



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109781975 A

(43)申请公布日 2019.05.21

(21)申请号 201711121110.3

(22)申请日 2017.11.14

(71)申请人 河南乾坤科技有限公司

地址 450044 河南省郑州市金水区徐庄路
97号牛顿国际B栋6楼

(72)发明人 杨国华

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 陈静

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图5页

(54)发明名称

富集循环稀有细胞的试剂及方法

(57)摘要

本发明涉及富集循环稀有细胞(CRC)的试剂及方法。本发明揭示了一种利用优选的CD标志物组合对血液中白细胞进行分离、从而富集CRC的方法,该方法为负向分选方法。本发明的方法可大幅度地提高细胞的识别准确度,实现高纯度CRC分选的突破,获得的样本更有利于直接应用于进行后续的基因组分析。同时,本发明还提供了应用于该方法的微流体检测装置。

1. 一种从血液样品中富集循环稀有细胞的方法,其特征在于,所述方法包括:
从血液样品中分离去除红细胞;
应用携带可识别信号的抗体标记血液样品中的白细胞,应用荧光染料标记有核细胞;
通过可鉴别可识别信号以及荧光染料的装置检测细胞,并分离出无白细胞标记的有核细胞,最终获得富集的循环稀有细胞。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的抗体包括:抗CD45抗体;较佳地,所述的抗体是抗体组合,包括:抗CD45抗体、CD14抗体、抗CD55抗体、抗CD66b抗体、抗CD90抗体、抗CD33抗体和抗CD36抗体。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的可鉴别可识别信号以及荧光染料的装置是微流体检测装置,包括:

微流体结构(7),其包括单细胞通道(11),允许单细胞以稳定的流速通过,并存在多条单细胞通道以允许单细胞的分流;

荧光检测组件(5),根据不同的荧光信号对每个细胞进行甄别,快速确认其身份,判断是否在下一步对其进行分选;

微射流发生器(6),其包括微型金属导体,接受荧光检测组件(5)的分选信号、引发微热泡。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的可识别信号包括:FITC、PE、APC、Rhodamine B、Alexa 555;较佳地为FITC。

5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的荧光染料包括:DAPI或hoechst;较佳地为DAPI。

6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的分离去除红细胞的方法是裂解液裂解或密度梯度离心;或

通过应用携带可识别信号的抗体处理血液样本,从中分离去除红细胞;较佳地,应用于分离去除红细胞的识别信号不同于应用于去除白细胞的识别信号。

7. 抗体的用途,用于从血液样品中富集循环稀有细胞时,从样品中分离去除白细胞;所述的抗体包括抗CD45抗体;较佳地,所述的抗体是抗体组合,包括:抗CD14抗体,抗CD55抗体,抗CD66b抗体,抗CD90抗体,抗CD33抗体和抗CD36抗体。

8. 一种微流体检测装置,其特征在于,所述的微流体检测装置包括:

微流体结构(7),其包括单细胞通道(11),允许单细胞以稳定的流速通过,并存在多条单细胞通道以允许单细胞的分流;

荧光检测组件(5),根据不同的荧光信号对每个细胞进行甄别,快速确认其身份,判断是否在下一步对其进行分选;

微射流发生器(6),其包括微型金属导体,接受荧光检测组件(5)的分选信号、引发微热泡。

9. 如权利要求8所述的微流体检测装置,其特征在于,所述的微流体检测装置中,包括:
基片(8);

位于基片上的微射流发生器(6);

位于微射流发生器(6)上的微流体结构(7);

位于微流体结构(7)上的盖片(10);

较佳地,微射流发生器(6)存在于保护层(9)中,该保护层在基片(8)与微流体结构(7)之间。

10.一种用于从血液样品中富集循环稀有细胞的试剂盒,其特征在于,其中包括权利要求8或9所述的微流体检测装置;

携带可识别信号的抗体;所述抗体包括抗CD45抗体;较佳地,所述的抗体是抗体组合,包括:抗CD14抗体,抗CD55抗体,抗CD66b抗体,抗CD90抗体,抗CD33抗体和抗CD36抗体;以及标记有核细胞的荧光染料。

富集循环稀有细胞的试剂及方法

技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤学领域,更具体地,本发明涉及富集循环稀有细胞的试剂、其用途,以及富集循环稀有细胞的方法。

背景技术

[0002] 目前癌症个体化治疗方案的制定依赖于组织标本中肿瘤信息,但是在临床实践中组织标本难以获得,尤其在治疗过程中和癌症转移初期的组织标本。因此,寻找组织标本的替代者是目前癌症治疗监控与耐药机制研究最迫切的要求。

[0003] 循环肿瘤细胞(CTC)是从原发肿瘤释放出来的细胞,其携带肿瘤特有的生物学信息。由于外周血检测的方便和及时性,CTC作为易获得的肿瘤信息载体可以提供动态监控肿瘤生物学特性变化的样本;科学研究也表明CTC是一个独立的肿瘤预后和预测因子,对患者CTC数量的动态监测可以及时了解患者疾病的进展状况以及干预治疗的效果。因此,研发并完善循环肿瘤细胞检测技术,使之可以更灵敏的检测多种类型的肿瘤和监控早中期患者的病情,能节约大量治疗成本,提高患者的生存质量,具有极大的社会意义。

[0004] 循环肿瘤细胞被包含在循环稀有细胞(Circulating rare cells,CRC)中,CRC的检测与分离的技术本质就是如何对CRC从原始血样中加以辨认,然后将其从其他血细胞分离出来。当前CRC的分离技术主要分为两大类。

[0005] 第一类方法是基于CTC的物理特征,如尺寸,变形率和电阻抗,对CRC和其他细胞进行区分和分离。然而,在细胞形态水平上,不同类型癌症的患者,同一种癌症的不同患者甚至同一患者血液中的CRC形态大小差异巨大。此外,虽然有一部分CRC尺寸明显大于白细胞,仍然有不少CRC的尺寸与形态与正常白细胞差别很小。因此,除了基于细胞尺寸的分离已经成功用于某些已知的大尺寸CRC,特别是CRC形成的细胞微栓,其余的分离技术尚未得到充分的病例验证。特别是其物理机理尚不清晰,尚未得到广泛验证与接受。

