



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107085107 A

(43)申请公布日 2017.08.22

(21)申请号 201710250399.2

(22)申请日 2017.04.17

(71)申请人 无锡准因生物科技有限公司

地址 214000 江苏省无锡市新吴区菱湖大道200号中国传感网国际创新园E2-518

(72)发明人 林泉 俞珏华 程禹

(74)专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理事务所(普通合伙) 11411

代理人 黄冠华

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

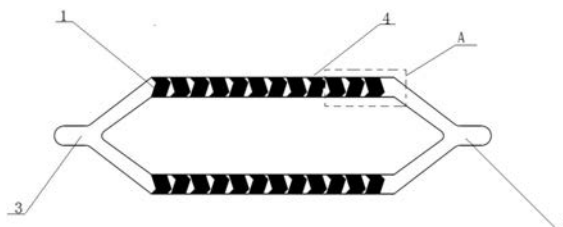
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统,采用以下步骤制备:一、制作从入口处分为2条以上平行的微流体信道,微流体信道内设置有若干个鱼骨结构的PDMS微流体管道系统;二、硅纳米线基底的刻蚀;三、硅纳米线的表面修饰和生物素生物功能化、四、硅纳米线基底的修饰和PDMS微流体芯片的组装。该系统在使用时将待测样本细胞与生物素修饰的p-EpCAM和p-cKit的200 μL PBS溶液共孵育1小时,然后注射进入微流体系统内进行检测。本发明的微流体系统可以识别和结合出含量极低的CTC,可以进行传统的免疫荧光染色,得到检出结果和表型分析结果,也可以进一步特异性释放,实现CTC的纯化,提高纯度以适应基因检测限度的要求。



1. 一种检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统,其特征在於,采用以下步骤制备:

一、PDMS微流体芯片的制作

PDMS微流体管道系统包括一个入口和一个出口,从入口处分为2条以上平行的微流体信道,微流体信道内设置有若干个鱼骨结构,在入口和出口处均设置有PDMS孔洞;

二、硅纳米线基底的刻蚀

1)、在硅片上旋转涂覆SU-8光阻胶,通过标准光刻方法限定刻蚀区域,仅刻蚀平行的微流体信道需要覆盖的区域;

2)、通过NH₄F/AgNO₃试剂引入Ag纳米颗粒沉积,在硅片表面形成纳米粒子膜;

3)、采用H₂O₂/NH₄F进行刻蚀,得到与平行的微流体信道相对应的纳米线;

4)、先采用浓硝酸洗去Ag纳米颗粒,然后采用浓硫酸/双氧水混合溶液清洗硅片表面,然后去离子水洗涤干净;浓硫酸/双氧水的体积比为3:1;

三、硅纳米线的表面修饰和生物功能化

1)、用无水乙醇清洗硅纳米线基底,超净环境下N₂气吹干;

2)、新鲜制备的质量浓度为1.0%的3-氨基丙基三乙氧基硅烷的甲苯溶液,并将清洗干燥后的具有硅纳米线的硅片浸泡在其中半小时;

3)、取出表面键合3-氨基丙基三乙氧基硅烷的硅片,用工业级乙醇清洗,N₂气吹干;

4)、将硅片在新鲜制备的50ng/mL的聚乙二醇2-氨基乙基醚生物素PBS溶液中静置3小时,以工业级乙醇清洗,N₂气吹干后保存在4℃干燥环境下备用;

5)、在样品测试前,用PBS清洗芯片表面两次后,加入200μL的5.0μM链霉亲和素溶液,37℃孵育1小时;PBS清洗后,再和含有生物素修饰的p-EpCAM和p-cKit两种多肽的200μL PBS溶液共孵育1小时,以PBS清洗后用于CTC的捕获;

四、硅纳米线基底的修饰和PDMS微流体芯片的组装

1)、制备5.0μM的链霉亲和素PBS溶液200μL,覆盖在PDMS微流体芯片上,于37℃静置1小时,PBS清洗三遍;PBS清洗后,再和含有生物素修饰的p-EpCAM和p-cKit两种多肽的200μL PBS溶液共孵育1小时,以PBS清洗后用于CTC的捕获;

2)、再将硅纳米线基底的芯片放置到芯片载台上,并将平行的微流体信道与纳米线相对应,再以载台的上盖压住微流体芯片;

3)、将入口和出口处的PDMS孔洞连接分别连接Tygon流体输送管,并和已经安装在注射泵上的注射器链接。

2. 如权利要求1所述的检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统,其特征在於,所述的鱼骨结构为由PDMS打印成的若干个V形槽,单个鱼骨结构内V形槽相互平行,相邻的鱼骨结构的V形槽的顶角上下交错。

