(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109752541 A
(43)申请公布日 2019.05.14

(21)申请号 201910156309.2

(22)申请日 2019.03.01

(71)申请人 周辉
地址 241000 安徽省芜湖市经济技术开发区科创中心软件园0123室

(72)发明人 周辉

(74)专利代理机构 芜湖安汇知识产权代理有限公司 34107
代理人 尹婷婷

(51)Int.Cl.
G01N 33/558(2006.01)
G01N 33/58(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)

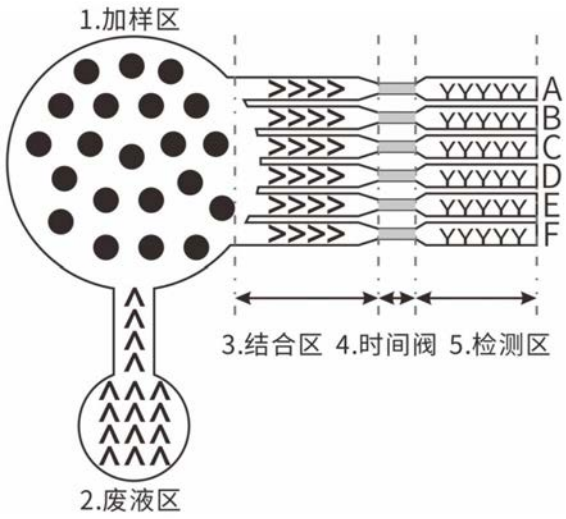
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种肿瘤干细胞分型定量检测卡及其制备方法和使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种肿瘤干细胞分型定量检测卡及其制备方法和使用方法，包括底卡和面卡，所述底卡上设有：所述底卡上设有：加样区，与加样区连接的多个结合区，通过时间阀与结合区一一对应连接的多个检测区；通过微通道与加样区连接的废液区；所述述结合区、检测区、废液区的底部均并联有微通道；结合区及检测区底部并联的微通道均连接时间阀。本发明通过微流控技术控制待测样品的流速和流量，具有同一种标志物的肿瘤干细胞通过一条微通道进入检测区，避免相互干扰，从而减少误差，增加反应灵敏度；将待测样品制备成水包水微液滴，增大检测限度。



CN 109752541 A

1.一种肿瘤干细胞分型定量检测卡，包括底卡和面卡，其特征在于，所述底卡上设有：加样区，与加样区连接的多个结合区，通过时间阀与结合区一一对应连接的多个检测区；通过微通道与加样区连接的废液区；

所述结合区、检测区、废液区的底部均并联有微通道；结合区及检测区底部并联的微通道均连接时间阀；

所述面卡上设有加样孔和观察孔，加样孔的位置与底卡加样区对应，观察孔的位置与底卡检测区对应。

2.根据权利要求1所述的肿瘤干细胞分型定量检测卡，其特征在于，所述结合区和检测区均为6个，结合区A、B、C、D、E、F分别喷涂有荧光微球A标记的抗CD133抗体、荧光微球B标记的抗CD90抗体、荧光微球C标记的抗CD44抗体、荧光微球D标记的抗CD24抗体、荧光微球E标记的抗pan-CK抗体、荧光微球F标记的抗ALDH1抗体；检测区A、B、C、D、E、F分别包被有抗CD133抗体、抗CD90抗体、抗CD44抗体、抗CD24抗体、抗pan-CK抗体、抗ALDH1抗体。

3.根据权利要求1或2所述的肿瘤干细胞分型定量检测卡，其特征在于，所述加样区覆盖圆形滤纸；所述检测区覆盖长方形滤纸条；所述圆形滤纸直径为1.5-2.0cm、孔径为1-3μm；所述长方形滤纸条直径为2cm×7cm。

4.根据权利要求1或2所述的肿瘤干细胞分型定量检测卡，其特征在于，所述微通道通过软光刻技术和微流控芯片技术制备，所述微通道孔径为10-15μm；所述时间阀孔径为8μm。

5.根据权利要求1或2所述的肿瘤干细胞分型定量检测卡，其特征在于，所述的底卡和面卡材质为PDMS；所述底卡和面卡的背面扣合连接。

6.根据权利要求1-5任意一项所述的肿瘤干细胞分型定量检测卡的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括以下步骤：

