

基于微流控芯片技术的流式细胞仪上样前细胞总量质控仪的研制

高跃东¹, 吴旭东², 李剑¹, 姚沁², 马国兰¹

(1.中国科学院昆明动物研究所公共技术中心, 云南昆明 650223; 2.江苏卓微生物技术有限公司, 江苏常州 213000)

摘要: 流式细胞仪的故障率较高成为其使用过程的重要风险, 这些故障中 80%都是因为样本处理不当或样本结团率、碎片率过高引起的流动室堵塞的问题。本文介绍了针对流式细胞仪上样前细胞总量质控仪的研发, 通过基于微流控芯片技术研发自动化上样及检测装置, 配套流式细胞仪大型设备, 完成细胞的总量快速质控。对细胞总数、细胞碎片、细胞结团情况形成可与流式细胞仪完全匹配的结果分析, 避免细胞结团, 碎片等样本不合理造成流式细胞仪的堵塞及其他使用不当的损坏。

关键词: 流式细胞仪;微流控芯片;细胞总量质控

Development of a Quality Control Instrument for Total Cells before Sample Loading by Flow Cytometer Based on Microfluidic Chip Technology

Gao Yuedong¹, Wu Xudong², Li Jian¹, Yao Qin², Ma Guolan¹

(1. Institutional Center for Shared Technologies and Facilities of Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Yunnan, Kunming, 650223. 2. Jiangsu Jimbio Technology Co., Ltd. Jiansu, Chanzhou, 213000)

Abstract: The high risk of maintain the flowcytometer system relies on the block in the flow chamber caused by high sample aggregation rate or debris rate because of their improper handling of the sample. This article demonstrates the research of the cellular sample quality assess instrument before detected by a flowcytometer. This quality assess instrument is developed based on the microfluidic technology to carry out the detection of cell quantity, cell viability, sample debris rate and cellular aggregation rate. The results of the instruments will provide helpful information to evaluate if the sample is proper to be taken into flowcytometer therefore the block or other related flowcytometer dysfunction can be avoid.

Keywords: Flow cytometry; Microfluidic chip; Quality Control of Total Cells

1 引言

流式细胞仪 (Flow Cytometer) 是集细胞与分子生物学、流体力学、激光技术、光电子技术、计算机技术、细胞荧光化学技术、单克隆抗体技术为一体的高科技仪器, 是细胞学研究和相关诊断检测的核心仪器平台, 主要用于细胞凋亡、细胞周期、DNA 倍性分析、

借助于荧光染料进行细胞内蛋白质和核酸的定量研究、快速进行细胞分选，免疫功能研究各种干细胞、癌症病人的多耐药性、细胞功能及代谢动力学研究、血小板分析等等。流式细胞仪的故障率较高成为其使用过程的重要风险，这些故障中 80%都是因为样本处理不当或样本结团率、碎片率过高引起的流动室堵塞的问题。

针对流式细胞仪上样前细胞质控，本文介绍了基于微流控技术的细胞总量质控仪的研发，应用于所有流式应用场景的标本上样前质控，有效对样本中的碎片、杂质、团块进行分析，减少流式细胞仪流动室堵塞风险的同时，确保流式细胞仪高效准确地分析和分选。亦可用于其他仪器的细胞样品的上样质控，如细胞能量代谢分析仪、单细胞制备系统等等。

通过微流控芯片实现流式细胞仪聚焦流动检测^[1]，实现 10 μ L 样本的全样本电阻抗检测，可以对于细胞总数、细胞碎片、细胞结团情况形成可与流式细胞仪完全匹配的结果分析。微流控芯片作为反应的载体，针对不同的检测内容，分别设计及实现流动过程中的样本平铺，流动过程中样本的排队聚焦，流动过程中阻抗的高灵敏度检测等，特别是根据样本的具体情况，进行不同浓度、不同浊度、不同检测方案的自动调节控制，保证样本的检测通量同时完成快速检测。

设计微流控芯片上阻抗脉冲传感检测设备，在阻抗脉冲传感检测方面，设计 DC/AC 电场环境下的生物颗粒的阻抗-频谱图^{[2][3]}，另外，设计不同孔径的微流控芯片检测模块，通过生物样本通过孔径发生的形变导致的表面电荷的重新排布，从而检测到同一生物样本中的不同状态，捕捉大小、形状及活性等信息。

