



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103205393 B

(45)授权公告日 2017.04.12

(21)申请号 201210290805.5

C12N 5/02(2006.01)

(22)申请日 2003.10.03

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103205393 A

US 20010051834 A1,2001.12.31,
CN 1085255 A,1994.04.13,
US 6001585 A,1999.12.14,
CN 1367841 A,2002.09.04,

(43)申请公布日 2013.07.17

(30)优先权数据
0222846.8 2002.10.03 GB

郭萍 等.人角膜缘干细胞在体外不同载体上培养的实验研究.《实验研究》.2001,第19卷(第4期),304-307.

(62)分案原申请数据
200380104770.0 2003.10.03

吴清法 等.微载体悬浮培养成人骨髓间充质干细胞.《中国实验血液学杂志》.2003,第11卷(第1期),15-21.

(73)专利权人 可塑细胞有限公司
地址 英国伦敦

王常勇 等.应用旋转生物反应器和微载体技术体外大规模扩增人骨髓间充质干细胞.《中华实验外科杂志》.2002,第19卷(第4期),378.

(72)发明人 蔡延

审查员 张林

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李波 万雪松

(51)Int.Cl.

C12N 5/071(2010.01)

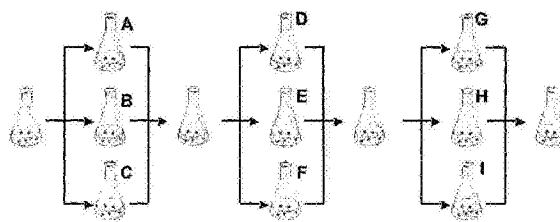
权利要求书1页 说明书30页 附图11页

(54)发明名称

细胞培养

(57)摘要

本发明涉及细胞培养。具体地,涉及一种用于确定多种培养条件对细胞的影响的方法,包括下列步骤:a)提供第一组各自包括一个或多个细胞的细胞单元群,并且将所述的群体暴露于所需要的培养条件;(b)汇聚两个或多个所述的群体以形成至少一个第二组;(c)再重分该第二组以产生进一步的细胞单元群;(d)将所述的进一步的群体暴露于所需要的培养条件;(e)任选地,根据需要反复地重复步骤(b)-(d);以及(f)任选地评估已经接触细胞的培养条件对所述的给定细胞单元的影响。



1. 用于培养干细胞和来源于干细胞的分化的细胞的方法,其中所述干细胞不是人胚胎干细胞,所述方法包括使附着于微载体或珠子或限制在培养基可渗透屏障物的范围内或截留的所述细胞生长,其中所述细胞经受至少两种不同的培养条件,所述不同的培养条件包括培养基的变化,其中产生细胞的汇合物并反复重分,其中所述方法包括:

- (a) 培养所述细胞;
 - (b) 将所述培养物分为两个或更多个细胞群;
 - (c) 在两种或更多种不同种类的培养条件下培养所述的细胞群;
 - (d) 组合在不同条件下生长的两个或更多个细胞培养物以获得汇合物;以及
 - (e) 在普通的条件下培养汇合物中的细胞。
2. 根据权利要求1的方法,其中所述微载体包括塑料、大分子或无机材料。
3. 根据权利要求2的方法,其中所述大分子是纤维素、葡聚糖、琼脂糖或丙烯酰胺。
4. 根据权利要求3的方法,其中所述无机材料是玻璃。
5. 根据前述任一项权利要求的方法,其中所述细胞截留在纤维素纤维或陶瓷柱体中。
6. 根据权利要求5的方法,其中所述纤维素纤维是DEAE、TLC、QAE或TEAE。
7. 根据权利要求1-4中任一项的方法,其中所述细胞是多潜能细胞。

细胞培养

[0001] 本申请是申请日为2003年10月3日的中国专利申请200380104770.0“细胞培养”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及细胞培养,并且特别涉及原代细胞、细胞系、多潜能细胞、全能细胞和干细胞的培养,及通过调节细胞培养条件对其多种细胞过程的调节。本发明涉及在多种条件下利用多重培养步骤来调节细胞通路并且提供用于确定各种多重培养步骤方式对细胞过程,例如生长、分化和代谢活动的影响的方法。

背景技术

[0003] 近年来细胞培养已经成为生命科学中的核心技术。在'Basic Cell Culture' Oxford University Press (2002) Ed. J.M. Davis; 和'Animal Cell Culture' Oxford University Press (2000) Ed. John R.W. Masters 中有关于细胞培养的描述,两者在此全部引入作为参考。细胞培养为研究细胞过程,例如细胞的存活、表型、基因型、增殖和分化,以及生物分子、中间物和产物的形成提供基础。也从遗传学水平-无论是在分离物或完整的转基因动物中-直到个体的蛋白质分子水平,为研究这些过程的调节提供方法。尽管其对生物学目前的状态有巨大贡献,即为令人鼓舞的科学最终提供了遗传治疗和组织工程的可能性,然而在许多方面细胞培养仍处于发展状态。

[0004] 细胞培养的重要目的是能够使多种细胞在体外生长。可培养生长的不同细胞类型的目录是广泛的(参见美国典型培养物保藏中心,<http://www.atcc.org>; 欧洲细胞保藏中心,<http://www.ecacc.org.uk>; 德国微生物保藏中心,<http://www.dsmz.de>), 包括大多数细胞类型的代表物,并且随着越来越多的培养条件被发现而不断增加。尽管本领域中的发展是稳定的,对于新的细胞类型的合适培养条件的确定方法仍保持为完全地经验主义状态:通常用反复试验的方法发现生长条件。起始点的选择经常是基于先前别人对于相似细胞所使用的,乃至目前实验室对于不同的细胞所正在使用的培养条件。通常这些条件可能根本是完全不够的,并且必须重新开始反复试验的过程。即使新的培养条件是成功的,也必须记住对先前方法的改进也为实验引入了历史性的偏移。例如,大量的早期组织培养实验使得成纤维细胞能广泛使用,并且迄今为止大多数标准的细胞培养条件促进来源于中胚层的细胞的生长(成纤维细胞、内皮、成肌细胞)。根据这些条件开发用于上皮细胞和其他细胞类型的选择性生长的培养基是一种挑战。对于一些细胞类型现在已知血清——用于中胚层细胞的许多培养基的正常成分——实际上抑制生长。在此所描述的本发明的一个方面是开发容许特定细胞类型的存活、增殖或生长以及保持其表型的合适培养条件的方法。

[0005] 除促进细胞增殖的条件外,现代组织培养中特别重要的步骤是能够控制或指导细胞向特定的表型分化。因为细胞系的增殖需要细胞数目增加,绝大多数的培养条件已经发展至促进最大的细胞增殖。并不令人惊讶的是这些条件对细胞分化没有帮助,其中细胞生长经常受到限制乃至消除了细胞生长。促进细胞增殖的条件一般是低的细胞密度、低的Ca²⁺

浓度、和存在生长因子,例如表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)和血小板衍生的生长因子(PDGF)。另一方面,在高细胞密度、高Ca²⁺浓度和存在分化诱导物,例如激素(例如氢化可的松)、旁泌性因子(例如IL-6、KGF、NGF)、类视黄醇以及甚至平面的极性化合物,例如二甲基亚砷(DMSO)的条件下促进白细胞郁积和分化。因此可能需要不同的条件用于特定细胞系的增殖和分化,当然这些相应的条件可能在不同谱系的细胞之间是不同的。在此所描述的本发明的第二个方面是用于发现容许细胞选择性分化的合适培养条件的方法。

[0006] 在细胞培养中还遇到的一些常见问题是原代细胞系的有限寿命,随着传代及其转化的细胞系特性的变化伴随有重要细胞特性的丢失。这些影响严重地限制了培养细胞供实验或分析之用,例如如下所述基于细胞的分析的实用性。原代细胞,即从组织新分离的细胞,极大地提供了最精确的细胞培养模型,因为它们表现出与其组织起源广泛相似的方式。值得注意的是,仍然没有开发出培养原代细胞的可靠方法,因此这些细胞在体外显示出有限的寿命。例如当试图扩增原代培养物或当试图进行更长时间的实验时,这表现出严重的技术限制。

[0007] 与原代培养物的使用相关的进一步问题是由于它们需要恒定的新鲜分离物,可能很难找到原材料,特别是来自于人的原材料,也很难获得表现一致的品系。因此本发明的第三个方面是培养原代细胞以获得具有延长寿命的有存活力培养物的方法。

[0008] 如果原代培养物在体外维持延长的时间,它们一般经受大部分细胞死亡的危险期,然而幸存的细胞是寿命较长的并且可进行无限培养。大多数的这些连续细胞系几乎总是如同细胞存在于完整动物组织中时的细胞的弱表现物。对于此的一个原因是容许细胞变得永生的过程也对细胞的特性有影响。例如,大多数已建立的细胞培养物已经停止表达组织特异的基因,并且替代的只表达为在细胞培养中连续生长所需要的管家基因——因此大多数这种细胞系相互之间的相似性比与其最初来源的组织之间的相似性要高。例如,大多数肝细胞系已经停止表达药物——代谢酶,该酶一般可能使其成为用于测试药物毒性的重要工具。在此所描述的本发明的进一步方面是培养细胞的方法,以使得它们提供更精确的组织模型。这随后可能改善基于细胞的实验和分析的可靠性和预测功效。

[0009] 本领域中需要培养细胞的改进技术,以及发现和实施这种技术来调节细胞过程,例如生长、分化、代谢活动、和表型表达的方法。

发明内容

[0010] 本发明提供新的细胞培养技术,该技术是基于将细胞培养作为涉及以限定顺序进行系列培养步骤的动力学过程从而更好地达到预期效果的概念。本发明认识到可开发顺序暴露于所选择试剂的方式以调节细胞过程,因此达到先前不能通过传统技术可得到的控制水平。

[0011] 本发明致力于解决通过传统技术即使能够也很难解决的涉及多个步骤和试剂的细胞培养技术。由于传统细胞培养的繁重特性,复杂的多阶段方法中组织培养条件的经验主义确定不是在实践中可实行的,因为它包括大量的工作负荷。

[0012] 在第一个方面,本发明提供用于确定多种培养条件对细胞的影响的方法,包括下列步骤:

[0013] (a) 提供第一组各自包括一个或多个细胞的细胞单元群,并且将所述的群体暴露

于所需要的培养条件；

[0014] (b) 再重分一个或多个所述的群体以产生进一步的细胞单元群；

[0015] (c) 将所述的进一步的群体暴露于所需要的培养条件；

[0016] (d) 任选地, 根据需要反复地重复步骤 (b) - (c) ; 以及

[0017] (e) 评估已经接触细胞的培养条件对所述的给定细胞单元的影响。

[0018] 有利的是, 根据本发明的细胞群是汇合的并且随后被分开。因此在优选的实施方案中, 本发明提供用于确定多种培养条件对细胞的影响的方法, 包括下列步骤:

[0019] (a) 提供第一组各自包括一个或多个细胞的细胞单元群, 并且将所述的群体暴露于所需要的培养条件;

[0020] (b) 汇聚两个或多个所述的群体以形成至少一个库;

[0021] (c) 再重分所述库以产生进一步的细胞单元群;

[0022] (d) 将所述的进一步的群体暴露于所需要的培养条件;

[0023] (e) 任选地, 根据需要反复地重复步骤 (b) - (d) ; 以及

[0024] (f) 评估细胞已经接触的培养条件对给定细胞单元的影响。

[0025] 本发明致力于所有的细胞过程, 包括细胞的表型、基因型、分子产生、活力和增殖以及分化。优选地, 使用本发明鉴定导致细胞分化的条件。例如可通过使细胞经受合适的培养条件来诱导细胞沿着所需要的发育途径分化。也研究改变培养条件的时机以更好地限定细胞的发育程序。

[0026] 培养条件包括生长培养基、化学制品、分子、和存在于生长培养基中的大分子试剂、温度状况、基质、大气条件、物理的细胞处理等。

[0027] 本发明的上述方法, 被称为组合的细胞培养、或分开-汇聚的培养, 容许细胞经受一系列培养条件, 并且在培养基中以系统的和高度多产的方式接触一系列试剂。

[0028] 尽管可通过与组合化学类似的方式高度有效地使用分开和汇合的重复循环, 考虑到必要的处理能力可使用包括至少2个连续的分开步骤(无再汇合)的方案。这种方法的缺点是它们可能迅速地产生极大量的已经不同处理的分离样品。然而优点是各个样品不需要费力的重叠合法, 因为其中的细胞单元只暴露于一组条件。因此, 考虑到合适的样品处理设备, 分开的处理可能产生快速的结果。

[0029] 本发明使用细胞单元。这种单元可以是单个细胞, 或者更有优势的是两个或多个细胞的克隆, 该细胞是以甚至在分开汇合培养过程期间可抗破坏的形式排列的。例如, 可在固体基质, 例如珠子上培养细胞, 如下进行更详细地描述。

[0030] 优选地, 可对细胞单元进行标记。标记允许对细胞已经接触的培养条件, 或暴露于不同培养条件的细胞单元进行追踪; 因此, 任何给定的细胞单元可通过其标记读取以确定它如何来源于起始细胞汇合物或培养物。标记可能是任何种类的分子或物理形式, 包括核酸标记、射频编码标记、荧光或光学的标记、和表面或基质上的细胞单元的空间编码。

[0031] 本发明的方法容许以多道传递高通量分析的方式测试成千的或上百万的细胞培养条件和试剂, 以确定为达到相对于任何细胞过程所需要的结果而必需的条件。

[0032] 因此, 本发明提供用于将细胞暴露于多种细胞培养条件的方法, 包括下列步骤:

[0033] (a) 提供第一组各自包括一个或多个细胞的细胞单元群, 并且将所述的群体暴露于所需要的培养条件;

[0034] (b) 再重分一个或多个所述的群体以产生进一步的细胞单元群；

[0035] (c) 将所述的进一步的群体暴露于所需要的培养条件；以及

[0036] (d) 任选地，根据需要反复地重复步骤 (b) - (c)。

[0037] 在优选的实施方案中，如上所述使用汇合步骤。在如此的实施方案中，本发明提供用于确定多种培养条件对细胞的影响的方法，包括下列步骤：

[0038] (a) 提供第一组各自包括一个或多个细胞的细胞单元群，并且将所述的群体暴露于所需要的培养条件；

[0039] (b) 汇合两个或多个所述的群体以形成至少一个第二库；

[0040] (c) 再重分第二库以产生进一步的细胞单元群；

[0041] (d) 将所述的进一步的群体暴露于所需要的培养条件；

[0042] (e) 任选地，根据需要反复地重复步骤 (b) - (d)；以及

[0043] (f) 评估细胞已经接触的培养条件对给定细胞单元的影响。

[0044] 在进一步的方面，本发明提供用于鉴定影响细胞过程的基因的方法，包括下列步骤：

[0045] a) 根据本发明中上述的方面来确定一种或多种培养条件对细胞单元的影响；

[0046] b) 当所述的细胞接触所述的培养条件时，在所述的细胞单元中分析基因表达；以及

[0047] c) 鉴定在所需要的培养条件下差异表达的基因。

[0048] 优选地，所使用的培养条件引起细胞过程的变化；选择这些培养条件用于产生待分析基因表达的细胞。可利用任何比较性的表达监测技术便利地分析基因表达，包括基于PCR的技术、基因表达的系列分析 (SAGE)、或例如可从如Affymetrix供应商广泛获得的阵列技术。

[0049] 在另一个方面，本发明提供用于产生编码影响细胞过程的基因产物的核酸的方法，包括如上鉴定基因，以及通过核酸合成或生物复制制备所述基因的至少编码区域。

[0050] 在进一步的方面，提供用于在细胞中诱导细胞过程的方法，包括下列步骤：

[0051] a) 根据本发明鉴定与细胞过程相关的一个或多个差异表达的基因；以及

[0052] b) 在细胞中调节所述的一种或多种基因的表达。

[0053] 可通过例如转染或其他方式将基因转移到细胞中，以使得其以瞬时或永久的方式过表达而调节细胞中基因的表达。备选地，可例如通过增强子插入或施用在基因表达中产生增加 (例如安慰诱导物) 或降低 (例如反义RNAi、转录因子) 的外源试剂而改变内源基因的表达。此外，可施用基因产物本身或导入细胞以实现增加其活性。而且可对细胞施用增减基因产物活性的试剂 (例如竞争性的和非竞争性的抑制剂、药物、药品)。

[0054] 在更进一步的方面，本发明提供用于鉴定细胞中细胞过程状态的方法，包括下列步骤：

[0055] a) 如上所述鉴定与细胞过程相关的一个或多个差异表达的基因；以及

[0056] b) 检测细胞中所述的一个或多个基因表达的调节，由此确定所述细胞中细胞过程的状态。

[0057] 优选地，用于这个分析的基因编码细胞标记，其可例如通过免疫测定进行检测。备选地，基因产物可以是能够根据荧光的、色度学的、放射度的、或其他方法学分析活性的酶。

[0058] 本发明进一步地提供用于调节细胞过程的方法,包括下列步骤:

[0059] a) 根据本发明中上述的方面来确定一种或多种培养条件对细胞单元的影响;

[0060] b) 将细胞暴露于影响细胞过程变化的培养条件;以及

[0061] c) 分离所需要的细胞。

[0062] 因此根据本发明的上述方面,本发明提供用于从双潜能、多潜能或全能的祖代产生分化细胞的方法。分化的细胞、特别是部分分化的、多潜能的细胞、或发育定型但未分化的祖细胞在药物发现、细胞治疗和需要限定谱系的细胞的其他步骤中是有用的。

[0063] 也提供一种用于鉴定能够诱导细胞过程的试剂的方法,包括下列步骤:

[0064] a) 根据本发明上述的方面来确定一种或多种试剂对细胞单元的影响;以及

[0065] b) 鉴定在细胞单元中诱导细胞过程的试剂。

[0066] 可通过常规的化学、生物化学或其他技术合成根据本发明鉴定的试剂,并用于在例如在此所描述的细胞中调节特定细胞过程的方法。

[0067] 此外本发明广泛提供培养附着于固体载体,例如附着于微载体或珠子的细胞的方法。这种载体可由大分子组成,例如纤维素、葡聚糖、琼脂糖、或丙烯酰胺、或无机材料,例如玻璃。可通过物理或化学处理进一步改进载体的表面,例如吸附或共价交联具有所需要电荷或其他所需要特性的分子实体。备选地,载体可由细胞或包封在基质内的细胞组成,该基质容许灌注亚细胞大小的物质。微载体培养具有显著的优点,包括扩大规模的培养,以及根据需要容许细胞单元便利地暴露于所选择的培养条件以产生所需要的细胞过程。因此在广泛的实施方案中,本发明提供用于在体外培养细胞的方法,包括使所述的细胞附着于微载体或珠子生长。

