



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111094567 A

(43)申请公布日 2020.05.01

(21)申请号 201880054954.7

(22)申请日 2018.06.30

(30)优先权数据

- 62/527,339 2017.06.30 US
- 62/551,069 2017.08.28 US
- 62/566,374 2017.09.30 US
- 62/566,375 2017.09.30 US
- 62/566,688 2017.10.02 US
- 62/567,697 2017.10.03 US
- 62/620,370 2018.01.22 US
- 62/648,130 2018.03.26 US
- 62/649,731 2018.03.29 US
- 62/657,651 2018.04.13 US
- 62/657,654 2018.04.13 US
- 62/671,385 2018.05.14 US
- 62/689,068 2018.06.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.02.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/040519 2018.06.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/006436 EN 2019.01.03

(71)申请人 因思科瑞普特公司

地址 美国科罗拉多州

(72)发明人 唐·马斯魁勒

菲利普·贝尔格莱德

豪尔赫·贝尔纳特 瑞恩·吉尔

凯文·奈斯

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262

代理人 张少波 郑霞

(51)Int.Cl.

C12N 15/10(2006.01)

G01N 35/04(2006.01)

G01N 35/00(2006.01)

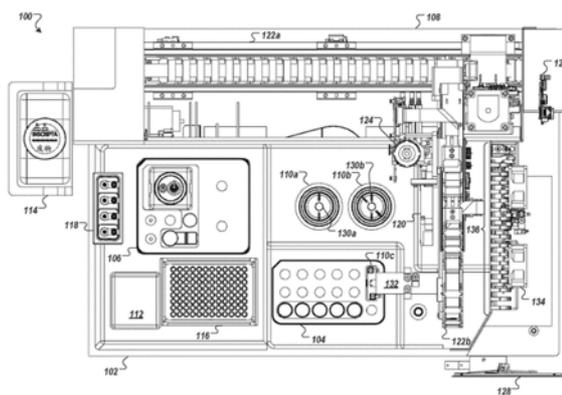
权利要求书2页 说明书59页 附图29页
按照条约第19条修改的权利要求书2页

(54)发明名称

自动化细胞处理方法、模块、仪器和系统

(57)摘要

在说明性实施例中,提供自动化多模块细胞编辑仪器以使在一个或多个细胞内部的核酸序列的多次编辑自动化。



1. 一种自动化多模块细胞编辑仪器,包括:
壳体,其被配置为容纳所述模块中的全部或一些;
容器,其被配置成接收细胞;
一个或多个容器,其被配置成接收核酸;
转化模块,其被配置为将所述核酸引入到所述细胞中;
恢复模块,其被配置为允许所述细胞在所述转化模块中的细胞转化之后恢复;
编辑模块,其被配置为允许所引入的核酸编辑所述细胞中的核酸;以及
处理器,其被配置为基于用户输入和/或预先编程的脚本的选择来操作所述自动化多模块细胞编辑仪器。
2. 根据权利要求1所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,在所述一个或多个容器中的所述核酸包括主链和编辑盒,并且所述自动化多模块细胞编辑仪器还包括核酸组装模块。
3. 根据权利要求2所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述核酸组装模块包括磁体。
4. 根据权利要求3所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述核酸组装模块被配置为执行等温核酸组装。
5. 根据权利要求1所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述编辑模块和所述恢复模块被组合。
6. 根据权利要求1所述的自动化多模块细胞编辑仪器,还包括被配置成使所述细胞生长的生长模块。
7. 根据权利要求6所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述生长模块测量生长细胞的光密度。
8. 根据权利要求7所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,光密度被连续地测量。
9. 根据权利要求6所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述处理器被配置为调节在所述生长模块中的生长条件,使得所述细胞在由用户请求的时间处达到目标光密度。
10. 根据权利要求1所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,被配置为接收细胞的所述容器和被配置为接收核酸的所述一个或多个容器被包含在试剂盒内。
11. 根据权利要求10所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,对于细胞编辑所需的一些或所有试剂被包含在所述试剂盒内。
12. 根据权利要求11所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,被包含在所述试剂盒内的所述试剂由所述处理器读取的脚本可定位。
13. 根据权利要求12所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述试剂盒包括试剂,并且在套件中被提供。
14. 根据权利要求1所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述转化模块包括电穿孔设备。
15. 根据权利要求14所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述电穿孔设备是流式电穿孔设备。
16. 根据权利要求1所述的自动化多模块细胞编辑仪器,还包括过滤模块,所述过滤模块被配置成浓缩所述细胞并使所述细胞成为电转感受态。

17. 一种自动化多模块细胞编辑仪器,包括:
壳体,其被配置为容纳所述模块中的一些或全部;
容器,其被配置成接收细胞;
至少一个容器,其被配置为接收核酸;
核酸组装模块,其被配置为组装主链和编辑盒;
生长模块,其被配置为使所述细胞生长;
转化模块,其包括电穿孔仪以将组装的核酸引入到所述细胞内;
编辑模块,其被配置为允许所述组装的核酸编辑所述细胞中的核酸;以及
处理器,其被配置为基于用户输入和/或预先编程的脚本的选择来操作所述自动化多模块细胞编辑仪器。

18. 根据权利要求17所述的自动化多模块细胞编辑仪器,还包括包含试剂的至少一个试剂盒以在所述自动化多模块细胞编辑仪器中执行细胞编辑。

19. 根据权利要求18所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,对于所述细胞和核酸的所述容器布置在所述试剂盒内。

20. 一种自动化多模块细胞编辑仪器,包括:
壳体,其被配置为容纳所述模块中的一些或全部;
容器,其被配置成接收细胞;
至少一个容器,其被配置为接收核酸;
核酸组装模块,其被配置为a) 组装主链和编辑盒,和b) 在组装之后使组装的核酸脱盐;
生长模块,其被配置为使所述细胞生长;
过滤模块,其被配置为浓缩所述细胞并使所述细胞成为电转感受态;
转化模块,其包括流式电穿孔仪以将所述组装的核酸引入到所述细胞内;
组合的恢复和编辑模块,其被配置为允许所述细胞在所述转化模块中的电穿孔之后恢复,并允许所述核酸编辑所述细胞;以及
处理器,其被配置为基于用户输入来操作所述自动化多模块细胞编辑仪器。

自动化细胞处理方法、模块、仪器和系统

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求下列专利申请的优先权:2017年6月30日提交的标题为“Automated Editing of Nucleic Acids Within a Cell”的美国临时专利申请序列号62/527,339;2017年8月28日提交的标题为“Electroporation Cuvettes for Automation”的美国专利申请序列号62/551,069;2017年9月30日提交的标题为“Electroporation Device”的美国专利申请序列号62/566,374;2017年9月30日提交的标题为“Electroporation Device”的美国专利申请序列号62/566,375;2017年10月2日提交的标题为“Introduction of Exogenous Materials into Cells”的美国专利申请序列号62/566,688;2017年10月3日提交的标题为“Automated Nucleic Acid Assembly and Introduction of Nucleic Acids into Cells”的美国专利申请序列号62/567,697;2018年1月22日提交的标题为“Automated Filtration and Manipulation of Viable Cells”的美国专利申请序列号62/620,370;2018年3月29日提交的标题为“Automated Control of Cell Growth Rates for Induction and Transformation”的美国专利申请序列号62/649,731;2018年5月14日提交的标题为“Automated Control of Cell Growth Rates for Induction and Transformation”的美国专利申请序列号62/671,385;2018年3月26日提交的标题为“Genomic Editing in Automated Systems”的美国专利申请序列号62/648,130;2018年4月13日提交的标题为“Combination Reagent Cartridge and Electroporation Device”的美国专利申请序列号62/657,651;2018年4月13日提交的标题为“Automated Cell Processing Systems Comprising Cartridges”的美国专利申请序列号62/657,654;以及2018年6月20日提交的标题为“Nucleic Acid Purification Protocol for Use in Automated Cell Processing Systems”的美国专利申请序列号62/689,068。所有上述申请为了所有目的而特此通过引用被全部并入。

[0003] 背景

[0004] 在下面的讨论中,为了背景和介绍目的,将描述某些文章和方法。在本文中包含的任何内容均不应被解释为现有技术的“承认”。申请人明确保留在适当情况下证明根据可适用的法律规定在本文提到的文章和方法不构成现有技术的权利。

[0005] 用工程核酸酶进行基因组编辑是一种在活生物体的基因组中发生核酸的变化方法。某些核酸酶在基因组中的靶区域(target region)处产生位点特异性的双链断裂,其可以通过非同源末端连接或同源重组来修复,导致靶向编辑(targeted edits)。然而,由于细胞转化、生长测量和细胞选择的挑战和低效率,这些方法与自动化不兼容。此外,传统台式设备不一定按比例缩放和很好地集成到自动化模块化系统中。因此,创建所编辑的细胞群体的方法和系统仍然很麻烦,并且使用递归技术引入多轮编辑的挑战限制了可以被创建的细胞群体的性质和复杂性。

[0006] 因此,需要用于以自动化方式将组装的(assembled)核酸和其他生物分子引入到活细胞内的自动化仪器、系统和方法,其中所编辑的细胞可用于在自动化仪器外部的进一步实验。

[0007] 说明性实施例的概述

[0008] 在某些实施例中,自动化方法用于在多个细胞中的一个或多个靶基因组区域的核酸酶导向基因组编辑,所述方法在自动化多模块细胞编辑仪器中被执行。这些方法可用于生成具有期望基因组变化的感兴趣的活细胞的库。使用本文所述的自动化多模块细胞编辑仪器执行的自动化方法可以与各种核酸酶导向基因组编辑技术一起使用,并且可以在使用或不使用一种或更多种可选择标记的情况下被使用。

[0009] 因此,在选定的实施例中,本公开提供了用于自动化多模块细胞编辑(包括核酸酶导向基因组编辑)的模块、仪器和系统。本公开的自动化多模块细胞编辑仪器的其他具体实施例被设计成用于递归基因组编辑,例如通过在仪器内的两个或多个编辑操作来将多个编辑顺序地引入到细胞群体的一个或多个细胞内部的基因组内。

[0010] 因此,在本文提供了自动化多模块细胞编辑仪器的实施例,自动化多模块细胞编辑仪器包括:壳体,其被配置为包含模块中的所有或一些;容器(receptacle),其被配置成接收细胞;一个或多个容器,其被配置成接收核酸;转化模块,其被配置为将核酸引入到细胞中;恢复模块,其被配置为允许细胞在转化模块中的细胞转化之后恢复;编辑模块,其被配置为允许被转化到细胞中的核酸编辑细胞中的核酸;以及处理器,其被配置为基于用户输入和/或适当控制器脚本的选择来操作自动化多模块细胞编辑仪器。

[0011] 在一些方面中,在一个或多个容器中的核酸包括主链和编辑盒,并且自动化多模块细胞编辑仪器还包括核酸组装模块。在一些方面中,核酸组装模块包括磁体,并且在一些方面中,核酸组装模块被配置为使用单个等温反应来执行组装。在其他方面中,核酸组装模块被配置为执行扩增和/或连接方法。

[0012] 在自动化多模块细胞编辑仪器的一些方面中,编辑模块和恢复模块被组合。

[0013] 在一些方面中,自动化多模块细胞编辑仪器还可以包括被配置成使细胞生长的生长模块,并且在一些实现中,生长模块连续地或每隔一段时间测量生长细胞的光密度。在一些实现中,处理器被配置成调节在生长模块中的生长条件,使得细胞在由用户请求的时间处达到目标光密度。此外,在一些实施例中,用户可以关于生长过程被更新。

[0014] 在一些方面中,自动化多模块细胞编辑仪器包括试剂盒,其中配置成接收细胞的容器和配置成接收核酸的一个或多个容器被包含在试剂盒内。此外,试剂盒还可以包含细胞编辑所需的一些或所有试剂。在一些实现中,被包含在试剂盒内的试剂是通过由处理器读取的脚本可定位的,并且在一些实现中,试剂盒包括试剂并在套件(kit)中被提供。

[0015] 在一些方面中,自动化多模块细胞编辑仪器的转化模块包括电穿孔设备;以及在一些实现中,电穿孔设备是流式电穿孔设备(flow-through electroporation device)。

[0016] 自动化多模块细胞编辑仪器的一些方面还包括被配置为交换液体和/或浓缩细胞的过滤模块。在特定的方面中,过滤系统也可用于使细胞成为电转感受态的。

[0017] 在其他实施例中,提供了一种自动化多模块细胞编辑仪器,其中自动化多模块细胞编辑仪器包括:壳体,其被配置为容纳模块中的一些或所有;容器,其被配置成接收细胞;至少一个容器,其被配置为接收核酸主链和编辑盒;核酸组装模块,其被配置为a) 组装主链和编辑盒,和b) 在组装之后使组装的核酸脱盐;生长模块,其被配置为使细胞生长并测量细胞的光密度(OD);过滤模块,其被配置为浓缩细胞并使细胞成为电转感受态的;转化模块,其包括流式电穿孔仪以将组装的核酸引入到细胞内;组合恢复和编辑模块,其被配置为允

许细胞在转化模块中的电穿孔之后恢复,并允许组装的核酸编辑细胞中的核酸;以及处理器,其被配置为基于用户输入和/或适当控制器脚本的选择来操作自动化多模块细胞编辑仪器。

[0018] 在一些实现中,自动化多模块细胞编辑仪器提供试剂盒,该试剂盒包括多个试剂储器、流式电穿孔设备和由处理器可读的用于分配位于多个试剂储器中的试剂并控制流式电穿孔设备的脚本。

[0019] 在一些方面中,生长模块包括温控旋转生长小瓶、使小瓶旋转的电机组件、用于测量例如在小瓶中的OD的分光光度计以及接受来自用户的输入并控制细胞的生长速率的处理器。生长模块可以连续地或以设定的间隔自动测量在旋转生长小瓶中的生长细胞的OD,并将细胞的生长控制到如由用户指定的目标OD和目标时间。也就是说,本文所述的方法和提供实时地监控细胞生长并实时地调节旋转生长小瓶的温度以在由用户指定的目标时间处达到目标OD的反馈回路。

[0020] 在自动化多模块细胞编辑仪器的一些方面中,转化模块包括流式电穿孔设备,其中流式电穿孔设备包括:入口和入口通道,其用于将细胞样品和组装的核酸引入到流式电穿孔设备内;出口和出口通道,其用于使电穿孔的细胞样品从流式电穿孔设备离开;流动通道,其与入口通道和出口通道相交并位于入口通道和出口通道之间;以及两个或更多个电极,其中两个或更多个电极位于在流动通道与第一入口通道的交叉点和流动通道与出口通道的交叉点之间的流动通道中,与流动通道中的细胞样品流体连通,并且被配置为向细胞样品施加一个电脉冲或更多个电脉冲。在特定的方面中,流式电穿孔设备可以包括平行的两个或更多个流动通道。

[0021] 还提供了用于使用自动化多模块细胞编辑仪器来在细胞内实现基因组编辑操作的系统。这些系统可以可选地包括在仪器和其它设备或容器之间的用于细胞准备、核酸准备、所编辑的细胞群体的选择、所编辑的细胞群体的功能分析、所编辑的细胞群体的存储和诸如此类的一个或更多个接口。

[0022] 此外,提供了用于使用自动化多模块细胞编辑仪器的方法。在一些方法中,电转感受态细胞优选地在期望光密度下被直接提供到仪器,并转移到转化模块。在一些方法中,细胞被转移到生长模块,在生长模块中它们被生长到期望光密度。然后细胞从生长小瓶被转移到过滤模块,在过滤模块中它们被浓缩并可选地成为电转感受态的。细胞然后被转移到转化模块。

[0023] 在一些方面中,组装的核酸盒被直接提供到仪器并被转移到转化模块。在一些方面中,核酸(例如载体主链和一个或更多个寡核苷酸(oligonucleotide)编辑盒)与细胞引入或准备同时或顺序地转移到核酸组装模块。在这个方面中,核酸被组装、脱盐(例如,通过液体交换或渗透)并被转移到转化模块以被电穿孔到电转感受态细胞内。电穿孔或转染发生在转化模块中,然后细胞被转移到恢复/编辑模块,其可选地包括包含一个或更多个基因组编辑的细胞的选择。在恢复/编辑/选择之后,细胞可被取回并直接用于研究或被储存用于进一步研究,或者另一轮(或多轮)基因组编辑可通过在仪器内重复编辑步骤来被执行。

[0024] 还提供了使用用于核酸酶导向基因组编辑的自动化多模块细胞编辑仪器所创建的细胞库(cell libraries),其中该仪器包括:壳体;容器,其被配置为接收细胞和一个或更多个合理地设计的核酸,所述核酸包括便于在细胞中的核酸酶导向基因组编辑事件的序

列;转化模块,其用于将核酸引入到细胞内;编辑模块,其用于允许核酸酶导向基因组编辑事件出现在细胞中;以及处理器,其被配置为基于用户输入来操作自动化多模块细胞编辑仪器,其中由自动化仪器创建的核酸酶导向基因组编辑事件导致包括具有合理地设计的编辑的单独细胞的细胞库。

[0025] 在一些方面中,细胞库包括饱和诱变细胞库。在一些方面中,细胞库包括启动子交换细胞库(promoter swap cell library)。在其他方面中,细胞库包括终止子交换细胞库(terminator swap cell library)。在另外其他方面中,细胞库包括单核苷酸多态性(SNP)交换细胞库。在还有其他方面中,细胞库包括启动子交换细胞库。

[0026] 在一些实现中,库包括至少100,000个编辑的细胞,而在还有其它实现中,库包括至少1,000,000个编辑的细胞。

[0027] 在一些实现中,核酸酶导向基因组编辑是RGN定向基因组编辑。在优选的方面中,仪器被配置成用于诱导型核酸酶的使用。核酸酶可以是例如化学诱导的、病毒诱导的、光诱导的、温度诱导的或热诱导的。

[0028] 在一些实现中,该仪器在单个周期中提供多个细胞的多重基因组编辑。在一些方面中,该仪器具有在单个周期中编辑至少5个细胞的基因组的能力。在其他方面中,该仪器具有在单个周期中编辑至少100个细胞的基因组的能力。在还有其他方面中,该仪器具有在单个周期中编辑至少1000个细胞的基因组的能力。在还有其他方面中,该仪器具有在单个周期中编辑至少10,000个细胞的基因组的能力。在特定的方面中,自动化多模块细胞编辑仪器具有在单个周期中编辑至少 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 或更多细胞的基因组的能力。

[0029] 可作为在单个周期中编辑的目标的在细胞群体中的基因组位点的数量可以在2-10,000,000之间。

[0030] 在涉及递归编辑的一些实施例中,自动化多模块细胞编辑仪器规定将两个或更多个基因组编辑引入到细胞内,其中单个基因组编辑在每个周期期间被添加到细胞群体的基因组。因此,本公开的自动化多模块细胞编辑仪器的一些方面对顺序地提供每周期在细胞群体中的每细胞两个或更多个编辑、在细胞群体中的每细胞三个或更多个编辑、在群体中的每细胞五个或更多个编辑或者对于细胞群体在单个周期中的每细胞10个或更多个编辑是有用的。

[0031] 在特定实施例中,自动化多模块细胞编辑仪器能够提供每周期被引入到编辑模块的至少10%的细胞的编辑效率,优选地每周期被引入到编辑模块的至少20%的细胞的编辑效率,更优选地每周期被引入到编辑模块的至少25%的细胞的编辑效率,仍然更优选地每周期被引入到自动化多模块细胞编辑仪器的编辑模块的至少30%的细胞的编辑效率,还更优选地每周期被引入到编辑模块的至少40%的细胞的编辑效率,以及甚至更优选地每周期被引入到编辑模块的50%、60%、70%、80%、90%或更多的细胞。

[0032] 下面将更详细地描述其他特征、优点和方面。

[0033] 附图简述

[0034] 合并在本说明书中并构成本说明书的一部分的附图示出一个或更多个实施例,并与描述一起解释这些实施例。附图不一定按比例绘制。在附图和图示中所示的任何值尺寸仅为了说明目的,且可以或不表示实际或优选的值或尺寸。在可适用的情况下,一些或

所有特征可以不被示出以帮助基本特征的描述。在附图中：

[0035] 图1A和1B描绘了用于使用可替换盒作为仪器的一部分进行多个细胞的多重基因组编辑的自动化多模块细胞处理仪器的示例实施例的平面图和透视图。

[0036] 图2A和2B描绘了图1A和1B的自动化多模块细胞处理仪器的侧视图和前视图。

[0037] 图2C和2D描绘了自动化多模块细胞处理仪器的第二示例机架。

[0038] 图3A-3C描绘了用于在自动化多模块细胞处理仪器中使用的示例细胞洗涤和/或浓缩模块的侧视图、剖视图和透视图。

[0039] 图4描绘了用于在自动化多模块细胞处理仪器中使用的核酸组装模块和提纯模块的示例组合。

[0040] 图5A描绘了用于在自动化多模块细胞处理仪器中使用的示例内联电穿孔模块。

[0041] 图5B和5C描绘了用于在自动化多模块细胞处理仪器中使用的示例一次性流式电穿孔模块。

[0042] 图6A-6B描绘了用于在自动化多模块细胞处理仪器中使用的示例洗涤盒。

[0043] 图6C-6E描绘了用于在自动化多模块细胞处理仪器中使用的示例试剂盒。

[0044] 图7A-7C提供了用于在自动化多模块细胞处理仪器中使用的示例过滤模块的功能框图和两个透视图。

[0045] 图7D是用于在自动化多模块细胞处理仪器中使用的示例过滤盒的透视图。

[0046] 图8A-8F描绘了用于在自动化多模块细胞处理仪器中使用的示例细胞生长模块。

[0047] 图9是用于自动化多模块细胞处理的示例方法的流程图。

[0048] 图10A是用于通过自动化多模块细胞处理仪器进行细菌细胞的自动化处理的第一示例工作流程的流程图。

[0049] 图10B是用于通过自动化多模块细胞处理仪器进行细菌细胞的自动化处理的第二示例工作流程的流程图。

[0050] 图10C是用于通过自动化多模块细胞处理仪器进行酵母细胞的自动化细胞处理的示例工作流程的流程图。

[0051] 图11示出了用于向自动化多模块细胞处理仪器提供指令和从自动化多模块细胞处理仪器接收反馈的示例图形用户界面。

[0052] 图12A是用于多个细胞的多重基因组编辑的自动化多模块细胞处理仪器的另一示例实施例的功能框图。

[0053] 图12B是用于多个细胞的递归、多重基因组编辑的自动化多模块细胞处理仪器的又一示例实施例的功能框图。

[0054] 图13是用于在自动化多模式细胞处理仪器中使用的示例控制系统。

[0055] 说明性实施例的详细描述

[0056] 下面关于附图阐述的描述被规定为所公开的主题的各种说明性实施例的描述。关于每个说明性实施例描述了特定的特征和功能；然而对于本领域中的技术人员将明显，可以在没有这些特定的特征和功能中的每一个的情况下实践所公开的实施例。

[0057] 本文描述的技术的实践可以采用在下列文献中阐述的技术：Green等人在Eds. (1999)中的Genome Analysis:A Laboratory Manual Series (I-IV卷)；Weiner、Gabriel、Stephens在Eds. (2007)中的Genetic Variation:A Laboratory Manual；Dieffenbach、

Dveksler在Eds. (2003)中的PCR Primer:A Laboratory Manual;Bowtell和Sambrook (2003),Bioinformatics:Sequence and Genome Analysis;Sambrook和Russell (2006), Condensed Protocols from Molecular Cloning:A Laboratory Manual;以及Green和Sambrook, (Molecular Cloning:A Laboratory Manual.第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,2014);Stryer,L. (1995) Biochemistry (第4版)W.H.Freeman,纽约;Gait的“Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach” 1984, IRL Press,伦敦;Nelson和Cox (2000),Lehninger,Principles of Biochemistry第3版,W.H.Freeman Pub.,纽约;以及Berg等人 (2002) Biochemistry,第5版,W.H.Freeman Pub.,纽约,所有这些为了所有目的通过引用被全部并入本文。

[0058] 注意,如在本文中和在所附权利要求中所使用的,单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“该(the)”包括复数所指物,除非上下文明确地另有规定。因此例如,对“寡核苷酸(an oligo)”的提及指提供相同功能的一种或更多种寡核苷酸,对“方法”的提及包括对本领域中的技术人员已知的等同步骤和方法的提及,等等。也就是说,除非另有明确规定,否则如本文使用的词“一个(a)”、“一个(an)”和“该(the)”具有“一个或更多个”的含义。此外应当理解,在本文可以被使用的术语例如“左”、“右”、“顶部”、“底部”、“前面”、“后面”、“侧面”、“高度”、“长度”、“宽度”、“上部”、“下部”、“内部”、“外部”、“内”、“外”仅描述参考点,且不一定将本公开的实施例限制到任何特定的定向或配置。此外,术语例如“第一”、“第二”、“第三”等仅仅标识如本文公开的多个部分、部件、步骤、操作、功能和/或参考点中的一个,并且同样不一定将本公开的实施例限制到任何特定的配置或定向。

[0059] 此外,术语“近似”、“接近”、“次要”和类似术语通常指包括在20%、10%或在某些实施例中优选地5%的裕度内的所识别的值的范围以及在其间的任何值。

[0060] 除非另有规定,否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与由本公开内容所属的领域中的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0061] 在本文提及的所有出版物(包括专利、已公开的申请和非专利文献)为了所有目的(包括但不限于描述和公开可以关于当前描述的方法、模块、仪器和系统使用或修改的设备、系统和方法的目的)通过引用被并入本文。

[0062] 在值的范围被提供的情况下,应理解,在那个范围的上限和下限之间的每个中间值以及在那个规定范围内的任何其他规定或中间值被包含在本公开内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括在较小范围中,并且也包含在本公开内,受到在范围中的任何被特别排除的限制。在范围包括限制中的一个或两个的场合,排除那些被包括的限制中的任一个或两个的范围也被包括在本公开中。

[0063] 在整个说明书中对“一个实施例”或“实施例”的提及意指关于实施例所描述的特定特征、结构或特性被包括在所公开的主题的至少一个实施例中。因此,短语“在一个实施例中”或“在实施例中”在整个说明书中的不同地方中的出现不一定指同一实施例。

[0064] 此外,在一个或更多个实施例中特定特征、结构或特性可以以任何适当的方式组合。此外,意图是所公开的主题的实施例覆盖其修改和变化。

[0065] 介绍和概述

[0066] 在选定的实施例中,本文所述的自动化多模块细胞编辑仪器、系统和方法可用在活细胞中的多重基因组编辑中以及在用于构建所编辑的细胞群体的库的方法中。本文公开

的自动化多模块细胞编辑仪器可与多种基因组编辑技术且特别是与核酸酶导向基因组编辑一起使用。本公开的自动化多模块细胞编辑仪器提供了用于引入以基因组位点作为目标的核酸序列以用于编辑活细胞的基因组的新方法,包括用于构建包括对编码区、非编码区或两者的基因组编辑的各种类的库的方法。自动化多模块细胞编辑仪器特别适合于在单个周期中将基因组编辑引入到多个细胞,从而以自动化、多重方式生成具有一个或更多个基因组编辑的细胞的库。自动化多模块细胞编辑仪器也适合于引入两个或更多个编辑,例如对在细胞群体的单独细胞中的不同靶基因组位点的编辑。无论是一个还是很多个,这些基因组编辑优选地是合理地设计的编辑;也就是说,被设计和创建以将特定编辑引入到在细胞的基因组内的靶区域的核酸。用于便于基因组编辑事件的序列包括有助于指导核酸酶裂解、将基因组编辑引入到感兴趣区域和/或两者的序列。这些序列还可以包括对细胞的基因组的区域的编辑以允许在细胞的基因组中的特定的合理地设计的编辑被跟踪。例如,在Gill等人的标题为“CRISPR enabled multiplexed genome engineering”的美国专利号US 9,982,278和Gill等人的标题为“Methods for generating barcoded combinatorial libraries”的美国专利号10,017,760、申请序列号15/632,222中教导了将编辑引入到细胞内的这样的方法。

[0067] 这种核酸和寡核苷酸(或“寡核苷酸(oligo)”)意欲包括但不限于可以具有不同长度的核苷酸的聚合形式,包括脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。用于在说明性实施例中使用的核酸和寡核苷酸可以在一个或更多个位置处被修饰以增强在化学合成或随后的酶修饰或聚合酶复制期间引入的稳定性。这些修饰包括但不限于在寡聚体中包括一种或更多种烷基化核酸、锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、磷酸酯、硫代磷酸酯。经修饰的核苷酸的示例包括但不限于5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤(xantine)、4-乙酰胞嘧啶、5-(羧羟甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖基腺苷、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫代尿嘧啶、 β -D-甘露糖基腺苷、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-D46-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-羟乙酸(v)、怀丁氧苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、腺苷(queosine)、2-巯基胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-羟乙酸甲基乙酯、尿嘧啶-5-羟乙酸(v)、5-甲基-2-硫尿嘧啶、3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶、(acp3)w和2,6-二氨基嘌呤。核酸分子也可以在碱基部分、糖部分或磷酸盐主链上被修饰。

[0068] 核酸酶导向基因组编辑

[0069] 在选定的实施例中,本文所述的自动化多模块细胞编辑仪器利用核酸酶导向基因组编辑系统。存在用于提供进入到生物体的基因组内的编辑的多个不同的基于核酸酶的系统,并且每个系统可以在单一编辑系统、顺序编辑系统(例如,顺序地使用不同的核酸酶导向系统以在细胞中提供两个或更多个基因组编辑)和/或递归编辑系统(例如,利用单个核酸酶导向系统以在细胞中引入两个或更多个基因组编辑)中被使用。本文描述了示例性核酸酶导向基因组编辑系统,尽管本领域中的技术人员在阅读本公开时将认识到,其他酶导向编辑系统在说明性实施例的自动化多模块细胞编辑仪器中也是有用的。

[0070] 应当注意,如本文阐述的自动化系统可以使用核酸酶,用于使用本公开的仪器进行基因组的裂解和将编辑引入到靶基因组区域内。

[0071] 在说明性实施例的特定方面中,核酸酶编辑系统是允许编辑的定时的控制的诱导系统。诱导系统可以包括核酸酶的诱导表达、编辑核酸的诱导表达或两者。调节核酸酶活性的能力可以减少离靶裂解并便于精确的基因组工程。许多不同的诱导系统可以与本公开的自动化多模块细胞编辑仪器一起使用,如对本领域中的技术人员在阅读本公开时明显的。

[0072] 在某些方面中,通过核酸酶的裂解也可以与说明性实施例的自动化多模块细胞编辑仪器一起使用以选择在靶区域处的具有基因组编辑的细胞。例如,受到基因组编辑的去除特定核酸酶识别位点(例如,经由同源重组)的细胞可以使用说明性实施例的自动化多模块细胞编辑仪器和系统通过在这种编辑之后将细胞暴露于核酸酶来被选择。在没有基因组编辑的细胞中的DNA将被裂解,且随后将具有有限的生长和/或死亡,而接受基因组编辑的去除核酸酶识别位点的细胞将不会受到对核酸酶的随后暴露影响。

[0073] 如果细胞或细胞群体包括由诱导物分子诱导的核酸导向核酸酶编码DNA,核酸酶将仅在诱导物分子存在时被表达。可选地,如果细胞或细胞群体包括由阻遏物分子阻遏的核酸导向核酸酶编码DNA,核酸酶将仅在没有阻遏物分子的情况下被表达。

[0074] 例如,已经描述了用于使用RNA导向核酸酶进行编辑的诱导系统,其使用化学诱导来限制细胞对RNA导向核酸酶的暂时暴露。(Zhang等人于2015年1月23日提交的标题为“Inducible DNA Binding Proteins and Genome Perturbation Tools and Applications Thereof”的美国专利申请公布2015/0291966 A1;也参见在科罗拉多州Lafayette的Horizon/Dharmacon处可得到的诱导慢病毒表达载体。对于额外的技术,参见例如Campbell的Targeting protein function:the expanding toolkit for conditional disruption,Biochem J.,473(17):2573-2589(2016)。

[0075] 在其他示例中,病毒诱导型核酸酶可用于诱导细胞中的基因编辑。参见例如Dong的Establishment of a highly efficient virus-inducible CRISPR/Cas9 system in insect cells,Antiviral Res.,130:50-7(2016)。在另一个示例中,对于核酸导向核酸酶的诱导表达,可以通过将核酸酶与雌激素受体(ERT2)的激素结合域融合来在具有4-羟基三苯氧胺(4-HT)的哺乳动物细胞中打开和关闭变体。(Liu等人,Nature Chemical Biology,12:980-987(2016)以及参见Tan于2016年11月7日提交的标题为“Chemical-Inducible Genome Engineering Technology”的国际专利申请公布WO 2017/078631 A1。

[0076] 此外,已经针对在原核和真核细胞中的基因的受控表达开发了许多基因调节控制系统。这些系统包括四环素控制的转录激活系统(Tet-On/Tet-Off,Clontech,Inc.(加利福尼亚州帕洛阿尔托)、Lac开关诱导系统(Brent等人的标题为“Regulation of eucaryotic gene expression”的美国专利号4,833,080)、蜕皮激素诱导基因表达系统(No等人的Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice,PNAS,93(8):3346-3351(1996))和cumate基因开关系统(Mullick等人的The cumate gene-switch:a system for regulated expression in mammalian cells,BMC Biotechnology,6:43(2006))。

[0077] 可以使用说明性实施例的自动化多模块细胞编辑仪器编辑的细胞包括任何原核细胞、古生菌细胞或真核细胞。例如,供本说明性实施例使用的原核细胞可以是革兰氏阳性

细菌细胞(例如枯草芽孢杆菌)或者革兰氏阴性细菌细胞(例如大肠杆菌细胞)。供说明性实施例的自动化多模块细胞编辑仪器使用的真核细胞包括任何植物细胞和任何动物细胞,例如真菌细胞、昆虫细胞、两栖动物细胞、线虫细胞或哺乳动物细胞。

[0078] 锌指核酸酶基因组编辑

[0079] 在选定的实施例中,本文所述的自动化多模块细胞编辑仪器执行锌指核酸酶基因组编辑。锌指核酸酶(ZFN)是通过将锌指DNA结合域融合到DNA裂解域而生成的人工限制性酶。锌指域可以被设计到在生物体的基因组中的靶特定区域。(Urnov等人,Nature Reviews Genetics,11:636-646(2010);Carroll等人于2003年1月22日提交的标题为“Targeted Chromosomal Mutagenesis Using Zinc Finger Nucleases”的国际专利申请公布WO 2003/087341 A2)。使用生物体的内源性DNA修复机制,ZFN可用于精确地改变基因组的靶区域。ZFN可以用于通过在突变等位基因中的DNA中产生双链断裂(“DSB”)来使在杂合个体中的显性突变失效,在没有同源模板的情况下,双链断裂可以通过非同源末端连接(NHEJ)来被修复。假定切口是干净且不复杂的,NHEJ通过将两端连接在一起来修复DSB,且通常不产生突变。(Durai等人的Zinc finger nucleases:custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells,Nucleic Acids Res.,33(18):5978-90(2005))。这种修复机制可用于通过插入缺失或染色体重排在基因组中诱导错误,常常使在该位置处编码的基因产物成为不起作用的。

[0080] 可选地,可以在外源双链DNA片段存在的情况下使用同源依赖修复(HDR)来将DNA引入到基因组内。可以通过将与DSB的旁侧序列同源的期望序列插入序列来利用HDR对同源序列的依赖性以修复DSB,当该旁侧序列由HDR系统用作模板时导致在感兴趣的基因组区域内产生期望的变化。

[0081] 多对ZFN也可用于完全去除基因组序列的整个大片段(Lee等人,Genome Res.,20(1):81-9(2009);以及Gregory等人于2010年7月28日提交的标题为“Methods and Compositions for Treating Trinucleotide Repeat Disorders”的美国专利申请公布2011/0082093 A1)。扩展的CAG/CTG重复序列道是包括亨廷顿病、肌强直性营养不良和几种脊髓小脑共济失调的多于12个遗传性神经紊乱的遗传基础。已经在人类细胞中证明,ZFN可以将DSB引导至CAG重复序列,并将重复序列从长病理长度缩短至短的较小毒性长度(Mittelman等人的Zinc-finger directed double-strand breaks within CAG repeat tracts promote repeat instability in human cells,PNAS USA,106(24):9607-12(2009);以及Miller等人于2013年2月28日提交的标题为“Methods and Compositions for Treating Huntington's Disease”的美国专利申请公布2013/0253040 A1)。

[0082] 大范围核酸酶基因组编辑

[0083] 在选定的实施例中,本文所述的自动化多模块细胞编辑、模块仪器和系统执行大范围核酸酶基因组编辑。大范围核酸酶在20世纪90年代被识别,且随后的工作表明它们是用于基因组编辑的特别有前途的工具,因为它们能够有效地诱导同源重组,在基因组的编码或非编码区中生成突变,并改变基因组的编码区的阅读框。(参见,例如Epinat等人的A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in eukaryotic cells,e.g.,yeast and mammalian cells,Nucleic Acids Research,31(11):2952-2962;以及2014年12月30日发布的标题为“Chromosomal Modification Involving the

Induction of Double-stranded DNA Cleavage and Homologous Recombination at the Cleavage Site”的Choulika等人的美国专利号8,921,332)。大范围核酸酶的高特异性给它们高精度和比其他天然地出现的限制酶低得多的细胞毒性。

[0084] 转录激活子样效应因子核酸酶编辑

[0085] 在选定的实施例中,本文所述的自动化多模块细胞编辑模块、仪器和系统执行转录激活子样效应因子核酸酶编辑。转录激活子样效应因子核酸酶(TALEN)是可被设计成切割DNA的特异序列的限制酶。它们通过将TAL效应因子DNA结合域融合到DNA裂解域(一种切割DNA链的核酸酶)而制成。转录激活子样效应因子核酸酶(TALEN)可以被设计成结合到实际上任何期望的DNA序列,因此当与核酸酶组合时,DNA可以在特定位置处被切割。(参见例如Miller等人的A TALE nuclease architecture for efficient genome editing, Nature Biotechnology, 29(2):143-8(2011);Boch的Nature Biotech.,TALEs of genome targeting, 29(2):135-6(2011);2010年1月12日提交的标题为“Modular DNA-binding Domains and Methods of Use”的Bonas等人的国际专利申请公布WO 2010/079430 A1;2010年12月10日提交的标题为“TAL Effector-Mediated DNA Modification”的Voytas等人的国际专利申请公布WO 2011/072246 A2)。

[0086] 像ZFN一样,TALEN可以通过诱导DSB来编辑基因组。在靶区域处的TALEN创建的位点特异性DSB通过NHEJ或HDR被修复,导致靶向基因组编辑。TALEN可用于引入插入缺失、重排或在外源双链DNA片段存在的情况下通过NHEJ将DNA引入到基因组内。

[0087] RNA导向核酸酶(RGN)编辑

[0088] 在某些方面中,说明性实施例的自动化多模块细胞编辑仪器的基因组编辑利用成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)技术,其中RNA导向核酸酶(RGN)用于编辑在生物体的基因组中的特定靶区域。通过将合成导向RNA(gRNA)复合的RGN转入细胞,细胞的基因组可以在期望位置处被切割,允许对基因组的靶区域的编辑。向导RNA帮助RGN蛋白识别和切割靶基因组区域的DNA。通过操纵向导RNA的核苷酸序列,RGN系统可以被编程为以用于裂解的任何DNA序列作为目标。

[0089] 与说明性实施例的自动化多模块细胞编辑仪器一起使用的RGN系统可以使用具有在期望靶基因组区域处切割和粘贴的能力的任何RNA导向核酸酶系统来执行基因组编辑。在某些方面中,RNA导向核酸酶系统可以使用两个单独的RNA分子作为gRNA,例如CRISPR RNA(crRNA)和反式激活CRISPR RNA(tracrRNA)。在其他方面中,gRNA可以是包括crRNA和tracrRNA序列的单个gRNA。

