



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101923053 A

(43) 申请公布日 2010.12.22

(21) 申请号 201010230276.0

(22) 申请日 2010.07.19

(71) 申请人 杭州师范大学

地址 310036 浙江省杭州市下沙高教园区学
林街 16 号

(72) 发明人 殷学锋 徐春秀 刘金华

(74) 专利代理机构 杭州天正专利事务所有限公
司 33201

代理人 黄美娟 冷红梅

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

利用微流控芯片连续高速分析单细胞内容物的装置及方法

(57) 摘要

本发明提供了一种结构简单的连续高速分析单细胞内物质的微流控芯片和操作方法。本发明在十字型微流控芯片进样通道的二侧各加一条鞘流通道,通过调节储液池之间的静压力差,使细胞悬液和鞘流液同时从样品池和鞘流液池中流出,在鞘流的作用下,细胞悬液中的单细胞排成一行,依次从进样通道进入分离通道,并在运行过程中与溶膜剂接触、在分离通道入口处于快速溶膜,在分离通道二端所产生的电场力的作用下,溶膜后的细胞内容物全部进入分离通道被连续、高速地分离,激光诱导荧光检测。由于进入分离通道中的溶液是鞘流液和细胞悬液中生理盐水的混合溶液,本发明还可以大大降低进入分离通道中生理盐水的浓度,显著减少电泳时由焦耳热导致的谱带增宽。

1. 一种利用微流控芯片连续高速分析单细胞内容物的装置, 主要包括微流控芯片、直流电源和激光诱导荧光检测器, 所述微流控芯片上设置有呈十字相交的进样通道和分离通道, 在进样通道两侧, 各设置有一条鞘流通道, 两条鞘流通道与进样通道沿进样液流向相交于十字交叉点上游, 与十字交叉点距离为 $10 \sim 1000$ 微米, 进样通道一端设置样品池、另一端设置样品废液池, 分离通道一端设置缓冲液池、另一端设置缓冲液废液池, 两条鞘流通道另一端均设置有鞘流液池。

2. 如权利要求 1 所述的装置, 其特征在于所述两条鞘流通道分别与进样通道沿进样液流向呈 $15 \sim 75^\circ$ 角相交。

3. 一种利用权利要求 1 所述装置连续高速分析单细胞内容物的方法, 所述方法包括: 在缓冲液池和缓冲液废液池中加入电泳缓冲液, 鞘流液池加入溶有溶膜剂的电泳缓冲液即鞘流液, 样品池中加入待测细胞悬液, 通过调节样品废液池和其他储液池之间的静压力差, 使细胞悬液和鞘流液同时从样品池和鞘流液池流出, 细胞悬液和鞘流液沿通道汇合后自动排成一行, 形成单细胞流, 细胞在运行过程中与加在鞘流液中的溶膜剂接触并快速溶膜于分离通道入口处, 在分离通道二端分离电场所产生的电场力的作用下, 溶膜后的细胞内容物全部进入分离通道被连续、高速地分离, 分离后细胞内容物中各组份流经设置于分离通道上的激光诱导荧光检测器, 通过检测荧光强度对细胞内容物中各组份的含量进行分析。

利用微流控芯片连续高速分析单细胞内容物的装置及方法

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用微流控芯片连续高速分析单细胞内物质的装置及方法,属于单细胞分析技术领域。

(二) 背景技术

[0002] 单细胞分析对癌症等重大疾病早期诊断、治疗、药物筛选和细胞生理、病理过程的研究有重要意义。由于细胞微小(直径 $8\mu\text{m}\sim 200\mu\text{m}$,体积 $\text{fL}\sim\text{nL}$),样品量极少($\text{zmol}\sim\text{fmol}$),细胞内组分十分复杂,分析难度很大。毛细管电泳技术是目前进行单细胞多组分分析使用最多的方法。但毛细管电泳技术受毛细管一维结构的限制,单细胞进入毛细管电泳时需使用玻璃毛细管拉制成的直径为微米级的尖端吸住单个细胞,配合以精密的微动操作器,才能完成单细胞进样操作,因此复杂耗时,对操作人员要求很高。所以分析速度很慢。每天只能分析几十个细胞。

