

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：96112425

※ 申請日期：96.4.10

※IPC 分類：

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

用於有效收集單一細胞與細胞菌落與快速生成穩定的轉染物之系統
及方法

SYSTEMS AND METHODS FOR EFFICIENT COLLECTION OF
SINGLE CELLS AND COLONIES OF CELLS AND FAST
GENERATION OF STABLE TRANSFECTANTS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

雷根斯加州大學

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

代表人：(中文/英文)

琳達 S. 史蒂芬森 / STEVENSON, LINDA S.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州 94607-5200 奧克蘭法蘭克林街 1111 號

1111 Franklin Street 12th Floor Oakland, California 94607-5200, US

國 籍：(中文/英文)

美國 / US

三、發明人：(共 6 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 南西 歐布萊頓 / ALLBRITTON, NANCY

2. 克里斯多弗 E. 席斯 / SIMS, CHRISTOPHER E.

3. 王育里 / WANG, YULI

4. 馬克 貝屈曼 / BACHMAN, MARK

5. 李廣鵬 / LI, GUANN-PYNG

6. 艾瑞克 史丹布雷 / STANBRIDGE, ERIC

國 籍：(中文/英文)

1. 美國 / US

2. 美國 / US

3. 中國大陸 / CN

4. 美國 / US

5. 美國 / US

6. 英國 / GB

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，
其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國、 2006.04.10 、 60/744,577
2. 美國、 2006.04.10 、 60/744,579

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種為了對試樣進行可尋址分析之目的而製造的能夠將細胞、微-生物、蛋白質、DNA、生物分子及其他生物基質之試樣放在淺盤上特定場所或位置的淺盤。較佳的是，某些或全部位置是以可移動材料建造或建造成底板，而得以從該淺盤中輕易地分離感興趣的試樣亞組，以進一步加工或分析。淺盤可含有提高或促進試樣之附著及/或功能，與促進或協助其分析的結構或化學處理。使用該淺盤，有利地使能夠基於動態現象選擇和分類細胞，與迅速建立穩定的轉染物。

六、英文發明摘要：

A plate manufactured to enable samples of cells, micro-organisms, proteins, DNA, biomolecules and other biological media to be positioned at specific locations or sites on the plate for the purpose of performing addressable analyses on the samples. Preferably, some or all of the sites are built from a removable material or as pallets so that a subset of the samples of interest can be readily isolated from the plate for further processing or analysis. The plate can contain structures or chemical treatments that enhance or promote the attachment and/or function of the samples, and that promote or assist in their analyses. Use of the plate

advantageously enables the selection and sorting of cells based on dynamic phenomena and the rapid establishment of stable tranfectants.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1A) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

10	淺 盤
12	底 板
13	位 置
14	試 樣

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

九、發明說明：

【相關申請案之交互參照】

本申請案主張 2006 年 4 月 10 日申請之美國臨時專利申請案第 60/744,577 號和 2006 年 4 月 10 日申請之 60/744,579 號的利益，該等申請案係以引用方式納入本文中。

【發明所屬之技術領域】

技術領域

本發明係關於生化分析，且更特定而言，係關於具有微-底板（pallet）之微圖化（micropatterned）淺盤，其使可尋址生化分析更容易，以及使分類和選擇細胞和細胞菌落更容易的方法。

【先前技術】

發明背景

用於細胞生物學之分子分析的現代技術，已經創造出對製備由均一細胞族群組成之試樣之逐漸增加的需求。基因組和蛋白質組研究、基因選殖、幹細胞研究、和基於細胞的篩選，均將獲益於提高獲得活的、單一細胞或小型均一生物試樣以供進行後續分析的能力。這些試樣包括各種分子，如 DNA 或 RNA，以及細胞或生物。

在從混合族群中選擇細胞的案例中，在鑑認與分離想要的亞族群之後必須分析具有想要特徵的個別細胞。哺乳動物細胞的標準分類方法需要使細胞分散成單一-細胞懸浮液，而最成功的就是造血細胞，其天然便以該方式生長。

這些方法較不適用於黏著細胞，其顯然為最為常見的細胞表現型。

黏著細胞通常係藉著將它們平鋪在生長表面上，然後使用顯微鏡觀看它們來分析。細胞的位置為隨機的，而使得尋找細胞可能為耗時的過程。為加快該過程，有時使用利用機器視覺之機器人系統，以在顯微鏡影像的視野內尋找細胞。用於從細胞之混合組群中分離感興趣細胞的傳統分類技術，典型需要以酵素或機械方式使黏著細胞從其生長表面釋放，這會傷害細胞的健康，或涉及基於限制稀釋或以遺傳工程產生之對選擇環境之抗性之選擇的延伸方法。在某些情況下，將犧牲的基底層放在培養盤上，使細胞生長在犧牲的基底層上，且一旦發現感興趣的細胞，藉著以高功率雷射切下感興趣細胞周圍的圓圈並通過犧牲層，分離細胞之混合族群的亞組。可藉著剝離犧牲層，或藉著使用高功率雷射脈衝使切下的物質從培養盤中彈出，帶有感興趣的細胞與彈出的切下之物質，來分離細胞。

可使用流式細胞計數器很快地分析非黏著細胞，該計數器使細胞流迅速地流過檢測裝置。可藉由下游靜電系統將感興趣的細胞分類，該系統將小滴移至收集容器內。流式細胞計數亦有助於處理其他的生物基質，如蛋白質和DNA，只要它們可附著在小珠上。其無益於處理較大的試樣(如多-細胞的生物)，也難以處理複合物。

【發明內容】

發明概述

本文所描述的系統和方法，為了對試樣進行可尋址分析之目的，提供以得以將試樣（如單或多細胞、微-生物、蛋白質、DNA、生物分子及其他生物基質）放在淺盤上特定場所或位置之方式而製造的淺盤。此外，某些或全部位置較佳是以可移動材料建造成微-底板的形式，而使感興趣的試樣亞組得以從淺盤中輕易地分離以進一步進行加工或分析。淺盤可含有提高或促進試樣之附著及/或功能，與促進或協助該試樣之分析的結構或化學處理。淺盤亦可含有協助在淺盤與外部儀器之間偶聯，或協助附屬操作，如維持該試樣之適合化學條件的結構。

微-圖化淺盤有益地包括(1)在其上企圖促使試樣附著在已知場所或位置而圖化的結構，(2)經處理或進一步圖化以便改善對該試樣進行分析的能力之結構或底板，(3)在需要時可移動，因此不需要雷射切開，並可輕易收集釋放出的試樣之結構或底板，以及(4)微-圖化的零件，如結構元件、電極和光學編碼器，其協助操作微-陣列淺盤，並可有利地放在傳統或專門的卡匣或托盤中。微圖化淺盤本身使生物和化學試樣的高速、可尋址分析，以及從較大之試樣族群中分離試樣亞組的有效方法成為可能。

使用微-底板陣列系統，有利地使基於動態現象選擇並分類細胞，以及轉染物之迅速穩定建立成為可能。

此外，從下列的詳細說明中，將使本發明的目標和優點變得更清楚。

【實施方式】

發明之詳細說明

在下文中揭示的每個額外的特徵和教示，可分開使用或與其他特徵和教示併用，以提供具有微-底板的改良微圖化淺盤，其有利於可尋址生化分析和細胞分類與選擇的改良方法。現在將參考所附之圖式，更詳細地說明本發明的代表性實例，該等實例分別及合併使用許多這些額外的特徵和教示。該詳細說明僅企圖教導熟諳此藝者關於實行本教示之較佳觀點的更多細節，而並非企圖限制本發明之範圍。因此，在下列詳細說明中揭示之特徵和步驟的組合，對於最廣義地實行本發明而言，可能不是必要的，且僅用以教示本教示特別敘述的代表性實例。

此外，代表性實例和隸屬之申請專利範圍的各種特徵，可以不具體地且明確地列舉的方式組合，以便提供本教示其他有用的具體事實。另外，應特別注意所有在說明及/或申請專利範圍中揭示的特徵，為了原始揭示之目的，並為了限制獨立於具體事實及/或申請專利範圍中之特徵的構成的所請主題之目的，係企圖彼此分開且獨立地揭示。亦應特別注意所有的數值範圍或實體群的指示，為了原始揭示之目的，並為了限制所請主題之目的，揭露每一個可能的中間值或中間實體。

在較佳的具體事實中，系統提供微-圖化淺盤，其包括試樣可附著於其上的可移動區域或位置之可尋址陣列。光學編碼器、電極及其類似物使微-圖化淺盤能夠輕易連接外部的儀器，使高速可尋址細胞測定成為可能。機器可移動

淺盤到顯微鏡下的任何可尋址位置之地點。可使用高倍率接物鏡顯像，因為僅使單一位置顯像(與許多細胞的大視野相反)。至於細胞，細胞位置的索引使比目前所使用的快很多的分析成為可能。

可以附著於表面的單一或多個細胞、分子、化合物、生物、以及生物學和化學介質之試樣、還有不附著的試樣使用該系統。可使用空腔或其他截流裝置，安置不附著的試樣。

微-圖化淺盤系統有利地解決了試樣陽性選擇的問題。可移動底板的可尋址陣列，容許從淺盤中快速並選擇地移動試樣，進行下一步加工。使用可移動的底板排除了切開試樣周圍的需求，大大地增加速度和處理量，同時降低了選擇試樣的複雜性。因為底板被排列在淺盤上，可以可與流式細胞計數相比擬的速度，以簡化很多的方式進行高速分析和試樣選擇。

在較佳的具體事實中，如在圖 1A 中所述，為了對試樣 14 進行可尋址分析，以可將試樣 14(如單一或多個細胞、微-生物、蛋白質、DNA、生物分子及其他生物介質)放在淺盤 10 上之特定場所或位置 13 上的方式，製造淺盤 10。一些或全部的位置 13 較佳是以可移動的材料建造成底板 12 之形式，而使感興趣試樣 14 的亞組可輕易與淺盤 10 分開並分離，進行進一步的加工或分析。淺盤可含有提高或促進試樣 14 之附著及/或功能，並促進或協助其分析的結構或化學處理。淺盤 10 亦含有協助在淺盤 10 與外部儀器之

間連結的結構。淺盤 10 亦可含有額外的結構，其協助附屬操作，如維持適合該試樣的化學條件。

參考圖 1B，微-圖化淺盤 10，如同所述，包含附著在特定可尋址位置 13，即小而薄的底板 12 上之試樣 14(如單一或多個細胞)，該底板 12 黏在淺盤 10 的位置 13 處。如同在該具體事實中所述，當將試樣 14 迅速地移進檢測器 16 下的位置內時，使用顯微鏡或其他檢測器 16 使試樣 14 顯像。可使每個位置 13 顯像，或以光或其他能源(例如磁、電、機械、熱能)探測，以測定在位置 13 處捕捉之試樣 14 的特性，或以修改在位置 13 處的試樣 14。而且，可從淺盤 10 中移出含有感興趣之試樣 14 的位置 13，實際上是底板 12，以與淺盤 10 分離，進行進一步分析或加工。

在淺盤 10 的表面上製備底板 12，且較佳是以具有與淺盤 10 之主體材料不同之性質的第二種材料建構。可藉著各種機械作用，從支撐的淺盤 10 中移出底板 12，其中裝有試樣 14，使試樣 14 得以與淺盤 10 分離並移出。可藉著局部修改表面化學，或藉著以物理方式改變表面，製備位置 13 或底板 12。企圖使位置 13 或底板 12 小得足以能夠在每個位置 13 處截留數個或單一個細胞、微-生物、生物分子或其他生物學或化學介質(在本文中稱為試樣 14)。底板 12 亦可含有在從淺盤 10 中移出之後，協助移動或安置底板 12 的結構。

可藉著任何適當的方法移動底板 12。代表性的方法包括以機械方式從淺盤中推或抬起底板 12、使用局部化的熱

或光、以改變底板 12 的黏附特性、使用聲學或機械衝擊從淺盤 10 中取下底板 12、使用高能量雷射脈衝從淺盤 10 中取下底板 12、改變底板 12 的電或磁特性、及其類似者。

翻到圖 2，顯示使用來自雷射 18 的雷射脈衝 17 移動底板的實例。如同說明，藉著從淺盤 10 中釋放含有試樣 14 的底板 12，完成試樣 14 的陽性選擇。如上述，可用來釋放底板的其他方法，包括應用機械、電、熱、光學、磁能量。可讓釋放的底板 12 流向下游收集，或可藉其他方法(如傾倒或吸移)收集。

位置 13 或底板 12 較佳係彼此密接形成，使得淺盤 10 可在分析儀器下移動，以迅速地進行許多位置 13 的分析。例如，若位置 13 的位置相隔 0.1 毫米，則可以 50 毫米/秒移動淺盤 10，以每秒分析 500 個試樣。可以許多方法中的任一種使試樣 14 附著在位置 13 上。例如，可容許活細胞漂浮在介質中，直到它們附著在位置上。可洗去剩下的細胞，留下可迅速顯像的細胞可尋址陣列。亦可使用傳統方法，如墨點法 (spotting)、絲印法 (silkscreen)、型板噴刷 (stenciling)、平版印刷 (lithography)、光學操作、或機械附著，使試樣附著於該位置。

位置 13 或底板 12 可形成長方形或其他規則的圖案(例如六邊形、圓形、線形等等)，或可隨機定方位。可將圖化的位置或底板放在較大的結構中，如多孔培養盤的底部。圖化的淺盤容許將其他結構放在其中，以利於其他功能，例如使用臨時的分割器，其容許將不同的試樣導入淺盤的

