



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102713640 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 16

(21) 申请号 201080035957. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 06. 10

G01N 35/08(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/487(2006. 01)

61/185919 2009. 06. 10 US

G01N 33/58(2006. 01)

61/313625 2010. 03. 12 US

12/813285 2010. 06. 10 US

审查员 刘梅

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 02. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/038229 2010. 06. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/144745 EN 2010. 12. 16

(73) 专利权人 辛温尼奥生物系统公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 P·帕加诺 Y·张 K·钱 H·T·索

P·W·登斯皮 A·德富斯科

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李进 郭文洁

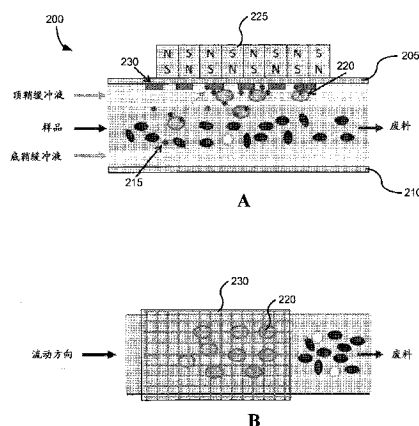
权利要求书2页 说明书29页 附图12页

(54) 发明名称

鞘流装置和方法

(57) 摘要

总的来讲,本发明涉及流体处理,在具体方面,对流体进行处理以检测、选择、捕集和/或分选微粒部分。所述鞘流装置可供从流体样品中分离靶物质,同时避免了不需要的物质与分离装置表面的非特异性结合。本发明描述了生物流体处理、细胞、蛋白质和核酸的检测、分选或选择。本发明特别用于诊断情况、分析患者医学病况、监测和/或调整治疗方案和产生基于细胞的产物。



1. 一种鞘流装置,其包括:
 - (a) 鞘流平面区上游的第一层流建立表面,其配置为在鞘流平面区中建立鞘层流;
 - (b) 平行于鞘流平面区并在鞘流平面区上游的样品层流建立表面,其中样品层流建立表面配置为建立与鞘流平面区平行的样品层流;和
 - (c) 配置成使靶物质从样品层流偏离并进入鞘层流的粒子移动站,其中所述粒子移动站具有大致矩形的内部空间,用于束缚流经粒子移动站的流体,其中内部空间具有横截于样品层流的第一和第二横向尺寸,其中第二横向尺寸为第一横向尺寸的至少约 2 倍;其中所述鞘流减少与内部空间的固体表面的非特异性结合。
2. 权利要求 1 的鞘流装置,其还包括 (d) 第二鞘流平面区上游的第二层流建立表面。
3. 权利要求 2 的鞘流装置,其中 (a) (b) 和 (d) 中的层流建立表面足以保持独立的鞘流平面基本无湍流。
4. 权利要求 3 的鞘流装置,其中子部件 (b) 的样品层流建立平面具有顶部和底部表面,且子部件 (d) 的第二层流表面位于与用于样品层流的表面相对的表面上。
5. 权利要求 4 的鞘流装置,其中所述粒子移动站采用磁力、声学力、电泳力和光学力中的至少一种。
6. 权利要求 5 的鞘流装置,对其进行调配用于磁泳粒子分离。
7. 权利要求 6 的鞘流装置,其还包括至少一个装有试剂的贮器。
8. 权利要求 6 的鞘流装置,其中所述靶物质是干细胞,且所述样品层流包含全血。
9. 权利要求 6 的鞘流装置,其是微流体的。
10. 权利要求 6 的鞘流装置,其还包括装有试剂的贮器,所述试剂包括缓冲剂、大量磁珠、干细胞扩繁剂、适体、包含蛋白质的组合物、细菌细胞培养物和包含噬菌体群的组合物中的至少一种。
11. 一种在鞘流装置中从流体样品中分离靶物质的方法,所述方法包括:
 - (a) 沿鞘流装置的表面建立鞘层流,其中所述表面位于鞘流平面区上游,并且其中所述鞘流装置如权利要求 1 所述;
 - (b) 邻接鞘层流建立流体样品层流;和
 - (c) 使靶物质从流体样品层流偏离并进入鞘层流;其中所述鞘层流和所述流体样品层流邻接。
12. 权利要求 11 的方法,所述方法还包括在邻接流体样品层流处建立第二鞘层流,其中 (b) 包括在第一和第二鞘层流之间建立流体样品层流。
13. 权利要求 12 的方法,其中建立第一和第二鞘层流以及流体样品层流足以保持独立的流动平面基本无湍流。
14. 权利要求 13 的方法,其中使靶物质从流体样品层流偏离并进入鞘层流包括使用磁力、声学力、电泳力和光学力中的至少一种。
15. 权利要求 14 的方法,其中所述靶物质包括细胞、细菌、病毒、蛋白质和核酸中的至少一种。
16. 权利要求 15 的方法,其中所述靶物质在鞘层流流过的捕集站中被分离。
17. 权利要求 16 的方法,其中所述捕集站应用磁力以捕集用磁性粒子选择性标记的靶物质。

-
18. 权利要求 17 的方法,其中所述靶物质是循环肿瘤细胞,所述流体样品是全血。

鞘流装置和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求保护 2009 年 6 月 10 日提交的美国临时申请号 61/185,919、2010 年 3 月 12 日提交的美国临时申请号 61/313,625 和 2010 年 6 月 10 日提交的美国专利申请号 12/813,285 的权益和优先权。这些较早申请的每一个均通过引用以其整体结合到本文中并用于所有目的。

发明领域

[0003] 总的来讲,本发明涉及流体处理,在具体方面,涉及对流体进行处理以检测、选择或分选微粒部分。在其它方面,本发明涉及生物流体处理,细胞、蛋白质和核酸的检测、分选或选择。本文公开了其它方面。

[0004] 背景

[0005] 粒子分选技术广泛用于悬液中的靶定部分 (targeting moieties),但是过多的污染可能是要克服的技术障碍。例如,可能试图从复杂的全血样品分选出相对稀少的细胞。其它细胞类型的污染可能需要预处理以富集靶细胞,或者需要后处理以除去不需要的非靶细胞。

[0006] 此外,污染部分可位于容器侧壁或其它表面上。尽管可使与表面涂层 (例如硅酮型产品) 的非特异性结合减到最小,但是这可能并不足够。当存在水平流体流动平面,且悬液中的粒子沿该平面流动时,粒子可能沉到底部 (取决于密度、粘度和其它特征)。然后粒子可能形成障碍,堵塞流路。加上污染粒子可以共定位于 (例如) 与捕集结构一起配置的微流体装置。特别是当靶粒子极其稀少时,非特异性结合可混淆靶物质 (target species) 的分选或检测。

[0007] 存在提高粒子分选特异性的手段。在微流体体积中,可以使用流体动力学聚焦 (hydrodynamic focusing) 转运靶部分。流体动力学聚焦的常规方法包括使用中央样品流每侧的两个外围流体流在横向上约束样品流。有关流式细胞术主题以及使用流体鞘的开创性论文一般参见 P.Crosland-Taylor, "A device for counting small particles suspended in fluid through a tube (通过管统计悬浮于流体中的小粒子的装置)," Nature 171:37-38 (1953) doi:10.1038/171037b0。

[0008] 一般而言,鞘流 (sheath flow) 是一种特殊的层流类型。虽然可将鞘流配置成包绕流体流的外流“管”,或者完全或部分包绕液体流的其它流路,但是本文的鞘流还包括层流中相对于邻接平行流体流路的流体流路。因此,固体表面上的层流平面被认为就是位于流体“表面” (例如邻接的平行流体流路) 上时的鞘流平面。鞘流意味着基本无湍流,因为过多的湍流可导致流体流路混合 (而且流体层流平面层可能不再起“鞘”的作用)。因此,层流,而不是湍流,是产生鞘流所必需的。

[0009] 根据构造和流体特征,鞘流可起流体动力学聚焦流体样品 (通过包绕样品流路而不混合) 的作用,或者,如果存在层 (或鞘,其不完全包绕液流),则层流平面的流体可起流体延伸装置壁的作用—本质上在流体样品和周围固体表面之间起流体屏障的作用。

[0010] 鞘流特别用于微流体的情况下,其中悬液中的粒子可破坏或阻断微流体回路。因此,流体动力学聚焦或鞘流允许更快的样品流速和更高的通过量。

[0011] 然而,产生用于微流体装置(或较大装置)的层流鞘流(laminar sheath flow)是个问题。常规装置,例如常规流式细胞仪需要具有专门组件的复杂仪器,而且制造特别精细。虽然据报道可能有产生微流体鞘流的特殊几何形状和构造,但是仍存在对易于制造、可用于宏观流体和微流体尺度的可预测的鞘流装置,特别是在靶部分分选中灵敏度得到改进以及与表面的非特异性结合降低的鞘流装置的需要。

[0012] 概述

[0013] 本发明提供基于鞘流的装置、制造和仪器系统、使用方法、制造方法和相关方面。

[0014] 本发明源于可在固体表面上建立的层流下游获得鞘流的观察结果。在固体表面不连续的地方,层流基本按照所建立的那样连续不断,除非当配置使得流动平面与相邻的平行液体流动平面中的液体流邻接时,便起“鞘流”的作用。这个观察结果产生了本发明的许多方面和应用。因此,容易建立在许多流体学应用中具有优势的鞘流,而又不需要复杂仪器。

[0015] 在具体方面,本发明涉及处理生物流体和粒子,包括但不限于血液及其组分、细胞、核酸和蛋白质以及存在于生物功能或与生物功能有关的其它分析物。鉴于本公开内容,其它方面对本领域普通技术人员将是显而易见的。

[0016] 附图简述

[0017] 图1是鞘流装置的示意图,其中在样品层流上方和下方使用4个组件板建立层流缓冲液流。

[0018] 图2A和图2B是分别表示配置用于磁泳粒子分离(magnetophoretic particle separation)的装置的横截面侧视图和顶视图的图示。

[0019] 图2C表示适于本文所述的鞘流装置的磁捕集器(magnetic trap)的各种结构。

[0020] 图3A和图3B是分别表示可移动磁捕集站(magnetic trapping station)的横截面侧视图和顶视图的图示。

[0021] 图4是表示无鞘流(左图)和接着使用鞘流(右图)的装置中固体微流体通道表面上血细胞的非特异性结合的照片的复件。

[0022] 图5A和图5B柱状图分别表示使用本文所述鞘流装置自全血得到的稀有细胞纯度和稀有细胞回收率。

[0023] 图6A是表示鞘流装置组件的分解透视图。

[0024] 图6B是装配的图6A的鞘流装置的照片。

[0025] 图6C是表示图6A和图6B所述鞘流装置的细节的横截面透视图。

[0026] 图7A是表示鞘流装置组件的分解透视图。

[0027] 图7B是图7A所述装配鞘流装置的透视图。

[0028] 图8是根据不同实施方案分选样品的方法的工艺流程图。

[0029] 图9A和图9B表示使用本文所述鞘流装置自脐带血分离的造血细胞的纯度和回收率。

[0030] 详述

[0031] 如上所述,本发明源于以下观察结果:一旦在固体表面上建立起层流流路,则可作

为邻接相邻的平行层流流路平面的鞘流而持续。因此,即使没有最初用来建立层流的固体表面,流体也可在与一个或多个平行流体层流平面邻接时建立的流路和流动平面中持续。在一些实施方案中,与一个或两个缓冲液流路邻接建立层流样品流路。这样,建立起鞘流,从而防止样品流路与鞘流装置的内表面接触。

[0032] 图 1 表示本发明的鞘流装置 100 的分解透视图。鞘流装置 100 包括 4 个平行板 105、110、115 和 120,当使之毗连时形成鞘流装置 100。通过板 105 “z”轴上的出入口引入样品流体,正如用虚线箭头 125 表示的一样。流体样品冲击例如板 115 上的研磨表面并发生偏离,通过内腔加工(chambering),样品流体沿固体表面定向从而建立起层流流路。固体表面在层流流路平面上是不连续的(例如当流体通过固体表面的末端,或以其它方式中断与固体表面的接触时),而流体作为层流持续。缓冲流体通过板 120 和 105 的进口引入,正如用虚线箭头 130 和 135 标明的一样。每个缓冲液流分别冲击板 115 和 110 的类似表面,同样建立与样品层流邻接的层流。这些层流作为各自的层流连续不断,从而产生鞘流。也就是说,样品层流被缓冲液层流包入鞘中,例如防止样品流接触鞘流装置的某些内表面。

[0033] 因此,一方面,本发明提供鞘流装置,其包括:(a) 鞘流平面区上游的第一层流建立固体表面;(b) 与鞘流平面区平行的样品层流区;和任选(c) 第二鞘流平面区上游的第二层流建立固体表面。

[0034] 如同图 1 说明的配置一样,可使用本发明的装置来建立鞘流,所述装置被配置成在相应的鞘流平面上游的相应固体表面上建立一个或多个平行层流平面。本文描述的实施方案包括具有磁力分离站的鞘流装置,该分离站使磁性标记的样品组分偏离,并且任选捕集磁性标记的样品组分。示例性的磁捕集站可参见例如美国专利公开文本 20090053799A1,“Trapping Magnetic Sorting System for Target Species(靶物质的捕集磁选系统)”,通过引用结合到本文用于所有目的。在某些实施方案中,鞘流装置采用非磁力驱动分离。这些力的实例包括声学力(acoustic force)、光学力(optical force)和介电力(dielectric force)。

[0035] 图 2A 和 2B 是分别表示被配置用于磁泳粒子分离的本发明鞘流装置 200 的横截面侧视图和顶视图的图示。装置 200 包括顶板 205 和底板 210。含有靶部分(例如图示的细胞 220)的复杂样品位于顶部流体层和底部流体层之间的层流层中。用于粒子选择的结构,此处为镍铁磁结构 230,位于顶板 205 内表面,使得通过顶部缓冲鞘流防止层流中的样品直接接触。在一个实施方案中,镍结构是隔离开的,例如用材料包覆,使得所收集的靶物质(例如活细胞)不会直接接触(可能有毒的)镍。施加外部可控力(此处为磁力)以磁泳分选出选择性粒子(如图所示,细胞用磁性粒子 215 选择性标记,因此对磁性选择起反应)。图 2B 表示表示自上而下的视图,显示废料不会偏离或不被磁泳结构捕集,而是在样品液流中通过。下面描述了本实施方案的更多方面。

[0036] 图 2C 表示可用于本文所述的鞘流装置的磁捕集网格或图案的 9 种变化。这些用作产磁场梯度(MFG)结构。在一个实施方案中,磁捕集网格或图案由磁性材料制成。在另一个实施方案中,由与外磁体联用的材料形成磁捕集网格或图案,例如微加工或丝网印刷,所述外磁体在磁捕集网格或图案中引起高度定位的强磁场,目的是吸引样品流中磁性粒子标记的靶物质通过缓冲鞘流并转移到磁捕集网格或图案上。

[0037] 一般而言,本发明的装置及相关方法和系统建立基本无湍流或实质无湍流的分立

的流体层流层,使得流体层间保持分立。本文使用的关于层流鞘流的术语“基本无湍流”在层流鞘流方面是指可能有一些湍流,但仍实现鞘流结果。在这种情况下使用的术语“实质无”是指可能有一些不可避免的湍流,但如上所述,仍实现所需要的层流鞘流层。

[0038] 在某些方面,鞘流在样品流体(试图从其中分离或检测靶部分)与固体表面之间提供流体屏障,从而起固体表面的隔离屏障的作用。例如,使用鞘流减少任何非靶部分与固体表面的非特异性结合。因此,本发明提供防止样品流体组分与装置的固体表面进行不需要的相互作用的方法。随着样品流体与固体表面之间不需要的相互作用实现所需要的相互作用,例如流体组分的选择性收集。例如,可使用本发明的装置,通过提供基本上防止样品流体与固体表面(像侧壁或者固体顶表面或底表面、捕集站(如上所述)等)接触的鞘流屏障,来防止样品流体层流平面内的非靶部分过多的非特异性结合。

[0039] 另外,可利用鞘流“夹住(pinch)”样品流或以其它方式使样品流横向变窄,从而提供狭窄的样品流,这可用于例如样品中的细胞计数的目的。在某些实施方案中,层流鞘流束缚层流样品流,所述层流样品流在尺寸上具有与待检测的细胞或其它靶物质的尺寸相当的宽度。鉴于本公开内容,其它方面对本领域普通技术人员而言是显而易见的。

[0040] 术语:

[0041] 除非另有定义,否则与本发明联用的科技术语应具有本领域普通技术人员通常所理解的含义。

[0042] 通用术语:本申请中,单数的使用包括复数,除非另有明确的说明。本申请中,不定冠词意指“至少一个”,除非另有明确说明。列出的名单后的表述“……的至少一个”意指该名单中的任一个或多个成员,并非意指所列的所有成员都必需存在。“或”的使用意指“和/或”,除非另有明确说明。在多项从属权利要求的情况下,“或”的使用是以仅择一方式回指多于一个的前述独立权利要求或从属权利要求。此外,术语“包括”以及其它形式例如“包含”和“含有”的使用不是限制性的。同样,术语例如“元件”或“组分/组件”涵盖包括一个单元的元件和组分/组件以及包括多于一个单元的元件或组分/组件,除非另有明确说明。如果提及“技术从业人员”,则这是指文中主题所属领域的普通技术从业人员,除非另有说明。

[0043] 流体力学/流体动力学术语:描述流体力学(包括微流体学(microfluidics))的各种术语以其常规技术含义使用。

[0044] 术语“流体”和术语“液体”在本文中按同义词使用,是指流动并任选呈容器的形状的物质。在某些情况下,有可能是流动的气态物质或固体物质。例如,微细颗粒状材料可以流动。

[0045] 术语“流体回路”是指位于本发明的鞘流装置中的流体相互连接的功能区的配置。正如本文更详细的描述一样,功能区包括贮器或区室和流体可通过其流动的通道。通道可以是任选的,例如,其中两个区室通过邻接壁直接在流体上连通。两个贮器或室可以在流体上可逆连通,例如通过可为密封和开放的或者可为多孔的邻接壁,只允许某种大小的粒子流过。技术从业人员应了解可能用于本发明的流体回路的多种配置。除了配置以外,还有同样多种的集成流体回路的选择,例如本文所述的流量控制结构元件。

[0046] 粒子分选术语:本文不时使用的术语“部分”是指“一部分”并包括对粒子的提及。“粒子”是指就其转运和性质而言作为完整单元工作的小物体。术语“分析物”可以是“部

分”或“粒子”，在分析方法中，作为检测其存在情况或测定其性质的物质，以其普通含义使用。

[0047] 生物学和生物化学术语：如果讨论分子的具体分类，例如核酸或蛋白质，则包括合成形式，例如天然存在的分子的模拟物或异构形式。除非另有说明，否则同样包括修饰形式，只要保持所需要的功能性质。例如，对 CD34 细胞表面蛋白有选择性的适体包括化学衍生物（例如聚乙二醇化、产生替代形式（pro-form）、用其它活性部分（例如酶、核酶等）衍生化）。

[0048] 术语“生物流体”是指流体的来源，包括（但不限于）羊水、房水、血液和血浆（本文的血液是指血浆成分、除非文中另有明确规定或说明）、耳垢（耳垢）、考珀（Cowper's）液、食糜（chyme）、间质液、淋巴液、哺乳动物乳汁、黏液、胸膜液、脓、唾液、皮脂、精液、血清、汗液、泪液、尿液、阴道分泌物、呕吐物和渗出物（来自伤口或病灶）。

