



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103235124 A

(43) 申请公布日 2013. 08. 07

(21) 申请号 201310139673. 0

(22) 申请日 2013. 04. 22

(71) 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路 220 号

(72) 发明人 高明霞 张祥民 张鹏

(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司

31200

代理人 陆飞 盛志范

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

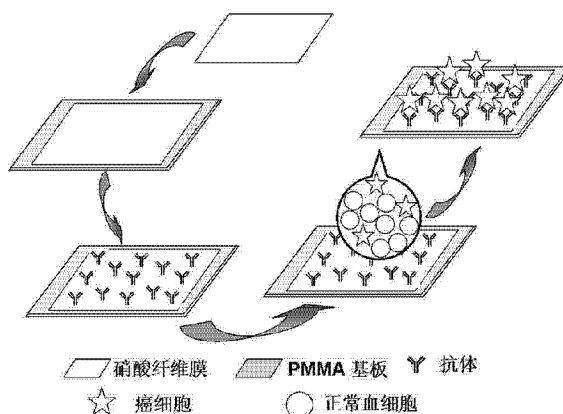
权利要求书1页 说明书3页 附图3页

(54) 发明名称

一种基于硝酸纤维素膜的便捷癌细胞捕获芯片

(57) 摘要

本发明属于生物分析与检测技术领域, 具体为一种循环肿瘤细胞(CTC) 捕获芯片及其制备方法和应用。本发明 CTC 芯片以硝酸纤维素膜为主体, 利用其对蛋白质的超强吸附能力来固定抗体, 进而特异性捕集血液中的癌细胞。实验结果表明本 CTC 芯片对非小肺癌细胞 NCI-H1650 具有很高的捕获效能, 并成功分离检测出了人全血中的微量癌细胞。本发明新颖便捷, 实用高效, 具有巨大的临床推广应用潜力。



1. 一种 CTC 捕获芯片,其特征在于,以硝酸纤维素膜为主体,其透明软化后固定在 PMMA 有机玻璃板上,然后直接吸附固定上抗体而组成。

2. 如权利要求 1 所述的 CTC 捕获芯片,其特征在于,所述硝酸纤维素膜的孔径为 0.2-0.45 μm 。

3. 一种如权利要求 1 所述的 CTC 捕获芯片的制备方法,其特征在于具体步骤如下:

(1) 将商品化的硝酸纤维素膜切成 1-3 cm \times 1-3 cm 的小块,然后放入纯乙醇中浸泡 3-15 s,让其软化变透明,并平铺在预先剪裁好的 PMMA 平板上自然风干,装配制作出芯片基底;

(2) 在吸附抗体以前,芯片基底需要在含 10%-30% 乙腈的 1-5 mM PBS 缓冲液中浸泡 0.5-1 h 活化;然后把浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 20-60 μL 抗体溶解在 200 μL 含 10%-30% 乙腈的 1-5 mM PBS 缓冲液中,均匀滴加在 CTC 芯片基底上,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 0.5-1 h,利用静电作用和疏水作用让抗体吸附固定在 CTC 芯片上;然后用 PBS 缓冲液洗去多余的抗体,再加上质量浓度为 0.1%-0.5% 的 50 μL 的 BSA 溶液封端 0.5-1 h。

4. 如权利要求 1 所述的 CTC 捕获芯片在癌细胞捕获实验中的应用,其特征在于把非小肺癌细胞 NCI-H1650 培养收集起来后,用 PBS 稀释成 10-100 个/ μL 的浓度,滴加一定数量的癌细胞液滴于 CTC 芯片上,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育箱中孵育 0.5-1 h, PBS 洗去未捕获的癌细胞,然后进行检测计数。

5. 一种利用如权利要求 1 所述的 CTC 捕获芯片来模拟人全血中 CTC 检测计数的方法,其特征在于向 1-5 mL 新鲜采集的健康人外周全血样品中加入 100-20000 个癌细胞,然后用 0.15 M $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{K}_2\text{CO}_3$ 进行红细胞裂解,离心弃去上清,取下层单核细胞与 CTC 芯片孵育 0.5-1 h, PBS 冲洗后进行计数检测。