[0068] 优选地,细胞经受至少一个培养条件的变化。优选地,它们经受2、3、4、5、6、7、8、9或10或10种以上不同的培养条件。优选地,所述的培养条件的变化包括培养基的变化。

[0069] 此外本发明提供用于培养细胞的方法,其中如本发明前述实施方案所描述的的产生汇合的细胞并加以再重分。因此,在一个方面中,提供用于体外培养细胞的方法,包括下列步骤:

[0070] a) 组合在不同条件下生长的一个或多个细胞培养物;以及

[0071] b) 在普通的条件下培养该细胞。

[0072] 在进一步的实施方案中,提供用于体外培养细胞的方法,包括下列步骤:

[0073] a) 培养细胞培养物;以及

[0074] b) 将所述的培养物分为两组或多组细胞群,并且在两种或多种不同种类的培养条件下培养所述的细胞群。

[0075] 优选地,将细胞暴露于3、4、5、6、7、8、9、10种或10种以上不同的培养条件。所使用的培养条件有利地包括培养基的变化。此外本发明广泛提供附着于微载体,例如珠子来体外培养干细胞和来源于干细胞的分化细胞的方法。微载体培养具有显著的优点,包括扩大规模的培养,以及根据需要容许干细胞单元暴露于所选择的培养条件以获得所需要的生长和/或分化条件。因此在一个实施方案中,本发明提供用于在体外培养干细胞和来源于干细胞的分化细胞的方法,包括使所述的细胞附着于微载体或珠子生长。

[0076] 有利地,细胞经受至少一个培养条件的变化。优选地,它们经受2、3、4、5、6、7、8、9、10或10种以上不同的培养条件。优选地,所述的培养条件的变化包括培养基的变化。

[0077] 此外本发明提供用于培养干细胞的方法,其中如本发明前述实施方案所描述的产生汇合的干细胞并加以再重分。因此,在一个方面中,提供用于体外培养干细胞和来源于干细胞的分化细胞的方法,包括下列步骤:

[0078] a) 组合在不同条件下生长的一个或多个细胞培养物;以及

[0079] b) 在普通的条件下培养该细胞。

[0080] 在进一步的实施方案中,提供用于体外培养干细胞和来源于干细胞的分化细胞的方法,包括下列步骤:

[0081] a) 培养干细胞培养物;以及

[0082] b) 将所述的培养物分为两组或多组干细胞群,并且在两种或多种不同种类的培养条件下培养所述的干细胞群组。

[0083] 优选地,将细胞暴露于3、4、5、6、7、8、9、10或10种以上不同的培养条件。所使用的培养条件有利地包括培养基的变化。

[0084] 有利地,以细胞单元的方式培养细胞或干细胞,每个细胞单元包括一个或多个这种细胞。例如,该细胞单元可以是单个细胞。

[0085] 然而,各个细胞单元可能包括附着或结合固体基质,例如微载体或珠子的一个或多个细胞或干细胞。进一步地固体基质包括孔或培养基可渗透的屏障物。

[0086] 根据本发明用于培养细胞或干细胞的方法可以在合适的生物反应器中扩大规模。例如,本发明的方法可利用超过50g干重的微载体来实施。

附图说明

[0087] 图1显示进行三轮分开-汇合细胞培养的实施例。通过在给定的条件下进行生长来获得细胞单元群。将细胞单元描绘为球状物而细胞单元群显示在培养瓶中。将细胞单元分为3等分,在标示为A、B、C的不同生长条件下培养2天。随后汇合细胞单元并且再一次分为3等分,在条件D、E或F下生长。在这个步骤进行2轮后,可见多种细胞群已经暴露于所有可能的细胞培养条件的组合。

[0088] 图2显示分开-汇合细胞培养的另一个实例。在这种情况下,实验从A、B和C3群开始。在第一个步骤中汇合样品,随后分为D、E和F群。

[0089] 图3显示分开-汇合方法的变化,其中来自A、B和C的群直接分为D、E和F群而没有先前的汇合。个别细胞群的分隔可以是随机的或可以是预定的。

[0090] 图4显示分开-汇合方法的进一步变化,其中将细胞群A、B和C分为细胞群D、E和F而没有先前的汇合,但是在第二个步骤中细胞群D、E和F汇合并随后分为细胞群G、H和I。

[0091] 图5显示分开-分开的方法,包括将细胞群A分开以形成细胞群B、C和D的第一步骤,以及将细胞群B、C和D分开以形成细胞群E-M的第二步骤。

[0092] 图6显示包含分开-分开步骤地分开-汇合方法。在2轮的分开和汇合后,分开细胞群A、B和C而没有先前的汇合,结果形成来源于细胞群A、B或C的3组不同的细胞群谱系。注意可使用包括分开-分开步骤来推导细胞效应的产生中细胞培养条件的作用。例如,如果在只来源于谱系A的细胞单元中观察到细胞效应,而假定在谱系A、B和C的分散后的多种细胞群中分析的细胞培养条件是相同的,那么在分支点的细胞群A的培养条件必定对细胞效应是必不可少的。也注意图1-6中所说明的方法可进行许多组合使用。

[0093] 图7显示包括多潜能的胚胎干细胞、表达嵌合的 τ -绿色荧光蛋白、附着于多孔微载体(Cytopore2, Amersham Biosciences)的细胞单元。

[0094] 图8A-H显示通过抗体染色法确定神经胶质标记GFAP的表达,表明包含表达 τ -绿色荧光蛋白(GFP)融合蛋白质的ES细胞和多孔微载体Cultispher G的细胞单元正在进行分化。A-D显示利用40 \times 物镜在相差显微镜(A)下,以及在荧光作用下观察到的细胞单元,其中利用DAPI(B)、和(红色)标记GFAP(C)以及(绿色)GFP(D)染成蓝色的细胞核是明显的。图C和D显示似乎是暗示为神经胶质包裹神经元过程的细胞的线性阵列(白色箭头)。E-H显示对照细胞单元,其中已经除去了抗-GFAP的第一抗体。

[0095] 图I显示通过荧光显微术获得的合成图像,显示在无孔微载体(Cytodex3, Amersham Biosciences)上生长的分化的胚胎干细胞。该细胞表达 τ -GFP并且用针对神经元-特异的蛋白质 β 微管蛋白III的荧光抗体免疫化学地染成红色。黄色着色表明红色和绿色的同时染色。

[0096] 图9显示包括附着于无孔微载体(Cytodex3, Amersham Biosciences)的HepG2细胞的细胞单元的相差(图A、C、E)和荧光显微照片。图A/B:阳性对照细胞单元显示乙氧基9-羟基-3-异吩唑酮转化为红色荧光产物;图C/D:以同样方式培养的阴性对照细胞单元,其中没有加入乙氧基9-羟基-3-异吩唑酮;图E/F:分开-汇合实验后的细胞单元,表明一些用P450诱导剂 β -萘黄酮处理的细胞单元具有高水平的P450,并且能够快速转化乙氧基9-羟基-3-异吩唑酮为荧光产物(图F),同时通过不表达高水平P450的大量细胞增殖经受分开-汇合培养的其他细胞单元(例如图E的底部右侧的明显细胞单元)。

[0097] 图10显示利用RFID标记细胞单元。图A:玻璃包封的射频转发器ID100-A(Trovan);图B:在玻璃包封的射频转发器的直线边缘上生长的表达 τ -GFP融合体蛋白质的小鼠胚胎干细胞(光学显微术,顶部;荧光显微术,底部;合并成像,中部);(C)显示在玻璃包封的射频转发器的圆头上生长的表达GFP的胚胎干细胞(光学显微术,顶部;荧光显微术,底部;合并成像,中部)。

[0098] 图11表明小鼠ES细胞的分开-汇合培养后有差异的基因表达。使ES细胞在Cytopore2微载体上,在没有加入物(泳道1、4、7、10)、或加有1 μ M LiCl(2、5、8、11)、或1 μ M视黄酸(3、6、9、12)的ES培养基(A)、CDM(B)、或DMEM(C)中生长。从该细胞制备cDNA,并且以相等的数量用对照基因甘油醛3磷酸脱氢酶(G3PDH)、和未分化的ES细胞的标记物(Oct4)、神经元前体(Nestin)、和内皮细胞(HNF3B)的寡核苷酸引物进行PCR。该照片是PCR产物的溴化乙啶-染色的琼脂糖凝胶,其以开括号(open brackets)表明。'PD'表明引物-二聚体产物。

[0099] 图12显示微载体的标记。图A-D:没有(A、B)或有(C、D)生物素酰化的抗-胶原抗体孵育的、用链霉抗生物素-FITC染色的Cytodex3微载体,并且在相差(A、C)和荧光(B、D)显微镜下观察。图E-H:没有(E、F)或有(G、H)交联的生物素部分的、用链霉抗生物素-包被的1 μ m直径的红色荧光珠染色的Cultispher G微载体,并且在相差(E、G)和荧光(F、H)显微镜下观察。图片a显示将Cytodex3微载体与表达 τ -GFP转基因的ES细胞一起接种。

[0100] 图13显示具有2种不同荧光标记的微载体的2个群体的标记。将Cytodex3微载体分别与红色或绿色的链霉抗生物素乳状珠孵育,然后以1:1比率混合。利用相差显微镜术(A)进行观察,并且用滤光器检测绿色(C)或红色(D)荧光。B是C+D的合并照像。两个标记是容易检测的,并且没有检测到标记的显著转移。

[0101] 图14表明具有2种不同荧光标记的微载体的双标记。将Cytodex3微载体与红色和绿色链霉抗生物素乳状珠的1:1混合物孵育。在相差显微镜(A)下进行观察,并且用滤光器检测绿色(C)或红色(D)荧光。B是C+D的合并照像。每种微载体都是双标记的。

[0102] 图15显示利用相差(图A)或荧光(图B)显微镜检测显示细胞过程的细胞单元。可利用荧光显微术(B)容易地从背景辨别出表达 τ -GFP融合蛋白的细胞单元,并且可从混合物人工分离出来。

[0103] 图16显示来自利用COPAS选择(Union Biometrica Inc., Somerville, MA)仪器自动分析微载体和细胞单元的数据。图A和B:将悬浮在PBS中的Cytodex3微载体通过分拣器并且监测大小(飞行时间;TOF)对光散射(消光;Ext) [A],以及监测绿色荧光(FLU1)对红色荧光(FLU2) [B]。图C和D:对标记有红色荧光乳状珠的Cytodex3微载体的分析显示Ext对TOF [C]、和荧光 [D]的曲线图;图B和D的比较说明微载体的标记导致其红色荧光信号的增加。图E和F:分析包括Cytodex3和表达 τ -GFP转基因的ES细胞的细胞单元群。Ext对TOF [E]的曲线图中增加的散射和绿色荧光的宽范围(FLU1) [F]显示可根据细胞数目分拣细胞单元。

[0104] 图17显示鉴定用于标记细胞单元的标记。图A-D:用生物素修饰的Cultispher微载体的链霉抗生物素-FITC标记(A、B)或其天然的未处理状态(C、D)。图E-G:在相差显微术(E)下,和在绿色(F)和红色(G)落射荧光光学装置下观察包括表达 τ -GFP融合蛋白的ES细胞,和用链霉抗生物素-包被的 $1\mu\text{M}$ 红色-荧光乳状珠(Sigma)标记的生物素酰化Cultispher G微载体的细胞单元,以分别显像GFP-标记的细胞和红色荧光标记。图H-K:利用 $1\mu\text{M}$ 红色-荧光乳状珠(Sigma)的对照样品校准FACS,显示FL3荧光通路(I)中特征性的前向和旁侧的-散射参数(H;方框区域)和特征性的荧光强度。通过控制预先确定的标记的大小参数对单独蛋白水解消化的、用 $1\mu\text{M}$ 红色-荧光乳状珠(Sigma)标记的细胞单元进行FACS分析(J;方框区域),然后检测特征性标记的特征性的FL3通路强度(K)。

[0105] 图18显示鉴定用于标记微载体的多个标记。图A:使用对照标记的前进/旁侧散射参数限定控制门大小为 $4.4\mu\text{M}$ (控制门R1)、 $5.5\mu\text{M}$ (控制门R2)、和 $1\mu\text{M}$ (控制门R3)珠。图B-D:蛋白水解消化的标记的微载体的FACS分析显示存在相应于来自Bangs Labs5号组的绿色荧光 $4.4\mu\text{M}$ 珠的标记(图B);来自Bangs Labs1号组的绿色-荧光 $5.5\mu\text{M}$ 珠(图C),和来自Sigma的 $1\mu\text{M}$ 红色荧光珠(图D)。

具体实施方式

[0106] 定义

[0107] 培养条件如在此所使用的,术语“培养条件”是指为了促进所述细胞的生长或分化而放置细胞或细胞接触的环境。因此,该术语是指可能影响细胞的生长和/或分化的培养基、温度、大气条件、基质、搅拌条件等。更特别地,该术语是指可掺入培养基并可影响细胞的生长和/或分化的特定试剂。

[0108] 细胞如在此所指,细胞被定义为能够独立发挥功能的生物体的最小结构单位,或单细胞的生物体,其由全部都被半透性的细胞膜或细胞壁包围的一个或多个细胞核、细胞质和多种细胞器组成。该细胞可以是原核的、真核的或古细菌的。例如,细胞可以是真核细胞。优选哺乳动物细胞,特别是人细胞。细胞可以是天然的或例如通过遗传操作或在培养物中传代而改进以获得所需要的特性。对于细胞如下进行更详细地定义,其是能够产生一个

以上分化的细胞类型的全能性、多潜能或多能细胞。干细胞可以在体外分化以产生分化的细胞,其本身可以是多能的,或可以是末端分化的。体外分化的细胞是已经通过将干细胞暴露于一种或多种促进细胞分化的试剂而人工产生的细胞。

[0109] 细胞过程细胞过程是任何胞内或胞外发生或观察到的,或可归于细胞的特性、功能、过程、事件、起因或效应。细胞过程的实例包括但不限于,活力、衰老、死亡、多能性、形态学、信号、结合、识别、分子的产生或破坏(降解作用)、突变、蛋白折叠、转录、翻译、催化作用、突触传递、泡囊转运、细胞器功能、细胞周期、代谢、增殖、分裂、分化、表型、基因型、基因表达、或这些过程的调控。

[0110] 细胞单元一群细胞,其可以是一种细胞的群体。可以是基本上不离解细胞单元本身而分拣、重分和处理的细胞单元的汇合,该细胞单元表现为细胞的集落并且在该细胞单元中各个细胞暴露于相同的培养条件。例如,细胞单元可包括粘附细胞群体的珠子。

[0111] 全能性全能细胞是存在于生物体中具有分化成为任何类型的体细胞或生殖细胞的潜力细胞。因此,可以从全能细胞以一些方式衍生出任何所需要的细胞。

[0112] 多潜能性多潜能的细胞是可分化成为一种以上但不是所有细胞类型的细胞。

[0113] 标记如在此所使用的,标记或标记物是鉴定细胞单元和/或确定接触细胞单元的培养条件、或培养条件的顺序的方式。因此,标记可以是各自在特定的培养步骤加入的一组标记;或在开始阶段或实验中加入的标记,其根据接触细胞单元的培养步骤进行改进或在培养期间进行追踪;或只是定位的参考,其容许推导所使用的培养步骤。标记或标记物也可以是在任一时刻报告或记录细胞单元的位置或同一性,或将独特的识别器指派给细胞单元的装置。标记或标记物的实例是单一序列的分子、结构或质量;或荧光分子或物体,例如珠子;或射频和其他转发器;或具有独特标记或形状的物体。

[0114] 暴露于培养条件当使细胞处于与培养基接触,或在影响一种或多种细胞过程,例如细胞的生长、分化、或新陈代谢状态的条件时,该细胞是暴露于培养条件的。因此,如果培养条件包括在培养基中培养细胞,将细胞置于培养基中足够的时段以使它具有效应。同样地,如果该条件是温度条件,在所需要的温度培养细胞。

[0115] 汇合一个或多个细胞单元群的汇合包括混合群体以产生单个的群体或汇合,其包括一种以上背景的背景细胞单元,即,已经暴露于一种以上不同种类的培养条件的背景细胞单元。可以进一步随机或非随机地重分汇合成为群体;这种群体不是为了现成的目的而本身“汇合”,但是可以通过联合,例如在暴露于不同种类的培养条件后而自身汇合的。

[0116] 增殖在此细胞生长和细胞增殖是可互换使用的,以表示细胞数目的增加而不是分化成为不同的细胞类型或谱系。换言之,该术语表示活细胞数目的增加。优选地增殖不伴随有表型或基因型中的明显变化。

[0117] 分化细胞分化是从不同细胞类型的细胞类型进行发育。例如,双潜能、多潜能或全能细胞可以分化成为神经细胞。分化可以伴随有增殖,或可以是独立的。术语“分化”泛指从较少发育性限定的细胞类型获得成熟细胞类型的表型,例如神经元或淋巴细胞,但是不排除转分化,由此一种成熟细胞类型可能转化成另一种成熟细胞类型,例如神经元到淋巴细胞。

[0118] 分化状态细胞的分化状态是细胞沿着特定的途径或谱系分化的水平。

[0119] 细胞过程的状态细胞过程的状态是指无论是否发生或没有发生细胞过程,以及在

复杂的细胞过程中,可能表示该细胞过程中特定的步骤或阶段。例如,细胞中的细胞分化途径可以是非活化的或可能受到诱导,以及可以包括许多不连续的阶段或组成,例如由存在特征性种类的酶或中间物而表征的信号事件。

[0120] 基因基因是编码基因产物,如多肽或RNA基因产物的核酸。如在此所使用的,基因至少包括编码基因产物的编码序列;它可以任选地包括一个或多个为编码序列的转录和/或翻译所必需的调节区域。

[0121] 基因产物基因产物一般是由基因以常规的方式编码的蛋白质。然而,该术语也包括非多肽的基因产物,例如核糖核酸,其由基因编码。

[0122] 核酸合成可以根据任何可利用的技术合成核酸。优选地,核酸合成是自动的。此外,可以通过生物复制产生核酸,例如通过在细菌或真核细胞中根据本领域已知的方法进行克隆和复制。

[0123] 差异表达可通过基因表达分析,例如在基因芯片上通过本领域已知的方法鉴定应答细胞培养条件而在不同水平表达的基因。在测试条件下的细胞比在备选条件下的细胞中差异表达的基因相对于总的基因表达水平显示更多或更少数量的mRNA或基因产物。

[0124] 转染可以通过任何适当的方式将基因转染到细胞中。在此使用该术语以表示常规的转染,例如利用磷酸钙,但是也包括将核酸转移到细胞中的其他技术,包括转化、病毒转导、电穿孔等。

