



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107250344 B

(45) 授权公告日 2021.01.12

(21) 申请号 201580055791.0

徐志安

(22) 申请日 2015.08.14

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107250344 A

代理人 庞东成 李栋修

(43) 申请公布日 2017.10.13

(51) Int.CI.

C12M 1/42 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12M 3/00 (2006.01)

62/038,150 2014.08.15 US
62/181,627 2015.06.18 US

G01N 21/01 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2017.04.14

US 2010101960 A1, 2010.04.29

(86) PCT国际申请的申请数据

US 2009170186 A1, 2009.07.02

PCT/US2015/045387 2015.08.14

US 2014124370 A1, 2014.05.08

(87) PCT国际申请的公布数据

Hsan-yin Hsu et al. Phototransistor-based optoelectronic tweezers for dynamic cell manipulation in cell culture media.
《Lab on a Chip》.2010, (第10期),

W02016/025901 EN 2016.02.18

审查员 吴漾

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 杨雅嘉 毛宇飞 培钰·E·邱

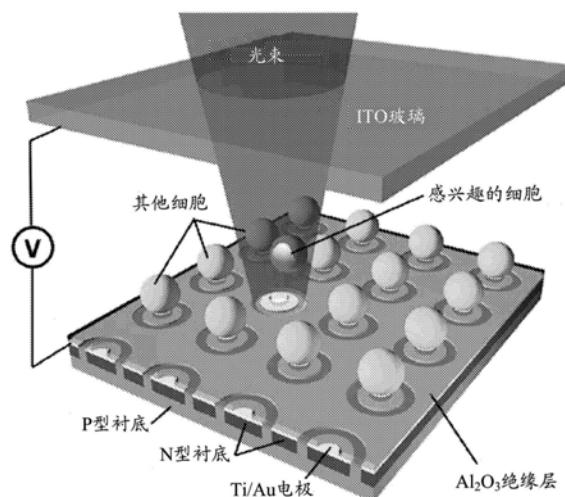
权利要求书3页 说明书11页 附图17页

(54) 发明名称

自锁式光电镊子及其制造

(57) 摘要

提供了一种用于在大面积上进行单微粒操纵的新型自锁式光电镊子(SLOT)。由环形横向光电晶体管产生的DEP力用于在黑暗状态下锁定单微粒或细胞。可以通过光学去激活这些锁定位点来选择性地释放所述锁定的微粒或细胞。



1. 一种自锁式光学镊子装置,其包括:

第一衬底,其包括第一电极和可以光学导通和截止的多个环状和/或非圆形光电晶体管,其中所述光电晶体管和第一衬底被配置成在向所述装置施加电压时在所述环状或非圆形光电晶体管处产生负介电泳力DEP;并且当用光照射所述光电晶体管时,关闭在环状或非圆形光电晶体管处的所述DEP;以及

包括第二电极的表面,其中所述表面被设置成限定位于所述第一衬底与所述表面之间的室或通道,并且所述室或通道被配置成接收并且,或者保持含有细胞或颗粒的流体。

2. 如权利要求1所述的装置,其中所述光电晶体管是环状的。

3. 如权利要求1所述的装置,其中所述非圆形光电晶体管是豆形的。

4. 如权利要求1所述的装置,其中所述光电晶体管产生垂直于设备的平面的电场。

5. 如权利要求2所述的装置,其中所述光电晶体管产生垂直于设备的平面的电场。

6. 如权利要求3所述的装置,其中所述光电晶体管产生垂直于设备的平面的电场。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述光电晶体管的所述环状或非圆形部分是p掺杂的。

8. 如权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述衬底是包括环状或豆形部分的掺杂p型衬底,其中所述环状或豆形部分的中心和所述环状或非圆形部分外侧的区域是n掺杂的。

9. 如权利要求8所述的装置,其中所述掺杂p型衬底是掺杂p型III-V族或p型IV族材料。

10. 如权利要求8所述的装置,其中所述掺杂p型衬底是掺杂p型硅。

11. 如权利要求8所述的装置,其中所述n掺杂区域涂覆有薄膜导体。

12. 如权利要求11所述的装置,其中所述薄膜导体中的一个或多个包括选自由Au、Ti、Al、Cr、Ni、Ta、Pd和Pt组成的组的材料。

13. 如权利要求11所述的装置,其中所述衬底的顶表面涂覆有绝缘体,所述绝缘体具有在所述环状或非圆形形状的中心处到所述薄膜导体的开口。

14. 如权利要求13所述的装置,其中所述绝缘体包括选自由SU-8或其他光致抗蚀剂、PDMS、二氧化硅、Al₂O₃和氮化硅组成的组的材料。

15. 如权利要求13所述的装置,其中所述绝缘体被配置成在黑暗状态下提供50%的部分电压泄漏。

16. 如权利要求13所述的装置,其中所述绝缘体包括Al₂O₃。

17. 如权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述光电晶体管的所述环状或非圆形部分是n掺杂的。

18. 如权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述衬底是包括环状或非圆形部分的掺杂n型衬底,其中所述环状或非圆形部分的中心和所述环状或非圆形部分外侧的区域是p掺杂的。

19. 如权利要求18所述的装置,其中所述掺杂n型衬底是掺杂n型III-V族或n型IV族材料。

20. 如权利要求18所述的装置,其中所述掺杂n型衬底是掺杂n型硅。

21. 如权利要求18所述的装置,其中所述p掺杂区域涂覆有薄膜导体。

22. 如权利要求21所述的装置,其中所述薄膜导体中的一个或多个包括选自由Au、Ti、Al、Cr、Ni、Ta、Pd和Pt组成的组的材料。

23. 如权利要求21所述的装置,其中所述衬底的顶表面涂覆有绝缘体,所述绝缘体具有在所述环状或非圆形形状的中心处到所述薄膜导体的开口。

24. 如权利要求23所述的装置,其中所述绝缘体包括选自由SU-8或其他光致抗蚀剂、PDMS、二氧化硅、Al₂O₃和氮化硅组成的组的材料。

25. 如权利要求23所述的装置,其中所述绝缘体被配置成在黑暗状态下提供50%的部分电压泄漏。

26. 如权利要求23所述的装置,其中所述绝缘体包括Al₂O₃。

27. 如权利要求26所述的装置,其中Al₂O₃的厚度为30nm。

28. 如权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述衬底的尺寸范围为从1mm²、或5mm²、或10mm²、或50mm²、或1cm²直至500cm²、或直至200cm²、或直至100cm²或直至50cm²。

29. 如权利要求1-6中任一项所述的装置,其中环状物的直径或非圆形形状的长轴的范围为从10、或20nm、或50nm、或100nm、或200nm、或500nm直至500μm、或直至250μm、或直至200μm、或直至100μm、或直至150μm、或直至80μm、或直至60μm、或直至50μm、或直至30μm、或直至20μm。

30. 如权利要求29所述的装置,其中环状物的所述直径或非圆形形状的所述长轴为10μm至20μm。

31. 如权利要求29所述的装置,其中环状物的所述直径或非圆形形状的所述长轴为15μm。

32. 如权利要求1-6中任一项所述的装置,其中形成环状物或非圆形形状的环的厚度在0.5μm直至10μm范围内。

33. 如权利要求26所述的装置,其中形成环状物或非圆形形状的环的厚度在2μm直至8μm范围内。

34. 如权利要求27所述的装置,其中形成环状物或非圆形形状的环的厚度为5μm。

35. 如权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述室或通道含有生理缓冲液。

36. 如权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述室或通道含有等渗缓冲液。

37. 如权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述室或通道含有颗粒。

38. 如权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述室或通道含有细胞。

39. 如权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述室或通道含有原核细胞。

40. 如权利要求39所述的装置,其中所述室或通道含有细菌细胞。

41. 如权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述室或通道含有真核细胞。

42. 如权利要求41所述的装置,其中所述室或通道含有昆虫细胞、哺乳动物细胞或禽类细胞。

43. 如权利要求1-6中任一项所述的装置,其中所述室或通道含有卵或胚胎。

44. 一种捕获细胞或颗粒的方法,所述方法包括:

将细胞或颗粒引入根据权利要求1-33中任一项所述的装置的室中;以及

在所述第一电极与所述第二电极之间施加电压,以便在包括所述衬底的环状晶体管处捕获所述细胞或颗粒。

45. 如权利要求44所述的方法,其还包括照射一个或多个光电晶体管以释放捕获的颗粒或细胞。

46. 如权利要求44或45所述的方法,其中所述电压是AC电压。
47. 如权利要求46所述的方法,其中所述电压范围为0.5V至100V pp。
48. 如权利要求46所述的方法,其中所述电压的频率范围为1kHz至50MHz。
49. 如权利要求47所述的方法,其中所述电压的频率范围为1kHz至50MHz。
50. 如权利要求44或45所述的方法,其中所述室或通道含有生理缓冲液。
51. 如权利要求44或45所述的方法,其中所述室或通道含有等渗缓冲液。
52. 如权利要求44或45所述的方法,其中所述室或通道含有颗粒或颗粒簇。
53. 如权利要求44或45所述的方法,其中所述室或通道含有细胞或细胞簇。
54. 如权利要求53所述的方法,其中所述室或通道含有原核细胞。
55. 如权利要求54所述的方法,其中所述室或通道含有细菌细胞。
56. 如权利要求53所述的方法,其中所述室或通道含有真核细胞。
57. 如权利要求56所述的方法,其中所述室或通道含有昆虫细胞、哺乳动物细胞或禽类细胞。
58. 如权利要求44或45所述的方法,其中所述室或通道含有卵或胚胎。

自锁式光电镊子及其制造

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年8月15日提交的USSN 62/038,150和2015年6月18日提交的USSN 62/181,627的权益和优先权,两者的全文出于所有目的以引用的方式并入本文。

[0003] 政府资助声明

[0004] 本发明是在政府的支持下根据国家科学基金会 (National Science Foundation) 授予的资助号1232279进行的。政府享有本发明的某些权利。

背景技术

[0005] 光电镊子 (OET) 已被开发用于单细胞和颗粒的并行操纵用于各种生物应用 (Chiou 等人 (2005) *Nature* 436 (7049) :370–372.)。例如光电镊子 (OET) 已被开发用于单细胞和颗粒的动态操纵 (Chiou 等人 (2005) *Nature*, 436 (7049) :370–372)。OET 可以用于捕获和操纵半导体和金属纳米线 (Jamshidi 等人 (2008) *Nature Photonics*, 2 (2) :86–89)、微/纳米珠 (Ota 等人 92013) *Nano Letts.*, 13 (6) :2766–2770; Glaesener 等人 (2012) *Optics Letts.*, 37 (18) :3744–3746; Zarowna-Dabrowska 等人 (2011) *Optics Express*, 19 (3) :2720–2728)、DNA (Jamshidi 等人 (2009) *Nano Letts.*, 9 (8) :2921–2925) , 和生物细胞 (Jorrett 等人 (2014) *Optics Express* 22 (2) :1372–1380; Shah 等人 (2009) *Lab on a Chip*, 9 (12) :1732–1739)。

[0006] 在典型的OET设置中,在低电导率介质 ($\sim 0.01\text{S/m}$) 中在 1mm^2 的区域上可以形成大量(例如,超过15,000个)可单独寻址的光阱。然而,OET的效用由于其与生理缓冲液的不相容性和低操纵通量而遇到瓶颈。先前,已提出了基于垂直光电晶体管的OET (Hsu 等人 (2010) *Lab on a Chip*, 10 (2) :165–172) 来解决缓冲液不相容性问题。然而,低通量对于所有光学操纵技术(包括但不限于OET)来说仍然是主要问题。这个基本限制来自视场 (FOV) 与光学分辨率之间的折衷。大FOV通常意味着使用具有低数值孔径 (N.A.) 的透镜。然而,此类低数值孔径透镜不能提供所需的光学图像清晰度以形成产生足够的捕获力的光强度梯度。这对于光学镊子中的直接光学力和OET中的光诱导DEP力两者来说确实如此。因此,即使使用高功率光束,单细胞或颗粒的大面积光学操纵几乎是不可能的。

发明内容

[0007] 本文设想的各种实施方案可包括但不限于以下中的一个或多个:

[0008] 实施方案1:一种自锁式光电镊子装置,其包括:第一衬底,其包括第一电极和可以光学导通和截止的多个环状和/或非圆形光电晶体管,其中所述光电晶体管和第一衬底被配置成在向所述装置施加电压时在环状或非圆形光电晶体管处产生负介电泳 (DEP) 力;并且当用光照射所述光电晶体管时,关闭在环状或豆形(例如,芸豆形)光电晶体管处的DEP;以及包括第二电极的表面,其中所述表面被设置成限定位所述第一衬底与所述表面之间的室或通道,并且所述室或通道被配置成接收并且,或者保持含有细胞或颗粒的流体。

