

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 21/55 (2006.01)

G01N 21/41 (2006.01)



[12] 实用新型专利说明书

专利号 ZL 200820169047.0

[45] 授权公告日 2009年9月2日

[11] 授权公告号 CN 201302544Y

[22] 申请日 2008.12.4

[21] 申请号 200820169047.0

[73] 专利权人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路38号

[72] 发明人 丁志华 孟婕 王玲 王川
王凯 徐磊 陈明惠

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司
代理人 林怀禹

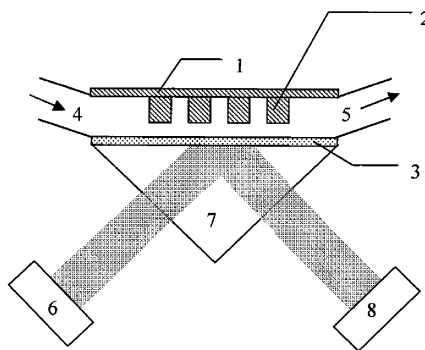
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

[54] 实用新型名称

高俘获率高灵敏度的微流控 SPR 生物传感装置

[57] 摘要

本实用新型公开了一种高俘获率高灵敏度的微流控 SPR 生物传感装置。将微流控芯片技术与 SPR 技术结合，微结构基片下端有微柱阵列构成的三维微通道结构，微结构基片与下面的 SPR 金属膜封接构成微流控 SPR 集成芯片。采用三维微通道结构介导的微流控流场来控制循环肿瘤细胞 (CTC) 的流向与速度，在保证血流高通量的前提下，提高 CTC 与 SPR 金属膜的接触机率与结合效率，并依靠 SPR 的高灵敏度检测能力同步实现 CTC 的计量，实现对痕量 CTC 高效率俘获与高灵敏同步检出的目标。本实用新型将促进微流控芯片技术的发展和细胞分析方法的创新，推动床边检验技术和仪器的发展，有望直接利用少量血对高危人群实施筛查，还可用于癌症病人疗效的动态监视。



1、一种高俘获率高灵敏度的微流控 SPR 生物光学传感装置，其特征在于：包括微结构基片(1)、微柱阵列(2)、SPR 金属膜(3)、液体入口(4)、液体出口(5)、入射光源(6)、光路系统(7)和 CCD 探测器(8)；微结构基片(1)下端面有微柱阵列(2)构成的三维微通道结构，微结构基片(1)与下面的 SPR 金属膜(3)封接构成微流控 SPR 集成芯片，两端开有液体入口(4)和液体出口(5)，SPR 金属膜(3)下端设置光路系统(7)，由入射光源(6)、光路系统(7)和 CCD 探测器(8)构成光学检测系统。

2、根据权利要求 1 所述的一种高俘获率高灵敏度的微流控 SPR 生物光学传感装置，其特征在于：所述微柱阵列(2)中微柱直径与高度均为 $50\mu\text{m}$ ，间隙 $50\mu\text{m}$ ，每三个微柱均呈等边三角形排列，微柱底面与 SPR 金属膜(3)的间距为 $20\mu\text{m}$ 。

高俘获率高灵敏度的微流控 SPR 生物传感装置

技术领域

本实用新型涉及微流控芯片技术、SPR(Surface Plasmon Resonance)传感技术和微结构流场控制技术，尤其涉及一种高俘获率高灵敏度的微流控 SPR 生物传感方法和装置。

背景技术

恶性肿瘤是我国当前严重危害人类生命和健康的重大疾病之一，尽管发展了包括免疫治疗、生物治疗和基因治疗在内的系列治疗新手段，但癌症病人的整体治疗效果却并未有实质性提高，原因之一是没能早期发现。事实上，我国癌症死亡率在过去 30 年增长达八成以上，而且过多资源用于中晚期患者的治疗。目前肿瘤发现和诊断仍高度依赖于医学影像学、肿瘤特异性血清标志物和组织活检。医学影像学方法，如超声(US)、计算机断层显像(CT)、磁共振显像(MRI)和正电子发射断层显像(PET)，在灵敏度与分辨率上具有很大的局限性，一毫米以下的肿瘤检测不到，而且往往费用昂贵。基于分子标记和基因技术的血清肿瘤标志物检测方法，已经广泛应用于人群的肿瘤筛查，但这些标志物的特异性大多不高，而且存在着安全性问题。组织活检是确诊肿瘤的有效方法，但这种侵入性的检查手段难以成为常规方法广泛采用。因此，研究开发简单、高灵敏度的肿瘤筛查方法，发展床边检验所需的肿瘤筛查与监测技术和仪器，对缓解我国面临的医疗卫生方面的压力，提高人类的健康水平和生活质量起着至关重要的作用。

