



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113189070 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 16

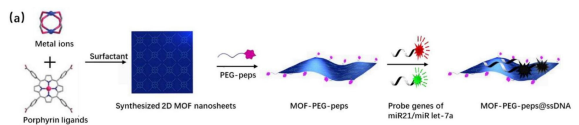
(21) 申请号 202110467712.4
(22) 申请日 2021.04.28
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113189070 A
(43) 申请公布日 2021.07.30
(73) 专利权人 香港理工大学
地址 中国香港九龙红磡香港理工大学
(72) 发明人 杨莫 陈艳 欧登格日乐
陈俊粤
(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 陈嘉雯
(51) Int. Cl.
G01N 21/64 (2006.01)
C12Q 1/6851 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)
(56) 对比文件
US 2016314583 A1, 2016.10.27
US 2016231324 A1, 2016.08.11
EP 3385699 A1, 2018.10.10
CN 112034160 A, 2020.12.04
KR 20190092177 A, 2019.08.07
CN 111454907 A, 2020.07.28
CN 106645726 A, 2017.05.10

CN 109839501 A, 2019.06.04
CN 109722481 A, 2019.05.07
CN 111467491 A, 2020.07.31
US 2019256897 A1, 2019.08.22
CN 103060327 A, 2013.04.24
CN 112391448 A, 2021.02.23
US 2021060229 A1, 2021.03.04
US 2018024135 A1, 2018.01.25
CN 112014563 A, 2020.12.01
US 2013220809 A1, 2013.08.29
孙帅; 邓宇亮. 肺癌循环肿瘤细胞的单细胞 EGFR 基因突变检测. 遗传. 2015, 37 (12), 1251-1257.
Lina Wu 等. “Fluorescence hydrogel array based on interfacial cation exchange amplification for highly sensitive microRNA detection”. 《Analytica Chimica Acta》. 2019, 第1080卷206-214.
陈璐 等. “循环肿瘤细胞捕获与检测的纳米分析技术进展”. 《生物化学与生物物理进展》. 2021, 第48卷 (第1期), 35-53.
张惠敏 等. “基于微流控技术的循环肿瘤细胞分析研究进展”. 《中国科学: 化学》. 2019, 第49卷 (第9期), 1220-1236.
审查员 刘永
权利要求书2页 说明书14页 附图6页

(54) 发明名称
一种纳米探针及其制备方法和应用、循环肿瘤细胞的miRNAs的检测系统

(57) 摘要
本申请属于医药技术领域, 尤其涉及一种纳米探针及其制备方法和应用、循环肿瘤细胞的miRNAs的检测系统。本申请提供了一种纳米探针包括: 光吸收纳米材料、聚乙二醇、循环肿瘤细胞靶向物和荧光基团修饰的miRNAs单链探针; 所述循环肿瘤细胞靶向物通过所述聚乙二醇与所述光吸收纳米材料连接, 所述荧光基团修饰的miRNAs单链探针吸附在所述光吸收纳米材料的

表面。本申请无需富集CTCs即可在单个活CTCs中灵敏地检测其miRNAs, 有效解决现有检测CTCs的miRNA方法中存在的CTCs难以富集, 容易对CTCs造成侵入性破坏的技术缺陷。



CN 113189070 B

1. 一种纳米探针, 其特征在于, 包括:

光吸收纳米材料、聚乙二醇、循环肿瘤细胞靶向物和荧光基团修饰的miRNAs单链探针;

所述循环肿瘤细胞靶向物通过所述聚乙二醇与所述光吸收纳米材料连接, 所述荧光基团修饰的miRNAs单链探针吸附在所述光吸收纳米材料的表面; 所述荧光基团修饰的miRNAs单链探针与目的miRNAs的结合力大于所述荧光基团修饰的miRNAs单链探针与所述光吸收纳米材料的结合力;

所述光吸收纳米材料选自MOF纳米片、石墨相氮化碳、MAX相碳化氮、石墨烯纳米片、纳米金属颗粒或二维过渡金属二硫化物中的一种或多种。

2. 根据权利要求1所述的纳米探针, 其特征在于, 所述MOF纳米片选自Cu-TCPP纳米片。

3. 根据权利要求1所述的纳米探针, 其特征在于, 所述循环肿瘤细胞靶向物选自具有循环肿瘤细胞靶向识别能力的多肽、具有循环肿瘤细胞靶向识别能力的叶酸和具有循环肿瘤细胞靶向识别能力的特异性蛋白中的一种或多种。

4. 根据权利要求3所述的纳米探针, 其特征在于, 所述具有循环肿瘤细胞靶向识别能力的多肽选自多肽peptide 18-4、疏水肽PFV、Ephrin模拟胎YSA和穿膜肽R7s中的一种或多种。

5. 根据权利要求1至4任意一项所述的纳米探针, 其特征在于, 所述荧光基团修饰的miRNAs单链探针选自miRNA21单链探针、miRNAlet-7a单链探针、miRNA 10A单链探针、miRNA449 a单链探针和miRNA 125b单链探针中的一种或多种; 所述荧光基团选自Alexa Fluor 350、Fluorescein、Cyanine3.5和Cyanine5和荧光量子点中的一种或多种。

6. 一种纳米探针的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

步骤1、将聚乙二醇与马来酰亚胺混合反应, 得到马来酰亚胺化处理的聚乙二醇;

将所述马来酰亚胺化处理的聚乙二醇与具有循环肿瘤细胞靶向识别能力的多肽混合反应, 得到聚乙二醇多肽复合链;

步骤2、将MOF纳米片分散液与所述聚乙二醇多肽复合链混合, 除去沉淀后, 制得MOF纳米片-聚乙二醇多肽复合链;

步骤3、将荧光基团修饰的miRNAs单链探针与所述MOF纳米片-聚乙二醇多肽复合链混合孵育, 制得纳米探针。

7. 权利要求1至5任意一项所述的纳米探针或权利要求6所述制备方法制得的纳米探针在制备检测循环肿瘤细胞的miRNAs产品中的应用。

8. 一种循环肿瘤细胞的miRNAs的检测系统, 其特征在于, 包括权利要求1至5任意一项所述的纳米探针或权利要求6所述制备方法制得的纳米探针; 微流控芯片和荧光检测装置; 所述微流控芯片和所述荧光检测装置连接。

9. 根据权利要求8所述的检测系统, 其特征在于,

所述微流控芯片包括: 硼硅酸盐抛光玻璃层、金属镀层、PDMS底层和PDMS流道层; 所述金属镀层通过磁控溅射在所述硼硅酸盐抛光玻璃层的上表面; 所述PDMS底层设置在所述金属镀层的上表面; 所述PDMS流道层设置在所述PDMS底层的上表面; 所述金属镀层设有交流电线路;

所述PDMS流道层包括油相微通道、细胞样品微通道和纳米探针微通道; 所述油相微通道的一端设有油相端口, 所述细胞样品微通道的第一端设有细胞样品端口, 所述油相微通

道的另一端与所述细胞样品微通道的第二端垂直交错相通,所述油相微通道与所述细胞样品微通道交错相通形成交叉口;所述纳米探针微通道的一端设有纳米探针端口;所述纳米探针微通道的另一端与所述细胞样品微通道的第三端相通连接,所述纳米探针微通道与所述细胞样品微通道连接形成连接口;所述细胞样品微通道的第四端设有液滴流出端口,所述金属镀层的交流电线路在所述连接口上形成电场,使得所述PDMS流道层的纳米探针被电场诱导注入单细胞液滴中。

10. 根据权利要求9所述的检测系统,其特征在于,所述荧光检测装置包括荧光检测芯片和激光检测装置;

所述荧光检测芯片包括PDMS流道层;

所述PDMS流道层上设有液滴微通道和油相微通道;所述油相微通道的一端设有油相端口,所述液滴微通道的第一端设有液滴端口;所述液滴微通道的第二端与所述油相微通道的另一端垂直交错相通,所述油相微通道与所述细胞样品微通道交错相通形成交叉口;所述液滴微通道的第三端设有激光光纤端,所述液滴微通道的第四端设有检测光纤端;

所述激光检测装置分别与所述激光光纤端和所述检测光纤端连接。

一种纳米探针及其制备方法和应用、循环肿瘤细胞的miRNAs的检测系统

技术领域

[0001] 本申请属于医药技术领域,尤其涉及一种纳米探针及其制备方法和应用、循环肿瘤细胞的miRNAs的检测系统。

背景技术

[0002] 分子生物学及临床研究显示,肿瘤的侵袭和微转移很可能在肿瘤发生的早期就已出现,而目前临床肿瘤的发现和诊断仍高度依赖与影像学及血清肿瘤标志物的检查,难以早期发现肿瘤的转移或复发,也难以及时反映疗效。因此,早期发现微转移不仅对肿瘤复发和预后的判断有重要意义,而且对指导临床治疗也有很大价值。大量研究显示,循环肿瘤细胞(Circulating tumor cells,简称CTCs)正成为新的肿瘤标志物,因为它们含有多种早期生物标志物,如microRNAs(miRNAs)。miRNAs可以在细胞信号通路的相对上游阶段调控各种基因的表达。miRNAs被认为是肿瘤发生早期指示和预测的“种子角色”。因此,CTCs的检测有助于早期发现肿瘤的微转移、监测术后复发、评估疗效及预后,以及选择合适的个体化治疗。

[0003] 目前的检测CTCs的miRNA策略主要基于终点模式,如northern杂交或RT-PCR。其中现有方法需要富集血液中的CTCs,也需要破坏CTCs。由于CTCs含量极低,在1mL外周血样中,约有 5×10^8 个正常血细胞,只有1~10个CTCs。即使在富集了这些少数细胞之后,这些细胞也会被侵入性的破坏以进行进一步的加工(需被进一步进行细胞粉碎,蛋白剔除和基因提取)。可见,现有检测CTCs的miRNA技术对细胞具有侵入式的破坏性,并且操作繁琐、耗时长、样品成本大、成本高。因此,研发一种能够在单个活CTC中灵敏地检测miRNAs,不需要大量的生物样品或试剂消耗的检测产品是本领域技术人员亟待解决的技术问题。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本申请提供一种纳米探针及其制备方法和应用、循环肿瘤细胞的miRNAs的检测系统,无需富集CTCs下可在单个活CTC中灵敏地检测miRNAs,有效解决现有检测CTCs的miRNA方法中存在的CTCs难以富集,容易对CTCs造成侵入性破坏的技术缺陷。

[0005] 本申请第一方面提供了一种纳米探针包括:

[0006] 光吸收纳米材料、聚乙二醇、循环肿瘤细胞靶向物和荧光基团修饰的miRNAs单链探针;

[0007] 所述循环肿瘤细胞靶向物通过所述聚乙二醇与所述光吸收纳米材料连接,所述荧光基团修饰的miRNAs单链探针吸附在所述光吸收纳米材料的表面;所述荧光基团修饰的miRNAs单链探针与目的miRNAs的结合力大于所述荧光基团修饰的miRNAs单链探针与所述光吸收纳米材料的结合力。

[0008] 具体的,本申请创造性利用所述miRNAs单链探针具有大量暴露的碱基,与MOF纳米片的六元环结构通过范德华力和 π - π 吸附,相互良好吸附,从而使得MOF纳米片将miRNAs单

