



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102460171 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 16

(21) 申请号 201080033792. 2

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

(22) 申请日 2010. 05. 17

代理人 李进 郭文洁

(30) 优先权数据

61/178787 2009. 05. 15 US

61/257345 2009. 11. 02 US

61/296099 2010. 01. 19 US

61/315144 2010. 03. 18 US

61/323070 2010. 04. 12 US

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/566 (2006. 01)

G01N 33/50 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 01. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/035152 2010. 05. 17

(87) PCT申请的公布数据

W02010/132890 EN 2010. 11. 18

(71) 申请人 SRU 生物系统公司

地址 美国麻萨诸塞州

(72) 发明人 S·沙马 L·G·莱恩

A·于斯哈科夫 R·沃纳

M·阿博迪利 B·罗克尼

S·C·舒尔斯 Z·帕达利亚

M·格特曼 E·桑德伯格

权利要求书 7 页 说明书 41 页 附图 33 页

(54) 发明名称

细胞群和混合细胞群变化的检测

(57) 摘要

本发明提供无标记检测细胞群和混合细胞群中的变化的方法。

1. 一种检测一个容器中的两种或更多种细胞类型对刺激或试验试剂的不同反应的方法,其中两种或更多种细胞类型不含可检测标记,所述方法包括:

(a) 将两种或更多种细胞类型加到一个容器中,其中所述容器包括比色共振反射生物传感器表面、基于光栅的波导生物传感器表面或介电薄膜叠式生物传感器表面,其中所述生物传感器表面具有一种或多种固定在其表面上的特异性结合物质,且其中一种或多种特异性结合物质可结合两种或更多种细胞类型中的一种或多种;

(b) 使两种或更多种细胞类型与一种或多种特异性结合物质结合;和

(c) 检测两种或更多种细胞类型的不同反应。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述不同反应是两种或更多种细胞类型与一种或多种特异性结合物质连接的不同时间。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述不同反应是由两种或更多种细胞类型呈现的对一种或多种特异性结合物质的不同细胞连接形态。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述不同反应是两种或更多种细胞类型对一种或多种特异性结合物质的不同连接强度。

5. 权利要求 1 的方法,所述方法还包括:

(a) 将两种或更多种细胞类型暴露于一种或多种试验试剂或刺激;和

(b) 检测两种或更多种细胞类型的不同反应。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述不同反应是两种或更多种细胞类型对一种或多种试验试剂或刺激的不同反应强度。

7. 权利要求 5 的方法,其中所述不同反应是由两种或更多种细胞类型在响应一种或多种试验试剂或刺激时呈现的不同细胞形态。

8. 权利要求 5 的方法,其中所述不同反应是两种或更多种细胞类型随时间推移对一种或多种试验试剂或刺激的不同细胞反应。

9. 权利要求 5 的方法,其中所述不同反应是两种或更多种细胞类型随时间推移的不同反应动力学。

10. 权利要求 1 的方法,所述方法还包括:

(d) 将两种或更多种细胞类型暴露于第一试验试剂或第一刺激;

(e) 检测两种或更多种细胞类型对第一试验试剂或第一刺激的反应;

(f) 将两种或更多种细胞类型暴露于第二试验试剂或第二刺激,其中两种或更多种细胞类型中的一种细胞类型对第二试验试剂或第二刺激的反应是已知的;

(g) 检测两种或更多种细胞类型对第二试验试剂或第二刺激的反应;

(h) 在生物传感器上鉴定对第二试验试剂或第二刺激具有已知反应的两种或更多种细胞类型中的一种细胞类型;

(i) 检测两种或更多种细胞类型的不同反应。

11. 权利要求 1 的方法,其中一种或多种试验试剂或刺激由生物传感器表面上存在的两种或更多种细胞类型中的一种或多种细胞表达。

12. 一种检测混合细胞群中第一细胞类型的存在情况的方法,其中所述混合细胞群中的细胞不含可检测标记,所述方法包括:

(a) 将混合细胞群加到一个容器中,其中所述容器包括比色共振反射生物传感器表面、

基于光栅的波导生物传感器表面或介电薄膜叠式生物传感器表面,其中所述生物传感器表面具有一种或多种固定在其表面上的特异性结合物质;

(b) 使混合细胞群与一种或多种特异性结合物质结合,其中对于与一种或多种特异性结合物质结合,第一细胞类型具有与混合细胞群的其它细胞不同的反应;和

(c) 检测混合细胞群的不同反应,其中通过它们的不同反应检测第一细胞类型的存在情况。

13. 权利要求 12 的方法,其中所述不同反应是第一细胞类型与一种或多种特异性结合物质连接的不同时间。

14. 权利要求 12 的方法,其中所述不同反应是由第一细胞类型呈现的对一种或多种特异性结合物质的不同细胞连接形态。

15. 权利要求 12 的方法,其中所述不同反应是第一细胞类型对一种或多种特异性结合物质的不同连接强度。

16. 权利要求 12 的方法,其中测定混合细胞群中的第一细胞类型的百分比。

17. 权利要求 12 的方法,其中所述不同反应是第一细胞类型随时间推移的不同反应。

18. 一种检测混合细胞群中第一细胞类型的存在情况的方法,其中所述混合细胞群中的细胞均不含可检测标记,所述方法包括:

(a) 将混合细胞群加到一个容器中,其中所述容器包括比色共振反射生物传感器表面、基于光栅的波导生物传感器表面或介电薄膜叠式生物传感器表面,其中所述生物传感器表面具有一种或多种固定在其表面上的特异性结合物质;

(b) 使混合细胞群与一种或多种特异性结合物质结合,

(c) 将混合细胞群暴露于一种或多种试验试剂或刺激,其中与混合细胞群中的其它细胞相比,第一细胞类型对一种或多种试验试剂或刺激具有不同反应;

(d) 检测第一细胞类型对一种或多种试验试剂或刺激的不同反应,其中如果检出不同反应,则第一细胞类型存在于细胞的混合物中。

19. 权利要求 18 的方法,其中所述不同反应是第一细胞类型对一种或多种试验试剂或刺激的不同反应强度。

20. 权利要求 18 的方法,其中所述不同反应是由第一细胞类型在响应一种或多种试验试剂或刺激时呈现的不同细胞形态。

21. 权利要求 18 的方法,其中所述不同反应是第一细胞类型随时间推移对一种或多种试验试剂或刺激的不同细胞反应。

22. 权利要求 18 的方法,其中所述不同反应是第一细胞类型随时间推移的不同反应动力学。

23. 权利要求 18 的方法,其中测定混合细胞群中的第一细胞类型的百分比。

24. 权利要求 18 的方法,其中一种或多种试验试剂或刺激由存在于生物传感器表面上的混合细胞群中的一种或多种细胞表达。

25. 一种检测第一细胞群对一种或多种试验试剂或刺激的反应的方法,所述方法包括:

(a) (i) 将一种或多种胞外基质配体固定在比色共振反射生物传感器、基于光栅的波导生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的表面上,其中第一细胞群具有对一种或多种胞外

基质配体有特异性的细胞表面受体；并且将第一细胞群加到生物传感器上；或

(ii) 将第一细胞群与一种或多种胞外基质配体混合，其中第一细胞群具有对一种或多种胞外基质配体有特异性的细胞表面受体；并将第一细胞群与一种或多种胞外基质配体一起加到比色共振反射生物传感器、基于光栅的波导生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的表面上；

(b) 将凝胶、凝胶样物质或者第二细胞群加到生物传感器表面上；

(c) 将一种或多种试验试剂或刺激加到凝胶或凝胶样物质或者第二细胞群中；和

(d) 检测第一细胞群对一种或多种试验试剂或刺激的反应。

26. 权利要求 25 的方法，其中一种或多种试验试剂或刺激是趋化物质或者产生试验试剂或刺激的第三细胞群。

27. 权利要求 25 的方法，其中所述第二细胞群是上皮细胞群或内皮细胞群。

28. 权利要求 25 的方法，其中所述第一细胞群是干细胞群。

29. 权利要求 25 的方法，其中不使用检测标记。

30. 权利要求 25 的方法，其还包括检测第二细胞群的反应。

31. 权利要求 25 的方法，其中通过在一个或多个期间内监测波长峰值或者通过在一个或多个期间内监测有效折射率变化，来检测第一细胞群或第二细胞群对一种或多种刺激的反应。

32. 权利要求 25 的方法，其中实时检测第一细胞群或第二细胞群的反应。

33. 一种检测第一群细胞对一种或多种试验试剂或刺激的反应的方法，所述方法包括：

(a) 将一种或多种试验试剂或刺激加到比色共振反射生物传感器、基于光栅的波导生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的表面上；

(b) 将基底膜基质、藻酸胶、胶原凝胶、琼脂糖凝胶、合成水凝胶或第二细胞群加到生物传感器表面上；

(c) 将第一细胞群与一种或多种胞外基质配体混合，其中所述第一细胞群具有对一种或多种胞外基质配体有特异性的细胞表面受体；且将第一细胞群加到生物传感器上；

(d) 检测第一细胞群对一种或多种试验试剂或刺激的反应。

34. 权利要求 33 的方法，其中一种或多种试验试剂或刺激是趋化物质或者产生试验试剂或刺激的第三细胞群。

35. 权利要求 33 的方法，其中所述第二细胞群是上皮细胞群或内皮细胞群。

36. 权利要求 33 的方法，其中所述第一细胞群是干细胞群。

37. 权利要求 33 的方法，其中不使用检测标记。

38. 权利要求 33 的方法，其还包括检测第二细胞群的反应。

39. 权利要求 33 的方法，其中通过在一个或多个期间内监测波长峰值或者通过在一个或多个期间内监测有效折射率变化，来检测第一细胞群或第二细胞群对一种或多种刺激的反应。

40. 权利要求 33 的方法，其中实时检测第一细胞群或第二细胞群的反应。

41. 一种检测第一细胞群分化的方法，所述方法包括：

(a) 将第一细胞群加到比色共振反射生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的表面

上,其中所述生物传感器具有两个或更多个表面区域,其中每个表面区域具有共振值不同于其它表面区域的光栅;

(b) 检测两个或更多个表面区域中每个的两个或更多个波长峰值;和

(c) 检测生物传感器表面上第一细胞群的分化。

42. 权利要求 41 的方法,其中实时检测分化。

43. 权利要求 41 的方法,其中将一种或多种试验试剂或刺激加到生物传感器上之后,检测来自两个或更多个表面区域中每个的两个或更多个波长峰值。

44. 权利要求 41 的方法,其中在将一种或多种试验试剂或刺激加到生物传感器上之前,检测一个或多个波长峰值。

45. 权利要求 41 的方法,其中一种或多种试验试剂或刺激是趋化物质或者产生试验试剂或刺激的第三细胞群。

46. 权利要求 41 的方法,其中所述第一细胞群是干细胞群。

47. 权利要求 41 的方法,其中不使用检测标记。

48. 一种生物表达概况分析以鉴定对特定干细胞群有特异性的生物反应特征的方法,所述方法包括:

(a) (i) 将一种或多种胞外基质配体固定在比色共振反射生物传感器、基于光栅的波导生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的两个或更多个表面上,其中干细胞群具有对一种或多种胞外基质配体有特异性的细胞表面受体;并将干细胞群加到生物传感器的两个或更多个位置上;或者

(ii) 将干细胞群与一种或多种胞外基质配体混合,其中所述干细胞具有对一种或多种胞外基质配体有特异性的细胞表面受体;并将干细胞群与一种或多种胞外基质配体一起加到比色共振反射生物传感器、基于光栅的波导生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的两个或更多个表面上;

(b) 将生物传感器的两个或更多个表面暴露于两种或更多种试验试剂或刺激;

(c) 在生物传感器的两个或更多个表面的每个上检测干细胞对试验试剂或刺激的反应;

(d) 鉴定特定干细胞群特有的对两种或更多种试验试剂或刺激的生物反应特征。

49. 权利要求 48 的方法,其中实时进行干细胞的反应的检测。

50. 一种用于筛选候选化合物调节细胞分化的能力的方法,所述方法包括:(a) 将一种或多种细胞类型加到比色共振反射生物传感器、基于光栅的波导生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的表面上;(b) 诱导一种或多种细胞类型分化;(c) 通过比较候选化合物存在或不存在时的波长峰值或有效折射率变化,检测候选化合物存在或不存在时细胞分化的变化,其中与候选化合物不存在时的细胞分化活性相比,在化合物存在时细胞分化活性的变化表示候选化合物调节细胞分化的能力。

51. 权利要求 50 的方法,其中所述细胞分化活性的变化是细胞分化活性增加、细胞分化活性降低、细胞分化活性受抑制、干细胞自我更新增加或降低或者分化细胞类型改变。

52. 权利要求 50 的方法,其中所述细胞分化活性的变化是胶原产生的增加或降低。

53. 权利要求 50 的方法,其中所述细胞分化活性的变化是矿化结节形成的增加或降低。

54. 权利要求 50 的方法,其中一种或多种细胞类型是干细胞。
55. 权利要求 50 的方法,其中一种或多种细胞类型是间充质干细胞。
56. 权利要求 50 的方法,其中通过检测细胞大小、细胞形状、细胞膜电位、细胞代谢活性或细胞对信号的反应性的变化,来检测细胞分化活性的变化。
57. 权利要求 50 的方法,其中所述候选化合物是抑制性核酸分子。
58. 一种用于筛选候选化合物调节细胞分化的能力的方法,所述方法包括:(a)将一种或多种细胞类型加到比色共振反射生物传感器、基于光栅的波导生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的表面上;(b)诱导一种或多种细胞类型分化;(c)通过比较候选化合物存在或不存在时的波长峰值或有效折射率,检测候选化合物存在或不存在时一种或多种细胞分化产物的产生,其中与候选化合物不存在时的一种或多种细胞分化产物相比,候选化合物存在时一种或多种细胞分化产物的变化表示候选化合物调节细胞分化的能力。
59. 权利要求 58 的方法,其中所述细胞分化产物是胶原或矿化结节。
60. 权利要求 58 的方法,其中一种或多种细胞类型是干细胞。
61. 权利要求 58 的方法,其中一种或多种细胞类型是间充质干细胞。
62. 权利要求 58 的方法,其中所述候选化合物是抑制性核酸分子。
63. 一种比色共振反射生物传感器光栅表面、基于光栅的波导生物传感器光栅表面或介电薄膜叠式生物传感器光栅表面,其包含:固定在生物传感器光栅表面上或与生物传感器光栅表面缔合的一种或多种特异性结合物质;以及一种或多种特异性结合物质上面的一层凝胶或凝胶样物质。
64. 一种试剂盒,所述试剂盒包括一个或多个比色共振反射生物传感器光栅表面、一个或多个基于光栅的波导生物传感器光栅表面或介电薄膜叠式生物传感器光栅表面和一个或多个凝胶或凝胶样物质的容器。
65. 权利要求 64 的试剂盒,其还包括一种或多种特异性结合物质的容器。
66. 权利要求 64 的试剂盒,其中一个或多个比色共振反射生物传感器光栅表面、基于光栅的波导生物传感器光栅表面或介电薄膜叠式生物传感器光栅表面包含固定在生物传感器光栅表面上或与生物传感器光栅表面缔合的一种或多种特异性结合物质。
67. 权利要求 63 的共振反射比生物传感器光栅表面、基于光栅的波导生物传感器光栅表面或介电薄膜叠式生物传感器光栅表面,其中所述生物传感器光栅表面形成盛液容器的内表面。
68. 权利要求 67 的比色共振反射生物传感器光栅表面、基于光栅的波导生物传感器光栅表面或介电薄膜叠式生物传感器光栅表面,其中所述盛液容器是微量滴定板或微观流体槽。
69. 一种用于在比色共振反射生物传感器光栅表面、基于光栅的波导生物传感器光栅表面或介电薄膜叠式生物传感器光栅表面上检测特异性结合物质和结合配偶体之间的反应的改进方法,所述方法包括:
- 将一种或多种特异性结合物质加到生物传感器光栅表面上,使得一种或多种特异性结合物质固定在生物传感器光栅表面上或者与生物传感器光栅表面缔合;
- 将凝胶或凝胶样物质加到生物传感器表面上。
70. 一种从混合细胞群中分选出两种或更多种细胞类型并检测分选细胞对刺激、培育

或试验试剂的反应的方法,其中所述分选和检测发生在一个生物传感器表面上,所述方法包括:

(a) 将混合细胞群加到一个比色共振反射生物传感器表面、一个基于光栅的波导生物传感器表面或一个介电薄膜叠式生物传感器表面上,其中一个生物传感器表面具有两种或更多种类型的特异性结合物质固定在其一个表面上,且其中两种或更多种特异性结合物质可潜在结合混合细胞群中的一种或多种细胞类型;

(b) 从生物传感器的一个表面上洗去未结合细胞,使得一种或多种细胞类型与生物传感器表面结合并在生物传感器表面上分选;

(c) 将一种或多种结合细胞类型暴露于刺激、培育或试验试剂;和

(d) 检测一种或多种结合细胞类型对刺激、培育或试验试剂的反应。

71. 权利要求 70 的方法,其中所述两种或更多种特异性结合物质包含一种或多种胞外基质蛋白与一种或多种其它特异性结合物质的组合。

72. 权利要求 70 的方法,其中一个生物传感器表面是微量滴定板孔的底部。

73. 权利要求 70 的方法,其中两种或更多种细胞类型和试验试剂不含可检测标记。

74. 一种在一个生物传感器表面上从混合细胞群中分选一种或多种细胞类型并检测一种或多种细胞类型的胞内分析物的方法,所述方法包括:

(a) 将混合细胞群加到一个比色共振反射生物传感器表面、一个基于光栅的波导生物传感器表面或一个介电薄膜叠式生物传感器表面上,其中一个生物传感器表面具有两种或更多种特异性结合物质固定在其一个表面上,其中两种或更多种特异性结合物质包含 (i) 特异性结合混合细胞群中的一种或多种细胞类型的第一特异性结合物质和 (ii) 特异性结合一种或多种细胞类型的一种或多种胞内分析物的第二特异性结合物质;

(b) 洗去生物传感器表面上的未结合细胞,使得一种或多种细胞类型与生物传感器表面结合并且在生物传感器表面上分选;

(c) 使一种或多种结合细胞类型溶解或透化;

(d) 洗去生物传感器表面上的任何未结合的分析物;和

(d) 检测固定在生物传感器表面上的胞内分析物。

75. 权利要求 74 的方法,其中第一特异性结合物质包含一种或多种胞外基质蛋白。

76. 权利要求 74 的方法,其中在使一种或多种结合细胞类型溶解或透化之前将所述细胞培育一段时间,或暴露于刺激,或暴露于试验试剂。

77. 权利要求 74 的方法,其中一个生物传感器表面是微量滴定板孔的底部。

78. 权利要求 74 的方法,其中所述混合细胞群和两种或更多种特异性结合物质不含可检测标记。

79. 一种在一个生物传感器表面上从混合细胞群中分选一种或多种细胞类型并检测一种或多种细胞类型的分析物的方法,所述方法包括:

(a) 将混合细胞群加到一个比色共振反射生物传感器表面、一个基于光栅的波导生物传感器表面或一个介电薄膜叠式生物传感器表面上,其中一个生物传感器表面具有两种或更多种特异性结合物质固定在其一个表面上,其中两种或更多种特异性结合物质包含 (i) 特异性结合混合细胞群中的一种或多种细胞类型的第一特异性结合物质和 (ii) 特异性结合一种或多种细胞类型的一种或多种分析物的第二特异性结合物质;

(b) 洗去生物传感器表面上的未结合细胞,使得一种或多种细胞类型与生物传感器表面结合并且在生物传感器表面上分选;

(c) 将试验试剂加到细胞中,或培育细胞,或使细胞经受刺激或其组合;和

(d) 检测固定在生物传感器表面上的分析物。

80. 权利要求 79 的方法,其中第一特异性结合物质是一种或多种胞外基质蛋白。

81. 权利要求 79 的方法,其中一个生物传感器表面是微量滴定板孔的底部。

82. 权利要求 79 的方法,其中所述混合细胞群和两种或更多种特异性结合物质不含可检测标记。

细胞群和混合细胞群变化的检测

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求保护下列临时申请的权益：2009年5月15日提交的美国顺序号61/178,787、2009年11月2日提交的美国顺序号61/257,345、2010年1月19日提交的美国顺序号61/296,099、2010年3月18日提交的美国顺序号61/315,144和2010年4月12日提交的美国顺序号61/323,070的权益，所有申请均通过引用以其整体结合到本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 细胞分析，特别是干细胞分析、原代细胞分析和混合细胞群分析，由于缺乏准确的实时测定例如粘附、细胞迁移和趋化、侵入基底膜或组织、分化、由细胞粘附介导的分化、由三维环境（3-D细胞培养）介导的分化和与不同细胞类型共培养介导的分化等生物过程的可用工具，目前在本领域中受到限制，特别是当细胞数稀少时。

[0005] 本文公开了使用包括干细胞、原代细胞和混合细胞群在内的活细胞，采用实时无标记检测解决这些问题中的每一个的方法。

[0006] 另外，用于分析的生物样品的制备可能耗时又复杂。活细胞的分离和操作是许多生物学和医学分析的起始步骤，包括癌细胞的分离和检测、稀悬液中细胞的浓缩、根据特定性质分离细胞以及用于分析的各种细胞的分离和定位。

[0007] 流式细胞术和荧光激活细胞分选仪（FACS）广泛用于细胞分选和细胞分析。然而，这些方法花费大，需要可检测标记，可能损害细胞使之无法用于进一步分析，并且需要相对大的样品体积。此外，装置难以灭菌、机械方面复杂且只能由经过培训的人员操作和维护。因此，需要可快速有效地分选、计数、检测和分析活细胞（包括活细胞混合群和低细胞数测定）的便宜装置用于生物科学研究和医学诊断。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明的一个实施方案提供检测一个容器中两种或更多种细胞类型对刺激或试验试剂的不同反应的方法，其中两种或更多种细胞类型不含可检测标记。该方法包括将两种或更多种细胞类型加到一个容器中，其中所述容器包含比色共振反射生物传感器（colorimetric resonant reflectance biosensor）表面、基于光栅的波导生物传感器（grating-based waveguide biosensor）表面或介电薄膜叠式生物传感器（dielectric film stack biosensor）表面，其中生物传感器表面具有一种或多种固定在其表面上的特异性结合物质，且其中一种或多种特异性结合物质可结合两种或更多种细胞类型的一种或多种。允许两种或更多种细胞类型与一种或多种特异性结合物质结合。检测两种或更多种细胞类型的不同反应。不同反应可以是两种或更多种细胞类型与一种或多种特异性结合物质连接的不同时间；由两种或更多种细胞类型呈现的对一种或多种特异性结合物质的不同细胞连接形态；和/或两种或更多种细胞类型对一种或多种特异性结合物质的不同连接强度。

[0010] 所述方法还可包括将两种或更多种细胞类型暴露于一种或多种试验试剂或刺激，并检测两种或更多种细胞类型对一种或多种试验试剂或刺激的不同反应。不同反应可以是两种或更多种细胞类型对一种或多种试验试剂或刺激的不同反应强度；由两种或更多种细

胞类型在响应一种或多种试验试剂或刺激时呈现的不同细胞形态 ;两种或更多种细胞类型随时间推移对一种或多种试验试剂或刺激的不同细胞反应 ;和 / 或者两种或更多种细胞类型随时间推移的不同反应动力学。

[0011] 所述方法还可包括将两种或更多种细胞类型暴露于第一试验试剂或第一刺激 ;检测两种或更多种细胞类型对第一试验试剂或第一刺激的反应 ;将两种或更多种细胞类型暴露于第二试验试剂或第二刺激,其中两种或更多种细胞类型中的一种细胞类型对第二试验试剂或第二刺激的反应是已知的 ;检测两种或更多种细胞类型对第二试验试剂或第二刺激的反应 ;在生物传感器上鉴定具有对第二试验试剂或第二刺激的已知反应的两种或更多种细胞类型中的一种细胞类型 ;并检测两种或更多种细胞类型的不同反应。一种或多种试验试剂或刺激可由生物传感器表面上存在的两种或更多种细胞类型的一种或多种细胞表达。

[0012] 本发明的另一个实施方案包括检测混合细胞群中第一细胞类型的存在情况的方法,其中混合细胞群中的细胞不含可检测标记。该方法包括将混合细胞群加到一个容器中,其中所述容器包含比色共振反射生物传感器表面、基于光栅的波导生物传感器表面或介电薄膜叠式生物传感器表面,其中生物传感器表面具有一种或多种固定在其表面上的特异性结合物质。允许混合细胞群与一种或多种特异性结合物质结合,其中对于结合一种或多种特异性结合物质,第一细胞类型具有与混合细胞群的其它细胞不同的反应。检测混合细胞群的不同反应,其中通过它们的不同反应检测第一细胞类型的存在情况。不同反应可以是第一细胞类型与一种或多种特异性结合物质连接的不同时间 ;由第一细胞类型呈现的对一种或多种特异性结合物质的不同细胞连接形态 ;第一细胞类型对一种或多种特异性结合物质的不同连接强度 ;和 / 或第一细胞类型随时间推移的不同反应。可测定混合细胞群中第一细胞类型的百分比。

[0013] 本发明的又一个实施方案提供检测混合细胞群中第一细胞类型的存在情况的方法,其中混合细胞群中的细胞均不含可检测标记。该方法包括将混合细胞群加到一个容器中,其中所述容器包含比色共振反射生物传感器表面、基于光栅的波导生物传感器表面或介电薄膜叠式生物传感器表面,其中生物传感器表面具有一种或多种固定在其表面上的特异性结合物质。允许混合细胞群与一种或多种特异性结合物质结合。将混合细胞群暴露于一种或多种试验试剂或刺激,其中与混合细胞群中的其它细胞相比,第一细胞类型对一种或多种试验试剂或刺激具有不同反应。检测第一细胞类型对一种或多种试验试剂或刺激的不同反应,其中如果检出不同反应,则第一细胞类型存在于细胞的混合物中。不同反应是第一细胞类型对一种或多种试验试剂或刺激的不同反应强度 ;第一细胞类型在响应一种或多种试验试剂或刺激时呈现的不同细胞形态 ;第一细胞类型随时间推移对一种或多种试验试剂或刺激的不同细胞反应 ;和 / 或第一细胞类型随时间推移的不同反应动力学。可测定混合细胞群中第一细胞类型的百分比。一种或多种试验试剂或刺激可由存在于生物传感器表面上的混合细胞群的一种或多种细胞表达。

[0014] 本发明的又一个实施方案提供检测第一细胞群对一种或多种试验试剂或刺激的反应的方法。该方法包括将一种或多种胞外基质配体固定在比色共振反射生物传感器、基于光栅的波导生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的表面上,其中第一细胞群具有对一种或多种胞外基质配体有特异性的细胞表面受体 ;并且将第一细胞群加到生物传感器上。或者,可将第一细胞群与一种或多种胞外基质配体混合,其中第一细胞群具有对一种或多

种胞外基质配体有特异性的细胞表面受体；并加到比色共振反射生物传感器、基于光栅的波导生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的表面上。将凝胶、凝胶样物质或第二细胞群加到生物传感器表面上。将一种或多种试验试剂或刺激加到凝胶或凝胶样物质或第二细胞群中。检测第一细胞群对一种或多种试验试剂或刺激的反应。一种或多种试验试剂或刺激可以是趋化物质或者产生试验试剂或刺激的第三细胞群。第二细胞群可以是上皮细胞群或内皮细胞群。第一细胞群可以是干细胞群。可以不使用检测标记。所述方法还可包括检测第二细胞群的反应。可通过在一个或多个期间内监测波长峰值 (peak wavelength value) 或者通过在一个或多个期间内监测有效折射率变化, 来检测第一细胞群或第二细胞群对一种或多种刺激的反应。可实时检测第一细胞群或第二细胞群的反应。

[0015] 本发明又一个实施方案提供检测第一细胞群对一种或多种试验试剂或刺激的反应的方法。该方法包括将一种或多种试验试剂或刺激加到比色共振反射生物传感器、基于光栅的波导生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的表面上；将基底膜基质、藻酸胶、胶原凝胶、琼脂糖凝胶、合成水凝胶或第二细胞群加到生物传感器表面上；将第一细胞群与一种或多种胞外基质配体混合, 其中第一细胞群具有对一种或多种胞外基质配体有特异性的细胞表面受体；并且将第一细胞群加到生物传感器上；检测第一细胞群对一种或多种试验试剂或刺激的反应。一种或多种试验试剂或刺激可以是趋化物质或者产生试验试剂或刺激的第三细胞群。第二细胞群可以是上皮细胞群或内皮细胞群。第一细胞群可以是干细胞群。可以不使用检测标记。所述方法还包括检测第二细胞群的反应。可通过在一个或多个期间内监测波长峰值或者通过在一个或多个期间内监测有效折射率变化, 来检测第一细胞群或第二细胞群对一种或多种刺激的反应。可实时检测第一细胞群或第二细胞群的反应。

[0016] 本发明的另一个实施方案提供检测第一细胞群分化的方法。该方法包括将第一细胞群加到比色共振反射生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的表面上, 其中生物传感器具有两个或更多个表面区域, 其中每个表面区域具有共振值不同于其它表面区域的光栅；检测两个或更多个表面区域中每一个的两个或更多个波长峰值；并检测生物传感器表面上第一细胞群的分化。可实时检测分化。可在检测两个或更多个表面区域中每一个的两个或更多个波长峰值之前, 将一种或多种试验试剂或刺激加到生物传感器上。可检测一个或多个波长峰值, 之后将一种或多种试验试剂或刺激加到生物传感器上。一种或多种试验试剂或刺激可以是趋化物质或者产生试验试剂或刺激的第三细胞群。第一细胞群可以是干细胞群。可以不使用检测标记。

[0017] 本发明又一个实施方案提供生物表达特征分析 (biological expression profiling) 以鉴定对特定干细胞群有特异性的生物反应特征 (biological response signature) 的方法。该方法包括将一种或多种胞外基质配体固定在比色共振反射生物传感器、基于光栅的波导生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的两个或更多个表面上, 其中干细胞群具有对一种或多种胞外基质配体有特异性的细胞表面受体；并将干细胞群加到生物传感器的两个或更多个位置上。或者, 可将干细胞群与一种或多种胞外基质配体混合, 其中干细胞具有对一种或多种胞外基质配体有特异性的细胞表面受体；并加到比色共振反射生物传感器、基于光栅的波导生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的两个或更多个表面上。将生物传感器的两个或更多个表面暴露于两种或更多种试验试剂或刺激。在生物传感器的两个或更多个表面的每一个上检测干细胞对试验试剂或刺激的反应。鉴定特定干细

胞群特有的对两种或更多种试验试剂或刺激的生物反应特征。可实时进行干细胞反应检测。

[0018] 本发明的又一个实施方案提供用于筛选候选化合物调节细胞分化的能力的方法。该方法包括将一种或多种细胞类型加到比色共振反射生物传感器、基于光栅的波导生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的表面上；诱导一种或多种细胞类型分化；并通过比较候选化合物存在或不存在时的波长峰值或有效折射率变化，来检测候选化合物存在或不存在时细胞分化的变化。与候选化合物不存在时的细胞分化活性相比，在化合物存在时细胞分化活性的变化表示候选化合物调节细胞分化的能力。细胞分化活性的变化可以是细胞分化活性提高、细胞分化活性降低、细胞分化活性受抑制、干细胞自我更新增加或减少和/或分化细胞类型改变。细胞分化活性的变化可以是胶原产生的增加或减少。细胞分化活性的变化可以是矿化结节 (mineralized nodule) 形成的增加或减少。一种或多种细胞类型可以是干细胞。一种或多种细胞类型可以是间充质干细胞。可通过检测细胞大小、细胞形状、细胞膜电位、细胞代谢活性或细胞对信号的反应性的变化，来检测细胞分化活性的改变。候选化合物可以是抑制性核酸分子。

[0019] 本发明的又一个实施方案提供用于筛选候选化合物调节细胞分化的能力的方法。该方法包括将一种或多种细胞类型加到比色共振反射生物传感器、基于光栅的波导生物传感器或介电薄膜叠式生物传感器的表面上；诱导一种或多种细胞类型分化；并通过比较候选化合物存在或不存在时的波长峰值或有效折射率，来检测候选化合物存在或不存在时一种或多种细胞分化产物的产生。与候选化合物不存在时一种或多种细胞分化产物相比，候选化合物存在时一种或多种细胞分化产物的变化表示候选化合物调节细胞分化的能力。细胞分化产物可以是胶原或矿化结节。一种或多种细胞类型可以是干细胞。一种或多种细胞类型可以是间充质干细胞。候选化合物可以是抑制性核酸分子。

[0020] 本发明的另一个实施方案提供包含以下的比色共振反射生物传感器光栅表面、基于光栅的波导生物传感器光栅表面或介电薄膜叠式生物传感器光栅表面：固定在生物传感器光栅表面上或与生物传感器光栅表面缔合 (associate) 的一种或多种特异性结合物质；和在一种或多种特异性结合物质上的一层凝胶或凝胶样物质。生物传感器光栅表面可形成盛液容器的内表面。盛液容器可以是微量滴定板或微观流体槽。

[0021] 本发明又一个实施方案提供包括一个或多个比色共振反射生物传感器光栅表面、一个或多个基于光栅的波导生物传感器光栅表面或介电薄膜叠式生物传感器光栅表面和一个或多个凝胶或凝胶样物质的容器的试剂盒。试剂盒还可包括装有一种或多种特异性结合物质的容器。一个或多个比色共振反射生物传感器光栅表面、基于光栅的波导生物传感器光栅表面或介电薄膜叠式生物传感器光栅表面可包含固定在生物传感器光栅表面上或者与生物传感器光栅表面缔合的一种或多种特异性结合物质。

[0022] 本发明的又一个实施方案提供用于在比色共振反射生物传感器光栅表面、基于光栅的波导生物传感器光栅表面或介电薄膜叠式生物传感器光栅表面上检测特异性结合物质和结合配偶体之间的反应的改进方法。该方法包括将一种或多种特异性结合物质加到生物传感器光栅表面上，使得一种或多种特异性结合物质固定在生物传感器光栅表面上或者与生物传感器光栅表面缔合，并将凝胶或凝胶样物质加到生物传感器表面上。

[0023] 本发明的又一个实施方案提供从混合细胞群中分选两种或更多种细胞类型并检

测分选细胞对刺激、培育或试验试剂的反应的方法,其中分选和检测发生在一个生物传感器表面上。该方法包括将混合细胞群加到一个比色共振反射生物传感器表面、一个基于光栅的波导生物传感器表面或一个介电薄膜叠式生物传感器表面上,其中一个生物传感器表面具有两种或更多种类型的特异性结合物质固定在其一个表面上,且其中两种或更多种特异性结合物质可潜在结合混合细胞群中的一种或多种细胞类型;从生物传感器的一个表面上洗去未结合细胞,使得一种或多种细胞类型与生物传感器表面结合并在生物传感器表面上分选;将一种或多种结合细胞类型暴露于刺激、培育或试验试剂;并检测一种或多种结合细胞类型对刺激、培育或试验试剂的反应。两种或更多种特异性结合物质可包含一种或多种胞外基质蛋白与一种或多种其它特异性结合物质的组合。一个生物传感器表面可以是微量滴定板孔的底部。两种或更多种细胞类型和试验试剂不含可检测标记。

