



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109752543 A

(43)申请公布日 2019.05.14

(21)申请号 201910157353.5

(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)

G01N 33/574(2006.01)

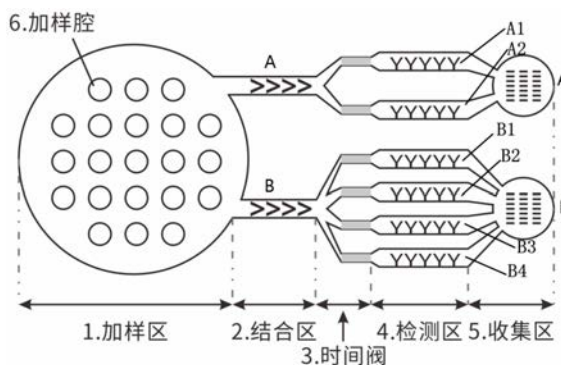
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡及其
制备方法和使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种脑恶性肿瘤细胞联合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:加样区,结合区,微通道,时间阀,检测区以及收集区,所述加样区位于微通道的一端,所述结合区通过微通道和时间阀连接一个或多个检测区位于微通道的另一端,所述检测区通过微通道连接收集区,所述加样区内设置多个加样腔,所述加样腔为圆柱体微通道,其底部直接连接至结合区;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循环肿瘤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。



1. 一种脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡,包括底卡和面卡,其特征在于,所述底卡上设有:加样区,结合区,微通道,时间阀,检测区以及收集区,所述加样区位于微通道的一端,所述结合区通过微通道和时间阀连接一个或多个检测区位于微通道的另一端,所述检测区通过微通道连接收集区。

2. 根据权利要求1所述的脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡,其特征在于,所述加样区内设置多个加样腔;所述加样腔为圆柱体微通道,其底部直接连接至结合区。

3. 根据权利要求1所述的脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡,其特征在于,所述结合区为多个;所述结合区、检测区及收集区的底部均并联有微通道;所述结合区及检测区底部并联的微通道均连接时间阀。

4. 根据权利要求1或2所述的脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡,其特征在于,所述结合区为两个,分别为结合区A及结合区B;所述结合区A通过微通道和时间阀连接检测区A1、A2;所述结合区B通过微通道和时间阀连接检测区B1、B2、B3、B4。

5. 根据权利要求4所述的脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡,其特征在于,所述结合区A喷涂有荧光微球A1标记的抗VMA抗体、荧光微球A2标记的抗HVA抗体;所述结合区B喷涂有荧光微球B1标记的抗S100蛋白抗体、荧光微球B2标记的抗骨髓细胞NSE抗体、荧光微球B3标记的抗骨髓细胞AFP抗体、荧光微球B4标记的抗MGMT抗体;所述检测区A1、A2、B1、B2、B3、B4分别包被有抗VMA抗体、抗HVA抗体、抗S100蛋白抗体、抗NSE抗体、抗AFP抗体、抗MGMT抗体。

6. 根据权利要求1或2所述的脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡,其特征在于,所述微通道孔径为10-15 μm ;所述时间阀孔径为8 μm 。

7. 根据权利要求1-6任意一项所述的脑恶性肿瘤细胞联合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) 在加样区和收集区覆盖滤纸;

(5) 将所述底卡和面卡的背面扣合连接。

8. 根据权利要求1-6任意一项所述的脑恶性肿瘤细胞联合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8 μm 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8 μm 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所述的脑恶性肿瘤细胞联合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 $8\mu\text{m}$ 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°C 进行热孵化,最后将血清标准品加入其中,即可制备得到 $8\mu\text{m}$ 的水包水微液滴。

10. 根据权利要求9所述的脑恶性肿瘤细胞联合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%。

一种脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡及其制备方法和使用方法

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,具体涉及一种脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡及其制备方法和使用方法。

背景技术

[0002] 近几年,颅内肿瘤发病率呈上升趋势,据统计,颅内肿瘤约占全身肿瘤的5%,占儿童肿瘤的70%,而其它恶性肿瘤最终会有20-30%转入颅内,由于其膨胀的浸润性生长,在颅内一旦占据一定空间时,不论其性质是良性还是恶性,都势必使颅内压升高,压迫脑组织,导致中枢神经损害,危及患者生命。生长于颅内的肿瘤通称为脑瘤,包括由脑实质发生的原发性脑瘤和由身体其他部位转移至颅内的继发性脑瘤。其病因至今不明,肿瘤发生自脑、脑膜、脑垂体、颅神经、脑血管和胚胎残余组织者,称为原发性颅内肿瘤。由身体其它脏器组织的恶性肿瘤转移至颅内者,称为继发性颅内肿瘤。颅内肿瘤可发生于任何年龄,以20-50岁为最多见。

