



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109486653 A
(43)申请公布日 2019.03.19

(21)申请号 201811413397.1

(22)申请日 2018.11.27

(71)申请人 上海昆道生物技术有限公司
地址 201201 上海市浦东新区川沙路1666
弄83号302

申请人 蓝怡科技集团股份有限公司

(72)发明人 张鹏飞 韩焕兴

(51)Int.Cl.
C12M 1/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

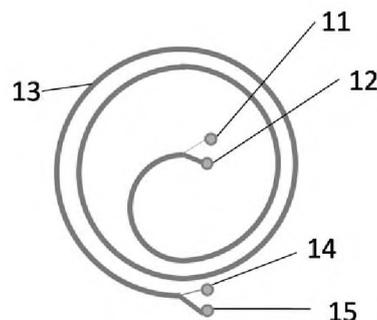
(54)发明名称

基于微流控和免疫磁分离双重策略的痕量细胞捕获系统

(57)摘要

本发明属于细胞分离分析技术领域,具体涉及一种基于微流控和免疫磁分离双重策略的痕量细胞捕获系统。该系统包括螺旋式微流控芯片和包含磁铁的芯片托,微流控芯片包括样本入口(11)、鞘液入口(12)、螺旋式流道(13)、痕量细胞收集出口(14)和废液口(15);所述的螺旋式流道由单螺旋式通道构成,所述单螺旋型通道的入口位于圆形螺旋通道的中心附近,经半圆形起始通道进入螺旋形微流道,流道末端包含2个出口,分别收集样品中的痕量细胞和废液。所述的芯片托用于固定芯片,包括芯片托底座(21)、芯片凹槽(22)、芯片固定弹片(23)和磁铁(25),圆形磁铁固定在芯片托的凹槽中,位置对应芯片的螺旋流道中心位置。本发明方法提供的痕量细胞捕获系统,首次将单螺旋微流控芯片和免疫磁分离相结合,可以同时利用细胞大小、密度和表面标志物形成双策略细胞分离系统,提高真实复杂样本中

痕量目标细胞的回收率。



1. 一种基于微流控和免疫磁分离双重策略的痕量细胞捕获系统,该系统包括螺旋式微流控芯片和包含磁铁的芯片托;所述的微流控芯片包括样本入口(11)、鞘液入口(12)、螺旋式流道(13)、痕量细胞收集出口(14)和废液口(15);所述的螺旋式流道由单螺旋式通道构成,所述单螺旋型通道的入口位于圆形螺旋通道的中心附近,经半圆形起始通道进入螺旋形微流道,流道末端包含2个出口,分别收集样品中的痕量细胞和废液。所述的芯片托用于固定芯片,包括芯片托底座(21)、芯片凹槽(22)、芯片固定弹片(23)和磁铁(25),圆形磁铁固定在芯片托的凹槽中,位置对应芯片的螺旋流道中心位置。

2. 根据权利要求1所述的一种痕量细胞微流控芯片捕获系统,其特征在于所述微流控芯片由上层PDMS或者PMMA聚合物芯片和下层玻璃片或者硅片封接而成,或者采用PC塑料注塑而成。

3. 根据权利要求1所述的一种痕量细胞微流控芯片捕获系统,其特征在于所述的微流控芯片中螺旋式流道(13)宽度为100-1000微米,高度为50-200微米,样品入口(11)流道宽度为100-200微米,鞘液入口(12)流道宽度为400-800微米,样品入口/鞘液入口流道宽度比例为1:5-1:9,芯片流道末端,痕量细胞出口(14)流道宽度为100-200微米,废液出口(15)流道宽度为400-800微米,痕量细胞出口/废液出口流道宽度比例为1:5-1:10。

4. 根据权利要求1所述的一种痕量细胞微流控芯片捕获系统,其特征在于所述的微流控芯片各出入口和外接导管连接,样品和鞘液通过注射泵或者压力泵装置将液体恒速注入芯片系统,其中注射样品的流速为0.5-2 mL/h,注射鞘液的流速为2.5-50 mL/h。

5. 根据权利要求1所述的一种痕量细胞微流控芯片捕获系统,其特征在于所述的微流控芯片托由PMMA塑料或者其他非铁质材料制成,芯片托具有和与芯片下层同样大小玻片或者硅片同样尺寸的凹槽,芯片由夹子固定在芯片托中。

6. 根据权利要求1所述的一种痕量细胞微流控芯片捕获系统,其特征在于所述生物样品可以为外周血、胸腔积液、腹腔积液、脑脊液、骨髓液或尿液。

7. 根据权利要求1所述的一种痕量细胞微流控芯片捕获系统,其特征在于所述痕量细胞微流控捕获系统的使用方法,包括以下步骤:

(1) 将待测血液或者其他体液进行红细胞裂解或者前处理后,加入PBS缓冲液,然后样本中加入包被有抗体的磁珠,室温孵育0.5-2h,作为进样样品。

(2) 利用注射泵或压力泵装置,分别将步骤(1)处理后的样本和缓冲液经导管从芯片的样本入口和鞘液入口注入芯片内,部分细胞根据的大小和密度的差异在单螺旋芯片内实现痕量细胞惯性聚焦分离,部分细胞根据细胞表面标志物的表达在芯片内实现痕量细胞的免疫磁分离。

(3) 两种策略分离出的痕量细胞都从出口流出,非目标细胞从废液口流出。

基于微流控和免疫磁分离双重策略的痕量细胞捕获系统

技术领域

[0001] 本发明属于细胞分离技术领域,具体涉及一种微流控芯片和免疫磁分离双重策略的痕量细胞捕获方法。

背景技术

[0002] 液体活检技术通过从病人的外周血、脑脊液或者骨髓等体液中选择性分离稀少的功能细胞尤其是循环肿瘤细胞(CTC)或者ctDNA等相关细胞和核酸信息,再结合传统的检测技术进行分析,对病人进行病理诊断,为肿瘤的临床诊断、病情监测及个体化治疗等方面提供生物信息数据。液体活检与传统的组织活检技术形成互补,避免了入侵式的组织取样。

[0003] 但是由于体液中的目标细胞含量很少,通常为1-10个/mL,因而有效地从体液中选择性分离痕量目标细胞是液体活检技术的关键。目前常用痕量细胞分离方法包括利用和不利于生物标记物捕获两大类:利用标记物的捕获方法尤其以基于抗体包被磁珠的阳性富集和阴性富集法比较常见,以强生公司Cell Search系统为代表,免疫磁分离技术将抗体的特异性与磁珠的富集分离作用相结合,具有简单、快速、灵敏等特点。然而传统的磁分离技术,分离操作需要较长的磁力路径,磁珠-细胞完全沉淀所需时间较长,且细胞容易被洗涤液带走,导致细胞的回收分离效率不高;此外,由于循环肿瘤细胞的异质性,采用单一抗体或者几种抗体组合都会存在非抗原表达CTC的漏检问题。不利用生物标记物的捕获方法,借助肿瘤细胞的大小、密度等形态学的不同,通过过滤、密度梯度离心等方法可将肿瘤细胞分离,但该方法所得样品纯度较低,特异性较差。

[0004] 微流控芯片技术是通过构建微尺度的流道,将生物化学领域的样品制备、分离和检测等操作单元集成到一张载玻片大小的芯片上,完成不同的生物或化学反应过程,对样品成分进行分析检测。在微流控芯片上利用过滤、流体动力学、免疫捕获、磁分离等技术,进行循环肿瘤分离已有较多的报道。如Sarioglu等2015年报道一种无标记物理捕获CTC的微流控芯片[A. Fatih Sarioglu, Nicola Aceto, et al., A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell-clusters, Nat. Methods, 2015, 12, 685.],该芯片巧妙设计的分叉结构可以有效地捕获CTC团簇,并在30-40%的乳腺癌转移病人中发现CTC团簇。但该芯片结构复杂,加工和操作流程成本都较高。

[0005] Hou等设计了一种螺旋结构的微流控芯片(H-W. Hou, M. E. Warkiani, Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces, Sci Rep. 2013, 3, 1259.),利用不同大小和密度的颗粒在流体中因惯性力和Dean力的平衡,在流道中分布位置的不同,从而将CTC从全血中有效分离,肿瘤细胞的回收率可达80%以上,该芯片结构具有简单、回收效率高、对细胞损伤小等特点,但该方法会漏检小粒径的肿瘤细胞。

发明内容

[0006] 本发明的目的是为了克服上述现有技术存在的缺陷,提供一种简单、高效的痕量细胞捕获系统。本发明基于螺旋式微流控芯片结合免疫磁分离技术,通过免疫磁分离和大小、密度分离双重策略对样品中痕量细胞进行捕获,提高痕量细胞的捕获效率。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明的技术方案是:一种痕量细胞微流控芯片捕获系统,该系统包括螺旋式微流控芯片和包含磁铁的芯片托;所述的微流控芯片包括样本入口(11)、鞘液入口(12)、螺旋式流道(13)、痕量细胞收集出口(14)和废液口(15);所述的螺旋式流道由单螺旋式通道构成,所述单螺旋型通道的入口位于圆形螺旋通道的中心附近,经半圆形起始通道进入螺旋形微流道,流道末端包含2个出口,分别收集样品中的痕量细胞和废液。所述的芯片托用于固定芯片,包括芯片托底座(21)、芯片凹槽(22)、芯片固定弹片(23)和磁铁(25),圆形磁铁固定在芯片托的凹槽中,位置对应芯片的螺旋流道中心位置。

