



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103201374 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 10

(21) 申请号 201080070000. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 11. 04

C12M 1/12(2006. 01)

B01L 3/00(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日  
2013. 05. 06

(86) PCT申请的申请数据  
PCT/FR2010/052380 2010. 11. 04

(87) PCT申请的公布数据  
W02011/055091 FR 2011. 05. 12

(71) 申请人 史格林细胞公司  
地址 法国巴黎

(72) 发明人 伊冯·凯尔

(74) 专利代理机构 北京市浩天知识产权代理事  
务所 11276

代理人 韩龙 郭群

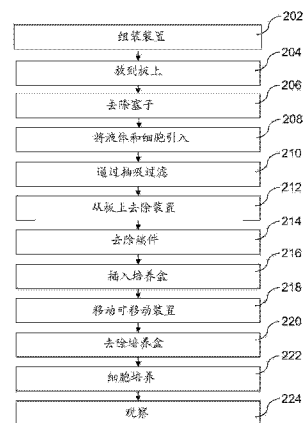
权利要求书1页 说明书11页 附图15页  
按照条约第19条修改的权利要求书2页

(54) 发明名称

在过滤器上分离并且培养活细胞或者从它们之中提取遗传物质的装置和方法

(57) 摘要

该发明涉及一种用于在过滤器上分离活细胞或提取它们的遗传物质的方法,其特征在于所述方法包括:至少临时地将过滤器(108,308)固定到隔室(102,302)的下部开口上的步骤(202,402),该隔室还具有空气入口;将带有所述细胞的液体注入所述隔室的步骤(204,404);以密封方式将针(180)至少临时地固定到所述隔室开口的步骤(205,405),过滤器设置在针和隔室的内部空间之间;利用所述针刺穿具有相对于环境压力为负压的真空管(185)的盖子(186)的穿透步骤(206,406);以及利用真空管的负压抽吸液体使其通过所述过滤器的抽吸步骤(210,410),所述过滤器拦截所述细胞。



1. 一种用于在过滤器上分离固定细胞或者活细胞的装置,其特征在于其包括:
  - 隔室(102,302),具有用于容纳含有所述细胞的液体的内部容积、下部开口和空气入口,
  - 过滤器(108,308),至少临时地与所述隔室开口一起形成一个单一单元,被设计成当液体经过滤器时拦截所述细胞以及
  - 针(180),至少暂时地与所述隔室开口一起形成单一防渗漏单元,过滤器定位于针和隔室的内部容积之间,所述针被设计成刺穿具有相对于环境压力为负压的真空管(185)的塞子(186)以抽吸所述液体通过所述过滤器。
2. 根据权利要求1的装置,另外还包括位于隔室和围绕着针的保护筒之间的连接装置,保护筒被设计成在抽吸液体通过过滤器的过程中至少部分地包围真空管。
3. 根据权利要求2的装置,其至少临时地包括所述保护筒。
4. 根据权利要求2或3中任一项的装置,其中所述连接装置是临时的并且其使保护筒能够与真空管共同被移除。
5. 根据权利要求2到4中任一项的装置,其中所述保护筒包括密封面对连接装置的开口的可移动膜以及一个开口,真空管穿过该开口插入到保护筒中。
6. 根据权利要求1到5中任一项的装置,另外还包括设计用于暂时地连接到隔室的下部开口的手术钢制成的可移动的过滤器支撑。
7. 根据权利要求6的装置,其中所述环的厚度被设计成使其能够被扫描。
8. 根据权利要求6或7中任一项的装置,其中所述环带有标识符。
9. 用于在过滤器上分离活细胞或提取它们的遗传物质的方法,其特征在于其包括:
  - 至少暂时地将过滤器(108,308)连接到隔室(102,302)的下部开口上的步骤,该隔室还具有空气入口,
  - 将带有所述细胞的液体插入所述隔室的步骤(204,404),
  - 以防渗漏的方式将针至少暂时地连接到所述隔室开口的步骤(205,405),过滤器设置在针和隔室的内部容积之间,
  - 利用所述针刺穿具有相对于环境压力为负压的真空管(185)的塞子(186)的穿透步骤以及
  - 利用真空管的负压,抽吸液体使其通过所述过滤器的抽吸步骤(210,410),所述过滤器拦截所述细胞。
10. 根据权利要求9的方法,进一步包括将保护筒至少暂时地紧固到隔室的步骤,所述保护筒随后包围针,并且在穿透步骤中真空管插入到保护筒中。

## 在过滤器上分离并且培养活细胞或者从它们之中提取遗传物质的装置和方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于在过滤器上分离和 / 或培养活细胞或者固定细胞的装置, 从而进行所有的细胞分析(细胞学、免疫化学、FISH 测试, 等等)或者从在过滤器上分离的活细胞或者固定细胞中提取遗传物质, 如果需要的话放大后提取遗传物质。本发明尤其适用于分离和 / 或培养在液体尤其是血液中的特殊细胞, 或者从这些特殊细胞中提取遗传物质。

### 背景技术

[0002] 特殊的血液细胞, 例如肿瘤细胞或者滋养细胞, 以非常小的比例存在并且在进行细胞学分析之前必须对其进行计数。

[0003] 众所周知, 要将基于甲醛的结合缓冲液加入到血液样品中以固定目标细胞, 然后得到的液体通过多孔过滤器。该过滤器接着用于在实验室的显微镜下检查其上的目标细胞。然而, 使用此过程是不可能得到活细胞的。

[0004] 既然如此, 发明者已经确定出获得活细胞将有可能在良好的条件下识别出特定的标记, 以在诊断肿瘤或滋养细胞的遗传异常中应用分子生物学、细胞遗传学和 FISH (“荧光原位杂交”的缩写) 技术。

[0005] 本发明的目的是通过以下手段来弥补这些缺点并满足这个要求: 实现了在与标准实验室测试兼容的条件下收集活细胞, 活细胞随后可以在适宜的生长因素中在适当的介质中培养。

[0006] 本发明还涉及从在过滤器上分离的细胞中提取遗传物质, 如果有必要的话放大后再提取, 并且还涉及靶向治疗的敏感性和耐药性或者遗传异常的变异和基因表达水平的检测。

[0007] 本发明尤其适用于对液体尤其是血液中的特殊细胞的 DNA 或 RNA 的收集和潜在的均匀放大。

[0008] 例如从文献 PCT/FR2006/000562 中获知, 基于甲醛的结合缓冲液被添加到血液样品中用以固定被寻求的目标细胞, 并且得到的液体随后通过多孔过滤器。接着在实验室的显微镜下分析该过滤器以检测位于其上的细胞。接着可以在过滤器上抽样细胞进行分析, 例如采用遗传分析。

[0009] 然而, 由于涉及工作时间、材料和精度, 这个过程不能以合理的成本被大规模复制。既然如此, 大规模的复制和降低的成本使分子生物学分析能够应用在肿瘤细胞和滋养细胞中。此外, 使用甲醛固定细胞并不能获得质量良好的遗传材料: DNA 被部分地降解并且与周围蛋白质之间形成桥梁, 并且 RNA 的提取实际上也是不可能的。

### 发明内容

[0010] 本发明的目的是通过以下手段弥补这些缺点并满足这个要求: 实现了在与标准实

实验室试验相兼容的条件下所考虑的细胞中收集大部分条件良好的细胞物质,尤其是 RNA 和 DNA。还应该注意到本发明可以使用有或没有甲醛的固定液来分离固定细胞。

[0011] 为了这个目的,根据一个方面,本发明涉及一种用于分离位于过滤器上的固定或者活细胞的装置,特征在于其包括:

[0012] - 隔室,其具有用于容纳携带所述细胞的液体的内部容积、下部开口以及空气入口;

[0013] - 过滤器,其形成一个单一的单元,当液体通过过滤器时,至少暂时地通过所述隔室开口拦截所述细胞,

[0014] - 针,其形成单一的防渗单元,至少暂时地,通过所述隔室开口,过滤器设置于针和隔室的内部容积之间,所述针被设计成穿刺相对于环境压力为负压的真空管的塞子以通过所述过滤器抽吸液体。

[0015] 由于这些特征,该装置能够在过滤器上分离并收集感兴趣的固定后的活细胞,或者处于与它们的培养完美兼容的条件下的活细胞以便进行细胞学特性检测、以及细胞遗传学检测、用于其他任何细胞检测或者从细胞中提取遗传物质。

[0016] 这种收集直接地在过滤器上进行几乎不会丢失所需的细胞。在这种方式中,在良好的条件下,以及与实验室中常规培养相兼容的条件下,可以以降低的成本收集考虑中的细胞的一大部分。分离后的细胞可以在培养前或培养后用于细胞或分子生物学测试。

[0017] 构成本发明的装置还能以快速和高效的方式从特殊细胞中收集细胞物质,例如,在下面各阶段完成后:

[0018] - 过滤阶段,在该阶段中液体的主要部分和所述其它细胞通过具有微孔的过滤器,微孔具有大小位于所述特殊细胞和其它细胞的直径之间的中间直径,

[0019] - 细胞溶解阶段,不管后面是否有 DNA 和 / 或 RNA 在所述隔室中放大以及

[0020] - 在过滤器上从溶解后的细胞中收集遗传物质的阶段。

[0021] 构成本发明的装置具有多个优点:

[0022] 1/ 过滤可以在支架上或者将装置握在一个人的手里进行,从而显著地节省了时间和材料(尤其,避免了使用真空泵以及适配器箱),

[0023] 2/ 过滤可以在无菌罩中进行。

[0024] 3/ 过滤可以在装置处于倾斜位置,甚至几乎水平时进行。

[0025] 4/ 条件是完全标准化,取样管以具有预定真空量的标准化方式生产。

[0026] 5/ 使用条件包括加强安全条件,以使得其可以完全地在无菌罩内进行的操作;再者,一旦真空管被填充,它可以像正常的血液取样管一样被移除,因为采集的血液不会与操作者接触。

[0027] 根据特定的特征,本发明的装置如上面简要描述的那样,还包括位于隔室和保护筒之间的连接装置,保护筒包围针并且设计成至少部分地在液体被吸入到过滤器的过程中包围真空管。

[0028] 由于这些设置,可以防止使用者不小心被针扎到。此外,通过使用保护筒作为导引,真空管的定位变得更容易。真空管在抽吸过程中还被更牢固地保持在原位,这能防止其被移除或挪动以使得空气从位于真空管塞子中的针的旁边进入真空管。因为使用者不能在无意中碰到针所以使样品污染的风险最小化。

[0029] 根据特定的特征,本发明的装置,如上面简要描述的,至少临时地包括所述保护筒。

[0030] 以这种方式,确保了对针、样品和使用者的保护。

[0031] 根据特定的特征,所述连接装置是临时性的并且使保护筒能够与真空管和针共同地被移除。

[0032] 以这种方式,在保护筒与隔室分离之后,能够保证对针和使用者的保护。

[0033] 根据特定的特征,所述保护筒包括可移除的膜,密封其面向连接装置的开口,穿过开口真空管被插入到保护筒中。

[0034] 由于这些设置,使用者在插入真空管之前移除膜。该膜为使用者和针提供更好的保护并且减少了样品污染的风险。

[0035] 根据特定的特征,本发明的装置还包括由手术钢制成的可移除的过滤器支撑,其设计成暂时地连接到隔室的下部开口。

[0036] 由于这些设置,过滤器能够与其支架一起被移除,用于培养或分析收集在过滤器上的细胞或者用于从它们之中提取遗传物质。另外,手术钢对收集在过滤器上的细胞是无毒害的。

