



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114252425 A

(43) 申请公布日 2022. 03. 29

(21) 申请号 202011025438.7

(22) 申请日 2020.09.25

(71) 申请人 中国科学院青岛生物能源与过程研究所

地址 266101 山东省青岛市崂山区松岭路189号

(72) 发明人 李远东 阚凌雁 任立辉 葛安乐
籍月彤 马波 徐健

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 徐迅 祝莲君

(51) Int. Cl.

G01N 21/65 (2006.01)

G01N 21/01 (2006.01)

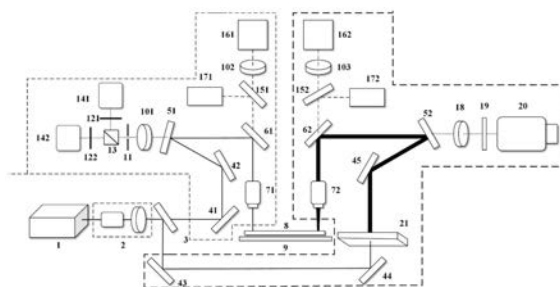
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种高通量拉曼单细胞分选装置及方法

(57) 摘要

本发明提供了一种高通量单细胞分选装置与方法。包括：微流控芯片，用于放置单细胞样品；PMT (光电倍增管) 窄带拉曼单细胞预筛选模块，用于对单细胞样品进行预筛选检测，获得对应于单细胞样品的窄带拉曼信号和窄带背景信号；线阵拉曼单细胞识别模块，用于获取单细胞样品的全谱信息。所述芯片包括依次连接窄带拉曼检测预筛选部分、线阵拉曼检测部分、液滴包裹形成部分、单细胞分选部分；本发明可实现细胞样品的高通量检测、分析和分选。



1. 一种高通量拉曼单细胞分选装置,其特征在于,包括:
 - PMT窄带拉曼单细胞预筛选模块,用于对单细胞样品进行预筛选检测,获得对应于单细胞样品的窄带拉曼信号和窄带背景信号;
 - 线阵拉曼单细胞识别模块,用于获取单细胞样品的全谱信息;
 - 微流控芯片,用于放置单细胞样品。
2. 根据权利要求1所述的高通量单细胞分选装置,其特征在于,所述PMT窄带拉曼单细胞预筛选模块包括激光光源、光电倍增管。
3. 根据权利要求1所述的高通量拉曼单细胞分选装置,其特征在于,所述线阵拉曼单细胞识别模块包括激光光源、线阵光生成器、光谱仪。
4. 根据权利要求1所述的高通量拉曼单细胞分选装置,其特征在于,所述PMT窄带拉曼单细胞预筛选模块、线阵拉曼单细胞识别模块具有同一个激光光源。
5. 根据权利要求1所述的高通量拉曼单细胞分选装置,其特征在于,所述微流控芯片包括依次连接的窄带拉曼检测预筛选部分、线阵拉曼检测部分、液滴包裹形成部分、单细胞分选部分;所述窄带拉曼检测预筛选部分包括依次连接的进样口、第一储液池、第一通道、所述第一通道设有废液池,所述第一通道外侧设有第一分选电极;所述线阵拉曼检测部分依次包括第二储液池、第二通道,所述第二通道设有缓冲液进出口,所述第二通道外侧设有捕获电极;所述液滴包裹形成部分依次包括储油池和液滴包裹形成口;所述单细胞分选部分依次包括第三通道和至少两个分离口,所述第三通道外设有第二分选电极。
6. 根据权利要求5所述的高通量拉曼单细胞分选装置,其特征在于,所述电极外接电源。
7. 根据权利要求1所述的高通量拉曼单细胞分选装置,其特征在于,所述微流控芯片放置于三维移动平台上。
8. 一种高通量拉曼单细胞分选方法,其特征在于,利用权利要求2-7任一所述的高通量拉曼单细胞分选装置,并包括以下步骤:
 - S1:单细胞样品注入微流控芯片;
 - S2:当单细胞样品位于第一通道时,使用PMT窄带显微拉曼单细胞预筛选模块,对所述单细胞样品进行预筛选检测,获得对应于单细胞样品的窄带拉曼信号和窄带背景信号,识别出具有特异性的单细胞样品;
 - S3:在第一分选电极上施加电压,使具有特异性的单细胞样品进入第二储液池并进入第二通道;
 - S4:在捕获电极上施加电压,线阵拉曼单细胞识别模块对单细胞样品进行探测,获得一个或者多个单细胞样品的拉曼光谱,识别单细胞样品;
 - S5:在储油池内注入油相,使单细胞样品在液滴包裹形成口生成液滴,生成的液滴进入第三通道;
 - S6:在第二分选电极上施加电压,使液滴进入不同的分离口进行分选。
9. 根据权利要求8所述的高通量单细胞分选方法,其特征在于,所述步骤S2识别出具有特异性的单细胞样品包括对获得的窄带拉曼信号和窄带背景信号进行数据处理,得到信噪比值,根据预先设置的值做比较,从而分辨单细胞样品是否为具有特异性。
10. 根据权利要求8所述的高通量单细胞分选方法,其特征在于,所述步骤S4中的识别

