



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102405411 A

(43) 申请公布日 2012. 04. 04

(21) 申请号 201080017232. 8

B82B 3/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 03. 18

C12Q 1/02 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/574 (2006. 01)

61/161, 248 2009. 03. 18 US

C12N 5/09 (2006. 01)

61/301, 839 2010. 02. 05 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 10. 18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/027816 2010. 03. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02010/108003 EN 2010. 09. 23

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 曾宪荣 王树涛 王浩 刘侃

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 顾晋伟 田旻

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

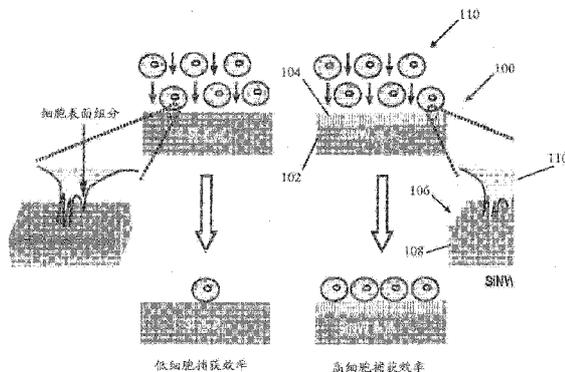
权利要求书 4 页 说明书 20 页 附图 9 页

(54) 发明名称

用于捕获循环细胞的装置

(57) 摘要

本发明提供了用于捕获稀少细胞的装置和方法。使用本文所述的装置和方法可用于辅助诊断和监测转移癌。



1. 用于捕获生物细胞的装置,其包含包含纳米结构化表面区域的基底;和连接至所述基底之所述纳米结构化表面区域的多个结合剂,其中所述纳米结构化表面区域包含多个纳米结构,每个所述纳米结构具有纵向尺寸和横向尺寸,所述纵向尺寸至少 10 倍于所述横向尺寸,并且其中生物细胞被协作作用的所述结合剂和所述多个纳米结构选择性地捕获。
2. 权利要求 1 的装置,其中所述基底是硅基底,并且所述多个纳米结构是硅纳米线或纳米纤维。
3. 权利要求 1 的装置,其中所述基底是金属基底,并且所述多个纳米结构是金属纳米线或纳米纤维。
4. 权利要求 3 的装置,其中所述金属基底包含钛、铝或钢中的至少一种。
5. 权利要求 1 的装置,其中所述基底是无机氧化物基底,并且所述多个纳米结构是无机氧化物纳米线或纳米纤维。
6. 权利要求 5 的装置,其中所述无机氧化物基底包含锌氧化物、硅氧化物、钛氧化物或铝氧化物中的至少一种。
7. 权利要求 1 的装置,其中所述基底是聚合物基底,并且所述多个纳米结构是聚合物纳米线或纳米纤维。
8. 权利要求 7 的装置,其中所述聚合物基底包含聚甲基丙烯酸甲酯、多糖或聚交酯中的至少一种。
9. 权利要求 2 ~ 8 中任一项的装置,其中所述纳米线或纳米纤维与所述基底的主体部分形成整体。
10. 权利要求 2 ~ 9 中任一项的装置,其中所述纳米线或纳米纤维沉积于所述基底上。
11. 权利要求 1 ~ 10 中任一项的装置,其中所述纵向尺寸至少为 6 μm 长。
12. 权利要求 1 ~ 11 中任一项的装置,其中所述横向尺寸大于 30nm 并且小于 400nm。
13. 权利要求 1 ~ 12 中任一项的装置,其中所述基底的所述纳米结构化表面区域包被有链霉亲和素,所述结合剂是生物素化的并且连接至所述包被有链霉亲和素之基底的所述纳米结构化表面区域。
14. 权利要求 1 ~ 13 中任一项的装置,其中所述多个结合剂包含 DNA、肽、适配体和抗体中的一种或多种。
15. 权利要求 1 ~ 13 中任一项的装置,其中所述多个结合剂包含多个针对肿瘤细胞的过表达抗体。
16. 权利要求 1 ~ 13 中任一项的装置,其中所述多个结合剂是多个抗上皮细胞粘附分子抗体(抗-EpCAM)。
17. 权利要求 1 ~ 13 中任一项的装置,其中所述多个结合剂是多个针对免疫细胞的抗体。
18. 权利要求 1 ~ 17 中任一项的装置,其还包含连接至所述基底的流动层以形成微流体通道,从而在运行时所述基底之所述纳米结构化表面区域的至少一部分与流经所述微流体通道的流体相接触,其中所述用于捕获生物细胞的装置是微流体装置。
19. 权利要求 18 的装置,其中所述流动层包含带纹理的表面,其引起混沌流以增加所

述生物细胞与所述基底之所述纳米结构化表面区域接触从而被捕获的可能性。

20. 权利要求 19 的装置,其中所述带纹理的表面包含多个相对于流体流动之主要方向取向的结构。

21. 权利要求 20 的装置,其中所述多个结构以鲱鱼骨状图案取向。

22. 权利要求 18 ~ 21 中任一项的装置,其中所述流动层包含弹性材料聚合物。

23. 权利要求 22 的装置,其中所述弹性材料聚合物包括硅酮聚合物、聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 和聚四氟乙烯 (Teflon) 中的一种或多种。

24. 用于捕获生物细胞的微流体装置,其包含:

包含纳米结构化表面区域的基底;

连接至所述基底以形成微流体通道的流动层,从而在运行时所述基底之所述纳米结构化表面区域的至少一部分与流经所述微流体通道的流体相接触;和

连接至所述基底之所述纳米结构化表面区域的多个结合剂,

其中所述纳米结构化表面区域包含多个纳米结构,每个所述纳米结构具有纵向尺寸和横向尺寸,并且

其中生物细胞被协作作用的所述结合剂和所述多个纳米结构选择性地捕获。

25. 权利要求 24 的微流体装置,其中所述基底是硅基底,并且所述多个纳米结构是硅纳米线或纳米纤维。

26. 权利要求 24 的微流体装置,其中所述基底是金属基底,并且所述多个纳米结构是金属纳米线或纳米纤维。

27. 权利要求 26 的微流体装置,其中所述金属基底包含钛、铝或钢中的至少一种。

28. 权利要求 24 的微流体装置,其中所述基底是无机氧化物基底,并且所述多个纳米结构是无机氧化物纳米线或纳米纤维。

29. 权利要求 28 的微流体装置,其中所述无机氧化物基底包含锌氧化物、硅氧化物、钛氧化物或铝氧化物中的至少一种。

30. 权利要求 24 的微流体装置,其中所述基底是聚合物基底,并且所述多个纳米结构是聚合物纳米线或纳米纤维。

31. 权利要求 30 的微流体装置,其中所述聚合物基底包含聚甲基丙烯酸甲酯、多糖或聚交酯中的至少一种。

32. 权利要求 25 ~ 31 中任一项的微流体装置,其中所述纳米线或纳米纤维与所述基底的主体部分形成整体。

33. 权利要求 25 ~ 32 中任一项的微流体装置,其中所述纳米线或纳米纤维沉积于所述基底上。

34. 权利要求 24 ~ 33 中任一项的微流体装置,其中所述纵向尺寸至少为 $6\ \mu\text{m}$ 长。

35. 权利要求 24 ~ 34 中任一项的微流体装置,其中所述横向尺寸大于 30nm 并且小于 400nm 。

36. 权利要求 24 ~ 35 中任一项的微流体装置,其中所述基底之所述纳米结构化表面区域包被有链霉亲和素,所述结合剂是生物素化的并且连接至所述包被有链霉亲和素之基底的所述纳米结构化表面区域。

37. 权利要求 24 ~ 36 中任一项的微流体装置,其中所述多个结合剂包含 DNA、肽、适配

体和抗体中的一种或多种。

38. 权利要求 24 ~ 36 中任一项的微流体装置,其中所述多个结合剂包含多个针对肿瘤细胞的过表达抗体。

39. 权利要求 24 ~ 36 中任一项的微流体装置,其中所述多个结合剂是多个抗上皮细胞粘附分子抗体(抗-EpCAM)。

40. 权利要求 24 ~ 36 中任一项的微流体装置,其中所述多个结合剂是多个针对免疫细胞的抗体。

41. 权利要求 24 的微流体装置,其中所述流动层包含带纹理的表面,其引起混沌流以增加所述生物细胞与所述基底之所述纳米结构化表面区域接触从而被捕获的可能性。

42. 权利要求 41 的微流体装置,其中所述带纹理的表面包含多个相对于流体流动之主要方向取向的结构。

43. 权利要求 42 的微流体装置,其中所述多个结构以鲑鱼骨状图案取向。

44. 权利要求 24 ~ 43 中任一项的装置,其中所述流动层包含弹性材料聚合物。

45. 权利要求 44 的装置,其中所述弹性材料聚合物包括硅酮聚合物、聚二甲基硅氧烷(PDMS)和聚四氟乙烯(Teflon)中的一种或多种。

46. 权利要求 24 ~ 45 中任一项的装置,其还包含流体输入微通道。

47. 权利要求 24 ~ 46 中任一项的装置,其还包含与所述微流体装置流体连通的泵。

48. 从细胞样品中选择性分离生物细胞的方法,其包括:

在使所述结合剂与生物细胞亚群选择性结合的条件下,使所述细胞样品与权利要求 1 ~ 47 中任一项的装置接触,得到所结合的生物细胞;以及

从所述装置中去除未结合的生物细胞。

49. 权利要求 48 的方法,其还包括用含水介质清洗所捕获的生物细胞。

50. 权利要求 48 或 49 的方法,其中所述细胞样品包括体液、血浆、唾液、脊髓液和尿液中的一种或多种。

51. 权利要求 48 ~ 50 中任一项的方法,其中所述生物细胞亚群包括循环肿瘤细胞。

52. 从细胞样品中选择性分离至少一个靶生物细胞的方法,其包括:

在使所述靶细胞与连接至所述纳米结构之所述结合剂有效结合的条件下,

提供包含至少一个靶生物细胞的细胞样品;以及

将所述细胞样品与多个纳米结构接触,从而导致所述靶生物细胞被捕获,

其中特异性针对并结合所述靶生物细胞的多个结合剂与所述纳米结构连接;

得到所结合的生物细胞。

53. 权利要求 52 的方法,其还包括用含水介质清洗所结合的生物细胞。

54. 权利要求 52 或 53 的方法,其还包括检测所述靶生物细胞的存在情况。

55. 权利要求 52 ~ 54 中任一项的方法,其中所述细胞样品包括体液、血浆、唾液、脊髓液和尿液中的一种或多种。

56. 权利要求 52 ~ 55 中任一项的方法,其中所述靶生物细胞包括循环肿瘤细胞。

57. 权利要求 52 ~ 56 中任一项的方法,其中所述多个结合剂包括 DNA、肽、适配体和抗体中的一种或多种。

58. 权利要求 52 ~ 56 中任一项的方法,其中所述多个结合剂包括多个针对肿瘤细胞的

过表达抗体。

59. 权利要求 52 ~ 56 中任一项的方法,其中所述多个结合剂是多个抗上皮细胞粘附分子抗体(抗-EpCAM)。

60. 权利要求 52 ~ 56 中任一项的方法,其中所述多个结合剂是多个针对免疫细胞的抗体。

61. 用于从细胞样品中分离至少一个靶生物细胞的试剂盒,其包含权利要求 1 ~ 47 中任一项的装置。

62. 权利要求 61 的试剂盒,其还包含从哺乳动物对象中获取样品和从所述样品中分离生物细胞的说明。

63. 权利要求 61 或 62 的试剂盒,其中所述靶生物细胞包括循环肿瘤细胞。

用于捕获循环细胞的装置

[0001] 本申请要求 2009 年 3 月 18 日提交的美国临时申请 no. 61/161248 和 2010 年 2 月 5 日提交的美国临时申请 no. 61/301839 的优先权,它们的全部内容通过引用并入本文。

[0002] 获得本文所述和请求保护之发明的工作是在美国国立卫生研究院的资助(资助号 CA119347)下进行的。美国政府享有本发明的一些权利。

背景技术

[0003] 1. 发明领域

[0004] 本发明涉及捕获稀少细胞的装置和方法。

[0005] 2. 背景技术

[0006] 癌症是发达国家的首要死亡原因之一,仅在美国每年就有超过 500,000 人死于癌症。在美国,每年有超过 1 百万人被诊断出癌症,并且据总体估计,每 3 个人中有超过 1 人会在有生之年患某种类型的癌症。

[0007] 大部分癌症患者并非死于其原发肿瘤。事实上,癌症患者多死于“转移”——恶性细胞从身体的一部分扩散至另一部分。如果原发肿瘤被足够早地检出,则其通常可通过手术、放射、化疗或这些治疗的某些组合来消除。与之相反,转移肿瘤难以被检出,并且随着转移的进展而愈加难以治疗。因此,需要开发用于检测早期癌转移的方法。

[0008] 脱离原发肿瘤部位的癌细胞被称为“循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)”¹。CTC 代表了作为肿瘤组织来源之介入性活检的潜在替代物,以用于检测、表征和监测非血液系统癌症²⁻⁴。在过去十年中,CTC 已成为检测早期癌转移、预测患者预后以及监测疾病进展和癌症治疗效果的新兴“生物标志物”⁵。然而,由于 CTC 在包含大量血细胞(10^9 个细胞/mL)的血液中的丰度极低(每毫升有几个至几百个细胞),因此对 CTC 的分离在技术上存在难度^{4,6,7}。

[0009] 先前从外周血中富集或分选 CTC 的方法包括流式细胞术、免疫磁珠、高通量光学成像系统和光纤阵列扫描。免疫磁珠纯化 CTC 是目前临床中应用最广泛的技术,并且已成功地从肺癌、前列腺癌、结肠癌、乳腺癌和胰腺癌患者中鉴定出 CTC^{3,4,8-10}。然而,该方法以非常低的纯度(0.01 ~ 0.1%)¹⁰ 和低产率(约 20 ~ 60% 的患者)³ 分离出少量的 CTC(肺癌中, 4 ± 24 个(平均值 \pm 标准差)/ml;乳腺癌中, 11 ± 118 个/ml;前列腺癌中, 10 ± 33 个/ml;结直肠癌和胰腺癌中, 1 ± 2 个/ml)³。与免疫磁珠技术的低灵敏度、选择性和产率相关的“生物噪声”水平限制了其在早期癌症检测和患者对治疗之响应的监测中的应用。目前,免疫磁珠技术可用作反映大致情况的预后工具,从而将患者划分为高风险和低风险类型⁵。

