



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109270262 A

(43)申请公布日 2019.01.25

(21)申请号 201811165822.X

(22)申请日 2018.10.08

(71)申请人 宁波美晶医疗技术有限公司  
地址 315100 浙江省宁波市高新区光华路  
299弄6幢12号1-1

(72)发明人 张晓晶 沈挺

(74)专利代理机构 宁波奥圣专利代理事务所  
(普通合伙) 33226

代理人 陈怡菁

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

C12N 5/09(2010.01)

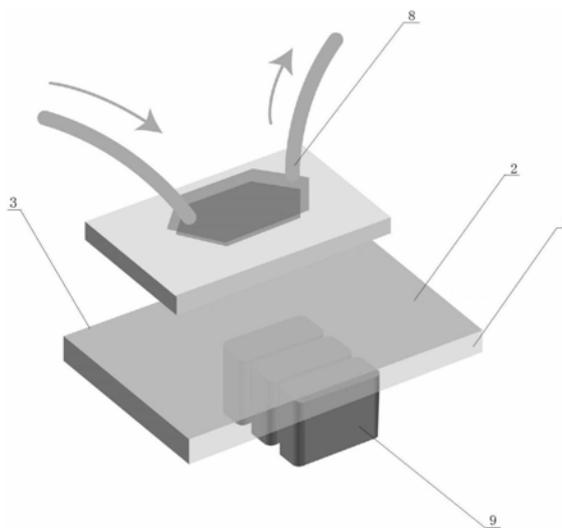
权利要求书2页 说明书6页 附图4页

### (54)发明名称

一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法

### (57)摘要

本发明公开了一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法,特点是:包括在载玻片表面覆盖一层PEN膜,并使用多聚赖氨酸溶液处理PEN膜表面;将载玻片装入捕获仪的微流体装置内;将经预处理的血液样本装载于捕获仪中,采用免疫磁微粒技术对靶细胞进行分离;取出载玻片干燥;用丙酮固定靶细胞,并进行免疫荧光染色;显微镜下观察读片,识别靶细胞;采用激光切割单个靶细胞,并去除杂质细胞;将切割后的带有单个靶细胞的PEN膜挑取至PCR管,或通过微流体在通道中收集,完成单细胞提取;优点是:操作简便,可实现单细胞捕获过程的自动化,减少试剂用量,单细胞捕获效率和提取效率高,能够有效保持被分离提取细胞的完整性,有利于细胞下游分析应用。



1. 一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 在载玻片表面覆盖一层厚度为2~5 $\mu$ m的PEN膜,并使用0.01~0.02%W/V的多聚赖氨酸溶液处理PEN膜表面,得到镀膜载玻片;

(2) 将镀膜载玻片装入微流体装置内,并安装至捕获仪内,并安装配套使用的捕获耗材包及配套试剂;

(3) 将血液样本进行预处理,将带有特定生物标志物的纳米磁珠结合到血液中的目标细胞上,然后将经过预处理的血液样本装载于捕获仪中,设置捕获仪的运行参数,采用免疫磁微粒技术对血液样本中的目标细胞进行分离,分离完成后得到附着于镀膜载玻片表面的靶细胞;

(4) 取出镀膜载玻片,37 $^{\circ}$ C干燥;

(5) 用丙酮固定镀膜载玻片表面上的靶细胞,并采用免疫荧光染料对镀膜载玻片表面进行免疫荧光染色;

(6) 将染色后的镀膜载玻片放置在显微镜下观察读片,识别靶细胞和其余杂质细胞,其中细胞的免疫荧光显色反应满足判断标准的被判定为靶细胞;

(7) 在显微镜观察下,采用激光切割带有单个靶细胞的PEN膜,并去除切割范围内的杂质细胞;

(8) 在显微镜观察下,将切割后的带有单个靶细胞的PEN膜通过针手动拾取膜,并将其置于涂抹有粘合剂的PCR管中,使PEN膜的背面放置于粘合剂部分上;或者将切割后的带有单个靶细胞的PEN膜通过微流体在通道中收集单个靶细胞,完成单细胞提取。

2. 根据权利要求1所述的一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法,其特征在于所述的目标细胞为肿瘤细胞,所述的步骤(5)中采用的免疫荧光染料为:anti-CD45和anti-CK;所述的步骤(6)中细胞的免疫荧光显色反应满足判断标准的被判定为靶细胞具体为:细胞的免疫荧光显色反应满足CK为阳性且CD45为阴性的被判定为靶细胞。

3. 根据权利要求2所述的一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法,其特征在于所述的步骤(5)中对可分离镀膜载玻片表面进行免疫荧光染色具体为:对干燥后的镀膜载玻片先用anti-CK进行荧光标记,37 $^{\circ}$ C条件下孵育1小时,然后用PBST缓冲液漂洗;再对镀膜载玻片用anti-CD45进行荧光标记,33 $^{\circ}$ C条件下孵育1小时,用PBST缓冲液漂洗后室温下干燥。

4. 根据权利要求2或3所述的一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法,其特征在于所述的步骤(3)中将血液样本进行预处理具体包括:取适量血液样本加入到离心管中,然后加入血液前处理试剂,混匀后在离心力800g $\pm$ 200g下离心8~12min,去除血浆与红细胞;用移液器吸取离心管中的上清液,并往上清液中加入血液前处理试剂至5ml,混匀并确保底部无沉淀;然后往混匀后的溶液中加入具有上皮细胞功能粘附分子的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米磁珠悬浮液100ul,所述的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米磁珠的粒径大小为100~200nm,混匀后置于垂直混合仪上,在8-10rpm条件下孵育1.5h。