[0049] 术语“选择性结合分子”是指与特定靶部分选择性但不必特异性结合的分子。结合不是随机的。选择性结合分子可选自各种抗体或置换物（permutations）（多克隆或单克隆抗体、肽体（peptibody）、人源化抗体、截短抗体、模拟物和本领域可获得的其它形式）、适体（其可为 DNA、RNA 或各种蛋白质形式，并且可用其它功能部分（例如酶部分或比色部分）进一步修饰），或者可能是特定生物系统特有的。蛋白质可与特定的“标签”例如“His 标签”一起表达，技术人员可确定合适种类的选择性结合分子或合适的可检测标记。所述列举的名单不是穷尽性的。

[0050] 应当理解的是，本发明的实施方案不限于生物样品甚至有机样品，而是扩展到非生物材料和无机材料。因此，可采用本文描述的仪器和方法筛选、分析、修饰或者以其它方式加工液体中的大范围的生物和非生物物质。靶物质和 / 或非靶物质可包括小或大的天然或合成来源的化学实体，例如化合物、超分子装配体、蛋白质、细胞器、片段、玻璃、陶瓷等。在某些实施方案中，它们是单体、寡聚体和 / 或具有任何分支程度的聚合体。它们可在细胞或病毒上表达，或者它们可以是独立的实体。它们还可以是完整的细胞或病毒本身。

[0051] 整体考虑因素：

[0052] 实施和利用本发明的整体考虑因素包括整体装置配置、材料、制备系统、仪器系统和应用。另提供包括工作实施例的具体实施方案。下面还包括了预测性实施例。

[0053] 在实施或利用本发明时，一般要考虑流体动力学原理，包括：可压缩流与不可压缩流、粘性流与非粘性流、稳流与非稳流、层流与湍流、牛顿流体与非牛顿流体、亚音速流与近音速流、超音速流和高超音速流、非相对论流（non-relativistic flow）与相对论流、磁流体动力学（或粒子分选的其它考虑因素）。所列名单是不完整的，但是从业人员应了解流体、粒子、装置和分选方法必需全部整体化。

[0054] 因此，本发明尤其可用于选择血样中的稀有细胞，例如循环肿瘤细胞，同时使可能混淆结果的非选择性结合降到最小。对于细胞尺寸的粒子，物理约束意味着流体动力学聚焦流需要几米 / 秒钟的速度。在这种速度下，典型细胞可在几微秒内横越自身的直径。

[0055] 可将本发明的装置配置用于其它功能。例如，可试图首先分离细胞，然后原位培养细胞；因此，可将本发明的装置另外配置以用作生物反应器。此外，可先在本发明的鞘流装置上培养细胞，或者利用预先生长的细胞，获得蛋白质（或其它靶部分）。然后，可对靶蛋白（或部分）进行可检测标记，并悬于准备在本发明的鞘流装置中分选的流体中。本发明

可用来分选或筛选化学物质文库,即通过选择适体文库中的适体与之结合的蛋白质。

[0056] 可以现有流体处理装置使用的任何方式使用本发明的鞘流装置。整体考虑因素包括所需要的制备方法系统、所需要的用途和所需要的相关仪器(如有的话)。要结合样品大小和应用要求;控制液流方向、路径和速度的方法;选择或分选微粒物质(如有需要)的方法以及与所需仪器的配合,来考虑装置几何学。

[0057] 本发明的鞘流装置、相关方法和系统在宏观流体以及微观流体样品两个方面有工业应用,并且正如下面更详细描述的一样,可进行配置和调配用于多种目的。微流体装置可用于以下目的:例如样品中的蛋白质纯化、稀有细胞分离和稀有分子(例如蛋白质或适体)筛选。这些可与本发明的层流建立表面配置,以便如本文所述在流体层中建立鞘流。参见例如 J. Qian, X. Lou, Y. Zhang, Y. Xiao, H. T. Soh, "Rapid Generation of Highly Specific Aptamers via Micromagnetic Selection(通过微观磁性选择快速产生高特异性适体)" *Analytical Chemistry*(2009); U. Kim 和 H. T. Soh, "Simultaneous Sorting of Multiple Bacterial Targets Using Integrated Dielectrophoretic-Magnetic Activated Cell Sorter(使用集成介电电泳-磁性活化细胞分选仪同时分选多个细菌靶标)" *Lab on a Chip*(2009); Y. Liu, J. D. Adams, K. Turner, F. V. Cochran, S. Gambhir 和 H. T. Soh, Controlling the Selection Stringency of Phage Display Using a Microfluidic(使用微流体控制噬菌体展示的选择严格性). *Lab on a Chip*(2009); X. Lou, J. Qian, Y. Xiao, L. Viel, A. E. Gerdon, E. T. Lagally, P. Atzberger, T. M. Tarasow, A. J. Heeger 和 H. T. Soh, "Micromagnetic Selection of Aptamers in Microfluidic Channels(微流体通道中适体的微观磁性选择)," *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106 (9) 2989-2994 (2009), 所有文献均通过引用结合到本文中。

[0058] 鞘流装置的总体配置:

[0059] 按照以下原理来配置本发明的鞘流装置:在固体表面上建立这样的层流,一旦流体层与另一流体层接触(例如正如本文所述与固体表面的接触中止时),其便作为鞘流持续。本发明的鞘流装置可具有任何数目的配置和构造,只要可获得固体表面建立与平行的层流流路平面上的邻接流体在上游流体接触的层流。

[0060] 总的来讲,本发明提供针对用作流体样品流路与装置表面之间的屏障的鞘流配置的装置。这种屏障抑制或防止样品流体与装置表面相互作用。在一个实例中,这种屏障基本上防止主题流体样品中的部分与固体表面非特异性结合。通过基本上防止非特异性结合,可以避免有害作用,例如因部分的蓄积破坏流路流动(path flow),或者污染选定的稀有部分。

[0061] 在空间上,如果鞘流装置水平(相对于地平线)放置时,则流路彼此垂直排成一线(例如一层放在另一层上)。这阐述于图 1 和图 6A-C,其中顶部鞘流和底部鞘流与样品流平面的两侧之一平行和邻接。顶鞘位于“顶部”,底鞘位于“底部”,因此以垂直方向堆放,虽然流动平面是水平的。

[0062] 可以垂直方向(垂直于水平线)类似地配置本发明的装置。至于垂直方向,流路是水平分层的(例如彼此从左到右)。

[0063] 根据流体回路,流路可以在或不在平坦平面上。如果将流路配置成半圆通道、圆形管的形状或类似有沟的配置,则流路将基本上平行(不相交,与弧形平面三维形状的欧氏

几何学一致)。

[0064] 在某些情况下,可具有基本静止的流体“池(pool)”用作流体鞘(fluid sheath)。虽然严格来说流体池是不流动的,但非常粘的流体(例如呈装载其的容器形状的物质)可具有流体移动特征,但是极其缓慢。因此,可对本发明的装置进行配置以具有这类“池”区,例如底部流体层(见下文),粘性较低的流体样品在其上流动。

[0065] 尺寸:在具体考虑流体力学/动力学和流体特征的情况下,可调节本发明的装置至任何尺寸。在一个实施方案中,针对微流体回路调节本发明的装置。在其它实施方案中,将本发明的装置配置用于升规模或多升规模的用途。

[0066] 就层流建立区域而言,考虑因素包括鉴于流体特征建立层流所必需的表面积。

[0067] 正如本领域普通技术人员应了解的是,流体特征包括粘度、微粒物质特征(例如流体动力学)、微粒物质浓度和流体与例如邻接层中的流体混溶(或否则与之反应)的程度。

[0068] 至于尺寸,可根据包括以下的流体动力学考虑因素,计算用于所需流量/流速的压力的量:可压缩流与不可压缩流、粘性流与非粘性流、稳流与非稳流、层流与湍流、牛顿流体与非牛顿流体、亚音速流与近音速流、超音速流和高超音速流、非相对论流与相对论流、磁流体动力学和按照本领域已知方法的其它近似法。本领域的普通技术人员应以整个系统(包括装置材料)的角度来考虑流体动力学。

[0069] 鞘流装置可具有方向性,分离力在该方向内起使靶物质从样品流平面偏向鞘流平面的作用。总的来讲,这个方向将垂直于流动方向,且鞘流和样品流将形成平行邻接层,沿着这个方向一个位于另一个之上。这个方向的装置尺寸(装置的“高度”)可能相对较小,通常在装置中是最小的,大约是分离力在其内起作用的距离。因为这些力常常是短程力,所以这个方向上的装置尺寸常常约为1毫米或更小。相比之下,横向装置尺寸,即垂直于流动方向和分离力方向两者的方向上的尺寸,可能相当大。这允许将装置调节到相对较大的尺寸,并且允许通过量相应增加,在某些情况下,在微流体形式下约为数百毫升/小时。在某些情况下,这个横向装置尺寸为至少约10厘米甚至至少约20厘米。在一个具体的实施方案中,装置的高度约为700微米,其横向尺寸约为20厘米。本文提供的尺寸良好适用于磁泳分离机械装置,包括本文其它部分描述的任何磁泳分离机械装置。

[0070] 目前,工作实施例涉及微流体尺寸(一般具有1mm或更小的流体通道直径,参见下文中的实施例)。除了对实际应用的限制以外,尺寸的下限主要受制备方法的约束。例如,如果需要纳米电子元件,则可采用微型平板印刷技术集成这类元件。对于微流体应用,可以寻找限制液流中的湍流和使所需路径中的层流最优化的均衡。可对本发明的鞘流装置进行配置以用于例如1-10 μ L、10-100 μ L、100-1000 μ L、1000 μ L-100ml 的样品体积。

[0071] 此外鉴于实际考虑因素例如流体力学和流体动力学原理和所需应用,可将本发明的鞘流装置的规模放大至实际上的任何尺寸。在鞘流上游建立层流的普遍原理广泛适于比用于微流体应用的装置大的装置,本领域的普通技术人员应了解允许放大的流体动力学普遍原理。例如,在一些实施方案中,可对本发明的装置进行配置以用于介于约100ml-1升之间、在某些情况下为多升规模的较大的样品体积。

[0072] 流体层的数目和特征:术语“流体层”在本文中用于表示分立的基本无湍流的流体流路平面。“流体层”可以是固体表面上的层流,或者可以是相对于平行平面上的邻近、邻接

流体层的鞘流。

[0073] 虽然不位于二维平面方向上,但是本发明也适用于具有全鞘包绕样品流体的装置。可使用这些层流建立表面的组合来产生包绕样品的流体层,从而允许 3D 流体动力学聚焦易于实现。这样,样品流在水平和垂直两个方向上与通道壁(在装置流体回路中)分隔开。

[0074] 流体层的数目:在总体方面,本发明提供包括至少三个分立的依次邻接的流体层流层的装置(及相关方法和系统)。层流流路彼此邻接放置,并彼此平行,呈串联形式。每个层流流路与其它层流流路平行,并垂直于其流路分层。

[0075] 可使用三层(正如下文中的工作实施例),使得样品层流平面夹在(例如)上层和下层之间。可以增加另外的流体层,虽然固相支持体不存在时层(鞘)流平面持续的程度大多将取决于流体力学考虑因素。可考虑流体回路的特征,例如几何配置、通道壁组成和摩擦力。其它考虑因素涉及流速和流动力、流动平面尺寸、每个流动平面层的流体体积和技术从业人员所了解的其它流体力学考虑因素。

[0076] 流体层厚度:有关流体层的数目,每个流体层的厚度(或深度)是重要的。从业人员应理解的是,装置配置和应用以及流体特征将决定流体层厚度。

[0077] 例如,如果对鞘流装置进行配置用于磁泳,磁力应大于提供鞘流的流体层所提供的阻力。也就是说,施加以自溶液分离磁性标记的靶粒子的磁力应足以吸引粒子穿过流体层到达所需要的区域(比如捕集站,见上文)。

[0078] 因此,例如,如果寻求上表面上具有捕集站的磁泳装置,使得将磁力施加于水平平面上的装置顶部,则本发明的鞘流装置可包括相对粘的(相对于样品粘度)、缓慢流动的(或静止的)第一(例如底部)流体层,相对不粘的(相对于底部层)样品层,和大体上无粘性的顶层。那样的话,顶层的鞘流基本上阻止了磁捕集站(位于顶面)中的非特异性结合,却不阻止磁性标记的靶粒子穿过该层而被捕集。

[0079] 结构元件:

[0080] 一般而言,除简单的流体保留或储存以外,本发明的鞘流装置还起提供流体移动以实现具体应用的作用。

[0081] 结构特征提供了这个流体回路。本发明的鞘流装置包括一个或多个出入口、一个或多个贮器和在出入口和贮器之间或之中提供流体连通的一个或多个通道。还描述了其它结构组件。

[0082] 出入口:一般而言,根据整体配置和材料,本发明的鞘流装置可具有其中使材料进入或排出的至少一个出入口和用于装载流体的至少一个贮器。可对用于流体(或其它材料)进入或排出的出入口进行配置以便与其它装置或仪器一起作为整个系统的组成部分一起操作。

[0083] 出入口可与外部环境连接,例如通过提供流体充入或流体排出的通道。对于流体充入,可配置出入口用于通过注射器、移液管或通过自动充填仪器充入。参见图 6B,其中出入口配备了适于注射器的适配器。流体出口可以是例如废物处理。或者,出口可以是阳性选择方案的组成部分,由此选择性俘获悬液中的微粒物质。可以使用出入口的外部互连的各种类型,例如管道钉(tubing stud)、软管倒钩连接、O 环连接或其它外部互连类型。

[0084] 出入口,而不是外部互连,可备选地与装置的另一部分(例如单独封闭的贮器)呈

流体连通。从功能上讲,用于相同的目的,例如流体充入或流体分配(出口)的目的。

[0085] 本发明的装置可具有一个或不止一个用于多种功能的出入口,例如用于引入多种不同的流体或用于排出单独部分,而且每一个可任选与外部环境或与装置的另一部分连接。

[0086] 贮器:本发明的装置还包括至少一个用于装载流体并对流体进行任何功能的贮器。贮器可用于功能目的,并包括实现此目的的其它结构元件。例如,如果需要培养细胞,则可将合适的细胞培养仪与贮器整合,例如(但不限于)通风装置、混合器或温度控制器。这些装置可构成本发明的鞘流装置的组成部分,或者可以是相关加工仪器的组成部分,其中其装置整合是临时的(当鞘流与仪器有效连接时)。可对贮器进行调配以系统内操作实现某一功能。

[0087] 装置功能组件:可对本发明的装置进行配置或调配以充入和测量固定的体积,或者用于连续流。可对本发明的装置进行配置用于多重功能(例如细胞溶解和蛋白质分离)。可对本发明的装置进行配置用于单步或多步过程或测定,并且可进行配置用于试剂储存。本发明的装置可包括过滤配置或调配。

[0088] 例如,本发明的鞘流装置还可包括用于捕集靶部分的结构,例如作为粒子分选的形式。例如,如下所述,可包括用于磁泳粒子分选的铁磁网格,以用作用于磁力结合靶物质的“捕集站”。可在本发明的鞘流装置中特别有利地进行从悬液中分离粒子。例如,如果需要从复杂混合物中磁泳分离特定部分,则可在适当的位置上放置合适的磁泳捕集结构,例如上文引述的美国专利公开文本 20090053799A1 中描述的铁磁结构。参见图 6B,其中上层包括铁磁捕集站。

[0089] 可包括多种粒子分选/检测/分析功能部件,正如本说明书各处指出的一样。

[0090] 可与鞘流流体学装置中的磁捕集分选仪集成的操作模块的实例包括(a)其它富集模块,例如荧光激活细胞分选仪和洗涤模块,(b)反应模块,例如样品扩增(例如 PCR)模块、限制性内切酶反应模块、核酸测序模块、靶标记模块、染色质免疫沉淀反应模块、交联模块,甚至细胞培养模块,(c)检测模块,例如核酸、抗体或其它高特异性结合剂的微阵列和荧光分子识别模块,和(d)溶解模块,用于溶解细胞、破坏病毒蛋白质外壳或以其它方式释放小的生命系统中的组分。可在磁性分选仪之前或之后提供这些模块的每一种。在单一流体学系统中,可能有多个相同或不同类型的与磁性分选仪集成的操作模块。此外,一个或多个磁性分选仪可与多个其它操作模块平行或串联排列。这些操作模块中的一些可设计或配置成捕集器,其中样品中的靶物质保持静止或一般限制在特定的体积中。

[0091] 从上述模块实例中应显而易见的是,可在集成流体学装置模块中对靶物质和/或非靶物质进行的操作包括分选、与磁性粒子偶联(本文有时亦称“标记”)、结合、洗涤、捕集、扩增、除去不需要的物质、沉淀、裂解、稀释、连接、测序、合成、标记(例如使细胞染色)、交联、培养、检测、成像、定量、溶解等。

[0092] 可在集成流体装置的磁选模块中进行的生物化学操作的具体实例包括合成、纯化和/或筛选质粒、适体、蛋白质和肽;评价酶活及使蛋白质和糖衍生化。还可进行多种生物化学测定和电生理学测定,包括:(1)基因组分析(测序、杂交)、PCR和/或用于DNA和RNA寡聚体的其它检测和扩增方案;(2)基因表达;(3)酶活测定;(4)受体结合测定;和(5)ELISA测定。可以多种方式进行前述测定,例如:均质方式、基于珠粒的方式和表面结合方

式。此外,可使用本文所述装置进行使用特定酶或催化剂的生物分子的连续产生,以及生物分子或在生物系统中有活性的分子(例如治疗药)的产生和递送。还可使用本文所述流体装置进行肽、蛋白质及 DNA 和 RNA 寡聚体的重组合成。

[0093] 集成和流体回路:可以许多方法实现功能元件的集成。一般而言,可通过液流通道以所有组合使出入口和贮器呈流体连接。可使液流通道适于所需要的流动种类,并可具有允许所需要的流体移动的任何尺寸。

[0094] 流量控制结构元件可选自多种种类。这些可以是阀、多孔膜、混合器、泵和其它传统的流量控制结构元件。可采用非常规的流量控制,例如原位固化以阻断流动的材料调配。

[0095] 应考虑层流建立表面与流体回路集成的结合。例如,如果存在在鞘流上游建立的层流,则鞘流应以反向不相容的(逆流)方式互不干扰。

[0096] 本发明的装置的全部或部分可以是生物可降解的,例如使用在热、阳光、水等存在下降解为无毒的组成部分的聚合材料。

[0097] 本发明考虑因素还包括产品识别,例如条形码、RFID 或其它识别装置的方法。本发明的装置还可与相关试剂包装在一起。例如,为了与生物试剂一起使用,将本发明的装置与合适的缓冲液、介质、可检测标记部分、仪器(例如用于流体充入的注射器)或其它项目包装在一起。

[0098] 洗液或载液:可对本发明的装置进行配置或调配以与例如水性缓冲液(含或不含洗涤剂)、醇(例如甲醇、乙醇、异丙醇)、有机溶剂(例如己烷、碳氟化合物、芳族化合物)或任何上述物质的组合一起使用。在某些实施方案中,这些流体可用作鞘流流体。

[0099] 电化学活性/电活性:本发明的装置可包括一个或多个印刷电路板、交叉指型电极、溅射电极或丝网印刷电极或者电容阵列。例如,可在聚合材料上预先制备电路板,并使用该电路板制备本发明的鞘流装置。这些元件可通过指导捕集站和/或各种前处理和后处理模块或站的操作的关联逻辑来控制。