链探针上的荧光淬灭,产生第一步“荧光关”效应。由于miRNAs单链探针和目的miRNAs发生特异性杂交,此结合力大于miRNAs单链探针与光吸收纳米材料的吸附,形成双链基因结构。双链结构中,原本暴露的碱基被包藏入双链中,从而双链基因与光吸收纳米材料的吸附力明显减少,进而脱附,产生第二步“荧光开”效应,即形成一个“关-开”型纳米传感器。

[0009] 另一实施例中,所述光吸收纳米材料选自MOF纳米片、石墨相氮化碳、MAX相碳化氮、石墨烯纳米片、纳米金属颗粒或二维过渡金属二硫化物中的一种或多种。

[0010] 另一实施例中,所述MOF纳米片选自Cu-TCPP纳米片。

[0011] 具体的,荧光基团修饰的miRNAs单链探针与光吸收纳米材料的结合力小于荧光基团修饰的miRNAs单链探针与目的miRNAs的结合力。使得体系中存在目的miRNAs时,所述荧光基团修饰的miRNAs单链探针从所述光吸收纳米材料上分离,并与目的miRNAs的互补配对结合,使得荧光基团恢复荧光。

[0012] 具体的,本申请中Cu-TCPP纳米片,只需要在PVP等表面活性剂辅助下,一步法水热合成即可得到尺寸分布在200nm左右的纳米薄片,并具有良好的分散性。此外,Cu-TCPP纳米片可用于修饰的羧基基团普遍分布于纳米片外周,从而使得Cu-TCPP纳米片进一步由PEG-多肽修饰后,仍然保留了纳米片大量的平铺表面,用于探针序列的负载,可增加基因负载的效率。

[0013] 具体的,本申请中聚乙二醇PEG具有优秀的生物安全性,PEG修饰纳米材料可提升纳米材料在单细胞内的生物兼容性;并且PEG是一种安全水溶性聚合物分子,可提升纳米材料水溶性,减少其他免疫分子的追踪,从而延长纳米材料在生物环境的循环时间。此外,PEG的表面具有丰富的官能团,可以用来改善纳米材料的水溶/脂溶特性从而进一步控制纳米材料的分散性和细胞内吞效率,PEG也可以改变纳米材料的表面电荷使其在下一步进行其他分子,如基因,药物,蛋白等分子的吸附和负载。

[0014] 具体的,二维的MOF纳米片,具有很强的光吸收能力,在450nm到750nm之间。经PEG和循环肿瘤细胞靶向物修饰后,形成的纳米复合物MOF-PEG-peps具有对miRNA单链DNA探针的保护性和循环肿瘤细胞靶向性。

[0015] 另一实施例中,所述循环肿瘤细胞靶向物选自具有循环肿瘤细胞靶向识别能力的多肽、具有循环肿瘤细胞靶向识别能力的叶酸和具有循环肿瘤细胞靶向识别能力的特异性蛋白中的一种或多种。

[0016] 另一实施例中,所述具有循环肿瘤细胞靶向识别能力的多肽选自多肽peptide 18-4、疏水肽PFV、Ephrin模拟肽YSA和cell penetrating peptide R7s中的一种或多种。

[0017] 另一实施例中,所述荧光基团修饰的miRNAs单链探针选自miRNA 21单链探针或/和miRNAlet-7a单链探针;所述荧光基团选自Alexa Fluor 350、Fluorescein、Cyanine3.5和Cyanine5中的一种或多种。

[0018] 另一实施例中,本申请的纳米探针中,循环肿瘤细胞靶向多肽peptide 18-4通过聚乙二醇连接Cu-TCPP纳米片上,荧光基团修饰的miRNAs单链探针吸附在Cu-TCPP纳米片的表面。

[0019] 具体的,荧光基团修饰的miRNAs单链探针为FAM标记的miRNA21纳米探针、Texas red标记的miRNAlet-7a纳米探针。

[0020] 本申请第二方面提供了一种纳米探针的制备方法,包括如下步骤:

- [0021] 步骤1、将聚乙二醇与马来酰亚胺混合反应,得到马来酰亚胺化处理的聚乙二醇;
- [0022] 将所述马来酰亚胺化处理的聚乙二醇与具有循环肿瘤细胞靶向识别能力的多肽混合反应,得到聚乙二醇多肽复合链;
- [0023] 步骤2、将MOF纳米片分散液与所述聚乙二醇多肽复合链混合,除去沉淀后,制得MOF纳米片-聚乙二醇多肽复合链;
- [0024] 步骤3、将荧光基团修饰的miRNAs单链探针与所述MOF纳米片-聚乙二醇多肽复合链混合孵育,制得纳米探针。
- [0025] 具体的,MOF纳米片为Cu-TCPP纳米片。可通过常规的溶剂热反应合成尺寸均匀的Cu-TCPP纳米片。
- [0026] 具体的,具有循环肿瘤细胞靶向识别能力的多肽为循环肿瘤细胞靶向多肽18-4。
- [0027] 具体的,在pH为6.5-7.5条件下,循环肿瘤细胞靶向多肽18-4与马来酰亚胺化处理的聚乙二醇混合反应,制得PEG-peps的聚合物多肽复合链。
- [0028] 具体的,Cu-TCPP纳米片分散在水中,制得MOF纳米片分散液,然后将EDC/NHS与MOF纳米片分散液混合反应,制得反应分散液。然后将PEG-peps的聚合物多肽复合链与反应分散液混合反应,除去沉淀后离心,制得MOF-PEG-peps。
- [0029] 本申请第三方面公开了所述纳米探针或所述制备方法制得的纳米探针在所述制备的检测循环肿瘤细胞的miRNAs产品中的应用。
- [0030] 本申请第四方面提供了一种循环肿瘤细胞的miRNAs的检测系统,包括所述纳米探针或所述制备方法制得的纳米探针;微流控芯片和荧光检测装置;所述微流控芯片和所述荧光检测装置连接。
- [0031] 具体的,所述微流控芯片可以为现有常规的可分离血液样品的单细胞仪器,如流式细胞仪,其他微流控技术制造的细胞分选设备,如液滴封闭式,以及表面图案化处理形成的开放式液滴芯片等。
- [0032] 具体的,所述荧光检测装置可为现有常规的检测荧光的设备。
- [0033] 另一实施例中,所述微流控芯片包括:硼硅酸盐抛光玻璃层、金属镀层、PDMS底层和PDMS流道层;所述金属镀层通过磁控溅射在所述硼硅酸盐抛光玻璃层的上表面;所述PDMS底层设置在所述金属镀层的上表面;所述PDMS流道层设置在所述PDMS底层的上表面;所述金属镀层设有交流电路;
- [0034] 所述PDMS流道层包括油相微通道、细胞样品微通道和纳米探针微通道;所述油相微通道的一端设有油相端口,所述细胞样品微通道的第一端设有细胞样品端口,所述油相微通道的另一端与所述细胞样品微通道的第二端垂直交错相通,所述油相微通道与所述细胞样品微通道交错相通形成交叉口;所述纳米探针微通道的一端设有纳米探针端口;所述纳米探针微通道的另一端与所述细胞样品微通道的第三端相通连接,所述纳米探针微通道与所述细胞样品微通道连接形成连接口;所述细胞样品微通道的第四端设有液滴流出端口,所述金属镀层的交流电路在所述连接口上形成电场,使得所述PDMS流道层的纳米探针被电场诱导注入单细胞液滴中。
- [0035] 使用时,将油相液体通过流速控制器通入油相端口,细胞样品通过流速控制器通入细胞样品端口,油相液体和细胞样品是两种互不相溶的液体,两种互不相溶的液体分别从油相微通道和细胞样品微通道进入,由于表面张力和剪切力间的相互作用,油相液体在

交叉口处破裂,使得油相液体对细胞样品的单细胞进行包裹形成液滴,通过控制油相液体和细胞样品的流速可以精确控制液滴大小,通过控制油相液体和细胞样品的流速无需通电就能实现油相包裹细胞水相的单细胞液滴。单细胞液滴通过细胞样品微通道流动至连接口上,金属镀层通入交流电,金属镀层的电场覆盖PDMS流道层在对应连接口4B的位置,从而在连接口上对单细胞液滴施加电势,电势能破坏单细胞液滴的表面张力从而让纳米探针微通道中的纳米探针注入到每个单细胞液滴中。

[0036] 另一实施例中,所述金属镀层可为铂镀层,如图9所示,将铂镀层的铂电极的两端(a、b)用绝缘胶带与可编程交流电源的接地线端和火线端连接,对铂镀层施加交流电,使得在所述连接口上产生电场。

[0037] 另一实施例中,所述荧光检测装置包括荧光检测芯片和激光检测装置;

[0038] 所述荧光检测芯片包括PDMS流道层;

[0039] 所述PDMS流道层上设有液滴微通道和油相微通道;所述油相微通道的一端设有油相端口,所述液滴微通道的第一端设有液滴端口;所述液滴微通道的第二端与所述油相微通道的另一端垂直交错相通,所述油相微通道与所述细胞样品微通道交错相通形成交叉口;所述液滴微通道的第三端设有激光光纤端,所述液滴微通道的第四端设有检测光纤端;

[0040] 所述激光检测装置分别与所述激光光纤端和所述检测光纤端连接。

[0041] 使用时,从液滴流出端口中吸取注入纳米探针的单细胞液滴进行孵育,孵育2~5h后,将注入纳米探针的单细胞液滴转移至荧光检测芯片的液滴端口,油相液体通过流速控制器通入油相端口,油相液体和注入纳米探针的单细胞液滴是两种互不相溶的液体,两种互不相溶的液体分别从液滴微通道和油相微通道进入,由于表面张力和剪切力间的相互作用,油相液体在交叉口处破裂,通入的油相液体对每个注入纳米探针的单细胞液滴分隔开,使得注入纳米探针的单细胞液滴单个通过激光光纤端和检测光纤端,通过检测光纤端检测单个注入纳米探针的单细胞液滴的荧光信号。激光检测装置的激光器通过激发光纤发出488nm波长的激光,激光达到激光光纤端,诱导在激光光纤端液滴中的细胞发出荧光,并由激光检测装置的检测光纤接收荧光。通过光纤准直器的校准和双向色镜处折射和反射,荧光被分为两条光路,并利用滤光片分别收集532nm和644nm波长的荧光。最后,荧光信号经光电倍增管(PMT)放大转换为数字信号,由计算机采集和记录。

[0042] 具体的,采用荧光检测芯片,对每个注入纳米探针的单细胞液滴分隔开,确保每个注入纳米探针的单细胞液滴都有一个独立、相同的实验环境,减少相互干扰。此外,每个注入纳米探针的单细胞液滴都是一个微型反应器,可以更清晰地反映单个细胞之间的共性和差异。然后,应用激光检测装置对不同肿瘤细胞系的每个细胞中的多个miRNA进行定量检测。因此,可以获得不同肿瘤细胞系间的特征差异,进行聚类分析和建库,用于未知循环肿瘤细胞(CTC)的鉴定。

