



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102500439 A

(43) 申请公布日 2012.06.20

(21) 申请号 201110331113.6

(22) 申请日 2011.10.27

(71) 申请人 北京大学

地址 100871 北京市颐和园路5号北京大学
科研部

(72) 发明人 黄岩 俞立 庞玉宏 申洁
周莹

(51) Int. Cl.

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

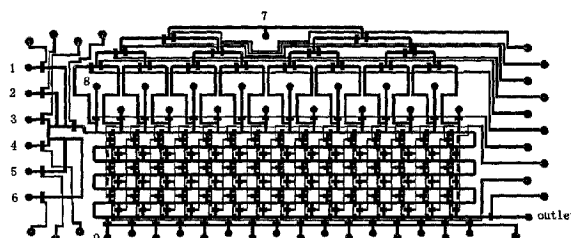
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 5 页

(54) 发明名称

一种可用于细胞免疫荧光分析的微流芯片

(57) 摘要

一种可用于细胞免疫荧光分析的微流芯片，包括微流层、控制层以及将微流层和控制层连接起来的连接层；微流层具有纵向、横向两组微流通道，纵向微流通道具有 m 条微流通道、横向微流通道 n 条微流通道， m 、 n 均为大于或等于 2 的正整数，每一条微流通道与同组的微流通道不相交，与另一组微流通道中的每一条相交一次，共形成 $m \times n$ 个交汇点；控制层具有 2 条以上的控制通道，每一条控制通道与至少一条微流通道形成至少一个交叠点，所述交叠点位置的连接层由弹性体材料构成，称为弹性体阀门；任意两个交汇点之间有且仅有一个交叠点；每一组微流通道中至少一条微流通道具有一个出口和一个入口与外界相通。



1. 一种可用于细胞免疫荧光分析的微流芯片,其特征在于所述微流芯片包括微流层、控制层以及将微流层和控制层连接起来的连接层;微流层具有横向、纵向两组微流通道,横向微流通道具有 m 条微流通道、纵向微流通道具有 n 条微流通道, m 、 n 均为大于或等于 2 的正整数,每一条微流通道与同组的微流通道不相交,与另一组微流通道中的每一条相交一次,共形成 $m \times n$ 个交汇点;控制层具有 2 条以上的控制通道,每一条控制通道与至少一条微流通道形成至少一个交叠点,所述交叠点位置的连接层由弹性体材料构成,当控制通道中的压力增加到一定值时,上述交叠点位置的弹性体连接层将向微流层方向膨胀并与微流通道内表面接触至完全阻断微流通道,使其处于断开的状态,当控制通道中的压力恢复时,交叠点位置的弹性体连接层恢复原态,微流通道重新连通,上述交叠点位置的弹性体材料具有阀门的功能,称为弹性体阀门;任意两个交汇点之间有且仅有一个交叠点;每一组微流通道中至少一条微流通道具有一个出口和一个入口与外界相通。

2. 一种可用于细胞免疫荧光分析的微流芯片,其特征在于所述微流芯片包括微流层、控制层以及将微流层和控制层连接起来的连接层;微流层具有由微流通道形成的 4 个以上进行细胞免疫荧光分析的区域,称为分析区域,每一个分析区域具有位于其上端的入口和位于其下端的出口,所述分析区域在微流芯片上排列成 2 行、 n 列的点阵结构, n 为大于或等于 2 的正整数,第 1 行的每一个分析区域的入口通过微流通道与位于其左方的分析区域的出口相连,其出口通过微流通道与位于其下方和右方的分析区域的入口相连,第 2 行的每一个分析区域的入口通过微流通道与位于其上方和左方的分析区域的出口相连,其出口通过微流通道与位于其右方的分析区域的入口相连,上述连接不同分析区域出口和入口的微流通道称为连接通道;控制层具有 2 条以上的控制通道,每一条控制通道与至少一条连接通道形成至少一个交叠点,所述交叠点位置的连接层由弹性体材料构成,当控制通道中的压力增加到一定值时,上述交叠点位置的弹性体连接层将向微流层方向膨胀并与连接通道内表面接触至完全阻断连接通道,使其处于断开的状态,当控制通道中的压力恢复时,交叠点位置的弹性体连接层恢复原态,连接通道重新连通,上述交叠点位置的弹性体材料具有阀门的功能,称为弹性体阀门;每一条连接通道上有且仅有一个交叠点;分析区域与连接通道构成的微流网络通过至少一个出口和一个入口与外界相通。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的微流芯片,其特征在于微流层、控制层和连接层均由弹性体材料构成。

