



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103823072 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201410050570. 1

(22) 申请日 2009. 07. 23

(30) 优先权数据

08013447. 1 2008. 07. 25 EP

61/083, 639 2008. 07. 25 US

(62) 分案原申请数据

200980129078. 0 2009. 07. 23

(73) 专利权人 萨莫芬尼根有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 D·塞德尔

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51) Int. Cl.

G01N 33/80(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101105457 A, 2008. 01. 16,

WO 2006081185 A1, 2006. 08. 03,

I. P. Lipscomb et al. The sensitivity
of approved Ninhydrin and Biuret tests in

the assessment of protein contamination
on surgical steel as an aid to prevent
iatrogenic prion transmission. 《Journal of
Hospital Infection》. 2006, 第 64 卷 (第 3 期),

审查员 李倩

权利要求书1页 说明书10页

(54) 发明名称

体液中细胞成分的解离

(57) 摘要

本发明指通过冷冻 / 解冻处理处理包括细胞
成分的物流体的方法。该方法对于制备用于分
析物检测的生物样品特别有用。

1. 双金鸡宁酸(BCA)用于清洁与生物样品接触的装置的用途。
2. 权利要求1的用途,其中所述BCA包含在进一步含有下述的清洁试剂中:
 - (i)金属离子,和
 - (ii)具有碱性pH的含水缓冲溶液。
3. 权利要求2的用途,其中所述金属离子是铜离子。
4. 权利要求2的用途,其中所述pH在10—12之间。
5. 权利要求4的用途,其中所述pH是11。
6. 权利要求2的用途,其中所述含水缓冲溶液包含酒石酸盐、碳酸氢盐或碳酸盐缓冲液,或者其组合。
7. 权利要求6的用途,其中所述清洁试剂是包含双金鸡宁酸(BCA)、酒石酸盐和铜的碱性试剂。
8. 权利要求1的用途,其中所述BCA在最高达60°C的温度下使用。
9. 权利要求8的用途,其中在562nm下监控清洁。
10. 一种清洁与生物样品接触的装置的方法,包括将与生物样品接触的所述装置的部分与包含双金鸡宁酸(BCA)的清洁试剂进行接触。
11. 权利要求10的方法,其中清洁在单个处理步骤中进行。
12. 权利要求11的方法,其中包括将待清洁的所述装置的部分与所述试剂在最高达60°C的温度下接触。
13. 权利要求12的方法,其中在562nm下监控清洁。

体液中细胞成分的解离

[0001] 本申请是申请号为200980129078.0、申请日为2009年7月23日、发明名称为“体液中细胞成分的解离”的中国发明专利申请的分案申请。

【技术领域】

[0002] 本发明指通过在提供细胞成分的基本上定量解离而基本上无流体成分的沉积,沉淀,变性,凝集及胶凝发生的条件下快速冷冻/解冻处理来处理包括细胞成分的生物流体的方法及装置。方法对于制备用于分析物检测的生物样品特别有用。

【背景技术】

[0003] 已在各种研究中研究血细胞的冷冻及溶血效应。Scheiwe等人(Cryobiology19, 1982,p.461-477)研究了以不同线性冷却速度用或不用冷冻保护剂羟乙基淀粉(HES)降至-196℃的小的玻璃毛细管中分离的及浓缩的红细胞的悬浮液的冷冻。从作为冷却速度的函数的溶血的U-形曲线得出,对于例如0.6的血细胞比容(Hct),及在缺乏HES的情况下,必需用大致100℃/分钟的冷却速度处理细胞悬浮液,以便实现100%溶血。具有更低的分别0.4和0.2的Hct的红细胞悬浮液,在这些条件下产生80~90%溶血。在HES的存在下可实现50~60%的溶血率。大致5000℃/分钟的冷却速度显示大致40%溶血。

[0004] Rapatz及Luyet以保存人红细胞的方式研究了冷冻温度,冷冻速度或保护试剂(例如冷冻保护剂)对全血样品的效应(Cryobiology4,1968,pp.215-222)。相应实验已在具有1.5+/-0.5mm外径及0.3+/-0.5mm的壁厚度的玻璃毛细管中进行。在另一出版物中,作者研究了血的快速冷冻后几种动物物种中的溶血(J.Cell.Physiol.77,1970,pp.373-376)。对红细胞溶血的新近结果也在综述“A review on basic researches on the cryopreservation of red blood cells”中总结(Luyet and Rapatz,Cryobiology6, 1970,pp.425-482)。