一种基于硝酸纤维素膜的便捷癌细胞捕获芯片

技术领域

[0001] 本发明属于生物分析与检测技术领域,具体为一种循环肿瘤细胞(CTC)捕获芯片。

背景技术

[0002] 循环肿瘤细胞(CTC)是指那些从肿瘤组织上脱落下来并进入血液全身循环的癌细胞。它由普通癌细胞转化而来,并且随时可以通过逆分化再次长出肿瘤组织,因此它与癌症的扩散和转移密切相关,是反映癌症病情发展的风向标,对其进行详尽研究对于癌症的早期诊断与治疗具有决定性的意义。人体外周血液中 CTC 的含量很低,一般不会超过 100 个/mL, 而其中的红细胞白细胞等背景干扰细胞则高达 10^9 个,这对现有的分离分析方法来说是一个巨大的挑战。总的来说,目前的研究亟需解决两个方面的问题:一是怎样把数量如此少的 CTC 从背景如此复杂的人血中分离出来? 二是如何对分离的少量 CTC 进行高灵敏的检测计数和后续的生化分析。

[0003] 近十年来,关于循环肿瘤细胞的分离捕集研究受到了国内外的广泛关注,一系列研究成果也相继被报道。美国强生公司推出了基于免疫磁珠分离的循环肿瘤细胞检测与分析系统(CellSearch™),率先得到了美国食品药品监督管理局(FDA)的认证并已广泛用于临床诊断,不过费用昂贵,而且假阳性率比较高。近来微流控芯片成为了 CTC 分离研究的热点,Nagrath 等报道了基于 EpCAM 抗体组装的微流体芯片阵列,对相应的循环肿瘤细胞具有很高的捕获效率;Hosokawa 等基于癌细胞与正常细胞的形态差异,制成了体积排阻分离装置,扩展了 CTC 研究的思路;国内的王树涛也基于硅板表面的纳米纤毛与癌细胞表面的结构相互作用,开发了一种硅板芯片,其对癌症病人血液样本的检测效果要好于当前的 CellSearch™ 系统。目前报导的这些关于 CTC 芯片的最新研究成果,其对 CTC 的捕集效率较高,假阳性也控制得不错,但是芯片的制备过程大多太复杂,而且重复性较差,很难大规模生产,严重妨碍了其在临床应用上的前景;另外由于芯片孔道的尺寸限制,对病人血液的分析耗时很长,而且捕获的癌细胞也不方便进行后续的再培养等生化分析。

[0004] 基于以上认识,目前 CTC 的研究真正需要的是一种设计新颖,制备便捷,分析快速高效的 CTC 捕获芯片。最近各种膜基底平台开始广受关注,因此我们设计研究了一种以硝酸纤维素膜(NCM)为基底的 CTC 高效捕集芯片。硝酸纤维素膜常用于免疫印迹(western blotting)等生化分析中,利用其对蛋白质优良的吸附效能,可以方便地吸附上抗体进行 CTC 特异性捕获,简便高效;另外还可利用其良好的生物亲和性和在蛋白质组学分析中的特殊作用,对捕集到的癌细胞进行生物学再培养和单细胞蛋白质组的研究。由于其在生物分析上的巨大优势和潜能,我们采用硝酸纤维素膜为基底吸附固定抗体来制备 CTC 芯片。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种制备简便,对癌细胞捕集效率高,成本低易于大规模推广应用的 CTC 捕获芯片。

[0006] 本发明提供的 CTC 捕获芯片,以硝酸纤维素膜为主体,其透明软化后固定在 PMMA

有机玻璃板上,然后直接吸附固定上抗体而组成,可以用来进行癌细胞的特异性捕集。

[0007] 本发明中,硝酸纤维素膜的孔径为 0.2--0.45 μm 。

[0008] 本发明以硝酸纤维素膜为基底,其具有良好的生物亲和性,广泛应用于 western blotting 等生化分析,适宜作为生物分析检测的平台;同时硝酸纤维素膜具有对蛋白质天然的吸附性能,因而可以直接物理吸附固定抗体,相比于化学结合的方法更为便捷,效率也更高;硝酸纤维素膜在乙醇中浸泡处理后会变软变透明,可以方便地固定在 PMMA 基板上,同时也便于对捕获到的癌细胞进行光学检测。

