



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 007 607**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)
G01N 15/14 (2014.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2022 PCT/CN2022/081234**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2022 WO22242285**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2022 E 22803614 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2024 EP 4144834**

(54) Título: **Método para aislar las células trofoblásticas placentarias de las células exfoliadas del cuello uterino de una mujer embarazada**

(30) Prioridad:

20.05.2021 CN 202110549947

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.03.2025

(73) Titular/es:

GUANGZHOU HYBRIBIO MEDICINE TECHNOLOGY LTD. (50.00%)
4th Floor, No.2 Reagent Building, No. 71 Fenghuang 3rd Road, Sino-Singapore, Guangzhou Knowledge City, Nine Dragon Town, Haunagpu District Guangzhou, Guangdong 510700, CN y **GUANGDONG HYBRIBIO BIOTECH CO., LTD. (50.00%)**

(72) Inventor/es:

ZHENG, YAN;
MA, JIAYAN;
FENG, XIAOWEI;
LIU, MENGYU;
CHEN, PEIXUAN;
GUAN, ZHISHENG;
XIE, LONGXU y
GE, YIYUAN

(74) Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 3 007 607 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para aislar las células trofoblásticas placentarias de las células exfoliadas del cuello uterino de una mujer embarazada

5 **Campo técnico**
 La presente invención pertenece al campo técnico de la clasificación celular. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para aislar las células trofoblásticas placentarias de las células exfoliadas del cuello uterino de una mujer embarazada.

10 **Antecedentes**
 15 El sistema de prevención y control de tres niveles (antes del embarazo, prenatal y neonatal) es uno de los medios importantes para reducir los defectos congénitos y mejorar la calidad de la población en China, entre los que la parte más compleja y difícil es el análisis y el diagnóstico prenatal.

20 Actualmente, existen varias desventajas en las tecnologías de diagnóstico prenatal utilizadas clínicamente, tal como la amniocentesis o la cordocentesis, y en los métodos de análisis prenatal no invasivos, como la secuenciación de ácidos nucleicos libres fetales. La amniocentesis y la cordocentesis tienen un alto riesgo de infección durante la muestra y el aborto, un período de análisis prolongado y elementos y un rango de detección limitados. Además, el tiempo de diagnóstico es limitado en las etapas media y avanzada del embarazo, las mujeres embarazadas tienen una baja aceptabilidad de estas dos tecnologías y el tratamiento clínico es difícil. La tecnología de secuenciación de ácidos nucleicos libres fetales tiene un rango de prueba extremadamente limitado, y solo puede detectar de 3 a 5 25 cromosomas aneuploides designados, y es difícil evitar casos de falsos positivos y falsos negativos utilizando este método. Además, la tecnología tiene una capacidad insuficiente para detectar mutaciones comunes y existen diferencias individuales en el contenido de ácidos nucleicos libres fetales en la sangre materna.

30 El solicitante describe un método para aislar células trofoblásticas en la solicitud de patente CN111304153A. En este método, al determinar un antígeno específico expresado en la superficie de las células trofoblásticas y al utilizar perlas inmunomagnéticas que portan el anticuerpo específico correspondiente, las células trofoblásticas placentarias se aíslan de una suspensión celular de una muestra trofoblástica placentaria y se purifican. En comparación con la amniocentesis convencional y la muestra de vellosidades coriónicas, la tecnología tiene las ventajas de no ser invasiva, de un tiempo de muestra más temprano, de bajo riesgo de infección y aborto, y de una confiabilidad similar en los 35 resultados de las pruebas. Por otro lado, la tecnología todavía tiene espacio para la mejora de los anticuerpos aplicables cuyas combinaciones descritas son aún limitadas, su precisión y especificidad. El equipo solicitante ha realizado una investigación y un desarrollo continuo del proyecto.

40 **Resumen**
 45 El objetivo de la presente invención es proporcionar un método para aislar las células trofoblásticas placentarias de las células exfoliadas del cuello uterino de una mujer embarazada basándose en la separación por citometría de flujo o la microfluídica. La presente invención no solo supera los problemas y defectos de los métodos convencionales, sino que también puede lograr el etiquetado sincrónico de una pluralidad de antígenos, así como la identificación y clasificación de señales de fluorescencia características simultáneamente; y el método ha mejorado considerablemente la precisión y la especificidad superiores a la solución de separación de perlas inmunomagnéticas anterior. Además, el método tiene ventajas en la mejora tanto de la cantidad como de la calidad de las células. El número de células obtenidas es mayor que el de los métodos convencionales, con buena especificidad y sensibilidad.

50 Los objetivos anteriores de la presente invención se logran mediante las siguientes soluciones técnicas:
 55 un método para aislar células trofoblásticas, que incluye los siguientes pasos:
 paso (1) preparar una suspensión celular de muestra a partir de una solución que contiene células exfoliadas del cuello uterino;
 paso (2) añadir un anticuerpo específico a la suspensión celular de la muestra para la incubación;
 el anticuerpo específico es una combinación de anticuerpos que corresponde al antígeno(s) específico(s) expresado(s) en la superficie o en el interior de las células trofoblásticas; preferiblemente, la combinación de anticuerpos específica es HLA-G+CK7, HLA-G+CK18, HLA-G+β-HCG, CD31+HPL, MMP9+CD31, HLA-G+HPL, HLA-G+MMP9, HLA-G+CD31, HLA-G+P, CD31+P, HLA-G+CDH5, CD31+CDH5, CD31+CK7+HLA-G, HLA-G+CK18+CD31, HLA-G+β-HCG+CD31, CD31+HPL+HLA-G, MMP9+CD31+HLA-G, CD31+P+HLA-G o HLA-G+CDH5+CD31;
 paso (3) realizar la clasificación de una resuspensión celular incubada en el paso (2) mediante un citómetro de flujo para obtener células trofoblásticas placentarias aisladas y purificadas;

alternativamente, realizar el etiquetado fluorescente y la clasificación celular microfluídica de una resuspensión celular incubada en el paso (2) mediante un chip de clasificación celular microfluídica para obtener células trofoblásticas placentarias aisladas y purificadas.

- 5 Preferiblemente, el chip de clasificación celular microfluídica en el paso (3) tiene una estructura: incluye un sustrato y una placa de cubierta equipada con el mismo; el chip se fabrica mediante la tecnología de moldeo por inyección a partir de material base, que incluye pero no se limita al acrílico.
- 10 Un lado del sustrato está proporcionado de un canal principal, un canal lateral A y un canal lateral B, y los dos canales laterales están cerca de las porciones extremas izquierda y derecha del canal principal, de manera correspondiente.
- 15 Otro lado del sustrato está proporcionado de una entrada C, una entrada S, una salida N y una salida T; todas las dos entradas y las dos salidas penetran en el sustrato para comunicarse con los canales del otro lado; y una posición de la entrada C corresponde a la porción extrema izquierda del canal principal; una posición de la entrada S corresponde a la porción final del canal lateral A; una posición de la salida N corresponde a la porción extrema derecha del canal principal; y una posición de la salida T corresponde a la porción extrema del canal lateral B.
- 20 Un dispositivo de electrodo de desviación está dispuesto además en el canal principal y en un sitio de convergencia de la salida N y la salida T.
- Preferiblemente, el canal principal, el canal lateral A y el canal lateral B tienen una anchura no mayor de 1000 µm y una profundidad no mayor de 500 µm.
- 25 Más preferiblemente, el canal principal, el canal lateral A y el canal lateral B tienen una anchura de 500-1000 µm.
- Más preferiblemente, el canal principal, el canal lateral A y el canal lateral B tienen una anchura de 1000 µm.
- 30 En el chip de clasificación celular microfluídica, la entrada C se usa para alimentar la muestra de células mixtas que se va a clasificar; la entrada S se utiliza para alimentar una solución reguladora; la salida T se utiliza para recolectar células diana y la salida N se utiliza para recolectar células no diana.
- 35 Durante el proceso de clasificación, la muestra mezclada que contiene las células diana fluye hacia el canal principal del chip desde la entrada C, y la solución reguladora fluye hacia el canal lateral desde la entrada S; los dos se mezclan en la intersección de los canales y, a continuación, fluyen continuamente a lo largo de la misma dirección del canal principal. Cuando las células mixtas fluyen a través del dispositivo de electrodos de desviación, el canal por el que están a punto de fluir las celdas se selecciona controlando la encendido/apagado del electrodo; las células diana se clasifican para llegar a la salida T, mientras que las células no diana continúan fluyendo a lo largo del canal principal para llegar a la salida N, completando así la clasificación.
- 40 40 Además, preferiblemente, un anticuerpo primario en el paso (2) se incuba en las siguientes condiciones: reaccionar durante 30 - 90 minutos a 4 °C, preferiblemente, reaccionar durante 60 minutos a 4 °C; y se incuba un segundo complejo de etiquetado fluorescente de anticuerpos en las siguientes condiciones: haciendo reaccionar durante 20 minutos a 2 °C - 8 °C.
- 45 Preferiblemente, el paso (2) incluye específicamente: unir de modo sucesivo y específico el anticuerpo primario y el segundo complejo de etiquetado fluorescente de anticuerpos a un antígeno diana paso a paso mediante incubación, en donde se usa una tecnología de lavado y separación centrífuga para evitar la contaminación cruzada durante el proceso de unión.
- 50 Preferiblemente, el paso (3) incluye específicamente: alimentar la resuspensión celular incubadas en la entrada C del chip de clasificación celular microfluídica, alimentar la solución reguladora en la entrada S, a continuación, colocar el chip de clasificación celular microfluídica en un clasificador de células para realizar el programa de clasificación y recolectar muestras en la salida T al final del programa de clasificación para obtener células trofoblásticas clasificadas.
- 55 Preferiblemente, un sistema de clasificación celular en fase líquida en el paso (3) es el 0,2 % al 0,4 % de Triton-X-100, preferiblemente el 0,3 % de Triton-X-100. Más preferiblemente, se utiliza PBS para la preparación.
- 60 Preferiblemente, las condiciones de clasificación del citómetro de flujo en el paso (3) son las siguientes: la tasa de carga de la muestra se ajusta dentro de 1000 a 2000 eventos/s, y la tasa de recolección es de 5,0.
- 65 Preferiblemente, un sistema óptimo de suspensión celular en el paso (1) es 1xPBS que contiene 0,2 % - 0,4 % de FBS, preferiblemente 1xPBS que contiene 0,3 % de FBS.
- Además, se describen también una aplicación del método en la construcción de productos para la autenticación de la STR humana, la detección de ploidías cromosómicas humanas, las pruebas genéticas de la talasemia, las pruebas genéticas de la epicófisis, la secuenciación del exoma completo, la detección de microdeleción/duplicados de

cromosomas (un método de secuenciación de alto rendimiento) o la detección de variaciones de la estructura cromosómica (un método de chip de alta densidad) sin que se reivindique en las reivindicaciones.

La presente invención tiene los siguientes efectos beneficiosos:

5 En comparación con la amniocentesis convencional y la muestra de vellosidades coriónicas, el método para aislar las células trofoblásticas placentarias basado en la separación por citometría de flujo o la microfluídica proporcionado por la presente invención tiene las ventajas de obtener muestras de forma no invasiva, un tiempo de muestreo más temprano, un bajo riesgo de infección y aborto, y el resultado de la prueba tiene una mayor fiabilidad y un área de cobertura más amplia. Las muestras de ácido nucleico del genoma completo del feto se pueden obtener con este tipo de muestra, lo que hace posible la detección y el análisis de todas las enfermedades genéticas y, básicamente, logra la cobertura de la detección de enfermedades genéticas (ploidía cromosómica, variación de la estructura cromosómica CNV, mitocondrias, microdeleción/duplicación, mutación de un solo gen, detección de características genéticas de SNP/STR y similares).

10 15 El método de la presente invención puede obtener una cantidad considerable de células (miles de células, el estándar de control de calidad mínimo diseñado es mayor que 2000 células positivas) y puede lograr la detección de muestras mediante la técnica de ensayo molecular convencional sin operaciones especiales. Además, el método de la presente invención no tiene requisitos estrictos para los técnicos y el equipo de laboratorio, lo que reduce los umbrales técnicos 20 y los costes de uso y puede realizarse en más instituciones médicas, capaz de popularizarse en un amplio rango.

