

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 3 月 1 日 (01.03.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/035977 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 15/14 (2006.01)

(ZHAO, Jingjing); 中国北京市海淀区清华
园, Beijing 100084 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/104946

(22) 国际申请日: 2016 年 11 月 7 日 (07.11.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610704513.X 2016年8月22日 (22.08.2016) CN

(71) 申请人: 清华大学 (TSINGHUA UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国北京市海淀区清华园,
Beijing 100084 (CN)。

(72) 发明人: 尤政 (YOU, Zheng); 中国北京市海淀区清华园, Beijing 100084 (CN)。 赵晶晶

(74) 代理人: 北京清亦华知识产权代理事务
所 (普通合伙) (TSINGYIHUA INTELLECTUAL
PROPERTY LLC); 中国北京市海淀区清华园清华
大学照澜院商业楼301室, Beijing 100084 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP,
KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA,
RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,

(54) Title: METHOD AND SYSTEM FOR AUTOMATIC ALIGNMENT OF MICROFLUIDIC CHIP BASED ON BINARY OPTICAL DEVICE

(54) 发明名称: 基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法和系统

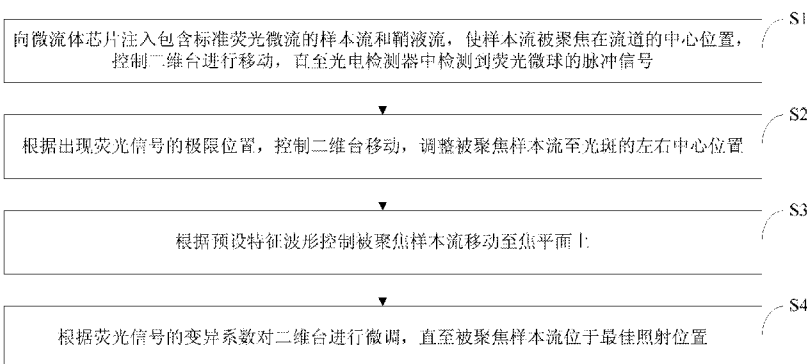


图 1

- S1 Inject a sample fluid comprising a standard fluorescence micro-fluid, and a sheath fluid to a microfluidic chip, so that the sample fluid is focused to the center of a fluid path, and control a two-dimensional table to move until a photoelectric detector detects a pulse signal of a fluorescent microsphere
- S2 Control, according to a limit position where a fluorescence signal occurs, the two-dimensional table to move, and adjust the focused sample fluid to the center of a light spot in a left-right direction
- S3 Control, according to a preset characteristic waveform, the focused sample fluid to move onto a focal plane
- S4 Finely adjust the two-dimensional table according to a coefficient of variation of the fluorescence signal until the focused sample fluid is located at an optimal irradiation position

(57) Abstract: A method and system for automatic alignment of a microfluidic chip (106) based on a binary optical device (104). The method comprises: injecting a sample fluid (321) comprising a standard fluorescence micro-fluid, and a sheath fluid (322) to a microfluidic chip (106), so that the sample fluid (321) is focused to the center of a fluid path, and controlling a two-dimensional table (109) to move until a photoelectric detector (114) detects a pulse signal of a fluorescent microsphere; adjusting a focused sample fluid (327) to be located at the center of a light spot (23) according to a limit position where a fluorescence signal occurs; controlling,



WO 2018/035977 A1

SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

according to a preset characteristic waveform, the two-dimensional table (109) to move, and adjusting the focused sample fluid (327) to be located on a focal plane (212); and finely adjusting the two-dimensional table (109) to an optimal irradiation position according to a coefficient of variation of the fluorescence signal. The present application has the following advantages: by using the binary optical device (104) as a light spot shaping device, determining the position of the microfluidic chip (106) according to characteristics of fluorescence signals sent by fluorescent micro-particles subjected to laser irradiation, and whereby adjusting the focused sample fluid (327) to an optimal location, an optimal detection effect and consistency are achieved.

(57) 摘要: 一种基于二元光学器件 (104) 的微流体芯片 (106) 自动对准方法和系统, 该方法包括: 向微流体芯片 (106) 注入包含标准荧光微流的样本流 (321) 和鞘液流 (322), 使样本流 (321) 被聚焦在流道的中心位置, 控制二维台 (109) 进行移动, 直至光电检测器 (114) 中检测到荧光微球的脉冲信号; 根据出现荧光信号的极限位置, 调整被聚焦样本流 (327) 位于光斑 (23) 的中心位置; 根据预设特征波形控制二维台 (109) 移动, 调整被聚焦样本流 (327) 位于焦平面 (212) 上; 根据荧光信号的变异系数对二维台 (109) 进行微调直至最佳照射位置。本申请具有如下优点: 采用二元光学器件 (104) 作为光斑整形器件, 并根据荧光微粒受激光照射后发出的荧光信号的特征判别微流体芯片 (106) 的位置, 并据此调节被聚焦样本流 (327) 至最佳位置, 从而实现最佳的检测效果和一致性。

基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法和系统

相关申请的交叉引用

- 5 本申请要求清华大学于 2016 年 8 月 22 日递交的、发明名称为“基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法和系统”的，中国专利申请号为“201610704513.X”的优先权。

技术领域

- 10 发明涉及流式细胞术、物理光学和微流体领域，具体涉及一种基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法和系统。

背景技术

- 15 得益于微流体技术的发展以及流式细胞术在细胞检测方面的强大功能，近年来涌现出了大量基于微流体芯片的片上流式细胞仪。这些微流体芯片能够将细胞等生物微粒聚焦在流道的中心位置，而后这些生物微粒将被激光照射并发射出散射光和荧光。发射出的光信号被后续的光电检测传感器收集，并传入分析系统进行分析。一般用于照射的激光光斑尺寸仅为数十微米，这就要求被聚焦后的生物微粒恰好处于激光光斑照射的范围内且在焦平面上。对于传统的流式细胞仪而言，这一对准过程可以手动调节，因为调节后可将各个部件固定、后续除矫正外不需要频繁调节。但对于微流体芯片而言，由于需要频繁更换微流体芯片，以消除交叉污染，而手动调节费时费力且难以保证一致性。
- 20

发明内容

- 25 本发明实施例提供一种适合于批量化生产的多层微流体芯片制作方法、系统、设备及计算机存储介质，旨在适合批量生产且降低成本。

- 30 本发明实施例是这样实现的，一种基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法，包括激光器、二元光学器件、聚焦物镜、微流体芯片、光收集物镜、滤光片、光电检测器、计算机、二维台和荧光微球，所述激光器用于发射激光，所述激光经过所述二元光学器件整形并被聚焦物镜聚焦为所需光斑，所述光斑照射位于所述微流体芯片中所述荧光微球以使所述荧光微球发出荧光，所述荧光经所述光收集物镜收集并被所述滤光片滤除杂光后进入所述光电检测器，所述光电检测器将荧光信号转换为电信号，所述计算机根据所述电信

