



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113567326 A

(43) 申请公布日 2021. 10. 29

(21) 申请号 202110821829.8

(22) 申请日 2021.07.19

(71) 申请人 清华大学

地址 100084 北京市海淀区清华园

(72) 发明人 王文会 丰泳翔

(74) 专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理

有限公司 11246

代理人 陈波

(51) Int. Cl.

G01N 15/10 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

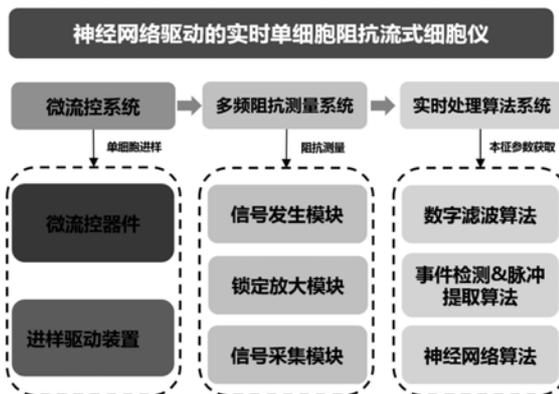
权利要求书3页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统和方法,所述测量系统包括微流控系统、多频阻抗测量系统和实时处理算法系统共三个子系统。其中,微流控系统负责完成驱动大量单细胞聚束列队高速通过测量区域;多频阻抗测量系统负责测量并采集单细胞在多个不同频点下的阻抗值;实时处理算法系统负责实现对阻抗值进行滤波、脉冲检测提取以及实时获取待测单细胞的细胞半径、细胞质电导率和细胞膜单位膜电容等本征参数。应用本发明所述的测量系统可以高通量实时单细胞电学本征参数,在生命科学仪器上具有广阔应用前景。



1. 一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统,其特征在于,包括三个子系统:微流控系统、多频阻抗测量系统和实时处理算法系统;

其中,所述微流控系统由微流控器件和进样驱动装置组成,负责完成驱动大量单细胞聚束列队高速通过测量区域;

所述多频阻抗测量系统由DDS信号发生模块、锁定放大器模块和信号采集模块组成,负责测量并采集单细胞在多个不同频点下的阻抗值;

所述实时处理算法系统由数字滤波算法、事件检测与脉冲提取算法和神经网络回归算法组成,负责实现对阻抗值进行滤波、脉冲检测提取以及实时获取待测单细胞的细胞半径、细胞质电导率和细胞膜单位膜电容这些本征参数。

2. 根据权利要求1所述的一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统,其特征在于,所述微流控系统微流控器件被芯片化设计为微流控器件芯片,所述微流控器件芯片被设计为两层,其中,底层以玻璃作为基底并配置有一对平面电极以进行阻抗检测,顶层配置有聚二甲基硅氧烷PDMS微通道,以使单细胞聚束列队依次通过检测区域,所述检测区域流道的尺寸由细胞大小决定。

3. 根据权利要求2所述的一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统,其特征在于,对于直径为8-18 μm 的哺乳动物细胞,所述测量区域流道的宽度和高度均为20 μm ;在所述测量区域的入口配置有间隔为20 μm 的柱状阵列作为片上过过滤器,并根据伯努利原理,将所述过过滤器设计为漏斗状;所述一对平面电极被配置为30 μm 长,20 μm 宽和20 μm 间距。

4. 根据权利要求2所述的一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统,其特征在于,所述微流控器件芯片的微流道层通过软光刻技术制作,利用PDMS倒模形成;所述微流控器件芯片的顶层的平面电极层是通过lift-off技术图案化到玻璃基底上,用氧等离子体处理并烘烤之后,将所述平面电极层和微通道层对准牢固地键合在一起,接着,所述平面电极与其图案匹配的定制印刷电路板焊接在一起。

5. 根据权利要求1-4任一所述的一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统,其特征在于,所述微流控系统中,细胞悬浮液进口出口通过塑料软管与流体驱动装置相连,通过流体驱动装置将细胞悬浮液推注入所述微流控器件芯片顶层的微流道。

6. 根据权利要求1所述的一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统,其特征在于,所述DDS信号发生模块为基于DDS芯片AD9958搭建的四频信号发生器;所述锁定放大器模块包括基于电流运算放大器芯片OPA657搭建的跨阻放大器TIA、基于宽带四象限电压输出乘法器AD835芯片搭建的解调器、具有5KHz截止频率的低通滤波器和由运算放大器OPA227搭建的放大器;所述信号采集模块为连接计算机的数据采集卡;所述多频阻抗测量系统最终输出的直流信号由计算机通过所述数据采集卡以20KHz的采样率进行采样获取,并在计算机上由实时处理算法系统进行后续处理。

7. 根据权利要求1所述的一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统,其特征在于,所述实时处理算法系统基于Python,Matlab和LabView混合编程,其处理过程为:首先通过数字低通滤波器对数据流进行数字滤波,以进一步提高信噪比SNR;随后在Matlab脚本中检测单细胞事件并提取相应的单细胞阻抗峰值;所提取的阻抗峰值通过TCP/IP协议发送到Python节点,以通过训练好的神经网络计算单细胞的本征参数,并将计算结果显示在图形界面中,整个处理过程。

8. 一种应用根据权利要求1-7任一所述的一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统实时测量单细胞电学本征参数的方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤S1:流道修饰,具体是将所述微流控器件芯片的微流道用1wt%,即1x PBS的Pluronic F-127表面活性剂预处理15分钟;

步骤S2:细胞进给,具体是使用注射泵将单细胞样品以 $1\mu\text{L}/\text{min}$ 的恒定流速通入微通道中,其中,在测量区域的等效速度为 $20\text{mm}/\text{s}$,从而实现超过1000个细胞/分钟的高通量;

步骤S3:信号测量,具体是当单细胞在流道中列队通过测量区域时,所产生的电信号由阻抗测量系统采集并经过实时处理算法系统求解得到单细胞本征参数;

步骤S4:将步骤S3中所得到的单细胞本征参数实时显示在用户界面上。

9. 根据权利要求8所述的实时测量单细胞电学本征参数的方法,其特征在于,步骤S3中阻抗测量系统采集电信号并经过实时处理算法系统求解得到单细胞本征参数的过程包括:

子步骤S31:用单细胞和悬浮介质的特性来表示细胞-溶液混合体系的电学特性,其复数阻抗由式(1)给出:

$$Z_{\text{mix}}^* = \frac{1}{j\omega\varepsilon_{\text{mix}}^*lk} \quad (1),$$

其中 κ 是细胞常数,取决于几何参数, l 是电极长度, $\varepsilon_{\text{mix}}^* = \varepsilon_{\text{mix}} - j\frac{\sigma_{\text{mix}}}{\omega}$ 是细胞-溶液混合体系的复介电常数,其中 σ 为电导率, ε 为介电常数, ω 为角频率,将其计算为如式(2)所示:

$$\varepsilon_{\text{mix}}^* = \varepsilon_m^* \frac{1 + 2\varphi f_{\text{CM}}^*}{1 - \varphi f_{\text{CM}}^*} \quad (2),$$

