



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109060756 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201810554484.2

(22)申请日 2018.06.01

(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 21/65(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

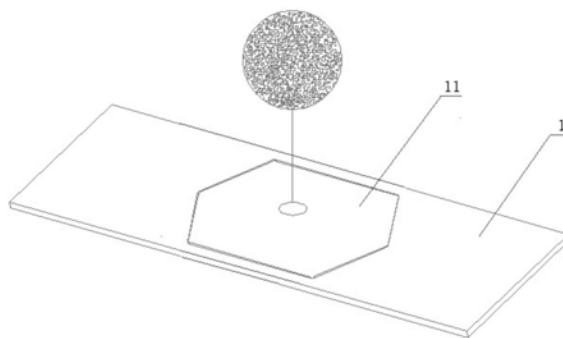
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞
检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,特点是:包括在载玻片的表面采用喷涂的方法镀上一层等离子有色金属膜,制备得到金属纳米结构的SERS芯片;将SERS芯片安装至捕获仪的捕获盒内;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,利用免疫磁性富集方法对血液样本进行稀有细胞的捕获;将捕获完成的金属纳米结构的SERS芯片从捕获盒中取出,37℃干燥后对SERS芯片进行免疫荧光染色;使用检测系统对染色后的稀有细胞进行扫描检测,优点是:能够明显提高血液中例如CTC细胞等稀有细胞的捕获效率,增强其检测信号。



1. 一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 在载玻片的表面采用喷涂的方法镀上一层等离子有色金属膜,制备得到金属纳米结构的SERS芯片;

(2) 将金属纳米结构的SERS芯片安装至捕获仪的捕获盒内,并安装配套使用的捕获耗材包及配套试剂;

(3) 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,利用免疫磁性富集方法对血液样本进行稀有细胞的捕获;

(4) 将捕获完成的金属纳米结构的SERS芯片从捕获盒中取出,37℃干燥,干燥后对金属纳米结构的SERS芯片进行免疫荧光染色;

(5) 使用检测系统对染色后的稀有细胞进行扫描检测。

2. 根据权利要求1所述的一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,其特征在于所述的稀有细胞为循环肿瘤细胞。

3. 根据权利要求1或2所述的一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,其特征在于所述的等离子有色金属膜的厚度为0.5~5μm。

4. 根据权利要求3所述的一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,其特征在于所述的等离子有色金属膜采用的金属材料为金、镍、镉或铜。

5. 根据权利要求1所述的一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,其特征在于所述的等离子有色金属膜完全覆盖或超出所述的捕获盒的捕获区域。

6. 根据权利要求1所述的一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,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,金属纳米结构的SERS芯片的清洗速度4~6ml/hr。

7. 根据权利要求1所述的一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,其特征在于所述的步骤(4)中免疫荧光染色采用的免疫荧光染料为:CK-IRDye800和二脒基苯基吡啶DAPI。

8. 根据权利要求7所述的一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,其特征在于所述的步骤(4)中对金属纳米结构的SERS芯片进行免疫荧光染色具体为:对干燥后的金属纳米结构的SERS芯片先用CK-IRDye800进行荧光标记,37℃条件下孵育1小时,然后用PBST缓冲液漂洗;再对金属纳米结构的SERS芯片用DAPI进行荧光标记,25℃条件下孵育15分钟,用PBST缓冲液漂洗后室温下干燥。

9. 根据权利要求1所述的一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,其特征在于所述的捕获盒内设置有用于采集稀有细胞的采集腔,所述的采集腔的底部两端分别与血液样本的输入口和输出口连通,所述的捕获区域与所述的采集腔的上方连通,所述的步骤(2)中将金属纳米结构的SERS芯片安装至捕获仪的捕获盒内具体包括,将金属纳米结构的SERS芯片上带有等离子有色金属膜的一侧朝向所述的采集腔,与血液样本接触。

10. 根据权利要求1所述的一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,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。

