



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103869060 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 18

(21) 申请号 201410081509. 3

(22) 申请日 2014. 03. 07

(71) 申请人 复旦大学附属中山医院
地址 200032 上海市徐汇区枫林路 180 号

(72) 发明人 樊嘉 杨欣荣 孙云帆 徐洪
周俭

(74) 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司
31001

代理人 翁若莹

(51) Int. Cl.
G01N 33/533(2006. 01)

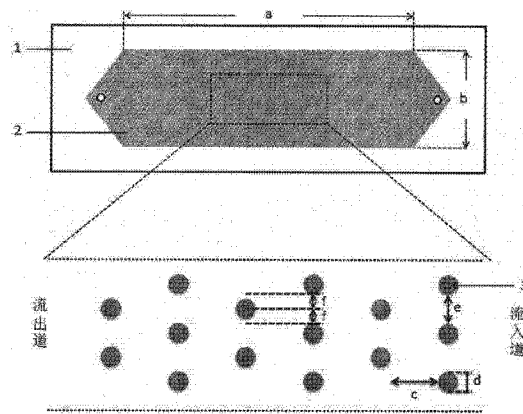
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒,其特征在于,包含微流控芯片、至少一种能够与循环肿瘤干细胞特异性结合的标记有肿瘤干细胞生物标志物的免疫磁珠以及至少一种针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体,其中,所述的微流控芯片包括玻璃芯片基底,所述的玻璃芯片基底上设有微流控通道,微流控通道内设有软磁性微阵列。本发明可实现一次样品进样即可捕获检测多种不同类别的稀有循环肿瘤干细胞,具有较高的灵敏度和特异性,操作方便快速,捕获细胞易于收集,无需芯片内部微流通道复杂的一抗二抗表面修饰过程等特点。



1. 一种基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒,其特征在于,包含微流控芯片、至少一种能够与循环肿瘤干细胞特异性结合的标记有肿瘤干细胞生物标志物的免疫磁珠以及至少一种针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体,其中,所述的微流控芯片包括玻璃芯片基底(1),所述的玻璃芯片基底(1)上设有微流控通道(2),微流控通道(2)内设有软磁性微阵列。

2. 如权利要求1所述的基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒,其特征在于,所述的软磁性微阵列由镍铁合金圆柱(3)构成,相邻两列镍铁合金圆柱(3)交错排列。

3. 如权利要求2所述的基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒,其特征在于,所述的相邻两列镍铁合金圆柱(3)的距离(a)为 $100\mu\text{m}$,镍铁合金圆柱(3)的直径(b)为 $30\mu\text{m}$,每列中相邻两个镍铁合金圆柱(3)之间的距离(c)为 $50\mu\text{m}$ 。

4. 如权利要求1所述的基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒,其特征在于,所述的肿瘤干细胞生物标志物包括EpCAM、CD133、CD90、CD24、CD13、ICAM-1、SALL4、CD44和ALDH的至少一种。

5. 权利要求1-4中任一项所述的基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒的使用方法,其特征在于,具体步骤包括:

步骤1:裂解外周血红细胞,离心,去除上清,重悬获得外周血有核细胞悬液;

步骤2:将能够与循环肿瘤干细胞特异性结合的标记有肿瘤干细胞生物标志物的免疫磁珠掺入外周血有核细胞悬液,孵育,得到标记有免疫磁珠的外周血有核细胞悬液;

步骤3:在微流控芯片底部施加外磁场,将标记有免疫磁珠的外周血有核细胞悬液泵入微流控芯片的微流控通道(2)中;

步骤4:将相应的针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体泵入微流控芯片的微流控通道(2)中,孵育,显微镜鉴定循环肿瘤干细胞;

步骤5:撤除微流控外磁场,回收循环肿瘤干细胞以进行下游分子生物学实验。

6. 权利要求1-4中任一项所述的基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒的使用方法,其特征在于,具体步骤包括:

步骤A:裂解外周血红细胞,离心,去除上清,重悬获得外周血有核细胞悬液;

步骤B:将针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体掺入外周血有核细胞悬液,孵育,得到含有针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体的外周血有核细胞悬液;

步骤C:将相应的能够与循环肿瘤干细胞特异性结合的标记有肿瘤干细胞生物标志物的免疫磁珠掺入有针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体的外周血有核细胞悬液,孵育,得到标记有免疫磁珠的外周血有核细胞悬液;

步骤D:在微流控芯片底部施加外磁场,将标记有免疫磁珠的外周血有核细胞悬液泵入微流控芯片的微流控通道(2)中,显微镜鉴定循环肿瘤干细胞;