[0024] 本发明的另一个实施方案提供从混合细胞群中分选一种或多种细胞类型并且在一个生物传感器表面上从一种或多种细胞类型中检测胞内分析物的方法。该方法包括将混合细胞群加到一个比色共振反射生物传感器表面、一个基于光栅的波导生物传感器表面或一个介电薄膜叠式生物传感器表面上,其中一个生物传感器表面具有两种或更多种特异性结合物质固定在其一个表面上,其中两种或更多种特异性结合物质包含 (i) 特异性结合混合细胞群中的一种或多种细胞类型的第一特异性结合物质和 (ii) 特异性结合一种或多种细胞类型的一种或多种胞内分析物的第二特异性结合物质;洗去生物传感器表面上的未结合细胞,使得一种或多种细胞类型与生物传感器表面结合并且在生物传感器表面上分选;使一种或多种结合细胞类型溶解或透化;洗去生物传感器表面上的任何未结合的分析物;并检测固定在生物传感器表面上的胞内分析物。第一特异性结合物质可包含一种或多种胞外基质蛋白。可在使一种或多种结合细胞类型溶解或透化之前将细胞培育一段时间,或者暴露于刺激,或者暴露于试验试剂。一个传感器表面可以是微量滴定板孔的底部。混合细胞群和两种或更多种特异性结合物质不含可检测标记。

[0025] 本发明又一个实施方案提供从混合细胞群中分选一种或多种细胞类型并在一个生物传感器表面上检测一种或多种细胞类型的分析物的方法。该方法包括将混合细胞群加到一个比色共振反射生物传感器表面、一个基于光栅的波导生物传感器表面或一个介电薄膜叠式生物传感器表面上,其中一个生物传感器表面具有两种或更多种特异性结合物质固定在其一个表面上,其中两种或更多种特异性结合物质包含 (i) 特异性结合混合细胞群中的一种或多种细胞类型的第一特异性结合物质和 (ii) 特异性结合一种或多种细胞类型的一种或多种分析物的第二特异性结合物质;洗去生物传感器表面上的未结合细胞,使得一种或多种细胞类型与生物传感器表面结合并且在生物传感器表面上分选;将试验试剂加到细胞中,或培育细胞,或使细胞暴露于刺激或其组合;并检测固定在生物传感器表面上的分析物。第一特异性结合物质可以是一种或多种胞外基质蛋白。一个生物传感器表面可以是微量滴定板孔的底部。混合细胞群和两种或更多种特异性结合物质不含可检测标记。

[0026] 附图简述

[0027] 图 1 表示 SH-SY5Y 细胞对比色共振反射生物传感器微孔板上的毒蕈碱配体、P2Y 配体和 β 抑制蛋白配体的特征反应。

[0028] 图 2 表示当细胞位于包含 PBS/ 卵清蛋白、纤连蛋白、胶原或层粘连蛋白的比色共振反射生物传感器上时, mP-M5 和 mP-M4 细胞对以下 3 种配体的反应:乙酰胆碱、卡巴胆碱

和毛果芸香碱。

[0029] 图 3A 表示由与比色共振反射生物传感器连接的 M5 细胞产生的信号。图 3B 表示细胞与生物传感器连接后 30 分钟完成的扫描。

[0030] 图 4A 表示细胞顶面（连接比色共振反射生物传感器的细胞的相对面）的细胞相差图，而图 4B 表示细胞底面（结合生物传感器的细胞的一面）的相同细胞的连接信号。

[0031] 图 5A 表示 M5 细胞对比色共振反射生物传感器的连接反应。图 5B 表示 M5 细胞对加入卡巴胆碱的反应。

[0032] 图 6 表示加到比色共振反射生物传感器上的 M4 细胞和 RBL 亲代细胞的混合群。M4 细胞具有比 RBL 细胞多的卡巴胆碱受体。然后将 10 μ M 卡巴胆碱加入细胞中。中图表示卡巴胆碱加入细胞中后 30 分钟 3 : 1 比率的 M4 细胞 : RBL 细胞。右图表示加入卡巴胆碱后 30 分钟 1 : 3 比率的 M4 细胞 : RBL 细胞。图 6 的中图显示比右图多的信号，因为存在的 M4 细胞比 RBL 细胞多，各 M4 细胞具有更多的卡巴胆碱受体。

[0033] 图 7 表示与包含卵清蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白或胶原的比色共振反射生物传感器连接的大鼠 MSC 细胞。

[0034] 图 8 表示将细胞加到比色共振反射生物传感器上后不久（图 8A）和在生物传感器上 16 小时后（图 8B）的大鼠 MSC 细胞。

[0035] 图 9 表示大鼠 MSC 细胞在 30 小时内在比色共振反射生物传感器表面上的移动。左边的箭头（指向深色斑点）表示细胞在其与生物传感器表面连接后不久的所在位置，右边的箭头（指向浅色斑点）表示细胞在与生物传感器表面连接后 30 小时的所在位置。

[0036] 图 10 表示使用比色共振反射生物传感器微孔板和 BIND [®] READER 所得的，THP-1 细胞（图 10A）和 CEM 细胞（图 10B）对不同浓度的 SDF-1 α 的反应。

[0037] 图 11A 表示 MSC 细胞对比色共振反射生物传感器微孔板上的 SDF-1 α 的反应。图 11B 表示 MSC 细胞（384 孔微量培养板上 7,000 个细胞）对 SDF-1 α 和抑制剂（CXCR4 封闭性抗体）的反应。

[0038] 图 12 表示用纤连蛋白包被的生物传感器上的大鼠 MSC 细胞。在 3 小时和 16 小时在比色共振反射生物传感器上检测细胞连接（左图）。将连接信号清零后，用或不用 SDF-1 α 刺激细胞（右图）。细胞的移动可参见图 12 右图。较深的斑点是检测前细胞所处位置，而较浅的斑点是当检出反应物时细胞所处位置。如果不将刺激加到细胞中，则可观察到细胞有些移动；然而，如果将 SDF-1 α 加入细胞中，则观察到随同细胞在生物传感器上散开的细胞移动。

[0039] 图 13A-B 表示图 12 右图的放大图。在发生移动和 / 或细胞粘附的细胞边缘上观察到信号增强。增强的信号与细胞跨过生物传感器移动时的细胞前缘有关，正如通过延时成像证实的一样。

[0040] 图 14 表明 BIND [®] READER（图 14A）和 BIND [®] SCANNER（图 14B）的读数。观察到信噪比改进约 7-10 倍。

[0041] 图 15 表示升离测定（lift-off assay）示意图。

[0042] 图 16 表示与对照孔相比，在 MATRIGEL[™] 基底膜基质存在下 MSC 细胞升起离开生物传感器。可容易地用 MATRIGEL[™] 涂层鉴定 MSC 连接信号。与对照孔相比，MSC 显示升起离开生物传感器的趋势。这通过图 16 中黑色部分所显示的负 PWV 变化来证实。

[0043] 图 17 表示在用胶原包被的生物传感器上被诱导分化为成骨细胞的大鼠 MSC。到第 14 天,细胞矿化并产生骨。

[0044] 图 18 表示在用胶原包被的生物传感器上被诱导分化为成骨细胞的大鼠 MSC。到第 14 天,细胞矿化并产生骨。

[0045] 使用茜素红染料证实细胞确实产生了骨。自前一日对图像基线化。

[0046] 图 19A 表示图 18 的第 17 天图的近视图。白色区域是成骨细胞的矿化。图 19B 表示相同细胞部分的相差显微图。相差显微图未显示细胞分化。

[0047] 图 20 表示以 100 个细胞 / 孔接种在 384 孔比色共振反射生物传感器上并用成骨细胞分化培养基处理的大鼠 MSC(Invitrogen)。在 BIND® SCANNER 上获得每日图像,并基线化到至第 0 天细胞连接信号。正如茜素红染色的平行孔所表明的一样,在骨样矿物质沉积在传感器表面时,观察到逐步和稳步的 PWV 变化(约 25nM)(图 20A)。一种糖原合酶激酶 3(GSK3 β) 的抑制剂加快 MSC-成骨细胞分化。图 20B 表示由 GSK3 β 引起的加速分化的检测。图 20C 表明在检测矿化时 BIND® SCANNER 比茜素红染色敏感。

[0048] 图 21 表示 BIND™ 生物传感器上分化的 MSC。表明胶原形成在矿化之前,这与正常的骨形成一致。

[0049] 图 22 表示在有或没有 GSK3 β 抑制剂时在成骨细胞分化培养基中培养 1-19 天的大鼠 MSC。每天收集 BIND™ 图像,并基线化至前一天的测量,从而提供有关矿化率的信息(图 22A)。图 22B 表示在 BIND® SCANNER 上测定的 PWV 变化的定量(+/- 标准差, n = 12 孔)。

[0050] 图 23 表示阻断 MSC 迁移的抗体,还显示孔中心非常亮的长方形的正 PWV 变化,表示 PDGF-BB 抗体与点在生物传感器上的 PDGF-BB 的相互作用。图 23 中,“趋化因子 X”是 PDGF-BB;“趋化因子 X nAb”是对 PDGF-BB 有特异性的中和抗体。

[0051] 图 24 表示接种在 384 孔比色共振反射生物传感器板上的人 MSC。将细胞用成骨细胞分化混合物处理。每日测量 PWV。给出了未处理细胞(Ctrl)和成骨细胞分化的(OS-Diff)细胞的代表性孔。

[0052] 图 25 表示当将对 GSK3 β 和 ADK 有特异性的 siRNA 分子在临分化前转染至人 MSC 中时,在无标记测定中在 BIND® SCANNER 上检测的加快的成骨细胞分化。图中给出第 12 天几个处理条件的样品孔。

[0053] 图 26 对图 25 所示结果量化。

[0054] 图 27 表示以 1 : 1 比率混合并接种在比色共振反射生物传感器孔中的 RBL 和 M5/RBL 细胞。使细胞与生物传感器连接,并在 BIND® SCANNER 上检测连接反应。结果见图 27A 和图 27B。细胞与乙酰胆碱的反应见图 27C 和图 27D。

[0055] 发明详述

[0056] 本文使用的单数形式包括复数对象,除非文中另有明确说明。

[0057] 生物传感器

[0058] 本发明的生物传感器可以是比色共振反射生物传感器。参见例如 Cunningham 等, " Colorimetric resonant reflection as a direct biochemical assay technique(作为直接生物化学测定技术的比色共振反射), " Sensors and Actuators B, 第 81 卷,第 316-328 页,2002 年 1 月 5 日;美国专利公开号 2004/0091397、美国专利号 7,094,595、美国专利号 7,264,973。比色共振生物传感器不是表面等离子共振(SPR)生物

传感器。SPR 生物传感器具有薄金属层,例如银、金、铜、铝、钠和铟。金属必须具有能够与合适波长的光共振的导带电子。暴露于光的 SPR 生物传感器表面必须为纯金属。氧化物、硫化物和其它薄膜干扰 SPR。比色共振生物传感器没有金属层,而是具有高折射率材料的介电涂层,例如硫化锌、二氧化钛、氧化钽和氮化硅。

[0059] 本发明的生物传感器还可以是介电薄膜叠式生物传感器(参见例如美国专利号 6,320,991)、衍射光栅生物传感器(diffraction grating biosensor)(参见例如美国专利号 5,955,378、6,100,991)和衍射反常生物传感器(diffraction anomaly biosensor)(参见例如美国专利号 5,925,878、RE37,473)。介电薄膜叠式生物传感器包含在具有开槽表面或光栅表面的基底上形成的一叠介电层(参见例如美国专利号 6,320,991)。生物传感器从至少一个入射角接受光,部分光在介电层内传播。通过检测光学性反常的变化(即共振峰或谷(notch)的变化)来测定样品介质的参数。可以共振角的变化或共振波长的变化来检测光学性反常的变化。

[0060] 可用于本发明方法的其它生物传感器包括描述于例如美国专利号 5,738,825 的基于光栅的波导生物传感器。基于光栅的波导生物传感器包含将入射光场连接(incouple)到波导薄膜中以产生衍射光场的波导薄膜和衍射光栅。检测波导薄膜的有效折射率的改变。其中波必须在装置内传送相当距离的装置,例如基于光栅的波导生物传感器,缺乏比色共振反射生物传感器的空间分辨率。

[0061] 比色共振反射生物传感器可供在生物传感器表面上测定生化相互作用而又无需使用荧光标签、比色标记或任何其它类型的检测标签或检测标记。介电薄膜叠式生物传感器的运作与比色共振反射生物传感器的非常相似。生物传感器表面含有这样的光学结构,其被设计成当用准直光和/或白光照射时,只反射或透射窄带波长(“共振光栅效应(resonant grating effect)”)。对于反射,窄波长带描述为波长“峰”。对于透射,窄波长带描述为波长“谷(dip)”。当将材料(例如生物材料)沉积到或从生物传感器表面去除时,“波长峰值”(PWV)改变。还可检测波长谷。使用读出仪器用准直光和/或白光照射生物传感器表面的独特位置,并收集反射光。将收集的光集中到波长分光计中以测定 PWV。

[0062] 可通过使结构(生物传感器面向上)与无底微量滴定板盒(microtiter plate cartridge)底部结合将生物传感器整合到标准的一次性实验器材(例如微量滴定板)上。对于与现有的微量滴定板处理设备(例如混合器、培养箱和液体分配装置)的兼容性,生物传感器与通用实验板盒的整合是合乎需要的。还可将生物传感器与例如微观流体、宏观液体或微阵列装置整合(参见例如美国专利号 7,033,819、美国专利号 7,033,821)。生物传感器可与本领域众所周知的方法一起使用(参见例如 Methods of Molecular Biology,由 Jun-Lin Guan 主编,第 294 卷,Humana Press, Totowa, New Jersey),以在暴露于一种或多种胞外试剂时,监测细胞行为变化或这些变化的缺乏。

[0063] 比色共振反射生物传感器包含子波长结构化表面(subwavelength structured surface, SWS),并且是可模拟薄膜涂层的效果的非传统衍射光学类型(Peng 和 Morris, “Resonant scattering from two-dimensional gratings(二维光栅的共振散射),” J. Opt. Soc. Am. A, 第 13 卷,第 5 期,第 993 页,1996 年 5 月;Magnusson 和 Wang, “New principle for optical filters(滤光器的新原理),” Appl. Phys. Lett., 61, 第 9 期,第 1022 页,1992 年 8 月;Peng 和 Morris, “Experimental demonstration of resonant anomalies

in diffraction from two-dimensional gratings(二维光栅衍射的共振异常的实验证明),”*Optics Letters*,第21卷,第8期,第549页,1996年4月)。SWS结构含有一维、二维或三维光栅,其中光栅周期比入射光波长的小,使得不允许反射和透射零阶以外的衍射阶次传播。不支持横向波导模的传播。更确切地说,波导模共振效应发生在距任何光子进入生物传感器结构的点约3微米的十分有限的区域内。

[0064] 可通过将分子例如配体、特异性结合物质、细胞或结合配偶体或两者加到生物传感器的上表面来调节比色共振反射生物传感器的反射光或透射光。所加入的分子增加入射辐射通过结构的光程长度,并因此修正可能发生最大反射比或透射比的波长。

[0065] 在一个实施方案中,设计了当用白光和/或准直光照射时反射单波长或窄带(例如约1-10nm)波长(“共振光栅效应”)的比色共振反射生物传感器。当将物质沉积在生物传感器表面上时,由于生物传感器上显示的光的光程改变而使反射波长改变。

[0066] 检测系统由例如光源和分光计组成,光源通过例如光纤探头以正入射照射生物传感器的某一小点,分光计通过例如第二光纤探头同样以正入射收集反射光。由于在激发/检测系统和生物传感器表面之间不发生实体接触,所以不需要特殊的耦合棱镜,且生物传感器可容易地适于任何常用的测定平台,包括例如微量滴定板。可在几毫秒内进行一次分光计读数,因此可快速测定生物传感器表面上平行发生的大量的分子相互作用,并实时监测反应动力学。

[0067] 比色共振反射生物传感器包含例如光栅,其由高折射率材料、支持光栅的基底层和任选一种或多种固定在基底层相对面的光栅表面上的特异性结合物质或接头组成。高折射率材料具有比基底层高的折射率。参见例如美国专利号7,094,595、美国专利号7,070,987。任选覆盖层覆盖光栅表面。光栅涂有高折射率介电薄膜,该薄膜可由包括例如硫化锌、二氧化钛、氧化钽、氮化硅和二氧化硅的材料组成。具有光学特征的光栅的截面轮廓可包含任何周期性重复功能,例如“方波”。光栅还可包含选自以下形状的重复图式:线形(一维)、正方形、圆形、椭圆形、三角形、梯形、正弦波、卵形、矩形和六边形。本发明的比色共振反射生物传感器还可包含由例如塑料或环氧树脂组成的光栅,所述光栅用高折射率材料包覆。

[0068] 线性光栅(即一维光栅)具有其中照射光偏振垂直于光栅周期定向的共振特性。比色共振反射生物传感器还可包含例如二维光栅,例如孔或方格的六边形阵列。也可使用其它形状。线性光栅具有与六边形阵列光栅相同的节距(pitch)(即高折射率区和低折射率区之间的距离)、周期、层厚度和材料性质。然而,为了与光学结构共振耦合,光必须垂直于光栅线偏振。因此,必须将其偏振轴垂直于线性光栅定位的偏振滤波器插入发光源和生物传感器表面之间。因为仅少部分的发光源被正确的偏振,与六边形光栅相比,需要较长的积分时间收集等量的共振反射光。

[0069] 光栅还可包含例如“台阶式”轮廓,其中将单一固定高度的高折射率区包埋在较低折射率的覆盖层中。高折射率和低折射率的交替区提供与生物传感器顶面平行的光波导。

[0070] 本发明的比色共振反射生物传感器还可包含基底层相对面的光栅表面上的覆盖层。如果覆盖层存在,则将一种或多种特异性结合物质固定在光栅相对面的覆盖层表面上。优选覆盖层包含具有比包含光栅的材料低的折射率的材料。覆盖层可由例如玻璃(包括旋涂玻璃(spun-on glass, SOG))、环氧树脂或塑料组成。

[0071] 例如,可将符合生物传感器的折射率要求的各种聚合物用于覆盖层。由于其有利的折射率、易于操作和采用多种玻璃表面活化技术用特异性结合物质激活的便利,因此可使用 SOG。如果生物传感器表面的平直度对特定系统设置不是问题,则 SiN/ 玻璃的光栅结构可直接用作敏感表面,可采用与在玻璃表面上一样的方法对其进行活化。

[0072] 可获得共振反射而又不使光栅上的覆盖层偏振。例如,生物传感器可只含有用高折射率材料的结构化薄膜层涂覆的基底。无需使用偏振覆盖层,周围的介质(例如空气或水)便会充满光栅。因此,特异性结合物质被固定在暴露于特异性结合物质的光栅的所有表面上的,而不只是在上表面上的生物传感器上。

[0073] 总的来说,比色共振反射生物传感器可用容纳每个偏振角的光的白光和 / 或准直光照射。偏振角相对于生物传感器光栅中的重复特征的方向决定共振波长。例如,由一组重复线条和间隙组成的“线性光栅”(即一维光栅)生物传感器具有可产生单独共振反射的两种光偏振。垂直于线条偏振的光称为“s 偏振”,而平行线条偏振的光称为“p 偏振”。入射光的 s 和 p 分量两者在未过滤发光束中同时存在,而且各自产生独立的共振信号。一般可将生物传感器设计成仅使一种偏振(s 偏振)的性质最优化,非最优化的偏振容易通过偏振滤波器去除。

[0074] 为了去除偏振依赖性,使得每个偏振角产生相同的共振反射谱,可以使用由一组同心环组成的交替生物传感器结构。在这种结构中,各个同心环的内径和外径之间的差异等于约光栅周期的二分之一。每个相继的环具有比前一环内径大约 1 个光栅周期的内径。同心环图式延伸以覆盖单个传感器位置—例如阵列点或微量滴定板孔。每个单独的微阵列点或微量滴定板孔具有单独的同心环图式位于其内。这类结构的所有偏振方向具有相同的截面轮廓。必须准确照射同心环结构的中心以保持偏振独立性。同心环结构的光栅周期小于共振反射光的波长。光栅周期为约 0.01 微米至约 1 微米。光栅深度为约 0.01 微米至约 1 微米。

[0075] 在另一个实施方案中,将孔或柱(post)的阵列排列以紧密接近上述同心圆结构而不需要将照射光束集中在任何特定的网格位置上。通过 3 个激光束以相同角度从三个方向射在表面上的光干涉自动产生这类阵列图式。在这种图式中,孔(或柱)集中在紧密排列的六边形的阵列的角落中。孔或柱还出现在各六边形的中心。孔或柱的这类六边形网格具有 3 个“看到(see)”相同截面轮廓的偏振方向。因此,使用任何偏振角的光,六边形网格结构都会提供等效的共振反射谱。因此,不需要偏振滤波器去除不需要的反射信号分量。孔或柱的周期可为约 0.01 微米至约 1 微米,深度或高度可为约 0.01 微米至约 1 微米。

[0076] 检测系统可包括比色共振反射生物传感器、将光导向比色共振反射生物传感器的光源和检测从生物传感器反射的光的检测器。在一个实施方案中,可通过应用滤波器简化读出仪器,使得仅超出确定阈值的阳性结果引发检测。

[0077] 通过测定本发明的比色共振反射生物传感器各个独特位置上的共振波长的变化,可确定哪些独特位置具有例如沉积在其上的生物材料。变化的程度可用来测定例如试验样品中结合配偶体的量和一种或多种特异性结合物质与试验样品的结合配偶体之间的化学亲和力。

[0078] 可照射比色共振反射生物传感器两次。第一次测量测定例如将细胞加入生物传感器之前,生物传感器的一个或多个独特位置的反射谱。第二次测量测定例如将一种或多种

细胞加到生物传感器之后的反射谱。这两次测量之间的波长峰值的差异是生物传感器上细胞的存在情况、量或状态的度量。这种照射方法可控制生物传感器表面的小缺陷,所述缺陷可导致区域具有峰值共振波长的微小变化。这种方法还可控制生物传感器上细胞物质的不同浓度或密度。还可照射比色共振反射生物传感器两次以上,测定并记录 PWV。例如,1 秒钟可照射生物传感器 1、2、4、5 或 10 次,或 1 分钟、或每 1 分钟、5 分钟、10 分钟、20 分钟或 60 分钟照射 1、2、3、4、5、10、20 或 30 次,或一天照射 1、2、3、4、5、10 或更多次。

[0079] 检测系统

[0080] 检测系统可包括生物传感器、将光导向生物传感器的光源和检测从生物传感器反射的光的检测器。在一个实施方案中,可通过应用滤波器来简化读出仪器,使得只有超出确定阈值的阳性结果引发检测。

[0081] 光源可从其顶面(即固定有一种或多种特异性结合物质的表面)或从其底面照射比色共振反射生物传感器。通过测定本发明的生物传感器的各个独特位置上的共振波长的变化,可测定哪些独特位置具有与之结合的结合配偶体。变化的程度可用来测定试验样品中结合配偶体的量和一种或多种特异性结合物质与试验样品的结合配偶体之间的化学亲和力和。

[0082] 用于照射生物传感器表面和用于收集反射光的检测系统的一种类型是含有例如 6 个与光源连接的照射光纤和一个与分光计连接的收集光纤的探头。光纤数目不是关键性的,照射或收集光纤的任何数目都是可行的。光纤以束排列,使得收集光纤位于束的中央,并且被 6 个照射光纤包围。光纤束末端与将照射光聚焦在生物传感器表面上的准直透镜连接。

[0083] 在这种探头排列中,照射光纤和收集光纤是并排的。因此,当准确调整准直透镜使光聚焦在生物传感器表面上时,会观察到 6 个界限分明的环形照射区和中心暗区。因为生物传感器不散射光,而是反射准直光束,因此光不入射到收集光纤,而且观察不到共振信号。只有通过使准直透镜散焦直到 6 个照射区在中心区重叠,任何光才反射到收集光纤。由于只是散焦,所以稍稍未准直的光便可产生信号,不用单一入射角,而是用一系列入射角照射生物传感器。一系列入射角导致共振波长的混合。因此,测量到比其它方式可能测定到的更宽的共振峰。

[0084] 因此,合乎需要的是照射和收集光纤探头在空间上具有相同的光程。可采用若干方法使照射光程和收集光程共处在一起。例如,在其第一末端与将光导向生物传感器的光源连接的单一照射光纤,以及在其第一末端与检测从生物传感器反射的光的检测器连接的单一收集光纤,各自可在其第二末端与可用作发光器和收集器两者的第三光纤探头连接。第三光纤探头与生物传感器成正入射角定位并支持反向传播照射和反射光学信号。

[0085] 另一种检测方法包括使用分束器,所述分束器能够使与光源连接的单一照射光纤与同检测器连接的收集光纤成 90 度角定位。将光通过照射光纤探头导向分束器,分束器将光导向生物传感器。将反射光导回到分束器,而分束器将光导向收集光纤探头中。分束器可供照射光和反射光在分束器和生物传感器之间具有共同的光程,因此可使用精确准直光而无需散焦。

[0086] 生物传感器的表面

[0087] 配体或特异性结合物质是与另一种分子结合的分子。配体和特异性结合物质是类

似术语。配体或特异性结合物质可以是例如核酸、肽、胞外基质配体（参见表 1）、蛋白质溶液、肽溶液、单链或双链 DNA 溶液、RNA 溶液、RNA-DNA 杂合体溶液、含有来自组合化学文库的化合物的溶液、抗原、多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体（scFv）、F(ab) 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、有机小分子、细胞、病毒、细菌、聚合物或生物样品。生物样品可以是例如血液、血浆、血清、胃肠分泌物、组织或肿瘤匀浆物、滑液、排泄物、唾液、痰、囊内液、羊水、脑脊液、腹膜液、肺灌洗液、精液、淋巴液、泪液或前列腺液。聚合物选自每分子具有多个活性部位的长链分子水凝胶、葡聚糖、聚氨基酸及其衍生物，包括聚赖氨酸（包括聚-L-赖氨酸和聚-D-赖氨酸）、聚-phe-赖氨酸和聚-glu-赖氨酸。在本发明的一个实施方案中，配体是胞外基质蛋白配体。

[0088] 例如，将结合配偶体加到包含特异性结合物质、配体或细胞的生物传感器表面以测定例如结合配偶体是否与特异性结合物质、配体或细胞结合，或者是否以任何方式改变特异性结合物质、配体或细胞（例如引起细胞分化或去分化）。结合配偶体可以是例如核酸、肽、胞外基质配体（参见表 1）、蛋白质溶液、肽溶液、单链或双链 DNA 溶液、RNA 溶液、RNA-DNA 杂合体溶液、含有来自组合化学文库的化合物的溶液、抗原、多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体（scFv）、F(ab) 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、有机小分子、细胞、病毒、细菌、聚合物或生物样品。生物样品可以是例如血液、血浆、血清、胃肠分泌物、组织或肿瘤匀浆物、滑液、排泄物、唾液、痰、囊内液、羊水、脑脊液、腹膜液、肺灌洗液、精液、淋巴液、泪液或前列腺液。聚合物选自每分子具有多个活性部位的长链分子水凝胶、葡聚糖、聚氨基酸及其衍生物，包括聚赖氨酸（包括聚-L-赖氨酸和聚-D-赖氨酸）、聚-phe-赖氨酸和聚-glu-赖氨酸。

[0089] 使一种或多种配体固定在生物传感器上，使得配体不会被任何漂洗步骤洗去，并且使得生物传感器表面不会阻碍配体与试验样品中的结合配偶体结合。一种或多种配体可通过物理吸附（即无需使用化学接头）或通过化学结合（即使用化学接头）以及电化学结合、静电结合、疏水结合和亲水结合与生物传感器表面连接。化学结合可导致配体在生物传感器表面上更牢固的连接，并提供方向和构象确定的表面结合分子。在本发明的一个实施方案中，配体或特异性结合物质可与生物传感器表面缔合，使得它不是固定的，但由于重力或者加在配体或特异性结合物质上的凝胶或凝胶样物质仍保持与生物传感器表面缔合。

[0090] 配体或特异性结合物质还可通过以下特异性结合物质与生物传感器表面特异性结合：例如核酸、肽、蛋白质溶液、肽溶液、含有来自组合化学文库的化合物的溶液、抗原、多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体（scFv）、F(ab) 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、有机小分子、病毒、聚合物或生物样品，其中特异性结合物质被固定在生物传感器表面上。

[0091] 此外，可将配体或特异性结合物质排列在生物传感器表面上的一个或多个独特位置阵列中，其中表面可存在于多孔板的一个或多个孔内，并包含多孔板或微阵列的一个或多个表面。配体阵列在微孔板内的生物传感器表面上包含一种或多种配体，使得表面含有各具有不同配体的一个或多个独特位置。例如，阵列可包含 1、10、100、1,000、10,000 或 100,000 个或更多个独特位置。因此，多孔板或微阵列的各孔在其中可具有与多孔板的其它孔分开的一个或多个独特位置的阵列，这可供在一个多孔板上处理多种不同的样品。任何一个孔内的一个或多个阵列可与存在于相同微量滴定板的任何其它微量滴定板孔中的一个或多个阵列相同或不同。另外，本发明的阵列可以任何规则或不规则图式类型包含一种

或多种特异性结合物质。例如独特位置可限定一种或多种结合物质的点的阵列。阵列点的直径可为约 10、20、30、40、50、100、200、300、400 或 500 微米。

[0092] 特异性结合物质与加到本发明的生物传感器表面上的结合配偶体（即细胞或细胞上的分子）特异性结合，使得细胞固定在生物传感器上。特异性结合物质与其结合配偶体特异性结合，但基本不与加到生物传感器表面上的其它结合配偶体结合。例如，当特异性结合物质是抗体，其结合配偶体是特定抗原时，抗体与特定抗原特异性结合，但基本不与其它抗原结合。结合配偶体可以是例如细胞或存在于细胞上或细胞内的任何分子，例如核酸、重组核酸、蛋白质、重组蛋白、胞外基质蛋白受体、脂质或碳水化合物。在本发明的一个实施方案中，结合配偶体是可与固定在生物传感器上的特异性结合物质结合的受体，其中受体位于细胞表面。

[0093] 虽然微量滴定板是用于生化测定的最普遍形式，但微阵列越来越被视为使一次可测量的生化相互作用的数量最大化同时使贵重试剂的体积减到最小的手段。通过用微阵列点样器 (spotter) 将特异性结合物质加到本发明的一个生物传感器表面，可获得密度为 10,000 个特异性结合物质 /in² 的特异性结合物质。通过将照射光束聚焦以探测单一微阵列位置，生物传感器便可用作无标记微阵列读出系统。

[0094] 还可通过与例如下列官能接头结合来影响配体与生物传感器表面的固定：镍基、胺基、醛基、酸基、烷基、烯基、炔基、芳基、醇基、醚基、酮基、酯基、酰胺基、氨基酸基、硝基、腈基、糖基、巯基、有机磷酸基、脂基、磷脂基或类固醇基。此外，配体可通过物理吸附、化学结合、电化学结合、静电结合、疏水结合或亲水结合和免疫捕获方法固定在生物传感器表面上。

[0095] 在本发明的一个实施方案中，生物传感器可用例如以下接头包覆：镍基、胺基、醛基、酸基、烷基、烯基、炔基、芳基、醇基、醚基、酮基、酯基、酰胺基、氨基酸基、硝基、腈基、糖基、巯基、有机磷酸基、脂基、磷脂基或类固醇基。例如，胺表面可用来连接若干类型的接头分子，而醛表面可用来直接结合蛋白质而不需要加入接头。镍表面可用来结合已掺入组氨酸 (“his”) 标签的分子。用镍激活表面检测“加 his 标签”的分子是本领域众所周知的 (Whitesides, Anal. Chem. 68, 490, (1996))。

[0096] 可将接头、配体和特异性结合物质固定在生物传感器表面上，使得每孔都有固定在其中的相同的接头、配体和 / 或特异性结合物质。或者，各孔可含有接头、配体和 / 或特异性结合物质的不同组合。

[0097] 配体或特异性结合物质与固定在生物传感器表面上的接头特异性或非特异性结合。或者，生物传感器的表面可能无接头，且配体或特异性结合物质可与生物传感器表面非特异性结合。

[0098] 使一种或多种特异性结合物质或接头固定在生物传感器上，使得特异性结合物质或接头不会被漂洗步骤洗去，而且生物传感器表面不阻碍其与试验样品中的配体的结合。可实施若干不同类型的表面化学策略以使特异性结合物质与例如用于各种类型的微阵列和生物传感器的玻璃共价连接。可容易地使这些相同方法适于本发明的生物传感器。使之含有用于结合一种或多种特异性结合物质的合适官能团的生物传感器的表面制备是生物传感器制造过程的必要部分。

[0099] 可通过物理吸附（即无需使用化学接头）或通过化学结合（即使用化学接头）以

及电化学结合、静电结合、疏水结合和亲水结合,使一种或多种特异性配体或特异性结合物质与生物传感器表面连接。化学结合可导致配体在生物传感器表面上更牢固的连接,并提供方向和构象确定的表面结合分子。

[0100] 将配体固定于塑料、环氧树脂或高折射率材料上基本上可按照固定在玻璃上所述方法进行。然而,如果这类处理将破坏固定有特异性结合物质的材料,则可排除酸洗步骤。

[0101] 细胞(例如原代细胞或干细胞)可通过一种或多种配体固定在生物传感器上。在本发明的一个实施方案中,细胞通过与胞外基质配体反应而固定在生物传感器上。整联蛋白是与胞外基质(ECM)相互作用并介导胞内信号的细胞表面受体。整联蛋白负责细胞骨架组织、细胞移动、细胞周期调节、整联蛋白亲和力的细胞调节、细胞与病毒连接、细胞与其它细胞或ECM连接。整联蛋白还负责信号转导,一种细胞藉此将一种信号或刺激在胞内和胞间转变成另一种信号或刺激的过程。整联蛋白可将ECM的信息转导至细胞,并将细胞的信息转导至其它细胞(例如通过其它细胞上的整联蛋白)或转导至ECM。整联蛋白及其ECM配体列表可参见Takada等,Genome Biology 8:215(2007),如下表1所示。

[0102] 表 1

整联蛋白	ECM 配体
$\alpha_1\beta_1$	层粘连蛋白、胶原
$\alpha_2\beta_1$	层粘连蛋白、胶原、血小板反应蛋白、E-钙黏着蛋白、生腱蛋白
$\alpha_3\beta_1$	层粘连蛋白、血小板反应蛋白、uPAR
$\alpha_4\beta_1$	血小板反应蛋白、MadCAM-1、VCAM-1、纤连蛋白、骨桥蛋白、ADAM、ICAM-4
$\alpha_5\beta_1$	纤连蛋白、骨桥蛋白、肌原纤蛋白、血小板

