



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111735853 A

(43) 申请公布日 2020.10.02

(21) 申请号 202010547638.2

(22) 申请日 2020.06.16

(71) 申请人 东南大学

地址 211102 江苏省南京市江宁区东南大学路2号

(72) 发明人 项楠 张孝哲 王斯林 周宇杰

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 柏尚春

(51) Int.Cl.

G01N 27/07 (2006.01)

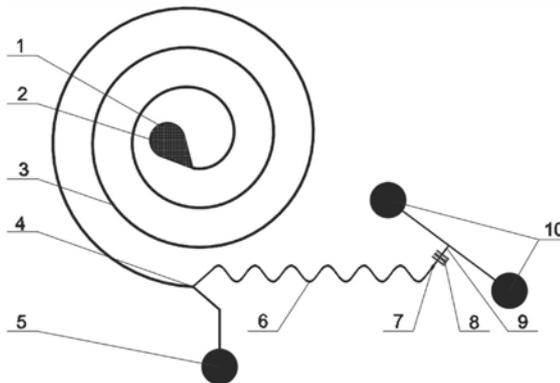
权利要求书1页 说明书4页 附图4页

(54) 发明名称

一种集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置

(57) 摘要

本发明公开了一种集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置,包括预分选模块、聚焦模块、电检测模块和形变模块,预分选模块设置样品入口,样品入口下方连通螺旋流道,其末端的Y型双出口分别与聚焦模块和血细胞出口连通,聚焦模块将细胞聚焦为单列并增大两细胞间距,电检测模块对细胞进行宽频阻抗测量,细胞经电检测模块检测后进入形变模块,在形变模块内撞击壁面产生形变,进而对细胞的变形性进行分析。本发明对细胞进行机械和电学多参数联合检测,通过预分选模块去除绝大部分血细胞,同时借助电检测模块和形变模块实现循环肿瘤细胞和相近尺寸白细胞的精准鉴别,为癌症复发转移的临床诊断以及其他细胞学研究等提供一种快捷有效的方式。



1. 一种集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置,其特征在于:包括预分选模块、聚焦模块、电检测模块和形变模块,所述预分选模块设置有样品入口(1),所述样品入口(1)下方连通螺旋流道(3),所述螺旋流道(3)的末端设有Y型双出口(4),所述Y型双出口(4)分别与聚焦模块和血细胞出口(5)连通,所述聚焦模块将细胞聚焦为单列并增大相邻两细胞之间的间距,所述电检测模块对所述聚焦模块的细胞进行宽频阻抗测量,细胞经所述电检测模块检测后进入所述形变模块,在所述形变模块内撞击壁面产生形变,进而对细胞的变形性进行分析。

2. 根据权利要求1所述的集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置,其特征在于:所述螺旋流道(3)的入口处设置有过滤筛(2),所述过滤筛(2)由等距排列的微柱阵列组成。

3. 根据权利要求1所述的集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置,其特征在于:所述螺旋流道(3)的垂直截面呈宽度大于高度的矩形或者两侧高度不相同的梯形;当所述螺旋流道(3)的垂直截面呈矩形时,其高度与宽度的比值为 $1/2\sim 1/4$ 。

4. 根据权利要求1所述的集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置,其特征在于:所述聚焦模块通过设置的聚焦正弦流道(6)将细胞聚焦为单列后,再通过设置的突扩结构(7)增大相邻两细胞之间的间距。

5. 根据权利要求1所述的集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置,其特征在于:所述形变模块设置有T型流道双出口(10),所述T型流道双出口(10)的T型流道区域中心为细胞撞击壁面而产生形变的区域。

6. 根据权利要求5所述的集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置,其特征在于:所述T型流道双出口(10)的入口处设置有窄缩结构(9),细胞经所述窄缩结构(9)后撞击在所述T型流道双出口(10)的T型流道区域的壁面。

7. 根据权利要求5所述的集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置,其特征在于:通过高速摄像机拍摄所述T型流道双出口(10)中T型流道区域的细胞形变。