(1)底卡的制备：

(1-1)制图；

(1-2)掩模；

(1-3)光刻；

(1-4)再铸模；

(1-5)软光刻；

(2)在底卡的结合区分别喷涂荧光微球标记的抗体；

(3)在底卡的检测区分别包被抗体；

(4)将直径1.5-2.0cm、孔径为1-3μm的圆形滤纸覆盖在加样区，直径为2cm×7cm的长方形滤纸条覆盖检测区；

(5)将所述底卡和面卡的背面扣合连接。

7.根据权利要求6所述的肿瘤干细胞分型定量检测卡的制备方法，其特征在于，所述步骤(1)具体包括以下步骤：

(1-1)制图：微通道图形按照设计通过绘图软件绘制掩膜版图；

(1-2)掩模：制成掩膜版图后，打印在透明胶片上制得光刻掩膜板，利用此掩膜板通过光刻工艺制作硅片模具；

(1-3)光刻：在基片表面镀上一层阻挡层，再用甩胶机在阻挡层上均匀地甩上一层光敏材料-光刻胶；在光掩模上制备所需的通道图案；将光掩模复盖在基片上，用紫外光照射涂

有光刻胶的基片，光刻胶发生光化学反应；用光刻胶配套显影液通过显影的化学方法除去经曝光的光刻胶；烘干后，利用未曝光的光刻胶的保护作用，采用化学腐蚀的方法在阻挡层上精确腐蚀出底片上平面二维图形，制成所需硅片模具；

(1-4)再铸模：通过将弹性材料涂于光刻形成的硅片模具表面，干燥后取下则硅片模具表面上图形转移到弹性材料上形成印模；

(1-5)软光刻：将PDMS前聚体与固化剂按10:1比例混合，搅拌混匀后，置于真空箱内脱除气泡，然后在印模上浇注，PDMS前聚体在印模上完全摊平后，将其连同印模一起放入烘箱内进行固化，置于80℃烘箱固化约48小时，之后将PDMS基片从印模上剥离下来。

8.根据权利要求1-5任意一项所述的肿瘤干细胞分型定量检测卡的使用方法，其特征在于，包括以下步骤：

(a)将血清标准品包裹成8μm的水包水微液滴，配制成5个以上的一系列浓度，用同一批次的数张检测卡检测各浓度的标准品溶液，以检测区的荧光强度为纵坐标，血清标准品溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线并将标准曲线保存在多色荧光分析仪中；

(b)样品检测：以与步骤(a)中同样的方法将待测样品包裹成8μm的水包水微液滴，平放检测卡，待测样品平衡至室温后，用已灭菌的胶头滴管吸取一定量待测样品加入加样孔中，立即将检测卡放入多色荧光检测仪中，记录荧光微球在最佳激发光源的激发下所发出的荧光值；

(c)将所得数值代入已保存在多色荧光分析仪中的标准曲线，根据公式计算得到样本中待测物的浓度。

9.根据权利要求8所述的肿瘤干细胞分型定量检测卡的使用方法，其特征在于，所述步骤(a)中，将血清标准品包裹成8μm的水包水微液滴的具体步骤为：将含有葡聚糖、海藻糖和明胶的水溶液A加入到含有聚乙二醇的水溶液B中形成原纤维网络，然后加入1wt％鸡蛋清溶菌酶在60℃进行热孵化，最后将血清标准品加入其中，即可制备得到8μm的水包水微液滴。

10.根据权利要求9所述的肿瘤干细胞分型定量检测卡的使用方法，其特征在于，所述水溶液A中，葡聚糖、海藻糖、明胶的质量百分比浓度分别为1.5wt％、0..5wt％、0..5wt％；所述水溶液B中，聚乙二醇的质量百分比浓度为6.5wt％。

一种肿瘤干细胞分型定量检测卡及其制备方法和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微流控技术和免疫荧光微球免疫层析技术相结合的技术领域，具体涉及一种肿瘤干细胞分型定量检测卡及其制备方法和使用方法。

背景技术

[0002] 近年来随着生物和医学技术的发展，在肝癌组织、肺癌组织、乳腺癌以及直肠癌等多种恶性肿瘤组织中均可以分离出肿瘤干细胞(cancer stem cells,CSCs)。肿瘤干细胞是参与调控癌细胞增殖与自我更新，以及维持肿瘤生长的一类在肿瘤组织中含量很少的细胞。肿瘤干细胞和正常组织干细胞在特征上存在诸多的相似性，包括自我更新、多向分化、细胞周期较长等。