其中 ε_m^* 和 ε_c^* 是介质和细胞的复介电常数, φ 是体积分数, f_{CM}^* 是Clausius-Mossotti系数,由式(3)给出:

$$f_{\text{CM}}^* = \frac{\varepsilon_c^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_c^* + 2\varepsilon_m^*} \quad (3);$$

子步骤S32:构建当单细胞位于所述微流控器件芯片的一对平面测量电极之间时的等效电路模型ECM,其中,阻抗由溶液电阻 R_{med} 、溶液电容 C_{med} 、细胞质电阻 R_i 、细胞膜电容 C_{mem} 、双电层电容 C_{DL} 和杂散电容 C_s 组成,将细胞-溶液混合体系的阻抗表征为如式(4)所示:

$$Z_{\text{mix}}^* = \frac{R_{\text{med}}(1 + j\omega R_i C_{\text{mem}})}{j\omega R_{\text{med}} C_{\text{mem}} + (1 + j\omega R_i C_{\text{mem}})(1 + j\omega R_{\text{med}} C_{\text{med}})} \quad (4),$$

考虑到 C_s 和 C_{DL} ,将模型总阻抗表示为如式(5)所示:

$$Z_{\text{entirety}}^* = \frac{2Z_{\text{mix}}^*}{2j\omega C_s Z_{\text{mix}}^* + j\omega C_{\text{DL}} Z_{\text{mix}}^* + 2} \quad (5);$$

子步骤S33:分别以45KHz,250KHz,750KHz和1200KHz四个频率进行模型拟合和参数提取,其中45KHz和250KHz用于确定 C_{DL} 和细胞大小,750KHz用于确定细胞膜介电常数,1200KHz用于确定细胞质电导率和 C_s ;利用最小二乘法与梯度下降法,通过最小化测量阻抗值 Z_{exp}^* 与模型估计值,及模型总阻抗 Z_{entirety}^* 之间的方差确定单细胞的本征参数如式(6)所示:

$$\min_n \Sigma [Z_{\text{exp}}^*(\omega_n) - Z_{\text{entirety}}^*(\omega_n)]^2, \quad n = 1, 2, 3, 4 \quad (6);$$

步骤S34: 基于混频原理, 将步骤S33中的四个频率点的余弦信号通过加法器进行调制, 表示为如式(7)所示:

$$S(t) = \cos \omega_1 t + \cos \omega_2 t + \cos \omega_3 t + \cos \omega_4 t \quad (7),$$

再分别通过四个解调器将响应信号 $R(t)$ 解调为实电压和虚电压, 如式(8)所示:

$$\begin{cases} D_{cn}(t) = R(t) * \cos \omega_n t \\ D_{sn}(t) = R(t) * \sin \omega_n t \end{cases} \quad n = 1, 2, 3, 4 \quad (8),$$

利用跨阻放大器TIA中使用的已知参考反馈电阻 R_F 和测量系统的校准系数, 从而计算出复数阻抗。

10. 根据权利要求8所述的实时测量单细胞电学本征参数的方法, 其特征在于, 所述实时处理算法系统的处理过程包括以下序列:

序列1: 在开源框架Pytorch下搭建了一个深层全连接神经网络FCN用于处理阻抗数据流, 从而实现对单细胞本征参数的实时求解; 所述设计的FCN由五层组成, 第一层为输入层, 负责接收输入数据; 中间三层为隐藏层, 负责将输入数据映射到输出数据; 最后一层是输出层, 负责导出输出结果; 所述FCN的每一层都由多个神经元组成, 这些神经元获得前一层的加权总和, 并利用线性整流ReLU激活函数将加权总和转换为输出;

序列2: 将FCN的输入设为四频点的单细胞阻抗幅度, 输出则为本征参数, 选择均方误差函数作为损失函数计算标签值与输出值的偏差, 并通过使用随机梯度下降SGD优化器反向传播误差对FCN进行监督训练; 通过基于梯度下降算法模型拟合获得的本征参数估计值, 用作训练数据的目标标签; 完整的数据集分为占70%的训练集与占30%的测试集两个数据集, 分别用于训练和测试。

一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统及方法

技术领域

[0001] 本发明单细胞电学参数测量领域,具体涉及一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统及方法。

背景技术

[0002] 单细胞表征提供了细胞基本结构,功能信息和病理状态,在揭示细胞异质性中起着重要作用,对生命科学研究、疾病诊断和个性化医学意义重大。一直以来,荧光标记是单细胞分析和成像的主要工具,它通过对细胞标记具有分子特异性的检测标签(如荧光染料、量子点、磁珠和稳定同位素等)来识别细胞中的组分及其状态。对细胞进行荧光标记不但需要细胞特异性的先验知识,而且标记过程的侵入式操作会改变细胞状态,使分析过程复杂化,限制后续分析。相比之下,细胞的生物物理特性(如电学特性和机械特性)同样与细胞内的分子组成有关,已被证明是诊断疾病(癌症、疟疾、糖尿病和镰状细胞性贫血等)的有效生物标记,且生物物理特性表征无需标记细胞,表征过程中细胞状态基本不变,表征后细胞仍然可以进行下一步操作和分析,如分选、培养、组学分析等,因此广受关注。

[0003] 作为生物物理特性之一,细胞电学特性反映了膜形态、离子通道状态、核大小和细胞质的特征。电学特性表征的基本原理是利用电旋转、电阻抗谱和阻抗流式术,对细胞施加交流电激励,以细胞运动学或电学测量信号表征细胞的电学特性。电旋转技术中,单细胞被定位于微流控器件的多个电极中,受介电作用而发生旋转,通过拟合细胞的转速-电信号频率曲线,解算出单细胞的电学本征参数(如细胞大小,细胞质电导率和单位膜电容)。此技术对细胞的定位操作过程繁琐,测量时间较长,通量只有1个细胞/秒,且不太适用于高电导率的真实细胞缓冲液。电阻抗谱技术中,单细胞被捕获在电极中,对电极施加扫频信号并测量输出电流,得到单细胞的阻抗谱后从细胞电学模型中解算出细胞的电学本征参数。由于电信号响应快,该技术能够实现对捕获细胞的快速扫描,但是测量结果易受捕获结构的影响,通量因为捕获操作而无法提升。相比之下,阻抗流式技术中,单细胞连续高速通过电极检测区,直接以细胞的少数频点的绝对或相对阻抗值来表征其电学特性,通量高达1000个细胞/秒,但现有的基于模型拟合的本征参数解算方法耗时较长,测量系统在线使用时只能给出现象学参数(如阻抗幅度、相位和阻抗透明度)来表征单个细胞,导致测量结果高度依赖于测量平台,并且无法在不同平台之间进行比较。