[0043] 本申请将光吸收纳米材料修饰上聚乙二醇,对光吸收纳米材料连接循环肿瘤细胞靶向物并负载了荧光基团修饰的miRNAs单链探针,循环肿瘤细胞靶向物使得本申请的纳米探针可靶向识别CTCs;荧光基团修饰的miRNAs单链探针可吸附在光吸收纳米材料的表面,从实验数据可知,循环肿瘤细胞靶向物和聚乙二醇修饰光吸收纳米材料后可显著提高纳米探针的内化率,当体系中不存在目的miRNAs时,荧光基团修饰的miRNAs单链探针可吸附在光吸收纳米材料的表面,使得荧光基团猝灭,当体系中存在目的miRNAs时,荧光基团修饰的

miRNAs单链探针从光吸收纳米材料分离,荧光基团修饰的miRNAs单链探针与目的miRNAs互补结合,使得荧光基团恢复荧光,通过检测荧光信号是否恢复即可对单细胞CTCs的目的miRNAs进行检测。此外,本申请的纳米探针可应用在微流控芯片中,微流控芯片产生包裹单个细胞的单细胞液滴,然后在交流电场的作用下,将纳米探针均匀地注入每个单细胞液滴中,在通过荧光检测芯片对每个注射有纳米探针的单细胞液滴用油相分隔;利用激光诱导荧光检测系统检测每个单细胞液滴的荧光信号,实现单细胞CTC的miRNA分析。

附图说明

[0044] 为了更清楚地说明本申请实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0045] 图1为本申请实施例提供的纳米探针的合成路线。

[0046] 图2为本申请实施例提供的MOF纳米片和MOF-PEG-peps的性能分析;图2b为本实施例提供的MOF纳米片的微观图;图2c为本实施例提供的MOF纳米片和MOF-PEG-peps的动态光散射法(DLS)测定的尺寸分析;图2d为本实施例提供的MOF纳米片的紫外可见光吸收光谱与FAM和Texas red的发射光谱分析。

[0047] 图3为本申请实施例提供的MOF纳米片和MOF-PEG-peps的性能分析;图3e为本实施例提供的MOF纳米片和MOF-PEG-peps的傅里叶变换红外(FTIR)分析结果;图3f为本实施例提供的MOF纳米片和MOF-PEG-peps的热重分析(TGA)分析结果;图3g为本实施例提供的MOF纳米片和MOF-PEG-peps的 ζ 电位分析结果。

[0048] 图4为本申请实施例提供的MOF-PEG-peps与FAM标记的miRNA21纳米探针混合后的纳米探针的淬灭性能分析;图4a为本实施例提供的不同浓度MOF-PEG-peps对40nM FAM标记的miRNA21探针的淬灭光谱;图4b为本实施例提供的不同浓度MOF-PEG-peps对40nM FAM标记的miRNA21探针的淬灭效率和荧光强度分析。

[0049] 图5为本申请实施例提供的纳米探针检测miRNA 21的荧光恢复能力分析;图5c为本实施例提供的纳米探针针对不同浓度miRNA21检测的荧光光谱;图5d为本实施例提供的纳米探针检测不同浓度miRNA21荧光强度和荧光恢复率分析。

[0050] 图6为本实施例提供的纳米探针检测目的基因miRNA的特异性分析;图6e为本实施例提供的纳米探针针对miRNA21和miRNAlet-7a的同步检测;;图6f为本实施例提供的纳米探针针对miRNA21和miRNA let-7a的特异性检测分析。

[0051] 图7为本申请实施例提供的微流控液滴流式细胞仪检测CTCs中miRNA的工作流程图;其中,7a为微流控芯片进行单细胞包裹,纳米探针注入,和单细胞miRNAs检测的流程图,7b为微流控液滴流式细胞仪检测单细胞的荧光结果图。

[0052] 图8为本申请实施例提供的微流控芯片的爆炸图。

[0053] 图9为本申请实施例提供的微流控芯片的平面结构图。

[0054] 图10为本申请实施例提供的微流控芯片和荧光检测装置的结构示意图。

[0055] 图11为本申请实施例提供的荧光检测装置的结构示意图。

[0056] 图12为本申请实施例提供的纳米探针注入到每个单细胞液滴检测CTC中miRNA的示意图以及注射效率分析。

[0057] 图13为本申请实施例提供的纳米探针注入单细胞液滴的示意图。

[0058] 图14为本申请实施例提供的纳米探针对细胞内miRNAs的检测效果图。图14a为纳米探针与非纳米探针处理组对细胞内miRNA检测效果对比；图14b为纳米探针对miRNA21和miRNAlet-7a的检测效果对比。

具体实施方式

[0059] 本申请提供了一种纳米探针及其制备方法和应用、循环肿瘤细胞的miRNAs的检测系统,用于解决现有技术中存在的CTCs难以富集,容易对CTCs造成侵入性破坏的技术缺陷。

[0060] 下面将对本申请实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本申请一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本申请保护的范围。

[0061] 其中,以下实施例所用原料或试剂均为市售或自制。

[0062] 以下实施例的采用的MOF纳米片为Cu-TCPP纳米片,Cu-TCPP纳米片为现有常规的四(4-羧基苯基)钴卟啉金属有机框架纳米片。

[0063] 以下实施例的PEG为马来酰亚胺化处理的聚乙二醇,为MAL-PEG-NH₂。;购买自上海拓旻生物科技有限公司,产品名:氨基聚乙二醇马来酰胺,纯度>95%,条码号是C110602。

[0064] 以下实施例的peps为CTC靶向多肽18-4,多肽18-4(氨基酸序列为WxEAAyQrFL)的末端加半胱氨酸作为巯基化端,多肽18-4由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。靶向多肽18-4可以特异性识别乳腺癌循环肿瘤细胞,即MCF-7的表面受体Keratin 1。该角蛋白Keratin 1仅在乳腺癌细胞、MCF-7和MDA-MB-231高表达,而在多数正常细胞及血红细胞中都为低表达。这就保证了在本申请实施例检测环境里,MOF-PEG-peps纳米探针具有特异性的识别能力,可更高效的检测MCF-7细胞,提高纳米材料在传感环境中的利用率。

[0065] 以下实施例的miRNA21DNA探针为现有常规与miRNA21互补配对的单链DNA;miRNAlet-7aDNA探针为现有常规与miRNAlet-7a互补配对的单链DNA。具体的,miRNA21 DNA探针的序列为5'-TCAACATCAGTC TGA TAA GCTA-3';miRNA 21target序列为:5'-TAG CTTATC AGA CTG ATG TTGA-3';miRNAlet-7a DNA探针的序列为5'-AAC TATACAACC TAC TAC CTCA-3';miRNAlet-7atarget序列为5'-TGAGGTAGTAGG TTG TATAGTT-3'。

[0066] 实施例1

[0067] 本实施例公开纳米探针的制备方法,包括如下步骤:

[0068] 如图1所示,图1为本申请实施例提供纳米探针的合成路线,从图1可知,本实施例将PEG和peps对MOF纳米片进行修饰,形成MOF-PEG-peps,分别用荧光基团FAM和Texas标记miRNA21的DNA探针和miRNAlet-7a的DNA探针,得到两种荧光基团标记的单链DNA探针(ssDNA),分别为FAM标记的miRNA21纳米探针和Texas red标记的miRNAlet-7a纳米探针。MOF纳米片可以通过 π - π 相互作用吸附这些荧光基团标记的ssDNA,通过荧光共振能量转移(FRET)引起其猝灭,得到纳米探针,图1中标记为MOF-PEG-peps@ssDNA。在靶miRNAs(miRNA21或/和miRNAlet-7a)存在的情况下,ssDNA与靶miRNAs互补配对结合,形成与Cu-TCPP纳米片亲和力较弱的双链DNA(dsDNA),使得ssDNA从MOF纳米片上释放,恢复绿色荧光信号(FAM代表miRNA21)和红色荧光信号(Texas red代表miRNA let-7a)。

[0069] 1、制备MOF纳米片:通过常规的溶剂热反应合成MOF纳米片(即Cu-TCPP纳米片),制

得尺寸均匀的MOF纳米片。

[0070] 2、制备PEG-peps聚合物多肽复合链：将多肽18-4(WxEAAyQrFL)与马来酰亚胺化处理的聚乙二醇的氨基(1.5KDa)以摩尔比1:5在磷酸缓冲溶液PBS(pH=7)中混合,室温氮气保护下反应5h反应,反应所得混合物继续在PBS中透析24h,多肽18-4的巯基终端与马来酰亚胺化处理的聚乙二醇形成稳定的硫醚键,从而得到PEG-peps的聚合物多肽复合链,将产物冻干称重,保存在-20℃备用。

[0071] 3、1mg MOF纳米片经5分钟超声分散在2mL的去离子水中。2mg EDC/NHS(质量比1:1)加入到该MOF纳米片分散液在室温搅拌0.5小时。之后将1mg的PEG-peps聚合物多肽复合链在摇晃条件下加入到上述混合液中在室温搅拌下反应12小时。反应的后的混合物先用1000rpm的转速离心5分钟去除大的沉降物。然后将收集的产物经过100kDa的超滤管去除多余未反应的组分。最终得到的MOF-PEG-peps纳米片复合物经过冻干干燥后,调节为浓度为0.5mg/mL的储存分散液保存在4度以备下一步使用。

[0072] 4、对上述制得的MOF纳米片和MOF-PEG-peps进行性能测定,结果如图2~图3所示,图2的b为本实施例提供的MOF纳米片的微观图;图2的c为本实施例提供的MOF纳米片和MOF-PEG-peps的动态光散射法(DLS)测定的尺寸分析;图2的d为本实施例提供的MOF纳米片与FAM的吸光度分析(MOFAbs为MOF纳米片的吸光曲线,FAM excitation为FAM的激发谱,FAM emission为FAM的发光谱);图3的e为本实施例提供的MOF纳米片和MOF-PEG-peps的FTIR分析结果;图3的f为本实施例提供的MOF纳米片和MOF-PEG-peps的TGA分析结果;图3的g为本实施例提供的MOF纳米片和MOF-PEG-peps的 ζ 电位分析结果。

[0073] 从图2b可知MOF纳米片的尺寸约为200nm。图2c显示在动态光散射(DLS)尺寸分析中,PEG-peps修饰前后MOF纳米片的平均尺寸从220nm增加到250nm,说明PEG-peps成功修饰到MOF纳米片上。在图2d中,MOF纳米片显示出从450nm到750nm的强吸光度,可见MOF纳米片与FAM(荧光素酰胺)和Texas red荧光染料的光谱重叠。图3e、3f和3g可知,PEG-peps修饰MOF纳米片后,由于PEG-peps的存在,MOF纳米片的 ζ 电位从-27.5mv移动到-21.0mv(图3g)。图3e显示了MOF纳米片和MOF-PEG-peps的傅里叶变换红外(FTIR)光谱。MOF纳米片和MOF-PEG-peps在1396 cm^{-1} 和1620 cm^{-1} 处都有峰,这是由于Cu原子与TCPP配体羧基的配位作用;在2854 cm^{-1} 和2929 cm^{-1} 处有较强的拉伸,这是由于C-H的拉伸作用;在1095 cm^{-1} 处,C-O-C的伸缩振动峰较强,表明PEG分子发生了接枝反应;在3200-3600 cm^{-1} 附近的显著增强可能归因于肽中胺基数量的增加;在1600 cm^{-1} 处出现了明显的酰胺峰,这归因于C=O和CN的拉伸振动,表明PEG-peps成功地与MOF纳米片结合。图3f热重分析(TGA)也表明了MOF纳米片和MOF-PEG-peps的失重行为。MOF-PEG-peps在300~800℃范围内逐渐失重,这是由于PEG-peps在MOF表面修饰了稳定的氧官能团。