原发肿瘤在早期阶段就有肿瘤细胞脱落到循环系统成为循环肿瘤细胞(CTC)，与肿瘤进程、疗效监测、转移复发和预后等临床指标具有相关性。但癌症初期只有非常痕量的 CTC，要实现其成功检出必须提高 CTC 的俘获效率与检测仪器的灵敏度。体外流式细胞术、光纤束扫描成像术、免疫细胞化学检测、转录多聚酶链反应、免疫磁性分离术等都可用于检测血液样品中的 CTC，但这些方法往往需要血液的预处理，CTC 分离效率和纯度也有待进一步提高。现行微流控芯片技术的特点在于操纵微量样品，具有集成度高、样品耗量小、污染少等诸多其他常量流控技术难以具备的优点，但由于微流控芯片的通道一般在微米量级，并不适合大通量血样的快速分析。如 1 毫升的全血以 1mm/s 的速度流经 $30\mu\text{m}\times 30\mu\text{m}$ 的微通道，需要耗时 12.9 天，无法满足快速分析的要求。新

近报道的 CTC 芯片,演示了直接针对全血样品实施高通量、高灵敏度 CTC 俘获的可行性,是微流控细胞分析方法的重要进展。不过,CTC 的检测采用了荧光染色和后续的荧光显微镜观察与 CTC 计数,这种针对痕量 CTC 样品的附加处理步骤易造成 CTC 的丢失和污染,因而直接影响检查结果的判断。而且,CTC 俘获与观察分开来进行也制约了最后的分析速度。集成化微流控技术是解决这一问题的根本途径和一大发展趋势,如将光学、电化学检测手段与微流控芯片结合,或者将质谱技术与微流控器件联用等。

发明内容

本实用新型的目的在于提供一种高俘获率高灵敏度的微流控 SPR 生物传感方法和装置,以高危人群和癌症初期患者全血中痕量的 CTC 作为俘获与检出对象,将微流控芯片技术与 SPR 技术结合,采用三维微通道结构介导的微流控流场来控制 CTC 的流向与速度,有效提高 CTC 与 SPR 金属膜的接触机率与结合效率,并依靠 SPR 的高灵敏度检测能力同步实现 CTC 的计量。

本实用新型的目的是通过如下技术方案实现的:

一种高俘获率高灵敏度的微流控 SPR 生物光学传感装置:

包括微结构基片、微柱阵列、SPR 金属膜、液体入口、液体出口、入射光源、光路系统和 CCD 探测器;微结构基片下端面有微柱阵列构成的三维微通道结构,微结构基片与下面的 SPR 金属膜封接构成微流控 SPR 集成芯片,两端开有液体入口和液体出口,SPR 金属膜下端设置光路系统,由入射光源、光路系统和 CCD 探测器构成光学检测系统。

所述微柱阵列中微柱直径与高度均为 $50\mu\text{m}$,间隙 $50\mu\text{m}$,每三个微柱均呈等边三角形排列,微柱底面与 SPR 金属膜的间距为 $20\mu\text{m}$ 。

将微流控芯片应用到 SPR 装置中,采用微柱阵列构成的三维微通道结构介导的微流控流场来控制 CTC 的流向与速度,将 CTC 导向 SPR 金属膜的表面,并形成合适的剪切力与接触时间,因此在保证血流高通量的前提下,提高 CTC 与 SPR 金属膜的接触机率与结合效率,同时依靠 SPR 装置的高灵敏度检测能力实现 CTC 的计量,实现对痕量 CTC 高效率俘获与高灵敏同步检出的目标;所述的 SPR 金属膜附着抗体,抗体与相应抗原之间高亲和力的特异性结合,将赋予 SPR 金属膜特异性俘获 CTC 的能力,全血样品流经微流控 SPR 集成芯片,CTC 不断被三维微结构介导而流向 SPR 金属膜表面,并被附着在 SPR 金属膜上的抗体所俘获。

与背景技术相比,本实用新型具有如下优点:

1、提出三维结构介导的微流场控制方法，能够实现大流量条件下 CTC 与 SPR 金属膜的充分接触，并形成合适的剪切力与接触时间，以显著提高 SPR 金属膜对 CTC 的俘获效率，解决了常规微流体通道中无法缓解的通量与俘获效率间的矛盾。