4. 根据权利要求 3 所述的微流芯片,其特征在于,控制通道在与微流通道的交叠点处扩大形成空腔。

5. 根据权利要求 2-4 的任一项所述的微流芯片,其特征在于所述分析区域为一段蛇形的微流通道。

6. 根据权利要求 1 所述的微流芯片,其特征在于每一条微流通道均有一个出口和一个入口与外界相通,共 $m+n$ 个出口和 $m+n$ 个入口。

7. 根据权利要求 2 所述的微流芯片,其特征在于分析区域在微流芯片上排列成 2 行 $\times n$ 列的点阵结构,每一行均有一个出口和一个入口与外界相通,每一列也均有一个出口和一个入口与外界相通,共 $2+n$ 个出口和 $2+n$ 个入口。

8. 根据权利要求 1-7 的任一项所述的微流芯片,其特征在于与外界相通的出口在微流层内形成多个分支,分支的数目与进行细胞免疫荧光分析时需要注入的液体种类数目相

同,每一个分支上均设置弹性体阀门控制其连通或断开。

9. 根据权利要求 1-8 的任一项所述的微流芯片,其特征在于控制通道中通入液体,控制通道通过外部管道连接压力控制装置。

10. 根据权利要求 9 所述的微流芯片,其特征在于所述压力控制装置选自蠕动泵、注射器泵、活塞泵、真空泵或压缩空气泵中的一种或多种。

11. 根据权利要求 1-10 的任一项所述的微流芯片,其特征在于所述弹性体材料选自聚二甲基硅氧烷 (PDMS)、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、聚碳酸酯 (PC)、聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA)、聚氨酯、聚乙烯、聚丙烯、聚甲基戊烯、聚四氟乙烯 (PTFE)、聚氯乙烯 (PVC)、环状聚烯烃共聚合物 (Cyclic Olefin Copolymers ;COC)、聚偏二氟乙烯、聚苯乙烯、聚砜、尼龙、苯乙烯-丙烯酸共聚物、天然橡胶、聚异戊二烯、丁基橡胶、卤化丁基橡胶、聚丁二烯、丁苯橡胶、丁腈橡胶、氯丁二烯橡胶、乙丙橡胶、表氯醇橡胶、聚丙烯酸酯橡胶、硅酮橡胶、氟硅橡胶、含氟弹性体 (FKM)、全氟弹性体 (FFKM)、乙烯-乙酸乙烯酯、节肢弹性蛋白 (resilin)、弹性蛋白 (elastin)、聚酰亚胺、酚醛树脂中的一种或者任意两种以上的混合物。

一种可用于细胞免疫荧光分析的微流芯片

技术领域

[0001] 本发明涉及一种微流芯片,特别涉及一种廉价、易于制备、可同时对多种细胞进行集成化、高通量的免疫荧光分析的微流芯片。

背景技术

[0002] 免疫荧光染色技术是一种用于观察细胞内蛋白质分布和定位的普遍方法。免疫荧光染色的传统做法需要消耗大量的试剂,人力和时间,特别是某些珍贵抗体的消耗,限制了传统方法的使用。微流控芯片技术以其大大减少样品消耗,节省人工及时间成本,可在厘米见方的空间上实现自动化、高通量的实验等优势,受到了广泛的关注。

[0003] 溶酶体是真核细胞中的一种细胞器;为单层膜包被的囊状结构,直径约 0.025 ~ 0.8 微米;内含多种水解酶,专司分解各种外源和内源的大分子物质,维持细胞内环境的稳态。溶酶体的形态和大小会因某些病理状态而改变,故其可作为溶酶体相关疾病的诊断标准。溶酶体贮积症是一组遗传性代谢疾病,是由于基因突变致溶酶体中有关酸性水解酶缺陷,导致机体中相应的生物大分子不能正常降解而在溶酶体中贮积,引起细胞组织器官功能的障碍。溶酶体贮积症既可导致神经系统和其他多种系统的病变。溶酶体贮积症单一亚型的发病率不足 1 : 5000,但溶酶体贮积症疾病组的发病率高达 1 : 1500-1 : 17000。LAMP1 是溶酶体相关膜蛋白,LC3 是微管相关蛋白,二者分别用作指示溶酶体和自噬体的常用标记物。

[0004] 我们用多层软刻蚀技术制作了一种可快速有效优化染色条件,并可一次性完成 16 种细胞的并行染色实验的集成化、高通量的细胞免疫荧光染色芯片,并且通过标记 Lamp1 溶酶体膜蛋白将这一芯片应用于检测分析患有溶酶体贮积症的病人的上皮细胞。通过可控性气压微阀的使用,我们可以在 3 个小时内完成细胞免疫荧光染色过程中固定、冲洗、孵育抗体等一系列步骤,抗体的总消耗量不超过 1 微升。微流控芯片技术不仅降低了实验成本,还提高了实验结果的并行可靠性。