一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学诊断领域,尤其涉及一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤严重威胁人类健康,其致死的主要原因是部分肿瘤细胞获得侵袭能力并造成远处转移。肿瘤转移是一个涉及多步骤因素的复杂过程,具有转移潜能的肿瘤细胞脱离原发病灶,以极少的数量转移到血液、骨髓、淋巴结或远处器官中,使用常规的检测手段难以发现,称为肿瘤的微转移。肿瘤细胞的脱落、侵袭并进入血液循环是实现肿瘤转移的最初阶段,并为最终形成肿瘤转移病灶提供了可能,因此,在外周血液中检测循环肿瘤细胞(Circulating tumor cells,CTC)具有重要的临床应用价值。

[0003] 1869年科学家首次提出CTC的概念,目前肿瘤转移理论认为,肿瘤细胞需要先从原发灶脱离并进入血液或淋巴循环,才能在远处形成转移灶。因此理论上CTC与肿瘤的血行转移有直接关系。CTC的检测有助于早期转移肿瘤患者的诊断、监测术后患者肿瘤的复发与转移、评估抗肿瘤药物的敏感性与患者愈后以及选择个体化的治疗策略。但是,对于CTC的检测和分析并不容易,因为CTC并没有显著的特异性与其他血细胞明确区分,而且CTC在外周血中的数量极少,平均在 10^6 - 10^7 个白细胞中有1个。

[0004] 总体来说,CTC的捕获和检测包括CTC细胞富集(一般通过细胞大小、密度差异、免疫磁微粒、微流体等方法)和CTC细胞下游鉴别分析(一般通过特异性蛋白的表达、核酸序列等方法)。目前,应用最多的CTC细胞富集方法是表面靶向蛋白EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule,上皮细胞粘附分子)和CTC芯片相结合的免疫磁性富集方法。该方法依赖于肿瘤细胞的免疫磁性富集,利用链接于结合EpCAM的抗体的磁流体,该上皮细胞粘附分子在上皮衍生细胞上表达。因此,将该磁流体加入肿瘤患者外周血中,磁流体即与CTC细胞结合,当在外磁场的作用下,结合有CTC细胞的磁流体就会被筛选出来,附着于CTC芯片上,从而完成CTC细胞的富集捕获。

[0005] 其中,在CTC芯片的选择上,从原来的选自普通载玻片发展到选自醛改性载玻片或环氧树脂包被的载玻片等,但这些CTC芯片都仍存在缺陷,其中最大的缺陷在于:对CTC细胞的捕获效率低,以及由于检测信号不强造成的CTC检测假阴性结果。

发明内容

[0006] 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表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,能够明显提高血液中例如CTC细胞等稀有细胞的捕获效率,增强其检测信号。

[0007] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案为:一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 在载玻片的表面采用喷涂的方法镀上一层等离子有色金属膜,制备得到金属

纳米结构的SERS芯片；

[0009] (2) 将金属纳米结构的SERS芯片安装至捕获仪的捕获盒内，并安装配套使用的捕获耗材包及配套试剂；

[0010] (3) 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，利用免疫磁性富集方法对血液样本进行稀有细胞的捕获；

[0011] (4) 将捕获完成的金属纳米结构的SERS芯片从捕获盒中取出，37℃干燥，干燥后对金属纳米结构的SERS芯片进行免疫荧光染色；

[0012] (5) 使用检测系统对染色后的稀有细胞进行扫描检测。

[0013] 在一些实施方式中，所述的稀有细胞为循环肿瘤细胞。

[0014] 在一些实施方式中，所述的等离子有色金属膜的厚度为0.5~5μm。

[0015] 在一些实施方式中，所述的等离子有色金属膜采用的金属材料为金、镍、镉或铜。

[0016] 在一些实施方式中，所述的等离子有色金属膜完全覆盖或超出所述的捕获盒的捕获区域。

[0017] 在一些实施方式中，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，金属纳米结构的SERS芯片的清洗速度4~6ml/hr。

[0018] 在一些实施方式中，所述的步骤(4)中免疫荧光染色采用的免疫荧光染料为：CK-IRDye800和二脒基苯基吡啶DAPI。

[0019] 在一些实施方式中，所述的步骤(4)中对金属纳米结构的SERS芯片进行免疫荧光染色具体为：对干燥后的金属纳米结构的SERS芯片先用CK-IRDye800进行荧光标记，37℃条件下孵育1小时，然后用PBST缓冲液漂洗；再对金属纳米结构的SERS芯片用DAPI进行荧光标记，25℃条件下孵育15分钟，用PBST缓冲液漂洗后室温下干燥。