2 系统设计及开发

2.1 基于微流控芯片的微颗粒阻抗检测技术

基于微流控的微颗粒芯片检测包括阻抗检测、图像形态学检测和生物荧光检测。在阻抗脉冲传感检测方面，设计 DC/AC 电场环境下的细胞的阻抗-频谱图，另外，设计不同孔径的微流控芯片检测模块，通过生物样本通过孔径发生的形变导致的表面电荷的重新排布，从而检测到同一生物样本中的不同状态，捕捉大小、形状及活性等信息。在阻抗检测方面，本项目组采用差分与锁相放大相结合的放大方式^[4]，利用差分放大器的高共模抑制比的特点，使得该区域内的噪声干扰等共模信号得到极大的抑制，从而使得样本引起的阻抗变化带来的差模信号得到有效检测。

在检测方案中（图1）， V_+ 和 V_- 分别为加在芯片两端的偏置电压。该偏置电压可能为直流信号，也可能为交流信号。样本流经的检测过程中引起检测通道的阻抗变化，而检测通道两端分别连接信号采集通道，通道一段分别于检测电极相连。

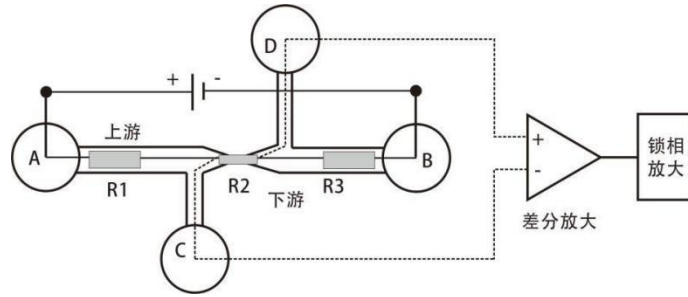


图1 差分放大检测方式

在样本流经检测通道的过程中，其微观局部结构如图 2（A）所示，因此，样本流经检测通道的等效电路如图 2（B）所示。在图 2（B）中，R1、R2 分别代表微流通道进口端与出口端通道的等效电阻，Rm 代表检测通道无样本时的电阻参数，阻抗 ΔZ 代表样本在该区域时的阻抗变化。

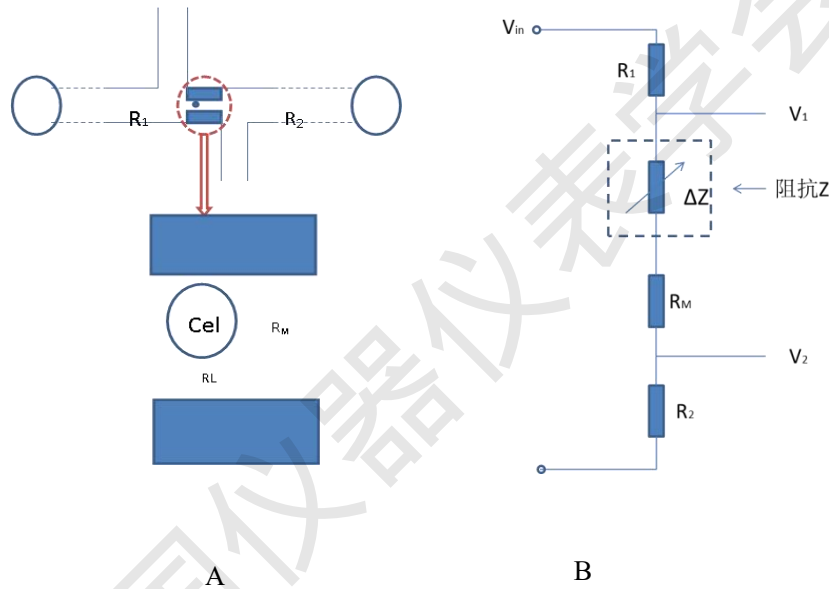


图2 微流控阻抗检测模型

2.2 AC 电场下样本阻抗变化的检测

在角频率为 ω 的AC 电场下，根据图，可以分别得到V1、V2 点的计算公式：

$$\frac{V_1}{V_{in}} = \frac{(R_L + R_2 + R_M) + j\omega CR_L(R_2 + R_M)}{(R_L + R_1 + R_2 + R_M) + j\omega CR_L(R_1 + R_2 + R_M)} \quad (1)$$

$$\frac{V_2}{V_{in}} = \frac{R_2 + j\omega CR_L R_2}{(R_L + R_1 + R_2 + R_M) + j\omega CR_L(R_1 + R_2 + R_M)} \quad (2)$$