3. 如权利要求2所述的检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统,其特征在於,硅纳米线基底的刻蚀时选用厚度为0.7毫米、长为50毫米和宽为25毫米的硅片,纳米线长度为2~5微米。

4. 如权利要求1所述的检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统,其特征在於,硅纳米线基底的刻蚀时步骤2)中Ag纳米颗粒沉积小于等于50nm。

5. 如权利要求3所述的检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统,其特征在於,

所述PDMS微流体管道系统从入口处分为2条平行的微流体信道,各信道长为25mm,宽位2mm;所述微流体信道内鱼骨结构的宽为50微米,间距50微米,高30微米。

6.如权利要求1所述的检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统,其特征在于,所述PDMS微流体管道的各分流处设置有圆角。

7.如权利要求1-6任一项所述的检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统的使用方法,其特征在于,包括以下步骤:

1)、将待测样本细胞与含有生物素修饰的p-EpCAM和p-cKit两种多肽的200 μ L PBS溶液共孵育1小时,之后以1000rpm的离心方式分离出有生物素修饰p-EpCAM和p-cKit两种多肽特异性吸附的细胞进行检测;

2)、将细胞待测样本通过注射器注射进入微流体系统内进行检测。

一种检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及用于循环肿瘤细胞检测的微流体系统,具体为一种检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的基于硅纳米线基底的微流体系统。

背景技术

[0002] 随着污染程度的增加,肿瘤的患病几率已经高于1/3的比例。对于肿瘤的诊断方法主要包括:病理学(活检切片);影像学(超声、X光、CT或PET等)和血清学(血清肿瘤相关蛋白,如CA-125、CA-199或CEA等)。然而这些方法对存在自身的缺陷,不能为不断变化肿瘤和诊断预警提供帮助。目前临床公认的人外周血循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cell,简称CTC)检测目前已被公认为最好检测手段之一。

[0003] 在2004年,美国药品与食品监督管理局首次批准通过了第一个有关CTC富集和计数的技术产品。这一产品是利用细胞表面所表达的上皮细胞粘附分子(EpCAM)与干细胞因子受体(cKit)来完成细胞的分选的。EpCAM在绝大多数的上皮细胞上多有表达,因此在来源于上皮细胞的肿瘤细胞中也有表达。c-Kit是典型的Ⅲ型受体酪氨酸激酶,在肿瘤的发生发展以及侵袭、迁移和复发过程中起着十分重要的作用,是目前肿瘤分子靶向治疗的热门靶标之一。修饰有anti-EpCAM或anti-cKit的磁珠与固化的血液细胞相互作用,这样一来所有表达EpCAM或cKit的细胞表面都会附着一些磁珠,最后再通过磁场进行分选。要进一步识别双阳性CTC,所有被捕获的细胞会首先从磁珠上解离下来,然后用细胞角蛋白Krt19以及白细胞抗原(CD45)的荧光抗体进行标记。在这一系统中,对于CTC的技术定义是EpCAM+/cKit+/CD45-有细胞核的物体。该设备和方法已被作为一个嵌入式生物标志物应用在几个治疗相关的临床试验中。首个有关CTC计数检测的大规模临床试验是于2004年进行的,主要针对已经发生转移的乳腺癌病人。这次试验所得出的治疗前和治疗期间的CTC检测结果同时预测了无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)。很短的时间内,在多种不同的癌症研究中也进行了类似的CTC计数测试,其中就包括肠癌、皮肤癌、肺癌和前列腺癌,并且得出了类似的发现。值得注意的是,这些研究大多将CTC计数检测结果分为两类:定性的作为(对于评价病人病情)有利或者不利,而不是把他们作为一个可连续变化的定量数据。

[0004] 目前CTC技术的局限性所带来的各种问题。首先,在CTC研究中检测灵敏度还是至关重要的影响因素。FDA批准通过的CTC技术在50%的食管鳞状细胞癌病人都无法检测出CTC。其次,基于EpCAM单独抗体的CTC富集技术会无法检测出正在发生上皮间质化转化的肿瘤细胞。早期的CTC研究已经证明有些病人的CTC具有间质化特征,所以通常认为上皮间质化现象在CTC的产生过程中起着非常重要的作用。第三,仅仅对CTC进行计数,忽视了CTC中亚群的重要意义。在最近的研究中显示,一些CTC所具有的特异形貌特征和剪接变异体的表达与肿瘤内脏转移和癌症抗药性有关联。这些发现都指出CTC作为肿瘤标志物,不仅仅用来做计数。第四,将血液样品先固定化再进行检测的方法会限制分离CTC后下游的分子分析研究。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现CTC检测时纯度和灵敏度不够高,同时捕获的CTC不能继续用于后序研究的缺陷,提供一种检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的基于硅纳米线基底的微流体系统。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供了如下的技术方案:

