



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109328098 A

(43)申请公布日 2019.02.12

(21)申请号 201780037993.1

(22)申请日 2017.06.19

(30)优先权数据

2016-121791 2016.06.20 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2017/022554 2017.06.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/221898 JA 2017.12.28

(71)申请人 凸版印刷株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 新井宪彰

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

代理人 白丽

(51)Int.Cl.

B01D 12/00(2006.01)

B01J 19/00(2006.01)

B03C 1/00(2006.01)

G12M 1/00(2006.01)

G01N 1/28(2006.01)

G01N 37/00(2006.01)

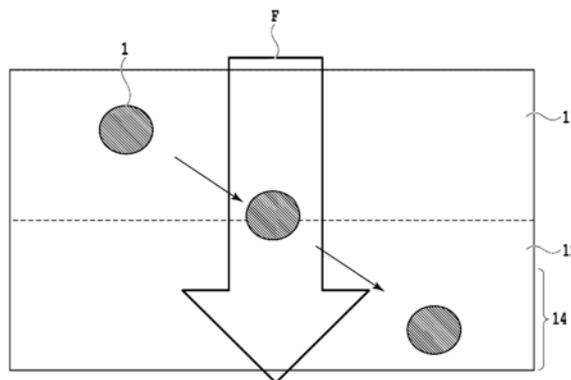
权利要求书2页 说明书16页 附图14页

(54)发明名称

液体介质的置换方法及用于该方法的流路设备

(57)摘要

本发明的课题在于液体介质的置换。其为一种方法及用于实施该方法的流路设备,所述方法包含下述工序:通过含有试样液体及第二液体介质的至少2个以上的液体形成由多个层流部分组成的层流的工序,其中试样液体是含有分散状态的目标粒子的第一液体介质,层流至少含有由试样液体构成的第一层流部分、和由第二液体介质构成的第二层流部分;通过使外力作用于层流而使目标粒子从第一层流部分移动至第二层流部分的工序,其中,目标粒子具有可通过外力的作用向第二层流部分的方向移动的至少一个物理特性;以及从第二层流部分中将含有目标粒子的层流级分回收的工序,其中,层流级分的回收从垂直于层流的流动方向的层流级分回收面进行,层流级分回收面与第一层流部分的截面远离。



1. 一种方法,其为通过使目标粒子从第一液体介质移动至第二液体介质中而对液体介质进行置换的方法,其特征在于,其包含下述工序:

(i) 将含有试样液体及第二液体介质的至少2个以上的液体分别向同一方向送液,从而形成由多个层流部分组成的层流的工序,

其中,所述试样液体是含有分散状态的目标粒子的第一液体介质,

所述层流至少含有由所述试样液体构成的第一层流部分、和由所述第二液体介质构成的第二层流部分;

(ii) 通过使外力作用于所述层流,使所述目标粒子从所述第一层流部分移动至所述第二层流部分的工序,

其中,所述目标粒子具有可通过外力的作用向所述第二层流部分的方向移动的至少一个物理特性;以及

(iii) 从所述第二层流部分中将含有所述目标粒子的层流级分回收的工序,

其中,所述层流级分的回收从垂直于所述层流的流动方向的层流级分回收面进行,并且所述层流级分回收面与所述第一层流部分的截面远离。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述第一及第二层流部分相互间相邻地接触。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,在所述第一层流部分及所述第二层流部分之间存在至少由第三液体介质构成的第三层流部分。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,其特征在于,所述外力为利用电场、磁场、水力过滤或决定性侧向移动(DLD)所产生的外力中的任一种以上。

5. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,其特征在于,所述外力至少含有利用决定性侧向移动(DLD)产生的外力,所述目标粒子的物理特性为粒径。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的方法,其特征在于,所述目标粒子至少含有生物粒子、珠粒、珠粒与生物粒子的复合体粒子中的任一种。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述目标粒子为生物粒子与珠粒的复合体粒子,所述第二液体介质可以使所述复合体粒子解离而使所述生物粒子游离。

8. 根据权利要求6或7所述的方法,其特征在于,所述生物粒子为生物分子、细胞外囊泡、细胞中的任一种。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述生物粒子为生物分子、细胞中的任一种。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,所述生物粒子为细胞。

11. 一种流路设备,其为能够使目标粒子从第一液体介质移动至第二液体介质中的流路设备,其特征在于,该流路设备具备:

(i) 在所述流路设备的前方至少含有用于导入试样液体的第一导入口及用于导入第二液体介质的第二导入口的多个导入口;

(ii) 可以形成层流的流路;

(iii) 在所述流路设备的后方至少含有第一排出口及第二排出口的二个以上的排出口;以及

(iv) 赋予外力的机构,

其中，

所述试样液体为含有分散状态的目标粒子的第一液体介质，

所述流路可以形成至少含有由所述试样液体构成的第一层流部分、和由第二液体介质构成的第二层流部分的层流，

所述第二排出口是用于将含有通过所述外力的作用移动至所述第二层流部分的所述目标粒子的层流级分从垂直于所述层流的流动方向的层流级分回收面进行回收的目标粒子回收用排出口，

所述第一排出口从所述第二排出口观察位于所述第一层流部分一侧，

位于所述第一层流部分一侧的所述第二排出口的隔壁配置于使得所述层流级分回收面与所述第一层流部分的截面远离的位置上。

12. 根据权利要求11所述的流路设备，其特征在于，按照所述第一及第二层流部分相互间相邻接触地形成的方式，所述第一及第二导入口相邻地形成。

13. 根据权利要求11所述的流路设备，其特征在于，

在所述流路设备的前方进一步具备用于导入第三液体介质的第三导入口，

所述流路可以形成进一步还包含由第三液体介质构成的第三层流部分的层流，

所述第三导入口按照所述第三层流部分介于所述第一层流部分及所述第二层流部分之间的方式配置在所述第一导入口与所述第二导入口之间。

14. 根据权利要求11~13中任一项所述的流路设备，其特征在于，所述赋予外力的机构是由用于利用决定性侧向移动(DLD)的多个柱状结构所形成的规定配置图案的结构。

15. 一种流路设备体系，其为含有多个权利要求11所述的流路设备的流路设备体系，其特征在于，

所述多个流路设备串联地连接，

所述串联连接是将一个流路设备的所述第二排出口与成为串联连接的对方的另一个流路设备的所述第一导入口连接而形成，

所述各流路设备的赋予外力的机构或外力的强度相互间不同。

液体介质的置换方法及用于该方法的流路设备

技术领域

[0001] 本发明涉及液体介质的置换方法,特别是对至少含有作为目标粒子的生物粒子、珠粒或者该生物粒子与珠粒的复合体粒子中的任一种的液性混合试样的液体介质进行置换的方法。

背景技术

[0002] 从液性混合试样(例如血液或培养液、反应溶液)中将目标粒子分离、对液体介质进行置换是为了进行基础研究、诊断及治疗所需的方法。

[0003] 一般来说,例如在进行液性混合试样中所含的蛋白质等的液体介质置换时,采用下述方法:使用抗体标记磁性粒子捕获蛋白质等而形成复合体粒子,之后利用磁力将该复合体粒子捕获,接着反复进行上清的除去、洗涤,从而置换成目标液体介质。

[0004] 另外已知使用离心分离法等对具有固有密度(比重)的细胞(例如白细胞和红细胞)进行分离的方法、或者称为流式细胞术的方法也能够以该目的进行使用。

[0005] 不过,对于含有目标粒子的液性混合试样,作为精度良好地对其液体介质进行置换的方法,以往通常是利用离心分离等进行液体固体分离之后将液体部分除去、反复进行添加新的液体介质的操作、从而进行置换的方法。

[0006] 但是,这种以往的方法中,在其过程中目标粒子发生损失成为课题。另外,为了精度良好地进行液体介质的置换时,需要反复洗涤,但特别是混合试样中所含目标粒子稀少时,有其回收率降低的危险。

[0007] 现有技术文献

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:D.W.Inglis,et al,Critical particle size for fractionation by deterministic lateral displacement,Lab on a Chip,6,655-658(2006)。

发明内容

[0010] 发明要解决的技术问题

[0011] 因此,本发明的课题在于提供在将液性试样中的目标粒子的损失止于最小限度的同时、精度良好地置换成所希望的液体介质的方法、以及用于该方法及设备。

[0012] 用于解决技术问题的手段

[0013] [本发明的第一方式]

[0014] 本发明的第一方式为一种方法,其为通过使目标粒子从第一液体介质移动至第二液体介质中而对液体介质进行置换的方法,其特征在于,其包含下述工序:

[0015] (i) 将含有试样液体及第二液体介质的至少2个以上的液体分别向同一方向送液,从而形成由多个层流部分组成的层流的工序,

[0016] 其中,所述试样液体是含有分散状态的目标粒子的第一液体介质,

[0017] 所述层流至少含有由所述试样液体构成的第一层流部分、和由所述第二液体介质

构成的第二层流部分；

[0018] (ii) 通过使外力作用于所述层流,使所述目标粒子从所述第一层流部分移动至所述第二层流部分的工序,

[0019] 其中,所述目标粒子具有可通过外力的作用向所述第二层流部分的方向移动的至少一个物理特性;以及

[0020] (iii) 从所述第二层流部分中将含有所述目标粒子的层流级分回收的工序,

[0021] 其中,所述层流级分的回收从垂直于所述层流的流动方向的层流级分回收面进行,并且所述层流级分回收面与所述第一层流部分的截面远离。

[0022] [本发明的第二方式]

[0023] 本发明的第二方式为一种流路设备,其为能够使目标粒子从第一液体介质移动至第二液体介质中的流路设备,其特征在于,该流路设备具备:

[0024] (i) 在所述流路设备的前方至少含有用于导入试样液体的第一导入口及用于导入第二液体介质的第二导入口的多个导入口;

[0025] (ii) 可以形成层流的流路;

[0026] (iii) 在所述流路设备的后方至少含有第一排出口及第二排出口的二个以上的排出口;以及

[0027] (iv) 赋予外力的机构,

[0028] 其中,

[0029] 所述试样液体为含有分散状态的目标粒子的第一液体介质,

[0030] 所述流路可以形成至少含有由所述试样液体构成的第一层流部分、和由第二液体介质构成的第二层流部分的层流,

[0031] 所述第二排出口是用于将含有通过所述外力的作用移动至所述第二层流部分的所述目标粒子的层流级分从垂直于所述层流的流动方向的层流级分回收面进行回收的目标粒子回收用排出口,

[0032] 所述第一排出口从所述第二排出口观察位于所述第一层流部分一侧,

[0033] 位于所述第一层流部分一侧的所述第二排出口的隔壁配置于使得所述层流级分回收面与所述第一层流部分的截面远离的位置上。

[0034] 发明效果

[0035] 根据本发明,可以在与现有技术相比进一步减少目标粒子损失的同时、精度良好地进行液体介质的置换。

[0036] 另外,根据本发明,还可以连续地进行该液体介质的置换。

附图说明

[0037] 图1为说明本发明实施方式的液体介质的置换方法之一例的示意图。

[0038] 图2为说明本发明实施方式的使用了3个以上层流部分的液体介质的置换方法之一例的示意图。

[0039] 图3为说明本发明实施方式的流路设备的基本结构之一例的示意图。

[0040] 图4为说明本发明实施方式的流路设备之一例的示意图。

[0041] 图5为说明本发明实施方式的构成3个以上层流部分的流路设备的基本结构之一

例的示意图。

[0042] 图6为表示本发明实施方式的流路设备的竖直方向截面图之一例的示意图。

[0043] 图7为说明本发明实施方式的具备送液部和回收部的流路装置之一例的示意图。

[0044] 图8为说明本发明实施方式的使粒子移动的外力的基本原理之一例的示意图。

[0045] 图9为说明本发明实施方式的具备决定性侧向移动(DLD)结构部分的流路设备之一例的示意图。

[0046] 图10为说明本发明实施方式的具备决定性侧向移动(DLD)结构部分的流路设备的竖直方向截面图之一例的示意图。

[0047] 图11为表示说明本发明实施方式的流路设备之一例的示意图。

[0048] 图12为本发明的实施例中使用的流路设备之一例的概视图。

[0049] 图13为本发明的实施例中使用的流路设备之一例的结构详图。

[0050] 图14为说明本发明的实施例中使用的流路设备中的层流形成的情形之一例的图。

具体实施方式

[0051] [1. 本发明第一方式的液体介质的置换方法]

[0052] 以下一边参照附图一边说明本发明的液体介质的置换方法。

[0053] 本发明为从含有目标粒子1(含有细胞等的生物粒子、珠粒、珠粒与生物粒子的复合体粒子)的液性的混合试样(试样液体)中、在将其目标粒子的损失止于最小限度的同时将混合试样的液体介质(第一液体介质)置换成所希望的第二液体介质的方法。

[0054] 试样液体是指含有分散状态的目标粒子的液体介质(第一液体介质),可以是含有目标粒子的液性的混合试样其本身,或者还可以是适当用任意的缓冲液进行了稀释而成的液体。例如,作为试样液体,可以举出含有血细胞的血液、淋巴液、唾液、尿、泪等体液。

[0055] 此外,这里所说的第一液体介质是指从试样液体中将目标粒子除去后剩余的所有部分,当不仅是纯的液体介质其本身、还含有目标粒子以外的含有成分时,它们也作为构成第一液体介质的成分来看待。

