



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103439241 B

(45) 授权公告日 2016.03.16

(21) 申请号 201310372705.1

(22) 申请日 2013.08.23

(73) 专利权人 东南大学

地址 210096 江苏省南京市玄武区四牌楼2号

(72) 发明人 倪中华 唐文来 项楠 严岩

(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

CN 201532352 U, 2010.07.21,

CN 202951486 U, 2013.05.29,

WO 2005105292 A1, 2005.11.10,

US 2011/0146390 A1, 2011.06.23,

David Holmes et al..Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry. 《Lab on a Chip》. 2009, 第9卷 (第20期), 2881-2889.

审查员 栾谦聪

(51) Int. Cl.

G01N 15/14(2006.01)

B01L 3/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102059161 A, 2011.05.18,

CN 202356108 U, 2012.08.01,

US 4786165 A, 1988.11.22,

CN 102183504 A, 2011.09.14,

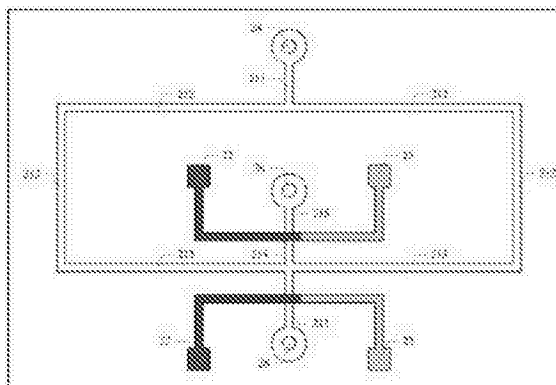
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

单细胞多参数表征的微流控芯片检测系统

(57) 摘要

本发明公开了一种用于单细胞多参数表征的微流控芯片检测系统,所述系统主要包括微流控芯片、光学检测模块、电阻抗检测模块和处理器,其中,微流控芯片由三层基片依次对准键合而成,流道层上设有两条对称的输送聚焦流道和出口流道,在两条输送聚焦流道的汇合处与出口流道形成十字结构,上下层基片的电极相对设置,形成对电极结构,两条出口流道处均设有对电极结构。本发明的系统能够实现单细胞多个参数的同时表征,提高了细胞检测的准确性和灵敏度,且无需鞘液、无需复杂的免疫标记预处理,具有成本低、操作简单、通量高以及集成化、自动化程度高等优点,本发明的检测系统可广泛用于细胞周期、细胞分化、药物筛选以及疾病早期诊断与治疗等领域。



CN 103439241 B

1. 一种单细胞多参数表征的微流控芯片检测系统,其特征在于:包括待测细胞悬浮介质、微流控芯片(11)、光学检测模块(12)、电阻抗检测模块(13)以及处理器(14);

其中,待测细胞悬浮介质为粘弹性溶液,所述粘弹性溶液通过向等渗的磷酸盐缓冲液中添加聚乙烯吡咯烷酮或聚环氧乙烷配制而成;

其中,所述微流控芯片(11)由上基片(281)、流道层(282)和下基片(283)依次对准键合而成,所述流道层(282)上设两条对称设置的输送流道(212)、聚焦流道(213)以及出口流道(215),两条输送流道(212)分别与聚焦流道(213)两端连通,出口流道(215)设置在聚焦流道(213)的中心处,且与聚焦流道(213)形成十字结构(214),所述上基片(281)设顶端电极(22),所述下基片(283)设底部电极(23),顶端电极(22)与底部电极(23)相互对齐设置,在两条出口流道(215)上下两侧均形成对电极结构,两对对电极结构对称分布于聚焦流道(213)的两侧;

其中,用于记录细胞形变的光学检测模块(12)位于微流控芯片(11)中十字槽结构(214)的正下方,并与处理器(14)连接;

其中,电阻抗检测模块(13)与微流控芯片(11)中的对电极结构连接,并将得到的电阻抗信号传输给处理器(14);

其中,所述电阻抗检测模块由相互连接的电流放大器(131)和阻抗谱仪(132)组成,其中,阻抗谱仪(132)连接微流控芯片(11)中的顶端电极(22),电流放大器(131)连接微流控芯片(11)中的底部电极(23)。

