



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105136763 B

(45)授权公告日 2017.10.13

(21)申请号 201510574452.5

(22)申请日 2015.09.10

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105136763 A

(43)申请公布日 2015.12.09

(73)专利权人 大连海事大学

地址 116026 辽宁省大连市高新园区凌海路1号

(72)发明人 王俊生 孟雄飞 潘新祥 孙野青 李冬青

(74)专利代理机构 大连东方专利代理有限责任公司 21212

代理人 赵淑梅 李馨

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

(56)对比文件

CN 204945045 U, 2016.01.06,

CN 2821565 Y, 2006.09.27,

CN 101923053 A, 2010.12.22,

CN 103234949 A, 2013.08.07,

CN 103529006 A, 2014.01.22,

CN 103616356 A, 2014.03.05,

TW 201516154 A, 2015.05.01,

WO 2014151658 A1, 2014.09.25,

孙润哲等.微流控芯片上样品连续介电过滤及微藻检测.《大连海事大学学报》.2013,

Z. G. Li等.Single cell membrane poration by bubble-induced microjets in a microfluidic chip.《lab on a chip》.2013,

Huabing Yin等.Microfluidics for single cell analysis.《Current Opinion in Biotechnology》.2012,

审查员 王琴

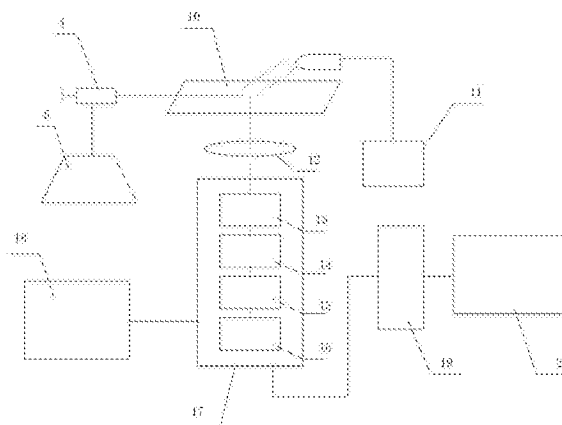
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

基于气液界面单细胞捕获及叶绿素荧光表征的单微藻细胞活性动态监测新方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于气液界面单细胞捕获及叶绿素荧光表征的单微藻细胞活性动态监测装置和监测方法,所述装置包括单个微藻细胞捕获单元和单个微藻细胞活性动态监测单元;所述单个微藻细胞捕获单元包括气泡发生装置与微流控芯片组件;所述方法,包括以下步骤:在微流控芯片捕获区域附近打出一气泡;将微藻细胞悬浮液注入微流控芯片的通道中,通过碰撞使单个微藻细胞会吸附在气泡上;对捕获的单个微藻细胞进行检测。本发明采用激光诱导叶绿素荧光的方法检测静止的微藻细胞的活性,克服了以往在检测前对微藻样品进行染色的方法所带来的缺点,具有工作量少、准确度高的特点。



CN 105136763 B

1. 基于气液界面单细胞捕获及叶绿素荧光表征的单微藻细胞活性动态监测装置, 其特征在于:

包括单个微藻细胞捕获单元和单个微藻细胞活性动态监测单元;

所述单个微藻细胞捕获单元包括气泡发生装置与微流控芯片组件;

所述气泡发生装置包括数字注射泵、注射器和密封导管; 所述微流控组件包括微流控芯片承载平台、微流控芯片; 所述微流控芯片包括进样通道, 所述进样通道两端分别设有进样口和出样口, 所述进样通道上设有与其垂直且相通的进气通道, 所述进气通道上设有注气口, 所述注气口与密封导管的另一端相连接; 所述进样通道和进气通道的交接处形成细胞捕获区域;

所述单个微藻细胞活性动态监测单元包括激光光源、荧光检测组件、红光滤光片、稳压直流电源、数据处理组件和数据传输及显示组件;

所述荧光检测组件包括光电反射阴极、电子光学输入系统、电子倍增系统、电子收集极、全封闭式挡光外壳及支架。

2. 根据权利要求1所述装置, 其特征在于: 所述数字注射泵由步进电机及其驱动器、丝杆和支架构成, 具有往复移动的丝杆、螺母, 螺母与所述注射器的活塞相连, 所述密封导管一端与所述注射器的注射口相连接。