[0009] 本发明的 CTC 芯片的制备步骤如下:

(1) 将商品化的硝酸纤维素膜切成 1-3 cm \times 1-3 cm 的小块,然后放入纯乙醇中浸泡 3-15 s,让其软化变透明,并平铺在预先剪裁好的 PMMA 平板上自然风干,装配制作出芯片基底;

(2) 在吸附抗体以前,芯片基底需要在含 10%-30% 乙腈的 1-5 mM PBS 缓冲液中浸泡 0.5-1 h 活化;然后把 20-60 μL 抗体(浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)溶解在 200 μL 含 10%-30% 质量乙腈的 1-5 mM PBS 缓冲液中,均匀滴加在 CTC 芯片基底上,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 0.5-1 h,利用静电作用和疏水作用让抗体吸附固定在 CTC 芯片上;然后用 PBS 缓冲液洗去多余的抗体,再加上 50 μL 的 BSA 溶液(质量浓度为 0.1%-0.5%)封端半小时,以降低其对癌细胞的非特异性吸附。制备好的 CTC 芯片保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

[0010] 本发明 CTC 芯片用于捕获癌细胞的过程如下:

把非小肺癌细胞 NCI-H1650 培养收集起来后,用 PBS 稀释成 10-100 个/ μL 的浓度,滴加一定数量的癌细胞液滴于 CTC 芯片上,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育箱中孵育 0.5-1 h, PBS 洗去未捕获的癌细胞,然后进行检测计数。

[0011] 为了模拟病人血液中癌细胞的捕集,向 1-5 mL 新鲜采集的健康人外周全血样品中加入 100-20000 个癌细胞,然后用 0.15 M $\text{NH}_4\text{Cl}-\text{K}_2\text{CO}_3$ 进行红细胞裂解,离心弃去上清,取下层单核细胞与 CTC 芯片孵育 0.5-1 h, PBS 冲洗后进行计数检测。

[0012] 本发明中所选用的抗体具有高度的特异性,使用 FITC (异硫氰酸荧光素) 荧光标记的抗体结合目标癌细胞并进行流式分析,发现其对非小肺癌细胞 NCI-H1650 的结合特异性达到 99.9%,而对其他阴性对照细胞的非特异性结合还不到 0.1%。CTC 芯片抗体吸附量也很大,通过用高效毛细管电泳 HPCE 来对比分析芯片吸附前后的抗体溶液,可计算出抗体吸附量为 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,这么高的抗体结合也保证了芯片对癌细胞的捕获效率。在对 PBS 缓冲液中的 CTC 进行捕集时,捕获效率可达 70%;在 1 mL 全血中加入 500 个 CTC 进行实际样品模拟分析,最终检测效率也超过 30%,充分证明了我们的 CTC 芯片技术指标上达到了实际应用的要求,因而具有广阔的临床应用前景。

附图说明

[0013] 图 1 为 CTC 芯片的制备和癌细胞捕获整体流程示意图。

[0014] 图 2 为抗体特异性结合癌细胞的流式分析图。

[0015] 图 3 为 CTC 芯片实物以及癌细胞捕获效果图。其中, a. 连接了抗体的芯片捕获的细胞; b. 未连接抗体芯片的对照实验; c. 同一芯片上是否连接抗体的细胞对照捕获; d. 制备好的 CTC 芯片图片。