[0090] 在某些方面中,基因组编辑将期望DNA变化引入到靶区域,并从靶区域去除前间区序列基序(PAM)区域,因此例如当暴露于与补充靶区域的合成gRNA复合的RNA导向核酸酶时排除在该靶区域处的基因组的任何额外编辑。在这个方面中,第一编辑事件可以是例如RGN定向编辑事件或同源重组事件,并且具有期望编辑的细胞可以使用与补充靶区域的合成gRNA复合的RGN来被选择。未经历第一编辑事件的细胞将被切割,且因此在适当的选择标准下将不会继续存活。包含期望突变的细胞不会被切割,因为它们将不再包含必需的PAM位点,并将在自动化多模块细胞编辑仪器中继续生长和繁殖。

[0091] 当RGN蛋白系统用于选择时,需要的主要是切割活动;因此,RNA导向核酸酶蛋白系统可以与用于编辑的相同,或者可以是在使用特定PAM位点切割时有效、但在该位点处编辑

时不一定有效的RGN蛋白系统。用于选择的核酸酶的一个重要方面是使用先前基因组编辑操作的编辑方法替换的PAM位点的识别。

[0092] 通过同源重组进行基因组编辑

[0093] 在其他方面中,说明性实施例的自动化多模块细胞编辑仪器的基因组编辑可以利用包括cre-lox技术和FRET技术的同源重组方法。位点特异性同源重组不同于一般的同源重组,因为重组酶识别所需的短特异性DNA序列是只有在其处出现重组的位点。位点特异性重组需要专门的重组酶来识别位点并催化在这些位点处的重组。许多噬菌体和酵母衍生的位点特异性重组系统(每一个包括重组酶和特异性同源位点)被表明为了DNA整合目的而在真核细胞中工作,且因此可应用于在本发明中的使用,且这些包括噬菌体P1 Cre/lox、酵母FLP-FRT系统和位点特异性重组酶的酪氨酸家族的Dre系统。例如在美国专利号7,422,889、7,112,715、6,956,146、6,774,279、5,677,177、5,885,836、5,654,182和4,959,317中描述了这种系统和使用方法,这些美国专利通过引用被并入本文以教导使用这种重组酶的方法。已知酪氨酸家族的其他系统(例如,噬菌体λInt整合酶、HK2022整合酶)以及此外属于重组酶的单丝氨酸家族的系统(例如噬菌体phiC31、R4Tp901整合酶)使用它们各自的重组位点在哺乳动物细胞中工作,并且也可应用于在本发明中的使用。在美国专利号6,689,610、6,204,061、5,631,153、5,627,059、5,487,992和5,464,764中描述了用于同源重组的示例性方法;这些美国专利中的每一个通过引用被全部并入。

[0094] 仪器架构

[0095] 图1A和1B描绘了利用基于盒的源材料(例如,试剂、酶、核酸、洗涤溶液等)的示例自动化多模块细胞处理仪器100。例如,仪器100可以被设计为用于在实验室环境中使用的台式仪器。仪器100可以合并用于在细胞中进行自动化基因组裂解和/或编辑时执行各种分阶段操作的可重复使用的和一次性的元件的混合物。例如,基于盒的源材料可以位于在仪器100的底板102上的指定区域上用于由机器人操纵仪器108获得。如图1B所示,底板102可以包括保护水槽,使得来自仪器100的任何模块的污染物溅出、滴落或溢出被容纳在保护水槽的唇缘内。

[0096] 转到图1A,在一些实现中,仪器100包括用于将DNA样品和其他源材料引入到仪器100的试剂盒104、用于将洗脱液和其他源材料引入到仪器100的洗涤盒106以及用于在模块(例如,模块110a、110b和110c)、盒容器(例如,盒104和106的容器)和仪器100的存储单元(例如,单元112、114、116和118)之间移动材料以执行自动化基因组裂解和/或编辑的机器人操纵系统108。当完成细胞供应品106的处理时,在一些实施例中,细胞输出可以由机器人操纵仪器108转移到放置在例如试剂盒104或洗涤盒106中的存储单元或容器用于临时存储和随后取回。

[0097] 机器人操纵系统108例如可以包括空气排代泵120以将液体从盒104、106的各种材料源转移到各种模块110和存储单元,存储单元可以是在试剂盒104或洗涤盒106中的容器。在其他实施例中,机器人操纵系统108可以包括拾取和放置头(未示出)以将源材料的容器(container)(例如,管或小瓶)从试剂盒104和/或洗涤盒106转移到各种模块110。在一些实施例中,一个或更多个摄像机或其他光学传感器(未示出)确认机器人操纵装置沿着台架122的正确移动和定位。

[0098] 在一些实施例中,机器人操纵系统108使用设置在转移端供应品116(例如,移液枪

枪头架)中的一次性转移端来转移在仪器100内的源材料、试剂(例如核酸组件)和细胞。例如,所使用的转移端116可以被丢弃在固体废物单元112中。在一些实现中,固体废物单元112包含弹射器(kicker)以从机器人操纵系统108的拾取和放置头移除管、枪头、小瓶和/或过滤器。例如,如所示,机器人操纵系统108包括过滤器拾取头124。

[0099] 在一些实施例中,仪器100包括具有连接到空气排代泵120的吸管(sipper)的电穿孔比色皿(cuvette)。在一些实现中,细胞和试剂通过吸管被吸入到电穿孔比色皿内,并且比色皿被移动到仪器100的一个或更多个模块110。

[0100] 在一些实现中,仪器100由处理系统126(例如,图13的处理系统1310)控制。处理系统126可以被配置成基于用户输入来操作仪器100。例如,用户输入可以由仪器100通过触摸屏控制显示器128来接收。处理系统126可以控制仪器100的各种模块110的定时、持续时间、温度和其他操作。转到图1B,处理系统126可以连接到电源150以用于仪器100的操作。

[0101] 返回到图1A,如所示,试剂盒104包括16个储器(5X 3个储器的矩阵,加上附加储器)和流式转化模块(电穿孔设备)110c。洗涤盒106可以被配置成容纳大的管或储器以存储例如洗涤溶液或在整个迭代过程中常常使用的溶液。此外在一些实施例中,洗涤盒106可以包括多个较小的管、小瓶或储器以保持较小体积的例如源培养基以及用于所编辑的细胞的容器或储藏库。例如,当两个或更多个试剂盒104被顺序地使用和更换时,洗涤盒106可以被配置为保持在适当的位置上。尽管试剂盒104和洗涤盒106在图1A中被显示为分离的盒,但是在其他实施例中,洗涤盒106的内容物可以合并到试剂盒104中。在另外的实施例中,三个或更多个盒可以被装载到自动化多模块细胞处理仪器100中。在某些实施例中,在自动化多模块细胞处理仪器100中的试剂盒104、洗涤盒106和模块110的其他部件被一起包装在套件中。

[0102] 在一些实现中,洗涤盒106和试剂盒104是为了在自动化多模块细胞处理仪器100中使用而提供的一次性套件。例如,用户可以在激活细胞处理之前打开并定位在自动化多模块细胞处理仪器的机架内的试剂盒104和洗涤盒106中的每个。在下面关于图2A至2D更详细讨论了示例机架。

[0103] 在一些实现中,盒104、106的部件被标记有机器可读标记,例如条形码,用于由机器人操纵系统108识别。例如,机器人操纵系统108可以扫描在盒104、106中的每个内的容具以确认内容物。在其他实现中,机器可读标记可以被标记在每个盒104、106上,并且自动化多模块细胞处理仪器100的处理系统可以基于机器可读标记来识别所存储的材料图。

[0104] 转到图6A-6B,在一些实施例中,洗涤盒106是包括一对大瓶602、一组四个小管604和被保持在盒主体608中的大管606的洗涤盒600。在一些实施例中,瓶602和管604、606中的每一个用可刺穿的箔密封用于由自动化液体处理系统(例如吸管或移液枪)进入。在其他实施例中,瓶602和管604、606中的每一个包括可密封的检修垫圈(sealable access gasket)。在一些实施例中,瓶602和管604、606中的每一个的顶部被标记有机器可读标记(未示出)用于内容物的自动化识别。

[0105] 在一些实施例中,大瓶602每个包含洗涤溶液。洗涤溶液可以是相同或不同的洗涤溶液。在一些示例中,洗涤溶液可以包含例如缓冲液、缓冲液和10%甘油、80%乙醇。

[0106] 在一些实现中,盖610将瓶602和管604、606固定在盒主体608内。转到图6B,盖610可以包括用于进入瓶602和管604、606中的每一个的孔。此外,盖610可以包括用于识别盒的

类型的机器可读标记612(例如,获得盒内容物的图)。可选地,每个孔可以单独地标记有单独的内容物。

[0107] 转到图6C-E,在一些实现中,试剂盒104是包括一组16个小管或小瓶626和被保持在盒主体622中的流式电穿孔模块624的试剂盒620。在一些实施例中,小管或小瓶626中的每一个用可刺穿的箔密封用于由自动化液体处理系统(例如吸管或移液枪)进入。在其他实施例中,小管或小瓶626中的每一个包括可密封的检修垫圈。在一些实施例中,小管或小瓶626中的每一个的顶部被标记有机器可读标记(未示出)用于内容物的自动化识别。机器可读标记可以包括条形码、QR码或其他机器可读编码。用于识别特定容具的其他自动化手段可以包括颜色编码、符号识别(例如,文本、图像、图标等)和/或形状识别(例如,容具的相对形状)。在一些实施例中,不是被标记在器皿(vessel)本身上,盒主体和/或盒盖的上表面可以包含用于识别内容物的机器可读标记。小管或小瓶可以每个具有相同的尺寸。可选地,可以在试剂盒620中提供管或小瓶的多个体积。在说明性示例中,每个管或小瓶可以被设计成容纳2和20mL之间、4和10mL之间或大约5mL。

[0108] 在说明性示例中,小管或小瓶626可以每个容纳下列材料之一:载体主链、寡核苷酸、用于等温核酸组装的试剂、用户供应的细胞样品、诱导剂、在缓冲液中的磁珠、乙醇、用于细胞选择的抗生素、用于洗脱细胞和核酸的试剂、油覆盖物、其他试剂和细胞生长和/或恢复培养基。

[0109] 在一些实现中,盖628将小管或小瓶626固定在盒主体622内。转到图6D,盖628可以包括用于进入小管或小瓶626中的每一个的孔。三个大孔632用粗体(例如蓝色)带被描画轮廓以指示添加用户供应的材料的位置。例如,用户供应的材料可以包括载体主链、寡核苷酸和细胞样品。此外,盖610可以包括用于识别盒的类型的机器可读标记630(例如,获得盒内容物的图)。可选地,每个孔可以单独地标记有单独的内容物。在一些实现中,为了确保用户供应的材料的位置,用于在实验室环境中填充而提供的小瓶或管可以具有独特的形状或尺寸,使得细胞样品小瓶或管仅配合在细胞样品孔中,寡核苷酸小瓶或管仅配合在寡核苷酸孔中,等等。

[0110] 返回到图1A,还示出了包括台架122的机器人操纵系统108。在一些示例中,机器人操纵系统108可以包括自动化液体处理系统,例如由瑞士Mannedorf的Tecan Group有限公司、内华达州Reno的Hamilton公司(参见例如标题为“Pipetting device, fluid processing system and method for operating a fluid processing system”的0tt的W02018015544A1)或科罗拉多州Fort Collins的Beckman Coulter有限公司(参见例如标题为“Methods and systems for tube inspection and liquid level detection”的Striebl等人的US20160018427A1)制造的自动化液体处理系统。机器人操纵系统108可以包括空气排代移液枪120。试剂盒104、106允许与机器人操纵系统108的液体处理仪器(例如空气排代移液枪120)的特别容易的集成。在一些实施例中,只有空气排代移液枪120由台架122移动,并且各种模块110和盒104、106保持静止。移液枪枪头116可以被提供用于供空气排代移液枪120使用。

[0111] 在一些实施例中,自动化机械运动系统(致动器)(未示出)另外向自动化多模块细胞处理系统100的一个或多个模块110和/或盒104、106供应XY轴运动控制或XYZ轴运动控制。例如,所使用的移液枪枪头116可以由机器人操纵系统放置在废物储藏库112中。例如,

当机器人操纵系统将材料移动到自动化多模块细胞处理仪器100内的其他模块110时,主动模块可以被升高以接触与机器人操纵系统的可接近定位,或者相反,在使用后被降低以避免与机器人操纵系统的碰撞。

[0112] 在一些实现中,自动化多模块细胞处理仪器100包括在试剂盒104中包括的流式电穿孔模块110c。例如,在细胞和核酸经由输入通道被转移到流式电穿孔设备后,流式电穿孔连接桥132与流式电穿孔设备接合。桥132提供不透液密封和与电极的电连接以及用于在电穿孔模块110c内进行电穿孔的控制。例如,电穿孔连接桥132可以连接到在自动化多模块细胞处理仪器100的电子支架136内的流式电穿孔控制器134。

[0113] 在一些实现中,自动化多模块细胞处理仪器100包括双细胞生长模块110a、110b。如所示,细胞生长模块110a、110b每个包括旋转细胞生长小瓶130a、130b。细胞生长模块110a、110b中的至少一个可以另外包括集成过滤模块(未示出)。在可选的实施例中,过滤模块或细胞洗涤和浓缩模块可以替代地与细胞生长模块110a、110b分离(例如,如关于图12A和12B的细胞生长模块1210a和过滤模块1210b所述)。例如,细胞生长模块110a、110b可以每个包括关于图8A-F的细胞生长模块800讨论的特征和功能。

[0114] 在一些实施例中,细胞生长模块110a、110b中的一个或两个的过滤部分使用储存在过滤盒118中的可更换过滤器。例如,机器人操纵系统可以包括过滤器拾取头124以拾取和接合过滤器用于供细胞生长模块110a、110b中的一个或两个使用。过滤器拾取头将过滤器转移到生长模块,从生长模块向上吸取细胞,然后洗涤细胞并使细胞成为电转感受态的。来自细胞的培养基和洗涤液布置在废物模块114中。

[0115] 在一些实现中,自动化多模块细胞处理仪器100包括用于将在试剂盒104中提供的材料组合成用于细胞编辑的组装核酸的核酸组装和提纯功能(例如,核酸组装模块)。此外,脱盐或提纯操作提纯组装的核酸并将缓冲液脱盐,使得核酸更有效地电穿孔到细胞内。核酸组装和提纯特征可以包括反应室或管容器(未示出)和磁体(未示出)。

[0116] 尽管示例仪器100被示为包括模块110的特定布置,但该实现仅为了说明目的。例如,在其他实施例中,在仪器100内可以包括更多或更少的模块110,并且可以包括不同的模块,例如用于细胞融合以产生杂交瘤的模块和/或用于蛋白产生的模块。此外,可以在某些实施例中复制某些模块,例如图1A的复制的细胞生长模块110a、110b。

[0117] 在一些实施例中,在引入到自动化多模块细胞编辑仪器之前,细胞被修饰。例如,可以通过使用λ红色系统以通常对于卡那霉素或氯霉素用抗生素抗性基因替换靶基因来修饰细胞。(参见Datsenko和Wanner的One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, PNAS USA, 97 (12):6640-5 (2000); 2003年1月21日颁布的标题为“DNA Cloning Method Relying on the *E. coli* recE/recT Recombination System”的Stewart等人的美国专利号6,509,156B1)。在一些实施例中,细胞可能已经用包含核酸酶的表达盒的载体被转化或转染。在另一个示例中,在引入到自动化多模块细胞编辑仪器(例如,使用同源定向修复)之前,可以将期望的基因编辑引入到细胞群体,并且系统用于使用核酸酶选择这些编辑和/或向细胞群体添加额外的编辑。

[0118] 图2A至2D示出了用于在自动化多模块细胞处理仪器的台式版本中使用的示例机架200和230。例如,机架200和230可以具有大约24-48英寸的宽度、大约24-48英寸的高度和大约24-48英寸的深度。机架200和230中的每一个都可以被设计成保持在自动化细胞处理

中使用的多个模块和一次性供应品。此外,每个机架200和250可以安装用于在模块之间移动材料的机器人操纵系统。

[0119] 图2A和2B描绘了自动化多模块细胞处理仪器的第一示例机架200。如所示,机架200包括盖202,其具有手柄204和用于提升盖202并进入机架200的内部的铰链206。冷却格栅214可以允许空气通过内部风扇(未示出)流动。此外,机架200由可调节支脚220提升。例如,支脚220可以在机架200下方提供额外的气流。在一些实施例中,控制按钮216允许在机架200内的细胞处理的单按钮自动开始和停止。

[0120] 在机架200内部,在一些实现中,机器人操纵系统208沿着台架210布置在材料盒212a、212b和模块上方。在一些实施例中,控制电路、液体处理管、气泵控件、阀、热单元(例如,加热和冷却单元)和其他控制机构在机架200的底板下方布置在控制箱区域218中。

[0121] 尽管未示出,但在一些实施例中,显示屏可以位于例如覆盖盖202的一部分的机架200的正面上。显示屏可以向用户提供关于自动化多模块细胞处理仪器的处理状态的信息。在另一个示例中,显示屏可以接受来自用户的用于进行细胞处理的输入。

[0122] 图2C和2D描绘了自动化多模块细胞处理仪器的第二示例机架230。如所示,机架230包括带有铰链234的透明门232。例如,门可以向页面的左侧摆动以提供对机架的工作区域的接近。例如,用户可以打开透明门232以将供应品(例如试剂盒和洗涤盒)装载到机架230中。

[0123] 在一些实施例中,机架230的正面还包括被示为在门232的右侧的显示器(例如,触摸屏显示设备)236。显示器236可以向用户提供关于自动化多模块细胞处理仪器的处理状态的信息。在另一个示例中,显示器236可以接受来自用户的用于进行细胞处理的输入。

[0124] 在机架230的右端面上的通气格(air grate)238可以在机架230(例如,在底板上方)的工作区内(例如,在底板上方)提供气流。在机架230的左侧上的第二通气格240可以在机架230的控制箱区域242内(例如,在底板下方)提供气流。虽然未示出,但在一些实施例中,支脚(例如机架200的支脚220)可以将机架230升高到工作表面上方,提供另外的气流。

[0125] 在机架230内部,在一些实现中,机器人操纵系统248沿着台架250布置在盒252a、252b、材料供应品254a、254b(例如,移液枪枪头和过滤器)和模块256(例如,双生长小瓶)上方。在一些实施例中,控制电路、液体处理管、气泵控件、阀和其他控制机构在机架230的底板下方布置在控制箱区域242中。

[0126] 在一些实施例中,液体废物单元246安装到机架230的左外壁。液体废物单元246例如可以在外部安装到机架230以避免潜在的污染并确保液体废物单元246的迅速倒空和更换。

[0127] 核酸组装模块

[0128] 本公开的自动化多模块细胞编辑仪器的某些实施例包括在仪器内的核酸组装模块。核酸组装模块被配置为接受便于期望基因组编辑事件所必需的核酸。核酸组装模块也可以被配置为接受合适的载体主链用于载体组装和随后转化到感兴趣的细胞中。

[0129] 一般来说,术语“载体”指能够运输它链接到的另一个核酸的核酸分子。载体包括但不限于单链、双链或部分双链的核酸分子;包括一个或多个自由端、无自由端(例如圆形)的核酸分子;包括DNA、RNA或两者的核酸分子;以及本领域中已知的其他品种的多核苷酸。一种类型的载体是“质粒”,其指额外的DNA片段可以例如通过标准分子克隆技术被插入

到其中的圆形双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中病毒衍生的DNA或RNA序列存在于载体中,用于包装成病毒(例如,逆转录病毒、复制缺陷逆转录病毒、腺病毒、复制缺陷腺病毒和腺相关病毒)内。病毒载体还包括由病毒携带的用于转染到宿主细胞内的多核苷酸。某些载体能够在它们被引入到其中的宿主细胞(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和游离哺乳动物载体)中自主复制。其他载体(例如,非游离哺乳动物载体)在引入宿主细胞内时被整合到宿主细胞的基因组中,并从而与宿主基因组一起被复制。此外,某些载体能够指导它们被操作地链接到的基因的表达。此类载体在本文中被称为“表达载体”。在重组DNA技术中有效用的常见表达载体常常是以质粒的形式。在本文提供了载体的进一步讨论。

[0130] 重组表达载体可以包括在适合于转化以及对于一些核酸序列适合于在宿主细胞中的核酸的转译和表达的形式中的核酸,这意味着重组表达载体包括一个或更多个调节元件(其可以基于待用于表达的宿主细胞来被选择),其操作地链接到待表达的核酸序列。在重组表达载体内,“操作地链接”意欲意指感兴趣的核苷酸序列以允许转录以及对于一些核酸序列允许核苷酸序列的转译和表达(例如,在体外转录/转译系统中或者当载体被引入到宿主细胞内时在宿主细胞中)的方式链接到调节元件。在于2004年9月2日被公布为US 2004-0171156 A1的标题为“Recombinational Cloning Using Nucleic Acids Having Recombination Sites”的美国专利申请序列号10/815,730中公开了合适的重组和克隆方法,该美国申请的内容为了所有目的通过引用被全部并入本文。

[0131] 在一些实施例中,调节元件可操作地链接到可靶向核酸酶系统的一个或更多个元件,以便驱动转录,并且对于一些核酸序列驱动可靶向核酸酶系统的一个或更多个组分的转译和表达。

[0132] 在一些实施例中,载体可以包括可操作地链接到对核酸导向核酸酶编码的多核苷酸序列的调节元件。对核酸导向核酸酶编码的多核苷酸序列可以是针对在特定细胞(例如原核或真核细胞)中的表达优化的密码子。真核细胞可以是酵母、真菌、藻类、植物、动物或人类细胞。真核细胞可以是特定生物体的细胞或从特定生物体得到的细胞,特定生物体例如是哺乳动物,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔、狗或非人哺乳动物(包括非人灵长类动物)。此外或可选地,载体可以包括可操作地链接到多核苷酸序列的调节元件,多核苷酸序列在被转录时形成向导RNA。

[0133] 核酸组装模块可以被配置成以自动化方式执行多种不同的核酸组装技术。可在所公开的自动化多模块细胞编辑仪器的核酸组装模块中执行的核酸组装技术包括但不限于使用限制酶的那些组装方法,包括PCR、BioBrick组装(2016年6月7日发布的标题为“Scarless Multi-part DNA Assembly Design”的Hillson的美国专利9,361,427)、IIS型克隆(例如GoldenGate组装;2010年7月6日提交的标题为“System and Method of Modular Cloning”的Weber等人的欧洲专利申请公布EP 2 395 087A1)以及连接酶循环反应(de Kok S的Rapid and Reliable DNA Assembly via Ligase Cycling Reaction,ACS Synth Biol.,3(2):97-106(2014);Engler等人的PLoS One,A One Pot,One Step,Precision Cloning Method with High Throughput Capability,3(11):e3647(2008);2000年11月7日发布的标题为“Chain Reaction Cloning Using a Bridging Oligonucleotide and DNA Ligase”的Pachuk等人的美国专利号6,143,527)。在其他实施例中,由所公开的自动化多模块细胞编辑仪器执行的核酸组装技术基于在核酸的相邻部分之间的重叠,例如Gibson

Assembly[®]、CPEC、SLIC、连接酶循环等。附加组装方法包括在酵母中的间隙修复 (Bessa 的 Improved gap repair cloning in yeast: treatment of the gapped vector with Taq DNA polymerase avoids vector self-ligation, *Yeast*, 29 (10): 419-23 (2012))、通路 (gateway) 克隆 (Ohtsuka 的 Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering, *Curr Pharm Biotechnol*, 10 (2): 244-51 (2009); 1999年3月30日发布的标题为“Recombinational Cloning Using Engineered Recombination Sites”的 Hartley 等人的美国专利号 5,888,732; 2001年8月21日发布的标题为“Recombinational Cloning Using Nucleic Acids Having Recombination Sites”的 Hartley 等人的美国专利号 6,277,608) 以及拓扑异构酶介导的克隆 (Udo 的 An Alternative Method to Facilitate cDNA Cloning for Expression Studies in Mammalian Cells by Introducing Positive Blue White Selection in Vaccinia Topoisomerase I-Mediated Recombination, *PLoS One*, 10 (9): e0139349 (2015); 2005年7月12日发布的标题为“Methods and Reagents for Molecular Cloning”的 Chestnut 等人的美国专利号 6,916,632B2)。例如在下列文献中描述了这些和其他核酸组装技术: Sands 和 Brent 的 Overview of Post Cohen-Boyer Methods for Single Segment Cloning and for Multisegment DNA Assembly, *Curr Protoc Mol Biol.*, 113: 3.26.1-3.26.20 (2016); Casini 等人的 Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, (9): 568-76 (2015); Patron 的 DNA assembly for plant biology: techniques and tools, *Curr Opin Plant Biol.*, 19: 14-9 (2014)。

[0134] 根据在自动化多模块细胞编辑仪器中使用的核酸组件的类型,核酸组件是温度控制的。例如,当在核酸组装模块中利用PCR时,该模块将具有允许温度在变性、退火和延伸之间循环的热循环能力。当在核酸组装模块中利用单一温度组装方法时,该模块将具有达到优化所执行的特定组装过程的温度并保持在该温度处的能力。这些温度和用于保持这些温度的持续时间可以由脚本所执行的参数的预编程集合确定,或者由用户使用自动化多模块细胞处理仪器的处理系统来手动地控制。

[0135] 在一个实施例中,核酸组装模块是使用单一等温反应来执行组装的模块,例如图4所示的模块。等温组装模块被配置成使用单一等温反应来执行分子克隆方法。某些等温组装方法可以基于序列一致性来同时组合多达15个核酸片段。在一些实施例中,组装方法提供待组装的核酸,其包括与相邻核酸片段重叠的大约20-40个碱基。这些片段与三种酶(核酸外切酶、聚合酶和连接酶)的混合物连同缓冲液组分混合在一起。因为该过程是等温的并且可以使用单个反应器皿以1步骤或2步骤方法被执行,所以等温组装反应对于在自动化多模块细胞处理仪器中使用是理想的。1步骤方法允许使用单步骤等温过程组装多达五个不同的片段。片段和酶的主混合物被组合并在50°C下被培养多达1小时。为了产生具有多达15个片段的更复杂的构成物或者为了掺入从100bp到10kb的片段,通常使用2步骤,其中2步骤反应需要主混合物的两次单独添加;一次添加针对核酸外切酶和退火步骤,第二次添加针对聚合酶和连接步骤。

[0136] 图4示出了具有集成提纯的示例等温核酸组装模块400。等温核酸组装模块400包括室402,室402具有用于(例如,经由移液枪或吸管)向等温核酸组装模块400转移液体和从等温核酸组装模块400转移液体的检修垫圈404。在一些实施例中,检修垫圈404连接到位于

室402内的可更换小瓶。例如,用户或机器人操纵系统可以将小瓶放置在等温核酸组装模块400内用于处理。

[0137] 室402与电阻加热器408共享壳体406。一旦样品被引入到等温核酸组装模块400的室402,电阻加热器408就可以用于将室402的内容物加热到期望的温度。可以基于室402的内容物(例如,经由机器人操纵系统的移液枪或吸管单元通过检修垫圈404供应的材料)来设置热斜升。自动化多模块细胞处理系统的处理系统可以确定目标温度和热斜升计划。可以通过监控被包括在壳体406内的热传感器(例如热敏电阻410)来控制热斜升和目标温度。在特定实施例中,电阻加热器408被设计成将在壳体406内的温度保持在20°C和80°C之间、25°C和75°C之间、37°C和65°C之间、40°C和60°C之间、45°C和55°C之间或者优选约50°C。

[0138] 提纯模块

[0139] 在一些实施例中,当核酸组装模块被包括在自动化多模块细胞编辑仪器中时,该仪器还可以包括提纯模块以去除核酸组装混合物的不需要的组分(例如盐、矿物质),并且在某些实施例中浓缩组装的核酸。用于在核酸组装之后交换液体的方法的示例包括磁珠(例如,加利福尼亚州Carlsbad的Invitrogen公司的SPRI或Dyna1 (Dyna1bead))、二氧化硅珠、二氧化硅旋转柱、玻璃珠、沉淀(例如使用乙醇或异丙醇)、碱裂解、渗透提纯、用丁醇的萃取、基于膜的分离技术、过滤等。

[0140] 在一个方面中,提纯模块提供过滤,例如超过滤。例如,配合有变化的孔隙率的各种异性亲水生成的纤维素膜的一系列微浓缩器是可用的。(参见例如在Juan、Li-Jung等人的“Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation”(Journal of Biological Chemistry 275.27 (2000):20436-20443)中使用的Millipore SCX微浓缩器)。在另一个示例中,提纯和浓缩涉及使包括组装的核酸和离子盐的液体样品与包括不溶性磷酸盐的离子交换剂接触,除去液体,并从离子交换剂洗脱核酸。

[0141] 在提纯模块的特定方面中,可以使用SPRI珠,其中可以将0.6-2.0倍体积的SPRI珠添加到核酸组件中。核酸组装产物变得结合到SPRI珠,且SPRI珠通过自动定位接近持有小球(pellet)的管、器皿或室的磁体来成球形。例如,可以将0.6-2.0倍体积的SPRI珠添加到核酸组件。例如,可以用乙醇洗涤SPRI珠,并且例如在水、Tris缓冲液或10%甘油中将结合的核酸组装产物洗脱。

[0142] 在特定的方面中,磁体耦合到定位磁体的线性致动器。在一些实现中,核酸组装模块是对于集成组装和提纯而设计的组合组装和提纯模块。例如,如上面关于等温核酸组装模块所讨论的,一旦足够的时间已经过去用于使等温核酸组装反应发生,在一些实施例中,室402的内容物(例如,等温核酸组装试剂和核酸)就与磁珠(未示出)组合以激活提纯过程。在缓冲液中的SPRI珠例如由机器人操纵系统输送到等温核酸组装模块的内容物。此后在一些实施例中,螺线管412由磁体启动以激励在室402内包含的磁珠。在特定示例中,螺线管可以向室402内的磁珠施加2磅磁拉力和5磅拉力或者大约4磅的磁拉力。室402的内容物可以被培养足够长的时间用于使组装的载体和寡核苷酸结合到磁珠。

[0143] 在结合之后,在一些实现中,从等温核酸组装模块移除所结合的等温核酸组装混合物(例如,等温核酸组装试剂+所组装的载体和寡核苷酸),并用80%乙醇洗涤附着于珠的核酸一次至几次。一旦被洗涤,附着到珠的核酸就被洗脱到缓冲液中并转移到转化模块。

[0144] 在一些实现中,小瓶被锁定在室402中的适当位置上用于处理。例如,用户可以越

过在室402中的棘爪按压小瓶,该棘爪被设计成在与移液枪或吸管接合时保持小瓶。在另一个示例中,用户可以将小瓶扭转到适当位置上,因而将突出部接合到相应的通道并阻止向上运动。位置传感器(未示出)可以确保小瓶的缩回。在特定实施例中,位置传感器是检测在室402的一部分和小瓶之间的接合的磁传感器。在其他实施例中,位置传感器是检测在缩回位置处的小瓶的存在的光学传感器。在使用通道和突出部的实施例中,被突出部压下的机械开关可以检测小瓶的接合。

[0145] 生长模块

[0146] 当核酸被组装时,细胞可以生长,为编辑做准备。可以通过在生长模块中测量的光密度(例如,在OD 600nm处)来监控细胞生长,并且反馈回路用于调节细胞生长,以便在目标时间处达到目标OD。可以测量的细胞密度和生理状态的其他度量包括但不限于pH、溶解氧、释放的酶、声学特性和电学特性。

[0147] 在一些方面中,生长模块包括在摇动器或混匀器(vortexer)中的培养管,该培养管由分光光度计或荧光计询问。摇动器或混匀器可以加热或冷却细胞,且细胞生长通过实时吸光度或荧光性测量被监控。在一个方面中,细胞在25°C-40°C下生长至1-100D的OD600吸光度。细胞也可以在25°C-35°C、25°C-30°C、30°C-40°C、30°C-35°C、35°C-40°C、40°C-50°C、40°C-45°C或44°C-50°C的温度范围下生长。在另一方面中,通过在42°C-50°C下加热或通过添加诱导剂来诱导细胞。也可以通过在42°C-46°C、42°C-44°C、44°C-46°C、44°C-48°C、46°C-48°C、46°C-50°C或48°C-50°C的范围下加热来诱导细胞。在一些方面中,在诱导之后将细胞冷却至0°C-10°C。细胞也可以在诱导之后被冷却到0°C-5°C、0°C-2°C、2°C-4°C、4°C-6°C、6°C-8°C、8°C-10°C或5°C-10°C的温度范围。

[0148] 图8A示出了用于与细胞生长设备一起使用的旋转生长小瓶800的一个实施例,例如图8B-8C所示的细胞生长设备850。在一些实现中,旋转生长小瓶800是透明容具,其具有用于接收液体培养基和细胞的开口端804、限定用于使细胞生长的主容具的中心小瓶区域806、限定至少一个光路808、810的锥形至收缩区域818、封闭端816和驱动接合机构812。旋转生长小瓶800可以具有中心纵轴820,小瓶800围绕该中心纵轴旋转,且光路808、810可以大致垂直于小瓶的纵轴。在一些示例中,第一光路810可以位于锥形至收缩区域818的下部收缩部分中。在一些实现中,驱动接合机构812与驱动机构(例如,致动器、电机(未示出))接合以旋转小瓶800。致动器可以包括用于驱动电机864的驱动轴874(图8D)。

[0149] 在一些实施例中,旋转生长小瓶800包括例如在锥形至收缩区域818的上部锥形区域中的第二光路808。在一些示例中,限定对于第二光路808的锥形至收缩区域818的上部锥形区域的壁可以相对于纵轴820布置在比限定对于第一光路810的锥形至收缩区域810的下部收缩部分的壁更宽的角度处。例如,两个光路808、810都可以位于不断地用细胞培养物(细胞+生长培养基)填充的旋转生长小瓶800的区域中,并且不受生长小瓶800的旋转速度的影响。如所示,第二光路808比第一光路810短,当在小瓶中的细胞培养物的光密度(OD)值在高水平处(例如,在细胞生长过程中后期)时允许OD值的灵敏测量,而当在小瓶中的细胞培养物的OD值在低水平处(例如,在细胞生长过程中早期)时,第一光路810允许OD值的灵敏测量。

[0150] 旋转生长小瓶800可以是可重复使用的,或者优选地,旋转生长小瓶是消耗品。在一些实施例中,旋转生长小瓶800是消耗品,并且可以被预先填充有生长培养基来呈递给用

户,其中小瓶800在开口端804处用箔密封件密封。以这种方式封装的培养基填充的旋转生长小瓶可以是供独立细胞生长设备或细胞生长模块使用的套件的一部分,该细胞生长模块是自动化多模块细胞处理系统的一部分。为了将细胞引入到小瓶中,用户只需要吸出期望体积的细胞,并使用移液枪枪头刺穿小瓶800的箔密封件。可选地,当然,自动化仪器可以将细胞从例如试剂盒转移到生长小瓶。生长培养基可以在生长小瓶中被提供,或者也可以在细胞的添加之前从试剂盒转移到生长小瓶。开口端804可以包括延伸唇缘802以与细胞生长设备850重叠并接合(图8B-8C)。在自动化仪器中,可以用可由扫描仪或摄像机读取的条形码或其他识别手段来标记旋转生长小瓶800,扫描仪或摄像机是处理系统1310的一部分,如图13所示。

[0151] 在一些实现中,旋转生长小瓶800的体积和细胞培养物(包括生长培养基)的体积可以极大地变化,但旋转生长小瓶800的体积应该足够大,用于使在生长小瓶800中的细胞培养物在小瓶800旋转时获得适当的通气。实际上,旋转生长小瓶800的体积可以范围从1-250ml、2-100ml、从5-80ml、10-50ml或从12-35ml。同样,细胞培养物(细胞+生长培养基)的体积应该适合于允许在旋转生长小瓶800中的适当通气。因此,细胞培养物的体积应该约为生长小瓶800的体积的10-85%或生长小瓶的体积的15-80%或生长小瓶的体积的20-70%、30-60%或40-50%。在一个示例中,对于35ml生长小瓶800,细胞培养物的体积将为从约4ml至约27ml。

[0152] 在一些实施例中,旋转生长小瓶800由生物相容透明材料制成,或者至少小瓶800的包括光路的部分是透明的。另外,制造旋转生长小瓶800的材料应该能够被冷却到约0°C或更低,并被加热到约75°C或更高(例如,约2°C或到约70°C,约4°C或到约60°C,或约4°C或到约55°C)以适应基于温度的细胞分析和在低温下的长期储存。此外,用于制造小瓶的材料优选地能够经得起高达55°C的温度而在旋转时没有变形。合适的材料包括玻璃、聚氯乙烯、聚乙烯、聚酰胺、聚丙烯、聚碳酸酯、聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)、聚砷、聚氨酯以及这些和其它聚合物的共聚物。优选的材料包括聚丙烯、聚碳酸酯或聚苯乙烯。在一些实施例中,通过例如注射成型或挤压来廉价地制造旋转生长小瓶800。

[0153] 图8B示出了旋转生长小瓶800b的顶视图,旋转生长小瓶800b是旋转生长小瓶800的替代实现。在一些示例中,小瓶800b可以包括固定到朝着小瓶800b的中心突出的内表面的一个或更多个叶片822。图8B中所示的小瓶800b包括在小瓶800b的周边周围实质上相等地间隔开的三个叶片822,但在其他示例中,小瓶800b可以包括两个、四个或更多个叶片822。在一些实现中,叶片在细胞生长设备内旋转的小瓶800b内提供高混合和通气,这便于微生物生长。

[0154] 图8C-D示出了接收旋转生长小瓶800的示例细胞生长设备850的视图。在一些实施例中,细胞生长设备850旋转以将在小瓶800内的细胞或细胞生长加热或冷却至预定温度范围。在一些实现中,旋转生长小瓶800可以位于主壳体852的内部,小瓶800的延伸唇缘802经过主壳体852的上表面延伸。在一些方面中,延伸唇缘802为用户提供从设备850的主壳体852插入或抽回小瓶800的抓握表面。另外,当完全插入到主壳体852内时,延伸唇缘802的下表面邻接主壳体852的上表面。在一些示例中,细胞生长设备850的主壳体852依尺寸被制造为使得旋转生长小瓶800的外表面邻接主壳体852的内表面,从而将小瓶800固定在主壳体852内。在一些实现中,细胞生长设备850可以包括布置在主壳体854的每侧上的端部壳体

854和布置在主壳体852的下端处的下壳体856。在一些示例中,下壳体856可包括凸缘858,凸缘858可用于将细胞生长设备850附接到温度控制(例如,加热/冷却)机构或其他结构,例如自动化细胞处理系统的机架。

[0155] 如图8D所示,在一些实现中,细胞生长设备850可以包括位于主壳体852中的、支撑插入到主壳体852中的旋转生长小瓶800的垂直负载的上轴承860和下轴承862。在一些示例中,细胞生长设备850还可以包括当插入到主壳体852中时与小瓶800的第一光路810和第二光路808对准的主光学端口866和次光学端口868。在一些示例中,主光学端口866和次光学端口868是由透明材料构成的主壳体的间隙、开口或部分,其允许光穿过小瓶800以执行细胞生长OD测量。除了光学端口866、868之外,细胞生长设备850还可以包括发射板870和检测器板872,发射板870提供对于光路的一个或更多个照明源,而检测器板872在光穿过旋转生长小瓶800中的细胞培养物液体行进之后检测光。在一个示例中,布置在发射板870上的照明源可以包括发光二极管(LED)或光电二极管,其提供在与通常在细胞培养物(例如,不管是哺乳动物细胞、细菌细胞、动物细胞、酵母细胞)中使用的生长培养基相称的一个或更多个目标波长处的照明。

[0156] 在一些实现中,发射板870和/或检测器板872通过有线或无线连接通信地耦合到处理系统(例如,处理系统126、1220、1310),该处理系统控制由发射板870输出的光的波长,并接收和处理在检测器板872处感测的照明。在一些方面中,远程地可控制的发射板870和检测器板872规定在细胞生长的过程期间进行自动OD测量。例如,处理系统126、1220可以控制OD测量被执行的周期性,其可以是以预定的间隔或响应于用户请求。此外,处理系统126、1220可以使用从检测器板872接收的传感器数据来执行实时OD测量并调节细胞生长条件(例如,温度、速度/旋转方向)。

