



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201321512 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：100141978

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 17 日

(51)Int. Cl. : C12N5/00 (2006.01)

(71)申請人：國立交通大學(中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)
新竹市大學路 1001 號

(72)發明人：趙瑞益 CHAO, JUI I (TW)；連芷漪 LIEN, ZHI YI (TW)；黃國柱 HWANG, KUO CHU (TW)

(74)代理人：陳昭誠

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：12 項 圖式數：19 共 41 頁

(54)名稱

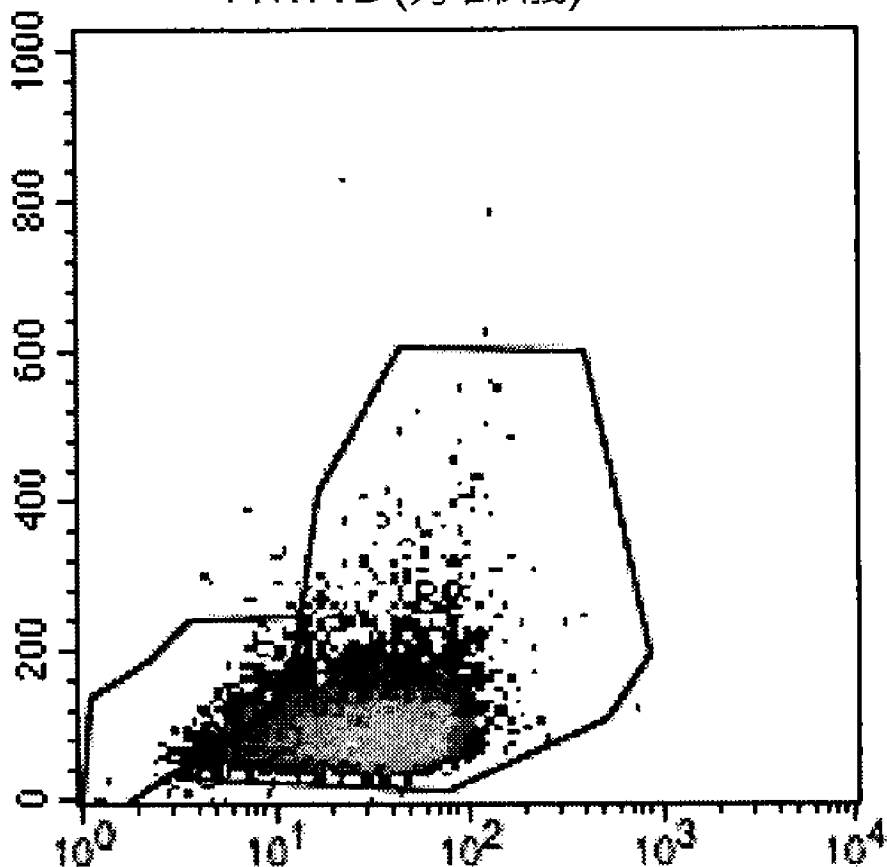
經標記細胞的分離方法及其用途

A SEPARATION METHOD OF THE LABELED CELLS AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明提供一種經標記的細胞的分離方法及其用途。更具體而言，本發明涉及一種使用螢光磁性奈米鑽石標記細胞的方法，並藉由該奈米鑽石的螢光或磁性分離該經該標記方法標記的細胞。

FMND(分篩儀)



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 100141978

※申請日： 100. 11. 17 ※IPC分類： C12N 5/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

經標記細胞的分離方法及其用途

A SEPARATION METHOD OF THE LABELED CELLS AND USES THEREOF

二、中文發明摘要：

本發明提供一種經標記的細胞的分離方法及其用途。更具體而言，本發明涉及一種使用螢光磁性奈米鑽石標記細胞的方法，並藉由該奈米鑽石的螢光或磁性分離該經該標記方法標記的細胞。

三、英文發明摘要：

This invention provides a separation method for the nanodiamond labeled cells and uses thereof. In particular, the present invention relates to a method for labeling cells using fluorescent magnetic nanodiamond, separation method for the labeled cells obtained by the method and uses thereof.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (9B) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

本案圖式為實驗數據圖，無代表圖。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

本案無化學式。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明有關於經標記細胞的分離方法及其用途。更具體而言，本發明涉及一種經螢光磁性奈米鑽石標記的細胞的分離方法以及其用途。

【先前技術】

近年來，已開發多種功能性奈米材料應用於生物醫學領域，例如奈米級微脂體攜帶藥物用於癌症治療(Batist G, et al, *J Clin Oncol*. 2001 Mar 1;19(5):1444-54; Chen Y, et al, *Mol Ther*. 2010 Apr;18(4):828-34);奈米級磁石結合螢光進行動態追蹤與細胞標記(Maxwell DJ, et al, *Stem Cells*. 2008 Feb;26(2):517-24; Ruan J, et al, *Nanoscale Res Lett*. 2011 Apr 6;6(1):299);奈米級量子點(quantum dots)與氧化矽結合應用於生物造影(Erogbogbo F, et al, *ACS Nano*. 2011 Jan 25;5(1):413-23);奈米級量子棒(quantum rods)與磷脂結合利用於腫瘤造影與追蹤(Yong KT, et al, *ACS Appl Mater Interfaces*. 2009 Mar; 1(3):710-9);以奈米碳管攜帶藥物用於癌症治療(Liu Z, et al, *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009; 48(41): 7668-72)等。

奈米材料在生物醫學領域應用上的限制包括難以在活體中追蹤奈米材料的定位與移動、量子棒等對生物具有毒性、以及奈米碳管(carbon nanotube)或富勒烯(fullerenes)等奈米等級碳系材料在生物相容性上仍有疑

慮。

作為上述奈米材料的替代品，奈米鑽石 (nanodiamond; ND) 因為其優異的生物相容性以及相較於其他奈米碳系材料的較低細胞氧化壓力誘發性 (即較低毒性)，成為應用於生物醫學領域的奈米材料。奈米鑽石已證實可應用於多種細胞株中，而不會引起顯著的細胞毒性 (Liu KK, et al, *Biophys J.* 2007 Sep 15; 93(6):2199-208; Yu SJ, et al, *J Am Chem Soc.* 2005 Dec 21; 127(50):17604-5; Vaijyanthimala V, et al, *Nanotechnology.* 2009 Oct 21; 20(42):425103; Huang H, et al, *Nano Lett.* 2007 Nov; 7(11):3305-14; Schrand AM, et al, *Nanoscale.* 2011 Feb; 3(2):435-45)。同時，奈米鑽石對於胚胎發育中的細胞分裂、細胞分化與型態變化等細胞功能，不會引起顯著的異常 (Liu KK, et al, *Biomaterials* 2009; 30(26):4249-59; Mohan N, et al, *Nano Lett.* 2010; 10(9):3692-3699)。

就生物醫學領域的應用而言，奈米鑽石因為其本身之生物相容性、電化學特性與光學特性，具有多種優勢。例如經由對於奈米鑽石的化學修飾或物理吸附，可對化學藥劑、生物分子或治療藥劑可提供便利的結合平台。表面經功能化的奈米鑽石可結合螢光分子 (Schrand AM, et al, *Nanoscale* 2010; 3(2):435-445; Chang IP, et al, *J Am Chem Soc* 2008; 130(46):15476-15481; Hens SC, et al, *Diamond Relat Mater* 2008; 17(11):1858-1866); 溶菌酶

(Chao JI, et al, Biophys J 2007; 93(6):2199-2208; Perevedentseva E, et al, Nanotechnology 2007;18(31):7); 生長荷爾蒙(Cheng CY, et al, Appl Phys Lett 2007; 90(16):3); DNA(Zhang XQ, et al, ACS Nano 2009; 3(9):2609-2616); 細胞色素 c (Huang LC, et al, Langmuir 2004; 20(14):5879-2884); 蛋白質(Hartl A, et al, Nat Mater 2004; 3(10):736-742); 抗癌劑(Huang H, et al, Nano Lett 2007; 7(11):3305-3314; Liu KK, et al, Nanotechnology 2010; 21(31):14); 抗原(Kossovsky N, et al, Bioconjugate Chem 1995; 6(5):507-511); 與聚乳酸(Zhang Q, et al, Biomaterials 2010; 32(1):87-94)。

奈米鑽石可發射明亮的螢光且無光漂白 (photobleaching)及光閃爍現象(Yu SJ, et al, J Am Chem Soc 2005; 127(50): 17604-17605; Chao JI, et al, Biophys J 2007; 93(6): 2199-2208)。以螢光分子化學性修飾或結合可對奈米鑽石導入螢光性質。經化學性修飾或結合的奈米鑽石包括醯胺化奈米鑽石(aminated-ND)、TAMRA-ND(醯胺化奈米鑽石結合反應性 N-羥基琥珀醯亞胺功能化四甲基若丹明)等。螢光奈米鑽石(fluorescent nanodiamond; FND)可經由合成的質子束去轟擊奈米鑽石的輻射線損傷，製造晶格缺陷，以及氮晶格空位中心為螢光分子而於遠紅光發射($\lambda_{em} \sim 600$ 至 800nm)。除了螢光性質之外，具有磁性性質的 ND 顆粒可利用於核磁共振成像(MRI)偵測。已有報導，石墨可於質子照射後導入鐵磁性

(Esquinazi P, et al, Phys Rev Lett 2003; 91(22):4)。同位素(^{15}N)與(^{12}C)離子植入(ion implantation)，可經由產生 sp^2/sp^3 缺陷而對 ND 顆粒產生磁性(Talapatra S, et al, Phys Rev Lett 2005; 95(9): 097201)。再者，磁性奈米顆粒可於礦物油與奈米鑽石的熱混合物中，經由含金屬化合物的熱破壞而固定於奈米鑽石的表面(Gubin SP, et al, Diamond Relat Mater 2007; 16(11):1924-1928)。

已有報導提出利用微波發弧(microwave-arcing)方法，將鐵奈米顆粒(二茂鐵(ferrocene))經由石墨烯層化學鍵結至奈米鑽石的表面，組成具有螢光與磁性之奈米鑽石，稱為螢光磁性奈米鑽石(fluorescent magnetic ND; FMND) (Chang IP, et al, J Am Chem Soc 2008; 130(46): 15476-18481)。也可以將磁性奈米鑽石(MND)經由聚丙烯酸的表面接枝進行化學性修飾，使螢光部分共價結合至表面，而使 MND 轉為 FMND。使用於 FMND 的螢光成分，稱為螢光素 0-甲基丙烯酸酯，在波長 488nm 發出明亮的綠色螢光，且在波長 510 至 530nm 收集該發射光。同時，FMND 已顯示可被取入 HeLa 細胞。

雖然已有提出胞飲的 ND 簇集在細胞分裂中可被分開而且最終仍於細胞中保留單一 ND 簇集的模式理論，但是目前沒有報導關於將經奈米鑽石標記的細胞予以分離的方法，以及該經標記的細胞有無存活與繼代的能力。

