



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113533178 B

(45) 授权公告日 2022. 11. 11

(21) 申请号 202110870228.6

(22) 申请日 2021.07.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113533178 A

(43) 申请公布日 2021.10.22

(73) 专利权人 东南大学
地址 211100 江苏省南京市江宁区东南大
学路2号

(72) 发明人 倪中华 周正 项楠

(74) 专利代理机构 北京德崇智捷知识产权代理
有限公司 11467

专利代理师 曹婷

(51) Int. Cl.
G01N 15/14 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104251810 A, 2014.12.31

CN 111744565 A, 2020.10.09

CN 103439241 A, 2013.12.11

CN 111735853 A, 2020.10.02

US 2019344278 A1, 2019.11.14

审查员 孙钦青

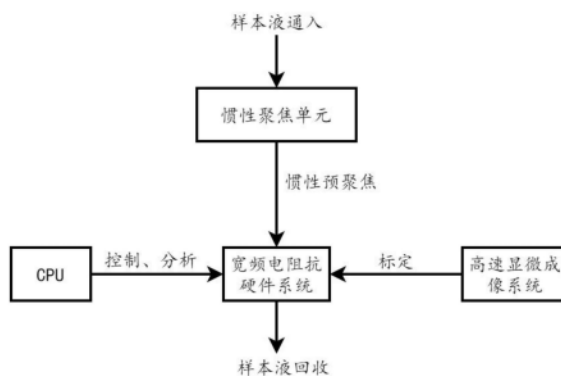
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

多物理特性融合感知的细胞流式检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种多物理特性融合感知的细胞流式检测方法,涉及细胞检测技术领域,解决了对细胞进行多物理特性检测时精度和效率都不高的技术问题,其技术方案要点是通过测量细胞形变前后电信号的差异表征细胞的多物理特性来研究剪切诱导形变机理及细胞机械特性的影响机制,可有效减少外部检测设备,简化信号的处理方式,提高细胞的检测效率。检测参量均为细胞的物理属性,方法属于非标记技术,有效避免传统免疫生化检测方法存在的操作工序复杂、特异性高、细胞损伤及检测成本高等问题。



1. 一种多物理特性融合感知的细胞流式检测方法,其特征在于,该细胞流式检测方法通过检测系统进行检测,该检测系统包括微流控芯片、高速显微成像系统和CPU,所述微流控芯片包括惯性聚焦单元和宽频电阻抗硬件系统,所述宽频电阻抗硬件系统与所述惯性聚焦单元和所述CPU都连接,所述高速显微成像系统与所述CPU连接,CPU用于对所述宽频电阻抗硬件系统和所述高速显微成像系统进行控制以完成数据交换和分析;所述高速显微成像系统位于所述宽频电阻抗硬件系统的竖直方向上,实时检测时所述高速显微成像系统与所述宽频电阻抗硬件系统同步工作,该细胞流式检测方法包括:

通过所述惯性聚焦单元对检测细胞进行预聚焦,得到聚焦细胞;

通过所述高速显微成像系统提取所述聚焦细胞的形状信息、形变信息和位置信息,并计算聚焦细胞的第一物理特性和第一机械特性,在预实验中通过所述第一物理特性和所述第一机械特性对所述聚焦细胞进行标定;其中,高速显微成像系统用于捕获和量化细胞的实际形变量,由高速显微成像系统拍摄细胞变形后的图像并传输到CPU中进行处理分析,优化选择用于形变评价的最佳电信号参量,建立电信号与细胞机械特性之间的定量映射关系;

通过所述宽频电阻抗硬件系统获取标定后的所述聚焦细胞的数量、体积及多频率下的电指纹参量,获得聚焦细胞的第二物理特性;并采用流体的剪切效应完成聚焦细胞的高通量可控自变形,然后通过电信号差异的量化来表征聚焦细胞的第二机械特性;

CPU通过选择不同工作模式对所述第一物理特性、所述第二物理特性、所述第一机械特性和所述第二机械特性中的任意一种特性或多种特性进行采集和分析,实现对聚焦细胞的鉴别;

其中,所述电指纹参量包括多场耦合下所述聚焦细胞的电学特性,包括幅值、相位和不透明度;所述电信号差异包括峰值差异和峰宽差异。

2. 如权利要求1所述方法,其特征在于,所述惯性聚焦单元包括由两片PVC塑料基底和一片硅胶材料基底通过激光器刻出正弦聚焦流道的流道结构,所述流道结构再通过离子体键合技术进行封装。

