



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107723208 A

(43)申请公布日 2018.02.23

(21)申请号 201711085698.1

(22)申请日 2017.11.07

(71)申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘
路866号

(72)发明人 王本 苏逸

(74)专利代理机构 杭州求是专利事务有限公
司 33200

代理人 郑海峰

(51)Int.Cl.

C12M 1/00(2006.01)

C12M 1/12(2006.01)

C12N 5/09(2010.01)

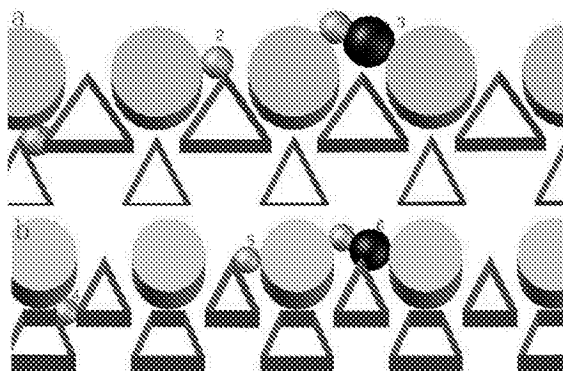
权利要求书2页 说明书7页 附图10页

(54)发明名称

功能化微球结合过滤芯片捕获循环肿瘤细胞的装置及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种功能化微球结合过滤芯片捕获循环肿瘤细胞的装置及其应用。包括微量注射泵、待分选富集的血液样品和过滤芯片,过滤芯片由第一圆弧形通道和第二圆弧形通道组成;所述的圆弧形通道内设置有栅栏结构;将纳米氧化锌修饰微球和处理后的血液进行混合,形成待分选富集的血液样品;过滤芯片的进样口连接微量注射泵;待分选富集的血液样品通过微量注射泵注入过滤芯片进样口,白细胞和其它杂质由于体积小会通过栅栏结构得到分离,循环肿瘤细胞被捕获。提供了用于液体活检的功能化微球结合过滤芯片捕获循环肿瘤细胞的装置及其应用,基于循环肿瘤细胞的大小和循环肿瘤细胞的表面抗原整合,利用虚拟惯性力进行循环肿瘤细胞的捕获。



1. 一种用于捕获循环肿瘤细胞的过滤芯片,其特征在於所述装置包含过滤芯片;所述的过滤芯片上设置有第一圆弧形通道和第二圆弧形通道;两级圆弧形通道连接构成S形通道,每级圆弧角度为90度;

所述的圆弧形通道内设置有栅栏结构;所述的栅栏结构设置在圆弧形通道内部,且平行于所述圆弧形通道;栅栏结构将圆弧形通道分割为液体流通区域和过滤后通道区域;所述的第一圆弧形通道底部的过滤后通道区域处设有第一出样口,所述的第二圆弧形通道底部的过滤后通道区域侧设有第二出样口,第二圆弧形通道底部的液体流通区域侧设有第三出样口;所述第一圆弧形通道的顶部液体流通区域侧设有进样口。

2. 根据权利要求1所述的用于捕获循环肿瘤细胞的过滤芯片,其特征在於第一圆弧形通道内的栅栏结构由一排圆柱体和一排三角柱体平行并排排列组成,圆柱体与三角柱体间隔排列,过滤通道最大间距10 μ m,最小间距6 μ m。

3. 根据权利要求1所述的用于捕获循环肿瘤细胞的过滤芯片,其特征在於第二圆弧形通道内的栅栏结构由一排圆柱体,一排三角柱体和一排等腰梯形柱体组成,圆柱体和三角柱体间隔排列;等腰梯形柱体排列在圆柱体的过滤后通道区域侧,过滤通道最小间距为8 μ m,最大间距为15微米。

4. 如权利要求1所述用于捕获循环肿瘤细胞的过滤芯片,其特征在於所述圆弧通道的宽度为100 μ m。

5. 如权利要求1所述用于捕获循环肿瘤细胞的过滤芯片,其特征在於所述的过滤芯片的制备方法为:

- (1) 设计通道模板样式,超声清洗低阻硅片,烘干后将硅表面氧化成二氧化硅氧化物;
- (2) 二氧化硅表面甩胶机涂胶;
- (3) 紫外光刻,RIE刻蚀二氧化硅,采用STS深硅刻蚀机干法刻蚀硅成芯片模板;
- (4) 超纯水清洗步骤(3)中所获得的刻蚀模板,使用聚二甲基硅氧烷固定形成芯片模板。

6. 一种功能化微球结合权利要求1所述过滤芯片捕获循环肿瘤细胞的装置,其特征在於包括微量注射泵、待分选富集的血液样品和所述的过滤芯片;

所述的待分选富集的血液样品中包含纳米氧化锌修饰微球;所述的纳米氧化锌修饰微球的含量为100个/ml,直径大小为23微米;

所述的过滤芯片的进样口连接所述的微量注射泵;所述的待分选富集的血液样品通过微量注射泵注入所述的进样口。

7. 如权利要求6所述捕获循环肿瘤细胞的装置,其特征在於所述纳米氧化锌修饰微球表面纳米氧化锌由以下方法制得:

- 1) 微球放置在载波片表面,在等离子清洗机上清洗后结合上晶种层;
- 2) 对步骤1)中所获得处理过的微球结合的晶种层,基于晶种生长上纳米氧化锌。
- 3) 对步骤2)中所获得的纳米氧化锌微球表面修饰抗体方法为:
三种微球用胺丙基三甲氧基硅烷修饰30min,碳酸脂修饰10min,avidin修饰60min,biotin-EpCAM抗体修饰30min,重复清洗一次。

8. 一种应用权利要求1所述过滤芯片结合纳米氧化锌修饰微球进行循环肿瘤细胞捕获的方法,其特征在於包括如下步骤:

1) 利用淋巴细胞梯度分离液,将临床病人外周血中通过离心作用将中性粒细胞和红细胞,血浆进行分离;将纳米氧化锌修饰微球和处理后的血液进行混合,形成待分选富集的血液样品;所述的纳米氧化锌修饰微球的含量为100个/ml,直径大小为23微米;

2) 利用微量注射泵,将所述的待分选富集的血液样品注入所述的进样口;

3) 微球、循环肿瘤细胞、循环肿瘤细胞团和循环肿瘤细胞-微球共聚体在过滤芯片栅栏内被截留捕获,白细胞和其它杂质由于体积小会通过栅栏结构在第一出样口和第二出样口得到分离,循环肿瘤细胞栅栏中被捕获得到分离。

功能化微球结合过滤芯片捕获循环肿瘤细胞的装置及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于现代医学领域,具体涉及一种用于液体活检的能化微球结合过滤芯片捕获循环肿瘤细胞的装置及其应用。

背景技术

[0002] 液体活检是现代医学领域越来越受重视的方向之一,相比较于组织活检,液体活检可以低创伤,高效率,准确的对肿瘤患者循环肿瘤细胞进行高效的分析。转移癌细胞即循环癌细胞(circulating tumor cells,CTCs)在癌症转移中起着关键的作用。循环肿瘤细胞的异质性特征导致组织活检不可能对肿瘤细胞进行可靠的分析,另外组织活检可能提高肿瘤转移的风险,组织活检的滞后性也是极为不利的。

[0003] 基于循环肿瘤细胞表面特异性抗体捕获循环肿瘤细胞,效率低,成本高,难以有效的临床推广和应用。

发明内容

[0004] 本发明的目的是克服现有技术的不足,提供了用于液体活检的能化微球结合过滤芯片捕获循环肿瘤细胞的装置及其应用,基于循环肿瘤细胞的大小和循环肿瘤细胞的表面抗原整合进行循环肿瘤细胞的捕获。

[0005] 本装置结合了功能化纳米微球和过滤芯片,纳米微球和循环肿瘤细胞抗原抗体特异性结合被捕获,通过过滤芯片被截流。

[0006] 一种用于捕获循环肿瘤细胞的过滤芯片;所述的过滤芯片上设置有第一圆弧形通道和第二圆弧形通道;两级圆弧形通道连接构成S形通道,每级圆弧度为90度;