5. 根据权利要求1-3任一项所述的一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法,其特征在于所述的步骤(8)中通过微流体在通道中收集单个靶细胞具体包括:首先用水相层流传输激光切割后附着在PEN膜上的靶细胞,然后用双相油-水混合形成油滴包裹的微液滴,完成对单个靶细胞的收集。

6. 根据权利要求1-3任一项所述的一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法,其特

征在于所述的捕获仪为免疫磁微粒捕获仪,设置捕获仪的运行参数为:磁微粒捕获速度2.2~3ml/hr,镀膜载玻片的清洗速度4~6ml/hr。

7.根据权利要求1-3任一项所述的一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法,其特征在于所述的步骤(2)中的配套试剂包括:血液前处理试剂、免疫磁微粒、细胞捕获增强剂、清洗液和质控品。

8.根据权利要求1-3任一项所述的一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法,其特征在于所述的显微镜和所述的激光采用蔡司激光显微切割系统,切割PEN膜的切割区域尺寸为500 $\mu\text{m}$ ×500 $\mu\text{m}$ 。

## 一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术应用领域,尤其涉及一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法。

### 背景技术

[0002] 细胞是组成生物及生命活动的基本单位,对细胞从形态到功能上的区分是细胞生物学研究最重要的内容。经过研究者的不断探索与努力,现在我们可以特异性辨别大部分细胞类型,给我们认识生物生理功能和病理变化带来了重要进步。但是,随着研究的深入,我们认识到同样的细胞类型,在发挥功能上存在非常巨大的亚群,并没有两个细胞是完全相同的。经典的细胞分类并不能有效区分细胞个体功能差异。

[0003] 在肿瘤研究领域,肿瘤细胞存在异质性,单个细胞间的信息表达千差万别,传统的多细胞体外分析通常反映细胞集体的平均水平,从而错失很多重要的信息。而且,很多可以直接反映疾病状态的关键细胞,如循环肿瘤细胞的含量极其稀少,很容易被大量的背景细胞干扰。单细胞水平研究能够获取更全面更精准的细胞信息,评估细胞异质性对机体状态和功能的影响,克服群体分析结果对个别信息掩盖的局限性,对了解生命奥秘具有重要的意义。近年来,随着基因测序技术的不断提高及个体化医疗的迅速发展,单细胞分析已成为细胞及生命科学研究的前沿与重中之重。因此,建立精准的单细胞分析方法将对细胞生物学研究起到极大的推进作用,并广泛应用于生命科学领域。

[0004] 细胞捕获和单细胞提取是单细胞分析的前提条件。传统细胞分离的方法,如流式细胞术依赖于被标记细胞的荧光信号,适用于含量丰富的细胞分离,对于非常罕见的肿瘤细胞的分离效果并不理想。微流控技术是一种引起广泛关注的新兴技术,具有高通量、高效率、集成化、自动化、微型化、低消耗等特点,并且能与细胞下游分析如基因组学、转录组学等相结合,是实现单细胞分析的可靠工具。目前,研究证实,微流控技术可实现人外周血中稀量存在的循环肿瘤细胞的高效捕获。激光捕获显微切割技术(Laser capture microdissection,LCM)是在不破坏组织结构,保存要捕获的细胞和其周围组织形态完整的前提下,直接从冰冻或石蜡包埋组织切片中获取目标细胞,其突出特点是能高效地从复合组织中特异性分离出单一类型细胞群或单个细胞,该技术自问世以来已被广泛应用于核酸、蛋白等基础研究领域。

### 发明内容

[0005] 为了解决上述现有技术中存在的不足,本发明提供一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法,基于免疫磁微粒原理结合微流体技术从血液中捕获靶细胞,同时利用免疫荧光染色结合激光显微切割技术精准提取单细胞,能够简单便捷地实现单细胞的高效分离与精准捕获,提取效率高。

[0006] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法,包括以下步骤:

(1) 在载玻片表面覆盖一层厚度为2~5 $\mu$ m的PEN膜,并使用0.01~0.02%W/V的多聚赖氨酸溶液处理PEN膜表面,得到镀膜载玻片;

(2) 将镀膜载玻片装入微流体装置内,并安装至捕获仪内,并安装配套使用的捕获耗材包及配套试剂;

(3) 将血液样本进行预处理,将带有特定生物标志物的纳米磁珠结合到血液中的目标细胞上,然后将经过预处理的血液样本装载于捕获仪中,设置捕获仪的运行参数,采用免疫磁微粒技术对血液样本中的目标细胞进行分离,分离完成后得到附着于镀膜载玻片表面的靶细胞;

(4) 取出镀膜载玻片,37 $^{\circ}$ C干燥;

(5) 用丙酮固定镀膜载玻片表面上的靶细胞,并采用免疫荧光染料对镀膜载玻片表面进行免疫荧光染色;

(6) 将染色后的镀膜载玻片放置在显微镜下观察读片,识别靶细胞和其余杂质细胞,其中细胞的免疫荧光显色反应满足判断标准的被判定为靶细胞;

(7) 在显微镜观察下,采用激光切割带有单个靶细胞的PEN膜,并去除切割范围内的杂质细胞;