[0005] 但是,无出版物应对全血样品的冷冻给出线索,有关如何获得来自包括细胞成分的生物样品的经处理的流体,从而将含于生物样品的基本上全部细胞成分定量解离,然而基本上无流体成分的沉积,沉淀,变性,凝集及胶凝发生。也无在分析中使用经处理的全血的导向。

[0006] 在来自生物流体的样品中的分析物的测定常要求复杂的及繁琐的预处理过程,以便去除来自流体样品的细胞成分。别的细胞成分或沉积物将阻塞样品注射装置,毛细管,分离柱等。例如,全血含成分,即红细胞,白细胞及血小板。为测定血样品中的分析物,这些细胞成分常必需通过预处理过程(例如离心,过滤或沉积)除去。

[0007] 关于代表主要血级分的红细胞,样品预处理涉及使用(生物)化学试剂,渗透压休克(即通过低-或高渗溶液)和/或机械处理溶血。但是,溶血产生由血浆及所谓的源于红细胞的血影组成的裂解产物。这些血影耗尽了血红蛋白及仍具有天然的红细胞的尺寸。这意味着,也必需在分析之前通过离心,过滤或沉积除去血影。

[0008] 但是,这些过程常难以整合进自动化的测试形式。尤其是在靶分析物存在于细胞

成分的胞质溶胶或膜的情况中,例如红细胞中的免疫-抑制药物。此情况中,将细胞成分在添加裂解试剂之前通过离心和/或过滤分离富含,或通过将变性剂(例如 ZnSO_4 及乙腈的混合物)添加到原样品来将它们变性,然后离心。

[0009] 刚刚提议用于处理用于分析物测定的生物流体的新方法。此方法基于热处理,及适宜于自动化的过程(WO2008/003451)。但是,此方法强烈依赖于小的温度范围的温度,从而需要复杂的温度控制。处理也被 $t_{\max}$,发生凝固的温度限制。此外,添加有机修饰物(例如甲醇)影响加热处理从而处理参数。而且,非每含于生物流体的分析物在推荐的热处理期间稳定。因此,如果要测定热不稳定的分析物,此方法不太优选。

[0010] 【发明概述】

[0011] 由此,本发明的课题是提供在以下条件下包括细胞成分的生物流体的新处理方法:

[0012] (i)提供所述细胞成分的基本上定量解离,

[0013] (ii)不导致流体成分的实质性沉积,沉淀,变性,凝集及胶凝,

[0014] (iii)不局限于小的温度范围,及

[0015] (iv)允许添加其他不影响处理的流体,例如甲醇等。

[0016] 以上问题的解决通过提供权利要求中表征的实施方式来实现。

[0017] 根据本发明的第一方面,提供在以下条件下产生经处理的生物流体的方法:

[0018] (i)提供所述细胞成分的基本上定量解离,及

[0019] (ii)不导致流体成分的实质性沉积,沉淀,变性,凝集及胶凝,

[0020] 包括下列步骤:

[0021] (a)提供包括细胞成分的生物流体,

[0022] (b)冷冻所述生物流体,及

[0023] (c)解冻步骤(b)的冷冻的流体。

[0024] 本发明的再一方面是经处理的生物流体,包括基本上定量解离的细胞成分,其基本上无沉积,沉淀,变性,凝集及胶凝产物。优选地,生物流体不稀释,即处理期间或之前无其他流体加入。

[0025] 本发明又一方面是在生物流体样品测定分析物的方法,其中所述生物流体如上所述处理,及在经处理的生物流体中测定分析物。

[0026] 本发明又一方面是处理包括细胞成分的生物流体的装置,其中所述装置包括:

[0027] (a)流体处理单元,其至少部分可冷冻/可加热,

[0028] (b)冷却元件,其用于冷冻预定部分的流体处理单元,

[0029] (c)加热元件,其用于加热预定部分的流体处理单元,

[0030] (d)任选流体运输元件,例如抽泵元件,

[0031] (e)控制元件,其用于在以下条件下控制流体的冷冻/加热

[0032] (i)提供所述细胞成分的基本上定量解离,及

[0033] (ii)不导致流体成分的实质性沉积,沉淀,变性,凝集及胶凝,

[0034] (f)任选清洁元件,及

[0035] (g)任选样品分析元件。

[0036] 【发明详述】

[0037] 意外地,本发明人发现,可通过在预定时间及温度条件下冷冻/解冻处理来实现生物样品中细胞成分,优选来自高等生物的细胞或细胞群集,更优选动物细胞(例如哺乳动物细胞(包括人细胞)),及最优选血细胞(例如红细胞,白细胞和/或血小板)的完全解离。根据本发明的方法的步骤(b)及(c)的冷冻/解冻处理可进行至少一次,优选两次或最优选3次或甚至更多次。

[0038] 利用根据本发明的处理,将含于生物流体的细胞成分基本上定量解离,以产生无流体成分的实质性沉积,沉淀,变性,凝集和/或胶凝的亚细胞粒子。由此,本发明的经处理的生物流体包括亚细胞粒子,以及包括离子,气体,低分子物质(如糖,及蛋白)的液体成分。

[0039] 本发明利用的“生物流体”涉及包括细胞成分及液体成分的生物悬浮液,及其选自体液或细胞培养液。细胞成分是细胞,细胞群集或细胞影,液体成分是血浆,尿,唾液等或细胞培养基。体液的特定实施例是全血,尿,脑脊液,唾液,淋巴液,及细胞培养液的特定实施例是哺乳动物细胞培养液。

[0040] 本发明中使用的“细胞成分”涉及细胞,细胞群集或细胞影,特别是红细胞影。

[0041] 在本发明中,含于经处理的生物流体的“亚细胞粒子”涉及细胞碎片(例如通过本发明的方法产生及由重封的膜的非常小的球和/或非常小的粒子构成的膜囊泡),其特征在于,它们

[0042] (a)静置状态下,在至少约24小时的时间内不沉淀,及

[0043] (b)不像红细胞影(约5~8 μ m尺寸)或完整的细胞,在以约3000g重力离心至少10分钟的时间后不沉淀,及

[0044] (c)在以高于约11000g重力离心至少20分钟的时间后沉淀。

[0045] 含于生物样品流体的“细胞成分的基本上定量解离”在本发明中指约70%,优选约80%,更优选约90%及甚至最优选约100%的细胞成分解离为亚细胞粒子。

[0046] 在这里,发明人发现,期望的约100%的解离可例如通过根据本发明的处理用天然的抗-凝固的全血实现,其中此解离速度独立于可变化于0.1~0.6的血细胞比容。

[0047] 本发明的经处理的全血或经处理的溶血包括血浆及解离的血细胞,即解离的红细胞,白细胞及血小板。经处理的(即细胞解离的)血浆,全血包括:离子(例如钠离子,氯离子,钾离子,镁离子,磷酸根离子及钙离子),低分子物质(如单糖,激素,气体),营养物质(如脂质或维生素),代谢物质(例如脲或尿酸),以及血浆蛋白(例如白蛋白及珠蛋白)。本发明的“全血”涉及血细胞基本上完整的血,“溶血”涉及已发生溶血的全血。

[0048] 也发现可将溶血样品(即红细胞影)如上所述基本上解离。其进一步发现,存在于全血的白细胞和/或血小板也可如上所述基本上定量解离。

[0049] 因此,这些经处理的生物流体包括允许通过流体分离系统进一步处理及不阻塞这些系统的亚细胞粒子。

[0050] 得到的生物流体可无加入的试剂,从而其特征在于是未稀释的。因此,此生物流体可不额外施剂地以定量方式进一步处理。

[0051] 由此,经处理的生物流体适宜于用于原位分析技术,例如固相提取(SPE),未稀释的在线/离线SPE或要求点样,采样或分注的技术,例如在微流体装置上。

[0052] 本发明的方法中的冷冻可通过快速冷冻进行。快速冷冻可通过如下浸入含于样品装置的样品来进行:

