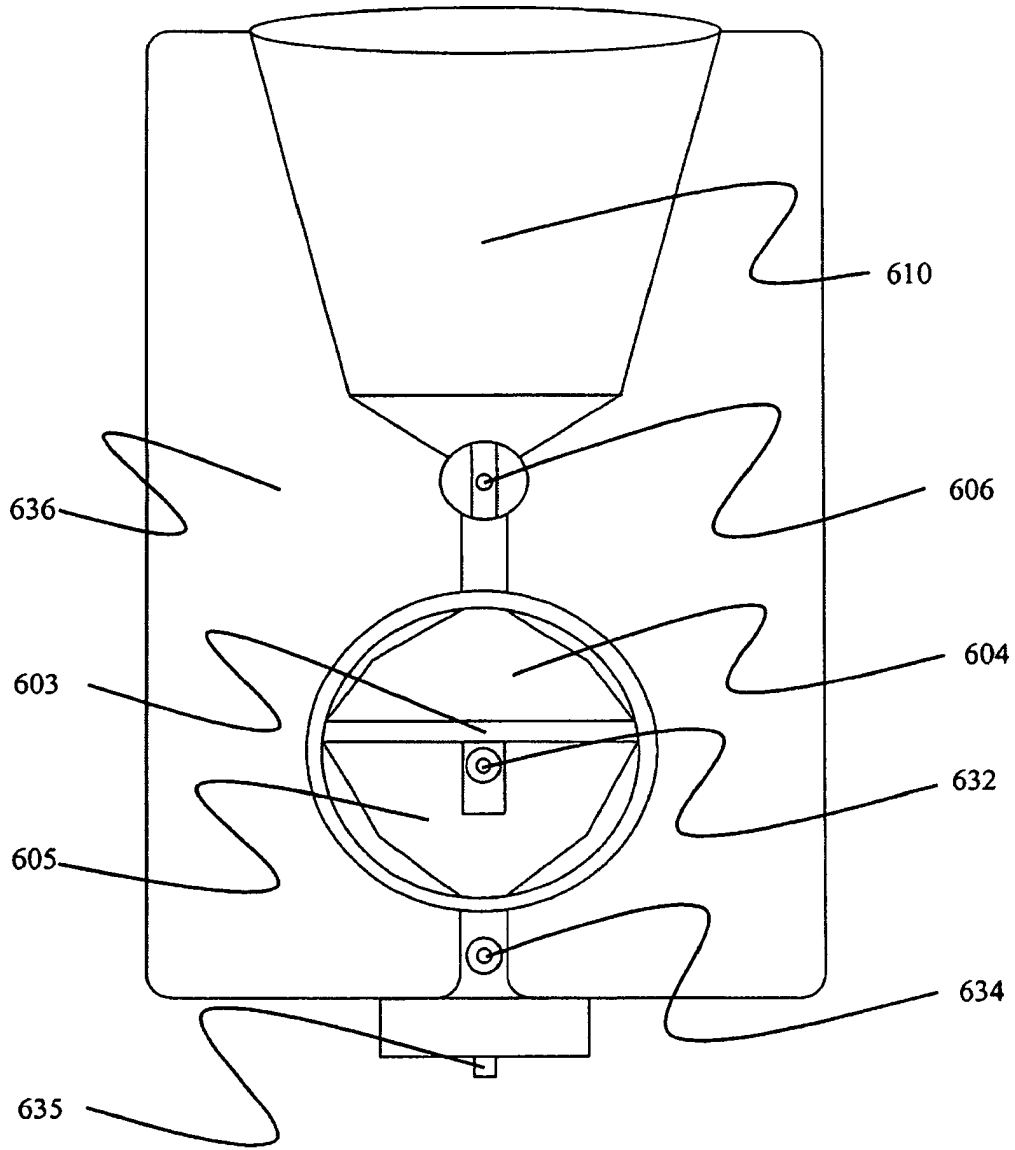


第二十一圖 B



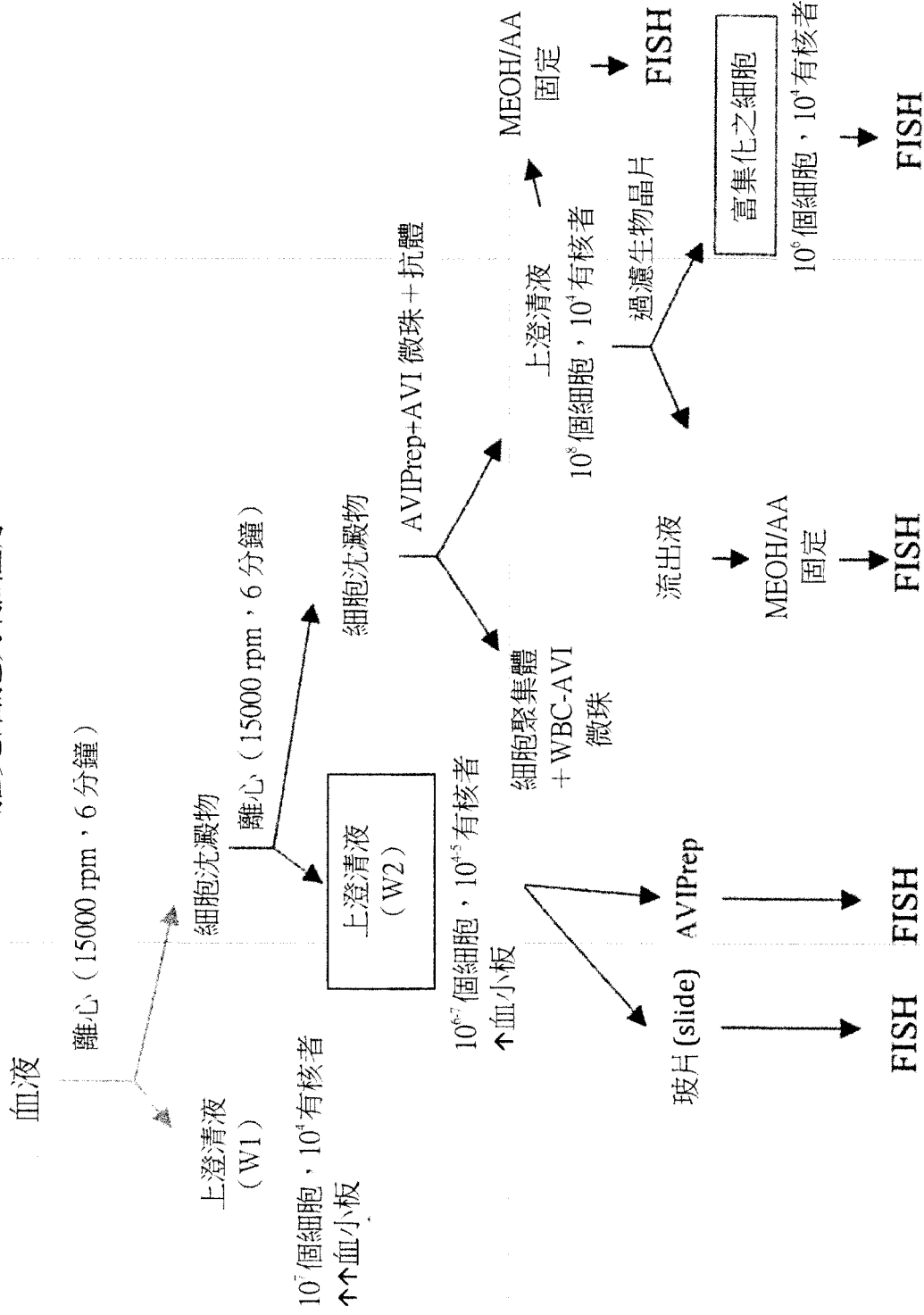


第二十二圖