[0157] 在一些实施例中,下壳体856可以包含生成旋转运动的驱动电机864,该旋转运动使旋转生长小瓶800在细胞生长设备850内旋转。在一些实现中,电机864可以包括接合旋转生长小瓶800的下端的驱动轴874。在一些实施例中,生成对于旋转生长小瓶800的旋转运动的电机864是具有内置驱动控件的无刷DC型驱动电机,驱动电机可被配置为保持在0和约3000转数/分钟(RPM)之间的恒定RPM。可选地,可以使用其他电机类型,例如步进电机、伺服电机或有刷DC电机。可选地,电机864还可以具有允许旋转方向的反转的方向控件以及感测和报告实际RPM的转速计。在其他示例中,电机864可以通过以预定频率使旋转的方向反转来生成振荡运动。在一个示例中,小瓶800以350RPM的速度在每个方向上旋转一秒钟。在一些实现中,电机864通过有线或无线通信网络通信地耦合到被配置为控制电机864的操作的处理系统(例如,处理系统126、1220),该操作可以包括执行被编程到处理器中和/或由用户输入提供的协议,例如如关于图13的模块控制器1330所述的。例如,电机864可以被配置成改变小瓶800的速度和/或旋转方向以引起细胞培养物的轴向旋进,从而增强混合,以防止细胞聚集并增加通气。在一些示例中,电机864的速度或旋转方向可以基于从检测器板872接收的光密度传感器数据而变化。

[0158] 在一些实施例中,细胞生长设备856的主壳体852、端部壳体854和下壳体856可以由包括铝、不锈钢和其他导热材料(包括塑料)的坚固材料制成。可以通过各种技术(例如,金属制造、注射成型、被融合的结构层的创建等)来创建这些结构或其部分。虽然在一些示例中旋转生长小瓶800是可重复使用的,但在其他实施例中,小瓶800优选地是消耗品。在一

些方面中,细胞生长设备850的其他部件优选地是可重复使用的,并且可以起独立台式设备或在自动化多模块细胞处理系统中的模块的作用。

[0159] 在一些实现中,通信地耦合到细胞生长模块的处理系统可以用信息被编程以用作对于使细胞培养物生长的“坯料(blank)”或控件。在一些示例中,“坯料”或控件是仅包含细胞生长培养基的、产生100%透射率和OD的器皿,而细胞样品使光射线偏转并将具有较低百分比的透射率和较高的OD。当细胞在培养基中生长并变得更密集时,透射率降低且OD增加。在一些实现中,细胞生长模块的处理器可以被编程为使用对于与在细胞培养物(例如,不管是哺乳动物细胞、细菌细胞、动物细胞、酵母细胞)中通常使用的生长培养基相称的坯料的波长值。可选地,第二分光光度计和器皿可以被包括在细胞生长模块中,其中第二分光光度计用于以指定的间隔读取坯料。

[0160] 图8E示出了另一种类型的细胞生长设备880,其使用摇动而不是旋转来控制温度并促进在细胞生长小瓶890(图8F)内的混合和通气。在一些示例中,细胞生长设备880在尺寸上小于用于集成到自动化多模块细胞处理系统中的传统台式摇动器。在一些实现中,细胞生长设备880包括接纳细胞生长小瓶890的壳体884。在一些示例中,细胞生长设备880可以包括位于小瓶890下方的电机组件,该电机组件基于电机的速度生成小瓶890的轨道运动。在一个示例中,小瓶890以600至900RPM(例如以750RPM)在水平面内的轨道中行进,这明显快于以大约250RPM绕轨道运行的较大台式摇动器。在一些方面中,摇动运动在至少一个水平面中生成。在一些示例中,与摇动细胞生长设备880一起使用的细胞生长小瓶890是圆锥形底部管,其在形状上实质上类似于在传统台式摇动器中使用的烧瓶。类似于旋转细胞生长设备850,细胞生长设备880可以包括用于在细胞生长的过程中进行自动OD测量的照明板870和检测器板872。在一些示例中,光源882可以耦合到生成由检测器板测量的照明的细胞生长设备880,在一些示例中,检测器板位于小瓶890下方或小瓶890与光源882相对的一侧上。

[0161] 为了减少没有接受基因组编辑的细胞的背景,生长模块还可以允许对所编辑的细胞富集化的选择过程。例如,所引入的核酸可以包括赋予抗生素抗性的基因或另一可选择标记。对于连续轮的编辑交替可选择标记的引入也可以消除未编辑细胞的背景,并允许自动化多模块细胞编辑仪器的多个周期来选择具有连续基因组编辑的细胞。

[0162] 合适的抗生素抗性基因包括但不限于如下基因:例如,氨苄青霉素抗性基因、四环素抗性基因、卡那霉素抗性基因、新霉素抗性基因、刀豆氨酸抗性基因、杀稻瘟菌素抗性基因、潮霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因和氯霉素抗性基因。在一些实施例中,使用溶解增强剂(例如清洁剂)、渗透压力、温度、酶、蛋白酶、噬菌体、还原剂或离液剂来帮助去除死细胞背景。在其他实施例中,细胞去除和/或培养基交换用于减少死细胞背景。

[0163] 细胞洗涤和/或浓缩模块

[0164] 细胞洗涤和/或浓缩模块可以利用用于交换在细胞环境中的液体的任何方法,并且可以浓缩细胞或允许它们保留在与在核酸组装模块中使用的基本上相同或更大体积的液体中。此外在一些方面中,在细胞洗涤模块中执行的过程还通过例如在洗涤中使用甘油来使细胞成为电转感受态的。

[0165] 可以使用许多不同的方法(包括密度梯度提纯、渗析、离子交换柱、过滤、离心、稀释和用于提纯珠的使用)来洗涤细胞。

[0166] 在一些方面中,细胞洗涤和/或浓缩模块利用离心设备。在其他方面中,细胞洗涤和/或浓缩模块利用过滤模块。在又一些方面中,珠耦合到被结合到细胞表面的部分。这些部分包括但不限于抗体、外源凝集素、麦胚凝集素、突变溶菌酶和配体。

[0167] 在其他方面中,细胞被设计成被磁化,允许磁体在洗涤步骤之后使细胞成小球。细胞磁化的机制可以包括但不限于铁蛋白表达。

[0168] 在一些实现中,细胞洗涤和/或浓缩模块是离心机组件模块。转到图3A-C,在一些实现中,离心机组件模块300包括顶门板302,其被设计成由机器人操纵系统(未示出)启动以将核酸组件材料(例如,寡核苷酸、载体主链、酶等)输送到位于连接到转子308的小瓶桶306a、b中的一个或更多个小瓶304a、b。在一些实施例中,机器人操纵系统将小瓶304a、b输送到离心机组件模块300。在其他实施例中,用户将小瓶304a、304b布置在小瓶桶306a、306b内。在一些实施例中,小瓶桶306a、306b经由铰接连接来连接到转子308,使得小瓶桶306a、306b可以在旋转期间向外摆动。在其他实施例中,桶306a、b的定位是固定的。

[0169] 在一些实施例中,离心机组件模块300在气候上被控制。例如,内部温度可以由冷却盘管310和绝缘体312管理。冷却剂供应和返回管线314可以将冷却剂泵送到冷却盘管310,从而冷却离心机组装模块300的室316。在一些示例中,离心机组件模块300可被设计成将室316冷却到0°C和10°C之间、2°C和8°C之间以及最优选地到约4°C。此外,冷凝控制可被提供以限制室316内的湿度。在一些实施例中,通过自动化多模块细胞处理仪器的处理系统来设置气候控制。例如,处理系统可以将信号引导到电路320的接口。

[0170] 在一些实施例中,电机318旋转地驱动转子308。电机318以及因而转子308的加速度和减速度可以由自动化多模块细胞处理仪器的处理系统控制。如所示,运动传感器322(例如,加速度计或陀螺仪)位于电机318的底部处以监控旋转参数。可选地,运动传感器(未示出)(例如,加速度计或陀螺仪)可以放置在室316内以监控旋转参数。例如,处理系统可以监控来自运动传感器的信号,并且如果旋转在参数范围之外则分析条件以实施安全关闭。在说明性实施例中,转子臂可以设计成以高达10000转数/分钟(RPM)、高达8000RPM或高达约6500RPM旋转。处理系统可以基于供应给离心机组件模块300的材料来修改旋转速度。

[0171] 在一些实现中,细胞洗涤和/或浓缩模块是过滤模块。转到图7A,框图示出了过滤模块700的示例功能单元。在一些实现中,过滤模块700的主控制器702包括吸入洗涤流体706的第一液体泵704a和将液体废物移除到液体废物单元708(例如,图1A的液体废物单元114或图12A和12B的液体废物单元1228)的第二液体泵704b。流量传感器712可以布置在液体废物单元708的连接器714上以监控液体废物从过滤模块的释放。阀716(如所示的三通阀)可以布置在洗涤流体716的连接器718上以选择性地连接洗涤流体716和过滤模块700。

[0172] 在一些实现中,过滤模块700包括用于过滤和浓缩细胞样品的过滤歧管720。过滤歧管720可以包括一个或更多个温度传感器722和压力传感器724以监控洗涤流体和/或液体废物的流量和温度。在一些实施例中,传感器722、724由自动化多模式细胞处理系统的处理系统(例如,图13的处理系统1310)监控和分析。过滤歧管720可以包括用于引导洗涤流体和/或液体废物的流动的一个或更多个阀726。例如,自动化多模式细胞处理仪器的处理系统可以根据用于引导过滤模块700的过滤的一组指令来启动阀。

[0173] 过滤模块700包括至少一个过滤器730。适用于在过滤模块700中使用的过滤器的示例包括膜过滤器、陶瓷过滤器和金属过滤器。过滤器可以以任何形状被使用;过滤器可以

例如是圆柱形的或者基本上平的。在一些实施例中,对于给定操作或给定工作流选择的过滤器取决于工作流的类型(例如,细菌、酵母、病毒等)或正在被处理的材料的体积。例如,尽管平面过滤器是相对低成本的且通常被使用,但具有较大表面积的过滤器(例如圆柱形过滤器)可以接受更高的流速。在另一个示例中,当处理小体积的样品(例如,小于约10ml)时,中空过滤器可以展示较低的恢复率。例如,为了与细菌一起使用,所使用的过滤器是膜过滤器、尤其是中空纤维过滤器可能是优选的。术语“中空纤维”意指管状膜。在一些示例中,管的内径是至少0.1mm,更优选地至少0.5mm,最优选地至少0.75mm,并且优选地,管的内径是至多10mm,更优选地至多6mm,最优选地至多1mm。具有中空过滤器的过滤器模块是在市场上从各种公司可买到的,包括G.E.Life Sciences(马萨诸塞州,Marlborough)和InnovaPrep(密苏里州,Drexel)(参见,例如标题为“Liquid to Liquid Biological Particle Concentrator with Disposable Fluid Path”的Page等人的US20110061474A1)。

[0174] 在一些实现中,过滤模块700包括过滤器弹出装置728(例如,致动器)以在使用后弹出过滤器730。例如,用户或机器人操纵系统可以将过滤器730推到使用位置内,使得过滤器在过滤期间由过滤器歧管720保持。在过滤之后,为了移除所使用的过滤器730,过滤器弹出致动器728可以弹出过滤器730,释放过滤器730,使得用户或机器人操纵系统可以从过滤模块700移除所使用的过滤器730。在一些示例中,所使用的过滤器730可以布置在图1A-1B的固体废物单元112、图12A和12B的固体废物单元1218中,或者返回到过滤盒740,如图7D所示。

[0175] 转到图7D,在一些实现中,在布置在自动化多模块细胞处理仪器的机架内的过滤盒740中设置的过滤器730在使用之前由机器人操纵系统(例如,关于图1A和1B描述的机器人操纵系统108或图12A和12B的机器人操纵系统1218)传送到过滤模块700,并且定位在过滤模块700内。

[0176] 在一些实现中,过滤模块700需要定期清洁。例如,处理系统可以通过自动化多模块细胞处理仪器的用户界面和/或通过无线消息传送装置(例如,文本消息、电子邮件和/或个人计算设备应用)来警告用户何时需要清洁。例如,净化过滤器可以装载到过滤模块700中,并且过滤模块700可以用洗涤溶液和/或酒精混合物被清洁。

[0177] 在一些实现中,过滤模块700经由连接器718与包含洗涤流体716的洗涤盒710(例如图6A的洗涤盒600)流体连接。例如,当由洗涤盒710的用户定位在自动化多模块细胞处理仪器的机架内时,连接器718可以与洗涤盒710的底部入口配合,在洗涤流体716和过滤模块700之间形成液体通道。

[0178] 转到图7B和7C,在一些实现中,双过滤器过滤模块750包括布置在双洗涤储器754上方的双过滤器752、754。在示例中,每个过滤器可以是具有.45 μ m孔隙和大于85 cm^2 面积的中空芯纤维过滤器。在一些示例中,洗涤储器754可以在体积上是50ml、100ml或超过200ml。在一些实施例中,洗涤储器754布置在洗涤盒756(例如图6A的洗涤或试剂盒600)中。

[0179] 在一些实现中,自动化多模块细胞处理仪器的处理系统控制双过滤器752在X(水平)和Z(垂直)方向上的启动以将过滤器752a、752b定位在洗涤储器754中。在特定示例中,双过滤器752可以沿着X轴一致地移动,但具有独立的Z轴运动范围。

[0180] 如所示,过滤模块750的双过滤器752连接到细长臂主体758。在一些实施例中,过滤模块750的任何泵和阀可以远离主体758布置(例如,在自动化多模块细胞处理仪器的机

架的底板内)。以这种方式,过滤模块750可以代替体积大得多的传统商业过滤模块。

[0181] 此外,在一些实施例中,过滤模块750与废物清除系统液体连通,该废物清除系统被设计成将液体废物释放到液体废物存储单元(例如图7A的存储单元708或图1A的液体废物存储单元114或图12A和12B的1228)中。

[0182] 转化模块

[0183] 转化模块可以实现由在转染、转化和微流体的领域中的技术人员例行地使用的任何细胞转化或转染技术。转化可以发生在微量离心管、测试管、比色皿、多孔板、微纤维和流动仪器中。可以使用处理系统(例如图13的处理系统1310)来控制转化模块的温度和控制,其中控制由用户和/或通过被提供到处理系统的脚本来设置。

[0184] 转化意欲包括用于将外源核酸序列(例如,DNA)引入到靶细胞内的各种本领域公认的技术,并且如本文使用的术语“转化”包括所有转化和转染技术。这样的方法包括但不限于电穿孔、脂转染、光穿孔(optoporation)、注射、微量沉淀、微量注射、脂质体、粒子轰击、声穿孔(sonoporation)、激光诱导穿孔、珠转染、磷酸钙或氯化钙共同沉淀或DEAE葡聚糖介导转染。也可以使用例如蔗糖或甘油洗液来使细胞准备用于载体摄取。此外,可以使用利用机械和化学转染方法的能力的混合技术,例如磁转染,一种将化学转染与机械方法组合的转染方法。在另一个示例中,阳离子脂质可以与基因枪或电穿孔仪结合配置。用于转化或转染靶细胞的合适材料和方法可以在例如下列文献中找到:Green和Sambrook的Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,纽约,2014年)。

[0185] 用于使细胞和将被电穿孔到细胞内用于电穿孔过程的材料(试剂)悬浮的培养基或缓冲液可以是包括但不限于MEM、DMEM、IMDM、RPMI、Hanks、PBS或Ringer溶液的培养基或缓冲液,其中培养基可以作为套件的一部分被提供在试剂盒中。对于大多数真核细胞的电穿孔,培养基或缓冲液通常包含盐以维持适当的渗透压力。在培养基或缓冲液中的盐也使培养基成为导电的。对于非常小的原核细胞(例如细菌)的电穿孔,有时使用水或10%甘油作为低电导培养基以允许非常高的电场强度。在这种情况下,待输送的带电分子仍然使水基培养基变得比脂质基细胞膜更导电,并且该培养基仍然可以粗略地被认为是导电的,特别是与细胞膜比较时。

[0186] 将被电穿孔到选择的细胞中的化合物可以是本领域中已知的对电穿孔有用的任何化合物,例如核酸、寡核苷酸、多核苷酸、DNA、RNA、肽、蛋白和小分子(如激素、细胞因子、趋化因子、药物或药物前体)。

[0187] 重要的是使用足够用于实现材料到细胞内的电穿孔的电压,而不是过多的电压,因为过多的功率将降低细胞生存能力。例如,为了将人类细胞系的悬液电穿孔,在有来自电容器的约1000 μ F的指数律放电的情况下对于在4mm间隙比色皿中的0.2ml样品需要200伏。然而,如果将相同的0.2ml细胞悬液放置在具有2cm电极距离(比色皿间隙距离的5倍)的较长容器中,所需电压将为1000伏,但只有40 μ F(1000 μ F的1/25)的电容器是需要的,因为来自电容器的电能遵循下面的方程:

[0188] $E=0.5U^2 C$

[0189] 其中,E是电能,U是电压以及C是电容。因此,高电压脉冲发生器实际上很容易制造,因为它需要小得多的电容器来存储类似量的能量。类似地,生成较高电压的其他波形将

不是困难的。

[0190] 本公开的电穿孔设备可以允许在相对短的时间量内的细胞转化的高速率。细胞转化的速率取决于细胞类型和被转化的细胞的数量。例如,对于大肠杆菌,电穿孔设备可以提供每秒1到 10^{10} 细胞、每秒 10^4 到 10^7 、每秒 10^5 到 10^8 或每秒 10^6 到 10^9 的细胞转化率。电穿孔设备还允许使用该设备在单个转化过程中转化范围从1个细胞到 10^{10} 个细胞的多批细胞。

[0191] 使用本公开的电穿孔设备的转化的效率可导致至少10%的细胞被充分穿孔以允许生物分子的输送。优选地,使用本公开的电穿孔设备的转化的效率可导致至少15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%、95%或更多的细胞被充分穿孔以允许生物分子的输送。

[0192] 在一些实施例中,在比色皿、孔、管、室、流动池、通道或移液枪枪头中执行电穿孔。在其他实施例中,比色皿、孔、管或室从底部被填充和从底部被倒空。在一些实施例中,比色皿包含连接到底部的吸管。

[0193] 图5A描绘了示例单一单元电穿孔设备500(电穿孔模块),其从上到下包括壳体502和过滤器506,壳体502包围被配置为与移液枪(例如自动空气排代移液枪(未示出))接合的接合构件504。除了壳体502之外,还有电穿孔设备500的电穿孔比色皿510部分,其包括电极512和电穿孔室516的壁514。在一些示例中,室可以范围是在宽度上在0.01-100mm之间,在高度上在1-5,000mm之间,以及在体积上在1-20,000 μ l之间;在宽度上在0.03-50mm之间,在高度上在50-2,000mm之间,以及在体积上在500-10,000 μ l之间;或者在宽度上在0.05-30mm之间,在高度上在2-500mm之间,以及在体积上在25-4,500 μ l之间。

[0194] 在一些实施例中,第一储器508可以放置在过滤器506和电穿孔室516之间,第一储器与电穿孔室516流体连通,并且为可能经过电穿孔室516进入的任何细胞样品提供空的储藏库。在一些示例中,第一储器508可以范围是在宽度上在0.1-150mm之间,在高度上在0.1-250mm之间,以及在体积上在0.5-10,000 μ l之间;在宽度上在0.3-100mm之间,在高度上在30-150mm之间,以及在体积上在20-4,000 μ l之间;或者在宽度上在0.5-100mm之间,在高度上在0.5-100mm之间,以及在体积上在5-2,000 μ l之间。

[0195] 在一些实现中,电穿孔设备500可以另外包括(通过过滤器506)与第一储器508流体连通的另一储器524。第二储器524可以放置在过滤器506和接合构件504之间以保护移液枪免受任何液体污染,移液枪可能使任何液体经过过滤器506。在一些示例中,第二储器524可以范围是在宽度上在0.1-250mm之间,在高度上在0.2-1000mm之间,以及在体积上在0.1-2,500 μ l之间;在宽度上在0.1-150mm之间,在高度上在50-400mm之间,以及在体积上在1-1,000 μ l之间;或者在宽度上在0.2-100mm之间,在高度上在0.5-200mm之间,以及在体积上在2-600 μ l之间。

[0196] 在一些实施例中,吸管518与电穿孔室516流体连通并耦合到电穿孔室516,吸管518具有与电穿孔室516邻近的端部520和与电穿孔室516远离的端部522。吸管518的远端522可以允许从电穿孔设备500摄取和分配细胞样品。在一些实施例中,吸管518是机器人操纵系统的一部分。在一些示例中,吸管518可以由塑料(例如,聚氯乙烯、聚乙烯、聚酰胺、聚乙烯、聚丙烯、丙烯腈丁二烯、聚碳酸酯、聚醚醚酮(PEEK)、聚砜和聚氨酯、这些和其他聚合物的共聚物、玻璃(例如玻璃毛细管)和金属管材(例如铝、不锈钢或铜)制成。示例性材料包括结晶苯乙烯和环烯烃共聚物。PEEK是首选塑料,假定它在价格是低的且容易制造。在一

些示例中,吸管518可以范围是在宽度上在0.02-2,000mm之间,在高度上在0.25-2,000mm之间,以及在体积上在1-2,000 μ l之间;在宽度上在0.02-1,250mm之间,在高度上在250-1,500mm之间,以及在体积上在1.5-1,500 μ l之间;或者在宽度上在0.02-10mm之间,在高度上在4.0-1,000mm之间,以及在体积上在2.5-1,000 μ l之间。

[0197] 在一些示例中,电穿孔设备500的壳体502和接合构件504可以由硅树脂、树脂、聚氯乙烯、聚乙烯、聚酰胺、聚丙烯、丙烯腈丁二烯、聚碳酸酯、聚醚醚酮(PEEK)、聚砜和聚氨酯、这些聚合物和其他聚合物的共聚物制成。类似地,在一些示例中,电穿孔室的壁512可以由硅树脂、树脂、玻璃、玻璃纤维、聚氯乙烯、聚乙烯、聚酰胺、聚丙烯、丙烯腈丁二烯、聚碳酸酯、聚醚醚酮(PEEK)、聚砜和聚氨酯、这些和其他聚合物的共聚物制成。示例性材料包括结晶苯乙烯和环烯烃共聚物。可以通过各种技术(例如注射成型、被融合的结构层的创建等)来创建这些结构或其部分。聚碳酸酯和环烯烃聚合物是优选的材料。

[0198] 在一些实施例中,电穿孔室516通常在形状上是圆柱形的。在其他实施例中,电穿孔室516可以是矩形、圆锥形或正方形。

[0199] 在一些示例中,过滤器506可以由多孔塑料、疏水聚乙烯、棉或玻璃纤维制成。优选地,过滤器506由低成本材料(例如多孔塑料)构成。过滤器可以范围是在宽度上在0.2-500mm之间,在高度上在0.2-500mm之间,以及在体积上在1-3,000 μ l之间;在宽度上在0.3-250mm之间,在高度上在20-200mm之间,以及在体积上在50-2,500 μ l之间;或者在宽度上在0.5-150mm之间,在高度上在0.2-80mm之间,以及在体积上在10-2,000 μ l之间。

[0200] 接合构件504被配置成具有与在电穿孔仪器中使用的液体处理设备兼容的尺寸。

[0201] 电穿孔设备的部件可以单独地被制造且然后被组装,或者电穿孔设备的某些部件可以作为单个实体被制造或模制,在模制之后其他部件被添加。例如,吸管、电穿孔壁和壳体可以被制造或模制为单个实体,其中电极、过滤器、接合构件随后被添加到单个实体以形成电穿孔模块。类似地,电穿孔壁和壳体可以被制造为单个实体,吸管、电极、过滤器、接合构件在模制之后被添加到电穿孔模块。集成和非集成部件的其他组合是可能的。

[0202] 电极512可以由能够经得起电场的施加的金属(例如铜、钛、铝、黄铜、银、铑、金或铂)或石墨形成。例如,外加电场可能破坏由金属(如铝)制成的电极。如果多用途电穿孔设备是需要的,电极板可以涂覆有抗电化学腐蚀的金属。导电涂层(如贵金属,例如金)可用于保护电极板。在特定示例中,电穿孔比色皿可以包括由钛制成的覆盖有金层的第一金属电极和第二金属电极。相反,如果电穿孔设备500被设计为单次使用(例如,一次性的),则较便宜的金属(例如铝)可以被使用。

[0203] 在一个实施例中,在电极之间的距离可以在0.3mm和10mm之间。在另一个实施例中,在电极之间的距离可以在1mm和20mm之间或者1mm到10mm或者2mm到5mm。电穿孔室的内径可以在0.1mm和10mm之间。为了避免在电极之间的不同场强,电极应该在电极的整个表面上以彼此间恒定距离平行地布置。优选地,第一金属电极和第二金属电极在平行布置中以小于 $\pm 20\mu$ m的距离变化分开2-4mm的距离。此外,电极的表面应是尽可能光滑的而没有针孔或峰。具有1到10 μ m的粗糙度Rz的电极是优选的。在其他实施例中,电穿孔设备包括至少一个附加电极,其向例如电穿孔设备的吸管部分施加地电位。

[0204] 尽管被示为单一单元设备500,但在其他实施例中,电穿孔模块包括多个电穿孔单元。每个电穿孔单元可以被配置成使体积在1 μ l到20ml之间的细胞样品电穿孔。例如,电穿

孔单元的不同体积容量可以在多单元电穿孔设备中是可实现的。

[0205] 在多单元电穿孔模块中,在一些实施例中,电极是单独的独立元件。在其他实施例中,多单元电穿孔设备可以包括电极,其被布置成使得在相邻电穿孔单元中的电穿孔比色皿共享电极。这种多单元电穿孔设备可以包括优选地在自动化设备中的例如2个或更多个电穿孔单元、4个或更多个电穿孔单元、8个或更多个电穿孔单元、16个或更多个电穿孔单元、32个或更多个电穿孔单元、48个或更多个电穿孔单元、64个或更多个电穿孔单元,或者甚至96个或更多个电穿孔单元。在多个并行设备被使用的情况下,通常在每个单元中使用相似的体积。

[0206] 虽然提供了示例尺寸,但尺寸当然将根据细胞样品的体积和用于容纳将被电穿孔的细胞和/或材料的容具而变化。

[0207] 在优选实施例中,转化模块包括至少一个流式电穿孔设备,其具有带有电穿孔室的壳体、配置成与电脉冲发生器接合的第一电极和第二电极。在一些实现中,流式电穿孔设备被配置成与可替换的盒(例如图1A的盒104、106(例如,转化模块110c))相匹配,电触头通过可替换的盒与电穿孔设备的电极接合。在某些实施例中,电穿孔设备是耐高压加热的和/或一次性的,与试剂一起被包装在试剂盒中,和/或可以从试剂盒可移除的。电穿孔设备可被配置为使体积在1 μ l到2ml、10 μ l到1ml、25 μ l到750 μ l或50 μ l到500 μ l之间的细胞样品电穿孔。可以用所公开的电穿孔设备来电穿孔的细胞包括哺乳动物细胞(包括人类细胞)、植物细胞、酵母、其他真核细胞、细菌、古生菌和其他细胞类型。

[0208] 在一些实施例中,用于在自动化多模块细胞处理系统中使用的试剂盒(例如,图1A的盒104)包括一个或更多个电穿孔设备(例如,图1A的电穿孔模块110c),优选地流式电穿孔设备。图5B是可以是试剂盒的一部分的六个共同连接的流式电穿孔设备(例如,单元或模块)532a-f的组530的底部透视图,以及图5C是该组530的顶部透视图。盒可以包括布置在单个基底534上的一到六个或更多个流式电穿孔单元532a-f。六个流式电穿孔单元532a-f中的每一个具有限定细胞样品入口的相应孔536a-f和限定细胞样品出口的孔538a-f(见图5C)。此外,如在图5B中看到的,每个电穿孔单元532a-f包括相应的入口540a-f、相应的出口542a-f、相应的流动通道544a-f和在每个流式电穿孔单元532a-f的相应流动通道544a-f中的收缩部的任一侧上的两个电极546a-f。

[0209] 一旦六个流式电穿孔单元532a-f被制造,在一些实施例中,它们就可以沿着将每个单元与相邻单元分开的划线与彼此分开(即,“突然断裂”),并且一次被使用一个,或者可选地在其他实施例中,两个或更多个流式电穿孔单元532a-f可以并行地被使用,在这种情况下,这两个或更多个单元优选地沿着划线保持连接。

[0210] 一般来说,微流控电穿孔(使用小于约10ml且低至1 μ l的细胞悬液体积)允许对转染或转化过程的更精确的控制,并且与实验室规模的电穿孔设备相比允许与其他细胞处理工具的灵活集成。微流控电穿孔因此针对例如单细胞转化、处理和分析、多单元电穿孔设备配置以及集成的自动化多模块细胞处理和分析提供独特的优势。

[0211] 在试剂盒中包括的流式电穿孔设备可以实现具有低毒性的高效细胞电穿孔。在本公开的流式电穿孔设备的特定实施例中,转化的毒性水平导致在电穿孔之后的大于10%的活细胞,或者优选地在转化之后的大于15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或甚至95%的活细胞,这取决于细胞类型和被引入

到细胞内的核酸。

[0212] 在转化之后,细胞被允许在促进基因组编辑过程的条件下恢复,该基因组编辑过程作为在细胞中的所引入的核酸的转化和表达的结果而发生。

[0213] 用于自动化多模块细胞处理的方法

[0214] 图9是用于使用自动化多模块细胞处理系统(例如图1A-1B和12A-12B所示的系统)的示例方法900的流程图。例如,图13的处理系统可以指导方法900的处理阶段。例如,软件脚本可以识别对于每个处理阶段的设置和用于机器人操纵系统的移动的指令以执行方法900的行动。在一些实施例中,软件指令脚本可以由被供应到自动化多模块细胞处理仪器的盒标识。例如,盒可以包括机器可读标记,例如条形码或QR码,包括存储在自动化多模块细胞处理仪器的存储器(例如,图13的存储器1302)中的脚本的标识。在另一个示例中,盒可以包含嵌在机器可读标记(例如射频(RF)标签)中的可下载脚本。在其他实施例中,用户可以通过经由有线或无线连接将脚本下载到自动化多模块细胞处理仪器的处理系统或者通过经由自动化多模块细胞处理仪器的用户界面选择所存储的脚本来识别脚本。在特定示例中,自动化多模块细胞处理仪器可以包括用于提交用户设置和激活细胞处理的触摸屏界面。

[0215] 在一些实现中,方法900开始于将细胞转移到生长模块(902)。生长模块例如可以是关于图8A至8F描述的生长模块800。在特定示例中,处理系统120可以指示机器人操纵系统108将细胞106转移到生长模块110a,如关于图12A和12B所述的。在另一个示例中,如关于图1A所述的,细胞可以由机器人操纵系统108从盒104、106之一转移到生长模块110a、110b。在一些实施例中,生长小瓶可以包含生长培养基,并且例如作为套件的一部分被供应。在其他实施例中,生长小瓶可以被填充有例如经由液体处理设备从试剂容具转移的培养基。

[0216] 在一些实施例中,在转移细胞(例如,从试剂盒104或从添加到仪器的小瓶)之前,可以在小瓶或位于对细胞指定的位置上的其他容具上扫描机器可读标记以确认小瓶或容具被标记为包含细胞。此外,机器可读标记可以指示提供到仪器的细胞的类型。在一些实施例中,细胞的类型可以使仪器选择特定的处理脚本(例如,用于机器人操纵系统的指令的序列以及各种模块的设置和激活)。

[0217] 在一些实现中,细胞在生长模块中生长至期望光密度(904)。例如,图1A-1B的处理系统126或图12A-B的处理系统1220可以管理生长模块110a的温度设置,用于在生长周期期间培养细胞。处理系统126、1220还可以从生长模块110a、110b接收指示光密度的传感器信号,并分析传感器信号以监控细胞的生长。在一些实施例中,用户可以设置用于管理细胞的生长的生长参数。例如,温度和细胞的搅动程度。此外,在一些实施例中,用户可以关于生长过程被更新。在一些示例中,更新可以包括在自动化多模块细胞处理系统的用户界面上呈现的消息、到用户的蜂窝电话号码的文本消息、到电子邮件帐户的电子邮件消息或者传输到在便携式电子设备(例如,蜂窝电话、平板电脑等)上执行的应用的消息。在一些实施例中,响应于该消息,用户可以修改参数(例如温度)以调节细胞生长。例如,用户可以通过自动化多模块细胞处理系统的用户界面或者通过与自动化多模块细胞处理系统通信的便携式计算设备应用(例如图11的用户界面1100)来提交已更新的参数。

[0218] 尽管关于光密度被描述,但是在其他实现中,在生长模块内的细胞生长可以使用细胞密度和生理状态的不同度量(例如,在一些示例中的pH、溶解氧、所释放的酶、声学特性

和电学特性)被监控。

[0219] 在一些实现中,当达到期望光密度时(904),细胞从生长模块转移到过滤模块或细胞洗涤和浓缩模块(906)。例如,图1A-1B的机器人操纵系统108或图12A-12B的机器人操纵系统1208可以将细胞从生长模块1210a转移到过滤模块1210b。例如,过滤模块可以被设计成使细胞成为电转感受态的。此外,过滤模块可以被配置成将细胞样品的体积减少到适合于电穿孔的体积。在另一个示例中,过滤模块可以被配置为从细胞样品去除不需要的成分,例如盐。在一些实施例中,机器人操纵系统108将洗涤溶液转移到过滤模块1210b,用于洗涤细胞。

[0220] 在一些实现中,细胞在过滤模块或细胞洗涤和浓缩模块中成为电转感受态的并被洗脱(908)。细胞可以用洗涤溶液被洗脱。例如,可以使用来自试剂供应品的试剂来洗脱细胞。例如,过滤模块或细胞洗涤和浓缩模块可以类似于图7A和7B所示的过滤模块700。如上面所讨论的,可以使用许多不同的方法(包括密度梯度提纯、渗析、离子交换柱、过滤、离心、稀释和用于提纯的珠的使用)来洗涤细胞。在一些方面中,细胞洗涤和浓缩模块利用离心设备。在其他方面中,过滤模块利用过滤仪器。在还有其他方面中,珠耦合到结合到细胞表面的部分。这些部分包括但不限于抗体、外源凝集素、麦胚凝集素、突变溶菌酶和配体。在其他方面中,细胞被设计成被磁化,允许磁体在洗涤步骤之后使细胞成小球状。细胞磁化的机制可以包括但不限于铁蛋白表达。

[0221] 在一些实施例中,洗涤溶液在洗脱之前被转移到过滤模块。例如,图12A-12B的机器人操纵系统108可以从位于对洗涤溶液指定的位置上的小瓶或容具转移洗涤溶液。在转移洗涤溶液之前,可以在位于对洗涤溶液指定的位置上的小瓶或其它容具或储器上扫描机器可读标记以确认小瓶、容具或储器的内容物。此外,机器可读标记可以指示提供到仪器的洗涤溶液的类型。在一些实施例中,洗涤溶液的类型可以使系统选择特定的处理脚本(例如,适合于特定洗涤溶液的过滤模块的设置和激活)。

[0222] 在其他实施例中,细胞在洗涤盒的细胞洗涤模块中被洗脱。例如,洗脱的细胞可以被收集在图1A所示的洗涤盒106的空器皿中,且机器人操纵系统108可以将培养基从试剂盒104(或洗涤盒10b的试剂孔)转移到洗脱的细胞。

[0223] 一旦细胞成为电转感受态的并悬浮在合适的体积(诸如,50 μ L到10mL、或100 μ L到80mL、或150 μ L到8mL、或250 μ L到7mL、或500 μ L到6mL、或750 μ L到5mL)中用于由过滤模块转化(906),在一些实现中,细胞就被转移至转化模块(918)。例如,图1A-1B的机器人操纵系统108可以将细胞从过滤模块转移到转化模块110c。过滤模块可以物理地耦合到转化模块,或者这些模块可以是分离的。在例如具有基于盒的供应品的图1A的仪器100的实施例中,细胞可以在转移到转化模块之前被洗脱到在盒(例如试剂盒104)内的储器。

[0224] 在一些实现中,在自动化多模块细胞处理仪器之外准备核酸。例如,在方法900中运行转化过程和其他过程之前,组装的载体或其他核酸组件可以作为试剂由用户包括。

[0225] 然而,在其他实现中,核酸由自动化多模块细胞处理仪器准备。在一些实施例中,下面的步骤910至916的一部分与步骤902至908的一部分并行地被执行。在一些实施例中,下面的步骤的至少一部分在步骤902至908之前和/或之后被执行。

[0226] 在一些实现中,核酸(例如,编辑寡核苷酸和载体主链)以及在一些示例中的酶和其他反应组分被转移到核酸组装模块(910)。核酸组装模块可以被配置成以自动化方式执

行多种不同核酸组装技术中的一种或更多种。可以在核酸组装模块中执行的核酸组装技术可以包括但不限于使用限制性内切酶的那些组装方法,包括PCR、BioBrick组装、IIS型克隆(例如GoldenGate组装)以及连接酶循环反应。在其他示例中,核酸组装模块可以基于在核酸的相邻部分之间的重叠来执行组装技术,例如Gibson **Assembly**[®]、CPEC、SLIC、连接酶循环等。可由核酸组装模块执行的其他示例组装方法包括在酵母中的间隙修复、通路克隆和拓扑异构酶介导的克隆。核酸组装模块例如可以是关于图4描述的核酸组装模块400。在特定示例中,处理系统120可以指导机器人操纵系统1208将核酸1206转移到核酸组装模块1210e,如关于图12B所述的。在另一个示例中,如关于图1A所述的,核酸可以由机器人操纵系统108从盒104、106之一转移到核酸组装模块。

[0227] 在一些实施例中,在转移核酸样品、酶和其他反应组分中的每个之前,可以在位于对这些材料指定的位置上的小瓶或其他容具上扫描机器可读标记以确认小瓶或容具被标记为包含预期的材料。此外,机器可读标记可以指示提供到仪器的核酸样品、酶和其他反应组分中的一个或多个的类型。在一些实施例中,材料的类型可以使仪器选择特定的处理脚本(例如,机器人操纵系统的指令的序列以识别另外的材料和/或核酸组装模块的设置和激活)。

[0228] 在一些实施例中,核酸组装模块根据所使用的核酸组装的类型是温度控制的。例如,当在核酸组装模块中使用PCR时,该模块可以具有允许温度在变性、退火和延伸之间循环的热循环能力。当在核酸组装模块中利用单一温度组装方法时,该模块可具有达到优化所执行的特定组装过程的温度并保持在该温度处的能力。

[0229] 在一些实施例中,温度控制由自动化多模块细胞处理仪器的处理系统(例如图13的处理系统1310)管理。这些温度和保持温度的持续时间可以由预编程的一组参数确定(例如,在处理脚本中或在由处理系统可访问的另一个存储空间中被识别),或者由用户通过与处理系统通过接口连接来手动地控制。

[0230] 一旦足够的时间已经过去用于使组装反应发生,在一些实现中,核酸组件被转移到提纯模块(914)。例如,处理系统可以基于提供到自动化多模块细胞处理仪器的反应的类型、材料的类型和用户设置中的一个或多个来监控组装反应的定时。例如,图1A-1B或12A-12B的机器人操纵系统108可以通过吸管或移液枪接口将核酸组件转移到提纯模块。在另一个示例中,图1A-1B或12A-12B的机器人操纵系统108可以将包含核酸组件的小瓶从核酸组装模块的室转移到脱盐/提纯模块的室。

[0231] 在一些实现中,核酸组件在提纯模块处被脱盐和洗脱(916)。例如,提纯模块可以去除核酸组装混合物的不需要的组分(例如盐、矿物质等)。在一些实施例中,提纯模块将组装的核酸浓缩到比核酸组件体积更小的体积中。用于在核酸组装之后交换液体的方法的示例包括磁珠(例如加利福尼亚州Carlsbad的Invitrogen公司的SPRI或Dyna1(Dyna1beads))、二氧化硅珠、二氧化硅旋转柱、玻璃珠、沉淀(例如使用乙醇或异丙醇)、碱裂解、渗透提纯、用丁醇的萃取、基于膜的分离技术、过滤等。例如,可以使用配合有变化的孔隙率各向异性亲水生成的纤维素膜的一个或多个微浓缩器。在另一个示例中,脱盐/提纯模块可以通过将混合物与包括不溶性磷酸盐的离子交换剂接触、除去液体并从离子交换剂洗脱核酸来处理包括核酸和离子盐的液体样品。