[0056] 作为混悬在液体介质(培养溶液等)中的目标粒子,例如包括生物粒子、珠粒、珠粒与生物粒子的复合体粒子。另外,作为更具体的生物粒子的例子,包括生物分子(例如核酸、蛋白质、糖、脂质等)、细胞外囊泡(例如外泌体、凋亡小体等)、细胞。如此,作为目标粒子,可以是单一的物质,还可以是与其他物质的复合体。另外,试样液体中所含的目标粒子的种类或数量并无限定。作为形成复合体粒子的珠粒,可以示例出在珠粒上结合有对生物粒子的特征性结构进行识别的对象捕获分子的珠粒。作为这种对象捕获分子,优选抗体、肽适配体、外源凝集素、细胞间粘附分子、糖链、细胞识别性的高分子,作为担载这种对象捕获分子的珠粒,优选聚苯乙烯珠粒或乳胶珠粒、磁性珠粒等。需要说明的是,并非限定于这些例子,只要是能够达成本目的的手段,则可以没有任何限定地选择适当手段进行利用。

[0057] 第二液体介质可以使用适于接收目标粒子的任意液体介质。不过,如果目标粒子含有细胞、想要避免对细胞存活性造成影响的话,可以使用一种或组合使用多种等渗液,例如使用生理盐水、磷酸缓冲液(PBS)等即可。另外,目标粒子含有核酸、蛋白质等时,为了避免这些物质的变性,优选选择适当的缓冲液。另外,第二液体介质还可以是通过pH等的调节使复合体粒子解离而使目标粒子游离的介质。此外,当在液体介质中使目标粒子溶解或者

使其发生任意的反应时,根据需要适当选择优选的液体介质即可,并非限定于上述介质。

[0058] 本发明的液体介质的置换方法为下述的方法:利用至少含有在同一方向上并列流动的、由试样液体构成的第一层流部分和由所述第二液体介质构成的第二层流部分的层流,通过外力的作用使目标粒子从第一层流部分向第二层流部分的方向移动,从而将含有目标粒子的液体介质从第一液体介质置换成第二液体介质。

[0059] 这里,层流是指在管内流过粘性流体时、流体的各部分与管轴平行地整齐地运动、相邻的流体部分不会相互混合的顺畅的流动。与此相对,将并非层流的流动称作乱流,在乱流中,相邻的流体部分会相互混合。通过利用这种相互间不混合的层流的性质,可以精度良好地进行液体介质的置换。本发明的方法中使用的层流至少含有至少由试样液体构成的第一层流部分和由作为所希望的液体介质的第二液体介质构成的第二层流部分。这里,层流部分是指由规定的液体介质构成、以规定的流速作为整体进行流动的层流。因此,液体介质不同(例如目标粒子以外的含有成分相互间不同的磷酸缓冲液)的情况或者流速不同的情况(液体介质的送液装置不同时,视为是流速不同)下的相互间并列地流动的层流作为各自独立的层流部分看待。另外,即便是液体介质相同、用相同的送液装置对液体介质进行送液的情况下,在由于连接于该送液装置的液体介质导入口分为2个而形成空间上分离的2个层流时,将它们作为各自独立的层流部分(参照图13~图14的导入口32B)。不过,从尽量不打乱层流状态的观点出发,优选不同层流部分的每单位截面积的流速尽量设定为相同。

[0060] 另外,本发明的方法中,目标粒子具有能够通过外力的作用向第二层流部分的方向移动的至少一个物理特性。作为优选的外力,可举出利用电场、磁场、水力过滤或决定性侧向移动(DLD)所产生的外力中的任一种以上,分别与其相对应的目标粒子的物理特性分别是电荷、磁性、粒径。例如,如果是目标粒子具有磁性,则通过在层流平面上、向相对于流动方向呈直角的方向赋予磁场,可以使目标粒子从由试样液体构成的第一层流部分逐渐地向由目标液体介质(第二液体介质)构成的第二层流部分移动。作为流体力学的方法,例如通过在流路设备中设置以DLD为原理的结构,可以根据目标粒子的大小,同样地使其向由目标液体介质(第二液体介质)构成的第二层流部分移动。

[0061] 这种目标粒子的物理特性例如可以利用生物粒子的物理性质其本身,也可以是形成珠粒与生物粒子的复合体粒子时的来自于珠粒物理性质的特性。例如,通过制成珠粒与目标生物粒子的复合体粒子,至少可以调节粒径的尺寸。

[0062] 本发明的液体介质的置换方法更具体地包含下述工序:(i)形成至少含有由试样液体构成的第一层流部分和由第二液体介质构成的第二层流部分的层流的工序;(ii)通过使外力作用而使目标粒子从试样液体向第二液体介质移动的工序;以及(iii)对移动来的目标粒子的层流级分进行回收的工序。

[0063] 图1图示了由试样液体构成的第一层流部分11与由作为所希望的液体介质的第二液体介质构成的第二层流部分12所组成的层流相互间相邻的一例,示出了通过外力F的作用、目标粒子1从第一层流部分11向第二层流部分12移动的情形,此外,图1中,14表示作为垂直于层流的流动方向的平面的层流级分回收面,将通过该面的第二层流部分12的层流级分回收,从而将目标粒子回收。

[0064] 这里,本发明的方法中,层流级分回收面与所述第一层流部分的截面远离。更优选的是,层流级分回收面位于第二层流部分的截面的内部。这是为了在进行层流级分回收时

尽量地避免试样液体的混入。这里,第一层流部分的截面是指垂直于第一层流部分的层流流动方向的截面。另外,对于远离的程度,可以考虑层流级分回收面上的层流状态的混乱或者因层流界面上的扩散所导致的液体介质的移动的影响等来决定。图1所示的一例中,至少层流级分回收面位于垂直于第二层流部分的层流流动方向的截面的内部。

[0065] 另一方面,从获得目标粒子的充分回收率的观点出发,优选确保足以可尽量没有遗漏地回收目标粒子的大小的层流级分回收面。优选设定足以能够回收优选90%以上、更优选95%以上、最优选99%以上的目标粒子的面积的层流级分回收面。因此,通过调节层流的流速或流路长、外力带来的目标粒子的移动速度等、按照层流级分回收面上的目标粒子的分布尽量窄的方式进行设计是有利的。特别有利的是使流路长足够长。

[0066] 作为层流的构成,并非限定于如图1所示的层流部分为2个的情况,还可以根据需为3个以上。

[0067] 例如,通过制成在由试样液体构成的第一层流部分与由所希望的液体介质(第二液体介质)构成的第二层流部分之间设置由任意的其他液体介质(第三液体介质)构成的第三层流部分的结构,可以进一步降低因层流界面上的扩散所导致的液体介质成分的移动的影响,可以减少成分的混杂,在粒子通过第三层流部分的过程中可进行目标粒子以外的混杂物的洗涤。因此,在以更高精度实施液体介质的置换时,更优选设有介于第一层流部分与第二层流部分之间的第三层流部分的构成。

[0068] 作为这种构成之一例,作为一例可举出图2的构成。即,图2中图示使用了在除了由试样液体构成的第一层流部分11、由作为要置换的液体介质的第二液体介质构成的第二层流部分12之外、在第一层流部分与第二层流部分之间进一步含有由第三液体介质形成的第三层流部分13的层流的一例。图11、13及14也包含在该构成的一例中。

[0069] 此外,图2图示了层流级分回收面14与图1同样地位于第二层流部分的截面内部的一例。但是,在该图2的构成例中,由于层流级分14与第一层流部分的截面远离,因此并非必须位于垂直于第二层流部分的层流流动方向的截面的内部,还可以含有垂直于第三层流部分13的层流流动方向的截面的一部分。特别是当第三液体介质与第二液体介质为相同的液体介质时,也可以还含有垂直于第三层流部分13的层流流动方向的截面的一部分。不过,从前述的精度良好地进行液体介质的置换的观点出发,优选层流级分回收面至少与垂直于第二层流部分层流流动方向的截面相同,或者更优选位于所述截面的内部。

[0070] 进而,作为本发明的方法中使用的层流的构成,不仅是图1或图2所示的例子,还可以使追加的层流部分与其他任意的的位置、例如第二层流部分相邻、且在与第一层流部分成相反侧的位置上含有由第三液体介质构成的第三层流部分。在这样的一例中,也有有利的使用方法。例如,对于作为目标粒子的生物粒子,考虑以下情况:使用该生物粒子与珠粒的复合体粒子,作为第二液体介质使用通过pH等的调节使复合体粒子解离而使目标的生物粒子游离那样的液体介质,外力的作用为利用珠粒的性质(例如珠粒所具有的磁性等)产生的作用。在这种情况下,在第二层流部分中游离出的珠粒进一步通过外力的作用向第三层流部分移动,但对于目标的生物粒子本身,外力产生的作用已经不会再起作用,而停留在第二层流部分,因此也可以仅将目标的生物粒子从第二层流部分中直接回收。另外,在这种情况下,层流级分回收面优选:不仅与第一层流部分的截面远离,在用于避免珠粒的混入所需的限度内也与第三层流部分的截面远离。进而,这种情况下的层流级分回收面优选位于第二

层流部分的截面的内部。

[0071] [2.本发明的第二方式的流路设备]

[0072] 优选用于上述1.中说明的本发明第一方式的对液体介质进行置换的方法中的流路设备具备：

[0073] (i) 在流路设备的前方至少含有用于导入试样液体的第一导入口及用于导入第二液体介质的第二导入口的多个导入口；

[0074] (ii) 可以形成层流的流路；

[0075] (iii) 在流路设备的后方至少含有第一排出口及第二排出口的二个以上排出口；以及

[0076] (iv) 赋予外力的机构，

[0077] 其中，

[0078] 流路可以形成至少含有由试样液体构成的第一层流部分、和由第二液体介质构成的第二层流部分的层流，

[0079] 第二排出口是用于将含有通过外力的作用移动至第二层流部分的目标粒子的层流级分从垂直于层流的流动方向的层流级分回收面进行回收的目标粒子回收用排出口，

[0080] 第一排出口从第二排出口观察位于第一层流部分一侧，

[0081] 位于第一层流部分一侧的第二排出口的隔壁配置在使得层流级分回收面与第一层流部分的截面远离的位置上。

[0082] 这里，当第一排出口与第二排出口相互间相邻时，位于第一层流部分一侧的第二排出口的隔壁为将第一排出口与第二排出口之间隔开的隔壁。但是，当在第一排出口与第二排出口之间存在追加的排出口（例如第三排出口）、且所述追加的排出口与第二排出口相邻时，位于第一层流部分一侧的第二排出口的隔壁为将所述追加的排出口与第二排出口之间隔开的隔壁。

[0083] 能够使用的流路只要是具备能够产生层流的机构则无特别限定。不过，当由于所使用的流路宽度或流速等而不产生层流、而是产生乱流（混合流）时，应该在形成层流的条件下进行使用。

[0084] 此外，对于是成为层流还是成为乱流，已知相当于称作雷诺数的惯性力除以粘性力所获得的值的无因次数成为指标。例如，在为圆管内的流动时，将成为层流与乱流的边界的临界雷诺数约为2000~4000左右称作标准。当流体的粘性系数大时或者流速小时，粘性力处于支配地位，向产生层流的方向倾斜。另外，在具有利用了集成电路的微加工技术的微细结构的微（流路）设备中，一般来说，雷诺数小，会形成层流。

[0085] 另外，从层流级分回收面进行回收是指对通过层流级分回收面的层流部分进行回收。

[0086] 以下一边参照附图一边说明本发明的流路设备。

[0087] 图3是从上面观察能够形成由试样液体构成的第一层流部分和由作为所希望的液体介质的第二液体介质构成的第二层流部分所组成的层流的本发明的流路设备的基本结构30之一例的示意图。

[0088] 首先，作为图3的流路设备的入口结构，具备试样液体导入口31及液体介质（第二液体介质）导入口32A。另外，作为图3的流路设备的流体的出口结构，主要具备排出试样液

体的第一排出口41及排出目标液体介质(第二液体介质)的第二排出口42A。此外,对于导入入口或排出口的数量,并不限于如图1所示那样必须分别为2个,可根据需要设置更多的导入入口及排出口。

[0089] 另外,还如图3所示,在流路设备的试样液体导入口31及液体介质导入口32A与第一排出口41及第二排出口42A之间具有赋予使目标粒子移动的外力的机构F。通过该机构,可以在层流平面上、使试样液体中所含的目标粒子向垂直于流动方向的方向移动。

[0090] 作为赋予外力的机构F,可以是沿着流路、一定的、相同设计的机构连续,还可以根据目的适当组合方法、设定沿着流路逐渐地改变设计的机构。该外力如前所述,优选为利用电场、磁场、水力过滤或决定性侧向移动(DLD)所产生的外力中的任一种以上,但只要是能够使目标粒子移动,则并非特别限定于这些。

[0091] 此外,图3中还图示了位于垂直于层流流向的平面上的层流级分回收面14。隔壁43按照该层流级分回收面14与第一层流部分的截面15远离的方式设置。这是为了避免目标的液体介质以外的液体介质的混入。为图3所示的一例时,层流级分回收面14位于第二层流部分的截面的内部。