2. 根据权利要求1所述的单细胞多参数表征的微流控芯片检测系统,其特征在于:还包括进样装置(15)和废液收集装置(16),进样装置(15)和废液收集装置(16)分别通过微管(17)与微流控芯片(11)连接。

3. 根据权利要求1所述的单细胞多参数表征的微流控芯片检测系统,其特征在于:所述聚焦流道(213)为直线型流道。

## 单细胞多参数表征的微流控芯片检测系统

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微流控芯片和微纳米生物粒子操控、检测领域,具体涉及一种基于粘弹性粒子聚焦、同时进行单细胞机械性能和电学性能表征的微流控芯片检测系统。

### 背景技术

[0002] 细胞是生命活动的基本单位,独特的生物化学和生物物理学特性使其能够实现特定的功能和适应周围环境。生物物理性能在细胞的各个生物进程中具有重要作用,参与到细胞的基因表达调控、分化、迁移和代谢活动中,且细胞内的生理变化伴随着物理改性和重组。可见,物理性能是表征细胞的有效标记物,单细胞的生物物理性能分析能够阐明细胞的结构与功能,揭示细胞之间的差异性,在细胞分化、生理病理研究及疾病早期诊断与治疗中具有重要作用。

[0003] 然而,由于常规技术的检测通量低和操作流程繁琐,使得细胞的生物物理性能检测不具有实际的临床意义。与常规技术相比,微流控技术具有样品消耗少、通量高、易于集成、操作简单和响应速度快等优点,在单细胞生物物理性能检测方面具有广阔的应用前景。目前,基于微流控技术表征单细胞生物物理性能的研究主要分为两种:机械性能表征技术和电学性能表征技术。在单细胞机械性能表征方面,研究者采用微管吸吮、电学变形、光延伸、流体动力拉伸和收缩流道挤压变形等方法,分析细胞的变形能力与机械性能。而在单细胞电学性能表征方面,膜片钳、电旋转、微流控阻抗细胞仪等技术被广泛用于研究细胞的电学性能参数。这些微流控检测芯片在单细胞生物物理性能表征方面各具优势,但不能同时具有较高的检测通量和检测精度。更重要的是,已有的微流控芯片只能实现对细胞单个性能参数的分析,而细胞极具多样性,单一的表征参数不能有效的区分细胞,容易造成假阳性、假阴性等情况。

[0004] 因此,如能提出一种同时保证较高通量和精度、实现单细胞多参数表征的微流控芯片检测系统必将在一定程度上克服上述局限。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种能够实现单细胞多参数表征的微流控芯片检测系统,这种技术无需鞘液、无需复杂的免疫标记预处理,能够实现对细胞多性能参数的同时表征,具有低成本、高通量、高精度、易于实现集成化和自动化等优点。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明所采用的技术方案为:

[0007] 一种单细胞多参数表征的微流控芯片检测系统,包括微流控芯片、光学检测模块、电阻抗检测模块以及处理器;

[0008] 其中,所述微流控芯片由上基片、流道层和下基片依次对准键合而成,所述流道层上设两条对称设置的输送流道、聚焦流道以及出口流道,两条输送流道分别与聚焦流道两端连通,出口流道设置在聚焦流道的中心处,且与聚焦流道形成十字结构,所述上基片设顶端电极,所述下基片设底部电极,顶端电极与底部电极相互对齐设置,在两条出口流道上下

两侧均形成对电极结构,两对对电极结构对称分布于聚焦流道的两侧;

[0009] 其中,用于记录细胞形变的光学检测模块位于微流控芯片中十字结构的正下方,并与处理器连接;