[0020] 在一些实施方式中，所述的捕获盒内设置有用于采集稀有细胞的采集腔，所述的采集腔的底部两端分别与血液样本的输入口和输出口连通，所述的捕获区域与所述的采集腔的上方连通，所述的步骤(2)中将金属纳米结构的SERS芯片安装至捕获仪的捕获盒内具体包括，将金属纳米结构的SERS芯片上带有等离子有色金属膜的一侧朝向所述的采集腔，与血液样本接触。

[0021] 在一些实施方式中，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。

[0022] 与现有技术相比，本发明的优点在于：通过在原有的芯片表面镀上一层等离子有色金属膜，相对于传统生物芯片不仅能够大幅度提高对稀有细胞的捕获能力，捕获效率高，而且用特定的荧光染料对捕获细胞进行荧光染色后，其检测光谱从原先的可见光扩展到近红外光，大大增强了稀有细胞的检测信号。

附图说明

[0023] 图1为本发明中金属纳米结构的SERS芯片的结构示意图；

[0024] 图2为本发明中捕获盒的结构示意图；

[0025] 图3为本发明中捕获稀有细胞的原理图；

[0026] 图4为本发明中捕获仪的内部管路示意图；

[0027] 图5为本发明实施例二中普通芯片捕获的MCF-7细胞的荧光成像照片；(a)是用

CD45-Alexa 594荧光标记的荧光成像照片；(b)是用DAPI荧光标记的荧光成像照片；(c)是用CK-FITC荧光标记的荧光成像照片；(d)是合成图；

[0028] 图6为本发明实施例二中镀金SERS芯片捕获的MCF-7细胞的荧光成像照片；(a)是明视野图；(b)是用DAPI荧光标记的荧光成像照片；(c)是用CK-IRDye800荧光标记的荧光成像照片；(d)是合成图；

[0029] 图7为本发明实施例三中13例肿瘤病人血液样本分别用普通芯片、镀镉SERS芯片、镀金SERS芯片检测CTC细胞得到的统计结果柱状图。

[0030] 其中,金属纳米结构的SERS芯片1,等离子有色金属膜11,捕获盒2,捕获区域21,采集腔22,捕获仪3,输入口31,输出口32,锥形管33,蠕动泵夹闭管路34,PBS液袋35,循环肿瘤细胞4,血细胞5,外磁场6。

具体实施方式

[0031] 以下结合附图对本发明一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法作进一步详细说明,但不作为对本发明的限定。

[0032] 实施例一

[0033] 本发明的一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,包括以下步骤:

[0034] (1)在载玻片的表面采用喷涂的方法镀上一层等离子有色金属膜11,制备得到金属纳米结构的SERS (Surface-enhanced Raman scattering,表面增强拉曼散射) 芯片1;

[0035] (2)将金属纳米结构的SERS芯片1安装至捕获仪3的捕获盒2内,并安装配套使用的捕获耗材包及配套试剂;

[0036] (3)将经过预处理的血液样本装载于捕获仪3中,设置捕获仪3的运行参数,利用免疫磁性富集方法对血液样本进行稀有细胞的捕获;

[0037] (4)将捕获完成的金属纳米结构的SERS芯片1从捕获盒2中取出,37℃干燥,干燥后对金属纳米结构的SERS芯片1进行免疫荧光染色;

[0038] (5)使用检测系统对染色后的稀有细胞进行扫描检测。

[0039] 本实施例中,稀有细胞为循环肿瘤细胞4 (CTC细胞)。等离子有色金属膜11的厚度为2.5μm,在其他实施例中厚度可以是0.5μm、1.5μm、3μm、4μm、5μm等。等离子有色金属膜11采用的金属材料为金,在其他实施例中也可采用例如镍、镉等有色金属。等离子有色金属膜11设置成刚好完全覆盖住捕获盒2的捕获区域21。捕获仪3为免疫磁微粒捕获仪3,设置捕获仪3的运行参数为:磁微粒捕获速度2.5ml/hr,金属纳米结构的SERS芯片1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、2.8ml/hr、3ml/hr等;金属纳米结构的SERS芯片1的清洗速度可以是4ml/hr、6ml/hr等。其中,由实验得到当磁微粒捕获速度为2.5ml/hr,金属纳米结构的SERS芯片1的清洗速度为5ml/hr时,结合本发明的金属纳米结构的SERS芯片1,具有最佳的稀有细胞捕获效果,稀有细胞的捕获效率提高,其检测信号增强。