不同區域，或流動結構(如通道)，以便使緩衝溶液易於流過該位置(如在圖 6 中的說明)。

參考圖 3，顯示微-圖化淺盤 20 裝有附著至特定可尋址位置 23 的試樣 24(生物)。在該具體事實中，在淺盤 20 上的 3-D 結構圖案 25，協助在特定位置收集試樣 24，在那裡它們可直接附著至淺盤 20，或在每個位置 23 處附著至小底板 22。

可修飾表面的物理形狀，以提高在位置處捕捉(在非-位置處則否)，或改善分析。例如，可在柱子頂端形成位置(參見 32，圖 4)。這提供了顯微鏡顯像系統不會聚焦在非-位置處的優點(參見 35，圖 4)，減少了影像的背景。其他實施例可包括空腔，其截流試樣於其中，或在淺盤上的不透明區。

可將其他特徵加在淺盤上，以利其與外部儀器連接。例如，可將光學編碼器、電極或磁性裝置納入淺盤上，以利於安置；可使用感應器測試生長條件；為了光學定位可納入框標；等等。

在圖 4 中出示一些提到的增強。如同在圖 4 中所述，微-圖化淺盤 30 包括在特定可尋址位置附著至底板 32 或柱子的試樣(細胞)34。在該具體事實中，當試樣 34 迅速移進接物鏡 36 下的位置內時，使用顯微鏡接物鏡 36 使”焦點上的”試樣 34 顯像。其他所包括的特徵包括圖化的電極 37、圖化的不透明區 38，以及從外面施加的電場 39，其可用來溶胞感興趣的特定細胞。

亦可修飾位置的化學特性，以提高在該位置處的捕捉(在非-位置處則否)，或改善分析。例如，可修飾表面化學，以製造一些疏水性區域和其他親水性的區域，以提高細胞附著在疏水性位置上。亦可使用表面化學製造淺盤不透明的非-位置和透明的位置-區域，以提供局部的隙縫，增加光學顯像。

可在現有之工業標準盤和卡匣內，產生位置的陣列。例如，可在多孔培養盤的底部內建造該位置，替工業標準設備提供高速可尋址測定(參見，例如圖 5)。亦可在筒狀的定製系統中產生位置的陣列(參見，例如圖 6)。

如同在圖 5 中所述，將微-圖化淺盤 40 放在多孔培養盤 41 之單一孔 47 的底部，容許對淺盤 40 使用傳統的工具。微-圖化淺盤 40 包括多個底板 42，形成多個裝有試樣 44 的位置 43。緩衝溶液充滿該單孔。

如同在圖 6 中所述，顯示微-圖化淺盤 50 包含臨時或永久的分割器 51 附著在流體帽 55 上，以容許將不同類型或病史的試樣 54 平鋪在淺盤 50 上的不同場所。這容許在單一淺盤上進行多重分析。分割結構 51 亦利於緩衝溶液流動覆蓋試樣區，以便提取釋放的底板 52。

翻到圖 7A 和 7B，顯示在使用底板淺盤進行黏著細胞篩選和培養之過程中的步驟。該實施例說明如何可使用所揭示之系統，從大的細胞集合中篩選罕見的細胞或感興趣的細胞。例如，可從患者生檢取得黏著細胞，並可使用所揭示之系統搜尋及選擇顯示出不尋常或惡性行為的細胞。

或可以希望能轉染細胞的 DNA 載體處理黏著細胞，並使用該系統找出並分離被適當轉染的細胞。

根據實例之過程，在步驟 1，根據適當的方法預處理細胞 60，然後在步驟 2，使細胞 60 分散在淺盤 70 上，並容許於多個位置 73 上附著至淺盤 70 或底板 72。這可在多孔培養盤 62，如所示，或在單孔培養盤上進行。在步驟 3，細胞黏著於淺盤 70 或底板 72，如試樣 74。因為淺盤經過處理和圖化，細胞寧願黏著特定的位置。然後在步驟 4，較佳沖洗該淺盤，且較佳進行更多測定工作，以便標示感興趣的細胞。在步驟 5，藉著檢測器 76 篩選淺盤，以得到關於細胞族群的統計資訊，並鑑認感興趣的細胞。在步驟 6，從淺盤中移出(釋放)含有感興趣細胞(試樣 74)的底板 72a，較佳是例如藉著來自雷射 78 的高能量雷射脈衝 77。然後在步驟 7，從緩衝溶液中收集自由漂浮的底板 72a。在步驟 8，從釋放出的細胞 74，生長出新的細胞培養物。

現在翻到圖 8A 和 8B，出示在使用底板淺盤進行 DNA 篩選之過程中的步驟。該實例說明如何可使用所揭示之系統，從大的 DNA 集合中篩選罕見的 DNA 股。例如，可對 DNA 淺盤篩選未知的疾病引發性劑，以選出感興趣的股。然後可分離該感興趣的股，並進行 PCR，以擴增它們以進行更多的分析。該過程的步驟如下：在步驟 1，在特定位置 83 處以寡核苷酸沾點在淺盤 80 上，其係擔任 DNA 股的目標。亦製備作為對照組的寡核苷酸。在步驟 2，從試樣中取得 DNA 85，變性並根據適當的方法預處理。在步

驟 3，使 DNA 85 分散在淺盤 80 上，並容許與在特定位置 83 上，與其相配的目標雜交。在步驟 4，徹底沖洗淺盤，移除未結合的 DNA。進行更多測定工作，以標示感興趣的 DNA。然後在步驟 5，藉著檢測器 86 篩選淺盤，以進行試樣的統計分析，並鑑認感興趣的 DNA。在步驟 6，藉著來自雷射 88 的高能量雷射脈衝 87，從淺盤 80 中移出(釋放)含有感興趣 DNA 84 的底板 82a。在步驟 7，從緩衝溶液中收集自由漂浮的底板。在步驟 8，使 DNA 84 變性以離開底板，並在 PCR 反應中使用，以擴增該試樣。

參考圖 9，說明用於自動測定的整合底板淺盤卡匣 90。該實例說明如何可將所揭示之系統與其他系統整合，產生自動筒形系統。如同在圖 9 中所述，整合底板淺盤卡匣 90 包含微底板淺盤 99，有多個底板 92 在淺盤 99 上形成三列，以及流體帽 91，在其內面有小通道 95 形成。帽 91 與微底板淺盤 99 配對，使緩衝溶液流動覆蓋底板 92。

翻到圖 10A 到 M，出示使用微-機械之整合底板淺盤卡匣 100 的過程。卡匣 100 包含底板淺盤 109，其最好包含可釋放底板 102 之預-設陣列，用於細胞培養，其以可釋放之方式安置在以玻璃或類似物形成的淺盤 109 之頂部。底板 102 較佳經過處理以促進細胞在底板 102 的中央生長。底板 102 較佳有索引，例如以橫條編碼，使得在使用卡匣 100 之前，知道它們的位置。

在圖 10B 和 10C 中，將帽 101 蓋在淺盤 109 上，露出進出孔 107。在圖 10D 中，使細胞分散在淺盤 109 上，並

容許附著至淺盤之特定位置 102 或底板上。然後藉著檢測器 106 篩選淺盤 109，如同在圖 10E 中所述，進行試樣之統計分析，並鑑認感興趣的細胞。如同在圖 10F 中所示，藉著來自雷射 108 之高能量雷射脈衝，從淺盤 109 中移出(釋放)含有感興趣之細胞的底板 102a。如同在圖 10G 中所示，淺盤自緩衝溶液至盤 109 的末端收集自由漂浮的底板 102a。在圖 10H 中，藉著來自雷射 108 之高能量雷射脈衝，從淺盤 109 中移出(釋放)含有額外感興趣細胞的第二個底板 102b。如同在圖 10I 中所示，淺盤自緩衝溶液至盤 109 的末端收集自由漂浮的底板 102b。如同在圖 10J 和 10K 中所述，通過進出孔 107，使用提取器 110，提取底板 102a 和 102b。如同在圖 10L 和 10M 中所示，從釋放出的細胞中生長出新的細胞培養物。

如同在圖 11 中所示，卡匣 170 包括玻璃或類似物形成的受質或淺盤 179，以及帽 171。淺盤 169 可包含安置在淺盤 179 上的微-底板 172 之陣列-例如，提供 500,000 個 (50x50 微米)底板位置。為了顯像、螢光分析、分類及其類似者，卡匣 170 可與顯微鏡附件 150 一起使用。可使用在電腦 160 上提供的分析軟體，進行高容量篩選和細胞選擇。可使用底板提取器提取從卡匣 170 中選出的底板。

在本文中描述的微-底板陣列系統，有益地讓使用各式各樣的選擇基準於單一細胞、細胞菌落和生物成為可能。該系統有益地讓以下者成為可能：分析存在於底板上之細胞或其他材料的各種特性，接著細胞的陽性選擇，且細胞

仍黏著在底板上。依據分析方法，這些特性或選擇基準可包括光學特性，如螢光、光散射、形態學、菌落形成及其他生物特性、化學特性和機械特性。例如，基於該等表現編碼螢光蛋白之目標基因之那些細胞的螢光之分析的細胞之早期檢測，接著細胞選擇，即底板釋放和收集，會使迅速地建立無性繁殖系族群成為可能。與利用有毒性之抗生素的選擇相比較，結果可能明顯地節省了時間和人力。

微-底板陣列系統的底板釋放和收集過程，使細胞經歷比藉著流動細胞計數分類更少的擾亂，因為細胞在分析和分類期間仍維持附著。結果提供了改善的細胞健康和存活。此外，生長在底板上的細胞將展現其全組的細胞-表面蛋白質，並維持其天然形態學和信號特性。因此，可利用更廣泛的細胞屬性作為選擇基準。重要的是，可在一段時間內分析這些特性，以讓基於特定特性的時間性改變之選擇成為可能。

使用微底板陣列系統有益地使基於動態現象（如蛋白質移位、激酶活化、離子改變及其類似者）之細胞的選擇與分類成為可能。在傳統方法中，當從混合族群中分離單一細胞或細胞群時，選擇幾乎都是基於在選擇過程期間內不會改變的細胞特性，例如表面蛋白的存在或螢光蛋白的表現。這些蛋白質的壽命尺度是許多小時至數天及更長，使得細胞蛋白質的含量在分類過程之前、期間和之後是相同的。然而，許多細胞特性的改變是於快很多的時間規尺度（秒至分鐘）。例如，細胞內的自由鈣濃度或細胞骨架網

的組織化。諸如此類的特性在細胞中是極為動態的，尤其是回應在細胞環境中加入刺激或藥物。因為在回應激動劑或抑制劑時，細胞不會同步行動，故在測量一段時間時，即在加入刺激或藥物之前、期間和之後，最容易評估這些動態特性。

基於動態特性分離或選擇細胞，通常是不可能的，因為這些屬性係處於比可利用或傳統分類方法的時間尺度更快之流動狀態。此外，如同上文暗示的，為了分類將黏著細胞從表面分開，排除或至少非常戲劇化地改變了這些動態細胞過程。最後，許多傳統的分類過程，如流式細胞計數，僅允許單一時間點的測量；結果，使用在單一細胞內迅速發生的變化來作為選擇基準是非常困難的。容許基於動態特性選擇並分離黏著細胞的方法，將明顯地擴大分類基於其的特徵。例如，細胞可基於其對激動劑反應或被拮抗劑抑制反應的能力來選擇。藉著結合精密的顯影技術（如標準顯影細胞計數）或當前技術發展水平之顯影技術（如雷射掃描細胞計數）與可釋放之微-底板陣列系統，基於在細胞行為或信號動態上之差異分類係可能的。

憑藉著隨時間經過追蹤細胞（即隨時間經過追蹤經編碼或可尋址底板）的能力，可使用更複雜的篩選基準。一種這類應用是篩選及選擇表現遺傳編碼之蛋白質的細胞，其特性會隨時間經過而改變，例如螢光蛋白共軛物，其螢光特性在細胞刺激之後增加或減少。可基於在刺激後的最小和最大螢光變化選擇細胞，以產生顯示出提高螢光特性

之動態範圍的細胞株。其他的實例為針對阻斷第二個蛋白質之細胞質移位，或減少鈣細胞中鈣高峰之頻率的蛋白質，篩選隨機 siRNA 庫。轉染細胞可存活一段時間，同時在底板陣列上發送這些動態改變的信號。然後釋放陽性的細胞，培養並解碼在細胞中之 siRNA 序列。

微-底板陣列系統所具有之優點，亦可應用在幹細胞選擇技術上。大多數的幹細胞分離依賴一或多個生物標記(通常是表面抗原)。黏著幹細胞的分類，藉著容許在解聚步驟之後補充表面蛋白，將改良檢測並增廣表面標記的選擇。結果，可在大量族群中迅速地鑑認少數幹細胞或其後代，並在一個步驟中直接分離。

憑藉著隨時間經過追蹤個別細胞的能力，可選殖具有特殊時間性特徵之細胞。該能力使篩選並選擇經過遺傳設計以表現編碼蛋白質的細胞成為可能，該編碼蛋白質被設計以指出細胞內狀態的改變。這些狀態包括各種細胞特性，如酵素活性、離子或第二信使的濃度、pH 值、酵素活性、蛋白質位置或任何可隨時間改變的其他特性。產生改良指示子的目前實施，涉及藉著編碼原型指示子的基因之隨機突變產生大量不同的 DNA 分子。使用這些各式各樣的 DNA 序列轉染細胞，接著在誘導想要的細胞狀態改變之後篩選細胞。因為目前的技術僅使在單一時間點測量個別的細胞成為可能，故不能測定在指示子變化上的大小。在鑑認表現最佳選擇之指示子的細胞時，必須基於指示子的改變程度(即動態範圍)選擇細胞。最想要在細胞狀態改