号的波形特征判别被聚焦样本流的位置，并控制所述二维台调节所述微流体芯片中的所述被聚焦样本流的位置；所述方法包括以下步骤：S1：向所述微流体芯片注入包含标准荧光微流的样本流和鞘液流，使所述样本流被聚焦在流道的中心位置，控制所述二维台进行移动，直至所述光电检测器中检测到所述荧光微球的脉冲信号；S2：根据出现所述荧光信号的极限位置，控制所述二维台移动，调整被所述聚焦样本流至所述光斑的左右中心位置；S3：根据预设特征波形控制所述被聚焦样本流移动至焦平面上；S4：根据所述荧光信号的变异系数对所述二维台进行微调，直至所述被聚焦样本流位于最佳照射位置。

本发明实施例的另一目的在于提供一种基于二元光学器件的微流体芯片自动对准系统，包括激光器、二元光学器件、聚焦物镜、微流体芯片、光收集物镜、滤光片、光电检测器、计算机、二维台和荧光微球，所述激光器用于发射激光，所述激光经过所述二元光学器件整形并被聚焦物镜聚焦为所需光斑，所述光斑照射位于所述微流体芯片中所述荧光微球以使所述荧光微球发出荧光，所述荧光经所述光收集物镜收集并被所述滤光片滤除杂光后进入所述光电检测器，所述光电检测器将荧光信号转换为电信号；泵或其他液流源在向所述微流体芯片注入包含标准荧光微流的样本流和鞘液流，使所述样本流被聚焦在流道的中心位置后，所述计算机控制所述二维台进行移动所述光电检测器中检测到所述荧光微球的脉冲信号；所述计算机还用于根据出现所述荧光信号的极限位置，控制所述二维台移动、直至所述微流体芯片中被聚焦样本流位于所述光斑的中心位置；所述计算机还用于根据预设的特征波形控制所述二维台移动，直至所述被聚焦样本流位于所述聚焦物镜的焦平面上；所述计算机还用于根据所述荧光信号的变异系数对所述聚焦样本流进行微调直至最佳照射位置。

本发明实施例的另一目的在于提供一种设备，包括：一个或者多个处理器；存储器；一个或者多个程序，所述一个或者多个程序存储在所述存储器中，当被所述一个或者多个处理器执行时，执行上述实施例所述的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法。

本发明实施例的另一目的在于提供一种非易失性计算机存储介质，所述计算机存储介质存储有一个或者多个程序，当所述一个或者多个程序被一个设备执行时，使得所述设备执行本发明上述实施例的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法。

本发明实施例的采用二元光学器件作为光斑整形器件，并根据标准荧光微粒受激光照射后发出的荧光信号的特征判别微流体芯片中被聚焦样本流的位置，并据此调节微流体芯片使被聚焦样本流位于最佳位置，从而实现最佳的检测效果。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动性的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

5 图 1 是本发明实施例的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准系统的流程图；

图 2 是本发明一个实施例的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准系统的结构示意图；

图 3 是本发明一个实施例的二元光学器件对激光整形并匀化形成准平顶的矩形光斑示意图；

10 图 4 是本发明一个实施例的微流体芯片的内部微流道示意图；

图 5 是本发明一个实施例的步骤 S1 中光电检测器件输出的信号变化，以及聚焦后样本流的位置变化示意图；

图 6 是本发明一个实施例的步骤 S2 中光电检测器件输出的信号变化，以及聚焦后样本流的位置变化示意图；

15 图 7 是本发明一个实施例的步骤 S3 中光电检测器件输出的信号变化，以及聚焦后样本流的位置变化，离焦时光斑的能量分布情况示意图；

图 8 是本发明一个实施例的步骤 S4 中左右微调获得最佳照射位置时的示意图。

具体实施方式

20 下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出，其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

参照下面的描述和附图，将清楚本发明的实施例的这些和其他方面。在这些描述和附图中，具体公开了本发明的实施例中的一些特定实施方式，来表示实施本发明的实施例的
25 原理的一些方式，但是应当理解，本发明的实施例的范围不受此限制。相反，本发明的实施例包括落入所附加权利要求书的精神和内涵范围内的所有变化、修改和等同物。

以下结合附图描述根据本发明实施例的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法和系统。

图 1 是本发明一个实施例的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法的流程图，

30 图 2 是本发明一个实施例的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准系统的结构示意图。

如图 1 和图 2 所示，一种基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法，包括如下硬

件：激光器 103、二元光学器件 104、聚焦物镜 105、微流体芯片 106、光收集物镜 107、滤光片 113、光电检测器 114、计算机 116、二维台 109 和荧光微球。激光器 103 用于发射激光，激光经过二元光学器件 104 整形并被聚焦物镜 105 聚焦为所需光斑，在聚焦物镜 105 的焦平面上形成所设计的光斑。光斑照射位于微流体芯片 106 中荧光微球以使荧光微球发出荧光。荧光经光收集物镜 107 收集并被滤光片 113 滤除杂光后进入光电检测器 114。光电检测器 114 将荧光信号转换为电信号。计算机 116 根据电信号的波形特征判别微流体芯片 106 的位置，并控制二维台 109 调节微流体芯片 106 的位置。经过检测的样本流和鞘液流进入废液桶 110 中，观察屏 111 可用于观察光斑。

本发明实施例的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法包括以下步骤：

S1：向微流体芯片注入包含标准荧光微流的样本流和鞘液流，使样本流被聚焦在流道的中心位置，控制二维台进行移动，直至光电检测器中检测到荧光微球的脉冲信号。

具体地，将微流体芯片 106 安装在二维台 109 的固定架 108 上。如图 3 和图 4 所示，通过泵 101 和泵 102 分别向微流体芯片 106 注入样本流 321 和鞘液流 322，鞘液流 322 经过分流器 323 分流，使样本流 321 经过垂直聚焦 324 和水平聚焦 325 后被聚焦在流道的中心位置 326，最终形成被聚焦样本流 327。样本流 321 和鞘液流 322 的流量分别为 $1\mu\text{l/s}$ 和 $120\mu\text{l/s}$ ，流道截面为 $316\mu\text{m}\times 163\mu\text{m}$ ，样本流流速为 4.8m/s 。光线 211 经过二元光学器件 104 整形并被聚焦透镜 105 聚焦，在焦平面上形成聚焦光斑 23。起始时，光电检测器 114 的输出为噪声信号，示波器 115 的输出波形如图 5 所示。之后，控制二维台 109 左右和前后移动，直至光电传感器 114 中检测到荧光微球 431 的脉冲信号。此时，被聚焦样本流 327 在焦平面 212 前后，聚焦后样本流 327 在光斑 23 的照射范围内。一般，根据使用经验，可确定一个初始的调节范围，从而能够尽快调节出荧光脉冲信号。