8. 根据权利要求4所述的集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置,其特征在于:所述电检测模块设置有ITO电极(8),所述ITO电极(8)靠近所述突扩结构(7)的出口,且所述ITO电极(8)的周围设置有屏蔽电极。

9. 根据权利要求4所述的集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置,其特征在于:所述聚焦正弦流道(6)的截面为矩形,尺寸满足高度与宽度的比值为 $1\sim 1/3$ 。

10. 根据权利要求2所述的集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置,其特征在于:所述微柱横截面为圆形、三角形和“T”形中的任意一种或组合。

一种集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置

技术领域

[0001] 本发明涉及对循环肿瘤细胞进行多物理参量检测的装置,具体涉及一种集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置。

背景技术

[0002] 近年来,基于微流控技术的循环肿瘤细胞分选富集方法得到了广泛关注并取得了突破性进展。然而,对于分选后循环肿瘤细胞的鉴定与表征通常仍采用传统的分析手段,如免疫细胞学、流式细胞术和核酸检测技术等。这些方法均以生物分子标记物为分析对象,不仅影响细胞活性,而且无法实现不表达特定分子标记物的循环肿瘤细胞(肿瘤细胞在转移过程中可能发生上皮间充质转化而丢失上皮细胞标志物)的检测,同时存在操作复杂、检测效率低以及不易集成等共同缺点。

[0003] 生物细胞的介电特性是指示细胞生理、病理状态的一种有效标记,可通过测量细胞悬浮液混合系统的电阻抗信号进行表征。借助微尺度电极,微流控单细胞电阻抗检测技术将传统的电阻抗测量方法引入到微流控芯片上,并逐渐发展演化为微型库尔特计数器、微型阻抗分析仪和阻抗流式细胞仪。现有的阻抗流式细胞仪通常仍采用台式的阻抗分析仪来获取被测细胞的单频率阻抗信号,造成整个检测系统的复杂和细胞阻抗信息的匮乏。此外,虽然阻抗流式细胞仪等方法可以实现大部分血细胞和循环肿瘤细胞的分离,但仍存在部分细胞被误判,故而需要考虑细胞的其他特性,从而进行联合鉴别。

[0004] 研究表明,细胞机械性能与细胞的病理状态密切相关,如癌变细胞比健康细胞更加柔软。得益于蓬勃发展的微加工技术,一些能够分析单细胞机械性能的微流控器件已研制成功,例如利用介电泳诱导变形技术测量细胞的变形能力,借助压缩、拉伸和流体剪切应力作用分析细胞的机械响应,以及通过图形化微柱基底表征细胞的收缩力等。上述这些微流控平台能够有效分析单细胞的机械特性,但在实验过程中需要对细胞进行捕捉和固定,使得整个测量过程耗时较长,极大地限制了该类器件的检测通量。

发明内容

[0005] 发明目的:本发明的目的在于提供一种简化的宽频阻抗测量系统,实现对聚焦后细胞的多频交流阻抗检测;同时,还能利用捕获细胞在T型流道撞击壁面产生的变形对细胞机械性能进行检测的集成预分选的细胞机械和电学多参数联合检测的装置。

[0006] 技术方案:本发明包括预分选模块、聚焦模块、电检测模块和形变模块,所述预分选模块设置有样品入口,所述样品入口下方连通螺旋流道,所述螺旋流道的末端设有Y型双出口,所述Y型双出口分别与聚焦模块和血细胞出口连通,所述聚焦模块将细胞聚焦为单列并增大相邻两细胞之间的间距,所述电检测模块对所述聚焦模块的细胞进行宽频阻抗测量,细胞经所述电检测模块检测后进入所述形变模块,在所述形变模块内撞击壁面产生形变,对细胞的变形性进行分析。

[0007] 所述螺旋流道的入口处设置有过滤筛,所述过滤筛由等距排列的微柱阵列组成;