[0003] 由于微流控芯片的网络结构和微米级的通道尺寸,以及芯片毛细管电泳高效分离的特性,单细胞的进样、溶膜以及胞内物质的分离分析可以在一块微流控芯片上实现。在十字和双 T 微流控芯片上,通过电控、液压结合电控或激光镊子,操纵单细胞从微流控分析芯片的进样通道进入分离通道,使细胞精确停留在分离通道中进样口管壁上,静态溶膜后,通过芯片毛细管电泳分离分析测定胞内物质的含量。但固定细胞在分离通道进口管壁上和静态溶膜的操作复杂,需要时间也较长,因此大大限制了单细胞分析的速率。这种方法分析单细胞的速度在每小时 25 个细胞以下。

[0004] 至今为止,只有三篇文献报道了在微流控芯片上进行连续高速分析单细胞内物质含量的方法。但细胞连续进样时细胞悬浮液中的生理盐水和单细胞一起进入分离通道,导致电泳时焦耳热增加,分离性能变差。为了避免焦耳热的增加,需使用昂贵的脉冲交流电叠加直流电的特殊电源和微量注射泵等设备(*Analytical Chemistry* 2003,75,5646~5655)。由于这些原因,在微流控芯片上进行连续高速分析单细胞内物质的方法未得到广泛应用。

(三) 发明内容

[0005] 本发明提供一种结构简单能连续高速分析单细胞内物质的微流控芯片和操作方法。

[0006] 本发明采用的技术方案是:

[0007] 一种利用微流控芯片连续高速分析单细胞内容物的装置,主要包括微流控芯片、高压直流电源和激光诱导荧光检测器,所述微流控芯片上设置有呈十字相交的进样通道和分离通道,在进样通道两侧,各设置有一条鞘流通道,两条鞘流通道与进样通道沿进样液流向相交于十字交叉点上游,与十字交叉点距离为 $10\sim 1000$ 微米,进样通道一端设置样品池、另一端设置样品废液池,分离通道一端设置缓冲液池、另一端设置缓冲液废液池,在两条鞘流通道另一端均设置有鞘流液池。通常,进样通道,鞘流通道宽度和深度需大于或等于

和分离通道的宽度和深度。高压直流电源电压一般为 500 ~ 10000V, 正极与缓冲液池相连、负极与缓冲液废液池相连, 在分离通道内形成直流电场。激光诱导荧光检测器的检测点一般设置在缓冲液废液池与十字交叉点之间的分离通道中, 用于检测待测物质在激光诱导下发出荧光的光强度。

[0008] 本发明通过在十字型微流控芯片进样通道的二侧各加一条鞘流通道, 鞘流液由溶膜剂和电泳缓冲溶液混合配制, 提供一种结构简单能连续高速分析单细胞内物质的微流控芯片和操作方法。通过调节样品废液池和其他储液池之间的液面差, 使置于样品池中的细胞悬液和鞘流液同时从样品池和鞘流液池流出。细胞悬液中的单细胞通过进样通道与鞘流通道的交叉点后, 受到鞘流从二个侧面的挤压而自动排成一行, 细胞在运行过程中与加在鞘流液中的溶膜剂接触并快速溶膜于分离通道入口处, 在分离通道两端电场力作用下, 溶膜后的细胞内容物从进样通道进入分离通道, 流经设置于分离通道上的激光诱导荧光检测器, 通过检测荧光强度对细胞内容物含量进行分析。在本发明中, 进入微流控芯片分离通道中的溶液是鞘流液和细胞悬液中生理盐水的混合溶液。它既可以使单细胞在分离通道入口处快速溶膜, 还可以使进入分离通道中细胞悬液的比例大大缩小, 使电泳缓冲液中生理盐水的浓度大大降低, 显著减少焦耳热导致的谱带增宽。

[0009] 所述两条鞘流通道分别与进样通道沿进样液流向呈 15 ~ 75° 角相交。

[0010] 参见图 1 和图 2 本发明提供的连续高速分析单细胞内物质的微流控芯片上有缓冲液池 (B)、样品池 (S)、样品废液池 (SW)、二个鞘流液池 (SF₁ 和 SF₂) 和缓冲液废液池 (BW) 以及进样通道、鞘流通道和分离通道。所述的样品储液池和样品废液池之间的通道为进样通道 S-SW; 在进样通道的二侧各有一条与鞘流液池相通的鞘流通道, 所述的分离通道 B-BW 和进样通道垂直相交, 进样通道与分离通道十字相交于 O 点, 两条鞘流通道与进样通道相交于 O 点上游。激光点置于 O 点下游的分离通道下方, 用于检测细胞内物质在激光诱导下发出荧光的光强度。