发明内容

[0005] 本发明的目的正是为了解决现有技术中免疫荧光染色的传统做法需要消耗大量的试剂,人力和时间等问题,提供一种廉价、易于制备、可同时对多种细胞进行集成化、高通量的免疫荧光分析的微流芯片。

[0006] 本发明中的“芯片”与通常本领域所定义的芯片概念相同,其外观为厚度均一的平整片状物体,最常见的形状为长方形或正方形。

[0007] 本发明中的“交叠点”指的是微流通道与控制通道在微流芯片上的投影的相交点。显而易见,由于微流通道和控制通道属于不同的层,它们之间不可能是连通的。

[0008] 本发明中的“交汇点”指的是同一个微流层的不同微流通道之间交汇连通的点。因此,与同一个交汇点相连的不同微流通道之间通过交汇点连通。

[0009] 除非特别说明,本发明的“n 种以上”、“n 种以下”均包括数值 n 本身。

[0010] 本发明采用的技术方案如下。

[0011] 一种可用于细胞免疫荧光分析的微流芯片,其特征在于所述微流芯片包括微流层、控制层以及将微流层和控制层连接起来的连接层;微流层具有横向、纵向两组微流通道,横向微流通道具有 m 条微流通道、纵向微流通道具有 n 条微流通道, m 、 n 均为大于或等于2的正整数,每一条微流通道与同组的微流通道不相交,与另一组微流通道中的每一条相交一次,共形成 $m \times n$ 个交汇点;控制层具有2条以上的控制通道,每一条控制通道与至少一条微流通道形成至少一个交叠点,所述交叠点位置的连接层由弹性体材料构成,当控制通道中的压力增加到一定值时,上述交叠点位置的弹性体连接层将向微流层方向膨胀并与微流通道内表面接触至完全阻断微流通道,使其处于断开的状态,当控制通道中的压力恢复时,交叠点位置的弹性体连接层恢复原态,微流通道重新连通,上述交叠点位置的弹性体材料具有阀门的功能,称为弹性体阀门;任意两个交汇点之间有且仅有一个交叠点;每一组微流通道中至少一条微流通道具有一个出口和一个入口与外界相通。

[0012] 或者如下:

[0013] 一种可用于细胞免疫荧光分析的微流芯片,其特征在于所述微流芯片包括微流层、控制层以及将微流层和控制层连接起来的连接层;微流层具有由微流通道形成的4个以上进行细胞免疫荧光分析的区域,称为分析区域,每一个分析区域具有位于其上端的入口和位于其下端的出口,所述分析区域在微流芯片上排列成2行、 n 列的点阵结构, n 为大于或等于2的正整数,第1行的每一个分析区域的入口通过微流通道与位于其左方的分析区域的出口相连,其出口通过微流通道与位于其下方和右方的分析区域的入口相连,第2行的每一个分析区域的入口通过微流通道与位于其上方和左方的分析区域的出口相连,其出口通过微流通道与位于其右方的分析区域的入口相连,上述连接不同分析区域出口和入口的微流通道称为连接通道;控制层具有2条以上的控制通道,每一条控制通道与至少一条连接通道形成至少一个交叠点,所述交叠点位置的连接层由弹性体材料构成,当控制通道中的压力增加到一定值时,上述交叠点位置的弹性体连接层将向微流层方向膨胀并与连接通道内表面接触至完全阻断连接通道,使其处于断开的状态,当控制通道中的压力恢复时,交叠点位置的弹性体连接层恢复原态,连接通道重新连通,上述交叠点位置的弹性体材料具有阀门的功能,称为弹性体阀门;每一条连接通道上有且仅有一个交叠点;分析区域与连接通道构成的微流网络通过至少一个出口和一个入口与外界相通。

[0014] 采用上述第一种方案的芯片可以对细胞免疫荧光分析实验进行实验条件的优化,例如对抗体浓度进行优化、对洗脱液的选择进行确定。进行实验条件优化时,先将含有细胞的溶液通入微流通道中,在芯片中培养细胞,待细胞状态稳定后开始免疫荧光染色实验。通过调节控制通道中的压力打开横向微流通道上的弹性体阀门并关闭纵向微流通道上的弹性体阀门,则横向微流通道处于连通状态,而纵向微流通道处于断开状态,从横向微流通道与外界相通的入口(若每一条横向微流通道都具有与外界相通的入口,则可以分别从每个入口注入;若只有一条,例如最上方的一条横向微流通道具有与外界相通的入口,则可以将纵向微流通道上靠近芯片边缘的部分弹性体阀门打开,使得液体在不同的横向微流通道之间沿S型路线流动)注入PBS、4%多聚甲醛及含胎牛血清的PBS,冲洗、固定和终止固定。然后,通过调节控制通道中的压力打开纵向微流通道上的弹性体阀门并关闭横向微流通道上的弹性体阀门,则纵向微流通道处于连通状态,而横向微流通道处于断开状态,由纵向微流