25 Mientras tanto, el método proporcionado por la presente invención es una solución de análisis de etiquetado múltiple, que puede lograr el etiquetado sincrónico de una mayor pluralidad de antígenos, así como la identificación y clasificación de las señales de fluorescencia características simultáneamente, y la precisión se ha mejorado considerablemente. En comparación con las perlas inmunomagnéticas existentes y otras tecnologías, el método de la presente invención puede tener las ventajas de la cantidad y la calidad de las células. Las células obtenidas no solo son numerosas, sino que también tienen lesiones leves, y las células obtenidas tienen buena calidad, buena especificidad de detección y sensibilidad.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra una estructura de sustrato de un chip de clasificación celular microfluídica; las figuras (a) y (b) representan respectivamente los dos lados del sustrato;

35 la figura 2 muestra una población celular positiva etiquetada por monofluorescencia seleccionada en la clasificación por citometría de flujo;

40 la figura 3 muestra una población celular positiva etiquetada por bifluorescencia seleccionada en la clasificación por citometría de flujo;

45 la figura 4 es un canal 1 etiquetado con FAM; "822-" representa el resto de las muestras después de la clasificación; "822+" representa muestras clasificadas; "822" representa las muestras antes de la clasificación;

50 la figura 5 es un canal 2 etiquetado con HEX;

55 la figura 6 es un canal 3 etiquetado con TAMRA;

60 la figura 7 es un canal 4 etiquetado con ROX;

la figura 8 es un diagrama esquemático que muestra el resultado de una prueba de la Y-STR de la muestra que contiene el cromosoma Y en las células de plasmoditrofoblasto clasificadas;

la figura 9 es un resultado de una prueba de los genes de epicófosis de la muestra clasificada;

la figura 10 es un resultado de una prueba de los genes de talasemia de la muestra clasificada;

la figura 11 muestra un genograma familiar que contiene las mutaciones patogénicas familiares detectadas;

la figura 12 es un diagrama esquemático que muestra cromosomas completos;

la figura 13 es un diagrama esquemático que muestra cromosomas anormales;

la figura 14 es una imagen que muestra células positivas clasificadas mediante el método de la presente invención;

65 la figura 15 es una imagen que muestra la comparación de células positivas y células negativas antes y después de la clasificación utilizando el método de la presente invención;

la figura 16 es una imagen que muestra células positivas clasificadas mediante el método de control de perlas inmunomagnéticas.

5 **Descripción detallada de las realizaciones**

La presente invención se describirá adicionalmente en combinación con las realizaciones detalladas de la descripción, y las realizaciones no se utilizan para limitar la presente invención de ninguna forma. A menos que se especifique lo contrario, el reactivo, el método y el equipo utilizados en la presente invención son reactivos, métodos y equipos convencionales en la técnica.

A menos que se especifique lo contrario, el reactivo y el material utilizados en los ejemplos a continuación están disponibles en el mercado.

15 **Ejemplo 1 - Diseño de un chip de clasificación celular microfluídica**

El diagrama esquemático del chip de clasificación celular microfluídica para aislar las células trofoblásticas de las células exfoliadas del cuello uterino de una mujer embarazada se muestra en la figura 1.

20 La estructura del chip de clasificación celular microfluídica se diseña y describe a continuación: el chip se prepara incluyendo, pero no se limita al acrílico como material base; Se formó la forma de tubo de la figura 1 en un lado del material base mediante la tecnología de moldeo por inyección, con una anchura de tubo no mayor que 1000 µm y una profundidad no mayor que 500 µm, y el otro lado del material base se utiliza para ajustarlo y formar un chip completo.

25 Específicamente, el chip de clasificación celular microfluídica incluye un sustrato y una placa de cubierta equipada con el mismo.

30 Como se muestra en la figura 1, un lado del sustrato está proporcionado de un canal principal, un canal lateral A y un canal lateral B, y los dos canales laterales están, respectivamente, cerca de las porciones extremas izquierda y derecha del canal principal; y todos los canales tienen una anchura de 1000 µm.

35 El otro lado del sustrato está proporcionado con una entrada C (una entrada de líquido para muestras celulares), una entrada S (una entrada de líquido para la solución reguladora), una salida N (un orificio de almacenamiento de líquido para células no diana) y una salida T (un orificio de almacenamiento de líquido para células diana); todas las dos entradas y las dos salidas penetran en el sustrato para comunicarse con los canales; y una posición de la entrada C corresponde a la porción extrema izquierda del canal principal; una posición de la entrada S corresponde a la porción final del canal lateral A; una posición de la salida N corresponde a la porción extrema derecha del canal principal; y una posición de la salida T corresponde a la porción extrema del canal lateral B.

40 La entrada C se utiliza para alimentar las muestras de células mixtas que se van a clasificar; la entrada S se utiliza para alimentar la solución reguladora; la salida T se utiliza para recolectar las células diana y la salida N se utiliza para recolectar las células no diana.

45 Además, el canal principal está proporcionado además de un dispositivo de electrodo de desviación para la clasificación celular; el dispositivo de electrodo de desviación está ubicado específicamente en la intersección de la salida N y la salida T; el encendido/apagado del electrodo puede controlarse según la presencia de una señal de celda de flujo. Las células cargadas negativamente se someten a una desviación en el campo electromagnético formado por los electrodos para fluir hacia una tubería designada que conduce a la salida N o la salida T.

50 Durante el proceso de clasificación, la muestra mezclada que contiene las células diana fluye hacia el canal principal del chip desde la entrada C, y la solución reguladora fluye hacia el canal lateral desde la entrada S; los dos se mezclan en la intersección de los canales y, a continuación, fluyen continuamente a lo largo de la misma dirección del canal principal. Cuando las células mixtas fluyen a través del dispositivo de electrodos de desviación, el canal por el que están a punto de fluir las celdas se selecciona controlando la encendido/apagado del electrodo; las células diana se clasifican para llegar a la salida T, mientras que las células no diana continúan llegando a la salida N junto con el canal principal, completando así la clasificación.

55 Al final de la clasificación, el chip se desecha inmediatamente y es necesario cambiar un chip nuevo antes de cada clasificación para garantizar un entorno de clasificación limpio, controlable y libre de contaminación cruzada.

60 Ejemplo 2 - Aislamiento de células trofoblásticas a partir de células exfoliadas del cuello uterino de una mujer embarazada basándose en el chip de clasificación celular microfluídica

I. Un método para aislar células trofoblásticas incluye los siguientes pasos:

paso 1, se preparó una suspensión celular de muestra a partir de una solución que contenía células exfoliadas del cuello uterino; el método específico incluía lo siguiente, como se muestra en el paso (1) - paso (5);

5 paso 2, se añadió un anticuerpo específico a la suspensión celular de la muestra para la incubación; y el método específico incluía lo siguiente, como se muestra en el paso (6) - paso (14);

10 paso 3, se realizaron etiquetado fluorescente y clasificación celular microfluídica en una resuspensión celular incubada en el paso 2 mediante el chip de clasificación celular microfluídica del ejemplo 1; el método específico incluía lo siguiente, como se muestra en el paso (15) - paso (18).

10 Las combinaciones de anticuerpos específicos se muestran en la tabla 1:

Tabla 1: Combinaciones de antígenos y anticuerpos expresados en las células trofoblásticas

15	Combinaciones de anticuerpos	HLA-G+CK7, HLA-G+CK18, HLA-G+β-HCG, CD31+HPL, MMP9+CD31, HLA-G+HPL, HLA-G+MMP9, HLA-G+CD31, HLA-G+P, CD31+P, HLA-G+CDH5, CD31+CDH5, CD31+CK7+HLA-G, HLA-G+CK18+CD31, HLA-G+β-HCG+CD31, CD31+HPL+HLA-G, MMP9+CD31+HLA-G, CD31+P+HLA-G, HLA-G+CDH5+CD31	
20	La información de los antígenos correspondientes se muestra a continuación:		
25	Antígenos específicos en la superficie de las células trofoblásticas	Receptores correspondientes	Anticuerpos monoclonales disponibles
30	HLA-G (antígeno G leucocitario humano)	LIR1/ILT2, LIR2/ILT4, P49/KIR2DL4, BY55	4H84 (BD Biosciences)
35	β-hCG (gonadotropina coriónica humana)	Receptor de LH/HCG	5H4-E2 (Thermo Scientific)
40	Citoqueratina 7 (CK-7)		OV-TL 12/30 (DAKO), anticuerpo monoclonal de ratón anticitoqueratina 7 (CK-7) humano
45	Citoqueratina 18 (CK-18)		Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CK18 humano (ab181597) (Abcam company)
50	Metaloproteinasa de matriz 9 (MMP9)	Colágenos, gelatinas y fibras elásticas de tipo IV, V, VII y X	4H3 (R&D Systems)
55	VE-Cadherina (CDH5)		2158 (tecnología de señalización celular)
60	Precursor de la molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias PECAM1 (CD31)		89C2 (tecnología de señalización celular)
65	Lactógeno placentario humano (HPL)	Receptor de prolactina	
	Progesterona (P)	Receptor de progesterona (PGR)	

II. Específicamente, el método de clasificación de las células trofoblásticas incluye los siguientes pasos de:

50 paso (1), se mezcló una solución de conservación de células (que contiene las células exfoliadas del cuello uterino) en un mezclador oscilante de modo uniforme durante 5 minutos;

55 paso (2), la solución de conservación se transfirió a un tubo de centrífuga de 15 ml y se añadieron 3 ml de 1×PBS a la botella de la solución de conservación, y se mezcló de modo uniforme por oscilación, a continuación, la solución se transfirió al mismo tubo de centrífuga de 15 ml;

paso (3), la solución se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm y se desechó el sobrenadante;

60 paso (4), se añadió 1 ml de 1 x PBST y se mezcló bien y se transfirió a un tubo EP de 1,5 ml, se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm y se desechó el sobrenadante;

paso (5), el paso (4) se repitió dos veces para preparar una suspensión celular;

65 paso (6), se añadió 200 ml de 0,3 % de Triton X-100 y se mezcló bien, a continuación, se permeabilizó a temperatura ambiente durante 20 min;

paso (7), el paso (4) se repitió tres veces;

5 paso (8), adición de un anticuerpo primario: 200 µl de anticuerpo monoclonal de ratón anti-CK7 humano, anticuerpo monoclonal de ratón anti-CK18 humano, anticuerpo monoclonal de ratón anti-β-HCG humano, anticuerpo monoclonal de ratón anti-MMP9 humano, anticuerpo monoclonal de ratón anti-CDH5 humano, anticuerpo monoclonal de ratón anti-P humano, anticuerpo monoclonal de ratón anti-hPL humano, anticuerpo monoclonal de conejo anti-HLA-G humano, y anticuerpo monoclonal de conejo anti-CD31 humano (Abcam company) que se diluyeron en proporciones se añadieron, respectivamente, y se mezclaron bien, incubando durante 60 minutos a 4 °C;

10 paso (9), el paso (4) se repitió tres veces;

15 paso (10), adición de un complejo secundario de etiquetado fluorescente con anticuerpos: 200 µl de anticuerpos de cabra anti-conejo y antirratón, que se diluyeron en proporciones se mezclaron bien, y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C;

15 paso (11), el paso (4) se repitió tres veces y se utilizaron 200 µl de regulador (DPBS + 0,1 % de BSA+2 mM de EDTA) para la resuspensión;

20 paso (12), la reacción se realizó durante 20 minutos a 2 °C - 8 °C;

20 paso (13), se añadió 1 ml de 1 x PBST y se mezcló bien y se transfirió a un tubo EP de 1,5 ml, se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm y se desechó el sobrenadante;

25 paso (14), el paso (13) se repitió de dos a tres veces, y se añadió 200 µl 1×PBST para resuspender y obtener una resuspensión celular;

30 paso (15), la resuspensión celular obtenida se alimentó en la entrada C del chip de clasificación celular microfluídica en el ejemplo 1, y se alimentó 1×PBST en la entrada S;

30 paso (16), el chip de clasificación celular microfluídica se colocó y se fijó en una mesa de objetivos de un clasificador celular, y el clasificador celular se encendió para configurar el programa designado para el funcionamiento;

35 paso (17), al final del programa, se recolectaron muestras en la salida T para obtener las células trofoblásticas clasificadas;

35 paso (18), se recolectan muestras en la salida N para obtener las células restantes obtenidas después de extraer las células trofoblásticas de las células exfoliadas del cuello uterino.