[0040] 本实施例中,步骤(2)中的配套试剂包括:血液前处理剂、免疫磁微粒、细胞捕获增强剂、清洗液和质控品。步骤(4)中免疫荧光染色采用的免疫荧光染料为:Anti-pan Cytokeratin (human) IRDye800 conjugated antibody (CK-IRDye800) 和二脒基苯基吡啶 DAPI。对金属纳米结构的SERS芯片1进行免疫荧光染色具体为:对干燥后的金属纳米结构的SERS芯片1先用CK-IRDye800进行荧光标记,37℃条件下孵育1小时,然后用PBST缓冲液漂

洗;再对金属纳米结构的SERS芯片1用DAPI进行荧光标记,25℃条件下孵育15分钟,用PBST缓冲液漂洗后室温下干燥。

[0041] 如图3所示,捕获盒2内设置有用于采集循环肿瘤细胞4的采集腔22,采集腔22的底部两端分别与血液样本的输入口31和输出口32连通,捕获区域21与采集腔22的上方连通,箭头表示磁力方向。步骤(2)中将金属纳米结构的SERS芯片1安装至捕获仪3的捕获盒2内具体包括,将金属纳米结构的SERS芯片1上带有等离子有色金属膜11的一侧朝向采集腔22,与血液样本中的血细胞5和循环肿瘤细胞4接触。在外磁场6作用下,结合有循环肿瘤细胞4的磁流体就会被筛选出来并捕获。本实施例中,捕获仪3为CellRich™免疫磁微粒捕获仪,免疫磁微粒捕获仪采用现有技术,产品型号为NLS-CR-001R2。具体的捕获仪3包括:血液样本的输入口31,输出口32,锥形管33,蠕动泵夹闭管路34和PBS液袋35。

[0042] 实施例二

[0043] 以肿瘤细胞MCF-7模拟样本为例,用普通芯片(即表面没有等离子有色金属膜11的玻璃载玻片)作对照组,用本发明的镀金SERS芯片(其中金属纳米结构的SERS芯片1采用的金属材料为金)做实验组,分别对MCF-7细胞进行捕获和荧光检测。

[0044] (1) MCF-7细胞经培养、收集、稀释后备用。

[0045] (2) 采取健康人血液,将MCF-7加入其中,制备成模拟样本。

[0046] (3) 将模拟样本均分为2个待检测样本:实验组待检测样本和对照组待检测样本,每个待检测样本5ml。

[0047] (4) 免疫磁微粒捕获仪3开机自检,分别将普通芯片和镀金SERS芯片安装至捕获仪3的2个相同的捕获盒2内,捕获盒2安装在捕获盒2支架上,并安装耗材包及填充试剂。

[0048] (5) 将实验组待检测样本和对照组待检测样本进行样本预处理,然后分别同样加入免疫磁微粒,分别装载于捕获仪3中,实验组待检测样本对应镀金SERS芯片,对照组待检测样本对应普通芯片。

[0049] (6) 设置捕获仪3的运行参数:磁微粒捕获速度:2.5ml/hr,芯片清洗速度:5ml/hr,运行仪器。

[0050] (7) MCF-7细胞捕获完毕后,将捕获盒2从仪器上取下,打开分别取出普通芯片和镀金SERS芯片,37℃条件下干燥。

[0051] (8) 对干燥后的镀金SERS芯片分别用Anti-pan Cytokeratin(human)IRDye800 conjugated antibody (CK-IRDye800) 和二脒基苯基吡啶DAPI进行荧光标记;对干燥后的普通芯片分别用anti-CD45(human) Alexa Fluor 594conjugated antibody (CD45-Alexa 594)、Anti-pan Cytokeratin(human) fluorescein isothiocyanate (CK-FITC)、DAPI进行荧光标记。