變時，顯示出最大指示子變化。例如，細胞內鈣濃度的理想指示子（其已被設計以基於鈣的結合改變螢光共振能量轉移(FRET)），當鈣從最低增加到最大值時，將顯示出最大的 FRET 動態範圍。若細胞的基礎 FRET 也很高，可能不想要在使細胞內的鈣升高之後，僅基於高程度之 FRET 選出的細胞。在本申請案中，選擇和收集具有最大動態範圍指示子之細胞的能力是一項驚人的優點。

在細胞選殖中，另一時間測量所需的領域是產生具有均一信號特性的細胞株。許多基於細胞的篩選測定依賴時間-分辨的讀出，如加上標籤之分子的移位、細胞內指示子之螢光特性的改變、或細胞狀態的其他動態標記。終點目標是決定細胞的狀態是否已經被實驗操作（如暴露至藥物、小型干擾 RNA、或其他形式）擾亂。一個在分析這些測定時的複雜性，是在個別細胞中，其隨著時間經過對刺激之反應的異質性。該目標的一個實例是在以激動劑刺激細胞之後，加上螢光標籤之信號蛋白的移位模式。在給定的族群中，暴露至相同的刺激下之個別細胞，可能展現極為不同的移位模式。將藉著選殖產生具有均一時間特性（像是在限定刺激之後有相同的移位模式）的細胞會改良依賴這類讀出的測定。可藉著基於在二或多個時間點的測量篩選細胞，接著選擇並分離具有想要反應模式的個別細胞，提高這類細胞株的均一性。然後可選殖擴大這些細胞，以得到具有較一致行為的細胞族群。

翻到圖 12，敘述展示基於時間特性選擇細胞的實驗。

關於該實驗以及在本文中描述的其他實驗，使用標準光刻蝕法在玻片上製造底板陣列，即藉著旋塗並烘烤玻片上的抗蝕劑，獲得具有想要厚度的 SU-8 薄膜，接著通過具有設計特徵的光罩，使 SU-8 薄膜暴露在 UV 光下。使 SU-8 試樣顯影，並藉著氮氣流脫水。在製造之後，處理底板陣列，以在氧化矽表面形成疏水性全氟烷基矽烷層。該步驟使陣列能夠在底板之間保留連續的氣泡(“虛擬牆”)，防止在底板之間區域中的溶液或細胞接近(參見，例如美國專利申請案第 11/539695 號，2006 年 10 月 9 日提申，標題為圖化生物學和非-生物學材料的微-氣泡盤(Micro-Bubble Plate For Patterning Biological And Non-Biological Materials)，其係以引用方式納入本文中)。在矽烷化之後，藉著使用 PDMS 將矽”O”-環(24 毫米外直徑)附接至底板陣列，建造小隔間。然後使用膠原蛋白或纖維網蛋白修飾底板的上表面，以提高細胞附著。在平鋪細胞之前先以基質沖洗陣列。

為收集釋放的底板和黏著細胞，藉著以 SU-8 鑄模鑄造 PDMS，以製造微孔淺盤。淺盤具有多個尺寸為 1 毫米的方或圓孔。該孔之深度為 150 微米，並以 0.25 毫米厚的壁分開。每個孔按號碼標示以供鑑認。微孔淺盤是圓形的，具有 17 毫米之直徑，並被設計成與含有底板陣列之隔間相配對，以形成不透水密封。在底板釋放之前，使用無菌稱墊將 PDMS 微孔淺盤與底板陣列密封。在底板釋放之後，倒轉微孔淺盤-底板陣列組件，使底板和含水溶液因重力而

落入微孔淺盤中。

如上文提及的，底板-陣列系統的有利條件之一是以基於其中需要多次測量的動態現象，在一段時間內從相同的細胞或細胞群中選擇細胞的能力。為展示底板陣列在基於時間特性分離的利用性，基於其生長速率分離細胞。以產生每個底板 <1 個細胞的密度，將 HeLa 細胞平鋪在具有按號碼編碼之底板的陣列上，並在 2 小時內藉著顯微鏡檢查，以證明底板具有每個底板 0 或 1 個細胞。在這些實驗中，以獨特的數字碼編碼底板，而使在陣列上追蹤特定的底板超過數天成為可能。在培養 96 小時時，再度檢查在平鋪時含有單一細胞的底板。拆開此時有 <4 個細胞(2.5 ± 0.8 個細胞[平均值 $\pm$ 標準差]， $n=6$)之菌落的底板，收集到第一個多孔培養盤內，並在條件培養基中培養。如在圖 12A 中所見，輕易地測定在每個衍生自單一細胞之菌落中的細胞數目。亦釋放在 96 小時有 ≥ 22 個細胞(25 ± 2 ， $n=5$)的底板，收集至第二個多孔培養盤內，並放在條件培養基中(參見圖 12C)。在平鋪在底板陣列上之後 118 和 144 小時，再次判定每個收集到之底板中出現的細胞數目。在 144 小時，具有緩慢和迅速生長族群的孔，分別具有 3.0 ± 1.6 對 65 ± 18 個細胞(參見圖 12B 和 12D)。兩個細胞族群的生長曲線之擬合，緩慢生長的細胞有 4 天的加倍時間，而較快速生長的細胞則有 1 天的加倍時間，因此展示基於加倍時間或生長速率成功地分類。這些數據亦展示收集細胞菌落的能力。基於生長速率的選擇，可以在鑑認涉及調節細胞週期

或促進生長抑制之基因和蛋白質上找到利用性。其他藉由在單一細胞上重複測量而成為可能之分離的類型，包括基於離子（例如鈣）濃度、蛋白質移位、酵素（例如激酶）活化或細胞骨架改變之時間模式的選擇。

翻到圖 12E 和 12F，敘述展示基於細胞形態學之細胞選擇的實驗。可使用流式細胞計數評估顯著的細胞形態學，如基於正向光散射的尺寸和粒性。目前在流動細胞中之細胞高速顯影上的進步，已經證明可用以獲得額外的結構數據，其對增加可能的分類決定顯示有用。然而，這些方法需要在分析之前先使細胞置入懸浮液，結果喪失了細胞在其黏著狀態下特有的三維結構。為展示藉著形態學分離細胞，以產生每個底板<1 個細胞的密度，將 HeLa 細胞平鋪在底板陣列上，並培養 4 天。已知 HeLa 細胞在標準組織培養條件下會展現出一些形態學。當在透照法下觀察時，偶爾在底板上的細胞具有完全-伸展的表現型，其因為細胞被在陣列上維持於培養中而被保留(圖 12E)。較常看到的是展現出較球狀形態的細胞，與底板接觸最少(圖 12E)。“*”標記非常扁平的圓形細胞，而“^”標記球狀的細胞。在相同的實驗中，釋放並收集含有顯示兩種形態學之細胞的底板(每個表現型 n=6)。當分類到多孔培養盤中時，再度檢查底板，而在所收集之底板上的所有細胞均保持其在釋放前的形態學，即使是在持續培養 3 天之後(圖 12F)亦如此。因此，可基於其形態學或形狀來選擇和收集細胞。基於形態學的選擇使鑑認調節細胞骨架、表面附著、或細

胞-對-細胞黏附的基因及/或蛋白質成為可能。

翻到圖 13，敘述展示無性繁殖系菌落中基於個別細胞特性之細胞選擇的實驗。可在大範圍之尺寸內(數十到數百微米)製造陣列中的底板。如同先前討論的，可使用該系統分離單一細胞或細胞菌落。當在能夠容納多個細胞的底板上培養單一細胞時，在底板上形成細胞的菌落。因為在底板之間的虛擬牆限制細胞移動至其他底板，這些菌落大多數本質上應該是無性繁殖系的。因為可隨著時間經過重複查詢底板，可隨著菌落生長測量在底板上菌落中之個別細胞的特性。因此，基於創建細胞之後裔的特徵(如基因表現)的分離應該是可能的。對於這些研究，使用以包括與組織蛋白-H1 蛋白質融合之 EGFP 的蛋白質穩定轉染的 HeLa 細胞株。組織蛋白-H1 與細胞 DNA 密切相關，使得經轉染之細胞在其核中局部地展現出綠螢光。分別以 10:1 之比例，將野生型 HeLa 細胞與表現 EGFP-組織蛋白-H1 的細胞混合。然後將細胞以產生每個底板 <1 個細胞之限制稀釋平鋪在陣列(175 微米邊長，40 微米間隙，50 微米高)上。以獨特的號碼將陣列中 5,600 個底板分別編碼，以使在分類之前和之後追蹤特定的底板成為可能。在數天內藉著顯微鏡(透射和螢光)檢視底板陣列，並測量在陣列上每個親代細胞之後代的螢光。可在含有非螢光細胞的底板中輕易地看出有螢光細胞的底板(圖 13A 和 13B)。在這些條件下，看不見底板的綠自身螢光。在培養 72 小時之後，76%底板沒有細胞，22%含有非螢光細胞的菌落，而 2%顯示出具有

螢光細胞的菌落($n=10$ 實驗)。其中所有細胞均表現 EGFP-組織蛋白-H1 的菌落，具有平均 $7+4$ 個細胞，為最初在底板上培養之單一親代細胞的後裔。為展示這些無性繁殖系菌落的分類，釋放螢光菌落、收集、並安置於培養中(圖 13C 和 13D)。這些螢光菌落的擴展持續六天，產生表現融合蛋白之細胞的無性繁殖系族群($n=15$)(圖 13E 和 13F)。這些實驗展示基於個別細胞是否保有親代細胞之特性分類細胞菌落的能力。該選擇策略可在細胞之分子設計或細胞株（例如幹細胞）的發育方面，找到利用性。

諸如在流式細胞計數、LCM、Palm 系統、抗生素選擇、和限制稀釋中使用的標準選擇基準，亦可能用於微-底板陣列系統技術。這些選擇基準包括螢光，如來自自身螢光、由細胞表現的螢光分子、螢光染料、免疫螢光；螢光特性，如螢光壽命、極化、各向異性現象、螢光共振能量轉移、猝滅、螢光光譜；生物發光；化學染色；從產色原受質中產生有色產物；光學特性，包括光散射、消光、干涉、相位、分光光度吸收、極化、紅外光譜；電學特性，包括阻抗和電容；聲學特性；及其他。例如，如在圖 14 中所示，可分析使用免疫螢光染色的細胞，然後基於表面蛋白的有無或強度選擇。該實例展示可在生長在底板上的細胞上進行免疫螢光染色，並可基於細胞-表面標記的螢光染色呈像細胞，同時在底板上培養細胞。在該實例中，將 RBL 細胞與經 Alexa Fluor 647-標示之 IgE(10 微克/毫升)一起培養，然後沖洗。RBL 細胞具有表面 $Fc\epsilon$ 受體，其與 IgE 結合。

在底板陣列上可輕易看到 Alexa Fluor- 染色的細胞(激發/發射 -650/665 毫微米)。空的底板(在中央下排)顯示無明顯背景螢光。

如同在前圖 10 中所述，可在從底板陣列中釋放之後選殖細胞。為進一步展示在底板釋放之後的存活力，並展示可使用底板選擇技術產生無性繁殖系族群，進行進一步的實驗。為測定在底板釋放與收集之後，細胞是否能生長成菌落，將細胞平鋪在底板陣列上。在培養 24 小時之後，從陣列中釋放出在底板上的個別細胞，收集在多孔培養盤中，並安置在標準組織培養恆溫箱中。在收集的一小時內，以及之後不同的時間，使細胞顯像。在收集之後一小時，大多數細胞仍維持在底板頂端(參見圖 15A 和 B)。在收集之後 10 小時，大多數細胞已經從底板移動到鄰近的表面上，且有些細胞亦已經經歷細胞分裂(參見圖 15C 和 D)。在底板釋放與收集之後 5 和 7 天，在以含有細胞之底板平鋪的那些孔中出現許多細胞(參見圖 16 和 17)。在孔中出現衍生自在底板上收集之細胞的無性繁殖系或在遺傳上相同的菌落。

除了使使用更廣泛的細胞選擇基準成為可能，微-底板陣列系統亦有利地使迅速建立穩定轉染物的菌落成為可能。以 DNA 轉染細胞，以過度表現蛋白質，或以表現非-天然或突變蛋白質，是在生物學實驗室中進行過無數次的標準過程。從大族群中選擇少數的細胞需要嚴謹的努力，因為穩定轉染細胞的發生率可能是 10,000 分之 1 那麼低。

雖然現代的分子生物學技術經常可獲得高百分比攝入 DNA 的細胞，但將 DNA 併入宿主基因組內卻是相當罕見的事件，其為穩定複製並轉移至子代細胞所必需的。被暫時轉染的細胞通常在培養數天時喪失外來的 DNA，並停止表現蛋白質。通常藉著抗生素選擇與限制稀釋法併用，建立轉染細胞之穩定表現的無性繁殖系。當轉染細胞攜帶螢光標記時，在消耗足夠的時間建立適當數目的穩定無性繁殖系之後，亦可使用流式細胞計數來分類細胞。抗生素選擇法通常需要數週和大量的人力。此外，選擇法本身可能是有毒性的，更降低了穩定轉染物的發生率。

在許多暫時轉染方法中看到之表現的迅速喪失，展示在轉染數天內分離並擴展細胞的小型無性繁殖系菌落時，可比傳統方法更迅速地產生穩定的無性繁殖系。當以 DNA 轉染細胞時，可在轉染後幾天內(例如 <5-10 天)分離仍表現融合蛋白的無性繁殖系菌落。無性繁殖系菌落在這幾天中的生長，可包括在範圍大約 <50-1000 個細胞內的菌落尺寸，具有在範圍大約 <10-20 次細胞分裂內的細胞分裂次數。若原始細胞(群)的所有後代均在底板上持續表現該基因，則這些菌落就是被穩定轉染的。然後所選殖的菌落被迅速地擴展，因為收集到菌落而非單一細胞。這提供細胞生物學家有力的新工具，以迅速製備無性繁殖系族群，明顯地減少了時間、人力和成本。

