

(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
2020年12月17日 (17.12.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/249130 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12M 1/42 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2020/096176
- (22) 国际申请日: 2020年6月15日 (15.06.2020)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910512145.2 2019年6月13日 (13.06.2019) CN
- (71) 申请人: 安行生物技术有限公司 (SAVELIFE BIOTECHNOLOGY CO. LIMITED) [CN/CN]; 中国香港特别行政区湾仔区骆克道洛克中19C, Hong Kong (CN)。
- (72) 发明人: 段学欣 (DUAN, Xuexin); 中国天津市南开区卫津路92号天津大学, Tianjin 300072 (CN)。
杨洋 (YANG, Yang); 中国天津市南开区卫津路92号天津大学, Tianjin 300072 (CN)。
- (74) 代理人: 北京启坤知识产权代理有限公司 (BEIJING QIKUN INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.); 中国北京市朝阳区东三环北路3号中远幸福大厦A座1105室黄可峻, Beijing 100027 (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, JO, JP, KE, KG, KH, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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,

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR CELL OR MICROVESICLE ISOLATION

(54) 发明名称: 细胞或微囊泡的分离方法及设备

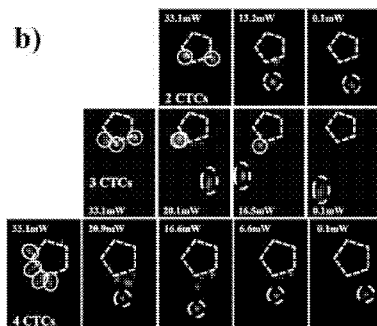


图11

(57) Abstract: Disclosed are a microfluidic system and method for isolating target cells or vesicles in a fluid. The system of the present invention comprises a fluid passageway having an inlet and an outlet; one or more ultra-high frequency acoustic resonator capable of generating bulk acoustic waves in the fluid passageway at a frequency of about 0.5-50 GHz; a power regulator which adjusts the power of the bulk acoustic waves generated by the ultra-high frequency resonator; and a flow rate regulating device that regulates the velocity of the solution flowing through the bulk acoustic wave region. Adjusting the power of the generated bulk acoustic waves by means of the power regulator and/or adjusting the velocity of the solution flowing through the bulk acoustic wave region by means of the flow rate regulating device allow cells or vesicles to stay in a bulk acoustic wave-affected region. The system and method of the present invention can capture and release cells or vesicles in a solution, and further process and analyze the obtained cells or vesicles.

(57) 摘要: 本发明公开了一种分离流体中的目标细胞或囊泡的微流控系统和方法。本发明的系统包括流体通道, 其具有入口和出口; 一个或多个超高频声波谐振器, 所述超高频体声波谐振器可在所述流体通道产生频率为约0.5-50GHz的体声波; 功率调节器, 其调节所述超高频谐振器产生体声波的功率; 流速调节装置, 其调节所述溶液流经体声波区域的速度。通过所述功率调节器调节产生的体声波的功率和/或通过所述流速调节装置调节所述溶液流经体声波区域的速度, 使得细胞或囊泡在体声波影响区域停留。本发明的系统和方法可以对溶液中的细胞或囊泡进行捕捉和释放, 对得到的细胞或囊泡进行进一步的处理及分析。

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))。

细胞或微囊泡的分离方法及设备

本申请要求以下中国专利申请的优先权：2019年6月13日提交的、申请号为201910512145.2、发明名称为“细胞或微囊泡的分离方法及设备”，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明涉及细胞研究方法学与医疗器械领域。具体的，本发明涉及一种对细胞或微囊泡进行分离和分析的微流控系统和使用所述系统来分离和分析细胞或微囊泡的方法。

背景技术

对生物颗粒物，特别是对细胞或微囊泡的操作是一项最基本的生物技术，同时也是前沿研究的基石技术。目前有很多种方法可以实现对生物颗粒物，例如细胞或微囊泡等物质的操控，其中包括电学方法、声学方法、光学方法、磁学方法、化学方法、流体操控方法等。每种方法的都有特定的应用范围，仅对特定的粒子属性有效，如声表面波和介电泳方式的操控是与粒子的半径大小相关，因此对于微米尺寸的粒子操控效果较好，对于纳米级的粒子区分度较差；电泳等方法只在粒子带有电性的情况下才能工作，因此对不带电性或着带电量相似的不同物质的区分度较差。光学操控方法精度高，但会在操控过程中产生较多的热，这样会对生物分子的活性有较大的影响，并且光学系统较复杂，难与微流体器件集成。每一种方法的单独使用都有一定的局限性，因此多数情况下，通过不同方法的结合使用，会使得样品的区分和操纵效果更好。

单细胞操控是近年来受到越来越多关注的领域。对单个细胞或微囊泡的操纵，对于例如单细胞分析，药物开发，器官芯片和细胞间相互作用等研究非常重要。其中基于细胞间特异性的研究（例如对单个细胞的细胞形态学、表面粘附性、迁移速度、蛋白表达和基因表达的研究）极度依赖单

细胞操控技术。但是，传统提取单细胞的方式繁复、耗时、费力且效率不佳。

声流体技术，例如表面声波和基于为流体中驻波的声泳技术都已经被用来微米粒子和细胞的分离、提取与操作。但是现有的这些技术采用的器件均有体积大、难以小型化的特点。

因此，目前亟需一种系统及方法，以实现细胞或微囊泡，特别是单个细胞或囊泡的捕捉，以方便对捕捉后的单细胞或囊泡的进一步的处理及分析。

发明内容

本发明首次发现利用超高频体声波能够在微流控系统中有效地操控和分离溶液中的细胞等柔性颗粒，由此提供了分离和“捕捉”目标细胞的方法和系统。本发明的方法和系统还可以用于精确控制捕捉到的细胞的种类和数量，特别适用于获得单个或有限数量的细胞。

具体的，本发明提供了一种将柔性微粒如细胞或囊泡从溶液中分离的方法，包括以下步骤：

(1) 使含有柔性微粒的溶液流经一个微流控设备，所述设备包括；
流体通道，其具有入口和出口；

一个或多个超高频体声波谐振器，其设置于所述流体通道的一个壁上，所述超高频体声波谐振器可在所述流体通道产生传向所述流体通道的对侧的壁的频率为约 0.5-50GHz 的体声波；

(2) 所述超高频谐振器发射传向所述流体通道的对侧的壁的体声波，在体声波影响区域的溶液产生涡旋；

(3) 调节体声波的功率（例如通过功率调节器）和/或调节所述溶液流经体声波影响区域的速度（例如通过流速调节装置），使得柔性微粒在体声波影响区域停留，即不发生相对流体通道向前的位移。

在本发明的其中一个方面，还包括使停留的所述柔性微粒离开停留位置的步骤，即“释放”所述柔性微粒。例如可以将所述捕捉到的柔性微粒释放到需要的通道或容器中。

本发明中的超高频体声波谐振器是指能够产生频率超过 0.5GHz（优选为超过 1GHz），例如频率为 0.5-50GHz 的声波的谐振器。所述超高频体声波谐振器可以为薄膜体声波谐振器或固态装配型谐振器。

所述微流控设备通常包括功率调节装置，其调节所述超高频谐振器产生的体声波的功率。

所述微流控设备通常包括流速调节装置，其调节所述溶液流经体声波影响区域的速度。

柔性微粒是指具有形变性质的纳米或微米颗粒。柔性颗粒可以是人工的或天然的，通常所述颗粒为带有膜结构的微团，特别是具有脂质双分子层或类脂质双分子层的微团。本发明涉及的柔性颗粒通常具有约 0.01-30 μm ，优选为 0.5-25 μm ，更优选为 0.8-20 μm 的直径。在本发明的其中一个方面，所述柔性颗粒为天然存在的颗粒，例如细胞或细胞释放到外环境中的细胞囊泡，包括外泌体、微囊泡、囊泡、膜小泡、水泡、气泡、前列腺小体、微颗粒、管腔内囊泡、核内体样囊泡或胞吐囊泡等。这些细胞相关的囊泡是从细胞膜上脱落或由细胞分泌的具有双层膜结构的囊泡状小体。囊泡通常具有大约 30-1000nm 的直径，例如具有大约 800-1000nm 的直径。

在本发明的其中一个方面，其中所述细胞包括细胞簇。所述细胞簇通常由数个，例如 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个，细胞组成。在本发明的其中一个方面，其中所述囊泡包括囊泡群。所述囊泡群通常由数个，例如 2-50 个囊泡组成。

在本发明的其中一个方面，其中所述细胞或囊泡的直径约为 0.8-30 μm ，例如为 1-25 μm ，又例如为 5-20 μm 。

在本发明的其中一个方面，其中所述功率调节装置的输出功率为约输出功率为约 0.5-800mW，优选为 0.5-500mW，更优选为 0.5-350mW。

在本发明的其中一个方面，其中所述流速调节装置可调节所述溶液流经体声波区域的速度为约 0.1-10mm/s，优选为约 0.3-5mm/s，更优选为约 0.5-2.5mm/s。

在本发明的其中一个方面，其中所述流速调节装置可调节所述溶液流经体声波区域的速度为约 0.1-100 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，优选为约 0.1-50 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，更优选

为约 0.5-20 μ L/min。

在本发明的其中一个方面，其中所述流体通道的高度为所述细胞或囊泡的直径的约 1.5-10 倍，优选为直径的约 1.5-6 倍，更优选为约 2-4 倍。

在本发明的其中一个方面，其中所述微流控设备的流体通道的高度为约 25-200 μ m，优选为约 25-100 μ m，更优选为约 30-80 μ m，例如为约 40-60 μ m。

在本发明的其中一个方面，其中所述超高频体声波谐振器的体声波产生区域面积为约 500-200000 μ m²，优选为约 5000-50000 μ m²，最优选为约 10000-25000 μ m²。

在本发明的其中一个方面，其中所述入口包括样品入口和设置于所述样品入口的一侧或两侧的辅助溶液入口。辅助溶液可以为例如缓冲液等液体。辅助溶液可以用于重悬“捕获”的细胞或囊泡，或用于加入处理“捕获”的细胞或囊泡的试剂，如特异性识别所述细胞或囊泡或其特异性标记物的荧光标记。基于鞘流作用，辅助溶液也可以用于控制样品液体在微流道中的流动方向和范围。

在本发明的其中一个方面，前述方法用于分离和得到单个细胞或数个（例如 2-100 个，优选为 2-10 个）细胞，或是用于分离和得到单个或数个（例如 2-100 个，优选为 2-10 个）细胞簇。

在本发明的其中一个方面，前述方法还包括在所述体声波影响区域选择性捕捉不同种类或不同性质（例如不同大小或密度等）的细胞或囊泡。在本发明的其中又一个方面，还包括控制在所述体声波影响区域停留的细胞或囊泡的数量。在本发明的其中又一个方面，可通过以下方式的一种或其任意组合来选择在所述体声波影响区域停留的细胞或囊泡及其数量：

- (a) 调节体声波的功率；
- (b) 调节产生体声波的时间；
- (c) 调节所述溶液流经体声波区域的速度。

在本发明的其中一个方面，上述方法控制在所述体声波影响区域停留的细胞或囊泡为单个或数个（例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个，或 11-20 个）。在其中又一个方面，调节溶液流经体声波区域的速度为约

0.1-10mm/s，优选为约 0.5-3mm/s。在其中又一个方面，调节体声波的功率为约 0.1-500mW，优选为约 0.5-200mW。在其中又一个方面，调节溶液流经体声波区域的速度为约 0.1-10mm/s，优选为约 0.5-3mm/s，以及调节体声波的功率为约 0.1-500mW，优选为约 0.5-200mW。

在本发明的其中一个方面，前述方法还包括使得停留的细胞或囊泡离开停留位置，即释放所述细胞或囊泡。在本发明的其中一个方面，可通过以下方式的一种或其任意组合释放所述细胞或囊泡：

- (a) 停止体声波；
- (b) 降低所述体声波的功率；
- (c) 增大溶液流经体声波区域的速度。

在本发明的其中一个方面，所述方法可控地释放停留的细胞或囊泡，在本发明的其中一个方面，所述方法可以控制释放的细胞或囊泡的种类，例如释放不同大小的细胞或囊泡。在本发明的其中一个方面，通过调节体声波的功率，控制“捕获的”细胞按尺寸从小到大顺序释放，例如，所述体声波的功率按约 5-20%的程度递减。在本发明的其中一个方面，所述方法可以控制释放的细胞或囊泡的数量，例如通过调节体声波的功率和/或溶液的流速，控制“捕获的”细胞以不同的数量被释放，由此可控地得到需要的数量的细胞或囊泡，特别是单个细胞或囊泡。

在本发明的其中一个方面，所述方法还包括将成簇细胞分散的步骤。例如通过调节超高频谐振器产生的体声波的功率，将成簇细胞分散。

在本发明的其中一个方面，所述方法还包括提高超高频谐振器产生的体声波的功率，破坏细胞膜或囊泡膜，以释放细胞或囊泡内物质，如蛋白质或核酸等。

在本发明的其中一个方面，所述方法中的溶液为含有待捕捉细胞或囊泡的液体，例如体液、全血、任何含有细胞的血液级份、片段化的肿瘤、肿瘤细胞悬浮液、细胞培养物或培养物上清。在本发明的其中一个方面，所述溶液为血液，包括全血或血液级份。

在本发明的其中一个方面，所述方法用于将需要分离的细胞或囊泡从含有其它颗粒或细胞的溶液中分离。在本发明的其中一个方面，其中所

述需要分离的细胞或囊泡在溶液中的含量与所述其它颗粒或细胞的比例小于 $1:10^4$ ，优选小于 $1:10^5$ ，更优选小于 $1:10^6$ 。在本发明的其中又一个方面，其中所述需要分离的细胞或囊泡在溶液中的含量小于 10 个/ml 或更少。

在本发明的其中一个方面，所述方法中的微流控设备的设置为在处理含有不同的颗粒或细胞时，捕获需要的细胞或囊泡的位置（或称为捕获点）与其它细胞或囊泡离开体声波作用区域的位置（或称为释放点）不同。优选的，其它细胞离开体声波作用区域的位置设置在捕获需要的细胞的位置的上游。在本发明的其中又一个方面，所述方法中微流控设备的超高频体声波谐振器的体声波作用区域的设置方式为捕获需要的细胞的位置（或称为捕获点）与其它细胞离开体声波作用区域的位置（或称为释放点）不同。

在本发明中，细胞包括天然的或培养的高等植物或动物（例如包括人在内的哺乳动物）的细胞，以及细菌，真菌等单细胞生物或简单多细胞生物。在本发明的其中一个方面，所述细胞为真核动物细胞，优选为哺乳动物细胞，更优选为人的细胞。在本发明的其中又一个方面，所述细胞为血细胞、干细胞、体细胞或肿瘤细胞，例如为循环肿瘤细胞（circulating tumor cell, CTC）。所述循环肿瘤细胞选自而但不限于以下上皮细胞癌症：前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、膀胱癌、卵巢癌、肾癌、头颈部癌、胰癌和肺癌。在本发明的其中又一个方面，所述细胞为胎盘滋养层细胞或有核红细胞，更优选的，所述细胞来自孕妇外周血。

在本发明的其中一个方面，所述方法中还包括把分离的细胞或囊泡用于以下一种或多种分析：DNA 和 RNA 扩增（例如 cDNA 末端快速扩增 (RACE)；简并性寡聚引物 PCR；线粒体 DNA PCR；基因组 PCR、数字 PCR、RT-PCR、邻位连接 PCR；免疫 PCR）；测序；免疫化学；代谢物分析；酶法分析；报告基因表达分析；和杂交研究。