[0104]

	反应蛋白、ADAM、COMP、L1
$\alpha_6\beta_1$	层粘连蛋白、血小板反应蛋白、ADAM、Cyr61
$\alpha_7\beta_1$	层粘连蛋白
$\alpha_8\beta_1$	生腱蛋白、纤连蛋白、骨桥蛋白、玻连蛋白、LAP-TGF- β 、nephronectin
$\alpha_9\beta_1$	生腱蛋白、VCAM-1、骨桥蛋白、uPAR、纤溶酶、制管张素、ADAM、VEGF-C、VEGF-D
$\alpha_{10}\beta_1$	层粘连蛋白、胶原
$\alpha_{11}\beta_1$	胶原
$\alpha_V\beta_1$	LAP-TGF- β 、纤连蛋白、骨桥蛋白、L1
$\alpha_L\beta_2$	ICAM、ICAM-4
$\alpha_M\beta_2$	ICAM、iC3b、因子 X、血纤蛋白原、ICAM-4、肝素
$\alpha_X\beta_2$	ICAM、iC3b、血纤蛋白原、ICAM-4、肝素、胶原
$\alpha_D\beta_2$	ICAM、VCAM-1、血纤蛋白原、纤连蛋白、玻连蛋白、Cyr61、纤溶酶原
$\alpha_{IIb}\beta_3$	血纤蛋白原、血小板反应蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、vWF、Cyr61、ICAM-4、L1、CD40 配体
$\alpha_V\beta_3$	血纤蛋白原、玻连蛋白、vWF、血小板反应蛋白、肌原纤蛋白、生腱蛋白、PECAM-1、纤连蛋白、骨桥蛋白、BSP、MFG-E8、ADAM-15、COMP、Cyr61、ICAM-4、MMP、FGF-2、uPA、uPAR、L1、制管张素、纤溶酶、心脏毒素、LAP-TGF- β 、Del-1
$\alpha_6\beta_4$	层粘连蛋白
$\alpha_V\beta_5$	骨桥蛋白、BSP、玻连蛋白、CCN3 [35]、LAP-TGF- β
$\alpha_V\beta_6$	LAP-TGF- β 、纤连蛋白、骨桥蛋白、ADAM
$\alpha_4\beta_7$	MAcCAM-1、VCAM-1、纤连蛋白、骨桥蛋

	白
[0105]	$\alpha E\beta_7$ E-钙黏着蛋白
	$\alpha v\beta_8$ LAP-TGF- β

[0106] 缩略语:ADAM,一种解联蛋白金属蛋白酶;BSP,骨唾液酸蛋白(bone salicprotein);CCN3,一种胞外基质蛋白;COMP,软骨寡聚物基质蛋白,Cyr61,富半胱氨酸蛋白61;L1,CD171;LAP-TGF- β 潜伏状态相关肽;iC3b,灭活补体组分3;PECAM-1,血小板和内皮细胞粘附分子1;uPA,尿激酶;uPAR,尿激酶受体;VEGF,血管内皮生长因子;vWF,von Willebrand 因子。

[0107] 与ECM相互作用的其它细胞表面受体包括黏着斑蛋白。黏着斑蛋白形成使细胞的细胞骨架与ECM连接的大的复合体。黏着斑蛋白包括例如踝蛋白、 α -辅肌动蛋白、细丝蛋白、纽蛋白、黏着斑激酶、桩蛋白、parvin、actopaxin、nexilin、丝束蛋白、G-肌动蛋白、波形蛋白、内居蛋白等等。

[0108] 另外其它的细胞表面受体可包括但不限于可与ECM相互作用的细胞表面受体,包括分化簇(cluster of differentiation, CD)分子。CD分子以多种方式起作用,并常常可用作细胞的受体或配体。与ECM相互作用的其它细胞表面受体包括钙黏着蛋白、黏连蛋白(adherin)和选择蛋白。

[0109] ECM具有许多功能,包括为细胞提供支持和锚定、组织彼此分离和胞内通讯调节。ECM由纤维状蛋白和糖胺聚糖组成。糖胺聚糖是通常与ECM蛋白连接形成蛋白聚糖(包括例如硫酸肝素蛋白聚糖、硫酸软骨素蛋白聚糖、硫酸角质素(karatin sulfate)蛋白聚糖)的糖聚合物。不作为蛋白聚糖存在的糖胺聚糖是透明质酸。ECM蛋白包括例如胶原(包括纤维胶原、facit胶原、短链胶原、基底膜胶原和胶原的其它形式)、纤连蛋白、弹性蛋白和层粘连蛋白(对于ECM蛋白的其它实例参见表1)。本文中可使用的ECM配体包括ECM蛋白、糖胺聚糖、蛋白聚糖和透明质酸。

[0110] “特异性结合”或“对……有特异性”是指细胞表面受体(例如整联蛋白或黏着斑蛋白等)以比其它非特异性分子大的亲和力与关联胞外基质配体结合。非特异性分子基本上不与细胞受体结合。例如,整联蛋白 $\alpha 4/\beta 1$ 特异性结合ECM配体纤连蛋白,但不特异性结合非特异性ECM配体胶原或层粘连蛋白。在本发明的一个实施方案中,细胞表面受体与胞外基质配体的特异性结合(其中胞外基质配体固定在表面(例如生物传感器表面)上),将细胞固定在胞外基质配体上,并因此固定在表面上,使得细胞不会因正常的细胞测定洗涤步骤而被从表面上洗去。

[0111] 与使细胞非特异性固定(即通常所有细胞的固定,而不是通过特异性结合反应(例如细胞表面受体与特异性结合细胞表面受体的抗体结合)固定某些细胞)在生物传感器表面上相比,通过细胞表面受体(例如整联蛋白)与固定在生物传感器上的ECM配体、抗体、关联结合蛋白或肽模拟物结合而使细胞特异性固定在生物传感器表面上,细胞与生物传感器的结合和细胞对刺激的反应显著改变。也就是说,当细胞通过ECM配体结合固定在生物传感器上时,细胞对刺激的反应的检测大大提高或增强。在本发明的一个实施方案中,当将细胞加到生物传感器表面上时,细胞可在无血清培养基中。无血清培养基含有约10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或更少的血清。无血清培养基可包含约0%血清或约0%至约

1%血清。在本发明的一个实施方案中,将细胞加到生物传感器表面上,其中一种或多种类型的 ECM 配体已固定在生物传感器表面。在本发明的另一个实施方案中,将细胞与一种或多种类型的 ECM 配体混合,然后加到生物传感器表面。

[0112] 在本发明的一个实施方案中,将 ECM 配体纯化。纯化 ECM 配体是基本上不含细胞物质、其它类型的 ECM 配体、化学前体、用于制备 ECM 配体的化学制品或其组合的 ECM 配体制备物。基本上不含其它类型的 ECM 配体、细胞物质、培养基、化学前体、用于制备 ECM 配体的化学物质等的 ECM 配体制备物含有的用于制备的其它 ECM 配体、培养基、化学前体和/或其它化学制品低于约 30%、20%、10%、5%、1%或更低。因此,纯化 ECM 配体的纯度为约 70%、80%、90%、95%、99%或更高。纯化 ECM 配体不包括纯度低于 70%的未纯化或半纯化的 ECM 配体制备物或混合物,例如胎牛血清。在本发明的一个实施方案中,ECM 配体未经纯化,并包含 ECM 蛋白和非 ECM 蛋白的混合物。未纯化 ECM 配体制备物的实例包括胎牛血清、牛血清白蛋白和卵清蛋白。

[0113] 例如,表达 $\alpha 4/\beta 1$ 整联蛋白受体(已知其与纤连蛋白配体结合,但不与胶原或层粘连蛋白配体结合)的细胞,在纤连蛋白包被孔上产生的 PWV 变化是在胶原或层粘连蛋白表面上观察到的 PWV 变化的约 8-10 倍大。在胶原或层粘连蛋白与之固定的生物传感器表面上,表达 $\alpha 4/\beta 1$ 整联蛋白受体的细胞的 PWV 变化类似于在 BSA 包被对照孔观察到的背景细胞连接信号。

[0114] 在本发明的一个实施方案中,当 ECM 配体对存在于细胞表面的细胞表面受体(例如整联蛋白或黏着斑蛋白)有特异性时,检测的与 ECM 配体结合的细胞增加约 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 或更多倍(或介于 2 倍和 20 倍之间的任何范围)。在本发明的另一个实施方案中,当细胞通过对细胞表面受体(例如整联蛋白)有特异性的 ECM 配体固定在生物传感器表面上时,检测的对刺激的细胞反应增加约 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 或更多倍(或介于 2 倍和 20 倍之间的任何范围)。

[0115] 一旦细胞通过配体、ECM 或其它方法与生物传感器连接,则可将一种或多种配体加入细胞中以测定细胞对一种或多种配体的反应。

[0116] 盛液容器

[0117] 生物传感器可包括内表面,例如盛液容器的底面。盛液容器可以是例如微量滴定板孔、试管、培养皿、微阵列载玻片、显微镜载玻片、生物传感器表面或微观流体槽。本发明的一个实施方案是整合到任何类型的微量滴定板中的生物传感器。例如,可通过将反应容器的壁装配在生物传感器表面上而将生物传感器整合到微量滴定板底面中,使得各个反应“点”均可暴露于不同的试验样品。因此,各个单独的微量滴定板孔可用作独立的反应容器。因此,独立的化学反应可发生在各个单独的容器(例如无混合反应液的相邻孔)内,并可将化学上不同的试验溶液加入各个容器中。

[0118] 可以采用使本发明的生物传感器或光栅与无底微量滴定板底面连接的若干方法,包括例如黏着连接、超声波焊接和激光焊接。

[0119] 用于药物高通量筛选实验室、分子生物学研究实验室和诊断测定实验室的最常用的测定形式为微量滴定板。板为标准尺寸的塑料盒,其可含有约 2、6、8、24、48、96、384、1536、3456、9600 个或更多个单独的反应容器排列在网格中。由于这些板的标准机械配置,因此设计出液体分配、自动板操作和检测系统与该通用形式一起工作。本发明的生物传感

器可整合到标准微量滴定板底面中。由于可大面积地制造生物传感器表面,而且由于读出系统不与生物传感器表面发生实体接触,因此可限定单个生物传感器区域的任意数目,其仅受限于照射光学的聚焦分辨率和扫描跨越生物传感器表面的照射/检测探头的 x-y 工作台。

[0120] 使用生物传感器的方法

[0121] 本发明的生物传感器可用于平行研究一种或多种特异性结合物质/配体和结合配偶体的相互作用。可通过将一种或多种结合配偶体(例如具有与特异性结合物质结合的受体或抗原或其它分子的细胞)加到具有固定在其表面各个独特位置上的一种或多种特异性结合物质生物传感器的表面上,来检测一种或多种特异性结合物质或配体与其各自的结合配偶体的结合而无需使用标记。在本发明的一个实施方案中,一种或多种特异性结合物质是一种或多种胞外基质蛋白配体,且一种或多种结合配偶体是细胞上的受体,其中受体(例如整联蛋白)对胞外基质蛋白配体有特异性。用光照射生物传感器,并从生物传感器上检测各个独特位置的光反射波长最大值或透射波长最小值。从基于光栅的波导生物传感器中检测信号,并以类似于比色共振反射生物传感器的方式彼此比较或与对照比较。可在比色共振反射生物传感器、衍射反常生物传感器、衍射光栅生物传感器、介电叠式生物传感器和基于光栅的波导生物传感器上进行本文所描述的所有测定或方法。如果一种或多种特异性结合物质在比色共振反射生物传感器上与其各自的结合配偶体结合,则与其中一种或多种特异性结合物质未与其各自的结合配偶体结合的位置相比,该独特位置上的光的反射波长改变。如果生物传感器包覆有含有一种或多种特异性结合物质的一个或多个独特位置的阵列,则从生物传感器各个独特位置上检测光反射波长的最大值或透射波长的最小值。如果一种或多种特异性结合物质在光栅型生物传感器上与其各自的结合配偶体结合,则有效折射率发生改变。

[0122] 在本发明的一个实施方案中,多种特异性结合物质,例如对细胞受体或细胞抗原有特异性的特异性结合物质、对在细胞被一种或多种病毒感染时在细胞表面上表达、下调或上调的蛋白质有特异性的特异性结合物质(参见 Liang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005) 102 :5838) 或者对由与细胞凋亡相关的细胞表达的蛋白质有特异性的特异性结合物质(例如 p53、TNF- α 、TNF- β 、Fas 配体的上调;神经元生长因子和 IL-2 的下调),可以阵列形式固定在本发明的生物传感器上。然后,使生物传感器与包含结合配偶体的目标试验样品接触,结合配偶体例如具有 ECM 配体受体(例如整联蛋白或黏着斑蛋白)的细胞。只将与特异性结合物质特异性结合的细胞固定在生物传感器表面上。在本发明的一个实施方案中,通过 ECM 配体结合的细胞可不与未结合细胞一样地对刺激起反应。不需要使用酶标记、放射性标记或荧光标记等可检测标记检测细胞对刺激、试验试剂或培育时间的反应。对于高通量应用,可将生物传感器排列在阵列的阵列中,其中包含特异性结合物质阵列的若干生物传感器排列在阵列中。可将这类阵列的阵列例如沉在微量滴定板中以一次性进行多项测定。在另一个实施方案中,生物传感器可存在于用于体内检测生化物质的光纤探头末端上。或者,细胞可与 ECM 配体混合或作为细胞和 ECM 的混合物获得,然后加到生物传感器表面上。

[0123] 加到生物传感器上的细胞可以是原核细胞,例如细菌或古细菌或真核细胞,例如动物、真菌、植物和原生生物细胞。细胞可以是哺乳动物细胞,例如人细胞。可将任何量的

细胞加到本发明的生物传感器上。例如约 1、2、3、4、5、10、15、50、100、150、200、300、500、1,000、10,000、100,000 个或更多个细胞（或介于约 1 和 100,000 之间的任何范围或值；例如约 50-约 100,约 50-约 200,约 50-约 500,约 50-约 1,000）均可用于本发明的测定。

[0124] 本发明的一个实施方案可供直接检测细胞变化,例如细胞生长模式的改变、细胞对分析物（例如细胞表面受体）的上调或下调或者表达（例如在响应某些刺激时,细胞受体或分析物表达增加或降低,或者细胞受体或分析物表达随时间推移而变化（例如在将细胞固定并在生物传感器表面上培育时细胞受体的表达增加,随后在将刺激加入细胞中时细胞受体表达降低））、细胞死亡模式、细胞分化的变化、细胞移动的变化、细胞大小或体积的变化或细胞粘附的变化,因为用比色共振反射生物传感器或基于光栅的波导生物传感器时细胞变化实时出现,不需要掺入放射性标记、比色标记或荧光标记或不受这些标记的干扰（虽然需要时也可使用标记）。在细胞受干扰时,可检测到细胞行为和形态的变化。然后可利用高速、高分辨率仪器,例如 BIND® READER（即比色共振反射生物传感器系统）实时检测细胞变化,并应用相应的算法将数据量化。参见例如美国专利号:7,422,891、7,327,454,7,301,628,7,292,336、7,170,599、7,158,230、7,142,296、7,118,710。通过将该方法、仪器和计算分析结合,可以无标记的方式方便地实时监测细胞行为（即在细胞对刺激或试验试剂起反应之时以及细胞在响应刺激或试验试剂期间内,方便合宜地观察和定量细胞反应）。无标记方式是指细胞没有与细胞连接或缔合且用于检测细胞或细胞变化的标记（例如荧光标记、放射性标记、酶标记、标记亲和物、磁性标记、化学发光标记、发光标记、生物发光标记、化学标记等）。将可检测标记（例如荧光标记、放射性标记、酶标记、标记亲和物、磁性标记、化学发光标记、发光标记、生物发光标记、化学标记等）与细胞连接或缔合,并用于检测细胞或细胞的变化。当在整个测定过程（例如约 1 分钟、2 分钟、3 分钟、4 分钟、5 分钟、10 分钟、20 分钟、30 分钟、45 分钟或 60 分钟或者约 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、10 小时、12 小时、24 小时或 48 小时,或者约 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、10 天、20 天或 30 天,这取决于测定类型）中,从生物传感器表面获取多次读数（例如每隔约 0.001 秒、0.01 秒、0.1 秒、1.0 秒、5 秒、10 秒、20 秒、30 秒、40 秒、50 秒或 60 秒,每隔约 1 分钟、2 分钟、3 分钟、4 分钟、5 分钟、10 分钟、20 分钟、30 分钟、45 分钟或 60 分钟,每隔约 1 小时、2 小时、6 小时、12 小时或 24 小时）时,进行实时监测。

[0125] 比色共振反射生物传感器,例如 SRU Biosystems, Inc. BIND™ 技术 (Woburn, MA) 具有从纳米尺度生物系统中测量有关物质连接的表面变化的能力。其中之前已实施比色共振反射生物传感器的应用和方法已被改变,因为仪器的分辨率得到改进。以前,测定与比色共振反射生物传感器表面连接的细胞的量是主要目的。然而,在观察一些分辨率较差的细胞图像时,注意到细胞给出有关已占用像素的数目、信号 / 像素强度、各像素的 PWV 变化等的不同信号。在试图减少这些数据的变化性时,变得明显的是变化性在于各个细胞及其对刺激的不同形态反应。为了进一步研究这些细胞事件,构建了较高分辨率版本的 BIND® READER（即比色共振反射生物传感器系统）、BIND® SCANNER（高分辨率比色共振反射生物传感器系统）。参见例如美国专利号 7,301,628、7,298,477、7,148,964、7,023,544。BIND® SCANNER（即高分辨率比色共振反射生物传感器系统）具有高分辨率透镜。透镜的分辨率为约 2、3、3.75、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、50、100、200、500、1,000 或 2,000 微米（或介于约 2 和约 2,000 微米之间的任何范围,例如 2-5、2-3.75、2-10、2-15、8-12、2-20、2-50、2-100、

2-200 或 2-300 微米)。另外,开发了以更好的分辨率实时分析细胞变化的方法。BIND[®] SCANNER 的高分辨率优势是它可供分析单个孔或容器内不同像素位置上的波长变化。通过扫描仪或仅小部分的孔或表面便可对整个生物传感器微量滴定板孔进行读数。

[0126] 本发明的方法可用来检测细胞变化,包括细胞生长模式的改变或细胞受体或分析物的表达。简单地说,可将细胞固定在比色共振反射光学生物传感器上;检测 PWV;使细胞暴露于试验试剂、培育或刺激;检测 PWV;可对起始 PWV 和随后的 PWV 进行比较,其中起始 PWV 相对于随后的 PWV 之间的差异表明细胞生长模式的变化或其它细胞变化。任选还可在整个测定过程中在若干时间点测定并记录 PWV 的变化,并进行比较。

[0127] 细胞生长模式的变化可选自细胞形态、细胞粘附、细胞迁移、细胞增殖和细胞死亡。可将原核或真核细胞的一种类型或者真核或原核细胞的两种或更多种类型固定在生物传感器上。

[0128] 本发明的方法提供检测细胞(例如原代细胞和干细胞)变化的独特机会,包括例如趋化测定、低细胞数测定、分化测定、迁移测定、连接测定、细胞侵袭测定、粘附测定、细胞分化状态的生物概况分析。

[0129] 本发明的生物传感器系统还能够通过测定光反射波长的变化,来检测和定量与限定阵列的一个或多个独特位置结合的样品中的结合配偶体的量。例如,可对一个或多个独特位置上的波长变化与其它独特位置上的阳性对照和阴性对照进行比较,以测定结合的特异性结合物质的量。重要的是,可将许多这样的—个或多个独特位置排列在生物传感器表面上,且生物传感器可包括容器(例如约 2、6、8、24、48、96、384、1536、3456、9600 或更多个孔的微量滴定板)的内表面。例如,如果将 96 个生物传感器与固定器连接,每个生物传感器包含约 100 个独特位置,则可同时进行大约 9600 种生化测定。

[0130] 分选、分析和定量细胞的方法

[0131] 本发明的方法提供从混合细胞群中分选 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 或更多种细胞类型,并检测分选细胞对刺激、培育或试验试剂的反应的方法,其中分选和检测发生在一个生物传感器表面上。将混合细胞群加到一个比色共振反射生物传感器表面或其它生物传感器表面上,其中生物传感器具有固定在其一个表面上的一种或多种特异性结合物质(例如抗体或 ECM 配体),其中一种或多种特异性结合物质可潜在结合混合细胞群中的一种或多种细胞类型。任选从生物传感器表面洗去未结合细胞,使得一种或多种细胞类型与生物传感器表面结合并在生物传感器表面上分选。将一种或多种结合细胞类型暴露于刺激、试验试剂、培育或其组合。通过检测 PWV 变化或有效折射率的变化来检测一种或多种结合细胞类型对刺激的反应。可随时间推移实时对 PWV 和有效折射率进行比较,或者可与阴性对照或阳性对照进行比较。因此,一个生物传感器表面可用来分选、检测、定量和/或分析混合群中的一种或多种细胞类型对刺激、试验试剂、培育或其组合的反应。

[0132] 细胞的分选可以是将混合群样品中少于全部的细胞类型固定在生物传感器表面上,其中任选洗去样品中的未固定细胞。分选细胞也可以是指将一种细胞类型固定在生物传感器的一个独特位置上,同时将一种或多种其它细胞类型固定生物传感器表面的其它独特位置上。未固定细胞可任选洗去,或者可保留在生物传感器表面上。

[0133] 本发明的方法还提供从混合细胞群中分选一种、两种或更多种细胞类型并检测由一个生物传感器表面上的一种或多种细胞类型产生的细胞胞内分析物或其它分析物的方

法。在本发明的一个实施方案中,将混合细胞群加到一个比色共振反射生物传感器表面或一个基于光栅的波导生物传感器表面上。一个生物传感器表面可具有固定在其一个表面上的两种或更多种特异性结合物质,其中两种或更多种特异性结合物质包含 (i) 特异性结合混合细胞群中的一种或多种细胞类型的第一特异性结合物质和 (ii) 特异性结合一种或多种细胞类型的一种或多种胞内分析物的第二特异性结合物质。第一和第二特异性结合物质可不同或相同。任选从生物传感器表面上洗去未结合细胞,使得一种或多种细胞类型与生物传感器表面结合并且在生物传感器表面上分选。将一种或多种结合细胞类型用例如生物洗涤剂、TWEEN®、TRITON®、NP40、Brij、辛基-β-硫代吡喃葡萄糖苷、毛地黄皂苷、甲醛、低聚甲醛、高浓度的盐或其组合溶解或透化。或者,可将细胞培育一段时间,或者暴露于刺激,然后任选在溶解前培育。溶解、透化、培育、暴露于刺激(或其任何组合)后,任选可从生物传感器表面上洗去任何未结合的分析物。通过检测生物传感器的每个独特位置上的PWV变化或有效折射率的变化,来检测固定在生物传感器表面上的胞内分析物。可随时间推移比较PWV和有效折射率,或者可与阴性对照或阳性对照进行比较。因此,可使用混合群细胞样品分选、检测、定量测定和/或分析混合群细胞样品内的一种或多种特定细胞类型的胞内组分。胞内分析物或其它分析物可以是例如蛋白质、RNA、DNA、碳水化合物、脂质、细胞受体或存在于细胞上或细胞内或者由细胞产生的任何其它分子。

[0134] 在本发明的另一个实施方案中,可从混合细胞群中分选一种、两种或更多种细胞类型,并且可只使用一个生物传感器表面检测一种或多种细胞类型的分析物。将混合细胞群加到一个比色共振反射生物传感器表面或一个基于光栅的波导生物传感器表面上。一个生物传感器表面具有两种或更多种特异性结合物质固定在其一个表面上,其中两种或更多种特异性结合物质包含 (i) 特异性结合混合细胞群中的一种或多种细胞类型的第一特异性结合物质和 (ii) 特异性结合一种或多种细胞类型的一种或多种分析物的第二特异性结合物质。任选从生物传感器表面上洗去未结合细胞,使得一种或多种细胞类型与生物传感器表面结合,并且在生物传感器表面上分选。使细胞与试验试剂接触,或者培育细胞,或者使细胞暴露于刺激或其组合。检测固定在生物传感器表面上的分析物。通过检测PWV变化或有效折射率的变化来检测固定在生物传感器表面上的分析物。可随时间推移比较PWV和有效折射率,或者可与阴性对照或阳性对照进行比较。分析物可以是例如蛋白质、RNA、DNA、碳水化合物、脂质或可由响应培育、试验试剂或暴露于刺激的细胞产生的任何其它分子。

[0135] 如果将特异性结合一种或多种细胞类型的一种或多种特异性结合物质和特异性结合一种或多种细胞类型的一种或多种胞内分析物或者其它分析物的一种或多种特异性结合物质固定在生物传感器表面上,则特异性结合一种或多种细胞类型的特异性结合物质可位于一个生物传感器表面的一个独特位置上,而特异性结合一种或多种细胞类型的一种或多种胞内分析物或者其它分析物的一种或多种特异性结合物质可存在于第二独特位置上。各特异性结合一种或多种细胞类型的一种或多种特异性结合物质和特异性结合一种或多种细胞类型的一种或多种胞内分析物或者其它分析物的一种或多种特异性结合物质可存在于一个生物传感器表面的其自身的独特位置上。或者,不同类型的特异性结合物质可存在于一个生物传感器表面的一个独特位置上,或者在一个生物传感器表面的一个独特位置上混合在一起。一个生物传感器表面和生物传感器表面的一个独特位置可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30或更多种特异性结合物质类型。

[0136] 一个生物传感器表面可包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、100、500、1,000 或更多个独特位置。各个独特位置可具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、100 或更多种固定在其上的特异性结合物质。例如,一个生物传感器表面可具有两个独特位置。在第一独特位置上可固定一种特异性结合物质类型。在第二独特位置上可固定与其它特异性结合物质不同类型的两种特异性结合物质。

[0137] 本发明的方法还可用于从混合细胞群中分选两种或更多种细胞类型(例如 2、3、4、5、10、15、20 或更多种细胞类型)到一个生物传感器表面的两个或更多个独特位置上。例如,可将含有例如大于 2、3、4、5、10、15、20 或 30 种细胞类型的混合细胞群加到具有固定在两个或更多个独特位置上的两种或更多种类型的特异性结合物质(例如约 2、3、4、5、10、15、20 或更多种)的一个生物传感器表面上。两种或更多种特异性结合物质可结合并固定混合细胞群的两种或更多种细胞类型。因此,可将细胞分选到一个生物传感器表面的两个或更多个独特位置上。可洗去混合细胞群的未结合细胞。然后可刺激细胞、使细胞暴露于试验试剂、进行溶解或透化。可在测定的各个步骤进行检测、计数和分析。

[0138] 本发明的一个实施方案提供定量与固定在一个生物传感器表面上的特异性结合物质特异性结合的细胞上的结合配偶体(例如细胞受体或细胞表面抗原)的数目或量的方法。将混合细胞群加到一个比色共振反射生物传感器表面或一个基于光栅的波导生物传感器表面上。一个生物传感器表面具有固定在其一个表面上的一种或多种特异性结合物质,其中一种或多种特异性结合物质特异性结合混合细胞群中的细胞上的一种或多种结合配偶体,例如细胞表面上的细胞受体或其它蛋白质或分析物。任选从生物传感器表面上洗去未结合细胞,使得一种或多种细胞类型与生物传感器表面结合,并且在生物传感器表面上分选。使细胞与试验试剂接触,或者培育细胞,或者使细胞暴露于刺激或其组合。通过检测 PWV 变化或有效折射率的变化,来分析生物传感器表面结合的细胞或细胞受体的量。可随时间推移比较 PWV 和有效折射率,或者可与阴性对照或阳性对照进行比较。可通过与例如对照值比较,来测定细胞上结合配偶体的量。对照值可得自包含已知细胞受体或细胞表面抗原数目的细胞。

[0139] 对于本文描述的所有测定,可在每次洗涤或加到生物传感器表面上之前、在每次加到生物传感器表面上的期间、在每次洗涤或加到生物传感器表面上之后、在每次培育周期前或后或者其组合,获取 PWV 和有效折射率读数。还可在测定过程中实时连续地获取 PWV 或有效折射率读数。

[0140] 混合细胞群或“两种或更多种细胞”包含约 2、3、4、5、10、15、20、30 种或更多种不同的细胞类型。混合细胞群(或“两种或更多种细胞”)可包含不同细胞类型的任何混合物,例如红细胞、白细胞和血小板的混合物;不同类型的细菌的混合物;生物样品中存在的不同细胞类型的混合物;干细胞的混合物和分化细胞类型的混合物。干细胞群可视为混合细胞群,因为干细胞群中的细胞常处于分化的不同阶段。混合细胞群可以是例如肺抽吸物、痰、唾液、血液、血浆、组织、排泄物、尿液、骨髓、淋巴结、环境样品、食物样品。混合细胞群可以是部分纯化的、未纯化的、浓缩的、未浓缩的或未稀释的。用前可将样品(例如组织样品或排泄物样品)粉碎并悬于缓冲液中。混合细胞群可以是活检材料,可预期其包含约 2、3、4、5、10、15、20、30 或更多种细胞类型。活检可包括通过细针抽吸、粗针穿刺活检(core needle biopsy)、真空辅助活检、切开手术活检、皮肤活检(例如刮、钻、切开、切除或刮除

术)采集的组织。可收集活检,例如骨髓、子宫内膜、皮肤、淋巴结、肝、肺、胃肠道、肾、移植器官或睾丸组织。总的来说,混合细胞群含有潜在与固定在生物传感器表面上的特异性结合物质结合的两种或更多种细胞类型。也就是说,在混合细胞群中,仅细胞亚群(即一种或多种细胞类型)通过与固定在生物传感器表面上的一种或多种特异性结合物质结合而固定在生物传感器表面上。不与特异性结合物质结合的混合细胞群中的细胞可任选从生物传感器表面洗去,或者留在生物传感器表面上。一种细胞类型可以是一类细胞类型,例如所有的淋巴细胞,或是一种特定的细胞类型,例如淋巴细胞的一种特定类型(例如T细胞),或T细胞的一种特定类型(例如CD8⁺T细胞)。

[0141] 直接取自活的生物体(例如活检材料)的外植块的生长称为原代细胞培养。原代细胞培养可由细胞类型的混合群组成。从这些混合细胞群中分选和纯化原代细胞所需要的时间和过程可能对测定结果产生负面影响。另外,用这些方法提取的细胞的数目常常有限,使得能够用非常少的每孔细胞数的测定对用于原代培养细胞颇具吸引力。需要测定原代细胞群特定亚群的状态、活性和感受性而无需以非所需方式干扰测定结果的漫长分离步骤的方法。可采用本发明的方法分选、检测、定量和/或分析原代细胞而又不对细胞和测定结果产生不良影响。原代细胞培养包括但不限于T细胞、B细胞、干细胞、NK细胞、单核细胞、树突细胞、内皮细胞、肿瘤细胞、白细胞、星形细胞、心肌细胞、肝细胞、神经元。通常使用原代细胞进行的测定包括刺激和功能试验,例如GPCR测定、RTK测定、离子通道测定、siRNA测定、病毒感染测定、内靶反应测定、毒性测定、增殖测定。其它测定测试特定细胞类型的存在、不存在或调节;细胞表面蛋白质的存在、不存在、调节,和进一步测试响应刺激的分选细胞类型。在一种情况下,试验可包括有目的地将细胞混合(因为在其它细胞存在下细胞发生变化),然后将有目的的混合物分选回单独的细胞类型组分,以进一步测试在其它细胞存在下诱导的变化。例如,可将健康细胞系与相同类型的不健康细胞混合,以寻找疾病特征的转移。临床背景下的另一个实例可包括在开药方前测试患者细胞对药物的反应。另一种临床背景试验可包括现场实时分选、定量和测试患者细胞的癌症标志物。

[0142] 一个生物传感器表面可以是与混合细胞群接触的一个生物传感器的表面上的一部分(例如微观流体槽、孔、表面的一个独特部分)。如果将生物传感器整合到微孔板中,则每个孔便是一个生物传感器表面。微量滴定板内的每个孔可具有固定在其上的不同的特异性结合物质或特异性结合物质的不同组合,从而制备一组可用一种或多种不同的细胞和一种或多种不同类型的刺激、培育或试验试剂探查的特异性结合物质或特异性结合物质的组合。

[0143] 可刺激细胞的化合物或分析物包括例如激素、生长因子、药物、试验药物、分化因子、形态发生素、细胞因子、趋化因子、胰岛素、EGF、ATP、UTP、卡巴胆碱(carbanoylcholine)、乙酰胆碱、肾上腺素、毒蕈碱、诱导同渗浓度改变的化合物、诱导膜去极化的化合物、小分子试验化合物、病毒、抗体、蛋白质、多肽、抗原、多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体(scFv)、F(ab)片段、F(ab')₂片段、RNA、DNA、siRNA、Fv片段、有机小分子、细胞、细菌和生物样品,例如血液、血浆、血清、胃肠分泌物、组织或肿瘤匀浆物、滑液、排泄物、唾液、痰、囊内液、羊水、脑脊液、腹膜液、肺灌洗液、精液、淋巴液、泪液和前列腺液以及可潜在影响细胞的任何其它分子或化合物。其它刺激可包括例如温度、pH、压力的改变和其它环境因素的改变。

[0144] 刺激包括“激活”或“敏化 (prime)”细胞的刺激。刺激通过改变细胞的生化和功能活性而激活或敏化细胞。细胞活化可能与快速诱导许多新基因的表达有关,包括编码转录因子、癌基因、细胞因子、早期反应基因、细胞表面分子、粘附分子的基因和其它基因。例如,当巨噬细胞或单核细胞被刺激激活时,它们可显示降低的运动性、新表面抗原表达、纤溶酶原激活物合成、对肿瘤细胞的细胞毒性提高、细胞因子的产生和释放增加、前列腺素/白三烯的合成增加、活性氧中间体的产生增加以及其它变化。例如,被激活的细胞可表达、下调或上调蛋白质或其它分析物的产生。例如,在内皮细胞中,当内皮细胞在炎症期间被例如组胺或凝血酶激活时,P-选择蛋白,一种细胞粘附分子,从细胞内部位置移动到内皮细胞表面。可通过活化细胞表面上新抗原的阶段特异性表达(可采用本发明的方法测定),对细胞的不同活化状态进行鉴定和分类。

[0145] 根据刺激的性质,细胞可以只针对所选择的功能被敏化,并且可以不实现全部范围的功能能力。活化和敏化过程也可逆转,因为一些刺激能够使预活化的细胞失活,例如巨噬细胞灭活因子。

