

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580006643.6

[51] Int. Cl.

C12N 13/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/551 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 3 月 12 日

[11] 公开号 CN 101142314A

[22] 申请日 2005.3.3

[21] 申请号 200580006643.6

[30] 优先权

[32] 2004.3.3 [33] US [31] 60/549,610

[86] 国际申请 PCT/US2005/007058 2005.3.3

[87] 国际公布 WO2005/084374 英 2005.9.15

[85] 进入国家阶段日期 2006.9.1

[71] 申请人 综合医院公司

地址 美国马萨诸塞州

共同申请人 生活微系统公司

[72] 发明人 M·D·科斯曼 R·卡普尔

B·L·卡瓦尔霍 T·巴伯

U·J·巴利斯 M·托纳 黄乐天

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 权陆军 黄可峻

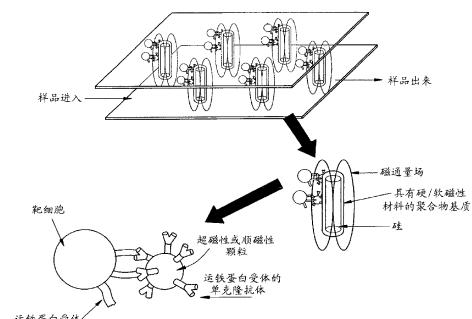
权利要求书 4 页 说明书 12 页 附图 4 页

[54] 发明名称

用于微流体环境中的细胞和生物分子分离的
磁力装置

[57] 摘要

本发明表征了新的和有用的磁力装置以及将其用于细胞、蛋白、DNA 和其他分子的分离、富集和纯化的方法。所述装置总的来说包含磁性颗粒可结合的磁性区域或障碍物。然后可使用磁性颗粒表面上的化学基团即捕获部分来结合颗粒，例如，来自复杂样品的目标细胞或分子，然后选择性地释放被结合的种类以进行下游收集或进一步分析。



1. 用于保留样品中一种或多种想要的分析物的装置，所述装置包含置于通道中的磁性障碍物的第一区域和通过磁力相互作用附着至所述障碍物中的至少一个上的许多磁性颗粒。
2. 权利要求 1 的装置，其中所述通道是微流体通道。
3. 权利要求 1 的装置，其中所述磁性颗粒包含能够结合所述一种或多种分析物的捕获部分。
4. 权利要求 3 的装置，其中所述捕获部分特异性地结合第一类型的分析物。
5. 权利要求 4 的装置，其中所述捕获部分包含全运铁蛋白或抗 CD71、抗 CD36、抗 GPA 或抗 CD45 抗体或其组合。
6. 权利要求 1 的装置，其还包含磁性障碍物的第二区域，其中许多磁性颗粒通过磁力相互作用附着至所述第二区域中的所述障碍物中的至少一个上。
7. 权利要求 6 的装置，其中所述第一区域中的所述障碍物散置在所述第二区域中的所述障碍物之中。
8. 权利要求 6 的装置，其中所述第一区域中的所述障碍物特异性地结合第一类型的分析物，且所述第二区域中的所述障碍物特异性地结合第二类型的分析物。
9. 权利要求 1 的装置，其中至少部分所述磁性障碍物包含永久性磁体。
10. 权利要求 1 的装置，其中至少部分所述磁性障碍物包含非永久性磁体。
11. 权利要求 1 的装置，其还包含能够在所述磁性障碍物中产生磁场的磁力发生器。
12. 权利要求 11 的装置，其中所述磁力发生器能够独立地将磁场应用于一个或多个障碍物。
13. 权利要求 1 的装置，其中所述障碍物以二维阵列方式安排。
14. 权利要求 1 的装置，其中如此放置所述障碍物，从而使所述一种或多种分析物能够在所述障碍物之间通过。
15. 权利要求 1 的装置，其中如此放置所述障碍物，从而使至少部分所述一种或多种分析物不能在所述障碍物之间通过。

16. 权利要求 1 的装置，其中所述一种或多种分析物包含细胞。

17. 权利要求 1 的装置，其中所述一种或多种分析物包含分子。

18. 用于保留样品中一种或多种想要的分析物的装置，所述装置包含这样的通道，其包含许多磁性障碍物，其中所述障碍物包含许多磁性颗粒，且所述磁性颗粒包含能够结合所述一种或多种分析物的捕获部分。

19. 用于保留样品中一种或多种想要的分析物的装置，所述装置包含这样的通道，其包含许多磁性障碍物，其中所述障碍物包含许多磁性颗粒，且其中如此放置所述磁性障碍物，从而使至少部分所述一种或多种分析物不能在所述障碍物之间通过。

20. 权利要求 18 或 19 的装置，其中所述通道还包含许多磁性位置的区域，且所述磁性障碍物通过磁力相互作用附着至所述位置。

21. 权利要求 18 或 19 的装置，其中所述一种或多种分析物包含细胞。

22. 保留样品中第一类型分析物的方法，所述方法包括步骤：

(a) 提供包含至少第一和第二类型的分析物的样品和装置，所述装置包括：

(i) 置于通道中的磁性障碍物的第一区域；和

(ii) 通过磁力相互作用附着至所述障碍物中的至少一个上的许多磁性颗粒；和

(b) 将所述样品导入所述装置中，其中通过和所述障碍物中的至少一个相互作用将所述第一类型的分析物保留在所述装置中。

23. 保留样品中第一类型的分析物的方法，所述方法包括步骤：

(a) 提供包含至少第一和第二类型的分析物的样品和包含置于通道中的磁性障碍物的第一区域的装置，其中所述障碍物包含许多磁性颗粒；和

(b) 将所述样品导入所述装置中，其中通过和所述障碍物中的至少一个相互作用将所述第一类型的分析物保留在所述装置中。

24. 权利要求 22 或 23 的方法，其中用能够结合所述第一类型的分析物的捕获部分包被所述磁性颗粒。

25. 权利要求 22 或 23 的方法，其中如此放置所述磁性障碍物，从而使至少部分所述第一类型的分析物不能在所述障碍物之间通

过。

26. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述第一类型的分析物是颗粒。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述颗粒是细胞。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述细胞是细菌细胞、胎儿细胞或血细胞。

29. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述颗粒是细胞器。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述细胞器是细胞核。

31. 权利要求 22 的方法，其中所述颗粒是病毒。

32. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述第一类型的分析物是分子。

33. 权利要求 32 的方法，其中所述分子是核酸、蛋白或超分子复合物。

34. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述样品中的至少 60% 的所述第一类型的分析物被保留。

35. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述样品中的至少 70% 的所述第二类型的分析物不被保留。

36. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述捕获部分包含全运铁蛋白或抗 CD71、抗 CD36、抗 GPA 或抗 CD45 抗体或其组合。