能够挡住大颗粒杂质,避免器件的流道堵塞。

[0008] 所述螺旋流道的垂直截面呈宽度大于高度的矩形或者两侧高度不相同的梯形;当所述螺旋流道的垂直截面呈矩形时,其高度与宽度的比值为 $1/2\sim 1/4$ 。

[0009] 所述聚焦模块通过设置的聚焦正弦流道将细胞聚焦为单列后,再通过设置的突扩结构增大相邻两细胞之间的间距,以避免两个细胞撞壁时产生干扰。

[0010] 所述形变模块设置有T型流道双出口,所述T型流道双出口的T型流道区域中心为细胞撞击壁面而产生形变的区域。

[0011] 所述T型流道双出口的入口处设置有窄缩结构,细胞经所述窄缩结构后撞击在所述T型流道双出口的T型流道中心区域的壁面。

[0012] 通过高速摄像机拍摄所述T型流道双出口中T型流道区域的细胞形变。

[0013] 所述电检测模块设置有ITO电极,所述ITO电极靠近所述突扩结构的出口,且所述ITO电极的周围设置有屏蔽电极以减少外界环境对测量电信号的干扰。

[0014] 所述聚焦正弦流道的截面为矩形,尺寸满足高度与宽度的比值为 $1\sim 1/3$ 。

[0015] 所述微柱横截面为圆形、三角形和“T”形中的任意一种或组合;这样的结构设计,使得大于相应尺寸的杂质流经时将被捕获,减少流道堵塞的风险。

[0016] 有益效果:本发明与现有技术相比,其有益效果在于:(1)通过集成细胞变形性检测及细胞电阻抗检测,实现了细胞的多参量联合检测,大大减少实验及检测时间的同时使细胞的鉴定更为准确;(2)通过细胞撞击壁面产生形变,细胞受力更大,更易产生变形;此外,此种形变方式大大提高了检测通量,较介电泳诱导变形、原子力显微形变、微管吮吸等变性方式具有更大的检测通量及更明显的细胞变形;(3)成本低、操作简单、易集成微型化。

附图说明

[0017] 图1为本发明整体结构的俯视图;

[0018] 图2为本发明中微柱阵列的局部放大图;

[0019] 图3为本发明中螺旋流道惯性分选原理示意图;

[0020] 图4为本发明中电检测过程示意图;

[0021] 图5为本发明中T型流道的局部放大兼细胞形变过程示意图;

[0022] 图6为实施例中T型流道细胞变形图;

[0023] 图7为实施例中白细胞和癌细胞在1M频率交流信号下的阻抗谱。

具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施方式和说明书附图对本发明做进一步详细介绍。

[0025] 如图1所示,本发明包括预分选模块、聚焦模块、电检测模块和形变模块,预分选模块设置有样品入口1,样品入口1下方连通螺旋流道3,螺旋流道3的入口处设置过滤筛2。如图2所示,样品液经注射泵推动注射器由样品入口1注入螺旋流道3入口,流经过滤筛2时,大颗粒杂质被截获,从而避免器件的流道堵塞。本实施例中,过滤筛2由微柱阵列组成,微柱阵列中的各个微柱之间保持一定间距均匀分布。微柱的横截面为圆形、三角形和“T”形中的任意一种或组合。这样的结构设计,使得大于相应尺寸的杂质流经时将被捕获,减少流道堵塞的风险。为使细胞粒子能够在螺旋流道3内实现聚焦,细胞直径和螺旋流道3的截面高度间

满足 $0.07 < a_p/h < 0.3$, 其中 a_p 为粒子直径, h 为螺旋流道3的截面高度。同时, 螺旋流道3的垂直截面形状应设计成低深宽比矩形(深宽比 $AR = h/w < 1$), 优选地, 其高度与宽度的比值为 $1/2 \sim 1/4$, 以便对经过螺旋流道3的细胞沿流道宽度方向进行分选; 螺旋流道3的截面还可设计成两侧高度不相同的梯形。螺旋流道3的出口为Y型双出口4, Y型双出口4分别与聚焦模块和血细胞出口5连通。样品液进入螺旋流道3后在惯性力和迪恩拽力的共同作用下, 样品液中的循环肿瘤细胞以及尺寸相近的白细胞靠近流道内壁面11, 而大部分血细胞则靠近外壁面12, 它们在到达Y型双出口4时, 循环肿瘤细胞及尺寸相近的白细胞流入聚焦模块, 而大部分血细胞则由5口流出器件。

