



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103018224 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 03

(21) 申请号 201210545205. 9

(22) 申请日 2012. 12. 14

(71) 申请人 中国科学院上海微系统与信息技术  
研究所

地址 200050 上海市长宁区长宁路 865 号

(72) 发明人 李刚 贾春平 赵建龙

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司  
31002

代理人 潘振甦

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006. 01)

G01N 1/28 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

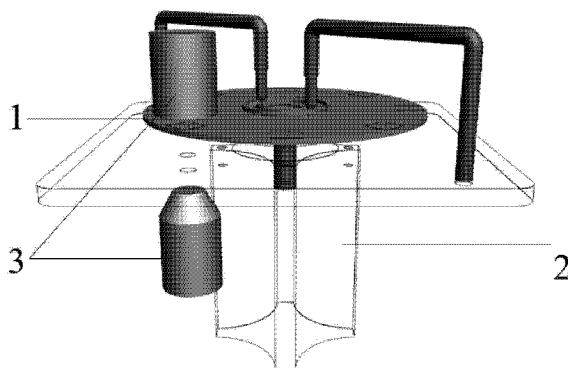
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 3 页

## (54) 发明名称

基于离心微流控技术的稀少细胞分离检测系统  
及方法

## (57) 摘要

本发明公开了一种基于离心微流控技术的稀少细胞分离检测系统及方法,所述系统包含一个类似光盘的微流控芯片、一个离心驱动模块和一个光学检测模块。其中微流控芯片包含多组辐射状排列的微管道和微腔,芯片整体结构由弹性微柱导轨层、可变形薄膜层、管道/腔体层、过滤膜层和废液收集层组成。使用时,首先将样品液和免疫修饰的微球通过微流控芯片进样口导入其储液腔中,并将其置于离心驱动模块的离心平台上,装配好弹性微柱,低速旋转,实现储液腔中样品液和免疫修饰的微珠液体的充分混合和反应,然后高速旋转芯片分离;然后在各分离细胞收集区滴加特异识别的荧光标记抗体溶液,温育反应,加入缓冲液并离心;最后,通过光学检测模块进行鉴定和分析。



1. 一种基于离心微流控技术的稀少细胞分离检测系统,其特征在于:所述系统包含一个类似光盘的微流控芯片、一个离心驱动模块和一个分离检测系统的光学检测模块;其中微流控芯片由多个结构层组成,依次为包含弹性微柱导轨层、可变形薄膜层、管道/腔体层、过滤膜层和废液收集层;离心驱动模块由一个旋转马达、一个固定基座和一组弹性微柱组成;分离检测系统的光学检测模块由一组可激发和检测荧光的透镜组成。

2. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于所述类似光盘的微流控芯片外观为圆盘形中芯片的管道/腔体层包含一个储液腔和一组分离腔,且每个分离腔围绕储液腔呈辐射状周期性排布;储液腔和每个分离腔之间由一组微管道连通;储液腔连接一组通孔,包括一个进样口、一个通气口和至少一个形变腔;每个分离腔远离芯片中心的一端收缩为一个分离细胞收集区,且每个细胞收集区对应一个加载鉴定反应液的进样口,芯片旋转时每个鉴定反应液进样口均以透明胶带密封。

3. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于:

①所述微流控芯片的弹性微柱导轨层为凹面环形结构,用以限制芯片旋转过程中弹性微柱仅发生纵向位移;其对应形变腔区域开有通孔,通过此通孔压缩的弹性微柱可施加压力于形变腔顶层的可变形薄膜上;

②所述微流控芯片的可变形薄膜层夹持于芯片弹性微柱导轨层和管道/腔体层之间,在压力作用下可发生弹性形变。

4. 根据权利要求2所述的系统,其特征在于:

①所述的分离腔呈扇形,远离芯片中心的一端收缩为一个半圆形微腔,作为分离细胞收集区(10);且每个细胞收集区上方均开有进样口,用于细胞鉴定过程中加载荧光标记的特异抗体溶液,各细胞收集区上方进样口均以胶带(13)密封,防止芯片旋转过程和温育过程样品液的损失;

②所述的微管道一方面作为流体通道保证流体和细胞从储液腔转移至分离腔,同时也作为毛细阀在低驱动压情况下暂时限制样品液于储液腔中;

③形变腔顶层为橡胶薄膜(15),该薄膜层夹持于芯片弹性微柱导轨层(14)和管道/腔体层(16)之间;

④安装于离心模块固定基座上的压缩弹性微柱(6)提供机械压力,压缩弹性微柱仅在垂直方向发生位移;

