



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113009145 A

(43) 申请公布日 2021.06.22

(21) 申请号 202010553023.0

(22) 申请日 2020.06.17

(71) 申请人 山东大学

地址 250013 山东省青岛市即墨区滨海路  
72号

(72) 发明人 韩琳 王超 张宇

(74) 专利代理机构 青岛华慧泽专利代理事务所  
(普通合伙) 37247

代理人 刘娜

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

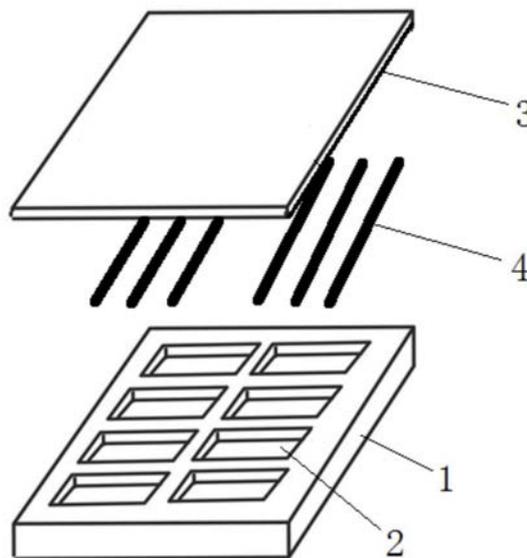
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片及制备方法,该芯片包括微腔阵列芯片和抗体条形码衬底,所述抗体条形码衬底覆盖于微腔阵列芯片上方;所述微腔阵列芯片为生物亲和芯片,其微腔壁修饰有石墨烯纳米材料,所述抗体条形码衬底上印刷有功能捕获抗体,所述功能捕获抗体位于微腔顶部。本发明所公开的微流控芯片可以改善细胞培养环境,有利于细胞生长,捕获抗体效率高,均匀性好,分析结果更加准确,其制备方法工艺简单,成本低廉,适合于大规模生产。



1. 一种用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片,其特征在于,包括微腔阵列芯片和抗体条形码衬底,所述抗体条形码衬底覆盖于微腔阵列芯片上方;所述微腔阵列芯片为生物亲和芯片,其微腔壁修饰有石墨烯纳米材料,所述抗体条形码衬底上印刷有功能捕获抗体,所述功能捕获抗体位于微腔顶部。

2. 根据权利要求1所述的一种用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片,其特征在于,所述微腔阵列芯片采用聚二甲基硅氧烷和固化剂按5:1-20:1的质量比,经高温烘烤后,脱模制备得到。

3. 根据权利要求1所述的一种用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片,其特征在于,所述微腔阵列芯片含有3000-4000个微腔,微腔尺寸的长、宽、深分别为1800-2500 $\mu\text{m}$ 、40-120 $\mu\text{m}$ 、20-50 $\mu\text{m}$ 。

4. 根据权利要求1所述的一种用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片,其特征在于,所述抗体条形码衬底含有20个抗体通道,通道宽10-80 $\mu\text{m}$ ,间距不小于10 $\mu\text{m}$ 。

5. 一种如权利要求1所述的用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 采用聚二甲基硅氧烷和固化剂按5:1-20:1的质量比,经高温烘烤后,脱模制备微腔阵列芯片;

(2) 对微腔阵列芯片Plasma羟基化,然后使用石墨烯纳米材料偶联剂对微腔阵列芯片氨基化,形成氨基化微腔阵列芯片;

(3) 使用石墨烯纳米材料修饰剂对微腔阵列芯片进行石墨烯纳米材料修饰组装,用生物改性剂对微腔阵列芯片进行生物亲和改性,形成生物亲和微腔阵列芯片;

(3) 对抗体条形码衬底进行石墨烯纳米材料修饰,然后在抗体条形码衬底上印刷功能捕获抗体;

(4) 将抗体条形码衬底和生物亲和微腔阵列芯片使用细胞缓冲液浸润后干燥处理;