[0010] 微流体芯片实验室装置为细胞分选和稀少细胞检测提供了唯一的机会。微流体技术已成功地用于微流体流式细胞术、基于尺寸连续分离(continuous size-based separation)¹¹ 和色谱分离¹²;然而这些方法不能处理大体积的样品(例如,几毫升全血)¹³。还使用微流体技术从全血样品中捕获 CTC^{8,9}。但是,现有的 CTC 捕获系统需要复杂的流体处理系统来使血流通过装置。此外,这些系统采用对于细胞捕获来说并非最优的微结构来分离 CTC。

[0011] 大部分上皮起源的肿瘤（上皮癌）细胞的表面覆盖有多种大小和构型的纳米尺度的微绒毛¹⁴。在腺体起源的良性上皮细胞中，微绒毛是有极性的（即局限在正常细胞的一面，通常是面向腺体或器官内腔的一面）并且具有一致且单一的构型。上皮癌细胞的微绒毛覆盖整个细胞表面，其大小和长度有所不同，并且有时形成非常长之微绒毛的簇。在一些肿瘤（尤其是癌性间皮瘤）中，长微绒毛的簇代表了恶性细胞。此外，细胞表面上还存在大小亦为纳米尺度的其它结构，包括板状伪足、丝状伪足和脂筏分子团。本发明的一些实施方案涉及利用细胞表面上存在的这些纳米尺度结构的新型细胞捕获装置。

[0012] 发明概述

[0013] 参考说明书、附图和实施例会明确其它目的和优点。

[0014] 根据本发明一些实施方案的细胞捕获装置具有包含纳米结构化表面区域的基底。纳米结构化表面区域连接有多个结合剂，其能选择性地捕获细胞样品中的靶细胞。所述纳米结构化表面区域包含多个纳米结构。纳米结构具有纵向尺寸和横向尺寸，在一些实施方案中，纵向尺寸是横向尺寸的至少 10 倍。

[0015] 在本发明的一些实施方案中，所述装置是微流体装置。微流体装置具有连接流动层的基底，其形成微流体通道。所述基底具有纳米结构化表面区域，该表面区域的一部分与运行中流过微流体通道的流体相接触。所述纳米结构化表面区域包含多个纳米结构，每个纳米结构具有纵向尺寸和横向尺寸。纳米结构化表面区域连接有多个结合剂，其能选择性地捕获细胞样品中的靶细胞。

[0016] 本发明的一些实施方案还涉及从细胞样品中分离把细胞的方法。该方法包括提供具有至少一个靶细胞的细胞样品，并将所述细胞样品与多个纳米结构相接触。纳米结构连接有多个结合剂，其能选择性地捕获细胞样品中的靶细胞。

[0017] 本发明的另一些实施方案涉及使用本发明的方法和装置来诊断疾病、监测疾病进展和评价治疗效果。

[0018] 本发明的另一些实施方案还涉及包含本发明装置的试剂盒。

附图说明

[0019] 图 1 提供了根据本发明的一个实施方案如何使用纳米结构化基底提高细胞捕获效率的示意图。由于纳米结构化基底提高了与细胞表面组分的局部相互作用，因此，与平基底相比，更多的细胞表面组分附着到纳米结构化基底上。

[0020] 图 2A-2C 示意了根据本发明的一个实施方案的硅纳米线 (SiNW) 的制备。图 2A 显示通过 Ag^+ 和 HF 的化学蚀刻将 SiNW 阵列引入到硅晶片上。扫描电子显微镜 (SEM) 图像显示清晰可辨的 SiNW，其直径为 100 ~ 200nm，长度为约 10 μ m。图 2B 是将生物素化的上皮细胞粘附分子抗体（抗 -EpCam）移接到硅基底上的示意图。图 2C 显示通过湿化学蚀刻获得的不同 SiNW 长度之 SiNW 基底的 SEM 图像。

[0021] 图 3A ~ 3C 比较了平硅基底与本发明一些实施方案中的 SiNW 基底。图 3A 显示捕获 MCF7 的 SiNW 基底和平硅基底的荧光显微图像和 SEM 图像。图 3B 显示捕获 Daubi B 细胞的 SiNW 基底和平硅基底的荧光显微图像和 SEM 图像。在图 3A 和图 3B 中，SiNW 基底显示出比平基底显著更高的细胞捕获效率。图 3C 示意，以相近的实验设置，在硅晶片上设计交替的 SiNW 和平基底用以比较细胞捕获效率的光蚀刻方法。图 3D 显示细胞捕获前经图案

化之基底的 SEM 图像（上图）以及经图案化之基底上捕获的细胞的荧光图像（下图）。

[0022] 图 4A 和 4B 显示捕获时间和 SiNW 长度对本发明一些实施方案中 SiNW 基底之捕获效率的作用。图 4A 显示细胞捕获效率和捕获时间之间的相关性。图 4B 显示细胞捕获效率和 0 ~ 20 μm 的不同 SiNW 长度之间的相关性。

[0023] 图 5 比较了三种不同基底的细胞捕获表现：未经任何表面修饰的 SiNW 基底 (SiNW-No)、经链霉亲和素包被的 SiNW 基底 (SiNW-SA) 和用抗 -EpCAM 修饰的 SiNW 基底 (SiNW-SA-EpCAM)。

[0024] 图 6A ~ 6E 显示本发明一个实施方案的微流体装置。图 6A 是微流体细胞捕获平台的照片。图 6B 是包括经捕获剂包被之 SiNW 基底和覆盖其上之微流体混沌混合器 (chaotic mixer) 的整合 CTC 捕获平台的示意图。图 6C 是混沌混合通道下 SiNW 模式的光学图像。图 6D 是直径为 100 ~ 200nm、长度为约 10 μm 的清晰可辨的 SiNW 的侧视 SEM 图像。图 6E 显示细胞表面组分如何高效地附着到纳米结构化基底上,这可能是由于纳米结构化基底提高了与细胞表面组分的局部相互作用。

[0025] 图 7A ~ 7C 显示本发明一个实施方案的微流体装置中流速对细胞捕获的作用。图 7A 显示微流体装置中流速与捕获产率之间的相关性。图 7B 显示从微通道入口到出口 (0 ~ 88cm) 的捕获细胞分布。图 7C 是微流体装置的照片。

[0026] 图 8 显示,在本发明一个实施方案的微流体装置中,针对三种不同癌细胞系——乳腺癌 (MCF7)、前列腺癌 (PC3) 和膀胱癌 (T-24),每毫升 PBS 掺入 100 个细胞的捕获产率。

[0027] 图 9 显示,在本发明一个实施方案的微流体装置中,比较针对全血与经裂解血液样品中的多种靶细胞浓度的捕获效率。图表示掺入细胞数相对于所回收的细胞数。

[0028] 图 10A ~ 10D 显示,在本发明一个实施方案的微流体装置中,捕获时间和 SiNW 长度对捕获效率的作用。图 10A 显示细胞捕获效率与捕获时间之间的相关性。图 10B 显示细胞捕获效率与 0 ~ 20 μm 之不同 SiNW 长度之间的相关性。图 10C 显示,在不同比例的细胞混合物中捕获的靶 Daudi B 细胞的百分比。图 10D 是利用 SiNP 基底捕获的 Daudi B 细胞的荧光图像。每幅图和误差线表示 3 次重复的平均值 \pm 标准差。

[0029] 图 11A ~ 11C 比较了本发明一些实施方案之装置与 Cellsearch™ 技术的捕获能力。图 11A 显示 43 个转移性前列腺癌患者样品得到的 CTC 数。图 11B 显示在静态孵育条件下使用本发明一个实施方案的装置得到的患者样品之 CTC 数。图 11C 显示使用本发明一个实施方案的微流体装置得到的患者样品之 CTC 数。

[0030] 发明详述

[0031] 本发明的一些实施方案涉及能从生物样品中快速且高效地分离出稀少细胞（例如 CTC）的装置。该装置包含连接至纳米结构的结合剂。细胞捕获由靶细胞与结合剂之间的相互作用来介导。此外,纳米结构通过与细胞表面组分（如微绒毛、板状伪足、丝状伪足和脂筏分子团）相互作用来辅助细胞捕获。除了精确地识别和测量生物样品中的稀少细胞外,本发明一些实施方案的装置还可分离出稀少细胞用以后续处理。本发明的一些实施方案还涉及在研究和临床中使用所述装置,包括使用该装置来检测、诊断和监测疾病。

[0032] 在一些实施方案中,本发明的装置和方法能以单个步骤直接从全血中分选出稀少细胞。例如,本发明一些实施方案的装置和方法能够无需任何其它样品处理步骤（如稀释、离心、红血细胞裂解、细胞固定或细胞标记）来使用抗凝全血（但不限于此）。这与基于免

疫磁珠的系统不同,后者需要多个“批量”半自动制备步骤(离心、清洗和孵育)从而导致显著量的稀少细胞受到损失和/或破坏。此外,本发明一些实施方案的装置和方法能分离活的和固定的细胞,而基于磁珠的方法只可分离固定的非存活细胞。而且,与需要复杂流体处理系统的现有微流体 CTC 捕获装备不同,本发明一些实施方案的装置可通过在装置中静态孵育血液样品而获得高的细胞捕获效率。

[0033] 本发明一些实施方案的装置和方法的特点还在于:它们使用纳米结构来捕获和分离生物样品中的循环细胞。先前的微流体 CTC 捕获装置使用微结构来与靶细胞相互作用。这些微结构能与大部分细胞(大小通常为 10 ~ 30 μm)相互作用。然而,这些微结构不能与细胞表面上纳米尺度的多种组分(例如微绒毛)相互作用。本发明一些实施方案的纳米结构通过与这些纳米级细胞表面组分的相互作用来增强与靶细胞的结合。

[0034] 在一些实施方案中,本发明的装置和方法可以高灵敏度(例如,鉴定为具有 CTC 的肿瘤患者的百分比)、高特异性(例如,鉴定为不具有 CTC 的非肿瘤患者的百分比)和高纯度(定义为与该装置截获的其它细胞相比装置截获的稀少细胞的百分比)实现稀少细胞的捕获。与先前用于捕获 CTC 的装置和方法相比,所观察到的灵敏度、特异性和纯度水平是出人意料的(参见例如图 10)。

[0035] 在一些实施方案中,可容易地对本发明的装置和方法进行改造(包括变换通量,变换结合剂)以适于多种临床情形中的潜在应用,从而允许捕获任意类型的稀少循环细胞。此外,本发明一些实施方案的装置和方法不限于鉴定和分离循环肿瘤细胞。本发明一些实施方案的装置和方法适用于一定范围的细胞学研究领域中。本发明一些实施方案的“一步”可能性和多用性使这些实施方案可用于即时使用并快速整合入临床实践中。

[0036] 以下详细讨论本发明的一些实施方案。在所述的实施方案中,为明确起见使用特定术语。然而,这些实施方案不旨在限于所选用的特定术语。相关领域的普通技术人员会认识到可在不背离本发明的精神和范围下使用其它等效组分以及开发其它方法。本文引用的所有参考文献如同每个被单独并入地那样通过引用并入本文中。

[0037] 1. 定义

[0038] 为了便于理解本发明,以下定义一些术语和短语。

[0039] 除非上下文中另外明确指出,否则本文中无数量词修饰的形式包括复数含义。因此,例如“结合剂”也涉及多于一种结合剂。

[0040] 术语“纳米结构”是指具有横向尺寸和纵向尺寸的结构,其中横向尺寸、纵向尺寸或者横向和纵向尺寸两者均小于 1mm。纳米结构的形状不是关键的。例如,它可以是任何三维表面,如珠、颗粒、线、管、球等。

[0041] 术语“诊断”是指鉴定病理状态的存在情况或性质,包括鉴定具有发生特定疾病或病症之风险的患者。诊断方法有不同的灵敏度和特异性。诊断测定的“灵敏度”是测试为阳性之患病个体的百分比(“真阳性”百分比)。测定未检测出的患病个体为“假阴性”。未患病并且在测定中测试为阴性的对象称为“真阴性”。诊断测定的“特异性”是 1 减去假阳性率,其中“假阳性”率定义为未患病但测试为阳性之患者的比例。尽管特定的诊断方法可能不会提供病症的确定性诊断,但是如果该方法提供辅助诊断的阳性指示就已足够。

[0042] 术语“检测”等可用于这样的上下文中:检测生物标志物或者检测疾病或病症(例如当获得阳性测定结果时)。在后一情形中,认为“检测”和“诊断”是同义的。

[0043] 术语“对象”、“患者”或“个体”通常是指人,但本发明的方法不限于人,并且应可用于其它哺乳动物(例如猫、犬等)。

[0044] 本文所用“样品”取其最广泛的含义。样品可包括体液(包括血液、血清、血浆、泪液、房水和玻璃液、脊髓液、尿液和唾液);细胞或组织制备物的可溶级分,或细胞生长的介质。获得合适的生物样品的方法是本领域技术人员已知的。

[0045] 本文所用术语“结合剂”是指与纳米结构化表面区或该表面之一部分(例如塑料表面的衍生部分)连接并且可以与靶细胞进行特异性相互作用或连接的任何实体或物质(例如分子)。“多个结合剂”可以指一种特定结合剂的多个或者指多于一种结合剂的多个。

[0046] “抗体”是通过免疫球蛋白分子可变区中至少一个抗原识别位点识别并且特异结合靶标(例如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质等)的免疫球蛋白分子。本文所用的该术语取其最广泛的含义,并包括完整多克隆抗体、完整单克隆抗体、抗体片段(如 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段)、单链 Fv(scFv) 突变体、多特异性抗体(如由至少 2 种完整抗体产生的双特异性抗体)、杂合抗体、包含抗体部分的融合蛋白以及包含抗原识别位点的任何其它经修饰免疫球蛋白分子,前提是所述抗体显示期望的生物活性。抗体可以是免疫球蛋白五种主要类型的任意种: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,或其亚类(同种型)(例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2),根据它们的重链恒定区的性质分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同的免疫球蛋白类型具有不同并且公知的亚基结构和三维构型。抗体可以是“裸露的(naked)”或缀合至其它分子(如毒素、放射性同位素等)。

[0047] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括但不限于:线形抗体;单链抗体分子;Fc 或 Fc' 肽、Fab 和 Fab 片段以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0048] “杂合抗体”是这样的免疫球蛋白分子,其中来自具有不同抗原决定区之抗体的重链和轻链对被组装在一起,从而可以识别两种不同的表位或两种不同的抗原并通过所得的四聚体结合。

[0049] 对于细胞而言,“分离”是指从其天然环境(如实体瘤中)取出分离的或隔离的细胞,并且其中至少约 30%、50%、75%和 90%不含天然状态下与其一起存在的、但缺少分离该细胞所依据之标志物的其它细胞。

[0050] 与靶细胞“特异性结合”或显示“特异性结合”或者“捕获”或“选择性捕获”靶细胞的分子(例如结合剂)是指:与另一些物质相比,以更长的持续时间和/或更大的亲和力与靶细胞更频繁、更迅速地反应或连接的分子。因此,在特定的实验条件下,特定的分子与靶细胞的结合至少为背景的 2 倍,并且其基本上不与样品中存在的其它细胞和蛋白质以显著量结合。