步骤E:撤除微流控外磁场,回收循环肿瘤干细胞以进行下游分子生物学实验。

基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒。

背景技术

[0002] 肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) (简称肝癌) 是最常见的恶性肿瘤之一, 在中国每年新诊断的肝癌约占全世界 55%, 其死亡率在我国恶性肿瘤中列第二位。虽然手术切除是目前肝癌治疗的首选方式, 但即便是根治性切除 5 年内仍有 60-70% 的病人出现转移复发。肝癌术后转移和复发是病人术后的主要死亡原因, 它已成为进一步提高肝癌治疗效果的最主要障碍。因此, 探索肝癌转移、复发的机制, 寻找更有效的转移早期预警及疗效评估手段, 以便进行早期合理干预, 已成为进一步提高肝癌生存率的关键。

[0003] 近来研究提示循环肿瘤细胞在肿瘤转移和复发中扮演关键角色。但是每天有数以千计的肿瘤细胞脱离原发瘤进入循环血中, 但并不是每个循环肿瘤细胞都能成为转移复发的“种子”。这除有环境(土壤)因素外, “种子”本身特性也决定着其能否在新环境中成功“定植”。我们在前期研究中发现具有干细胞特性的循环肿瘤细胞的数量与肝癌切除术后早期肝内复发和肺转移密切相关, 相对于较成熟的循环肿瘤细胞而言, 那些循环肿瘤干细胞具有很强的成瘤、抗凋亡能力。因此精确地捕获分类这些导致癌症转移、复发的“种子”细胞具有重大的临床和科研意义。然而这群细胞在外周血中极其稀有, 平均 10^7 个白细胞中只有一个循环肿瘤干细胞。目前已有的循环肿瘤细胞捕获技术如梯度密度离心技术、滤膜技术和流式细胞技术在实现循环肿瘤干细胞的捕获分类方面均存在一定的缺陷。梯度密度离心和滤膜技术通过循环肿瘤细胞与血细胞之间物理特性的差异(密度、大小)实现细胞的捕获, 由于这两种基于物理特性实现捕获的技术其灵敏度和特异性较低, 无法对捕获细胞进行分类, 细胞易丢失, 限制了其在循环肿瘤细胞捕获中的应用。流式细胞术通过对待测样品进行特定的荧光标记, 然后利用复杂的光学检测系统进行鉴定分选, 该技术虽可实现不同类别肿瘤细胞的分类收集, 但是设备本身成本昂贵、检测效率低、需专人操作, 同时检测稀有细胞灵敏度差, 无法对细胞形态学进行观察, 也很难广泛应用于循环肿瘤干细胞的捕获。因此亟需开发一种廉价、操作简单, 一次性使用的, 具有高灵敏度、特异性和多标志物检测的循环肿瘤干细胞方法。

[0004] 微流控芯片技术具有检测高效、集成化、试剂消耗量小等诸多优点正被越来越多地应用于生物医学领域, 并已发展出多种微流控细胞捕获技术。然而目前大多数已报道的细胞捕获芯片仍停留在单标志物、单种细胞的捕获, 对于多标志物、多类别细胞捕获仍然缺乏相应的手段。它们中的代表是 Nagrath S 等 2007 年于 Nature 上报道的一种单标志物循环肿瘤细胞捕获芯片, 该芯片在流道内设置圆形的微柱阵列, 经过化学修饰, 在流道内壁及微柱表面结合上皮细胞黏附因子抗体, 通过细胞流动中与微柱的碰撞来捕获靶细胞。这种方法捕获细胞的成功与否完全取决于靶细胞是否碰撞微柱, 因此其捕获效率较低。该类芯片无法一次进样实现多标志物循环肿瘤干细胞捕获的功能。此外这种芯片的应用还受制于捕获的细胞很难释放收集和前期芯片化学修饰过程复杂等缺点。为了实现多标志物癌细胞

捕获的目的, Xu Y 等 2009 年在 Anal Chem 上提出蛇形管道划定不同捕获区域, 在每个捕获区域的上下游设置进出样开孔, 利用开孔的交替开放与封闭在不同区域固定上各自不同的核酸适体, 以此来达到在同一管道中并行捕获不同癌细胞的目的。该方法虽然可以实现多标志物细胞的捕获, 但多次重复的流道固定使芯片制备过程时间长、步骤多, 又由于在同一管道内进行流动固定, 容易产生上下游的交叉污染, 使假阳性增高, 而为了控制假阳性率, 必须加长各区域的长度, 这对芯片的进一步集成造成了障碍。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒, 无需对其芯片的内部进行繁复的化学修饰, 具备一次样品进样就能对完成包括单、多标志物循环肿瘤干细胞的捕获、鉴定和回收等功能, 同时还具有操作简便、集成度高的特点。

[0006] 为了达到上述目的, 本发明提供了一种基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒, 其特征在于, 包含微流控芯片、至少一种能够与循环肿瘤干细胞特异性结合的标记有肿瘤干细胞生物标志物的免疫磁珠以及至少一种针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体, 其中, 所述的微流控芯片包括玻璃芯片基底, 所述的玻璃芯片基底上设有微流控通道, 微流控通道内设有软磁性微阵列。