[0052] (9) 将荧光标记完成的镀金SERS芯片和普通芯片分别在InnoScan 710microarray scanner扫描仪和荧光显微镜下对MCF-7细胞进行扫描,记录结果。

[0053] 试验结果如图5和图6所示,可以看到本实施例中镀金SERS芯片(实验组)相对于普通芯片(对照组)能够增强稀有细胞的检测信号,使荧光成像效果更好;经测得普通芯片的捕获率为77.70%,镀金SERS芯片的捕获率为82.15%,本实施例的镀金SERS芯片能够提高对稀有细胞的捕获能力。

[0054] 实施例三

[0055] 以13名肿瘤患者的外周血样本为例,分别用普通芯片、镀镉SERS芯片和镀金SERS芯片进行CTC细胞捕获和荧光检测。

[0056] (1) 采取13名肿瘤患者外周血于ACD采血管中,24小时内对每例样本进行分装和检测,5ml/管,分3管。

[0057] (2) 血液样本经样本预处理液预处理后加入免疫磁微粒,装载于捕获仪3中。

[0058] (3) 设置捕获仪3运行参数:磁微粒捕获速度为2.5ml/hr,芯片清洗速度为5ml/hr,运行仪器。

[0059] (4) CTC细胞捕获完毕后,将捕获盒2从仪器上取下,打开分别取出普通芯片、镀镉SERS芯片和镀金SERS芯片,37℃条件下干燥。

[0060] (5) 对干燥后的镀镉SERS芯片和镀金SERS芯片分别用Anti-pan Cytokeratin (human) IRDye800conjugated antibody (CK-IRDye800) 和二脒基苯基吡啶DAPI进行荧光标记;对干燥后的普通芯片分别用anti-CD45 (human) Alexa Fluor 594conjugated antibody (CD45-Alexa 594)、Anti-pan Cytokeratin (human) fluorescein isothiocyanate (CK-FITC)、DAPI进行荧光标记。

[0061] (6) 将荧光标记完成的镀金SERS芯片和普通芯片分别在InnoScan 710microarray scanner扫描仪和荧光显微镜下对CTC细胞进行扫描,记录结果。

[0062] 其中,13例肿瘤病人的血液样本信息如表1所示。

[0063] 表1

[0064]

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
2	女	33	乳腺癌	未知	/	手术
3	女	44	乳腺癌	I-II	/	手术
4	男	69	前列腺癌	未知	3+3=6	手术
5	男	54	前列腺癌	未知	4+5=9	手术
6	男	78	前列腺癌	未知	4+4=8	手术、内分泌治疗
7	男	48	前列腺癌	未知	3+3=6	手术
8	女	54	乳腺癌	II	/	手术、化疗
9	女	49	乳腺癌	II	/	手术、化疗
10	男	75	前列腺癌	未知	3+3=6	手术
11	男	67	前列腺癌	未知	3+4=7	手术
12	男	56	前列腺癌	未知	3+4=7	手术

[0065]

13	男	66	前列腺癌	未知	4+4=8	手术、内分泌治疗
----	---	----	------	----	-------	----------

[0066] 结果分析:13例肿瘤病人血液样本分别用普通芯片、镀镉SERS芯片、镀金SERS芯片

检测到的CTC细胞数目结果数据如图7所示,可以看到镀镉SERS芯片和镀金SERS芯片在总体样本、女性/乳腺癌样本、男性/前列腺癌样本、小于60岁样本、大于60岁样本的分类中检测到的CTC数目,相比普通芯片在各分类中检测到的CTC数目均有较大幅度提高,镀金SERS芯片相比镀镉SERS芯片效果更好。试验充分说明了本发明技术方案的可行性和有效性。

[0067] 本发明的一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法,通过在原有的芯片表面镀上一层等离子有色金属膜,相对于传统生物芯片不仅能够大幅度提高对稀有细胞的捕获能力,捕获效率高,而且用特定的荧光染料对捕获细胞进行荧光染色后,其检测光谱从原先的可见光扩展到近红外光,大大增强了稀有细胞的检测信号,解决了现有的由于检测信号不强造成假阴性结果的缺陷,检测效果优于现有的普通芯片。

