

(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 1 月 16 日 (16.01.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/010786 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/118707
- (22) 国际申请日: 2018 年 11 月 30 日 (30.11.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201810765586.9 2018 年 7 月 12 日 (12.07.2018) CN
- (71) 申请人: 广东工业大学 (GUANGDONG UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省广州市番禺区大学城外环西路 100 号, Guangdong 510006 (CN)。 佛山市铭维科技有限公司 (FOSHAN GEWEI TECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN]; 中国广东省佛山市南海区狮山镇软件园桃园路南海产业智库城一期 A 座 601B 室, Guangdong 528225 (CN)。
- (72) 发明人: 邓宇 (DENG, Yu); 中国广东省广州市番禺区大学城外环西路 100 号, Guangdong 510006

(CN)。 王文兵 (WANG, Wenbing); 中国广东省广州市番禺区大学城外环西路 100 号, Guangdong 510006 (CN)。 郭钟宁 (GUO, Zhongning); 中国广东省佛山市南海区狮山镇软件园桃园路南海产业智库城一期 A 座 601B 室, Guangdong 528225 (CN)。 谭蓉 (TAN, Rong); 中国广东省佛山市南海区狮山镇软件园桃园路南海产业智库城一期 A 座 601B 室, Guangdong 528225 (CN)。

(74) 代理人: 广州三环专利商标代理有限公司 (SCIHEAD PATENT AGENT CO., LTD); 中国广东省广州市越秀区先烈中路 80 号汇华商贸大厦 1508 室, Guangdong 510000 (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,

(54) Title: CELL ANALYSIS CHIP, AND CELL FLUORESCENCE DETECTION SYSTEM HAVING SAME AND DETECTION METHOD THEREOF

(54) 发明名称: 一种细胞分析芯片及其具有其的细胞荧光检测系统和检测方法

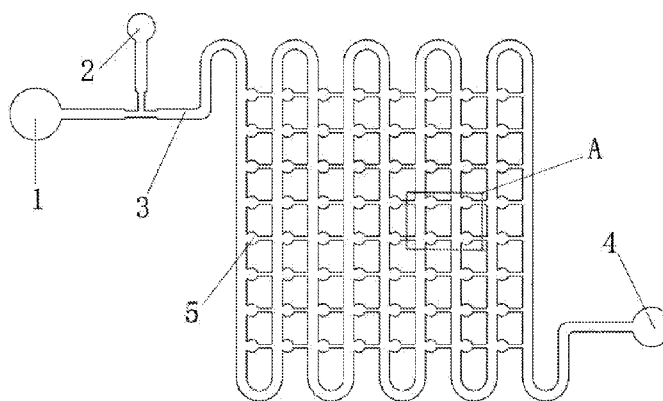


图 1

(57) Abstract: Disclosed are a cell analysis chip (10), and a fluorescence detection system having the cell analysis chip (10) and a detection method thereof. The cell analysis chip (10) comprises a first reaction tank (1), a second reaction tank (2), a flow channel (3) and a buffer tank (4), wherein the first reaction tank (1) and the second reaction tank (2) are in communication with one end of the flow channel (3) by means of tubes; the buffer tank (4) is connected to the other end of the flow channel (3); and the flow channel (3) is of a reciprocating S-shape, and several well structures (5) are provided between two adjacent reciprocating sections of the reciprocating S-shaped flow channel (3), with each of the well structures having two ends respectively in communication with the two adjacent reciprocating sections. The efficiency of detection can be improved, and the requirements for multicolor fluorescence detection can be satisfied. The overall design of the system is simple, and both the sensitivity of detection and the working efficiency of the whole system are improved.



WO 2020/010786 A1

PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, 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))。

(57) 摘要: 一种细胞分析芯片 (10)、具有细胞分析芯片 (10) 的荧光检测系统和检测方法, 其中, 细胞分析芯片 (10) 包括第一反应池 (1)、第二反应池 (2)、流道 (3) 和缓冲池 (4), 第一反应池 (1) 和第二反应池 (2) 通过导管与流道 (3) 的一端连通, 缓冲池 (4) 与流道 (3) 另一端连接, 流道 (3) 呈蛇形往复状, 蛇形往复状的流道 (3) 相邻两往复段之间设有若干两端分别与该相邻两往复段连通的阱结构 (5)。能够提升检测效率, 能满足多色荧光检测的需求, 系统整体设计简便, 整个系统的检测灵敏度以及工作效率都得到提升。

一种细胞分析芯片及其细胞荧光检测系统和检测方法

技术领域

本发明涉及细胞分析技术领域，更具体地，涉及一种细胞分析芯片及其细胞荧光检测系统和检测方法。

背景技术

随着现代生物学技术的发展，以及人类对抗生素的滥用，传统的群体样本检测掩盖了大量重要信息，甚至会出现错误结果，需要对单个样本进行检测分析显得尤为重要，借助芯片实验室能很好完成样本检测分析。

芯片实验室-lab on a chip，又指微流控分析芯片，是把生物、化学医学分析过程的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成到一块微米尺度的芯片上，自动完成分析全过程。由于它在生物、化学、医学等领域的巨大潜力，已经发展成为一个生物、化学、医学、流体、电子、材料、机械等学科交叉的崭新研究领域。自微流控芯片问世以来，其检测研究是人们关注的热点，而微流控芯片中各种生物和化学过程都是通常在微米两级别完成，要求检测器具有灵敏度高、相应速度快、微型化等特点。

荧光检测技术是在微流控芯片上常用的荧光检测技术，由于其无需与样品接触，对检测样品进行非破坏性的定量或定性的检测，因此该技术被广泛使用，要实现高灵敏度的荧光检测系统，需要设计合适的荧光检测光路，目前报道的有正交型、非共聚焦型、共聚焦型、平行型等。常用的光学元件包括光源、透镜、滤光片、分色镜、光纤、物镜、光电转换元件等。