3. 根据权利要求1所述装置, 其特征在于: 所述激光光源与支架固定在一起, 所述荧光检测组件的阴阳极与所述稳压直流电源相连接, 所述荧光检测组件的输出端与所述数据处理组件相连接, 所述数据处理组件与所述数据传输及显示组件相连接, 所述红光滤光片安装在所述全封闭式挡光外壳的上表面。

4. 根据权利要求1所述装置, 其特征在于: 所述微流控芯片承载平台为载玻片。

5. 根据权利要求1所述装置, 其特征在于: 所述进样通道宽度为200um。

6. 根据权利要求1所述装置, 其特征在于: 所述进气通道宽度为200um。

7. 基于气液界面单细胞捕获及叶绿素荧光表征的单微藻细胞活性动态监测方法, 其特征在于包括以下步骤:

①. 将微流控芯片放在倒置显微镜下, 将其与气泡发生装置连接好;

②. 在微流控芯片内注入缓冲溶液, 打开注射泵, 靠压力在微流控芯片捕获区域附近打出一气泡;

③. 将微藻细胞悬浮液注入微流控芯片的通道中, 控制注射泵的速度, 当微藻细胞流经捕获区域时, 使气泡与微藻细胞充分碰撞, 由于表面张力的存在, 单个微藻细胞会吸附在气泡上;

④. 成功捕获细胞后, 将微流控芯片放在微流控芯片承载平台上, 将其固定在单个微藻细胞活性动态监测单元上;

⑤. 打开单个微藻细胞活性动态监测单元上的各项开关, 对捕获的单个微藻细胞进行检测;

⑥. 数据处理组件对检测结果进行信号提取、采集和处理, 并将结果显示在显示屏上。

8. 根据权利要求7所述监测方法, 其特征在于: 步骤②中, 所述缓冲溶液为磷酸缓冲溶液1×PBS。

## 基于气液界面单细胞捕获及叶绿素荧光表征的单微藻细胞活性动态监测新方法装置

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基于气液界面单细胞捕获及叶绿素荧光表征单藻细胞活性动态监测技术,特别是关于基于气液界面单细胞捕获及叶绿素荧光表征单藻细胞活性动态监测新方法装置。

### 背景技术

[0002] 微藻是一类古老的低等植物,广泛地分布在海洋、淡水湖泊等水域。近年来,随船舶压载水传播的外来生物的入侵已在世界范围内造成严重的环境污染和巨大的经济损失,微藻作为外来生物中的主要生物之一,也受到越来越多的关注。而且,微藻细胞中含有多种高价值的营养成分和化工原料,藻类已经越来越多的被利用到实验当中。目前,用于检测微藻活性的方法主要有:光学显微镜法、染料荧光显微镜法、流式细胞仪法、分子及生化方法等。

[0003] 光学显微镜法是用细胞固定液固定从水中分离出来浮游植物细胞,在显微镜下直接观察浮游植物细胞的形态,根据细胞不同的形态来判断微藻细胞的活性。这种方法要求实验人员必须具备丰富的水生生物学知识,能鉴定识别常见藻类并判断活性,人为因素影响和误差较大,而且工作强度大、效率低。

[0004] 染料荧光显微镜法通过对微藻样品进行荧光染料的染色,荧光染料与微藻体内某些活性物质(如DNA等)结合,根据所染荧光强度来判断微藻的活性。这种方法克服了人为观察微藻活性的缺点,一定程度上提高了准确性;然而每种染料根据各自染色机理的不同,只能对某些藻成立,普适性差,并且染色过程繁琐,需要具有专业知识的人员进行染色,染色过程易受外界各种因素干扰,某些染料本身存在毒性。

[0005] 流式细胞仪法了用荧光染料标记微藻细胞并将其制成的悬液,利用流式细胞仪测量通过激光照射区域的悬浮溶液中微藻细胞的荧光信号和散射光信号,通过这些信号判断微藻的活性。这种方法工作效率高,具有快速准确的优点,但是商用流式细胞仪价格昂贵、体积庞大,样前处理繁琐,操作复杂,另外,藻类活性的判断依然依靠荧光染料进行,荧光染料存在的缺点仍未得到解决。