[0068] 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。

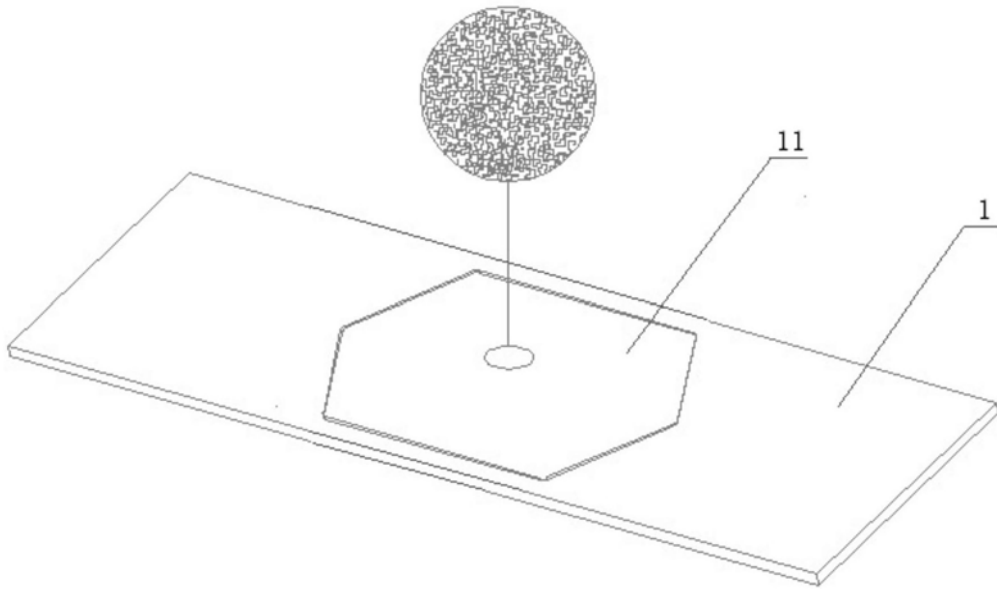


图1

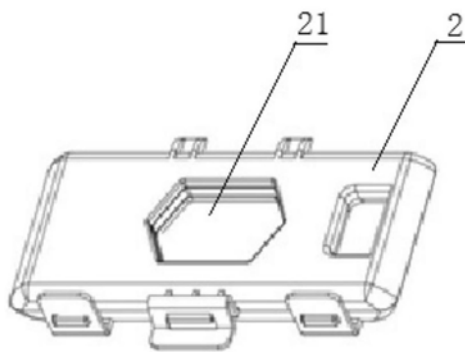


图2

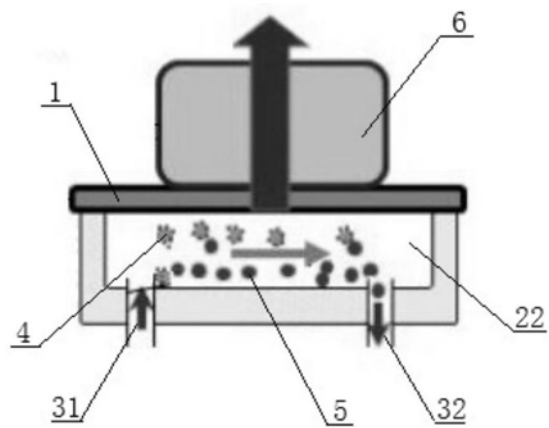


图3

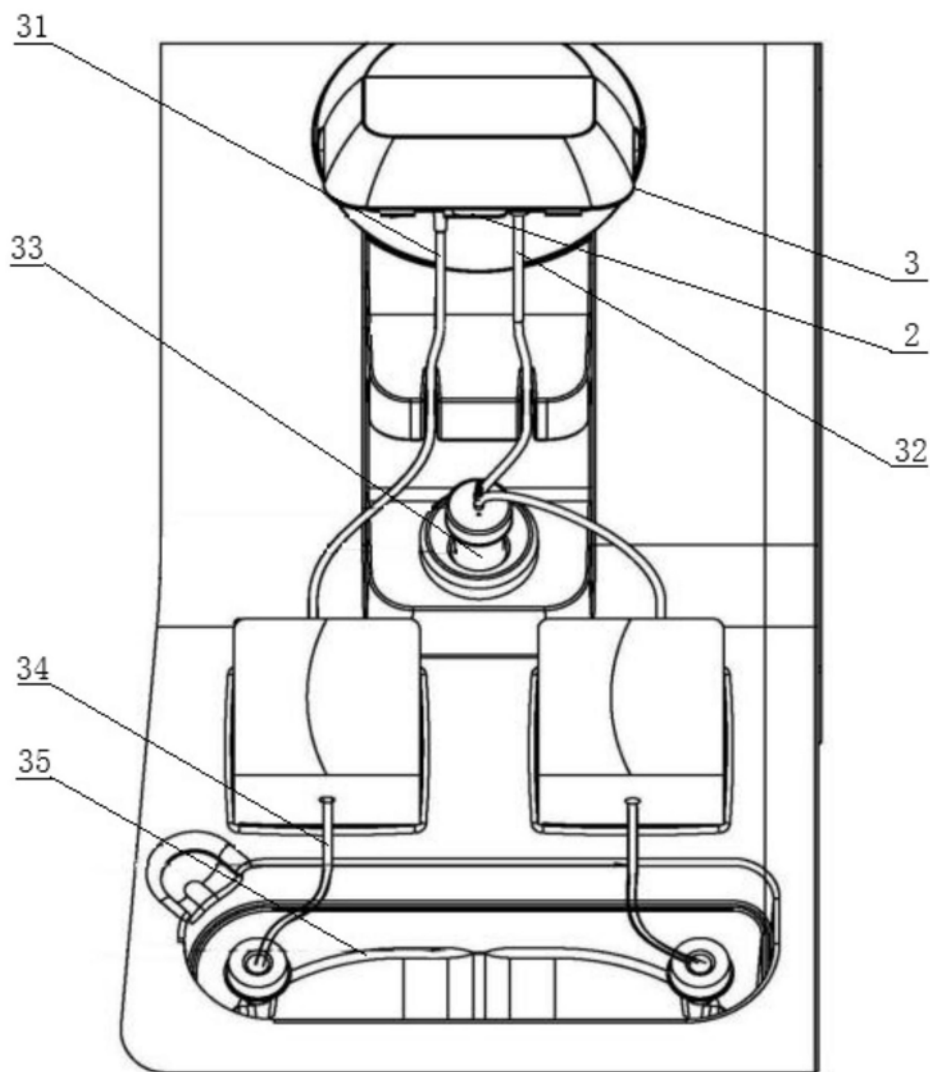


图4

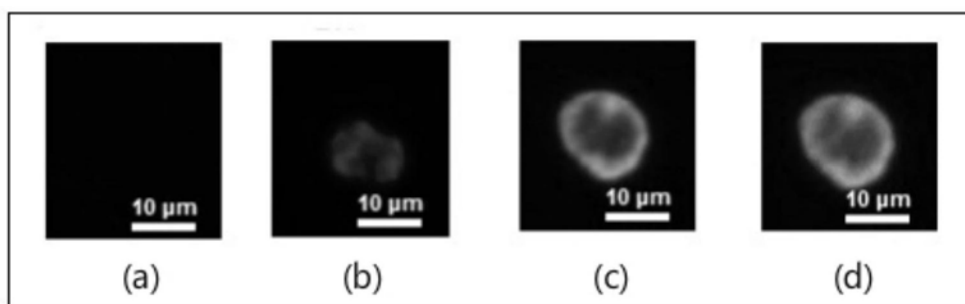


图5

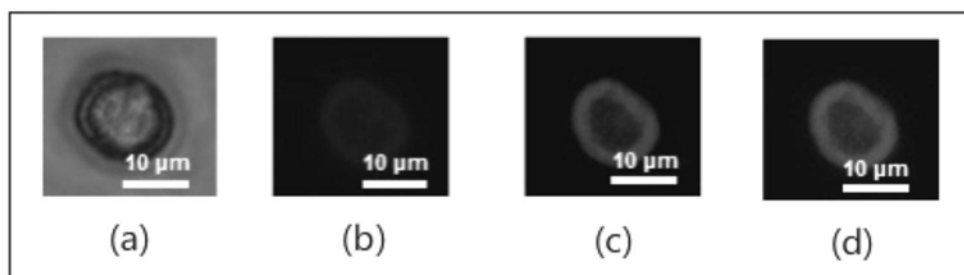