[0006] 第二类方法基于CRC表面的蛋白标志物,采用磁珠或者某些微流体结构针对某些已知细胞标志物对CRC进行正向富集(如采用EpCAM),或对白细胞进行负向去除(如采用CD45)。然而这两类CRC分离方法的缺点也非常明显。基于特定标志物的正向富集虽然容易获得较高的CRC纯度(>1%),但其提取率强烈依赖某些CRC特定标志物的表达水平,对不表达或低表达该蛋白的CRC无能为力。具有极强入侵能力的CRC均经历上皮细胞向间充质细胞的转化过程(EMT,epithelial mesenchymal transition)。其现象是细胞上的表皮细胞特征(如EpCAM)消失,而间充质细胞标志蛋白获得表达。因此,基于EpCAM的CRC分离技术无法富集这一类极其重要的细胞。比如目前唯一商用的CellSearch系统仅能有效检测某几种癌症(如乳腺癌、结肠癌和前列腺癌)的晚期癌症患者,而对一些发病率高和死亡率高的肿瘤(如肺癌,肝癌和胃癌),该技术难以有效检出。此外,CellSearch对于癌症的早中期患者,检出率低于10%。另外,基于标志物的正向分离技术往往需要对细胞进行固定化、穿孔与细胞质角蛋白标记。经历这个过程后细胞已失去活性,无法用于很多后续分析譬如细胞培养和药物作用等。

[0007] 与正向分离相比,负向分离技术采用白细胞特征标志物,力求最大程度地去除白细胞。整个过程不依赖肿瘤细胞标志物,可以最大限度地保留各种不同类型的CRC。然而目前的单一白细胞标志物均无法将白细胞全部标记和去除,因此尽管存留的CRC提取率很高,纯度却不太理想,通常在0.1%以下,无法对样品直接进行基因型分析。

[0008] 因此,目前CRC的检测技术仍然存在着检测灵敏度低、适应肿瘤类型少、装置操作复杂和检测成本高昂的缺陷。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种富集循环稀有细胞(Circulating rare cells,CRC)的试剂及方法。

[0010] 在本发明的第一方面,提供一种从血液样品(离体样品)中富集循环稀有细胞(CRC)的方法,其特征在于,所述方法包括:

[0011] 从血液样品中分离去除红细胞;

[0012] 应用携带可识别信号的抗体标记血液样品中的白细胞,应用荧光染料标记有核细胞;

[0013] 通过可鉴别可识别信号以及荧光染料的装置检测细胞,并分离出无白细胞标记的有核细胞,最终获得富集的循环稀有细胞。

[0014] 在一个优选例中,所述的抗体包括:抗CD45抗体。

[0015] 在另一优选例中,所述的抗体是抗体组合,包括:抗CD45抗体、CD14抗体、抗CD55抗体、抗CD66b抗体、抗CD90抗体、抗CD33抗体和抗CD36抗体。

[0016] 在另一优选例中,所述的方法为非诊断性及非治疗性的方法。

[0017] 在另一优选例中,所述的可鉴别可识别信号以及荧光染料的装置是微流体检测装置,包括:

[0018] 微流体结构(7),其包括单细胞通道(11),允许单细胞以稳定的流速通过,并存在多条单细胞通道以允许单细胞的分流;

[0019] 荧光检测组件(5),根据不同的荧光信号对每个细胞进行甄别,快速确认其身份,判断是否在下一步对其进行分选;

[0020] 微射流发生器(6),其包括微型金属导体,接受荧光检测组件(5)的分选信号、引发微热泡。

[0021] 在另一优选例中,所述的可识别信号包括(但不限于):FITC,PE、APC、Rhodamine B、Alexa 555;较佳地为FITC。

[0022] 在另一优选例中,所述的荧光染料包括(但不限于):DAPI或hoechst;较佳地为DAPI。

[0023] 在另一优选例中,所述的分离去除红细胞的方法是裂解液裂解或密度梯度离心;或

[0024] 通过应用携带可识别信号的抗体处理血液样本,从中分离去除红细胞;较佳地,应用于分离去除红细胞的识别信号不同于应用于去除白细胞的识别信号。

[0025] 在本发明的另一方面,提供抗体的用途,用于从血液样品中富集循环稀有细胞时,从样品中分离去除白细胞;所述的抗体包括抗CD45抗体;较佳地,所述的抗体是抗体组合,

包括：抗CD14抗体，抗CD55抗体，抗CD66b抗体，抗CD90抗体，抗CD33抗体和抗CD36抗体。

[0026] 在一个优选例中，所述的用途为非诊断性及非治疗性的用途。

[0027] 在本发明的另一方面，提供一种微流体检测装置，所述的微流体检测装置包括：

[0028] 微流体结构(7)，其包括单细胞通道(11)，允许单细胞以稳定的流速通过，并存在多条单细胞通道以允许单细胞的分流；

[0029] 荧光检测组件(5)，根据不同的荧光信号对每个细胞进行甄别，快速确认其身份，判断是否在下一步对其进行分选；

[0030] 微射流发生器(6)，其包括微型金属导体，接受荧光检测组件(5)的分选信号、引发微热泡。

[0031] 在一个优选例中，所述的微流体检测装置中，包括：

[0032] 基片(8)；

[0033] 位于基片上的微射流发生器(6)；

[0034] 位于微射流发生器(6)上的微流体结构(7)；

[0035] 位于微流体结构(7)上的盖片(10)；

[0036] 较佳地，微射流发生器(6)存在于一保护层(9)中，该保护层在基片(8)与微流体结构(7)之间。

[0037] 在另一优选例中，所述的保护层(9)如二氧化硅保护层。

[0038] 在本发明的另一方面，提供一种用于从血液样品中富集循环稀有细胞的试剂盒，其中包括所述的微流体检测装置；

[0039] 携带可识别信号的抗体；所述抗体包括抗CD45抗体；较佳地，所述的抗体是抗体组合，包括：抗CD14抗体，抗CD55抗体，抗CD66b抗体，抗CD90抗体，抗CD33抗体和抗CD36抗体；以及

[0040] 标记有核细胞的荧光染料。

[0041] 本发明的其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0042] 图1、基于负向分选的CRC微流体检测系统架构。