⑤微流控芯片的过滤膜层(17)为一层加工有微孔阵列的聚合物薄膜,夹持于芯片管道/腔体层和废液收集层之间,孔径大小为 $8\sim 12\mu\text{m}$ ;

⑥微流控芯片的废液收集层(18)包含一个加工有微柱阵列的环形微腔,微柱阵列用作支撑结构;

⑦所述的微腔外径应大于芯片的管道/腔体层细胞收集区距离芯片中心的距离。

5. 根据权利要求1所述的系统,其特征在于:

①所述微流控芯片的弹性微柱导轨层、管道/腔体层和废液收集层的制作材料为玻璃、聚二甲基硅氧烷、聚苯乙烯、聚碳酸酯、环烯烃共聚物、聚甲基丙烯酸甲酯和SU-8中的任意一种;

②过滤膜材料为聚二甲基硅氧烷、聚苯乙烯、聚碳酸酯、环烯烃共聚物、聚甲基丙烯酸甲酯、聚酰亚胺、聚对二甲苯和SU-8中的任意一种。

6. 根据权利要求 1 所述的系统,其特征在於所述离心驱动模块所包含旋转马达为可控调速马达;所包含弹性微柱在垂直方向力的作用下,可上下移动,弹性微柱下端为光滑球面形状,并通过自身弹簧产生的压力其下端与芯片导轨层凹槽面直接接触;弹性微柱通过一个可升降支架固定于固定基座上。

7. 按权利要求 6 所述的系统,其特征在於分离检测系统的光学检测模块由一组可激发和检测荧光的透镜(3)组成,透镜(3)分别位于芯片上下方,透镜距离离心平台中心轴距离等于芯片分离细胞收集区距离离心平台中心轴距离。

8. 使用根据权利要求 1-7 中任一项所述的系统的方法,其特征在於首先将样品液和免疫修饰的微球通过微流控芯片进样口导入其储液腔中,并将其置于离心驱动模块的离心平台上,装配好弹性微柱,低速旋转,利用旋转过程中弹性微柱对芯片表面变形薄膜的周期性挤压,实现储液腔中样品液和免疫修饰的微珠液体的充分混合和反应,然后高速旋转芯片,通过离心力结合过滤膜实现免疫捕获细胞的快速高效分离;分离后,在各分离细胞收集区滴加可特异识别待检测细胞的荧光标记抗体溶液,温育反应,然后加入缓冲液并离心,清除未反应的荧光标记抗体分子;最后,通过光学检测模块进行鉴定和分析。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在於包含以下步骤:

a) 将样品液和免疫修饰的微球通过微流控芯片进样口导入其储液腔中,并将其置于离心模块的离心平台上;

b) 下降离心模块上的弹性微柱支架,使微柱下端接触导轨槽,并使弹性微柱弹簧处于压缩状态,低速旋转离心平台,利用旋转过程中弹性微柱对芯片形变腔上表面变形薄膜的周期性挤压,实现储液腔中样品液和免疫修饰的微球的充分混合和反应;

c) 反应结束后,高速旋转离心平台,利用离心力结合过滤膜实现免疫捕获细胞的快速高效分离,并将已分离目标细胞聚集于芯片收集区;

d) 分离完成后,将各收集区对应加液口上密封胶带除去,加入可特异识别待检测细胞的荧光标记抗体溶液,并再次贴上密封胶带,温育反应;

e) 反应结束后,在芯片进样口加入缓冲液并高速离心,清除未反应的荧光标记抗体分子,最后通过光学检测模块对收集区细胞进行鉴定和分析。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在於:

①低速旋转离心平台的转速为 60-300 转 / 分钟;

②高速旋转离心平台的转速为 500-5000 转 / 分钟。

## 基于离心微流控技术的稀少细胞分离检测系统及方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于离心微流控技术的稀少细胞分离检测系统及使用方法,可应用于无创产前诊断、肿瘤早期诊断和预后监测以及干细胞研究等领域。