通道与外界相通的入口分别通入不同浓度配比的一抗溶液（可以根据实际需要设置纵向微流通道及其的入口数目，例如需要进行 8 种不同浓度一抗溶液的对比，则设置 8 条纵向微流通道，每一个微流通道均设置一个入口、一个出口与外界相通），孵育后通过入口加入冲洗溶液，将一抗溶液完全冲洗干净。最后打开横向微流通道上的弹性体阀门并关闭纵向微流通道上的弹性体阀门，仍然从芯片左端横向微流通道与外界相通的入口加入带有荧光标记的二抗溶液，孵育后冲洗干净即可用显微镜观察，确定优化条件。如果要对洗脱溶液进行优化选择，则可以采用相同浓度的一抗溶液，而在不同的纵向微流通道中通入不同的洗脱液，对比不同纵向微流通道中的染色结果来选择最合适的洗脱液。

[0015] 对一抗、二抗溶液浓度、洗脱液的选择以及孵育时间等进行了优化之后，则可以采用上述第二种方案的微流芯片对待测样品进行细胞免疫荧光分析。以图 4 表示的芯片为例，蛇形微流通道为分析区域，32 个分析区域排列成 2 行 16 列，从上方入口 8 分别通入 16 种不同的细胞（如图 4b 左 1 所示），然后关闭 2 行分析区域之间的弹性体阀门，同时打开相邻列的分析区域之间的弹性体阀门，通入多聚甲醛固定液（如图 4b 左 2 所示），再往位于上方的第一行分析区域中通入一抗溶液，往位于下方的第二行分析区域中通入空白对照溶液，（如图 4b 左 3 所示），最后是清洗及加入二抗等步骤（如图 4b 左 4 所示）。用荧光显微镜对分析区域进行观察、拍照即可获得实验结果。

[0016] 使用上述芯片及方法进行细胞免疫荧光分析实验的有益效果是显然的，一是消耗的试剂很少，微流芯片的微流通道尺寸一般都很小（微流通道宽度为 10-100 微米，高度为 20 微米），一次实验所消耗的样品体积也在微升量级（一般小于 10 微升），与传统方法相比节约了大量的试剂，特别是当试剂昂贵的时候，这个优点更加突出；二是可以进行全自动化操作，控制通道通过外部管道与泵连接，将泵一直设置在工作状态，在外部管道上设置电磁阀，电磁阀打开时控制通道与泵连通，则压力传输到弹性体阀门，使弹性体阀门关闭，从而断开相应的微流通道；电磁阀关闭时控制通道与泵断开，压力不能传输到弹性体阀门，压力解除从而弹性体阀门打开，相应的微流通道重新连通；使用计算机控制电磁阀的打开和关闭，则可以通过计算机程序自动化控制在特定的时间打开或者关闭某些电磁阀，全自动化地进行实验，无需人工干预，从而节约了大量的人力成本；三是通过横向微流通道和纵向微流通道上的弹性体阀门交替打开或者关闭可以避免试剂的交叉污染，弹性体阀门关闭后形成封闭的反应空间，后续进入的试剂单向流动，不会进入相隔的反应空间。传统方法该试验在载玻片上完成，为避免交叉污染需要每个反应在单独的一块玻片上进行，每次加入试剂均需更换移液枪枪头。交叉污染会导致假阳性出现。

[0017] 优选地，微流层、控制层和连接层均由弹性体材料构成，控制通道在与微流通道的交叠点处扩大形成空腔。由于许多弹性体材料具有良好的加工成型的性能，例如热塑性、热固性、辐射诱导交联等，无需昂贵的设备以及复杂的方法，采用实验室简单的常用设备便可以方便地制备出各种结构的微流芯片。控制通道在与细胞生长微流通道的交叠点处扩大形成空腔，则进一步保证了膨胀的空腔能将微流通道彻底断开。

[0018] 优选地，对于第二种技术方案，分析区域设置为一段蛇形的微流通道。蛇形的微流通道可以容纳更多的细胞，同时可以让细胞与溶液进行更充分的接触，从而使得实验误差减小，可重复性更好。