【發明內容】

本發明係針對上述問題提供一種經標記細胞的分離

方法及其用途。更具體而言，本發明涉及一種經螢光磁性奈米鑽石標記的細胞的分離方法以及其用途。

本發明之一態樣，提供一種經標記細胞的分離方法，該方法包含下述步驟：

提供螢光磁性奈米鑽石溶液；培養目標細胞；將該螢光磁性奈米鑽石溶液與該目標細胞共同培養，以令該螢光磁性奈米鑽石溶液中的螢光磁性奈米鑽石標記目標細胞；藉該經標記之目標細胞的螢光或磁性自該經共同培養的螢光磁性奈米鑽石溶液與該目標細胞中分離出經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。

進一步地，係藉經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記者之螢光強度的不同，分離出經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。於具體實施例中，係使用流式細胞儀分選出經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。

較佳地，於使用該流式細胞儀前，復包括清洗該經共同培養的螢光磁性奈米鑽石溶液與該目標細胞，以收集經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記的目標細胞；以及藉由離心處理，以集中經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記的目標細胞。

於另一實施例中，係使用磁性裝置分離出經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。較佳地，於使用該磁性裝置前，復包括清洗該經共同培養的螢光磁性奈米鑽石溶液與該目標細胞，以收集經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記的目標細胞；藉由離心處理，以集中經該螢光

磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記的目標細胞；以及將該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記的目標細胞懸浮於具有緩衝溶液的容器中，俾該磁性裝置將該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞吸附至該容器的管壁。

本發明之分離方法復可包括冷凍保存經分選之經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。

本發明之又一態樣，提供一種經分離的細胞，該細胞係根據本發明的分離方法予以分離者。

進一步地，該經標記及分離的細胞係利用於細胞的標定、檢測、細胞的造影或追蹤、生物分子活性的分析及藥物活性的篩選。

進一步地，該細胞為動物細胞。該動物細胞包括癌細胞與幹細胞。

本發明使用螢光磁性奈米鑽石標記細胞，並藉由該螢光磁性奈米鑽石的螢光或磁性分離該經該標記方法標記的細胞，所得之經標記的細胞能繼續存活，且可被儲存和再培養，適用於細胞的標定、檢測、細胞的造影或追蹤、生物活性的分析及藥物活性的篩選等應用。

【實施方式】

本發明將以下列實施例進一步具體說明，惟該等實施例之揭示不應視為任何限制本發明之意圖。

螢光磁性奈米鑽石(FMND)的製備

螢光磁性奈米鑽石(FMND)的製備係根據已公開之製

造方法製備(Chang IP, et al, J Am Chem Soc 2008; 130(46): 15476-18481)。具體地，經由微波-發弧方法製得由精純的奈米鑽石與鐵奈米顆粒(二茂鐵)所組成的磁性奈米鑽石(MND)。該等二茂鐵顆粒與奈米鑽石利用石墨烯層化學性的結合而形成MND。為了對MND導入螢光性質，將MND經由表面共價接枝聚丙烯酸與螢光素0-甲基丙烯酸酯，僵MND轉為FMND。以FMND處理細胞之前，係將FMND顆粒溶解於蒸餾去離子水(DDW)或磷酸緩衝溶液(PBS)中。

動態光散射(Dynamic Light Scattering, DLS)分析

為了測定溶解於DDW與PBS中之FMND的尺寸分布，製備濃度為0.5mg/ml的FMND於DDW或PBS中之溶液，將所製備的溶液以動態光散射(BI-200SM, Brookhaven Instruments Co., Holtsville, NY)進行分析。在一具體懸浮液中，當雷射光束撞擊顆粒時，顆粒會散射某些雷射光。測得之數據以BIC動態光散射軟體(Brookhaven Instruments Co.)進行分析。散射光經時變化且藉由散射光的變異計算出平均顆粒尺寸。

細胞培養

HFL-1(ATCC #CCL-153)為衍生自高加索白種人胎兒的正常肺纖維母細胞。HFL-1細胞維持於DMEM培養基(Invitrogen Co., Carlsbad, CA)。A549肺上皮細胞株(ATCC #CCL-185)為衍生自高加索白種人男性的肺腺癌。

A549 細胞係培養於 RPMI-1640 培養基(Invitrogen)。完全培養基含有 10%胎牛血清(FBS)、100unit/ml 盤尼希林與 100g/ml 鏈酶素。細胞係培養於 37°C 與 5%CO₂之潮濕培養箱(310/Thermo, Forma Scientific, Inc., Marietta, OH)。

MTT 分析

將細胞以 1×10^4 細胞/孔的密度接種於 96-孔盤維持 16 至 20 小時。接著以含有或不含有 FMND 的完全培養基處理細胞 24 小時。之後，更換培養基且將細胞與 0.5mg/ml 的 3-(4,5-二甲基-噻唑-2 基)-2,5-二苯基四唑鎢溴鹽 (MTT)(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)於完全培養基中培養 4 小時。存活的細胞將 MTT 轉化為甲簪(formazan)，於溶解於二甲基亞砷時產生藍紫色。於酵素連結免疫吸附分析中使用讀盤儀(VERSAmax, Molecular Dynamic Inc., CA)於 565nm 測定甲簪強度。細胞存活力係將經 FMND 處理的細胞的吸收值除以未經 FMND 處理的細胞的吸收值相除而求出。

細胞生長分析

A549 細胞以 1×10^6 細胞/10mm 培養皿的密度接種於完全培養基中培養 24 小時。然後將細胞以含有或不含有 FMND 的培養基處理 24 小時。然後將經或未經 FMND 處理的細胞以新鮮培養基再度培養至 10 日且每 2 日計算總細胞數。

FMND 的細胞螢光強度、顆粒複雜性與顆粒尺寸分布

細胞以 7×10^5 細胞/60-mm 培養皿的密度接種於完全培養基中培養 16 至 20 小時。然後將細胞以含有或不含有 10 至 $100 \mu\text{g/ml}$ 的 FMND 的培養基處理 0.5 至 24 小時後，細胞以 PBS 清洗 2 次。經清洗的細胞以胰蛋白酶處理 (trypsinized) 後以 1500rpm 離心 5 分鐘收集細胞小粒 (cell pellet)。將細胞小粒再懸浮於 PBS 中。為了避免凝集，將細胞懸浮液經尼龍篩網膜過濾。最後，樣品以流式細胞儀 (FACSCalibur, Becton-Dickinson, San Jose, CA) 分析。至少分析 10,000 個細胞。FMND 的螢光於波長 488nm 激發且發射光收集於綠色光信號範圍。螢光強度、顆粒複雜性與細胞尺寸係由至少 10,000 個細胞藉由 CellQuest 軟體 (BD Biosciences) 分析。

免疫螢光染色與共軛焦顯微鏡技術

細胞培養於蓋玻片 (cover slip) 且於處理前於 35-mm 培養品維持 16 至 20 小時。經或未經 FMND 處理後，細胞以等張 PBS (pH 7.4) 清洗後，以 4% 三聚甲醛於 PBS 的溶液於 37°C 固定 1 小時。之後，該蓋玻片以 PBS 清洗 3 次且以含有 10% FBS、0.3% Triton X-100 的 PBS 阻斷非特異性的結合位點 1 小時。 β -tubulin 與核分別以抗 β -tubulin Cy3 (1:100) 與 Hoechst 33258 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 於 37°C 染色 30 分鐘。之後，樣品以配備有 UV 雷射 (405nm)、Ar 雷射 (488nm) 與 HeNe 雷射 (543nm) 的

OLYMPUS 共軛焦顯微鏡(FV500, OLYMPUS, Japan)鏡檢。

藉由流式細胞儀分離攜帶 FMND 的細胞

細胞以 2×10^6 細胞/100-mm 培養皿的密度於完全培養基中培養 24 小時。以 $50 \mu\text{g/ml}$ 的 FMND 處理 24 小時後，細胞以 PBS 清洗 2 次。經清洗的細胞(包括經該螢光磁性奈米鑽石標記的 A549 細胞與未標記的 A549 細胞)以胰蛋白酶處理(trypsinized)後以 1500rpm 離心 5 分鐘收集細胞小粒(cell pellet)。將細胞小粒再懸浮於 1 至 2ml 的冰冷分篩緩衝液中，該緩衝液為於 PBS 中含有 1mMEDTA、25mM HEPES 與 2%FBS。為了避免凝集，將細胞懸浮液經尼龍篩網膜過濾。螢光活化細胞分篩分析係以 FACSCalibur 分篩儀(Becton-Dickinson)進行。攜帶 FMND 的細胞於流式細胞儀中顯現綠色螢光強度，且經選擇予以分離。經分離的細胞收集於管壁塗布有 10%FBS 且內含 15 至 20ml 完全培養基的 50ml 離心管中。分離後，將細胞懸浮液於 1000rpm 離心 10 分鐘。然後將細胞小粒再度懸浮於完全培養基中。最後將細胞培養於 37°C 與 5% CO_2 之潮濕培養箱或添加 10%DMSO 保存於液態氮中。

藉由磁性裝置分離攜帶 FMND 的細胞

細胞以 2×10^6 細胞/100-mm 培養皿的密度於完全培養基中培養 24 小時。以 $50 \mu\text{g/ml}$ 的 FMND 處理 24 小時後，細胞以 PBS 清洗 2 次。經清洗的細胞(包括經該螢光磁性奈

米鑽石標記的 A549 細胞與未標記的 A549 細胞)以胰蛋白酶處理(trypsinized)後以 1500rpm 離心 5 分鐘收集細胞小粒(cell pellet)。將細胞小粒再懸浮於 1ml 的 PBS 中，且轉移至 1.5ml 的 eppendorf 小管中。將該 eppendorf 小管置於磁架(magnetic rack)(Magna GrIP Rack, Millipore, Bedford, MA)至少 3 分鐘直到細胞小粒吸附至管壁。然後移除該懸浮液且將細胞小粒溶解於完全培養基。於 eppendorf 小管中之細胞懸浮液重複 5 次放置於磁架。最後將攜帶 FMND 的細胞培養於 37°C 與 5%CO₂ 之潮濕培養箱或添加 10%DMSO 保存於液態氮中。

