



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102227637 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 26

(21) 申请号 200980147313. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 09. 25

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/574(2006. 01)

61/100, 420 2008. 09. 26 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 05. 26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/058408 2009. 09. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02010/036912 EN 2010. 04. 01

(71) 申请人 通用医疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 梅梅特·托纳 香农·斯托特

许佳贤

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 王国祥

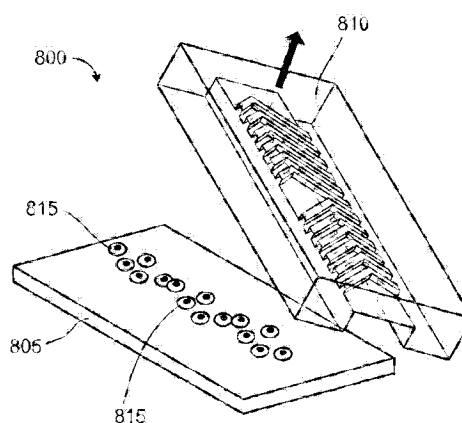
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 15 页

(54) 发明名称

捕获粒子

(57) 摘要

用于捕获悬浮于流动通过微通道的流体中的粒子的方法和系统可包括使包含待捕获的粒子的流体流动通过微通道且经过由微通道的壁表面限定的凹槽,从而由于流体流动通过凹槽而在流体中形成微涡旋;在流体中形成微涡旋后,使至少一些所述粒子与设置在微通道的一个或多个壁上的吸附物接触;和捕获至少一些与吸附物接触的粒子。



1. 用于捕获悬浮于流动通过微通道的流体中的粒子的方法,所述方法包括:
使包含待捕获的粒子的流体流动通过微通道且经过由微通道的壁表面限定的凹槽;
使至少一些所述粒子与设置在微通道的一个或多个壁上的吸附物接触;知
捕获至少一些与吸附物接触的粒子。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述吸附物被设置在凹槽被限定在其中的壁的表面上。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述凹槽被限定在所述微通道的壁中。
4. 权利要求 3 的方法,其中所述凹槽延伸到所述壁中。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述凹槽和多个其它凹槽被限定在所述壁的表面中,从而
由于流体流动通过所述多个其它凹槽而在流体中形成相应的微涡旋。
6. 权利要求 1 的方法,其中使流体流动通过凹槽包括使流体流动通过包括顶部和两个
端部的凹槽,每个端部与所述顶部相连,所述凹槽被定向成使流体朝向所述顶部而流动通
过所述端部。
7. 权利要求 6 的方法,其中所述顶部和所述两个端部被限定在呈 V 形的表面中。
8. 权利要求 7 的方法,其中所述凹槽的尺寸为 $3\ \mu\text{m}$ 至 $70\ \mu\text{m}$ 。
9. 权利要求 1 的方法,其中使流体流动包括使流体以 $2.4\text{cm}/\text{min}$ 至 $6.0\text{cm}/\text{min}$ 的平均
流速流动。
10. 权利要求 1 的方法,其中所述粒子为癌细胞且所述吸附物为用于与所述癌细胞结
合的抗体。
11. 权利要求 10 的方法,所述方法还包括对所捕获的癌细胞进行培养。
12. 权利要求 1 的方法,其中由于流体流动通过凹槽而在流体中形成微涡旋。
13. 一种微流体装置,其包括:
微通道,所述微通道包括:
入口,
位置距所述入口一定距离的出口,其中流体由入口流向出口,和
限定到微通道的壁表面中的凹槽,所述凹槽包括顶部和两个端部,每个端部与所述顶
部相连,所述凹槽被定向成使流体朝向所述顶部而流动通过所述端部;和
涂布于至少一个壁的用于选择性附着所需分析物的吸附物。
14. 权利要求 13 的装置,其中限定在壁表面中的凹槽由微通道向外突出。
15. 权利要求 13 的装置,其中所述吸附物为抗体。
16. 权利要求 13 的装置,其中所述吸附物为适体。
17. 权利要求 13 的装置,其中所述入口被配置为接收包含分析物的流体。
18. 权利要求 13 的装置,其中所述顶部和所述两个端部形成 V 形。
19. 权利要求 13 的装置,其中所述凹槽的跨度小于所述微通道的宽度。
20. 权利要求 13 的装置,其中所述两个端部各自与所述顶部等距离。
21. 权利要求 13 的装置,其中使所述凹槽对称地形成在所述壁的表面中,从而使所述
顶部位于通过微通道中心的轴线上且所述两个端部被设置成与所述顶部等距离。
22. 权利要求 13 的装置,其中所述两个端部中的一个被设置成比所述两个端部中的另
一个距所述顶部近。
23. 权利要求 13 的装置,其中所述顶部偏离沿微通道中心延伸的轴线。

24. 权利要求 13 的装置,其中所述凹槽被设置成使所述凹槽的一个端部在另一个端部前接收流体。

25. 权利要求 13 的装置,其中所述凹槽为限定在所述微通道的壁中的多个凹槽中的一个,所述多个凹槽中的每个具有顶部和两个端部。

26. 权利要求 25 的装置,其中所述多个凹槽被设置成凹槽列。

27. 权利要求 26 的装置,所述装置还包括形成在所述凹槽列附近的其它凹槽列。

28. 权利要求 27 的装置,其中所述凹槽列中的凹槽的顶部和两个端部在相应的平面上与所述其它凹槽列中的凹槽的顶部和两个端部对齐,所述相应的平面垂直于通过所述微通道的轴线。

29. 权利要求 27 的装置,其中所述其它凹槽列偏离所述凹槽列。

30. 权利要求 13 的装置,其中凹槽由微通道向外突出的尺寸为 $3\ \mu\text{m}$ 至 $70\ \mu\text{m}$ 。

捕获粒子

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 9 月 26 日提交的题目为“用于对粒子进行聚集、引导和分类的微涡旋 (Microvortex for focusing, guiding and sorting of particles)”的美国专利申请 61/100,420 的优先权,将其全部内容并入本申请作为参考。

背景技术

[0003] 微流体装置 (microfluidic device) 可用于微量全分析系统 (μ TAS) 或实验室芯片 (LOC) 系统,这是因为这些装置能够对小样品体积进行分析且可被开发为低成本的高度平行的系统。具体地,这些系统可用于其中对粒子进行处理操作的生物和临床应用,所述处理操作例如对粒子样品 (例如细胞和胶体) 进行浓缩、检测、分类和聚集。与使用外部能量例如光能、磁力、电力、介电电泳、声能等的有源操作 (active manipulation) 相比,通过诸如水力聚焦、尺寸过滤和沉降等技术对流动通过微流体装置的粒子进行无源操作 (passive manipulation) 是相对简单的。无源操作不依赖于外部能量来源而可利用装置中微通道的几何形状和通过这些通道的流动条件来进行。相反地,主动操作将使用外部能量来源且可能需要将供能组件整合到微流体装置中。

发明内容

[0004] 本申请描述了涉及在具有凹槽的微流体装置中基于亲和性对粒子进行捕获的技术。当本申请提及凹槽时,本申请包括例如长的窄通道 (例如通过延伸到较大通道的壁中而形成且由较大通道的壁所限定的通道)。

[0005] 在一个方面,用于捕获悬浮于流动通过微通道的流体中的粒子的方法包括使包含待捕获的粒子的流体流动通过微通道且经过由微通道的壁表面限定的凹槽;使至少一些所述粒子与设置在微通道的一个或多个壁上的吸附物 (adherent) 接触;和捕获至少一些与吸附物接触的粒子。

[0006] 在一个方面,微流体装置包括微通道,所述微通道包括入口,位置距所述入口一定距离的出口,其中流体由入口流向出口,和限定到微通道的壁表面中的凹槽,所述凹槽包括顶部 (apex) 和两个端部,每个端部与所述顶部相连,所述凹槽被定向成使流体朝向所述顶部而流动通过所述端部;和涂布于至少一个壁的用于选择性附着所需分析物的吸附物。

[0007] 实施方案可单独或以各种组合形式包括一个或多个以下特征。

[0008] 在一些实施方案中,所述吸附物被设置在凹槽被限定在其中的壁的表面中。

[0009] 在一些实施方案中,所述凹槽被限定在所述微通道的壁中。在一些情况下,所述凹槽延伸到所述壁中。

[0010] 在一些实施方案中,所述凹槽和多个其它凹槽被限定在所述壁的表面中,从而由于流体流动通过所述多个其它凹槽而在流体中形成相应的微涡旋 (microvortices)。

[0011] 在一些实施方案中,使流体流动通过凹槽包括使流体流动通过包括顶部和两个端部的凹槽,每个端部与所述顶部相连,所述凹槽被定向成使流体朝向所述顶部而流动通过

所述端部。在一些情况下,所述顶部和所述两个端部被限定在呈 V 形的表面中。所述凹槽的尺寸可以是 $3\ \mu\text{m}$ 至 $70\ \mu\text{m}$ 。

[0012] 在一些实施方案中,使流体流动包括使流体以 $2.4\text{cm}/\text{min}$ 至 $6.0\text{cm}/\text{min}$ 的平均流速流动。

[0013] 在一些实施方案中,所述粒子为癌细胞且所述吸附物为用于与所述癌细胞结合的抗体。在一些情况下,方法还包括对所捕获的癌细胞进行培养。

[0014] 在一些实施方案中,由于流体流动通过凹槽而在流体中形成微涡旋。

[0015] 在一些实施方案中,所述吸附物是抗体。

[0016] 在一些实施方案中,所述吸附物为适体 (aptamer)。

[0017] 在一些实施方案中,所述入口被配置为接收包含分析物的流体。

[0018] 在一些实施方案中,所述顶部和所述两个端部形成 V 形。

[0019] 在一些实施方案中,所述凹槽的跨度小于所述微通道的宽度。

[0020] 在一些实施方案中,所述两个端部各自与所述顶部等距离。

[0021] 在一些实施方案中,使所述凹槽对称地形成在所述壁的表面中,从而使所述顶部位于通过微通道中心的轴线上且所述两个端部被设置成与所述顶部等距离。

[0022] 在一些实施方案中,所述两个端部中的一个被设置成比所述两个端部中的另一个距所述顶部近。

[0023] 在一些实施方案中,所述顶部偏离沿微通道中心延伸的轴线。

[0024] 在一些实施方案中,所述凹槽被设置成使所述凹槽的一个端部在另一个端部前接收流体。

[0025] 在一些实施方案中,所述凹槽为限定在所述微通道的壁中的多个凹槽中的一个,所述多个凹槽中的每个具有顶部和两个端部。

[0026] 在一些实施方案中,所述多个凹槽被设置成凹槽列。

[0027] 在一些实施方案中,所述装置还包括形成在所述凹槽列附近的其它凹槽列。

[0028] 在一些实施方案中,所述凹槽列中的凹槽的顶部和两个端部在相应的平面上与所述其它凹槽列中的凹槽的顶部和两个端部对齐,所述相应的平面垂直于通过所述微通道的轴线。

