



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105486865 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 13

(21) 申请号 201410467913. 4

(22) 申请日 2014. 09. 15

(71) 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38 号

(72) 发明人 王本 肖云 唐睿康

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224

代理人 胡红娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 35/00(2006. 01)

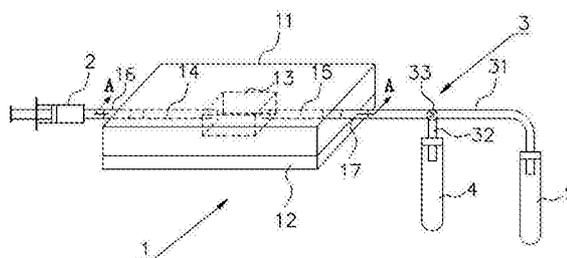
权利要求书1页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称

一种用于细胞分选和富集的微流控芯片及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用于细胞分选和富集的微流控芯片及其应用。微流控芯片包括叠置固定的芯片本体和盖体,所述盖体设有凹槽、与凹槽相连接的进样通道和出样通道,所述凹槽的开口朝向芯片本体;芯片本体由以下方法制备获得:(a) 在导电基底表面进行壳聚糖/普鲁士蓝纳米颗粒的层层自组装处理;(b) 在步骤(a)所获产品的表面进行聚二甲基二烯丙基氯化铵/聚丙烯酸的层层自组装处理;(c) 对步骤(b)所获产品依次进行羧基活化处理、亲和素修饰、生物素化抗体偶联,获得所述芯片本体。本发明在微流控芯片中引入环境刺激响应型材料,其在外界刺激的作用能够发生性质变化,能够实现被捕获细胞的可控、无损释放。



1. 一种用于细胞分选和富集的微流控芯片,其特征在于,包括叠置固定的芯片本体和盖体,所述盖体设有凹槽、与凹槽相连通的进样通道和出样通道,所述凹槽的开口朝向芯片本体;

所述芯片本体由以下方法制备获得:

(a) 在导电基底表面进行壳聚糖 / 普鲁士蓝纳米颗粒的层层自组装处理;

(b) 在步骤 (a) 所获产品的表面进行聚二甲基二烯丙基氯化铵 / 聚丙烯酸的层层自组装处理;

(c) 对步骤 (b) 所获产品依次进行羧基活化处理、亲和素修饰、生物素化抗体偶联,获得所述芯片本体。

2. 如权利要求 1 所述的微流控芯片,其特征在于,步骤 (a) 中,将导电基底交替地浸泡在壳聚糖溶液、普鲁士蓝纳米颗粒溶液中进行层层自组装处理,浸泡次数均为 10 次以上,每次浸泡 5min 以上。

3. 如权利要求 2 所述的微流控芯片,其特征在于,导电基底在壳聚糖溶液、普鲁士蓝纳米颗粒溶液中的浸泡次数均为 21 ~ 30 次,每次浸泡 10min。

4. 如权利要求 2 所述的微流控芯片,其特征在于,所述壳聚糖溶液的浓度为 0.1 ~ 10mg/mL,溶剂为 0.01 ~ 1M 醋酸溶液;所述普鲁士蓝纳米颗粒溶液的浓度为 0.15 ~ 15mg/mL,普鲁士蓝纳米颗粒的粒径为 10 ~ 20nm。

5. 如权利要求 1 ~ 4 任一所述的微流控芯片,其特征在于,所述导电基底为 ITO 导电玻璃。

6. 如权利要求 5 所述的微流控芯片,其特征在于,步骤 (b) 中,将步骤 (a) 所获产品交替地浸泡在聚二甲基二烯丙基氯化铵溶液、聚丙烯酸溶液中进行层层自组装处理,浸泡次数均为 2 次以上,每次浸泡时间为 5min 以上。

7. 一种细胞分选和富集装置,其特征在于,包括:

如权利要求 1 ~ 6 任一所述的微流控芯片;

微量注射泵,与进样通道相连;

三通管,包括主管以及一端与主管相连通的侧管,所述主管一端与出样通道对接,另一端连接有目标细胞收集管,所述侧管与废液收集管相连,主管与侧管的连通处设有三通球阀;

电化学工作站,用于向芯片本体施加电压。

8. 如权利要求 1 ~ 6 任一所述微流控芯片在分选和富集循环肿瘤细胞中的应用。

9. 如权利要求 8 所述的应用,其特征在于,所述微流控芯片上偶联的生物素化抗体为生物素化的 anti-EpCAM,生物素化抗体偶联的条件为:生物素化的 anti-EpCAM 溶液浓度为 10 μ g/mL。

一种用于细胞分选和富集的微流控芯片及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于现代医学技术领域,具体涉及一种用于细胞分选和富集的微流控芯片及其应用。

背景技术

[0002] 癌症是发达国家第一位、发展中国家第二位的死亡病因。从临床上讲,造成癌症患者死亡率高的主要原因是疾病诊断的延迟和治疗方案的不恰当。从生理上来说,癌症造成的死亡大多数是由于肿瘤细胞通过血源性途径迁移到全身其他器官导致的。在这个过程中,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。越来越多的证据表明肿瘤细胞从原发部位转移到其他部位在癌症发生的早期就已经发生。因此,收集 CTCs 并对其生物化学分析,一方面能为癌症病人的早期诊断提供了一个有效的渠道,另一方面,它们也可以提供转移性恶性肿瘤的相关生物学信息。

[0003] CTCs 往往具有以下特点:外周血中 CTCs 的含量极少,大约每 1ml 血液中含有 1-100 个 CTCs,因此从外周血中分选 CTCs 面临巨大的技术挑战;作为上皮细胞的 CTCs 往往比血细胞大很多;CTCs 的变形性较大,而且,癌细胞越软,侵袭转移能力越强。CTCs 的以上特性使得从外周血中收集 CTCs 面临种种困难。

[0004] 现有的 CTCs 分选富集方法主要包括三种:(1) 基于细胞大小的微过滤设备。(2) 免疫磁珠分选系统:即采用交联有抗体 anti-EpCAM(Epithelial Cell Adhesion Molecule, 上皮细胞粘附分子)的纳米磁珠捕获 CTCs,再借助磁力作用分选 CTCs。该方法后来发展成为目前 CTCs 检测领域唯一经美国 FDA 认证的产品 Cell Search™。(3) 微流控芯片系统:该技术采用包括抗体和核酸契合寡聚物(apptamer)在内的捕获分子修饰在目标物种或者材料表面,然后再借助于微流体的特定复杂结构控制细胞-材料界面之间的相互作用力。

[0005] 以上策略在 CTCs 分选富集中存在着一些限制,比如,采用方法(1)进行细胞分选时,特异性不高,严重制约着该方法捕获细胞的纯度;由于磁珠的摩擦作用和细胞侵入性,通过方法(2)获得的细胞往往都是死细胞,只能实现细胞的个数统计,而无法对细胞的生物特征作进一步研究;方法(3)用于富集环境中相对数目较多的目标细胞时是行之有效的手段,但对于 CTCs 等相对数目较少的细胞,即便能够将其与非目标细胞分开,却缺乏对细胞进行收集或富集的手段。难以获得目标细胞。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种用于细胞分选和富集的微流控芯片,该微流控芯片中含有环境响应性材料,能够实现黏附在芯片上的目标细胞的可控释放,便于目标细胞的分选富集。