為說明底板陣列於迅速建立穩定細胞株之用途，在圖 18 到 20 中敘述並說明代表性實驗。第一個步驟包括以欲

表現之 DNA (如編碼螢光蛋白者) 轉染細胞(步驟 1), 並回收在燒瓶中的轉染細胞(步驟 2)。可使用各種轉染載體中的任一者, 包括但不限於以基於脂質的載劑、病毒或微生物。或者, 可在存在 DNA 構築體下使用電穿透。在所敘述之方法中, 在將細胞放在底板陣列上之前, 先進行該步驟, 而然後容許回收細胞, 並在培養燒瓶中繁殖一段適當的時間(步驟 2)。在下一個步驟(步驟 3)中, 使細胞沉降在含有底板的陣列上, 每個底板都有足夠的表面積, 以容許具有想要細胞數目的細胞菌落在單一底板上生長。細胞可自具有適當密度和體積之懸浮液的平鋪, 使得大多數的底板僅含有單一細胞。或者, 可在細胞沉降使底板含有單一細胞之後, 篩選陣列。在平鋪之後, 鑑認並記錄僅含一個細胞的底板。在一段時間內隨著細胞生長和繁殖來分析陣列。憑藉著在底板之間插入空氣障壁, 將細胞維持限制在其最初附著的底板上; 因此, 在任一底板上僅發現原始細胞的後代。針對感興趣的特徵(如螢光, 其代表目標 DNA 的表現)對後代評分。如同在圖 19 和 20 中指出的, 釋放並收集含有一或多個具有感興趣特徵(在這裡是綠螢光)之細胞的底板(步驟 4), 並容許小型無性繁殖系菌落擴展(步驟 5)。穩定轉染結果將產生由所有皆展現感興趣特徵(即綠螢光)之後代組成的菌落。翻到圖 20, 出示一段時間內之無性繁殖系菌落的擴展。

或者, 如在圖 21 中所示, 可藉著在轉染步驟之後馬上將細胞平鋪在底板陣列上, 甚至更迅速地鑑認並選擇穩定

轉染(步驟 1)。然後在陣列上進行細胞生長大約 5 至 7 天(步驟 2)。如上文提及的，穩定轉染結果將產生由全部皆展現感興趣特徵(即綠螢光)之後代組成的菌落。在目前的實例中，在菌落中的所有後代，由於表現目標蛋白的結果，均為有螢光的。未經穩定轉染的細胞，將隨時間導致在一些或全部後代中喪失特徵的菌落。接下來，如在圖 21 和 22 中所述，釋放(步驟 3)並收集(步驟 4)含有穩定轉染物的底板-即僅含有綠螢光細胞的底板，然後容許穩定轉染物之小型無性繁殖系菌落擴展(步驟 5)。

雖然本發明可容許各種修飾和可選擇的形式，但已經在圖片中出示，並在本文中詳細說明其特定的實例。然而，應瞭解本發明並不受限於所揭示之特定形式或方法，相反的，本發明涵蓋所有落在附錄之申請專利範圍之精神與範圍內的修飾、相等物和選擇。

【圖式簡單說明】

圖 1A 為具有微-底板之陣列的微-圖化淺盤。

圖 1B 為微-圖化淺盤的側面圖，其在特定之可尋址位置具有與附著在底板的試樣(細胞)。

圖 2 為微-圖化淺盤另一具體事實的側面圖，並說明藉著從該淺盤中釋放含有試樣之底板的試樣的陽性選擇。

圖 3 為微-圖化淺盤另一具體事實的側面圖，其具有附著至特定之可尋址位置的試樣(生物)。

圖 4 為微-圖化淺盤另一具體事實的側面圖，其具有附著特定之可尋址位置的試樣(細胞)。

圖 5 為微-圖化淺盤另一具體事實的側面圖，其位在多孔培養盤之單孔的底部，容許對該淺盤使用傳統的工具。

圖 6 為淺盤的側面圖，顯示使用臨時或永久的分割器，以容許將不同類型或病史的試樣平鋪在淺盤上不同的場所，或在不同的通道內。

圖 7A 和 7B 顯示在使用底板淺盤進行黏著細胞篩選和培養之過程中的步驟。

圖 8A 和 8B 顯示在使用底板淺盤進行 DNA 篩選之過程中的步驟。

圖 9 為自動測定之整合型底板淺盤卡匣的透視圖。

圖 10A 到 M 顯示在使用整合型底板淺盤卡匣進行試樣篩選和培養之過程中的步驟。

圖 11 為使用包括微-底板陣列之微-底板卡匣的高容量篩選和細胞選擇系統的圖解。

圖 12A 到 12F 為顯示基於不同的細胞特徵，鑑認並收集生物學細胞的影像。圖 12A 和 C 顯示從同時平鋪在底板陣列上之單一細胞生長的細胞無性繁殖系菌落。釋放個別的底板，並分開收集，以產生兩個生長特徵有所不同的無性繁殖系族群。圖 12B 和 D 顯示細胞以不同的速率增殖。圖 12E 和 F 顯示同時平鋪在底板陣列上的細胞具有不同的形態學。可釋放含有想要形態學之細胞的底板，收集並與具有另類形態學之細胞分離。

圖 13A 到 13F 是顯示收集以綠螢光標記蛋白穩定轉染之無性繁殖系菌落的影像。將單一細胞平鋪在陣列上，使

得一或數個細胞平鋪在個別的底板上。圖 13A、C 和 E 為透射光影像，而圖 13B、D 和 F 為相對應的螢光影像。圖 13A 和 B 顯示，表現螢光蛋白之細胞的無性繁殖系族群的單一菌落以及缺少該蛋白質之細胞的數個菌落。圖 13C 和 D 顯示已經與陣列分開，並放在培養孔中的底板和螢光菌落。圖 13E 和 F 顯示無性繁殖系菌落已經增殖成僅含有螢光細胞的大型菌落。

圖 14 為以長波長螢光染料(Alexa Fluor647)染色活細胞的透射光和相對應螢光影像。圖 13 和 14 一起證實在廣大範圍螢光波長內，進行生長在底板陣列上之細胞的透射光學顯微鏡和螢光顯微鏡檢查的能力。

圖 15A 到 15D 為顯示含有收集自陣列之單一細胞，並將其維持培養 10 小時的個別底板的兩個實例的影像，其證實在分離並放在培養孔中之後，該單一細胞仍保持黏著並存活。在圖 15A 和 C 中，在分離之後仍看到細胞保持與底板黏著，然後顯示其開始移動離開底板。在圖 15B 和 D 中，顯示在放在培養孔中之後，另一個細胞開始增殖。

圖 16 為顯示獲自底板陣列之個別細胞的實例的影像，其顯示在培養孔中收集和分離之後，該細胞生長成為無性繁殖系菌落。

圖 17 為顯示獲自底板陣列之個別細胞的另一實例的影像，其顯示在培養孔中收集和分離之後，該細胞生長成為無性繁殖系菌落。

圖 18 為流程圖，其顯示使用底板陣列建立穩定之轉染

細胞株的方法。

圖 19A 和 19B 為顯示從使用在圖 18 中出示之方法產生的細胞陣列中，鑑認並釋放(陽性選擇)轉染無性繁殖系的影像。

圖 20 為顯示在圖 19 中看到之轉染無性繁殖系，生長成穩定之轉染菌落的影像。

圖 21 為顯示使用底板陣列，更輕易建立穩定轉染細胞株之另一個方法的流程圖。

圖 22 為顯示從使用在圖 21 中出示之方法產生的細胞陣列中，建立穩定之轉染無性繁殖系菌落的影像。

【主要元件符號說明】

10	淺盤
12	底板
13	位置
14	試樣
16	檢測器
17	雷射脈衝
18	雷射
20	淺盤
22	底板
23	位置
25	淺盤
30	淺盤
32	底板

34	試 樣
35	非-位置
36	顯 微 鏡 接 物 鏡
37	電 極
38	不 透 明 區
39	電 場
40	淺 盤
41	多 孔 培 養 盤
42	底 板
43	位 置
44	試 樣
47	單 一 孔
50	淺 盤
51	分 割 器
52	底 板
54	試 樣
55	流 體 帽
60	細 胞
62	多 孔 培 養 盤
70	淺 盤
72	底 板
72a	底 板
73	位 置
74	試 樣

76	檢 測 器
77	雷 射 脈 衝
78	雷 射
80	淺 盤
82a	底 板
83	位 置
84	DNA
85	DNA
86	檢 測 器
87	雷 射 脈 衝
88	雷 射
90	整 合 底 板 淺 盤 卡 匣
91	流 體 帽
92	底 板
95	小 通 道
99	淺 盤
100	整 合 底 板 淺 盤 卡 匣
101	帽
102	底 板
102a	底 板
102b	底 板
106	檢 測 器
107	進 出 孔
108	雷 射

109	淺 盤
110	提 取 器
150	顯 微 鏡 附 件
160	電 腦
170	卡 匣
171	帽
172	底 板
179	淺 盤

十、申請專利範圍：

公告本

1. 一種收集單一活細胞的方法，其包括下列步驟：

將多個活細胞排列在陣列上，其中多個細胞中的個別細胞被分開地置於在可移動地連接至淺盤的底板陣列之中的個別底板上，

從該多個活細胞中選擇單一的活細胞，其中選擇單一的活細胞包括基於時間上分離之細胞的二或多次測量，鑑認感興趣的細胞，並

藉由將所選擇的單一的活細胞之底板從淺盤取下以將其從陣列中移出，其中感興趣的細胞在選擇及移出步驟期間維持附著於其底板上。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該二或多次測量係以超過 1 秒之間隔得到。

3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該選擇步驟包括鑑認展現出感興趣之短暫特徵的細胞。

4. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該選擇步驟包括鑑認展現出感興趣之動態特徵的細胞。

5. 一種收集單一活細胞的方法，其包括下列步驟：

將多個活細胞排列在陣列上，其中多個細胞中的個別細胞被分開地置於在可移動地連接至淺盤的底板陣列之中的個別底板上，其中細胞體積小於 1 毫微升，

從該多個活細胞中選擇單一的活細胞，並

藉由將所選擇的單一的活細胞之底板從淺盤取下以將其從陣列中移出，其中所選擇的細胞在選擇及移出步驟期

間維持附著於其底板上。

6.如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該細胞體積小於 100 微微升。

7.一種收集單一活細胞的方法，其包括下列步驟：

基於時間上分離之細胞的二或多次測量，從多個活細胞中鑑認單一的活細胞，其中多個細胞中的個別細胞被分開地置於可移動地連接至淺盤的個別底板上，並

藉由將所選擇的活細胞之底板從淺盤取下以將其從該多個活細胞中分離，其中所選擇的細胞在鑑認及分離步驟期間維持附著於其底板上。

8.如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該二或多次測量係以超過 1 秒之間隔得到。

9.如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該鑑認步驟包括鑑認展現出感興趣之短暫特徵的細胞。

10.如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該鑑認步驟包括鑑認展現出感興趣之動態特徵的細胞。

11.一種收集細胞菌落(colony)之方法，其包括下列步驟：

將多個細胞菌落排列在陣列上，其中該多個細胞菌落中的個別細胞菌落被分開地置於在可移動地連接至淺盤的底板陣列之中的個別底板上，且其中在菌落中每個細胞的細胞體積，按體積計小於 1 毫微升，

從該多個菌落中選擇單一的細胞菌落，並

藉由將所選擇的單一的菌落之底板從淺盤取下以將其

從陣列中移出，其中所選擇的細胞菌落在選擇及移出步驟期間維持附著於其底板上。

12.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該菌落包括少於 500 個的無性繁殖系細胞。

13.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該菌落包括少於 100 個的無性繁殖系細胞。

14.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該菌落包括少於 50 個的無性繁殖系細胞。

15.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中在該菌落中每個細胞的細胞體積，按體積計小於 100 微微升。

16.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中在該菌落中每個細胞的細胞體積，按體積計小於 10 微微升。

17.一種收集細胞菌落之方法，其包括下列步驟：

將多個細胞菌落排列在陣列上，其中該多個細胞菌落中的個別細胞菌落被分開地置於在可移動地連接至淺盤的底板陣列之中的個別底板上，

從該多個菌落中選擇單一的細胞菌落，其中該選擇步驟包括基於時間上分離之菌落的二或多次測量，鑑認感興趣之菌落，並

藉由將所選擇的單一的菌落之底板從淺盤取下以將其從陣列中移出，其中所選擇的細胞菌落在選擇及移出步驟期間維持附著於其底板上。

18.如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該二或多次測量係以超過 1 秒之間隔得到。

19.如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該選擇步驟包括鑑認展現出感興趣之暫時特徵的菌落。

