



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107937257 A

(43)申请公布日 2018.04.20

(21)申请号 201711205076.8

(22)申请日 2017.11.27

(71)申请人 长春理工大学

地址 130000 吉林省长春市朝阳区卫星路
7989号

(72)发明人 王哲 于源华 孟祥凯 宫平
杨羽 刘传志 嵇晓强 庞春颖
李健 张震 张硕 王开曦

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理
有限公司 22214

代理人 李青

(51)Int. Cl.

C12M 1/12(2006.01)

C12M 1/00(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

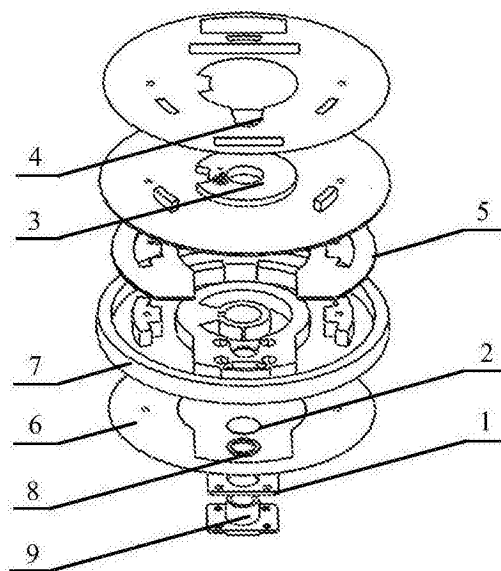
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种循环肿瘤细胞分离芯片及其检测方法

(57)摘要

一种循环肿瘤细胞分离芯片及其检测方法属于循环肿瘤细胞分离技术领域,解决了现有装置复杂,传动机构多,精度不易保证的问题。当芯片旋转时,进样液体快速径向向外运动,通过过渡件泵送过滤室上,大于细胞尺寸选择膜孔径的细胞被捕获,小于细胞尺寸选择膜孔径的细胞转移到过滤室流入废物室。本发明体积小、重量轻、方便携带,采用具有液体填充孔的细胞分离膜,具有无阻塞、高灵敏度、选择性、快速等优点,毛细管被储存在位于膜下方的流体辅助室中的液体引发,在整个过滤过程中保持完全润湿,使得液体流量需要最小的压力差并过滤更均匀地发生在整个膜上;该方法提供均匀、无堵塞的超快速细胞分离技术,其压力值比常规尺寸过滤中的1kPa小得多。



1. 一种循环肿瘤细胞分离芯片,包括基底和上盖,所述基底和上盖密封;其特征在于,基底包括:加载室、过渡件、过滤室和废物室;所述上盖对应加载室的区域设置进样孔;加载室内设置一挡片,所述挡片对应处设置过渡件;所述过渡件结构靠近挡片处为从低到高的斜面;所述过滤室上端为细胞尺寸选择膜,下端的空间通过通道与废物室联通,所述过渡件的高度大于等于细胞尺寸选择膜的位置;在所述芯片的中心设置离心孔;在使用分离芯片时,通过进样孔给加载室进样,将芯片安装在离心设备上,当芯片旋转时,进样液体快速径向向外运动,通过过渡件泵送过滤室上,大于细胞尺寸选择膜孔径的细胞被捕获,小于细胞尺寸选择膜孔径的细胞转移到过滤室流入废物室。

2. 根据权利要求1所述的一种循环肿瘤细胞分离芯片,其特征在于,所述基底和上盖通过双面压敏粘合带进行粘合。

3. 根据权利要求1所述的一种循环肿瘤细胞分离芯片,其特征在于,所述过滤室与基底活动连接,过滤室背面依次设置通过密封O型圈和细胞尺寸选择膜压盖进行密封和加样。

4. 根据权利要求1所述的一种循环肿瘤细胞分离芯片,其特征在于,所述细胞尺寸选择膜上随机分布有非均匀形式的孔,且细胞尺寸选择膜为可拆卸结构。

5. 根据权利要求4所述的一种循环肿瘤细胞分离芯片,其特征在于,当处理含有脆弱细胞的进样液体时,跨越细胞尺寸选择膜的压降 ΔP 保持在阈值以下防止细胞损伤,通过使用以下方程来计算跨越细胞尺寸选择膜的压降:

$$\Delta P = \mu \left[\frac{128L}{d^3} + \frac{24}{d} \right] \frac{Q}{N}$$

其中 μ 是动态粘度的系数, L 是细胞尺寸选择膜的厚度, d 是细胞尺寸选择膜的孔径, Q 是细胞尺寸选择膜的流量, N 是细胞尺寸选择膜孔的数量。

6. 根据权利要求1所述的一种循环肿瘤细胞分离芯片,其特征在于,所述基底和上盖外皆设置遮光贴,所述上盖内设置一个强力吸水膜。

7. 基于权利要求1-6所述的一种循环肿瘤细胞分离芯片的检测方法,其特征在于,该方法包括如下步骤:

步骤一:将进样液体在补充有胎牛血清和抗生素/抗真菌剂的培养基中,并在培养箱中和 CO_2 环境下培养;

步骤二:通过加载室将芯片的表面用牛血清白蛋白钝化;

步骤三:孵育后,芯片由离心设备置带动以一定转速进行旋转,使加载室中的胎牛血清溶液移到废物室中;

步骤四:洗涤缓冲液由进样孔加至加载室,保持步骤三芯片的转速,洗涤缓冲液通过细胞尺寸选择膜经过过滤室到废物室;

步骤五:保持离心装置按照步骤三的转速进行工作,将进样液体通过进样孔加至加载室;过滤室中的细胞进行分离,然后将加载室用洗涤缓冲液洗涤;

步骤六:分离结束后,将细胞尺寸选择膜取下安装与载玻片上进行染色处理,由荧光显微镜进行观察并记录数据。

8. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,所述步骤一中,将所有细胞在补充有5%FBS胎牛血清1%抗生素/抗真菌剂的培养基中,并在设定为 $37^\circ C$ 的培养箱中和5% CO_2 环

境下培养,对于加标实验,细胞用荧光染料预标记。

9. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,所述步骤三中,在进行细胞尺寸选择之前,将芯片的表面用牛血清白蛋白钝化,将1%牛血清白蛋白溶液加至样品由芯片上盖中的加样孔。

10. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,所述步骤三中,保持过滤室充满液体。

一种循环肿瘤细胞分离芯片及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于循环肿瘤细胞分离技术领域,具体涉及一种循环肿瘤细胞分离芯片及其检测方法。

背景技术

[0002] 循环肿瘤细胞(CTC)研究的一个主要障碍是其全血数量极度罕见,每 10^6 - 10^7 个血液细胞中含有1-10个CTC,可加工的血容量有限。由于CTC的罕见,开发有效的收集过程已经成为检测和表征CTC的关键步骤,CTC在每1毫升血液的出现频率为1-10个细胞。在这方面,微流体平台已经成为可能的解决方案,因为该装置的微细结构允许精确的流体控制并且还可为细胞提供生物相容性的环境。尽管迄今为止报道了使用微流控技术的各种CTC检测平台,但这些平台都具有一些主要的局限性。到目前为止,提出的基于微流控芯片的CTC隔离技术已经扎根于癌细胞生物学特性(即表面标志物表达)或物理性质(即尺寸,密度,介电性能,等等)。

[0003] 从原发性和转移性肿瘤流入外周血的CTC是早期检测侵袭性癌症以及个性化癌症治疗中的重要生物标志物。由于CTC的浓度极低,所以得到高回收和高纯度的CTC是一个很大的挑战。此外,CTC非常脆弱,因此强烈建议在患者采血后6-8小时内进行分析。所以,迫切需要开发可以广泛部署在临床环境中的快速,高效及稳定的CTC分离技术。在以前从外周血中选择性分离CTC的实验中,最常见的基于免疫亲和性的检测方法,该方法有相对较高的灵敏性和特异性,但是检测时间长(>1-4小时)。

