



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111019805 A

(43)申请公布日 2020.04.17

(21)申请号 201911326487.1

(22)申请日 2019.12.20

(71)申请人 南通大学

地址 226019 江苏省南通市崇川区啬园路9号

(72)发明人 秦玉岭 吴丽 刘金霞 冀海伟 周晓波

(74)专利代理机构 南京瑞弘专利商标事务所 (普通合伙) 32249

代理人 秦秋星

(51)Int.Cl.

C12M 1/00(2006.01)

C12Q 1/6844(2018.01)

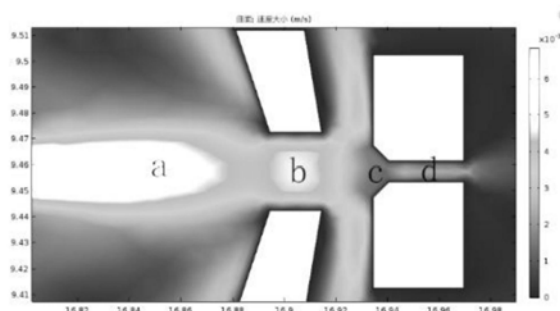
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

用于单细胞固定并原位进行医学分析的微流控芯片装置及其应用

(57)摘要

本发明提供一种用于单细胞固定并原位进行医学分析的微流控芯片及其应用,包括细胞阵列,所述细胞阵列是由若干个重复微阵列单元构成的矩阵结构,微阵列单元包括单元入口、细胞捕捉卡口、核酸扩增反应室和单元出口,核酸扩增反应室由若干个栅栏围绕而成,栅栏之间存在间隙,所述间隙只能通过细胞液、细胞分散液或核酸扩增试剂,不能通过油相;栅栏外围为导流油相的导流渠道,导流渠道分别与单元入口和单元出口连通。本发明利用该芯片构建单细胞分析平台,实现对高、低通量的单细胞的快速分选隔离,提供对细胞捕获的直观视觉认证,并能够控制单细胞核酸扩增反应的试剂体积、便利进行下游基因分析,来解决现有单细胞技术中的成本高、分析复杂的问题。



1. 一种用于单细胞固定并原位进行医学分析的微流控芯片,包括进样口、细胞阵列和出样口,所述细胞阵列是由若干个重复微阵列单元构成的矩阵结构,其特征在于,所述微阵列单元包括单元入口、细胞捕捉卡口、核酸扩增反应室和单元出口,所述核酸扩增反应室由若干个栅栏围绕而成,栅栏之间存在间隙,所述间隙只能通过细胞液、细胞分散液或核酸扩增试剂,不能通过油相;栅栏外围为导流油相的导流渠道,导流渠道分别与单元入口和单元出口连通。

2. 根据权利要求1所述的一种用于单细胞固定并原位进行医学分析的微流控芯片,其特征在于,所述栅栏结构为以位于单元入口与单元出口的中心连线为对称线的对称结构,包括位于所述中心连线两侧的横向的第一栅栏和竖向的第二栅栏;所述第一栅栏包括两段,靠近单元入口的一段向单元入口方向弯折,构成第一段导流结构,另一段平行于所述中心连线;细胞捕捉卡口位于所述中心连线上,第一段导流结构之后;所述第二栅栏与第一栅栏之间存在间隙,两个第二栅栏之间存在间隙,第二栅栏的靠近所述中心连线的一端向单元出口方向偏移,构成第二段导流结构。

3. 根据权利要求2所述的一种用于单细胞固定并原位进行医学分析的微流控芯片,其特征在于,还包括以所述中心连线为对称线对称设置的两个第三栅栏,第三栅栏位于细胞捕捉卡口的前方,其为竖向,且靠近所述中心连线的一端向细胞捕捉卡口偏移,构成第三导流结构。

4. 根据权利要求3所述的一种用于单细胞固定并原位进行医学分析的微流控芯片,其特征在于,两个所述第三栅栏远离细胞捕捉卡口的一侧呈150度夹角,将单元入口流入的水相导流至细胞卡口。

5. 权利要求1所述的微流控芯片的应用,其特征在于,包括如下步骤:

步骤1:向进样口通入细胞液,将微流控芯片内全部填充;

步骤2:细胞分散液从进样口注入;