電泳分析

為了比較親代細胞與攜帶 FMND 的細胞之間的總蛋白質分佈曲線，將細胞進行鈉十二烷基的硫酸鹽聚丙烯醯胺凝膠電泳法(SDS-PAGE)分析。經分離的攜帶 FMND 的細胞於含有 0.5mMDTT、0.2mMEDTA、20mM HEPES、2.5mMMgCl₂、75mM NaCl、0.1mMNa₃VO₄、50mMNaF、0.1%Triton X-100 的冰冷細胞萃取緩衝液(pH7.6)中分解。對細胞懸浮液添加包括 1 μg/ml aprotinin、0.5 μg/ml leupeptin 與 100 μg/ml 4-(2-氨基乙基)苯磺醯基氟化物的蛋白酶抑制劑。細胞萃取物於 4°C 迴轉 30 分鐘。離心後，棄置小粒且上清液蛋白質濃度以 BCA 蛋白質套組(Pierce, Rockford, IL)測定。以 12%SDS-PAGE 對等量的蛋白質(40 μg/孔)進行電泳。電泳後，膠片以考馬斯藍(coomassie blue)緩衝液(0.1%

coomassie blue、10%乙酸與 45%甲醇)染色 1 小時。

統計分析

數據係以 Student's test 分析，且 p 值 <0.05 認定為統計上顯著。

結果

FMND 在蒸餾去離子水中與磷酸緩衝溶液中的尺寸分布

為了比較 FMND 的尺寸分布，於 DDW 或 PBS 中所製備之 0.5mg/ml 的 FMND 溶液，藉由 DLS 進行分析。如第 1 圖所示，粗線顯示 FMND 溶解於 DDW。FMND 於 DDW 的第 1 峰係由 137.24 至 176.71nm，且第二峰係由 805.18 至 1127.86nm。FMND 於 DDW 中的平均顆粒尺寸為 277.7nm。細線顯示 FMND 溶解於 PBS。FMND 於 PBS 的第 1 峰係由 95.22 至 116.34nm，且第 2 峰係由 272.58 至 333.04nm。FMND 於 PBS 的平均顆粒尺寸為 131.7nm。

FMND 在 HFL-1 正常肺纖維母細胞與 A549 肺癌細胞中不誘發細胞毒性

為了測定以 FMND 處理人類肺細胞後的細胞毒性，使用 HFL-1 正常纖維母細胞與 A549 人類肺癌細胞。於經 FMND 處理後進行 MTT 分析。如第 2 圖所示，HFL-1 經 FMND 處理(0.1 至 100 $\mu\text{g/ml}$ ，24 小時)的細胞未顯著降低細胞存活力。如第 3 圖所示，FMND 顆粒於 A549 細胞中也未誘發細

胞毒性。

FMND 在肺癌細胞中不改變細胞生長能力

A549 細胞以 $50 \mu\text{g/ml}$ 的 FMND 處理 24 小時後，再度培養至 10 日。每 2 日計算與分析總細胞數目。第 4 圖顯示 FMND 顆粒未改變 A549 細胞的細胞生長能力。

FMND 在肺癌細胞中被取入的能力

為了檢測 FMND 於 A549 細胞中被取入的能力，將細胞以 FMND 處理 ($50 \mu\text{g/ml}$ 的 FMND, 24 小時) 且以共軛焦顯微鏡鏡檢。FMND 顆粒在 A549 細胞中顯現綠色螢光於波長 488nm ，且於範圍 510 至 530nm 收集發射。 β -tubulin 蛋白質的細胞骨架以 Cy3-標記的小鼠抗- β -tubulin 染色。紅色螢光(Cy3)顯示 β -tubulin 存在於 A549 細胞中。核以 Hoechst 33258 染色而呈現藍色。如第 5 圖所示，自差異干擾之影像(differential interference contrast, DIC)觀察 FMND 溶解於不同的溶液並不影響於 A549 細胞中的取入能力。

藉由流式細胞儀偵測具有 FMND 的 A549 肺癌細胞

FMND 於 A549 細胞中的螢光強度係藉由流式細胞儀測定。A549 細胞以 FMND 處理 (10 至 $100 \mu\text{g/ml}$, 24 小時) 後，以流式細胞儀分析。第 6 圖以定量的數據顯示 FMND 處理顯著地增加 FMND 於 A549 細胞中的螢光強度。A549 細胞中

FMND 的顆粒複雜性，係藉由 SSC-H(側向散射光)以流式細胞儀檢測。第 7 圖顯示 FMND 處理(10 至 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，24 小時)的定量數據，其中，顯示 FMND 處理顯著地增加 FMND 於 A549 細胞中的顆粒複雜性。然而，FMND 並未改變 FSC-H 於 A549 細胞中的細胞尺寸分布(第 8 圖)。

藉由流式細胞儀與磁性裝置分離攜帶 FMND 的細胞

FMND 的螢光與磁性性質，提供分別藉由具有分篩儀之流式細胞儀之 FACS-純化功能與磁性裝而分離攜帶 ND 的細胞。為了分離攜帶 ND 的細胞，A549 細胞以 FMND 處理(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，24 小時)且以具有分篩儀之流式細胞儀收集。第 9A 圖係說明分篩儀之 R1 閘(對照，綠色螢光-陰性)顯示親代細胞的區域。第 9B 圖係說明 R2 閘顯示綠色螢光性質的攜帶 FMND 的細胞(螢光活化)的區域。於 R2 區域的攜帶 FMND 的細胞係藉由具有分篩儀之流式細胞儀收集。

藉由流式細胞儀分離的攜帶 FMND 的細胞的分析

分離後，攜帶 FMND 的細胞立即於螢光與相對比顯微鏡之活細胞造影系統中檢測。與親代細胞相比較，經分離的攜帶 FMND 的細胞於螢光顯微鏡下顯著地顯現螢光(第 10 圖)。再者，將攜帶 FMND 的細胞再度培養 24 小時。於相對比顯微鏡下鏡檢細胞形態學與存活力(第 11 圖)。攜帶 FMND 的細胞之細胞形態、存活力與生長能力，與親代細胞類似(第 11 圖)。其次，藉由 SDS-PAGE 分析檢測攜帶 FMND 的細

胞與親代細胞的總蛋白質表現曲線。在親代細胞與攜帶 FMND 的細胞之間，蛋白質表現圖形沒有顯著改變(第 12 圖)。此外，攜帶 FMND 的細胞中之綠色螢光強度可於再度培養 24 小時後藉由流式細胞儀偵測(第 13 圖)。

藉由磁性裝置分離的攜帶 FMND 的細胞的分析

A549 細胞以 $50 \mu\text{g/ml}$ 的 FMND 處理或未處理 24 小時。攜帶 FMND 的細胞係藉由上文所揭示之磁性裝置分離。不同繼代之攜帶 FMND 的細胞之細胞形態、存活力與生長能力與親代細胞類似(第 14 圖)。此外，攜帶 FMND 的細胞的蛋白質表現圖形於 SDS-PAGE 分析中沒有改變(第 15 圖)。再者，攜帶 FMND 的細胞仍帶有 FMND 的螢光強度，且可藉由流式細胞儀(第 16 圖)與共軛焦顯微鏡(第 17 圖)偵測。

冷凍保存、再溶解與繼代分析

繼代之攜帶 FMND 的細胞的分離比率係將分離之攜帶 FMND 的細胞數目除以分離前的細胞總數目而求出。第 1 繼代的分離比率平均為 75.89%且第 4 繼代得分離比率平均為 60%(第 18 圖)。將第 1 繼代之攜帶 FMND 的細胞珠保存於液態氮中。將攜帶 FMND 的細胞再溶解後，細胞形態與存活力仍與親代細胞類似(第 19 圖)。第 19 圖中之箭號顯示正進行細胞分裂之圓形細胞。

產業上可利用性

根據本發明提供一種利用螢光磁性奈米鑽石標記細胞的方法，且可利用所標記之螢光性質與磁性性質分離經標記的細胞。根據本發明的方法所標記或分離的細胞於繼代培養或冷凍保存後，仍與親代細胞具有類似的細胞形態、存活力與生長能力。本發明所提供之方法，有用於生物醫學領域中之細胞的標定、檢測、細胞的造影或追蹤、生物分子活性的分析及藥物篩選等。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為 FMND 於 DDW 與 PBS 之尺寸分布圖；

第 2 圖為 FMND 對於 HFL-1 正常肺纖維母細胞之細胞存活力的效果圖；

第 3 圖為 FMND 對於 A549 肺癌細胞之細胞存活力的效果圖；

第 4 圖為 FMND 對於 A549 肺癌細胞之細胞生長能力的效果圖；

第 5 圖為藉由雷射掃描共軛焦顯微鏡於 A549 細胞中之 FMND 的偵測；

第 6 圖為 FMND 於 A549 細胞中之螢光強度圖；

第 7 圖為 FMND 於 A549 細胞中之顆粒複雜性圖；

第 8 圖為 A549 細胞以不同濃度之 FMND 顆粒處理後之細胞尺寸分布圖；

第 9A 及 9B 圖為藉由具有分篩儀之流式細胞儀之攜帶 FMND 的細胞的分離圖；

第 10 圖為藉由流式細胞儀分離後之攜帶 FMND 的細胞

之螢光造影圖；

第 11 圖為親代細胞與攜帶 FMND 的細胞之間的形態學與存活力的比較圖；

第 12 圖為親代細胞與攜帶 FMND 的細胞之間的總蛋白質表現曲線的比較圖；

第 13 圖為藉由流式細胞儀所分離之攜帶 FMND 的細胞的螢光強度的偵測圖；

第 14 圖為不同繼代藉由磁性裝置所分離之攜帶 FMND 細胞的細胞形態與存活力圖；

第 15 圖為親代細胞與不同繼代之攜帶 FMND 的細胞之間的總蛋白質表現曲線的比較圖；

第 16 圖為不同繼代之攜帶 FMND 的細胞的螢光強度的偵測圖；

第 17 圖為藉由雷射掃描共軛焦顯微鏡之攜帶 FMND 的細胞的螢光強度的偵測圖；

第 18 圖為不同繼代之攜帶 FMND 細胞的分離比率圖；
以及

第 19 圖為親代細胞與再溶解的攜帶 FMND 的細胞之間的細胞形態與存活力的比較圖。

【主要元件符號說明】

無。

七、申請專利範圍：

1. 一種經標記細胞的分離方法，包括：

提供螢光磁性奈米鑽石溶液；

培養目標細胞；

將該螢光磁性奈米鑽石溶液與該目標細胞共同培養，以令該螢光磁性奈米鑽石溶液中的螢光磁性奈米鑽石標記目標細胞；

藉該經標記之目標細胞的螢光或磁性自該經共同培養的螢光磁性奈米鑽石溶液與該目標細胞中分離出經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之分離方法，係藉經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記者之螢光強度的不同，使用流式細胞儀分選出經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。

3. 如申請專利範圍第 2 項所述之分離方法，其中，經分選的細胞收集於管壁塗布有 FBS 且內含完全培養基的離心管中。

4. 如申請專利範圍第 3 項所述之分離方法，復包括冷凍保存經分選之經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。