[0037] 根据特定的特征,所述环的厚度被设计成使其能够被扫描。

[0038] 根据特定的特征,所述环带有标识符。

[0039] 以这种方式,该标识符以及所收集的细胞可以与患者相关联。由此避免发生错误。

[0040] 根据特定的特征,本发明的装置还包括与所述隔室相关的移动装置,其用于对过滤器支撑施加力并且释放所述过滤器。

[0041] 由于整个过滤模块都是无菌的并且使用通常适用于分子生物学的标准而制备,因此可以避免过滤器上的活细胞或者遗传物质发生任何的污染或变坏。隔室里容纳的物质以无菌状态保存同时在合适的层流罩下面进行处理。以这种方式,所有分离和培养细胞的阶段或者分析细胞的遗传物质的阶段都可以在无菌条件下进行。

[0042] 根据特定的特征,本发明的装置包括以不可渗透并且可移除的方式连接到隔室的可移除的端件;它被设计成限制移动装置和隔室的相对运动,该相对运动能够施加所述力用于释放所述过滤器支撑。

[0043] 由于这些设置,过滤器支架被确保保持在原位。此外,端件可以保护它不受飞溅和污染。

[0044] 以这种方式,过滤器在过滤过程中被保持住并且接着被释放以使其可以通过移除端件以及分别使可移动装置和隔室运动而被取回,该运动用于施加释放过滤器支撑的力。

[0045] 根据第二方面,本发明涉及一种在过滤器上分离活细胞或者提取它们的遗传物质的方法,特征在于其包括:

[0046] - 至少暂时地将过滤器连接到隔室的下部开口的步骤,其中隔室还具有空气入口,

[0047] - 将携带有所述细胞的液体插入所述隔室的步骤,

[0048] - 以不可渗透的方式将针至少暂时地连接到所述隔室的开口的步骤,过滤器设置在针和隔室的内部容积之间,

[0049] - 使用所述针穿透相对于环境压力为负压的真空管的塞子的步骤以及

[0050] - 利用真空管的负压,通过所述过滤器抽吸液体的步骤,所述过滤器保持所述细

胞。

[0051] 根据特定的特征,如上面简要地描述的本发明的方法还包括:

[0052] - 将保护筒至少暂时地固定到隔室的步骤,接着所述保护筒包围针并且

[0053] - 真空管在穿透阶段被插入到保护筒中。

[0054] 由于该方法的优点、目的和特定特征与上面简要描述的本发明的装置相类似,就不在这里重复了。

#### 附图说明

[0055] 本发明的其他优点、目的和特征将在下面的描述中呈现,下面的描述参照附图进行只是起到解释作用而绝不是详尽无遗,其中

[0056] - 图 1 示意性地示出构成本发明的装置的一个初始实施例的各部件组装的透视图,

[0057] - 图 2A 到 2D,示意性地示出装置的初始实施例在使用前彼此垂直的轴向剖面图,

[0058] - 图 3A 到 3O,示意性示出构成本发明的装置的初始实施例的各实施步骤的正视图或者横截面图,

[0059] - 图 4,以流程图示出构成本发明的方法的一个具体初始实施例的各实施步骤,

[0060] - 图 5,示意性地示出构成本发明的装置的第二个具体实施例的各部件组装透视图,

[0061] - 图 6A 到 6D,示意性地示出装置的第二个实施例在使用前彼此垂直的轴向剖面图,

[0062] - 图 7A 到 7L,示意性示出构成本发明的装置的第二个实施例的各实施步骤的正视图或者横截面图,

[0063] - 图 8,以横截面图示出过滤器支撑集成到构成本发明的装置的第二个实施例中,

[0064] - 图 9,以流程图示出构成本发明的方法的第二个具体实施例的各实施步骤,

[0065] - 图 10 示意性地示出装置的具体实施例在使用前的状态,

[0066] - 图 11 示意性地示出图 10 所示的装置的实施例在移除保护膜之后以及插入真空管之前的状态,

[0067] - 图 12 示意性地示出图 10 和 11 所示装置的实施例在插入真空管之后的状态,

[0068] - 图 13 示意性地示出图 10 到 12 所示的装置的实施例处于移除真空管和保护筒的过程中的状态以及

[0069] - 图 14 作为流程图示出,表示构成本发明的方法的一个具体实施例的各实施步骤。

#### 具体实施方式

[0070] 在下面对附图的描述中,一种系统被设想用于液体尤其是血液的过滤,其包括用于移除过滤器支撑的装置。然而,本发明并不是局限于这些优选的实施例,而是可以延伸到包括用于容纳液体的隔室的任意系统,过滤器至少暂时地安装到这个隔室的开口上并且针至少暂时地以防漏的方式安装到隔室的开口上以刺穿预先封装的真空管的塞子,针将所抽取的液体运送通过过滤器并且目标细胞被拦截在过滤器上。

[0071] 针具有设计用于刺穿真空管的塞子的极细的针尖(参见图 3B 到 3D)以及设计用于容纳隔室或者过滤器支撑的下端的较宽的孔径。真空管具有相当大的负压以及大于要被过滤的液体体积的容积。

[0072] 在针可以从隔室移除的优选的实施例中,一旦隔室被包含有目标细胞的液体填充,为了收集细胞,针的孔径配置在隔室的开口上方并且真空管的塞子接着被针的细尖穿透。借助于负压,液体的过滤通常在 60 秒内自动进行。

[0073] 以这种方式,可以通过手握装置进行过滤,这将节省大量的时间和材料,尤其是因为这样不再需要为泵上的隔室设置真空泵或者适配器盒。

[0074] 此外,过滤可以在无菌罩中进行,以使装置可以倾斜甚至水平放置。

[0075] 现在将对具有可移除的过滤器支撑以及用于将过滤器支撑从隔室移除而不会碰到过滤器支撑的装置的实施例进行描述,

[0076] 图 1 示出容器或者隔室 102、端件 104、密封件 106、具有支撑 108 的过滤器、可移动装置 110、密封件 112 和具有空气入口(未示出)的塞子 114。

[0077] 隔室 102 为圆筒形状。它的上端被塞子 114 以除了空气入口之外不可渗漏的方式密封。隔室 102 的下端在其外表面上具有间断的环,环上具有引导可移动装置 110 上的支腿的空隙,所述环引导可移动装置 110 的主体。

[0078] 可移动装置 110 通常为圆筒形状并且具有两个朝向端件 104 延伸的支腿并且支腿在该方向上一起变窄以使得在它们之间具有一个间隔,间隔的大小小于过滤器支撑 108 的直径。如后面接着要描述的,这种特定的形状,支腿 116 明显地朝向彼此弯曲,使得可移动装置 110 在其从端件 104 移除后,能够向过滤器支撑 108 施加压力以使其与其过滤器一起从隔室 102 释放,同时可移动装置朝向过滤器支撑 108 移动。

[0079] 可移动装置 110 的支腿 116 的端部以及隔室 102 的下端被设计成插入到细胞培养盒中或井中。另一方面,间断的环在隔室 102 的端部的直径被设计成使得隔室可以支撑在细胞培养盒或井的边缘上。

[0080] 端件或适配器 104 设置在隔室 102 的下部开口,其夹紧隔室 102 的外壁并且具有直径小于隔室 102 的直径的下部狭窄开口以使得隔室不可渗透、无菌并且可拆卸。

[0081] 端件或适配器 104 的下部狭窄开口足够长以使针的口径形成密封的机械配合(参见图 3B 到 3D)。

[0082] 与具有侧面凸耳 118 的隔室 102 的下端形状相配合,端件 104 具有旋转锁紧装置用于以已知的方式夹紧所述凸耳。以这种方式,端件 104 确保过滤器支架在过滤阶段保持在原地不动。另外,端件 104 保护过滤器不受飞溅和污染危害。

[0083] 当连接时,隔室 102 的下端具有向由过滤器支撑 108 支撑的过滤器排放物质的开口,过滤器支撑本身一方面通过隔室 102 的下端和另一方面通过端件 104 保持在适当的位置。

[0084] 过滤器支撑 108 在该第一实施例中的形状为环状圆盘。过滤器为微孔的并且熔附于过滤器支撑 108 的下面,然后过滤器与过滤器支撑一起插入到隔室 102 的下端。

[0085] 可移动的过滤器支撑 108 优选地为环形的并且由手术钢制作而成。手术钢实际上对收集在过滤器上的细胞无毒害。此外,由手术钢制作的过滤器支撑比由塑料制作的支撑更容易移动且更坚固。所述环的厚度优选地被设计成使其能被扫描。该环优选地带有标识

符。以这种方式,该标识符以及收集的细胞能与患者相关联。由此避免错误的发生。

[0086] 或者,过滤器支撑 108 可以由 PVC 制作而成并且厚度小于或等于 0.4mm,并且优选小于 0.3mm。例如,它的外部直径为 12.6mm。连接到过滤器支撑 108 上的过滤器的直径例如为 5.9mm。

[0087] 隔室 102、端件 104 以及可移动装置 110 例如由聚丙烯制作而成。密封件 106 和 112 例如由有机硅塑料制作而成。

[0088] 图 2A 和 2C 为构成本发明的装置的第一实施例的轴向剖面图,其中图 1 示出的部件已经组装在一起。图 2B 和 2D 分别为图 2A 和 2C 中的部件的放大细节图。与图 1 相关的元件在图 2A 和 2D 中示出。

[0089] 图 3A 表示处于贮藏状态的正视图。图 3B 表示端件 104 插入到针 180 的开口 181 中,针 180 具有另一个极细的斜面端 182 以使其容易刺穿真空管的塞子。针 180 的开口 181 优选地由塑料制作而成。针 180 的端部 182 优选地为金属的。针 180 能够设置在液体(未示出),例如血液,通过隔室上部开口被引导进入隔室 102 之前或之后放置在端件 104 上。

[0090] 图 3C 示出一旦针 180 无渗漏地接合到端件 104,真空管 185 的塞子 186 开始被刺穿时的状态。

[0091] 图 3D 示出塞子 186 被针 180 完全地刺穿,将负压真空管 185 的内部通过过滤器连接到保持有包含目标细胞的液体的隔室 102 的容积。真空管 185 的内部容积大于被过滤的液体的体积。

[0092] 在抽吸过程中,位于隔室 102 中的液体里的某些特殊细胞,其直径较大,被过滤器 108 拦住同时大部分的液体,容纳物以及如果必要还有溶解细胞和尺寸小于被收集细胞的细胞通过过滤器 108 被抽吸进入真空管 185。

[0093] 接着,如图 3E 和 3F 所示,端件 104 在旋转而从凸耳 118 释放之后被移除。接着,如图 3G 和 3H 所示,隔室 102 的端部被插入到细胞培养盒或井 130 中。

[0094] 如上面描述和在图 3I 中示出的,邻近可移动装置 110 的支腿 116 的端部和隔室 102 的下端被设计成插入到培养盒或井中。相反,位于隔室 102 端部的间断的环的直径使其能够支撑在培养盒或井 130 的边缘上。

[0095] 更精确地,如图 3J 和 3K 所示,可移动装置 110 在该位置仍然可以平行于隔室 102 的轴线而移动。

[0096] 如图 3N 和 3M 所示,在移动过程中,当操作者的手指移动移动装置的支腿 116 时,向过滤器支撑 108 施加垂直向下的压力并且将其从隔室 102 的下端释放。过滤器和其支撑 108 接着落入细胞培养盒或井 130 中。

[0097] 最后,如图 3O 所示,隔室 102 和移动装置 110 从细胞培养盒或井 130 中移除。

[0098] 图 4 对这些实施阶段作出了总结。

[0099] 在阶段 202 中,装置的各个部件被组装到一起。在阶段 203,塞子 114 被移除。在阶段 204,端件 104 被插入到针 180 的开口 181 中。在阶段 205,包含有被分离并且有可能被培养的细胞的液体,例如血液,通过隔室 102 的上端被引入。