3. 如权利要求2所述方法,其特征在于,所述宽频电阻抗硬件系统包括自上而下设置的上电极层、中间流道层和下电极层,通过热塑封方法对所述上电极层、中间流道层和下电极层进行键合;

所述中间流道层为由热塑性聚合物薄膜上透层借助紫外激光切割出的流道结构,所述流道结构的出口接细胞收集管;所述流道结构构成一个通道,所述通道的截面为正方形,所述正方形的边长为细胞直径的111%~200%。

4. 如权利要求3所述方法,其特征在于,所述上电极层和所述下电极层都包括带氧化铟锡导电层的柔性聚合物薄膜,通过激光剥离非电极区域的氧化铟锡层而形成微电极图形,然后对所述上电极层和下电极层的微电极图形进行对准。

5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于,所述通过电信号差异的量化来表征细胞的第二机械特性包括:在响应信号图上获取检测的6组电信号峰值,通过电信号峰值表征聚焦细胞的电阻抗特性,包括:

第一峰峰值R1与第二峰峰值R2用于表示检测聚焦细胞的原始粒径,R1和R2的平均值用于验证所述聚焦细胞在所述通道截面中的垂直位置;

第三峰峰值R3与第四峰峰值R4用于检测聚焦细胞拉伸或剪切变形后的尺寸,并通过R3、R4与R1、R2之比来表征聚焦细胞的变形程度;

第五峰峰值R5与第六峰峰值R6与R1、R2进行比较,获取R5、R6恢复到与R1、R2值一样时的时间,则得到聚焦细胞的弛豫时间,所述弛豫时间用于表征聚焦细胞的恢复能力。

6.如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述不透明度包括:通过高频和低频下的电信号幅值之比来表示聚焦细胞核质比信息,得到不透明度Opacity,则有:

$$Opacity = |Z_{High}| / |Z_{Low}|;$$

其中,Z High表示高频下的电信号幅值,Z Low表示低频下的电信号幅值。

7.如权利要求1所述方法,其特征在于,所述CPU的工作模式包括手动触发和自动触发;

所述手动触发包括:同时或有延时地触发所述宽频电阻抗硬件系统和所述高速显微成像系统,获取聚焦细胞的第一物理特性、第一机械特性、第二物理特性、第二机械特性进行细胞鉴别;

所述自动触发包括:首先使用所述宽频电阻抗硬件系统进行细胞检测,当聚焦细胞通过所述宽频电阻抗硬件系统,且电阻抗信号发生突变超过设定阈值时,则触发所述高速显微成像系统进行拍摄。

多物理特性融合感知的细胞流式检测方法

技术领域

[0001] 本公开涉及细胞检测技术领域,尤其涉及一种多物理特性融合感知的细胞流式检测方法。

背景技术

[0002] 细胞的操控与检测是临床检验仪器的核心技术功能,属于机械工程、信息技术与生命科学的多学科交叉研究领域。传统临床检验仪器实现细胞操控与检测依赖于复杂的免疫标记技术,存在操作工序复杂、特异性高及检测成本高等问题。基于物理机械原理的非标记细胞操控与检测方法可有效克服上述弊病。同时,从柜式向便携式的微型化发展,从实验室走向床旁分析或家庭化检测亦是下一代新概念检验仪器的必然发展趋势。近年来,微机电系统(Microelectromechanical Systems, MEMS)的蓬勃发展为开发下一代的微型化临床检验仪器提供了崭新的思路。作为微机电系统在生命科学中的典型应用,微流控芯片因其精度高、成本低及集成微型化等众多优势而被逐步应用于细胞的非标记操控与检测,有望为开发下一代微型化临床检验仪器提供核心技术单元。