出所需单细胞包括将所述获得一个或者多个单细胞样品的拉曼光谱与构建的单细胞表型数据库中的标准的拉曼光谱信号或参考的拉曼光谱信号进行比较,获得确定细胞的类型。

11.根据权利要求8所述的高通量单细胞分选方法,其特征在于,所述步骤S6在第二分选电极上施加电压,使液滴进入不同的分离口进行分选包括对依次进入第三通道的液滴,根据步骤S4识别出单细胞样品进行编号,按不同的编号顺序施加不同的电压,从而使液滴进入不同的分离口。

一种高通量拉曼单细胞分选装置及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及显微拉曼单细胞分选领域,尤其涉及一种高通量拉曼单细胞分选装置与方法。

背景技术

[0002] 拉曼光谱是一种高效的信息识别技术,通过对特定入射光线对化合物的非弹性散射谱线分析,显微拉曼光谱可以直接检测化合物分子振动或转动能级,通过对拉曼特征谱线的分析,可以获得化合物分子构成和结构信息。

[0003] 但是目前已有的拉曼显微技术用于样品分析时存在缺陷,以微生物单细胞测量为例:单细胞拉曼光谱信号强度较弱,尤其是当细胞悬浮于液体中时,通常仅有 10^{6-8} 分之一的光子通过拉曼散射,导致获得完整可信的拉曼光谱信号的光谱扫描时间较长,在针对大量的样品分析时,每个细胞进行全谱识别,会大幅度增加样品的分析时间,从而致使采集通量较低。

[0004] 目前市面上的线阵拉曼探测产品,一般针对固态样品或者干片细胞样品进行分析,可以实现单细胞样品的快速分析,但仅于此,无法进行单细胞分离、分选。

[0005] 专利号为CN107462566A的中国专利公布了用于检测特定窄带波数范围的拉曼光谱仪,可实现快速、高灵敏度的检测特定窄波数范围的拉曼图谱,但在现场或者临床样品检测时,可以判定单细胞的特异性,但该专利无法得到完成的拉曼光谱信息,不能实现高通量、快速单细胞种类识别,进而对单细胞进行分离、分选,做后续的处理(如单细胞培养、扩增等)。

发明内容

[0006] 针对以上缺陷,本发明提供了一种高通量拉曼单细胞分选装置与方法。

[0007] 本发明一方面提供了高通量拉曼单细胞分选装置,包括:

[0008] -PMT(光电倍增管)窄带拉曼单细胞预筛选模块,用于对单细胞样品进行预筛选检测,获得对应于单细胞样品的窄带拉曼信号和窄带背景信号;

[0009] -线阵拉曼单细胞识别模块,用于获取单细胞样品的全谱信息;

[0010] -微流控芯片,用于放置单细胞样品。

[0011] 在另一优选例中,所述窄带拉曼单细胞预筛选模块包括激光光源、光电倍增管。

[0012] 在另一优选例中,所述线阵拉曼单细胞识别模块包括激光光源、线阵光生成器、光谱仪。

[0013] 在另一优选例中,所述PMT(光电倍增管)窄带拉曼单细胞预筛选模块,线阵拉曼单细胞识别模块具有同一个激光光源。

[0014] 在另一优选例中,所述微流控芯片放置于三维移动平台上。

[0015] 在另一优选例中,所述微流控芯片包括依次连接的窄带拉曼检测预筛选部分、线阵拉曼检测部分、液滴包裹形成部分、单细胞分选部分;所述窄带拉曼检测预筛选部分包括

依次连接的进样口、第一储液池、第一通道、所述第一通道设有废液池，所述第一通道外侧设有第一分选电极；所述线阵拉曼检测部分依次包括第二储液池、第二通道，所述第二通道设有缓冲液进出口，所述第二通道外侧设有捕获电极；所述液滴包裹形成部分依次包括储油池和液滴包裹形成口；所述单细胞分选部分依次包括第三通道和至少两个分离口，所述第三通道外设有第二分选电极。