[0026] 聚焦模块包括聚焦正弦流道6和突扩结构7, 聚焦正弦流道6的截面为矩形, 尺寸满足高度与宽度的比值为 $1 \sim 1/3$ 。S弯单元在4组以上, 本实施例中, 聚焦模块包括6组S弯单元组成的正弦流道。突扩结构7与流道壁先互成 $30^\circ \sim 60^\circ$ 夹角, 然后, 经平直延伸扩张至所需宽度, 扩张比例为 $1.5 \sim 3$ 。循环肿瘤细胞及尺寸相近的白细胞进入聚焦正弦流道6后, 在惯性力和迪恩拽力的作用下聚焦于流道中心。细胞经聚焦正弦流道6聚焦为单列后进入突扩结构7, 由于粘性排斥作用, 两个细胞之间的间距增大, 从而减小细胞间的干扰作用。螺旋流道3的Y型双出口4的血细胞出口5与连通聚焦正弦流道6的出口的宽度比为 $1.5 \sim 3$;

[0027] 电检测模块设置包括一对ITO电极8、电流放大器、数据采集卡与计算机的宽频阻抗测量系统, 系统包括硬件上伪随机M序列激励信号的施加与响应信号的采样, 以及软件上宽频阻抗信号的分析提取。其中, ITO电极8靠近突扩结构7的出口, 且ITO电极8的周围设置有屏蔽电极, 用于减少外界环境对测量电信号的干扰。细胞从突扩结构7出来后, 流经置有ITO电极8的流道, 电极的电信号将产生变化并由相应装置进行放大、收集、处理, 通过向流道下方的ITO电极8施加伪随机M序列信号实现测量细胞的宽频阻抗, 之后细胞流入形变模块。

[0028] 形变模块设置包括窄缩结构9和T型流道双出口10, 窄缩结构9与流道壁先互成 $30^\circ \sim 60^\circ$ 夹角, 然后经平直延伸窄缩至所需宽度, 窄缩比例为 $0.4 \sim 0.6$ 。T型流道双出口10的T型流道区域中心为细胞撞击壁面而产生形变的区域。T型流道双出口10的入口处设置有窄缩结构9, 细胞经过窄缩结构9以使细胞更好地撞击在壁面中心。细胞经窄缩结构9后撞击在T型流道双出口10的T型流道区域的壁面, 撞击局域置于高速摄像机(300000fps)下以捕捉形变图像并传输给计算机进行处理分析; 细胞撞击壁面后的图像由原来的圆形变为椭圆形, 通过分析细胞变形后的长短轴之比 b/a 以及细胞初始直径 D 来鉴别细胞的变形能力。最终细胞由T型流道双出口10流出。

[0029] 本发明中各个流道的制备材质为聚二甲基硅氧烷(PDMS), 也可选用玻璃、环氧树脂、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚碳酸酯(PC)等光学性能良好的材料制作。原型器件通过软光刻加工工艺制备, 具体包括光刻SU-8阳模、PDMS浇注以及PDMS-玻璃键合封装等步骤。对于PDMS微流道与ITO微电极的封装, 利用真空氧等离子体键合技术实现。此外, 阳模的制备也可借助硅的湿法/深反应离子刻蚀、超精密机加工、金属电镀及感光电路板刻蚀加工等技术实现。

[0030] 如图3所示, 以特定流速经样品入口1向螺旋流道3内注入粒子悬浮液后, 因弯流道内中心线附近流体较壁面附近流体具有更高的流速, 在离心力和径向压力梯度不平衡的作用下向外流动; 同时, 基于封闭流道内的质量守恒, 靠近外壁面12处的流体将沿着螺旋流道