37. 权利要求 24 的方法，其中所述捕获部分包含抗体、蛋白、肽或核酸。

38. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述装置还包含磁性障碍物的第二区域，所述磁性障碍物具有通过磁力相互作用附着至其上的磁性颗粒，且其中用选择性地结合第三类型的分析物的捕获部分包被附着至所述第二区域内的所述障碍物上的所述磁性颗粒。

39. 权利要求 38 的方法，其中所述第一区域内的所述障碍物散置在所述第二区域中的所述障碍物之中。

40. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述磁性障碍物包含永久性磁体。

41. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述磁性障碍物包含非永久性磁体。

42. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述装置还包含能够在所述

磁性障碍物中产生磁场的磁力发生器。

43. 权利要求 42 的方法，其中所述磁场发生器能够独立地将磁场应用于一个或多个障碍物。

44. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述障碍物以二维阵列的方式安排。

45. 权利要求 22 或 23 的方法，其还包括将标记部分和保留在所述装置中的所述第一类型的分析物接触。

46. 权利要求 22 或 23 的方法，其还包括打断磁力相互作用，从而将所述第一类型的分析物从所述障碍物上释放出来。

47. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述通道是微流体通道。

48. 权利要求 24 的方法，其中将所述第一类型的分析物特异性地结合至所述捕获部分。

49. 权利要求 24 的方法，其中将候选药物化合物附着至所述磁性颗粒。

50. 权利要求 49 的方法，其中所述第一类型的分析物是细胞，且所述方法还包括确定所述候选药物化合物对结合至所述捕获部分的所述第一类型的细胞的作用。

51. 权利要求 24 的方法，其中所述捕获部分包含细胞表面受体。

52. 权利要求 51 的方法，其中所述样品包含所述细胞表面受体的候选配体。

53. 权利要求 24 的方法，其中所述装置还包含第二类通过磁力相互作用附着至所述障碍物中的至少一个的许多磁性颗粒，其中用能够结合所述第一类型的分析物的第二捕获部分包被所述磁性颗粒。

54. 权利要求 53 的方法，其中将步骤(a)(ii)中的所述许多颗粒和所述第二类的许多颗粒置于相同的障碍物上。

用于微流体环境中的细胞和生物分子分离的磁力装置

发明背景

本发明涉及微流体以及颗粒和分子的分选领域。

存在几种经设计用于从复杂混合物例如血液中分离同种细胞群体的方法。这些细胞分离技术可分为两大类：（1）侵入性方法，所述方法基于经固定的和使用各种细胞特异性标记染色的细胞的选择；和（2）非侵入性方法，通过使用对目标细胞群具有特异性的生物物理参数，所述方法用于分离活细胞。

侵入性技术包括荧光激活细胞分分类术（FACS）、磁力激活细胞分分类术（MACS）和免疫磁性胶体分分类术。FACS 通常是阳性选择技术，该技术使用经荧光标记的标记物来结合表达特定的细胞表面标记的细胞。FACS 也可用于针对细胞内标记透化细胞并对细胞进行染色，这可构成分分类术的基础。在实验室医学中，该技术是快速的，通常以 1,000 至 1,500Hz 的速率进行，和被良好地确立的。因为在高速度下在极短的停留时间期间获得较低数目的光子，所以高假阳性率和 FACS 关联。复杂的多参数分类方法也可用于增强 FACS 的特异性，但因为与基于多分析物的 FACS 关联的高成本，基于多分析物的 FACS 可能在常规临床检测中不实用。因为 FACS 需要相当高的操作员的专门技术，FACS 非常耗费劳力，由于多重的操作导致细胞的损失，再加上设备的成本非常高，所以 FACS 的临床应用受到进一步的限制。

将 MACS 用作细胞分离技术，其中将表达特定的表面标记的细胞用抗该表面标记的抗体包被的磁珠从细胞混合物中分离出来。和 FACS 相比，MACS 具有更便宜、更简单和更快速地进行的优点。由于多重的操作和处理，其遭受细胞的损失。

磁力胶体系统也已用于从血液中分离细胞。该胶体系统使用铁磁性纳米颗粒（nanoparticle），该颗粒包被有可容易地附着至细胞表面抗原特异性单克隆抗体的山羊抗小鼠 IgG。用铁磁性纳米颗粒标记的细胞在磁场中沿着通过平板印刷技术沉积在光学透明的表面上的铁磁性 Ni 线排列。该方法也需要多重的细胞处理步骤，所述步骤包

括将细胞和磁性珠混合和在所述表面上进行分离。也不可能从样品中分选出单个细胞以进行进一步分析。

非侵入性技术包括电荷流分离术 (charge flow separation)，其使用和电场相反的水平交叉流流体梯度 (crossflow fluid gradient) 以基于其特征性表面电荷密度分离细胞。尽管该方法可完全根据生物物理差异来分离细胞，但其特异性仍然不够。已试图修饰装置的特性(例如，分离器筛 (separator screens) 和缓冲液逆流条件) 以解决该技术的该主要缺点。考虑到不同样品中预期的个体可变性，这些装置的特性的修饰都没有提供实际的解决方案。

因为现有技术方法存在高成本、低产量和缺少特异性的问题，所以存在对克服这些限制、将特定类型的细胞从混合物中排除的方法的需要。

发明概述

本发明表征了新的和有用的磁力装置以及将其用于细胞、蛋白、DNA 和其他分子的分离、富集和纯化的方法。该装置总的来说包括磁性颗粒可结合的磁性区域或障碍物。然后使用磁性颗粒表面上的化学基团即捕获部分来结合颗粒，例如，来自复杂样品的目标细胞或分子，然后可选择性地释放被结合的种类以进行下游收集或进一步分析。

在一个方面，本发明表征了用于从样品中分离一种或多种想要的分析物的装置。该装置包括放置在通道中例如微流体通道中的磁性障碍物的第一区域，和通过磁力相互作用附着至障碍物中的至少一个上的许多磁性颗粒。

用于从样品中分离一种或多种想要的分析物的本发明的另一种装置包含具有许多磁性障碍物的通道，其中所述障碍物包含许多例如不具任何底层 (underlying) 支持结构的磁性颗粒，且能够结合一种或多种分析物的捕获部分附着至所述颗粒。可选择地，用于从样品中分离一种或多种想要的分析物的装置包含具有许多磁性障碍物的通道，其中所述障碍物包含许多磁性颗粒，且如此放置所述磁性障碍物以使至少部分一种或多种分析物在障碍物之间不能通过。在这些实施方案中，所述通道可进一步包含多个磁性位置的区域，在该区域磁性