在本发明的其中一个方面，所述方法用于细胞或囊泡与微胶囊的组合，特别是单个细胞或囊泡与单个微胶囊的组合。在本发明的其中一个方面，其中包括使得单个或数个细胞或囊泡在超高频谐振器体的声波影响区域停留，以及还包括使得单个或数个微胶囊在同一超高频谐振器体的声波影响区域停留，然后所述单个或数个细胞或囊泡与单个微胶囊形成组合，

例如在捕获点形成所述单个或数个细胞或囊泡与单个微胶囊的组合。所述方法还包括改变微流控设备的参数，使得组合后的微胶囊-细胞/囊泡被释放。

微胶囊是包括包含多个隔室 (partitions) 的装置，广泛用于不同的分子生物学应用，包括但不限于：核酸测序、蛋白质测序、核酸量化、测序优化、检测基因表达、量化基因表达以及基因组标记物或表达的标记物的单细胞分析。微胶囊的分区可以包含含有一种或多种试剂（例如，酶、独特标识符例如条形码、抗体等）。用于微胶囊的材料，尤其是微胶囊的壳的材料，可使微胶囊能够在施加的刺激下破裂。封装在微胶囊中的试剂可以是适合于分析物的样品制备反应的各种分子、化学物质、颗粒和元素。例如，在用于靶标的 DNA 测序的样品制备反应中使用的微胶囊可以包含一种或多种下列试剂：酶、限制酶、连接酶、聚合酶、荧光团、寡核苷酸条形码、缓冲液等。在另一实例中，在用于单细胞分析的样品制备反应中使用的微胶囊可以包含：裂解缓冲液、去污剂、荧光团、寡核苷酸条形码、连接酶、蛋白酶、可热活化的蛋白酶、蛋白酶或核酸酶抑制剂、缓冲液、酶、抗体、纳米颗粒等。微胶囊通常通过乳化剂或者基于液滴的微流控来封装和制备。所述乳液或液滴包含油包水制剂或者水包油包水(W/O/W)双乳液制剂，或者所述乳液或液滴包括琼脂糖或者 PEG 等聚合物。微胶囊一般具有从 10nm 到 100 μ m 的尺寸。优选的，在本发明的方法中，微胶囊具有从 1 μ m 到 100 μ m 的尺寸。

在本发明的其中一个方面，上述方法包括以下步骤：

(a) 通过调节超高频体声波谐振器的参数，例如通过调节体声波功率和/或流速，使得单个或数个细胞或囊泡在超高频体声波谐振器的体声波作用区域停留；

(b) 从样品入口注入凝胶微球，在保持步骤 (a) 中停留的细胞或囊泡不被释放的条件下，调节超高频体声波谐振器的参数，例如通过调节体声波功率和流速，使得单个或数个微胶囊在超高频体声波谐振器的体声波作用区域停留；

(c) 所述微胶囊与所述停留的细胞或囊泡在超高频体声波谐振器的

体声波作用区域发生组合。通常在超高频体声波谐振器的体声波作用区域的捕获点形成所述单个或数个细胞或囊泡与单个微胶囊的组合。

在本发明的其中一个方面，上述方法还包括以下步骤：

(d) 通过改变微流控设备的参数，例如通过减小体声波功率或停止体声波，使得组合后的微胶囊-细胞/囊泡被释放。

本发明还提供了一种试剂盒，其中包括微胶囊和如前定义的超高频体声波谐振器。所述试剂盒可用于组合微胶囊和细胞或囊泡（特别是单个细胞或囊泡），以及用于对细胞或囊泡（特别是单个细胞或囊泡）的以下一种或多种分析：DNA 和 RNA 扩增（例如 cDNA 末端快速扩增(RACE)；简并性寡聚引物 PCR；线粒体 DNA PCR；基因组 PCR、数字 PCR、RT-PCR、邻位连接 PCR；免疫 PCR）；测序；免疫化学；代谢物分析；酶法分析；报告基因表达分析；和杂交研究。所述试剂盒还可含有用于所述分析的试剂。

本发明还提供了将需要的柔性颗粒从溶液中分离的微流控设备。

在本发明的一个方面，提供了一种用于分离细胞或囊泡的微流控设备，包括：

流体通道，其具有入口和出口；

一个或多个超高频体声波谐振器，其设置于所述流体通道的一个壁上，所述超高频体声波谐振器可在所述流体通道产生传向所述流体通道的对侧的壁的频率为约 0.5-50GHz 的体声波；

功率调节装置，其调节所述超高频谐振器产生的体声波的功率；

流速调节装置，其调节所述溶液流经体声波区域的速度，

所述超高频谐振器可发射传向所述流体通道的对侧的壁的体声波，使得流经体声波区域的溶液产生涡旋，通过所述功率调节器调节体声波的功率和/或通过所述流速调节装置调节所述溶液流经体声波区域的速度，使得细胞或囊泡在体声波区域停留。

本发明提供的微流控设备用于处理生物活性细胞或分子，因此具有处理生物活性物质的设置或材料。例如，其流道内表面可采用生物相容性的材料制成。又例如，其具有防止交叉污染特别是导致污染扩增的设计。

在本发明的其中又一个方面，所述微流控设备的功率调节装置的输出功率为约 0.5-800mW，优选为 0.5-500mW，更优选为 0.5-350mW。

在本发明的其中又一个方面，所述微流控设备的流速调节装置可调节所述溶液流经体声波区域的速度为约 0.1-10mm/s，优选为约 0.3-5mm/s，更优选为约 0.5-2.5mm/s。

在本发明的其中又一个方面，所述微流控设备的流速调节装置可调节所述溶液流经体声波区域的速度为约 0.1-100 μ L/min，优选为约 0.1-50 μ L/min，更优选为约 0.5-20 μ L/min。

在本发明的其中又一个方面，所述微流控设备的流体通道的高度为所述需要的细胞或囊泡的直径的约 1.5-10 倍，优选为直径的约 1.5-6 倍，更优选为约 2-4 倍。

在本发明的其中又一个方面，所述微流控设备的流体通道的高度为约 25-200 μ m，优选为约 25-100 μ m，更优选为约 30-80 μ m，例如为约 40-60 μ m。

在本发明的其中又一个方面，所述微流控设备的高频体声波谐振器的体声波产生区域面积为约 500-200000 μ m²，优选为约 5000-50000 μ m²，最优选为约 10000-25000 μ m²。

在本发明的其中又一个方面，所述微流控设备的入口包括样品入口和设置于所述样品入口的一侧或两侧的辅助溶液入口。

在本发明的其中又一个方面，所述微流控设备设置为捕获需要的细胞或囊泡的位置与溶液中其它细胞或囊泡离开体声波作用区域的位置不同。

在本发明的其中又一个方面，所述微流控设备的超高频体声波谐振器的体声波作用区域的设置方式为捕获需要的细胞的位置与其它细胞离开体声波作用区域的位置不同。在本发明的其中又一个方面，其它细胞离开体声波作用区域的位置设置在捕获需要的细胞的位置的上游。

在本发明的其中又一个方面，所述微流控设备的超高频体声波谐振器可以为薄膜体声波谐振器或固态装配型谐振器，例如为厚度伸缩振动模式的声波谐振器。

在本发明的其中又一个方面，所述微流控设备的超高频体声波谐振器的压电层的厚度范围为 1nm~2um。

附图标记

100 微流道装置 101 流体通道

200 芯片外壳 201 库尔特细胞计数器 202 超高频体声波谐振器 203 顶电极层 204 压电层 205 底电极层 206 声波反射层 声阻抗层 207 底衬层 208 顶部

300 PCL 控制器 301 高频信号发生器 302 功率放大器 303 阻抗仪

400 液体注入和流速调节装置

500 声射流 501 涡旋

600 较大尺寸颗粒 601 中等尺寸颗粒 602 较小尺寸颗粒

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案，下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作一简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图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。

图 1 本申请实施例提供的一种微流控设备系统的结构示意图；

图 2 本申请实施例提供的一种微流控设备系统中的超高频体声波谐振器的结构示意图；其中，(a) 表示图 1 所示的微流控系统的微流道的俯视图（左侧）及 A-A 的剖面图（右侧）；(b) 表示超高频体声波谐振器的俯视图（左侧）（其中的黑色五边形部分为超高频体声波谐振器的声波作用区域）以及 B-B 的剖视图（右侧）；(c) 表示微流道+超高频体声波谐振器的俯视图（左侧）以及剖视图（右侧）；

图 3 显示 Hela 细胞在本申请实施例提供的一种微流控设备系统中被捕捉。图 3 (a) 显示的单个 Hela 细胞在微流控设备系统超高频体声波谐振器发生体声波形成的涡旋通道中的运动轨迹图像（单个细胞在不同时间的

轨迹叠加)；图 3 (b) 显示 HeLa 细胞的运动轨迹示意图 (多个细胞的运动轨迹叠加) 和分析图；图 3 (c) 为 HeLa 细胞的时间和速度分析图。

图 4 显示细胞在本申请实施例提供的一种微流控设备系统中的涡旋通道中的运动。图 4 (a) 显示涡旋中细胞移动的图像；图 4 (b) 显示停止体声波后细胞沉降；图 4 (c) 显示涡旋隧道存在多个细胞。

图 5 显示细胞簇在本申请实施例提供的一种微流控设备系统中可控分解和释放。图 5 (a) 显示，细胞簇在体声波功率为 66mV 下的条件下在本发明的声涡旋隧道中被捕捉和分解成单个细胞。图 5 (b) 显示，当超高频体声波谐振器发出的体声波的功率大过一定水平后，细胞在涡旋的作用下被破坏。图 5 (c) 显示细胞簇在本发明的声涡旋隧道中被捕捉的荧光图。图 5 (d) 显示细胞簇在本发明的声涡旋隧道中分解成单个细胞和单个细胞被释放的荧光图 (功率 15mV，流速 2 μ L/min)。

图 6 显示本申请实施例提供的一种微流控设备系统能够从含有 HeLa 细胞和血液细胞的血液混合液中分离和捕获 HeLa 细胞。图 6 (a) 显示，HeLa 细胞被捕获在高频体声波谐振器的声波作用区域边缘，白细胞和红细胞则流过声波作用区。图 6 (b) 为细胞的捕获效率与不同体声波功率和样品溶液流速的关系曲线图。

图 7 显示本申请实施例提供的一种微流控设备系统能够从血液混合液中分离和捕获不同细胞。图 7 (a) 显示，HeLa 细胞被捕获在高频体声波谐振器的声波作用区域边缘并在 560s 仍保持活性。图 7 (b) 显示，本发明的设备和方法可捕获白细胞并保持活性。图 7 (c) 显示，本发明的设备和方法可分别捕获 HeLa 细胞、白细胞和红细胞。

图 8 显示超高频体声波谐振器周围的温度分布。图像处理采用 Matlab 软件。

图 9 显示本申请实施例提供的一种微流控设备系统能够从含有 HeLa 细胞的全血混合液中分离和捕获 HeLa 细胞。图 9 (c) 和 (d) 显示两种微流道设置方式下 HeLa 细胞被捕捉和血细胞被释放的照片，图 9 (a) 和 (b) 分别是图 9 (c) 和 (d) 的分析和示意图。图 9 (e) 显示体声波作用区域上游和下游 (图 9 (c) 和 (d) 中的颜色线) 的血细胞分布。

图 10 显示本申请实施例提供的一种微流控设备系统能够从肝癌患者血液样品中捕捉循环肿瘤细胞。

图 10 (a-1) 和 (a-2) 分别显示为施加和施加电力产生体声波和涡流时流道里液流的情况。图 10 (a-3) 显示捕获的单个细胞被 Calcein-A 染成绿色。图 10 (a-4) 和图 10 (a-5) 分别是荧光和亮视场像。图 10 (b) 显示被捕获的细胞的染色。Calcein-A 染成绿色，而抗-EpCAM 标记的红色荧光代表捕获细胞存在癌症标记物 EpCAM。

图 11 显示在流速不变的条件下，捕捉到的细胞数目与施加给超高频体声波谐振器的功率是线性关系。

图 12 显示本申请实施例提供的一种微流控设备系统将单个或数个细胞与微胶囊一对一组合。

具体实施方式

为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的区间。

实施例 1 实验方法和材料

微流体通道和超高频体声波谐振器制备：

通过软光刻制备由聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 制成的微流体通道。

体声波谐振器装置通过在硅基的晶圆上进行化学气相沉积、金属溅射、光刻等方法制备。具体的方法如下：

1. 使用浓硫酸与双氧水体积比为 3:1 的食人鱼溶液对硅片的表面进行彻底的清洗，该方法可以有效地去除硅片上的有机物和无机物。

2. 在清洗过的硅片上，通过表面溅射的方法形成一层氮化铝薄膜，再使用离子增强型化学气相沉积的方法，沉积一层二氧化硅薄膜。接着使用同样的方法，交替沉积氮化铝薄膜和二氧化硅薄膜，形成氮化铝和二氧化

硅交替重叠的布拉格声反射结构。

3.在布拉格反射层结构上，溅射出一层 600nm 的钼薄膜作为底电极。接着采用标准光刻技术，包括涂胶、曝光、显影等，对钼电极薄膜进行光刻，之后进行刻蚀，形成有目标图案的底电极。

4.在钼电极上再溅射一层氮化铝薄膜作为压电层。使用干法刻蚀对氮化铝薄膜定义图案。

5.使用负光刻胶对掩模版上的图案进行转移，再溅射出一层 50nm 厚的钛钨合金，它作为粘附层可以增加金电极的粘附性。之后使用蒸镀的方法长出一层 300nm 厚的金薄膜的上电极。最后使用丙酮去除掉目标图案周围的金薄膜，形成有目标图案的金电极。

最后，体声波谐振器装置与 PDMS 微通道芯片粘合集成。体声波谐振器装置设置在通道的中间位置。

将体声波谐振器装置用标准 SMA 接口与网络分析仪连接，通过测试频谱找到谐振峰，可测得体声波谐振器装置在微流道中发出的体声波的频率。

仪器和材料

高频信号发生器: (MXG Analog Signal Generator, Agilent, N5181A 100 kHz-3 GHz

功率放大器: Mini-Circuits, with 35 dBm enhancement of the original RF source power

注射泵: New Era Pump Systems, Inc., NE-1000

细胞:

Hela 细胞株: 广州吉妮欧生物科技有限公司, ATCC#CCL2

3T3 细胞: 广州吉妮欧生物科技有限公司, ATCC#CRL-1658

细胞培养:

在补充有 10% FBS (Thermo), 100U/ml 青霉素 (Thermo) 和 100ug/ml 链霉素 (Thermo) 的 DMEM 培养基 (Thermo) 中培养 293T 细胞。培养的细胞密度在 $1 \times 10^5/\text{mL} \sim 2 \times 10^6/\text{mL}$ 。在进行微流道实验时, 可稀释为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 进行实验。PBS 缓冲液 (Gibco)。

细胞或肿瘤标记物或染色剂：

Calcein-AM (北京索莱宝科技有限公司，中国)

Anti-EpCAM (Biolegend, USA)

4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) (Invitrogen, USA)

实施例 2

在本实施例的具体实施过程中，提供了一种微流控设备，其可用于在溶液中分离和捕捉柔性颗粒，特别是直径约为 0.8-30 μm 的柔性颗粒。柔性颗粒可以是人工的或天然的，通常所述颗粒为带有膜结构的微团，特别是具有脂质双分子层或类脂质双分子层的微团。本发明涉及的柔性颗粒通常具有约 0.8-30 μm 的直径。在本发明的其中一个方面，所述柔性颗粒为天然存在的颗粒，例如细胞或细胞释放到细胞外环境中的囊泡。