[0092] 不过,对于层流级分回收面14,从在尽量不遗漏目标粒子的情况下进行回收的观点出发,优选设定足够面积的层流级分回收面。因此,通过调节层流的流速或流路长、利用外力带来的目标粒子的移动速度等、按照层流级分回收面上的目标粒子的分布尽量狭窄的方式进行设计是有利的。特别有利的是使流路长足够长。

[0093] 图4图示了按照图3的流路设备的2个导入口及2个排出口分别独立的方式设有隔壁结构的流路设备之一例。对于从试样液体导入口31向流路设备40内的入口部分的结构,由于需要使试样液体作为与所希望的液体介质(第二液体介质)的层流进行流动,因此优选设置图示那样的各自独立的隔壁结构。从试样液体导入口31送液的试样液体一边与从液体介质导入口32A送液的第二液体介质(典型地为缓冲液)保持层流(平行于流动方向形成层的流动),一边进行流动,目标粒子随着前述的赋予外力的机构、向相对于流动方向为斜向的方向移动,从而从试样液体层流部分向作为目标液体介质的第二液体介质层流部分移动。另一方面,对于目标粒子以外的部分,随着试样液体的层流部分(第一层流部分)的流动,整体上向前流动。

[0094] 如此,从更有效地进行液体介质的置换的目的出发,垂直于流路设备平面上的层流流向的方向上的试样液体导入口31的位置优选并非是同方向上的第二排出口42A一侧、而是靠近同方向上的第一排出口41一侧地进行设置。

[0095] 同样地,垂直于流路设备平面上的层流流向的方向上的液体介质(第二液体介质)导入口32A的位置优选并非是同方向上的第一排出口41一侧、而是靠近同方向上的第二排出口42A一侧地进行设置。

[0096] 另外,为了调整所排出的液量,第一排出口41及第二排出口42A的结构可以根据目的适当改变设计。例如,当按照从附图上部至下部为1:1间隔的方式设置排出口附近的隔壁43时(第一层流部分与第二层流部分的流速相同时, $x_2:y_2=1:1$ 、图4),由各个排出口获得的液量大概成为1:1。与此相对,同样地按照9:1的间隔设置隔壁43时,可以将由第二排出口42A获得的液量浓缩至大概10倍(第一层流部分与第二层流部分的流速相同时, $x_2:y_2=9:1$ 、图4)。如此,不仅可根据用途用于目标粒子的液体介质的置换,还可以用于液量的浓缩。

[0097] 同样地,由于通过也适当变更导入口(例如调节图4的隔壁44的位置等)、所使用的液量的比例(第一层流部分与第二层流部分的流速相同时为 $x1:y1$)也可变更,因此在想要减少使用液量时等是有效的。

[0098] 另外,对于根据目的构成3个以上的层流部分的情况,如图5所示,可以制成下述结构:在试样液体层流部分(第一层流部分)与目标液体介质(第二液体介质)层流部分(第二层流部分)之间设置另外的液体介质(第三液体介质)层流部分(第三层流部分)。

[0099] 此时,可以适当设定作为第三液体介质的导入口的液体介质(第三液体介质)导入口32B及排出该第三液体介质的第三排出口42B。液体介质导入口32B从本方法的目的出发,适合存在于试样液体导入口31及液体介质(第二液体介质)导入口32A之间。与此相对,对于第三排出口42B,由于可以一并利用第一排出口41进行代替,因此并非必须进行设置。不过,从本发明的目的出发,为了最小限度地抑制其他液体介质混入到目标液体介质(第二液体介质)中,优选如上所述不将第二排出口42A与其他液体介质进行共用。

[0100] 同样地,对于根据目的制成使层流部分的个数为4、5、……、 n 个以上的构成的情况,可以适当设定这些液体介质各自的层的导入口及排出该另外的液体介质的排出口。另外,同样地,这些液体介质(第二液体介质以外的追加的液体介质)导入口优选存在于试样液体导入口31及液体介质(第二液体介质)导入口32A之间,但并非必须那样。另一方面,对于追加的液体介质用排出口,由于也可以利用作为第二液体介质排出口的排出口以外的排出口(例如第一排出口)进行代替,因而并非必须设置追加的排出口。

[0101] 此外,图5中,与图3或图4同样,图示了按照层流级分回收面14为第二层流部分的截面内部的方式设有排出口侧隔壁43的一例,但这不过是优选方式之一例。图5的例子中,由于在第二层流部分与由试样液体构成的第一层流之间存在第三层流部分,因此只要层流级分回收面14与第一层流部分的截面远离,则排出口侧隔壁43也可以偏向第三层流部分一方地进行设置。不过,从更为精密地对液体介质进行置换的观点出发,优选层流级分回收面尽量多地与第一层流部分的截面远离,优选在第二层流部分的截面的内部。

[0102] 图6为本发明实施方式的流路设备之一例的垂直方向截面的示意图。

[0103] 流路设备40可以通过具备各个导入口、排出口结构部等形状的流路结构部50与平面结构部51的接合来制成,在其空间中具有流路空间53。另外,在各个试样液体导入口31、液体介质(第二液体介质)导入口32A、第一排出口41、第二排出口42A部分上适当接合管子,通过设置与注射器等的接合部,也可以适当加以变更进行使用。

[0104] 流路空间53的高度只要是设定为目标粒子能够通过的高度则无任何限定。

[0105] 流路结构部50的构件及流路结构的制作方法可以适当选择公知的任一种方法进行制作。作为构件的材料,例如可以使用玻璃、有机硅、二甲基聚硅氧烷、塑料等。

[0106] 另外,对于平面结构部51,只要是平坦且能够与流路结构部50接合的材料则无特别限定,优选使用具有强度的玻璃、塑料等。

[0107] 此外,本流路设备40只要具备各个流路结构及导入口、排出口结构部等的形状、形成流路空间即可,例如还可以制成在图示的平面结构部51侧的构件中具备各个流路结构及导入口、排出口结构部等形状的结构。

[0108] 图7为说明本发明实施方式的具备送液部及回收部的流路装置之一例的示意图。

[0109] 流路装置80是在流路设备40上具备多个送液部及回收部的装置。图7图示了在试

样液体导入口31上设有试样液体送液部81、在液体介质导入口32A上设有液体介质送液部82A、在第一排出口41上设有第一回收部91、在第二排出口42A上设有第二回收部92A的例子。

[0110] 试样液体送液部81与液体介质送液部82A可以各自具有具备送液体系的机构,能够以恒定的速度进行各自独立的送液。这些只要是能够以恒定的速度进行送液的机构则无特别限定,例如优选利用注射泵等进行送液。另外,还可以根据需要在试样液体送液部81中具备用于防止粒子的沉淀及凝聚的搅拌机构。

[0111] 关于第一回收部91、第二回收部92A,只要是能够回收排出液的机构则无特别限定,也可以具备在马上要开始前、开始后立即可进行排出液的分级的机构等。

[0112] 与上述同样,对于根据目的制成4、5、……、n层以上的构成的情况,可以适当设定各液体介质的导入口及排出口,可适当设置与它们分别对应的送液部及回收部。

[0113] 进而,还可以制成将多个本发明的流路设备串联连接而成的流路设备体系。串联连接例如可以将一个流路设备的第二排出口与成为串联连接的对方的另一个流路设备的第一导入口连接来形成。另外,可以使应用于所用多个流路设备的外力的机构或外力的强度相互间不同。由此,可以使目标粒子更为精密地移动。

[0114] 例如,作为目标粒子进行生物粒子的分离时,考虑下述情况:使用生物粒子与珠粒的复合体粒子,且作为第二液体介质使用通过pH等的调节使复合体粒子解离而使目标的生物粒子游离那样的液体介质,外力的作用是利用珠粒的性质(例如珠粒所具有的磁性或大小等)所产生的作用。在这种情况下,通过将在第二层流部分中游离的生物粒子和珠粒进一步导入到串联连接的另一个流路设备中,从而通过该另一个流路设备中的外力的作用而仅使珠粒移动,还可以仅将目标的生物粒子直接回收。这种情况下,在所述另一个流路设备中,未形成复合体的生物粒子的回收从第一层流部分进行。另外,此时的所述另一个流路设备中的层流级分回收面优选与第二层流部分的截面远离,更优选位于第一层流部分的截面的内部。

[0115] [3.用于使本发明的实施例中使用的粒子移动的外力]

[0116] 接着,以下对作为使在本发明实施例中具体使用的目标粒子移动的外力的决定性侧向移动(DLD)原理进行说明。

[0117] [3-1.决定性侧向移动(DLD)]

[0118] 决定性侧向移动(DLD)是指利用下述性质实现根据尺寸的分类的方法:在粒子的分散液流向稍稍错开的柱状结构(柱状物)时,较大的粒子因在柱状物周围产生的流动的变化而斜向地流动,而较小的粒子乘着层流大体上直线地前进的性质(参照非专利文献1、图8)。

[0119] 使用将规则的障碍物(微柱状物)错开地配置的流路,较小的粒子乘着流动前进,而较大的粒子随着在障碍物周围产生的流动的变化,沿着障碍物的错开斜向地前进。因此,对于目标粒子,通过应用本方法可以赋予层间移动的外力。

[0120] [3-2.DLD原理中向斜方向移动的粒子直径的阈值]

[0121] 根据非专利文献1记载的DLD原理,可以设定向斜方向移动的粒子直径的阈值(Dc)。更具体地说,阈值Dc的设定可以由下式1求得。

[0122] $D_c = 2\eta G \varepsilon$ (式1)

[0123] 其中,

[0124] D_c :向斜方向移动的粒子直径的阈值

[0125] η :变量

[0126] G :柱状物间的间隙

[0127] ϵ :柱状物的错开角度($\tan\theta$)

[0128] 然后,解上述式1则获得下述的近似式2。

[0129] $D_c = 1.4G\epsilon^{0.48}$ (式2)

[0130] 出于经验规则,为 $0.06 < \epsilon < 0.1$ 左右时分离是良好的,因此使用

[0131] $\epsilon = \tan\theta = 1/15 = 0.067$

[0132] 可以导出以下的关系式3。

[0133] $G \approx 2.62057D_c$ (式3)

[0134] 然后,由上述式3,根据向斜方向移动的粒子直径的阈值 D_c ,算出柱状物间的间隙 G ,从而可以制作具有设置了特定柱状物间间隙的柱状物(障碍物结构)的结构部分的流路设备。

[0135] 如此,可以制作带有具有目标阈值 D_c 的DLD微流路的流路设备。

[0136] 作为例子,可以制成如图9所示、作为使目标粒子移动的外力设有以所述DLD为基本结构的DLD结构部分101的流路设备100来进行使用。另外,将截面示于图10中。

[0137] 此外,作为除了粒子直径的阈值以外的用于更为有效地进行液体介质的置换的因子,重要的是流路长。向侧方的移动距离由于与流路长成比例,因此流路长越长越优选。

[0138] 以上详细叙述了本发明的实施方式,但实际上并非限定于上述实施方式,即便是不脱离本发明主旨的范围的变更也包含在本发明内。

[0139] 实施例

[0140] 本实施例中,目的在于混悬液中所含的 $30\mu\text{m}$ 珠粒、或珠粒与生物粒子的复合体粒子的分离及液体介质的置换。

[0141] (制作例1)流路设备的制作

[0142] 根据决定性侧向移动(DLD)法的原理,使用二甲基聚硅氧烷(PDMS),制作具有将粒径 $30\mu\text{m}$ 设为分离阈值 D_c 的决定性侧向移动(DLD)结构的流路设备。

[0143] 具体地说,在下述式:

[0144] $G \approx 2.62057D_c$

[0145] 中代入 $D_c = 30\mu\text{m}$ 而获得 $G = 78.6\mu\text{m}$,由此将直径为 $15\mu\text{m}$ 的柱状物以间隔 $78.6\mu\text{m}$ 进行排列,另外由于优选的分离条件:

[0146] $\epsilon = \tan\theta = 1/15$

[0147] 成为具有该柱状物以15段错开1列配置的基本结构的设备。

[0148] 另外,流路空间的高度为 $50\mu\text{m}$ 。

[0149] 更具体地说,按照具有上述基本结构的方式,使用掩模制作抗蚀剂模具之后,对二甲基聚硅氧烷(PDMS)进行模塑,制作柱状物以等间隔配置的PDMS制流路,制成具有微柱状物结构的DLD微流路的流路结构部50。

[0150] 然后,在该流路结构部50的两端中的一端上开气孔,设置试样液体(第一液体介质+目标粒子)导入口31和液体介质(第二液体介质)导入口32A,在另一端上设置第一排出口

41和第二排出口42A。这里,考虑到即便是在排出口附近产生极微小的乱流时也不会使试样液体直接从第一层流部分混入到回收层流级分中,在垂直于层流的流动方向的第二排出口42A的层流级分回收面与由试样液体构成的第一层流部分的截面远离的位置上设置第一排出口41与第二排出口42A之间的隔壁43。

[0151] 接着,使该流路结构部50接合在作为平面结构部51的玻璃基板上,使得在流路结构部与玻璃基板之间的空间中形成流路空间52。

[0152] 然后,在试样液体导入口31和缓冲液液体介质导入口32A、以及第一排出口41和第二排出口42A上安装管子,制作具备送液装置的流路设备。

[0153] 以下的实施例1~3中使用该流路设备。

[0154] 此外,该流路设备的第一层流部分与第二层流部分的流路宽度之比($x_1:y_1$ 、图4)约为1:1。

[0155] (实施例1)