步骤3:待细胞进样结束后,通入细胞核酸扩增所需要的试剂,将原有的细胞液全部取代;

步骤4:从出样口注入油相,油相将含有细胞的阵列单元分割成独立空间;

步骤5:待观测到进样口有油相流出后,表示进样结束,关闭油相进样器;

步骤6:用玻璃片或胶带封盖进出样口,转移芯片至后续实验。

6. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述油相为硅油。

7. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,步骤2中,细胞分散液的流速在0.5-10ul/min。

8. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,步骤3中,试剂的流速为0.5-10ul/min。

9. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,步骤4中,油相的流速为流速0.5-5ul/min。

用于单细胞固定并原位进行医学分析的微流控芯片装置及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于单细胞分析芯片领域,具体涉及一种用于单细胞固定并原位进行核酸扩增的微流控芯片装置及其应用。

背景技术

[0002] 研究细胞异质的关键就在于能否实现对单个细胞进行多参数的分析。单细胞分析技术在癌症诊疗中的研究应用还处于起步阶段,仍有许多技术问题尚待解决。

[0003] 近几年,随着相关领域一系列技术突破,“单细胞分析”才真正得以实现,如单细胞核酸样本扩增技术已经成为非常重要的基因分析手段。

[0004] 要将核酸扩增技术运用于单细胞遗传信息分析领域,建立的分析方法必须首先满足高效地分选及隔离单个细胞,以保证对稀有细胞分子生物学分析的准确性。

[0005] 其次,由于单细胞水平上的样品量极其有限(一个典型的人类细胞仅含有约6.6pg DNA、10pg总RNA),而传统的高通量分析手段往往只能基于大量细胞进行分析,得到的也是大量细胞的平均信息。因此,新发展的技术用于单细胞分析还需要满足反应试剂体积尽可能小($\leq 1\mu\text{L}$),以防止待分析的目标基因被稀释,也避免在分析过程中引入核酸污染物。

[0006] 再次,所设计的实验平台应当简单易操作,不需要复杂的设备部件,如阀门或者混合器等。

[0007] 最后,建立的方法易于做进一步的分子生物学表征,包括基因扩增、测序、蛋白质组学表达和分泌物分析等。

[0008] 常规的单细胞分离方法都或多或少的存在以下问题:1)耗时长,2)操作复杂,3)结果不可靠,4)分析效率低,6)单个细胞分析试剂量大,7)下游分子生物学分析复杂,7)大样品体积要求,8)高污染风险和/或昂贵仪器的要求。因此依赖于常规分析手段的单细胞技术研究成本非常高。

发明内容

[0009] 针对上述现有技术的不足,本发明提供一种用于单细胞固定并原位进行核酸扩增的微流控芯片装置及其应用,利用该芯片构建一个单细胞分析平台,实现对高、低通量的单细胞的快速分选隔离,提供对细胞捕获的直观视觉认证,并且能够控制单细胞核酸扩增反应的试剂体积、便利进行下游基因分析,来解决现有单细胞技术中的成本高、分析复杂的问题。

[0010] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0011] 一种用于单细胞固定并原位进行医学分析的微流控芯片,包括进样口、细胞阵列和出样口,所述细胞阵列是由若干个重复微阵列单元构成的矩阵结构,所述微阵列单元包括单元入口、细胞捕捉卡口、核酸扩增反应室和单元出口,所述核酸扩增反应室由若干个栅栏围绕而成,栅栏之间存在间隙,所述间隙只能通过细胞液、细胞分散液或核酸扩增试剂,

不能通过油-水混合相;栅栏外围为导流油相的导流渠道,导流渠道分别与单元入口和单元出口连通。每个单元入口都和相邻单元的出口相连。总进样口和出样口连接开始和末端的单元入口和出口,为水相和油相的总的流入和流出通道。

[0012] 进一步的,所述栅栏结构为以位于单元入口与单元出口的中心连线为对称线的对称结构,包括位于所述中心连线两侧的第一栅栏和竖向的第二栅栏;所述第一栅栏包括两段,靠近单元入口的一段向单元入口方向弯折,构成第一段导流结构,另一段平行于所述中心连线;细胞捕捉卡口位于所述中心连线上,第一段导流结构之后;所述第二栅栏与第一栅栏之间存在间隙,两个第二栅栏之间存在间隙,第二栅栏的靠近所述中心连线的一端向单元出口偏移,构成第二段导流结构。