[0009] 实施方案2:如实施方案1所述的装置,其中所述光电晶体管是环状的。

[0010] 实施方案3:如实施方案1所述的装置,其中所述非圆形光电晶体管是豆形的(例如

芸豆形)。

[0011] 实施方案4:如实施方案1-3所述的装置,其中所述光电晶体管产生垂直于设备的平面的电场。

[0012] 实施方案5:如实施方案1-4所述的装置,其中所述光电晶体管的所述环状或非圆形部分是p掺杂的。

[0013] 实施方案6:如实施方案1-5所述的装置,其中所述衬底是包括环状或豆形部分的掺杂p型衬底,其中所述环状或豆形部分的所述中心和所述环状或非圆形部分外侧的区域是n掺杂的。

[0014] 实施方案7:如实施方案6所述的装置,其中所述掺杂p型衬底是掺杂p型III-V族或p型IV族材料。

[0015] 实施方案8:如实施方案6所述的装置,其中所述掺杂p型衬底是掺杂p型硅。

[0016] 实施方案9:如实施方案6所述的装置,其中所述n掺杂区域涂覆有薄膜导体。

[0017] 实施方案10:如实施方案9所述的装置,其中所述薄膜导体中的一个或多个包括选自由Au、Ti、Al、Cr、Ni、Ta、Pd和Pt组成的组的材料。

[0018] 实施方案11:如实施方案1所述的装置,其中所述光电晶体管的所述环状或非圆形部分是n掺杂的。

[0019] 实施方案12:如实施方案1和6所述的装置,其中所述衬底是包括环状或非圆形部分的掺杂n型衬底,其中所述环状或非圆形部分的所述中心和所述环状或非圆形部分外侧的所述区域是p掺杂的。

[0020] 实施方案13:如实施方案12所述的装置,其中所述掺杂n型衬底是掺杂n型III-V族或n型IV族材料。

[0021] 实施方案14:如实施方案12所述的装置,其中所述掺杂n型衬底是掺杂n型硅。

[0022] 实施方案15:如实施方案12所述的装置,其中所述p掺杂区域涂覆有薄膜导体。

[0023] 实施方案16:如实施方案15所述的装置,其中所述薄膜导体中的一个或多个包括选自由Au、Ti、Al、Cr、Ni、Ta、Pd和Pt组成的组的材料。

[0024] 实施方案17:如实施方案1-15所述的装置,其中所述衬底的顶表面涂覆有绝缘体,所述绝缘体具有在所述环状或非圆形形状的所述中心处到所述导体膜的开口。

[0025] 实施方案18:如实施方案17所述的装置,其中所述绝缘体包括选自由SU-8或其他光致抗蚀剂、PDMS、二氧化硅、Al₂O₃和氮化硅组成的组的材料。

[0026] 实施方案19:如实施方案17-18所述的装置,其中所述绝缘层被配置成在黑暗状态下提供约50%的部分电压泄漏。

[0027] 实施方案20:如实施方案17-19所述的装置,其中所述绝缘体包括Al₂O₃。

[0028] 实施方案21:如实施方案20所述的装置,其中包括所述绝缘体的Al₂O₃层的厚度为约30nm。

[0029] 实施方案22:如实施方案1-21所述的装置,其中所述衬底的尺寸范围为从约1mm²、或约5mm²、或约10mm²、或约50mm²、或约1cm²直至约500cm²、或直至约200cm²、或直至约100cm²或直至约50cm²。

[0030] 实施方案23:如实施方案1-22所述的装置,其中环状物的直径或非圆形形状的长轴的范围从亚微米尺寸(例如,用于捕获分子)到数百微米以捕获大的物体(例如,细胞的聚

集)。

[0031] 实施方案24:如实施方案1-23所述的装置,其中环状物的直径或非圆形形状的长轴的范围为从约10、或约20nm、或约50nm、或约100nm、或约200nm、或约500nm直至约500μm、或直至约250μm、或直至约200μm、或直至约100μm、或直至约150μm、或直至约100μm、或直至约80μm、或直至约60μm、或直至约50μm、或直至约30μm、或直至约20μm。

[0032] 实施方案25:如实施方案24所述的装置,其中环状物的所述直径或非圆形形状的所述长轴为约10μm至约20μm。

[0033] 实施方案26:如实施方案24所述的装置,其中环状物的直径或非圆形形状的长轴为约15μm。

[0034] 实施方案27:如实施方案1-26所述的装置,其中形成环状物或非圆形形状的所述环的所述厚度在约0.5μm直至约10μm范围内。

[0035] 实施方案28:如实施方案1-26所述的装置,其中形成环状物或非圆形形状的所述环的所述厚度在约2μm直至约8μm范围内。

[0036] 实施方案29:如实施方案1-26所述的装置,其中形成环状物或非圆形形状的所述环的所述厚度为约5μm。

[0037] 实施方案30:如实施方案1-29所述的装置,其中所述室或通道含有生理缓冲液。

[0038] 实施方案31:如实施方案1-29所述的装置,其中所述室或通道含有等渗缓冲液。

[0039] 实施方案32:如实施方案1-31所述的装置,其中所述室或通道含有颗粒。

[0040] 实施方案33:如实施方案1-31所述的装置,其中所述室或通道含有细胞。

[0041] 实施方案34:如实施方案1-31所述的装置,其中所述室或通道含有原核细胞。

[0042] 实施方案35:如实施方案34所述的装置,其中所述室或通道含有细菌细胞。

[0043] 实施方案36:如实施方案1-31所述的装置,其中所述室或通道含有真核细胞。

[0044] 实施方案37:如实施方案36所述的装置,其中所述室或通道含有昆虫细胞、哺乳动物细胞或禽类细胞。

[0045] 实施方案38:如实施方案1-31所述的装置,其中所述室或通道含有卵或胚胎。

[0046] 实施方案39:一种捕获细胞或颗粒的方法,所述方法包括:将细胞或颗粒引入根据实施方案1-28所述的装置的室中;以及在所述第一电极与所述第二电极之间施加电压到所述第一电极,以便在包括所述衬底的环状晶体管处捕获所述细胞或颗粒。

[0047] 实施方案40:如实施方案39所述的方法,其还包括照射一个或多个光电晶体管以释放捕获的颗粒或细胞。

[0048] 实施方案41:如实施方案39-40所述的方法,其中所述电压是AC电压。

[0049] 实施方案42:如实施方案41所述的方法,其中所述电压范围为约0.5V至约100Vpp。

[0050] 实施方案43:如实施方案41-42所述的方法,其中所述电压的频率范围为约1kHz至约50MHz。

[0051] 实施方案44:如实施方案39-43所述的方法,其中所述室或通道含有生理缓冲液。

[0052] 实施方案45:如实施方案39-43所述的方法,其中所述室或通道含有等渗缓冲液。

[0053] 实施方案46:如实施方案39-45所述的方法,其中所述室或通道含有颗粒或颗粒簇。

- [0054] 实施方案47:如实施方案39-45所述的方法,其中所述室或通道含有细胞或细胞簇。
- [0055] 实施方案48:如实施方案47所述的方法,其中所述室或通道含有原核细胞。
- [0056] 实施方案49:如实施方案48所述的方法,其中所述室或通道含有细菌细胞。
- [0057] 实施方案50:如实施方案47所述的方法,其中所述室或通道含有真核细胞。
- [0058] 实施方案51:如实施方案50所述的装置,其中所述室或通道含有昆虫细胞、哺乳动物细胞或禽类细胞。
- [0059] 实施方案52:如实施方案39-45所述的方法,其中所述室或通道含有卵或胚胎。
- [0060] 附图简述
- [0061] 图1,图面A-D,示意性示出SL0T的操作。(a) 样品装载。微粒散布在装置表面上。(b) 自锁。一旦施加AC电压,微粒被锁定到环形电极的中心。(c) 选择性释放。光束用于单颗粒释放。(d) 最终图案。释放单个靶向颗粒。
- [0062] 图2示出通过绘制电场的平方的等值面以及在具有和不具有光照明的环电极处的DEP力的方向来展示SL0T操作原理的模拟。
- [0063] 图3A和3B示出一个示例性SL0T平台的顶视图和侧视图。
- [0064] 图4,图面(a)电压关闭并且光断开。两个颗粒通过微流体通道流入。图4,图面(b)电压接通并且光断开。两个颗粒是自锁的。图4,图面(c)电压接通并且光开启。颗粒2被踢出捕获位点。图4,图面(d)电压接通并且光断开。颗粒2被移除,同时颗粒1停留在相同的位置。
- [0065] 图5示出SL0T的一个示例性实施方案的操作参数。模拟自锁和释放效应。
- [0066] 图6示出在DC电源(488nm激光,10V)下的一个实施方案的光电特性。
- [0067] 图7示出自锁过程的测试。
- [0068] 图8示出PBS中荧光标记的细胞的单细胞锁定和释放。
- [0069] 图9示意性示出自锁式光电镊子(SLOT)平台的一个实施方案。所述平台利用环形的侧向光电晶体管的阵列作为光学传感器来触发DEP力。涂覆高k介电层(例如30nm Al₂O₃)以确保在黑暗状态中的部分电压泄漏,从而实现单细胞自锁功能。光学照明关闭锁定功能并释放受照细胞。
- [0070] 图10示出显示SL0T平台上的光照射像素和暗像素处的电场分布和DEP力方向(箭头)的数值模拟的结果。在黑暗状态下,负DEP力将使细胞锁定到电极中心。在明亮状态下,锁定的细胞被推出电极中心。
- [0071] 图11示出显示SL0T平台上的环形晶体管的暗和光电流的I-V曲线测量的结果。已观察到三个数量级光电流增加以实现在常规细胞培养基($\sim 1\text{S}/\text{m}$)中的操作。橙色的参考线表示细胞培养基的电导率。相应地,它比明亮状态低10倍,比黑暗状态高10倍。
- [0072] 图12,图面(a)-(d),示出在SL0T平台上操纵10 μm 微粒。图面(a):微粒在整个FOV上的自锁。大约120,000个颗粒在1cm²芯片上自锁。图面(b)和(d):单独操纵颗粒。图面(c):形成5×3颗粒阵列。
- [0073] 图13示出在SL0T平台上的常规细胞培养基(DMEM)中的单细胞操纵。右:单个靶细胞从位置1移动到位置6。左:单个靶细胞从位置1移动到位置2的细节。
- [0074] 图14显示不同绝缘层对SL0T操作的影响的比较。针对绝缘层和液体电导率的九种不同组合来计算部分电压泄漏。基于所述计算,我们得出结论,就同时实现自锁和释放功能

而言,30nm Al₂O₃应优于在1S/m高导电介质内的另外两个绝缘层。

[0075] 图15,图面(a)-(c),示出SL0T的非圆形光电晶体管。图面(a):制造工艺与SL0T相同。然而,在非圆形SL0T的一个实施方案中,P区域(蓝色区域)已被设计为“豆”形(例如,芸豆形)而不是圆形。绿色区域表示用于电极-液体接触的高k电介质涂层上的开口面积。图面(b):模拟非圆形SL0T。图面(c):颗粒沿着圆周逐步迁移(2Mhz,0.1S/m,5Vpp)。

[0076] 具体描述

[0077] 在各种实施方案中,提供了一种自锁式光电镊子(SLOT)。本文所述的自锁式光电镊子(SLOT)平台克服了用于大面积单细胞和微粒操纵的模糊光学图案问题。本文所述的SL0T平台提供了在大面积上在生理缓冲液或其他缓冲液(例如像,通常用于DEP技术中的等渗缓冲液)中进行单细胞或微粒的方便和有效的操纵。SL0T可以尤其用于分选稀有细胞或颗粒,用于体外受精,用于组织工程,以及用于需要操纵单细胞或颗粒的各种其他环境中。

[0078] 据信,所有现有的OET平台均需要光束的投射以形成正或负的DEP陷阱。这意味着细胞和颗粒在没有光束存在的情况下不能被捕获。为了使用光束捕获细胞,需要满足两个标准。第一,光强度需要足够强,使得其可以产生虚拟电极并且触发足够的电场来捕获细胞。第二,通常忽略的因素,但对于大面积单细胞操纵至关重要,是投射的光图案的清晰度。模糊光图案,即使足够强以打开虚拟电极,也不能产生足够大的DEP力用于细胞操纵,这是因为DEP力与电场强度的梯度成线性比例。具有缓慢变化的强度分布的模糊光图案不产生导致足以有效捕获和操纵细胞的DEP力的足够大电场梯度。