Ejemplo 3 - Método para aislar células trofoblásticas de células exfoliadas del cuello uterino de una mujer embarazada basándose en un citómetro de flujo

40 Un método para clasificar las células trofoblásticas incluye los siguientes pasos:

45 paso 1, se preparó una suspensión celular de muestra a partir de una solución que contenía células exfoliadas del cuello uterino; y el método específico era el mismo que los del paso (1) - paso (5) del ejemplo 2;

45 paso 2, se añadió un anticuerpo específico a la suspensión celular de la muestra para la incubación; y el método específico era el mismo que los del paso (6) - paso (14) del ejemplo 2; las combinaciones de los anticuerpos específicos son las mismas que las de la tabla 1 anterior;

50 paso 3, una resuspensión celular incubada en el paso 2 se sometió a etiquetado fluorescente y clasificación mediante un citómetro de flujo (BD FACSAria tipo II, EE. UU.), incluyendo las siguientes pasos:

55 paso 1), el citómetro de flujo se encendió para la operación de inicio diaria según las instrucciones;

55 paso 2), el instrumento se sometió a un ajuste del flujo de líquido de tal modo que la posición del punto de interrupción del flujo de líquido se ubicó en la parte media superior de la ventana;

60 paso 3), se ajustó la trayectoria del líquido de clasificación para confirmar el retraso de las gotas de líquido, y se ajustó la tasa de carga de la muestra en 1000-2000 eventos/s;

60 paso 4), se eligieron tubos de flujo de 5 ml como dispositivos de recolección; el número de células clasificadas fue de 3000, y se dejó la dirección, y se añadió la población de células a clasificar, y se sometió a un sistema de cierre sucesivamente, y a continuación se cargaron los tubos colectores;

65 paso 5), la suspensión celular incubada se puso en un almacén de muestras, se estableció una tasa de recolección de 5,0 y se realizó la carga de la muestra;

5 paso 6), la tensión se ajustó dentro del alcance de 300 a 500 V de tal modo que la compensación entre los tintes fluorescentes se mantuviera lo más pequeña posible; la posición de la puerta se ajustó de tal modo que las células positivas se ubicaran en el centro y se recogieran las células dentro de la puerta; y las células del tubo colector eran, a saber, las células diana seleccionadas.

10 La población de células diana se obtuvo según las combinaciones de etiquetado dadas, como se muestra en las figuras 2-3. La figura 2 muestra un resultado de clasificación del etiquetado por monofluorescencia, y la figura 3 muestra un resultado de clasificación del etiquetado por bifluorescencia.

15 Ejemplo 4 - Caso de aplicación del método - autenticación de la STR humana

20 1. Las células trofoblásticas se clasificaron y aislaron de una muestra (células exfoliadas del cuello uterino) según el método del Ejemplo 2 anterior.

25 2. Las células trofoblásticas aisladas y las células exfoliadas del cuello uterino de una mujer embarazada se sometieron a extracción de ADN:

30 1) las células trofoblásticas clasificadas (las células trofoblásticas obtenidas en el paso (17) del método de clasificación celular en el ejemplo 2) y las células obtenidas en el paso (18) del método de clasificación celular en el ejemplo 2 (las células restantes obtenidas después de eliminar las células trofoblásticas de las células exfoliadas del cuello uterino) se centrifugaron respectivamente durante 3 minutos a 12.000 rpm;

35 2) se desecharon el sobrenadante, y se añadió 200 µl de solución P para resuspender los precipitados;

40 3) se añadieron 20 µl de proteasa K y 200 µl de solución L y se mezclaron bien;

45 4) la solución mixta se trató en un baño caliente a 56 °C durante 20 minutos y se volcó y se mezcló bien;

50 5) se añadió 200 µl de alcohol etílico absoluto y se mezcló bien, y a continuación, la solución mezclada se transfirió a una columna de adsorción y se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto, a continuación, se desecharon la solución residual en el tubo colector;

55 6) se añadió 500 µl de W1 y se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto, a continuación, se desecharon la solución residual en el tubo colector;

60 7) se añadió 500 µl de W2 y se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto, a continuación, se desecharon la solución residual en el tubo colector;

65 8) se añadió 500 µl de W2 y se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 minuto, a continuación, se desecharon la solución residual en el tubo colector;

70 9) el tubo en blanco se centrifugó a 12.000 rpm durante 3 minutos, a continuación se desecharon el tubo colector;

75 10) la columna de adsorción se colocó en un nuevo tubo de centrífuga de 1,5 ml, se destapó y se dejó reposar durante 2 minutos, a continuación, se añadieron 50 µl de TE y se centrifugó a 12.000 rpm durante 2 minutos después de reposar durante 5 minutos, y la columna de adsorción se desecharon;

80 11) se determinaron la concentración y pureza del ADN extraído.

85 3. Las células trofoblásticas aisladas y las células exfoliadas del cuello uterino de una mujer embarazada se sometieron a extracción de ADN y, a continuación, se sometieron a amplificación por PCR con el kit de autenticación de STR humana Microread D-21; los productos de la PCR se sometieron a electroforesis capilar con un secuenciador 3500xL y el instrumento se sometió a una calibración fluorescente con el estándar G5-Matrix, y se compilaron los archivos de paneles y contenedores correspondientes, y se utilizó el software GeneMapper ID versión 3.0 para el análisis de los resultados.

90 4. Detección de STR

95 1) La amplificación por PCR y el sistema de amplificación se muestran en la tabla 2:

Tabla 2: Sistema de amplificación por PCR

	Reactivos	Volumen (μ l)
5	2,5 × regulador D	10
	5 × mezcla de cebador	5
	Mezcla I de polimerasa	0,55
10	ADN	1
	H ₂ O	Hasta 25

Procedimiento de reacción de PCR: La reacción de PCR se realizó durante 10 minutos a 50 °C y durante 4 minutos a 96 °C (5 segundos a 94 °C y 1 minuto + 10 segundos a 60 °C) x 27 ciclos, durante 30 minutos a 60 °C y se conservó a 15 °C.

15 2) Resultado de la prueba de STR

Se mezclaron bien 8,7 μ l de Hidi y 0,3 μ l de referencia interna según las instrucciones y se añadieron 1 ml de producto amplificado. A continuación, el producto de PCR tratado se sometió a electroforesis capilar con un secuenciador 3500XL y el instrumento se sometió a una calibración fluorescente con el estándar G5-Matrix, y se compilaron los archivos de paneles y bin correspondientes, y se utilizó el software GeneMapper ID versión 3.0 para el análisis de los resultados. Los resultados se muestran en las figuras 4-7. Los resultados muestran que, además del ADN de la mujer embarazada, había exactamente otra información de ADN individual, y la información del ADN tiene una fuerte relación genética con la mujer embarazada.

25 3) Detección de Y-STR

La muestra del cromosoma Y detectada en la STR se sometió a la detección del Y-STR con un kit Microread 40Y. Los resultados se muestran en la figura 8, y los resultados muestran que existe ADN masculino en la muestra.

30 Ejemplo 5 - Caso de aplicación del método - detección de genes susceptibles a la epicófosis

Células exfoliadas del cuello uterino de una mujer embarazada (fuente de muestra: Guangzhou Hybrizio Medical Laboratory) se sometieron a pruebas genéticas susceptibles a la epicófosis con un kit comercial (un kit de genes susceptibles a la epicófosis (PCR+hibridación de flujo continuo), Chaozhou Hybrizio Biochemistry Co., Ltd., núm. de certificado de registro de dispositivo médico de la República Popular China: 20153401698) según el método del ejemplo 2; específicamente, se sometieron a pruebas 9 sitios de mutación (mtDNA1494, mtDNA1555, SLC26A4-IVS7(-2), SLC26A4-2168, GJB2-35, GJB2-176, GJB2-235, GJB2-299 y GJB3-538) de los genes relacionados con la epicófosis (GJB2, GJB3, SLC26A4 y mtDNA).

40 Se utilizó el método de extracción de ADN de las células exfoliadas del cuello uterino de una mujer embarazada en el ejemplo 4 y, a continuación, un kit comercial (kit de genes susceptibles a la epicófosis (PCR+hibridación de flujo continuo), Chaozhou Hybrizio Biochemistry Co., Ltd., núm. de certificado de registro para dispositivo médico de la República Popular China: 20153401698) se utilizó para las pruebas posteriores. Las operaciones específicas se muestran específicamente en las instrucciones. Los datos sin procesar se muestran en la figura 9; y el análisis de resultados se muestran en la tabla 3.

45 Tabla 3 - Análisis de los resultados de la epicófosis

50	Homocigosidad 155M	Homocigosidad 176M	Homocigosidad 235 M
	Homocigosidad de 299 M	Homocigosidad de 1494 M	Homocigosidad de 1555 M
	Homocigosidad de 7445 M	Homocigosidad de 538 M	Homocigosidad 2168 M
55	Homocigosidad IVS-M	Homocigosidad de 1229 M	Muestra normal
	Control en blanco	Control en blanco	Control en blanco

Los resultados indican que los resultados de las pruebas son consistentes con los resultados de las pruebas clínicas.

60 Ejemplo 6 - Caso de aplicación del método - detección de genes relacionados con la talasemia

65 Las células exfoliadas del cuello uterino de una mujer embarazada (fuente de la muestra: las muestras restantes de ácido nucleico del espécimen humanizado detectadas por Hybrizio Medical Laboratory) se sometieron a pruebas genéticas susceptibles a la epicófosis con un kit comercial (kit de genes de alfa y beta talasemia (método de hibridación de membranas PCR+), Chaozhou Hybrizio Biochemistry Co., Ltd., núm. de certificado por la SFDA: 3400399, 2012) según el método del ejemplo 2; específicamente, 3 tipos comunes de delección de alfa talasemia (–SEA, – $\alpha^{3,7}$, – $\alpha^{4,2}$), 2

tipos de mutantes de alfa talasemia (CS y QS) y 11 tipos de mutantes de beta talasemia (CD14-15, CD17, CD27-28, CD41-42, CD43, CD71-72, -28, -29, IVS-I-1, IVS-II-654 y β EN) se sometieron a pruebas.

Se utilizó el método de extracción de ADN de las células exfoliadas del cuello uterino de una mujer embarazada en el ejemplo 4, y a continuación, un kit comercial (kit de genes de alfa y beta talasemia (método de hibridación de membrana PCR+), Chaozhou Hybrivio Biochemistry Co., Ltd., núm. de certificado por la SFDA: 3400399, 2012) se utilizó para las pruebas posteriores. Las operaciones específicas se muestran específicamente en las instrucciones. Los datos sin procesar se muestran en la figura 10; y el análisis de los resultados se muestra en la tabla 4.

10 Tabla 4 - Análisis de los resultados de la talasemia

Deleción del sudeste asiático (--SEA--SEA)	Deleción izquierda (- α 4,2/aa)	Heterocigoto de mutación QS
Deleción izquierda (- α 4,2/aa)	Heterocigoto 41-42 M	Heterocigoto 17M
Muestra normal	Muestra normal	Deleción derecha (- α 3,7/- α 3,7)
Deleción derecha (- α 3,7/- α 3,7)	Muestra normal	Deleción izquierda (- α 4,2/aa)
Muestra normal	Muestra normal	Heterocigoto 654 M

20 Los resultados indican que los resultados de las pruebas son consistentes con los resultados de las pruebas clínicas.

Ejemplo 7 - Caso de aplicación del método - secuenciación del exoma completo

25 1. La muestra de células exfoliadas del cuello uterino y la muestra de líquido amniótico de una mujer embarazada se obtuvieron en una familia con epicófosis conocida (padre, madre (embarazo de 16 semanas), hijo mayor (hijo sordo) e hijo menor (hijo sordo)) según el método del ejemplo 2. La mujer embarazada y otros miembros de la familia se sometieron a la extracción de muestras de sangre completa y a la extracción de ADN (después de clasificar las células exfoliadas del cuello uterino de la mujer embarazada, la muestra se obtuvo mediante el método de extracción del ejemplo 4; el líquido amniótico y las muestras de sangre completa se extrajeron mediante un kit de extracción de ADN del genoma de sangre humana completa (Hybrivio, China) (fuente de la muestra: una muestra humanizada detectada por Hybrivio Medical Laboratory)); y el ADN del genoma humano obtenido se sometió a secuenciación del exoma completo (WES, por sus siglas en inglés) con un kit de exoma completo (iGenetech Biotechnology (Beijing) Co., Ltd., núm. de Art.: T086V4);

35 2. El ADN del genoma se procesó en fragmentos de 300 pb con una transposasa Tn5 para construir una genoteca de ADN; se añadieron los adaptadores P5, P7, índice1, 2 en ambos terminales; se eligió una longitud adecuada de los fragmentos de ADN, se amplificó y se purificó, a continuación, se hibridó con la genoteca de sondas de exones con biotina; se utilizó una fuerte fuerza de unión de la biotina a la estreptavidina para unir las perlas magnéticas portadoras de estreptavidina con la sonda que se había unido a la genoteca diana; las perlas magnéticas se adsorberon y el sobrenadante se retiró, y el ADN de las perlas magnéticas se eluyó, y la genoteca se sometió a amplificación por PCR, y a evaluación de la calidad; y se realizó la secuenciación en una máquina.