[0051] 本文所用的“转移”是指癌从初始部位向身体其它区域扩散或转移、同时在新的部位产生类似癌性病变的过程。“转移”的细胞是失去与邻近细胞的粘附接触并经血流或淋巴从患病初始部位迁移以侵袭邻近机体结构的细胞。

[0052] 2. 装置

[0053] 本发明一个实施方案的装置在图 1、2A 和 2B 中示意显示。装置(100 和 200)包含具有纳米结构化表面区域(104 和 204)的基底(102 和 202)。多个结合剂(106 和 206)连接至所述基底的所述纳米结构化表面区域。纳米结构化表面区域包含多个纳米结构(如纳米结构 108 和纳米结构 208),其每个均具有纵向尺寸和横向尺寸。当将样品置于装置上时,

生物细胞 (110 和 210) 被协作作用的结合剂和多个纳米结构选择性地捕获。

[0054] 所使用的结合剂将取决于被靶向的生物细胞类型。常规的结合剂适用于本发明的一些实施方案。结合剂的非限制性实例包括抗体、核酸、寡肽或多肽、细胞受体、配体、适配体、生物素、亲和素、配位复合物、合成的聚合物和碳水化合物。在本发明的一些实施方案中,使用常规方法将结合剂连接至纳米结构化表面区域。所采用的方法将取决于结合剂和用于构成装置的材料。连接方法的非限制性实例包括结合剂或与该试剂连接或化学结合(例如通过自组装的单层或硅烷化学)的化合物的非特异性表面吸附。在一些实施方案中,用链霉亲和素包被纳米化结构表面区域,并且结合剂被生物素化(其通过与链霉亲和素分子相互作用而辅助与纳米化表面区域的连接)。

[0055] 在本发明的一些实施方案中,纳米结构增加了基底的表面面积并且增加了给定细胞与结合剂接触的可能性。在这些实施方案中,纳米结构可以通过与细胞表面组分(如微绒毛、板状伪足、丝状伪足和脂筏分子团)相互作用而增强与靶细胞的结合。在一些实施方案中,纳米结构具有等于其横向尺寸的纵向尺寸,其中横向尺寸和纵向尺寸均小于 $1\ \mu\text{m}$,即为纳米尺度。在另一些实施方案中,纳米结构的纵向尺寸为其横向尺寸的至少 10 倍。在又一些实施方案中,纳米结构的纵向尺寸为其横向尺寸的至少 20 倍、50 倍或 100 倍。在一些实施方案中,横向尺寸小于 $1\ \mu\text{m}$ 。在另一些实施方案中,横向尺寸为 $1\sim 500\text{nm}$ 。在又一些实施方案中,横向尺寸为 $30\sim 400\text{nm}$ 。在又一些实施方案中,横向尺寸为 $50\sim 250\text{nm}$ 。在一些实施方案中,纵向尺寸为至少 $1\ \mu\text{m}$ 长。在另一些实施方案中,纵向尺寸为 $1\sim 50\ \mu\text{m}$ 长。在另一些实施方案中,纵向尺寸为 $1\sim 25\ \mu\text{m}$ 长。在又一些实施方案中,纵向尺寸为 $5\sim 10\ \mu\text{m}$ 长。在又一些实施方案中,纵向尺寸为至少 $6\ \mu\text{m}$ 长。

[0056] 纳米结构的形状不是关键的。在本发明的一些实施方案中,纳米结构是球或珠。在另一些实施方案中,纳米结构是线、丝或管。在又一些实施方案中,多个纳米结构包含一个或多个纳米线、纳米纤维、纳米管、纳米柱、纳米球或纳米颗粒。

[0057] 装置的精确几何结构将由测定决定。装置可以包含或不包含允许光学或目视检查纳米结构表面的区域。

[0058] 在一些实施方案中,可以通过静态孵育血液样品来实现高的细胞捕获效率。

[0059] 图 6B 示意本发明微流体装置的一个实施方案 (600)。该微流体装置 (600) 具有连接至基底 (604) 以形成微流体通道 (606) 的流动层 (602)。在这种装置 (600) 中,基底 (604) 之纳米化结构表面区域的一部分将与流经微流体通道的流体相接触。微流体装置包含至少一个流体输入微通道 (608)。然而微流体装置不限于仅有一个输入微通道。在一些实施方案中,微流体装置可以包含两个或更多个输入通道以及两个或更多个流体连通的流体源。微流体装置还具有一个或多个排出流体的输出微通道 (610)。

[0060] 可引入装置的流体的非限制性实例包括清洗缓冲液(例如用于除去非特异结合的细胞或未使用的试剂)、裂解试剂或标记试剂(例如细胞外或细胞内染料)。在一些实施方案中,将本发明的装置设计为具有允许接近全部或细胞可结合之区域的可移除覆盖物。使用这些装置,可以将试剂(例如标记试剂或裂解试剂)施加到特定区域。还可以从这些装置中取出各细胞。在另一些实施方案中,装置具有多于一个的输入微通道和输出微通道以允许将多于一种的流体引入装置中(通常在不同的时间)。通过具有多个输入微通道和相应的输出微通道,可以将流体同时引入装置从而在特定区域处理所结合的细胞。这些区

域的大小可以根据输入微通道和输出微通道的位置以及输入微通道和输出微通道的相对体积流速来调整。

[0061] 在本发明的一些实施方案中,输入微通道与泵(612)连接以控制进入微流体通道的样品和试剂的流动。常规的流体泵能在适用于本发明一些实施方案的装置中产生所需的剪切应力。泵的非限制性实例包括注射泵、蠕动泵和真空泵。在一些实施方案中,使用常规方法将泵与装置连接。可以将装置配置为在任何给定通道中具有基本恒定的剪切应力或者在给定通道中具有变化的剪切应力。本领域普通技术人员已知如何根据待处理之流体的体积和类型以及期望的流体流速来选择和配置用于本发明的泵。

[0062] 在一些实施方案中,本发明的装置包含混沌混合器。常规的混沌混合器适用于本发明的一些实施方案。在一些实施方案中,流动层具有带纹理的表面以在微流体通道中引起混沌流(chaotic flow)。该混沌流增加了生物细胞与基底之纳木结构化表面区域接触的可能性,从而增加了纳米结构化表面区域上的结合剂与样品中的靶生物细胞相互作用和结合的可能性。在一些实施方案中,所述带纹理的表面具有相对于流体流动主要方向取向以混合循环流体的多个结构。带纹理表面可以形成多种几何形状,包括例如矩形、圆形和抛物线形。可以将所述形状组合成周期或随机的排布。在一些实施方案中,所述形状可以包括多个形成鲑鱼骨图案的“八”形状。本文所用术语“鲑鱼骨图案”具有其通常含义:短平行线的列(例如两列),其中一列中的所有线条向一个方向倾斜,而相邻列的所有线条向另一方向倾斜。可以在带纹理表面上形成以便于流体混合的图案的其它细节在Stook等题为“LAMINAR MIXING APPARATUS AND METHODS”的美国专利申请公布2004/0262223中描述。

[0063] 在一些实施方案中,本发明的装置使用常规技术制造。所使用的制造技术将取决于用于制造装置的材料。制造技术的非限制实例包括塑模、光蚀刻、电子束光刻、软光刻、电铸和机械加工。材料的非限制性实例包括玻璃、石英、聚合物(例如聚苯乙烯、硅酮如聚二甲基硅氧烷(PDMS)、环氧树脂、聚甲基丙烯酸甲酯、尿烷、多糖、聚交酯(poly lactide)和聚四氟乙烯(Teflon)、硅和其它半导体和金属(例如铝、钛和钢)。材料还可以为无机氧化物(例如锌氧化物、硅氧化物、钛氧化物和铝氧化物)。

[0064] 在本发明的一些实施方案中,微流体装置通过软光刻制成。例如,可以在具有所需图案的基底上施加聚二甲基硅氧烷(PDMS)层。该层可包被抗蚀剂(resist),暴露于光图案并被蚀刻以产生形成流体通道的结构(例如,以预定的图案)。可以使用连续的包被、暴露和蚀刻步骤来产生更复杂的结构。

[0065] 3. 使用方法

[0066] 在一些实施方案中,使用本发明的装置来从样品中分离稀少细胞。在一些实施方案中,稀少细胞是外周血中的循环肿瘤细胞。在另一些实施方案中,稀少细胞是外周血中的生物体(例如细菌、病毒、原生物和真菌)。在又一些实施方案中,稀少细胞是在正常情况下不存在于血液中的非血细胞(例如,内皮细胞或胎儿细胞),甚至是造血起源细胞(例如血小板、镰刀形红细胞和白细胞的亚型)。

[0067] 可以使用本发明一些实施方案的装置检测的癌包括前列腺癌、肺癌、腺癌、腺瘤、肾上腺癌、基底细胞癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、支气管癌、宫颈发育不良、结肠癌、表皮样癌、尤因肉瘤(Ewing's sarcoma)、胆囊癌、胆囊结石肿瘤、巨细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤、头癌、增生、增生性角膜神经瘤、原位癌、肠节细胞神经瘤、胰岛细胞瘤、卡波西肉瘤(Kaposi's

sarcoma)、肾癌、喉癌、平滑肌瘤、肝癌、恶性类癌、恶性高钙血症、恶性黑素瘤、马方综合征样体征肿瘤 (marfanoid habitus tumor)、髓样癌、转移性皮肤癌、粘膜神经瘤、蕈样肉芽肿病、颈癌、神经组织癌、神经母细胞瘤、骨原发性肉瘤、骨肉瘤、卵巢肿瘤、胰腺癌、甲状旁腺癌、嗜铬细胞瘤、原发性脑肿瘤、直肠癌、肾细胞瘤、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、精原细胞瘤、皮肤癌、小细胞肺肿瘤、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、甲状腺癌、局部皮肤病变、网状细胞肉瘤 (reticulum cell sarcoma) 或维尔姆斯瘤 (Wilm's tumor)。在一些实施方案中, 结合剂是抗上皮细胞粘附分子抗体 (抗-EpCAM 抗体)。由于 EpCAM 经常被肺、结直肠、乳房、前列腺、头颈和肝起源的癌过表达, 所以它提供了对从未分级分离之血液中捕获 CTC 的特异性, 从而可以提供与肿瘤 (甚至临床上被认为是局部的肿瘤) 相关的临床和诊断信息。

[0068] 除了从样品中分离生物细胞的方法以外, 本发明的一些实施方案还提供了可使用所分离细胞提供其它信息的方法。在一些实施方案中, 使用本发明方法和装置分离的细胞可以用其它体外测定进一步测定。在一些实施方案中, 对使用本发明方法和装置分离的细胞进行计数。可用于一些实施方案中的细胞计数的常规方法包括例如: 光学检测 (例如目视检查、自动计数、基于显微镜的检测)、FACS 和电学检测 (如 Coulter 计数器)。细胞计数可用于诊断疾病、监测疾病进展以及监测或确定治疗效果。

[0069] 在一些实施方案中, 通过流式细胞术或其它分析平台对使用本发明方法和装置分离的细胞进行免疫细胞化学分析。这些分析利于诊断并向临床医生提供重要信息。

[0070] 在一些实施方案中, 可以裂解使用本发明之方法和装置分离的细胞, 并且可以测量所述细胞或其部分的一种或多种特性。可以在裂解细胞中测量的生物学特性的非限制性实例包括 mRNA 表达、蛋白质表达和 DNA 定量。此外, 在一些实施方案中, 可以使用常规技术 (例如 FISH 或 PCR) 对细胞 DNA 进行测序或鉴定某些序列特性 (例如多态性和染色体异常)。在一些实施方案中, 裂解细胞并仍使其结合于装置上。使用本发明一些实施方案的装置和方法获得的高纯度样品使得能够利用装置裂解细胞并获得有用的遗传信息。

[0071] 在一些实施方案中, 不经裂解测定本发明方法分离的细胞。用于测定未裂解之细胞的方法的非限制实例包括使用细胞外或细胞内染色; 观察不同培养基中的形态或生长特性; 以及鉴定细胞表面上的生物标志物。在另一些实施方案中, 培养所分离的细胞以获得富集的分细胞群, 而后用于后续的体外测定。

[0072] 在本发明的一些实施方案中, 可以从分离细胞获得的信息包括特定基因组 DNA、cDNA 或 mRNA 序列的鉴定或定量; 细胞表面标志物 (例如癌干细胞上的 CD133、CD44、CD24、上皮特异性抗原 (epithelial-specific antigen, ESA)、Nanog 和 BMI1) 的鉴定或定量; 以及指示特定肿瘤类型或存在的蛋白质或其它细胞内含物的鉴定或定量。在一些实施方案中, 可以分析 CTC 以确定组织起源、疾病的阶段或严重程度或者对特定治疗的敏感性。

[0073] 在一些实施方案中, 使用本发明的方法和装置来评估在消除肿瘤的药物、放射或手术治疗后循环中的残留癌细胞。在另一些实施方案中, 在数年内定期地使用本发明之方法和装置来评估患者循环中肿瘤细胞的存在和数目, 以作为疾病发生、复发和 / 或进展的指示。

[0074] 本发明的一些实施方案还提供了用于实施本文所述方法的试剂盒。在一些实施方案中, 所述试剂盒包含本发明的装置。在一些实施方案中, 所述试剂盒包含与本发明装置一起使用的试剂。在又一些实施方案中, 所述试剂盒包含从哺乳动物对象中获取样品 (例如

体液) 以及使用试剂盒来诊断哺乳动物对象之癌症或者监测施用给患癌症之哺乳动物对象的治疗效果的说明。

[0075] 通过参照以下非限制性实施例可以进一步理解本发明的一些实施方案。很明显, 本领域普通技术人员在不背离本公开内容的精神的前提下可以对材料和方法进行诸多变动。

实施例

[0076] 应理解, 本文所述的实施例和实施方案仅用于举例说明, 并且基于其, 本领域普通技术人员会想到多种改变或变动, 并且这些改变和变动涵盖在本申请的精神和范围内。

