

小型微流控芯片流式细胞仪的研制

叶晓兰¹ 杜文斌¹ 古淑青¹ 潘建章¹ 牟颖² 方群^{* 1}¹(浙江大学微分析系统研究所, 杭州 310058) ²(浙江大学分析仪器研究中心, 杭州 310058)

摘 要 基于芯片正交光路检测模式, 搭建了一套小型的微流控芯片流式细胞仪。以 532 nm 小型半导体激光器作为激发光源, 激光束被透镜聚焦于芯片通道中央。采用光电二极管检测芯片通道内流动细胞的前向散射光信号, 采用小型光电倍增管检测荧光信号, 整套仪器体积为 19 cm × 15 cm × 25 cm (长 × 宽 × 高), 具有结构简单、体积小、价格低廉等特点。荧光检测系统对四甲基罗丹明异硫氰酸的检出限为 4.4×10^{-8} mol/L, 采用 6 μm 荧光微球作为模型样品考察了仪器的分析性能, 同时初步实现了细胞样品的分析。

关键词 微流控芯片, 正交光路检测, 流式细胞仪

1 引言

流式细胞术^[1]是对处在液流中的颗粒, 逐个进行多参数自动分析和分选的技术。流式细胞仪是基于流式细胞术的基本原理, 综合利用了光学、机械、流体动力学和计算机控制技术的现代化生物医学仪器^[2], 可对细胞大小、内部结构和组成等参数进行测定, 并能按上述参数分类收集细胞, 在生物学和医学领域得到了广泛的应用。

微流控分析技术的目标是通过微机电加工技术将试样预处理、反应、分离和检测等单元集成到单片芯片内^[3], 代表了当前分析仪器微型化的发展方向。微流控芯片的通道尺度一般为数微米至数十微米, 这与细胞的尺度相近。此外芯片网络化的通道结构有利于对细胞进行精确的操控。因此, 采用微流控技术实现流式细胞仪的微型化和便携化, 具有特殊的优势。

自 1994 年 Sobek 等^[4]利用电导法在微流控芯片上实现了细胞的计数功能以来, 基于微流控技术的小型化和集成化的流式细胞分析系统取得了很大的发展。在基于微流控芯片的众多检测方法中, 激光诱导荧光方法以其灵敏度高和响应速度快等优点被广泛使用。目前, 微流控芯片系统中常用的激光诱导荧光检测光路模式包括共焦型^[5]、光纤正交型^[6]和斜射型^[7]等。国内外已有多个研究组将上述模式应用到芯片流式细胞分析系统中^[8~10]。但因检测光路结构较为复杂, 使得系统难以实现进一步的小型化和集成化。

本研究组在 2005 年提出了应用于微流控芯片的正交型激光诱导荧光检测光路新模式^[11, 12], 具有光路结构简单, 易于搭建的特点。本研究在上述工作基础上, 进一步进行了正交光路激光诱导荧光检测芯片流式细胞分析仪的小型化研究。采用小型半导体激光器作为激发光源, 以光电二极管和小型光电倍增管分别检测细胞散射光和荧光信号, 整套装置缩小为 19 cm × 15 cm × 25 cm (长 × 宽 × 高), 具有仪器结构简单、体积小、试样消耗量少及价格低廉等优点。

2 实验部分

2.1 仪器装置

微流控芯片加工采用紫外光刻、湿法刻蚀、低温预键合和高温键合技术^[13]。芯片结构如图 1 所示, 其中微通道深 20 μm, 宽 70 μm。在通道末端钻 1 mm 直径的竖孔做为溶液的进出口。围绕 A、B、C、D 4 个进出口, 分别用环氧树脂固定塑料管 (7 mm 内径, 20 mm 高) 做为储液池。

2008-03-21 收稿; 2008-04-22 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20575059)、国家科技部 973 (No. 2007CB714503) 和教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-05-0511) 资助项目