2、将微流控芯片技术与 SPR 技术有机结合，可实现痕量 CTC 俘获与检出的双重目标，提高 CTC 的分析速度，避免 CTC 检测所需的荧光染色和荧光显微镜观察过程，避免针对痕量 CTC 样品的附加处理和由此造成的 CTC 丢失与污染，从而确保检查结果的可靠性。

3、直接针对全血样品的高通量、高俘获率、高灵敏度 CTC 检测技术，避免了血液的预处理过程，是细胞分析方法与生物传感方法的重要创新，有望利用少量血就可在较短时间内对高危人群实施筛查，还可用于癌症病人疗效的动态监视，实现“个性化治疗”。

附图说明

图 1 是本实用新型所述的高俘获率高灵敏度微流控 SPR 生物光学传感装置的示意图。

图 2 是微流控 SPR 集成芯片的微柱阵列的平面示意图。

图中：1、微结构基片，2、微柱阵列，3、SPR 金属膜，4、液体入口，5、液体出口，6、入射光源，7、光路系统，8、CCD 探测器。

具体实施方式

下面结合附图和实施例对本实用新型作进一步的说明：

如图 1 所示，微流控 SPR 生物光学传感装置包括微结构基片 1、微柱阵列 2、SPR 金属膜 3、液体入口 4、液体出口 5、入射光源 6、光路系统 7 和 CCD 探测器 8。微结构基片 1 与下面的 SPR 金属膜 3 封接构成微流控 SPR 集成芯片，入射光源 6、光路系统 7 和 CCD 探测器 8 构成光学检测系统。全血样品以恒定的速度被泵浦到微流控 SPR 集成芯片中，微结构基片 1 采用聚二甲基硅氧烷(PDMS)作为基片材料，微结构基片 1 下端面有微柱阵列 2 构成的三维微通道结构，微结构区域呈长方形，尺度为 $10\text{mm} \times 5\text{mm}$ 。微柱阵列 2 的排列如图 2 所示，参数为：微柱直径与高度均为 $50\mu\text{m}$ ，间隙 $50\mu\text{m}$ ，每三个微柱均呈等边三角形排列，微柱底面与 SPR 金属膜 3 间距为 $20\mu\text{m}$ 。由于 PDMS 基片具有一定的弹性，可能会造成微柱底面与 SPR 金属膜 3 的接触，导致微结构干扰 SPR 检测信号，并改变三维微结构介导的流场分布，限制 CTC 沿 SPR 金属膜 3 表面通过，进而降低 CTC 的俘获效率。因此，要控制芯片通道宽度并且增加微结构基片 1 的厚度

与硬度，以确保基片的稳定性和微流场的稳定性。微结构基片 1 采用 SU-8 软光刻技术制备，为了形成阶梯形结构，SU-8 阳模需要通过多次匀胶和多次曝光的方法制作，通过调节各层 SU-8 光胶的厚度，可以调节微柱高度和微柱底面与 SPR 金属膜 3 的距离。微结构基片 1 制作好后与 SPR 金属膜 3 封合，并开有液体入口 4 和液体出口 5。

三维微结构介导下的大通量微流场控制技术，是微流控 SPR 集成芯片的关键，也是确保大通量流场中 CTC 与 SPR 金属膜 3 充分接触实现高效俘获的根本保证。微流控 SPR 集成芯片的设计，要综合考虑三维微结构中微柱形状、高度、尺度、分布密度、排布方式及微柱底面与 SPR 金属膜 3 的间距等因素，从流通量、微结构对流场的介导作用和俘获条件等方面来优化芯片设计，确定最优化的三维微结构参数和使用条件。

SPR 金属膜 3 表面附着抗体（如抗-上皮细胞粘附分子，抗-EpCAM）。由于 EpCAM 在血细胞中不存在，但在肺癌、乳腺癌、前列腺癌等癌症细胞中过表达，因此，抗-EpCAM 与 EpCAM 之间高亲和力的特异性结合，将赋予 SPR 金属膜 3 特异性俘获 CTC 的能力。全血样品流经微流控 SPR 集成芯片，CTC 不断被三维微结构介导而流向 SPR 金属膜 3 表面，并被经特异性生化处理的 SPR 金属膜 3 上的表面抗体所俘获。