[0004] 现有技术至少存在以下缺点:1)由于单细胞操作的局限性如对细胞的定位与捕获操作过程繁琐、测量时间较长,导致测量系统复杂且单细胞测量通量较低;2)阻抗流式分析技术中单细胞连续高速通过电极检测区,单频点测量导致信息不足,只能以现象学参数(如阻抗幅度、相位和阻抗透明度)来表征单个细胞,使得测量结果高度依赖于测量平台,并且无法在不同平台之间进行比较;3)在高通量背景下,传统的基于梯度下降拟合或决策树等算法计算量大、所需时间长,无法满足实时处理的需求,导致现有技术无法实现对单细胞进行高通量实时在线的电学本征参数测量。

[0005] 因此,需要寻找一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统及方法,可以提高

高通量场景下单细胞阻抗流式技术有效分析原始阻抗数据的能力,实现对单细胞的高通量实时在线电学本征参数测量。

[0006] 发明目的

[0007] 本发明的目的就在于解决现有技术中所存在的不足,提供一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统及方法,一是利用微流控技术、阻抗流式分析技术与锁定放大技术,提高单细胞电学表征系统的通量的同时降低测量系统的复杂程度;二是利用多频锁定放大原理,得到单细胞的多频阻抗并解算出电学本征参数;三是利用神经网络技术快速分析复杂的输入数据并以高精度预测输出的优势,实现对单细胞进行高通量实时在线电学本征参数测量。

发明内容

[0008] 根据本发明的一个方面,提供了一种高通量实时单细胞电学本征参数测量系统,包括共三个子系统:微流控系统、多频阻抗测量系统和实时处理算法系统;

[0009] 其中,所述微流控系统由微流控器件和进样驱动装置组成,负责完成驱动大量单细胞聚束列队高速通过测量区域;

[0010] 所述多频阻抗测量系统由DDS信号发生模块、锁定放大器模块和信号采集模块组成,负责测量并采集单细胞在多个不同频点下的阻抗值;

[0011] 所述实时处理算法系统由数字滤波算法、事件检测与脉冲提取算法和神经网络回归算法组成,负责实现对阻抗值进行滤波、脉冲检测提取以及实时获取待测单细胞的细胞半径、细胞质电导率和细胞膜单位膜电容这些本征参数。

[0012] 优选地,所述微流控系统微流控器件被芯片化设计为微流控器件芯片,所述微流控器件芯片被设计为两层,其中,底层以玻璃作为基底并配置有一对平面电极以进行阻抗检测,顶层配置有聚二甲基硅氧烷PDMS微通道,以使单细胞聚束列队依次通过检测区域,所述检测区域流道的尺寸由细胞大小决定。

[0013] 更优选地,对于直径为8-18 μm 的哺乳动物细胞,所述测量区域流道的宽度和高度均为20 μm ;在所述测量区域的入口配置有间隔为20 μm 的柱状阵列作为片上过过滤器,并根据伯努利原理,将所述过滤器设计为漏斗状;所述一对平面电极被配置为30 μm 长,20 μm 宽和20 μm 间距。

[0014] 优选地,所述微流控器件芯片的微流道层通过软光刻技术制作,利用PDMS倒模形成;所述微流控器件芯片的顶层的平面电极层是通过lift-off技术图案化到玻璃基底上,用氧等离子体处理并烘烤之后,将所述平面电极层和微通道层对准牢固地键合在一起,接着,所述平面电极与其图案匹配的定制印刷电路板焊接在一起。

[0015] 优选地,所述微流控系统中,细胞悬浮液进口出口通过塑料软管与流体驱动装置相连,通过流体驱动装置将细胞悬浮液推注入所述微流控器件芯片顶层的微流道。

[0016] 优选地,所述DDS信号发生模块为基于DDS芯片AD9958搭建的四频信号发生器;所述锁定放大器模块包括基于电流运算放大器芯片OPA657搭建的跨阻放大器TIA、基于宽带四象限电压输出乘法器AD835芯片搭建的解调器、具有5KHz截止频率的低通滤波器和由运算放大器OPA227搭建的放大器;所述信号采集模块为连接计算机的数据采集卡;所述多频阻抗测量系统最终输出的直流信号由计算机通过所述数据采集卡以20KHz的采样率进行采

样获取,并在计算机上由实时处理算法系统进行后续处理;

[0017] 优选地,所述实时处理算法系统基于Python,Matlab和LabView混合编程,其处理过程为:首先通过数字低通滤波器对数据流进行数字滤波,以进一步提高信噪比SNR;随后在Matlab脚本中检测单细胞事件并提取相应的单细胞阻抗峰值;所提取的阻抗峰值通过TCP/IP协议发送到Python节点,以通过训练好的神经网络计算单细胞的本征参数,并将计算结果显示在图形界面中,整个处理过程在实时在线模式下进行。

[0018] 根据本发明的另一个方面,提供了一种应用上述高通量实时单细胞电学本征参数测量系统实时测量单细胞电学本征参数的方法,包括以下步骤:

[0019] 步骤S1:流道修饰,具体是将所述微流控器件芯片的微流道用1wt%,即1x PBS的Pluronic F-127表面活性剂预处理15分钟;

[0020] 步骤S2:细胞进给,具体是使用注射泵将单细胞样品以1 μ L/min的恒定流速通入微通道中,其中,在测量区域的等效速度为20mm/s,从而实现超过1000个细胞/分钟的高通量;

[0021] 步骤S3:信号测量,具体是当单细胞在流道中列队通过测量区域时,所产生的电信号由阻抗测量系统采集并经过实时处理算法系统求解得到单细胞本征参数;

[0022] 步骤S4:将步骤S3中所得到的单细胞本征参数实时显示在用户界面上。

[0023] 优选地,步骤S3中阻抗测量系统采集电信号并经过实时处理算法系统求解得到单细胞本征参数的过程包括:

[0024] 子步骤S31:用单细胞和悬浮介质的特性来表示细胞-溶液混合体系的电学特性,其复数阻抗由式(1)给出:

$$[0025] \quad Z_{\text{mix}}^* = \frac{1}{j\omega\epsilon_{\text{mix}}^* l\kappa} \quad (1),$$

[0026] 其中 κ 是细胞常数,取决于几何参数, l 是电极长度, $\epsilon_{\text{mix}}^* = \epsilon_{\text{mix}} - j\frac{\sigma_{\text{mix}}}{\omega}$ 是细胞-溶液混合体系的复介电常数,其中 σ 为电导率, ϵ 为介电常数, ω 为角频率,将其计算为如式(2)所示:

$$[0027] \quad \epsilon_{\text{mix}}^* = \epsilon_m^* \frac{1+2\phi f_{\text{CM}}^*}{1-\phi f_{\text{CM}}^*} \quad (2),$$

[0028] 其中 ϵ_m^* 和 ϵ_c^* 是介质和细胞的复介电常数, ϕ 是体积分数, f_{CM}^* 是Clausius-Mossotti系数,由式(3)给出:

$$[0029] \quad f_{\text{CM}}^* = \frac{\epsilon_c^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_c^* + 2\epsilon_m^*} \quad (3);$$

