



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106990077 A

(43)申请公布日 2017. 07. 28

(21)申请号 201710449704.0

(22)申请日 2017.06.15

(71)申请人 福建师范大学

地址 350117 福建省福州市闽侯县上街镇
大学城科技路1号,福建师范大学旗山
校区

(72)发明人 卓双木 陈建新 林宏心 朱小钦
李连煌 谢树森

(74)专利代理机构 福州元创专利商标代理有限
公司 35100

代理人 蔡学俊

(51)Int.Cl.

G01N 21/63(2006.01)

G01N 1/28(2006.01)

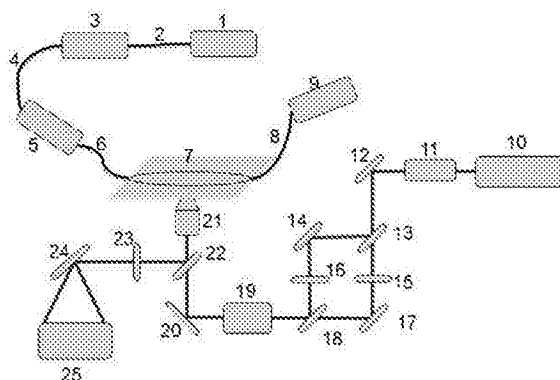
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统

(57)摘要

本发明涉及一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统,包括一灌注培养单元以及一对该灌注培养单元进行成像的激发光源成像单元;通过所述激发光源成像单元激发光源,该激发光源与所述灌注培养单元的细胞相互作用产生内源性的多光子信号,所述激发光源成像单元通过该多光子信号进行高分辨成像。本发明所提出的一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统,设计合理,构思巧妙,具有广阔的发展前景和较大的推广意义。



1. 一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统, 其特征在于, 包括一灌注培养单元以及一对该灌注培养单元进行成像的激发光源成像单元; 通过所述激发光源成像单元激发光源, 该激发光源与所述灌注培养单元的细胞相互作用产生内源性的多光子信号, 所述激发光源成像单元通过该多光子信号进行高分辨成像。

2. 根据权利要求1所述的一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统, 其特征在于, 所述灌注培养单元包括: 注射泵、第一微流体连接器、氧合器、第二微流体连接器、微泡清除器、第三微流体连接器、微流芯片、第四微流体连接器以及培养基存储器; 所述注射泵经所述第一微流体连接器与所述氧合器一端连接; 所述氧合器另一端经所述第二微流体连接器与所述微泡清除器一端连接; 所述微泡清除器另一端经所述第三微流体连接器与所述微流芯片一端连接; 所述微流芯片的另一端经所述第四微流体连接器与所述培养基存储器相连。

3. 根据权利要求2所述的一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统, 其特征在于, 所述微流芯片包括三对微孔, 每对微孔都具有一个入口和一个出口。

4. 根据权利要求2所述的一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统, 其特征在于, 所述激发光源成像单元包括沿光路设置的钛宝石飞秒激光器、光子晶体光纤, 第一反射镜、第一二向色分光镜、第二反射镜、第一滤光片、第二滤光片、第三反射镜、第二二向色分光镜、光学扫描器件、第四反射镜、与所述微流芯片配合的显微物镜、第三二向色分光镜、第三滤光片、反射光栅以及光电倍增管阵列。

5. 根据权利要求4所述的一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统, 其特征在于, 所述第一反射镜与经所述光子晶体光纤产生的光路夹角为45度; 所述第一二向色分光镜与经所述第一反射镜反射后的光路的夹角为45度; 所述第二反射镜与经所述第一二向色分光镜后的一光路的夹角为45度; 所述第三反射镜与经所述第一二向色分光镜后的另一光路的夹角为45度; 所述第二二向色分光镜与经所述第二反射镜反射后的光路的夹角为45度; 所述第三二向色分光镜与经所述第三反射镜反射后的光路的夹角为45度; 所述第一滤光片设置于所述第一二向色分光镜以及所述第三反射镜之间; 所述第二滤光片设置于所述第二反射镜与所述第二二向色分光镜之间; 所述光学扫描器件设置于所述第二二向色分光镜以及所述第四反射镜之间; 所述第四反射镜与经所述光学扫描器产生的光路的夹角为45度; 所述第三二向色分光镜与经所述显微物镜产生的光路的夹角为45度; 所述反射光栅与经所述第三二向色分光镜后的光路的夹角为45度。