40 2. El resultado de la secuenciación del exoma completo

45 La secuenciación completa del exoma se realizó con una tecnología de secuenciación de alto rendimiento y el sitio patógeno detectado o sospechoso se verificó con la secuenciación de Sanger. La muestra de prueba fue una muestra de líquido amniótico (embarazo de 16 semanas); dos hermanos eran sordos y los padres eran normales. En la muestra se detectaron la mutación heterocigótica del gen CDH23 c.8363T>C (p.Leu2788PRO) y la mutación heterocigótica del gen GJB2 c. 109G>A (p.VAL27ILE). El genograma familiar se muestra en la figura 11.

50 Los resultados indican que la mutación patógena se detectó efectivamente en la muestra de células exfoliadas clasificadas, lo que es completamente consistente con la muestra de líquido amniótico. La patogénesis y las situaciones portadoras de mutaciones patógenas se pueden encontrar a partir de los resultados de las pruebas.

55 Ejemplo 8 - Caso de aplicación del método - detección de la variación del número de copias (CNV) del ADN en todo el genoma

60 1. La variación del número de copias del ADN en todo el genoma se detectó con un chip cromosómico CytoOneArray y un kit de soporte de Phalanx Biotech según la teoría (aCGH) de la hibridación genómica comparativa:

65 las células trofoblásticas clasificadas mediante el método del ejemplo 2 se extrajeron mediante el método de extracción de ADN de las células exfoliadas del cuello uterino de la mujer embarazada en el ejemplo 4; el ADN del genoma humano obtenido se sometió a fragmentación, pretratamiento de amplificación, amplificación y purificación del producto de PCR, a continuación, se marcó con dos tintes fluorescentes diferentes (la muestra normal se marcó con Cy3, que se muestra en verde, y la muestra del paciente se marcó con Cy5, que se muestra en rojo);

el producto fluorescente se vertió en el chip después de ser purificado, y el chip se lavó y escaneó para obtener resultados.

2. Resultados de las pruebas de la variación del número de copias (CNV) del ADN en todo el genoma

5 El diagrama esquemático de los cromosomas completos se muestra en la figura 12 y el diagrama esquemático de los cromosomas anormales se muestra en la figura 13. En la figura 13, el eje horizontal representa el diagrama esquemático de una zona cromosómica, y el eje longitudinal muestra una relación de señal de la muestra con respecto a la muestra estándar (representada por una relación log2). Cuando el cromosoma CNV tiene una diferencia significativa, se representa con diferentes colores. La región (ganancia) donde se amplifica el cromosoma se representa en azul y la región (pérdida) donde se elimina el cromosoma se representa en rojo. La longitud y el valor de la línea negra representan respectivamente el tamaño medio y la señal de cada segmento.

10 Se detecta una anomalía en la muestra, a saber, la delección 22q11,21; las posiciones iniciales [UCSC hg19] del fragmento anormal son arr22q11,21 (19006943_21461068)x1 con un tamaño de 2,454 Mb. El área de enfermedad relacionada es patogénica (patogenicidad, clasificación ACMG); y tal fragmento anormal cubre 106 genes ISCA, tales como TBX1, CRKL, GP1BB, SLC25A1, DGCR10, TSSK1A, GSC2 y CLTCL1. La anomalía regional se ubica en la región recurrente del 22q11,2 (DGS/VCFS) (incluye TBX1). La delección de la región proximal (A-D) 22q11,2 se refiere al síndrome de DiGeorge / velocardiofacial (DGS/VCFS), que generalmente se caracteriza clínicamente por 15 cardiopatías congénitas, anomalías cardíacas, rasgos faciales característicos, DD/ID, trastornos del comportamiento, inmunodeficiencia e hipocalcemia (PMID 25217958). La anomalía regional se ubica en la región recurrente del 22q11,2 (central, B/C-D) (incluye CRKL). Los fenotipos clínicos posiblemente causados por la delección de la región incluyen: 20 rasgos faciales deformados, restricción del crecimiento/baja estatura, anormalidad/ataque del sistema nervioso central, retraso del desarrollo, disgranía, anomalías esqueléticas, defectos cardiovasculares, anomalías del sistema urogenital, inmunodeficiencia/infección repetida (PMID 25123976).

25 Los resultados indican que la muestra celular clasificada puede someterse efectivamente a la detección de variaciones en la estructura cromosómica y pueden detectarse las mutaciones correspondientes.

30 Ejemplo 9 - Comparación entre el método para aislar células trofoblásticas de células exfoliadas del cuello uterino de una mujer embarazada basándose en el chip de clasificación celular microfluídica y el método de perlas inmunomagnéticas

(I) Muestra experimental:

35 Dos soluciones que contienen células exfoliadas del cuello uterino de una muestra humanizada detectada por el Hybrizio Medical Laboratory.

(II) La clasificación de las perlas inmunomagnéticas sirvió como experimento de control para comparar las diferencias de los efectos de los dos métodos.

40 El método de la presente invención fue el mismo que el del ejemplo 2.

El proceso para clasificar las células trofoblásticas mediante las perlas inmunomagnéticas incluye los siguientes pasos:

45 paso (1) la muestra de la célula exfoliada del cuello uterino recolectada de la mujer embarazada se mezcló bien mediante oscilación durante 5 minutos;

50 paso (2) la solución de conservación se transfirió a un tubo de centrífuga de 15 ml, y se añadió 3 ml de solución de separación de células a la botella de la solución de conservación, y se mezcló de modo uniforme por oscilación, a continuación, la solución restante se transfirió al mismo tubo de centrífuga de 15 ml;

paso (3) la solución se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm y se desechó el sobrenadante;

55 paso (4) se añadió 1 ml 1 x PBST y se mezcló bien y se transfirió a un tubo EP de 1,5 ml, se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm y se desechó el sobrenadante;

paso (5) el paso (4) se repitió dos veces;

60 paso (6) se añadió 200 µl de 0,5 % de Triton X-100 y se mezcló bien, a continuación, se permeabilizaron a temperatura ambiente durante 20 minutos;

paso (7) el paso (4) se repitió tres veces;

65 paso (8) se añadió 200 µl de anticuerpo primario y se mezcló bien, incubando durante la noche a 4 °C;

paso (9) el paso (4) se repitió tres veces;

paso (10) se añadió 200 µl de anticuerpo secundario y se mezcló bien para la reacción durante 1 hora a 37 °C;
5 paso (11) el paso (4) se repitió tres veces, y se utilizó 200 µl de regulador (DPBS+0,1 % de BSA+2 mM de EDTA) para la resuspensión;
10 paso (12) se mezclaron completamente 25 µl de perlas con 50 µl de regulador bien, y 600 g se centrifugaron durante 10 minutos, y el sobrenadante se desechó, y la solución restante se resuspendió con 25 µl de regulador y, a continuación, se añadió a la solución mixta en el paso (11);
10 la reacción del paso (13) se realizó durante 20 min a 2 °C-8 °C;
15 paso (14) se añadió 1 ml de regulador y se mezcló bien, dejándolo reposar sobre un marco magnético durante 2 minutos, a continuación, se desechó el sobrenadante (se conservó 200 µl para comparación);
15 paso (15) el paso (14) se repitió de dos a tres veces;
20 paso (16) se añadió 200 µl de regulador precalentado a 37 °C para resuspender, y se añadió 4 µl de regulador de liberación y se mezcló bien;
20 paso (17) 15 minutos después a temperatura ambiente, la solución se pipeteó de 5-10 veces con una pipeta de carga de muestras, se dejó reposar sobre el marco magnético durante 2 minutos y se recogió el sobrenadante;
25 paso (18) se añadió 200 µl de regulador y se pipeteó de 5-10 veces, dejándolo reposar sobre el marco magnético durante 2 minutos, después se recogió el sobrenadante;
25 paso (19) el paso (18) se repitió tres veces para obtener finalmente las células trofoblásticas.

(III) Resultado

30 Las células positivas clasificadas se sometieron a una sesión fotográfica con un microscopio de fluorescencia SUNNY RX50, como se muestra en las figuras 14-16. La figura 14 es una imagen que muestra células positivas clasificadas mediante el método de la presente invención; la figura 15 es una imagen que muestra la comparación de células positivas y células negativas antes y después de ser clasificadas mediante el método de la presente invención; la figura 16 es una imagen que muestra células positivas clasificadas por las perlas inmunomagnéticas. De la comparación se observa obviamente que hay una diferencia obvia en el orden de las magnitudes de la población celular después de clasificarla mediante los dos métodos; el método de la presente invención es significativamente superior a las perlas inmunomagnéticas. Las estadísticas muestran que el número de células positivas clasificadas mediante el método de la presente invención puede ser de hasta aproximadamente 3000 a 13.000.

40 Los ejemplos descritos anteriormente son simplemente varias realizaciones de la presente invención, y se describen más específicamente, pero no pueden interpretarse como limitativos del alcance de la patente

45 Por lo tanto, el alcance de protección de la presente invención debería estar sujeto a las reivindicaciones adjuntas.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar células trofoblásticas, **caracterizado por que**, el método comprende los siguientes pasos:

paso (1) preparar una muestra de suspensión celular a partir de una solución que contiene células exfoliadas del cuello uterino, en donde las células se suspenden en 1x PBS que contiene 0,2 %-0,4 % de FBS

paso (2) añadir un anticuerpo específico a la suspensión celular de la muestra para la incubación; se incuba un anticuerpo primario en las siguientes condiciones: hacer reaccionar durante 30-90 minutos a 4 °C; y se incuba un segundo complejo de etiquetado fluorescente de anticuerpos en las siguientes condiciones: hacer reaccionar durante 20 minutos a 2 °C - 8 °C;

en donde el anticuerpo específico es una combinación de anticuerpos que reconoce específicamente un antígeno específico expresado en la superficie de o en el interior de las células trofoblásticas correspondientes, es decir, una combinación de anticuerpos específica es HLA-G+CK7, HLA-G+CK18, HLA-G+β-HCG, CD31+HPL, MMP9+CD31, HLA-G+HPL, HLA-G+MMP9, HLA-G+CD31, HLA-G+P, CD31+P, HLA-G+CDH5, CD31+CDH5, CD31+CK7+HLA-G, HLA-G+CK18+CD31, HLA-G+β-HCG+CD31, CD31+HPL+HLA-G, MMP9+CD31+HLA-G, CD31+P+HLA-G o HLA-G+CDH5+CD31; y

paso (3) realizar el etiquetado fluorescente y la clasificación celular microfluídica de una resuspensión celular incubada en el paso (2) mediante un chip de clasificación celular microfluídica para obtener células trofoblásticas placentarias aisladas y purificadas;

en donde un sistema de clasificación celular en fase líquida es 0,2 % - 0,4 % de Triton-X-100; el chip de clasificación celular microfluídica comprende un sustrato y una placa de cubierta equipada con el mismo;

en donde un lado del sustrato está provisto de un canal principal, un canal lateral A y un canal lateral B, y los dos canales laterales están respectivamente cerca de las porciones extremas izquierda y derecha del canal principal;

y en donde el otro lado del sustrato está provisto de una entrada C, una entrada S, una salida N y una salida T; todas las dos entradas y las dos salidas penetran en el sustrato para comunicarse con los canales del otro lado; y una posición de la entrada C corresponde a la porción extrema izquierda del canal principal; una posición de la entrada S corresponde a la porción extrema del canal lateral A; una posición de la salida N corresponde a la porción extrema derecha del canal principal; y una

posición de la salida T corresponde a la porción extrema del canal lateral B; y un dispositivo de electrodo de desviación está dispuesto además en el canal principal y en un sitio de convergencia de la salida N y la salida T; y cada uno del canal principal, el canal lateral A y el canal lateral B tiene una anchura no mayor que 1000 μm y una profundidad no mayor que 500 μm .