[0007] 一种检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统,采用以下步骤制备:

[0008] 一、PDMS微流体芯片的制作

[0009] PDMS微流体管道系统包括一个入口和一个出口,从入口处分为2条以上平行的微流体信道,微流体信道内设置有若干个鱼骨结构;优选的鱼骨结构为由PDMS打印成的若干个V形槽,单个鱼骨结构内V形槽相互平行,相邻的鱼骨结构的V形槽的顶角上下交错;在入口和出口处均设置有PDMS孔洞;

[0010] 优选的所述PDMS微流体管道系统从入口处分为2条平行的微流体信道,各信道长为25mm,宽位2mm;所述微流体信道内鱼骨结构的宽为50微米,间距50微米,高30微米。这种鱼骨结构增加了细胞捕捉效率,而且可以在流道内产生明显的涡流,可以批量低成本生产。

[0011] 优选的,所述PDMS微流体管道的各分流处设置有圆角,一方面增加样本导流,另一方面减低细胞因剪切力造成的伤害。在进入信道0.5mm处才开始产生由鱼骨结构产生的涡流效应,鱼骨结构对细胞溶液搅动,增加细胞接触硅纳米线的机会;

[0012] PDMS微流体管道系统采用单进单出的设计,以及较大的流道设计实现了高通量CTC纯化方法,与传统方法相比,可减少一半的操做时间,而且搭配分析软件后可以用作影像分析。

[0013] 二、硅纳米线基底的刻蚀

[0014] 1)、在硅片上旋转涂覆SU-8光阻胶,通过标准光刻方法限定刻蚀区域,仅刻蚀平行的微流体信道需要覆盖的区域;优选的,硅纳米线基底的刻蚀时选用厚度为0.7毫米、长为50毫米和宽为25毫米的硅片,钠米线长度为2~5微米。

[0015] 2)、通过NH₄F/AgNO₃试剂引入Ag纳米颗粒沉积,在硅片表面形成纳米粒子膜;优选的,Ag纳米颗粒沉积小于等于50nm;优选的,采用超声波震荡辅助Ag纳米颗粒的沉积;更能均匀的蚀刻出均匀的纳米线,粗细均匀的纳米线比较均匀、平整,提供了更好的细胞捕捉环境,有利于增加纯化后细胞的存活率;

[0016] 3)、采用H₂O₂/NH₄F进行刻蚀,得到与平行的微流体信道相对应的钠米线;

[0017] 4)、先采用浓硝酸洗去Ag纳米颗粒,然后采用浓硫酸/双氧水混合溶液清洗硅片表面,然后去离子水洗涤干净;浓硫酸/双氧水的体积比为3:1;

[0018] 优选的,硅纳米线基底的刻蚀时选用厚度为0.7毫米、长为50毫米和宽为25毫米的硅片,钠米线长度为2~5微米,最佳CTC捕获效率钠米线长度3μm;

[0019] 本发明的硅纳米线基底的刻蚀,与传统的硅纳米线不同,没有引入HF这种对环境和操作者具有非常大危害的试剂,在保护环境的同时可以将整个操作和制备过程在普通化学实验室中完成,为后期产品生产提供容易的制作条件,同时确保了材料表面的生物安全性,更适合细胞捕捉之用。制作而成的硅纳米线基底芯片可与病理载玻片搭配使用,可以用于荧光分析,也可以与标准的病理分析切片一样储存。

[0020] 三、硅纳米线的表面修饰和生物功能化

[0021] 1)、用无水乙醇清洗硅纳米线基底,超净环境下N₂气吹干;

[0022] 2)、新鲜制备的质量浓度为1.0%的3-氨基丙基三乙氧基硅烷的甲苯溶液,并将清洗干燥后的具有硅纳米线的硅片浸泡在其中半小时;优选的,可以使用转速为60rpm的震荡槽增加反应速率;

[0023] 3)、取出表面键合3-氨基丙基三乙氧基硅烷的硅片,用工业级乙醇清洗,N₂气吹干;

[0024] 4)、将硅片在新鲜制备的50ng/mL的聚乙二醇2-氨基乙基醚生物素PBS溶液中静置3小时,以工业级乙醇清洗,N₂气吹干后保存在4℃干燥环境下备用;

[0025] 5)、在样品测试前,用PBS清洗芯片表面两次后,加入200μL 5.0μM链霉亲和素溶液,37℃孵育1小时;PBS清洗后,再和含有生物素修饰的p-EpCAM和p-cKit两种多肽的200μL PBS溶液共孵育1小时,以PBS清洗后用于CTC的捕获;