[0030] 子步骤S32:构建当单细胞位于所述微流控器件芯片的一对平面测量电极之间的等效电路模型ECM,其中,阻抗由溶液电阻 R_{med} 、溶液电容 C_{med} 、细胞质电阻 R_i 、细胞膜电容 C_{mem} 、双电层电容 C_{DL} 和杂散电容 C_s 组成,将细胞-溶液混合体系的阻抗表征为如式(4)所示:

$$[0031] \quad Z_{\text{mix}}^* = \frac{R_{\text{med}}(1+j\omega R_i C_{\text{mem}})}{j\omega R_{\text{med}} C_{\text{mem}} + (1+j\omega R_i C_{\text{mem}})(1+j\omega R_{\text{med}} C_{\text{med}})} \quad (4),$$

[0032] 考虑到 C_s 和 C_{DL} ,将模型总阻抗表示为如式(5)所示:

$$[0033] \quad Z_{\text{entirety}}^* = \frac{2Z_{\text{mix}}^*}{2j\omega C_s Z_{\text{mix}}^* + j\omega C_{\text{DL}} Z_{\text{mix}}^* + 2} \quad (5);$$

[0034] 子步骤S33:分别以45KHz, 250KHz, 750KHz和1200KHz四个频率进行模型拟合和参数提取,其中45KHz和250KHz用于确定 C_{DL} 和细胞大小,750KHz用于确定细胞膜介电常数,1200KHz用于确定细胞质电导率和 C_s ;利用最小二乘法与梯度下降法,通过最小化测量阻抗值 Z_{exp}^* 与模型估计值,及模型总阻抗 Z_{entirety}^* 之间的方差确定单细胞的本征参数如式(6)所示:

$$[0035] \quad \min_n \sum [Z_{\text{exp}}^*(\omega_n) - Z_{\text{entirety}}^*(\omega_n)]^2, \quad n=1,2,3,4 \quad (6);$$

[0036] 步骤S34:基于混频原理,将步骤S33中的四个频率点的余弦信号通过加法器进行调制,表示为如式(7)所示:

$$[0037] \quad S(t) = \cos \omega_1 t + \cos \omega_2 t + \cos \omega_3 t + \cos \omega_4 t \quad (7),$$

[0038] 再分别通过四个解调器将响应信号 $R(t)$ 解调为实电压和虚电压,如式(8)所示:

$$[0039] \quad \begin{cases} D_{cn}(t) = R(t) * \cos \omega_n t \\ D_{sn}(t) = R(t) * \sin \omega_n t \end{cases} \quad n=1,2,3,4 \quad (8),$$

[0040] 利用跨阻放大器TIA中使用的已知参考反馈电阻 R_f 和测量系统的校准系数,从而计算出复数阻抗。

[0041] 优选地,所述实时处理算法系统的处理过程包括以下序列:

[0042] 序列1:在开源框架Pytorch下搭建了一个深层全连接神经网络FCN用于处理阻抗数据流,从而实现对单细胞本征参数的实时求解;所述设计的FCN由五层组成,第一层为输入层,负责接收输入数据;中间三层为隐藏层,负责将输入数据映射到输出数据;最后一层是输出层,负责导出输出结果;所述FCN的每一层都由多个神经元组成,这些神经元获得前一层的加权总和,并利用线性整流ReLU激活函数将加权总和转换为输出;

[0043] 序列2:将FCN的输入设为四频点的单细胞阻抗幅度,输出则为本征参数,选择均方误差函数作为损失函数计算标签值与输出值的偏差,并通过使用随机梯度下降SGD优化器反向传播误差对FCN进行监督训练;通过基于梯度下降算法模型拟合获得的本征参数估计值,用作训练数据的目标标签;完整的数据集分为占70%的训练集与占30%的测试集两个数据集,分别用于训练和测试。

附图说明

[0044] 图1是本发明所述高通量实时单细胞电学本征参数实时测量系统示意框图。

[0045] 图2是测量系统中微流控系统器件的结构示意图:(a)微流控器件测结构示意图;(b)微流控器件测量尺寸图。

[0046] 图3是测量系统中微流控系统器件加工示意图及示例图:(a)微流控器件加工示意图;(b)一种器件实例图。

[0047] 图4是单细胞等效电路模型及电阻抗谱:(a)单细胞等效电路模型;(b)单细胞电阻抗谱

[0048] 图5是单细胞通过测量电极产生的电信号示意图以及锁定放大器原理图:(a)单细

胞通过测量电极产生的电信号示意图；(b) 锁定放大器原理图。

[0049] 图6是测量系统中多频阻抗测量硬件系统视为示意图及软件系统处理流程图：(a) 多频阻抗测量硬件系统示意图；(b) 软件系统处理流程图。

[0050] 图7是本发明实施例所应用的神经网络结构示意图。

[0051] 图8是本发明所述高通量实时单细胞电学本征参数实时测量系统的使用流程框图。

具体实施方式

[0052] 以下结合附图详细阐述本发明的具体实施方式，本领域技术人员应当理解，此处的具体实施例仅用于示例性地描述本发明，而不应被视作对本发明保护范围的限定。

[0053] 图1是本发明所述高通量实时单细胞电学本征参数实时测量系统示意框图。由图可知，所述高通量实时单细胞电学本征参数实时测量系统包括共三个子系统：微流控系统、多频阻抗测量系统和实时处理算法系统。以下详细描述各个子系统的结构设计。

[0054] 微流控系统及其器件结构设计

[0055] 由图1可以看出，微流控系统由微流控器件与进样装置组成。图2是测量系统中微流控系统器件的结构示意图，如图2所示，考虑到制造和光学观察的便利性，本实施例中微流控器件芯片被设计为两层，结构示意图如图2(a)所示。底层以玻璃作为基底并配置有一对平面电极以进行阻抗检测，顶层则配置有聚二甲基硅氧烷(PDMS)微通道以使单细胞聚束列队依次通过检测区域，检测区域流道的尺寸由细胞大小决定。特别地，针对常见的哺乳动物细胞，在典型直径为8-18 μm 的范围时，为了实现高灵敏度且准确的单细胞电学表征并避免细胞阻塞和电流泄漏问题，如图2(b)所示，测量区域流道的宽度和高度均为20 μm 。同时为了降低发生多个细胞同时通过测量区域的可能性，测量区域的入口配置有间隔为20 μm 的柱状阵列作为片上过滤器，并根据伯努利原理设计为漏斗状从而产生压力分离距离太近的细胞。此外，通过对单细胞电学模型的分析优化的电极尺寸为30 μm 长，20 μm 宽和20 μm 间距。需要指出，给出的这个结构和尺寸并不是唯一的，可以根据应用场合进行适当调整。