[0146] 在本发明的一个实施方案中,将结合或潜在结合分析物或蛋白质的特异性结合物质固定在生物传感器表面上,所述分析物或蛋白质在细胞被激活或敏化时被表达、上调或下调。激活或敏化(即暴露于一种或多种刺激)混合细胞群(或纯化细胞群),并加到生物传感器表面上。或者,可将混合细胞群加到生物传感器表面上,然后激活或敏化。与生物传感器表面上的特异性结合物质结合的细胞将固定在细胞表面上。任选可从生物传感器表面洗去未结合细胞。因此,可分选、检测、定量和分析细胞。任选可将其它刺激加入细胞中,并检测其反应。

[0147] 在本发明的另一个实施方案中,细胞可被激活或敏化,然后通过加入可抑制细胞活化的刺激(例如拮抗剂、抗体或药物)测试细胞活化的抑制。例如,可将细胞(混合群或纯化群)激活或敏化,然后加到生物传感器表面上,所述生物传感器表面具有固定在其表面上的结合或潜在结合当细胞被激活或敏化时表达、上调或下调的分析物或蛋白质的特异性结合物质。任选可将细胞加到生物传感器表面上,然后敏化或激活。将可抑制细胞活化或细胞敏化的一种或多种刺激加到生物传感器表面上,并可检测细胞对刺激的反应。如此可在一个生物传感器表面上分选、检测、定量和分析细胞。

[0148] 本发明的方法可用于组织分型,其中在移植或输血前测试供体和受体的组织、血液或血液制品。可对任何组织或血液制品进行组织分型,包括例如胚胎。本发明的方法可用于通过确定例如 HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DP、HLA-DQ 和 HLA-DR 基因座上的表型而进行组织分型,并且可用于进行百分比反应性抗体测定(percent reactive antibody assay)。本发明的方法还可用于交叉配血以确定捐出的血液单位与其预期受体的相容性。在一个实例中,将供体全血加到具有结合白细胞的固定的特异性结合物质的生物传感器表面上。从全血样品中洗去未结合细胞。将受体的血清(例如刺激)加到生物传感器上,并检测反应。如果供体的白细胞遭破坏,则结果为交叉配血阳性,无法输血。

[0149] 其中特异性结合物质是与细胞上的特异性抗原或受体结合的特异性抗体或配体的通过本发明的方法对细胞进行分选、计数、检测和分析,应用于例如移植、血液学、肿瘤免疫学和化学疗法、性别预选的遗传学和精子分选、从酵母展示文库和细菌展示文库鉴定具有所需性质的细胞表面展示蛋白变体。

[0150] 本发明的方法还可用来研究细胞的体积和形态复杂性；进行细胞周期分析；研究细胞动力学（例如细胞增殖）；进行染色体分析和分选；研究细胞蛋白质表达和定位；研究蛋白质修饰（例如磷蛋白质）；研究体内转基因产物的表达（例如绿色荧光蛋白或细胞表面抗原例如 CD 标志物）；研究胞内抗原（例如细胞因子、次级介质）的产生；研究核抗原的表达；研究酶活性；监测 pH、胞内离子钙、镁和膜电位；研究膜流动性；研究细胞凋亡；研究细胞活力；监测细胞的电透化 (electropermeabilization)；研究氧化爆发；表征癌细胞中的多药耐药性 (MDR)；研究谷胱甘肽产生及其组合。在一个实例中，将细胞固定在生物传感器上，并用这样的化合物处理，所述化合物刺激 G- 蛋白偶联受体（例如刺激性的卡巴胆碱和作为竞争性拮抗剂的阿托品），实现毒蕈碱性乙酰胆碱受体 (mAChR) 作用。可用本发明检测这些作用。

[0151] 在其它实例中，可采用本发明的方法进行免疫分型，即鉴定和定量与单克隆抗体一起的细胞抗原。利用免疫分型诊断急性白血病、慢性淋巴细胞增殖性疾病和恶性淋巴瘤并分类。这些疾病的治疗策略常常取决于所述疾病的诊断和分类。将急性白血病分成两个亚类：成淋巴细胞 (ALL) 型和骨髓 (AML) 型。把 ALL 进一步细分为 3 个亚型，把 AML 进一步分成 8 个亚型。许多特异性结合细胞抗原的不同抗体被用来进行血液恶性肿瘤的免疫分型分析。细胞抗原可包括例如 CD1、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD23、CD25、CD30、CD34、CD41、CD42b、CD43、CD45、CD56、CD57、CD61、CD79a、CD103、CD117、HLA-DR、血型糖蛋白 A、TdT 和髓过氧化物酶。可将血液样品、脊髓液或骨髓等细胞样品加到已固定抗体的生物传感器表面上，所述抗体特异性结合一种或多种细胞抗原，使得可对具有细胞抗原的细胞进行分选、检测、细胞计数和分析以诊断急性白血病或提供急性白血病的预后。

[0152] 在一些实例中，一组抗体（包括例如与 CD19、CD20 和 CD22 特异性结合的抗体）可用来测定 B 细胞克隆形成能力，而可使用混合细胞群样品，使用与 CD2、CD3、CD4 和 / 或 CD7 特异性结合的抗体来测定 T 细胞克隆形成能力。其它抗体可用来诊断特定的淋巴细胞增殖性疾病。可使用对 CD45 有特异性的抗体将血液恶性肿瘤与其它肿瘤区别开来，并有助于检测母细胞。在另一个实例中，与表面免疫球蛋白的弱反应、与 CD5、CD23 和 CD43 的阳性结果及与 CD10、CD11c、CD103 和 cyclin D 的阴性结果表示慢性淋巴细胞性白血病。在另一个实例中，多发性骨髓瘤由 B 细胞瘤形成引起，B 细胞瘤形成导致表达 CD138 的恶性浆细胞的产生和克隆扩增失调。检测和测定骨髓或血液中的 CD138⁺ 浆细胞可用来诊断和确定多发性骨髓瘤的治疗。

[0153] 本发明的方法还可用于诊断轻微后遗症，其是在减轻后患者中存在恶性细胞，其中恶性细胞以低于常规形态学技术的检测限的水平存在。恶性细胞可引起患者复发。本发明的方法提供 MRD 的灵敏性（至少 10^{-3} 个细胞的检测限）特异性诊断。例如，检出脑脊液中表达 CD10、TdT 或 CD34 的细胞表示 MRD；而骨髓细胞中 TdT、胞质 CD3、CD1a 或 CD4/CD8 的表达表示 MRD。

[0154] 可采用本发明的方法，通过对表达 CD4、CD8 和 CD38 或其组合的细胞进行分选、检测和 / 或计数来诊断 HIV 感染以提供预后。本发明的方法还可用于诊断，和提供免疫缺陷疾病、变应性疾病和白细胞粘附疾病的预后信息。

[0155] 本发明的方法可用于通过分析和测定多药耐药性的细胞表面和胞内标志物的表

达来监测多药耐药性。可采用本发明的方法监测癌症化学治疗的功效。此外,如果使用抗体治疗癌症(例如对 CD20、CD33、CD25、CD45 或 CD52 有特异性的抗体),则可采用本发明的方法证实抗体的结合并监测根除肿瘤细胞的功效。

[0156] 本发明的方法也可用于网织红细胞计数、网织红细胞成熟指数测定、未成熟网织红细胞部分测定、血小板功能分析、血小板表面受体定量和分布分析、血小板相关 IgG 定量测定、网状血小板测定、血纤蛋白原受体占据研究、活化血小板表面标志物的检测、胞质钙离子测定、血小板微粒测定、细胞功能分析、使用抗磷酸酪氨酸抗体的酪氨酸磷酸化测定、使用 Ca²⁺ 指示物的钙流量分析、氧化代谢测定和细胞增殖测定。

[0157] 本发明的方法还可用于分选、检测、定量和分析生物、环境或食品样品中的细菌、真菌、寄生物和病毒。如果微生物是细胞内的,则可使细胞透化或溶解。有利的是,微生物不需要是可培养的。

[0158] 单一生物传感器表面上筛选两种或更多种细胞类型的方法

[0159] 在本发明之前,大多数基于细胞的测定可供筛选单个细胞系中的单个靶标,或者单个细胞系中的多个靶标或参数(高内容筛选(high content screening))。Besko 等人(Journal of Biomolecular Screening,第 9 卷,第 3 期,173-185(2004))描述了用于通过同时给各个细胞系加标签来测定多个细胞系的技术。然而,该项技术需要可检测地标记各个单独的细胞系,使得它们可彼此区别开来。

[0160] 采用通过高通量筛选组群进行的基于细胞的无标记测定的一个障碍是成本。如果可同时筛选多个靶标,则用于筛选的每孔成本被待筛选的靶标数分摊。例如,如果同时筛选 3 个靶标,则筛选的每孔成本是如果一次只筛选一个靶标的成本的三分之一。另外,仍十分需要用原代培养细胞进行高通量筛选,但分离或购买原代培养制备物的成本可能非常高。如果可在仍使稳定测定读出可行的筛选测定中使用较少的原代培养细胞/孔,则可降低使用这些有限的细胞类型的筛选的每孔成本。

[0161] 本发明提供以完全无标记的方式在单一生物传感器表面上(例如微量培养板的一个孔)同时筛选、测定和定量多个细胞系的方法。在筛选/测定活性后,不需要可检测地标记每个细胞系以进行鉴定。

[0162] 用某些检测装置筛选多个细胞系受限于可耐受的因加入多个细胞系引起的信号稀释的量。例如,在同一孔中使用某些检测装置测定 2 个细胞系将给出测定一个单一细胞系的信号的一半。同样,用某些检测装置筛选多个细胞系因测定读出而显得混乱,所述测定读出不区分来自各个细胞类型的反应,而是提供由来自混合的所有各个细胞类型的平均信号构成的读出。通过使用 BIND[®] SCANNER 检测信号来避免信号稀释的这个问题(然而,在一个容器中筛选多个细胞系也可使用 BIND[®] READER 检测,参见图 28-30)。因为可对响应刺激的各个细胞进行鉴定和计数,可同时测定更多的细胞系而无需顾虑信号稀释,并且可测定各个细胞亚群的反应。

[0163] 本发明的一个功能优势是通过在单一孔中针对相同试验试剂筛选多种细胞,该测定具有试验试剂特异性的内置测试(built-in test)。如果发现同一试验试剂抑制表达不同受体的多个细胞系的活化,则该试验试剂很可能是无选择性的或有细胞毒性。目前这可通过在含有不同细胞的多孔中筛选一种试验试剂来进行。本发明允许用户在单个孔中针对混合细胞群(例如心肌细胞和肝细胞)筛选一种试验试剂。筛选的每孔成本有效地被同时

待筛选的靶标数分摊。

[0164] 一个容器中, 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、100 种或更多种细胞类型对刺激、试验试剂或培育步骤的反应可采用其中细胞不含可检测标记的本发明的方法检测。所述方法包括将两种或更多种细胞类型加到容器中, 其中容器的内表面包括比色共振反射生物传感器表面或基于光栅的波导生物传感器表面, 其中生物传感器表面具有固定在其表面上的一种或多种特异性结合物质或配体, 且其中一种或多种特异性结合物质或配体可结合两种或更多种细胞类型中的一种或多种。可任选洗去不与特异性结合物质或配体结合的细胞, 但是洗涤步骤不是必需的。可将两种或更多种细胞类型暴露于刺激、试验试剂或培育步骤。可通过 BIND[®] SCANNER (高分辨率比色共振反射生物传感器系统) 检测两种或更多种细胞类型对刺激或试验试剂的反应, 参见例如图 6 和图 27。可通过研究生物传感器表面上的各个单独细胞的信号, 分别对各个细胞类型对试验试剂、刺激或培育的反应进行检测和分析。

[0165] 两种或更多种细胞类型对刺激或试验试剂的反应也可通过 BIND[®] READER (比色共振反射生物传感器系统) 检测。例如, 将内皮素受体表达细胞 (ETaR) 和 M4 毒蕈碱性受体表达细胞 (M4R) 接种在 CA2 细胞基质包覆的比色共振反射生物传感器板的饥饿培养基中。将细胞用拮抗剂 (抑制 M4 的阿托品或抑制 ETaR 的 BMS) 预处理 30 分钟。然后, 将细胞用 10 μ M 卡巴胆碱或 50nM ET-1 处理。BIND[™] Reader 上检测的终点反应见图 28。图 28A 表示只接种 ETaR 细胞。图 28B 表示只接种 M4R 细胞。数据以缓冲液对照做参比。给出了 4 个重复的平均值 \pm SD。ETaR 细胞对 ET-1 起反应, 但不对卡巴胆碱起反应, 这就表明了反应的特异性。所使用的 BMS 浓度未高到足以完全抑制 ET-1 反应。M4R 细胞对卡巴胆碱起反应, 但不对 ET-1 起反应, 这就表明了反应的特异性。阿托品完全抑制卡巴胆碱反应。

[0166] 然后将 ETaR 细胞和 M4R 细胞用第二配体处理。例如, 之前用卡巴胆碱处理的 ETaR 细胞现用 ET-1 处理。BIND[™] Reader 上检测的终点反应见图 29。图 29A 表示只接种 ETaR 细胞。图 29B 表示只接种 M4R 细胞。

[0167] 结果表明, ETaR 细胞甚至在卡巴胆碱刺激后仍对 ET-1 起反应, 而 M4R 细胞甚至在 ET-1 刺激后仍对卡巴胆碱起反应。BMS 在以较长的培育时间阻断 ET-1 信号方面更有效。ET-1 刺激时 M4 细胞中显露有一些来自第一次加入的卡巴胆碱信号。同样, 卡巴胆碱刺激后的 ET-1 细胞中显露有一些来自第一次加入的 ET-1 信号。因此, 在第二次加入前使之前的信号完全饱和是有利的。

[0168] 图 30 表示按图 30A-B 所示地不同添加阿托品、BMS、卡巴胆碱和 ET-1 的相同孔中培养的 ETaR 细胞和 M4R 细胞。图表明可将两种细胞类型接种到相同孔中, 并可分别检测各个细胞类型独自的活化。因此, 可通过例如配体反应或受体表达来区分来自例如天然组织的细胞的复杂混合物。因此, 可测定细胞混合物中特定细胞类型的存在与否。

[0169] 对配体、刺激或培育的不同反应

[0170] 在混合细胞群中各个细胞类型可具有不同的反应, 并因此具有对刺激、试验试剂或培育步骤的 PWV 读数。根据限定细胞对刺激、试验试剂或培育步骤的反应的跨越像素取平均的 PWV 信号, 不同的细胞类型可在生物传感器上显示彼此不同的 PWV 信号。也就是说, 与生物传感器上对刺激、试验试剂或培育步骤发生微弱反应并显示较低的 PWV 的第二细胞类型相比, 生物传感器上的一种细胞类型可对刺激、试验试剂或培育步骤发生强烈的反应

并显示较高的 PWV。进行 BIND[®] SCANNER 或 BIND[®] READER 采集, 得到生物传感器表面的 PWV 图像。分析最初的细胞连接图像以发现各个细胞, 对各个细胞进行形态学测量, 并将细胞分成两个或更多个亚群。对细胞连接图像进行处理除去局部背景变化并锐化边缘。对图像进行“阈值处理 (thresholded)”以鉴定充分超出背景的 PWV 值。将邻接采集的超阈值像素标记为各个细胞。对于从细胞连接图像中分隔开来的各个细胞, 计算形态度量。对于其中混合群的细胞类型可根据细胞大小分类的测定, 测定各个细胞的面积。对于其中细胞类型可根据基于形状的特征来区分的测定, 提供圆度等度量。利用测定相关的一个或多个形态度量, 将细胞分成亚群, 其中一个群显示所需的形态特征。对于各孔, 在数据分析工作流程中, 转换来自指定形态亚群的标记细胞的二值图像 (“掩图 (mask)”)。将该掩图应用于由随后的采集 (其中加入了试验试剂、刺激或培育 / 对混合细胞群进行) 得到的图像; 该掩图可供只从形态亚群的这些细胞中定量对试验试剂、刺激或培育的细胞反应。

[0171] 对次级配体或刺激的不同反应

[0172] 混合群内的目标细胞也可根据其对于次级配体的反应来区分。容器中的独特细胞群可对产生 PWV 变化的试验试剂或刺激起不同的反应, 所述 PWV 变化可用作鉴定这些亚群的标记 (signature)。例如, 有可能对测定原代培养制备物中神经元对辣椒素、疼痛刺激的反应产生兴趣。在细胞制备物中, 可能存在全都对辣椒素起反应的多种细胞类型 (神经元、少突胶质细胞、星形细胞), 而兴趣仍在测定神经元细胞的反应。在容器内的细胞中, 只有神经元对神经生长因子 (NGF) 起反应 (PWV 变化)。因此, 可在用 NGF 二次刺激后, 测定容器中所有细胞对辣椒素的 Δ PWV 反应, 以确定容器中哪些细胞是神经元。

[0173] 为了测定混合细胞群对初级配体或试验试剂与已知的次级配体或试验试剂组合的反应, 进行了 BIND[®] SCANNER 采集以获得微量培养板孔的 PWV 图像, 其中培养物中的细胞连接在生物传感器表面上。对这些细胞连接图像进行分析以分隔所有的各个细胞。在加入配体库后进行 BIND[®] SCANNER 采集, 在生物传感器微量培养板中每孔一种配体。尚不清楚目标细胞亚群在该阶段是否对初级配体起反应。然后给予已知用目标细胞类型特异性刺激的次级配体, 并进行最后的 BIND[®] SCANNER 采集和分析。对细胞连接图像进行处理, 除去局部背景变化并锐化边缘。对图像进行“阈值处理”以鉴定充分超出背景的 PWV 值。将邻接采集的超阈值像素标记为各个细胞。采用从细胞连接图像分隔的细胞定义掩图, 对加入次级配体后获得的 BIND[®] SCANNER 图像中的细胞进行处理。对于各细胞, 计算其对次级配体的 PWV 反应。将细胞分成亚群。保留对次级配体具有最大反应的细胞亚群。对于各孔, 随后将鉴定根据次级配体区分的细胞亚群的二值掩图应用于得自初级配体的数据。从加入次级配体得到的掩图可供从仅目标亚群的这些细胞中定量对初级配体的细胞反应。

[0174] 基于连接信号的细胞的不同反应

[0175] 可根据其连接信号区分细胞。当细胞与生物传感器表面连接或结合时, 它们显示出连接信号, 也就是说, 如果细胞连接, 则像素上 PWV 提高。根据限定细胞连接信号的跨越像素取平均值的信号强度, 不同的细胞类型可在生物传感器上显示彼此不同的 PWV 连接信号。也就是说, 比起与生物传感器微弱结合且显示较低 PWV 并因此显示较低细胞连接信号的生物传感器上的第二细胞类型, 生物传感器上的一种细胞类型可与生物传感器强烈结合, 显示较高的 PWV, 并因此显示较高的细胞连接信号。进行 BIND[®] SCANNER 采集, 获得培养物中的细胞与之连接的生物传感器表面的 PWV 图像。如下所述对这些细胞连接图像进行

分析以发现各个细胞,测定各个细胞的连接信号的强度,并将细胞分成两个或更多个亚群。对细胞连接图像进行处理除去局部背景变化并锐化边缘。对图像进行“阈值处理”以鉴定充分超出背景的PWV值。将邻接采集的超阈值像素标记为各个细胞。对于从细胞连接图像中分隔开来的各个细胞,计算其平均PWV值。PWV值与细胞的连接强度(与生物传感器表面结合的细胞团块的数量)成比例。将细胞分成亚群,其中一个群显示目标细胞连接信号。对于各孔,在数据分析工作流程中,转换来自指定细胞连接亚群的标记细胞的二值图像(“掩图”)。将该掩图应用于由随后的采集(其中将试验试剂或刺激加入孔内的混合细胞群中)得到的图像;该掩图可供只从处于细胞连接亚群的孔中的这些细胞中定量对试验试剂或刺激的细胞反应。

[0176] 根据由超过预定PWV阈值的邻接像素限定的细胞连接信号的表面积,不同的细胞类型在生物传感器上可显示彼此不同的PWV连接信号。也就是说,生物传感器上的一种细胞类型可与生物传感器结合,使得各个细胞覆盖的平均生物传感器表面积显著大于或小于生物传感器上的第二细胞类型的。根据由超过预定PWV阈值的邻接像素限定的细胞连接信号的整体形状,不同的细胞类型可在生物传感器上显示彼此不同的PWV连接信号。例如,根据金字塔形相对长方形的细胞形态,还可进一步彼此区分与光学生物传感器连接产生相似表面积的连接信号的两种细胞类型。进行BIND® SCANNER采集以获得生物传感器表面的PWV图像。对这些细胞连接图像进行分析以发现各个细胞,对各个细胞进行形态学测量,并将细胞分成两个或更多个亚群。对细胞连接图像进行处理除去局部背景变化并锐化边缘。对图像进行“阈值处理”以鉴定充分超出背景的PWV值。将邻接采集的超阈值像素标记为各个细胞。对于从细胞连接图像中分隔开来的各个细胞,计算形态度量。对于其中混合群中的细胞类型可根据细胞大小分类的测定,测定各个细胞的面积。对于其中细胞类型可根据基于形状的特征来区分的测定,提供圆度等度量。利用测定相关的一个或多个形态度量,将细胞分成亚群,其中一个群显示所需的形态特征。对于各孔,在数据分析工作流程中,转换来自指定形态亚群的标记细胞的二值图像(“掩图”)。将该掩图应用于来自随后的采集(其中将试验试剂或刺激加入混合细胞群中)的图像;该掩图可供只从形态亚群中的这些细胞中定量对试验试剂或刺激的细胞反应。

[0177] 当其连接在传感器表面上时根据其随时间推移的反应,不同的细胞类型在生物传感器上可显示彼此不同的PWV连接信号。例如,可通过与生物传感器快速(例如在加入细胞后头20分钟内)连接的异质混合物中的细胞群限定第一细胞类型,而第二细胞类型可显示较慢的连接信号(例如在加入细胞后将近1小时饱和)。因此,可根据其随时间推移的反应区分混合群内的目标细胞。进行BIND® SCANNER采集以获得生物传感器的PWV图像,其中培养物中的细胞与生物传感器表面连接。对这些细胞连接图像进行分析以将所有的各个细胞分隔开来。在将试验试剂或刺激加入生物传感器后,进行BIND® SCANNER采集,其中在一段时间内对微量培养板重复读数。对细胞连接图像进行处理除去局部背景变化并锐化边缘。对图像进行“阈值处理”以鉴定充分超出背景的PWV值。将邻接采集的超阈值像素标记为各个细胞。采用从细胞连接图像分隔的细胞定义掩图,对加入配体后获得的BIND® SCANNER图像中的细胞进行处理。对于各细胞类型,在各个BIND® SCANNER时程图像中测定其PWV反应,以产生细胞的时程特征。产生表征各时程的度量,例如到最大反应的时间和反应改变期间的范围(最大值-最小值)。将细胞分成亚群,其中一个群显示目标时程特

征。对于各孔,使用来自指定时程特征亚群的标记细胞的二值图像(“掩图”)来定量仅来自指定亚群中孔内的这些细胞的对试验试剂或刺激的细胞反应。

[0178] 随时间推移的不同反应动力学

[0179] 根据随时间推移的反应动力学,容器中的不同细胞群可显示可与其它细胞区分开的对特定刺激的 Δ PWV 反应。例如,神经元对辣椒素的反应可通过达到平稳状态的快速正 PWV 变化表征,而星形细胞和少突胶质细胞对相同刺激的反应可通过快速返回基线的瞬时正 PWV 变化表征。当细胞类型对试验试剂、刺激或培育的反应是已知时,反应动力学随时间推移的任何变化可用来区分生物传感器表面上的不同细胞类型或鉴定细胞表面上的细胞类型。

[0180] 因此,本发明提供用于检测一个容器中两种或更多种细胞类型对刺激或试验试剂的不同反应的方法,其中两种或更多种细胞类型不含可检测标记。所述方法包括将两种或更多种细胞类型加到一个容器中,其中所述容器包括比色共振反射生物传感器表面、基于光栅的波导生物传感器表面或介电薄膜叠式生物传感器表面,其中生物传感器表面具有一种或多种固定在其表面上的特异性结合物质,且其中一种或多种特异性结合物质可结合两种或更多种细胞类型中的一种或多种。允许两种或更多种细胞类型与一种或多种特异性结合物质结合,并检测两种或更多种细胞类型的不同反应。不同反应可以是例如两种或更多种细胞类型与一种或多种特异性结合物质连接的不同时间、由两种或更多种细胞类型呈现的与一种或多种特异性结合物质的不同细胞连接形态,以及两种或更多种细胞类型与一种或多种特异性结合物质连接的不同强度。所述方法还包括将两种或更多种细胞类型暴露于一种或多种试验试剂或刺激,并检测两种或更多种细胞类型的不同反应。不同反应可以是两种或更多种细胞类型对一种或多种试验试剂或刺激的不同反应强度、由两种或更多种细胞类型在响应一种或多种试验试剂或刺激时呈现的不同细胞形态,两种或更多种细胞类型随时间推移对一种或多种试验试剂或刺激的不同细胞反应,或者两种或更多种细胞类型随时间推移的不同反应动力学。

[0181] 所述方法还可包括将两种或更多种细胞类型暴露于第一试验试剂或第一刺激,并检测两种或更多种细胞类型对第一试验试剂或第一刺激的反应。然后将两种或更多种细胞类型暴露于第二试验试剂或第二刺激,其中两种或更多种细胞类型中的一种细胞类型对第二试验试剂或第二刺激的反应是已知的。或者,已知一种细胞类型对第一试验试剂的反应,而对第二试验试剂的反应未知。检测两种或更多种细胞类型对第二试验试剂或第二刺激的反应。鉴定对第二试验试剂或第二刺激具有已知反应的两种或更多种细胞类型中的一种细胞类型,并检测两种或更多种细胞类型的不同反应。一种或多种试验试剂或刺激可由生物传感器表面上存在的两种或更多种细胞类型中的一种或多种细胞表达。

[0182] 本发明还提供检测混合细胞群中第一细胞类型的存在情况的方法,其中混合细胞群中的细胞均不含可检测标记。所述方法包括将混合细胞群加到一个容器中,其中所述容器包括比色共振反射生物传感器表面、基于光栅的波导生物传感器表面或介电薄膜叠式生物传感器表面,其中生物传感器表面具有一种或多种固定在其表面上的特异性结合物质。允许混合细胞群与一种或多种特异性结合物质结合,其中对于结合一种或多种特异性结合物质,第一细胞类型具有与混合细胞群的其它细胞不同的反应。检测混合细胞群的不同反应,其中通过它们的不同反应检测第一细胞类型的存在情况。可测定混合细胞群中第一细

胞类型的百分比。

[0183] 本发明还提供检测混合细胞群中第一细胞类型的存在的方法,其中混合细胞群中的细胞均不含可检测标记。该方法包括将混合细胞群加到一个容器中,其中所述容器包括比色共振反射生物传感器表面、基于光栅的波导生物传感器表面或介电薄膜叠式生物传感器表面,其中生物传感器表面具有一种或多种固定在其表面上的特异性结合物质。允许混合细胞群与一种或多种特异性结合物质结合。将混合细胞群暴露于一种或多种试验试剂或刺激,其中与混合细胞群中的其它细胞相比,第一细胞类型对一种或多种试验试剂或刺激具有不同反应。检测第一细胞类型对一种或多种试验试剂或刺激的不同反应。如果检出不同反应,则第一细胞类型存在于细胞的混合物中。可测定混合细胞群中第一细胞类型的百分比。一种或多种试验试剂或刺激可由存在于生物传感器表面上的混合细胞群的一种或多种细胞表达。

[0184] 这些方法可用于许多现实应用中。例如,测定天然组织或任何混合细胞群的细胞的复杂混合物可用本发明的方法完成。可通过其对配体、细胞毒性剂或任何其它刺激的反应区分混合群内细胞群的各个类型,然后可测定混合物中细胞类型或目标类型的存在与否。这些方法可用于:例如在健康组织不起反应时,通过癌细胞对刺激的反应鉴定癌细胞;在非干细胞不起反应时,通过癌症干细胞对刺激的反应鉴定肿瘤中的癌症干细胞;检测血液和/或血清样品中特定循环细胞类型的存在情况;以及测定特异性细胞生物标记或细胞蛋白质的存在与否。

[0185] 本发明的方法可供定量混合细胞群中各种细胞类型的量。这些方法可用于:例如在健康组织不起反应时,通过其对刺激的反应鉴定混合群中癌细胞的百分比;在非干细胞不起反应时,通过癌症干细胞对刺激的反应鉴定肿瘤中癌症干细胞的百分比;鉴定分化成中间祖细胞的干细胞群的百分比;鉴定哪种最终分化的细胞群去分化成为干细胞样群(例如诱导多能干细胞群);检测血液和/或血清样品中特定循环细胞类型的存在情况;测定分离细胞群的纯度;以及测定特异性细胞生物标记或细胞蛋白质的存在或不存在的百分比。

[0186] 本发明的方法可用于测定细胞间的相互作用。可将产生影响邻近细胞类型的物质的细胞的混合物的治疗暴露于例如废止生产活性的化合物或检查干扰对所产生的物质的反应的化合物。例如,这些方法可用于后期阶段临床前试验,其中试验药物化合物效果的复分析需要体内样细胞系统。例如,人皮层神经元在某些细胞类型(例如神经膜细胞)存在时受到促进形成网状结构或轴突束。这种促进主要是由神经膜细胞产生和输入其周围环境的物质引起的。另外,可检测受由相邻细胞产生的化学物质促进的癌症转移。

[0187] 本发明的方法可用来测定混合群内指定细胞类型的存在与否,但此外,如果群内的不同细胞类型是已知的或可区分的,则可测定混合群中的各个细胞类型对外部刺激的选择性或敏感性。潜在应用包括选择性杀死或以其它方式影响群的一部分的鉴定剂,包括但不限于有害细胞(癌细胞、感染细胞等)、特殊细胞、含有健康、正常、激活、转化或不健康细胞的群中的细胞。

[0188] 本发明的方法可用于进行样品试剂和细胞系的高度平行测试,例如同时测试针对多个细胞系的多种拮抗剂/激动剂。可通过将拮抗剂混合物加到生物传感器孔中来进行多种拮抗剂的平行测试。可在第二步骤中对显示阳性命中的任何孔去卷积,即通过测试针对混合物的各种化合物的各个细胞系。同样,可测试多种激动剂以发现指定受体的新的激动

剂或使孤儿受体去孤儿化。

[0189] 干细胞和其它细胞的分析

[0190] 包括干细胞分析在内的细胞分析的一种方式将利用 BIND® READER 或 BIND® SCANNER 的无标记检测与 BIND 微量培养板生物传感器整合在一起。在该方法中,将微量培养板生物传感器用胞外基质材料或其它特异性结合物质包覆,随后与干细胞一起培育。干细胞与胞外基质或特异性结合物质粘附,并加入试验化合物或刺激。使用 BIND® READER 或 BIND® SCANNER 监测形态和粘附变化。在某些情况下,可优选使用 BIND® SCANNER,一种能够进行单细胞分析的高分辨率无标记检测仪器。按其性质,干细胞群不是均质细胞群。此外,它们可不是均一分化的。因此,BIND® SCANNER 可测量和区分这些混合细胞群。

[0191] 细胞(例如干细胞)可与本发明的生物传感器连接并散开。可实时监测细胞与生物传感器的连接。本发明的方法可用来检测单一细胞或细胞群的形态变化。例如,扫描电子显微图显示 ATP 对表达大鼠 P2X7 受体的 HEK 细胞的作用。对照细胞显示 HEK 细胞的典型形态,其具有粗糙表面及细丝状伪足和薄片状板状伪足,而暴露于 ATP 2 分钟的细胞显示光滑表面和许多大的 (1 μ m) 泡和小的 (0.5 μ m) 微泡。本发明的方法无需使用标记或显微照相术便可检测这些和其它的形态变化。

[0192] 细胞各自对配体具有特征反应,所述配体被加到细胞与之连接或驻留在上面的生物传感器表面上。图 1 表示 SH-SY5Y 细胞对比色共振反射生物传感器微孔板上的毒蕈碱性配体、P2Y 配体和 β 抑制蛋白配体的特征反应。由于各个细胞类型对各个配体类型都具有特征反应,因此可一起测定混合细胞群。例如,可将不同类型的细胞或不同分化阶段的细胞(或其组合)加到本发明的生物传感器表面(例如微量滴定板孔)上。可将配体加到生物传感器表面上,并检测细胞对配体的反应。可根据细胞对配体的反应测定某些细胞的存在与否。另外,可测定群中反应性/非反应性细胞的比例。也就是说,如果细胞群含有两种或更多种细胞类型(例如与配体反应的癌细胞和与配体反应的非癌细胞),则可通过测定孔中各个细胞对配体的反应,来测定癌细胞与非癌细胞的比例。

[0193] 在某些情况下,细胞(例如干细胞或原代细胞)对配体有不同的反应,这取决于什么胞外基质组分存在于生物传感器表面上。可测定各种细胞类型的这种偏好。图 2 表示当细胞在包含 PBS/ 卵清蛋白、纤连蛋白、胶原或层粘连蛋白的比色共振反射生物传感器上时,mP-M5 和 mP-M4 细胞对以下 3 种配体的反应:乙酰胆碱、卡巴胆碱和毛果芸香碱。mP-M5 和 mP-M4 细胞当在包含纤连蛋白或胶原的生物传感器上时对配体具有最佳反应。图 7 表示与包含卵清蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白或胶原(collagen)的比色共振反射生物传感器的大鼠 MSC 细胞连接。MSC 细胞与包含胶原的生物传感器连接比与其它表面的连接更好。可测试细胞以确定用于与生物传感器连接的最佳配体/ECM 包层。

[0194] 在干细胞研究中,测定中通常使用少于 1,000 个细胞的群。可采用本发明的方法容易地测定少于 1,000 个细胞的细胞群。本发明的方法可用于在单一生物传感器表面(例如微观流体槽或微量滴定板孔)上测定少于约 1,000、750、500、100、50、10 或 5 个细胞。此外,可采用本发明的方法测定单个细胞。

[0195] 图 3A 表示由连接在比色共振反射生物传感器上的 M5 细胞产生的信号。BIND® SCANNER 根据连接信号鉴定细胞位置,并只在细胞所在位置测定对刺激的反应。空白区不包括在导致更高敏感性的反应测量内。可在 384 孔培养皿中获得少至约 100-150 个细胞的

稳定剂量反应图。图 3B 表示细胞与生物传感器连接后 30 分钟完成的扫描。将细胞连接的信号清零。因此,连接后,细胞没有显示形态上的其它变化。图 4A 表示细胞顶面(连接比色共振反射生物传感器的细胞的相对面)的细胞相差图,而图 4B 表示细胞底面(与生物传感器结合的细胞一面)的相同细胞的连接信号。

[0196] 图 5A 表示 M5 细胞对比色共振反射生物传感器的连接反应。图 5B 表示 M5 细胞对加入卡巴胆碱的反应。把信号基线化至连接信号。因此,所有反应是由于加入卡巴胆碱,而不是由于连接反应。如果不加入卡巴胆碱,则检测不到细胞反应。图 5 右图,表示由各个细胞产生的信号不均匀。也就是说,如果细胞在响应卡巴胆碱时移动或改变形态,则在细胞边缘附近观察到更多信号。