(5) 使用时,将治疗细胞加载到生物亲和微腔阵列芯片的微腔中,使用抗体条形码衬底封闭,形成治疗细胞微流控芯片。

## 一种用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及单细胞分析领域,特别涉及一种用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片及制备方法。

### 背景技术

[0002] 生物治疗细胞治疗已经成为手术、放疗、化疗外的第四种治疗肿瘤的手段,并将成为未来肿瘤治疗必选手段,传统需要分离外周血单个单核细胞,在多种因子诱导下,大量扩增出具有高效抗癌活性的细胞,再通过静脉、皮内注射、介入等回输到患者体内,达到增强患者免疫功能和杀伤肿瘤细胞的目的,常用的细胞治疗手段包括CIK、DC、TIL、DC+CIK细胞等。

[0003] 在临床上发现肿瘤时,一般已是中晚期,此时病人体内肿瘤细胞占优势,严重损害了机体的免疫功能,在这样的免疫系统微环境下,细胞功能受损,激活治疗细胞效率较低,攻击癌细胞能力不够,也不够精准;另外,肿瘤细胞通过低表达或不表达MHC分子的逃逸机制,逃脱免疫细胞的攻击。这就需要制造精密制导、精准打击的细胞武器,克服MHC介导的杀瘤机制,于是靶向性抗肿瘤细胞的CAR-T, CAR-NK、治疗干细胞技术应运而生。但是,有研究发现这些治疗细胞对人体具毒副作用,Kaufman团队将人卵巢癌细胞移植到免疫抑制小鼠体内,将CAR-NK细胞注入动物模型,用CAR-T细胞作为对照,发现与接受CAR-NK细胞治疗的动物相比,CAR-T细胞治疗的动物肝脏、肺和肾等器官受到较为严重的损害。体内炎症细胞因子水平增加,治疗细胞让小鼠感到不适,症状为体重减轻,治疗细胞技术应用于临床,需要进一步对其进行单细胞功能分析,充分理解治疗细胞工作的潜在机制。

[0004] 在过去的几年中,细胞分离和蛋白质分泌分析的创新策略取得了进步,从而实现了单细胞分离。其中,液滴微流控技术已被证明是用于单细胞分选和分析的有前途的平台。该技术主要涉及将单个细胞封装在装有特异性荧光抗体或酶的液滴中,以捕获和检测分泌的细胞因子。尽管该技术具有单细胞分离的功能。但是,随后的细胞因子定量需要使用流式细胞仪,这会增加整个系统的复杂性,并且无法实现原位检测,特别是贴壁细胞的正确检测。并且该方法所使用的流式细胞仪虽然可以快速测量、存贮、显示悬浮在液体中的分散细胞的一系列重要的生物物理、生物化学方面的特征参量,但是流式细胞仪是一种零时间分辨率的仪器,它只能测量细胞的某一时间点诸如总核酸量,总蛋白量等指标,而不能对细胞动态监测,也无法实时在单细胞水平对细胞进行后续分析处理,它的细节分辨率为零,并且价格昂贵,不适用于大众。

[0005] 对于某些应用,流式细胞术仍然受到一定程度的限制。细胞必须处于悬浮状态,这意味着组织需要解离,从而导致细胞功能和细胞-细胞相互作用以及组织结构的丧失。具有相似标记表达的亚群难以区分,并且荧光染料之间的发射光谱重叠可能会导致噪声水平升高,从而使低强度样品不可用于检测。此外,流式细胞术的分选系统对细胞活力可能具有不可忽略的影响。除此以外,流式细胞仪系统的最小样品量为几百微升至几毫升。较长的管路导致无法使用稀有样品,尤其是在需要分析整个样品时。最后,由于由非一次性组件组成的