[0008] 具体的,所述微流控芯片由上层PDMS或者PMMA聚合物芯片和下层玻璃片或者硅片封接而成,或者采用PC塑料注塑而成。

[0009] 所述微流控芯片中螺旋式流道(13)宽度为100-1000微米,高度为50-200微米。

[0010] 所述微流控芯片的中心,样品入口(11)流道宽度为100-200微米,鞘液入口(12)流道宽度为400-800微米,样品入口/鞘液入口流道宽度比例为1:5-1:9。

[0011] 所述微流控芯片流道末端,痕量细胞出口(14)流道宽度为100-200微米,废液出口(15)流道宽度为400-800微米,痕量细胞出口/废液出口流道宽度比例为1:5-1:10。

[0012] 所述微流控芯片各出入口和外接导管连接,样品和鞘液通过注射泵或者压力泵装置将液体恒速注入芯片系统,其中注射样品的流速为0.5-2 mL/h,注射鞘液的流速为2.5-50 mL/h。

[0013] 所述微流控芯片托由PMMA塑料或者其他非铁质材料制成,芯片托(21)具有和与芯片下层同样大小玻片或者硅片同样尺寸的凹槽(22),芯片由夹子(23)固定在芯片托中。

[0014] 所述微流控芯片托在微流控芯片螺旋流道中心位置,芯片凹槽处固定一个圆形磁铁(24),磁铁的直径2-10 mm。

[0015] 所述生物样品可以为外周血、胸腔积液、腹腔积液、脑脊液、骨髓液或尿液。

[0016] 一种痕量细胞微流控捕获系统的使用方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将待测血液或者其他体液进行红细胞裂解或者前处理后,加入PBS缓冲液,然后样本中加入包被有抗体的磁珠,室温孵育0.5-2h,作为进样样品。

[0017] (2) 利用注射泵或压力泵装置,分别将步骤(1)处理后的样本和缓冲液经导管从芯片的样本入口和鞘液入口注入芯片内,部分细胞根据的大小和密度的差异在单螺旋芯片内实现痕量细胞惯性聚焦分离,部分细胞根据细胞表面标志物的表达在芯片内实现痕量细胞的免疫磁分离。

[0018] (3) 两种策略分离出的痕量细胞都从出口流出,非目标细胞从废液口流出。

[0019] 本发明的细胞分离装置,首次将利用细胞大小、密度不同的单螺旋微流控芯片和免疫磁分离相结合,形成双策略细胞分离微流控芯片,以前并没有相关文献和专利的发表。使用该双重策略细胞分离芯片,可以将样本中大小、密度不同的细胞和有目标表面标志物的细胞都从样本中分离,提高真实复杂样本中痕量目标细胞的回收率,将尽可能多的痕量细胞从样本系统中分离。

[0020] 使用该细胞分离系统时,样本只需要进行常规的溶血、离心、重悬等处理,即可进行免疫磁珠标记。且该细胞分离芯片系统结构简单,操作便捷,大大降低了分离细胞的费用。

[0021] 以下结合附图对本发明的构思、具体步骤及产生的技术效果做进一步说明,以充分地了解本发明的目的、特征和效果。

附图说明

[0022] 图1为本发明的微流控芯片结构图。

[0023] 图2为本发明的芯片托结构图。

具体实施方式

[0024] 现结合实施例和附图,对本发明作进一步描述,但本发明的实施并不仅限于此。

[0025] 下述实施例如无特殊说明所用方法均为常规方法。

[0026] 实施例1。

[0027] 一种痕量细胞微流控芯片捕获系统,用于外周血中循环肿瘤细胞的分离,该系统包括螺旋式微流控芯片和包含磁铁的芯片托;所述的微流控芯片包括样本入口(11)、鞘液入口(12)、螺旋式流道(13)、痕量细胞收集出口(14)和废液口(15);所述的螺旋式流道由单螺旋式通道构成,所述单螺旋型通道的入口位于圆形螺旋通道的中心附近,经半圆形起始通道进入螺旋形微流道,流道末端包含2个出口,分别收集样品中的痕量细胞和废液。所述的芯片托用于固定芯片,包括芯片托底座(21)、芯片凹槽(22)、芯片固定弹片(23)和磁铁(25),圆形磁铁固定在芯片托的凹槽中,位置对应芯片的螺旋流道中心位置。

[0028] 所述微流控芯片由上层PDMS或者PMMA聚合物芯片和下层玻璃片或者硅片封接而成,或者采用PC塑料注塑而成;螺旋式流道(13)宽度为500微米,高度为100微米;样品入口(11)流道宽度为100微米,鞘液入口(12)流道宽度为800微米,样品入口/鞘液入口流道宽度比例为1:8;流道末端痕量细胞出口(14)流道宽度为100微米,废液出口(15)流道宽度为800微米,痕量细胞出口/废液出口流道宽度比例为1:8。