* E-mail: fangqun@zju.edu.cn

微流控芯片平台固定于三维精密移动台上(大恒新纪元科技股份有限公司)。激发光源采用 532 nm 半导体激光器(RD532-5G4 陕西日成科技发展有限公司),功率为 5 mW, 外型尺寸为 $\Phi 14 \times 60$ mm。激光器发出的绿光经窄带滤光片滤光和物镜聚焦,从垂直于芯片平面的方向聚焦到芯片微通道中央的检测区。在激发光前向小角度(6°)方向上,放置一个光电二极管 OPT101 检测细胞流经检测区域产生的前向光的变化,进行细胞计数。从芯片微通道内发出的荧光,在与芯片通道成 45° 角方向上,用显微镜目镜收集,经针孔滤波器($\Phi 0.9$ mm)空间滤波,窄带滤光片滤除杂散光,最后由小体积光电倍增管(H5784-02 北京滨松光子股份有限公司)检测。OPT101 和光电倍增管检测到的信号通过数据采集卡(USB-6008 北京中科泛华测控技术有限公司)采集,由 Lab-view 编写的程序进行数据处理和结果显示。

2.2 试剂及细胞样品

四甲基罗丹明异硫氰酸(TRITC, Sigma 公司),用 0.01 mol/L 硼砂溶液(pH 9.2)配制成浓度为 1×10^{-4} mol/L 的溶液备用;羟丙基甲基纤维素(HPMC, Sigma 公司),用 PBS 溶液(吉诺生物医药技术有限公司)配制成质量浓度为 0.8% 的溶液;碘化吡啶(PI, Sigma 公司),用 PBS 溶液配制成 0.05 $\mu\text{g/L}$ 的溶液。以上溶液使用前均经过 0.45 μm 微孔滤膜过滤。荧光微球(P-14832 Molecular Probe 公司),直径为 6 μm ,用超纯水稀释 100 倍后备用。中国仓鼠卵巢细胞系(Chinese hamster ovary, CHO)由浙江大学化学系提供。

2.3 实验方法

芯片每次使用前,需对芯片微通道进行清洗,先用浓 H_2SO_4 浸泡通道 30 min,然后依次用超纯水、0.1 mol/L NaOH、超纯水、缓冲液清洗。B 液池中加入 500 μL 超纯水,分别在 A 和 C 液池中加入 200 μL 超纯水做为鞘流液。C 液池连接废液管,利用各液池与废液管出口的静压力差驱动微通道内液流流动,待形成稳定鞘流后,将 B 液池中的超纯水换成荧光微球或细胞样品悬液。

2.3.1 荧光微球实验 将超纯水稀释的荧光微球,经超声及漩涡震荡后,取 500 μL 加入到 B 样品池。

2.3.2 细胞样品实验 细胞样品用 PBS 清洗两次,然后用 70% 冷乙醇固定过夜,用 PBS 离心两次除去固定液,加 250 μL PI 溶液避光染色 30 min。取 200 μL 染色后的细胞溶液,加入 200 μL 含有 0.8% HPMC 的 PBS 溶液作为细胞样品溶液。将 A 和 C 液池中的超纯水换成 100 μL PBS, B 液池中加入 300 μL 细胞样品溶液。

将芯片固定到芯片平台上,通过三维精密移动台将激光焦点微调至芯片通道上的检测点,开启光电二极管与光电倍增管,进行计数及荧光测定。

3 结果与讨论

3.1 小型流式细胞分析系统的设计

2005 年,本研究组搭建了一种基于正交型光路结构的微流控芯片流式细胞分析装置^[12],采用 473 nm 半导体泵浦激光器为光源、普通光电倍增管检测细胞荧光信号,系统体积较大。在此基础上,本工作主要从光源、聚光透镜、检测器和驱动系统等方面入手,实现芯片流式细胞仪系统的小型化,其光路系统结构如图 2 所示。