复杂系统,一般来说流式细胞术难以实现无菌操作。

[0006] 聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane,PDMS)具有良好的光学性能、热稳定性和生物兼容等优点,是微流控芯片的主要加工材料之一。近年来,以PDMS为材料加工的芯片,即PDMS微流控芯片已逐步成为低成本、便携式和环保型生化微量检测工具。基于PDMS材料的芯片,已在细胞操纵、细胞内基因表达检测、细胞培养、免疫荧光分析等方面成功应用。在细胞培养方面,传统方法是在PDMS表面修饰有机生物活性材料,例如BSA等,但通过研究发现,修饰有机生物活性材料存在稳定性差,易染菌等问题,石墨烯纳米材料是一种新型无机生物基底材料,具有促进细胞黏附和增殖的作用,由于是新兴纳米材料,很少用在细胞培养方面。

## 发明内容

[0007] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片及制备方法,以达到改善细胞培养环境,有利于细胞生长,捕获抗体效率高,均匀性好,分析结果更加准确的目的。

[0008] 为达到上述目的,本发明的技术方案如下:

[0009] 一种用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片,包括微腔阵列芯片和抗体条形码衬底,所述抗体条形码衬底覆盖于微腔阵列芯片上方;所述微腔阵列芯片为生物亲和芯片,其微腔壁修饰有石墨烯纳米材料,所述抗体条形码衬底上印刷有功能捕获抗体,所述功能捕获抗体位于微腔顶部。

[0010] 上述方案中,所述微腔阵列芯片采用聚二甲基硅氧烷和固化剂按5:1-20:1的质量比,经高温烘烤后,脱模制备得到。

[0011] 上述方案中,所述微腔阵列芯片含有3000-4000个微腔,微腔尺寸的长、宽、深分别为1800-2500 $\mu\text{m}$ 、40-120 $\mu\text{m}$ 、20-50 $\mu\text{m}$ 。

[0012] 上述方案中,所述抗体条形码衬底含有20个抗体通道,通道宽10-80 $\mu\text{m}$ ,间距不小于10 $\mu\text{m}$ 。

[0013] 一种用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片的制备方法,包括如下步骤:

[0014] (1) 采用聚二甲基硅氧烷和固化剂按5:1-20:1的质量比,经高温烘烤后,脱模制备微腔阵列芯片;

[0015] (2) 对微腔阵列芯片Plasma羟基化,然后使用石墨烯纳米材料偶联剂对微腔阵列芯片氨基化,形成氨基化微腔阵列芯片;

[0016] (3) 使用石墨烯纳米材料修饰剂对微腔阵列芯片进行石墨烯纳米材料修饰组装,用生物改性剂对微腔阵列芯片进行生物亲和改性,形成生物亲和微腔阵列芯片;

[0017] (3) 对抗体条形码衬底进行石墨烯纳米材料修饰,然后在抗体条形码衬底上印刷功能捕获抗体;

[0018] (4) 将抗体条形码衬底和生物亲和微腔阵列芯片使用细胞缓冲液浸润后干燥处理;

[0019] (5) 使用时,将治疗细胞加载到生物亲和微腔阵列芯片的微腔中,使用抗体条形码衬底封闭,形成治疗细胞微流控芯片。

[0020] 通过上述技术方案,本发明提供的用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片具有

如下有益效果：

[0021] 1、本发明的用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片，创新了现有微流控细胞微培养环境，相比传统PDMS生物材料，使用石墨烯纳米材料修饰微腔，改善了细胞培养环境，有利于细胞的生长（三天内的细胞生长率达到1200%），单细胞处于正常生长状态，功能分析结果更加准确，并且使用石墨烯纳米材料修饰抗体条形码衬底，固定捕获抗体的效率与均匀性提高了一倍。

[0022] 2、本发明的用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片的制备方法具有操作简单、成本低廉的优点。

[0023] 3、本发明的用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片检测范围广，可用于检测从悬浮细胞到贴壁细胞的血液细胞样本、海水细胞样本、体外培养细胞系样本等，可以实时观察细胞活性并对单细胞多种分泌蛋白同时检测，省去了以往单细胞实验所需要的多种仪器设备，极大简化了分析实验流程。