[0029] 在一些实施方案中,所述其它凹槽列偏离所述凹槽列。

[0030] 在一些实施方案中,凹槽由微通道向外突出的尺寸为 $3\ \mu\text{m}$ 至 $70\ \mu\text{m}$ 。

[0031] 可具体实施本申请描述的主题以实现一个或多个以下优点。本申请描述的技术可提高无源操作的潜力和促进在微流体环境中捕获悬浮于流体中的粒子例如悬浮于缓冲液中的细胞。形成在微流体装置的微通道中的凹槽可引起螺旋形流动,所述螺旋形流动在流动通过通道的流体中形成微涡旋。所述微涡旋可用于增加轴向流动通过通道的粒子朝向通道壁的横向移动,这使粒子更频繁地与壁相互作用和与壁结合。与包含不具有凹槽的微通道的微流体装置相比,当悬浮于缓冲液中的细胞流动通过具有凹槽的微通道时,细胞-基板相互作用可得以增加。这接下来可提高装置的捕获效率。另外,本申请描述的无源微流体流体操作技术可取消对外部能量来源的需要,因此可降低能量消耗和制造成本,特别是当将微流体装置放大到高度平行的 μTAS 或 LOC 系统或这两者时。所述装置可以是透明的,这取决于对制造材料的选择。样品和试剂的消耗体积由于所述体积所流动通过的尺寸是微

米级的而可得以减小。因此,也可降低样品和试剂的成本。所描述的技术适用于捕获和培养活细胞。

[0032] 实施本申请一个或多个技术方案的细节请参见附图和以下描述。本申请其它特征、方面和优点基于说明书、附图和权利要求书而将变得显而易见。

附图说明

[0033] 图 1 示出了具有凹槽的微流体装置的实施方案。

[0034] 图 2A-2D 示出了在具有平坦的壁的微通道中和在具有形成在壁中的凹槽的另一种微通道中的粒子流动路径。

[0035] 图 3A-3C 示出了示例性凹槽。

[0036] 图 4A-4C 示出了形成图 1 的微流体装置的示例性方法。

[0037] 图 5 示出了实施例微流体装置在不同流速时的捕获效率。

[0038] 图 6 示出了对掺杂在全血中的癌细胞的捕获效率。

[0039] 图 7 示出了高通量微流体装置的实施方案,其具有的列为箭尾形 (herringbone) 图案。

[0040] 图 8 示出了对所捕获的细胞进行培养的微流体装置的实施方案。

[0041] 图 9A-9C 为显微照片,其示出了所捕获的细胞在玻璃基板上的生长。

[0042] 图 10 示出了对用具有凹槽的微流体装置捕获的细胞上的 EpCAM 表达和对照细胞上的 EpCAM 表达进行的分析。

[0043] 图 11A-11E 示出了使用微流体装置从前列腺癌患者中捕获的循环肿瘤细胞。

[0044] 图 12 示出了健康供体对照。

[0045] 图 13 示出了使用具有凹槽的微流体装置从患者样品中捕获的 CTC。

[0046] 图 14A-14D 示出了对具有凹槽的微流体装置中的 CTC 进行的 Wright-Giemsa 染色。

[0047] 图 15 示出了对具有不同凹槽尺寸的两种微流体装置进行的比较。

[0048] 各幅附图中相同的标号和标记表示相同的元件。

具体实施方式

[0049] 本申请描述了在具有凹槽的微流体装置中基于亲和性对粒子进行捕获的方法、装置和系统。可对形成在微流体装置中的微通道进行处理以捕获悬浮于流动通过通道的流体中的粒子。可将所述微流体装置的粒子捕获效率定义为在通道中捕获的粒子数目与流动通过通道的粒子总数的比例。如下所述,使凹槽形成为延伸到微通道的壁中以在流体中形成这样的流动模式,所述流动模式促进悬浮于流体中的粒子和通道壁的内表面之间的相互作用。所增加的相互作用可增加通道中捕获的粒子数目,因此尤其提高微流体装置的粒子捕获效率。所述效率可通过调整微流体装置的结构特征(包括例如装置基板(substrate)材料、通道和凹槽尺寸等)来进一步提高及基于粒子类型和粒子悬浮于其中的流体类型通过调整流体流动参数例如流速来进一步提高。图 1 示出了使用软平板印刷技术(soft lithography techniques)制造的所述微流体装置的实施例。如下所述,粒子在微流体装置微通道中如下捕获:在微通道的壁中形成凹槽,在微通道壁的内表面上涂布吸附物,和使

悬浮于流体中的粒子流动通过微通道。

[0050] 图 1 示出了具有凹槽 135 和 140 的微流体装置 100, 所述凹槽 135 和 140 延伸到限定装置 100 的通道 115 的壁之一中。在一些实施方案中, 微流体装置包括由壁向外延伸的突起物 (例如 V 形突起物) 而非延伸到通道 115 的壁中的凹槽。在一些实施方案中, 微流体装置 100 可包括与下基板 110 结合的上基板 105, 所述上基板 105 和下基板 110 各自可使用合适的材料来制造。例如, 上基板 105 可使用弹性体例如聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 来制造且下基板可使用玻璃、PDMS 或其它弹性体来制造。可选择地或另外, 所述基板可使用塑料例如聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA)、聚碳酸酯、环烯烃共聚物 (COC) 等来制造。通常, 就制造上基板和下基板所选择的材料可易于加工 (例如易于蚀刻), 可提供有助于使检测容易的光学性质 (例如可以是光学透明的), 和可以是无毒的, 从而不会负面地影响细胞与基板的附着。另外, 所述材料优选不显示自发荧光或显示有限的自发荧光。另外, 所述材料可易于官能化, 从而使分析物可附着于基板。另外, 所述材料可具有机械强度以使微流体装置 100 具有强度。如下所述, 可将上基板 105 牢固地固定于下基板 110, 其中在它们之间形成微通道。

[0051] 在一些实施方案中, 微通道 115 可具有矩形截面, 其包括形成在上基板 105 中的两个侧壁 120 和 125 及上壁 130。有关相对位置的术语例如“上”和“下”用于方便说明且表示图中的位置而非所述特征的必要相对位置。例如, 可将所述装置定向成使凹槽在通道的底表面上或使通道的中心轴线在垂直方向上延伸。可选择地, 微通道 115 的截面可以是几种形状之一, 所述形状包括但不限于三角形、梯形、半月形等。下基板 110 在与上基板 105 结合后可形成微通道 115 的下壁。在一些实施方案中, 微通道 115 包括形成在微通道 115 的上壁 130 中的多个凹槽 135。可选择地, 凹槽 135 可形成在任何壁中, 和 / 或可形成在微通道 115 的多于一个壁中。凹槽 135 可跨越壁是整个长度, 或仅跨越壁的一部分。

[0052] 图 2A-2D 示出了粒子悬浮液流动通过具有平坦的壁的微通道和具有形成在壁中的凹槽的另一种微通道。图 2A 示出了微流体装置 200, 其包括具有矩形截面的微通道 205。微通道 205 的壁不包括凹槽例如就微流体装置 100 所述的那些凹槽, 即壁的表面是平坦的。包含悬浮于流体中的粒子 225 的粒子悬浮液 220 流动通过微通道 205。相反地, 图 2B 示出了类似的悬浮液流动通过微流体装置 100。

[0053] 当流体流动通过由于将凹槽 135 在微通道 115 中排列成列而形成的箭尾形图案时, 流体路径中的凹槽 135 扰乱了流体流动。在一些实施方案中, 基于流速和凹槽尺寸 (尤其是例如凹槽的大小和凹槽两臂之间的角度), 由于对流体流动的扰乱而在流体中形成微涡旋。微涡旋的成因是凹槽在横向于流体流动主要方向 (即轴向) 的方向上引起流体流动。在一些实施方案中, 虽然没有形成微涡旋, 但凹槽 135 和 140 引起足够的扰乱以改变部分流体的流动路径, 从而增加壁 - 粒子相互作用。

[0054] 如图 2C 所示, 当不存在凹槽时, 悬浮于流体中的粒子 225 以基本直线的方式流动通过平坦的微通道 205, 其中仅在流场边缘附近 (例如与微通道 205 的壁直接相邻) 的那些粒子 225 才可能与微通道 205 的壁相互作用。相反地, 如图 2D 所示, 流动通过箭尾形图案的粒子 225 的流动路径可被流体中的微涡旋所扰乱, 这增加了粒子 - 微通道壁相互作用的次数。所述微涡旋受形成在微流体装置 100 的上壁 130 中的每个凹槽 445 的结构特征所影响。图 3 示出了凹槽 445 的示例性尺寸。

[0055] 图 3A 和 3B 示出了形成在微通道 115 的上壁 130 上的凹槽 135。如图 3A 所示, 对称的凹槽 135 包括两个臂, 所述臂各自跨越第一端部 150 和顶部 145 之间的长度 (l_1) 和跨越第二端部 155 和顶部 145 之间的长度 (l_2)。在所实施方案中, 两个臂之间的角度 α 为 90° 。在一些实施方案中, 两个臂之间的角度 α 为 10° 至 170° 。图 3B 示出了微通道 115, 其包括形成在上表面 115 中的凹槽 135。如图 3B 所示, 凹槽的宽度为 w , 微通道 115 的侧壁 120 和 125 的高度为 h_c , 和形成在上壁 115 上的凹槽 135 的高度为 h_g 。在一些实施方案中, l_1 和 l_2 各自为 $250\ \mu\text{m}$ – $400\ \mu\text{m}$, h_g 为 $3\ \mu\text{m}$ 至 $70\ \mu\text{m}$, 和 h_c 为 $100\ \mu\text{m}$ 。例如, 当 h_c 为 $100\ \mu\text{m}$ 时, h_g 为 $25\ \mu\text{m}$ 。

[0056] 图 3C 示出了不对称的凹槽 140, 其包括两个臂, 所述臂各自分别跨越第一端部 170 和顶部 165 之间的长度 (l_3) 和跨越第二端部 175 和所述顶部之间的长度 (l_4)。在所实施方案中, 两个臂之间的角度 β 为 90° 且可以是 10° 至 170° 。在一些实施方案中, 可将凹槽 140 制造成使 l_3 与 l_4 的比例为 0.5。例如, l_3 为 $141\ \mu\text{m}$ 且 l_4 为 $282\ \mu\text{m}$ 。凹槽 140 的厚度为 $35\ \mu\text{m}$ 。图 15 示出了凹槽的高度即 h_g 对粒子捕获的影响。

[0057] 箭尾形图案可如下形成: 形成箭尾形的列, 其中将每个凹槽设置成与另一个凹槽相邻。另外, 列中的所有凹槽可朝向相同方向。在一些实施方案中, 各个凹槽之间的距离为 $50\ \mu\text{m}$ 。可选择地, 凹槽可按彼此之间的任何距离来设置。列可包括任何数目的凹槽, 例如 10 个凹槽。箭尾形图案可进一步包括由入口到出口依次形成的多个凹槽列。在一些实施方案中, 两个相邻的凹槽列可间隔 $100\ \mu\text{m}$ 。换言之, 可将第二列中的第一个凹槽设置成距第一列中的最后一个凹槽 $100\ \mu\text{m}$ 。该图案可在微通道 115 的入口和出口之间重复。

[0058] 在一些实施方案中, 列中的凹槽或凹槽组可在横向上彼此偏离。例如, 如图 2B 所示, 微流体装置 100 中的凹槽列包括顶部设置在通道中心线右边 (朝向下游) 的第一组凹槽和顶部设置在通道中心线左边的第二组凹槽。相信上述偏离可进一步增加壁-粒子相互作用。

[0059] 图 3A–3C 示出的尺寸是示例性的。通常, 对凹槽高度的选择可取决于多种因素, 这些因素包括通道尺寸、粒子性质 (包括大小、密度等) 和粒子悬浮液流速。虽然较深的凹槽提供较大的扰乱, 但其它因素可限制凹槽高度。例如, 至多达到一定程度的限制, 凹槽高度可随通道高度成比例增加。通道高度及相应的凹槽高度可取决于粒子-微通道 115 表面接触面积。通道尺寸的增加可使粒子-微通道 115 相互作用减少, 这是因为可用于粒子进行相互作用的表面接触面积相对于截面流动面积是降低的。另外, 可设置通道高度的下限及相应的凹槽高度的下限以防止阻塞。在一些实施方案中, 凹槽高度与通道高度的比例可小于 1, 例如为 0.1 至 0.6。在一些实施方案中, 所述比例可等于 1 (例如凹槽高度可等于通道高度), 或可大于 1 (例如凹槽高度 (例如 $60\ \mu\text{m}$) 可大于通道高度 (例如 $50\ \mu\text{m}$))。另外, 凹槽的形状可不同于“V”形, 例如为“U”形、“L”形等。