[0003] 微流控技术(Microfludics)是指在至少有一维为微米甚至纳米尺度的低维通道结构中控制体积为皮升至纳升的流体进行流动并传质、传热的技术。实现微流控操控的主要方法就是将流体限制在一个微米甚至纳米尺度的通道中，流体在微流控的微通道中具有独特的流体性质，如层流、液滴等等。当微通道在微米甚至纳米尺度时，微通道表面积与其内部体积比很大，通道的结构、形状和壁面性质都对流体的流动状态产生极大影响。因此，微流控可以实现一系列常规方法难以完成的微加工和微操作。时间阀的作用就是在固定的时间内控制通过微通道的流体的流速和流量，可以严格控制整个反应的时间并且控制进入检测区的流体量，并且时间阀的孔径尺寸可以设置为循环肿瘤干细胞的尺寸，只能循环肿瘤干细胞通过其他干扰物质无法通过。。

[0004] 荧光微球是指将荧光团通过包埋、共价键连接等方式引入有机或无机纳米粒子中，并让纳米粒子承担有机小分子荧光染料的检测、标记等功能，具有相对稳定的形态结构以及发光行为。荧光微球免疫层析技术是继胶体金免疫层析技术后，在荧光染料标记技术上发展起来的，作为一种免疫学检测方法，它是免疫亲和技术、免疫标记技术、免疫层析技术的结合，与胶体金免疫层析技术一样具有快速、操作简便等优点。

[0005] 水包水微液滴技术即将富含1.5wt％葡聚糖、0..5wt％海藻糖和0.5wt％明胶加入到不混溶的6.5wt％聚乙二醇的水相中形成原纤维网络，为了增加原纤维网络的吸附作用，加入1wt％鸡蛋清溶菌酶在60℃进行热孵化，原纤维网络转化为成熟的原纤维，再用该成熟的原纤维包裹直径为8μm的的微液滴形成水包水微液滴，使微液滴表面积增加了60％而没有破裂，极大的增加了检测限度，比普通Elisa方法的检测限度增大了1000倍。水包水微液滴具有高度稳定的特异性，避免使用可是蛋白变性的有机溶剂。

[0006] 目前已经明确的肝癌干细胞标志物包括CD133，CD90，CD44，CK19，CK7以及CD133等。CD133蛋白是在人类造血干/祖细胞上发现的一种跨膜糖蛋白，起初被认为是造血干细胞的特异性表面标志物，后来经研究发现该蛋白不仅仅在神经干细胞、表皮干细胞等干细胞中有表达，在各种肿瘤干细胞中也均有表达;CD44蛋白属于在细胞表面广泛表达的糖蛋白，与细胞与基质、细胞与细胞之间的相互作用有关，Camerlingo R等通过流式细胞术筛选出57位乳腺癌病人肿瘤组织细胞中的CD44+细胞，并经鉴别实验证明此类细胞表达有干细

胞样特性;CD 90是一种葡萄糖6磷酸异构酶锚定的糖蛋白,与CD44一样参与胞间的相互作用。CD 90主要表达与肝脏干细胞的表面,然而在成人的肝脏中表达稀少;ALDH1是乙醛脱氢酶(ALDH)家族之一,是催化细胞内的乙醛氧化为乙酸的细胞溶脂酶,是参与乙醇分解的一种重要蛋白。近年来,研究发现ALDH1可能作为肺癌干细胞标志物,并用于白血病干细胞的鉴定与分离。

[0007] 综上所述,循环肿瘤干细胞在肿瘤早期检测中有重要意义。因此,当前迫切需要研发一种高效、低成本的循环肿瘤干细胞检测平台,能够检测血液中循环肿瘤干细胞数量,从而为肿瘤的临床诊断、疗效监控和预后判断提供更准确的信息。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种肿瘤干细胞分型定量检测卡及其制备方法和使用方法,其灵敏度高、操作简单、携带方便且制备成本低。使用的荧光微球基本不受外界环境介质变化的影响,稳定性好,染料荧光猝灭大大减少。使用微流控技术设置时间阀的孔径在8μm,使得肿瘤干细胞能够通过时间阀并富集。具体技术方案如下:

[0009] 一种肿瘤干细胞分型定量检测卡,包括底卡和面卡,所述底卡上设有:加样区,与加样区连接的多个结合区,通过时间阀与结合区一一对应连接的多个检测区;通过微通道与加样区连接的废液区;

[0010] 所述述结合区、检测区、废液区的底部均并联有微通道;结合区及检测区底部并联的微通道均连接时间阀;

[0011] 所述面卡上设有加样孔和观察孔,加样孔的位置与底卡加样区对应,观察孔的位置与底卡检测区对应。

[0012] 所述结合区和检测区均为6个,结合区A、B、C、D、E、F分别喷涂有荧光微球A标记的抗CD133抗体、荧光微球B标记的抗CD90抗体、荧光微球C标记的抗CD44抗体、荧光微球D标记的抗CD24抗体、荧光微球E标记的抗pan-CK抗体、荧光微球F标记的抗ALDH1抗体;检测区A、B、C、D、E、F分别包被有抗CD133抗体、抗CD90抗体、抗CD44抗体、抗CD24抗体、抗pan-CK抗体、抗ALDH1抗体。