[0043] 其中，1为样本入口；

[0044] 2为剩余细胞收集管；

[0045] 3为CRC收集管；

[0046] 4为细胞(红色为DAPI-FITC+/-细胞、蓝色为DAPI+FITC+细胞、橘色为DAPI+FITC-细胞)；

[0047] 5为CRC荧光检测组件；

[0048] 6为微射流发生器；

[0049] 7为微流体结构。

[0050] 图2、微热泡射流芯片的加工步骤，整个步骤依次经历a)、b)、c)、d)步骤。

[0051] 其中，6为微射流发生器；

[0052] 7为微流体结构；

- [0053] 8为基片；
- [0054] 9为保护层；
- [0055] 10为盖片；
- [0056] 11为单细胞通道；
- [0057] 其中的保护层为二氧化硅保护层。
- [0058] 图3、未染色的对照样本的流式检测结果。
- [0059] 图4、经CD45-FITC和DAPI染色的样本的流式检测结果。
- [0060] 图5、经多重CD荧光抗体和DAPI染色的样本的流式检测结果。
- [0061] 图3~图5中，FSC表示细胞的相对大小，FSC的值越大表示细胞越大；SSC表示的是细胞内部复杂程度，SSC的值越大说明细胞内部的颗粒越多。R1区代表淋巴细胞，R2区代表单核细胞和粒细胞，R3区代表未除尽的红细胞、血小板和细胞碎片。FL1代表DAPI检测通道，FL2代表FITC检测通道。Total events表示流式检测时样本总的进样细胞数，Gated events分别表示R1、R2和R3区域相应的细胞数。
- [0062] 图6、掺入KB细胞的血样经该检测系统分选后的免疫荧光染色鉴定结果；
- [0063] (A) 掺入20个KB细胞；
- [0064] (B) 掺入50个KB细胞；
- [0065] 掺入KB细胞的血样经该检测系统分选后，阳性收集管中富集到的细胞包括：DAPI⁺表示所有被分选至阳性收集管中的细胞；FITC表示被错误分选至阳性收集管中的白细胞；DAPI⁺FITC⁻Pan-Keratin⁻表示未被CD系列荧光抗体标记上的白细胞；Pan-Keratin⁺表示KB细胞；DAPI⁺FITC⁻Pan-Keratin⁺即表示CRC细胞，此处的KB细胞为癌细胞，掺入到血液样本中用以模仿CRC细胞。

具体实施方式

[0066] 针对现有产品和技术的问题与难点，本发明人经过深入的研究，揭示了一种利用优选的CD标志物组合对血液中白细胞进行分离、从而富集循环稀有细胞(CRC)的方法，该方法为负向分选方法。本发明的方法可大幅度地提高细胞的识别准确度，实现高纯度CRC分选的突破，获得的样本更有利于直接应用于进行后续的基因组分析。同时，本发明还提供了应用于该方法的微流体检测装置。

[0067] 如本文所用，所述的循环稀有细胞(CRC)包括循环肿瘤细胞(CTC)。

[0068] 富集循环稀有细胞的方法

[0069] 本发明人致力于从血液中分离CRC的研究，在研究前期发现，若是采用正向分离的方法，直接从血液中分离CRC，则分离效率不高，血液中将仍然存在较多的CRC，只能实现粗略定性，无法实现精确定性以及定量。若是采用负向分离的方法，则在从样品中分离掉红细胞后，再去除白细胞的效率并不理想，最终的产物中往往残余较多的白细胞。

[0070] 针对白细胞难以高效率地被排除的问题，本发明人进行了大量的研究，人类白细胞表面抗原(CD)的数量可观，多于100种。以往，人们一般采用单个CD来分选白细胞，即CD45。本发明人发现，采用抗CD45的抗体去结合、分离白细胞，获得的经分离的产物中仍然存在较多的白细胞。因此，本发明人又针对大量的CD进行了分析、筛选，从中选择了CD45、CD14、CD55、CD66b、CD90、CD33和CD36作为联合靶标。因此，本发明的最优选的方法中，联合

应用抗CD45抗体,抗CD14抗体,抗CD55抗体,抗CD66b抗体,抗CD90抗体,抗CD33抗体和抗CD36抗体来从血液样品中分离白细胞,获得富集的循环稀有细胞产物。利用联合抗体的进行分选,可以极为显著地降低未标记白细胞的比例。

[0071] 因此,本发明揭示了一种从血液样品中富集循环稀有细胞的方法,所述方法包括:从血液样品中分离去除红细胞;应用携带可识别信号的抗体标记血液样品中的白细胞,应用荧光染料标记有核细胞;通过可鉴别可识别信号以及荧光染料的装置检测细胞,并分离出无白细胞标记的有核细胞,最终获得富集的循环稀有细胞。作为本发明的优选方式,所述的抗体是一种抗体组合,包括抗CD45抗体,抗CD14抗体,抗CD55抗体,抗CD66b抗体,抗CD90抗体,抗CD33抗体和抗CD36抗体。

[0072] 从血液样品中分离去除红细胞的方法可以采用本领域已知的分离方法。作为本发明的优选方式,采用离心的方法来去除红细胞,所述的离心是差速离心。作为本发明的另一优选方式,通过应用携带可识别信号的抗体处理血液样本,从中分离去除红细胞;较佳地,应用于分离去除红细胞的识别信号不同于应用于去除白细胞的识别信号。例如,应用于分离去除红细胞的识别信号为信号1,则应用于去除白细胞的识别信号为信号2。

[0073] 本发明中,术语“可识别信号”是指在光源的照射下,能够产生不同的信号,实现细胞区分的标识或标记。作为本发明的优选方式,所述的识别信号是各种荧光标记。更优选地,所述的识别信号选自(但不限于):FITC,DAPI,PE、APC、Rhodamine B、Alexa 555。作为本发明的优选方式,所述的识别信号为FITC。

[0074] 细胞标记部分的目的在于,通过荧光染色,尽可能准确地区分血细胞和CRC。在血样上机检测前,对样品中的所有细胞进行多重标志物的染色,也可以先对全血样本进行处理去除大部分的红细胞(如密度梯度离心或红细胞裂解等),然后再对白细胞和CRC进行染色。比如实施例2中,一方面,采用细胞核染料(如DAPI)对白细胞和CRC进行核染,以区分(排除)少量残留的红细胞、血小板和细胞膜碎片。另一方面,针对多种特异性的白细胞表面抗原,采用相应的荧光抗体(如CD-FITC)进行染色,以最大程度地标记上所有白细胞。则DAPI+FITC-的细胞将被判读为CRC,DAPI+FITC+的细胞将被判定为白细胞。

[0075] 作为本发明的优选方式,在从血液样品中富集循环稀有细胞时,在分离去除白细胞后,应用本发明的微流体检测装置进行进一步分选,获得富集的循环稀有细胞。

[0076] 将标记好的细胞输入通过微流体检测装置的入口,采用微流体技术持续稳定地产生单个细胞的串行细胞流。该细胞流中的细胞可逐个地通过光学检测窗口和后续的细胞分选单元。

[0077] 本发明的基于负向分选的方法及微流体检测装置,相比较于其他CRC分选技术,其主要优点如下:

[0078] (1) 在细胞标记部分,该技术采用多重CD标志物对白细胞进行标记后,将其负向去除,一方面可以对剩下的所有类型的CRC进行不遗漏的分选,能够极大提高CRC的检测灵敏度和分选效率,避免了依赖某个特异的CRC标志物对CRC进行识别可能引起的假阴性问题。另一方面,采用本发明优选的多重白细胞标志物克服了使用单一标志物(通常为CD45)造成剩余白细胞过多的问题,有助于大幅度提高细胞的识别准确度,实现高纯度CRC分选的突破,使样本可以用于后续的基因组分析。

[0079] (2) 细胞的检测和分选均对单个细胞进行操作,可极大提高分选准确率。整个过程

无需细胞固定化、透化、或角质蛋白染色,且对细胞的机械损伤作用小,分选后的细胞仍然保持细胞活性,可以直接进行体外培养,用于研究肿瘤耐药机制的产生,指导肿瘤的个体化治疗。

[0080] (3) 检测方法具备足够弹性,可由用户根据具体情况调整参数组合,针对不同种类的癌症,设置不同的检测参数,使该检测系统适用面更广,可以适用于更多种类或不同亚型的癌症检测。并且分离方式(正向或负向)可以根据CRC类型或用户需求调节。

[0081] (4) 检测与分选集成在全封闭系统中,可杜绝样品污染。制备工艺简单,无需对其内部结构进行繁复的化学修饰,无微柱或孔等复杂结构,不容易造成细胞在分选过程中的阻塞。

[0082] (5) 高度微型化、集成化、自动化,成本低、操作简便,对临床样本的适应性强。

[0083] 该检测系统的应用方向有两个方面:在科学研究方面,可以分选高纯度活性CRC细胞,为肿瘤的耐药机制和转移机制提供最直接的研究样本。在临床应用方面,为目前极为迫切的癌症检测需求提供自动化、适用于大多数癌症种类的CRC检测平台;为临床提供诊断依据,动态监控肿瘤在治疗中的变化,并为患者提供预后评测。

[0084] 微流体检测装置

[0085] 本发明人发现,采用常规的FACS仪器来进行细胞分选CRC时,细胞损坏严重,使得定性、定量检测的效果不理想。因此,本发明人还优化了应用于进行细胞分选的装置。

[0086] 本发明的应用于基于负向分选的CRC检测的微流体检测系统,其总体结构如图1所示,包括:微流体结构7,其包括单细胞通道,允许单细胞以稳定的流速通过,并存在多条单细胞通道以允许单细胞的分流;荧光检测组件5,根据不同的荧光信号对每个细胞进行甄别,快速确认其身份,判断是否在下一步对其进行分选;微射流发生器6,其包括微型金属导体,接受荧光检测组件5的分选信号、引发微热泡。

[0087] 不同身份的细胞,经由不同的单细胞通道被分流至不同的收集容器中。

[0088] 试剂盒

[0089] 基于本发明人的新发现,本发明还提供了一种应用于从血液样品中富集循环稀有细胞的试剂盒,其中包括本发明所述的微流体检测装置;携带可识别信号的抗体;所述的抗体是抗CD45抗体,抗CD14抗体,抗CD55抗体,抗CD66b抗体,抗CD90抗体,抗CD33抗体和抗CD36抗体的组合;以及,标记有核细胞的荧光染料。

[0090] 为了便于本领域技术人员应用,本发明所述的试剂盒中,还包括说明如何从血液样品中富集循环稀有细胞的方法的使用说明书。例如,可以在使用说明书中记载本发明前述的方法。

[0091] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如J. 萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,第三版,科学出版社,2002中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0092] 生物材料及仪器

[0093] 红细胞裂解液(R1010)购自北京索莱宝科技有限公司。

[0094] KB细胞株购自中科院上海细胞库。

[0095] 荧光抗体CD45-FITC (REF MHCD4501, LOT 1669391A)、CD14-FITC (REF MHCD1401,

LOT 767825I)、CD90-FITC (REF A15761, LOT 521928)、CD33-FITC (REF A15763, LOT 521680)、CD36-FITC (REF MA1-19771, LOT QH2076195) 及细胞核染料DAPI (REF D1306, LOT 876632) 均购自ThermoFisher公司。

[0096] CD55-FITC (REF MA1-19573, LOT QK2121353) 购自Pierce公司。

[0097] CD66b-FITC (REF555724, LOT12597) 购自BD公司。

[0098] Pan-Keratin (C11)-Alexa 555 (#3478) 购自Cell Signaling公司。

[0099] 其余试剂均购自Sigma Aldrich。

[0100] CRC微流体检测系统相关硬件组件购自比利时微电子研究中心 (IMEC)。

[0101] 实施例1、CRC微流体检测系统的制备

[0102] 本发明的CRC微流体检测系统硬件部分的核心是微型金属导体,通过接收CRC荧光检测组件5的分选信号,引发从微射流发生器6发出的微热泡,驱动微热泡射流单元腔体内的流体喷射出腔体,推动正好经过分选节点的CRC进入阳性通道。

[0103] 其制备加工过程如图2所示,首先提供基片8,将微热泡发生的金属导体(如铝或铜)采用光刻技术加工在硅或玻璃基片上,并在其上沉积保护层(如二氧化硅)(图2步骤a)、b)。与此同时,在另一片玻璃盖片9上加工微流体结构,并与事先加工好的金属导体器件进行键合(图2步骤c)、d)。主体部分完成后,将被封装在一个包含了输入输出部分的卡盒里。

[0104] 该器件的原理简单,易于加工,可应用于任何细胞的流体分选,采用微加工工艺加工保证器件精度、生产规模以及成本。

[0105] 实施例2、白细胞荧光标记抗体的筛选

[0106] 针对预处理以后的CRC与白细胞的混合样品,关键在于如何有效地采用多重标记最大程度地去除白细胞,提高CRC的识别率和特异性。本发明人采用流式细胞仪考察了多重CD荧光抗体对白细胞的标记效率。

[0107] 取两份3mL健康人血样,实验步骤如下:

[0108] (1) 去除红细胞:将全血用等量的PBS稀释后缓慢加入到装有等体积histopaque的离心管中,2000rpm离心30min;血液离心后,获取位于血浆和红细胞层之间的细胞层;

[0109] (2) 洗涤:将(1)的细胞层的细胞轻轻取出,加入等量的PBS洗涤,600g离心15min;500μL PBS重悬细胞沉淀;

