

申請日期	91 年 2 月 7 日
案 號	91102250
類 別	G01K 35/02, 35/10

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	自動半固體基質分析及其液體處理設備
	英 文	Automated semi-solid matrix assay and liquid handler apparatus for the same
二、發明 創作人	姓 名	(1) 伊蓮·包爾斯 Powers, Elaine A.
	國 籍	(1) 美國 (1) 美國新澤西州海布里治美費悠大道一六四號 164 Fairview Avenue, High Bridge, NJ 08829, U.S.A.
三、申請人	住、居所	
	姓 名 (名稱)	(1) 艾文提斯製藥股份有限公司 Aventis Pharmaceuticals Inc.
	國 籍	(1) 美國 (1) 美國新澤西州橋水市索美塞特市政大道三〇〇號 300 Somerset Corporate Boulevard, Bridgewater, NJ 08807-2854, U.S.A.
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	(1) 蘿絲·歐勒 Oehler, Ross J.

裝

訂

線

I278625

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期：

案號：

，☐有 ☐無主張優先權

美國
英國

2001 年 2 月 16 日 60/269,645
2001 年 7 月 20 日 0117706.2

☒有主張優先權
☒有主張優先權

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (1)

發明領域

本發明有關用以自動製備含有半固體基質之多槽腔板之方法，諸如那些用於軟瓊脂分析者，及用於自動半固體基質分析之方法。本發明亦有關一種適於製備該基質之液體處理設備。

發明背景

快速、高產量分析技術導致大量之潛在相合化合物 (hit compound)，但用於確認此等相合之生物學重大性之輔助分析方法尚未自動化，而在該輔助分析層次導致一瓶頸及顯著地拖慢化合物展開。

瓊脂係一化合物類別之通用名稱，大致上定義為一由紅藻類擷取之已乾燥膠黏物質，而具有在大約攝氏 100 度溶化之特性，及在大約攝氏 40 度凝固成一膠質。瓊脂係不被大部份細菌所消化吸收及於固體培養介質之製備中係用為一膠質。於 1974 年 W.B.Saunders 公司所發行之多蘭氏 (Dorland's) 圖解醫學辭典第 25 版中，瓊脂糖 (Agarose) 係一修飾瓊脂，藉此糖、甲基、及其他化學基係以化學方式結合至瓊脂，以便增強想要之物理性質，諸如低膠質化溫度。

一軟瓊脂分析典型涉及超過一層之半固體基質。其大致上較佳的是使用二或更多層，在此每一層較佳地係由瓊脂或混合以一液體營養介質之瓊脂糖所構成。其亦較佳的是每一層通常係具大約相伯之容量。該底層典型具有一稍

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (2)

微較高之半固體基質濃度，諸如瓊脂糖，及包含於該頂層中所含除了各細胞外之每一事物。該測試化合物可在該半固體基質已經凝固之後放在該二層或任一層中，或二選一地加入各層中。

軟瓊脂分析原係開發成用以培養需要三度空間之非附著、或非黏合細胞、細胞生長之輔助分析，及原係開發用以在玻璃容器內培養骨髓及白血球細胞。一用於在骨髓中測定巨噬細胞先質數目之標準玻璃容器內實驗方法係於軟瓊脂中以生長介質生長骨髓幹細胞及以各種生長因子補充，諸如菌群刺激因子 - 1 (C S F - 1)。在一培育期之後，計數各細胞之菌群形成單位 (C F U s)。

最後，用以於半固體基質中培養非黏合細胞之技術、諸如軟瓊脂分析係應用於腫瘤細胞，如在玻璃容器內分析中預言一腫瘤細胞對在活體內作化學療法所造成之反應性。於此等研究中，腫瘤係由病人身體移除，及切成較小碎片。在腫瘤碎片進一步解離成個別細胞之後，在半固體基質內覆蓋該個別之細胞。然而，已發現只有腫瘤細胞之亞群、稱做幹細胞能夠在玻璃容器內於軟瓊脂中繁殖及菌群成形、或無性系生長。因此，此分析係稱為腫瘤幹細胞分析，或另外稱為腫瘤無性遺傳因子 (clonogenic) 分析。

如現在所使用者，在用於此軟瓊脂分析之方法論中有相當可觀之變化。譬如，最常使用之半固體基質係瓊脂及瓊脂糖，且一般係只稱為“瓊脂”。由研究者決定該“菌群”一詞，其可定義為細胞之數目或總直徑。一菌群典型

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (3)

係定義為由至少 40 或 50 個細胞所組成，雖然有時可少至 30 個細胞或更少，較小團聚體通常稱為「群簇」。一給定細胞型式達到所謂「菌群」之臨界尺寸或細胞數目所需之培育期係於各細胞型式之間有所變化，但典型需要七至十四天之間之一培育期。因此，於一給定研究中之培育期不斷變化，而假如該細胞生長緩慢，即使用較長之時期，或變化這些定義一「菌群」之細胞。假如直徑係用作該定義之標準，一「菌群」典型係定義為 50 微米。於軟瓊脂分析中之另一變異點係決定何者是一測試化合物之有效劑量，譬如百分之 50 抑制作用，百分之 70 抑制作用，或任何抑制作用。

吾人已開發出數種培養技術，用以於半固體基質中生長非黏合細胞。在玻璃容器內培養之細胞需要各種生長因子以促進生長或維持生活力。市售有極多種生長介質，諸如 Dulbecco's Modified Eagle Medium, RPM1, Ham's F12，且包含一寬廣變化之生長需求因子。除了生長介質外，很多因子係提供當作補加生長因子，諸如胎兒之腓腸血清或成纖維細胞生長因子。生長介質及補加因子可當該基質仍為液體時或在該半固體基質已經凝固之後直接加至該半固體基質，且認為可增進細胞生長及／或分裂。不幸地是吾人不知這些不同因子如何影響細胞對治療劑之敏感性 (Singletary, S.E., et al., 1985)。返回人類之腫瘤幹細胞分析。細胞無性繁殖之國際期刊 3 : 116 - 128)。市售「2X 介質」有效降低／取代很多包含條件培養基、高程

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (4)

度血清 (百分之 1 5 - 2 0) 、或超過常見之生長介質成份之補加因子在內之補加 - 原始分析設計，這是重要的，因為已顯示將該生長介質稀釋超過百分之 1 0 會減少細胞生長 (Singletary 1985，同上) 。

軟瓊脂分析通常係用作輔助分析，當作一用以評估測試化合物對腫瘤生長之效果之細胞模型系統。吾人已建立用於軟瓊脂之若干不同議定書，及包含漢堡 - 鮭魚 (Hamburger-Salmon) 、Courtenay-Mills、Courtenay-Mills附加增訂條款、軟瓊脂 (未增訂) 及軟瓊脂附加增訂條款，譬如看威斯特 (West, C.M.L) 及索色蘭 (Sutherland R.M.,) Int.J.癌症 3 7 : 8 9 7 - 9 0 3 (1 9 8 6) 。在瓊脂糖或其他型式瓊脂中混懸之腫瘤細胞能夠不附著的生長，導致形成三度空間之菌群。此菌群係視為更接近地模倣天然活體內之腫瘤形成。

二種最常使用之軟瓊脂分析技術係稱為漢堡 - 鮭魚 (或 H - S) 及該 Courtenay-Mills (或 C - M) 方法。於該 Hamburger-Salmon分析中，加富培養基係加至已將營養物加至該二層之瓊脂，而使細胞包含在該上層中。該下層由大約百分之 0 . 5 瓊脂所組成，且該上層係大約百分之 0 . 3 之瓊脂。這些培養物係平皿培養在碟子中 (每塊平皿包含一至 2 4 個槽腔) 。

另一種方法係敘述於 Courtenay-Mills，譬如看 Courtenay,V.D. 1984,之人類腫瘤敏感性測試用之可添加軟瓊脂菌群分析。於癌症研究之最新結果 9 4 : 1 7 - 3 4 中

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (5)

，其中紅血球細胞係加至該瓊脂當作該瓊脂層中之一成份，並需要約每隔 5 天添加液體介質、低氧氣環境，及使用培養管代替培養皿。1989 年 Tveit.K.M 等人於 抗癌劑研究 9 : 1577 - 1582 之 “Courtenay 軟瓊脂分析中人類卵巢癌之菌群形成能力” 中，報告人類卵巢癌細胞於該 C - M 分析中比該 H - S 方法形成更多腫瘤衍化菌群。然而，其改良部份可解釋為由於在該培養時期間補充該生長介質而使該 C - M 方法有較長培養時期之機會。

吾人已做了若干研究以比較該二培養方法之敏感性。譬如，腫瘤細胞系及由腫瘤隔離細胞之比較證明細胞對該 H - S 方法中之化學療法比該 C - M 方法具有較大敏感性，即使該 C - M 方法具有一較大之出菌率（看 1985 年 Endresen, L., 等人之化學敏感性）。藉著軟瓊脂分析所作之人類腫瘤細胞測量係受該培養條件所影響。看 1981 年 Tveit, K.M 等人之 Br.J. 癌症 51 : 843 - 852。用以在玻璃容器內分析人類腫瘤之化學敏感性二軟瓊脂方法之比較：惡性黑腫瘤。看 1986 年威斯特（West, C.M.L）及索色蘭（Sutherland R.M.,）之 Br.J. 癌症 44 : 539 - 544。人類腫瘤軟瓊脂無性遺傳因子分析之一放射生物學比較。癌症國際期刊 37 : 897 - 903）。

甲基纖維素可加至該分析以幫助獲得這些菌群，但只有在假設該細胞生長不受甲基纖維素之抑制作用生長效應之影響時（1980 年 Stanasic, T.H., 等人之人類膀胱癌用之軟瓊脂 - 甲基纖維素分析，人類腫瘤幹細胞之無性繁殖第

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明(6)

7 5 - 8 3 頁) 。當培養紅色遠祖細胞時傳統上使用甲基纖維素之添加。甲基纖維素之黏性防止細胞之聚集，但未足以使這些細胞固定在適當位置(1 9 8 4 年 Metcalf, D. 之造血菌群刺激因子。紐約 Elsevier 科學出版社) ；對比之下，甚至在百分之 0 . 3 之低百分比下之瓊脂及瓊脂糖可形成真凝膠。

吾人已檢查各種半固體基層。於淋巴瘤細胞之一項研究中，為決定菌群形成及抑制效果，吾人發現對該分析用精煉之瓊脂糖勝過瓊脂或甲基纖維素(1 9 8 5 年 Hays E.F., 等人之於半固體基質中影響淋巴瘤細胞無性系生長之條件，在玻璃容器內之細胞質及發育生物學 2 1 (5) : 2 6 6 - 2 7 0) 。瓊脂糖是一種已移去大部份大帶電分子之修飾瓊脂，其能允許以其帶電之基質分子而比瓊脂具有更好之生長因子擴散作用。

為了避開該軟瓊脂分析需要較大槽腔容積之問題，研究者已測試其他半固體基層以模倣軟瓊脂中之細胞生長。一實例是 1 9 9 5 年 Fukazawa, H., 等人於一項研究中報告一種用於轉化細胞之固定－獨立生長之定量之微量培養皿分析。解析生物化學 2 2 8 : 8 3 - 9 0 ，藉著四坐(tetrazolium) 染料還原作用或 3 H - 胸腺嘧啶核苷滲入作用評定 P o l y (H E M A) - 塗附有 9 6 個槽腔之平皿。P o l y (H E M A) 係一與軟瓊脂有著類似效果之抗黏著聚合物(只注視著細胞生長，沒有複合效應) 。

對該軟瓊脂分析之另一適應性係藉著使用滲入 D N A

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(7)

當作細胞分割線之 3 H - 胸腺嘧啶核苷作定量菌群，而取代依靠目視計數以決定菌群之數目，看 1 9 8 5 年 Unshared, G., 等人之報告。一項由大腦腫瘤自動記錄無性遺傳因子細胞之繁殖之新技術係在 短距腫瘤學 (Near-Oncology) 期刊 3 : 2 0 3 - 2 0 9 。於該特別之分析中，紅海藻抽提物 Furcellaran 係於單一層中用作該基層凝膠，而與該雙層半固體基質系統相反。以放射性物質示蹤法當作測量方法之一缺點係需要於玻璃過濾器上獲得每一管子之內含物及於一液體閃爍計數器中計數該材料之額外步驟，以及需要使用放射能。

分離之腫瘤細胞可暴露至各種實驗性處理，諸如化學療法或輻射，而可於平皿培養之前或係以該化學治療化合物於該半固體基質作平皿培養。該軟瓊脂分析可對一細胞之抗性比對其敏感性更具預言性；譬如，對抗性之預測準確性係百分之 9 6 及百分之 9 1，及對其敏感性預測為百分之 6 2 及百分之 5 9，如 1 9 8 0 年 Salmon S.E 等人“於人類腫瘤莖幹細胞分析中之藥品敏感性之臨床相互關係”，癌症研究之最新結果 7 4 : 3 0 0 - 3 0 5 及 1 9 9 0 年 Scholz, C.C., 等人“於具有固體之人類腫瘤異種皮移植之病人及無性遺傳因子分析中之藥品反應之相互關係”，Eur.J. 癌症 2 6 (8) : 9 0 1 - 9 0 5 所報告者。其他研究者及我們已觀察到細胞在三度空間結構中之生長係比生長為一單層結構之相同腫瘤細胞對化學療法更具抗性（看 1 9 9 9 年 O'Connor, K.C. 之“前列腺細胞之三度空間培養

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (8)

：用以開發新穎抗癌療法之組織模型”，醫藥研究 1 6 (4) : 4 8 6 - 4 9 3) 。然而，在三度空間結構中生長之細胞偶而可對一化合物更敏感，如由 Hedlund 於 1 9 9 9 年所示。之“人類攝護腺癌細胞系之三度空間球面培養”，攝護腺 4 1 : 1 5 4 - 1 6 5 、並具有於球面中以 1 , 2 5 (O H) ₂ D ₃ 處理之 P C - 3 細胞。諸如這些研究之結果證明生長為單層結構之細胞係極度不同於那些在三度空間結構中生長者，且因此一單層結構中之細胞係極度不同於一腫瘤內之細胞。

除了抗癌化合物效果之檢查外，在玻璃容器內於軟瓊脂上之細胞培養業已用於檢查腫瘤細胞上之生長因子之效果（例如 1 9 8 7 年 Rizzino, A. 之軟瓊脂生長分析用於轉化生長因子及細胞有絲分裂酶，酶學中之各種方法 1 4 6 : 3 4 1 - 3 5 2) 。

能夠於半固體基質、諸如軟瓊脂中繁殖之細胞未能反映所有腫瘤細胞亞群。看 1 9 8 5 年 Tveit, K.M., 等人之“於軟瓊脂中培植人類腫瘤期間所發生之腫瘤細胞亞群之選擇”。— D N A 流動細胞計量研究 . Br.J.癌症 5 2 : 7 0 1 - 7 0 5 證明使用該 C - M 方法時，於軟瓊脂中之培植將選擇特定之非整倍體腫瘤細胞群體。儘管這些缺點，由軟瓊脂分析所獲得之結果係視為一特定化合物在活體內抑制效果之預測，因為一化合物必須能夠殺死該腫瘤幹細胞，以有效地中止腫瘤生長。

如現在所熟練使用者，軟瓊脂技術係勞力密集的。傳

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (9)

統上目視地刻痕記錄該軟瓊脂分析中菌群生長之測定，在此以眼睛計數菌群之數目，或藉著一成像系統之輔助染色及計數這些菌群。因此，該定量化可能因主觀之計數而扭曲，諸如群簇及菌群間之辨別，及藉著該瓊脂培養之三度空間類型所產生之成像器之計數誤差（為回顧，可看

1 9 8 5 年 Singletary, S.E., 等人之“重遊人類腫瘤幹細胞分析”、細胞無性繁殖之國際期刊 3 : 1 1 6 - 1 2 8) 。譬如可看 Salmon, S.E., 等人之細胞無性繁殖之國際期刊 2 : 1 4 2 - 1 6 0 (1 9 8 4) 。目視計數係極勞力密集且主觀的。Salmon 等人報告：主要基於操作員之疲勞，大部份技士實質上每日難以做菌群計數超過三至四小時。該染色法係受限於該成像器識別個別菌群之能力；重疊之菌群將妨礙精確之計數。目視地接觸或重疊之菌群，即使他們具不同深度，仍可能被該成像器不當地刻痕記錄。儘管有這些問題，成像器係例行地用於增加該計數加速及減少該軟瓊脂分析之勞力。一種此成像系統（如 1 9 8 4 年 Salmon, S.E., 等人所述自動影像分析系統之評估、一 Omnicon FAS II 影像分析系統，用以計數人類腫瘤菌群，細胞無性繁殖之國際期刊 2 : 1 4 2 - 1 6 0) 能夠比有經驗之技士快十倍地計數托盤上之平皿，而與技士之計數有良好之相互關係。這些定量化方法需要大目視表面積，而需要使用 2 4 個槽腔之多槽腔空間或較大之空間。這妨礙該吾人使用自動化之 9 6 槽腔系統。

傳統分析決定菌群之存在或不存在，且典型未說明一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (10)

菌群內之細胞生活力。在此所呈現之方法可視需要與用以決定細胞狀態之生活力染色一起使用。

其它業已提出之相關部份係如何在活體內對該腫瘤生長表示其軟瓊脂分析。一測試化合物在腫瘤細胞之繁殖族群上之效果不能代表其在活體內全部腫瘤細胞族群上之效果。在腫瘤細胞生活力上之研究及在該生長參數上之平皿密度 (plate density) 可看譬如 1988 年佩基, R.H., 等人所發表者。當該細胞族群係源自一腫瘤, 為成功培養必須隔離充分之細胞數目。不幸地是通常用於產生該單一細胞族群之解離技術可能損害這些細胞, 而導致更少之會發育細胞, 且扭曲一特定測試化合物之功效。此外, 並非全部由這些腫瘤隔離之細胞皆能於半固體基質中非黏合生長。既然由一給定之腫瘤獲得有限之細胞族群、諸如腫瘤幹細胞係於半固體基質中繁殖, 且當切除時一給定之腫瘤可包含不同幹細胞之層次, 而由一軟瓊脂分析所獲得之結果可能有不同變化。

於軟瓊脂分析中, 細胞係就地固定在該半固體基質內, 及藉著細胞分裂形成一菌群。另一種分析, 即該球面分析, 藉著個別細胞之聚集形成菌群。兩者皆認為比在活體內腫瘤之單層結構培養更具代表性, 因為在三度空間結構中之腫瘤生長於該緊鄰區域中具有營養物及氧氣之不均勻分佈。

扁球面最初係以胚胎細胞之團聚體發展, 然後隨之用於腫瘤細胞培養 (回顧 1999 年 Santini, M.T. 及 Rainaldi, G.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (11)

之“腫瘤生物學中之三度空間扁球面模型”、病理學 6 7 : 1 4 8 - 1 5 7)。藉著一些方法完成扁球面培養。最常使用者係該液體覆疊法，這涉及將單一細胞懸浮液放置於塗以一非黏著性表面、諸如瓊脂或瓊脂糖之盤子中。團聚體通常在一至三日內開始形成。這些扁球面必須由任何殘留之單細胞分開及傳送進入第二盤子。為產生扁球面，單一細胞亦可播種進入一Spinner燒瓶及藉著攪動保持於懸浮狀態。同理，這些細胞可在非黏著性燒瓶中於一迴旋器或旋轉式壁面容器上旋轉（看1999年O'Connor, K.C.之“前列腺細胞之三度空間培養：用於開發新穎抗癌療法之細胞組織模型”、醫藥研究 1 6 (4) : 4 8 6 - 4 9 3)。

該軟瓊脂分析具有一些勝過扁球面培養分析之優點。譬如，這些細胞不會遭受存在於該攪動或轉動燒瓶中之液體剪力。因為扁球面必須由這些未形成扁球面之細胞分開，扁球面分析增加該菌群之處理以及係費力的。該軟瓊脂分析允許圍繞該菌群之緊鄰微環境中之生長因子等之濃度增加及消耗兩者，這可對活體內腫瘤狀態更具代表性。環繞一軟瓊脂菌群之微環境中所存在之因子亦可影響該測試化合物，這將影響該化合物抑制細胞生長之能力。該軟瓊脂分析亦允許一給定之菌群產生細胞外基質（ECM）成分，這依序允許細胞內所發信號可類似於活體內腫瘤所產生之信號。在扁球面中同樣已觀察ECMs，但於任一分析中所表示及／或分泌之ECMs可不同於由活體內腫瘤

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

所產生者。與菌群成形上之半固體基質、諸如瓊脂或瓊脂糖之接觸效應係未知數，且此變數未存在於一扁球面分析中。於該二技術之間可比較菌群形成之時間長短。

半固體基質就地固定這些細胞，如此允許連續地觀察單一細胞或個別之菌群。基於典型用於一扁球面分析之連續式混合，這些扁球面未固定在適當位置，這使其難以掌握單一菌群。即使當該扁球面分析不需要移動時，該分析之液體本質仍允許隨著時間之過去使扁球面移動。

於具有由超過一種細胞所組成之團聚體係有利之條件中，一扁球面分析係比一軟瓊脂分析較佳，在此這些菌群源自單一細胞。譬如，O'Connor於檢查在類似成骨細胞上之轉移攝護腺細胞效果之研究報告 P C - 3 細胞，可看