S2：根据出现荧光信号的极限位置，控制二维台 109 移动直至被聚焦样本流 327 位于光斑的左右中心位置。

在本发明的一个实施例中，步骤 S2 进一步包括：

S201：控制二维台 109 向左移动，直至光电探测器 114 检测不到荧光信号的左极限位置，并记录左极限位置。

S202：控制二维台向右移动，直至光电探测器 114 检测不到荧光信号的右极限位置，并记录右极限位置；

S203：控制二维台移动直至被聚焦样本流位于左极限位置和右极限位置的中间位置；

其中，二维台向左移动为垂直于所述聚焦物镜 105 和光收集物镜 107 之间的连线向左移动，二维台向右移动为垂直于聚焦物镜 105 和光收集物镜 107 之间的连线向右移动。

具体地，如图 6 所示，由于激光采用二元光学器件 104 整形并被聚焦物镜透镜 105 聚焦，因而在焦面上 212 可以获得一个边界清晰的平顶矩形光斑 23，其长边垂直于液流的流动方向，短边与液流方向平行。前后调节二维台 109 调节微流体芯片 106 的位置，直至获得最大脉冲幅值，此时被聚焦样本流 327 位于聚焦透镜 105 的焦平面 212 附近。向左调节微流体芯片 106 直至没有荧光信号的左极限位置，此时被聚焦样本流 327 恰好位于光斑的左外侧；再向右调节微流体芯片 106，此时荧光信号又显现出来，持续向右调节直至再次没有荧光信号，此时被聚焦样本流 327 恰好位于光斑的右外侧。根据两个没有荧光信号的右极限位置，调节微流体芯片 106 使被聚焦样本流 327 位于这两个位置的中间位置，此时被聚焦样本流 327 位于光斑的左右中线上 56。经过上述调节，被聚焦样本流 327 位于焦平面 212 附近，且位于光斑的左右中线上。

S3：根据预设特征波形控制二维台移动直至被聚焦样本流 327 位于焦平面上。

在本发明的一个实施例中，步骤 S3 进一步包括：

S301：设定被聚焦样本流 327 位于焦面上以及附近时单个荧光微球 431 的荧光脉冲信号的预设波形特征；

S302：控制二维台 109 向前后方向移动，直至在计算机采集波形特征与焦面上预设波形特征相符合时停止二维台移动调整被聚焦样本流 327 位于聚焦物镜 105 的焦面 212 上。

具体地，如图 7 所示，由于激光采用二元光学器件 104 整形，光斑只有在焦平面 212 上才能有最佳的均匀性和精准的尺寸。离焦时，根据距离焦面的距离和前后位置，光斑会发生变形 601~605。因而，当标准荧光微球 431 粒经过光斑时，其发射出的荧光信号会发生变化 606~610。根据波形的特征不仅能够判别被聚焦样本流 327 位于焦面 212 前还是焦面后，还能判别其距离焦面的距离。调节微流体芯片 106 的前后位置，当荧光信号的波形符合样本流位于焦面上时的波形特征时，被聚焦样本流 327 已经被精确地调节在焦平 212 上。

S4：根据荧光信号的变异系数对二维台进行微调直至被聚焦样本流 327 位于最佳照射位置。

在本发明的一个实施例中，步骤 S4 进一步包括：

S401：控制二维台在左右方向上进行微调，并采集在移动过程中荧光信号的变异系数；

S402：控制二维台移动至变异系数最小对应的位置。

具体地，如图 8 所示，虽然被聚焦样本流 327 已经被精确地调节在焦平面 212 上，但由于激光采用二元光学器件整形，故光斑不是绝对的平顶（不是绝对均匀）。这将影响照射质量和测试结果。因而，可以左右细微调节被聚焦样本流 327 的位置 741。取荧光脉冲的

面积 711 为荧光信号的强度，收集计算 10000 个荧光微球 431 的荧光信号 72。绘制这些信号强度的直方图 73 并用一个门 731 去除偏离均值的信号，计算门内信号的变异系数。左右细微调节微流体芯片 106 既被聚焦样本流 327 的位置 741，当变异系数最小时即为最佳的照射位置。此时，被聚焦样本流 327 不仅被精确地调节在焦平面上，还处于最佳的照射位置，至此完成调节。

在本发明的一个实施例中，在步骤 S4 之后还包括：

S5：通入清洗剂清洗流道。以便在清洗之后可向流道再次通入包含生物微粒的样本流和鞘液流进行检测。

本发明的实施例还公开了一种基于二元光学器件的微流体芯片自动对准系统，包括如下硬件：激光器 103、二元光学器件 104、聚焦物镜 105、微流体芯片 106、光收集物镜 107、滤光片 113、光电检测器 114、计算机 116、二维台 109 和荧光微球 431。激光器 103 用于发射激光，激光经过二元光学器件 104 整形并被聚焦物镜 105 聚焦为所需光斑 23。光斑照射位于微流体芯片 106 中荧光微球以使荧光微球发出荧光。荧光经光收集物镜 107 收集并被滤光片 113 滤除杂光后进入光电检测器 114。光电检测器 114 将荧光信号转换为电信号。泵 101 和 102 或其他液流源在向微流体芯片 106 注入包含标准荧光微流的样本流和鞘液流，使样本流被聚焦在流道的中心位置后，计算机 116 控制二维台进行移动至光电检测器中检测到荧光微球的脉冲信号；计算机 116 还用于根据出现荧光信号的极限位置，控制二维台移动使被聚焦样本流 327 位于光斑的中心位置；计算机 116 还用于根据预设的特征波形控制二维台移动使被聚焦样本流 327 位于焦平面上；计算机 116 还用于根据荧光信号的变异系数对二维台进行微调直至被聚焦样本流 327 位于最佳照射位置。

在本发明的一个实施例中，计算机 116 进一步用于：控制二维台 109 向左移动，直至光电检测器 114 检测不到荧光信号的左极限位置，并记录左极限位置；控制二维台 109 向右移动，直至光电检测器 114 检测不到荧光信号的右极限位置，并记录右极限位置；控制二维台 109 移动使被聚焦样本流 327 位于左极限位置和右极限位置的中间位置；其中，二维台 109 向左移动为垂直于所述聚焦物镜 105 和所述光收集物镜 107 之间的连线向左移动，二维台 109 向右移动为垂直于所述聚焦物镜和所述光收集物镜之间的连线向右移动。

在本发明的一个实施例中，计算机 116 进一步用于：设定被聚焦样本流 327 中荧光微球 431 位于焦面上以及附近时的预设波形特征；控制二维台 109 向前后方向移动，直至在计算机 116 采集波形特征与焦面上预设波形特征相符合时停止二维台 109 移动调整被聚焦样本流 327 位于第一聚焦物镜 105 的焦面 212 上。

在本发明的一个实施例中，计算机 116 进一步用于：控制二维台 109 在左右方向上进

行移动以调节被聚焦样本流 327 在左右方向的位置，并采集在移动过程中荧光信号的变异系数；控制二维台 109 移动至变异系数最小对应的位置。

在本发明的一个实施例中，光电检测器 114 为光电倍增管、光电倍增管阵列、电荷藕荷单元或光电二极管。

5 需要说明的是，本发明实施例的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准系统的具体实施方式与本发明实施例的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法的具体实施方式相同，不再赘述。