本发明的方法和设备可用于溶液中分离和捕捉柔性颗粒，例如在血液中对目标细胞进行分离和捕捉。又例如在血浆中对囊泡进行分离和捕捉。

如图 1 所示，所述微流控设备 100 包括流体通道 101，超高频体声波谐振器 202，体声波驱动和功率调节装置，液体注入和流速调节装置 400。

本发明提供的微流控设备可以单独存在，也可以是一个微流控系统的一部分，例如以可装卸的芯片形式存在。微流控系统或装置可用于容纳和运输液体等流体材料，其流道尺寸在微米甚至纳米级别。典型的微流控系统和设备通常包括毫米级或更小尺寸的结构和功能单位。

所述微流控设备的流体通道，或称为微流道，除了供流体进入和流出的开口以外，一般是封闭的。流体通道的截面通常具有 0.1-500 μm 的尺寸，其可以为各种形状，包括椭圆、矩形、方形、三角形、圆形等。可以用各种已知的微制备技术来制备流体通道，其材料包括但不限于硅石、硅、石英、玻璃或聚合材料（例如 PDMS、塑料等）。可以用涂层涂覆所述通道。涂层可改变通道的特性，并且可以图案化。例如，涂层可以是亲水的，疏水的，磁性的，传导的，或生物性功能化的。

在本发明的其中一个方面，所述微流控设备的流体通道的高度为约 20-200 μm ，优选为约 20-100 μm ，更优选为约 30-80 μm ，例如为约 40-60 μm 。

在本发明的其中一个方面，所述微流控设备用于捕获细胞，其流体通道的高度通常为目标细胞的直径的约 1.5-10 倍，优选为直径的约 1.5-6 倍，更优选为约 2-4 倍。

在本发明的其中一个方面，所述微流控设备的流体通道的宽度为约 50-1000 μm ，优选为约 100-500 μm ，更优选为约 150-300 μm 。

本实施例中的微流道 100 具有供流体出入的入口和出口。所述入口与液体注入装置连接，用于接收液体的注入。本实施方式的所述入口包括样品入口 101 及缓冲液入口 102。其中，所述缓冲液入口为设置于所述样品入口的两侧的两个入口，与所述样品入口交汇相通。所述微流道入口通过上述三相流方式（中间的样品流，两边的缓冲液流）的设置，有利于通过对中间的样品入口通入的样品进行被动聚焦。

如图 1 所示，本实施例的微流控设备包括液体注入和流速调节装置 400，用于控制液体注入及控制液体的流速。所述液体可以为含有样品的液体。例如，所述样品为含有待捕捉细胞的液体。所述样品可以包含体液、全血、任何含有细胞的血液级份、片段化的肿瘤、肿瘤细胞悬浮液、细胞培养物或培养物上清等。所述液体可以为各种体液，包括血液、组织液、细胞外液、淋巴液、脑脊液、房水、尿液、汗液等。

可以通过外部压力源、内部压力源、电子动力学或磁场动力学方式来控制注入液体的流速。外部压力源和内部压力源可以是泵，例如蠕动泵、注射泵或气动泵等。本实施例中采用由电脑微调的注射泵来控制液体注入的流速。

在本发明中，液体的流速范围在约 0.1-10mm/s，优选为约 0.3-5mm/s，更优选为约 0.5-2.5mm/s。在本发明的另一个方面，所述液体的流量流速范围在约 0.1-100 μL /分钟，优选为约 0.1-50 μL /分钟，更优选为约 0.5-20 μL /分钟。

所述通道可以为单条通道，或是多个平行或以其它形式共同排布、具有共同输出和输入的通道，其中可以根据需要共同或独立控制各通道的流体的流出流入和其流速。

本发明的微流控设备具有一个或多个超高频体声波谐振器 200，其设

置于流体通道的一个壁上（通常是设置在流道的底部）。所述超高频体声波谐振器可在所述流体通道产生传向所述流体通道的对侧的壁（通常是指流道的顶部）的频率为约 0.5-50GHz 的体声波。

可使用于本发明的超高频体声波谐振器可以为薄膜体声波谐振器或固态装配型谐振器，例如为厚度伸缩振动模式的声波谐振器。

如图 1 所示，本实施方式的微流控设备具有多个设置在流道的底部的超高频体声波谐振器 202。

所述超高频体声波谐振器是体声波产生部件，可在所述流体通道产生传向所述流体通道的对侧的壁的体声波。

如图 2 (b) 右侧的剖面图所示，所述超高频体声波谐振器包括由下往上依次设置的声波反射层 206、底电极层 205、压电层 204 及顶电极层 203。所述底电极层、压电层、顶电极层及声波反射层相重叠区域构成体声波产生区域。如图 2 (b) 左侧的俯视图所示，所述超高频体声波谐振器的顶部表面配置在流体通道的壁上，向对侧的壁产生传播方向与所述壁垂直的体声波；一般来说，超高频体声波谐振器的顶部表面构成的区域即为体声波产生区域，在本文中也称为体声波区域或体声波作用区域。在本发明的其中一个方面，所述声波作用区域面积为约 $500\text{-}200000\mu\text{m}^2$ ，优选为约 $5000\text{-}50000\mu\text{m}^2$ ，最优选为约 $10000\text{-}25000\mu\text{m}^2$ 。如图 2 所示的本实施例的体声波作用区域为五角形，其边长为约 $120\mu\text{m}$ 微米。

在本发明中，所述声波作用区域的形状至少包括但不限于以下其一：圆形，椭圆形、半圆、抛物线、顶点为锐角或者钝角的多边形、顶点用圆弧替代的多边形、顶点为锐角、半圆或抛物线任一组合的多边形，或者同样形状的重复排列的方阵式或圆环式阵列。本申请提供上述形状的声波作用区域，但其他任意形状的声波作用区域也在本申请的保护范围之内。

如图 2 右侧的剖面图所示，本实施例的流体通道可具有多个超高频体声波谐振器。在本发明的其中一个方面，它们以与流体运动方向一致的方向直线排列。

本发明采用的超高频体声波谐振器是厚度伸缩振动模式，其中的压电材料薄膜层在垂直方向上生长而制成，通过 d33 压电系数耦合垂直电场而

被激发。本发明采用的超高频体声波谐振器可以在装置和液体的界面产生局部化的声流，不需要耦合介质或结构的帮助。

本发明采用的超高频体声波谐振器产生的超高频体声波，在溶液中基本上不产生驻波。如图 1 右图所示，超高频谐振器发射传向所述流体通道的对侧的壁（例如流道顶部）的体声波，声波衰减到流体中产生的体积力使得流经的溶液中出现声射流 500，导致微流道中的液体产生局部的立体的旋涡 501，超高频体声波引起的连续涡旋形成声流体涡旋通道。由于涡旋是由于声波衰减引发的体积力产生的，涡旋的中心轴在体声波作用边界的上方，因此涡旋通道的形状基本与体声波作用区域的形状相同，位于体声波作用区域边界的上方。声流体涡旋是由于声波在液体介质中传播的非线性引起的。而声波的振幅的强弱直接决定了声流体涡旋的强度。通过调节施加功率可以调控特超声器件的振幅，即声波的振幅，进而控制了声流体涡旋的流速。在涡旋中的颗粒（包括较大尺寸颗粒 600、中等尺寸颗粒 601，较小尺寸颗粒 602）受到的力包括涡旋产生的流体拖拽力(Stokes drag force)，层流产生的惯性拖拽力（inertial lift force）和声波衰减引起的声辐射力（acoustic radiation force）。当流体中的颗粒受到的力达到一定的平衡时，颗粒停止在涡旋通道相关位置，不产生相对流道的运动。由于流体拖拽力的大小与颗粒如颗粒直径成正向关系，而声辐射力的大小与颗粒尺寸的平方成正向关系。随着颗粒的增大，受到的力会从以流体拖拽为主导转变到以声辐射力为主导，声辐射力将颗粒推向涡旋中心。较大的颗粒受到更大的声辐射力从而移动到涡旋中心；而较小的颗粒则在涡旋拖拽力的作用下在外围旋转，进一步的，在层流产生的侧向拖拽力作用下向体声波作用区域的下游移动。

颗粒在进入涡旋通道中受到的流体拖拽力和声波引起的声辐射力可以根据某些公式推算，但声流体涡旋产生的惯性拖拽力（inertial lift force）几乎无法用简单的物理学原理和公式计算，特别是在含有复杂成份的流体的情况下。与现有技术中的二维的颗粒捕获相比，本发明的方法和设备涉及可变形的细胞或囊泡，其在声流体旋涡及其形成的通道中的受力情况和运动轨迹更复杂，因为各个涡旋之间的相互作用和颗粒在涡旋之间的迁移

都对流体中的捕获有影响，特别是在流体中存在大量的所述细胞或囊泡的情况下，因为细胞或囊泡相互之间由于碰撞等现象存在相互作用和影响，其在涡旋中的受力和运动与理论计算和模拟的受力和运动存在不同，在涡旋通道中的运动方式和轨迹更是无法根据理论计算和模拟预测。

申请人通过实验出乎意料地发现，在本发明的方法和装置中，溶液中的细胞或囊泡经过超高频体声波造成的声流体涡旋通道区域时，在适合的流速和体声波功率的条件下，在涡旋通道的某个（些）位置达到稳定状态后不产生相对流道的运动，即被捕捉（该细胞或囊泡达到稳定状态的位置可称为捕获位置）；而不符合稳定状态的溶液中的其它细胞或囊泡（例如体积尺寸较小的细胞或囊泡）在层流产生的侧向拖拽力作用下，不进入涡旋通道或是在涡旋通道的某个（些）位置离开体声波作用区域，向下游移动，即被释放；细胞或囊泡离开涡旋通道的位置也称为释放点。在涡旋通道中，由于层流的作用，涡旋中心的细胞或囊泡通常会移动到涡旋通道位于流体通道下游的区域，即捕获位置通常处于涡旋通道位于流体通道下游的区域。

发明人还出乎意料地发现，细胞或囊泡离开涡旋通道的位置通常是在涡旋和声辐射力的跳变点。在产生涡流的体声波功率以及溶液流速、流体通道形状和尺寸不变的条件下，细胞或囊泡离开涡旋通道的位置通常处于涡旋通道出现转折或转角的地方，即对应体声波作用区域边界出现转折或转角的位置的上方。在不受有关理论约束的情况下，申请人认为，这个现象的原因在于，在涡流通道的转折或转角处，涡旋方向和声辐射力方向突然变化，进入涡旋通道的细胞或囊泡中，符合合适的条件（如合适的尺寸）的颗粒由于已经聚焦到涡旋中心，在声辐射力的作用下能够随着涡旋通道改变运动方向并且快速重新聚焦到转折后的涡旋通道的中心；而不符合条件（如具有较小尺寸）的颗粒则会因为层流拖拽方向的跳变而受到更大的影响，从而离开涡旋通道。

在本发明的其中一种优选实施方式中，所述微流体装置的设置令在处理含有不同细胞或囊泡时，捕获目的细胞或囊泡的位置（或称为捕获点）与非目的细胞或囊泡离开体声波作用区域的位置（或称为释放点）不同。

在本发明的其中一种优选实施方式中，所述微流体装置的超高频体声波谐振器的体声波作用区域的设置方式，为令在处理含有不同尺寸的细胞或囊泡时，捕获目的细胞或囊泡的位置（或称为捕获点）与非目的细胞或囊泡离开体声波作用区域（或称为释放点）不同。例如，在超高频体声波谐振器的体声波作用区域为五边形时，将其设置为其中一个角对着通道液体流入方向，沿流道中线对称的放置方式：此时，非目的细胞或囊泡离开体声波作用区域，即释放点，位于沿流体方向的下游边线的两端；而捕获目的细胞或囊泡的位置，即捕获点在沿流体方向的下游边线中间；二者互不重合。由此，非目的细胞对被捕获的细胞的稳定影响最小。在本发明的其中又一种优选实施方式中，将捕获目的细胞或囊泡的位置（或称为捕获点）设置在非目的细胞或囊泡离开体声波作用区域（或称为释放点）的上游。

可以通过理论计算推断或实际实验方式获得能够达到所述捕获点和释放点不同的微流体装置的设置方式。

例如，从血液中筛分循环肿瘤细胞，由于血液中细胞密度极大，若是释放位点与捕捉位点重合，则所有的细胞都会通过捕捉位点，这会导致强的细胞间相互作用，在捕捉位点的循环肿瘤细胞存在由于大量的红细胞和白细胞的碰撞下脱落的可能性。在本发明的一个实施例中，将捕捉点与释放点分离，例如将释放点设置在捕捉位点之前，非目标的红细胞和白细胞不经过捕捉位点就会被层流带走，只有目标循环肿瘤细胞能够到达捕捉位置。

由此，本申请人的发明人发现和提供了更有效地分离样品中目标细胞或囊泡的方法，特别是从含有其它细胞或囊泡的样品中分离数量极少或比例极低的目标细胞或囊泡的方法。

在本发明中，薄膜体声波谐振器的频率主要由压电层的厚度和材料决定。本发明采用的薄膜体声波谐振器的压电层的厚度范围为 1nm~2um。本发明的超高频体声波谐振器的频率在约 0.5 GHz -50GHz，优选为超过 1 GHz -约 10GHz。

所述超高频体声波谐振器产生的体声波由高频信号发生器的信号驱

动。驱动谐振器的脉冲电压信号可以用脉冲宽度调制驱动，脉冲宽度调制可以产生任何期望的波形，例如正弦波、方波、锯齿波或三角波。脉冲电压信号也可以具有调幅或调频开始/停止能力，以开始或消除体声波。

本发明的微流控设备还包括功率调节装置，其调节所述超高频谐振器产生的体声波的功率。在本实施例中，所述功率调节装置为具有功率调节功能的功率放大器。在本发明的其中一个方面，所述功率调节装置的输出功率为约 0.5-800mW，优选为 0.5-500mW，更优选为 0.5-350mW。由于薄膜体声波谐振器能量转换效率高，基本没有损耗，所述功率调节装置的输出功率可基本上视为薄膜体声波谐振器在流体中产生体声波的输出功率。本发明的微流控设备中，所述功率调节装置可与高频信号发生器连接。所述功率放大器的输出电路分别与所述超高频体声波谐振器的底电极、压电层、顶电极连接。

本发明的微流控设备还可以包括检测设备，用于检测样品中的细胞或其携带的标记物的特征的特征的信号。这些特征可包括分子尺寸、分子重量、分子磁矩、折射率、电导率、电荷、吸光率、荧光性、极性 etc 物理性质。例如，检测设备包括检测电学检测装置，例如库尔特计数器，用于细胞计数。检测设备还可以是光电检测器，其包括照明源和光学检测部件，用于检测电荷、吸光率、荧光性、极性等物理参数。

在如图 1 和图 2 所示的本发明的微流控设备中，具有库尔特计数器（其器件基础为阻抗仪 303），设置于所述微流道内距离所述样品入口与所述缓冲液入口交汇处的一指定距离处，以及设置于所述微流道内距离所述微流道的出口的一指定距离处。库尔特计数器是利用细胞的电学特性与培养液（或者缓冲液）不同实现细胞计数和检测的传感器。从结构上看，由库尔特计数器由多个电极条组成，大多是两个或者三个电极，其工作原理是当细胞通过电极时会取代掉相同体积的电解液，导致电极之间介质阻抗发生变化，会产生一个瞬时的电位脉冲，可以被外接的阻抗仪检测到。从而可以实现细胞的计数。同时，由于其加工工艺与体声波器件（超高频体声波谐振器）加工工艺相兼容，可集成在同一个基底上，实现对细胞和囊泡等的检测。

实施例3 分离缓冲液中的细胞

将Hela细胞溶于DMEM培养液，制备成样品（细胞含量为约 $1 \times 10^5/\text{mL}$ ）。另外，用Calcein-AM标记Hela细胞，以便观察其运动途径。将样品从样品入口注入至微流道中。