(8) 在显微镜观察下,将切割后的带有单个靶细胞的PEN膜通过针手动拾取膜,并将其置于涂抹有粘合剂的PCR管中,使PEN膜的背面放置于粘合剂部分上;或者将切割后的带有单个靶细胞的PEN膜通过微流体在通道中收集单个靶细胞,完成单细胞提取。

[0007] 所述的目标细胞为肿瘤细胞,所述的步骤(5)中采用的免疫荧光染料为:anti-CD45和anti-CK;所述的步骤(6)中细胞的免疫荧光显色反应满足判断标准的被判定为靶细胞具体为:细胞的免疫荧光显色反应满足CK为阳性且CD45为阴性的被判定为靶细胞。

[0008] 所述的步骤(5)中对镀膜载玻片表面进行免疫荧光染色具体为:对干燥后的镀膜载玻片先用anti-CK进行荧光标记,37 $^{\circ}$ C条件下孵育1小时,然后用PBST缓冲液漂洗;再对镀膜载玻片用anti-CD45进行荧光标记,33 $^{\circ}$ C条件下孵育1小时,用PBST缓冲液漂洗后室温下干燥。

[0009] 所述的步骤(3)中将血液样本进行预处理具体包括:取适量血液样本加入到离心管中,然后加入血液前处理试剂,混匀后离心8~12min,去除血浆与红细胞;用移液器吸取离心管中的上清液,并往上清液中加入血液前处理试剂至5ml,混匀并确保底部无沉淀;然后往混匀后的溶液中加入具有上皮细胞功能粘附分子的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米磁珠悬浮液100 $\mu$ l,所述的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米磁珠的粒径大小为100~200nm,混匀后置于垂直混合仪上,在8-10rpm条件下孵育1.5h。

[0010] 所述的步骤(8)中通过微流体在通道中收集单个靶细胞具体包括:首先用水相层流传输激光切割后附着在PEN膜上的靶细胞,然后用双相油-水混合形成油滴包裹的微液滴,完成对单个靶细胞的收集。

[0011] 所述的捕获仪为免疫磁微粒捕获仪,设置捕获仪的运行参数为:磁微粒捕获速度2.2~3ml/hr,镀膜载玻片的清洗速度4~6ml/hr。

[0012] 所述的步骤(2)中的配套试剂包括:血液前处理试剂、免疫磁微粒、细胞捕获增强剂、清洗液和质控品。

[0013] 所述的显微镜和所述的激光采用蔡司激光显微切割系统,切割PEN膜的切割区域

尺寸为 $500\mu\text{m}\times 500\mu\text{m}$ 。

[0014] 与现有技术相比,本发明的优点在于:基于免疫磁微粒原理结合微流体技术从血液中捕获靶细胞,同时利用免疫荧光染色结合激光显微切割技术精准提取单细胞,本发明可实现单细胞捕获过程的自动化,减少化学试剂用量;单细胞捕获效率高,能够实现85%以上的单细胞捕获率;能够有效保持被分离提取细胞的完整性,有利于细胞下游分析应用;操作简便安全,为认识肿瘤的生物学进程提供了全新视角。

## 附图说明

[0015] 图1为本发明中捕获靶细胞的微流体装置的分解示意图;

图2为本发明中捕获靶细胞的原理图;

图3为本发明中激光提取靶细胞的过程示意图;

图4为本发明中通过微流体在通道中收集单个靶细胞的示意图;

图5为本发明实施例二中分离得到SKBR3(a)和MCF7(b)肿瘤细胞的荧光成像图;

图6为本发明实施例三中患者1外周血样本中分离得到的肿瘤细胞荧光成像图;

图7为本发明实施例三中患者2外周血样本中分离得到的肿瘤细胞荧光成像图。

[0016] 其中,载玻片1,PEN膜2,镀膜载玻片3,目标细胞4,纳米磁珠5,靶细胞6,PCR管7,微流体通道8,磁体9。

## 具体实施方式

[0017] 以下结合附图对本发明一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法作进一步详细说明,但不作为对本发明的限定。

[0018] 实施例一

本发明的一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法,包括以下步骤:

(1) 在载玻片1表面覆盖一层厚度为 $3\mu\text{m}$ 的PEN(polyethylene naphthalat,聚萘二甲酸乙二醇酯)膜,并使用0.01%(W/V)的多聚赖氨酸溶液处理PEN膜2表面,得到镀膜载玻片3;

(2) 将镀膜载玻片3装入微流体装置内,并安装至捕获仪内,并安装配套使用的捕获耗材包及配套试剂;

(3) 将血液样本进行预处理,将带有特定生物标志物的纳米磁珠5结合到血液中的目标细胞4上,然后将经过预处理的血液样本装载于捕获仪中,设置捕获仪的运行参数,采用免疫磁微粒技术对血液样本中的目标细胞4进行分离,分离完成后得到附着于镀膜载玻片3表面的靶细胞6;

(4) 取出镀膜载玻片3,37°C干燥;

(5) 用丙酮固定镀膜载玻片3表面上的靶细胞6,并采用免疫荧光染料对镀膜载玻片3表面进行免疫荧光染色;

(6) 将染色后的镀膜载玻片3放置在显微镜下观察读片,识别靶细胞6和其余杂质细胞,其中细胞的免疫荧光显色反应满足判断标准的被判定为靶细胞6;