10 本发明的实施例还公开了一种设备，包括：一个或者多个处理器；存储器；一个或者多个程序，所述一个或者多个程序存储在所述存储器中，当被所述一个或者多个处理器执行时，执行如上述实施例所述的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法。

15 本发明的实施例还公开了一种非易失性计算机存储介质，计算机存储介质存储有一个或者多个程序，当一个或者多个程序被一个设备执行时，使得设备执行上述实施例所述的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法。

另外，本发明实施例的批量化生产的多层微流体芯片制作方法、系统和非易失性计算机存储介质的其它构成以及作用对于本领域的技术人员而言都是已知的，为了减少冗余，不做赘述。

20 在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

25 尽管已经示出和描述了本发明的实施例，本领域的普通技术人员可以理解：在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型，本发明的范围由权利要求及其等同限定。

权利要求书

1、一种基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法，其特征在于，包括激光器、二元光学器件、聚焦物镜、微流体芯片、光收集物镜、滤光片、光电检测器、计算机、二维台和荧光微球，所述激光器用于发射激光，所述激光经过所述二元光学器件整形并被聚焦物镜聚焦为所需光斑，所述光斑照射位于所述微流体芯片中所述荧光微球以使所述荧光微球发出荧光，所述荧光经所述光收集物镜收集并被所述滤光片滤除杂光后进入所述光电检测器，所述光电检测器将荧光信号转换为电信号，所述计算机根据所述电信号的波形特征判别被聚焦样本流的位置，并控制所述二维台调节所述微流体芯片中的所述被聚焦样本流的位置；所述方法包括以下步骤：

S1：向所述微流体芯片注入包含标准荧光微流的样本流和鞘液流，使所述样本流被聚焦在流道的中心位置，控制所述二维台进行移动，直至所述光电检测器中检测到所述荧光微球的脉冲信号；

S2：根据出现所述荧光信号的极限位置，控制所述二维台移动，调整被所述聚焦样本流至所述光斑的左右中心位置；

S3：根据预设特征波形控制所述被聚焦样本流移动至焦平面上；

S4：根据所述荧光信号的变异系数对所述二维台进行微调，直至所述被聚焦样本流位于最佳照射位置。

2、根据权利要求1所述的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法，其特征在于，步骤S2进一步包括：

S201：控制所述二维台向左移动，直至所述光电探测器探测不到荧光信号的左极限位置，并记录所述左极限位置；

S202：控制所述二维台向右移动，直至所述光电探测器探测不到荧光信号的右极限位置，并记录所述右极限位置；

S203：控制所述二维台移动至所述被聚焦样本流位于所述左极限位置和所述右极限位置的中间位置；

其中，所述二维台向左移动为垂直于所述第一聚焦物镜和所述第二聚焦物镜之间的连线向左移动，所述二维台向右移动为垂直于所述第一聚焦物镜和所述第二聚焦物镜之间的连线向右移动。

3、根据权利要求2所述的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法，其特征在于，步骤S3进一步包括：

S301: 设定所述被聚焦样本流位于所述焦面上以及附近时的荧光微球发出的荧光脉冲信号的预设波形特征;

S302: 控制所述二维台向前后方向移动, 直至在所述计算机采集波形特征与所述预设波形特征相符合时停止所述二维台移动调整所述被聚焦样本流至所述第一聚焦物镜的焦面上。

4、根据权利要求 3 所述的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法, 其特征在于, 步骤 S4 进一步包括:

S401: 控制所述二维台在左右方向上进行调节, 并采集在调节过程中荧光信号的变异系数;

S402: 控制所述二维台移动使所述被聚焦样本流位于所述变异系数最小对应的位置。

5、根据权利要求 1-4 任一项所述的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准方法, 其特征在于, 在步骤 S4 之后还包括:

S5: 通入清洗剂清洗流道。

6、一种基于二元光学器件的微流体芯片自动对准系统, 其特征在于, 包括激光器、二元光学器件、聚焦物镜、微流体芯片、光收集物镜、滤光片、光电检测器、计算机、二维台和荧光微球, 所述激光器用于发射激光, 所述激光经过所述二元光学器件整形并被聚焦物镜聚焦为所需光斑, 所述光斑照射位于所述微流体芯片中所述荧光微球以使所述荧光微球发出荧光, 所述荧光经所述光收集物镜收集并被所述滤光片滤除杂光后进入所述光电检测器, 所述光电检测器将荧光信号转换为电信号; 泵或其他液流源在向所述微流体芯片注入包含标准荧光微流的样本流和鞘液流, 使所述样本流被聚焦在流道的中心位置后, 所述计算机控制所述二维台进行移动所述光电检测器中检测到所述荧光微球的脉冲信号; 所述计算机还用于根据出现所述荧光信号的极限位置, 控制所述二维台移动、直至所述微流体芯片中被聚焦样本流位于所述光斑的中心位置; 所述计算机还用于根据预设的特征波形控制所述二维台移动, 直至所述被聚焦样本流位于所述聚焦物镜的焦平面上; 所述计算机还用于根据所述荧光信号的变异系数对所述聚焦样本流进行微调直至最佳照射位置。

7、根据权利要求 6 所述的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准系统, 其特征在于, 所述计算机进一步用于:

控制所述二维台向左移动, 直至所述光电探测器探测不到荧光信号的左极限位置, 并记录所述左极限位置; 控制所述二维台向右移动, 直至所述光电探测器探测不到荧光信号的右极限位置, 并记录所述右极限位置; 控制所述二维台移动、直至所述被聚焦样本流位于所述左极限位置和所述右极限位置的中间位置; 其中, 所述二维台向左移动为垂直于所

述聚焦物镜和所述光收集聚焦物镜之间的连线向左移动，所述二维台向右移动为垂直于所述第一聚焦物镜和所述第二聚焦物镜之间的连线向右移动。

8、根据权利要求 7 所述的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准系统，其特征在于，所述计算机进一步用于：

5 设定所述样本流位于所述焦面上以及附近时荧光微球发出的荧光脉冲信号的预设波形特征；控制所述二维台向前后方向移动，直至在所述计算机采集波形特征与所述预设焦面上波形特征相符合时停止所述二维台移动调整直至所述被聚焦样本流位于所述第一聚焦物镜的焦面上。

9、根据权利要求 8 所述的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准系统，其特征在于，
10 所述计算机进一步用于：

控制所述二维台在左右方向上进行移动，并采集在移动过程中荧光信号的变异系数；控制所述二维台移动直至所述被聚焦样本流位于所述变异系数最小对应的位置。

10、根据权利要求 6-9 任一项所述的基于二元光学器件的微流体芯片自动对准系统，其特征在于，所述光电检测器为光电倍增管、光电倍增管阵列、电荷藕荷单元或光电二极
15 管。

11、一种设备，其特征在于，包括：

一个或者多个处理器；

存储器；

一个或者多个程序，所述一个或者多个程序存储在所述存储器中，当被所述一个或者
20 多个处理器执行时，执行如权利要求 1-5 任一项所述的适合于批量化生产的多层微流体芯片制作方法。