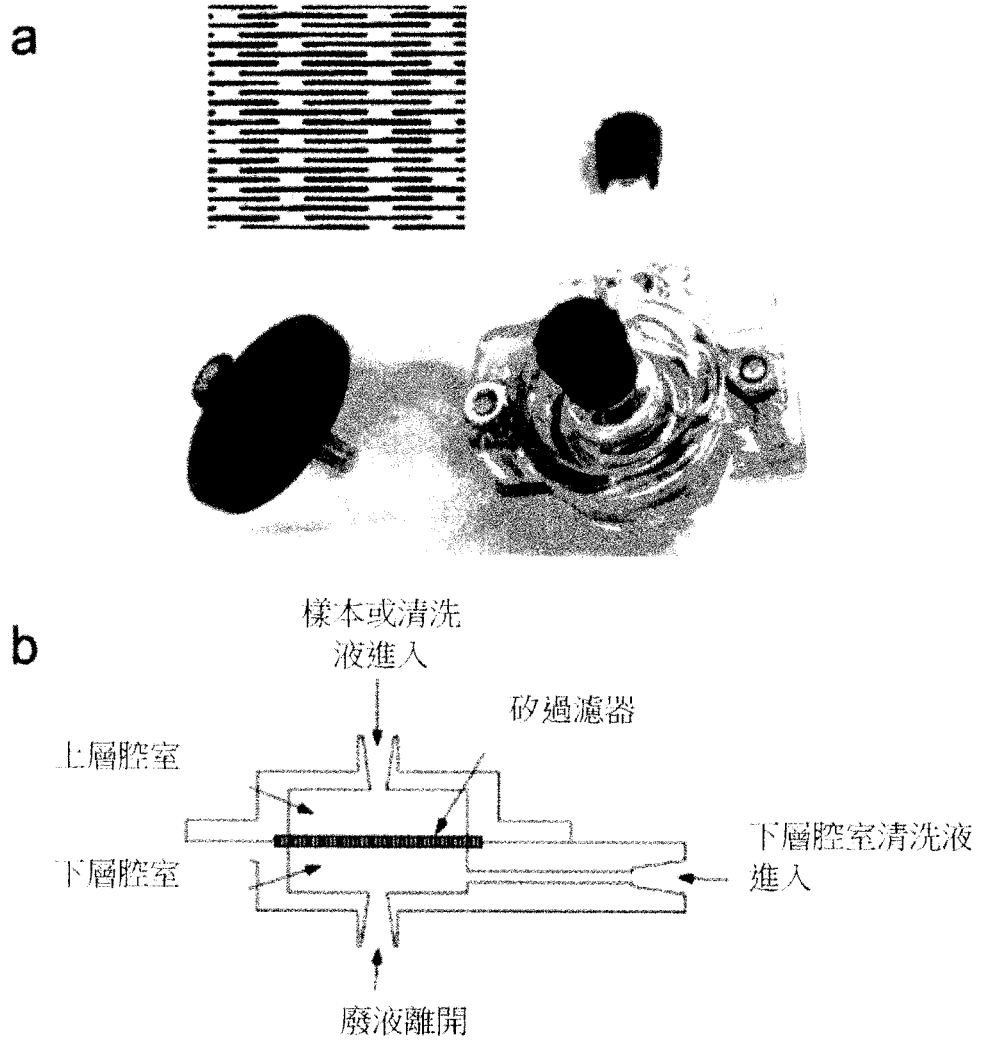


第二十三圖

胎兒細胞分離程序

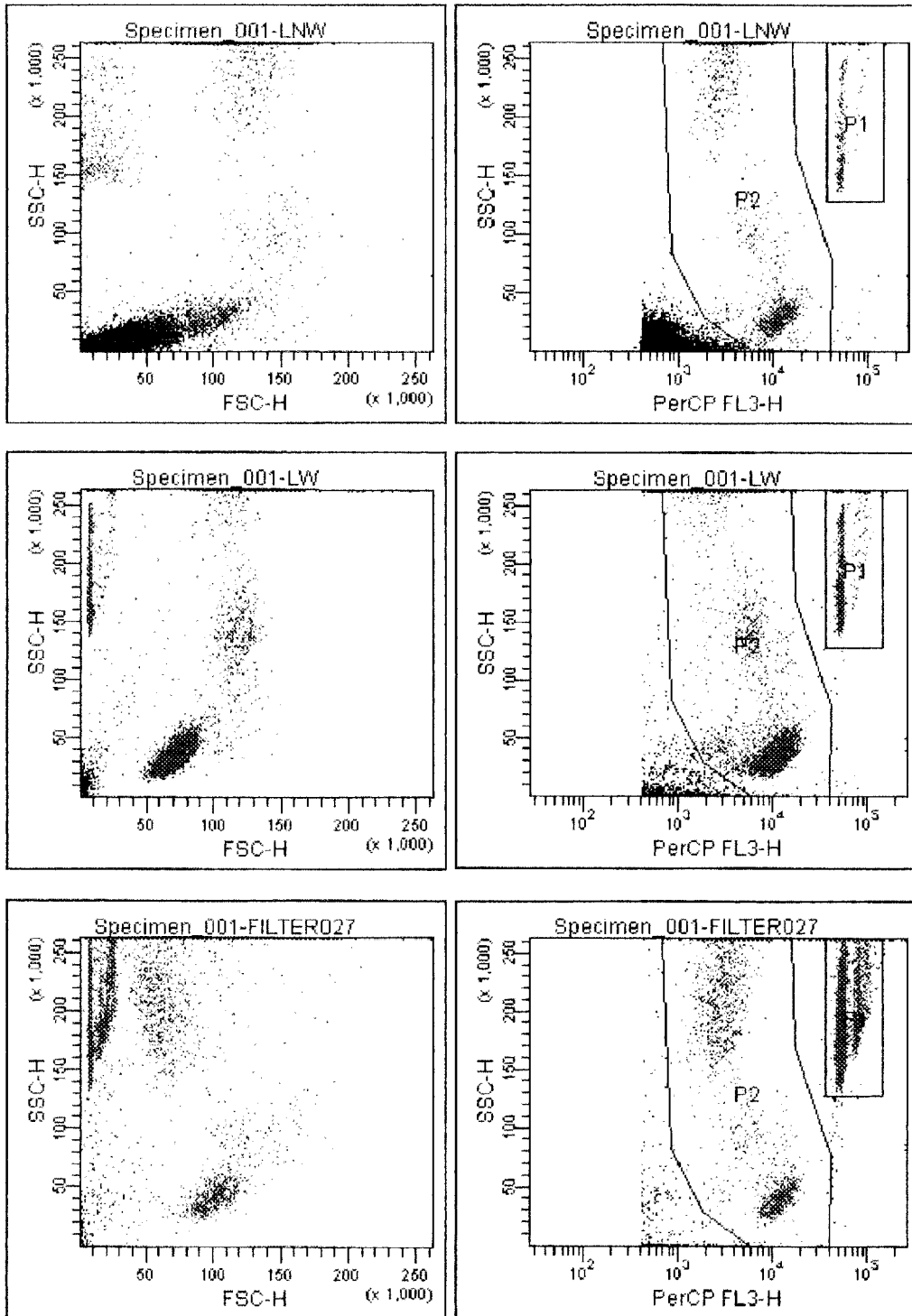


第二十四圖

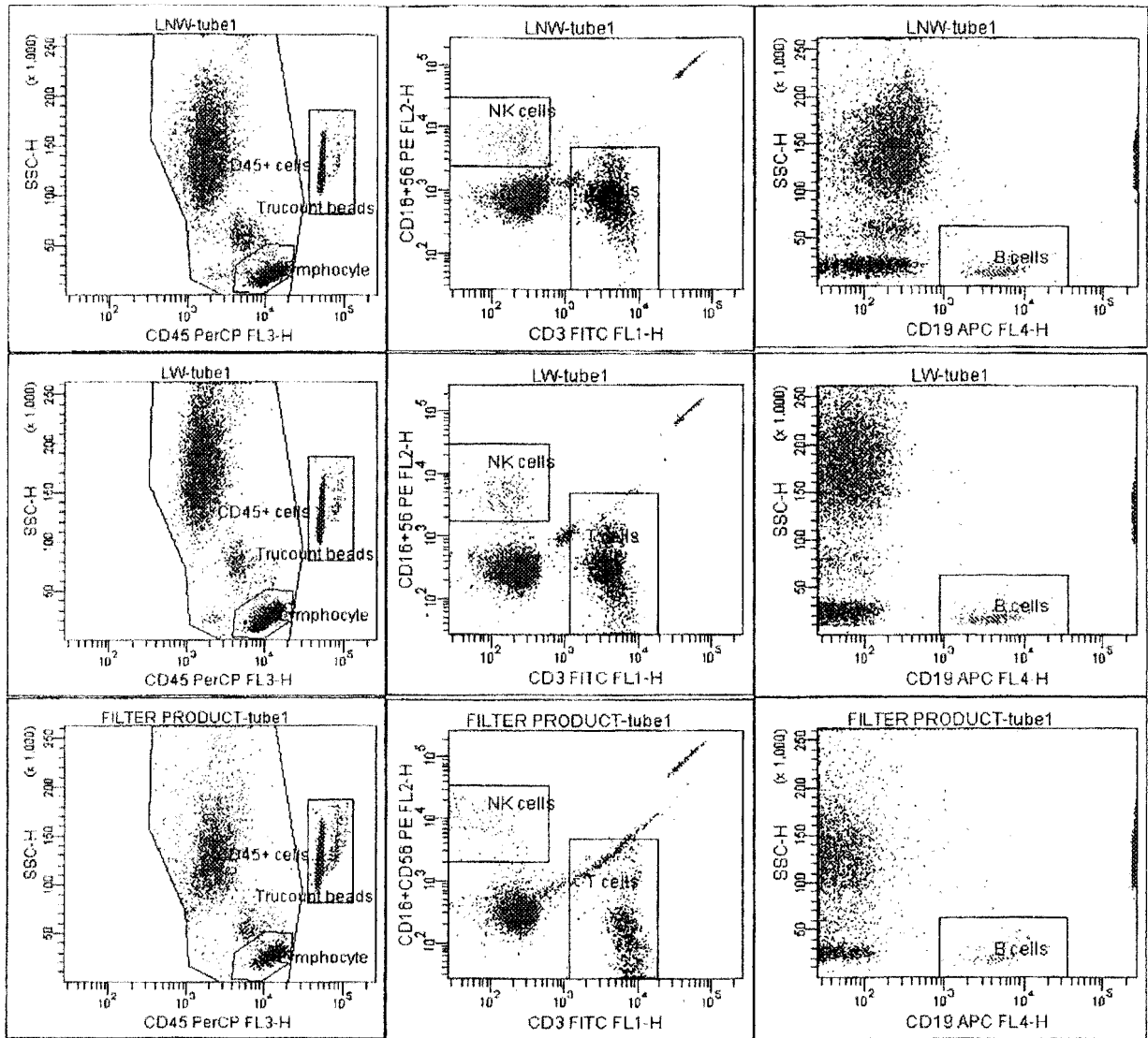