[0074] 需要保证荧光基团修饰的miRNAs单链探针和MOF纳米片之间合理的比例,以获得高于90%的淬灭效率,从而确保下一步检测有低的背景噪音和良好的荧光恢复基础。因此将40nM的miRNAs 21探针与浓度为0、5、10、20、30、40、50、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ 的MOF-PEG-peps分别在室温黑暗条件下孵育1小时。经过该梯度测试,确定最佳比例为60 $\mu\text{g/mL}$ MOF-PEG-peps吸附淬灭40nM的miRNAs 21探针。对后续目的miRNAs 21的测试,均采用此浓度比例来制备纳米探针。对于miRNAs let-7a,也采用60 $\mu\text{g/mL}$ MOF-PEG-peps吸附淬灭40nM的miRNAs let-7a探针。

[0075] 5、对上述制得的MOF-PEG-peps与FAM标记的miRNA21纳米探针混合后的纳米探针进行猝灭性能测定,结果如图4所示,图4a为本实施例提供的FAM标记的miRNA21纳米探针针对不同浓度的MOF-PEG-peps的猝灭情况;图4b为本实施例提供的FAM标记的miRNA21纳米探针针对MOF-PEG-peps的猝灭效率和荧光强度情况。图4a和图4b显示40nM的FAM标记的miRNA 21纳米探针在0~100 μ g/mL的梯度浓度下被MOF-PEG-peps孵育后猝灭情况。猝灭效率(Q_e)通过 $Q_e = (F_0 - F_q) / F_0$ 的方程式计算,其中 F_0 是40 μ g/mL的荧光强度nMP210032131, F_q 是MOF-PEG-peps猝灭FAM标记的miRNA 21纳米探针的荧光强度。如图4b所示,100 μ g/mL MOF-PEG-peps的 Q_e 可达97.34% \pm 3.65%。

[0076] 6、将上述制得的MOF-PEG-peps和FAM标记的miRNA21纳米探针混合后,制得纳米探针A,纳米探针A检测不同浓度目的基因miRNA21,测定纳米探针A检测miRNA 21的荧光恢复能力,结果如图5所示。目的基因miRNA 21的浓度设置为0-70nm,MOF-PEG-peps的添加浓度为60 μ g/mL和FAM标记的miRNA21纳米探针添加浓度为40nM;图5c为本实施例提供的纳米探针检测不同浓度miRNA21在不同波长下的荧光强度情况;图5d为本实施例提供的纳米探针检测不同浓度miRNA21的荧光强度情况,图5d插图为准图。如图5c和图5d所示,从0-70nm开始,随着miRNA21浓度的增加,纳米探针发出的荧光强度逐渐增强。根据校准图(图5d插图),本实施例的纳米探针的检测线性范围为0.5至10nM,miRNA 21的检测限(LOD)约为43pM。

[0077] 7、测定纳米探针单独和同时检测miRNA21和miRNAlet-7a的荧光情况。将上述制得的MOF-PEG-peps与FAM标记的miRNA21纳米探针混合,制得纳米探针A,将上述制得的MOF-PEG-peps和Texas red标记的miRNAlet-7a纳米探针混合,制得纳米探针B。将纳米探针A与miRNA21混合,检测荧光发射情况;将纳米探针B与miRNAlet-7a混合,检测荧光发射情况;将纳米探针A、纳米探针B、miRNA21与miRNAlet-7a混合,检测双重miRNA的荧光发射情况。结果如图6e所示,图6e为本实施例提供的纳米探针与目的基因miRNA的荧光强度情况,图6e可知,每个miRNA只能与相应的纳米探针杂交,没有明显的交叉反应。

[0078] 8、测定纳米探针特异性检测miRNA21和miRNAlet-7a的荧光情况,结果如图6f所示。将上述制得的MOF-PEG-peps与FAM标记的miRNA21纳米探针混合,制得纳米探针A。将纳米探针A与miRNA21混合,检测荧光发射情况,结果如图6f标记1的miR 21柱;将纳米探针A与1碱基错配miRNA 21混合,检测荧光发射情况,结果如图6f标记2的1base mismatchtarget柱;将纳米探针A与4碱基错配miRNA21混合,检测荧光发射情况,结果如图6f标记3的4base mismatchtarget柱;将纳米探针A与miRNAlet-7a混合,检测荧光发射情况,结果如图6f标记4的miR let-7a柱;将纳米探针A与miRNA 20a混合,检测荧光发射情况,结果如图6f标记5的miR 20a柱;将纳米探针A与PBS混合,检测荧光发射情况,结果如图6f标记6的PBS柱。

[0079] 将上述制得的MOF-PEG-peps和Texas red标记的miRNAlet-7a纳米探针混合,制得纳米探针B。将纳米探针B与miRNAlet-7a混合,检测荧光发射情况,结果如图6f标记7的miR let-7a柱;将纳米探针B与1碱基错配miRNA let-7a混合,检测荧光发射情况,结果如图6f标记8的1base mismatchtarget柱;将纳米探针B与4碱基错配miRNAlet-7a混合,检测荧光发射情况,结果如图6f标记9的4base mismatchtarget柱;将纳米探针B与miRNA21混合,检测荧光发射情况,结果如图6f标记10的miR 21柱;将纳米探针B与miRNA20a混合,检测荧光发射情况,结果如图6f标记11的miR 20a柱;将纳米探针B与PBS混合,检测荧光发射情况,结果

如图6f标记12的PBS柱。

[0080] 其中,1碱基错配miRNA21为与miRNA21的DNA探针有一个错配的miRNA21,1碱基错配miRNA21的核苷酸序列为5'-TAG CTTATCAGT CTG ATG TTGA-3';4碱基错配miRNA21为与miRNA21的DNA探针有四个错配的miRNA21,4碱基错配miRNA21的核苷酸序列为5'-TAGATTATC CGA CTG GTG CTG A-3';1碱基错配miRNA let-7a为与miRNA let-7a的DNA探针有一个错配的miRNAlet-7a,1碱基错配miRNAlet-7a的核苷酸序列为5'-TGAGGTAGTAGG CTG TATAGT T-3';4碱基错配miRNAlet-7a为与miRNA let-7a的DNA探针有四个错配的miRNA let-7a,4碱基错配miRNAlet-7a的核苷酸序列为5'-TGAAGTAGTTGG TTG GAT CGT T-3'。

[0081] 从图6f可知,纳米探针与完全配对的目的DNA、1碱基错配DNA、4碱基错配DNA、相互调换的miRNA21和miRNAlet-7a、miR 20a和PBS的样品来评估本实施例纳米探针的特异性。仅在具有与本实施例纳米探针特异配对的样品中检测到荧光,可见,本实施例的纳米探针具有优异的特异性。

[0082] 具体的,本实施例中的荧光基团除了可采用FAM和Texas red外,还可使用蓝色荧光基团、绿色荧光基团、橙色荧光基团、红色荧光基团等,如Alexa Fluor350、Cyanine3.5 (Cy3.5)或Cyanine5 (Cy5)。

[0083] 具体的,本实施例的纳米探针除了可检测miRNA21和miRNAlet-7a外,还可以针对不同的靶标miRNA,可根据实际需要检测的靶标miRNA设计并合成与其互补的探针基因序列,制得检测CTCs中不同靶标miRNA的纳米探针,从而检测CTCs中更多的miRNA。

[0084] 但是,若本实施例采用其他MOF材料,由于UiO-66纳米MOF; Ln(III)-MOF ; $\{[\text{Cu}(\text{dcb})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 10\text{H}_2\text{O}\}_n$ ($1, \text{H}_2\text{dcbBr} = 1-(3,5\text{-dicarboxybenzyl})-4,4'\text{-bipyridiniumbromide}$),CoNi-based metal-organic framework (CoNi-MOF) 的尺寸过大,生物安全性较低,具有细胞毒性,无法使用在活细胞的目的基因检测。

[0085] 根据以下参考文献可知,本申请除了可以使用Cu-TCPP纳米片,还可以使用石墨相氮化碳、MAX相碳化氮、石墨烯纳米片、纳米金颗粒,以及二维过渡金属二硫化物例如 MoS_2 , WS_2 均可使用在活细胞内目的基因的检测。

[0086] Wu, Y.; Han, J.; Xue, P.; Xu, R.; Kang, Y., Nano metal-organic framework (NMOF) -based strategies for multiplexed microRNA detection in solution and living cancer cells. *Nanoscale* 2015, 7(5), 1753-1759.

[0087] Afzalnia, A.; Mirzaee, M., Ultrasensitive fluorescent miRNA biosensor based on a "sandwich" oligonucleotide hybridization and fluorescence resonance energy transfer process using an Ln(III)-MOF and Ag nanoparticles for early cancer diagnosis: application of central composite design. *ACS applied materials & interfaces* 2020, 12(14), 16076-16087.

[0088] Qiu, G.-H.; Lu, W.-Z.; Hu, P.-P.; Jiang, Z.-H.; Bai, L.-P.; Wang, T.-R.; Li, M.-M.; Chen, J.-X., A metal-organic framework based PCR-free biosensor for the detection of gastric cancer associated microRNAs. *Journal of inorganic biochemistry* 2017, 177, 138-142.

[0089] Hu, M.; Zhu, L.; Li, Z.; Guo, C.; Wang, M.; Wang, C.; Du, M., CoNi bimetallic metal-organic framework as an efficient biosensing platform for miRNA

126detection.Applied Surface Science 2021,542,148586。

[0090] Ryoo,S.;Lee,J.;Yeo,J.;Na,H.;Kim,Y.;Jang,H.;Lee,J.;Han,S.;Lee,Y.;Kim,V.,ACS Nano 2013,7,5882-5891.Part II-Peptide Nucleic Acid for Nanotechnology 6。

[0091] Li,J.;Huang,J.;Yang,X.;Yang,Y.;Quan,K.;Xie,N.;Wu,Y.;Ma,C.;Wang,K.,Two-color-based nanoflares for multiplexed MicroRNAs imaging in live cells.Nanotheranostics 2018,2(1),96。

[0092] Oudeng,G.;Au,M.;Shi,J.;Wen,C.;Yang,M.,One-step in situ detection of miRNA 21expression in single cancer cells based on biofunctionalized MoS₂nanosheets.ACS applied materials&interfaces 2018,10(1),350-360。

[0093] Liao,X.;Wang,Q.;Ju,H.,Simultaneous sensing ofintracellular microRNAs with a multi-functionalized carbon nitride nanosheet probe.Chemical Communications 2014,50(88),13604-13607。

[0094] Wang,S.;Wei,S.;Wang,S.;Zhu,X.;Lei,C.;Huang,Y.;Nie,Z.;Yao,S.,Chimeric DNA-functionalized titanium carbide MXenes for simultaneous mapping of dual cancer biomarkers in living cells.Analytical chemistry 2018,91(2),1651-1658。

[0095] 但是,若本实施例采用其他聚合物,如聚多巴胺PDA或聚乙烯亚胺PEI,PDA修饰Cu-TCP纳米片往往会因为其黏附性过高,产生非特异性吸附,从而影响Cu-TCP纳米片本身的生物分子吸附效率,会影响纳米探针的传感可靠性;因为PEI的正电性会产生路易斯酸效应,从而影响Cu-TCP纳米片的结构稳定性,因此,常见的聚多巴胺PDA或聚乙烯亚胺PEI无法用于本实施例Cu-TCP纳米片的修饰。