[0125] 调节使用术语调节表示增加和/或减少被调节的参数。因此,基因表达的调节包括增加基因表达和降低基因表达。

[0126] 基于细胞的分析

[0127] 基于细胞的分析是现代生物医学科学的重要部分,包括对涉及使用细胞的步骤的任何分析。基于细胞的分析可用于跨越医药药物发现和开发过程的几乎所有阶段,又在提供关于化合物如何在生物系统中相互作用,以及其如何与分离物中潜在的药物靶标相互作用的信息中是有价值的。

[0128] 例如,基于细胞的分析可用于鉴定和验证潜在的药物靶物。已经开发基于细胞的分析来用于鉴定涉及疾病过程的基因或细胞途径,用于确定靶基因的功能,或测量在活化某些基因或其产物后诱导的表型变化。

[0129] 基于细胞的分析也可用于对先导化合物的发现、选择和优化的药物发现。不同于经常被用于常规高通量筛选分析的生物化学分析,基于细胞的分析可提供关于药物特性,例如吸收作用、渗透性、选择性、特异性和代谢的信息。因此,更好地鉴定在基于细胞筛选后所选择的先导化合物,更可能提供有价值的引导,并且更少可能在药物发现过程的后继阶段中被除去。

[0130] 基于细胞的分析的主要应用是在毒性筛选中。药物发现和开发的决定性部分是药物候选物的筛选,以除去可能产生副作用的化合物。然而,现在的方法大多是不够的,特别是利用动物模型用于毒性筛选是费钱且费时的。此外,动物模型可能是不可靠的,因为这些模型中的结果不总是准确预测化合物将在人类中如何进行。因此基于人细胞的筛选是优选的。

[0131] 干细胞

[0132] 在Stem Cells:Scientific Progress and Future Research Directions中详细

描述了干细胞。Department of Health and Human Services.2001年6月<http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm>.在此引入该报告的内容作为参考。

[0133] 干细胞是能够分化形成至少一种以及有时形成许多特化的细胞类型的细胞。可从干细胞形成的不同细胞的库被认为是完全的;即它包括组成生物体的所有不同的细胞类型。从干细胞相对充足的早期胚胎到它们相对稀少的成体,干细胞在生物体的终生自始至终都存在。存在于成体动物的许多组织中的干细胞在正常的组织修复和体内平衡中是很重要的。

[0134] 这些细胞的存在增加了提供产生特化的功能性细胞来移植到人中和在疾病组织中替代死的或无功能细胞的方式的可能性。由此可以提供治疗的疾病的列表包括帕金森氏症、糖尿病、脊髓损伤、中风、慢性心脏病、晚期肾病、肝功能衰竭和肿瘤。为了使细胞代替治疗成为可行的,在干细胞研究中需要至少两个主要的突破。首先,需要开发使干细胞生长至足够数目的条件,以便能够制备治疗相关剂量的细胞。理论上大规模的培养物可能为治疗多数患者提供材料。其次,由于移植到动物中的未分化干细胞经常产生肿瘤,设想使干细胞分化成为更特化的细胞对于细胞代替治疗将是首要的,因此它对于发现使干细胞分化成为不同疾病需要的特别特化的细胞类型的条件是必需的。

[0135] 很明显克服这些障碍的关键是设计用于干细胞及其衍生物的细胞培养的合适方法。然而,由于上述阐明的理由,即涉及细胞培养技术发展的反复试验的繁重过程,该任务是特别困难的。因此在此所描述的本发明的一个应用是说明用于干细胞生长和分化的技术。

[0136] 干细胞的类型

[0137] 关于什么构成干细胞仍然存在相当多的争论,然而为了这些讨论的目的,关键特征是能够分化成为不同的细胞类型。如下列出干细胞的实例。

[0138] 不同的干细胞具有形成多种细胞类型的不同潜能:精子发生干细胞是单潜能的,因为它们只自然地产生精子,但是造血干细胞是多能的,而胚胎干细胞被认为能够产生所有的细胞类型,是全能性或多潜能的。

[0139] 迄今为止已经分离了3种类型的哺乳动物多潜能干细胞。这些细胞能够产生通常来源于胚胎的所有3种胚层(内胚层、中胚层和外胚层)的细胞类型。干细胞的3种类型是:来源于睾丸肿瘤的胚胎性癌(EC)细胞;来源于植入前胚胎(通常为胚囊)的胚胎干(ES)细胞;来源于植入后胚胎(通常为将会成为生殖腺部分的胎儿细胞)的胚胎生殖(EG)细胞。正好因为它们是多潜能的,这些细胞在指导分化的作用中受到特别的注意。

[0140] 干细胞也存在于成年生物体中。成年干细胞是存在于分化(特化的)组织中,对本身进行更新,并且能够分化产生更特化细胞的未分化细胞。最近已经表明成年干细胞具有可塑性,即它们能够分化产生具有不是其驻留的组织或组织起源的实际胚层的特性的细胞类型。例如,已经表明血液干细胞(来源于中胚层)能够分化成为神经元(通常来源于外胚层)。Toma等人(2001,Nature Cell Biol.3,p778-784)最近已经描述了鉴定和分离来源于皮肤下真皮层的新型干细胞。定义这些干细胞是皮肤衍生的前体(SKP)细胞。可通过在聚赖氨酸上培养和变化培养基中血清的浓度诱导SKP细胞分化。当缺少血清时,它们分化成为神经元和胶质细胞;加入3%血清它们分化成为平滑肌细胞;增加血清至10%导致SKP细胞分化成为脂肪细胞。迄今为止已经报道成年的干细胞存在于各种组织中,如神经系统、骨髓和

血液、肝脏、骨骼肌、皮肤和消化系统。

[0141] 除成年的干细胞之外,存在许多类型的祖代或前体细胞。这些细胞部分地限制了其分化潜能并且可能存在于所有的机体组织中,它们能够分化但是不同于干细胞,因为它们的所有组成成分不是广泛的,并且由于限制,它们不能自我更新。

[0142] 最近的证据甚至表明分化的细胞类型能够改变表型。这个现象,被定义为转分化,是分化的细胞类型在有或没有介入细胞分裂下转化为另一个细胞类型。先前普遍接受的是终端分化状态是固定的,但是现在表明有时候分化可能是逆转或改变的。现在体外方法是可利用的,其中可诱导细胞系转分化(参见Shen,Slack&Tosh2000,Nature Biol.vol2,p.879-887Horb等人,2003,CurrentBiol.Vol13,p105-115)。最后,已经报道特化的细胞类型可能去分化而产生具有分化成为进一步细胞类型的潜能的干样细胞。

[0143] 干细胞的生长和分化

[0144] 干细胞的重要特性是它们在培养中对称分裂,产生2个子细胞的能力,该子细胞是其衍生的干细胞的精确拷贝。这容许干细胞在培养中以其未分化的状态扩展,产生足够用于生物研究甚至细胞治疗的物质。随着对个体的深入研究可理解干细胞能够如此进行的方式,然而对于促进干细胞更新的因子知之甚少。一般地,多潜能的干细胞系保持在成纤维细胞的有丝分裂非活化的滋养层上,或这种细胞的培养基条件中。假定培养的细胞从培养基移出/中和一些未知的因子,和/或它们提供抑制干细胞分化和促进干细胞自我更新的因子。这种因子的一种是白血病抑制因子(LIF),与IL-6相关的细胞因子家族成员,其当缺少饲养细胞时能够促进小鼠ES细胞自我更新。在缺乏饲养细胞(和/或LIF)时生长的干细胞经常自然和不规则地分化,产生分化细胞类型的混合物。

[0145] 影响干细胞自我更新的因子可能是刺激或抑制的,并且可能在胞外或胞内发挥作用。就分泌因子LIF来说,已知其胞外的受体是gp130,而且该蛋白质的活化足以抑制鼠类ES细胞的分化。在细胞内,gp130的重要下游效应物是转录-3的信号转导物和活化物(STAT-3)。另一个对保持干细胞多潜能性特别重要的分子是转录因子Oct-4,当人工下调时其导致小鼠ES细胞中可塑性状态的丢失。也已经阐明了天然抑制ES细胞自我更新的其他信号分子,例如促分裂原-活化的蛋白激酶。干细胞研究的主要目的是发现天然和合成的因子、药物、多肽、基因、寡核苷酸、组织培养基和条件、特定处理的培养基、培养细胞、和对促进多种类型干细胞分化潜能的扩展和保持具有作用的其他刺激。这包括成年干细胞,目前其还没有以细胞培养的方式进行可观地扩展。

[0146] 干细胞研究的第二大挑战是指导分化为特定的功能性的细胞类型,其能替代在多种疾病状态中丢失的细胞,并且产生积极的临床结果。诱导干细胞开始分化实际上是相当简单的过程。例如,从培养的培养物移出并且在附着基质上生长汇合的ES细胞将开始自然地分化。类似地,从培养的培养物移出并且在非附着的基质上生长的ES细胞将从所有的3种胚层形成未分化的和部分分化细胞的胚状体-簇。可随后分离这些细胞,接种为单层的培养物,并且暴露于促进直接分化的因子。与包括许多不同细胞类型的混合物的分化细胞的胚状体或未处理的培养物相比,很可能通过很少类型的分化细胞增殖暴露于这些因子的培养物。尽管如此,即使有也是极少数设计了产生基本上纯的分化细胞培养物的条件。此外还不清楚即使有设计用于干细胞分化产生适于细胞代替治疗的细胞的任何方法,可能该细胞不能末端分化成为需要的准确表型,或分化的细胞在体内不再是有生存力的。

[0147] 已经用于诱导干细胞的直接分化的因子包括：视黄酸、表皮生长因子(EGF)、骨形态发生蛋白质(BMPs)、碱性的成纤维细胞生长因子(bFGF)、活化素-A、转化生长因子 β -1(TGF β -1)、肝细胞生长因子、神经生长因子、sonic hedgehog(SHH)、白介素-3(IL-3)、白介素-6(IL-6)、粒性巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、促红细胞生成素、维生素D3、地塞米松、 β -巯基乙醇、丁基化羟基苯甲醚、5-氮胞苷、DMSO、胰岛素、甲状腺激素(T3)、LIF、胎牛血清、血管内皮生长因子(VEGF)、钢化因子、氧浓度的变化、抗坏血酸、 β -磷酸甘油、烟酰胺、血小板衍生生长因子(PDGF)、cAMP、多种细胞粘附分子和底物等。除这些限定的因子之外，很可能不限定提取物，例如条件培养基、人和动物组织的匀浆物、或植物提取物，都可用于指导干细胞分化。这些不定提取物的渐进性分级分离可以产生活性部份或具有高效力的更纯的成分。可将这些因子单独或组合或以对实验结果至关重要的限定顺序的方式加入用于特定实验的生长培养基。

[0148] 已经设计用于体外干细胞分化的许多系统是复杂的多阶段步骤，其中多种步骤的准确特征以及多种步骤的时序是重要的。例如，Lee等人(2000, *Nature Biotechnology*, vol. 18, p675-679)使用5阶段的方案从小鼠ES细胞衍生出多巴胺能神经元：1) 使未分化的ES细胞在涂有白明胶的组织培养表面上在ES细胞培养基中，在存在LIF时扩展；2) 在ES细胞培养基中悬浮培养4天产生胚状体；3) nestin-阳性的细胞选自在组织培养表面上接种8天后的ITSFn培养基中的胚状体；4) 在含有bFGF/层粘连蛋白的N2培养基中扩展nestin-阳性细胞6天；5) 最后通过从含有层粘连蛋白的N2培养基取出bFGF诱导扩展的神经元前体细胞分化。

[0149] 在连续细胞培养的第二个实施例中，Bonner-Weir等人[*Proc. Natl. Acad. Sci.* (2000) 97:7999-8004]从人胰管细胞得到产生胰岛素的细胞：1) 通过在存在血清2-4天时选择性粘附在固体表面上而从胰岛细胞选择导管细胞；2) 随后取出血清并向成纤维细胞的导管上皮细胞加入角质化细胞生长因子5-10天；以及3) 用胞外基质制品'Matrigel'覆盖细胞3-6周。

[0150] 在连续细胞培养的另一实施例中，Lumelsky等人[*Science* (2001) 292:1389-1394]通过直接分化小鼠胚胎干(ES)细胞衍生出分泌胰岛素的细胞：1) 在存在LIF时扩展ES细胞2-3天；2) 在缺乏LIF4天中产生胚状体；3) 利用ITSFn培养基选择nestin-阳性细胞6-7天；4) 在含有B27培养基添加剂和bFGF的N2培养基中扩展胰腺的内分泌前体6天；以及5) 通过取出bFGF并加入烟酰胺诱导分化为分泌胰岛素的细胞。

[0151] 然而不只是多种步骤的顺序和持续时间或加入不同因子的系列对于决定细胞分化是重要的。因为胚胎发育受到透露定位信息的信号因子梯度作用的调节，所以预期单个信号因子的浓度，以及两个或多个因子的相对浓度在体外和体内指定细胞群体的命运中是重要的。因子浓度在发育期间发生变化，干细胞对于相同分子的不同浓度产生不同的应答。例如，从晚期胚胎的CNS分离的干细胞对不同浓度的EGF产生不同的应答：EGF的低浓度产生增殖的信号，而EGF的高浓度产生增殖和分化为星形胶质细胞。

[0152] 已经被发现体外影响干细胞的自我更新和分化的许多因子是天然存在的分子。这是可以预期的，因为通过沿着信号转导途径起作用的信号分子和受体诱导和控制了分化。然而同理，很可能许多合成的化合物对干细胞分化具有影响。通常人工合成这种在信号和信号转导途径内具有与细胞靶物(也称为药物靶)相互作用的高度可能性的合成化合物，例

如用于医药公司的药物筛选。一旦已知这些化合物可用于自体内指导干细胞的分化,或可用于体内给药,在这种情况下它们将对患者靶器官中的固有干细胞起作用。

[0153] 组织培养中的常见变化

[0154] 在开发用于成功培养特定细胞类型的条件中,或为了实现或调节细胞过程,考虑多种因素通常是很重要的。

[0155] 一个重要因素是判断是否悬浮增殖细胞或以附着于基质的单层增殖细胞。大多数细胞优选附着于基质,而一些细胞,包括转化的细胞、造血细胞和来自腹水的细胞可悬浮增殖。

[0156] 假定是贴壁细胞的培养,一个重要因素是选择粘附基质。大多数实验室使用一次性的塑料作为用于组织培养的基质。已经使用的塑料包括聚苯乙烯(最常见的类型)、聚乙烯、聚碳酸酯、有机玻璃、PVC、特氟隆、玻璃纸和醋酸纤维素。可使用任何塑料,但是其中许多塑料需要处理以使得它们可润湿并且适于细胞附着。此外可使用任何适当制备的固体基质提供细胞的支持物,目前已经使用的基质包括玻璃(例如明矾-硅酸硼和钠钙玻璃)、橡胶、合成纤维、聚合的葡聚糖、金属(例如不锈钢和钛)等。

[0157] 一些细胞类型,例如支气管上皮细胞、血管内皮、骨骼肌和神经元需要涂有生物制品的生长基质,通常为胞外基质材料例如纤粘连蛋白、胶原、层粘连蛋白、多溶素等。生长基质和应用方法(湿或干的涂布、或凝胶)可能对细胞过程,例如细胞的生长和分化特性有影响,而这些必须如上所述凭经验确定。

[0158] 可能细胞培养中最重要的变化因素是培养基和补充物,例如血清的选择。这些为细胞生长提供了含水的间隔,以营养物和多种因子实现,其中一些已经在上文列出、其它的则很少有限定。一些因子对粘附是必不可少的,其它对传递信息必不可少(例如激素、促分裂原、细胞因子),而其他的可作为解毒物。通常使用的培养基包括RPMI1640、MEM/Hank's盐、MEM/Earle's盐、F12、DMEM/F12、L15、MCDB153等。多种培养基在其成分中具有很大的差别,一些常见的差异包括碳酸氢钠浓度、二价离子的浓度,例如Ca和Mg,缓冲液组成、抗生素、微量元素、核苷、多肽、合成的化合物、药物等。已知不同的培养基是选择性的,指它们只促进一些细胞类型的生长。培养基补充物,例如血清、脑垂体和其他提取物,经常对培养物中细胞的生长是不可缺少的,此外经常对决定培养物中细胞的表型负责,即它们能够决定细胞的生存或直接分化。例如分化的细胞过程中补充物的作用是复杂的,并且取决于它们的浓度、它们加入培养物的时间点、细胞类型和所使用的培养基。这些补充物的不确定特性及其对于细胞表型影响的潜能刺激了无血清培养基的发展。对于所有的培养基,如上所述主要通过反复试验进行它们的开发。

[0159] 组织培养的气相态是同样重要的,并且应使用的其组成和体积可能取决于所使用培养基的类型、需要的缓冲数量、培养瓶是否是敞开或密封的、以及特定的细胞过程是否需要调节。常见的变化包括二氧化碳和氧的浓度。

[0160] 对组织培养重要的其他条件包括选择培养容器、罐顶空隙量、接种密度、温度、培养基变化的频率、酶处理、振荡或搅拌的速率和模式。

[0161] 因此变化细胞培养条件是获得所需要细胞过程的方法。本发明的一个方面认识到连续方式中细胞培养条件的变化可能是获得细胞效应的卓有成效的方法。在多种应用中,例如在细胞分化的研究中,经常需要特异的连续不同的组织培养条件以作用于细胞过程。

不同的条件可包括向/从培养基进行加入或取出或在特定的时间点变化培养基。如下给出这类条件的实施例,通常是如上所述通过反复试验而发展出来的。

[0162] 细胞单元的形成

[0163] 本发明的一个重要方面是细胞群(细胞集落)能够在多种条件下生长在细胞培养物中,并且当受到干扰以及当与其他集落混合时该集落可在多种条件下基本上保持其完整性。这种群体或集落在此称为细胞单元。可经由例证说明,通过使细胞在例如载体的固体基质上附着培养生长来实现细胞单元的形成。如果细胞增殖发生在接种于载体上后,子细胞将附着在相同的载体上并且形成相同集落的部分。一般,活的贴壁细胞不是容易地从其生长基质上分离的,因此不管对载体进行任何机械操作、振荡培养基、或转移到另一个组织培养系统中都可持续该细胞集落的完整性。类似地,如果任何时候多数载体处于相同的容器中(例如汇合珠子),将没有细胞从一个珠子实质性的转移到另一个珠子。