[0100] 用于粒子捕集或分选的力的可操作性:本发明装置的最有前景的应用之一是粒子分选,有许多方法可进行这种分选。使用可控力,例如磁力、声学力、电泳力或光学力移动悬于流体中的反应性粒子。

[0101] 例如,可考虑使用磁性活化粒子分选(例如细胞分选)。实际应用中,这包括使用选择性结合分子与之连接的磁珠。在选择性结合分子与所需要的靶标结合时,磁体因此如此连接。然后,可使用磁力,任选铁磁捕集站,捕集或分选所需要的靶标。因此,可将铁磁材料埋入鞘流装置材料中,例如印制的磁性区域或通过将铁磁尘粒掺入制造材料(例如应用于特定区域)。同样可以使用本领域可得到的其它可控力,例如声学力、电泳力或其它力。技术人员应了解适应本发明系统的合适的装置配置。

[0102] 光学检测:可将本发明的装置配置成允许进行光学检测。例如,如果需要比色、荧光或发光可检测标记,则这具有实际的应用性。其它光学界面可包括光纤、表面等离子共振、衰减全反射或其它光学界面。

[0103] 其它特征/特殊要求:可对本发明的装置进行灭菌(例如用环氧乙烷,考虑选定材料对于其它灭菌技术的耐久性,例如耐高压灭菌能力(autoclavability))。在如此选定的材料或配置中,可具有与细胞培养要求的表面相容性和其它的表面能。本发明的装置可以

是例如可透气的。可寻求内涂层（例如硅）以使与表面的非特异性结合降到最低。

[0104] 磁泳实施方案和磁捕集实施方案：记住上述原理，便可设想包括鞘流和磁选两者的各种设计。在某些实施方案中，磁选包括捕集模式，其中非靶物质和靶物质在加入外磁场后相继洗脱出来。换句话说，与磁性粒子连接的物质保持在原位，而未连接的物质被洗脱出来。然后，在此第一洗脱步骤完成后，附着磁场并防止洗脱的物质以使得其可被洗脱和回收的某种方式释放。

[0105] 按照一些实施方案，MACS 系统的捕集模块包括样品（包括与磁性粒子连接和未连接的物质）通过其流动的通道。通道的一侧包括产生磁场梯度的结构，该结构随着施加外部来源的磁场而产生磁场梯度。该磁场梯度吸引和俘获磁性粒子以及连接的物质。在样品流过捕集模块后，俘获的粒子可通过改变所施加的磁场或通过切断磁性粒子与连接物质之间的连接而释放出来。

[0106] 例如，在某些实施方案中，流体分离装置可通过下列特征表征：(a) 至少一个样品入口或接入通道，其被配置成在流体分离装置中提供样品流；(b) 至少一个鞘流入口通道，其被配置成提供一个或多个液流，所述液流在流体分离装置内形成环绕样品流的鞘，从而降低样品组分与装置的非特异性结合；(c) 分选站，其与样品和鞘流入口呈流体连接，并沿着样品流路径定位；和 (d) 磁场梯度发生器，用于与外磁场相互作用以在分选站中产生磁场梯度变化，从而使磁性粒子从样品流偏离和 / 或自样品流捕集磁性粒子。

[0107] 在某些情况下，分选站具有大致矩形的内部空间，用于束缚流经分选站的流体。在这类情况下，内部空间具有横截于（例如垂直于）样品流的流动方向的第一和第二横向尺寸。在不同实施方案中，第二横向尺寸（其通常为水平平面上的宽度）为第一横向尺寸（其通常为垂直方向的高度）的至少约 2 倍。可对装置进行配置，使得所述至少一个鞘流入口通道被配置成提供沿第一横向尺寸被样品流彼此分隔开的两个鞘流。

[0108] 此外，在使用内部矩形空间的一些实施方案中，内部空间部分被两个基本平行和基本平坦的表面限定，所述平面以不大于约 2 毫米、在其它情况下不大于约 1 毫米的距离间隔开。在这类实施方案中，配置所述至少一个鞘流入口通道以提供与两个平行的平坦表面呈接触流动并被样品流彼此分隔开的两个鞘流。第一鞘流入口通道可包括位于分选站上游且以基本平行于内部空间的两个基本平坦表面定向的基本平坦表面。另外，装置可包括第二鞘流入口通道，其具有其自身的位于分选站上游且以基本平行于内部空间的两个基本平坦表面定向的基本平坦表面。样品入口通道可具有其自身的平行于分选站内部空间的两个基本平行和基本平坦表面的基本平坦表面。可在同样提供用于鞘流入口通道中的平坦表面的平面结构上提供这些表面。示例性的结构见图 1、图 2 和图 6A-6C。

[0109] 流体分离装置的磁场梯度发生器可包括在接近分选站的分选装置上经图案化的大量铁磁元件，并且可具有接近大量铁磁元件的永磁体。可将大量铁磁元件布置在分选站的流体通路内，以供铁磁元件和样品流之间的流体接触。为了防止元件与流动鞘和样品直接接触，可能需要在铁磁元件上提供保护层或钝化层。这类层可用于防止例如样品组分（例如细胞）中毒或污染。合适保护层的实例包括薄的（例如 10nm-1 微米）氧化硅层、氮化硅层或其它合适的惰性防渗材料层。在某些实施方案中，铁磁元件包括镍元件，例如微图案化元件。实例见图 8A-8H。如下所示，以有条理或随机的方式提供铁磁结构，例如规则或不规则几何形状的平行线条、正交网格和矩形阵列。结构可以是如图所示的规则或网状

的。在一个具体实例中,镍铁磁元件用薄的二氧化硅钝化层涂覆。在不同实施方案中,对磁场梯度发生器进行配置以临时俘获磁性粒子,然后释放磁性粒子。

[0110] 如有关图 2A 和图 2B 所述,在流动通道底壁内表面上形成铁磁结构。这些用作产磁场梯度 (MFG) 结构。外磁场通常用作捕集流经流体介质的磁性粒子的驱动力。为了产生局部高磁场梯度以助于俘获流动的磁性粒子,MFG 结构可定形外磁场。在图 2A 描述的实施方案中,通过一系列交变极性的永磁体提供外磁场。更概括地讲,外磁场可通过一个或多个永磁体和 / 或电磁体来产生。在一些实施方案中,磁体的聚集体 (例如图 2A 所示聚集体) 是可单独或作为一个单元移动的,目的是为了在动力学上改变施加在捕集区的磁场。

[0111] 在某些实施方案中,使用电磁体控制磁场。在其它实施方案中,可以使用永磁体,其可机械地移入和移出分选站附近,使得可局部提高和降低分选区的磁场梯度以利于磁性粒子的序贯俘获和释放。在使用电磁体的一些情况下,控制磁场,使得在过程早期 (磁性粒子俘获期间) 产生强场梯度,然后在过程后期 (粒子释放期间) 降低或移除。

[0112] 在一个实施方案中,装置的捕集区是可移动的。在另一个实施方案中,可移动的捕集区是一次性的。在一个具体的实施方案中,如果整合捕集区 (例如镍网格) 的板是一次性的,则捕集区由被刻痕的最外面的周缘限定,使得在捕集操作和洗涤以除去任何废料后,捕集区可从整合捕集区的板中“放出”。参见图 3A 和图 3B——板 300 的侧视图和顶视图,该板在板中整合了镍网格捕集区 310 和刻痕 315,使得例如可使用吸盘装置通过施加足以沿着板上的刻痕折断的拉力,从板中拉出可移动的捕集区。根据需要,可在有或没有所施加的磁场时,移动可移动的捕集区。一旦移动,可在网格上对靶细胞分析或操作,或者取出靶细胞并在网格以外进行分析或操作。

[0113] 如图 2A 的实例所示,磁性粒子用一个或多个对靶细胞或要俘获的其它物质的标记有特异性的分子识别元件 (例如抗体) 包覆。因此,一个或多个磁性粒子与结合的细胞或其它靶物质一起作为组合单元流入捕集模块。对于大的具有许多暴露的结合部分的靶物质 (例如哺乳动物细胞),常见的是具有多个附着的磁性粒子。

[0114] 在一些实施方案中,捕集区相对较薄,但却可能相当宽,以提供相对高的通过量。换句话说,通道本身的横截面积相对较大,而通道的高度或深度相当薄。通道的薄度可受磁场的有效范围的限定,所述磁场用于吸引流体介质中流经捕集区的磁性粒子。因此,在一些实施方案中,捕集区内部的横截面高度为约 2 毫米或更小。在某些情况下,高度为约 1.5 毫米或更小、或约 1 毫米或更小、甚至约 0.8 毫米或更小。捕集区内部空间的宽度受通过量因素和制备限制的组合的支配。在一些实施方案中,宽度小于 1 毫米,但可大于 30cm。在一个具体实例中,高度为约 0.5-1 毫米,宽度为约 15-25 厘米。此外,可通过连接多个独立的平行鞘流捕集装置改进通过量。在一些实施方案中,向这些平行装置的每一个提供单一样品供给。同样,可向装置提供缓冲液或其它鞘流流体的单一供给。平行操作的这类装置的数目可以为 2、3、4、5 个,甚至更多个。

[0115] 在 Sang-Hyun Oh 等人为发明人,2006 年 10 月 18 日提交的美国专利申请 11/583,989 (以 US 2008/0124779A1 公布,题为“Microfluidic magnetophoretic device and methods for using the same (微流体磁泳装置和使用该装置的方法)”) 描述流动模块的其它文段中,论述了适用于本发明的流体学系统的各种细节,该文献通过引用结合到本文中用于所有目的。这类细节的实例包括缓冲液组成、磁性粒子特征、外磁体特

征、用于 MFG 的铁磁材料、流动条件、样品类型、与其它模块的集成、流体学元件和磁性元件的控制系统、靶物质和磁性粒子之间的结合机制等。总的来讲,与用于美国专利申请号 11/583,989(同上)中所述类型的连续流磁流分选仪(continuous flow magnetic flow sorter)相比,在磁捕集模块中,所施加的外磁场可相对较高(考虑模块的整体设计)。无论如何,为了确保(与磁性粒子连接的)靶物质被俘获并且抵御流动的流体保持在原位,对靶物质施加的磁力应充分大于流体动力阻力。

[0116] 在图 8 所示的典型阳性选择实例中,磁捕集过程 800 如下进行。首先,在操作 801 中,将样品(例如可能含有靶细胞的生物样品)用小的磁性粒子标记,所述磁性粒子用对靶细胞的表面标志物有特异性的俘获部分(例如抗体)包覆。该标记过程可发生在微流体分选装置上或在微流体分选装置以外。在该标记后,在操作 803 中,使样品流入含或不含同时流动的缓冲溶液的分选站(包括捕集区)中。缓冲液可通过一个或多个鞘流入口递送,样品则通过一个或多个其它的入口递送,参见 805。在一个具体的实施方案中,缓冲液先流动以建立一个或两个缓冲液层流的鞘流。一个缓冲液层流用于防止与分选站附近的装置内表面非特异性结合。当使用两个层流缓冲液流时,一个如上所述使用,另一个防止装置的另一个内表面非特异性结合,其中样品层流介于两个缓冲液层流之间。在操作 807 中给分选站赋予外磁场,以在操作 809 中使磁性标记的靶细胞或其它物质抵御由流动流体发挥的流体动力阻力而保持在原位。这种情况发生的同时,在操作 811 中使未标记的非靶物质连续洗脱出来。如上所述,磁场通常通过位于分选站附近的外磁体施加。在大多数或全部样品溶液完全流过分选站后,在操作 813 中可通过许多不同的机制(包括一些涉及改变磁场梯度和/或提高流体动力的机制)的任一种将磁性组分释放出来。例如,可减少、移除室中的磁场或使之重新定向,同时将样品输入流用脱离剂(用于释放俘获物质)和/或缓冲液流置换。最后,之前固定化的磁性组分或者仅其俘获的物质(未纯化的)在缓冲溶液中流出室。然后,在操作 815 中可在分选室出口收集包括靶物质的纯化样品组分,在一些配置中,所述出口可直接位于捕集室的下游。在某些情况下,将纯化靶物质递送到一个或多个后处理站中。然后该工艺流程结束。

[0117] 在一些实施方案中,从捕集区中直接取出捕集的靶材料。可对如此取出的材料进行分析,可将如此取出的材料用于产生细胞产物,对其进行操作用于其它目的等。在一种情况下,把装置的捕集区设计成与所连接的捕集材料一起从装置的其余部分上剥落。为此,可将装置设计成具有在产磁场梯度区周围的薄的周缘或弱化区。使用该配置,技术人员可在样品流过装置后,拆离捕集区,以从外部接近捕集的材料。为了有助于拆离过程,可用机械设计装置(例如拉环、槽口或螺脊)设计该装置。

[0118] 为此,现将描述捕集型磁力分离系统的实例。该系统采用一次性流体学芯片或盒(cartridge),各装有包括磁捕集模块的流体学元件。在操作的一种模式(阳性选择)中,将样品(例如少量血液)供应到盒的接收端口,然后将与样品在一起的盒插入处理和分析仪器中。在芯片内,在磁捕集模块上分选样品中的磁性粒子和靶物质(如有的话),并浓缩。在样品以这种方式处理后,可释放捕集的种类,并收集在输出管中。这可通过各种方法完成,包括降低或消除施加于捕集模块的外磁场,或者加入从磁性粒子中释放俘获物质的试剂。备选地或者联合地,可增加施加于磁性粒子的流体动力。在某些实施方案中,底架放置系统组件,其包括提供使样品流过捕集模块的主要驱动力的压力系统(例如注射泵和压力

控制器)。当然,可以采用利用备选驱动力(例如连续泵或气动系统)的其它设计。同样在缓冲液泵和流量控制模块控制下将缓冲液贮器中的缓冲液供给盒。

[0119] 鞘流装置制造系统:一般而言,本发明的装置和相关仪器可按照可获得的方法制造,只要配置以允许层流建立表面是组件。

[0120] 可以利用平版印刷术和蚀刻技术制造针对所需微流体流的精确设计。可以低成本使用注射成型以制备具有特殊配置的刚性基底。然而,单独制备基底,使室和通道(其中流体流过)开放。为了封闭装置,然后可以使用层压、热、声学或激光将类似的刚性材料顶层密封(附着在密封装置的顶层)。

[0121] 例如玻璃、乙烯树脂(vinyls)或其它常用的塑料聚合物等材料可用于“芯片实验室(lab on a chip)”和其它装置。可对盒设计(通道、入口、区室和其它流体流路或保留区)进行配置。可附加互连元件,例如用于进入或流出或者用于加压流动/终止的口,或者可将互连元件形成成为可注模设计(例如)的组成部分。其它元件,例如电传感器、机械传感器或不同的传感器可位于类似的专用位置上。

[0122] 本发明的鞘流装置制造系统包括用于流体充入、装配、分离、编码(例如条形编码)、灭菌和包装的仪器。

[0123] 本发明的制造系统包括遵从各种政府或工业制度(包括食品和药物要求(例如FDA、EMA)、质量检查机构(例如国际标准化组织(International Organization for Standardization))和其它设立来确保用于特殊目的的质量的制度)的制备系统。

[0124] 鞘流装置仪器系统:可将本发明的装置和方法调配或配置成与主体仪器一起工作或满足系统要求。调配或配置包括(但不限于)以下的一种或多种:例如真空填充、泵和阀的自动控制、有压流、加样用注射环(injection loop)、温度控制、电渗流动、变容真空泵、预计体积流率、离心力处理、湿度控制和气体交换控制。

[0125] 可通过自动化仪器控制流体流动,虽然取决于装置,但也可使用手工控制。例如,本发明的装置可使用气压或空气压力以通过与自动化仪器有效连接的集成口建立流动。

[0126] 捕集前的处理

[0127] 可在鞘流装置上的分选“上游”或之前进行各种处理。这些处理的实例包括靶标记、细胞溶解和耗尽。在下面的论述中说明的标记可包括使具有特异性结合部分的磁性粒子与样品的靶成分或非靶成分偶联。溶解可包括破坏细胞膜或细胞壁以将细胞成分(细胞器、生物分子等)释放到样品中。耗尽包括在分离前除去样品中的一种或多种特定的成分。耗尽的实例是通过声学方法或其它方法从样品中除去红细胞。可在芯片上或芯片以外进行其它预处理操作,包括用于染色、固定或将外来材料导入细胞的各种化学方法。

[0128] 在许多实现中,必须确保样品的靶成分或非靶成分适当地用磁珠“标记”。这种标记操作在捕集/分离阶段(其中磁性粒子在流动的流体介质被俘获和保持静止)上游(之前)进行。

[0129] 磁性粒子可具有对靶物质或非靶物质有特异性亲和力的表面官能团。因此,当磁性粒子与相关物质接触时,它们便与这些物质结合形成缀合物。一个本发明的操作涉及有利于磁性粒子与样品中的合适物质或组分结合或缀合的机制。

[0130] 通常,这种分选前处理在与捕集区呈流体连通定位的一个或多个独立室或贮器中进行,虽然这不是必需的。这类室或贮器可位于与捕集区相同的装置(芯片)上或位于独立

的装置或芯片中。合适时,它们可具有微流体尺寸甚至略微较大的尺寸。在一个实例中,一个或多个预处理贮器的每一个的体积约为 5 毫升。在某些情况下,贮器可介于 0.5ml-10ml 之间。

[0131] 将磁珠以及样品和有利于结合的其它试剂各自供应给一个或多个贮器中。注意,磁性粒子可以官能化形式提供,在这种情况下,不必提供其它试剂。磁性粒子相对于贮器中的其它成分移动以利于标记。按照某些实施方案,这种移动是通过将连续施加气压于两个独立室中引起的。在一些实施方案中,这种移动是通过在稍后部分所述磁性粒子释放中所述类型的磁性混合机制引起的。可采用有利于混合的相同机制;例如通过例如使磁场振荡而移动磁场。混合机制的其它实例包括超声搅拌或搅拌。提供磁性粒子的流体混合并允许标记和 / 或释放样品物质的系统和方法的实例详见 2009 年 4 月 16 日提交的 PCT 专利申请号 PCT/US2009/040866 (PCT 公布号 WO 2009/129415),通过引用结合到本文用于所有目的。

[0132] 捕集后的处理:

[0133] 可在鞘流装置中分选后进行不同的处理。这些处理可在分选站中和 / 或站的下游进行。总的来讲,处理可包括定量测定靶物质(例如细胞计数)、提取有关靶物质的分子信息(例如特定的 SNP 是否存在)和 / 或提取基于细胞的产物(例如捕集的干细胞的分化型)。适当处理的实例包括通过光学技术直接检测靶物质、分析试验、捕集细胞或病毒的生长、靶物质的转化(例如分化捕集干细胞)、对表达模式进行概况分析和遗传表征。可用来表征表达概况和 / 或遗传序列的特殊工具包括微阵列(例如 mRNA 阵列)和高通量测序工具。更多的论述可参见 PCT 专利申请号 PCT/US2009/040866(同上)。

[0134] 分离后操作常常包括用于从在捕集站中捕集的或以其它方式在分选站中分离的磁性粒子中释放靶物质的方法。在典型情况下,在捕集操作结束时,仅保留在捕集区中的样品物质与磁性粒子结合。对于许多应用,重要的是在进一步处理前从磁性粒子中分离出俘获的物质。

