

基于微流控芯片的微球计数方法研究

夏新成¹, 冯吉军^{1*}, 任文波¹, 蒋巍¹, 杨存亮¹, 于志恒¹, 黄凤立²

¹上海理工大学光电信息与计算机工程学院, 上海市现代光学系统重点实验室, 上海

²嘉兴大学, 浙江省医学电子与数字健康重点实验室, 生命健康智能感知浙江省工程研究中心, 浙江 嘉兴

收稿日期: 2024年3月8日; 录用日期: 2024年5月9日; 发布日期: 2024年5月20日

摘要

微球荧光微球是一种圆形球状颗粒, 在医学研究中, 常被用于模拟病毒传播痕迹。传统的流式细胞仪测量微球个数时不仅所耗样品多, 且成本高。为此, 本文基于微流控方法, 结合光学检测技术, 开发了一种微球快数精确计数的方法, 研究了纯水、Tris-硼酸、羟乙基纤维素(HEC)分别作为背景液时微球在微通道内的运动状况。结果表明, 在HEC作为缓冲时, 即使一个微球通过微流控芯片的检测窗口时, 也可以获取其检测信号, 微球检测通量约为400个/分钟。本文所报道的微流控芯片方法有望实验提供低成本、简便快捷的微球计数工作的开发提供技术指导。

关键词

微流控芯片, 微球, 芯片实验室

Research on Microsphere Counting Method Based on Microfluidic Chip

Xincheng Xia¹, Jijun Feng^{1*}, Wenbo Ren¹, Wei Jiang¹, Cunliang Yang¹, Zhiheng Yu¹, Fengli Huang²

¹Shanghai Key Laboratory of Modern Optical Systems, School of Optical-Electrical and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai

²Key Laboratory of Medical Electronics and Digital Health of Zhejiang Province, Engineering Research Center of Intelligent Human Situation Awareness of Zhejiang Province, Jiaxing University, Jiaxing Zhejiang

Received: Mar. 8th, 2024; accepted: May 9th, 2024; published: May 20th, 2024

Abstract

Microsphere fluorescent microspheres are circular spherical particles commonly used in medical

*通讯作者。

文章引用: 夏新成, 冯吉军, 任文波, 蒋巍, 杨存亮, 于志恒, 黄凤立. 基于微流控芯片的微球计数方法研究[J]. 物理化学进展, 2024, 13(2): 110-116. DOI: 10.12677/japc.2024.132014

research to simulate traces of virus transmission. Traditional flow cytometry not only consumes a lot of samples but also has high cost when measuring the number of microspheres. Therefore, based on microfluidic methods and optical detection technology, this article developed a method for accurately counting the fast number of microspheres, and studied the motion of microspheres in micro channels when pure water, Tris boric acid, and hydroxyethyl cellulose (HEC) were used as background liquids. The results showed that when HEC was used as a buffer, even when a microsphere passed through the detection window of the microfluidic chip, its detection signal could still be obtained, and the microsphere detection flux was about 400 per minute. The micro fluidic chip method reported in this article is expected to provide technical guidance for the development of low-cost, convenient, and fast microsphere counting experiments.

Keywords

Microfluidic Chip, Microspheres, Lab-on-Chip

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

荧光微球一般由有机或无机聚合物材料构成,其内部含有荧光物质或表面涂有荧光物质,在外部能量刺激后可发出荧光,目前被广泛应用于高通量筛选、生物和合成分子分析、成像和动力学研究以及模拟病毒传播痕迹等领域[1] [2]。南京师范大学李建林教授课题组设计了一种新型高通量光子晶体微球悬浮阵列,实现了谷物样品中多种真菌毒素的检测[3]。吴团队利用分子印迹聚合物离子液体微球构建了可识别的表面,最终通过荧光猝灭实现了对硝基苯胺的检测。浙江师范大学研究人员利用分子印迹聚合物离子液体微球构建了可识别的表面,最终通过荧光猝灭实现了对硝基苯胺的检测[4]。