[0110] (3) 荧光抗体染色:其中一份样本,选取下列抗体的组合标记白细胞:CD45-FITC、CD14-FITC、CD55-FITC、CD66b-FITC、CD90-FITC、CD33-FITC、CD36-FITC,各10μL;另一份样本,只加入CD45-FITC,10μL;室温避光孵育40min;

[0111] (4) 核染色标记有核细胞:DAPI,5μL,室温避光孵育2min;所有有核细胞,包括白细胞和CRC细胞被染色;

[0112] (5) 洗涤:1mL PBS洗涤3次,600g离心10min;

[0113] (6) 检测:500μL PBS重悬细胞沉淀,流式细胞仪(BD LSR II)检测;

[0114] (7) 同时以未进行细胞染色处理的样本作为阴性对照,调节流式检测电压和阈值线,使99%的细胞荧光信号值为阴性。

[0115] 结果见图3~图5。

[0116] 以上结果显示,只用CD45-FITC染色时,未被标记到的白细胞数(R1、R2、R3的UL区域之和)占总的进样细胞数的比例为0.04%,而采用多重CD荧光抗体染色时,未被标记到的

白细胞数占总的进样细胞数的比例为0.01%。

[0117] 上述结果说明,通过标记多重CD荧光抗体可以区分绝大多数的白细胞与CRC,有助于获得高纯度的CRC。

[0118] 进一步的实验显示,CD45-FITC+CD90-FITC组合的未标记比例为0.04%,CD45-FITC+CD34-FITC组合的未标记比例为0.03%,CD45+CD50的未标记比例为0.03%,未标记比例均比所述的CD45-FITC、CD14-FITC、CD55-FITC、CD66b-FITC、CD90-FITC、CD33-FITC和CD36-FITC的组合高。

[0119] 实施例3、本发明的CRC微流体检测系统的建立

[0120] 如图1,建立本发明的微流体检测装置。所述的微流体检测装置包括微流体结构7,其包括单细胞通道,允许单细胞以稳定的流速通过,该单细胞通道起始于样本入口1,其下游存在多条单细胞通道以允许单细胞的分流,一个通道通向CRC收集管3,另一或多条通道通向剩余细胞收集管2;荧光检测组件5,可根据不同的荧光信号对每个细胞进行甄别,快速确认其身份,判断是否在下一步对其进行分选;微射流发生器6,其包括微型金属导体,接受荧光检测组件5的分选信号、引发微热泡,推动细胞的分流。

[0121] 在进行分选时,经过染色的活细胞4的细胞流从图1中微流体检测装置的样本入口1进入单细胞通道,经过荧光检测组件5,荧光检测组件5能够识别细胞所携带的染色标记的不同,将识别的信息传递给微射流发生器6,如果该细胞不是CRC,则不被分选,该细胞径直流向中间(或上方)的剩余细胞收集管2收集。而如果该细胞被判断为CRC,则启动分选,改变其流向,使之进入阳性通道,由CRC收集管3收集,从而实现CRC的富集。

[0122] 实施例4、基于负向分选的CRC微流体检测系统的性能检测

[0123] 取3mL健康人血样,分别掺入20和50个KB细胞(人口腔表皮样癌细胞),模拟含有CRC的肿瘤病人血样,考察本发明的检测系统对CRC的分选性能,实验步骤如下:

[0124] (1) 去除红细胞:将全血用等量的PBS稀释后缓慢加入到装有等体积histopaque的离心管中,2000rpm离心30min;血液离心后,获取位于血浆和红细胞层之间的细胞层;

[0125] (2) 洗涤:将细胞层的细胞轻轻取出,加入等量的PBS洗涤,600g离心15min;PBS重悬细胞沉淀。

[0126] (3) 荧光抗体染色:选取下列抗体的组合标记白细胞:CD45-FITC、CD14-FITC、CD55-FITC、CD66b-FITC、CD90-FITC、CD33-FITC、CD36-FITC,各10 μ L,室温避光孵育40min。

[0127] (4) 核染色标记有核细胞:DAPI,5 μ L,室温避光孵育2min。所有有核细胞,包括白细胞和CRC细胞被染色。

[0128] (5) 细胞分选:将细胞悬液以1,000个细胞/sec的流速通过本发明的CRC微流体检测系统,将分选至阳性通道的细胞收集到收集管中。

[0129] (6) 细胞鉴定:按照下述步骤对阳性收集管中富集的细胞进行染色鉴定,计算该检测系统分选的回收率和纯度。

[0130] 滴片:向收集管中加入100 μ L PBS,重悬细胞沉淀,并将细胞悬液全部滴于载玻片上的标记区域内,37 $^{\circ}$ C烘箱干燥;置于装有PBS的染色缸中水化2min;

[0131] 穿膜:从染色缸中取出样品,加入100.0 μ L 0.1%Triton X-100室温穿膜10min;

[0132] 洗涤:将样品置于装有PBS的染色缸中洗涤2次;

[0133] 封闭:从染色缸中取出样品,加入100.0 μ L 1%BSA室温封闭30min;

[0134] 抗体孵育:除去封闭液,加入KB细胞特异性的Pan-Keratin (C11)-Alexa555抗体,0.05ml/片(1/25),室温避光孵育60min。

[0135] 洗涤:将样品置于装有PBS的染色缸中洗涤2次;

[0136] 封片:从染色缸中取出样品,加入抗荧光淬灭封片液后,用盖玻片封片;

[0137] 检测:荧光显微镜(OLYMPUS)下观察荧光信号。

[0138] 结果见图6和表1。

[0139] 表1

[0140]	掺入 KB 细胞数	分选后检出 KB 细胞数	分选后检出 白细胞数	回收率	纯度
	20	17	143	85.0%	10.6%
	50	41	152	82.0%	21.2%