3的上下壁面回流,于是在垂直主流动方向上产生两个旋转方向相反的涡,称为迪恩流或二次流。此外,由于流道内流体流速从流体中心指向流道壁面呈抛物线分布,由此形成的速度梯度诱导产生一个指向流道壁面的剪切诱导升力,使得处于其中的粒子向流道壁面移动,与此同时又受到壁面和流体的共同作用,产生一个驱使粒子离开壁面的壁面诱导升力,这两种升力的合力称为惯性升力 F_L 。在惯性升力 F_L 及由迪恩流诱导产生的迪恩拽力 F_D 的共同作用下,粒子将达到稳定的平衡位置a、b处,且不同尺寸的粒子具有不同的平衡位置。

[0031] 如图4所示,在计算机中基于MATLAB编写程序生成M序列数字信号(单个周期),利用USB数据采集卡结合LabView数据采集程序将数字信号转换为电压信号后不断重复地施加到ITO电极8的一端。ITO电极8另一端得到的响应离子电流信号经电流放大器放大转换为电压信号后,采用相同的数据采集卡进行同步采样并存储为TXT文本文件。在计算机中编写MATLAB程序读取文本文件,将采集到的数字信号以M序列的周期为单位进行分解,并对每个周期内的响应信号先后进行快速M序列变换、脉冲信号截断和快速傅里叶变换得到细胞宽频阻抗信号。

[0032] 如图5所示,细胞经过窄缩结构9后,从出口处的中心撞向流道壁面;细胞未碰撞到流道壁面时,高速摄像机的拍摄的细胞图像整体呈圆形,当细胞碰撞到流道壁面时,细胞开始发生形变直至最大形变;此时,高速摄像机拍摄的细胞图像呈椭圆形。此后,细胞从壁面反弹,最后从T型流道双出口10流出。高速摄像机将图像传回计算机后由事先编制好的程序进行处理,分析细胞变形前后的尺寸关系。

[0033] 如图6所示,90 μ l/min流量下细胞撞击壁面产生了明显的变形,细胞形状由球形变为椭球形;

[0034] 如图7所示,交流信号下,白细胞和循环肿瘤细胞在1M频率下得到如图所示的阻抗谱。

[0035] 通过上述实施例可看出,本发明通过集成细胞形变性检测及细胞电阻抗检测,实现了细胞的双参量同时检测,大大减少实验及检测时间的同时对细胞特性的测定更为准确;同时,螺旋分选模块的串联进一步减少了操作时间。此外,本发明通过细胞撞击壁面产生形变,细胞受力更大,更易产生变性;此种形变方式也大大提高了检测通量,较介电泳诱导变形、原子力显微形变、微管吮吸等形变方式具有更大的检测通量及更明显的细胞变形。