20.如申請專利範圍第 17 項之方法，其中該選擇步驟包括鑑認展現出感興趣之動態特徵的菌落。

21.一種方法，其包括下列步驟：

以感興趣之 DNA 轉染或以微生物-介導之方式感染多個細胞，其中該多個細胞中的個別細胞被分開地置於可移動地連接至淺盤的個別底板上，

在轉染或以微生物-介導之方式感染該多個細胞之後少於 5 天，從該多個細胞中鑑認細胞的穩定轉染物，並

藉由將細胞的穩定轉染物之底板從淺盤取下以收集細胞的穩定轉染物，其中轉染物在鑑認及收集步驟期間維持附著於其底板上。

22.如申請專利範圍第 21 項之方法，其中該多個細胞係排列在陣列上。

23.如申請專利範圍第 21 項之方法，其中該細胞係附著於表面上。

24.一種方法，其包括下列步驟：

以感興趣之 DNA 轉染或以微生物-介導之方式感染多個細胞，其中該多個細胞中的個別細胞被分開地置於可移動地連接至淺盤的個別底板上，其中該細胞體積小於 1 毫微升，

在轉染或以微生物-介導之方式感染該多個細胞之後少於 10 天，從該多個細胞中鑑認細胞的穩定轉染物，並

藉由將細胞的穩定轉染物之底板從淺盤取下以收集細胞的穩定轉染物，其中轉染物在鑑認及收集步驟期間維持附著於其底板上。

25.如申請專利範圍第 24 項之方法，其中該細胞體積小於 100 微微升。

26.一種方法，其包括下列步驟：

以感興趣之 DNA 轉染或以微生物-介導之方式感染多個細胞，其中該多個細胞中的個別細胞被置於可移動地連接至淺盤的分開底板上，

在轉染或以微生物-介導之方式感染該多個細胞之後少於 20 次細胞分裂，從該多個細胞中鑑認細胞的穩定轉染物，並

藉由將細胞的穩定轉染物之底板從淺盤取下以從收集細胞的穩定轉染物，其中轉染物在鑑認及收集步驟期間維持附著於其底板上。

27.如申請專利範圍第 26 項之方法，其中該鑑認步驟包括在轉染或以微生物-介導之方式感染該多個細胞之後少於 10 次細胞分裂，鑑認細胞的穩定轉染物。

28.如申請專利範圍第 26 項之方法，其中該細胞體積小於 1 毫微升。

29.如申請專利範圍第 26 項之方法，其中該細胞體積小於 100 微微升。

30.如申請專利範圍第 26 項之方法，其中該多個細胞係排列在陣列上。

31.如申請專利範圍第 26 項之方法，其中該細胞係附著於表面上。

十一、圖式：

如次頁

公告本

1/16

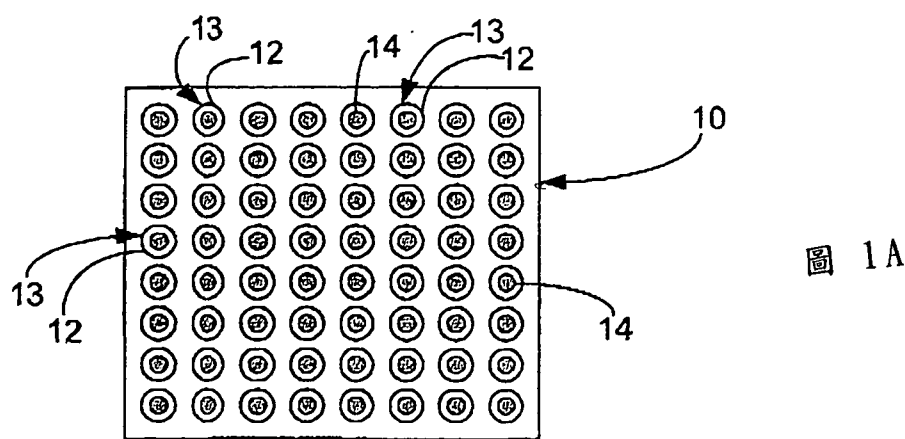


圖 1A

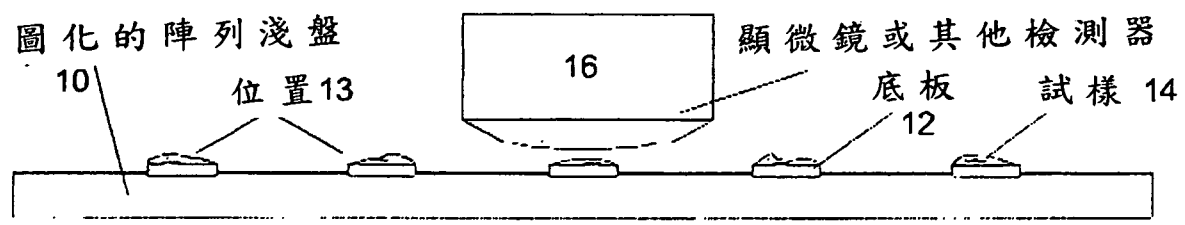


圖 1B

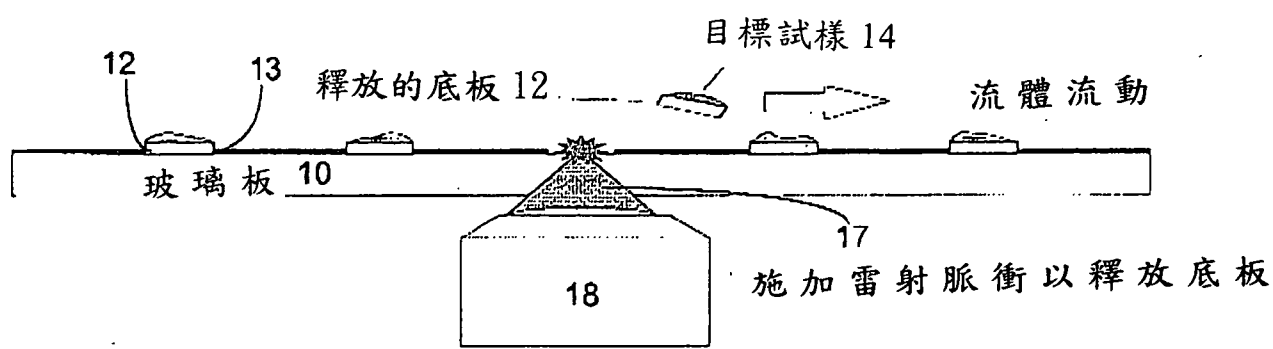


圖 2

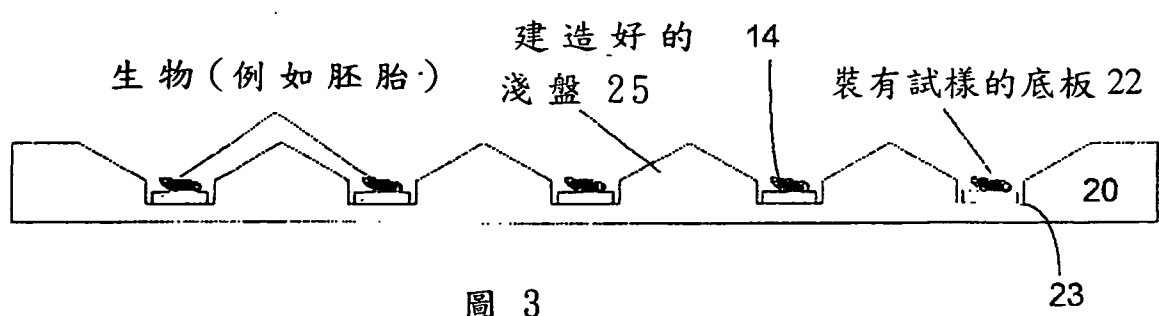


圖 3

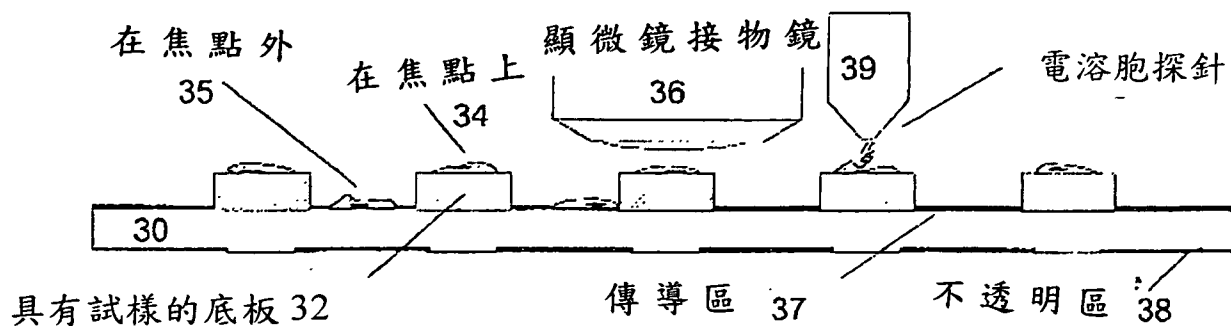


圖 4

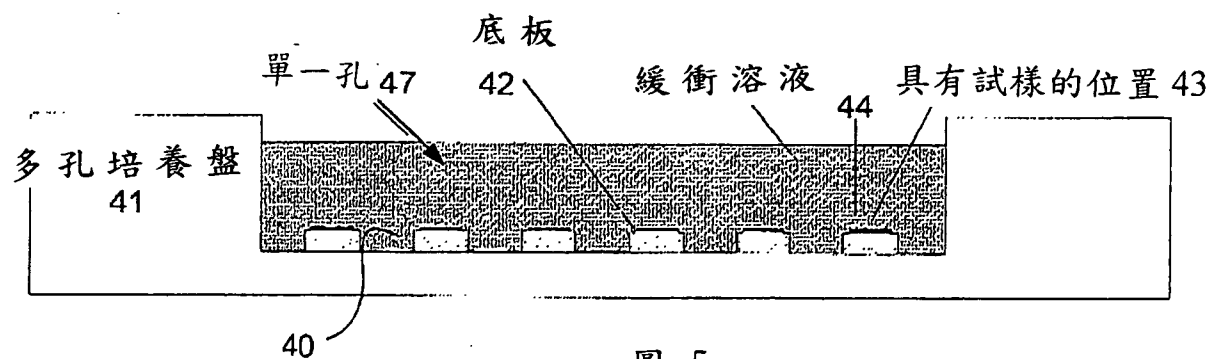


圖 5

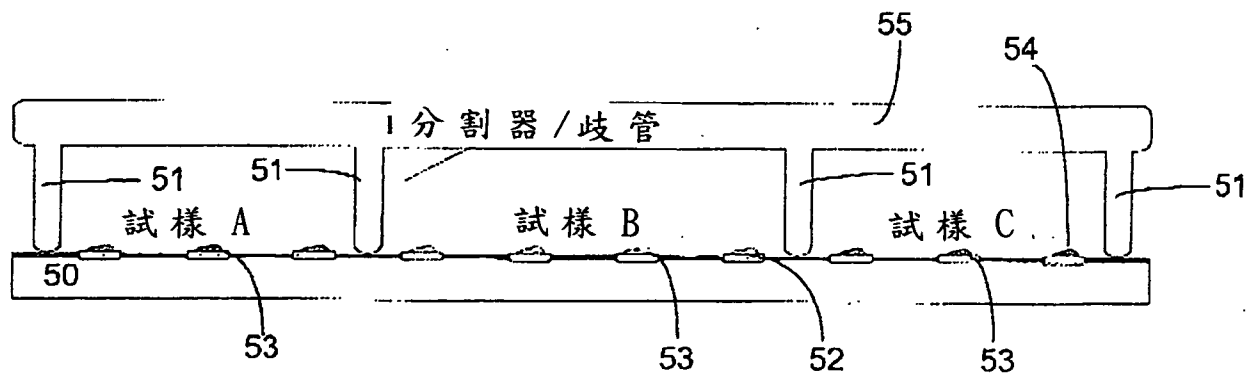
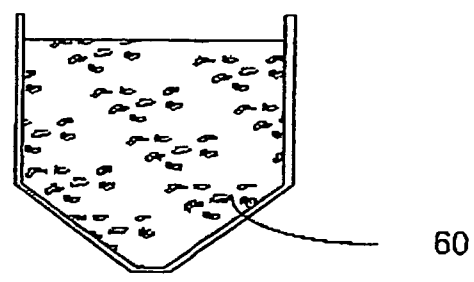
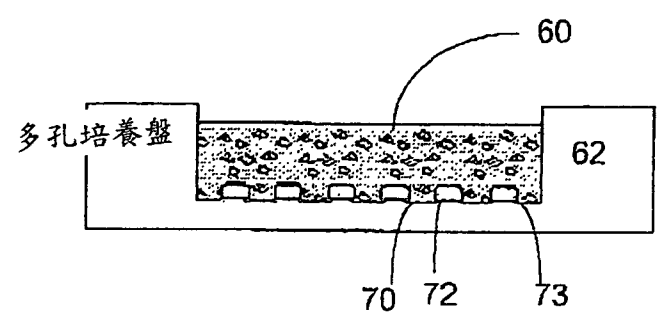