[0060] 微通道 115 可例如使用软平板印刷技术来形成在上基板 105 中。在一些实施方案中, 可使负性光刻胶 (SU-8, MicroChem, Newton, MA, USA) 在硅晶片上以光刻方式形成图案以得到具有两层特征的母版。由此形成的母版可包括 SU-8 特征, 所述 SU-8 特征形成针对微通道 115 的特征例如通道截面、通道尺寸等的基础。母版上 SU-8 特征的高度 ($3\ \mu\text{m}$ – $100\ \mu\text{m}$) 可用表面面形测定器 (surface profilometer) [例如 Dektak ST System Profilometer (Veeco Instruments Inc., Plainview NY)] 测量。然后, 所述母版可用作模

具,可将 PDMS 预聚物倾倒在所述模具上且使 PDMS 预聚物在 65°C 的常规烘箱中固化 24 小时。当所倾到的 PDMS 预聚物固化时,形成包括微通道 115 的上基板 105。可从模具中取出固化的上基板 110,且例如通过氧等离子体处理来与下基板 105 结合以形成微流体装置 100。可选择地,可使用其它类型的结合,例如使用双面密封剂、在压力下进行物理夹紧和保持等。在一些实施方案中,基板可通过化学键而牢固地结合在一起,然后可通过在施加机械力下使所述键断裂而分开。

[0061] 图 4A-4C 示出了微流体装置 100 的形成,所述微流体装置 100 包括使用 PDMS 制造的上基板 405 和使用玻璃制造的下基板 410。包括微通道 415 的上壁和侧壁的上基板 405 可使用先前描述的技术来形成。可选择地或另外,上壁可包括多个凹槽 440,每个所述凹槽形成为不对称的“V”形。在一些实施方案中,对称的凹槽 440 和不对称的凹槽 445 可散布在箭尾形图案中。每个凹槽进一步包括顶部 445 和两个端部 450 和 455。另外,微通道 415 包括两个侧壁 420 和 425。

[0062] 为了构建用于捕获所需生物分析物的微流体装置 400,将吸附物 460 设置在微通道 115 的内表面上。具体地,对内表面进行表面修饰。在一些实施方案中,如图 4B 所示,可将吸附物 460 混合在溶液中且流动通过微通道 415。当所述溶液流动通过微通道 415 时,吸附物 460 与通道 415 的内表面结合且由此设置在通道 415 的内表面中。

[0063] 除使吸附物流动通过微通道 115 外,还可使用其它技术来设置吸附物。例如,在使用塑料基板的实施方案中,吸附物可在使上基板和下基板结合前例如如下设置在基板上:进行紫外 (UV) 照射处理以改变表面性质,从而使分析物与发生改变的表面结合。在下基板为玻璃的实施方案中,玻璃可在使玻璃基板与上基板结合前例如通过溅射、气相沉积、堆积纳米粒子单层等来进行官能化。

[0064] 如图 4C 所示,可将吸附物 460 设置在微通道 415 的全部内表面上。可选择地,可将吸附物 460 设置在微通道 415 的一个或多个壁中,例如设置在凹槽 445 形成在其中的壁中。在一些实施方案中,可将吸附物 460 仅设置在由玻璃制造的下基板 410 上。在上述实施方案中,可在将吸附物设置在下基板上后使下基板 410 与上基板 405 结合。在上述实施方案中,对流体的流速进行选择,从而使因凹槽 410 而形成的微涡旋朝向下基板 410 驱动流体中的细胞,这增加了细胞 - 下基板 410 相互作用的次数。然后,可使下基板 410 与上基板 405 分开且可对所捕获的细胞进行培养。

[0065] 在一些实施方案中,可对吸附物 460 进行选择,从而使微通道 415 可用于通过湿化学技术 (wet chemistry techniques) 基于亲和性对细胞进行捕获。在上述实施方案中,吸附物 460 可以是抗体 (例如针对 EpCAM 的抗体) 或适体 (例如针对表面蛋白的适体),微通道 415 的内表面用所述抗体或适体进行官能化。吸附物 460 的其它实例包括用抗生物素蛋白涂布的表面以通过生物素 - 抗生物素蛋白连接来捕获扩增的表达生物素的靶标细胞。与被捕获的细胞相应的吸附物的其它实例示于下表 1 中。

[0066] 表 1

[0067]

细胞类型	吸附物
嗜中性粒细胞	抗 CD66
单核细胞	抗 CD14
淋巴细胞	抗 CD4 ;抗 CD8
循环肿瘤细胞	抗 EpCAM
中性粒细胞	E, P 选择蛋白
HIV 特异性 T 细胞	HAL A2-SL9
任何疾病特异性 T 细胞	五聚体

[0068] 官能化后,内表面发挥可结合所需分析物的捕获装置的功能。图 5 示出了示例性微流体装置的捕获效率。

[0069] 实施例 1 :捕获效率

[0070] 图 5 示出了实施例微流体装置在不同流速时的捕获效率。如上所述,吸附物 460 被设置在其上的内表面结合与所述表面相互作用的细胞。为了研究微流体装置的捕获效率,使掺有癌细胞(肺癌细胞 H1650 系)的缓冲液流动通过在上壁中具有箭尾形图案的微流体装置 400 和具有平坦的壁表面的微流体装置 200。用于该实施例的微流体装置 400 是宽度为 2mm 且长度为 2cm 的小足印设计 (small footprint design)。使流体以 0.12ml/hr、0.24ml/hr、0.36ml/hr 和 0.48ml/hr 的流速流动通过装置 400 的微通道 415。将流动通过微流体装置 200 和 400 的所有流体收集到经特别设计的螺旋形废物腔中。细胞捕获效率如下确定:对装置(平坦的装置 200 或箭尾形的装置 400)中捕获的细胞数目进行计数且将该数目除以流动通过装置的细胞总数(对废物腔中的细胞进行计数且加上装置中捕获的细胞数目)。

[0071] 对于这些实验,研究了三种不同的流速,其中对于每种条件采集四个数据点。所期望的是,装置在高流速时提供高捕获效率。这可减少捕获所需相关细胞数目所需要的时间和样品大小。如图 5 所示,对于所有流速,就细胞捕获效率而言,包括箭尾形图案的微流体装置 400 好于仅具有平坦表面的微流体装置 200。当流速增加时,具有箭尾形图案的装置 400 的优势是提高了。即使流速非常高,具有箭尾形图案的装置 400 的捕获效率为约 50%,然而不具有凹槽的装置 200 的捕获效率降低至约 30%。

[0072] 实施例 2 :捕获效率

[0073] 图 6 示出了具有凹槽和不具有凹槽的实施例微流体装置的捕获效率。与上述实验类似,通过确定对掺杂到全血中的癌细胞(5,000 个细胞 /ml)的捕获效率对具有平坦表面的微流体装置 200 和具有箭尾形图案的装置 400 进行比较。用于该实施例的微流体装置 400 为就图 5 所述的小足印设计。研究了与就实施例 1 所述的流速类似的四种不同流速。

另外,测试了对照微流体装置,其中一种对照微流体装置包括箭尾形图案,且另一种对照微流体装置包括平坦表面。另外,对照微流体装置还通过用不是配置为捕获所述癌细胞的不相关捕获抗体进行官能化来测试。对于这两种对照微流体装置,没有观察到细胞捕获。与上述与缓冲液中癌细胞相关的结果类似,对于所有测试条件,具有箭尾形图案的微流体装置 400 的捕获效率好于具有平坦表面的微流体装置 200。

[0074] 另外,前列腺癌细胞的细胞系 (PC3) 由于降低的 EpCAM 表达而被测试。癌细胞具有比常规上皮细胞少的 EpCAM。所述新的细胞系及其表达水平为约 40,000 个 EpCAM 分子/细胞。掺杂到血液中的细胞数目为 1,000 个细胞/ml,从而使掺杂数目与微乎其微的细胞检测水平 (rare cell detection level) 更相关。对于所述新的细胞系,以 0.12ml/hr 和 0.24ml/hr 的流速进行实验。对于 PC3, EpCAM 的表面表达相对于癌细胞降低一个数量级,且掺杂浓度降低 5 倍。然而,在使用微流体装置 400 的情况下,观察到与 H1650 相当的捕获效率。

[0075] 实施例 3:细胞活力

[0076] 流动模式及相应的较高剪切应力对所捕获的细胞的活力的影响还使用常规存活/死亡测定来研究。在如图 7 所示具有箭尾形图案列的高通量微流体装置 700 的微通道 415 中对掺杂到全血中的癌细胞进行捕获。微流体装置 400 代表了可用于初步验证研究的小足印形式。微流体装置 700 是微流体装置 400 的放大形式的实施例。为了放大所述装置,对微流体装置 400 的设计进行重复和延长。在一些实施方案中,微流体装置 700 为 2cm 宽和 4cm 长,且包括上部区域 (header region) 和下部区域 (footer region)。在该实施例中,多个箭尾形图案如下形成:在宽度大于微通道 415 的微通道的上壁中形成彼此相邻的箭尾形图案列。通过微通道 715 的体积计量流速为 2ml/hr。所捕获的细胞在结合所述细胞的基板上用 Calcein AM 和 Ethidium Homodimer 染色。结果表明,所捕获的大多数 (~90%) 细胞是有活力的,这证实箭尾形图案在这些条件下对所捕获的细胞的负面影响是有限的。

[0077] 在一些实施方案中,可使细胞与基板分开且单独培养。为了使细胞与吸附物分开,吸附物和细胞之间的连接可例如通过将吸附物溶解于不影响细胞的溶液中来弱化。

[0078] 箭尾形图案列的数目仅受限于微通道的宽度。在一些实施方案中,微流体装置 700 包括 8 个微小腔室 (mini-chamber) 即 8 个箭尾形图案列。在上述实施方案中,可在微通道的入口处引入上部设计以向每个箭尾形图案列提供稳定性和均匀的流体体积。在一些实施方案中,将每个箭尾形图案列设置成跟随相邻的图案列,从而使列中“V”形凹槽的顶部与相邻列中“V”形凹槽的顶部对齐。换言之,这两个凹槽的顶部位于这样的直线上,所述直线垂直于通过微流体装置 700 的微通道的主要轴线。如果列中的所有凹槽等距离地形成在装置 700 的微通道中,则装置 700 中的所有凹槽将彼此对齐。在一些实施方案中,箭尾形图案列可偏离相邻的列。例如,列中“V”形凹槽的顶部可偏离相邻列中“V”形凹槽的顶部 10 μ m。偏离的列设计可进一步促进混合。在一些实施方案中,装置 700 中的多个列可包括随机散布在每个列中的对称的凹槽 335 和不对称的凹槽 340。形成散布的凹槽,这促进了流体和悬浮于流体中的粒子的横向移动,由此增加了细胞-微通道壁相互作用的次数且因此增加了细胞捕获。