[0010] 其中,电阻抗检测模块与微流控芯片中的对电极结构连接,并将得到的电阻抗信号传输给处理器。

[0011] 其中,还包括进样装置和废液收集装置,进样装置和废液收集装置分别通过微管与微流控芯片连接。

[0012] 其中,所述电阻抗检测模块由相互连接的电流放大器和阻抗谱仪组成,其中,阻抗谱仪连接微流控芯片中的顶端电极,电流放大器连接微流控芯片中的底部电极。

[0013] 其中,所述聚焦流道为直线型流道。

[0014] 有效收益:本发明提出的单细胞多参数表征的微流控芯片检测系统,巧妙地将细胞的机械性能和电学性能检测方法集成起来,将待测细胞悬浮在具有良好生物相容性的粘弹性溶液里注入本系统中,利用本系统的微流控芯片流道结构实现了细胞的无旋转拉伸,还完成了细胞的电学性能差分检测,再通过系统中的光学检测模块和阻抗谱仪得到了细胞的图像信息和电阻抗信号,最后通过计算机处理和分析细胞的力学、电学参数。与其他细胞检测方法相比,本发明的系统能够实现单细胞多个参数的同时表征,提高了细胞检测的准确性和灵敏度,且无需鞘液、无需复杂的免疫标记预处理,具有低成本、操作简单、通量高以及集成化、自动化程度高等优点,本发明的检测系统可广泛用于细胞周期、细胞分化、药物筛选以及疾病早期诊断与治疗等领域。

## 附图说明

[0015] 图 1 为本发明的单细胞多参数表征微流控芯片检测系统的结构示意图;

[0016] 图 2 为本发明检测系统中微流控芯片的结构示意图;

[0017] 图 3 为图 2 中十字结构的局部放大图;

[0018] 图 4 为本发明实例中聚焦流道中细胞聚焦的原理示意图;

[0019] 图 5 为本发明实例中十字结构流道处细胞流体动力拉伸变形示意图;

[0020] 图 6 为细胞进行差分电阻抗测量的示意图。

## 具体实施方式

[0021] 为更进一步阐述本发明所采取的技术手段和实际效果,以下结合附图 1-6 及较佳实施例,对本发明提出的单细胞多参数表征的微流控芯片检测系统具体结构、特征及功效进行详细说明。然而所有附图仅是供参考与说明本发明之用,并非用来对本发明加以限制。且本发明所能够使用的检测仪器、芯片材料、加工方法、微结构尺寸形状以及应用对象和领域并不局限于本实施例。

[0022] 如图 1 所示,一种单细胞多参数表征的微流控芯片检测系统,主要包括样品进样装置 15、废液收集装置 16、微流控芯片 11、光学检测模块 12、电阻抗检测模块 13 和计算机 14;样品进样装置 15 和废液收集装置 16 通过微管 17 与微流控芯片 11 相连,分别用于样品的进样和废液的收集。光学检测模块 12 由物镜 122 和高速摄像装置 123 组成,位于微流控芯片 11 中十字结构 214 的正下方,用于记录细胞的形貌情况,其通过数据线 19 将图像信息

传输到计算机 14 中；电阻抗检测模块 13 由电流放大器 131 和阻抗谱仪 132 组成，阻抗谱仪 132 通过电缆线 18 对芯片 11 施加交流激励信号，得到的响应信号首先经过电流放大器 131 将电流信号转换成电压信号，然后利用阻抗谱仪 132 对信号进行过滤、转换，再通过数据线 19 将得到的细胞阻抗信号存储到计算机 14 中；最后在计算机 14 中利用软件将得到的细胞图像信息和电阻抗信号进行分析和处理，得到细胞的大小、变形量、电阻抗幅值和相位角等参数，完成对细胞机械性能和电学性能多参数表征，进而绘制多细胞性能参数的散点图，完成具有实际意义的统计学分析，再根据得到的细胞性能参数，结合力学模型和电学模型，进一步分析得到细胞的内部组成结构和特性。

[0023] 如图 2 ~ 3 所示，所述微流控芯片 11 由三层基片依次对准键合而成，自上而下分别为上基片 281、流道层 282 和下基片 283，流道层 282 包括进口流道 211、输送流道 212、聚焦流道 213 以及出口流道 215，进口流道 211 在与输送流道 212 连接处形成两条对称的输送支流，两条输送支流分别与聚焦流道 213 两端连通，出口流道 215 设置在聚焦流道 213 的中心处，且与聚焦流道 213 形成十字结构 214，上基片 281 设顶端电极 22，下基片 283 设底部电极 23，顶端电极 22 与底部电极 23 大小相同，相互对齐设置，形成对电极结构，在两条出口流道 215 上下两侧均形成对电极结构，两对对电极结构对称分布于聚焦流道 213 的两侧；上基片 281 上还设有出口连接孔 24、入口连接孔 26，出口连接孔 24 位于出口流道 215 的出口处，入口连接孔 26 位于进口流道 211 的进口处。