[0019] 优选地，对于第一种技术方案，每一条微流通道均有一个出口和一个入口与外界

相通,共 $m+n$ 个出口和 $m+n$ 个入口。对于第二种技术方案,则分析区域在微流芯片上排列成 $2 \text{ 行} \times n \text{ 列}$ 的点阵结构,每一行均有一个出口和一个入口与外界相通,每一列也均有一个出口和一个入口与外界相通,共 $2+n$ 个出口和 $2+n$ 个入口。这样设置的好处是,每一条微流通道(或者每一列/行分析区域)都可以输入不同的溶液,而且与其他微流通道的溶液都不产生交叉污染。对于第一种技术方案, n 的数目可以根据需要优选的条件来确定,例如需要从 8 种不同浓度的一抗溶液中确定合适的浓度,则可以设置 $n = 8$,即有 8 条纵向微流通道;对于第二种技术方案, n 的数目可以根据需要进行实验的样本数决定,例如有 16 种细胞需要进行细胞免疫荧光分析,则设置 $n = 16$,即分析区域排列成 16 列,每一列对应一种细胞。

[0020] 优选地,与外界相通的出口在微流层内形成多个分支,分支的数目与进行细胞免疫荧光分析时需要注入的液体种类数目相同,每一个分支上均设置弹性体阀门控制其连通或断开。试验中可能需要通入数量众多的溶液,因此根据需要使用到的溶液的数目来设置分支数目,再通过每一个分支上设置弹性体阀门,使得实验准备完毕后,整个实验可以全自动化进行。

[0021] 优选地,控制通道中通入液体,控制通道通过外部管道连接压力控制装置。所述压力控制装置例如可以是选自蠕动泵、注射器泵、活塞泵、真空泵或压缩空气泵中的一种或多种。液体能够比气体更加稳定地传递压力,通过液体作用的弹性体阀门称为液压弹性体阀门。通过外接压力控制装置,便可以方便地调节控制通道中的压力大小,从而控制液压弹性体阀门的打开和关闭。

[0022] 优选地,弹性体材料选自聚二甲基硅氧烷(PDMS)、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物、聚碳酸酯(PC)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚氨酯、聚乙烯、聚丙烯、聚甲基戊烯、聚四氟乙烯(PTFE)、聚氯乙烯(PVC)、环状聚烯烃共聚合物(Cyclic Olefin Copolymers;COC)、聚偏二氟乙烯、聚苯乙烯、聚砜、尼龙、苯乙烯-丙烯酸共聚物、天然橡胶、聚异戊二烯、丁基橡胶、卤化丁基橡胶、聚丁二烯、丁苯橡胶、丁腈橡胶、氯丁二烯橡胶、乙丙橡胶、表氯醇橡胶、聚丙烯酸酯橡胶、硅酮橡胶、氟硅橡胶、含氟弹性体(FKM)、全氟弹性体(FFKM)、乙烯-乙酸乙烯酯、节肢弹性蛋白(resilin)、弹性蛋白(elastin)、聚酰亚胺、酚醛树脂中的一种或者任意两种以上的混合物。实施例中使用聚二甲基硅氧烷制备微流芯片,这是由于 PDMS 具有许多有利于微浇筑、微模塑和微图案化的材料特性。本领域技术人员能够了解,所有本领域现有的弹性体材料都能应用于本发明的微流芯片中,而并不限于上述优选的实例。

附图说明

[0023] 图 1 染色条件优化实验芯片图。(a) 芯片实物图。(b) 芯片设计示意图。蓝色管道为流体层管道,紫色管道为控制层管道。(c) 染色实验过程中重要步骤演示图。分别为通入细胞悬液,由芯片上方入口 8 分别加入不同浓度的 LAMP1 和 LC3 一抗混合溶液,依次冲洗 16 个纵向区域,避免交叉污染。

[0024] 图 2 染色条件优化结果、LAMP1 单染及 LAMP1 和 LC3 双染传统方法和芯片结果图。(a)-(d) 展示了使用不同配比试剂的染色结果,其中图 2(d) 是优化结果, LAMP1 形态清晰,抗体的非特异性吸附低。(f) 和 (h) 分别为 LAMP1 单染及 LAMP1 和 LC3 双染在芯片上的结果,与之对应的是使用传统方法得到的染色图片 (e) 和 (g)。二者的图片质量具有可比性,且芯片操作更省时省力。

[0025] 图 3 按时间序列固定染色实验结果图。我们利用微流芯片观察饥饿细胞中微管相关蛋白 LC3 随时间的变化, 如图所示, 我们分别取了 0 到 7 小时, 间隔 1 小时的固定结果。随细胞饥饿时间的延长, LC3 的表达量逐渐增高, 在饥饿 4 小时时表大量最高, 随后逐渐降低。