## 附图说明

[0024] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0025] 图1为本发明实施例所公开的一种用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片的拆分结构示意图；

[0026] 图2为本发明实施例所公开的用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片的制备方法流程示意图；

[0027] 图3为本发明实施例的CAR-T治疗细胞分泌信号检测结果细胞分类热图。

[0028] 图中，1、微腔阵列芯片；2、微腔；3、抗体条形码衬底；4、功能捕获抗体。

## 具体实施方式

[0029] 下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。

[0030] 本发明提供了一种用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片，如图1所示的结构，该芯片包括微腔阵列芯片1和抗体条形码衬底3，抗体条形码衬底3覆盖于微腔阵列芯片1上方；微腔阵列芯片1为生物亲和芯片，其微腔2壁修饰有石墨烯纳米材料，抗体条形码衬底3上印刷有功能捕获抗体4，功能捕获抗体4位于微腔2顶部。

[0031] 本实施例中，微腔阵列芯片1采用聚二甲基硅氧烷和固化剂按质量比为10:1，经80℃烘烤2h，脱模制备得到。

[0032] 微腔阵列芯片1含有3381个微腔2，微腔尺寸的长、宽、深分别为2100um、100um、30um，其大小足以细胞正常贴壁生长。

[0033] 抗体条形码衬底3含有20个抗体通道，通道宽20μm，间距20μm，最多可以同时捕捉20种分泌信号。

[0034] 一种用于治疗细胞分泌蛋白检测的微流控芯片的制备方法，如图2所示，包括如下步骤：

[0035] (1) 采用聚二甲基硅氧烷和固化剂按质量比为10:1，经80℃烘烤2h，脱模制备微腔

阵列芯片；

[0036] (2) 对微腔阵列芯片Plasma羟基化,然后使用石墨烯纳米材料偶联剂对微腔阵列芯片氨基化,形成氨基化微腔阵列芯片；

[0037] (3) 使用石墨烯纳米材料修饰剂对微腔阵列芯片进行石墨烯纳米材料修饰组装,用生物改性剂对微腔阵列芯片进行生物亲和改性,形成生物亲和微腔阵列芯片；

[0038] (3) 对抗体条形码衬底进行石墨烯纳米材料修饰,然后在抗体条形码衬底上印刷功能捕获抗体；

[0039] (4) 将抗体条形码衬底和生物亲和微腔阵列芯片使用细胞缓冲液浸润后干燥处理；

[0040] (5) 使用时,将治疗细胞加载到生物亲和微腔阵列芯片的微腔中,使用抗体条形码衬底盖上封闭,形成治疗细胞微流控芯片。

[0041] 在进行细胞分泌信号检测时,将治疗细胞CAR-T在微腔中生长孵育一段时间,抗体条形码衬底捕获IL8、IL12、HSP70的分泌信号,然后取下抗体条形码衬底,组装配对的荧光检测抗体IL8、IL12、HSP70,放入荧光扫描仪中扫描检测,检测结果见图3所示。检测CAR-T3200个单细胞IL8 IL12 HSP70三种分泌蛋白的量并对检测结果使用聚类热图方法可视化分析,CAR-T细胞被进一步多级分类。colorbar显示了分泌蛋白的量,分泌蛋白的量log归一化到0-5 5级0-5依次增加,左侧显示CAR-T细胞亚群级别,从外向内一次增加级别,最外侧为一级分群,以此类推。上方分级显示了CAR-T细胞分泌蛋白相关性,HSP70与IL12的相关性比与IL8高。