[0007] 一种用于细胞分选和富集的微流控芯片,包括叠置固定的芯片本体和盖体,所述盖体设有凹槽、与凹槽相连通的进样通道和出样通道,所述凹槽的开口朝向芯片本体;

[0008] 所述芯片本体由以下方法制备获得:

[0009] (a) 在导电基底表面进行壳聚糖/普鲁士蓝纳米颗粒的层层自组装处理;

[0010] (b) 在步骤 (a) 所获产品的表面进行聚二甲基二烯丙基氯化铵 / 聚丙烯酸的层层自组装处理 ;

[0011] (c) 对步骤 (b) 所获产品依次进行羧基活化处理、亲和素修饰、生物素化抗体偶联, 获得所述芯片本体。

[0012] 步骤 (a) 在导电基底表面形成微电压响应释放层, 步骤 (b) 在微电压响应释放层外形成连接层, 连接层外带有羧基 (由 PAA 提供); 然后对连接层外的羧基进行活化处理, 并在羧基上连接亲和素, 最后利用亲和素与生物素之间的作用力, 将能与目标细胞特异性结合的抗体偶联在连接层外, 形成细胞黏附层, 从而获得所述芯片本体。

[0013] 样品经进样通道注入凹槽中, 凹槽的开口朝下, 从而样品中细胞可与凹槽开口处的芯片本体充分接触, 样品中的目标细胞被芯片本体外的抗体捕获, 从而固定在芯片本体表面; 未被捕获的非目标细胞则为游离状态, 从出样通道先行流出。

[0014] 目标细胞释放的方法为: 对芯片本体施加微电压 (约 1.25V), 微电压响应释放层因普鲁士蓝 (PB) 纳米颗粒发生氧化还原反应变为电中性而瓦解, 目标细胞即释放, 进而被收集起来。

[0015] 本发明中, 芯片本体表面尽量保持平整、光滑, 盖体可采用 PDMS 材料制成, 便于在其上设置凹槽、进样通道和出样通道。芯片本体与盖体之间的固定方式为: 当盖体较薄 (3mm 以下) 时, 分别采用离子蚀刻机对盖体与芯片本体的接触面进行表面羟基化处理, 然后将盖体与芯片本体贴合, 直接密闭封装; 当盖体较厚 (3mm 以上) 时, 采用小型文件夹将盖体与芯片本体上下固定即可。

[0016] 具体地, 所述含有微电压响应释放层的芯片本体的制备方法为:

[0017] (a) 在导电基底表面进行壳聚糖 / 普鲁士蓝纳米颗粒的层层自组装处理;

[0018] 微电压响应释放层 $(\text{CHI}/\text{PB})_n$ 的调控因素为电压, 因此要求基底具有导电性能, 作为优选, 所述导电基底为 ITO 导电玻璃。

[0019] 在制备芯片本体之前, ITO 导电玻璃或玻璃需通过等离子体刻蚀等手段进行清洗; 清洗后, ITO 导电玻璃或玻璃表面带负电荷。而层层自组装是通过材料与材料之间的静电相互作用实现的, 因此:

[0020] 步骤 (a) 中, 将导电基底交替地浸泡在壳聚糖溶液、普鲁士蓝纳米颗粒溶液中进行层层自组装处理, 浸泡次数均为 10 次以上, 每次浸泡 5min 以上; 在交替浸泡的间隙, 需采用 pH 4.0 的去离子水清洗至少三分钟, 洗去前一次浸泡中未紧密组装的分子, 保证结构稳定, 下同。

[0021] 优选地, 导电基底在壳聚糖溶液、普鲁士蓝纳米颗粒溶液中的浸泡次数均为 21 ~ 30 次 (即 $(\text{CHI}/\text{PB})_n$ 中层数 n 为 21 ~ 30), 每次浸泡 10min。

[0022] 在 $n \geq 21$ 时, $(\text{CHI}/\text{PB})_n$ 能够完整地覆盖导电基底, 施加电压后可以实现目标细胞的完全释放。若 n 值太小, $(\text{CHI}/\text{PB})_n$ 覆盖不完全, 难以保证目标细胞的有效释放。

[0023] 壳聚糖 (CHI) 带正电荷, 普鲁士蓝 (PB) 纳米颗粒带负电荷; 交替浸泡在上述溶液中, 从而能在带负电荷的导电基底上通过静电吸引力进行层层自组装。

[0024] 作为优选, 所述壳聚糖溶液的浓度为 0.15 ~ 15mg/mL, 溶剂为 0.01 ~ 1M 醋酸溶液; 所述普鲁士蓝纳米颗粒溶液的浓度为 0.15 ~ 15mg/mL, 普鲁士蓝纳米颗粒的粒径为 10 ~ 20nm。

[0025] 作为进一步优选,所述壳聚糖溶液的浓度为 1.5mg/mL,溶剂为 0.1M 醋酸溶液;所述普鲁士蓝纳米颗粒溶液的浓度为 1.5mg/mL,普鲁士蓝纳米颗粒的粒径为 10 ~ 20nm。

[0026] 在该浓度下,高分子溶液既具有较好的溶解性和流动性,同时又能满足层层自组装所需要的浓度要求。普鲁士蓝纳米颗粒的小尺寸保证了采用颗粒进行层层自组装的可行性,若颗粒太大,自组装的难度就会增加。

[0027] (b) 在步骤 (a) 所获产品的表面进行聚二甲基二烯丙基氯化铵 / 聚丙烯酸的层层自组装处理;

[0028] 形成微电压响应释放层 (CHI/PB)_n 后,处于最外层的为带负电荷的普鲁士蓝纳米颗粒;为了在材料表面引入羧基,需要对表面进行聚二甲基二烯丙基氯化铵 (PDADMAC) / 聚丙烯酸 (PAA) 的层层自组装处理。因此,将所获产品交替地浸泡在聚二甲基二烯丙基氯化铵溶液、聚丙烯酸溶液中,浸泡次数均为 2 次以上,每次浸泡时间为 5min 以上。

[0029] 聚二甲基二烯丙基氯化铵 (PDADMAC) 带正电荷,聚丙烯酸 (PAA) 带负电荷,不仅便于形成静电吸引力,且聚丙烯酸裸露在外侧,其羧基可用于连接亲和素。

[0030] 聚二甲基二烯丙基氯化铵溶液和聚丙烯酸溶液的浓度优选为 1 ~ 10mg/mL,更优选为 5mg/mL;采用的溶剂均为 pH 为 4 的 0.5M 氯化钠溶液。连接层 (PDADMAC/PAA)_n 中,层数 n 优选为 4(即各浸泡 4 次),以保证连接层表面带有足够量的羧基。

[0031] (c) 对步骤 (b) 所获产品依次进行羧基活化处理、亲和素修饰、生物素化抗体偶联,获得所述芯片本体。

[0032] 首先,利用 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 作为交联剂进行羧基活化处理,EDC 的浓度优选为 0.2M,NHS 的浓度优选为 0.05M。