[0079] 投射的光图案的清晰度(或分辨率)由光学系统的数值孔径(N.A.)来确定。为了保持良好的清晰度以用于有效的OET操纵,在大多数OET平台中通常使用10倍物镜。然而,10倍物镜仅具有1~2mm²的视场(FOV)。使用具有较低N.A.的凸透镜来增加操纵面积是可能的,但这极大牺牲了如我们在全息OET,~1cm²中说明的操纵力(Hsu等人(2010)Lab Chip,19(2):165-172)。因此,据信几乎不可能进一步扩展OET上的单细胞操纵面积。高光学分辨率图案与大视场操纵之间的折衷是基本的物理障碍。

[0080] 本文所述的自锁式光电镊子提供了一种新的光学操纵方法和平台,其可以绕过这种基本障碍,以便在取决于晶片尺寸和可以提供的电力的极大面积(可能数百cm²)上使用光束提供高分辨率单细胞操纵功能。

[0081] 在各种实施方案中,SL0T系统包括一个或多个“顶部”电极、底部光电晶体管和其间的流体通道或室(例如,微流体通道)。图1示意性示出SL0T平台的操作原理。首先,如图1(a)所示,将颗粒或细胞引入到顶部电极与光电晶体管衬底之间的通道或室中(例如通过微流体通道流入)。顶部和底部电极连线到外部电压源(例如,函数发生器)。一旦施加AC电压,介电泳(DEP)陷阱(负陷阱和颗粒被锁定在弱电场区域中)将形成并将单独的颗粒或细胞(或者颗粒或细胞簇)锁定到其相邻环(环状)光电晶体管,如图1(b)所示。可以进行光学观察(例如,荧光、暗场、相衬和其他)以鉴定感兴趣的颗粒或细胞。然后,光束照射目标光电晶体管控制的电极以增加局部光电流,从而暂时去激活所述负DEP陷阱,如图1(c)所示。最后,目标颗粒或细胞可以从它们的锁定位点释放并通过流体流运走以用于下游收集和分析,如图1(d)所示。可替代地,可以保留目标颗粒或细胞用于进一步检查和/或操纵。

[0082] 在设计过程中使用计算机模拟来验证概念。使用COMSOL来模拟SL0T的工作原理,如图2所示。如果施加AC电压,则在环状光电晶体管处形成负DEP陷阱。选择AC频率使得所施

加的电压的一部分可以在大电极区域处通过SU-8绝缘体泄漏。这是颗粒或细胞可以在黑暗状态下如何锁定在环形光电晶体管中。当光束照射连接大电极与浮岛电极的光电晶体管时,其打开浮动电极,以在岛电极区域中产生比被绝缘体覆盖的大电极区域更强的电场。这通过负DEP力排斥锁定的颗粒。

[0083] 如上所述, SLOT中的自锁功能可以通过在黑暗状态下的背景中的部分电压泄漏来实现。这种泄漏电压取决于几个参数,包括绝缘层的厚度、其介电常数、操作AC频率和介质电导率。为了理解这些关系,使用简单的块元素模型来计算在九个不同条件下跨液体层和绝缘层的电压降的比率。在理想的SLOT操作条件下,绝缘层应允许大约50%的部分电压泄漏,使得可以在黑暗状态下提供足够强的自锁力,同时保持足够的电场强度梯度以在明亮状态下排斥捕获的细胞。图14表示1 μ m SU-8、30nm SiO₂和30nm Al₂O₃的绝缘层在黑暗状态下的泄漏电压降的计算结果,其中它们中的每一个在具有0.01S/m、0.1S/m和1S/m的电导率的介质中。在高导电介质(1 μ m SU-8+1S/m)中使用厚介电层的一种极端情况下,由于跨绝缘层的大部分电压降而不存在自锁功能。在较不导电介质(30nm Al₂O₃+0.01S/m)中使用高k和薄电介质的另一种极端情况下,黑暗阶段中的自锁功能是强的,但在明亮状态下不允许释放功能,这是因为介质中接近100%的泄露电压降消除了在排斥捕获的细胞所需的明亮状态下产生电场强度梯度的空间。因此,绝缘层厚度和材料的优化以及与操作介质的匹配对于SLOT操作是重要的,并且高k电介质(例如,30nm Al₂O₃)特别好地适用于在导电溶液(例如,生理缓冲溶液)中操作。

[0084] 在制造期间可以精确地控制绝缘(介电层)的组成和厚度。例如,可以使用原子层沉积(ALD)方法容易地精确地沉积高k电介质。

[0085] 图3A和3B示出SLOT平台的某些实施方案的顶视图和侧视图。所示的装置在p型硅衬底上制造。通过光刻形成环形图案电极。在大电极与岛电极之间,进行n型离子注入以产生npn光电晶体管。在衬底上的p型区域中图案化10nm钛(Ti)薄膜上的100nm金(Au)用于电接触。还可以制造具有p型离子注入的N型衬底以产生pnp型光电晶体管来控制浮岛电极。光电检测器结构不限于光电晶体管。诸如光电导体和金属-半导体-金属(MSM)的其他结构原则上也可以工作。最终的SU-8图案化用于在浮岛电极区域中形成用于流体接触的开口。还可以使用诸如PDMS、二氧化硅、Al₂O₃、氮化硅或其他的其他电介质材料来代替用于部分电绝缘的SU-8。另一个SLOT平台的架构如图9所示。

[0086] SLOT的原型已成功制造和测试。在概念验证装置中,我们使用悬浮在常规生理缓冲液中或悬浮在具有0.1S/m电导率的等渗缓冲液中的微粒(直径10 μ m)和细胞来进行实验。原则上,SLOT还在其他含水介质中起作用,其中电导率从DI水变化到5S/m,具有适当设计的装置参数。

[0087] 图4说明SLOT的自锁功能和选择性释放功能。

[0088] SLOT的独特特征是在黑暗状态下的自锁功能。当一组颗粒或细胞被引入到SLOT平台上时,它们在没有光束照射的情况下通过负DEP力单独地锁定在环形(环状)光电晶体管控制的电极中。当光束照射一个或多个环状光电晶体管时,其关闭那些光电晶体管中的DEP陷阱以释放捕获的微粒或细胞。由于颗粒或细胞在黑暗状态下是自锁定的,因此大量环形光电晶体管和相关联的电极可以在大面积(例如,跨几十甚至几百cm²)上部署,以捕获数百万个颗粒或细胞而不需要有源光束。

[0089] 具有有限视场 (FOV) 但是高光学分辨率的光学照明系统可以扫描整个晶片以顺序地选择性地释放捕获的细胞或颗粒,类似于在现代光刻中使用的步进机概念。可替代地,可以照射某些区域(例如,使用掩模)以释放衬底的选定区域中的许多细胞或颗粒。因此, SLOT 的操作区域不受用于成像的物镜的FOV和光学图案投射的限制。为了比较,在常规OET操作中,在没有光照射的区域中的微粒将通过流体流被冲洗掉。

[0090] 此外,通过将照明系统与检测系统耦合,可以选择性地释放或选择性保留特定的细胞或颗粒(例如,具有特定颜色或形态的细胞或颗粒,或用特定的例如荧光标记物标记的细胞或颗粒)。以这种方式,本文所述的SLOT系统可以用作有效的分选机(例如,细胞分选机)。

[0091] 尽管上面关于环状(圆形)光电晶体管描述SLOT,但光电晶体管不必限于这种形状。在各种实施方案中,设想非圆形光电晶体管。此类光电晶体管尤其可以包括其他规则多边形、椭圆形光电晶体管和不规则光电晶体管,包括但不限于肾形光电晶体管。使用圆形光电晶体管配置,细胞或微粒将仅经历对称的DEP力,这意味着释放方向将仅取决于背景流的方向。非圆形光电晶体管设计(参见例如图15中的肾形状)可以用于产生不对称电场,从而导致定向DEP力。非圆形设计的优点是,即使没有外部流体泵送系统,系统也可以操作。使用单独的非圆形光电晶体管作为建构基元,大量电极的组合可以非常强大。例如,我们已表明,使用良好控制的激光束,单颗粒可以沿着任意预先设计的路径(直线、环路等)迁移。

[0092] 非圆形光电晶体管的制造与SLOT中的环状光电晶体管相同。区别在于设计过程,其中p区域的形状将是非圆形的,而p区域的宽度保持相同。

[0093] 实施例1

[0094] 用于在大面积上进行微粒操纵的自锁式光电镊子

[0095] 本实施例描述了一种新型自锁式光电镊子(SLOT)平台的设计和制造,其克服了用于大面积单细胞和微粒操纵的模糊光学图案问题。通过布置可以光学导通和截止的环形(环状)光电晶体管的阵列来实现SLOT。单细胞和微粒在没有光照明的黑暗状态下自锁到这些环状光电晶体管中。当光束照射环形电极时,其关闭所述电极中的DEP陷阱以释放捕获的微粒。由于细胞和微粒在黑暗状态下自锁定,因此可以在横跨数十或甚至数百cm²的大面积上部署大量环状光电晶体管,以捕获数百万单细胞。具有有限视场 (FOV) 的光学照明系统可以扫描整个晶片以选择性地释放捕获的细胞,类似于在现代光刻中使用的步进机概念。因此, SLOT 的操作区域不局限于用于成像的物镜的FOV和光学图案投射。此外, SLOT还是基于单晶硅光电晶体管的平台。它提供了在常规生理缓冲液中进行单细胞操纵的可能(Hsu等人(2010) Lab Chip, 10 (2) :165-172)。

[0096] 装置操作和原理

[0097] 图1示意性示出SLOT平台的一个实施方案的操作,所述SLOT平台的示例性配置在图3A和3B中示出。如图所示,SLOT系统包括顶表面,其包括电极、底部光电晶体管和其间的流体通道或室(例如,微流体通道)。例如通过微流体通道流入将颗粒或细胞引入到平台上。

[0098] 顶部和底部电极(参见例如图3B)电连接到电压源(例如,函数发生器)。一旦将电压(例如,AC电压)施加到电极,则形成DEP陷阱并将单独的颗粒(或细胞)锁定到其相邻的光电晶体管环电极。接下来,可以进行光学观察(例如,荧光、暗场、相衬和其他)或其他观察,以鉴定感兴趣的颗粒或细胞。然后,光束照射增加局部光电导率的目标光电晶体管,并暂时

去激活相应的DEP陷阱。最后,目标单颗粒或细胞(或者颗粒簇或细胞簇)从锁定位点释放并例如通过连续流运走以用于下游收集和分析。可替代地,可以保留目标颗粒或细胞(或者颗粒簇或细胞簇)用于分析或进一步处理,并且可以释放不需要的颗粒或细胞(或者颗粒簇或细胞簇)。

[0099] 在某些实施方案中,光束可以被引导到单独的光电晶体管位点以释放放在单个DEP陷阱中捕获的部分。在某些实施方案中,光束可以例如使用掩模被引导到多个光电晶体管位点,以释放放在多个DEP陷阱处捕获的部分。

[0100] 装置制造和模拟

[0101] 图3A和3B示出示例性SLOT平台的顶视图和侧视图。所示的装置在p型硅衬底(例如,在高度掺杂的p型衬底)上制造。通过光刻形成环形图案,然后用作n型离子注入的掩模。然后将10nm钛(Ti)薄膜上的100nm金(Au)蒸发到衬底上,随后进行SU-8图案化以形成用于与流体电极接触的开口。我们使用COMSOL来模拟SLOT的操作原理,如图2所示。如果仅施加AC电压,则在环电极处形成负DEP陷阱。选择AC频率使得所施加的电压的一部分在大电极区域处通过SU-8绝缘体泄漏。当光束照射连接大电极与浮岛电极的光电晶体管时,其打开浮动电极以在岛电极中产生强电场,所述岛电极通过负DEP力排斥捕获的颗粒。

[0102] 应认识到,所示的构造是说明性的而非限制性的。应认识到,例如所述装置可以被配置为具有相反的掺杂,以形成环状n-p-n光电晶体管。另外,尺寸可以,例如,如本文所描述和要求的那样变化。

[0103] 在一个概念验证装置中,我们用悬浮在电导率为0.1S/m的等渗缓冲液中的微粒(直径10μm)来进行实验。在图4中,我们说明单颗粒在SLOT上的自锁和选择性释放。SLOT可以被放大以便能够在大面积上操作。