[0003] 脑恶性肿瘤标识物是指特征性存在于脑的恶性肿瘤细胞,或由脑恶性肿瘤细胞异常产生的物质,或是宿主对脑恶性肿瘤的刺激反应而产生的物质,并能反映脑恶性肿瘤发生、发展,监测脑恶性肿瘤对治疗反应的一类物质。目前对于脑肿瘤的诊断与监测手段主要有S100蛋白、神经原特异性烯醇化酶(NSE)、甲胎蛋白(AFP)、DNA修复蛋白O6-甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(MGMT)、3-甲基-4-羟基杏仁酸(VMA)、同香草酸(HVA)等血清肿瘤标志物检测。

[0004] 微流控技术(Microfluidics)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的量。

[0005] 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。

[0006] 目前临床检验脑恶性肿瘤的手段,诸如血清鉴定、医学影像扫描、组织病理学切片等。如利用血清鉴定,由于个体差异导致有些脑恶性肿瘤缺乏高度特异性的标志物不能被有效检出,其可靠性较差;医学影像扫描可以非侵入地、快速地对患者的脑恶性肿瘤情况进

行评估,但即使是最先进准确的影像检测方法,脑恶性肿瘤检出直径至少也要在2~3mm,即小于该直径范围的脑恶性肿瘤通过影像学检查往往不能被发现,所以只能应用于癌症中晚期的检测;组织病理学切片往往根据穿刺或术后取出的脑恶性肿瘤组织才能鉴定,且技术要求较高,无法做到反复多次、长期或随时获取,此外,该方法还具有一定的创伤性且不能准确判定是否有转移情况发生。

[0007] 综上所述,如果可以早期发现,早期治疗,则对提高患者生活质量,延长生命至关重要。因此,早期发现对脑肿瘤来说就显得非常重要了。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种脑恶性肿瘤细胞联合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。

[0009] 具体技术方案如下:

[0010] 一种脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡,包括底卡和面卡,所述底卡上设有:加样区,结合区,微通道,时间阀,检测区以及收集区,所述加样区位于微通道的一端,所述结合区通过微通道和时间阀连接一个或多个检测区位于微通道的另一端,所述检测区通过微通道连接收集区。所述加样区内设置多个加样腔,所述加样腔为圆柱体微通道,其底部直接连接至结合区。

[0011] 进一步地,所述结合区为多个。

[0012] 进一步地,所述结合区为两个,分别为结合区A及结合区B;所述结合区A通过微通道和时间阀连接检测区A1、A2;所述结合区B通过微通道和时间阀连接检测区B1、B2、B3、B4。

[0013] 进一步地,每个检测区均分别通过一个时间阀和微通道与结合区连接。

[0014] 进一步地,所述检测区A1、A2通过微通道连接收集区A;所述检测区B1、B2、B3、B4通过微通道连接收集区B。

[0015] 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。

[0016] 所述结合区、检测区及收集区的底部均并联有微通道;所述结合区及检测区底部并联的微通道均连接时间阀。

[0017] 所述结合区A喷涂有荧光微球A1标记的抗VMA抗体、荧光微球A2标记的抗HVA抗体;

[0018] 所述结合区B喷涂有荧光微球B1标记的抗S100蛋白抗体、荧光微球B2标记的抗骨髓细胞NSE抗体、荧光微球B3标记的抗骨髓细胞AFP抗体、荧光微球B4标记的抗MGMT抗体;

[0019] 所述检测区A1、A2、B1、B2、B3、B4分别包被有抗VMA抗体、抗HVA抗体、抗S100蛋白抗体、抗NSE抗体、抗AFP抗体、抗MGMT抗体。

[0020] 进一步地,

[0021] 荧光微球A1的粒径0.51 μm 、激发波长660nm、发射波长690nm;

[0022] 荧光微球A2的粒径0.52 μm 、激发波长480nm、发射波长520nm;

[0023] 荧光微球B1的粒径0.51 μm 、激发波长360nm、发射波长420nm;

[0024] 荧光微球B2的粒径0.87 μm 、激发波长550nm、发射波长590nm;

[0025] 荧光微球B3的粒径0.9 μm 、激发波长395nm、发射波长410nm;