由于激光具有能量高、方向性好、易聚焦等特点，特别适合作为微流控芯片中检测器激发光源，以提高检测的灵敏度。然而现有技术中的荧光检测系统往往只满足于单色荧光对样品检测，对多色荧光标记的样本则无能为力。另外，现有的多通道光学检测装置虽然能满足多色荧光检测需求，但是其往往存在一定不足之处，导致其工作效率低。

发明内容

本发明为克服上述现有技术所述的至少一种缺陷，提供一种细胞分析芯片及其细胞荧光检测系统和检测方法。本发明能够大大提升检测效率，能满足

多色荧光检测的需求，系统整体设计简便，整个系统的检测灵敏度以及工作效率都得到提升。

为解决上述技术问题，本发明采用的技术方案是：一种细胞分析芯片，其中，包括第一反应池、第二反应池、流道和缓冲池，所述第一反应池和第二反应池通过导管与所述流道的一端连通，所述缓冲池与所述流道另一端连接，所述流道呈蛇形往复状，蛇形往复状的流道相邻两往复段之间设有若干两端分别与该相邻两往复段连通的阱结构。

进一步的，所述阱结构靠近所述第一反应池的一端为阱结构的入口，阱结构靠近所述缓冲池的一端为阱结构的出口，所述阱结构的直径 R 为细胞直径的 1.2-1.5 倍，所述阱结构的入口开口宽度 L_1 为细胞直径的 1.2-1.4 倍，所述阱结构的出口开口宽度 L_2 为细胞直径的 0.4-0.6 倍。

进一步的，所述流道的直径 L 为细胞直径的 1.5-1.8 倍，所述流道的深度为细胞直径 1.2-1.8 倍。

进一步的，连通所述第一反应池和流道的导管设有开关。

细胞分析芯片的作用主要包括液滴的生成及捕获两个单元，细胞分析芯片上通常应用的液滴的生成结构为两种，一种为 T 形交叉型通道，另一种为液流聚焦型通道，两种构形均利用连续相的剪切力将分散相剪断以生成液滴。对于 T 形交叉通道，液滴的生成过程的研究已经有很多，其流体动力学条件亦更加清楚。对于液流聚焦型通道，液滴的生成过程如下：由于液体的流阻在通道内各处不一，液流将优先从流阻小的线路前进，当前进受阻压力足够大时，受挤压通过通道狭窄处，当有稳定剂存在时，液滴能顺利通过而不分裂，最终稳定时大部分捕获单元将被液滴填充。本发明的细胞分析芯片采用类似的原理，第一反应池用于盛放细胞悬浮液，为分散相，第二反应池用于盛放矿物油，为连续项，利用液滴进行细胞的包裹并将液滴固定在阱结构中。

本发明还提供一种细胞荧光检测系统，其中，包括工作站、与所述工作站电连接的激发光源、CCD 和三维移动平台，所述三维移动平台上设有微流控芯片，所述微流控芯片为上述的细胞分析芯片，所述微流控芯片上方由下往上依次设有物镜、半反半透镜和第一整光装置，所述 CCD 设在所述第一整光装置上方，所述激发光源的位置满足激发光源发出的光经所述半反半透镜反射后，再经所述物镜

聚焦在所述微流控芯片上，所述激发光源和半反半透镜之间设有第二整光装置。

进一步的，所述第一整光装置包括截止滤镜和聚焦透镜，所述聚焦透镜设在所述截止滤镜上方；所述第二整光装置包括扩束镜和激发滤镜，所述扩束镜设在靠近所述激发光源的一侧，所述激发滤镜设在靠近所述半反半透镜的一侧。

进一步的，所述激发光源为多波段的激发光源，所述截止滤镜和激发滤镜上设有数量和种类均与所述激发光源各波段的波长相对应的截止滤片和激发滤片，所述截止滤片和激发滤片的切换由所述工作站控制。

本发明中，整个检测系统按照类似显微镜结构系统化和集成化，光路各部分零件结构稳定，无需繁杂的结构设计，整体空间尺寸更小。

本发明还提供一种细胞荧光检测方法，其中，包括如下步骤：

S1. 关闭连接第一反应池和流道的导管，向第二反应池中持续注入矿物油，待流道内部充满矿物油后，停止向第二反应池中注入矿物油，静置一定时间至流道与缓冲池连接的一端无液滴产生；

S2. 将带有不同荧光染料标记的不同抗体与细胞悬浮液混合均匀，然后向第一反应池中注入细胞悬浮液，待第一反应池中充满细胞悬浮液后停止注入，然后缓缓打开连接第一反应池和流道的导管，静置一定时间以调整压力差；

S3. 分别继续向第一反应池和第二反应池中注入细胞悬浮液和矿物油，控制第一反应池和第二反应池的流速，由于流道的宽度仅能容下一个细胞流过，因此细胞将一个接着一个流动并被阱结构所捕获，待所有阱结构中均捕获有细胞后，停止向第一反应池和第二反应池中注入细胞悬浮液和矿物油；

S4. 将步骤 S3 得到的微流控芯片固定在三维移动平台上，工作站控制激发光源发出某一波长的激发光，同时控制与该激发光波长对应的截止滤片和激发滤片进入光路，激发光源发出的激发光经过扩束镜扩束后，再经过激发滤片滤去杂散光，最后通过半反半透镜将激发光反射经过物镜的作用聚焦在微流控芯片的某一区域上，该区域上的细胞所带的与激发光波长对应的荧光染料受激发发出荧光信号；