[0100] 在阶段 206,针 180 的尖端 182 定位于接近塞子 186 中心的位置并且向隔室 102 施压以使针刺穿塞子 186 直到针的端部到达处于负压或者真空压力的真空管 185 的内部容积。



[0101] 在阶段 210, 过滤通过将比目标细胞小的细胞, 任意的溶解细胞, 以及隔室 102 中的大部分液体抽吸进入真空管而实现, 目标细胞被阻拦在过滤器 108 上。

[0102] 在阶段 212, 真空管 185 和针 180 被移除。在阶段 214, 端件 104 被移除。在阶段 216, 隔室 102 的端部被插入到细胞培养盒或井中。

[0103] 在阶段 218, 可移动装置和隔室分别被移动以向过滤器支撑 108 施加力并且将其释放以使得过滤器支撑与过滤器一起落入细胞培养盒或井 130 中。在阶段 220, 隔室 102 和可移动装置 110 从细胞培养盒或井 130 中移除。

[0104] 在阶段 222, 细胞培养以已知的方式在细胞培养井 130 中进行。注意到支撑 108 围绕着过滤器的上表面, 该表面保存有分离在过滤器上的细胞, 防止细胞脱离过滤器。

[0105] 在阶段 222, 目标活细胞的培养在过滤器上进行, 过滤器覆盖有 Matrigel 薄层, (或者与 Matrigel 层接触, Matrigel 层预先放置在孔板和 / 或培养瓶的底面上, 在底面上搁置有该 Matrigel 层, Matrigel 为一个注册商标) 例如, 其包括设计成培养目标细胞的因子。

[0106] 在阶段 224, 当希望对细胞或者它们的遗传物质进行观察时, 使用手术钳将过滤器支撑 108 取回; 过滤器支撑 108 的上表面上的水平圆柱形孔, 或者凹槽的存在使上述过程变得很方便。

[0107] 过滤器支撑 108 接着能够放置在载玻片上并且过滤器覆盖有圆盘形盖玻片, 盖玻片的直径与过滤器空的上表面相适应。细胞分析或者它们的遗传物质的提取用已知的方法进行。

[0108] 图 5 示出容器或隔室 302, 端件 304, 密封件 306, 过滤器支撑 308, 可移动装置 310, 密封件 312 以及塞子 314。

[0109] 隔室 302 大体为圆筒形。其上端借助塞子 314 形成除了空气可进入(未示出)的无渗漏密封。隔室 302 下端的外表面上具有与隔室 302 的主体分离的圆筒 350, 它们彼此仅通过侧带 352 形式的机械连接而相接。该圆筒 350 的外直径与可移动装置 310 主体的内直径相匹配, 以使其随着自身的移动而被引导。圆筒 350 配设有设计成允许可移动装置 310 的支腿 316 插入到其中并在纵向上滑动的开口。

[0110] 可移动装置 310 大体为圆筒形, 其具有两个朝向端件 304 延伸并在该方向上变窄以在它们之间形成尺寸小于过滤器支撑 308 的间隔的支腿 316。如后面描述的, 这种特定的形状, 支腿 316 明显地向彼此弯曲使得可移动装置 310 在其从端件 304 移除后, 随着可移动装置朝向过滤器支撑 308 移动而推动过滤器支撑 308 使其从隔室 302 释放。

[0111] 为了与隔室 302 具有侧面凸耳 318 的下端的形状相匹配, 端件 304 具有旋转锁紧装置用于以已知的方式夹紧所述凸耳。以这种方式, 端件 304 确保了在过滤阶段使过滤器支撑保持在原位。此外, 端件 304 保护过滤器不会遭受飞溅和污染的危害。

[0112] 在装配时, 隔室 302 的下端具有朝向由过滤器支撑 308 所支撑的过滤器排放物质的开口, 过滤器支撑 308 本身一方面通过隔室 302 的下端另一方面通过端件 304 保持在原位。

[0113] 如图 8 所示, 过滤器支撑 308 在第二个实施例中具有容纳离心管(Eppendorf tube)的形状。

[0114] 具体为:

[0115] - 支撑 308 的内部上面部分的形状与离心管的内部上面部分的形状相同, 使得所

述支撑的上部开口可以采用离心管的塞子封闭并且

[0116] - 支撑 308 的外部上面部分与离心管的内部上面部分相符合,使得过滤器支撑 308 能够插入到离心管的顶部中。

[0117] 此外,过滤器支撑 308 作用为立柱以允许拦截在过滤器上的细胞发生溶解并且将细胞溶解物和遗传物质从过滤器支撑离心转移到离心管。

[0118] 过滤器支撑 308 优选地由聚碳酸酯塑料制作而成。隔室 302,端件 304 以及可移动装置 310 例如由聚丙烯生产而成。密封件 306 和 312 例如由硅树脂制作而成。

[0119] 图 6A 和 6C 为构成本发明的装置的第二个实施例的相互垂直的轴向剖面图,其中图 5 示出的部件已经被组装起来。图 6B 和 6D 分别为图 6A 和 6C 中的部件的放大细节图。图 5 中描述的部件在图 6A 到 6D 中示出。

[0120] 图 7A 表示装置处于贮藏状态的正视图。图 7B 到 7D 与图 3B 到 3D 相同,除了端件的参考标记为 304。

[0121] 如图 7E 到 7F 所示,端件 304 在其旋转释放凸耳 318 之后被移除。接着,如图 7G, 7H 和 7I 所示,隔室 302 的端部被插入到支撑有离心管的支撑 328 中。

[0122] 如图 7J 和 7K 所示,可移动装置 310 接着平行于隔室 302 的轴而被降低。随着它的移动,操作者用手指移动可移动装置 310 的支腿 316 从而在过滤器支撑 308 上施加向下的压力并且将其从隔室 302 的下端释放。过滤器支撑 308 接着下降进入离心管中。

[0123] 最后,如图 7L 所示,隔室 302 和可移动装置 310 被移除。

[0124] 图 9 对这些阶段的实施进行了总结。

[0125] 在阶段 402,装置的各个部件被组装到一起。在阶段 403,塞子被移除。在阶段 404,塞子 304 被插入到针 180 的开口 181 中。在阶段 405,包含有被过滤并且有可能被培养的细胞的液体,例如血液,通过隔室 302 的上端被引导进入。

[0126] 在阶段 406,针 180 的尖端 182 定位在大约塞子 186 的中心位置并且向隔室 302 施加力以使针刺穿塞子 186 直到针的端部到达处于负压甚至真空压力下的真空管 185 的内部容积。

[0127] 在阶段 410,过滤通过将小于目标细胞的细胞和任意的溶解细胞以及隔室 302 中的大部分液体抽吸进入真空管 185 而实现。

[0128] 在阶段 412,真空管 185 和针 180 被移除。在阶段 414,端件 304 被移除。在阶段 416,隔室 302 的端部被插入到离心管的支撑中。

[0129] 在阶段 418,可移动装置和隔室分别被移动以向过滤器支撑施加压力使其下落进入离心管。最后,在阶段 420,隔室 302 和可移动装置 310 被移除并且由离心管的塞子所取代。

[0130] 离心管接着以已知的方法投入使用,例如应用在溶解、离心过滤和遗传物质收集阶段中,这些阶段带有或不带有全基因组的预放大。

[0131] 在阶段 422 和 424,在离心过滤之后,对收集在离心管底部的遗传物质,尤其是目标细胞的 DNA 和 RNA 进行分析。扩增的 DNA 作为阵列用于探测靶向治疗的灵敏度或阻抗的变化。此外,或替代地,cDNA (“c”表示互补)通过 RT 转换(逆转换)以及扩增从 RNA 中获得,其作为阵列用于探测靶向治疗的灵敏度或阻抗的基因表达水平。这种遗传物质从胚胎滋养层中获得,胚胎滋养层通过对采自于孕妇的血液进行过滤而得到,这种遗传物质能够

用于识别潜在的遗传异常。

[0132] 通过在实时定量 PCR (“聚合酶链式反应”) 过程中使用成对的正向和反向引物以及成对的探针, 对确定体积的扩增遗传物质, 尤其是 DNA 进行采样来探测靶向治疗的灵敏度或阻抗的变化。

[0133] 研究靶向治疗的灵敏度或阻抗变化的原理在具体实施例中的实施在下面进行描述。等位基因的分析或者“SNP 基因型分析”(SNP 为单核苷酸多态性的首字母缩写) 使得关于基因偶尔变化的出现或消失的信息被收集起来。等位基因检测的第一阶段 422 为一个实时定量 PCR 反应, 其采用两种引物以及两个探针, 例如 TaqMan (注册商标) 来扩增目标细胞的序列。其中一个探针识别变异序列同时另一个识别正常序列。这两个探针与不同的荧光物质相关联, 例如“VIC”荧光物质用于探测正常序列的杂交并且“FAM”荧光物质用于探测变异序列的杂交。第二阶段 424, 使用等位基因分析程序检测由 FAM 和 / 或 VIC 荧光物质产生的初始荧光和最终荧光。该程序允许各种序列出现在每个被辨别的样品中:

[0134] -VIC 荧光单独增多表示正常序列的纯合子特征(homozygous profile),

[0135] -FAM 荧光单独增多表示变异序列的纯合子特征,

[0136] -VIC 和 FAM 荧光同时增多表示杂合的特征。

[0137] 探针在两个引物之间成对出现并且根据与它们关联的荧光而显示变异的发生或消失。

[0138] 在其它实施例中, 确定体积的遗传物质, 尤其是 RNA, 通过 RT (“反转录”的首字母缩写) 转换成 cDNA 并且被扩增, 其被采样用于通过使用成对的正向和反向引物以及探针在定量实时 PCR (“聚合酶链式反应”的首字母缩写) 过程的多个周期中探测靶向治疗的灵敏度和阻抗的基因表达水平, 多个周期例如为 50 个周期。

[0139] 在上面描述的每一个实施例中, 过滤器优选地由聚碳酸酯塑料生产, 并且对其进行亲水性表面处理。使用这种过滤器增强了对特殊细胞的拦截并且当其它细胞具体地经历溶解时减小了其它细胞或它们的内容物的粘附。

[0140] 过滤器孔径的大小优选地集中在比用于相同的固定细胞, 即硬化细胞的对应值小的范围之内, 例如小  $1 \mu\text{m}$ 。

[0141] 例如, 如果固定细胞的孔径集中在  $7.5 \mu\text{m}$ , 过滤器的孔径集中在一个较低的值, 例如  $6.5 \mu\text{m}$ 。由于直径的差量, 实际上没有孔径大于  $7 \mu\text{m}$  的过滤器。

[0142] 对于本发明在血液细胞中的应用, 过滤器的孔密度在 50,000 到 200,000 孔/ $\text{cm}^2$  之间并且大约为 100,000 孔/ $\text{cm}^2$ 。

[0143] 由于使用聚碳酸酯塑料过滤器, 对负压的要求远低于现有技术的系统, 差不多低了四倍, 这就防止了收集在过滤器上的目标细胞变坏。

[0144] 在存在替代变化的情况下, 过滤器支撑 108 或 308 机械地连接到可移动装置直到力被施加以通过朝向培养井或离心管移动隔室而将过滤器支撑从可移动装置释放。隔室 102 或 302 的下端与可移动装置 110 或 310 的角色互换以使得后者将过滤器支撑支持在培养井或离心管的载玻片上或者载玻片前方, 当向隔室的上端施加压力时, 隔室将过滤器支撑释放, 这对于本领域技术人员来说是能够从前面实施例的描述中容易地改变而得到的。