[0013] 进一步的,还包括以所述中心连线为对称线对称设置的两个第三栅栏,第三栅栏位于细胞捕捉卡口的前方,其为竖向,且靠近所述中心连线的一端向细胞捕捉卡口偏移,构成第三导流结构。两个第三栅栏的外侧呈150度夹角,可以起到将进样口流入的水相导流经过细胞卡口的作用。

[0014] 上述的微流控芯片的应用,包括如下步骤:

[0015] 步骤1:向进样口通入细胞液,将微流控芯片内全部填充;

[0016] 步骤2:细胞分散液从进样口注入;

[0017] 步骤3:待细胞进样结束后,通入细胞核酸扩增所需要的试剂,将原有的细胞液全部取代;

[0018] 步骤4:从出样口注入油相,油相将含有细胞的阵列单元分割成独立空间;

[0019] 步骤5:待观测到进样口有油相流出后,表示进样结束,关闭油相进样器;

[0020] 步骤6:用玻璃片或胶带封盖进出样口,转移芯片至后续实验。

[0021] 进一步的,所述油相为硅油。

[0022] 进一步的,步骤2中,细胞分散液的流速在0.5-10微升每分钟($\mu\text{l}/\text{min}$)。

[0023] 进一步的,步骤3中,试剂的流速为0.5-10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。

[0024] 进一步的,步骤4中,油相的流速为流速0.5-5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。

[0025] 有益效果:本发明的微流芯片结构可以对进入的流体进行导流,引导细胞流经细胞卡口,由于卡口设计的尺寸小于细胞,因此可以将细胞卡住,实现单个细胞的固定。每个阵列单元只设计一个卡口,保证每个单元只有一个细胞被固定,避免核酸扩增后细胞之间的信号污染。可以根据检测的细胞的体积修改卡口尺寸(维持卡口距离比细胞直径小2-5微米(μm)即可),实现对不同细胞的分析。阵列单元设计的栅栏之间的缝隙可以保证多余的细胞可以被流体带走,而进油后由于油水界面张力存在可以阻止油进入反应室。油水不互溶可以方便的将水相的反应物隔离,避免信号污染。

[0026] 本发明成功的实现单细胞的分离固定可以直接应用于分析临床水相中悬浮的细胞样本,研究细胞之间基因层面的差异。检测细胞群体中基因异常的存在量,实现定量分析基因突变率。

[0027] 传统的孔板单细胞分析实验,单个样品需要试剂是微升(μl)量级的,本发明的芯片单个细胞分析仅需1-5纳升(nl)体积试剂。极大的降低了分析成本($<1\%$ 商业成本)。芯片内部操作,避免多步实验引入的杂质污染,提高了分析的正确率。

[0028] 本发明通过技术拓展可以很容易提高分析样本量,具有临床和商业推广价值。所

有的样本均为平行样本,可以同时进行分析。相比于商业的单独样品逐个分析,极大的缩短了分析时间成本。

[0029] 本发明的芯片装置体积小,便于存储和携带。芯片具有可视化特点,可以根据荧光信号直接得出分析结果。

附图说明

[0030] 图1微阵列单元结构示意图;

[0031] 图2为流体力学软件模拟细胞捕捉陷阱附近的速率分布图,颜色越深表示流动速率越慢;

[0032] 图3为流体力学软件模拟细胞捕捉后芯片单元结构内的速率分布,颜色的深和浅对应了流速的慢和快;

[0033] 图4为流体力学软件模拟芯片单元结构内反向进油,黑色区域代表水相,浅灰色代表油相。

具体实施方式

[0034] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步的说明。

[0035] 本发明设计了一个基于光学透明塑料(聚二甲基硅氧烷)材质的微流控芯片,该芯片包括:进样口、细胞阵列和出样口。

[0036] 进样口主要进行前期细胞溶液和核酸扩增试剂的进样和后期油相的流出。出样口主要前期进行细胞溶液和核酸扩增试剂的流出和后期油相的流入。细胞阵列是多个重复单元构成的矩阵结构。每个独立阵列单元由细胞捕捉卡口、核酸扩增反应室和导流渠道组成,每一个微阵列单元用于单个细胞的固定和原位的核酸扩增,微渠道用于液体样本的流通,最后用油将含水相的微单元隔离开。