- [0026] 荧光微球B4的粒径 $0.9\mu\text{m}$ 、激发波长 460nm 、发射波长 480nm 。
- [0027] 所述加样区和收集区覆盖滤纸；所述加样区覆盖圆形滤纸，所述圆形滤纸直径为 $1.5\text{--}2.0\text{cm}$ 、孔径为 $1\text{--}3\mu\text{m}$ 。
- [0028] 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 $10\text{--}15\mu\text{m}$ ；所述时间阀孔径为 $8\mu\text{m}$ 。
- [0029] 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。
- [0030] 本发明还提供了所述的脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡的制备方法，所述制备方法包括以下步骤：
- [0031] (1) 底卡的制备：
- [0032] (1-1) 制图；
- [0033] (1-2) 掩模；
- [0034] (1-3) 光刻；
- [0035] (1-4) 再铸模；
- [0036] (1-5) 软光刻；
- [0037] (2) 在底卡的结合区分别喷涂荧光微球标记的抗体；
- [0038] (3) 在底卡的检测区分别包被抗体；
- [0039] (4) 在加样区和收集区覆盖滤纸；
- [0040] (5) 将所述底卡和面卡的背面扣合连接。
- [0041] 所述步骤(1)具体包括以下步骤：
- [0042] (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；
- [0043] (1-2) 掩模：制成掩膜版图后，打印在透明胶片上制得光刻掩模板，利用此掩模板通过光刻工艺制作硅片模具；
- [0044] (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；
- [0045] (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；
- [0046] (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°C 烘箱固化约48小时，之后将PDMS基片从印模上剥离下来。
- [0047] 本发明还提供了所述脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡的使用方法，包括以下步骤：
- [0048] (a) 将血清标准品包裹成 $8\mu\text{m}$ 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；
- [0049] (b) 样品检测：以与步骤(a)中同样的方法将待测样品包裹成 $8\mu\text{m}$ 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;

[0050] (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。

[0051] 进一步地,所述步骤(a)中,将血清标准品包裹成 $8\mu\text{m}$ 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 $1\text{wt}\%$ 鸡蛋清溶菌酶在 60°C 进行热孵化,最后将血清标准品加入其中,即可制备得到 $8\mu\text{m}$ 的水包水微液滴。

[0052] 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 $1.5\text{wt}\%$ 、 $0.5\text{wt}\%$ 、 $0.5\text{wt}\%$;

[0053] 所述水溶液B中,聚乙二醇的质量百分比浓度为 $6.5\text{wt}\%$ 。

[0054] 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,检测区以及收集区,通过各个区之间的相互配合,完成血液样本中男性肿瘤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。

[0055] 在加入样本之前,先将样本制备成 $8\mu\text{m}$ 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 $10-15\mu\text{m}$,使得只有脑恶性肿瘤细胞能进入结合区;时间阀的尺寸设置为 $8\mu\text{m}$,只有脑恶性肿瘤细胞可以单个逐次通过,使得所有待测物质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。加样区设置多个加样腔,加样腔为竖直的圆柱体微通道,使得在加样区样品中的肿瘤细胞即可直接进入微通道,其余物质则留在加样区;收集区的设置可以在检测技术后收集肿瘤细胞,避免人为感染和环境污染;结合区分为多个微通道,其上包埋了荧光素标记的二抗,每一个结合区包埋一种类型的二抗,如:糖蛋白类、表面抗原类、生长因子类等等;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,增大检测限度,提高检测灵敏度。

[0056] 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脑恶性肿瘤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脑恶性肿瘤细胞的浓度,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:

[0057] (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脑恶性肿瘤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;

[0058] (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脑恶性肿瘤细胞的浓度,达到定量检测的水平,测定全血用于脑恶性肿瘤细胞的监控和筛选,从而使得能够监控癌症复发;

[0059] (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;

[0060] (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。;

[0061] (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

[0062] 图1是一种脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡的底卡结构示意图

[0063] 图2是一种脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡的面卡结构示意图

具体实施方式

[0064] 下面结合实施例及说明书附图对本发明进行详细说明。

[0065] 实施例1

[0066] 一种脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡,包括底卡和面卡,所述底卡上设有:加样区,结合区,微通道,时间阀,检测区以及收集区,所述加样区位于微通道的一端,所述结合区通过微通道和时间阀连接一个或多个检测区位于微通道的另一端,所述检测区通过微通道连接收集区;所述加样区内设置多个加样腔,所述加样腔为圆柱体微通道,其底部直接连接至结合区。

[0067] 所述结合区为两个,分别为结合区A及结合区B;所述结合区A通过微通道和时间阀连接检测区A1、A2;所述结合区B通过微通道和时间阀连接检测区B1、B2、B3、B4。