[0016] 在另一优选例中，所述窄带拉曼检测预筛选部分快速、高灵敏的筛选出具有特异性的单细胞，并将不具有特异性的单细胞通过加电极的方式分离到废液口剔除掉。

[0017] 在另一优选例中，所述线阵拉曼检测识别部分可以实现高通量的采集单细胞的拉曼信号，得到单细胞的全谱信息，通过数据库比对识别出单细胞种类。

[0018] 在另一优选例中，所述液滴包裹形成部分形成液滴将单细胞包裹起来。

[0019] 在另一优选例中，所述单细胞分选部分通过加载分选电极将液滴包裹的单细胞由不同的分离通道导出。

[0020] 在另一优选例中，所述电极外接电源。

[0021] 在另一优选例中，第一通道的宽度为10-50 μm ，为最窄尺寸。

[0022] 在另一优选例中，第一储液池的宽度为80-100 μm ，为最宽尺寸。

[0023] 所述单细胞样品包括细菌、真菌、微生物等。

[0024] 本发明另一方面提供了一种高通量拉曼单细胞分选方法，包括以下步骤：

[0025] S1：单细胞样品注入微流控芯片；

[0026] S2：当单细胞样品位于第一通道时，使用PMT窄带显微拉曼单细胞预筛选模块，对所述单细胞样品进行预筛选检测，获得对应于单细胞样品的窄带拉曼信号和窄带背景信号，识别出具有特异性的单细胞样品；

[0027] S3：在第一分选电极上施加电压，使具有特异性的单细胞样品进入第二储液池并进入第二通道；

[0028] S4：在捕获电极上施加电压，线阵拉曼单细胞识别模块对单细胞样品进行探测，获得一个或者多个单细胞样品的拉曼光谱，识别单细胞样品；

[0029] S5：在储油池内注入油相，使单细胞样品在液滴包裹形成口生成液滴，生成的液滴进入第三通道；

[0030] S6：在第二分选电极上施加电压，使液滴进入不同的分离口进行分离出。

[0031] 在另一优选例中，所述步骤S2识别出具有特异性的单细胞样品包括对获得的窄带拉曼信号和窄带背景信号进行数据处理，得到信噪比值，根据预先设置的值做比较，从而分辨单细胞样品是否为具有特异性。

[0032] 在另一优选例中，所述步骤S4中的识别出所需单细胞包括将所述获得一个或者多个单细胞样品的拉曼光谱与构建的单细胞表型数据库中的标准的拉曼光谱信号或参考的拉曼光谱信号进行比较，获得确定细胞的类型。

[0033] 在另一优选例中，所述步骤S6在第二分选电极上施加电压，使液滴进入不同的分离口进行分选包括对依次进入第三通道的液滴，根据步骤S4识别出单细胞样品进行编号，按不同的编号顺序施加不同的电压，从而使液滴进入不同的分离口。

[0034] 在另一优选例中，所述单细胞高通量探测方法包括把分选后的单细胞样品进行培养或扩增。

[0035] 本发明的有益效果：

[0036] 本发明阐述一种基于PMT与线阵探测技术联合的高通量并行拉曼单细胞分选装置，首先采用PMT探测器对特定需求的细胞进行初步筛选，大幅度提高筛选通量；而后将已筛选出的具有特异性的细胞通过微流控装置控制进行拉曼全谱并行采集，此策略可以避免所有样品进行全谱分析，大幅度减少样品的采集时间，同时采用线阵拉曼采集特异性细胞的光谱进行细胞的种类识别，最终通过微流控芯片可以将测试完的特异型细胞分选出来，为后续细胞的进一步分析提供可能（如单细胞培养、单细胞测序等），实现细胞样品的高通量检测、分析和分选。