[0026] 本步骤通过安全的化学键和方法将硅纳米线表面修饰上生物素,再通过链霉亲和素的引入,进一步将具有CTC识别功能的多肽分子修饰在其表面,便于后期专一性的细胞捕获后的剪切与释放;由于PEG分子量为2300,可以用来减少非特异性吸附,PEG的吸水能力可以明显地避免细胞破裂造成的细胞死亡,增加在后续CTC的分子分析的可行性。

[0027] 四、硅纳米线基底的修饰和PDMS微流体芯片的组装

[0028] 1)、制备5.0μM的链霉亲和素PBS溶液200μL,覆盖在PDMS微流体芯片上,于37℃静置1小时, PBS清洗三遍;PBS清洗后,再和含有生物素修饰的p-EpCAM和p-cKit两种多肽的200μL PBS溶液共孵育1小时,以PBS清洗后用于CTC的捕获;

[0029] 2)、再将硅纳米线基底的芯片放置到芯片载台上,并将平行的微流体信道与纳米线相对应,再以载台的上盖压住微流体芯片;

[0030] 3)、将入口和出口处的PDMS孔洞连接分别连接Tygon流体输送管,并和已经安装在注射泵上的注射器链接。

[0031] 本发明的检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统的使用方法,包括以下步骤:

[0032] 1)、将待测样本细胞与含有生物素修饰的p-EpCAM和p-cKit两种多肽的200μL PBS溶液共孵育1小时,之后以1000rpm的离心方式分离出有生物素修饰p-EpCAM和p-cKit两种多肽的细胞进行检测;p-EpCAM,p-cKit是两种特异性高的多肽分子,无论是对人工样品和血液样品都具有较高的特异性;

[0033] 2)、将细胞待测样本通过注射器注射进入微流体系统内进行检测。

[0034] 本发明通过硅纳米线基底的表面修饰和生物素功能修饰与PDMS微流体管道系统相配合,待测样本细胞采用有生物素修饰的p-EpCAM和p-cKit两种多肽分子共孵后,可以识别和结合出含量极低的CTC,结合捕获后的CTC被吸附在硅纳米线表面,可以进行传统的免疫荧光染色,得到检出结果和表型分析结果,也可以进一步释放,实现CTC的纯化,提高纯度以适应基因检测限度的要求,适合用于分子诊疗和精准医疗的要求,因为用于释放CTC的试剂主要针对的是与CTC结合的多肽分子,所以释放具有特异性,最终收集的CTC样品具有很高的纯度,为后期的基因检测提供可能。

附图说明

[0035] 附图用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与本发明的实施例一起用于解释本发明,并不构成对本发明的限制。在附图中:

[0036] 图1是本发明实施例的PDMS微流体管道系统的结构示意图;

[0037] 图2是图1中A处的放大结构示意图;

[0038] 图3是在PDMS微流体管道系统的平行信道内不设置鱼骨结构时细胞的流动模拟图;

[0039] 图4是在PDMS微流体管道系统的平行信道内设置鱼骨结构时细胞的流动模拟图;

[0040] 图5是在PDMS微流体管道系统分流处设置圆角时的细胞流速模拟图。

具体实施方式

[0041] 以下结合附图对本发明的优选实施例进行说明,应当理解,此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明,并不用于限定本发明。

[0042] 实施例1

[0043] 一种检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统,采用以下步骤制备:

[0044] 一、PDMS微流体芯片的制作

[0045] PDMS微流体管道系统包括一个入口和一个出口,PDMS微流体管道系统从入口处分为2条平行的微流体信道,各分流处设置有圆角,各信道长为25mm,宽位2mm;所述微流体信道内鱼骨结构的宽为50微米,间距50微米,高30微米,如图1所示,其中1为鱼骨结构,2为入口,3为出口,4为微流体信道。图5显示了分流处圆角设计对流速的影响。在图5中,纵轴与横轴都是流道大小,单位为毫米,右边图例显示了流速的大小;从图5中可知,圆角分流设计时,可以产生一层慢速层在圆角分流处,如图圈选位置所示,该圆角分流处产生的慢速层可以有效的减少细胞在流动时,因为撞击而产生的破坏,也因此提升了细胞的生物完整性。

[0046] 鱼骨结构为由PDMS打印成的若干个V形槽,单个鱼骨结构内V形槽相互平行,相邻的鱼骨结构的V形槽的顶角上下交错,如图2所示;在入口和出口处均设置有PDMS孔洞;