[0068] 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。

[0069] 所述结合区、检测区及收集区的底部均并联有微通道;所述结合区及检测区底部并联的微通道均连接时间阀。

[0070] 所述结合区A喷涂有荧光微球A1标记的抗VMA抗体、荧光微球A2标记的抗HVA抗体;

[0071] 所述结合区B喷涂有荧光微球B1标记的抗S100蛋白抗体、荧光微球B2标记的抗骨髓细胞NSE抗体、荧光微球B3标记的抗骨髓细胞AFP抗体、荧光微球B4标记的抗MGMT抗体;

[0072] 所述检测区A1、A2、B1、B2、B3、B4分别包被有抗VMA抗体、抗HVA抗体、抗S100蛋白抗体、抗NSE抗体、抗AFP抗体、抗MGMT抗体。

[0073] 所述加样区和收集区覆盖滤纸;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1-3 μm 。

[0074] 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10-15 μm ;所述时间阀孔径为5 μm 。

[0075] 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。

[0076] 所述荧光微球A1标记的抗VMA抗体的制备方法为:

[0077] A、荧光微球A1的制备:称取0.009g过硫酸钾,0.004gNaHCO₃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 $^{\circ}\text{C}$ 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A1的荧光激发波长为660nm、发射波长为690nm;

[0078] B、荧光微球A1标记的抗VMA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氮经基哌嗪拍酞亚胺(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VMA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A1标记的抗VMA抗体;

[0079] 步骤B中,所述抗VMA抗体的制备方法为:用VMA抗体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VMA抗体。并采用同样的方法制备得到抗HVA抗体、抗S100蛋白抗体、抗NSE抗体、抗AFP抗体、抗MGMT抗体。

[0080] 所述荧光微球A2标记的抗HVA抗体;所述结合区B喷涂有荧光微球B1标记的抗S100蛋白抗体、荧光微球B2标记的抗骨髓细胞NSE抗体、荧光微球B3标记的抗骨髓细胞AFP抗体、荧光微球B4标记的抗MGMT抗体的制备方法均与荧光微球A1标记的抗VMA抗体相同。

[0081] 进一步地,荧光微球A2的粒径0.52μm、激发波长480nm、发射波长520nm;

[0082] 荧光微球B1的粒径0.51μm、激发波长360nm、发射波长420nm;

[0083] 荧光微球B2的粒径0.87μm、激发波长550nm、发射波长590nm;

[0084] 荧光微球B3的粒径0.9μm、激发波长395nm、发射波长410nm;

[0085] 荧光微球B4的粒径0.9μm、激发波长460nm、发射波长480nm。

[0086] 实施例2

[0087] 一种脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡的制备方法,包括以下步骤:

[0088] (1)底卡的制备:

[0089] (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;

[0090] (1-2)掩模:制成掩膜版图后,打印在透明胶片上制得光刻掩模板,利用此掩模板通过光刻工艺制作硅片模具;

[0091] (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;

[0092] (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;

[0093] (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;

[0094] (2) 在底卡的结合区A喷涂有荧光微球A1标记的抗VMA抗体、荧光微球A2标记的抗HVA抗体;结合区B喷涂有荧光微球B1标记的抗S100蛋白抗体、荧光微球B2标记的抗骨髓细胞NSE抗体、荧光微球B3标记的抗骨髓细胞AFP抗体、荧光微球B4标记的抗MGMT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;

[0095] (3) 在底卡的检测区A1、A2、B1、B2、B3、B4分别包被有抗VMA抗体、抗HVA抗体、抗S100蛋白抗体、抗NSE抗体、抗AFP抗体、抗MGMT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;

[0096] (4) 在加样区和收集区覆盖滤纸;所述加样区覆盖直径为1.5-2.0cm、孔径为1-3μm的圆形滤纸;

[0097] (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。

[0098] 实施例3

[0099] 所述脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡的使用方法,包括以下步骤:

[0100] (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%;

[0101] (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;

[0102] (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VMA抗原的浓度:

$$[0103] \quad A1 = (B' - A') / V * (tB - tA)$$

[0104] A1表示待测血清中的VMA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VMA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。