[0135] 在本文描述的分离后操作中,采用从磁性粒子中释放结合的物质的一些机制。可获得各种结合和释放系统。这些包括例如以下释放试剂,其(1)消化使磁珠与俘获物质化学偶联的键,(2)与化学键或生物化学键机制竞争结合俘获物质,和(3)裂解与第二抗体的键。可按照所述方法简单浓缩、纯化和 / 或释放捕集的靶物质。或者可对其作进一步分析和 / 或处理。

[0136] 在一些实施方案中,将已俘获和洗涤并任选按上述方法在捕集器中释放的粒子暴露于样品中的靶物质的一种或多种标志物(例如标记抗体)。例如,某些待检测的肿瘤细胞表达两种或更多种特异性表面抗原。为了检测这些肿瘤,可以使用多于一种标志物。抗原的这种组合只发生在某些独特的肿瘤中。在一个或多个标记流经捕集器达足够长的时间后,可洗涤俘获的粒子 / 细胞。此后,粒子 / 细胞可从捕集器中取出用于进一步分析或可原位分析它们。例如,如果例如这类标记或荧光团,则可在第一和第二标记激发时用探测束扫描捕集器的内容物。然后,以第一和第二标记特有的频率检测发射光。在某些实施方案中,使各别细胞或粒子成像以表征捕集 301 的内容物,因此确定靶肿瘤细胞的存在情况(或数量)。当然可检测肿瘤细胞以外的各种靶成分。实例包括病原体,例如某些细菌或病毒。

[0137] 在另一个实施方案中,来自样品进入物的核酸通过适当机制俘获。可检测这些核酸,并在未进行任何扩增的情况下直接进行概况分析,例如使用微阵列。或者,PCR 试剂(合

适缓冲液中的核苷酸、聚合酶和引物)进入捕集器,并进行适当的PCR热循环程序。热循环持续直到达到适当的扩增水平。随后,可进行扩增靶核酸的原位检测,用于例如基因分型或特定突变的检测。或者可在例如单独室(其可含有核酸微阵列或电泳介质)的捕集器下游完成检测。在另一个实施方案中,可通过引入例如靶序列的适当标记的插入探针或供体-猝灭剂探针,在捕集器中进行实时PCR。探针可与其它PCR试剂(例如引物、聚合酶和核苷酸)一起引入。原位实时PCR适用于这样的分析,其中正对表达水平进行分析。在一些实施方案中,在实时PCR或终点PCR中,可通过使用聚焦在捕集区的合适检测仪器(例如荧光显微镜),在捕集器中进行扩增序列的检测。

[0138] 在一些实施方案中,俘获元件原位将样品中的细胞俘获并将其限于反应室。此后,将裂解剂(例如盐或洗涤剂)递送到该室中。裂解剂可以溶液管塞(plug)递送,并可供在整个室中扩散,在此其将固定化细胞及时溶解。这可供提取细胞遗传材料用于随后的扩增。在某些实施方案中,裂解剂可与PCR试剂一起递送,使得在经过允许裂解剂溶解细胞并移出核酸的足够的一段时间后,可开始热循环程序,并检测靶核酸。

[0139] 在其它实施方案中,样品核酸以未加工样品提供,并与含有合适的杂交序列的磁性粒子偶联。然后,分选磁性粒子,并固定在捕集器中。在将PCR试剂递送到室中并关闭所有阀门后,可通过热循环进行PCR。在最初的温度波动期间,俘获的样品核酸从磁性粒子上释放。

[0140] 本文描述的核酸扩增技术是聚合酶链式反应(PCR)。然而,在某些实施方案中,可采用非PCR扩增技术,例如各种等温核酸扩增技术;例如实时链置换扩增(SDA)、滚环扩增(RCA)和多重置换扩增(MDA)。这些中的每一种都可在装有适当阀门和流送管的装置中的捕集器(例如室)内进行。

[0141] 除了核酸的提取和分析以外,俘获的细胞本身可直接用作该过程的产物,或者可对其进行操作以产生所需要的产物。例如,可使用装置从血液或组织中分离干细胞作为基于细胞的产物。或者,俘获的细胞可用试剂(例如生长因子、趋化因子和抗体)操作以产生所需要的基于细胞或基于分子的产物。可进行多个纯化和操作步骤以在装置内得到所需要的产物。

[0142] 应用本发明的仪器和方法的一个实例操作是自动化蛋白质纯化,特别因为在细胞培养中表达蛋白质。蛋白质纯化可手工进行。然而,本发明的仪器和方法提供节省时间和劳力的自动操作,其以低成本提供高纯度的产物。

[0143] 在一个实例中,所需要的蛋白质在生物体(例如病毒、细菌、昆虫或哺乳动物细胞)中表达。可设计表达的蛋白质,使得可将其从背景材料中选择性分离出来。这可通过加入一个或多个可选择的氨基酸标签来实现,所述氨基酸标签将一段氨基酸加到蛋白质上。标签可以是His标签、FLAG标签或其它基于表位的标签(E-标签)。将细胞(例如)引入本文所述的一个样品贮器中,其中磁性粒子和裂解试剂在相同贮器中,或者在一个或多个贮器中。磁性粒子可以用高亲和力介质(例如NTA-琼脂糖或含有镍的其它树脂)包被的磁珠。通过一种或多种上述技术(例如气动、液压或磁性混合)促进各个样品贮器之间的混合。通过裂解试剂破坏细胞后,在合适的条件下磁性粒子与裂解物中的靶蛋白结合。然后,未加工的裂解物流入磁力分离室,在此珠粒被捕集到通道表面。加入洗涤缓冲液以洗脱未加标签和未结合的蛋白质和其它细胞片段。按照不同的实施方案,可通过磁力或通过其

它方法搅拌磁力分离室,以进一步除去困在捕集粒子之间的任何未结合的蛋白质。可使用高严格性洗涤缓冲液进一步洗脱不需要的粒子。这时,以非常高选择性仅将靶蛋白和结合的磁性粒子保留在室中。可通过珠粒脱离剂将靶蛋白释放到小体积中,任选用于进一步处理。最后,可释放出磁性粒子。因为这些各种不同的操作发生在机器中的单一盒或一次性盒中,可对程序进行预先编程和自动化以节省时间和成本。可使用该配置来选择性捕集其它核酸相关产物,例如 RNA,其可如此标记,使得同样是可选择的。

[0144] 一般应用:

[0145] 正如所述,可广泛地应用本发明的鞘流装置。它们可用来俘获和分离许多不同类型的用磁性粒子加标签的靶物质。因此本发明的鞘流流体装置具有许多应用,包括例如生物流体样品制备和分析、稀有分子或细胞分离、化学文库筛选、临床实验情况下的护理点诊断 (point of care diagnostic)、环境试验或监测、消费产物和食品质量控制方面。本发明特别应用于学术、工业和临床情况中。在学术、工业和临床情况中,本发明的鞘流装置特别用于分离细胞系、蛋白质、遗传材料等,以测试、表征和进一步操作例如扩增细胞系、蛋白质、mRNA、遗传密码、分子特征蛋白质组学 (proteonomics) 等。鞘流装置和方法可通过从血样中分离 CTC 而用于疾病 (例如癌症) 的早期检测和诊断。特别在临床情况中,实施方案包括筛选潜在患者群的临床试验候选人资格和 / 或测试已招募到临床试验中的患者的生物流体有关治疗功效和 / 或治疗方案的未来进程的信息以及测定辅助治疗或新辅助治疗的功效。下面描述了更具体的实例。

[0146] 鞘流研究工具:

[0147] 本发明的鞘流装置广泛用于科学研究中,包括但不限于筛选分子文库。例如,可利用本发明的装置,通过在本发明的装置上制备纯化和分离的蛋白质,然后将蛋白质暴露于单一装置中的适体文库,来筛选适体文库。本文使用的术语“适体”意指其最大意义而言,是指与特异性靶分子和相关合成分子 (例如模拟物) 结合的寡核酸或肽分子。本发明的鞘流装置可用于生物标记 / 药物研发平台,其利用分子或细胞文库分选例如适体文库、核糖体文库、噬菌体展示、细菌肽展示、酵母展示系统等。在另一个实例中,本发明的鞘流装置可用来针对多个终点分离靶细胞,所述终点包括细胞计数、分型、扩增、分化等。

[0148] 鞘流生物 / 化学监测、合成或分析:可对本发明进行配置或调配用于多种生物或化学监测、合成或分析目的,例如化学威胁监测、核酸分析 (例如利用聚合酶链式反应扩增)、连续监测特殊情况,例如封闭环境监测、个人化基因组学和诊断、化学合成,例如病毒外壳或适于递送到生理环境中的其它纳米笼 (nanocage) 内包含的适体治疗剂 (aptameric therapeutics) 的合成,或者其它化学合成。对于家庭用途,例如在监测游泳池或饮用水质量方面,可包括 pH 指示物、金属指示物或其它水质量指示物。可对本发明的装置进行配置或调配用于生产过程控制,例如生物制药生产过程中的生物反应器监测,或者用于食品工业。可对本发明的装置进行调配或配置用于流体控制和分析、气体控制和分析。例如,通过针对连续流调配本发明装置,可监测分选细胞的速率。可对本发明的装置进行配置用于生产质量控制,例如用于供应链监测。因为本发明的鞘流仪器可以高选择性俘获流体样品中的靶物质,所以在例如在治疗背景下,必须以高纯度从具有十分复杂的物质混合物的流体生物样品中分离出靶物质时,这就表示优于许多常规系统的强大优势。

[0149] 配置:

[0150] 预充装“芯片试剂盒 (Kit on a Chip)”：因为易于制备和使用，所以考虑本发明的一个方面是预装用于特定目的的试剂的鞘流装置。例如，装置可预装用于生物样品制备的试剂。可对这个“芯片试剂盒”鞘流装置方面进行调配用于多种如上所述的应用。

[0151] 例如，这类“芯片试剂盒”实施方案可包括各种试剂，并可调配用于多个领域，例如生物流体样品制备和分析、稀有分子或细胞分离、化学文库筛选、临床实验情况下的护理点诊断、环境试验或监测、消费产物和食品质量控制方面。本发明包括一个或多个适于这类用途的预充装装置。配置是非限制性的，但应与相关仪器和方法一起加以考虑。

[0152] 可将试剂置于鞘流装置内以易于使用，例如以预定量在贮器中。例如，可通过培养如此表达所需要的蛋白质的细胞，来获得基本纯化的蛋白质制备物。主题贮器可如此调配以培养细胞，并具有在受控条件下与合适试剂呈流体连通的出入口。试剂包括用于溶解细胞、洗涤细胞和除去与某一部分选择性结合的珠粒的缓冲液。其它试剂包括选择性结合分子，例如抗体、适体和选择性（虽然不必是特异性）结合靶分子的其它分子。另外的试剂包括允许俘获选定分子的不同部分，例如磁珠、声学珠粒 (acoustic bead) 和提供该功能的其它珠粒。试剂还包括核酸，例如适于从复杂混合物中选出特定核酸的引物。例如，本发明的装置可用来筛选基因组 DNA，并在装置本身内使用聚合酶链式反应扩增所选出的序列。

[0153] 集成系统：芯片试剂盒配置可单独存在、为包括本发明的鞘流装置的集成系统的组成部分或用作所述集成系统。可将其它处理模块或室加在本发明仪器的鞘流组件的“上游”或“下游”。例如，可制备合适的表达后修饰流体回路，例如给贮器供应例如用于衍生化和或其它反应的所需要的聚合物或其它物质。在一个具体实例中，使本发明的鞘流装置配置用于从培养中的细胞表达蛋白质的流体回路和任选用于衍生化如此表达的蛋白质的其它模块，例如其中可使主题蛋白质衍生化的聚乙二醇化模块。

[0154] 可与流体学装置中的磁捕集分选仪集成的操作模块的实例包括 (a) 其它富集模块，例如荧光激活细胞分选仪和洗涤模块，(b) 反应模块，例如样品扩增（例如 PCR）模块、限制性内切酶反应模块、核酸测序模块、靶标记模块、染色质免疫沉淀反应模块、交联模块、甚至细胞培养模块，(c) 检测模块，例如核酸、抗体或其它高特异性结合剂的微阵列及荧光分子识别模块，和 (d) 溶解模块，用于溶解细胞、破坏病毒蛋白质外壳或以其它方式释放小的生命系统的组分。这些模块的每一种都可在磁性分选仪之前或之后提供。在单一流体学系统中，可能有多个相同或不同类型的与磁性分选仪整合的操作模块。此外，一个或多个磁性分选仪可与多个其它操作模块平行或串联排列。这些操作模块中的一些可设计或配置成捕集器，其中样品中的靶物质保持静止或一般限于特定体积中。操作模块的特征取决于所需要的反应类型，可包括热管理系统、微型混合器、催化剂结构和传感系统。热管理系统可包括加热器、温度传感器和微型热交换器。可将所有这些组件整合以精确控制温度。这类温度控制在例如使用 PCR 用于 DNA 扩增时是决定性的。

[0155] 从上述模块实例中应显而易见的是，可在集成流体学装置模块中对靶物质和 / 或非靶物质进行的操作包括分选、与磁性粒子偶联（本文有时亦称“标记”）、结合、洗涤、捕集、扩增、除去不需要的物质、沉淀、裂解、稀释、连接、测序、合成、标记（例如使细胞染色）、交联、培养、检测、成像、定量、溶解等。可对本发明的装置进行配置以在同一装置中进行多种功能之一。

[0156] 可在集成鞘流流体装置的磁选模块中进行的生物化学操作的实例包括质粒、适

体、蛋白质和肽的合成和 / 或筛选 ; 评价酶活 ; 以及使蛋白质和糖衍生化。还可进行多种生物化学试验和电生理学测定, 包括 : (1) 基因组分析 (测序、杂交)、PCR 和 / 或 DNA 和 RNA 寡聚体的其它检测和扩增方案 ; (2) 基因表达 ; (3) 酶活测定 ; (4) 受体结合测定 ; 及 (5) ELISA 测定。可以多种方式进行前述测定, 例如 : 均质方式、基于珠粒的方式和表面结合方式。此外, 可使用本文所述装置进行使用特定酶或催化剂的生物分子的连续产生以及生物分子或在生物系统中有活性的分子 (例如治疗药) 的产生和递送。还可采用本文所述鞘流装置进行肽、蛋白质及 DNA 和 RNA 寡聚体的重组合成, 正如在宏观流体体积中常规进行的一样。

[0157] 特殊应用 :

[0158] 细胞捕集和操作 : 如上所述, 当配置或调配以培养、纯化或分离多种生物材料的组分或者分析多种生物材料时, 本发明的鞘流装置的开发特别有用。在具体方面, 可对本发明的装置进行配置或调配用于细胞溶解、基于珠粒的置换测定、灌注、过滤、样品制备、趋化作用、全血分离和各种其它过程。

[0159] 从复杂的生物样品中分离特定的细胞类型特别有用。例如, 生物样品可含有一种或多种干细胞、细菌、人细胞、生物膜材料、哺乳动物细胞、酵母、藻类、原发性肿瘤细胞、永生化细胞系、组织或器官培养物、单细胞或多细胞生物体、霉菌和可从样品 (例如培养物) 中分离的其它生物体。按照惯例, 从这些复杂混合物中分离细胞类型是劳动密集型的, 并且常由于低产量、低纯度、因过度操作造成的分离细胞无存活力等而不成功。正如所提及的, 本发明的鞘流装置不仅仅可具有调配用于细胞分选的流体回路, 而且还可分离不同的细胞类型, 所述细胞随后可扩繁或分化用于表征、治疗等。本发明的鞘流仪器允许分离后处理例如异地和 / 或原位扩繁和分化。

[0160] 例如, 通过用携带对靶细胞有选择性的结合剂 (例如抗体或化学活性基团) 的磁性粒子给细胞加标签来分离靶细胞类型。将样品暴露于磁性粒子中, 因此靶细胞通过结合磁性粒子的选择性结合剂与磁性粒子选择性结合。其中本发明的鞘流装置有特别应用的两种示例性细胞类型是干细胞和循环肿瘤细胞 (CTC)。有关干细胞和 CTC 的鞘流装置和方法应用的更详尽描述如下。

[0161] 干细胞 : 医学研究人员认为, 干细胞治疗具有改变人类疾病局面和减轻疾患的潜力。干细胞自我更新和产生新干细胞群的倾向, 提供了修复和 / 或置换 (通过分化成靶细胞群) 机体患病和受损组织而又无排斥和副作用风险的巨大潜力。医学研究人员预期使用成体干细胞和胚胎干细胞技术治疗癌症、代谢障碍、心力衰竭、肌肉损伤和神经障碍。干细胞治疗具有前景的更具体的病症为脑损伤、癌症、脊髓损伤、心脏损伤、造血作用、秃发、缺齿、失聪、失明和视力减退、肌萎缩性侧索硬化、移植物抗宿主病、克罗恩病 (Crohn's disease)、神经和动作出生缺陷 (neural and behavioral birth defect)、糖尿病、矫形障碍 (orthopedic disorder)、伤口愈合和不育症。参见 : The Leading Edge of Stem Cell Therapeutics (干细胞治疗学的最前缘), Singec I. 等, Annu. Rev. Med. 58 : 313-328, 2007。

[0162] 干细胞研究和 / 或治疗的一个关键是分离高纯度的有活力的干细胞。如上所述, 本发明的鞘流仪器和方法允许用户从例如血液、骨髓、脐带或其它来源中选择和分离特定的干细胞, 并任选对分离细胞进行进一步操作, 例如原位和 / 或异地培养通过鞘流装置分离的细胞。

[0163] 因此, 本发明的一个具体方面是配置用于从生物样品中分离干细胞的鞘流装置和

方法。这类选择性结合分子可与多种用于鞘流装置内选择的合适载体连接,例如磁泳珠粒、声学珠粒或能够俘获如此选择的分子(和细胞)的其它部分。在一个实施方案中,鞘流装置使用携带对于干细胞有选择性的部分的磁性粒子,所述部分为例如 CD34⁺ 选择性结合分子。在一个具体的实施方案中,磁性粒子用来通过与靶干细胞结合并且在被装置中的缓冲鞘流包绕的样品流中移动时,从样品流中经由鞘流选择性拉出或偏离出至收集网格,来捕集和分离干细胞。

[0164] 可对分离干细胞在收集网格上或收集网格以外进行表征和/或操作。正如所提及的,本发明的鞘流装置可具有其它分离后用于扩增干细胞群和/或分化干细胞的模块或特征。例如可根据结合部分和局部环境,在从用于捕集细胞的磁性粒子中分离出来之前或之后进行分离后修饰。正如本领域普通技术人员所理解的一样,这类分离后模块或特征可具有用于干细胞生长的生物反应器的其它特征,例如培养基、氧气、温度、培养基更换等。

[0165] 在一个具体实例中,可对本发明的鞘流装置进行配置用于从血液中分选合适的干细胞,并进一步培养用于扩繁的干细胞。可任选包括选择培养基、生长因子和预装到本发明的鞘流装置中的其它材料。例如,可使用造血干细胞选择性试剂,例如抗体或适体。这类试剂可与例如 CD34⁺ 干细胞选择性结合。在一个实例中,然后,与 CD34⁺ 细胞结合和未结合的磁性粒子保持原位,洗去其它材料。加入珠粒释放试剂(例如市售试剂),使结合细胞释放。在珠粒被磁力俘获的同时,可在流体上清液中分离出干细胞。其它类型的干细胞可包括胚胎干细胞、胎儿干细胞、羊膜(amneonic)干细胞、成体干细胞或诱导多能干细胞。