6. 根据权利要求4所述的一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统, 其特征在于, 所述钛宝石飞秒激光器发出脉冲光, 泵浦所述光子晶体光纤产生超连续谱, 经过所述第一反射镜、所述第一二向色分光镜以及所述第二反射镜后, 并经所述第一滤光片产生第一激发光源, 经所述第二滤光片产生第二激发光源; 所述第一激发光源经过所述第三反射镜至所述第二二向色分光镜, 并与所述第二激发光源经所述第二二向色分光镜, 传输至所述光学扫描器; 所述光学扫描器输出的光信号经所述第三反射镜以及所述显微物镜到达所述微流芯片表面, 激发产生内源性多光子信号; 所述内源性多光子信号经过所述显微物镜以及所述第三二色分光镜, 并经所述第三滤光片分离后, 将分离出的光信号入射到所述反射光栅; 所述反射光栅把光信号按两波段分开并导向所述光电倍增管阵列进行探测, 对细胞源的Tryptophan和NADH进行高分辨成像。

7. 根据权利要求6所述的一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统, 其特征在于, 所述钛宝石飞秒激光器发出脉冲光为波长为800 nm的脉冲光; 所述第一激发光源的波长为700 nm, 所述第二激发光源的波长为600 nm。

8. 根据权利要求4所述的一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统, 其特征在于, 所述光子晶体光纤的长度为12.5厘米, NL-1.4-775; 所述钛宝石飞秒激光器为高重复频率的超短脉冲激光器, 频率为80 MHz, 超短脉冲为140 fs, 波长范围为680nm至1080 nm, 输出功率为3.5 W。

9. 根据权利要求4所述的一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统, 其特征在于, 所述第一滤光片为一700nm带通滤光片, 其通过波段为 700 ± 20 nm; 所述第二滤光片为一600nm带通滤光片, 其通过波段为 600 ± 20 nm; 所述第三滤光片为一500 nm短通滤光片, 其通过波段为300-500 nm; 所述第一二向色分光镜至所述第三二色分光镜均为长通二向色分光镜, 其反射低于650 nm 波长的光, 而高透射高于650 nm波长的光; 所述反射光栅能够将光信号按不同波段分开, 间隔4 nm, 以用于分光; 所述光电倍增管阵列由50个光电倍增管组成, 探测的波长范围300nm至500 nm。

一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于多光子显微技术与微流控芯片技术相结合的高通量筛选系统。

背景技术

[0002] 众所周知,灌注式细胞培养技术是将细胞培养在流动环境中,通过外部流体灌注装置为细胞连续提供新鲜的培养液并移除代谢产物,减少培养液的手工更换步骤,保证细胞培养环境的稳定性和无菌状态,具有很多优势。另外,微流控芯片技术能把生物、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,具有分析速度快、试剂消耗少、易于集成和高通量分析等诸多优点,已成为大规模高通量药物筛选的实验和检测技术平台。将灌注式细胞培养技术与微流控技术相结合,构建药物筛查的细胞微系统平台是目前的研究热点。

[0003] 目前,细胞微系统平台评价药物响应主要是靠生化检验。然而,生化检验是有创,不能实现动态实时监测。发展无创,可实时动态监测的手段对药物开发具有重要的意义。近年来,光学显微技术由于具有无创、简单、快速、高效等优点已在生物医学中得到越来越广泛的应用。特别是多光子显微技术,它是利用激光与组织内在成分相互作用发生的双光子激发荧光,能实现对细胞源的还原吡啶核苷酸(NADH)和色氨酸(Tryptophan)的高分辨成像【细胞源的NADH和Tryptophan跟细胞的新陈代谢和微环境相关】,实现对细胞的形态、新陈代谢和微环境等变化信息的提取和可视化。

[0004] 因此,发展一种基于多光子显微技术与微流控芯片技术相结合的高通量筛选系统,能为药物毒性监测提供了一种快速、非标记、无创、可靠、高通量的新方法和新技术,对制药业具有重大的价值。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统,以克服现有技术中存在的缺陷。