第二十五圖

5



第二十六圖



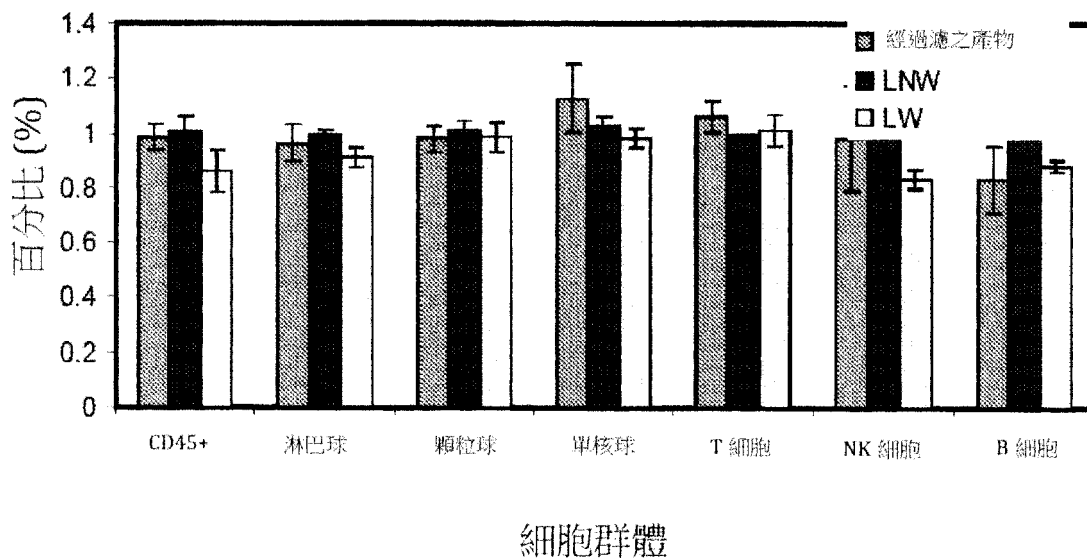
Tube: 2DOR

群	#總數	%母群樣本 (parent)	%總數
總次數 (Events)	10,000		100.0
Trucount 微珠	4,913	49.1	49.1
CD45+細胞	3,958	39.6	39.6
- 淋巴球	891	22.5	8.9
- B細胞	60	6.7	0.6
- NK細胞	77	8.6	0.8
- T細胞	727	81.6	7.3
P1	4,990	49.9	49.9
- Q1	8	0.2	0.1
- Q2	4,981	99.8	49.8
- Q3	1	0.0	0.0
- Q4	0	0.0	0.0