[0033] 然后,置于 10 μg/mL 的亲和素溶液中孵育 90min,亲和素的氨基与温度响应释放层外的羧基偶联,从而完成亲和素修饰。

[0034] 最后,置于生物素化抗体溶液中孵育,利用生物素与亲和素的相互作用将生物素化抗体偶联在温度响应释放层外,即完成芯片本体的制备。

[0035] 抗体的种类视目标细胞的种类而定,当本发明的微流控芯片用于分选和富集 CTCs 时,优选采用生物素化的 anti-EpCAM,生物素化抗体偶联的条件为:生物素化的 anti-EpCAM 溶液浓度为 10 μg/mL(生物素化的 anti-EpCAM 溶于含 0.1% BSA 的 1×PBS 中),37℃ 下孵育 60min。

[0036] 本发明还提供了一种细胞分选和富集装置,包括:

[0037] 所述微流控芯片;

[0038] 微量注射泵,与进样通道相连;

[0039] 三通管,包括主管以及一端与主管相连通的侧管,所述主管一端与出样通道对接,另一端连接有目标细胞收集管,所述侧管与废液收集管相连,主管与侧管的连通处设有三通球阀;

[0040] 电化学工作站,用于向芯片本体施加电压。

[0041] 微量注射泵将样品经进样通道注入凹槽内,目标细胞吸附在芯片本体表面,非目标细胞先经出样通道、三通管流入废液收集管(此时目标细胞收集管的通路关闭,由三通球阀实现);经清洗后,利用电化学工作站的两个电极向芯片施加电压,促使目标细胞释放,并经出样通道、三通管流入目标细胞收集管中被收集起来(此时废液收集管的通路关

闭,由三通球阀实现)。

[0042] 需要释放目标细胞时,可直接对微流控芯片施加电压,也可将芯片本体分离出来,对芯片本体施加电压,此时释放的目标细胞可直接吸取,不必经过出样管道、三通管等造成不必要的损耗。

[0043] 在释放目标细胞之前,微流控芯片可以进行多次目标细胞捕获,以获得更多的目标细胞。

[0044] 本发明还提供了所述微流控芯片在分选和富集循环肿瘤细胞中的应用。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。

[0045] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0046] (1) 本发明在微流控芯片中引入微电压响应释放层这一环境刺激响应型材料,借助于环境刺激响应型材料在光、电、磁、温度以及特异性酶等外在刺激的作用能够发生性质变化的特性,实现被捕获的细胞(包括微生物)在更广范围下的特异性无损释放、富集;

[0047] (2) 本发明的微流控芯片具有良好的细胞捕获效率,在血液样品流速 0.5mL/h 情况下,可以获得 95%~100% 的 CTCs 捕获效率;而且,从癌症病人的新鲜血液样品中被捕获的 CTCs 具有很好的细胞活性,便于后续的科学研究和病情评价分析。

附图说明

[0048] 图 1 为含微电压响应释放层的芯片本体的制备过程及工作原理图;

[0049] 其中,“Oxygen plasma etch”表示氧等离子体蚀刻,“Layer by layer”表示层层自组装,CHI/PB 表示壳聚糖/普鲁士蓝纳米颗粒,PAA/PDADMAC 表示聚丙烯酸/聚二甲基二烯丙基氯化铵,NHS/EDC 表示 N-羟基琥珀酰亚胺/1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺,Anti-EpCAM 表示抗上皮细胞粘附分子抗体;

[0050] 图 2a 为本发明一种细胞分选和富集装置的结构示意图;

[0051] 图 2b 为图 2a 中的 A-A 剖面图;

[0052] 图 3a 为微电压响应释放层 (CHI/PB)_n 中 n 分别取 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 时所对应产品的外观图;

[0053] 图 3b 为利用椭圆偏振光谱仪测得的不同微电压响应释放层处理层数的产品的薄膜厚度;

[0054] 其中,“Thickness(nm)”表示厚度(nm),“Number of Bilayers(n)”表示 CHI/PB 的层数(n);

[0055] 图 3c 为利用紫外可见分光光度计检测不同微电压响应释放层处理层数的产品在 700nm 处的吸收值的类线性变化图;

[0056] 其中,“Absorbance(700nm)”表示 700nm 处的吸光度,“Number of Bilayers(n)”表示 CHI/PB 的层数(n);

[0057] 图 3d 为利用扫描电子显微镜获得 (CHI/PB)_n 中 n = 27 的产品表面形貌图;

[0058] 图 3e 为利用原子力显微镜获得 (CHI/PB)_n 中 n = 27 的产品表面形貌图;

[0059] 图 4a 为利用微流控芯片捕获肝癌细胞 HepG2 后的显微图片;

[0060] 图 4b 为经过电化学处理后芯片本体的显微图片;

- [0061] 图 4c 为随着电化学反应时间的延长芯片本体的厚度变化曲线；
- [0062] 其中，“Absorbance (700nm)”表示 700nm 处的吸光度，“Time (min)”表示电化学反应时间 (min)；
- [0063] 图 4d 为随着电化学反应时间的延长被捕获细胞的吸附率变化曲线；
- [0064] 其中，“Harvest cell (%)”表示被捕获细胞的吸附率 (%)，“Time (min)”表示电化学反应时间 (min)；
- [0065] 图 4e 为吸附在芯片本体表面的细胞活性表征图；
- [0066] 图 4f 为被捕获细胞释放后的细胞活性表征图；
- [0067] 图 4g 为 (CHI/PB)_n 中 n = 15 时芯片本体上被捕获细胞的释放效率图；
- [0068] 图 4h 为 (CHI/PB)_n 中 n = 21 时芯片本体上被捕获细胞的释放效率图；
- [0069] 图 5a 为样品流速对微流控芯片的细胞捕获率的影响；
- [0070] 其中，“Flow rate (mL/h)”表示流体流速 (mL/h)，“Capture yield (%)”表示捕获率 (%)；
- [0071] 图 5b 为微流控芯片对不同溶液环境中、不同浓度 HepG2 细胞的捕获率；
- [0072] 其中，“Spiked number of cells”表示细胞浓度；“Capture yield (%)”表示捕获率 (%)；
- [0073] 图 5c 为微流控芯片对不同癌细胞的捕获率；
- [0074] 其中，“Capture yield (%)”表示捕获率 (%)；
- [0075] 图 5d 为利用免疫荧光染色验证被捕获细胞的类型；
- [0076] 图 6a 为利用微流控芯片对临床样本中 CTCs 进行分选；
- [0077] 其中，左上图为利用 DAPI (4', 6-二脒基-2-苯基吲哚) 对被捕获细胞进行细胞核染色的结果，右上图为被捕获细胞的细胞角蛋白 (Cytokeratin) 染色情况，左下图为确认被捕获细胞表面有无 CD45 的情况，右下图为前三张图片的整合结果；
- [0078] 图 6b 为对分选获得的 CTCs 进行 mRNA 提取的结果图；
- [0079] 其中，Marker 表示分子量标准，control 表示对照，Released 表示被释放细胞。