目前,商品化的流式细胞仪大部分是采用 488 nm 激光器,但是此类激光器体积大,不适用于微型化仪器。而 473 nm 半导体泵浦激光器体积也较大。半导体激光器体积较小,是较为理想的微型化激光光源。目前市场上销售的技术较为成熟的半导体激光器主要在绿光和红光波段,由于流式细胞仪中所用的荧光染料大部分需要蓝光和绿光激发,因此,选择了 532 nm 半导体激光器作为光源。

为减小仪器体积,同时降低仪器成本,采用由废弃光驱上拆下的透镜,将激发光聚焦到芯片微通道

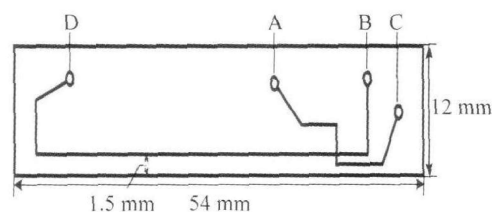


图 1 微流控芯片通道构型示意图

Fig 1 Schematic diagram of the chip microchannel with access hole A, B, C and D

A, B, C, D 分别为微通道的进出口(A, B, C, D are the inlet and outlet of microchannel respectively).

的中央检测点处, 所得斑点直径约为 $15\ \mu\text{m}$, 与细胞直径相近, 能够提高细胞检测的分辨率。利用经抛光后的芯片侧壁作为荧光的采集面, 可显著提高荧光检测的信噪比^[11 12]。荧光信号的检测采用集成化的微型光电倍增管, 在保证检测灵敏度的前提下, 进一步减小系统体积。

采用重力提供细胞样品和夹流液流的驱动力, 与采用机械泵驱动或电渗驱动的系统相比, 显著简化了系统的结构, 缩小了系统体积。以上措施有效地降低了分析仪的体积, 整套仪器体积为 $19\ \text{cm} \times 15\ \text{cm} \times 25\ \text{cm}$ (长 $\times$ 宽 $\times$ 高)。

3.2 检测性能

分析仪搭建之后, 首先采用 TRITC 溶液为样品, 以门式进样方法考察了系统的检测性能。在 $2 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-6}\ \text{mol/L}$ 浓度范围内, 荧光信号强度与 TRITC 浓度之间具有良好的线性关系, 线性回归方程为 $F = 7.41 \times 10^4 C - 5.30 \times 10^{-3}$, 线性相关系数 $r = 0.997$ 。对 TRITC 的检出限 (3σ) 为 $4.45 \times 10^{-8}\ \text{mol/L}$ 。与文献报道的高灵敏激光诱导荧光检测系统相比, 本系统的检测灵敏度偏低的主要原因是小型的半导体激光器输出功率不稳定, 造成本底噪声较高。同时, 集成化的小型光电倍增管的检测性能指标也低于常规的光电倍增管。

3.3 荧光微球实验

实验中, 首先选择与细胞尺度相似的荧光微球为样品, 建立基于重力驱动的芯片鞘流系统, 实现了荧光微球在微通道内的单列顺序流动。实验考察了不同储液池内液位差对鞘流效果的影响。优化条件为, 在样品池 B 中加入 $500\ \mu\text{L}$ 荧光微球样品溶液, A 和 C 缓冲液池中分别加入 $200\ \mu\text{L}$ 超纯水。在此条件下, 可获得满意的鞘流效果 (如图 3 所示)。图中 3 个荧光微球在进入十字通道的交叉点之前, 呈无规则分布; 进入鞘流区域后, 荧光微球迅速排列成单列, 逐一顺序通过检测区。在此基础上, 利用光电二极管和光电倍增管实现对每个荧光微球的前向散射光和荧光强度的同时检测, 结果如图 4 所示。