[0197] 图 6 表示加到比色共振反射生物传感器上的 M4 细胞与 RBL 亲代细胞的混合群。M4 细胞具有比 RBL 细胞多的卡巴胆碱受体。然后将 $10 \mu\text{M}$ 卡巴胆碱加入细胞中。中图表示将卡巴胆碱加入细胞中后 30 分钟 3 : 1 比率的 M4 细胞 : RBL 细胞。右图表示加入卡巴胆碱后 30 分钟 1 : 3 比率的 M4 细胞 : RBL 细胞。图 6 的中图显示比右图多的信号,因为存在的 M4 细胞比 RBL 细胞多,各个 M4 细胞具有更多的卡巴胆碱受体。

[0198] 将 RBL 和 M5/RBL 细胞以 1 : 1 比率混合,并接种到比色共振反射生物传感器孔中。使细胞与生物传感器连接,并在 BIND[®] SCANNER 上检测连接反应。结果见图 27A 和图 27B。将乙酰胆碱加到生物传感器表面上。仅 M5/RBL 细胞与乙酰胆碱起反应。细胞对乙酰胆碱的反应见图 27C 和图 27D。约 50% 的 1 : 1 RBL+M5/RBL 细胞的混合群对乙酰胆碱起反应。可对反应细胞的不依赖于非反应群的定量反应(例如对其它试验试剂或刺激的反应)进行门控(gated)和分析。因此,在已知其对配体的反应时,可检测生物传感器上不同细胞类型的存在情况。

[0199] 图 8A 表示将细胞加到比色共振反射生物传感器上后不久和在生物传感器上 16 小时后的大鼠 MSC 细胞(图 8B)。在生物传感器上 16 小时后细胞散开。图 9 表示大鼠 MSC 细胞在 30 小时内在比色共振反射生物传感器表面上的移动。左边的箭头(指向深色斑点)表示细胞在其与生物传感器表面连接后不久的所在位置,右边的箭头(指向浅色斑点)表示细胞在与生物传感器表面连接后 30 小时的所在位置。

[0200] SDF-1 α 结合并激活 CXCR4、GPCR。干细胞将移向释放 SDF-1 α 梯度的组织。受损组织释放升高水平的 SDF-1 α , 导致间充质干细胞向损伤部位的迁移增加。在受体活化时,趋化因子诱导细胞的肌动蛋白细胞骨架显著改变。当以梯度提供趋化因子时,这些变化表现为定向移动。SDF-1 α 诱导间充质干细胞和成骨细胞祖细胞迁移。CXCR4 的过表达导致 MSC 迁移提高并归巢至血管损伤部位。图 10A 表示使用比色共振反射生物传感器微孔板和 BIND[®] READER 得到的, THP-1 细胞和 CEM 细胞(图 10B)对不同浓度的 SDF-1 α 的反应。SDF-1 α 在多种细胞类型中诱导快速稳定的反应,正如用 BIND[®] READER 测量的一样。图 11A 表示 MSC 细胞对比色共振反射生物传感器微孔板上的 SDF-1 α 的反应。图 11B 表示 MSC 细胞(384 孔微量培养板中的 7,000 个细胞)对 SDF-1 α 和抑制剂(CXCR4 封闭性抗体)的反应。

[0201] 将大鼠 MSC 细胞加到用纤连蛋白包被的生物传感器上。在 3 小时和 16 小时在比色共振反射生物传感器上检测细胞连接。参见图 12 左图。将连接信号清零,并用或不用 SDF-1 α 刺激细胞。参见图 12 右图。细胞的移动可参见图 12 右图。较深的斑点是检测前

细胞所处位置,而较浅的斑点是当检出反应时细胞所处位置。若无刺激加入到细胞中,则可观察到一些细胞移动;然而,如果将 SDF-1 α 加入细胞中,则随同生物传感器上细胞的散开,观察到细胞的移动。图 13A-B 表示图 12 右图的放大图。在发生移动和/或细胞粘附的细胞边缘上观察到信号增强。增强的信号与细胞跨生物传感器移动时的细胞前缘有关,正如通过延时成像证实的一样。这与细胞的胞外基质-整联蛋白相互作用(engagement)一致。图 14 表示自 BIND[®] READER(图 14A)和 BIND[®] SCANNER(图 14B)的读数。观察到信噪比改进约 7-10 倍。

[0202] 干细胞分化依赖于细胞粘附(参见 Stem Cells 25:3005(2007); Cardiovascular Res. 47:645(2000))。通过监测粘附,可检测分化。无标记干细胞成像方法为观察细胞粘附、移动和分化提供了独特机会。可由本发明的一个生物传感器表面上存在的不同纳米结构区诱导干细胞的不同反应(例如不同的分化、趋化或粘附)。美国顺序号 12/218,096(PCT/US09/03541)描述了在一个生物传感器表面上具有多于一种光栅区域类型的生物传感器。也就是说,显示不同共振值或周期(PWV1、PWV2、……)的光栅的两个或更多个不同的空间区域存在于一个生物传感器表面上。在本发明的一个实施方案中,不同的空间区域在响应用光照射的生物传感器时具有足够的光谱分离,从而可通过对测试装置进行计数的检测仪器解析光谱分离。具有两种或更多种不同的空间区域的生物传感器可用来诱导干细胞或其它细胞的分化、移动或粘附。然后,可通过检测各区域上的不同 PWV 来检测生物传感器上的这种分化、移动或粘附。例如,细胞群可在一个具有独特共振值的区域上分化,正如该区域上的 PWV 增加所显示的一样,但不在另一区域上分化,正如该区域上的 PWV 无变化所显示的一样。

[0203] 另外,具有两种或更多种区域(各包含不同的共振值)的生物传感器,可用来检测两种或更多种细胞群对一个容器中的一种或多种试验试剂或刺激的反应。例如,可将一种细胞类型加入一个区域,可将第二细胞类型加入具有不同于第一区域的共振值的第二区域。可检测各区域的 PWV,并且可测定一个容器中的各个细胞类型对试验试剂或刺激的反应。

[0204] 同样,可以测定细胞从一个区域向第二区域的移动。例如,可将化学引诱物加在一个区域上,而可将细胞群加在第二区域中。可通过测定各个区域的 PWV,来检测细胞从第二区域向具有化学引诱物的区域的移动。第二区域中的 PWV 降低和具有化学引诱物的区域的 PWV 的提高表明细胞向化学引诱物区域的移动。

[0205] 筛选对细胞分化产生作用的化合物的方法

[0206] 本发明的方法可用来筛选对细胞分化产生作用的化合物,细胞包括例如干细胞,例如间充质干细胞、造血干细胞、神经元干细胞和胚胎干细胞。干细胞是这样的细胞,其可无限自我更新同时产生成熟为更特化的器官特异性细胞的细胞后代。细胞分化是不太特化的细胞变成更特化的细胞类型的过程。分化可改变细胞的大小、形状、膜电位、代谢活性和对信号的反应性。例如,试验化合物可保持干细胞自我更新、促进或加快分化、减慢或终止分化或使多能细胞分化成与正常观察到的不同的细胞。试验化合物还可促进细胞去分化。去分化是其中部分分化或最终分化的细胞恢复到较早的发育阶段。本发明的方法可直接或间接地通过检测细胞分化产物的变化(增加、降低或抑制),或者通过检测在已进行自我更新、分化或去分化的细胞中的变化,例如形态变化、细胞与生物传感器连接的变化、动力学

特征变化或本文所述的其它变化,来检测试验化合物对细胞的自我更新、分化和去分化的作用。也就是说,采用本发明的方法检测的细胞的变化(例如形态变化、细胞与生物传感器连接的变化、动力学特征变化或本文所述的其它变化)可用于测定细胞的自我更新、分化和去分化,和测定细胞群或混合细胞群中细胞分化的增加、降低或抑制。

[0207] 间充质干细胞(MSC)具有显著的临床潜力,因为能够自我更新的多能细胞可分化成若干细胞类型,包括例如成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞。本发明的方法提供采用光学共振检测技术以能够高通量筛选MSC(和其它细胞)迁移和分化的无标记测定。MSC可容易地在例如胞外基质包被的光学生物传感器上增殖,并以稳定的剂量依赖性且高度灵敏的无标记反应方式对浴槽应用(bath application)的趋化因子起反应。MSC-成骨细胞分化检测的特征在于独特的无标记信号,因为在传感器表面上形成胶原或矿物沉积物。实时读出显示单个孔中的完全分化表型,比传统染色试剂更灵敏,而且可用于高通量筛选化合物文库(包括小分子文库或siRNA文库)以监测分化或自我更新率的提高或降低。

[0208] 大鼠MSC可分化成例如脂肪细胞、软骨细胞和成骨细胞。在用胶原包被的生物传感器上,大鼠MSC被诱导分化成为成骨细胞。图17和图18表示到第14天,细胞矿化并产生骨。使用茜素红染料来证实细胞的确产生骨。参见图18。将图18中的图像从前一天基线化。将比色共振反射生物传感器放在BIND® SCANNER上用以每天读数。图19A表示图18的第17天图的近视图。白色区域是成骨细胞的矿化。图19B表示相同细胞部分的相差显微图。相差显微图未显示细胞分化。因此,本发明的方法可检测细胞分化的阶段而不需标记或染色。

[0209] 将大鼠MSC(Invitrogen)以100个细胞/孔接种在384孔比色共振反射生物传感器中,并用成骨细胞分化培养基处理。在BIND® SCANNER上获得每日图像,并基线化至第0天细胞连接信号。在骨样矿物质沉积在传感器表面上时,观察到逐步和稳步的PWV变化(约25nM),正如平行孔的茜素红染色所表明的一样。参见图20A。糖原合酶激酶3(GSK3 β)的抑制剂加快MSC-成骨细胞分化。图20B表示由GSK3 β 引起的加速分化的检测。图20C表明在检测矿化时,BIND® SCANNER比茜素红染色更灵敏。有利的是,图20A所示BIND™图像是许多天从单一孔中成像的;茜素红需要1孔/天作为终点染色测定。因此,本发明的方法可供在几天内测定相同孔的细胞,而细胞染色方法需要在几天内使用多个孔。

[0210] 在另一个实验中,大鼠MSC在384孔生物传感器上分化成为成骨细胞,用茜素红对矿化进行每日染色,或用Van Gieson染色对胶原进行每日染色。用读板仪在562nm下对染色定量。实验显示BIND™生物传感器上分化MSC的胶原形成在矿化之前,这与正常骨形成一致。参见图21。

[0211] 具有未分化MSC的传感器的扫描电子显微镜(SEM)分析清楚显示位于下面的光栅结构,而具有分化MSC的传感器则被一层矿化结节沉积物包覆,使光栅模糊—这与跨孔测量的扩散而强的PWV变化一致。较大沉积物簇的能量色散X射线(EDS)分析表明钙(Ca)和磷(P)的存在,与骨沉积一致。钛(Ti)、氧(O)和硅(Si)峰得自生物传感器组分。

[0212] 在另一个实验中,将大鼠MSC(Invitrogen)在有或没有GSK3 β 抑制剂的成骨细胞分化培养基中培养1-19天。每天收集BIND™图像,并基线至前一天的测量,因此提供有关矿化率的信息。用标准染色方法(例如茜素红)不可能收集矿化率数据。参见图22A。图22B表示在BIND® SCANNER上测定的PWV变化的定量(+/-标准差,n=12孔)。用GSK3 β

抑制剂的不同分化率表明, GSK3 β 调节 MSC 分化成为成骨细胞的时机和比率。

[0213] 干细胞具有显著的临床潜力, 本发明的方法提供采用光学共振检测技术以能够高通量筛选干细胞迁移和分化的无标记测定。可从单个细胞培养孔中获得完全分化特征, 并可测定分化率。

[0214] 本发明的一个实施方案提供用于筛选候选化合物调节细胞分化的能力的方法。将一种或多种细胞类型(均质或异质细胞群)(有或没有 ECM) 加到比色共振反射生物传感器(或基于光栅的波导生物传感器)的表面上, 其可任选用 ECM 包覆。在一个实施方案中, 可将推定的支持细胞连接和分化的不同 ECM 或材料用于传感器上, 作为加强分化或其它细胞过程(粘附、移动等)的材料的屏蔽(screen)。可诱导细胞分化。通过比较各细胞群在候选化合物存在或不存在时的波长峰值(或折射率), 来检测候选化合物存在或不存在时细胞分化的变化。与候选化合物不存在时的细胞分化活性相比, 候选化合物存在时细胞分化活性的变化表明候选化合物调节细胞分化的能力。细胞分化活性的变化可以是细胞分化活性提高、细胞分化活性降低、细胞分化活性受抑制、分化细胞类型改变(也就是说, 试验化合物引起细胞分化成不是正常观察到的细胞类型)。细胞分化活性的变化可以是胶原产生的增加或降低、矿化结节形成的增加或降低或者其它细胞分化产物的增加或降低。一种或多种细胞类型可以是干细胞, 例如间充质干细胞。可通过检测细胞大小、细胞形状、细胞粘附、细胞膜电位、细胞代谢活性或细胞对信号的反应性的变化来检测细胞分化活性的变化。

[0215] 本发明的另一个实施方案提供用于筛选候选化合物调节细胞分化的能力的方法。可将一种或多种细胞类型(有或没有 ECM) 加到比色共振反射生物传感器(或基于光栅的波导生物传感器)的表面上, 其可任选用 ECM 包覆。可诱导一种或多种细胞类型分化。通过比较在候选化合物存在或不存在时的波长峰值(或折射率), 来检测候选化合物存在或不存在时一种或多种细胞分化产物的产生。与候选化合物不存在时一种或多种细胞分化产物相比, 候选化合物存在时一种或多种细胞分化产物的变化表示候选化合物调节细胞分化的能力。

[0216] 检测细胞分化的基因调节的方法

[0217] GSK3 β 或腺苷激酶(ADK)的抑制加快 MCS- 成骨细胞分化。通过毛喉素处理的 cAMP 的活化使成骨细胞分化减慢。将人 MSC 接种在 384 孔比色共振反射生物传感器板上。将细胞用成骨细胞分化混合物处理。每日测量 PWV。未处理细胞(Ctrl)和成骨细胞分化的(OS-Diff)细胞的代表孔见图 24。对于成骨细胞分化的细胞, 生物传感器表面上的矿化沉积物在第 9 天开始出现, 之后持续积累。物质在生物传感器表面上的积累产生非常大而稳步的正 PWV 信号变化。

[0218] 对 GSK3 β 或 ADK 有特异性的 siRNA 分子购自 ThermoFisher, 并将其转染到成骨细胞分化的细胞中。当将对 GSK3 β 和 ADK 有特异性的 siRNA 分子在临分化前转染至人 MSC 中时, 在无标记测定中在 BIND[®] SCANNER 上检测到成骨细胞分化加快。参见图 25 和图 26。图 25 表示对于若干处理条件的第 12 天的样品孔。图 26 对图 25 所示结果进行定量。对每个处理条件的 6 个孔取平均。在 ADK siRNA 处理的情况下, 通过在 ADK siRNA 转染后在毛喉素中培育细胞, 可阻断加快的分化表型。ADK 是腺苷酸环化酶-cAMP 信号转导途径中的关键上游酶。当 ADK 通过 siRNA 转染下调时, 信号转导途径受到抑制, 导致加速表型。然而, 毛喉素激活 ADK 下游的相同信号转导途径, 因此毛喉素处理恢复适当的信号转导, 并阻断 ADK

下调的作用。

[0219] 这些实验表明,本发明的方法可通过例如抑制性核酸或其它基因调节方法而用于检测和评价特异性基因表达调节。抑制性核酸包括例如三链结构核酸、piRNA、dsRNA、siRNA、发夹 dsRNA、shRNA、miRNA、核酶、适体酶 (aptazyme) 和反义核酸。

[0220] 细胞迁移测定

[0221] 响应环境刺激的细胞迁移对很多生理过程是重要的,包括免疫应答、伤口愈合和干细胞归巢。在某些情况下,过度的细胞迁移可有助于疾病病理,包括炎症疾病和肿瘤转移。缺少能够在功能相关的细胞类型中进行初步筛选活动的高通量测定阻碍了细胞迁移抑制剂的药物研发努力。本发明提供使用无标记光学生物传感器技术的不同的用于趋化的高通量筛选测定。BIND™ “降落 (touchdown)”测定测量细胞通过胶原层侵袭并侵袭到包覆趋化因子的生物传感器表面上。BIND™ “升离”测定测量细胞从胶原包覆生物传感器表面上离开朝向浴培养基中提供的趋化因子的剥离。两种测定不依赖于转孔 (transwell), 每孔需要低的细胞数, 并且是 1536 孔兼容的。

[0222] “升离”测定提供检测第一细胞群对一种或多种刺激的反应的方法。参见图 15。细胞可以是任何类型的细胞, 包括例如干细胞。可将一种或多种胞外基质配体固定在比色共振反射生物传感器或基于光栅的波导生物传感器的表面上。第一细胞群具有对一种或多种胞外基质配体有特异性的细胞表面受体。然后可将第一细胞群加到生物传感器上。或者, 将第一细胞群与一种或多种胞外基质配体混合, 其中第一细胞群具有对一种或多种胞外基质配体有特异性的细胞表面受体。将第一细胞群和一种或多种胞外基质配体加到比色共振反射生物传感器或基于光栅的波导生物传感器的表面上。

[0223] 可将凝胶或凝胶样物质加到生物传感器上, 使得第一细胞群和胞外基质配体被凝胶或凝胶样物质部分或完全包覆。

[0224] 凝胶或凝胶样物质可以是例如 MATRIGEL™ 基底膜基质、藻酸胶、胶原凝胶、琼脂、琼脂糖凝胶、合成聚合物水凝胶、合成水凝胶基质、层粘连蛋白凝胶、vitrogen、脱乙酰壳多糖凝胶、血纤蛋白原凝胶、PuraMatrix™ 肽水凝胶 (一种合成基质, 用于产生适于各种细胞培养实验的限定的三维 (3D) 微环境) 或明胶。凝胶或凝胶样物质可任选包含一种或多种 ECM 配体、趋化物质、生长因子、特异性结合配偶体、配体或其组合。

[0225] 或者, 可将第二细胞群或人工基底膜而不是凝胶或凝胶样物质加到生物传感器表面。第二细胞群、人工基底膜或凝胶或凝胶样物质可形成屏障, 第一细胞群通过该屏障迁移。人工基底膜是本领域众所周知的。参见例如 Inoue 等, *J. Biomed. Mater. Res. A.* 73 :158 (2005) ;Guo 等, *Int. J. Mol. Med.* 16 :395 (2005) ;Saha 等, *Ind. J. Exp. Biol.* 43 :1130 (2006) ;Barroso 等, *J. Biol. Chem.* , 283 :11714 (2008) ;Okumoto 等, *J. Hepatol.* , 43 :110 (2005)。第二细胞群可以是例如上皮细胞或内皮细胞群。

[0226] 可将一种或多种刺激加到凝胶、凝胶样物质、第二细胞群或人工基底膜中。一种或多种刺激可以是例如趋化物质、配体或产生刺激的第三细胞群。

[0227] 检测第一细胞群对试验试剂或刺激的反应。如果第一细胞群从生物传感器表面上移开, 则 PWV 或有效折射率将呈现降低。可通过在一个或多个期间内监测波长峰值或者通过在一个或多个期间内监测有效折射率变化, 来检测第一细胞群对一种或多种刺激或试验试剂的反应。可实时检测第一细胞群的反应。另外, 可相对于第一细胞群检测第二细胞群对

刺激或试验试剂的反应。可通过在一个或多个期间内监测波长峰值或者通过在一个或多个期间内监测有效折射率变化,来检测第二细胞群对一种或多种刺激或试验试剂的反应。可实时检测第二细胞群的反应。

[0228] 例如,HT1080 细胞对胎牛血清 (FBS) 起反应,而 NIH3T3 细胞不起反应。在使用比色共振反射生物传感器的升离测定中,将 HT1080 细胞和 NIH3T3 细胞在趋化因子中暴露于 FBS。HT1080 细胞从生物传感器上兴起,并向 FBS 移动,正如来自生物传感器的信号较少所表示的一样。NIH3T3 细胞保留在生物传感器表面上并增殖,因为它们不与 FBS 起反应,正如来自生物传感器的信号更多所表示的一样。图 16 表示与对照孔相比,在 MATRIGEL™ 基底膜基质存在下 MSC 细胞从生物传感器上兴起。可容易地用 MATRIGEL™ 包层鉴定 MSC 连接信号。与对照孔相比,MSC 显示从传感器上兴起的趋势。这由图 16 中黑色部分所显示的负 PWV 变化所证实。

[0229] “降落”测定提供检测第一细胞群(例如干细胞或原代细胞)对一种或多种刺激的反应的方法。将一种或多种刺激加到比色共振反射生物传感器或基于光栅的波导生物传感器的表面上。将凝胶、凝胶样物质、第二细胞群或人工基底膜加到生物传感器表面上。第一细胞群与一种或多种胞外基质配体混合,其中第一细胞群具有对一种或多种胞外基质配体有特异性的细胞表面受体。将第一细胞群加到生物传感器上。检测第一细胞群对一种或多种刺激的反应。如果第一细胞群向生物传感器表面移动,则 PWV 或有效折射率将提高。可通过在一个或多个期间内监测波长峰值或者通过在一个或多个期间内监测有效折射率变化,来检测第一细胞群对一种或多种刺激的反应。可实时检测第一细胞群的反应。一种或多种刺激可以是趋化物质或产生刺激的第三细胞群。第二细胞群可以是上皮细胞群或内皮细胞群。第一细胞群可以是干细胞群。

[0230] 其它测定

[0231] 可将趋化物质用于“浴槽应用”中的细胞。在该方法中,使细胞(例如干细胞或原代细胞)粘附生物传感器,随后用趋化物质处理。在加入试验物质后,使用 BIND® READER 或 BIND® SCANNER,实时检测细胞反应(随机移动和粘附)。

[0232] 可采用本发明的方法检测干细胞向二维趋化梯度的定向迁移。在这些方法中,使细胞(例如干细胞)粘附生物传感器,优选在微量滴定板孔的角落或侧壁。以产生趋化物质跨孔浓度梯度的方式,从孔中的规定区域加入趋化物质。在 BIND® READER 或 BIND® SCANNER 上检测细胞反应和迁移。可以多种方法确定方向性;在一个实施方案中,BIND® READER 或 BIND® SCANNER 能够测定微量滴定板孔内的各个区域,使得当细胞从一个区域迁移至另一区域时,可监测变化。在另一种方法中,用不同光栅结构使生物传感器的光栅图案化,所述光栅结构在生物传感器上与不同光频率共振。通过使用不同的光频率监测不同区域,可监测细胞从一个区域到另一个区域的移动。在第三种方法中,通过单一细胞分析,BIND® SCANNER 可通过其在生物传感器上的粘附变化来直接测定和跟踪各个细胞的移动。

[0233] 干细胞分析的另一种方式涉及使用无标记检测平台检测干细胞分化。在一个实施方案中,微量培养板生物传感器用胞外基质材料包覆,随后与干细胞一起培育。干细胞粘附胞外基质,经受促进干细胞分化的培养条件。在某些情况下,可加入试验物质检测其对于干细胞分化的影响。可通过检测不同时间间隔的 PWV 信号,使用 BIND® READER 或 BIND® SCANNER 跟踪分化。相反,可在欲防止分化的条件下利用 PWV 信号监测干细胞分裂。在另一

种方式中,根据与ECM不同的相互作用,分化细胞的连接信号可在质/量上不同于未分化细胞。可利用这种差异作为 BIND[®] SCANNER 上不同细胞类型的特征。

[0234] 在本发明的另一个实施方案中,可能合乎需要的是通过称为“生物概况分析”的方法监测分化阶段。生物概况分析在概念上涉及使用基因芯片的遗传概况分析,因为可根据细胞内的生物反应监测图案化反应 (patterned response)。然而,生物概况分析的不同在于它使用活细胞,并可实时监测。在该方法中,干细胞粘附胞外基质,且干细胞是贴壁的。随后,使干细胞经受分化条件、配体或试验化合物或环境条件。生物概况是随时间推移(约1秒钟、5秒钟、10秒钟、30秒钟、60秒钟、约1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、10分钟、20分钟、40分钟、60分钟或更多分钟)获取的细胞群的约2、5、10、20、50个或更多个PWV的集合。生物概况揭示PWV随时间推移的变化,并代表细胞对分化条件、试验化合物或环境条件的反应的特有特征。例如,如果试验化合物诱导分化,则在细胞分化和生长时,PWV可随时间推移升高。如果试验化合物是毒素,则在细胞变弱并死亡时,PWV可随时间推移而降低。生物概况也可以是对两种或更多种不同浓度的试验化合物或配体获取的细胞群的PWV。生物概况揭示随不同浓度而发生的PWV变化,并代表试验化合物或配体的特有特征。

[0235] 周期性地配体加到细胞中以探查无标记反应;例如,加入一组GPCR配体以探查细胞对配体的图案化反应。生物传感器上的不同反应可自细胞出现,因为它们进行分化,而且新的受体受到上调或下调。此外,参与信号转导途径或细胞粘附途径的蛋白质在响应分化时将变化,并且在响应一组配体时也将引起变化。因此,该一组配体可以是已知在响应分化时变化的特异性受体,或者优选是更随机的细胞调节剂。因此,各种分化细胞类型将对配体产生其自有的图案化反应,因此称为“生物概况”。此外,光学生物传感器可整合电探头的阵列,为可对电位起反应的分化细胞(例如肌肉或神经细胞)提供电刺激。光学生物传感器记录这类细胞对电刺激的反应。BIND[®] SCANNER可监测反应细胞和电探头之间的几何关系。同样,生物传感器可包括流量装置的部分,使能够进行涉及流量或压力的干细胞测定。

[0236] 提高灵敏度和降低背景信号的方法

[0237] 可采用本发明的方法提高结合测定的灵敏度和降低结合测定的背景信号。结合测定可包括使配体或特异性结合物质与生物传感器表面固定或以别的方式缔合,然后将结合配偶体加到表面上。可检测结合配偶体与配体或特异性结合物质的结合。然而,在某些情况下,结合配偶体可与生物传感器非特异性结合。也就是说,结合配偶体不与配体或特异性结合物质特异性结合,而与生物传感器表面本身特异性结合。可通过阻断剂降低非特异性结合。然而,阻断剂可降低特异性结合信号。

[0238] “特异性结合”或“对……有特异性”是指结合配偶体识别和结合规定的配体或特异性结合物质,但基本上不识别或结合样品中的其它非特异性分子。

[0239] 本发明的一个实施方案提供通过将一层凝胶或凝胶样物质加到与生物传感器表面固定或以其它方式缔合的特异性结合物质或配体之上,以提高结合测定的灵敏度和降低结合测定的背景的方法。凝胶或凝胶样物质可以是例如MATRIGEL[™]基底膜基质、藻酸胶、胶原凝胶、琼脂、琼脂糖凝胶、合成聚合物水凝胶、合成水凝胶基质、层粘连蛋白凝胶、vitrogen、脱乙酰壳多糖凝胶、血纤蛋白原凝胶、明胶或PuraMatrix[™]肽水凝胶(一种用于产生适于各种细胞培养实验的限定的三维(3D)微环境的合成基质)。凝胶或凝胶样物质可任选包含一种或多种ECM配体、趋化物质、生长因子、特异性结合配偶体、配体或其组合。

[0240] 在“降落”趋化性测定中,将趋化因子(PDGF-BB)点样在384孔生物传感器板仅各孔的中央(而不是遍布孔的整个底面)。然后,将孔表面用MATRIGEL™基底膜基质包覆,并将间充质干细胞(MSC)加到MATRIGEL™基底膜基质的表面上。使用BIND® SCANNER检测孔的波长峰值以确定MSC是否与随机穿过孔相反地优先向PDGF-BB点迁移。对细胞的迁移评分作为细胞连接(正PWV变化)信号。数据表明,实际上,存在MSC向PDGF-BB点迁移的倾向。还制备了平行孔,并将对PDGF-BB有特异性的中和抗体加到孔中以测定趋化因子诱导的迁移是否可被阻断。参见图23。图23底行中间的图显示抗体的确阻断MSC迁移,但也显示在孔中心非常亮的长方形的正PWV变化,这代表了PDGF-BB抗体与点在生物传感器上的PDGF-BB的相互作用。图23中,“趋化因子X”是PDGF-BB;“趋化因子X nAb”是对PDGF-BB有特异性的中和抗体。

[0241] 出人意料的是,MATRIGEL™基底膜基质通过降低生物传感器上的背景信号而提高系统的灵敏度,并产生比预测大的抗体-抗原信号:背景反应。因此,凝胶和凝胶样物质提供新的生物传感器表面化学类型,与其它生物传感器表面化学或葡聚糖样生物传感器表面不同,为其中信号:背景需要优化的生化应用提供了改进。

[0242] 因此,本发明提供包含以下的比色共振反射生物传感器光栅表面或基于光栅的波导生物传感器光栅表面:与生物传感器表面固定或缔合的一种或多种特异性结合物质和一种或多种特异性结合物质上面的一层凝胶或凝胶样物质。生物传感器光栅表面可形成盛液容器的内表面。盛液容器可以是微量滴定板或微观流体槽。

[0243] 本发明还提供用于检测比色共振反射生物传感器光栅表面或基于光栅的波导生物传感器光栅表面上特异性结合物质和结合配偶体之间的反应的改进方法。可将一种或多种特异性结合物质加到生物传感器光栅表面上,使得一种或多种特异性结合物质固定在生物传感器光栅表面上或者与生物传感器光栅表面缔合。一种或多种特异性结合物质可在生物传感器表面的一个或多个独特位置上沉积。将凝胶或凝胶样物质加到生物传感器表面上。任选可将一种或多种ECM配体、趋化物质或配体加到生物传感器表面上。将潜在结合一种或多种特异性结合物质的一种或多种结合配偶体加到凝胶或凝胶样表面上。通过测定一个或多个波长峰值或有效折射率来检测一种或多种特异性结合物质和一种或多种结合配偶体的相互作用。结果比不用凝胶或凝胶样物质而得到的结果更有特异性,而且与不使用凝胶或凝胶样物质而得到的结果相比,非特异性背景降低。虽然不希望受特定理论的束缚,但一般认为凝胶或凝胶样物质起阻断非特异性结合的作用,导致更具特异性的结果。

[0244] 本发明的一个实施方案提供包括一个或多个比色共振反射生物传感器光栅表面或一个或多个基于光栅的波导生物传感器光栅表面和一个或多个凝胶或凝胶样物质的容器的试剂盒。试剂盒可任选含有一种或多种特异性结合物质。一个或多个比色共振反射生物传感器光栅表面或基于光栅的波导生物传感器光栅表面可包含固定在生物传感器光栅表面上或与生物传感器光栅表面缔合的一种或多种特异性结合物质。

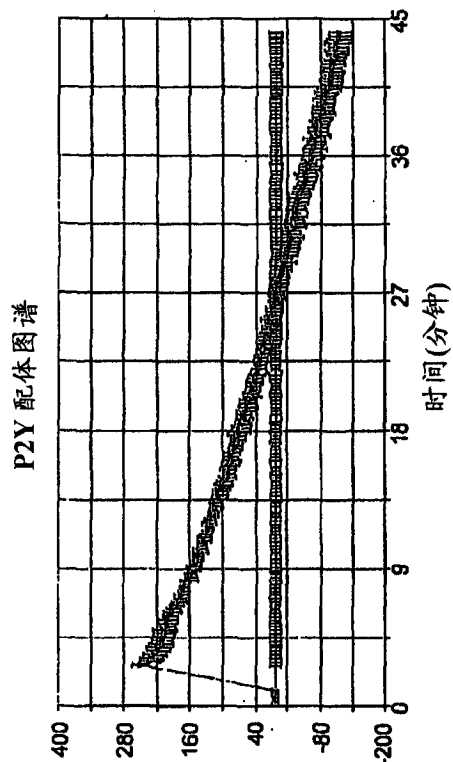
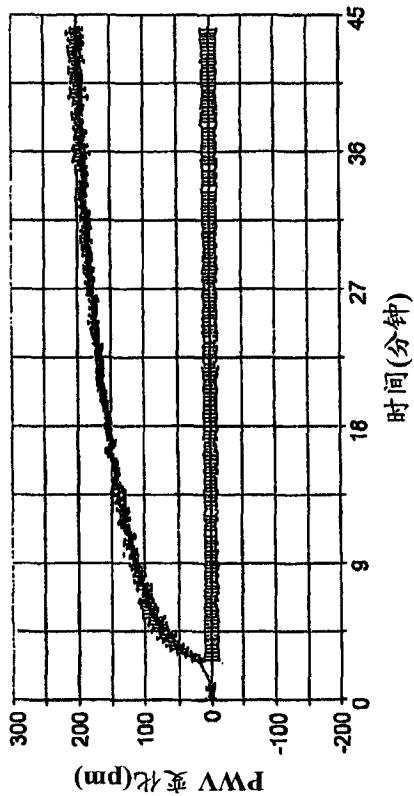
[0245] 本文不论何处提及的所有专利、专利申请和其它科学或技术文献都通过引用以整体结合到本文中。本文对本发明进行了示例性描述,可在不存在本文未具体公开的任何要素或限制时,适当地实施本发明。因此,例如,在本文任何情况下,术语“包含”、“基本上由……组成”和“由……组成”中的任一个可被其它两个术语中的任一个替换,而又保持它们的通用含义。所使用的术语和表达作为描述性而非限制性术语使用,而且在使用这些术

语和表达方式时,并不排除所写明和记载的特征或特征部分的任何等价物,但是要了解的是,各种修改在本发明要求保护的范围内都是可能的。因此,应当了解的是,虽然通过实施方案、任选特征具体地公开了本发明,但是本领域技术人员可采用本文所公开的构思的修改和变动,这些修改和变动也被认为属于本发明说明书和所附权利要求书限定的范围内。

[0246] 另外,当按照马库什基团或其它备选基团描述本发明的特征或方面时,本领域技术人员应当理解,藉此也按照马库什基团或其它基团的各成员或成员亚组来描述本发明。