具体实施方式

- [0080] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步详细说明。
- [0081] 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。
- [0082] 本具体实施方式中用到的主要实验材料包括：
- [0083] (1) 试验用癌细胞株：均购自 ATCC，产品目录号分别为：肝癌细胞株 (Hep G2, ATCC® HB-8065™)，肺腺癌细胞株 (A549, ATCC® CRM-CCL-185™)，乳腺癌细胞株 (MCF7, ATCC® HTB-22™)，口腔鳞状细胞癌细胞株 (KB, ATCC® CCL-17™) 和宫颈癌细胞株 (HeLa, (ATCC® CCL-2™))。
- [0084] 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、全血或裂解血中。

[0085] (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, 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐购自 TCI, 其他化学试剂购自 Wako, ITO 导电玻璃购自 DeltaTechnologies。

[0086] (3) 壳聚糖溶液的配制: 壳聚糖以 1.5mg/mL 的浓度溶解于 0.1M 醋酸溶液中, 然后采用 0.45 μm 聚醚砜超滤膜真空抽滤, 所得溶液使用盐酸或者氢氧化钠溶液调节 pH 至 4.0。

[0087] (4) PB 纳米颗粒溶液的配制: 在搅拌状态下, 将 10mM 的 FeCl₂ 溶液逐滴加入相同体积的 50mM K₃Fe(CN)₆ 和 KCl 溶液中, 然后采用 3,000Da 纤维素透析膜对反应液进行透析; 收集透析残余溶液, 采用邻苯二氢钾缓冲液或盐酸和氢氧化钠溶液调节 pH 至 4.0。保持溶液中 PB 纳米颗粒终浓度为 1.5mg/mL。

[0088] (5) 聚二甲基二烯丙基氯化铵溶液和聚丙烯酸溶液的配制: 将聚丙烯酸钠和聚二甲基二烯丙基氯化铵分别溶解于 0.5M 氯化钠溶液中, 终浓度为 5g/L。

[0089] 上述 FeCl₂ 溶液、K₃Fe(CN)₆ 溶液、KCl 溶液、盐酸、氢氧化钠溶液氯化钠溶液均采用三蒸水配制。

[0090] 实施例 1 芯片本体的制备

[0091] 芯片本体的制备过程及工作原理如图 1 所示, 其制备过程包括以下步骤:

[0092] (1) 依次采用二氯甲烷、丙酮、甲醇和去离子水超声清洗 ITO 导电玻璃 15min, 然后使用等离子体刻蚀 (Harrick PCD 32G) 处理 ITO 导电玻璃 5min, 将处理后的 ITO 导电玻璃放入事先配好的壳聚糖溶液中静置 3min;

[0093] (2) 按照层层自组装的标准方法, 将 ITO 导电玻璃交替地浸泡在壳聚糖溶液、普鲁士蓝纳米颗粒溶液中进行层层自组装处理, 每次浸泡 10min, 两次浸泡的间隙采用 pH 4.0 的去离子水清洗 3min, 在 ITO 导电玻璃表面形成微电压响应释放层 (CHI/PB)₂₇;

[0094] (3) 按照层层自组装的标准方法, 将步骤 (1) 所获产品交替地浸泡在聚二甲基二烯丙基氯化铵溶液、聚丙烯酸溶液中进行层层自组装处理, 每次浸泡 10min, 两次浸泡的间隙采用 pH 4.0 的去离子水清洗 3min, 在 (CHI/PB)₂₇ 外形成连接层 (PDADMAC/PAA)₄;

[0095] (4) 利用 EDC(0.2M)/NHS(0.5M) 对步骤 (3) 所获产品进行羧基活化处理;

[0096] (5) 将步骤 (4) 所获产品置于 10 μg/ml 的亲素溶液中孵育 90min;

[0097] (6) 将步骤 (5) 所获产品置于 10 μg/mL 的生物素化人上皮细胞吸附因子抗体溶液中 (溶于含有 0.1% BSA 的 1×PBS 中), 37℃ 下孵育 60min; 获得含微电压响应释放层的芯片本体。

[0098] 实施例 2 细胞分选和富集装置的制备

[0099] 如图 2a 所示, 本实施例一种细胞分选和富集装置, 包括微流控芯片 1、微量注射泵 2、三通管 3、废液收集管 4、目标细胞收集管 5 以及电化学工作站 (图中省略)。

[0100] 由图 2a 和 2b 可见, 微流控芯片 1 包括叠置固定的芯片本体 12 (由实施例 1 制得) 和盖体 11, 盖体 11 设有凹槽 13、与凹槽 13 相连通的进样通道 14 和出样通道 15, 且凹槽 13 的开口朝向芯片本体 12。

[0101] 盖体 11 采用 PDMS 材料制成, 便于在其上设置凹槽 13、进样通道 14 和出样通道 15。盖体 11 与芯片本体 12 的固定方式为: 当盖体 11 较薄 (3mm 以下) 时, 分别采用离子蚀刻机对盖体 11 与芯片本体 12 的接触面进行羟基化处理, 然后将盖体 11 与芯片本体 12 贴合, 直

接密闭封装；当盖体 11 较厚（3mm 以上）时，采用小型文件夹将盖体 11 与芯片本体 12 上下固定即可。

[0102] 如图 2a 所示，微量注射泵 2 通过第一连接管 16 与进样通道 14 相连，用于注入样品，并控制样品的流动速度；三通管 3 包括主管 31 以及一端与主管 31 相连通的侧管 32，主管 31 一端通过第二连接管 17 与出样通道 15 对接，另一端连接有目标细胞收集管 5，侧管 32 与废液收集管 4 相连，主管 31 与侧管 32 的连通处设有三通球阀 33；电化学工作站用于向芯片本体 12 施加电压。

[0103] 本实施例细胞分选和富集装置的工作原理为：

[0104] 微量注射泵 2 将样品经进样通道 14 注入凹槽 13 内，目标细胞吸附在芯片本体 12 表面，非目标细胞先经出样通道 15、三通管 3 流入废液收集管 4（此时目标细胞收集管 5 的通路关闭，由三通球阀 33 实现）；经清洗后，利用电化学工作站的两个电极向芯片本体 12 施加电压，促使目标细胞释放，并经出样通道 15、三通管 3 流入目标细胞收集管 5 中被收集起来（此时废液收集管 4 的通路关闭，由三通球阀 33 实现）。从三通管 3 流出的目标细胞液也可直接被细胞培养皿收集起来，经培养后做进一步的生物化学分析。

[0105] 对于含有温度响应释放层的微流控芯片 1，则直接将微流控芯片 1 置于 4℃ 下一段时间，促使目标细胞释放，并被目标细胞收集管收集。

[0106] 需要释放目标细胞时，可直接对微流控芯片 1 施加电压或低温处理，也可将芯片本体 12 分离出来，对芯片本体 12 施加电压或低温处理，此时释放的目标细胞可直接吸取，不必经过出样管道 15、三通管 3 等造成不必要的损耗。

[0107] 在释放目标细胞之前，可多次加样，从而微流控芯片 1 可以进行多次目标细胞捕获，以获得更多的目标细胞。

[0108] 实施例 3 形貌表征和性能测试

[0109] (1) 对实施例 1 步骤 (2) 所获产品进行形貌表征

[0110] 图 3a 所示的为微电压响应释放层 (CHI/PB)_n 中 n 分别取 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 时，所对应产品的外观图。