圖 6

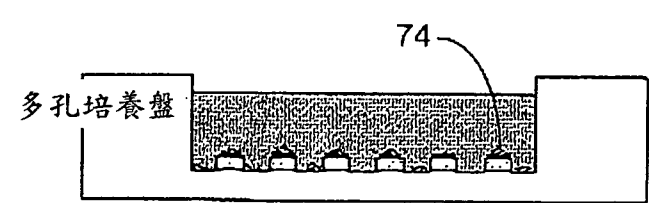
3/16



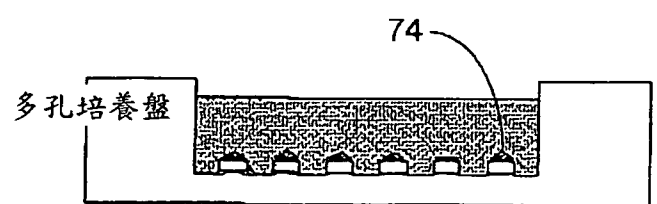
步驟 1



步驟 2



步驟 3



步驟 4

圖 7A

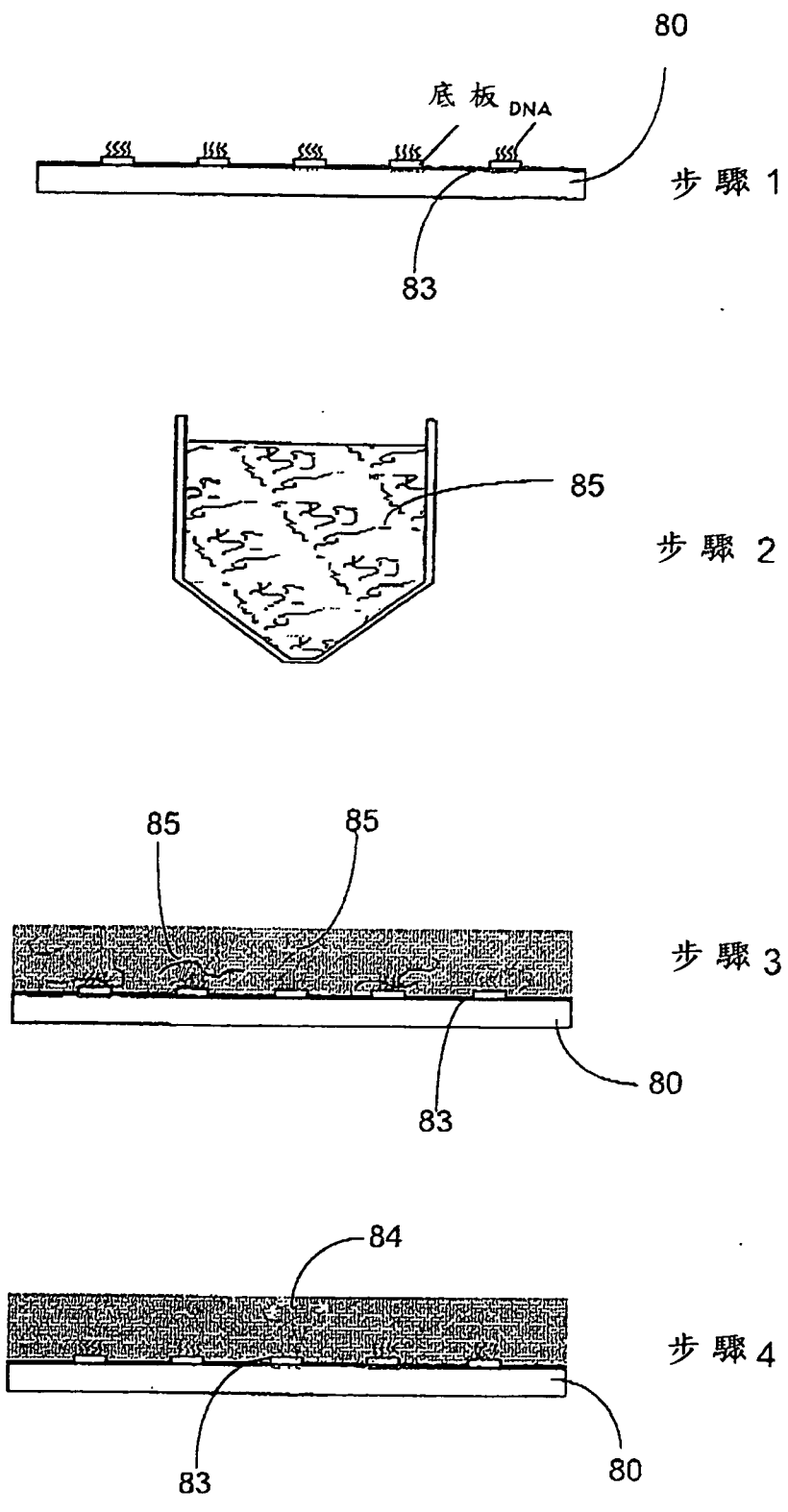
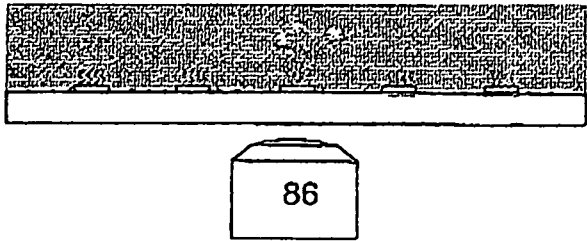
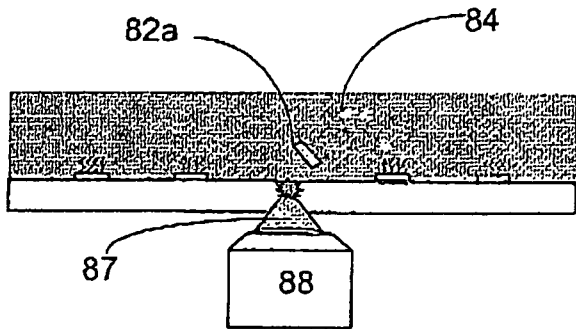