### 背景技术

[0002] 从复杂混合物中选择性地分离稀少细胞在细胞生物学和临床方面都具有重要意义,比如从母体外周血中分离胎儿红细胞、患者外周血中分离循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cell, CTC)以及骨髓或组织中分离干细胞等,这些细胞的分析往往能给临床诊断和疾病的治疗提供非常有价值的信息,但是这类细胞在样品中的含量非常稀少,通常仅为 $1\sim 10$ 个/mL,分离提取非常困难,因此大大限制了其临床应用。传统的稀少细胞分离富集技术主要有密度梯度离心法、过滤分离法和免疫磁珠分选法等。其中密度梯度离心法和过滤分离法均是借助各种细胞的物理特性差异(比如密度、大小)来筛选和富集目标细胞,但是这类基于细胞物理特性来进行分离富集的方法特异性较差,所得样品纯度较低,其风险在于经常会导致疾病诊断的错误。免疫磁珠分选法是目前最为常用的稀少细胞分离富集方法,其基本原理是利用稀少细胞表面抗原与连有免疫磁珠的单克隆抗体特异性结合,在外加磁场作用下实现稀少细胞的分离富集。这种方法将抗原抗体反应的高度特异性和免疫磁珠的富集分离作用相结合,具有简便、灵敏、快速的特点,且分离纯度高,产率大,不影响被分离细胞的活性。但是这种方法应用于稀少细胞的富集方面,仍有许多不足。一方面,传统的基于磁力的分离方法,往往采用离心管操作,由于相对于磁珠所受磁力,其平均沉降路径较长(几个 $\text{mm}\sim 1\text{cm}$ ),因此磁珠-细胞复合物完全沉降所需时间较长,分离效率较低,且因磁珠所受磁场作用力相对较弱,基本与流体剪切力一个量级,容易导致部分磁珠或磁珠-细胞复合物被洗涤液一起带走,影响检测结果的准确性;另外,在检测过程中,分离富集的细胞往往需要转移到新的容器或平板上进行检测,往往容易导致部分靶细胞因转移损失被遗漏。因此,为了提高并改善稀少细胞分离检测的特异性及敏感性,国内外很多研究机构及企业都致力于研究新的稀少细胞分离富集方法和设备,尤其是基于微流控技术的稀少细胞分离方法近年来得到迅速发展。其中最引人注目的是哈佛医学院报道的基于微流控技术的CTC分离方法,该方法利用微流体芯片技术成功地分离检测到肿瘤病人体内的少量CTC[Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*. 2007, 450:1235-1241.],肿瘤细胞捕获效率高达99%,分离纯度约为50%。所用微流控芯片以硅为基片,采用光刻、等离子体深刻蚀、键合等工艺加工制作,该芯片包含了78,000个硅基微柱,通过在微柱上包被抗EpCAM抗体,使得当血液流经微柱时其中所含的CTC被免疫捕获,最后再用免疫荧光方法原位标记CTC并对其计数,实现CTC的检测。由于该方法无需全血标本的预处理,同时操作过程简单温和,对细胞损伤比较小,避免了分离纯化及反复离心洗涤的繁琐步骤,且检测灵敏度高,显示了很好的应用前景。尽管如此,该方法仍存在较大不足:一方面,为了保证细胞的捕获效率,考虑流体剪切力、流体流形空间分布

等因素影响,血液样本在芯片中必须维持较慢的速度( $\sim 1\text{mL/h}$ ),因此该方法检测过程耗时较长(5~7 小时),效率较低。另一方面,所用芯片采用不透明的硅基制作,不利于光学检测,且芯片中微柱的等离子体刻蚀加工,需要昂贵仪器,制作成本较高,限制了其临床的大规模应用。虽然,最近有人力图改进这一方法 [Wang S, Liu K, Liu J, et al. Highly Efficient Capture of Circulating Tumor Cells by Using Nanostructured Silicon Substrates with Integrated Chaotic Micromixers. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50:3084 - 3088. ],比如通过调节免疫捕获微柱间距和排列或在微管道中增加斜纹脊形微结构优化微流控芯片中 CTC 捕获效率,但改进效果有限,仍然无法同时满足高效捕获和快速分离的要求。因此,急需发展一种易于操作、可实现稀少细胞快速高效分离的系统。从而成为本发明的构思。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种基于离心微流控技术的稀少细胞分离检测系统及使用方法,所提供的分离检测系统具有操作简单、自动化程度高、可实现稀少细胞快速高效分离的特点,可望应用于母体外周血中胎儿红细胞、患者外周血中循环肿瘤细胞和人体组织中干细胞等稀少细胞的高效分离。

[0004] 本发明提供的一种基于离心微流控技术的稀少细胞分离检测系统,其特征在于:所述系统包含一个类似光盘的微流控芯片 1、一个离心驱动模块 2 和一个分离检测系统的光学检测模块 3。该系统利用离心模块 2 上离心平台 4 的旋转,使得固定于其固定基座 5 上的压缩弹性微柱 6 周期性地挤压芯片上与储液腔 7 相通的形变腔 9 上橡胶薄膜 15,实现储液腔中样品液和免疫修饰微球的充分混合和快速反应,同时利用芯片高速旋转产生的离心力结合芯片分离腔 8 区域集成的过滤膜层 17,实现免疫捕获细胞的高效分离。