[0003] 但是,细胞的复杂异质特性仍是阻碍细胞高精度检测的重要挑战。对于稀有细胞的检测,精度仍需进一步提升,如何提升复杂异质细胞的检测精度仍是非标记检测领域急需解决的关键科学难题。目前,细胞的形貌结构特性是细胞鉴别最直接且常用的技术标尺,但传统的形貌结构特性检测依赖于耗时的镜检。细胞的机械特性是细胞的另一重要物理属性,且与细胞的生理状态和疾病发生与发展直接相关。传统的单细胞机械特性检测技术包括:原子力显微镜、微吸管技术、光镊与光学拉伸及窄缩挤压法,这些技术一般具有较高的精度,但检测效率相对较低(一般低于每分钟一个细胞),使其使用仅局限于实验室研究。对于临床检测的大样本需求,需要一种可在流动态下实现细胞机械特性高通量检测的方法。同时,目前研究仅见单一物理特性的检测,融合多种不同物理特性的细胞高精度检测未见进展。

发明内容

[0004] 本公开提供了一种多物理特性融合感知的细胞流式检测方法,其技术目的是在多元电指纹特性检测的基础上,融合细胞的形貌结构特性及细胞的机械特性等多种不同物理特性,以满足稀有细胞准确鉴别的高精度要求。

[0005] 本公开的上述技术目的是通过以下技术方案得以实现的:

[0006] 一种多物理特性融合感知的细胞流式检测方法,该细胞流式检测方法通过检测系统进行检测,该检测系统包括微流控芯片、高速显微成像系统和CPU,所述微流控芯片包括惯性聚焦单元和宽频电阻抗硬件系统,所述宽频电阻抗硬件系统与所述惯性聚焦单元和所述CPU都连接,所述高速显微成像系统与所述CPU连接,CPU用于对所述宽频电阻抗硬件系统和所述高速显微成像系统进行控制以完成数据交换和分析;所述高速显微成像系统位于所述宽频电阻抗硬件系统的竖直方向上,实时检测时所述高速显微成像系统与所述宽频电阻

抗硬件系统同步工作,该细胞流式检测方法包括:

[0007] 通过所述惯性聚焦单元对检测细胞进行预聚焦,得到聚焦细胞;

[0008] 通过所述高速显微成像系统提取所述聚焦细胞的形状信息、形变信息和位置信息,并计算聚焦细胞的第一物理特性和第一机械特性,在预实验中通过所述第一物理特性和所述第一机械特性对所述聚焦细胞进行标定;

[0009] 通过所述宽频电阻抗硬件系统获取标定后的所述聚焦细胞的数量、体积及多频率下的电指纹参量,获得聚焦细胞的第二物理特性;并采用流体的剪切效应完成聚焦细胞的高通量可控自变形,然后通过电信号差异的量化来表征聚焦细胞的第二机械特性;

[0010] CPU通过选择不同工作模式对所述第一物理特性、所述第二物理特性、所述第一机械特性和所述第二机械特性中的任意一种特性或多种特性进行采集和分析,实现对聚焦细胞的鉴别;

[0011] 其中,所述电指纹参量包括多场耦合下所述聚焦细胞的电学特性,包括幅值、相位和不透明度;所述电信号差异包括峰值差异和峰宽差异。

[0012] 本公开的有益效果在于:

[0013] (1) 借助生物微机电系统体积小和集成度高的优势,通过集成面对面检测电极及惯性聚焦等技术保障检测的精度,多种物理特性检测集成在一块非常小的微流控芯片上,依托机器学习等工具训练的模型,实现稀有细胞的高精度鉴别。

[0014] (2) “以电绘形(形变)”,通过测量细胞形变前后电信号的差异表征细胞的多物理特性来研究剪切诱导形变机理及细胞机械特性的影响机制,可有效减少外部检测设备,简化信号的处理方式,提高细胞的检测效率。检测参量均为细胞的物理属性,方法属于非标记技术,有效避免传统免疫生化检测方法存在的操作工序复杂、特异性高、细胞损伤及检测成本高等问题。

[0015] (3) 借助流体的剪切效应实现细胞的高通量可控自形变,变形更明显,较介电泳诱导变形、原子力显微变形、微管吮吸等变形方式具有更大的检测通量及更明显的细胞变形,且有效克服传统接触式形变技术存在的低效和细胞损伤的问题。

附图说明

[0016] 图1为本申请所述方法的流程图;

[0017] 图2为通过宽频电阻抗硬件系统获取的细胞特性示意图;

[0018] 图3为本发明的电检测信号示意图;