S5. 物镜收集受激发的荧光信号，通过半反半透镜后将荧光信号透射出，通过截止滤片滤去其他杂散光，再经过聚焦透镜聚焦后成像到 CCD 上，并生成光谱信号，得到检测到的细胞的位置和数量信息，同时将检测到的细胞的位置和数量

信息反馈给工作站，完成该区域的细胞荧光检测；

S6. 工作站控制三维移动平台移动，使得激发光聚焦在所述微流控芯片上另一个相同大小的区域上，然后重复步骤 S5，完成该区域的细胞荧光检测；

S7. 重复步骤 S6，使得微流控芯片上所有区域均完成细胞荧光检测；

S8. 工作站自动切换激发光源的下一个激发波长，同时控制相应的激发滤片和截止滤片自动切换进入光路，并控制微流控芯片回到检测起始点，进行下一种荧光信号的检测；依次类推，当与激发光源所有激发波长对应的受激发荧光信号检测完毕后，所有待检测细胞的位置和数量信息都被工作站收集，用于后续的信息分析。

与现有技术相比，本发明的有益效果：

本发明的细胞分析芯片能对细胞进行分离及捕获，可以根据待检测样品的大小和尺寸更改芯片结构设计。

本发明的检测系统所用的激发光源具有多个激发波长，能满足多色荧光检测的需求，系统整体设计较简便，采用类似显微镜结构将检测系统系统化和集成化，具有自动对焦功能，整体空间尺寸较小，光路各部分零件结构稳定，整个系统的检测灵敏度以及工作效率都得到提升。

本发明的检测方法采用区域扫描检测形式，可以根据不同检测需求来调整视野范围大小，能大大减少进行单个阱结构检测所需要的时间，检测效率大大提升。

附图说明

图 1 是本发明细胞分析芯片的整体结构示意图。

图 2 是图 1 中 A 处的局部放大图。

图 3 是本发明荧光检测系统的工作原理示意图。

图 4 是本发明荧光检测系统的结构示意图。

图 5 是本发明实施例 3 中假设检测完实际的细胞分布图。

图 6 是本发明实施例 3 中采用激发波长 A 对细胞①进行扫描得到的实际的样本分布图。

图 7 是本发明实施例 3 中采用激发波长 B 对细胞②进行扫描得到的实际的样本分布图。

具体实施方式

附图仅用于示例性说明，不能理解为对本专利的限制；为了更好说明本实施例，附图某些部件会有省略、放大或缩小，并不代表实际产品的尺寸；对于本领域技术人员来说，附图中某些公知结构及其说明可能省略是可以理解的。附图中描述位置关系仅用于示例性说明，不能理解为对本专利的限制。

实施例 1

如图 1 和图 2 所示，一种细胞分析芯片，其中，包括第一反应池 1、第二反应池 2、流道 3 和缓冲池 4，所述第一反应池 1 和第二反应池 2 通过导管与所述流道 3 的一端连通，所述缓冲池 4 与所述流道 3 另一端连接，所述流道 3 呈蛇形往复状，蛇形往复状的流道 3 相邻两往复段之间设有若干两端分别与该相邻两往复段连通的阱结构 5。

如图 1 和图 2 所示，所述阱结构 5 靠近所述第一反应池 1 的一端为阱结构 5 的入口，阱结构 5 靠近所述缓冲池 4 的一端为阱结构 5 的出口，所述阱结构 5 的直径 R 为细胞直径的 1.2-1.5 倍，所述阱结构 5 的入口开口宽度 $L1$ 为细胞直径的 1.2-1.4 倍，所述阱结构 5 的出口开口宽度 $L2$ 为细胞直径的 0.4-0.6 倍。

如图 1 和图 2 所示，所述流道 3 的直径 L 为细胞直径的 1.5-1.8 倍，所述流道 3 的深度为细胞直径 1.2-1.8 倍。

本实施例中，连通所述第一反应池 1 和流道 3 的导管设有开关。

细胞分析芯片的作用主要包括液滴的生成及捕获两个单元，细胞分析芯片上通常应用的液滴的生成结构为两种，一种为 T 形交叉型通道，另一种为液流聚焦型通道，两种构形均利用连续相的剪切力将分散相剪断以生成液滴。对于 T 形交叉通道，液滴的生成过程的研究已经有很多，其流体动力学条件亦更加清楚。对于液流聚焦型通道，液滴的生成过程如下：由于液体的流阻在通道内各处不一，液流将优先从流阻小的线路前进，当前进受阻压力足够大时，受挤压通过通道狭窄处，当有稳定剂存在时，液滴能顺利通过而不分裂，最终稳定时大部分捕获单元将被液滴填充。本发明的细胞分析芯片采用类似的原理，第一反应池 1 用于盛放细胞悬浮液，为分散相，第二反应池 2 用于盛放矿物油，为连续项，利用液滴进行细胞的包裹并将液滴固定在阱结构 5 中。

实施例 2

如图 3 所示，一种细胞荧光检测系统，其中，包括工作站 6、与所述工作站

6 电连接的激发光源 7、CCD8 和三维移动平台 9，所述三维移动平台 9 上设有微流控芯片 10，所述微流控芯片 10 为实施例 1 所述的细胞分析芯片，所述微流控芯片 10 上方由下往上依次设有物镜 11、半反半透镜 12 和第一整光装置，所述 CCD8 设在所述第一整光装置上方，所述激发光源 7 的位置满足激发光源 7 发出的光经所述半反半透镜 12 反射后，再经所述物镜 11 聚焦在所述微流控芯片 10 上，所述激发光源 7 和半反半透镜 12 之间设有第二整光装置。

如图 3 所示，所述第一整光装置包括截止滤镜 13 和聚焦透镜 14，所述聚焦透镜 14 设在所述截止滤镜 13 上方；所述第二整光装置包括扩束镜 15 和激发滤镜 16，所述扩束镜 15 设在靠近所述激发光源 7 的一侧，所述激发滤镜 16 设在靠近所述半反半透镜 12 的一侧。