(7) 在显微镜观察下,采用激光切割带有单个靶细胞6的PEN膜2,并去除切割范围内的杂质细胞;

(8) 在显微镜观察下,将切割后的带有单个靶细胞6的PEN膜2通过针手动拾取膜,并将

其置于涂抹有粘合剂的PCR管7中,使PEN膜2的背面放置于粘合剂部分上;或者将切割后的带有单个靶细胞6的PEN膜2通过微流体在通道中收集单个靶细胞6,完成单细胞提取。其中涂抹有粘合剂的PCR管7可以采用市售的Zeiss Adhesive Cap管。

[0019] 其他实施例中,PEN膜2厚度可以为2 $\mu\text{m}$ 、4 $\mu\text{m}$ 或5 $\mu\text{m}$ 等,使用0.015%或0.02%(W/V)的多聚赖氨酸溶液处理PEN膜2表面,在载玻片1表面形成PEN膜2是用于更好地附着并承载捕获到的靶细胞6,其是进行后续操作的基础;使用多聚赖氨酸溶液处理PEN膜2表面是更加有利于固定靶细胞6,以便后续操作顺利进行。

[0020] 本实施例中,目标细胞4为肿瘤细胞,步骤(5)中采用的免疫荧光染料为:anti-CD45(小鼠抗细胞角蛋白,pan-FITC,Sigma-Aldrich,St)和anti-CK(AlexaFluor 594,Invitrogen);对镀膜载玻片3表面进行免疫荧光染色具体为:对干燥后的镀膜载玻片3先用anti-CK进行荧光标记,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育1小时,然后用PBST缓冲液漂洗;再对镀膜载玻片3用anti-CD45进行荧光标记,33 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育1小时,用PBST缓冲液漂洗后室温下干燥。步骤(6)中细胞的免疫荧光显色反应满足判断标准的被判定为靶细胞6具体为:细胞的免疫荧光显色反应满足CK为阳性且CD45为阴性的被判定为靶细胞6,其中CD45荧光标记鉴定污染的白细胞。

[0021] 本实施例中,步骤(2)中的配套试剂包括:血液前处理试剂、免疫磁微粒、细胞捕获增强剂、清洗液和质控品。步骤(3)中将血液样本进行预处理具体包括:取血样样本加入到15ml离心管中,然后加入3ml已经恢复到室温的血液前处理试剂,颠倒混匀后在离心力800g $\pm$ 200g,室温25 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下离心8~12min,本实施例中选择离心力800g,离心时间10min,去除血浆与红细胞;然后平稳地取出离心管,用移液器吸取上清液直至保留红细胞上部约1ml的上清液后停止;往上清液中加入血液前处理试剂至5ml,上下轻轻颠倒混匀离心管,确保底部没有沉淀;然后加入具有上皮细胞功能粘附分子(anti-EpCAM)的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性纳米粒子悬浮液(粒径大小:100~200nm)100 $\mu\text{l}$ ,上下轻轻颠倒混匀,并置于垂直混合仪上,在8-10rpm条件下孵育1.5h。

[0022] 微流体装置的结构原理如图1所示,将带有PEN膜2的载玻片装入微流体装置内,经过预处理的血液样本流经微流体通道8,并在磁体9的作用下进行捕获分离。捕获仪采用现有的CellRich<sup>TM</sup>免疫磁微粒捕获仪,型号为NLS-CR-001R2。设置捕获仪的运行参数为:磁微粒捕获速度2.5ml/hr,镀膜载玻片3的清洗速度5ml/hr。在其他实施例中,磁微粒捕获速度可以是2.2ml/hr、2.8 ml/hr、3 ml/hr等;金属纳米结构的SERS芯片1的清洗速度可以是4ml/hr、6 ml/hr等。其中,由实验得到当磁微粒捕获速度为2.5ml/hr,镀膜载玻片3的清洗速度为5ml/hr时,能够使捕获到的靶细胞6更为均匀地分布在PEN膜2表面,避免靶细胞6之间的相互重叠,有利于保证后续免疫荧光染色及激光切割质量,提高单细胞提取率。步骤(6)和步骤(7)中利用激光捕获显微切割技术,显微镜和激光采用蔡司激光显微切割系统(PALM Microbeam),切割PEN膜2的切割区域尺寸为500 $\mu\text{m}$  $\times$ 500 $\mu\text{m}$ ,由此能够利于操作者处理薄膜,切割区域内包含单个靶细胞6和少量杂质细胞,例如1-5个白细胞WBC,如图3所示,Cell表示靶细胞6,Void (removed WBC)表示切割移除白细胞留下的空缺。

[0023] 本实施例中,如图4所示,步骤(8)中通过微流体在通道中收集单个靶细胞6具体包括:首先用水相层流传输激光切割后附着在PEN膜2上的靶细胞6,然后用双相油-水混合形成油滴包裹的微液滴,完成对单个靶细胞6的收集。

**[0024] 实施例二**

以肿瘤细胞MCF-7和肿瘤细胞SKBR3样本为例,对MCF-7和SKBR3细胞进行精准分离与提取,具体方法如下:

(1) 在载玻片表面覆盖一层厚度为 $3\mu\text{m}$ 的PEN膜2,并使用0.01% (W/V) 的多聚赖氨酸溶液处理PEN膜2表面,得到镀膜载玻片;