[0013] 进一步地,

[0014] 荧光微球A的粒径0.51μm、激发波长660nm、发射波长690nm;

[0015] 荧光微球B的粒径0.52μm、激发波长480nm、发射波长520nm;

[0016] 荧光微球C的粒径0.51μm、激发波长360nm、发射波长420nm;

[0017] 荧光微球D的粒径0.87μm、激发波长550nm、发射波长590nm;

[0018] 荧光微球E的粒径0.9μm、激发波长395nm、发射波长410nm;

[0019] 荧光微球F的粒径0.9μm、激发波长460nm、发射波长480nm。

[0020] 所述加样区覆盖圆形滤纸;所述检测区覆盖长方形滤纸条;所述圆形滤纸直径为1.5-2.0cm、孔径为1-3μm;所述长方形滤纸条直径为2cm×7cm。

[0021] 所述微通道通过软光刻技术和微流控芯片技术制备,所述微通道孔径为10-15μm;所述时间阀孔径为8μm。

[0022] 所述的底卡和面卡材质为PMDS;所述底卡和面卡的背面扣合连接。

[0023] 本发明还提供了所述的肿瘤干细胞分型定量检测卡的制备方法,所述制备方法包

括以下步骤：

[0024] (1)底卡的制备：

[0025] (1-1)制图；

[0026] (1-2)掩模；

[0027] (1-3)光刻；

[0028] (1-4)再铸模；

[0029] (1-5)软光刻；

[0030] (2)在底卡的结合区分别喷涂荧光微球标记的抗体；

[0031] (3)在底卡的检测区分别包被抗体；

[0032] (4)将直径1.5-2.0cm、孔径为1-3μm的圆形滤纸覆盖在加样区，直径为2cm×7cm的长方形滤纸条覆盖检测区；

[0033] (5)将所述底卡和面卡的背面扣合连接。

[0034] 所述步骤(1)具体包括以下步骤：

[0035] (1-1)制图：微通道图形按照设计通过绘图软件绘制掩膜版图；

[0036] (1-2)掩模：制成掩膜版图后，打印在透明胶片上制得光刻掩膜板，利用此掩膜板通过光刻工艺制作硅片模具；

[0037] (1-3)光刻：在基片表面镀上一层阻挡层，再用甩胶机在阻挡层上均匀地甩上一层光敏材料-光刻胶；在光掩模上制备所需的通道图案；将光掩模复盖在基片上，用紫外光照射涂有光刻胶的基片，光刻胶发生光化学反应；用光刻胶配套显影液通过显影的化学方法除去经曝光的光刻胶；烘干后，利用未曝光的光刻胶的保护作用，采用化学腐蚀的方法在阻挡层上精确腐蚀出底片上平面二维图形，制成所需硅片模具；

[0038] (1-4)再铸模：通过将弹性材料涂于光刻形成的硅片模具表面，干燥后取下则硅片模具表面上图形转移到弹性材料上形成印模；

[0039] (1-5)软光刻：将PMDS前聚体与固化剂按10:1比例混合，搅拌混匀后，置于真空箱内脱除气泡，然后在印模上浇注，PMDS前聚体在印模上完全摊平后，将其连同印模一起放入烘箱内进行固化，置于80℃烘箱固化约48小时，之后将PMDS基片从印模上剥离下来。

[0040] 本发明还提供了所述肿瘤干细胞分型定量检测卡的使用方法，包括以下步骤：

[0041] (a)将血清标准品包裹成8μm的水包水微液滴，配制成5个以上的一系列浓度，用同一批次的数张检测卡检测各浓度的标准品溶液，以检测区的荧光强度为纵坐标，血清标准品溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线并将标准曲线保存在多色荧光分析仪中；

[0042] (b)样品检测：以与步骤(a)中同样的方法将待测样品包裹成8μm的水包水微液滴，平放检测卡，待测样品平衡至室温后，用已灭菌的胶头滴管吸取一定量待测样品加入加样孔中，立即将检测卡放入多色荧光检测仪中，记录荧光微球在最佳激发光源的激发下所发出的荧光值；

[0043] (c)将所得数值代入已保存在多色荧光分析仪中的标准曲线，根据公式计算得到样本中待测物的浓度。

[0044] 进一步地，所述步骤(a)中，将血清标准品包裹成8μm的水包水微液滴的具体步骤为：将含有葡聚糖、海藻糖和明胶的水溶液A加入到含有聚乙二醇的水溶液B中形成原纤维网络，然后加入1wt％鸡蛋清溶菌酶在60℃进行热孵化，最后将血清标准品加入其中，即可