[0156] 准备作为试样液体的混悬有作为目标粒子的 $30\mu\text{m}$ 珠粒样品的第一液体介质[含5%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸缓冲液(PBS)]、作为第二液体介质的磷酸缓冲液(PBS),使用制作例1中制作的流路设备,使该珠粒样品从第一液体介质移动至第二液体介质,从而尝试进行液体介质的置换。

[0157] 首先,在送液所述试样液体及第二液体介质之前,事先自试样液体导入口31及液体介质导入口32A通入含0.05%聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯(Tween)的磷酸缓冲液(PBS),将气泡从流路中除去之后,分别通入磷酸缓冲液(PBS),用作为第二液体介质的磷酸缓冲液(PBS)将流路设备内充满。

[0158] 接着,分别使用注射泵以 $10\mu\text{L}/\text{min}$ 的恒定速度将试样液体送液至试样液体导入口31、将第二液体介质从液体介质导入口32A送液,确认到形成由试样液体所构成的第一层流部分及第二液体介质所构成的第二层流部分组成的层流。

[0159] 分别在显微镜下观察自第一排出口41获得的排出液、及自第二排出口42A获得的排出液时,通过显微镜下的观察确认到自第一排出口41获得的排出液中不含 $30\mu\text{m}$ 珠粒、自第二排出口42A获得的排出液(回收层流级分)中含有 $30\mu\text{m}$ 珠粒。

[0160] 然后,对于各个排出液上清,利用二喹啉甲酸(BCA)分析进行蛋白质的定量时,从自第一排出口41获得的排出液的上清中检测到含有约5%的蛋白质,从自第二排出口42A获得的排出液的上清中基本未检测到。

[0161] 如上所述,对于分散在第一液体介质中的 $30\mu\text{m}$ 珠粒样品,通过使用制作例1的流路设备使其移动到第二液体介质中,确认到实现了液体介质的置换。

[0162] (比较例1)

[0163] 取混悬在含5%BSA的PBS中的 $30\mu\text{m}$ 珠粒样品于管子中,以 $1000\times g$ (重力加速度)进行离心分离后添加PBS,进行液体介质的置换。结果, $30\mu\text{m}$ 珠粒的量产生损失,且进行BCA(二喹啉甲酸)分析时,从其上清中检测到微量的蛋白质。

[0164] (实施例2)

[0165] 对于在含5%BSA的PBS(第一液体介质)中以 $10\text{ng}/\text{mL}$ 浓度混悬的癌胚抗原(CEA、型号“HISCL CEA Calibrator”、KAINOS公司),使标记有抗CEA单克隆抗体的 $30\mu\text{m}$ 珠粒样品与其反应,形成复合体粒子。

[0166] 对于由此获得的试样液体,与实施例1同样地使用在制作例1中制作的流路设备,使所述复合体移动至另外准备的PBS(第二液体介质)中,从而尝试进行液体介质的置换。

[0167] 首先,在对试样液体及PBS进行送液之前,事先从试样液体导入口31及液体介质导入口32A通入含0.05%Tween的PBS缓冲液,将气泡从流路中除去,将设备内充满。

[0168] 接着,分别使用注射泵以10 μ L/min的恒定速度将试样液体送液至试样液体导入口31、将PBS从液体介质导入口32A送液,确认到形成由试样液体所构成的第一层流部分及第二液体介质所构成的第二层流部分组成的层流。

[0169] 分别在显微镜下观察自第一排出口41获得的排出液、及自第二排出口42A获得的排出液时,通过显微镜下的观察确认到自第一排出口41获得的排出液中不含30 μ m珠粒、自第二排出口42A获得的排出液中含有30 μ m珠粒。

[0170] 然后,对于各个排出液上清,利用BCA分析进行蛋白质的定量时,从自第一排出口41获得的排出液的上清中检测到含有约5%的蛋白质,从在自第二排出口42A获得的排出液的上清中基本未检测到。

[0171] 如上所述,对于30 μ m珠粒复合体,通过使用制作例1的流路设备使其移动到第二液体介质中,确认到将第一液体介质置换成了PBS。

[0172] 此外,本实施例中使用的抗原的尺寸由于比珠粒的尺寸小得多,因此即便如本实施例那样形成复合体粒子,复合体粒子的尺寸也不会与珠粒自身的尺寸有很大不同。

[0173] (比较例2)

[0174] 从与上述同样的目的出发,对于在含5%BSA的PBS中以10ng/mL浓度混悬的CEA抗原(型号“HISCL CEA Calibrator”、KAINOS公司),使标记有抗CEA单克隆抗体的30 μ m珠粒样品与其发生反应,形成复合体。

[0175] 取由此获得的试样液体于管子中,以1000 \times g进行离心分离后添加PBS,进行液体介质的置换。结果,30 μ m珠粒的量产生损失,且进行BCA(二喹啉甲酸)分析时,从其上清中检测到微量的蛋白质。

[0176] (实施例3)

[0177] 本实施例出于下述目的进行:将混入到全血中的人乳腺癌来源细胞(MCF-7)分离,使其移动到另外准备的PBS(第二液体介质)中,从而将全血(第一液体介质)置换成PBS。

[0178] 首先,将事先作为探针使用有核细胞染色试剂(Hoechst 33342 solution: Takara-bio)进行了染色的人乳腺癌来源细胞(MCF-7: DS PHARMA BIOMEDICAL)添加到用PBS进行了稀释的正常全血内,制成试样样品。

[0179] 对该试样样品,作为对象捕获分子,添加搭载有针对人上皮细胞粘附分子(EpCAM)的单克隆抗体(抗EpCAM抗体)的粒径为30 μ m的抗EpCAM抗体标记珠粒[CD326(EpCAM), Human, pluriBeads, s-beads: pluriselect],在室温下一边搅拌一边孵育,形成复合体,获得试样液体。

[0180] 对于该试样液体,使用制作例1中制作的流路设备,使所述复合体向另外准备的PBS(第二液体介质)中移动,从而尝试进行液体介质的置换。

[0181] 首先,预先用含1%BSA的PBS将设备充满,分别使用注射泵以10 μ L/min的恒定速度将试样液体送液至试样液体导入口31、将PBS从液体介质导入口32A送液,确认到形成由试样液体所构成的第一层流部分及PBS所构成的第二层流部分组成的层流。

[0182] 分别在荧光显微镜下观察自第一排出口41获得的排出液、及自第二排出口42A获得的排出液时,观察到自第一排出口41获得的排出液中不含30 μm 珠粒及该珠粒与细胞的复合体,而观察到血细胞及血液成分。另外,通过荧光显微镜下的观察确认到第二排出口42A获得的排出液中含有30 μm 珠粒及该珠粒与细胞的复合体。

[0183] 如上所述,对于30 μm 珠粒复合体,通过使用制作例1的流路设备使其移动到PBS中,确认到将第一液体介质置换成了PBS。

[0184] 此外,本实施例中使用的MCF-7细胞的尺寸小于30 μm ,作为分离的阈值采用30 μm 时,仅形成了与30 μm 珠粒的复合体粒子的细胞发生侧向移动,当有珠粒未结合的细胞时,该未结合的细胞不会发生侧向移动、而是从第一排出口41流出。因此,从使损失为最小限度、提高回收率的观点出发,优选过剩地使用珠粒等尽量不残留试样液体中的细胞地形成与珠粒的复合体粒子。

[0185] (比较例3)

[0186] 从上述同样的目的出发,取实施例3中制备的试样液体于管子中,以1000 \times g进行离心分离后添加PBS,进行液体介质的置换。与实施例3相比,30 μm 珠粒及其细胞复合体的量产生损失,而且发生红细胞等的混入,无法精度良好地将目标的复合体粒子置换到PBS液体介质中。

[0187] (制作例2)

[0188] 接着,设计具备与制作例1中制作的流路设备相同的微柱状物结构、但导入口由3个组成的图11~图14所示的设备,按照相同的制作方法制作设备。

[0189] 以下在实施例4~6中使用本流路设备。

[0190] 此外,如图14所示也可知,该流路设备中,由试样液体构成的第一层流部分专门从第一排出口41排出,在对含有目标粒子的层流级分进行回收的第二排出口42A与第一排出口41之间存在第三排出口42B,因此层流级分回收面与第一层流部分的截面明显地远离很远。

[0191] 作为层流形成的确认,首先事先将含0.05% Tween的PBS自试样液体导入口31及2个液体介质导入口32A及32B通入,将气泡从流路中除去之后,分别通入PBS,利用PBS将流路设备内充满。

[0192] 接着,使用注射泵以10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的恒定速度从试样液体导入口31送液含5% BSA的PBS,使用注射泵以10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的恒定速度从液体介质导入口32A送液PBS,使用注射泵以达到10倍量的100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的恒定速度从液体介质导入口32B送液超纯水。

[0193] 形成了图14所示的层流,其由试样液体所构成的第一层流部分、分别位于该第一层流部分两侧的超纯水所构成的第三及第四层流部分、及PBS所构成的第二层流部分组成。

[0194] 此外,将自液体介质导入口32B的送液速度设定为自液体介质导入口32A的送液速度的10倍是考虑到通过使送液量为与流路体积成比例的量而使层流整体的流速达到一样。

[0195] 以下,以该送液量比例实施实验。

[0196] (实施例4)

[0197] 与实施例1同样地准备作为试样液体的混悬有作为目标粒子的30 μm 珠粒样品的第一液体介质(含5% BSA的PBS)、作为第二液体介质的PBS。

[0198] 然后,使用由制作例2制作的流路设备,使该珠粒样品从第一液体介质移动至第二

液体介质,从而尝试进行液体介质的置换。

[0199] 首先,在对样品及PBS进行送液之前,事先自试样液体导入口31及2个液体介质导入口32A及32B通入含0.05%Tween的PBS缓冲液,将气泡从流路中除去后,分别通入PBS,用PBS将流路设备内充满。

[0200] 接着,使用注射泵以10 μ L/min的恒定速度将试样液体送液至试样液体导入口31,使用注射泵以10 μ L/min的恒定速度将PBS送液至液体介质导入口32A,使用注射泵以100 μ L/min的恒定速度从32B送液PBS,确认到层流的形成。

[0201] 之后,分别在显微镜下观察自第一排出口41获得的排出液、及自第二排出口42A获得的排出液时,通过显微镜下的观察确认到自第一排出口41获得的排出液中不含30 μ m珠粒、自第二排出口42A获得的排出液中含有30 μ m珠粒。

[0202] 另外,自第三排出口42B获得的排出液中不含30 μ m珠粒。

[0203] 然后,对于各个排出液上清,利用BCA分析进行蛋白质的定量时,从自第一排出口41获得的排出液的上清中检测到含有约1%的蛋白质,从自第二排出口42A获得的排出液的上清中基本未检测到。

[0204] 另外,显示了与实施例1的结果相比更低的值。

[0205] 如上所述,对于分散在第一液体介质中的30 μ m珠粒样品,通过使用制作例2的流路设备使其移动到PBS中,确认到精度更好地实现了液体介质的置换。

[0206] (实施例5)

[0207] 与实施例2同样地,对于在含5%BSA的PBS(第一液体介质)中以10ng/mL浓度混悬的癌胚抗原(CEA、型号“HISCL CEA Calibrator”、KAINOS公司),使标记有抗CEA单克隆抗体的30 μ m珠粒样品与其发生反应,形成复合体粒子。

[0208] 对于由此获得的试样液体,与实施例4同样地使用制作例2中制作的流路设备,使所述复合体粒子移动至另外准备的PBS(第二液体介质)中,从而尝试进行液体介质的置换。

[0209] 首先,在对试样液体及PBS进行送液之前,事先自试样液体导入口31及2个液体介质导入口32A及32B通入含0.05%Tween的PBS,将气泡从流路中除去,将设备内充满。

[0210] 接着,分别使用注射泵以10 μ L/min的恒定速度将试样液体送液至试样液体导入口31、将PBS送液至液体介质导入口32A,使用注射泵以100 μ L/min的恒定速度自液体介质导入口32B送液PBS,确认到层流的形成。

[0211] 分别在显微镜下观察自第一排出口41获得的排出液、及自第二排出口42A获得的排出液时,通过目视确认到自第一排出口41获得的排出液中不含30 μ m珠粒、自第二排出口42A获得的排出液中含有30 μ m珠粒。另外,自第三排出口42B获得的排出液中不含30 μ m珠粒。

[0212] 然后,对于各个排出液上清,利用BCA分析进行蛋白质的定量时,从自第一排出口41获得的排出液的上清中检测到含有约1%的蛋白质,从自第二排出口42A获得的排出液的上清中基本未检测到。另外,显示了与实施例2的结果相比更低的值。

[0213] 如上所述,对于30 μ m珠粒复合体粒子,通过使用制作例2的流路设备使其向PBS中移动,确认到精度更好地将第一液体介质置换成了PBS。

[0214] (实施例6)

[0215] 与实施例3同样地,本实施例以下述目的进行:将混入到全血中的人乳腺癌来源细胞(MCF-7)分离,使其移动到另外准备的PBS(第二液体介质)中,从而将全血(第一液体介

质) 置换成PBS。

[0216] 首先,将事先作为探针使用有核细胞染色试剂(Hoechst 33342 solution: Takara-bio)进行了染色的人乳腺癌来源细胞(MCF-7:DS PHARMA BIOMEDICAL)添加到用PBS进行了稀释的正常全血内,制成试样样品。