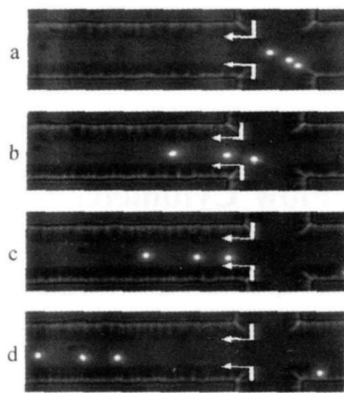


图 3 微球鞘流进样

Fig 3 Sheath flow for fluorescence beads
箭头表示缓冲液的流动方向 (the arrows show the flow direction of buffer solution)。

3.4 细胞检测

使用该仪器检测荧光标记的细胞样品, 实验过程中曾出现细胞贴壁现象。通过在细胞溶液中加入 HPMC 溶液的方法能够减轻细胞在芯片微通道口和通道内的贴壁现象。实验选择细胞样品溶液中 HPMC 的最佳浓度为 0.4% 。由于 HPMC 溶液的加入, 溶液粘性增大, 荧光微球条件下的最佳鞘流条件不适用于细胞样品。经实验优化, 最终选择在样品池 B 中加入 $300\ \mu\text{L}$ 含有 0.4% HPMC 细胞溶液,

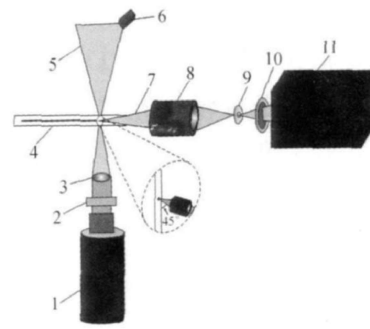


图 2 小型流式细胞仪的光路系统

Fig 2 Schematic diagram of optical setup of microchip-based flow cytometer

1. 激光器 (laser); 2. 滤光片 (filter); 3. 透镜 (lens); 4. 芯片 (chip); 5. 激光束 (laser beam); 6. 光电二极管 (photodiode); 7. 荧光 (fluorescence); 8. 目镜 (objective); 9. 针孔滤光器 (pinhole); 10. 滤光片 (filter); 11. 光电倍增管 (photomultiplier tube)。

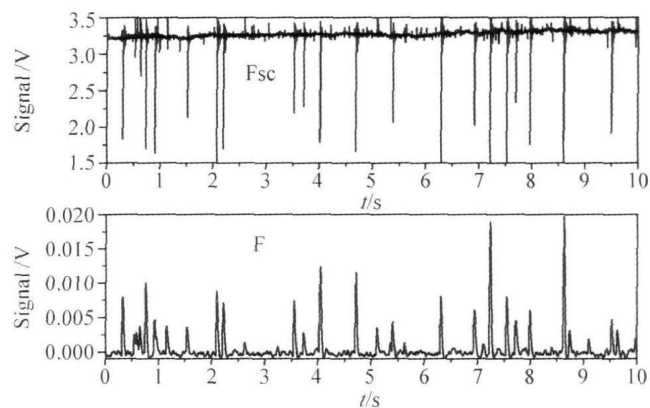


图 4 荧光微球前向散射信号 (Fsc) 和荧光信号 (F) 记录图

Fig 4 Simultaneous detection of forward scattering light signal (Fsc) and fluorescence signal (F)

A 和 C 缓冲液池中分别加入 100 μL PBS 所得结果如图 5 所示。由图 5 可以看到, 散射光的倒峰和荧光的正峰信号有较好的对应度, 说明仪器对于细胞的测定较为准确, 可以初步实现细胞样品检测。

4 结 论

本研究报道了一种小型微流控芯片流式细胞仪, 具有结构简单, 操作方便, 体积小, 价格低廉等特点, 并初步应用于细胞分析。显示该仪器在细胞学和临床诊断领域中具有广阔的应用前景。其体积小、成本低的特点, 尤其适合应用于床旁分析 (Point of Care Testing POCT) 和小型医院, 对于流式细胞术的普及, 具有重要意义。