[0164] 在单元或集落中生长细胞的一个优点是如果将单元连续地置于一组不同的组织培养基中,包括该集落的所有细胞将按相同的顺序和相同的时段暴露于相同的系列培养条件。使细胞在不一定本身附着于组织培养容器的单元中生长有下列好处,即能够随意移出个别集落并转入不同的培养容器。该方法的一个优点是能够最小化组织培养:即使与最小的组织培养瓶相比,只需要相对很少的细胞来建立微载体珠子克隆(参见下文)。在载体上形成生长细胞单元的进一步的优点是能够扩大细胞培养的规模。在载体上生长干细胞提供了扩大生产规模以提供足够用于干细胞治疗的材料的方法。同样地,在载体上分化干细胞提供随分化进行而扩大生产规模,最后提供足够用于细胞替代治疗的材料。这种细胞培养的规模扩大需要至少50g(干重)的微载体,优选100g、500g、1kg、10kg或以上。

[0165] 在固体基质上形成细胞单元的另一个重要优点是可通过多种方式标记由于缔合而附着细胞的基质。

[0166] 已经广泛使用3mm和5mm的玻璃珠作为细胞粘附的基质,特别是在使用玻璃珠生物反应器(例如由Merodos GmbH制造)来扩大细胞培养的规模时。这些珠子一般被用于分层包装而不是分批培养,避免对贴壁细胞造成机械损伤。

[0167] 相比之下,当细胞在较小的载体上生长时它们可当做悬浮培养物。在小的载体上生长细胞的常见方法被称为微载体细胞培养(参见'Microcarrier cell culture, Principles and Methods', Edition AA, 可从Amersham Biosciences(18-1140-62)获得;在此全部引入作为参考)。商业上使用微载体培养用于在多达4000升的发酵罐中生产抗体和干扰素。各种微载体都是有效的,无论其形状和大小以及由不同的材料制成。其中由聚苯乙烯(Biosilon, Nunc)、玻璃(Bioglass, Solohill Eng)、胶原(Biospheres, Solohill Eng)、DEAE交联葡聚糖凝胶(Cytodex-1, Pharmacia)、葡聚糖(Dormacell, Pfeifer & Langen)、纤维素(DE-53, Whatman)、白明胶(Gelibeal, Hazelton Lab)、和DEAE葡聚糖(Microdex, Dextran Prod.)制成的微载体珠子是可商业购买的。根据珠子的相对密度、直径和适于细胞生长的表面积可很好表征这些载体。此外可利用许多具有极大增加细胞生长的表面积的多孔(微)载体。这些多孔载体的进一步特征是它们适合于锚定依赖性的细胞以及悬浮细胞的生长,这些细胞通过滞留在开放的连通的孔的网络中而被携带。多孔载体可利用的材料是例如白明胶(Cultispher G, HyClone)、纤维素(Cytocell, Pharmacia)、聚乙烯(Cytoline 1和2, Pharmacia)、硅橡胶(Immobasil, Ashby Scientific)、胶原

(Microsphere, Cellex Biosciences), 和玻璃 (Siran, Schott Glassware)。这些载体是分别适合于搅拌、流化或固定床培养系统的。

[0168] 由于载体的物理性能是已知的, 很容易计算用于实验的载体的数目。所述的一些载体和除此之外的许多载体有效的, 其作为干制品可准确地称重, 并随后通过在液体培养基中膨胀而制备。此外用于接种在微载体培养中的细胞数目是可以计算并进行变化的。例如, 以每个珠子接种6个细胞的Cytodex3 (2g/升) 的培养将产生包含8百万个微载体的培养物, 其中以 5×10^4 个细胞/cm²的密度生长4千8百万个细胞/升。

[0169] 可通过细胞的酶促脱附, 和/或通过合适的载体消化来收获在微载体上生长的细胞, 或从微载体释放标记 (参见下文): 可通过胰蛋白酶和/或EDTA溶解白明胶载体, 利用胶原酶溶解胶原载体以及利用葡聚糖酶溶解葡聚糖载体。

[0170] 除固体或多孔的微载体之外, 可通过禁闭, 即限制在培养基可渗透屏障物的范围内来分群细胞。已经开发了膜培养系统, 其中可渗透的渗析膜保留细胞群体, 但是容许培养基及其成分在内部和外部的间隔进行自由交换。也已经开发了在空心纤维柱体中的细胞培养, 大量的纤维以及全部完整的系统都是可商业购买的 (例如来自Amicon, Cellex Biosciences)。也已经开发了在半固体基质中的细胞包封, 其中通过吸附、共价键、交联或滞留在聚合物基质中使细胞固定。已经使用的材料包括白明胶、聚赖氨酸、藻酸盐和琼脂糖。一般的方法是在40℃将5%琼脂糖与在正常生长培养基中的细胞混合, 利用等体积的石蜡油使该混合物乳化, 在冰浴中冷却产生直径为80-200μM的球状物。可从油类分离这些球状物并转入组织培养容器中的培养基中。

[0171] 细胞截留是用于固定细胞群的简单方法, 类似于利用微载体或多孔的基质。简单的技术是使细胞陷入纤维素纤维, 例如DEAE、TLC、QAE、TEAE (所有的都获得自Sigma) 中。其他更改进的装置是如Opticel培养系统 (Cellex Biosciences) 中的适合于悬浮细胞的陶瓷柱体。

[0172] 除上述产生细胞单元的方法之外, 本领域的技术人员将设想其他产生细胞群的方法, 包括形成细胞的3D培养物, 例如神经的球状物或胚状体、或利用组织和实际上完整的生物体, 例如果蝇或秀丽线虫。

[0173] 细胞单元或包括细胞单元的基质可能与特定的因子相关, 包括但不限于蛋白质、核酸或其他化学品, 例如药物。可通过许多途径实现基质的预处理, 例如仅仅通过使基质与目标因子孵育, 或通过共价或非共价地使因子附着于基质。可通过浸透使可溶性因子结合到干燥材料中。这个技术依赖于携带可溶性因子的液体快速进入干燥的多孔材料, 其附随地变得溶胀而随时可使用。可在形成含有因子的纤维蛋白凝块时, 通过在凝血酶溶液的纤维蛋白原中混合因子而掺入固体因子。除浸透之外可设计使因子与细胞群缔合的多种其他方法来截留或包封与细胞一起的因子。

[0174] 用于使细胞群与许多不同因子缔合的方法是预先形成因子的混合物, 随后与特定的细胞群缔合。第二个方法是以许多因子连续地处理细胞群。利用细胞群生长基质的干燥剂举例来说, 这个方法包括首先在包含第一因子的溶液中部分地溶胀该基质, 随后进一步地在包含第二因子的溶液中进行相同溶胀, 使两个因子都与基质缔合。通过设计使细胞群与不同因子的不同组合缔合的系统性方法, 可能取样检查任何组合的一组因子对细胞群的影响。

[0175] 不考虑用于处理细胞单元与因子的方法,该因子被包括细胞单元的细胞吸收。稀释渗入生长培养基的因子达到这样的程度以至它们的浓度低于生理学相关的限制并且它们对任何接触的附加细胞群无效。在例如基质外分散的因子成为细胞单元的一部分取决于下列参数,例如材料的特性和大小、平均孔径、以及因子的分子量和浓度。必要时为了校准该过程,可通过物理的分析,例如HPLC分析或标记因子到培养基中的释放、或通过生物测定,例如针对神经营养性因子的脊神经后根神经节长出的生物测定来测量因子的释放。

[0176] 细胞的组合连续培养

[0177] 分开-汇合的细胞培养

[0178] 此外形成细胞单元(特别是显微的细胞单元)可用于取样多重组织培养条件,因为各个细胞单元构成可暴露于各种细胞培养条件的容易处理的单元。为简单起见,在讨论中我们假定细胞群是通过在微载体培养中生长而产生的,并且术语细胞单元、细胞群、集落和珠子可互换地使用。然而,所述的方法同样地适用于任何细胞单元,例如如上所述的细胞单元。用于取样大量细胞培养条件的特别有效的方法被称为组合的细胞培养或分开-汇合的细胞培养(图1和2),在一个实施方案中,包括为了取样多重组合的细胞培养条件连续的重分并组合细胞单元群。在本发明的一个方面,操作方法为将最初的起始培养物分成 X_1 数目等分的细胞单元(或不同的起始培养物),其各自包含分别在不同的培养条件下生长的多个珠子(群体/集落/载体)。细胞培养给定的时间后,通过组合和混合来自不同等分的珠子而汇合细胞单元。这个汇合可再次分开成为 X_2 数目等分,各自在不同的条件下培养一段时间后再汇合。这个分开、培养和汇合细胞单元(或汇合,分开和培养;取决于在何处进入循环)的重复步骤容许系统取样许多不同细胞培养条件的组合。实验的复杂性,或换言之不同待测试细胞培养条件组合的数目等于在每轮中取样的不同条件的数目的产物($X_1 \times X_2 \times \dots \times X_n$)。注意在随后的分开前汇合所有细胞单元的步骤可以是任选的,其中汇合有限数目的细胞单元,这可能具有如图3和4中所说明的相同的效应。因此本发明包含许多系统地取样细胞培养条件的多重组合的相关方法,其中成批地处理细胞单元群。

[0179] 不考虑用这种方法取样多种细胞培养条件的精确方式,该方法都是有效的,因为多重细胞单元可共享单个容器,它们在相同条件下培养,并且可在任一时刻只利用少量的培养容器进行培养(所使用的培养容器的数目等于分开取样的数目)。在许多方面这个方法的原理相似于大型化学文库的分开合成(被称为组合化学),其中取样在化学品结构单元群之间结合的所有可能的组合(参见例如:Combinatorial Chemistry, Oxford University Press (2000), Hicham Fenniri (Editor))。可重复分开-汇合的细胞培养许多轮,并且可在每一轮中取样任意数目的条件。只要细胞单元的数目(或在这个实例中为集落化的珠子)大于或等于所有轮中取样的不同条件的数目,并且假定细胞单元的分开完全随机发生,预计通过实验将取样到至少一个已经按照多种培养条件组合中的一种培养的细胞单元。这个方法可用于取样对于任何细胞类型的生长或分化条件,或由任何细胞类型生产生物分子(例如生产促红细胞生成素或干扰素)的效率。因为该方法是重复的,理论上它适合于测试多级的组织培养方法,例如如上所述与干细胞分化相关的方法。利用这个技术可取样的变化包括细胞类型、细胞群(例如微载体培养、细胞包封、完整的生物体)、生长基质(例如微载体上有纤粘连蛋白)、细胞培养一轮的持续时间、温度、不同的培养基(包括成分的不同浓度)、生长因子、条件培养基、多种细胞类型的共培养(例如饲养细胞)、动物或植物提取物、药物、其

他的合成化学品、用病毒感染(包括转基因的病毒)、加入转基因、加入反义或抗基因分子(例如RNAi、三链螺旋)、感觉输入(就生物体来说)、电、光、或红外刺激等。

[0180] 分开-分开的细胞培养

[0181] 对细胞单元进行分开汇合过程的目的是将这些细胞单元有系统地暴露于预定的条件组合。本领域的技术人员将设想许多不同的方式来达到这些结果。除分开-汇合过程及其变化之外,也值得简要地论述分开-分开过程。分开-分开过程包括至少重分细胞单元群两次,而不插入细胞单元的汇合(图5)。如果将分开-分开过程进行很多轮,产生的分离样品的数目按指数增加。在这种情况下重要的是使用一些自动操作水平,例如利用机器人平台和改进的取样追踪系统。分开-分开步骤的优点是(因为不组合细胞单元)有可能根据细胞培养历史分离多种细胞单元的谱系。因此分开-分开步骤可用于推导是否特定的细胞培养条件决定了任何产生的细胞过程并因此用于推导细胞单元的培养历史(在图6中说明,并且在'细胞单元培养历史的确定'下详细说明)。

[0182] 预定的方法

[0183] 可完全随机地或可按照预定的方法完成细胞单元的分开和/或汇合。细胞单元在何处随机分开和/或汇合,给定细胞单元在何处分离成为任何群体不是能以任何方式预定或预见的。为了产生使至少一个细胞单元暴露于细胞培养条件可能组合的每一种的高可能性,使用大于待测细胞培养条件组合的总数的细胞单元数目是有利的。因此在某些情况下根据预定的方法分开和/或汇合细胞单元是有利的,防止了组合的偶发重复或遗漏的总的效应。可预先选择性地计划细胞单元的预定处理并且记录在电子数据表或计算机程序上,利用自动方法,例如机器人执行分开和/或汇合的操作。可通过任何方式标记细胞单元(参见下文),例如通过RFID、光学标记物或空间编码进行标记。机器人装置能够确定取样的同一性,因此根据预定的方法区分样品,这已经有描述(参见'Combinatorial Chemistry, A practical Approach', Oxford University Press (2000), Ed H. Fenniri)。备选地,标准的实验室流体处理和/或组织培养机器人(例如由Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA; The Automation Partnership, Royston, UK制备)能够空间地编码多重抽样的同一性,并根据既定程序的方法对其进行加入、除去或移位。

[0184] 细胞单元的分析 and/或分离

[0185] 在每轮细胞培养后,或在限定的轮数后,可研究细胞单元以观察可能受到组织培养条件影响而产生的任何细胞过程。下文的实例是例证性的而非意在限制本发明的范围。

[0186] 在每轮细胞培养后,或在限定的轮数后,可分析细胞单元以确定是否存在成员显示增加的细胞增殖。这可通过各种技术实现,例如在显微镜下目测检查细胞单元,或测定细胞的标记产物特征。这可以是内源的标记物,例如特定的DNA序列、或可通过配体或抗体检测的细胞蛋白质。备选地可将外源的标记物,例如绿色荧光蛋白(GFP)导入细胞单元进行测试以提供特定(活)细胞读数。可利用各种活体染色剂显像活的细胞,或相反地利用各种方法,例如利用碘化丙锭标记死细胞。此外可通过各种技术人工和自动化的从未标记的细胞单元分离标记的细胞单元,包括亲合纯化('淘选'),或通过荧光激活细胞分选法(FACS)或广泛相似的技术(图16)。根据应用可使用标准的实验室设备,或可能使用特殊的测试设备是有利的。例如,某些分析和分选仪器(例如参见Union Biometrica Inc., Somerville MA, USA)具有达到1毫米的流通细胞直径,其容许流通分选直径达到500微米的珠子。这些仪器

提供珠子大小和吸光度以及来自标记物例如GFP、YFP或DS-红的2种荧光发射波长的读数。每小时180,000个珠子的分拣速度和分配进入多孔平板或进入批量受体都是可能的。

[0187] 在每轮细胞培养后,或在限定的轮数后,可测试细胞单元以确定是否存在成员显示特定的基因型或表型。可利用公知的技术进行基因型确定,例如聚合酶链式反应(PCR)、荧光原位杂交(FISH)、DNA测序等。可通过各种技术进行表型确定,例如在显微镜下目测检查细胞单元,或检测细胞的标记产物特征。这可以是内源的标记物,例如特定的DNA或RNA序列,或可通过配体、酶底物的转化、或识别特定表型的标记物而检测的细胞蛋白质(例如看见Appendix E of Stem Cells:Scientific Progress and Future Research Directions.Department of Health and Human Services.2001年6月;附录在此引入作为参考)。遗传标记也可以是外源的,即已经例如通过转染或病毒转导而导入细胞群体的遗传标记。外源标记物的实例是荧光蛋白质(例如GFP)或通常不在特定细胞谱系中表达或修饰表位、或来自不同种属的细胞表面抗原。与转录调控元件结合的转基因或外源标记基因可以反映代表内源基因特征的模式的方式表达。这可通过使基因与最小的细胞类型特异的启动子缔合,或将转基因整合到特定的基因座中而实现(例如参见欧洲专利号EP0695351)。可通过各种技术人工和自动化的从未标记的细胞单元分离标记的细胞单元,包括亲合纯化(‘淘选’),或通过荧光激活细胞分拣法(FACS)。Nishikawa等人(1998,Development vol125,p1747-1757)使用由抗体识别的细胞表面标记物追踪全能性鼠ES细胞的分化。利用FACS能够鉴定和纯化处于各种分化阶段的造血系统的细胞。

[0188] 用于富集特定基因型或表型的细胞单元的备选或补充技术是遗传选择所需要的群体。这可例如通过将可选择的标记物导入到细胞单元中并分析在选择性条件下的存活力而实现,例如参见Soria等人(2000,Diabetes vol49,p1-6),其使用这种系统从分化的ES细胞选择分泌胰岛素的细胞。Li等人(1998,Curr Biol vol8,p971-974)通过在鼠ES细胞中经同源重组将双功能的选择标记/报告子 β geo(提供 β -半乳糖苷酶活性和G418抗性)整合到Sox2位点中来鉴定神经祖代。因为神经祖代的一个特征是表达Sox2,因此可在利用视黄酸诱导分化后通过添加G418而非神经元系统选择整合标记基因的这些细胞。可通过在显微镜下观察,或通过监测 β -gal活性来确定细胞成活力。不同于可通过利用合适的配体或抗体的基于表型的选择方式,遗传选择可应用于任何差异表达的基因。

[0189] 确定细胞单元的同源性或细胞培养历史

[0190] 当处理大量细胞单元时,它们的同源性和/或细胞培养历史(例如任何一个群体或单元可能已经接触的一系列培养条件的时序和准确特性)可能变得混乱。例如,细胞培养的分开-汇合方法必定包括在每轮中混合细胞单元,使得难以追随个别单元。确定已经经受多重培养条件的细胞单元混合物中细胞单元的细胞培养历史有时被称为细胞培养历史的‘反演’。进行这个过程的一个方法是标记细胞单元,因此标记细胞单元是有利的。可在实验开始时,或在每轮实验期间进行标记,并且可以包括独特的标记(在实验的过程中可以或未必进行改进)或包括独特聚集物的一系列标记。类似地,在每轮实验期间或仅仅在实验结束时进行标记的读取。优选地,在每轮期间读取独特的标记,例如RFID标记,而在实验结束时读取在每一轮连续加入的标记。

[0191] 可通过各种方式实现细胞单元的标记,例如标记细胞本身,或细胞附着或与之关联的任何物质。任何化学品和用于编码合成的组合文库的非化学方法可能适宜这个目的,

一些在Methods in Enzymology Vol267(1996), 'Combinatorial Chemistry', John N. Abelson (Editor); Combinatorial Chemistry, Oxford University Press (2000), Hicham Fenniri (Editor); K. Braeckmans等人, 'Scanning the code', Modern Drug Discovery (2003年2月); K. Braeckmans等人, 'Encoding microcarriers: Present and Future Technologies'; Nature Reviews Drug Discovery, vol.1, p.447-456 (2002) 中有描述, 其所有的在此引入作为参考。下列是一些标记法的实例。

[0192] 一个标记细胞单元的方法包括使细胞单元与标记物联合, 该标记物在处于不同的培养条件中时序贯发生变化。这可能包括例如向标记物加入或减少进一步的单元以使得其立体化学、序列或质量发生改变; 或读写RF转发器的电子储存发生变化 (参见下文)。