[0006] 分子及生化方法,主要包括:核酸杂交技术,聚合酶链反应(PCR)技术、基因芯片技术、DNA指纹技术、酶活性分析等。该方法具有检测灵敏度高的优点。其缺点是:对于微藻体积测量无能为力,所需设备昂贵、笨重,基本采用收集样品后拿回实验室进行培养鉴定,耗时费力,效率不高,并且进行检测的种类也相对有限。

[0007] 上述检测方法检测对象往往是一细胞群体,这往往会模糊个体细胞间存在的差异,统计平均结果不能十分准确地反映单个藻细胞活性变化的真实情况。为了更好地解析细胞生物学特性,开发用于研究单个细胞的技术势在必行。

[0008] 实现单个细胞检测的前提是细胞的捕获及固定。现有的细胞捕获技术主要借助于电场力、介电力、静压力、磁场力等操纵手段实现对细胞的灵活操纵,并将细胞捕获在微流

控芯片通道特定的位置。

[0009] 电场力捕获细胞是通过反复切换一组低电压,使带电的细胞在电场力作用下不断改变流速和方向,最终沉降至微通道底部并贴壁,这样可以控制细胞捕获在十字交叉口附近一定范围内。

[0010] 介电力捕获细胞是利用介电泳力将单个细胞捕获在微电极点阵上,当单个细胞被捕获在电极中间而占据了介电泳力最大的位置时,其余细胞由于介电泳力较小而被流动的溶液冲走。

[0011] 静压力捕获细胞是细胞在流体压力作用下向前运动并被侧通道的液流带到捕获单细胞的位置,单个细胞被捕获在侧通道口,阻止主通道液流向该方向流动,则其余细胞会被主通道液流带至下一个细胞捕获口,从而形成阵列单细胞捕获。

[0012] 磁场力捕获细胞是利用磁场力在芯片内吸附带有特定抗体的磁珠,通过磁珠和细胞的相互作用完成对细胞的捕获。

[0013] 这些细胞捕获方法往往需要外接复杂的设备,样前处理繁琐,操作步骤复杂,不能做到快速便捷的捕获单个藻细胞,不利于后续的单个微藻细胞活性检测工作的进行。

## 发明内容

[0014] 为解决现有技术存在的上述问题,本发明要提供一种利用界面张力来捕获单个微藻细胞的技术及叶绿素荧光表征的单微藻细胞活性动态监测新方法 with 装置。

[0015] 为了实现上述目的,本发明的技术发案如下:基于气液界面单细胞捕获及叶绿素荧光表征的单微藻细胞活性动态监测新方法 with 装置,它包括单个微藻细胞捕获单元和单个微藻细胞活性动态监测单元。单个微藻细胞捕获单元用于为微藻细胞检测提供平台,并从流过捕获区域的多个微藻细胞中捕获单个微藻细胞。单个微藻细胞活性动态监测单元用于检测单个微藻细胞捕获单元捕获到的单个微藻细胞的叶绿素荧光信号,并将检测到的荧光信号转换为电信号,对电信号进行放大、滤波、降噪,并通过数据处理组件对检测到的信号进行采集、处理,从而将单个微藻细胞的叶绿素荧光信号在显示器上清楚地显示出来。

[0016] 所述单个微藻细胞捕获单元包括气泡发生装置与微流控芯片组件。所述气泡发生装置包括数字注射泵、注射器和密封导管。所述数字注射泵由步进电机及其驱动器、丝杆和支架等构成,具有往复移动的丝杆、螺母,螺母与所述注射器的活塞相连,所述密封导管与所述注射器的注射口相连接。所述微流控组件包括微流控芯片承载平台、微流控芯片。所述微流控芯片包括进样口、出样口、注气口、通道和细胞捕获区域。所述注气口与所述密封导管的另一端相连接。所述进样通道两端分别设有进样口和出样口,所述进样通道上设有与其垂直且相通的进气通道,所述进气通道上设有注气口,所述注气口与密封导管的另一端相连接;所述进样通道和进气通道的交接处形成细胞捕获区域。

[0017] 所述单个微藻细胞活性动态监测单元包括激光光源、荧光检测组件、红光滤光片、稳压直流电源、数据处理组件和数据传输及显示组件。所述荧光检测组件主要由光电反射阴极、电子光学输入系统、电子倍增系统、电子收集极、全封闭式挡光外壳及支架组成。所述激光光源与支架固定在一起,所述荧光检测组件的阴阳极与所述稳压直流电源相连接,所述荧光检测组件的输出端与所述数据处理组件相连接,所述数据处理组件与所述数据传输及显示组件相连接,所述红光滤光片安装在所述全封闭式挡光外壳的上表面。