如图 3 所示，所述激发光源 7 为多波段的激发光源 7，所述截止滤镜 13 和激发滤镜 16 上设有数量和种类均与所述激发光源 7 各波段的波长相对应的截止滤片和激发滤片，所述截止滤片和激发滤片的切换由所述工作站 6 控制。

本实施例中，整个检测系统按照类似显微镜结构系统化和集成化，如图 4 所示，光路各部分零件结构稳定，无需繁杂的结构设计，整体空间尺寸更小。

实施例 3

一种细胞荧光检测方法，其中，包括如下步骤：

S1. 关闭连接第一反应池 1 和流道 3 的导管，向第二反应池 2 中持续注入矿物油，待流道 3 内部充满矿物油后，停止向第二反应池 2 中注入矿物油，静置一定时间至流道 3 与缓冲池 4 连接的一端无液滴产生；

S2. 将带有不同荧光染料标记的不同抗体与细胞悬浮液混合均匀，然后向第一反应池 1 中注入细胞悬浮液，待第一反应池 1 中充满细胞悬浮液后停止注入，然后缓缓打开连接第一反应池 1 和流道 3 的导管，静置一定时间以调整压力差；

S3. 分别继续向第一反应池 1 和第二反应池 2 中注入细胞悬浮液和矿物油，控制第一反应池 1 和第二反应池 2 的流速，由于流道 3 的宽度仅能容下一个细胞流过，因此细胞将一个接着一个流动并被阱结构 5 所捕获，待所有阱结构 5 中均捕获有细胞后，停止向第一反应池 1 和第二反应池 2 中注入细胞悬浮液和矿物油；

S4. 将步骤 S3 得到的微流控芯片 10 固定在三维移动平台 9 上，工作站 6 控制激发光源 7 发出某一波长的激发光，同时控制与该激发光波长对应的截止滤

片和激发滤片进入光路，激发光源 7 发出的激发光经过扩束镜 15 扩束后，再经过激发滤片滤去杂散光，最后通过半反半透镜 12 将激发光反射经过物镜 11 的作用聚焦在微流控芯片 10 的某一区域上，该区域上的细胞所带的与激发光波长对应的荧光染料受激发发出荧光信号；

S5. 物镜 11 收集受激发的荧光信号，通过半反半透镜 12 后将荧光信号透射出，通过截止滤片滤去其他杂散光，再经过聚焦透镜 14 聚焦后成像到 CCD8 上，并生成光谱信号，得到检测到的细胞的位置和数量信息，同时将检测到的细胞的位置和数量信息反馈给工作站 6，完成该区域的细胞荧光检测；

S6. 工作站 6 控制三维移动平台 9 移动，使得激发光聚焦在所述微流控芯片 10 上另一个相同大小的区域上，然后重复步骤 S5，完成该区域的细胞荧光检测；

S7. 重复步骤 S6，使得微流控芯片 10 上所有区域均完成细胞荧光检测；

S8. 工作站 6 自动切换激发光源 7 的下一个激发波长，同时控制相应的激发滤片和截止滤片自动切换进入光路，并控制微流控芯片 10 回到检测起始点，进行下一种荧光信号的检测；依次类推，当与激发光源 7 所有激发波长对应的受激发荧光信号检测完毕后，所有待检测细胞的位置和数量信息都被工作站 6 收集，用于后续的信息分析。

本实施例中，以五色荧光检测系统为例，采用区域扫描检测形式，视野范围为 4*4。先进行样品捕获，假设检测完实际的细胞分布如图 5 所示，①②③④⑤代表五种不同的细胞。不同颜色代表它们分别受不同激发波长光源 A、B、C、D、E 激发后的荧光信号。第一次扫描，采用激发波长 A 对细胞①进行扫描，定位出一种荧光信号颜色①，且工作站 6 能得到实际的样本分布位置如图 6 所示，通过图像的标定，可以定位出有荧光信号细胞的位置。第二次扫描，采用激发波长 B 对细胞②进行扫描，定位出一种荧光信号颜色②，且工作站 6 能得到实际的样本分布位置如图 7 所示。以此类推，扫描五次即可区分出每种荧光信号细胞的位置，并且不同细胞的位置和数量都能被反馈出来，用于后续的分析。

显然，本发明的上述实施例仅仅是为了清楚地说明本发明所作的举例，而并非对本发明的实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说，在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改

进等，均应包含在本发明权利要求的保护范围之内。

权利要求书

1. 一种细胞分析芯片，其特征在于，包括第一反应池（1）、第二反应池（2）、流道（3）和缓冲池（4），所述第一反应池（1）和第二反应池（2）通过导管与所述流道（3）的一端连通，所述缓冲池（4）与所述流道（3）另一端连接，所述流道（3）呈蛇形往复状，蛇形往复状的流道（3）相邻两往复段之间设有若干两端分别与该相邻两往复段连通的阱结构（5）。

2. 根据权利要求1所述的一种细胞分析芯片，其特征在于，所述阱结构（5）靠近所述第一反应池（1）的一端为阱结构（5）的入口，阱结构（5）靠近所述缓冲池（4）的一端为阱结构（5）的出口，所述阱结构（5）的直径R为细胞直径的1.2-1.5倍，所述阱结构（5）的入口开口宽度L1为细胞直径的1.2-1.4倍，所述阱结构（5）的出口开口宽度L2为细胞直径的0.4-0.6倍。