[0077] 实施例 1

[0078] SiNW 基底的制备和表面修饰

[0079] 如下制备纳米结构化细胞捕获基底。首先, 使用湿化学蚀刻法将直径约 100 ~ 200nm 的紧密捆扎的纳米线 (SiNW) 引入硅晶片 (例如 1cm×2cm) 上。将硅基底的表面处理成亲水性。在室温下, 将硅晶片分别在丙酮和乙醇中超声 10 分钟和 5 分钟, 从而从杂质中去除有机润滑脂。然后, 在沸腾的 Piranha 溶液 (4 : 1 (体积 / 体积) H₂SO₄/H₂O₂) 和 RCA 溶液 (1 : 1 : 5 (体积 / 体积 / 体积) NH₃/H₂O₂/H₂O) 中加热每个去润滑脂的硅基底 1 小时, 并用去离子 (deionized, DI) 水漂洗硅基底几次。通过湿蚀刻方法处理洁净的硅基底。用 Teflon 瓶作为容器, 在室温下使用由去离子水、HF 和硝酸银组成的蚀刻混合物。HF 和硝酸银的浓度分别为 4.6M 和 0.2M。蚀刻时间根据所需的纳米线长度而有所不同。蚀刻后, 在沸腾的王水 (3 : 1 (体积 / 体积) HCl/HNO₃) 中浸没基底 15 分钟以去除银膜。最后, 用去离子水漂洗基底, 并在氮气中干燥, 以用于表面修饰。可以通过采用不同的蚀刻时间来控制这些化学蚀刻的 SiNW 的长度。结果, 我们能够获得 SiNW 长度为 1 ~ 25 μm 的一系列 SiNW 基底 (图 2C)。在制备 SiNW 基底后, 采用 NHS-马来酰亚胺化学 (图 2B) 向 SiNW 表面上引入链霉亲和素。用 1% (体积 / 体积) 3-巯基丙基三甲氧基硅烷的乙醇溶液在室温下修饰基底 12 小时, 或者用 4% (体积 / 体积) 3-巯基丙基三甲氧基硅烷的乙醇溶液在室温下修饰基底 45 分钟。然后用偶联剂 N-马来酰亚胺丁酰氧基琥珀酰亚胺酯 (GMBS, 0.25mM) 处理基底 30 分钟, 使 GMBS 粘附到基底上。然后, 用 10 μg/mL 链霉亲和素在室温下处理基底 30 分钟使其固定到 GMBS 上。用 1×PBS 冲洗基底以去除过量的链霉亲和素, 将链霉亲和素包被的 SiNW 基底在 PBS 缓冲液 (pH = 7.2) 的存在下在 4°C 储存多至 6 个月。在临用于细胞捕获实验前, 将生物素化的抗-EpCAM (R&D) 引入链霉亲和素包被的基底上。

[0080] 实施例 2

[0081] 比较利用 SiNW 基底和平基底捕获之细胞的形态

[0082] 使用扫描电子显微镜 (SEM) 观察纳米尺度的细胞 / 基底相互作用。为了维持固定于基底之细胞的形态, 通过戊二醛固定、四氧化锇处理和脱水来处理样品。简言之, 在基底上孵育细胞 24 小时后, 将细胞用缓冲于 0.1M 二甲胍酸钠的 1.5 ~ 4% 戊二醛固定 (4°C, 1 小时)。然后用 1% 四氧化锇后固定 (post-fix) 细胞 1 小时, 用 1% 丹宁酸作为媒染剂。经一系列醇浓度 (30%、50%、70% 和 90%) 使样品脱水, 用 0.5% 乙酸双氧铀对样品染色, 然后进一步脱水 (96%、100% 和 100% 的醇)。在六甲基二硅氮烷 (HMDS) 中进行最后一次脱水而后空气干燥。干燥后, 用金喷覆样品, 然后用加速电压为 10keV 的 Hitachi S800 场发

射 SEM 检测。

[0083] 可用荧光显微镜观察细胞。通过以 1000 ~ 1250、80 ~ 100 和 5 ~ 20 个细胞/mL 的细胞浓度将 DiD 染色的 MCF7 乳腺癌细胞掺入兔血来制备对照样品。在 1cm×2cm 的基底上添加 25 μL 经生物素化的抗-EpCAM(10 μg/mL, (在含有 1% (重量/体积) BSA 和 0.09% (重量/体积) 叠氮化钠的 PBS 中), 并孵育 30 分钟。用 PBS 清洗基底。在基底上加入 1mL 样品并孵育 45 分钟 (37°C, 5% CO₂)。用 PBS 清洗基底, 并用 4% 多聚甲醛 (PFA) 的 PBS 溶液固定基底上捕获的细胞 20 分钟。为染色和观察所捕获的细胞, 将 0.9mL 的 0.2% Triton X-100 的 PBS 溶液加至基底并孵育 10 分钟。然后向基底上加入 DAPI 溶液 (1×DAPI 试剂的 1mL 去离子水溶液) 并孵育 5 分钟。用 PBS 清洗基底, 将基底反转到标准盖玻片上。用 Nikon TE2000 荧光显微镜成像并计数细胞。采用颜色、亮度和形态特征 (包括细胞大小、形状和细胞核大小) 鉴定潜在的 CTC 并排除细胞碎片和非特异性细胞。显示双染色 (红色: DiD⁺ 和蓝色: DAPI⁺) 并具有某些表型形态学特征的细胞被记为 CTC, DAPI⁺ 细胞被记为非特异性细胞。

[0084] 如图 3A 右侧所示, 与利用 SiNW 基底捕获的细胞相比, 利用平 Si 基底捕获的细胞显示显著不同的形态。图 3A 中的插图是利用平 Si 基底 (上图) 和 SiNW 基底 (下图) 捕获之细胞的典型形态。在平基底上, 有围绕细胞中央部分 (通常包括细胞核和核周细胞器) 的板状伪足连成的薄层。这些结果表明, 尽管细胞难于附着于平 Si 基底上, 但是细胞一旦与平 Si 基底连接即开始伸展。与之不同的是, 在 SiNW 基底上, 细胞伸出的许多丝状伪足在三维 (3D) 空间中与纳米线连接, 其使用它们的顶部或中部“抓住”纳米线。并且丝状伪足也如 SiNW 的横向尺寸一样是纳米尺度的 (约 100 ~ 150nm)。尽管 SiNW 是不动的, 但细胞表面组分可以自行排布, 使得细胞和基底之间更紧密地局部相互作用。因此, SiNW 有利于细胞捕获, 并且导致对与平 Si 基底和 SiNW 基底相连的细胞所观察到的不同形态。

[0085] 我们还用 Daudi B 细胞 (即癌性 B 细胞) 作为靶细胞以及包被有抗-CD20 的纳米结构捕获 Daudi B 细胞来确认了这些结果。这些结果在图 3B 中显示并与使用 MCF7 乳腺癌细胞时观察到的结果一致。

[0086] 我们还比较了邻近放置的 SiNW 基底和平 Si 基底的结合效率。用光蚀刻与化学蚀刻方法组合在硅基底上施加图案 (图 3C 左图)。我们使用和不用纳米线制备带图案的基底 (图 3D 上部)。在与上述类似的表面修饰和细胞捕获过程后, 在荧光显微镜下观察带图案的基底。在这些实验中, 我们使用 MCF7 乳腺癌细胞和包被有抗-EpCAM 的纳米结构。如图 3D 下部所示, 与纳米线区域相比, 在平区域上观察到显著较少的细胞。这些结果与以上获得的结果一致, 并提供了基于纳米线的表面与平表面相比可表现出增强的细胞捕获效果的进一步证据。

[0087] 实施例 3

[0088] 捕获时间对细胞捕获效率的影响

[0089] 为了确定实现最大细胞捕获所需的最短时间, 我们检测了不同孵育时间下 10 μm SiNW 和平 Si 基底 (包被有抗-EpCAM) 两者的细胞捕获表现。测试了 3 种表达 EpCAM 的癌细胞 (即 MCF7、U87 脑癌细胞和 PC3 前列腺癌细胞)。图 4A 总结了孵育时间与基底所固定之细胞数之间的关系。在 SiNW 基底存在时, 无论检测何种类型的细胞, 均在 45 分钟的孵育时间时达到最大细胞捕获。在 45 分钟的时间点, 与平 Si 基底相比, 10 μm SiNW 显示出 10

倍的更佳之细胞捕获效率。对于平 Si 基底,观察到连续增加的细胞数。然而,与利用 SiNW 基底所观察到的相比,平 Si 基底的总细胞捕获数显著更低。

[0090] 我们通过利用三种不同的基底(无任何表面修饰的 SiNW(SiNW-No)、具有链霉亲和素包被的 SiNW 基底(SiNW-SA)和用抗-EpCAM 修饰的 SiNW 基底(SiNW-SA-EpCAM))进行类似的细胞捕获实验来评价此高捕获产率是否由于 SiNW 的非特异性相互作用所致。利用 SiNW-No 和 SiNW-SA 基底捕获之细胞数少于利用 SiNW 基底捕获之细胞数的 5% (图 5)。因此,利用 SiNW 基底的高细胞捕获产率是由于 SiNW 和细胞表面组分之间的物理局部相互作用以及抗-EpCAM 与细胞表面上之 EpCAM 之间的化学识别的协作作用所致。

[0091] 实施例 4

[0092] SiNW 长度对细胞捕获效率的影响

[0093] 我们在细胞捕获实验中使用了 SiNW 长度为 4、6、8、10 和 20 μm 的一系列 SiNW 基底。在 SiNW 基底和平基底上静态孵育含有癌细胞系(即 MCF7、U87 脑癌细胞或 PC3 前列腺癌细胞)的样品。在两种基底上均包被抗-EpCAM,如图 4B 所示,增加的 SiNW 纵向尺寸使所捕获的细胞数增加。当 SiNW 的长度大于 6 μm 时实现最大细胞捕获效率。

[0094] 实施例 5

[0095] 从掺杂的全血样品中静态捕获 CTC

[0096] 我们测试了我们的装置进行静态细胞捕获的能力。通过以 1000、100 和 5 个细胞/mL 血液的细胞密度将表达增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的 U87 细胞掺入兔血来制备人工的含 CTC 之血液样品。在 10 μm EpCAM 包被的 SiNW 基底上孵育所掺杂的样品 45 分钟。如表 1 所示,我们的方法具有高捕获产率(> 40%)、高特异性(> 40%)和高灵敏度(> 90%)。这些结果表明,本发明的装置比现有领先技术(即具有非常低灵敏度(约 20~60%)和非常低特异性(约 0.1%)的免疫磁珠法)表现更佳。

[0097]

	每 10^9 个血细胞中 CTC 的数量范围		
	1000~1250	80~120	5~20
捕捉产率	55%	40%	65%
特异性	64%	57%	44%
灵敏度	100%	100%	92%

[0098] 我们制造了具有产生混沌混合之流动层的本发明微流体装置。(见图 6A 和 6B)。通过立式软光刻技术制造混沌混合 PDMS 层。首先,我们制造了具有阳图案的硅模具,其具有两层 SU-8 图案。下层为主要微通道(100 μm 高,2mm 宽),上层为鲑鱼骨(混沌混合)微通道(25 μm 高)。鲑鱼骨结构类似于枪管中的膛线,其可以对粘性流产生各向异性的阻力。在倾倒 PDMS 混合物并将其烘烤几小时后,我们获得微通道上部具有鲑鱼骨结构的 PDMS 层。在 PDMS 层冲压出入口和出口后,将 1~3 μm 厚的粘性 PDMS 层通过接触压印转移至 PDMS 块(block),而后直接连接到抗-EpCAM 包被的 SiNW 基底上从而得到组装的装置。

[0099] 实施例 7**[0100] 流速对细胞捕获效率的影响**

[0101] 为了确定在微流体装置中实现最佳细胞捕获所需的最佳流速,我们以 100 个细胞/mL 将乳腺癌细胞(即 MCF7)掺入 PBS 并捕获掺杂的癌细胞。微流体装置连接至样品瓶。将生物素化的抗 -EpCAM(10 μ g/mL,在含有 1% (重量/体积)BSA 和 0.09% (重量/体积)叠氮化钠的 PBS 中)加载至样品瓶中,从而使微流体装置充满该溶液。将生物素化的抗 -EpCAM 溶液孵育 30 分钟,然后用 PBS 清洗微流体装置。以期望的流速向微流体芯片压入 1mL 样品,而后用 PBS 清洗。用 4%多聚甲醛(PFA)的 PBS 溶液填充微流体装置并保持 20 分钟从而固定基底上捕获的细胞。为染色和观察所捕获的细胞,用 0.2% Triton X-100 的 PBS 溶液替换 PFA 并孵育 10 分钟,然后加入 DAPI 溶液(1 \times DAPI 试剂的 1mL 去离子水溶液)保持 5 分钟。用 PBS 清洗微流体装置,从基底上分离微流体层。将基底反转至标准盖玻片上,用于成像。

[0102] 计算得到的捕获效率高于 90%,并且在流速高于 3mL/小时时显著降低(图 7A),推测这是由于剪切应力增加所致。在流速低于 1mL/小时时捕获效率没有增加,这使我们选择 1~2mL/小时的流速进行后续研究。图 7A 总结了流速和捕获产率之间的关系。

[0103] 实施例 8**[0104] EpCAM 表达水平对不同癌细胞系的作用**

[0105] 为了确定 EpCAM 表达对本发明一个实施方案的微流体装置的 CTC 捕获效率的作用,我们比较了具有不同 EpCAM 表达的三种癌细胞系(包括每个细胞具有 > 500,000 个抗原的乳腺癌 MCF-7 细胞、每个细胞具有约 50,000 个抗原的前列腺癌 PC3 细胞以及每个细胞具有约 2,000 个抗原的膀胱癌 T-24 细胞)的捕获产率。每种细胞系以 100 个细胞/mL 的浓度掺入 PBS 中。尽管每种细胞系中 EpCAM 的表达不同,但是在所有情况下平均捕获产率均 > 90%(图 8)。这些结果可能是由于微流体装置中细胞与 SiNW 基底之间增强的细胞-基底相互作用所致。

[0106] 实施例 9**[0107] 用微流体装置从掺杂的样品中捕获 CTC**

[0108] 为了测试微流体装置的细胞捕获效率,通过以 5000、1000、500、100 和 50 个细胞/mL 血液的细胞密度向健康供体血液中掺入 DiD 染色的 MCF7(乳腺癌细胞系)来制备人工的含有 CTC 的血液样品。在 10 μ m EpCAM 包被的 SiNW 基底上孵育掺杂的样品 45 分钟。如图 8 所示,我们的微流体装置显示高的捕获产率(> 90%),这比免疫磁珠法的捕获产率高得多。为了评估红血细胞在流通通道中潜在的空间阻碍,这些研究使用来自健康供体的裂解血进行了重复实验。使用全血和裂解血样品,我们得到了相似的结果(图 9)。

[0109] 我们还测试了捕获时间和 SiNW 长度对微流体装置的捕获效率的作用。为了确定实现最大细胞捕获所需的最短时间,我们以不同孵育时间检测 10 μ m SiNW(包被有抗 -EpCAM)的细胞捕获表现。在微流体装置中,利用抗 -CD20 包被的基底检测了 Daudi B 细胞(即癌性 B 细胞)和 Jurkat 细胞(即癌性 T 细胞)。图 10A 总结了孵育时间与基底固定细胞数之间的关系。在 SiNW 基底存在下,对于 Daudi B 细胞而言,30 分钟的孵育时间实现了最大细胞捕获。与之不同的是,在细胞表面上缺乏 CD20 的 Jurkat 细胞中未观察到细胞捕获。