1 9 9 9 年 O'Connor, K.C. 之 “前列腺細胞之三度空間培養：用於開發新穎抗癌療法之細胞組織模型”、醫藥研究 1 6 (4) : 4 8 6 - 4 9 3 。

雖然半固體基質分析有諸如上述之缺點及係勞力密集的，該軟瓊脂分析仍然例行地用作輔助分析，及係比單層結構之細胞培養較佳，因為其視為更接近地模倣生物腫瘤形成。

自動化半固體基質分析之潛在用途

如在此所述，本分析對任何半固體基質分析係有用的，而用以檢查具有任何光學活性回報系統以及放射性同位素系統之非黏合細胞生長。本分析在此係敘述適用於 9 6

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (13)

個槽腔之平皿，但本分析亦可適用於具有較大數目之多槽腔設計之用途，諸如 3 8 4 個槽腔或 1 5 3 6 個槽腔之平皿設計。

半固體基質

半固體基質包含適於培養細胞之凝膠。較佳之半固體基質係那些能夠補給生長之細胞，且較佳之半固體基質形式係瓊脂形式，包含諸如瓊脂糖之修飾形式。

典型用在本發明之較佳半固體基質在室溫以上之溫度或在培育這些細胞所需溫度以上之溫度形成一液體，且當在約室溫或培育該細胞之溫度時形成半固體、或凝膠。半固體基質之較佳形式係瓊脂及瓊脂糖。然而，聚合物之寬廣變化性，包括蛋白質及其衍生物皆可用作本發明中之半固體基質。Matrigel®、生膠質或骨膠，或其他類似材料亦可用作該半固體基質。

瓊脂係一化合物類屬之通用名稱，大致上定義為一由紅藻類抽提之已乾燥膠黏物質，具有在大約攝氏 1 0 0 度溶化及在大約攝氏 4 0 度凝固成一凝膠之特性。瓊脂係不為大部份之細菌所消化吸收及於製備固體培養介質中係用作一凝膠。如 1 9 7 4 年 W.B.Saunders 公司之 Dorlands 插圖式醫學辭典第 2 5 版所示。

瓊脂糖係在瓊脂製備中所發現之微量天然線性多醣類，其大致上包含 D - 半乳糖及修改之 3 , 6 - 脫水半乳糖殘餘物，如此瓊脂糖係一修飾瓊脂。瓊脂糖係一由瓊脂或

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (14)

產生瓊脂之海藻隔離之精煉線型糖衣 (glactan) 水膠體。當在不同於其溶化溫度之膠凝點時，瓊脂糖形成一凝膠基質。糖、甲基團、及其他化學基團典型係以化學方式鍵結至瓊脂，或是衍化瓊脂之微量，以便增強所想要之物理性質，諸如低膠凝溫度。

另一種半固體基質包含形成一相當堅固基質之聚合物，諸如 poly (H E M A) ，這是一種抗黏著聚合物。

生膠質係結締組織、軟骨組織、及骨頭之白纖維之一主要哺乳類蛋白質。生膠質大致上係不溶於水，但典型係變化至改善想要之性質，諸如在一給定溫度下膠凝。

骨膠係一衍化之蛋白質，而藉著水煮由組織之生膠質所形成。當放在冷水時，骨膠膨脹，但在熱水中溶解。

於 Matrigel® 之案例中，生膠質或骨膠、或其他類似材料，該材料之溫度控制係重要的，以便當該材料變暖和至約室溫時防止過早膠凝。因此，以此材料，其重要的是於該槽腔充滿之前保持這些材料冷卻。

於該平皿中之槽腔或微導管可包含該半固體基質之單一層，或包含多層。於一較佳具體實施例中，使用每一槽腔包含多層之半固體基質。於另一具體實施例中，該槽腔或微導管可包含多層不同型式之半固體基質，譬如，該下層可包含骨膠，且一上層可包含骨膠瓊脂糖混合物。在此不同型式之半固體基質係用於該槽腔或微導管中，最好該下層之半固體基質密度係比該上層之密度高。

可用相同或不同型式之半固體基質以形成任何或所有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (15)

層。不同型式之半固體基質包括含有第一型半固體基質之混合物，或可為不同於該第一半固體基質層中所用之物質，譬如，假如該第一半固體基質係瓊脂，該第二半固體基質層可為瓊脂－瓊脂糖、或瓊脂糖、聚合物、生膠質或骨膠之混合物。

於具有多層半固體基質之分析中，最好該第一或下層包含一較密、或較堅實之半固體基質。藉著使用比該上層稍微較高比率之半固體基質、或另一選擇為藉著使用一不同型式之半固體基質可達成此目的，該不同型式之半固體基質相對該第一半固體基質形成一更少密度之半固體基質。

該半固體基質分析之較佳具體實施例涉及超過一層之半固體基質，且一或多半固體基質係與生長介質混合。其亦較佳的是每一層半固體基質包含生長介質。其亦較佳的是每一層通常具有約相同之體積。最好下層之半固體基質具有稍微較高之半固體基質濃度，且包括上層半固體基質中所含除了這些細胞外之所有物件。該測試化合物及／或細胞可於任何或全部液體半固體基質層中，或另一選擇為在該半固體基質已經凝固之後加入。最好這些細胞係加至，或加入當作上層半固體基質之一部份。

最好該細胞係懸浮遍及該上層，以致當由遭受間接分裂之單一細胞形成一菌群細胞時，其結果之菌群係亦均勻散布遍及該半固體基質。這有助於目視計數，以致這些菌群在該培育期之後不會彼此接觸或重疊。因此，最好各菌

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (16)

群係懸浮遍及該上層半固體基質。

合適之細胞型式

本分析亦可用於決定骨髓中之巨噬細胞先質之數目，以及檢查腫瘤細胞生長。吾人業已及可檢查無性遺傳因子腫瘤細胞，用以對化學療法、新防止新生物藥品之篩選、檢查基因療法、及於基本研究中作個別之臨床反應預測。

如在此所述，本分析係用於檢查能夠非黏合生長之任何型式細胞。如此，該分析係特別有用於培養腫瘤細胞，但亦可用於檢查很多正常細胞，包含但未限於哺乳類之幹細胞及骨髓細胞。哺乳類細胞之使用係較佳，且人類或靈長類動物細胞係特佳。此細胞之分析方法係已為吾人所熟知，譬如看，Vescovi,A.L.,(1999)之 Exp.Neurology156:71-83。當它們能夠化為若干不同細胞型式時，幹細胞係特別重要。用以隔離及培養幹細胞之方法係討論於Murray,K,及Dubois-Dalcq,M.,J. 之 Neurosci.Res.50:146-156(1997)、Pincus,D.W.,等人之 Ann Neurol.43:576-585(1998)、Sabate,O.,等人之 天然麝貓類 (Nature Genet)9:256-260(1995)、及Svendsen,等人之 Exp.Neurol.148:135-146(1997)。

本發明之另一效用係半自動化、或自動化胚胎幹、或其他用於遺傳控制之哺乳類、細胞實驗。譬如，本方法可允許用以瞄準基因(gene targeting)之胚胎幹細胞之快速平皿培養，而使用λ噬菌體病媒，這操作係敘述於Tsuzuki,T.,及Rancourt,D.E.,之 Nucl. Acids Res.(1998)26(4):988-993。這些

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (17)

方法係特別想要當作一允許出現目標誘變哺乳類種系而無限制性內切酶之手段。使用本方法，大數量之幹細胞或其他哺乳類細胞可自動地作平皿培養，如此減少完成之時間及節省勞力支出。此外，自動化可減少人為錯誤，及改善重複性。

培養條件

熟練該技藝者已熟知用以在半固體基質上生長細胞之方法。大致上，細胞係能夠停滯或生長於一存在有生長介質之環境中。此生長介質係可輕易地由市售獲得及適於培養各種細胞型式。熟知之生長介質包含如粉末狀介質或液體介質之可用完全介質，譬如 Minimum Essential Medium Eagle Medium，任一介質可補充以血清，諸如百分之 10 之胎牛血清。生長介質包含不完全介質之使用，在此刪除一或多種營養物。生長介質包含無血清或減少血清之介質，以及鹽混合物，諸如 Hank's Balanced 鹽。生長介質亦包含專用介質，這是設計供增進特定細胞型式之生長。

較佳生長介質係呈濃縮形式之生長介質，諸如 10X Dulbecco 之修飾 Eagle Medium 或 Dulbecco 之磷酸質緩衝生理食鹽水。

血清包含完全血清及血清替換物或替代物之使用，諸如牛胚胎流體。

生長介質可包含額外之抗生素、附著物及基質因子，通常加入它們以有助於很多錨定相依 (anchorage dependent)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (18)

細胞型式之附著及散佈。緩衝劑亦可加至生長介質，以便維持 pH 值。諸如成纖維細胞生長因子 (F C F s)、有粒細胞菌群刺激因子 (G - C S F) 等之生長因子亦可加至生長介質。

測試化合物之型式

本分析亦可用於決定各種測試化合物在細胞生長或停滯上之能力及效果。合適之測試化合物包含營養物、生長因子及／或能夠擴散穿過該介質抵達該半固體基質中所懸浮細胞之任何其他分子。用於本發明之測試化合物包括天然造成之生物化合物，含有生活力、表面受納體及蛋白質、生長因子、分泌蛋白質、附著物因子、apoptosis／壞疽因子，鈣及其他細胞內離子、分化介質、基層成分、及醣蛋白質。非天然造成之化學藥品、蛋白質、小分子等亦可用作本分析之測試化合物。此外，可測試環境條件之影響，諸如紫外線、熱等。

測試化合物亦包含各種化合物，諸如抗生素、附著物及基質因子、緩衝劑、及諸如 F G F s、G - C S F 等生長因子、賀爾蒙、凝集素、脂多醣、脂類、胺基酸類。

在這些細胞生長之各種影響之測定

在本發明中可用於測定此等化合物或條件在該測試細胞上之生物學效果之偵檢方法包含螢光、比色受酶質、發色酵素受酶質、同位素、螢光素、綠螢光蛋白質 (G F P

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (19)

)、糖甘酶酵素、生活力染料、反應性氧屬檢測器、
C a ²⁺ 及 M g ²⁺ 及其他離子指示器、無機離子指示器
、P H 值指示器等。

可藉著用於決定細胞生活力之各種標準技術決定測試
化合物在該細胞生長或停滯上之效果。較佳之技術包含輕
易地自動化之偵檢方法，諸如直接及間接之螢光及酵素鍵
合螢光。現在可用之螢光標籤包含 R - 藻紅素、德州 Red
Sulforhodamine、BODIPY 系列、奧勒岡綠色 (Oregon Green)
、螢光素 (F I T C)、玫瑰紅 (T R I T C)、四甲基
玫瑰紅、Y O Y O - 1、D A P I、I N D O - 1、藍色
小瀑布 (Cascade Blue)、E u r a - 2、胺基甲基香豆素、
F M 1 - 4 3 + 脂類、D i l C 1 8、N B D、羧基 -
S N A R F - 1、曉星黃色 (Lucifer Yellow)、Dansyl+R-
NH₂、Propidium 碘化物、水母發光蛋白 (Aequorin)、對鈉敏
感之染料、及該 Alexa 染色系列 (分子探測)。用於這些標
籤而當作偵檢探測之議定書已為吾人所熟知。

可測試不同型式之細胞在其他細胞上生長或停滯之效
果。譬如，可測試一幹細胞或遠祖細胞之細胞分化之刺激
。本方法允許測定分泌物質之效果，在此係加入一瓊脂或
瓊脂糖層以分開不同型式之細胞。該半固體基質層將防止
不同細胞之實際物理接觸，但允許分泌因子通過。

較佳之菌群偵檢方法係決定細胞生活力，且較佳之生
活力偵檢方法係一螢光之生活力染料，但可使用其他生活
力偵檢方法。優先用生活力染料係由於可輕易地由市售獲

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (20)

得之螢光平皿讀出機。優先用生活力測定係由於比假如僅只目視地計數獲得更多關於該分析結果之重要生物學資訊。譬如，生活力測定允許在活細胞、活著但呈靜態、或死細胞之間作辨別。其結果是，該較佳方法允許吾人測定關於腫瘤細胞狀態之更多資訊，且因此允許吾人於每一實驗中對該測試化合物之生物學效果有更佳理解。

加入各成分之順序

吾人亦熟知在此所歷述諸如該瓊脂糖層之數目及深度等參數之修正，可能根據所使用托盤之槽腔大小及尺寸選擇而增減。如在本分析所敘述者，除了在該基質凝固之前將此溶解劑直接加入該半固體基質外，溶解劑可藉著在該半固體基質頂部上之分層作用加至各培養操作。細胞外基質蛋白質及化合物／因子可併入半固體基質層或在半固體基質層之頂部上。異於諸如瓊脂或瓊脂糖之典型半固體基質之材料可替代為於該自動化方法中檢查細胞生長之各層。不像需要保持溫暖以防止膠凝之瓊脂，諸如 Matrigel®、生膠質及骨膠之基層(受脢質)需要保持冷卻以防止膠凝。使用此材料之技術係於該技藝中所熟知者，譬如看 Becton Dickinson之 Matrigel®使用議定書及用於延伸生膠質資料單之 Rockland Inc.議定書。

亦可使用本方法檢查細胞遷移。引誘劑可放置於該上方或下方之瓊脂糖層中，如此允許研究細胞遷移穿過該瓊脂糖之能力。可分開該瓊脂糖層以決定每一層中之細胞數

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (21)

目，或可變化這些層之深度以研究遷移或分泌能力之不同距離。

細胞密度

對於所選擇之偵檢方法，為細胞密度最佳化無性遺傳因子分析條件。一用以在該半固體基質內較佳均勻分佈細胞之理由係由於 E C M s 或細胞穿透性接觸菌群可能改變環繞這些菌群之化合物／因子撒遍特性，如此扭曲該分析結果。因此，有需要提供一種避免重疊或接觸菌群等問題之無性遺傳因子方法。對於目視地計數，當菌群於一平皿中形成彼此太接近時，將難以偵檢各別菌群。因此，傳統使用目視計數之無性遺傳因子分析係以每平皿最多 24 個槽腔完成；這允許菌群之充分分散以便能夠預備好目視偵檢。

培育期

不論是否有一顯微鏡之輔助，目視計數，係沉悶及昂貴的。為了便利、成本、可靠性及速度，另一種自動偵檢方法係較佳。菌群係允許由單一細胞生長，直至每一細胞形成一可計數之充分尺寸之菌群。一菌群傳統上係定義為含有最少約 30 至約 50 個細胞，或擁有 10 微米之直徑者。為達成此生長或尺寸，通常必要的是該細胞生長之培育期約七至十四天。較長時期大致上係不佳；因為於該培育期間將因這些細胞而耗盡該原始生長介質。然而，假如

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (22)

於該培育期間加入額外之生長介質及因子，該培育期可據此加長。

平皿或托盤、或微導管

該半固體基質分析最好係適用於具有較多數目之槽腔型態平皿，例如多槽腔平皿。市售用於細胞培養工作之標準化平皿係具有一、三、六、十二、二十四、四十八、九十六、384、1536個槽腔，及每平皿甚至具有較多數目之槽腔。另一種為著名之托盤，此平皿係輕易地順應市售液體處理設備及其他裝備之標準軌跡。當每平皿之槽腔數目增加時，每一槽腔之容積減少。使用較高數目之槽腔型態平皿，諸如96或384個槽腔之平皿，導致大量之勞動，標準化及比傳統之24槽腔平皿型態節省成本且係較佳。

用在本發明之較佳平皿係那些適於細胞培養工作者，特別較佳者是具有多槽腔之平皿。較佳之多槽腔平皿包含那些每平皿具有96、384、及1536個槽腔者。其亦較佳的是該槽腔在這些平皿上之底部係容易辨識之塑膠，這有助於偵檢方法。

節省成本、優點

使用較小之槽腔尺寸導致大幅節省每個槽腔之材料成本，以及每個槽腔需要使用更少之總體測試化合物。當例行性測試大量化合物時，這些因子係重要之標準，且當每

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (23)

一濃度優先一式三份地施行時甚至更重要。標準之目視軟瓊脂分析係於每層具有至少400微升之24個槽腔之平皿（另外稱做一托盤）中施行，且傳統上係一式三份地完成，並具有充分範圍之測試化合物，以允許IC₅₀值之計算。由所使用平皿或托盤之尺寸決定最少之液體量，且該液體量係形成均勻地越過該槽腔之單一層所需之容量。大致上，於一給定分析中對每一化合物使用約六至八種不同測試化合物之濃度。因此。大約需要十八個槽腔以決定單一測試化合物之IC₅₀值。使用較大之槽腔顯然同時需要將較大量之每一種材料加至每一槽腔。

對比之下，96個槽腔平皿設計比起用於24個槽腔平皿設計之材料量允許使用約百分之20之測試化合物。譬如，使用10 μM測試化合物原種以在50 μM一式三份地平皿培養槽腔，該24個槽腔平皿將需要12微升之測試化合物。對比之下，該96個槽腔平皿將只需要2.25微升之測試化合物。

本半固體基質方法亦允許對相同數目之資料點使用更少之平皿。譬如，一項在八種濃度下一式三份地以三個控制槽腔（最好於每一平皿中具有多個控制槽腔）檢查三種測試化合物之實驗，需要使用四塊24個槽腔之平皿。對比之下，使用本方法之相同實驗將只需要單塊96個槽腔之平皿。僅只所用培養平皿數量之成本節省即相當可觀。現在列出於該Fisher目錄之單塊96個槽腔之平皿為每平皿\$2.74，反之四塊24個槽腔平皿（每塊\$2.02

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (24)

) 現在需花費 \$ 8 . 0 8 。這導致對三種測試化合物之每次實驗可節省 \$ 5 . 3 4 , 或約使用傳統 2 4 個槽腔平皿設計之成本之三分之一。這不只於實驗用品上省錢, 而且減少電冰箱或孵卵器中之空間。

勞力及省時之重要性

使用本自動化系統之軟瓊脂方法, 單一全時間之職員能於 1 . 5 天內製備分析試劑、平皿培養這些細胞、加入化合物、染色這些細胞、及在 8 種濃度下一式三份地藉著螢光在該 Cytofluor 上對 5 細胞系、1 5 種化合物測定該會發育之細胞。使用傳統之方法, 此工作將使一個人花費十一個全工作天。因此, 在此所述之自動多槽腔半固體分析方法需要約傳統目視軟瓊脂分析之十分之一工時。

本發明提供一種決定及定量菌群生活力自動、或半自動之軟瓊脂分析。因此, 此分析允許類似於傳統軟瓊脂方法之菌群形成測定, 但此外允許在業已形成之菌群上測定化合物之效應、生長因子等。因此本方法提供用於識別生長抑制介質之優越分析方法。

液體處理設備之性質

本發明係針對具有半固體基質之平皿之自動製備方法。本發明可與現存之液體處理設備機械一起使用, 其未具有調節液體溫度之機構, 但最好該液體處理設備機械具有調節液體溫度之機構。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (25)

然而，任何液體處理機將可如常運作，只要該機械具有充分之速度以迅速地運送這些試劑及能無菌地操作。用以選擇本無性遺傳因子方法之一自動機器手臂或機械之重要特色係如下。該機器手臂或機械應能施行幾乎任何比率之連續稀釋、交錯施行八或十二個槽腔之連續稀釋、運送精密之液體量、混合一微量培養平皿之內容物、與不同高度之微量培養平皿一起使用、以稀釋劑充滿各微量培養平皿、於微量培養平皿之間傳送樣本。

假如該液體處理設備機械不具有調節一液體半固體基質之溫度之機構，則該液體處理機必須能夠以充分速度運送該基質至該平皿，俾能防止該基質過早膠凝。假如由本方法所製備之平皿係意欲用於培養細胞，其亦重要的是該液體處理設備機械能夠無菌地操作，以免污染該平皿。較佳之液體處理設備應能夠規劃程式，以施行幾乎任何比率之連續稀釋、交錯施行八或十二個槽腔之連續稀釋、運送精密之液體量、混合一微量培養平皿之內容物、與不同高度之微量培養平皿一起使用、以稀釋劑充滿各微量培養平皿、於微量培養平皿之間傳送樣本及無菌地使用。

本發明係針對含有一或多個槽腔之平皿之自動製備方法，該槽腔具有一或多層半固體基質。

體積密度控制

當每平皿之槽腔數目增加時，或另一選擇為當一給定槽腔之體積容量減少時，其更重要的是能精確地控制每一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (26)

試劑運送至每一槽腔之體積。此外，最好該方法製備具有槽腔之平皿，該槽腔含有一或多預定之稀釋反應物。本方法係適於製備用以測試化合物之平皿，且因此製備精確、可再現地運送一或多反應物之指定量之槽腔之能力係重要的。