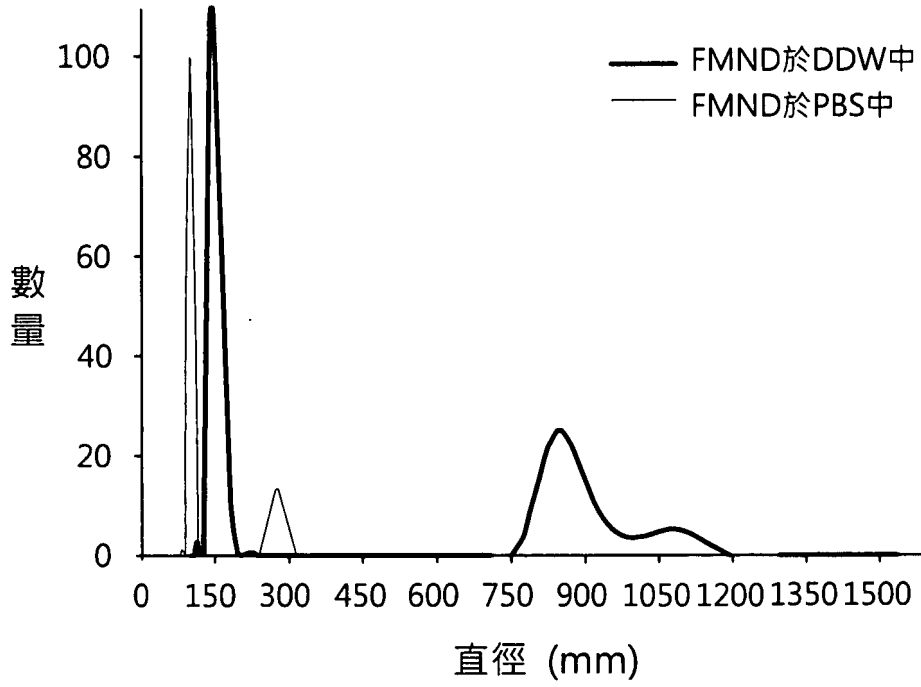
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之分離方法，係使用磁性裝置分離出經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之分離方法，其中，於使用

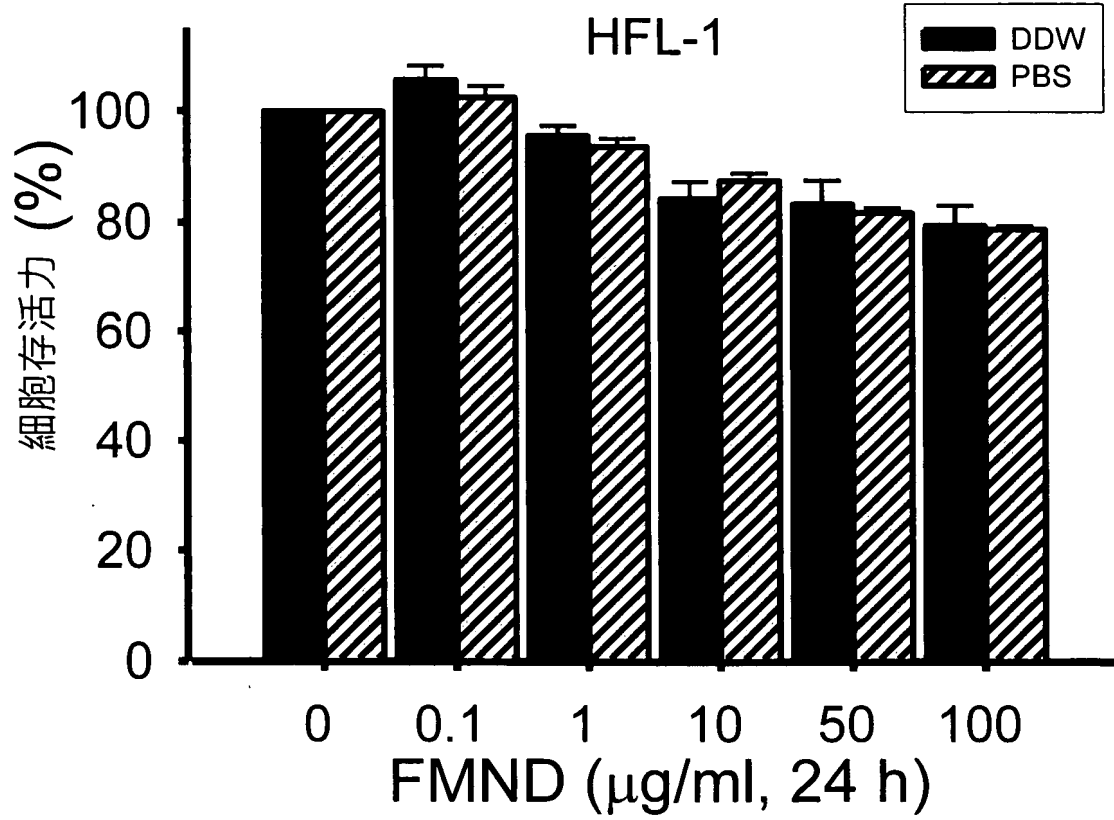
該磁性裝置前，復包括將該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記的目標細胞懸浮於具有緩衝溶液的容器中，俾該磁性裝置將該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞吸附至該容器的管壁。

7. 如申請專利範圍第 6 項所述之分離方法，復包括冷凍保存經分選之經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。
8. 一種經分離的細胞，該細胞係由申請專利範圍第 1 項所述之分離方法予以分離者。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之經分離的細胞，其中，該細胞為動物細胞。
10. 如申請專利範圍第 9 項所述之經分離的細胞，其中，該動物細胞為癌細胞與幹細胞。
11. 一種申請專利範圍第 10 項所述之經分離的細胞的用途，其係用於細胞的標定、檢測、造影或追蹤。
12. 一種申請專利範圍第 10 項所述之經分離的細胞的用途，其係用於生物分子活性的分析及藥物活性的篩選。