制备得到8μm的水包水微液滴。

[0045] 所述水溶液A中，葡聚糖、海藻糖、明胶的质量百分比浓度分别为1.5wt％、0..5wt％、0..5wt％；

[0046] 所述水溶液B中，聚乙二醇的质量百分比浓度为6.5wt％。

[0047] 本发明技术方案采用了微流控技术在底卡上设有加样区，结合区，微通道，时间阀，检测区及废液区，通过各个区之间的相互配合，完成血液样本中肿瘤干细胞的自动定量检测。通过微流控技术和时间阀技术设置多个微通道，避免了交叉污染，提高了检测精确度，并且无需加样泵产生的气压来推动样品流动，微通道产生的毛细作用就可以使样品从加样区流入检测区；微通道的尺寸和长度设计可以精确控制样品的流量和流速，精确控制反应时间。

[0048] 在加入样本之前，先将样本制备成8μm的水包水微液滴，微液滴的比表面积增大，可以与包被的荧光微球充分识别并结合，增大了检测限度；当样本通过加样区进入微通道，微通道的尺寸设计为10-15μm，使得只有肿瘤干细胞能进入结合区，白细胞、红细胞等尺寸大于15μm的细胞则留在加样区；时间阀的尺寸设置为8μm，只有肿瘤干细胞可以单个逐次通过，使得所有待测细胞同一时间进入检测区，提高了检测精确度；微流控检测卡在荧光检测仪中检测识别荧光信号，通过自动计算获得表面抗原的浓度。

[0049] 与目前现有技术相比，本发明通过微流控技术控制待测样品的流速和流量，具有同一种标志物的肿瘤干细胞通过一条微通道进入检测区，避免相互干扰，从而减少误差，增加反应灵敏度；本发明利用免疫荧光技术检测不同时间抗体变化，再根据变化曲线换算待测样品中肿瘤干细胞的浓度，达到定量检测的水平；本发明采用了水包水微液滴，增大检测限度，避免使用有机溶剂，具有高度稳定的特异性；本发明操作简单、检测时间短、储存简单，易推广使用。具体来说：

[0050] (1)通过微流控技术控制待测样品的流速和流量，具有同一种标志物的肿瘤干细胞通过一条微通道进入检测区，避免相互干扰，从而减少误差，增加反应灵敏度；

[0051] (2)本发明利用免疫荧光技术检测不同时间抗体变化，再根据变化曲线换算待测样品中肿瘤干细胞的浓度，达到定量检测的水平，测定全血用于肿瘤干细胞的监控和筛选，从而使得能够监控癌症复发；

[0052] (3)荧光微球表面包裹了聚苯乙烯，实现了对荧光物质的保护，减少了外界环境的干扰，荧光微球的稳定性增强；

[0053] (4)本发明采用了水包水微液滴，极大的增加了检测限度，水包水微液滴具有高度稳定的特异性，避免使用可是蛋白变性的有机溶剂。；

[0054] (5)本发明操作简单、检测时间精确、储存简单。非专业人士均可操作，因而适用范围广，易推广使用。

附图说明

[0055] 图1是一种肿瘤干细胞分型定量检测卡的底卡结构示意图

[0056] 图2是一种肿瘤干细胞分型定量检测卡的面卡结构示意图

具体实施方式

[0057] 下面结合实施例及说明书附图对本发明进行详细说明。

[0058] 实施例1

[0059] 一种肿瘤干细胞分型定量检测卡，包括底卡和面卡，所述底卡上设有：加样区1，与加样区1连接的多个结合区3，通过时间阀4与结合区一一对应连接的多个检测区5；通过微通道与加样区1连接的废液区2；

[0060] 所述述结合区3、检测区5、废液区2的底部均并联有微通道；结合区3及检测区5底部并联的微通道均连接时间阀；

[0061] 所述面卡上设有加样孔6和观察孔7，加样孔6的位置与底卡加样区1对应，观察孔7的位置与底卡检测区5对应。

[0062] 所述结合区和检测区均为6个，结合区A、B、C、D、E、F分别喷涂有荧光微球A标记的抗CD133抗体、荧光微球B标记的抗CD90抗体、荧光微球C标记的抗CD44抗体、荧光微球D标记的抗CD24抗体、荧光微球E标记的抗pan-CK抗体、荧光微球F标记的抗ALDH1抗体；检测区A、B、C、D、E、F分别包被有抗CD133抗体、抗CD90抗体、抗CD44抗体、抗CD24抗体、抗pan-CK抗体、抗ALDH1抗体。