[0011] 本发明还涉及一种利用所述装置连续高速分析单细胞内容物的方法, 所述方法包括: 在缓冲液池和缓冲液废液池中加入电泳缓冲液, 鞘流液池加入溶有溶膜剂的电泳缓冲液即鞘流液, 样品池中加入待测细胞悬液, 使细胞悬液和鞘流液同时从样品池和鞘流液池流出, 细胞悬液和鞘流液沿通道汇合后形成单细胞流, 细胞在运行过程中与加在鞘流液中的溶膜剂接触并快速溶膜于分离通道入口处, 在分离通道两端电场力作用下, 溶膜后的细胞内容物全部从进样通道进入分离通道, 流经设置于分离通道上的激光诱导荧光检测器, 通过检测荧光强度对细胞内容物含量进行分析。通过改变溶膜剂的种类、浓度以及两条鞘流通道与进样通道沿进样液流向相交于十字交叉点上游的距离, 可使细胞在与鞘流溶液接触 50ms 内快速溶膜于分离通道入口处, 溶膜后的细胞内容物在分离通道二端分离电场所产生的电场力的作用下, 全部进入分离通道。

[0012] 本方法的关键在于利用含有溶膜剂的鞘流液对细胞悬液侧面进行挤压使之自动排成一行, 并使之快速溶膜, 具体溶膜剂及电泳缓冲液可按本领域常规方法进行选择, 本领域普通技术人员可根据常识, 依据待测细胞的不同选择不同的溶膜剂。通常, 细胞浓度为 0.5 ~ 10 × 10⁵ cells/mL, 溶膜剂在缓冲液中浓度为 0.1 ~ 10% (w/w)。

[0013] 本发明中微流控芯片单细胞的分析步骤如下:

[0014] 在微流控芯片上缓冲液池 B 和缓冲液废液池 BW 中加入电泳缓冲液, 鞘流液池 SF₁

和 SF₂ 中加入含溶膜剂的电泳缓冲溶液,在样品池 S 中加入细胞悬液,样品废液池 SW 空置。在液面差导致的静压力的驱动下,样品池中的细胞悬液和鞘流同时从样品池和鞘流液池流出,细胞液流与鞘流通道会流后,细胞悬液中的单细胞受到鞘流的挤压排成一行继续运行,并在运行中与鞘流液中的溶膜剂接触,在分离通道二端分离电场所产生的电场力的作用下,每分钟可控制 150 个细胞连续、单个地从进样通道进入分离通道,并在分离通道入口处处于 50ms 内快速溶膜,溶膜后的细胞内容物全部进入分离通道被芯片毛细管电压连续、高速地分离检测。

[0015] 本发明方法操作方便,通过调节样品废液池和其他储液池之间的液面差,可以使细胞悬液中的单细胞在鞘流挤压下自动排成一行,大大提高了单细胞的进样速率,避免了多个细胞同时从进样通道进入分离通道;通过将溶膜剂加在电泳缓冲液中作为鞘流液,可以使单细胞在分离通道入口处快速溶膜,并使溶膜后的细胞内容物全部进入分离通道予以连续、高速地分离检测。由于进入微流控芯片分离通道中的溶液是鞘流液和细胞悬液中生理盐水的混合溶液,还可以使细胞连续进样时进入分离通道中生理盐水的浓度大大降低,显著减少焦耳热导致的谱带增宽。

(四) 附图说明

[0016] 图 1 为鞘流聚焦连续分析单细胞的微流控芯片示意图;

[0017] 图 2 为鞘流聚焦连续分析单细胞的装置图;

[0018] 图 3 为微流控芯片鞘流聚焦连续分析单细胞示意图;

[0019] 图 4 为单细胞内容物电泳检测结果图。

(五) 具体实施方式

[0020] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0021] 实施例 1:

[0022] 参见图 1,微流控芯片上有缓冲液池 (B)、样品池 (S)、样品废液池 (SW)、二个鞘流储液池 (SF₁ 和 SF₂) 和缓冲液废液池 (BW)。进样通道为 S-SW,长度为 12mm、通道宽 95 μm,深 35 μm,通道 S-O 长度为 6mm;分离通道为 B-BW,长度为 46mm,通道宽 65 μm,深 20 μm,通道 B-O 长度为 6mm;进样通道与分离通道十字相交于 O 点。在进样通道的二侧各有一条鞘流通道,与进样通道相交于 O 点上方 200nm 处,鞘流通道宽 95 μm,深 35 μm,长度为 6mm。在进样通道,分离通道和鞘流通道的端点处各打小孔,在小孔上用粘接剂粘合微量塑料储液池。