图6

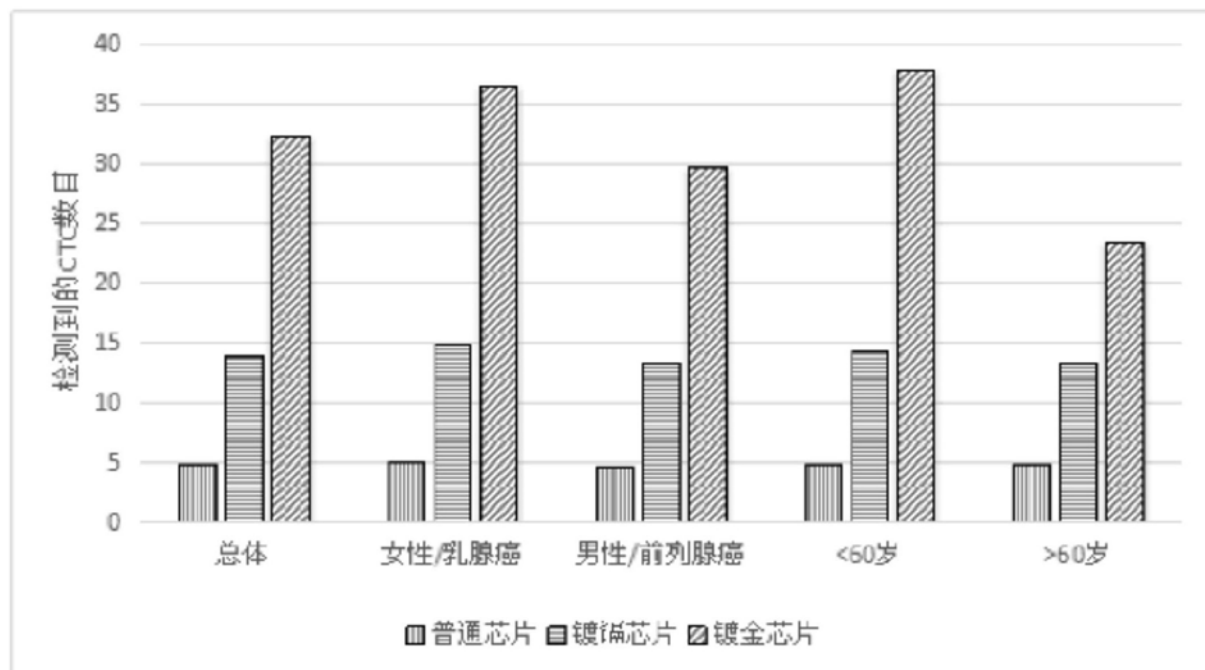


图7

专利名称(译)	一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法		
公开(公告)号	CN109060756A	公开(公告)日	2018-12-21
申请号	CN201810554484.2	申请日	2018-06-01
[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	G01N21/65 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N21/658 G01N33/533 G01N33/5436		
代理人(译)	陈怡菁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于表面增强效应的血液中稀有细胞检测方法，特点是：包括在载玻片的表面采用喷涂的方法镀上一层等离子有色金属膜，制备得到金属纳米结构的SERS芯片；将SERS芯片安装至捕获仪的捕获盒内；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，利用免疫磁性富集方法对血液样本进行稀有细胞的捕获；将捕获完成的金属纳米结构的SERS芯片从捕获盒中取出，37℃干燥后对SERS芯片进行免疫荧光染色；使用检测系统对染色后的稀有细胞进行扫描检测，优点是：能够明显提高血液中例如CTC细胞等稀有细胞的捕获效率，增强其检测信号。