[0042] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

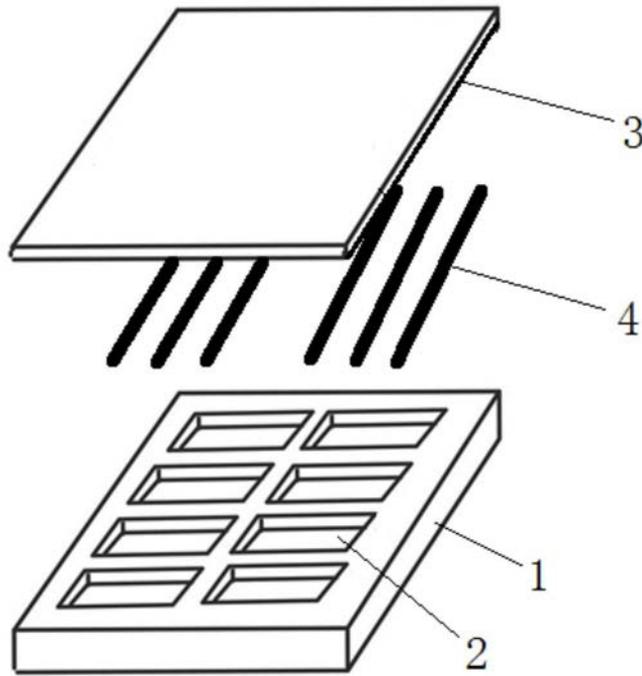