[0047] 在图3和图4中纵轴与横轴都是流道大小,单位为毫米,右边图例显示了流速的大小;由图3和图4可知,当没有鱼骨结构时,流体为稳定的层流状态,表示流体没有受到扰动,细胞也因而不会增加与底部的接触机会;而设置了鱼骨结构后,流体有明显的流速差异,以及产生许多扰乱流动的现象。与没有鱼骨相比,流体内的颗粒(或细胞)在这个流动的情况下,与底下面积接触的机会增加了。

[0048] 分别打印出微流体通道结构和鱼骨结构的掩模板;

[0049] 二、硅纳米线基底的刻蚀

[0050] 1)、选用厚度为0.7毫米、长为50毫米和宽为25毫米的硅片,在硅片上旋转涂覆SU-8光阻胶,旋转涂布转速为3000rpm,利用流体信道掩模板光照通道结构区域,成像后得到通道结构;

[0051] 2)、通过NH₄F/AgNO₃试剂引入小于等于50nm的Ag纳米颗粒沉积,在硅片表面形成纳米粒子膜;

[0052] 3)、采用H₂O₂/NH₄F进行刻蚀,得到与平行的微流体信道相对应的纳米线,纳米线长

度为2~5微米；

[0053] 4)、先采用浓硝酸洗去Ag纳米颗粒,然后采用浓硫酸/双氧水混合溶液清洗硅片表面,然后去离子水洗涤干净;浓硫酸/双氧水的体积比为3:1;

[0054] 三、硅纳米线的表面修饰和生物功能化

[0055] 1)、用无水乙醇清洗硅纳米线基底,超净环境下N₂气吹干;

[0056] 2)、新鲜制备的质量浓度为1.0%的3-氨基丙基三乙氧基硅烷的甲苯溶液,并将清洗干燥后的具有硅纳米线的硅片浸泡在其中半小时;优选的,可以使用转速为60rpm的震荡槽增加反应速率;

[0057] 3)、取出表面键合3-氨基丙基三乙氧基硅烷的硅片,用工业级乙醇清洗,N₂气吹干;

[0058] 4)、将硅片在新鲜制备的50ng/mL的聚乙二醇2-氨基乙基醚生物素PBS溶液中静置3小时,以工业级乙醇清洗,N₂气吹干后保存在4℃干燥环境下备用;

[0059] 5)、在样品测试前,用PBS清洗芯片表面两次后,加入200μL的5.0μM链霉亲和素溶液,37℃孵育1小时;PBS清洗后,再和含有生物素修饰的p-EpCAM和p-cKit两种多肽的200μL PBS溶液共孵育1小时,清洗后用于CTC的捕获;

[0060] 四、硅纳米线基底的修饰和PDMS微流体芯片的组装

[0061] 1)、制备5.0μM的链霉亲和素PBS溶液200μL,覆盖在PDMS微流体芯片上,于37℃静置1小时,PBS清洗三遍;PBS清洗后,再和含有生物素修饰的p-EpCAM和p-cKit两种多肽的200μL PBS溶液共孵育1小时,以PBS清洗后用于CTC的捕获;

[0062] 2)、再将硅纳米线基底的芯片放置到芯片载台上,并将平行的微流体信道与纳米线相对应,再以载台的上盖压住微流体芯片;

[0063] 3)、将入口和出口处的PDMS孔洞连接分别连接Tygon流体输送管,并和已经安装在注射泵上的注射器链接。

[0064] 本发明的检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统的使用方法,包括以下步骤:

[0065] 1)、将待测样本细胞与含有生物素修饰的p-EpCAM和p-cKit两种多肽的200μL PBS溶液共孵育1小时;之后以1000rpm的离心方式分离出有生物素修饰p-EpCAM和p-cKit两种多肽的细胞进行检测;

[0066] 2)、将200μL模拟样品装入1mL注射器中,连接好注射系统;

[0067] 3)、注射完毕后,在注射器中装载100μL浓度为1%的PFA(多聚甲醛)溶液,以流速1.0mL/h流经芯片组,对捕获的细胞进行固定;

[0068] 4)、拆装芯片组后,取出硅纳米线基底载玻片;

[0069] 5)、PBS清洗后,将制备的一抗:5μM细胞角蛋白抗体anti-Krt19和5μM CD45抗体(anti-CD45)混合溶液200μL覆盖在硅纳米线区域,4℃下,静置8小时;

[0070] 6)、之后清洗,并标准方法进行二抗的染色。对应CK抗体为Alex488标记,对应CD45抗体为Alex555标记,二抗染色为室温下40分钟;