尽管目前关于微球合成方法的报道较多,但是关于微球计量方法的报道较少,主要还是依赖于荧光成像方法,这种方法相对不精确,因为不同的微球可能会聚合在一起[5] [6]。尽管流式细胞仪可以实现细胞等计数,但对于尺寸较小的微球准确计数尚存在一定的问题,且样品耗量多,仪器价格高,较难在一般实验室普及使用[7]。采用毛细管电泳实现微球计数时所需系统庞大,且微球很容易在毛细管口堵塞[8]。微流控芯片技术是通过蚀刻到玻璃、硅或聚合物或者将聚二甲基硅氧烷(PDMS)倒模制成系列微通道,通过泵或电场等作用力驱动生物样品在微通道内运动,从而实现特定对象的分析[9]。本文基于微流控芯片技术,报道了一种低成本的微球精确计数方法,该方法也可应用于亚细胞结构如线粒体数目的测量。

2. 实验部分

2.1. 仪器与试剂

高分子材料缓冲液 TBE (Tris-硼酸缓冲液); HEC (羟乙基纤维素); PDMS (聚二甲基硅氧烷); 可调式光纤到光纤耦合器; 红外相机; 光功率计; 光电转换器和数据采集卡; 1550 nm 便携式激光光源; 10~100 μL 移液枪; 单分散聚苯乙烯染色微球; 超纯水。

2.2. 实验方法

微球计数和成像的过程,在自建的系统上进行,主要包括两块,一个是计数平台一个是成像平台,

成像平台是为了观察微球在毛细管中的运动具体情况，计数光路平台是为了及时响应计数，成像平台是由一个红外相机，显示器，20x 物镜组成，还包括一个位移平台，保证毛细管在光纤到光纤耦合器光路的正中心。如图 1 光路是从激光光源出发经光纤到可调式光纤到光纤耦合器中，经过耦合器出射再经过光纤收集到光功率计或者数据采集卡中，进行相关数据收集和处理[10] [11] [12]。

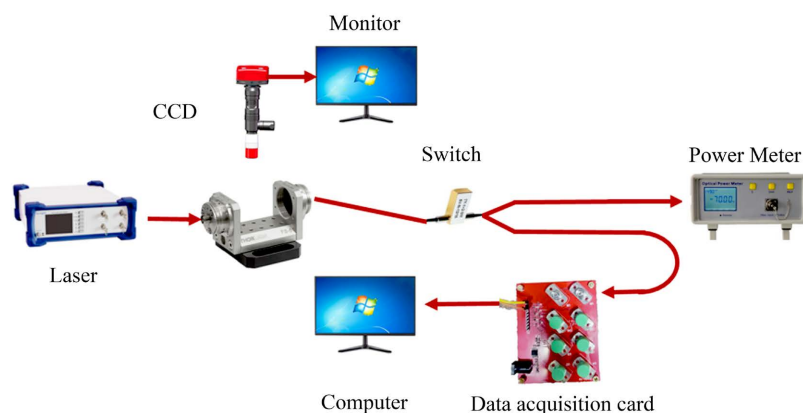


Figure 1. Schematic diagram of experimental setup

图 1. 实验装置示意图

在自主研发的实验系统中，实现了微球计数的精确操作与动态成像。该系统主要包括两个核心部分：一是用于微球计数的平台，二是用于实时观察微球在毛细管中运动情况的成像平台。成像平台凭借其高分辨率红外相机、显示器以及 20 倍物镜，提供了微球在毛细管内运动的详细信息。同时，一个高精度的位移平台确保了毛细管始终处于光路中心，确保了光学耦合的高效性和稳定性[13] [14]。

光路设计上，激光光源发出的光首先通过光纤传输至可调式光纤到光纤耦合器。经过耦合器的光束随后被精确地引导至收集光纤，最后传输至光功率计或数据采集卡[15] [16] [17]。