附图说明

[0037] 图1为本发明PMT与线阵拉曼联合的高通量拉曼单细胞分选装置及方法光路示意图。

[0038] 图2为微流控芯片的示意图。

[0039] 附图标记如下：

[0040] 1.激光器 2.扩束准直器 3.激光分束器 41.第一反射镜 42.第二反射镜 43.第三反射镜 44.第四反射镜 45.第五反射镜 51.第一高通滤光片 52.第二高通滤光片 61.第一二向色镜 62.第二二向色镜 71.第一显微镜组 72.第二显微镜组 8.微流控芯片 9.三维移动平台 101.第一透镜 102.第二透镜 103.第三透镜 11.针孔 121.第一窄带滤光片 122.第二窄带滤光片 13.分光棱镜 141.第一PMT 142.第二PMT 151.第一可见光分束器 152.第二可见光分束器 161.第一图像采集器 162.第二图像采集器 171.第一LED光源 172.第二LED光源 18.柱面镜 19.狭缝 20.光谱仪 21.线阵光生成器 22.进样口 23.第一储液池 24.窄带拉曼检测光 25.第一分选电极 26.第一通道 27.废液池 28.第二储液池 29.缓冲液进出口 30.捕获电极 31.线阵拉曼检测光 32.第二通道 33.储油池 34.液滴包裹形成口 35.第二分选电极 36.第三通道 37.第一分离口 38.第二分离口 39.第三分离口

具体实施方式

[0041] 为便于对本发明实施例的理解，下面将结合附图以具体实施例做进一步的解释说明，且各个实施例并不构成对本发明实施例的限定。此外，附图为示意图，因此本发明装置和设备并不受所述示意图的尺寸或比例限制。

[0042] 需要说明的是，在本专利的权利要求和说明书中，诸如第一和第二等之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来，而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。而且，术语“包括”、“包含”或者任何其他变体意在涵盖非排他性的包含，从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素，而且还包括没有明确列出的其他要素，或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。在没有更多限制的情况下，由语句“包括一个”限定的要素，并不排除在包括所述要素的过程、方法、物品或者设备中还存在另外的相同要素。

[0043] 实施例一

[0044] 如图1所示包括PMT窄带拉曼单细胞预筛选光路、线阵拉曼单细胞识别光路，所述

PMT窄带显微拉曼单细胞预筛选光路与线阵显微拉曼单细胞识别光路并行聚焦于所述微流控芯片,所述微流控芯片内盛放有单细胞样品。

[0045] 所述PMT窄带显微拉曼单细胞预筛选光路与线阵显微拉曼单细胞识别光路形成PMT与线阵拉曼联合的高通量拉曼单细胞分选装置及方法,所述单细胞拉曼光谱仪包括激光器1、扩束准直器2、激光分束器3、反射镜41、42、43、44、45、高通滤光片51、52、二向色镜61、62、显微物镜组71、72、微流控芯片8、三维位移平台9、透镜101、102、103、针孔11、窄带滤光片121、122、分光棱镜13、PMT141、142、可见光分束器151、152、图像采集器161、162、LED光源171、172、柱面镜18、狭缝19、光谱仪20、线阵光生成器21等。其中:

[0046] 所述激光器1出射的激光光束经过扩束准直器2产生平行光,平行光束依次经过激光分束器3、第一反射镜41、第二反射镜42、第一高通滤光片51、第一二向色镜61、第一显微物镜组71聚焦于所述微流控芯片8内单细胞样品上,产生拉曼信号,拉曼信号依次反向经过第一显微物镜组71、第一二向色镜61、第一高通滤光片51、第一透镜101、针孔11、分光棱镜13,均分进入第一窄带滤光片121、第二窄带滤光片122分别进入第一PMT141和第二PMT142。

[0047] 所述第一LED光源171依次经过第一可见光分束器151、第一二向色镜61、第一显微物镜组71聚焦于微流控芯片8,得到单细胞样品图像信息,图像信息依次反向经过第一显微物镜71、第一二向色片61、第一可见光分束器151、第二透镜102进入第一图像采集器161。

[0048] 所述激光器1出射的激光光束经过扩束准直器2产生平行光,平行光束依次经过激光分束器3、第三反射镜43、第四反射镜44、线阵光生成器21、第五反射镜45、第二高通滤光片52、第二二向色镜62、第二显微物镜组72聚焦于所述微流控芯片8内单细胞样品上,产生拉曼信号,拉曼信号依次反向经过第二显微物镜组72、第二二向色镜62、第二高通滤光片52、柱面镜18、狭缝进入19光谱仪20。

[0049] 所述第二LED光源172依次经过第二可见光分束器152、第二二向色镜62、第二显微物镜组72聚焦于微流控芯片8,得到单细胞样品图像信息,图像信息依次反向经过第二显微物镜72、第二二向色片62、第二可见光分束器152、第三透镜103进入第二图像采集器162。