[0096] 根据以下参考文献可知,本申请除了使用具有CTC靶向识别能力的多肽peptide 18-4外,还可使用叶酸分子,具有CTC靶向识别能力的靶向多肽,具有CTC细胞靶向识别能力的特异性蛋白。其余的多肽如经典的疏水肽PFV (PFVYLI);Ephrin模拟胎YSA (YSAYPDSVPMMS);穿膜肽R7s可使用在本实施例中。

[0097] Shahin,M.;Soudy,R.;Aliabadi,H.M.;Kneteman,N.;Kaur,K.;Lavasanifar,A.,Engineered breast tumor targeting peptide ligand modified liposomal doxorubicin and the effect ofpeptide density on anticancer activity.Biomaterials2013,34(16),4089-4097。

[0098] Ahmed,S.;Mathews,A.S.;Byeon,N.;Lavasanifar,A.;Kaur,K.,Peptide arrays for screening cancer specific peptides.Analytical chemistry 2010,82(18),7533-7541。

[0099] Zhang,Q.;Wang,J.;Zhang,H.;Liu,D.;Ming,L.;Liu,L.;Dong,Y.;Jian,B.;Cai,D.,The anticancer efficacy ofpaclitaxel liposomes modified with low-toxicity hydrophobic cell-penetrating peptides in breast cancer:an in vitro and in vivo evaluation.RSCAdvances 2018,8(43),24084-24093。

[0100] Xie,X.;Yang,Y.;Lin,W.;Liu,H.;Liu,H.;Yang,Y.;Chen,Y.;Fu,X.;Deng,J.,Cell-penetrating peptide-siRNA conjugate loaded YSA-modified nanobubbles for ultrasound triggered siRNA delivery.Colloids and Surfaces B:

Biointerfaces2015,136,641-650。

[0101] Chen,J.;Li,S.;Shen,Q.,Folic acid and cell-penetrating peptide conjugated PLGA-PEG bifunctional nanoparticles for vincristine sulfate delivery.European journal of pharmaceutical sciences 2012,47(2),430-443。

[0102] 实施例2

[0103] 本实施例公开的上述纳米探针应用在微流控液滴流式细胞仪的方法,包括如下步骤:

[0104] 如图7所示,图7为本申请实施例提供的微流控液滴流式细胞仪检测CTCs的流程图,其中,7a为微流控芯片包裹单细胞的流程图,7b为微流控液滴流式细胞仪检测单细胞的荧光结果图。

[0105] 本申请实施例提供的微流控液滴流式细胞仪包括微流控芯片、流速控制器和荧光检测装置。如图8~图12所示,图8为本申请实施例提供的微流控芯片的爆炸图,图9为本申请实施例提供的微流控芯片的平面结构图,图10为本申请实施例提供的微流控芯片和荧光检测装置的结构示意图,图11为本申请实施例提供的荧光检测装置的结构示意图;图12为本申请实施例提供的纳米探针注入到每个单细胞液滴检测CTC中miRNA的示意图,其中,图12左图为纳米探针注入到每个单细胞液滴的截面图,图12右图为在不同油相液体浓度和不同电势下,纳米探针注入到每个单细胞液滴中的注射效率。本申请实施例提供的微流控芯片包括:硼硅酸盐抛光玻璃层1、铂镀层2、PDMS底层3和PDMS流道层4;铂镀层2通过磁控溅射在硼硅酸盐抛光玻璃层1的上表面,PDMS底层3设置在铂镀层2的上表面,PDMS流道层4设置在PDMS底层3的上表面。

[0106] 铂镀层2可以为现有常规的铂交流电线路,铂交流电线路可施加交流电。

[0107] 流速控制器可以为可控制液体流速的装置,例如真空泵和气压控制器,真空泵与气压控制器连接控制对液体施加的压力;可通过与真空泵和气压控制器连接的储液枪头将油相液体输入油相端口4-1,将细胞样品输入细胞样品端口4-2,将油相液体输入油相端口5-1,将注入纳米探针的单细胞液滴输入液滴端口5-2中。

[0108] PDMS流道层4设有T型垂直交错微通道。

[0109] PDMS底层3是密闭的薄层,PDMS底层3的厚度为100 μm ,使得铂镀层2的电极产生的电场能够覆盖PDMS流道层4,铂镀层2在连接口4B上形成电场,以实现单细胞液滴通过连接口4B时,纳米探针被电极诱导注入单细胞液滴的过程。

[0110] PDMS流道层4包括油相微通道、细胞样品微通道和纳米探针微通道;油相微通道的一端设有油相端口4-1,细胞样品微通道的第一端设有细胞样品端口4-2,细胞样品微通道的第四端设有液滴流出端口4-4,纳米探针微通道的一端设有纳米探针端口4-3;油相微通道的另一端与细胞样品微通道的第二端垂直交错相通,油相微通道与细胞样品微通道交错相通形成交叉口4A;纳米探针微通道的另一端与细胞样品微通道的第三端相通连接,纳米探针微通道与细胞样品微通道连接形成连接口4B;铂镀层2的铂交流电线路在对应连接口4B的位置上连通,铂镀层2可在连接口4B上形成电场;铂镀层2的电场覆盖PDMS底层3在对应连接口4B的位置,使得铂镀层2的铂电极施加电场诱导所述PDMS流道层的纳米探针注入单细胞液滴中。

[0111] 将油相液体通过流速控制器通入油相端口4-1,细胞样品通过流速控制器通入细

胞样品端口4-2,油相液体和细胞样品是两种互不相溶的液体,两种互不相溶的液体分别从油相微通道和细胞样品微通道进入,由于表面张力和剪切力间的相互作用,油相液体在交叉口4A处破裂,使得油相液体对细胞样品的单细胞进行包裹形成液滴,通过控制油相液体和细胞样品的流速可以精确控制液滴大小,通过控制油相液体和细胞样品的流速无需通电就能实现油相包裹细胞水相的单细胞液滴。单细胞液滴通过细胞样品微通道流动至连接口4B上,铂镀层2通入交流电,铂电极在对应连接口4B的位置上形成电场,铂镀层2的电场覆盖PDMS流道层4在对应连接口4B的位置,电势能破坏单细胞液滴的表面张力从而让纳米探针微通道中的纳米探针注入到每个单细胞液滴中,从图12左图从上至下可知,单细胞液滴通过细胞样品微通道流动至连接口4B上,在电势作用下破坏单细胞液滴的表面张力从而让纳米探针注入到每个单细胞液滴中,纳米探针即可检测单细胞的目的基因。从液滴流出端口4-4中吸取注入纳米探针的单细胞液滴进行孵育,孵育2~5h后,将注入纳米探针的单细胞液滴转移至荧光检测装置读取注入纳米探针的单细胞液滴中的荧光信号。

[0112] 其中,孵育的作用是使得纳米探针与单细胞液滴中的细胞目的基因互补配对结合,从而让单细胞液滴发出相应的荧光。

[0113] 如图10~图11所示,图10为本申请实施例提供的微流控芯片和荧光检测装置的结构示意图,图11为本申请实施例提供的荧光检测装置的结构示意图。本申请实施例提供的荧光检测装置包括荧光检测芯片和激光检测系统;荧光检测芯片包括PDMS流道层5,PDMS流道层5上设有液滴微通道、油相微通道;油相微通道的一端设有油相端口5-1,液滴微通道的第一端设有液滴端口5-2;液滴微通道的第二端和油相微通道的另一端垂直交错相通,油相微通道与细胞样品微通道交错相通形成交叉口5A;液滴微通道的第三端设有激光光纤端5B,液滴微通道的第四端设有检测光纤端5C,激光检测装置分别与激光光纤端5B和检测光纤端连接5C;激光检测装置可为现有常规的检测荧光设备,激光检测装置包括光纤准直器、二向色镜、滤光片和光电倍增管。

[0114] 具体的,荧光检测芯片使得注入纳米探针的单细胞液滴通过油相的隔离,以气压控制的一定频率将注入纳米探针的单细胞液滴单个连续地通过激光光纤端5B和检测光纤端5C,使该液滴检测达到最佳检测效果。在检测过程中,激光检测装置的激光器通过激发光纤发出488nm波长的激光,激光达到激光光纤端,诱导在激光光纤端该液滴中的细胞发出荧光,并由激光检测装置的检测光纤接收荧光。通过光纤准直器的校准和双向色镜处折射和反射,荧光被分为两条光路,并利用滤光片分别收集532nm和644nm波长的荧光。最后,荧光信号经光电倍增管(PMT)放大转换为数字信号,由计算机采集和记录。

[0115] 通过微流控芯片得到注入纳米探针的单细胞液滴,注入纳米探针的单细胞液滴在EP管中孵育4h后,将注入纳米探针的单细胞液滴转移至液滴端口5-2,将油相液体通过流速控制器通入油相端口5-1,油相液体和注入纳米探针的单细胞液滴是两种互不相溶的液体,两种互不相溶的液体分别从液滴微通道和油相微通道进入,由于表面张力和剪切力间的相互作用,油相液体在交叉口5A处破裂,通入的油相液体对每个注入纳米探针的单细胞液滴分隔开,使得注入纳米探针的单细胞液滴单个通过激光光纤端5B,通过检测光纤端5C检测单个注入纳米探针的单细胞液滴的荧光信号。

[0116] 具体的,本实施例的通入油相端口4-1和油相端口5-1的油相液体为商品化的dsurf (Fluigent),油相液体的溶剂为Novec™ 7500 (3M氟化液,Novec™ 7500,型号:

3MNOVEC 7500, 品牌: 3M), 采用Novec TM 7500对商品化dSURF (Fluigent) (微液滴生成油, dSURF, 型号: 2% w/t, 公司: Fluigent 法国) 配制0.1wt%、0.3wt%、0.5wt%、0.8wt%、1.0wt%、1.5wt%、2.0wt%的油相液体。铂镀层2施加交流电压为80V~140V, 从图12右图可知, 在不同油相液体浓度和不同电势下, 纳米探针注入到每个单细胞液滴中的注射效率, 可通过控制不同的dSURF (Fluigent) 浓度和交流电压, 控制纳米探针注入到每个单细胞液滴中的注射效率达到100%。为了达到最佳的注射效果, 采用1~2wt% dSURF (Fluigent) 的油相液体, 以及施加120V~140V电压, 使得纳米探针注入到每个单细胞液滴的注入效率达到100%。

[0117] 具体的, 本实施例的微流控芯片可产生60滴/分钟的封装单细胞液滴。单细胞封装、纳米探针注射步骤均能自动完成。

[0118] 请参阅图13, 图13为本申请实施例提供的纳米探针注入单细胞液滴的示意图, 其中, a为单细胞被油相液体包裹形成液滴的显微图, b为a图的放大图, c为纳米探针未注入单细胞液滴的显微图, d为纳米探针注入到单细胞液滴的显微图, e、f、g和h为单细胞液滴通过细胞样品微通道流动至连接口4B上, 在电势作用下破坏单细胞液滴的表面张力从而让纳米探针注入到每个单细胞液滴的显微图。