於一具體實施例中，該方法自動化地製備具有半固體基質之多槽腔平皿，該半固體基質包含細胞。

於另一具體實施例中，該方法自動化地製備具有超過一層半固體基質之多槽腔平皿。

於另一具體實施例中，該方法自動化地製備具有超過一層半固體基質之多槽腔平皿，但在此一基質包含細胞。

於本發明之一具體實施例中，該分析方法係用於在含有半固體基質之預定槽腔中決定一測試化合物在一細胞上之效果，包括：

(a) 使用一具有第一貯槽及第二貯槽之液體處理設備，以由第一貯槽傳送液態半固體基質至一分析平皿之預定槽腔；

(b) 使用一液體處理設備以由第二貯槽傳送細胞至一分析平皿之預定槽腔；

(c) 允許該液態半固體基質於該預定槽腔中凝固；

(d) 培育該平皿中之細胞達一時期，使這些細胞生長成一菌群；

(e) 將一預定數量之測試化合物加至該預定槽腔；

及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (27)

(f) 測定該測試化合物在該菌群上之生物學效應。

於本發明之一具體實施例中，該半固體基質約在室溫凝固。於另一具體實施例中，該半固體基質在攝氏 10 至 45 度之間凝固。於一較佳具體實施例中，該半固體基質於攝氏 15 至 40 度之間凝固。於另一具體實施例中，該半固體基質於攝氏 20 至 35 程度之間凝固。於一更佳具體實施例中，該半固體基質於攝氏 20 至 30 度之間凝固。

於本發明之一具體實施例中，該半固體基質包含瓊脂、瓊脂糖、生膠質、或基膜。於本發明之另一具體實施例中，該半固體基質包含瓊脂、瓊脂糖、或生膠質。於本發明之又另一具體實施例中，該半固體基質包含瓊脂或瓊脂糖。於本發明之又另一具體實施例中，該半固體基質包含瓊脂糖。於本發明之又另一具體實施例中，該半固體基質包含生膠質或 Matrigel®。於本發明之又另一具體實施例中，該半固體基質包含 Matrigel®。

於本發明之一具體實施例中，加熱該半固體基質直至其在該液態半固體基質加至該第一貯槽之前成為液體。於本發明之另一具體實施例中，加熱該半固體基質直至其在該半固體基質加至該第一貯槽之後為一液體。

於本發明之一具體實施例中，冷卻該半固體基質直至其在該液態半固體基質加至該第一貯槽之前為一液體。於本發明之另一具體實施例中，冷卻該半固體基質直至其在該半固體基質加至該第一貯槽之後為一液體。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (28)

於本發明之一具體實施例中，用於決定一測試化合物在細胞上之效應之分析方法包含：

(a) 使用一液體處理設備，以由第一貯槽傳送一液態半固體基質至一分析平皿之預定槽腔；

(b) 使用一液體處理設備，以由第二貯槽傳送生長介質至該分析平皿之預定槽腔；

(c) 使用一液體處理設備，以由第三貯槽傳送細胞至該分析平皿之預定槽腔；

(d) 允許該分析平皿之預定槽腔中之液態半固體基質凝固；

(e) 培育該分析平皿之預定槽腔中之細胞達一時期，用以使這些細胞生長成一菌群；

(f) 將預定數量之測試化合物加至該分析平皿之預定槽腔；及

(g) 測定該測試化合物在該菌群上之生物學效應。

於本發明之又另一具體實施例中，用於決定一測試化合物在細胞上之效應之分析方法包含：

(a) 使用一液體處理設備，以由第一貯槽傳送一液態半固體基質進入該分析平皿之一預定槽腔；

(b) 使用一液體處理設備，以由第二貯槽傳送生長介質至該分析平皿之預定槽腔；

(c) 使用一液體處理設備，以由第三貯槽傳送細胞至該分析平皿之預定槽腔；

(d) 使用一液體處理設備，以由第四貯槽傳送一測

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (29)

試化合物之預定數量至該分析平皿之預定槽腔；

(e) 允許該分析平皿之預定槽腔中之液態半固體基質凝固；

(f) 培育該分析平皿之預定槽腔中之細胞達一時期，用以使這些細胞生長成一菌群；及

(g) 測定該測試化合物在該菌群上之生物學效應。

於本發明之一具體實施例中，使用該液體處理設備以於一稀釋平皿在預定槽腔中製備該測試化合物之稀釋液。於本發明之另一具體實施例中，該液體處理設備由該稀釋平皿中之預定槽腔傳送一預定數量之測試化合物至該分析平皿之預定槽腔。

於本發明之一具體實施例中，該分析平皿包含六或更多槽腔。於本發明之另一具體實施例中，該分析平皿包含二十四或更多槽腔。於本發明之又另一具體實施例中，該分析平皿包含四十八或更多槽腔。於本發明之一較佳具體實施例中，該分析平皿包含九十六或更多槽腔。於本發明之一更佳具體實施例中，該分析平皿包含 384 或更多槽腔。

於本發明之一具體實施例中，這些細胞係能夠於半固體基質中非黏合生長。於本發明之另一具體實施例中，這些細胞係正常之原細胞、幹細胞、或腫瘤細胞。於本發明之另一具體實施例中，這些細胞係正常之原細胞。於本發明之另一具體實施例中，這些細胞係幹細胞。於本發明之另一具體實施例中，這些細胞係腫瘤細胞。於本發明之另

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (30)

一具體實施例中，該腫瘤細胞係胸部腫瘤細胞、卵巢腫瘤細胞、黑腫瘤細胞、神經母細胞瘤細胞、結腸腫瘤細胞、攝護腺腫瘤細胞、大細胞之肺腫瘤細胞或小細胞之肺腫瘤細胞。

於本發明之一具體實施例中，藉著使用照度計、光度計、閃爍劑、螢光、或藉著菌群之目視計數決定該測試化合物在該菌群上之效應。於本發明之另一具體實施例中，藉著使用螢光或藉著使用一照度計決定該測試化合物在該菌群上之效應。於本發明之另一具體實施例中，藉著一生活力染色決定該測試化合物在該菌群上之效應。於本發明之另一具體實施例中，該生活力染色係一螢光探測裝置。於本發明之另一具體實施例中，該生活力染色係 Calcein AM。

於本發明之一具體實施例中，該液體處理設備能夠傳送由約一納升至大約五微升之液體量至一預定槽腔。於本發明之另一具體實施例中，該液體處理設備能夠傳送由約一微升至約五百微升之液體量至一預定槽腔。

於本發明之一具體實施例中，該液體處理設備能夠維持一貯槽之預定溫度。於本發明之另一具體實施例中，該液體處理設備能夠同時傳送一液體至超過一個之槽腔。

於本發明之另一具體實施例中，該分析平皿培養係一微導管。

於本發明之另一具體實施例中，該半固體基質包含至少百分之 25 之瓊脂、瓊脂糖、生膠質、或基膜。於本發

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (31)

明之另一種具體實施例中，該半固體基質包含至少百分之 45 之瓊脂、瓊脂糖、生膠質、或基膜。於本發明之另一具體實施例中，該半固體基質包含至少百分之 60 之瓊脂、瓊脂糖、生膠質、或基膜。於本發明之另一具體實施例中，該半固體基質包含至少百分之 75 之瓊脂、瓊脂糖、生膠質、或基膜。

於本發明之另一選擇具體實施例中，該半固體基質包含至少百分之 25 之瓊脂糖。於本發明之另一具體實施例中，該半固體基質包含至少百分之 45 之瓊脂糖。於本發明之另一具體實施例中，該半固體基質包含至少百分之 60 之瓊脂糖。於本發明之另一具體實施例中，該半固體基質包含至少百分之 75 之瓊脂糖。

於本發明之一具體實施例中，該半固體基質包含至少百分之 25 之瓊脂。於本發明之另一具體實施例中，該半固體基質包含至少百分之 45 之瓊脂。於本發明之另一具體實施例中，該半固體基質包含至少百分之 60 之瓊脂。於本發明之另一具體實施例中，該半固體基質包含至少百分之 75 之瓊脂。

於本發明之一具體實施例中，該分析平皿包含由 50 槽腔至 2000 槽腔。於本發明之另一具體實施例中，該分析平皿包含由 50 槽腔至 200 槽腔。於本發明之另一具體實施例中，該分析平皿包含由 200 槽腔至 500 槽腔。於本發明之另一具體實施例中，該分析平皿包含由 300 槽腔至 500 槽腔。於本發明之另一具體實施例中

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (32)

，該分析平皿包含由 3 5 0 槽腔至 2 0 0 0 槽腔。

於本發明之一具體實施例中，該液體處理設備係一自動化系統。

於本發明之另一具體實施例中，藉著該細胞生活力決定該測試化合物在該菌群上之效應。於本發明之另一具體實施例中，藉著一螢光探測裝置決定該細胞生活力。

於本發明之一具體實施例中，對於一包含添加化合物至該半固體基質之分析，使用一液體處理設備以自動製備含有半固體分析基質之平皿之方法包含：

使用一具有成行列配置之多重槽腔之平皿，並使每一槽腔能夠保有一預定液體量，在此該液體處理設備包含多重貯槽；其中第一貯槽含有一於第一 1 X 濃度之液體生長介質；其中第二貯槽含有一於第二濃度 2 X 之液體生長介質；其中第三貯槽含有一液態半固體基質；其中第四貯槽含有一於第三濃度 1 . 6 7 X 之液體生長介質；其中第五貯槽含有懸浮於 1 X 生長介質中之細胞，及其中該第一步驟係施行一測試化合物之連續稀釋進入一稀釋平皿，其中每一行列中之一槽腔係指派為一開始槽腔，且其餘槽腔係指派為稀釋槽腔，在此該稀釋槽腔包含生長介質，這是藉著

a . 由第一貯槽傳送預定數量之 1 X 生長介質至該行列中之每一稀釋槽腔，

b . 由該開始槽腔傳送一預定數量之測試化合物進入第一稀釋槽腔，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (33)

c . 混合該第一稀釋槽腔之內容物 ,

d . 由第一稀釋槽腔將相同之預定液體數量傳送進入第二稀釋槽腔 ,

e . 混合該第二稀釋槽腔之內容物 ,

f . 如需要時重複步驟 b 及 c 。

該方法可另外包含藉著製備第二平皿以混合該半固體基質之各成分之第二步驟 , 其藉著

a . 由第一平皿傳送每一槽腔之一預定數量至第二平皿中之一對應槽腔 , 該第二平皿係指派為一混合平皿 ,

b . 由該貯槽傳送一預定數量之 2 X 生長介質至該混合平皿中之每一槽腔 ,

c . 由該貯槽傳送一預定數量之半固體基質至該混合平皿中之每一槽腔 ,

d . 混合該混合平皿中每一槽腔之內容物 , 而該半固體基質係仍為液體 , 該方法可另外包含藉著製備第三分析平皿中之第一層半固體基質之第三步驟 , 其藉著

a . 由該混合平皿傳送每一槽腔之一預定數量至第三平皿中之一對應槽腔 , 該第三平皿係指派為該分析平皿 ,

b . 允許該半固體基質在想要之溫度下凝固 , 該方法可另外包含藉著於第三分析平皿中製備第二層半固體基質之第四步驟 , 其藉著

a . 由該第一平皿傳送每一槽腔之一預定數量至第四平皿中之一對應槽腔 , 該第四平皿係指派為第二混合平皿 ,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (34)

b . 由該貯槽傳送一預定數量之 1 . 6 7 X 生長介質至該第二混合平皿中之每一槽腔，

c . 由該貯槽傳送一預定數量之 1 X 生長介質至該第二混合平皿中之每一槽腔，

d . 由該貯槽傳送一預定數量之半固體基質至該第二混合平皿中之每一槽腔，

e . 混合該第二混合平皿中每一槽腔之內容物，而該半固體基質係仍為液體，

f . 在該第一層半固體基質之頂部上由第二混合平皿傳送每一槽腔之一預定數量至第三分析平皿中之一對應槽腔，

g . 允許該半固體基質在想要之溫度下凝固。

此外，該方法亦可包含移去該平皿以在想要之溫度及條件下培育達預定時期之額外步驟。

以下之實例提供本發明之使用之額外特定教旨，但不欲成為本發明之使用限制。

實例 1：細胞能夠非黏合地生長

可用於本方法之細胞系包含以下能夠在半固體基質上非黏合生長之細胞系。在此所提供之細胞系係可由商業來源取得，諸如該美國組織型式蒐藏，A T C C（美國維吉尼亞州麥納薩斯市）。細胞亦可使用用以隔離合適細胞之熟知方法直接由病人獲得。

細胞系 D U - 1 4 5、C o l o 2 0 5、N C I -

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (35)

H 4 6 0 、 P C - 3 、 H L - 6 0 、 M D A - M B 4 3 5 、 M D A - M B 2 3 1 及 M C F - 7 係由 A T C C 獲得。以綠螢光之蛋白質 (G F P) 所轉染之細胞系 (購自美國加州聖地牙哥之抗癌劑公司) 係指派為 G F P - M D A - M B 4 3 5 、 G F P - M D A - M B 2 3 1 、 G F P - P C - 3 及 G F P - C o l o 2 0 5 。

實例 2：選擇液體處理設備機械之標準

用以自動化該軟瓊脂分析之較佳機械係 9 6 個槽腔之液體處理設備 (Denley Wellpro, Propette, 實驗系統)。用於選擇該 W e l l p r o 之性質係如下：用以運送試劑至該槽腔之速度、施行幾乎任何比率之連續稀釋之能力、超過八或十二列施行連續稀釋之能力、運送精確之試劑數量至每一槽腔之能力、混合這些試劑及由不同平皿之槽腔傳送試劑之能力、將該頭部調整至不同高度之彈性、無菌地操作該機械及輕鬆操作機器之能力。

實例 3：9 6 個槽腔設計之最佳化步驟

9 6 個槽腔平皿中之每一槽腔可容納 0 . 3 7 ml 體積，比起傳統 2 4 個槽腔平皿中之每一槽腔之 3 . 5 ml 體積，其體積幾乎減少十倍。因此，該第一步驟係決定每一瓊脂糖層之最佳體積。

該第一實驗由該傳統較大之多槽腔平皿槽腔中所使用之標準量成比例地減少該二層瓊脂糖之體積。於該 9 6 個

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (36)

槽腔平皿槽腔中使用二種厚度係：50微升＝薄及150微升＝厚。該頂層瓊脂糖包含1000，5000，10000及20000細胞／頂層之連續稀釋液。

該底層係約百分之0.5至約百分之0.7之瓊脂糖，較佳約百分之0.55至約百分之0.65之瓊脂糖，且該頂層約係百分之0.3至約百分之0.5之瓊脂糖，較佳約百分之0.35至約百分之0.45之瓊脂糖。該底層通常係較密，因為其用於支撐該頂層及防止該細胞抵達該塑膠基層。假如該細胞抵達該塑膠基層，他們取代菌群形成一單層結構。然而，假如該頂層之密度太高，該細胞不會往外擴展，亦即實際往外推。此外，假如各層太密集，將妨礙該營養物之佈滿至該菌群及使該細胞餓死。

實例 4：半固體基質之比較

以下之實例提供二半固體基質型式之比較。選擇供比較用之二瓊脂糖係：海徽牌（Sea Plaque）#50101 FMC BioProducts及Sigma瓊脂糖型式V I I、低膠凝溫度# A 6 5 6 0。海徽牌瓊脂糖通常係在標準24個槽腔之大型設計中用於軟瓊脂分析。Sigma瓊脂糖型式V I I低膠凝溫度# A 6 5 6 0係時常用於定序膠凝。

最初係使用1 X R P M I生長介質（G M）。該底層由百分之50之1 X R P M I G M及百分之50、百分之1.2之瓊脂糖（水）所組成。該G M係有效地稀釋成兩半。於該頂層中，該體積之百分之70係

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (37)

1 X R P M I G M 及細胞，及百分之 30、百分之 1.2 之瓊脂糖，於該頂層中導致百分之 0.7 之最後 G M 濃度。市售 R P M I 生長介質係呈 500 毫升裝瓶（可購自 Gibco BRL），及由約百分之 10 之胎兒腓腸血清、約百分之 1 之麩胺酸及約百分之 1 之抗生素所組成。對於 M C F - 7 細胞，以 I M E M 生長介質替換 R P M I 生長介質。於 24 個槽腔及 96 個槽腔平皿之三細胞系中比較菌群形成。

該薄層（50 微升）及 Sigma 瓊脂糖具有最好之菌群生長。該厚層顯現出該菌群生長之減緩。於該 Sigma 瓊脂糖中，該菌群形成隨著具有該薄層之所有槽腔尺寸中之細胞數目而增加。以海徽牌而言，約百分之 50 之細胞已形成菌群。此外，該菌群係大於該 Sigma 瓊脂糖之菌群。在一星期之後，一細胞系具有可刻痕記錄之菌群，而其他二細胞系需要更進一步之生長。在二星期結束之前，於該 96 個槽腔平皿中全部三細胞系在該最高之平皿培養密度處具有可刻痕記錄菌群。於不同尺寸之多平皿之間有類似之菌群形態學。

較長之培育造成該薄層槽腔逐漸變乾及減少體積。譬如，該 50 微升薄層中之部份槽腔於該 14 日培育期間變乾。為防止該瓊脂糖於該二星期培育期間之乾燥作用，於該 96 個槽腔平皿中之瓊脂糖層深度係增加至 75 微升；在攝氏 37 度下培育，該 75 微升層保持充分含水達四星期之久。於較短之培育期間，各層可為較小。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (38)

爲了減輕由於該 G M 之稀釋所致之營養物缺乏，外源之胎兒腓腸血清可加至該瓊脂糖混合物。額外之血清使得該 F C S 濃度高達約百分之 25 之體積濃度。該額外之血清只稍微改善菌群形成，但增加該菌群尺寸中之變異性；此變異性係一種不想要之效應。這顯現出增加部份較無活力細胞系之菌群形成。

實例 5：介質濃度之選擇

比較 1 X 對 2 X 介質之使用，而當作該瓊脂糖層之製備中之濃度。一旦加入其他分析成分時，使用 1 X 生長介質之實驗導致進一步稀釋。假如使用 2 X 介質濃度，該生長介質係稀釋至 1 X 之最後濃度。於該 2 X 介質中之菌群形成大致上係更好，如下面所示。

表 1 提供一 1 X 生長介質 (1 X G M) 對 2 X 生長介質 (2 X G M) 在標以 Calcein AM 之 GFP-COLO205 細胞 (抗癌劑) 上之比較 (分子探測劑，糖膠，N，N' - [[3'，6 - 雙 (乙醯氧基) - 3 - 氧基螺 [異苯並呋喃 - 1 (3 H)，9' - [9 H) 氧雜蒽] - 2'，7' - 二基] 雙 (伸甲基)] 雙 [N - [2 - [(乙醯氧基) 甲氧基] - 2 - 氧基乙基]] - ，雙 [(乙醯氧基) 甲基] 酯) 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (39)

表 1

	1X GM			2X GM		
細胞 / 毫升	螢光 單位	標準 偏差	標準 誤差	螢光 單位	標準 偏差	標準 誤差
781	319	53	8.8	394	52	8.7
1563	295	48	8	414	52	8.7
3126	306	56	9	435	68	11.3
6250	312	61	10	519	81	13.5
12500	339	69	11.5	682	108	18
25000	395	70	12	877	123	20.5
50000	887	104	17	1328	246	41

該二層所需之介質濃度係如下。2 X 生長介質係用於該底層及 1 . 6 7 X 係用於該頂層。1 . 6 7 X = 2 X 生長介質 + 1 0 0 毫升無菌水。2 X 生長介質 = 無苯酚紅色之 2 X R P M I 生長介質 (5 0 0 毫升) 、 1 0 0 毫升 F C S 、 1 0 毫升麩胺酸、及 1 0 毫升抗生素。2 X 介質係已有市售者。

實例 6 : 使用一非加熱式液體處理設備製備平皿之自動化方法

下文說明以半固體基質製備平皿之方法，其使用一非加熱式液體處理設備，特別使用一 Denley Wellpro 液體處理設備 (Propette™) 機械，該機械能充填 9 6 個槽腔之平皿

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (40)

、施行連續之稀釋及傳送平皿。

該 Propette™ 機械可用於安裝軟瓊脂之 96 個槽腔平皿。自動分析之一攸關事項係於處理期間之細胞機械傷害。當使用該 Propette™ 機械時需要考慮一些參數。譬如，應該要對所用之每一細胞系測試混合物之數目、作用之速度、細胞之數目。

速度

該機械能把試劑倒入個別槽腔之速度係重要的，因為該瓊脂糖在室溫下迅速地凝固。緩慢之速度將造成較少之氣泡形成在該平皿上，但其風險是該瓊脂糖在其倒入之前已凝固。較快之速度可造成較多氣泡形成在該槽腔中，但應防止該瓊脂糖太快凝固。

氣泡形成之效應係由在三種速度下之細胞平皿培養所決定，指示為慢速、中間及快速凝結。該平皿培養速度將於各模型及不同製造廠之間變化。於該瓊脂糖中之氣泡係在每一種速度下形成。然而，當該平皿隨後係整夜於搖晃位置中培育，而與垂直堆疊相反時，氣泡將散開。其結果是，選擇該快速度，因為其確保該平皿培養係在該瓊脂糖凝固之前完成。假如該機械包含一於該散開製程期間保持該瓊脂糖或平皿溫暖之機構，亦即包含一加熱元件以於該平皿培養期間保持該瓊脂糖呈液態，則速度將較不重要。

腫瘤細胞及瓊脂糖之預先混合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (41)