[0019] 图4为本发明的数据分析流程图。

具体实施方式

[0020] 下面将结合附图对本公开技术方案进行详细说明。

[0021] 本申请所述的多物理特性融合感知的细胞流式检测方法通过检测系统进行检测,该检测系统包括微流控芯片、高速显微成像系统和CPU,所述微流控芯片包括惯性聚焦单元和宽频电阻抗硬件系统,所述宽频电阻抗硬件系统与所述惯性聚焦单元和所述CPU都连接,所述高速显微成像系统与所述CPU连接,CPU用于对所述宽频电阻抗硬件系统和所述高速显微成像系统进行控制以完成数据交换和分析。

[0022] 高速显微成像系统位于所述宽频电阻抗硬件系统的竖直方向上,实时检测时所述高速显微成像系统与所述宽频电阻抗硬件系统同步工作。

[0023] 图1为本申请所述方法的流程图,如图1所示,该细胞流式检测方法包括:

[0024] 步骤S1:通过所述惯性聚焦单元对检测细胞进行预聚焦,得到聚焦细胞。

[0025] 具体地,样本液从入口流入惯性聚焦单元的正弦聚焦流道,在惯性力及二次流的共同作用下,细胞达到稳定的平衡位置处,排列成单列。惯性聚焦单元借助惯性聚焦效应将细胞聚焦排列成具有均匀间距的细胞列,并逐一通过检测区域,避免多个细胞同时经过检测区域而造成的假性检测结果。

[0026] 作为优选方式,惯性预聚焦单元包括由两片PVC塑料基底和一片硅胶材料基底通过激光器刻出正弦聚焦流道的流道结构,再通过离子体键合技术对该流道结构进行封装完成。

[0027] 步骤S2:通过所述高速显微成像系统提取所述聚焦细胞的形状信息(例如横截面积、周长)、形变信息(例如变形性、弛豫时间)和位置信息,并计算聚焦细胞的第一物理特性和第一机械特性,在预实验中通过所述第一物理特性和所述第一机械特性对所述聚焦细胞进行标定。

[0028] 具体地,高速显微成像系统用于捕获和量化细胞的实际形变量,由高速摄影机拍摄细胞变形后的图像并传输到CPU中进行处理分析,优化选择用于形变评价的最佳电信号参量,建立电信号与细胞机械特性之间的定量映射关系。联合成像实验和仿真手段,研究细胞特性对机械特性的影响机制。最终,完成机械特性检测单元的结构优化设计及性能标定。

[0029] 步骤S3:通过所述宽频电阻抗硬件系统获取标定后的所述聚焦细胞的数量、体积及多频率下的电指纹参量,获得聚焦细胞的第二物理特性;并采用流体的剪切效应完成聚焦细胞的高通量可控自变形,然后通过电信号差异的量化来表征聚焦细胞的第二机械特性。

[0030] 其中,所述电指纹参量包括多场耦合下所述聚焦细胞的电学特性,包括幅值、相位和不透明度;所述电信号差异包括峰值差异和峰宽差异。

[0031] 具体地,宽频电阻抗硬件系统用于实现不同频率下细胞阻抗信号(幅值和相位)的连续流检测。在不同频段电信号激励下,通过多对检测电极实现细胞多物理特性参量的测量。多频率响应信号进行降噪、基准化、信号特征识别和提取等处理后得到有效的宽频电阻抗谱。

[0032] 作为优选方式,宽频电阻抗硬件系统包括自上而下设置的上电极层、中间流道层和下电极层,通过热塑封方法对所述上电极层、中间流道层和下电极层进行键合。

[0033] 中间流道层为由热塑性聚合物薄膜上透层借助紫外激光切割出的流道结构,所述流道结构的出口接细胞收集管。在有限雷诺数下,当细胞经过一个比其自身直径略大的微流道时,抛物线型的流速分布将诱导产生剪切力及流体正压力作用于细胞,使细胞产生形变。流道结构基于上述原理进行设计,并将采用格子玻尔兹曼耦合有限元法研究细胞的形变机理。

[0034] 中间流道层的流道结构需要满足变形性检测要求,流道结构主体构成一个狭窄通道,通道截面为正方形,其边长由所测细胞的直径决定,保证细胞直径为正方形边长的50%~90%(即正方形的边长为细胞直径的111%~200%);细胞在狭窄通道受到流体剪切力与