3. 实验结果与讨论

3.1. 纯水、TBE、HEC 缓冲试剂对微球运动的影响

微球在毛细管中移动时，微球在移动过程中容易发生粘连现象，这主要是由于微球间的相互作用力以及缓冲液粘滞性的影响。当多个微球在毛细管中运动时，微球之间可能会因为碰撞和摩擦而粘在一起，形成较大的团块。这种现象可能导致微球计数的不准确。不同的缓冲试剂对微球的粘连具有重要的影响，因此选择合适的缓冲液是十分必要的。一般来说，粘度越高，微球运动也就越稳定，为防止微球粘连，通过选取不同的缓冲试剂来寻找最佳方案。选取了 3 组试剂，做对照实验来选取最佳试剂，三组试剂分别是纯水，TBE，HEC。在毛细管中，开设两个观察窗口，通过观察小球通过两个窗口前后变化，这些位移变化反映了缓冲试剂对微球运动影响。若相邻小球在运动过程中的位置相对变化较小，这表明该缓冲试剂在减少微球粘连方面具有显著效果。

通过给毛细管通入不同的缓冲试剂，观察不同缓冲液下微球的运动变化，揭示了微球在毛细管中的运动变化，由图 2 可见，HEC 溶液微球相对位置前后的变化最小，其次是 TBE 纯水溶液有的聚集在一起，这是因为 HEC 有着高粘度，可以增加溶液的粘稠度，有助于维持悬浮液的稳定性，HEC 拥有一种独特的织网状高分子结构，这种结构就像一张精细的网，将微球牢牢地固定在其位置上，使其前后位置变化不大。这种网状结构不仅提供了强大的物理锁定机制，确保微球在各种环境条件下都能保持稳定，而且还显著减少了微球之间的粘连现象。进一步提高了微球计数的准确性。

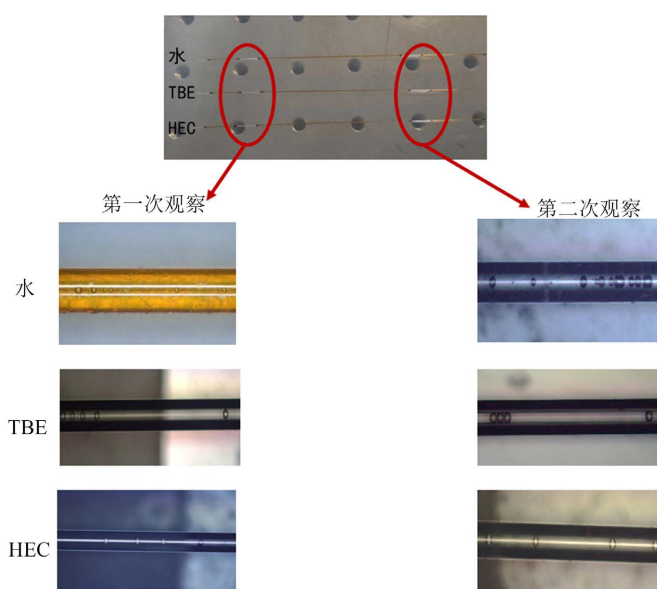


Figure 2. Changes in the position of microspheres before and after different buffer solutions
图 2. 微球在不同缓冲液前后位置变化

3.2. 微通道优化

在实验过程中，发现尽管毛细管的内径设计得很小，旨在防止微球的聚集，然而在实际操作中，微球在毛细管入口处频繁发生堵塞，导致流动效率显著降低。这种堵塞现象不仅影响了微球的流动通量，而且还可能引入计数误差，对实验结果造成干扰。因此，为了实现微通道的优化，决定采用微流控芯片技术。这一选择主要归功于 PDMS 材料的独特优势。PDMS 具有极高的柔性和可塑性，能够根据需求设计出精确的微通道形状。通过利用 PDMS，可以设计和制造出具有复杂微通道网络的芯片，从而实现对流体的高效控制和精确操作，提高了实验的效率和准确性[9] [18] [19]。