該細胞、瓊脂糖及視需要之化合物應於倒在該底層上之前混合。假如該細胞係在分層之後混合於該頂層瓊脂糖中，他們不會散開遍及該頂層，這在該瓊脂糖層介面導致一細胞單層結構。於平皿培養之前之單次混合亦不足以散開該細胞。藉著數次混合，諸如二次或三次可獲得充分之細胞散開，這足以使該細胞充分均勻地散開遍及該瓊脂糖。

為減少平皿培養時間，瓊脂糖之頂層、細胞及視需要之化合物係在由該混合平皿傳送至該培養平皿之前只混合兩次。該 Propette™ 之速度係足以混合該頂層成分及在該最近列之瓊脂糖凝固之前傳送該槽腔至該培養平皿。

細胞密度

開始一系列之細胞密度實驗以決定最佳之細胞密度。約 50,000 細胞／毫升最後濃度（工作濃度 10X = 500,000）之較高密度係決定為所使用細胞系範圍之一良好密度。這是一比該傳統軟瓊脂分析所使用者較高之密度。然而，吾人認為來自該自動化之機械處理可能損害部份細胞。此外，既然未目視地刻痕記錄該菌群，該菌群於該 96 個槽腔平皿中可更靠近。較高密度之細胞亦增加該槽腔之總螢光性螢光。

吾人測定當以該測試化合物作平皿培養時，假如在傳送至該 96 個槽腔平皿之前預先混合於分開之平皿中，各個成分，亦即瓊脂糖、細胞及化合物係更均勻地分佈。該

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (42)

測試化合物係於 R P M I G M 中製成 1 0 X，並於該混合平皿中稀釋至一 1 X 化合物濃度。每槽腔 1 5 0 微升之最終混合平皿體積係足以均勻地散佈每層 7 5 微升之平皿。

以下之組合可獲得令人滿意之結果：

表 2

於具有該細胞之半固體基質中包含該測試化合物。

底層	頂層
15微升 10X測試化合物 (於 1X介質中製備)	15微升 10X測試化合物
60微升 2X介質	75微升 1.67X介質
75微升瓊脂糖 (於水中有百分之 1.2原料)	15微升之 500,000細胞/毫升
	45微升瓊脂糖

表 3

於添加測試化合物之前允許菌群形成。

底層	頂層
75微升 2X介質	75微升 1.67X介質
75微升瓊脂糖 (於水中有百分之 1.2原料)	15微升 1X介質
	15微升之 500,000細胞/毫升
	45微升瓊脂糖

實例 7：自動定量化之方法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (43)

對於自動定量方法之最佳化，比較一些染色技術。特別地是使用 G F P - 細胞線，比較 M T T 或 calcein AM 染色。

對於該 M T T 染色，使用以下之議定書：

於一 Hank 之均衡鹽溶液 (H B S S) 中之 2 5 微升、1 0 毫克 / 毫升 M T T 原料 (3 - [4 , 5 - 二甲基 - 2 - y 1] - 2 , 5 - 二苯四唑溴化物 ; 硫氮雜環戊烯基藍) (Sigma) 係加至每一槽腔及在攝氏 3 7 度下培育有四小時之久。在培育之後，2 0 0 微升二甲亞楓 (dimethyl sulfoxide , D M S O) 係加至每一槽腔及在 5 7 0 納米下於分光光度計上讀取該平皿。然而以 SpectraMax 2 5 0 平皿讀出機未能決定任何計算。對於該 calcein AM 染色，使用以下之議定書：

2 5 微升於 (H B S S) 中之 1 0 μ M calcein AM 係加至每一及允許在攝氏 3 7 度下培育達至少一小時之久。然後在一 Cytofluor 4000 (3 計數 / 槽腔) 中以每次增加 4 0 之方式讀取該平皿。用於 calcein AM 之螢光 (在活細胞分裂之後) 係激發 = 4 8 5 + 2 0 納米及放射 = 5 3 0 + 2 0 納米。

該 G F P - 細胞之螢光大致上產生一微弱之信號，且不足以藉著該 CytoFluor 或其他螢光平皿讀出機讀出。此外，該細胞係較無活力及比該起源細胞系對該測試化合物更敏感。該 M T T 結果係比該 calcein AM 變化更大。該 calcein AM 結果係更一致，且因此該染色方法係比其他方法較佳。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (44)

與目視定量化之常見方法相反，使用該生活力染料之一優點為只計數活細胞。該菌群中之死去或垂死之細胞藉著該瓊脂糖保持固定在適當位置。目視計數方法分不清這些細胞及可能導致將死去之菌群當活菌群計數。該軟瓊脂分析之一項變化係在菌群形成之後將測試化合物加至測試菌群。該方法應對活體內腫瘤更具代表性，而與該化合物係當該平皿培養細胞時出現且導致殺掉個別細胞之常見方法相反。

爲了分析，該 CytoFluor 所提供之資料係於 E X C E L 中分析。平均該 D M S O 控制槽腔及決定該標準差。然後每一化合物槽腔係除以該控制平均數 x 1 0 0 以獲得控制百分比。平均該一式三份槽腔及決定該標準差。在此有一些背景螢光及在形成之後處理之菌群並未藉著該單次二星期處置所消除。可由每一槽腔減去該背景。諸如 P R I S M 之統計程式亦能以曲線圖表示及 I C ₅₀ 測定。

證明

以劑量反應曲線測試一些化合物，包含 flavopiridol ((c i s - (-) - 5 , 7 - 二羥基 - 2 - (2 - 氯苯) - 8 - [4 - (3 - 羥基 - 1 - 甲基) 氮己烷基] - 4 H - 1 - 氧雜奈基 - 4 - 一羥基氯化物 - 二水合物) 。當作一比較，於傳統之手動移液管、24 個平皿、目視計數方法中測試相同之化合物。使用該 Sigma 瓊脂糖之唯一差別係該軟瓊脂分析於該 24 個槽腔平皿中使用 500 微升瓊脂

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (45)

糖層及於該 9 6 個槽腔系統中使用 7 5 微升／層。

該二方法產生類似結果，亦即用於該化合物之
I C₅₀s，見表 4。

表 4

2 4 - 對 9 6 個槽腔之多槽腔托盤之比較。

Calcein AM染色法

	具有 Flavopiridol 之 IC ₅₀ (μ M)	具有 Flavopiridol 之 IC ₅₀ (μ M)
處理清單	24個槽腔	96個槽腔
以 0.09 μ M Flavopiridol 作平皿培養之細胞	0.08,0.15	0.15
在平皿培養之後立即加 入之 0.4 μ M Flavopiridol	0.4,0.4	0.6
將 Flavopiridol加至一星 期之菌群	1.5,4	1

在表 5 亦目視地計數該 2 4 個槽腔平皿，及在表 6 決定該 I C₅₀s。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (46

表 5

目視地計數以決定24個槽腔托盤中之菌群數目

	以Flavopiridol作 平皿培養		在平皿培養之 後立即加入之 Flavopiridol			將 Flavopiridol 加 至一星期之菌群	
μM Flavopiridol	平均數	標準差	平均數	標準差	μM Flavopiridol	平均數	標準差
0	31	3.5	27	9	0	36.0	5.7
0.00032	27	4.2	30	10.4	0.0032	34.0	9.7
0.0016	25	10.5	30	2.6	0.016	35.0	6.8
0.008	22	5.5	32	7.6	0.08	32.0	6.9
0.04	25	1.5	26	5	0.4	33	1.5
0.2	0	0	27	5.9	2	25	8.1
1	0	0	0	0	10	32	7.2
5	0	0	0	0	50	20	3.1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (47)

注意：即使仍存在，該 flavopiridol 處置槽腔中之菌群似乎死去，其中該化合物係加至該一星期菌群。

表 6

由菌群計數決定 I C₅₀S

以 Flavopiridol 作平皿培養：	0.09 μ M
在平皿培養之後立即加入：	0.4 μ M
加至一星期者：	未達百分之 50 之控制

吾人感興趣的是注意充分膠凝之 Sigma 瓊脂糖，其當用於該 96 個槽腔設計時有時候無法一致膠凝於該 24 個槽腔平皿中及維持其完整狀態，特別是當在菌群形成之後將該化合物加入生長介質時。

表 7 以微克分子 (micromolar) 值提供該 I C₅₀S，其係在業已形成若干不同細胞系菌群 (一星期菌群) 上使用 flavopiridol 所獲得。Flavopiridol 係加至在華氏 37 度下培育 7 天之後所形成之菌群。此將化合物加至業已形成菌群之方法可對該化合物抵抗活體內腫瘤之有效性更具預測作用。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (48)

表 7

在已形成菌群上之 Flavopiridol IC₅₀(μ M)

細胞系	平均數 $\pm$ 標準誤差
Colo 205	1.4 $\pm$ 0.06
HL-60	1.6 $\pm$ 0.15
NCI-H460	2.4 $\pm$ 0.1
MDA-MB435	2.2 $\pm$ 0.09
PC-3	1.7 $\pm$ 0.04

發明概要

本發明有關一種用以施行生物分析之自動化方法，及一用以於複數含液體槽腔之間自動地傳送液體以製備含有該分析所用半固體基質之培養托盤之改良液體處理機。該機械較佳地是具有頭部，而具有一安裝在該頭部上之推液塞組件，該推液塞組件包含複數具有用以承接塞尖之垂掛端點之移液管。複數推液塞係分別配置在該移液管內，該推液塞係可在該移液管內同軸地移動以變化其內部體積。

該機械亦具有一用以移去配置在該移液管之垂掛端點上之塞尖之塞尖排放器。一最好呈修長平台形式之支架係安裝在該頭部下方，該支架具有適於容納一具有移液管塞尖承接插孔之托盤之至少第一工作站，及第二及第三工作站，每一工作站係適於容納含有液體槽腔之一個別托盤。該支架及該頭部係可彼此相對移動，以使該移液管放置成

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (49)

與該塞尖承接插孔中之任何塞尖對齊，及使任何槽腔與該移液管對齊。

一運動控制器、較佳地是一微處理器係用於控制該頭部及該支架間之相對運動，以及該推液塞之運動以完成該含液體槽腔間之液體傳送。該運動控制器亦控制該塞尖排放器之作用，以於預定液體傳送步驟之間用配置於至少部份移液管塞尖承接插孔中之其他塞尖替換在該移液管各端點上之塞尖。

該機械係已改良，其中該支架具有複數溫度控制元件，用以在第二及第三工作站之每一站獨立地控制該溫度，以將該含液體槽腔中之液體維持在一預定溫度。該支架在第二及第三工作站之每一站亦具有一用以感測溫度之感測器，及一溫度控制器，較佳地是一微處理器，用以控制該溫度控制元件及該感測器。

該溫度控制元件最好包含用以在第二及第三工作站之每一站加熱或冷卻該平台之獨立加熱器及冷卻裝置。該機械亦具有一用以使該第二及第三工作站彼此絕熱之絕熱片，該絕熱片係介入該第二及第三工作站之間，以防止熱傳及允許各工作站藉著個別之溫度控制元件維持在不同溫度。

實際之溫度控制元件包含電阻式加熱器、柏爾帖（Peltier）效應模組及熱幫浦或其他獨立之加熱或冷卻裝置，該裝置能啣取一工作流體穿過一安排在該第二及第三工作站下方之支架平台中之通道，以完成各工作站之加熱及冷

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (50)

卻，而將該分析成份維持在想要之溫度。

該改良之液體處理機亦可與用以刻痕記錄該分析結果之機械結合，譬如藉著螢光、分光光度或其他技術。

圖面簡述

圖 1 顯示一根據本發明之改良液體處理機之局部立體圖；

圖 2 顯示圖 1 所示液體處理機之局部側視圖；

圖 3 係以放大比例顯示圖 2 所示機械之一詳細之局部橫截面側視圖；

圖 4 係以放大比例顯示圖 3 所示機械之一詳細之局部橫截面側視圖；

圖 5 係以放大比例顯示圖 3 所示機械之一詳細之局部橫截面側視圖；

圖 6 係圖 1 所示機械之一局部橫截面上視圖；

圖 7 係圖 6 所示機械之一詳細之上視圖；

圖 8 係圖 1 所示機械之一端點視圖；

圖 9 係圖 8 所示機械之一詳細之局部上視圖；

圖 10 係取自圖 8 沿著剖線 10 - 10 之一局部橫截面視圖；

圖 11 係取自圖 8 沿著剖線 11 - 11 之一局部橫截面視圖；

圖 12 係圖 1 所示機械之一詳細之局部立體圖；

圖 13 係根據本發明之一改良液體處理機之側視圖；

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (51)

及

圖 1 4 係根據本發明之一改良液體處理機之側視圖，其併入一用以自動評估生物學分析結果之裝置。

符號說明

9	處理機
1 0	平台
1 2	頭部
1 4	導桿
1 5	箭頭
1 6	軸承
1 7	水平面
1 8	步進馬達
1 9	表面
2 0	小齒輪
2 1	軸
2 2	齒條
2 3	箭頭
2 4	導桿
2 6	軸承
2 8	步進馬達
3 0	小齒輪
3 2	齒條
3 3	連接栓銷

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (52)

3 4	推液塞組件
3 5	氣缸
3 6	移液管
3 7	安裝部件
3 8	推液塞機制
3 9	活塞部份
4 0	推液塞桿
4 2	橫板
4 4	導桿
4 5	彈簧
4 6	墊圈
4 8	驅動機制
4 9	O 型環
5 4	托盤
5 6	托盤
6 0	端點
6 2	塞尖
6 3	插孔
6 4	平板
6 5	開槽
6 6	桿
6 8	螺線管
7 0	微處理器
7 2	定向片

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (53)

7 4	感測器
7 6	極限感測器
8 2	光束
8 9	發光二極體
9 0	光電元件
1 0 0	工作站
1 0 2	工作站
1 0 4	工作站
1 0 6	工作站
1 0 8	工作站
1 0 9	工作站
1 1 0	貯槽
1 1 2	隔間
1 1 4	隔間
1 1 6	隔間
1 1 8	槽腔
1 2 0	控制元件
1 2 2	加熱元件
1 2 4	電源
1 2 6	通道
1 2 8	貯槽
1 3 0	加熱器
1 3 2	冷卻裝置單元
1 3 4	熱泵

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (54)

1 3 5	柏爾帖組件
1 3 6	絕熱片
1 3 8	溫度感測器
1 3 8 a	連接線
1 3 8 b	連接線
1 4 0	溫度感測器
1 4 0 a	連接線
1 4 0 b	連接線
1 4 2	溫度感測器
1 4 2 a	連接線
1 4 2 b	連接線
1 4 4	溫度感測器
1 4 6	溫度感測器
1 6 2	托盤
1 6 4	托盤
1 6 6	托盤
2 0 0	刻痕機
2 0 0 a	刻痕機
2 0 0 b	刻痕機
2 0 2	機械手臂

較佳具體實施例之詳細敘述

圖 1 , 2 及 8 顯示一改良之液體處理機 9 , 其能夠於該自動及半自動之培養托盤製備中調節生物學分析用之各

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (55)

分析成份之溫度，諸如用以培養致瘤細胞、幹細胞及／或骨髓細胞之軟瓊脂分析。機器 9 包含二主要之可移動零件，一可水平位移平台 10 及一可垂直位移頭部 12。如圖 2 所最佳顯示，安裝該平台 10 以藉著滑動軸承 16 在硬化導桿 14 上水平位移。如此該平台可在導桿 14 上沿著標以箭頭 15 之路徑於一水平面 17 中移動，該水平面

17 較佳地係與平台 10 之表面 19 共平面。藉著一步進馬達 18 經過一連接至該馬達之小齒輪 20 及一安裝在該平台下側之齒條 22 提供該平台之位移。該頭部 12 係藉著滑動軸承 26 安裝在導桿 24 上，及如此能夠沿著一實質上垂直於該平台 10 表面 19 之軸 21 平移運動，如箭頭 23 所示。藉著一步進馬達 28 經過一小齒輪 30 及一齒條 32 提供頭部之位移。

如圖 2 及 8 所示，該頭部 12 支撐一移液管及推液塞組件 34。該組件包含橫亙於該平台 10 之位移軸安排成一行之複數移液管 36。該移液管係藉著一安裝部件 37 及連接栓銷 33 可移去地附著至該頭部，以致可輕易地替換具有更多或較少移液管之不同移液管組件。該移液管與該頭部 12 一起移動。如圖 3 所詳細顯示者，一推液塞機制 38 係安裝在該頭部上，用以相對該移液管 5 作垂直移動。該推液塞機制包含一系列推液塞桿 40，每一推液塞桿係分別配置在每一移液管 36 內。所有推液塞桿係安裝在一共用之促動器橫板 42 上，用以同時垂直移動。該橫板 42 係沿著導桿 44 藉著一步進馬達 46 及一導螺桿驅

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (56)

動機制 4 8 (看圖 2) 位移。如圖 3 所最佳示出者，該推液塞桿 4 0 相對該移液管 3 6 之位移將改變各移液管之內部體積，造成該移液管塞尖所浸入之流體被抽吸入該移液管或由該移液管排出，如此，允許該移液管於該分析程序中完成流體之傳送，如下文所述。藉著一 O 型環 4 9 於每一推液塞桿及其相聯移液管頂部之間提供氣密式密封，並由墊圈 4 7 及柔性彈簧 4 5 所固定。

再參考圖 3，該底部端點 6 0 之每一移液管 3 6 係在其外部表面製成錐形，以便承接及摩擦地嚙合一用完即丟式移液管塞尖 6 2 之內部表面。塞尖 6 2 較佳地係由一不可與水混合之聚丙烯材料製成，在下面將說明其理由。如圖 1，2 及 4 所示，該塞尖 6 2 係儲存於一塞尖托盤 5 6 中之各排插孔 6 3 內，該托盤係可定位在平台 1 0 上。為使該移液管塞尖 6 2 附著至該移液管 3 6，藉著步進馬達 1 8 移動平台 1 0 以使一系列塞尖與該移液管對齊，且藉著該步進馬達 2 8 降低該頭部 1 2 以使該移液管 3 6 之錐形部份與該移液管塞尖摩擦地嚙合。如圖 3 所示，每一移液管 3 6 包含一個活塞部份 3 9，該活塞部份係往復式地安裝在一形成於安裝部件 3 7 中之氣缸 3 5。藉此用彈簧 4 5 垂直地限制移液管 3 6，以致當用完即丟式移液管塞尖 6 2 係於該塞尖裝載步驟期間暫時附著至該移液管之端點時，移液管 3 6 可於部件 3 7 中垂直地滑動抵住柔性彈簧 4 5。這允許所有移液管可靠地拾取稍微不同尺寸之塞尖及確保該塞尖 6 2 之開口端係相對平台 1 0 位在相同之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (57)

高度及使一培養托盤 5 4 (下文所述) 定位在該平台上。

如圖 3 所示，每一塞尖 6 2 之體積係由移液管 3 6 及該塞尖內部體積所形成圓柱體總體積之一實質部份。如圖 4 及 5 中最佳看出者，每一塞尖 6 2 於托盤 5 6 插孔 6 3 中之支撐係藉著如圖 4 之端點支撐或是支撐在形成於該塞尖 6 2 外部上之底部開槽 6 5 之端點上。安排插孔 6 3 之壁面以中心定位塞尖 6 2，用以與移液管 3 6 之錐形端點 6 0 嚙合。

以一塞尖排放器達成該塞尖 6 2 由該移液管之移除，該排放器包括一最佳說明在圖 1 1 之梳子狀塞尖排放器平板 6 4。該平板具有容納該移液管之壁凹，且其梳齒圍繞著每一移液管之外部圓周之一實質部份，例如 1 8 0 度。該平板 6 4 係連接至一對安裝在該頭部 1 2 上之可垂直位移桿 6 6 及由其所支撐 (看圖 1 0)。藉著安裝在該頭部頂端上之一對螺線管 6 8 (看圖 1 及 9) 位移該桿 6 6。當該螺線管 6 8 係未致動時，該塞尖排放器平板 6 4 係維持在圖 5 所示之上方位位置。螺線管之致動將使該平板垂直往下移動，以往下推該塞尖 6 2 及使他們由與該移液管 3 6 端點之嚙合釋放摩擦。

如圖 1 2 所最佳顯示，平台 1 0 係分成複數工作站 1 0 0，1 0 2，1 0 4，1 0 6，1 0 8 等，該工作站係在平台 1 0 沿著其運動 1 5 之路徑隔開。該工作站容納各種施行根據本發明之自動化軟瓊脂分析所必要之零組件。下文詳細敘述用於較佳具體實施例之平台及工作站，應

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (58)

了解的是該平台及各種零組件之結構及組織中之各種變化係包含在本發明之範圍內。

於施行該自動化軟瓊脂分析時，在頭部 1 2 上之移液管 3 6 係用於在各種貯槽及定位在平台 1 0 上之槽腔（下文敘述）之間重複傳送已精確測量之不同流體量，諸如瓊脂、稀釋劑、含有會發育細胞之液體生長介質、及欲分析在該細胞上之效應之化合物。該工作站 1 0 0 及以下等等較佳地係呈線性排列，沿著該平台 1 0 之長度方向彼此毗連，如必要時，每一工作站係可藉著步進馬達 1 8 之作用定位在該頭部 1 2 下方，以允許該移液管 3 6 嚙合位在每一工作站之各種貯槽及槽腔，及完成該分析所需各種流體之傳送。