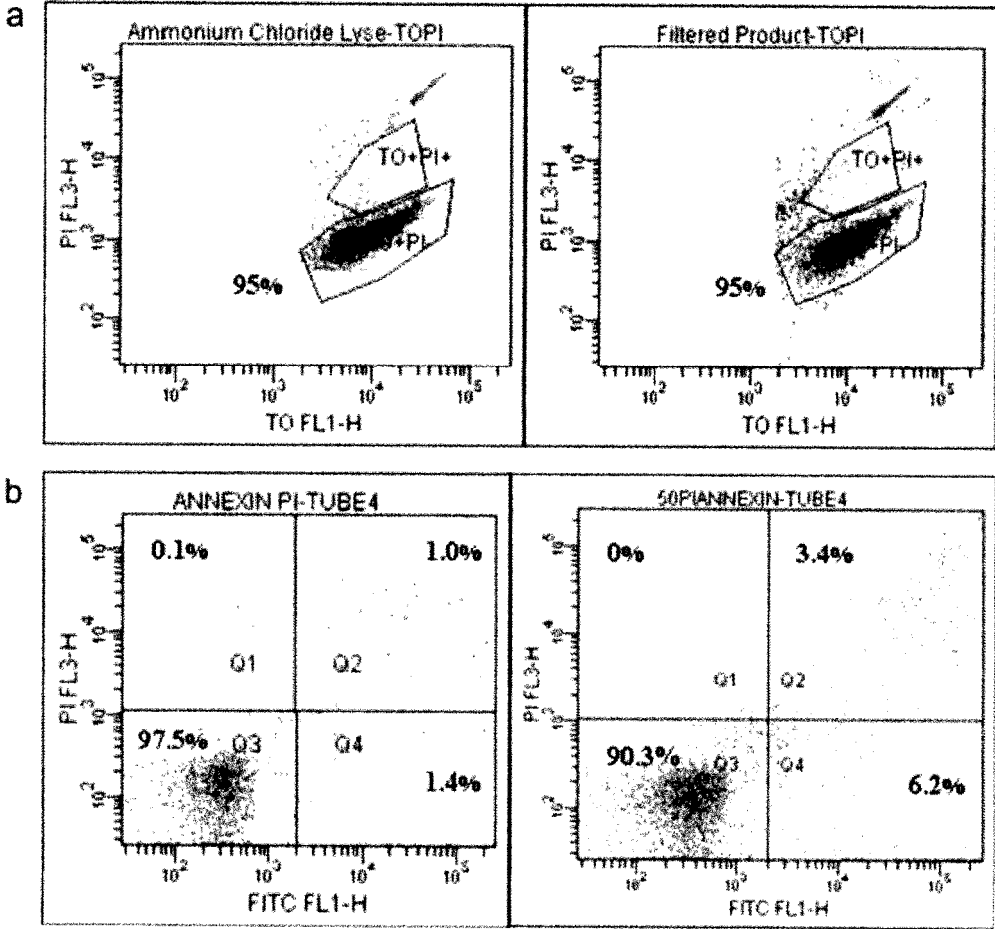
第二十七圖 a

50

使用不同分離方法所回收之白血球及次群體

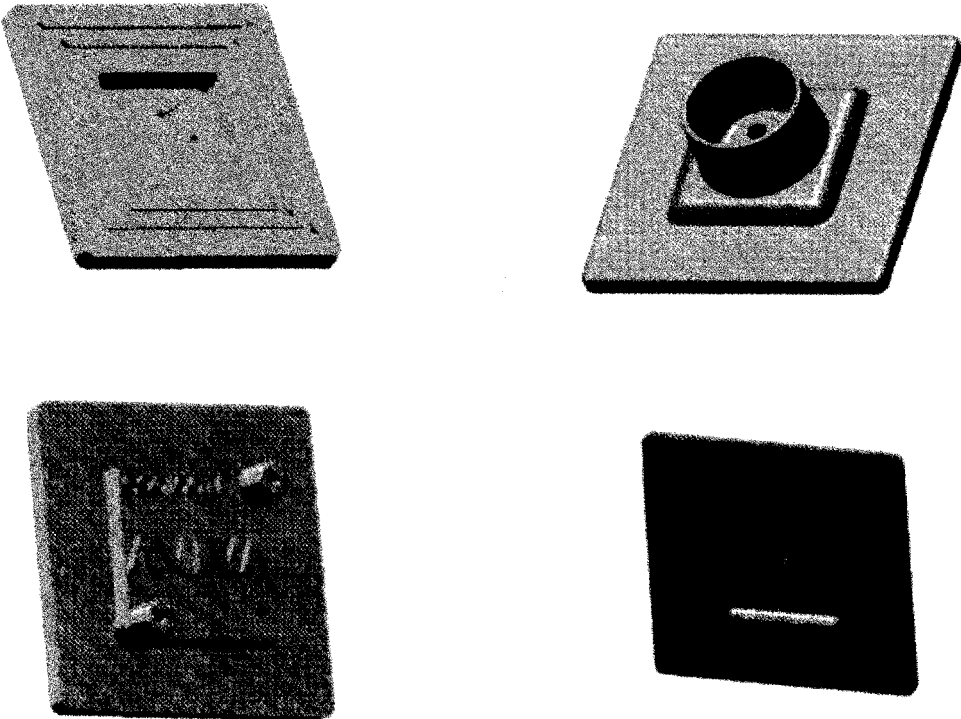


第二十七圖 b