压力而发生形变。狭窄通道可实现细胞在流道中心的精准定位,进而减少细胞位置波动对电阻抗检测的影响,同时可实现细胞多种生物物理特性的联合检测,进而实现对肿瘤细胞的精准鉴别。

[0035] 所述上电极层和所述下电极层都包括带氧化铟锡导电层的柔性聚合物薄膜,通过激光剥离非电极区域的氧化铟锡层而形成微电极图形,然后对所述上电极层和下电极层的微电极图形进行对准。优选地,采用前后若干对差分电极分别检测细胞形变前后的电指纹参量,减小环境噪音及流量波动对检测的影响。

[0036] 步骤S4:CPU通过选择不同工作模式对所述第一物理特性、所述第二物理特性、所述第一机械特性和所述第二机械特性中的任意一种特性或多种特性进行采集和分析,实现对聚焦细胞的鉴别。

[0037] 具体地,CPU用于控制宽频电阻抗硬件系统和高速显微成像系统,实现数据交换和分析。CPU基于Labview编写上位机的控制程序,使用数据采集设备以两种检测方式同步进行采样,包含手动触发和自动触发两种方式,控制两个系统表征物理和机械特性,实现对聚焦细胞的鉴别。

[0038] 手动触发包括:同时或有延时地触发所述宽频电阻抗硬件系统和所述高速显微成像系统,获取聚焦细胞的第一物理特性、第一机械特性、第二物理特性、第二机械特性进行细胞鉴别。这种触发方式参数全面,识别精度高。

[0039] 自动触发包括:首先使用所述宽频电阻抗硬件系统进行细胞检测,当聚焦细胞通过所述宽频电阻抗硬件系统,且电阻抗信号发生突变超过设定阈值时,则触发所述高速显微成像系统进行拍摄。该触发方式适用于低浓度的细胞检测,减少了冗余图像的传输、存储和分析处理。

[0040] 细胞图像的处理算法由C++实现,CPU首先从摄像机获得单帧图像,图像被分配一个唯一的句柄,并传输到负责图像预处理的系统进行背景减法和阈值化,以创建二值图像。接下来,检测图像中是否存在细胞,如果存在,则使用边界跟踪算法得到细胞的轮廓;该算法从细胞的轮廓得到细胞的横截面积、周长和位置,并计算细胞的物理、机械特性,包括但不限于圆度、硬度、粘弹性、弹性模量、瞬时模量、体积膜量、弛豫时间等。

[0041] 中间流道层的流道结构的工作原理包括:在未有细胞通过时,检测流道的幅频响应,对系统阻抗进行分析计算,结合实验结果校核检测流道灵敏度,实现自校核功能。细胞通过时,不同频段电信号激励下的响应信号反映细胞的多种不同电生理特性。响应电极上产生的响应离子电流信号经过电流放大装置的放大作用后转换为电压信号传入CPU。CPU将电压信号存储为txt文本文件,利用MATLAB程序读取所述txt文本文件,对采集到的每个周期内的数字信号作快速傅里叶变换、降噪处理、反向傅里叶变换,得到细胞的响应信号图。获取的多频率下的电信号通过编写MATLAB程序进行降噪、基准化、信号特征识别和提取等处理,转化为有效宽频电阻抗谱。

[0042] 作为具体实施例地,各个流道的制备材质为聚合物薄膜,也可选用聚二甲基硅氧烷(PDMS)、玻璃、环氧树脂、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚碳酸酯(PC)等对电阻抗信号不会产生干扰的材料来制作。PDMS的器件可通过软光刻工艺制备,具体制备过程包括软光刻平面电极,光刻SU-8阳模、PDMS浇注以及利用真空氧等离子体键和技术对PDMS-玻璃键进行合封装等步骤。电极可替换为平面电极,布置在玻璃基底表面。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。

[0043] 图2为通过宽频电阻抗硬件系统获取的细胞特性示意图,在低频频段时,电信号无法穿透细胞膜,测得的响应阻抗信号体现了细胞的体积和形状信息;而在中高频信号作用时,电信号可部分穿透细胞膜,测得的电信号体现细胞的内部结构信息(如细胞膜电容、细胞质和细胞核电阻)。因此可以进一步通过定义高频和低频下的电信号幅值之比来反映细胞核质比信息,得到新的参数不透明度(Opaicity)其计算公式如下:

[0044] $Opaicity = |Z_{High}| / |Z_{Low}|$;