[0026] 图 4 16 种细胞的并行染色实验芯片图。(a) 芯片设计图, 由图中红色的控制管道组成的微阀将蓝色的蛇形流体层管道分隔成 16 道培养不同细胞的区域, 全部染色过程由电脑程序控制完成, 实现了高度的自动化、集成化。(b) 染色实验过程中重要步骤演示图, 分别展示了由芯片上方入口通入 16 种细胞; 再通入多聚甲醛固定液; 一抗溶液及空白对照溶液, 最后是清洗及加入二抗等步骤。

[0027] 图 5 溶酶体贮积症病人细胞和正常成纤维细胞溶酶体染色图。绿色的荧光蛋白标记的是溶酶体的表征蛋白膜蛋白 Lamp1, 相对于正常人, 在患有溶酶体贮积症的病人上皮细胞中, 溶酶体数量明显增多, 分布异常。

[0028] 图 6 实验结果计算数据图。图 6(a) 为图 5 中的图片经 Image Pro Plus 计算的结果。图 6(b) 是经 Matlab 计算, 分别以图片中亮点的平均亮度、LAMP1 荧光强度的变差系数及细胞中单位面积的亮点数为 x、y 和 z 轴做图, 图 6(c)、(d) 和 (e) 为图 6(b) 的二维分解图。

具体实施方式

[0029] 以下举例说明微流芯片的制备方法, 下面的实例中使用较简便的六甲基二硅烷 (HMDS、三甲基氯硅烷 (TMCS)、AZP 4620 以及 PDMS 制备, 但并不表示微流芯片只能由这样的方法制备, 本领域技术人员可以了解, 任何本领域现有的技术都可以用来制备具有本发明结构的微流芯片。

[0030] 我们首先使用光刻蚀的方法分别制作流体层管道和控制层管道的模板。控制层管道用正胶 AZP 4620 制作。将硅片用六甲基二硅烷 (HMDS) 熏 5 分钟, 然后倾倒正胶 AZP 4620 到干净的硅片上, 1000rpm 的转速旋转 1 分钟, 95 度加热板烘烤 5 分钟, 115 度加热板烘烤 10 分钟, 曝光, 显影。流体层管道用正胶 AZP 4620 制作。将硅片用六甲基二硅烷 (HMDS) 熏 5 分钟, 然后倾倒正胶 AZP 4620 到干净的硅片上, 1000rpm 的转速旋转 1 分钟, 95 度加热板烘烤 5 分钟, 115 度加热板烘烤 10 分钟, 曝光, 显影, 然后在加热板上以每小时增加 10 度的方法从 40 度逐步升温到 220 度以圆化正胶管道。

[0031] 我们使用软刻蚀的方法制作芯片, 所用的材料为聚二甲基硅氧烷 (PDMS)。在被用来制作微流控芯片之前, 所有的模板都要被三甲基氯硅烷 (TMCS) 熏 10 分钟以利于聚合的 PDMS 和硅片的脱离。我们先将 RTV 615 的 A 组分和 B 组分 (粘连剂) 以 5 比 1 的比例混合, 倾倒到控制层管道的硅片上, 真空抽气除泡, 80 度烘箱加热 20 分钟, 从硅片上撕下带有流体层管道的 PDMS 块, 切割, 打孔。同时将 RTV 615 的 A 组分和 B 组分 (粘连剂) 以 20 比 1 的比例混合, 倾倒到流体层管道的硅片上, 以 1600rpm 的速度将混合液体均匀甩到硅片上, 80 度烘箱加热 30 分钟, 然后将已打好孔的控制层管道的 PDMS 块对准贴合到烘好的流体层硅片上, 两层在 80 度烘箱中聚合 45 分钟, 撕下后, 打孔。另外, 我们将 RTV 615 的 A 组分和 B 组分 (粘连剂) 以 10 比 1 的比例混合, 倾倒到载玻片上, 以 1000rpm 的速度将混合液体均匀甩到载玻片上, 80 度烘箱加热 15 分钟, 将打好孔的两层聚合 PDMS 块贴到载玻片上, 80 度烘箱加热过夜。