对各种配体的细胞反应

天然细胞图谱: SH-SY5Y 细胞
毒草碱性配体图谱



β 抑制蛋白途径图谱*

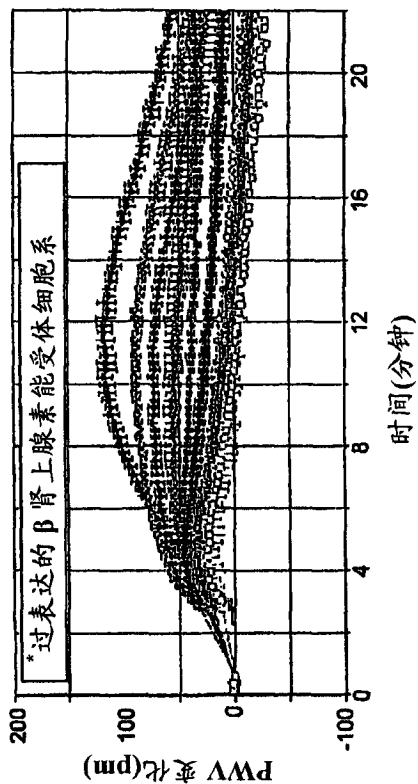


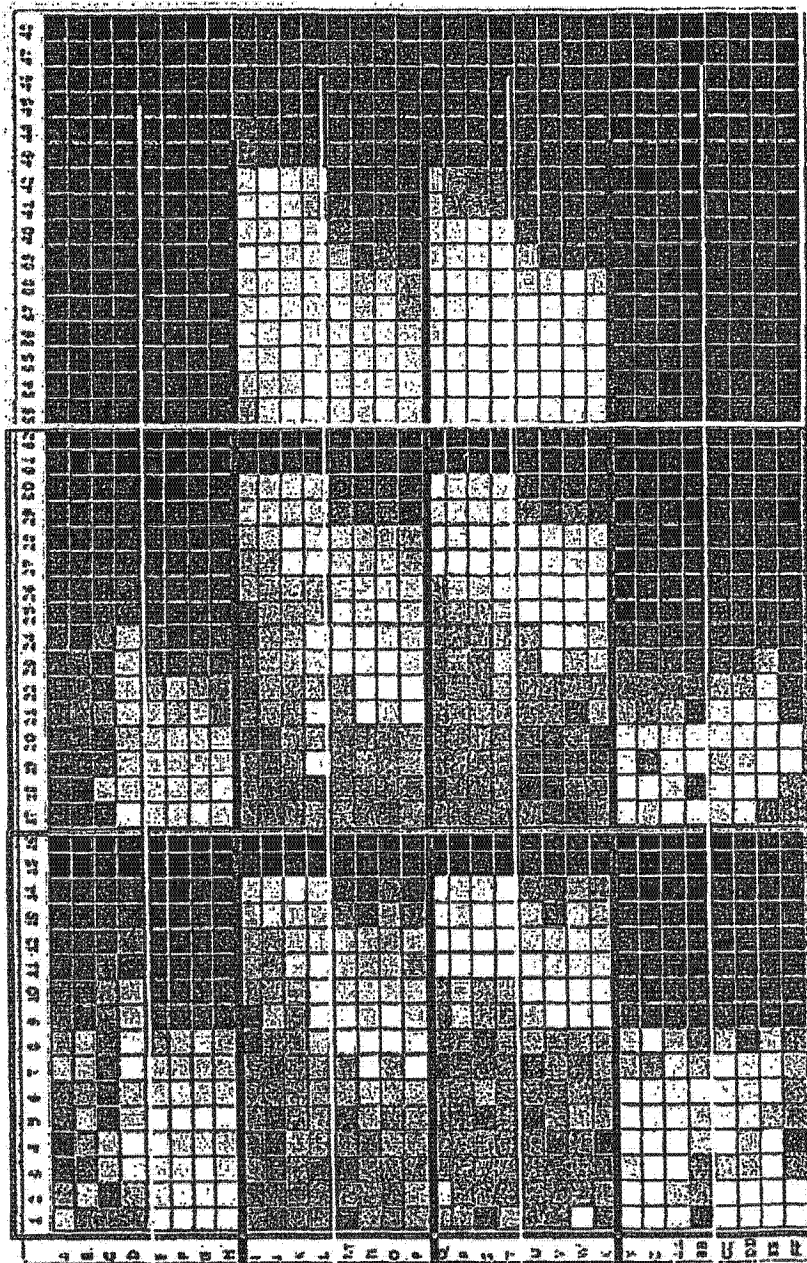
图 1

1536 孔 GPCR 测定 M4 和 M5 细胞

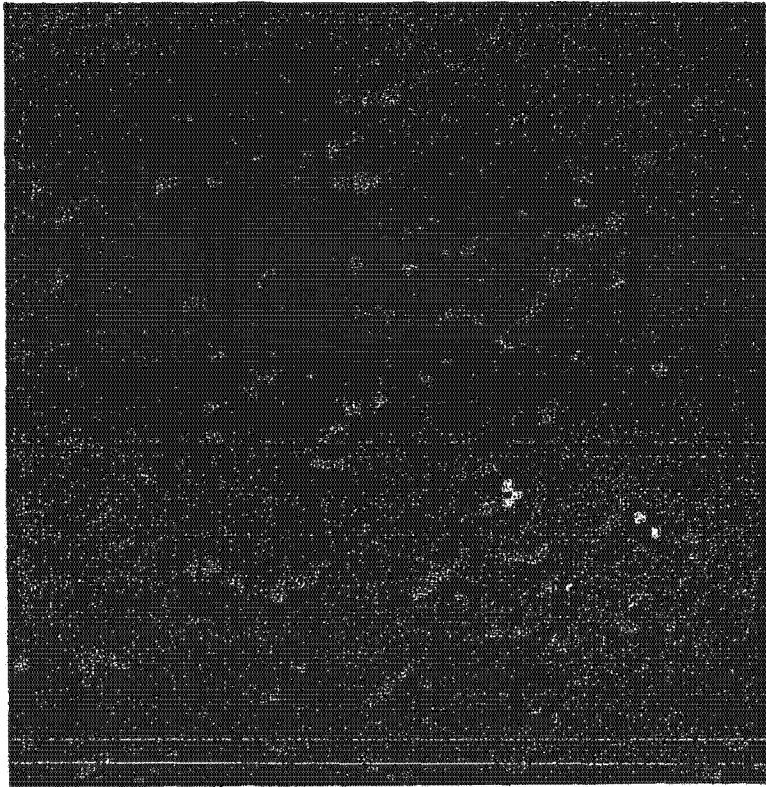
毛果芸香碱

卡巴胆碱

乙酰胆碱

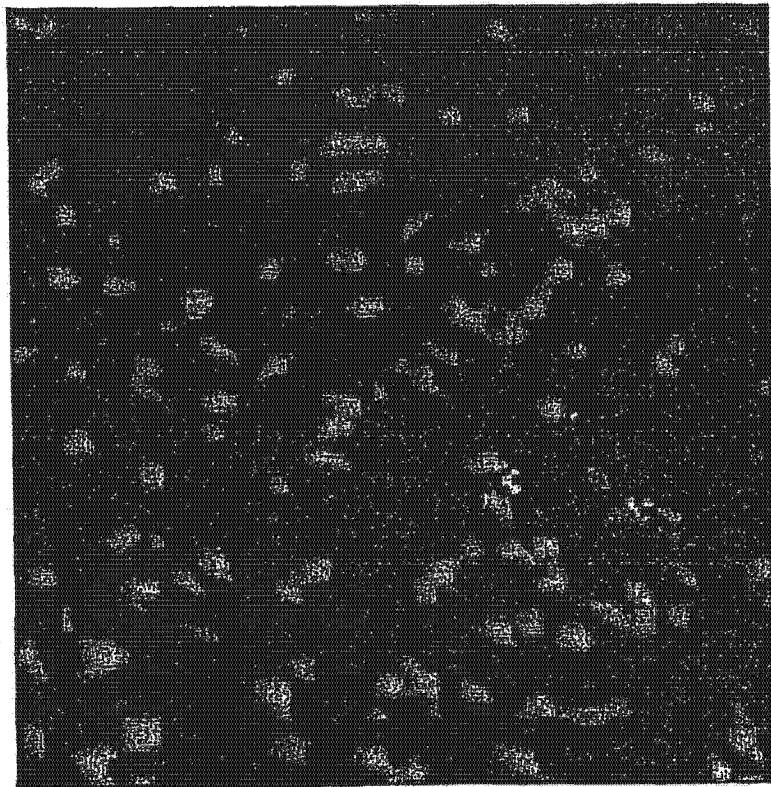


30 分钟后未给予孔的连接与反应, M5 细胞



反应(基线化至连接信号)

3B

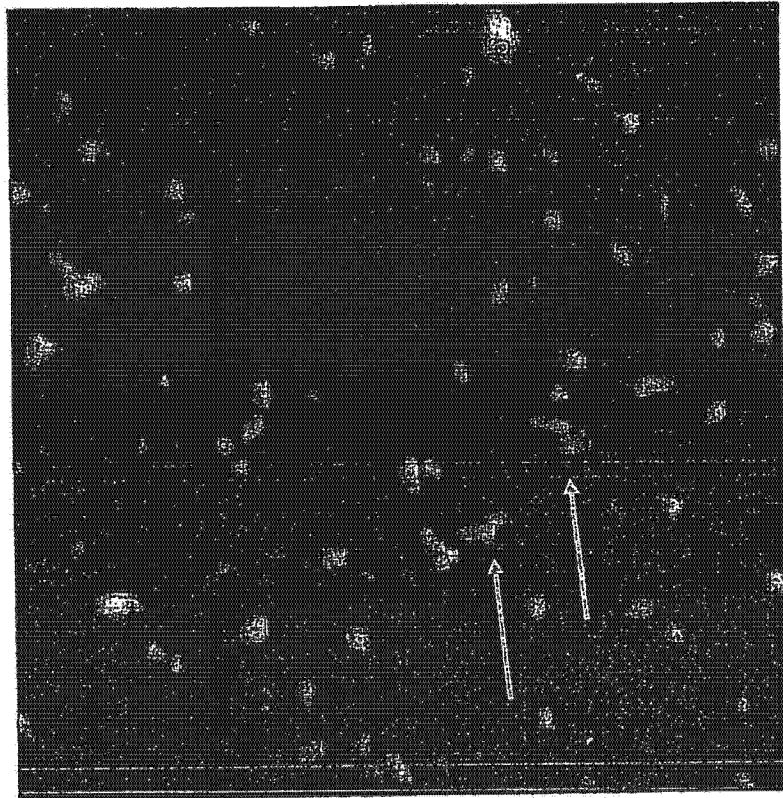


连接

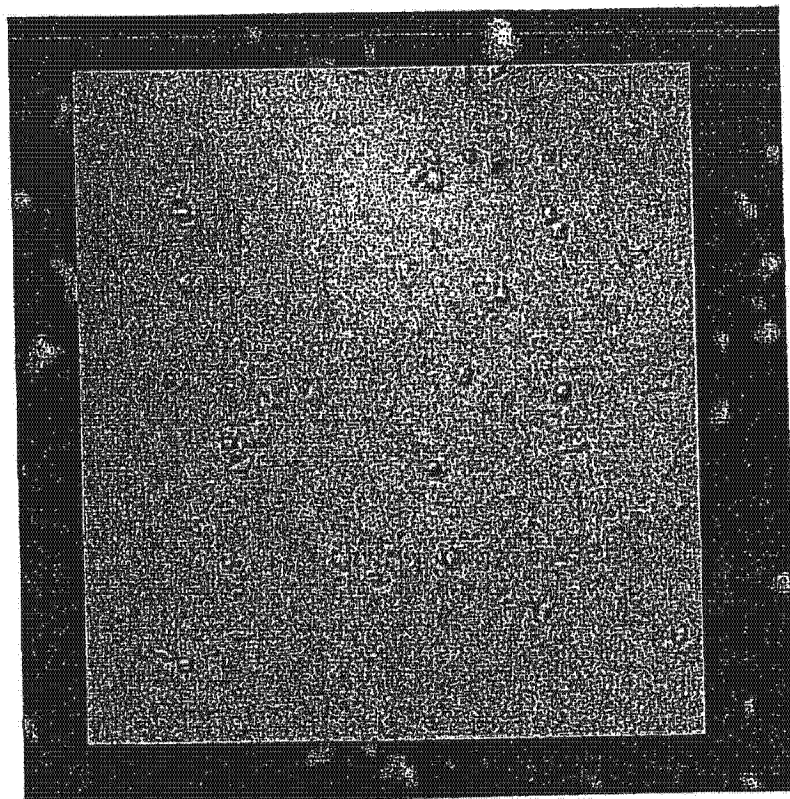
3A

图 3

与明视场 M5 细胞比较



连接信号
4B

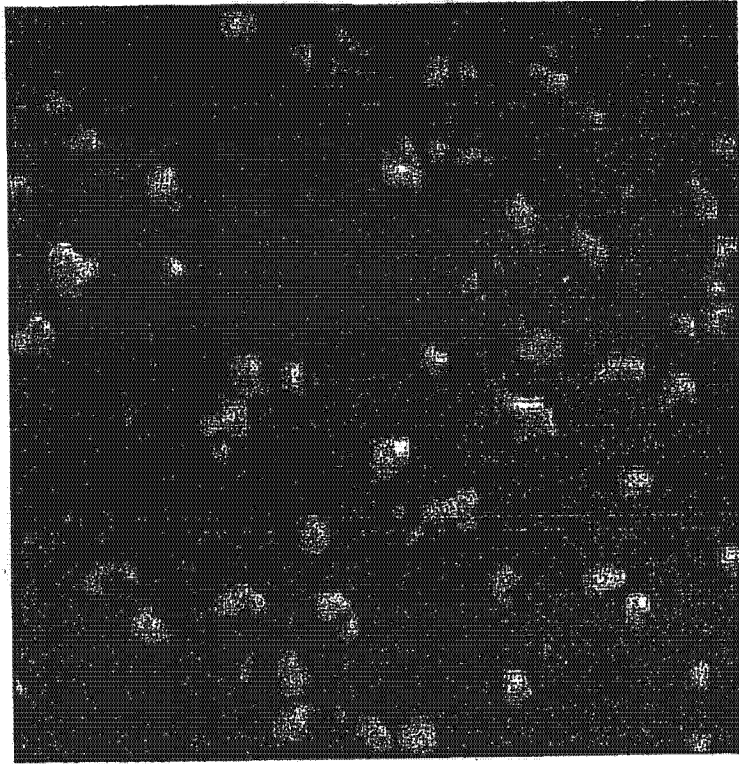


相差
4A

图 4

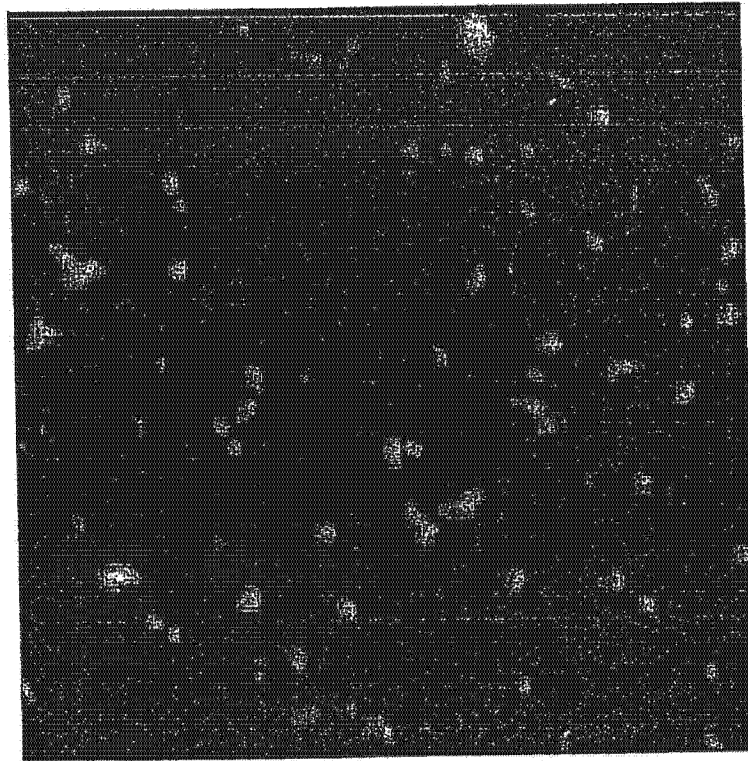
30 分钟后给予孔的连接与反应, M5 细胞

加入卡巴胆碱



反应(基线化至连接信号)