[0045] 其中, Z_{High} 表示高频下的电信号幅值, Z_{Low} 表示低频下的电信号幅值。

[0046] 通过宽频电阻抗硬件系统的电学测量方法来实现细胞形貌结构特性的表征,及利用细胞的不同频率下多元电指纹参量(电信号的幅值和相位信息)和电信号量化的机械特性实现细胞的鉴别。电信号的差异量化细胞形变,对细胞受到外力的响应时间特性进行分析,表征的机械特性包括但不限于硬度、弛豫时间。

[0047] 作为优选方式,获取的多频率下的电信号通过编写MATLAB程序进行降噪、基准化、信号特征识别和提取等处理,转化为有效宽频电阻抗谱。采用细胞形变前后的电信号差异量化表征不同细胞的机械特性,如图3所示,在所得响应信号图上得到匹配若干次检测的6组峰值,通过电信号峰值表征检测细胞的电阻抗特性。第一峰峰值R1与第二峰峰值R2是检测细胞的原始粒径,其平均值用于验证聚焦细胞在流道截面中的垂直位置;第三峰峰值R3与第四峰峰值R4是检测细胞拉伸或剪切变形后的尺寸,R3、R4与R1、R2的值之比表征检测细胞的变形程度;第五峰峰值R5和第六峰峰值R6用于与R3、R4进行比较,当R5、R6恢复至与R1、R2一样时,认为细胞此时已恢复至正常形态,由此可以得出细胞弛豫时间的长短,表征细胞的恢复能力。

[0048] 在具体实施例中,由于癌细胞相对于普通上皮细胞要更加的软,故而其变形程度会大于普通上皮细胞,癌细胞通过时的第三峰峰值与第二峰峰值的比值会比普通细胞要小;癌细胞和普通上皮细胞有益于细胞骨架结构不同,在受压产生形变后,恢复至正常形态的时间较普通上皮细胞会有所区别。

[0049] 进一步借助Maxwell混合理论、等效电路模型及多壳模型,建立不同频率下细胞固有电指纹参量与阻抗信号间的等效模型。经过实验图像标定后的电信号用于检测和鉴别细胞,以电测细胞的多种不相关物理特性有效减少外部检测设备,简化信号的处理方式,提高细胞的检测效率。

[0050] 本实施例中,多维参量的电阻抗信号采用主成分分析法(PCA)进行降维。PCA能够减少数据集的维度,又保留数据中对方程贡献最大的特征,提升特征密度,有利于多种细胞的分类。其实现步骤一般为求数据矩阵的协方差,并计算特征值和向量,将求得的值进行组合形成映射矩阵,并取前n列或后n列作为最后的映射矩阵(贡献最大的n维数据),使用最终的映射矩阵与原始数据集相乘得到降维数据集,达到数据降维的目的。

[0051] 如图4所示,多维细胞散点图的检测门划分方法采用基于模拟退火算法优化的等概率曲线划分,等概率曲线为两种细胞数据的置信椭圆交点拟合而成。假设样品的x轴和y轴方向的数据均满足正态分布,绘制各置信水平下的椭圆将两个样本间交点拟合成曲线,在该曲线上,两种不同细胞群组出现的概率偏差相同。使用模拟退火算法对曲线进行优化,模拟退火算法是基于蒙特卡罗迭代求解的一种启发式随机搜索算法,具有概率的全局优化

性能。模拟退火算法的搜索过程引入了随机因素,具有一种时变且最终趋于零的概率突跳性,以一定的概率来接受调整分布规律后,可能比当前划分要差的解,有效避免陷入局部极小并最终趋于全局最优。