[0063] 进一步地，

[0064] 所述加样区覆盖圆形滤纸；所述圆形滤纸直径为1.5-2.0cm、孔径为1-3μm；

[0065] 所述微通道通过软光刻技术和微流控芯片技术制备，所述微通道孔径为10-15μm；所述时间阀孔径为8μm；

[0066] 所述的底卡和面卡材质为PMDS；所述底卡和面卡的背面扣合连接。

[0067] 所述荧光微球A标记的抗CD133抗体的制备方法为：

[0068] A、荧光微球A的制备：称取0.009g过硫酸钾，0.004g$NaHCO_3$溶于7ml去离子水，将1mg荧光染料A溶于2ml无水乙醇及1ml苯乙烯，加入到水溶液中，摇匀，通氮气5min，放入70℃恒温水浴震荡24h，取出，离心分离出的聚合物分别再用乙醇、去离子水离心洗涤3次，即得到荧光微球A；其直径为510nm；所述荧光染料A的荧光激发波长为660nm、发射波长为690nm；

[0069] B、荧光微球A标记的抗CD133抗体的制备：将1mg荧光染料标记的聚苯乙烯荧光微球A在1000rpm×15min，收集沉淀，用0.01M pH4.8的硼酸盐缓冲液调节微球浓度为10mg/mL；然后加入90μL 50mg/mL对乙基-N,N-二甲基丙基碳二亚胺(EDC)，150μL 5mg/mL氮经基唬拍酞亚胺(NHS)，振荡混匀，室温孵育10-30min后，离心，沉淀再用0.01M pH4.8的硼酸盐缓冲液溶解，并调节微球浓度为10mg/ml；向0.1mL荧光微球中加入6μL抗CD133抗体，充分混匀后，室温搅拌反应3h，分别用超纯水洗涤离心3次后，沉淀用0.01M pH7.2的PBS溶液复溶沉淀至0.1mL，即为制备好的荧光微球A标记的抗CD133抗体；

[0070] 步骤B中，所述抗CD133抗体的制备方法为：用CD133作为免疫原注入小鼠体内，免疫剂量为150μg/只，使其产生抗血清；取产生特异性抗体的小鼠脾细胞与循环细胞融合，采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液，筛选阳性孔；利用有限稀释法对阳性孔进行克隆，得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株；取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液，分装于冻存管，在液氮中长期保存；复苏时取出冻存管，立即放入37℃水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养；采用体内诱生法，将小鼠腹腔注入灭

菌石蜡油,7-14天后腹腔注射杂交瘤细胞,7-10天后采集腹水;经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,纯度经SDS-PAGE电泳鉴定,小瓶分装,-20℃保存,即可得到抗CD133抗体。并采用同样的方法制备得到抗CD90抗体、抗CD44抗体、抗CD24抗体、抗pan-CK抗体、抗ALDH1抗体。

[0071] 所述荧光微球B标记的抗CD90抗体、荧光微球C标记的抗CD44抗体、荧光微球D标记的抗CD24抗体、荧光微球E标记的抗pan-CK抗体、荧光微球F标记的抗ALDH1抗体的制备方法均与荧光微球A标记的抗CD133抗体相同。

[0072] 进一步地,荧光微球B的粒径0.52μm、激发波长480nm、发射波长520nm;

[0073] 荧光微球C的粒径0.51μm、激发波长360nm、发射波长420nm;

[0074] 荧光微球D的粒径0.87μm、激发波长550nm、发射波长590nm;

[0075] 荧光微球E的粒径0.9μm、激发波长395nm、发射波长410nm;

[0076] 荧光微球F的粒径0.9μm、激发波长460nm、发射波长480nm。

[0077] 实施例2

[0078] 一种肿瘤干细胞分型定量检测卡的制备方法,包括以下步骤:

[0079] (1)底卡的制备:

[0080] (1-1)制图:微通道图形按照设计通过绘图软件绘制掩膜版图;

[0081] (1-2)掩模:制成掩膜版图后,打印在透明胶片上制得光刻掩膜板,利用此掩膜板通过光刻工艺制作硅片模具;

[0082] (1-3)光刻:在基片表面镀上一层阻挡层,再用甩胶机在阻挡层上均匀地甩上一层光敏材料-光刻胶;在光掩模上制备所需的通道图案;将光掩模复盖在基片上,用紫外光照射涂有光刻胶的基片,光刻胶发生光化学反应;用光刻胶配套显影液通过显影的化学方法除去经曝光的光刻胶;烘干后,利用未曝光的光刻胶的保护作用,采用化学腐蚀的方法在阻挡层上精确腐蚀出底片上平面二维图形,制成所需硅片模具;