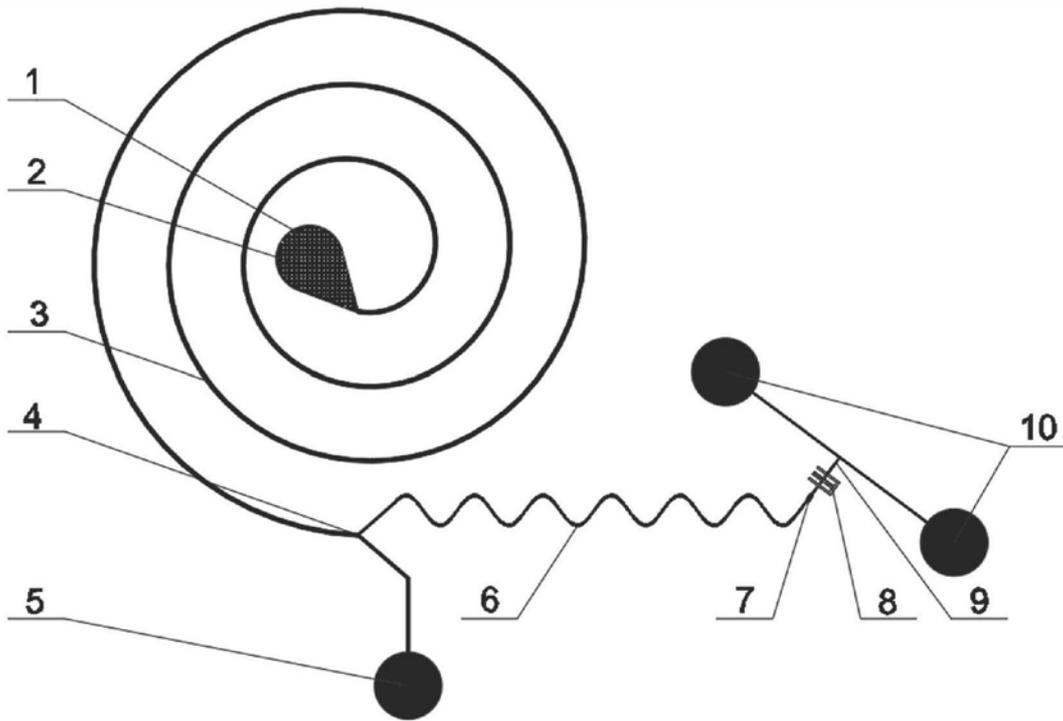


图1

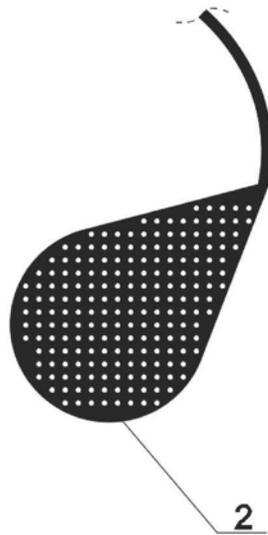


图2