[0007] 优选地, 所述的软磁性微阵列由镍铁合金圆柱构成, 相邻两列镍铁合金圆柱交错排列。

[0008] 更优选地, 所述的相邻两列镍铁合金圆柱的距离为 $100\ \mu\text{m}$, 镍铁合金圆柱的直径为 $30\ \mu\text{m}$, 每列中相邻两个镍铁合金圆柱之间的距离为 $50\ \mu\text{m}$ 。

[0009] 优选地, 所述的肿瘤干细胞生物标志物包括 EpCAM、CD133、CD90、CD24、CD13、ICAM-1、SALL4、CD44 和 ALDH 的至少一种。

[0010] 本发明还提供了上述基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒的第一种使用方法, 其特征在于, 具体步骤包括:

[0011] 步骤 1: 裂解外周血红细胞, 离心, 去除上清, 重悬获得外周血有核细胞悬液;

[0012] 步骤 2: 将能够与循环肿瘤干细胞特异性结合的标记有肿瘤干细胞生物标志物的免疫磁珠掺入外周血有核细胞悬液, 孵育, 得到标记有免疫磁珠的外周血有核细胞悬液;

[0013] 步骤 3: 在微流控芯片底部施加外磁场, 将标记有免疫磁珠的外周血有核细胞悬液泵入微流控芯片的微流控通道中;

[0014] 步骤 4: 将相应的针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体泵入微流控芯片的微流控通道 (2) 中, 孵育, 显微镜鉴定循环肿瘤干细胞;

[0015] 步骤 5: 撤除微流控外磁场, 回收循环肿瘤干细胞以进行下游分子生物学实验。

[0016] 本发明还提供了上述基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒的另一种使用方法, 其特征在于, 具体步骤包括:

[0017] 步骤 A: 裂解外周血红细胞, 离心, 去除上清, 重悬获得外周血有核细胞悬液;

[0018] 步骤 B: 将针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体掺入外周血有核细胞悬液, 孵育, 得到含有针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体的外周血有核细胞悬液;

[0019] 步骤 C: 将相应的能够与循环肿瘤干细胞特异性结合的标记有肿瘤干细胞生物标志物的免疫磁珠掺入有针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体的外周血有核细胞悬液, 孵

育,得到标记有免疫磁珠的外周血有核细胞悬液;

[0020] 步骤D:在微流控芯片底部施加外磁场,将标记有免疫磁珠的外周血有核细胞悬液泵入微流控芯片的微流控通道中,显微镜鉴定循环肿瘤干细胞;

[0021] 步骤E:撤除微流控外磁场,回收循环肿瘤干细胞以进行下游分子生物学实验。

[0022] 图2中的上面一行显示了基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒的第一种使用方法的流程,其余部分显示了基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒的第二种使用方法的流程。

[0023] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0024] 本发明利用标记有循环肿瘤干细胞标志物的免疫磁珠掺入外周血与循环肿瘤干细胞特异性结合,通过微流控芯片内软磁性微阵列捕获循环肿瘤干细胞,实现外周血稀有循环肿瘤干细胞的多标志物分类检测,撤除外加磁场后去磁化,使吸附的循环肿瘤干细胞脱落以便于收集。本发明结合了免疫磁珠对细胞高效率结合以及微流控芯片高通量动态捕获的这两大优点,可实现一次样品进样即可捕获检测多种不同类别的稀有循环肿瘤干细胞,具有较高的灵敏度和特异性,操作方便快捷,捕获细胞易于收集,无需芯片内部微流通道复杂的一抗二抗表面修饰过程等特点。

附图说明

[0025] 图1为微流控芯片结构示意图;

[0026] 图2为基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒使用流程图;

[0027] 图3为对EpCAM、CD133、CD90、CD24阳性的循环肝癌干细胞检测结果图。右上,红色荧光标记EpCAM⁺循环肝癌干细胞,蓝色荧光标记细胞核;左上,红色荧光标记CD133⁺循环肝癌干细胞,绿色荧光标记CD45⁺白细胞,蓝色荧光标记细胞核;右下,绿色荧光标记CD90⁺循环肝癌干细胞,红色荧光标记CD45⁺白细胞,蓝色荧光标记细胞核;左下,红色荧光标记CD24⁺循环肝癌干细胞,绿色荧光标记CD45⁺白细胞,蓝色荧光标记细胞核。

[0028] 图4为同时使用商售CellSearch™系统和本专利方案中基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒对33例原发性肝癌患者外周血EpCAM⁺循环肿瘤干细胞检测对比结果。

具体实施方式

[0029] 下面结合实施例来具体说明本发明。

[0030] 实施例1

[0031] 1、一种基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒,由以下组分组成:

[0032] (1) 微流控芯片,如图1所示,为微流控芯片结构示意图,所述的微流控芯片微流控芯片包括玻璃芯片基底1,所述的玻璃芯片基底1上设有长度a为50mm,宽度b为17mm的微流控通道2,微流控通道2内设有软磁性微阵列。所述的软磁性微阵列由镍铁合金圆柱3构成,相邻两列镍铁合金圆柱3交错排列。所述的相邻两列镍铁合金圆柱3的距离c为100μm,镍铁合金圆柱3的直径d为30μm,每列中相邻两个镍铁合金圆柱3之间的距离e为50μm。后一列镍铁合金圆柱3水平中轴线到前一列镍铁合金圆柱3边缘的最短垂直距离f为25μm。