[0079] 实施例 4:细胞培养

[0080] 在另一个实施例中,如图 8 所示用于对所捕获的细胞进行培养的微流体装置 800

用于捕获和培养细胞。微流体装置 800 与就图 7 所述的高通量设计类似,且包括使用玻璃制造的下基板和使用 PDMS 制造的上基板 810,所述上基板 810 包括如上所述的箭尾形图案列。含有待捕获的细胞的血液的流速为约 2ml/hr,且对含有待捕获的细胞的血液的流速进行控制以使细胞接触附着于下玻璃基板 810。在微流体装置 800 中,上基板和下基板均涂布有吸附物。下基板和上基板可逆性地彼此结合,由此在捕获细胞后,上基板 810 可例如通过施加机械力而与下基板 805 分开。在其它实施方案中,可将下基板和上基板以机械方式夹紧以形成不透水的密封,或通过不损害所附着的细胞的合适方法来结合。在一些实施方案中,可将吸附物 460 设置在下基板或上基板上。细胞可被捕获在设置有吸附物的基板上。

[0081] 图 9A-9C 为显微照片,其示出了所捕获的细胞在玻璃基板上的生长。在捕获了掺杂到血液中的癌细胞后,取下微流体装置 800 的上基板 810,将上基板和下基板均置于培养皿中,且在 37°C 和 5% CO₂ 的条件下用适当的细胞培养基孵育(图 9A)。如图 9B 所示,细胞附着于基板,且在 24 小时内开始扩散和增加数目。细胞培养进行超过 3 周后,细胞不断分裂,由此在下基板(玻璃)和上基板(PDMS)上均形成单层。此时,从捕获表面上取下细胞(通过用胰蛋白酶处理),且在常规细胞培养烧瓶中进行培养。以该方式证实了对所捕获的癌细胞进行的长期培养是成功的。因此,所述细胞不但是有活力的,而且是有功能的,且可在培养基中生长。

[0082] 实施例 5 :表型变化

[0083] 图 10 示出了对用具有凹槽的微流体装置捕获的细胞上及对照细胞上的 EpCAM 表达进行的荧光活化细胞分类(“FACS”)分析。为了确定所述癌细胞暴露于微流体装置 800 是否对细胞表型具有任何影响,对一种标志物即 EpCAM 进行了研究。具体地,对捕获在装置 800 上的细胞的表达水平和对照细胞(以相同方式制备但不流动通过所述装置)的表达水平进行比较。将这两种细胞群落在实验后培养 3 周。流式细胞计量术结果表明,对所述癌细胞的捕获和培养没有改变其 EpCAM 的表达水平。这些结果表明,用微流体装置 800 进行的捕获不会改变细胞的表型。

[0084] 实施例 6 :细胞捕获

[0085] 图 11A 示出了使用微流体装置 100 从前列腺癌患者中捕获的循环肿瘤细胞(CTC)。如图 11A 所示,CTC 被捕获在微流体装置 100 的凹槽中。图 11B 证实细胞是完整的,其显示出完整的细胞核和细胞质。所述细胞经鉴定为 CTC,这是因为其对于 PSA(前列腺特异性抗原/绿色)和细胞核染色(DAPI/蓝色)是染色阳性的且对于 CD45(一种针对白细胞的常规标志物)(红色)是染色阴性的(参见以灰阶表示的图 11C 和 11D)。另外,没有污染细胞(contaminating cell)。图 11E 示出了反射光下的完整细胞。

[0086] 实施例 7 :背景 CTC 水平

[0087] 图 12 示出了健康供体对照。为了确认使用患者样品观察到的 CTC 计数高于可在健康供体样品中观察到的背景,使用微流体装置 100 对四位不同供体(3 位男性和 1 为女性)进行测试,且用 PSA/CD45 染色剂染色。对于所有四位供体,健康供体计数 ≤ 5 个假阳性/mL,其中平均为 2 个假阳性/mL。用硅芯片进行的类似实验得到较高的假阳性数,推测这是因为非特异性结合的增加。

[0088] 实施例 8 :捕获水平

[0089] 图 13 示出了使用具有凹槽的微流体装置 100 从患者样品中捕获的 CTC。初始结果

表明,当使用具有凹槽的微流体装置 100 时,从患者样品中捕获的 CTC 可高达 160 个 CTC/mL。

[0090] 图 14A-14D 示出了对具有凹槽的微流体装置 100 中的 CTC 进行 Wright-Giemsa 染色的灰阶图。因为用于制造微流体装置 100 的基板是透明的,所以捕获在微流体通道 115 中的患者样品可用组织染色剂例如 Wright-Giemsa 进行染色。图 14A-14D 示出了采自流动通过微流体装置 100 的肺癌患者样品的显微照片。所选择的细胞是 CTC。

[0091] 图 15 示出了对具有不同凹槽尺寸的两微流体装置进行的比较。对两种微流体装置进行比较以确定凹槽高度对捕获效率的影响。第一种微流体装置的通道高度为 70 μm ,且第二种微流体装置的通道高度为 50 μm 。第一种微流体装置的凹槽高度为 35 μm ,且第二种微流体装置的通道高度为 25 μm 。与第一种微流体装置相比,第二种微流体装置显示出对掺杂到全血中的低表达子细胞 PC3 的捕获效率的三倍提高。

[0092] 尽管本申请含有许多物质,但这些不应该被理解为对本申请范围或所要求保护的范围的限制,而是作为具体实施本申请特定的特征的说明。在本申请在单独实施的上下文中描述的某些特征还可在单个实施方案中组合实施。相反地,在单个实施方案中描述的各项特征也可单独地在多个实施方案中实施或以任何合适的亚组合的方式实施。另外,虽然特征可如上描述为在某些组合中起作用,甚至如所述地初始要求保护,但来自所要求保护的组合的一个或多个特征可在一些情况下从该组合中删除,所要求保护的组合可涉及亚组合或亚组合的变形。

[0093] 类似地,尽管以具体的顺序在附图中说明各操作,但不应理解为为了获得期望的结果,要求该操作以所示的具体顺序或连续顺序进行,或进行所有说明操作。在某些情况下,多任务处理和平行处理可能是有利的。另外,在上述描述的各项实施方案中各种系统组件的分开不应理解为在所有实施方案中要求该分开,而应理解为所描述的程序组件和系统通常可以单个软件产品集成在一起或封装到多个软件产品中。因此,已经描述了本申请的具体实施。其它实施在所附权利要求的范围内。例如,在权利要求中记载的动作可以不同的顺序进行,且仍然获得期望的结果。

[0094] 配置在血液或缓冲液中的细胞可以与设置在通道中的吸附物结合的倾向性流动通过微通道。诸如热压花、模塑等的技术可用于形成微通道或凹槽或微通道和凹槽两者。在上述实施方案中,制造基板的母版不需是硅。在一些实施方案中,诸如肽、核苷等的小分子可用作吸附物。

[0095] 在一些实施方案中,在使任何血液流动通过微通道前,可通过添加表面活性剂到封闭缓冲液 (blocking buffer) (通常为在 1 \times PBS 中的 1-3% BSA) 来降低非特异性结合。在添加封闭缓冲液 (例如 0.05% TWEEN20,在 1 \times PBS 中的 3% BSA) 后,微流体装置可在一定温度如室温孵育一段时间例如 1 小时,以充分封闭基板。在封闭步骤后可开始血液流动。

[0096] 在一些实施方案中,可如下降低与微通道表面的非特异性结合:通过使包含分析物-结合部分的表面与非离子型洗涤剂接触,然后使样品接触所述表面。非离子型洗涤剂可以是聚山梨醇酯表面活性剂,例如山梨聚糖单月桂酸酯的聚氧乙烯衍生物 (例如聚山梨醇酯 20,以商品名 TWEEN20 销售)。非离子型洗涤剂可以低于溶解哺乳动物细胞所需浓度的浓度与所述表面接触。例如,在表面与生物样品接触前,包含浓度为至多约 0.05% 的聚山梨醇酯 20 的水溶液可用于预处理所述表面。

[0097] 该水溶液可进一步包含组分及降低来自血液组分的非特异性结合。例如,所述表面可与0.05%聚山梨醇酯20、1%BSA和1×磷酸盐缓冲盐水(PBS)(不含钙离子和镁离子)的混合物接触。可基于通道的尺寸来选择预处理溶液的体积。例如,约3mL的上述0.05%聚山梨醇酯20溶液可以约30ml/hr的速度通过微流体通道。在将生物样品引入到通道前,微通道可在聚山梨醇酯20溶液中孵育约1小时。

[0098] 在一些实施方案中,在与含有CTC、生物素化的EpCAM抗体、生物素和链霉抗生物素的生物样品接触前,使微通道与含有在1%BSA的1×PBS中的0.05%Tween20的溶液(不含Ca²⁺/Mg²⁺)(例如3mL的表面活性剂溶液,流速约30mL/hr)接触,所述微通道具有含有生物素-结合共轭体(binding conjugate)的表面。Pluronics、poloxymmer、PEG和其它类似表面活性剂可类似地代替聚山梨醇酯20使用或与聚山梨醇酯20组合使用。