[0053] (a)将所述样品装置浸入含于绝缘的箱的低温流体,

[0054] (b)将所述样品装置浸入低温流体的蒸汽相,或

[0055] (c)将所述样品装置插入紧密适于样品装置及被浸入低温流体或被浸入低温流体的蒸汽相的套筒。

[0056] 本发明中使用的“低温流体”涉及对于冷冻水溶液必需的温度范围(优选-90℃以下的温度)内是液体的物质。低温流体可为冷气体或低温液体。低温液体是冷冻的液体,如氩,氦,氢,氮,氧,甲烷,二氧化碳,一氧化二氮,异戊烷,己烷,或乙醇,及其他流体,如烃流体或它们的混合物。在优选实施方式中使用液氮。

[0057] 冷冻期间,本发明的方法的生物流体被冷冻至-20℃~-196℃,优选-120℃~-190℃的温度。相应冷却速度变动于约1260℃/分钟~约12600℃/分钟,优选约2000℃/分钟~约5000℃/分钟,及最优选约2500~3500℃/分钟,例如约3150℃/分钟。

[0058] 优选地,使冷冻的流体随后经历解冻处理至至少室温,优选至少40℃,最优选至少50℃及达60℃或甚至达75℃的温度。

[0059] 对于解冻而言,可进行热处理,而将含冷冻的样品的样品装置插入紧密适于样品装置及可被加热的套筒。加热可通过任何适宜手段进行及可包括例如传导加热,感应加热(例如微波处理,例如如US6,605,454中所述),对流加热,电阻性加热和/或通过激光激发加热。

[0060] 相应解冻速度变动于约500℃/分钟~约11400℃/分钟,优选约1000℃/分钟~约4000℃/分钟,及最优选约1500~2500℃/分钟。

[0061] 冷冻和解冻之间的时间可保持到最小,优选在1和5秒钟之间。但是,更长时期也可接受。

[0062] 本发明的适宜样品装置可为施剂单元的容量装置及由耐受达-200℃的温度的热传导或感应材料制成。优选的材料是不锈钢,玻璃或塑料。最优选为不锈钢。

[0063] 本发明的装置包括流体处理单元,其至少部分可冷冻/可加热。此处理单元可优选包括针,例如注射针,移液器管端,毛细管(例如玻璃毛细管),注射器或导管。最优选的是液体操作系统(例如用于HPLC的自动采样器(例如PAL-自动采样器(LEAP-Technologies)))或移液机器人(例如Evoclean(Tecan))的注射针或移液器管端。

[0064] 流体处理单元也可包括用于原位分析的物质,例如用于固相提取(SPE)的层析吸附剂,例如本领域中熟知的C-18修饰的硅石, Oasis HLB等。

[0065] 流体处理单元,特别是针,玻璃-毛细管或移液器管端的腔/内径可变化于0.01~5mm,优选0.1~2mm,甚至更优选0.5~1mm。移液器管端,玻璃-毛细管或针的最优选腔/内径为约0.3~约0.5mm。针的最优选腔/内径约为0.3mm。

[0066] 流体处理单元,特别是由塑料或金属制成的装置的壁厚度,优选在约0.05~0.5mm范围内。

[0067] 解离的完全性可通过细胞计数,例如在Neubauer计数室中,通过显微镜观察特定成分和/或通过离心后缺失沉淀形成来测定。在这里,需知,约95%的细胞血成分呈现为红细胞。由此,血样品中的细胞计数优选通过计数红细胞来测定。

[0068] 利用本发明,样品中的细胞计数优选降至原值的0.1%或以下,及更优选至0.01%或以下。例如,当使有 5×10^6 红细胞/ μl 的样品经历根据本发明的处理,细胞计数优选降至 $5 \times$

10³细胞或以下/ μ l,更优选至500细胞或以下/ μ l。最优选,样品无可检测的细胞。也可通过光学显微镜观察(例如达100 $\times$ 放大倍率)和/或通过以达3000g(优选以达7400g)离心10分钟来测定到特定成分(例如红细胞影)的缺乏。

[0069] 有关快速冷冻,首先向毛细导管(或任何如上所述的其他流体处理单元)装载样品。此优选通过将样品分段为指定的体积的气体,例如空气来实现。例如,可将第一体积的气体吸入流体处理单元,然后是样品及然后是第二体积的气体。随后,含样品的流体处理单元可:

[0070] (a)浸入低温流体或浸入低温流体的蒸汽相,

[0071] (b)与通过低温流体或其蒸汽相冷却的表面接触,或

[0072] (c)插入紧密适于样品装置及被浸入低温流体或被浸入低温流体的蒸汽相的套筒。

[0073] 有关本方法的解冻处理,将含冷冻的样品的流体处理单元通过任何适宜手段加热,所述手段可包括:例如感应加热(例如微波处理,例如如US6,605,454中所述),对流加热,电阻性加热和/或通过激光激发加热。