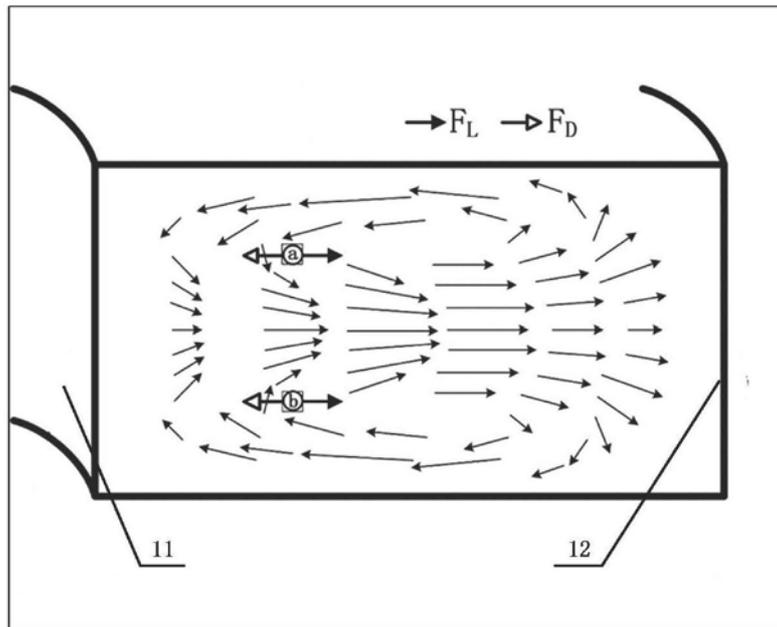


图3

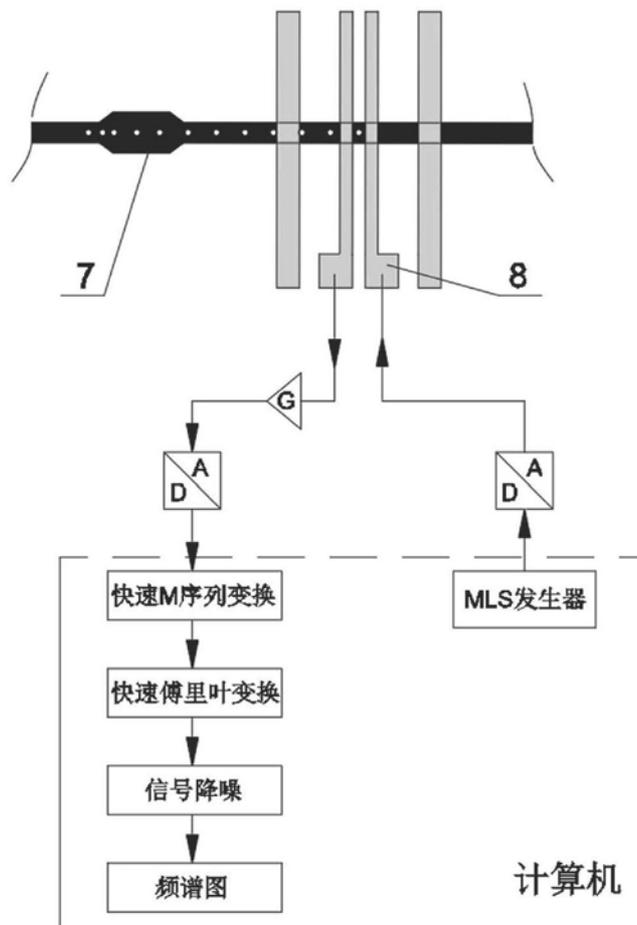


图4

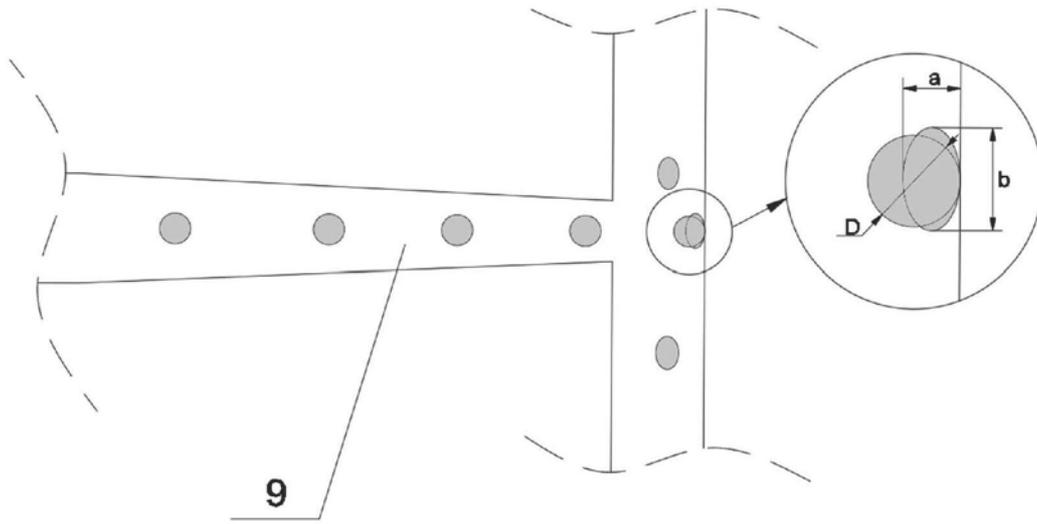