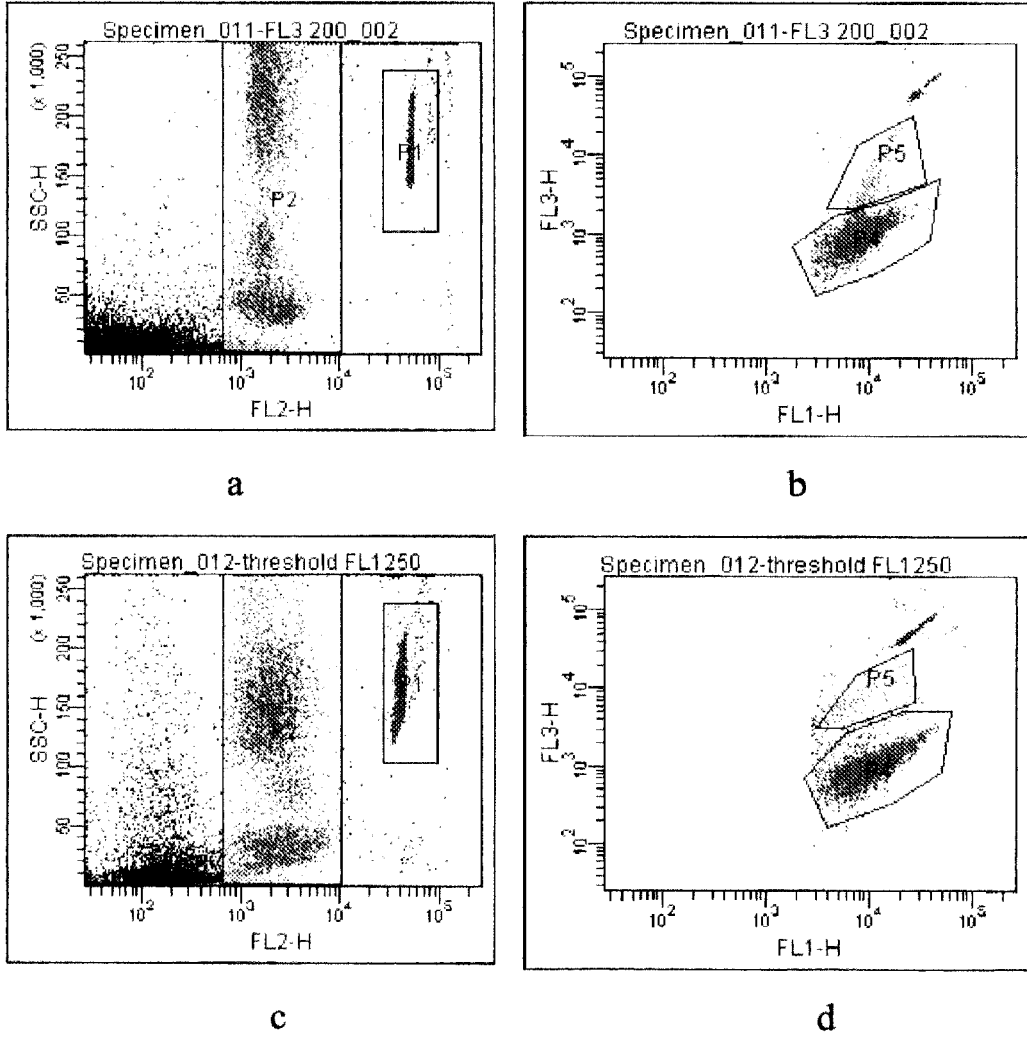
第二十八圖

(c)

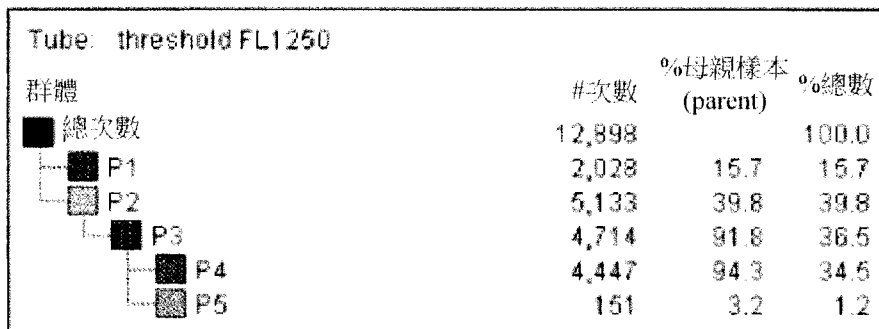
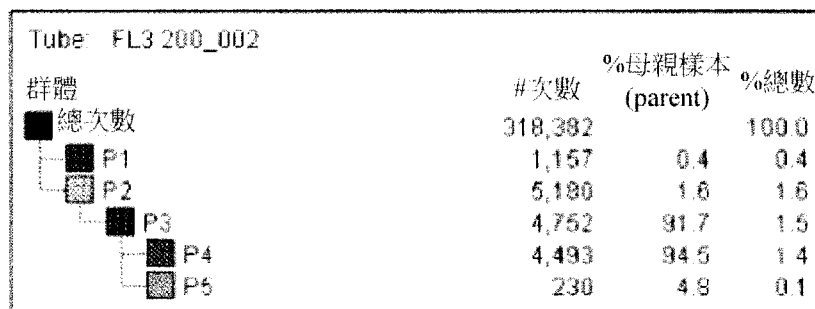