[0004] 经过对现有的技术进行调研,中国专利201520684448.X公开了与本发明专利原理较为相似的细胞分离方法。虽然该装置具有一定细胞分离能力,但是该装置设计较为复杂,传动机构过多,精度不易保证;而且体积庞大,操作复杂,不易携带,不能用于医院检验科及床旁监测,不利于推广应用。

发明内容

[0005] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明提供了一种循环肿瘤细胞分离芯片及其检测方法,利用尺寸分离CTC的技术,采用规则孔径和形状的光刻薄膜来提高CTC的回收率和纯度,通过在整个过滤过程之前和整个过程中,细胞分离膜下的腔室充满的液相扩散作用,可使整个膜面积进行过滤,并大大减轻堵塞问题。

[0006] 本发明解决技术问题所采用的技术方案如下:

[0007] 一种循环肿瘤细胞分离芯片,包括基底和上盖,所述基底和上盖密封;基底包括:加载室、过渡件、过滤室和废物室;所述上盖对应加载室的区域设置进样孔;加载室内设置一挡片,所述挡片对应处设置过渡件;所述过渡件结构靠近挡片处为从低到高的斜面;所述过滤室上端为细胞尺寸选择膜,下端的空间通过通道与废物室联通,所述过渡件的高度大于等于细胞尺寸选择膜的位置;在所述芯片的中心设置离心孔;在使用分离芯片时,通过进样孔给加载室进样,将芯片安装在离心设备上,当芯片旋转时,进样液体快速径向向外运

动,通过过渡件泵送过滤室上,大于细胞尺寸选择膜孔径的细胞被捕获,小于细胞尺寸选择膜孔径的细胞转移到过滤室流入废物室。

[0008] 一种循环肿瘤细胞分离的检测方法,该方法包括如下步骤:

[0009] 步骤一:将进样液体在补充有胎牛血清和抗生素/抗真菌剂的培养基中,并在培养箱中和CO₂环境下培养;

[0010] 步骤二:通过加载室将芯片的表面用牛血清白蛋白钝化;

[0011] 步骤三:孵育后,芯片由离心设备置带动以一定转速进行旋转,使加载室中的胎牛血清溶液移到废物室中;

[0012] 步骤四:洗涤缓冲液由进样孔加至加载室,保持步骤三芯片的转速,洗涤缓冲液通过细胞尺寸选择膜经过过滤室到废物室;

[0013] 步骤五:保持离心装置按照步骤三的转速进行工作,将进样液体通过进样孔加至加载室;过滤室中的细胞进行分离,然后将过滤室用洗涤缓冲液洗涤;

[0014] 步骤六:分离结束后,将细胞尺寸选择膜取下安装与载玻片上进行染色处理,由荧光显微镜进行观察并记录数据。

[0015] 本发明的有益效果是:本发明专利体积小、重量轻、方便携带,可以检测到不仅癌症转移患者的大量CTC,而且还可以从没有癌症症状的相对早期阶段的患者中检测到CTC,这表明了潜在的CTC被用作早期诊断标记的可能。采用具有液体填充孔的细胞分离膜,其具有无阻塞、高灵敏度(95.9±3.1%回收率)、选择性(>2.5log消耗白细胞)、快速(>3mL/min)等优点,毛细管被储存在位于膜下方的流体辅助室中的液体引发,并且在整个过滤过程中保持完全润湿,使得液体流量需要最小的压力差并且过滤更均匀地发生在整个膜上;并且使用有流体辅助分离技术的独立实验室芯片系统,实现了来自全血的活体CTC的无标记分离,而无需先前的样品处理。数值模拟及实验表明,该方法提供均匀、无堵塞的超快速细胞分离技术,其压力值比常规尺寸过滤中的1kPa小得多。

附图说明

[0016] 图1本发明一种循环肿瘤细胞分离芯片爆炸图。

[0017] 图2本发明一种循环肿瘤细胞分离芯片背面结构图。

[0018] 图3本发明一种循环肿瘤细胞分离芯片原理图。

[0019] 图中1、密封硅胶垫,2、细胞尺寸选择膜,3、上盖,4、上盖遮光贴,5、强力吸水膜,6、基底遮光贴,7、基底,8、密封O型圈和9、细胞尺寸选择膜压盖。