40 2. El método según la reivindicación 1, en donde el paso (2) comprende específicamente:

unir de modo sucesivo y específico el anticuerpo primario y el segundo complejo de etiquetado fluorescente de anticuerpos a un antígeno diana paso a paso mediante incubación, en donde se utiliza una tecnología de lavado y separación centrífuga para evitar la contaminación cruzada durante el proceso de unión.

3. El método según la reivindicación 1, en donde el paso (3) comprende específicamente: introducir la resuspensión de células incubadas en la entrada C del chip de clasificación celular microfluídica, introducir una solución reguladora en la entrada S, a continuación colocar el chip de clasificación celular microfluídica en un clasificador de células para realizar el programa de clasificación y recolectar muestras en la salida T al final del programa de clasificación para obtener células trofoblásticas clasificadas.

55

60

65

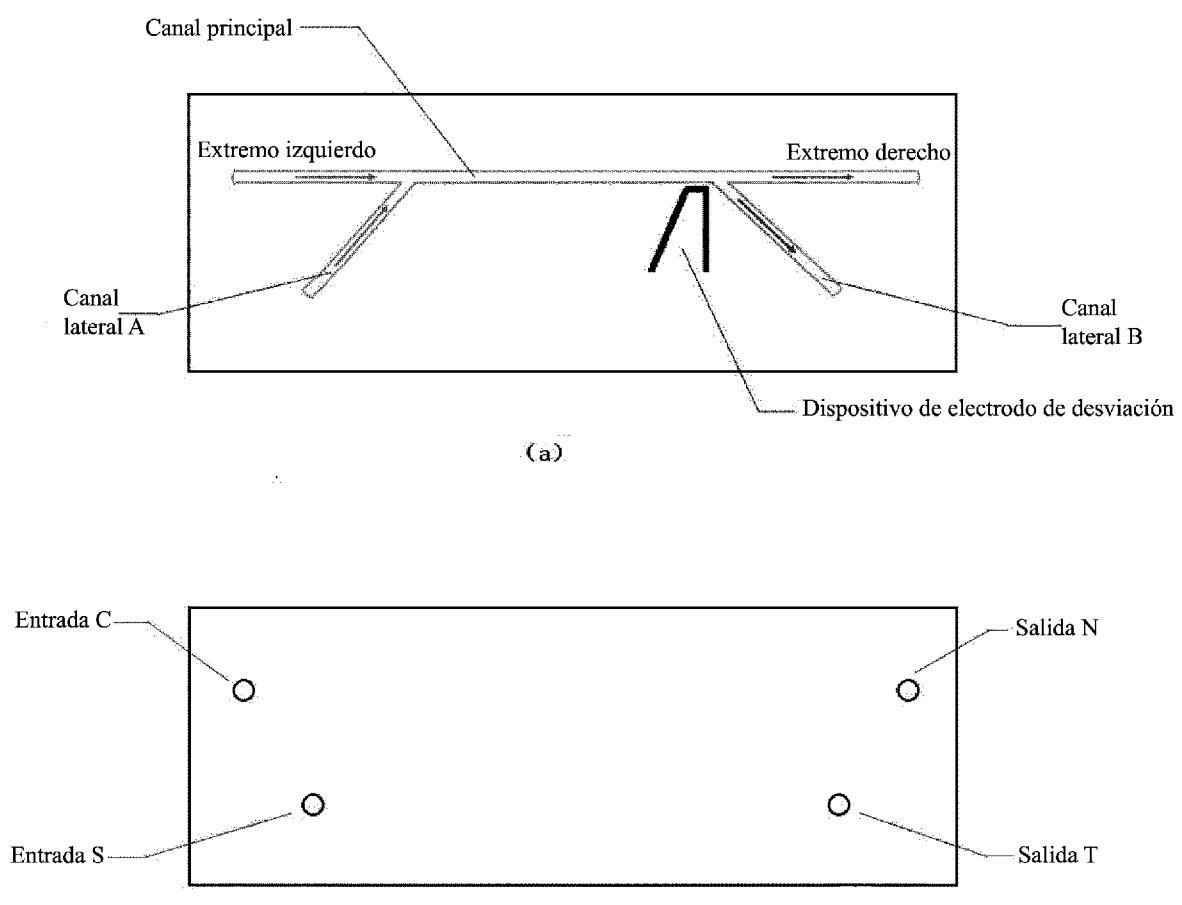


Figura 1

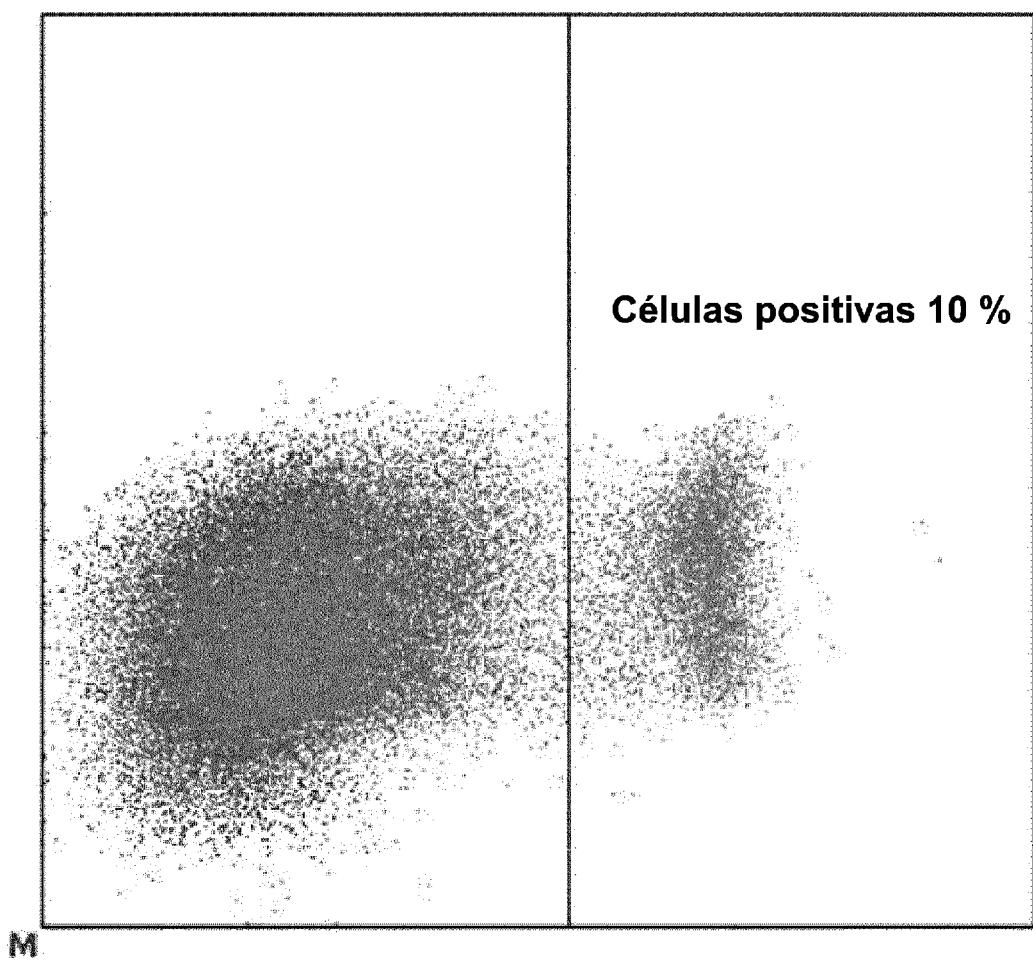


Figura 2

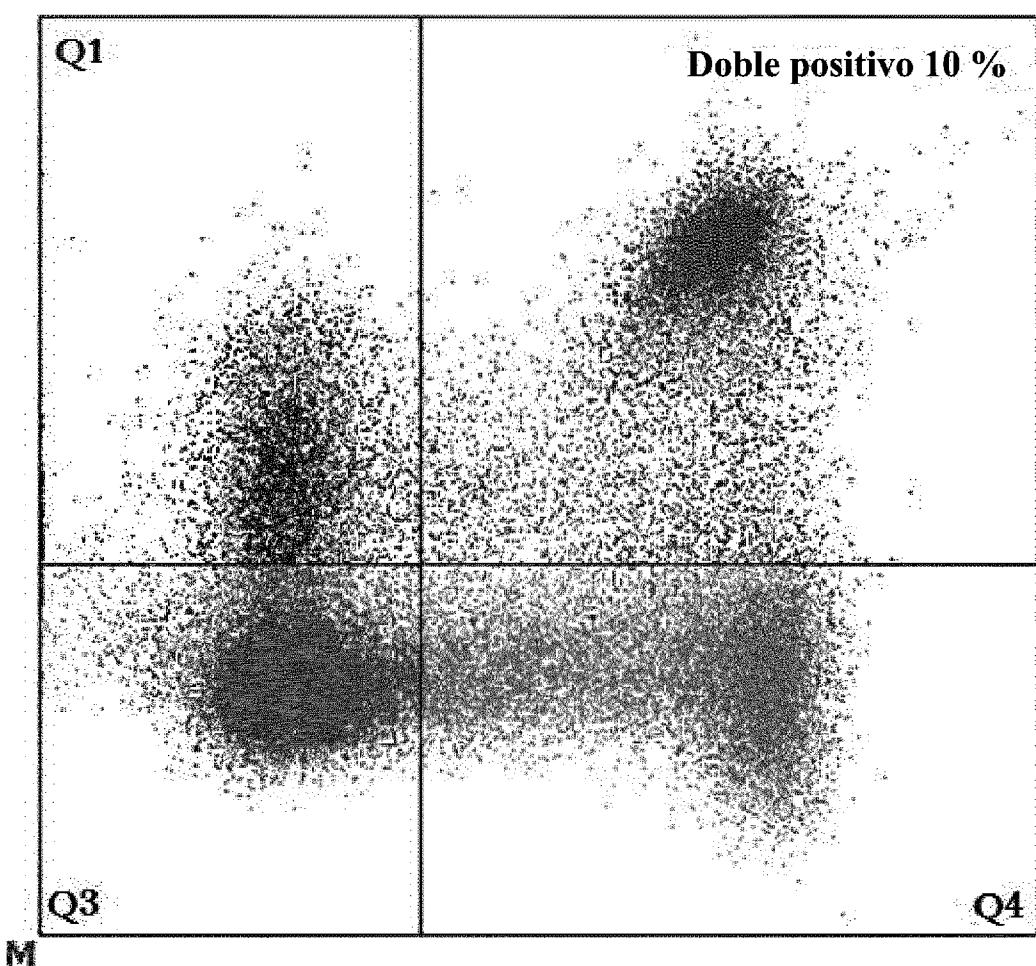


Figura 3

ES 3 007 607 T3

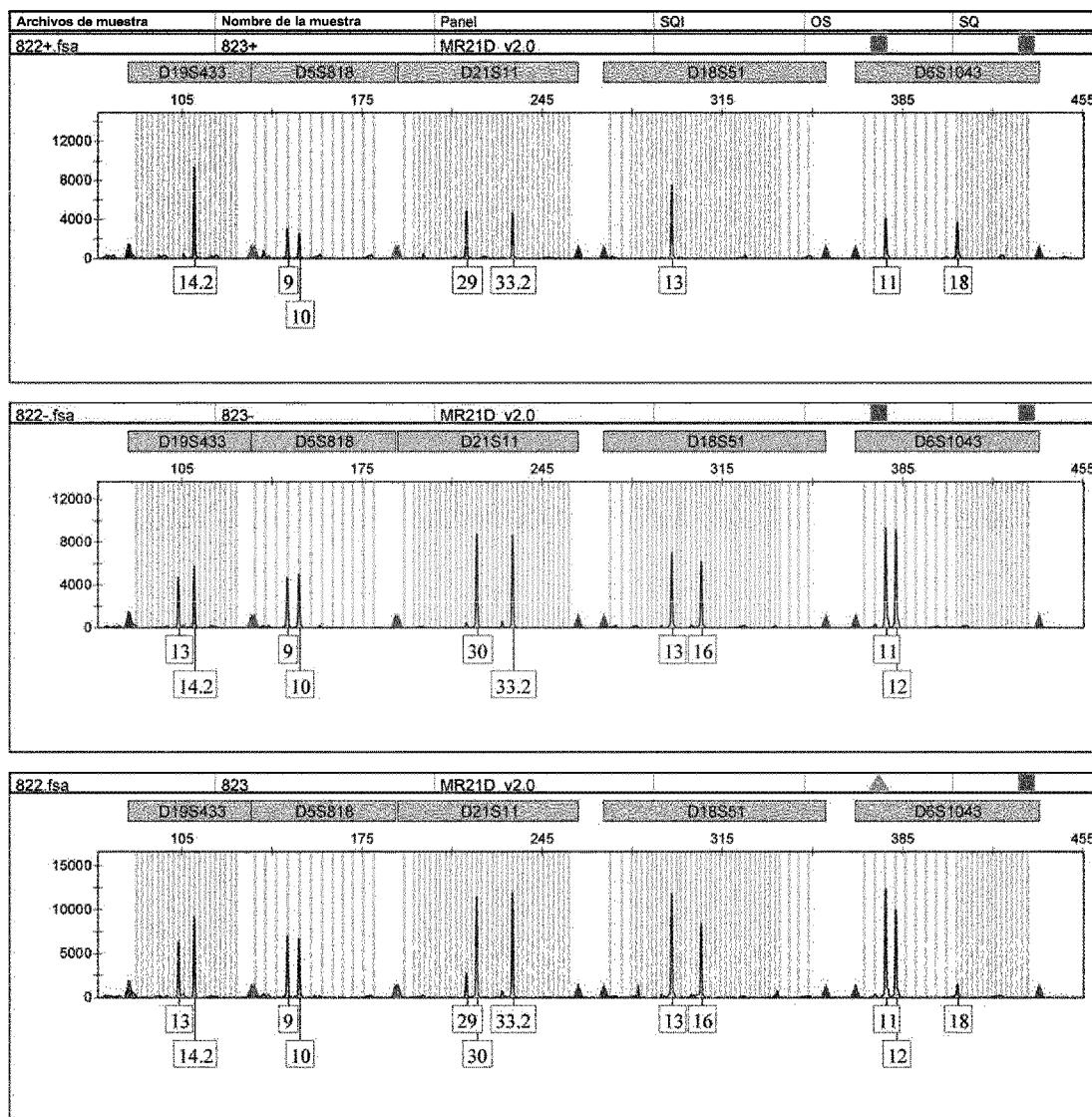


Figura 4

ES 3 007 607 T3

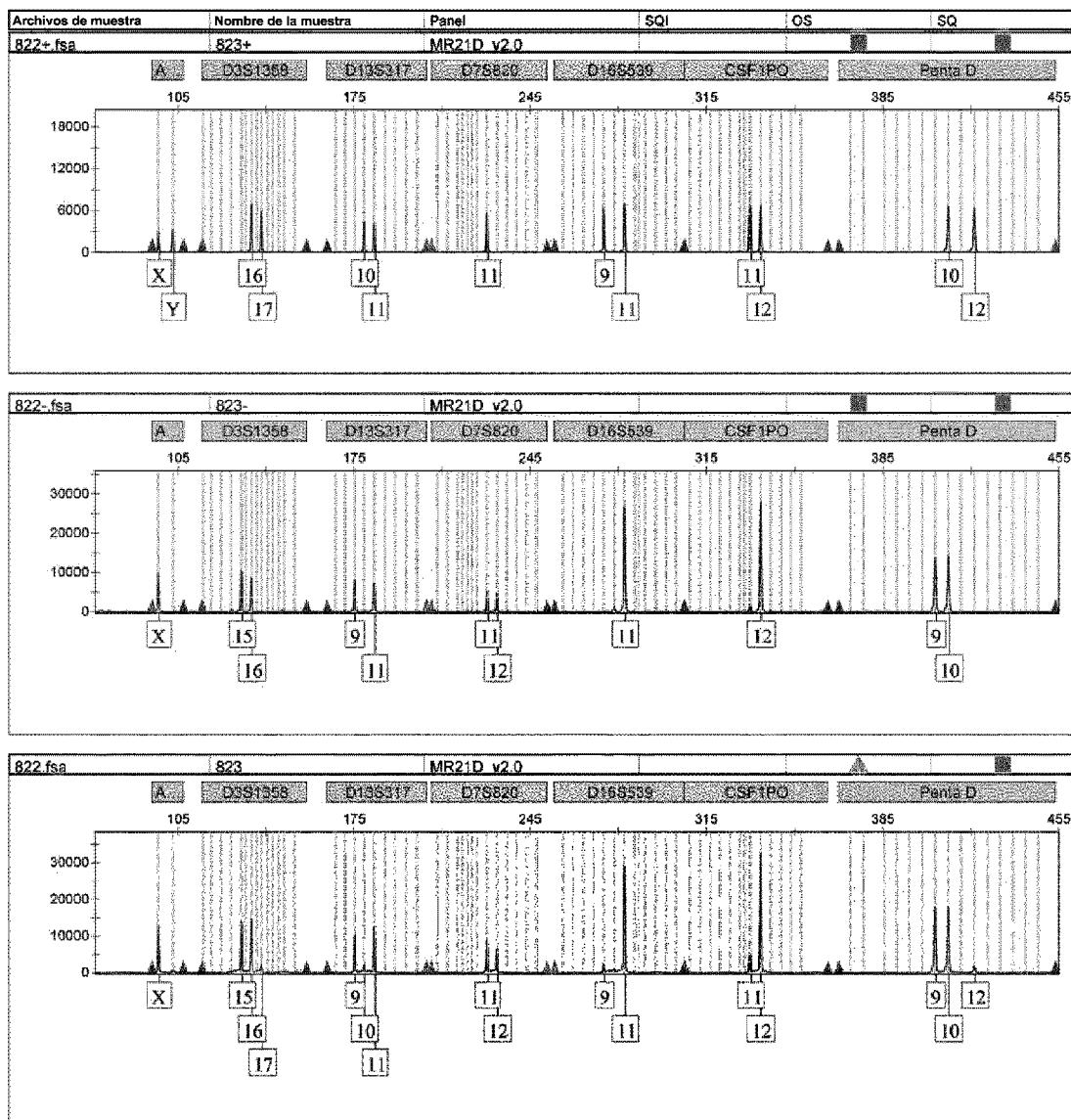


Figura 5

ES 3 007 607 T3

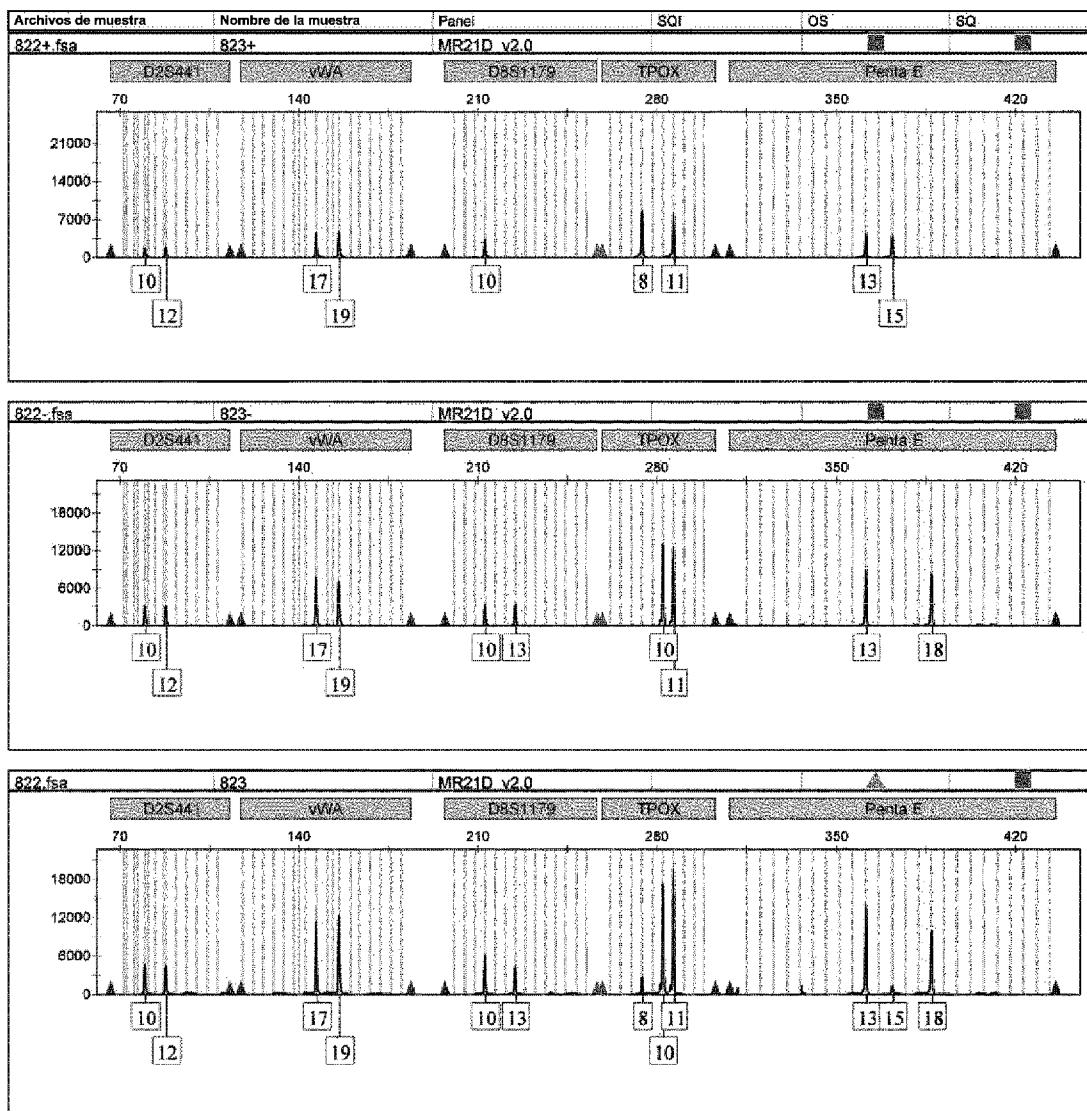


Figura 6

ES 3 007 607 T3

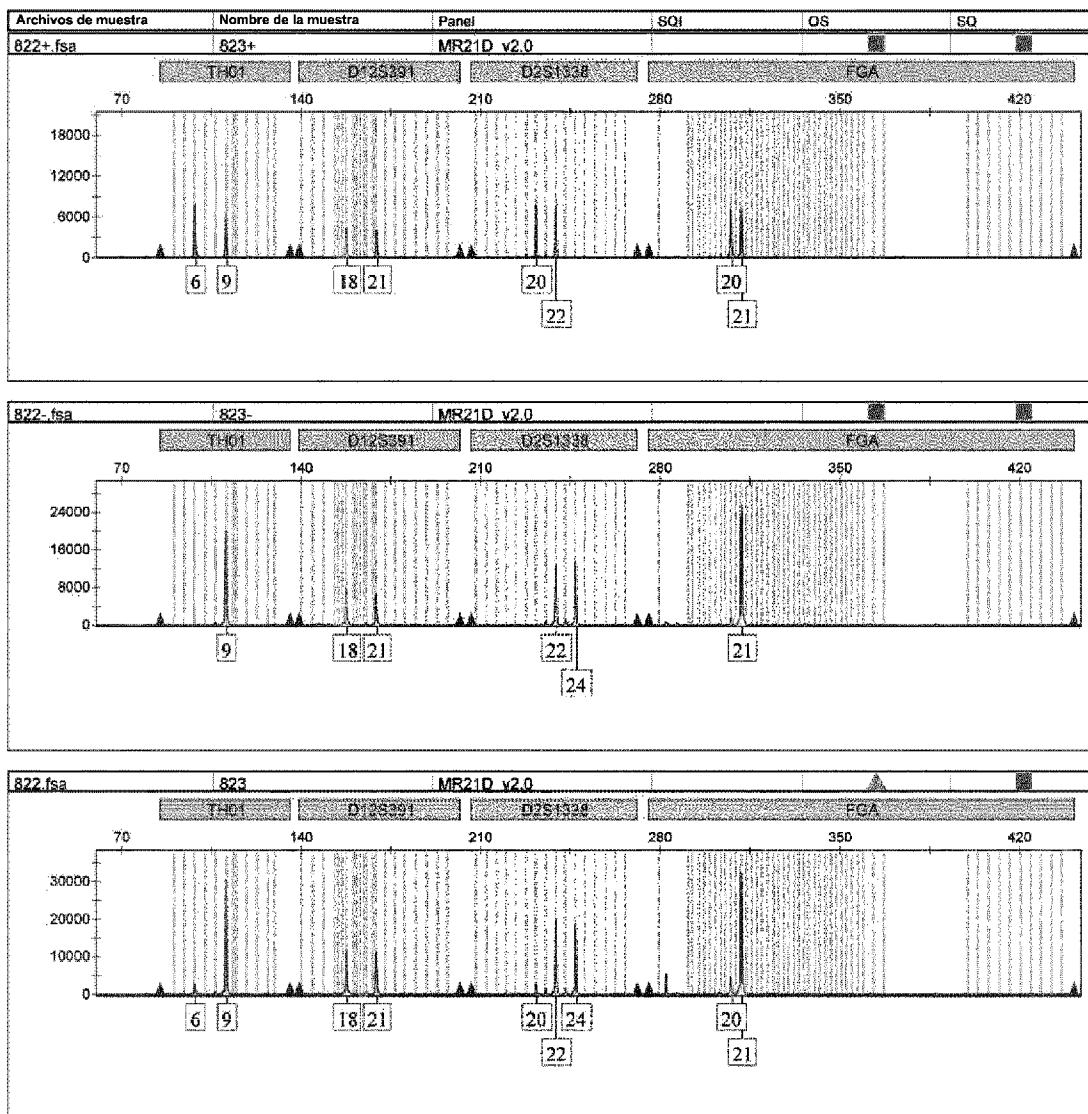


Figura 7

ES 3 007 607 T3

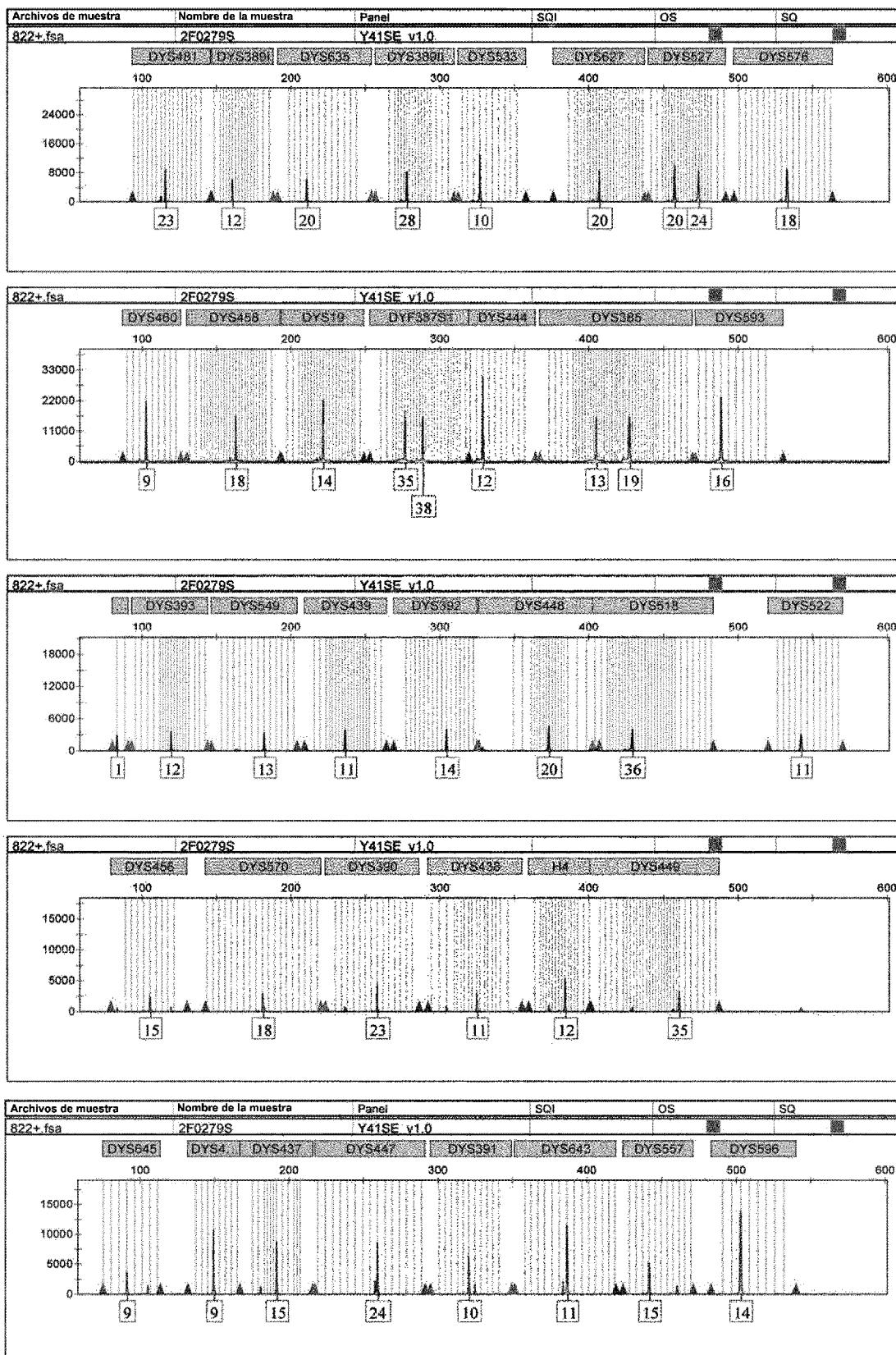