12、一种非易失性计算机存储介质，其特征在于，所述计算机存储介质存储有一个或者多个程序，当所述一个或者多个程序被一个设备执行时，使得所述设备执行如权利要求 1-5 任一项所述的适合于批量化生产的多层微流体芯片制作方法。

25

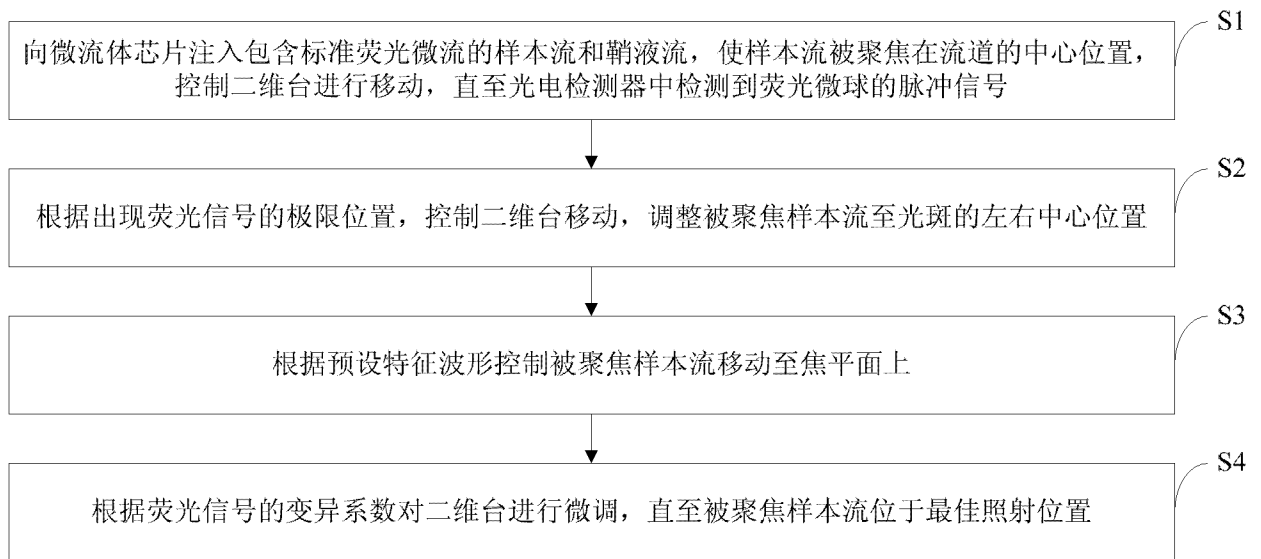


图 1

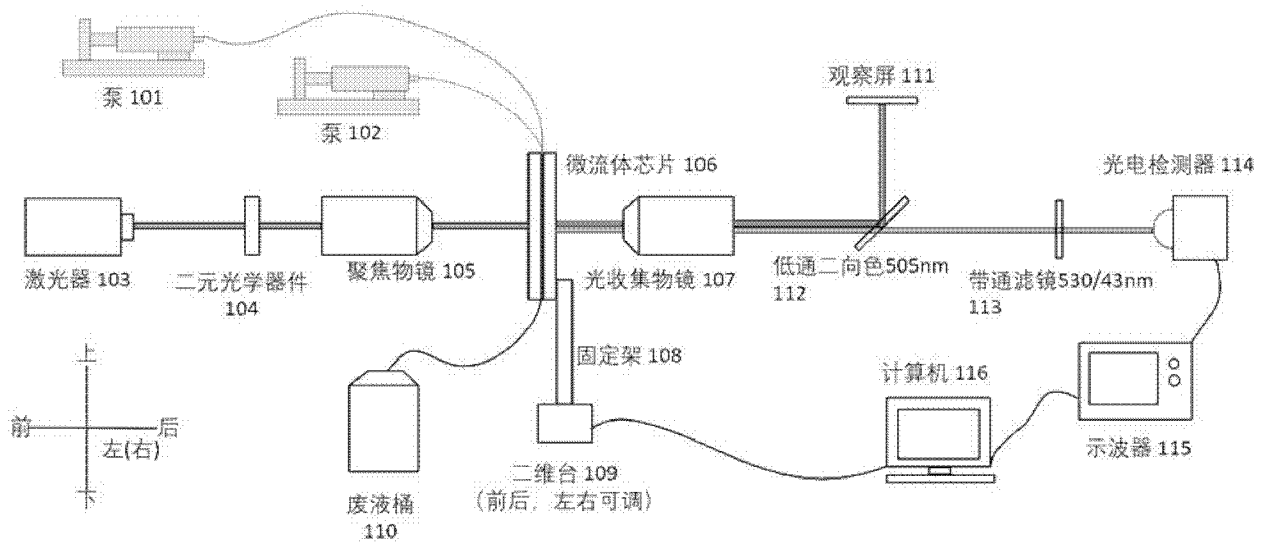


图 2

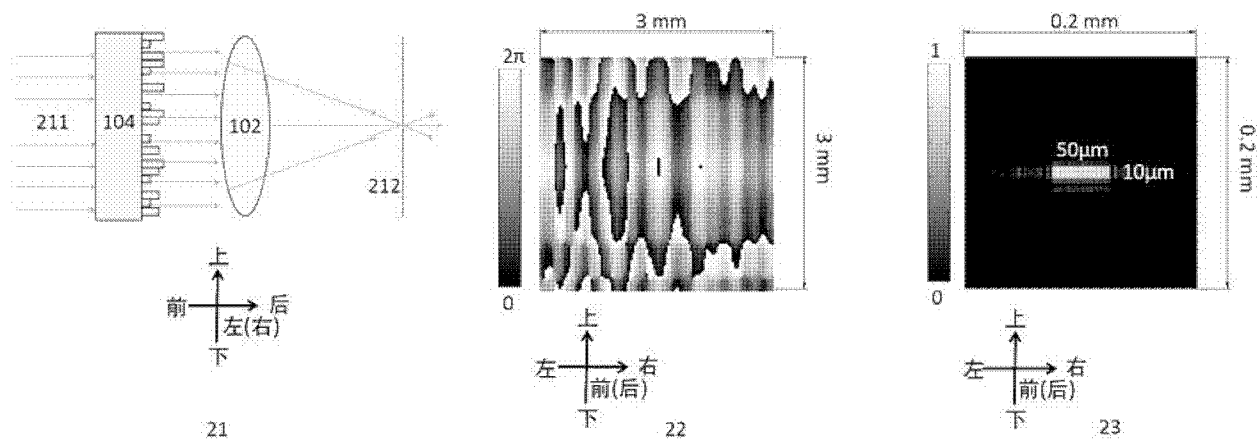


图 3

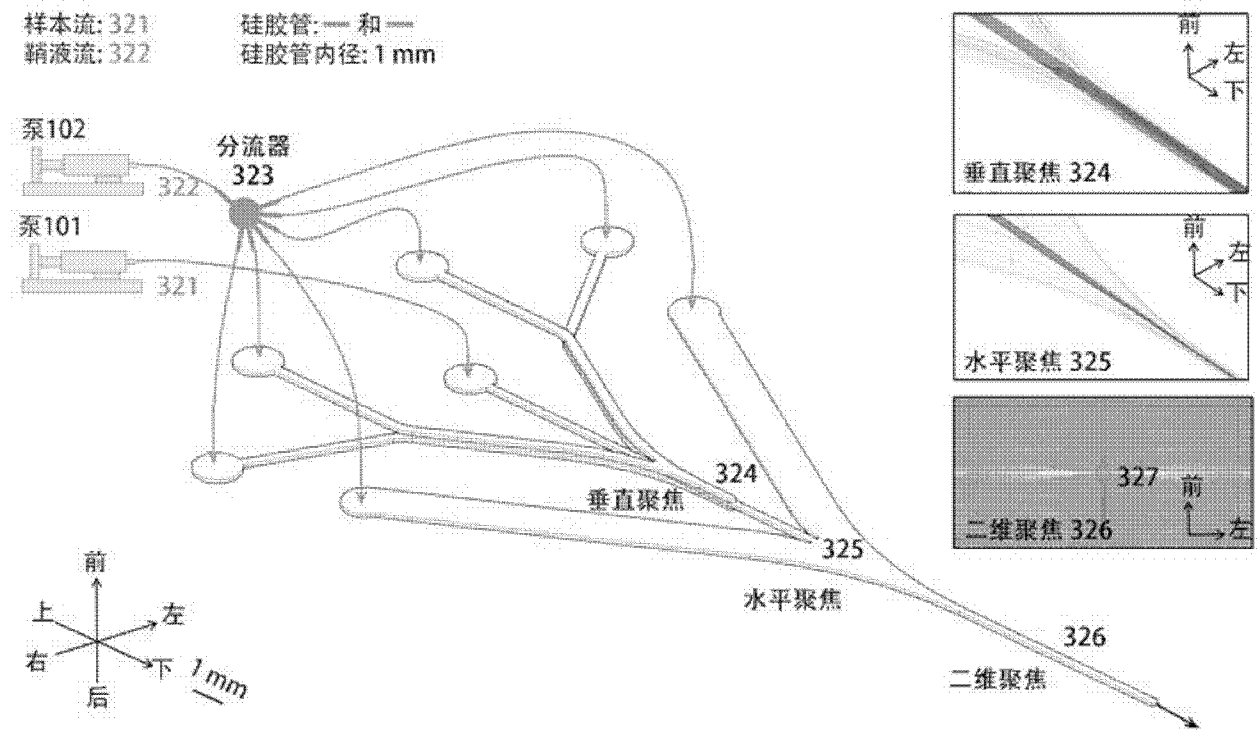


图 4

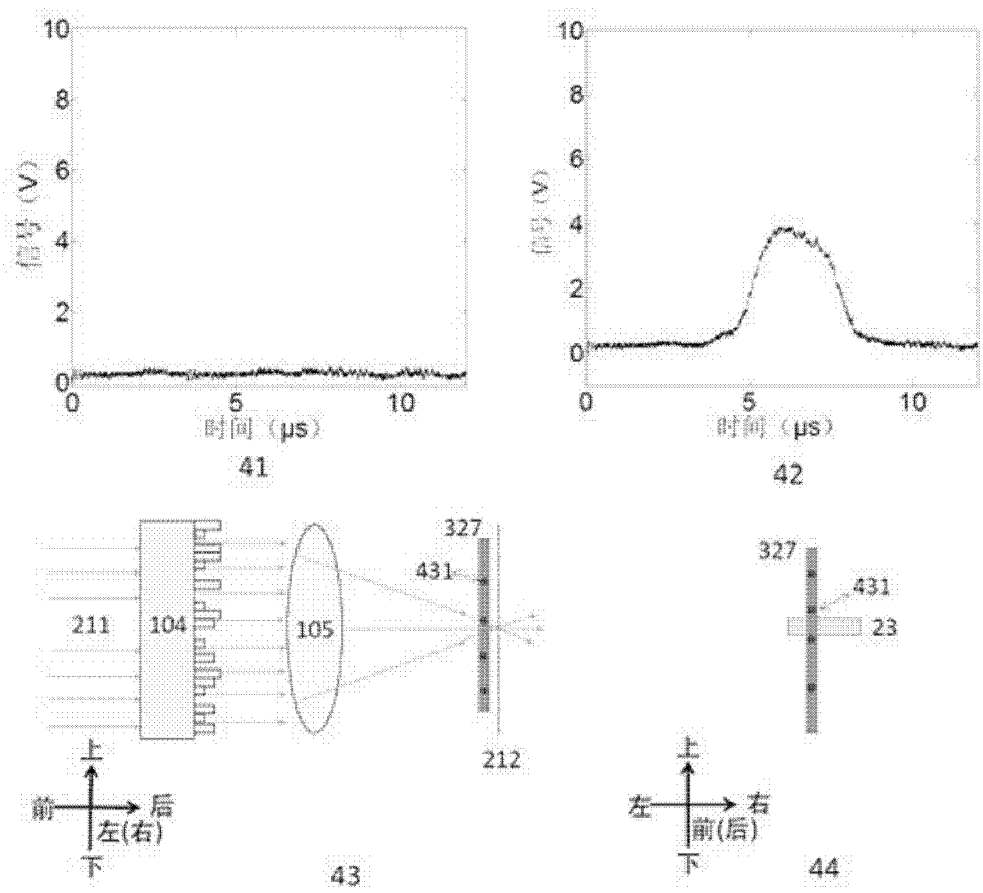


图 5

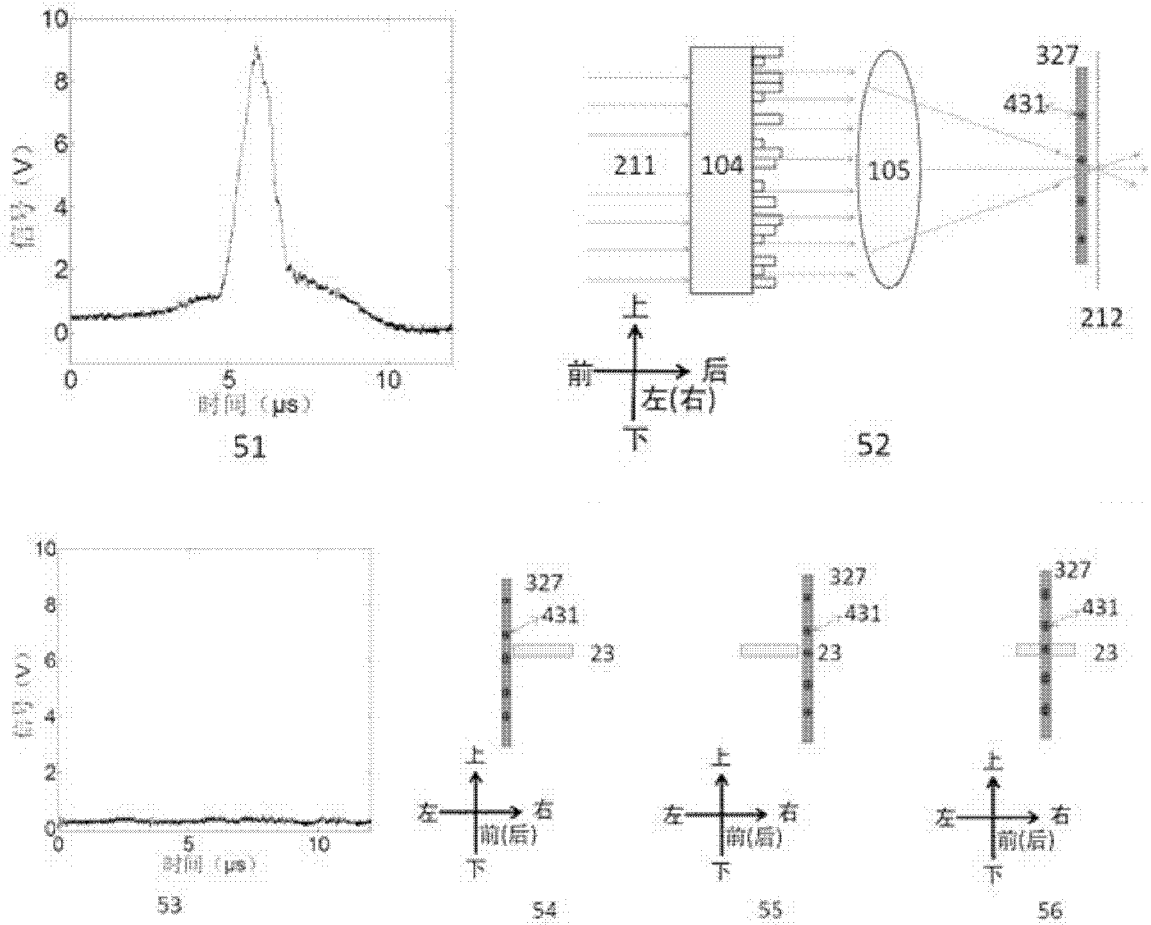


图 6

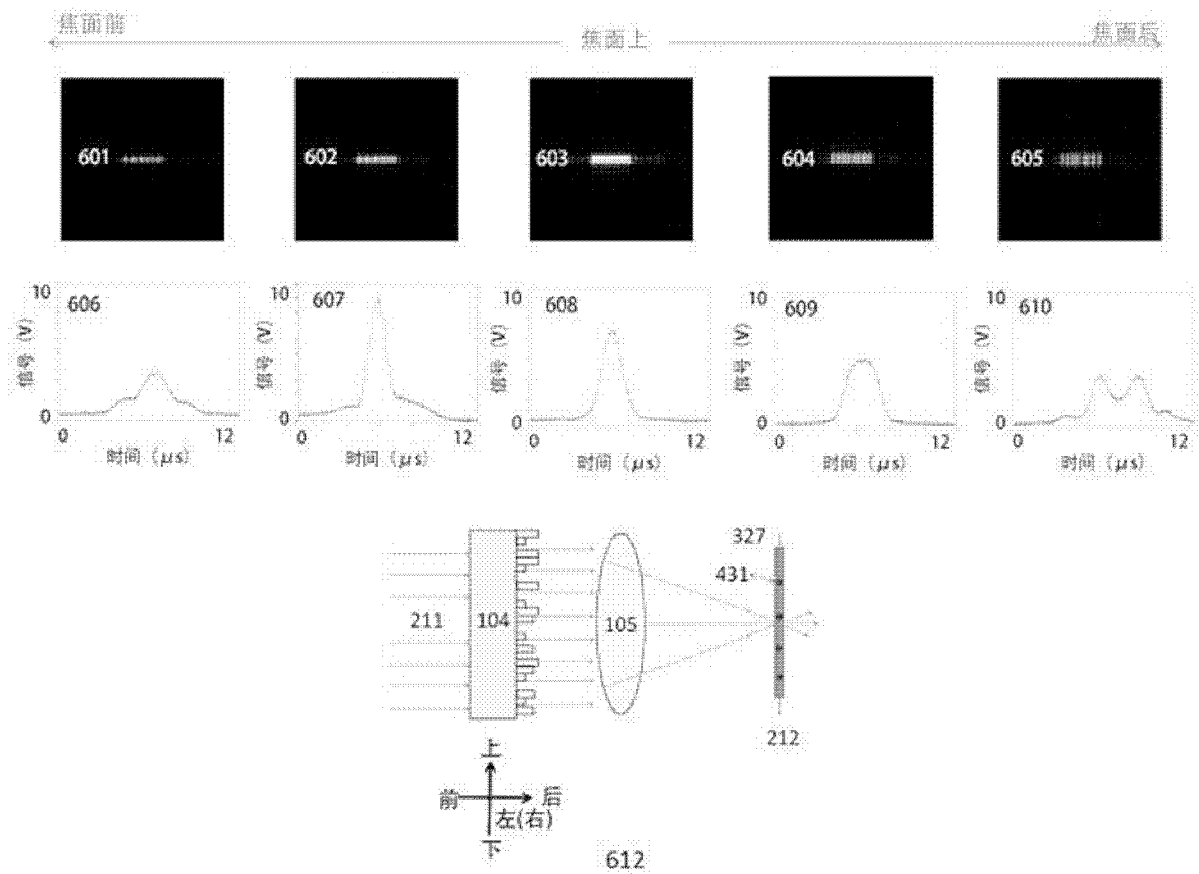


图 7

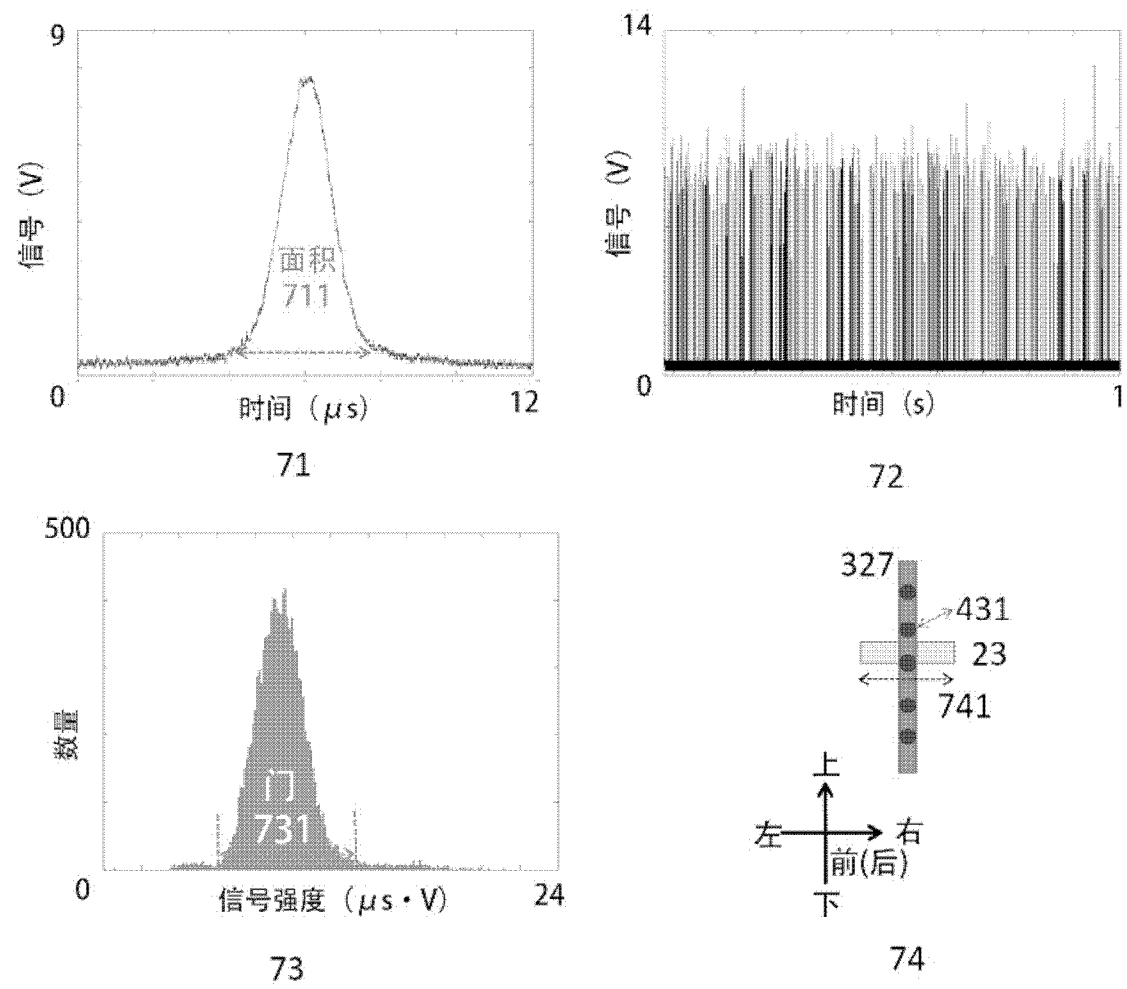


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/104946

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 15/14 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNXTX; CNABS; VEN: 微流体芯片, 对准, 校准, 自动, 聚焦, 光学, 激光, 检测, 移动, 中心, 调节, 调整, 光斑, 预定, 预设, micro-fluidic+, align+, automatic, focus, optical, laser, detect+, movement, motion, central, adjust, light spot, predetermined

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 202177564 U (WUXI RONGXING TECHNOLOGY CO., LTD.), 28 March 2012 (28.03.2012), description, paragraphs [0036]-[0046], and figures 1-12	1-12
A	CN 1954199 A (INTEL CORPORATION), 25 April 2007 (25.04.2007), entire document	1-12