[0110] 为了评价 SiNW 长度与捕获效率之间的关系,我们在细胞捕获实验中使用了 SiNW 长度为 4、6、8、10 和 20 μm 的一系列 SiNW 基底。测试了 Daudi B 细胞和 Jurkat 细胞,如图 10B 所示,增加 SiNW 的纵向尺寸使捕获的细胞数增加。当 SiNW 的长度为 6 μm 时达到最大细胞捕获效率。

[0111] 实施例 10

[0112] 比较我们的微流体芯片和 Cellsearch™ 技术捕获的 CTC 数

[0113] 在优化实验参数后,我们在 UCLA IRB 批准下 (IRB#09-03-038-01) 与 UCLA 的泌尿系合作进行了使用从转移性前列腺癌患者收集的 CTC 血液样品的临床研究。我们首先检测了本发明一个实施方案的装置在静态结合条件下捕获 CTC 的能力。简言之,从患有晚期实体肿瘤 (由 IRB 确定) 的患者抽取血液样品并收集到含有 EDTA 的采血管 (vacutainer) 中。在 1cm \times 2cm 的基底上添加 25 μL 生物素化的抗 -EpCAM (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在含有 1% (重量 / 体积) BSA 和 0.09% (重量 / 体积) 叠氮化钠的 PBS 中) 并孵育 30 分钟。用 PBS 清洗基底,将 1mL 样品加至基底上并孵育 45 分钟 (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2)。用 PBS 清洗基底,并用 4% 多聚甲醛 (PFA) 的 PBS 溶液固定所捕获的细胞 20 分钟。

[0114] 使用三参数免疫细胞化学实验方案 (针对平行染色 DAPI、FITC 标记的抗 -CD45 和 PE 标记的抗细胞角蛋白 (CK)) 对固定的细胞进行染色。例如,将 200 μL 的 0.3% Triton X-100 的 PBS 溶液加至基底上并孵育 30 分钟。在基底上加入 200 μL 封闭溶液 (含 5% 正常山羊血清、0.1% Tween 20、3% BSA 的 PBS) 并在室温下孵育 1 小时。然后向基底加入 200 μL 荧光团标记的抗体溶液 (起始浓度 20 $\mu\text{L}/1\text{mL}$) 并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 在黑暗中孵育过夜。用 200 μL PBS 清洗基底,加入 DAPI 溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 并孵育 5 分钟。用 PBS 清洗基底,将基底反转至标准盖玻片上,用于成像。

[0115] 我们还在本发明一个实施方案的微流体装置中测试了样品。微流体装置连接至样品瓶。将生物素化的抗 -EpCAM (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在含 1% (重量 / 体积) BSA 和 0.09% (重量 / 体积) 叠氮化钠的 PBS 中) 加载至样品瓶中,从而使微流体装置充满溶液。将生物素化的抗 -EpCAM 溶液孵育 30 分钟,然后用 PBS 清洗。以流速 1mL / 小时向微流体芯片压入 1mL 患者样品。用 PBS 清洗微流体装置,而后用 4% 多聚甲醛 (PFA) 的 PBS 溶液孵育 20 分钟以固定所捕获的细胞。为染色和观察所捕获的细胞,用 0.2% Triton X-100 的 PBS 溶液替换 PFA 并孵育 10 分钟,然后加入荧光团标记的抗体溶液 (起始浓度 20 $\mu\text{L}/1\text{mL}$)。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下,在黑暗中孵育微流体装置过夜。然后用 PBS 清洗微流体装置,并添加 DAPI 溶液 (1 \times DAPI 试剂的 1mL 去离子水溶液) 并孵育 5 分钟。用 PBS 清洗微流体装置,从基底上分离微流体层。将基底反转至标准盖玻片上,用于成像。

[0116] 根据对模式细胞建立的信号阈值和大小 / 形态特征,清楚地从背景免疫细胞中区分出 CTC。由于每个 CTC 捕获研究只需要 1.0mL 的患者血液,我们针对我们获得的每位患者血液样品能进行 3 次测量。图 11A-11C 显示在静态条件下使用我们的装置 (图 11B)、在流体条件下使用我们的装置 (图 11C) 和使用 Cellsearch™ 技术 (图 11A) 的 CTC 捕获实验结果。在静态和流体条件下,我们的装置能鉴定 CTC 阳性患者样品,而 Cellsearch™ 技术未能记录任何 CTC 计数。

[0117] 实施例 11

[0118] 试剂

- [0119] 适合用于实施本发明一些实施方案的试剂的非限制性实例包括：
- [0120] 1. 定向优等硅晶片，p 型，电阻率为约 10 ~ 20ohm-cm(Silicon Quest Int' l)。室温储存。
- [0121] 2. 光致抗蚀剂 (PR)AZ 5214(AZ Electronic Materials USA Corp.)
- [0122] 3. 显影剂 AZ 400K(AZ Electronic Materials USA Corp.)
- [0123] 4. 光致抗蚀剂 SU8-2100(MicroChem Corp. USA.)
- [0124] 5. 光致抗蚀剂 SU8-2025(MicroChem Corp. USA.)
- [0125] 6. 显影剂 SU8(MicroChem Corp. USA.)
- [0126] 7. 乙醇，> 99.5% (Sigma-Aldrich Co)。室温储存。
- [0127] 8. 硫酸，98% (Sigma-Aldrich Co, #32050-1)。室温储存。
- [0128] 9. 过氧化氢，30% (Sigma-Aldrich Co, #31698-9)。室温储存。
- [0129] 10. 氢氟酸，水中 48(重量)% (Sigma-Aldrich Co, #339261-100mL)。室温储存。
- [0130] 11. 硝酸银，> 99.8% (Sigma-Aldrich Co, #S6506-5G)。室温储存。
- [0131] 12. 丙酮，ACS 试剂，光谱级 99.5% (Fisher Scientific, #AC40010-0040)。室温储存。
- [0132] 13. 异丙醇，ACS 试剂，光谱级 99.5% (Fisher Scientific, #AC41279-5000)。室温储存。
- [0133] 14. 3- 巯基丙基三甲氧基硅烷，95% (Sigma-Aldrich Co, #175617-25G)。室温储存。
- [0134] 15. N-γ- 马来酰亚胺丁酰氧基琥珀酰亚胺酯 (4- 马来酰亚胺丁酸 N- 氢琥珀酰亚胺，GMBS)，> 98% HPLC(Sigma-Aldrich Co, #63175-25MG-F)。室温储存。
- [0135] 16. 链霉亲和素，1mg/mL(Invitrogen, #SNN1001)。在 -20°C 以单次使用的等份储存。
- [0136] 17. 戊二醛 E. M. 级，3% (Polysciences)。室温储存。
- [0137] 18. 三水卡可酸钠盐 (Sigma Aldrich, #C0250-10g)。室温储存。
- [0138] 19. 四氧化钨，ACS 试剂，> 98% (Sigma Aldrich, #419494-250mg)。有毒！室温储存。
- [0139] 20. 丹宁酸 (Electron Microscopy Sciences)。室温储存。
- [0140] 21. 醋酸双氧钼 (Electron Microscopy Sciences)。室温储存。
- [0141] 22. 六甲基二硅氮烷 (HDMS) (Sigma, #H4875-100mL)。有毒！室温储存。
- [0142] 23. 三甲基氯硅烷 (TMSCI, > 98%, Alfa Aesar, #MFCD00000502)
- [0143] 24. 聚二甲基硅氧烷 (PDMS, GE RTV 615)
- [0144] 25. 乳腺癌细胞系，MCF7 (美国典型培养物保藏中心)
- [0145] 26. Dulbecco ' s 改良 Eagle ' s 培养基 (DMEM, 1×)，液体 (高葡萄糖)，(Invitrogen, #11965-118)
- [0146] 27. 胎牛血清 (FBS)，标准 (Fisher Scientific, #BW14-502F)。储存在 -20°C。
- [0147] 28. 青霉素 - 链霉素，100× (Fisher Scientific, #ICN1670049)。储存在 -20°C。
- [0148] 29. 柠檬酸化全兔血 (Colorado Serum Company)
- [0149] 30. Vybrant [®] DiD 细胞标记溶液 (Invitrogen, #11330-057)。储存在 4°C。

- [0150] 31. Dulbecco's 磷酸盐缓冲液 (PBS), (Invitrogen, #14190250)。储存在 4°C。
- [0151] 32. 生物素化抗人 EpCAM/TROP1 抗体 (山羊 IgG, R&D) 根据 R&D 产品手册稀释至 10 μg/mL。以单次使用等份储存于 -20°C。
- [0152] 33. Lab-Tek Chamber Slide, 4 孔玻璃, 无菌 (Thermo Fisher Scientific, #177399)。室温储存。
- [0153] 34. 细胞角蛋白抗细胞角蛋白 PE (CAM5.2, 缀合有藻红素) (BD Biosciences, #347204) 用 PBS 稀释至 20 μg/mL。以单次使用等份储存于 -20°C。
- [0154] 35. FITC 抗人 CD45, Ms IgG1, 克隆 H130 (BD Biosciences, #555482) 用 PBS 稀释至 20 μg/mL。以单次使用等份储存于 -20°C。
- [0155] 36. 1×PBS 缓冲液 (漂洗剂)。储存于 4°C。
- [0156] 37. 1% DAPI 的 1×PBS 溶液 (核酸染色剂)。储存于 4°C。
- [0157] 38. 4% 多聚甲醛的 1×PBS 溶液 (固定剂)。储存于 4°C。
- [0158] 39. 牛血清白蛋白 (BSA), (Sigma)。储存于 4°C。
- [0159] 40. Triton X-100。储存于 4°C。
- [0160] 实施例 12
- [0161] 用于实施本发明一些实施方案的方法
- [0162] 用于制造和实施本发明一些实施方案的方法的非限制性实例包括：
- [0163] 1. 将硅晶片切成面积为 1cm×2cm 的硅基底片。
- [0164] 2. 在室温下将所切割的硅基底在丙酮中超声处理 10 分钟并在氮气中干燥。然后, 在室温下将基底在乙醇中超声处理 5 分钟并在氮气中干燥。这些步骤从硅基底上去除杂质 (例如有机润滑脂)。
- [0165] 3. 蚀刻硅晶片表面: 首先在沸腾的 Piranha 溶液 (4 : 1 (体积 / 体积) H₂SO₄/H₂O₂) 中加热硅基底 1 小时。然后, 在沸腾的 RCA 溶液 (1 : 1 : 5 (体积 / 体积) NH₃/H₂O₂/H₂O) 中加热基底 1 小时。用去离子水漂洗基底 5 次。然后, 将硅基底放置在 Teflon 容器中并用蚀刻混合物 (含 4.6M HF, 0.2M 硝酸银的去离子水溶液) 在 50°C 蚀刻基底。
- [0166] 4. 在沸腾的王水 (3 : 1 (体积 / 体积) HCl/HNO₃) 中浸没基底 15 分钟。
- [0167] 5. 用去离子水漂洗基底并在氮气中干燥。
- [0168] 1. 将 4% (体积 / 体积) 3-巯基丙基三甲基硅烷的乙醇溶液加至基底上, 然后将基底在室温放置 45 分钟。
- [0169] 2. 用 0.25mM N-马来酰亚胺丁酰氧基琥珀酰亚胺酯 (GMBS) 处理基底并在室温孵育 30 分钟。
- [0170] 3. 用 10 μg/mL 链霉亲和素 (SA) 处理基底并在室温孵育 30 分钟。
- [0171] 4. 用 1×PBS 冲洗基底以去除过量的链霉亲和素。
- [0172] 5. 在 4 ~ 8°C 储存经修饰的基底多至 6 个月。
- [0173] 1. 使细胞在基底上孵育 24 小时。
- [0174] 2. 用缓冲于 0.1M 二甲胂酸钠的 4% 戊二醛固定细胞, 并在 4°C 孵育细胞 1 小时。然后用 1% 四氧化锇固定细胞 1 小时。用 1% 丹宁酸作为媒染剂。3. 经一系列醇浓度 (30%、50%、70% 和 90%) 使样品脱水。在脱水后, 用 0.5% 乙酸双氧铀将样品染色。经一系列更高的醇浓度 (96%、100% 和 100%) 使样品进一步脱水。在六甲基二硅氮烷 (HMDS) 中将样

品进行最终的脱水。

[0175] 4. 空气干燥样品。

[0176] 5. 干燥后,用金喷覆样品并用场发射 SEM(加速电压为 10keV)检测。

[0177] 1. 用 DiD 红色荧光染料将 MCF7 细胞染色。

[0178] 2. 通过以 1000 ~ 1250、80 ~ 100 和 5 ~ 20 个细胞/mL 的细胞浓度将染色的 MCF7 细胞掺入兔血来制备对照样品。

[0179] 1. 将基底置于大小匹配的 4 孔 Lab-Tek Chamber Slide 中。在 1cm×2cm 的基底上滴加 25 μL 生物素化的抗-EpCAM(10 μg/mL,在含有 1% (重量/体积)BSA 和 0.09% (重量/体积)叠氮化钠的 PBS 中)。孵育 30 分钟,用 PBS 清洗。

[0180] 2. 在每个基底上加入 1mL 对照样品。

[0181] 3. 孵育整套装置 45 分钟(37°C,5% CO₂)。

[0182] 4. 用 PBS 轻柔清洗基底至少 5 次。

[0183] 5. 用 4%多聚甲醛(PFA)的 PBS 溶液固定基底上捕获的细胞 20 分钟。

[0184] 6. 染色和观察所捕获细胞:用 0.9mL 的 0.2% Triton X-100 的 PBS 溶液处理基底并孵育 10 分钟。用 DAPI 溶液(1×DAPI 试剂的 1mL 去离子水溶液)孵育基底 5 分钟。用 PBS 清洗基底 3 次。将基底反转至标准盖玻片上。

[0185] 7. 用 Nikon TE2000 荧光显微镜成像并计数细胞。

[0186] 8. 显示双染(红色:DiD⁺和蓝色:DAPI⁺)并符合表型形态学特征的细胞被记为 CTC。采用颜色、亮度和形态特征(包括细胞大小、形状和细胞核大小)鉴定潜在的 CTC 并排除细胞碎片和非特异性细胞。仅 DAPI⁺的细胞计数为非特异性细胞。

[0187] 9. 这些步骤应使血液样品制备效率最大化。

[0188] 1. 将基底置于大小匹配的 4 孔 Lab-Tek Chamber Slide 中。在 1cm×2cm 的基底上滴加 25 μL 生物素化的抗-EpCAM(10 μg/mL,在含有 1% (重量/体积)BSA 和 0.09% (重量/体积)叠氮化钠的 PBS 中)。孵育 30 分钟,用 PBS 清洗。