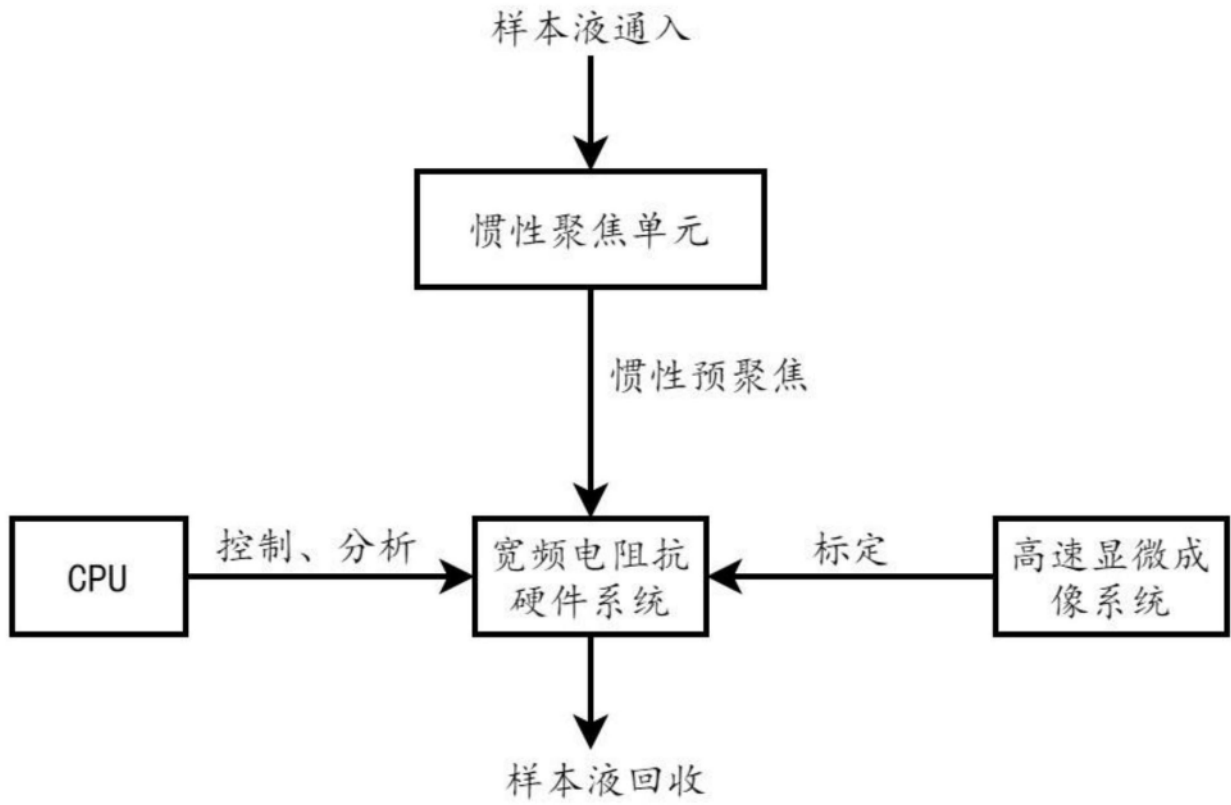


图1

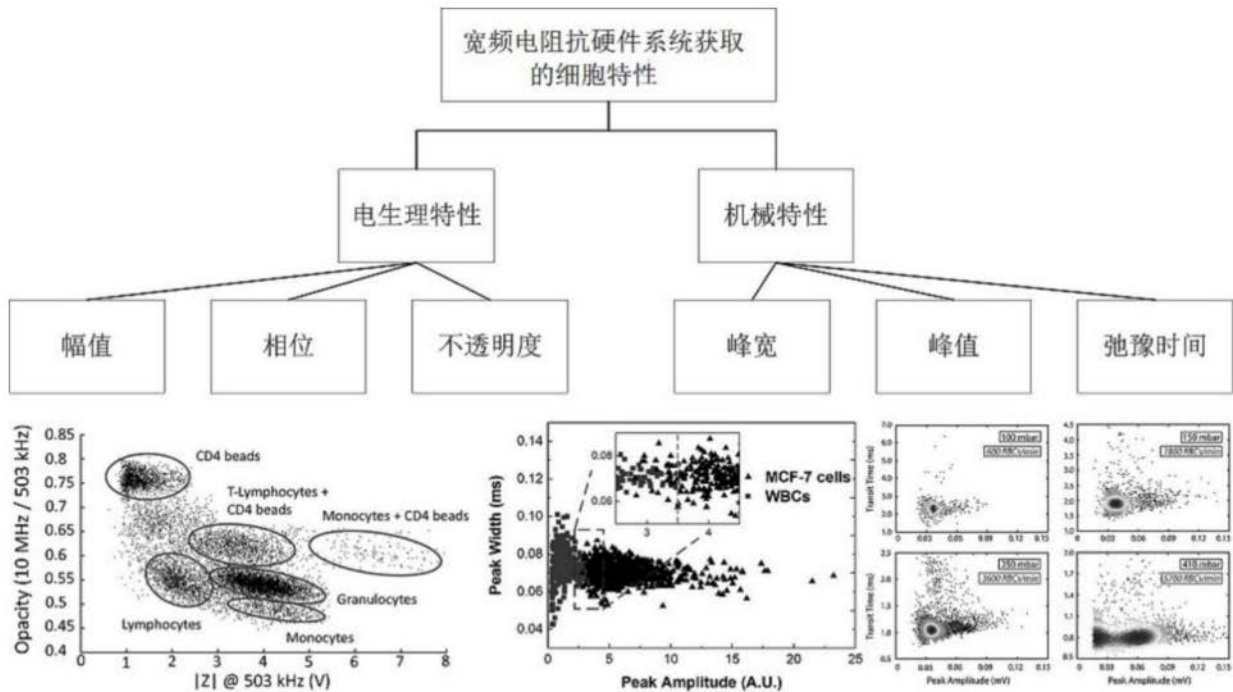


图2