[0056] 图3是测量系统中微流控系统器件加工示意图及示例图。如图3所示，微流控器件的一种制造过程如图3(a)所示。微流道层通过软光刻技术制作，利用PDMS倒模形成，电极层通过lift-off技术图案化到玻璃基底上。在用氧等离子体处理并烘烤之后，将电极层和微通道层对准牢固地键合在一起。最终，为便于施加激励信号和采集测量信号，电极与其图案匹配的定制印刷电路板焊接在一起。图3(b)为器件的实例图，细胞悬浮液进口出口通过塑料软管与流体驱动装置相连，通过流体驱动装置将细胞悬浮液推注入微流道中。

[0057] 单细胞电学参数测量原理

[0058] 本实施例中的电学本征参数测量原理可以球形单壳模型为一种实例，实际上，任何模型都可以用本系统来实现。在球形单壳模型中，细胞可以表示为被电介质膜包裹的均匀导电细胞质。当悬浮的细胞处于交流电场中时，通过麦克斯韦的混合理论(MMT)，可以用单细胞和悬浮介质的特性来表示细胞-溶液混合体系的电学特性，其复数阻抗由式(1)给出：

$$[0059] \quad Z_{\text{mix}}^* = \frac{1}{j\omega \varepsilon_{\text{mix}}^* l \kappa} \quad (1),$$

[0060] 其中 κ 是细胞常数,取决于几何参数, l 是电极长度, $\varepsilon_{\text{mix}}^* = \varepsilon_{\text{mix}} - j \frac{\sigma_{\text{mix}}}{\omega}$ 是细胞-溶液混合体系的复介电常数,其中 σ 为电导率, ε 为介电常数, ω 为角频率,将其计算为如式(2)所示:

$$[0061] \quad \varepsilon_{\text{mix}}^* = \varepsilon_m^* \frac{1 + 2\phi f_{\text{CM}}^*}{1 - \phi f_{\text{CM}}^*} \quad (2),$$

[0062] 其中 ε_m^* 和 ε_c^* 是介质和细胞的复介电常数, ϕ 是体积分数, f_{CM}^* 是Clausius-Mossotti系数,由式(3)给出:

$$[0063] \quad f_{\text{CM}}^* = \frac{\varepsilon_c^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_c^* + 2\varepsilon_m^*} \quad (3)。$$

[0064] 图4是单细胞等效电路模型及电阻抗谱,当细胞位于一对测量电极之间时,如图4(a)所示可以推导出等效电路模型ECM。在最简单的分析模型中,阻抗由溶液电阻 R_{med} ,溶液电容 C_{med} ,细胞质电阻 R_i ,细胞膜电容 C_{mem} ,双电层电容 C_{DL} 和杂散电容 C_s 组成。利用这些参数,计算细胞-溶液混合体系的阻抗如式(4)所示:

$$[0065] \quad Z_{\text{mix}}^* = \frac{R_{\text{med}}(1 + j\omega R_i C_{\text{mem}})}{j\omega R_{\text{med}} C_{\text{mem}} + (1 + j\omega R_i C_{\text{mem}})(1 + j\omega R_{\text{med}} C_{\text{med}})} \quad (4),$$

[0066] 考虑到 C_s 和 C_{DL} ,模型总阻抗表示为如式(5)所示:

$$[0067] \quad Z_{\text{entirety}}^* = \frac{2Z_{\text{mix}}^*}{2j\omega C_s Z_{\text{mix}}^* + j\omega C_{\text{DL}} Z_{\text{mix}}^* + 2} \quad (5)。$$

[0068] 如图4(b)所示,计算出的电阻抗谱具有四个区域。在第一个区域($<0.1\text{MHz}$)时,阻抗由 C_{DL} 主导,导致细胞-溶液混合体系的阻抗被淹没在高阻抗中;随着频率的增加, C_{DL} 的影响在第二个区域($0.1\text{MHz}-0.5\text{MHz}$)处呈指数下降,介电膜开始被电场穿透导致阻抗由膜电容调节,该膜的介电常数通常为 $10\text{mF}/\text{m}^2$;当频率在第三个区域($0.5\text{MHz}-5\text{MHz}$)处连续增加时,介电膜被电场完全穿透,此时细胞质的电导率在阻抗谱中占主导地位;但是,第四个区域($>5\text{MHz}$)的阻抗受 C_s 的影响,导致难以探索细胞核的性质。图4(b)展示了单细胞的电阻抗如何随本征参数的变化而变化,并为多频阻抗测量的频率选择提供了指导。根据上述讨论,本发明方法以其中四个频率(即 45KHz , 250KHz , 750KHz 和 1200KHz)为例进行模型拟合和参数提取,其中 45KHz 和 250KHz 用于确定 C_{DL} 和细胞大小, 750KHz 用于确定细胞膜介电常数, 1200KHz 用于确定细胞质电导率和 C_s 。利用最小二乘法与梯度下降法,通过最小化测量阻抗值 Z_{exp}^* 与模型估计值(模型总阻抗) Z_{entirety}^* 之间的方差确定单细胞的本征参数如式(6)所示:

$$[0069] \quad \min_n \sum [Z_{\text{exp}}^*(\omega_n) - Z_{\text{entirety}}^*(\omega_n)]^2, \quad n = 1, 2, 3, 4 \quad (6)。$$

[0070] 多频阻抗测量系统设计与原理

[0071] 细胞穿过测量区域时将替换等体积的介质并扰动电场,从而导致电路中阻抗的变化。图5是单细胞通过测量电极产生的电信号示意图以及锁定放大器原理图。如图5(a)所示,该信号具有高斯形状,其中的峰值对应于特定频率下的细胞阻抗。如图5(b)所示,阻抗测量的基本原理是将电流信号通过跨阻放大器TIA转换为电压信号,并通过锁相放大器LIA检测所得的微弱响应信号,从而实现单细胞阻抗的测量。本实施例基于混频原理单细胞测量原理中的四频点余弦信号通过加法器进行调制,表示为如式(7)所示:

$$[0072] \quad S(t) = \cos \omega_1 t + \cos \omega_2 t + \cos \omega_3 t + \cos \omega_4 t \quad (7),$$

[0073] 随后分别通过四个解调器将响应信号 $R(t)$ 解调为实电压和虚电压,如式(8)所示:

$$[0074] \quad \begin{cases} D_{cn}(t) = R(t) * \cos \omega_n t \\ D_{sn}(t) = R(t) * \sin \omega_n t \end{cases} \quad n = 1, 2, 3, 4 \quad (8),$$