因此设计了一种内部尺寸逐渐变化的微流控芯片，旨在解决实验中微球在毛细管入口处频繁堵塞的问题。如图 3 这种特殊设计的芯片通过逐渐变小通道尺寸，有效避免了微球在入口处的聚集，显著提高了微球的流动性和计数准确性。成功实现了微球的顺畅流动和准确计数，为微流控技术在生物医学和临床诊断等领域的应用提供了有力支持。

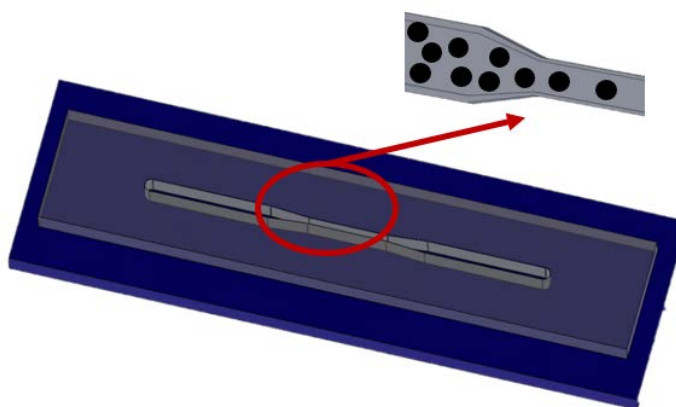


Figure 3. Schematic diagram of gradient channel microfluidic chip
图 3. 渐变通道微流控芯片示意图

3.3. 微球在微流控芯片迁移和计数

在实验过程中,毛细管的内径很小,微球在毛细管入口处频繁发生堵塞,导致流动效率显著降低。因此设计了一种内部尺寸逐渐变化的微型微流控芯片,微球从芯片的一端输入,通道预先用 $0.5 \times \text{HEC}$ 的缓冲液填充,将微球引入微流控芯片,随后将 PDMS 芯片置于显微镜下进行细致观察。观察结果显示,微球在微通道内部并未发生聚集或堵死的情况,确保了流体流动的顺畅性。更重要的是,如图 4(B)所示微球在由宽通道过渡至窄通道的过程中,并未出现堵塞现象,而是保持了有序的间隔分布。

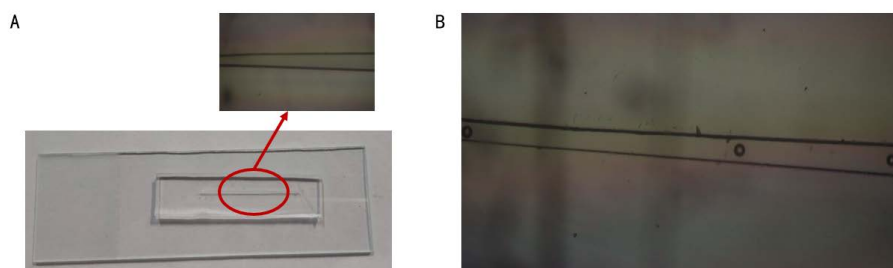


Figure 4. Actual diagram of gradient channel microfluidic chip
图 4. 渐变通道微流控芯片实际图

将微流控芯片精确放置在光纤到光纤耦合器的中心光斑上,确保光斑在芯片的微通道区域。采集的光强数据,利用光电转换器将其转换为电压信号进行实时显示。进一步地,通过数据采集卡对这些电压信号进行精确采集,获得了电压图谱。如图 5,该图谱由一个独立的窄峰组成,这一特征清晰地表明微球能够逐个通过检测窗口,而未发生堵塞或聚集现象。实验结果表明,微球在微通道的宽部区域呈现平稳的平行移动状态。微球进入微通道的窄部区域时,能够逐个通过检测窗口进行迁移,显示出良好的流动特性和通道设计的有效性。