[0145] 图 10 到 14 涉及本发明的具体实施例以及构成本发明的方法, 其使用保护导筒来保护真空管。

[0146] 虽然这些具体实施例补充了上面描述的一个或其它实施例,但是已经决定使它们适应图 1 到 4 所示出的实施例以产生图 10 到 14。

[0147] 图 10 到 13 示出隔室 102、可移动装置 110 和通过两部分连接装置 504 和 520 连接到隔室的保护筒 502。

[0148] 保护筒包括连接装置部分 504、磨砂部分 506、透明部分 508 以及位于面对隔室 102 的开口上的膜 510。

[0149] 部件 520 形成在隔室 102 的端部里面。图 13 示出包括有 4 个位于与隔室 102 共轴的筒部件的侧面上的插脚。在该实施例中,部件 504 包括四个形状与上面的插脚相对应的凹槽。这些凹槽 524 为椭圆形,从设计用于容纳插脚 522 的开口向保护筒 502 的内部延伸以使得通过沿图 13 中的箭头方向旋转保护筒 502 而使得每个插脚 522 进入对应的凹槽 524 并且将保护筒 502 紧固到隔室 102 上。

[0150] 保护筒连接到包含有下面的针 180 的端件上。针 180 嵌入部件 524 的下部,该下部面向隔室 502。部件 524 借助 4 个辐条通过施加压力而安装到部件 506 上。这些辐条位于部件 504 上并且插入到位于部件 506 上的四个凹槽里。

[0151] 部件 506 用于遮住针 180。透明部分 508 用于使用者检查过滤所处的阶段和是否完成。

[0152] 膜 510 覆盖并密封筒 502 的整个下部开口,其配置有从筒 502 延伸一个较短距离的横向部分(如图 10 所示)。这个横向部分使膜 510 可以容易地被移除。

[0153] 膜 510 保护使用者使其避免接近针 180。膜 510 还能保护针使其不会被堵住和/或发生污染。

[0154] 筒 502 被小心地着色,例如蓝色,绿色或者黄色,这取决于过滤装置的使用目的(分别是细胞学,分子生物学以及培养研究)

[0155] 注意到在图 11 中,在被过滤的液体进入隔室 102 之后,膜 510 被移除,安装有塞子 186 的真空管 185 插入到保护导筒 502 中。接着如上面描述的,向真空管 185 施加力使针 180 刺穿塞子 186。

[0156] 在图 12 示出的装配生产中,真空管 185 中的负压引起隔室 102 中的液体发生过滤。

[0157] 注意到在图 11 中,在被过滤液体被引入隔室 102 之后,膜 510 被移除,安装有塞子 186 的真空管 185 插入到保护导筒 502 中。接着,如早前描述的,向真空管 185 施加推力使针 180 刺穿塞子 186。

[0158] 在图 12 示出的装配生产中,真空管 185 中的负压引起隔室 102 中的液体发生过滤。

[0159] 如图 13 所示,当过滤完成时,保护筒 502 和其围绕的针 180 被共同移除。

[0160] 图 14 总结了这些实施阶段。

[0161] 在阶段 602,装置的各个部件被组装在一起。在阶段 603,塞子 114 被移除。在阶段 604,包含有被分离的并且有可能被培养的细胞的液体,例如血液通过隔室 102 的上端被引导。

[0162] 在阶段 605,真空管 185 插入到保护筒 502,其具有将针 180 的尖端 182 定位在塞子的近似中心位置的效果,并且施加相反的力使针 180 刺穿塞子 186 直到针的端部到达在

阶段 606 中处于负压甚至真空压力的真空管 185 的内部容积。

[0163] 在阶段 610, 通过将小于目标细胞的细胞和任意的溶解细胞, 以及隔室 102 中的大部分液体抽吸进入真空管而实现过滤, 目标细胞被拦截在过滤器 108 上。

[0164] 在阶段 612, 保护筒 502, 真空管 185 和针 180 被移除。

[0165] 下面的阶段已经参照并且依据其它的实施例进行了描述。因此, 在这里不再对它们进行描述。

[0166] 从前面的描述可以理解, 当保护筒连接到隔室, 可以保护使用者使其不会因为不小心被针扎到。此外, 通过由保护筒提供的引导使真空管的定位变得方便。真空管在过滤过程中还可以被牢固地保持不动, 防止其被移除或移动, 由此允许空气通过位于真空管塞子中的针的附近而进入真空管。由于使用者不能在无意中碰触到针, 使得样品被使用者污染的风险降到最低。

[0167] 优选地, 如图 10 到 13 所示, 构成本发明的装置至少暂时地包括所述保护筒。在其它实施例中, 在使用前立即进行组装。

[0168] 优选地, 如图 10 到 13 所示, 连接装置是暂时的并且使保护筒能够与真空管共同被移除。在替代的变化存在的情况下, 这两个部件在两个连续的步骤中被移除。

[0169] 在实施例中, 构成本发明的装置以一整套设备的形式表示, 包括一个外袋, 两个内袋:

[0170] - 第一个内袋包括如图 2A, 6A 和 10 中所示的组装好的装置。

[0171] - 第二个内袋包括针, 真空管, 培养井和圆形载玻片和 / 或离心管或者其它用于使用该装置的有用配件。

[0172] 使用本发明的装置能够避免细胞采样的高风险, 例如羊水细胞, 同时能够进行细胞培养, 例如羊膜腔穿刺术。此外, 由于过滤器支撑 108 的形状类似于容器, 免疫细胞化学反应和荧光原位杂交反应 (“FISH”) 能够直接在该支撑上进行。