[0075] 利用跨阻放大器TIA中使用的已知参考反馈电阻 R_f 和测量系统的校准系数,计算出复数阻抗。

[0076] 图6是测量系统中多频阻抗测量硬件系统示意图及软件系统处理流程图,其中,多频阻抗测量硬件系统如图6(a)所示,其用于负责产生激励信号,解调响应信号并获取输出直流信号。作为一种实例,四频信号发生器基于DDS芯片AD9958(ADI,美国)搭建,跨阻放大器TIA基于高增益带宽、低偏置电流运算放大器芯片OPA657(TI,美国)搭建,解调器基于宽带四象限电压输出乘法器AD835芯片(ADI,美国)搭建和具有5KHz截止频率的低通滤波器和放大器由高精度,低噪声运算放大器OPA227(TI,美国)搭建。最终输出的直流信号由计算机通过数据采集卡(NI,PCI-6289)以20KHz的采样率进行采样获取,并在计算机上由软件系统进行后续处理。软件系统处理流程如图6(b)所示,用于负责实时处理,显示和记录数据。软件系统基于Python,Matlab(Math Works,美国)和LabView(NI,美国)混合编程,首先通过数字低通滤波器对数据流进行数字滤波,以进一步提高信噪比(SNR),随后在Matlab脚本中检测单细胞事件并提取相应的单细胞阻抗峰值。提取的阻抗峰值通过TCP/IP协议发送到Python节点,以通过训练好的神经网络计算单细胞的本征参数,并将计算结果显示在图形界面中,整个工作流程都在实时在线模式下进行。

[0077] 实时算法设计与原理

[0078] 本实施例利用神经网络技术快速分析复杂的输入数据并以高精度预测输出的优势。图7是本实施例所应用的神经网络结构示意图,如图7所示,在开源框架Pytorch下搭建了一个深层全连接神经网络FCN用于处理阻抗数据流,从而实现单细胞本征参数的实时求解。设计的FCN由五层组成,第一层为输入层(负责接收输入数据),中间三层为隐藏层(负责将输入数据映射到输出数据),最后一层是输出层(负责导出输出结果)。每一层都由多个神经元组成,这些神经元获得前一层的加权总和,并利用线性整流ReLU激活函数将加权总和转换为输出。ReLU激活函数将非线性特性引入了神经网络系统。为了求解单细胞的本征参数,FCN的输入为四频点的单细胞阻抗幅度,输出则为本征参数,因此选择均方误差函数作为损失函数计算标签值与输出值的偏差,并通过使用随机梯度下降(SGD)优化器反向传播误差对FCN进行监督训练。通过传统的基于梯度下降算法模型拟合获得的本征参数估计值用作训练数据的目标标签。完整的数据集分为训练集(70%)与测试集(30%)两个数据集,分别用于训练和测试。在测试过程中,单细胞事件的推导时间约为0.3ms,而基于梯度下降的模型拟合方法则需要几秒钟才能解算得本征参数,从而使处理速度提高了数个数量

级,从而实现了实时在线单个细胞的本征参数求解。

[0079] 图8是本发明所述高通量实时单细胞电学本征参数实时测量系统的使用流程框图。如图所示,使用所述测量系统实时测量单细胞电学本征参数时,依次包括以下步骤:

[0080] 步骤S1:流道修饰,具体是将微通道用1wt%,即1x PBS的Pluronic F-127表面活性剂预处理15分钟;

[0081] 步骤S2:细胞进给,具体是使用注射泵将单细胞样品以 $1\mu\text{L}/\text{min}$ 的恒定流速通入微通道中,其中,在测量区域的等效速度为 $20\text{mm}/\text{s}$,从而实现超过1000个细胞/分钟的高通量;

[0082] 步骤S3:信号测量,具体是当单细胞在流道中列队通过测量区域时,所产生的电信号由阻抗测量系统采集并经过实时处理算法求解得到单细胞本征参数;

[0083] 步骤S4:将步骤S3中所得到的单细胞本征参数实时显示在用户界面上。

[0084] 在电学测量过程外,系统使用过程中也可使用配备CCD相机的倒置显微镜监视和记录细胞的运动,并通过时间戳与电信号同步,从而可以离线分析以将电阻抗信号与微观观察相关联。

[0085] 相较于现有技术,本发明具有如下优势:

[0086] 1) 利用微流控技术、阻抗流式分析技术与锁定放大技术,提高单细胞电学表征系统的通量的同时降低测量系统的复杂程度,构筑了一套样本入-结果出的单细胞表征方法和系统;

[0087] 2) 利用多频锁定放大原理,通过测量四个频点的阻抗值基于梯度下降的模型拟合方法离线解算出电学本征参数;

[0088] 3) 利用神经网络技术快速分析复杂的输入数据并以高精度预测输出的优势,将解算时间由秒级下降至亚毫秒级,实现对单细胞进行高通量实时在线电学本征参数测量。

[0089] 综上所述,本发明结合阻抗流式芯片结构设计、电学本征参数提取方法与人工智能与机器学习等数据分析方法,实现对单细胞电学特性本征参数的在线实时测量,构筑样本入-结果出的单细胞表征系统,并为后续的特异性分选与进一步的代谢组学分析构建技术基础。本发明具有多重意义,既能解决单细胞本征参数高通量实时精确测量的难题,还可为进一步通过组学研究探索细胞生物物理特性的深层次分子水平调控机制提供技术基础,推动单细胞分析向即时诊断和临床应用纵深发展。这种包含微流控技术、单细胞测量和人工智能和机器学习等多领域交叉的技术方案有望将单细胞分析提升到新的水平,对生命科学研究、疾病诊断和个性化医学具有重大意义。