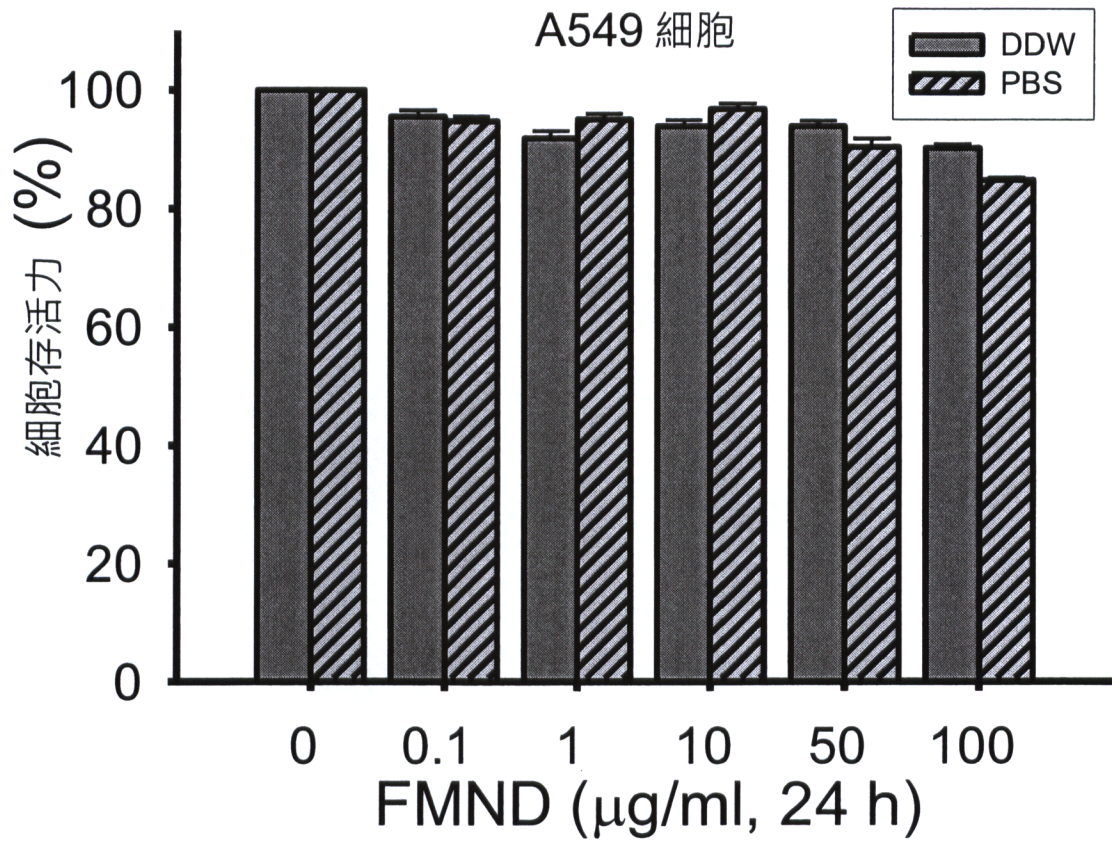
八、圖式：



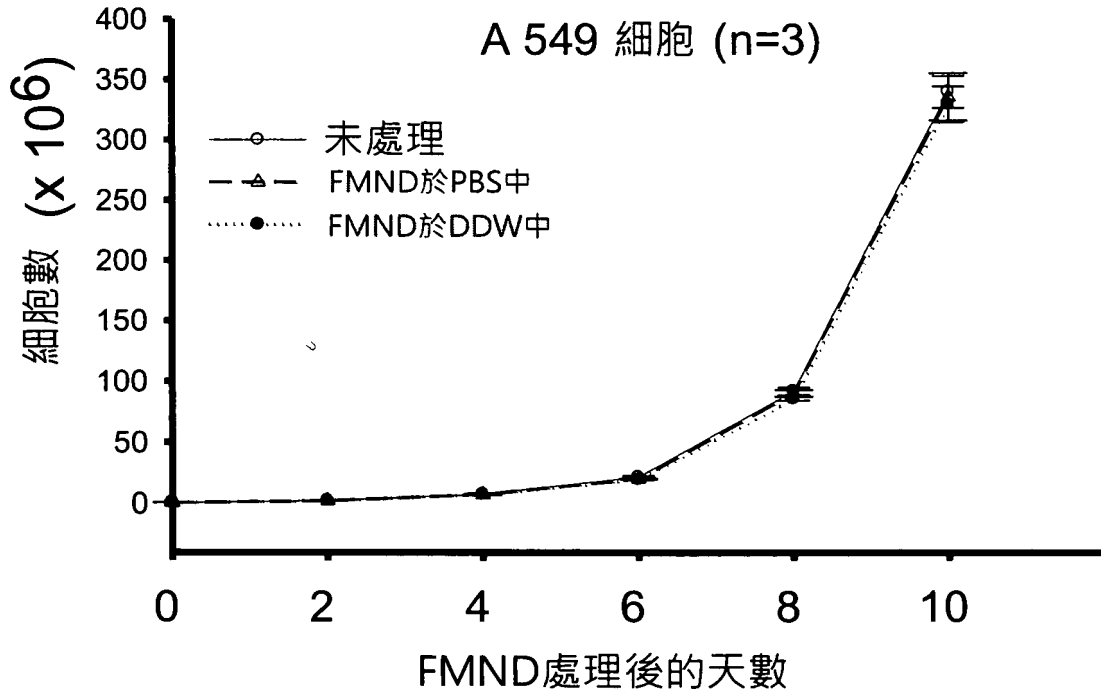
第 1 圖



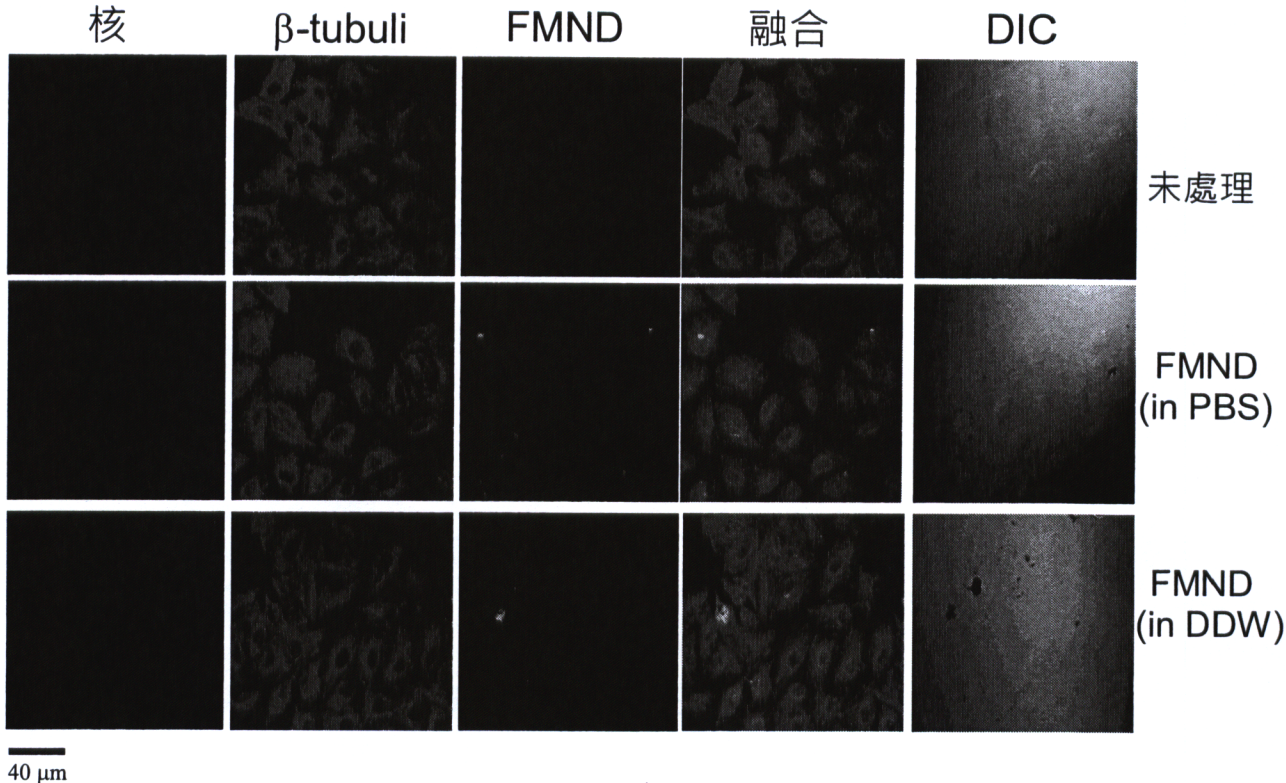
第 2 圖



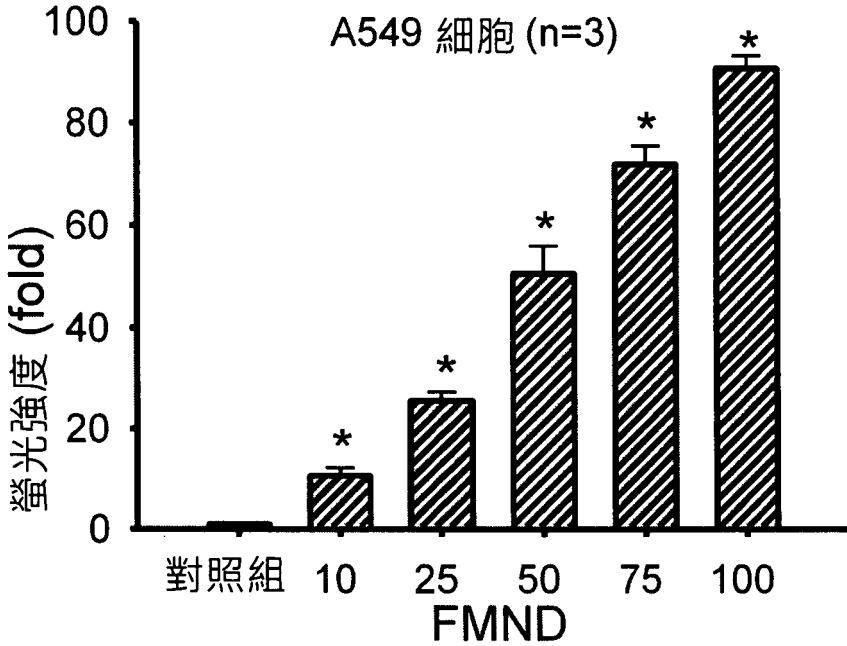
第 3 圖



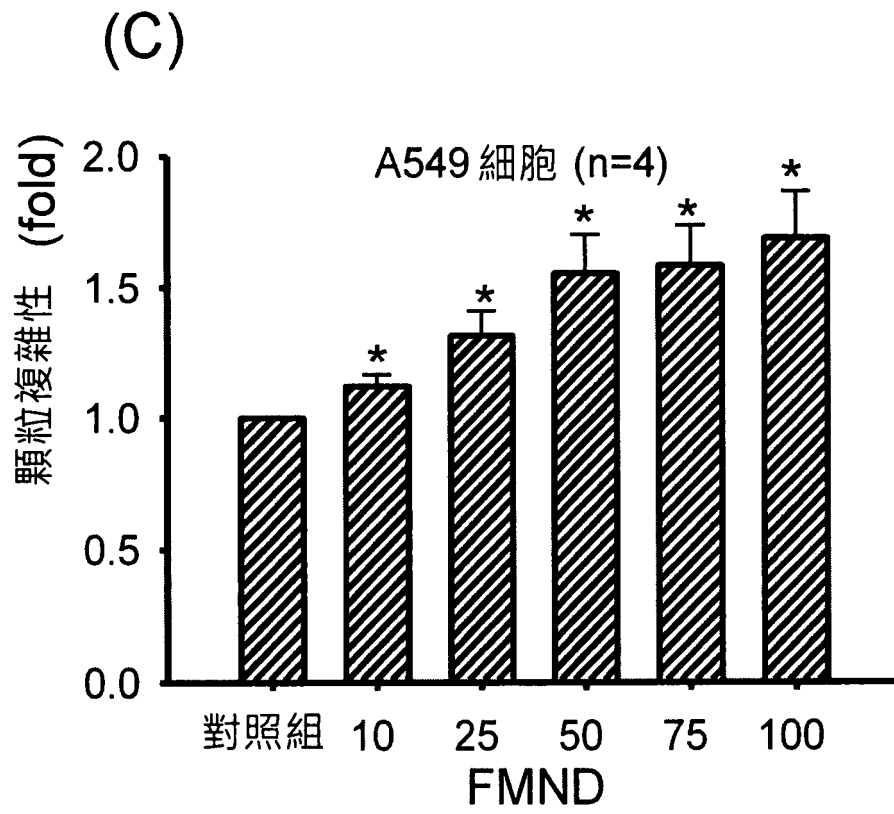
第 4 圖



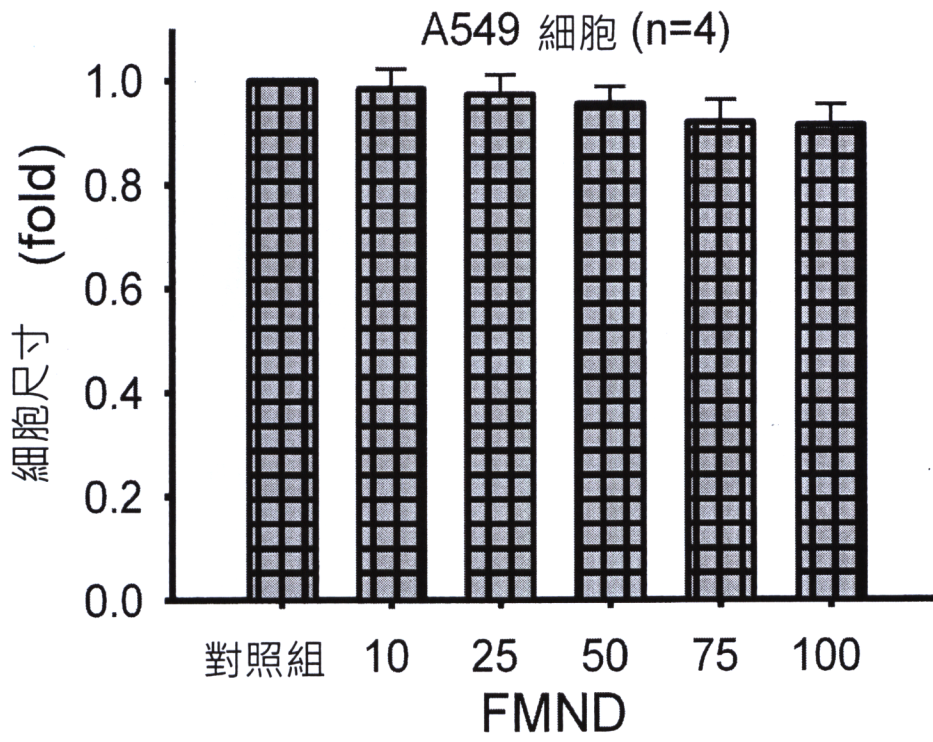
第 5 圖



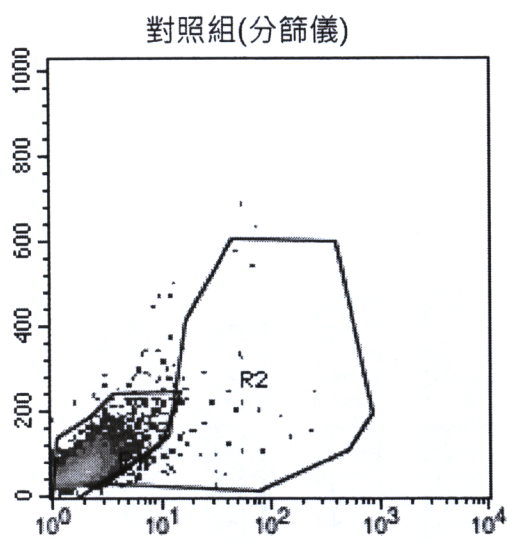
第 6 圖



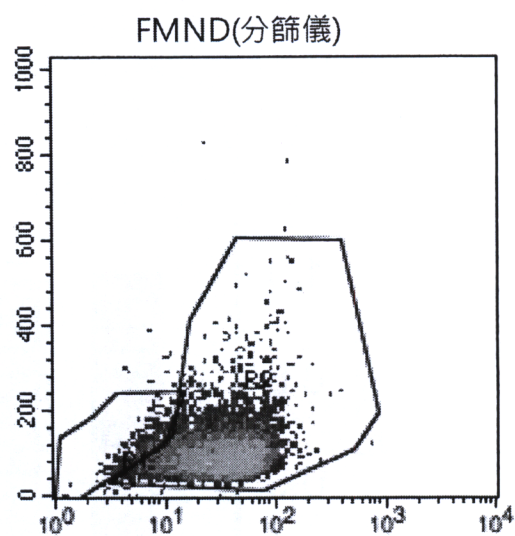
第 7 圖

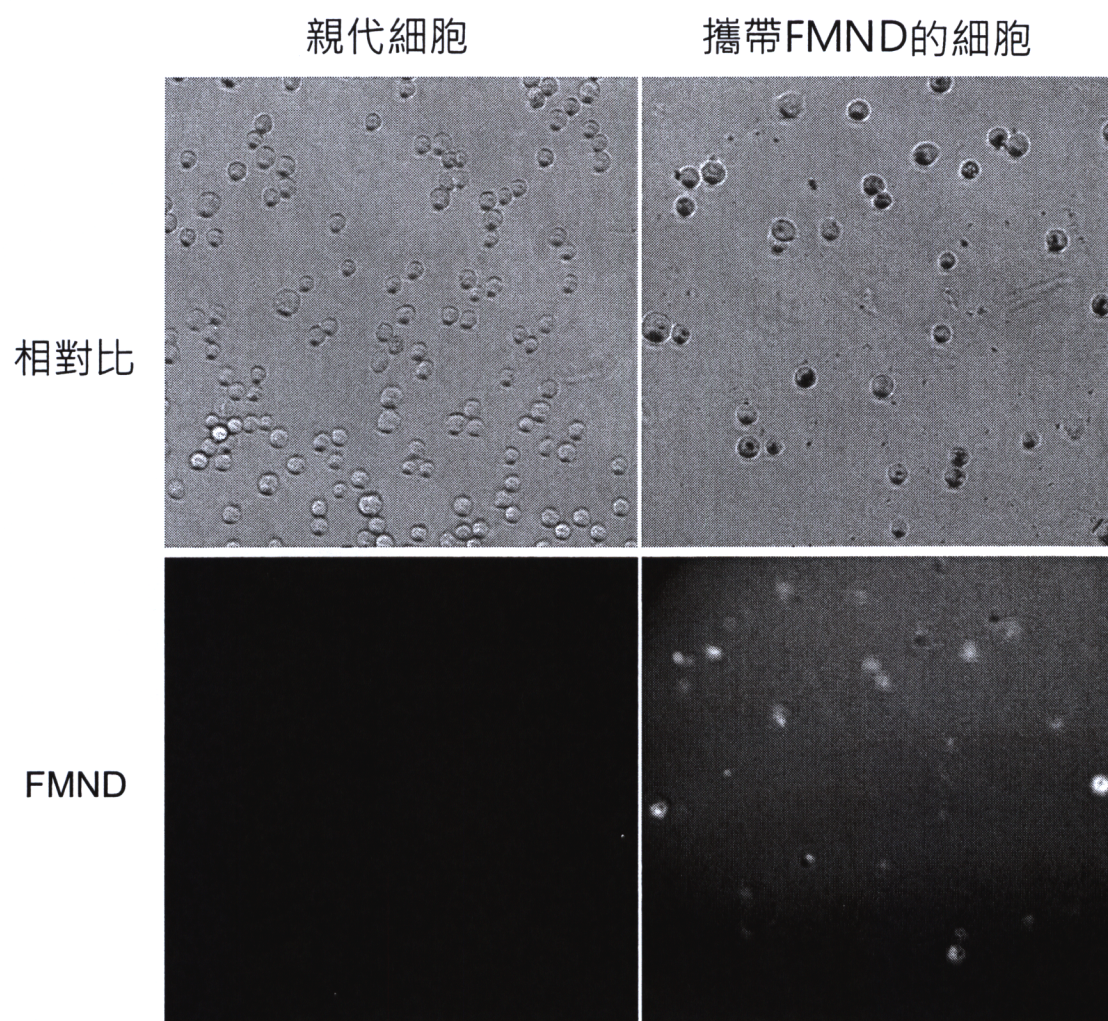


第 8 圖



第 9A 圖

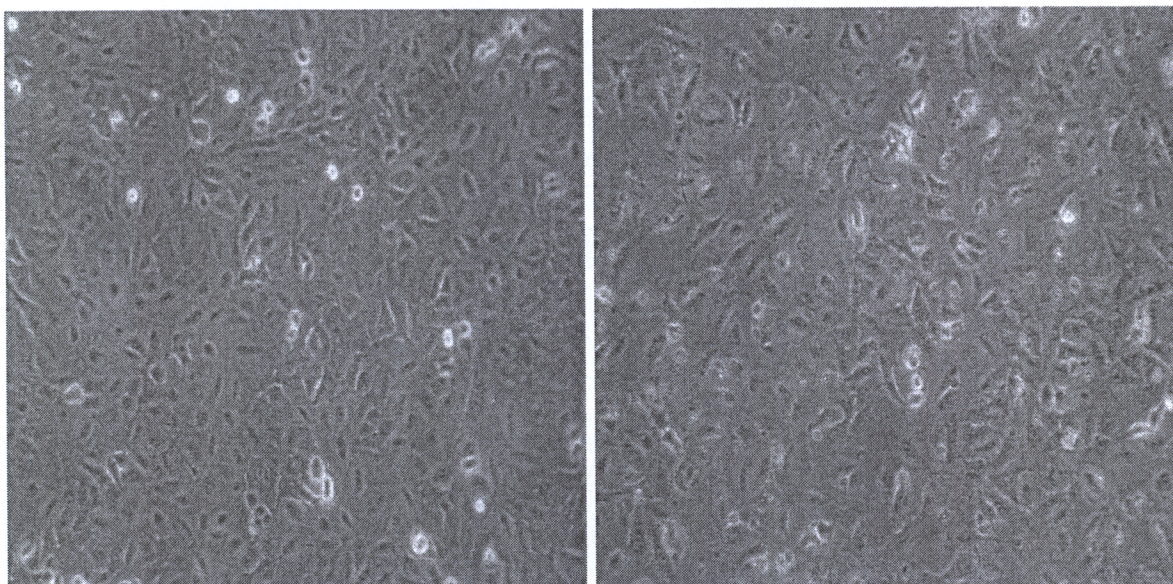




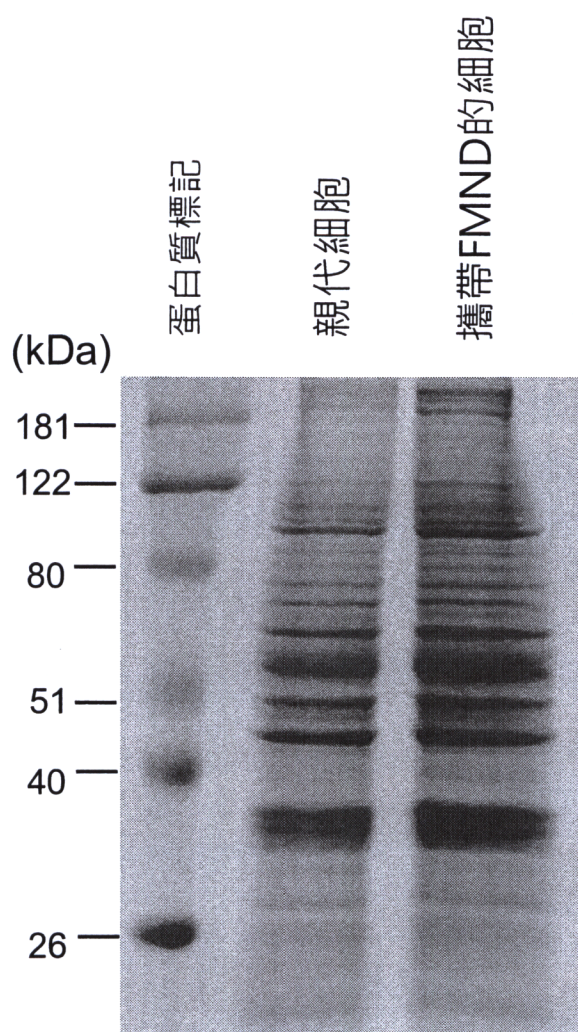
第 10 圖

親代細胞

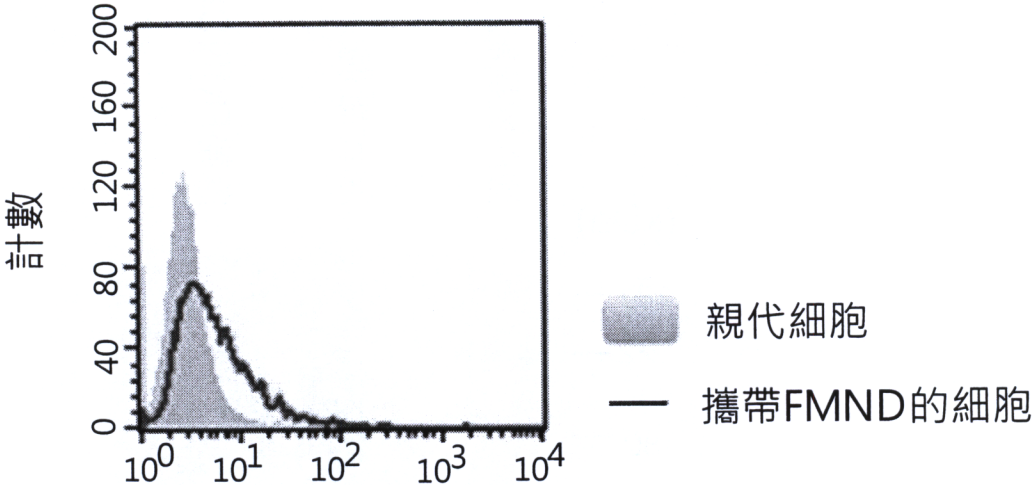
攜帶FMND的細胞



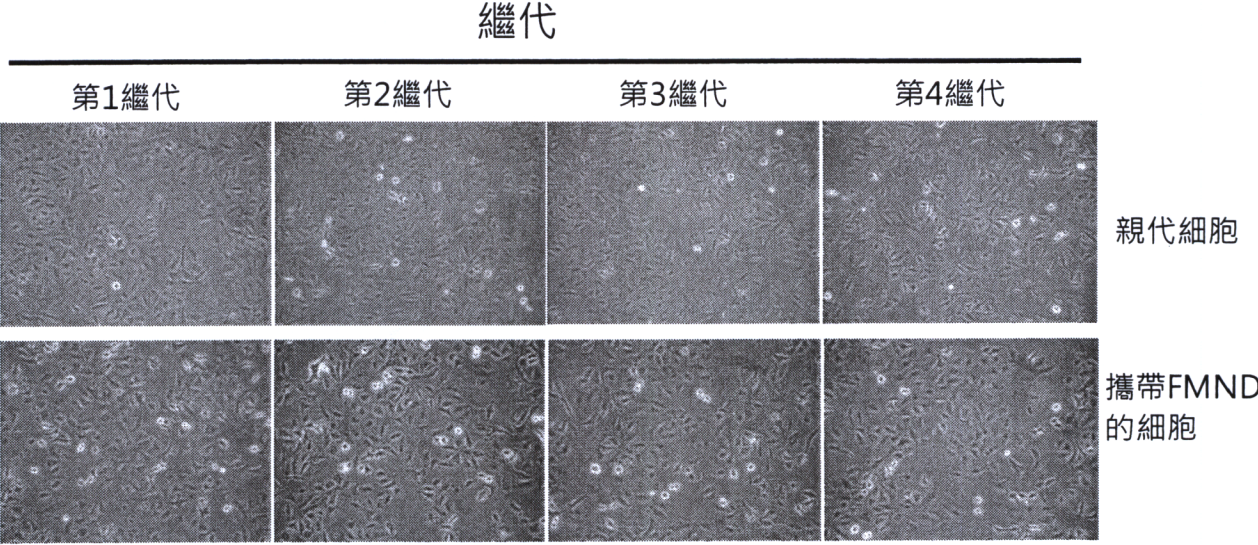
第 11 圖



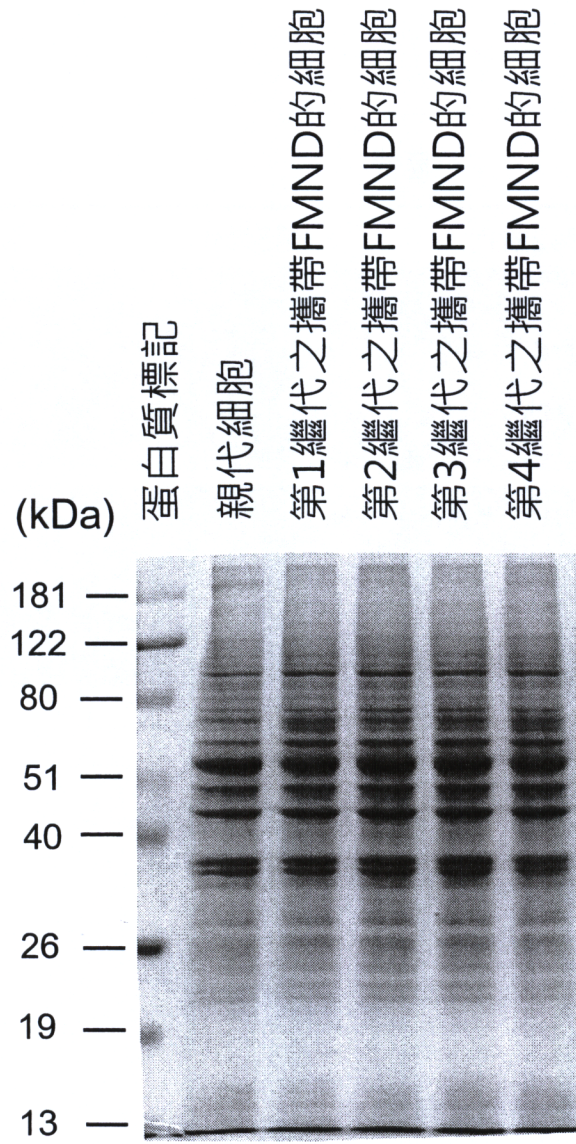
第 12 圖



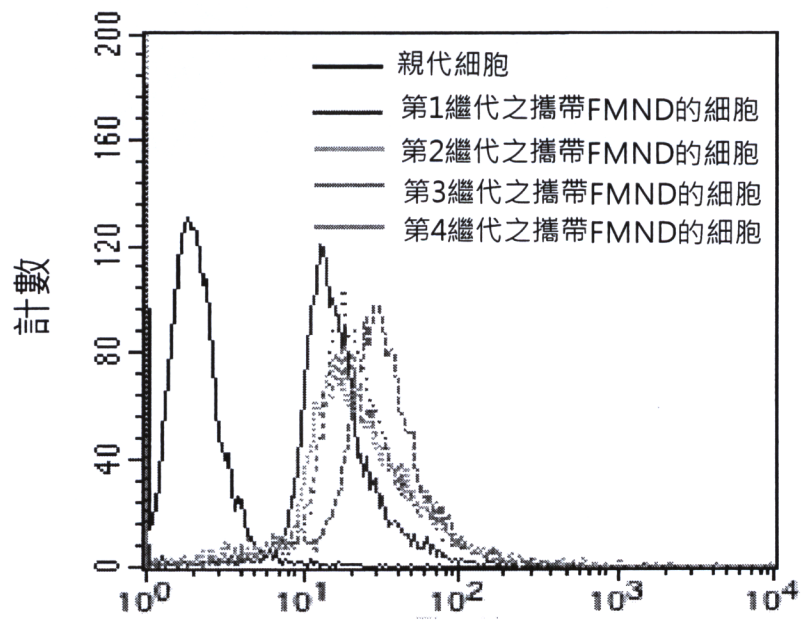
第 13 圖



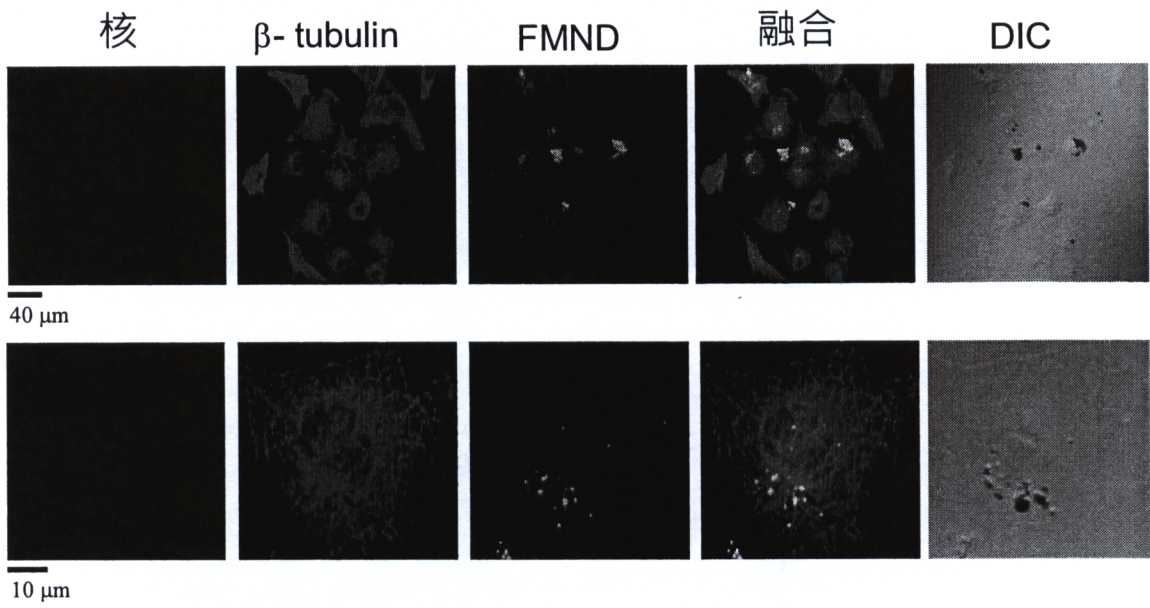
第 14 圖



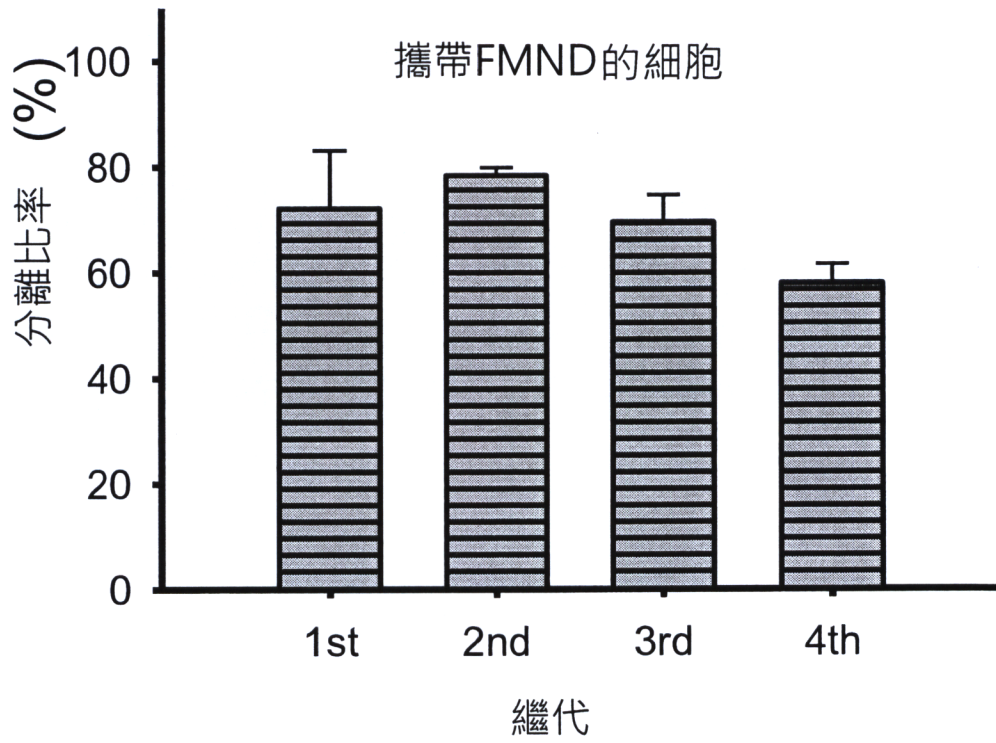
第 15 圖



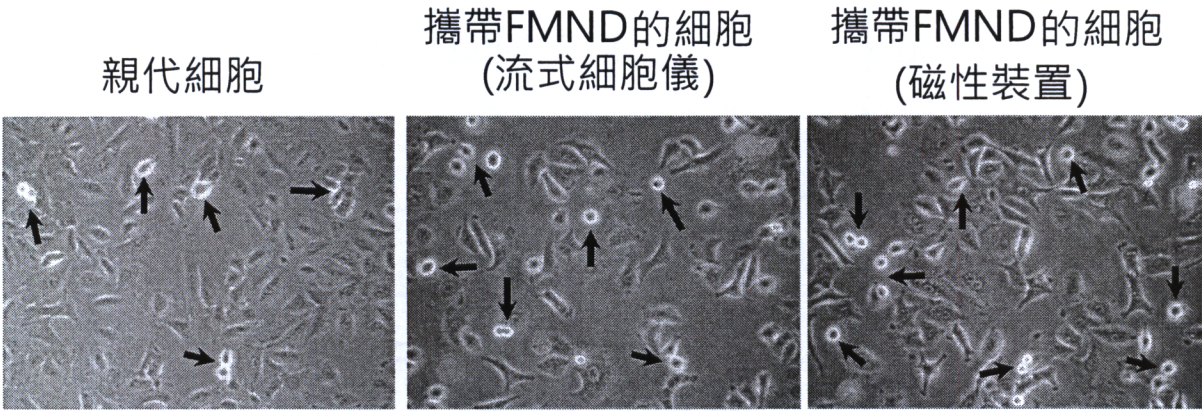
第 16 圖



第 17 圖

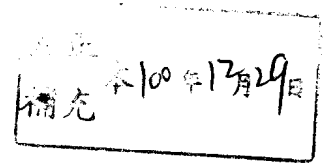


第 18 圖



第 19 圖

發明專利說明書



(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100141978

※申請日：100.11.17 ※IPC分類：C12N 5/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

經標記細胞的分離方法及其用途

A SEPARATION METHOD OF THE LABELED CELLS AND USES THEREOF

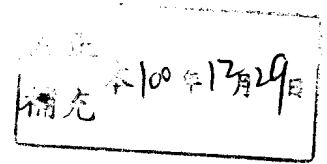
二、中文發明摘要：

本發明提供一種經標記的細胞的分離方法及其用途。更具體而言，本發明涉及一種使用螢光磁性奈米鑽石標記細胞的方法，並藉由該奈米鑽石的螢光或磁性分離該經該標記方法標記的細胞。

三、英文發明摘要：