[0141] 以上结果显示,采用基于负向筛选的CRC微流体检测系统对阳性细胞(CRC)的分选回收率不低于80%,纯度不低于10%。

[0142] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

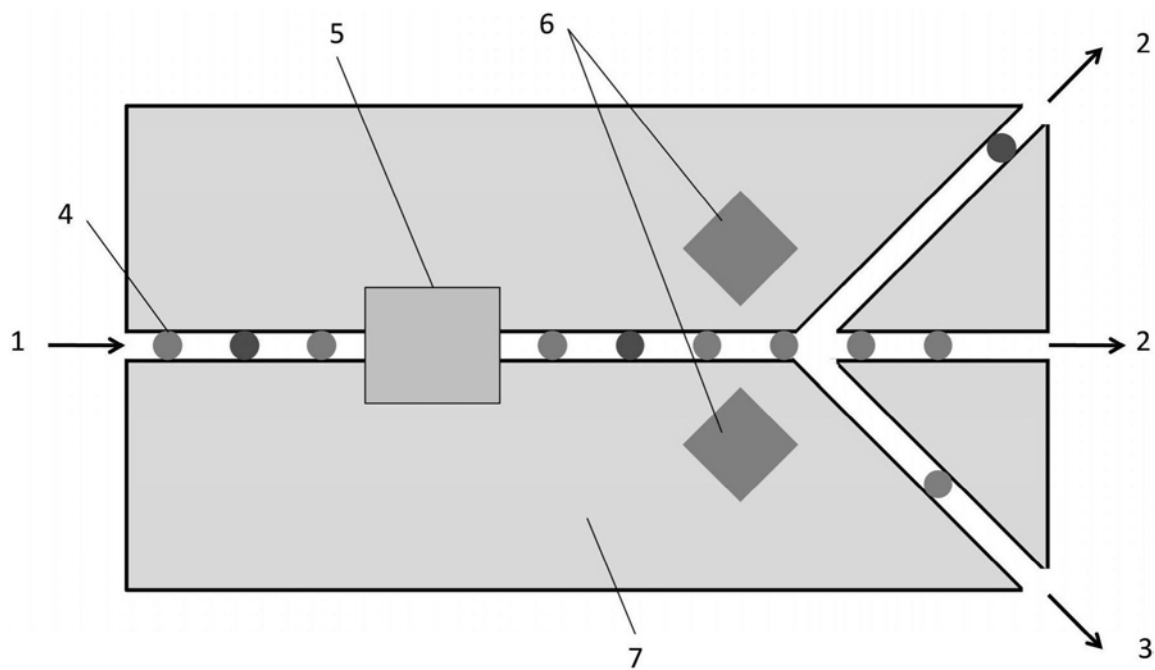


图1

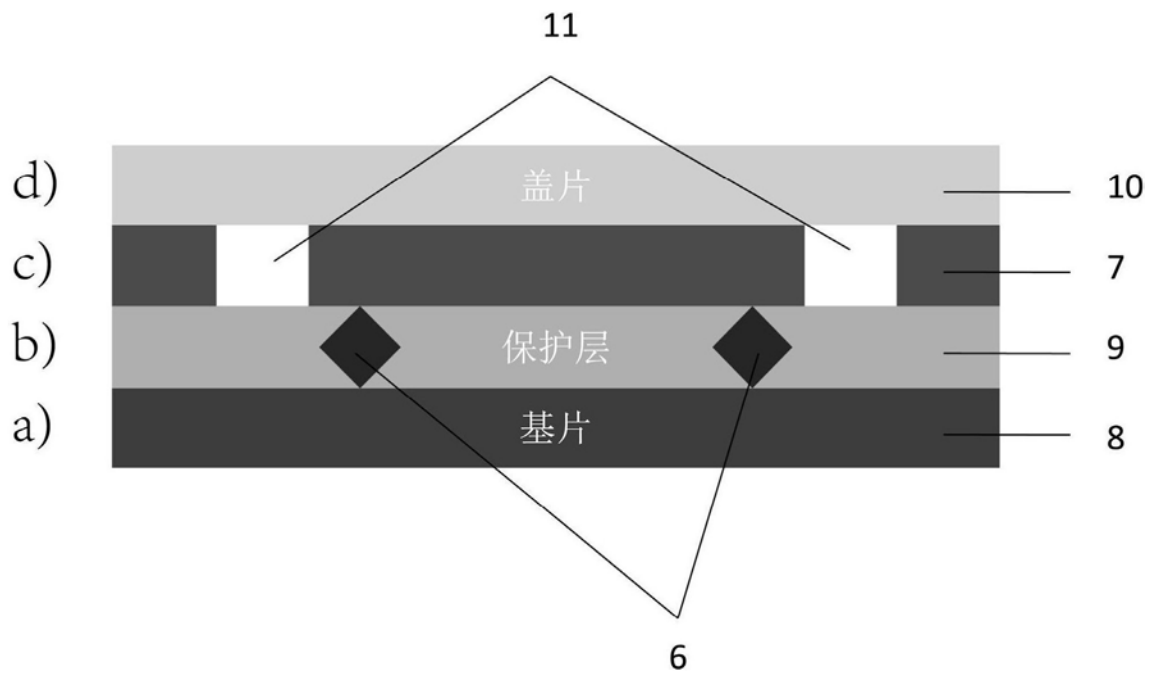
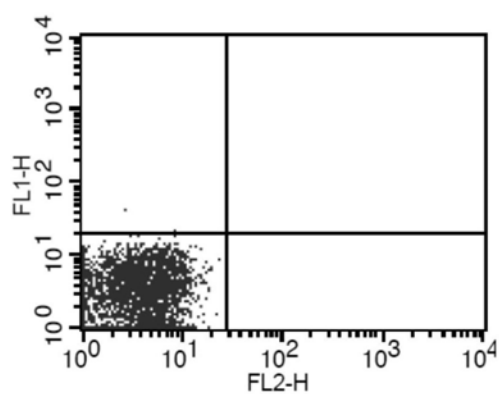
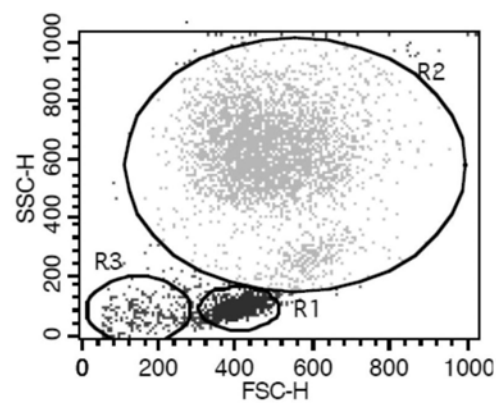