障碍物通过磁力相互作用附着至所述位置。

在任意一个上面的装置中，障碍物通常以二维阵列的方式安排，但也可随机放置。装置可进一步包括磁性障碍物的第二区域，所述磁性障碍物例如是由许多磁性颗粒制成的或是具有许多通过磁力相互作用附着至其上的磁性颗粒。第一和第二区域可以以串联、并联或散置的方式排列。在一些实施方案中，将能够特异性或非特异性地结合一种或多种分析物的捕获部分附着至磁性颗粒上。示例性捕获部分包括全运铁蛋白（*holo-transferrin*）和抗 CD71、抗 CD36、抗 GPA 或抗 CD45 抗体及其组合。当使用障碍物的两个或更多个区域时，不同区域可包含结合两种或更多种不同分析物的不同的捕获部分。当使用捕获部分时，一般如此放置障碍物以使一种或多种分析物能够在所述障碍物之间通过。当不使用捕获部分时，一般如此放置障碍物以使至少部分一种或多种分析物例如基于大小、形状或可变形性而不能在障碍物之间通过。

其他化合物，例如细胞表面受体和候选药物化合物，也可附着至具有或不具有捕获部分的磁性颗粒。其他化合物至磁性颗粒的附着使得可以确定该化合物对分析物的作用，例如，候选药物对细胞的作用，或鉴定细胞表面受体的配体。许多候选药物化合物或受体的附着使得可以在所述装置中进行高通量筛选。

在其他实施方案中，至少部分磁性障碍物包含永久性或非永久性磁体。装置也可包含能够在磁性障碍物中产生磁场的磁力发生器，例如，具有不均匀磁场的电磁或永久性磁体。优选地，磁场发生器能够独立地将磁场应用于一个或多个障碍物。

本发明也表征了用于保留样品中的第一类型的分析物的方法，该方法包括提供含有至少第一和第二类型的分析物的样品和本发明的装置，以及将样品导入装置，其中第一类型的分析物例如通过结合至捕获部分或基于大小、形状或可变形性被保留，从而被保留在装置中。优选地，样品中至少 60% 的第一类型分析物被保留，并且样品中至少 70% 的第二类型分析物不被保留。也可改变该方法以在装置中也保留第三类型的分析物。一旦保留，就可将分析物与标记部分接触。也可通过打断将磁性颗粒保持在装置中的磁力相互作用或通过破坏分析物和捕获部分之间或捕获部分和磁性颗粒之间的相互作用来

从装置中释放被保留的分析物以进行例如收集、培养或分析。当候选药物化合物附着至磁性颗粒时，第一类型的分析物一般是细胞，且所述方法可进一步包括确定候选药物化合物对细胞的作用。当细胞表面受体结合至磁性颗粒作为捕获部分，而假定的配体、激动剂或拮抗剂是分析物时可使用类似的方法。

“分析物”是指分子，其他化学种类，例如，离子或颗粒。示例性分析物包括细胞、病毒、核酸、蛋白、糖类和小的有机分子。

“捕获部分”是指颗粒结合的化学种类。捕获部分可以是偶联至表面或形成表面的材料上的化合物。示例性捕获部分包括抗体、寡肽或多肽、核酸、其他蛋白、合成的聚合物和糖类。

“稀释剂”是指可与样品的流体介质混溶的任何流体。一般地，稀释剂是液体。例如，稀释剂含有改变 pH 的试剂（例如，酸、碱或缓冲剂）或化学修饰样品中的分析物（例如，标记分析物、将化学种类缀合至分析物或切割分析物的部分）的试剂或影响生物学结果的试剂（例如，生长培养基或引起细胞应答的化学物质或导致细胞裂解的试剂）。稀释剂也可包含用于固定或稳定细胞、病毒或分子的试剂。稀释剂也可以是化学或生物学惰性的。

“磁性”是指具有硬（永久性）或软（非永久性）磁性特性。

“微流体”是指具有至少一个小于 1mm 的尺寸。例如，微流体装置包含具有小于 1mm 的高度、宽度或长度的微流体通道。

“障碍物”是指对通道中流动产生阻碍的障碍物，例如来自一个表面的凸出物。

“颗粒”是指在分析的时标上不溶于溶液的物体。

分析物的“类型”是指分析物的群体，例如，具有共同特性（例如特定表面抗原的存在）的细胞或分子。单个分析物可属于几种不同类型的分析物。

“特异性地结合”一类分析物是指通过特定的机制例如抗体-抗原相互作用、配体-受体相互作用、核酸互补性、蛋白-蛋白相互作用、电荷-电荷相互作用和疏水性-疏水性相互作用或亲水性-亲水性相互作用结合该类型的分析物。当分析物被结合时，尽管单个分析物在正常的操作条件下可偶尔分离，但键的强度一般足以阻止由存在的流体流动所产生的分离。

本发明的优点包括提供这样的分选装置的能力，所述装置不需要在包装装置之前用环境敏感捕获部分进行功能化，从而增加有用的捕获部分的带宽；提供这样的分选装置的能力，终端用户可以以简单、快速和可靠的方式用捕获分子功能化所述装置，以产生对终端用户的特殊应用的定制装置；和提供这样的分选装置的能力，和现有技术装置相比，所述装置的功能更通用。

根据下面的说明和权利要求可明显地看到其他特性和优点。

附图简述

图 1 是本发明的装置的横截面图和根据本发明进行细胞分离，然后释放以进行离线分析的相关工艺流程。

图 2 是本发明装置的制造和行为过程 (functionalization) 的示意图。被磁化的柱子使得能够进行装置的柱子包装性修饰。

图 3 是通过利用抗运铁蛋白 (CD71) 受体的单克隆抗体，应用本发明的装置从复杂混合物例如血液中捕获和释放 CD71+细胞的示意图。

图 4 是通过使用全运铁蛋白，应用本发明的装置从复杂混合物例如血液中捕获和释放 CD71+细胞的示意图。全运铁蛋白具有丰富的铁含量，可商购获得，并且和其对应的单克隆抗体相比，所述全运铁蛋白和 CD71 受体的相互作用具有更高的亲和常数和特异性。

发明详述

装置

本发明表征了含有多个磁性障碍物的装置，一般为微流体的。在其最简单的实施方案中，装置包含具有磁性区域的通道，磁性颗粒可通过磁力附着至所述通道从而产生有织纹的表面，通过通道的分析物可与所述表面接触。通过用合适的捕获部分包被这些磁性颗粒，可能通过亲和力机制结合想要的分析物。所述磁性颗粒可用于使通道产生织纹，且通过相对于通道的尺寸，合适地选择磁性颗粒的大小和形状，可能提供增强目标分析物和磁性颗粒之间相互作用的织纹。磁性颗粒可通过磁力附着至通道的硬磁性区域或附着至被励磁产生磁场的软磁性区域。此外，通过例如增加流过装置的流体的总体流动速