[0111] 利用椭圆偏振光谱仪测量不同处理层数的产品的薄膜厚度，结果如图 3b 所示。

[0112] 利用紫外可见分光光度计检测不同处理层数的产品在 700nm 处的吸收值的类线性变化，结果如图 3c 所示。

[0113] 利用扫描电子显微镜获得 n = 27 的产品表面形貌图，如图 3d 所示。

[0114] 利用原子力显微镜获得 n = 27 的产品表面形貌图，如图 3e 所示。

[0115] (2) 对实施例 1 芯片本体的细胞捕获与释放性能进行测试

[0116] 以肝癌细胞 HepG2 为例，测试芯片本体的细胞捕获与释放性能：将芯片本体放置于 12 孔板中，将 1mL 浓度为 10⁵ 个/mL 的细胞涂于芯片本体上，37℃、5% CO₂ 的环境下孵育 45min，然后采用磷酸缓冲溶液冲洗 3 次。然后对芯片本体施加 1.25V 的电压考察被捕获细胞的释放性能。结果如图 4a、4b、4c、4d、4e、4f 所示。

[0117] 由图 4a、4b 可见，芯片本体能够高效捕获 HepG2，并且在芯片本体施加电压（1.25V）后，HepG2 能够有效释放；由图 4c、4d 可见，随着芯片本体施加电压的时间的延长，芯片本体的厚度逐渐变小，HepG2 在芯片本体表面的吸附率也逐渐降低；由图 4e、4f 可见，HepG2 无论是吸附还是释放，其细胞活力均较高，表面本发明的芯片本体对细胞基本无损

伤。

[0118] 同时,本实施例还发现, $(\text{CHI/PB})_n$ 中 n 取不同数值时,芯片本体上被捕获细胞完全释放的时间会有差异。结果如图 4g、4h 所示。

[0119] 由图 4g 可见, $n = 15$ 时,所得到的芯片本体在细胞释放过程中不能实现 100% 的细胞释放效果;由图 4h 可见, $n = 21$ 时,芯片本体可以实现 100% 的细胞释放效率; $n = 27$ 时,芯片本体也可以实现 100% 的细胞释放效率。

[0120] (3) 对微流控芯片的细胞捕获与释放性能进行测试

[0121] 利用实施例 2 的细胞分选和富集装置,测试样品流速对微流控芯片的细胞捕获率的影响,结果见图 5a。由图 5a 可见,在不同的样品流速下,微流控芯片的细胞捕获率存在显著不同,流速越大,捕获率越低。

[0122] 分别利用 PBS 溶液、全血、裂解血配置不同浓度的肝癌细胞溶液,测试微流控芯片对 HepG2 的捕获率,结果见图 5b。由图 5b 可见,流速为 0.5mL/h 时,微流控芯片在三种溶液环境下均可以达到 90% 以上的细胞捕获率,表明该微流控芯片可以完成多种溶液环境下的细胞分选目标,且结果基本保持稳定一致。

[0123] 利用 PBS 缓冲溶液分别配置相同浓度 (100 个 /mL) 的各癌细胞溶液 (口腔鳞癌 KB 细胞,肺癌 A549 细胞,人宫颈癌 HeLa 细胞和人乳腺癌 MCF7 细胞),测试微流控芯片对各癌细胞的捕获率,结果见图 5c。由图 5c 可见,该微流控芯片对上皮细胞源的实体瘤细胞具有广谱的通用性。

[0124] 将捕获有细胞的芯片本体置于含 22mM calcein AM 和 4mM ethidium bromide 的 PBS 缓冲溶液中孵育 30min,然后采用磷酸缓冲溶液清洗芯片本体并置于荧光显微镜下观察结果 (见图 5d)。结合激光共聚焦显微镜确定被捕获细胞为肿瘤细胞,而不是血液中的其他细胞。

[0125] 实施例 4 临床肿瘤样本的应用实例

[0126] 在医院中采用包含有 EDTA 抗凝剂的真空取血管采集健康人及胰腺癌肿瘤病人的外周血,放置于 4℃ 冰箱,并在 24 小时内处理完毕。

[0127] 利用实施例 2 的装置对各外周血样本进行分选处理,处理步骤为:

[0128] 采用 0.5mL/h 的流速进行细胞捕获测试,测试外周血总量为每个样本 1mL。采用免疫荧光染色鉴定被捕获细胞种类,并对捕获细胞进行 RNA 提取,反转录,PCR 和凝胶电泳测试,结果见图 6a、6b 所示。

[0129] 由图 6a 可见,利用本发明的装置从胰腺癌肿瘤病人的裂解血样本中成功分选到 CTCs 细胞,而从健康人的裂解血样本中未分选到 CTCs 细胞,并由免疫荧光染色证实。由图 6b 可见,通过本发明装置获取的 CTCs 细胞实现了对 mRNA 的无损提取,证实了本发明装置对 CTCs 细胞后续分子分析的可行性。