具体实施方式

[0020] 下面结合附图和实施例对本发明做进一步详细说明。

[0021] 如图1所示和图2所示,一种循环肿瘤细胞分离芯片,该芯片包括:密封硅胶垫1、细胞尺寸选择膜2、上盖3、上盖遮光贴4、强力吸水膜5、基底遮光贴6、基底7、密封O型圈8和细胞尺寸选择膜压盖9。所述芯片由三个单独的过滤单元组成,可同时处理三个不同的血样,每个单元包含样品加载室、过渡件和过滤室,三个过滤单元共用一个废物室;所述上盖3与基底7通过双面压敏粘合带进行粘合,以实现芯片的紧密组装;所述上盖3上进样孔,用于进样和通风,将进样液体送入加载室,所述加载室设置挡片和与挡片位置对应的过滤件,从靠

近挡片处看,过滤件为从低到高的斜面结构;所述基底7创建有通道,并在基底7上形成主流体室;所述基底7上创建有出口通道并设置有放置细胞尺寸选择膜9的区域,由密封O型圈8与细胞尺寸选择膜压盖9、密封硅胶垫1进行紧固,形成过滤室。所述过渡件的高度大于等于细胞尺寸选择膜9的位置,并与细胞尺寸选择膜9紧邻。细胞尺寸选择膜压盖9容易拆卸,将其安装在载玻片上用于后续图像分析与分子表征。所述细胞尺寸选择膜压盖9上设置有加样孔,用于添加包被液;所述芯片废物室由强力吸水膜5通过双面压敏粘合带进行粘合,强力吸水膜5可以吸收一部分的废液;所述上盖遮光贴4与基底遮光贴6分别由双面压敏粘合带粘至上盖3与基底7,使进样液体不受到外界环境的干扰;所述芯片中间开有安置孔,用于与离心装置相连接。本实例中,上述上盖3、基底7和细胞尺寸选择膜压盖9为聚碳酸酯制成。

[0022] 上述芯片安装于离心装置中,如图3所示,当芯片旋转时,位于加载室的进样液体被快速径向向外泵送,通过设置在加载室的挡片和过滤件,进样液体轻轻地被推入至位于基底7的过滤室中,较大尺寸的细胞被细胞尺寸选择膜2捕获,而较小尺寸细胞通过细胞尺寸选择膜2以转移到废物室中。在整个过滤过程中,上盖3与基底7组成的各个单元中,细胞尺寸选择膜2下的过滤室填充有液体。其中过滤件设置有倾斜面,用于防止细胞由于离心力的作用而受到过大的压力导致细胞破损或者破裂,跨越细胞尺寸选择膜2的压降 ΔP 保持在阈值以下以防止细胞损伤,这是至关重要的。通过使用以下方程来计算跨越细胞尺寸选择膜2的压降:

$$[0023] \quad \Delta P = \mu \left[\frac{128L}{\pi d^3} + \frac{24}{d} \right] \frac{Q}{N}$$

[0024] 其中 μ 是动态粘度的系数, L 是细胞尺寸选择膜2的厚度, d 是细胞尺寸选择膜2孔径, Q 是细胞尺寸选择膜2上的流量, N 是细胞尺寸选择膜2上孔的数量。

[0025] 一种循环肿瘤细胞分离的检测方法,其检测方法包括如下步骤:

[0026] 步骤一:将进样液体的所有细胞在补充有5%FBS和1%抗生素/抗真菌剂的RPMI培养基中,并在设定为37℃的培养箱中和5%CO₂环境下培养,对于加标实验,细胞用荧光染料预标记。

[0027] 步骤二:在进行细胞尺寸选择之前,将芯片的表面用BSA钝化,将1%BSA溶液由上盖3中的加样孔,加至由上盖3与基底7组成的各个单元中,以使表面钝化,防止细胞吸附。