5B



连接

5A

图 5

用混合群培养物监测反应

M4 细胞

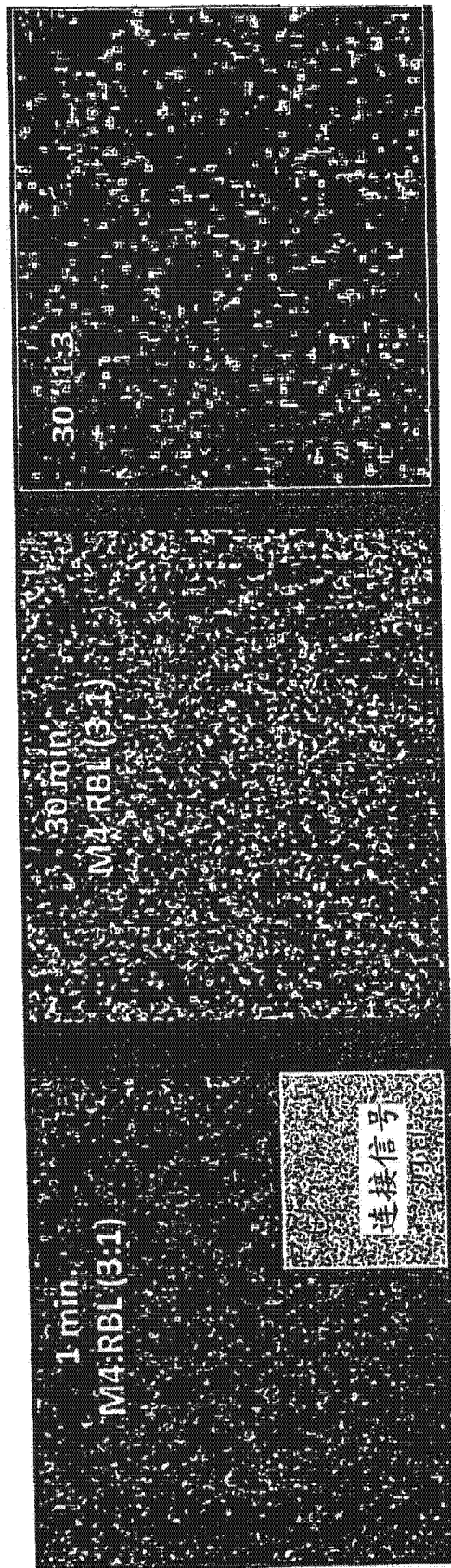


图 6

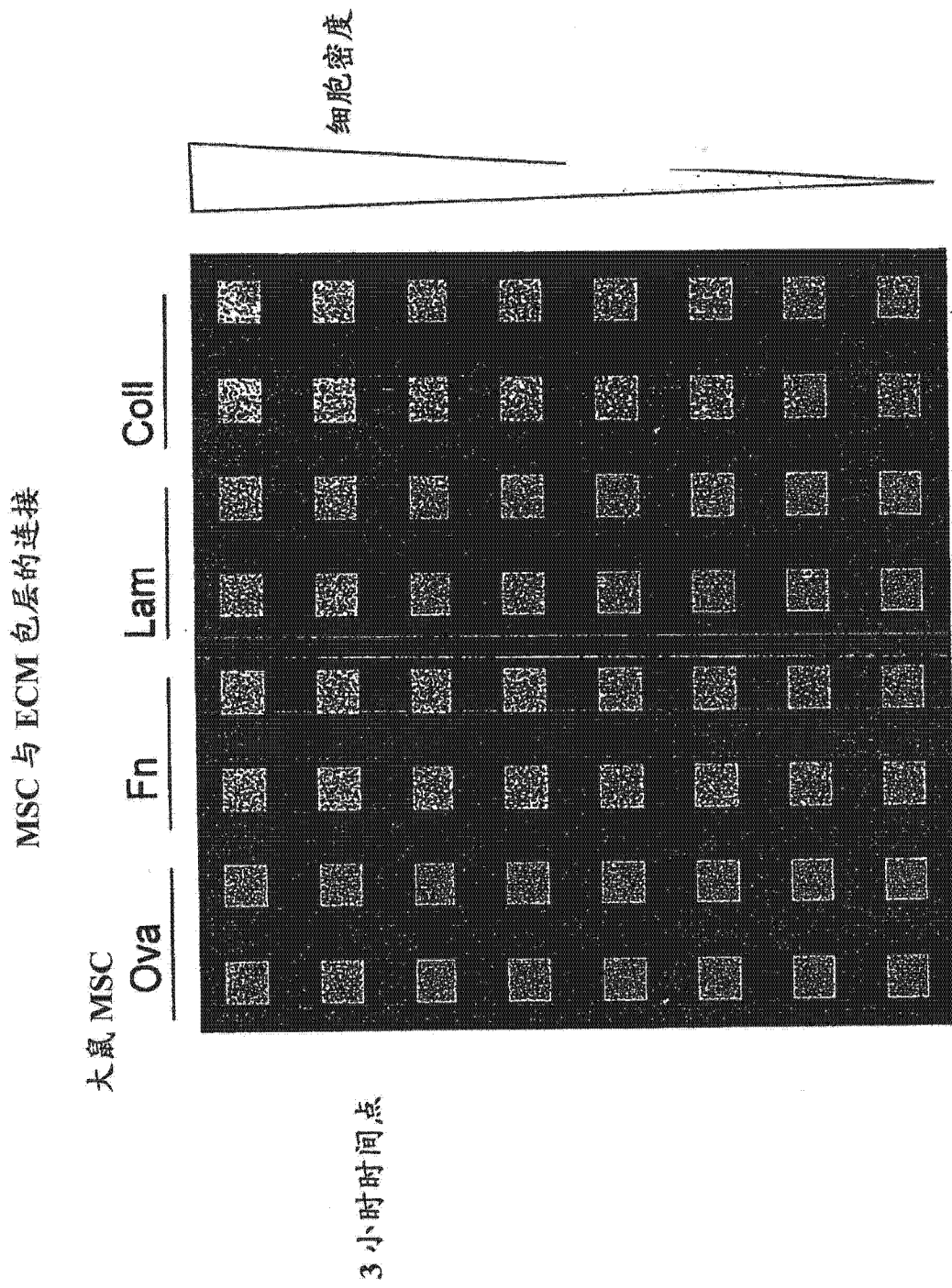


图 7

干细胞与纤连蛋白的连接

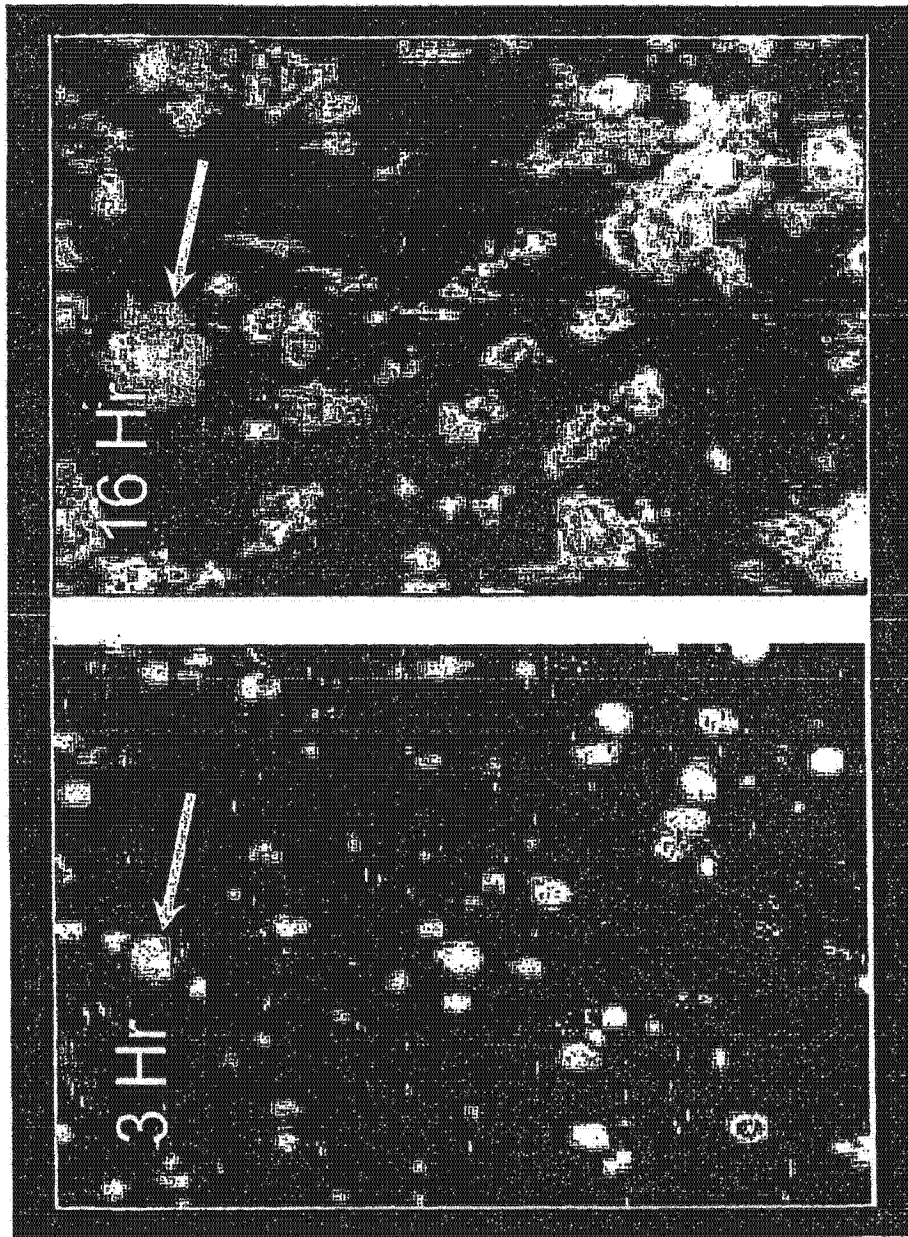


图 8

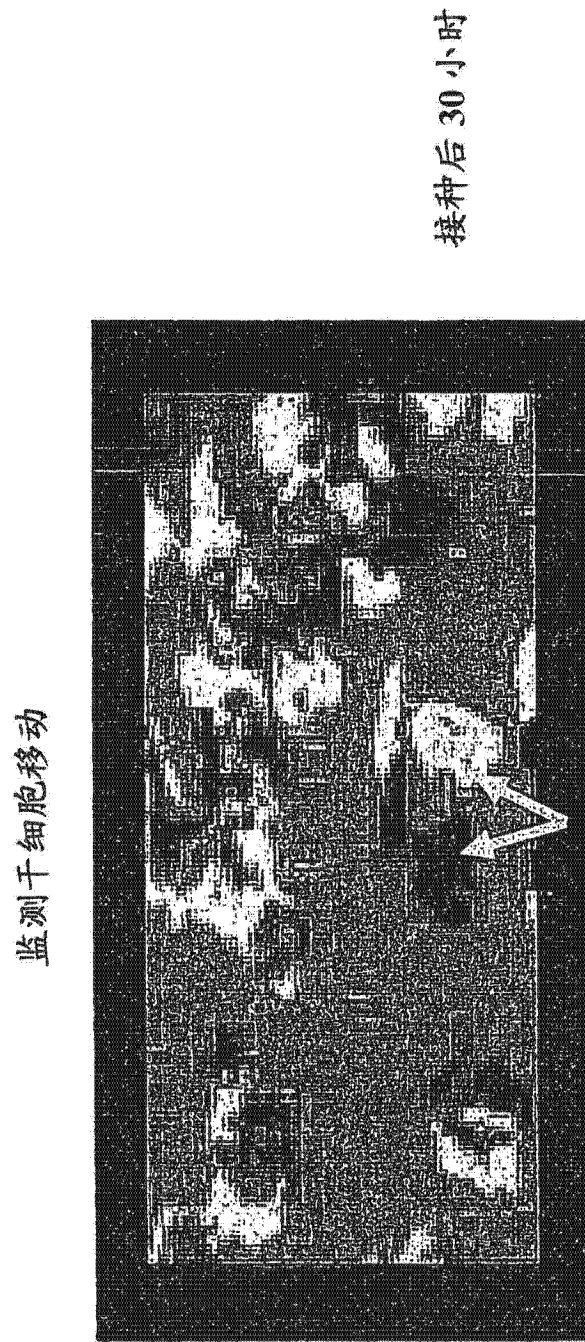


图 9

多种细胞类型的 SDF-1 α 刺激

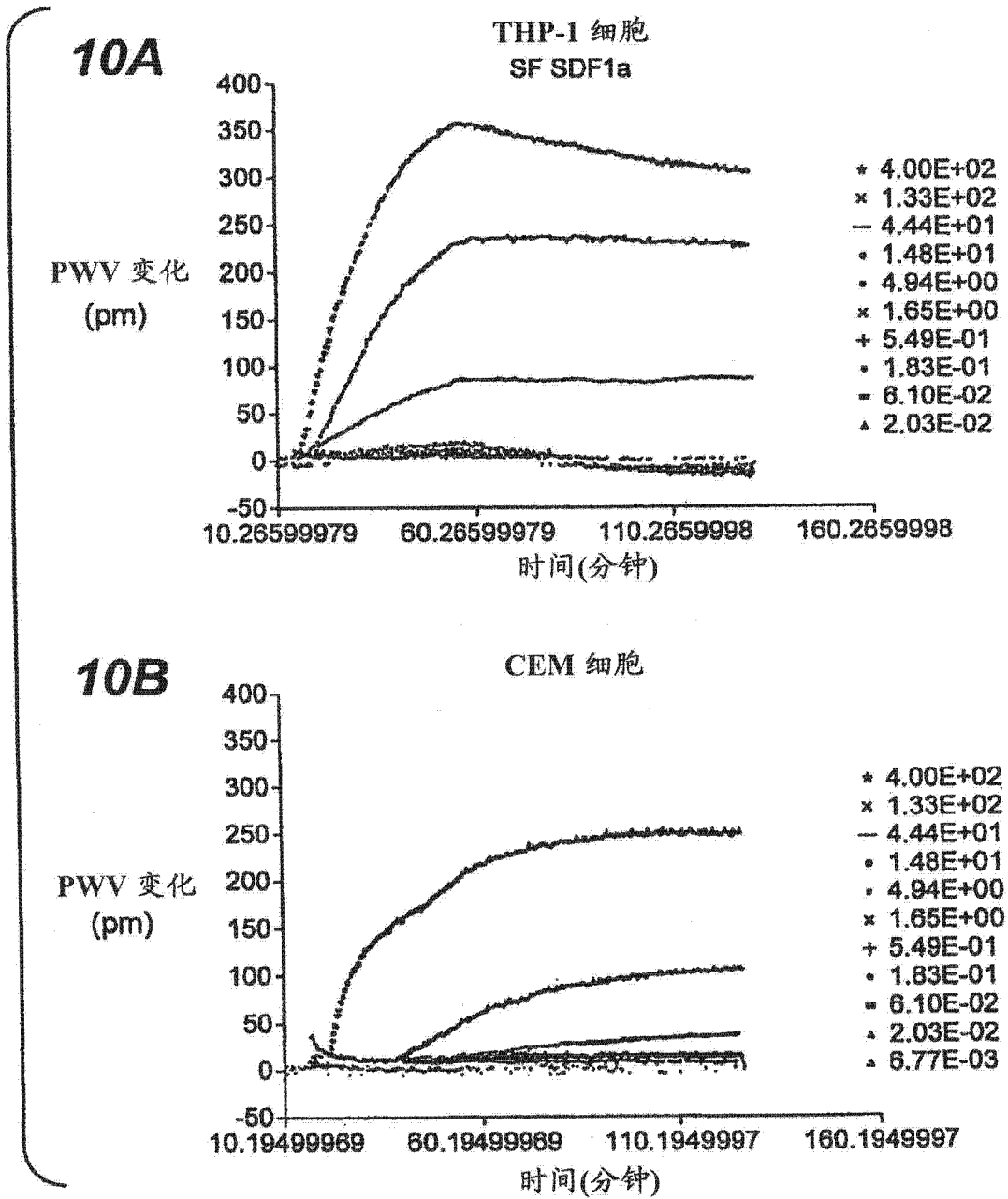


图 10

大鼠 MSC 对 SDF-1 α 起反应

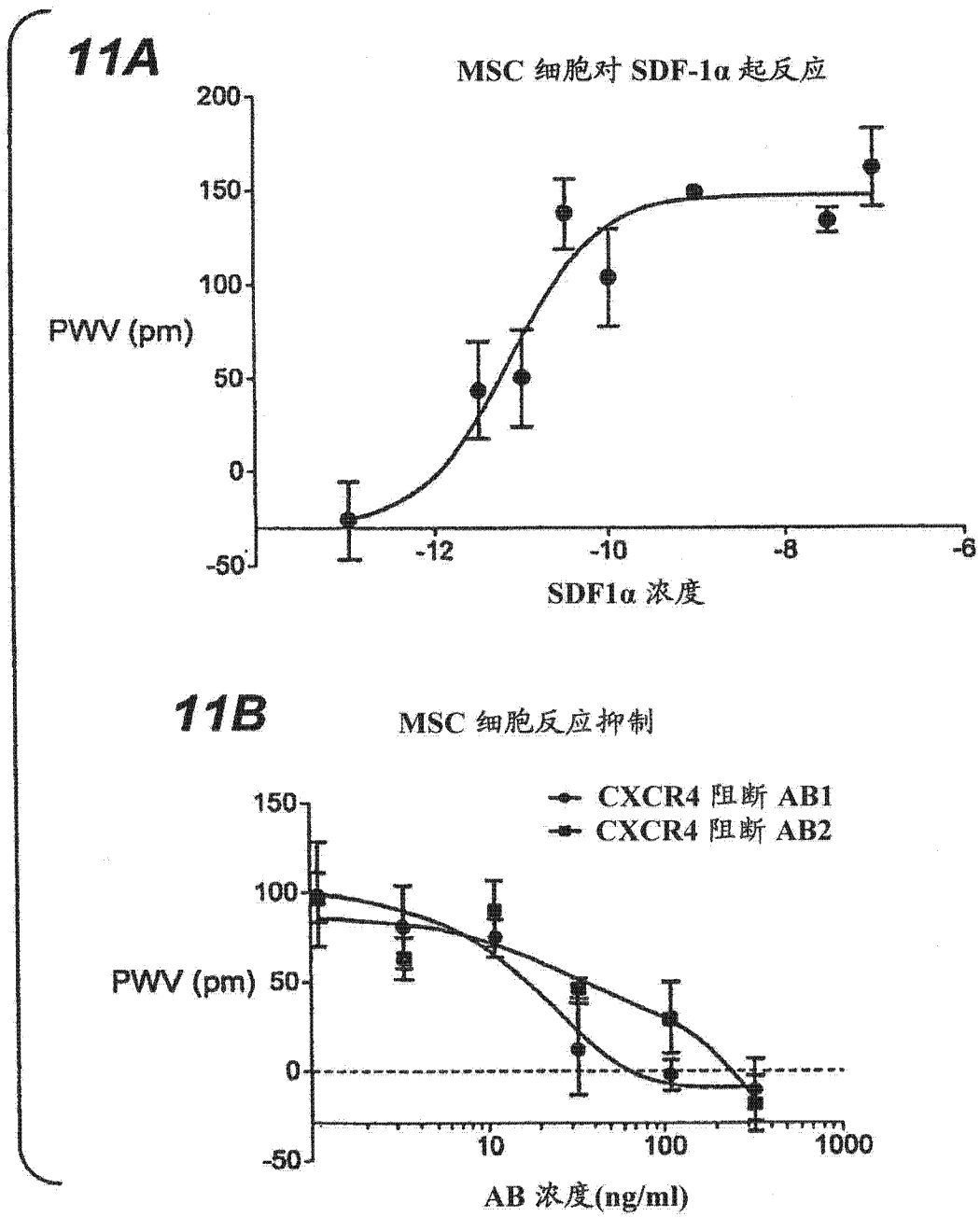


图 11

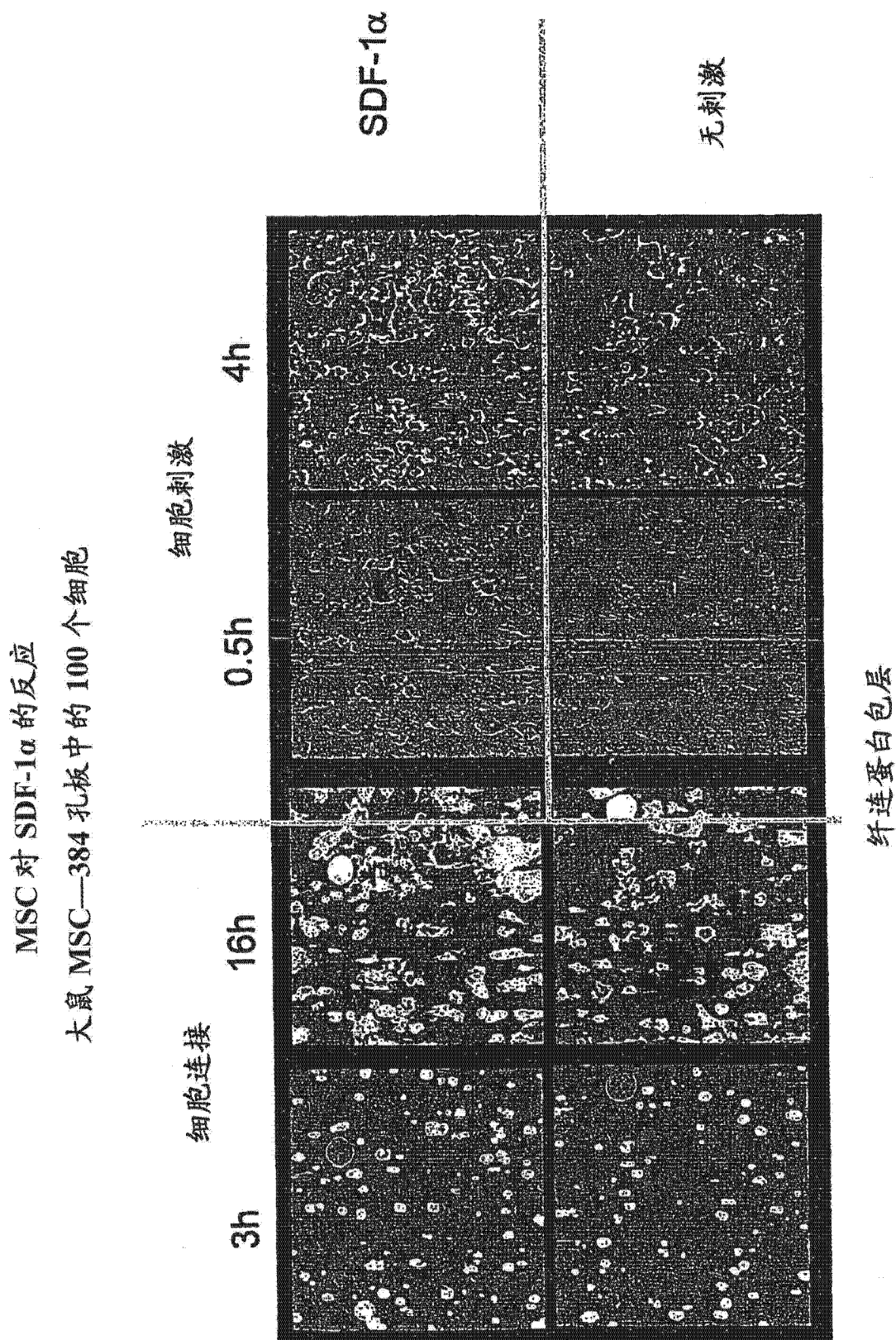
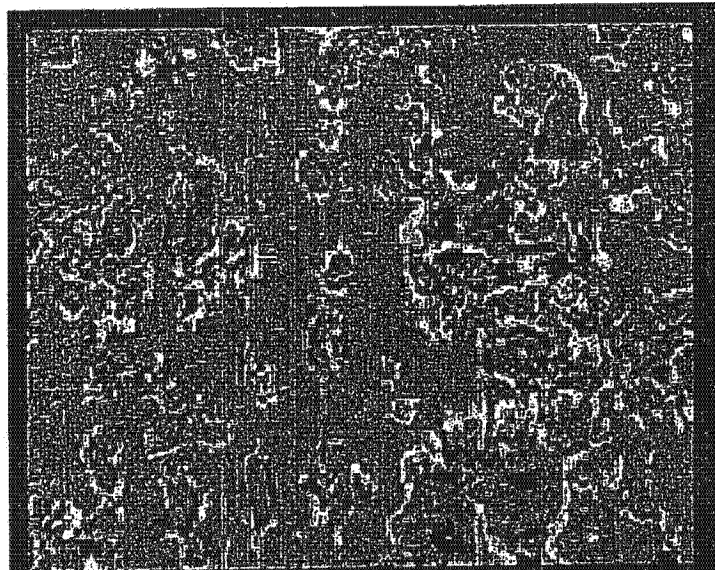


图 12

MSC 的 SDF-1 α 刺激

13A



13B

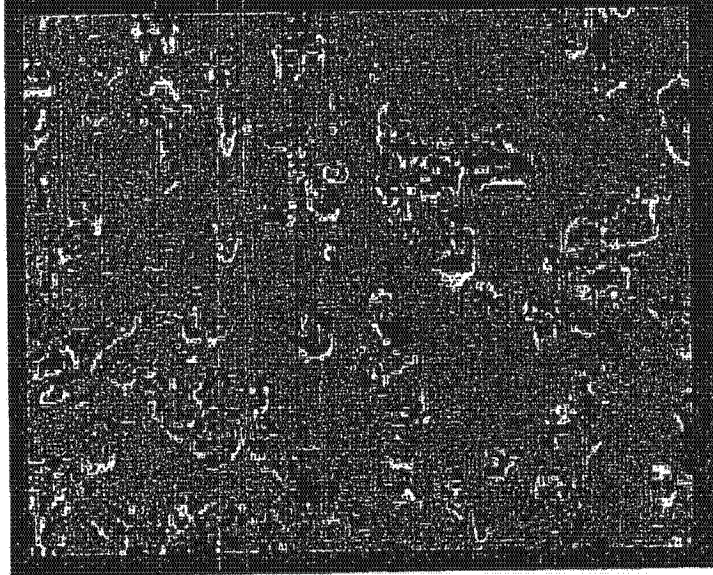


图 13

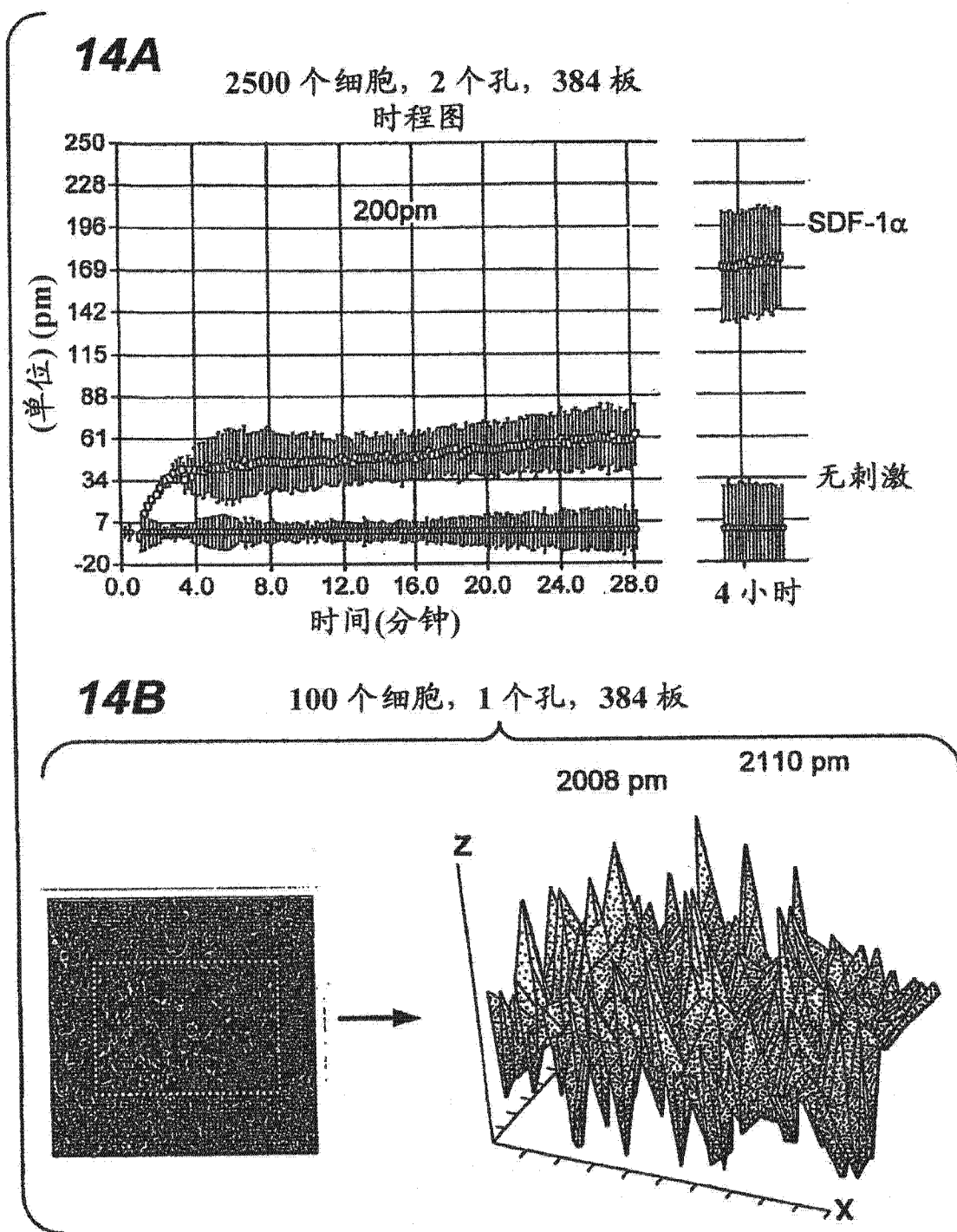
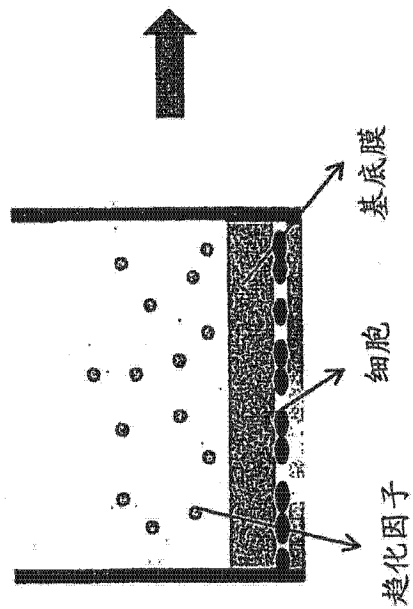


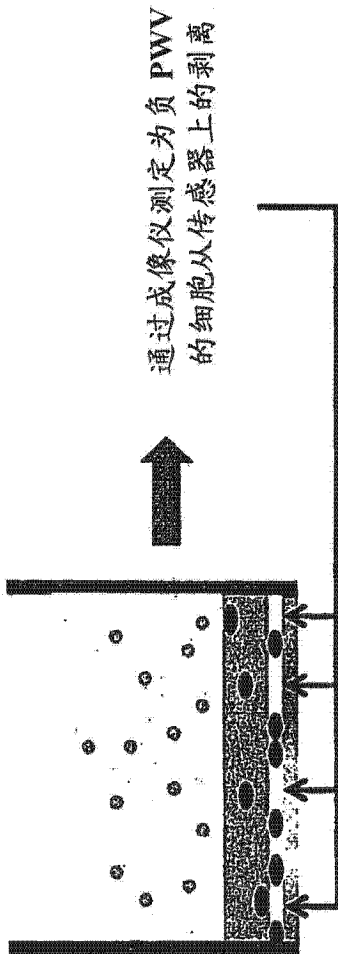
图 14

升高侵袭测定

- 将细胞接种在传感器上
- 用基底膜包覆
- 加入培养基和趋化因子



- 细胞从传感器上释放
- 细胞向趋化因子迁移



通过成像仪测定为负PWV
的细胞从传感器上的剥离

图 15

分离测定, 大鼠 MSC, 384 微量培养板的 1 孔中 100 个细胞

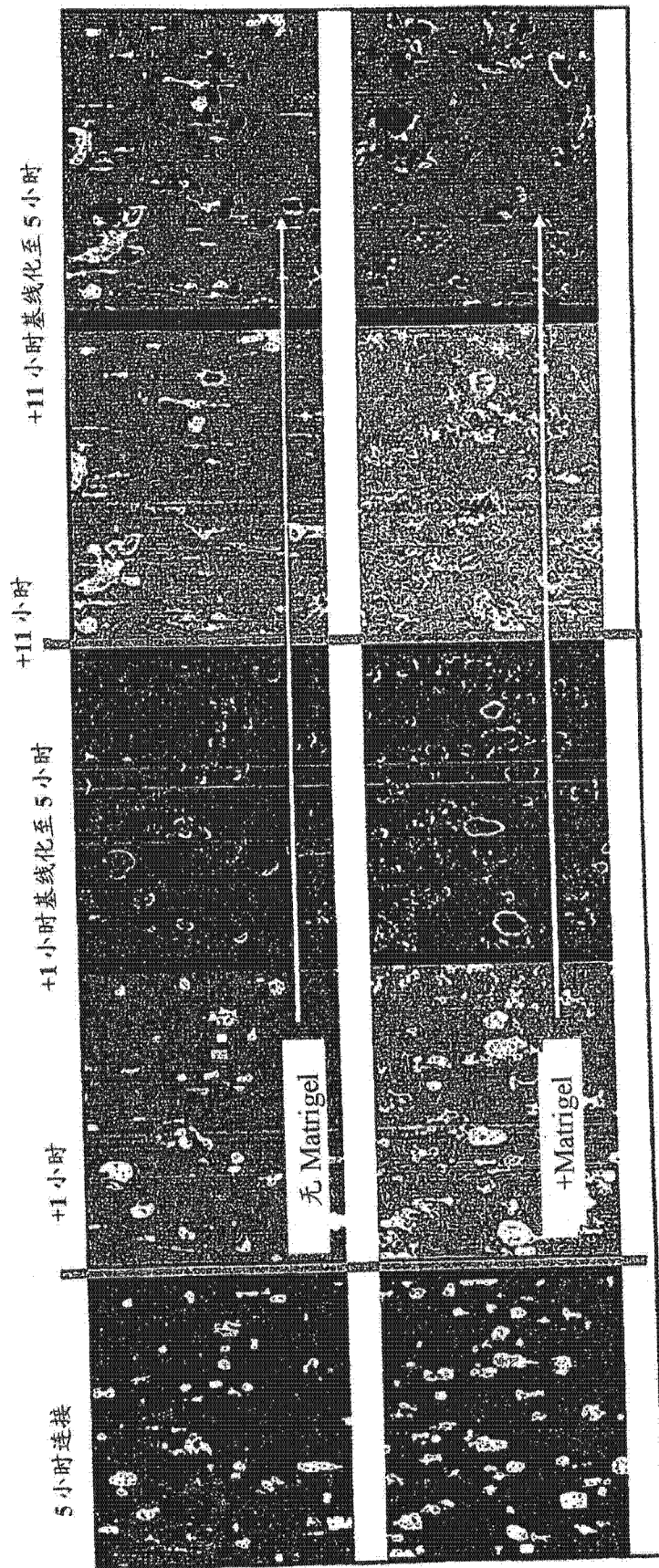
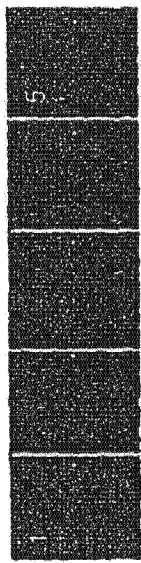


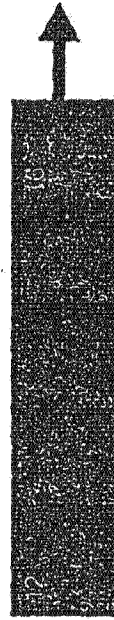
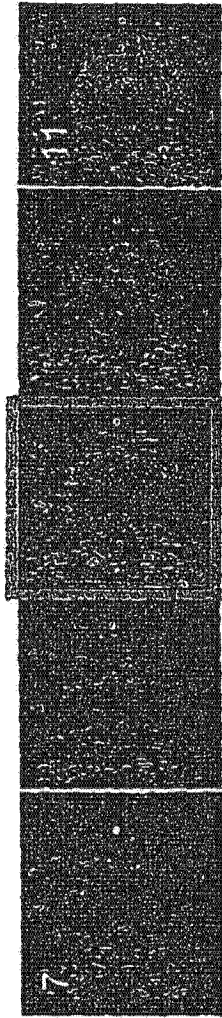
图 16

由大鼠 MSC 分化成骨细胞

384 孔微量培养板的 1 孔中 100 个细胞



无标记活细胞的动态成像



诱导后天数

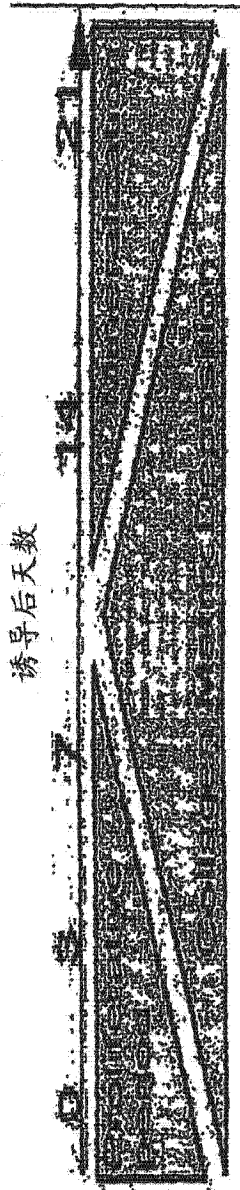


图 17

19 天内的成骨细胞分化

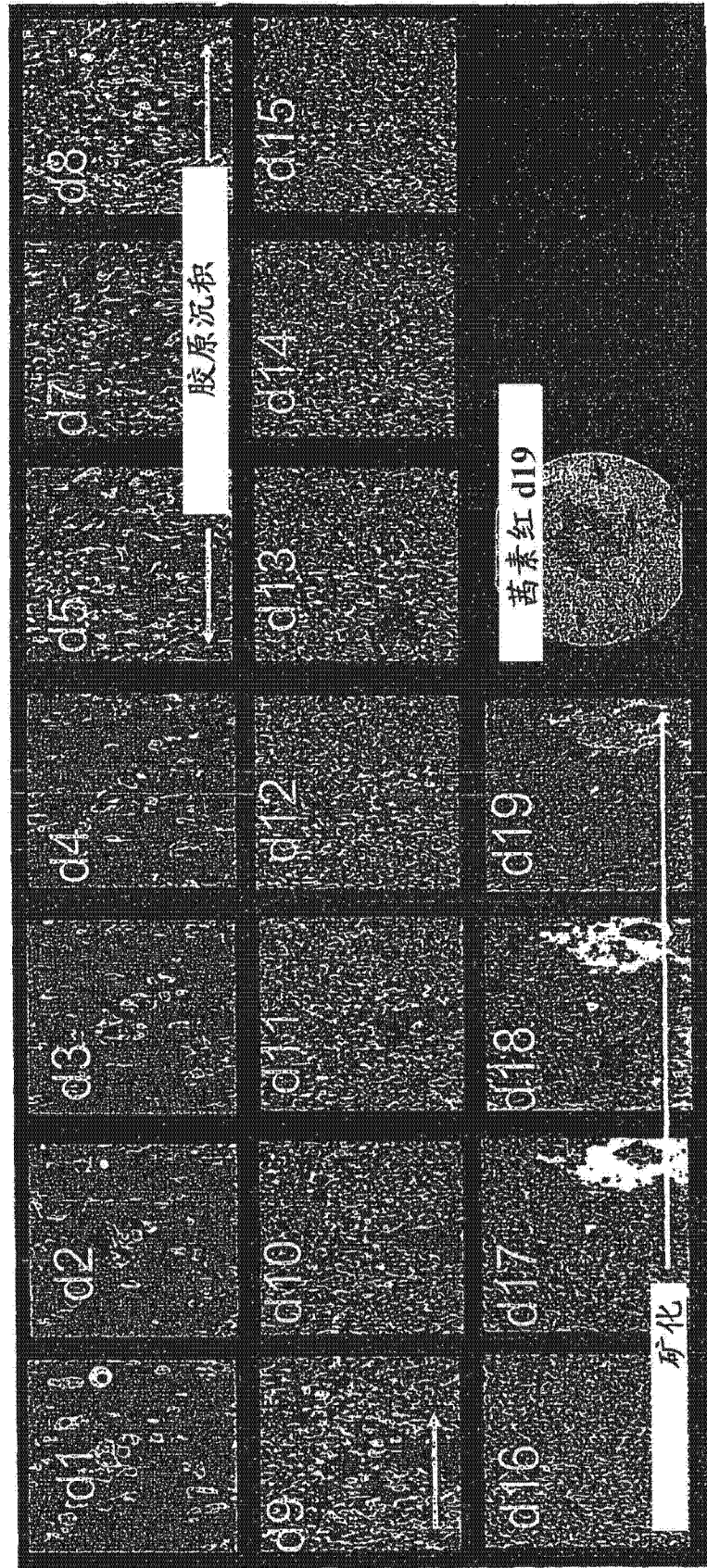
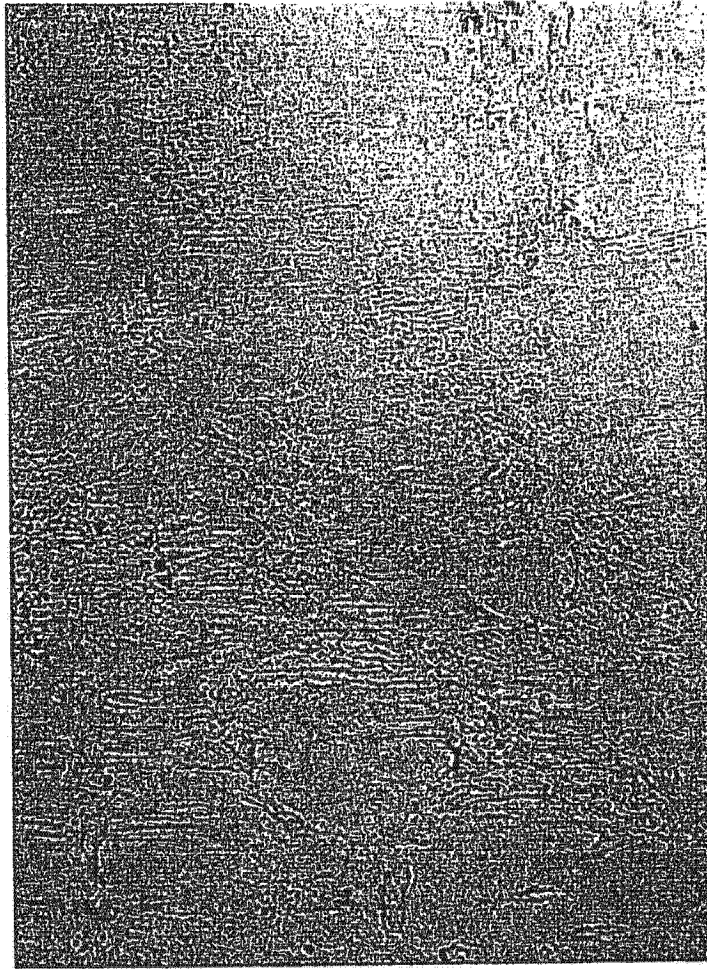
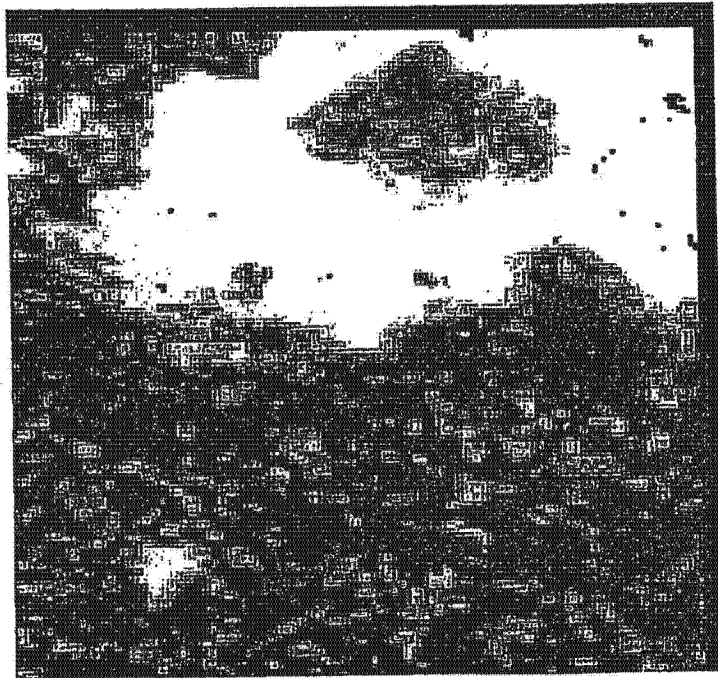