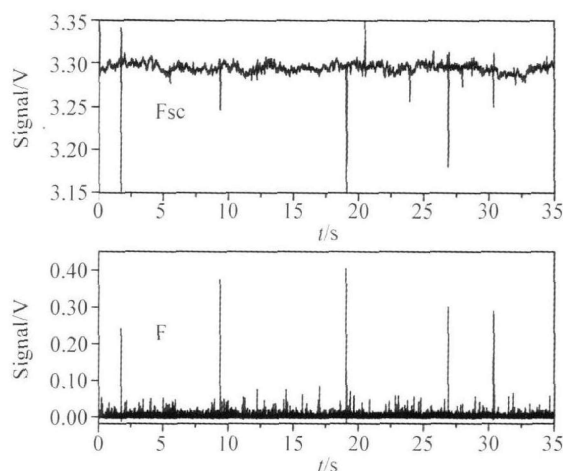


图 5 细胞样品前向散射信号和荧光信号结果记录图
Fig 5 Recordings of intensities of forward scattered light and fluorescence vs time

References

- Jaroszeski M J, Radcliff G. *Molecular Biotechnology*, **1999**, 11(1): 37~53
- Keating P, Cambrosio A. *Journal of the History of Biology*, **1994**, 27(3): 449~479
- Manz A, Becker H. *Microsystem Technology in Chemistry and Life Sciences*. New York: Springer-Verlag, **1999**
- Sobek D, Senturia S, Gray M. *Solid-State Sensor and Actuator Workshop*, Hilton Head, S C. **1994**, 120~121
- Woolley A T, Mathies R A. *Anal Chem.*, **1995**, 67(20): 3676~3680
- Liang Z H, Chinen O, Ocvirk G, Tang T, Fluri K, Harrison D J. *Anal Chem.*, **1999**, 68(6): 1040~1046
- Jacobson S C, Ramsey J M. *Anal Chem.*, **1996**, 68(5): 720~723
- McClain M A, Culbertson C T, Jacobson S C, Ramsey J M. *Anal Chem.*, **2001**, 73(21): 5334~5338
- Pamme N, Koyama R, Manz A. *Lab on a Chip*, **2003**, 3(3): 187~192
- Dittrich P S, Schiller P. *Anal Chem.*, **2003**, 75(21): 5767~5774
- Fang Qun(方群), Fu Jing-Lin(富景林), Huang Yan-Zhen(黄艳贞). *Chinese Patent(中国发明专利)*, Appl No. 03141572.5, **2003**
- Fu J L, Fang Q, Zhang T, Jin X H, Fang Z L. *Analytical Chemistry*, **2006**, 78(11): 3827~3834
- Jia Z J, Fang Q, Fang Z L. *Anal Chem.*, **2004**, 76(18): 5597~5602

Development of Compact Microfluidic Based Flow Cytometer

YE Xiao-Lan¹, DU Wen-Bin¹, GU Shu-Qing¹, PAN Jian-Zhang¹, MOU Ying², FANG Qun^{*1}

¹ (Institute of Microanalytical Systems, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

² (Research Center for Analytical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058)

Abstract A compact microfluidic chip-based flow cytometer has been developed based on the orthogonal optical arrangement. A 532-nm laser diode was used as the light source. Both photodiode and integrated photomultiplier tube were used as detectors for the forward scattering light and fluorescence, respectively. The size of the flow cytometer was 19 cm $\times$ 15 cm $\times$ 25 cm (L $\times$ H $\times$ W). The detection limit of the system for tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) was 4.4×10^{-8} mol/L. The performance of the system was demonstrated in the analysis of fluorescent beads (6 μm) and cell samples. The advantages of the present system are simple structure, small size and low cost.

Keywords Microfluidic chip, orthogonal optical arrangement, flow cytometer

(Received 21 March 2008; accepted 22 April 2008)