一工作站、諸如工作站 1 0 0 最好容納一托盤 5 6，該托盤於一系列插孔 6 3 中固定複數用完即丟式移液管塞尖 6 2（亦看圖 1 及 4）。如上面所述，用完即丟式移液管塞尖 6 2 係暫時地定位在該移液管 3 6 之端點上（看圖 3），及當製備不同化合物或化合物濃度之多重分析樣本時用於避免交叉污染，而對每一種不同濃度或化合物使用一新塞尖以傳送流體。工作站 1 0 0 具有儲藏位置之作用，由此可在需要時取出移液管塞尖 6 2 及藉著位移平台 1 0 定位在移液管 3 6 之端點上，以在該移液管 3 6 下方對齊定位一特別行列之塞尖及降低頭部 1 2 以使該移液管與該塞尖嚙合。此操作之進一步細節係敘述在下面。

如圖 6 及 7 中所視，托盤 5 6 能以二種架構之任一種

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (59)

安排在平台 1 0 上，變化安排橫互於平台 1 0 之運動方向之插孔 6 3 數目。圖 6 顯示具有以 1 2 行 8 列配置橫互於該平台 1 0 之 9 6 個插孔之托盤 5 6。藉著如圖所示 7 在該平台轉動該托盤 9 0 度，該插孔 6 3 係以 1 2 列 8 行配置呈現給該移液管。托盤 5 6 之尺寸及方位、以及頭部 1 2 中移液管 3 6 之數目係匹配於該分析中所用培養托盤（下文敘述）之型式及方位。

再參考圖 1 2，在平台 1 0 上之另一工作站、諸如工作站 1 0 2 係用於固定一貯槽 1 1 0。貯槽 1 1 0 能採用任何實用之形式，但較佳地係一具有多重隔間 1 1 2，1 1 4 及 1 1 6 之敞口槽，該隔間譬如用於容納各種流質成分，諸如用以製備適於軟瓊脂分析之托盤之瓊脂、細胞生長介質、會發育之細胞、稀釋劑及化合物（溶劑）。在圖 1 2 中說明三隔間者，應了解這僅只供作實例說明且不意欲以任何方式限制貯槽 1 1 0 之架構。

其它工作站，諸如 1 0 4，1 0 6 等最好容納用於該分析之其他零組件，諸如用於製備該能發育細胞與該生長介質及該化合物之一混合物之混合托盤、用於施行欲分析化合物之連續稀釋之化合物托盤、及用於容納包括瓊脂、生長介質、細胞及欲分析化合物之一混合物之多數樣本之培養托盤。如圖 6 中所視，該培養托盤 5 4 最好具有一列陣槽腔 1 1 8，每一槽腔係用於容納一分析用樣本。

該培養托盤之架構不限於任何特別之槽腔配置，但吾人業已發展出具有 6，1 2，2 4，4 8，9 6，2 5 6

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (60)

或多達 1, 530 個槽腔之標準工業托盤。該托盤大致上係呈標準尺寸，這意指當一托盤中之槽腔數目增加時將減少該槽腔尺寸。

該托盤 54 允許該樣本以有秩序之群組安排成欲評估化合物及其特定濃度之一函數。譬如，圖所示 6 者係一具有呈 8 列 12 行配置之槽腔 118 之標準培養托盤，而合計有 96 個槽腔。該托盤架構係譬如有用於評估腫瘤學研究中之抑制化合物，因為其允許在八種不同濃度下對照細胞之控制培養一式三份地評估三種不同抑制化合物，該細胞未加至該化合物，但卻含有溶劑（下文敘述）。一旦已培育及刻痕記錄（評估細胞生長），該托盤中所安排之樣本提供必要之資料以施行統計分析及決定每一化合物用以抑制細胞生長之最佳濃度。為產生此資訊，一組三行之槽腔包含未加入任何抑制化合物之細胞控制樣本，且該槽腔 118 之三行中之剩餘三組之每一組包含一抑制化合物，及八列之每一列裝有個別化合物之一不同濃度。源自這些分析型式之資訊係特別用於腫瘤學研究，但亦可用於與幹細胞有關係之分析及骨髓相關之化合物。

根據本發明之自動化方法及設備允許於短時間內有效率地施行一些化合物之複雜分析及很多不同濃度，這原要一實驗室技士手動施行者。然而，該程序中之各步驟，譬如由貯槽 110 傳送瓊脂至槽腔 118、由該貯槽傳送生長介質至該槽腔、將會發育之細胞及各種濃度之化合物傳送至該槽腔仍須費一段時間以達成。該程序通常係在室溫

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (61)

(典型約攝氏 25 度) 下施行，這溫度係在該瓊脂凝固之溫度 (典型約攝氏 37 度) 以下。如此，除非採取步驟以控制該瓊脂之溫度，其可能在可傳送至該培養托盤 54 中之槽腔 118 之前於該貯槽中凝固，或該瓊脂可在生長介質、會發育之細胞、或該化合物能傳送及與該瓊脂混合以形成欲分析樣本之前於該槽腔 118 中凝固。當托盤中之槽腔數目增加時，溫度控制變得逐漸重要，因為每一槽腔之容積減少 (不管槽腔數目多寡，該托盤之總尺寸保持不變)。該槽腔容積越小，則該瓊脂在室溫下凝固所花時間越短，如此假如未控制該托盤之溫度，每托盤有越多槽腔時則施行所有製備該分析用托盤之必要步驟所花時間越短。具有 96 個或更多槽腔之托盤未能實際地用於該軟瓊脂分析而無溫度控制，因為瓊脂凝固所需時間係如此之短。隨著工業界趨勢而朝向非常大量之較小體積槽腔，以節省原料成本及加速該分析流程，吾人可預期該溫度控制將隨著時間而日益重要。

為防止該瓊脂之過早凝固，諸如 102 至 108 之工作站具有溫度控制元件 120，用以在每一工作站獨立地控制該溫度，以將定位在該平台 10 上之貯槽 110 或托盤 54 中之液體維持在一想要之溫度。該溫度控制元件包含用以在每一工作站加熱該平台之獨立加熱器。該溫度控制元件與在每一工作站感測溫度之獨立感測器及一用以控制該溫度控制元件及感測器之溫度控制器一起合作工作。該溫度控制元件亦包含用以冷卻每一工作站之冷卻裝置，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (62)

該冷卻裝置亦係藉著該溫度控制器控制。

於圖 1 2 概要地顯示，該溫度控制元件可採用任何實用之形式，譬如簡單之電阻式加熱元件，諸如顯示用於工作站 1 0 2 之 1 2 2。此加熱元件係在每一工作站安裝於該平台 1 0 之表面上或下方及係由一電源 1 2 4 所供電。

該溫度控制元件在該平台 1 0 內交互地包含互連通道 1 2 6，如工作站 1 0 4 所視。加熱或冷卻一流體及使其流通穿過該通道 1 2 6 以加熱或冷卻該托盤或定位在該托盤上之貯槽。如工作站 1 0 4 所示，該流體係諸如水、甘醇或其混合物之液體，其係由一貯槽 1 2 8 唧取，且然後循環穿過該通道 1 2 6，如必需時藉著穿過一外部加熱器 1 3 0 或冷卻裝置單元 1 3 2 之通道加熱或冷卻該液體，以在該瓊脂之凝固溫度以上建立及將托盤 5 4 維持在一想要溫度。該流體可為一氣體，譬如已加熱或冷卻之空氣，或諸如氮或氟氯烷之工作流體來自一熱泵 1 3 4，如工作站 1 0 6 所示。如必需時藉著該熱泵加熱或冷卻該工作流體，以維持該工作站之想要溫度，保持該瓊脂呈液態或允許其如所想要地凝固。一實用溫度控制元件之又另一實例係顯示在工作站 1 0 8 之柏爾帖 (Peltier) 組件 1 3 5。該 Peltier 組件係一能用於在該工作站加熱或冷卻該托盤之供電式固態裝置。該組件之操作係基於該 Peltier 效應，這是當電流通過二不同金屬之連接面或一金屬一半導體連接面所發生之一熱電現象。該連接面係根據電流流經該連接面之方向變溫暖或冷卻。該 Peltier 效應係可逆性的，亦即反轉該電

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (63)

流造成該冷卻之連接面發熱及該熱連接面冷卻。當連接至一電源（未示出）時，Peltier組件 1 3 5 能用作一加熱或冷卻裝置以加熱或冷卻工作站 1 0 8。雖然顯示用以加熱及冷卻每一工作站之不同溫度控制元件，當然這是僅只用作實例及說明之目的，且未暗示於一實用機械中將不同元件實際使用在每一工作站。

每一工作站最好具有為每一工作站自身獨立操作之專用溫度控制元件 1 2 0，以允許每一工作站及定位在其上面之托盤或貯槽維持在一與另一工作站不同之溫度。為能夠獨立控制該工作站溫度，其必要由其附近之工作站絕熱每一工作站。這是藉著在該工作站之介面之間介入一絕熱片 1 3 6 達成，如在圖 1 2 所視。該絕熱片將阻斷鄰接工作站間之傳導性熱傳送，允許他們藉著其個別之溫度控制元件維持在不同溫度。該絕緣材料包含呈薄片形式之玻璃、玻璃纖維、陶瓷、塑膠、橡膠、木頭等，以施行該工作站之絕熱。

該溫度控制元件與獨立之溫度感測器一起合作運轉，諸如位在每一工作站之項目 1 3 8，1 4 0 及 1 4 2 所說明者。該溫度感測器較佳地係回應於其所安裝工作站之溫度而產生一電信號之電能轉送器。該信號係經由個別之連接線（1 3 8 a，1 4 0 a 或 1 4 2 a）提供至一用以控制該溫度控制元件及感測器之溫度控制器，諸如一微處理器 7 0，該微處理器解譯該信號及然後經由其他連接線 1 3 8 b，1 4 0 b 及 1 4 2 b 將控制信號送至該溫度控

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (64)

制元件 1 2 0 以在需要時加熱或冷卻該工作站，而將該工作站及定位在其上面之托盤或貯槽維持在一業已預先程式設計進入該溫度控制器之想要溫度。譬如，假設包括電阻式加熱元件 1 2 2 之溫度控制元件 1 2 0 係以電源 1 2 4 供電，該溫度感測器 1 3 8（經由連接線 1 3 8 a）發出信號至該微處理器 7 0，以致該工作站 1 0 2 之溫度滑落低於一設定溫度（典型約攝氏 4 2 度，即該瓊脂之較佳溫度），意指該貯槽 1 1 0 中之瓊脂將開始凝固，然後該微處理器（經由連接線 1 3 8 b）發出信號至該電源 1 2 4，以經過該電阻式加熱元件 1 2 2 送電流，直至該感測器 1 3 8 產生一指示該工作站 1 0 2 溫度又在想要溫度之信號，而將該瓊脂保持在液態。

同理，對於在穿過該平台 1 0 包含一系列通道 1 2 6 之工作站 1 0 4 之溫度控制元件 1 2 0，一加熱或冷卻液體或氣體係循環經過該通道，一來自溫度感測器 1 4 0 而指示該工作站 1 0 4 之溫度低於所想要程度之信號將導致該微處理器指揮液體（或氣體）由該貯槽唧取穿過該加熱器 1 3 0 及進一步穿過該通道 1 2 6，藉此將在工作站 1 0 4 之平台溫度升高至所想要程度。

於第三實例中，對於該加熱及冷卻元件包含通道 1 2 6 之工作站 1 0 6，且該熱泵 1 3 4 之工作流體能循環穿過通道 1 2 6，一由溫度感測器 1 4 2 至該微處理器之信號指示該工作站 1 0 6 之溫度係太熱以致其可能殺死裝在工作站上托盤中之會發育細胞，並將導致該微處理器

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (65)

命令該熱泵循環諸如氟氯烷或氨之冷卻流體通過呈冷卻裝置方式之通道，以冷卻該托盤及將該工作站之溫度維持在想要程度。

每一步進馬達 1 8，2 8 及 4 6 及該螺線管 6 8 之操作係藉著一運動控制器控制，最好是微處理器 7 0。根本上，該微處理器 7 0 具有一脈衝產生器之功能，以控制每一元件之操作序列，及如此控制該平台 1 0、該頭部 1 2、該推液塞組件 3 4、及該塞尖排放器平板 6 4 之相關運動，以在一工作站施行譬如該托盤 5 4 中之一樣本之連續稀釋。既然該步進馬達回應所施加之每一致動脈衝提供一預定旋轉量，經過適當控制藉著該微處理器所供給致動脈衝之數目能獲得該可移動元件之精確定位。

除了控制各種可移動元件之外，該微處理器 7 0 亦經由適當定位之感測器監視其移動。譬如，如圖 1 及 6 所示，該平台 1 0 用之感測器配置包含一附著至該平台及由該平台之側邊伸出之定向片 7 2、及一霍爾效應感測器 7 4，該感測器 7 4 感測該定向片 7 2 及因此該平台 1 0 在其位移中何時通過一預定參考點。該平台每次通過該點，該霍爾效應感測器 7 4 送一信號至該微處理器 7 0，而能夠使該微處理器更新有關該平台位置之資訊。如此，萬一該步進馬達 1 8 於該平台之位移期間錯過一致動脈衝，或萬一該微處理器 7 0 內所儲存之脈衝計數與該平台之位置不一致，此錯誤將不會延續至該操作之後續循環。

除了該參考感測器 7 4 之外，一對極限感測器 7 6 係

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (66)

配置在該平台行進路徑之各個端點。由該感測器所送出之信號指示該平台正接近之其行程末端及對該微處理器 70 提供一指示，以中斷對該步進馬達 18 之電源供給或採取某些其它之校正動作。提供類似之感測器配置以監視該頭部 12 及該推液塞橫板 42 之移動。

在該機械上亦提供一感測器，以感測是否業已藉著該移液管組件拾起成排托盤 56 中之所有塞尖。參考圖 8，該感測器最好在該平台之一邊包括一含有 L E D 89 或類似此發光裝置之電光學機制及在該平台之另一邊包括一光電元件 90。該二元件係與該列移液管 36 對齊。當一或多塞尖 62 係呈現在該列槽腔 63 內並與該感測器登錄對齊時，來自該 L E D 之光束 82 將被打斷及將不會抵達該光電元件 90。然而，假如藉著該移液管組件順利拿起成排之所有塞尖，該光束將延伸越過該托盤 56 及由該光電元件所感測。藉著適當定位 L E D 89 及光電元件 90，亦可感測托盤 56 本身之可能拾取，如藉著塞尖 62 及托盤 56 中槽腔間之摩擦。

連續稀釋用機器操作之敘述

該連續稀釋液操作係由一液體處理機所執行之重要功能。於施行該操作時，改良之液體處理機具有拾取該托盤 56 中成排塞尖、將他們插入該培養托盤 54 中之一列槽腔、由該槽腔抽提部份液體樣本、將該塞尖射入該槽腔之下一連續列中之稀釋劑、振動該推液塞以混合該液體、定

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (67)

位該塞尖以排出全部液體、且然後使該塞尖返回至該托盤 56 之功能。參考一程式之以下實例可更詳細地提出此操作，而可藉著該微處理器使用該程式以施行連續之稀釋處理。

步驟 指令動作

- | | |
|------------------|----------------------|
| 001 使平台移至位置 M | 將第 M 列之托盤 56 送至移液管下方 |
| 002 頭部下移 | 裝載塞尖 |
| 003 頭部上移 | 拾取塞尖 |
| 004 偵測是否完成塞尖拾取操作 | 是：跳至 005
否：跳至 002 |
| 005 使平台移至位置 N | 將第 N 列之托盤 54 送至塞尖下方 |
| 006 頭部下移 | 將塞尖插入槽腔 |
| 007 推液塞上移 | 將樣本吸入移液管 |
| 008 頭部上移 | 由槽腔移去塞尖 |
| 009 使平台移至位置 N+1 | 將下一列之托盤 54 送至塞尖下方 |
| 010 頭部下移 | 將塞尖插入槽腔 |
| 011 振動推液塞 | 混合樣本及稀釋劑 |
| 012 頭部局部上移 | 使塞尖剛好拔出該槽腔中之液體 |
| 013 推液塞下移 | 由移液管排出樣本 |
| 014 頭部稍微進一步上移 | 在液體因表面張力而形成凹狀或凸狀部份上方 |
| 015 推液塞下移至超過 | 排出所有樣本及一些空氣 |

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (68)

起始點

- 016 頭部上移至頂部位置
- 017 推液塞上移至起始點
- 018 使平台移至位置 M 將空的托盤 56 列送至塞尖下方
- 019 頭部下移 將塞尖插入各插孔
- 020 塞尖排放器下移 釋放塞尖
- 021 塞尖排放器上移
- 022 偵測是否完成塞尖 是：跳至 023
- 排放操作 否：跳至 020
- 023 頭部上移
- 024 $M=M+1, N=N+1$
- 025 使平台移至位置 M
- 026 跳至 002

該循環視需要係重複若干次，並等於欲進行稀釋次數。於任何給定循環期間，假如不需要改變該塞尖，能刪除步驟 001 - 004 及 018 - 022。

於開始一連續稀釋操作之前，該微處理器 70 能程式設計成具有該製程之每一循環期間欲傳送之液體量。此數量決定該推液塞桿 40 於該程式之步驟 007 期間所提升範圍。此舉依序決定該托盤 54 之連續槽腔中樣本之濃度。譬如，為獲得一稀釋幅度，其中一列中之濃度係前一列之一半，第一列之槽腔可充滿 100 微升之樣本，且所有其他槽腔每一個充滿 50 微升之稀釋劑。將設定該微處理

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (69)

器以於每一循環期間造成由一槽腔傳送50微升至下一相繼槽腔。

於步驟011期間，該推液塞桿40可上下振動，以確保充分混合。

在該連續稀釋流程之每一循環之最初，該推液塞桿40係配置在該移液管內之一預定校準點。能使用一類似先前關於該平台10所述型式之霍爾效應感測器，以監視及控制該桿之位置。於該程式之步驟數目014中，在該樣本及稀釋劑業已在步驟011中混合之後，升高該推液塞塞尖，以致他們於步驟012中係剛好位在該槽腔中液體水平面上方，且該推液塞係返回至該校準點以在步驟013中由該移液管排出該液體，該塞尖係升高至剛好位在該插孔中液體因表面張力而形成凹狀或凸狀部份上方一位置。至那時為止往下延伸該推液塞至超過該校準點，由該移液管排出全部液體。此舉有效地藉著造成該移液管內所收集之一些空氣亦排出而將該液體吹出該移液管，及允許任何保留於該塞尖中及延伸在該塞尖及該插孔間之液體藉著由於作用在該液體上之表面張力之毛細管作用抽出該塞尖。在該塞尖係由一不可與水混合之塑膠製成處，此步驟特別有效，該塑膠如上所述係一較佳材料。

雖然某些步驟已顯示為個別的，他們係同時地執行。譬如，步驟016及017可同時發生。

用於托盤間之傳送之機器操作敘述

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (70)

該改良液體處理設備之另一重要功能係個別槽腔元件間之托盤傳送。於該程序中，來自第一托盤之槽腔元件係藉著該移液管塞尖拿起及卸下放入第二托盤之想要槽腔。於前述敘述連續稀釋之步驟系列中，在步驟 0 0 9 發生槽腔元件至第二托盤之傳送，在此於來自第一托盤中一列之槽腔元件係吸入該移液管塞尖之後（步驟 0 0 7），定位該平台以使該第二托盤之想要行列位在該移液管塞尖下方。然後降低該移液管及使該移液管之內容物排出進入該第二托盤中所想要之槽腔列。如想要時重複該步驟，以施行由第一托盤中各槽腔傳送槽腔元件至第二托盤中之各槽腔。

用於軟瓊脂托盤之自動化製備之機器操作敘述

下文敘述一自動化軟瓊脂分析之實例，其評估一系列三種不同化合物之各種濃度在致瘤細胞生長上之抑制效應。根據本發明之改良液體處理機係用於在需要時自動化製備很多欲分析樣本之極沉悶及要不然勞力密集過程，以評估各化合物及決定用於最佳有效抑制致瘤細胞再生之化合物濃度。

如圖 1 3 所示，本實例之機械 9 具有一平台 1 0，該平台具有六個工作站以製備分析用樣本。一夾持用完即丟式移液管塞尖列 6 2 之塞尖托盤 5 6 係定位在標以 1 0 0 之第一工作站。塞尖托盤 5 6 係安排有 8 列 x 1 2 行之夾持用完即丟式移液管塞尖 6 2 之插孔 6 3（看圖 6）。選

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (71)

擇 8 列 x 1 2 行之架構以匹配該培養托盤架構 (下文敘述) , 而最後將承接欲分析之樣本。在該頭部 1 2 上亦有 1 2 支移液管 3 6 , 其同樣對應於該培養托盤架構。

一貯槽 1 1 0 係定位在該第二工作站 1 0 2 。貯槽 1 1 0 具有三隔間 (看圖 1 2) 。隔間 1 1 2 最初容納一瓊脂糖 (修飾瓊脂) 之供給源, 隔間 1 1 4 最初容納一生長介質之供給源, 諸如以胎兒腓腸血清補充之 R P M I , 及隔間 1 1 6 最初容納生長介質及致瘤細胞之一混合物。