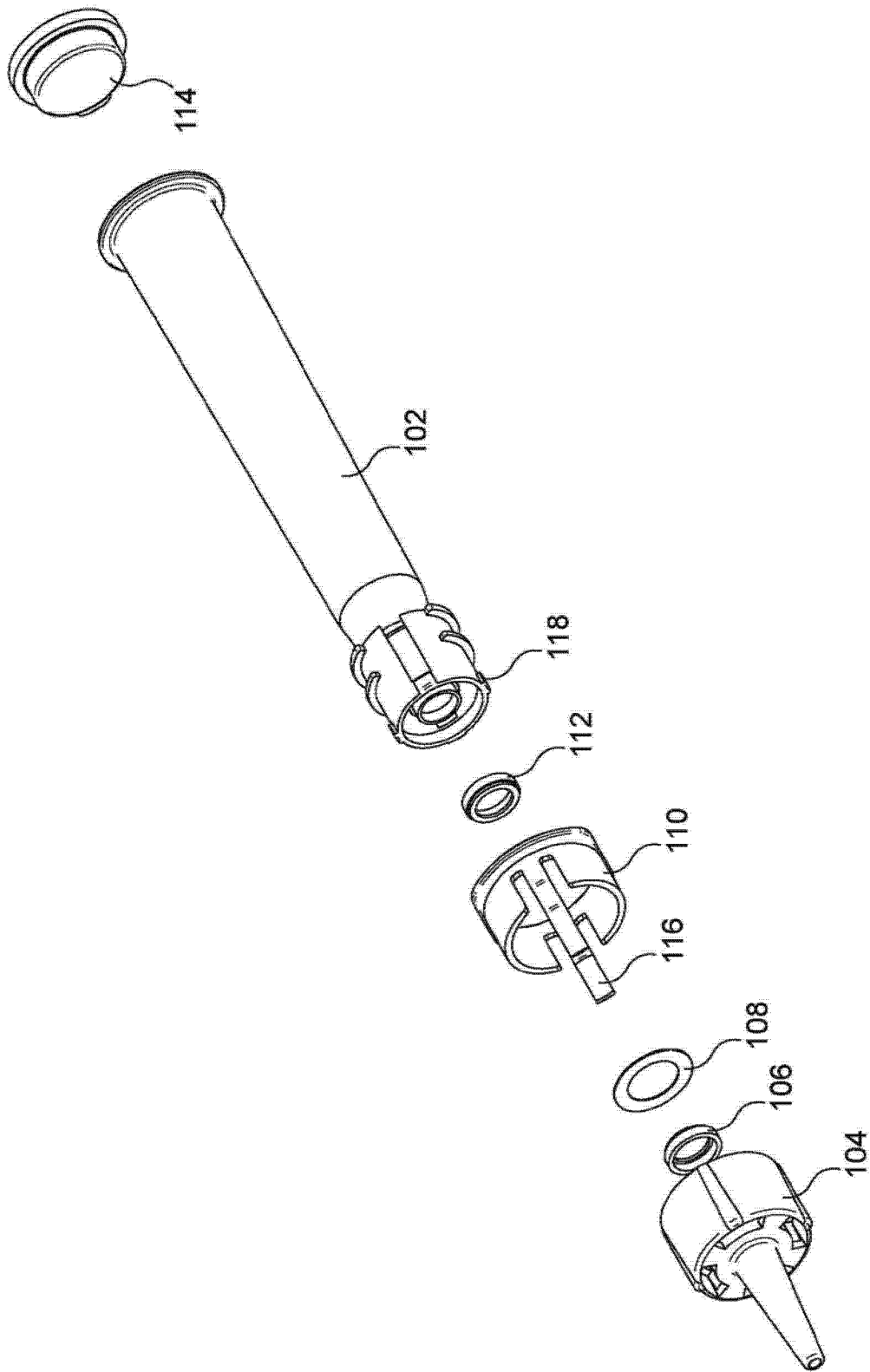


图 1

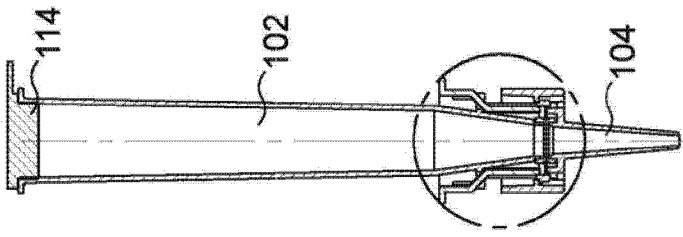


图 2A

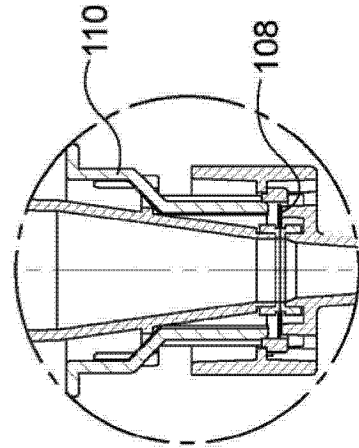


图 2B

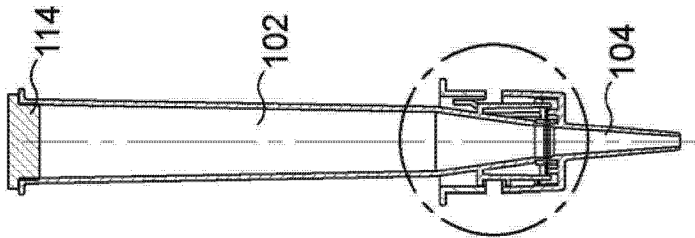


图 2C

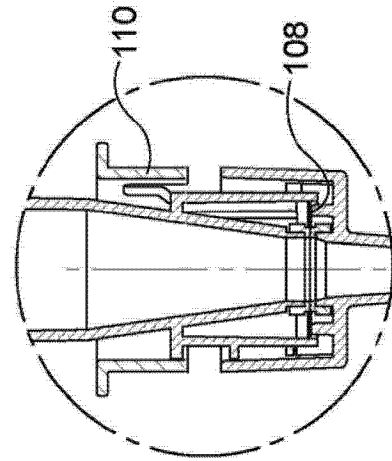


图 2D

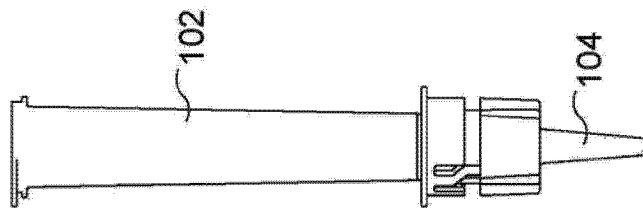


图 3A

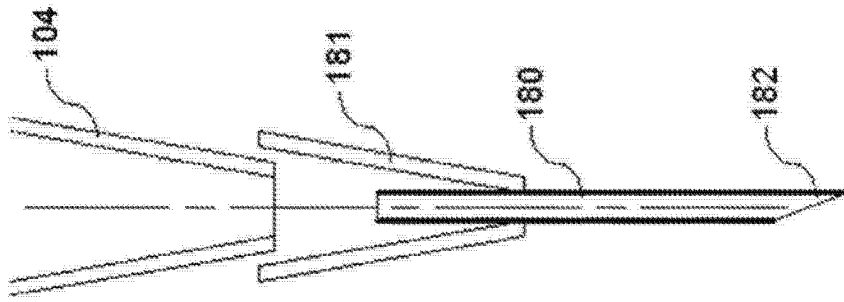


图 3B

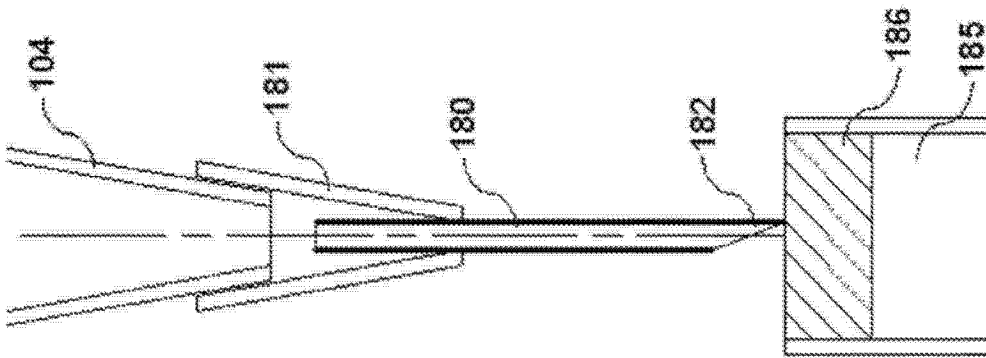


图 3C

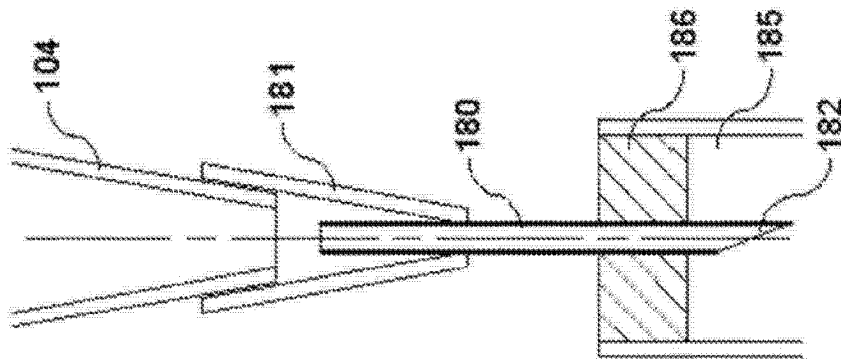
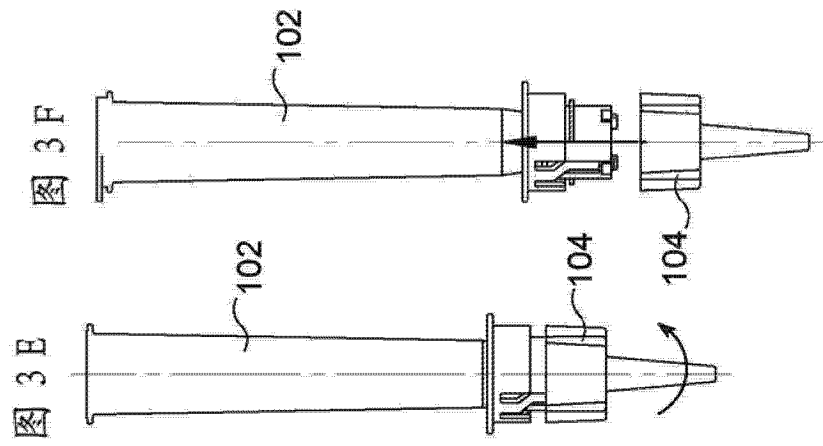
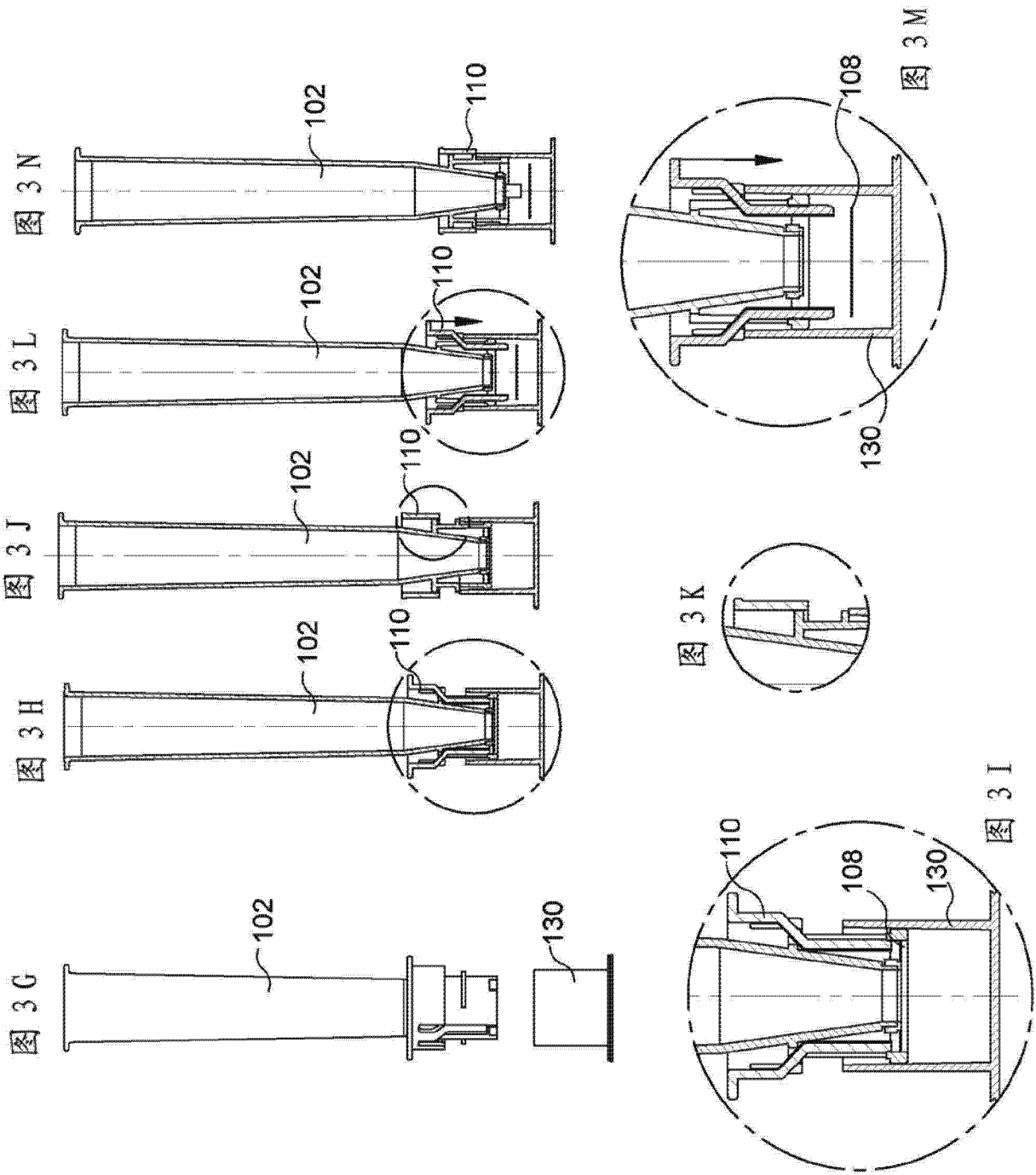