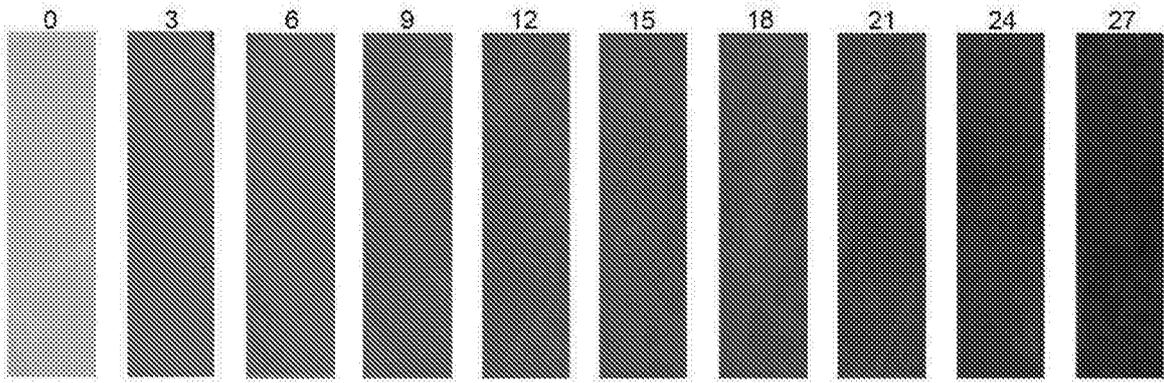


图 3a

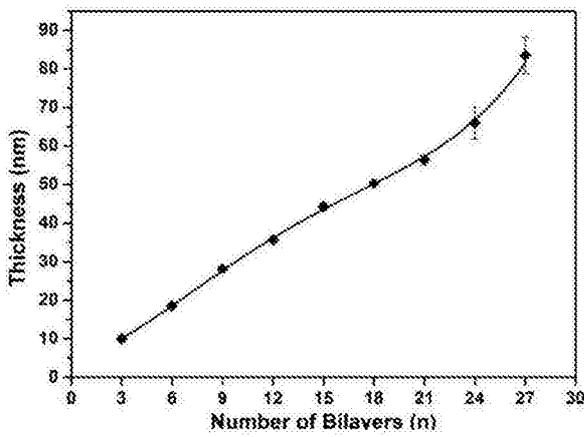


图 3b

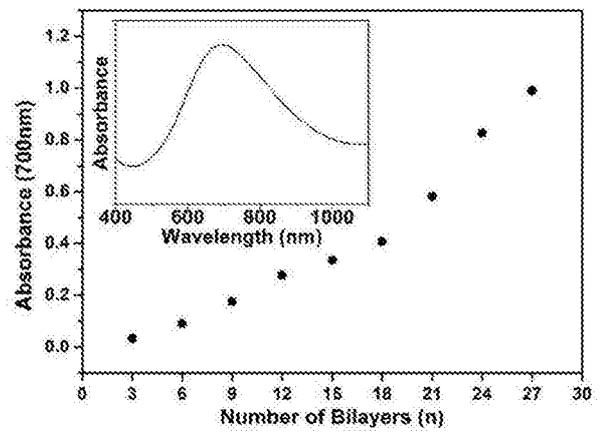


图 3c

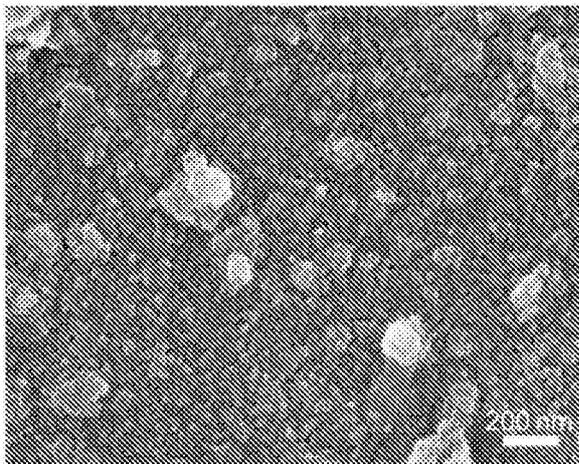


图 3d

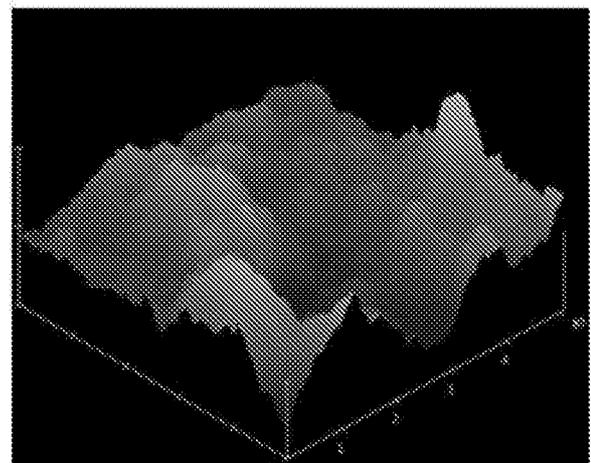


图 3e

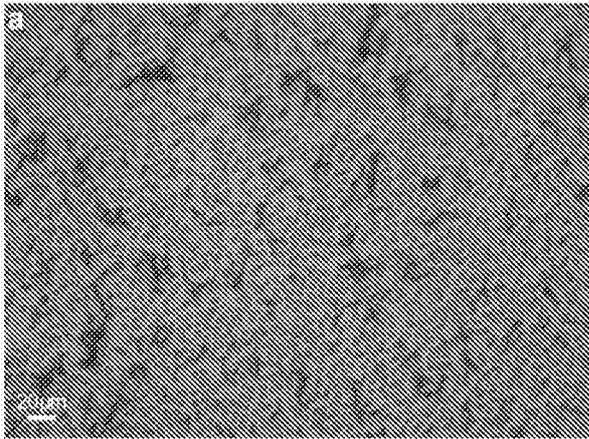


图 4a