[0104] 本文提供的数据说明一种用于在大面积上自锁和选择性释放单微粒和单细胞(或者颗粒簇或细胞簇)的新型SLOT平台。在一个示例性实施方案中,SLOT是基于单晶光电晶体管的OET系统,其具有在常规生理缓冲液中进行单细胞操纵的潜力。然而,SLOT不一定需要在单晶硅上制造。SLOT的颗粒操纵概念可以在基于非晶或多晶硅的环状光电晶体管结构上实现。还可以使用其他半导体材料,诸如III-V族材料。

[0105] 示例性但非限制性实施方案的操作参数

[0106] 制造高灵敏度SLOT:

[0107] 接合点宽度:2μm;

[0108] 离子注入:1e15cm⁻² 200keV,4e15cm⁻² 15keV(表面);

[0109] 退火:1000°C,1小时

[0110] 电极:在Ti(10nm)上的Au(100nm)

[0111] 绝缘层:2μm。

[0112] 模拟自锁和释放(参见,例如图5);

[0113] 大面积上的自动单细胞捕获;

[0114] 大面积上的选择性单细胞释放;

[0115] 10Vpp(电压),10MHz(频率),20μm(装置间距),1S/m(介质电导率)。

[0116] 光电特性测试(参见,例如图6)。

[0117] DC电源下的1000倍光电导率增加;

- [0118] 电导率:关闭状态 (0.005S/m) << PBS 介质 (1S/m) < 打开状态 (2S/m) ;
- [0119] 大面积自锁效应的测试 (参见, 例如图7)。
- [0120] 10Vpp (电压), 10MHz (频率), 20μm (装置间距), 1S/m (介质电导率)
- [0121] 常规PBS缓冲液中的单细胞自锁和释放 (参见, 例如图8)
- [0122] 观察到的单细胞自锁效应;
- [0123] 观察到的选择性荧光标记的单细胞释放;
- [0124] 10Vpp (电压), 10MHz (频率), 20μm (装置间距), 1S/m (介质电导率, PBS)。
- [0125] 前述实施方案旨在是示例性的而非限制性的。本领域技术人员将认识到变化。例如, 构成装置的环状区域的尺寸可以取决于应用。为了捕获尺寸~10μm的细胞 (或颗粒), 如本文所示的直径为约15μm的环状物是合适的。为了捕获较大的细胞、细胞簇、细胞的其他集合, 卵等较大尺寸的环将是足够的。为了捕获较小的颗粒或细菌 (例如, 约1-2μm), 小尺寸的环就足够了。因此, 在某些实施方案中, 设想范围为约1μm、或约2μm、或约5μm、或约10μm、或约15μm直至约200μm、或直至约150μm、或直至约100μm、或直至约50μm、或直至约40μm、或直至约30μm的环状物直径。在某些实施方案中, 环状物直径范围为约5μm至约50μm。
- [0126] 形成环状晶体管的掺杂环的宽度将控制晶体管特性。在某些实施方案中, 环状物厚度范围为约0.5μm直至约10μm。较薄的环状环可以提供较高的光增益, 其允许使用较低的光强度来打开电极。但折衷是其可以操作的小电压振幅, 因为光电晶体管可以在没有光照射的高电压下导通。如果使用更大的宽度, 则光增益可以更低, 但另一方面, 我们可以在高电压下操作装置以在细胞上产生更大的捕获力。
- [0127] 实施例2
- [0128] 在大面积上使用自锁式光电镊子在细胞培养基中的单细胞操纵
- [0129] 本实施例描述了用于在大面积上在细胞培养基中进行单细胞操纵的新型自锁式光电镊子 (SLOT) (参见, 例如图9)。SLOT克服了常规光电镊子 (OET) 对于高通量单细胞操纵的两个主要技术障碍。在一个示例性但非限制性的实施方案中, 通过布置可以光学导通和截止的基于横向光电晶体管的环形电极的阵列来制造SLOT。横向的环形光电晶体管设计使得能够在高电导率介质 (1S/m) 中进行操纵并克服在大面积 (>1cm²) 中的单细胞操纵的基本模糊光学图案问题。
- [0130] 操作原理。
- [0131] 由外部函数发生器供电的DEP陷阱围绕环形电极而形成, 其中单细胞在黑暗状态下自锁定而不需要光照射。当光束照射环电极时, DEP陷阱被关闭以释放受照单细胞。这种操作机制可以容易地扩大到超大面积, 甚至跨越整个晶片以并行捕获数百万单细胞。SLOT的操作概念类似于现代微细加工中使用的步进机。光学照明系统可以扫描整个晶片以释放感兴趣的细胞, 而其他的FOV外部细胞保持自锁定。
- [0132] 模拟和制造
- [0133] SLOT具有两种操作状态: 黑暗状态和明亮状态。在黑暗状态下, 仅施加ac电压。在明亮状态下, 施加ac电压和照明光束两者。为了理解SLOT在黑暗状态和明亮状态下如何工作, 进行数值模拟是有用的。图10示出在光照射像素和周围暗像素下的数值模拟电场强度分布和DEP力。施加高频率 (10MHz) ac偏压以通过Al₂O₃绝缘层 (30nm) 产生部分电压泄漏从而在黑暗状态中形成负DEP单细胞陷阱。DEP力在黑暗状态下指向电极中心, 从而锁定单细胞。

相反地,在明亮状态下,DEP力指向电极中心,从而释放单细胞。这是能够实现自锁和选择性释放的根本原因。自锁和光释放功能的解耦承诺将SL0T扩展到超大面积。

[0134] 在一个示例性实施方案中,所述装置在p型高度掺杂的单晶硅衬底上制造。环形图案由光刻产生并用作n型离子注入掩模。将10nm (Ti) 金属薄膜上的100nm (Au) 蒸发到衬底,随后进行剥离工艺。最后,我们形成30nm Al₂O₃薄膜的图案,其具有用于电极缓冲液接触的5 μm圆形开口的阵列。值得注意的是,Al₂O₃薄膜的选择是由于其在实现自锁和释放功能中起重要作用。所述膜应该是薄的并且具有高介电常数,使得来自ac电压的电场可以在黑暗状态下通过薄膜部分地泄漏,以实现自锁功能。生物相容性双面胶带通过商业切纸机图案化并用作可以通过其引入细胞样品的微流体通道。通道宽度大致为200μm。与传统的垂直光电晶体管设计不同,我们提出并实现了一种横向光电晶体管设计,其仅需要一次离子注入并且没有沟槽隔离。离子注入的掺杂浓度和厚度已被优化。与垂直设计相比,横向设计的最大优点是DEP捕获不再依赖于光照射,使得捕获区域可以扩展到整个晶片级。横向设计的另一个益处是光子和电子路径是分开的,这样我们具有独立调整光吸收和装置结构的自由。

[0135] 装置特征

[0136] 我们将激光扫描系统与荧光显微镜进一步集成以进行装置特征和操作条件的校准。通过一组labview控制的扫描镜将532nm 10mW绿色激光引导并聚焦到装置表面上。使用线性偏振器来调节激光功率,使得光强度在0.5W/cm²与5W/cm²之间。

[0137] 将与实际装置一起制造的圆形测试结构用于如图11所示的电学特征。在1W/cm²照明强度下记录I-V曲线。由于单晶硅中的高光电晶体管增益和载流子迁移率,在10V峰-峰电压下在明亮状态下观察到比在黑暗状态下高三个数量级的光电流。还绘制了指示细胞培养基的电导率的参考线(橙色),其显示与细胞培养基的电阻相比,光电晶体管在黑暗状态下的电阻至少大10倍,而光电晶体管在明亮状态下的电阻小10倍。

[0138] 实验结果

[0139] 我们说明了SL0T在1×1cm²区域上在细胞培养基(DMEM)中的各种操纵功能,如图12所示。这里我们示出大面积自锁、个体运动和阵列形成。在图12,图面a中,展示在超大面积上的自锁。总的装置工作面积超过1cm²。然而,由于显微镜的FOV的限制,我们一次仅能观察到相对较小的面积。

[0140] 基于上述讨论,自锁功能完全独立于观察,使得只要提供足够的电功率,有效自锁区域可以延伸到甚至整个晶片级。在图12,图面b中和图12,图面d中,单细胞操纵通过投射的激光束来实现。多个颗粒顺序地被释放。在图12,图面c中,形成5×3的微粒阵列。

[0141] 在1cm²SL0T平台上捕获大约120,000个颗粒,并且它们中的每一个可以被顺序研究和光学释放。应注意的一个实验细节是,为了实现超大面积自锁和释放,单独的通用函数发生器可能不再适合,这是因为装置消耗的功率可能容易地超出规格,特别是在高导电性细胞培养基中。这里我们使用能够放大12MHz ac输入的大功率放大器。

[0142] 常规细胞培养基中的单细胞操纵对于许多真实的生物医学应用是关键的。然而,大多数基于OET的技术仅能在低电导率介质(通常~0.01S/m)中工作。不能在除常规生理缓冲液(通常~1S/m)以外的培养基中预期诸如增殖和生长的正常细胞行为。将5μL样品溶液(悬浮在DMEM中的Ramos)引入到具有设置为8MHz和10Vpp的外部函数发生器的SL0T装置。我们证明,在物镜视场内的光束选择性地释放感兴趣的单细胞。

[0143] 在图13中,我们显示感兴趣的靶细胞如何顺序地从位置1移动到位置6,而非靶细胞保持锁定。最初,两个细胞通过DEP陷阱自锁。然后我们将激光束移动到靶细胞所在的位置。这导致受照光电晶体管处的光电流显著增加。因此,关闭DEP陷阱,捕获的细胞通过背景微流体流而被释放。从陷阱释放细胞需要少于0.5s。典型的背景流速为50 $\mu\text{m}/\text{s}$ 。这些参数随不同的实验条件而变化。

[0144] SLOT的操作类似于在现代光刻中广泛使用的“步进机”概念。我们将固定或可编程的光图案投射到SLOT衬底。感兴趣的细胞可以逐个释放或批量分批释放。由于每个电极的位置已被预先设计,因此可以在没有实时观察的情况下执行释放功能,这表明SLOT甚至超过物镜的视场来操纵细胞的能力。

[0145] 总结

[0146] 我们报告了一种用于在大面积上在细胞培养基中进行单细胞操纵的新型自锁式光电镊子(SLOT)。SLOT解决了常规光电镊子(OET)对于在大面积上在常规生理缓冲液中进行单细胞操纵的两个主要技术障碍。通过其独特的横向环形光电晶体管设计,已在高电导率介质操纵(>1S/m)中实现了高通量(超过120,000个颗粒)操纵。自锁概念是将传统OET的操纵面积扩展到1 cm^2 或更大的关键。SLOT的潜在应用包括组织工程、药物筛选(Nilsson等人(2009) *Analytica Chimica Acta*, 649 (2) :141-157)、细胞与细胞间的通信、稀有细胞分选和体外受精(Valley等人(2010) *PloS One*, 5 (4) :e10160)。

[0147] 应了解,本文所述的实施例和实施方案仅用于说明性目的并且根据其产生的各种修改或变化将为本领域技术人员所想到并且欲包括于本申请的精神和权限以及随附权利要求的范围内。本文所引用的所有公布、专利和专利申请针对所有目的以引用的方式整体并入本文。