率、减小磁场或通过两者的一些组合可将这些磁性颗粒从通道内确定的位置释放出来。在一个实施方案中，空间上不均匀的永久性磁体或电磁体可用于在另外的未织纹化的微流体通道内产生有组织的和在一些情况下周期性排列的磁性颗粒(Deng 等人 *Applied Physics Letters*, 78,1775 (2001))。也可使用电磁在装置中产生非均匀磁场。非均匀场产生具有更高和更低磁场强度的区域，其反过来将在装置中以周期性排列的方式吸引磁性颗粒。可用其他外磁场产生磁性颗粒附着的磁性区域。也可使用硬磁材料制造装置，从而避开对电磁体或外磁场的需要。在一个实施方案中，装置含有多个具有磁性区域的通道，例如，用于增加容积通量。此外，这些通道可垂直堆叠。

图 1 举例说明示例性装置的几何形状以及从复杂混合物中分离、然后释放靶分析物例如细胞或分子的功能性工艺流程。所述装置含有从一个通道表面延伸至相对的通道表面的障碍物。所述障碍物可以延伸至或可以不延伸至越过通道的整个距离。所述障碍物是磁性的（例如，含有硬或软磁材料或是非均匀场中的高磁场位置）并且吸引和保留磁性颗粒，所述磁性颗粒一般包被有捕获部分。可改变装置的几何形状、柱子的分布、形状、大小以及流动参数以最优化目标分析物和捕获部分的相互作用的功效（例如，如国际申请号 PCT/US03/30965 中所描述的）。在一个具体的示例中，独特地排列（间距和密度各种各样，可以是等边三角形、对角线和随机排列分布）具有有微织纹（microtextured）的、不同形状（圆柱形、矩形、梯形或多晶形）和大小（10-999 微米）的磁性障碍物的阳极有盖硅晶片，以使连续输注的流动流体界限内的分析物和障碍物的碰撞频率最大化。磁性障碍物的精确几何形状和障碍物的分布可依赖于要被分离、富集或纯化的分析物的类型。

本发明的装置可以包含或可以不包含微流体通道，即可以是或可以不是微流体装置。样品被导入的装置的通道的尺寸可依赖于所用的样品。优选地，通道具有至少一个不大于 10、9.5、9、8.5、8、7.5、7、6.5、6、6.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5 或 1 mm 的尺寸（例如，高度、宽度、长度或半径）。此处描述的微流体装置优选地具有这样的通道，其具有至少一个小于 1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1 或甚至 0.05 mm 的尺寸。本领域技术人员基于想要的应

用可确定通道的尺寸。

制造

可使用各种技术制造本发明的装置，且部分地基于所选择的材料来选择使用的技术。用于制造本发明的装置的示例性材料包括玻璃、硅、钢、镍、其他金属、聚(甲基丙烯酸甲酯) (PMMA)、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚乙烯、聚烯烃、聚硅氧烷 (silicones) (例如，聚(二甲基硅氧烷))、陶瓷和其组合。其他材料在本领域是已知的。用于在这些材料中制造通道的方法在本领域是已知的。这些方法包括，光刻法 (例如，立体平板印刷术 (stereolithography) 或 X 射线光刻法)、模塑法、压印术、硅微切削加工术、湿或干化学蚀刻术、铣削术、金刚石切割术、*Lithographie Galvanoformung and Abformung (LIGA)* 和电镀方法。例如，对于玻璃，可使用常规的光刻法硅制造技术，然后再使用湿蚀刻术 (KOH) 或干蚀刻术 (用氟或其他反应性气体蚀刻反应性离子)。可对具有高光子吸收效率的塑料材料采用技术例如激光微切削加工术。因为该方法的连续性特性，所以该技术适合用于更低通量的制造。对于大量生产的塑料装置，热塑性注射模塑和压缩模塑是合适的。用于光盘 (compact discs) (其在亚微米水平上保持性质的保真性) 的大量生产的常规热塑性注射模塑也可用于制造本发明的装置。例如，通过常规的光刻法在玻璃主盘上复制装置部件。对玻璃主盘进行电铸以产生结实的、抗热激的、导热的硬模具。该模具用作将部件注射模塑为或压缩模塑为塑料装置的主盘模板。依赖于用于生产装置的塑料材料和对光学质量的要求以及完成的产品的通量，可选择压缩模塑或注射模塑作为生产方法。压缩模塑 (也称作热压印 (hot embossing) 或凸版印刷 (relief imprinting)) 具有可与高分子量聚合物相容的优点，该压缩模塑对小结构是非常优良的，但其难以用于复制高纵横比的结构和具有更长的周期时间。注射模塑非常适合用于高纵横比的结构，但最适合低分子量聚合物。

所述装置可以以一个或多个部件生产，然后再将所述部件组装起来。装置的部件可通过夹具、粘合剂、加热、阳极结合或表面基团之间的反应 (例如，晶圆键合) 结合在一起。可选择地，装置可作为单

个部件生产，例如，使用立体平板印刷术或其他三维生产技术来生产。

可用硬或软磁材料（例如，但不限于，稀土材料，钕-铁-硼、亚铁-铬-钴、镍-亚铁、钴-铂和铁酸锶）生产装置的磁性区域。可直接用磁性材料制造装置的部分，或可将磁性材料应用于另外的材料。硬磁材料的使用可简化装置的设计，因为其能够产生磁场而无需其他励磁。然而，通过使材料消磁，软磁材料可使被结合的分析物的释放和下游处理简单化。依赖于磁性材料，应用方法可包括阴极溅射、烧结、电解沉积或聚合物粘合剂磁粉的复合物的薄膜涂覆。优选的实施方案是使用聚合物复合物例如聚酰亚胺-铁酸锶(聚酰亚胺用作粘合剂，铁酸锶用作磁性填料)通过旋模法 (spin casting) 对微切削加工的障碍物（例如，硅柱）进行的薄膜涂覆。涂覆后，固化聚合物磁性涂层以获得稳定的机械特性。固化后，将装置短暂地暴露于外感应场，所述感应场决定装置中永久性磁力的优选方向。可通过磁性填料的体积百分比来控制来自柱的磁场的磁通量密度和内禀矫顽力。

在另一个实施方案中，将导电材料在封闭的微流体装置的外表面上进行微模型化 (micropattern)。该模式由单个的、具有大约 100 微米的空间周期性的电路构成。通过控制该电路的设计和通过电路的电流量值，人们可在封闭的微流体装置内产生更高和更低磁力强度的周期性区域。