[0050] 所述PMT窄带显微拉曼单细胞预筛选光路及线阵显微拉曼单细胞识别光路并行聚焦于微流控芯片,依次探测单细胞样品。

[0051] 所述三维位移平台9放置有微流控芯片8,三维位移平台9的移动带动微流控芯片8的移动。

[0052] 实施例二

[0053] 如图2所述为一种微流控芯片示意图,具体包括:

[0054] 进样口22、第一储液池23、第一分选电极25、第一通道26、废液池27;样品通过进样口22进入第一储液池23等待检测,随着样品不断的流入单细胞依次由第一储液池23进入第一通道26,到达窄带拉曼检测光24的聚焦位置,窄带拉曼检测能够快速、高灵敏地检测出单细胞的窄带光谱信号,根据检测出的窄带光谱信号判别出该单细胞是否具有特异性,特指出的是所述单细胞特异性具有不确定性,需要根据实际的实验需求来设置该特异性,具有特异性的单细胞不施加电极,直接进入线阵拉曼检测部分的检测,不具有的特异性的单细胞施加电极,进入废液口剔除掉。

[0055] 线阵拉曼检测部分依次包括第二储液池28、缓冲液入口29、捕获电极20、线阵拉曼检测光31、第二通道32;具有特异性的单细胞由第二储液池28进入第二通道32,缓冲液进

入口29注入缓冲液,在缓冲液的作用下单细胞成线状排列,捕获电极30将成线状排列的单细胞稳定在线阵拉曼检测光束31的聚焦位置上,聚焦光束照射在单细胞上,单细胞产生全谱拉曼信号,通过光谱仪采集拉曼光谱,计算机对拉曼光谱通过数据库对比,识别出单细胞的种类,采集完成,捕获电极30放电,单细胞进入液滴包裹形成部分。

[0056] 液滴包裹形成部分依次包括储油池33、液滴包裹形成口;在储油池内注入33油相,油相可以实现单细胞在液滴包裹形成口34生成液滴,生成的液滴依次到达第三通道36。

[0057] 单细胞分选部分包括第二分选电极35、第三通道36、第一分离口37、第二分离口38、第三分离口39;对依次进入第三通道的液滴,计算根据识别出的种类进行编号,按不同的编号顺序施加不同的电极,从而使液滴进入不同的分离口:第一分离口37、第二分离口38、第三分离口39。

[0058] 实施例三

[0059] 本发明基于PMT与线阵拉曼联合的高通量拉曼单细胞分选装置,提供了一种单细胞高通量探测方法,包括以下步骤:

[0060] 1. 制备单细胞样品;

[0061] 2. 单细胞样品注入微流控芯片8,微流控芯片盛放于三维位移平台9;

[0062] 3. 单细胞窄带拉曼信号检测:PMT窄带显微拉曼单细胞预筛选光路,对单细胞样品进行预筛选检测,获得对应于单细胞样品的窄带拉曼信号和窄带背景信号;

[0063] 进一步地,在步骤3中还包括步骤:对获得的窄带拉曼信号和窄带背景信号进行数据处理,得到信噪比值,根据预先设置的值做比较,从而决定单细胞样品是否为具有特异性。

[0064] 4. 线阵拉曼信号检测:具有特异性的单细胞样品通过微流控芯片通道进入线阵显微拉曼单细胞识别光路,对位于线阵探测激光束的单细胞样品进行探测,获得一个或者多个单细胞的拉曼光谱;

[0065] 进一步地,在步骤4中还包括步骤:将所述的拉曼光谱信号进行标准化处理(减基线、归一化、杂散峰滤除等)后与构建的单细胞表型数据库中的标准的拉曼光谱信号或参考的拉曼光谱信号进行比较,同时采用深度学习、数据库挖掘等算法快速确定细胞的类型(种类)。

[0066] 5. 在储油池内注入油相,使单细胞样品在液滴包裹形成口生成液滴,生成的液滴进入第三通道。

[0067] 6. 将识别出的单细胞液滴,施加不同电极,单细胞样品进入不同分离口,将分选出的单细胞进行后续处理(例如培养、扩增等)。

[0068] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明方法的前提下,还可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