[0074] 有关从流体处理单元洗脱,可将经处理的流体由空气和/或其他流体取代。如果仅使用空气,无经处理的流体的稀释发生。

[0075] 生物流体可为体液,例如全血,尿,脑脊液,唾液,淋巴液等;或来自细胞培养(特别是哺乳动物细胞培养)的流体或任何其他包括细胞成分的生物流体,特别是包括血细胞的流体。更优选地,生物流体是全血,例如静脉,动脉或毛细管血的全血,特别抗凝剂-处理的全血,例如EDTA-,柠檬酸盐-,或肝素-处理的全血。例如,样品可用含抗凝剂的采血装置采取,及直接经历如下述的进一步处理。

[0076] 样品体积可广泛地,例如在1n1或更多,优选10n1或更多及达1ml的范围内变化。由此,方法优选适宜于微型化应用,例如芯片形式的微流体装置,纳米级LC-MS,MALDI-MS分析等。

[0077] 本发明的方法不要求任何沉积和/或沉淀和/或离心步骤和/或添加化学/生物化学试剂。由此,治疗优选无之前的细胞成分的除去和/或裂解地进行。方法可在任何适宜装置(例如一次性装置或可重复使用的装置)中进行。优选地,方法是自动化的过程,其可在集成的装置中进行,即任选例如无预处理地,特别无细胞成分的除去和/或裂解地与其他流体混合后,转移流体样品的装置。在装置内,优选不通过现有的细胞成分除去和/或裂解地直接使样品经历处理。处理后,可进行随后步骤,例如分析物测定。最优选,处理用基本上天然的样品,例如包括基本上完整的细胞成分的样品(例如全血)进行。

[0078] 本发明的方法可包括在处理之前和/或后将其他流体添加到生物流体。其他流体可为与生物流体相容,从而不导致沉淀,凝集或聚集的任何流体。其他流体可为有机溶剂,优选以基于生物流体的体积达20%(vol/vol)的量,更优选以达10%(vol/vol)的量。有机溶剂优选选自水-混溶性溶剂,例如甲醇,乙醇,乙腈,二甲亚砜(DMSO),二甲基甲酰胺(DMF)及其组合。

[0079] 优选地,其他流体基本上不影响细胞成分的解离。更优选地,其他流体是含水流体,例如缓冲水溶液或其他生物流体,优选具有对应于0.5~1.4%NaCl,更优选0.7~1.2%NaCl及最优选约0.9%NaCl的离子强度。

[0080] 其他流体可为包括预定量的至少一种标准化及/校准化合物的标准化和/或校准液。如果处理的生物流体利用层析,光谱和/或光谱方法进一步分析,添加标准化和/或校准化合物特别适宜。标准化和/或校准化合物可为含稳定的同位素(例如 ^2H 和/或 ^{13}C)的分析物类似物,从而可通过质量光谱法检测。适宜的校准物也可选自例如 **ClinCal® Matrix** 校准物。

[0081] 方法也可包括在处理之前和/或后将对于脂质,蛋白,肽,核酸及碳水化合物的标记物/染色化合物添加到生物流体。

[0082] 经处理的流体优选具有对应于0.5~1.4%NaCl,更优选0.7~1.2%NaCl及最优选基本上生理盐浓度的离子强度。经处理的流体可无加入的试剂,例如解离剂和/或去污剂。另一方面,经处理的流体也可包括有机溶剂和/或如上所述加入的含水流体。最优选,经处理的流体是解离的全血。

[0083] 本发明也指在已使经历如上所述的处理的生物流体样品中测定分析物的方法。分析物可为在生物流体中可检测的任何分析物,例如生物化合物,例如核酸,多肽,肽,脂质,糖,激素,代谢物,等。另一方面,分析物可为非-生物化合物,例如药理学化合物。在优选实施方式中,分析物是免疫抑制药物,例如环孢菌素,雷帕霉素或他克莫司或相关的化合物。