[0119] 为了计算本实施例微流控液滴流式细胞仪的单细胞液滴注射纳米探针效率, 本实施例使用初始细胞浓度为 5×10^5 cells/mL的MCF-7细胞悬液作为细胞样品, 2wt% dSURF (Fluigent) 作为油相液体, 油相液体的溶剂为Novec TM 7500, 施加电压为140V, 生成封装成单细胞液滴, 纳米探针的浓度为60 μ g/mL, 并计算单细胞液滴的封装率。统计结果表明, 采用本实施例的微流控芯片得到单细胞液滴的单细胞封装率为30.74%, 其中空液滴比例为61.49%, 双细胞封装率为4.53%, 多细胞封装率为3.24%。由于空液滴在荧光检测装置中不产生信号, 易于识别, 单细胞液滴数的比值满足统计要求。通过计算纳米探针注射前(图13c)和纳米探针注射后(图13d)的单细胞液滴直径的变化, 计算出注射前单细胞液滴的直径为 $154.8641 \pm 4.3742 \mu\text{m}$, 注射后单细胞液滴的直径为 $169.4805 \pm 5.1233 \mu\text{m}$, 纳米探针喷射量约为喷射后单细胞液滴体积的1/4。由于实验中与细胞孵育的MOF材料的最终浓度为60 μ g/mL。

[0120] 具体的, 本实施例的纳米探针还可应用在分离血液样品单细胞仪器, 如流式细胞仪, 其他微流控技术制造的细胞分选设备(液滴封闭式), 以及表面图案化处理形成的开放式液滴芯片等(Tronser, T.; Demir, K.; Reischl, M.; Bastmeyer, M.; Levkin, P.A., Droplet microarray: miniaturized platform for rapid formation and high-throughput screening of embryoid bodies. Lab on a Chip 2018, 18(15), 2257-2269)。

[0121] 本实施例使用MCF-7细胞作为CTCs, 初始细胞浓度为 5×10^5 cells/mL的MCF-7细胞悬液作为细胞样品, 2wt% dSURF (Fluigent) 作为油相液体, 油相液体的溶剂为Novec TM 7500, 施加电压为140V, 生成封装成单细胞液滴, 采用不同探针检测含有MCF-7细胞单细胞液滴的miRNA let-7a, 探针分为空白对照、Texas red标记的miRNA let-7a纳米探针、MOF纳米片Texas red标记的miRNA let-7a纳米探针和MOF纳米片混合物、纳米探针B; 结果如图14所示, 图14为本申请实施例提供了采用不同探针检测MCF-7细胞的miRNA let-7a的结果图。将上述已注入纳米探针的单细胞液滴孵育4h后, 孵育的作用是使得纳米探针与含有MCF-7细胞的单细胞液滴的miRNA let-7a互补配对结合, 使得纳米探针发出荧光, 对MCF-7细胞中

miRNA进行原位检测,可检测其中的荧光信号。

[0122] 图14a的Bare图为不采用探针检测含有MCF-7细胞单细胞液滴的miRNA let-7a的荧光检测图。

[0123] 图14a的ssDNA图为采用Texas red标记的miRNAlet-7a纳米探针检测含有MCF-7细胞单细胞液滴的miRNAlet-7a的荧光检测图。

[0124] 图14a的MOF图为采用上述实施例制得的MOF纳米片检测含有MCF-7细胞单细胞液滴的miRNAlet-7a的荧光检测图。

[0125] 图14a的ssDNA@MOF图为Texas red标记的miRNA let-7a纳米探针和MOF纳米片的混合物检测含有MCF-7细胞单细胞液滴的miRNA let-7a的荧光检测图。

[0126] 图14a的ssDNA@MOF-PEG-peps图为采用上述实施例制得的纳米探针B检测含有MCF-7细胞单细胞液滴的miRNAlet-7a的荧光检测图。其中,将上述制得的MOF-PEG-peps和Texas red标记的miRNA let-7a纳米探针混合,制得纳米探针B。

[0127] 图14b为采用上述实施例制得的纳米探针A和纳米探针B检测含有MCF-7细胞单细胞液滴的miRNAlet-7a的荧光检测图。其中,将上述制得的MOF-PEG-peps和FAM标记的miRNA 21纳米探针混合后,制得纳米探针A;将上述制得的MOF-PEG-peps和Texas red标记的miRNAlet-7a纳米探针混合,制得纳米探针B。

[0128] 图14a的结果表明,相对于Texas red标记的miRNA let-7a纳米探针、MOF纳米片、Texas red标记的miRNA let-7a纳米探针和MOF纳米片混合物作为探针检测荧光,本申请采用MOF-PEG-peps处理的细胞具有较高的荧光恢复率,说明双肽靶向和PEG修饰能提高单细胞的内化效率。这种高内化效率提高了细胞内miRNA检测的灵敏度,图14b所示,观察到miRNA21(绿色)、miRNA let-7a(红色)和miRNA21+miRNAlet-7a(黄色)检测的可分辨荧光信号,这与微流控液滴流式细胞仪中收集的荧光信号一致。

[0129] 从上述实施例可知,本实施例的微流控芯片可采用油相液体对单细胞进行包裹稳定产生单细胞液滴,然后在交流电场的作用下,将本申请的纳米探针均匀地注入每个单细胞液滴中。最后,利用激光诱导荧光检测系统检测每个细胞的信号,实现单细胞中miRNA分析。

[0130] 目前商业化的循环肿瘤细胞检测技术主要是基于表面蛋白生物标志物EpCAM的检测,存在特异性低、不适合活细胞原位检测等缺点。本申请的纳米探针应用在微流控液滴流式细胞仪可用于单个活循环肿瘤细胞中的原位miRNAs检测。本实施例的微流控芯片能快速产生大量的孤立单细胞液滴,通过电击作用将本申请的纳米探针注入到每个单细胞液滴中,通过检测通道,可在短时间内用于高通量单个细胞的miRNA检测。

[0131] 以上所述仅是本申请的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本申请原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本申请的保护范围。