[0007] 所述的圆弧形通道内设置有栅栏结构;所述的栅栏结构设置在圆弧形通道内部,且平行于所述圆弧形通道通道;栅栏结构将圆弧形通道分割为液体流通区域和过滤后通道区域;所述的第一圆弧形通道底部的过滤后通道区域处设有第一出样口,所述的第二圆弧形通道底部的过滤后通道区域侧设有第二出样口,第二圆弧形通道底部的液体流通区域侧设有第三出样口;所述第一圆弧形通道的顶部液体流通区域侧设有进样口。

[0008] 优选的,第一圆弧形通道内的栅栏结构由一排圆柱体和两排三角柱体平行并排排列组成,圆柱体与其中一排三角柱体间隔排列,另一排三角柱体位于圆柱体的过滤后通道区域侧,过滤通道最大间距10um,最小间距6um。

[0009] 优选的,第二圆弧形通道内的栅栏结构由一排圆柱体,一排三角柱体和一排等腰梯形柱体组成,圆柱体和三角柱体间隔排列;等腰梯形柱体排列在圆柱体的过滤后通道区域侧,过滤通道最小间距为8um,最大间距为15微米。

[0010] 优选的,所述圆弧形通道的宽度为100μm

[0011] 过滤芯片内部的微球和细胞均受到虚拟惯性力,在虚拟惯性力的液体作用下,循环肿瘤细胞和微球会在过滤栅栏处进行过滤,体积相对较大的循环肿瘤细胞和微球,微球-循环肿瘤细胞共聚体会被截留捕获。

[0012] 所述的过滤芯片的制备方法可以为:

[0013] (1) 设计通道模板样式,超声清洗低阻硅片,烘干后将硅表面氧化成二氧化硅氧化物;

[0014] (2) 二氧化硅表面甩胶机涂胶;

[0015] (3) 紫外光刻,RIE刻蚀二氧化硅,采用STS深硅刻蚀机干法刻蚀硅成芯片模板;

[0016] (4) 超纯水清洗步骤(3)中所获得的刻蚀模板,使用聚二甲基硅氧烷固定形成芯片模板。

[0017] 本发明公开了一种功能化微球结合所述过滤芯片捕获循环肿瘤细胞的装置,包括微量注射泵、待分选富集的血液样品和所述的过滤芯片;

[0018] 所述的待分选富集的血液样品中包含纳米氧化锌修饰微球;所述的纳米氧化锌修饰微球的含量为100个/ml,直径大小为23微米;

[0019] 所述的过滤芯片的进样口连接所述的微量注射泵;所述的待分选富集的血液样品通过微量注射泵注入所述的进样口。

[0020] 优选的,所述纳米氧化锌修饰微球表面纳米氧化锌由以下方法制得:

[0021] 1) 微球放置在载波片表面,在等离子清洗机上清洗后结合上晶种层;

[0022] 2) 对步骤1)中所获得处理过的微球结合的晶种层,基于晶种生长上纳米氧化锌。

[0023] 3) 对步骤2)中所获得的纳米氧化锌微球表面修饰抗体方法为:

[0024] 三种微球用胺丙基三甲氧基硅烷修饰30min,碳酸脂修饰10min,avidin修饰60min,biotin-EpCAM抗体修饰30min,重复清洗一次。

[0025] 本发明还公开了一种应用所述过滤芯片结合纳米氧化锌修饰微球进行循环肿瘤细胞捕获的方法,包括如下步骤:

[0026] 1) 利用淋巴细胞梯度分离液,将临床病人外周血中通过离心作用将中性粒细胞和红细胞,血浆进行分离;将纳米氧化锌修饰微球和处理后的血液进行混合,形成待分选富集的血液样品;所述的纳米氧化锌修饰微球的含量为100个/ml,直径大小为23微米;

[0027] 2) 利用微量注射泵,将所述的待分选富集的血液样品注入所述的进样口;

[0028] 3) 微球、循环肿瘤细胞、循环肿瘤细胞团和循环肿瘤细胞-微球共聚体在过滤芯片栅栏内被截留捕获,白细胞和其它杂质由于体积小会通过栅栏结构在第一出样口得到分离,第二级出样口中的收集液体中基本不存在循环肿瘤细胞。循环肿瘤细胞在第三出样口得到分离。

[0029] 血液处理制备如下:

[0030] (1) 利用淋巴细胞梯度分离液,将临床病人外周血中通过离心作用将中性粒细胞和红细胞,血浆进行分离。

[0031] (2) 将微球和处理后的血液进行混合,形成循环肿瘤细胞-微球共聚体。

[0032] 免疫荧光染色步骤如下:

[0033] (1) 8mmol/l的BSA溶液,3mL/h通入后封闭10min.

[0034] (2) FITC-CKpan和PE-CD45混合溶液,3mL/h比例混合通入过滤芯片中,室温12H抚育.

[0035] (3) DAPI 1:1000比例混合液通入,10min避光染色.

[0036] (4) PBS清洗清洗5min,3mL/h.

[0037] 本发明纳米氧化锌微球增加了循环肿瘤细胞与微球的结合概率,提高循环肿瘤细胞的捕获效率。微量注射泵与进样通道相连,处理后的血液通过垂直注射泵注射进入过滤芯片,微球,循环肿瘤细胞,循环肿瘤细胞团和循环肿瘤细胞-微球共聚体在过滤芯片栅栏内被截留捕获,白细胞和其它杂质会由于体积小会通过栅栏结构。

[0038] 对于目标细胞含量较少的样品,本发明的微流控芯片捕获目标细胞的效率极高,如用于在外周血中分选富集循环肿瘤细胞。

[0039] 与现有技术相比,本技术有益效果为:

[0040] 1) 本发明在微流控体系内制作了一套多级圆弧形自动过滤装置,极大提高了循环肿瘤细胞的捕获能力。

[0041] 2) 本发明可以整合了基于循环肿瘤细胞的大小和循环肿瘤细胞的表面抗原两种模式的捕获策略。

[0042] 3) 本发明在微球表面合成了纳米氧化锌阵列,并将其使用到循环肿瘤细胞的捕获中。

[0043] 4) 本发明使用了虚拟惯性力来分离循环肿瘤细胞。

附图说明

[0044] 图1a聚苯乙烯微球和二氧化硅微球表面扫描图,聚苯乙烯微球和二氧化硅微球表面合成纳米氧化锌扫描图,其中a、c分别为苯乙烯微球合成纳米氧化锌前后的扫描图;b、d分别为二氧化硅微球合成纳米氧化锌前后的扫描图;

[0045] 图1b纳米氧化锌功能化的聚苯乙烯微球和二氧化硅微球的元素分析图。

[0046] 图2a为淋巴细胞分离液处理后的血液中微球结合循环肿瘤细胞的效率;

[0047] 图2b为PBS和淋巴细胞分离液处理后的血液中微球结合循环肿瘤细胞的效率;

[0048] 图3a为本发明过滤芯片的实物图,其中芯片上半部分是PDMS,下半部分是载玻片,芯片有四个出入口,其中1为进样口,234为出样口,通过注射器血液从1进口进入芯片,循环肿瘤细胞在芯片中被捕获后,其他细胞从234出口进入废液缸,循环肿瘤细胞从淋巴细胞分离液处理后的溶液中完全分离。

[0049] 图3b为过滤芯片内部栅极阵列的电子扫描图,其中由三种柱状结构形成的阵列结构完整。

[0050] 图3c为本发明的原理图。从A为注射器,通过特氟龙管从1进样口通过连接枪头进入,经过滤芯片后,循环肿瘤细胞和微球被过滤芯片截留,B是Filter CHIP,C是废液缸收集第一级过滤阵列后流出的废液,D为废液缸收集第二级过滤阵列后的残留液,E为废液缸收集捕获后的残留液。