[0024] 进行单细胞检测时，分散有待测细胞的粘弹性样品液以特定流速由进口流道 211 进入芯片 11，经过输送流道 212 到达聚焦流道 213 时，由于粘弹性流体的三维聚焦作用，使细胞 41 规则排列于流道中心线上，聚焦后的细胞 41 进入十字结构 214 中心时，受到两股等速流体的挤压作用发生变形，位于十字结构 214 正下方的光学检测模块 12 高速记录细胞 41 的形貌情况，随后细胞 41 离开十字结构 214，进入出口流道 215 上的对电极区域，此时电阻抗检测模块 13 对细胞 41 的电学性能进行差分检测，最后细胞 41 通过出口连接孔 24 进入废液收集装置 16。

[0025] 微流控芯片 11 中上基片 281 和下基片 283 所用材质为透明的聚二甲基硅氧烷 (PDMS)、玻璃、聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 或聚碳酸酯 (PC) 中的任意一种，流道层 282 所用材质为聚二甲基硅氧烷 (PDMS)、玻璃、环氧树脂、聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) 或聚碳酸酯 (PC) 中的任意一种，顶端电极 22 和底部电极 23 为完全相同的金属微电极，其所用材质为金或铂等。上基片 281 和下基片 283 的制作可通过结合光刻技术和磁控溅射技术实现，而流道层 282 则可利用光刻技术或其他刻蚀技术快速加工得到。为了防止流道内表面对细胞 41 的吸附，各种材质流道都需经过化学修饰等特定方式进行改性。每层基片上均设置微结构对准标记，利用体式镜进行精确堆叠操作，各层基片通过紫外 / 臭氧照射或氧等离子体处理等表面改性技术实现不可逆封装，也可利用各层基片的不同组份配比实现不可逆自键合。

[0026] 如图 4 所示，细胞 41 在微流控芯片 11 的聚焦流道 213 内实现高通量三维聚焦。当分散在粘弹性样品液中的细胞 41 进入聚焦流道 213 时，由于粘弹性介质的第一法向应力在流道的四边角和中心位置处最小，细胞 41 受到弹性力 43 作用往流道四边角与中心线迁移。但位于边角处的细胞 41 同时受到细胞变形诱导的壁面升力 42 作用而向流道中心处迁移，最终细胞 41 在流道的中心线处形成唯一的平衡位置，实现细胞 41 的高通量三维聚焦，整个过程在直线型聚焦流道 213 中完成，因此无需鞘流作用。将细胞 41 精准聚焦在流道中心线

上,排除了后续性能表征中细胞位置带来的干扰,提高了检测的精度和稳定性。细胞 41 的悬浮介质为具有良好生物相容性的粘弹性溶液,其可通过向等渗的磷酸盐缓冲液中添加聚乙烯吡咯烷酮或聚环氧乙烷配制。

[0027] 如图 5 所示,细胞 41 在拉伸流场 51 作用下的变形过程如下:当经过聚焦的细胞 41 平稳到达十字结构 214 中心时,细胞 41 承受来自入口处流体的压缩应力 52 和出口处流体的拉伸应力 53 作用发生形变。通过调节流体流速,实现不同程度的细胞变形。位于十字结构 214 正下方的光学检测模块 12,高速记录细胞 41 的变形过程。利用拉伸流场作用使细胞 41 发生变形,大大降低了对细胞 41 的损伤,同时可以方便地控制流速研究不同作用力下的细胞 41 变形。

[0028] 图 6 为细胞 41 进行差分电阻抗测量的示意图,对电极结构的顶端电极 22 施加交流激励信号,从底部电极 23 得到相应的响应信号。当细胞 41 离开十字结构 214 流向任一出口流道 215 的对电极结构处时,电阻抗检测模块 13 实时获取细胞悬浮液的电阻抗信号,同时另一个对电极结构对纯粘弹性介质进行阻抗表征,利用差分电路直接得到细胞 41 电阻抗信息,必要时,可同时施加多个频率的激励信号,能够获得细胞 41 在不同频率下的电阻抗信号,得到细胞 41 的多频率阻抗谱。由于细胞与细胞之间有一定的间隔,因此当含有细胞的悬浮液流向一对对电极结构时,流向另一对对电极结构的液体为纯粘弹性液体,即里面没有细胞的液体。