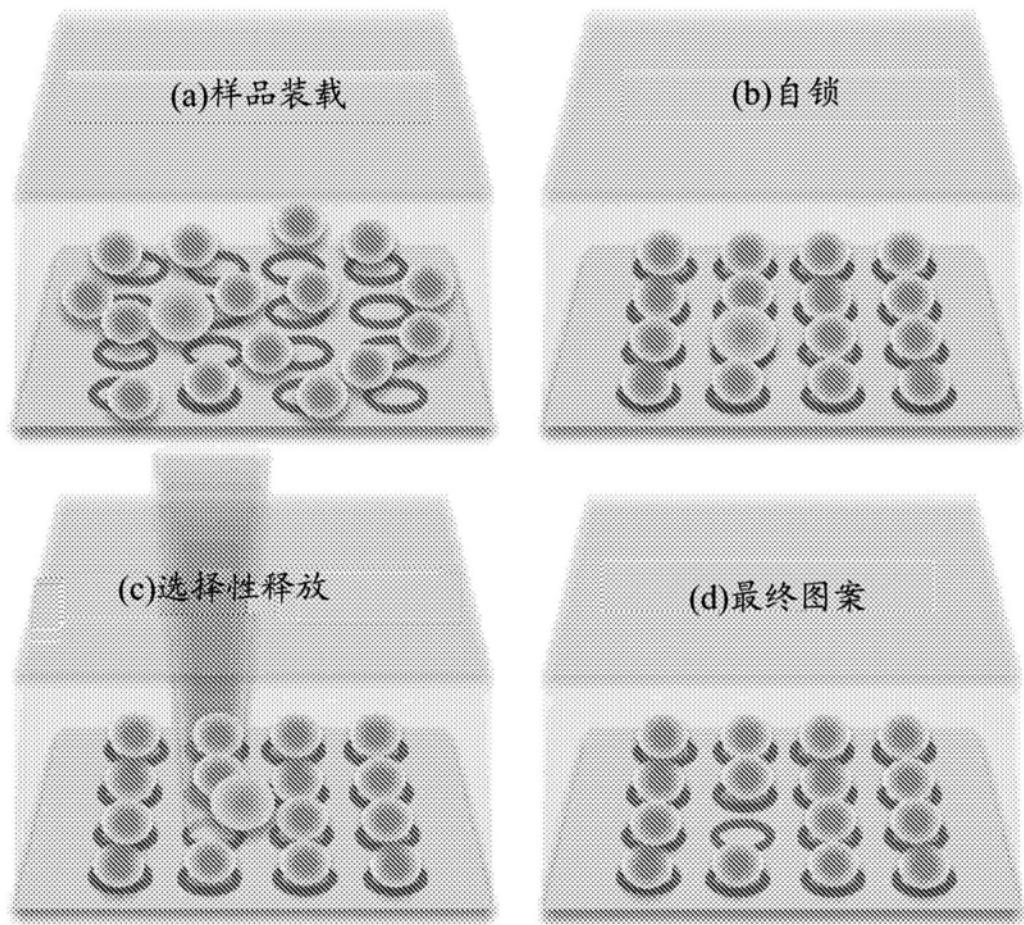


图1

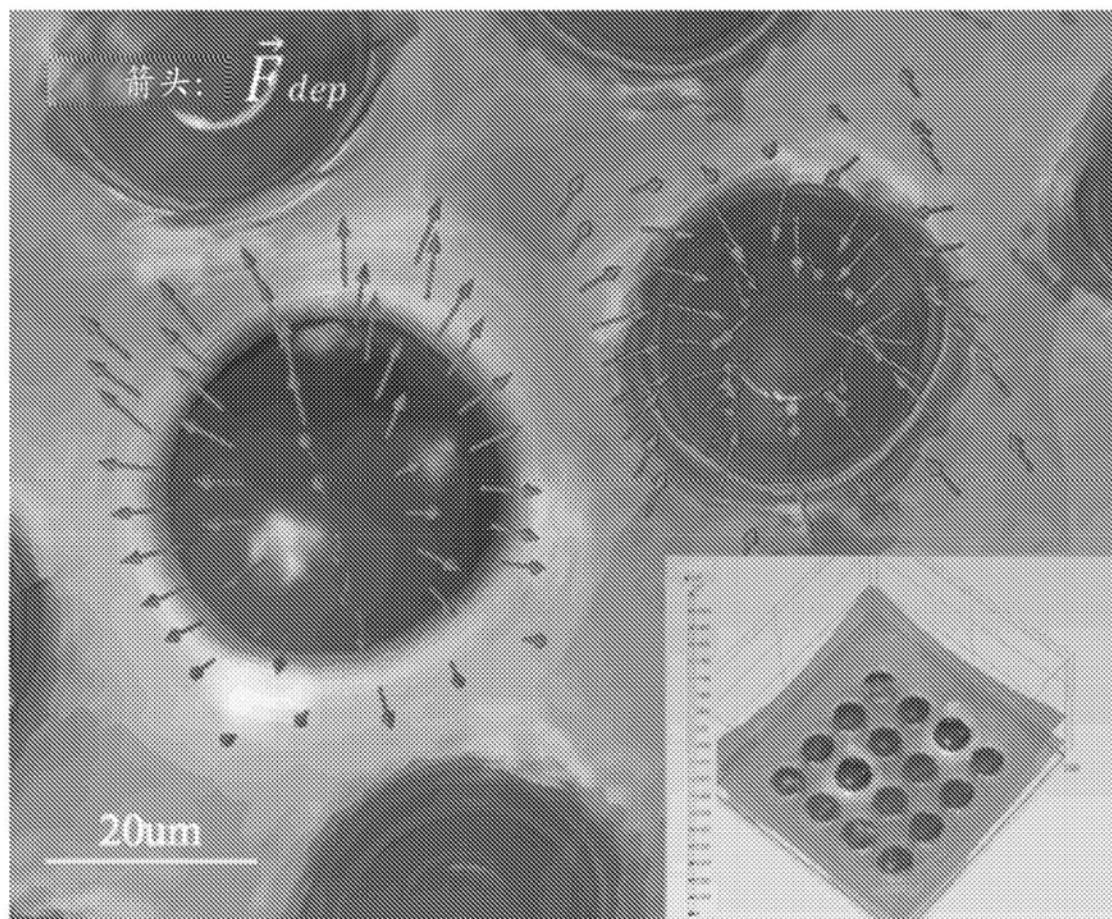


图2

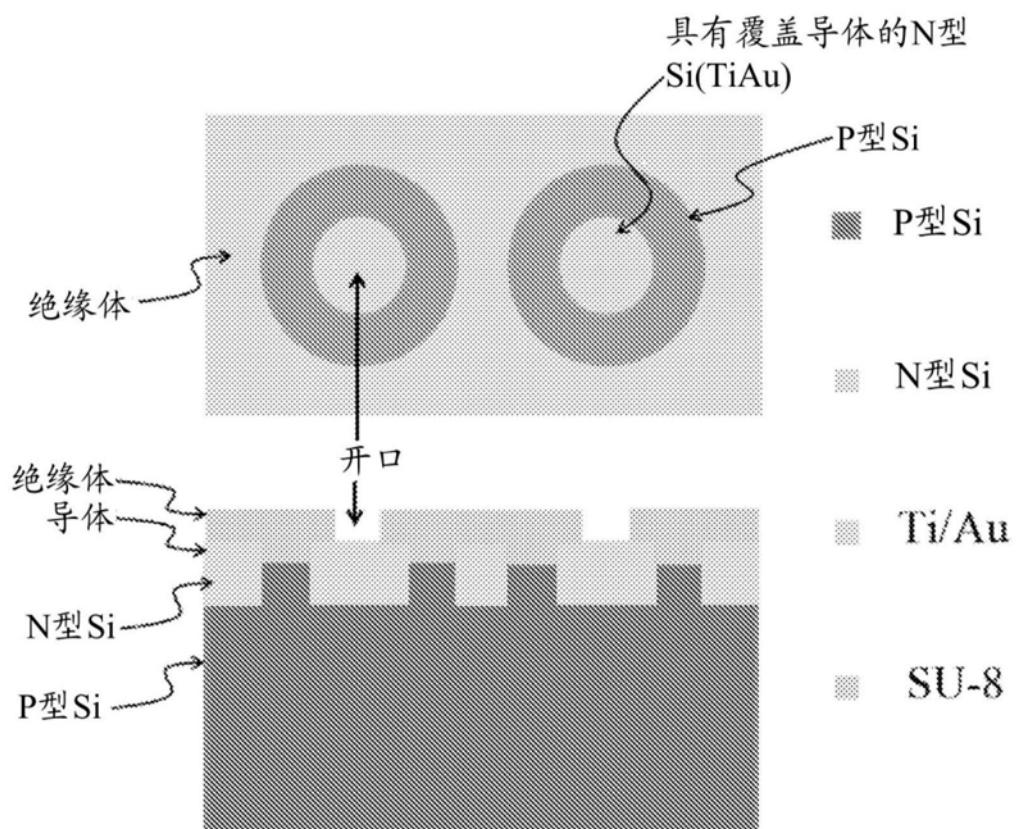


图3A

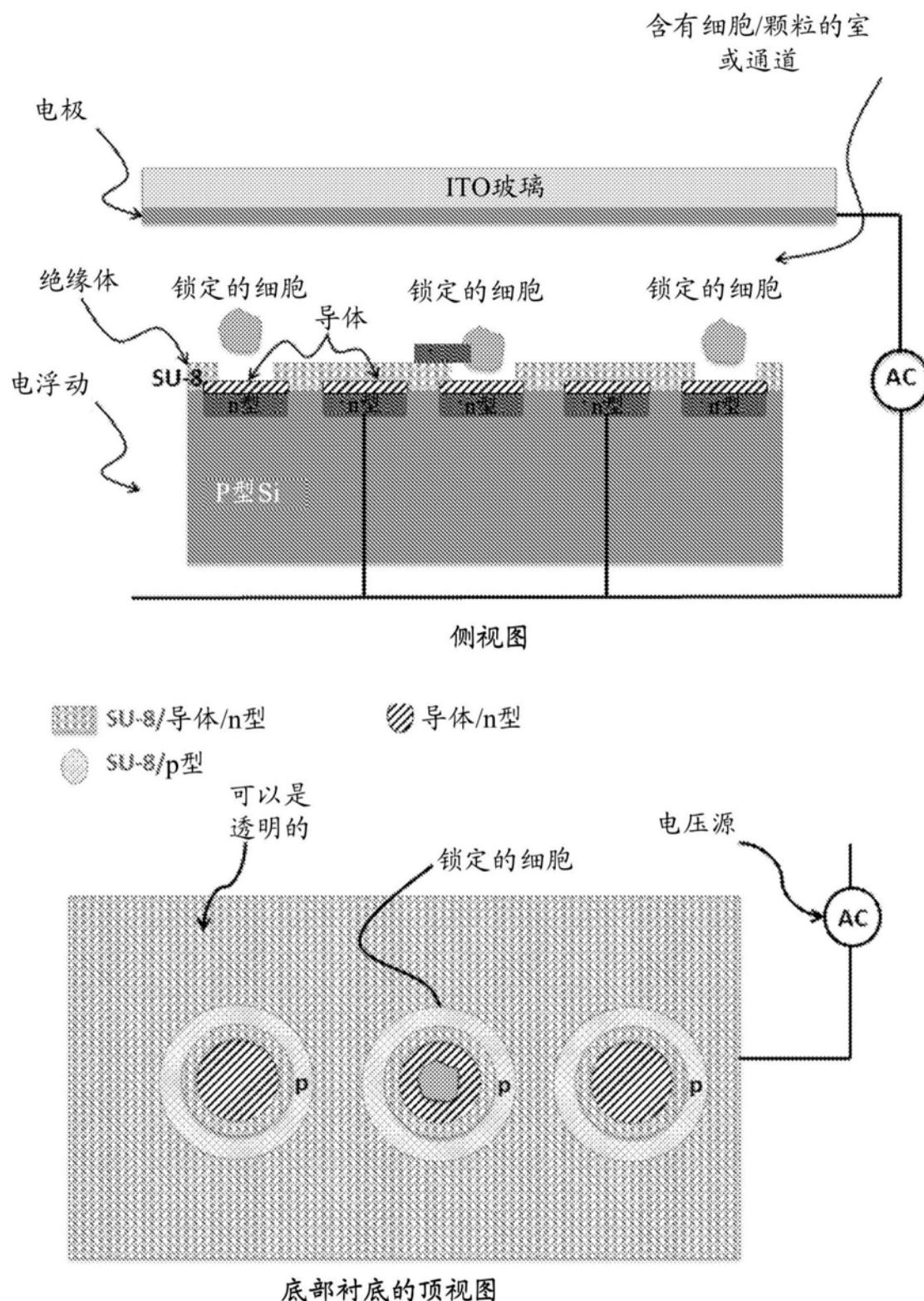