[0189] 2. 将从患晚期实体肿瘤(由 IRB 确定)的患者抽取的血液样品收集到含有抗凝 EDTA 的采血管中。应在收集后立即处理样品。

[0190] 3. 为了捕获细胞,将 1mL 患者样品加载到 SiNP 基底上。孵育整套装置 45 分钟(37°C,5% CO₂)。用 PBS 轻柔清洗基底至少 5 次。

[0191] 4. 在室温下,通过将 200 μL 的 4%多聚甲醛(PFA)的 PBS 溶液加至基底上来固定基底所捕获的细胞 20 分钟。用 PBS 清洗每个基底 3 次。

[0192] 5. 在室温下用 200 μL 的 0.3% Triton X-100 的 PBS 溶液处理每个基底 30 分钟以使细胞透化。随后用 PBS 清洗每个基底 3 次。

[0193] 6. 在每个基底上加入 200 μL 封闭溶液(含 5%正常山羊血清、0.1% Tween 20、3% BSA 的 PBS),并在室温下孵育 1 小时。然后向每个基底加入 200 μL 荧光团标记的抗体溶液(起始浓度 20 μL/1mL)并于 4°C 在黑暗中孵育过夜。用 200 μL PBS 清洗 3 次(第一次清洗为室温下 15 分钟,第二次和第三次清洗为室温下 5 分钟)。用 DAPI 溶液(10 μg/mL)孵育基底 5 分钟。用 PBS 清洗每个基底 3 次。

[0194] 7. 用镊子轻柔地将基底反转至盖玻片上,用于成像。

[0195] 1. 选择荧光显微镜设置。

- [0196] 1. 1. 优化的曝光时间
- [0197] 1. 1. 1. DAPI (蓝色) 滤片 :50ms 曝光时间 (背景 :约 1300)
- [0198] 1. 1. 2. FITC (绿色) 滤片 :300ms 曝光时间 (背景 :约 1600)
- [0199] 1. 1. 3. TRITC (红色) 滤片 :100ms 曝光时间 (背景 :约 1300)
- [0200] 1. 2. 数字转换器应被设置为 1MHz。其它设置会在绿色滤片下产生非常高的背景。
- [0201] 2. 将样品置于显微镜上并聚焦于基底边缘。聚焦后将滤片转换至 DAPI。
- [0202] 2. 1. 从基底的右上角开始,以 4× 或 10× 的放大倍数扫描直径约 7 ~ 20 μm 的细胞核。
- [0203] 2. 2. 当定位于推定的细胞时将放大倍数增加至 10× 或 20×。使用显微镜鼠标,检查在 DAPI、TRITC 和 FITC 荧光下的荧光强度。样品荧光强度 > 2× 背景荧光强度被计作阳性结果。
- [0204] 3. 显示双染 (红色 :抗细胞角蛋白 PE⁺ 和蓝色 :DAPI⁺) 并符合标准表型形态学特征的细胞应被记为 CTC。显示双染 (绿色 :抗 -CD45 FITC⁺ 和蓝色 :DAPI⁺) 的细胞应作为淋巴细胞 / 非特异性细胞而被排除。在所有 3 个滤片下显示染色的物质 (绿色 + 和红色 + 和蓝色 +) 应作为细胞碎片而被排除。
- [0205] 1. 清洁晶片 :丙酮、乙醇和去离子水。
- [0206] 2. 干燥晶片 :吹干晶片并放置在 150℃热板上 5 分钟。
- [0207] 3. 将 AZ 5214 倒在晶片上。
- [0208] 4. 以 1000rpm 离心晶片 1 分钟。
- [0209] 5. 在 100℃软性烘烤晶片 1 分钟。
- [0210] 6. 将晶片暴露于 UV 56mJ/cm²。
- [0211] 7. 制备显影溶液 :AZ 400K :水 = 1 : 3。
- [0212] 8. 用显影溶液显影 AZ 5214。
- [0213] 9. 吹干产物。
- [0214] 10. 在 100℃硬性烘烤 AZ 5214, 5 分钟。
- [0215] 11. 为蚀刻 AZ 5214 带图案的硅晶片表面,将硅晶片放置在 Telfon 容器中并在 50℃用蚀刻混合物 (含 4. 6M HF、0. 2M 硝酸银的去离子水) 蚀刻基底。
- [0216] 12. 在沸腾的王水 (3 : 1 (体积 / 体积)HCl/HNO₃) 中浸没基底 15 分钟。
- [0217] 13. 用去离子水浸没基底并在氮气下干燥。
- [0218] 1. 清洁晶片 :丙酮、乙醇和去离子水。
- [0219] 2. 干燥晶片 :吹干晶片并放置在 150℃热板上 5 分钟。
- [0220] 3. 将 SU8-2100 倒在晶片上
- [0221] 4. 以 3000rpm 离心晶片 1 分钟。
- [0222] 5. 在 95℃软性烘烤晶片 15 分钟。
- [0223] 6. 将晶片暴露于 UV 320mJ/cm²。
- [0224] 7. 在 95℃后烘烤晶片 10 分钟。
- [0225] 8. 用 SU-8 显影溶液显影 SU8-2100。
- [0226] 9. 吹干产物。
- [0227] 10. 在 150℃硬性烘烤 SU8-2100, 5 分钟。

- [0228] 11. 将 SU8-20250 倒在晶片上。
- [0229] 12. 以 2000rpm 离心晶片 1 分钟。
- [0230] 13. 在 95℃ 软性烘烤晶片 8 分钟。
- [0231] 14. 将晶片暴露于 UV 250mJ/cm²。
- [0232] 15. 在 95℃ 后烘烤晶片 5 分钟。
- [0233] 16. 用 SU-8 显影溶液显影 SU8-2025。
- [0234] 17. 吹干产物。
- [0235] 18. 在 150℃ 硬性烘烤 SU8-2025, 10 分钟。
- [0236] 1. 将微流体芯片的硅模具暴露于 TMSCI 蒸汽 10 分钟。
- [0237] 2. 将均匀混合的 PDMS 聚合物前体 (GE RTV 615 A 和 B, 总计 20g, 混合比 A : B = 10 : 1) 倾倒入硅模具上。
- [0238] 3. 在 80℃ 烘烤聚合物前体 48 小时。
- [0239] 4. 从硅模具上剥下 PDMS 层并冲压出入口和出口的孔。
- [0240] 5. 将 PDMS 层连接于链霉亲和素包被的 SiNP 基底上以形成微流体芯片。
- [0241] 1. 用 DiD 红色荧光染料将 MCF7 细胞染色。
- [0242] 2. 通过以 1000 ~ 1250、80 ~ 100 和 5 ~ 20 个细胞 /mL 的细胞密度将染色的 MCF7 细胞掺入兔血来制备对照样品。
- [0243] 1. 将微流体芯片连接至样品瓶。向样品瓶中加入 25 μL 生物素化的抗 -EpCAM(10 μg/mL, 在含有 1% (重量 / 体积) BSA 和 0.09% (重量 / 体积) 叠氮化钠的 PBS 中)。用溶液充满微流体芯片。孵育 30 分钟。用 PBS 清洗。
- [0244] 2. 以所需的流速将 1mL 人造血液样品压过微流体芯片。
- [0245] 3. 用 100 μL PBS 轻柔清洗微流体芯片。
- [0246] 4. 用 4% 多聚甲醛 (PFA) 的 PBS 溶液充满微流体芯片以将基底捕获的细胞固定 20 分钟。
- [0247] 5. 为了对所捕获的细胞进行染色和观察, 用 0.2% 的 Triton X-100 之 PBS 溶液替换 PFA 并孵育 10 分钟。
- [0248] 6. 用 DAPI 溶液 (1×DAPI 试剂的 1mL 去离子水溶液) 替换 Triton X-100, 保持 5 分钟。
- [0249] 7. 用 200 μL PBS 清洗微流体芯片。
- [0250] 8. 从基底上揭下微流体层, 并将基底反转至标准盖玻片上。
- [0251] 9. 用 Nikon TE2000 荧光显微镜成像并计数细胞。
- [0252] 10. 显示双染 (红色 :DiD⁺ 和蓝色 :DAPI⁺) 并符合表型形态学特征的细胞被记为 CTC。采用颜色、亮度和形态特征 (包括细胞大小、形状和细胞核大小) 鉴定潜在的 CTC 并排除细胞碎片和非特异性细胞。仅 DAPI⁺ 的细胞被计数为非特异性细胞。
- [0253] 1. 将微流体芯片连接至样品瓶。向样品瓶中加入 100 μL 生物素化的抗 -EpCAM(10 μg/mL, 在含有 1% (重量 / 体积) BSA 和 0.09% (重量 / 体积) 叠氮化钠的 PBS 中)。用溶液充满微流体芯片。孵育 30 分钟。用 PBS 清洗。
- [0254] 2. 以流速 1mL/ 小时将 1mL 患者血液样品压过微流体芯片。
- [0255] 3. 用 100 μL PBS 轻柔清洗微流体芯片。

- [0256] 4. 用 4% 多聚甲醛 (PFA) 的 PBS 溶液充满微流体芯片以将基底捕获的细胞固定 20 分钟。
- [0257] 5. 为了对捕获的细胞进行染色和观察, 用 0.2% 的 Triton X-100 之 PBS 溶液替换 PFA 并孵育 10 分钟。
- [0258] 6. 然后, 用 100 μ L 荧光团标记的抗体溶液 (起始浓度 20 μ L/1mL) 填充微流体芯片并在 4°C 在黑暗中孵育微流体芯片过夜。以流速 1mL/ 小时用 200 μ L PBS 清洗微流体芯片。
- [0259] 7. 用 100 μ L DAPI 溶液 (1 \times DAPI 试剂的 1mL 去离子水溶液) 充满微流体芯片并孵育 5 分钟。用 200 μ L PBS 清洗微流体芯片。
- [0260] 8. 从基底上揭下微流体层, 并将基底反转至标准盖玻片上。
- [0261] 1. 选择荧光显微镜设置。
- [0262] 1. 1. 优化的曝光时间
- [0263] 1. 1. 1. DAPI (蓝色) 滤片 :50ms 曝光时间 (背景 :约 1300)
- [0264] 1. 1. 2. FITC (绿色) 滤片 :300ms 曝光时间 (背景 :约 1600)
- [0265] 1. 1. 3. TRITC (红色) 滤片 :100ms 曝光时间 (背景 :约 1300)
- [0266] 1. 2. 数字转换器应被设置为 1MHz。其它设置会在绿色滤片下产生非常高的背景。
- [0267] 2. 将样品放置于显微镜上并聚焦于基底边缘。聚焦后将滤片转换至 DAPI。
- [0268] 2. 1. 从基底的右上角开始以 4 \times 或 10 \times 的放大倍数扫描直径约 7 ~ 20 μ m 的细胞核。
- [0269] 2. 2. 当定位至推定的细胞时将放大倍数增加至 10 \times 或 20 \times 。使用显微镜鼠标, 检查在 DAPI、TRITC 和 FITC 荧光下的荧光强度。样品荧光强度 > 2 \times 背景荧光强度被记作阳性结果。
- [0270] 3. 显示双染 (红色 :抗细胞角蛋白 PE⁺ 和蓝色 :DAPI⁺) 并符合标准表型形态学特征的细胞被记为 CTC。显示双染 (绿色 :抗 CD45 FITC⁺ 和蓝色 :DAPI⁺) 应作为淋巴细胞 / 非特异性细胞而被排除。在所有 3 个滤片下显示染色的物质 (绿色 + 和红色 + 和蓝色 +) 应作为细胞碎片而被排除。
- [0271] 本文引用的所有文献通过整体引用并入本文。
- [0272] 为方便起见, 以下列出本文引用的参考文献 :
- [0273] (1) Steeg, P. S. Tumor metastasis :mechanistic insights and clinical challenges. Nat Med 12,895-904(2006).
- [0274] (2) Budd, G. T. et al. Circulating Tumor Cells versus Imaging--Predicting Overall Survival in Metastatic Breast Cancer. Clinical Cancer Research 12, 6403-6409(2006).
- [0275] (3) Allard, W. J. et al. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. Clinical Cancer Research 10,6897-6904(2004).
- [0276] (4) Zieglschmid, V., Hollmann, C. & Böcher, O. DETECTION OF DISSEMINATED TUMOR CELLS IN PERIPHERAL BLOOD. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 42, 155-196(2005).

- [0277] (5) Cristofanilli, M. et al. Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine* 351, 781-791 (2004).
- [0278] (6) Racila, E. et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4589-4594 (1998).
- [0279] (7) Krivacic, R. T. et al. A rare-cell detector for cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10501-10504 (2004).
- [0280] (8) Nagrath, S. et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 450, 1235-1239 (2007).
- [0281] (9) Adams, A. et al. Highly Efficient Circulating Tumor Cell Isolation from Whole Blood and Label-Free Enumeration Using Polymer-Based Microfluidics with an Integrated Conductivity Sensor. *J Am Chem Soc* 130, 8633-8641 (2008).
- [0282] (10) Smirnov, D. A. et al. Global Gene Expression Profiling of Circulating Tumor Cells. *Cancer Research* 65, 4993-4997 (2005).
- [0283] (11) Huang, L. R. , Cox, E. C. , Austin, R. H. & Sturm, J. C. Continuous Particle Separation Through Deterministic Lateral Displacement, *Science* 304, 987-990 (2004).
- [0284] (12) Chang, W. C. , Lee, L. P. & Liepmann, D. Biomimetic technique for adhesion-based collection and separation of cells in a microfluidic channel. *Lab Chip* 5, 64-73 (2005).
- [0285] (13) Toner, M. & Irimia, D. BLOOD-ON-A-CHIP. *Annual Review of Biomedical Engineering* 7, 77-103 (2005).
- [0286] (14) Domagala, W. & Koss, L. Configuration of surfaces of human cancer cells in effusions. *Virchows Archiv B Cell Pathology Zell-pathologie* 26, 27-42 (1978).