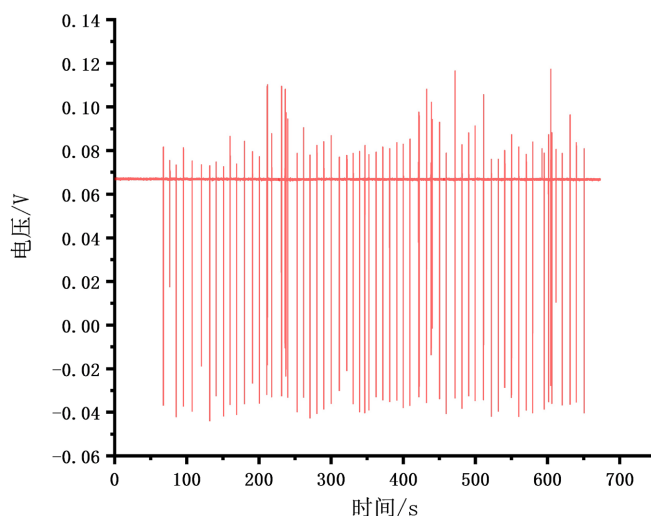


Figure 5. Microsphere voltage map in microfluidic chip
图 5. 微流控芯片中微球电压图谱

4. 结论

本研究设计了一种具有内部尺寸渐变特性的微型微流控芯片,并成功将其应用于微球计数实验。通

过引入这种微流控芯片，成功解决了传统方法中微球在毛细管入口处频繁堵塞的问题，从而显著提升了实验的可靠性和效率。实验数据表明，在微通道较窄的区域，微球能够有序地通过检测窗口，实现了高效且准确的计数。具体而言，该微流控芯片能够在一分钟之内迅速完成 400 个微球的检测，展现出卓越的计数能力和广阔的应用前景。这一设计不仅拓展了微流控技术在微球计数领域的应用范围，也为相关实验研究提供了更为可靠和高效的工具。

基金项目

国家重点研发计划项目(2022YFE0107400); 国家自然科学基金项目(U23A20381, 11933005, 11904232, 11774235, 61705130); 上海市科学技术委员会项目(23010503600, 23530730500); 上海高等学校特聘教授(东方学者)项目(GZ2020015)、浙江省医疗电子与数字健康重点实验室开放课题; 嘉兴市科技计划项目(2023AY31016)。