[0166] 如上所述,可使用分离细胞(本实例中为干细胞),从自鞘流装置的液体样品分离的干细胞得到基于细胞的产物。基于细胞的产物可包括扩繁细胞群、分化细胞和从细胞分子组分的分析中得到的产物,例如遗传编码信息、RNA、DNA、致癌信息等。在干细胞的情况下,本发明的鞘流装置的模块可用来原位培养干细胞、扩繁和/或分化干细胞群,或者将其取出用于在不同的装置中扩繁和/或分化。可使用扩繁的干细胞群给患者注射在例如肿瘤或组织损伤部位,例如神经或肌肉组织。干细胞也可修复组织或有助于修复组织。在肿瘤学中,可使用干细胞协助破坏肿瘤。另外,一般认为癌症干细胞(CSC)是因化学治疗在破坏肿瘤生长的同时对杀死CSC不起作用而引起癌生长复发的成分。可使用本发明的鞘流装置分离、表征和操作CSC,正像本文所述的其它干细胞一样。

[0167] 本发明的鞘流装置还可用于组织再生。例如如果鞘流装置用于如上所述的干细胞扩繁,则可使用试剂使分离的干细胞分化成不同类型的组织相关细胞——基于细胞的产物的另一个实例。本发明的这类鞘流装置可配置有对于离体生长组织生物相容性的支架和合适的试剂。在一个实施方案中,对鞘流装置进行配置,以最初在鞘流装置中分离和原位生长的细胞为基础培养肝或其它器官组织用于移植。因为可对本发明的装置进行配置用于干细胞选择和原位扩繁,所以可对装置作进一步配置成包括预充装试剂用于各种应用,包括干细胞分化成所需要的靶标组织。鞘流装置本身可由生物相容性材料制备,使得可将干细胞长成的组织(或支架上的细胞群)直接加到或植入患者中。在另一个实例中,可对本发明的鞘流装置进行配置以分离干细胞,并产生适于角膜移植的角膜组织。

[0168] 循环肿瘤细胞:大部分癌症死亡由肿瘤细胞在全身组织中通过造血系统转移扩散和增殖引起。有活力的肿瘤衍生上皮细胞、循环肿瘤细胞或CTC已在癌症患者的外周血中鉴定出来,并且可能是难治性转移疾病起因(参见:Nagrath, S. 等, Isolation of Rare

Circulating Tumour Cells in Cancer Patients by Microchip Technology(通过微芯片技术分离癌症患者中的稀有循环肿瘤细胞), Nature, 第 450 卷 :20/27, 1235-1240, 2007)。因此, CTC 的研究与早期转移扩散的生物学极其相关, 并为患有明显转移的患者提供有力的诊断来源(参见: Pantel, K. 等, Detection, Clinical Relevance and Specific Biological Properties of Disseminating Tumour Cells(扩散性肿瘤细胞的检测、临床相关性和特殊生物性质), Nature Reviews, 第 8 卷 :329-40, 2008)。此外, 癌症患者血液中的 CTC 的分子分析为监测疗程期间肿瘤基因型的改变提供了可能性(参见: Detection of Mutations in EGFR in Circulating Lung-Cancer Cells(循环肺癌细胞中 EGFR 突变的检测), Maheswaran, S. 等, N Engl J Med, 359 :366-77, 2008)。因此, 利用例如来自单次抽血的液体样品, 作为用于检测、表征和监测非血液学癌症的肿瘤组织源, 提供了优于侵入性活体检查的巨大优势。

[0169] CTC 研究和 / 或治疗的一个关键是分离高纯度的 CTC。本发明的鞘流仪允许用户从液体样品(例如来自抽血)中选择和分离 CTC, 而不需要对实体肿瘤进行活组织检查。使用本发明的仪器和方法, 可以例如自患者血液选出用于分析的特定的循环肿瘤细胞, 所述患者正进行诊断和 / 或监测细胞增殖病症(例如癌症)。使用本发明的鞘流装置的护理点诊断是早期和准确诊断例如癌症类型和 / 或进展的有力工具。此外, 现有癌症患者可获益于其系统中例如根据简单抽血的 CTC 的快速周转分析, 用于制订目前和未来的治疗方案以及测定辅助治疗(例如消除肿瘤生长的手术)的功效。

[0170] 因此, 本发明的一个方面是监测以及适当时调整患者的治疗方案的方法, 所述方法包括: (a) 从进行第一治疗方案的患者中获取包含肿瘤细胞的样品; (b) 通过分离方法从样品中分离肿瘤细胞, 所述分离方法包括: (i) 用对肿瘤细胞有特异性亲和力的磁性粒子标记样品, 从而产生标记样品, (ii) 使标记样品通过包括分选区的流体装置, 所述分选区具有有效使标记样品中的磁性粒子偏离和 / 或捕集标记样品中的磁性粒子的磁场梯度, 从而从样品中分离出肿瘤细胞, 其中样品在缓冲溶液鞘中流动以减少样品与流体装置的非特异性结合; 和 (c) 对在 (b) 中自样品分离的肿瘤细胞进行表征, 以为患者提出未来治疗和 / 或评价现有治疗的功效。在一个实施方案中, 样品是取自患者的流体样品。在一个具体的实施方案中, 样品是血样。在另一个实施方案中, 肿瘤细胞是 CTC。在一个实施方案中, 第一治疗方案是化学治疗方案, 而在一个更具体的实施方案中, 未来治疗是不同的化学治疗方案。在一个实施方案中, 肿瘤细胞的表征是计数, 在另一个实施方案中, 肿瘤细胞的表征是分子表征。在一个更具体的实施方案中, 分子表征是肿瘤细胞的遗传突变。

[0171] 在一个实施方案中, 为患者提出未来治疗包括预测第一治疗方案的未来有效性。在另一个实施方案中, 为患者提出未来治疗包括鉴定第二治疗方案, 其不同于第一治疗方案并考虑患者之前未观察到的肿瘤细胞的特征。在另一个实施方案中, 所述方法还包括: (d) 在患者进行第二治疗方案后, 从患者中获取包含肿瘤细胞的样品; 和 (e) 此后对在 (d) 中获取的样品和肿瘤细胞进行 (b) 和 (c) (与之前的段落相同)。

[0172] 因此, 采用本发明的方法和仪器, 临床医师可以例如针对适于临床试验的候选者筛选潜在患者群。这样, 可引导患者, 例如具有表明对预定治疗方案难起反应的致癌编码 (oncogenic coding) 的 CTC 患者, 转向其它可行的治疗。或者, 在某些情况下, 用特殊的新的治疗方案具体对准难治性患者。在另一个实例中, 分析患者的 CTC 的计数和 / 或其分子成

分,并根据这种信息确定现行治疗是否有效、是否应继续、或者是否应考虑另一种治疗或其它治疗。在另一个实施方案中,通过计数和 / 或其它表征对患者的 CTC 进行分析,以评价辅助治疗是否有效。在一个具体实例中,患者的 CTC 计数表明辅助治疗是成功的,目前不需要进一步治疗。在另一个具体实例中,患者的 CTC 计数表明辅助治疗是成功的,但是根据与之前患者的 CTC 表征相比 CTC 发生突变,另一种治疗是必需的。在另一个实例中,患者的 CTC 计数表明辅助治疗是不成功的,另一种辅助治疗是必需的。

[0173] 实施方案:

[0174] 按照本文的描述,一个实施方案是流体分离装置,其包括:(a) 至少一个样品入口通道,其被配置成在流体分离装置中提供样品流;(b) 至少一个鞘流入口通道,其被配置成提供一个或多个液流,该液流在流体分离装置内形成环绕样品流的鞘,从而减少样品组分与装置的非特异性结合;(c) 分选站,其与样品和鞘流入口呈流体连接,并沿着样品流路径定位;和(d) 磁场梯度发生器,用于与外磁场相互作用以在分选站中产生磁场梯度变化,从而使磁性粒子从样品流偏离和 / 或捕集样品流中的磁性粒子。在一个实施方案中,磁性粒子被分选站捕集。

[0175] 在一个实施方案中,分选站具有大致矩形的内部空间,用于束缚流经分选站的流体;内部空间具有横截于样品流的流动方向的第一和第二横向尺寸,第二横向尺寸为第一横向尺寸的至少约 2 倍;并将所述至少一个鞘流入口通道配置成提供沿第一横向尺寸被样品流彼此分隔开的两个鞘流。在另一个实施方案中,分选站具有大致矩形的内部空间,用于束缚流经分选站的流体;内部空间部分被以不大于约 2 毫米距离分隔开的两个基本平行和基本平坦的表面限定,并将所述至少一个鞘流入口通道配置成提供与两个平行的平坦表面呈接触流动并被样品流彼此分隔开的两个鞘流。在一个实施方案中,两个基本平行和基本平坦的表面以不大于约 1 毫米的距离分隔开。在一个实施方案中,所述至少一个鞘流入口通道包括第一鞘流入口通道,其包括位于分选站上游且以基本平行于内部空间的两个基本平坦表面定向的基本平坦表面。

[0176] 在一个实施方案中,流体分离装置还包括第二鞘流入口通道,其包括其自身的位于分选站上游且以基本平行于内部空间的两个基本平坦表面定向的基本平坦表面。在一个实施方案中,所述至少一个样品入口通道包括其自身的以基本平行于内部空间的两个基本平坦表面定向的基本平坦表面。

[0177] 在一个实施方案中,磁场梯度发生器包括在接近分选站的分选装置上经图案化的大量铁磁元件。在另一个实施方案中,磁场梯度发生器包括接近大量铁磁元件的永磁体。在又一个实施方案中,大量铁磁元件被布置在分选站的流体通路内,以供铁磁元件和样品流之间的流体接触。铁磁元件可包括微图案化镍元件。在一个实施方案中,对磁场梯度发生器进行配置以暂时俘获磁性粒子,然后释放磁性粒子。

[0178] 另一个实施方案是俘获样品中的靶物质的方法,所述方法包括:(a) 向流体分选装置的至少第一入口通道提供样品,其中样品包括对靶物质具有特异性亲和力的磁性粒子;(b) 向流体分选装置提供鞘流,以产生一个或多个鞘流,所述鞘流在流体分离装置内形成环绕样品流的鞘,从而减少样品与装置的非特异性结合;(c) 使磁场梯度发生器磁化以捕集至少一些磁性粒子,从而从样品中分离捕集的磁性粒子;和(d) 分析与捕集的磁性粒子结合或已结合的靶物质。在一个实施方案中,磁场梯度发生器包括大量铁磁元件。铁磁

元件可包括流体装置中的微图案化铁磁材料。在一个实施方案中,使磁场梯度发生器磁化包括自永磁体或电磁体向磁场梯度发生器施加外磁场。

[0179] 所述方法还可包括以下的任何组合:1) 检测与捕集磁性粒子结合的纯化的靶物质,2) 在流体分选装置中扩增靶物质的核酸,3) 在流体分选装置中溶解细胞,其中至少一些细胞包含靶物质,4) 从流体分选装置中的细胞或病毒中分离遗传材料,其中至少一些细胞或病毒包含靶物质,和5) 回收纯化的靶物质,包括样品中至少50%的靶物质。

[0180] 另一个实施方案是纯化样品中的靶物质(包括对靶物质具有亲和力的磁性粒子)的方法,所述方法包括:(a) 使样品流入具有磁场梯度发生器的流体分选装置,从而俘获至少一些磁性粒子,其中流动的样品包含在或夹在基本不含样品的液体鞘之间;(b) 除去或降低施加至磁场发生器的磁场,从而释放俘获的磁性粒子;和(c) 在磁场发生器下游收集或处理具有至少一些磁性粒子的纯化的靶物质。

[0181] 另一个实施方案是鞘流装置,其包括:(a) 鞘流平面区上游的第一层流建立表面;(b) 平行于鞘流平面区并在样品鞘流平面区上游的样品层流建立表面;和任选(c) 第二鞘流平面区上游的第二层流建立表面。在一个实施方案中,鞘流装置还包括粒子捕集站。该捕集站可以是例如磁捕集站。本文所述的鞘流装置可以是较大流体回路的组成部分。

[0182] 另一个实施方案是鞘流装置,其包括:(a) 鞘流平面上游的第一层流建立表面;(b) 平行于鞘流平面区并在样品鞘流平面区上游的样品层流建立表面;和(c) 第二鞘流平面区上游的第二层流建立表面。在一个实施方案中,(a) (b) 和(c) 中的层流建立表面足以保持独立的鞘流平面基本无湍流。在一个实施方案中,子部件(b) 的样品层流建立平面具有顶部和底部表面,且子部件(c) 的第二层流表面位于与用于样品层流的表面相对表面上。鞘流装置可与水平线基本正交地定向。鞘流装置还可包括粒子捕集站。在一个实施方案中,粒子捕集站包括铁磁成分。可对鞘流装置进行调配用于磁泳粒子分离。

[0183] 本文所述的鞘流装置可以:还包括至少一个装有试剂的贮器,经调配用于从全血中分离干细胞和/或经配置用于微流体操作。在一个实施方案中,鞘流装置包括装有试剂的贮器,所述试剂包括缓冲剂、大量磁珠、干细胞扩繁剂(expansion agent)、适体、包含蛋白质的组合物、细菌细胞培养物和包含噬菌体群的组合物中的至少一种。

[0184] 另一个实施方案是在鞘流装置中自流体样品分离靶物质的方法,包括:(a) 使用与选择性结合靶物质的磁性粒子结合的试剂,用磁性粒子预先标记流体样品中的靶物质;(b) 沿着鞘流装置的平坦表面建立层流缓冲液流;(c) 在邻接层流缓冲液流处建立流体样品层流;(d) 使来自流体样品层流的靶物质穿过层流缓冲液流;和(e) 在磁捕集站上捕集靶物质。在一个实施方案中,层流高度约为几微米,宽度约几毫米。缓冲液和样品层流由于其沿长度和宽度尺寸的面积一致而邻接,也就是说,它们在高度尺寸上堆积。当采用这类方法分离靶物质时,增加通过量的一种方式是通过增加层流的宽度,同时保持流动的高度为微米(亚毫米)状态。这可通过运行多个平行鞘流装置和/或通过增加鞘装置中的层流宽度来实现。在一个实施方案中,所述方法还包括在建立流体样品层流前,建立邻接第一层流缓冲液流的第二层流缓冲液流,其中流体样品的层流建立在第一和第二层流缓冲液流之间。在一个实施方案中,第一和第二缓冲液层流及流体样品层流足以保持独立的流动平面基本无湍流。在另一个实施方案中,磁捕集站包含铁磁成分。在一个实施方案中,靶物质包括细胞、细菌、病毒、蛋白质和核酸中的至少一种。在一个实施方案中,靶物质是循环肿瘤细胞,流体

样品是全血。

[0185] 另一个实施方案是分析患者的方法,所述方法包括:(a) 从患者中获取包含肿瘤细胞的样品;(b) 通过分离方法从样品中分离肿瘤细胞,所述分离方法包括:(i) 用对肿瘤细胞有特异性亲和力的磁性粒子标记样品,从而产生标记样品,(ii) 使标记样品通过包括分选区的流体装置,所述分选区具有有效使标记样品中的磁性粒子偏离和/或捕集标记样品中的磁性粒子的磁场梯度,从而从样品中分离出肿瘤细胞,其中样品在缓冲溶液鞘中流动以减少样品与流体装置的非特异性结合;和(c) 对在(b)中自样品分离的肿瘤细胞进行表征。在一个实施方案中,(c)中的表征提供用于诊断病况、针对临床试验进行筛选、评价治疗性治疗的有效性和测定手术有效性的信息。在另一个实施方案中,样品是取自患者的流体样品。在一个实施方案中,样品不取自患者的活组织检查,例如样品是血样。在一个实施方案中,肿瘤细胞是来自非血液学癌症的循环肿瘤细胞。在另一个实施方案中,表征是肿瘤细胞的计数和/或肿瘤细胞的分子表征。分子表征是例如肿瘤细胞的遗传突变。

[0186] 另一个实施方案是监测和适当时调整患者的治疗方案的方法,所述方法包括:(a) 从进行第一治疗方案的患者中获取包含肿瘤细胞的样品;(b) 通过分离方法从样品中分离肿瘤细胞,所述分离方法包括:(i) 用对肿瘤细胞有特异性亲和力的磁性粒子标记样品,从而产生标记样品,(ii) 使标记样品通过包括分选区的流体装置,所述分选区具有有效使标记样品中的磁性粒子偏离和/或捕集标记样品中的磁性粒子的磁场梯度,从而从样品中分离出肿瘤细胞,其中样品在缓冲溶液鞘中流动以减少样品与流体装置的非特异性结合;和(c) 对在(b)中自样品中分离的肿瘤细胞进行表征,以为患者提出未来治疗。在一个实施方案中,第一治疗方案是化学治疗方案。在一个实施方案中,未来治疗是不同的化学治疗方案。在一个实施方案中,为患者提出未来治疗包括预测第一治疗方案的未来有效性,在另一个实施方案中,为患者提出未来治疗包括鉴定第二治疗方案,其不同于第一治疗方案并考虑患者之前未观察到的肿瘤细胞的特征。

[0187] 监测和适当时调整患者的治疗方案的方法还可包括:(d) 在患者进行第二治疗方案后,从患者中获取包含肿瘤细胞的样品;和(e) 此后对在(d)中取得的样品和肿瘤细胞进行(b)和(c)。

[0188] 另一个实施方案是提供基于细胞的产物的方法,所述方法包括:(a) 获取包括靶细胞的样品;(b) 通过分离方法从样品中分离出靶细胞,所述分离方法包括:(i) 用对靶细胞具有特异性亲和力的磁性粒子标记靶细胞,从而在样品中产生标记细胞群,(ii) 使样品通过包括具有磁场梯度的分选区的流体装置,所述磁场梯度有效使至少部分的标记细胞群从样品中偏离和/或从样品中捕集至少部分的标记细胞群,从而从样品中分离出靶细胞,其中样品在缓冲溶液鞘中流动以减少样品与流体装置的非特异性结合;和(c) 从在(b)中自样品分离的靶细胞得到基于细胞的产物。在一个实施方案中,所述方法还包括对在(b)中自样品分离出的靶细胞进行处理以产生基于细胞的产物。在一个实施方案中,靶细胞是干细胞,处理靶细胞包括处理干细胞以成为有效的治疗药。在一个实施方案中,处理干细胞以成为有效的治疗药包括使干细胞分化以产生更特化的细胞类型。如同本文描述的其它方法一样,样品可以是取自患者的流体样品,例如血样。

[0189] 在一个实施方案中,所述方法还包括对在(b)中自样品分离出的靶细胞进行表征。表征可以是靶细胞的计数和/或靶细胞的分子表征。在一个实施方案中,分子表征是

靶细胞的遗传序列。

实施例：

[0190] 下面提供工作实施例和预测性实施例。实施例 1 表示从复杂的血样中磁泳分选稀有细胞的本发明的装置。实施例 2 描述了本发明的芯片试剂盒实施方案。实施例 3-7 描述了其中生物制剂或化学物质是样品流体的组成部分的实施方案。实施例 8 和 9 描述了其中本发明的装置用于监测（例如分别监测环境进程和生物药物制备）的实施方案。实施例 10 描述了使用本发明的装置用于护理点诊断。实施例 11 表示人脐带血样品中造血祖细胞（HPC）的相对富集。