可将磁性颗粒均匀地沉积在整个装置或空间上分辨的区域中。此外，磁性颗粒也可用于在装置内产生结构。例如，在通道的相对两侧上的两个磁性区域可用于吸引磁性颗粒以形成连接所述两个区域的“桥”。

可调整磁场以影响具有 $0.1-200 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{kg}$ 的质量磁化率的超磁性 (supramagnetic) 颗粒和顺磁性颗粒。所使用的顺磁性颗粒可根据大小分类为：颗粒（细胞直径的大小， $1-5\mu\text{m}$ ）；胶体（在 100nm 的量级上）；和分子（在 2-10nm 的量级上）。作用在顺磁性实体上的基本力为：

$$F_b = \frac{1}{2\mu_0} \Delta\chi V_b \nabla B^2$$

其中 F_b 是作用在体积为 V_b 的顺磁性实体上的磁力, $\Delta\chi$ 是磁珠 χ_b 和周围介质 χ_f 之间的磁化率的差, μ_0 是游离空间的磁导率, B 是外磁场, 且 ∇ 是梯度运算符。可控制和调节磁场以使能够吸引和保留广谱的、一般偶联至捕获部分的颗粒、胶体和分子顺磁性实体。

磁性颗粒和捕获部分

对磁场响应的任何磁性颗粒都可用于本发明的装置和方法。想要的颗粒是具有可经化学或物理修饰(例如, 通过化学反应、物理吸附、缠结或静电相互作用)的表面化学物质的颗粒。

可通过本领域已知的任何方法将捕获部分结合到磁性颗粒。例子包括化学反应、物理吸附、缠结或静电相互作用。结合至磁性颗粒的捕获部分依赖于被靶向的分析物的性质。捕获部分的例子包括, 但不限于, 蛋白(例如抗体、抗生素蛋白和细胞表面受体)、带电或不带电的聚合物(例如多肽、核酸和合成的聚合物)、疏水性或亲水性聚合物、小分子(例如生物素、受体配体和螯合剂)和离子。这些捕获部分可用于特异性地结合细胞(例如, 细菌、病原体、胎儿细胞、胎儿血细胞、癌细胞和血细胞)、细胞器(例如, 细胞核)、病毒、肽、蛋白、聚合物、核酸、超分子复合物、其他生物学分子(例如, 有机或无机分子)、小分子、离子或其组合或片段。捕获部分的具体的例子包括抗 CD71、抗 CD36、抗 GPA 和全运铁蛋白。在另一个实施方案中, 捕获部分对于胎儿细胞是特异性的。

应用

本发明的方法包括将分析物(例如作为混合物的部分)与装置的表面接触, 并将样品中想要的分析物(例如, 稀有细胞例如胎儿细胞、病原体细胞、癌细胞或细菌细胞)保留在装置中。然后目标分析物可以结合到装置表面。在另一个实施方案中, 通过基于大小、形状或可变形性的分离将想要的分析物保留在装置中。想要地, 至少 60%、70%、80%、90%、95%、98%或 99%的想要的分析物被保留在装置

中。理想地设计装置的表面，以使非靶分析物的非特异性结合最小化。例如，至少 99%、98%、95%、90%、80%或 70%的非靶分析物不被保留在装置中。装置中的选择性保留可使特定的分析物群体从混合物例如血液、痰、尿和土壤、空气或水样品中分离出来。

通过将磁性颗粒导入本发明的装置可实现选择性地保留想要的分析物。可将捕获部分到结合磁性颗粒以实现靶分析物的特异性结合。可选择地，可如此放置磁性颗粒以只允许具有被选择的大小、形状或可变形性的分析物通过所述装置。也可预见这些实施方案的组合。例如，可将装置进行配置以基于大小保留某些分析物和基于结合保留其他分析物。此外，可将装置设计用来在例如装置内的串联、并联或散置排列的区域中结合超过一种的目标分析物，或者其中两种或更多种捕获部分沉积在相同的磁性颗粒或例如和相同的障碍物或区域结合的相邻颗粒上。此外，对于相同分析物（例如抗 CD71 和抗 CD36）特异性的多个捕获部分可在设备中用于相同的或不同的磁性颗粒上，例如沉积在相同或不同的障碍物或区域上。

可将磁性颗粒附着至存在于装置中的障碍物（或经处理以产生障碍物），以为分析物增加相互作用的表面积，从而增加结合的概率。流动条件一般是这样的条件，其使分析物在装置中受到非常温和地处理从而防止被破坏。可将正压抽吸或负压抽吸或来自流体柱的流动用于将分析物转运入或转运出本发明的微流体装置。装置使得能够进行温和的处理，同时使各分析物和一种或多种磁性颗粒的碰撞频率最大化。在和磁性颗粒碰撞后，靶分析物和任何捕获部分相互作用。作为装置中磁场吸引力的设计结果，捕获部分可与障碍物共定位。该相互作用导致在确定的位置捕获和保留靶分析物。可选择地，基于无能力通过装置，例如基于大小、形状或可变形性，保留分析物。通过使保留磁性颗粒的磁性区域消磁可释放被捕获的分析物。为了从区域选择性地释放分析物，可将消磁限定于选择的障碍物或区域。例如，可将磁场设计成电磁性的，从而能够随意地打开和关闭每一个单个区域或障碍物的磁场。在其他实施方案中，可通过破坏分析物和捕获部分之间的键，例如通过非共价相互作用的化学裂解或打断来释放颗粒。例如，通过 DNA 接头将一些亚铁颗粒连接至单克隆抗体；可使用 DNA 酶从亚铁颗粒处裂解和释放分析物。可选择地，可使用抗体片段化蛋

白酶（例如木瓜蛋白酶）进行选择性释放。增加对磁性颗粒的剪切力也可用于从磁性区域特别是从硬磁性区域释放磁性颗粒。在其他实施方案中，不释放被捕获的分析物并可对其进行分析，或在被保留的同时对其进行进一步操作。

图 2 举例说明装置的制造和形为过程。被磁化的柱子使得能够进行装置的柱包装性修饰。这是超越现有技术的非常重要的改进。半导体处理参数（高热或粘合盖子的溶剂封闭剂）与捕获部分（对温度和无机以及有机溶剂敏感）的不相容性使该装置对用所有捕获部分进行的形为过程具有通用性和相容性。通过使用磁场将捕获部分保留在障碍物（例如，柱子）上是另外的优于使用复杂的表面化学物质进行固定的现有技术的优点。所述装置能够使终端用户容易和快速地用选择的捕获部分或捕获部分的混合物使装置带上电荷，从而增加用途的多功能性。通过该装置使得能够进行随选的和‘及时（just-in-time）’的一步形为过程，从而克服如果在生产时捕获部分发生化学交联造成的捕获部分搁置稳定性的问题。可被装载和保留在柱子上的捕获部分包括，但不限于，哺乳动物细胞上的所有分化簇（cluster of differentiation）(CD)受体、合成的和重组的细胞受体的配体以及任何其他有机、无机分子，或可被附着至任何磁性颗粒的目标化合物。