[0071] 7)、以PBS清洗二次后,尽量吸取除去表面的溶液残留,并用含有Hoechst(DAPI)染核试剂的封固液60μL封装,加盖盖玻片;

[0072] 8)、进行荧光成像并进行计数。

[0073] 9)、将成像结果中Krt19+/CD45-/DAPI+的细胞计数为捕获的癌细胞,通过对比起始加入的癌细胞数目200颗,计算得出相应的捕获效率。

[0074] 干扰实验

[0075] 提取健康人血液中的白细胞作为干扰细胞 $2.0 \times 10^6/\text{mL}$,制备模拟样品,并比较了对于不同类型的癌细胞(KYSE-30,KYSE-150和KYSE-180)的捕获能力,证明与实际血液中白细胞等量的干扰,不会影响检测的效率。

[0076] 癌症患者血液样本应用举例

[0077] 一、用BD Vacutainer Glass ACD Solution A tube采集肿瘤患者外周血,分两次收集(以避免EDTA抗凝对于血液中细胞表面的抗原损伤,导致影响捕获抗体的结合,降低捕获效率)

[0078] 采血的第一管只抽取2mL,并不用来进行测试,因为存在血液中存在针头刺入时脱落的上皮细胞,出现假阳性细胞读出。第二管抽取4mL用于后续实验。

[0079] 二、采取梯度密度离心对收集的第二管血液样本进行初步纯化

[0080] (a) 加入4mL PBS溶液,对于血样进行等体积稀释

[0081] (b) 混合均匀后,在已经加入4mL梯度密度离心液(1077)的15mL离心管中缓慢加入稀释后的血液样品。

[0082] (c) 采用300g,40分钟进行离心。

[0083] (d) 离心结束后收取约2-4mL的单核细胞层(PBMC, peripheral blood mononuclear cell)。

[0084] (e) 对收取的单核细胞层进行离心,400g,5分钟,去除上层清液

[0085] (f) 用2mL PBS进行清洗。

[0086] (g) 离心去除上层清液后,加入新鲜制备的 $5\mu\text{M}$ 细胞角蛋白抗体19(anti-Krt19)和 $5\mu\text{M}$ CD45抗体(anti-CD45)混合溶液 $400\mu\text{L}$,打散细胞聚集, 37°C 下共孵育45分钟。

[0087] (h) 清洗,并定容在 $400\mu\text{L}$ PBS中,进行后续实验

[0088] 结果:

[0089] 在收集和研究的9个样本中(6个食管鳞状细胞癌病人和3个健康人),收集了CTC的细胞悬浮液。在中和、清洗之后,CTC细胞沉积(cell pellet)使用全基因组扩增试剂盒进行DNA提取和扩增。之后,针对食管鳞状细胞癌标志性基因PIK3CA进行了扩增和Sanger测序。结果PIK3CA亚型在6个食管鳞状细胞癌患者中都有检出,而3个健康人样本中没有检出。