This invention provides a separation method for the nanodiamond labeled cells and uses thereof. In particular, the present invention relates to a method for labeling cells using fluorescent magnetic nanodiamond, separation method for the labeled cells obtained by the method and uses thereof.

發明專利說明書



(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100141978

※申請日：100.11.17 ※IPC分類：C12N 5/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

經標記細胞的分離方法及其用途

A SEPARATION METHOD OF THE LABELED CELLS AND USES THEREOF

二、中文發明摘要：

本發明提供一種經標記的細胞的分離方法及其用途。更具體而言，本發明涉及一種使用螢光磁性奈米鑽石標記細胞的方法，並藉由該奈米鑽石的螢光或磁性分離該經該標記方法標記的細胞。

三、英文發明摘要：

This invention provides a separation method for the nanodiamond labeled cells and uses thereof. In particular, the present invention relates to a method for labeling cells using fluorescent magnetic nanodiamond, separation method for the labeled cells obtained by the method and uses thereof.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (9B) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

本案圖式為實驗數據圖，無元件符號簡單說明。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

本案無化學式。

方法及其用途。更具體而言，本發明涉及一種經螢光磁性奈米鑽石標記的細胞的分離方法以及其用途。

本發明之一態樣，提供一種經標記細胞的分離方法，該方法包含下述步驟：

培養目標細胞；將螢光磁性奈米鑽石溶液與該目標細胞共同培養，以令該螢光磁性奈米鑽石溶液中的螢光磁性奈米鑽石標記目標細胞；藉該經標記之目標細胞的螢光或磁性自該經共同培養的螢光磁性奈米鑽石溶液與該目標細胞中分離出經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。