[0005] 具体而言,分离检测系统的微流控芯片外观为圆盘形,如图 4 所示,由多个结构层组成,依次包含弹性微柱导轨层 14、可变形薄膜层 15、管道/腔体层 16、过滤膜层 17 和废液收集层 18;其中芯片的管道/腔体层 16 包含一个储液腔 7 和一组分离腔 8,且每个分离腔围绕储液腔呈辐射状周期性排布;每个分离腔均呈扇形,远离芯片中心的一端收缩为一个半圆形微腔,作为分离细胞收集区 10,这种将分离细胞聚集在若干特定区域的设计,避免了后续检测过程中繁琐耗时的大面积显微搜索操作;且每个细胞收集区上方均开有进样口,用于细胞鉴定过程中加载荧光标记的特异抗体溶液,芯片旋转过程及温育反应过程中,各细胞收集区上方进样口均以胶带 13 密封,防止芯片旋转过程和温育过程样品液的损失。而且这种直接于分离细胞收集区加载鉴定反应液的方式,可大大减少鉴定过程中所需珍贵的荧光标记抗体溶液体积,降低检测成本;储液腔和每个分离腔之间由一组微管道连通,微管道一方面作为流体通道保证流体和细胞从储液腔转移至分离腔,同时也作为毛细阀在低驱动压情况下暂时限制样品液于储液腔中;储液腔连接一组通孔包括一个进样口 11、一个通气口 12 和至少一个形变腔 9;形变腔顶层为橡胶薄膜 15,该薄膜层夹持于芯片弹性微柱导轨层 14 和管道/腔体层 16 之间,在压力作用下可发生弹性形变,因而通过机械挤压形变腔上的橡胶薄膜可改变形变腔体积;如图 5 所示,安装于离心模块固定基座上的压缩弹性微柱 6 可以提供此机械压力,由于芯片上弹性微柱导轨层 14 导轨槽的限制作用,压缩弹性微柱仅在垂直方向发生位移,即其与芯片接触时仅施加垂直方向的压力,当芯片随离心平台旋转时,压缩弹性微柱周期性地与各形变腔 9 上橡胶薄膜 15 接触,从而周期性挤压形变

腔,导致与形变腔相通的储液腔中流体发生振荡运动,加速其中的流体混合反应过程;微流控芯片的过滤膜层 17 为一层加工有微孔阵列的聚合物薄膜,夹持于芯片管道/腔体层和废液收集层之间,孔径大小为  $8\sim 12\ \mu\text{m}$ ,保证可阻挡结合免疫微球后的目标细胞;微流控芯片的废液收集层 18 包含一个加工有微柱阵列的环形微腔,微柱阵列用作支撑结构,防止过滤薄膜的塌陷;为了保证废液收集腔能完全容纳分离和反应废液,微腔外径应大于芯片的管道/腔体层细胞收集区距离芯片中心的距离;上述微流控芯片的弹性微柱导轨层、管道/腔体层和废液收集层的制作材料可以为玻璃、PDMS (Polydimethylsiloxane, 聚二甲基硅氧烷)、PS (polystyrene, 聚苯乙烯)、PC (Polycarbonate, 聚碳酸酯)、COC (Cyclic olefin copolymer, 环烯烃共聚物)、PMMA (Polymethyl methacrylate, 聚甲基丙烯酸甲酯)、SU-8 中的任意一种。另外,微流控芯片的过滤膜层材料可以为 PDMS (Polydimethylsiloxane, 聚二甲基硅氧烷)、PS (polystyrene, 聚苯乙烯)、PC (Polycarbonate, 聚碳酸酯)、COC (Cyclic olefin copolymer, 环烯烃共聚物)、PMMA (Polymethyl methacrylate, 聚甲基丙烯酸甲酯)、PI (Polyimide, 聚酰亚胺)、PA (Parylene, 聚对二甲苯)、SU-8 中的任意一种。

[0006] 分离检测系统的离心驱动模块由一个旋转马达 4、一个固定基座 5 和一组弹性微柱 6 组成。其中旋转马达 4 为程控调速马达;固定基座 5 用于给一组弹性微柱结构 6 提供支撑;弹性微柱下端为光滑球面形状,保证旋转过程中弹性微柱与导轨槽和可形变膜的接触不会阻碍芯片的转动;在垂直方向力的作用下,弹性微柱可上下移动,并通过适当调整其高度,弹性微柱自身弹簧形变产生的压力可保证其下端与芯片导轨层凹槽面直接接触,当芯片旋转至形变腔 9 垂直对准弹性微柱时,压缩的弹性微柱会对形变腔顶层的可形变膜 15 施加压力,使其发生形变;弹性微柱通过一个可升降支架固定于固定基座上,当支架上升时,弹性微柱不会对芯片的形变腔施加挤压,而当支架下降时,弹性微柱则通过弹性力对芯片的形变腔施加挤压,辅助储液腔的流体快速混合。