[0033] (2) 能够与循环肿瘤干细胞特异性结合的标记有肿瘤干细胞生物标志物的免疫磁珠,包括:抗 EpCAM 的免疫磁珠 (Catalog no. 130-061-101, Miltenyi Biotec, Germany)、抗 CD133 的免疫磁珠 (Catalog no. 130-050-801, Miltenyi Biotec)、抗 CD90 的免疫磁珠 (Catalog no. 130-096-253, Miltenyi Biotec) 和抗 CD24 的免疫磁珠 (Catalog no. 130-095-951, Miltenyi Biotec)

[0034] (3) 针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体,包括:抗 EpCAM-PE 的荧光抗体 (Catalog no. 130-091-253, Miltenyi Biotec), 抗 CD133-PE 的荧光抗体 (Catalog no. 130-080-801, Miltenyi Biotec), 抗 CD90-FITC 的荧光抗体 (Catalog no. 130-095-953, Miltenyi Biotec), 抗 CD24-PE 的荧光抗体 (Catalog no. 130-095403, Miltenyi Biotec), 白细胞标志物的荧光抗体 CD45-FITC (Catalog no. 555482, BD bioscience) 和 CD45-PE (Catalog no. 561866, BD bioscience);

[0035] 2、制备微流控芯片:

[0036] (1) 在玻璃基片上溅射 Ti/Cu 种子层,然后通过正胶光刻得到依据软件模拟设计的软磁性微阵列的阳模,接着进行电铸,获得如图 1 所示的由镍铁合金圆柱 3 构成的软磁性微阵列,镍铁合金圆柱 3 的材料由 (镍和铁按照 80 : 20 的质量百分比组成) 组成。

[0037] (2) 通过化学腐蚀的方法去除 Cu/Ti 种子层,获得透明的玻璃芯片;接着划片,获得单个玻璃芯片基底 1;

[0038] (3) 通过硅片基底上的 SU8 胶光刻,获得所需要的微流控通道的阴模,然后通过 PDMS 快速成型,制备微流控通道 2;

[0039] (4) 最后采用常规方法将微流控通道 2 与玻璃芯片基底 1 进行加压键合,制成微流控芯片。

[0040] 3、使用基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒,对肝癌患者外周血中四种不同标志物阳性 (包括 EpCAM⁺、CD133⁺、CD90⁺、CD24⁺) 的循环肝癌干细胞进行捕获,具体步骤为:

[0041] 步骤 A:采集肝癌患者 8ml 外周静脉血,等分成 4 份,每份 2ml,分别与其 9X 体积的红细胞裂解液 (Red blood cell lysis solution 10X, Catalog no. 130094183, Miltenyi Biotec) 室温混匀 2 分钟,加入等体积 PBS 缓冲液 (PBS1X, pH = 7.4, Catalog no. 21-040-CVR, Corning,) 终止裂红反应,室温以 350g 的离心力离心 5 分钟,去除上清,300 μ l PBS 缓冲液 (pH = 7.4) 重悬,获得外周血全部有核细胞 (包括肿瘤细胞、白细胞、内皮细胞等)。最终获得 4 份 300 μ l 外周血有核细胞悬液。

[0042] 步骤 B:将抗 EpCAM-PE 的荧光抗体 (同上) 以比例 1 : 100、白细胞标志物 CD45-FITC (同上) 的荧光抗体以比例 1 : 200 与第一份 300 μ l 外周血有核细胞悬液混合,将抗 CD133-PE 的荧光抗体以比例 1 : 100、白细胞标志物 CD45-FITC (同上) 的荧光抗体以比例 1 : 200 与第二份 300 μ l 外周血有核细胞悬液混合,将抗 CD90-FITC 的荧光抗体以比例 1 : 100、白细胞标志物 CD45-PE (同上) 的荧光抗体以比例 1 : 200 与第三份 300 μ l 外周血有核细胞悬液混合,将抗 CD24-PE 的荧光抗体以比例 1 : 100、白细胞标志物 CD45-FITC (同上) 的荧光抗体以比例 1 : 200 与第四份 300 μ l 外周血有核细胞悬液混合,室温孵育 1 小时,室温以 350g 离心力离心 5 分钟,去除上清,分别加入 300 μ l PBS 缓冲液 (pH = 7.4) 重悬,得到 4 份 300 μ l 含有针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体的外周血有