所述微流道的高度为 $50\mu\text{m}$ 。超高频体声波谐振器频率 1.83GHz ，输出功率为 30mW 。控制样本输入流速为 $1\mu\text{L}/\text{min}$ ，即约 $0.67\text{mm}/\text{s}$ 。

结果如图3所示。图3(a)显示单个Hela细胞在微流控设备系统的超高频体声波谐振器发生体声波形成的涡旋通道中的运动轨迹。其为同一个单个细胞在不同时间的多幅图像的叠加，以显示其运动轨迹。图3(b)为不同单个细胞的运动轨迹的示意图：上图为顶视图，下图为侧视图。图3(c)为Hela细胞的时间和速度分析图。

在本发明的微流控设备中，超高频体声波谐振器产生的体声波使得流经的流体产生涡旋，沿着超高频体声波谐振器的声波作用区域的边界形成声流体涡旋通道或称为涡旋隧道。细胞在经过体声波作用区域时进入涡旋隧道，并在适合的流速和体声波功率的条件下，在涡旋通道的某个（些）位置达到稳定状态后不产生相对流道的运动，即被捕捉（该细胞或囊泡达到稳定状态的位置可称为捕捉位置）。在该捕捉位置的细胞，由于涡流和层流之间的相互作用，其受到的横向流动的力附近非常弱，因此不再发生向前（水平）的移动，即被捕捉。而且捕捉的细胞是漂浮在微流道底部的上方，与微流道没有接触。

图3(a)中的图像序列显示和证明了单个HeLa细胞捕捉的过程。可以将捕捉过程分为在区域a-b-c中发生的三个阶段，如图3(a)和图3(c)所示。在区域a中，细胞在侧流中以均匀的速度移动。在区域b中，细胞运动的方向被涡流阵列改变，并且细胞进入声波产生的涡流隧道，同时在3-D轴上聚焦并沿固定路径移动。具有不同初始位置的细胞在进入涡流阵列时的速度差异很大。由于与涡流的相对方向的差异，初始位置在微通道下层的细胞加速，而初始位置在上层的细胞减慢。在区域c中细胞运动的速度逐渐减慢。最后，细胞被困在固定的点，在该点，拖曳力和声辐射力

相互平衡。由于在涡旋隧道调整了细胞的轨迹，细胞的减速和俘获的过程具有良好的稳定性，不同的进入初始位置的细胞具有良好的减速和俘获的一致性。

图 3(b) 示意图进一步说明了细胞在流道中和体声波作用下的运动情况。图 3(b) 是不同的单个细胞的运动轨迹的叠加示意图。图 3(b) 的上图为顶视图，下图为侧视图。从顶视视角可见，细胞的轨迹仅分布在超高频体声波谐振器的声波作用区域的边界。每一个单个细胞最后都停留在超高频体声波谐振器的声波作用区域的边界的下游的捕获点。从侧视角度，可以看出细胞都漂浮在通道底部的上方，与底部没有接触。

实施例 4 细胞在微流道中的悬浮和沉降

在现有技术的声流涡旋方法中，颗粒或细胞在微流道的 z 轴（即流道的垂直方向）的运动被忽略，因为平面内声流是主要的涡旋。然而，z 轴的轨迹对于单细胞操作和高精度的感测非常重要。由于本发明采用的超高频体声波的独特的 TE 振动模式，在本发明的微流体系统中主导的涡旋平面外（out-of-plane）的。为了更好地研究本发明的微流体系统中超高频体声波产生的涡旋隧道，采用 Calcein-AM 标记的 Hela 细胞，使用共聚焦显微镜（Leica, Germany）观察和测量细胞在 z 轴上的运动。为了捕获涡流隧道内的粒子轨迹，使用了 x-z-t 模式。在此模式下，拍摄速度可达到每秒 37 帧。

根据实施例 3 的相同实验设置，但将样本含有 Hela 细胞的输入流速降低为 $0.1\mu\text{L}/\text{min}$ 。在含有细胞的样品及缓冲液通入微流道之后，开启信号发生器，细胞被捕捉在声波作用区域。然后调整入口和出口的压力至相同，流体停滞。观察细胞在涡旋中的运动。然后信号发生器关闭，观察细胞的运动。

结果如图 4 所示。图 4(a) 是涡旋中细胞移动的图像，其为复合堆叠图像（6 幅图像，相距 27ms），其中红点显示每帧中粒子的中心，绿色虚线圆圈表示范围粒子运动和红色箭头表示粒子运动的方向。当信号发生器电源打开，体声波产生，在流道内形成涡旋和涡旋隧道，颗粒相对“静止”

地悬浮在距离芯片表面。如图 4 (b) 所示, 当电源关闭时, 体声波消失, 颗粒在重力和浮力的共同作用下沉淀到芯片表面。结果表明, 粒子确实被困在涡旋隧道中。

图 4 (c) 显示, Calcein-AM 标记的 Hela 细胞被捕获在涡旋隧道中, 涡旋隧道具有和超高频体声波谐振器的声波作用区域的边界一样的形状。

对于细胞操作, 与装置接触的细胞可能被装置触发的负面效应杀死, 从而使生物相容性变差。此外, 由接触引起的细胞-细胞粘附和细胞-设备表面粘附也是一个严重的问题, 特别是对于单细胞操作。本发明提供的方法能够避免细胞捕获和分离操作中出现的细胞-细胞或细胞-设备表面接触和粘附的问题。

实施例 5 细胞的破碎

如图 5 (b) 所示, 发明人在实验中发现, 微流道系统内所述超高频体声波谐振器的激发功率被提高到 800mW 以上, 例如在 1300mW 时, 在高速涡旋的剪切力和速度梯度产生的体积力共同作用下, 细胞的细胞膜会被破坏, 细胞被裂解, 细胞内的物质如蛋白质和核酸等被释放 (图中红色圈所示), 随液流进入到系统的下游, 可以进行进一步的研究。引起细胞或囊泡破坏的功率的与细胞或囊泡的体积相关。由于细胞碎裂主要是受声辐射力挤压的影响, 而声辐射力一般与细胞或囊泡的体积的立方成正比, 因此令具有较小体积的细胞或囊泡受到破坏和裂解的超高频体声波谐振器的激发功率较高。

在细胞研究当中, 为了获得细胞内的信息, 例如 DNA, RNA, 蛋白质的情况, 细胞破坏细胞膜, 包括细胞膜和细胞核膜, 使得膜内包裹的物质能够释放出来进行下游分析。例如, DNA 测序中, 就需要通过裂解液破坏细胞膜获得 DNA 再参与聚合酶链式反应; 蛋白检测中常用的蛋白质印迹法也需要获得从细胞中获得蛋白。目前常用的细胞裂解方法以化学法为主, 加入不同的裂解液实现对细胞裂解。相比于物理裂解方法, 化学法由于会引入外源药剂, 有可能对下游分析产生影响。而物理方法中, 有超声裂解, 热裂解, 激光裂解等方法, 能做到少量细胞精准裂解方法目前只

有激光裂解，而激光裂解由于激光器和光路限制，成本高，与微流控芯片的兼容性也较差。

利用本发明的方法和系统，可以做到单细胞精度的精准裂解，获得个别细胞的独特性质信息。

实施例 6 在稀释的血液样品中分离不同的细胞

影响细胞在本发明的声波涡旋中的运动的力，包括流体拖拽力(Stokes drag force)，声流体涡旋产生的惯性拖拽力(inertial lift force)和声波引起的声辐射力(acoustic radiation force)，都与细胞的尺寸有密切关系。需要研究本发明的方法是否可以用于分离溶液中，特别是在血液中不同大小的细胞，以及分离的精度。

将Hela细胞溶于DMEM培养液，与稀释200倍的全血混合，制备成测试样品(调整Hela细胞含量为约 $1 \times 10^5/\text{mL}$)。Hela细胞用Calcein-AM标记(绿色)。以DAPI对血液进行染色，由此白细胞在观察镜下显示为蓝色。

将样品从样品入口注入至微流道中。以及将PBS缓冲液从两侧的缓冲液入口注入至微流道中。通过三相流的方式对注入样品进行被动聚焦，使得样品更好地流经高频体声波谐振器的声波作用区域。

图6显示含有Hela细胞和血液细胞的血液混合液中的Hela细胞，通过本发明的设备和方法，被选择性地捕获。

具体的，图6(a)显示，Hela细胞(染为绿色，图中为实线圈指示)停留在高频体声波谐振器的声波作用区域，而白细胞(染为蓝色，图中为虚线圈指示)和红细胞则沿流体运动方向继续前进。图6(a)最右侧图为其左侧图的放大显示。从图中可以看出，3个Hela细胞(箭头所指)捕获非常稳定，即使血液中其它细胞(白细胞和红细胞)试图进入和占领该位置。

另外，如图6(b)所示，细胞的捕获效率与不同体声波功率和样品溶液流速相关。在本实验中，捕捉效率定义为输入10个目标细胞，在单个超高频体声波谐振器的声波作用区域被捕捉到的细胞数目。在一定范围

内，细胞捕获效率随施加的功率而增加，并随着横向流速的增加而降低。原因是横向流量的增加会引发更强的剪切力，从而导致细胞逃逸。增加的功率产生较高速度的涡流，可抵消横向流量对体声波涡旋隧道的负面影响。为了得到具有高分辨率的稳定捕获区域，可以平衡所施加的功率和液体侧向流速。

通过本发明的微流控系统和方法，可以将目标细胞从混合样品（例如血液）中提取到另一种溶液（例如缓冲液或荧光染料）中。具体的，如图 7(a) 所示，通过调节功率和流速，Hela 细胞（染为绿色）停留在高频体声波谐振器的声波作用区域，而白细胞（染为蓝色）和红细胞则沿流体运动方向继续前进，留出微流体设备；然后，在保持所述功率和流速的情况下，停止输入含有细胞的血液，输入 PBS 液，Hela 细胞仍然停留在高频体声波谐振器的声波作用区域，而溶液由血液转化为 PBS；然后将功率调低，Hela 细胞从涡旋中脱离，随 PBS 液流到微流道的下一结构，即完成 Hela 细胞从血液捕捉到 PBS 缓冲液中的过程。类似的，可以将 Hela 细胞从血液或 PBS 缓冲液转移到其它溶液，如 Trypan 染料溶液中。

而且，本发明的设备和方法对细胞的捕捉可以达到单细胞分离的要求。由于在本发明的方法和设备的条件下，即微流道的高度为目标细胞的直径的约 1.5-6 倍，更优选为约 2-4 倍时，产生的涡旋通道在垂直高度范围内最适合保持一个细胞。这样，每个高频体声波谐振器的声波作用区域捕捉到的细胞沿着声波作用区域边线并列排布，基本不发生振荡，减少细胞之间因接触和碰撞导致的破坏。并且易于进行下一步的单个细胞通过改变涡流形成条件达到令细胞离开涡流隧道而分离的操作。

实验证明，本发明的方法和设备能够区分和分离不同大小的细胞，并且分辨率能够达到分离血细胞和血液中的其它细胞（例如 Hela 细胞等循环肿瘤细胞）。

另外，可以通过调整声流和侧向流速的强度来选择捕获细胞的大小。白细胞和红细胞也可以从血液样本中选择性地捕获，结果显示在图 7(b) 和图 7(c) 中。图 7(b) 中，血液样品用 DAPI 染色，因此在荧光视图中，白细胞 WBC 染成蓝色。图 7(b) 显示，在当功率调整为 13.2mV 的条件

下，捕捉到单个的白细胞并保持良好细胞活性。图 7 (c) 显示，不同功率下，捕捉到不同的细胞。例如，在功率为 6.6mV 时，白细胞和红细胞都未被捕捉；在功率为 13.2mV 时，捕捉到白细胞，而红细胞都未被捕捉；在功率为 20.9mV 时，白细胞和红细胞都被捕捉。

发明人使用软件 (COMSOL, USA) 构建模型来分析上述三种细胞的分离过程。模拟中细胞分离的分辨率远差于实际实验中观察到的效果。这可能是因为在模拟模型中未能体现细胞之间的相互作用和形变等因素。

实施例 7 捕获细胞的活性的保持

另外，细胞活性的保留对细胞研具有重要的意义。但大部分现有技术的细胞分离方法都会对细胞活性有不良影响，甚至是杀死细胞。现有细胞操作技术中，对细胞有影响的因素包括机械剪切力，焦耳热或电子场。当超高频体声波谐振器产生的声波被吸收到液体中时，机械能转换成流体和热量的动能。热效应可能导致生物效应，可能导致构象变化，蛋白质错误折叠，纠缠和/或蛋白质的非特异性聚集等。

然而，本发明的方法和设备能够保持捕获的细胞的完全活性。

在本实验中，采用台盼蓝 (一种用于选择性标记死亡组织或细胞的重要染色剂) 注入捕获的细胞作为活性细胞的探针。

实验和结果如图 7 (a) 所示。根据前述方法和条件对 HeLa 细胞进行捕获。然后用台盼蓝检测其活性。实验证明，在生存力测试期间，对细胞进行在缓冲液和台盼蓝溶液间的交换，重复 3 次。在 560 秒时，细胞仍具有活性：细胞膜仍保持对台盼蓝的选择性透过。

另外，在如上描述的实验设置中，在溶液中加入罗丹明 B (一种温度依赖性荧光染料)，测量不同应用功率下超高频体声波谐振器周围的温度分布。结果如图 8 所示，表明谐振器的热效应非常弱，特别是在选择性捕获细胞的条件下，例如施加的功率小于 100mW 下的时候。

实施例 8 全血中分离和捕捉不同的细胞

血液是最原始和最适合细胞的环境。在血液环境中，细胞具有最佳

的活力和完整的功能，这对于生物学研究很重要，例如细胞代谢，蛋白质组学。基于这些原因，CTC与全血分离是研究的重要要求，同时也是技术的挑战。

然而，与稀释的血液样本相比，全血是更具挑战性的样本。从物理参数来看，全血更粘稠和浑浊，这是都会对细胞操作有严重的负面影响。物理场，如介电场，磁场，流体动力场，在血液样本中是紊乱的。此外，高密度的细胞，特别是红细胞（ $10^9/\text{mL}$ ），会引起细胞之间的强烈相互作用，从而改变标本的轨迹并影响细胞捕获的稳定性。

发明人证明了本发明的设备和方法能够在全血中分离和捕获目标细胞。

将Hela细胞溶于DMEM培养液，与全血混合，制备成测试样品样品（Hela细胞含量调节为约 1×10^5 个/mL）。

将微流道系统的入口设计为三相流的方式，即包括中央的样品入口和两侧的缓冲液入口：将样品从中间的样品入口注入至微流道中；以及将PBS缓冲液从两侧的缓冲液入口注入至微流道中。由此，两侧加入的PBS缓冲液可作为夹持鞘流，限制了样品流体的横向范围，确保所有样品都会经过位于流道中央的超高频体声波谐振器的上方。通过三相流的方式对注入样品进行被动聚焦，使得样品更好地流经高频体声波谐振器的声波作用区域。

为了更好地分离目标细胞，增加分离效率，优化了本发明的微流道设备。例如，对高频体声波谐振器的声波作用区域的设置进行调整，把目标细胞的捕获点和非目标细胞的释放点分开。

本实施例的超高频体声波谐振器的体声波作用区域的设置方式，为令在处理含有不同尺寸的细胞时，捕获目的细胞的位置（或称为捕获点）与非目的细胞离开体声波作用区域（或称为释放点）不同。例如，在超高频体声波谐振器的体声波作用区域为五边形时，将其设置为其中一个角对着通道液体流入方向，沿流道中线对称的放置方式：此时，非目的细胞离开体声波作用区域的位置，即释放点，位于沿流体方向的下流边线的两端；而捕获目的细胞的位置，即捕获点在沿流体方向的下流边线中间；二者互