3. 根据权利要求1所述的一种细胞分析芯片，其特征在于，所述流道（3）的直径L为细胞直径的1.5-1.8倍，所述流道（3）的深度为细胞直径1.2-1.8倍。

4. 根据权利要求1所述的一种细胞分析芯片，其特征在于，连通所述第一反应池（1）和流道（3）的导管设有开关。

5. 一种细胞荧光检测系统，其特征在于，包括工作站（6）、与所述工作站（6）电连接的激发光源（7）、CCD（8）和三维移动平台（9），所述三维移动平台（9）上设有微流控芯片（10），所述微流控芯片（10）为权利要求1到3任一所述的细胞分析芯片，所述微流控芯片（10）上方由下往上依次设有物镜（11）、半反半透镜（12）和第一整光装置，所述CCD（8）设在所述第一整光装置上方，所述激发光源（7）的位置满足激发光源（7）发出的光经所述半反半透镜（12）反射后，再经所述物镜（11）聚焦在所述微流控芯片（10）上，所述激发光源（7）和半反半透镜（12）之间设有第二整光装置。

6. 根据权利要求5所述的一种细胞荧光检测系统，其特征在于，所述第一整光装置包括截止滤镜（13）和聚焦透镜（14），所述聚焦透镜（14）设在所述截止滤镜（13）上方；所述第二整光装置包括扩束镜（15）和激发滤镜（16），所述扩束镜（15）设在靠近所述激发光源（7）的一侧，所述激发滤镜（16）设在靠近所述半反半透镜（12）的一侧。

7. 根据权利要求 6 所述的一种细胞荧光检测系统，其特征在于，所述激发光源（7）为多波段的激发光源，所述截止滤镜（13）和激发滤镜（16）上设有数量和种类均与所述激发光源（7）各波段的波长相对应的截止滤片和激发滤片，所述截止滤片和激发滤片的切换由所述工作站（6）控制。

8. 一种细胞荧光检测方法，其特征在于，包括如下步骤：

S1. 关闭连接第一反应池（1）和流道（3）的导管，向第二反应池（2）中持续注入矿物油，待流道（3）内部充满矿物油后，停止向第二反应池（2）中注入矿物油，静置一定时间至流道（3）与缓冲池（4）连接的一端无液滴产生；

S2. 将带有不同荧光染料标记的不同抗体与细胞悬浮液混合均匀，然后向第一反应池（1）中注入细胞悬浮液，待第一反应池（1）中充满细胞悬浮液后停止注入，然后缓缓打开连接第一反应池（1）和流道（3）的导管，静置一定时间以调整压力差；

S3. 分别继续向第一反应池（1）和第二反应池（2）中注入细胞悬浮液和矿物油，控制第一反应池（1）和第二反应池（2）的流速，待所有阱结构（5）中均捕获有细胞后，停止向第一反应池（1）和第二反应池（2）中注入细胞悬浮液和矿物油；

S4. 将步骤 S3 得到的微流控芯片（10）固定在三维移动平台（9）上，工作站（6）控制激发光源（7）发出某一波长的激发光，同时控制与该激发光波长对应的截止滤片和激发滤片进入光路，激发光源（7）发出的激发光经过扩束镜（15）扩束后，再经过激发滤片滤去杂散光，最后通过半反半透镜（12）将激发光反射经过物镜（11）的作用聚焦在微流控芯片（10）的某一区域上，该区域上的细胞所带的与激发光波长对应的荧光染料受激发发出荧光信号；

S5. 物镜（11）收集受激发的荧光信号，通过半反半透镜（12）后将荧光信号透射出，通过截止滤片滤去其他杂散光，再经过聚焦透镜（14）聚焦后成像到 CCD 上，并生成光谱信号，得到检测到的细胞的位置和数量信息，同时将检测到的细胞的位置和数量信息反馈给工作站（6），完成该区域的细胞荧光检测；

S6. 工作站（6）控制三维移动平台（9）移动，使得激发光聚焦在所述微流控芯片（10）上另一个相同大小的区域上，然后重复步骤 S5，完成该区域的细胞荧光检测；

S7. 重复步骤 S6, 使得微流控芯片 (10) 上所有区域均完成细胞荧光检测;

S8. 工作站 (6) 自动切换激发光源 (7) 的下一个激发波长, 同时控制相应的激发滤片和截止滤片自动切换进入光路, 并控制微流控芯片 (10) 回到检测起始点, 进行下一种荧光信号的检测; 依次类推, 当与激发光源 (7) 所有激发波长对应的受激发荧光信号检测完毕后, 所有待检测细胞的位置和数量信息都被工作站 (6) 收集, 用于后续的信息分析。