[0051] 图3d是Filter CHIP(过滤芯片)的参数,左边为第一级过滤阵列的结构参数。右边为第二级过滤阵列的结构参数,误差范围在2%之内。

[0052] 图4为Filter CHIP过滤阵列捕获循环肿瘤细胞模型图。a,循环肿瘤细胞被第一级过滤阵列截留图,循环肿瘤细胞在第一级中有可能被截留在1和2,3是循环肿瘤细胞和微球结合后被过滤阵列截留。b,4表示循环肿瘤细胞在流速较大的时候通过一级过滤阵列的作用减小了流速后在下面过滤阵列处被捕获截留,5循环肿瘤细胞被第二级过滤阵列第一排截流捕获,6循环肿瘤细胞和微球结合后被第二级过滤阵列捕获,另外循环肿瘤细胞团更容

易被过滤阵列截留。

[0053] 图5Filter CHIP的捕获的流速和效率。

[0054] 图6Filter CHIP捕获四种细胞系Bxpc-3、HeLa、MCF-7、Panc-1的纯度。

[0055] 图7四种不同细胞系MCF-7、Bxpc-3、HeLa和Panc-1在Filter CHIP基于细胞大小捕获的效率。

[0056] 图8四种不同细胞系MCF-7、Bxpc-3、HeLa和Panc-1在Filter CHIP基于细胞表面特异性抗原的捕获效率。

[0057] 图9四种不同细胞系MCF-7、Bxpc-3、HeLa和Panc-1在Filter CHIP通过循环肿瘤细胞表面特异性抗原的整合捕获效率。

[0058] 图10Filter CHIP和肿瘤细胞系捕获Filter CHIP由一个进样口,三个出样口,由两段90度圆弧组成。a,AutoCAD设计出的Filter CHIP芯片设计图。b,微球和DAPI染色的MCF-7结合在一起。c,中微球结合肿瘤细胞系被栅栏拦截捕获。d,空的微流体通道。e,大量的DAPI染色的MCF-7被栅栏捕获。

[0059] 图11乳腺癌转移病人的体内循环肿瘤细胞。a,DAPI染色的芯片内细胞。b,绿色是CKpan-FITC染色的细胞。c,CD45-PE染料染色的细胞。d,明场图。e,合成图,将Figure a、b、c、d合成后,PE,FITC和DAPI所对应的细胞完全重合。

[0060] 图12Filter CHIP芯片捕获的临床乳腺癌病人体内的循环肿瘤细胞的个数。

具体实施方式

[0061] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步详细说明。

[0062] 本实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;其中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值;所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0063] 本具体实施方式中用到的主要实验材料包括:

[0064] (1) 试验用癌细胞株, (MCF7, ATCC®HTB-22™), 和宫颈癌细胞株 (HeLa, (ATCC®CCL-2™)。

[0065] 细胞在相应培养基中生长至一定浓度,然后采用胰酶消化约10min,收集细胞并计数后用于后续实验测试。如有必要,采用DAPI对细胞进行预标记。根据后续需要,将细胞以100~100,000个/mL的浓度分别分散于PBS或裂解血中。

[0066] (2) 细胞培养基 (DMEM、RPMI-1640等) 购自Invitrogen,胎牛血清 (FCS) 购自Sigma-Aldrich,生物素修饰的人源EpCAM抗体 (biotin-anti-EpCAM) 购自R&D systems。

[0067] (3) 纳米氧化锌晶种层配制

[0068] 称量二水硫酸锌,使用正丙醇溶液配制25mM的二水硫酸锌的晶种层。

[0069] (4) 纳米氧化锌生长液

[0070] 10mM六合硝酸锌和等摩尔的阿拉托品 (HTMA)。

[0071] (5) 芯片捕获效率

[0072] 将抗体修饰后的氨基化PS微球和2ml全血处理后的循环肿瘤细胞液混合10min后,速度为3mL/h,一起通入过滤芯片。

[0073] 实施例1纳米氧化锌修饰微球的合成

[0074] 聚苯乙烯微球和SiO₂微球表面合成纳米氧化锌的步骤如下:

[0075] (1) 微球清洗, 用移液枪吸取200 μ l的直径为23 μ m的聚苯乙烯微球和13微米二氧化硅微球, 用超纯水清洗3次, 10min每次。

[0076] (2) 微球预处理: 将清洗后微球放置载波片表面在等离子清洗机上清洗180s。

[0077] (3) 对步骤(1)中所获得处理过的微球黏附晶种层, 晶种层中摇匀10S, 离心, 重新放入晶种液中重复一次, 将微球离心后用超纯水清洗一次。

[0078] (4) 将铺盖晶种层的微球放入1mlEP管中, 生长液中95度生长液中静置合成4H。本实验中二氧化硅微球和聚苯乙烯微球如图1a中的a和b所示, 从图中1a中的c和d, 可以清楚的纳米氧化锌均匀的围绕微球生长, 结构均匀, 大小均匀, 生长在二氧化硅表面的纳米氧化锌阵列成簇状生长, 与在聚苯乙烯表面生长的纳米氧化锌结构差异化明显。

[0079] 纳米氧化锌二氧化硅微球和聚苯乙烯微球的表面元素分析如图1b中的a和b所示。a为聚苯乙烯微球表面合成纳米氧化锌元素XDS图, b为二氧化硅表面微球合成纳米氧化锌元素XDS图。

[0080] 聚苯乙烯微球表面主要有碳元素, 氧, 锌和硅三种元素组成, 验证在聚苯乙烯表面的材料是氧化锌纳米阵列, 硅元素来自硅基板, 二氧化硅微球表面主要有氧, 硅和碳三种元素, 验证在二氧化硅表面的主要材质是纳米氧化锌

[0081] (5) 具体地, 对(4)中所获得的纳米氧化锌微球表面修饰抗体。

[0082] 三种微球用胺丙基三甲氧基硅烷修饰30min, 碳酸脂修饰10min, avidin修饰60min, biotin-EpCAM抗体修饰30min. 重复清洗一次。

[0083] 实验例2过滤芯片的制备

[0084] (1) 丙酮, 乙醇, 水分别在超声清洗400微米低阻硅片, 每次10min;

[0085] (2) 烘干后将硅表面氧化成二氧化硅氧化物, 二氧化硅厚度为2 μ m, 甩胶机涂胶1.5 μ m, 紫外光刻5s, RIE刻蚀二氧化硅, 采用STS深硅刻蚀机干法刻蚀硅65微米, 丙酮去胶。

[0086] (3) 将(2)中所获得的刻蚀模板, 尽量保持干净, 平整, 乙醇和实验超纯水清洗后, 硅烷化处理10min。

[0087] (4) 10g的聚二甲基硅氧烷按1:10混合均匀, 倒上硅模板表面, 真空抽气30min, 转移到95度热板上加热60min。

[0088] (5) 使用手术刀将PDMS模板切成所固定形状, 保持表面尽可能干净, 将载波片分别用丙酮/乙醇/水超声清洗10min, 吹干, 氧离子刻蚀机60s, 迅速封装。

[0089] 在本实施例中, 圆弧通道的宽度为100 μ m第一圆弧形通道内的栅栏结构由圆柱体和三角柱体间隔排列组成, 圆柱体直径为40 μ m, 三角柱体边长为28.5 μ m, 通道最大间距10 μ m, 最小间距6 μ m, 圆柱体所在圆心和三角形一个顶点所连成曲线平行于圆弧形通道。第二圆弧形通道内的栅栏结构由圆柱体, 等腰三角形和等腰梯形柱体组成, 圆柱体和三角柱体间隔排列; 圆柱体所在圆心和三角形一个顶点所连成曲线平行于圆弧形通道; 圆柱体直径40 μ m, 三角形边长14 μ m, 等腰梯形柱体排列在圆柱体的过滤后通道区域侧, 且与圆柱体一一对应排列; 等腰梯形上边长20 μ m, 下边长40 μ m, 等腰梯形柱体间的过滤通道最小间距为8 μ m, 最大间距为15微米。