一化合物稀釋托盤 1 6 2 係定位在該第三工作站 1 0 4 。托盤 1 6 2 具有 9 6 個安排成 8 列 x 1 2 行之槽腔, 該槽腔最初係空的。

一主要化合物托盤 1 6 4 係定位在該第四工作站 1 0 6 上。托盤 1 6 4 亦具有 9 6 個安排成 1 2 x 8 架構之槽腔。三行槽腔包含相同溶劑之最初稀釋液或最高濃度, 例如 D M S O , 其中該化合物係溶解在該剩餘之九行中。該三行槽腔 (未承接任何化合物) 具有控制之作用。該主要化合物托盤上之剩餘九行槽腔係分成各三行之三群, 每一群最初容納一在欲評估之最高濃度之不同化合物。

一混合托盤 1 6 6 係定位在該第五工作站 1 0 8 。混合托盤 1 6 6 具有 9 6 個安排成 1 2 x 8 架構之槽腔, 該槽腔最初係空的。

一培養托盤 5 4 係定位在該第六工作站 1 0 9 。該培養托盤 5 4 具有 9 6 個安排成 1 2 x 8 架構之槽腔, 所有該槽腔最初係空的。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (72)

藉著一常駐於微處理器 7 0 中之軟體程式控制該製備托盤之流程，及首先移動該平台 1 0 以於移液管 3 6 下方對齊地定位一排塞尖 6 2，且降低該頭部 1 2 以將移液管塞尖裝載在移液管上。升高該頭部及移動該平台以於移液管下方定位譬如容納生長介質之隔間 1 1 4。降低該頭部，以把該移液管浸入該隔間及使生長介質抽吸進入該塞尖。升高該頭部及移動該平台以在該化合物稀釋托盤 1 6 2 中之槽腔上方定位該移液管。生長介質之一預定數量係由每一移液管傳送進入托盤 1 6 2 中八列槽腔之七列。

然後移動該平台以於移液管 3 6 下方定位該塞尖托盤 5 6，在此於其槽腔中替換已用過之塞尖，及一組新塞尖係由該托盤 5 6 中之下一列裝載至該移液管上。其次移動該平台以於移液管下方定位該主要之化合物托盤 1 6 4。該移液管係降低進入托盤 1 6 4 中之一排槽腔，然後想要數量之溶劑（前三行）及化合物（剩餘九行）係抽吸進入該塞尖。升高該移液管及移動該平台以在該化合物稀釋托盤 1 6 2 中之空槽腔列上方定位該移液管。該移液管係降低進入該空槽腔，及將化合物及溶劑傳送進入該空槽腔。

移動該平台及頭部，以將該移液管上之塞尖放入其插孔及裝載一組新塞尖至該移液管上。然後移動該平台以在該化合物稀釋托盤 1 6 2 中之各槽腔列上方定位該移液管，該托盤 1 6 2 中具有欲測試之溶劑及化合物。然後藉著由第一列槽腔抽吸一預定容量及傳送該容量進入第二列槽腔使該機械如上所述執行一連續之稀釋。在一混合步驟之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (73)

後，相同之預定量係由槽第二列腔抽吸及傳送至第三列槽腔。為剩餘列重複這些步驟。

再次用新塞尖替換舊塞尖及來回移動該平台，以允許該移液管由該化合物稀釋托盤 1 6 2 之每一槽腔抽吸一部份化合物及溶劑及傳送該部份至該混合托盤 1 6 6 之一對應槽腔。

再次替換移液管塞尖及然後該平台在該移液管下方定位該貯槽之隔間 1 1 6。隔間 1 1 6 容納生長介質及致瘤細胞之一混合物。該塞尖係降低進入該隔間及該生長介質與細胞係數次吸入該塞尖及由該塞尖排出，以攪動該混合物及確保實質上有一致數目之細胞浮動於懸浮液中及將吸入該塞尖。在混合之後，細胞及生長介質係抽吸進入該塞尖，且移動該平台以在該移液管下方定位該混合托盤 1 6 6，然後該細胞及生長介質混合物係傳送進入該混合托盤之槽腔。

再次替換移液管塞尖及移動該平台以在容納該瓊脂糖之貯槽隔間 1 1 2 上方定位該移液管。瓊脂糖係被抽吸進入該塞尖且然後藉著適當定位平台 1 0 傳送至該混合托盤 1 6 6 之槽腔。再次替換塞尖，然後降低進入該混合托盤之槽腔，每一槽腔具有在想要濃度之瓊脂糖、生長介質、細胞及溶劑或一化合物之混合物。該移液管係藉著交替地由該塞尖抽吸各內容物及排出該內容物退入該槽腔用於混合該混合托盤之各內容物。

於最後之步驟中，該混合托盤 1 6 6 中每一槽腔之一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (74)

部份內容物係在工作站 1 0 9 傳送至該培養托盤 5 4 中之一對應槽腔。在攝氏 3 7 度下於百分之 5 之 CO_2 大氣中培育一段時期（典型為數週）而使該致瘤細胞繁殖之後，允許該培養托盤中之混合物凝固。在該培育期之後，刻痕記錄在該培養托盤中發展之致瘤細胞菌群，以決定該化合物抑制細胞生長之效果。

如上述分析之實例所視，需要很多步驟以製備一具有 9 6 個槽腔之培養托盤，俾能對八種不同化合物濃度一式三份地評估三種抑制化合物。即使當如上面所述藉著實質上自動化之方法製備該培養托盤時，該製程需要時間。假如在室溫施行該製程，及假如未小心地控制該貯槽 1 1 0 及該各種托盤 1 6 2，1 6 4，1 6 6 與 5 4 之溫度，則該製程將失敗，因為該瓊脂糖在其能藉著該移液管之作用傳送及混合之前將會在該貯槽及於該槽腔中凝固。當該槽腔容積減少時該問題加劇，亦即每托盤之槽腔數目增加時，如上面所說明。因此，為自動化該軟瓊脂分析方法，最好該平台 1 0 上之工作站具有如圖 1 2 所示之溫度控制元件 1 2 0，其包含溫度感測器 1 3 8，1 4 0，1 4 2，1 4 4，1 4 6 及相關之輔助裝備，諸如電源 1 2 4、液體貯槽 1 2 8、及加熱與冷卻裝置 1 3 0 與 1 3 2 或熱泵 1 3 4，而充當所使用之特定加熱或冷卻元件。至於該改良液體處理機之所有其他功能，藉著該微處理器 7 0 控制該溫度控制元件之操作，以將溫度敏感分析成份之溫度自動地維持在適當之溫度。譬如，於一致瘤分析中，將該瓊

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (75)

脂糖保持在攝氏 42 度及將該致瘤細胞保持在約攝氏 37 度，或於一胚胎幹細胞研究中，將幹細胞保持在攝氏 37 度，或於不耐熱細菌之研究中，將該細菌保持在其適當溫度，以模擬該不耐熱細菌所生活之熱含硫排洩孔之溫度。

溫度控制係亦有用於將該貯槽中之細胞維持在一想要之最佳溫度，以確保細胞之生活力及防止他們彼此附著或附著至該貯槽之壁面，該細胞在較低溫度下可附著至該貯槽之壁面。如此，溫度控制可確保有充分數量之會發育細胞供做分析。

溫度控制對維持該瓊脂或瓊脂糖之溫度係同樣重要，在此理想之溫度係充分高，以防止該瓊脂或瓊脂糖之過早膠凝，直至該瓊脂或瓊脂糖係倒入該口槽腔。於 Matrigel® 之案例中，生膠質或骨膠、或其他類似材料之溫度控制係重要的，以當該材料變溫暖時防止過早膠凝。因此，以此材料，其重要的是於充填該槽腔之前保持該材料冷卻。

分析程序之自動化特點可延伸至刻痕記錄或評估該培養托盤中之細胞菌群，以評定該抑制化合物之有效性。一些機械可會同該改良液體處理機一起使用，以如下文所述刻痕記錄該培養托盤。

螢光刻痕記錄

螢光刻痕記錄 (Fluorescent scoring) 係現行自動化評估該軟瓊脂分析中所發展細胞菌群之較佳方法。這是因為該樣本中之細胞傾向於三維地散佈遍及該瓊脂，且該螢光

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (76)

方法係充分敏感，以正確地感測深入位於該瓊脂中之菌群。

在該培養托盤中之樣本已於適當溫度下培育達適當期間且已複製該細胞以形成菌群之後，一生活力化合物係插入每一樣本槽腔及允許其擴散穿過該瓊脂。該生活力化合物，譬如可穿透薄膜之 calcein AM 係擴散進入該細胞，在此其係藉著該會發育細胞新陳代謝。於新陳代謝期間，該化合物係藉著自然蛋白分解過程作細胞分裂及變成螢光。該螢光化合物係只呈現於會發育之細胞中。該培養托盤係在該細胞已有時間新陳代謝該生活力化合物之後放入該螢光刻痕機。該機械以適當波長之雷射光刺激該培養托盤每一槽腔中之生活力化合物，及使該會發育細胞中之已細胞分裂化合物發出螢光。對於每一槽腔中之每一樣本，由一感測器感測及記錄藉著該已細胞分裂化合物所放射之螢光。由每一樣本所放射之螢光大小係與會發育細胞之數目成正比。

大致言之，未看見任何抑制化合物之控制樣本將具有最大最高之會發育細胞，及因此具有最大之螢光。具有該抑制化合物之樣本中之細胞生長大致上將少於該控制樣本，且來自這些樣本之螢光光度將為來自該控制樣本之螢光之若干百分比。該螢光刻痕機比較由每一槽腔所放射之螢光大小與由具有該控制樣本之槽腔所放射之螢光大小，且由這些比較值，其可能繪製代表該會發育細胞之百分比之資料點，該百分比係所欲測試每一化合物之化合物濃度之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (77)

一函數，以決定何種濃度產生最低之會發育細胞數目，及因此決定何種濃度可最有效抑制該致瘤細胞之生長。藉著一式三份地具有該八種濃度，得以完成抑制作用曲線行及統計分析。

分光光度刻痕記錄

另一種評估分析結果之自動化方法係藉著分光光度法。一生活力化合物係在該培育期之後再次插入該培養托盤之槽腔及允許其擴散穿過該瓊脂。該生活力化合物擴散進入該會發育細胞，在此其係於新陳代謝期間裂解。當裂解時，該生活力化合物採取一特定顏色及在一主要波長下反射入射之白光。譬如當裂解時，MTT (3-[4,5-二甲基噻唑-2-yl]-2,5-二苯四唑溴化物) 生活力化合物主要反射具有一集中在570納米波長之紅光。該機械以一光源照明該培養托盤中之每一樣本，且一感測器測量該特別波長之光量，該波長對應於該已裂解生活力化合物由每一槽腔所反射之顏色。在所感興趣之波長所反射之光量將再次與每一樣本中之會發育細胞數目成正比。該機械比較由每一槽腔在所感興趣之波長所反射之光量與由具有該控制樣本之槽腔所反射之光量，以決定一特別抑制化合物之一特別濃度之有效性。由此資訊可產生抑制曲線，以比較該抑制有效性，其為每一欲測試化合物之濃度之一函數，且可獲得最有效之濃度。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (78)

放射性刻痕記錄

於放射性之刻痕記錄中，一化合物、諸如具有放射性追蹤物之胸腺嘧啶核苷係在該培育時期之後放入每一樣本槽腔中，該追蹤物諸如超重氫或放射性之硫磺同位素（

S 3 5）。該會發育細胞吸收該放射性元素及將他們併入其 D N A 及其他蛋白質，如此變成具放射性。未併入該細胞之多餘放射性材料係沖洗出該槽腔，且然後藉著諸如蓋氏計數器之適當感測器測量每一槽腔中之放射活性之程度。放射活性之程度係與每一槽腔中之會發育細胞成正比，及如此提供每一槽腔中各菌群尺寸之一相對量測。再者，內容物未加入欲分析之抑制化合物之控制槽腔應具有最會發育之細胞，且因此當以感測器測量時具有最高之放射性程度。其他槽腔與該控制槽腔中放射性程度之比較提供該抑制化合物之有效性之一相對量測，且其濃度及此資訊係於抑制癌細胞繁殖中用於決定具有最大有效性之濃度。

因為由該細胞所吸收之放射性材料量係相當少，其可能需要使用一閃爍計數器以及一閃爍流體，以感測及放大來自該槽腔之放射，俾能使該感測器正確地測量每一槽腔中之放射活性之程度。閃爍流體包含某些當與高能量輻射相互作用時會發出螢光之有機溶液。藉著電離輻射直接或間接地激發該溶液中之分子，導致光子之放射。藉著一光電倍增管裝置可偵測得這些光子，而導致回應於該原始電離輻射所產生之光子產生一大幅放大之電子脈衝。

根據本發明之改良液體處理機能藉著組合其與任何上

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (79)

述之自動化刻痕機用於自動化刻痕記錄該細胞菌群。

如圖 1 4 所示，該組合之機械併入該自動化刻痕機 2 0 0 與該改良液體處理機 9，用以施行自動化軟瓊脂分析。使用一螢光刻痕機之現行較佳具體實施例之操作係敘述在下面，當然這是當作實例及不限制本發明之範圍。

於該組合機器之操作中，培養托盤 5 4 係由該培育器移去及定位在該平台 1 0 之工作站上。該加熱及冷卻元件 1 2 0 係用於將該培養托盤保持在一想要溫度，以使該瓊脂糖中之細胞保持會發育及亦增進細胞新陳代謝之活性，以致該生活力化合物一旦導入該細胞將輕易地裂解。貯槽 1 1 0 係充滿一生活力化合物，當藉著該細胞裂解時該化合物發出螢光，且該移液管 3 6 係用於由該貯槽傳送一預定量之生活力化合物進入每一培養托盤之每一槽腔。一旦槽腔中之生活力化合物擴散進入該會發育細胞，其在此裂解。該培養托盤 5 4 維持在該平台 1 0 上達一充分時期，以允許該生活力化合物擴散及裂解，在此之後該托盤係傳送至該螢光刻痕機 2 0 0。最好藉著一自動化裝置、諸如機械手臂 2 0 2 達成此操作，該自動化裝置由該平台 1 0 移去每一托盤 5 4（實線所示）及將他們插入該刻痕機（虛線所示）。在該機械（在 2 0 0 a 所說明）內藉著如上所述之螢光方法刻痕記錄該托盤中之菌群，且由該刻痕機（在 2 0 0 b 所說明）排出該托盤，然後刻痕記錄下一個插入該機械之托盤。

吾人期待根據本發明之改良液體處理機可實現施行軟

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

五、發明說明 (80)

瓊脂分析所需工時之顯著節省。吾人估計其將只需要

1 . 5 F T E s (專任從業人員) 以使用該改良方法於五種致瘤細胞系上一式三份地在 8 種濃度下評估 1 5 種抑制化合物。此評估將需要製備 2 6 個具有所需分析成份 (譬如以瓊脂糖、生長介質、細胞、抑制化合物或溶劑充滿每一槽腔) 之托盤，及在該培育期之後刻痕記錄每一槽腔。對比之下，使用傳統之手工方法，該工作將花費最少

1 1 F T E s 。如此，吾人預期由根據本發明之改良液體處理機及方法所給定之自動化程序能 1 0 倍地減少施行軟瓊脂分析所需之時間，這將導致大幅節省成本、減少評估所感興趣化合物所需之時間、及藉著消除人類之變異性因子增加該刻痕記錄之一致性。本發明亦允許軟瓊脂分析以及使用溫度敏感元件之其他分析之微型化。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

四、中文發明摘要 (發明之名稱：自動半固體基質分析及其液體處理) 設備

本發明揭露一種改良之液體處理機，其能夠在培養托盤之自動化製備中調節分析成份之溫度供作生物學分析。該機械包含一定位在可垂直移動頭部下方之可水平移動平台。該平台係分成複數工作站，以容納混合托盤、培養托盤、及液體分析成份之貯槽。該頭部固定複數移液管，該移液管抽吸及排出液體，以當協調該頭部及該平台之移動時於該貯槽、該混合托盤及該培養托盤之間傳送及混合該分析成份，如藉著一微處理器所控制。該平台上之每一工作站具有獨立之加熱、冷卻及溫度感測元件，用以在工作站調節一托盤或貯槽中所容納液體之溫度。一用以諸如藉著螢光、分光光度、或放射性技術自動評估該分析結果之裝置係與該改良液體處理機結合。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要 (發明之名稱：)

**AUTOMATED SEMI-SOLID MATRIX ASSAY AND LIQUID HANDLER
APPARATUS FOR THE SAME**

An improved liquid handling machine capable of regulating the temperature of assay compounds in the automated preparation of culture trays for biological assays is disclosed. The machine includes a horizontally movable table positioned beneath a vertically movable head. The table is divided into a plurality of stations holding mixing trays, culture trays and reservoirs of liquid assay compound. The head holds a plurality of pipettes which aspirate and expel liquid to transfer and mix the assay compounds between the reservoir, the mixing trays and the culture trays upon coordinated movement of the head and the table as controlled by a microprocessor. Each station on the table has independent heating, cooling and temperature sensing elements for regulating the temperature of the liquid held in a tray or reservoir at the station. A device for automatically evaluating the results of the assay, such as by fluorescence, spectrophotometric or radioactive techniques is incorporated with the improved liquid handling machine.

訂

線

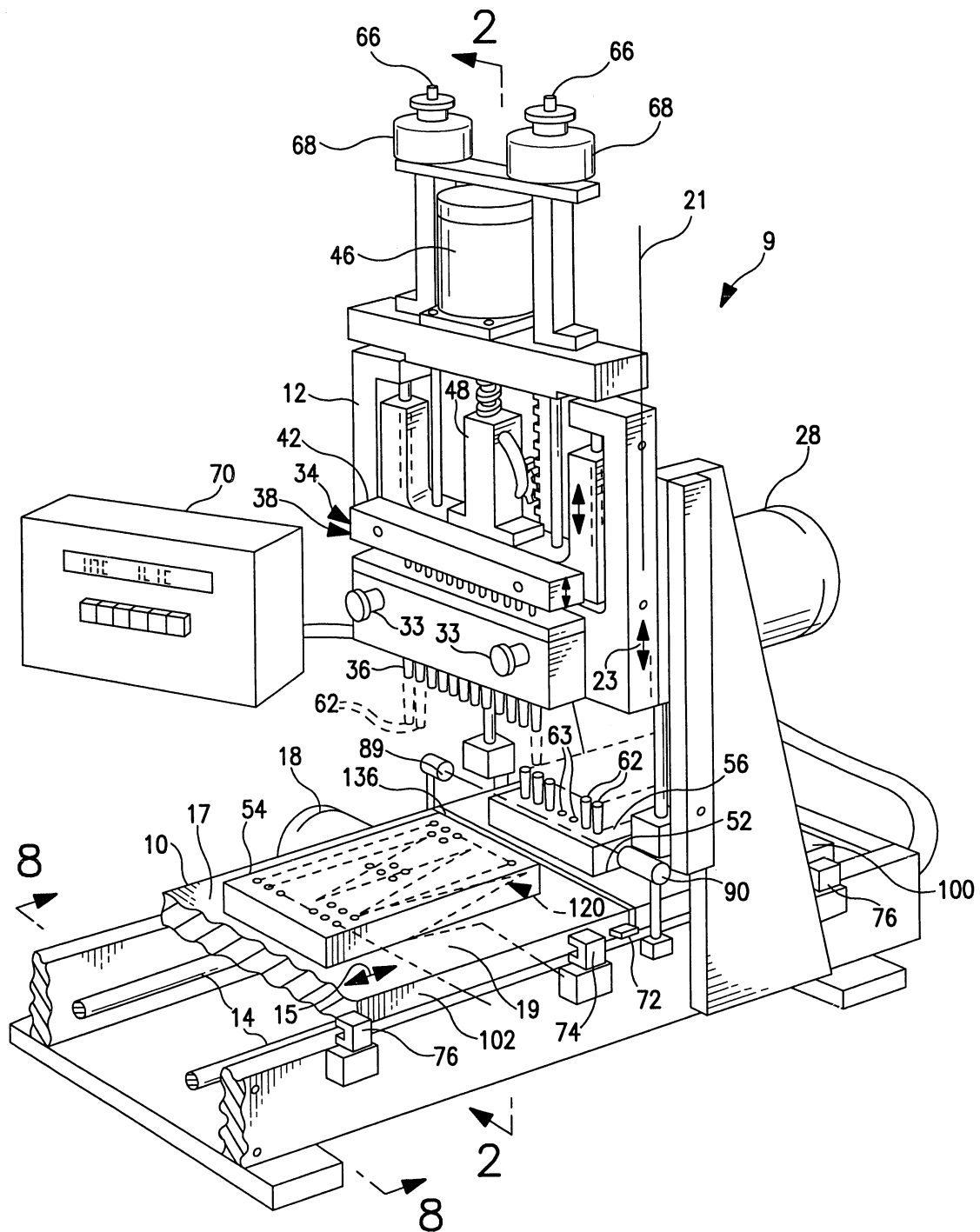
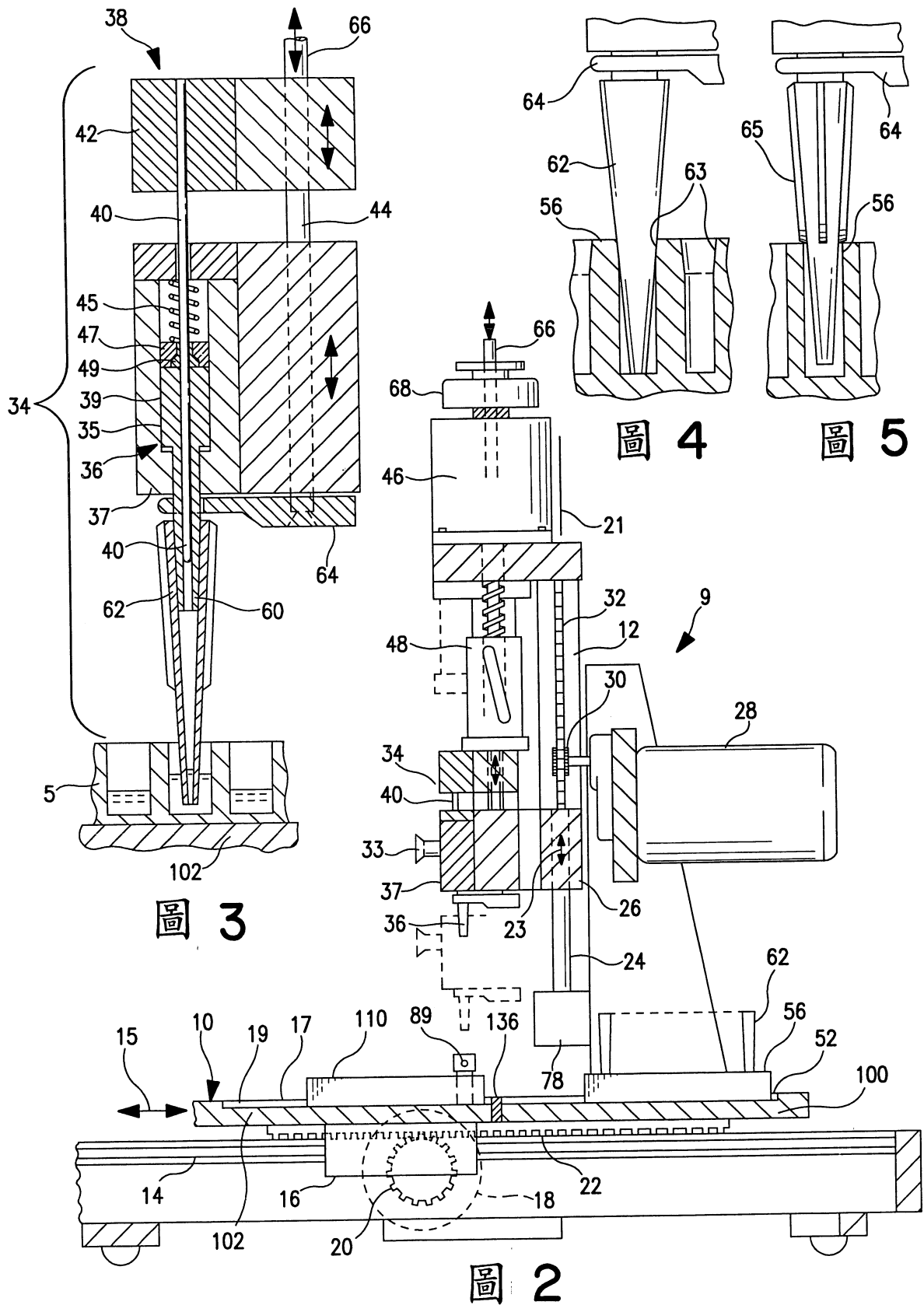