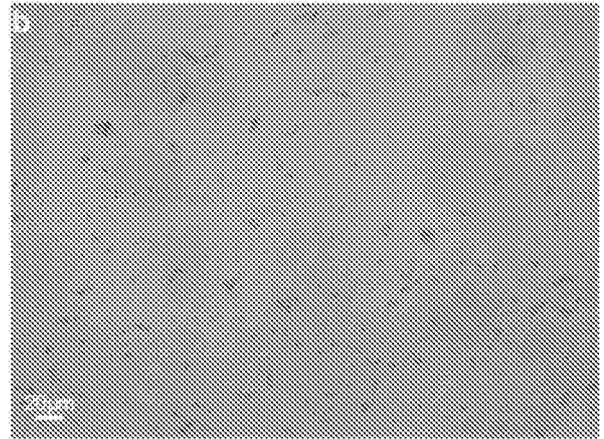


图 4b

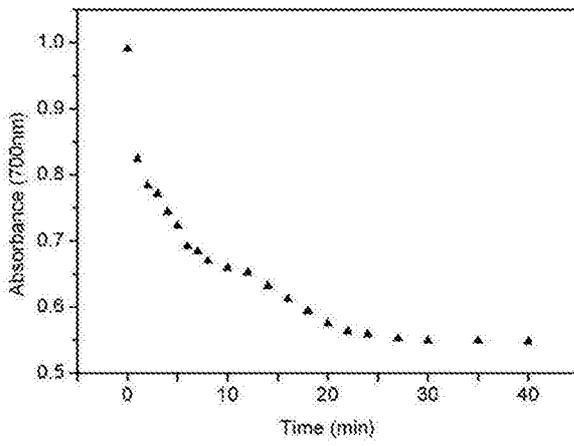


图 4c

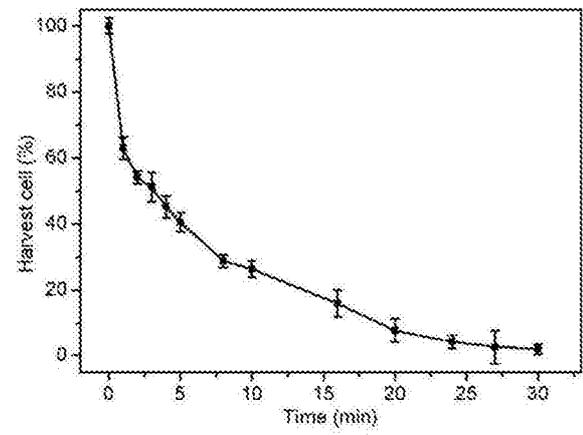


图 4d

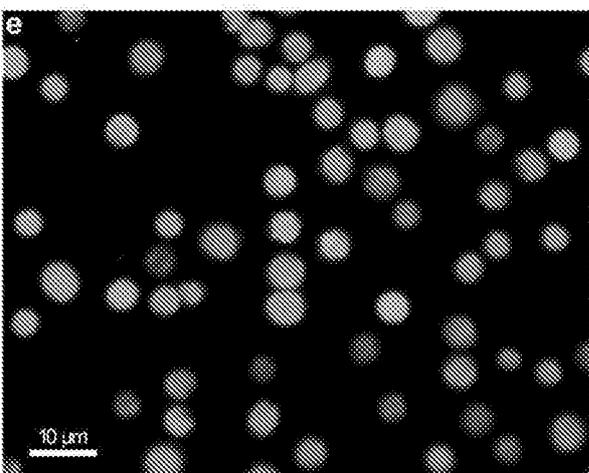


图 4e

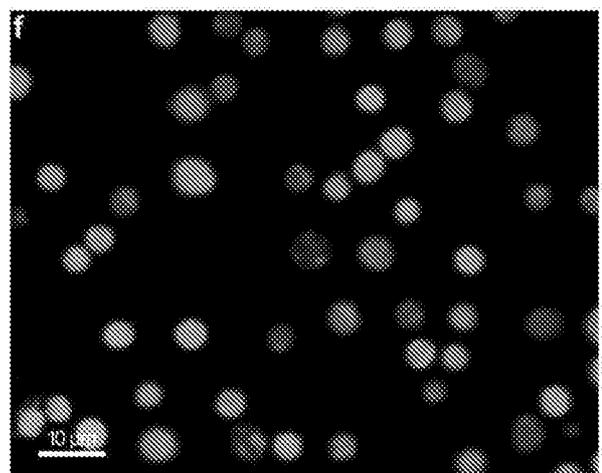


图 4f

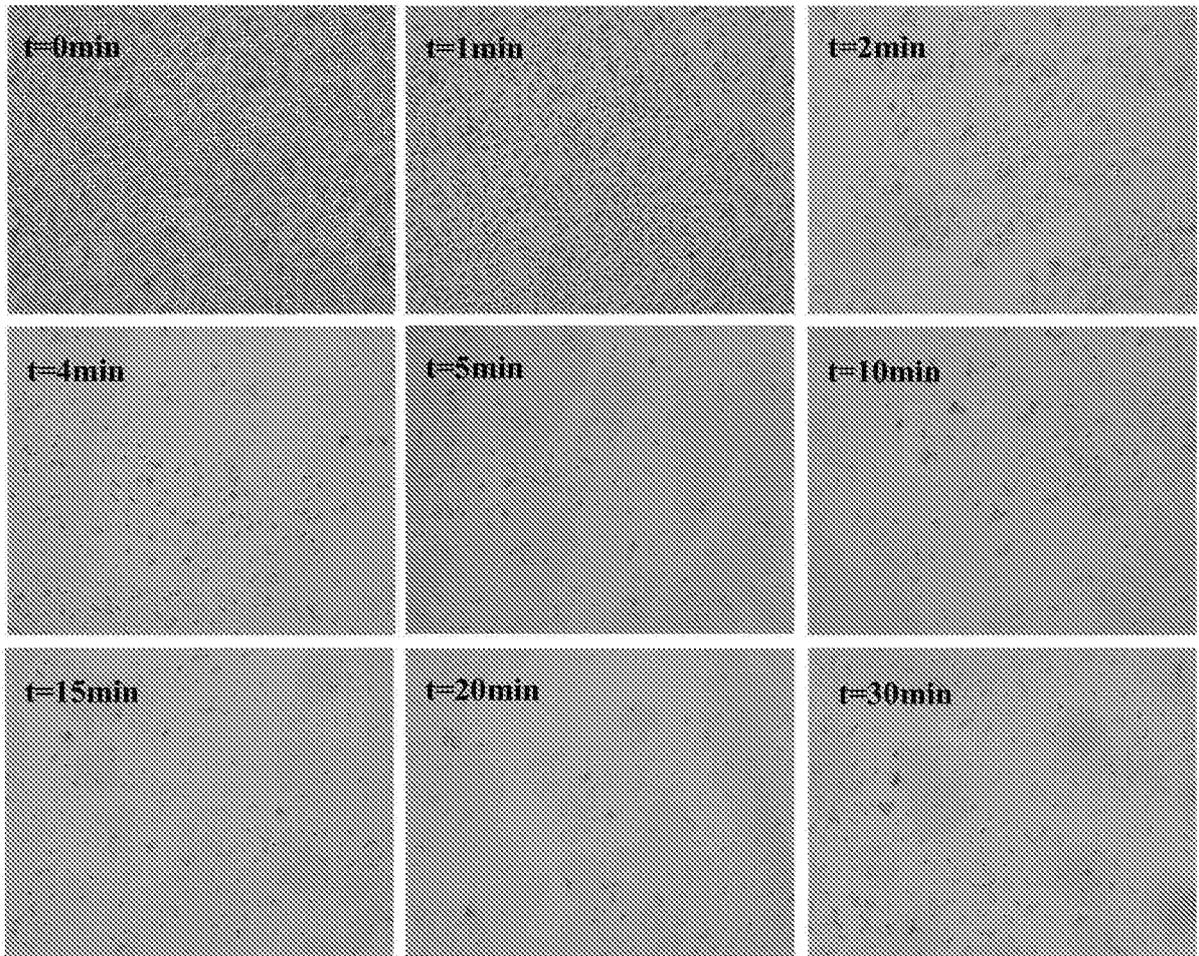


图 4g

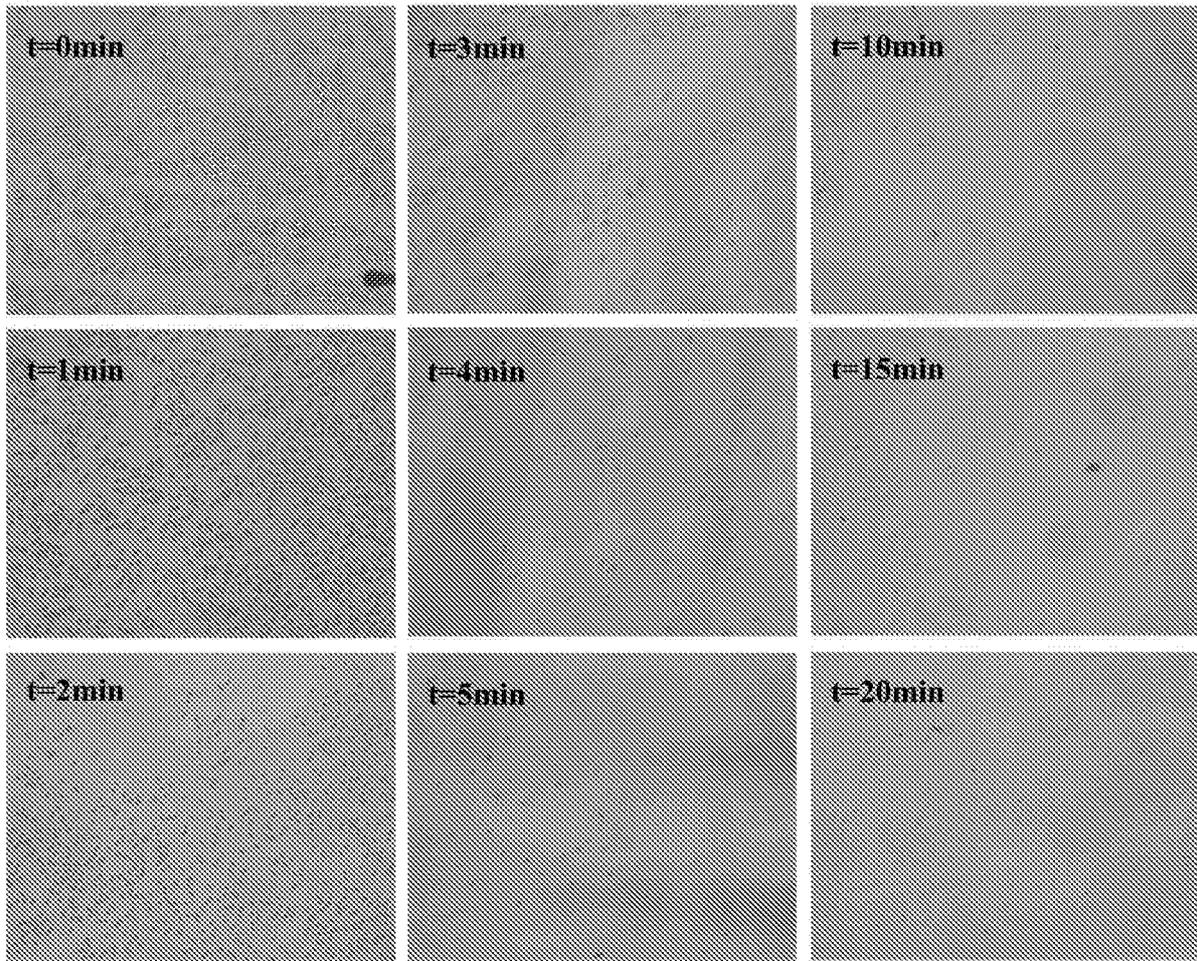