[0006] 为实现上述目的,本发明的技术方案是:一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统,包括一灌注培养单元以及一对该灌注培养单元进行成像的激发光源成像单元;通过所述激发光源成像单元激发光源,该激发光源与所述灌注培养单元的细胞相互作用产生内源性的多光子信号,所述激发光源成像单元通过该多光子信号进行高分辨成像。

[0007] 在本发明一实施例中,所述灌注培养单元包括:注射泵、第一微流体连接器、氧合器、第二微流体连接器、微泡清除器、第三微流体连接器、微流芯片、第四微流体连接器以及培养基存储器;所述注射泵经所述第一微流体连接器与所述氧合器一端连接;所述氧合器另一端经所述第二微流体连接器与所述微泡清除器一端连接;所述微泡清除器另一端经所述第三微流体连接器与所述微流芯片一端连接;所述微流芯片的另一端经所述第四微流体

连接器与所述培养基存储器相连。

[0008] 在本发明一实施例中,所述微流芯片包括三对微孔,每对微孔都具有一个入口和一个出口。在本发明一实施例中,所述激发光源成像单元包括沿光路设置的钛宝石飞秒激光器、光子晶体光纤、第一反射镜、第一二向色分光镜、第二反射镜、第一滤光片、第二滤光片、第三反射镜、第二二向色分光镜、光学扫描器件、第四反射镜、与所述微流芯片配合的显微物镜、第三二向色分光镜、第三滤光片、反射光栅以及光电倍增管阵列。

[0009] 在本发明一实施例中,所述第一反射镜与经所述光子晶体光纤产生的光路夹角为45度;所述第一二向色分光镜与经所述第一反射镜反射后的光路的夹角为45度;所述第二反射镜与经所述第一二向色分光镜后的一光路的夹角为45度;所述第三反射镜与经所述第一二向色分光镜后的另一光路的夹角为45度;所述第二二向色分光镜与经所述第二反射镜反射后的光路的夹角为45度;所述第三二向色分光镜与经所述第三反射镜反射后的光路的夹角为45度;所述第一滤光片设置于所述第一二向色分光镜以及所述第三反射镜之间;所述第二滤光片设置于所述第二反射镜与所述第二二向色分光镜之间;所述光学扫描器件设置于所述第二二向色分光镜以及所述第四反射镜之间;所述第四反射镜与经所述光学扫描器件产生的光路的夹角为45度;所述第三二向色分光镜与经所述显微物镜产生的光路的夹角为45度;所述反射光栅与经所述第三二向色分光镜后的光路的夹角为45度。

[0010] 在本发明一实施例中,所述钛宝石飞秒激光器发出脉冲光,泵浦所述光子晶体光纤产生超连续谱,经过所述第一反射镜、所述第一二向色分光镜以及所述第二反射镜后,并经所述第一滤光片产生第一激发光源,经所述第二滤光片产生第二激发光源;所述第一激发光源经过所述第三反射镜至所述第二二向色分光镜,并与所述第二激发光源经第二二向色分光镜,传输至所述光学扫描器;所述光学扫描器输出的光信号经所述第三反射镜以及所述显微物镜到达所述微流芯片表面,激发产生内源性多光子信号;所述内源性多光子信号经过所述显微物镜以及所述第三二色分光镜,并经所述第三滤光片分离后,将分离出的光信号入射到所述反射光栅;所述反射光栅把光信号按两波段分开并导向所述光电倍增管阵列进行探测,对细胞源的Tryptophan和NADH进行高分辨成像。

[0011] 在本发明一实施例中,所述钛宝石飞秒激光器发出脉冲光为波长为800 nm的脉冲光;所述第一激发光源的波长为700 nm,所述第二激发光源的波长为600 nm。

[0012] 在本发明一实施例中,所述光子晶体光纤的长度为12.5厘米,NL-1.4-775;所述钛宝石飞秒激光器为高重复频率的超短脉冲激光器,频率为80 MHz,超短脉冲为140 fs,波长范围为680nm至1080 nm,输出功率为3.5 W。