- [0018] 进一步地,在上述技术方案中,所述微流控芯片承载平台为载玻片。
- [0019] 进一步地,在上述技术方案中,所述进样通道宽度为200um。
- [0020] 进一步地,在上述技术方案中,所述进气通道宽度为200um。
- [0021] 基于气液界面单细胞捕获及叶绿素荧光表征的单微藻细胞活性动态监测新方法  
与装置的操作方法,包括以下步骤:
- [0022] ①.将所制作好的微流控芯片放在倒置显微镜下,将其与气泡发生装置连接好。
- [0023] ②.在微流控芯片内注入配制好的缓冲液,打开注射泵,靠压力在微流控芯片捕获  
区域附近打出一气泡。
- [0024] ③.将微藻(盐藻、扁藻及其他生理活性相似的藻类)细胞悬浮液注入微流控芯片  
的通道中,控制注射泵的速度,当微藻细胞流经捕获区域时,使气泡与微藻细胞充分碰撞,  
由于表面张力的存在,单个微藻细胞会吸附在气泡上。
- [0025] ④.成功捕获细胞后,将微流控芯片放在微流控芯片承载平台上,将其固定在单个  
微藻细胞活性动态监测单元上。
- [0026] ⑤.打开单个微藻细胞活性动态监测单元上的各项开关,对捕获的单个微藻细胞  
进行检测。
- [0027] ⑥.数据处理组件对检测结果进行信号提取、采集和处理,并将结果显示在显示屏  
上。
- [0028] 进一步地,在上述技术方案中,所述缓冲溶液为磷酸缓冲溶液1×PBS。
- [0029] 发明有益效果
- [0030] 1、由于本发明采用微流控芯片作为检测微藻活性的检测平台,相关的光电检测组  
件和数据处理组件体积较小,相对于大型贵重的检测设备,本发明具有结构简单、操作容易  
以及便携化等特点;
- [0031] 2、相对于以往需借助于电场力、介电力、静压力、磁场力以及空间等操纵手段实现  
对细胞的捕获,本发明利用气液界面实现对单个细胞的快速捕获,不仅克服了传统方法具  
有的设备复杂,操作繁琐、效率不高等缺点,而且简化了微流控芯片的通道结构,具有更强  
的实用性和更广泛的应用领域;
- [0032] 3、本发明采用激光诱导叶绿素荧光的方法检测静止的微藻细胞的活性,克服了以  
往在检测前对微藻样品进行染色的方法所带来的缺点,具有工作量少、准确度高的特点;
- [0033] 4、本发明实现了单个微藻细胞的活性动态监测,这是细胞检测领域的一大进步。  
现有对藻细胞活性分析的方法,通常都是是从所用样品中的细胞群体中获得统计平均结  
果,这样会模糊个体细胞间存在的差异,统计平均结果不能十分准确地反映单个藻细胞活  
性变化的真实情况。单细胞分析能更好地解析细胞生物学特性,供许多新的生物学信息,对  
于研究细胞之间的结构和性能、生命活动的规律和本质、基础医学和药物研发都具有重要  
的意义。

## 附图说明

- [0034] 图1为单个微藻细胞捕获单元的结构示意图;
- [0035] 图2为微流控芯片结构示意图;
- [0036] 图3为单个微藻细胞活性动态监测单元的结构示意图;

[0037] 图4为单个扁藻细胞经过次氯酸钠溶液处理后的荧光信号变化图；

[0038] 图5为单个盐藻细胞经过次氯酸钠溶液处理后的荧光信号变化图；

[0039] 图中：1、载玻片，2、微流控芯片，3、密封导管，4、注射器，5、注射泵，6、进样口，7、注气口，8、出样口，9、微藻细胞捕获区域，10、微流控芯片组件，11、激光光源，12、红光滤光片，13、光电反射阴极，14、电子光学输入系统，15电子倍增系统，16、电子收集极(阳极)，17、荧光检测组件，18、稳压直流电源，19、数据处理组件，20、数据传输及显示组件。