图 4h

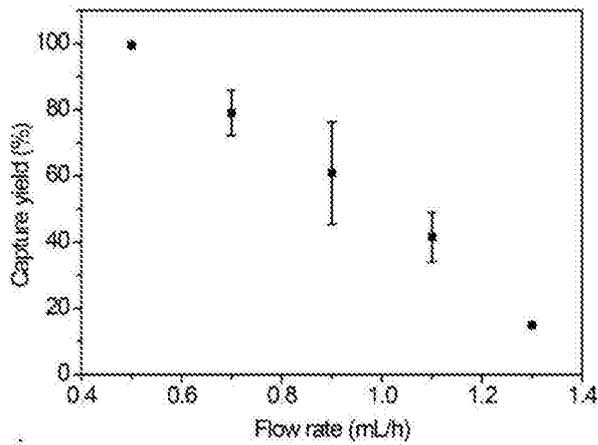


图 5a

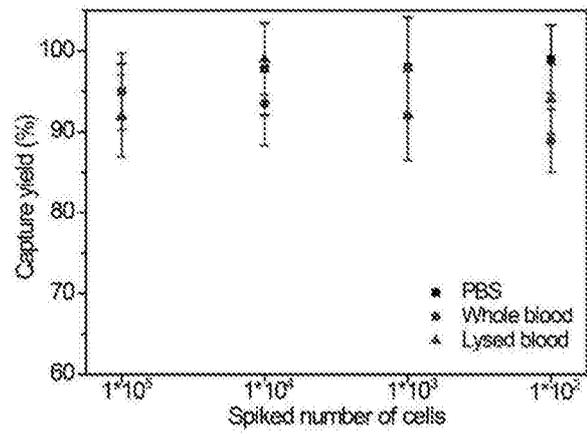


图 5b

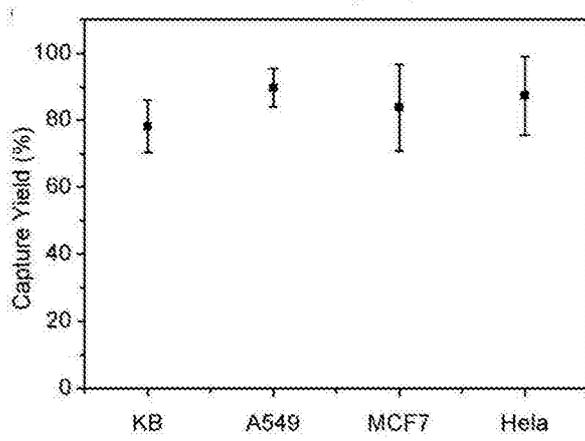


图 5c

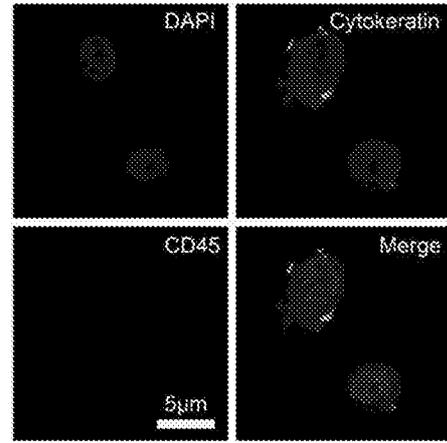


图 5d

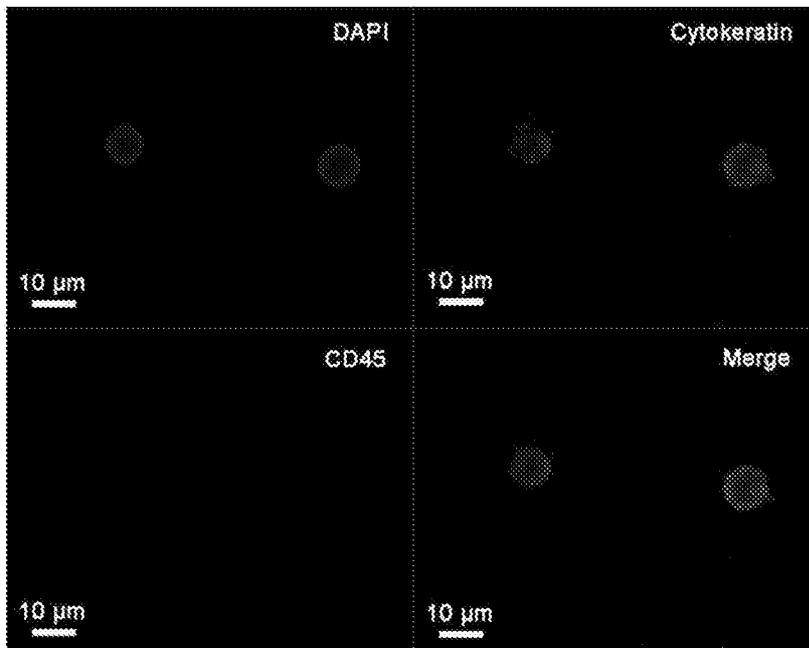


图 6a

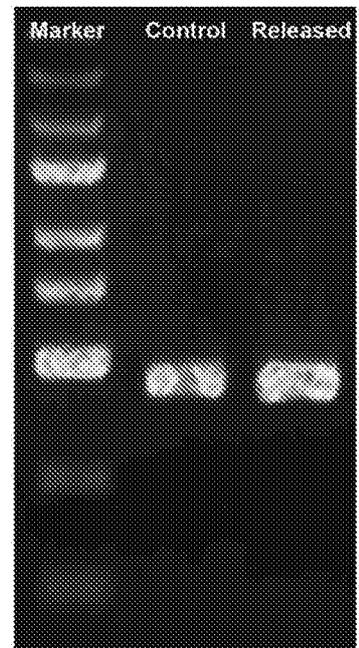


图 6b