[0037] 本发明的微流控芯片的应用包括如下步骤:

[0038] 步骤1:对芯片内所有液体接触到的表面做亲水处理。

[0039] 以聚二甲基硅氧烷-玻璃为芯片制作材质为例,利用等离子清洗设备处理材质表面,而后将二者贴合。芯片内表面为亲水表面,为防止芯片长时间的在空气中放置会导致表面由亲水性转化为疏水性,可将一定浓度的F127水溶液注入封存。

[0040] 步骤2:取干净芯片,进样口通入细胞液,将芯片内全部填充。

[0041] 步骤3:细胞分散液从进样口注入,控制流速在0.5-10ul/min。

[0042] 步骤4:可以通过显微镜观察细胞在阵列的捕捉情况,待细胞进样结束后,通入细胞核酸扩增所需要的试剂,流速0.5-10ul/min,将原有的细胞液全部取代。

[0043] 步骤5:从出样口注入硅油,流速0.5-5ul/min,根据油水不互溶原理,硅油可以将含有细胞的阵列单元分割成独立空间。

[0044] 步骤6:待观测到进样口有硅油流出后,表示进样结束,关闭进样器。

[0045] 步骤7:用玻璃片或胶带封盖进出样口,转移芯片到核酸扩增仪实施扩增实验,并进行后续荧光表征。

[0046] 利用流体模拟软件,模拟细胞、流体在设计芯片单元内的运动行为,揭示了该设计完全存在可行性。模拟流体的流速分布,可以清楚地看出液体在芯片内可以沿着设计的

路径运动,并将细胞移动到卡口,从而实现细胞固定。模拟进油后的行为,可以清楚看到油相能将水相隔离,并按照设计的渠道运动。用15 μm 尺寸的微球来模拟细胞的运动行为,结果表明微球可以完全按照设计的流体移动路线运动,最终被卡口固定。

[0047] 图1中的(1-4)分别是单元结构图的局部放大图。单元芯片设计为镜面对称。Z标记的是阵列单元的栅栏结构,目的是将内部围成一个半封闭的反应室,当外部有油存在时,和油共同组成一个封闭结构,将单细胞反应隔离。栅栏外围是导流的微渠道,目的是在进油的时候作为导流油相的流通渠道。

[0048] 其中,(1)标识的是单元入口的放大图,(2)标识的是细胞引流和固定卡口,(4)标识的是单元出口放大图。单元结构和主要距离参数标记的为:I,30 μm ;S,107 μm ;A,30 μm ;B,20 μm ;C,8 μm ;E,20 μm ;G,20 μm ;F,17 μm ;O,30 μm ;H,20 μm ;夹角M,70°。

[0049] 本芯片的材质为:上层图案部分为聚二甲基硅氧烷材质,下层为玻璃材质。二者先用等离子清洗设备处理表面,再贴合到一起,构成封闭的芯片。

[0050] 图2中,a点流速高于b点且高于d点。尽管c点流速最小,但在实际情况下,粒子从a到b处由于惯性力会继续往前运动至c位置,并停留在此位置。

[0051] 当c点被粒子占据时,会阻止流体进一步通过d位置,单细胞抓捕位点附近的流体将会沿着两侧边缘运动,确保该抓捕位点只会保留单个细胞,如图3所示。

[0052] 在适当的流速下,油相可以成功地将外围微通道的水相推动,并形成封闭的油包水微反应区间,如图4所示。(A-F)显示油相随时间变化在芯片内的移动轨迹。

[0053] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出:对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