圖 1



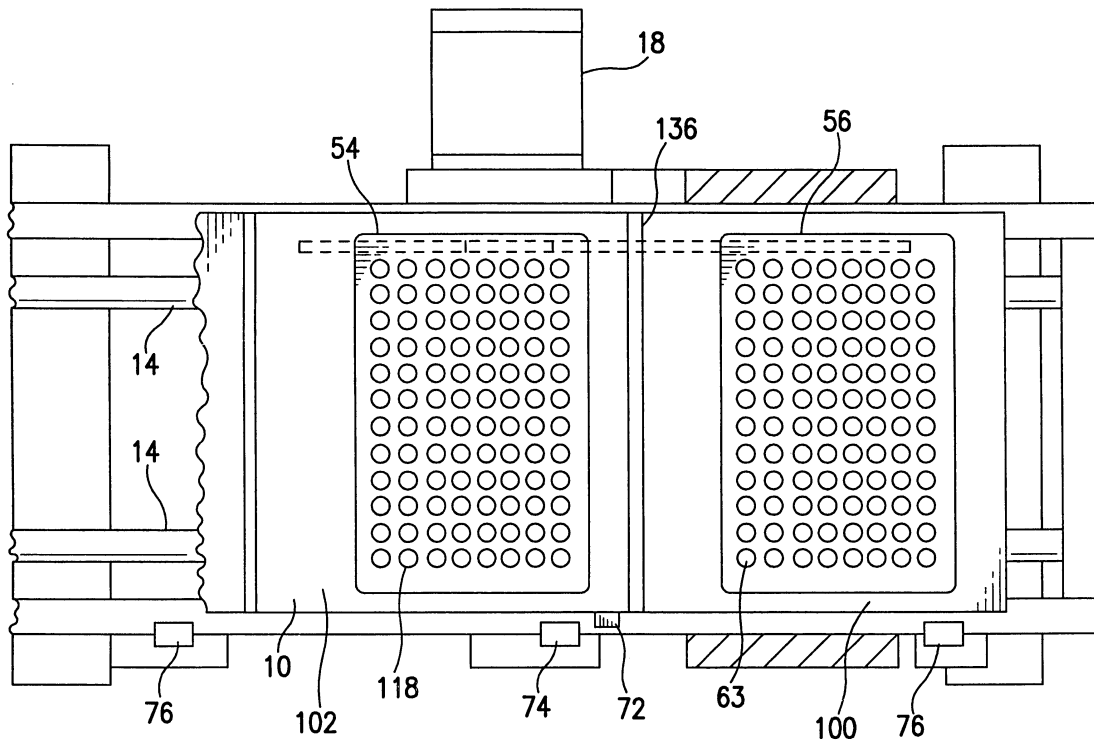


圖 6

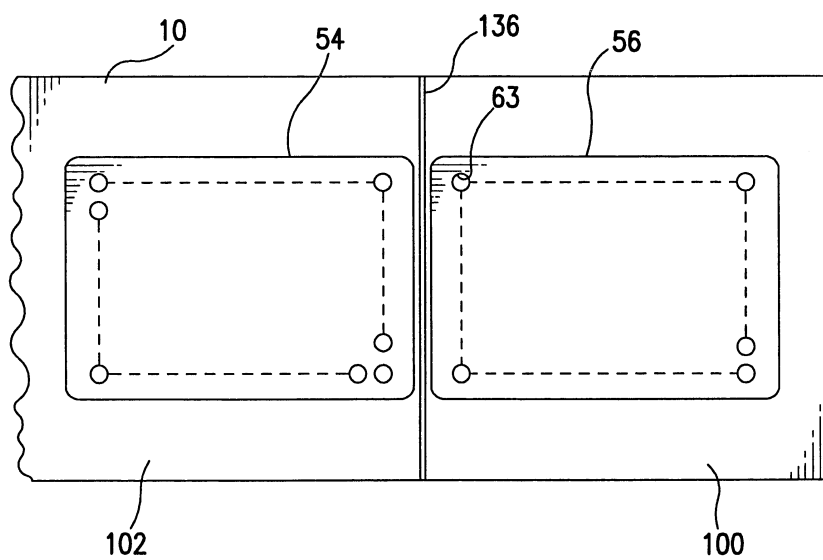


圖 7

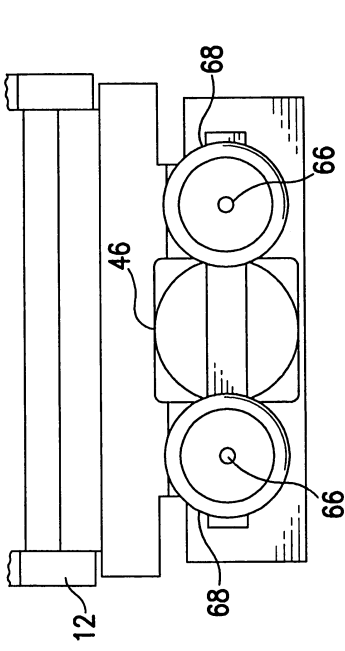


圖 9

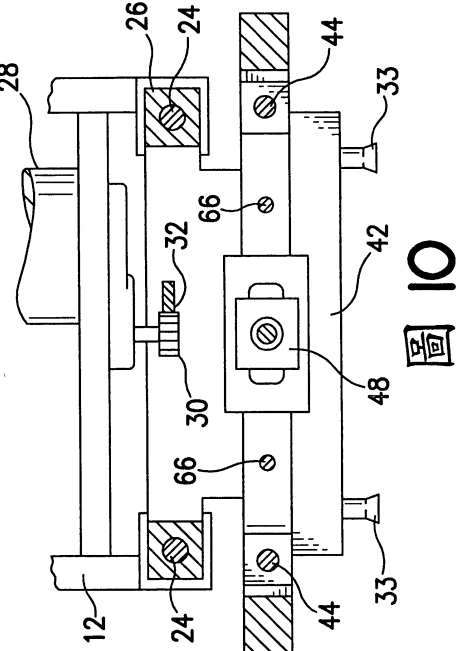


圖 10

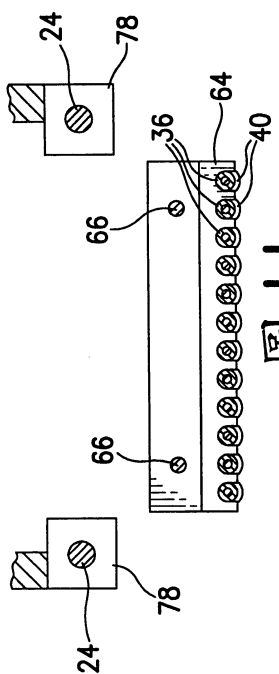


圖 11

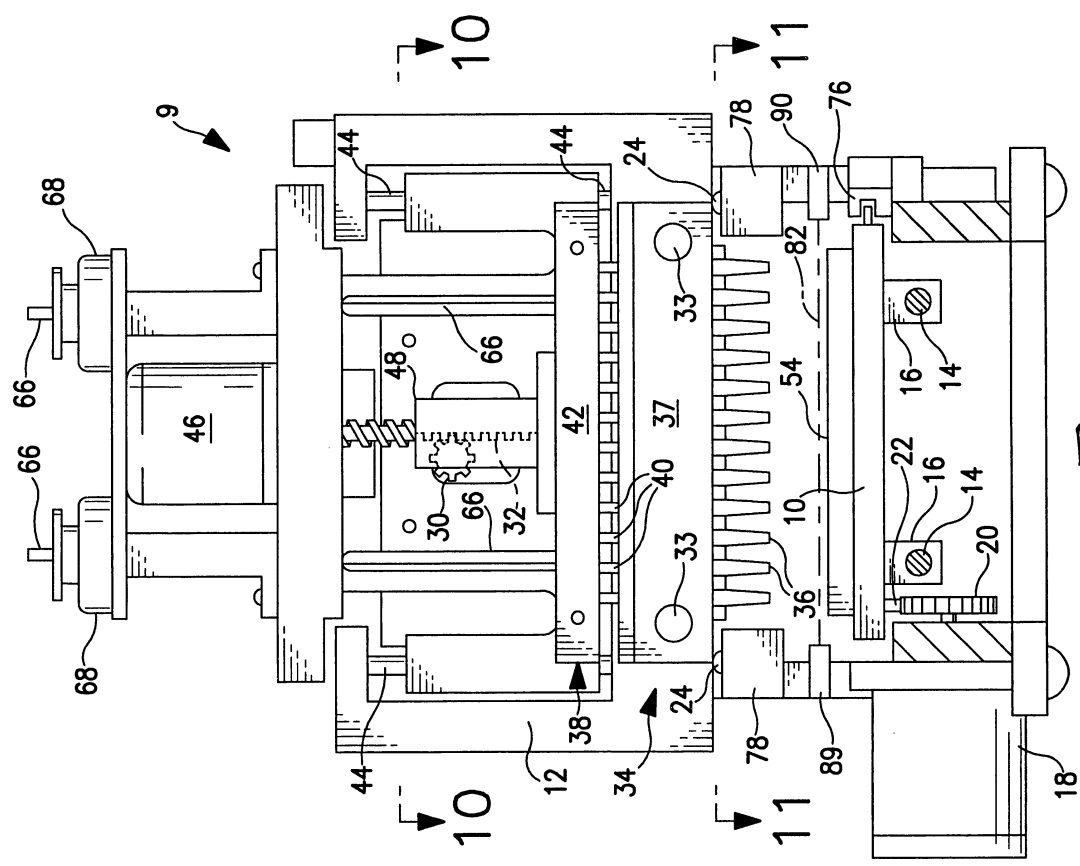


圖 8

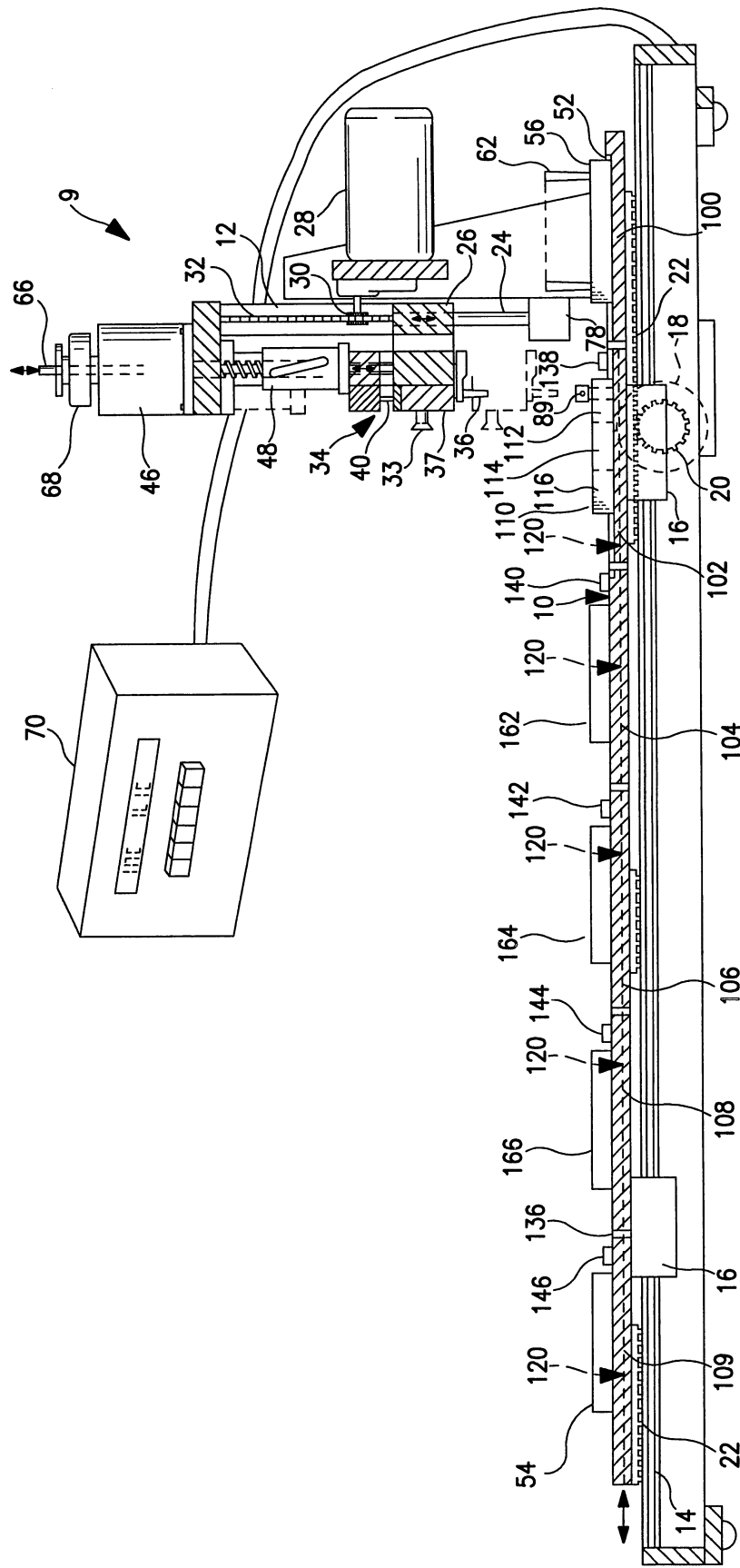


圖 13

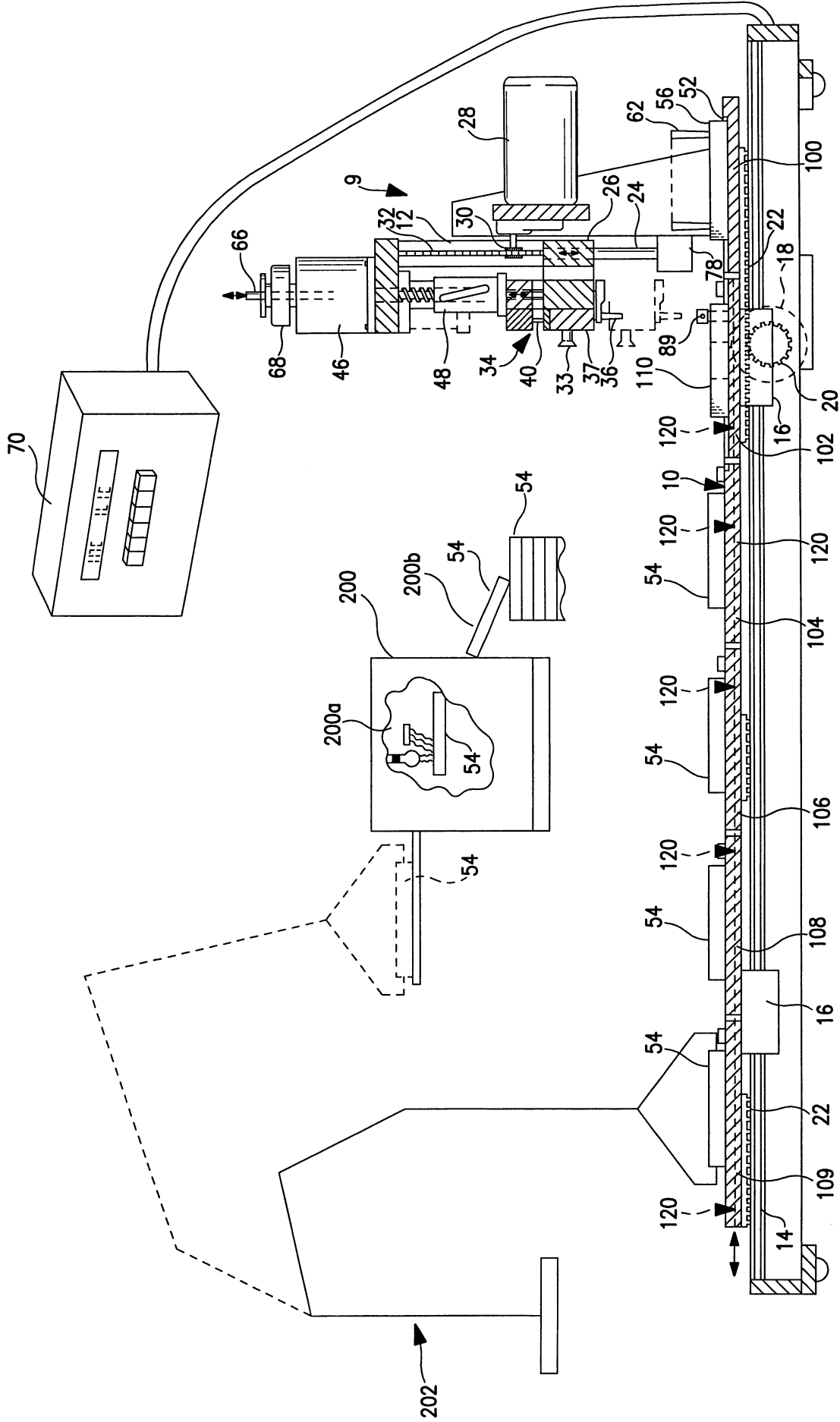


圖 14

六、申請專利範圍

附件 2A:

第 91102250 號專利申請案

中文申請專利範圍替換本

民國 95 年 6 月 19 日修正

1. 一種用以自動地於複數含液體槽腔之間傳送液體之改良液體處理機，該機具有：

一裝有推液塞組件和塞尖排放器之頭部；

一安裝在該頭部上之推液塞組件，該推液塞組件包含複數具有用以承接塞尖之垂掛端點之移液管，複數推液塞係分別配置在該移液管內，該推液塞係可在該移液管內同軸地移動以變化其內部體積；

一用以移去配置在該移液管之垂掛端點上之塞尖之塞尖排放器；

一垂直連接並安裝在該頭部下方之支架，該支架具有適於容納一具有移液管塞尖承接插孔之托盤之至少第一工作站、第二及第三工作站，每一工作站係適於容納含有液體槽腔之一個別托盤；