[0023] 参见图 2,将电泳缓冲液(如硼酸缓冲液、N-甘氨酸缓冲液等)100 μL、100 μL 分别加入储液池 B 和 BW 中,将 100 μL 用荧光试剂孵育过的细胞悬液(1.2×10⁵ cells/mL)加入样品池 S。将含有溶膜剂(常规溶膜剂,如 triton X-100,十二烷基磺酸钠、毛地黄皂苷等)的电泳缓冲液 100 μL,100 μL 分别加入鞘流储液池 SF₁ 和 SF₂,储液池 SW 中不加溶液。在分离通道二端的 B 和 BW 储液池中施加 2000V 直流电压。

[0024] 参见图 3,由于液面高度不同,细胞悬液中的细胞从储液池 S 流向 SW。同时含有溶膜剂电泳缓冲液从鞘流液池 SF₁ 和 SF₂ 流出。细胞液流与鞘流通道会流后,鞘流从二个侧面的挤压细胞悬液中的细胞,使细胞排成一行。细胞在运行中与鞘流液中的溶膜剂接触,当

细胞运行到进样通道与分离通道的交叉点 0 后,被施在分离通道二端分离电场所产生的电场力的作用下,使单细胞依次从进样通道拐弯进入分离通道并在在分离通道入口处快速溶膜,溶膜后的细胞内容物全部进入分离通道。通过调节样品废液池和其他储液池之间的液面差和细胞悬液中细胞的浓度,每分钟可控制 150 个细胞连续地单个地从进样通道进入分离通道,并在分离通道入口处处于 50ms 内快速溶膜,溶膜后释放出的细胞内容物质被芯片毛细管电泳连续、高速地分离检测。

[0025] 实施例 2:单个血红细胞内谷胱甘肽和活性氧的测定

[0026] 本实施例使用的微流控芯片与实施例 1 一致,样品为红细胞悬液。用蔡二甲醛和双氢罗丹明 123 分别标记细胞中谷胱甘肽和活性氧,用生理盐水稀释配置密度为 1.2×10^5 cells/mL 细胞悬液后,加入样品池;将 20mmol 硼酸缓冲溶液 (pH 9.2) 加入储液池 B 和 BW 中,将含有溶膜剂 (tritonX-100, 浓度 1%, w/w) 电泳缓冲液 (20mmol 硼酸缓冲溶液, pH 9.2) 加入鞘流储液池 SF₁ 和 SF₂ 中,各储液池中的加液量与实施例 1 一致。在分离通道二端的 B 和 BW 储液池中施加 2000V 直流电压。

[0027] 由于液面高度不同,红细胞悬液中的细胞从储液池 S 流向 SW。同时含有溶膜剂电泳缓冲液从鞘流液池流出,通过进样通道与鞘流通道的交叉点后,使红细胞排成一行。细胞与添加在鞘流液中的溶膜剂 triton X-100 在运动中相接触。当细胞运行到进样通道与分离通道的交叉点 0 后,在分离通道二端分离电场所产生的电场力的作用下,单细胞依次从进样通道拐弯进入分离通道并在分离通道入口处快速溶膜,溶膜后的细胞内谷胱甘肽和活性氧全部进入分离通道。被芯片毛细管电泳连续、高速地分离检测。测定结果见图 4。通过控制单细胞的进样速度和分离通道的长度,可以使同一个单细胞内谷胱甘肽和活性氧达到基线分离,且不同单细胞间的测定结果也不互相干扰。从图 4 可见,在 19 秒内测定了 12 个细胞中的谷胱甘肽和活性氧含量。