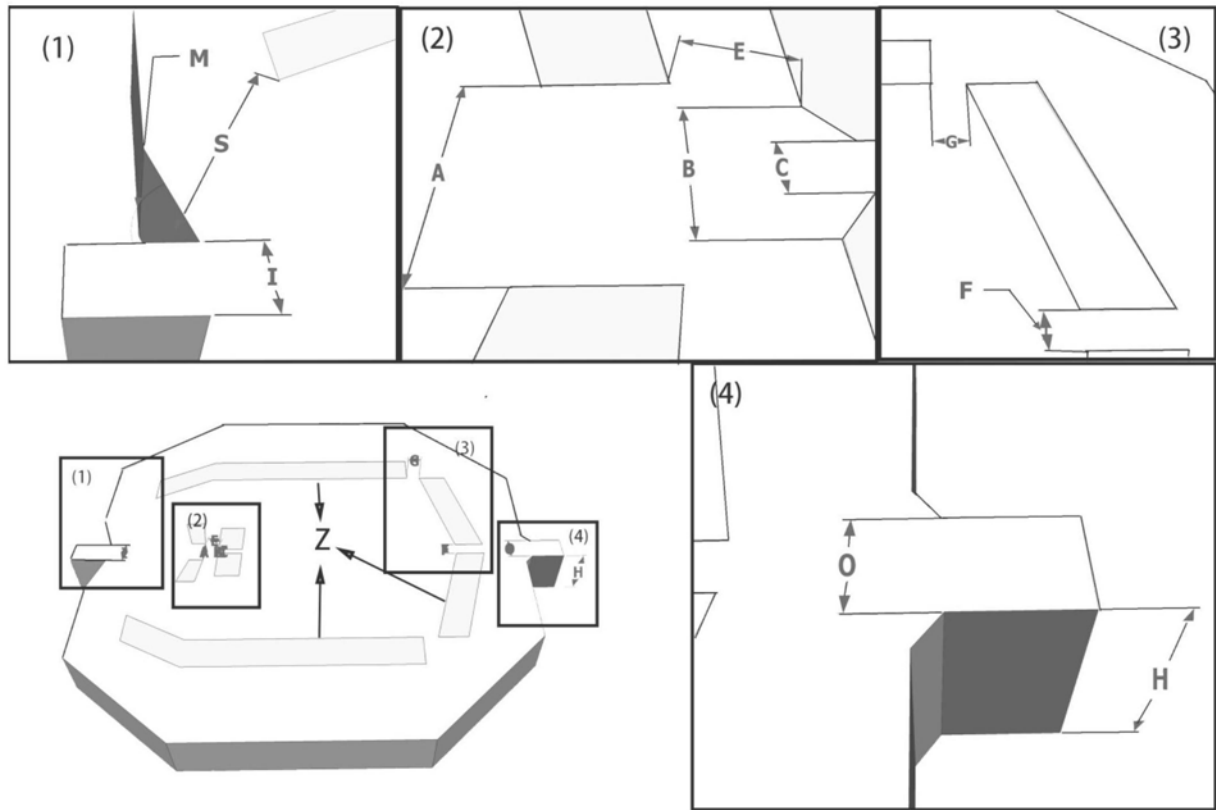


图1

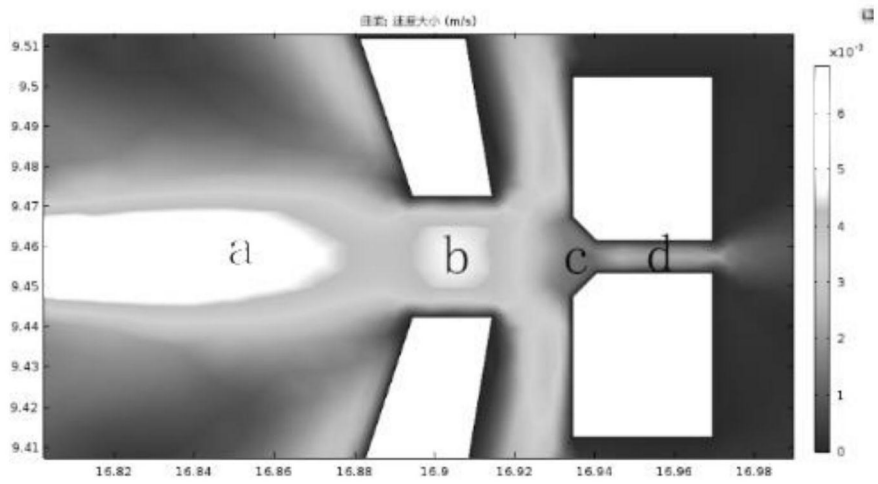


图2