核细胞悬液；

[0043] 步骤 C :取 4 种抗 EpCAM、CD133、CD90、CD24 免疫磁珠各 100 μ l 与步骤 B 获得的 4 份 300 μ l 含有针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体的外周血有核细胞悬液分别充分混匀（针对肝癌干细胞标志物的免疫磁珠在检测中与本次检测中使用的肿瘤干细胞标志物荧光抗体相对应），4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟，加入 1ml PBS 缓冲液（pH = 7.4），以 350g 的离心力 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟，去除上清，加入 1ml PBS 缓冲液（pH = 7.4）重悬，得到标记有免疫磁珠的外周血有核细胞悬液；

[0044] 步骤 D :取 4 块微流控芯片，在微流控芯片底部分别施加外磁场（钕铁硼永磁铁），步骤 C 获得的 4 份 1ml 标记有免疫磁珠的外周血有核细胞悬液以 2ml/hr 的速度匀速分别泵入微流控芯片的微流控通道 2 中。荧光显微镜下观察捕获的 EpCAM⁺、CD133⁺、CD90⁺、CD24⁺ 循环肝癌干细胞。（如图 3 所示）

[0045] 步骤 E :撤除微流控外磁场，回收循环肿瘤干细胞以进行下游分子生物学实验。

[0046] 在本实施例中检测了 33 名原发性肝癌患者外周血的 EpCAM⁺、CD133⁺、CD90⁺、CD24⁺ 循环肝癌干细胞。同时还从这 33 名患者外周静脉采集了另一份 7.5ml 外周血，并使用目前商售的循环肿瘤细胞检测系统（CellSearchTM, Johnson & Johnson, USA）对这 33 份外周血进行 EpCAM⁺ 循环肿瘤干细胞检测。实验结果显示：使用本发明方案中的微流控芯片检测 EpCAM⁺ 循环肿瘤干细胞检出率为 75.76%，而 CellSearchTM 系统的检出率为 54.54%。（如图 4 所示）。此外 CellSearchTM 系统仅能检测一种标志物的循环肿瘤干细胞。因此本发明方案的微流控芯片循环肿瘤干细胞检出效率显著高于目前商售系统，并且可以实现多种标志物循环肿瘤干细胞检测。

[0047] 实施例 2

[0048] 1、一种基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒，组成与实施例 1 相同：

[0049] 2、微流控芯片制备同实施例 1。

[0050] 3、制备掺入 Hep3B 细胞株的血液样本，模拟含有循环肿瘤干细胞的血样：

[0051] (1) Hep3B 细胞株（购自中科院上海生命科学园，肝细胞肝癌肿瘤细胞，表达 EpCAM、CD133、CD90 和 CD24 的 Hep3B 细胞阳性率分别为 99.8%、98%、0.2% 和 1%，本实施例中以 Hep3B 细胞作为掺入法的循环肿瘤细胞细胞）。取 4×10^7 的 Hep3B 细胞，按每份 1×10^7 细胞分别与如下荧光抗体以 1 : 100 混合 CD24-PE (Catalog no. 130-095-403, Milteny Biotec), CD90-FITC (Catalog no. 130-095-953, Milteny Biotec), EpCAM-PE (Catalog no. 130-091-253, Milteny Biotec), CD133-PE (Catalog no. 130-080-801, Milteny Biotec), 4 $^{\circ}$ C 孵育 15min，使用流式细胞仪 (BD FACSAria, BD Biosciences) 分别分选 EpCAM⁺、CD133⁺、CD90⁺ 和 CD24⁺ 的 Hep3B 细胞各 1000 个，分别用 1ml PBS (PBS1X, Catalog no. 21-040-CVR, Corning) 重悬。取 4 支 Eppendorf 管，每个管中放入上述四种 Hep3B 细胞悬液各 100 μ l（每个管内含有 100 个 Hep3B 细胞），另取 4 支 Eppendorf 管，每个管中放入上述四种 Hep3B 细胞悬液各 10 μ l（每个管内含有 10 个 Hep3B 细胞）。

[0052] 将上述制备好的四种 Hep3B 细胞悬液分别掺入 1ml 健康人外周血，分别得到 100 个 EpCAM⁺Hep3B/1ml 外周血样本、100 个 CD133⁺Hep3B/1ml 外周血样本、100 个 CD90⁺Hep3B/1ml 外周血样本和 100 个 CD24⁺Hep3B/1ml 外周血样本。10 个 EpCAM⁺Hep3B/1ml

外周血样本、10 个 CD133⁺Hep3B/1ml 外周血样本、10 个 CD90⁺Hep3B/1ml 外周血样本和 10 个 CD24⁺Hep3B/1ml 外周血样本

[0053] 4、使用基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒,对血样中四种不同标志物阳性(包括 EpCAM⁺、CD133⁺、CD90⁺、CD24⁺)的循环肝癌干细胞进行捕获,具体步骤为:

[0054] 步骤(1):将上述制备好的血液样本,分别与其 9X 体积的红细胞裂解液(Red blood cell lysis solution10X, Catalog no. 130094183, Miltenyi Biotec)室温混匀 2 分钟,加入等体积 PBS 缓冲液(PBS1X, pH = 7.4 Catalog no. 21-040-CVR, Corning)终止裂红反应,室温以 350g 的离心力离心 5 分钟,去除上清,300 μl PBS 缓冲液(pH = 7.4)重悬,获得外周血全部有核细胞(包括肿瘤细胞、白细胞、内皮细胞等)。最终获得 8 份 300 μl 外周血有核细胞悬液。