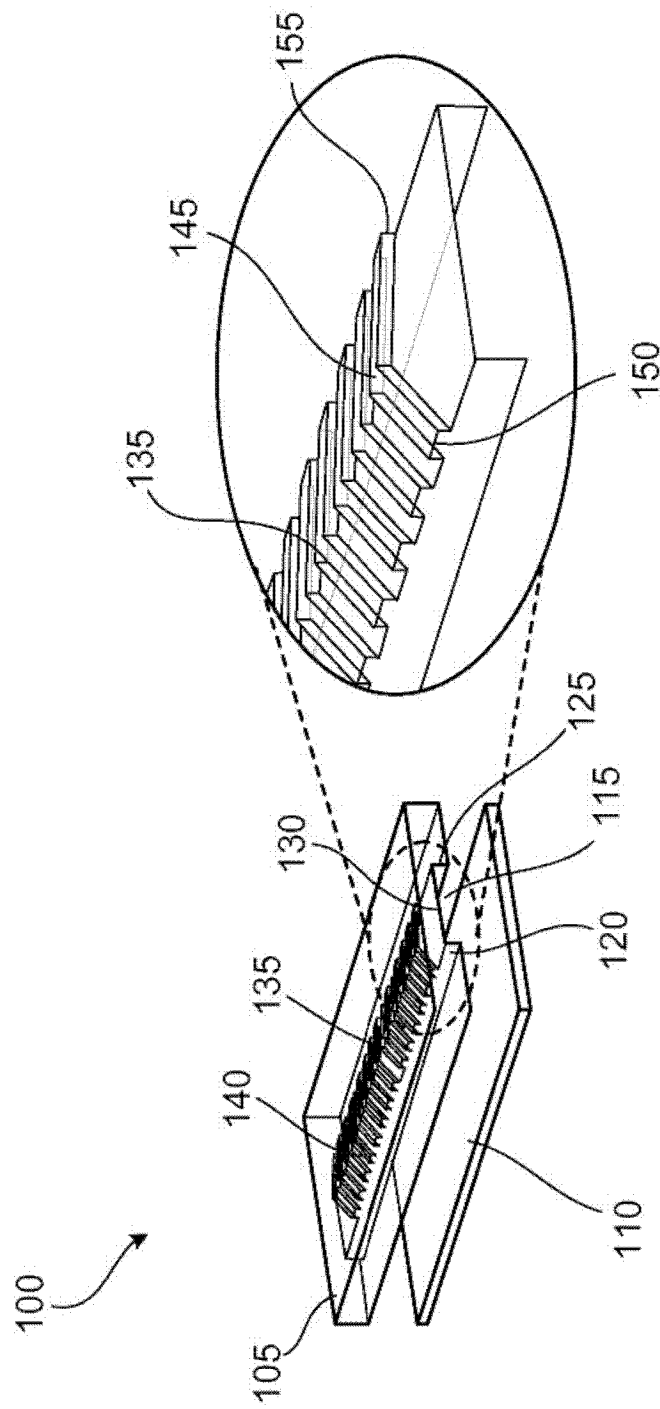


图 1

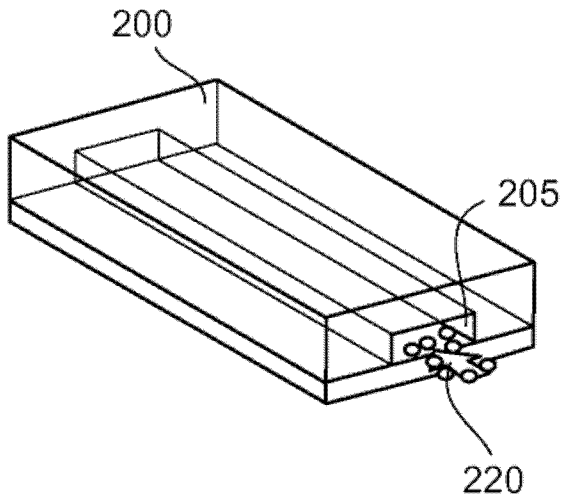


图 2A

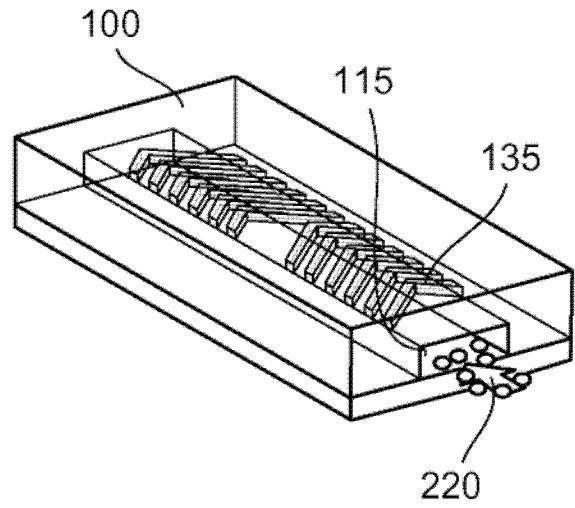


图 2B

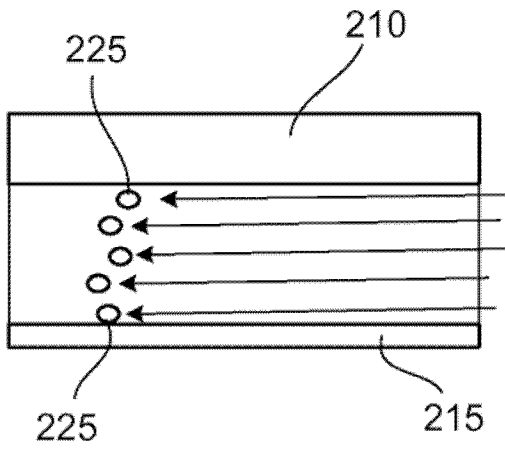


图 2C

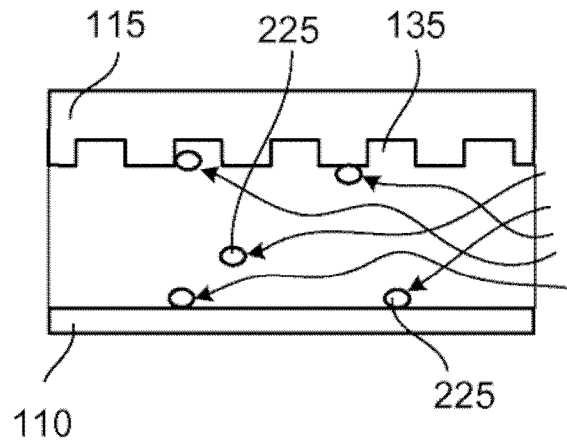


图 2D

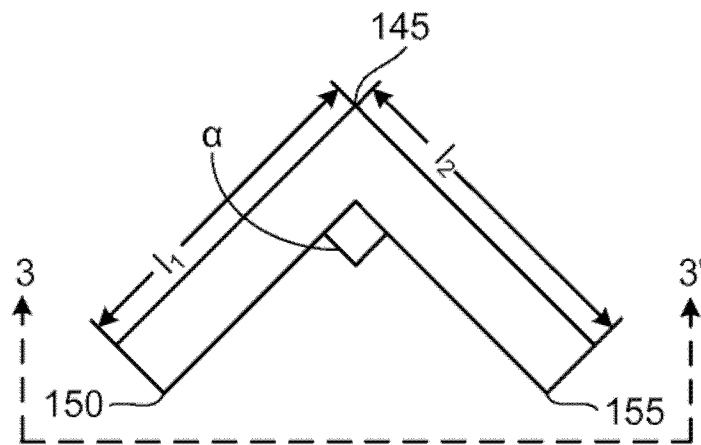


图 3A

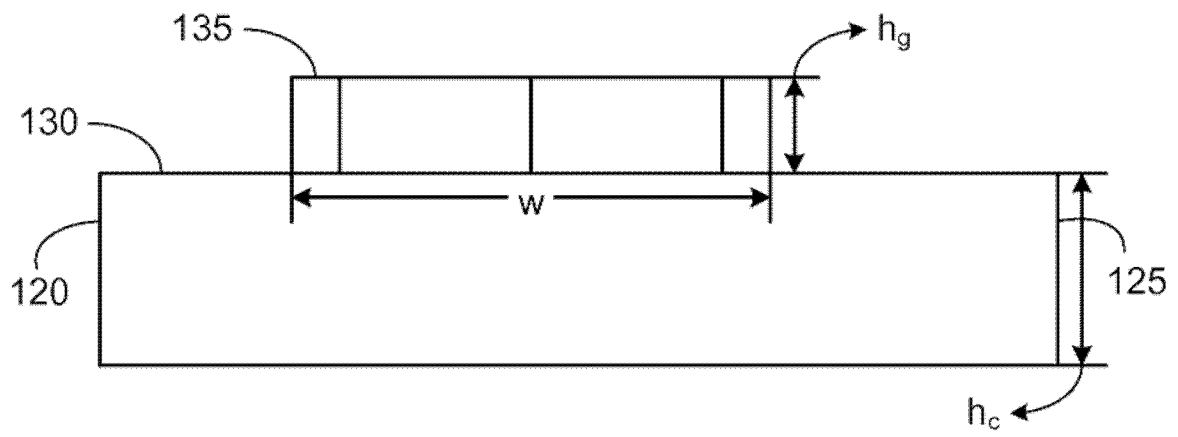


图 3B

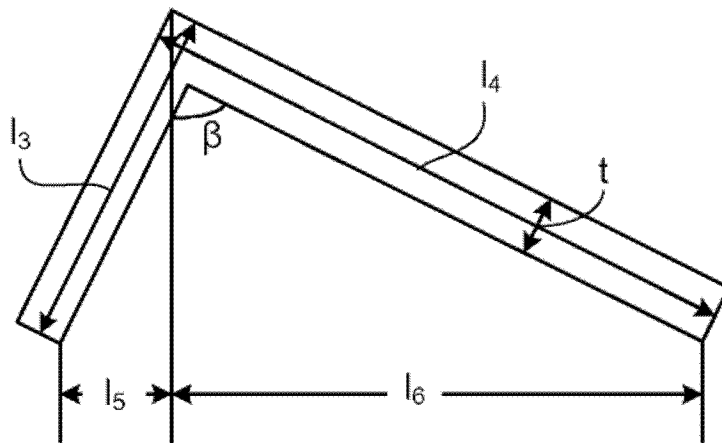