[0083] (1-4)再铸模:通过将弹性材料涂于光刻形成的硅片模具表面,干燥后取下则硅片模具表面上图形转移到弹性材料上形成印模;

[0084] (1-5)软光刻:将PMDS前聚体与固化剂按10:1比例混合,搅拌混匀后,置于真空箱内脱除气泡,然后在印模上浇注,PMDS前聚体在印模上完全摊平后,将其连同印模一起放入烘箱内进行固化,置于80℃烘箱固化约48小时,之后将PMDS基片从印模上剥离下来;

[0085] (2)在底卡的结合区A、B、C、D、E、F分别喷涂有荧光微球A标记的抗CD133抗体、荧光微球B标记的抗CD90抗体、荧光微球C标记的抗CD44抗体、荧光微球D标记的抗CD24抗体、荧光微球E标记的抗pan-CK抗体、荧光微球F标记的抗ALDH1抗体;具体方法为:用喷金机将荧光微球标记的抗体按照5-10μl的体积均匀喷涂在结合区上固定的位置,30℃真空干燥12h;

[0086] (3)在底卡的检测区A、B、C、D、E、F分别包被有抗CD133抗体、抗CD90抗体、抗CD44抗体、抗CD24抗体、抗pan-CK抗体、抗ALDH1抗体;具体方法为:用0.01M PBS缓冲液调节抗体浓度为0.5mg/ml,将包被后的溶液按照1-3μl的体积均匀喷涂在检测区上固定的位置;

[0087] (4)将直径1.5-2.0cm、孔径为1-3μm的圆形滤纸覆盖在加样区,直径为2cm×7cm的长方形滤纸条覆盖检测区;

[0088] (5)将所述底卡和面卡的背面扣合连接,压紧,再将组装后的检测卡装入铝箔袋中,加入干燥剂封口保存,在室温下可保存一年。

[0089] 实施例3

[0090] 所述肿瘤干细胞分型定量检测卡的使用方法，包括以下步骤：

[0091] (a)将含有葡聚糖、海藻糖和明胶的水溶液A加入到含有聚乙二醇的水溶液B中形成原纤维网络，然后加入1wt％鸡蛋清溶菌酶在60℃进行热孵化，，原纤维网络转化为成熟的原纤维，最后将血清标准品加入其中，用该成熟的原纤维包裹血清标准品，即可制备得到直径8μm的水包水微液滴，配制成5个以上的一系列浓度，用同一批次的数张检测卡检测各浓度的标准品溶液，以检测区的荧光强度为纵坐标，血清标准品溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线并将标准曲线保存在多色荧光分析仪中；所述水溶液A中，葡聚糖、海藻糖、明胶的质量百分比浓度分别为1.5wt％、0..5wt％、0..5wt％；所述水溶液B中，聚乙二醇的质量百分比浓度为6.5wt％；

[0092] (b)样品检测:以与步骤(a)中同样的方法将待测血清包裹成8μm的水包水微液滴，平放检测卡，待测样品平衡至室温后，用已灭菌的胶头滴管吸取一定量待测样品加入加样孔中，立即将检测卡放入多色荧光检测仪中，记录荧光微球在最佳激发光源的激发下所发出的荧光值；

[0093] (c)将所得数值代入已保存在多色荧光分析仪中的标准曲线，根据以下公式计算得到待测血清中CD133抗原的浓度：

[0094] A1＝(B′-A′)/V*(tB-tA)

[0095] A1表示待测血清中的CD133抗原的浓度，A′、B′表示检测区的两个位置A、B处的荧光值所对应的抗CD133抗体的浓度值，V表示在微通道中血清流体的流速，tA、tB表示荧光素达到A、B位置时对应的流体通过微通道的时间。

[0096] 可通过上述同样的方法测定出待测血清中的CD90、CD44、CD24、pan-CK、ALDH1抗原的浓度。

[0097] 上述参照实施例对一种肿瘤干细胞分型定量检测卡及其制备方法和使用方法进行的详细描述，是说明性的而不是限定性的，可按照所限定范围列举出若干个实施例，因此在不脱离本发明总体构思下的变化和修改，应属本发明的保护范围之内。