A	CN 102998242 A (NORTH UNIVERSITY OF CHINA), 27 March 2013 (27.03.2013), entire document	1-12
A	US 9341515 B2 (SCHULTE et al.), 17 May 2016 (17.05.2016), entire document	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 16 May 2017	Date of mailing of the international search report 24 May 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer JIANG, Yujing Telephone No. (86-10) 62411559

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/104946

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 202177564 U	28 March 2012	None	
CN 1954199 A	25 April 2007	WO 2005040742 A3	26 April 2007
		US 2005084980 A1	21 April 2005
		WO 2005040742 A2	06 May 2005
		EP 1766346 A2	28 March 2007
		TW 200525136 A	01 August 2005
		TW I304129 B	11 December 2008
CN 102998242 A	27 March 2013	CN 102998242 B	18 June 2014
US 9341515 B2	17 May 2016	US 2012206727 A1	16 August 2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/104946

A. 主题的分类 G01N 15/14 (2006.01) i 按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类																	
B. 检索领域 检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号) G01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用)) CNTXT; CNABS; VEN: 微流体芯片, 对准, 校准, 自动, 聚焦, 光学, 激光, 检测, 移动, 中心, 调节, 调整, 光斑, 预定, 预设, micro-fluidic+, align+, automatic, focus, optical, laser, detect+, movement, motion, central, adjust, light spot, predetermined																	
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 202177564 U (无锡荣兴科技有限公司) 2012年 3月 28日 (2012 - 03 - 28) 说明书第[0036]-[0046]段, 图1-12</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1954199 A (英特尔公司) 2007年 4月 25日 (2007 - 04 - 25) 全文</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102998242 A (中北大学) 2013年 3月 27日 (2013 - 03 - 27) 全文</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 9341515 B2 (SCHULTE 等) 2016年 5月 17日 (2016 - 05 - 17) 全文</td> <td>1-12</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 202177564 U (无锡荣兴科技有限公司) 2012年 3月 28日 (2012 - 03 - 28) 说明书第[0036]-[0046]段, 图1-12	1-12	A	CN 1954199 A (英特尔公司) 2007年 4月 25日 (2007 - 04 - 25) 全文	1-12	A	CN 102998242 A (中北大学) 2013年 3月 27日 (2013 - 03 - 27) 全文	1-12	A	US 9341515 B2 (SCHULTE 等) 2016年 5月 17日 (2016 - 05 - 17) 全文	1-12