[0029] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制。应当指出:对于任何熟悉本技术领域的相关人员来说,在不脱离本发明技术实质的前提下,还可以做出若干改进和修饰,这些改进和修饰也应视为本发明的保护范围。

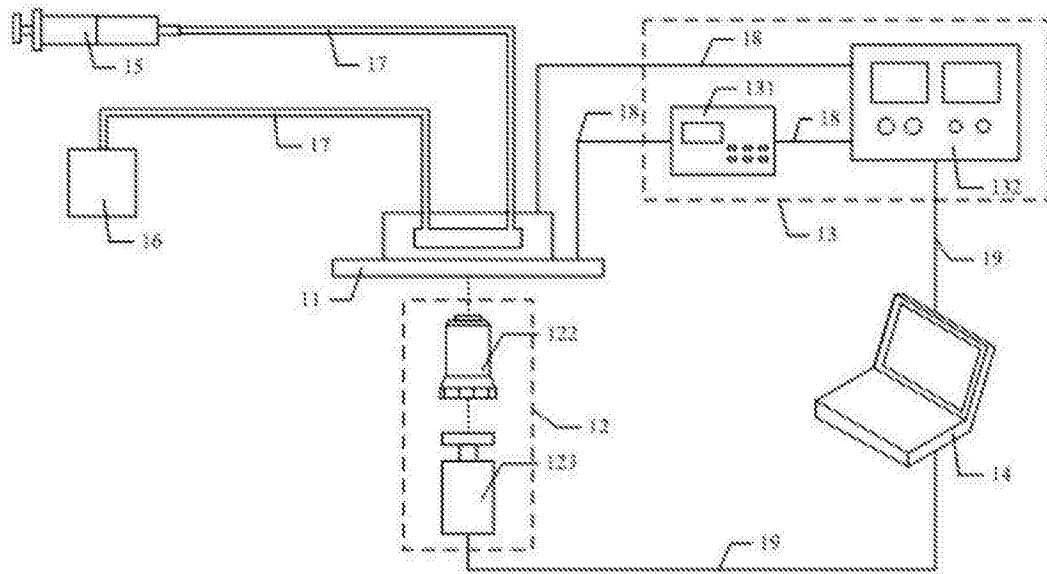


图 1

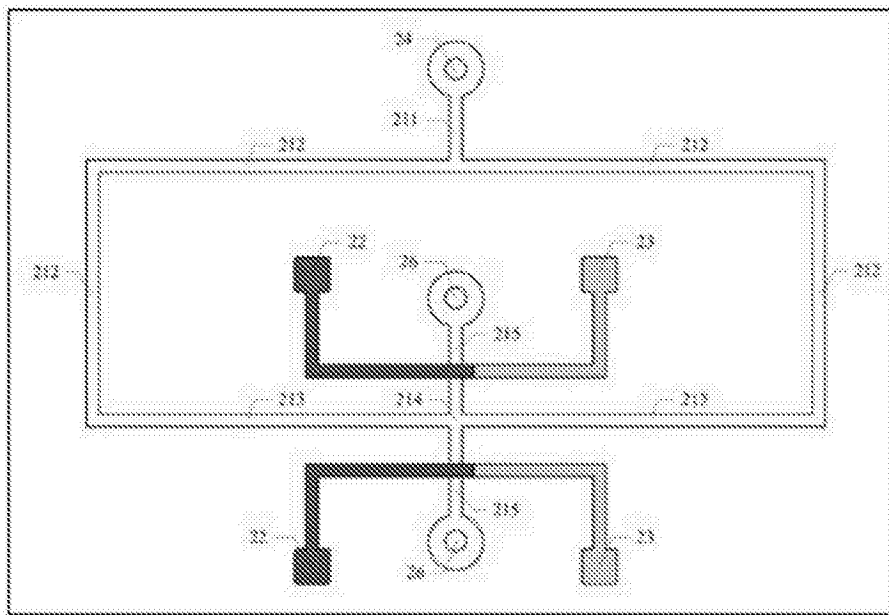