图 3 举例说明从复杂的混合物中捕获和分离表达运铁蛋白受体的细胞的装置的实施方案。可容易地获得现货供应的共价偶联至磁性材料的 CD71 受体的单克隆抗体，所述材料是例如，但不限于，掺亚铁的聚苯乙烯和亚铁颗粒或亚铁胶体（ferro-colloids）（例如，来自 Miltenyi 和 Dynal）。将结合在磁性颗粒上的抗 CD71 的 mAB 流入装置。将被抗体包被的颗粒吸引至柱（即，障碍物）、底面（floor）和壁上，并通过颗粒和磁场之间的磁场相互作用力保留所述颗粒。通过漂洗（可调整流速从而使施加在远离柱子的颗粒上的流体动力学剪切应力大于磁场力）除去柱子之间的颗粒和由远离柱的局部磁场影响范围松散地保留的颗粒。

图 4 是应用装置以使用全运铁蛋白从复杂的混合物例如血液中捕获和释放 CD71+ 细胞的优选的实施方案。全运铁蛋白具有丰富的铁含量，可商购获得，并且和其对应的单克隆抗体相比，所述全运铁蛋白和 CD71 受体的相互作用具有更高的亲和常数和特异性。偶联至

运铁蛋白配体上的铁起着保持配体用于与细胞受体结合的构象和作为用于将配体保留在柱子上的分子顺磁性元件的双重作用。

除了上述实施方案外，所述装置可用于分离和检测血液传播的病原体、细菌和病毒负荷、溶解在水介质中的空气传播的病原体、食品工业中的病原体检测和化学和生物学危险物的环境采样。可选择地，磁性颗粒可和捕获部分以及候选药物化合物共定位。可进一步分析目标细胞的捕获以研究被捕获的细胞和被固定的药物化合物的相互作用。因此所述装置可用于从复杂的混合物中分离细胞的亚群和测定其与候选药物化合物的反应性，所述候选药物化合物用于药物发现方法中以进行候选化合物的高通量和基于次生细胞 (secondary cell) 的筛选。在其他实施方案中，在所述装置中，通过将捕获部分即受体定位在磁性颗粒上，并流入候选配体（或激动剂或拮抗剂）的复杂混合物可实现关于药物发现的受体-配体相互作用的研究。捕获目标配体，且可通过例如用荧光探针进行二次染色 (secondary staining) 来检测结合事件。该实施方案使得能够从复杂混合物中快速鉴定已知配体的不存在或存在或鉴定候选药物化合物，所述复杂的混合物提取自组织或细胞消化物。

其他实施方案

上面说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请在此处引用作为参考。对本领域普通技术人员而言，显而易见的是，本发明的所描述的方法和系统的各种修饰和变化不背离本发明的范围和精神。尽管在具体的实施方案中描述了本发明，但应当理解所请求保护的发明不应当不适当当地被限定于这些具体的实施方案中。事实上，所描述的实施本发明的模式的各种修改预期都在本发明的范围之内，所述修改对本领域技术人员而言是显而易见的。

其他实施方案存在于权利要求中。

装置的横截面图 (A) 和进行细胞分离及
释放以进行分析的工艺流程 (B和C)