图3B

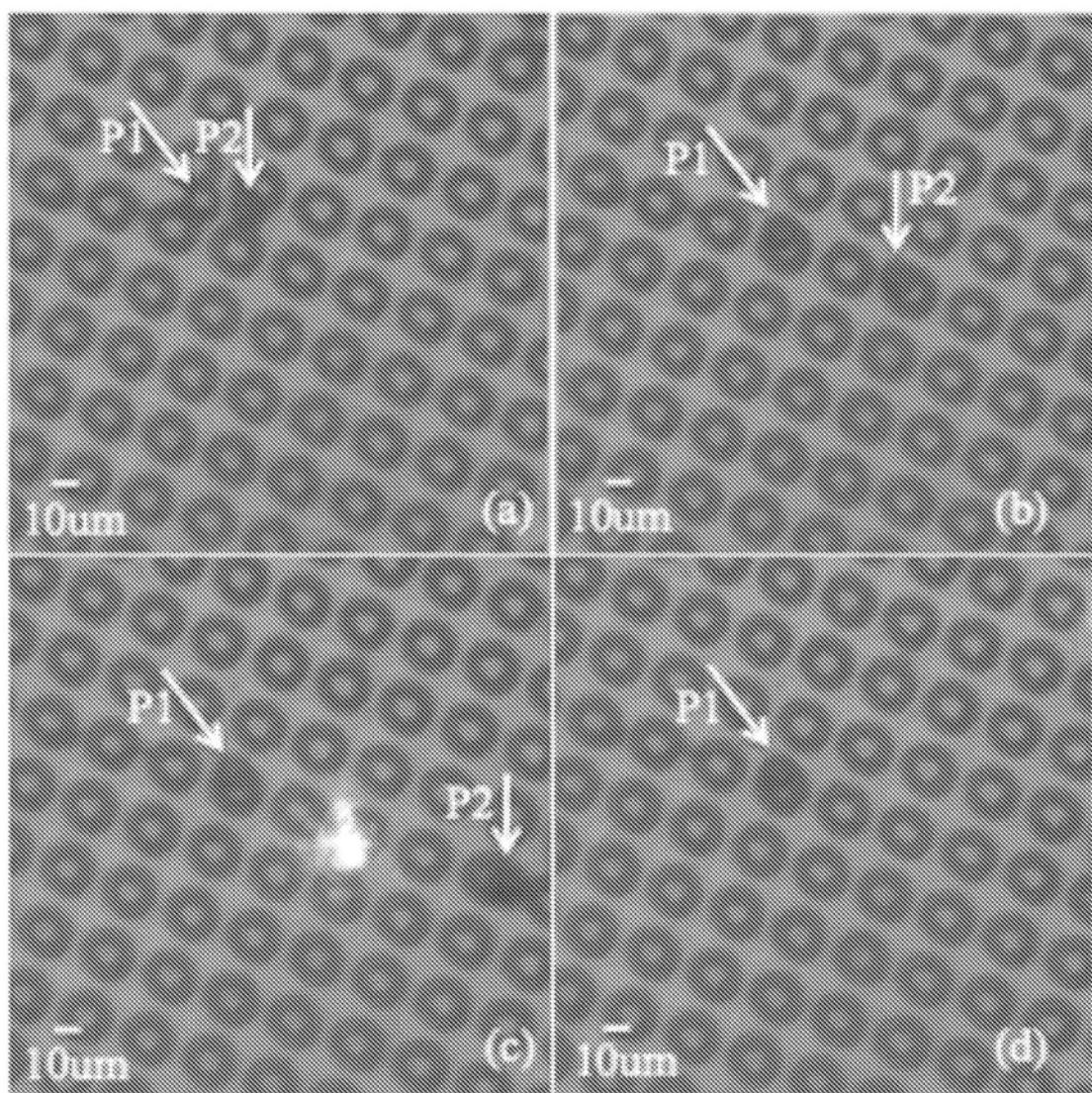


图4

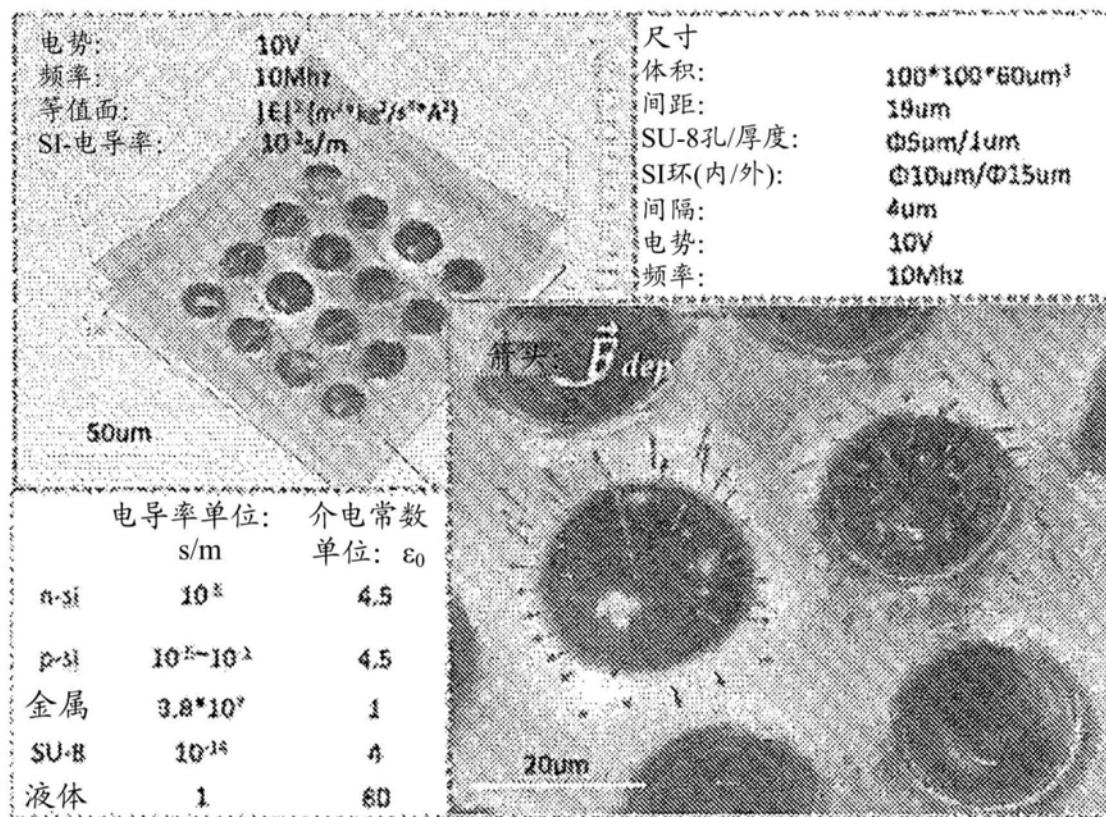
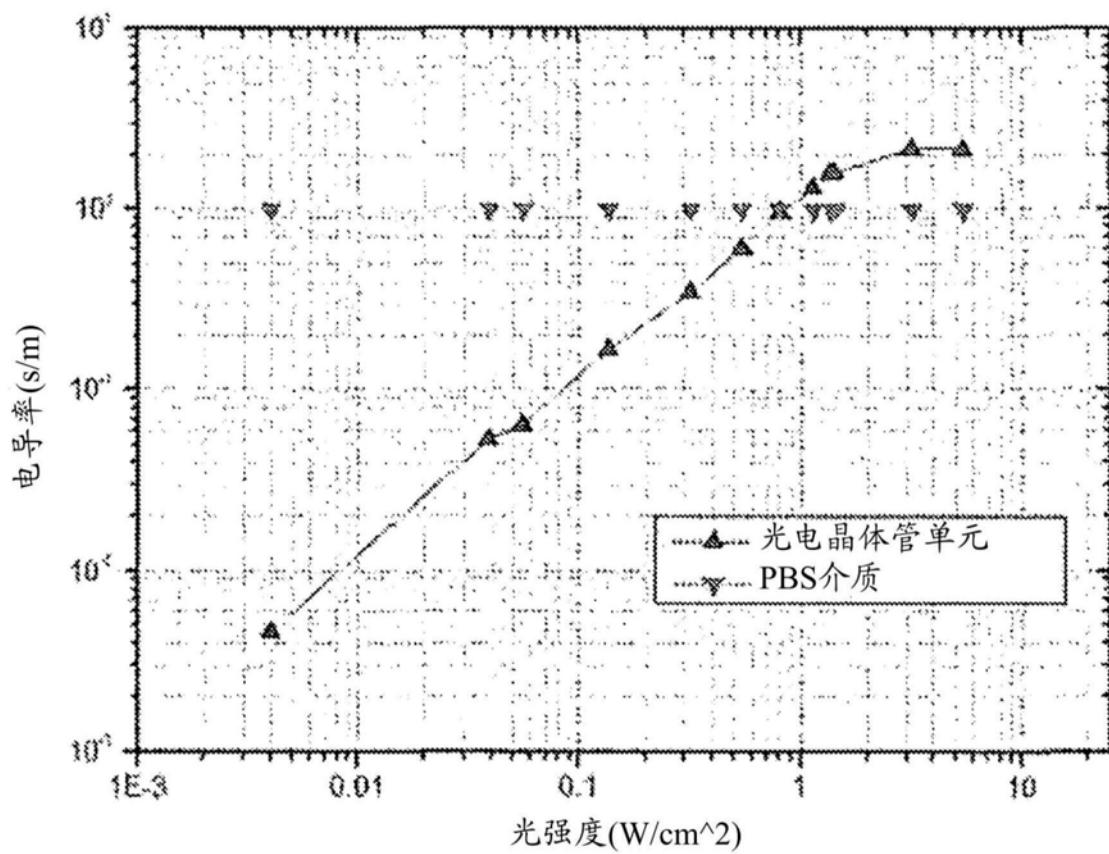
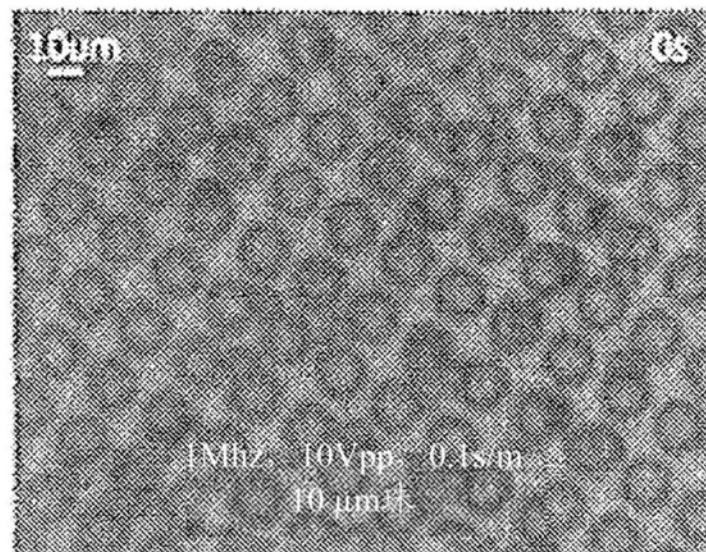