[0090] 本实验中Filter-CHIP的循环肿瘤细胞芯片, 芯片内部参数, 芯片流体压力模拟分析和Filter-CHIP捕获循环肿瘤细胞的结构进行了分析, 如图3a为芯片的图片, 图3b为芯片

内部的扫描图片,图3c,3d为芯片的结构参数,图4为Filter-CHIP芯片的捕获循环肿瘤细胞的结构图。

[0091] 实验例3微球结合肿瘤细胞的效率测试

[0092] (1) PS微球修饰抗体:PS微球清洗,1200rpm,90s.重复3次;

[0093] (2) 10 μ g/mL的抗体孵育10min,1200rpm,90s分离出微球,重复清洗3次,10/10²/10³/10⁴/10⁵/10⁶的微球和100个mL-1MCF-7在淋巴细胞层和PBS中的混合5min。

[0094] (3) 二氧化硅微球,PS-ZnO微球,SiO₂-ZnO微球修饰抗体:合成后的三种微球,胺丙基三甲氧基硅烷活化30min,N,N' 琥珀酰亚胺碳酸脂修饰10min,avidin修饰60min,biotin-EpCAM抗体耦联30min。

[0095] (4) 抗体修饰后清洗一次,10/10²/10³/10⁴/10⁵/10⁶的微球和100mL⁻¹MCF-7在淋巴细胞层和PBS中共混5min。

[0096] (5) PS微球捕获临床样本中的肿瘤细胞:将孵育后的PS微球清洗后和淋巴细胞分离液分离后的临床血液淋巴细胞共混5min。不同微球的结合循环肿瘤细胞的效率。

[0097] 本实验的实验结果如图2a和图2b所示,从图中我们可以看出PS微球,PS-ZnO微球,SiO₂微球和SiO₂-ZnO微球和循环肿瘤细胞系MCF-7的结合效率随着微球数量的增加而快速提高,PS微球和MCF-7细胞的结合效率要高于SiO₂微球结合效率,ZnO修饰微球结合效率略高于无纳米ZnO修饰微球的效率,在微球和细胞个数比值为10²的时候,微球和细胞的结合效率差异性最明显,但随着比值的增高,是否有纳米修饰影响被减小,在比值达到10³的时候,SiO₂不修饰纳米ZnO的捕获效率略高于修饰上纳米ZnO的微球。在以下实验中,选取微球数量为10³的来结合肿瘤细胞,然后通入Filter CHIP芯片来捕获肿瘤细胞。

[0098] 本实验中的芯片捕获标记的肿瘤细胞系的结果如图10所示。从图中我们勉县可以看出肿瘤细胞的捕获的区域和位置。

[0099] 实施例4细胞系中细胞分选和富集的性能测试

[0100] (1) Filter CHIP中使用四种肿瘤细胞系MCF-7、Bxpc-3、panc-1、HeLa作为细胞模型,在微球和肿瘤细胞比值为10²,测试不同流速下的循环肿瘤细胞的捕获效率。

[0101] 本实验结果如图5所示,循环肿瘤细胞的捕获效率在流速为1ml.h⁻¹到3ml.h⁻¹的区间内随着速度的提升,捕获效率不降反升,是由于流速太低,在芯片内部不能行程稳定的湍流体,肿瘤细胞的捕获效率有限,流速低流体内细胞不能有效地被截留。在流速大于3ml.h⁻¹以后,细胞捕获效率出现降低。

[0102] (2) 微流控捕获循环肿瘤细胞纯度是重要参数之一,循环肿瘤细胞纯度影响肿瘤细胞的鉴定,Filter CHIP中使用四种肿瘤细胞系MCF-7、Bxpc-3、Panc-1、HeLa作为细胞模型,在微球和肿瘤细胞比值为10²,流速为3ml.h⁻¹时,检测循环肿瘤细胞捕获的捕获纯度。

[0103] 本实验中结果如图6所示,其中四种肿瘤细胞系Bxpc-3,HeLa,Mcf-7,Panc-1在Filter CHIP中捕获纯度在15%-40%,Filter CHIP捕获循环肿瘤细胞纯度不是很高。Filter CHIP中不同循环肿瘤细胞的纯度差异性不大,纯度在40%左右。

[0104] (3) 通过细胞表面特异性抗原和修饰在微球表面特异性抗体EP-CAM结合后的捕获效率。

[0105] (4) Filter CHIP中通过过滤阵列的过滤作用,对体积相对较大的肿瘤细胞进行捕获肿瘤细胞效率在40%-60%之间。

[0106] 本实验结果如图7所示,Filter CHIP中四种细胞系MCF-7,Bxpc-3,HeLa和Panc-1在 $3\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速下,通过细胞表面特异性抗原和修饰在微球表面特异性抗体EP-CAM结合后的捕获效率20%-60%,

[0107] 本实验结果图8所示,Filter CHIP中四种细胞系MCF-7,Bxpc-3,HeLa和Panc-1在 $3\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速下通过过滤阵列的过滤作用,对体积相对较大的肿瘤细胞进行捕获肿瘤细胞效率在40%-60%之间。

[0108] 本实验结果图9所示,Filter CHIP中四种细胞系MCF-7,Bxpc-3,HeLa和Panc-1在 $3\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$ 的流速下通过过滤阵列的过滤作用和细胞表面特异性抗原的结合微球捕获作用,对肿瘤细胞进行捕获肿瘤细胞效率在85%-95%之间。

[0109] 实施例5临床肿瘤样本的应用实例

[0110] (1)Filter CHIP测试了大量临床样本,临床样本中,我们主要选择乳腺癌患者作为研究对象,研究不同时期,是否转移和是否进行治疗等6位患者。

[0111] (2)抽取病人外周血液2mL,按比例1:1和PBS混合,缓慢滴加入3mL的血细胞分离液中,600G离心30min,抽取淋巴细胞层,加入4mL的PBS中300G离心10min,重复清洗两次。

[0112] (3)在所测试的临床样本中,DAPI和带荧光一抗CD45-PE、CKpan-FITC来共同确定循环肿瘤细胞,其中CD45是白细胞表面特异性抗体,CKpan是循环肿瘤细胞表面特异性抗体,DAPI染细胞核。

[0113] 本实验结果如图11所示,从图中我们可以看出Filter CHIP可以捕获临床样本的循环肿瘤细胞,循环肿瘤细胞通过免疫荧光标记后可以清楚的被识别。图11c是乳腺癌临床病人的循环肿瘤细胞,其中图11a是DAPI染色Filter CHIP捕获的细胞,DAPI阳性为细胞,图11b中绿色是CKpan-FITC染色的细胞,CKpan是肿瘤细胞的特异性抗原,阳性表示这是循环肿瘤细胞。图11c是CD45-PE染料染色的细胞,CD45为白细胞表面特异性抗原,红色阳性表面该细胞为白细胞。图11d是明场图,明场图中圆形结构和三角结构形成的阵列结构清楚,通道明显,图中央区域一个循环肿瘤细胞外围四个白细胞。图11e是合成图,将图11a、11b、11c、11d合成后,PE,FITC和DAPI所对应的细胞完全重合。该乳腺癌转移病人1mL血液中检测出17个循环肿瘤细胞,在三角区域的细胞荧光清楚,其中三角区域中间细胞的绿色荧光是循环肿瘤细胞,周围四个红色荧光标记的是白细胞,合并后的图11e可以清楚观察循环肿瘤细胞和白细胞的结构。

[0114] 如图12是在十二个临床病样本实验的数据,从实验中我们可以得到FliterCHIP芯片可以发现乳腺癌病人的不同时期被捕获的肿瘤细胞是有相关性,肿瘤晚期的临床病人体内的循环肿瘤细胞远高于早期病人。