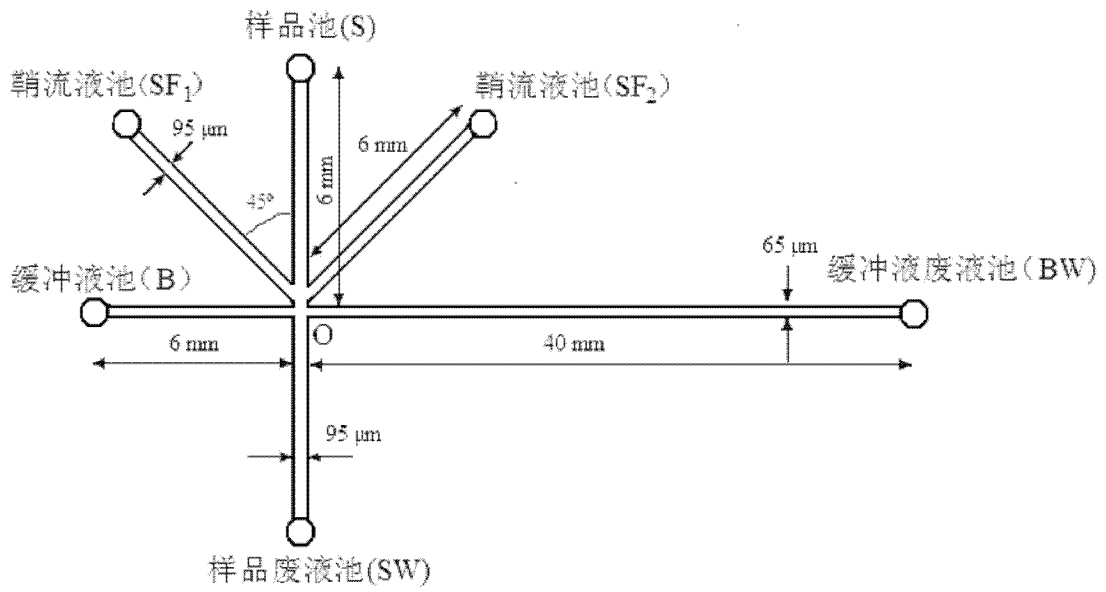


图 1

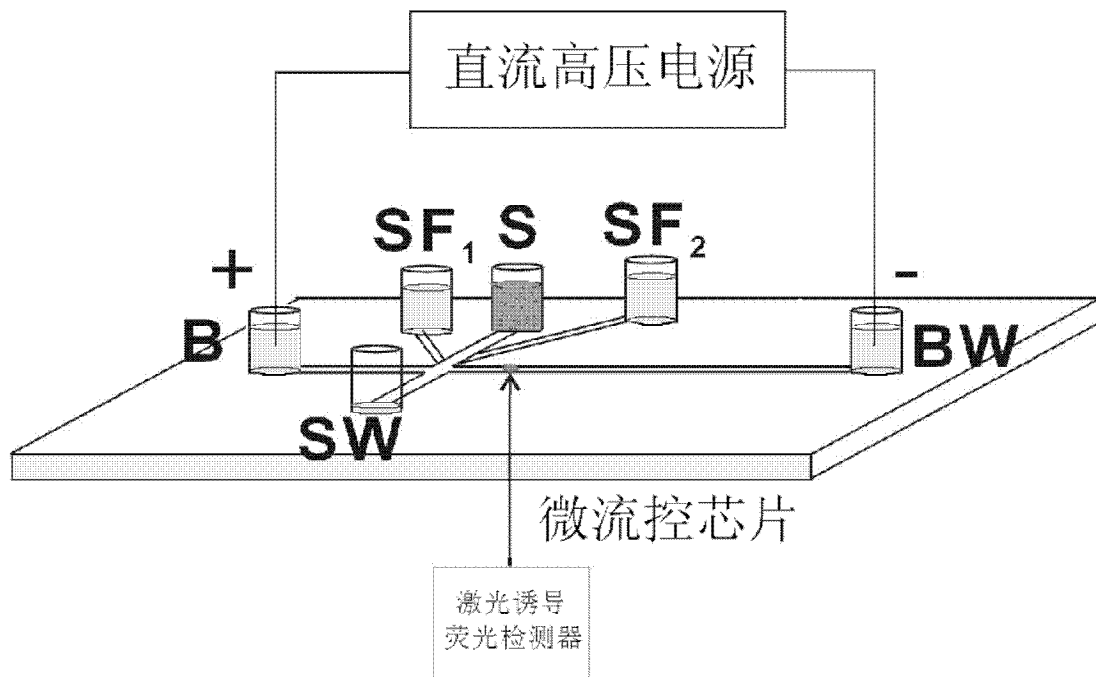


图 2

