

流式细胞仪样品预处理系统的设计与实现

刘佳琳, 刘萍, 周娜, 吴学丽, 栾传磊

(中国科学院烟台海岸带研究所 公共技术中心, 山东 烟台 264000)

摘要: 该项目根据流式细胞仪对样品“均一化”的需求, 研制了一套基于微流控芯片细胞分选技术的流式细胞仪样品预处理系统, 该装置可以实现对粒径小于 100 μm 细胞或微粒的驱动和分选。该系统主要包含微流控分选芯片和样品驱动模块两部分, 通过聚焦位置不同, 实现了对不同粒径细胞/颗粒的有效分离。该装置无需对细胞进行标记处理, 分选的细胞便于后续流式细胞仪检测。经验证, 该系统能够有效去除牡蛎血淋巴细胞样品中的大粒子杂质, 提高细胞样品的稳定性和均一性, 增加流式细胞仪检测结果的准确性。

关键字: 流式细胞仪; 样品预处理; 微流控芯片; 细胞分选

Design and Implementation of Sample Preprocessing System for Flow Cytometer

Liu Jialin, Liu Ping, Zhou Na, Wu Xueli, Luan Chuanlei

(Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264000, China)

Abstract: This design developed a flow cytometer sample pretreatment system based on microfluidic chip cell sorting technology to meet the demand for sample "homogenization" in flow cytometers. The device can realize the driving and sorting of cells or particles less than 100 μm . The system mainly consists of two parts: a microfluidic sorting chip and a sample driving module. By focusing at different positions, it achieves effective separation of cells/particles with different particle sizes. The system does not require labeling of cells, and the selected cells are convenient for subsequent flow cytometry detection. After verification, this system can effectively remove large particle impurities in oyster blood lymphocyte samples, improve the stability and uniformity of cell samples, and increase the accuracy of flow cytometry detection results.

Keywords: flow cytometers; sample preprocessing; microfluidic chip; cell sorting

1 引言

流式细胞仪是一种用于单个细胞多参数快速分析的先进仪器,能对处在快速直线流动状态中的单细胞或生物颗粒进行多参数的、快速的定量分析和分选。样品中的悬浮颗粒在鞘液的包被下呈单行排列,依次流经检测区域。在检测区,激光束照射在颗粒上,由于颗粒大小和内部结构等的差异发出前向角散射光(forward scatter light, FSC)和侧向角散射光(side scatter light, SSC),FSC 与被测颗粒的直径密切相关,基本上可表征颗粒的大小;而 SSC 受颗粒的内部结构如细胞质折射率、细胞器等影响重大,反映的是细胞的复杂程度;同时,颗粒荧光物质在激光的激发下能发出不同颜色的荧光,这些荧光信号的强弱代表了细胞颗粒内含有相关荧光物质的浓度。这些信号通过光电转换器转变成电信号被送往计算机分析系统,通过这些表征颗粒不同性质的光信号就可将不同类型的颗粒区分开来^[1-2]。

由于流式细胞仪的工作原理是利用激光照射到单个细胞上产生信号的变化来分析数据,所以样品的稳定性和均一性能够影响流式细胞仪数据获取的准确性。样品的处理是获得理想的流式细胞仪检测结果的关键步骤,传统的前处理方式是选用孔目数 200-300 目的尼龙筛网在检测样品之前对样品进行过滤,采用传统方式前处理的样品上机检测易出现如下问题:首先,流式细胞仪的“单细胞”分析特性,要求细胞样品必须分散成单细胞状态。由于筛网难以完全去除样品中的黏连细胞,在上样检测过程中黏连细胞会造成双细胞或多细胞复合物“污染”,从而会误导对单细胞数据的分析。其次,细胞样品由于自身的细胞多样性,容易导致在散点图中细胞分布范围太广,SSC-A 及 FSC-A 的变异系数(Coefficient of Variation, CV)值较大(流式细胞仪常用 CV 值来表示数据的可信度。CV 和标准差相关,代表的是一组数据中的分布,分布的越散, CV 越大,数据可信度越低;数值越集中, CV 就越小,数据可信度越高)。尤其在分析海洋贝类动物细胞时,由于筛网难以有效去除样品中主流细胞以外的粒径较大的细胞,散点图中细胞“全屏分布”的现象更明显,从而降低样品检测的准确性。

微流控芯片是一种在微米尺度空间内对流体进行操控的技术,它将复杂的微通道结构集成于面积很小的芯片上,实现生物、化学分析的基本功能。微通道的特征尺寸与细胞尺寸相当,特征尺寸和速度很小,惯性作用可以忽略不计,但在压力驱动下可以达到很高的流速(0.1 m/s -1 m/s),惯性效应开始显现。双螺旋微通道利用压力驱动液体样品,样品粒子经过弯曲的管道,受到侧向力和迪恩涡粘性阻力的共同作用,在横截面内达到特定的平衡位置。横向受力与尺寸相关,不同尺寸的粒子通过聚集在不同的侧向位置而分离^[3-5]。

为了解决上述流式细胞仪传统样品前处理方法的不足,本项目根据流式细胞仪对样品“均一化”的需求,研制了一套基于微流控细胞分选技术的流式细胞仪样品预处理系统,该装置可以实现对粒径小于 100 μm 细胞或微粒的驱动和分选,无需对细胞进行标记处理,分选