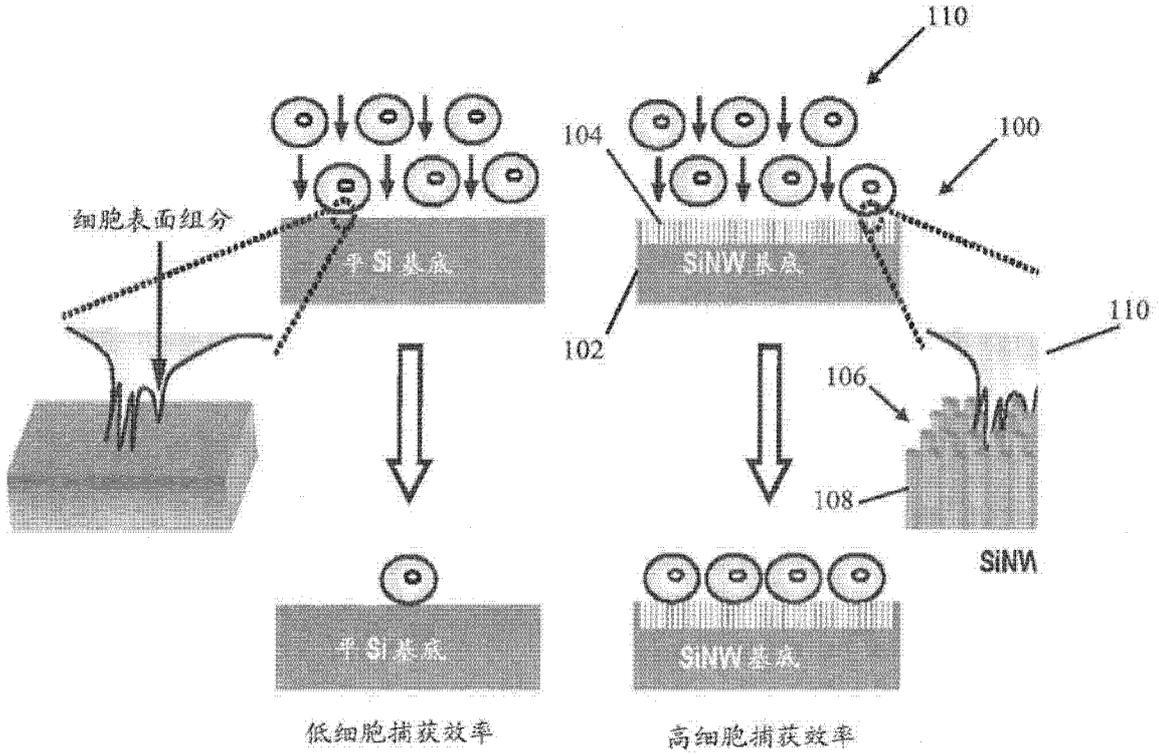


图 1

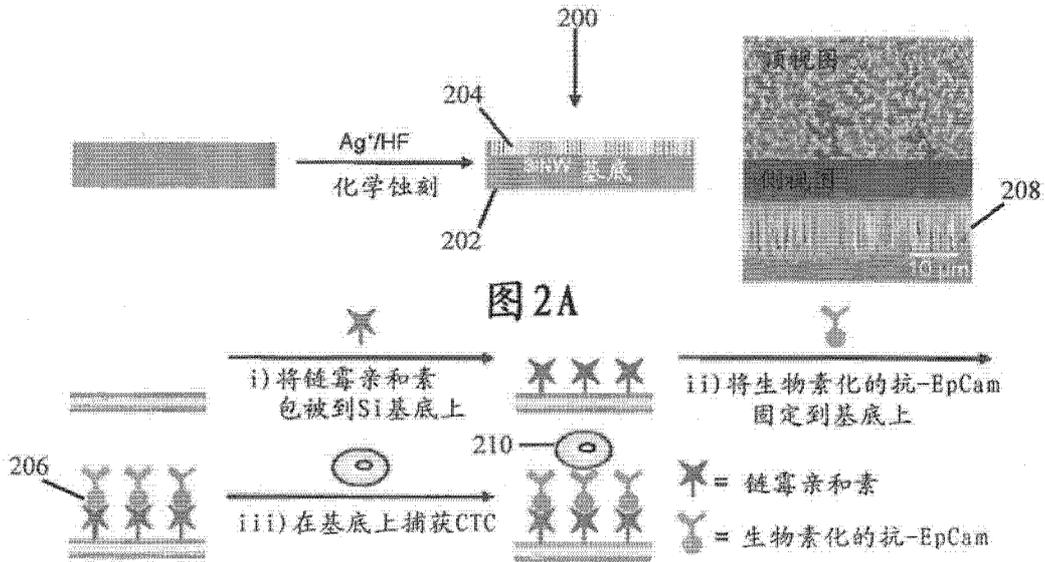


图 2B

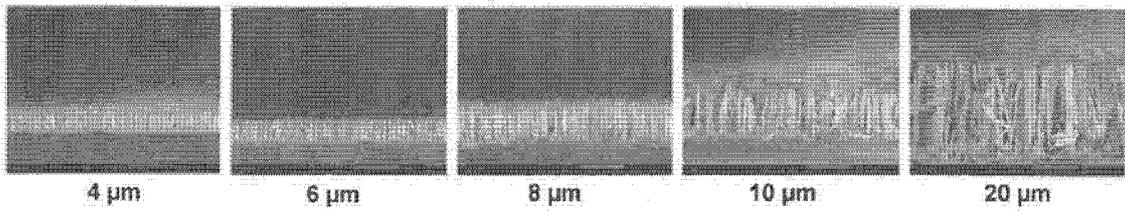


图 2C

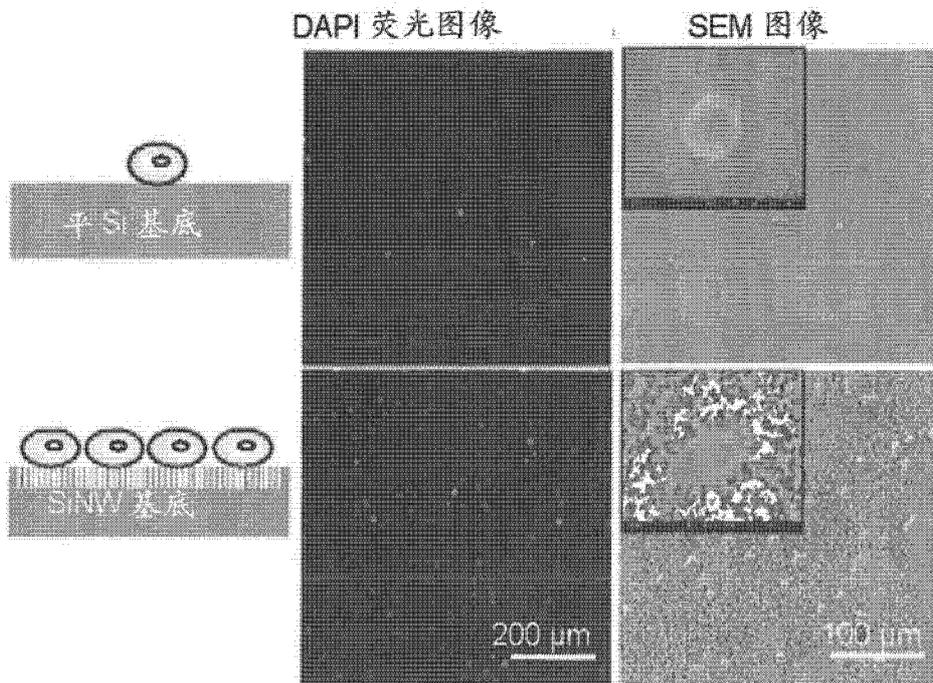


图 3A

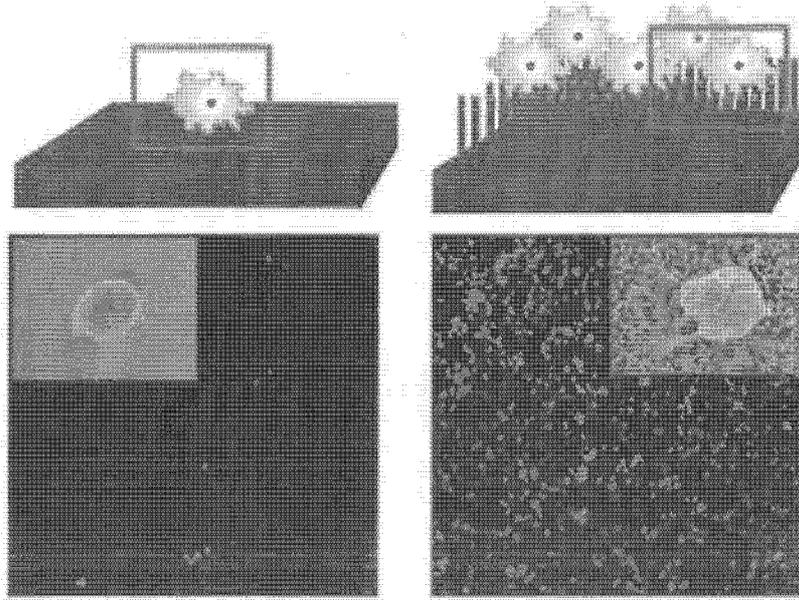


图 3B

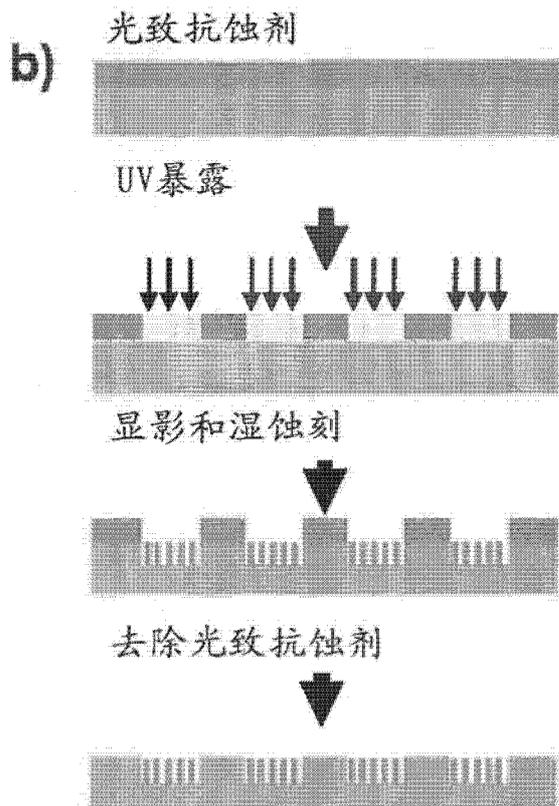


图 3C

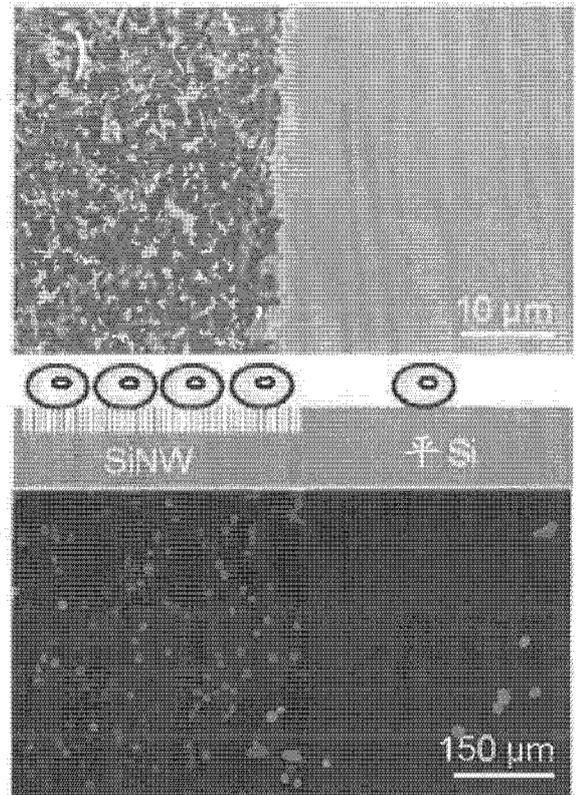


图 3D

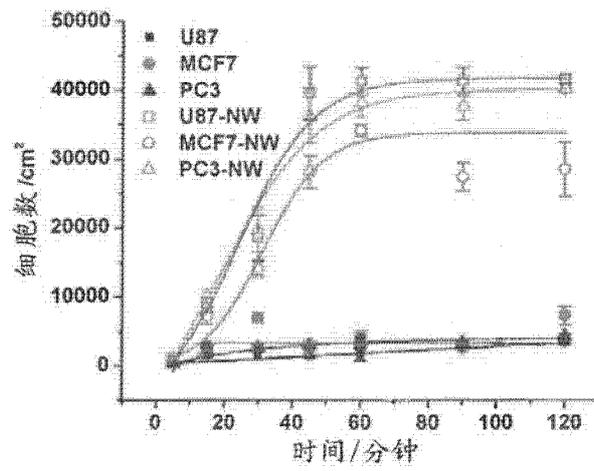


图 4A

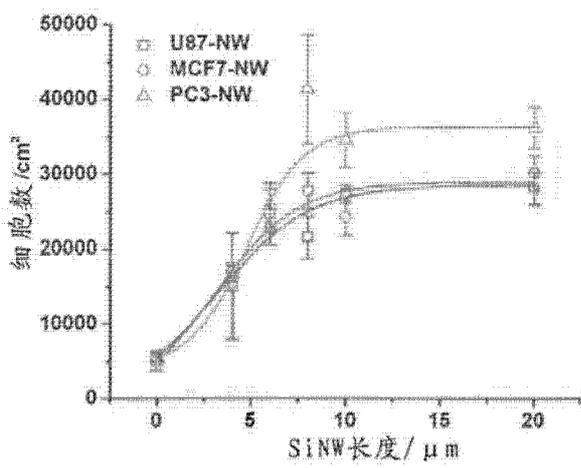


图 4B

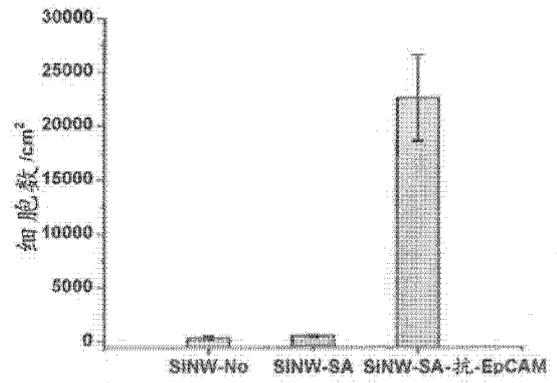


图 5

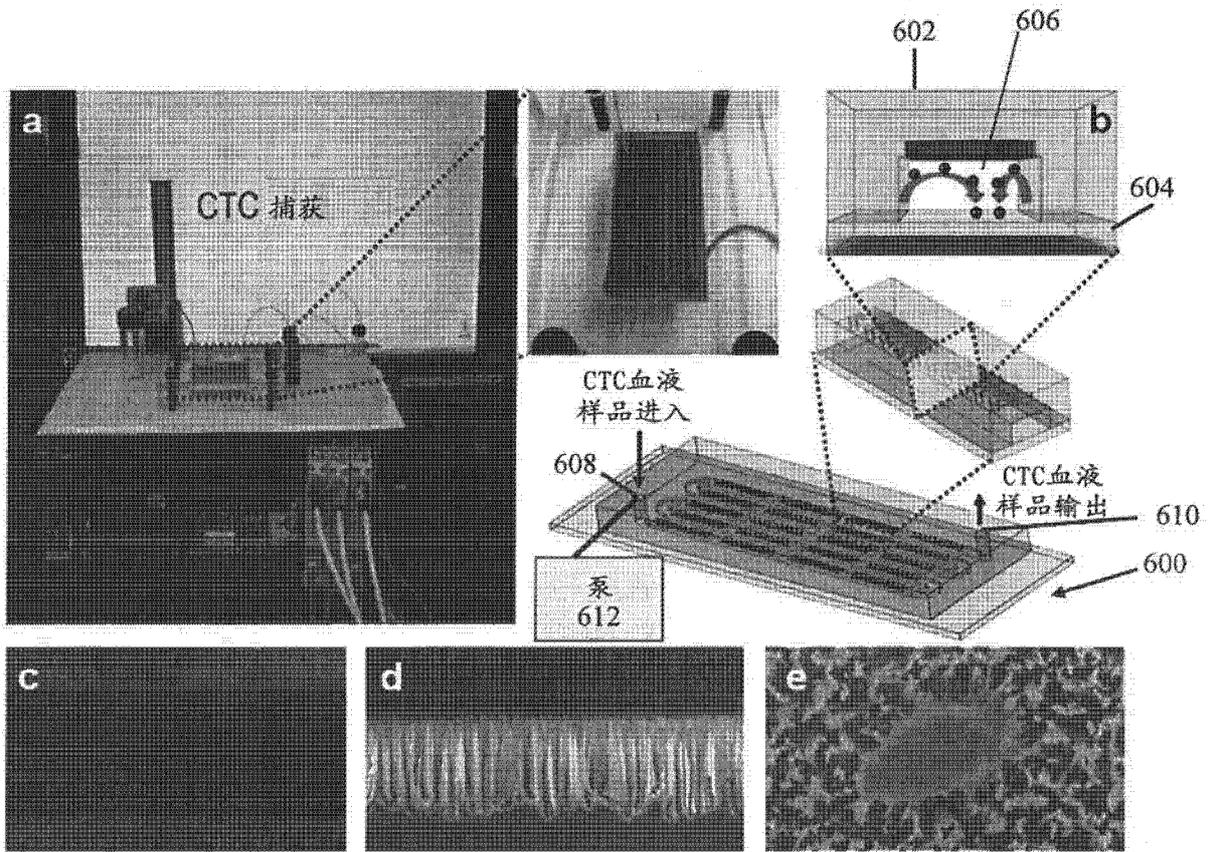


图 6A-6E

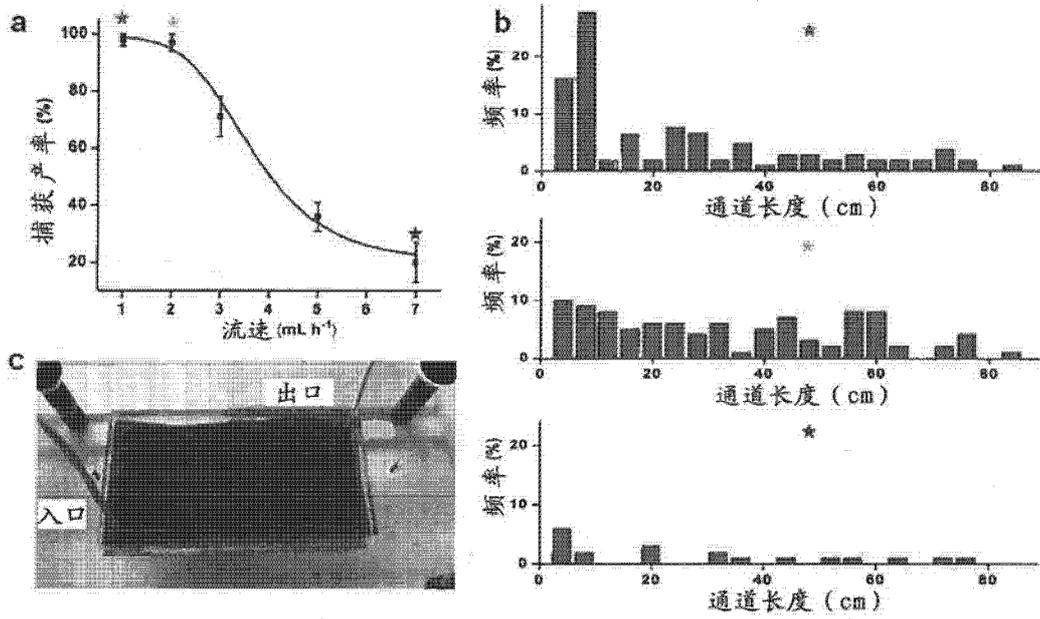


图 7A-7C

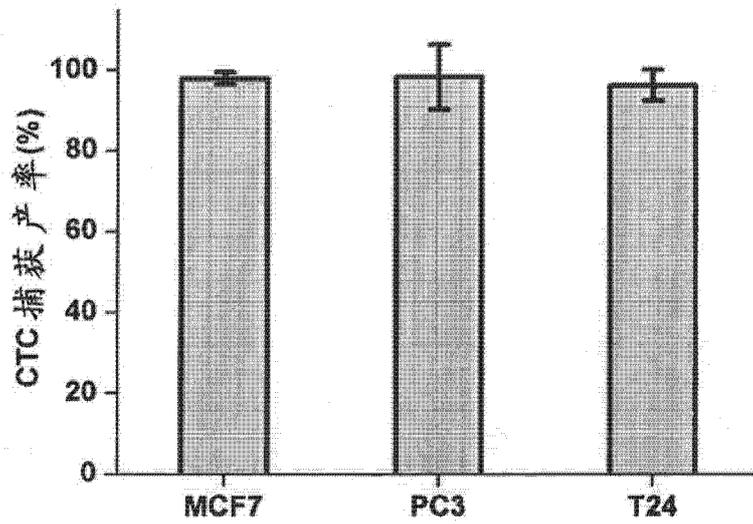


图 8

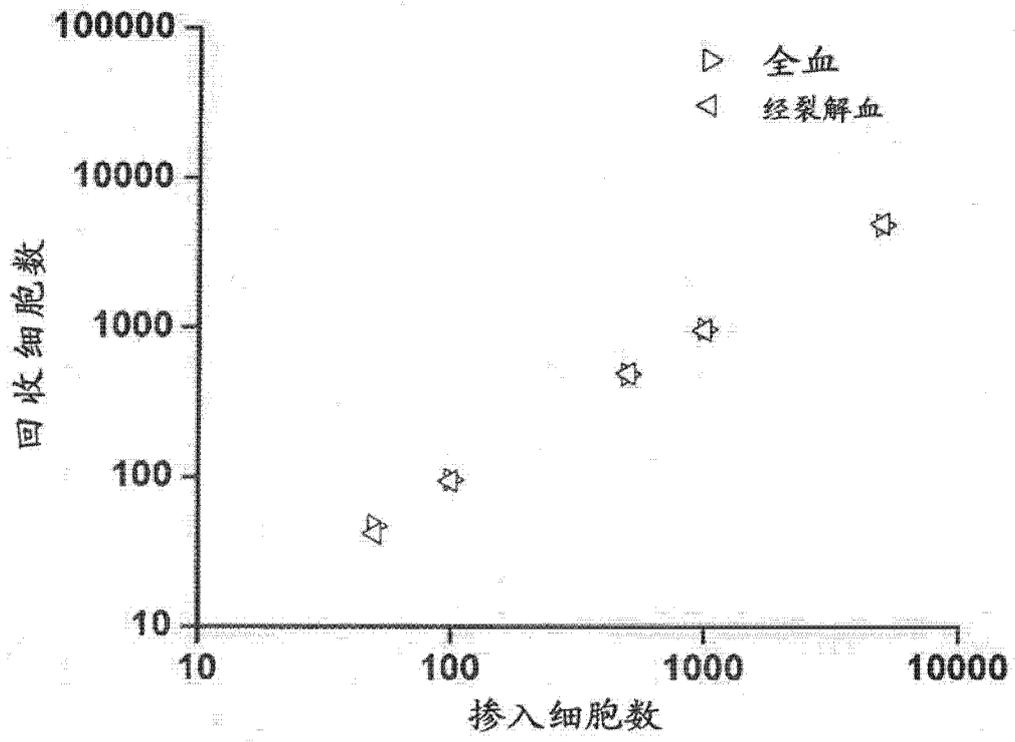


图 9