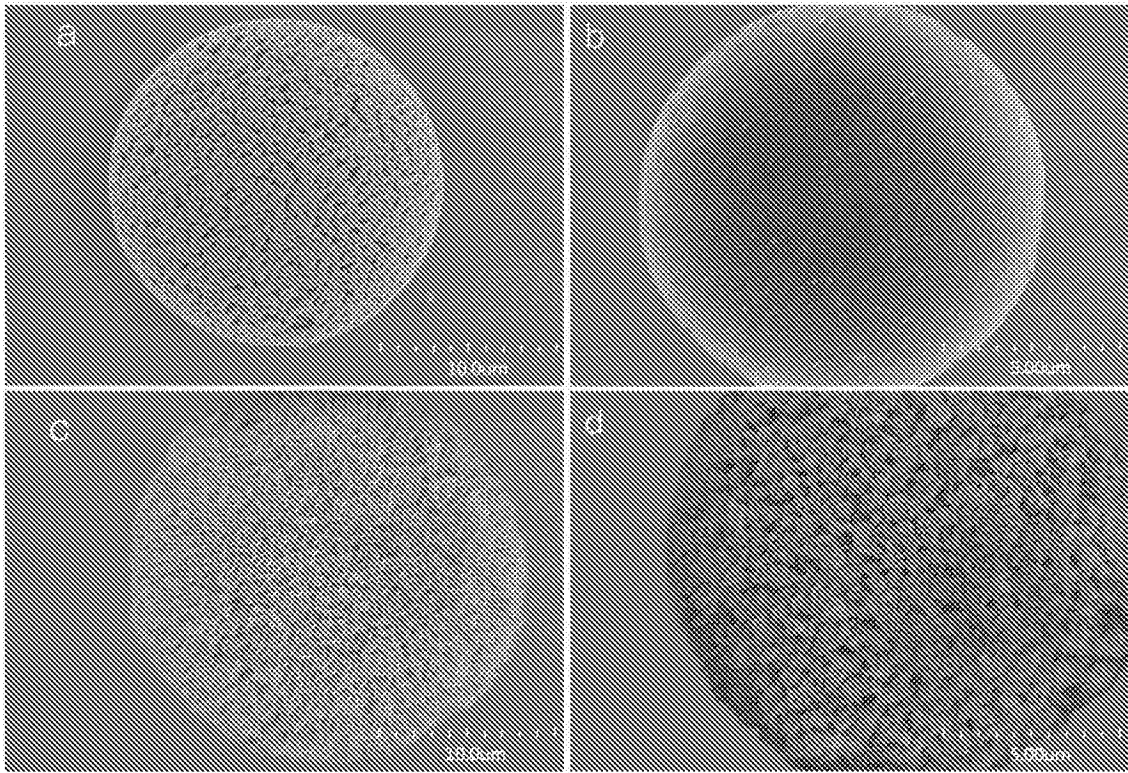


图1a

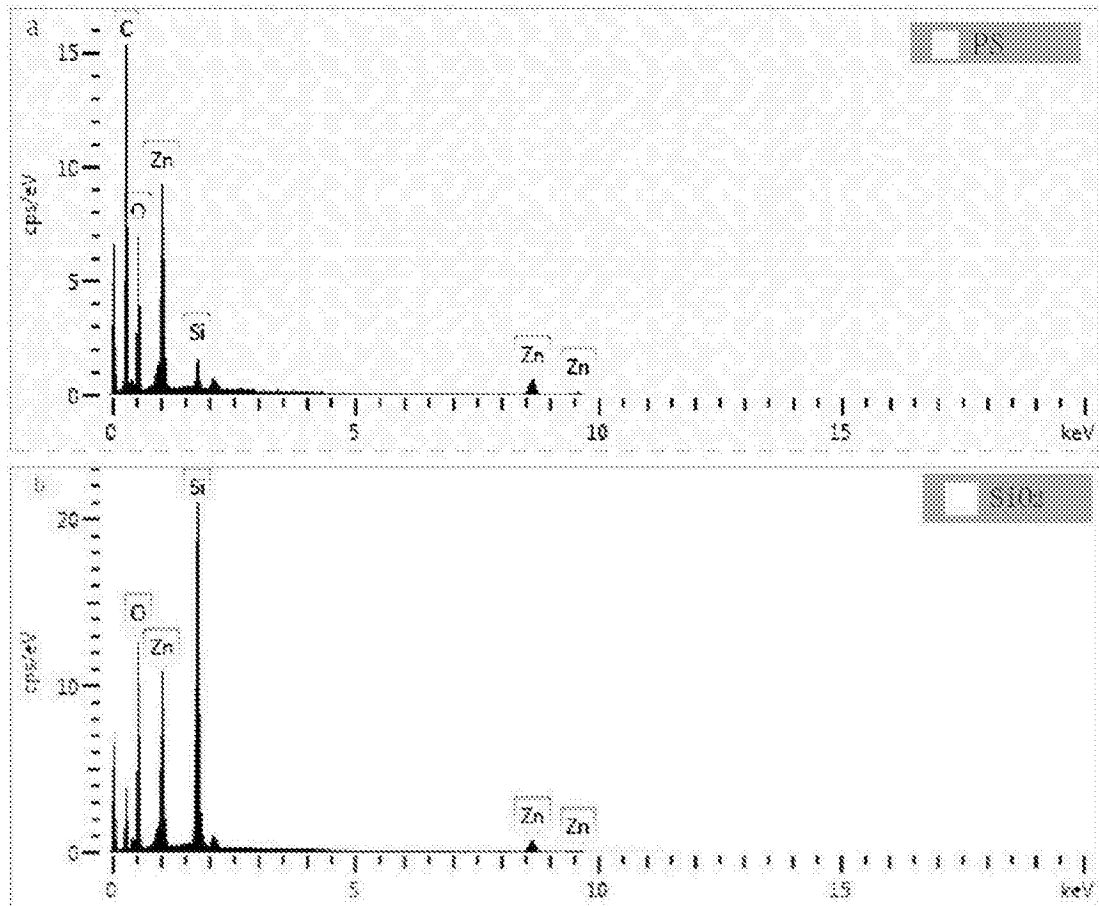


图1b

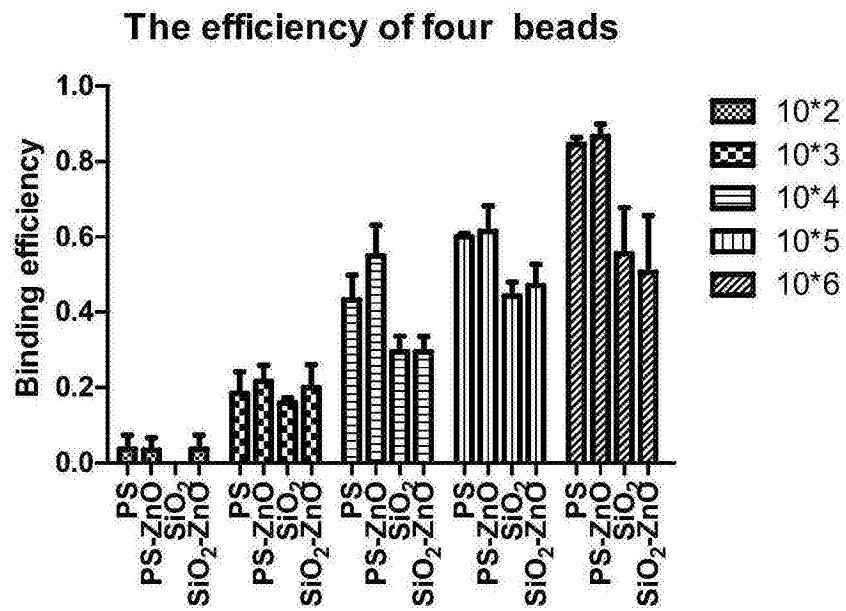


图2a

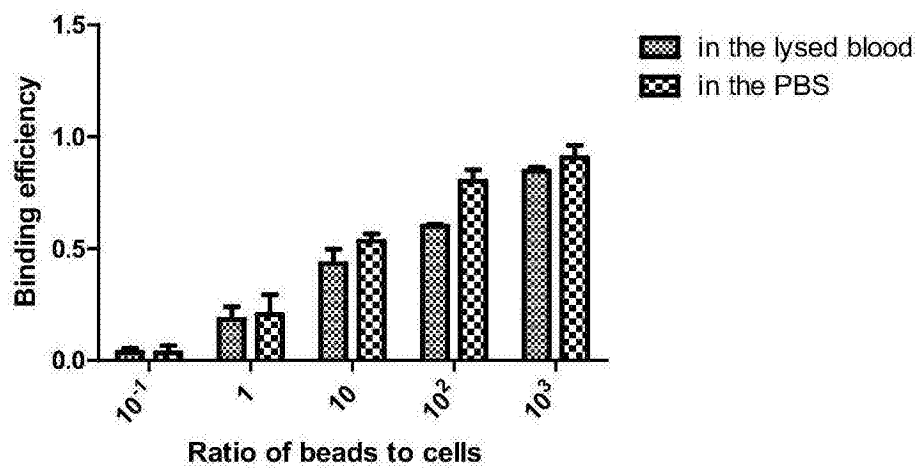


图2b

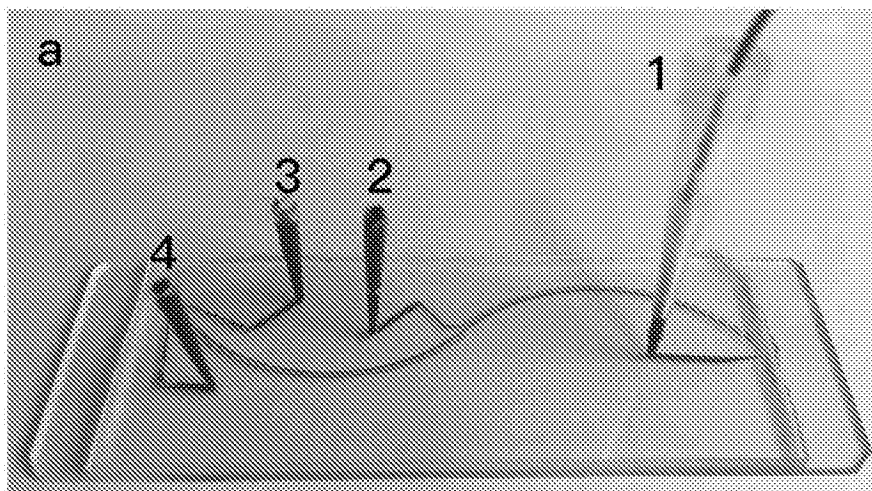