[0084] 在经处理的流体中的分析物测定可根据任何已知的方法进行。例如,分析物测定可根据化学,生物化学和/或物理化学方法进行,及可包括杂交反应,免疫学反应,酶促反应,例如核酸扩增,层析分析,光谱分析,例如质量-光谱或NMR分析和/或光谱分析。在特别优选的实施方式中,本发明指在全血样品中测定免疫抑制药物的方法,其中所述全血通过如上所述的处理来处理,及在经处理的全血中根据标准方法,例如通过质量-光谱(MS)方法测定免疫抑制药物。

[0085] 本发明的方法特别适宜于生物分析及临床-化学分析过程,例如固相提取(SPE),液体-液体提取(LLE)等。因此,根据本方法的优选的分析方法是SPE,特别是来自全血的靶分析物的原位SPE,使用未稀释的细胞解离的血的靶分析物的在线/离线/线内提取方法,例如有或未偶联于HPLC或MS的SPE,细胞解离的血点样到板,例如MALDI-板,阵列,微芯片等,未稀释的解离的血采样进适当的容器,例如96孔平板,Eppendorf瓶等,未稀释的细胞解离的血的衍生化及处理,例如MALDI-MS,及未稀释的细胞解离的血采样进微流体装置,例如到芯片实验室或床旁诊断测试(POCT)。

[0086] 再优选的实施方式中,分析物是临床-化学参数,例如与先天性代谢病症,例如苯丙酮尿症相关的临床-化学参数。在此实施方式中,样品优选是可从新生儿得到的毛细血管血样品。

[0087] 再更优选的实施方式中,方法适宜于处理来自非-人动物,优选小鼠,豚鼠及大鼠的血样品。例如,样品可通过自动化的系统采取,及直接经如上所述的处理。优选的自动化的系统是来自 **DiLab®** 的 **AccuSampler®**。

[0088] 本发明的装置也可包括流体导入口,其中可将生物流体样品注入流体处理单元。流体可在装置内通过运输元件(例如抽泵元件)运输。流体处理单元至少部分可冷冻/可加热。可冷冻的和/或可加热的部分流体处理单元可为装置的整体部分或可移动地附接到装置。流体处理单元具有优选约0.1~0.8mm的内径。

[0089] 由此,生物流体可根据本发明直接在可移动的单元中,例如在不锈钢针中处理,或

在毛细导管的集成单元中,例如在不锈钢毛细管中处理。

[0090] 冷却元件可为紧密适于流体处理单元及被浸入低温流体或低温流体的蒸汽相的套筒。加热元件可为任何适宜加热元件,例如用于感应加热的元件,用于对流加热的元件,用于电阻性加热的元件和/或用于通过激光激发加热的元件。例如,加热元件可为环绕预定部分的流体处理单元或微波发射体的加热线圈。控制元件提供样品处理的控制,即流体的冷却及加热,例如通过控制冷却/加热强度和/或在可冷冻的/可加热的部分流体处理单元中的时间。

[0091] 装置可任选包括清洁元件,其适宜于清洁和/或监控相应流体处理单元或其至少部分的清洁效率。

[0092] 清洁元件适于在预定数的生物流体处理循环后进行例如流体处理单元或其一部分的清洁。优选地,清洁包括使清洁流体通过流体处理单元或其一部分。清洁流体能去除处理单元中的生物性,例如蛋白性残留物。清洁可涉及用清洁流体吸入及分注或冲洗流体施剂单元或其一部分,其中优选将所述流体处理单元或其一部分加热。清洁功效可在清洁过程期间通过监控流体处理单元或其一部分中有生物材料来控制。

[0093] 在W02008/003451中描述了流体处理单元的适宜清洁过程,其至少涉及2个步骤。首先,流体处理单元必需用碱性NaOCl溶液,优选在60°C或以上温度冲洗。在这些条件下,将残留的生物材料氧化。在第二步骤,通过使用适宜试剂(例如OPA-试剂)监控此处理的效率,以便产生以340nm处的光度可检测的反应产物。