[0217] 对该试样样品,作为对象捕获分子,添加搭载有针对EpCAM的单克隆抗体(抗EpCAM抗体)的粒径为30 μ m的抗EpCAM抗体标记珠粒[CD326(EpCAM),Human,pluriBeads、s-beads: pluriselect],在室温下一边搅拌一边孵育,形成复合体粒子,获得试样液体。

[0218] 对于该试样液体,使用制作例2中制作的流路设备,使所述复合体粒子向另外准备的PBS(第二液体介质)中移动,从而尝试进行液体介质的置换。

[0219] 首先,预先用含1%BSA的PBS将流路设备充满,分别使用注射泵以10 μ L/min的恒定速度将试样液体送液至试样液体导入口31、将PBS从液体介质导入口32A送液,使用注射泵以100 μ L/min的恒定速度将含1%BSA的PBS从液体介质导入口32B送液。

[0220] 分别在荧光显微镜下观察自第一排出口41获得的排出液、及自第二排出口42A获得的排出液时,观察到自第一排出口41获得的排出液中不含30 μ m珠粒,而观察到血细胞及血液成分。

[0221] 另外,通过荧光显微镜下的观察确认到自第二排出口42A获得的排出液中含有30 μ m的珠粒及该珠粒与细胞的复合体粒子。确认到与实施例3的结果相比精度更为良好地减少了血液成分(红细胞或白细胞等)的混入的情形。

[0222] 另外,自第三排出口42B获得的排出液中不含30 μ m的珠粒及该珠粒与细胞的复合体粒子。

[0223] 如上所述,对于混入在全血中的30 μ m珠粒复合体粒子,通过使用制作例2的流路设备使其移动到PBS中,确认到精度更好地将第一液体介质置换成了PBS。

[0224] (实施例7)

[0225] 进一步与实施例6同样地,本实施例以下述目的进行:将混入到全血中的人乳腺癌来源细胞(MCF-7)分离,使其移动到另外准备的含10%FBS的DMEM培养基(第二液体介质)中,从而将全血(第一液体介质)置换成含10%FBS的DMEM培养基(第二液体介质)。

[0226] 即,对于实施例6中制备的试样液体,使用制作例2中制作的流路设备,使复合体粒子移动至另外准备的含10%FBS的DMEM培养基(第二液体介质)中,从而尝试进行液体介质的置换。

[0227] 首先,预先用含1%BSA的PBS将流路设备充满,分别使用注射泵以10 μ L/min的恒定速度将试样液体送液至试样液体导入口31、将含10%FBS的DMEM培养基自液体介质导入口32A送液,使用注射泵以100 μ L/min的恒定速度将含1%BSA的PBS自液体介质导入口32B送液,确认到层流的形成。

[0228] 分别在显微镜下观察自第一排出口41获得的排出液、及自第二排出口42A获得的排出液时,观察到自第一排出口41获得的排出液中不含30 μ m珠粒,而观察到血细胞及血液成分。

[0229] 另外,通过显微镜下的观察确认到自第二排出口42A获得的排出液中含有30 μ m的珠粒及该珠粒与细胞的复合体。

[0230] 另外,自第三排出口42B获得的排出液中不含30 μ m的珠粒及该珠粒与细胞的复合

体粒子。

[0231] 如上所述置换到含10%FBS的DMEM培养基中的珠粒及其与细胞的复合体粒子不用再次置换液体介质、而且不用进行稀释即可直接供至培养。

[0232] 产业上的可利用性

[0233] 本发明的液体介质的置换方法及设备可以利用于研究用途、诊断用途、医药品的制造等中的核酸、蛋白质、细胞等的分离及精制。

[0234] 符号说明

[0235] 1 目标粒子

[0236] 11 第一层流部分(含有经分散的目标粒子的第一液体介质)

[0237] 12 第二层流部分(接收目标粒子的第二液体介质)

[0238] F 外力

[0239] 13 第三层流部分(第三液体介质)

[0240] 14 层流级分回收面

[0241] 15 第一层流部分的(垂直于层流流动的)截面

[0242] 30 流路设备的基本结构之一例

[0243] 31 试样液体导入口(含有经分散的目标粒子的第一液体介质)

[0244] 32A 液体介质导入口(接收目标粒子的第二液体介质)

[0245] 41 第一排出口

[0246] 42A 第二排出口(含目标粒子的层流级分回收用排出口)

[0247] 40 流路设备的其他结构之一例

[0248] 43 排出口侧隔壁

[0249] 44 导入口侧隔壁

[0250] 32B 液体介质导入口(第三液体介质)

[0251] 42B 第三排出口

[0252] 50 流路结构部

[0253] 51 平面结构部

[0254] 53 流路空间

[0255] 81 试样液体送液部

[0256] 82A 液体介质送液部(第二液体介质送液部)

[0257] 91 第一回收部

[0258] 92A 第二回收部(含目标粒子的层流级分回收部)