图3a

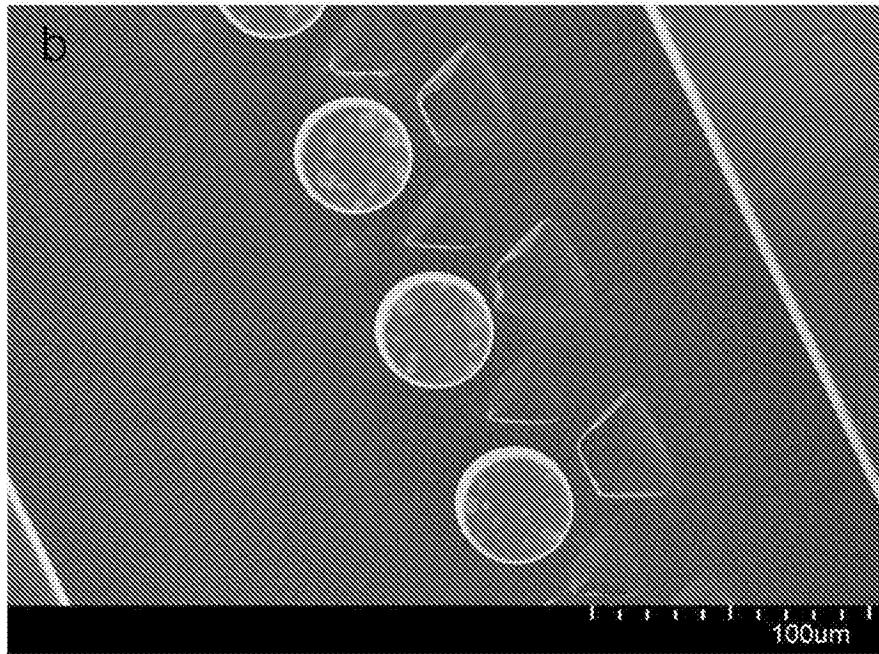


图3b

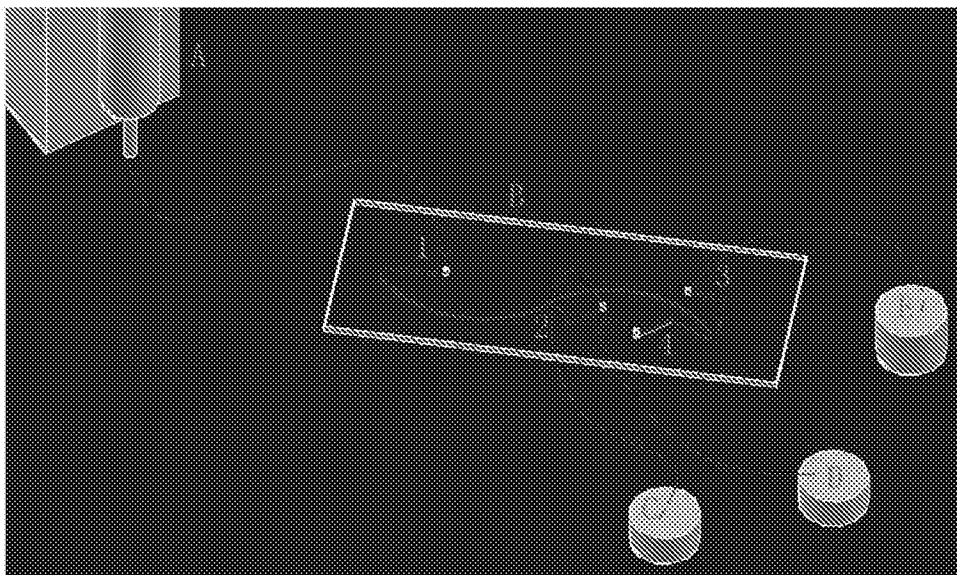


图3c

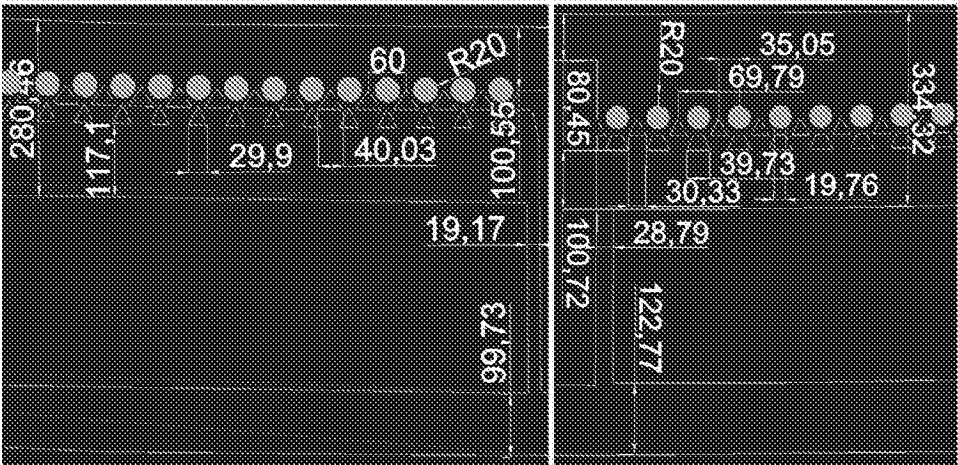


图3d

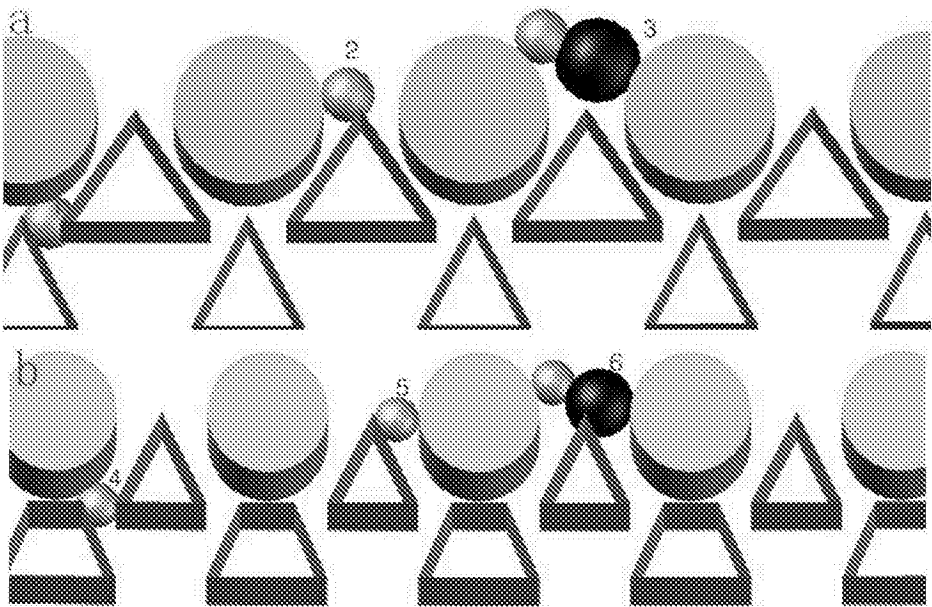


图4

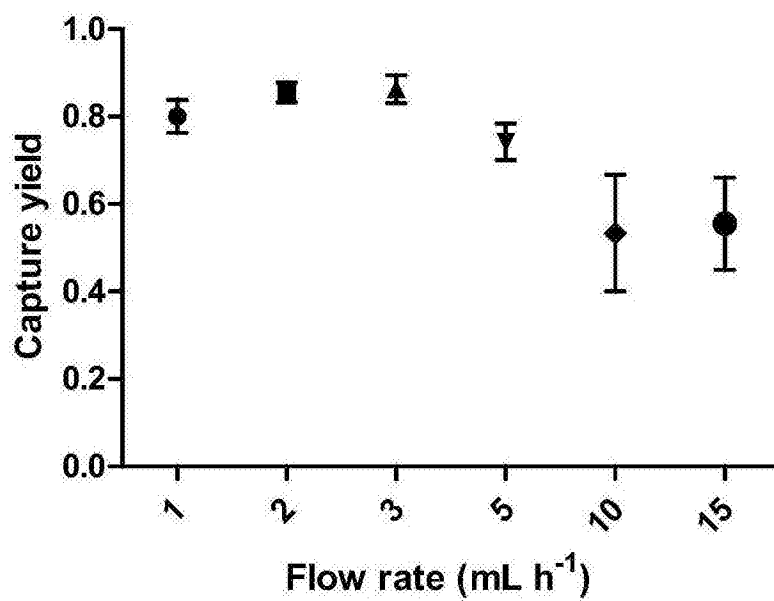