[0007] 分离检测系统的光学检测模块由一组可激发和检测荧光的透镜 3 组成,这些透镜分别位于芯片上下方,透镜距离离心平台中心轴距离等于芯片分离细胞收集区距离离心平台中心轴距离,通过离心驱动模块驱动芯片的旋转,实现分离细胞的原位自动检测,避免了传统方法中从分离区至鉴定区转移过程对所捕获的稀少细胞造成的损失,进一步提高了稀少细胞分离检测的灵敏度。

[0008] 使用过程中,首先将样品液和免疫修饰的微球通过微流控芯片进样口导入其储液腔中,由于微管道的毛细管作用,样品液和免疫修饰的微球会局限于储液腔中,不会通过连接微管道直接进入分离腔中;完成进样后,将芯片置于离心平台上,并降下弹性微柱支架,使微柱下端接触导轨槽,并使弹性微柱弹簧处于压缩状态;完成弹性微柱装配后,低速旋转离心平台,利用旋转过程中弹性微柱对芯片形变腔上表面变形薄膜的周期性挤压,使得储液腔中流体发生振荡运动,实现储液腔中样品液和免疫修饰微球的快速充分混合和反应;反应结束后,高速旋转离心平台,较大的离心力将驱动储液腔中的流体和细胞混合物克服微管道毛细管的作用进入分离腔,在分离腔区域,由于离心力的作用,流体将透过过滤膜流向下层废液腔,粒径较小的细胞也将透过膜孔随流体一起进入废液腔,而一般稀少细胞(如胎儿红细胞、CTC 和干细胞)直径较大,且结合免疫微球后,其复合体的尺度更大,因此将被过滤膜阻挡在分离腔上层,从而实现稀少细胞与其他绝大多数细胞的分离。在离心力的作用下,分离腔上层的细胞(包括免疫捕获的细胞)最终聚集于芯片收集区。分离完成后,将各

收集区对应加液口上密封胶带除去,加入可特异识别待检测细胞的荧光标记抗体溶液,并再次贴上密封胶带,温育反应。反应结束后,在芯片进样口加入缓冲液并高速离心,利用缓冲液的洗涤清除未反应的荧光标记抗体分子,最后通过自动旋转定位操控离心平台,利用光学检测模块对各收集区细胞进行原位鉴定和分析。

[0009] 由此可见,本发明特征在于:

[0010] ①每个分离腔远离芯片中心的一端收缩为一个分离细胞收集区,且每个细胞收集区对应一个加载鉴定反应液的进样口,芯片旋转时每个鉴定反应液进样口均以透明胶带密封;

[0011] ②所述微流控芯片的弹性微柱导轨层为凹面环形结构,用以限制芯片旋转过程中弹性微柱仅发生纵向位移;其对应形变腔区域开有通孔,通过此通孔压缩的弹性微柱可施加压力于形变腔顶层的可变形薄膜上;

[0012] ③所述微流控芯片的可变形薄膜层夹持于芯片弹性微柱导轨层和管道/腔体层之间,在压力作用下可发生弹性形变;

[0013] ④所述系统包含一个类似光盘的微流控芯片、一个离心驱动模块和一个分离检测系统的光学检测模块;其中微流控芯片由多个结构层组成,依次为包含弹性微柱导轨层、可变形薄膜层、管道/腔体层、过滤膜层和废液收集层;离心驱动模块由一个旋转马达、一个固定基座和一组弹性微柱组成;分离检测系统的光学检测模块由一组可激发和检测荧光的透镜组成;

[0014] ⑤本发明提供的系统使用时首先将样品液和免疫修饰的微球通过微流控芯片进样口导入其储液腔中,并将其置于离心驱动模块的离心平台上,装配好弹性微柱,低速旋转,利用旋转过程中弹性微柱对芯片表面变形薄膜的周期性挤压,实现储液腔中样品液和免疫修饰的微珠液体的充分混合和反应,然后高速旋转芯片,通过离心力结合过滤膜实现免疫捕获细胞的快速高效分离;分离后,在各分离细胞收集区滴加可特异识别待检测细胞的荧光标记抗体溶液,温育反应,然后加入缓冲液并离心,清除未反应的荧光标记抗体分子;最后,通过光学检测模块进行鉴定和分析。