[0193] 另一个标记细胞单元的方法包括每当在不同的条件下培养时连续地使独特的标记物与细胞单元联合, 以使得标记物的后继检测和鉴定提供已经接触细胞单元的细胞培养条件的时序和同一性的明确记录。标记物可能由细胞吸收, 或通过吸附作用、或合适的配体或抗体、或结合细胞-缔合的基质, 例如吸附的载体、胶体力或各种结合, 例如共价键或非共价键, 例如生物素-链霉抗生物素结合而附着于细胞表面。例如, 可导入细胞或附着于与细胞缔合的基质的一个简单标记物是限定长度和/或序列的寡核苷酸。寡核苷酸可包括任何种类的核酸 (例如RNA、DNA、PNA、线性的、环状的或病毒的), 并且可能包含用于扩增的特异序列 (用于PCR的引物序列) 或用于检测的标记 (例如荧光基团或淬灭剂、或同位素标记物)。这些标记的检测可以是直接的, 例如通过对oligos进行测序或使其与互补序列杂交 (例如在阵列或芯片上), 或是间接的, 例如通过监测编码寡核苷酸的基因产物、或核苷酸对细胞活性的干扰 (例如特定基因的反义抑制)。扩增核酸的有利方法是滚动循环扩增 (RCA; 2002, V. Demidov, Expert Rev. Mol. Diagn. 2 (6), p.89-95), 其中核酸标记物可包括RCA模板、延伸引物、或帮助环化小环模板的支持物)。

[0194] 可使用任何分子或大分子的标记物, 只要其能被检测, 包括肽标记物、颜色或荧光化合物、仲胺、卤化碳、稳定同位素的混合物等。标记物可以直接或借助于中间物而附着于细胞单元, 例如针对细胞单元成分产生的抗体, 或借助于相互作用的对, 例如生物素-链霉抗生物素。此外可以通过细胞培养的成分, 例如化学品或其他修饰或通过包封而防止标记物降解。可在许多不同的培养基, 例如在珠子中进行标记物的包封, 许多类型的珠子可从例如Bangs Laboratories Inc. (Fishers IN, USA) 的供应商获得, 并且除提供用于标记物扩增和/或检测 (例如提供为DNA标记所用的PCR引物) 的成分之外, 包封可用于标准化标记物的剂量。标记细胞单元的优选方法是使用荧光珠子, 例如由Luminex Corporation (Austin, TX, USA) 制造的珠子。Luminex系统包括聚苯乙烯珠子, 其可以或未必是外部衍生化的 (例如用抗生物素蛋白或抗体), 其内部用不同比率的2种光谱的不同荧光基团染色, 以及能够表征每个珠子的光谱特征的阅读器。进一步优选的方法是使用例如由Bangs Laboratories Inc. (Fishers IN, USA) 制造的珠子。Bangs系统包括能够根据不同大小而鉴别的珠子种类 (例如4.4 μ M和5.5 μ M直径的珠子种类)。而且每套内的珠子相互之间根据由于差异负载有单个的荧光染料产生不同的荧光强度而可以是不同的。有可能使用许多具有不同吸收作用或发射特性的不同染料, 其可以通过许多方式内部加载或外部附着于载体的。而且可使用'量子点'以获得可方便读取的极高数量的不同荧光。

[0195] 细胞生长基质, 例如所述的与形成细胞单元有关的基质可以是衍生化的或涂有便

于标记并且不妨碍细胞生长的物质。衍生化载体的优选方法是用生物素共价或非共价地加以修饰,使标记物能够借助于链霉抗生物素或抗生物素蛋白进行附着。通常使用本身不会诱导细胞效应(即惰性标记物),而且能够不同于存在于细胞单元或培养基中的分子,能够附着于其靶物并且随后在这种分子的背景中被检测到的标记物是很重要的。为了便于检测,从细胞单元有选择地洗脱标记物或利用选择性的条件从细胞单元脱落细胞可能是有利的。也可预计更复杂的分子标记策略,包括‘双体编码’的策略,其中通过指定到一组分子标记物及其混合物的一组双体密码子来记录信息。

[0196] 标记物的检测可伴随有本领域技术人员已知的各种方法。这些方法包括质谱、核磁共振、测序、杂交、抗原检测、电泳、分光术、显微术、图像分析、荧光检测等。

[0197] 特别感兴趣的是其中只进行一次标记或标记和/或检测是非身体性的而因此是非侵入性的标记或编码策略。射频鉴定(RFID)是显示这些特性的系统的实例。RFID使用转发器(RF标记物)、天线和读取仪。RF标记是小的电子线路,通常包裹在玻璃或塑料中,其中以最简单的形式通过合适的电子设备提供可以‘读取’的独特代码的入口,而不需接触或视线。标记也可储存由使用者产生的信息,也不需要接触或观测线。‘读取仪’是往返于一个或多个标记物转移信息的电子单元(应该注意到术语读取仪可互换地用于指只读和读/写单元)。读取仪的大小和构造可以进行相当大的变化,并且可以分离或连接远程计算机系统的方式进行操作。使用天线来将信息从读取仪传送到标记物,并且接收由RF标记物发送的信息。天线的大小和规格形式将反映特定的应用,可以从小的圆形线圈变化到大的平面构造。RFID系统可以分离或连接远程计算机的方式进行操作,来用于对来源于标记物的同一性和相关数据进行更广泛的译码和操作。用于组合化学的一个RFID策略在Nicolaou等人(1995, *Angew Chem Intl Ed Engl*, vol. 34p. 2289)中有描述,并且包括:(i)包含合成基质和半导体标记物的多孔包裹体;(ii)固相合成树脂;(iii)玻璃-包裹的单个或多个可访问的射频标记半导体单元,其能够接收,储存和发射射频信号。仅仅通过用组织培养微载体或合适的细胞单元替代固相合成树脂的类似装置可适合于生长和追踪细胞单元。可预计这个策略的更多变化,包括但不限于其上直接生长细胞的(涂覆或未涂覆的)RF标记物、或植入到细胞单元或生物体中的射频标记物。

[0198] 这种标记物最初未必通过其化学或分子结构而加以鉴别。可设计非化学标记策略的多重变化以确定混合物中给定细胞单元的同一性或推导包括混合物的不同细胞单元的身份。例如已经描述了标记的光学或目测法,其中以不同形状的物体、编码图形的物体或不同的颜色表示样品的身份(例如参见1998,Guiles等人,*Angew.Chem.Intl Ed Engl*, vol. 37,p926;Luminex Corp,Austin TX,USA;BD Biosciences;Memobead Technologies,Ghent,Belgium),或其中将图案或条码蚀刻到例如陶瓷棒的基质上并且利用图形识别技术进行识别(例如参见1997,Xiao等人,*Angew.Chem.Intl Ed Engl*,vol36,p780;SmartBead Technologies,Babraham,英国)。

[0199] 追踪或标记细胞单元的进一步方法是空间地,即通过其空间位置编码它们的身份。在这个方法中,在限定的相对位置分离不同的细胞单元,这些位置表示或编码单元的身份。例如,可以在阵列中培养细胞单元,借此了解每个单元的身份和/或培养历史并且使其与阵列中特定的位置相关。通过其最简单的形式,这种阵列能够包括组织培养瓶、多孔平板的孔或载玻片或其他表面上定位的采集。可在Geysen等人(1984,*Proc Natl Acad Sci USA*

vol.81,p.3998-4002)、Fodor等人(1991,Science vol.251,p.767-773)、Ziauddin和Sabatini(2001,Nature,Vol.411,p.107-110)、以及Wu等人(2002,Trends Cell Biol.Vol.12(10,p.485-8)中发现定位编码策略的实例。

[0200] 本发明具有具有许多方面,每个可能具有许多形式,可以将其合并形成本发明的许多改变。显而易见的是,为了能够推导关于来自细胞培养方法组合的输出结果的信息而标记所有细胞单元不是必需的。因此不标记细胞单元仍然可以根据本发明分析细胞培养条件的大量组合,并且确定这些组合的一种或多种是否能够产生特定的细胞效应。然而优选细胞单元是标记的。细胞单元的标记容许与所有的细胞单元对照,从考虑到通过标记细胞单元而取样的特定条件结果的实验推导有用的信息。备选地,有时标记全部暴露于某一培养方法的一个或几个细胞单元群体是有利的,例如在特定的分开或汇合步骤期间,已经分离到相同培养基中的细胞单元群。明显的是,标记某些细胞单元容许推断其他细胞单元(或许是未标记的)的身份。

[0201] 类似地,显然进行省略了多种条件的细胞培养试验可以产生关于相对于特定实验性结果的那些条件的应用的信息。因此在某种意义上可能根据本发明通过许多次地重复实验,每次省略不同类的条件来评估每个取样的条件。

[0202] 也可使用分开-分开的细胞培养步骤来确定特定种类的条件对实验性结果的效应。有效的分开-分开步骤导致已经在分支的时候各自暴露于独特细胞培养条件的细胞单元形成特定的谱系。通过研究不同的谱系,有可能相对于特定的实验性结果确定在分支点研究的组织培养条件的用途(图6)。

[0203] 在下文的实施例中进一步描述本发明。

[0204] 实施例

[0205] 实施例1-利用分开-汇合的细胞培养分化ES细胞单元

[0206] 为了分析可能产生多巴胺能表型的神经元的组织培养条件,利用未分化小鼠ES细胞的起始培养物进行分开-汇合的培养试验。

[0207] 在存在 $1,400\text{U ml}^{-1}$ 的白血病抑制因子(LIF;Chemicon)时,在由补充有15%FCS、100mM MEM非必需氨基酸、0.55mM2-巯基乙醇、L-谷氨酰胺、和抗生素(所有的都来自GIBCO/BRL)的敲除(knockout)Dulbecco's基本培养基(DMEM;GIBCO/BRL)组成的ES细胞培养基中,在涂有白明胶的组织培养平板上生长未分化的ES细胞。为了诱导胚状体(EB)形成,通过含有0.05%的胰蛋白酶和0.04%的EDTA的PBS将细胞分离成为单细胞悬液,并且在如上所述的培养基中以 $2-2.5 \times 10^4$ 个细胞 cm^{-2} 的密度接种到非粘附的细菌培养皿上。形成EBs4天,然后在ES细胞培养基中接种到粘附性的组织培养表面上。培养24h后,伴随通过无血清的胰岛素/转铁蛋白/硒/纤连蛋白(ITSFn)培养基替代ES细胞培养基并且培养10天来选择nestin-阳性细胞。

[0208] 使用这些nestin-阳性细胞作为分开-汇合培养试验的起始材料。具体地,通过0.05%胰蛋白酶/0.04%EDTA离解细胞,并且以大约 $1.5-2 \times 10^5$ 个细胞/ cm^{-2} 接种在 $>10,000$ 个玻璃生物球上(Whatman,英国)。此后所使用的组织培养皿由非粘附材料制成。用聚鸟氨酸(15mg ml^{-1})和层粘连蛋白($1\mu\text{g ml}^{-1}$,两者都来自Becton Dickinson Labware, Bedford, MA)预涂层无菌的玻璃珠。将珠子随机地分为4组,每组在4种组织培养基(表示为A1、A2、A3或A4)中的一种中培养,下列表1中给出了这些培养基的组成。这些培养基是根据

Johe等人(1996, Genes Dev, vol10, p3129-3140)基于N2培养基而改进的,并且此后被简称为N2培养基。

[0209] 表1

[0210]	A1	补充有 $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ 层粘连蛋白的N2培养基。
	A2	补充有 $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ 层粘连蛋白、 10 ng ml^{-1} bFGF (R & D Systems, Minneapolis, MN)的N2培养基。
	A3	补充有 $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ 层粘连蛋白、 10 ng ml^{-1} bFGF (R & D Systems, Minneapolis, MN)、SHH的鼠N-末端片段(500 ng ml^{-1} , 来自R & D Systems)的N2培养基。
	A4	补充有 $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ 层粘连蛋白、 10 ng ml^{-1} bFGF (R & D Systems, Minneapolis, MN)、SHH的鼠N-末端片段(500 ng ml^{-1} , 来自R & D Systems)和鼠FGF8同工型b(100 ng ml^{-1} , R & D Systems)的N2培养基。

[0211] 使4组珠子暴露于相应的组织培养基2天,然后汇合来自所有4种培养物的珠子,在N2培养基中简略地洗涤,再次分为4组,每组在培养基A1-A4的一种中培养。2天后,再次重复这个步骤,以在培养基A1-A4的多种组合中经过6天时间采样细胞培养物。此后,汇合来自所有的4种培养物的珠子,在N2培养基中简略地洗涤,并且随机地分为新的4组,每组在4种新的培养基(表示为B1、B2、B3或B4)中的一种中培养,下列表2中给出了这些培养基的组成。

[0212] 表2

[0213]	B1	补充有 $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ 层粘连蛋白、 10 ng ml^{-1} bFGF (R & D Systems, Minneapolis, MN)、SHH的鼠N-末端片段(500 ng ml^{-1} , R&D Systems)和鼠FGF8同工型b(100 ng ml^{-1} , R&D Systems)的N2培养基。
	B2	N3FL培养基: 含有胰岛素($25 \mu\text{g/ml}$)、转铁蛋白($50 \mu\text{g/ml}$)、黄体酮(20nM)、腐胺($100\mu\text{M}$)、氯化砷(30nM)、bFGF(5ng/ml)和层粘连蛋白($1 \mu\text{g/ml}$)的DMEM/F12(1:1)培养基,
	B3	补充有 25mM HEPES (pH 7.4)、层粘连蛋白(1mg ml^{-1})、cAMP($1\mu\text{M}$, Sigma, St. Louis, MO)和抗坏血酸($200 \mu\text{M}$, Sigma, St. Louis, MO)的N2培养基。
	B4	补充有层粘连蛋白(1mg ml^{-1})、cAMP($1\mu\text{M}$, Sigma, St. Louis, MO)和抗坏血酸($200 \mu\text{M}$, Sigma, St. Louis, MO)的N2培养基。

[0214] 每轮培养进行5天,然后汇合来自所有4种培养物的珠子,在N2培养基中简略地洗涤,分为4组,每组再次在培养基B1-B4的一种中培养。这个步骤总共进行3次,以使得珠子在B培养基中总共存在15天。

[0215] 包括在不同培养基组成中是附着于玻璃微载体(或细胞)的少量的独特寡核苷酸标记,并且随后为了推导分开汇合培养方法中任何时候微载体珠子的行踪而进行扩增和分析。每个标记的DNA序列是不同的,以便鉴别不同的培养基(即,培养基A1对培养基A2),和

在2轮不同的分开汇合培养中暴露于相同的培养基(即,在第0天使用的培养基A1对在第4天使用的培养基A1)。下列表3中给出了总共为21天的在多种培养基中的分开汇合培养方法的概要。表格中每一项也显示(在括号中)包括在组织培养瓶中的标记的身份。标记的全部DNA序列显示在表4中。

[0216] 表3

[0217]

第0天	第2天	第4天	第6天	第11天	第16天
A1 (L1)	A1 (L5)	A1 (L9)	B1 (L13)	B1 (L17)	B1 (L21)
A2 (L2)	A1 (L6)	A2 (L10)	B2 (L14)	B2 (L18)	B2 (L22)
A3 (L3)	A3 (L7)	A3 (L11)	B3 (L15)	B3 (L19)	B3 (L23)
A4 (L4)	A4 (L8)	A4 (L12)	B4 (L16)	B4 (L20)	B4 (L24)

[0218] 表4

[0219]

L1	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> aACGTGAAGcCACGTCGCCgCCGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L2	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> gACGTGAAGtCACGTCGCCaCCGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L3	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> cACGTGAAGaCACGTCGCCtCCGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L4	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> tACGTGAAGgCACGTCGCCcCCGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L5	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AaCGTGAAGAcACGTCGCCaGCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L6	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AgCGTGAAGAtACGTCGCCaCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L7	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AcCGTGAAGAcACGTCGCCaCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L8	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AtCGTGAAGAgACGTCGCCaCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L9	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAaGTGAAGAcCGTCGCCAcGCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L10	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAgGTGAAGAcCGTCGCCAcGCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L11	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAcGTGAAGAcCaCGTCGCCAcGCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L12	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAtGTGAAGAcGCGTCGCCAcGCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L13	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AACaTGAAGAcAcGTCGCCAcCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L14	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAcGTGAAGAcAtGTCGCCAcCaCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L15	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAcGTGAAGAcAcGTCGCCAcCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L16	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAcTGAAGAcAgGTCGCCAcCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L17	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAcGaGAAGAcAcCGTCGCCAcCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L18	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAcGgGAAGAcAcCGTCGCCAcCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L19	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAcGcGAAGAcAcCGTCGCCAcCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L20	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAcGtGAAGAcAcCGTCGCCAcCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L21	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAcGTaAAGAcAcCGcCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L22	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAcGTgAAGAcAcCGtCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L23	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAcGTcAAGAcAcCGcCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG
L24	<u>TGCAGGAATTCGCGCTATGCT</u> AAcGTtAAGAcAcCGgCGGCCGCCGACCCGGCCGAATTCCTG

[0220] 通过在不同的A培养基中分开-汇合培养干细胞3次,然后在不同的B培养基中分开-汇合培养3次,就可能取样4096种不同的组织培养方法-这是上述接触不同珠子的缓冲

液的不同组合的总数。

[0221] 最后一轮分开汇合培养后,汇合珠子,在N2培养基中简短地洗涤,并且利用标准方法通过FACS进行分析。简而言之,将细胞在含有4%多聚甲醛/0.15%苦味酸的PBS中固定。为了检测多巴胺能神经元,根据制造商的说明书利用抗-酪氨酸羟化酶的单克隆(Sigma)染色,然后是荧光标记的第二抗体(Jackson Immunoresearch Laboratories,West Grove,PA)染色。

[0222] 将具有最高荧光强度的5种珠子分拣到PCR平板的单独的孔中,利用Taq聚合酶(Stratagene,La Jolla,CA)和下列表5所示的引物通过30个循环的PCR来扩增寡核苷酸标记。

[0223] 表5

[0224]

PRF1	TGCAGGAATTCGCTATGC
PRF2	CAGGAATTCGGCCGGGTCGG

[0225] 通过酚/氯仿提取然后是乙醇沉淀纯化PCR产物,再利用限制性酶EcoRI(New England Biolabs,Beverly,MA)进行消化,并克隆到类似制备的pBluescript II KS+载体中(Stratagene,La Jolla,CA)。将重组载体电穿孔到感受态的大肠杆菌DH5α中,并接种到含有氨苄青霉素抗生素的培养基上。对于每种分析的珠子和制备的质粒DNA挑取200个克隆,并在多接头区域测序。

[0226] 测序分析显示携带具有多巴胺能表型细胞的大多数珠子被oligos标记(L4、L8、L12、L16、L20和L24)。使这些标记与其相应的细胞培养条件相关,表明在培养基A1中经过总共6天(在第0天、第2天和第4天),然后是在培养基B4中进一步经过15天(在第6天、第11天和第16天),这些珠子已经被分隔开来。推断这个培养方法适合于通过处理如上所述的小鼠ES细胞而生产多巴胺能神经元。