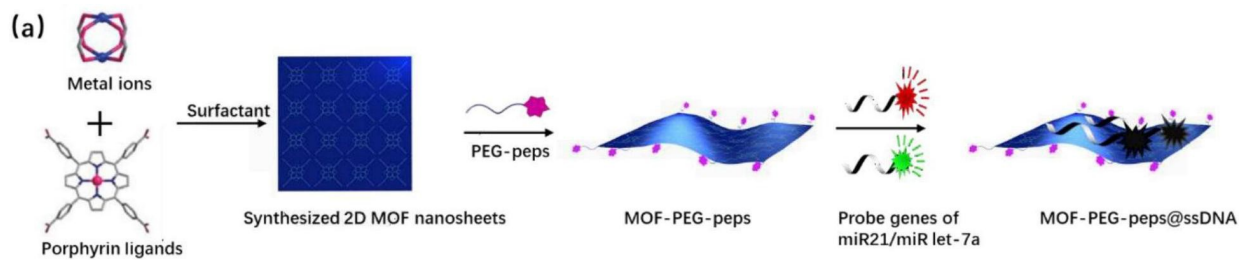


图1

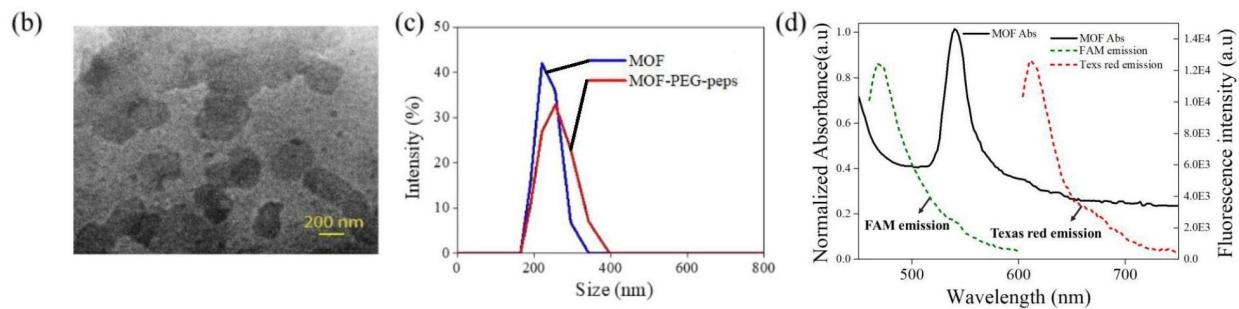


图2

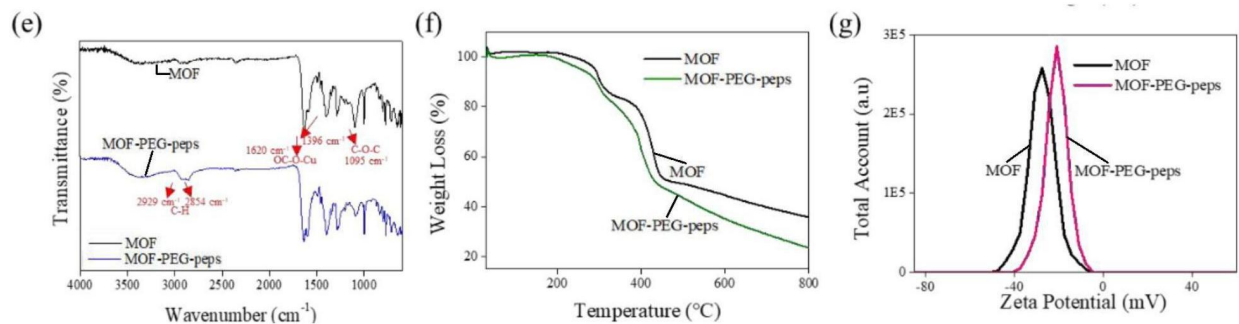


图3

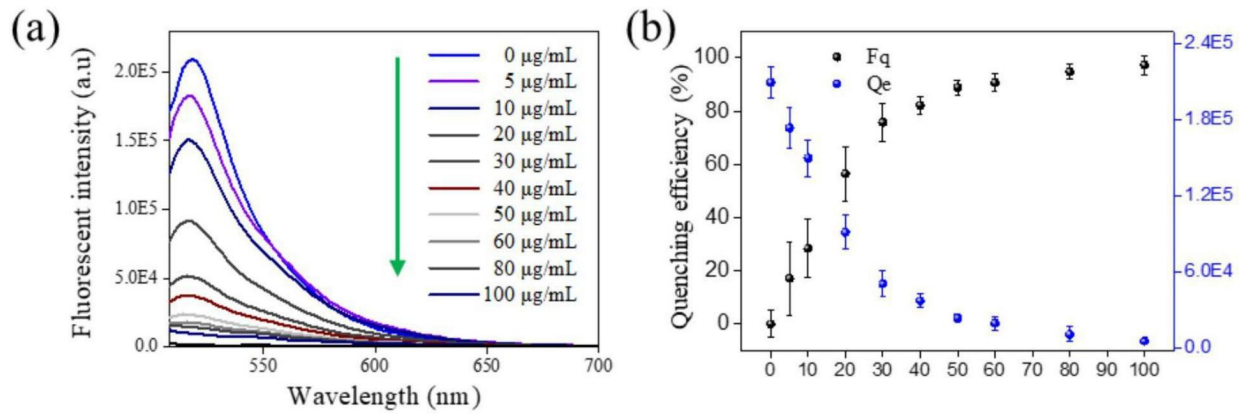


图4

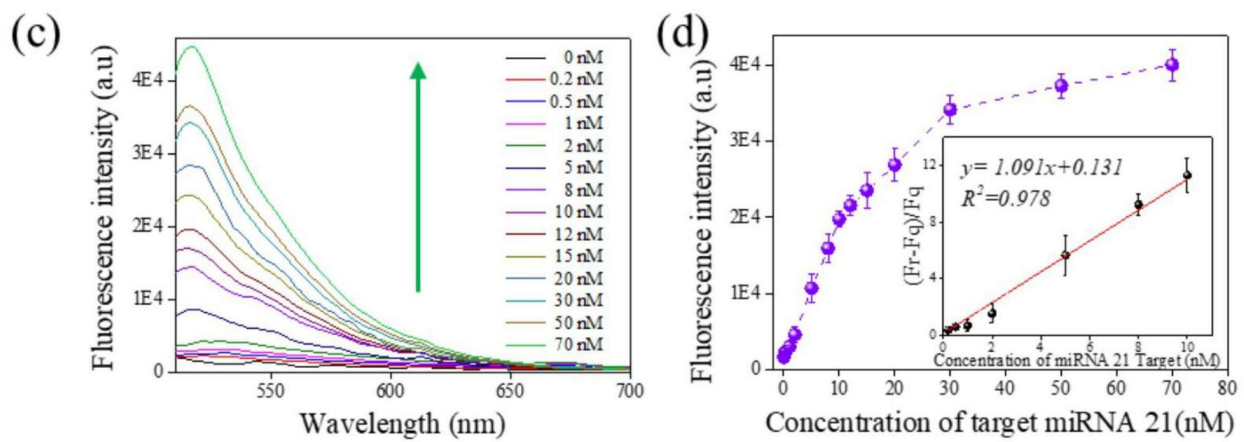


图5

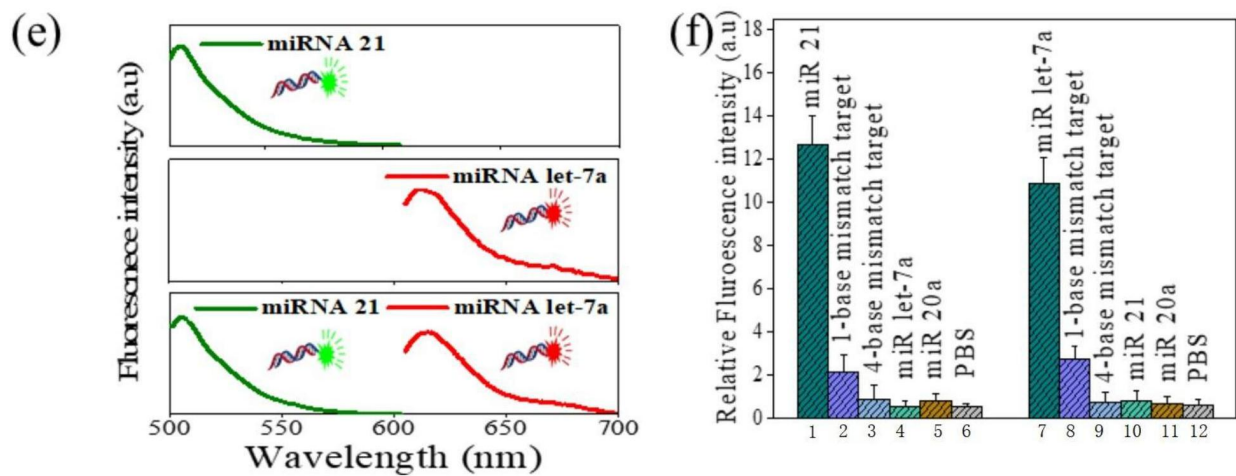


图6

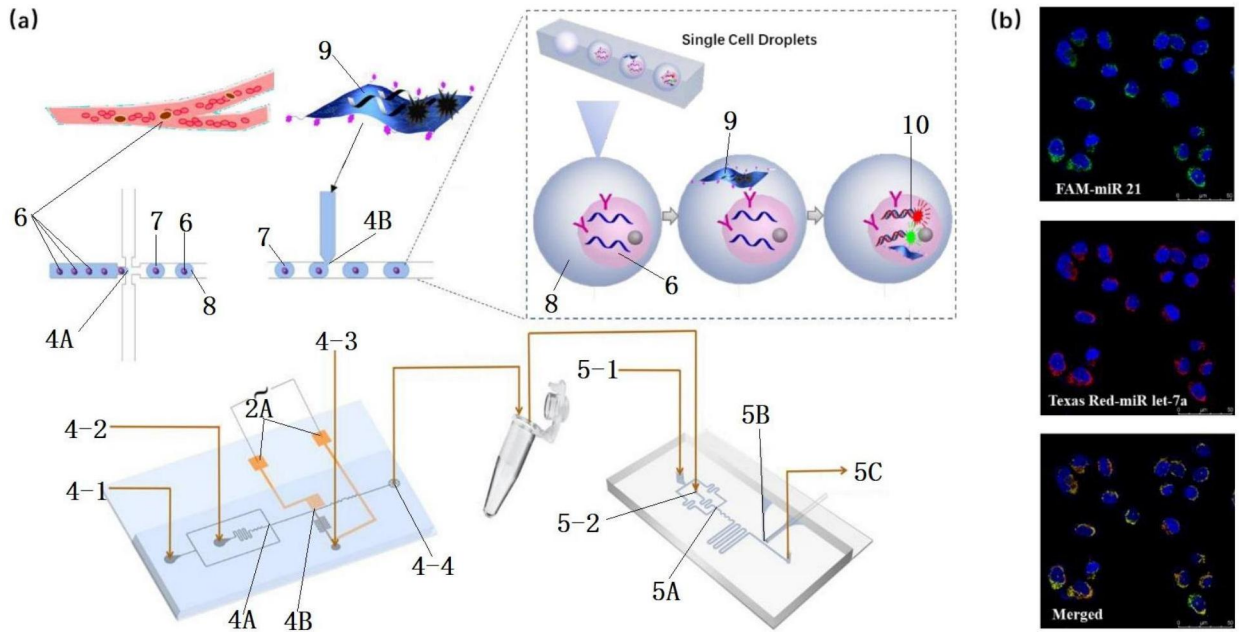


图7

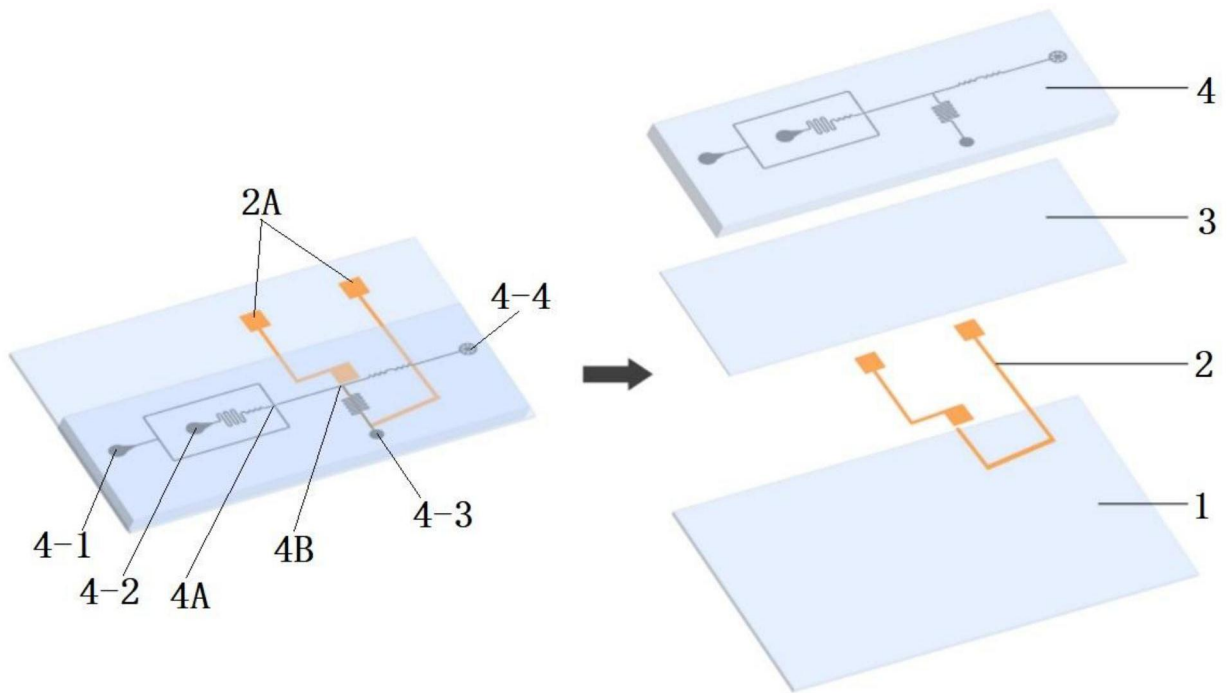