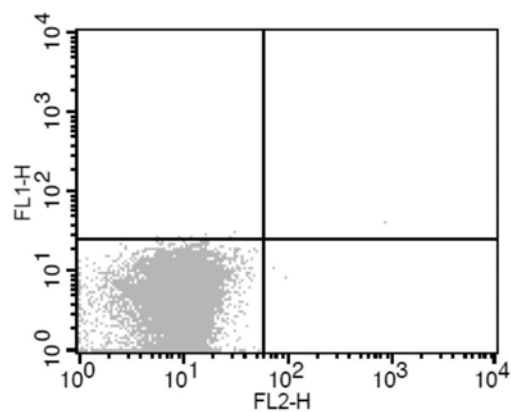
图2



Total Events: 1028843

Gated Events: 174982

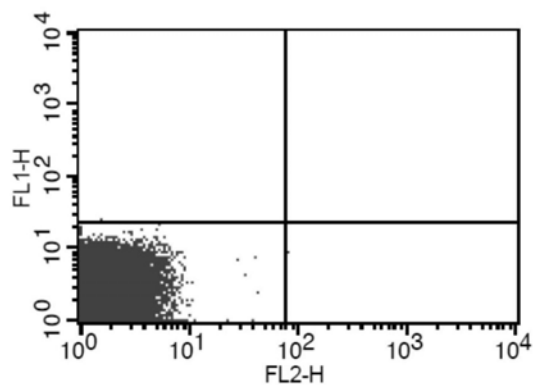
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	112	0.06	0.01
UR	2	0.00	0.00
LL	174856	99.93	17.00
LR	12	0.01	0.00



Total Events: 1028843

Gated Events: 765500

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1064	0.14	0.10
UR	60	0.01	0.01
LL	764204	99.83	74.28
LR	172	0.02	0.02



Total Events: 1028843

Gated Events: 48790

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	9	0.02	0.00
UR	0	0.00	0.00
LL	48778	99.98	4.74
LR	2	0.00	0.00

图3

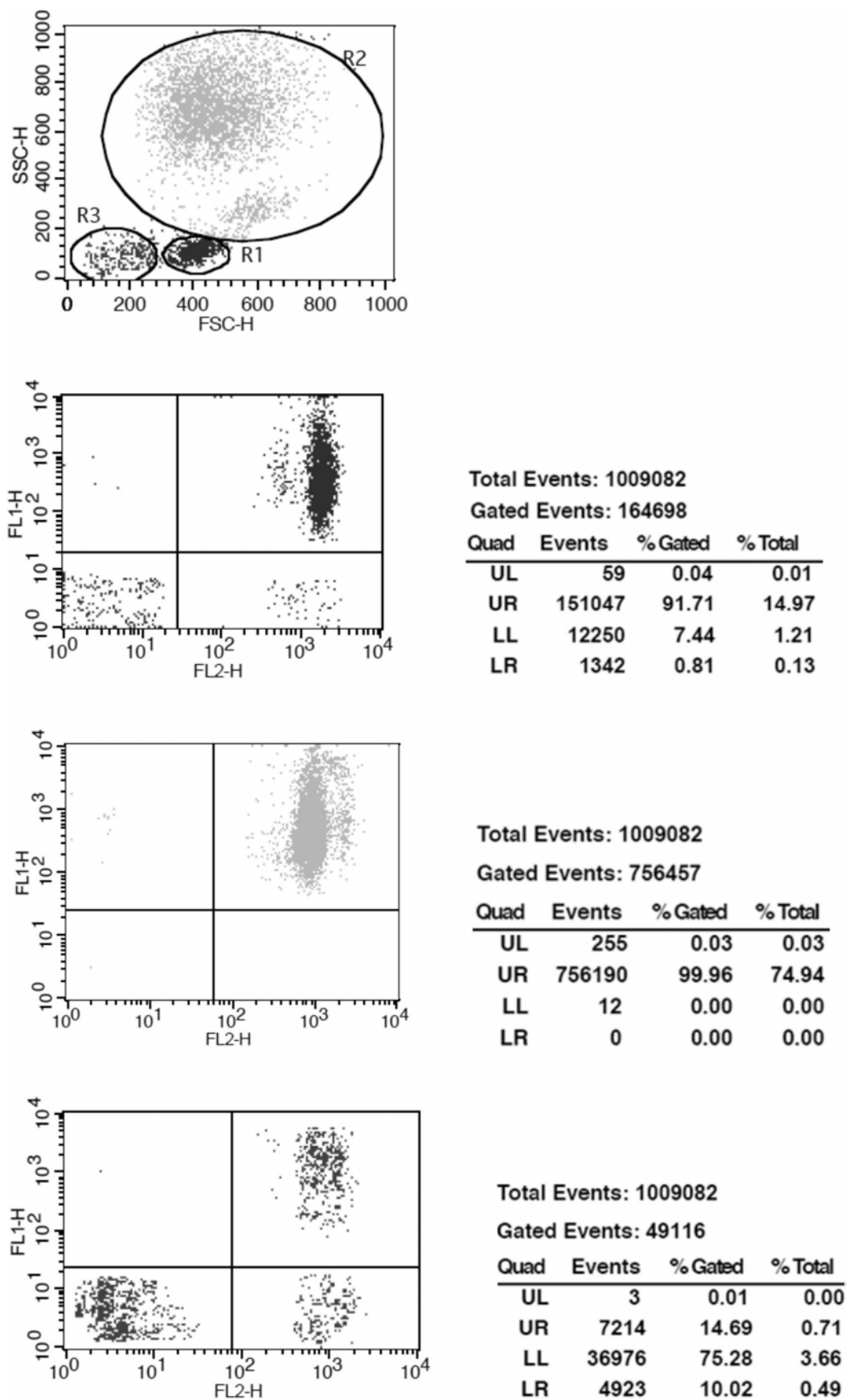
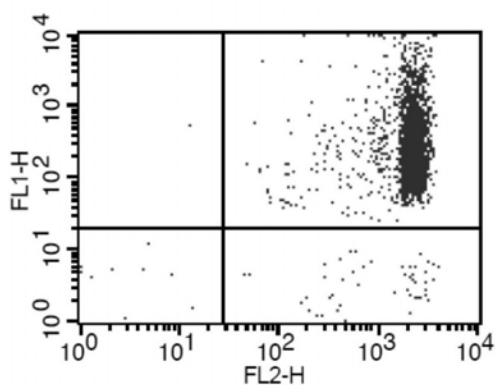
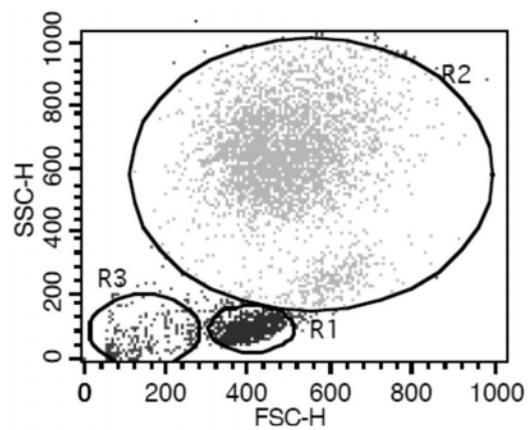