(2) 将两个镀膜载玻片分别装入微流体装置内,并安装至捕获仪内,并安装配套使用的捕获耗材包及配套试剂;

(3) 用PBS缓冲液分别制备MCF-7和SKBR3细胞悬浮液,并取两份各2.5ml的健康人血液样本,往血液样本中分别加入10个肿瘤细胞MCF-7和10个肿瘤细胞SKBR3;

(4) 通过密度梯度离心法离心去除血浆与红细胞,然后加入具有上皮细胞功能粘附分子(anti-EpCAM)的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米粒子悬浮液(粒径大小:100~200nm);

(5) 将经过上述预处理的两份血液样本装载于捕获仪中,设置捕获仪的运行参数,采用免疫磁微粒技术对血液样本中的目标细胞进行分离,设置捕获仪的运行参数:磁微粒捕获速度:2.5ml/hr,清洗速度为5ml/hr,运行仪器,分离完成后得到附着于镀膜载玻片表面的MCF-7细胞和SKBR3细胞;

(6) 取出镀膜载玻片,37°C干燥;

(7) 用丙酮固定镀膜载玻片表面上的MCF-7细胞和SKBR3细胞,并采用免疫荧光染料anti-CD45和anti-CK对镀膜载玻片进行免疫荧光染色;

(8) 将染色后的镀膜载玻片分别放置在蔡司激光显微切割系统的显微镜下观察读片,分别识别MCF-7肿瘤细胞和SKBR3肿瘤细胞,其中CK阳性并且CD45阴性的细胞判定为肿瘤细胞,并记录结果;实验结果如图5所示,位于荧光成像图中部的为SKBR3肿瘤细胞(a)和MCF-7肿瘤细胞(b)被从血液中分离出来并附着于镀膜载玻片的PEN膜2上,CK-FITC染色为绿色,同时镀膜载玻片上还非特异性捕获了血液中的白细胞,AlexaFluor染色为红色;

(9) 采用激光分别切割单个SKBR3细胞和MCF-7细胞,切割面积为 $500\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ ,并去除切割范围内的杂质细胞;

(10) 将切割后的带有单个SKBR3细胞的PEN膜以及带有单个MCF-7细胞的PEN膜直接分别挑取至PCR管,或者通过油滴包裹的形式分别收集,完成对MCF-7细胞和SKBR3细胞的精准单细胞提取。

**[0025] 实验结果:**本实施例中最终鉴定并提取到10个SKBR3细胞和9个MCF-7细胞,本发明的单细胞捕获和提取效率可达90%以上。在多次重复试验中,对于SKBR3和MCF7细胞的加标实验,它们的单细胞捕获和提取效率均高于90%。

**[0026] 实施例三**

以2名肿瘤患者的外周血样本为例,对肿瘤细胞进行分离与提取,以验证本发明方法的可行性和有效性,具体方法如下:

(1) 在载玻片表面覆盖一层厚度为 $3\mu\text{m}$ 的PEN膜,并使用0.01% (W/V) 的多聚赖氨酸溶液处理PEN膜表面,得到镀膜载玻片;

(2) 将两个镀膜载玻片分别装入微流体装置内,并安装至捕获仪内,并安装配套使用的捕获耗材包及配套试剂;

(3) 分别采集两名患者外周血5ml作为样本,并置于抗凝管中,即时对每例样本进行检

测;其中抗凝管选用CellSave™抗凝管;

(4)通过密度梯度离心法离心去除血浆与红细胞,然后加入具有上皮细胞功能粘附分子(anti-EpCAM)的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>磁性纳米粒子悬浮液(粒径大小:100~200nm);

(5)将经过上述预处理的两份血液样本装载于捕获仪中,设置捕获仪的运行参数,采用免疫磁微粒技术对血液样本中的目标细胞进行分离,设置捕获仪的运行参数:磁微粒捕获速度:2.5ml/hr,清洗速度为5ml/hr,运行仪器,分离完成后得到附着于镀膜载玻片表面的患者肿瘤细胞;

(6)取出镀膜载玻片,37℃干燥;

(7)用丙酮固定镀膜载玻片表面上的细胞,并采用免疫荧光染料anti-CD45和anti-CK对镀膜载玻片进行免疫荧光染色;

(8)将染色后的镀膜载玻片分别放置在蔡司激光显微切割系统的显微镜下观察读片,识别肿瘤细胞,其中CK阳性并且CD45阴性的细胞判定为肿瘤细胞,并记录结果;实验结果如图6、图7所示,两名患者外周血中的肿瘤细胞被从血液中分离出来并附着于镀膜载玻片的PEN膜上;

(9)采用激光分别切割单个肿瘤细胞,切割面积根据实况调整,并去除切割范围内的杂质细胞;

(10)将切割后的两组带有单个肿瘤细胞的PEN膜直接分别挑取至PCR管,或者通过油滴包裹的形式分别收集,完成对不同患者肿瘤细胞的精准单细胞提取,备用于肿瘤细胞下游分析。

[0027] 实验结果:从肿瘤患者样品中,通常发现的癌细胞数为1-10个,根据通常对患者外周血样本的经验,从5mL血液中发现的CTC细胞数量大多在1到5个之间,此外多个细胞通常在细胞团中被发现并且可以在单个PEN膜中被提取。本实施例中,患者1和患者2中均鉴定并成功分离提取得到3个肿瘤细胞,用于下游应用分析。

[0028] 其中,2例肿瘤患者的血液样本信息如表1所示:

表1

序号	性别	年龄	肿瘤种类	分期	格里森评分	治疗方案
1	女	57	乳腺癌	未知	/	手术、化疗
2	女	33	乳腺癌	未知	/	手术

本发明的一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法,基于免疫磁微粒原理结合微流体技术从血液中捕获靶细胞,同时利用免疫荧光染色结合激光显微切割技术精准提取单细胞,本发明可实现单细胞捕获过程的自动化,减少化学试剂用量;单细胞捕获效率高,能够实现85%以上的单细胞捕获率;能够有效保持被分离提取细胞的完整性,有利于细胞下游分析应用;操作简便安全,为认识肿瘤的生物过程提供了全新视角。

[0029] 值得注意的是,以上所述仅为本发明的较佳实施例,并非因此限定本发明的专利保护范围,本发明还可以对上述各种零部件的构造进行材料和结构的改进,或者是采用技术等同物进行替换。故凡运用本发明的说明书及图示内容所作的等效结构变化,或直接或间接运用于其他相关技术领域均同理皆包含于本发明所涵盖的范围内。

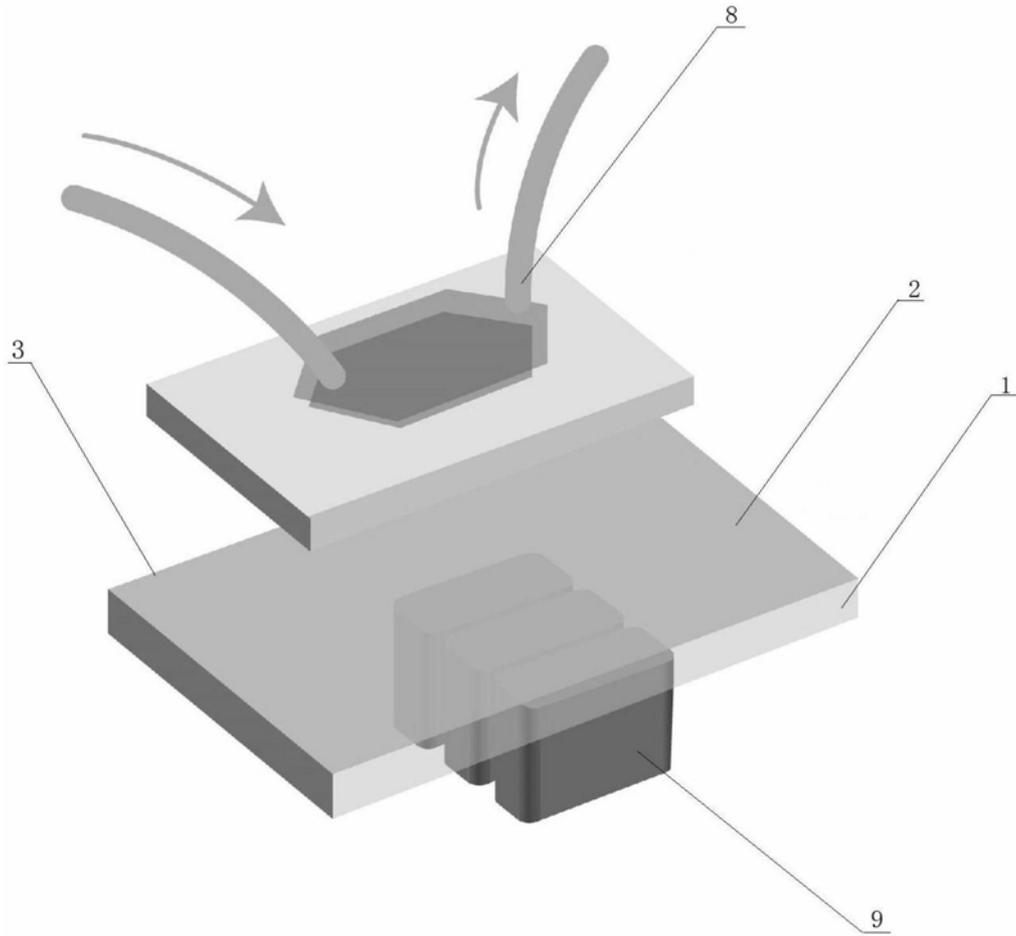


图1

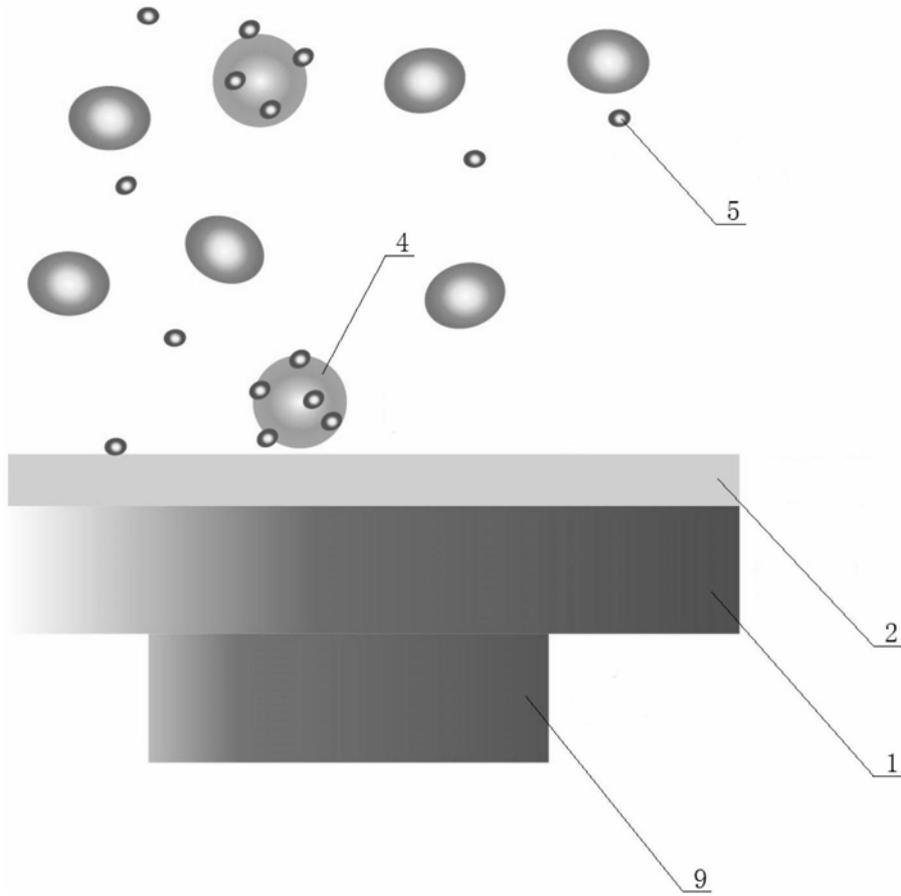