[0232] 在说明性实施例中,核酸组件可以在提纯模块的室中与磁珠(如SPRI珠)组合。核

酸组件可以在设定的温度下被培养足够长的时间,用于使核酸组件结合到磁珠。在培养之后,磁体可以在室附近接合,使得核酸组件可以被洗涤和洗脱。关于图4的组合等温核酸组装和提纯模块讨论了该过程的说明性示例。

[0233] 一旦核酸组件被洗脱,在一些实现中,核酸组件就被转移到转化模块(918)。例如,图1A-1B或12A-12B的机器人操纵系统108可以通过吸管或移液枪接口将核酸组件转移到转化模块,例如基于比色皿的电穿孔模块或流式电穿孔模块,如上所述。例如,脱盐的组装核酸可以在转移期间与来自步骤908的电转感受态细胞组合。在其他实施例中,转化模块可以单独地接受电转感受态细胞和核酸组件中的每一个,并且实现混合(例如,打开一个或多个通道以在共享室中组合材料)。

[0234] 细胞可以在转化模块中被转化(920)。转化可以涉及用于将外源核酸序列(例如,DNA)引入到靶细胞内(转化或转染)的任何本领域公认的技术,在一些示例中,包括电穿孔、脂转染、光穿孔、注射、微量沉淀、微量注射、脂质体、粒子轰击、声穿孔、激光诱导穿孔、珠转染、磷酸钙或氯化钙共同沉淀或DEAE葡聚糖介导的转染。在一些实施例中,可以使用利用机械和化学转染方法的能力的混合技术,例如磁转染,一种将化学转染与机械方法组合的转染方法。在另一个示例中,阳离子脂质可以与基因枪或电穿孔仪结合使用。

[0235] 在一些实现中,转化模块使用电穿孔来触发DNA材料的摄取。缓冲液或培养基可以被转移到转化模块并被添加到细胞,使得细胞可以悬浮在有利于在电穿孔期间的细胞存活的缓冲液或培养基中。在转移缓冲液或培养基之前,可在位于对缓冲液或培养基指定的位置上的小瓶或其它容具或储器上扫描机器可读标记以确认小瓶、容具或储器的内容物。此外,机器可读标记可以指示提供到仪器的缓冲液或培养基的类型。在一些实施例中,缓冲液或培养基的类型可以使仪器选择特定的处理脚本(例如,适合于特定缓冲液或培养基的转化模块的设置和激活)。对于细菌细胞电穿孔,低电导培养基(例如水或甘油溶液)可以用来减少由瞬时大电流导致的热产生。对于酵母细胞,可以使用山梨醇溶液。对于哺乳动物细胞电穿孔,细胞可以悬浮在高导电培养基或缓冲液(例如MEM、DMEM、IMDM、RPMI、Hanks、PBS、HBSS、HeBS和Ringer溶液)中。在特定示例中,机器人操纵系统108可以将缓冲溶液从盒104、106之一转移到转化模块110c。转化模块例如可以是流式电穿孔模块,例如关于图5A和5B描述的电穿孔模块。如关于图1A和图5B所述的,转化模块可以是配置有图1A的盒104的一次性流式电穿孔模块110c。

[0236] 在一些实现中,转化模块进一步准备细胞用于核酸摄取。例如,可以在核酸的添加之前用蔗糖或甘油洗液处理细菌细胞,且可以用乙酸锂、二硫苏糖醇(DTT)和TE缓冲液的溶液处理酵母细胞。在涉及用于核酸摄取的细胞的准备的其他实现中,过滤模块或另一个单独的模块(例如,细胞洗涤模块)可以准备细胞用于核酸更新。

[0237] 一旦被转化,细胞就被转移到第二生长/恢复/编辑模块(922)。例如,图1A-1B或12A-12B的机器人操纵系统108可以通过吸管或移液枪接口将所转化的细胞转移到第二生长模块。在另一个示例中,1A-1B或12A-12B的机器人操纵系统108可以将包含所转化的细胞的小瓶从转化模块的室转移到第二生长模块的室。

[0238] 在一些实施例中,第二生长模块充当恢复模块,允许细胞从转化过程恢复。在其他实施例中,细胞可以在被输送到第二生长模块之前被提供到单独的恢复模块。在恢复期间,第二生长模块允许所转化的细胞摄取,并且在某些方面中将所引入的核酸整合到细胞的基

基因组中。第二生长模块可以被配置为在对细胞生长最佳的任何用户定义的温度(优选地25°、30°或37°C)下培养细胞。

[0239] 在一些实施例中,第二生长模块表现为基于抗生素或其他试剂来选择所转化的细胞的选择模块。在一个示例中,RNA导向核酸酶(RGN)蛋白系统用于选择以使未接受期望编辑的细胞的基因组裂解。用于选择的RGN蛋白系统可以与用于编辑的RGN相同或不同。在抗生素选择剂的示例中,抗生素可以被添加到第二生长模块以实施选择。合适的抗生素抗性基因包括但不限于如下基因:例如氨苄青霉素抗性基因、四环素抗性基因、卡那霉素抗性基因、新霉素抗性基因、刀豆氨酸抗性基因、杀稻瘟菌素抗性基因、潮霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因或氯霉素抗性基因。例如,图1A-1B或12A-12B的机器人操纵系统108可以通过吸管或移液枪接口将抗生素转移到第二生长模块。在一些实施例中,使用溶解增强剂(例如清洁剂)、催眠洗液的渗透压力、温度、酶、蛋白酶、噬菌体、还原剂或离液剂来帮助去除死细胞背景。例如,图13的处理系统1310可以改变环境变量,例如温度,以诱导选择,而图1A-1B或12A-12B的机器人操纵系统108可以输送额外的材料(例如洗涤剂、酶、还原剂等)以帮助选择。在其他实施例中,通过过滤进行的细胞去除和/或培养基交换用于减少死细胞背景。

[0240] 在另外的实施例中,除了应用选择以外或者作为应用选择的替代,第二生长模块用作编辑模块,允许在所转化的细胞中的基因组编辑。可选地,在其他实施例中,恢复和选择(如果被执行)后的细胞被转移到单独的编辑模块。作为编辑模块,第二生长模块例如通过所引入的核酸的表达来诱导细胞的基因组的编辑。核酸酶的表达可能涉及化学、光、病毒或温度诱导中的一个或更多个。例如,第二生长模块可以被配置成在温度诱导过程期间加热或冷却细胞。在特定说明中,可以通过在42°C-50°C下加热来诱导细胞。对该说明进一步地,然后可以在诱导之后将细胞冷却到0°C-10°C。在化学或病毒诱导的示例中,诱导剂可以转移到第二生长模块以诱导编辑。如果诱导型核酸酶被引入到细胞,在编辑期间,诱导型核酸酶通过诱导物分子(例如关于图12A描述的诱导物分子1224)的引入来被诱导。在一些实现中,诱导剂或诱导物分子由图1A-1B或12A-12B的机器人操纵系统108转移到第二生长模块(例如,通过移液枪或吸管接口)。

[0241] 在一些实现中,如果没有额外的细胞编辑是需要的(924),则细胞可以从细胞生长模块转移到存储单元用于以后从自动化多模块细胞处理系统移除(926)。存储单元例如可以包括图12A-12B的存储单元114。例如,图1A-1B或12A-12B的机器人操纵系统108可以通过吸管或移液枪接口将细胞转移到存储单元114。在另一个示例中,图1A-1B或12A-12B的机器人操纵系统108可以将包含细胞的小瓶从第二生长模块的室转移到在存储单元内的小瓶或管。

[0242] 在一些实现中,如果额外的细胞编辑是需要的(924),则细胞可以被转移到相同或不同的过滤模块并成为电转感受态的(908)。此外,在一些实施例中,新的组装的核酸样品此时可以由核酸组装模块准备。在递归编辑之前,在一些实施例中,自动化多模块细胞处理仪器可能需要由用户供应的额外的材料(例如,替换盒)。

[0243] 步骤在第二轮编辑期间可以是相同或不同的。例如,在一些实施例中,在步骤904的随后执行时,选择性生长培养基被转移到生长模块以能够从第一轮编辑选择所编辑的细胞。例如,图1A-B或12A-B的机器人操纵系统108可以从在位于对选择性生长培养基指定的位置上的试剂盒中的小瓶或容具转移选择性生长培养基。在转移选择性生长培养基之前,

可以在位于对选择性生长培养基指定的位置上的小瓶或其他容具或储器上扫描机器可读标记以确认小瓶、容具或储器的内容物。此外，机器可读标记可以指示提供到仪器的选择性生长培养基的类型。在一些实施例中，选择性生长培养基的类型可以使仪器选择特定的处理脚本（例如，适合于特定的选择性生长培养基的生长模块的设置和激活）。关于图10A至10C描述递归编辑工作流的特定示例。

[0244] 在一些实现中，方法900可以被定时以请求材料和/或与用户的时间表协调地完成编辑周期。例如，自动化多模块细胞处理仪器可以向用户提供安排一个或更多个细胞处理周期（例如，一个或更多个递归编辑）的完成的能力，使得方法900以在用户的优选时间完成为目标而被实施。例如，可以通过用户界面（例如图13的用户界面1316）来设置时间安排。在特定的说明中，用户可以将第一周期的完成设置到下午4:00，使得用户可以向自动化多模块细胞处理仪器提供材料的额外盒，以实现另一轮细胞编辑的通宵处理。

[0245] 在一些实现中，在整个方法900中，自动化多模块细胞处理仪器可以警告用户它的当前状态。例如，图13的用户界面1316可以呈现当前处理阶段的图形指示。在特定示例中，自动化多模块细胞处理仪器的正面可以被覆盖有呈现描绘了细胞处理的当前状态的动画图形的用户界面（例如触摸屏）。用户界面可以进一步呈现与当前处理阶段相关联的任何用户和/或默认设置（例如，温度设置、时间设置等）。

[0246] 尽管被示为特定的一系列操作，但在其他实施例中，在方法900中可以包括更多或更少的步骤。例如，在一些实施例中，在参与每一轮编辑之前，可以筛选储器、盒和/或小瓶的内容物以确认合适的材料可用于继续处理。例如，在一些实施例中，一个或更多个成像传感器（例如，条形码扫描仪、摄像机等）可以确认在自动化多模块细胞处理仪器的壳体内部的不同位置处的内容物。在一个示例中，多个成像传感器可以布置在自动化多模块细胞处理仪器的壳体内，每个成像传感器被配置成检测一种或更多种材料（例如，机器可读标记，例如条形码或QR码、材料的形状/尺寸等）。在另一个示例中，至少一个成像传感器可以由机器人操纵系统移动到多个位置以检测一种或更多种材料。在另外的实施例中，一个或更多个重量传感器可以检测一次性或可替换材料的存在或不存在。在说明性示例中，转移枪头供应品保持器116可以包括重量传感器以检测枪头是否已经被装载到该区域中。在另一个说明性示例中，光学传感器可以检测到液体废物的水平已经达到阈值水平，需要在细胞处理的继续之前进行处置。对额外材料、废物供应品的移除或其他用户干预（例如，一个或更多个元件的手动清洁等）的请求在一些实现中被呈现在自动化多模块细胞处理仪器的图形用户界面上。在一些实现中，自动化多模块细胞处理仪器例如通过软件应用、电子邮件或文本消息来联系用户以请求新材料或其他手动干预。

[0247] 用于在自动化多模块细胞处理仪器中的细胞处理的工作流程

[0248] 自动化多模块细胞处理仪器被设计为使用相同的模块来执行各种细胞处理工作流程。例如，使用相同的基本仪器和机器人操纵系统，在单独容具中的或以盒形式的源材料可以不同，且相应的指令（例如，软件脚本）可以相应地被选择；也就是说，多模块细胞处理系统可以被配置为执行用于处理细胞样品和不同类型的细胞样品的许多不同的工作流程。在实施例中，可以迭代地执行相同的工作流程以递归地编辑细胞样品。在其他实施例中，单元样品被递归地编辑，但工作流程可以从一个迭代到另一迭代而改变。

[0249] 图10A至10C示出了可以使用包括两个细胞生长模块1002、1008、两个过滤模块

1004和1010以及流式电穿孔模块1006的自动化多模块细胞处理仪器执行的示例工作流程。尽管被描述为单独的生长模块1002、1008和过滤模块1004、1010,但每个模块可以替代地被设计为双模块。例如,包括生长模块1002和1008的双生长模块可以包括共享某个电路、控件和电源并布置在同一壳体中的双旋转生长小瓶。类似地,双过滤模块可以包括过滤模块1004和1010,包括两个单独的过滤器和液体供应管,但共享电路、控件、电源和壳体。例如,模块1002、1004、1006、1008和1010可以是关于图1A和1B描述的仪器100的一部分。

[0250] 转到图10A,流程图示出了涉及具有相同处理步骤的两个处理阶段的第一细菌基因组编辑工作流程1000,导致对细胞储备 (cell stock) 1012的两次编辑。每个阶段可以基于源材料的不同盒进行操作。例如,第一盒可以包括第一寡核苷酸库1014a和第一sgRNA主链1016a。在处理阶段之间或在处理之前但在与第一盒不同的位置上被引入到自动化多模块细胞处理仪器中的第二盒可以包括第二寡核苷酸库1014b和第二sgRNA主链1016b。每个盒可以被认为是用于构建所编辑的细胞的库的“库盒”。在一些实施例中,细胞储备1012被包括在第一库盒中。细胞储备1012可以在包括两个盒的套件内被供应。可选地,用户可以将细胞储备1012的容具(例如小瓶或管)添加到购买的盒。

[0251] 在一些实施例中,基于由自动化多模块细胞处理仪器的处理系统(例如图13的处理系统1310)执行的脚本来执行工作流程1000。在第一示例中,可以经由被添加到第一盒的机器可读标记或标签来访问脚本。在一些实施例中,使用单独的脚本来执行每个处理阶段。例如,每个盒可以包括用于处理盒的内容物的脚本或脚本本身的指示。

[0252] 在一些实现中,第一阶段开始于将细胞储备1012引入到第一生长模块1002中用于接种、生长和监控(1018a)。在一个示例中,机器人操纵系统将细胞储备1012的小瓶添加到在第一生长模块1002的旋转生长小瓶中包含的培养基。在另一个示例中,机器人操纵系统从第一盒吸取细胞储备1012,并将细胞储备1012添加到在旋转生长小瓶中包含的培养基。此时细胞可能已经被保持在4°C的温度处。在特定示例中,20ml的细胞储备可以在第一生长模块1002的旋转生长小瓶内在30°C的温度下被生长到0.50的OD。添加到第一生长模块1002的细胞储备1012可以随着时间的过去被监控,直到经由生长小瓶的自动监控感测到0.50OD为止。监控可以是周期性的或连续的。例如,这可能花费大约900分钟(估计的),尽管确切的时间取决于期望OD的检测。

[0253] 在一些实现中,在使细胞生长到期望OD之后,将诱导物添加到第一生长模块1002用于诱导细胞。在特定示例中,可以添加100 μ l的诱导物,并且生长模块1002可以将混合物的温度带到42°C并保持15分钟。

[0254] 在一些实现中,细胞储备1012在生长和诱导之后被转移到第一过滤模块1004,用于使细胞成为电转感受态的(1020a)并减少用于转化的细胞的体积。在一个示例中,机器人操纵系统将细胞储备1012的小瓶从第一生长模块1002的旋转生长小瓶移动到第一过滤模块1004的小瓶保持器。在另一个示例中,机器人操纵系统从第一生长模块1002的旋转生长小瓶吸取细胞储备1012,并将它输送到第一过滤模块1004。例如,用于将细胞储备1012转移到第一生长模块1002的一次性移液枪头可用于将细胞储备1012从第一生长模块1002转移到第一过滤模块1004。在一些实施例中,在将细胞储备1012从第一生长模块1002转移到第一过滤模块1004之前,将第一生长模块1002冷却到4°C,使得细胞储备1012类似地降低到该温度。在特定示例中,第一生长模块1002的温度可以在大约8分钟的一段时间内降低到大约

4°C,并且生长模块1002可以将温度保持在4°C大约15分钟以确保细胞储备1012的温度的降低。

[0255] 在转移细胞储备之前,在一些实现中,使用洗涤溶液来预洗涤第一过滤模块1004的过滤器。例如,洗涤溶液可以在洗涤盒(例如关于图1A描述的盒1006)中被供应。例如,第一过滤模块1004可以流体地连接到洗涤盒的洗涤溶液,如关于图7A所述的。

[0256] 例如,第一过滤模块1004可以是双过滤模块的一部分,例如关于图7B和7C描述的过滤模块750。在特定示例中,第一过滤模块1004可以在洗涤和洗脱过程期间被保持在4°C处,同时在洗脱小瓶和第一过滤模块1004之间转移细胞材料。

[0257] 在一些实现中,当在过滤模块1004处使细胞成为电转感受态的时,细胞储备1012被转移到转化模块1006(例如,流式电穿孔模块)用于转化。在一个示例中,机器人操纵系统将细胞储备1012的小瓶从第一过滤模块1004的小瓶保持器移动到流式电穿孔模块1006的储器。在另一个示例中,机器人操纵系统从第一过滤模块1002或临时储器吸取细胞储备1012,并将它输送到第一过滤模块1004。在特定示例中,来自第一过滤模块1004的400 μ l的所浓缩的细胞储备1012在转移到转化模块1006之前被转移到混合储器。例如,细胞储备1012可以被转移到用于与组装的核酸混合的盒中的储器,然后由机器人操纵系统使用移液枪枪头转移。在特定示例中,转化模块保持在4°C处。在说明性示例中,细胞储备1012可以在大约四分钟内被转化。

[0258] 当细胞生长和/或成为电转感受态时,在一些实现中,使用等温核酸组装过程来组装第一寡核苷酸库1014a和sgRNA主链1016a以在等温核酸组装主混合物中产生组装的核酸(1022a)。可以在工作流程1000的第一阶段的第一处理步骤1018a、1020a期间的某个时间点处创建组装的核酸。可选地,可以在开始第一处理步骤1018之前创建组装的核酸。

[0259] 在一些实施例中,使用自动化多模块细胞处理仪器的等温核酸组装模块来组装核酸。例如,机器人操纵系统可以将来自在自动化多模块细胞处理仪器的试剂盒中的库器皿的第一寡核苷酸库1014a和sgRNA主链1016a添加到等温核酸组装模块(未示出),例如关于图12B描述的核酸组装模块1210g。例如,在特定示例中,核酸组装混合物可以包括50 μ l Gibson **Assembly**[®]主混合物、25 μ l载体主链1016a和25 μ l寡核苷酸1014a。等温核酸组装模块可以保持在室温处。组装过程可能花费大约30分钟。

[0260] 在其他实施例中,核酸在多模块细胞处理仪器的外部被组装,并作为源材料被添加。例如,在激活细胞处理的第一步1018a之前,可以将组装的核酸的小瓶或管添加到试剂盒。在特定示例中,提供了100 μ l的组装的核酸。

[0261] 在一些实现中,组装的核酸被提纯(1024a)。例如,组装的核酸可以由机器人操纵系统从等温核酸组装模块转移到提纯模块(未示出),例如图12B的提纯模块1210h。在其他实施例中,等温核酸组装模块可以包括提纯特征(例如,组合等温核酸组装和提纯模块)。在另外的实施例中,组装的核酸在多模块细胞处理仪器的外部被提纯,并作为源材料被添加。例如,在激活细胞处理的第一步1018a之前,可以将所提纯的组装的核酸的小瓶或管与细胞储备1012一起添加到试剂盒。

[0262] 在特定示例中,在等温核酸组装混合物中的100 μ l的组装的核酸被提纯。在一些实施例中,磁珠被添加到等温核酸组装模块,例如,在液体悬液中的180 μ l的磁珠可以由机器人操纵系统添加到等温核酸组装模块。在功能上耦合到等温核酸组装模块的磁体可以被激

活,并且样品在200 μ l乙醇中被洗涤(例如,机器人操纵系统可以将乙醇转移到等温核酸组装模块)。在一些实施例中,来自该操作的液体废物被转移到盒的废物容器(例如,由机器人操纵系统使用与在转移乙醇时使用的相同的移液枪枪头)。此时,脱盐的组装的核酸可以被转移到保持容具,例如盒的储器。脱盐的组装的核酸可以保持在例如4 $^{\circ}$ C的温度处,直到细胞准备好转化为止。在特定示例中,在转移到转化模块1006之前,100 μ l的组装的核酸被添加到在混合储器中的400 μ l的浓缩的细胞储备1012。在一些实施例中,提纯过程可能花费大约16分钟。

[0263] 在一些实现中,将组装的核酸和细胞储备1012添加到流式电穿孔模块1006并且转化细胞储备1012(1026a)。例如,机器人操纵系统可以例如使用移液枪枪头或通过转移小瓶或管来将细胞储备1012和组装的核酸的混合物从混合储器转移到流式电穿孔模块1006。在一些实施例中,内置的流式电穿孔模块(例如图5A的流式电穿孔模块500)用于转化细胞储备1012。在其他实施例中,基于盒的电穿孔模块(例如图5B的流式电穿孔模块530)用于转化细胞储备1012。电穿孔模块1006例如可以保持在4 $^{\circ}$ C的温度处。在说明性示例中,电穿孔过程可能花费大约四分钟。

[0264] 在一些实现中,所转化的细胞储备1012被转移到第二生长模块1008用于恢复(1028a)。在特定示例中,所转化的细胞在第二生长模块1008中在30 $^{\circ}$ C的温度下经历恢复过程。例如,所转化的细胞可以在第二生长模块1008中保持大约一小时用于恢复。

[0265] 在一些实现中,将选择性培养基转移到第二生长小瓶(未示出),并在选择过程中细胞被留下以培养另一段时间。在说明性示例中,可以将抗生素转移到第二生长小瓶,并且细胞可以在30 $^{\circ}$ C的温度下培养额外的两个小时。

[0266] 在恢复之后,细胞可以针对另一轮编辑或针对在器皿中的储存(例如针对在自动化细胞处理环境之外进行的另外的实验)做准备。可选地,细胞的一部分可以作为细胞库输出被转移到存储单元,而细胞的另一部分可以针对第二轮编辑做准备。

[0267] 在一些实现中,针对第二轮编辑做准备,所转化的细胞被转移到第二过滤模块1010用于培养基交换和过滤(1030a)。在转移所转化的细胞储备之前,在一些实现中,使用洗涤溶液来预洗涤第二过滤模块1004的过滤器。例如,洗涤溶液可以在洗涤盒(例如关于图1A描述的盒1006)中被供应。第二过滤模块1010例如可以流体地连接到洗涤盒的洗涤溶液,如关于图7A所述的。

[0268] 例如,第二过滤模块1010可以是双过滤模块的一部分,例如关于图7B和7C描述的过滤模块750。在特定示例中,第二过滤模块1010可以在洗涤和洗脱过程期间保持在4 $^{\circ}$ C处,同时在洗脱小瓶和第二过滤模块1010之间转移细胞材料。在特定示例中,该过滤过程的输出被沉积在小瓶或管中以等待进一步的处理,例如转移到转化模块。小瓶或管可以在存储单元中保持在4 $^{\circ}$ C的温度处。

[0269] 第一处理阶段可能发生在一天期间。在说明性实施例中,第一处理阶段被估计为花费低于19小时来完成(例如,大约18.7小时)。在工作流程1000中的这点处,在一些实现中,新材料被手动地添加到自动化多模块细胞处理仪器。例如,可以添加新的试剂盒。此外,此时可以将新的洗涤盒、替换过滤器和/或替换移液枪枪头添加到自动化多模块细胞处理仪器。此外,在一些实施例中,过滤器模块可以经历清洁过程和/或固体和液体废物单元可以被倒空,针对下一轮处理做准备。在另外其他实施例中,试剂盒可以在两个或更多个编辑

周期期间提供试剂。

[0270] 在一些实现中,第二轮编辑涉及与上面描述的第一处理阶段相同的模块1002、104、1006、1008和1010、相同的处理步骤1018、1020、1022、1024、1026、1028和1030以及相同的温度和时间范围。例如,第二寡核苷酸库1014b和第二sgRNA主链1016b可以用于与上面所述的几乎相同的方式编辑所转化的细胞。尽管被示为两阶段过程,但在其他实施例中多达两次、四次、六次、八次或更多次递归可以被进行以继续编辑相同的细胞储备1012。

[0271] 在其他实现中,转到图10B,工作流程1040涉及相同的模块1002、1004、1006、1008和1010以及第一处理阶段的相同处理步骤1018、1020、1022、1024、1026、1028和1030。然而,与图10A的工作流程1000不同,图10B的工作流程1040的第二阶段包括固化步骤。“固化”是从所转化的细胞中除去载体的过程,例如在前一轮编辑中使用的编辑载体、包括核酸酶的表达序列的“引擎”载体或两者。可以通过例如下列操作来完成固化:使用固化质粒使编辑载体裂解,从而使编辑和/或引擎载体变得不起作用(在图10b的工作流程中例示的);经由细胞生长稀释在细胞群体中的载体(即,细胞经历的生长周期越多,保留编辑或引擎载体(未示出)的子细胞就越少),或者通过例如利用在编辑或引擎载体(未示出)上的热敏复制起点稀释在细胞群体中的载体。在一个示例中,“固化质粒”可以被包含在自动化仪器的试剂盒中,或者在第二处理阶段之前被手动地添加到仪器。如同工作流程1000一样,在一些实施例中,基于由自动化多模块细胞处理仪器的处理系统(例如图13的处理系统1310)执行的脚本来执行工作流程1040。在第一示例中,可以经由被添加到第一盒的机器可读标记或标签来访问脚本。在一些实施例中,使用单独的脚本来执行每个处理阶段。例如,每个盒可以包括用于处理盒的内容物的脚本的指示或脚本本身。以这种方式,例如,可以使用针对适合于固化的设置(例如,温度、时间、材料量等)设计的脚本来执行涉及固化盒的第二阶段。用于固化的条件将取决于用于固化的机制;也就是说,在这个示例中,固化质粒如何使编辑和/或引擎质粒裂解。

[0272] 在一些实现中,工作流程1040的第二阶段通过在第一生长模块1002处从工作流程1040的第一阶段接收第一编辑的细胞开始。例如,如关于图10A的工作流程1000所述,可以通过应用步骤1018、1020、1022、1024、1026、1028和1030使用细胞储备1042、寡核苷酸库1044和sgRNA主链1046来编辑第一编辑的细胞。例如,第一编辑的细胞储备1042可以由机器人操纵系统转移到第一生长模块1002。在一个示例中,机器人操纵系统将第一编辑的细胞储备1042的小瓶添加到第一生长模块1002的旋转生长小瓶。在另一个示例中,机器人操纵系统从存储单元的容器吸取第一编辑的细胞储备1042,并将细胞储备1042添加到旋转生长小瓶。此时细胞可能已经保持在4°C的温度处。

[0273] 在一些实现中,第一编辑的细胞在第一生长模块1002中被接种、生长和监控(1018d)。在特定示例中,第一编辑的细胞储备1042的等分部分(aliquot)可以被转移到处于30°C的温度的包含例如20mL的生长培养基的旋转生长小瓶直到0.50的OD。添加到第一生长模块1002的细胞储备1042可以随着时间的过去被监控,直到0.500D通过自动监控被感测到为止。监控可以是周期性的或连续的。例如,这可能花费大约900分钟(估计的),尽管确切的时间取决于期望OD的检测。

[0274] 在一些实现中,在生长到期望OD之后,诱导物被添加到第一生长模块1002中用于诱导细胞。在特定示例中,可以添加100 μ l的诱导物,并且生长模块1002可以将混合物的温

度带到42℃并保持15分钟。

[0275] 在一些实现中,在生长和诱导之后,第一编辑的细胞储备1042被转移到第一过滤模块1004用于使第一编辑的细胞成为电转感受态的(1020d)。在一个示例中,机器人操纵系统将第一编辑的细胞储备1042的小瓶从第一生长模块1002的旋转生长小瓶移动到第一过滤模块1004的小瓶保持器。在另一个示例中,机器人操纵系统从第一生长模块1002的旋转生长小瓶吸取第一编辑的细胞储备1042,并将它输送到第一过滤模块1004。例如,用于将第一编辑的细胞储备1042转移到第一生长模块1002的一次性移液枪头可用于将细胞储备1042从第一生长模块1002转移到第一过滤模块1004。在一些实施例中,在将细胞储备1042从第一生长模块1002转移到第一过滤模块1004之前,将第一生长模块1002冷却到4℃,使得细胞储备1042类似地降低到该温度。在特定示例中,第一生长模块1002的温度可以在大约8分钟的一段时间内降低到大约4℃,并且生长模块1002可以将温度保持在4℃处大约15分钟,以确保细胞储备1012的温度的降低。

[0276] 在将第一编辑的细胞储备1042转移到过滤模块之前,在一些实现中,使用洗涤溶液预洗涤第一过滤模块1004的过滤器。例如,洗涤溶液可以在洗涤盒(例如关于图1A描述的盒1006)中被供应。例如,第一过滤模块1004可以流体地连接到洗涤盒的洗涤溶液,如关于图7A所述的。

[0277] 例如,第一过滤模块1004可以是双过滤模块的一部分,例如关于图7B和7C描述的过滤模块750。在特定示例中,第一过滤模块1004可以在洗涤和洗脱过程期间保持在4℃处,同时在洗脱小瓶和第一过滤模块1004之间转移细胞材料。

[0278] 在一些实现中,当在过滤模块1004处使第一编辑的细胞成为电转感受态的(1020d)时,第一编辑的细胞储备1042被转移到转化模块1006(例如,流式电穿孔模块)用于转化。在一个示例中,机器人操纵系统将细胞储备1042的小瓶从第一过滤模块1004的小瓶保持器移动到流式电穿孔模块1006的储器。在另一个示例中,机器人操纵系统从第一过滤模块1002或临时储器吸取细胞储备1042,并将它输送到第一过滤模块1004。在特定示例中,来自第一过滤模块1004的400μl的所浓缩的细胞储备1042在转移到转化模块1006之前被转移到混合储器。例如,细胞储备1042可以被转移到在用于与固化质粒1050混合的盒中的储器,然后混合且由机器人操纵系统使用移液枪枪头来转移。在特定示例中,转化模块1006保持在4℃处。在说明性示例中,细胞储备1042可以在大约四分钟内被转化。

[0279] 在一些实现中,所转化的细胞储备1042被转移到第二生长模块1008用于恢复/固化(1028d)。在特定示例中,20ml的所转化的细胞在30℃的温度下在第二生长模块1008中经历恢复过程。例如,所转化的细胞可以在第二生长模块1008中保持大约一小时用于恢复。如果另一轮编辑是需要的,则第一编辑质粒或载体被固化。如果另一轮编辑是不需要的,则第一编辑质粒和引擎质粒可以被固化。

[0280] 在恢复和固化后,细胞可以对另一轮编辑或对储存做准备以在自动化细胞处理仪器之外的进一步研究中被使用。例如,细胞的一部分可以作为细胞库输出被转移到存储单元,而细胞的另一部分可以对第二轮编辑做准备。

[0281] 在一些实现中,对第二轮编辑做准备时,所转化的细胞被转移到第二过滤模块1010用于培养基交换和过滤(1030d),包含甘油用于使细胞成为电转感受态的。在转移所转化的细胞储备之前,在一些实现中,使用洗涤溶液预洗涤第二过滤模块1004的过滤器。例

如,洗涤溶液可以在洗涤盒(例如关于图1A描述的盒1006)中被供应。第二过滤模块1010例如可以流体地连接到洗涤盒的洗涤溶液,如关于图7A所述的。

[0282] 例如,第二过滤模块1010可以是双过滤模块的一部分,例如关于图7B和7C描述的过滤模块750。在特定示例中,第二过滤模块1010可以在洗涤和洗脱过程期间保持在4°C处,同时在洗脱小瓶和第二过滤模块1010之间转移细胞材料。在特定示例中,该过滤过程的输出是沉积在小瓶或管中以等待进一步处理的电转感受态细胞。小瓶或管可以在存储单元中保持在4°C的温度处。

[0283] 转到图10C,流程图示出了涉及具有相同处理步骤的两个处理阶段的酵母工作流程1060,导致对细胞储备1062的两次编辑。每个阶段可以基于源材料的不同盒进行操作。例如,第一盒可以包括第一寡核苷酸库1070a和第一sgRNA主链1072a。在处理阶段之间或在处理之前但在与第一盒不同的位置上被引入到自动化多模块细胞处理仪器中的第二盒可以包括第二寡核苷酸库1070b和第二sgRNA主链1072b。每个盒可以被认为是用于构建所编辑的细胞的库的“库盒”。可选地,用户可以将容具(例如,细胞储备1062a的小瓶或管)添加到在酵母细胞套件中包括的每个购买的盒。

[0284] 在一些实施例中,基于由自动化多模块细胞处理系统的处理系统(例如图13的处理系统1310)执行的脚本来执行工作流程1060。在第一示例中,可以经由被添加到第一盒的机器可读标记或标签来访问脚本。在一些实施例中,使用单独的脚本来执行每个处理阶段。例如,每个盒可以包括用于处理盒的内容物的脚本的指示或脚本本身。

[0285] 在一些实现中,第一阶段开始于将细胞储备1062引入到第一生长模块1002内用于接种、生长和监控(1018e)。在一个示例中,机器人操纵系统将细胞储备1062的小瓶添加到第一生长模块1002的旋转生长小瓶。在另一个示例中,机器人操纵系统从第一盒吸取细胞储备1062,并将细胞储备1062添加到旋转生长小瓶。此时细胞可能已经保持在4°C的温度处。在特定示例中,20ml的细胞储备可以在30°C的温度下在第一生长模块1002的旋转生长小瓶中生长到0.75的OD。添加到第一生长模块1002的细胞储备1012可以在生长模块1002中随着时间的过去被自动监控,直到经由自动监控检测到0.75OD为止。监控可以是周期性的或连续的。

[0286] 在一些实现中,可以使用诱导表达系统。因此,在生长到期望OD之后,诱导物被添加到第一生长模块1002用于诱导细胞。诱导物可以是小分子或与具有不同的糖(如半乳糖)的培养基交换的培养基。

[0287] 在一些实现中,细胞储备1062在生长和诱导之后被转移到第一过滤模块1004用于交换培养基(1064a)。在一个示例中,机器人操纵系统将细胞储备1062的小瓶从第一生长模块1002的旋转生长小瓶移动到第一过滤模块1004的小瓶保持器。在另一个示例中,机器人操纵系统从第一生长模块1002的旋转生长小瓶吸取细胞储备1062,并将它输送到第一过滤模块1004。例如,用于将细胞储备1062a转移到第一生长模块1002的一次性移液枪头可用于将细胞储备1062从第一生长模块1002转移到第一过滤模块1004。在一些实施例中,在将细胞储备1062从第一生长模块1002转移到第一过滤模块1004之前,将第一生长模块1002冷却到4°C,使得细胞储备1062类似地降低到该温度。在特定示例中,第一生长模块1002的温度可以在大约8分钟的一段时间内降低到大约4°C,并且生长模块1002可以将温度保持在4°C处大约15分钟以确保细胞储备1062的温度的降低。在培养基交换期间,在说明性示例中,可

以将0.4ml的1M山梨醇添加到细胞储备1062。

[0288] 在转移细胞储备1062之前,在一些实现中,使用洗涤溶液预洗涤第一过滤模块1004的过滤器。例如,洗涤溶液可以在洗涤盒(例如关于图1A描述的盒1006)中被供应。例如,第一过滤模块1004可以流体地连接到洗涤盒的洗涤溶液,如关于图7A所述的。

[0289] 例如,第一过滤模块1004可以是双过滤模块的一部分,例如关于图7B和7C描述的过滤模块750。在特定示例中,第一过滤模块1004可以在洗涤和洗脱过程期间保持在4°C处,同时在洗脱小瓶和第一过滤模块1004之间转移细胞材料。

[0290] 在培养基交换操作之后,在一些实现中,细胞储备1062被转移回到第一生长模块1002用于调节(1066a)。在一个示例中,机器人操纵系统将细胞储备1062的小瓶从第一过滤模块1004移动到第一生长模块1002。在另一个示例中,机器人操纵系统从第一过滤模块1004吸取细胞储备1062,并将它输送到第一生长模块1002的旋转生长小瓶。在调节期间,例如,5ml DTT/LIAC和80mM的山梨醇可以被添加到细胞储备1062。例如,机器人操纵系统可以单独地或同时将DTT/LIAC和山梨醇转移到第一生长模块1002。细胞储备1062可以例如通过第一生长模块1002的旋转生长小瓶的旋转来与DTT/LIAC和山梨醇混合。在调节期间,细胞储备1062可以保持在4°C的温度处。

[0291] 在一些实现中,在调节之后,细胞储备1062被转移到第一过滤模块1004用于洗涤和准备细胞(1068)。例如,在该步骤处可以使细胞成为电转感受态的。在一个示例中,机器人操纵系统将细胞储备1062的小瓶从第一生长模块1002的旋转生长小瓶移动到第一过滤模块1004的小瓶保持器。在另一个示例中,机器人操纵系统从第一生长模块1002的旋转生长小瓶吸取细胞储备1062,并将它输送到第一过滤模块1004。

[0292] 在转移细胞储备之前,在一些实现中,使用洗涤溶液预洗涤第一过滤模块1004的过滤器。例如,洗涤溶液可以在洗涤盒(例如关于图1A描述的盒1006)中被供应。例如,第一过滤模块1004可以流体地连接到洗涤盒的洗涤溶液,如关于图7A所述的。在其他实施例中,在步骤1064a处,与用于培养基交换的过滤器相同的过滤器用于成为电转感受态的。在一些实施例中,1M山梨醇用于使酵母细胞成为电转感受态的。

[0293] 在一些实现中,当在过滤模块1004处成为电转感受态的时,细胞储备1062被转移到转化模块1006(例如,流式电穿孔模块)用于转化。在一个示例中,机器人操纵系统将细胞储备1062的小瓶从第一过滤模块1004的小瓶保持器移动到流式电穿孔模块1006的储器。在另一个示例中,机器人操纵系统从过滤模块1004或临时储器吸取细胞储备1062,并将它输送到第一过滤模块1004。在特定示例中,来自第一过滤模块1004的400 μ l的所浓缩的细胞储备1062在转移到转化模块1006之前被转移到混合储器。例如,细胞储备1062可以被转移到在用于与核酸组分(主链和编辑寡核苷酸)混合的盒中的储器,然后混合和由机器人操纵系统使用移液枪枪头来转移。因为主链(载体)和编辑寡核苷酸在细胞(体内)中被组装,所以核酸组装模块不是用于酵母编辑的必要组分。在特定示例中,转化模块保持在4°C处。

[0294] 在一些实现中,待组装的核酸和细胞储备1062被添加到流式电穿孔模块1006并且细胞储备1062被转化(1026)。例如,机器人操纵系统可以例如使用移液枪枪头或通过转移小瓶或管来将细胞储备1062e和核酸组件的混合物从混合储器转移到流式电穿孔模块1006。在一些实施例中,内置的流式电穿孔模块(例如图5A的流式电穿孔模块500)用于转化细胞储备1062e。在其他实施例中,基于盒的电穿孔模块(例如图5B的流式电穿孔模块530)

用于转化细胞储备1062e。电穿孔模块1006例如可以保持在4°C的温度处。

[0295] 在一些实现中,所转化的细胞储备1062e被转移到第二生长模块1008用于恢复(1028a)。在特定示例中,20ml的所转化的细胞在第二生长模块1008中经历恢复过程。

[0296] 在一些实现中,将选择性培养基(例如营养缺陷型生长培养基或包含药物的培养基)转移到第二生长小瓶(未示出),且细胞在选择过程中被留下以培养另一段时间。在说明性示例中,可以将抗生素转移到第二生长小瓶,并且细胞可以在30°C的温度下培养额外的两个小时。

[0297] 在恢复之后,细胞可以对另一轮编辑或对在细胞库中的储存做准备。例如,细胞的一部分可以作为细胞库输出被转移到存储单元(1076a),而细胞的另一部分可以对第二轮编辑做准备(1078a)。细胞可以在例如4°C的温度下被储存。