[0016] 图 4 为不同孵育时间下 CTC 的捕获效率。

[0017] 图 5 为不同细胞数量下 CTC 的捕获效率。

具体实施方式

[0018] 通过实施例对本发明提供的 CTC 捕获芯片制备过程及其在癌细胞捕集中的应用作出进一步说明。

[0019] 实施例 1 CTC 捕获芯片的制备

商品化的硝酸纤维素膜切成 1 cm×1 cm 的小块,然后放入纯乙醇中浸泡 10 s,让其软化透明,并平铺在预先剪裁好的 PMMA 平板上自然风干,装配成芯片基底。在吸附抗体以前,需要在含 10% 乙腈的 PBS 缓冲液中浸泡一小时活化;然后把 20 μL 抗体(0.5 μg/μL)溶解在 200 μL 含 10% 乙腈的 1 mM PBS 缓冲液中,均匀滴加在 CTC 芯片上,并在 37 °C 下反应 0.5 h,然后用 PBS 洗去多余的抗体;再加上 50 μL 的 BSA 溶液(0.5%)封端半小时,以降低其对癌细胞的非特异性吸附。制得的 CTC 芯片保存在 4 °C 冰箱备用。

[0020] 实施例 2 CTC 芯片对 PBS 缓冲液中的癌细胞进行捕获

非小肺癌细胞 NCI-H1650 于含 5%(v/v)二氧化碳的 37 °C 恒温培养箱中,使用添加 10% (v/v)胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养,待细胞培养成熟后用 0.25% (w/w) trypsin-EDTA 孵育 3 min 消化下来,并用 PBS 缓冲液洗涤 3 次后配制成一定浓度的细胞悬液。把细胞液滴加在 CTC 芯片上,放入 37 °C 恒温箱孵育一定时间后,用 PBS 洗去未捕获的细胞,然后进行显微镜成像计数和后续的检测。

[0021] 实施例 3 调整 CTC 芯片与癌细胞接触孵育的时间分别为 5 min、15 min、30min、45 min 和 1 h,然后对捕获到的癌细胞进行计数,结果见图 4 所示。

[0022] 实施例 4 调整加入 CTC 芯片上的癌细胞数量分别为 10000、2000、400、100、20 个,然后对捕获的癌细胞计数并计算捕获效率,结果见图 5 所示。

[0023] 实施例 5 CTC 芯片对血液样品中癌细胞的捕集

为模拟癌症病人实际血样中 CTC 的检测,我们向 1 mL 新鲜采集的人外周全血样品中加入 500 个癌细胞,然后加入 9 mL 0.15 M NH₄Cl-K₂CO₃ 红细胞裂解液,室温放置 15 min 让血液中红细胞充分裂解,以减少癌细胞捕获的干扰;离心弃去上清,取下层沉积的单核细胞与 CTC 芯片孵育 0.5 h, PBS 冲洗未特异性吸附的血细胞后进行计数检测。

[0024] 实施例 6 抗体与癌细胞结合特异性考察

向溶于 PBS 的 NCI-H1650 细胞悬液中加入 FITC 荧光修饰的 EpCAM 抗体,在 37 °C 孵育反应 0.5 h 后,离心 3 次洗去未充分结合的抗体,然后把荧光标记的癌细胞进入流式分析,检测结合效率。