图1

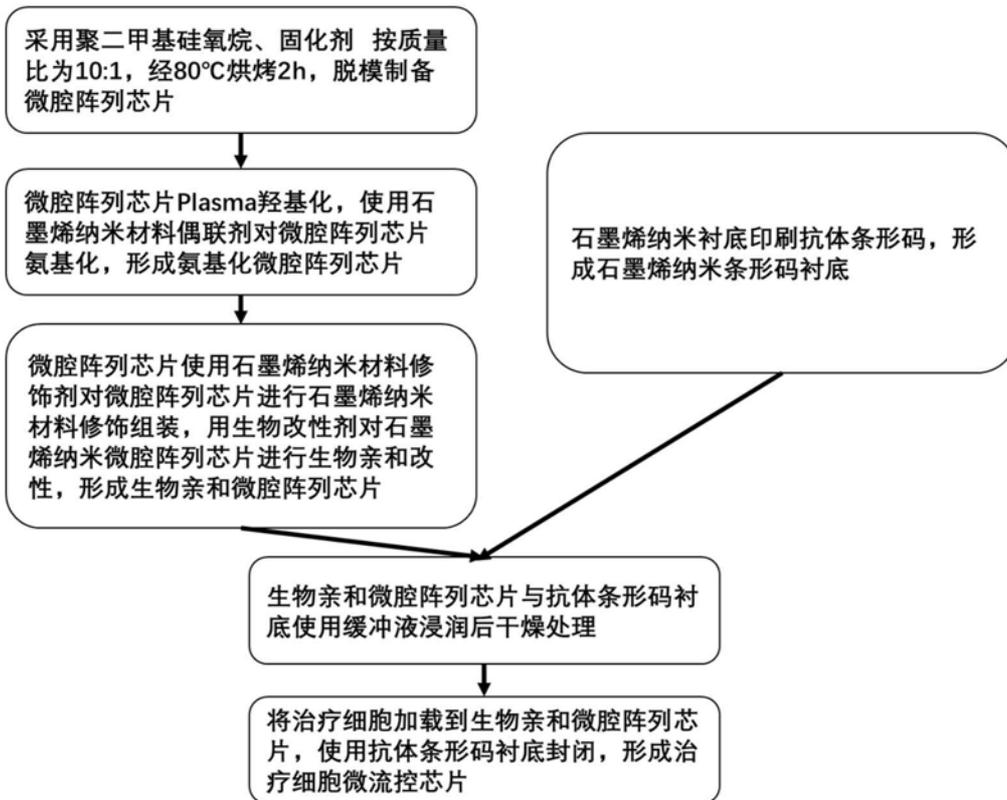


图2

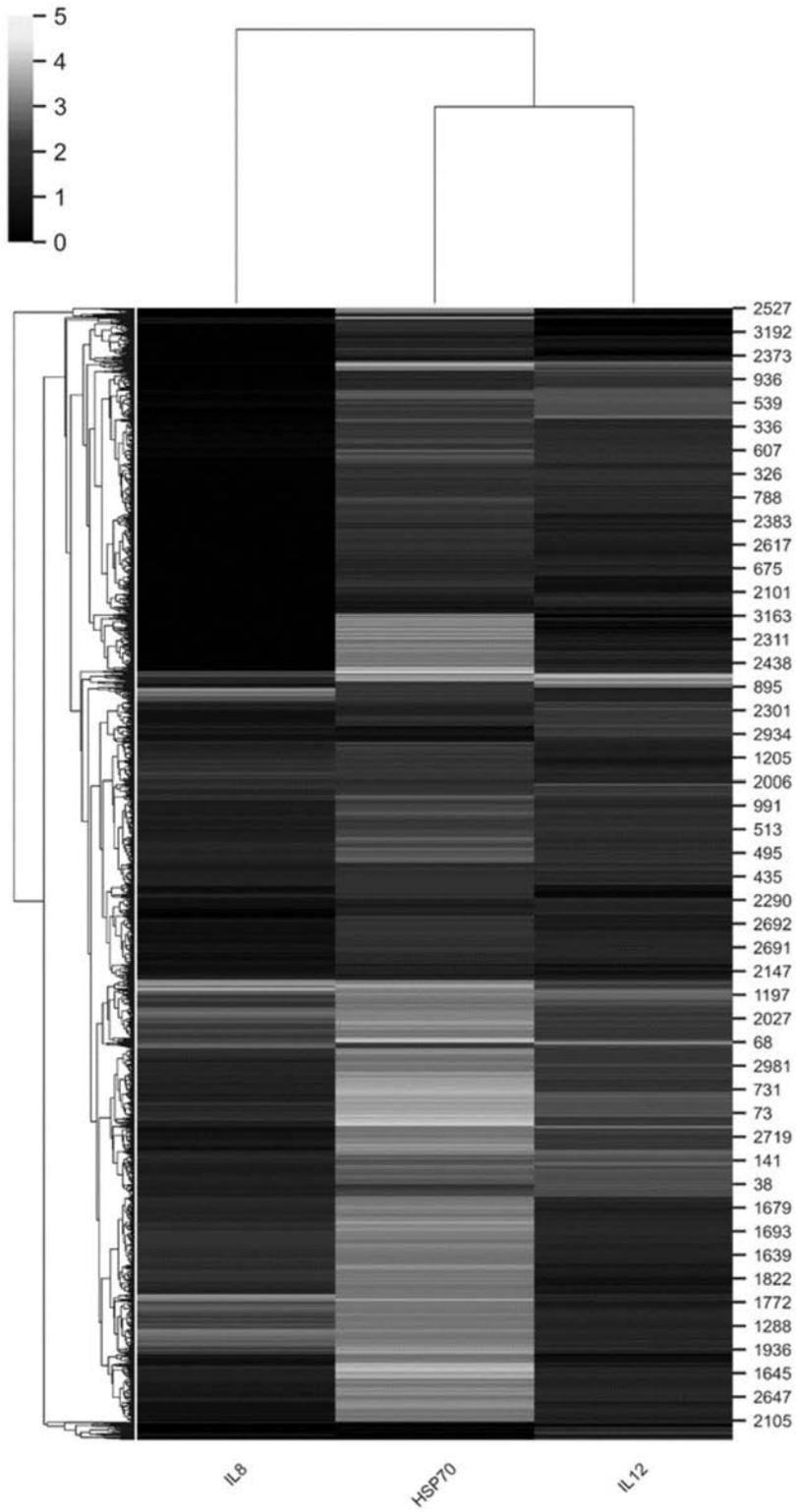


图3