其中， $j^2 = -1$ 则差分放大的输出信号 V_{out} 为：

$$V_{out} = V_1 - V_2 = V_{in} \frac{(R_L + R_M) + j\omega CR_L R_M}{(R_L + R_1 + R_2 + R_M) + j\omega CR_L(R_1 + R_2 + R_M)} \quad (3)$$

在实际实验中，我们可以设计芯片，使得 $R_1 = R_2 \gg R_M$ ，且样本引起阻抗变化中电阻

的值可认为远远小于 R_2 ，因此， $R_2 \gg R_L$ ，公式 3 可进一步简化可以得到：

$$V_{out} \approx \frac{V_{in} (R_L + R_M) + j\omega CR_L R_M}{2 R_2 + j\omega CR_L R_2} \quad (4)$$

我们可以得到相位的变化：

$$\Phi(\omega) = \tan^{-1} \frac{\omega CR_L R_M}{(R_L + R_M)} - \tan^{-1} \omega CR_L \quad (5)$$

因此，我们可以得到阻抗的变化在差分放大后的输出：

$$V_{out} = \frac{V_{in}}{2} \sqrt{\frac{(R_L + R_M)^2 + (\omega CR_L R_M)^2}{R_2^2 + (\omega CR_L R_2)^2}} (\cos \Phi(\omega) + j \sin \Phi(\omega)) \quad (6)$$

根据公式 6，我们可以得出结论，如果样本通过狭窄通道形成了阻抗的变化，则差分放大器的输出 V_{out} 及相位 $\Phi(\omega)$ 会发生变化，通过公式 6，我们可以将实际检测到的信号为：

$$V_{out} = \frac{V_{in}}{2} f(R_L, C) (\cos \omega t - \Phi(\omega)) \quad (7)$$

其中，

$$f(R_L, C) = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{(R_L + R_M)^2 + (\omega CR_L R_M)^2}{R_2^2 + (\omega CR_L R_2)^2}} \quad (8)$$

同时，根据公式 8，如果 $R_M \gg R_L$ 的话，相位变化基本为零，则意味着狭窄通道的电阻值不能太大，否则在相位方面我们无法得到有效的结果。因此可以得出结论，在芯片设计中，狭窄检测通道的物理尺寸应该尽量实现小电阻的效果，即长度不能太长，而宽度和高度可以适当增大。差分放大信号输出 V_{out} 在经过两个相差 90 度相位的锁相放大器检测，该系统输出为：

$$Z = R - jX \quad (9)$$

在样本没有进入狭窄检测通道的条件下， V_{out} 的输出为：

$$V_{out} = V_{in} \frac{R_M}{R_1 + R_2 + R_M} \quad (10)$$

如果输入 V_{in} 为一正弦交流电压信号： $V_{in} = A \cos \omega t$ ， A 为输入信号的振幅， ω 为输入信号的角频率。假设其同位参考信号和正交的参考信号分别为： $V_{ref1} = B \cos \omega t$ ， $V_{ref2} = B \cos(\omega t - \pi/2)$ ，其中 B 为参考信号的振幅。

则理想状态下锁相放大的系统输出为：

$$\begin{cases} R=V_{out}V_{ref1} \\ X=V_{out}V_{ref2} \end{cases} \quad (11)$$

通过计算得到:

$$R = kAB \frac{\cos 2\omega t + \cos 0}{2} = \frac{k}{2} AB + \frac{kAB \cos 2\omega t}{2}$$

$$X = kAB \frac{\cos \pi/2 + \cos(2\omega t - \pi/2)}{2} = \frac{kAB \cos(2\omega t - \pi/2)}{2} \quad (12)$$