[0191] 实施例 1：从全血中分离稀有细胞以及与无鞘流的装置的比较

[0192] 本工作实施例表明本发明的鞘流装置建立了基本上阻止非靶血细胞与磁泳捕集站非特异性结合的流体层。

[0193] 我们的实验表明，基于磁力的微流体分离在 10^6 个 MNC（单核细胞）和全血中富集了极稀有的靶细胞，其被称为多流微磁性分离器（Multi-stream Micro Magnetic Separator, M-MMS 或 MMS）。

[0194] 使用图 6A 所示和图 6B 所拍摄的装置。图 6A 是说明本发明的 MMS 装置 600 的鞘流组件的一个实施方案的分解透视图。为了说明装置的各个组件在彼此对齐时如何产生鞘流而将图分解。在本实施例中，有 7 块板，即 615、620、625、630、635、640 和 645，每个配置有出入口和 / 或通道，被配置成在对齐并将缓冲液和样品流引入装置时产生鞘流。

[0195] 样品入口 601，是引入液体样品的地方，如表示样品流路的虚线箭头 602 所指出。样品流经板 620 和 625 上的类似口，并流经板 630 上的通道尾部后，流经板 635 顶面（如图示）上的冲击区（striking area）606（样品层流建立表面）。为方便起见，对齐时，样品流箭头 602 表示为好像液流被冲击区 606 转向，因此建立了方向平行于板 630 并处于板 630 的腔室中的层流。类似地，缓冲液出入口 604 是引入缓冲液的地方，如表示一个缓冲液流路的虚线箭头 603 所指出。缓冲液流经板 620 的通道的类似尾部后，流经板 625 顶面（如图示）上的冲击区 605（缓冲液层流建立表面）。为方便起见，缓冲液流箭头 603 表示为好像液流被冲击区 605 转向，因此建立起方向平行于板 625 并处于板 625 的腔室中的层流。亦类似地，另一个缓冲液入口 608 是引入缓冲液的地方，如表示另一缓冲液流路的虚线箭头 609 所指出。缓冲液流经板 640 的通道的类似尾部后，流经板 635 底部表面（如图示）的冲击区 607（缓冲液层流建立表面）。为方便起见，缓冲液流箭头 609 表示为好像液流被冲击区 607 转向，因此建立于方向平行于板 635 并处于板 635 的腔室中的层流。

[0196] 箭头 611 表示共同的废料流路，因为液流 602、603 和 609 在板 620、625、630、635 和 640 的通道的远端形成汇合（当对齐时），并通过出口 610 排出装置，正如虚线箭头 611 所表示的一样。

[0197] 参照图 6B，在通道顶面使镍网格薄层图案化（例如，如有关图 2A 和图 2B 中所述；见图 6B 如灰色阴影中的网格图案）。对镍网格进行配置以在外磁体存在时产生强磁场梯度，从而允许俘获磁珠标记的靶分析物。未标记的背景细胞不受磁场梯度影响，作为废料持续洗脱出来。由于最初仅纯的鞘流接触顶面，仅磁捕集的靶分析物将被捕集到顶面，其中与表面的非特异性结合最小，产生极高纯度的样品。图 6B 表示样品入口配件 650（例如

leurlock)、分别为 655 和 660 的上部和下部缓冲液入口配件,以及废料出口配件 665。这些配件允许例如通过注射器引入样品,而将缓冲液通过专用管路持续泵入装置 600 中。废料例如通过专用废料管路移入中央贮器中。可通过简单地断开管路关上装置,并与新装置重新连接。

[0198] 图 6C 表示装置 600 一部分(左上四分之一)的横截面 A。图 6C 的下图即放大的横截面,表示样品流路和缓冲液流路、它们如何彼此邻接而建立、以及如何防止样品流触到鞘流装置 600 的顶部和底部内表面。在横截面的最右部分表示层流样品流上面和下面的层流缓冲液流鞘(虚线箭头表示顶部缓冲液、样品和底部缓冲液各自的流动方向)。

[0199] 图 7A 是表示类似鞘流装置 700 的组件的分解透视图。鞘流装置 700 具有层 705、710、715、720、725、730 和 735,其在如图所示的成叠彼此邻接对齐时形成装置 700。装置 700 不同于装置 600,因为装置 700 在顶板 705 上具有全部入口(下部缓冲液入口 740、上部缓冲液入口 745 和样品入口 755)和出口(废料出口 750)(回想起装置 600 在底板上具有下部缓冲液入口)。这允许方便处理,因为装置 700 可在操作期间放置在平坦表面上。在本实施例中,顶板 705 为具有镍捕集网格的玻璃,层 710、720 和 730 为粘结层(adhesive layer),例如厚约 0.2mm,层 715 和 725 为聚碳酸酯,例如厚约 0.125mm,而层 735 为玻璃。图 7B 是装配的图 7A 中描述的鞘流装置 700 的透视图。

[0200] 对本发明的鞘流装置进行配置,使得利用 50% (w/w) 蔗糖将底部流体层与血液的粘度和密度相匹配。

[0201] 首先通过以同样的流速,在用于比较的有和没有鞘流的芯片中,注入全血(在缺乏磁性粒子时),来证实鞘流功效。如图 4(左图)所示,无鞘流时,RBC 和其它细胞与表面非特异性粘附。图 4(右图)中,鞘流装置证实了功效,因为表面基本不含非靶细胞。

[0202] 为了量化 M-MMS 回收和寻回稀有细胞的能力,将 MCF-7 乳腺癌细胞用市售的纳米尺寸的磁性粒子(抗 PE 磁性粒子,BD Biosciences)预先标记。将预先标记的 MCF-7 肿瘤细胞以 50 个细胞/ml、30 个细胞/ml 或 10 个细胞/ml 加入全血中。结果见图 5A 和图 5B。平均纯度为 69%、58%和 20%(分别对于 50、30 和 10 个细胞/ml (5A))。这为初始样品的约 1×10^7 倍富集。平均细胞回收率为 86%、94%和 92%(分别对于 50、30 和 10 个细胞/ml (5B))。

[0203] 使用原位标记,得到靶细胞约 90%的回收率。细胞纯度约为 13%,这是初始样品的 2×10^6 倍富集。据推测,这不如预先标记分选一样有效,因为与原位磁性标记相关的效率低所致。

[0204] 因此,本发明提供流体鞘流装置,包括与层流平面中的样品流体层邻接和平行的平面中的层流鞘流的第一流体层,和任选与层流平面中的样品流体的第二侧邻接的层流鞘流的第二流体层,其中首先在固相支持体上建立鞘流。

[0205] 实施例 2:“芯片试剂盒”

[0206] 这是一项预测性实施例。按照预先确定的流体回路,制造本发明的鞘流装置。采用流体分配自动化仪器用所需要的流体预装入选定的贮器中来制造装置。将贮器密封,其中预充装贮器的一部分具有这样的密封,其将随预定拉力而破裂,使得流体与不同贮器呈流体连通。有若干种针对特殊目的预充装的贮器,而且流体回路允许流体在施加合适的力(例如气动力)时流向预定区域。因此,通过离开贮器和进入本发明的装置的流体实现本发

明的鞘流,例如参见图 1 和图 2,其是预先确定的流体回路的组成部分。在一个实例中,自动化仪器以预定的时间模式配合装置的流体回路用气动活塞加力以产生鞘流。

[0207] 实施例 3:生物标记检测

[0208] 这是一项预测性实施例。将本发明的鞘流装置与流体回路一起配置用于分选自个体获取的生物流体中的生物标记。生物标记的存在表明特定的疾病状态。生物标记选自细胞、蛋白质、核酸或上述任一种的降解产物。疾病状态选自癌症、神经系统疾病和感染。癌症生物标记选自循环肿瘤细胞、蛋白质和核酸。神经系统疾病生物标记选自细胞、蛋白质,包括但不限于 α -syn 蛋白或其片段或寡聚体,或选自以下的神经系统疾病的其它生物标记:阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease)、亨廷顿舞蹈病 (Huntington's disease)、肌萎缩性侧索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis) (“ALS”或 Lou Gehrig 病)、痴呆、多发性硬化和由朊病毒引起的疾病。感染的生物标记选自感染原和二级病原体或有害作用的可检测标记,包括但不限于病毒、细菌、真菌、朊病毒和任何其它类型的感染原。病毒可以是 HIV 病毒、肝炎病毒 (任何类型)、流感病毒 (任何类型)、任何类型的乳头瘤病毒 (HPV)、狂犬病病毒或任何其它病毒感染原。生物标记可以是如此列举的生物体或感染原的部分。例如,生物标记可以是与病毒外壳有关的蛋白质。

[0209] 实施例 4:适体筛选

[0210] 这是一项预测性实施例。将本发明的鞘流装置与流体回路一起配置以使用适体检测流体样品中的稀有分子。适体任选与可检测标记缔合。将适体在使之与其靶标结合的条件下暴露于流体悬液中。在位于本发明的鞘流装置中的贮器内的捕集站中俘获适体和靶标。用使用不足以从捕集站洗出适体 / 靶标的气动力 (或其它力) 施加的流体 (例如缓冲液) 洗去非靶材料。可采用这项预测性实施例,例如检测尿液、血液或其它体液中的物质。例如,可检测尿液中的痕量可卡因或其它非法吸食的药剂。参见例如 Swensen, J. S. 等, Continuous, real-time monitoring of cocaine in undiluted blood serum via a microfluidic, electrochemical aptamer-based sensor (通过微流体电化学的基于适体的传感器连续实时监测未稀释血清中的可卡因). J. Am. Chem. Soc. doi:10.1021/ja806531z, 通过引用结合到本文中用于所有目的。

[0211] 实施例 5:测试体液中的分析物

[0212] 这是一项预测性实施例。对本发明的鞘流装置进行配置用于流体回路,使得可监测个体 (例如人或动物) 的非法或合法药物的存在情况或剂量。可对本发明的装置进行配置以检测或监测医学处方剂量、药代动力学、身体性能或脑性能的提高、非法 (脱氧麻黄碱、可卡因、大麻 (大麻素)) 或内分泌相关物质,例如葡萄糖 (胰岛素)。例如,对本发明的鞘流装置进行配置以提供用适于检测体液 (例如血液或尿液) 中的药物或药物降解或下游代谢物质的试剂预充装的贮器 (或室)。对鞘流装置进行配置,使得将血液 (例如) 样品分配至贮器中,然后,用合适的试剂预充装的贮器随着施力 (例如手动拉伸压力) 可被打开。试剂当与体液如此混合时,提供是否给予患者适当的剂量的可视检测。

[0213] 实施例 6:包括适体在内的化学文库筛选

[0214] 这是一项预测性实施例。将本发明的鞘流装置与流体回路一起配置以针对特殊目的筛选化学物质文库。例如,可针对蛋白质靶标筛选适体文库,例如通过使用噬菌体展示筛选。可对适体 / 蛋白质复合物进行分析以鉴定如此结合的适体和任何结合特征,可再次对

富集的适体进行文库筛选。这可以重复过程进行,以选择具有特殊特征的适体部分,例如与例如蛋白质部分的特定表位的结合亲和力或与蛋白质部分的特定表位结合。本实施例的鞘流装置可具有贮存和任选培养预定蛋白质的噬菌体展示群的贮器,以及入口或用待如此筛选的主题适体文库预充装的室。或者,可具有贮存适体文库的贮器,所需蛋白质(或用于选择的其它基质)分配在其中。用施加于贮器以混合适体文库和蛋白质(或其它来源)的力可有助于结合反应。

[0215] 实施例 7 :基因组筛选 ;DNA 分析

[0216] 这是一项预测性实施例。将本发明的鞘流装置与微流体回路一起配置并用于核酸分选。或将 DNA 样品置于装置内,或将含有 DNA 的细胞置于装置内,所述装置与贮器和通道呈流体流通以递送适于与特定 DNA 序列结合(和如需要或必需时任选溶解细胞以暴露内部 DNA)的试剂。例如,使用 DNA 引物与特定的相应 DNA 序列结合。将引物加入装有主题 DNA(例如基因组或法医样品)的贮器中。将洗液加入室中以洗去未结合的部分。然后,使引物/DNA 暴露于数轮的聚合酶链式反应中,包括加入试剂。试剂是使用施加拉伸强度的自动化仪器适当混合的。

[0217] 实施例 8 :环境监测

[0218] 本实施例是一项预测性实施例。将本发明的鞘流装置与合适的材料和流体回路一起配置用于环境监测或分析。虽然环境流体样品处理与生物流体(见上文)的水性流体处理非常相像,但针对野外使用的改动包括坚固材料(例如被制备成承受极端温度、阳光、盐分或其它环境条件),以及在缺乏可靠电力时使用。例如,房主可能希望监测饮用水,但是在一段时间内在受试者中收集饮用水并分析一次。或者,本发明的鞘流装置可用来监测微生物物种指示物用于石油和天然气钻井,其中已知某些物种与含有石油或天然气的特殊地质构造有关。因此,本领域的普通技术人员选出能够在这些条件下承受样品施用的材料。还可对本发明的鞘流装置进行进一步配置,使得手动(手工工具或手提工具)施加的压力足以供流体在鞘流流路中流动。饮用水或环境水(例如盐水源或淡水源)、土壤(例如土壤整治)、PCB 或超级基金场(superfund site)清理监测、环境放射监测、种群恢复(例如藻类或磷虾)或其它生态学目的以及居住环境监测(例如水、空气或土壤样品监测或分析,包括饮用水或游泳池用水)。可以使用装有选择性结合重金属(例如水银、铅、铁,甚至金或银(用于探测))的适体(例如或其它选择性结合分子)的预充装装置。可以监测环境毒素(例如砷)、过多的药物环境污染、MBE 或其它有机溶剂。海洋区域(例如大陆架区域)酸化的检测可用例如包含酸化指示物(例如比色条)进行。

[0219] 实施例 9 :监测生物药物制备

[0220] 这是一项预测性实施例。本发明的鞘流装置可用于生物制品的制备中,以在生物过程期间监测。例如,可在不同阶段从分离生物反应器中收集蛋白质以监测蛋白质产生批次间的变化。还可以这样的方式监测疫苗制备。可采用本发明的鞘流装置,监测各种生物制品和生物药剂用于质量保证目的。

[0221] 实施例 10 :护理点诊断

[0222] 这是一项预测性实施例。可适宜地配置本发明的鞘流装置用于各种护理点血液面板分析,其通常在临床实验室中进行。对本发明的鞘流装置进行配置,使得先将患者的血液存放在贮器中,然后,使用拉伸压力,引导血液流动从而分配到分离贮器中。然后,如此分配

到各个贮器中的血样分别暴露于用于这类临床实验室实践的部分例如染剂或染料或者抗体。备选地或另外地,可将如此分配的血液暴露于更适于预定目的的备选试剂例如肝酶、血糖、甲状腺、C 蛋白或其它血液部分。

[0223] 实施例 11:从人脐带血样品中相对富集造血祖细胞 (HPC)

[0224] 在并行基础上,将如上文实施例 1 中描述的应用鞘流和磁捕集的本发明的实例装置与市售的 MACS[®] Cell Separation Column(可获自 Miltenyi Biotec of Bergisch Gladbach, Germany) 进行比较,所述市售装置利用磁捕集用磁性粒子标记的细胞用于细胞分离,但无鞘流能力。

[0225] 先将冷冻的或 2 天之久新鲜脐带血多核细胞 (MNC) 过滤除去任何死细胞。然后,样品用 Miltenyi CD34 Microbeads(可获自 Miltenyi Biotec of Bergisch Gladbach, Germany) 标记。将标记样品分割,使一部分流经上述 Miltenyi 分离柱,使另一部分流经例如关于实施例 1 描述的本发明鞘流磁分离装置。使流经 Miltenyi 柱的样品部分再次流经另一个 Miltenyi 柱,使得可对经由 Miltenyi 系统的一次通过 (MACS 1x) 和两次通过 (MACS 2x),与经由本发明的鞘流装置 (MMS) 的单一通过进行比较。采用本领域普通技术人员了解的标准免疫荧光染色和 FACS 分析,对 3 个纯化样品的每一个进行分析。

[0226] 图 9A 和图 9B 表示对使用上述方法(分别为 MACS 1x,MACS 2x 和 MMS) 分离的 HPC 进行 FACS 分析的结果。对如上所述的 N = 6 次运行汇集数据,其中包括误差棒以表示标准差。图 9A 表示来自 MMS 分离的 HPC 纯度比 MACS 1x 好得多,可能比 MACS 2x 好,但至少与 MACS 2x 相当。这就表明 MMS 技术优于常规非鞘流装置的改进性能。图 9B 表示分别基于 MACS 1x、MACS 2x 和 MMS 每一种的 HPC 回收率。虽然 MACS 1x 显示较高的回收率,但是样品的纯度(参见图 9A) 比 MACS 2x 或 MMS 低。结果还表明,用 MMS 的回收率(和纯度)与 MACS 2x 相当,但与用 MACS 常规装置的两次洗脱相比,只要一次通过 MMS 装置便能达到同等的纯度和回收率。