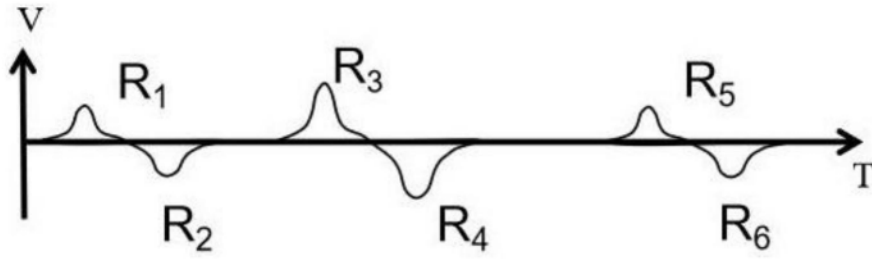


图3

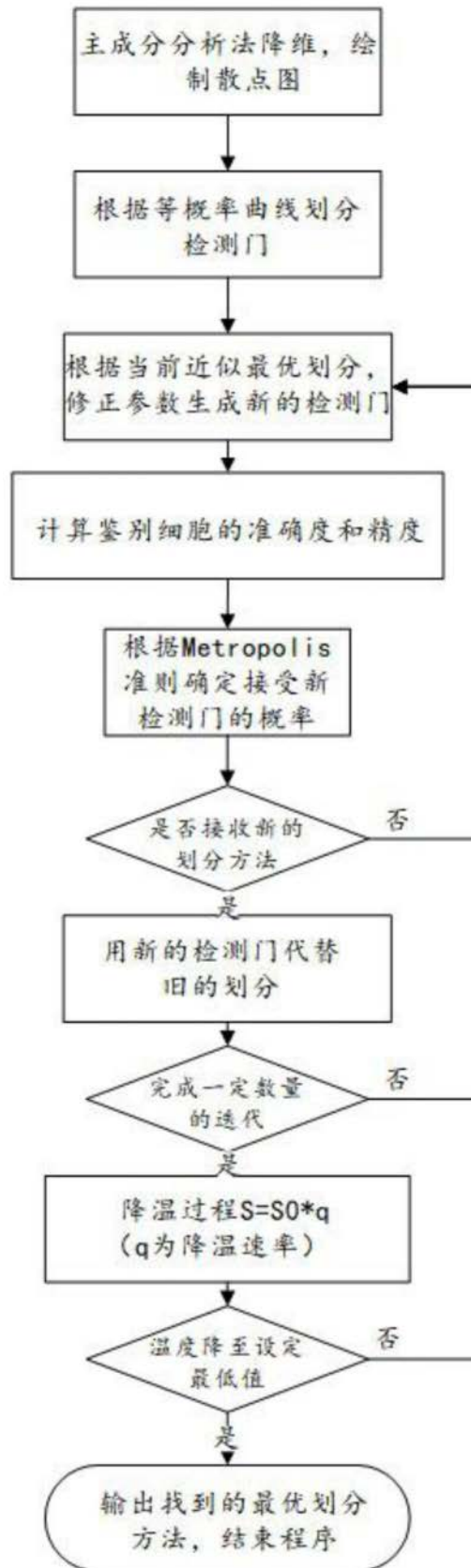


图4