其中, $k = R_M / (R_1 + R_2 + R_M)$ 。

根据公式 12, 由于检测系统的低通滤波将 $2\omega t$ 部分的频率滤除, 因此, 在整个系统的输出 Z 为:

$$R = \frac{k}{2} AB$$

$$X = 0 \quad (13)$$

则 $Z = kAB/2$ 。

而当样本通过检测区域过程中, 根据公式 19 和公式 23, 得到的锁相放大系统输出为:

$$R = \frac{k}{2} AB \cos \Phi(\omega)$$

$$X = \frac{k}{2} AB \cos(\pi/2 + \Phi(\omega)) \quad (14)$$

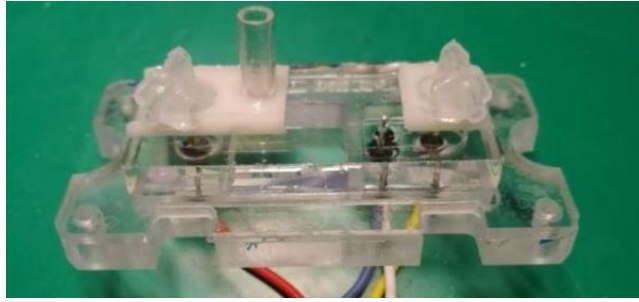
因此, 当系统中可以检测到样本通过狭窄检测通道时, 锁相放大的两个 90 度相位差输出上面会检测到信号。

通过计算, 在交流电场下, 该系统具备了检测细胞大小及总量的能力。

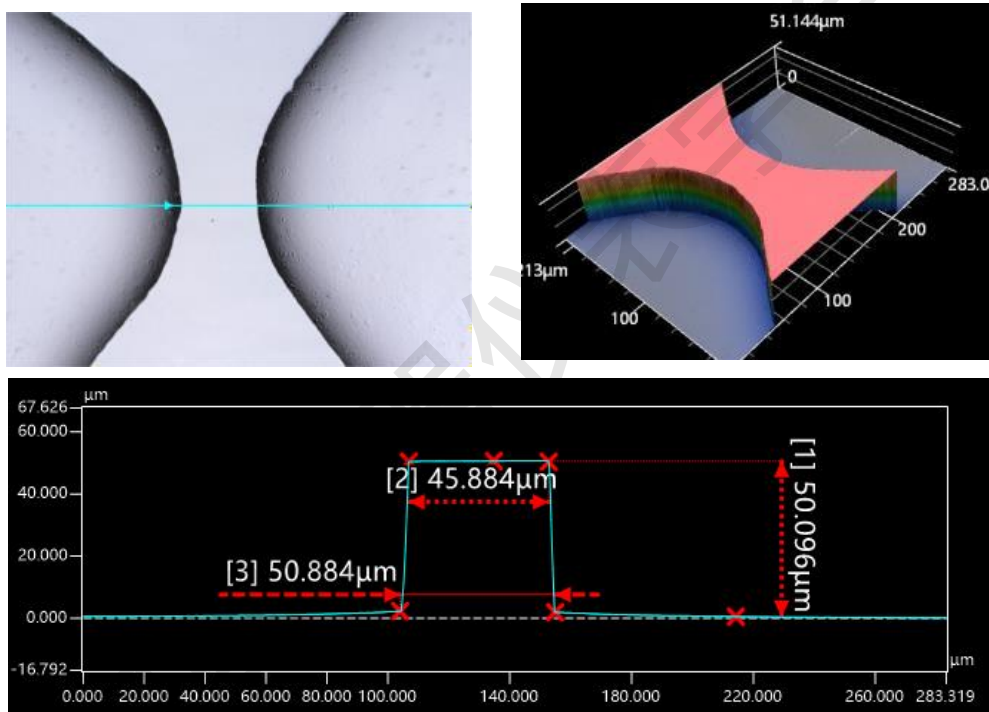
2.3 微流控芯片工艺技术

在阻抗及图像检测方面, 微流控芯片作为反应的载体, 针对不同的检测内容, 分别设计及实现流动过程中的样本平铺, 流动过程中样本的排队聚焦, 流动过程中阻抗的高灵敏度检测等, 特别是根据样本的具体情况, 进行不同浓度、不同浊度、不同检测方案的自动调节控制, 保证样本的检测通量同时完成快速检测。在微流控成型工艺方面, 考虑到检测过程的自动化需求, 在微流控芯片上预置反应体系, 涉及到大量的高分子材料-生物界面的相互作用问题, 涉及到高分子材料本身的低成本成型问题。由于 PDMS 材料的通透性, 不适用于长时间存储反应体系, 也不适用于大规模的成型工艺, 因此, 选择热塑或热固型高分子材料进行工艺技术的研发、贴合及反应体系的加载^[5]。