图 2

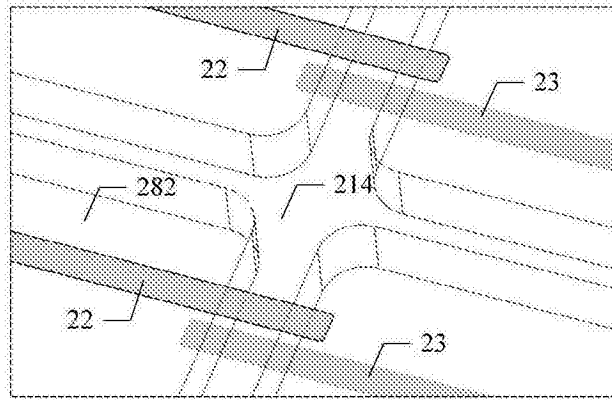


图 3

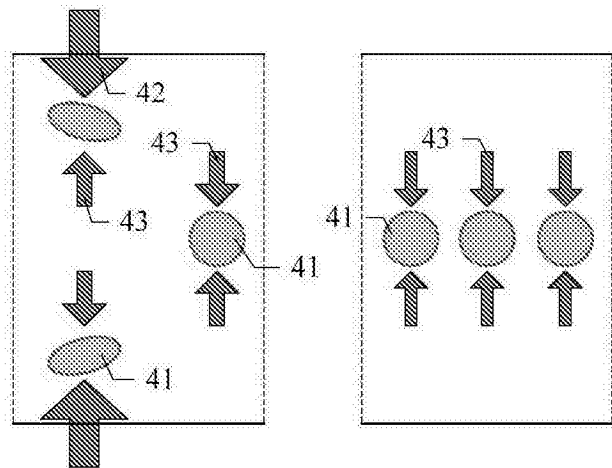


图 4

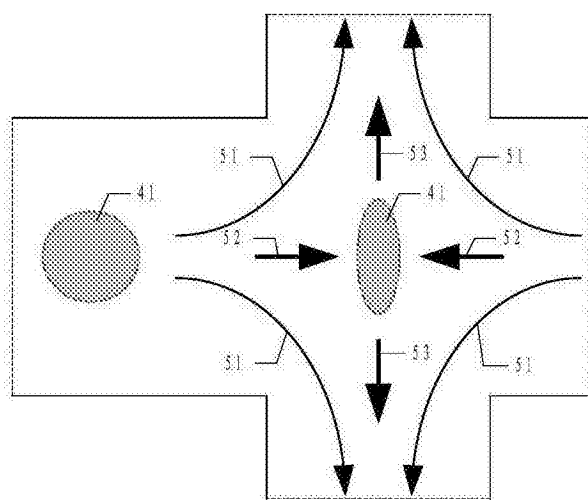


图 5



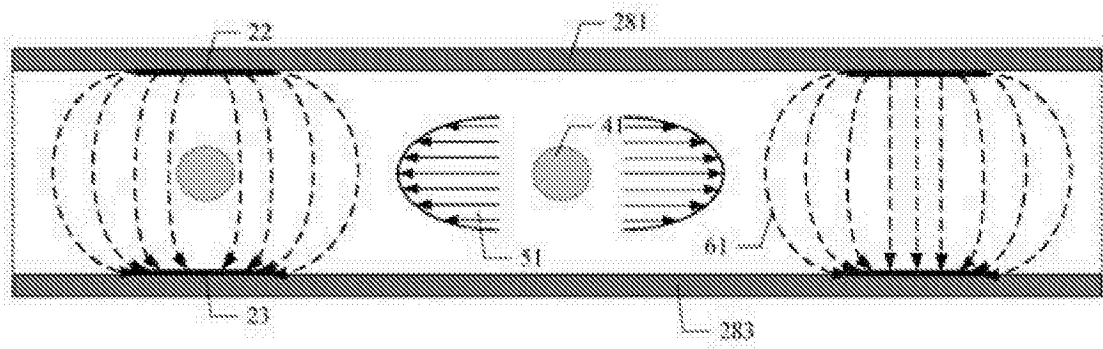


图 6