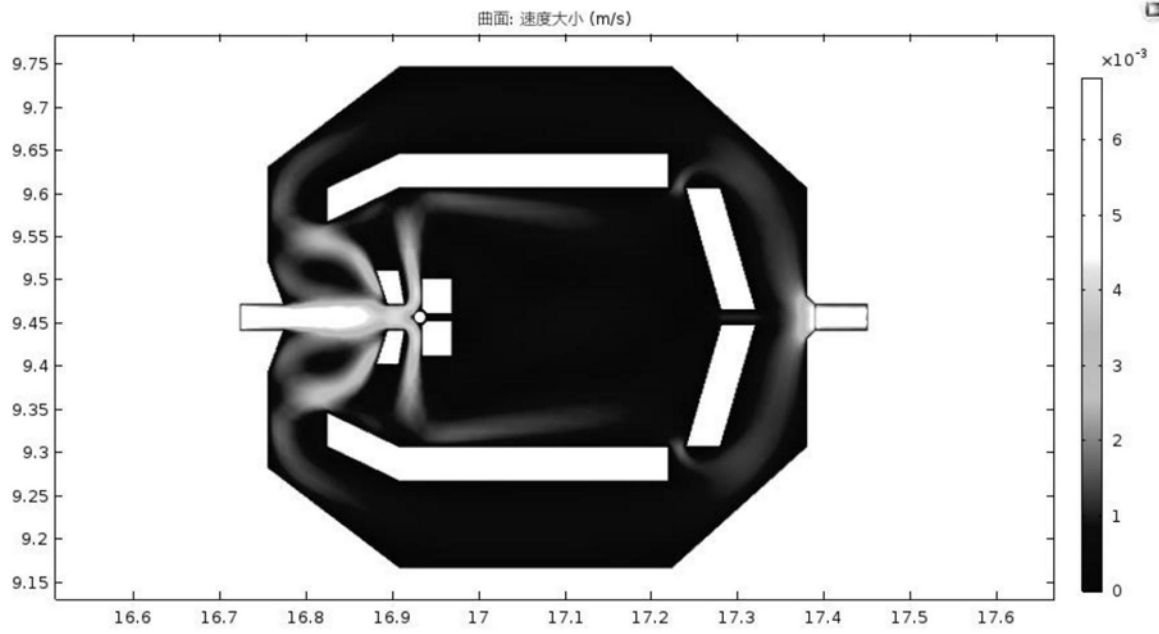


图3

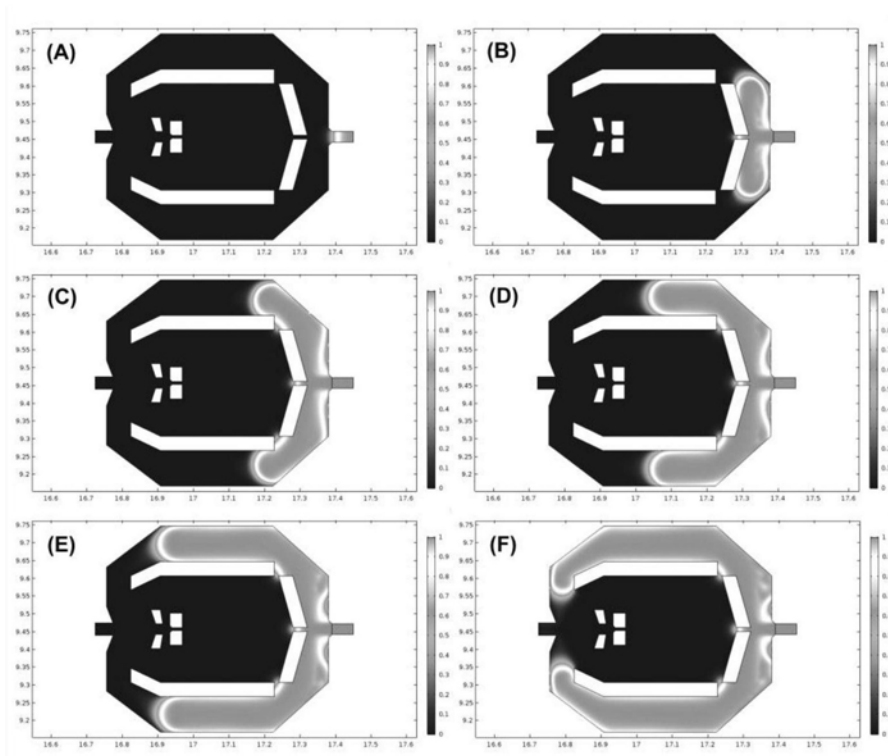


图4