[0013] 在本发明一实施例中,所述第一滤光片为一700nm带通滤光片,其通过波段为700 $\pm$ 20 nm;所述第二滤光片为一600nm带通滤光片,其通过波段为600 $\pm$ 20 nm;所述第三滤光片为一500 nm短通滤光片,其通过波段为300-500 nm;所述第一二向色分光镜至所述第三二色分光镜均为长通二向色分光镜,其反射低于650 nm 波长的光,而高透射高于650 nm波长的光;所述反射光栅能够将光信号按不同波段分开,间隔4 nm,以用于分光;所述光电倍增管阵列由50个光电倍增管组成,探测的波长范围300nm至500 nm。

[0014] 相较于现有技术,本发明具有以下有益效果:本发明所提出的一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统,基于微流控技术的灌注式细胞培养芯片单元将细胞培养在流动环境中,通过外部流体灌注装置为细胞连续提供新鲜的培养液并移除代谢产

物,减少培养液的手工更换步骤,保证细胞培养环境的稳定性和无菌状态,同时具有微型化、高通量等优点;利用飞秒激光泵浦光子晶体光纤产生的超连续谱,成功分离出600 nm和700 nm 的两束激发光源;激发光源与灌注培养单元的细胞相互作用产生内源性的多光子信号对细胞源的Tryptophan和NADH的高分辨成像,实现细胞的形态、新陈代谢和微环境等变化信息的提取和可视化;基于多光子显微技术与微流控芯片技术相结合的高通量筛选系统为抗癌药物毒性监测提供了一种快速、非标记、无创、可靠、高通量的新方法和新技术,对制药业具有重大的价值。本发明设计合理,构思巧妙,具有广阔的发展前景和较大的推广意义。

附图说明

[0015] 图1为本发明中基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统的系统连接示意图。

具体实施方式

[0016] 下面结合附图,对本发明的技术方案进行具体说明。

[0017] 本发明提供一种基于多光子显微与微流控芯片技术的高通量筛选系统的系统,基于微流控技术的灌注式细胞培养芯片单元将细胞培养在流动环境中,通过外部流体灌注装置为细胞连续提供新鲜的培养液并移除代谢产物,减少培养液的手工更换步骤,保证细胞培养环境的稳定性和无菌状态;利用飞秒激光泵浦光子晶体光纤产生的超连续谱,成功分离出600 nm 和700 nm 的两束激发光源;激发光源与灌注培养单元的细胞相互作用产生内源性的多光子信号对细胞源的Tryptophan和NADH的高分辨成像,实现细胞的形态、新陈代谢和微环境等变化信息的提取和可视化。

[0018] 进一步的,如图1所示,该基于多光子显微技术与微流控芯片技术相结合的高通量筛选系统包括注射泵1、第一微流体连接器2、氧合器3、第二微流体连接器4、微泡清除器5、第三微流体连接器6、微流芯片7、第四微流体连接器8、培养基存储器9、钛宝石飞秒激光器10、光子晶体光纤11,第一反射镜12、第一二向色分光镜13、第二反射镜14、第一滤光片15、第二滤光片16、第三反射镜17、第二二向色分光镜18、光学扫描器件19、第四反射镜20、显微物镜21、第三二向色分光镜22、第三滤光片23、反射光栅24、光电倍增管阵列25。

[0019] 进一步的,注射泵1经第一微流体连接器2与氧合器3连接,氧合器3再通过第二微流体连接器4与微泡清除器5连接,微泡清除器5再通过第三微流体连接器6与微流芯片7连接,微芯片7的另一端再通过第四微流体连接器8与培养基存储器9相接,形成了灌注培养单元。

[0020] 进一步的,钛宝石飞秒激光器10发出波长为800 nm的近红外超短脉冲光泵浦光子晶体光纤11产生的超连续谱经过第一反射镜12、第一二向色分光镜13、第二反射镜14、第一滤光片15和第二滤光片16形成600 nm和700 nm的两种激发光源,两束激发光再经过第三反射镜17、第二二向色分光镜18、光学扫描器19、第三反射镜20、显微物镜21到达微芯片7表面,激发产生内源性多光子信号,所述光信号经过显微物镜21、第三二色分光镜22到达第三滤光片23,滤光片23分离出的光信号入射到反射光栅24,所述反射光栅24把光信号按两波段分开并导向光电倍增管阵列25进行探测,对细胞源的Tryptophan(300-400 nm)和NADH