芯片实物如图所示：

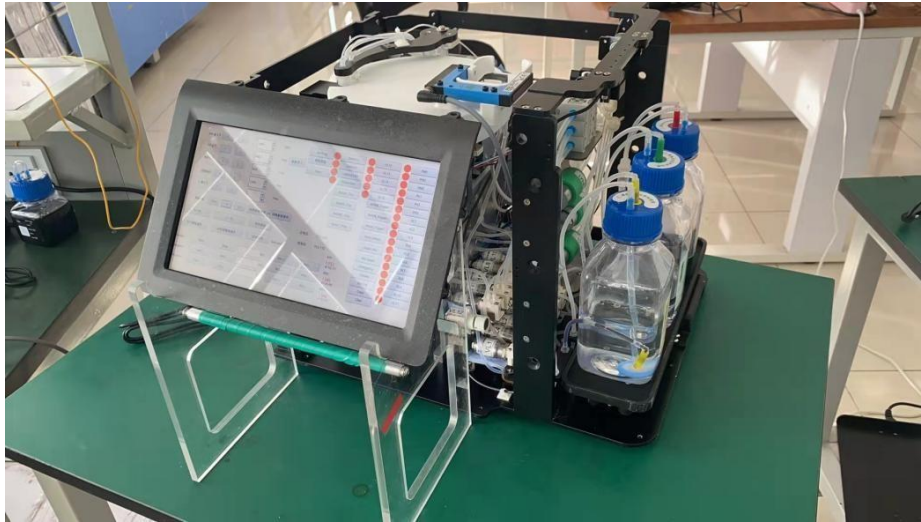


芯片核心结构测量尺寸如图所示，核心通道测量结果为 45×50 微米²：



2.4 设备组装

项目组完成了设备的搭建包括了流体控制模块，液量监测模块，细胞学阻抗与图形分析方法及显示模块，图像检测算法，台盼蓝自动染色模块和高通量细胞加载模块等。设备实验整机如图所示：



流体控制模块实现了鞘液、清洗液和废液的流动控制，采用高精度比例阀进行压力调节，压力调节范围：正压0-100kapa，负压-100kpa~0kpa；压力调节精度：0.1kpa；压力响应速度 ≥ 5 kpa/秒；

：结果显示屏幕 10 寸；控制方法是电容性触摸屏；图像操控包括放大、拖放、播放等功能；库尔特算法精度是 1 微米；库尔特算法显示范围 3~30 微米；数据库采用 sql 数据库。

软件界面如下图所示：

样本名	序号	日期	总浓度	活率	结团率	平均粒径	台胞量	全选
	A1	2020/08/05 08:52	0.00E+00	-	0.00%	0.00		<input type="checkbox"/>
	A6	2020/07/23 17:40	3.56E+06	99.64%	21.14%	12.55	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	A5	2020/07/23 17:40	3.59E+06	-	21.86%	12.74	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	A4	2020/07/23 17:40	3.75E+06	99.73%	22.02%	12.18	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	A3	2020/07/23 17:40	3.55E+06	-	17.98%	12.88	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	A2	2020/07/23 17:40	3.70E+06	99.93%	22.42%	12.73	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	A1	2020/07/23 17:40	3.78E+06	-	20.36%	12.78	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	-		-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	A4	2020/07/23 12:21	4.01E+06	99.85%	1.47%	12.11	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	A3	2020/07/23 12:21	3.64E+06	-	1.53%	12.29	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	A2	2020/07/23 12:21	3.87E+06	-	1.29%	12.32	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	A1	2020/07/23 12:21	4.02E+06	-	0.00%	12.23	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

(a)



(b)