該支架及該頭部係可彼此相對移動，以使該移液管放置成與該塞尖承接插孔中之任何塞尖對齊，及使任何槽腔與該移液管對齊；

一運動控制器，其用於控制該頭部及該支架間之相對運動，以及該推液塞及該塞尖排放器之運動，以完成該含液體槽腔間之液體傳送，及於預定液體傳送步驟之間用配置於至少部份移液管塞尖承接插孔中之其他塞尖替換在該

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

移液管各端點上之塞尖，其中該機之改良處包括：

該支架具有複數溫度控制元件，用以在第二及第三工作站之每一站獨立地控制該溫度，以將該含液體槽腔中之液體維持在一預定溫度，該支架在第二及第三工作站之每一站亦具有一用以感測溫度之感測器，及一溫度控制器，用以控制該溫度控制元件及該感測器，其中該溫度控制元件包含獨立之加熱器以用於在該第二及第三工作站之每一工作站加熱該平台，並包含獨立之冷卻裝置以用於在該第二及第三工作站之每一工作站冷卻該平台；

其中該支架包含一具有用以支撐該托盤之表面之平台，且該平台係可移動地安裝成用以沿著水平面中之一路徑作位移運動，該平台係在平行於該路徑之方向中呈修長形，沿著該路徑在該平台上隔開各工作站。

2．如申請專利範圍第1項之改良液體處理機，其中該頭部係可移動地安裝成用以沿著一實質上垂直於該平台表面之軸作位移運動。

3．如申請專利範圍第1項之改良液體處理機，尚包含用以使該第二及第三工作站彼此絕熱之絕熱片，該絕熱片係介入該第二及第三工作站之間。

4．如申請專利範圍第1項之改良液體處理機，其中該加熱器之一包含定位在該第二及第三工作站之一工作站之一電阻式加熱元件。

5．如申請專利範圍第1項之改良液體處理機，其中該加熱器之一包含：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

一 通道，其在該第二及第三工作站之一工作站下方安排於該平台中；

一流體，其可移動穿過該通道；

一幫浦，其與該通道連接，用以移動該流體穿過該通道；

一加熱裝置，其用以加熱該流體；及

如所需地加熱該流體，以在該一工作站將該槽腔中之液體樣本之溫度維持在該預定溫度，藉著經過該平台及該含有液體之托盤之傳導於該流體及該液體樣本之間傳送熱量。

6．如申請專利範圍第5項之改良液體處理機，其中該加熱裝置包含一熱泵。

7．如申請專利範圍第1項之改良液體處理機，其中該加熱器包含一柏爾帖（Peltier）效應模組。

8．如申請專利範圍第1項之改良液體處理機，其中該冷卻裝置之一包含：

一通道，其在該第二及第三工作站之一工作站下方安排於該平台中；

一流體，其可移動穿過該通道；

一幫浦，其與該通道連接，用以移動該流體穿過該通道；

一冷卻器模組，其用以冷卻該流體；及

如所需地冷卻該流體，以在該一工作站將該槽腔中之液體樣本之溫度維持在該預定溫度，藉著經過該平台及該

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

六、申請專利範圍

含有液體之托盤之傳導於該流體及該液體樣本之間傳送熱量。

9 . 如申請專利範圍第 8 項之改良液體處理機，其中該冷卻器模組包含一熱泵。

10 . 如申請專利範圍第 1 項之改良液體處理機，其中該冷卻裝置包含一柏爾帖（Peltier）效應模組。

11 . 如申請專利範圍第 1 項之改良液體處理機，其中該溫度控制器包含一微處理器。

12 . 如申請專利範圍第 1 項之改良液體處理機，其中該運動控制器包含一微處理器。

13 . 如申請專利範圍第 1 項之改良液體處理機，其中尚包括一用以評估該槽腔中液體分析結果之刻痕記錄裝置，及一用以由該第二及第三工作站之一工作站傳送該含有液體槽腔之托盤至該刻痕記錄裝置之運送器。

14 . 如申請專利範圍第 13 項之改良液體處理機，其中該刻痕記錄裝置包含一螢光刻痕機。

15 . 如申請專利範圍第 13 項之改良液體處理機，其中該刻痕記錄裝置包含分光光度刻痕機。

16 . 如申請專利範圍第 13 項之改良液體處理機，其中該運送器包含一機械手臂。

17 . 一種於包括半固體基質之預定槽腔中決定一測試化合物在一細胞上之效果之分析方法，其包括：

(a) 使用一具有第一貯槽及第二貯槽之申請專利範圍第 1 項之液體處理機，以由該第一貯槽傳送一液態半固

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

體基質至一分析平皿之預定槽腔；

(b) 使用該液體處理機，以由第二貯槽傳送細胞至一分析平皿之預定槽腔；

(c) 允許該預定槽腔中之液態半固體基質凝固；

(d) 培育該平皿中之細胞達一時期，用以使這些細胞生長成一菌群；

(e) 將預定數量之測試化合物加至該預定槽腔；及

(f) 測定該測試化合物在該菌群上之生物學效應。

18. 如申請專利範圍第17項之分析方法，其中該半固體基質係於攝氏10至45度之間凝固。

19. 如申請專利範圍第18項之分析方法，其中該半固體基質係於攝氏15至40度之間凝固。

20. 如申請專利範圍第19項之分析方法，其中該半固體基質係於攝氏20至35度之間凝固。

21. 如申請專利範圍第20項之分析方法，其中該半固體基質係於攝氏20至30度之間凝固。

22. 如申請專利範圍第17項之分析方法，其中該半固體基質包含瓊脂、瓊脂糖、生膠質、或基膜。

23. 如申請專利範圍第22項之分析方法，其中該半固體基質包含瓊脂、瓊脂糖、或生膠質。

24. 如申請專利範圍第23項之分析方法，其中該半固體基質包含瓊脂或瓊脂糖。

25. 如申請專利範圍第24項之分析方法，其中該半固體基質包含瓊脂糖。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

六、申請專利範圍

26. 如申請專利範圍第17項之分析方法，其中加熱該半固體基質，直至其在該液態半固體基質加至該第一貯槽之前係一液體。

27. 如申請專利範圍第17項之分析方法，其中加熱該半固體基質，直至其在該半固體基質加至該第一貯槽之後係一液體。

28. 如申請專利範圍第17項之分析方法，其中該半固體基質包含生膠質或Matrigel®。

29. 如申請專利範圍第28項之分析方法，其中該半固體基質其中包含Matrigel®。

30. 如申請專利範圍第17項之分析方法，其中冷卻該半固體基質，直至其在該液態半固體基質加至該第一貯槽之前係一液體。

31. 如申請專利範圍第17項之分析方法，其中冷卻該半固體基質，直至其在該半固體基質加至該第一貯槽之後係一液體。

32. 如申請專利範圍第17項之分析方法，其中該分析平皿培養包含六或更多槽腔。

33. 如申請專利範圍第32項之分析方法，其中該分析平皿包含二十四或更多槽腔。

34. 如申請專利範圍第33項之分析方法，其中該分析平皿包含四十八或更多槽腔。

35. 如申請專利範圍第34項之分析方法，其中該分析平皿包含九十六或更多槽腔。

六、申請專利範圍

36. 如申請專利範圍第35項之分析方法，其中該分析平皿包含384或更多槽腔。

37. 如申請專利範圍第17項之分析方法，其中該細胞係能夠於半固體基質中非黏合生長。

38. 如申請專利範圍第37項之分析方法，其中該細胞係正常之原細胞、幹細胞、或腫瘤細胞。

39. 如申請專利範圍第38項之分析方法，其中該細胞係正常之原細胞。

40. 如申請專利範圍第38項之分析方法，其中該細胞係幹細胞。

41. 如申請專利範圍第38項之分析方法，其中該細胞係腫瘤細胞。

42. 如申請專利範圍第41項之分析方法，其中該腫瘤細胞係胸部腫瘤細胞、卵巢腫瘤細胞、黑腫瘤細胞、神經母細胞瘤細胞、結腸腫瘤細胞、攝護腺之腫瘤細胞、大細胞肺腫瘤細胞、或小細胞肺腫瘤細胞。

43. 如申請專利範圍第17項之分析方法，其中該測試化合物在該菌群上之效果係藉著照度計之使用、光度計之使用、閃爍之使用、螢光之使用、或藉著菌群之目視計數所決定。

44. 如申請專利範圍第24項之分析方法，其中該測試化合物在該菌群上之效果係藉著螢光之使用或一照度計之使用所決定。

45. 如申請專利範圍第17項之分析方法，其中該

六、申請專利範圍

測試化合物在該菌群上之效果係由一生活力染色所決定。

4 6 . 如申請專利範圍第 4 5 項之分析方法，其中該生活力染色係一螢光探測劑。

4 7 . 如申請專利範圍第 4 5 項之分析方法，其中該生活力染色係 Calcein AM。

4 8 . 如申請專利範圍第 1 7 項之分析方法，其中該液體處理機係能夠傳送由約一納升至約五微升之液體量至一預定槽腔。

4 9 . 如申請專利範圍第 4 8 項之分析方法，其中該液體處理機係能夠傳送由約一微升至約五百微升之液體量至一預定槽腔。

5 0 . 如申請專利範圍第 1 7 項之分析方法，其中該液體處理機係能夠將一貯槽維持在一預定溫度。

5 1 . 如申請專利範圍第 1 7 項之分析方法，其中該分析平皿係一微導管。

5 2 . 如申請專利範圍第 1 7 項之分析方法，其中該液體處理機係能夠同時傳送一液體至超過一個之槽腔。

5 3 . 如申請專利範圍第 1 7 項之分析方法，其中該半固體基質包含至少百分之 2 5 之瓊脂、瓊脂糖、生膠質、或基膜。

5 4 . 如申請專利範圍第 5 3 項之分析方法，其中該半固體基質包含至少百分之 4 5 之瓊脂、瓊脂糖、生膠質、或基膜。

5 5 . 如申請專利範圍第 5 4 項之分析方法，其中該

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

半固體基質包含至少百分之60之瓊脂、瓊脂糖、生膠質、或基膜。

56. 如申請專利範圍第55項之分析方法，其中該半固體基質包含至少百分之75之瓊脂、瓊脂糖、生膠質、或基膜。

57. 如申請專利範圍第17項之分析方法，其中該半固體基質包含至少百分之25之瓊脂糖。

58. 如申請專利範圍第57項之分析方法，其中該半固體基質包含至少百分之45之瓊脂糖。

59. 如申請專利範圍第58項之分析方法，其中該半固體基質包含至少百分之60之瓊脂糖。

60. 如申請專利範圍第59項之分析方法，其中該半固體基質包含至少百分之75之瓊脂糖。

61. 如申請專利範圍第17項之分析方法，其中該半固體基質包含至少百分之25之瓊脂。

62. 如申請專利範圍第61項之分析方法，其中該半固體基質包含至少百分之45之瓊脂。

63. 如申請專利範圍第62項之分析方法，其中該半固體基質包含至少百分之60之瓊脂。

64. 如申請專利範圍第63項之分析方法，其中該半固體基質包含至少百分之75之瓊脂。

65. 如申請專利範圍第53項之分析方法，其中該分析平皿包含由50槽腔至2000槽腔。

66. 如申請專利範圍第65項之分析方法，其中該

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

分析平皿包含由 50 槽腔至 200 槽腔。

67. 如申請專利範圍第 66 項之分析方法，其中該分析平皿包含由 200 槽腔至 500 槽腔。

68. 如申請專利範圍第 67 項之分析方法，其中該分析平皿包含由 300 槽腔至 500 槽腔。

69. 如申請專利範圍第 65 項之分析方法，其中該分析平皿包含由 350 槽腔至 2000 槽腔。

70. 如申請專利範圍第 17 項之分析方法，其中該液體處理機係一自動化系統。

71. 如申請專利範圍第 17 項之分析方法，其中該測試化合物在該菌群上之效果係由該細胞生活力所決定。

72. 如申請專利範圍第 71 項之分析方法，其中藉著一螢光探測劑決定該細胞生活力。

73. 一種使用申請專利範圍第 1 項之液體處理機供自動製備一包括具有半固體基質之槽腔之分析平皿之方法，其中

該分析平皿包含成一或多行列之多數槽腔，其中至少一槽腔係能夠容納一半固體基質，

該液體處理機包括含有在一濃度下之生長介質之第一貯槽、含有一液態半固體基質之第二貯槽、含有於一液體中之細胞之第三貯槽、及第四貯槽、與由一貯槽傳送一液體至一分析平皿中之預定槽腔之機構，其藉著

a) 由第一貯槽傳送一預定數量之生長介質至該第四貯槽，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

b) 由該第二貯槽傳送一預定數量之液態半固體基質至該第四貯槽，

c) 由該第三貯槽傳送一液體中之預定數量細胞至該第四貯槽，

d) 於該第四貯槽中混合該生長介質、液態半固體基質、及細胞，

e) 由該第四貯槽傳送一預定數量之已混合生長介質、液態半固體基質、及細胞進入該第一分析平皿之一預定槽腔，及

f) 允許該半固體基質凝固，

其中能以任何順序施行步驟 a - c。

7 4 . 如申請專利範圍第 7 3 項之方法，其中該第一貯槽、第二貯槽、第三貯槽、或第四貯槽包含一測試化合物。

7 5 . 如申請專利範圍第 7 4 項之方法，其中該第一貯槽、第二貯槽、或第三貯槽包含一測試化合物。

7 6 . 如申請專利範圍第 7 5 項之方法，其中該第一貯槽包含一測試化合物。

7 7 . 如申請專利範圍第 7 5 項之方法，其中該第二貯槽包含一測試化合物。

7 8 . 如申請專利範圍第 7 5 項之方法，其中該第三貯槽包含一測試化合物。

7 9 . 如申請專利範圍第 7 5 項之方法，其中該第四貯槽包含一測試化合物。

六、申請專利範圍

80 . 如申請專利範圍第73項之方法，包括該額外之步驟g)在該細胞形成一菌群之條件下培育該分析平皿達一段時期。

81 . 如申請專利範圍第80項之方法，包括該額外之步驟h)決定該測試化合物在該菌群上之效果。

82 . 一種使用申請專利範圍第1項之液體處理機供自動製備一包括具有半固體基質之槽腔之分析平皿之方法，其中

該分析平皿包含成一或多行列之多數槽腔，其中至少一槽腔係能夠容納一半固體基質，

該液體處理機包括含有生長介質、液態半固體基質、及細胞之第一貯槽、及第二貯槽、與由一貯槽傳送一液體至一分析平皿中之預定槽腔之機構，其藉著

a) 於該第一貯槽中混合該生長介質、液態半固體基質、及細胞，

b) 由該第一貯槽傳送一預定數量之已混合生長介質、液態半固體基質、及細胞進入該第一分析平皿之一預定槽腔，及

c) 允許該預定槽腔中之半固體基質凝固，

視需要重複步驟a及b，但傳送進入該第一分析平皿之第二預定槽腔。

83 . 如申請專利範圍第82項之方法，包括該額外之步驟g)在該細胞形成一菌群之條件下培育該分析平皿達一段時期。

六、申請專利範圍

8 4 . 如申請專利範圍第 8 3 項之方法，包括該額外之步驟 h) 將一測試化合物加至該預定槽腔。

8 5 . 如申請專利範圍第 8 4 項之方法，包括該額外之步驟 i) 決定該測試化合物在該菌群上之效果。

8 6 . 一種使用申請專利範圍第 1 項之液體處理機供自動製備一包括具有半固體基質之槽腔之分析平皿之方法，其中

該分析平皿包含成一或多行列之多數槽腔，其中至少一槽腔係能夠容納一半固體基質，

該液體處理機包括含有在一濃度下之生長介質之第一貯槽、含有一液態半固體基質之第二貯槽、含有於一液體中之細胞之第三貯槽、及第四貯槽、與由一貯槽傳送一液體至一分析平皿中之預定槽腔之機構，

1) 藉著於第一分析平皿之一預定槽腔中形成第一層半固體基質，其包括：

a) 由第二貯槽傳送一預定數量之液態半固體基質至該分析平皿中之一預定槽腔，

b) 允許該半固體基質凝固，

2) 藉著於第一分析平皿之一預定槽腔中形成第二層半固體基質、生長介質、及細胞，其包括：

a) 由第一貯槽傳送一預定數量之生長介質至該第四貯槽，

b) 由該第二貯槽傳送一預定數量之液態半固體基質至該第四貯槽，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

c) 由該第三貯槽傳送一液體中之預定數量細胞至該第四貯槽，

d) 於該第四貯槽中混合該生長介質、液態半固體基質、及細胞，

e) 由該第四貯槽傳送一預定數量之已混合生長介質、液態半固體基質、及細胞進入該第一分析平皿之一預定槽腔，及

f) 允許該第二層液態半固體基質凝固，

視需要重複步驟 1 及／或 2，但傳送進入該第一分析平皿之第二預定槽腔。

87. 一種使用申請專利範圍第 1 項之液體處理機供自動製備一含有半固體基質之分析平皿之方法，其中

每一平皿具有成一或多行列之至少一槽腔，其能夠容納一半固體基質，

該液體處理機包括含有在一濃度下之液態生長介質之第一貯槽、含有第二濃度下之液態生長介質之第二貯槽、含有第三濃度下之液態生長介質之第三貯槽、含有液態半固體基質之第四貯槽、及於第一濃度之液態生長介質中含有細胞第五貯槽，其藉著

1) . 於第一分析平皿之一預定槽腔中製備第一層半固體基質，其包括：

a) 由該第三貯槽傳送一預定數量生長介質至該第四貯槽中之液態半固體基質，以形成一液體混合物，

b) 由該第四貯槽傳送一預定數量之液體混合物至該

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

第一分析平皿中之一預定槽腔，

c) 允許該第一分析平皿之預定槽腔中之液體混合物凝固，

d) 視需要以該第一分析平皿中之第二預定槽腔重複步驟 b 及 c；

2) . 於第一分析平皿之一預定槽腔中製備第二層半固體基質，其包括：

a) 由該第二貯槽傳送一預定數量之生長介質至含有該細胞之第五貯槽，

b) 傳送該第四貯槽中之一預定數量之液態半固體基質至該第五貯槽，

c) 混合該第五貯槽之內容物，

d) 傳送該第五貯槽中之一預定數量混合物至第一分析平皿之預定槽腔中之第一層半固體基質，以形成第二層，

e) 允許該預定槽腔中之第二層凝固。

88 . 如申請專利範圍第 87 項之方法，包括該額外之步驟 g) 在該細胞形成一菌群之條件下培育該分析平皿達一段時期。

89 . 如申請專利範圍第 88 項之方法，包括該額外之步驟 h) 將一測試化合物加至該預定槽腔。

90 . 如申請專利範圍第 89 項之方法，包括該額外之步驟 i) 決定該測試化合物在該菌群上之效果。

91 . 如申請專利範圍第 87 項之方法，包括製備稀

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

釋平皿之其它步驟，該平皿包括含有一測試化合物之第一預定槽腔，該步驟包括：

a) 由該第一貯槽傳送一預定數量之生長介質至該稀釋平皿中之第二預定槽腔，

b) 由第一預定槽腔傳送一預定數量之測試化合物進入該稀釋平皿中之第二預定槽腔，

c) 混合該第二稀釋槽腔之內容物，

d) 重複步驟 a, b 及 c, 但傳送該稀釋平皿中之第三預定槽腔。

9 2 . 一種用以決定一測試化合物在細胞上之效果之分析方法包括：

(a) 使用申請專利範圍第 1 項之液體處理機，以由第一貯槽傳送一液態半固體基質至一分析平皿之預定槽腔；

(b) 使用該液體處理機，以由第二貯槽傳送生長介質至該分析平皿之預定槽腔；

(c) 使用該液體處理機，以由第三貯槽傳送細胞至該分析平皿之預定槽腔；

(d) 允許該分析平皿之預定槽腔中之液態半固體基質凝固；

(e) 培育該分析平皿之預定槽腔中之細胞達一時期，用以使這些細胞生長成一菌群；

(f) 將預定數量之測試化合物加至該分析平皿之預定槽腔；及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

(g) 測定該測試化合物在該菌群上之生物學效應。

9 3 . 一種用以決定一測試化合物在細胞上之效果之分析方法包括：

(a) 使用申請專利範圍第 1 項之液體處理機，以由第一貯槽傳送一液態半固體基質進入該分析平皿之一預定槽腔；

(b) 使用該液體處理機，以由第二貯槽傳送生長介質至該分析平皿之預定槽腔；

(c) 使用該液體處理機，以由第三貯槽傳送細胞至該分析平皿之預定槽腔；

(d) 使用該液體處理機，以由第四貯槽傳送一測試化合物之預定數量至該分析平皿之預定槽腔；

(e) 允許該分析平皿之預定槽腔中之液態半固體基質凝固；

(f) 培育該分析平皿之預定槽腔中之細胞達一時期，用以使這些細胞生長成一菌群；及

(g) 測定該測試化合物在該菌群上之生物學效應。

9 4 . 如申請專利範圍第 9 3 項之分析方法，其中該液體處理機係用於在稀釋平皿之預定槽腔中製備該測試化合物之稀釋液。

9 5 . 如申請專利範圍第 9 4 項之分析方法，其中該液體處理機由該稀釋平皿中之預定槽腔傳送預定數量之測試化合物至該分析平皿之預定槽腔。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