[0090] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

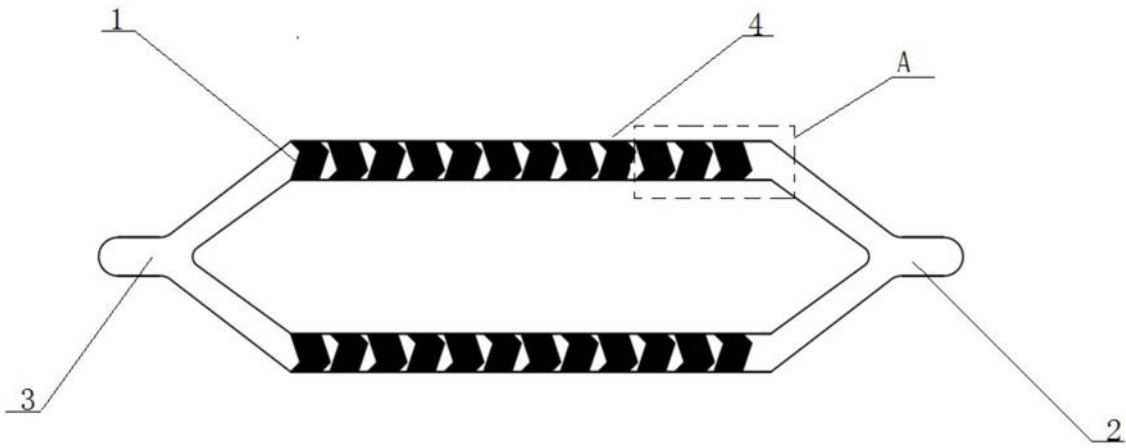


图1

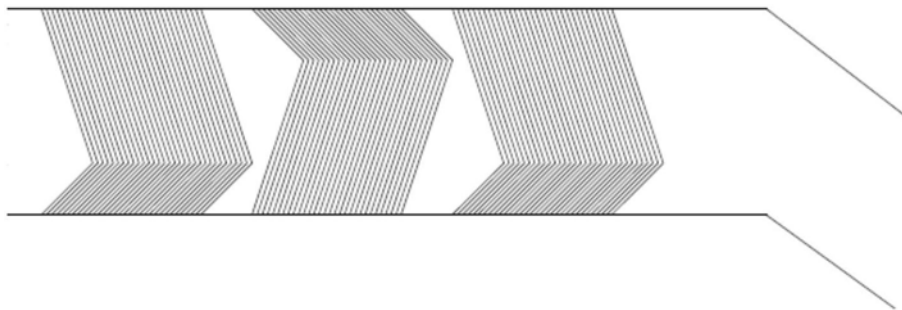


图2

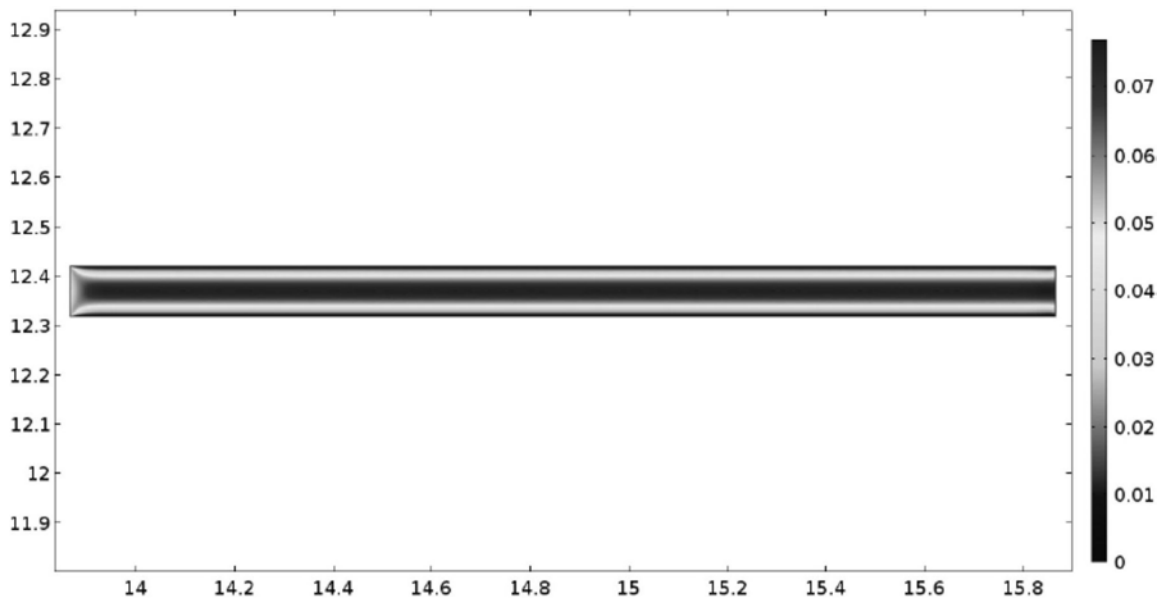


图3

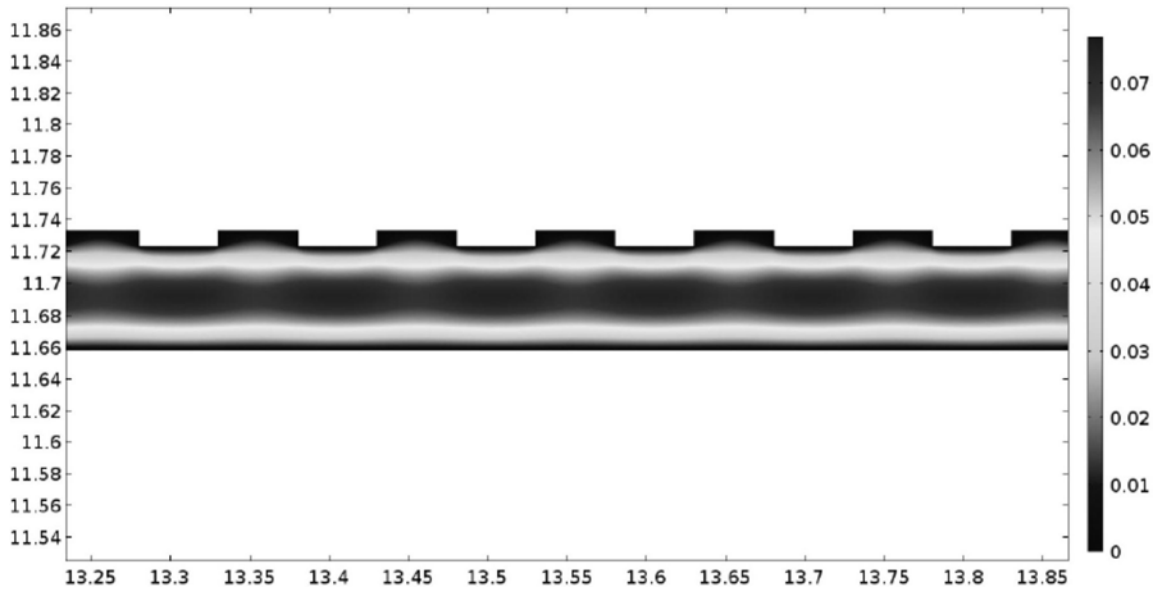


图4

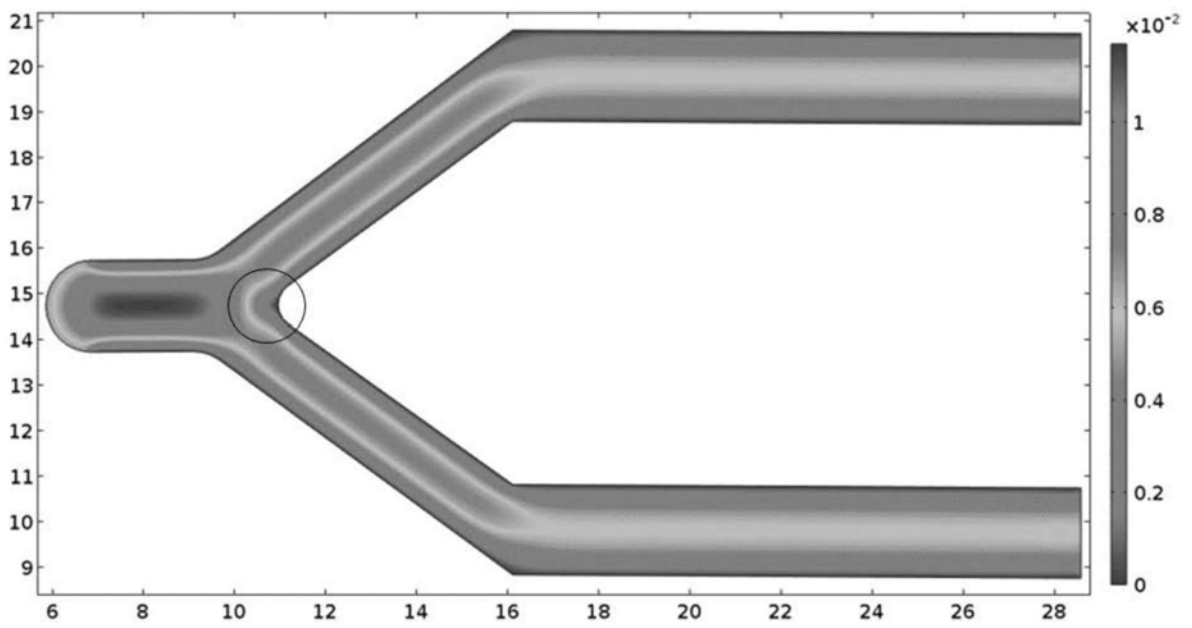


图5

专利名称(译)	一种检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统及其应用		
公开(公告)号	CN107085107A	公开(公告)日	2017-08-22
申请号	CN201710250399.2	申请日	2017-04-17
[标]发明人	林泉 俞珏华 程禹		
发明人	林泉 俞珏华 程禹		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/57407 G01N33/531		
代理人(译)	黄冠华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测食管鳞状细胞癌循环肿瘤细胞的微流体系统,采用以下步骤制备:一、制作从入口处分为2条以上平行的微流体信道,微流体信道内设置有若干个鱼骨结构的PDMS微流体管道系统;二、硅纳米线基底的刻蚀;三、硅纳米线的表面修饰和生物素生物功能化、四、硅纳米线基底的修饰和PDMS微流体芯片的组装。该系统在使用时将待测样本细胞与生物素修饰的p-EpCAM和p-cKit的200μL PBS溶液共孵育1小时,然后注射进入微流体系统内进行检测。本发明的微流体系统可以识别和结合出含量极低的CTC,可以进行传统的免疫荧光染色,得到检出结果和表型分析结果,也可以进一步特异性释放,实现CTC的纯化,提高纯度以适应基因检测限度的要求。