[0015] 本发明将免疫微球、微孔膜过滤和离心平台相结合构建稀少细胞分离检测系统,大大提高了稀少细胞的分离纯度,加快了稀少细胞的分离检测速度和效率。与现有基于微流控技术的稀少细胞分离检测系统相比,本发明提供的稀少细胞分离检测系统在分离检测速度和成本方面具有明显的优势,一方面通过结合免疫微球和离心过滤方法实现稀有细胞特异性分离,避免了制作集成免疫修饰微柱微流控芯片的复杂加工过程和昂贵成本;另一方面,从混合反应角度来看,免疫微球悬浮于样品液中,可以视为近似均相的反应,相对于现有的基于微柱阵列的微流控稀少细胞分离检测系统而言(其免疫反应为异相反应体系),具有更快的反应速率,且周期性机械挤压产生的流体振荡运动可进一步提高免疫微球与样品液中目标细胞的反应结合效率。此外,本发明提供的稀少细胞分离检测系统可将免疫分离后的细胞聚集于特定微区,避免了检测过程中繁琐耗时的大面积显微搜索操作,大大降低了稀少细胞分离检测实验操作的劳动强度,提高了稀少细胞分离检测效率。

## 附图说明

[0016] 图1为本发明基于离心微流控技术的稀少细胞分离检测系统结构示意图。

- [0017] 图 2 为图 1 所示分离检测系统结构组装示意图。
- [0018] 图 3 为本发明稀少细胞分离检测系统微流控芯片结构俯视示意图。
- [0019] 图 4 为本发明稀少细胞分离检测系统微流控芯片结构组装示意图。
- [0020] 图 5 为本发明稀少细胞分离检测系统执行混合反应时芯片形变腔区域剖面示意图。

### 具体实施方式

[0021] 下面结合实施例进一步说明本发明的实质性特点和显著的进步。

#### [0022] 实施例 1

[0023] 收集约 5mL 肿瘤病人外周血,并在血样中加入可与肿瘤细胞结合的 EpCAM 标记的免疫微球,然后注入稀少细胞分离检测系统微流控芯片的储液腔中;将加样后的芯片置于离心平台上,并装配好弹性微柱,以 60~100 转/分钟旋转离心平台,实现自动快速混合反应;5 分钟后,提高旋转离心平台转速至 500 转/分钟,实现目标细胞分离;10 分钟后,关闭离心平台运转,并撕开各细胞收集区上方加样口密封胶带,将可识别血液细胞的 CD45-FITC 及特异标记肿瘤细胞的 CK-PE 抗体依次加入细胞收集区,加液完成后再次以胶带封闭各加样口;温育 20 分钟,在芯片进样口注入磷酸缓冲液(PBS),并以 600 转/分钟旋转离心平台,洗涤清除细胞收集区未结合的荧光标记抗体分子。最后,调节旋转平台,将芯片各细胞收集区依次置于光学检测模块镜头处,对分离细胞进行鉴定分析。

#### [0024] 实施例 2

[0025] 收集约 100mL 人体骨髓,并在血样中加入可与胎儿红细胞结合的 CD71 标记的免疫微球,然后注入稀少细胞分离检测系统微流控芯片的储液腔中;将加样后的芯片置于离心平台上,并装配好弹性微柱,以 60~100 转/分钟旋转离心平台,实现自动快速混合反应;5 分钟后,提高旋转离心平台转速至 500 转/分钟,实现目标细胞分离;10 分钟后,关闭离心平台运转,并撕开各细胞收集区上方加样口密封胶带,将可识别胎儿红细胞血红蛋白的荧光标记抗体溶液加入细胞收集区,加液完成后再次以胶带封闭各加样口;温育 20 分钟,在芯片进样口注入磷酸缓冲液(PBS),并以 600 转/分钟旋转离心平台,洗涤清除细胞收集区未结合的荧光标记抗体分子。最后,调节旋转平台,将芯片各细胞收集区依次置于光学检测模块镜头处,对分离细胞进行鉴定分析。

#### [0026] 实施例 3

[0027] 收集约 1mL 人体脐带血,并在血样中加入可与造血干细胞选择性结合的免疫微球,然后注入稀少细胞分离检测系统微流控芯片的储液腔中;将加样后的芯片置于离心平台上,并装配好弹性微柱,以 60~100 转/分钟旋转离心平台,实现自动快速混合反应;5 分钟后,提高旋转离心平台转速至 500 转/分钟,实现目标细胞分离;10 分钟后,关闭离心平台运转,并撕开各细胞收集区上方加样口密封胶带,将可识别造血干细胞的 CD45-FITC 溶液加入细胞收集区,加液完成后再次以胶带封闭各加样口;温育 20 分钟,在芯片进样口注入磷酸缓冲液(PBS),并以 600 转/分钟旋转离心平台,洗涤清除细胞收集区未结合的荧光标记抗体分子。最后,调节旋转平台,将芯片各细胞收集区依次置于光学检测模块镜头处,对分离细胞进行鉴定分析。