不重合。由此，非目的细胞对被捕获的细胞的稳定影响最小。

结果如图 9 所示，含有 Hela 细胞的全血中的 Hela 细胞被选择性地捕获。

图 9 (c) 和 (d) 显示两种微流道设置方式下 Hela 细胞被捕捉和血细胞被释放的照片，图 9 (a) 和 (b) 分别是图 9 (c) 和 (d) 的分析和示意图。本实施例中，超高频体声波谐振器的体声波作用区域为五边形。其中图 9 (c) 中，体声波作用区域设置为液体流入方向下游存在突起拐角（五边形的一个角）：此时，血细胞离开体声波作用区域的其中一个点在该五边形的角附近；而捕获 Hela 细胞的位置，即捕获点也在同一个角的附近。由此，血细胞对被捕获的 Hela 细胞的稳定有所影响。图 9 (d) 中体声波作用区域调整为其中一个角对着通道液体流入方向，沿流道中线对称的放置方式：此时，血细胞的释放点，位于沿流体方向的下流边线的两端，而且处于捕获点的上游（即细胞先经过的位置）；而 Hela 细胞的捕获点，在沿流体方向的下流边线中间；二者互不重合。由此，血细胞对被捕获的 Hela 细胞的稳定影响最小。图 9 (e) 显示体声波作用区域上游和下游（图 9 (c) 和 (d) 中的颜色线）的血细胞分布。绿色曲线和蓝色曲线表示血细胞平均在两个对称释放点处释放而不通过捕获点。图 9 (f-1) 显示采用三相流的输入方式对注入样品进行被动聚焦，即将样品从中间的样品入口注入至微流道中，以及将 PBS 缓冲液从两侧的缓冲液入口注入至微流道中，使得样品更好地流经高频体声波谐振器的声波作用区域。图 9 (f-2) 显示电源打开，在微流道内产生体声波时血细胞的流动。图 9 (f-3) - (f-5) 显示 CTC 被选择性捕获：复合堆叠图像序列展示了捕获的 CTC 的轨迹。图 9 (f-6) 显示 CTC 选择性捕获的结果：合并图像显示，在本发明的装置在释放血细胞的同时稳定地捕获三个 CTC。

在本发明的更佳方法中，为了减少细胞-细胞相互作用引起的负面影响，调整微流道装置，例如超高频体声波谐振器的体声波作用区域，以区分目的细胞的捕获区和非目的细胞的释放点，其有助于捕获目的细胞。在从稀释血液样品中分离加入的 Hela 细胞的情况下，由于血细胞密度相对较低，因此由捕获细胞（Hela 细胞）和释放细胞（血细胞）之间的相互作

用引发的负面影响是可接受的。但是，在与未稀释的全血分离的情况下，血液的高粘度限制了流体的速度梯度，并且极高的细胞密度触发了细胞之间的碰撞和摩擦。被捕获的 Hela 细胞可能在其他细胞的相互作用下偏离原始轨迹或捕获点。通过调整调整微流道装置的超高频体声波谐振器的体声波作用区域，将捕捉点与释放点分离，特别是将释放点放在捕捉点之前（上游），非目标细胞不经过捕捉点就会被层流带走，只有目标细胞能够到达捕捉位置。

实施例 9 病人血液样品中 CTC 的捕捉

循环肿瘤细胞或 CTC，是指在肿瘤患者的循环中发现的肿瘤细胞。该术语一般不包括血液肿瘤细胞。在患者的循环中，CTC 含量极少，每毫升血液中的 CTC 可以少于 1 个。循环肿瘤细胞对癌症的诊断具有重要临床意义。由于 CTC 的数量稀少，以及血液中存在大量物理性质相近的细胞，检测血液中的 CTC 或是从血液中分离 CTC 具有重大挑战。

本申请证明了本发明的方法和设备能够从肝癌患者的血液中分离和捕获 CTC。

将来自 3 名 IV 期肝癌患者的 1ml 血液样品从样品入口注入至微流道中。以及分别将 PBS 缓冲液和含有 Calcein-AM 和用红色荧光标记的抗-EpCAM 抗体的染色溶液分别从两侧的入口注入至微流道中。通过三相流的方式对注入样品进行被动聚焦，使得样品更好地流经高频体声波谐振器的声波作用区域。控制中央样品流速范围在约 $1\mu\text{L}/\text{min}$ ，即约 $0.67\text{mm}/\text{s}$ ，而 PBS 流速为约 $5\mu\text{L}/\text{min}$ 。

结果如图 10 所示。图 10 (a-1) 显示未打开电力，流体在微流道的分布：PBS 液流从顶部的左侧通道进入流道，血液样品从顶部的右侧通道进入，底部右侧通道输入染色溶液；在 PBS 液流和染色溶液的夹持作用下，血液样品流经设置在靠近流道右侧的五角形高频体声波谐振器的体声波信号发生区域。图 10 (a-2) 显示当施加电力时，功率调节为 30mW，高频体声波谐振器在微流道产生涡旋，血细胞通过体声波信号发生区域，靶细胞被捕获；然后关闭血液样品和 PBS 缓冲液入口，染色溶液占领体声波

信号发生区域，对细胞进行染色。染色后，关闭染料入口并注入 PBS 缓冲液以洗涤剩余的血细胞和染料。图 10 (a3-5) 显示在体声波信号发生区域被捕获的 CTC 和未被捕获（通过体声波信号发生区域）的血细胞。图 10 (b) 显示被捕获的单个目标细胞的染色，该单个细胞被 Calcein-AM 染成绿色，显示捕获细胞保持活性，而抗-EpCAM 标记的红色荧光代表捕获细胞存在癌症标记物 EpCAM。

实验中还选择 3T3 细胞株（3T3 是一种低表达 EpCAM 的细胞株）作为阴性对照。实验过程与前述图 10 (a) 中的相同，结果见图 10 (c)。图 10 (c) 中的结果表明，CTC 和 3T3 均被 Calcein-AM（绿色）染色，CTC 被抗-EpCAM 抗体染色，而 3T3 没有被染成红色，因为其上的 EpCAM 几乎不表达。结果证明捕获的单细胞或细胞簇是癌细胞。

实验证明，本发明的方法可以在病人全血样品中捕获 CTC 并做原位染色。与通过离心和/或磁珠等方式在离心管中进行染色比较，本发明提供的原位染色分析方法具有很大的优势，包括无需重复离心以洗涤和换染料或溶液的步骤。

实施例 10 细胞的可控释放

本申请的发明人还出乎意料地发现，在本发明的方法和设备中，在一定范围内，超高频体声波谐振器体声波产生的涡旋隧道中捕捉到的细胞数目与施加给超高频体声波谐振器的功率是线性关系，由此提供了对细胞，特别是少数或单个细胞的可控释放。

根据实施例 3 的方法制备 Hela 细胞样品和标记以及微流道。将样品从样品入口注入至微流道中并通过超高频体声波谐振器体声波产生涡旋隧道。

如图 11 (a) 所示，在超高频体声波谐振器体声波产生的涡旋或涡旋隧道中捕捉到的细胞数目受到细胞的流速和施加给超高频体声波谐振器的功率的影响。

发明人出乎意料地发现，捕捉细胞数目 (N)，施加功率 (P) 和侧向流体速度 (V) 之间，在局部范围内具有线性关系。发明人通过实验发现，

当 $V=0.33\text{mm/s}$ 时, $N=0.4*P$; 当 $V=0.67\text{mm/s}$ 时, $N=0.28*P$; 当 $V=1.34\text{mm/s}$ 时, $N=0.18*P$; 当 $V=2\text{mm/s}$ 时, $N=0.15*P$ 。其中系数 $k \approx 0.47*\exp(-V/0.83)+0.14$ 。这个公式适用于细胞间相互作用较少和较弱时, 不发生细胞之间黏连团聚形成细胞簇的时候。

发明人通过实验发现, 优选的条件为: 在 $V<1\text{mm/s}$ 时, $P<100\text{mW}$; 在 $1\text{mm/s}<V<3\text{mm/s}$ 时, $P<300\text{mW}$ 。对 HeLa 细胞而言, 在保证筛分的准确性的前提下, 侧向流速最优选为约 $0.5\text{-}1\text{mm/s}$, 施加功率推荐在 $5\text{-}20\text{mW}$, 此时单个器件捕捉的细胞数目在 $1\text{-}6$ 个之间。如果需要更多的细胞数目, 可以通过阵列化排布器件实现。

下表为捕捉数目结果:

侧向流速 (V)/ 施加功率 (P)	0.33 mm/s	0.67 mm/s	1.34 mm/s	2 mm/s
1mW	1	0	0	0
5mW	3	1	-	-
10mW	4	3	1	-
15mW	8	6	2	1
40mW	15	10	9	4
80mW	-	-	14	11
160mW	-	-	-	26

由此, 本申请还提供可控的细胞捕捉和释放的方法, 其中可以控制捕捉到的细胞的数量, 以及控制释放的细胞的数量, 从而控制让细胞逐个释放, 即获得单个细胞。以图 8 (b) 为例, 通过控制梯度减小功率, 控制涡旋强度, 使得被捕捉的细胞能够按照顺序释放。例如, 针对直径在 $15\text{-}20\ \mu\text{m}$ 的细胞, 在 0.67mm/s 的侧向流速下, 捕捉多个细胞的功率为约 35mW 。其中, 优选功率低于 100mW , 更高的功率可能导致细胞间黏连出现, 不利于单细胞的操作。在 $30\text{-}35\text{mW}$ 的输入功率下进行细胞捕捉, 当达到目标细胞数目的时候, 开始梯度减小功率, 例如, 每一个减小的梯度为总功

率的 5-20%，例如约 10%。梯度越小操控越精确，但是细胞被捕捉的时间越长，越有可能发生细胞间黏连。

如图 8(b)所示，捕捉功率为约 33Mw 的情况下，两个细胞被捕捉时，单个释放功率为约 13mW，完全释放功率为约 0.1mW；三个细胞被捕捉时，第一个细胞释放功率为约 20mW，第二个细胞释放功率为约 16.5mW，第三个细胞释放功率为约 0.1mW；四个细胞被捕捉时，第一个细胞释放功率为约 21mW，第二个细胞释放功率为约 17mW，第三个细胞释放功率为约 6.6mW，第四个细胞释放功率为约 0.1mW。

可见。本发明的系统和方法中，可以通过调控施加功率来调整涡旋中被捕捉到的细胞的数目。被捕捉的细胞沿着超高频体声波谐振器的体声波作用区域边界排列，在侧向流体的作用下，细胞有沿着器件边界向下游运动的趋势，所以在捕捉条件变化的情况下，最先脱落的细胞是处于最靠下游边界的细胞。通过逐渐降低功率，涡旋捕捉细胞的能力逐渐降低，当降低到无法捕捉当前全部细胞的时刻，最靠近下游的细胞就会脱离涡旋，而其他捕捉细胞会顺次向下游移动一个细胞的位置填补释放细胞而空缺的空间。所以，可以通过梯度减小施加功率，实现对捕捉细胞的可控释放。值得强调的是，这种释放可以达到单细胞水平，即实现对捕获细胞单个依次释放。

实施例 11 细胞与凝胶微球的组合

由于发现本发明的系统和方法中，施加功率的提高与捕捉细胞或其它类似性质的柔性微粒的数目之间关系是线性的，基于此，可以通过调控施加功率来调整涡旋中被捕捉到的细胞和/或其它颗粒的数目，进而还可以通过梯度减小施加功率，实现对捕捉到的细胞或其它颗粒的可控释放。

在本实验中，测试了捕捉单个细胞以及将其与单个凝胶微球组装，以便对单细胞进行测序等进一步分析的方法。

本实施例的方法包括以下步骤：

(1) 从样品入口注入待处理的细胞样品（细胞含量稀释至适于超高频体声波谐振器的体声波作用区域可捕获单个至十个左右的细胞），通过

调节超高频体声波谐振器的体声波功率和流速，使得在超高频体声波谐振器的体声波作用区域捕获单个细胞；

(2) 从样品入口注入凝胶微球，调节超高频体声波谐振器的体声波功率和流速，在保持步骤(1)中捕获的单个细胞不被释放的条件下，使得单个凝胶微球进入超高频体声波谐振器的体声波作用区域并被捕获，以使所述凝胶微球与所述被捕捉细胞一对一配对；

(3) 通过控制梯度减小功率，控制涡旋强度，使得配对后的凝胶微球-细胞释放。

在单细胞测序等单细胞研究中，需要将凝胶微球(其中包裹有引物，裂解液等)与单细胞组装，目前的组装方式都是基于泊松分布的随机方式，需要大量的凝胶微球和浓度极低的细胞，才能保证每个细胞能够与单个凝胶微球被包裹在同一个滴液当中，完成后续反应。这样的技术会导致大量的凝胶微球浪费，更重要的是，组装过程是随机的，不可控制的，无法对需要的细胞做前期筛选，也不能保证某个指定细胞一定被凝胶微球包裹。利用声流体涡旋的单细胞捕捉能力，发明人在本发明提供的声流体系统捕捉到单细胞之后，再通入单个凝胶微球，在声流体隧道中，细胞和微球能够完成前期的组装。由此可以确定得到需要研究的单细胞，也保证了这个细胞能够与凝胶微球组装。

根据实施例3的方法制备Hela细胞样品和标记以及微流道。实验采用的凝胶微球来自10X genomics公司的Barcode Gel bead，其为用于单细胞测序的标准微球。实验和结果如图12所示。其中施加的功率为26.3mW，流速为1 μ L/min。微流控系统的入口分别可分别通入缓冲液(PBS)，HeLa细胞溶液或Barcode gel bead样品。调节系统的参数，使得单个细胞和单个barcode gel bead都可进入超高频体声波谐振器的体声波作用区域以及被捕获。本方法的流程包括：首先加入缓冲液；当缓冲液排干净流道内气泡后，仅开启细胞流道和放入Hela细胞。当超高频体声波谐振器的体声波区域捕捉到一个Hela细胞之后(如图12a所示)，关闭细胞流道，开启Barcode gel beads流道，放入一个Barcode gel bead(如图12b所示)。单个细胞与单个Barcode gel beads被捕获在同一个超高频体声波谐振器的体

声波区域（如图 12c 所示）。然后开启缓冲液流道，关闭施加功率，实现配对好的细胞和凝胶微球的释放（如图 12d 所示）。

综上所述，本申请提供的微粒捕捉系统及方法，能够实现选择性的对不同尺寸的细胞或囊泡的特异性捕捉以及可控释放，并进一步做单细胞或囊泡分析。

以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种分离目标细胞或囊泡的方法，包括：

(1) 使含有细胞或囊泡的溶液流经一个微流控设备，所述设备包括；
流体通道，其具有入口和出口；

一个或多个超高频体声波谐振器，其设置于所述流体通道的一个壁上，所述超高频体声波谐振器可在所述流体通道产生传向所述流体通道的对侧的壁的频率为约 0.5-50GHz 的体声波；

(2) 所述超高频谐振器发射传向所述流体通道的对侧的壁的体声波，在体声波影响区域的溶液产生涡旋；

(3) 通过调节体声波的功率和/或调节所述溶液流经体声波影响区域的速度，使得细胞或囊泡在体声波影响区域停留。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述超高频谐振器产生的体声波的功率为约 0.5-800mW，优选为 0.5-500mW，更优选为 0.5-350mW。