[0298] 在一些实现中,对第二轮编辑做准备时,所转化的细胞被转移到第二过滤模块1010用于培养基交换(1078a)。在转移所转化的细胞储备1062a之前,在一些实现中,使用洗涤溶液预洗涤第二过滤模块1004的过滤器。例如,洗涤溶液可以在洗涤盒(例如关于图1A描述的盒1006)中被供应。第二过滤模块1010例如可以流体地连接到洗涤盒的洗涤溶液,如关于图7A所述的。

[0299] 例如,第二过滤模块1010可以是双过滤模块的一部分,例如关于图7B和7C描述的过滤模块750。在特定示例中,第二过滤模块1010可以在洗涤和洗脱过程期间保持在4°C处,同时在洗脱小瓶和第二过滤模块1010之间转移细胞材料。

[0300] 在一些实现中,在过滤过程期间,添加酶制剂以溶解细胞储备1062a的细胞壁。例如,可以添加酵母分解酶(例如Zylomase®)以溶解细胞壁。在特定示例中,酵母分解酶可以在30°C的温度下在细胞储备1026a中被培养5-60分钟之间。在特定示例中,该过滤过程的输出被沉积在小瓶或管中以等待进一步的处理。小瓶或管可以在存储单元中保持在4°C的温度处。

[0301] 第一处理阶段可能发生在一天期间。在工作流1060的这点处,在一些实现中,新材料被手动地添加到自动化多模块细胞处理仪器。例如,可以添加新的细胞储备1062b和新的试剂盒。此外,此时可以将新的洗涤盒、替换过滤器和/或替换移液枪枪头添加到自动化多模块细胞处理系统。此外,在一些实施例中,过滤器模块可以经历清洁过程和/或固体和液体废物单元可以被倒空用于对下一轮处理做准备。

[0302] 在一些实现中,第二轮编辑涉及与上面所述的第一处理阶段相同的模块1002、104、1006、1008和1010、相同的处理步骤1018、1064、1066、1026、1028和1076和/或1078以及相同的条件(例如,温度、时间范围等)。例如,第二寡核苷酸库1070b和第二sgRNA主链1072b可以用于与上面所述的几乎相同的方式编辑所转化的细胞的组合。尽管被示为两阶段过程,但在其他实施例中多达两次、三次、四次、六次、八次或更多次递归可以被进行以继续编辑细胞储备1062。

[0303] 示例I:全自动化单丛RGN定向编辑运行

[0304] 用本公开的自动化多模块仪器成功地执行使用MAD7核酸酶的单丛自动化基因组编辑。参见美国专利号9,982,279。

[0305] ampR质粒主链和lacZ_F172*编辑盒经由Gibson Assembly®被组装到在自动化仪器中包括的等温核酸组装模块中的“编辑载体”中。lacZ_F172在功能上敲除(knock out)

lacZ基因。“lacZ_F172*”指示编辑发生在lacZ氨基酸序列中的第172位残基处。在组装之后,产物在等温核酸组装模块中使用AMPure珠被脱盐,用80%乙醇被洗涤,并在缓冲液中被洗脱。组装的编辑载体和准备好重组工程的电转感受态大肠杆菌细胞转移到转化模块中用于电穿孔。转化模块包括ADP-EPC比色皿。参见例如美国专利号62/551069。细胞和核酸被组合并被允许混合1分钟,且电穿孔被执行30秒。对于钻孔脉冲的参数为:电压,2400V;长度,5ms;间隔,50ms;脉冲的数量,1;极性,+。对于传输脉冲的参数是:电压,150V;长度,50ms;间隔,50ms;脉冲的数量,20;极性,+/-。在电穿孔之后,细胞被转移至恢复模块(另一个生长模块),并被允许在包含氯霉素的SOC培养基中恢复。羧苄青霉素在1小时之后被添加到培养基,且细胞被允许恢复另外2小时。在恢复之后,细胞保持在4℃处,直到由用户回收为止。

[0306] 在自动化处理和恢复之后,细胞的等分部分被铺在被补充有乳糖(作为糖基质)、氯霉素和羧苄青霉素的MacConkey琼脂基础上,并生长直到菌落出现为止。白色菌落代表在功能上被编辑的细胞,紫色菌落代表未编辑的细胞。所有液体转移由自动化多模块细胞处理仪器的自动化液体处理设备执行。

[0307] 自动化处理的结果是大约 $1.0E^{-03}$ 个总细胞(与常规台式(benchttop)结果相当)被转化,且编辑效率为83.5%。通过细胞的基因组的编辑区域的测序来确认在白色菌落中的lacZ_172编辑。此外,自动化细胞处理的步骤由网络摄像机远程地观察,且文本消息被发送以更新自动化处理过程的状态。

[0308] 示例II:全自动化递归编辑运行

[0309] 使用自动化多模块细胞处理系统成功实现了递归编辑。ampR质粒主链和lacZ_V10*编辑盒经由Gibson Assembly®被组装到在自动化系统中包括的等温核酸组装模块中的“编辑载体”中。类似于lacZ_F172编辑,lacZ_V10编辑在功能上敲除lacZ基因。“lacZ_V10”指示编辑发生在lacZ氨基酸序列中的氨基酸位置10处。在组装之后,产物在等温核酸组装模块中使用AMPure珠被脱盐,用80%乙醇被洗涤,并在缓冲液中被洗脱。第一组装的编辑载体和准备好重组工程的电转感受态大肠杆菌细胞转移到转化模块中用于电穿孔。转化模块包括ADP-EPC比色皿。细胞和核酸被组合并被允许混合1分钟,且电穿孔被执行30秒。对于钻孔脉冲的参数为:电压,2400V;长度,5ms;间隔,50ms;脉冲的数量,1;极性,+。对于传输脉冲的参数是:电压,150V;长度,50ms;间隔,50ms;脉冲的数量,20;极性,+/-。在电穿孔之后,细胞被转移至恢复模块(另一个生长模块),并被允许在包含氯霉素的SOC培养基中恢复。羧苄青霉素在1小时之后被添加到培养基,且细胞被生长另外2小时。然后将细胞转移至离心机模块,并执行培养基交换。将细胞重新悬浮在包含氯霉素和羧苄青霉素的TB中,其中细胞被生长到2.7的OD600,然后被浓缩并成为电转感受态的。

[0310] 在细胞生长期间,在等温核酸组装模块中准备第二编辑载体。第二编辑载体包括卡那霉素抗性基因,且编辑盒包括galK_Y145*编辑。如果成功,galK_Y145*编辑赋予细胞摄取半乳糖和使半乳糖代谢的能力。由galK_Y154*盒生成的编辑在第154位氨基酸残基处引入终止密码子,将酪氨酸氨基酸变为终止密码子。这个编辑使galK基因产物变得不起作用,并抑制细胞能够使半乳糖代谢。在组装之后,第二编辑载体产物在等温核酸组装模块中使用AMPure珠被脱盐,用80%乙醇被洗涤,并在缓冲液中被洗脱。组装的第二编辑载体和电转感受态大肠杆菌细胞(其用第一编辑载体被转化并被选择用于第一编辑载体)使用与上面所详述的相同的参数被转移到转化模块中用于电穿孔。在电穿孔之后,细胞被转移到恢复

模块(另一个生长模块),被允许在包含羧苄青霉素的SOC培养基中恢复。在恢复之后,细胞保持在4°C处直到被取回为止,其后,细胞的等分部分被铺在被补充有氯霉素和卡那霉素的LB琼脂上。为了量化lacZ和galK编辑,在两种培养基类型上生成复制修补板:1)被补充有乳糖(作为糖基质)、氯霉素和卡那霉素的MacConkey琼脂基础,和2)被补充有半乳糖(作为糖基质)、氯霉素和卡那霉素的MacConkey琼脂基础。所有液体转移由自动化多模块细胞处理系统的自动化液体处理设备执行。

[0311] 在这个递归编辑实验中,所筛选的菌落的41%有lacZ和galK编辑,其结果与使用“台式”或手动方法获得的双重编辑效率相当。

[0312] 仪器架构的替代实施例

[0313] 图12A和12B示出了用于执行自动化细胞处理(例如在单个周期中在多个细胞中编辑)的自动化多模块细胞编辑仪器的示例替代实施例。例如,自动化多模块细胞编辑仪器可以是设计成用于在实验室环境内使用的台式仪器。自动化多模块细胞编辑仪器可以合并用于在细胞中进行自动化基因组裂解和/或编辑时执行各种分阶段操作的可重复使用的和一次性的元件的混合物。

[0314] 图12A是根据本公开的一个实施例的用于执行自动化细胞处理(例如,在单个周期中在细胞单元中编辑)的第一示例仪器1200的框图。在一些实现中,仪器1200包括底板1202、用于将DNA样品组分引入到仪器1200的试剂供应容器1204、用于将细胞引入到仪器1200的细胞供应容器1206、以及用于在仪器1200的模块(例如,模块1210a、1210b、1210c、1210d)、容器(例如,容器1204、1206、1212、1222、1224和1226)和存储单元(例如,单元1216、1218、1228和1214)之间移动材料以执行自动化细胞处理的机器人操纵系统1208。在完成细胞供应品1206的处理时,在一些实施例中,细胞输出1212可以由机器人操纵系统1208转移到存储单元1214用于临时存储和稍后取回。

[0315] 机器人操纵系统1208例如可以包括空气排代泵以将液体从各种材料源转移到各种模块1210和存储单元1214。在其他实施例中,机器人操纵系统1208可以包括拾取和放置头以将源材料的容具(例如,管)从供应盒(未示出,关于图1A被讨论)转移到各种模块1210。在一些实施例中,一个或多个摄像机或其他光学传感器(未示出)确认适当的台架运动和定位。

[0316] 在一些实施例中,机器人操纵系统1208使用设置在转移枪头供应品1216中的一次性转移枪头来转移在仪器1200内的源材料、试剂1204(例如核酸组件)和细胞1206。例如,所使用的转移枪头1216可以被丢弃在固体废物单元1218中。在一些实现中,固体废物单元1218包含用于从机器人操纵系统1208的拾取和放置头移除管的弹射器。

[0317] 在一些实施例中,仪器1200包括具有连接到空气排代泵的吸管的电穿孔比色皿。在一些实现中,细胞1206和试剂1204通过吸管被抽吸到电穿孔比色皿中,并且比色皿被移动到仪器1200的一个或多个模块1210。

[0318] 在一些实现中,仪器1200由处理系统1220(例如图13的处理系统1310)控制。处理系统1220可以被配置成基于用户输入来操作仪器100。处理系统1220可以控制仪器1200的各种模块1210的定时、持续时间、温度和其他操作。处理系统1220可以连接到电源(未示出)以用于仪器1200的操作。

[0319] 在一些实施例中,仪器1200包括转化模块1210c用于例如在编辑的背景中将核酸

引入到细胞1206内。例如,机器人操纵系统1208可以将试剂1204和细胞1206转移到转化模块1210c。转化模块1210可以进行由在转染、转化和微流体的领域中的技术人员例行地使用的任何细胞转化或转染技术。转化意欲包括用于将外源核酸序列(例如,DNA)引入到靶细胞的各种本领域公认的技术,包括那些转化和转染技术。这样的方法包括但不限于电穿孔、脂转染、光穿孔、注射、微量沉淀、微量注射、脂质体、粒子轰击、声穿孔、激光诱导穿孔、珠转染、磷酸钙或氯化钙共同沉淀或DEAE葡聚糖介导的转染。转化可以发生在微量离心管、测试管、比色皿、多孔板、微纤维或流动仪器中。处理系统1220可以控制转化模块1210c的温度和操作。在一些实现中,处理系统1270根据由用户设置的一个或多个变量控制来实现转化模块1210c的操作。

[0320] 在一些实现中,转化模块1210c被配置为通过用预处理溶液1222(例如蔗糖或甘油洗液)增加细胞能力来使细胞为载体摄取做准备。此外,可以使用利用机械和化学转染方法的能力的混合技术,例如磁转染,一种将化学转染与机械方法组合的转染方法。在另一个示例中,阳离子脂质可以与基因枪或电穿孔仪组合配置。用于转化或转染靶细胞的合适材料和方法可以在例如下列文献中找到:Green和Sambrook的Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,纽约,2014年)以及其他实验室手册。

[0321] 在转化之后,在一些实现中,细胞可以被转移到恢复模块1210d。在一些实施例中,恢复模块1210d是编辑模块的组合恢复和诱导。在恢复模块1210d中,细胞可以被允许恢复、表达核酸,并且在诱导型核酸酶系统中例如借助于时间控制的诱导(例如,在一些示例中的化学、光、病毒或温度诱导)或用于核酸酶的表达的诱导物分子1224的引入,核酸酶被引入到细胞。

[0322] 在编辑之后,在一些实现中,细胞被转移到存储单元1214,其中细胞可以被存储为细胞输出1212,直到细胞被移除用于所编辑的细胞群体(例如所编辑的细胞库)的进一步研究或取回为止。

[0323] 在一些实现中,仪器1200被设计用于递归基因组编辑,其中多个编辑被顺序地引入到在细胞群体的细胞内部的基因组中。在一些实现中,试剂供应品1204在从存储单元接近细胞输出1212用于递归处理之前被补充。在其他实现中,可以将多个试剂供应品1204和/或大量试剂供应品1204引入到仪器1200中,使得用户交互作用在随后的处理周期之前不一定是需要的。

[0324] 在一些实施例中,细胞输出1212a的一部分被转移到自动化细胞生长模块1210a。例如,可以转移所有细胞输出1212a,或者只转移等分部分,使得仪器保留递增地修饰的样品。在一些实现中,细胞生长模块1210a在生长期间测量细胞的OD以确保它们在编辑的诱导之前在期望浓度处。可以被使用的细胞密度和生理状态的其他测量包括但不限于pH、溶解氧、所释放的酶、声学特性和电学特性。

[0325] 为了减少没有接受基因组编辑的细胞的背景,在一些实施例中,生长模块1210a执行选择过程以使用选择性生长培养基1226对所编辑的细胞富集化。例如,所引入的核酸可以包括赋予抗生素抗性的基因或另一可选择标记。在一些实现中,在递归编辑期间,可以将多个可选择基因或标记1226引入到细胞内。例如,对于连续轮的编辑使可选择标记的引入交替也可以消除未编辑细胞的背景,并允许仪器1200的多个周期选择具有连续基因组编辑

的细胞。合适的抗生素抗性基因包括但不限于如下的基因：例如氨苄青霉素抗性基因、四环素抗性基因、卡那霉素抗性基因、新霉素抗性基因、刀豆氨酸抗性基因、杀稻瘟菌素抗性基因、潮霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因和氯霉素抗性基因。

[0326] 细胞可以从生长模块1210a转移到过滤模块110b。过滤模块1210b或者可选地细胞洗涤和浓缩模块可以实现培养基交换。在一些实施例中，使用溶解增强剂（例如清洁剂）、渗透压力、温度、酶、蛋白酶、噬菌体、还原剂或离液剂来帮助去除死细胞背景。在其他实施例中，细胞去除和/或培养基交换用于减少死细胞背景。在一些实施例中，来自过滤模块1210b的废物产物被收集在液体废物单元1228中。

[0327] 在过滤之后，细胞可被呈递给转化模块1210c，且然后呈递给恢复模块1210d，以及最后呈递给存储单元1214，如上面所详述的。

[0328] 转到图12B，类似于图12A，用于在单个周期中在多个细胞中执行自动化基因组裂解和/或编辑的第二示例仪器1240包括底板1202、用于将一种或更多种核酸组分引入到仪器1240的试剂供应品容器1204、用于将细胞引入到仪器1240的细胞供应品容器1206以及用于在仪器1240的模块（例如，模块1210a、1210b、1210c、1210f、1210g、1210m和1210h）、容器（例如，容器1204、1206、1212、1214、1224、1242、1244和1246）和存储单元（例如，单元1214、1216、1218和1228）之间移动材料以执行自动化细胞处理的机器人操纵系统1208。在完成细胞供应品1206的处理时，在一些实施例中，细胞输出1212可以由机器人操纵系统1208转移到存储单元1214用于临时存储和稍后取回。

[0329] 在一些实施例中，机器人操纵系统1208使用设置在转移枪头供应品1216中的一次性转移枪头来转移源材料、载体主链1242、编辑寡核苷酸1244、试剂1204（例如，用于核酸组装、核酸提纯，以使细胞成为电转感受态的等）以及在仪器1240内的单元1206，如关于图12A所述的。

[0330] 在其他实施例中，仪器1240包括具有连接到空气排代泵的吸管的电穿孔比色皿。在一些实现中，细胞1206和试剂1204通过吸管被抽吸到电穿孔比色皿中，并且比色皿被移动到仪器1240的一个或更多模块1210。

[0331] 如关于图12A所述的，在一些实现中，仪器1240由处理系统1220（例如图13的处理系统1310）控制。

[0332] 在一些实施例中，仪器1240包括核酸组装模块1210g，并且在某些示例自动化多模块细胞处理仪器中，核酸组装模块1210g可以在一些实施例中包括等温核酸组件。如上所述，等温核酸组装模块被配置为执行Gibson **Assembly**[®]分子克隆方法。

[0333] 在一些实施例中，在核酸的组装之后，核酸（例如，在等温核酸组件的示例中，等温核酸组装混合物（核酸+等温核酸组装试剂）被转移到提纯模块1210h。在这里，核酸组装混合物的不需要的组分（例如，盐、矿物质）被去除，并且在某些实施例中所组装的核酸被浓缩。例如，在说明性实施例中，在提纯模块1210h中，等温核酸组装混合物可以与无盐缓冲液和磁珠（例如固相可逆固定化（SPRI）磁珠或AMPure珠）组合。等温核酸组装混合物可以被培养足够长的时间（例如30秒至10分钟）用于使组装的核酸结合到磁珠。在一些实施例中，提纯模块包括被配置成接合磁珠的磁体。磁体可以被接合，使得上清液可以从所结合的组装的核酸被去除，并且使得所结合的组装的核酸可以用例如80%乙醇被洗涤。再次，磁体可以被接合，并且80%乙醇洗涤溶液被移除。磁珠/组装的核酸可被允许干燥，然后组装的核酸

可以被洗脱,并且磁体可以再次被接合,这次为了隔离磁珠并去除包含洗脱的组装的核酸的上清液。然后,组装的核酸可以转移到转化模块(例如,在优选实施例中的电穿孔仪)。转化模块在转移时可能已经包含电转感受态细胞。

[0334] 在一些实施例中,仪器1240包括转化模块1210c用于将核酸引入到细胞1206内,如关于图12A所述的。然而,在这种情况下,从提纯模块1210h输出的组装的核酸1204被转移到转化模块1210c用于与细胞1206组合。

[0335] 在转化模块1210c中转化之后,在一些实现中,细胞可以被转移到恢复模块1210m。在恢复模块1210e中,细胞可以被允许恢复、表达核酸,并且在诱导型核酸酶系统中例如借助于时间控制的诱导(例如在一些示例中的化学、光、病毒或温度诱导)或用于核酸酶的表达的诱导物分子的引入,核酸酶被诱导。

[0336] 在恢复之后,在一些实现中,细胞被转移到编辑模块1210f。编辑模块1210f供应适当的条件以例如通过所引入的核酸的表达和诱导型核酸酶的诱导来诱导细胞基因组的编辑。细胞可以包括诱导型核酸酶。在一些示例中,核酸酶可以在编辑模块1210f内被化学地诱导、生物地诱导(例如,通过诱导型启动子)、病毒地诱导、光诱导、温度诱导和/或热诱导。

[0337] 在编辑之后,在一些实现中,如关于图12A所述的,细胞被转移到存储单元1214。

[0338] 在一些实现中,仪器1240被设计为用于递归基因组编辑,其中多个编辑被顺序地引入到在细胞群体的细胞内部的基因组中。在一些实现中,试剂供应品1204在从存储单元接近细胞输出1212用于递归处理之前被补充。例如,可以将额外的载体主链1242和/或编辑寡核苷酸1244引入到仪器1240中,用于通过核酸组装模块1210g和提纯模块1210h进行组装和准备。在其他实现中,可以将多个载体主链1242和/或编辑寡核苷酸1244引入到仪器140内,使得用户交互作用在随后的处理周期之前不一定是需要的。对于每个后续周期,载体主链1242和/或编辑寡核苷酸1244可以改变。在准备核酸组件时,可以在试剂供应品1204或另一个储存区域中提供核酸组件。

[0339] 在一些实施例中,细胞输出1212a的一部分被转移到自动化细胞生长模块1210a,如关于图12A所讨论的。

[0340] 为了减少没有接受基因组编辑的细胞的背景,在一些实施例中,生长模块1210a执行选择过程以使用选择性生长培养基1226使所编辑的细胞富集化,如关于图12A所讨论的。

[0341] 如关于图12A所讨论的,细胞可以从生长模块1210a转移到过滤模块1210b。如所示,来自洗脱供应品1246(例如缓冲液、甘油)的洗脱液可以转移到过滤模块1210b中用于培养基交换。

[0342] 在过滤之后,细胞可被呈递给转化模块1210c用于转化,且然后呈递给恢复模块110m和编辑模块1210f,以及最后呈递给存储单元1214,如上面所详述的。

[0343] 在一些实施例中,图12A和/或12B的自动化多模块细胞处理仪器包含一个或更多个可替换的供应盒和机器人操纵系统,如关于图1A和1B所讨论的。每个盒可以包含一种或更多种核酸组装混合物、寡核苷酸、载体、生长培养基、选择剂(例如抗生素)、诱导剂、核酸提纯试剂(例如固相可逆固定化(SPRI)珠)、乙醇和10%甘油。

[0344] 尽管示例仪器1200、1240被示为包括模块1210的特定布置,但这些布置仅用于说明目的。例如,在其他实施例中,更多或更少的模块1210可以被包括在仪器1200、1240的每个内。此外,在仪器中可以包括不同的模块,例如便于细胞融合用于提供例如杂交瘤的模

块、在组装之前使核酸扩增的模块和/或便于蛋白表达和/或分泌的模块。此外,可以在某些实施例中复制某些模块1210,例如图1A的复制细胞生长模块110a、110b。在另一个示例中,仪器1200和1240中的每一个可以被设计成接纳培养基盒,例如图1A的盒104和106。另外的修改是可能的。

[0345] 用于自动化多模块细胞处理仪器的控制系统

[0346] 转到图11,屏幕截图示出了用于与自动化多模块细胞处理仪器通过接口连接的示例图形用户界面(GUI) 1100。该界面例如可以呈现在图1C和图2D的显示器236上。在一个示例中,GUI 1100可以由图13的处理系统1310呈现在触摸屏1316上。

[0347] 在一些实现中,GUI 1100被分成多个信息和数据输入窗格,例如协议窗格1102、温度窗格1106、电穿孔窗格1108和细胞生长窗格1110。另外的窗格是可能的。例如,在一些实施例中,GUI 1100包括对于每个模块的窗格,例如在一些示例中的核酸组装模块、提纯模块、细胞生长模块、过滤模块、转化模块、编辑模块和恢复模块中的每一个的一个或多个。在一些实施例中,GUI 1100的下部窗格表示可应用于当前工作流程的模块(例如,如在协议窗格1102中选择的或者在通过脚本接口(未示出)加载的脚本中指定的)。在一些实施例中,滚动或分页功能可以允许用户访问在图11的屏幕截图中未示出的附加窗格。

[0348] 在一些实施例中,GUI 1100包括用于访问各种屏幕(例如所示的屏幕截图)(例如,通过使用家庭控件1120a)的一系列控件1120。例如,通过选择编辑控件1120b,可以向用户提供选项以提供一个、两个或一系列细胞处理步骤。通过选择脚本控件1120c,可以向用户提供添加新的处理脚本或改变现有处理脚本的机会。在一些实施例中,用户可以选择帮助控件1120d以获得关于GUI 1100和自动化多模块细胞处理仪器的功能的另外的信息。在一些实现中,用户选择设置控件1120e以访问对于期望过程和/或GUI 1100的设置选项,例如在一些示例中的时区、语言、单位、网络访问选项。电源控件1120f在被选择时允许用户使自动化多模块细胞处理仪器断电。

[0349] 转到协议窗格1102,在一些实现中,用户通过在协议输入字段1112(或可选地,下拉菜单)中输入协议来选择由自动化多模块细胞处理仪器执行的协议(例如,脚本或工作流程)。在其他实施例中,协议可以通过单独的用户界面屏幕来被选择,例如通过选择脚本控件1120b来被访问。在另一个示例中,自动化多模块细胞处理仪器可以选择协议并将它呈现在协议输入字段1112中。例如,自动化多模块细胞处理仪器的处理系统可以扫描位于装载到自动化多模块细胞处理仪器中的一个或多个盒上的机器可读标记以确定合适的协议。如所示,选择“Microbe_Kit1 (1.0.2)”协议,其可能对应于针对与自动化多模块细胞处理仪器一起使用而购买的试剂盒和其他一次性供应品的套件。

[0350] 在一些实现中,协议窗格1102还包括开始控件1114a和停止控件1114b以控制在协议条目字段1112中呈现的协议的执行。可以在触摸屏界面上提供GUI 1100,例如,其中开始控件1114a的触摸选择开始细胞处理,以及停止控件1114b的选择停止细胞处理。

[0351] 转到运行状态窗格1104,在一些实现中,图表1116示出了在协议窗格1102中识别的协议的处理的阶段。例如,用蓝色示出运行完成1118a的一部分,而用绿色示出当前阶段1118b的一部分,并且用从时间点沿着运行完成1118a的该一部分的进程(其中错误出现)延伸的标记来标注任何错误1118c。消息区域1118d呈现所完成的运行的百分比、所完成的阶段的百分比以及错误的总数。在一些实施例中,在选择图表1116时,可以向用户呈现关于运

行状态的更多细节,例如在一些示例中,错误的类型的识别、当前处理阶段的名称(例如,核酸组装、提纯、细胞生长、过滤、转化、恢复、编辑等)以及在运行中的处理阶段的列表。此外在一些实施例中,运行完成时间消息指示运行被估计完成的日期和时间。在一些示例中,该运行可以指示被安排用于在没有用户干预的情况下执行的单个细胞编辑过程或一系列递归细胞编辑过程。在一些实施例(未示出)中,运行状态窗格1104另外示出用户干预(例如,盒更换、固体废物处理、液体废物处理等)被需要时的所估计的时间。

[0352] 在一些实现中,运行状态窗格1104包括用于暂停细胞处理的暂停控件1124。用户可以选择暂停当前运行,例如,纠正识别出的错误或进行手动干预,例如废物去除。

[0353] 在一些实施例中,温度窗格1106示出了一系列图标1126,对应的消息1128指示对于自动化多模块细胞处理仪器的各种装置的温度设置。图标从左到右可以表示转化模块1126a(例如,与图1A的试剂盒110c相关联的流式电穿孔试剂盒或图5B的流式电穿孔设备534)、提纯模块1126b、第一生长模块1126c、第二生长模块1126d和过滤模块1126e。相应的消息1128a-e识别相应模块的当前温度、低温和高温(例如,对于该阶段或该运行)。在选择图标1126之一时,在一些实施例中,可以复查时间的温度的图形显示。

[0354] 在一些实现中,在温度窗格下方,一系列窗格识别多个模块的当前状态。例如,电穿孔窗格1108代表转化模块的状态,而细胞生长窗格1110代表生长模块的状态。在一些实施例中,这里呈现的窗格识别当前操作模块(例如,在当前阶段中涉及细胞处理的模块)的状态以及在当前运行期间已经被利用的任何模块的状态(如例如在运行状态窗格1104中所示的)。例如,过去的状态信息可以向用户呈现关于在细胞处理的前面阶段中使用的参数的信息。

[0355] 转到电穿孔板1108,在一些实现中,伏特、毫安和焦耳的操作参数1130a被呈现。另外,状态消息1132a可以识别关于转化模块的运作的附加信息,例如在一些示例中的错误状态、对处理剩余的时间或模块的内容物(例如,添加到模块中的材料)。在一些实现中,当相应的模块正在积极处理时,在状态消息1132a上方的图标1134a将在活动模式(例如,彩色的、“点亮的”、以粗体等)中被呈现。在一些实施例中,图标1134a的选择引起关于操作参数1130a的详细信息的图形显示的呈现。

[0356] 转到细胞生长窗格1110,在一些实现中,OD和生长小时的操作参数1130b被呈现。另外,状态消息1132b可以识别关于生长模块的运作的附加信息,例如在一些示例中的错误状态、对处理剩余的时间或模块的内容物(例如,添加到模块中的材料)。在一些实现中,当相应的模块正在积极处理时,在状态消息1132b上方的图标1134b将在活动模式(例如,彩色的、“点亮”、以粗体等)中呈现。在一些实施例中,图标1134b的选择导致关于操作参数1130b的详细信息的图形显示的呈现。

[0357] 接下来,参考图13描述根据示例性实施例的示例处理系统和处理环境的硬件描述。在图13中,处理系统1310包括执行上述过程的一部分的CPU 1308。例如,CPU 1308可以管理图9的方法900的处理阶段和/或图10A-C的工作流程。过程数据和脚本、指令和/或用户设置可以存储在存储器1302中。这些过程数据和脚本、指令和/或用户设置也可以存储在存储介质盘1304(例如便携式存储介质(例如,USB驱动器、光盘驱动器等))上或者可以远程地被存储。例如,过程数据和脚本、指令和/或用户设置可以存储在处理系统1310经由网络1328可访问的位置上。此外,所主张的进步不被创造性过程的指令被存储于其上的计算机

可读介质的形式限制。例如,指令可以存储在闪存、RAM、ROM或与处理系统1310通信的任何其他信息处理设备中,例如服务器、计算机、智能电话或其他手持计算设备。

[0358] 此外,所主张的进步的部件可以被提供为与CPU 1308和操作系统(例如,本领域中的技术人员已知的其他计算系统)结合执行的实用应用、后台守护进程或操作系统的部件或其组合。

[0359] CPU 1308可以是ARM处理器、片上系统(SOC)、微处理器、微控制器、数字信号处理器(DSP),或者可以是由本领域中的普通技术人员将识别的其他处理器类型。此外,CPU 1308可以被实现为并行地配合地工作以执行上述创造性过程的指令的多个处理器。

[0360] 处理系统1310是处理环境1300的一部分。图13中的处理系统1310还包括用于与网络1328通过接口连接以访问在处理环境1300中的附加元件的网络控制器1306。如可以认识到的,网络1328可以是公共网络(例如,互联网)或者专用网络(例如LAN或WAN网络)或者其任何组合,并且还可以包括PSTN或ISDN子网络。网络1328可以是无线的,例如包括EDGE、3G和4G无线蜂窝系统的蜂窝网络。无线网络也可以是Wi-Fi、蓝牙或任何其他已知的无线通信形式。

[0361] 处理系统1310还包括与用户界面(例如触摸屏)1316、一个或更多个传感器1314以及一个或更多个外围设备1318通过接口连接的通用I/O接口1312。在一些示例中,外围I/O设备1318可以包括视频记录系统、音频记录系统、麦克风、外部存储设备和/或外部扬声器系统。一个或更多个传感器1314可以包括陀螺仪、加速度计、重力传感器、线性加速度计、全球定位系统、条形码扫描器、QR码扫描器、RFID扫描器、温度监测器和照明系统或照明元件中的一个或更多个。

[0362] 通用存储控制器1324将存储介质盘1304与通信总线1340(例如并行总线或串行总线,例如通用串行总线(USB)或类似总线)连接,用于将处理系统的所有部件互连。存储控制器1324、网络控制器1306和通用I/O接口1312的一般特征和功能的描述在本文为了简洁起见被省略,因为这些特征是已知的。

[0363] 在一些实施例中,处理系统1310包括一个或更多个机载和/或外围传感器1314。例如,传感器1314可以直接合并到自动化多模块处理仪器的内部电子设备和/或壳体中。传感器1314的一部分可以例如通过电线与I/O接口1312直接物理联络;或者例如通过蓝牙、Wi-Fi或NFC连接处于无线联络中。例如,无线通信控制器1326可以实现在一个或更多个无线传感器1314和I/O接口1312之间的通信。此外,一个或更多个传感器1314可以例如经由在网络1328中被作为基础的中间服务器或存储设备处于间接联络;或者与在自动化多模块细胞处理仪器内某处的信号累加器(有线、无线或间接)联络,信号累加器又与I/O接口1312(有线或无线或间接)联络。

[0364] 与I/O接口1312通信的一组传感器1314可以组合地使用以从多个地方收集给定信号类型,以便生成更完整的信号图。与I/O接口1312通信的一个或更多个传感器1314可以用作比较器或验证元件,例如以过滤、取消或拒绝其他信号。

[0365] 在一些实施例中,处理环境1300包括通过无线通信控制器1326与处理系统1310通信的计算设备1338。例如,无线通信控制器1326可以使电子邮件消息、文本消息和/或被指定到用户的智能电话或其他个人计算设备的软件应用警报的交换成为可能。

[0366] 在一些实现中,处理环境1300包括机器人材料处理系统1322。处理系统1310可以

包括机器人控制器1320,用于发出控制信号以启动机器人材料处理系统的元件,例如操纵台架的定位、降低或升高吸管或移液管元件、和/或启动泵和阀以产生在吸管/移液枪和在自动化多模块细胞处理仪器中的各种器皿(例如,室、小瓶等)之间的液体转移。在一些示例中,机器人控制器1320可以包括硬件驱动器、固件元件和/或用于将处理系统1310与机器人材料处理系统1322通过接口连接的一个或更多个算法或软件包。

[0367] 在一些实现中,处理环境1310包括一个或更多个模块接口1332,例如在一些示例中的用于激活和控制自动化多模块处理系统的每个模块的处理的一个或更多个传感器接口、功率控制接口、阀和泵接口和/或致动器接口。例如,模块接口1332可以包括用于旋转细胞生长设备850(图8D)的驱动电机864的致动器接口和用于感测在旋转生长小瓶800内的细胞生长的光密度的检测器板872的传感器接口。在一些实施例中,模块控制器1330被配置成与模块接口1332通过接口连接。模块控制器1330可以包括一个或更多个控制器(例如,可能每模块一个控制器,尽管一些模块可以共享单个控制器)。在一些示例中,模块控制器1330可以包括硬件驱动器、固件元件和/或用于将处理系统1310与模块接口1332通过接口连接的一个或更多个算法或软件包。

[0368] 在一些实现中,处理环境1310包括用于控制在自动化多模块处理系统的壳体内部的气候条件的热管理系统1336。热管理系统1336可以另外控制在自动化多模块细胞处理仪器的一个或更多个模块内部的气候条件。在一些实施例中,处理系统1310包括用于与热管理系统1336通过接口连接的温度控制器1334。在一些示例中,温度控制器1334可以包括硬件驱动器、固件元件和/或用于将处理系统1310与热管理系统1336通过接口连接的一个或更多个算法或软件包。

[0369] 使用自动化编辑方法、模块、仪器和系统来产生细胞库

[0370] 在一个方面中,本公开提供了用于使用各种编辑策略来创建细胞库的自动化编辑方法、模块、仪器和自动化多模块细胞编辑仪器,其改变在各种细胞类型中的感兴趣的RNA和/或蛋白的表达、水平和/或活性,如在本文更详细描述。因此,本公开意欲涵盖由本公开的自动化编辑方法、自动化多模块细胞编辑仪器创建的所编辑的细胞库。这些细胞库可以具有不同的目标编辑,包括但不限于在各种生物体的细胞中的基因敲除、基因敲入、插入、删除、单核苷酸编辑、短串联重复编辑、移码、三联体密码子扩展等。这些编辑可以指向基因组的编码或非编码区,并且优选地被合理地设计。

[0371] 在其他方面中,本公开提供了自动化编辑方法、用于创建改变DNA链接过程的细胞的库的自动化多模块细胞编辑仪器。例如,细胞库可以包括具有在DNA结合位点上的编辑的单独细胞以干扰调节选定基因的表达的调控元件的DNA结合。此外,细胞库可能包括在基因组DNA中的编辑,其影响细胞过程,例如异染色质形成、转换类重组和VDJ重组。

[0372] 在特定方面中,使用在细胞群体内的单独细胞的多重编辑来创建细胞库,在细胞群体内的多个细胞在单轮编辑中被编辑,即,在细胞库的细胞内的多个变化在单个自动化操作中。可以在单个多重自动化操作中创建的库可以包括多达500个所编辑的细胞、1000个所编辑的细胞、2000个所编辑的细胞、5000个所编辑的细胞、10,000个所编辑的细胞、50,000个所编辑的细胞、100,000个所编辑的细胞、200,000个所编辑的细胞、300,000个所编辑的细胞、400,000个所编辑的细胞、500,000个所编辑的细胞、600,000个所编辑的细胞、700,000个所编辑的细胞、800,000个所编辑的细胞、900,000个所编辑的细胞、1,000,000个所编

辑的细胞、2,000,000个所编辑的细胞、3,000,000个所编辑的细胞、4,000,000个所编辑的细胞、5,000,000个所编辑的细胞、6,000,000个所编辑的细胞、7,000,000个所编辑的细胞、8,000,000个所编辑的细胞、9,000,000个所编辑的细胞、10,000,000个所编辑的细胞或更多。

[0373] 在其他特定方面中,使用在细胞群体中的单独细胞的递归编辑来创建细胞库,编辑在两轮或更多轮编辑中添加到单独细胞。递归编辑的使用导致两个或更多个编辑的合并,这两个或更多个编辑以在库的单独细胞中的基因组中的两个或更多个位点为目标。可以在自动化递归操作中创建的库可以包括多达500个所编辑的细胞、1000个所编辑的细胞、2000个所编辑的细胞、5000个所编辑的细胞、10,000个所编辑的细胞、50,000个所编辑的细胞、100,000个所编辑的细胞、200,000个所编辑的细胞、300,000个所编辑的细胞、400,000个所编辑的细胞、500,000个所编辑的细胞、600,000个所编辑的细胞、700,000个所编辑的细胞、800,000个所编辑的细胞、900,000个所编辑的细胞、1,000,000个所编辑的细胞、2,000,000个所编辑的细胞、3,000,000个所编辑的细胞、4,000,000个所编辑的细胞、5,000,000个所编辑的细胞、6,000,000个所编辑的细胞、7,000,000个所编辑的细胞、8,000,000个所编辑的细胞、9,000,000个所编辑的细胞、10,000,000个所编辑的细胞或更多。

[0374] 可以找到可基于本说明书而修改以利用自动化系统的非自动化编辑策略的示例,例如美国专利号8,110,360、8,332,160、9,988,624、20170316353和20120277120。

[0375] 在特定方面中,递归编辑可用于首先创建细胞表型和然后用于反转表型和/或加速其他细胞属性的后续轮的编辑。

[0376] 在一些方面中,细胞库包括用于在细胞中的非天然氨基酸的创建的编辑。

[0377] 在特定方面中,本公开提供了所编辑的细胞库,其具有在使用本公开的自动化编辑方法、自动化多模块细胞编辑仪器创建的一个或更多个调控元件中的编辑。术语“调控元件”指在特定环境和/或背景中可影响可操作地链接的编码序列的转录和/或转换的核酸分子。该术语意欲包括促进或调节转录和RNA稳定性的所有元件,包括启动子、对于RNA聚合酶和转录因子的基本相互作用所需的核心元件、上游元件、增强子和响应元件(参见,例如Lewin的“Genes V”(Oxford University Press,牛津)847-873页)。在原核生物中的示例性调控元件包括但不限于启动子、算子序列(operator sequences)和核糖体结合位点。在真核细胞中使用的调控元件可以包括但不限于启动子、增强子、绝缘体、剪接信号和聚腺苷酸化信号。

[0378] 优选地,所编辑的细胞库包括基于在特定细胞类型中的蛋白结构、表达和/或活性的预测而设计的合理地设计的编辑。例如,合理设计可以基于具有特定核酸酶和基因调控的基因组编辑的全系统生物物理模型以预测包括核酸酶表达和/或结合、生长条件和其他实验条件的不同编辑参数如何共同控制核酸酶编辑的动力学。参见例如Farasat和Salis的*PLoS Comput Biol.*,29:12(1):e1004724(2016)。

[0379] 在一个方面中,本公开提供了具有使用本发明的自动化编辑仪器、系统和方法创建的各种合理地设计的调控序列的所编辑的细胞的库的创建。例如,所编辑的细胞库可以包括使用一组组成型和/或诱导型启动子、增强子序列、算子序列和/或核糖体结合位点创建的原核细胞群体。在另一个示例中,所编辑的细胞库可以包括使用一组组成型和/或诱导型启动子、增强子序列、算子序列和/或不同的Kozak序列创建的真核序列,用于感兴趣蛋白