[0227] 一旦建立这些条件,根据上述方法(即扩展、EB形成、nestin选择等)再培养未分化的ES细胞,但不经历分开汇合培养的过程。使细胞在粘附性的组织培养平板而不是珠子上生长,不将寡核苷酸标记加入不同的培养基,并且只分析成功的培养条件。如此可产生大量的多巴胺能细胞并且测试基因表达的模式。从获得自培养方法的4个阶段的细胞移出总的RNA:(1)多潜能的ES细胞群体;(2)胚状体;(3)经受nestin选择的离解并接种的细胞;以及(4)在缓冲液A4中培养的nestin阳性细胞。利用逆转录酶,具有随机六聚体的引物和在各种样品之间标准化数量的肌动蛋白转录本来制备cDNA。利用表6中所示的引物来制备神经的cDNAs:

[0228] 表6

基因	正向引物	反向引物	+ve 阶段
Otx2	CCATGACCTATA CTCAGGCTTCAGG	GAAGCTCCATATCC-CTGGGTGGAAAG	1, (2, 3), 4
Pax2	CCAAAGTGGTGGACAAGATTGCC	GGGATAGGAAGGACGCTCAAAGAC	3, 4
Pax5	CAGATGTAGTCCGC-CAAAGGATAG	ATGCCACTGATGGAGTATGAGGAGCC	3, 4
En1	TCAAGACTGACTCACAGCAACCCC	CTTTGTCTGAACCGTGGTGGTAG	4
Wnt1	ACCTGTTGACGGATTCCAAG	TCATGAGGAAGCGTAGGTCC	3, 4
Nurr1	TGAAGAGAGCGGAGAAGGAGATC	TCTGGAGTTAAGAAATCGGAGCTG	3, 4
nestin	GGAGTGTCCCTTAGAGGTGC	TCCAGAAAGCCAAGAGAAGC	(1), 3, 4

[0229]

[0230] 表6也显示通过RT-PCR检测多种基因的转录本的阶段(括号表明痕量的检测)。由此结果推断En1、Pa2、Pax5、Wnt1和Nurr1的表达可能是将会是多巴胺能命运的细胞的合适标记物。相反地,具有这种基因的多潜能干细胞的转染,例如Nurr1,可能导致体外定向多巴胺能表型(Wagner et al,1999,Nature Biotechnology,vol.17,p653-659)。

[0231] 实施例2-HepG2细胞单元的分开-汇合的细胞培养

[0232] 为了分析可能影响特定细胞过程的组织培养条件,即影响细胞色素P450 (CyP450) 新陈代谢酶的表达和/或活性的组织培养条件,进行分开-汇合的培养试验。可借助于酶促水解产生产物9-羟基-异吩噻唑的底物乙氧基9-羟基-3-异吩唑酮,分析这类酶的成员,例如1A1和1A2,其中9-羟基-3-异吩噻唑具有可用于测量CyP450酶活性的独特荧光特性。可通过诱导剂分子,例如 β -萘黄酮和抑制剂,例如 α -萘黄酮、奎尼丁或氨基三唑调节CyP450酶的表达。对于一些分子也可能诱导CyP450基因的表达,但是抑制该基因酶产物的活性。因此,可根据将细胞连续暴露于调节化合物的模式产生表达和活性的复杂模式。

[0233] 使人肝癌细胞系HepG2在补充有L-谷氨酰胺、青霉素+链霉素、和10%加热灭活的胎牛血清的DME培养基中生长在Cytodex3 (Amersham Biosciences) 上。接种一天后,将细胞单元分为5组,并在含有5 μ M的 α -萘黄酮、 β -萘黄酮、奎尼丁、氨基三唑、或二甲亚砜(DMSO;待测化合物的溶剂载体)的培养基中,培养在多孔培养平板的单独的孔中。培养24小时后(37 $^{\circ}$ C,5%CO₂),用PBS洗涤单个孔中的细胞单元,在生长培养基中汇合在一起,并且分为5个群体,使其在第一轮使用的5个不同的培养基中培养。进一步培养24小时后,如前所述以第三轮的分开-汇合培养处理细胞单元。进一步培养24小时后,从最后的5个细胞群和对照群取出珠子样品,其中对照群在分开-汇合实验期间培养在具有DMSO的标准培养基中。

[0234] 对于CyP450分析,移出生长培养基中的珠子等分并且加入终浓度为10 μ M的酶底物乙氧基9-羟基-3-异吩唑酮。将珠子样品置于具有盖玻片的显微镜载玻片,并且立即用使用设置用于得克萨斯红/罗丹明荧光的标准滤光片地落射荧光显微镜进行观察(参见图9)。加入底物大约15-20分钟后对照细胞显示9-羟基-3-异吩唑酮荧光,而缺乏乙氧基9-羟基-3-异吩唑酮时没有检测到荧光。当在对照实验中用 β -萘黄酮处理细胞单元时,在5-10分钟内酶活性是明显的(数据未显示)。从经历分开-汇合培养步骤的群体取出的细胞单元显示各种程度的酶活性(在10分钟内),表明其中遇到各种诱导或抑制能够代谢乙氧基9-羟基-3-异吩唑酮的CyP450酶活性的条件。

[0235] 实施例3-包括多潜能干细胞的细胞单元的生长

[0236] 将表达 τ -GFP融合蛋白质的多潜能的小鼠ES细胞保持在丝裂霉素C-处理的SNL细胞饲养层上(ST0细胞衍生物),其是在由补充有15%FCS、0.55mM2-巯基乙醇、L-谷氨酰胺、抗生素(所有的都来自GIBCO/BRL)、和1,400U ml⁻¹的白血病抑制因子(Chemicon)的Iscove's培养基组成的ES细胞培养基中,并且每隔一天以1:5分开。将用于细胞单元形成的ES细胞和饲养细胞转入涂有白明胶的培养瓶并且在ES培养基中培养一天以减少培养物中饲养细胞的数目。从明胶平板胰蛋白酶消化ES细胞,并且用含有FCS的培养基洗涤,然后用已经在PBS中水化、通过高压锅或70%乙醇处理消毒、然后用ES培养基洗涤的Cytopore2或Cytodex3微载体(Amersham Biosciences)培养。以大约10个细胞/微载体的密度在非粘附的塑料皿中接种ES细胞。在标准条件下维持ES细胞培养,每隔一天用新鲜的ES培养基替代一半的培养基(参见图7)。在这些条件下观察多潜能细胞的生长5天,其后从ES细胞培养基

转移细胞而开始分化。

[0237] 实施例4-通过分开-分开培养分化干细胞单元

[0238] 在ES细胞培养基中培养多潜能的小鼠ES细胞单元5天(参见实施例3),轻轻倒出ES培养基并用PBS洗涤细胞单元两次以除去痕量的ES培养基。将珠子群体分为3组,轻轻倒出PBS并且用(i)ES细胞培养基;(ii)具有10%胎牛血清的Dulbecco's改进的Eagle's培养基(DMEM);或(iii)化学限定的培养基(CDM;Wiles MV,Johansson BM,1999,Exp.Cell Res.,vol247,p.241-8)中的一种替换。在标准条件下培养1个小时后,将3个群体中的每一种分为进一步的3个群体,每个群体在(i)其中培养细胞群的培养基;其中包括1 μ M LiCl的培养细胞群的培养基;或(iii)包括1 μ M视黄酸(RA)的培养细胞群的培养基中的一种中培养。每隔一天用相应的新鲜的培养基替换一半的培养基。

[0239] 实施例5-在细胞单元中使用表型标记物检测包括细胞分化的细胞过程

[0240] 将Cultispher G(Percell Biolytica)微载体接种于表达 τ -GFP融合蛋白质的小鼠ES细胞并且在无血清的培养基(15%Gibco KO血清替代品,具有Glutamax(Gibco)的Iscove's改进的DMEM,补充有青霉素/链霉素和1400U/ml LIF)中生长4周。当pH变为酸性,如培养基中的颜色指示剂所示时,更换培养基。移出等分的珠子并且用PBS洗涤然后在含有4%多聚甲醛的PBS中于4 $^{\circ}$ C固定20分钟。用PBS洗涤珠子若干次,重悬在PBS/2.5%FCS、0.1%TritonX-100中,并且分为2个样品。一个样品用鼠抗-神经胶质纤丝酸性蛋白(GFAP)单克隆抗体变成1:200,而留下另一个作为对照。在4 $^{\circ}$ C培养过夜后,用PBS洗涤样品3次,然后两者都与Cy3-标记的驴抗-小鼠抗体(Jackson ImmunoResearch)在室温下孵育2小时。用PBS洗涤样品3次,然后点样到具有包含DAPI的封固培养基(载体)的显微镜载玻片上。微载体上的大部分细胞显示出对于GFAP的特异染色(参见图8A-H)。

[0241] 在单独的实验中,将包括表达Tau-GFP融合蛋白质的小鼠ES细胞和Cytodex3微载体的细胞单元(参见实施例3),从ES培养基转移到CDM,并且在标准条件下培养4天,其后用PBS洗涤细胞单元一次并容许靠重力沉淀。除去PBS并且将细胞单元于4 $^{\circ}$ C在2%多聚甲醛中固定15分钟,其后除去溶液并用PBS洗涤细胞单元3次。将细胞单元重悬在包含2.5%胎牛血清和0.1%Triton X100(Sigma)的PBS中,并且分为3个分开的微离心试管。将特异于微管蛋白betaIII(Sigma)的小鼠免疫球蛋白以1:200的稀释度加入一个样品,容许抗体染色在室温下进行2小时,偶尔进行重悬浮。然后用大量过量的PBS洗涤所有的3个样品3次。然后使与抗微管蛋白抗体孵育的样品和另一个样品在室温下与1:200稀释度的Cy3-结合的驴抗-小鼠免疫球蛋白(Jackson ImmunoResearch)在PBS/FCS/Triton X100中孵育2小时。然后用过量的PBS洗涤所有的3个样品3次,使细胞单元重悬在包含DAPI(Sigma)的封固培养基中,点样到具有盖玻片的显微镜载玻片上,并通过落射荧光或共聚焦显微术进行观察(参见图8中的图I)。

[0242] 实施例6-检测由于细胞过程产生的差异基因表达

[0243] 用PBS洗涤通过分开-分开培养诱导分化的小鼠ES细胞的细胞单元(参见实施例4),并且使用Rneasy试剂根据制造商的指导(Qiagen)从细胞单元制备RNA。然后使用RNA样品用oligo-dT引物利用逆转录酶根据制造商的指导(Invitrogen)来制备第一链cDNA。为了校准样品的浓度,对于每个cDNA样品制备10-倍的稀释系列物,并与'管家'基因,甘油醛3磷酸脱氢酶的寡核苷酸引物一起经受25、30和35轮的聚合酶链式反应(PCR)。使用在1.5%琼

脂糖凝胶上分离的最终产物的溴化乙啶染色来评估每个样品中cDNA的相对量。然后在具有Oct4 (预测存在未分化的ES细胞); Nestin (预测存在分化的神经元子代); 或HNF3B (预测存在分化的内胚层子代)的DNA引物的PCR反应中使用等量的来自每个样品的cDNA。引物序列如下:

[0244]	HNF3b Nestin Oct4 G3PDH	ggacaagggaaatgagagg; ataacacctcactccactacc agtcagagcaagtgaatgg; agaaacaagatctcagcagg cgcgttctctttggaaaggtgttc; ctgaaccacatccttctct accacagtccatgccaacac; tccaccaccctgttgctgta
--------	--	--

[0245] 这些鉴别标记物的相对量根据细胞单元所接触的培养条件而不同。例如,ES培养基中的RA诱导内胚层标记HNF3B的表达;而具有RA以及较少程度LiCl的DMEM导致神经元前体标记物Nestin的表达。尽管LiCl抑制减少,在DMEM中Oct4特别明显地降低了(参见图11)。

[0246] 实施例7-利用RFID标记细胞单元

[0247] 用1N的盐酸处理包裹玻璃的ID100-A转发器(Trovan)2小时,用去离子化的水充分洗涤,然后在玻璃容器中与氨丙基三乙氧硅烷(Sigma)孵育2小时。轻轻倒出硅烷试剂,用水、70%乙醇、无菌去离子水、磷酸盐缓冲盐水连续地洗涤标记物。将标记物分别地放置到非粘附的细菌塑料多孔平板的孔中(Sterilin)。通过胰蛋白酶处理,将维持在涂有白明胶平板上的在具有LIF(Chemicon)的ES细胞培养基中的表达Tau-GFP融合转基因的ES细胞多潜能品系离解成单个细胞悬液。用ES细胞培养基洗涤细胞一次,以 10^6 个细胞/mL重悬在ES培养基中,并将250 μ L的悬浮物点样到每个标记物上。在标准培养条件(37 $^{\circ}$ C,5%CO₂)下培养1小时后,加入1.5ml另外的ES培养基并且将平板返回到恒温箱中。

[0248] 将转发器也与人肝癌细胞系HepG2和小鼠STO细胞衍生物-SNL一起接种。如对于ES细胞所描述的进行预处理和接种过程,但是细胞维持在具有10%FCS的DMEM中。

[0249] 用解剖显微镜观察到贴壁的培养物,利用落射荧光观察荧光标记的细胞(参见图10)。多种细胞类型在转发器上粘附,显示正常的扩展形态学,并且增殖。可维持标记的细胞单元数周而细胞单元或标记没有明显的破坏。可用Trovan袖珍读取仪记录细胞单元的独特身份,而不干扰细胞培养条件或细胞单元的维持。

[0250] 实施例8-通过荧光、分子、或光学标记物标记细胞单元

[0251] Cytodex3微载体(Amersham Biosciences)由具有变性胶原(白明胶)表层的葡聚糖组成。使Cytodex3珠子(在PBS中水合后50 μ l的体积)在室温下与在总体积为200 μ l的具有2.5%胎牛血清的PBS中以1:50稀释的结合生物素的抗-胶原抗体(Abcam,Cambridge,英国)孵育90分钟。然后通过大量过量的PBS中重悬浮再靠重力沉淀洗涤珠子3次。以同样的方式处理对照样品,但是不加入抗-胶原的抗体。将对照和处理的样品各自一分为二,每种样品的一个样品在室温下与250 μ l体积的PBS/FCS中的浓度为2.5 μ g/ml的链霉抗生物素-FITC结合物孵育30分钟。在相同的条件下孵育剩下的2个样品,但是不加入链霉抗生物素-FITC。用生物素酰化的抗-胶原抗体预处理珠子,然后通过链霉抗生物素-FITC结合物显示较高水平的荧光(参见图12)。用生物素酰化的抗体涂覆微载体珠子是提供可随后结合易检测的链霉抗生物素结合物的生物素部分的方式。因为链霉抗生物素可结合极大量的分子和大分子实体,因此可能衍生化微载体珠子以使得其能够以高亲合力结合大范围的标记物。

[0252] 在单独的实验中,用提供便利标记物的乳状珠子标记Cultispher G (Percell Biolytica) 微载体。在PBS中水合化微载体,用70%乙醇消毒,用PBS洗涤,然后共价地附着于生物素部分。利用溶于400 μ l二甲基甲酰胺的10mg生物素酰氨己酰-6-酰氨己酸N-羟琥珀酰亚胺酯(Sigma),将其加入在PBS中的1ml沉淀体积的微载体进行生物素酰化。容许反应在室温下进行过夜,用过量的PBS洗涤微载体3次。将等分的处理的珠子和未修饰的对照样品与 1×10^5 1 μ M直径、涂有链霉抗生物素的红色荧光珠子(Sigma),或与2.5 μ g/ml的链霉抗生物素-FITC(Sigma)在具有2.5%胎牛血清的PBS中孵育。利用荧光显微术比较用珠子标记物(图12E-H)或FITC(图17A-D)标记的水平。

[0253] 在进一步的实验中,用红色或绿色荧光的1 μ M直径、涂有链霉抗生物素的珠子(Sigma)标记Cytodex3微载体。将Cytodex3微载体(Amersham Biosciences)与红色、绿色、或1:1混合的红色和绿色乳状珠子的悬浮物在具有2.5%FCS的PBS中在室温下孵育30分钟。通过在过量的PBS中重悬浮再靠重力沉淀而洗涤样品3次。然后将通过红色标记物标记的珠子等分与来自包含通过绿色标记物标记的珠子的样品的相同体积等分混合,以确定是否发生交叉标记。然后在落射荧光显微镜下利用设置为检测FITC和得克萨斯红/罗丹明的标准滤光片观察样品(参见图13和14)。利用乳状珠子标记物稠密地标记微载体,产生不同标记的群体。2个群体的混合没有产生微载体之间标记的显著转移,意味着该群体保持可区别的状态。与2个标记物组合孵育的微载体被两者稳定标记表明能够用多个标记物标记单个微载体。因为例如用于这个实验的标记物能够结合极大量的报告子(例如不同的荧光基团、染料、酶),就有可能使用这些标记物标记具有大范围的可鉴别标记物的微载体。另外,有可能使抗体偶联至乳状的珠子标记物以将它们指引至微载体或细胞单元。

[0254] 实施例9-通过荧光、分子、或光学标记物标记细胞单元

[0255] 将Cytodex3微载体(Amersham)与表达 τ -GFP转基因的ES细胞一起接种(参见图12a)。一天后,用PBS洗涤微载体,在室温下与共价连接链霉抗生物素(Sigma)的红色、1 μ M直径的乳状珠子悬浮体孵育30分钟;在标准条件下立即分析或培养24小时后进行分析。分析包括在大量过量的PBS中通过重悬浮再靠重力沉淀而洗涤3次,在落射荧光下利用检测FITC和得克萨斯红/罗丹明的标准滤光片组观察样品。在所有情况下包括ES细胞(绿色),和已经通过与乳状珠子标记物(红色)胶体化相互作用而标记的细胞单元是明显的。

[0256] 因为由乳状液和其他聚合物组成的珠子能够结合极大量的分子和超分子报告子,因此就可能用大范围的可鉴别标记物标记细胞单元。

[0257] 实施例10-根据细胞过程人工分析和分离细胞单元。

[0258] 将包括表达 τ -GFP融合蛋白质和Cytodex3微载体的小鼠ES细胞的细胞单元与裸露的cytodex3微载体以1:100的比率混合。在显微镜下利用相位和荧光装置观察混合物。当使用荧光显微术,甚至在大量过量的非荧光载体中时表达GFP的细胞单元是显而易见的(参见图15)。能够利用定位的固定吸管人工分拣单独的细胞单元以吸出包含细胞单元的小体积培养物。