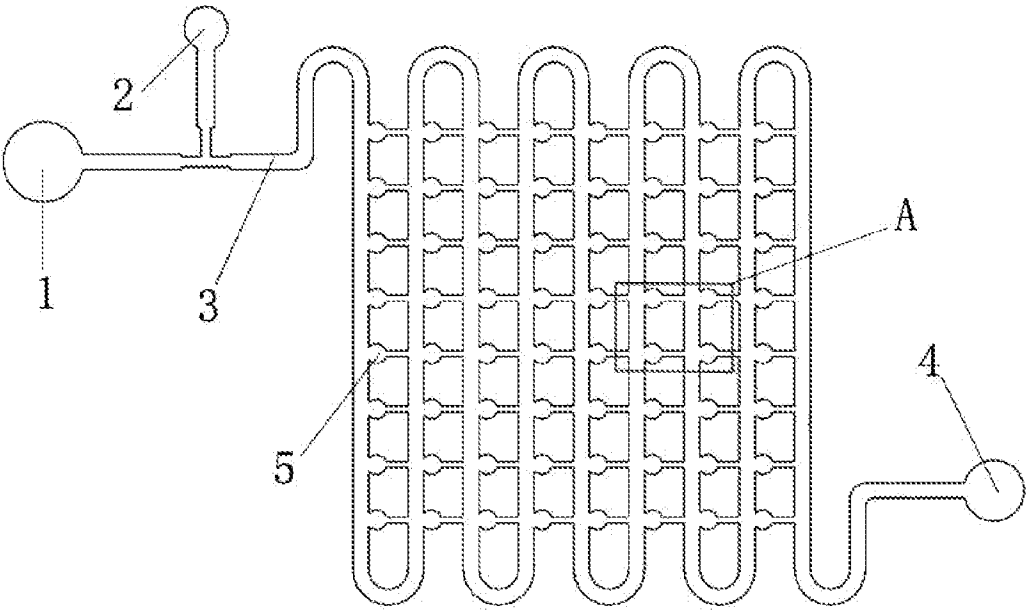


图 1

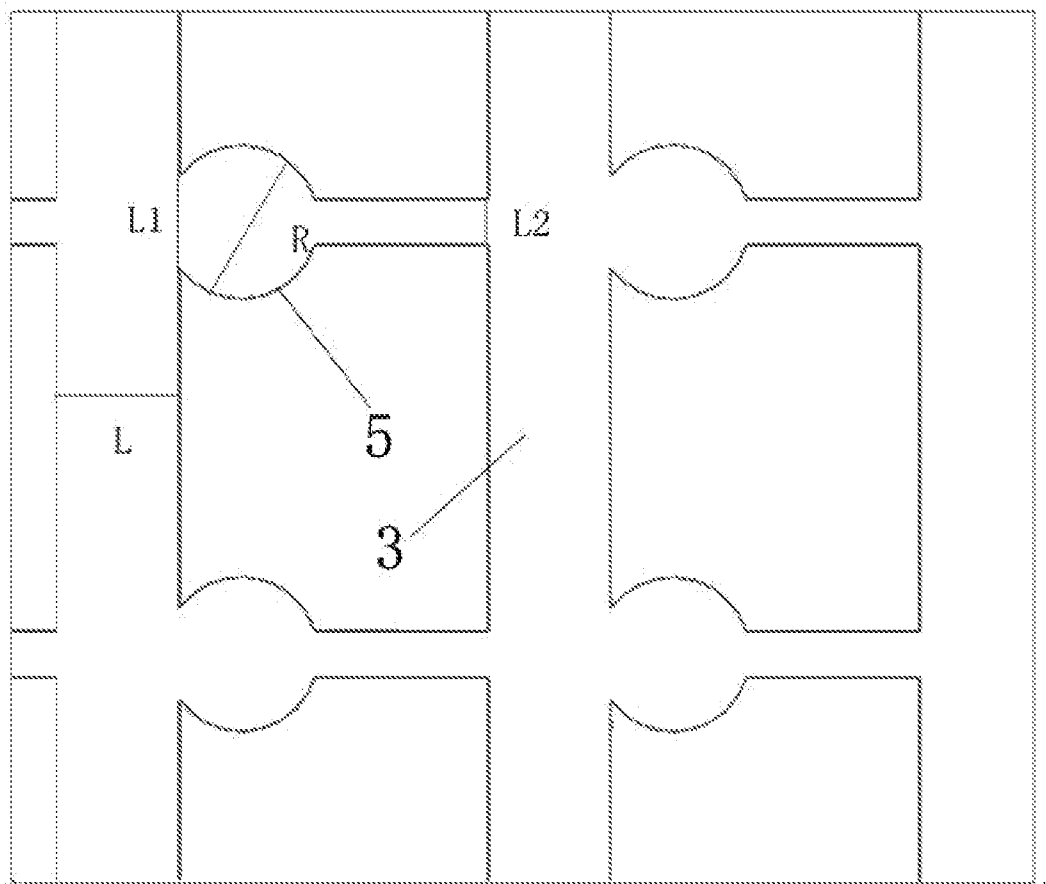


图 2

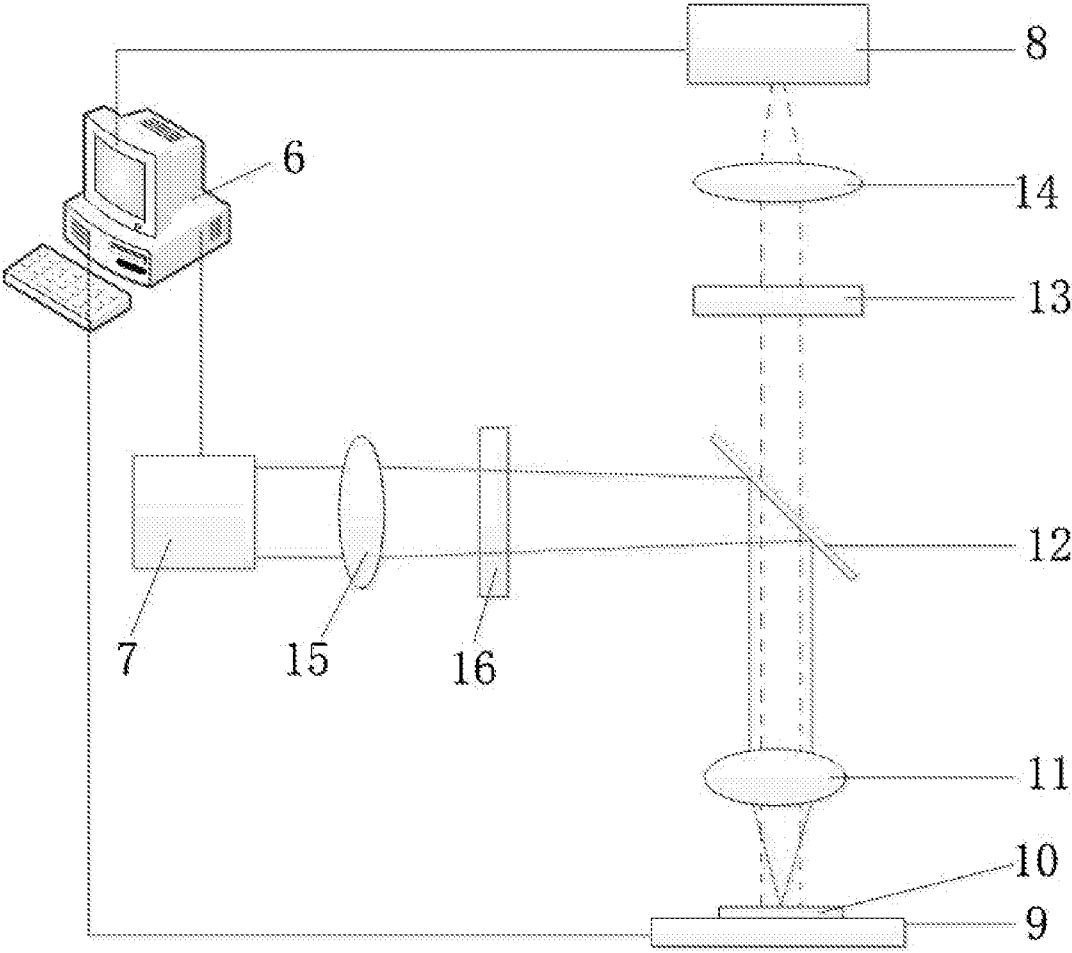


图 3

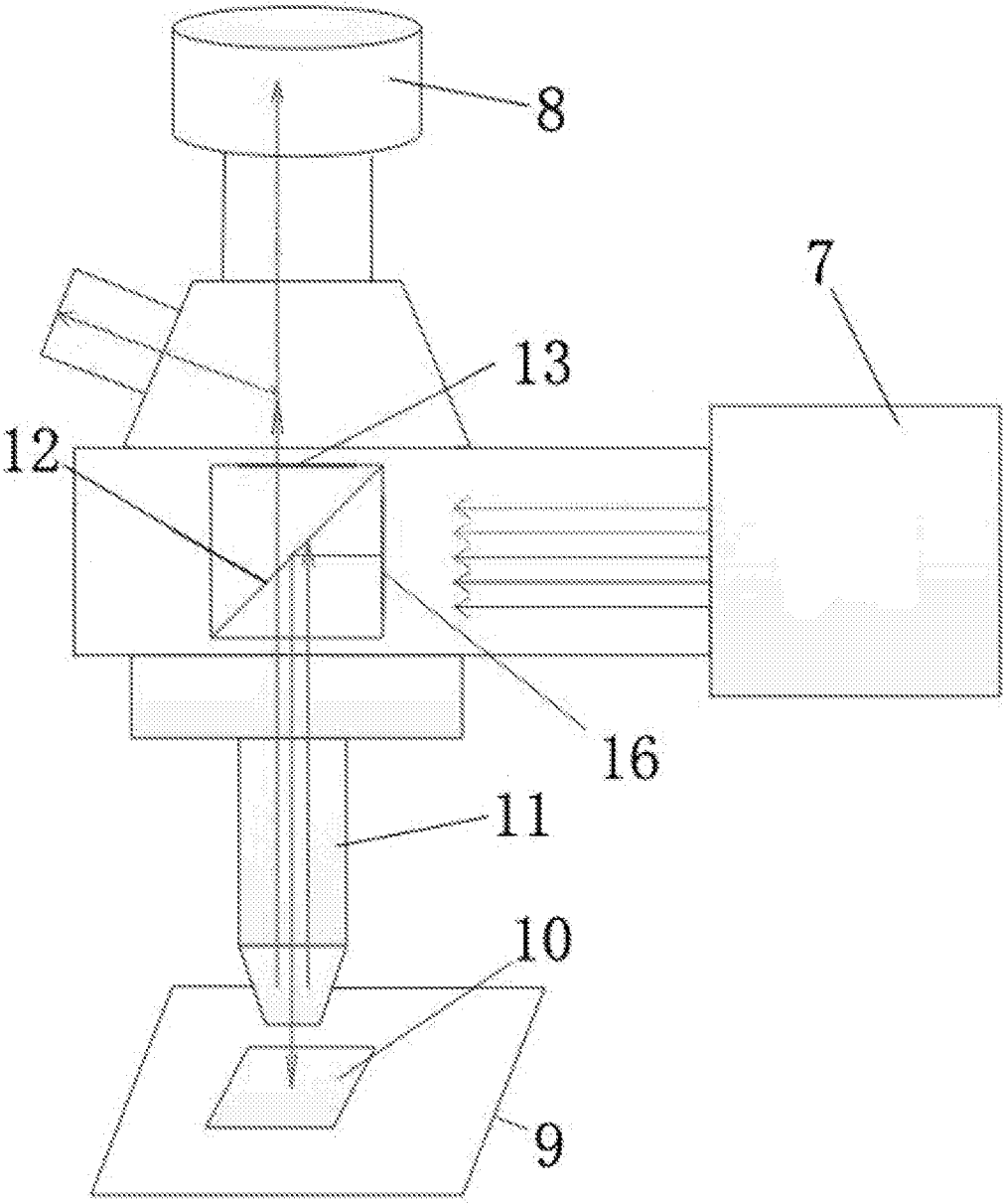


图 4

③	②	①	
⑤		④	①
②	④	②	
①	①	⑤	③

图 5

		①	
			①
①	①		

图 6

	②		
②		②	

图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/118707

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 21/64(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)