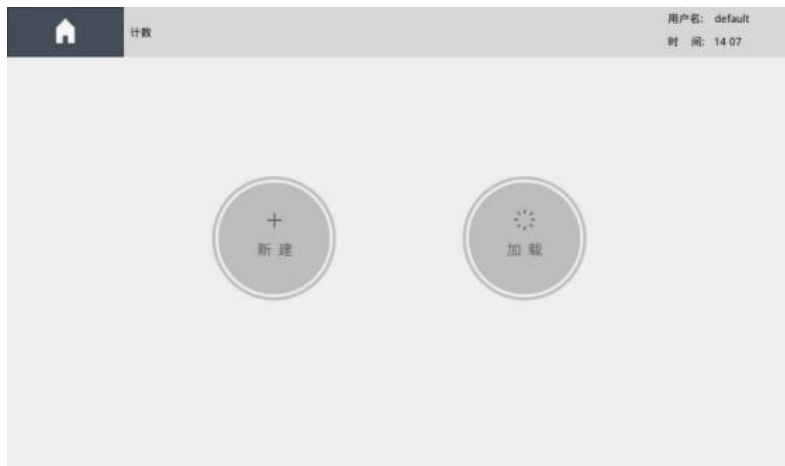


(c)

3 实验设计及测试

设备的粒径检测范围、细胞检测的稳定性、细胞检测的稳定性及高通量检测是本设备的核心指标。

仪器开机自检结束后，进入计数界面，加样过程如图所示，点击“新建”按钮，进入加样界面进行加样：



加样上盖自动打开，取20 微升混匀后的待测样本，移液器垂直插入加样孔，缓慢打入样本，提出移液器后再松开拇指，防止样本倒吸；每加一个样本，仪器自动进样到下一个孔进行加样；加样过程中或加样完成后均可对检测相关参数及样本名进行设置更改；孔位编号后面的绿色和红色图标代表已完成加样孔和待加样孔，点击完成按钮开始检测。