[0259] 实施例11-标记微载体和细胞单元的自动分析和分拣。

[0260] 能够以自动化的或高通量的方式分析和分拣用多种标记物标记、或显示特定细胞过程的细胞单元是所期望的。使用能够分拣多细胞生物体和直径达到0.5mm的珠子的COPAS选择仪器(Union Biometrical Inc., Somerville, MA)来分析细胞单元、微载体和标记的微载

体。根据Cytodex3的大小和光学特性(飞行时间,TOF;消光度,Ext)通过仪器分析Cytodex3(Amersham Bioosciences),其在大小中显示出轻微的变化但是在所使用的背景下没有显著的自发荧光(参见图16A/B)。用红色链霉抗生物素-结合的乳状珠子(Sigma)标记的Cytodex3微载体(参见实施例9)产生红色荧光的可检测偏移(图16C/D)。

[0261] 将包括用表达TauGFP转基因的ES细胞接种的Cytodex3微载体的细胞单元用于实验以根据细胞数目分拣细胞单元。使包括支持多种细胞密度的细胞单元的细胞单元群体通过仪器而不加以固定,表明宽范围的绿色荧光强度(图16E/F)。使用仪器来从低荧光的细胞单元分拣高荧光的细胞单元。随后利用落射荧光显微术分析样品,显示根据高荧光分拣的细胞单元携带大量的活细胞,而低荧光的细胞单元稀少地增殖。因此可根据多重参数,包括细胞数目、表型、和用可鉴别的标记物标记来进行细胞单元的自动分析、鉴别和分离。

[0262] 实施例12-鉴别来自单个细胞单元的标记物

[0263] 使Cultispher G(Percell Biolytica)微载体交联到生物素部分(参见实施例8),并且利用荧光显微术比较链霉抗生物素-FITC染色的水平来证实生物素酰化(图17A-D)。

[0264] 通过在ES细胞生长培养基中孵育250 μ l体积的生物素酰化的Cultispher G微载体的 10^6 个TGFP ES细胞的单细胞悬液24小时来形成细胞单元。用涂覆链霉抗生物素的1 μ M红色荧光乳状珠子(Sigma),通过与大约 5×10^5 个标记物在室温下培养15分钟来标记细胞单元的50 μ l样品。通过在大量过量PBS中的几轮重悬浮和沉淀洗涤细胞单元使其不含过量的乳状珠子。使用落射荧光显微术来确证细胞单元被乳状珠子标记物标记(图17E-G)。

[0265] 使细胞单元置于固定在解剖显微镜下的培养皿中,利用吸管分离单个单元并置入5ml的FACS试管中(Becton Dickinson Falcon)。向每个试管加入200 μ l等分的多粘芽胞杆菌(*Bacillus polymyxa*)中性蛋白酶的1 \times 溶液(DispaseII,Roche),在室温下消化该微载体基质过夜。使消化物经过已经校准的细胞荧光计(Becton Dickinson FACScalibur)以在1 μ M大小的范围和远红外的(FL3)发射光谱中检测事件(图17H,I)。通过检测符合适当大小和荧光标准的事件可确认分离自单个细胞单元的标记物的身份(图17J,K)。

[0266] 实施例13-鉴别用于标记细胞单元的多个标记物

[0267] 准确大小的多种乳状珠子的有效性和荧光特性提供了微载体的多重标记。通过在包含大小、荧光发射光谱和荧光强度不同的3类涂有链霉抗生物素的不同珠子标记物的培养基中连续培养来标记生物素酰化的Cultispher G微载体(参见实施例12)。用作标记物的珠子类型是:1)由Sigma制造的1 μ M绿色-荧光乳状珠子;2)由Bangs Laboratories制造的5.5 μ M红色-荧光乳状珠子(QuantumPlex)系列的珠子组1号;以及3)由Bangs Laboratories制造的4.4 μ M红色-荧光乳状珠子系列的珠子组5号。

[0268] 然后对标记的微载体进行蛋白水解消化,以及如前所述对释放的标记物进行FACS分析(参见实施例12)。用标记物的样品校准细胞荧光计(Becton Dickinson FACScalibur)以设置大小控制(图18A),并且通过分析适当的(绿色或红色)荧光通路中的事件检测3种不同标记物的荧光信号(图18B-D)。

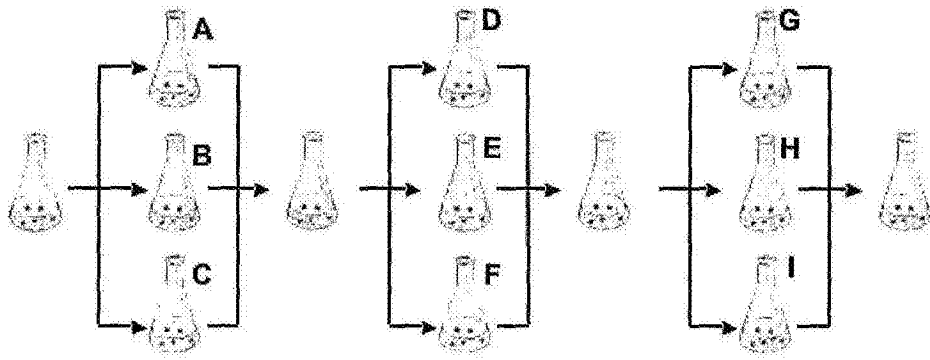


图1

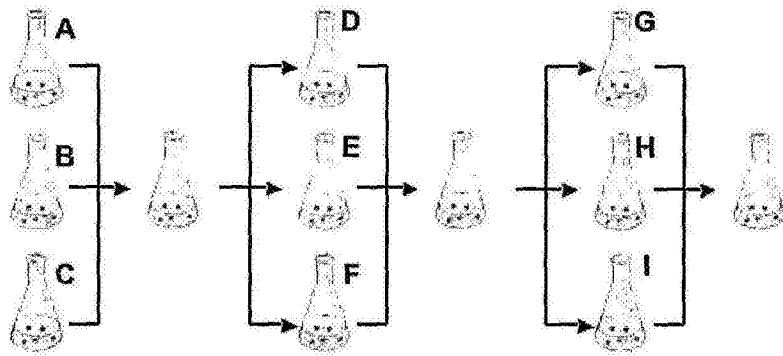


图2

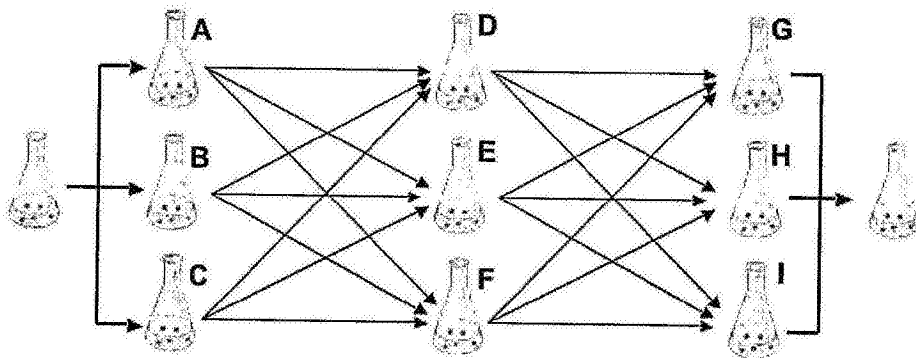


图3

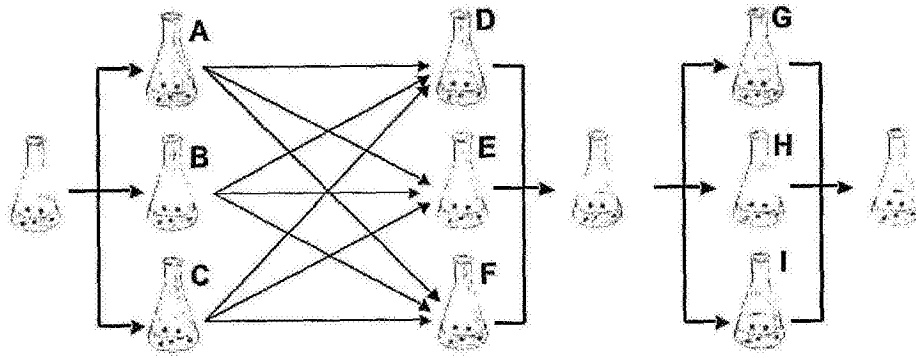


图4

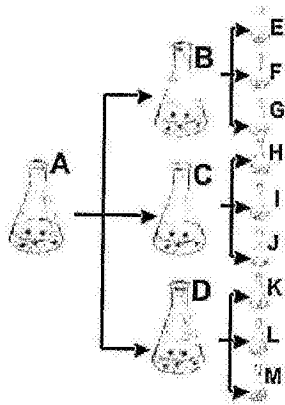


图5

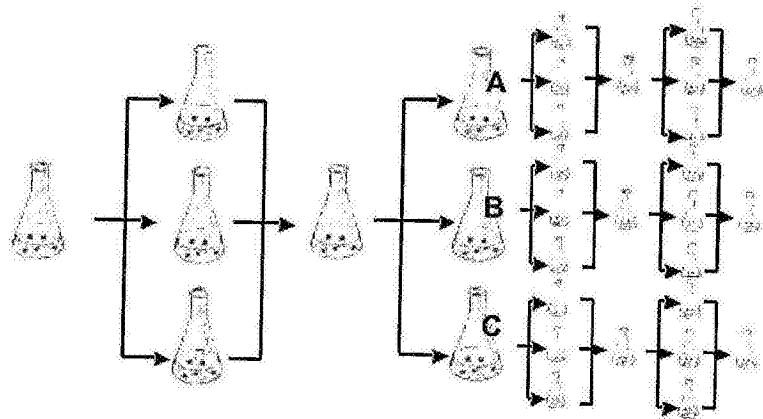


图6

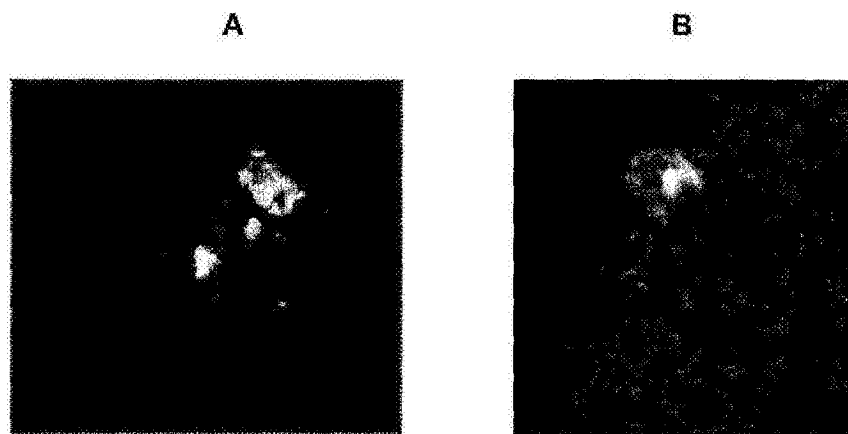


图7

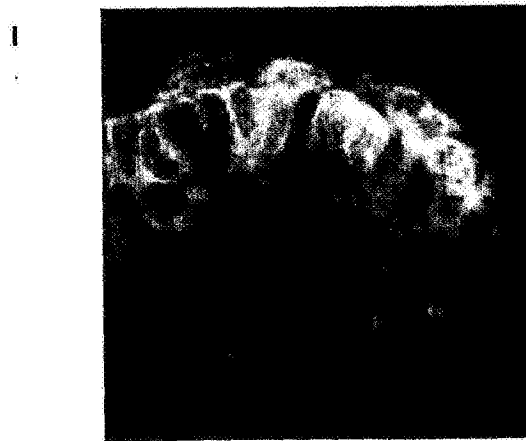
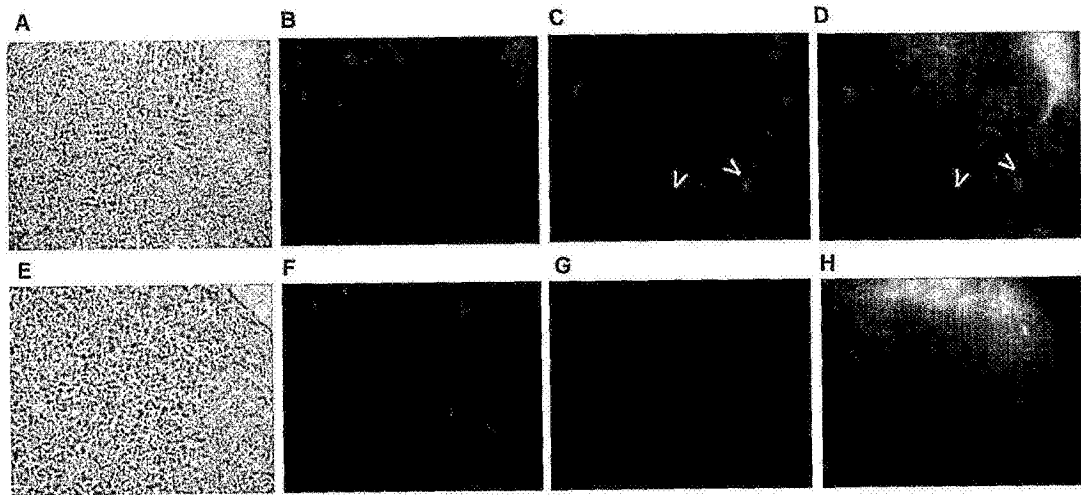