## 具体实施方式

[0040] 下面结合附图和实例对本发明作进一步描述。其中微藻实验样品由辽宁省海洋水产科学研究院提供。

[0041] 实施例1

[0042] 基于气液界面单细胞捕获及叶绿素荧光表征的单微藻细胞活性动态监测装置，包括单个微藻细胞捕获单元和单个微藻细胞活性动态监测单元。

[0043] 如图1、图2所示，单个微藻细胞捕获单元包括气泡发生装置与微流控芯片组件。

[0044] 气泡发生装置包括数字注射泵、注射器和密封导管；数字注射泵由步进电机及其驱动器、丝杆和支架构成，具有往复移动的丝杆、螺母，螺母与注射器的活塞相连，密封导管一端与注射器的注射口相连接。

[0045] 微流控组件包括微流控芯片承载平台、微流控芯片；微流控芯片包括进样通道，进样通道两端分别设有进样口6和出样口8，进样通道上设有与其垂直且相通的进气通道，进气通道上设有注气口，注气口与密封导管的另一端相连接；进样通道和进气通道的交接处形成细胞捕获区域。

[0046] 微流控芯片2载玻片1通过等离子清洗机牢固地粘合在一起，微流控芯片2的注气口7与密封导管3的一端连接，密封导管3的另一端与注射器4连接，注射器4由注射泵5精确控制，从而实现精确控制微通道内气泡的目的。捕获细胞时，将载玻片1及微流控芯片2放在显微镜下，当微藻细胞悬浮液由进样口6流经捕获区域9时，通过控制注射泵5使产生的气泡与微藻细胞相撞，由于气液界面张力微藻细胞会吸附在气泡上，从而将捕获的单个微藻细胞固定在捕获区域9的某个位置。

[0047] 单个微藻细胞活性动态监测单元包括激光光源、荧光检测组件、红光滤光片、稳压直流电源、数据处理组件和数据传输及显示组件。

[0048] 荧光检测组件包括光电反射阴极、电子光学输入系统、电子倍增系统、电子收集极、全封闭式挡光外壳及支架。

[0049] 激光光源与支架固定在一起，荧光检测组件的阴阳极与稳压直流电源相连接，荧光检测组件的输出端与数据处理组件相连接，数据处理组件与数据传输及显示组件相连接，红光滤光片安装在全封闭式挡光外壳的上表面。

[0050] 当完成单个微藻细胞捕获后，微流控芯片组件10通过微流控芯片承载平台固定在单个微藻细胞活性动态监测单元上。激光光源11采用波长为488nm的蓝光，通过支架固定在荧光检测组件17的密封挡光外壳表面。捕获区域9处的微藻细胞由于激光激发所发出的荧光经红光滤光片12滤光后打到荧光检测组件17上，荧光检测组件17会通过光电反射阴极13、电子光学输入系统14、电子倍增系统15和电子收集极(阳极)16等将荧光信号转换成电

信号给数据处理组件19进行分析处理,最后把处理后的信号送到数据传输及显示组件20并在显示屏上呈现出来。

[0051] 基于气液界面单细胞捕获及叶绿素荧光表征的单微藻细胞活性动态监测方法,包括以下步骤:

[0052] a、将微流控芯片2与载玻片1通过等离子清洗粘合在一起,将注射器4及注射泵5通过密封导管3与微流控芯片2的注气口7连接起来,连接好后将微流控芯片2与载玻片1至于荧光显微镜下。用数字移液器往芯片进样口6注入10 $\mu$ L配制好的磷酸缓冲液(1 $\times$ PBS,PH=9.0),调节注射泵(ATOM-1235N),使其在捕获区域9处打出一个气泡。用数字移液器往芯片进样口6注入10 $\mu$ L的扁藻细胞悬浮液(实验样品由辽宁省海洋水产科学研究院提供),当扁藻细胞流经捕获区域9时,通过控制注射泵5使产生的气泡与扁藻细胞相撞从而捕获单个扁藻细胞。

[0053] b、把微流控芯片2与载玻片1从显微镜上取下,通过微流控芯片承载平台固定在单个微藻细胞活性动态监测单元上。打开激光光源,调整角度使其照射到微流控芯片组件10的捕获区域9处。用数字移液器往芯片进样口6注入10 $\mu$ L的处理试剂。关闭周围光源后,打开荧光检测组件17的开关,开始对捕获的单个扁藻细胞进行活性检测。