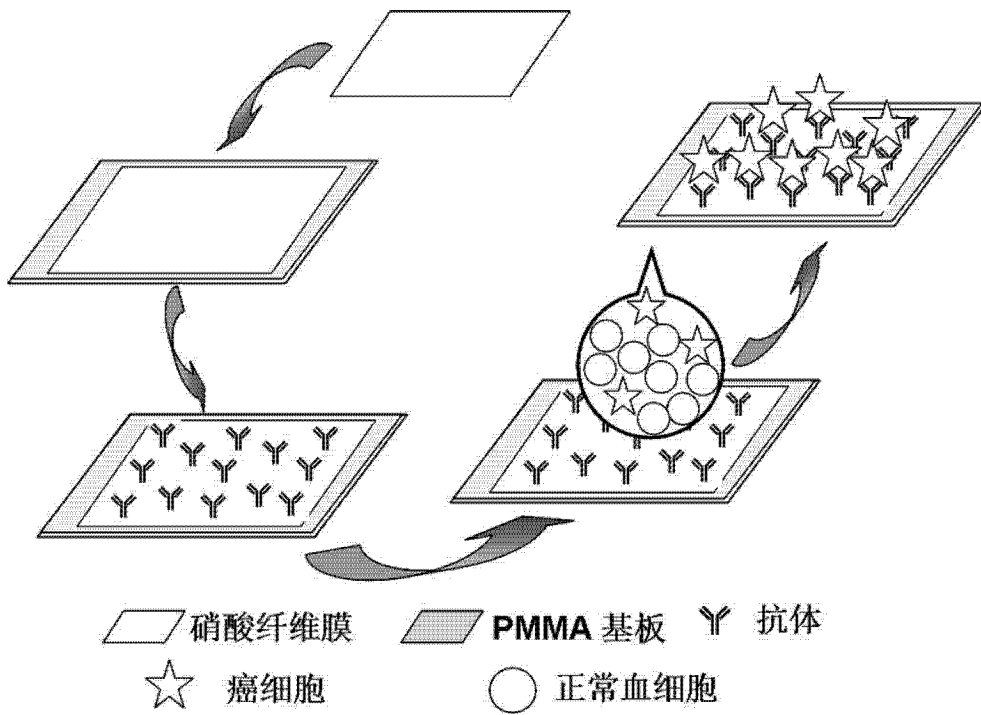


图 1

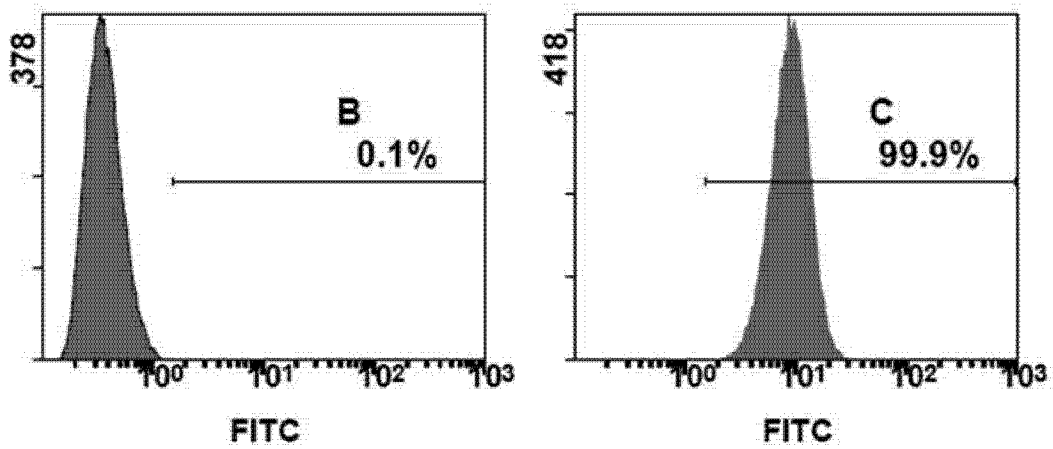


图 2

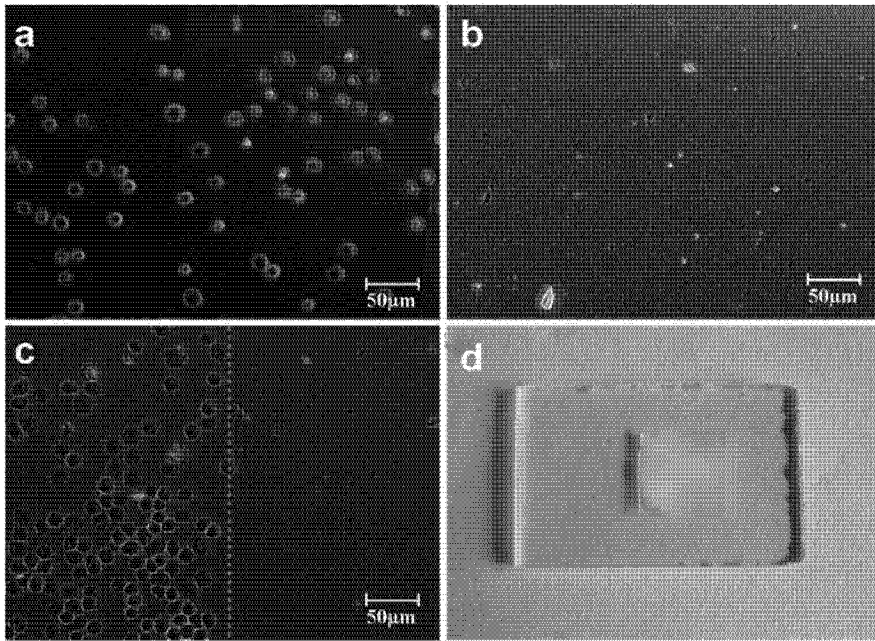


图 3

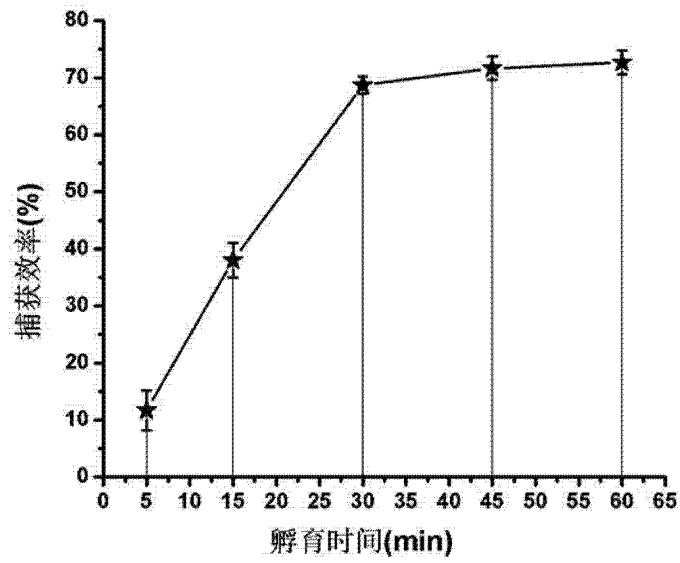


图 4

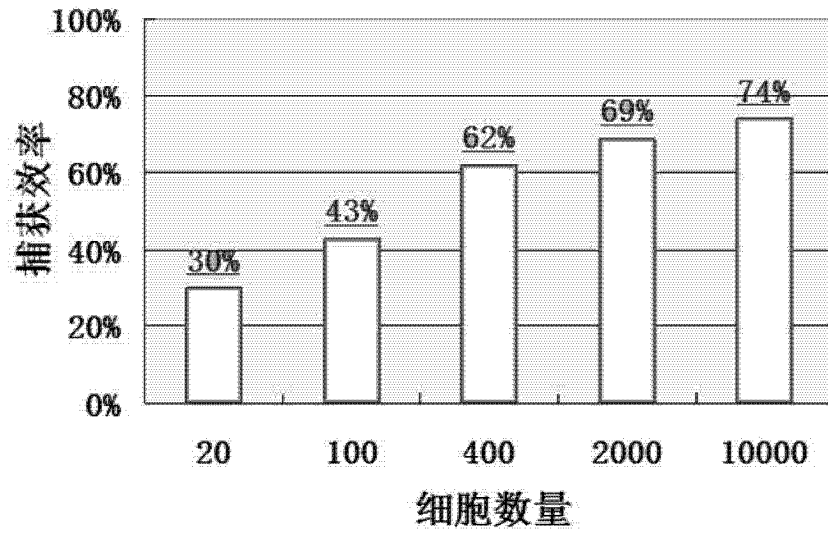


图 5

专利名称(译)	一种基于硝酸纤维素膜的便捷癌细胞捕获芯片		
公开(公告)号	CN103235124A	公开(公告)日	2013-08-07
申请号	CN201310139673.0	申请日	2013-04-22
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	高明霞 张祥民 张鹏		
发明人	高明霞 张祥民 张鹏		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
代理人(译)	陆飞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物分析与检测技术领域，具体为一种循环肿瘤细胞（CTC）捕获芯片及其制备方法和应用。本发明CTC芯片以硝酸纤维素膜为主体，利用其对蛋白质的超强吸附能力来固定抗体，进而特异性捕集血液中的癌细胞。实验结果表明本CTC芯片对非小肺癌细胞NCI-H1650具有很高的捕获效能，并成功分离检测出了人全血中的微量癌细胞。本发明新颖便捷，实用高效，具有巨大的临床推广应用潜力。