[0259] 100 实施例中使用的流路设备

[0260] 101 决定性侧向移动(DLD)结构部分

[0261] x1 第一层流部分的宽度

[0262] y1 第二层流部分的宽度

[0263] x2 第一排出口的排出宽度

[0264] y2 第二排出口的排出宽度

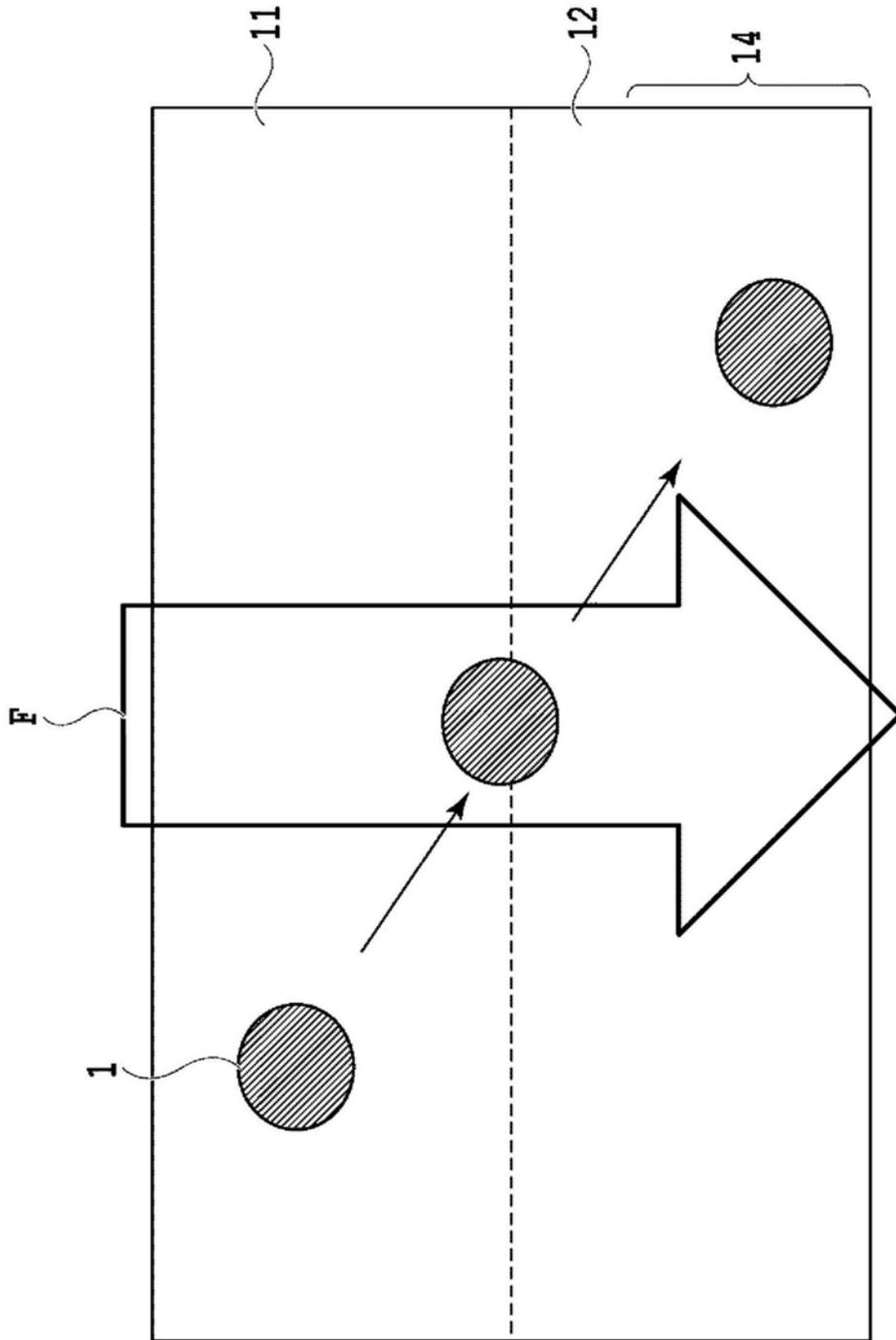


图1

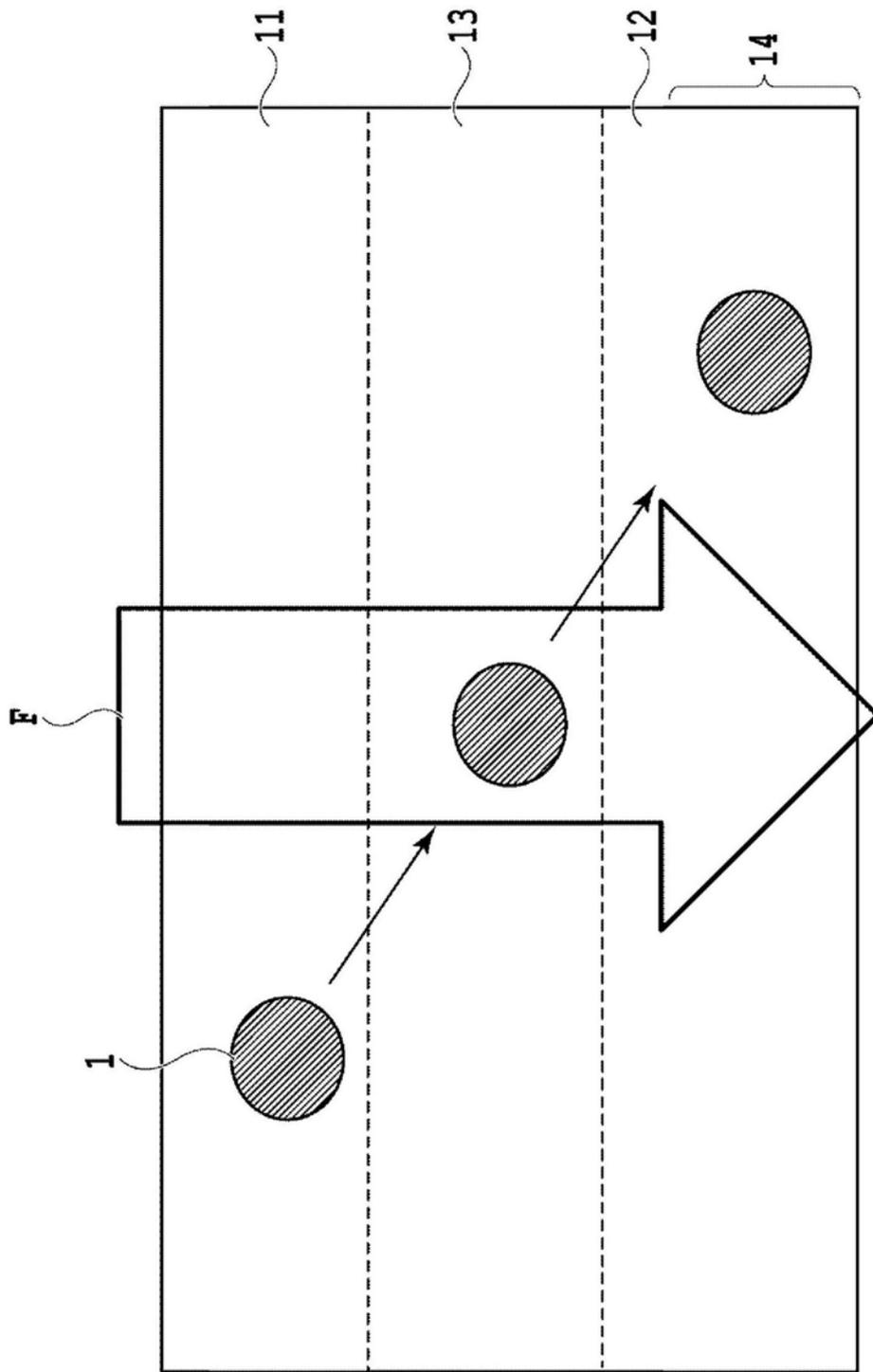


图2

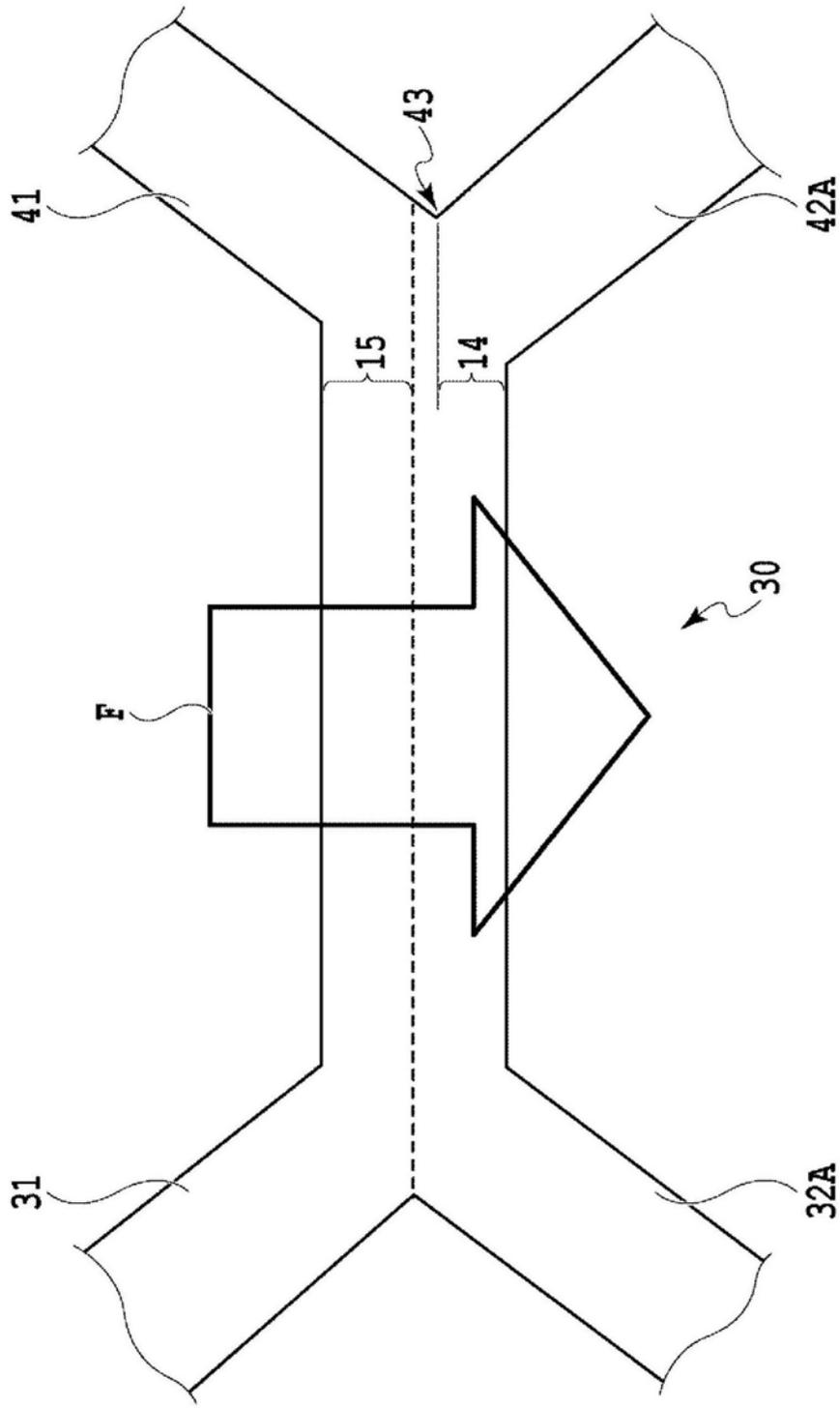