第二十九圖

經氯化鋁溶解後的細胞存活度



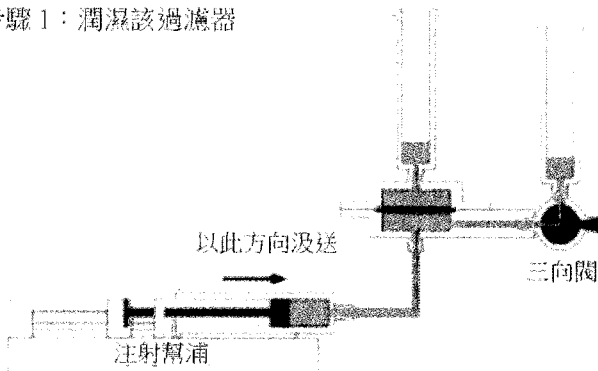
第三十圖



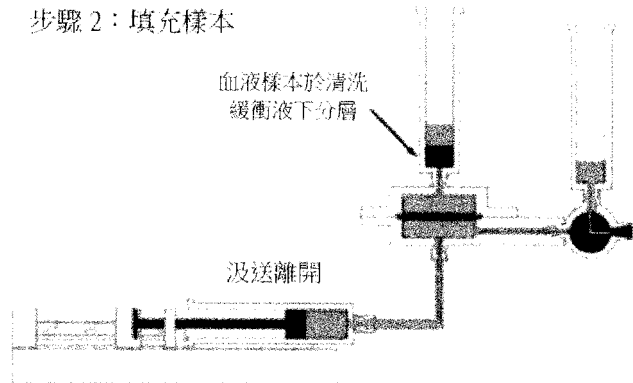
第三十一圖

AVIVA 過濾器操作程序

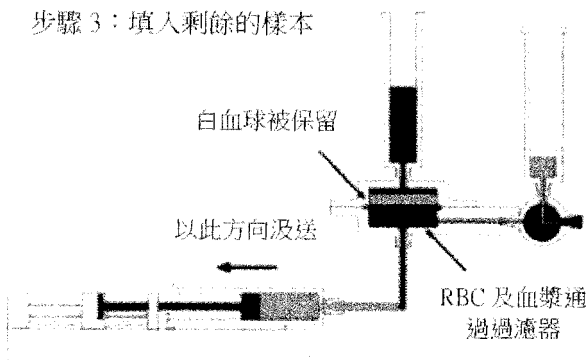
步驟 1：潤濕該過濾器



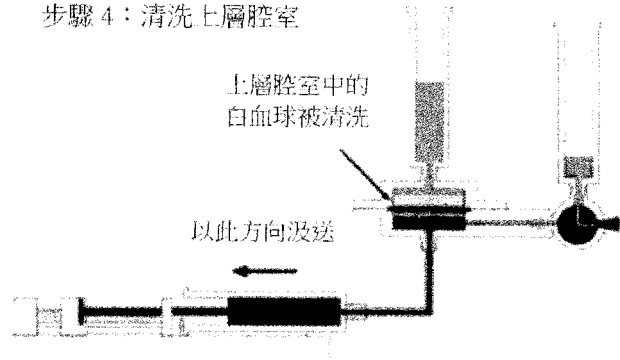
步驟 2：填充樣本



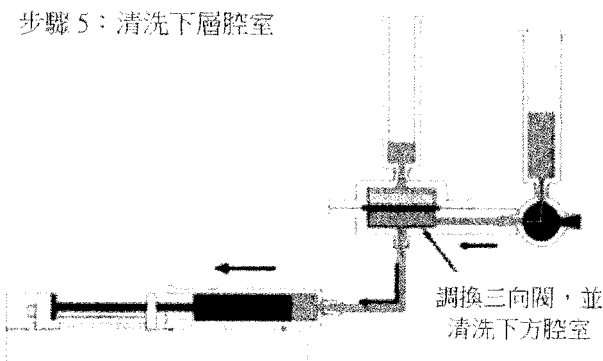
步驟 3：填入剩餘的樣本



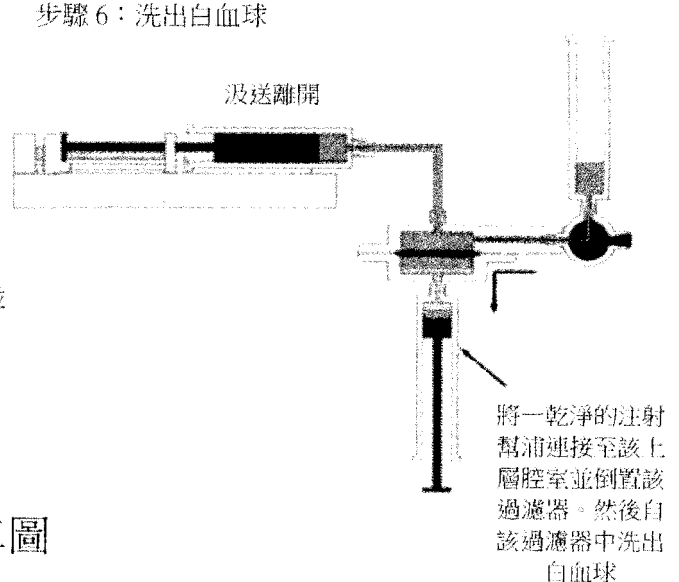
步驟 4：清洗上層腔室



步驟 5：清洗下層腔室



步驟 6：洗出白血球



第三十二圖



【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 一 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

5

無

10

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

15

無

20