图5

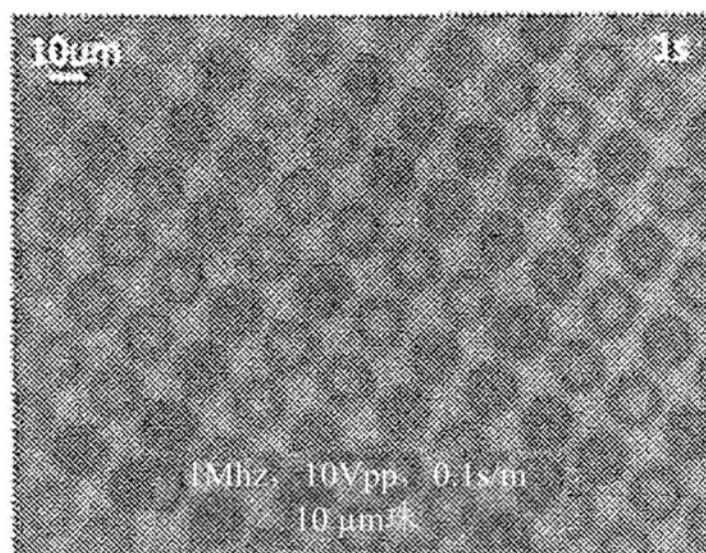
DC电源(488 nm激光, 10V)下的光电特性



自锁效应的测试



随机分布的微珠



呈有序方式的微珠

图7

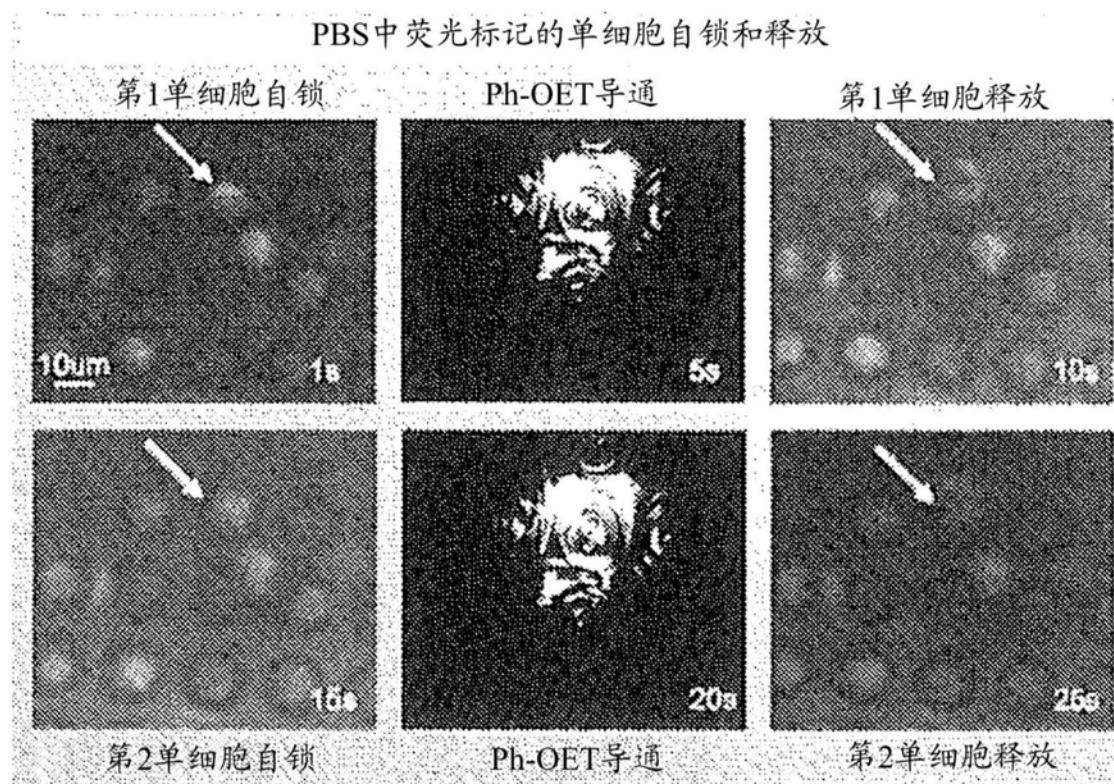


图8

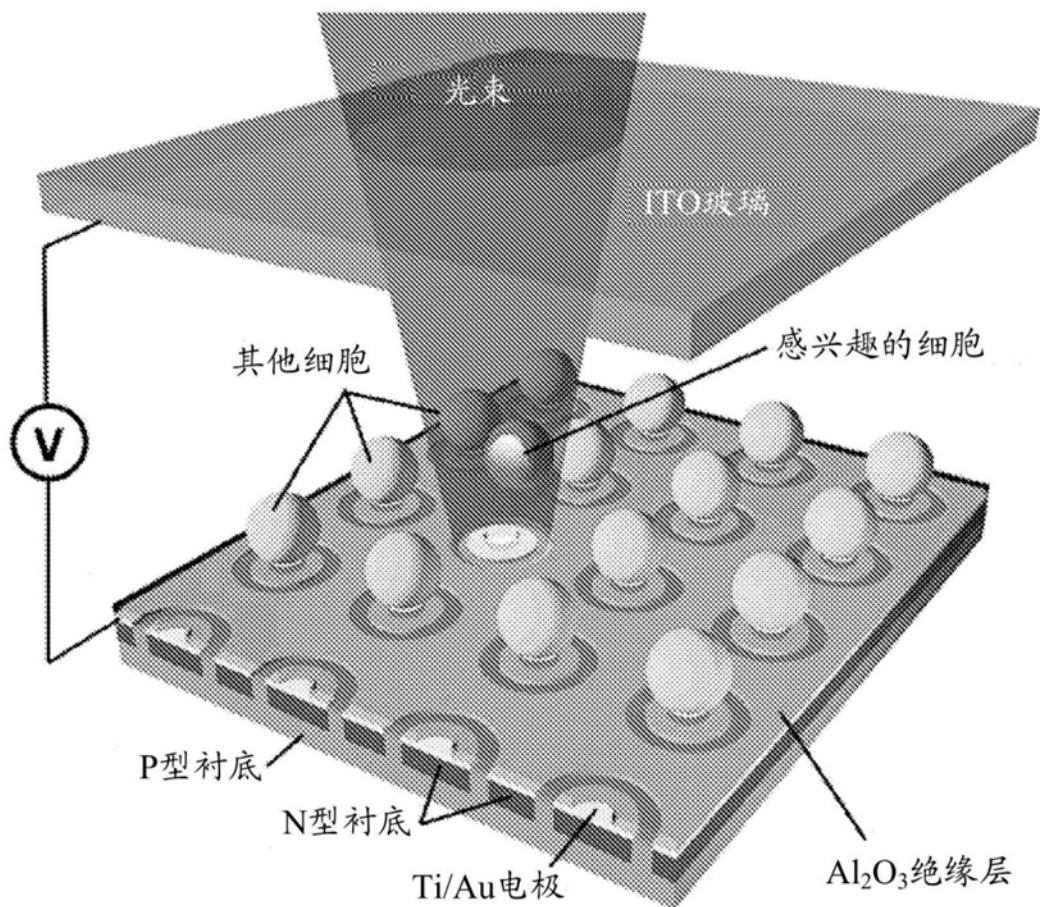


图9

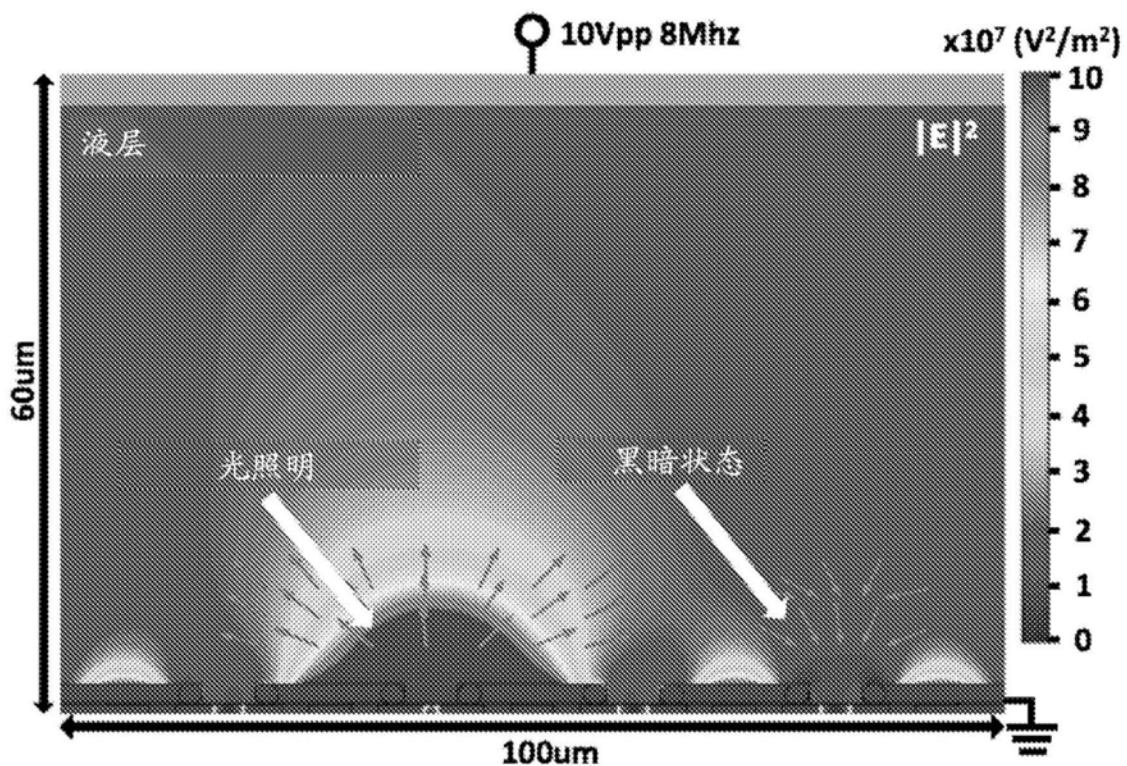


图10

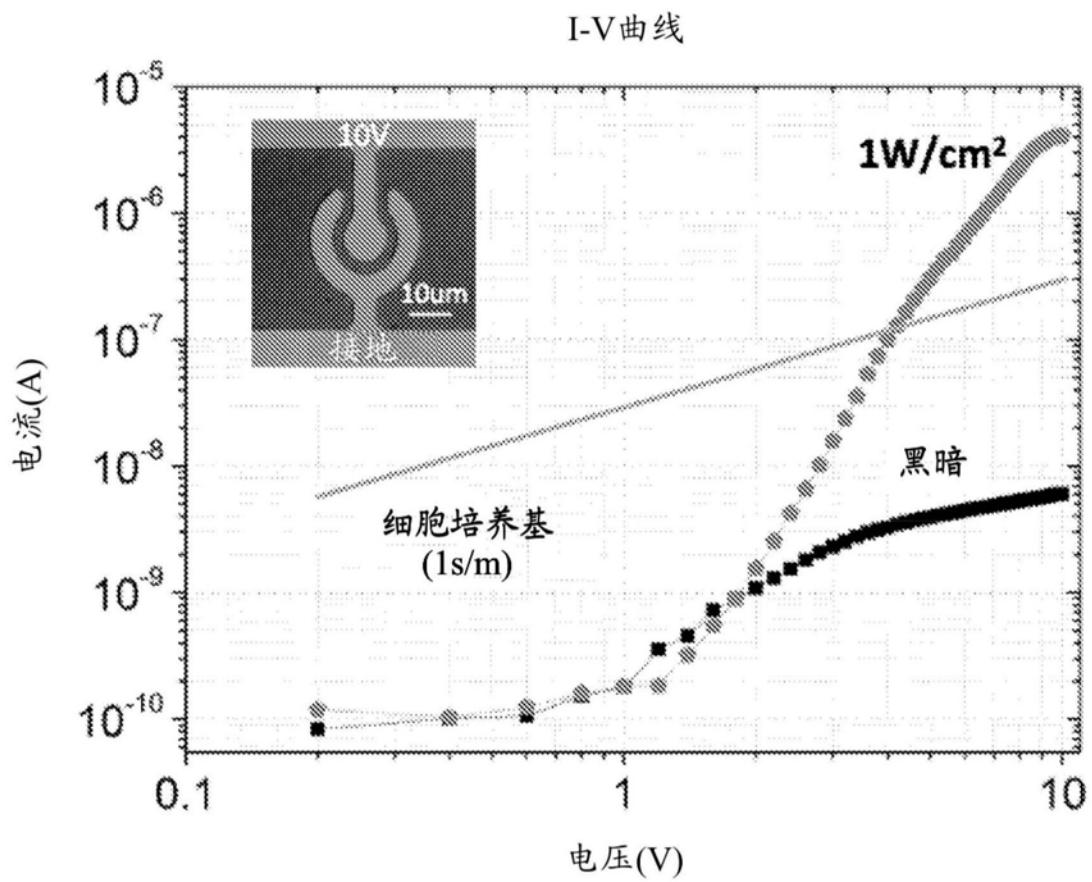