(400–500 nm)的高分辨成像,实现细胞的形态、新陈代谢和微环境等变化信息的提取和可视化。

[0021] 进一步的,微流芯片包括三对微孔,每对微孔都具有一个入口和一个出口。

[0022] 进一步的,光子晶体光纤的长度为12.5厘米,NL-1.4-775。钛宝石锁模飞秒激光器为高重复频率的超短脉冲激光器,频率达80 MHz,超短脉冲为140 fs,波长范围为680–1080 nm,输出功率为3.5 W。

[0023] 进一步的,第一滤光片为一个700nm带通滤光片,其通过波段为 700 ± 20 nm;第二滤光片为一个600nm带通滤光片,其通过波段为 600 ± 20 nm;第三滤光片为一个500 nm短通滤光片,其通过波段为300–500 nm;二向色分光镜均为长通二向色分光镜,其反射低于650 nm 波长的光而高透射高于650 nm波长的光;反射光栅是一个高质量的反射光栅,起分光作用,能够把光信号按不同波段分开,间隔4 nm;光电倍增管阵列由50个光电倍增管组成,探测的波长范围300–500 nm。

[0024] 以上是本发明的较佳实施例,凡依本发明技术方案所作的改变,所产生的功能作用未超出本发明技术方案的范围时,均属于本发明的保护范围。

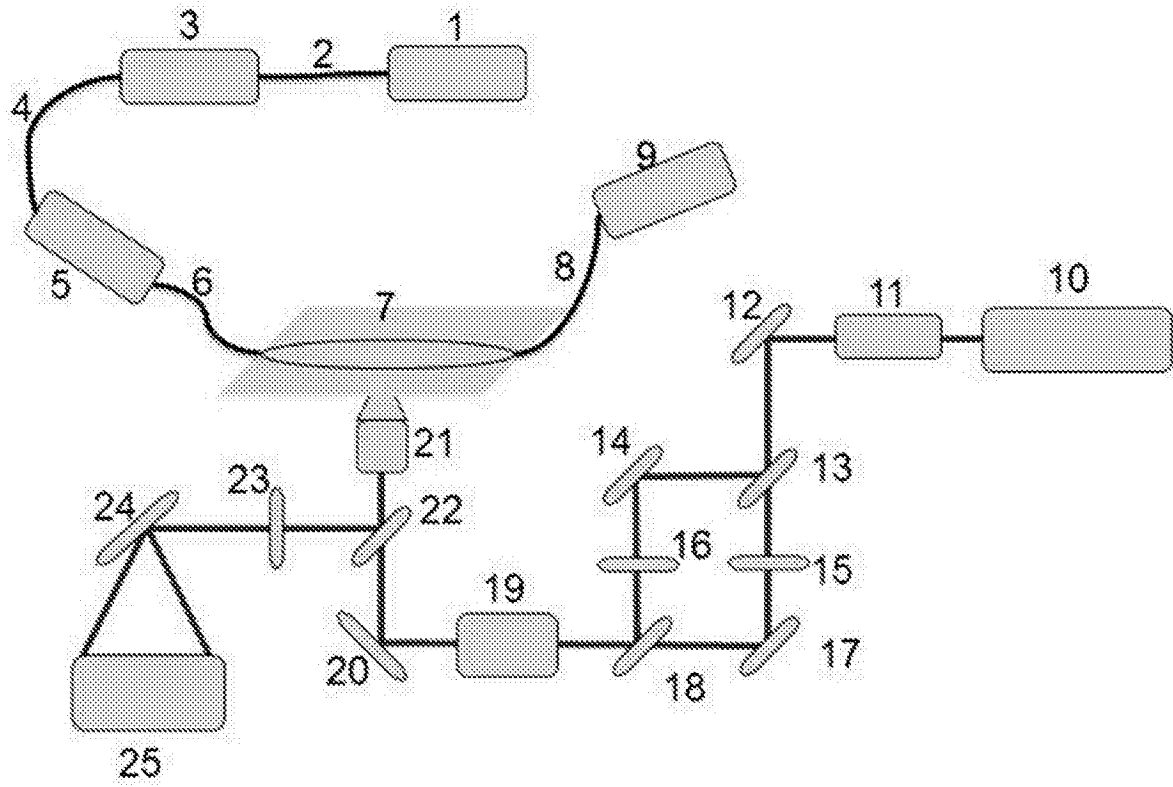


图1