图3

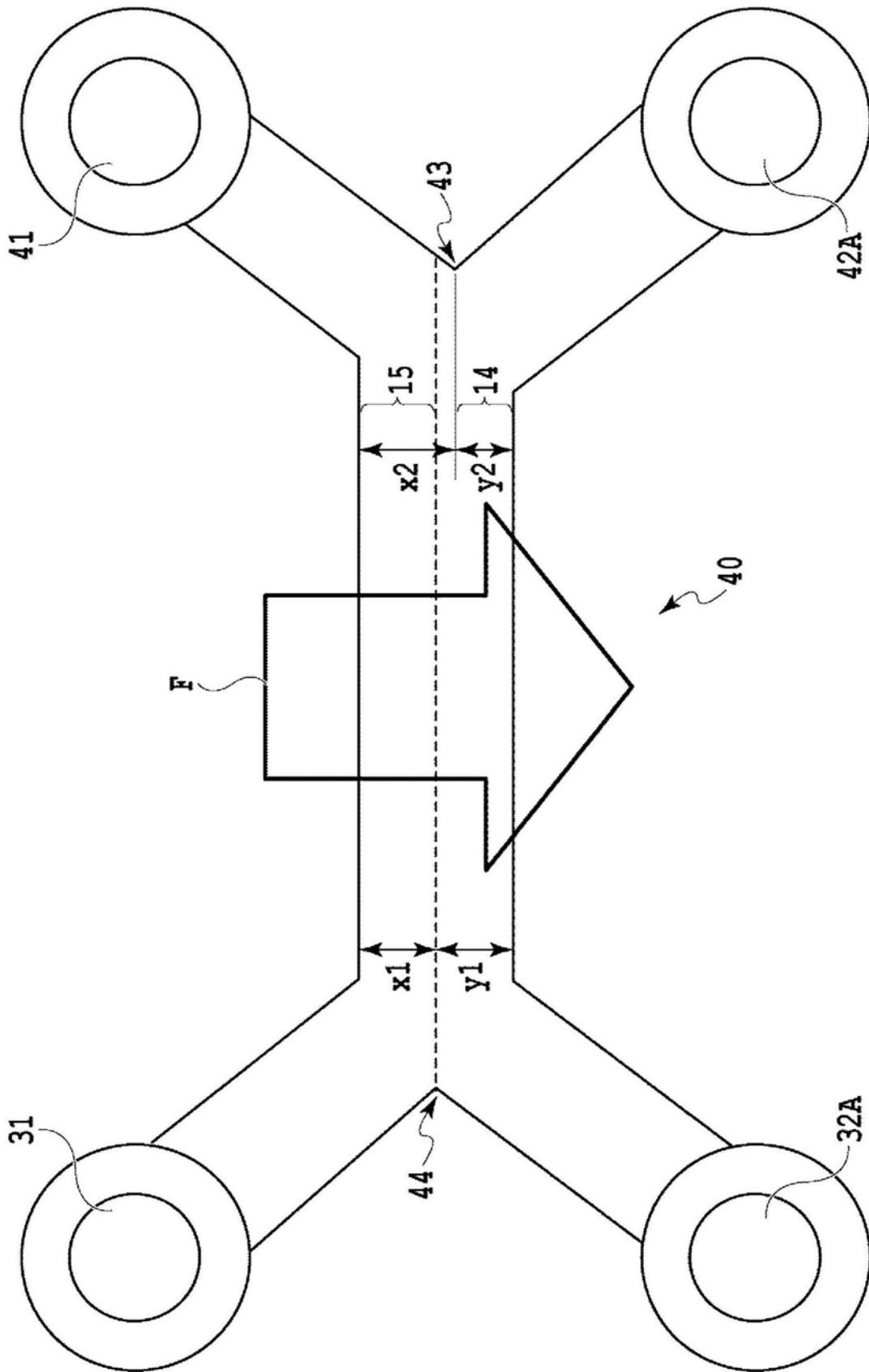


图4

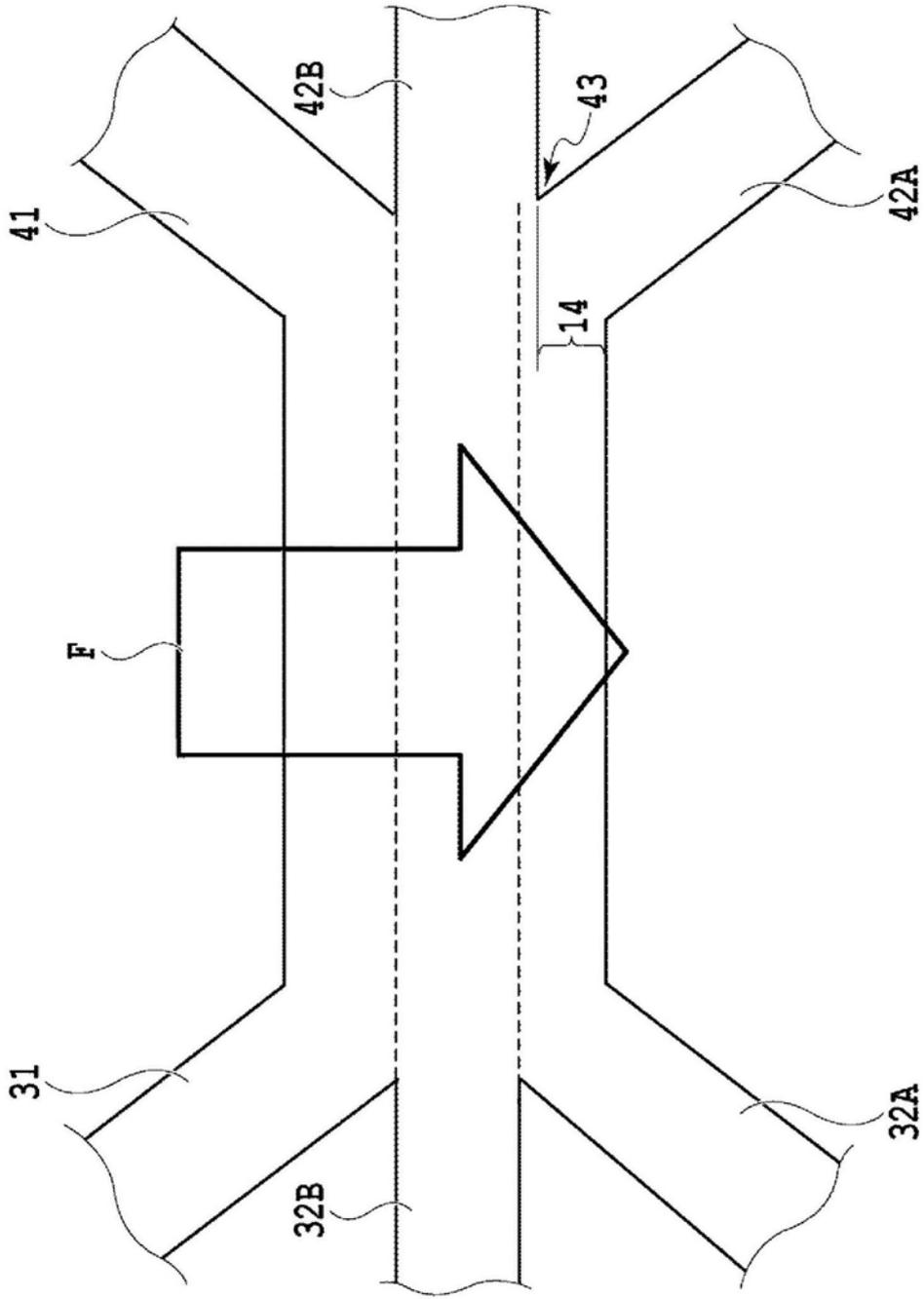


图5

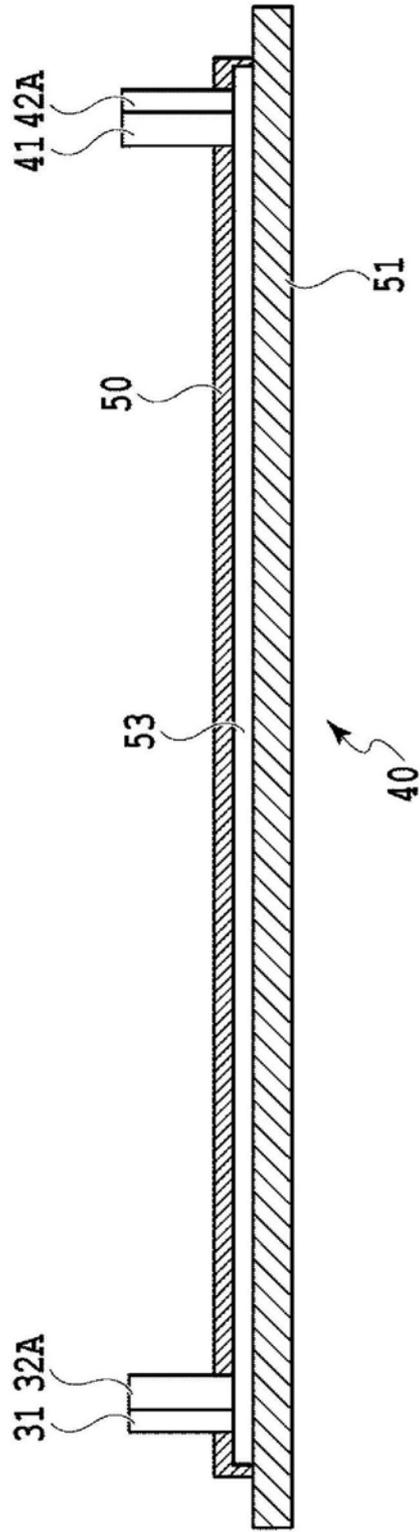


图6

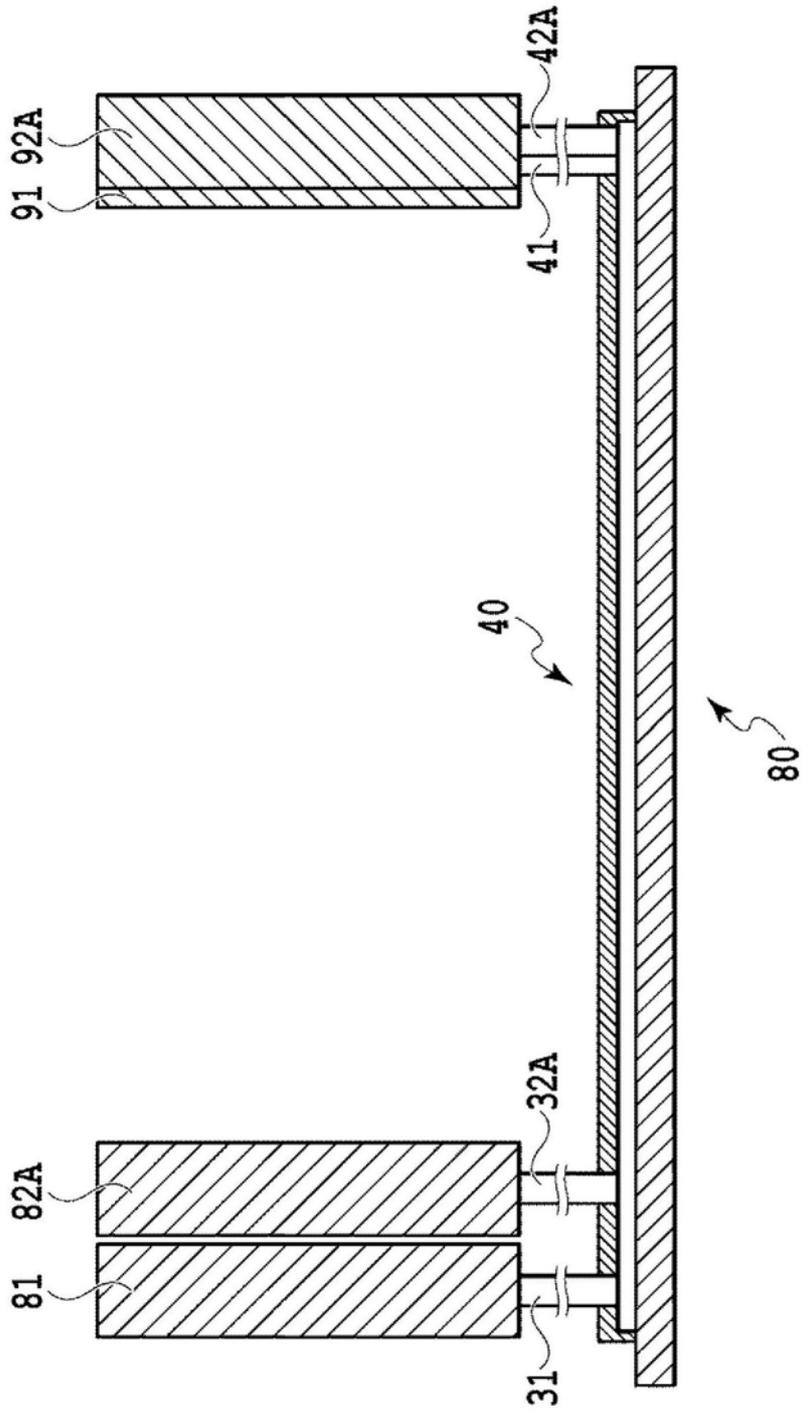


图7

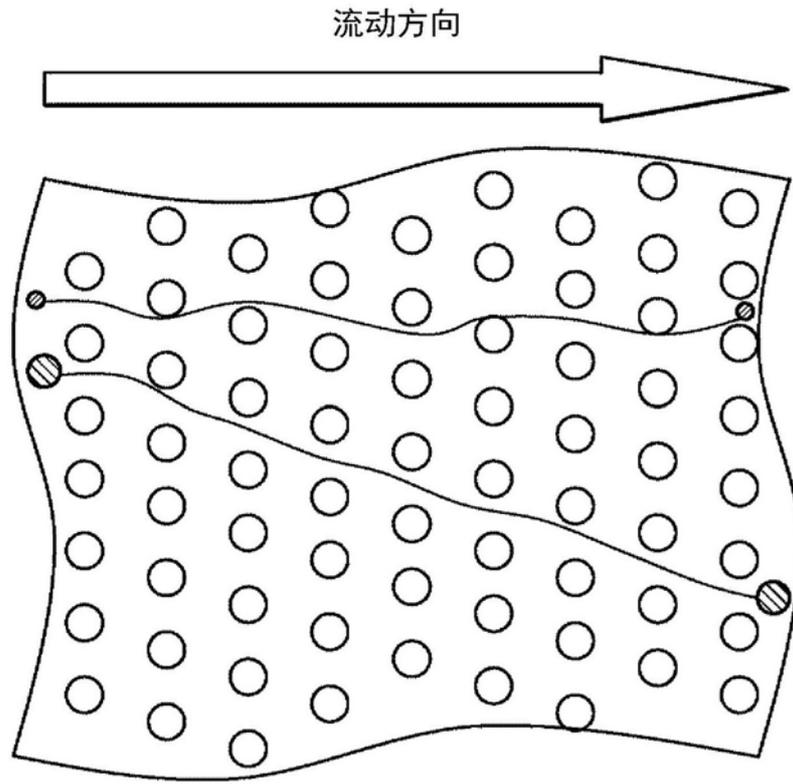


图8