参考文献

- [1] Si, S., Kaneko, T., Xu, L., *et al.* (2022) Microsphere Amplified Fluorescence and Its Application in Sensing. *Biosensors and Bioelectronics*, **218**, Article 114791. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114791>
- [2] Sankova, N., Shalaev, P., Semeykina, V., *et al.* (2020) Spectrally Encoded Microspheres for Immunofluorescence Analysis. *Journal of Applied Polymer Science*, **138**, Article 49890. <https://doi.org/10.1002/app.49890>
- [3] Yang, Y., Li, W., Shen, P., *et al.* (2017) Aptamer Fluorescence Signal Recovery Screening for Multiplex Mycotoxins in Cereal Samples Based on Photonic Crystal Microsphere Suspension Array. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **248**, 351-358. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.04.004>
- [4] Lu, X., Yang, Y., Zeng, Y., *et al.* (2018) Rapid and Reliable Determination of *p*-Nitroaniline in Wastewater by Molecularily Imprinted Fluorescent Polymeric Ionic Liquid Microspheres. *Biosensors and Bioelectronics*, **99**, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.041>
- [5] Göröcs, Z., Baum, D., Song, F., *et al.* (2020) Label-Free Detection of *Giardia Lamblia* Cysts Using a Deep Learning-Enabled Portable Imaging Flow Cytometer. *Lab on a Chip*, **20**, 4404-4412. <https://doi.org/10.1039/D0LC00708K>
- [6] Jin, M., Luo, J., Dou, X., *et al.* (2020) A Sensitive Cytometric Bead Array for Chlorpyrifos Using Magnetic Microspheres. *Microchemical Journal*, **156**, Article 104847. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104847>
- [7] Verma, R.S., Ahlawat, S. and Uppal, A. (2018) Optical Guiding-Based Cell Focusing for Raman Flow Cell Cytometer. *The Analyst*, **143**, 2648-2655. <https://doi.org/10.1039/C8AN00037A>
- [8] Li, Z., Yang, B., Sekine, S., *et al.* (2018) Alignment and Counting of Mitochondria Based on Capillary Electrophoresis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **265**, 110-114. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.032>
- [9] Grant, J., Özkan, A., Oh, C., *et al.* (2021) Simulating Drug Concentrations in PDMS Microfluidic Organ Chips. *Lab on a Chip*, **21**, 3509-3519. <https://doi.org/10.1039/D1LC00348H>
- [10] Mohan, A., Gupta, P., Nair, A.P., *et al.* (2020) A Microfluidic Flow Analyzer with Integrated Lensed Optical Fibers. *Biomicrofluidics*, **14**, Article 054104. <https://doi.org/10.1063/5.0013250>
- [11] Yuan, T., Zhang, X., Xia, Q., *et al.* (2021) Design and Fabrication of a Functional Fiber for Micro Flow Sensing. *Journal of Lightwave Technology*, **39**, 290-294. <https://doi.org/10.1109/JLT.2020.3022108>
- [12] Jia, H., Zhang, A., Yang, Y., *et al.* (2021) A Graphene Oxide Coated Tapered Microfiber Acting as a Super-Sensor for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Lab on a Chip*, **21**, 2398-2406. <https://doi.org/10.1039/D0LC01231A>
- [13] Yang, J., Li, Z., Zhang, D., *et al.* (2023) Direct Count of Fluorescent Microspheres in a Microfluidic Chip Based on the Capillary Electrophoresis Method. *Analytical Methods*, **15**, 3014-3018. <https://doi.org/10.1039/D3AY00710C>
- [14] Tang, W., Tang, D., Ni, Z., *et al.* (2017) Microfluidic Impedance Cytometer with Inertial Focusing and Liquid Electrodes for High-Throughput Cell Counting and Discrimination. *Analytical Chemistry*, **89**, 3154-3161. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04959>
- [15] Butement, J.T., Holloway, P.M., Welsh, J.A., *et al.* (2020) Monolithically-Integrated Cytometer for Measuring Particle Diameter in the Extracellular Vesicle Size Range Using Multi-Angle Scattering. *Lab on a Chip*, **20**, 1267-1280. <https://doi.org/10.1039/C9LC01182J>
- [16] Sadeghi, J., Patabadige, D.E.W., Culbertson, A.H., *et al.* (2017) Out-of-Plane Integration of a Multimode Optical Fiber for Single Particle/Cell Detection at Multiple Points on a Microfluidic Device with Applications to Particle/Cell

- Counting, Velocimetry, Size Discrimination and the Analysis of Single Cell Lysate Injections. *Lab on a Chip*, **17**, 145-155. <https://doi.org/10.1039/C6LC01161F>
- [17] Zhao, Y., Li, Q., Hu, X., *et al.* (2016) Microfluidic Cytometers with Integrated on-Chip Optical Systems for Red Blood Cell and Platelet Counting. *Biomicrofluidics*, **10**, Article 064119. <https://doi.org/10.1063/1.4972105>
- [18] Fei, P., Chen, Z., Men, Y., *et al.* (2012) A Compact Optofluidic Cytometer with Integrated Liquid-Core/PDMS-Cladding Waveguides. *Lab on a Chip*, **12**, 3700-3706. <https://doi.org/10.1039/c2lc40329c>
- [19] Barat, D., Benazzi, G., Mowlem, M.C., *et al.* (2010) Design, Simulation and Characterisation of Integrated Optics for a Microfabricated Flow Cytometer. *Optics Communications*, **283**, 1987-1992. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2009.12.046>