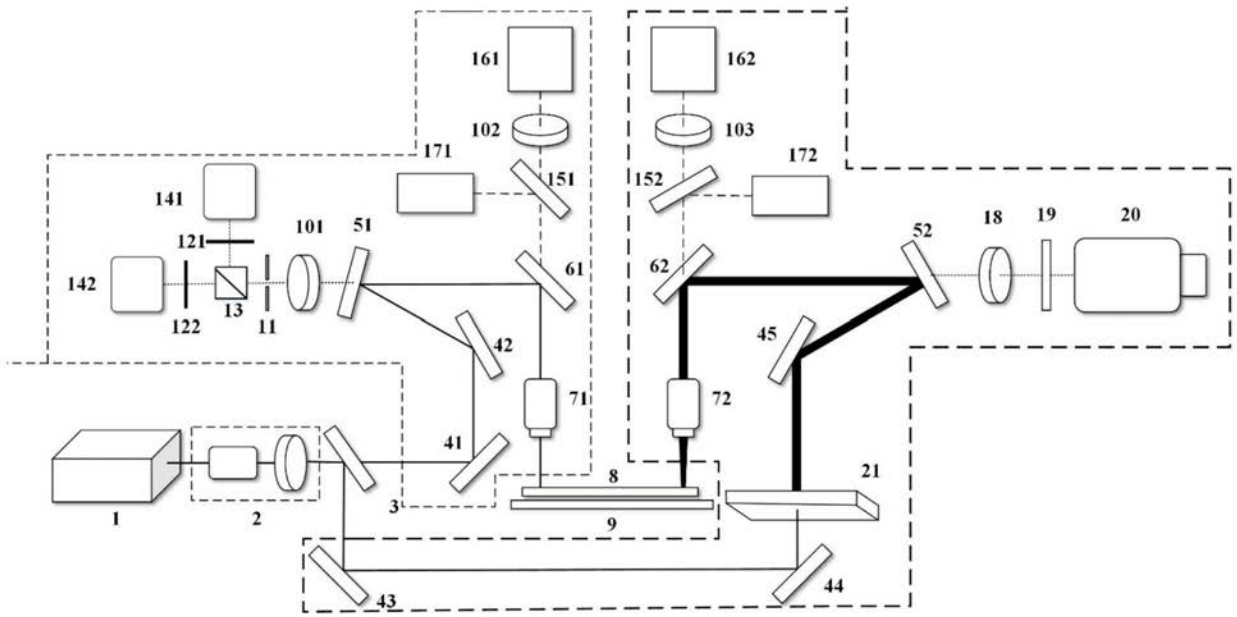


图1

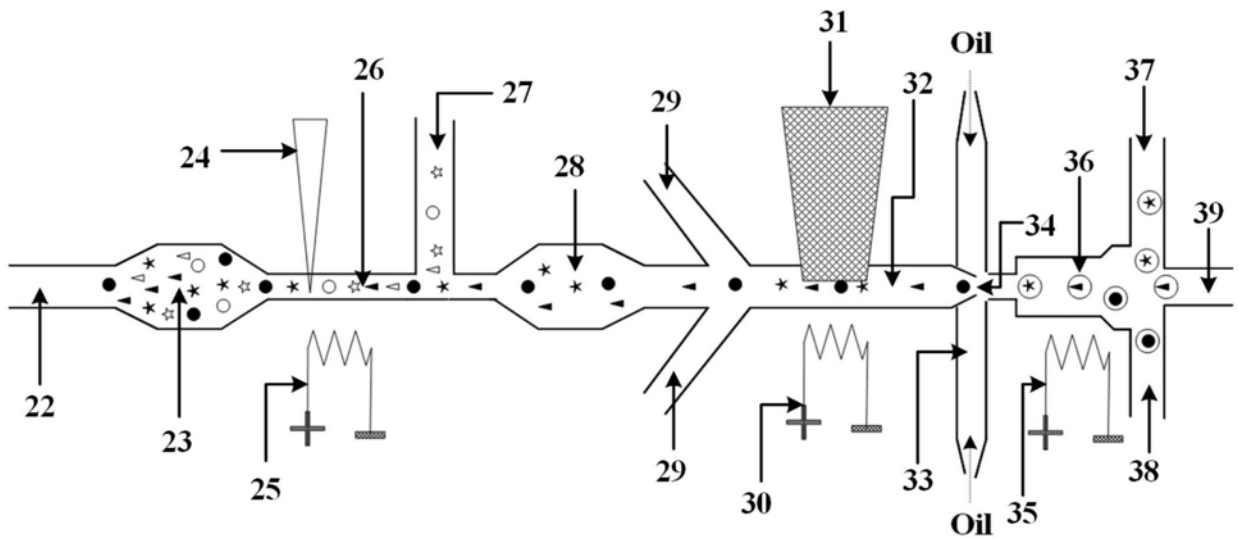


图2