图 3D







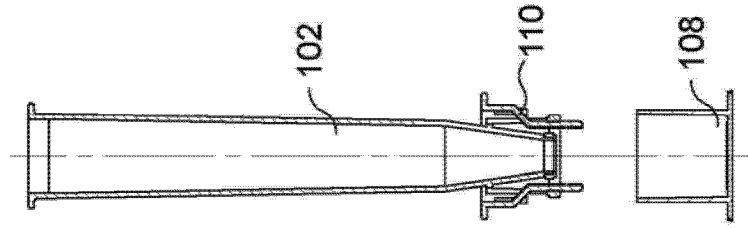


图 30

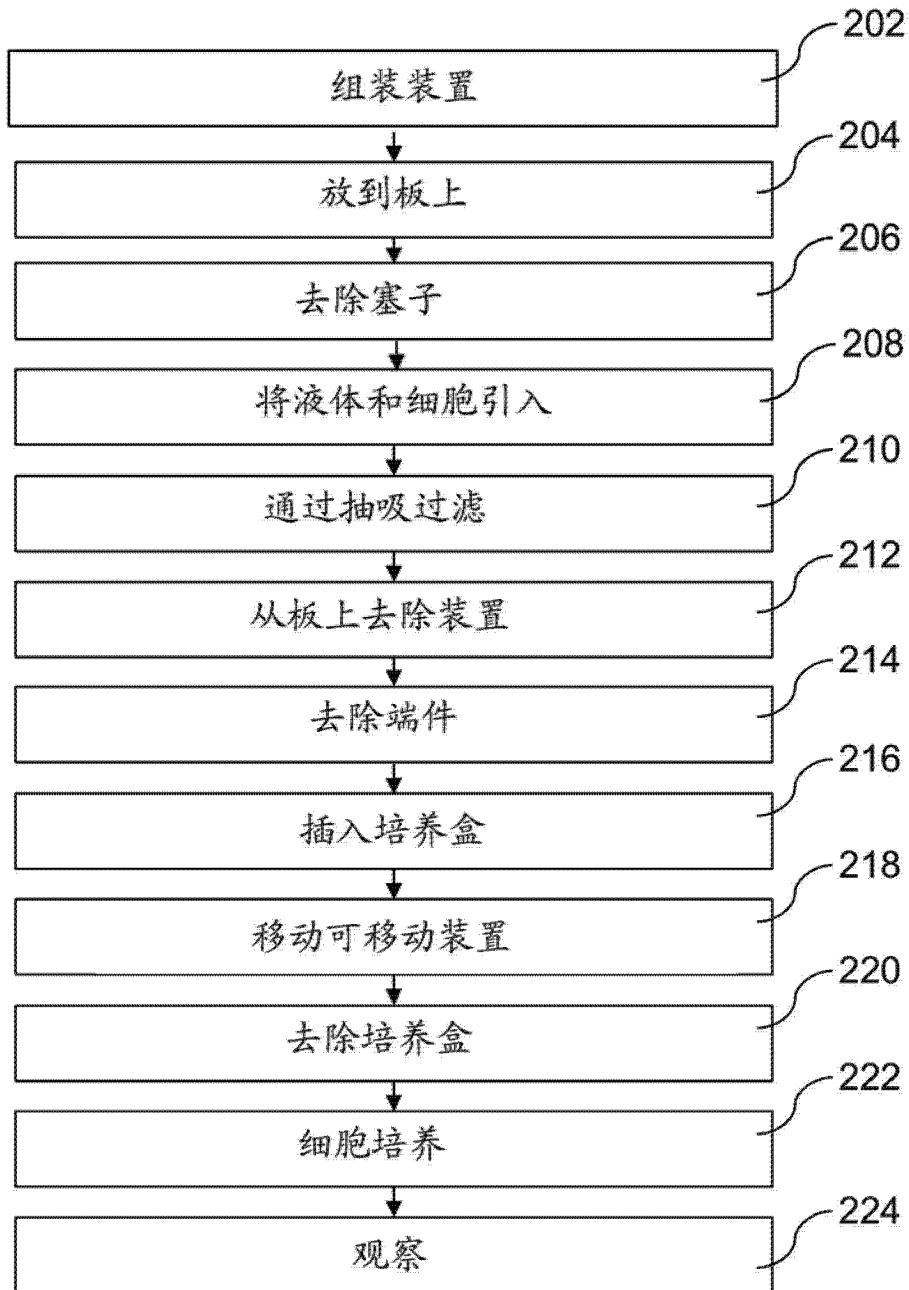


图 4

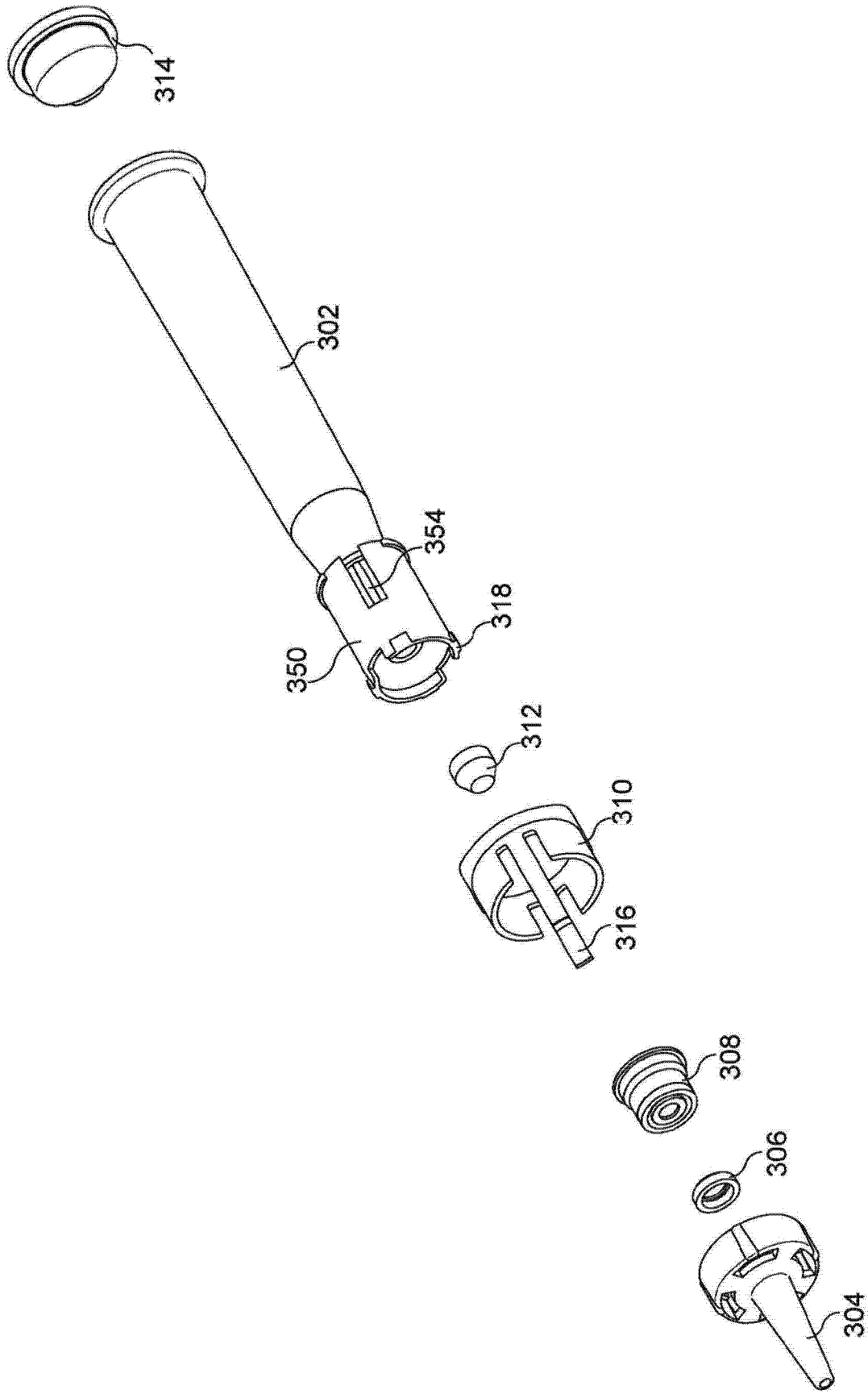


图 5

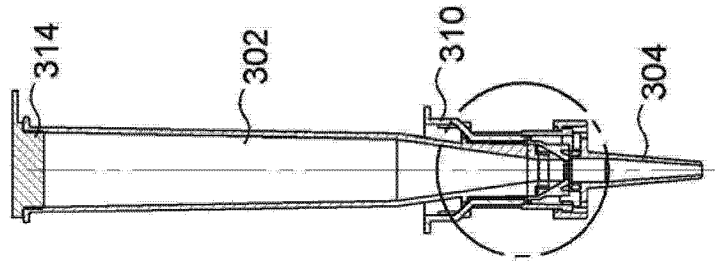


图 6A

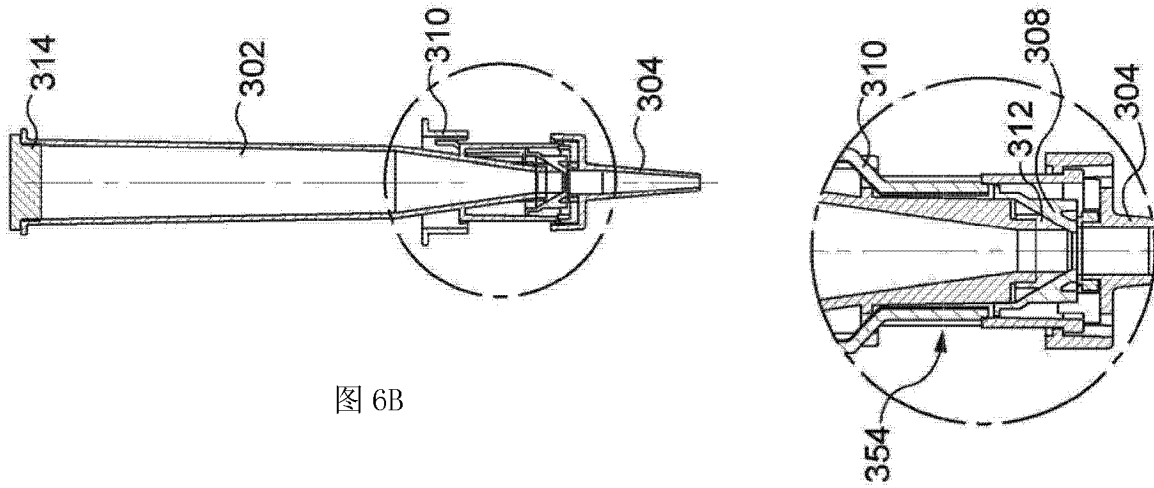


图 6B

图 6C

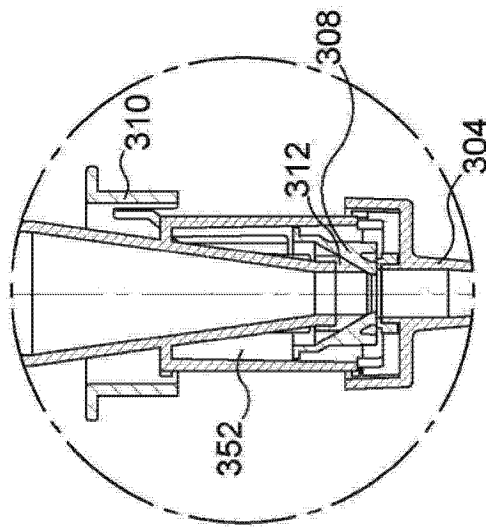


图 6D

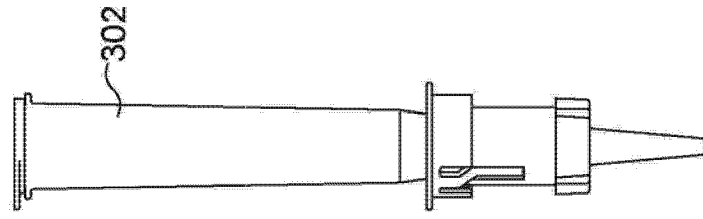


图 7A

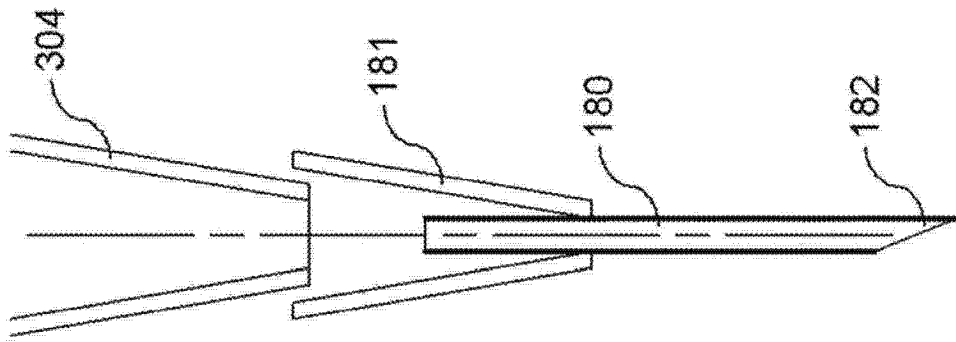


图 7B

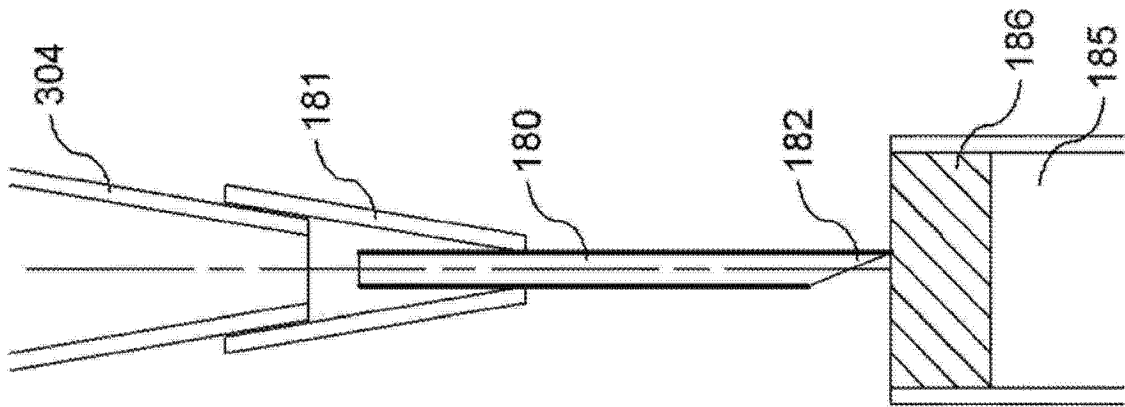


图 7C

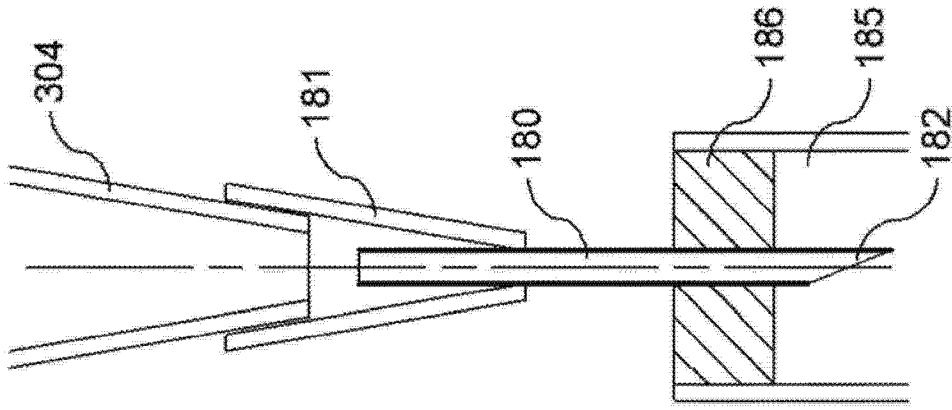


图 7D

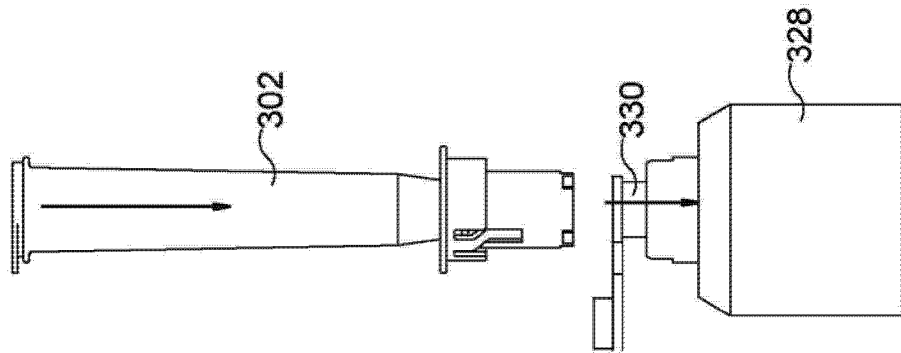
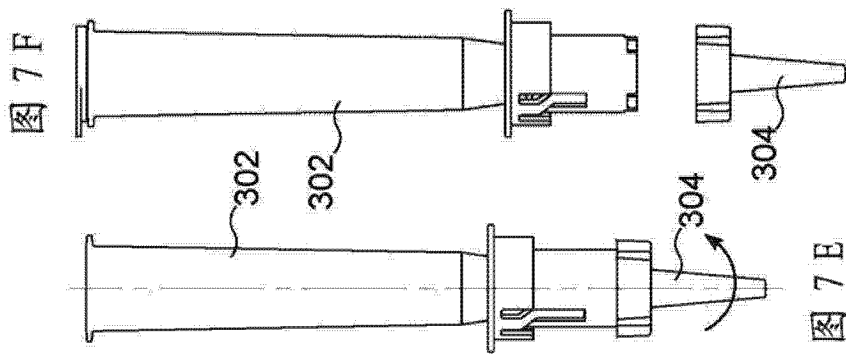