Figura 8

ES 3 007 607 T3

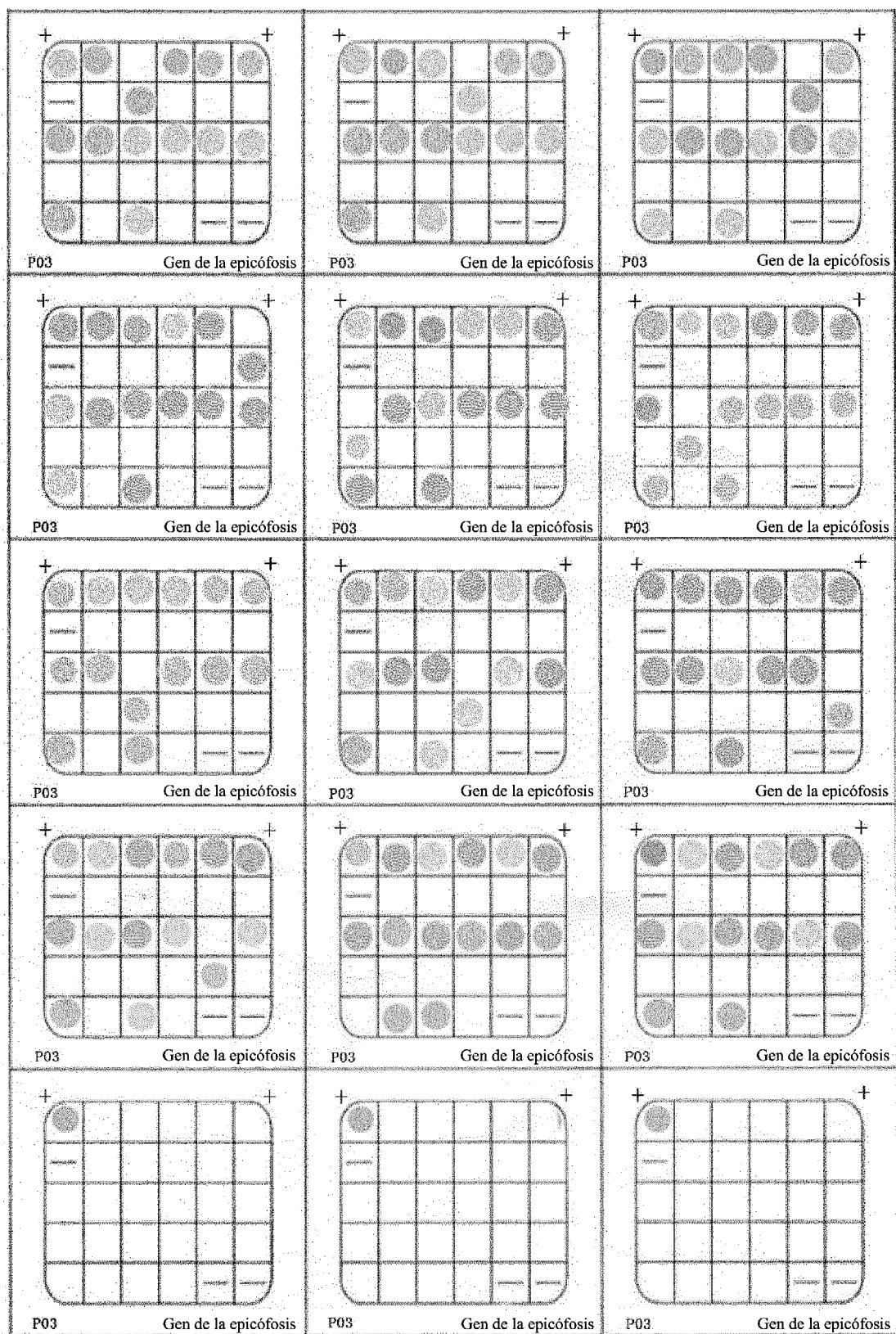


Figura 9

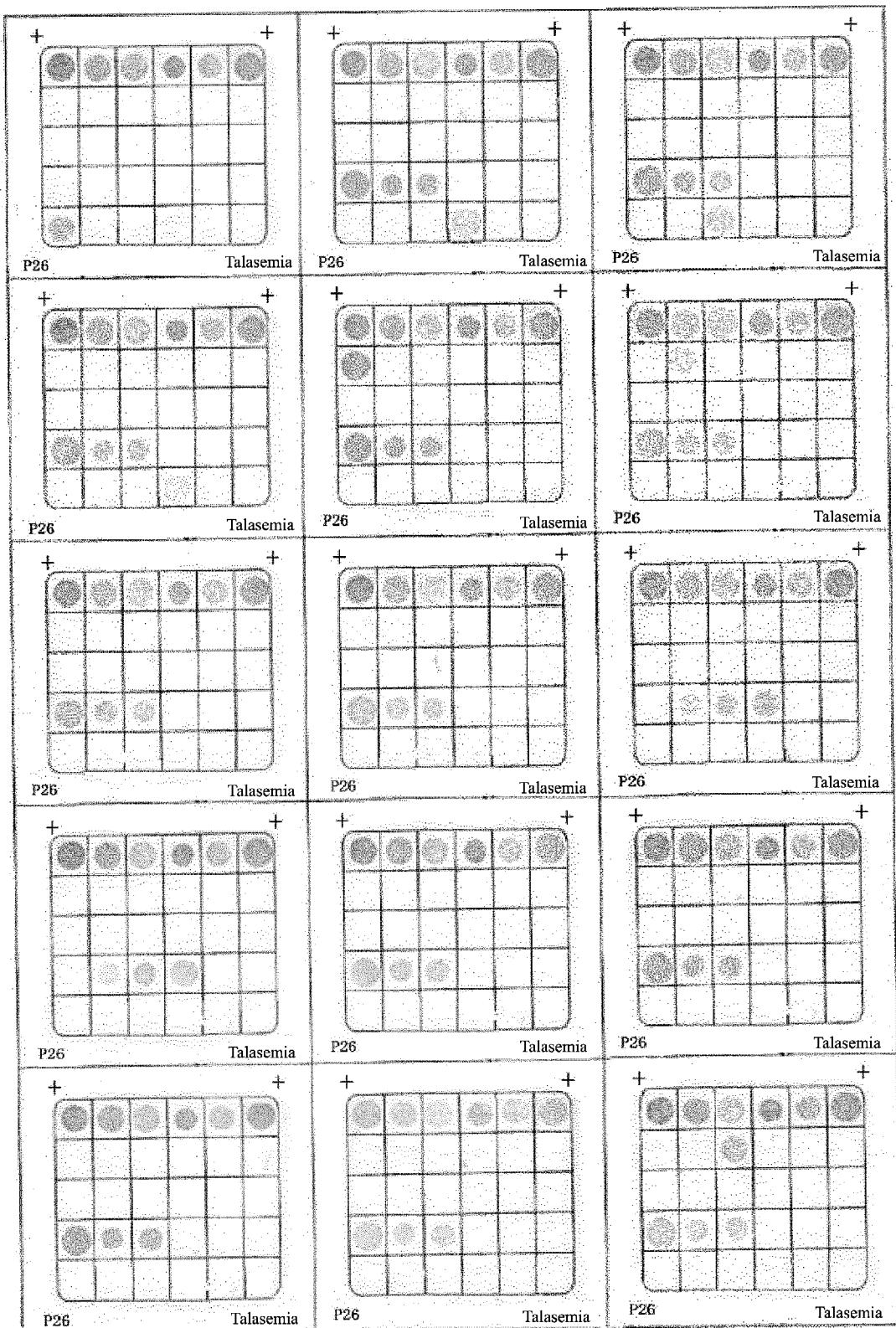


Figura 10

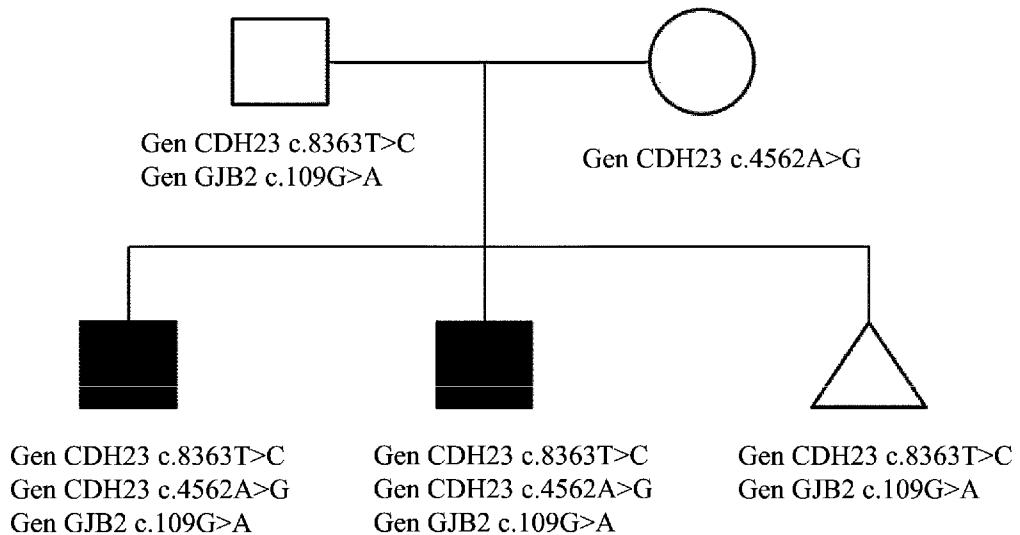


Figura 11

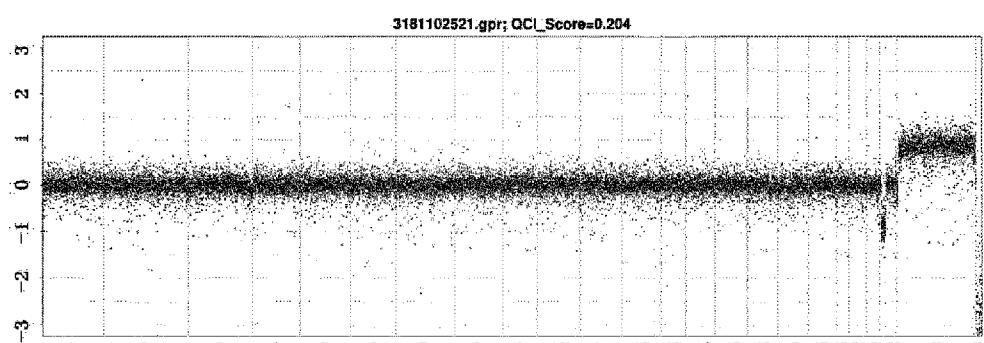


Figura 12

Pérdida: Chr22

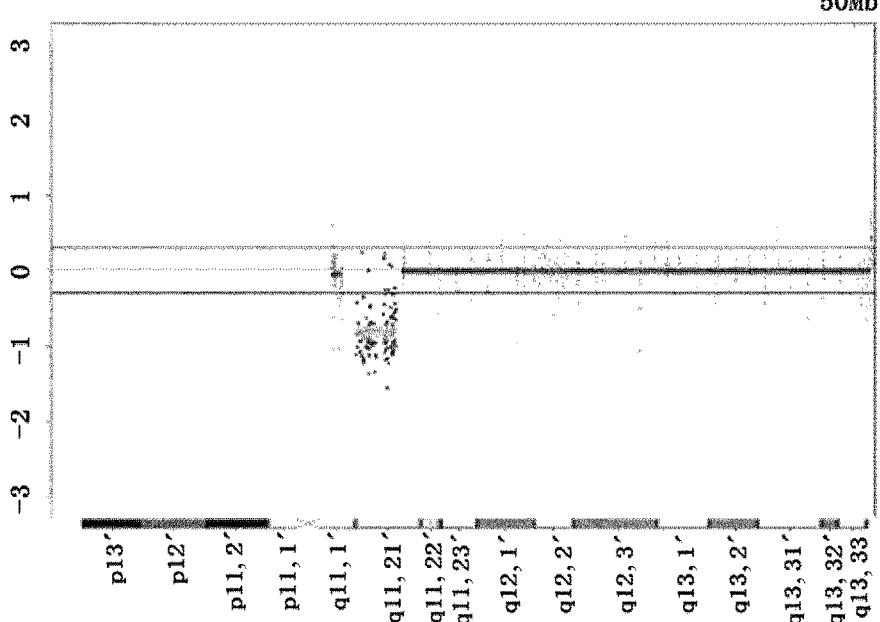


Figura 13

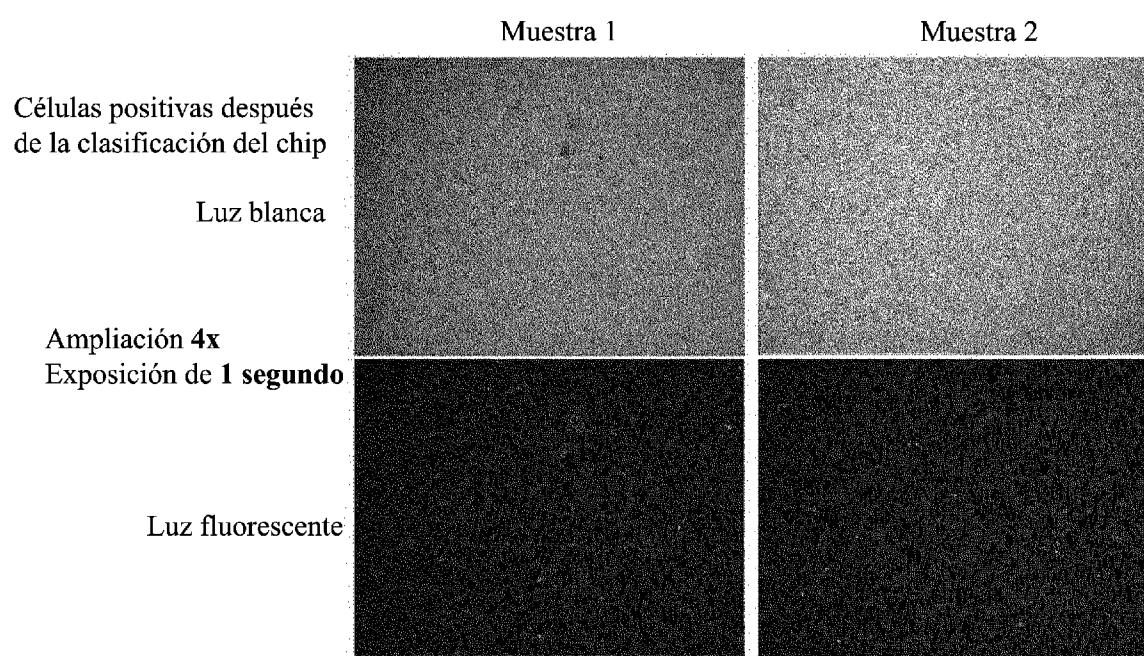


Figura 14

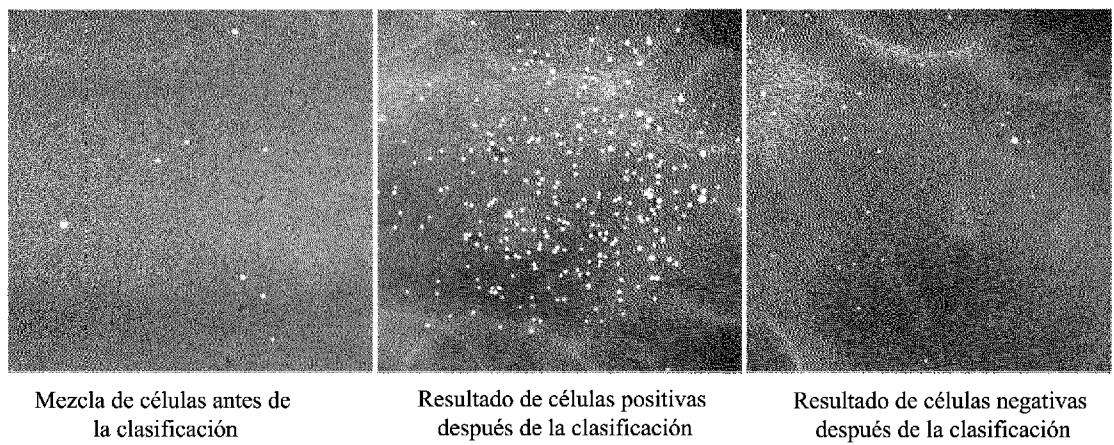


Figura 15

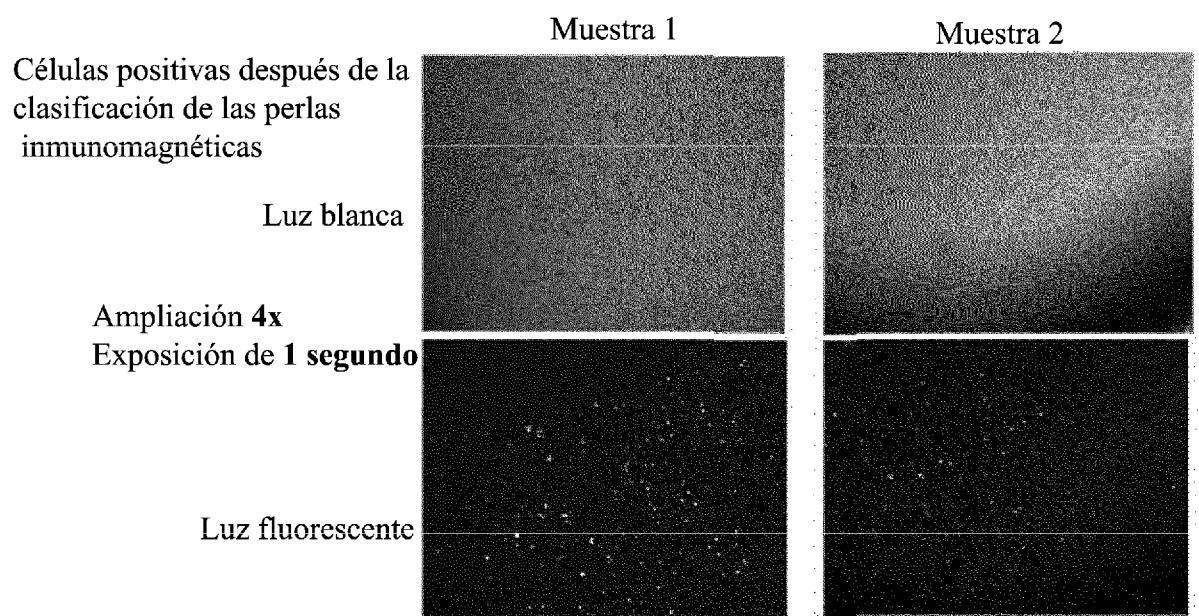


Figura 16