[0094] 在优选实施方式中,本发明提供替代性清洁过程,其

[0095] (a)涉及仅单个处理步骤,

[0096] (b)使同时进行及监控清洁处理,

[0097] (c)不导致由金属制成的材料的腐蚀,及

[0098] (d)在60°C以下温度有效。

[0099] 此清洁过程可用于本发明的方法及装置。但是,其也可在涉及使生物样品转运通过金属和/或塑料导管,特别是通过导管的不同方法及装置中应用。

[0100] 由此,本发明的其他主题是双金鸡宁酸(BCA)试剂(Stoscheck, Meth. Enzymol. 182 (1990), 50-69),优选碱性双金鸡宁酸(BCA)/酒石酸/铜试剂,用于清洁与生物样品,例如全血或血浆样品接触的装置的用途。BCA试剂,例如获自Pierce Chemicals的,与Cu(I)-离子在蛋白的存在下形成紫-着色的反应产物。此反应可在562nm处连续监控。意外地,BCA试剂能去除例如附着到与生物样品接触的装置(例如样品处理装置)的内部金属和/或塑料部分的生物膜。可将BCA试剂在适宜条件下(例如在达60°C的温度)与待清洁的装置的部分接触。

[0101] 由此,本发明的另一目的是提供包括BCA的清洁试剂。本发明的清洁试剂优选包括BCA,金属离子,例如铜离子,特别是铜(I)离子,及缓冲水溶液,及具有碱性pH,例如约10~12的pH,特别约pH11。缓冲水溶液可包括适宜缓冲液,例如酒石酸盐,碳酸氢盐,或碳酸盐缓冲液,或所述缓冲液的组合。

[0102] 而且,装置任选包括样品分析元件。样品分析元件可为适宜于生物样品中的分析物检测的任何元件。优选地,样品分析元件包括层析元件,例如HPLC元件,提取元件,例如固相提取(SPE)元件,光谱元件,例如质量-光谱或NMR元件,光谱元件,酶促和/或免疫测定元件和/或杂交测定元件。

[0103] 最后,装置可包括处理器单元,其可将数据转移到远程控制单元和/或从远程控制单元接受数据。数据转移可在线发生,例如通过无线转移例如经GSM/GPRS/3G数据转移。可将远程控制单元适应于许可相应装置的流体处理,例如在已接受对进行预定数的流体处理过程的支付后(即有偿处理)。

[0104] 需知,就本发明的一或几个方面讨论的全部优选的实施方式也涉及全部其他方面。

[0105] 进一步,通过以下实施例更详细解释本发明。

[0106] **【实施例】**

[0107] **【实施例1:解离存在于人全血的细胞成分(即红细胞,白细胞及血小板)的方法】**

[0108] 第一步,将20 μ l的环境空气通过注射器/注射针(不锈钢,内径0.3mm;壁厚度0.2mm)然后是10 μ l的来自自愿者的抗凝的全血样品(血细胞比容0.42)吸入。最后,再次将20 μ l的空气吸入。然后将注射器/注射针浸入填充有液氮的绝缘的容器中,及以全血样品位于液氮表面以下的方式定位。快速冷冻处理在所述条件下耗时5秒钟,其对应于约2700 $^{\circ}$ C/分钟的冷却速度。然后,将含冷冻的样品的注射器/注射针在2秒钟内浸入调至50 $^{\circ}$ C的水浴中,及以冷冻的样品位于水表面以下的方式定位。解冻时间为8秒钟,其对应于约1900 $^{\circ}$ C/分钟的加热速度。

[0109] 快速冷冻/解冻处理之前及后使用Neubauer计数室显微镜观察及细胞计数显示,存在于处理的血样品的细胞血成分(红细胞 $5.2 \times 10^6/\mu$ l;白细胞 $6.5 \times 10^3/\mu$ l;血小板 $2.2 \times 10^5/\mu$ l)被定量解离。

[0110] **【实施例2:清洁流体处理单元及同时监控清洁效率】**

[0111] 将已用于类似于实施例1的全血样品的50次快速冷冻及解冻处理的不锈钢毛细导管(内径0.5mm;长度10cm)通过以下方式清洁。将原本用于蛋白测定的所谓的BCA试剂溶液(双金鸡宁酸,酒石酸钠,碳酸氢钠,碳酸钠,4%硫酸铜,在0.1N NaOH中;Pierce Chemical)通过毛细导管,以200 μ l/分钟的流速抽泵。此外,将毛细导管浸入加热至50 $^{\circ}$ C的水浴。洗脱液体通过USV/UIS检测器,及在562nm处监控吸收。信号再次达到基线后(此情况中,9分钟后)实现完全清洁,即残留的蛋白等的除去。