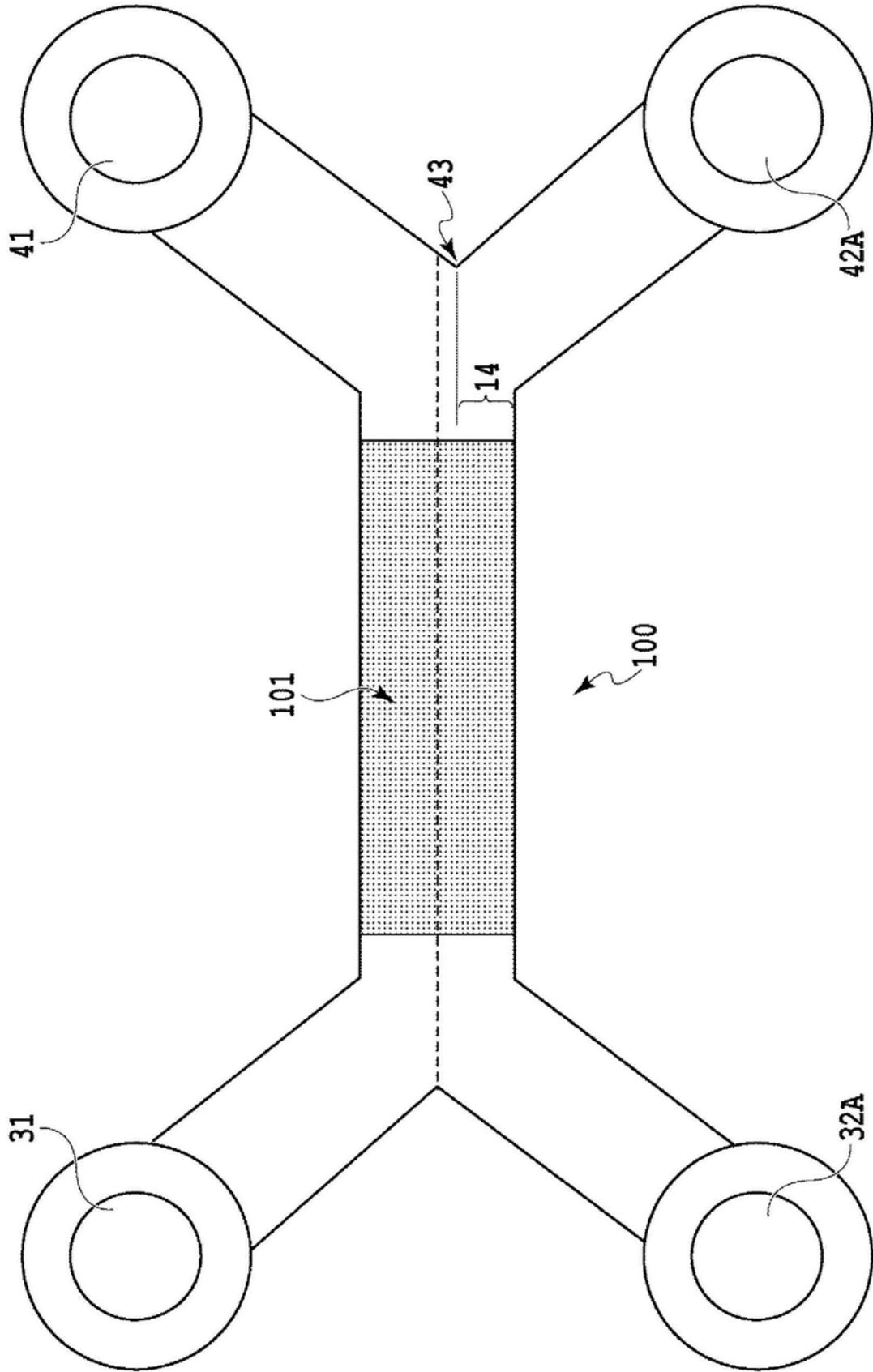


图9

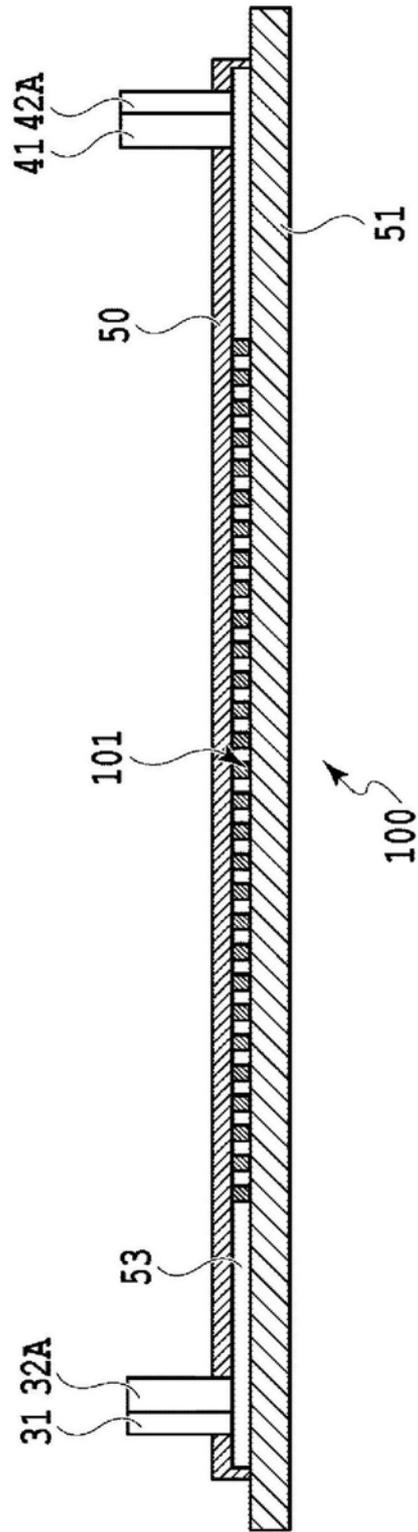


图10

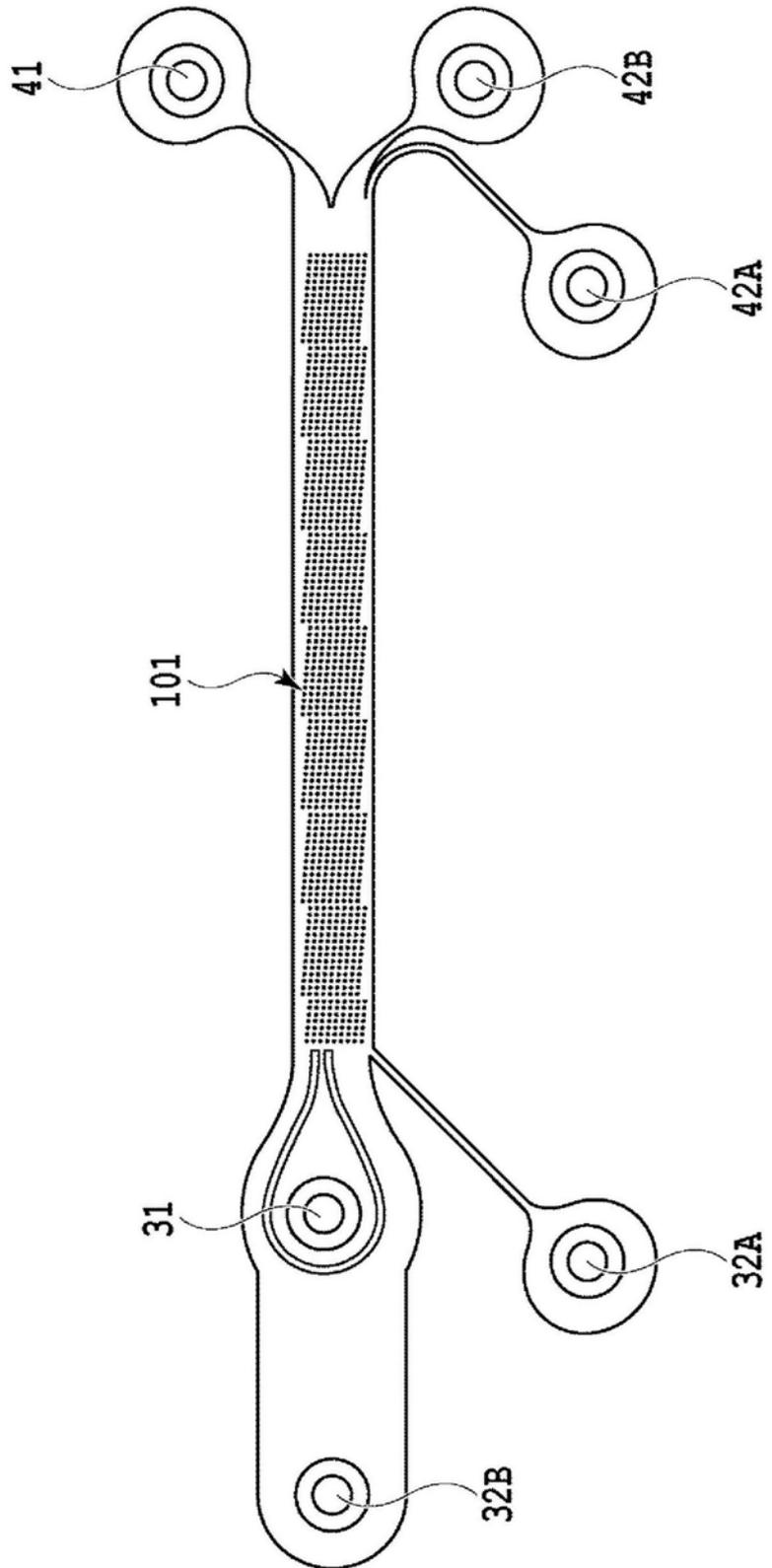


图11

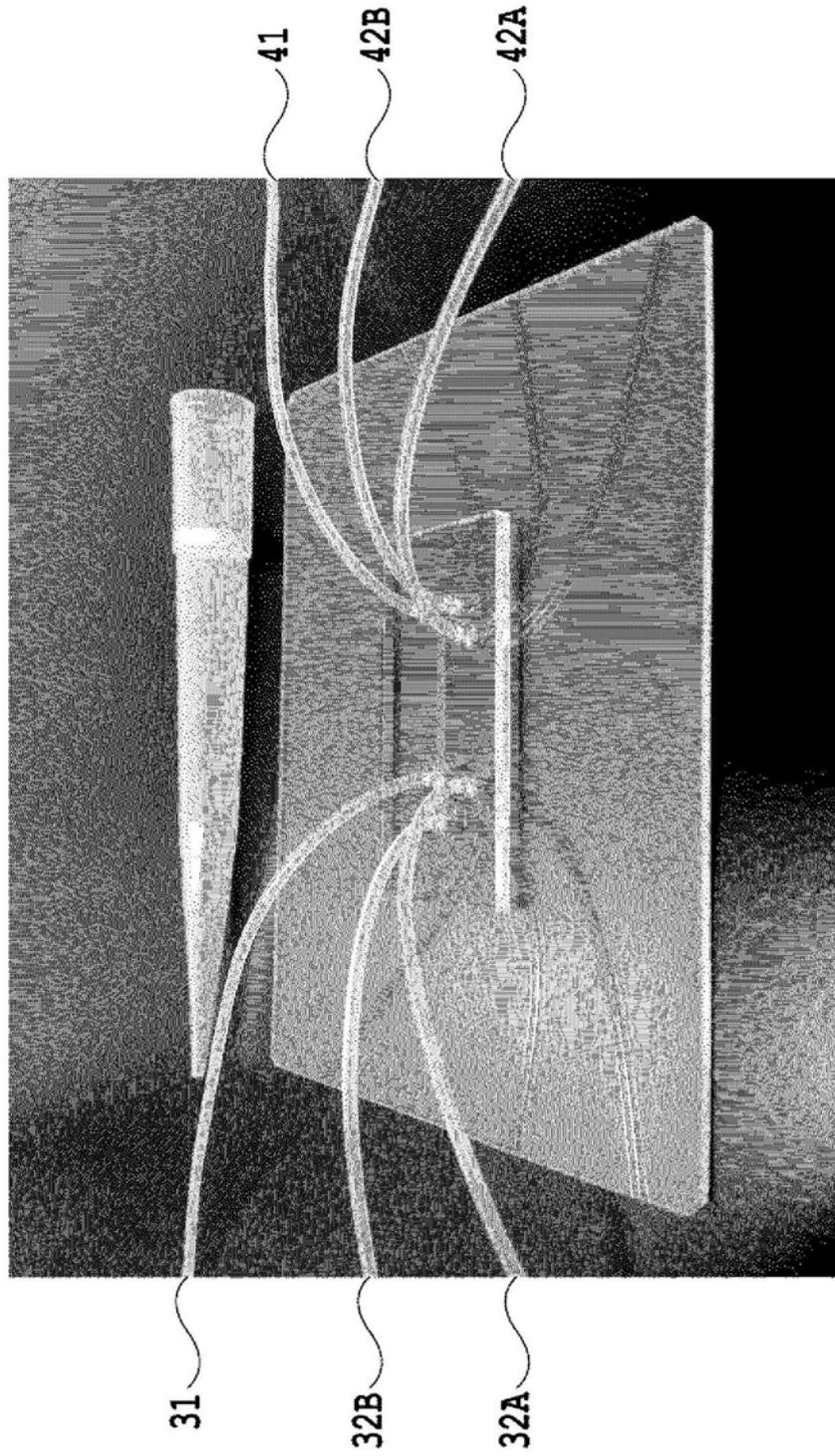


图12

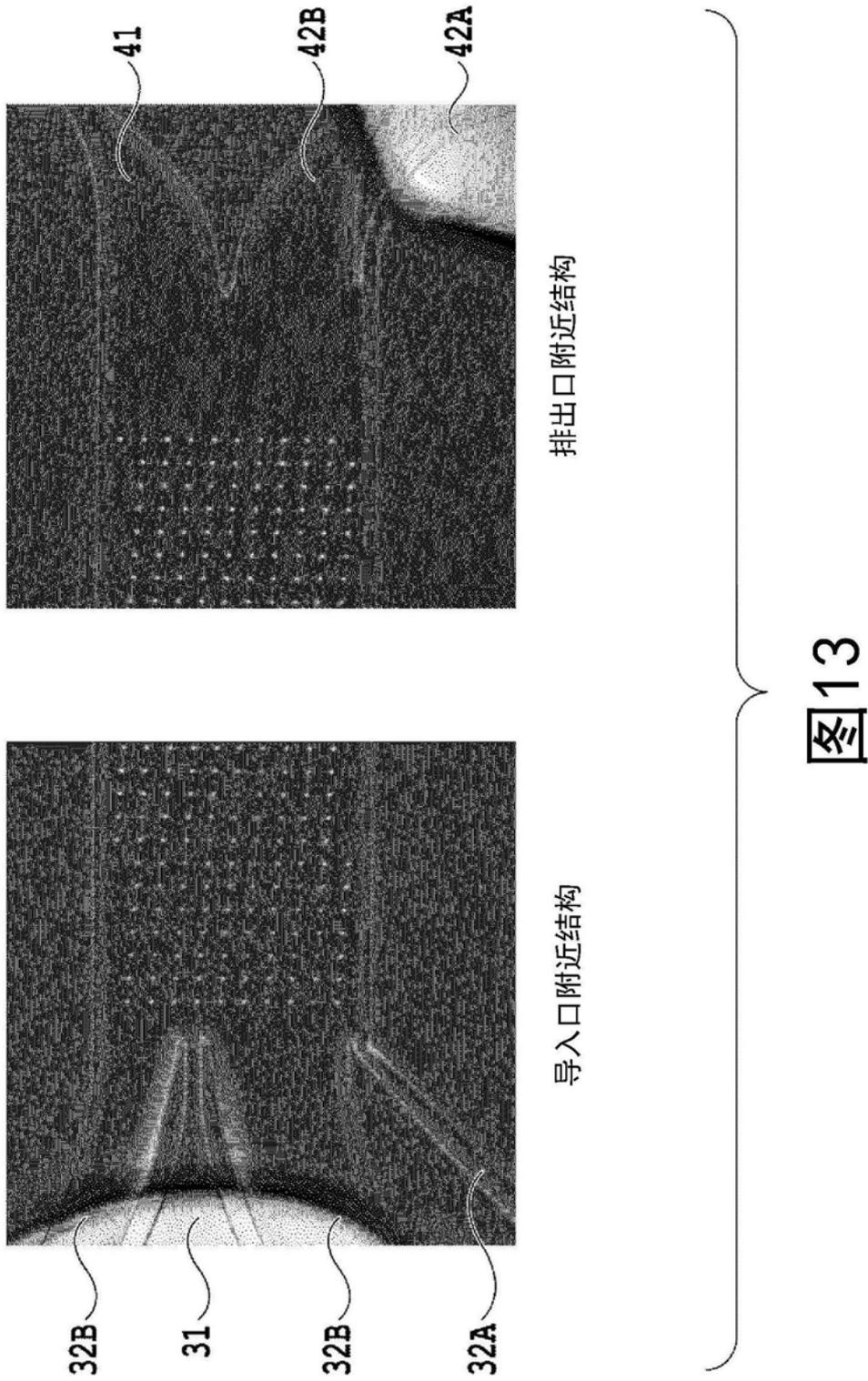


图13

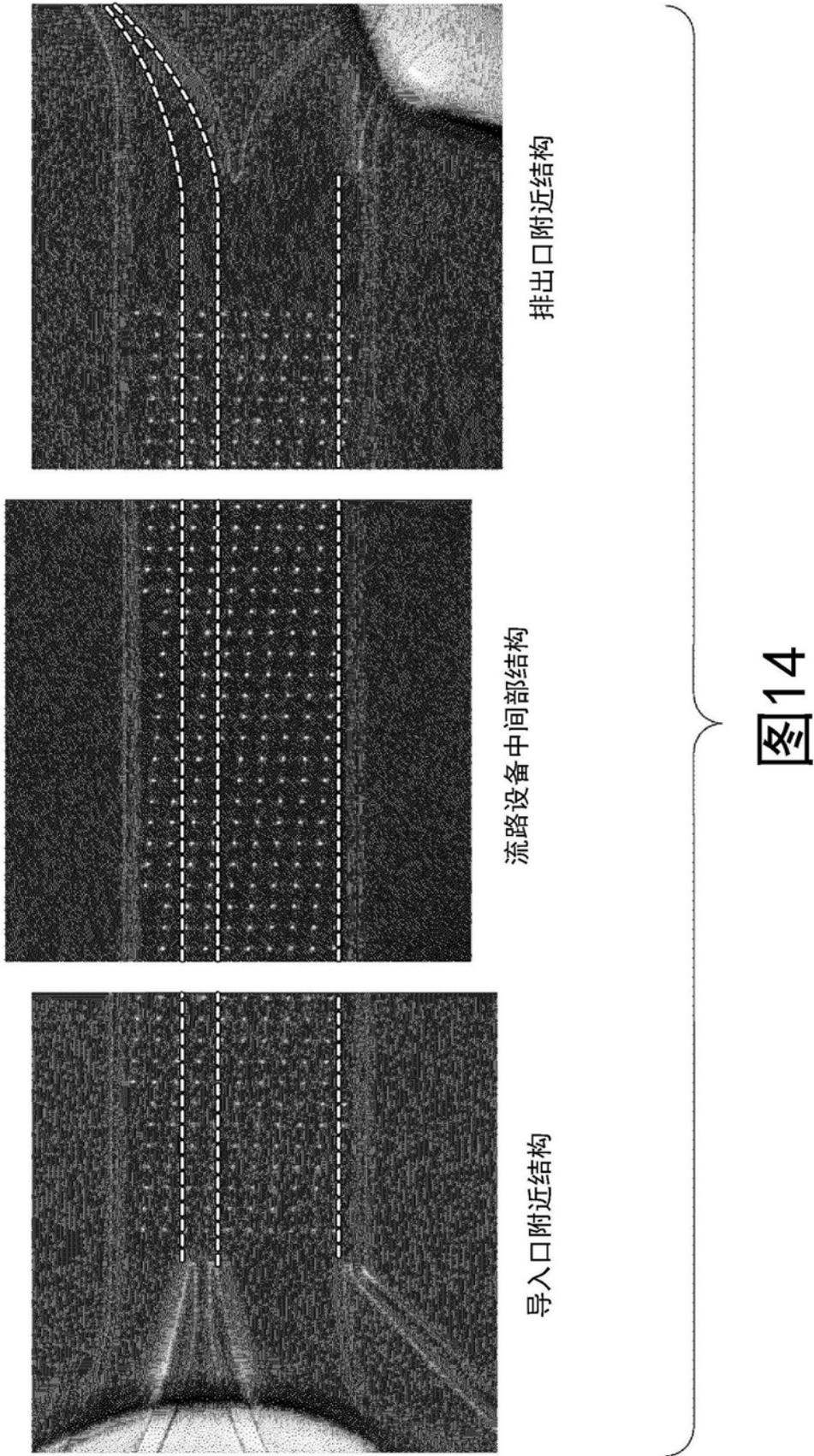


图14