图8

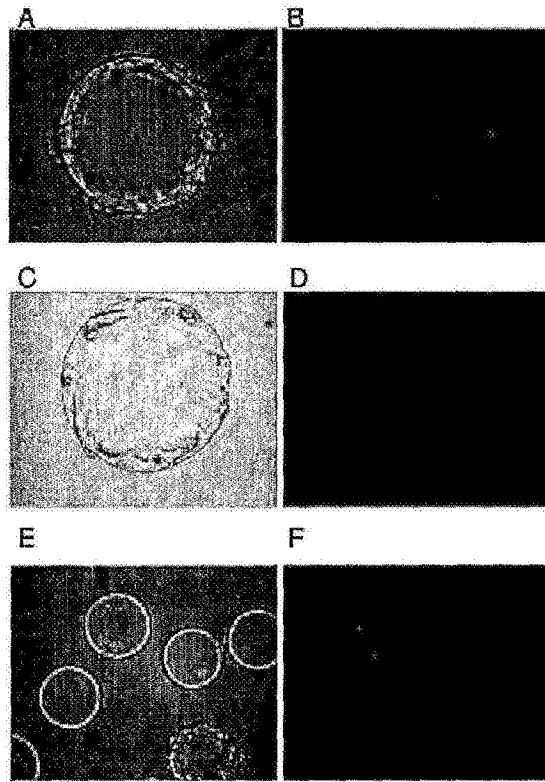


图9

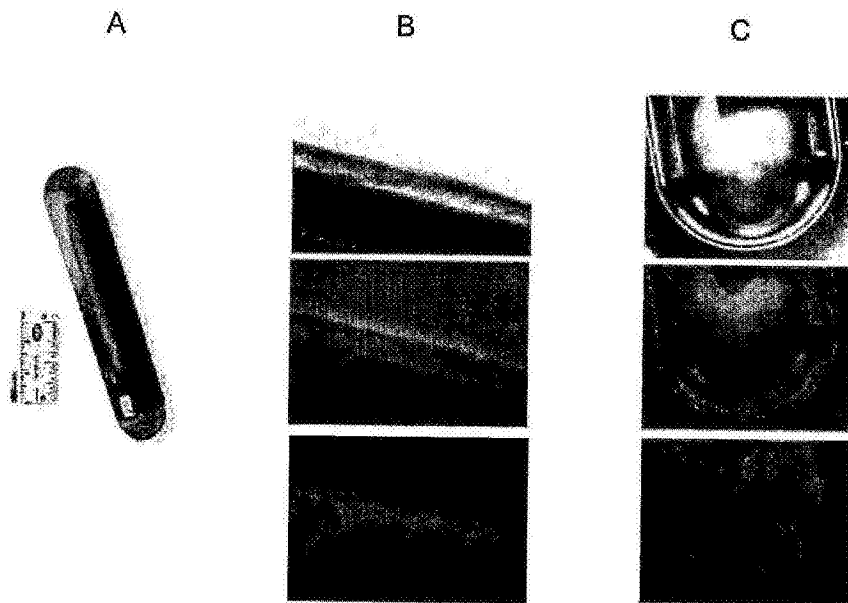


图10

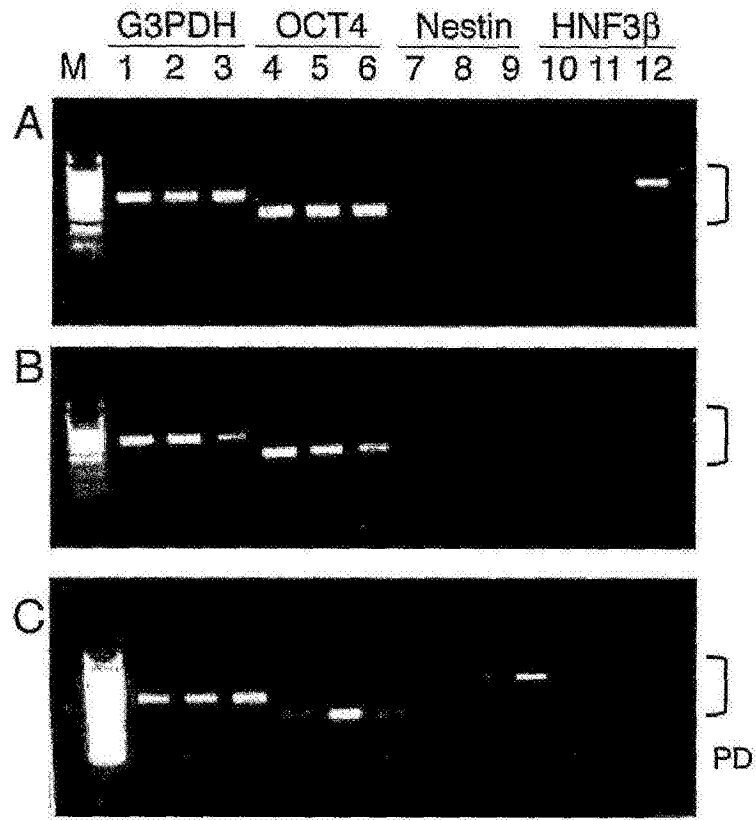


图11

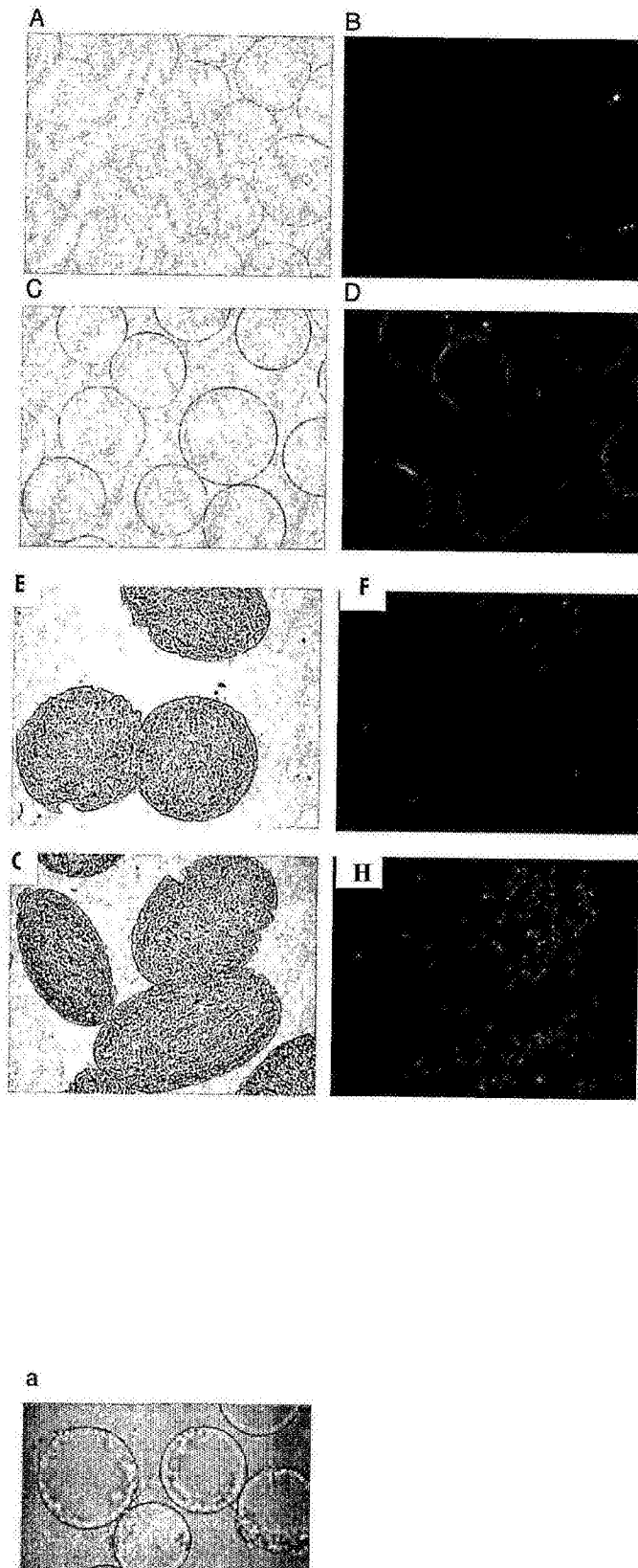


图12

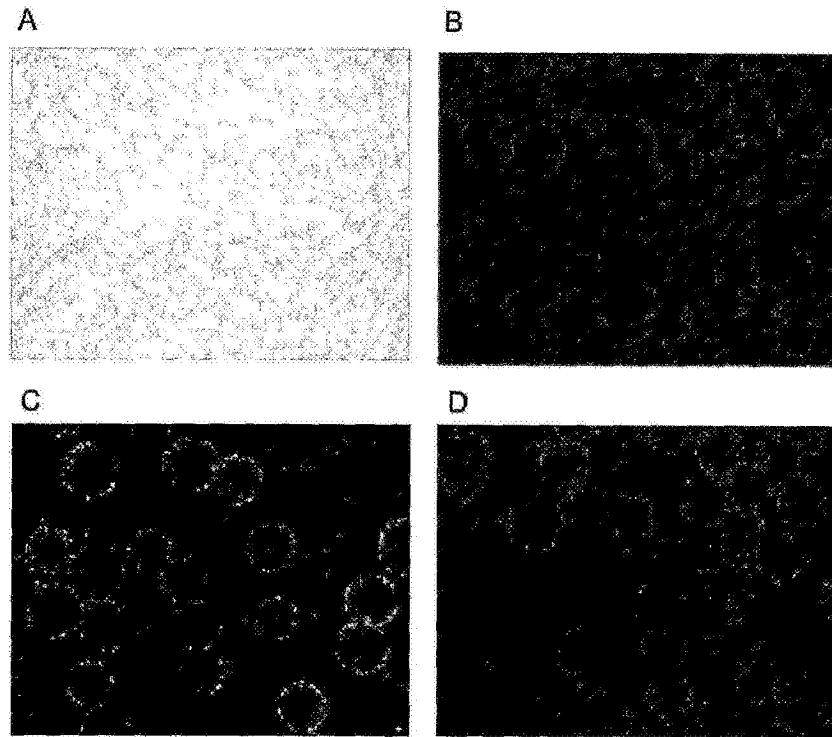


图13

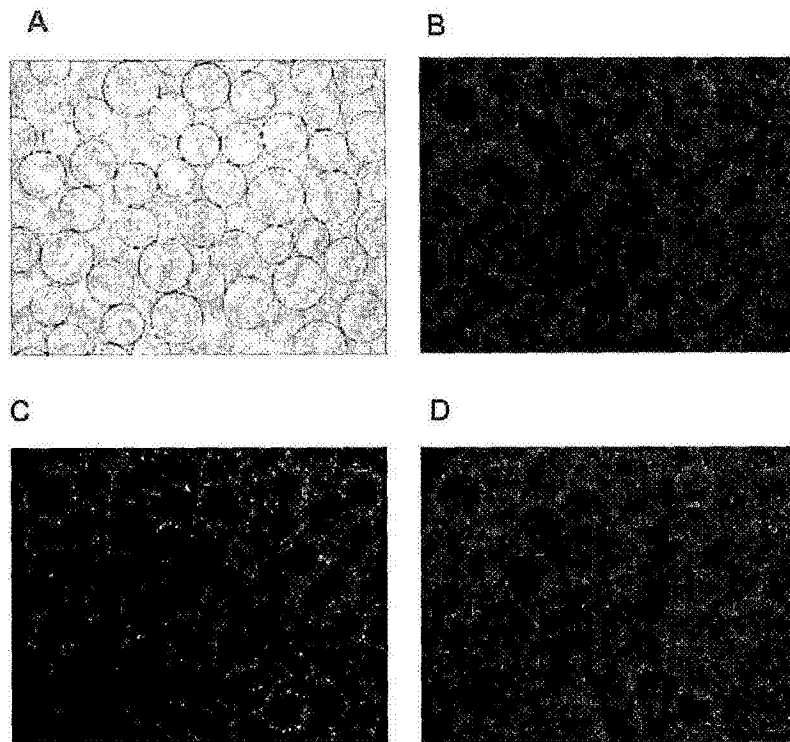


图14

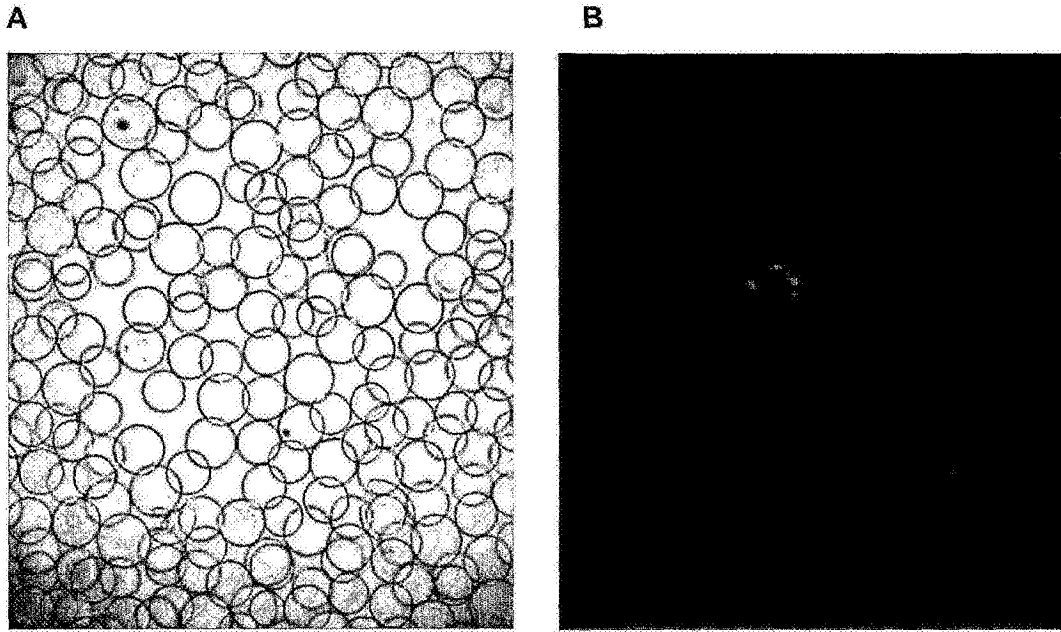


图15

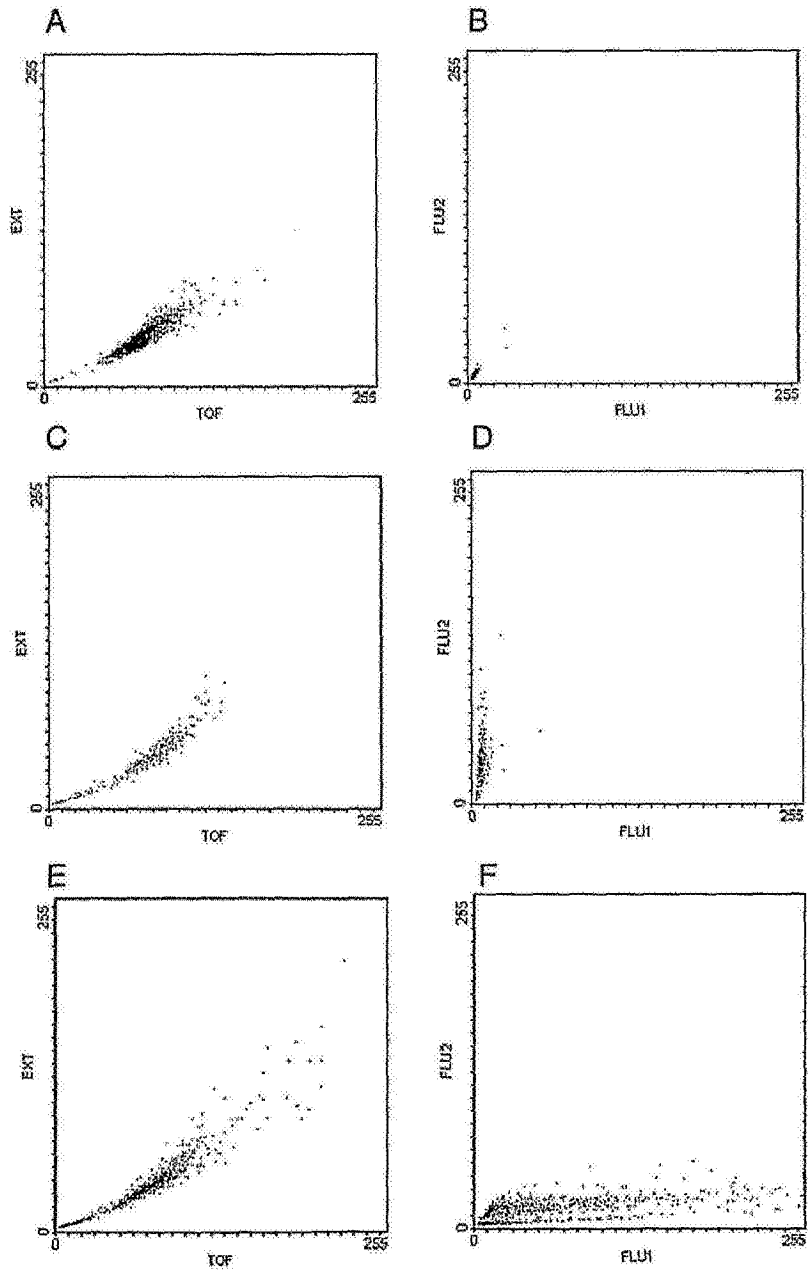


图16

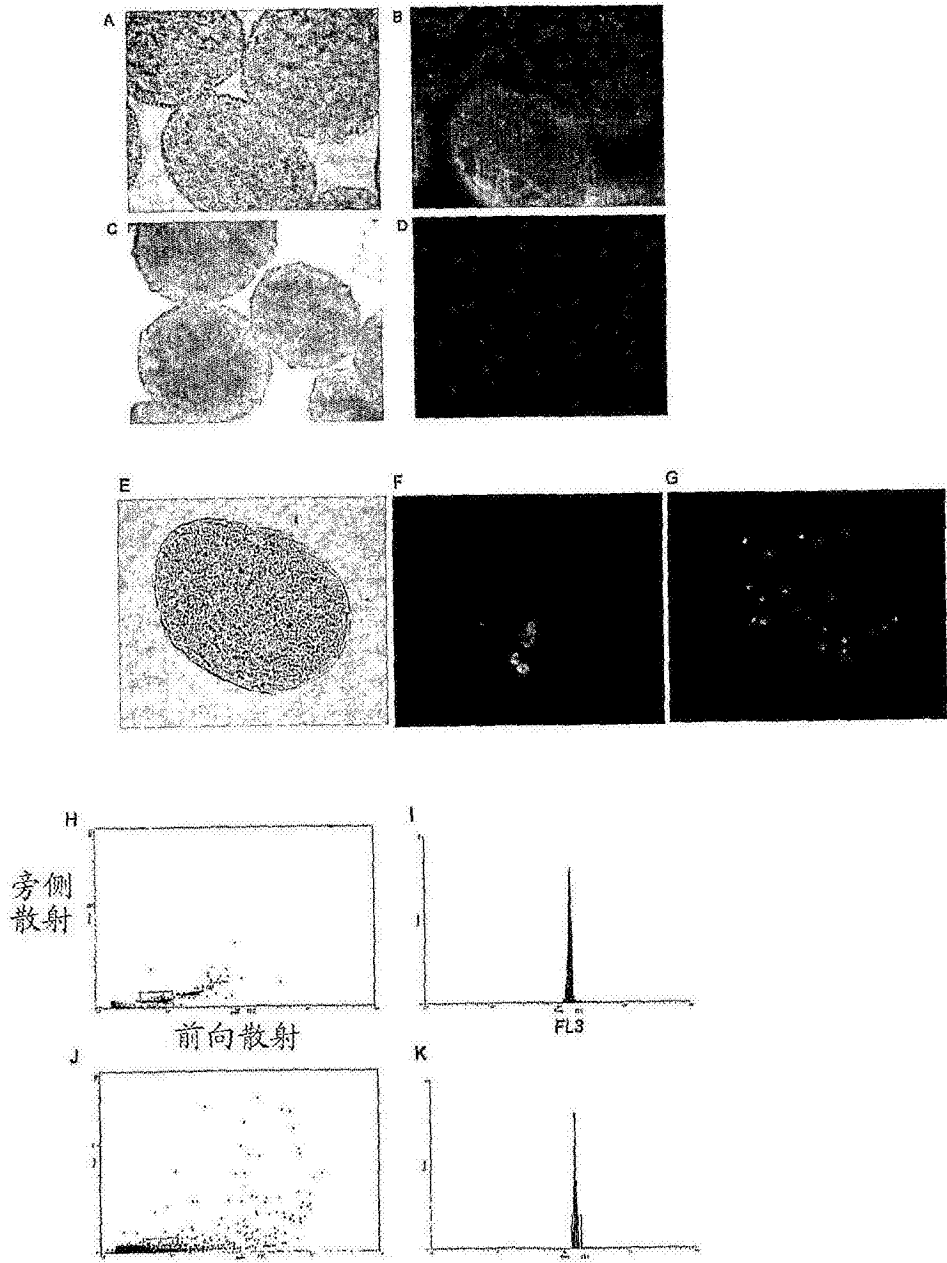


图17

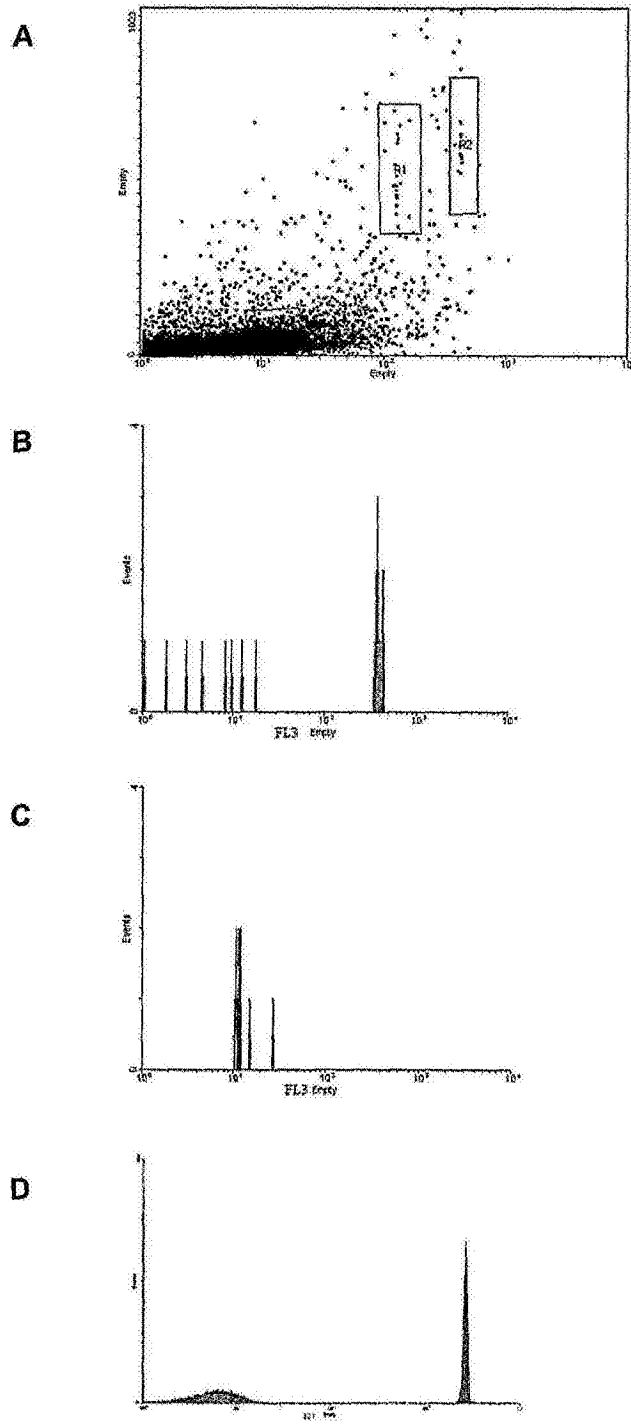


图18