[0112] 本申请涉及以下实施方式:

[0113] 实施方式1.一种在以下条件下产生经处理的生物流体的方法,

[0114] (i)提供所述细胞成分的基本上定量解离,及

[0115] (ii)不导致流体成分的实质性沉积,沉淀,变性,凝集及胶凝,

[0116] 包括以下步骤:

[0117] (a)提供包括细胞成分的生物流体,

[0118] (b)冷冻所述生物流体,及

[0119] (c)解冻步骤(b)的冷冻的流体。

[0120] 实施方式2.实施方式1的方法,其中

[0121] 在所述冷冻处理中所述流体被冷冻至-20 $^{\circ}$ C~-196 $^{\circ}$ C,优选-120 $^{\circ}$ C~-190 $^{\circ}$ C的温度,及

[0122] 其中使所述冷冻的流体经历解冻处理至达室温,优选达40 $^{\circ}$ C及更优选达50 $^{\circ}$ C的温度。

- [0123] 实施方式3.实施方式1~2中任一项的方法,
- [0124] 其中所述冷冻处理以约1260°C/分钟~约12600°C/分钟,优选约2000~4000°C/分钟的冷却速度进行,及
- [0125] 其中所述解冻处理以约1000°C/分钟~约11400°C/分钟,优选约1500~4000°C/分钟的解冻速度进行。
- [0126] 实施方式4.实施方式1~3中任一项的方法,其中所述生物流体是体液或细胞培养液,优选全血,更优选有0.1和0.6之间的血细胞比容的全血。
- [0127] 实施方式5.实施方式1~4中任一项的方法,其不包括:
- [0128] (i)沉积和/或沉淀步骤和/或离心步骤和/或
- [0129] (ii)在冷冻/解冻过程之前添加化学裂解试剂。
- [0130] 实施方式6.未稀释的经处理的生物流体,其包括基本上定量解离的细胞成分,其基本上无沉积,沉淀,变性,凝集及胶凝产物。
- [0131] 实施方式7.实施方式6的经处理的生物流体,其包括基本上解离的红细胞,白细胞及血小板。
- [0132] 实施方式8.在生物流体样品中测定分析物的方法,其中所述生物流体根据实施方式1~5中任一项的方法处理,及在所述经处理的生物流体中测定所述分析物。
- [0133] 实施方式9.实施方式8的方法,
- [0134] 其中所述分析物选自:
- [0135] 生物化合物,例如核酸,多肽,肽,脂质,糖,激素,代谢物等;及
- [0136] 药物化合物,
- [0137] 其中所述分析物优选是免疫抑制药物,例如环孢菌素,雷帕霉素或他克莫司。
- [0138] 实施方式10.全血样品中测定免疫抑制药物的方法,其中所述全血根据实施方式1~5中任一项的方法处理,及在所述经处理的全血中测定所述免疫抑制药物。
- [0139] 实施方式11.在来自新生儿的全血样品中测定临床-化学参数的方法,其中所述全血根据实施方式1~5中任一项的方法处理,及在所述经处理的全血中测定所述临床-化学参数。
- [0140] 实施方式12.用于处理包括细胞成分的生物流体的装置,其中所述装置包括:
- [0141] (a)流体处理单元,其至少部分可冷冻/可加热,
- [0142] (b)冷却元件,其用于冷冻预定部分的流体处理单元,
- [0143] (c)加热元件,其用于加热预定部分的流体处理单元,
- [0144] (d)任选流体运输元件,例如抽泵元件,
- [0145] (e)控制元件,其用于在以下条件下控制流体的冷冻/加热
- [0146] (i)提供所述细胞成分的基本上定量解离,及
- [0147] (ii)不导致流体成分的实质性沉积,沉淀,变性,凝集及胶凝,
- [0148] (f)任选清洁元件,及
- [0149] (g)任选样品分析元件。
- [0150] 实施方式13.实施方式14的装置,其中所述清洁元件适于在清洁过程后监控流体处理导管或其一部分中有生物材料。
- [0151] 实施方式14.实施方式15或16中任一项的装置,其中所述清洁元件包括清洁流体,

所述清洁流体是双金鸡宁酸(BCA)试剂。

[0152] 实施方式15.双金鸡宁酸(BCA)试剂用于清洁与生物样品接触的装置的用途。