图 7G

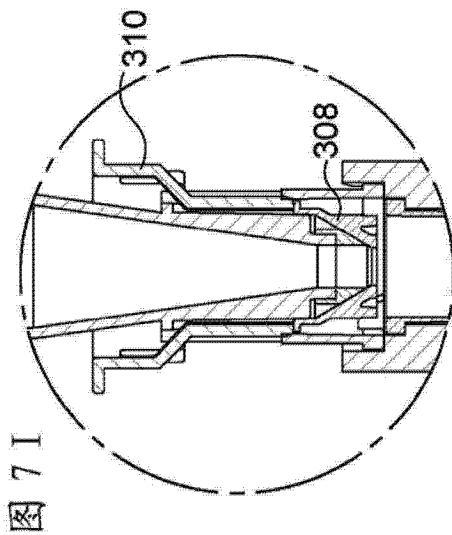


图 7 I

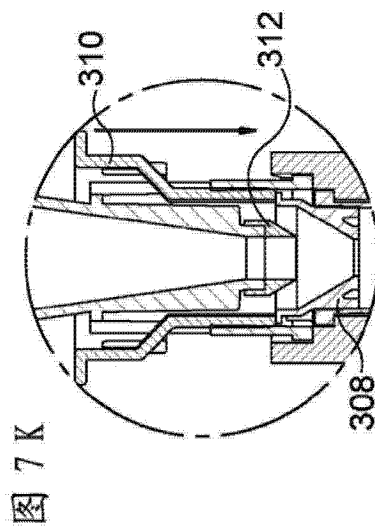


图 7 K

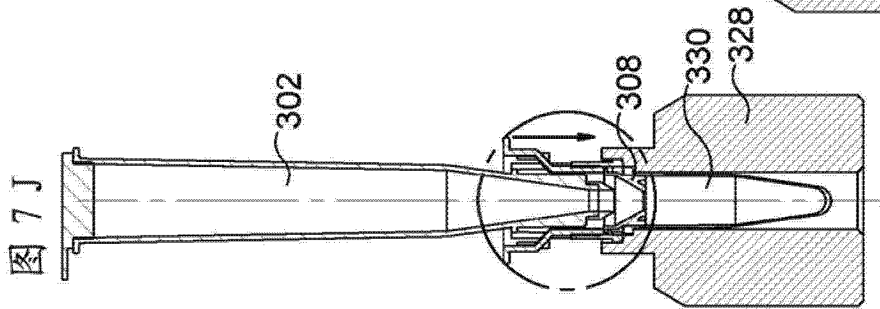


图 7 J

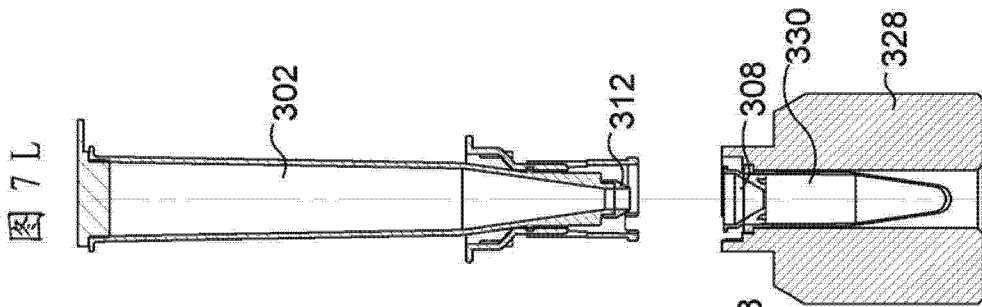


图 7 L

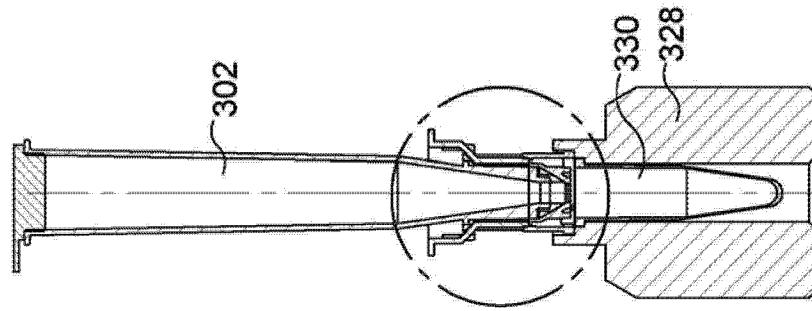


图 7 H

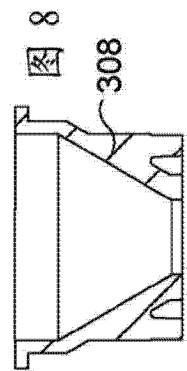


图 8



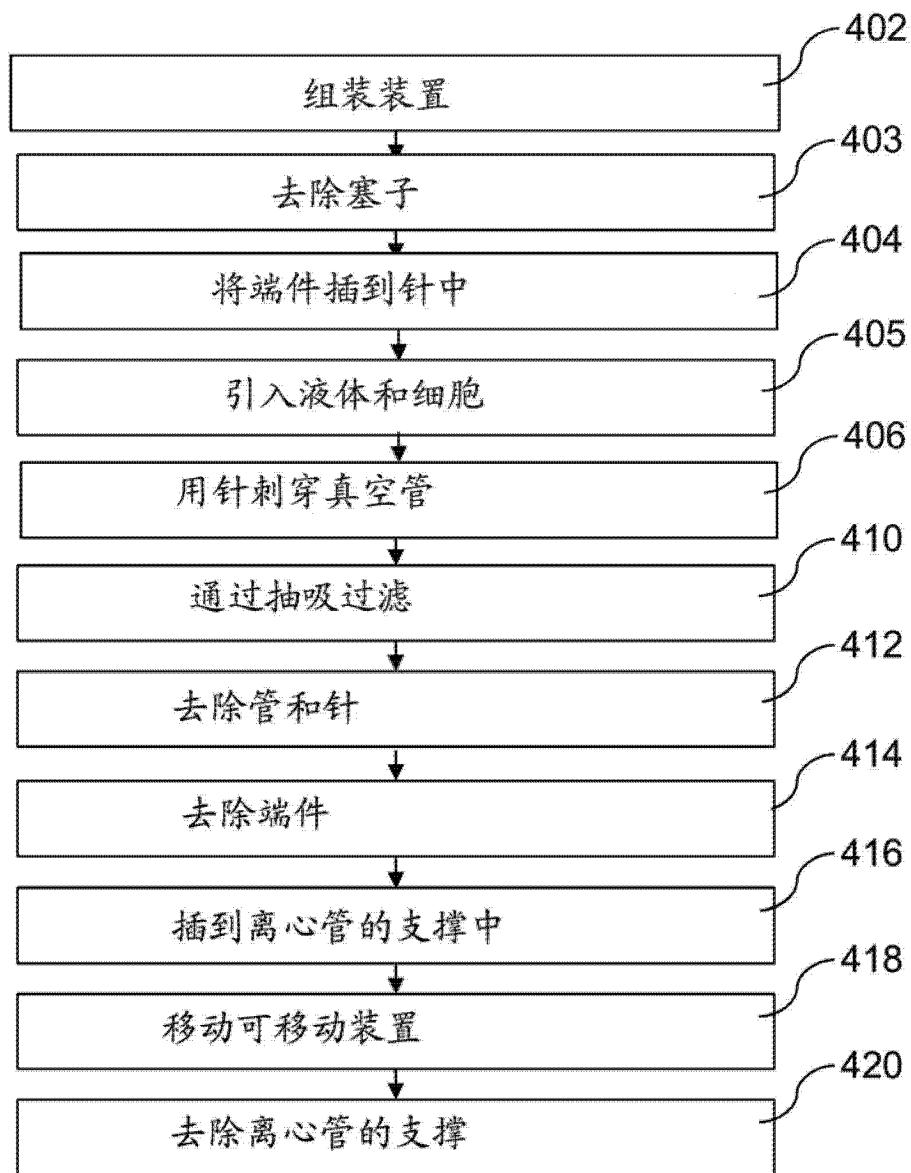


图 9

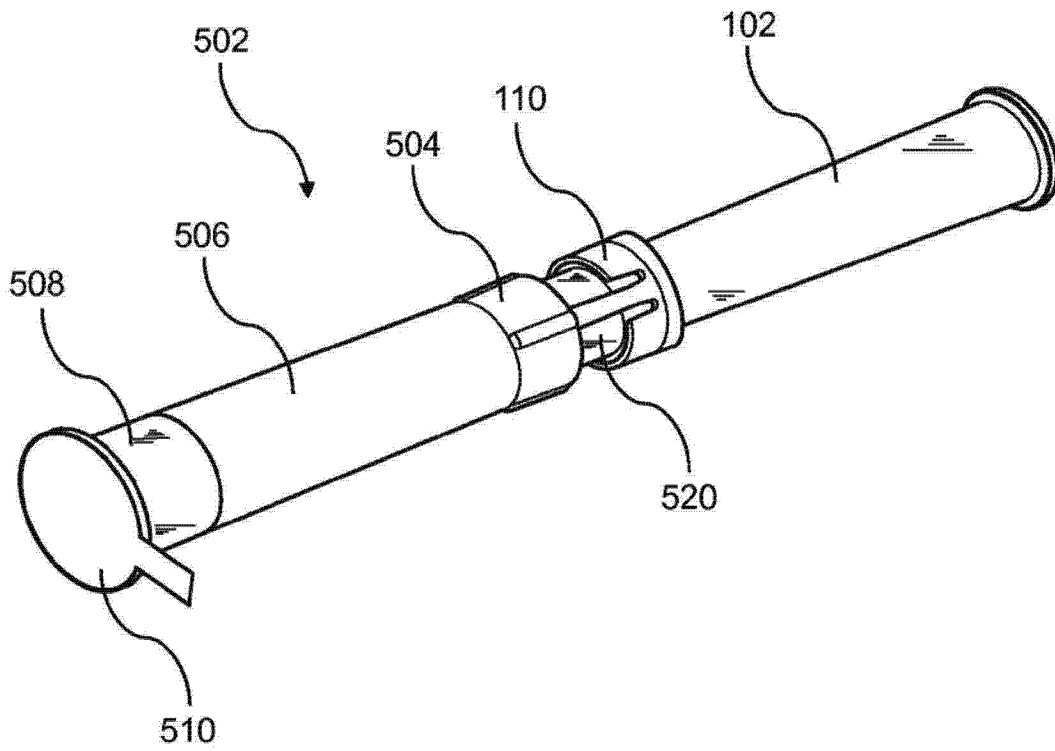


图 10

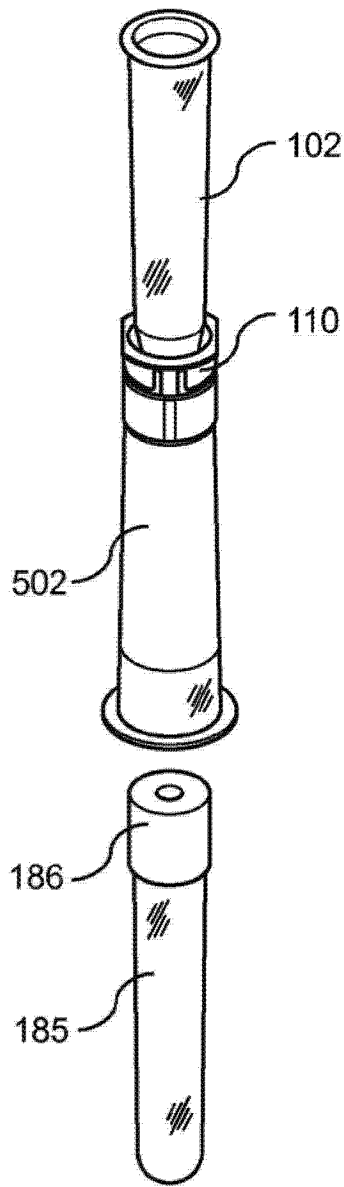


图 11

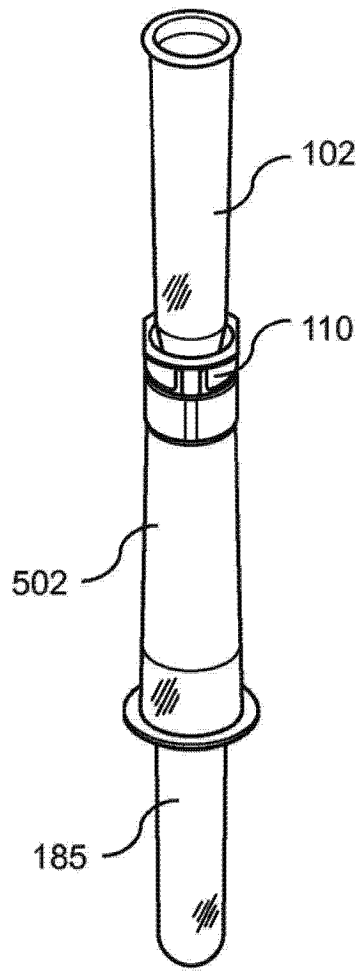


图 12

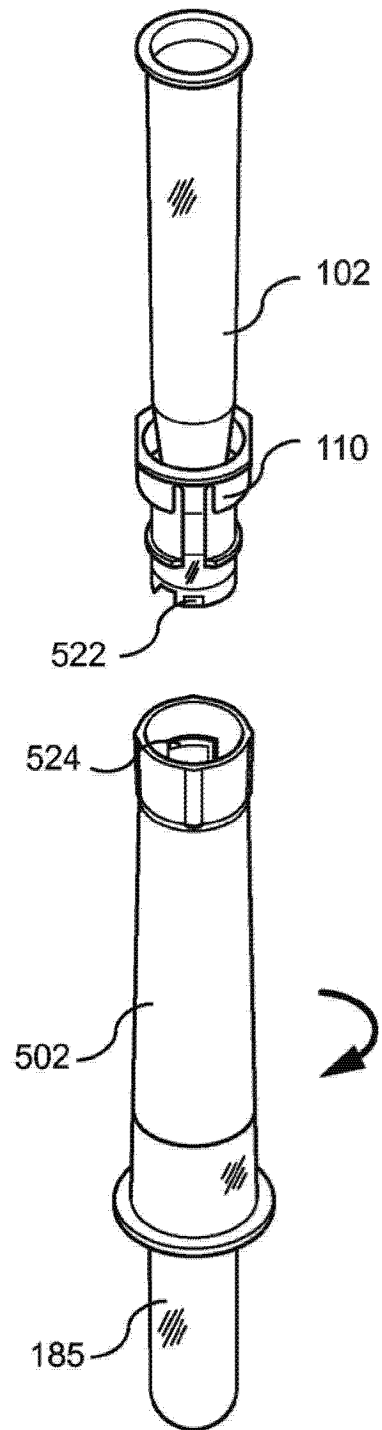


图 13

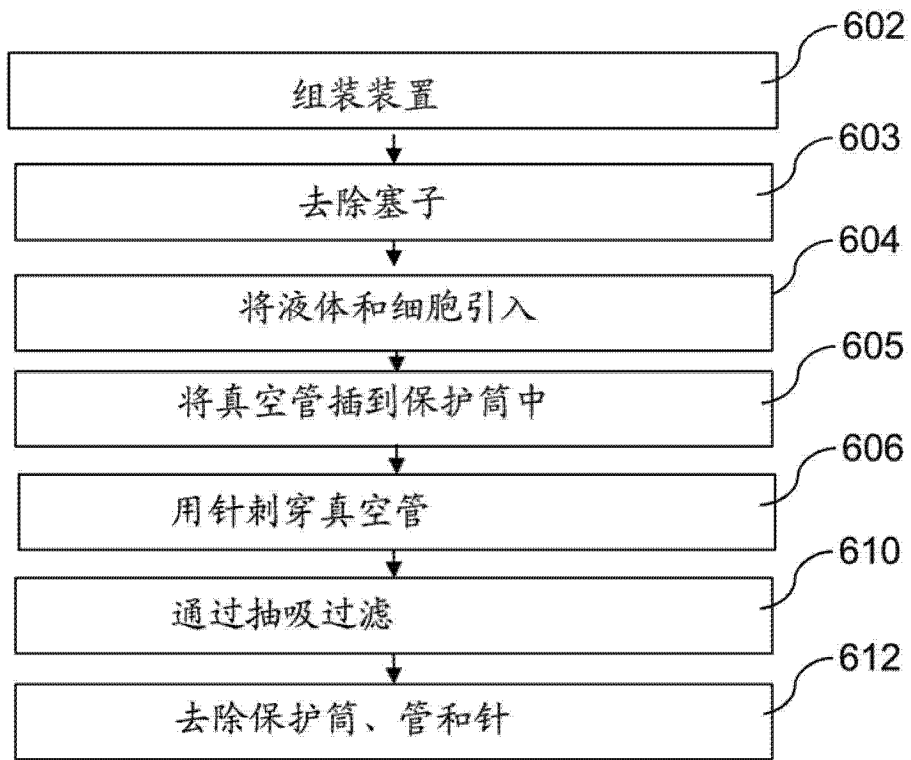


图 14

1. 一种用于在过滤器(108,308)上分离固定细胞或者活细胞或者从所述活细胞中提取遗传物质的装置,其包括:

- 隔室(102,302),具有用于容纳含有所述细胞的液体的内部容积、下部开口和空气入口,
- 过滤器,至少临时地与所述隔室开口一起形成一个单一单元,被设计成当液体经过滤器时拦截所述细胞以及
- 针(180),至少暂时地与所述隔室开口一起形成单一防渗漏单元,过滤器被定位于针和隔室的内部容积之间,所述针被设计成刺穿具有相对于环境压力为负压的真空管(185)的塞子(186)以抽吸所述液体通过所述过滤器,

其特征在于其进一步包括:

位于隔室和围绕着针的保护筒(502)之间的连接装置(504,520),所述连接装置适于在抽吸液体通过过滤器的过程中至少部分地包围真空管。