图11

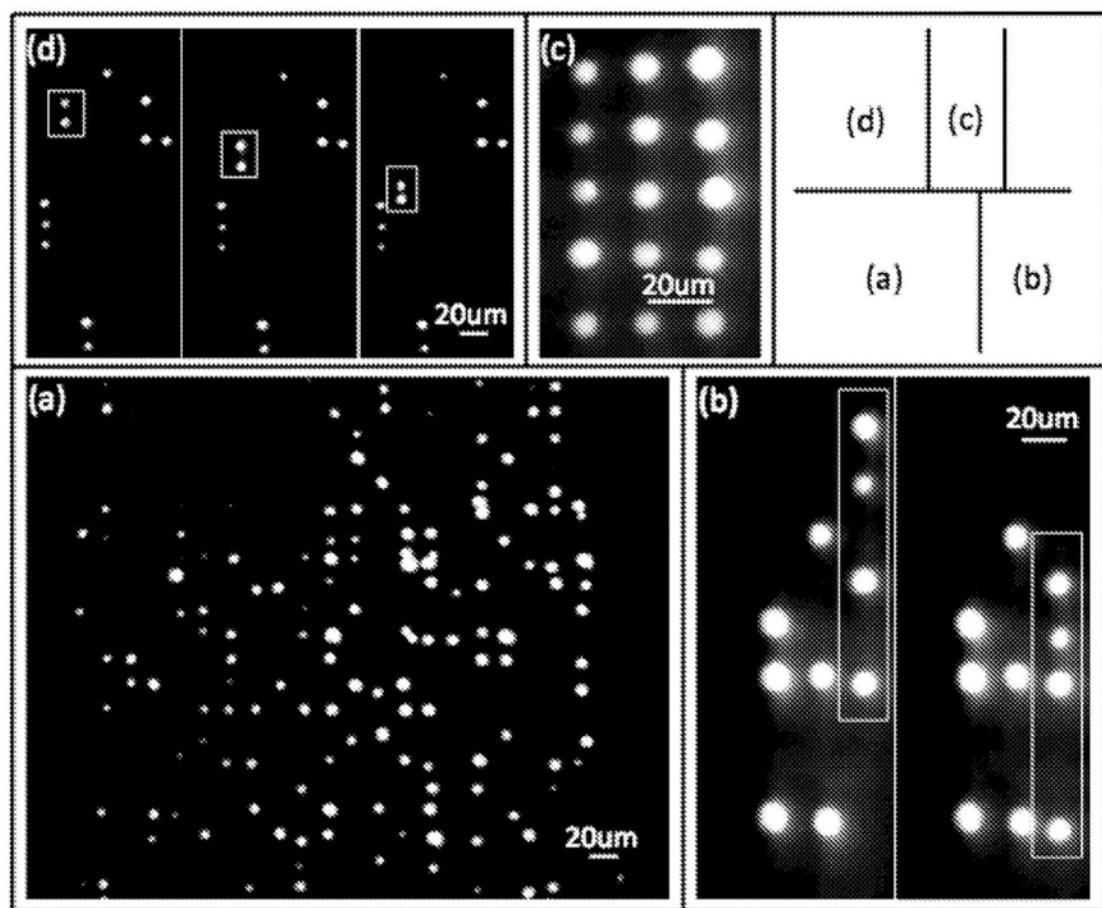


图12

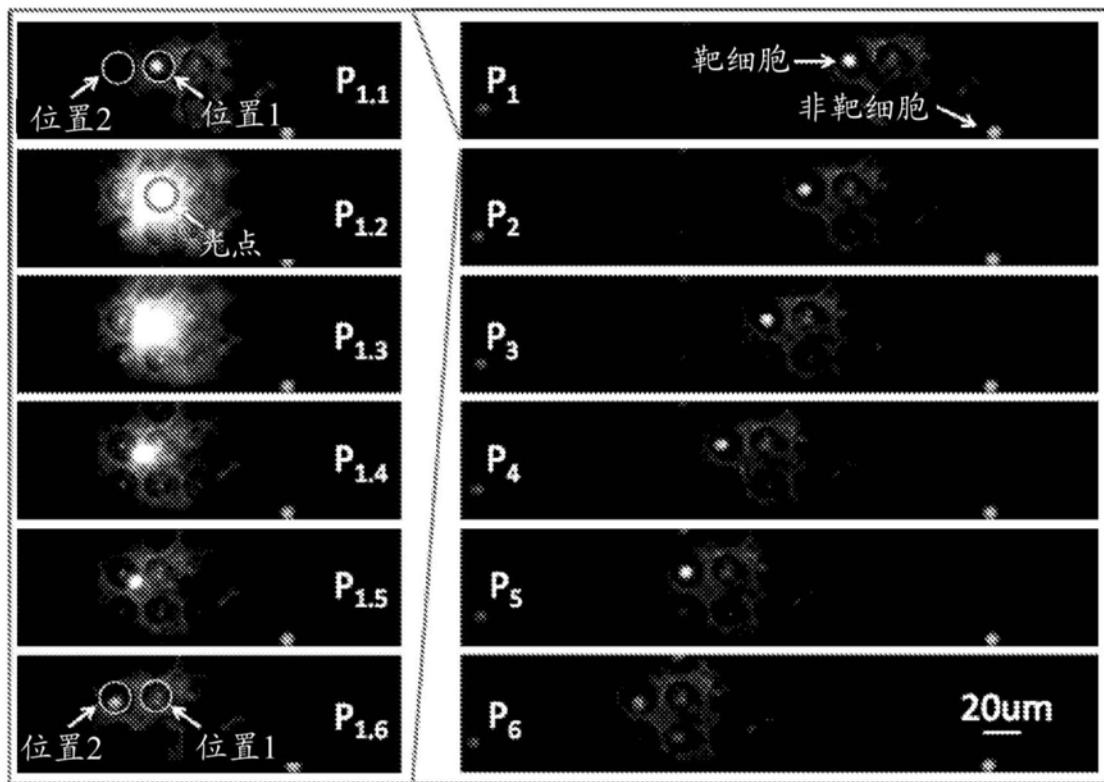


图13

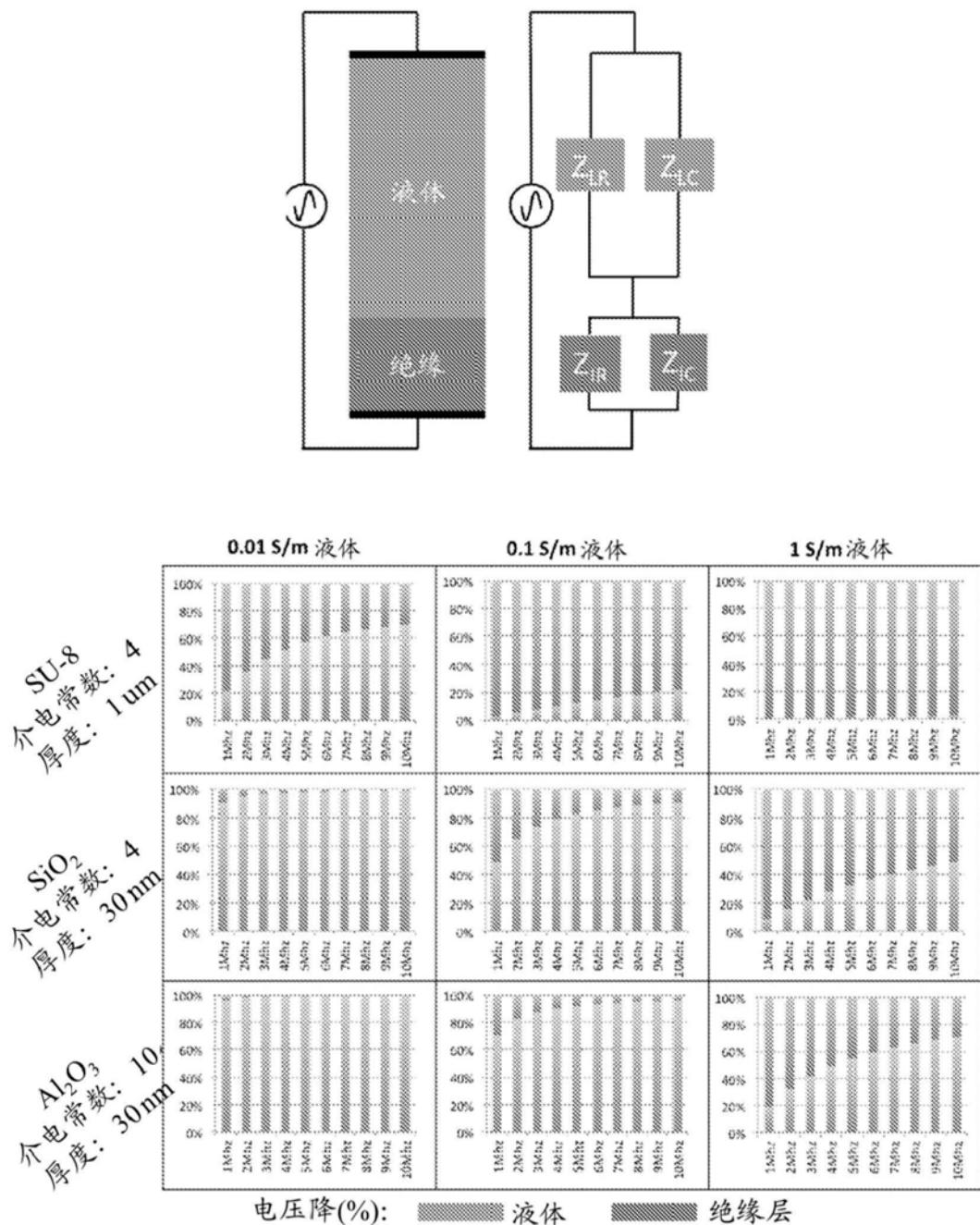
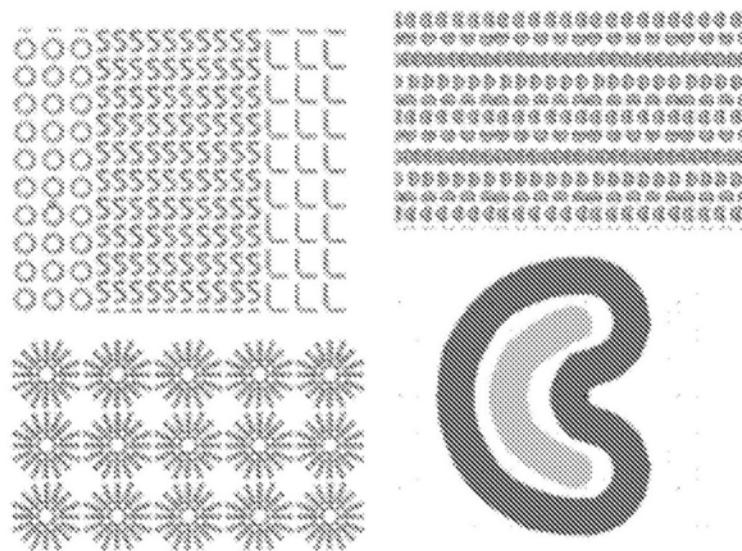


图14

(a)



(b)

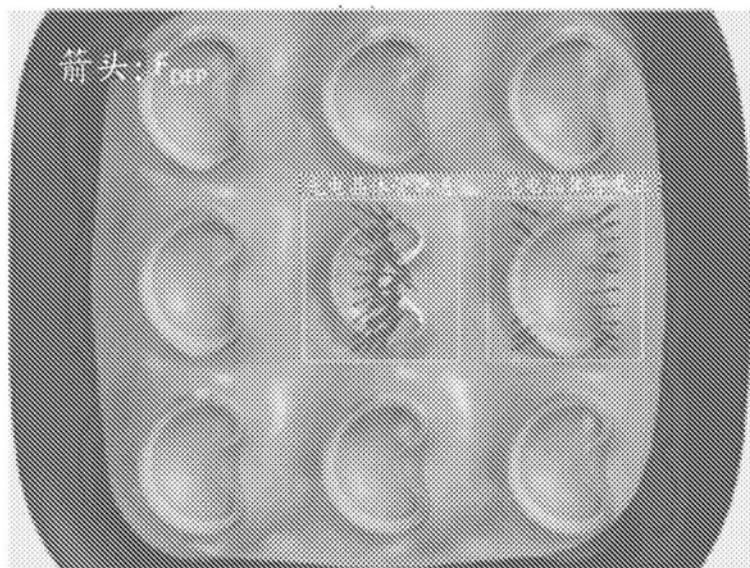


图15

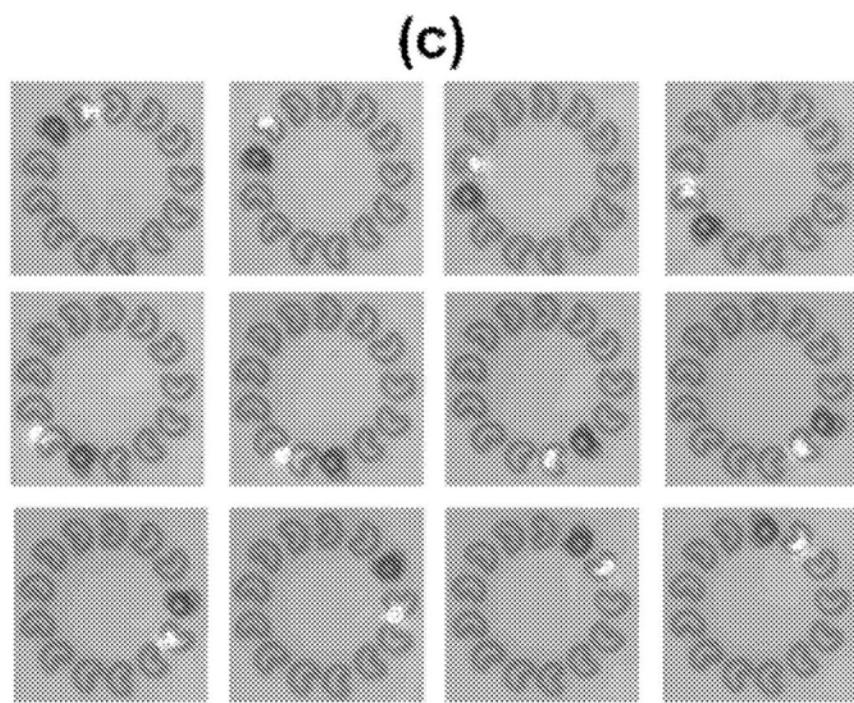


图15 (续)