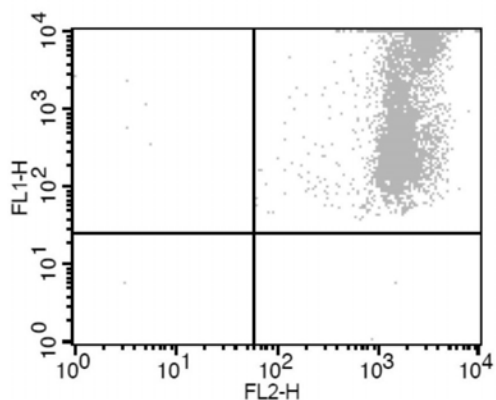
图4



Total Events: 1008711

Gated Events: 163310

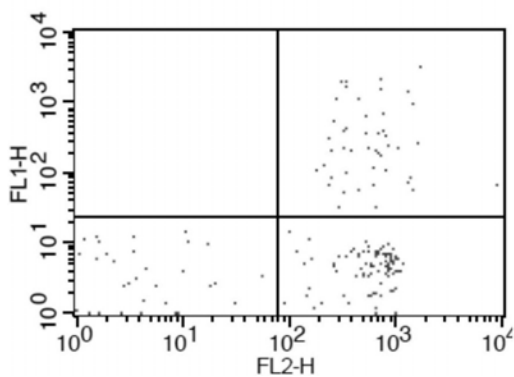
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	17	0.00	0.00
UR	150694	92.27	14.94
LL	1552	0.95	0.15
LR	11047	6.76	1.10



Total Events: 1008711

Gated Events: 756952

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	79	0.01	0.01
UR	756857	99.99	75.03
LL	5	0.00	0.00
LR	11	0.00	0.00



Total Events: 1008711

Gated Events: 49653

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	2	0.00	0.00
UR	7175	14.45	0.71
LL	5013	10.10	0.50
LR	37463	75.45	3.71

图5

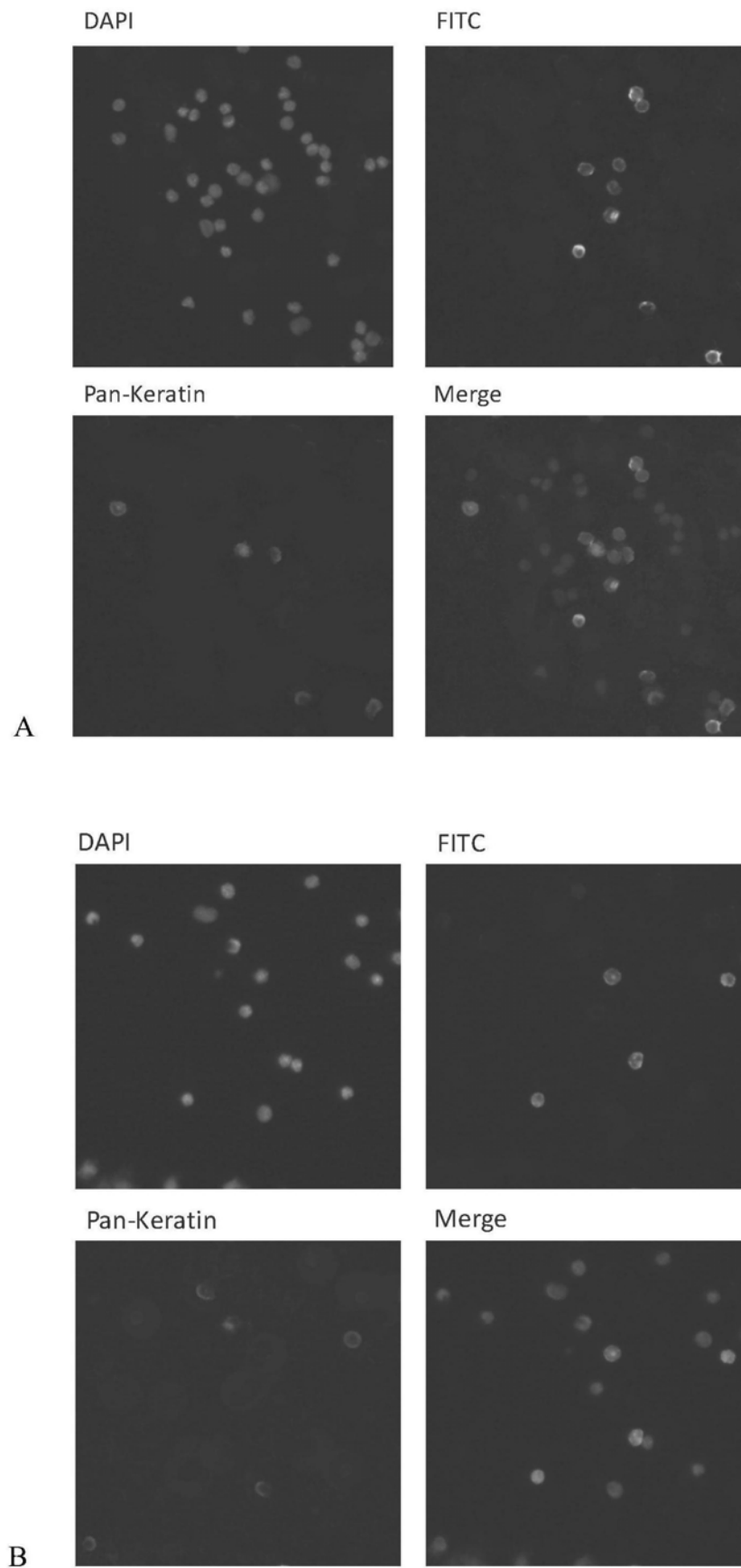


图6

专利名称(译)	富集循环稀有细胞的试剂及方法		
公开(公告)号	CN109781975A	公开(公告)日	2019-05-21
申请号	CN201711121110.3	申请日	2017-11-14
[标]发明人	杨国华		
发明人	杨国华		
IPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	陈静		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及富集循环稀有细胞(CRC)的试剂及方法。本发明揭示了一种利用优选的CD标志物组合对血液中白细胞进行分离、从而富集CRC的方法，该方法为负向分选方法。本发明的方法可大幅度地提高细胞的识别准确度，实现高纯度CRC分选的突破，获得的样本更有利于直接应用于进行后续的基因组分析。同时，本发明还提供了应用于该方法的微流体检测装置。