2. 根据权利要求1的装置,其至少临时地包括所述保护筒(502)。

3. 根据权利要求1或2中任一项的装置,其中所述连接装置(504,520)是临时的并且其使保护筒(502)能够与真空管(185)共同被移除。

4. 根据权利要求2到4中任一项的装置,其中所述保护筒(502)包括密封面对连接装置(504,520)的保护筒开口的可移动膜(510)以及一个开口,适用于在可移动膜被移除之后通过该开口将真空管(185)插入到保护筒中。

5. 根据权利要求1到4中任一项的装置,其另外包括适于暂时地接合到隔室(102,302)的下部开口的手术钢制成的可移动的过滤器支撑(108,308)。

6. 根据权利要求5的装置,其中所述过滤器支撑(108,308)的厚度适于使过滤器支撑能够被扫描。

7. 根据权利要求5或6中任一项的装置其中所述过滤器支撑(108,308)带有标识符。

8. 一种用于在过滤器(108,308)上分离活细胞或从所述活细胞提出遗传物质的方法,其包括:

- 至少暂时地将过滤器(108,308)连接到隔室(102,302)的下部开口上的步骤(202,402,602),该隔室还具有空气入口,
- 将含有所述细胞的液体加入到所述隔室中的步骤(208,405,604),
- 以防渗漏的方式将针(180)至少暂时地连接到所述隔室开口的步骤(202,402,602),过滤器设置在针和隔室的内部容积之间,

其特征在于其进一步包括:

- 至少暂时地将保护筒紧固到隔室的步骤(602),所述保护筒随后包围针,以及
- 借助所述针,刺穿相对于环境压力为负压的真空管(185)的塞子(186)的步骤(210,406,605,606),真空管在刺穿步骤被插入到保护筒以及
- 利用真空管的负压将液体抽吸通过所述过滤器的步骤(210,410,610),所述过滤器拦截所述细胞。

9. 根据权利要求8的方法,其包括将保护筒与真空管(185)共同地移除的步骤(612)。

10. 根据权利要求8和9中任一项的方法,其中所述保护筒(502)包括密封面对连接装置(504,520)的保护筒开口的可移动膜(510),该方法进一步包括在将真空管(185)插入到

保护筒之前移除可移动膜的步骤。