图2

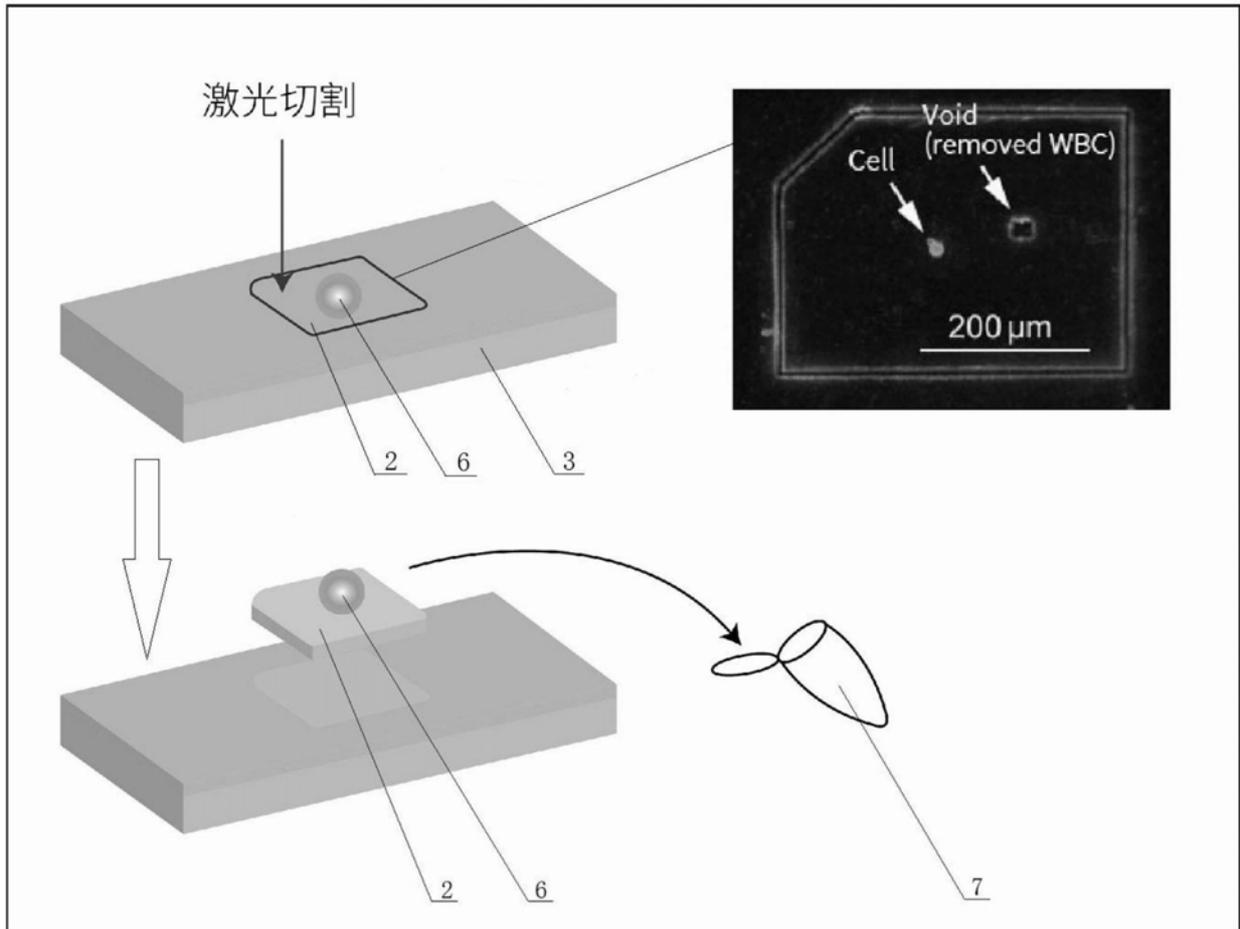


图3

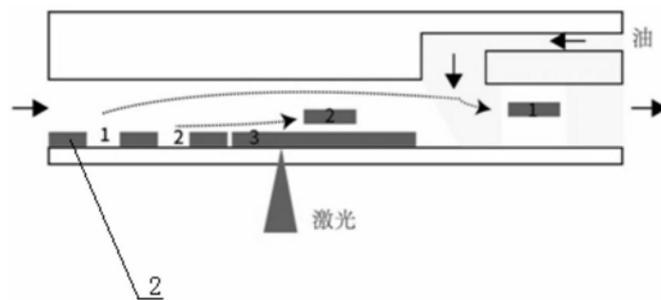


图4

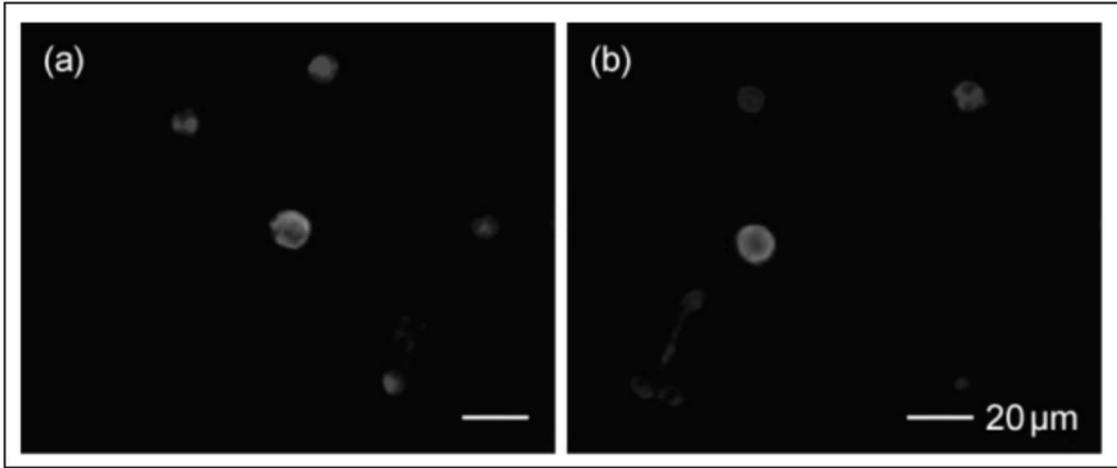


图5

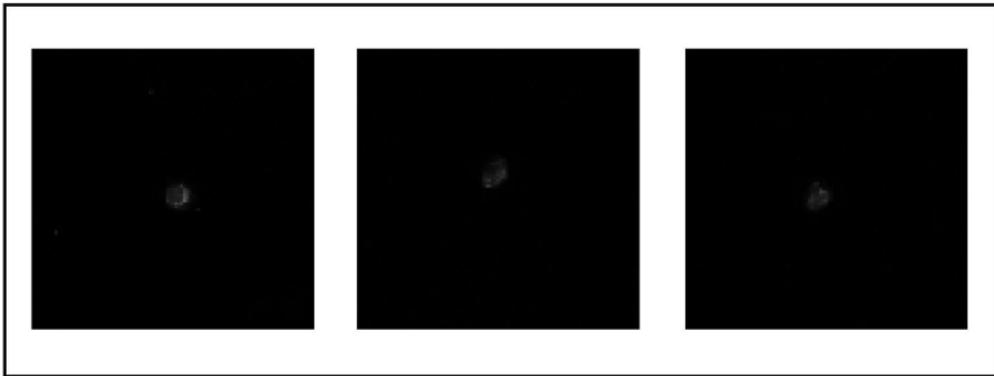


图6

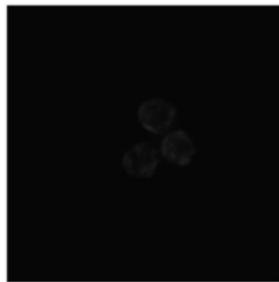


图7

专利名称(译)	一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109270262A</a>	公开(公告)日	2019-01-25
申请号	CN201811165822.X	申请日	2018-10-08
[标]申请(专利权)人(译)	宁波美晶医疗技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	宁波美晶医疗技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	宁波美晶医疗技术有限公司		
[标]发明人	张晓晶 沈挺		
发明人	张晓晶 沈挺		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533 C12N5/09		
CPC分类号	G01N33/54326 C12N5/0693 G01N33/533		
代理人(译)	陈怡菁		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种基于微流体技术的激光单细胞提取方法，特点是：包括在载玻片表面覆盖一层PEN膜，并使用多聚赖氨酸溶液处理PEN膜表面；将载玻片装入捕获仪的微流体装置内；将经预处理的血液样本装载于捕获仪中，采用免疫磁微粒技术对靶细胞进行分离；取出载玻片干燥；用丙酮固定靶细胞，并进行免疫荧光染色；显微镜下观察读片，识别靶细胞；采用激光切割单个靶细胞，并去除杂质细胞；将切割后的带有单个靶细胞的PEN膜挑取至PCR管，或通过微流体在通道中收集，完成单细胞提取；优点是：操作简便，可实现单细胞捕获过程的自动化，减少试剂用量，单细胞捕获效率和提取效率高，能够有效保持被分离提取细胞的完整性，有利于细胞下游分析应用。