3. 权利要求 1 的方法，其中调节所述溶液流经体声波区域的速度为约 0.1-10mm/s，优选为约 0.3-5mm/s，更优选为约 0.5-2.5mm/s。

4. 权利要求 1 的方法，其中调节所述溶液流经体声波区域的速度为约 0.1-100 μ L/min，优选为约 0.1-50 μ L/min，更优选为约 0.5-20 μ L/min。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞或囊泡的直径约为 0.8-30 μ m，例如为约 1-25 μ m，又例如为约 5-20 μ m。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述微流控设备的流体通道的高度为约 25-200 μ m，优选为约 25-100 μ m，更优选为约 30-80 μ m，例如为约 40-60 μ m。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述超高频体声波谐振器的体声波产生区域面积为约 500-200000 μ m²，优选为约 5000-50000 μ m²，最优选为约 10000-25000 μ m²。

8. 权利要求 1 的方法，其用于分离单个或数个细胞或细胞簇。

9. 权利要求 1 的方法，其中包括控制在所述体声波影响区域停留的细胞或囊泡和/或其数量，例如可通过以下方式的一种或其任意组合：

(a) 调节体声波的功率；

(b) 调节产生体声波的时间；

(c) 调节所述溶液流经体声波区域的速度。

10. 权利要求 1 的方法，其中还包括使得停留的细胞或囊泡离开停留位置，例如可通过以下方式的一种或其任意组合：

(a) 停止体声波；

(b) 降低所述体声波的功率；

(c) 增大溶液流经体声波区域的速度。

11. 权利要求 1 的方法，其为用于将需要分离的细胞或囊泡从含有其它细胞或囊泡的溶液中分离，优选的，其中所述需要分离的细胞或囊泡在溶液中的含量与所述其它细胞或囊泡的比小于 $1:10^4$ ，优选小于 $1:10^5$ ，更优选小于 $1:10^6$ 。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述设备的超高频体声波谐振器的体声波作用区域的设置方式为捕获需要的细胞或囊泡的位置与其它细胞离开体声波作用区域的位置不同，优选的，其它细胞或囊泡离开体声波作用区域的位置设置在捕获需要的细胞或囊泡的位置的上游。

13. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞为真核细胞，优选为哺乳动物细胞，更优选为人细胞。

14. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞为血细胞、干细胞、体细胞或肿瘤细胞，例如为循环肿瘤细胞（circulating tumor cell, CTC）。

15. 权利要求 1-14 中任一项的方法，其还包括使得单个细胞或囊泡在体声波影响区域停留，然后将所述单个细胞或囊泡与单个微胶囊组合。

16. 权利要求 15 的方法，其中包括以下步骤：

(a) 通过调节超高频体声波谐振器的参数，例如通过调节体声波功率和流速，使得单个或数个细胞或囊泡在超高频体声波谐振器的体声波作用区域停留；

(b) 从样品入口注入凝胶微球，在保持步骤 (a) 中停留的细胞或囊泡不被释放的条件下，调节超高频体声波谐振器的参数，例如通过调节体声波功率和流速，使得单个或数个微胶囊也在超高频体声波谐振器的体声波作用区域停留；

(c) 所述微胶囊与所述停留的细胞或囊泡发生组装，

优选的，其中还包括(d)通过减小体声波功率或停止体声波，使得组合后的微胶囊-细胞/囊泡被释放。

17. 一种用于分离目标的细胞或囊泡的微流控设备，包括：

流体通道，其具有入口和出口；

一个或多个超高频体声波谐振器，其设置于所述流体通道的一个壁上，所述超高频体声波谐振器可在所述流体通道产生传向所述流体通道的对侧的壁的频率为约 0.5-50GHz 的体声波；

功率调节装置，其调节所述超高频谐振器产生的体声波的功率；

流速调节装置，其调节所述溶液流经体声波区域的速度，

所述超高频谐振器可发射传向所述流体通道的对侧的壁的体声波，使得流经体声波区域的溶液产生涡旋，通过所述功率调节器调节体声波的功率和/或通过所述流速调节装置调节所述溶液流经体声波区域的速度，使得细胞或囊泡在体声波区域停留。

18. 权利要求 17 的微流控设备，其中所述功率调节装置的输出功率为约 0.5-800mW，优选为 0.5-500mW，更优选为 0.5-350mW。

19. 权利要求 17 的微流控设备，其中所述流速调节装置可调节所述溶液流经体声波区域的速度为约 0.1-10mm/s，优选为约 0.3-5mm/s，更优选为约 0.5-2.5mm/s。

20. 权利要求 17 的微流控设备，其中所述流速调节装置可调节所述溶液流经体声波区域的速度为约 0.1-100 μ L/min，优选为约 0.1-50 μ L/min，更优选为约 0.5-20 μ L/min。

21. 权利要求 17 的微流控设备，其中所述微流控设备的流体通道的高度为约 25-200 μ m，优选为约 25-100 μ m，更优选为约 30-80 μ m，例如为约 40-60 μ m。

22. 权利要求 17 的微流控设备，其中所述超高频体声波谐振器的体声波产生区域面积为约 500-200000 μ m²，优选为约 5000-50000 μ m²，最优选为约 10000-25000 μ m²。