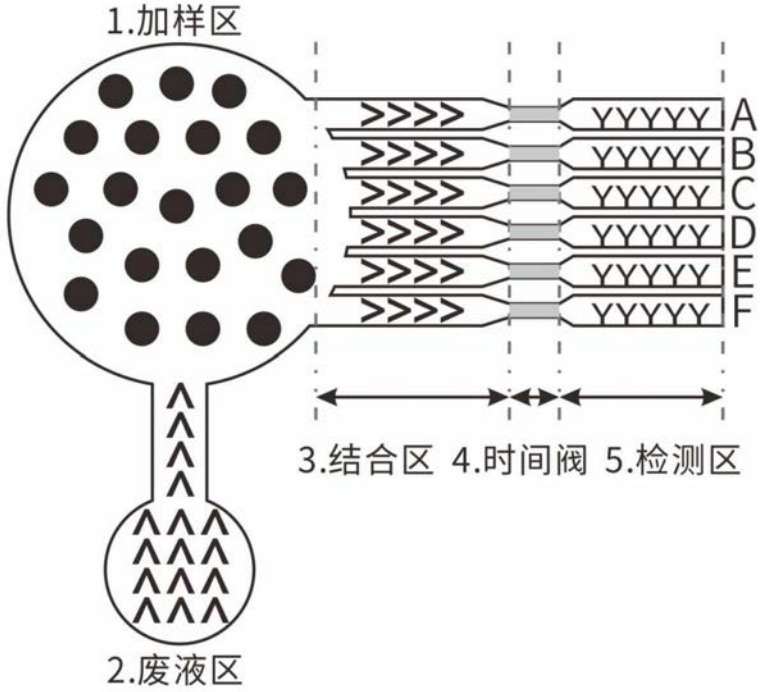


图1

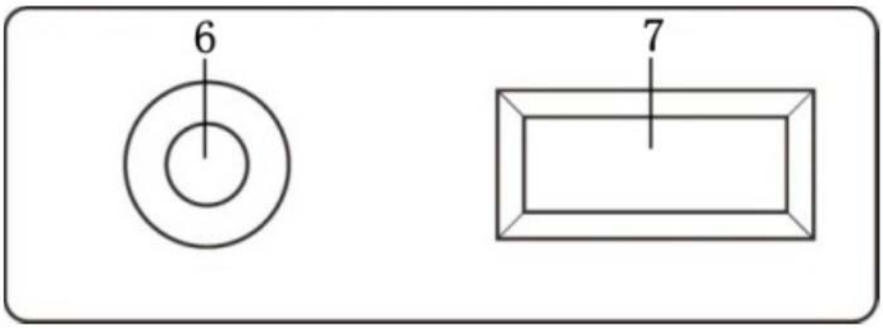
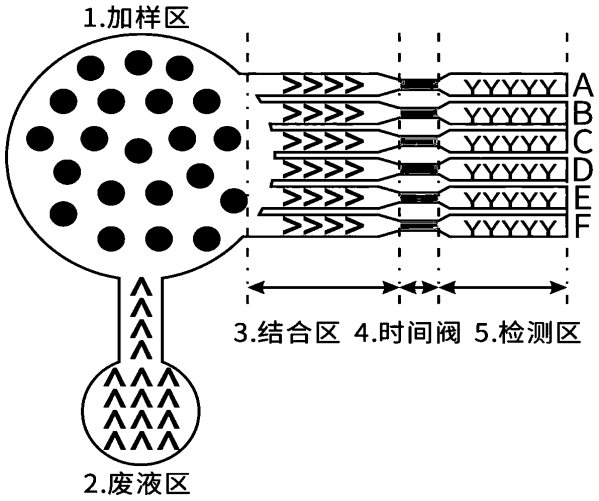


图2

专利名称(译)	一种肿瘤干细胞分型定量检测卡及其制备方法和使用方法		
公开(公告)号	CN109752541A	公开(公告)日	2019-05-14
申请号	CN201910156309.2	申请日	2019-03-01
[标]申请(专利权)人(译)	周辉		
申请(专利权)人(译)	周辉		
当前申请(专利权)人(译)	周辉		
[标]发明人	周辉		
发明人	周辉		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/58 G01N33/533		
代理人(译)	尹婷婷		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种肿瘤干细胞分型定量检测卡及其制备方法和使用方法，包括底卡和面卡，所述底卡上设有：所述底卡上设有：加样区，与加样区连接的多个结合区，通过时间阀与结合区一一对应连接的多个检测区；通过微通道与加样区连接的废液区；所述述结合区、检测区、废液区的底部均并联有微通道；结合区及检测区底部并联的微通道均连接时间阀。本发明通过微流控技术控制待测样品的流速和流量，具有同一种标志物的肿瘤干细胞通过一条微通道进入检测区，避免相互干扰，从而减少误差，增加反应灵敏度；将待测样品制备成水包水微液滴，增大检测限度。