CNKI, CNPAT, WPI, EPODOC: 细胞, 分析, 微流控, 微流体, 芯片, 反应池, 反应室, 流道, 通道, 导管, 缓冲, 蛇型, 蛇状, 蛇形, 阱, 单细胞, 筛, 捕捉, 分散相, 油, 荧光, 激光, 波长, 波段, cell?, analys+, detect+, measu+, flow-control+, flow w control+, microflow-control+, microflow w control+, chip?, lab w on w chip?, lab-on-chip, chamber?, tank?, passage???, pipe?, snakelike, s-shaped, reaction, buffer, trap?, filter+, laser, wavelength

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105518464 A (UNIVERSITY OF WASHINGTON CENTER FOR COMMERCIALIZATION) 20 April 2016 (2016-04-20) description, paragraphs [0183]-[0269], and figures 1-7, 17, 18, 22, and 23	1-4
Y	CN 105518464 A (UNIVERSITY OF WASHINGTON CENTER FOR COMMERCIALIZATION) 20 April 2016 (2016-04-20) description, paragraphs [0183]-[0269], and figures 1-7, 17, 18, 22, and 23	5-8
Y	CN 1724997 A (DONGHUA UNIVERSITY) 25 January 2006 (2006-01-25) description, p. 5, line 8 to p. 7, line 13, and figures 1-4	5-8
A	US 2005237521 A1 (KOWA COMPANY, LTD.) 27 October 2005 (2005-10-27) entire document	1-8
A	CN 106226278 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 14 December 2016 (2016-12-14) entire document	1-8
A	CN 106053467 A (SHANGHAI INSTITUTE OF MICROSYSTEM AND INFORMATION TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 26 October 2016 (2016-10-26) entire document	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“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)

“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

“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

“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

“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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 March 2019

Date of mailing of the international search report

01 April 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/118707

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106796166 A (WAFERGEN INC.) 31 May 2017 (2017-05-31) entire document	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/118707

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105518464	A	20 April 2016	TW	201516412	A	01 May 2015
				EP	3017308	A1	11 May 2016
				WO	2015002975	A1	08 January 2015
				US	2016146823	A1	26 May 2016
				JP	2016527494	A	08 September 2016
CN	1724997	A	25 January 2006	CN	100557419	C	04 November 2009
US	2005237521	A1	27 October 2005	FR	2869414	B1	14 December 2007
				US	7295306	B2	13 November 2007
				FR	2869414	A1	28 October 2005
				JP	4528664	B2	18 August 2010
				JP	2005331506	A	02 December 2005
CN	106226278	A	14 December 2016	None			
CN	106053467	A	26 October 2016	None			
CN	106796166	A	31 May 2017	US	2015360226	A1	17 December 2015
				EP	3155396	A1	19 April 2017
				US	9995662	B2	12 June 2018
				US	2016033378	A1	04 February 2016
				JP	2017518752	A	13 July 2017
				WO	2015191684	A1	17 December 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/118707

A. 主题的分类

G01N 21/64(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))

CNKI, CNPAT, WPI, EPDOC: 细胞, 分析, 微流控, 微流体, 芯片, 反应池, 反应室, 流道, 通道, 导管, 缓冲, 蛇型, 蛇状, 蛇形, 阱, 单细胞, 筛, 捕捉, 分散相, 油, 荧光, 激光, 波长, 波段, cell?, analys+, detect+, measu+, flow-control+, flow w control+, microflow-control+, microflow w control+, chip?, lab w on w chip?, lab-on-chip, chamber?, tank?, passage???, pipe?, snakelike, s-shaped, reaction, buffer, trap?, filter+, laser, wavelength

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
X	CN 105518464 A (华盛顿大学商业中心) 2016年 4月 20日 (2016 - 04 - 20) 说明书第[0183]-[0269]段, 附图1-7、17-18、22-23	1-4
Y	CN 105518464 A (华盛顿大学商业中心) 2016年 4月 20日 (2016 - 04 - 20) 说明书第[0183]-[0269]段, 附图1-7、17-18、22-23	5-8
Y	CN 1724997 A (东华大学) 2006年 1月 25日 (2006 - 01 - 25) 说明书第5页第8行至第7页第13行, 附图1-4	5-8
A	US 2005237521 A1 (KOWA COMPANY, LTD.) 2005年 10月 27日 (2005 - 10 - 27) 全文	1-8
A	CN 106226278 A (清华大学) 2016年 12月 14日 (2016 - 12 - 14) 全文	1-8
A	CN 106053467 A (中国科学院上海微系统与信息技术研究所) 2016年 10月 26日 (2016 - 10 - 26) 全文	1-8

☒ 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

2019年 3月 8日

国际检索报告邮寄日期

2019年 4月 1日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (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

王晓

电话号码 86-(10)-53962601

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
A	CN 106796166 A (瓦弗根公司) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 全文	1-8

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/118707

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	105518464	A	2016年 4月 20日	TW	201516412	A	2015年 5月 1日
				EP	3017308	A1	2016年 5月 11日
				WO	2015002975	A1	2015年 1月 8日
				US	2016146823	A1	2016年 5月 26日
				JP	2016527494	A	2016年 9月 8日
CN	1724997	A	2006年 1月 25日	CN	100557419	C	2009年 11月 4日
US	2005237521	A1	2005年 10月 27日	FR	2869414	B1	2007年 12月 14日
				US	7295306	B2	2007年 11月 13日
				FR	2869414	A1	2005年 10月 28日
				JP	4528664	B2	2010年 8月 18日
				JP	2005331506	A	2005年 12月 2日
CN	106226278	A	2016年 12月 14日	无			
CN	106053467	A	2016年 10月 26日	无			
CN	106796166	A	2017年 5月 31日	US	2015360226	A1	2015年 12月 17日
				EP	3155396	A1	2017年 4月 19日
				US	9995662	B2	2018年 6月 12日
				US	2016033378	A1	2016年 2月 4日
				JP	2017518752	A	2017年 7月 13日
				WO	2015191684	A1	2015年 12月 17日