[0054] c、检测一段时间后,关闭荧光检测组件17的开关,所测单个微藻细胞荧光信号经过数据处理组件19和数据传输及显示组件20后在显示屏上呈现出来,如图4。

[0055] 实施例2

[0056] 与实施例1的不同之处在于用盐藻细胞悬浮液替换扁藻细胞悬浮液(实验样品由辽宁省海洋水产科学研究院提供),单个盐藻细胞经过次氯酸钠溶液处理后的荧光信号变化见图5。

[0057] 上述各实施例仅用于说明本发明,其中各部件的结构、连接方式和制作工艺等都是可以有所变化的,凡是在本发明技术方案的基础上进行的等同变换和改进,均不应排除在本发明的保护范围之外。

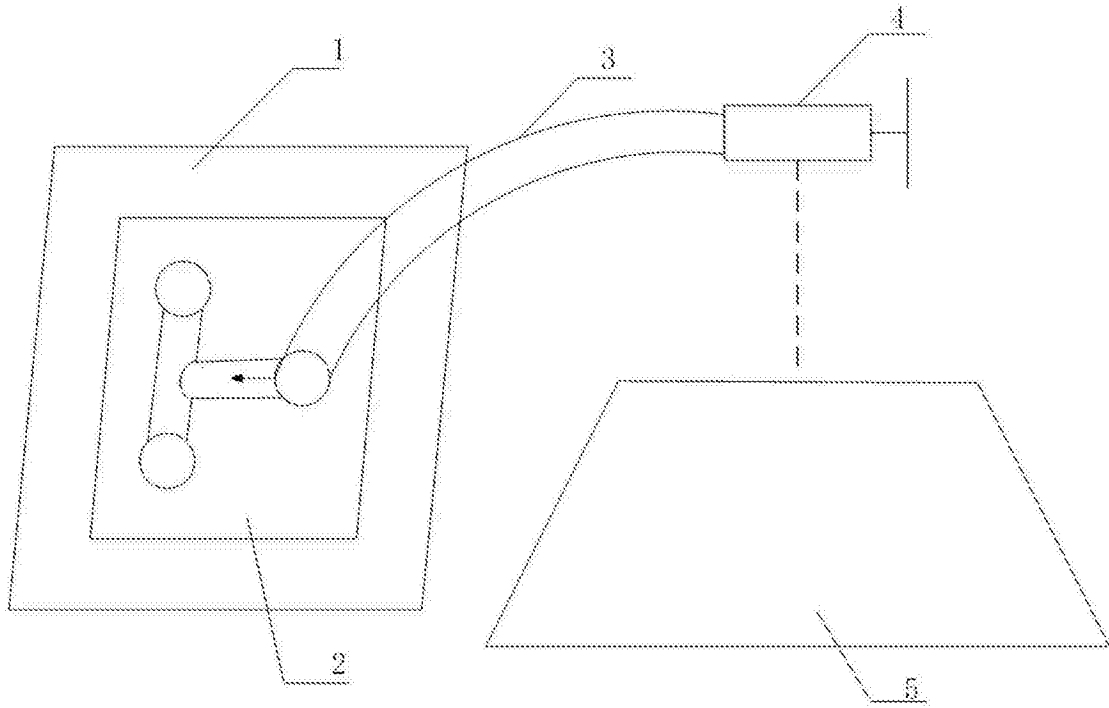


图1