图5

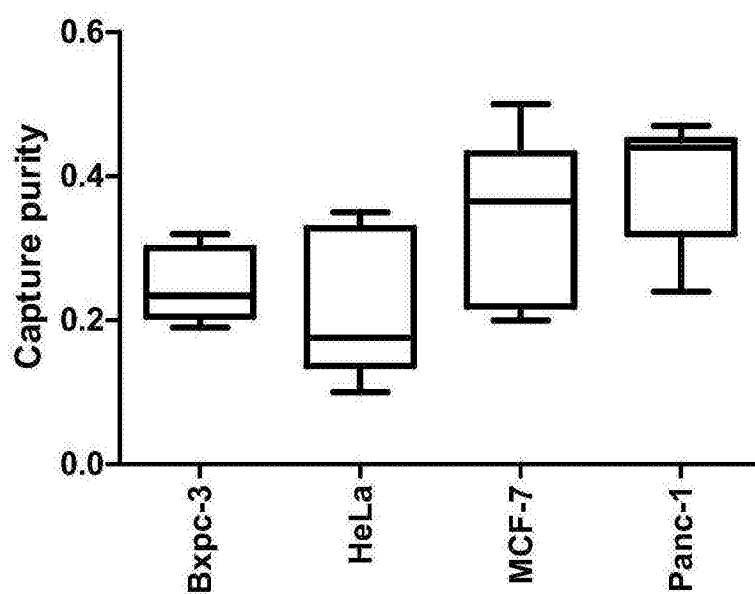


图6

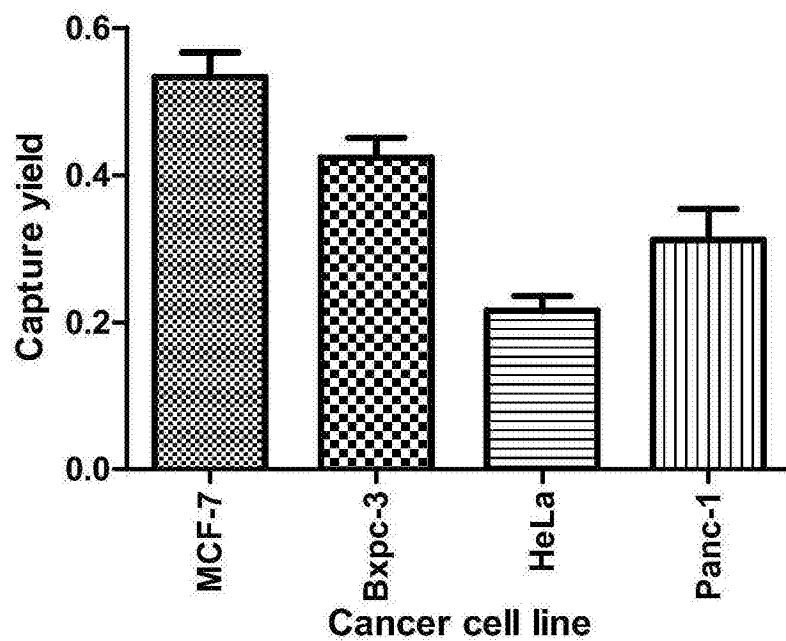


图7

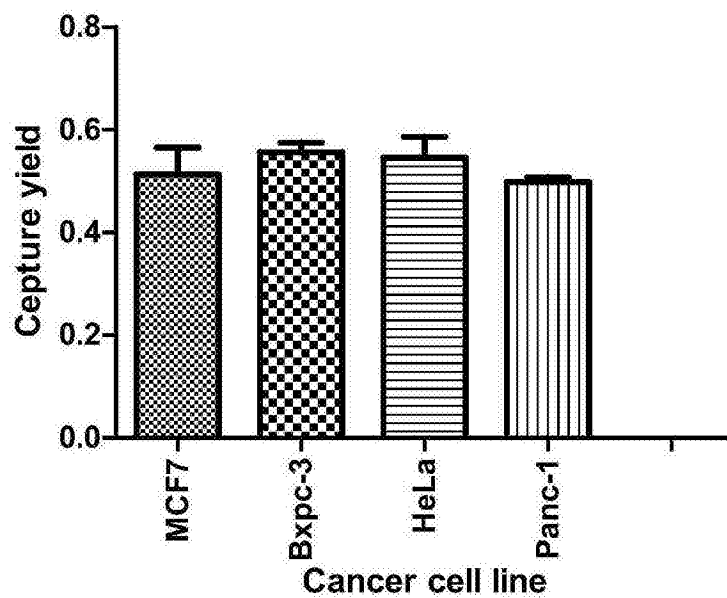


图8

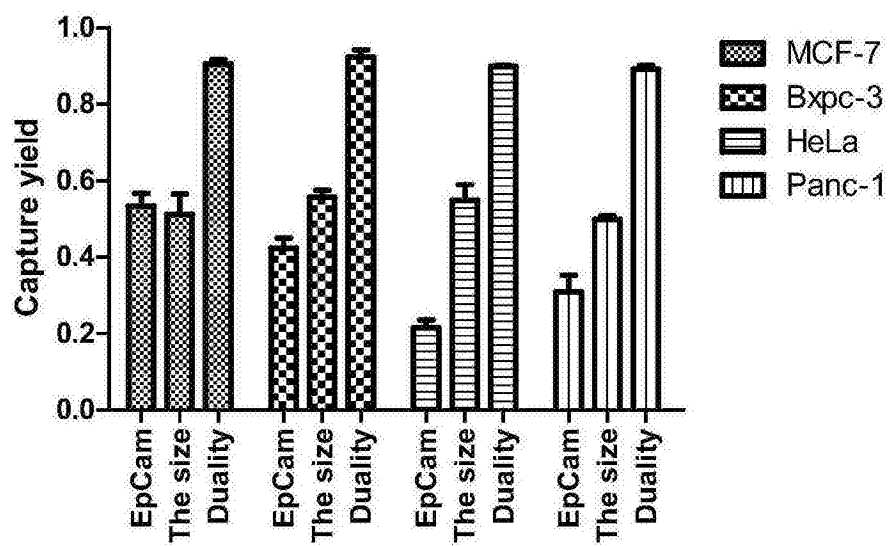


图9