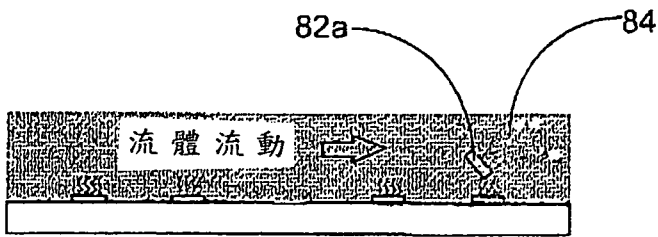
圖 8A



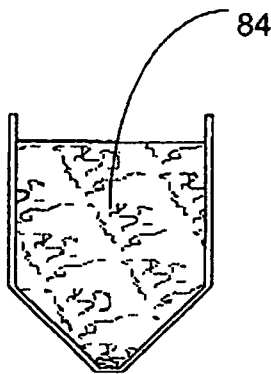
步驟 5



步驟 6



步驟 7



步驟 8

圖 8B

有通道的流體帽 91

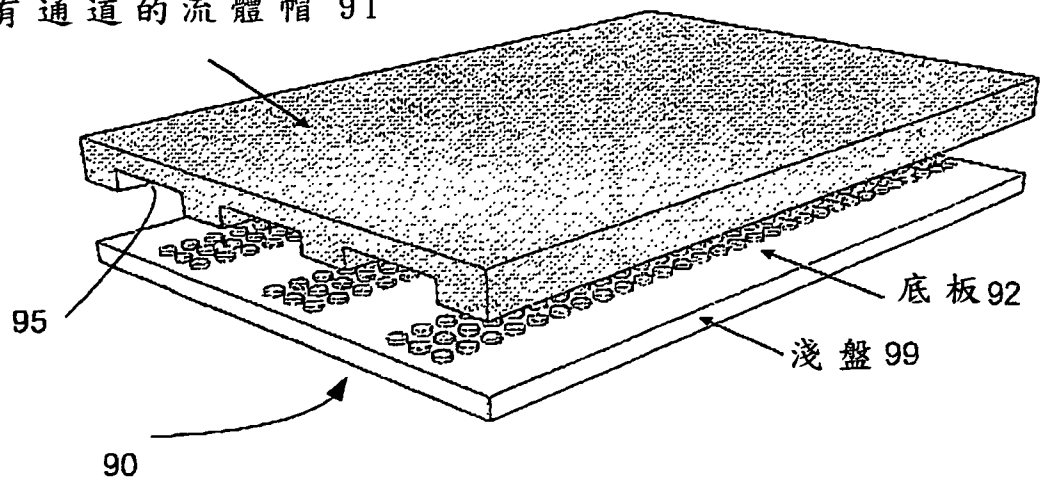


圖 9

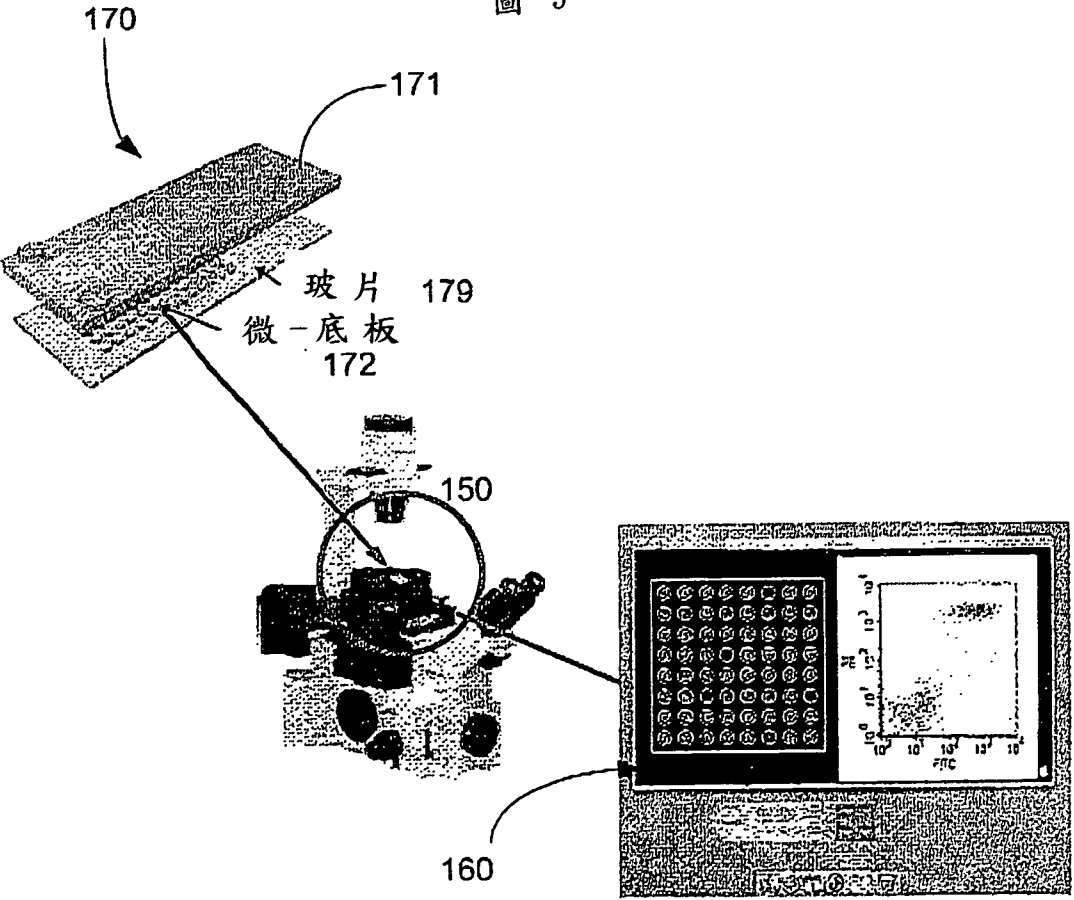


圖 11

8/16

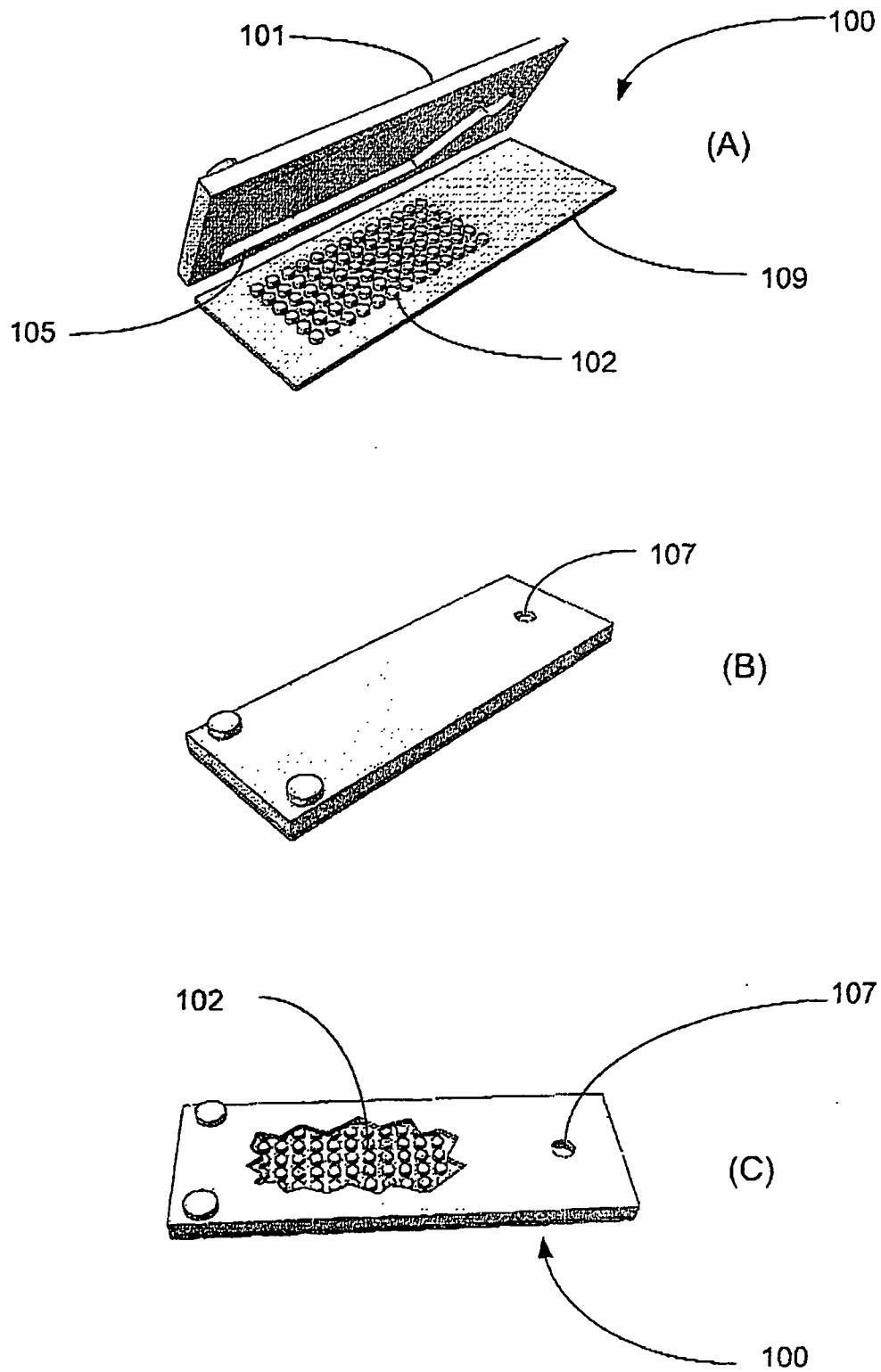


圖 10

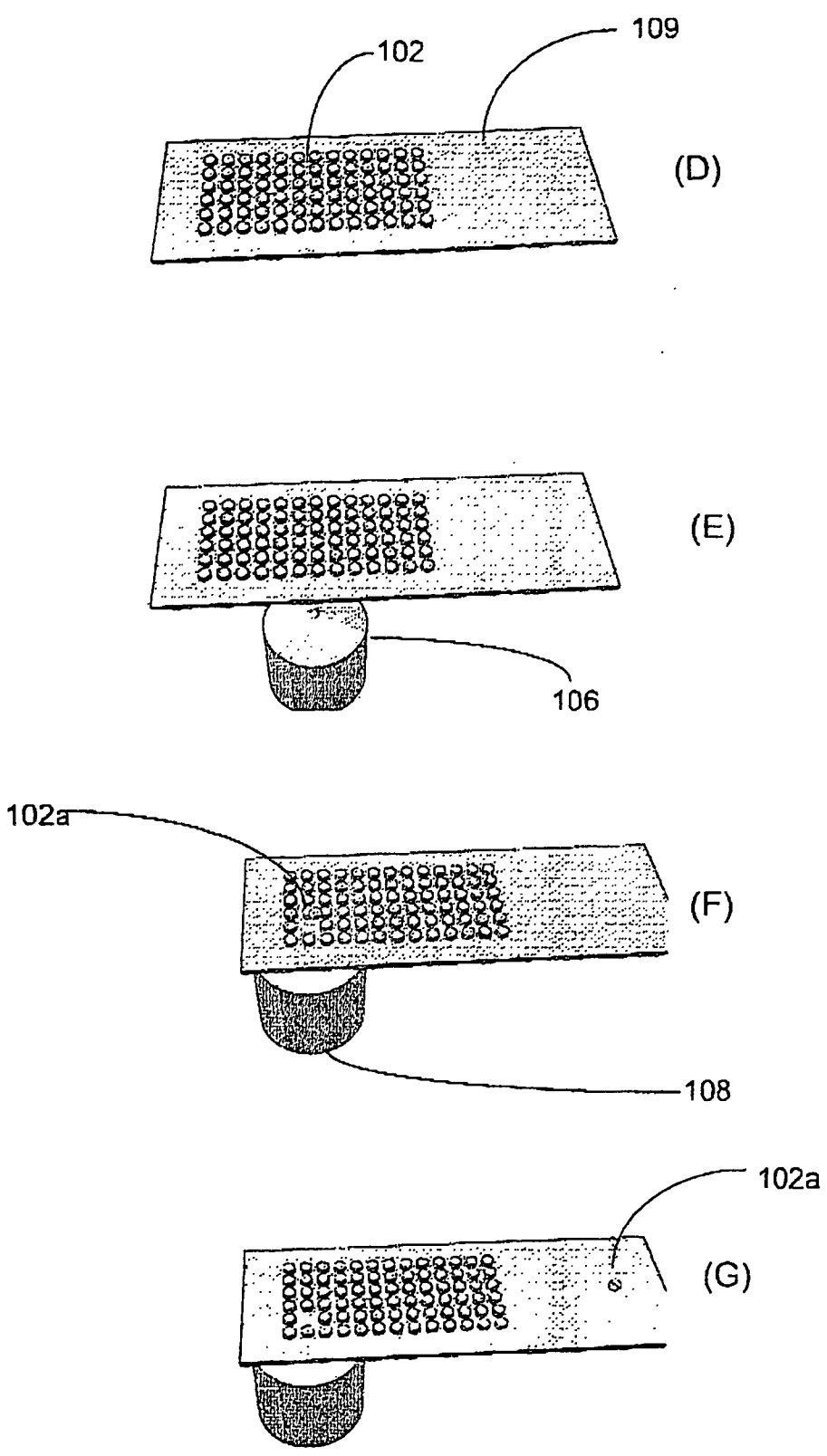


圖 10

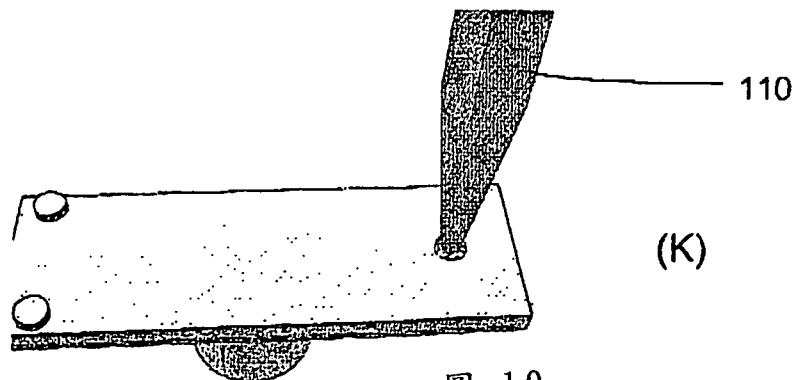
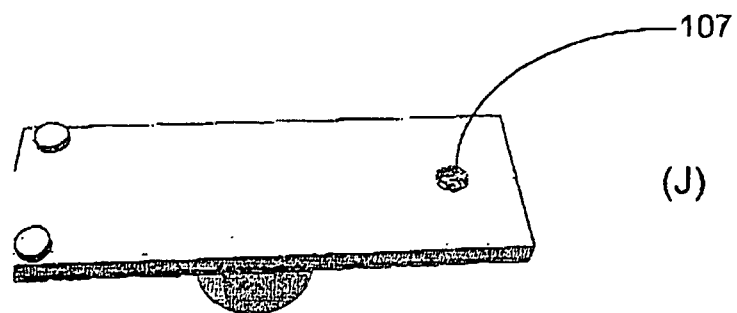
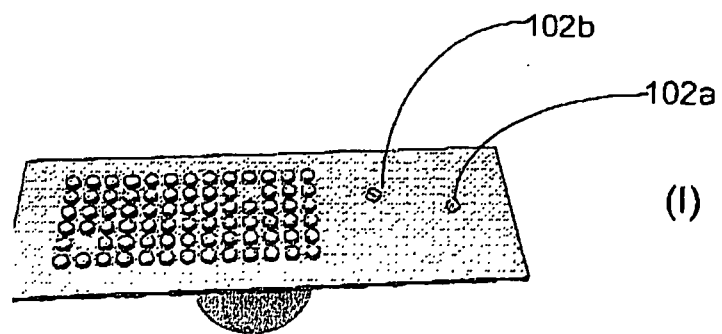
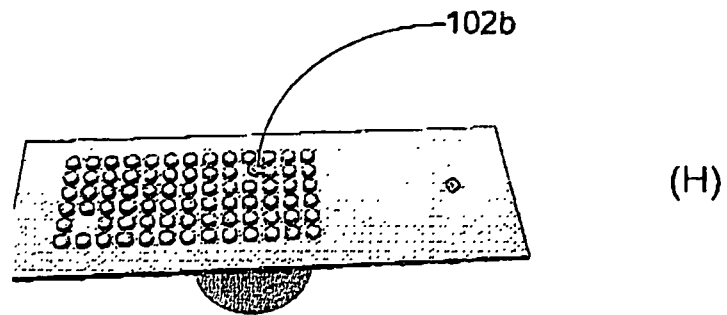