23. 权利要求 17 的微流控设备，其中所述微流控设备的设置为捕获需要的细胞或囊泡的位置与溶液中其它细胞或囊泡离开体声波作用区域的

位置不同。

24. 权利要求 23 的微流控设备,其中其它细胞离开体声波作用区域的位置设置在捕获需要的细胞的位置的上游。

25. 权利要求 17 所述的微流控设备,其中所述超高频体声波谐振器为薄膜体声波谐振器或固态装配型谐振器,例如为厚度伸缩振动模式的声波谐振器。

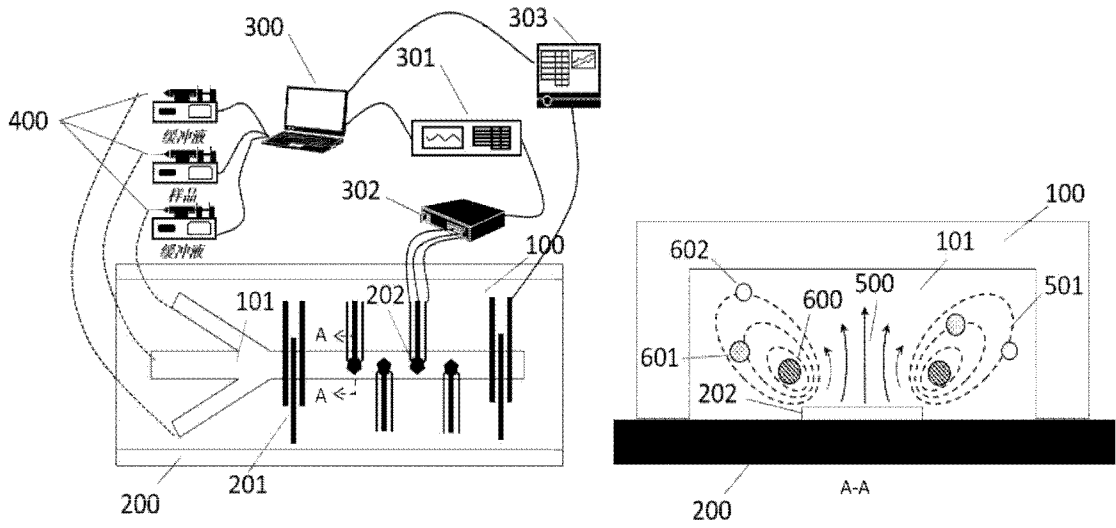


图1

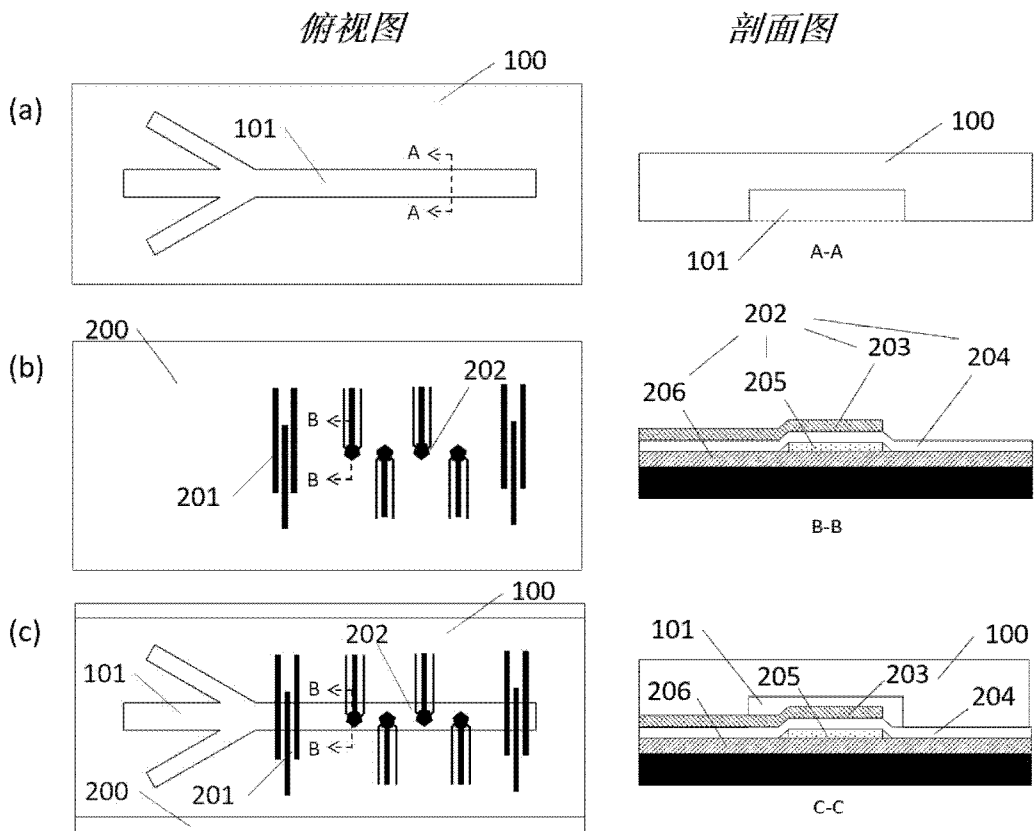


图2

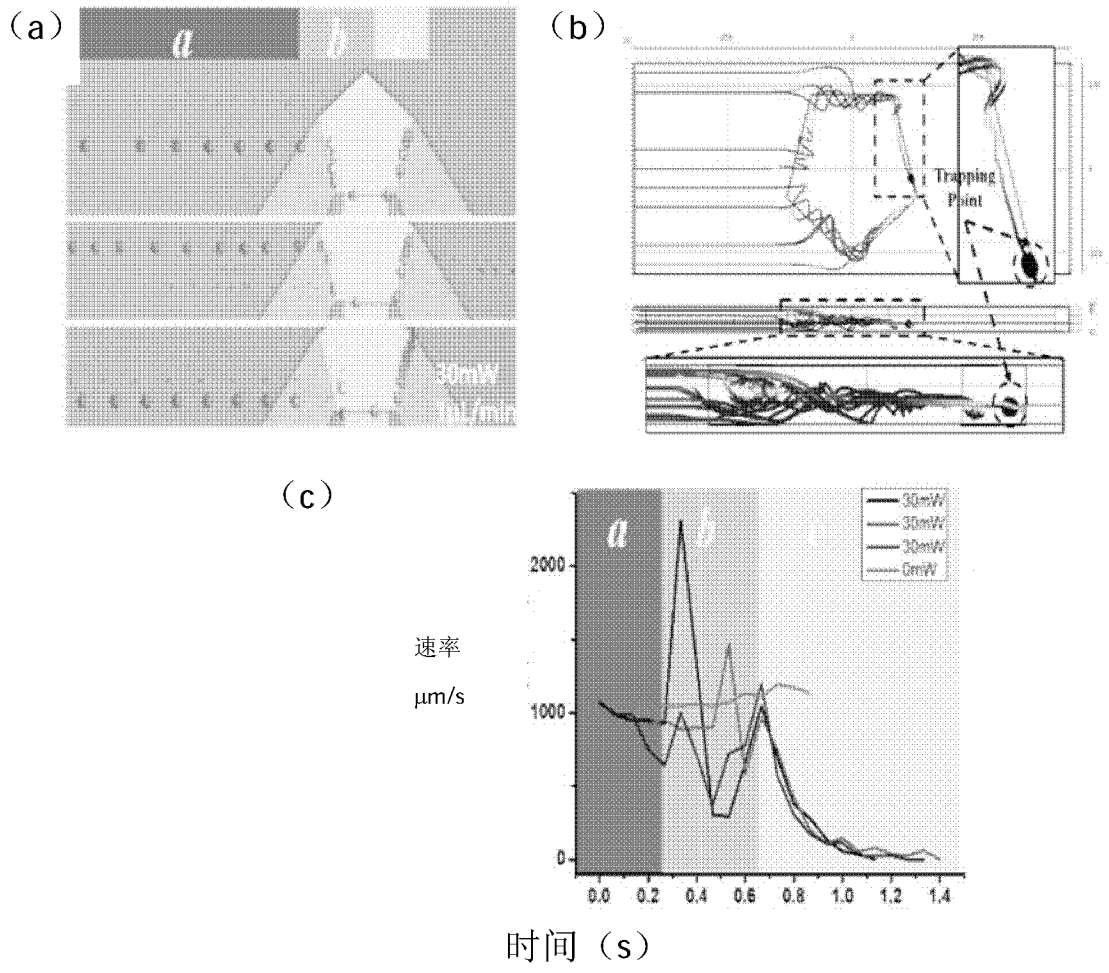


图3

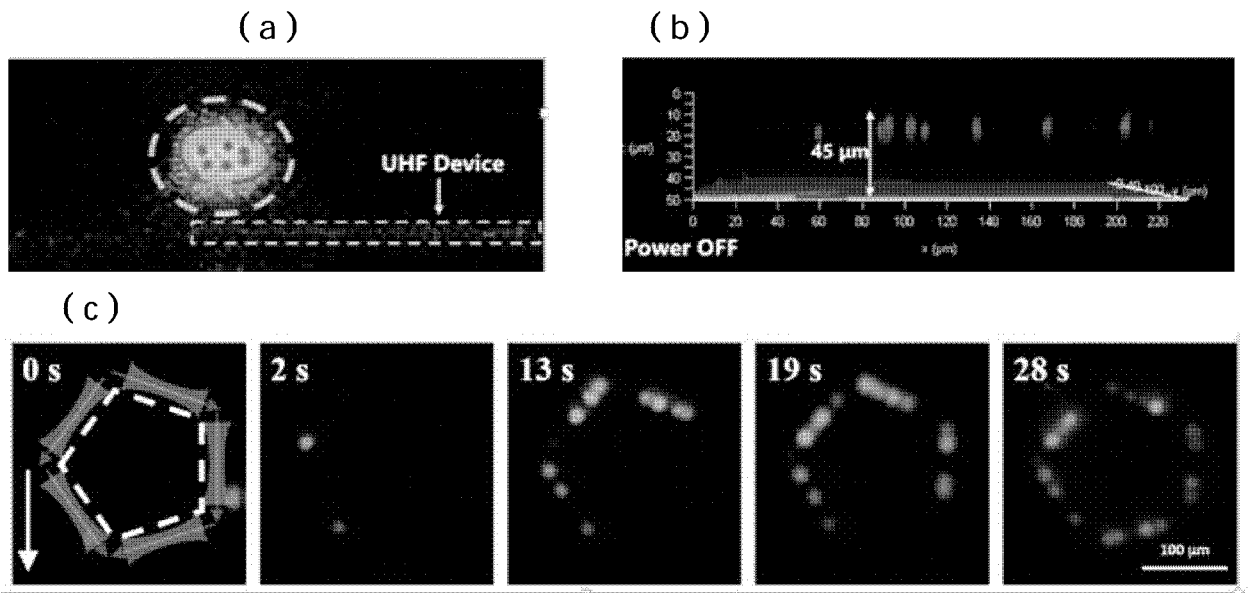


图4

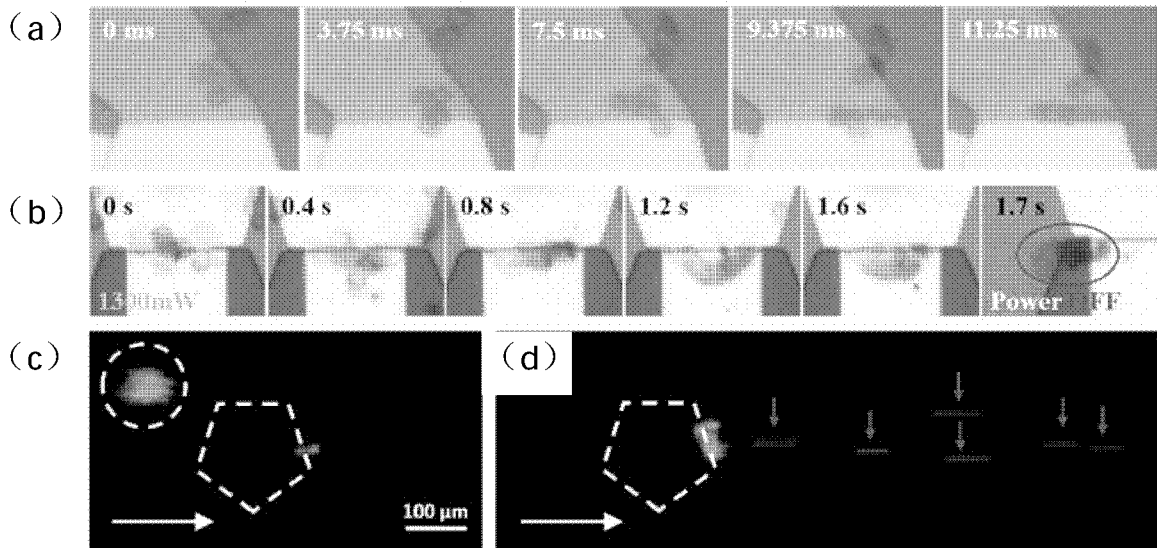


图5

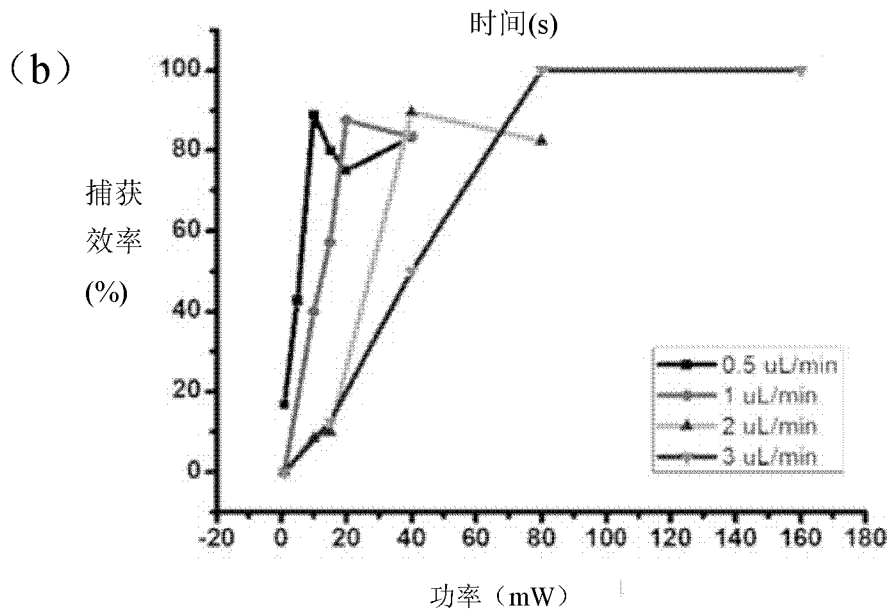
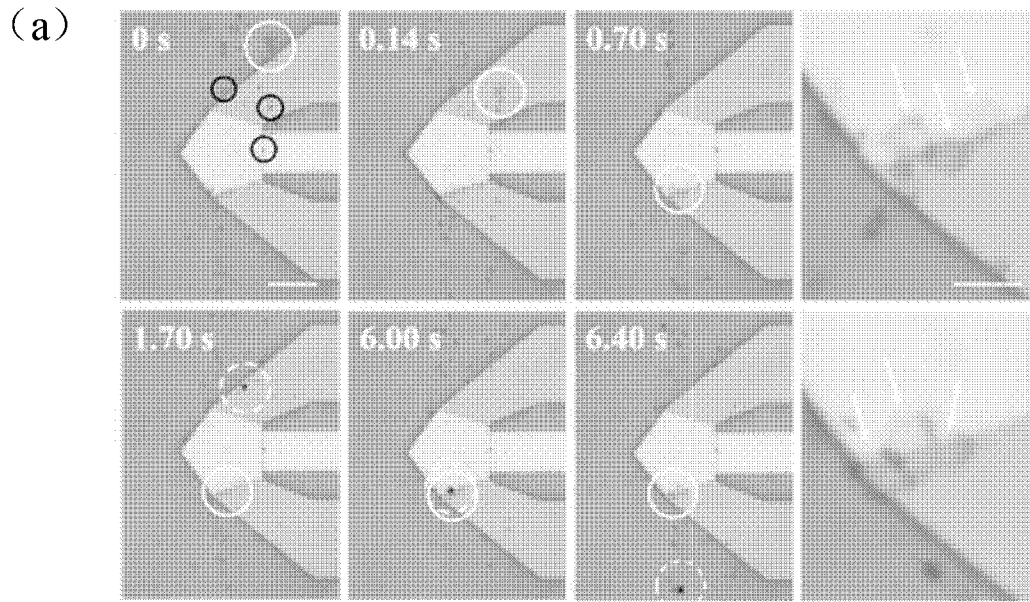