進一步地，係藉經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記者之螢光強度的不同，分離出經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。於具體實施例中，係使用流式細胞儀分選出經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。

較佳地，於使用該流式細胞儀前，復包括清洗該經共同培養的螢光磁性奈米鑽石溶液與該目標細胞，以收集經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記的目標細胞；以及藉由離心處理，以集中經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記的目標細胞。

於另一實施例中，係使用磁性裝置分離出經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。較佳地，於使用該磁性裝置前，復包括清洗該經共同培養的螢光磁性奈米鑽石溶液與該目標細胞，以收集經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記的目標細胞；藉由離心處理，以集中經該螢光

磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記的目標細胞；以及將該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記的目標細胞懸浮於具有緩衝溶液的容器中，俾該磁性裝置將該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞吸附至該容器的管壁。

本發明之分離方法復可包括冷凍保存經分選之經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。

本發明之又一態樣，提供一種經分離的細胞，該細胞係根據本發明的分離方法予以分離者。

進一步地，該經標記及分離的細胞係利用於細胞的標定、檢測、細胞的造影或追蹤、生物分子活性的分析及藥物活性的篩選。

進一步地，該細胞為動物細胞。該動物細胞包括癌細胞與幹細胞。

本發明使用螢光磁性奈米鑽石標記細胞，並藉由該螢光磁性奈米鑽石的螢光或磁性分離該經該標記方法標記的細胞，所得之經標記的細胞能繼續存活，且可被儲存和再培養，適用於細胞的標定、檢測、細胞的造影或追蹤、生物活性的分析及藥物活性的篩選等應用。

【實施方式】

本發明將以下列實施例進一步具體說明，惟該等實施例之揭示不應視為任何限制本發明之意圖。

螢光磁性奈米鑽石(FMND)的製備

螢光磁性奈米鑽石(FMND)的製備係根據已公開之製

之螢光造影圖；

第 11 圖為親代細胞與攜帶 FMND 的細胞之間的形態學與存活力的比較圖；

第 12 圖為為親代細胞與攜帶 FMND 的細胞之間的總蛋白質表現曲線的比較圖；

第 13 圖為藉由流式細胞儀所分離之攜帶 FMND 的細胞的螢光強度的偵測圖；