图 3C

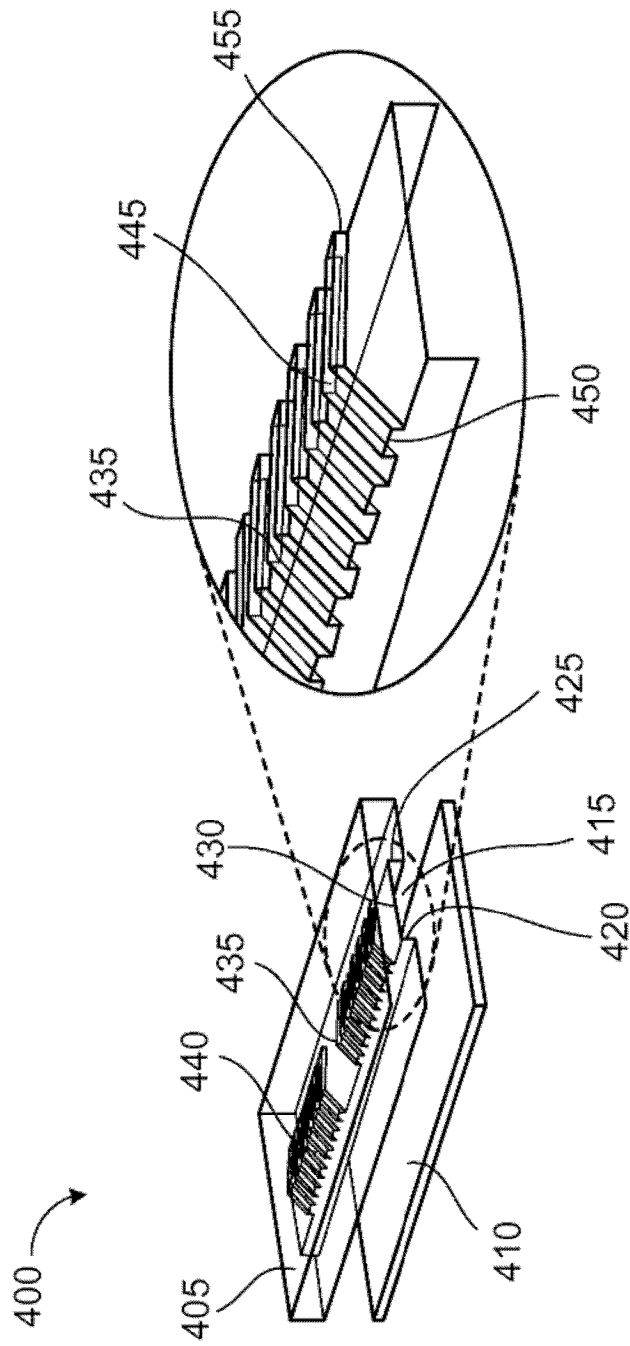


图 4A

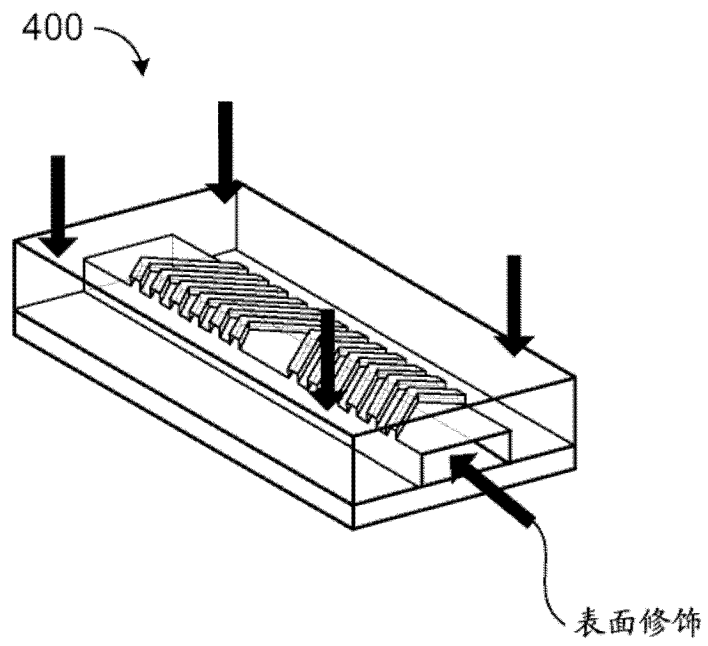


图 4B

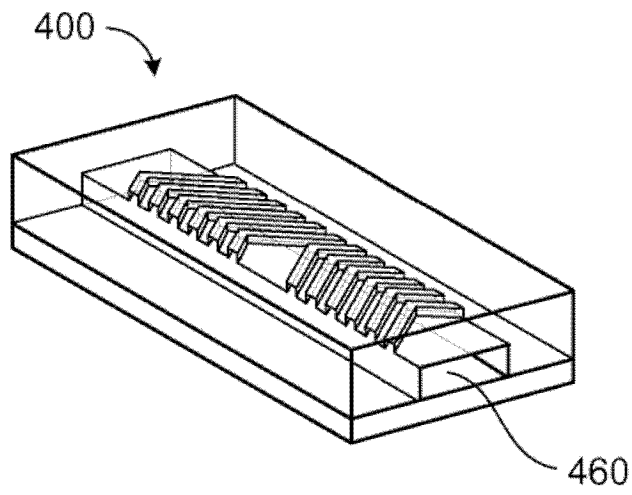


图 4C

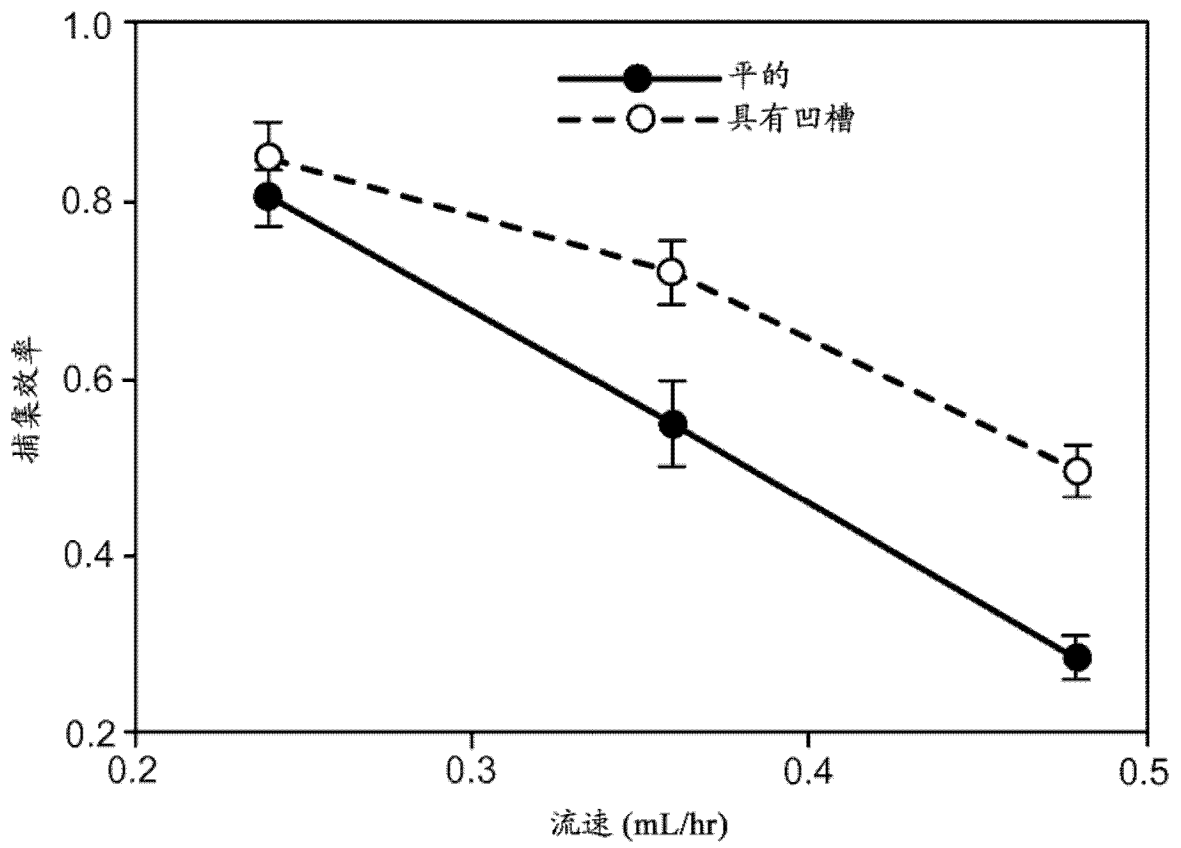


图 5

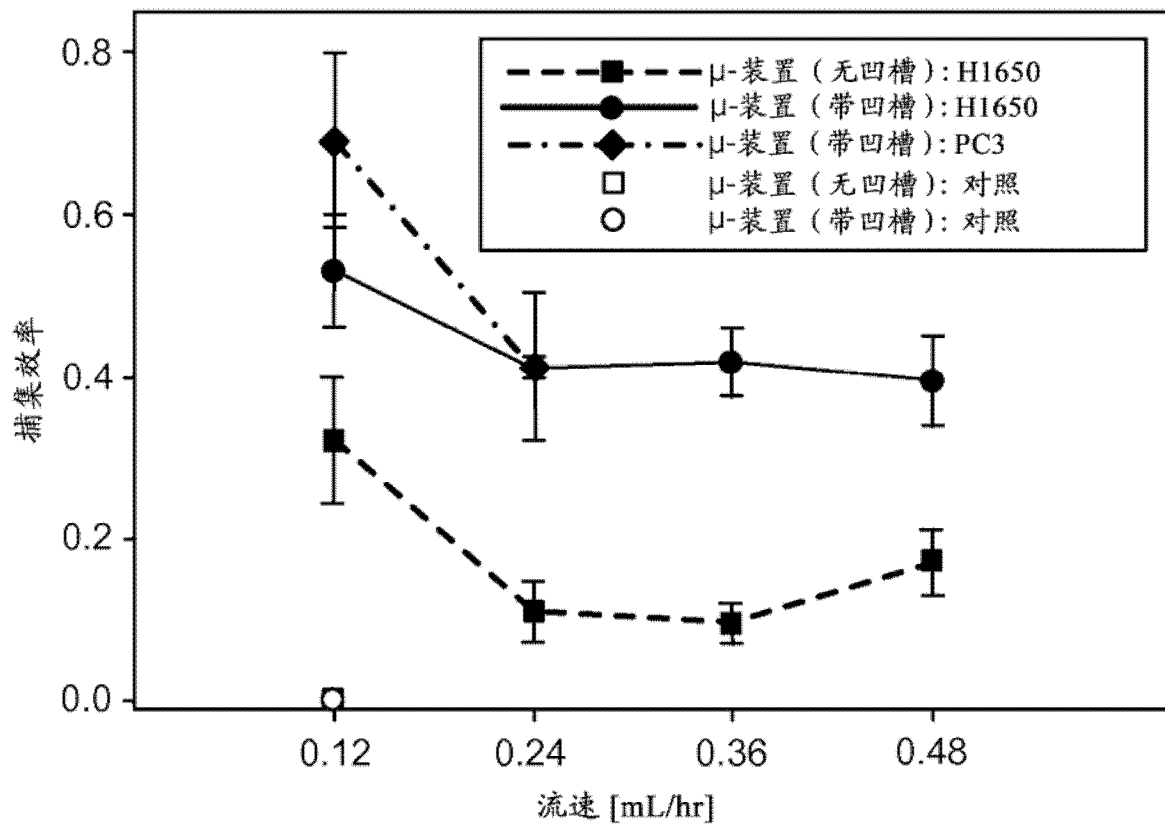


图 6

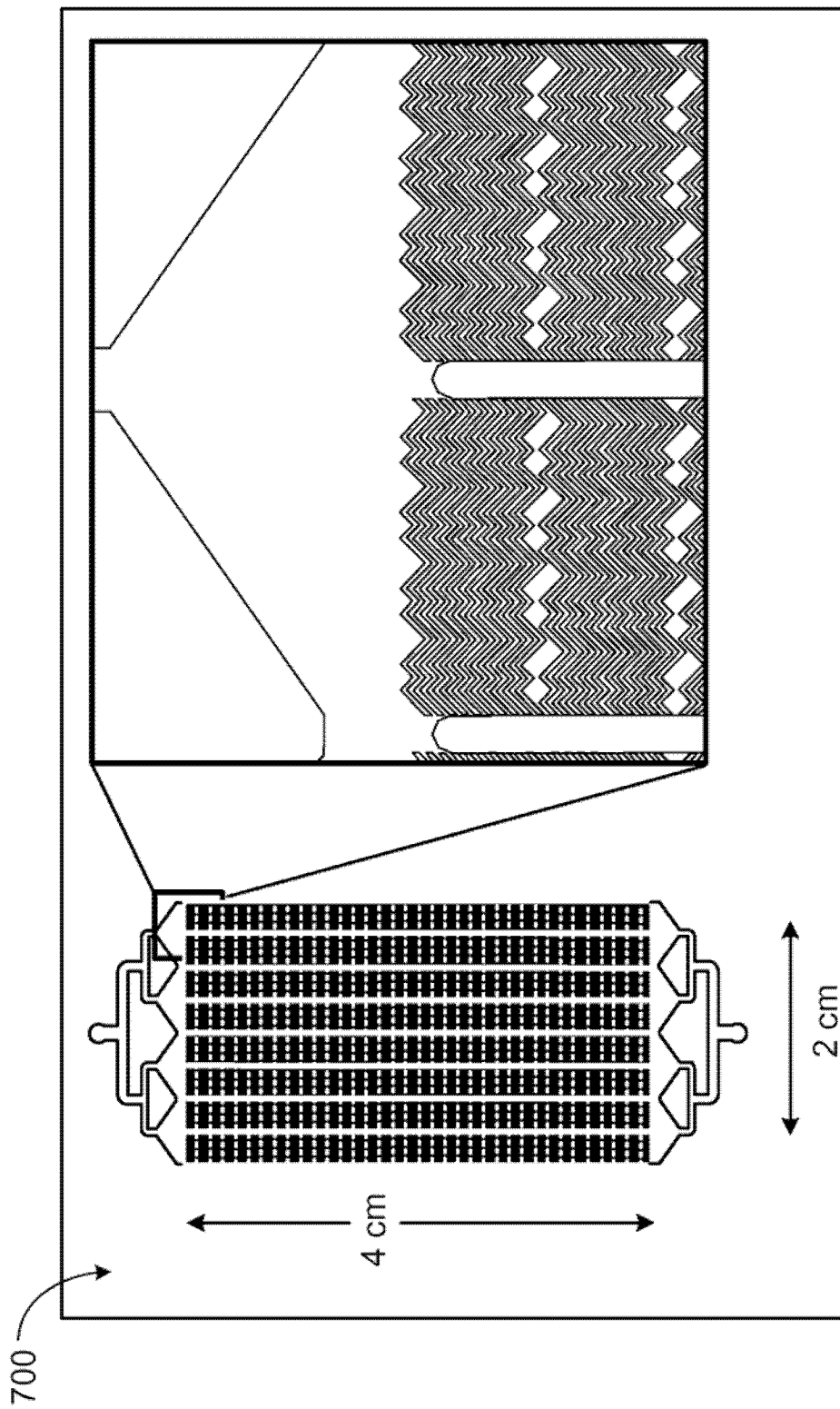


图 7

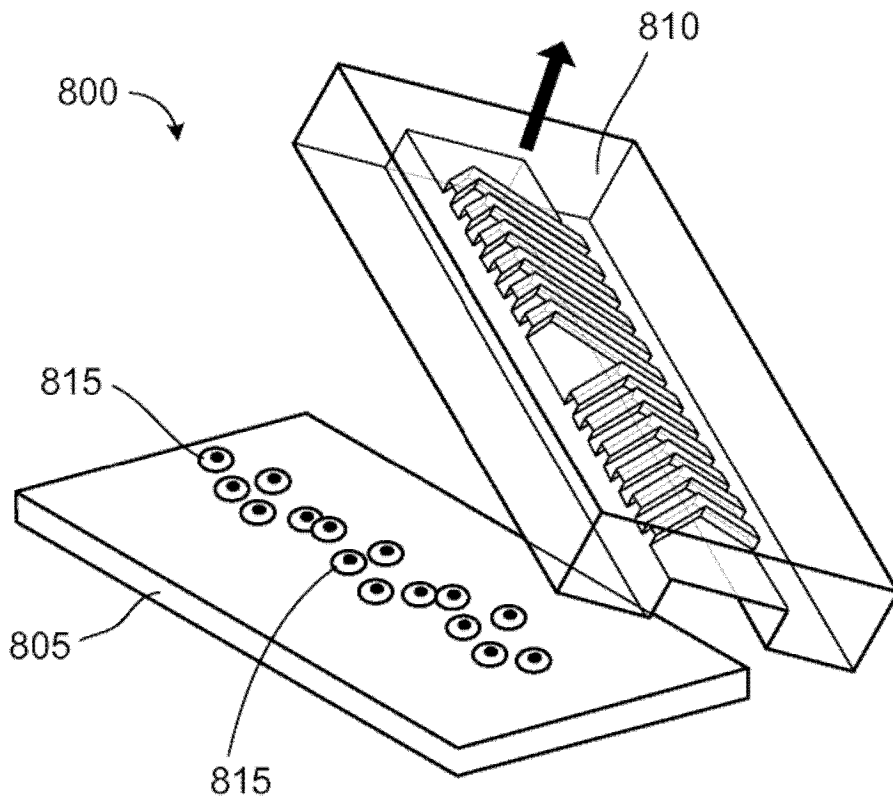


图 8