[0029] 所述微流控芯片各出入口和外接导管连接,样品和鞘液通过注射泵或者压力泵装置将液体恒速注入芯片系统,其中注射样品的流速为1 mL/h,注射鞘液的流速为10 mL/h。

[0030] 微流控芯片托由PMMA塑料材料制成,芯片托具有和与芯片下层同样大小玻片或者硅片同样尺寸的凹槽,芯片由夹子固定在芯片托中;芯片托在微流控芯片螺旋流道中心位置,芯片凹槽处固定一个圆形磁铁,磁铁的直径5 mm。

[0031] 所述生物样品可以为外周血、胸腔积液、腹腔积液、脑脊液、骨髓液或尿液等。

[0032] 下面选用肿瘤病人的外周血为样本,采用上述痕量细胞捕获装置进行循环肿瘤细胞分离,包括以下步骤。

[0033] (1)将待测5 mL血液样本加入红细胞裂解液处理后,1500 rpm离心后,去除裂解红细胞,重新分散于1 mL PBS缓冲液,然后加入包被有anti-EpiCAM抗体的磁珠(德国美天旎),室温孵育1h,作为进样样品。

[0034] (2)利用注射泵,将步骤(1)处理后的细胞样本经导管从芯片的样本入口以1 mL/h的速度注入芯片,同时PBS缓冲液经鞘液入口以50 mL/h的速度注入芯片内,部分细胞根

据的大小和密度的差异在单螺旋芯片内实现痕量细胞惯性聚焦分离,部分细胞根据细胞表面标志物的表达在芯片内实现痕量细胞的免疫磁分离。

[0035] (3)非目标细胞从废液口流出,分离出的痕量细胞从出口流出并收集在无菌试管中,并进一步进行免疫荧光标。

[0036] 实施例2。

[0037] 一种痕量细胞微流控芯片捕获系统,用于胸腔积液的循环肿瘤细胞的分离,装置与实施例1相同,分离步骤如下。

[0038] (1)将待测3mL胸腔积液样本1500 rpm离心后,去除上清后,重新分散于0.5 mL PBS缓冲液,然后加入包被有anti-EpiCAM抗体和anti-Her2抗体的磁珠(德国美天旎),室温孵育1h,作为进样样品。

[0039] 利用注射泵,将步骤(1)处理后的细胞样本经导管从芯片的样本入口以0.5 mL/h的速度注射入芯片,同时PBS缓冲液经鞘液入口以2.5 mL/h的速度注入芯片内,部分细胞根据的大小和密度的差异在单螺旋芯片内实现痕量细胞惯性聚焦分离,部分细胞根据细胞表面标志物的表达在芯片内实现痕量细胞的免疫磁分离。

[0040] (3)非目标细胞从废液口流出,分离出的痕量细胞从出口流出并收集在无菌试管中,并进一步进行免疫荧光标记。

[0041] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等同物界定。

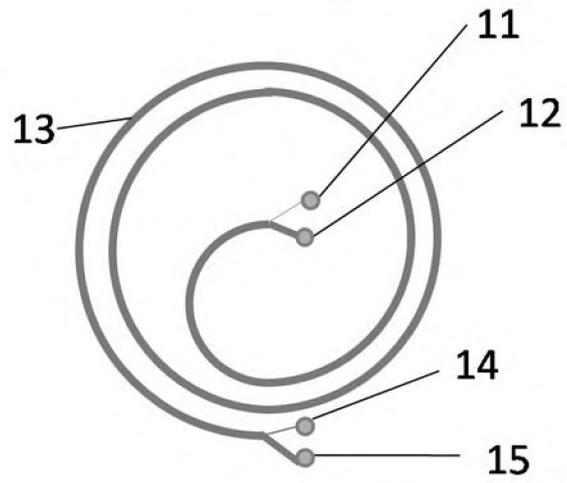


图1

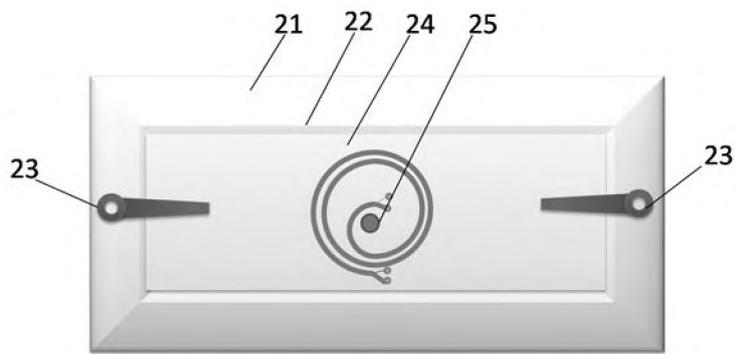


图2