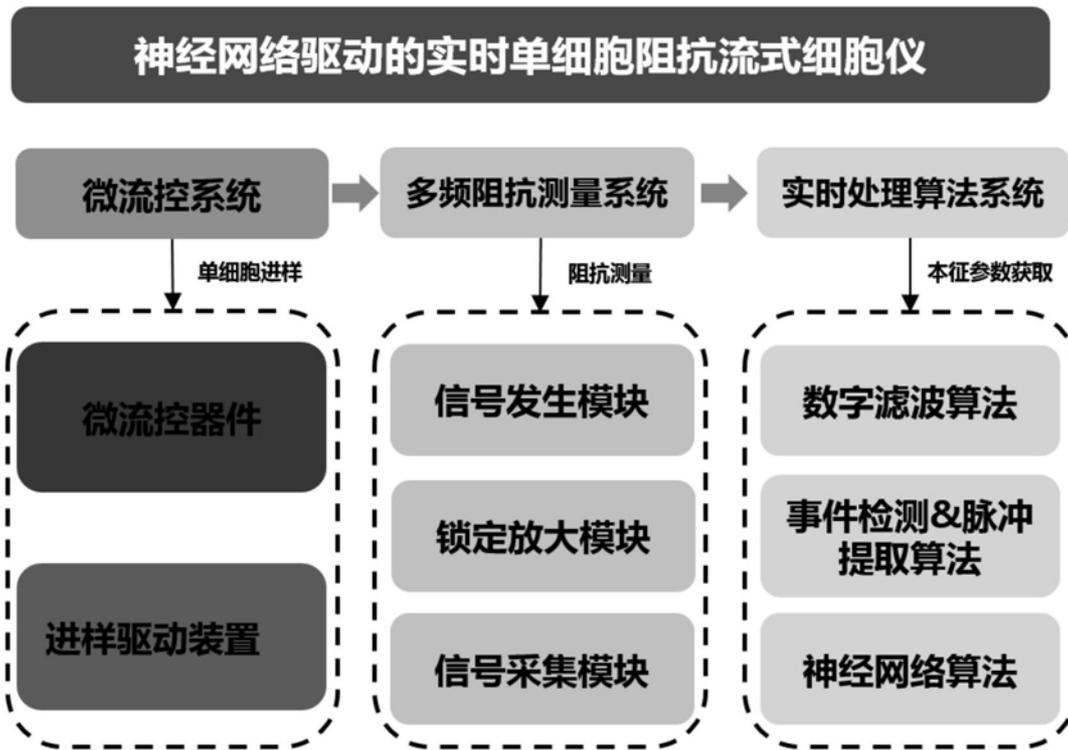


图1

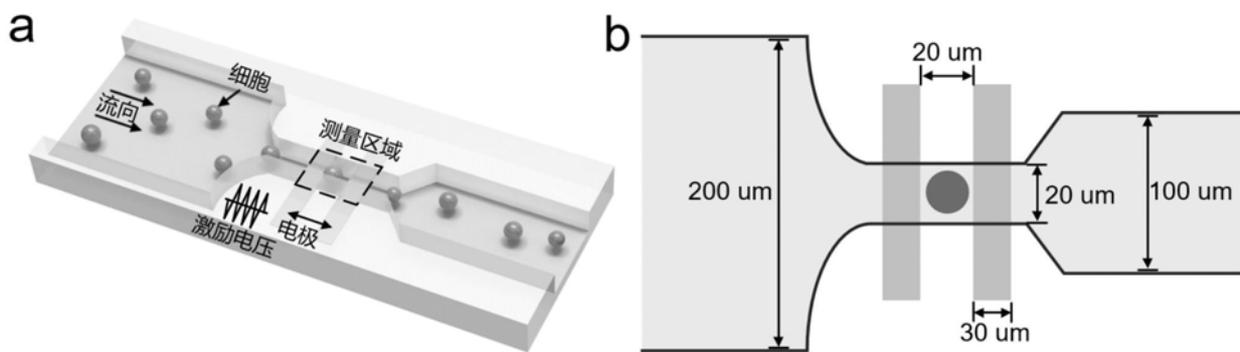


图2

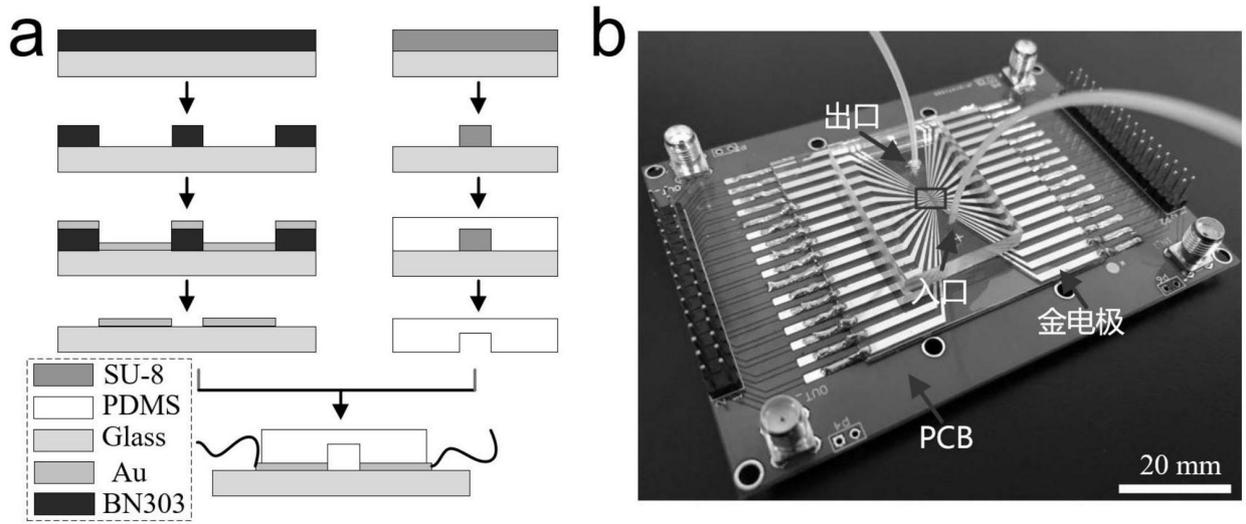


图3

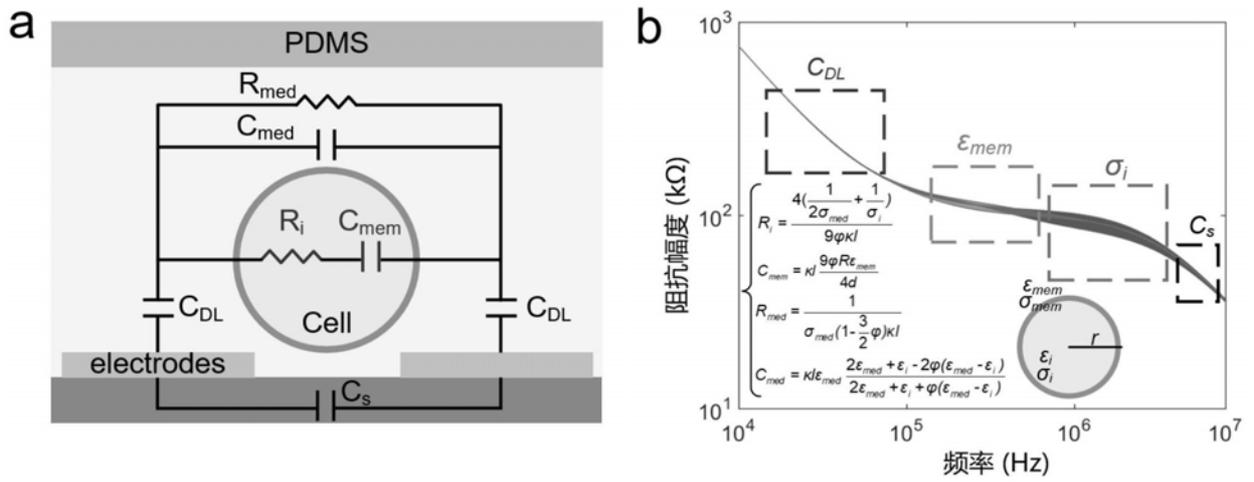