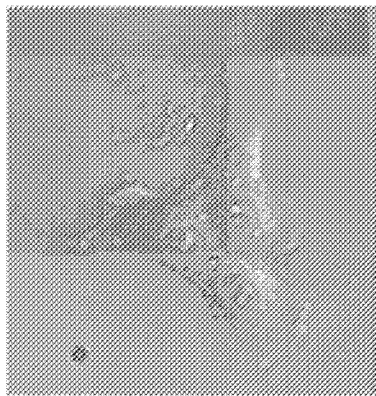


图 9A

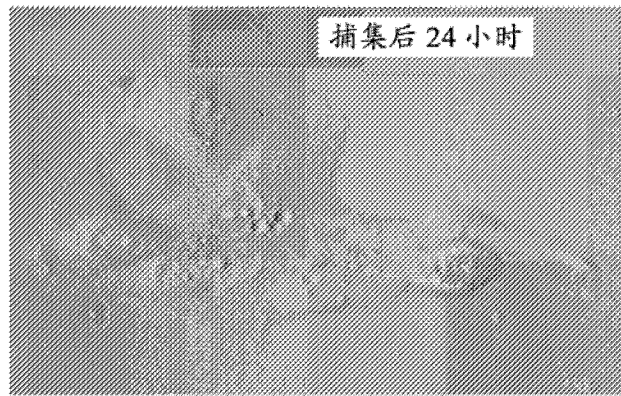


图 9B

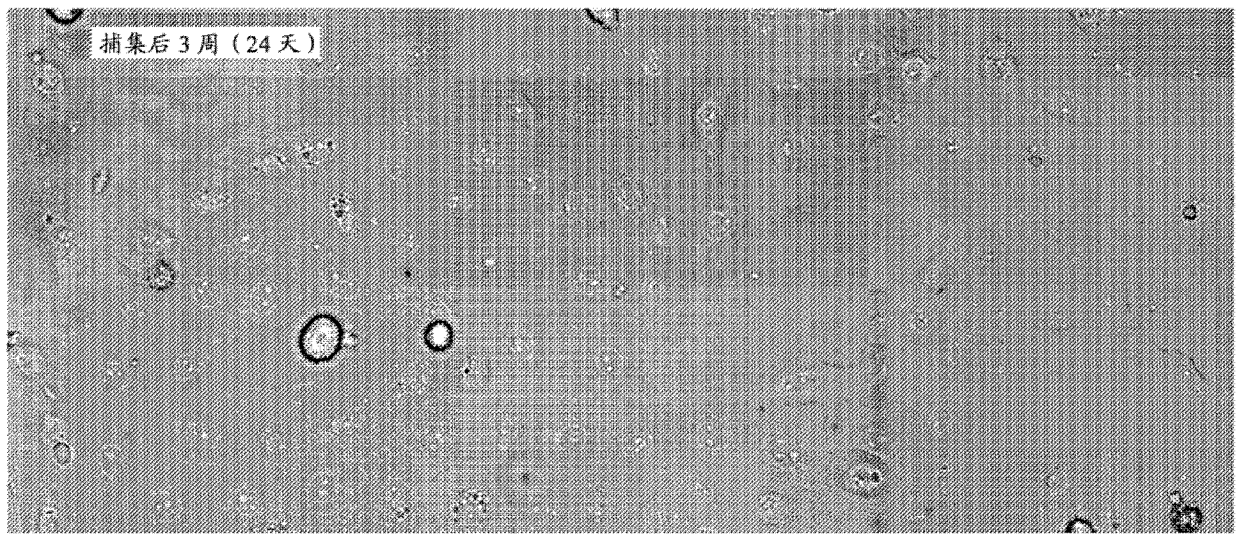
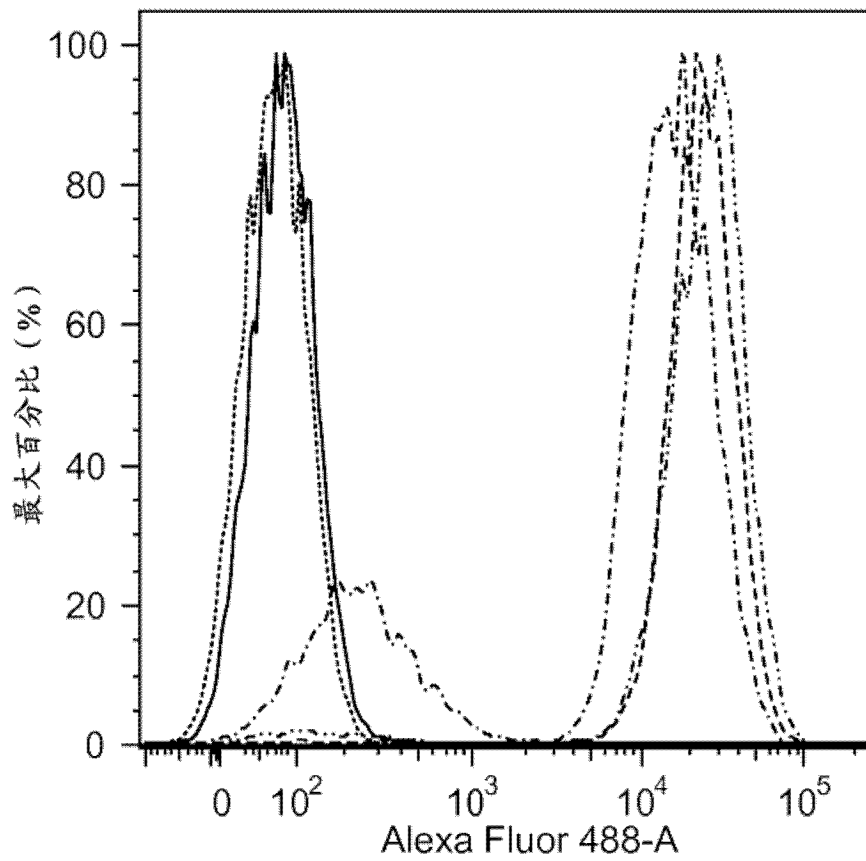


图 9C



FSC-A, SSC-A subset

-----	□	H1650_EpCAM-PDMS.fcs	83.2
- · - · -	□	H1650_EpCAM-new.fcs	62.9
.....	□	H1650_EpCAM-old.fcs	70.7
————	□	H1650_GIgG-PDMS.fcs	82.3
- · · · ·	□	H1650_unstained.fcs	83.3