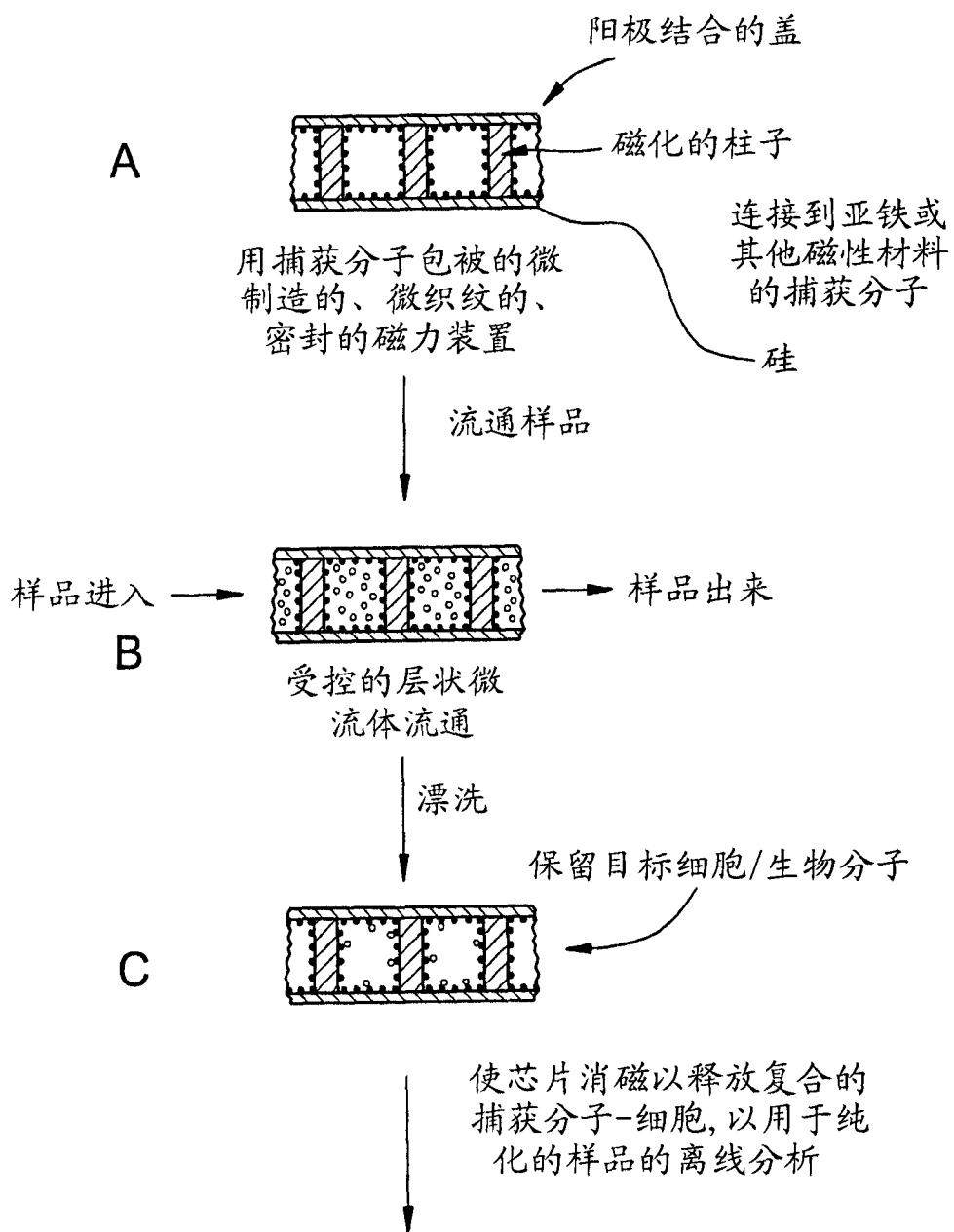


图 1

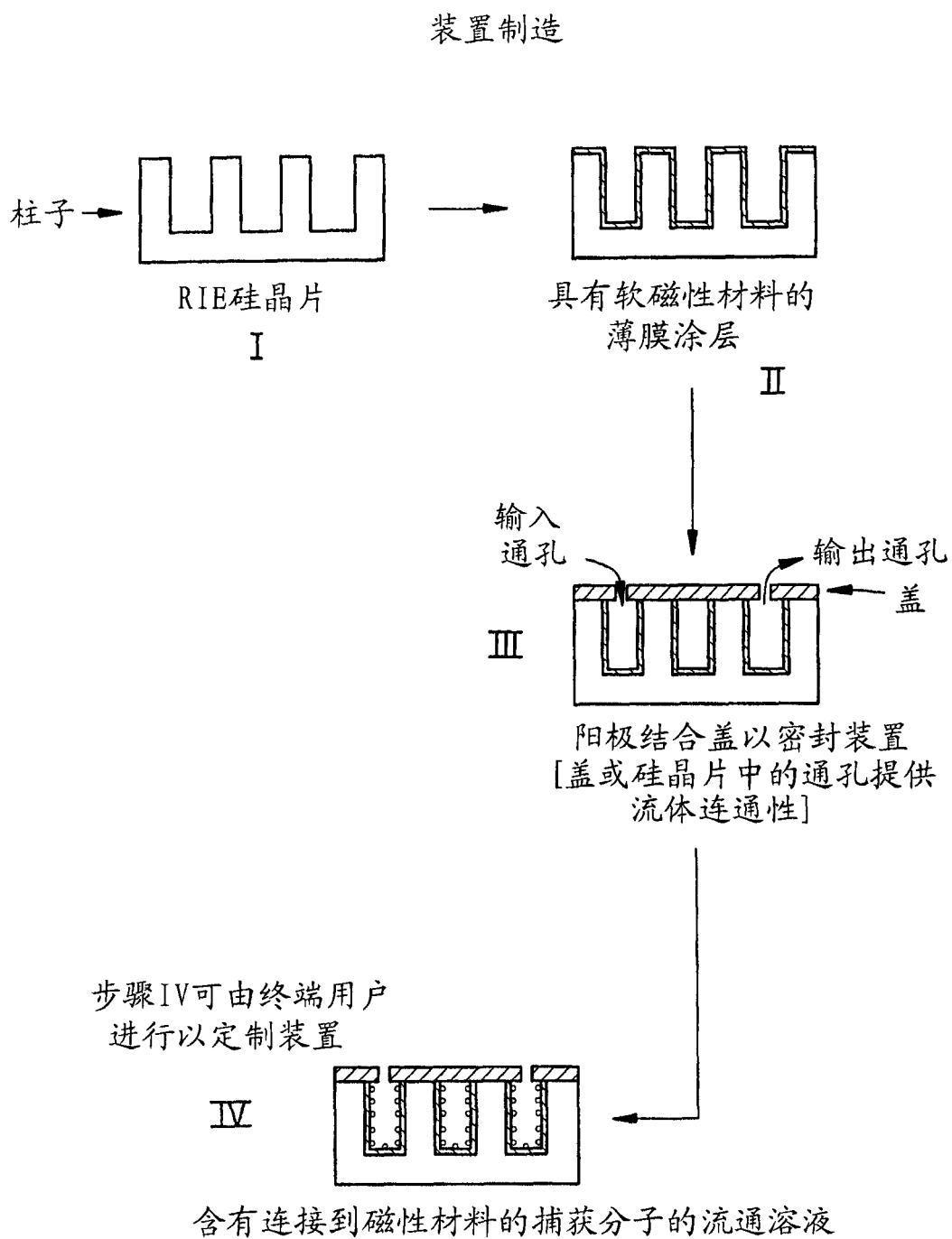


图 2

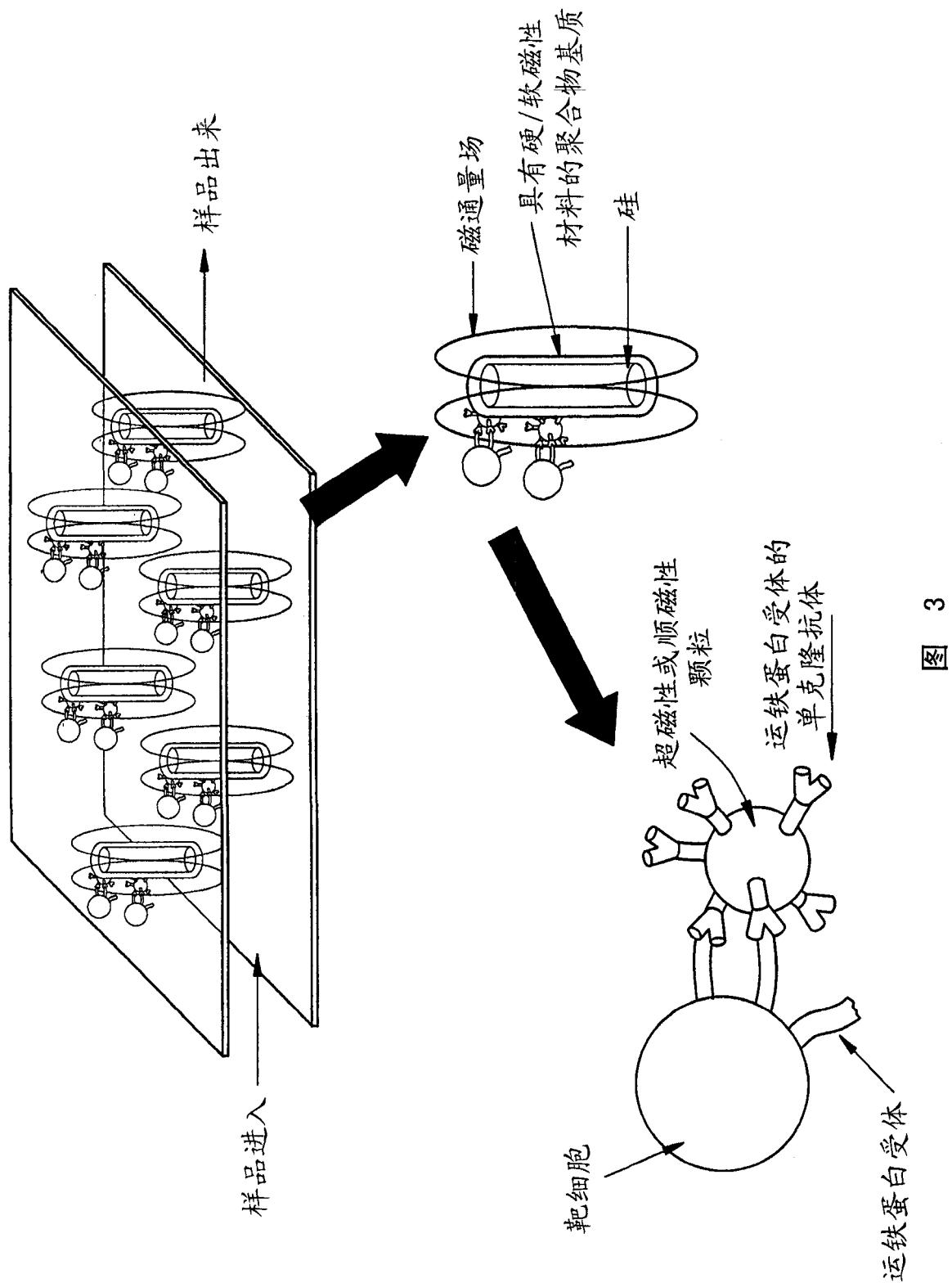


图 3

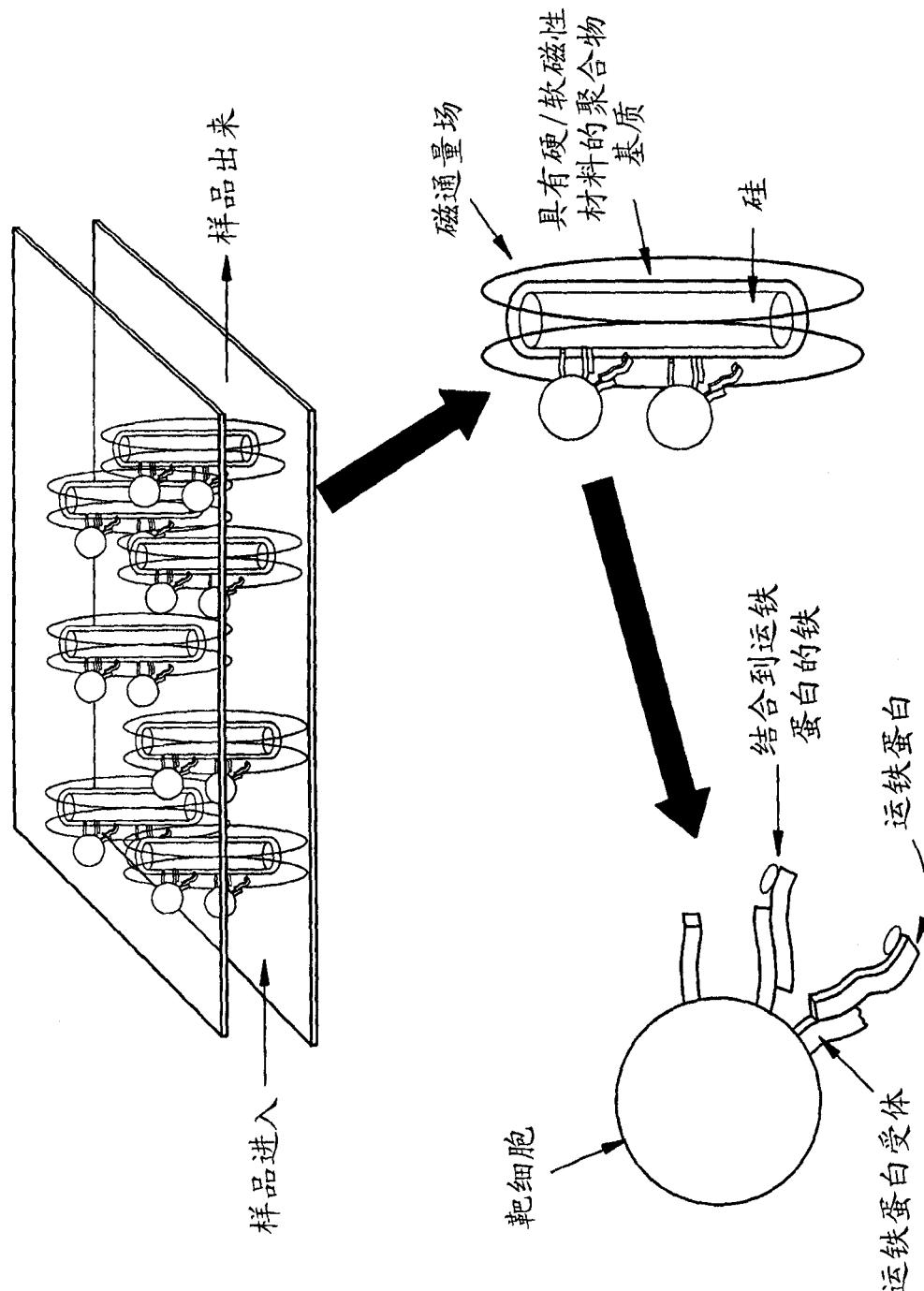


图 4

专利名称(译)	用于微流体环境中的细胞和生物分子分离的磁力装置		
公开(公告)号	CN101142314A	公开(公告)日	2008-03-12
申请号	CN200580006643.6	申请日	2005-03-03
[标]申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
申请(专利权)人(译)	综合医院公司		
当前申请(专利权)人(译)	综合医院公司		
[标]发明人	MD科斯曼 R卡普尔 BL卡瓦尔霍 T巴伯 UJ巴利斯 M托纳 黄乐天		
发明人	M·D·科斯曼 R·卡普尔 B·L·卡瓦尔霍 T·巴伯 U·J·巴利斯 M·托纳 黄乐天		
IPC分类号	C12N13/00 G01N33/543 G01N33/551 G01N33/553 B01L3/00 C12M1/34 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	B01L3/5027 G01N33/54326		
优先权	60/549610 2004-03-03 US		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明表征了新的和有用磁力装置以及将其用于细胞、蛋白、DNA和其他分子的分离、富集和纯化的方法。所述装置总的来说包含磁性颗粒可结合的磁性区域或障碍物。然后可使用磁性颗粒表面上的化学基团即捕获部分来结合颗粒，例如，来自复杂样品的目标细胞或分子，然后选择性地释放被结合的种类以进行下游收集或进一步分析。