图8

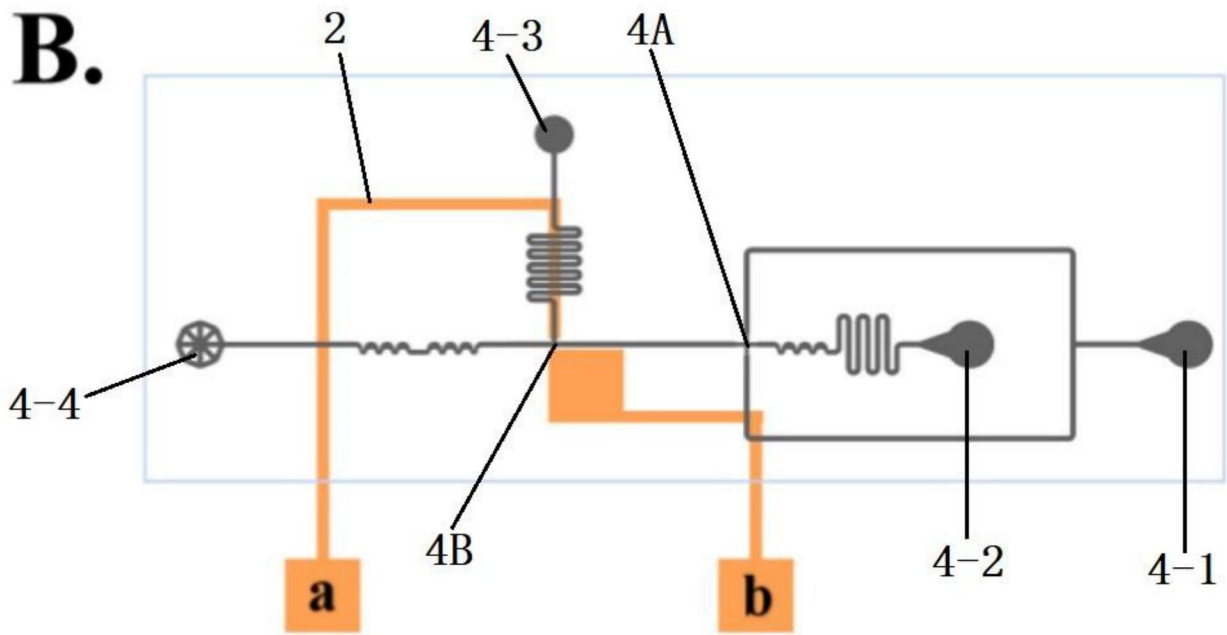


图9

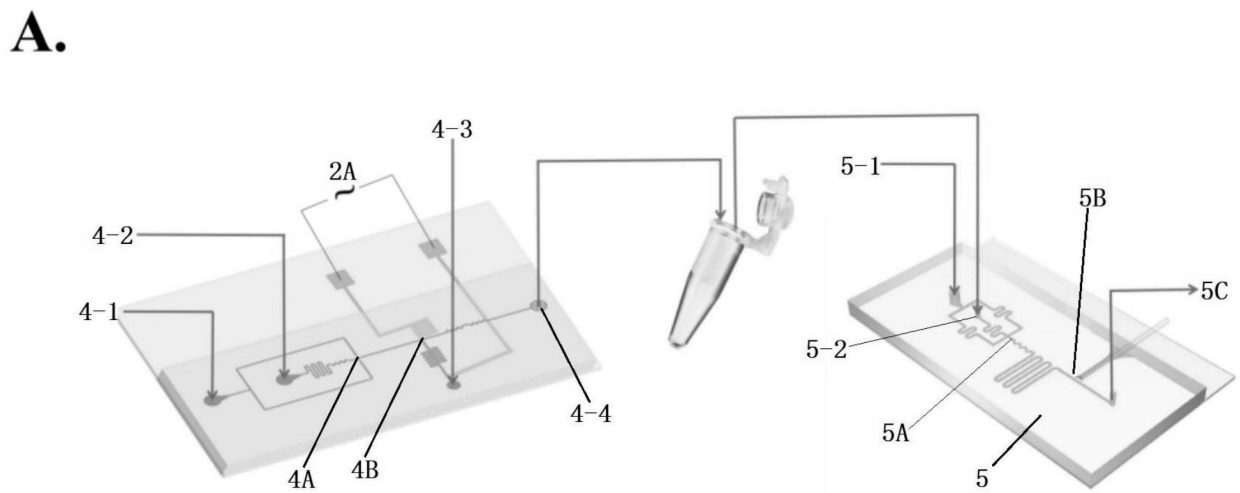


图10

C.

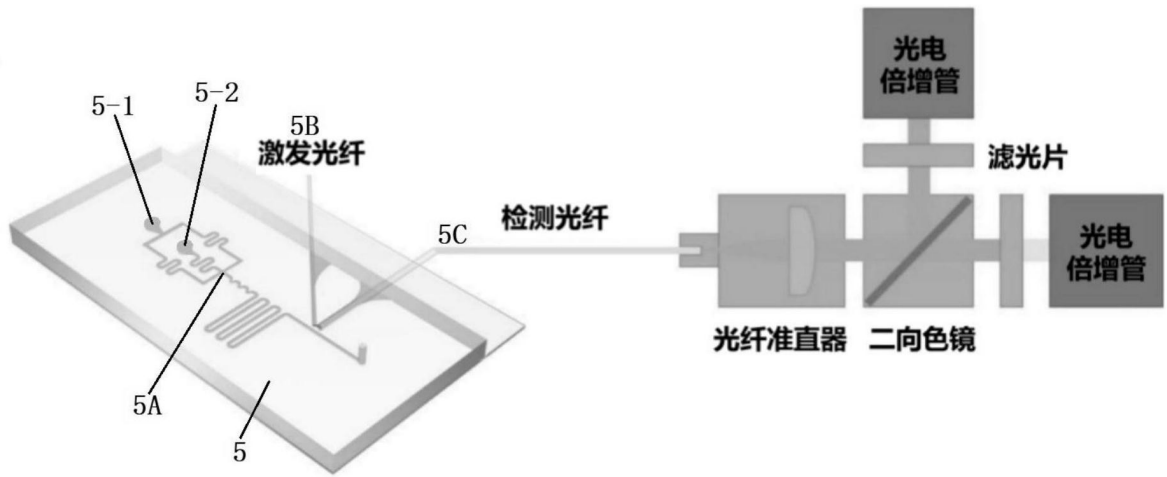


图11

(b)

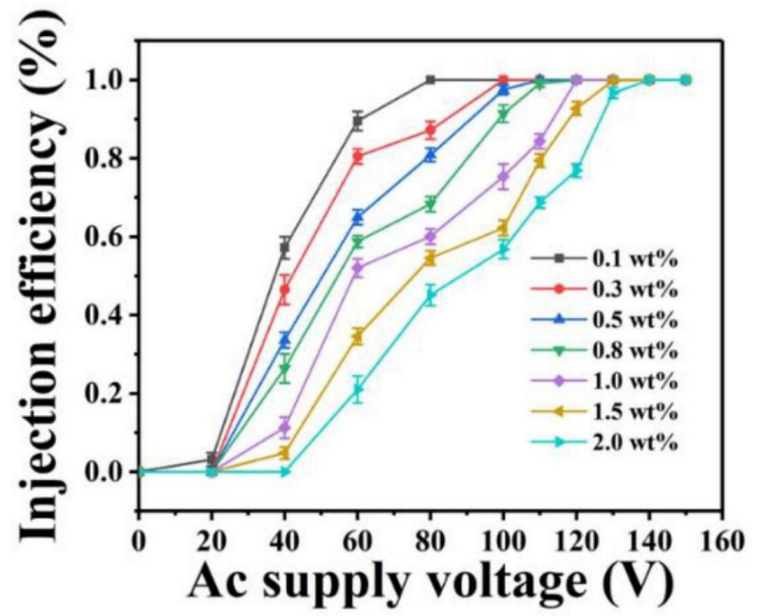
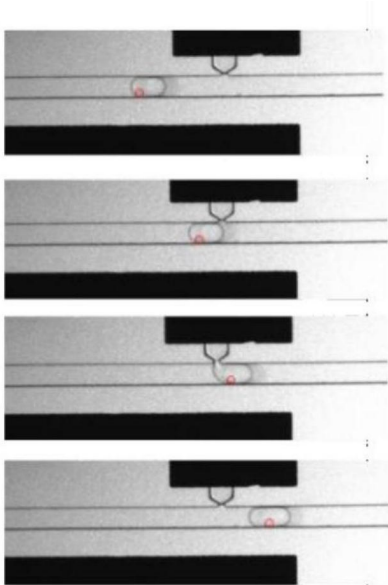


图12

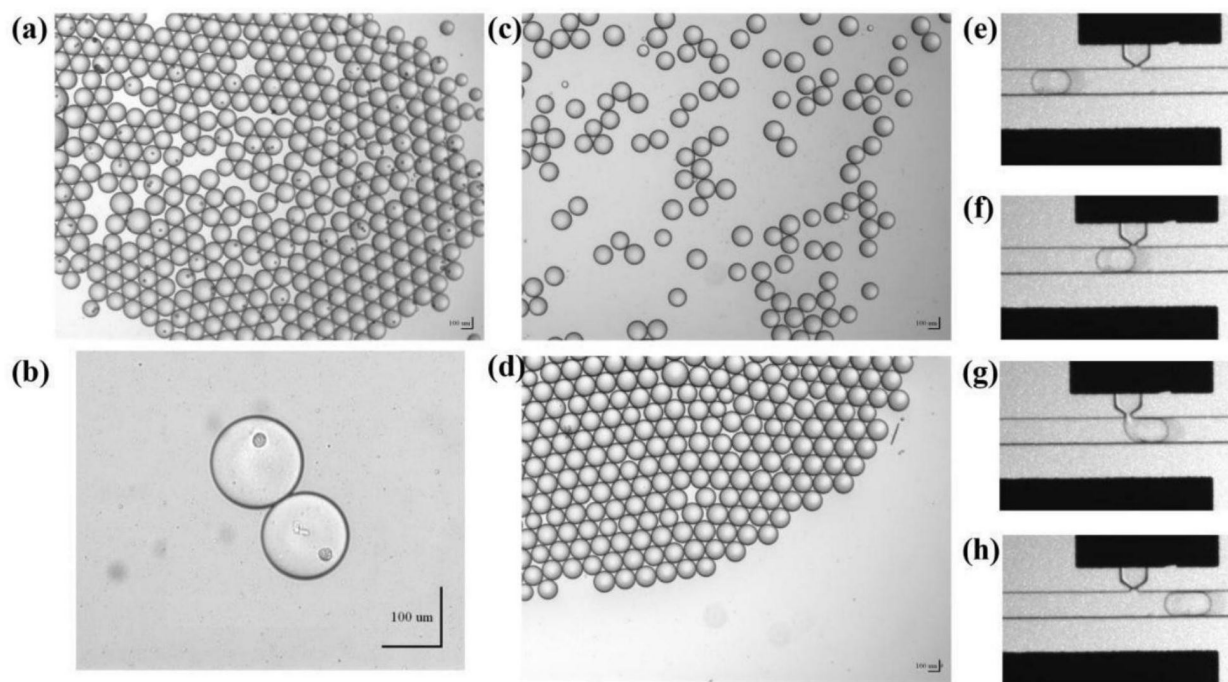


图13

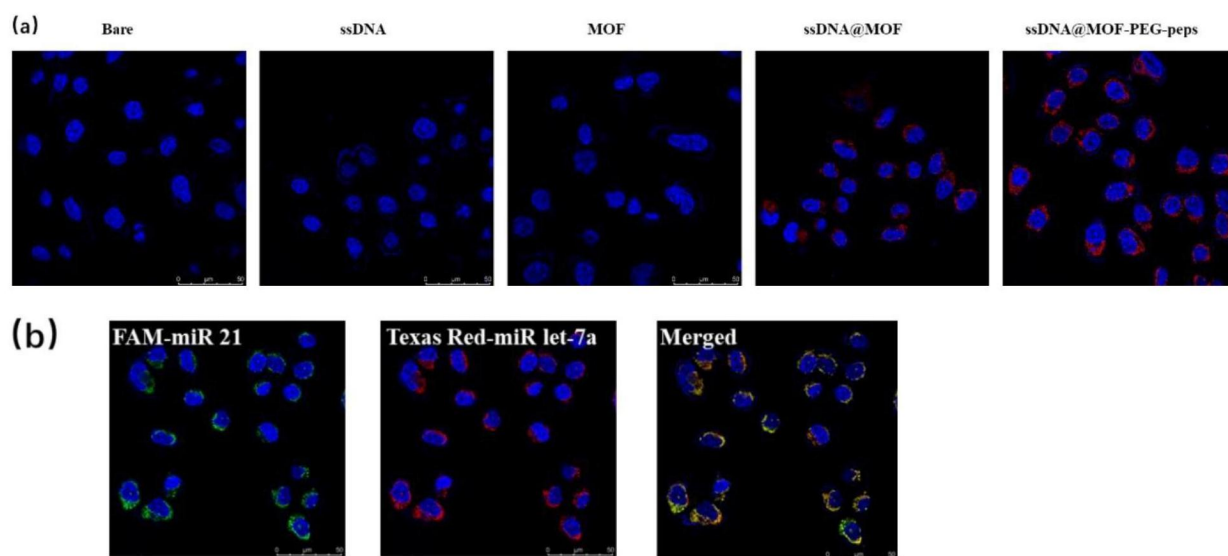


图14