[0055] 步骤(2):取抗 EpCAM、CD133、CD90、CD24 免疫磁珠各 100 μl 与步骤 B 获得的 8 份 300 μl 外周血有核细胞悬液分别充分混匀(针对肝癌干细胞标志物的免疫磁珠在检测中单独使用并与本次检测中使用的肿瘤干细胞标志物荧光抗体相对应),4℃孵育 30 分钟,加入 1ml PBS 缓冲液(pH7.4),以 350g 的离心力 4℃离心 5 分钟,去除上清,加入 1ml PBS 缓冲液(pH = 7.4)重悬,得到标记有免疫磁珠的外周血有核细胞悬液。

[0056] 步骤(3):取 8 块微流控芯片,在微流控芯片底部分别施加外磁场(钕铁硼永磁铁),将 8 份 1ml 标记有免疫磁珠的外周血有核细胞悬液以 2ml/hr 的速度匀速分别泵入微流控芯片的微流控通道 2 中。荧光显微镜下观察捕获的 EpCAM⁺、CD133⁺、CD90⁺、CD24⁺ 循环肝癌干细胞。

[0057] 步骤(4):将抗 EpCAM-PE 的荧光抗体以 1 : 100 的比例和白细胞标志物 CD45-PE 的荧光抗体以 1 : 200 的比例一起加入第一份 600 μl PBS 缓冲液(pH7.4),将抗 CD133-PE 的荧光抗体以 1 : 100 的比例和白细胞标志物 CD45-PE 的荧光抗体以 1 : 200 的比例一起加入第二份 600 μl PBS 缓冲液(pH7.4),将抗 CD90-FITC 的荧光抗体以 1 : 100 的比例和白细胞标志物 CD45-PE 的荧光抗体以 1 : 200 的比例一起加入第三份 600 μl PBS 缓冲液(pH7.4),将抗 CD24-PE 的荧光抗体以 1 : 100 的比例和白细胞标志物 CD45-PE 的荧光抗体以 1 : 200 的比例一起加入第四份 600 μl PBS 缓冲液(pH = 7.4),室温避光的环境下,以 1ml/hr 的速度分别泵入含有相应的免疫磁珠的微流控芯片的微流控通道 2 中,直至 600 μl 全部泵入(需 36 分钟),整个操作过程保持底部外加磁场存在,显微镜鉴定循环肿瘤干细胞。

[0058] 步骤(5):撤除微流控外磁场,回收循环肿瘤干细胞以进行下游分子生物学实验。

[0059] 本试剂盒捕获的 EpCAM⁺、CD133⁺、CD90⁺ 和 CD24⁺ 的 Hep3B 细胞数量分别为:掺入 100 个/ml 细胞,每种标志物细胞的捕获效率高达 99%、98%、98% 和 99%,掺入 10 个/ml 细胞,每种标志物细胞的捕获效率高达 100%、80%、90% 和 90%。使用目前商售的 MACS 细胞富集系统(QuadroMACS™ Separator and Starting Kits, Miltenyi Biotec, Germany),按照产品说明书对相同的血样进行处理,掺入 100 个/ml 细胞,每种标志物标志物 Hep3B 细胞的捕获率分别仅为 32%、25%、30%、36%。掺入 10 个/ml 细胞,四种标志物标志物 Hep3B 细胞回收效率为零。实验结果显示,本发明方案中微流控芯片对外周血不同标志物循环肿瘤细胞的分类捕获效率,尤其是外周血中极微量细胞(< 10 个/ml)捕获效率明显高于目前商售系统。