[0032] 实施例 1

[0033] 微流芯片的结构。以图 1 为例说明第一种技术方案的芯片结构。横向微流通道有 7 条,纵向微流通道有 16 条。相邻的横向微流通道首尾相接,形成一个蛇形的管道,这个蛇形管道具有一个出口 (outlet),一个入口,入口在微流芯片内部分叉形成 6 个 (标号 1-6) 液体注入口。每一条纵向微流通道都有一个入口 (8) 和一个出口,对应可以进行 8 种不同浓度一抗溶液的优化选择;7 为洗脱液 (冲洗液) 入口,由于同时对所有的纵向微流通道进行冲洗可能导致液体分配不均,从而导致冲洗条件的差别,因此,为保证对每一条纵向微流通道都采用同样的冲洗条件进行冲洗,分别用若干个弹性体阀门控制入口,在冲洗时单独对每一条纵向微流通道采用同样的条件进行冲洗。弹性体阀门的设置如图所示,每两个交汇点之间均设置一个弹性体阀门,此外在入口、出口附近还根据需要设置多个弹性体阀门。图 1c 表示了实验过程中的重要步骤,图 1c 左 1 表示的是通入细胞悬液的情况,将交汇点之间的弹性体阀门全打开,从横向微流通道入口通入细胞悬液,使得整个微流通道中都充满细胞悬液;图 1c 左 2 表示的是由芯片上方入口 8 分别加入不同浓度的 LAMP1 和 LC3 一抗混合溶液的情况,关闭横向微流通道上的弹性体阀门,使得微流通道中的液体只能沿着纵向微流通道流动 (用不同颜色表示不同的液体);图 1c 左 3 表示的是依次冲洗 16 个纵向区域的情况,如此操作可以避免交叉污染,从上方入口 7 通入冲洗液,打开最左侧纵向微流通道上方的弹性体阀门,关闭其他的弹性体阀门,同时打开最左侧纵向微流通道上的弹性体阀门,则冲洗液只能沿着最左侧的纵向微流通道流动,用同样的方法冲洗每一条纵向微流通道。

[0034] 以图 4 为例说明第二种微流芯片的结构。芯片共有 32 个分析区域,排列成 2 行 16 列,每一个分析区域都是蛇形的微流通道,以上方第一行左起第二列的分析区域为例,其入口通过连接通道与其左侧的分析区域出口相连,其出口通过连接通道分别于位于其下方的分析区域入口以及位于其右侧的分析区域入口相连,每一条连接通道上均设置一个弹性体阀门。32 个分析区域排列成 16 列、2 行,每一列均设置一个入口和一个出口与外界相通,每一行均有一个入口,2 个入口在芯片内部分叉形成 7 个入口与外界相通,可以通入 7 种不同溶液。在标号 1-7 的 7 条通道上以及标号 8 和 9 的 32 个出口、入口通道上均设置弹性体阀门。操作过程如下:从上方入口 8 分别通入 16 种不同的细胞 (如图 4b 左 1 所示),然后关闭 2 行分析区域之间的弹性体阀门,同时打开相邻列的分析区域之间的弹性体阀门,通入多聚甲醛固定液 (如图 4b 左 2 所示),再往位于上方的第一行分析区域中通入一抗溶液,往位于下方的第二行分析区域中通入空白对照溶液, (如图 4b 左 3 所示),最后是清洗及加入二抗等步骤 (如图 4b 左 4 所示)。用荧光显微镜对分析区域进行观察、拍照即可获得实验结果。

[0035] 实施例 2

[0036] 具体的试验操作过程。

[0037] 我们设计了两块芯片分别完成快速有效优化染色条件和一次性集成化、高通量进行 16 种细胞的并行染色实验。如图 1 所示,该芯片不仅能够快速完成染色条件筛选优化,还能进行按一定时间序列固定染色的实验。我们使用“Quake 阀门”将横向的蛇形管道分隔成 16 个区域,分别连通需要优化条件的试剂的管道,然后通过采用二进制方法控制的可实现单独冲洗功能的冲洗管道将参与优化的试剂完全冲洗干净,有效避免管道间的交叉污染。其他试剂分别由芯片左端的 6 个入口进入。以优化一抗浓度实验为例,首先在芯片中

培养细胞,待细胞状态稳定后开始免疫荧光染色实验。打开管道的横向控制阀门并关闭纵向阀门,依次由芯片左端入口加入 PBS、4%多聚甲醛及含胎牛血清的 PBS,冲洗、固定和终止固定。再打开管道的纵向控制阀门并关闭横向阀门,由芯片上方入口 8 分别加入不同浓度配比的一抗溶液,孵育后通过上方入口 7 加入冲洗溶液,将一抗溶液完全冲洗干净。最后打开管道的横向控制阀门并关闭纵向阀门,仍然从芯片左端入口加入带有荧光标记的二抗溶液,孵育后冲洗干净即可用显微镜观察,确定优化条件。如果需要观察目标分子随时间推移发生的变化,只需要将由芯片上方入口 8 通入的一抗溶液更换成多聚甲醛固定液,按照设定好的观察时间点依次加入相应的管道即可。图 4 展示了可一次性集成化、高通量进行 16 种细胞的并行染色实验的芯片。打开管道的纵向控制阀门并关闭横向阀门,我们可以从芯片上方入口 8 分别通入 16 种细胞,然后打开管道的横向控制阀门并关闭纵向阀门,由芯片左端 1 到 7 号入口依次通入免疫荧光染色试剂,即可得到具有高质量并行性的染色结果。