图 18

第 17 天大鼠 MSC 分化



19B



19A

图 19

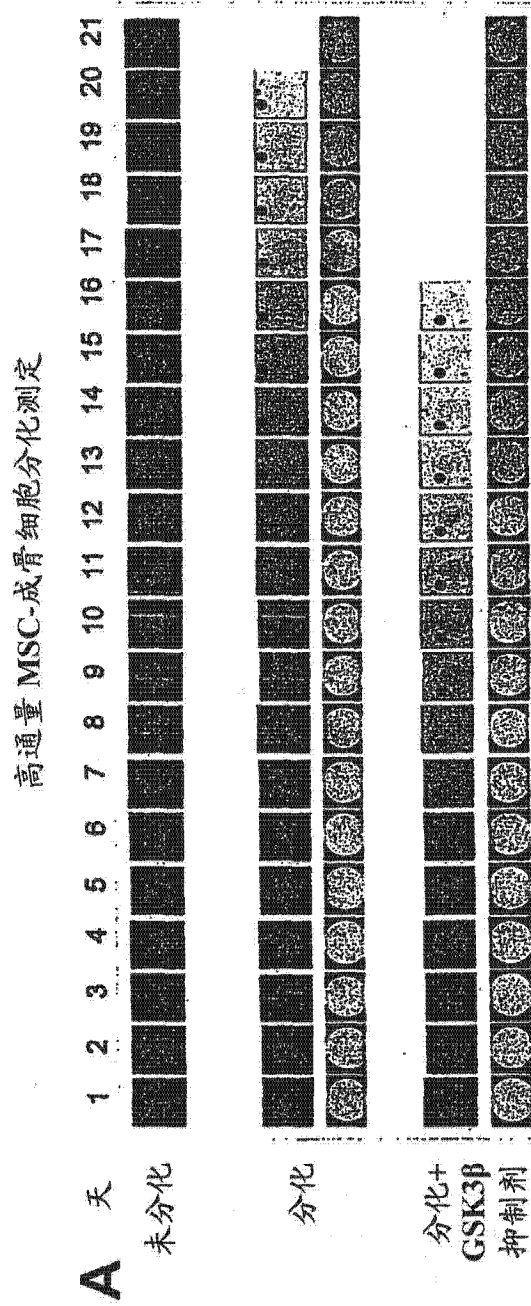


图 20a

高通量 MSC-成骨细胞分化测定

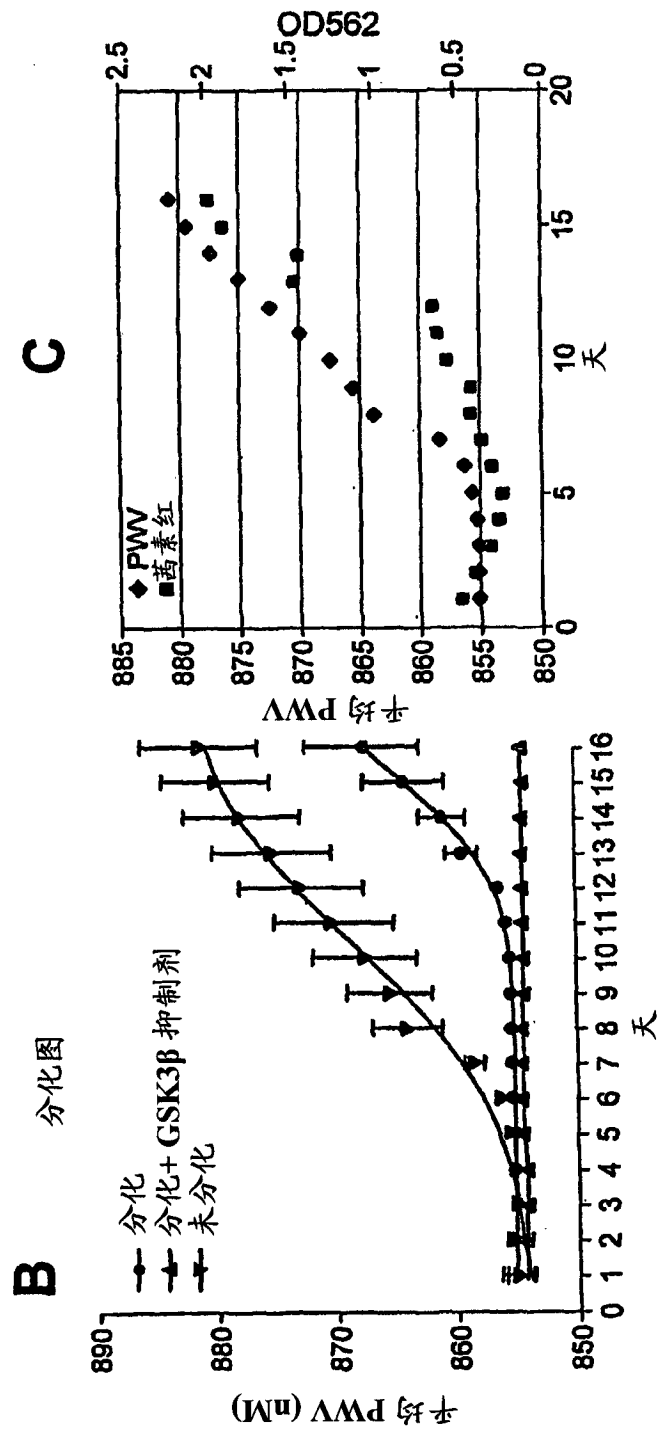


图 20b

BIND 生物传感器上分化 MSC 的胶原沉积先于矿化

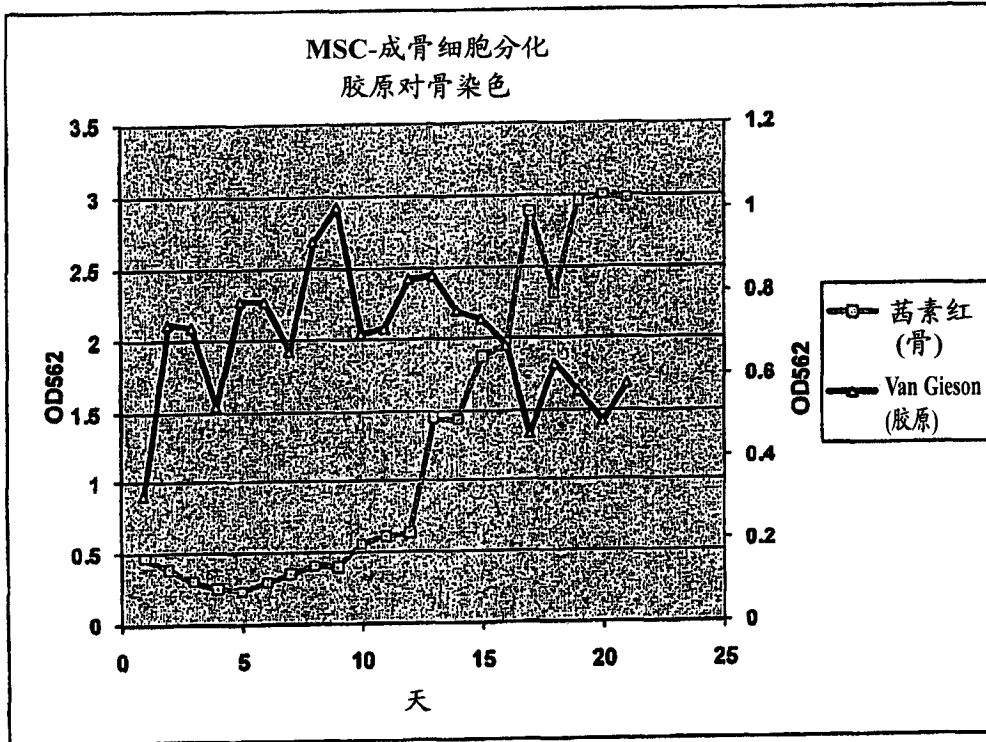


图 21

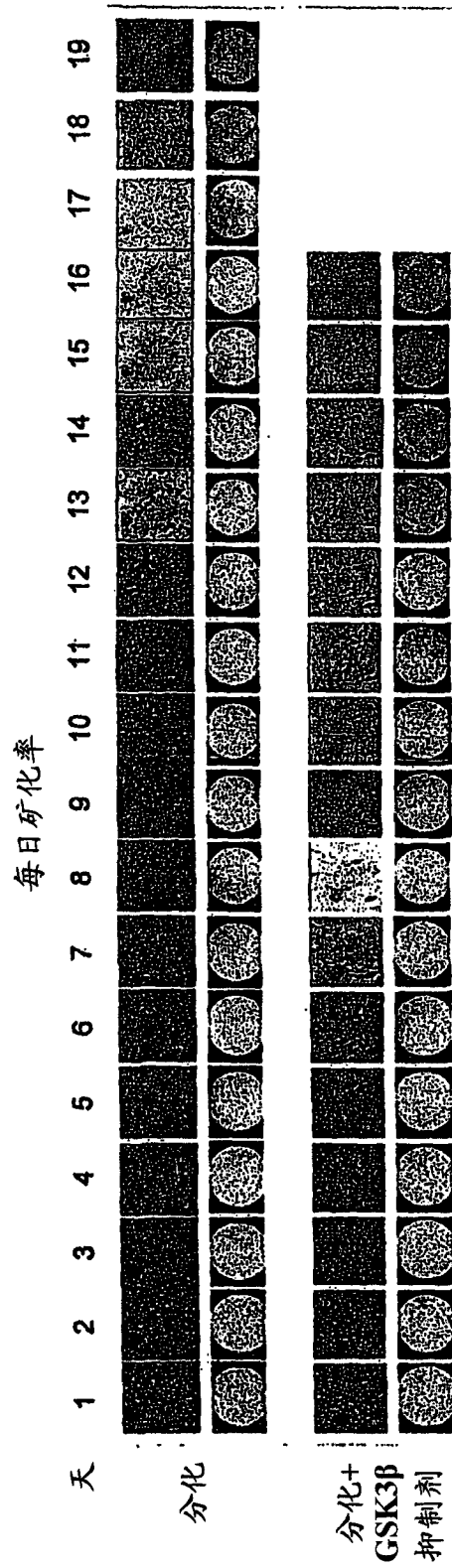


图 22a

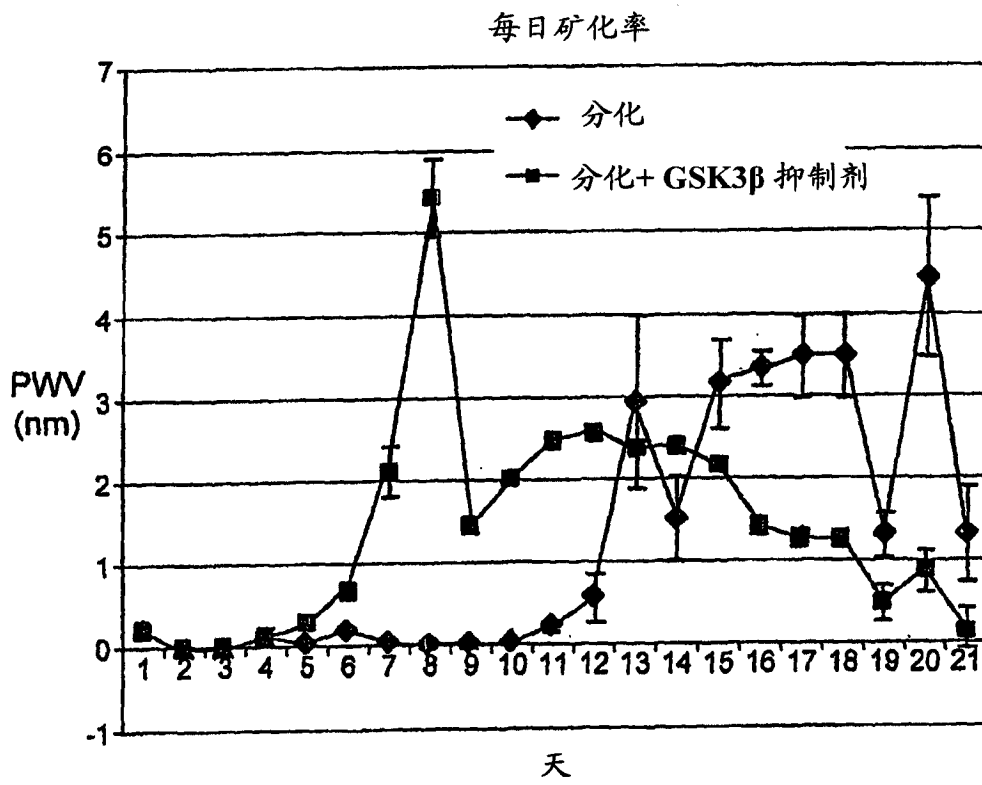


图 22b

降落测定中间充质干细胞的迁移

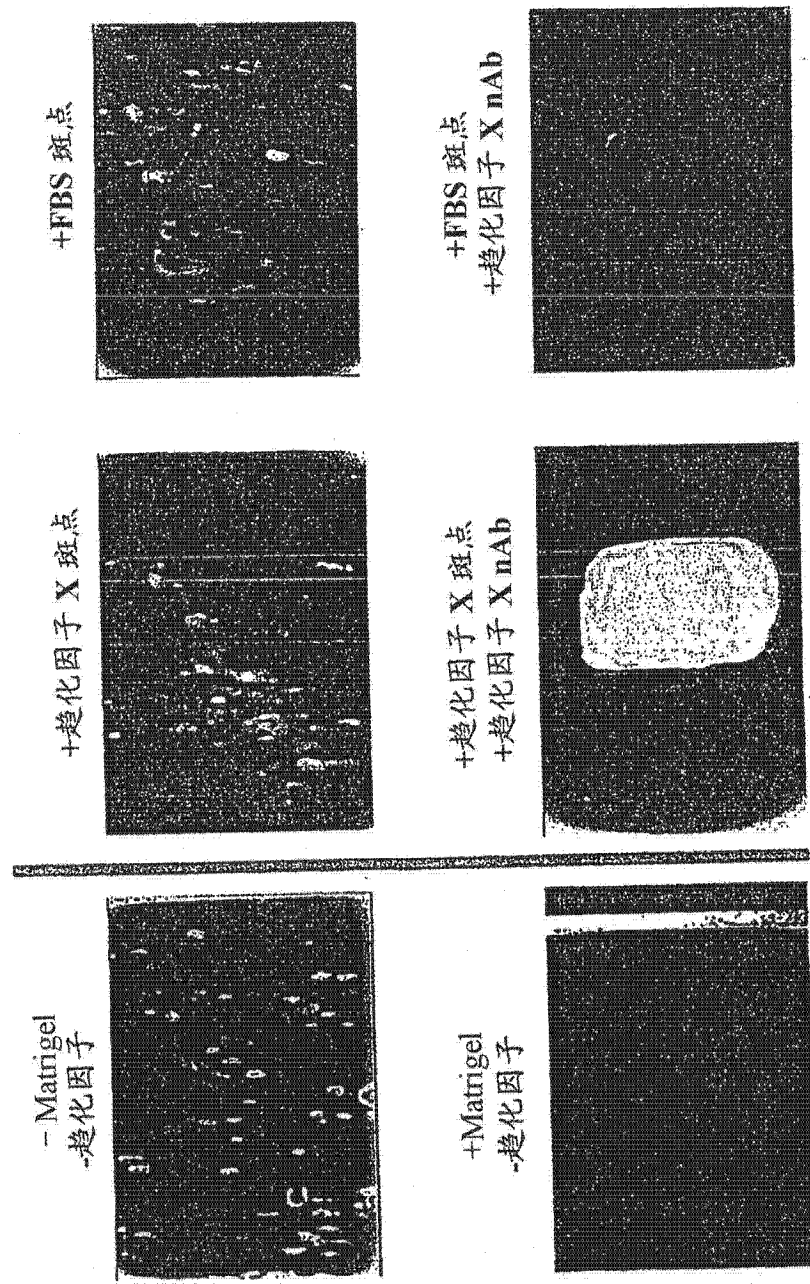


图 23

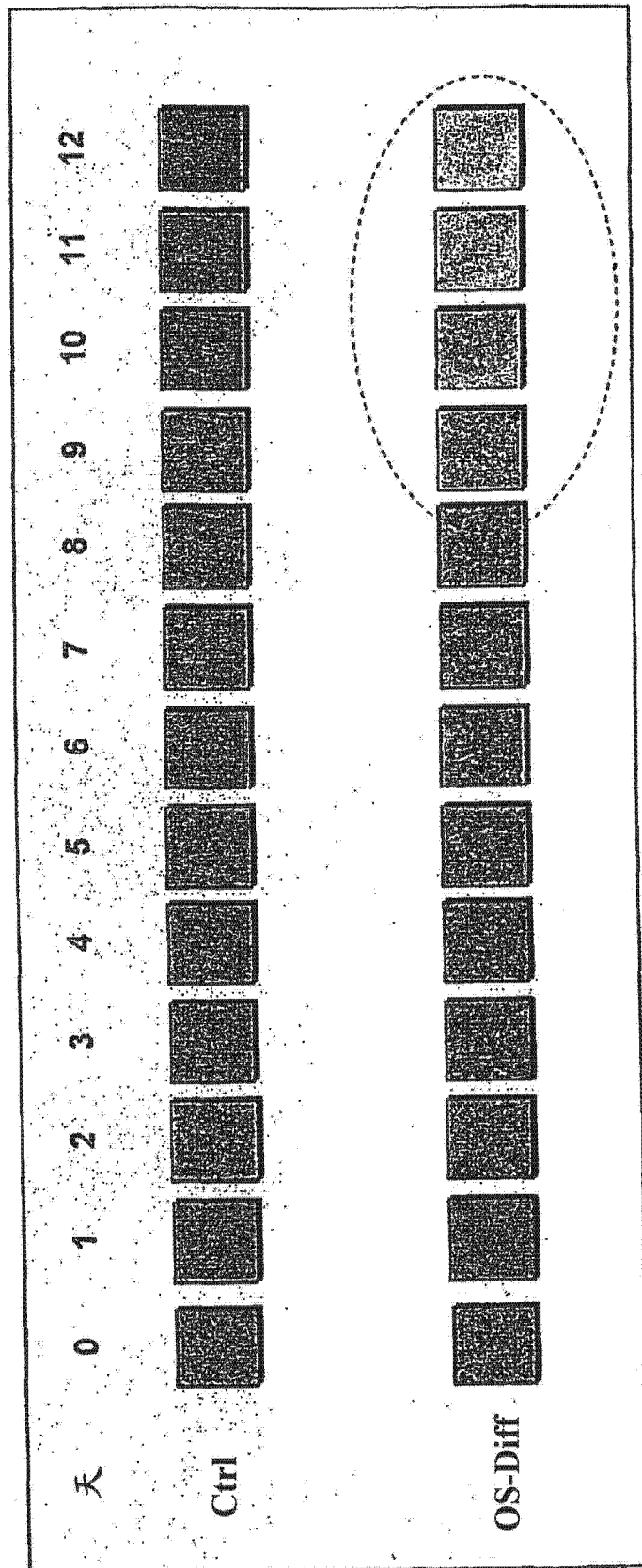


图 24

人 MSC-成骨细胞分化的 RNAi 调节

第 12 天

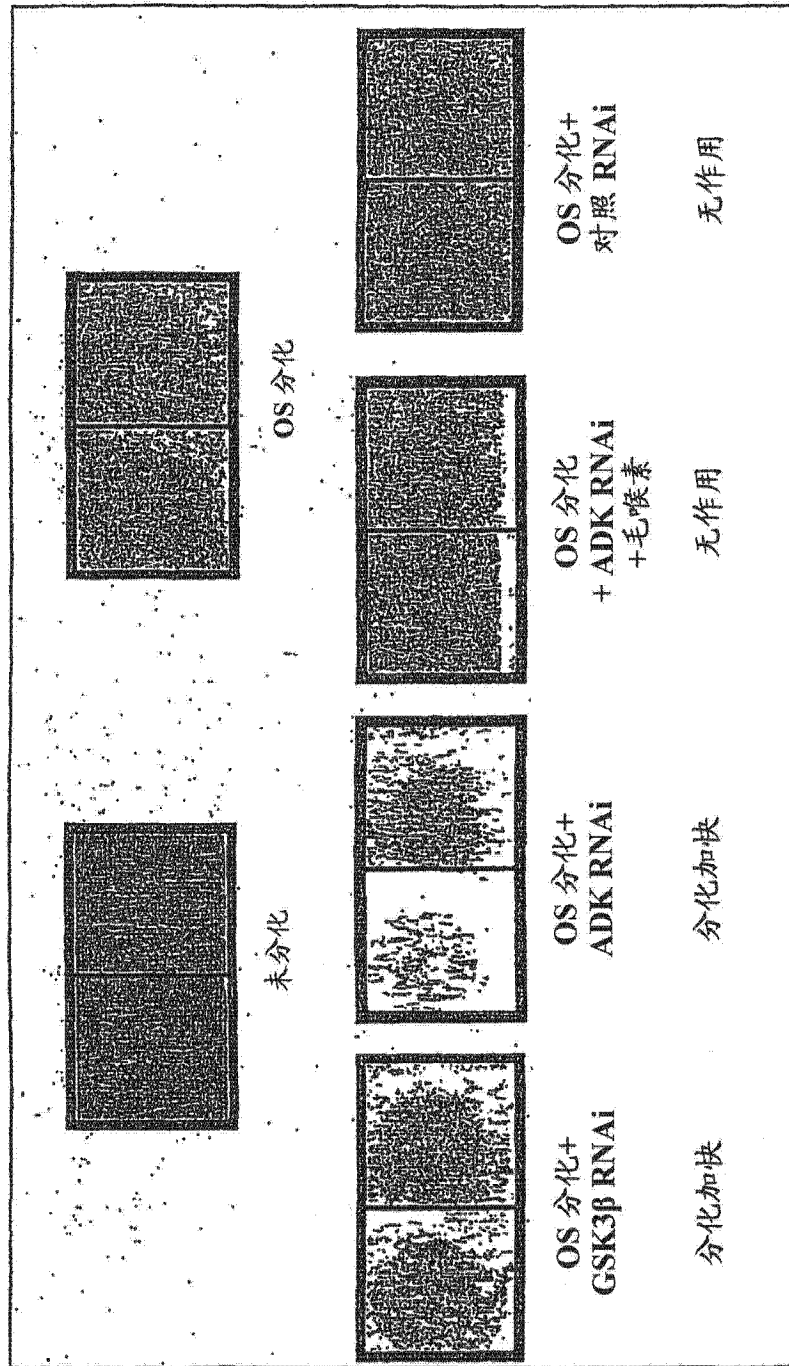


图 25

人MSC-成骨细胞分化的RNAi调节
第12天

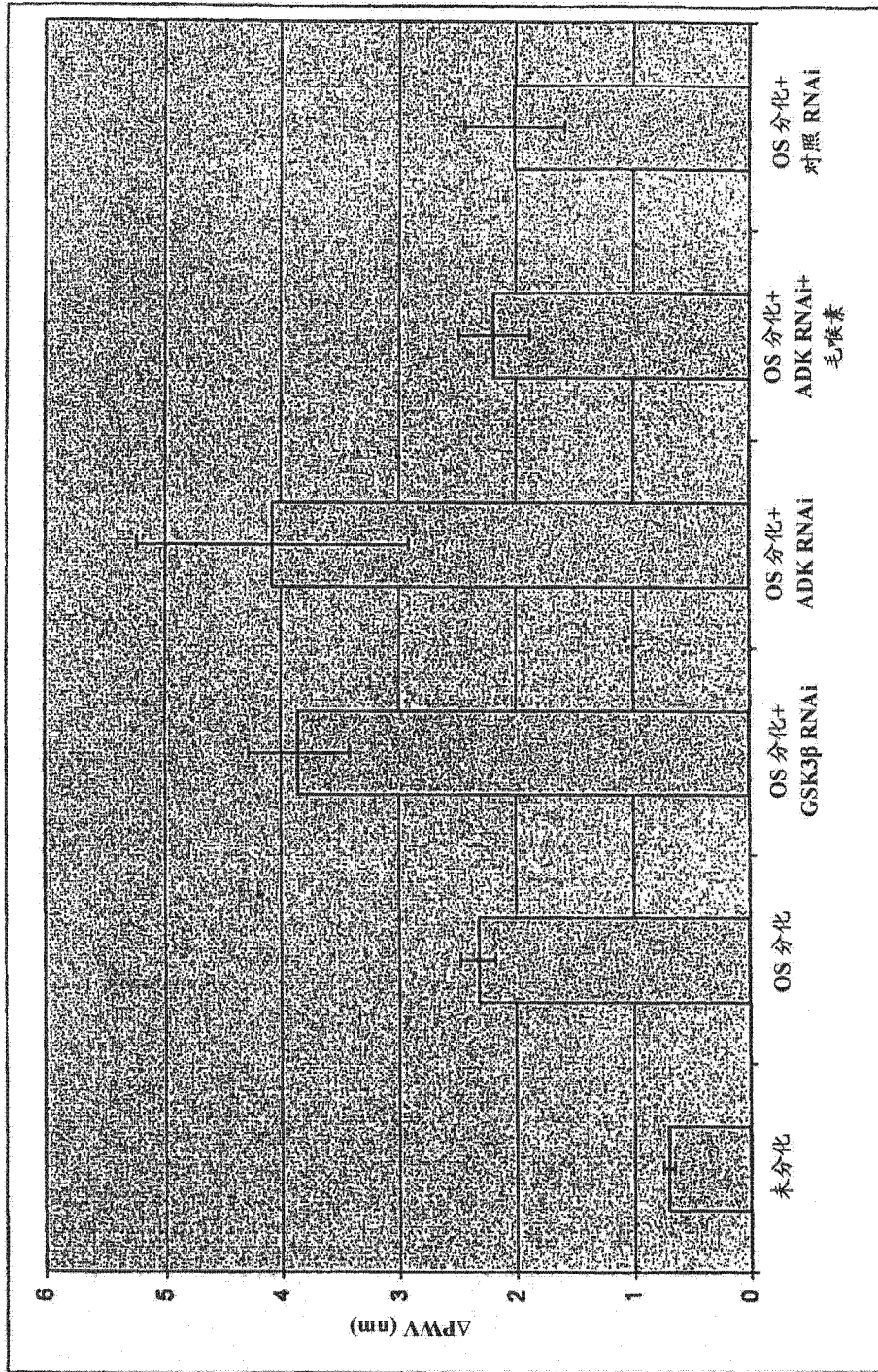


图 26

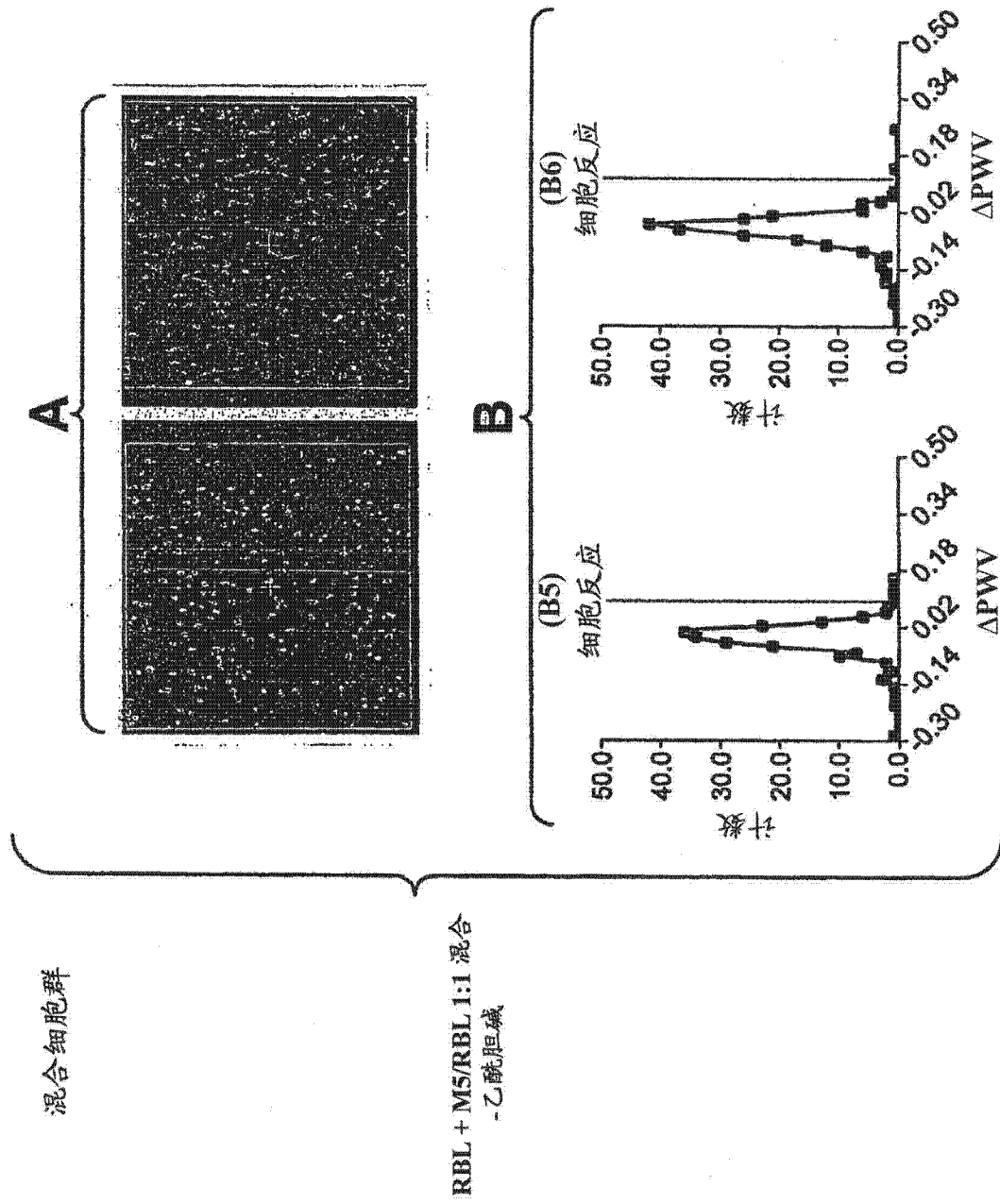


图 27a

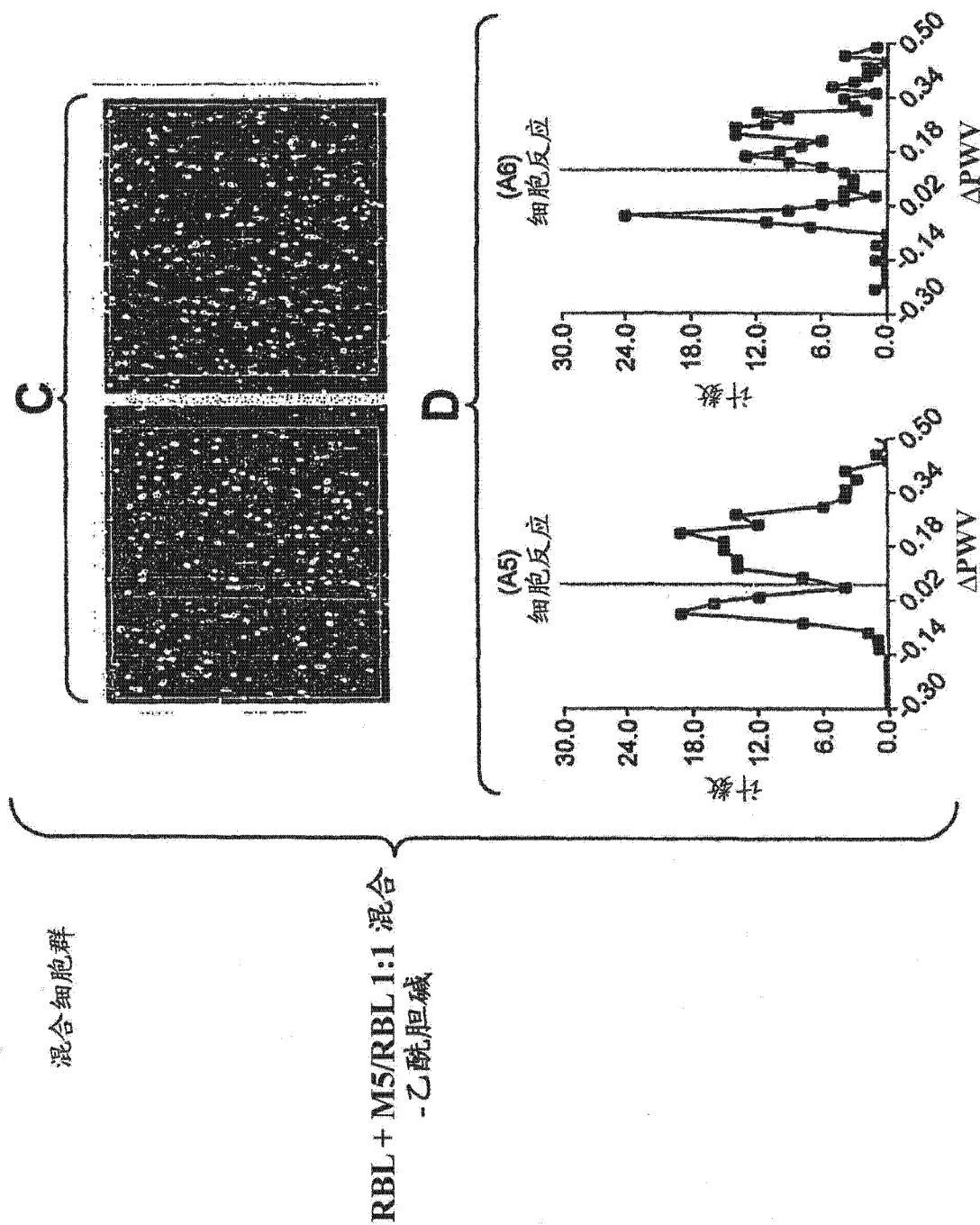
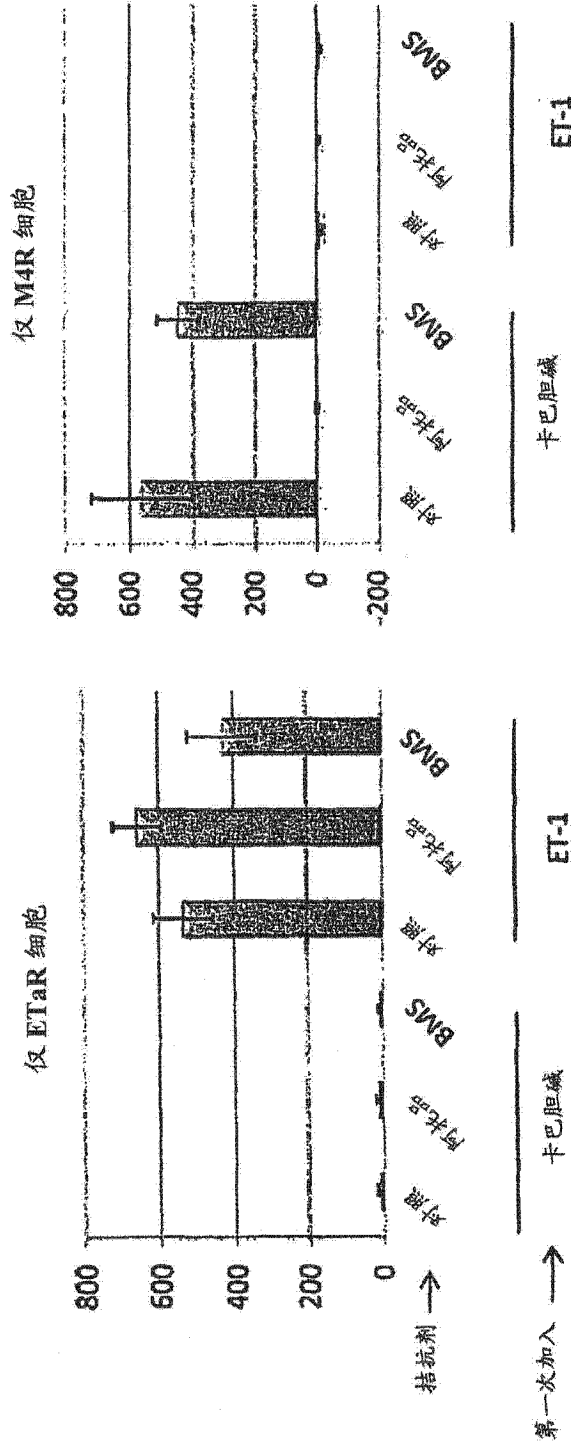


图 27b

信号特异性的证明(第1次加入)

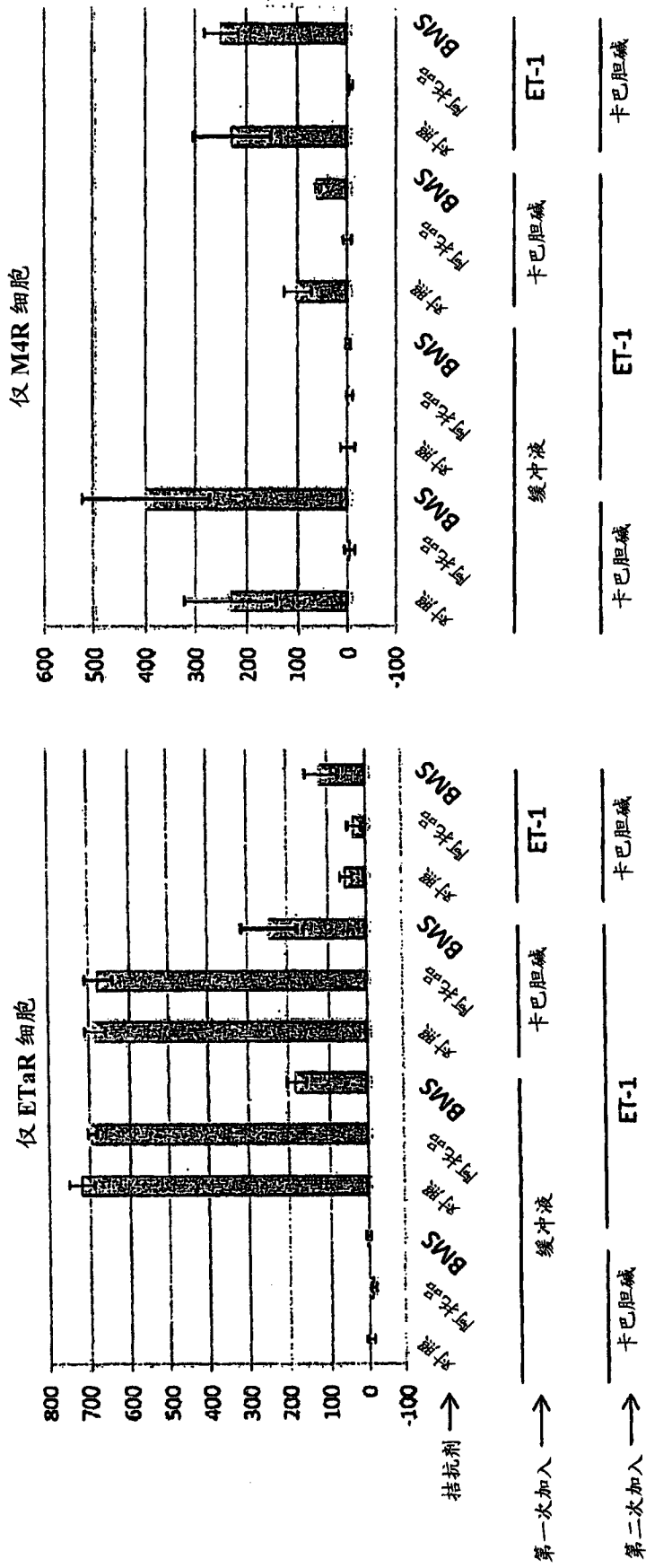


31A

31B

图 28

信号特异性的证明(第2次加入)



32B

32A

图 29

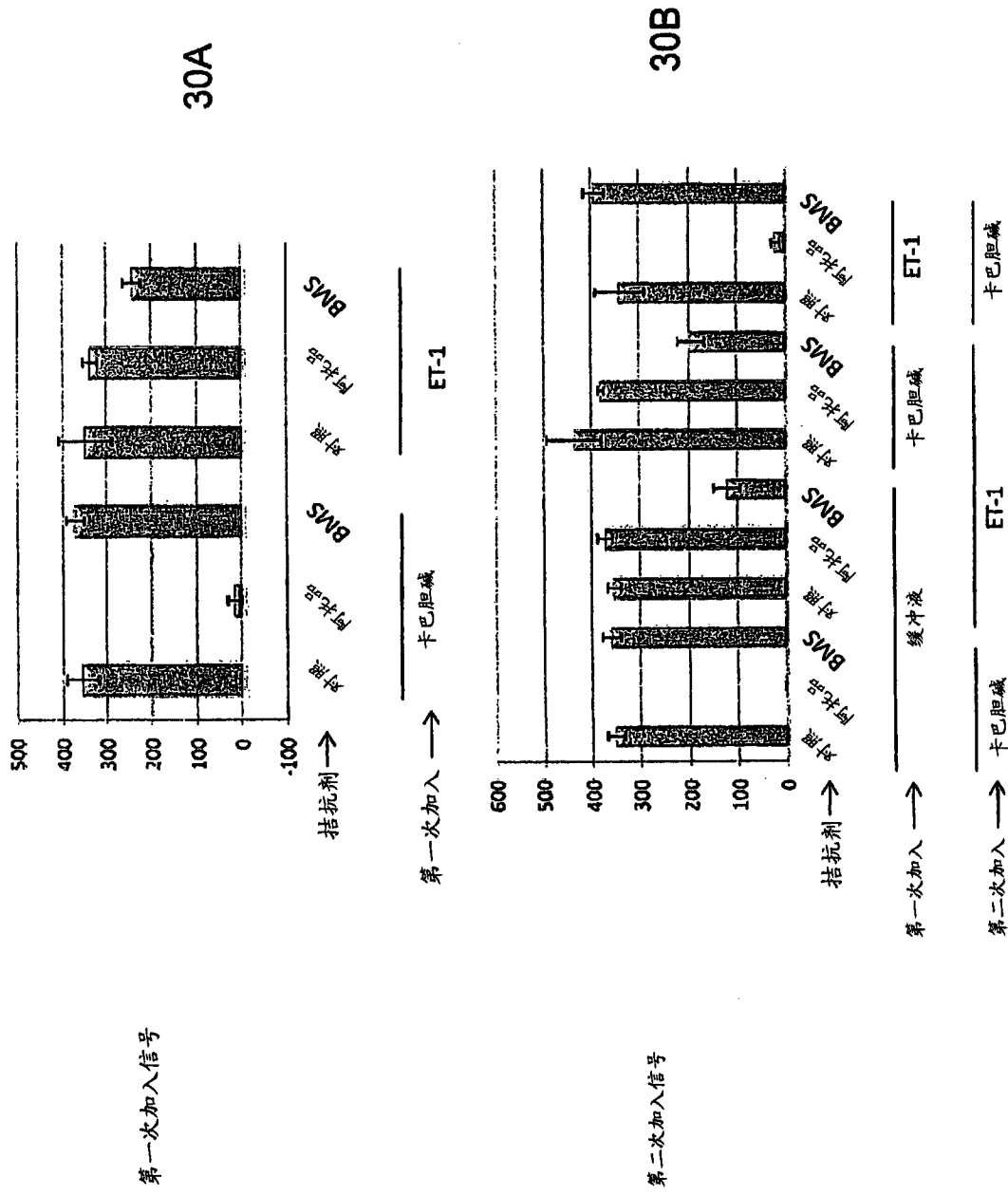


图 33 :混合细胞 :ETaR 与 M4 共培养