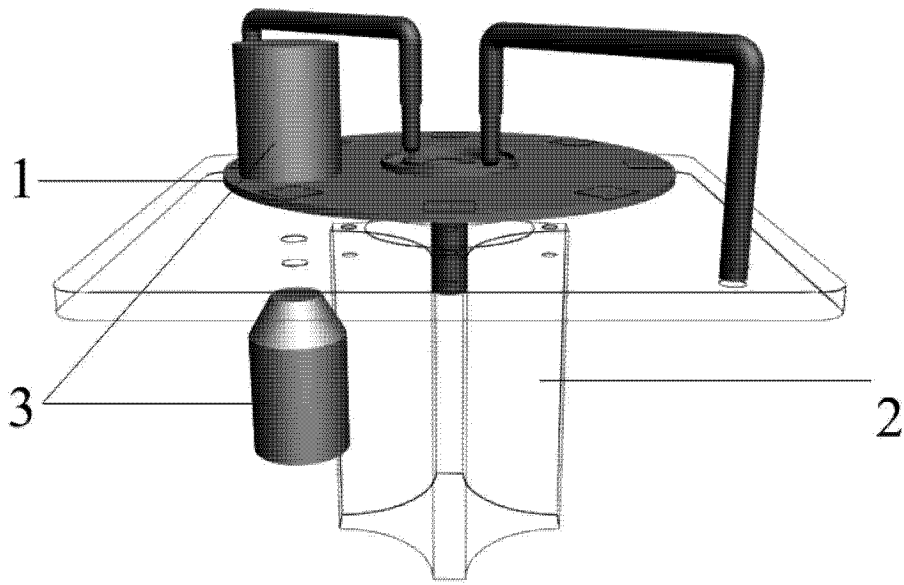


图 1

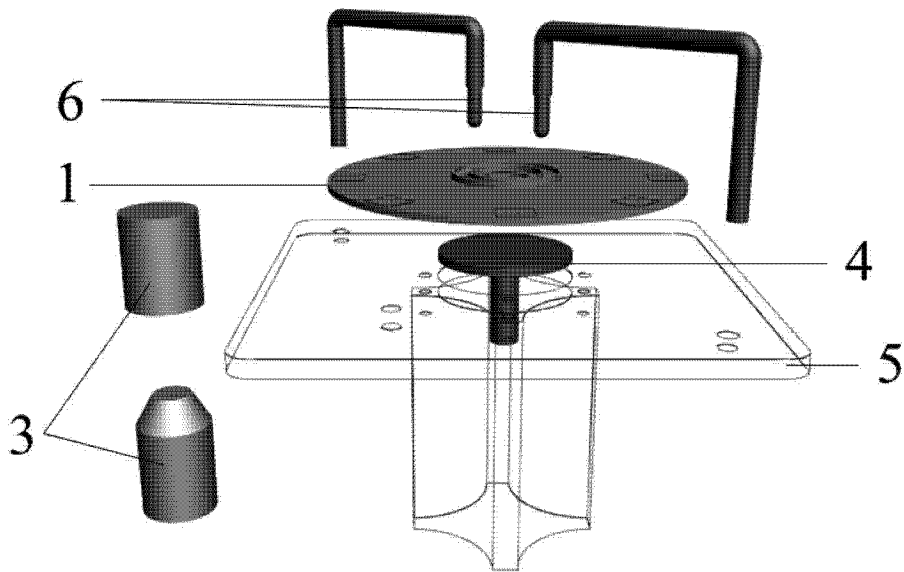


图 2

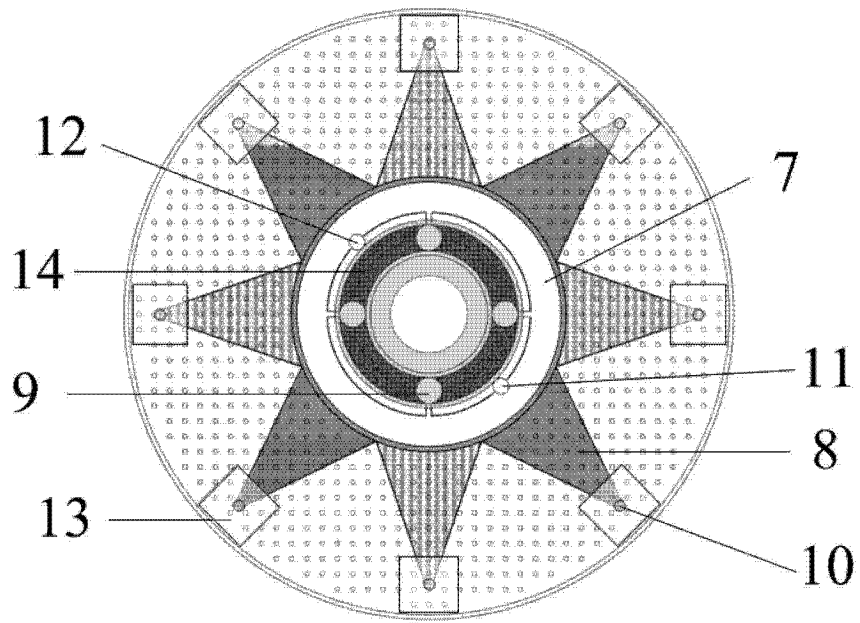


图 3

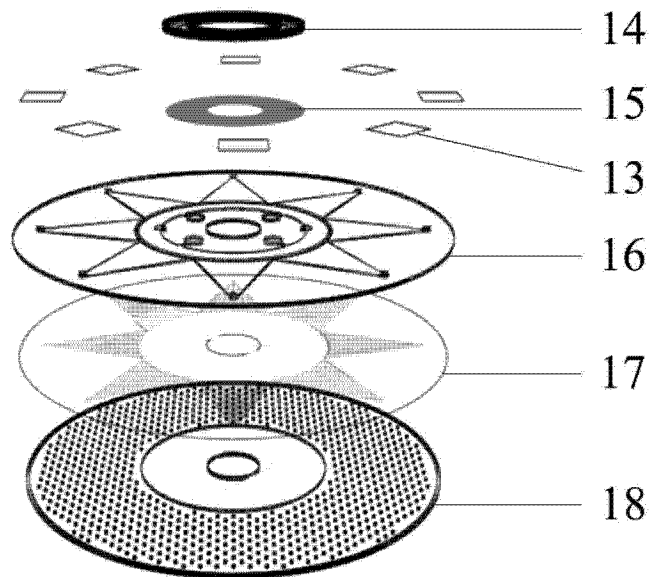


图 4

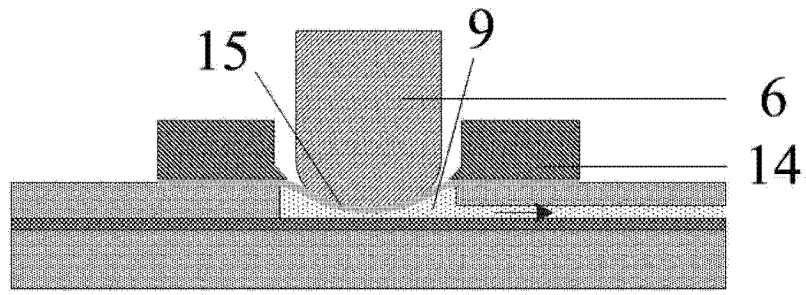


图 5

专利名称(译)	基于离心微流控技术的稀少细胞分离检测系统及方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103018224A</a>	公开(公告)日	2013-04-03
申请号	CN201210545205.9	申请日	2012-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海微系统与信息技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海微系统与信息技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海微系统与信息技术研究所		
[标]发明人	李刚 贾春平 赵建龙		
发明人	李刚 贾春平 赵建龙		
IPC分类号	G01N21/64 G01N1/28 G01N33/53		
其他公开文献	CN103018224B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种基于离心微流控技术的稀少细胞分离检测系统及方法，所述系统包含一个类似光盘的微流控芯片、一个离心驱动模块和一个光学检测模块。其中微流控芯片包含多组辐射状排列的微管道和微腔，芯片整体结构由弹性微柱导轨层、可变形薄膜层、管道/腔体层、过滤膜层和废液收集层组成。使用时，首先将样品液和免疫修饰的微球通过微流控芯片进样口导入其储液腔中，并将其置于离心驱动模块的离心平台上，装配好弹性微柱，低速旋转，实现储液腔中样品液和免疫修饰的微珠液体的充分混合和反应，然后高速旋转芯片分离；然后在各分离细胞收集区滴加特异识别的荧光标记抗体溶液，温育反应，加入缓冲液并离心；最后，通过光学检测模块进行鉴定和分析。