图4

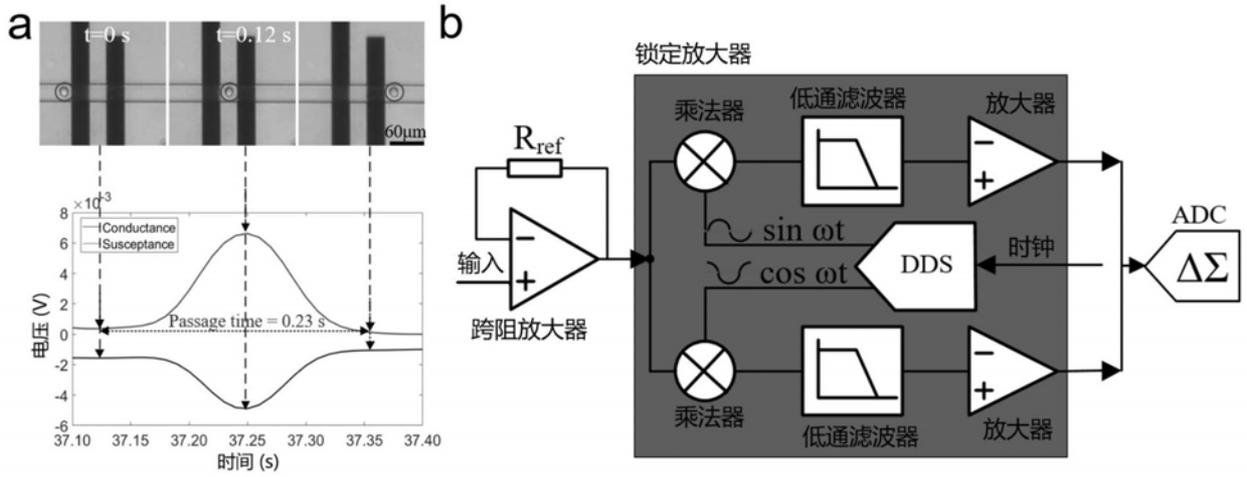


图5

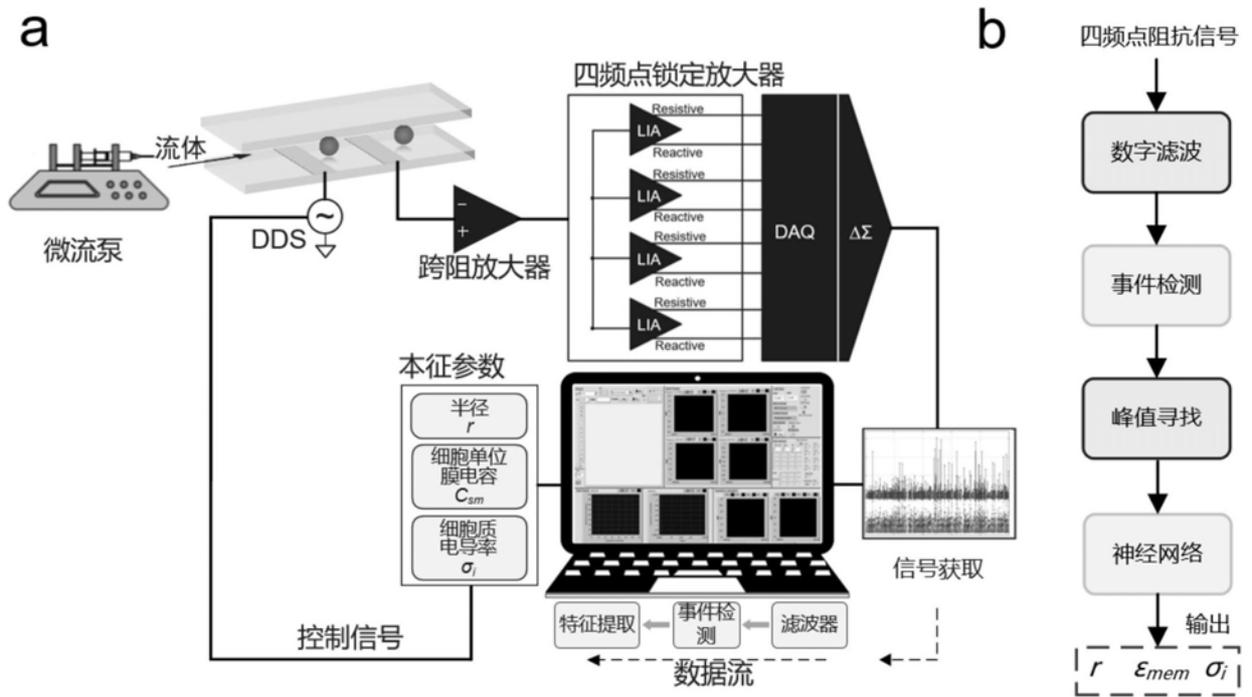


图6

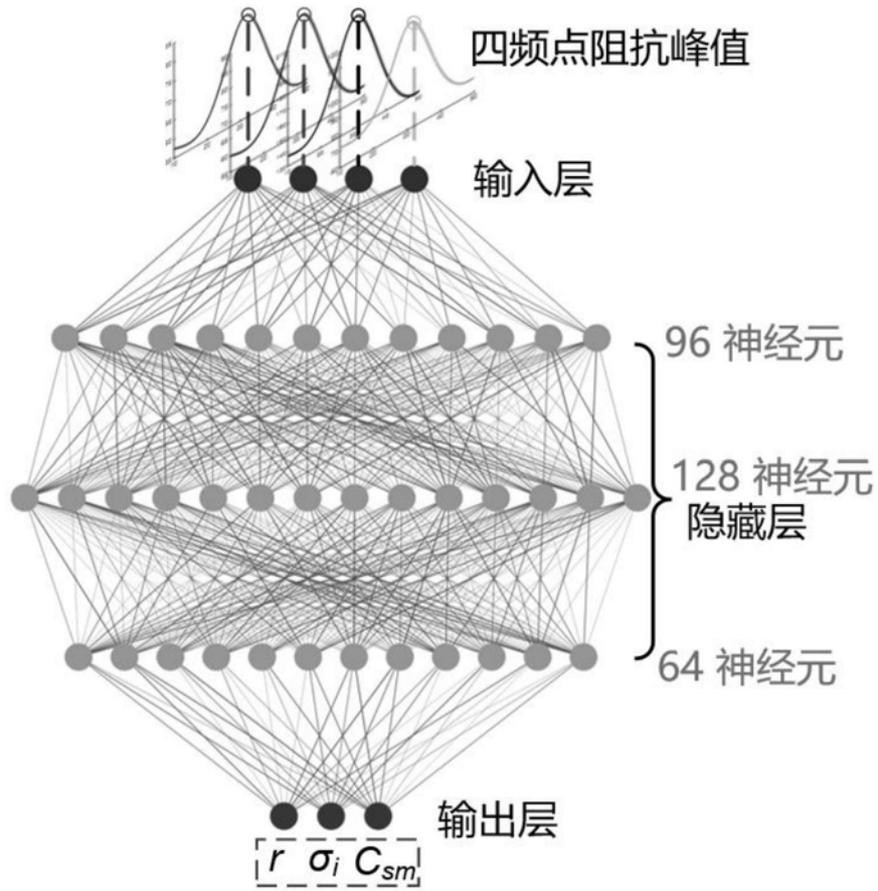


图7



图8