图5

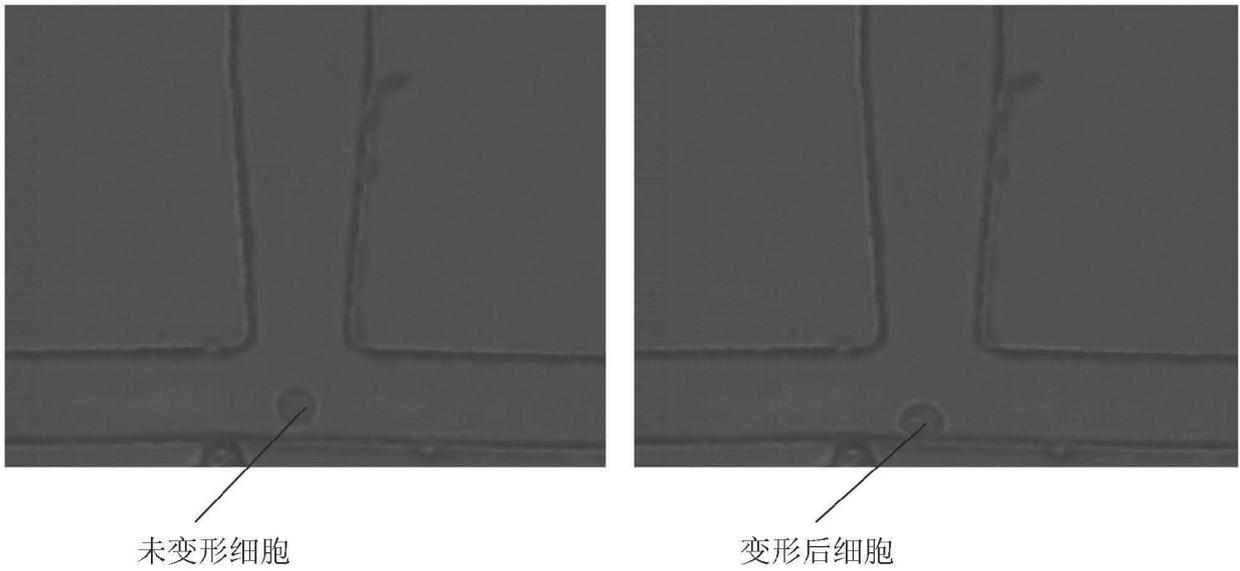


图6

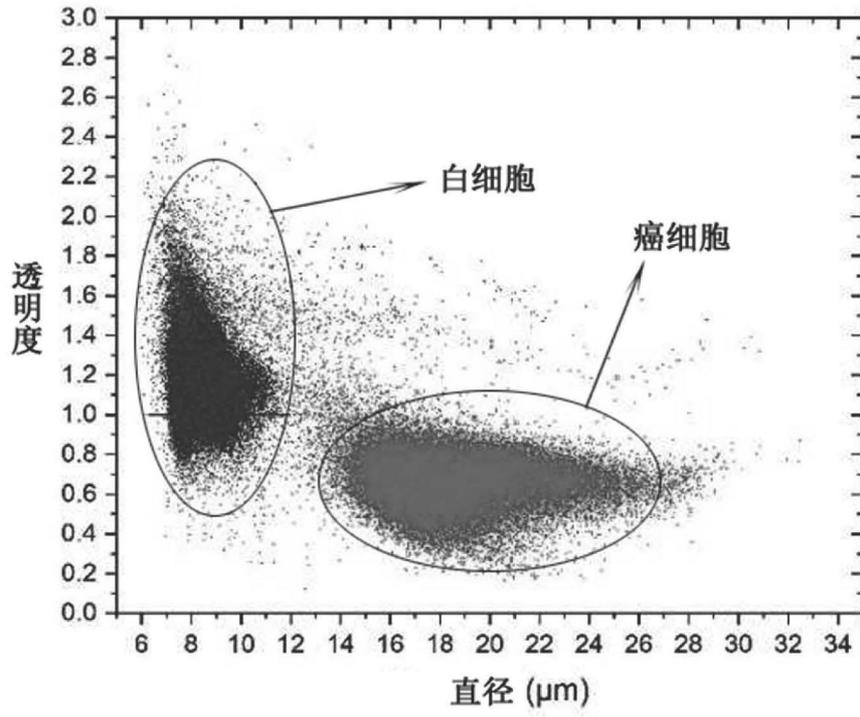


图7