[0227] 有各种各样的配置和应用,鉴于本公开内容,本领域的普通技术人员可确定这类配置和应用。本发明不受本文描述的具体实施例的限制。

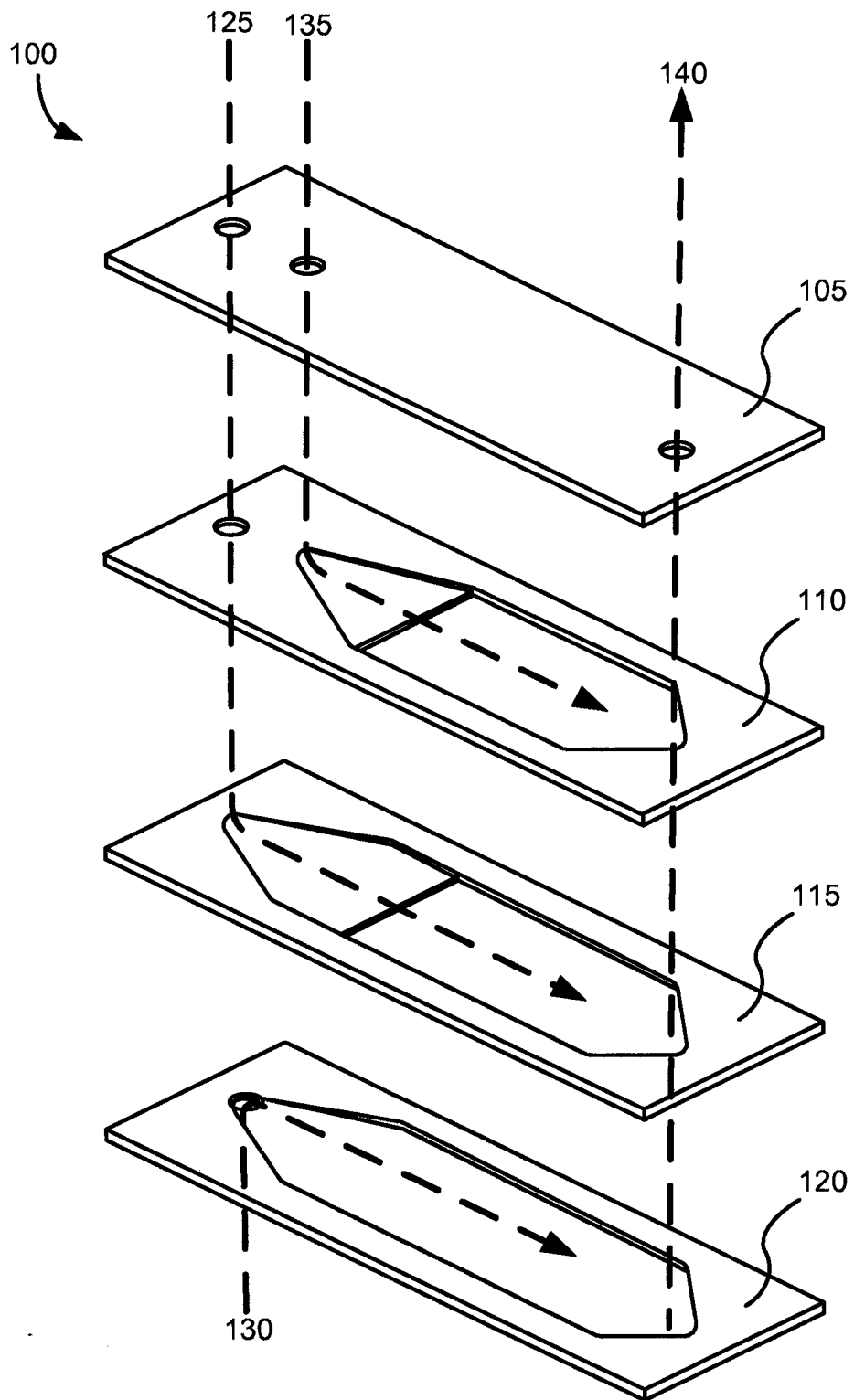


图 1

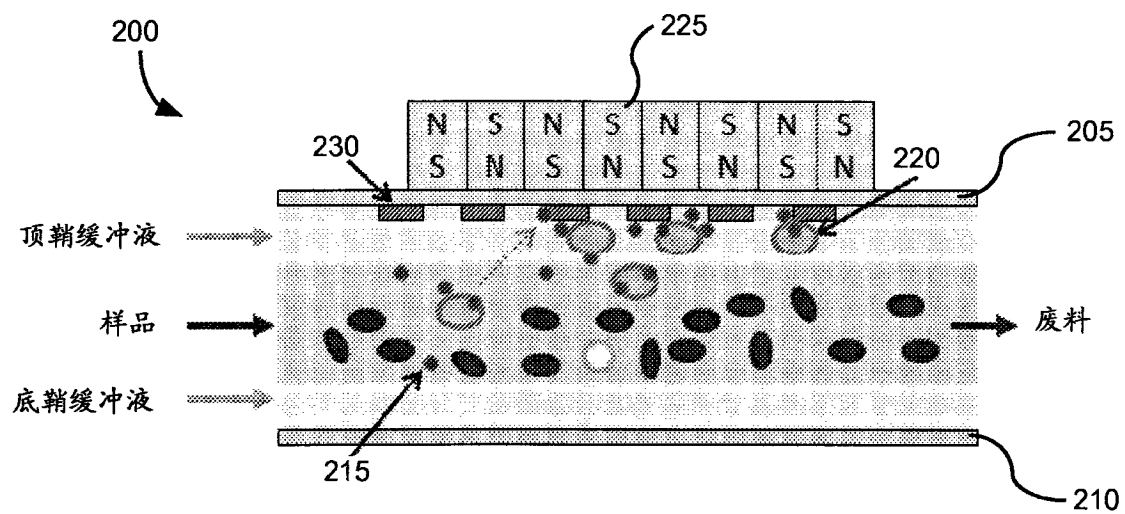


图 2A

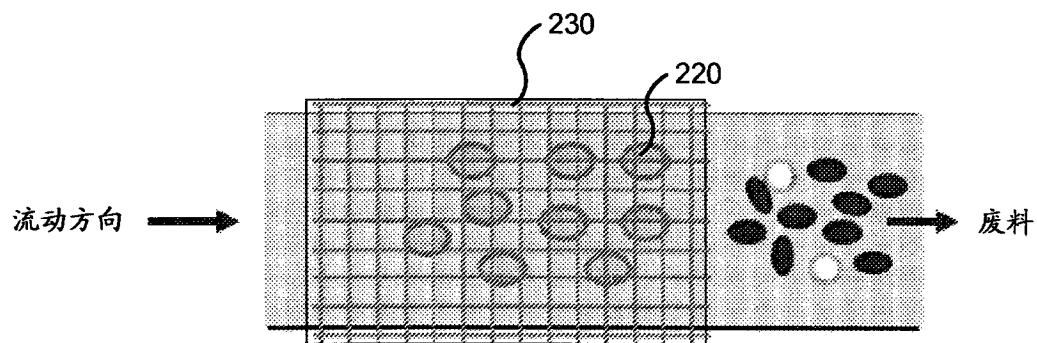


图 2B

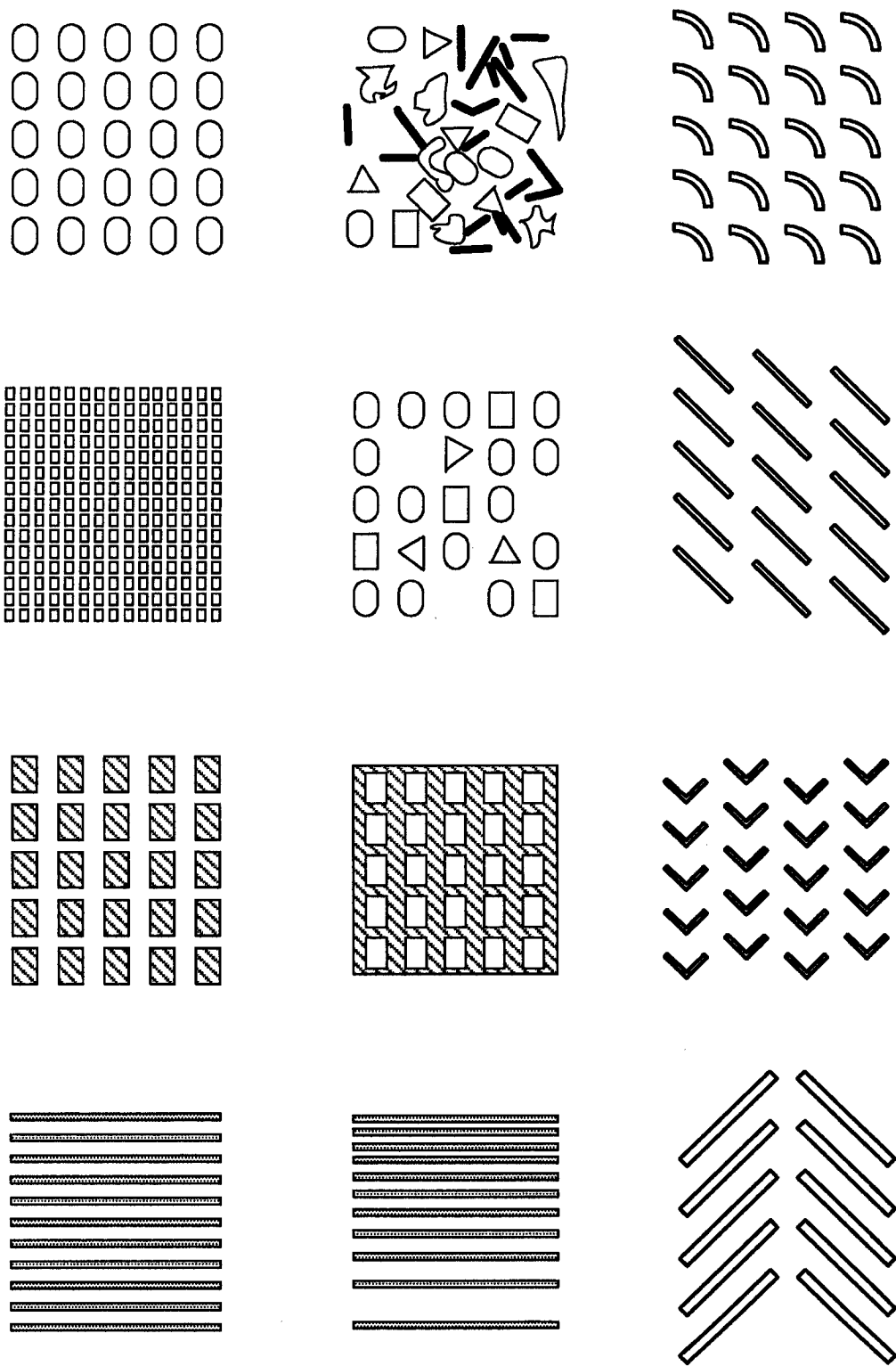


图 2C

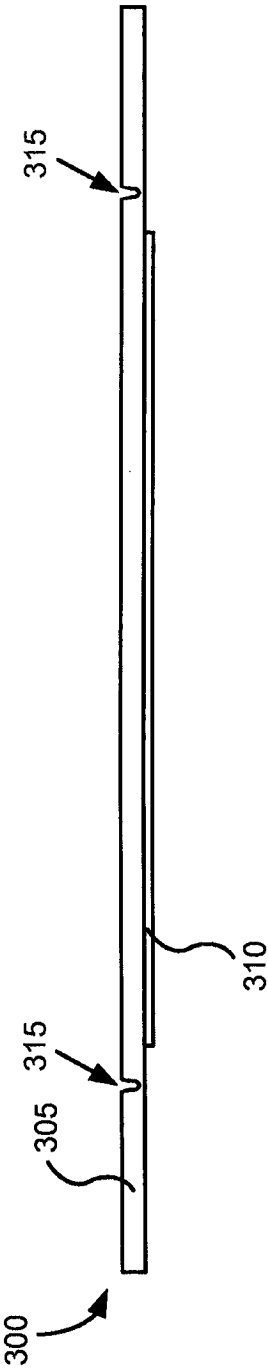


图 3A

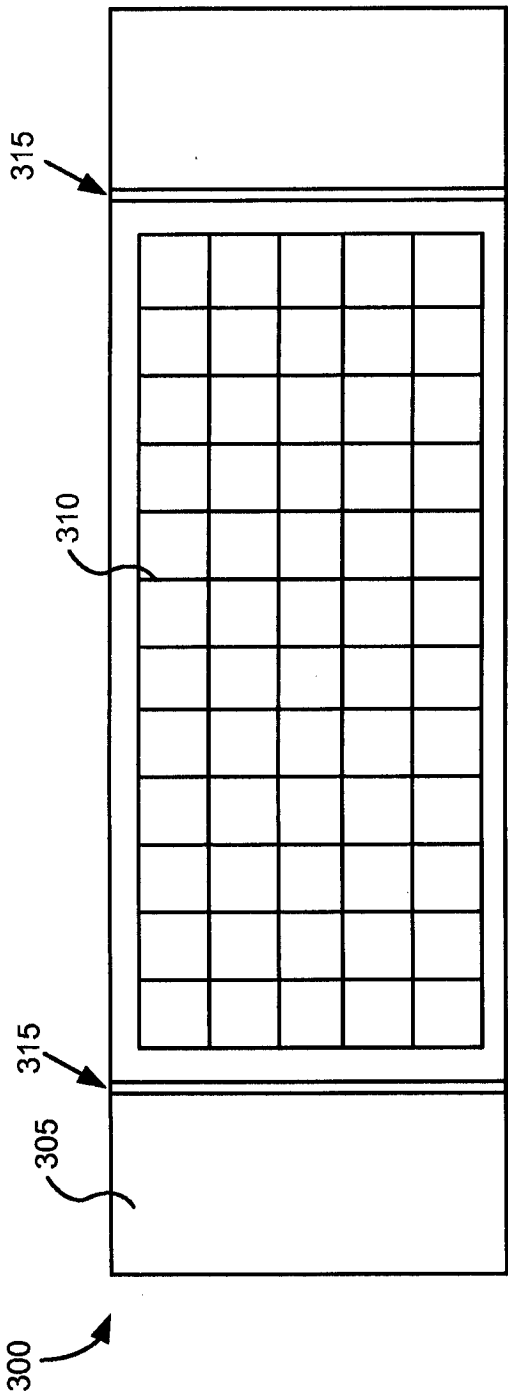


图 3B

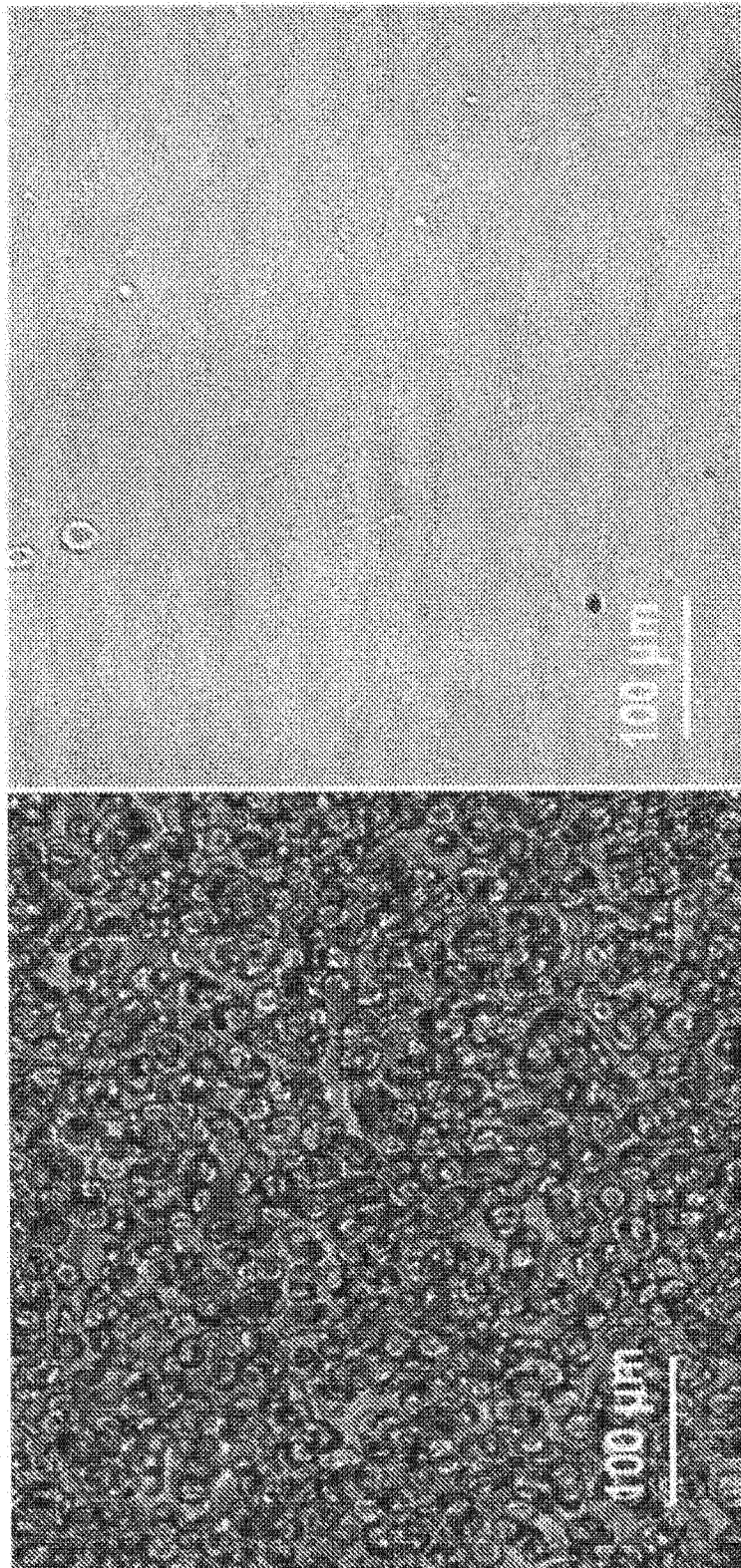


图 4

来自全血的稀有细胞纯度(%)

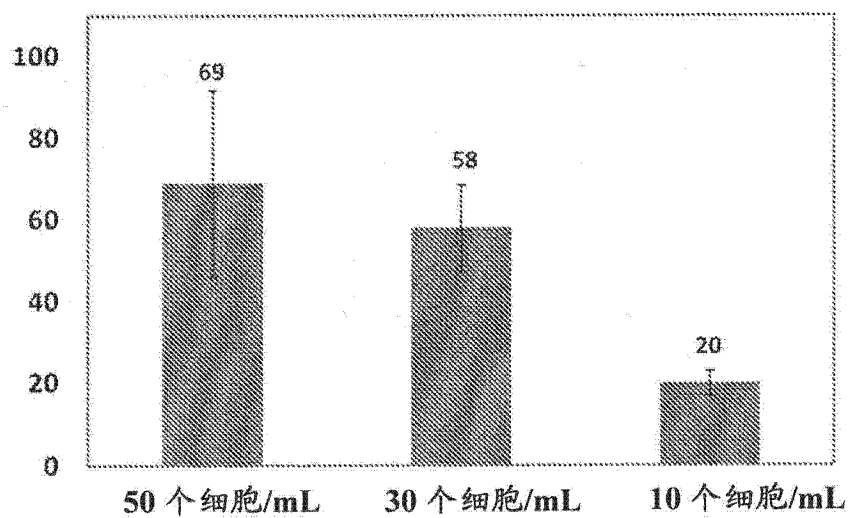


图 5A

来自全血的稀有细胞回收率(%)