的表达。

[0380] 在一些方面中,本公开提供了包括具有合理地设计的编辑的细胞的细胞库,所述编辑包括在跨越生物体的基因组的感兴趣序列中的一类或更多类编辑。在特定方面中,本公开提供了包括具有合理地设计的编辑的细胞的细胞库,所述编辑包括在跨越基因组的子集的感兴趣序列中的一类或更多类编辑。例如,细胞库可以包括具有合理地设计的编辑的细胞,所述编辑包括在跨越外显子组(例如基因组的每个或大多数开放阅读框)的感兴趣序列中的一类或更多类编辑。例如,细胞库可以包括具有合理地设计的编辑的细胞,所述编辑包括在跨越激酶组的感兴趣序列中的一类或更多类编辑。在又一个示例中,细胞库可以包括具有合理地设计的编辑的细胞,所述编辑包括在跨越分泌蛋白质组的感兴趣序列中的一类或更多类编辑。在还有其他方面中,细胞库可以包括具有合理地设计的编辑的细胞,所述编辑被创建以分析在外显子组内编码的蛋白的各种同种型,并且细胞库可以被设计成控制一种或更多种特定同种型的表达,例如用于转录组分析。

[0381] 重要地,在某些方面中,细胞库可以包括使用随机化序列(例如,随机化启动子序列)的编辑以减小在库内的单独细胞中的一个或多个蛋白的表达之间的相似性。此外,在细胞库中的启动子可以是组成型的、诱导型的或两者以实现强烈的和/或可滴定的表达。

[0382] 在其他方面中,本公开提供了用于创建包括编辑的细胞的库以识别选定基因靶的最佳表达的自动化编辑方法、自动化多模块细胞编辑仪器。例如,通过代谢工程生产生物化学品常常需要途径酶的表达,并且最佳生产产量并不总是由在细胞中的最高量的靶途径酶而是更确切地通过单独酶和相关调控蛋白和/或途径的表达水平的微调来实现。类似地,有时可以为了最佳产量而用实验方法调节异源蛋白的表达水平。

[0383] 转录影响基因表达水平的最明显的方式是通过Po1 II启动的速率,其可以通过启动子或增强子强度和反式激活因子的组合来调节(Kadonaga等人的Cell,116(2):247-57(2004))。在真核生物中,延伸率也可以通过影响可选的剪接来确定基因表达模式(Cramer等人的PNAS USA,94(21):11456-60(1997))。在基因上的失败的终止可能通过减小启动子到Po1 II的可接近性而损害下游基因的表达(Greger等人的2000PNAS USA,97(15):8415-20(2000))。被称为转录干扰的这个过程与低等真核生物特别有关,因为它们常常具有紧密间隔的基因。

[0384] 在一些实施例中,本公开提供了用于优化细胞基因转录的方法。基因转录是几个不同的生物现象(包括转录起始(RNAP招募和转录复合物形成)、伸长(链合成/延伸)和转录终止(RNAP分离和终止))的结果。

[0385] 位点定向诱变

[0386] 可以使用采用位点定向诱变的自动化编辑方法、模块、仪器和系统来创建细胞库,即,当蛋白或其他基因组特征的氨基酸序列可以通过故意和精确地使蛋白或基因组特征突变而改变时。这些细胞系可能对各种目的(例如,对确定在细胞内的蛋白功能、在细胞内的酶活性位点的识别以及新奇蛋白的设计)是有用的。例如,位点定向诱变可以以多重方式使用以将在蛋白的序列中的单个氨基酸换成具有不同化学性质的另一个氨基酸。这允许人们确定在细胞群体内的单独细胞中的合理地设计或随机地生成的突变的效果。参见例如Berg等人的Biochemistry,第六版(纽约:W.H.Freeman and Company)(2007)。

[0387] 在另一个示例中,可以对在细胞库内的单独细胞进行编辑以取代在结合位点中的

氨基酸,例如对于在蛋白复合物内的相互作用在蛋白结合位点中的一个或多个氨基酸的取代或者在可以容纳辅因子或配体的酶口袋中的一个或多个氨基酸的取代。这类编辑允许对蛋白的特定操纵的创建以测量一种或更多种蛋白的某些性质,包括与在蛋白复合物中的其他辅因子、配体等的相互作用。

[0388] 在又一个示例中,可以使用位点特定诱变来对在细胞库中的单独细胞进行各种编辑类型,用于研究表达数量性状基因座(eQTL)。eQTL是解释基因表达表型的遗传方差的一部分的基因座。本发明的库对评估eQTL并将eQTL与实际生病状态联系起来将是有益的。

[0389] 在特定方面中,可以使用基于蛋白的已知或预测的结构合理设计来创建被引入到本公开的细胞库中的编辑。参见例如Chronopoulou EG和Labrou的Curr Protoc Protein Sci.;第26章:单元26.6(2011)。这种位点定向诱变可以为库中的单独细胞提供一个或多个位点定向编辑以及优选地在细胞群体中的两个或多个位点定向编辑(例如,组合编辑)。

[0390] 在其他方面中,使用在基因的编码区中的所有或实质上所有密码子的位点定向密码子突变“扫描”来创建本公开的细胞库。以这种方式,可以基于在基因的一个或多个密码子中的特定多态性来针对功能丧失或功能获得来检查特定密码子的单独编辑。这些库可以是用于确定哪些基因变化是无声的或在细胞或细胞群体中的特定表型的因果联系的强大工具。密码子的编辑可以随机地生成,或者可以基于已知的多态性和/或已在待分析的基因中被识别的突变而被合理地设计。此外,在细胞中的单个途径中的两个或多个基因上使用这些技术可以确定潜在的蛋白:蛋白相互作用或在细胞功能或途径中的冗余。

[0391] 例如,丙氨酸扫描可用于确定特定残基对给定蛋白的稳定性或功能的贡献。参见例如Lefèvre等人的Nucleic Acids Research,第25(2)卷:447-448(1997)。丙氨酸常常由于它的不庞大的、在化学上惰性的甲基官能团而在这种密码子扫描技术中被使用,甲基官能团可以模仿许多其他氨基酸拥有的二级结构偏好。密码子扫描也可用于确定特定残基的侧链是否在细胞功能和/或活性中起重要作用。有时,如果保持突变残基的大小,则其他氨基酸(例如,缬氨酸或亮氨酸)可以在密码子扫描细胞库的创建中被使用。

[0392] 在其他特定方面中,可以使用本发明的自动化编辑方法、自动化多模块细胞编辑仪器来创建细胞库以确定蛋白(如酶或激素)的活性位点,并阐明在细胞库中的这些蛋白中的一个或多个的作用的机制。与分子模拟研究相关联的位点定向诱变可用于发现酶的活性位点结构和因此它的作用机制。这些细胞库的分析可以提供由在蛋白的活性位点处的特定氨基酸残基、在蛋白复合物的亚单位之间的联系、在各种基因背景中的细胞内运输和蛋白稳定性/半衰期上施加的作用的理解。

[0393] 饱和诱变

[0394] 在一些方面中,使用本公开的自动化编辑方法、自动化多模块细胞编辑仪器创建的细胞库可以使诱变库饱和,其中单个密码子或一组密码子被随机化以在感兴趣的一个或多个特定基因的位置处产生所有可能的氨基酸。这些细胞库对于生成变体(例如对于定向进化)可能是特别有用的。参见例如Chica等人的Current Opinion in Biotechnology 16(4):378-384(2005);以及Shivange的Current Opinion in Chemical Biology,13(1):19-25。

[0395] 在一些方面中,包括不同的简并密码子的编辑可用于对在库中的单独细胞中的氨

氨基酸组编码。因为一些氨基酸比其他氨基酸由更多的密码子编码,所以氨基酸的确切比不能是相等的。在某些方面中,使用更受限的简并密码子。“NNK”和“NNS”具有对所有20个氨基酸编码的优点,但仍然在3%的时间内对终止密码子编码。替代密码子(例如“NDT”、“DBK”)完全避免终止密码子,并对最小的一组氨基酸编码,这些氨基酸仍然包含所有主要的生物物理类型(阴离子的、阳离子的、脂肪族疏水的、芳香族疏水的、亲水的、小的)。

[0396] 在特定的方面中,在饱和诱变编辑过程中使用在非冗余饱和诱变中对于特定生物体最常用的密码子。

[0397] 启动子交换和阶梯(ladder)

[0398] 一种用于分析和/或优化一个或更多个感兴趣基因的表达的机制是通过“启动子交换”细胞库的创建,其中细胞包括具有链接到一个或更多个感兴趣基因的特定启动子的基因编辑。因此,使用本公开的方法、自动化多模块细胞编辑仪器创建的细胞库可以是启动子交换细胞库,其可以用于例如增加或减少感兴趣基因的表达以优化代谢或基因途径。在一些方面中,启动子交换细胞库可用于识别影响细胞活力或生存能力的基因(例如,对影响细胞的生长率或整体健康的蛋白编码的基因)的表达的增加或减少。在一些方面中,启动子交换细胞库可用于创建具有在启动子之间的依赖性和逻辑的细胞以创建合成基因网络。在一些方面中,启动子交换可用于控制在自然界中的同质和异质(复杂组织)群体的细胞之间的细胞间通信。

[0399] 细胞库可以利用任何给定数量的启动子,其基于一定范围的表达强度和任何给定数量的靶基因的展示而被分组在一起。启动子序列的阶梯在至少一个条件下改变至少一个基因座的表达。然后,使用本公开的自动化编辑方法、自动化多模块细胞编辑仪器来将该阶梯有系统地应用于在生物体中的一组基因。

[0400] 在特定方面中,使用本公开的自动化编辑过程、模块和系统形成的细胞库包括代表给定启动子的单独细胞,所述给定启动子可操作地链接到在另外相同的基因背景中的一个或更多个感兴趣的靶基因。可以在例如美国专利号9,988,624中找到可以被修改以利用自动化系统的非自动化编辑策略的示例。

[0401] 在特定方面中,通过编辑一组靶基因以可操作地链接到预先选择的一组启动子来产生启动子交换细胞库,该一组启动子充当用于感兴趣基因的表达的“启动子阶梯”。例如,细胞被编辑,使得一个或更多个单独的感兴趣基因被编辑以与在启动子阶梯中的不同启动子可操作地链接。当内源性启动子不存在、它的序列是未知的或者它以前以某种方式被改变时,启动子阶梯的单独启动子可以插在感兴趣基因的前面。这些所产生的细胞库具有带有阶梯的单独启动子的单独细胞,单独启动子可操作地链接到在另外相同的基因背景中的一个或更多个靶基因。

[0402] 启动子通常被选择以导致跨越不同基因座的可变表达,并且可以包括诱导型启动子、组成型启动子或两者。

[0403] 使用启动子阶梯所编辑的一组靶基因可以包括在基因组或基因组的选定子集中的所有或大部分开放阅读框(ORF),例如激酶组或分泌蛋白质组的ORF。在一些方面中,靶基因可以包括对于基因的各种同种型的编码区,并且细胞库可以被设计成一种或更多种特定同种型的表达,例如用于使用各种启动子的转录组分析。

[0404] 该一组靶基因也可以是已知或被怀疑涉及特定细胞途径(例如调控途径或信号途

径)的基因。该一组靶基因可以是通过与先前证明的有益编辑(先前的启动子交换或先前的SNP交换)相关、通过基于在先前生成的编辑之间的上位相互作用的算法选择、基于关于对靶的有益ORF的假设的其他选择标准或通过随机选择而与功能相关的ORF。在特定实施例中,靶基因可以包括非蛋白编码基因,包括非编码RNA。

[0405] 其他功能基因成分(包括绝缘体成分和其他基因组组织成分)的编辑也可以用于有系统地改变一组靶基因的表达水平,并且可以使用本公开的方法、自动化多模块细胞编辑仪器来被引入。在一个方面中,使用增强子序列的阶梯单独地或与选定启动子或启动子阶梯组合地编辑细胞的群体以创建具有在这些增强子元件中的各种编辑的细胞库。在另一个方面中,使用核糖体结合序列的阶梯单独地或与选定启动子或启动子阶梯组合地编辑细胞的群体以创建具有在这些核糖体结合序列中的各种编辑的细胞库。

[0406] 在另一方面中,细胞的群体被编辑以允许将各种mRNA和/或蛋白稳定或失稳序列附着到转录物或蛋白的5'或3'端或任何其他位置处。

[0407] 在某些方面中,可以使用本公开的自动化编辑方法、模块、仪器和系统来编辑先前建立的细胞系的细胞群体以创建细胞库来改善细胞的功能、健康和/或生存能力。例如,已经在许多年、有时几十年的时期内反复使用随机诱变过程来发展目前用于大规模制造的许多工业菌株。不需要的中性和有害突变连同有益变化一起被引入到菌株中,且随着时间的推移这导致具有在总体稳健性和关键性状(例如生长率)方面的缺陷的菌株。在另一个示例中,哺乳动物细胞系在时间段内通过细胞的传代而继续突变,且同样这些细胞系可能变得不稳定并获取不期望有的性状。本公开的自动化编辑方法、自动化多模块细胞编辑仪器可以使用编辑策略,例如SNP和/或STR交换、插入缺失创建或其他技术来移除或改变不期望的基因组序列和/或引入新的基因组序列以解决缺陷,同时保持细胞的合乎需要的特性。

[0408] 当递归编辑被使用时,在所编辑的细胞库中的单独细胞中的编辑可以合并到基因组的异位位点(例如CarT位点)中的“着陆垫(landing pad)”的包含以优化表达、稳定性和/或控制。

[0409] 在一些实施例中,在一个或多个标准(例如,感兴趣的化学品或产品的生产)下培养和分析具有包括一个或多个编辑(引入或移除)的单独细胞的所产生的每个库。然后,拥有特定标准的细胞与在细胞中的一个或多个特定编辑相关联或相关。以这种方式,可以确定给定编辑对任何数量的感兴趣的基因或表型性状的影响。与特定标准或增强的功能/稳健性相关联的多个编辑的识别可以导致具有高度合乎需要的特征的细胞。

[0410] 敲出或敲入库

[0411] 在某些方面中,本公开提供了用于创建具有各种感兴趣基因的“敲出”(KO)或“敲入”(KI)编辑的细胞的库的自动化编辑方法、模块、仪器和系统。因此,本公开意欲涵盖由本公开的自动化编辑方法、自动化多模块细胞编辑仪器创建的所编辑的细胞库,所述所编辑的细胞库具有移除或减少选定感兴趣基因的表达的一个或多个突变以询问这些编辑对在细胞库中的单独细胞中的基因功能的影响。

[0412] 可以使用靶向基因KO(例如,通过插入/缺失)或KO(例如,通过同源定向修复)来创建细胞库。例如,常常通过非同源末端连接DNA修复途径来修复双链断裂。已知修复是容易出错的,且因此可能引入可能干扰基因功能的插入和缺失。优选地,编辑被合理地设计以特别影响感兴趣基因,并且可以创建具有一个或多个感兴趣基因座的KO或KI的单个细胞。

可以使用本公开的自动化递归编辑来创建具有两个或更多个感兴趣基因座的KO或KI的细胞。

[0413] 在特定方面中,使用在细胞群体内的细胞的同时多重编辑来创建KO或KI细胞库,并且在细胞群体内的多个细胞在单轮编辑中被编辑,即,在细胞库的细胞内的多个改变在单个自动化操作中。在其他特定方面中,细胞库使用在细胞群体内的单独细胞的递归编辑来被创建,并导致在基因组中的两个或更多个位点的多次编辑合并到单个细胞内。

[0414] SNP或短串联重复交换

[0415] 在一个方面中,使用本公开的自动化编辑方法、自动化多模块细胞编辑仪器通过有系统地将单核苷酸多态性(“SNP”)引入或替换到单独细胞的基因组中来创建细胞库以创建“SNP交换”细胞库。在一些实施例中,本公开的SNP交换方法包括添加有益的SNP和去除有害的和/或中性的SNP。SNP交换可以以编码序列、非编码序列或两者为目标。

[0416] 在另一方面中,使用本公开的自动化编辑方法、模块、仪器、仪器和系统通过有系统地将短串联重复(“STR”)引入或替换到单独细胞的基因组中来创建细胞库以创建“STR交换”细胞库。在一些实施例中,本公开的STR交换方法包括添加有益STR和去除有害和/或中性的STR。STR交换可以以编码序列、非编码序列或两者为目标。

[0417] 在一些实施例中,用于创建细胞库的SNP和/或STR交换被复用,并且在细胞群体中的多个细胞在单轮编辑中被编辑,即,在细胞库的细胞内的多个改变在单个自动化操作中。在其他实施例中,用于创建细胞库的SNP和/或STR交换是递归的,并且导致多个有益序列的合并和/或有害序列到单个细胞中的去除。多个变化可以是特定的一组已定义的变化或突变的部分地随机化的组合库。有害突变的去除和有益突变的合并可以提供在各种细胞过程中的立即改善。基因负担的去除或者有益的变化到没有基因负担的菌株中的合并也针对额外的随机诱变提供新的、稳定的起点,其可能实现进一步的改进。

[0418] SNP交换克服了随机诱变方法的基础性限制,因为它不是随机方法,但更确切地是跨越细胞的单独突变的有系统的引入或去除。

[0419] 剪接位点编辑

[0420] RNA剪接是一个过程,在这个过程期间内含子被切除并且外显子被剪接在一起以产生转换成蛋白的mRNA。细胞机器对剪接信号的精确识别对这个过程是至关重要的。因此,在一些方面中,使用对在各种基因座中的已知和/或预测的剪接供体和/或受体位点的有系统的编辑来编辑细胞的群体以创建各种基因的剪接位点变体的库。这种编辑可以有助于阐明细胞背景中的基因的各种同种型的生物相关性。可以使用分析技术(例如在下列文献中找到的那些技术)来预测各种编码区的剪接位点的合理设计的序列,包括与各种哺乳动物疾病相关联的实际或预测的突变:Nalla和Rogan的Hum Mutat,25:334-342(2005);Divina等人的Eur J Hum Genet,17:759-765(2009);Desmet等人的Nucleic Acids Res,37:e67(2009);Faber等人的BMC Bioinformatics,12(suppl 4):S2(2011)。

[0421] 起始/终止密码子交换和核酸类似物的结合

[0422] 在一些方面中,本公开涉及使用本公开的自动化编辑方法、模块、仪器和系统来创建细胞库,其中所述库通过在生物体的整个基因组或对于在基因组(例如激酶组或分泌蛋白组)中的编码区的选定子集交换起始和终止密码子变体来被创建。在细胞库中,单独细胞将具有替换对于一个或更多个感兴趣基因的天然起始或终止密码子的一个或更多个起始

或终止密码子。

[0423] 例如,由真核生物使用的典型起始密码子是ATG (AUG),且原核生物最多地使用ATG (AUG),后面是GTG (GUG) 和TTG (UUG)。细胞库可以包括具有对一个或多个感兴趣基因的天然起始密码子的替换的单独细胞。

[0424] 在一些方面中,本公开规定通过在选定的感兴趣基因前面用TTG代替ATG起始密码子来自动创建细胞库。在其他方面中,本公开规定通过用GTG代替ATG起始密码子来自动创建细胞库。在其他方面中,本公开规定通过用ATG代替GTG起始密码子来自动创建细胞库。在其他方面中,本公开规定通过用TTG代替GTG起始密码子来自动创建细胞库。在其他方面中,本公开规定通过用ATG代替TTG起始密码子来自动创建细胞库。在其他方面中,本公开规定通过用GTG代替TTG起始密码子来自动创建细胞库。

[0425] 在其他示例中,啤酒酵母和哺乳动物的典型终止密码子分别是TAA (UAA) 和TGA (UGA)。单子叶植物的典型终止密码子是TGA (UGA),而昆虫和大肠杆菌通常使用TAA (UAA) 作为终止密码子(Dalphin等人的Nucl. Acids Res., 24:216-218 (1996))。细胞库可以包括具有对一个或多个感兴趣基因的天然终止密码子的替换的单独细胞。

[0426] 在一些方面中,本公开规定通过用TAG代替TAA终止密码子来自动创建细胞库。在其他方面中,本公开规定通过用TGA代替TAA终止密码子来自动创建细胞库。在其他方面中,本公开规定通过用TAA代替TGA终止密码子来自动创建细胞库。在其他方面中,本公开规定通过用TAG替换TGA终止密码子来自动创建细胞库。在其他方面中,本公开规定通过用TAA代替TAG终止密码子来自动创建细胞库。在其他方面中,本发明教导通过用TGA代替TAG终止密码子来自动创建细胞库。

[0427] 终止子交换和阶梯

[0428] 一种用于识别一个或多个感兴趣基因的预剪接mRNA的最佳终止的机制是通过“终止子交换”细胞库的创建,其中细胞包括具有链接到一个或多个感兴趣基因的特定终止子序列的基因编辑。因此,使用本公开的方法、模块、仪器和系统创建的细胞库可以是终止子交换细胞库,其可以用于例如通过从合成的位点释放转录物来影响mRNA稳定性。在其他实施例中,终止子交换细胞库可用于识别转录终止的效率的增加或减少,并因而识别未剪接的预mRNA的积累(例如,West和Proudfoot的Mol Cell.; 33 (3-9): 354-364 (2009) 和/或3'端处理(例如,West等人的Mol Cell. 29 (5): 600-10 (2008))。在基因链接到多个终止位点的情况下,编辑可以编辑对与基因相关联的多个终止子的编辑的组合。额外的氨基酸也可以被添加到蛋白的末端以确定对在终止子上的蛋白长度的影响。

[0429] 细胞库可以利用基于一定范围的活性和任何给定数量的靶基因的展示对终止子阶梯所选择的终止子的任何给定数量的编辑。终止子序列的阶梯在至少一个条件下改变至少一个基因座的表达。然后,使用本公开的自动化编辑方法、模块、仪器和系统来将该阶梯有系统地应用于在生物体中的一组基因。

[0430] 在一些方面中,本公开规定使用本公开的自动化编辑方法、模块、仪器和系统来创建细胞库,其中所述库被创建以编辑在库的单独细胞中的基因组中的一个或多个区域中的终止子信号。在真核生物中的转录终止通过终止子信号来操作,终止子信号由与RNA聚合酶II相关联的蛋白因子识别。例如,细胞库可以包含具有在对聚腺苷酸化特异因子(CPSF)和裂解刺激因子(CstF)编码的基因和/或对由CPSF和CstF因子招募到终止位点的蛋白编码

的基因中的编辑的单独真核细胞。在原核生物中,被称为Rho非依赖性和Rho依赖性终止的两种主要机制介导转录终止。例如,细胞库可以包含具有在对影响这些终止途径的结合、效率和/或活性的蛋白编码的基因中的编辑的单独原核细胞。

[0431] 在一些方面中,本公开提供了选择具有最佳特性的终止序列(“终止子”)的方法。例如,在一些实施例中,本公开教导提供用于引入和/或编辑在宿主细胞内的一个或多个终止子和/或生成一个或多个终止子的变体的方法,所述变体展示一定范围的活性。终止子的特定组合可以被分组在一起作为终止子阶梯,并且本公开的细胞库包括代表终止子的单独细胞,所述终止子可操作地链接到在另外相同的基因背景中的一个或多个感兴趣的靶基因。可以例如在Serber等人的标题为“Microbial strain improvement by a HTP genomic engineering platform”的美国专利号9,988,624中找到可被修改以利用自动化仪器的非自动化编辑策略的示例。

[0432] 在特定的方面中,通过编辑一组靶基因以可操作地链接到预先选择的一组终止子来产生终止子交换细胞库,该一组终止子充当用于感兴趣基因的表达的“终止子阶梯”。例如,细胞被编辑,使得内源性启动子可操作地链接到用在启动子阶梯中的不同启动子编辑的单独的感兴趣基因。当内源性启动子不存在、它的序列是未知的或者它以前以某种方式被改变时,启动子阶梯的单独启动子可以插在感兴趣基因的前面。这些所产生的细胞库具有带有阶梯的单独启动子的单独细胞,单独启动子可操作地链接到在另外相同的基因背景中的一个或多个靶基因。然后,所讨论的终止子阶梯与给定的感兴趣基因相关联。

[0433] 终止子阶梯可用于更普遍地影响在基因组或基因组的选定子集中的所有或大多数ORF(例如激酶组或分泌蛋白组的ORF)的终止。该一组靶基因也可以是已知或被怀疑涉及特定细胞途径(例如调控途径或信号途径)的基因。该一组靶基因可以通过与先前证明的有益编辑(先前的启动子交换或先前的SNP交换)相关、通过基于在先前生成的编辑之间的上位相互作用的算法选择、基于关于对靶的有益ORF的假设的其他选择标准或通过随机选择而与功能相关的ORF。在特定实施例中,靶基因可以包括非蛋白编码基因,包括非编码RNA。

[0434] 虽然已经描述了某些实施例,但这些实施例仅仅是作为示例被提出,且并不意欲限制本公开的范围。事实上,本文所述的新颖方法、装置、模块、仪器和系统可以体现在各种其他形式中;此外,可以做出在本文描述的方法、装置、模块、仪器和系统的形式中的各种省略、替换和改变而不偏离本公开的精神。所附权利要求及其等同物意欲涵盖如将落在本公开的范围和精神内的这样的形式或修改。