图6

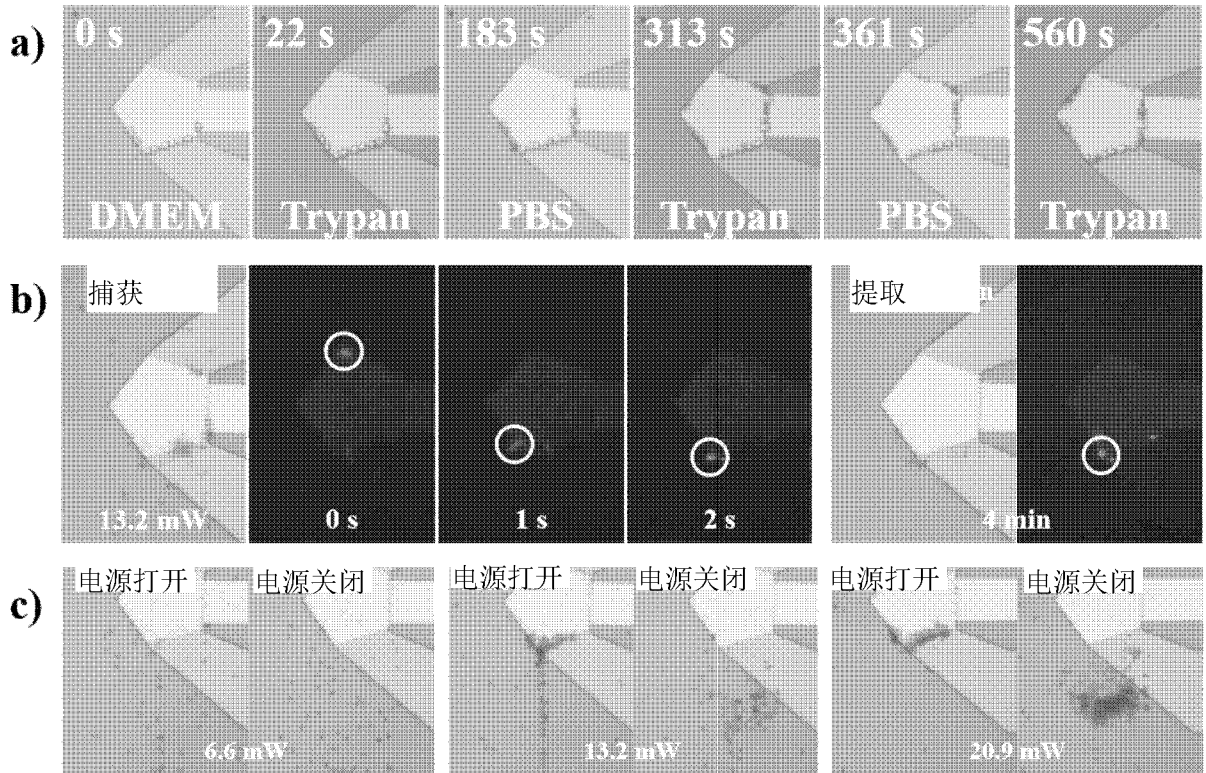


图7

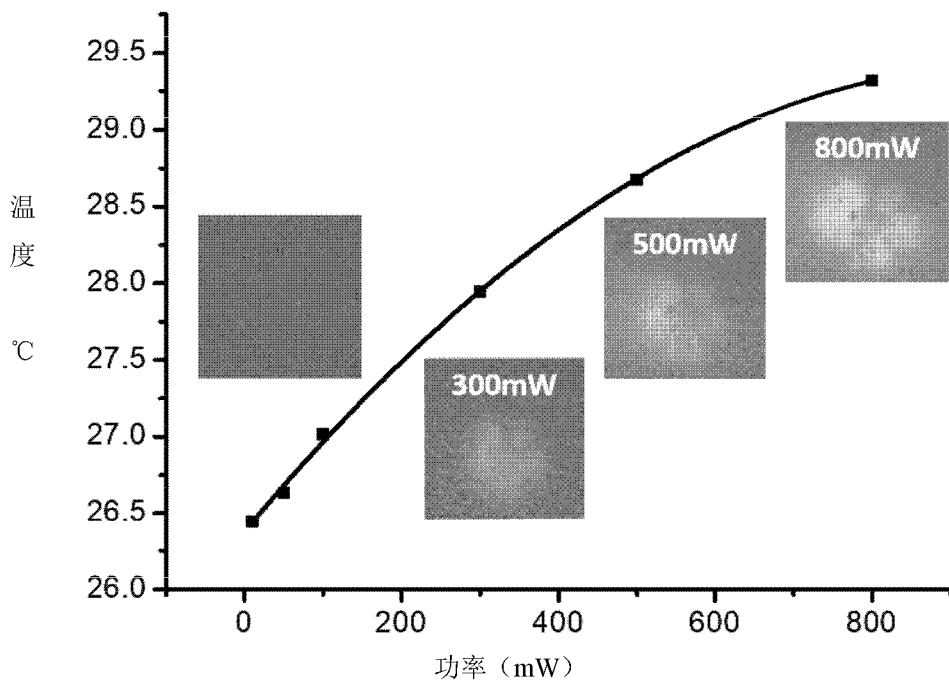


图8

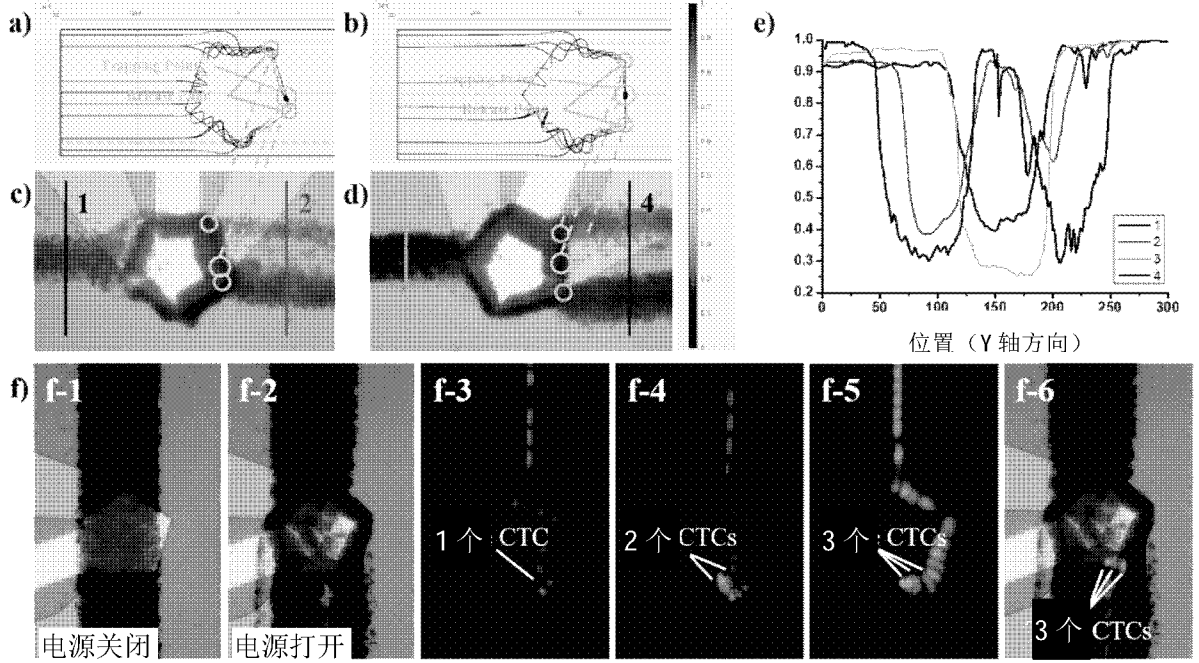


图 9

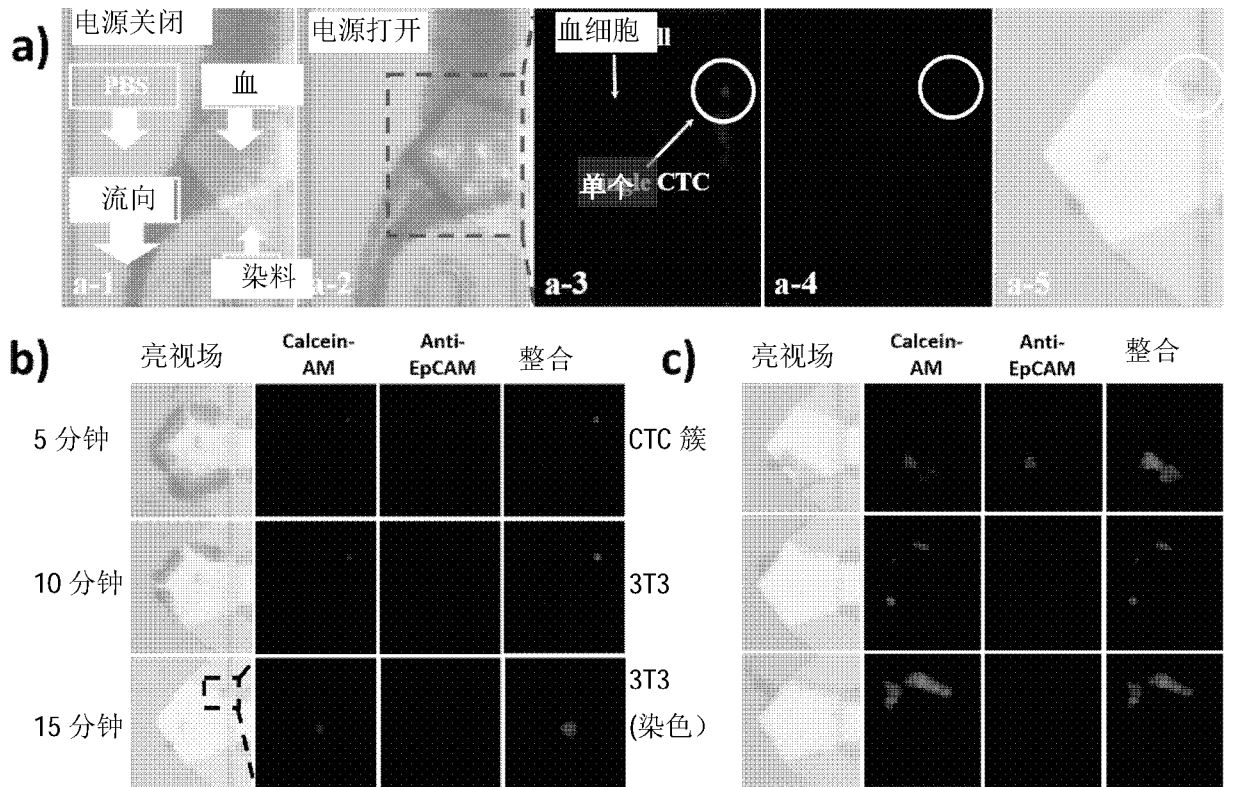


图10

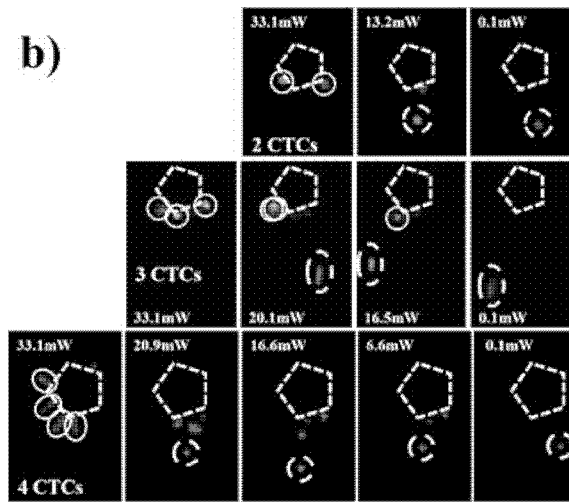
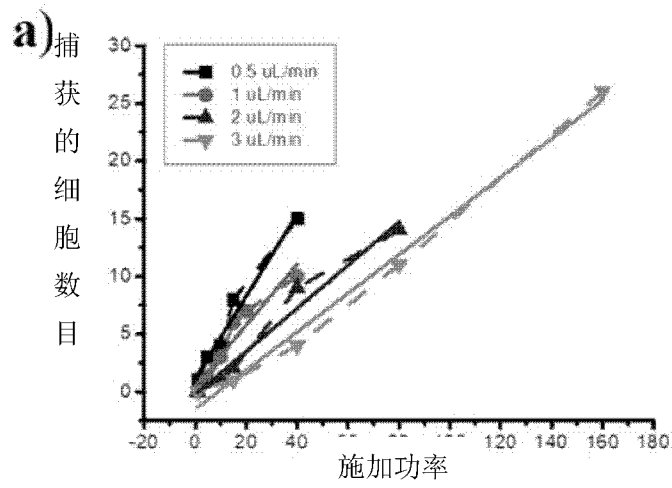


图11

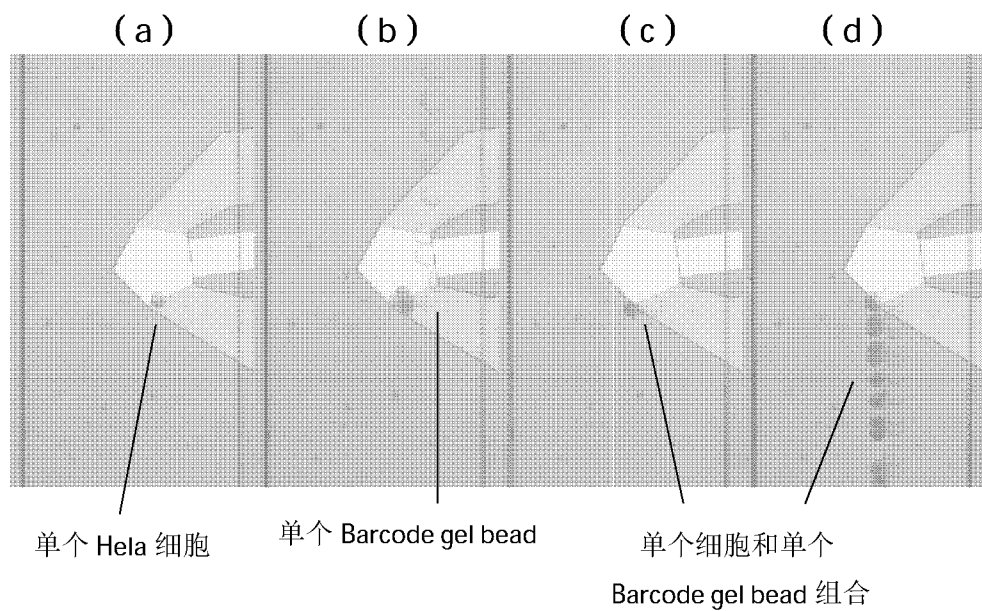


图12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/096176

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12M 1/42(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) C12M1 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) CNABS, CNTXT, CNKI: 体声波, 微流控, 微通道, 涡旋, 漩渦, 旋渦, 细胞, 囊泡, 粒子, 颗粒, 微胶囊, 凝胶微球; VEN, USTXT, EPTXT, WOTXT, IEEE, WILEY: bulk acoustic wave, BAW, vortex, microfluidic, microchannel, cell, vesicle, particle, gel bead, hydrogel bead, lab on a chip		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CUI,Weiwei et al. "Bulk Acoustic Wave Resonator Integrated Microfluidics for Rapid and High Efficiency Fluids Mixing and Bioparticle Trapping" <i>2016 IEEE International Ultrasonics Symposium(IUS)</i> , 31 December 2016 (2016-12-31), ISSN: 1948-5727, "II.METHODS", "III RESULTS AND DISCUSSIONS"	1-14, 17-25
Y	CUI,Weiwei et al. "Bulk Acoustic Wave Resonator Integrated Microfluidics for Rapid and High Efficiency Fluids Mixing and Bioparticle Trapping" <i>2016 IEEE International Ultrasonics Symposium(IUS)</i> , 31 December 2016 (2016-12-31), ISSN: 1948-5727, "II.METHODS", "III RESULTS AND DISCUSSIONS"	15-16
X	HE,Meihang et al. "IN-LINE TRAPPING AND ROTATION OF BIO-PARTICLES VIA 3-D MICRO-VORTICES GENERATED BY LOCALIZED ULTRAHIGH FREQUENCY ACOUSTIC RESONATORS" <i>2017 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers)</i> , 22 June 2017 (2017-06-22), pp. 1789-1791	1-14, 17-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 07 August 2020		Date of mailing of the international search report 23 September 2020
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HE,Meihang et al. "IN-LINE TRAPPING AND ROTATION OF BIO-PARTICLES VIA 3-D MICRO-VORTICES GENERATED BY LOCALIZED ULTRAHIGH FREQUENCY ACOUSTIC RESONATORS" <i>2017 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers)</i> , 22 June 2017 (2017-06-22), pp. 1789-1791	15-16
X	CUI,Weiwei et al. "Hypersonic-Induced 3D Hydrodynamic Tweezers for Versatile Manipulations of Micro/Nanoscale Objects" <i>Particle & Particle Systems Characterization</i> , Vol. 35, No. 8, 06 June 2018 (2018-06-06), ISSN: 0934-0866, pp. 1800068-2 to 1800068-7	1-14, 17-25
Y	CUI,Weiwei et al. "Hypersonic-Induced 3D Hydrodynamic Tweezers for Versatile Manipulations of Micro/Nanoscale Objects" <i>Particle & Particle Systems Characterization</i> , Vol. 35, No. 8, 06 June 2018 (2018-06-06), ISSN: 0934-0866, pp. 1800068-2 to 1800068-7	15-16
Y	CN 107614700 A (BROAD INSTITUTE INC. et al.) 19 January 2018 (2018-01-19) description paragraphs 408-422, figure 14	15-16
Y	ZHENG,Grace X.Y. et al. "Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells" <i>NATURE COMMUNICATIONS</i> , Vol. 8, 16 January 2017 (2017-01-16), ISSN: 2041-1723, pp. 2-3	15-16
A	CN 107979352 A (TIANJIN UNIVERSITY) 01 May 2018 (2018-05-01) entire document	1-25
A	US 2018298371 A1 (FLODESIGN SONICS INC.) 18 October 2018 (2018-10-18) entire document	1-25
A	韦学勇 等 (WEI, Xueyong et al.). "基于表面声波的微流控技术研究进展 (Research progress of microfluidic technology based on surface acoustic waves)" <i>Science & Technology Review</i> , Vol. 36, No. 16, 28 August 2018 (2018-08-28), ISSN: 1000-7857, pp. 8-19	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/CN2020/096176

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107614700	A	19 January 2018	US	2018112212	A1	26 April 2018
				WO	2016145409	A1	15 September 2016
				EP	3268462	A1	17 January 2018

CN	107979352	A	01 May 2018	None			

US	2018298371	A1	18 October 2018	None			

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12M 1/42 (2006.01) i</p> <p>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</p>														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12M1</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNABS, CNTXT, CNKI: 体声波, 微流控, 微通道, 涡旋, 漩渦, 旋渦, 细胞, 囊泡, 粒子, 颗粒, 微胶囊, 凝胶微球; VEN, USTXT, EPTXT, WOTXT, IEEE, WILEY: bulk acoustic wave, BAW, vortex, microfluidic, microchannel, cell, vesicle, particle, gel bead, hydrogel bead, lab on a chip</p>														
<p>C. 相关文件</p> <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>X</td> <td>CUI, Weiwei 等. "Bulk Acoustic Wave Resonator Integrated Microfluidics for Rapid and High Efficiency Fluids Mixing and Bioparticle Trapping" 2016 IEEE International Ultrasonics Symposium(IUS), 2016年 12月 31日 (2016 - 12 - 31), ISSN: 1948-5727, "II. METHODS"、"III RESULTS AND DISCUSSIONS"</td> <td>1-14、17-25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CUI, Weiwei 等. "Bulk Acoustic Wave Resonator Integrated Microfluidics for Rapid and High Efficiency Fluids Mixing and Bioparticle Trapping" 2016 IEEE International Ultrasonics Symposium(IUS), 2016年 12月 31日 (2016 - 12 - 31), ISSN: 1948-5727, "II. METHODS"、"III RESULTS AND DISCUSSIONS"</td> <td>15-16</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>HE, Meihang 等. "IN-LINE TRAPPING AND ROTATION OF BIO-PARTICLES VIA 3-D MICRO-VORTICES GENERATED BY LOCALIZED ULTRAHIGH FREQUENCY ACOUSTIC RESONATORS" 2017 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers), 2017年 6月 22日 (2017 - 06 - 22), 第1789-1791页</td> <td>1-14、17-25</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	X	CUI, Weiwei 等. "Bulk Acoustic Wave Resonator Integrated Microfluidics for Rapid and High Efficiency Fluids Mixing and Bioparticle Trapping" 2016 IEEE International Ultrasonics Symposium(IUS), 2016年 12月 31日 (2016 - 12 - 31), ISSN: 1948-5727, "II. METHODS"、"III RESULTS AND DISCUSSIONS"	1-14、17-25	Y	CUI, Weiwei 等. "Bulk Acoustic Wave Resonator Integrated Microfluidics for Rapid and High Efficiency Fluids Mixing and Bioparticle Trapping" 2016 IEEE International Ultrasonics Symposium(IUS), 2016年 12月 31日 (2016 - 12 - 31), ISSN: 1948-5727, "II. METHODS"、"III RESULTS AND DISCUSSIONS"	15-16	X	HE, Meihang 等. "IN-LINE TRAPPING AND ROTATION OF BIO-PARTICLES VIA 3-D MICRO-VORTICES GENERATED BY LOCALIZED ULTRAHIGH FREQUENCY ACOUSTIC RESONATORS" 2017 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers), 2017年 6月 22日 (2017 - 06 - 22), 第1789-1791页	1-14、17-25
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
X	CUI, Weiwei 等. "Bulk Acoustic Wave Resonator Integrated Microfluidics for Rapid and High Efficiency Fluids Mixing and Bioparticle Trapping" 2016 IEEE International Ultrasonics Symposium(IUS), 2016年 12月 31日 (2016 - 12 - 31), ISSN: 1948-5727, "II. METHODS"、"III RESULTS AND DISCUSSIONS"	1-14、17-25												
Y	CUI, Weiwei 等. "Bulk Acoustic Wave Resonator Integrated Microfluidics for Rapid and High Efficiency Fluids Mixing and Bioparticle Trapping" 2016 IEEE International Ultrasonics Symposium(IUS), 2016年 12月 31日 (2016 - 12 - 31), ISSN: 1948-5727, "II. METHODS"、"III RESULTS AND DISCUSSIONS"	15-16												
X	HE, Meihang 等. "IN-LINE TRAPPING AND ROTATION OF BIO-PARTICLES VIA 3-D MICRO-VORTICES GENERATED BY LOCALIZED ULTRAHIGH FREQUENCY ACOUSTIC RESONATORS" 2017 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers), 2017年 6月 22日 (2017 - 06 - 22), 第1789-1791页	1-14、17-25												
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <table border="0"> <tr> <td> <p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> </td> <td> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" 同族专利的文件</p> </td> </tr> </table>			<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>										
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>													
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 8月 7日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 9月 23日</p>												
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN)</p> <p>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>郑义智</p> <p>电话号码 86-(20)-28958458</p>												

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	HE, Meihang 等. "IN-LINE TRAPPING AND ROTATION OF BIO-PARTICLES VIA 3-D MICRO-VORTICES GENERATED BY LOCALIZED ULTRAHIGH FREQUENCY ACOUSTIC RESONATORS" 2017 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers), 2017年 6月 22日 (2017-06-22), 第1789-1791页	15-16
X	CUI, Weiwei 等. "Hypersonic-Induced 3D Hydrodynamic Tweezers for Versatile Manipulations of Micro/Nanoscale Objects" Particle & Particle Systems Characterization, 第35卷, 第8期, 2018年 6月 6日 (2018-06-06), ISSN: 0934-0866, 第1800068-2至1800068-7页	1-14, 17-25
Y	CUI, Weiwei 等. "Hypersonic-Induced 3D Hydrodynamic Tweezers for Versatile Manipulations of Micro/Nanoscale Objects" Particle & Particle Systems Characterization, 第35卷, 第8期, 2018年 6月 6日 (2018-06-06), ISSN: 0934-0866, 第1800068-2至1800068-7页	15-16
Y	CN 107614700 A (布罗德研究所有限公司 等) 2018年 1月 19日 (2018-01-19) 说明书第408-422段, 图14	15-16
Y	ZHENG, Grace X.Y. 等. "Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells" NATURE COMMUNICATIONS, 第8卷, 2017年 1月 16日 (2017-01-16), ISSN: 2041-1723, 第2-3页	15-16
A	CN 107979352 A (天津大学) 2018年 5月 1日 (2018-05-01) 全文	1-25
A	US 2018298371 A1 (FLODESIGN SONICS INC.) 2018年 10月 18日 (2018-10-18) 全文	1-25
A	韦学勇 等. "基于表面声波的微流控技术研究进展" 科技导报, 第36卷, 第16期, 2018年 8月 28日 (2018-08-28), ISSN: 1000-7857, 第8-19页	1-25

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/096176

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	107614700	A	2018年 1月 19日	US	2018112212	A1	2018年 4月 26日
				WO	2016145409	A1	2016年 9月 15日
				EP	3268462	A1	2018年 1月 17日
CN	107979352	A	2018年 5月 1日	无			
US	2018298371	A1	2018年 10月 18日	无			