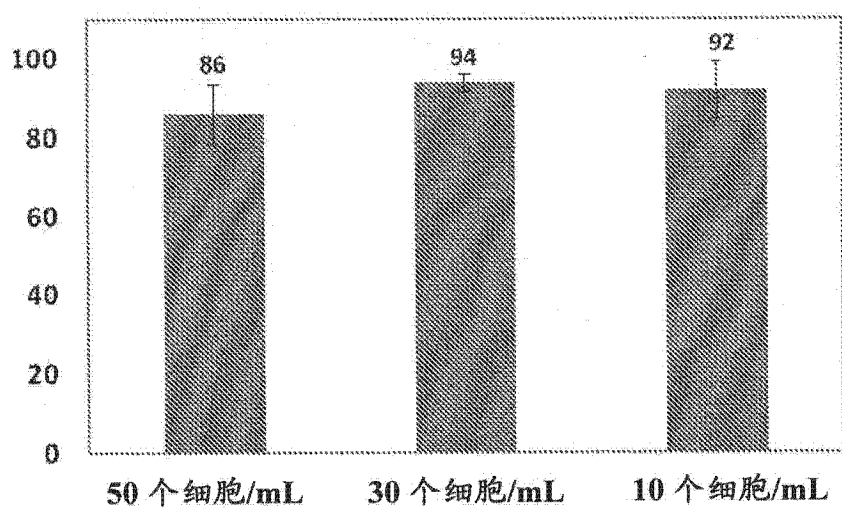


图 5B

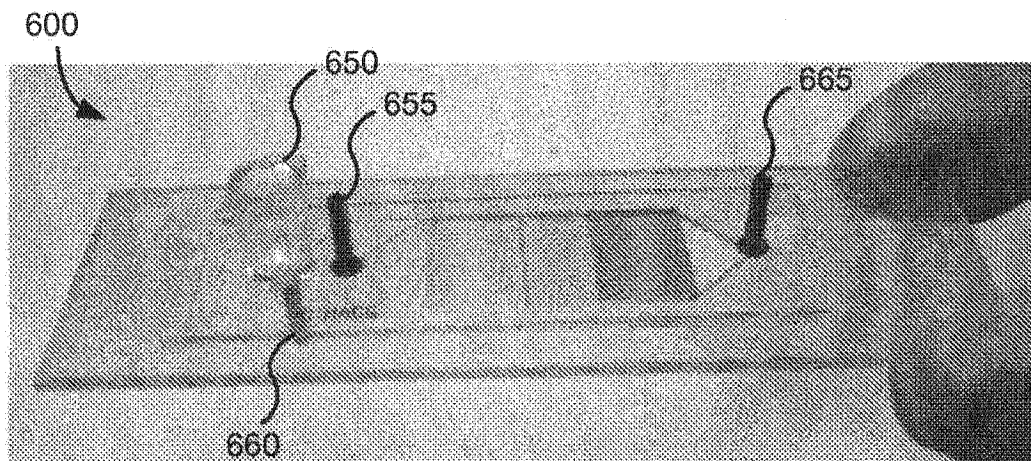


图 6B

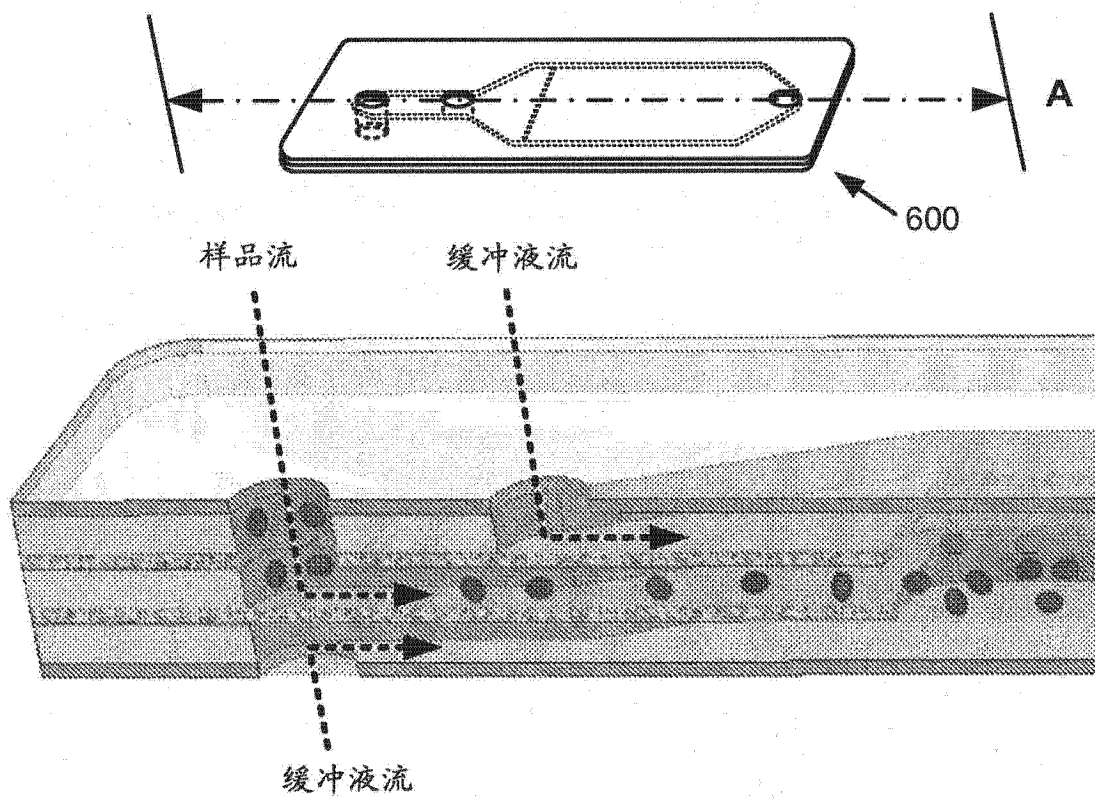


图 6C

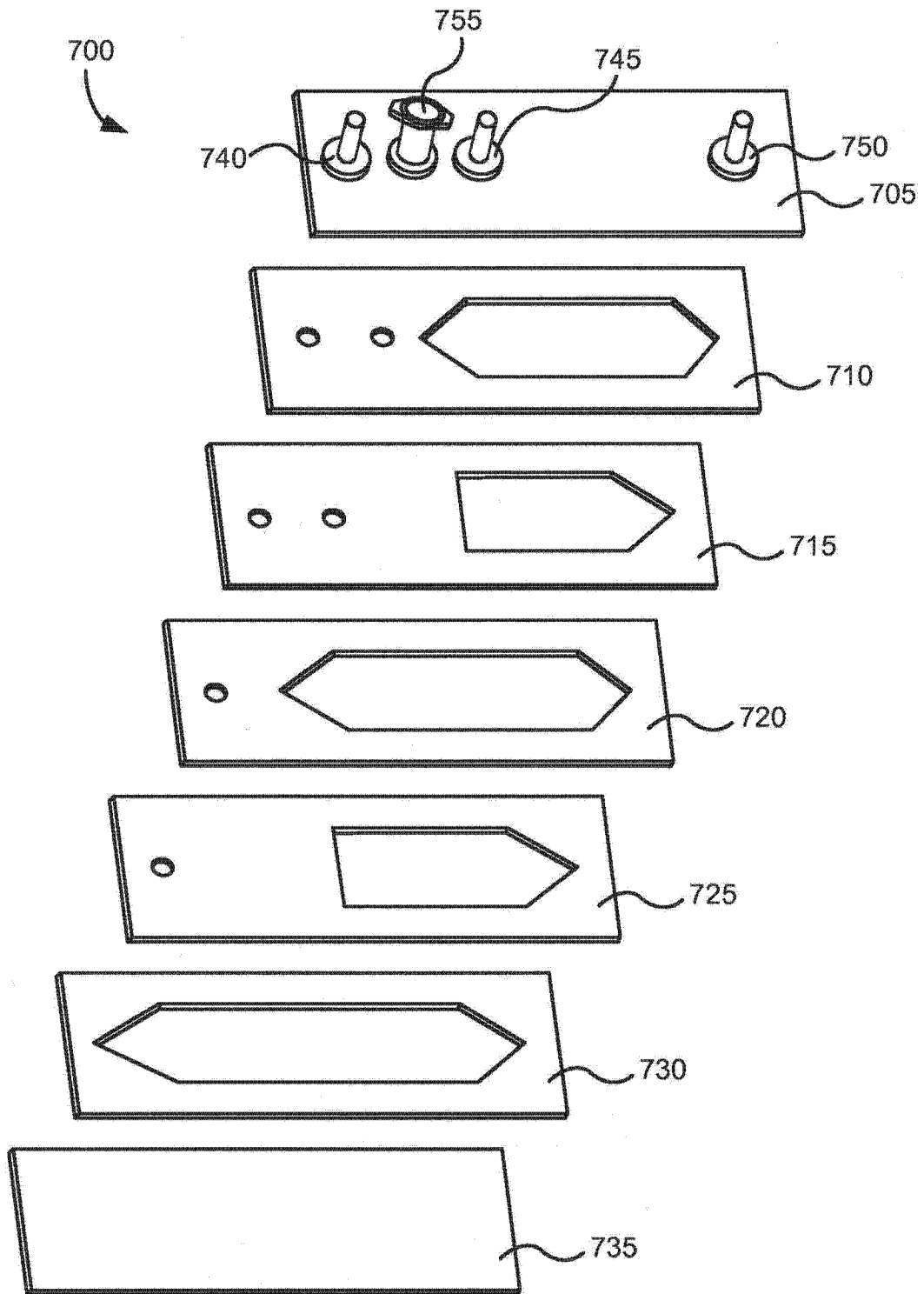


图 7A

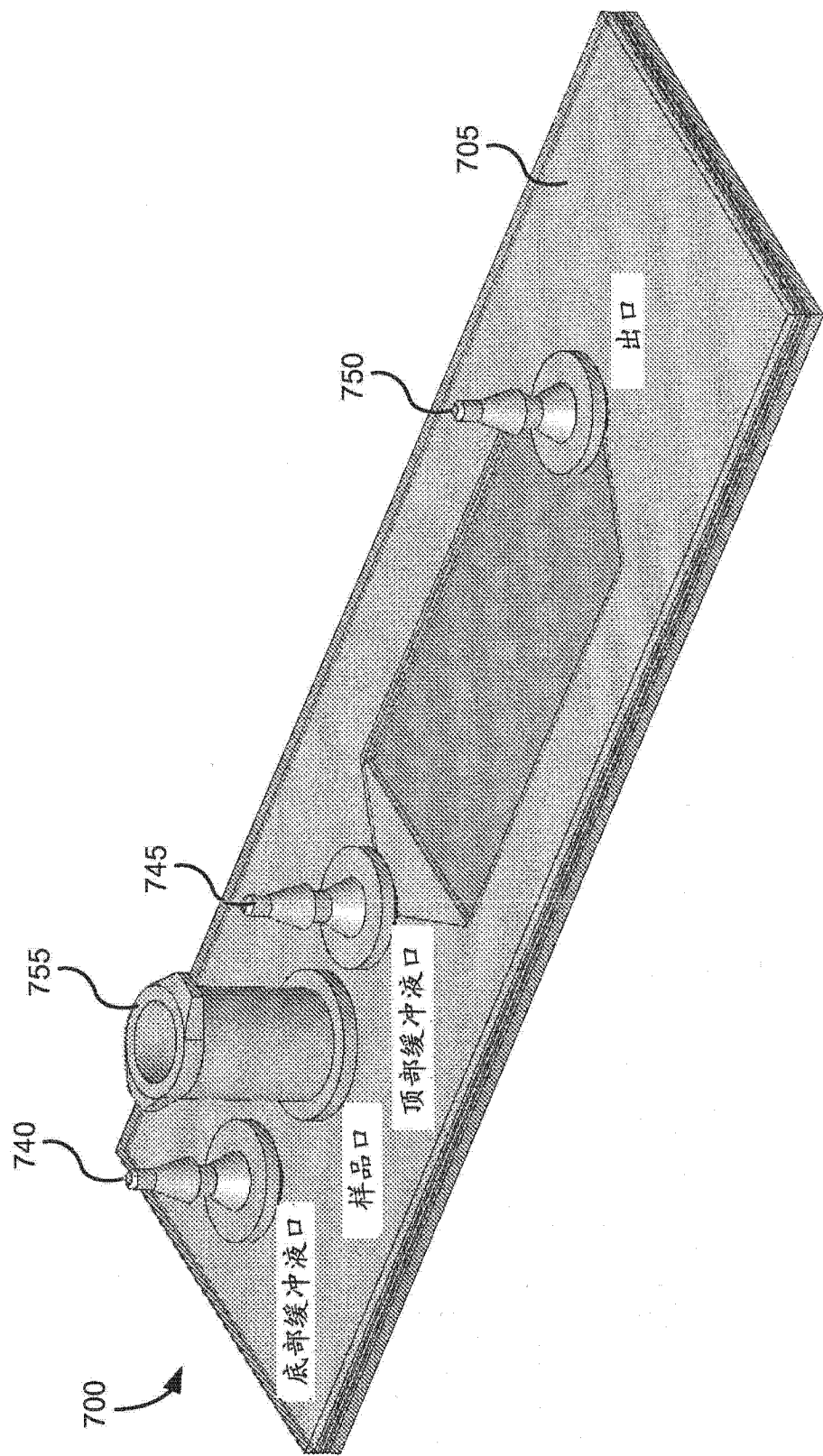


图 7B

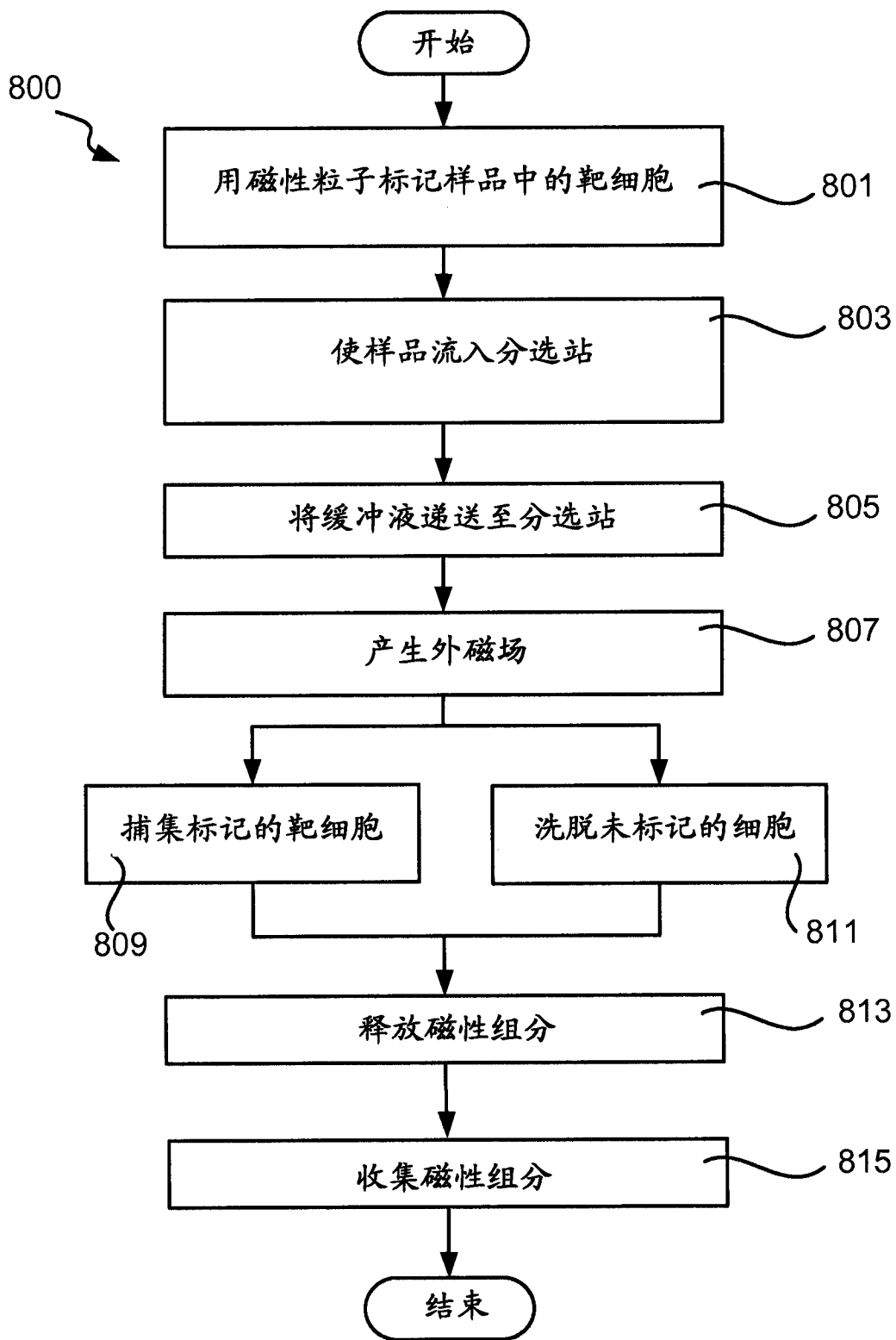


图 8

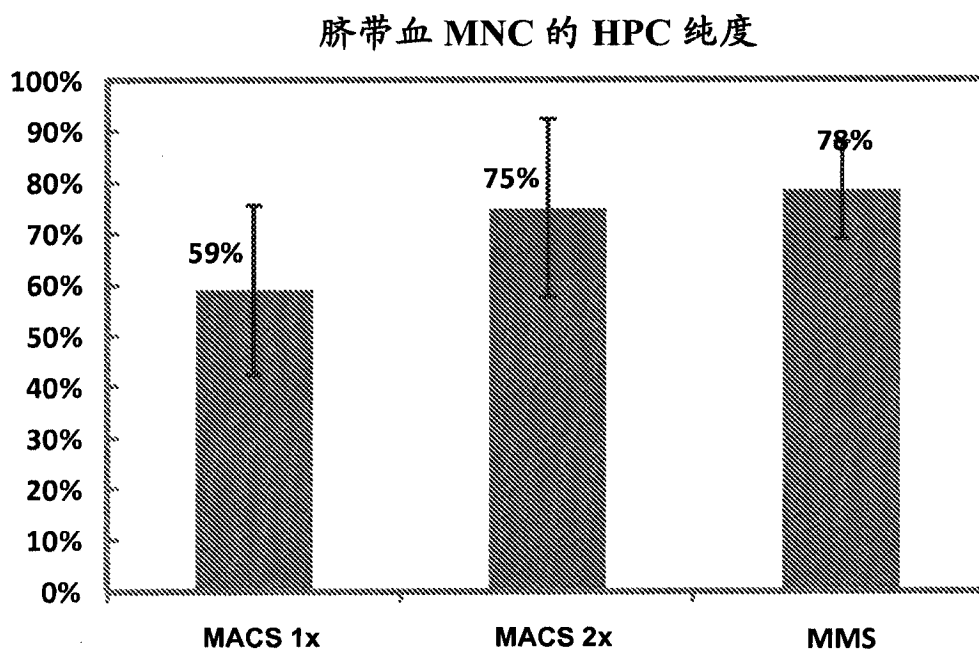


图 9A

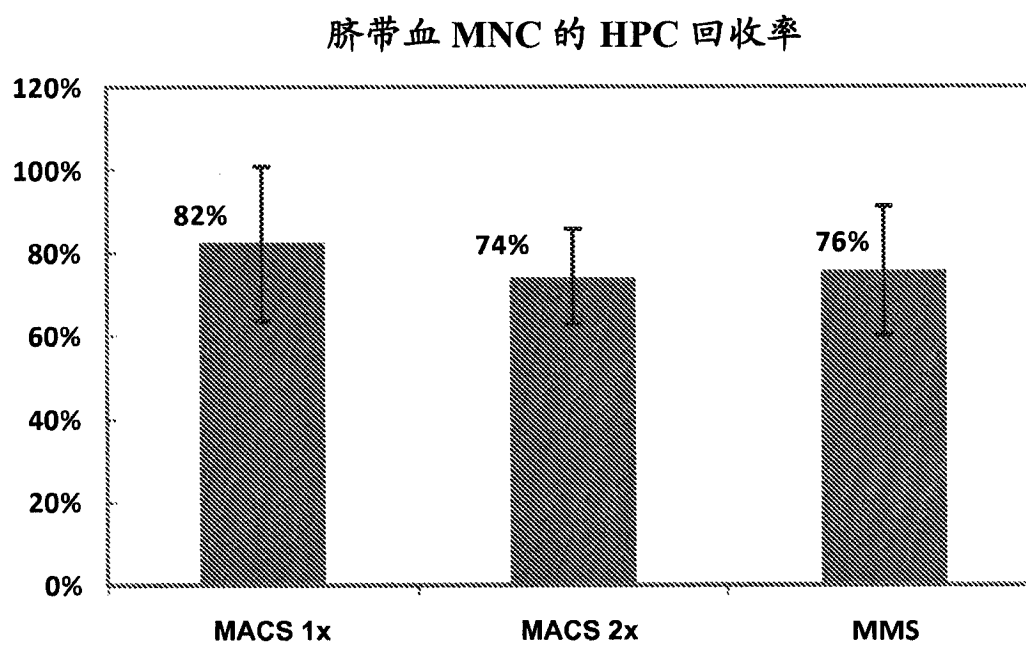


图 9B