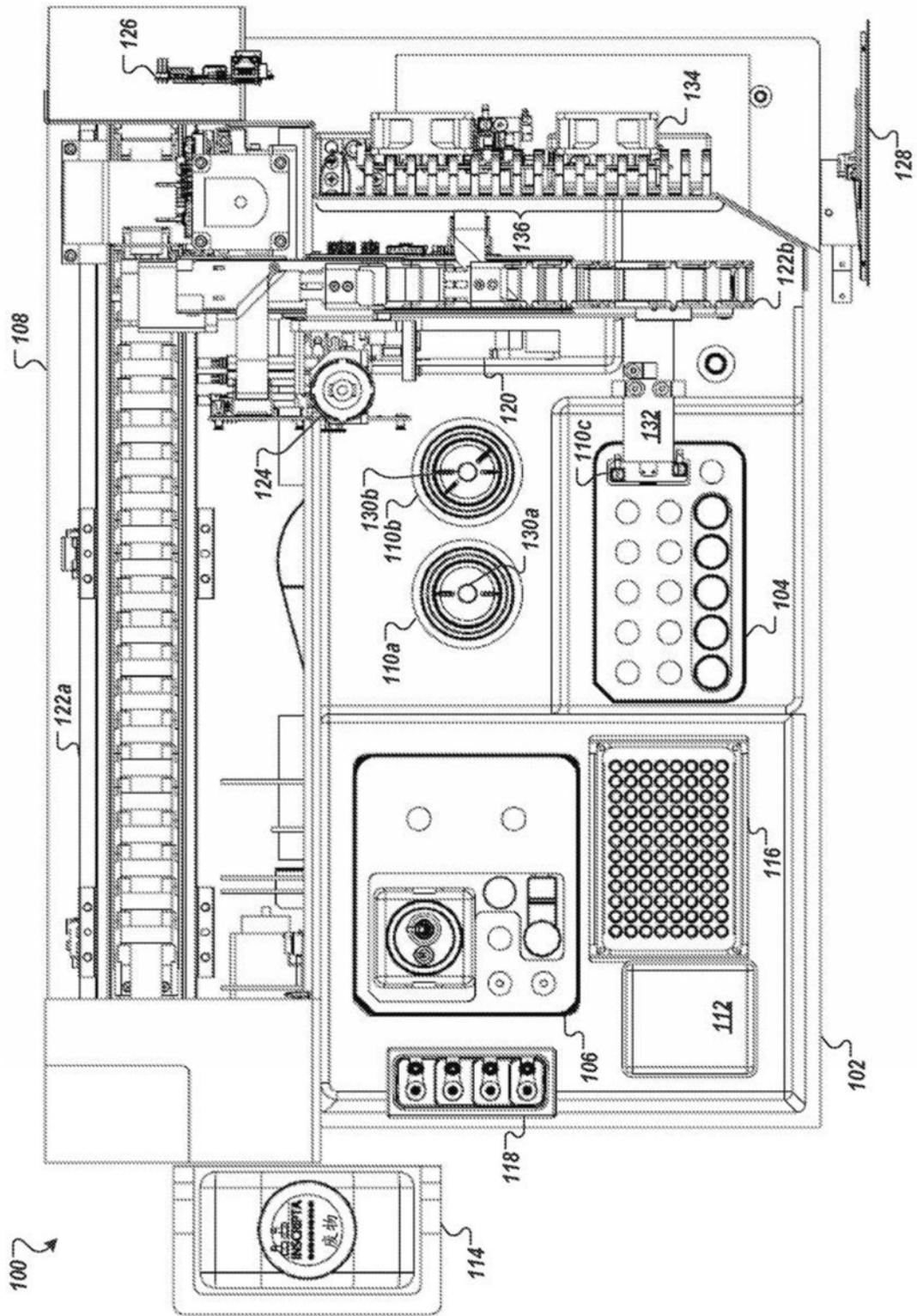


图1A

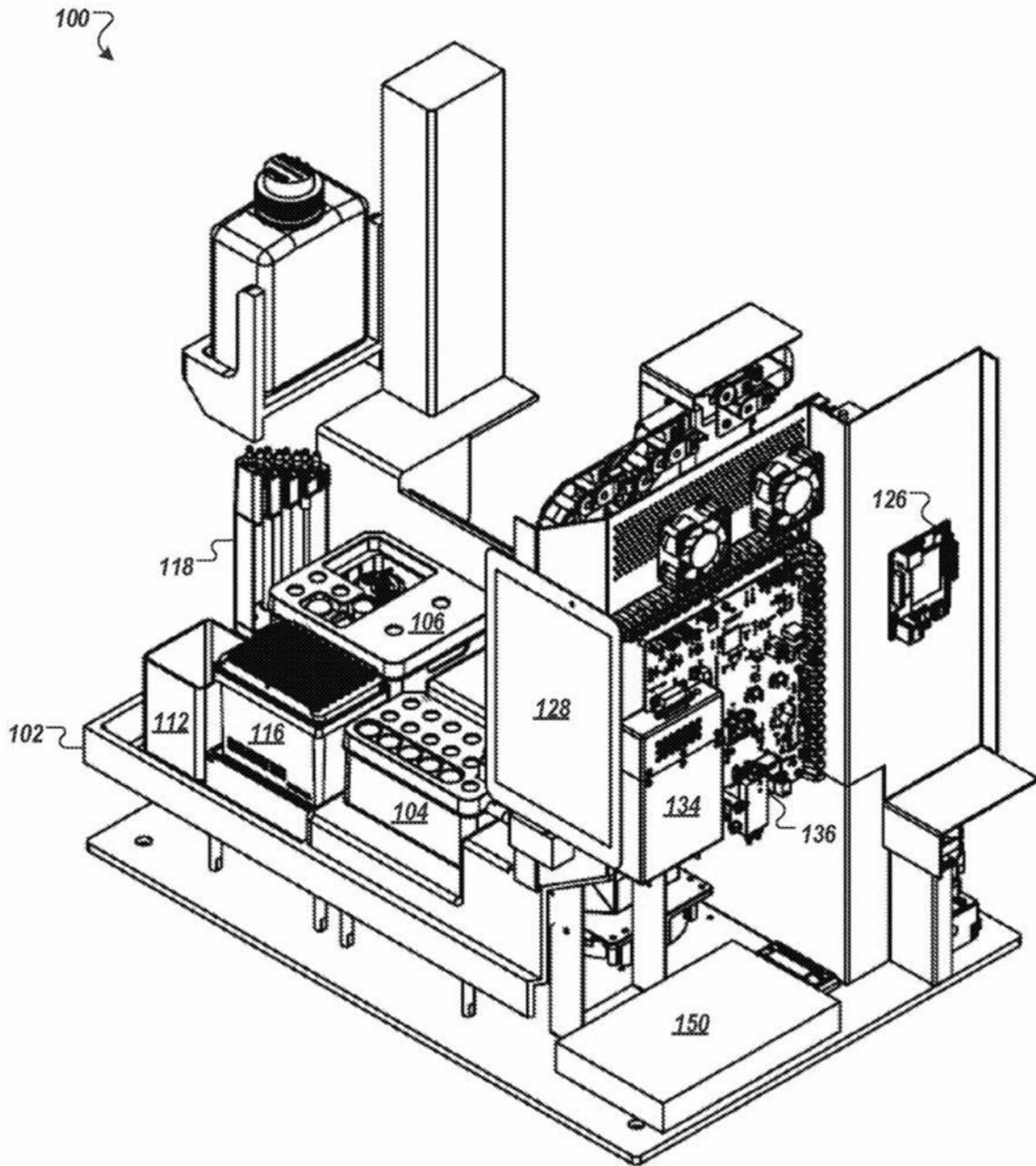


图1B

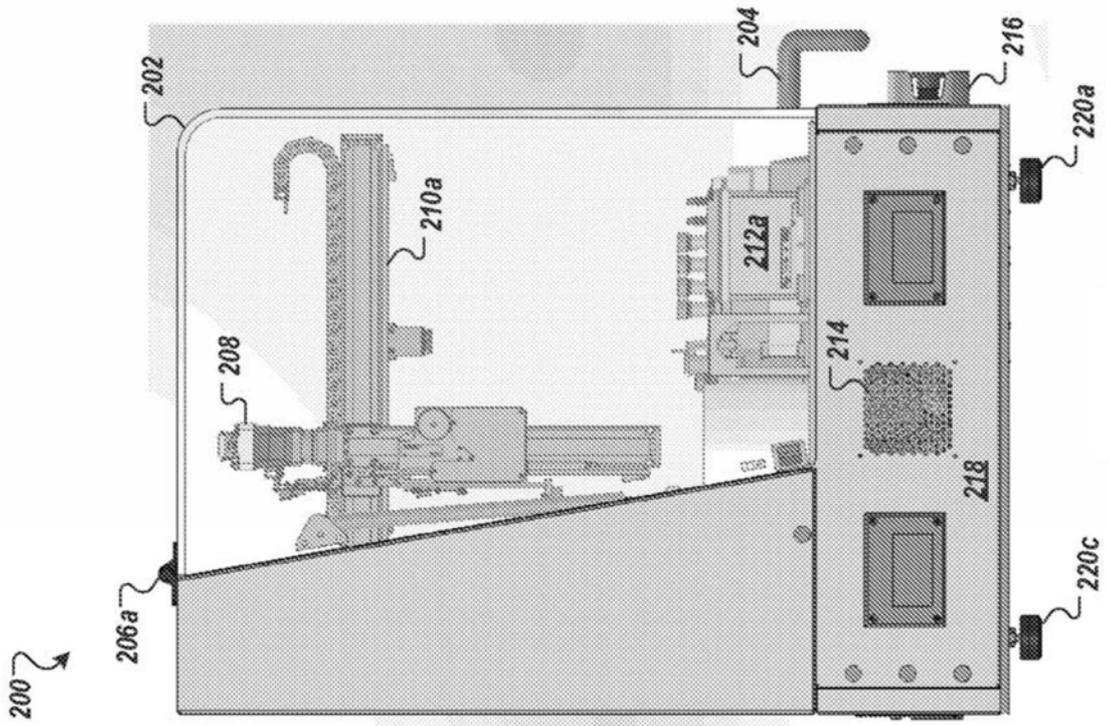


图2A

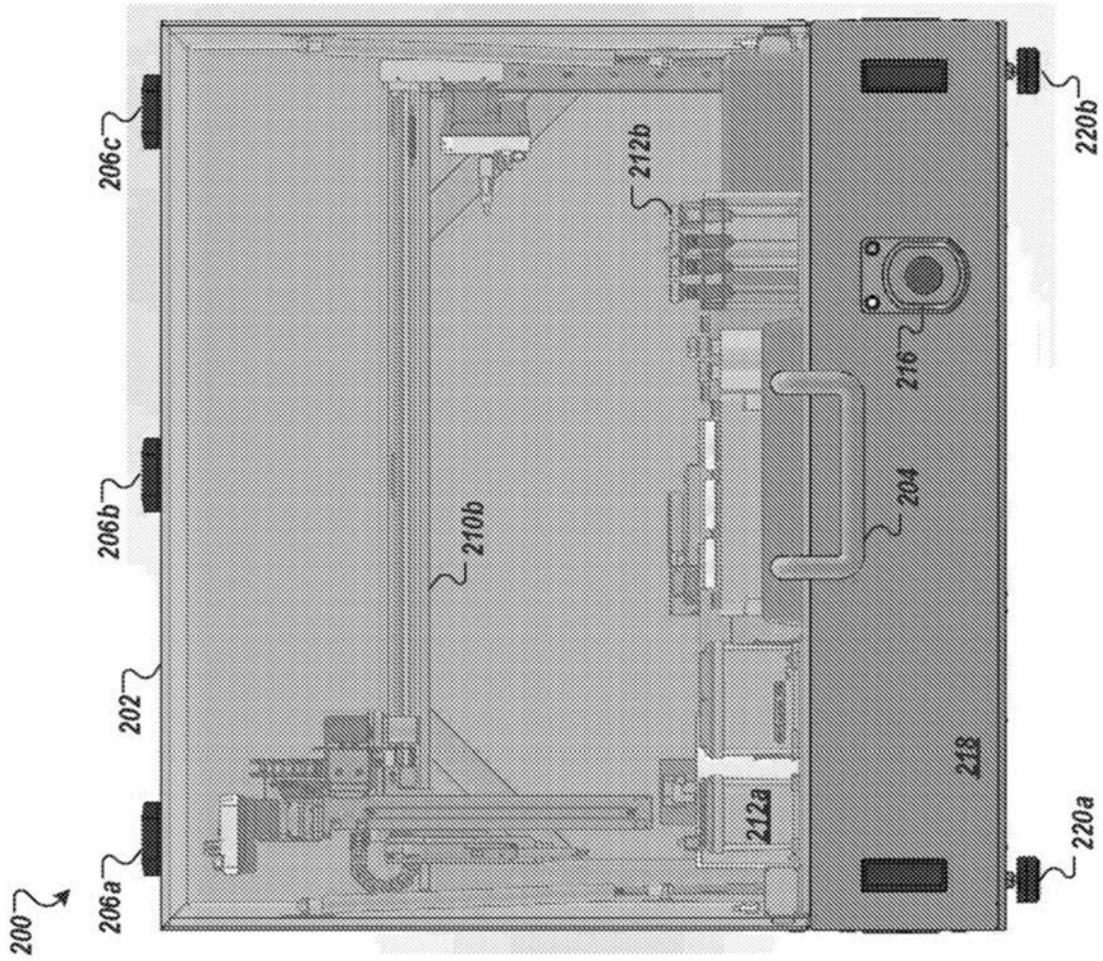


图2B

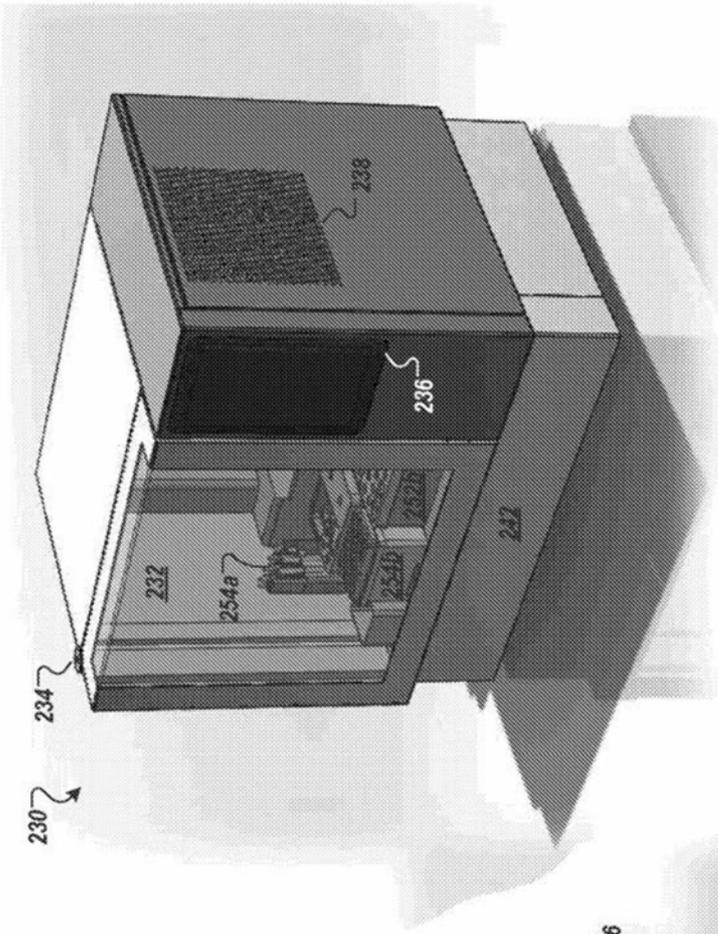


图 2C

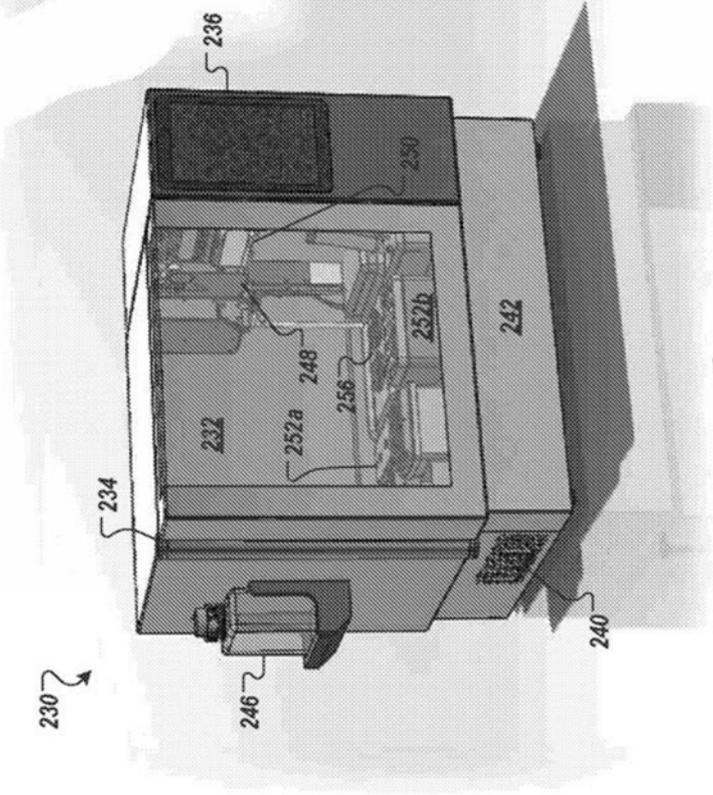


图 2D

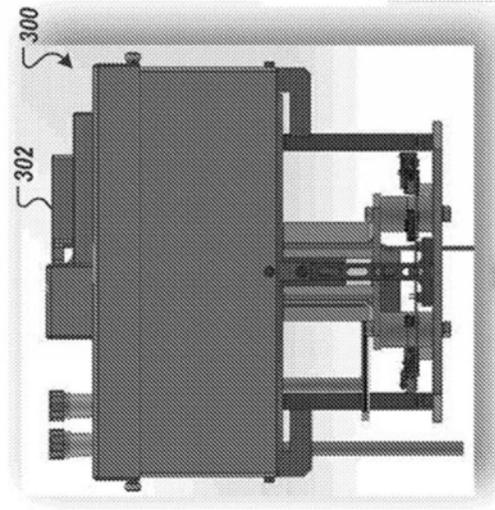


图3A

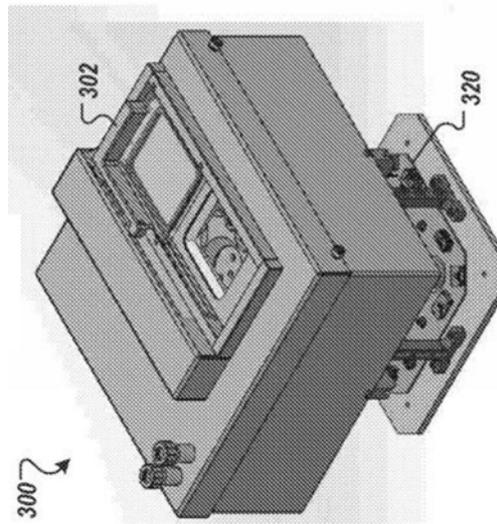


图3B

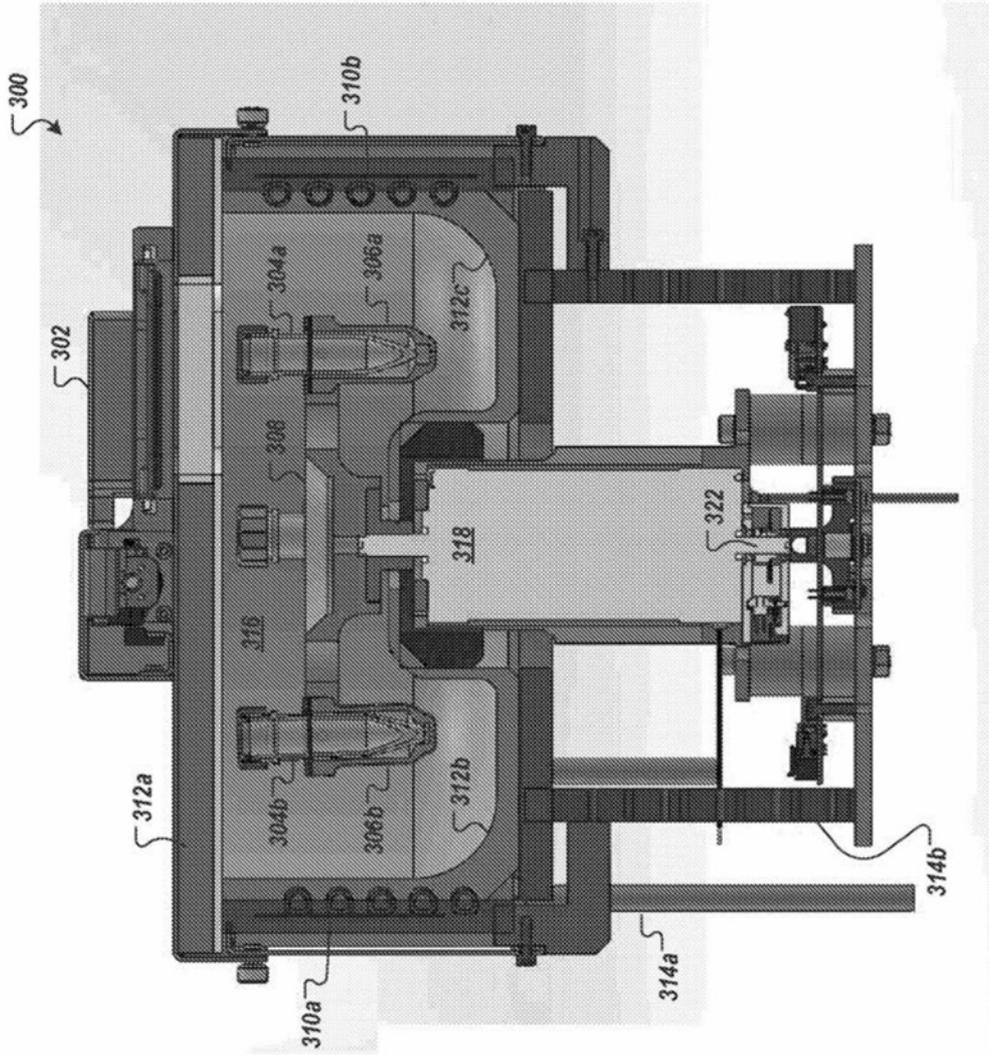


图3C

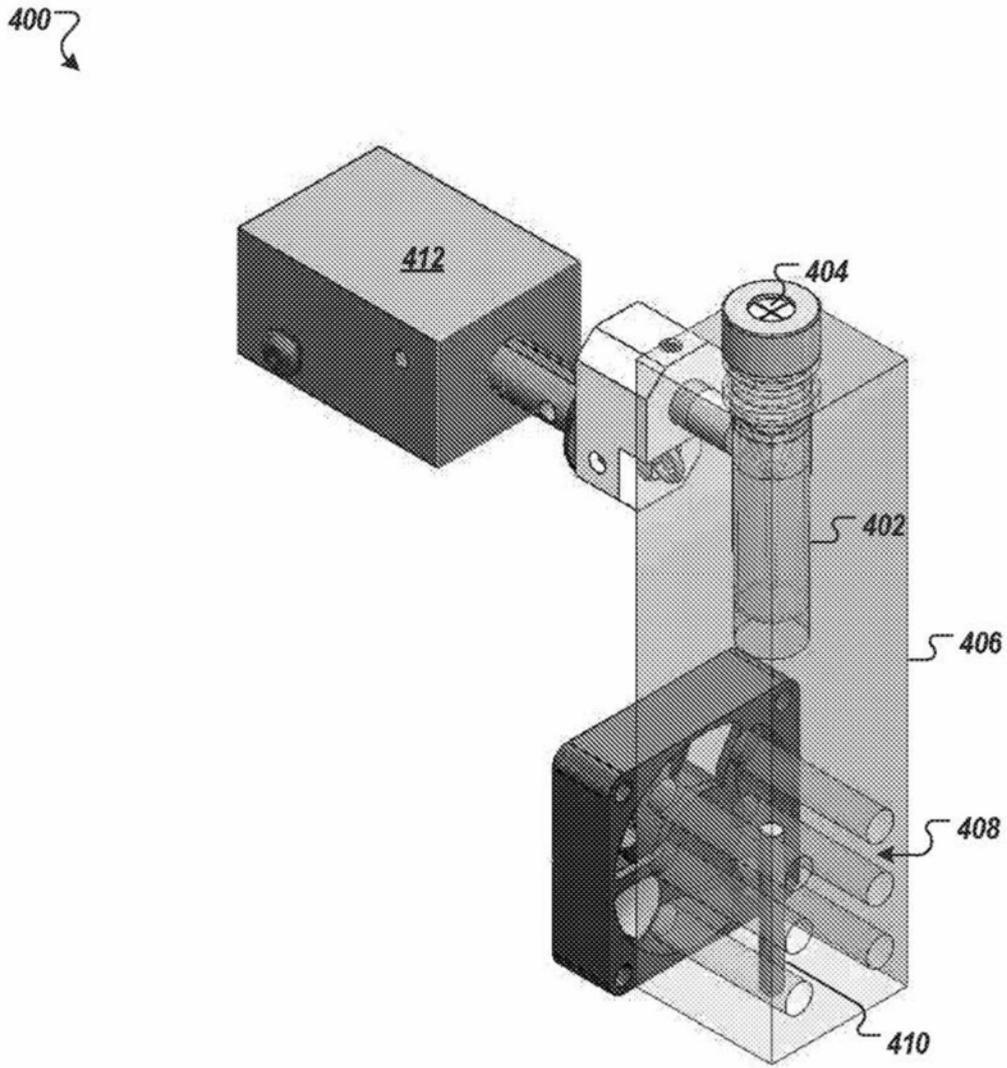


图4

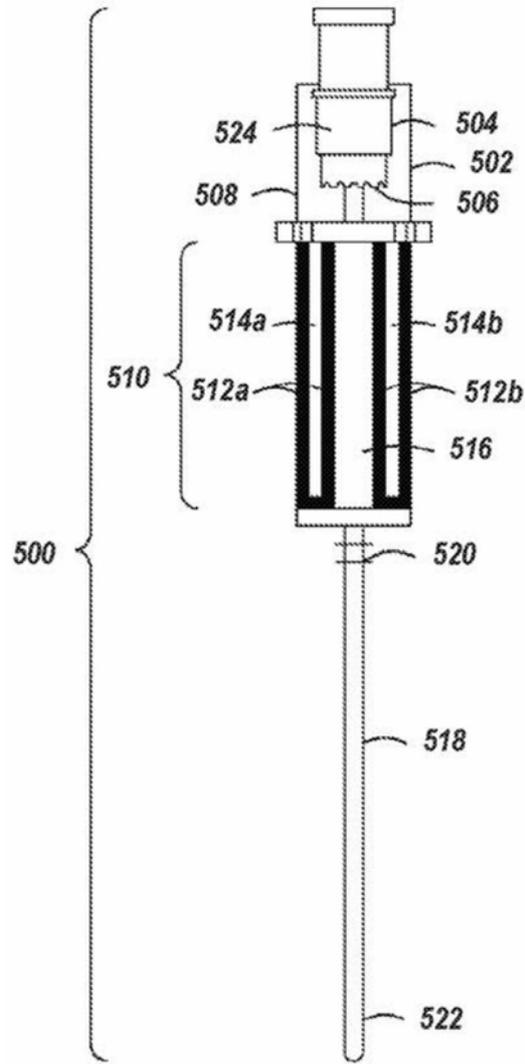


图5A

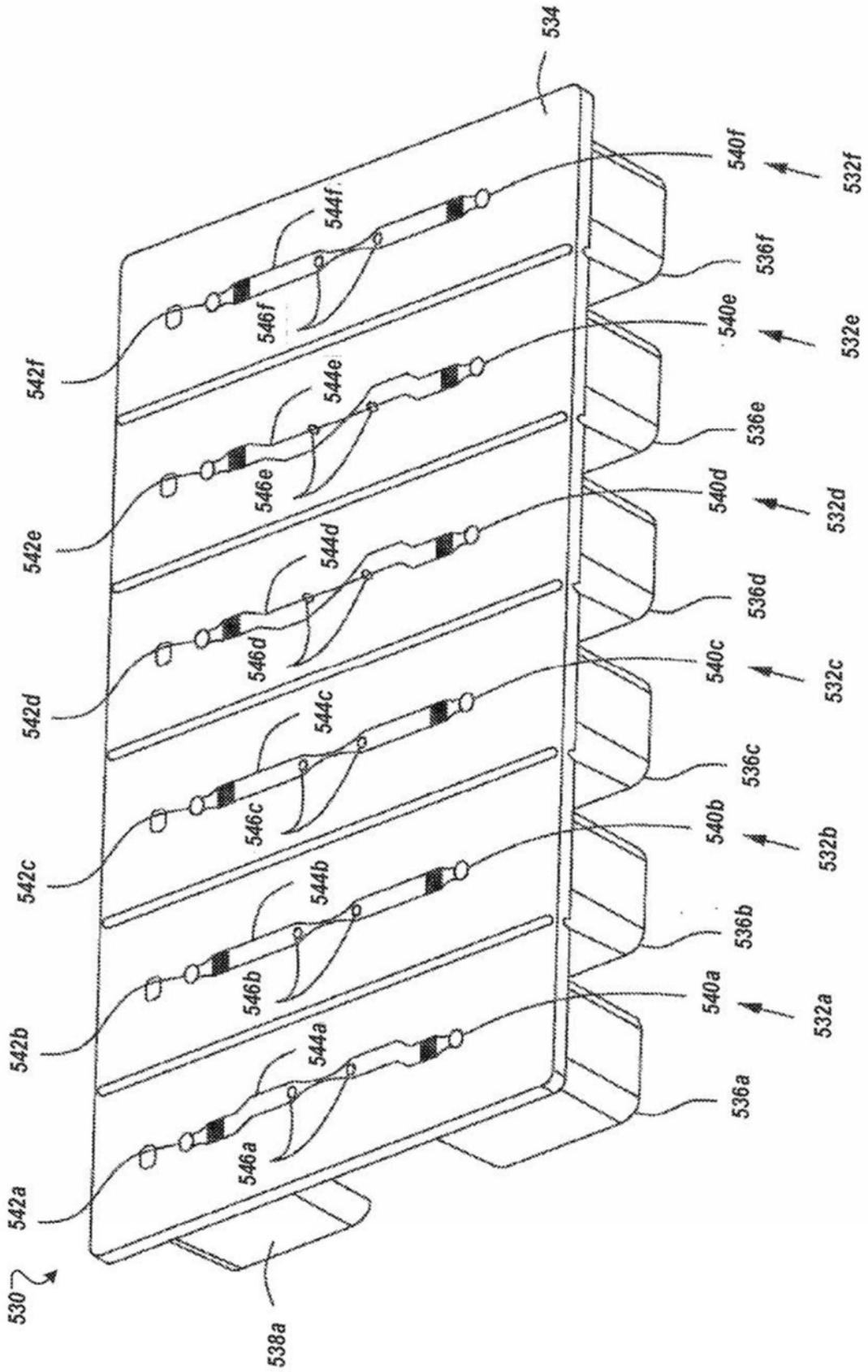


图5B

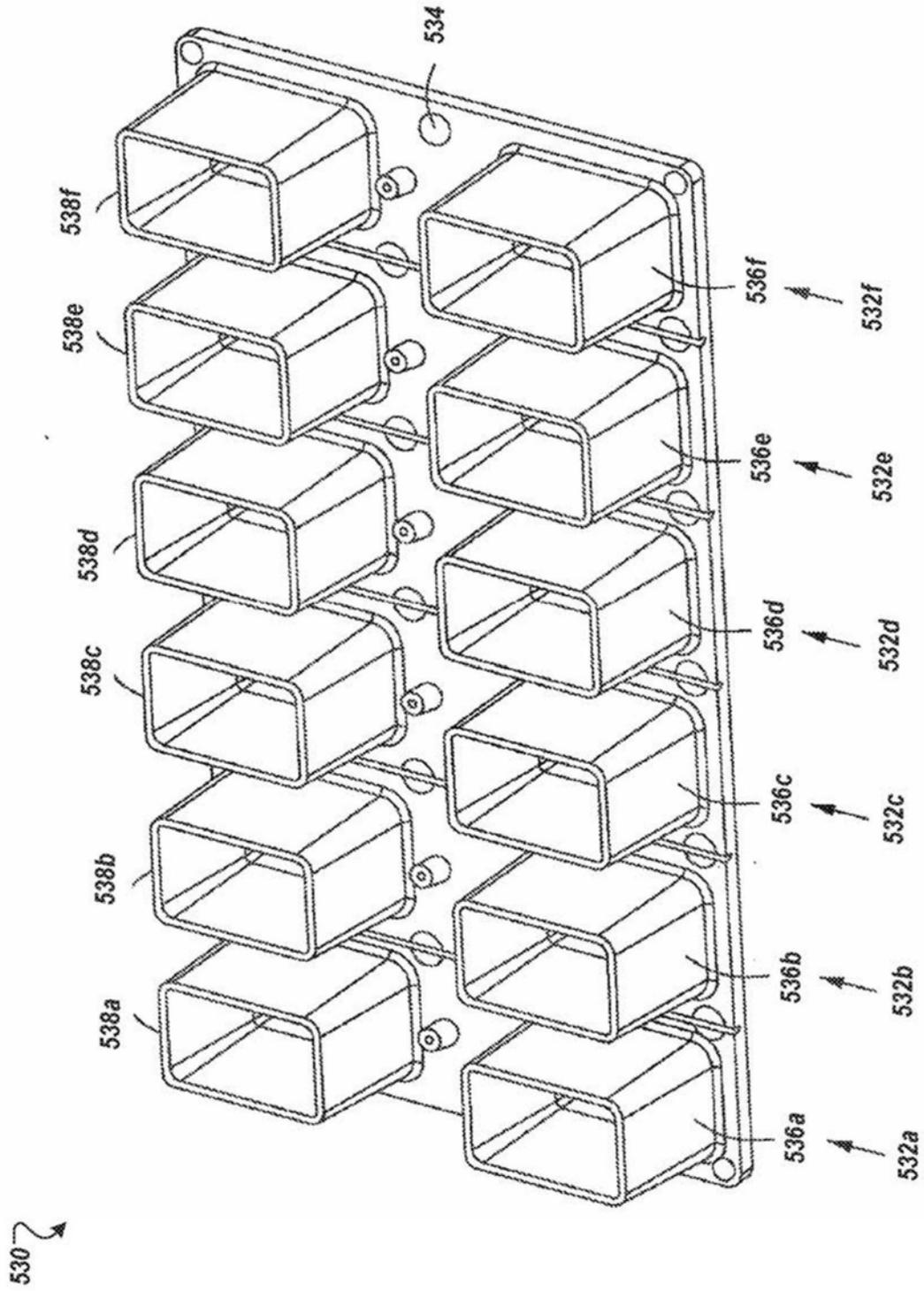


图5C

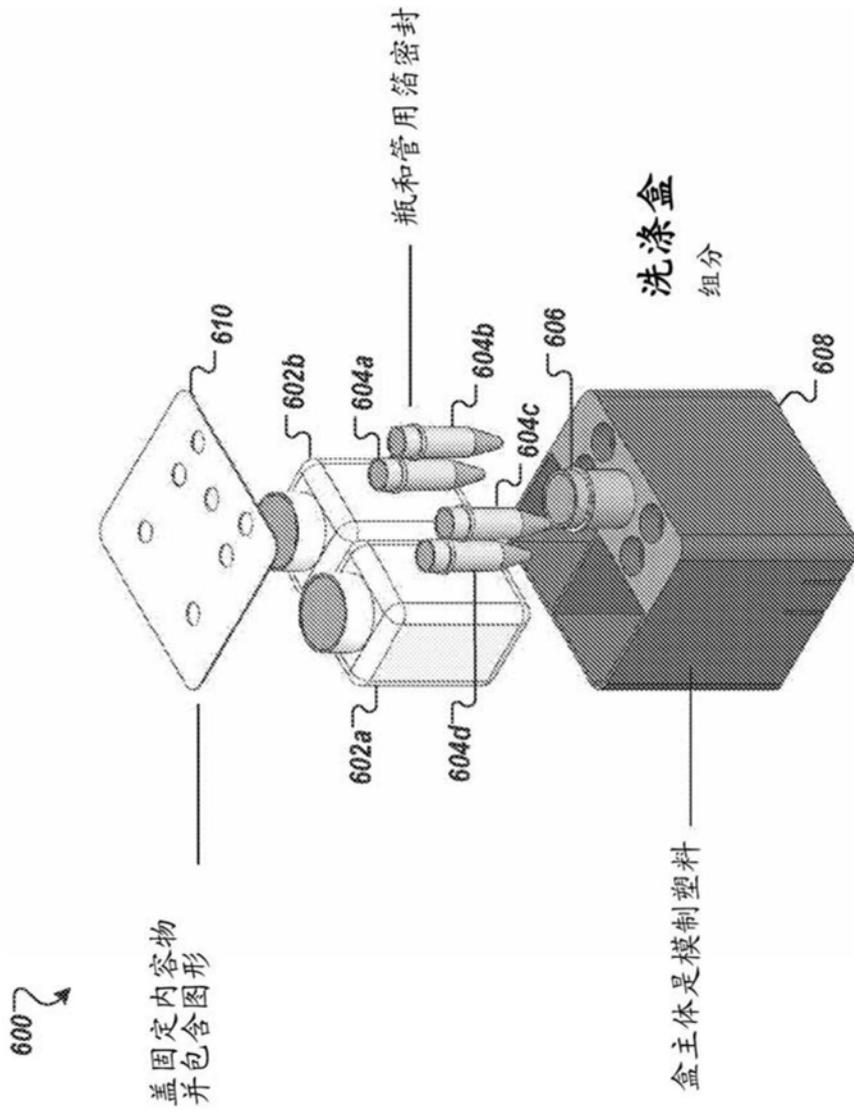


图6A

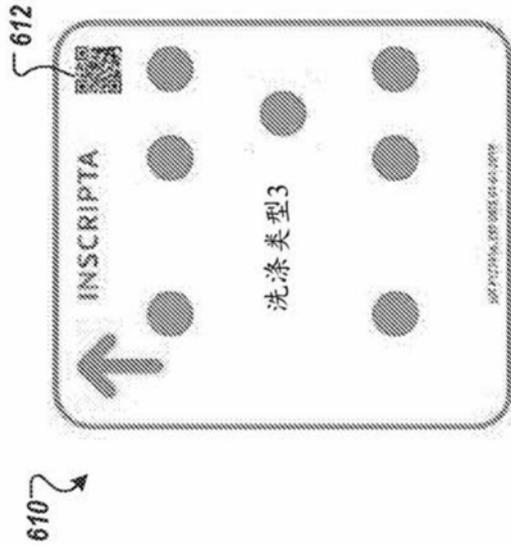


图6B

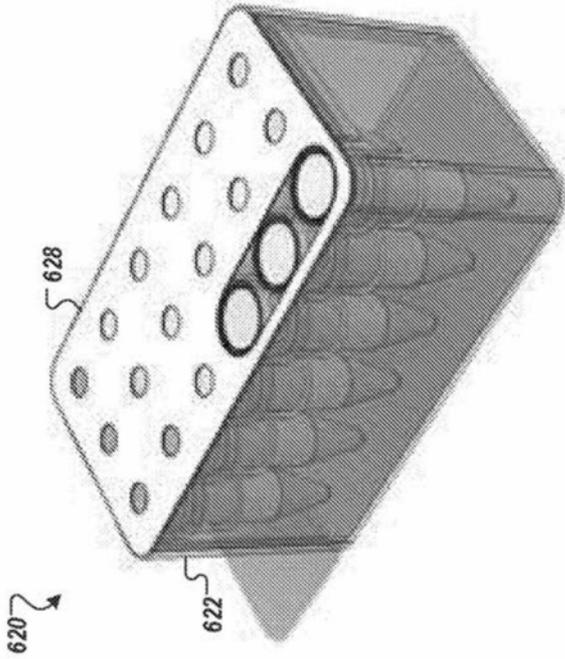


图6C

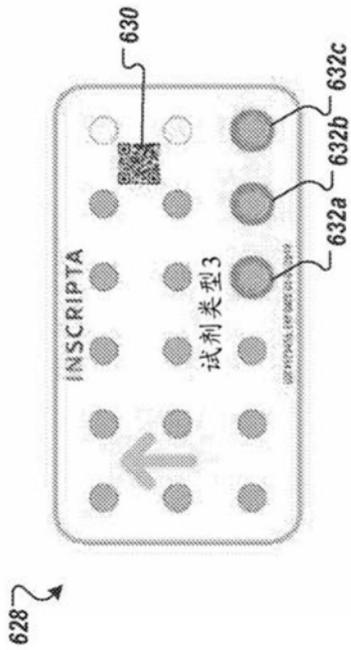


图6D

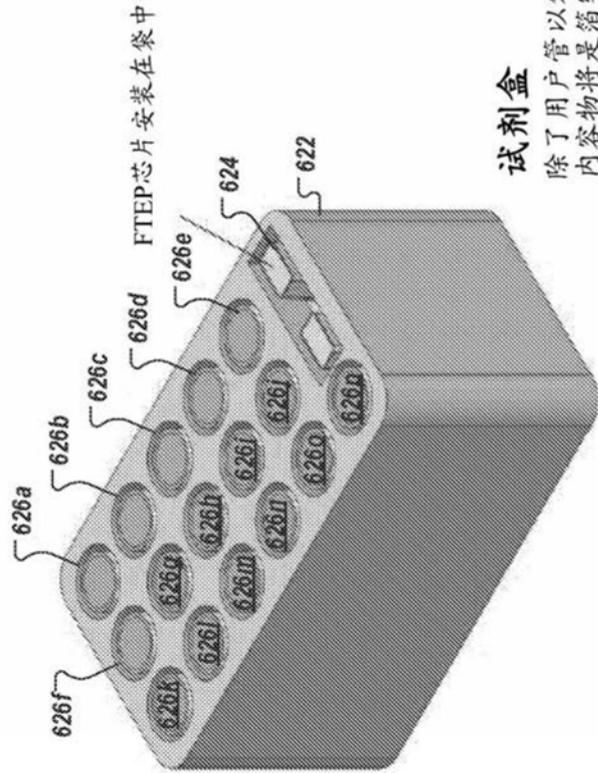


图6E

试剂盒
除了用户管以外的所有
内容物将是箔密封的。

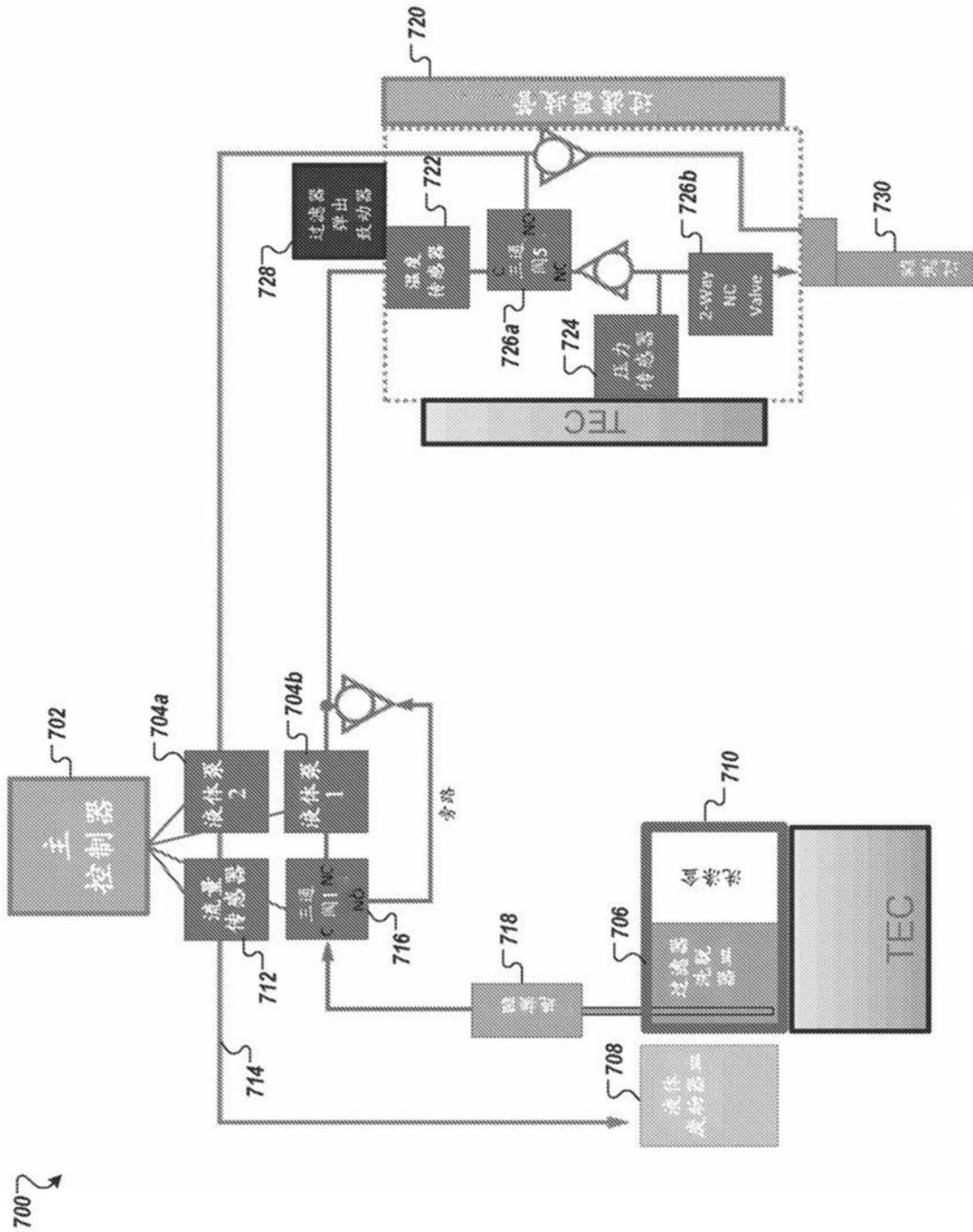


图7A

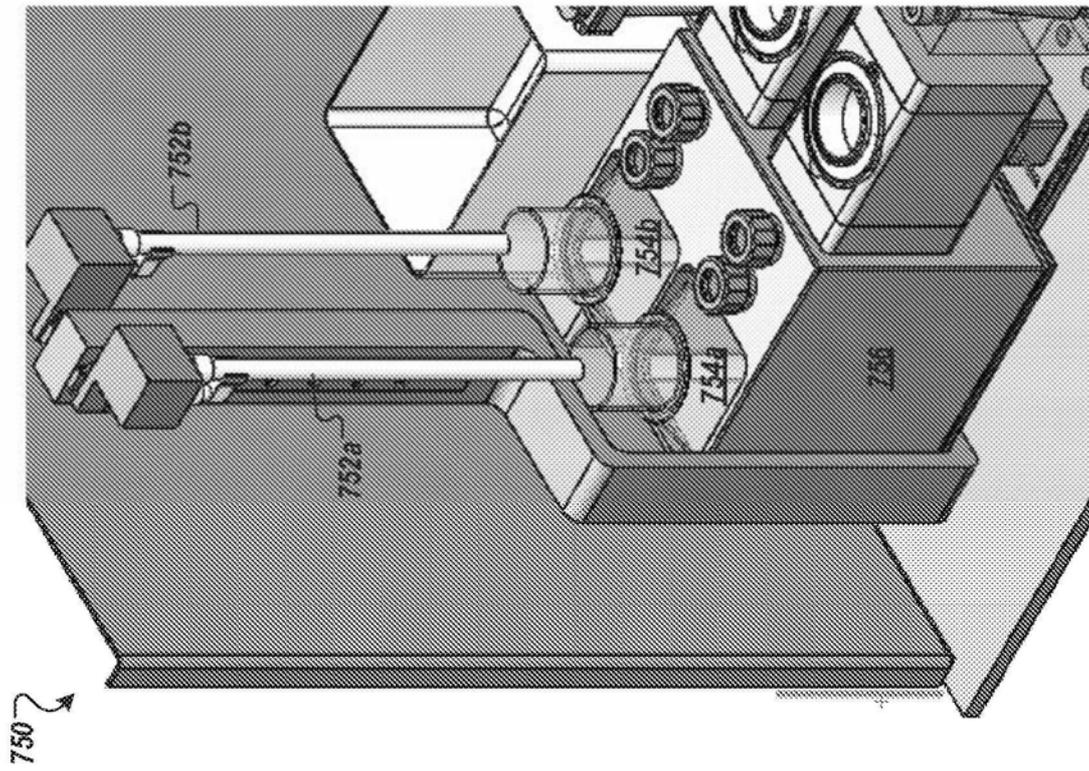


图7B

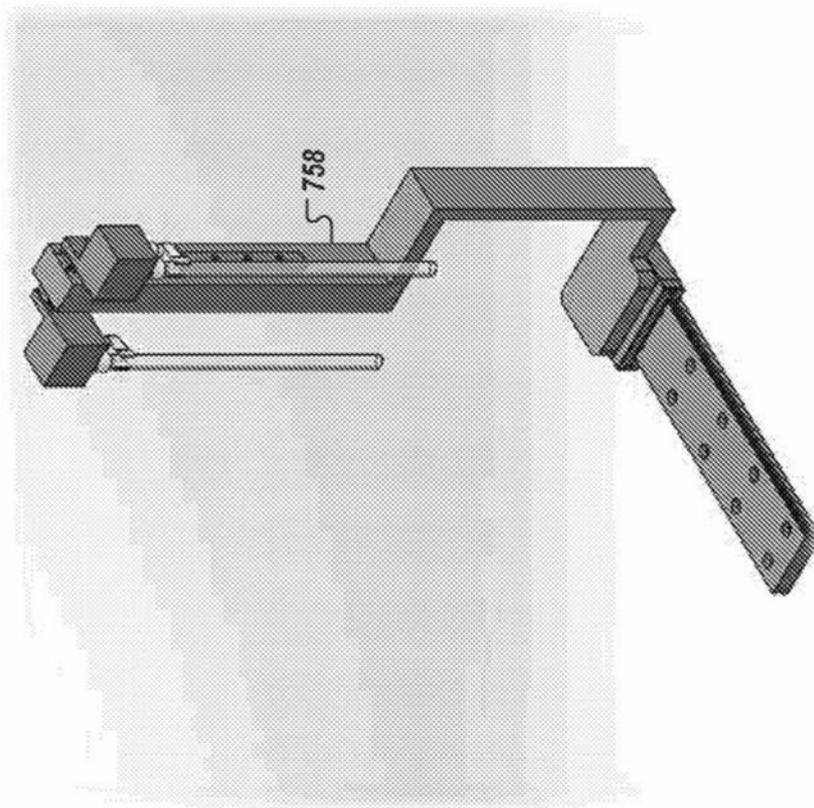
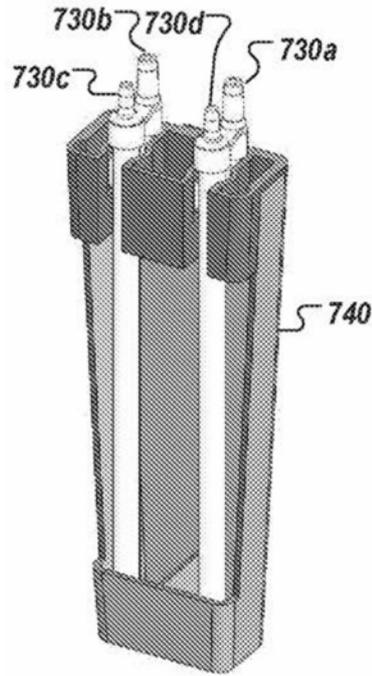