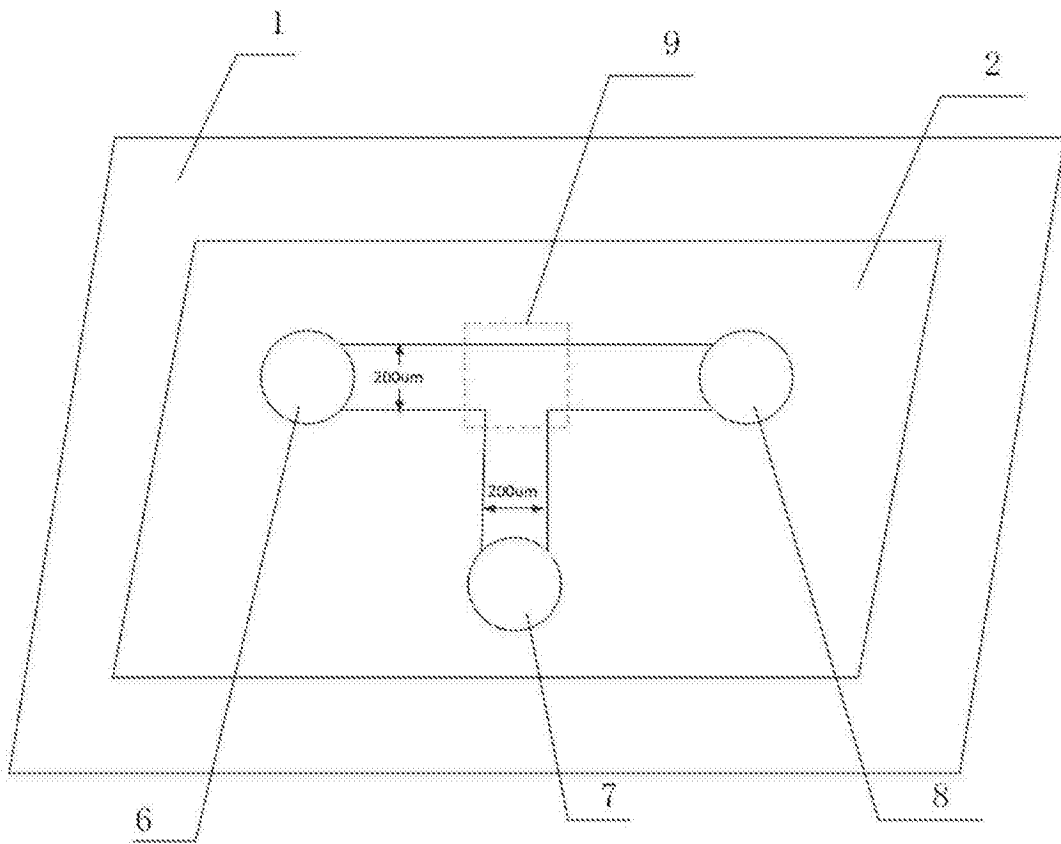


图2



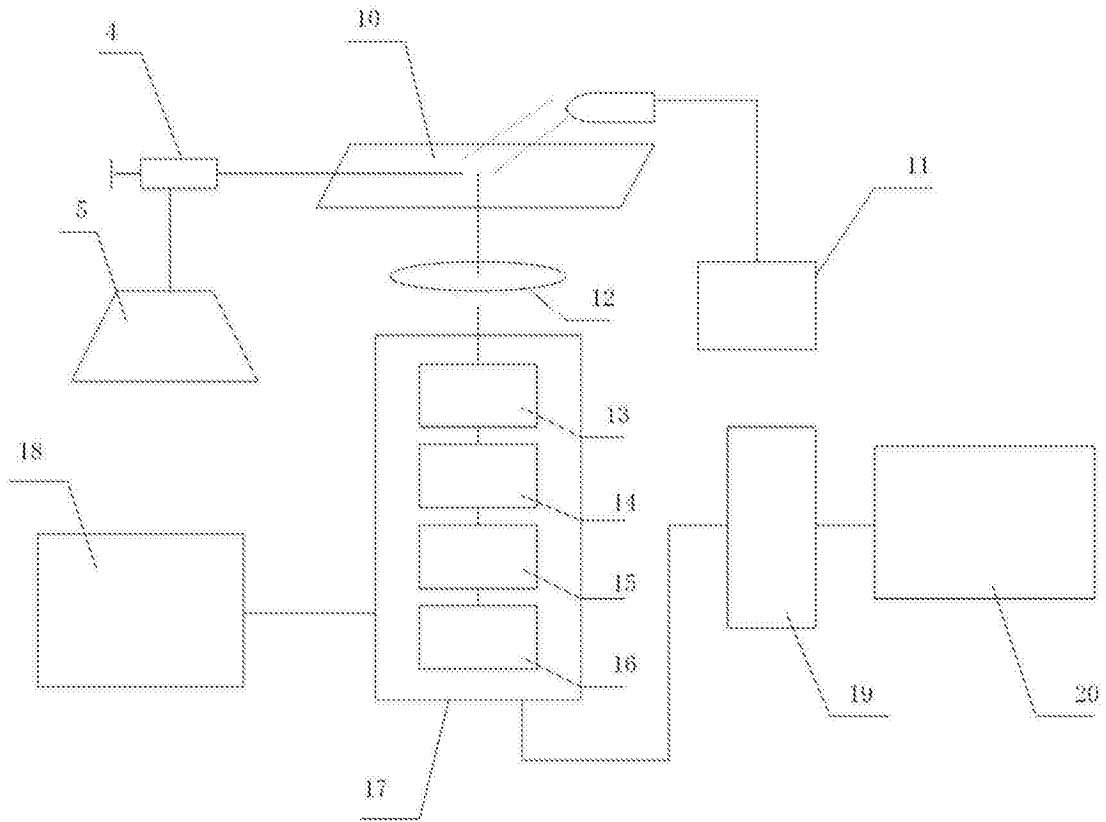


图3

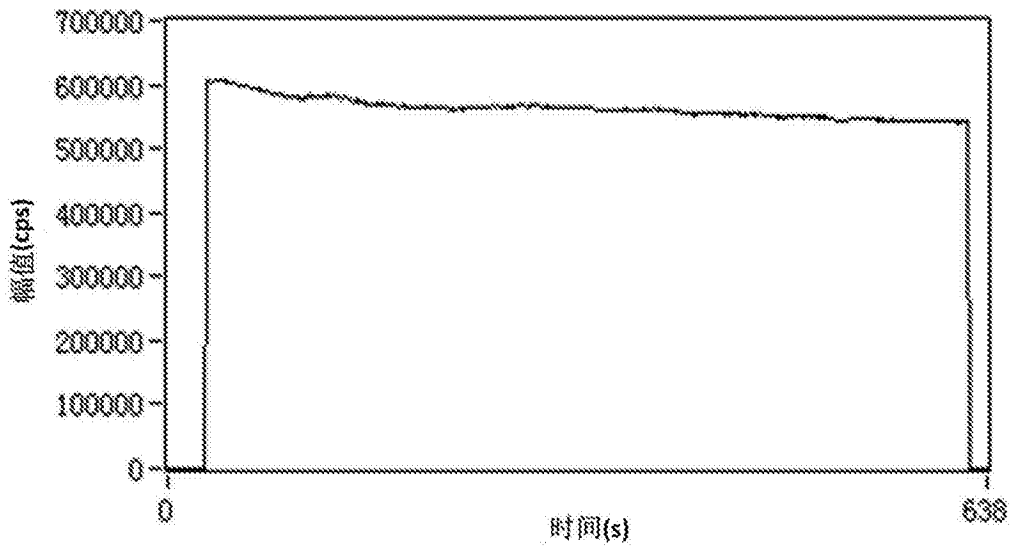


图4

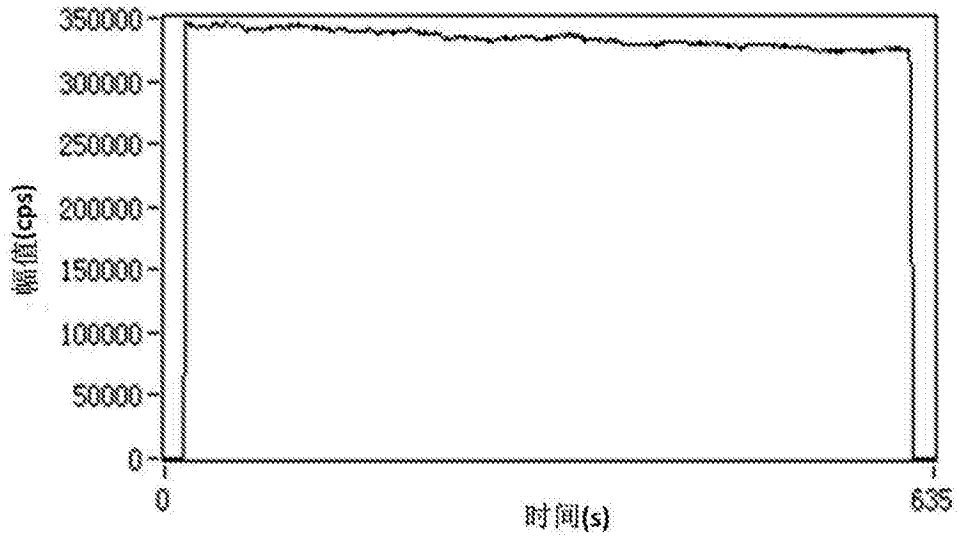


图5