圖 10

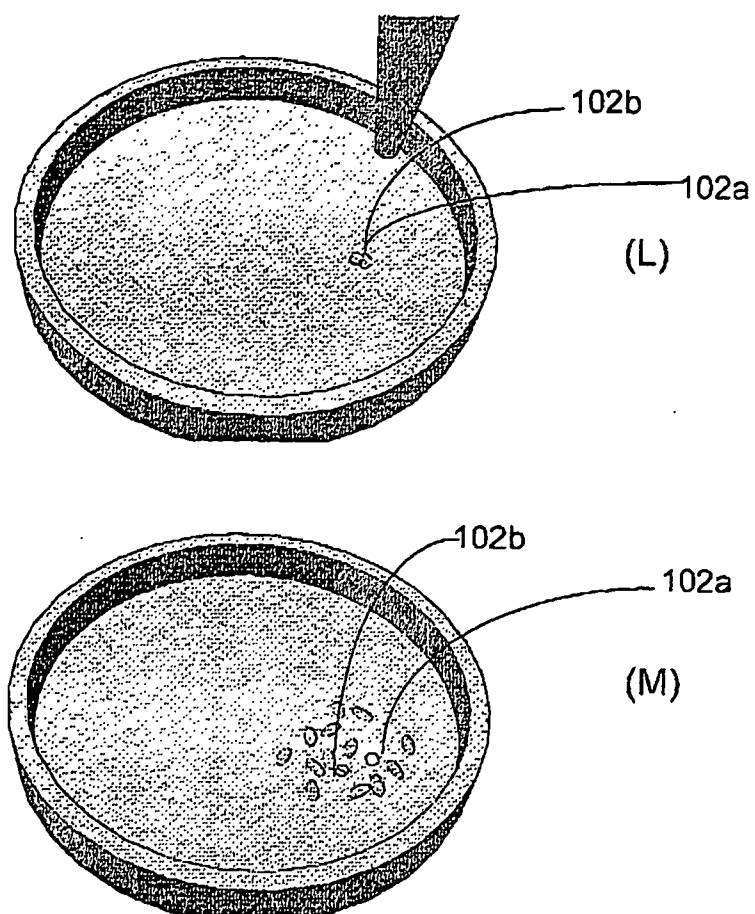


圖 10

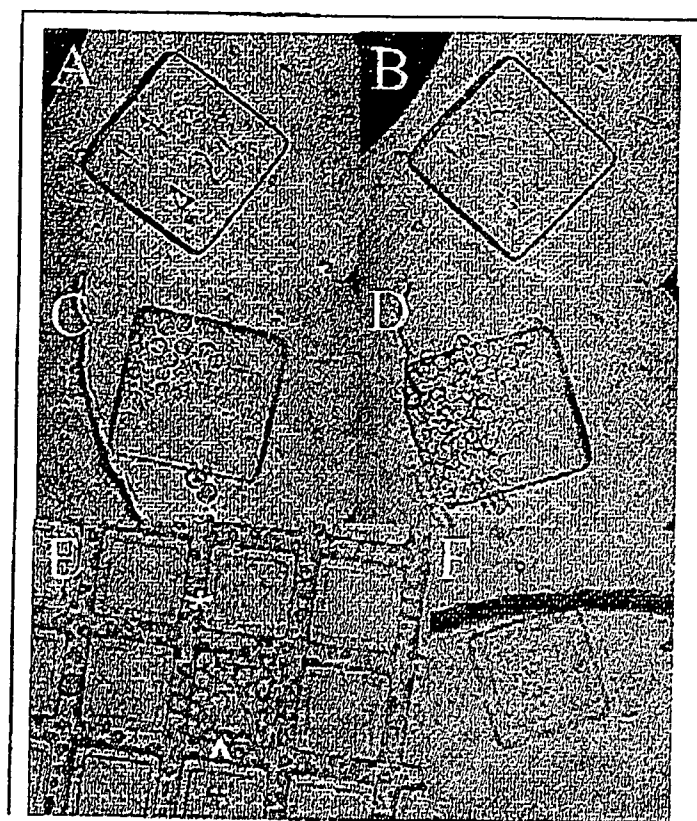


圖 12

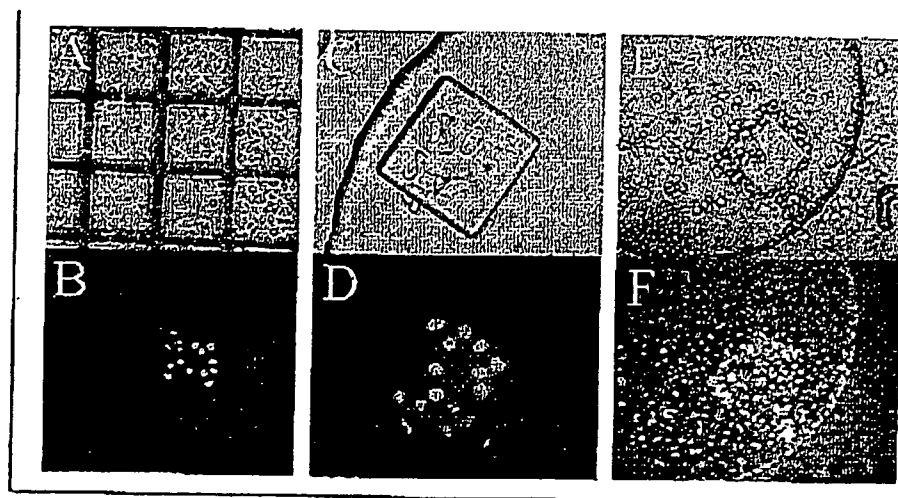


圖 13

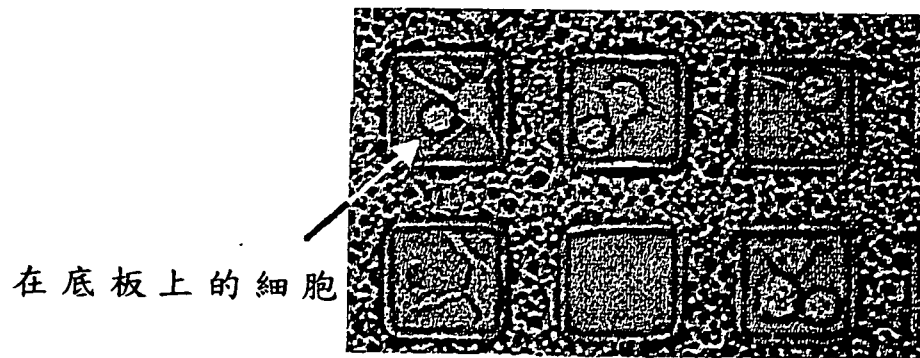


圖 14

細胞生長離開釋放和分離之底板

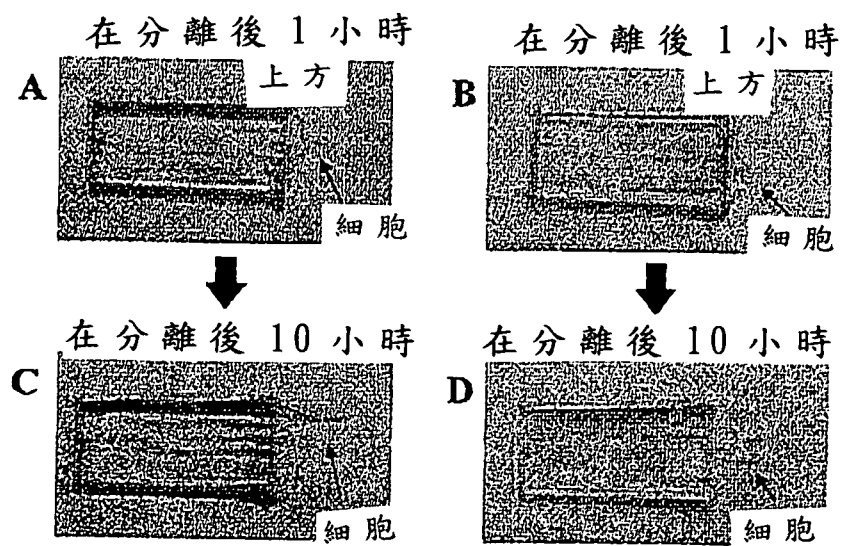
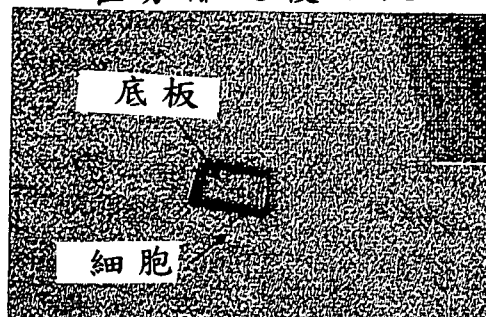


圖 15

選擇之細胞的選殖

在分離之後 1 天



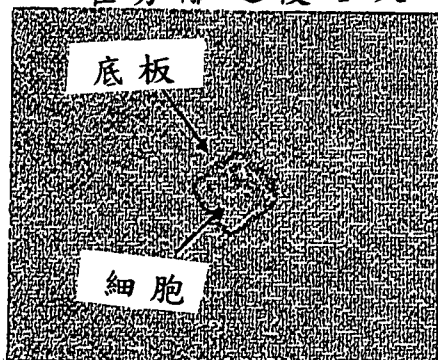
在分離之後 5 天



圖 16

選擇之細胞的選殖

在分離之後 1 天



在分離之後 7 天

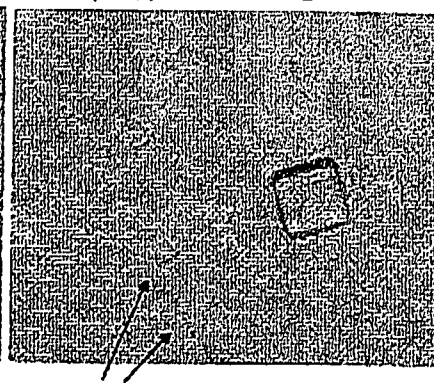


圖 17

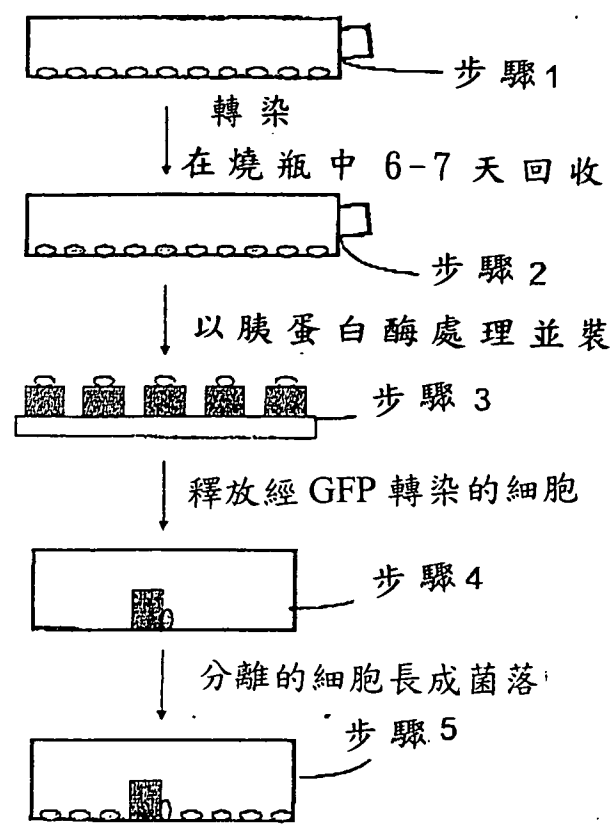


圖 18

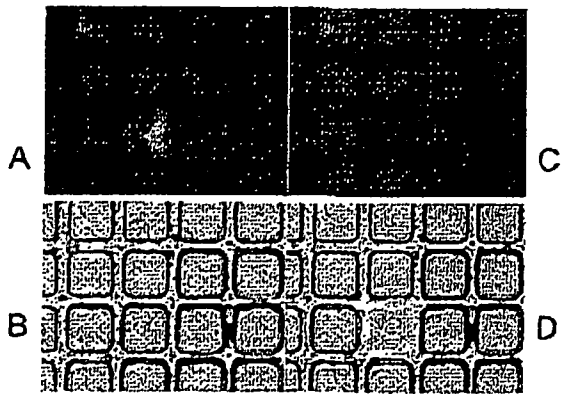
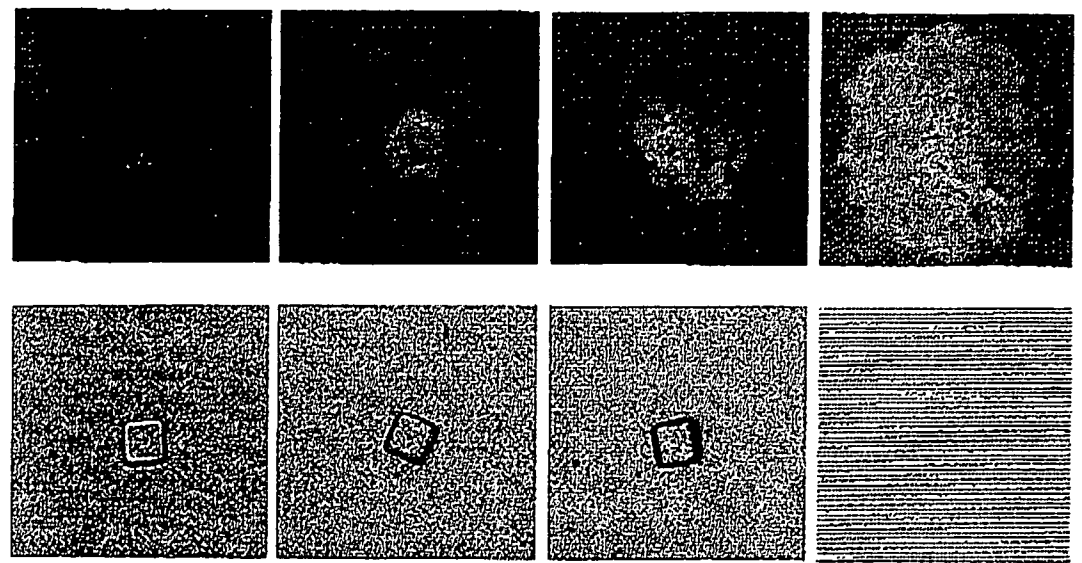


圖 19



在釋放後 0 小時 在釋放後 60 小時 在釋放後 74 小時 在釋放後 146 小時

圖 20

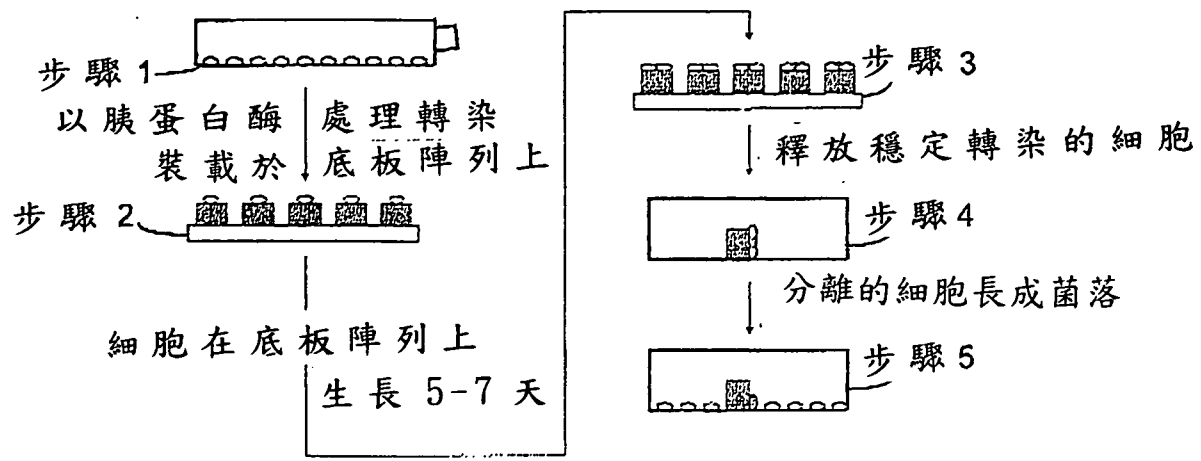
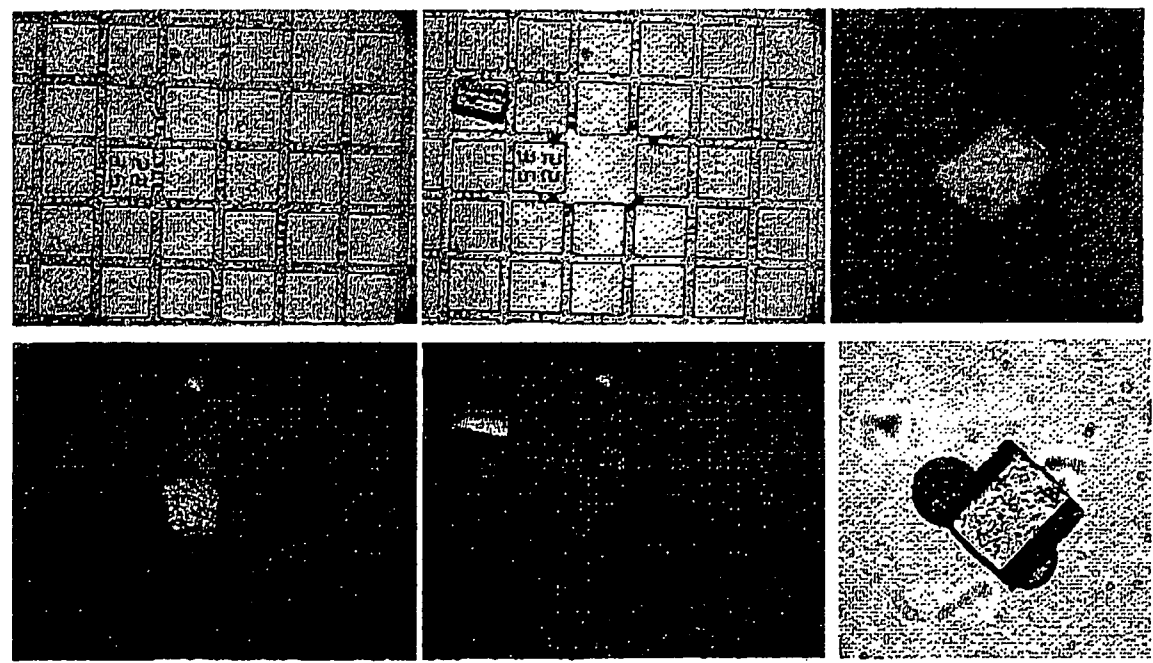


圖 21



在底板陣列上 6 天之後，釋放僅有綠細胞的底板

圖 22