为了检验设备最小阻抗的灵敏度，对4微米的校准颗粒进行测试，测试结果直方图如图所示，细胞测试结果如图所示。





粒径范围 $10e4 \sim 10e7$ 个每毫升，测试结果如图所示：

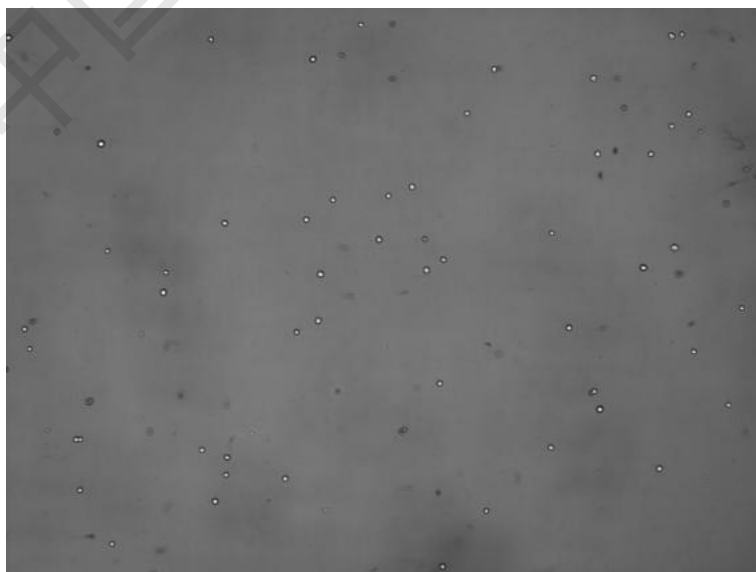
历史 时间: 22:34

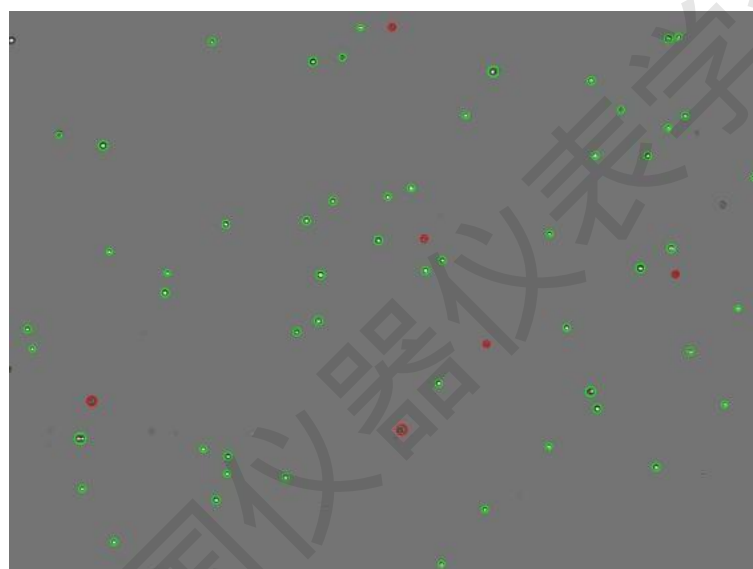
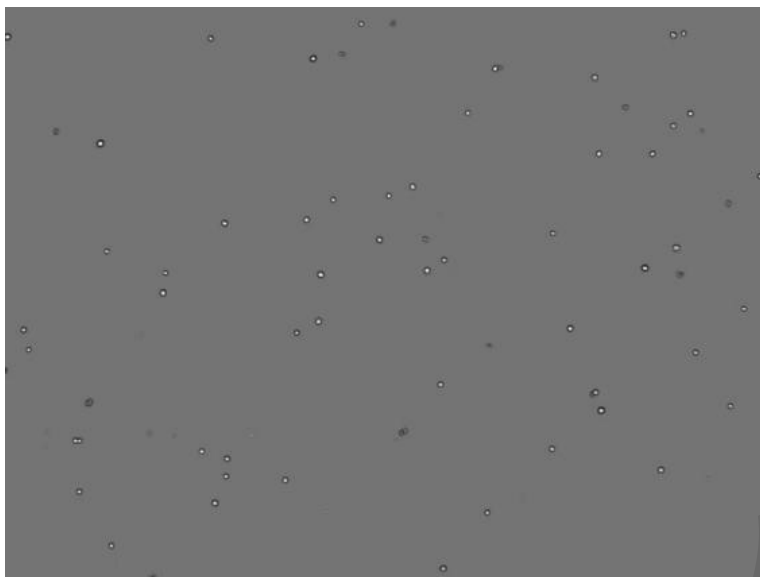
检测日期: 2022-08-19

时间	样本数	样本名
11:12:08	2	
11:06:20	2	
10:34:20	5	

样本名	序号	总浓度	活率	结团率	平均粒径	全选
	2	1.02E+04	96.15%	0.00%	14.02	<input type="checkbox"/>
	1	1.18E+08	96.68%	89.08%	13.32	<input type="checkbox"/>

图像算法实际效果：





设备检测重复性：5%以内，实验结果为（单位 个每毫升）：2.65e6、2.78e6、

日期:	2022-08-19	时间:	22:54	样本名	序号	总浓度	活率	结团率	平均粒径	全选
					5	2.64E+06	98.23%	2.15%	12.60	<input type="checkbox"/>
					4	2.89E+06	91.19%	3.54%	12.16	<input type="checkbox"/>
					3	2.72E+06	93.83%	1.49%	12.41	<input type="checkbox"/>
					2	2.78E+06	99.22%	2.49%	12.85	<input type="checkbox"/>
					1	2.65E+06	97.92%	3.00%	12.38	<input type="checkbox"/>

2.72e6、2.89e6、2.64e6；重复性达到3.77%

4 结果分析及讨论

根据以上现场测试结果，得出结论，流式样前质控仪达到了研发指标要求，重复达到了 5%以内，随着细胞治疗以及细胞学基础应用的研究发展，该设备在各类细胞质控方面具备了较好的应用前景。

参考文献：

- [1] J. Micromech. Microeng. 21 (2011) doi:10.1088/0960-1317/21/8/085019
- [2] Journal of Colloid and Interface Science 416 (2014) 101–104
- [3] X.Wu, Y.Kang, Y.Wang,D.Li;Electrophoresis 2008, 29, 2754–2759
- [4] X.Wu, Chan.Chon, Y.Wang,D.Li; Lab Chip, 2008, 8, 1943–1949 | 1943
- [5] J.Wang,X.Wu,Tanja Gonska, D.Li;Meas. Sci. Technol. 23 (2012) 025701