图7C



1.过滤器盒

图7D

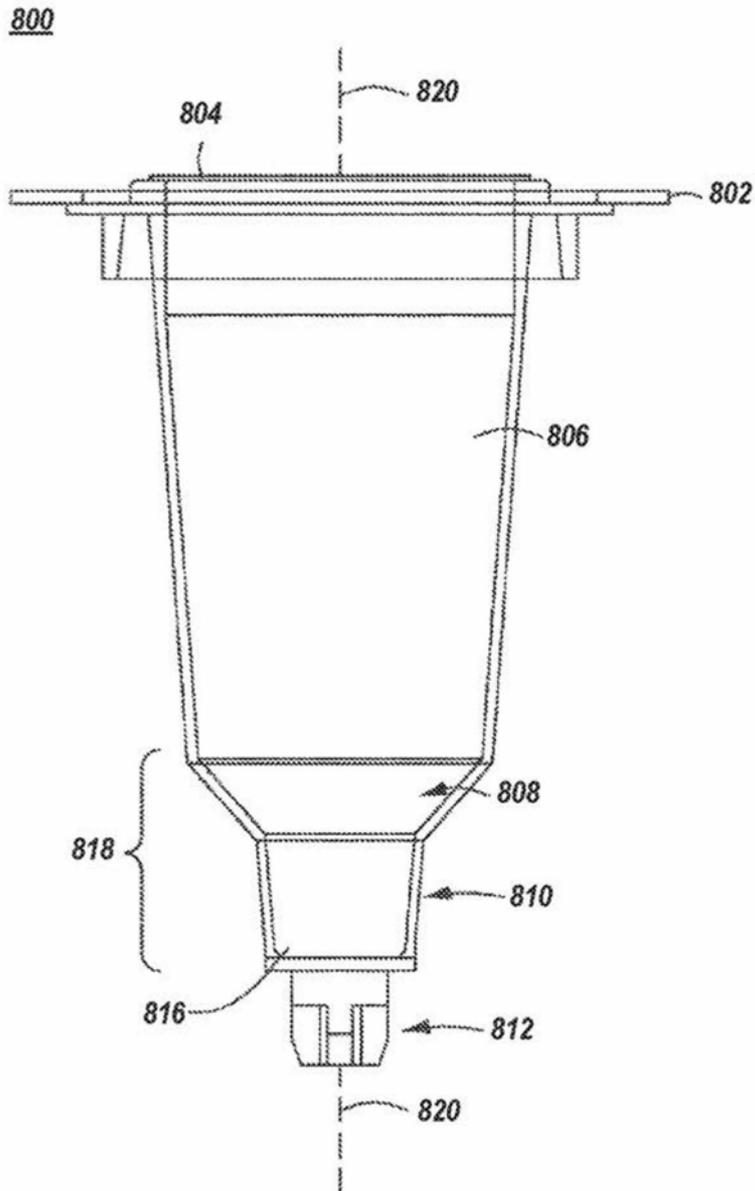


图8A

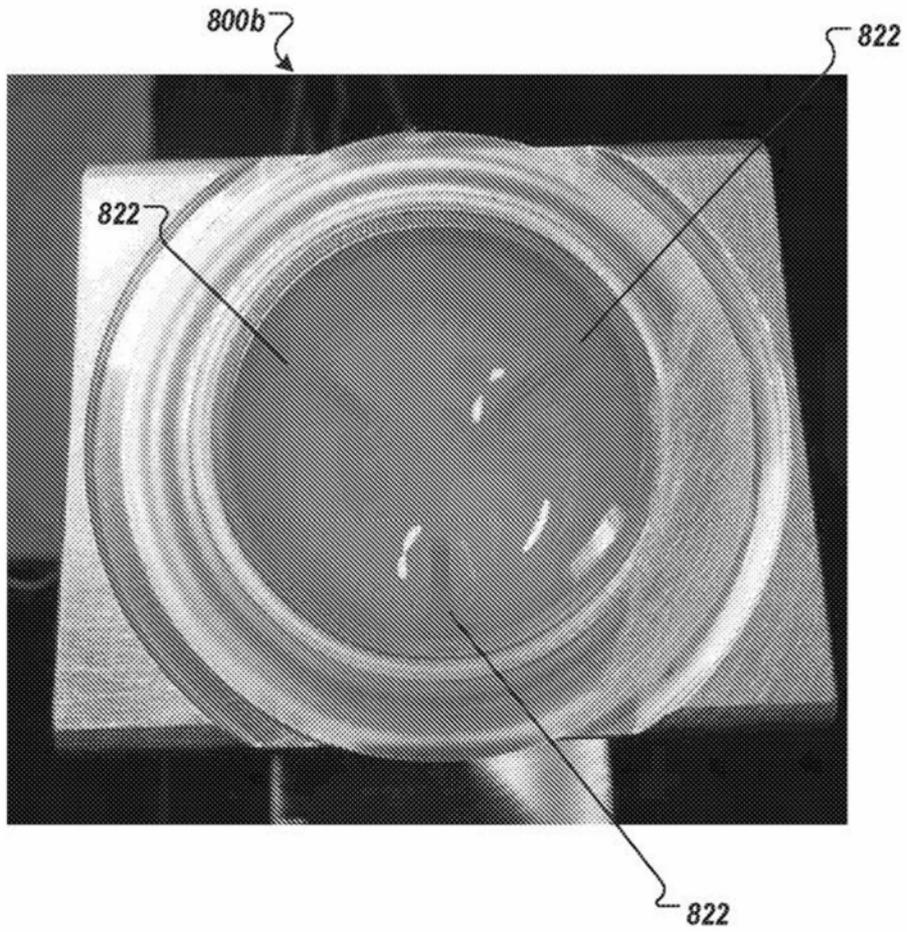


图8B

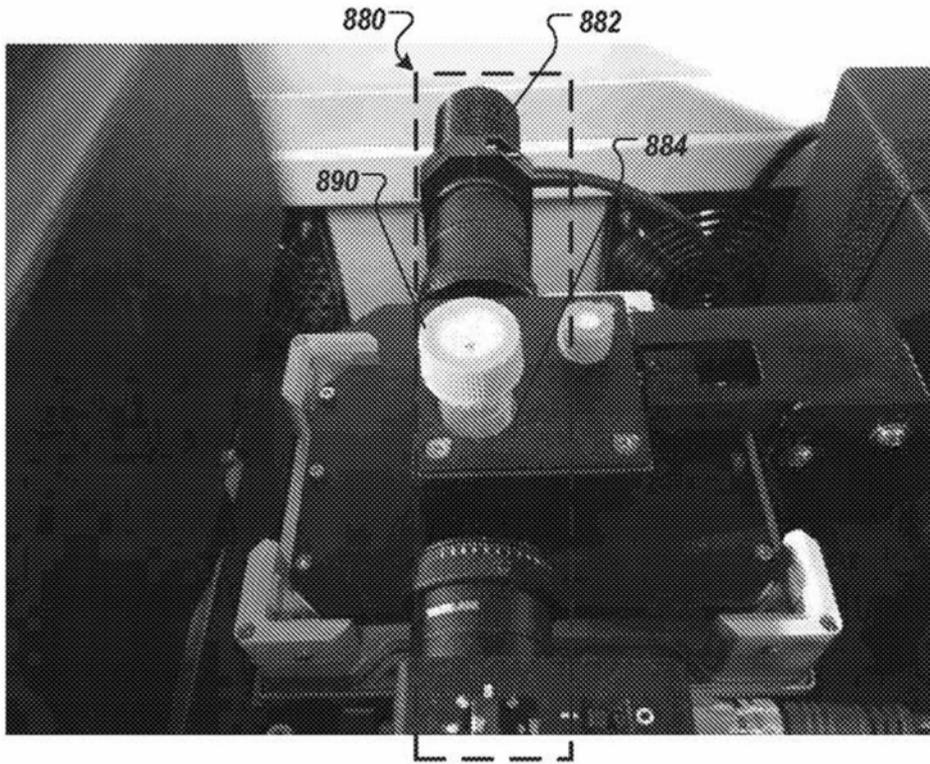


图8E

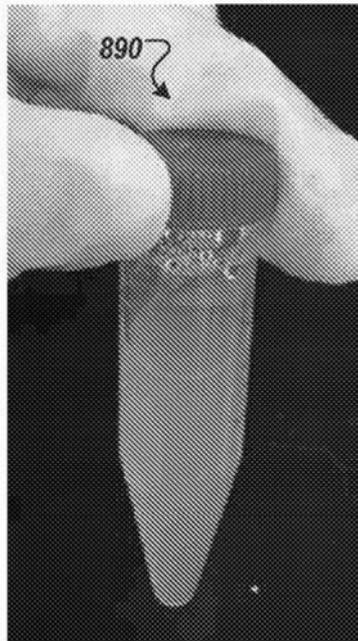


图8F

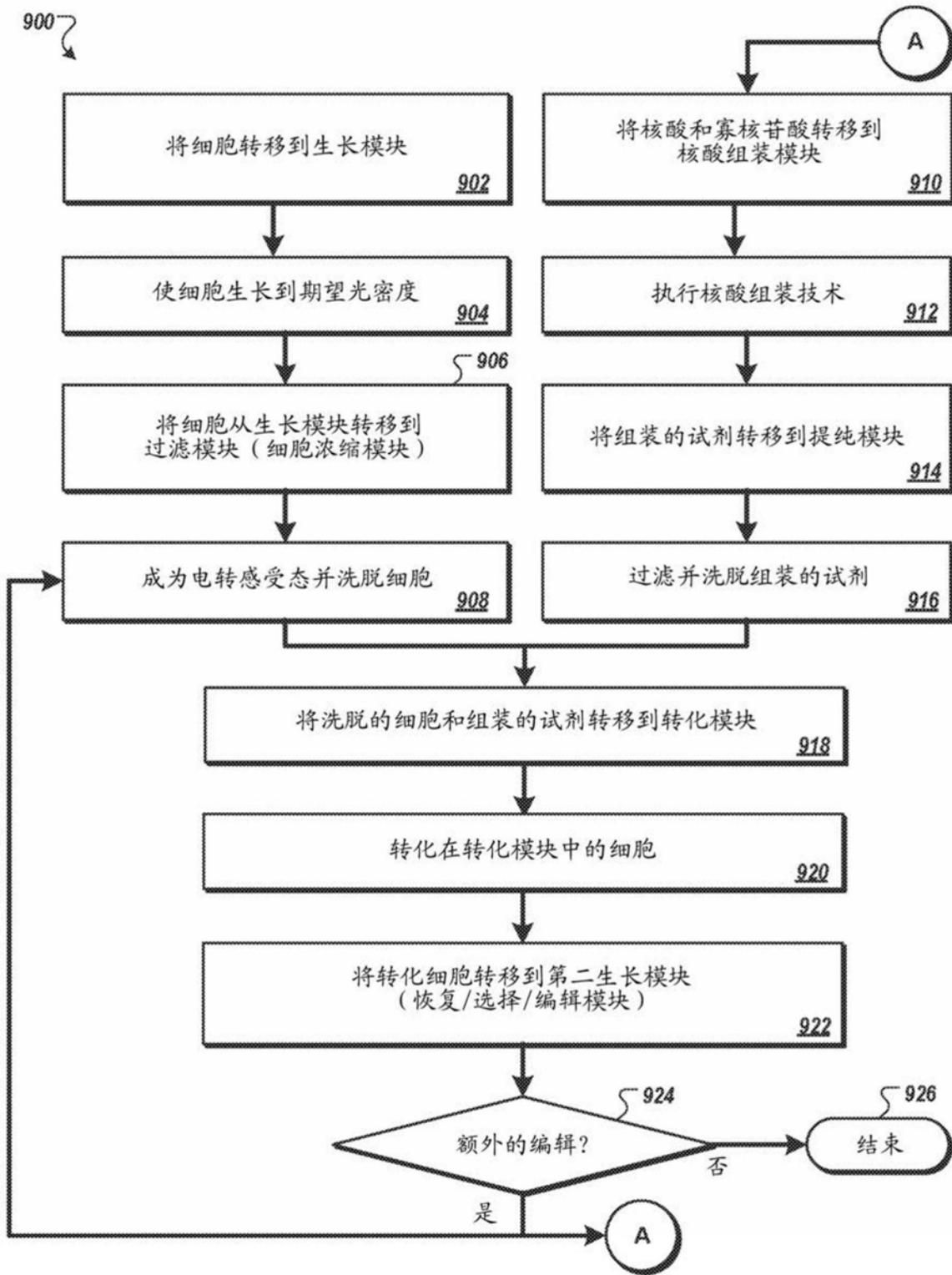


图9

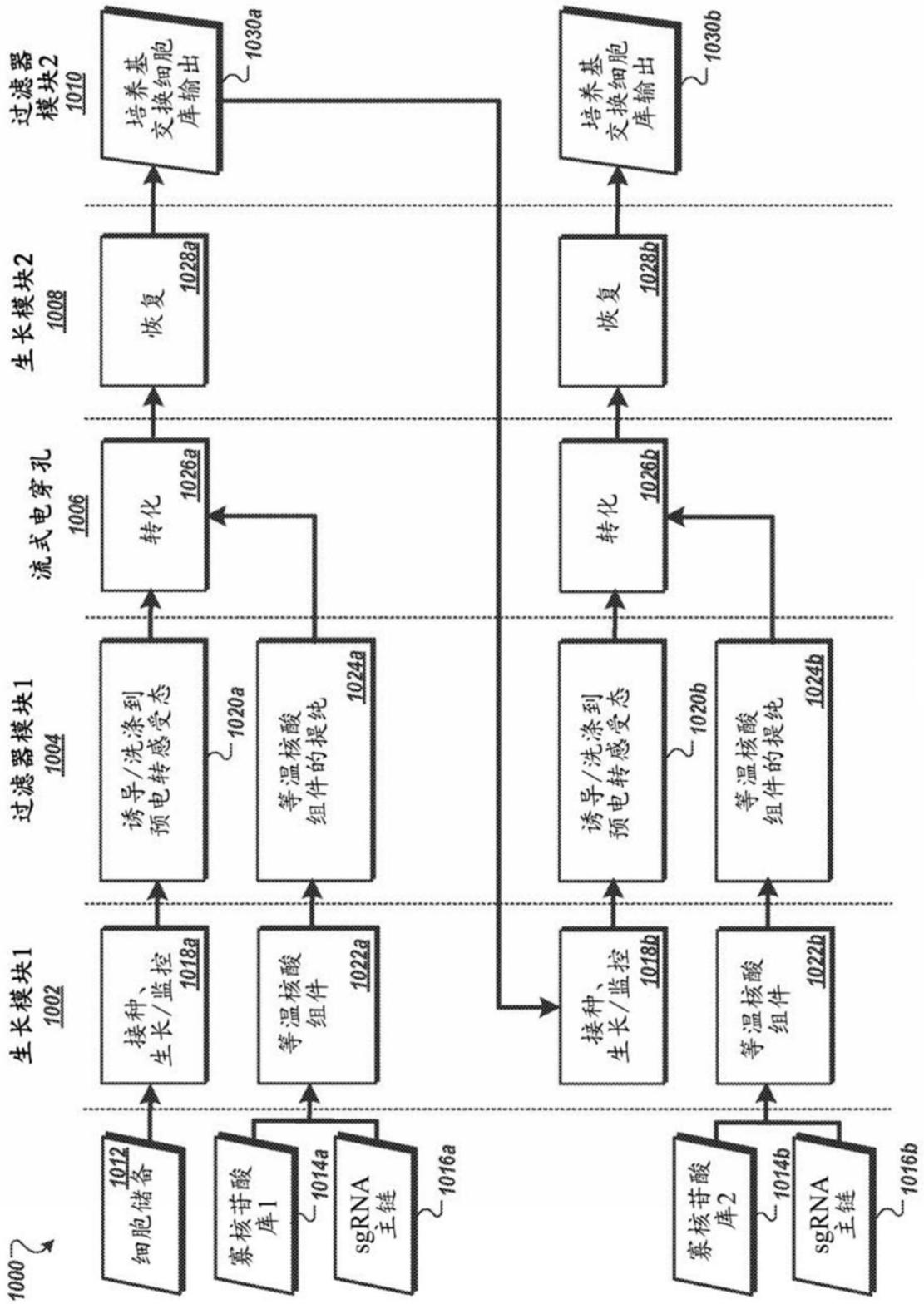


图10A

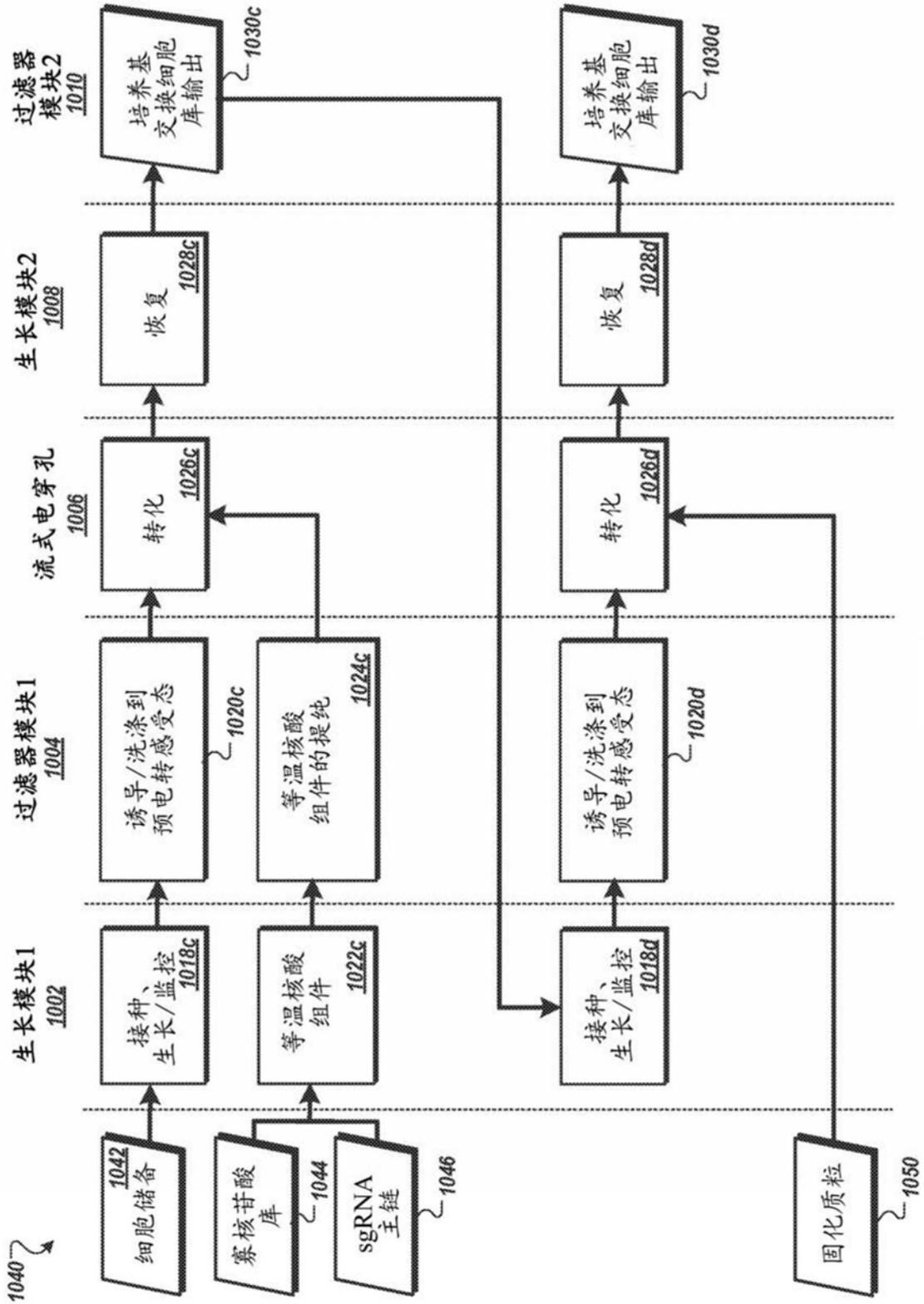


图10B

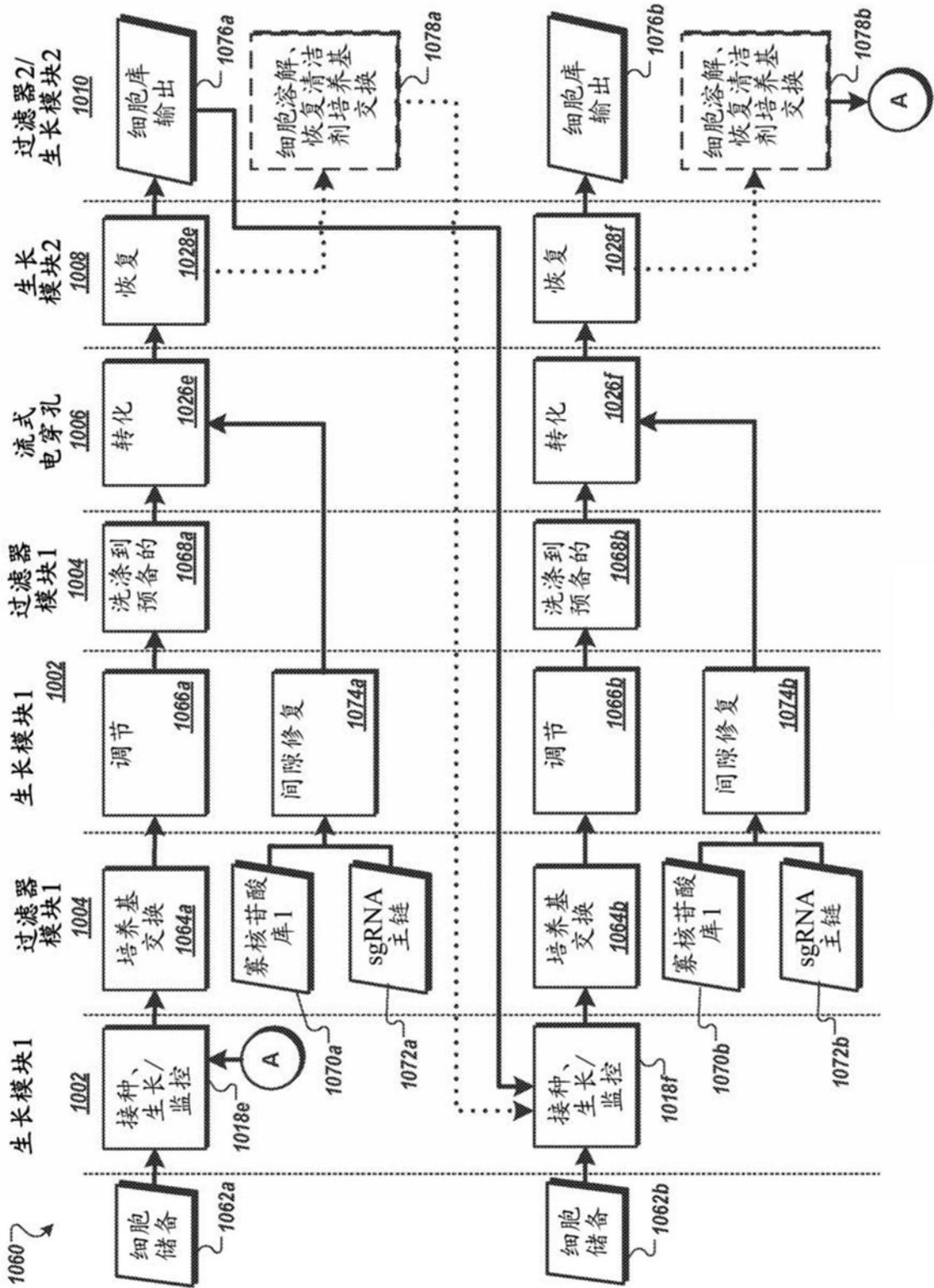


图10C

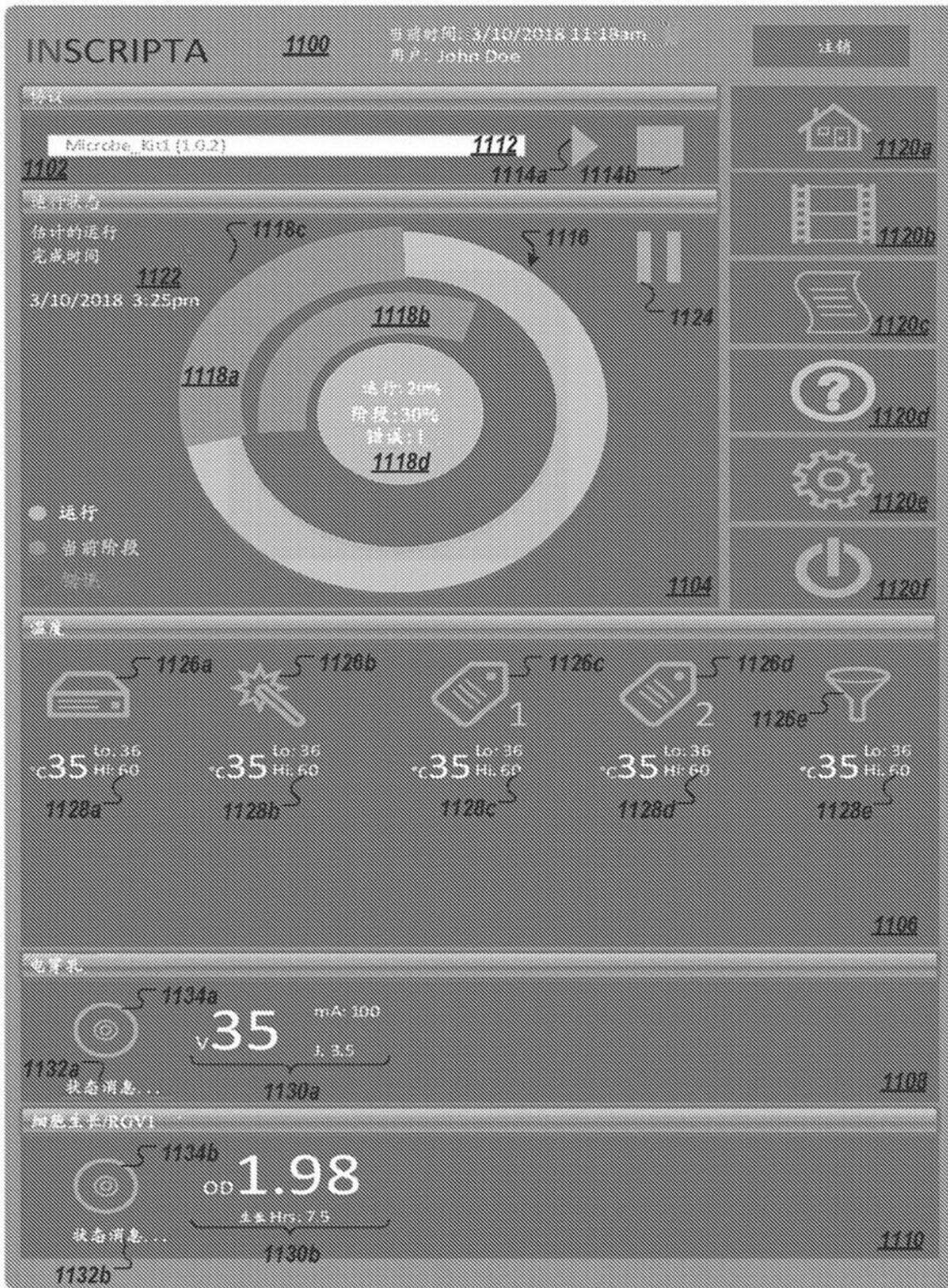


图11

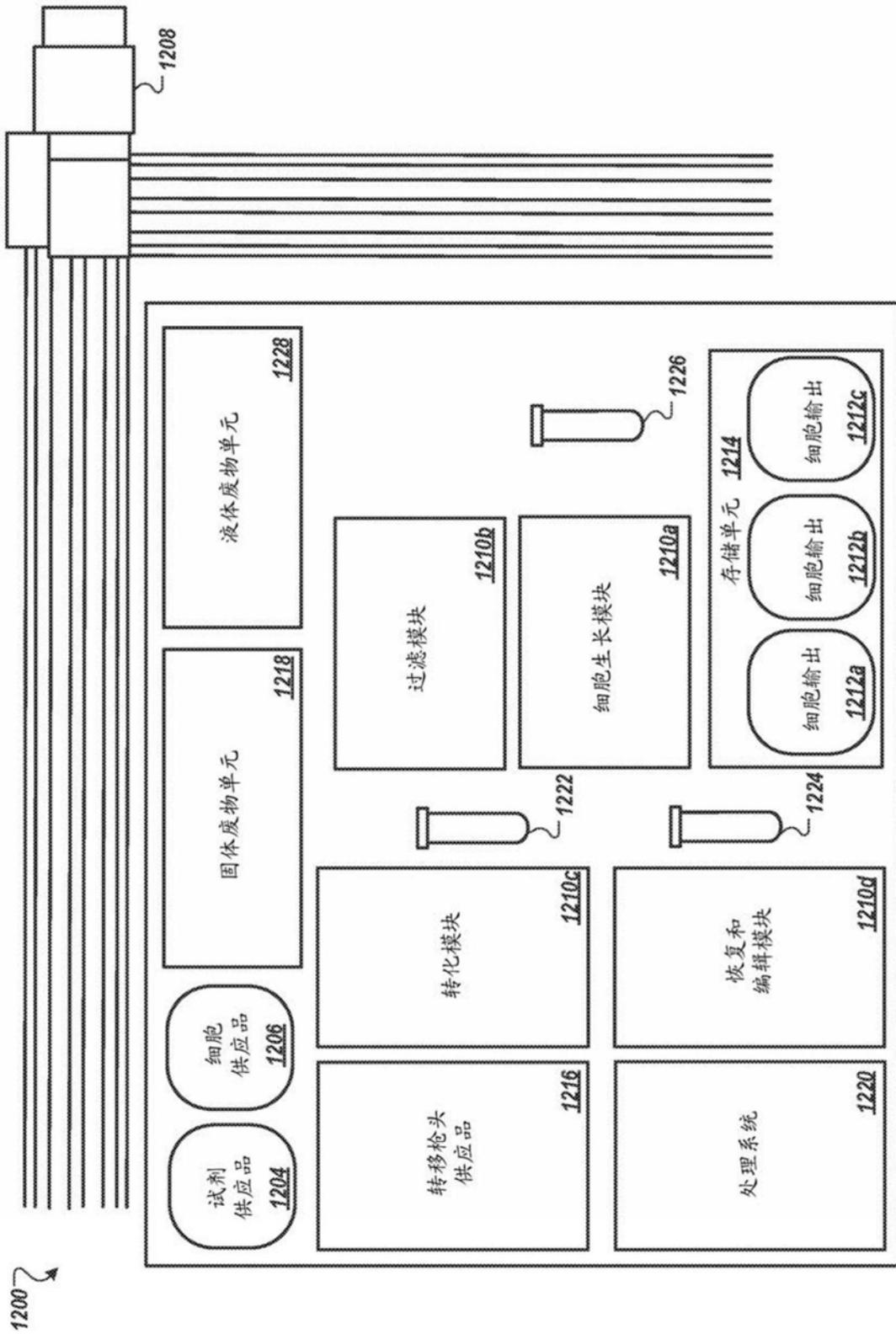


图12A

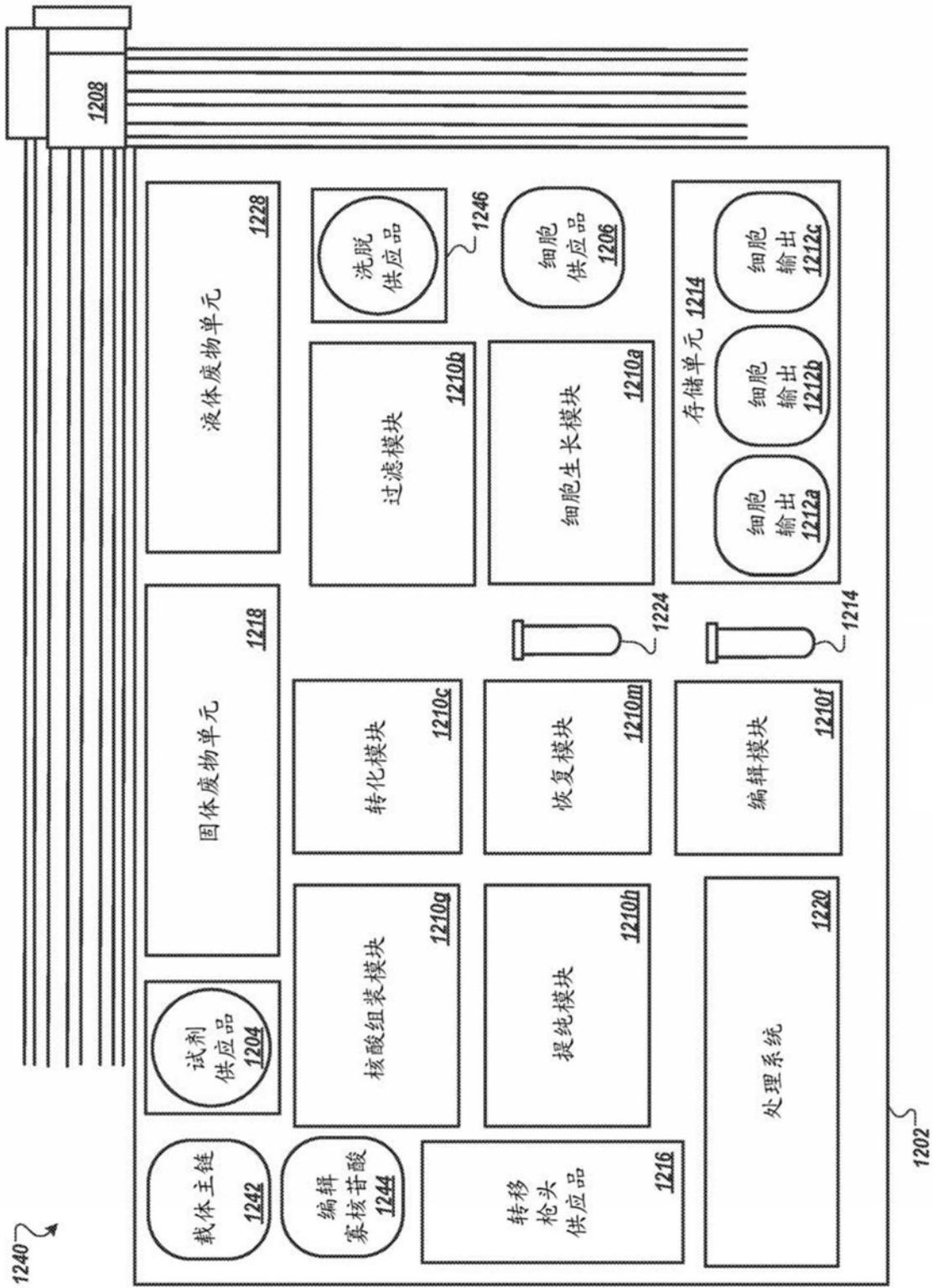


图12B

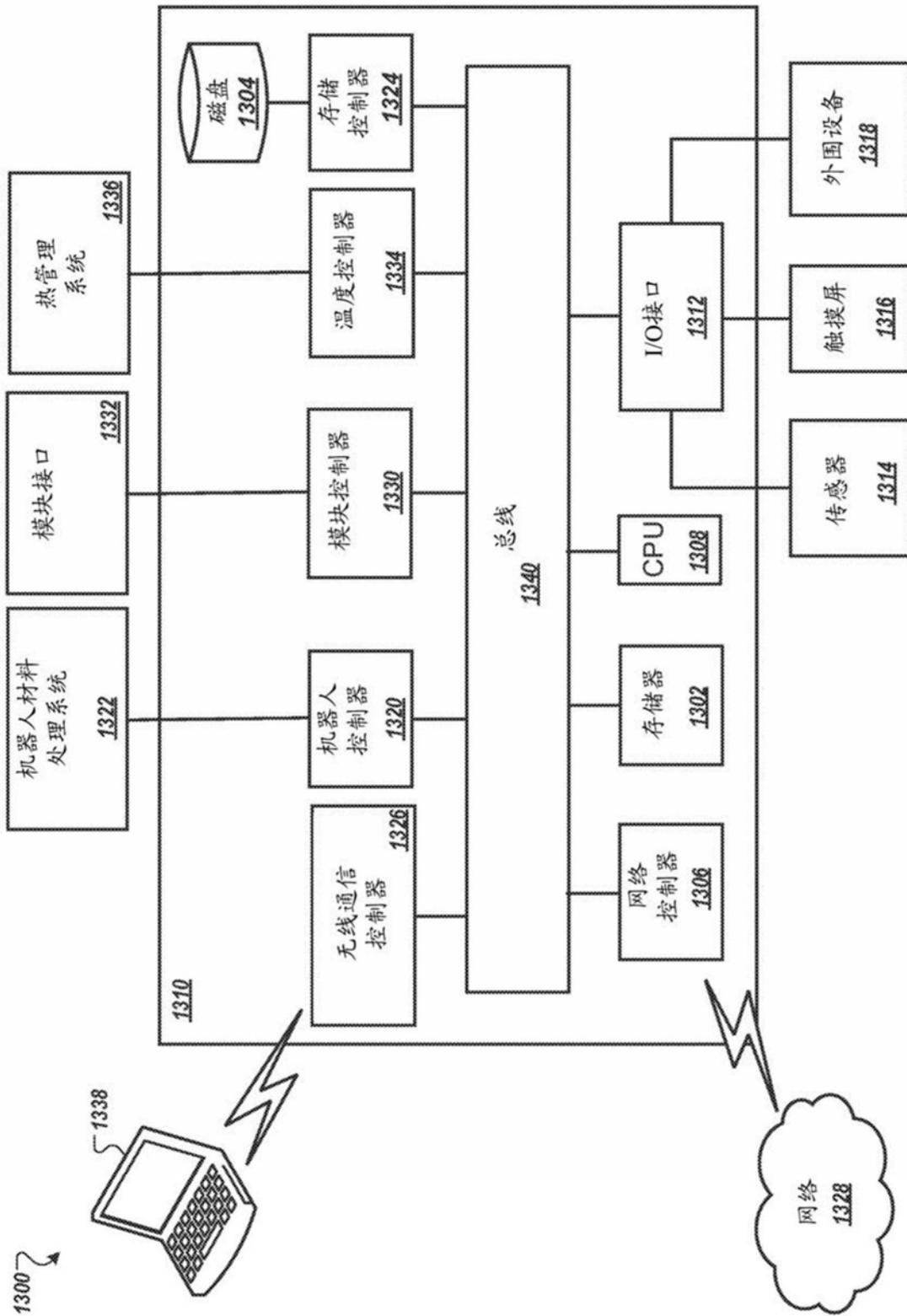


图13

1. 一种自动化多模块细胞编辑仪器,包括:
壳体,其被配置为容纳所述模块中的全部或一些;
容器,其被配置成接收细胞;
一个或多个容器,其被配置成接收核酸;
转化模块,其被配置为将所述核酸引入到所述细胞中;
恢复模块,其被配置为允许所述细胞在所述转化模块中的细胞转化之后恢复;
核酸酶导向编辑模块,其被配置为允许所引入的核酸编辑所述细胞中的核酸;以及
处理器,其被配置为基于用户输入和/或预先编程的脚本的选择来操作所述自动化多模块细胞编辑仪器;以及

自动化液体处理系统,其在没有用户干预的情况下将液体从所述生长模块、转化模块或核酸酶导向编辑模块中的一个直接移动到所述生长模块、转化模块或核酸酶导向编辑模块中的另一个。

2. 根据权利要求1所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,在所述一个或多个容器中的所述核酸包括主链和编辑盒,并且所述自动化多模块细胞编辑仪器还包括核酸组装模块。

3. 根据权利要求1所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述自动化液体处理系统包括吸管或移液枪。

4. 根据权利要求2所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述核酸组装模块被配置为执行等温核酸组装。

5. 根据权利要求1所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述编辑模块和所述恢复模块被组合成单个模块。

6. 根据权利要求1所述的自动化多模块细胞编辑仪器,还包括被配置成使所述细胞生长的生长模块。

7. 根据权利要求6所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述生长模块测量生长细胞的光密度。

8. 根据权利要求7所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述生长模块被配置为连续地测量生长细胞的光密度。

9. 根据权利要求6所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述处理器被配置为调节在所述生长模块中的生长条件,使得所述细胞在由用户请求的时间处达到目标光密度。

10. 根据权利要求1所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,被配置为接收细胞的所述容器和被配置为接收核酸的所述一个或多个容器被包含在试剂盒内。

11. 根据权利要求10所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,对于细胞编辑所需的一些或所有试剂由所述试剂盒接收。

12. 根据权利要求11所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,被包含在所述试剂盒内的所述试剂由所述处理器读取的脚本可定位。

13. 根据权利要求12所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述试剂盒包括试剂,并且在套件中被提供。

14. 根据权利要求1所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述转化模块包括电穿孔设备。

15. 根据权利要求14所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,所述电穿孔设备是流式电穿孔设备。

16. 根据权利要求1所述的自动化多模块细胞编辑仪器,还包括过滤模块,所述过滤模块被配置成浓缩所述细胞并使所述细胞成为电转感受态。

17. 一种自动化多模块细胞编辑仪器,包括:

壳体,其被配置为容纳所述模块中的一些或全部;

容器,其被配置成接收细胞;

至少一个容器,其被配置为接收核酸;

核酸组装模块,其被配置为组装载体主链和编辑盒,其中所述核酸组装模块被配置为接受并组装核酸以便于在所述细胞中的期望基因组编辑事件;

生长模块,其被配置为使所述细胞生长;

转化模块,其包括电穿孔仪以将组装的核酸引入到所述细胞内;

核酸酶导向编辑模块,其被配置为允许所述组装的核酸编辑所述细胞中的核酸;

自动化液体处理系统,其在没有用户干预的情况下将液体从所述核酸组装模块、转化模块或核酸酶导向编辑模块中的一个直接移动到所述核酸组装模块、转化模块或编辑模块中的另一个;以及

处理器,其被配置为基于用户输入和/或预先编程的脚本的选择来操作所述自动化多模块细胞编辑仪器。

18. 根据权利要求17所述的自动化多模块细胞编辑仪器,还包括包含试剂的至少一个试剂盒以在所述自动化多模块细胞编辑仪器中执行细胞编辑。

19. 根据权利要求18所述的自动化多模块细胞编辑仪器,其中,对于所述细胞和核酸的所述容器布置在所述试剂盒内。

20. 一种自动化多模块细胞编辑仪器,包括:

壳体,其被配置为容纳所述模块中的一些或全部;

容器,其被配置成接收细胞;

至少一个容器,其被配置为接收核酸;

核酸组装模块,其被配置为a) 组装主链和编辑盒,和b) 在组装之后使组装的核酸脱盐;

生长模块,其被配置为使所述细胞生长;

过滤模块,其被配置为浓缩所述细胞并使所述细胞成为电转感受态;

转化模块,其包括流式电穿孔仪以将所述组装的核酸引入到所述细胞内;

组合的恢复和核酸酶导向编辑模块,其被配置为允许所述细胞在所述转化模块中的电穿孔之后恢复,并允许所述核酸编辑所述细胞;

自动化液体处理系统,其在没有用户干预的情况下将液体从所述生长模块、过滤模块、转化模块或组合的恢复和核酸酶导向编辑模块中的一个直接移动到所述生长模块、过滤模块、转化模块或组合的恢复和核酸酶导向编辑模块中的另一个;以及

处理器,其被配置为基于用户输入来操作所述自动化多模块细胞编辑仪器。