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	CN 202177564 U (无锡荣兴科技有限公司) 2012年 3月 28日 (2012 - 03 - 28) 说明书第[0036]-[0046]段, 图1-12	1-12															
A	CN 1954199 A (英特尔公司) 2007年 4月 25日 (2007 - 04 - 25) 全文	1-12															
A	CN 102998242 A (中北大学) 2013年 3月 27日 (2013 - 03 - 27) 全文	1-12															
A	US 9341515 B2 (SCHULTE 等) 2016年 5月 17日 (2016 - 05 - 17) 全文	1-12															
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																	
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																	
国际检索实际完成的日期 2017年 5月 16日		国际检索报告邮寄日期 2017年 5月 24日															
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10) 62019451		受权官员 蒋煜婧 电话号码 (86-10) 62411559															

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/104946

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	202177564	U	2012年 3月 28日	无			
CN	1954199	A	2007年 4月 25日	WO	2005040742	A3	2007年 4月 26日
				US	2005084980	A1	2005年 4月 21日
				WO	2005040742	A2	2005年 5月 6日
				EP	1766346	A2	2007年 3月 28日
				TW	200525136	A	2005年 8月 1日
				TW	I304129	B	2008年 12月 11日
CN	102998242	A	2013年 3月 27日	CN	102998242	B	2014年 6月 18日
US	9341515	B2	2016年 5月 17日	US	2012206727	A1	2012年 8月 16日