[0028] 步骤三:孵育30分钟后,芯片由离心装置带动以一定转速进行旋转,这将样品加载室中的BSA溶液移到废物室中,但膜下方的过滤室保持充满液体。

[0029] 步骤四:将1mL洗涤缓冲液由上盖3中的加样孔加至加载室,并且芯片保持上一步的转速,洗涤缓冲液通过细胞尺寸选择膜2到废物室,而细胞尺寸选择膜2下方腔室中的BSA溶液被新添加的洗涤缓冲液置换。表面钝化后,将3mL样本液由上盖3中的加样孔加至加载室,无需任何样品预处理步骤。

[0030] 步骤五:通过旋转芯片将加载室中的细胞进行分离,然后将加载室用1mL洗涤缓冲液洗涤两次,每次加液后保持离心装置的原有工作转速进行工作。

[0031] 步骤六:分离结束后,将细胞尺寸选择膜2取下安装与载玻片上进行染色处理,由荧光显微镜进行观察并记录数据。

[0032] 本实例中,上述步骤所述细胞尺寸选择膜2上面分布的孔为非均匀形式及随机分布的。所述基底7与细胞尺寸选择膜压盖9均开有螺钉孔,其由螺钉紧固。上述步骤所述芯片

由于细胞尺寸选择膜2下方充满液相,进而在检测中膜下腔室中产生的压力梯度与上部腔室中的压力梯度传递性好,导致相对均匀的压降,所以液体流过细胞尺寸选择膜2时为均匀流动。

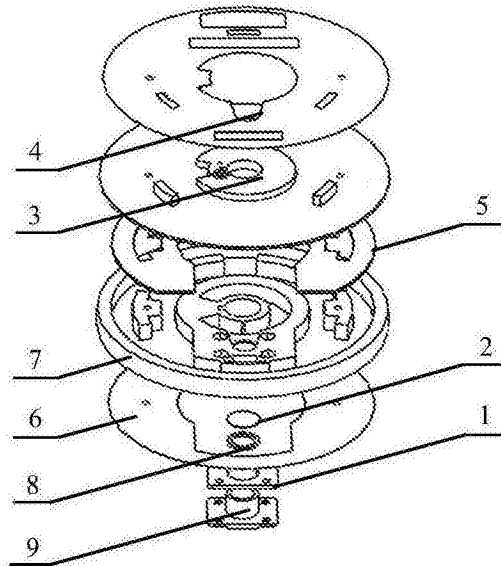


图1

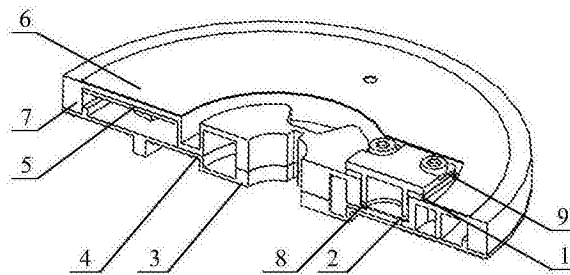


图2

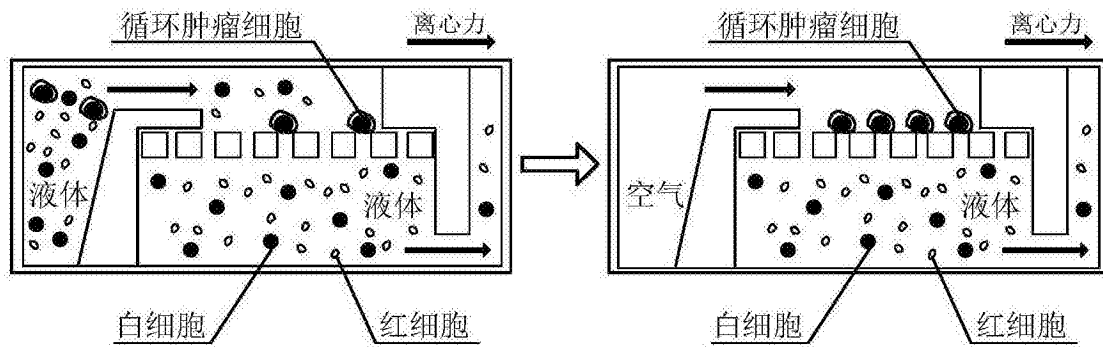


图3