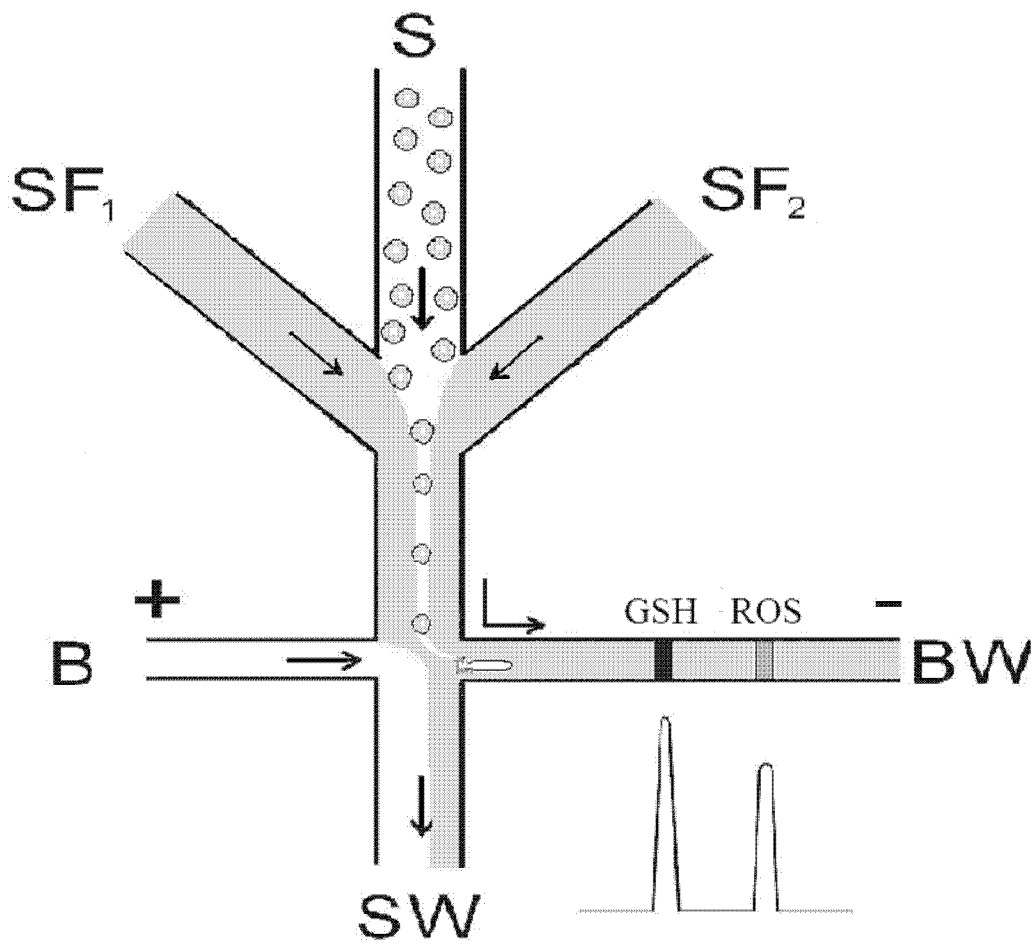


图 3

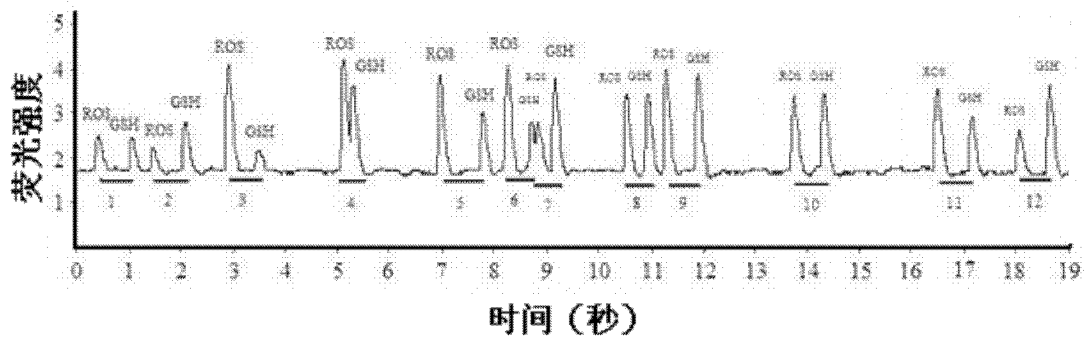


图 4