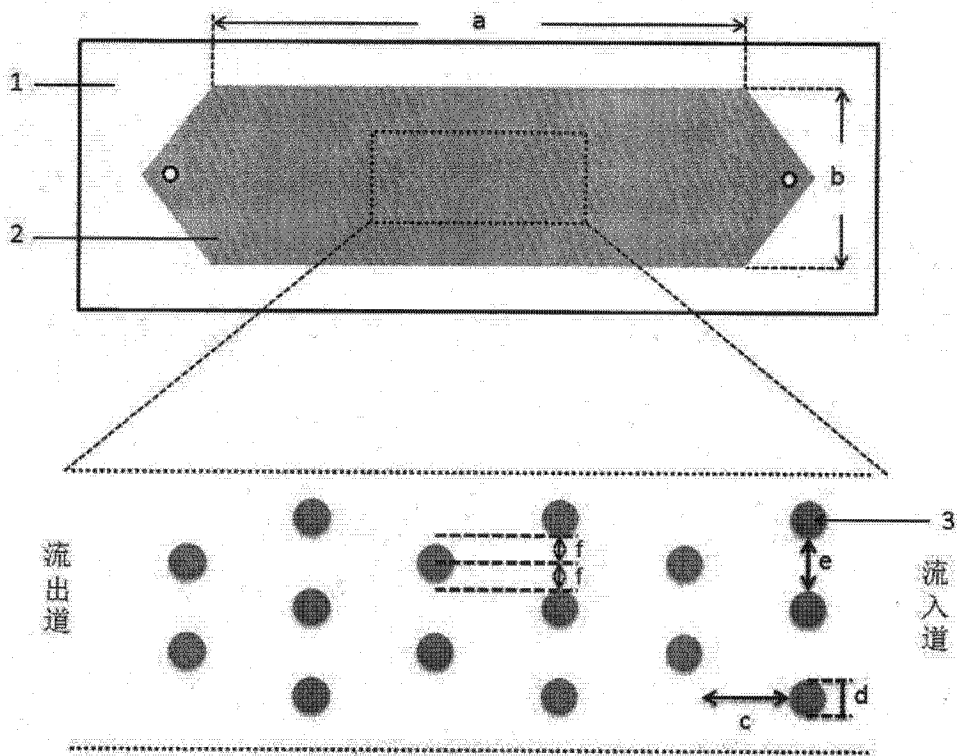


图 1

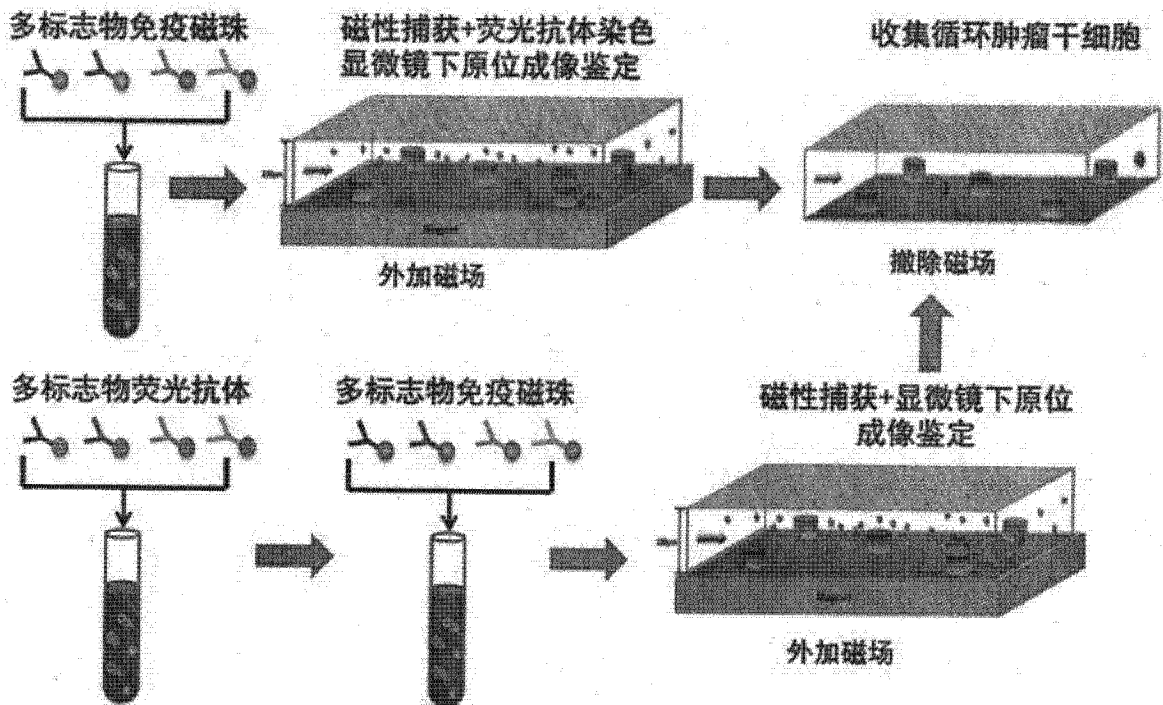


图 2

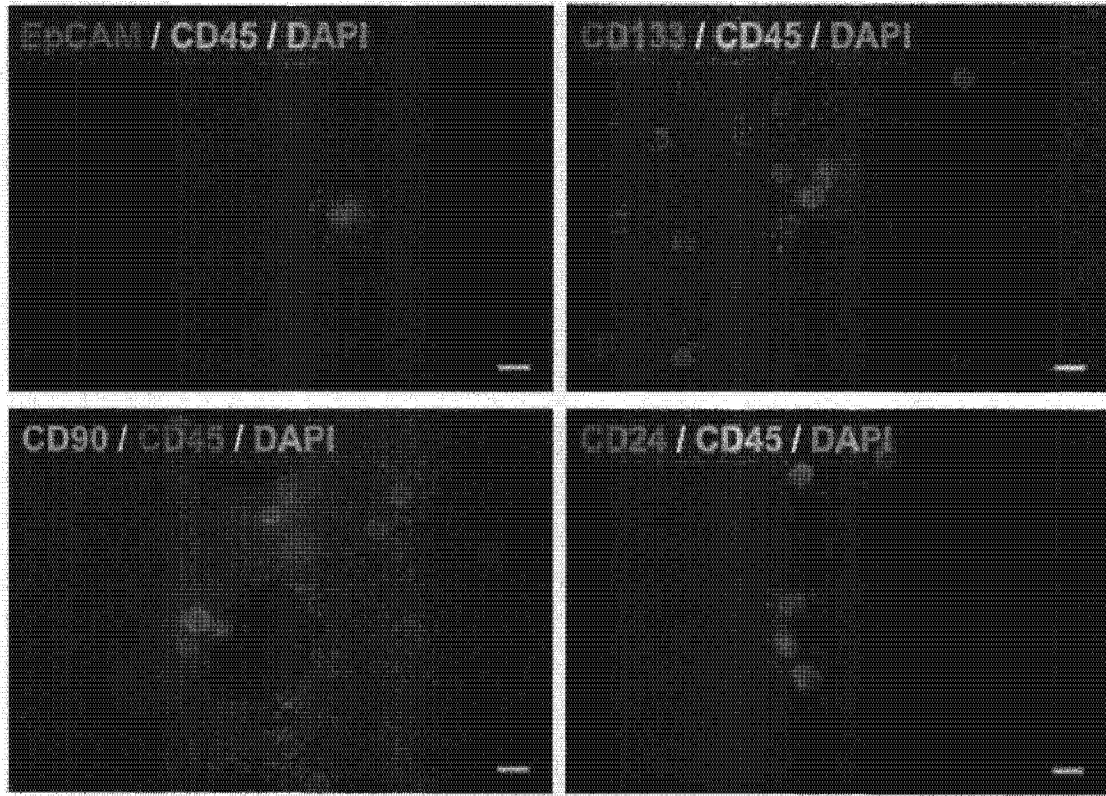


图 3

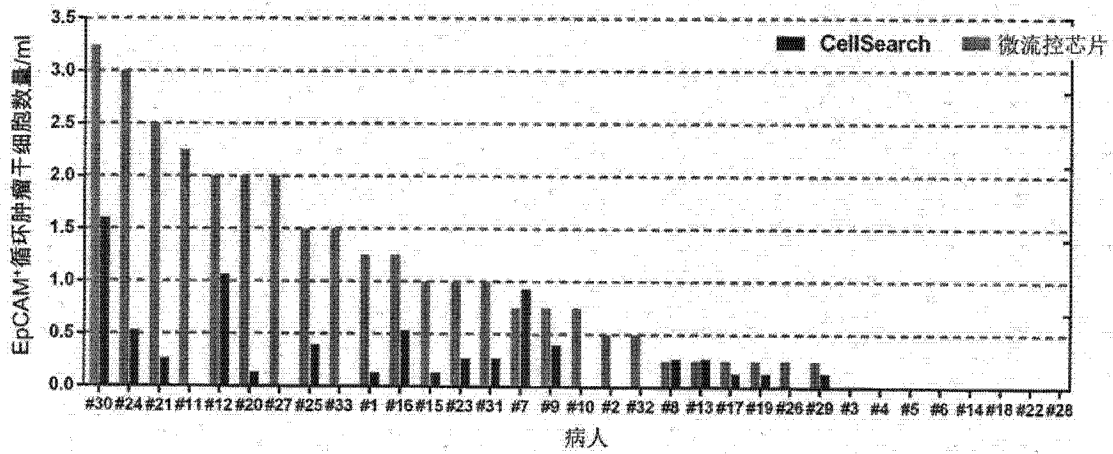


图 4

专利名称(译)	基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒		
公开(公告)号	CN103869060A	公开(公告)日	2014-06-18
申请号	CN201410081509.3	申请日	2014-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属中山医院		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属中山医院		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学附属中山医院		
[标]发明人	樊嘉 杨欣荣 孙云帆 徐泱 周俭		
发明人	樊嘉 杨欣荣 孙云帆 徐泱 周俭		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/57438 G01N35/00 G01N2035/00158		
其他公开文献	CN103869060B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种基于磁珠和微流控芯片的循环肿瘤干细胞检测试剂盒，其特征在于，包含微流控芯片、至少一种能够与循环肿瘤干细胞特异性结合的标记有肿瘤干细胞生物标志物的免疫磁珠以及至少一种针对肿瘤干细胞生物标志物的荧光抗体，其中，所述的微流控芯片包括玻璃芯片基底，所述的玻璃芯片基底上设有微流控通道，微流控通道内设有软磁性微阵列。本发明可实现一次样品进样即可捕获检测多种不同类别的稀有循环肿瘤干细胞，具有较高的灵敏度和特异性，操作方便快捷，捕获细胞易于收集，无需芯片内部微流通道复杂的一抗二抗表面修饰过程等特点。