图 10

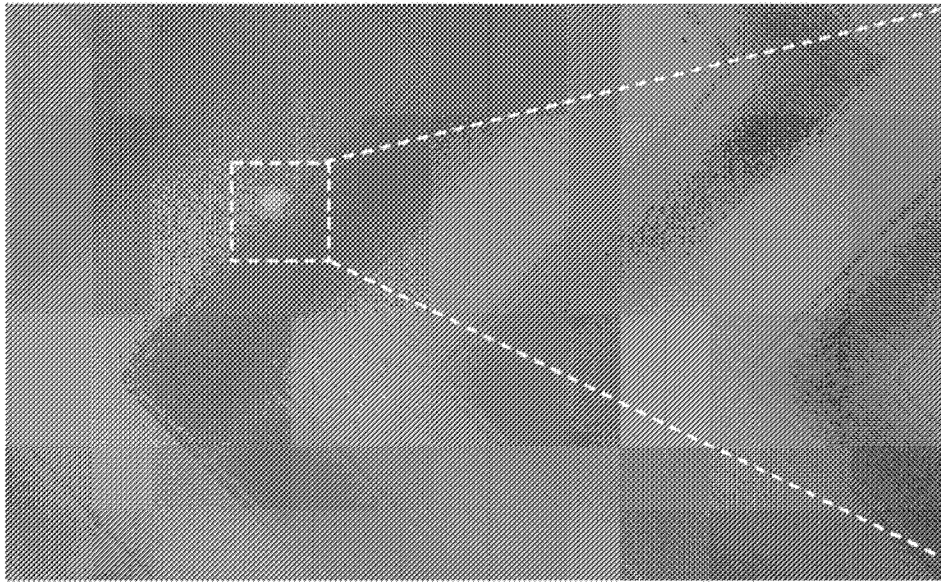


图 11A

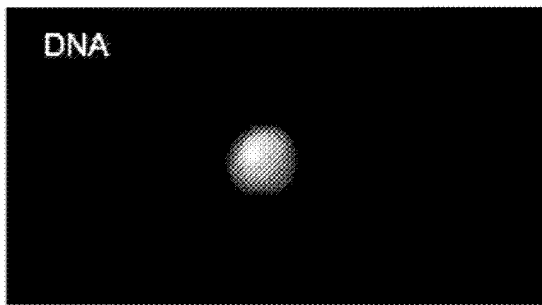


图 11B

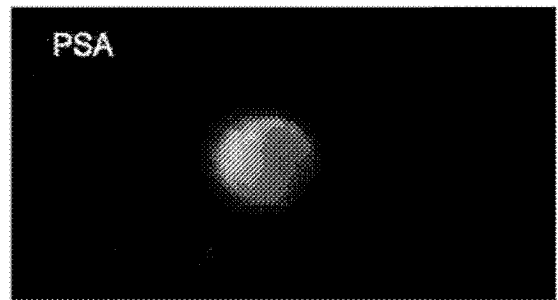


图 11C

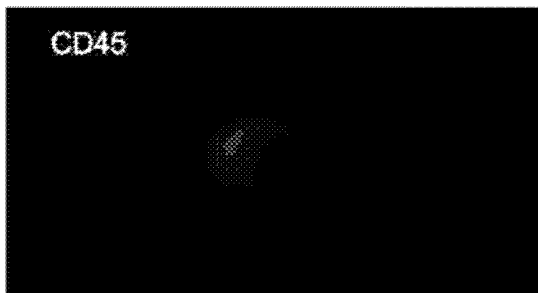


图 11D

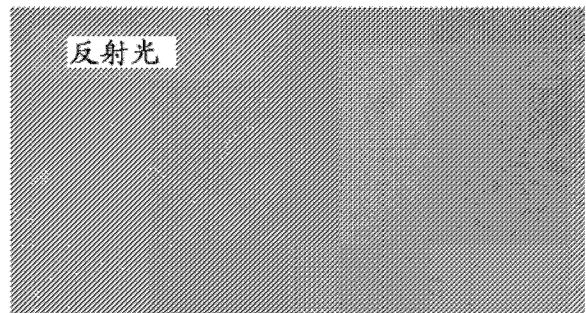


图 11E

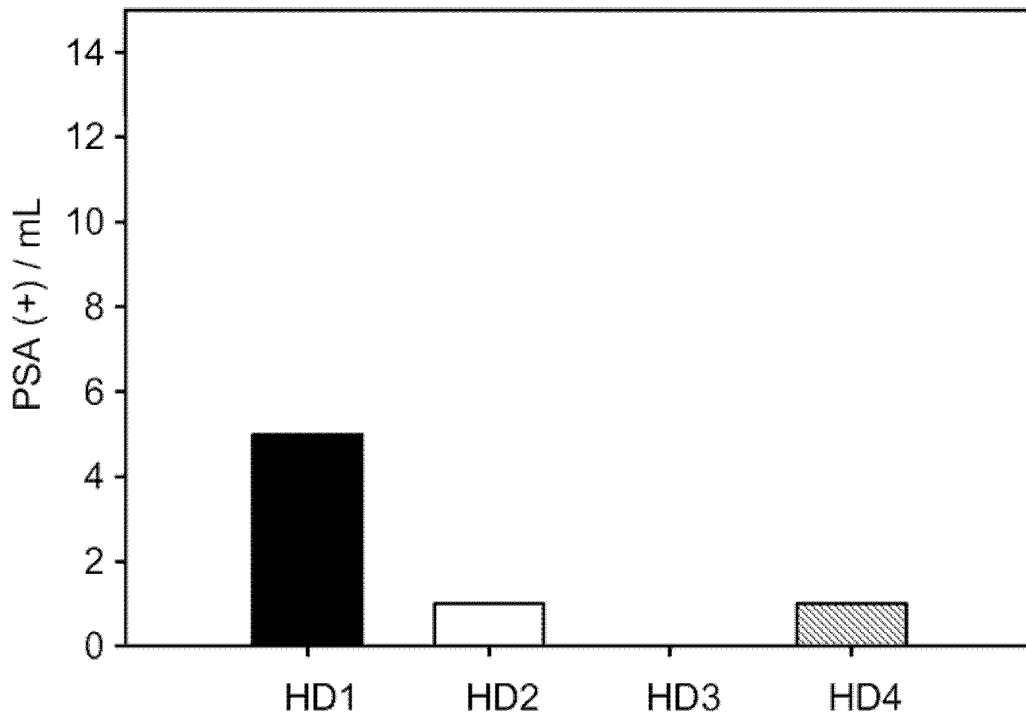


图 12

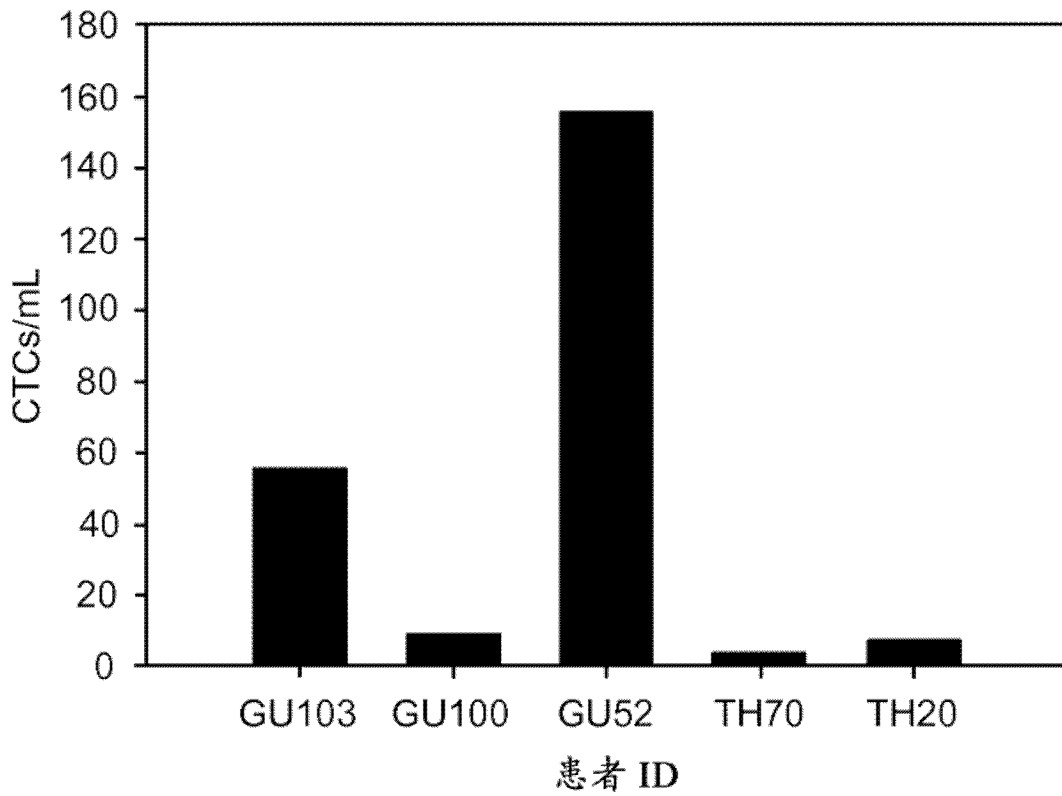


图 13

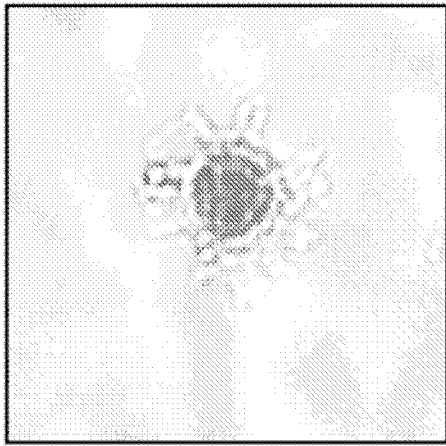


图 14A

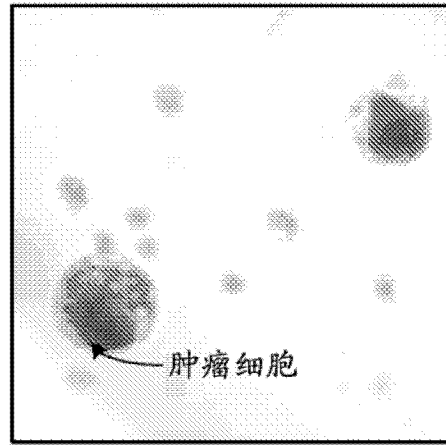


图 14B

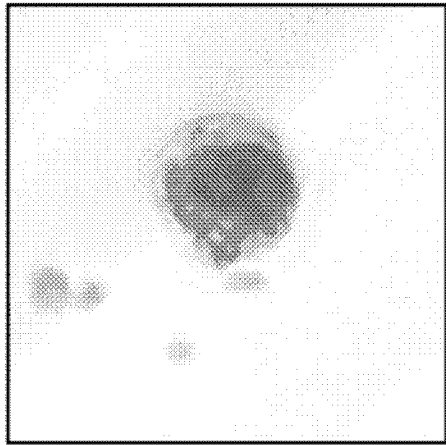


图 14C

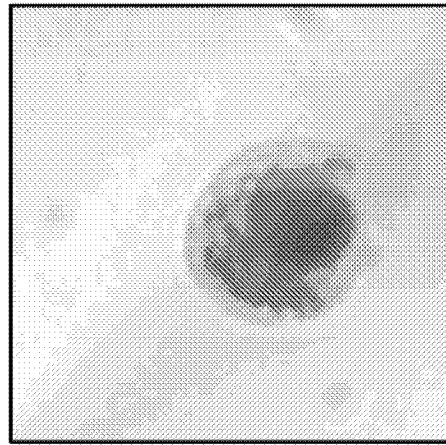


图 14D

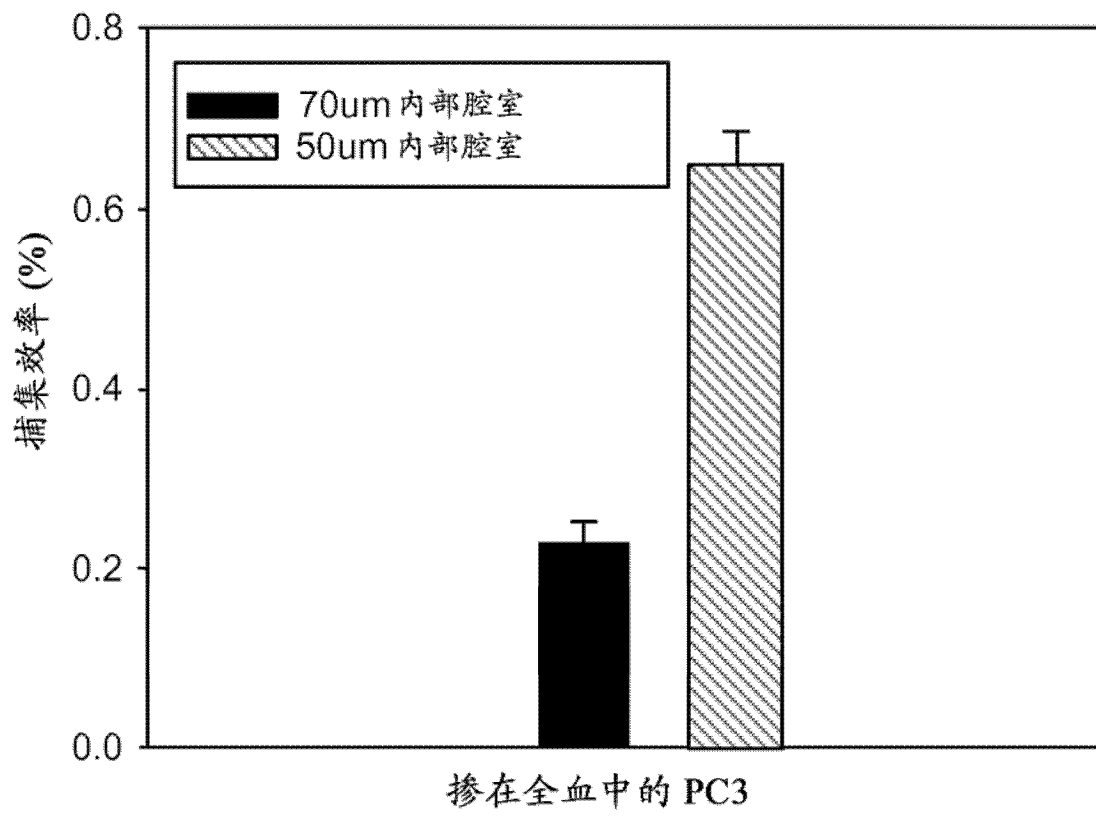


图 15