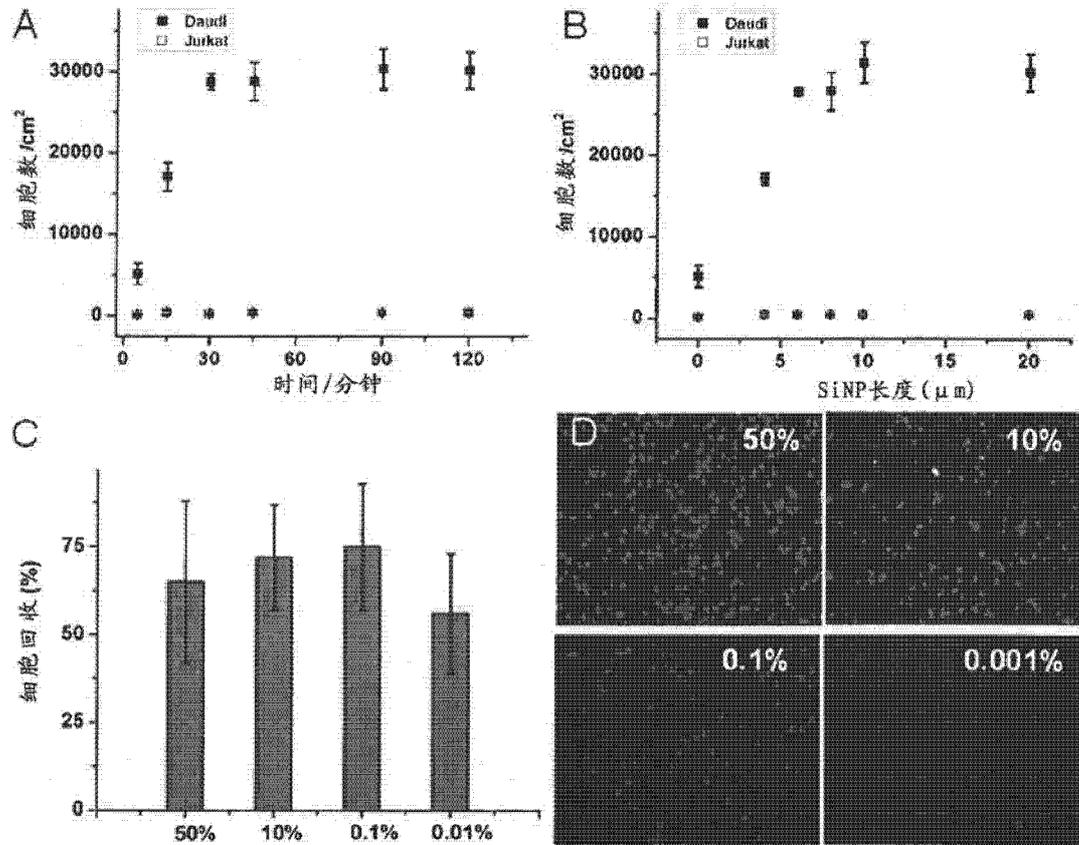
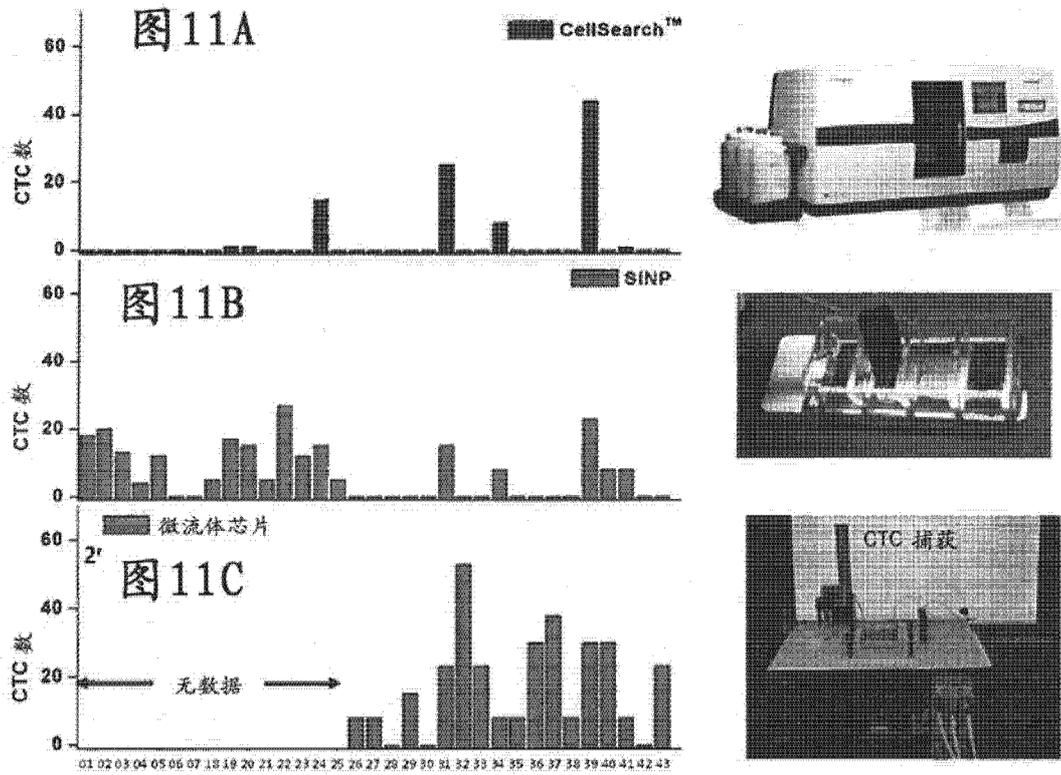


图 10A-10D



专利名称(译)	用于捕获循环细胞的装置		
公开(公告)号	CN102405411A	公开(公告)日	2012-04-04
申请号	CN201080017232.8	申请日	2010-03-18
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
当前申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
[标]发明人	曾宪荣 王树涛 王浩 刘侃		
发明人	曾宪荣 王树涛 王浩 刘侃		
IPC分类号	G01N33/53 B82B3/00 C12Q1/02 G01N33/574 C12N5/09		
CPC分类号	B01L2300/0816 B01L2300/0636 G01N33/54366 B01L3/502707 B01L3/502761 B01L2200/0668 B01L2300/0887 B01L2300/0877 G01N33/57492		
优先权	61/301839 2010-02-05 US 61/161248 2009-03-18 US		
其他公开文献	CN102405411B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于捕获稀少细胞的装置和方法。使用本文所述的装置和方法可用于辅助诊断和监测转移癌。