第 14 圖為不同繼代藉由磁性裝置所分離之攜帶 FMND 細胞的細胞形態與存活力圖；

第 15 圖為親代細胞與不同繼代之攜帶 FMND 的細胞之間的總蛋白質表現曲線的比較圖；

第 16 圖為不同繼代之攜帶 FMND 的細胞的螢光強度的偵測圖；

第 17 圖為藉由雷射掃描共軛焦顯微鏡之攜帶 FMND 的細胞的螢光強度的偵測圖；

第 18 圖為不同繼代之攜帶 FMND 細胞的分離比率圖；
以及

第 19 圖為親代細胞與再溶解的攜帶 FMND 的細胞之間的細胞形態與存活力的比較圖。

【主要元件符號說明】

無。

七、申請專利範圍：

1. 一種經標記細胞的分離方法，包括：

培養目標細胞；

將螢光磁性奈米鑽石溶液與該目標細胞共同培養，以令該螢光磁性奈米鑽石溶液中的螢光磁性奈米鑽石標記目標細胞；

藉該經標記之目標細胞的螢光或磁性自該經共同培養的螢光磁性奈米鑽石溶液與該目標細胞中分離出經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之分離方法，係藉經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞與未標記者之螢光強度的不同，使用流式細胞儀分選出經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。

3. 如申請專利範圍第 2 項所述之分離方法，其中，經分選的細胞收集於管壁塗布有 FBS 且內含完全培養基的離心管中。

4. 如申請專利範圍第 3 項所述之分離方法，復包括冷凍保存經分選之經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。

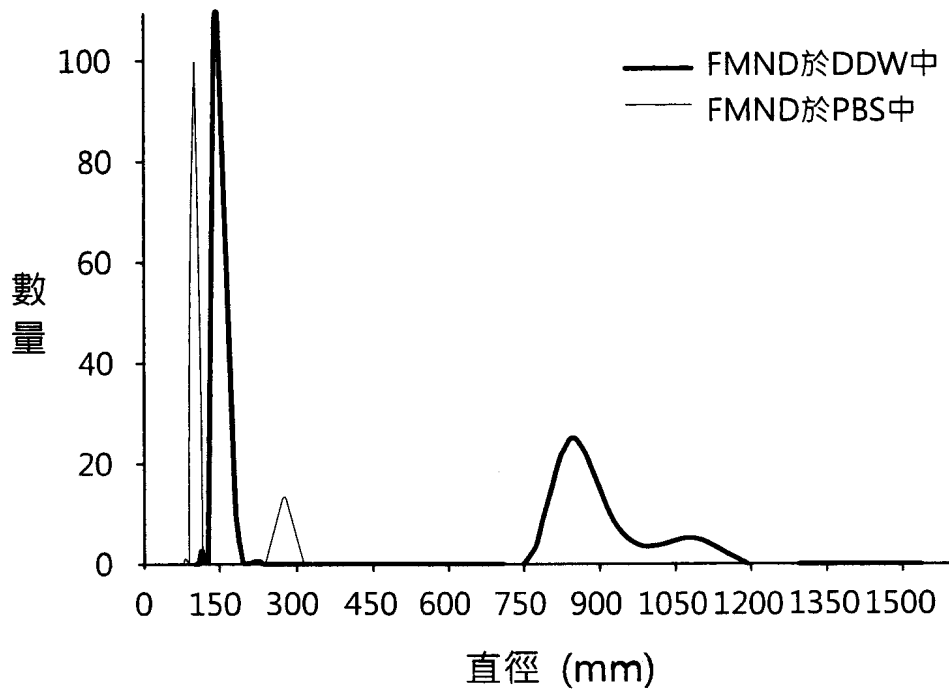
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之分離方法，係使用磁性裝置分離出經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之分離方法，其中，於使用該磁性裝置前，復包括將該螢光磁性奈米鑽石標記的

目標細胞與未標記的目標細胞懸浮於具有緩衝溶液的容器中，俾該磁性裝置將該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞吸附至該容器的管壁。

7. 如申請專利範圍第 6 項所述之分離方法，復包括冷凍保存經分選之經該螢光磁性奈米鑽石標記的目標細胞。
8. 一種經分離的細胞，該細胞係由申請專利範圍第 1 項所述之分離方法予以分離者。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之經分離的細胞，其中，該細胞為動物細胞。
10. 如申請專利範圍第 9 項所述之經分離的細胞，其中，該動物細胞為癌細胞與幹細胞。
11. 一種申請專利範圍第 10 項所述之經分離的細胞的用途，其係用於細胞的標定、檢測、造影或追蹤。
12. 一種申請專利範圍第 10 項所述之經分離的細胞的用途，其係用於生物分子活性的分析及藥物活性的篩選。

八、圖式：



第 1 圖