CTC 被 SPR 金属膜 3 俘获后，由 SPR 的光学检测系统同步实现 CTC 的计量。由于 SPR 对金属膜表面电介质的折射率非常敏感，不同电介质其表面等离子体共振角也不同。同种电介质，其附在金属膜表面的量不同，则 SPR 的响应强度也不同。所以 CTC 与 SPR 金属膜 3 表面抗体结合后，将导致 CCD 探测器 8 探测到的 SPR 谱峰发生可以观测到的位移，这些信息数据传输到计算机上，通过谱分析可以实时、定量、灵敏的监测 CTC 与 SPR 金属膜 3 的相互作用。这样就实现了对 CTC 高效率俘获的同时，进行同步的高灵敏度检测，提高了 CTC 的分析速度，避免常规 CTC 检测所需的荧光染色和荧光显微镜观察过程，避免针对痕量 CTC 样品的附加处理和由此造成的 CTC 丢失与污染，从而确保检查结果的可靠性。

综上所述，为解决高血流通量前提下痕量 CTC 的高效率俘获与高灵敏度检出，本实用新型将微流控芯片技术、SPR 技术和微结构流场控制技术有机结合，在微流控通道中引入三维微结构的目的在于形成微流控流场成对 CTC 的介导作用，有效提高 CTC 与 SPR 金属膜 3 的接触机率与结合效率。微结构对 CTC 的介导作用，类似于混合器结构中的导流块，通过三维微结构来迫使流体元产生

拉伸、折叠等效应，并由此形成对 CTC 向 SPR 金属膜 3 的导向作用，使得流体中几乎所有 CTC 都有与 SPR 金属膜 3 接触的机会，避免漏检的发生。将微结构介导的微流控芯片与 SPR 集成，凭借 SPR 的高灵敏度检测能力实现 CTC 的高灵敏度检出，在单一芯片上完成 CTC 俘获与检出双重目标。

本实用新型提出的这种新型的生物传感方法，以高危人群和癌症初期患者全血中非常痕量的 CTC 作为俘获与检出对象，有望发展成为快速实施肿瘤早期筛查与监测的新技术，将促进进床边检验技术与仪器的发展，推动我国肿瘤早期诊治发展战略的成功实施，还可用于生化分子的高灵敏检测以及医疗、环境和安全监测等领域。

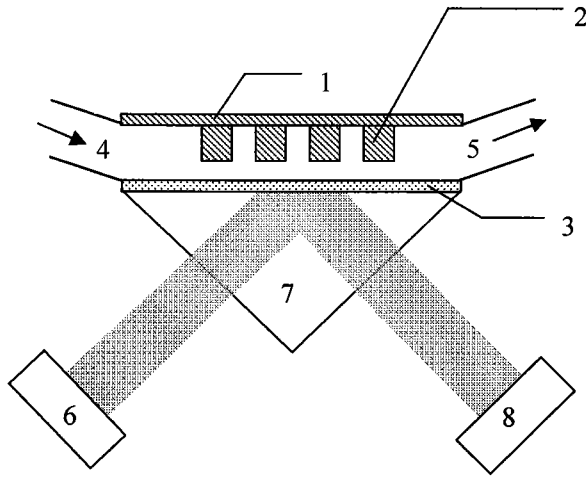


图 1

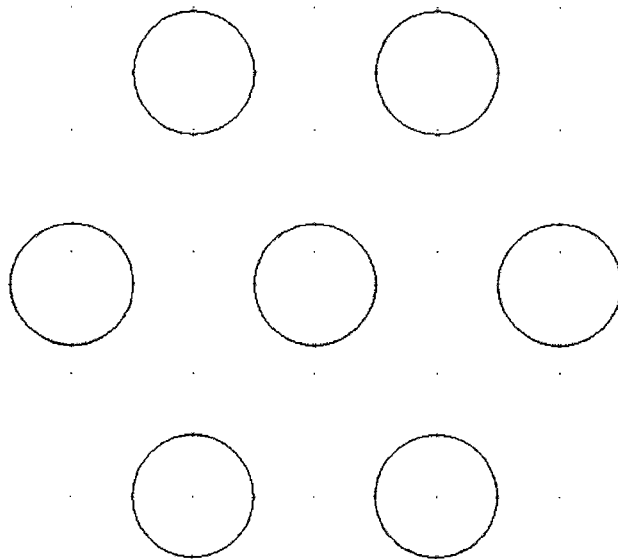


图 2