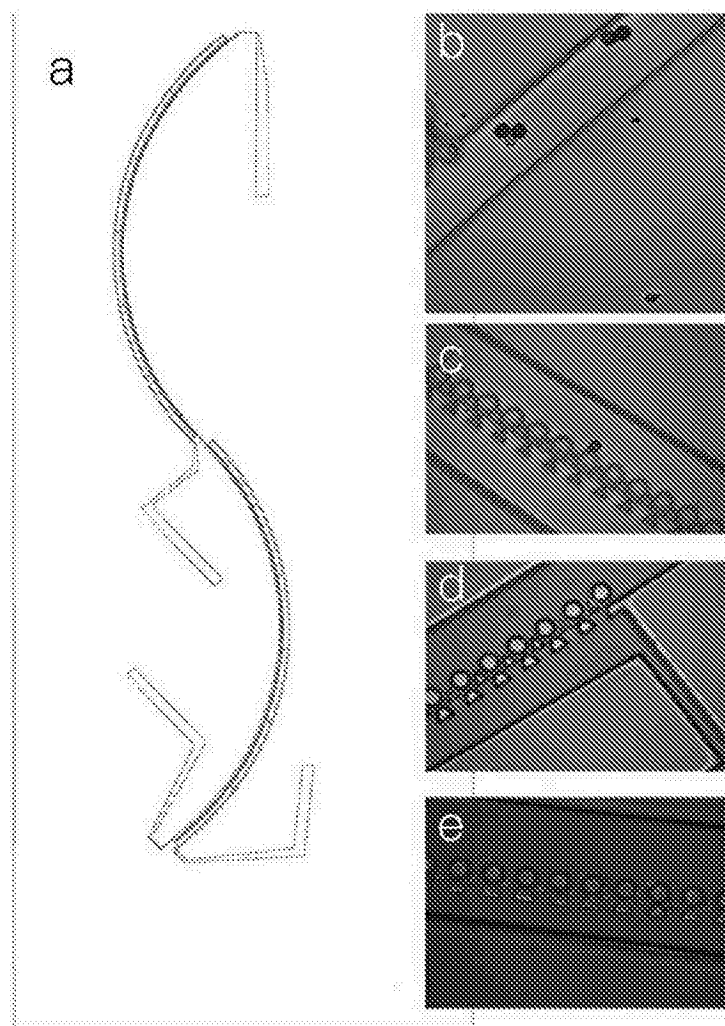


图10

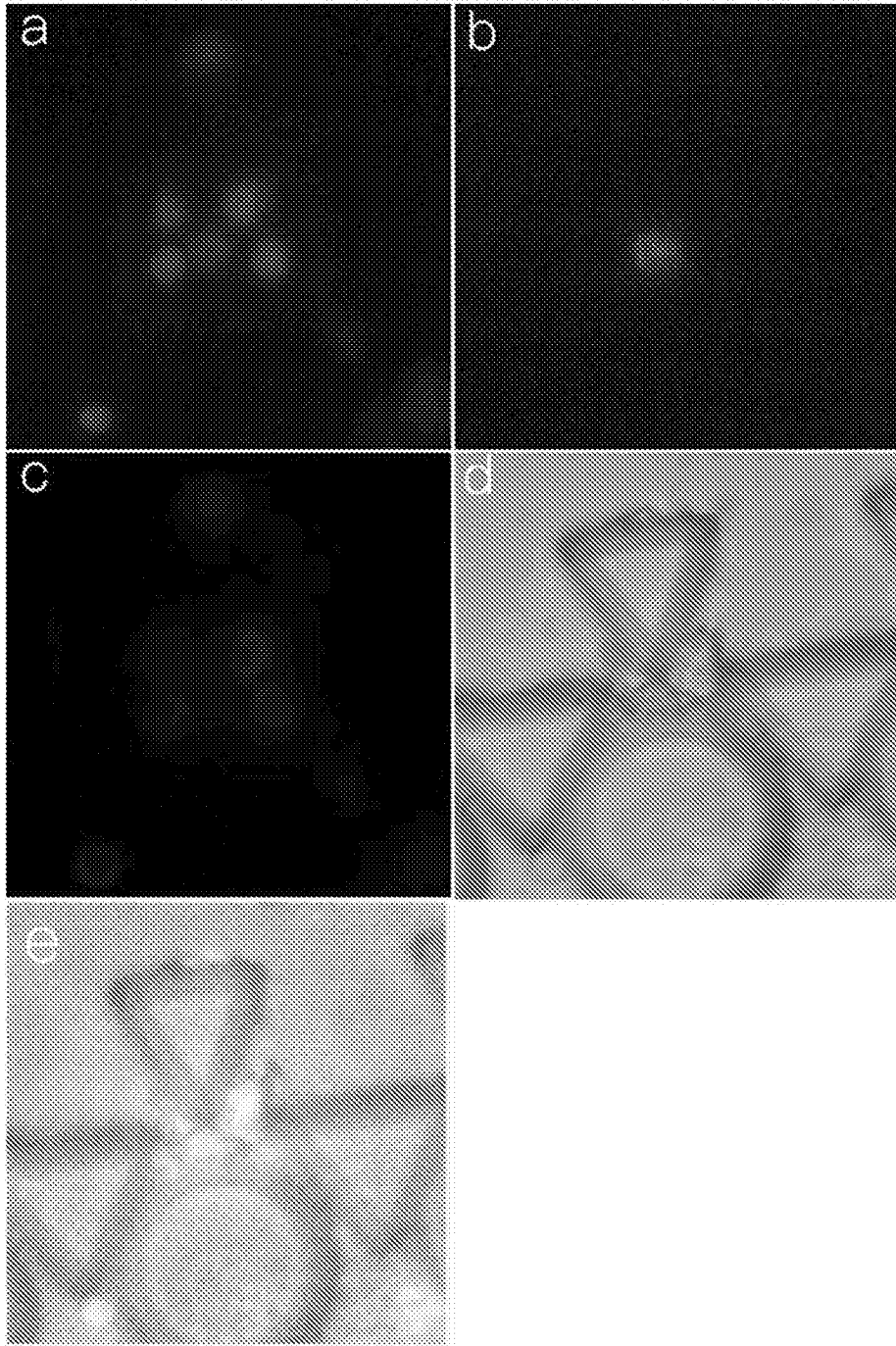


图11

	癌症临床病人	肿瘤细胞个数
1	乳腺癌早期	2 个/ml
2	乳腺癌早期	1 个/ml
3	乳腺癌早期	0
4	乳腺癌晚期肺（已发生转移没化疗）	17 个/ml
5	乳腺癌晚期	6 个/ml
6	乳腺癌晚期（化疗）	2 个/ml
7	自愿者	0
8	自愿者	0
9	自愿者	0

图12