[0105] 可通过上述同样的方法测定出待测血清中的HVA、S100蛋白、NSE、AFP、MGMT的浓度。

[0106] 上述参照实施例对一种脑恶性肿瘤细胞联合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。

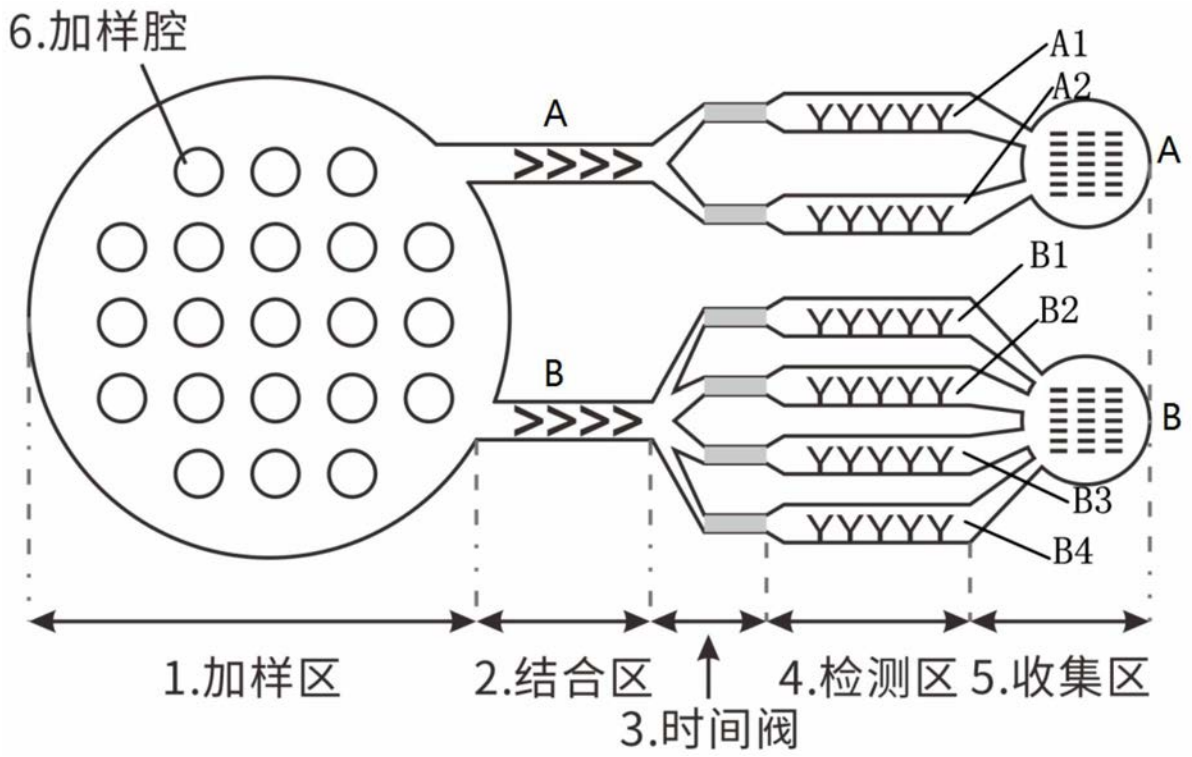


图1

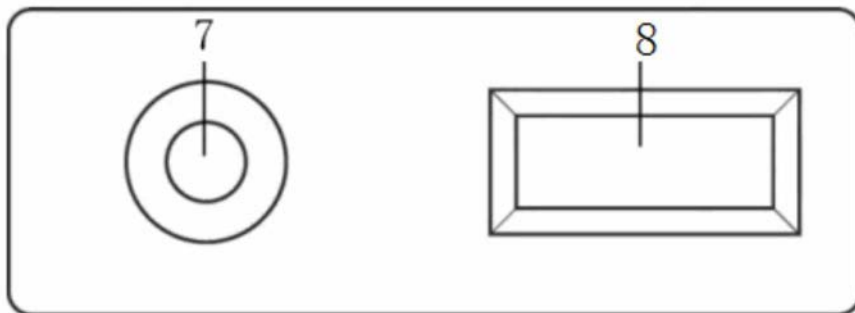


图2

专利名称(译)	一种脑恶性肿瘤细胞联合定量检测卡及其制备方法和使用方法		
公开(公告)号	CN109752543A	公开(公告)日	2019-05-14
申请号	CN201910157353.5	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 G01N33/574		
代理人(译)	尹婷婷		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明公开了一种脑恶性肿瘤细胞联合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：加样区，结合区，微通道，时间阀，检测区以及收集区，所述加样区位于微通道的一端，所述结合区通过微通道和时间阀连接一个或多个检测区位于微通道的另一端，所述检测区通过微通道连接收集区，所述加样区内设置多个加样腔，所述加样腔为圆柱体微通道，其底部直接连接至结合区；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循环肿瘤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。