[0038] 实施例 3

[0039] 染色条件优化实验

[0040] 我们对免疫荧光染色过程中多种试剂进行了筛选优化,包括冲洗溶液的成分组成,一抗、二抗的浓度及孵育时间等。当实验条件优化确定后,整个染色过程可在 Labview 程序控制下自动完成。仍然以一抗溶液浓度优化为例,如图 1(b) 所示,第一步,由芯片左端入口 2 通入人类纤粘连蛋白 ($100 \mu\text{g/mL}$),孵育 30 分钟;第二步,通入含有成纤维细胞的悬液,将芯片放入自制的细胞培养盒中,约 4 小时,细胞状态稳定后开始免疫荧光染色;第三步,由左端入口 3 通入 PBS 溶液,清洗残留培养液;第四步,由入口 4 通入 4%多聚甲醛,室温固定 10 分钟;第五步,由入口 6 通入含有 0.1% saponin 和 10%胎牛血清的 PBS 溶液冲洗约 1 分钟,并室温孵育 15 分钟;第六步,由芯片上方入口 8 分别加入不同浓度的 LAMP1 和 LC3 一抗混合溶液,室温孵育 30 分钟;第七步,由芯片上方入口 7 通入含有 0.1% saponin、1%吐温 20 和 10%胎牛血清的 PBS 溶液,由二进制方法设置的阀门控制,分别依次冲洗 16 个纵向区域,避免交叉污染;第八步,仍由左端入口 6 通入含有 0.1% saponin、1%吐温 20 和 10%胎牛血清的 PBS 溶液冲洗约 1 分钟;第九步,由左端入口 5 通入荧光标记的二抗溶液 (2mg/mL),室温孵育 40 分钟;第十步,仍由左端入口 6 通入含有 0.1% saponin、1%吐温 20 和 10%胎牛血清的 PBS 溶液冲洗约 3 分钟。芯片左端入口 1 为每次进样前用于排除管道连接中产生的气泡的通路。染色结束后,用共聚焦显微镜观察拍摄图像,用于分析计算。图 2 展示了使用不同一抗浓度处理、LAMP1 单染及 LAMP1 和 LC3 双染传统方法和芯片结果的对比染色照片。

[0041] 实施例 4

[0042] 按一定时间序列固定染色实验

[0043] 细胞中某些成分的多少、有无及分布随时间发生变化,故获取多时间点的荧光图像具有重要意义。使用图 1 所示芯片,我们可以得到按一定时间序列固定染色的结果。先由芯片左端入口 2 通入人类纤粘连蛋白 ($100 \mu\text{g/mL}$) 孵育 30 分钟,再通入含有成纤维细胞的悬液,将芯片放入自制的细胞培养盒中,约 4 小时,细胞状态稳定后开始免疫荧光染色实验。首先将含有血清的完全培养液更换成不含血清的不完全培养液,开始计时,由芯片上方入口 8 按照设定的时间点 0 到 7 小时,每隔 1 小时依次加入 4%多聚甲醛,室温孵育 10 分钟后,由芯片上方入口 7 通入含有 10%胎牛血清的 PBS 溶液,经由二进制方法设置的阀门控

制,按照时间序列分别依次冲洗 16 个纵向区域,避免交叉污染,其间先固定的细胞浸泡在 PBS 溶液中直至最后一个时间点的细胞固定结束。然后依次由左端入口 3、4、5、6 通入 LC3 一抗溶液 (2mg/ml) 孵育、含有 0.1% saponin 和 10% 胎牛血清的 PBS 溶液冲洗、荧光标记的二抗溶液 (2mg/ml) 孵育和含有 0.1% saponin、1% 吐温 20 和 10% 胎牛血清的 PBS 溶液冲洗。染色结束后,用共聚焦显微镜观察拍摄图像,用于分析计算,如图 3 所示。

[0044] 实施例 5

[0045] 16 种细胞的并行染色实验

[0046] 使用图 4 所示芯片,我们可以快速一次性集成化、高通量进行 16 种细胞的并行染色实验。先由芯片左端入口 2 通入人类纤粘连蛋白 (100 μ g/mL) 孵育 30 分钟,再分别由芯片上方入口 8 通入 16 种细胞,依次为 15 种溶酶体贮积症病人细胞系 (GM00156, GM00798, GM01256, GM02438, GM00852, GM00863, GM03030, GM00151, GM00244, GM00636, GM00654, GM00059, GM00110, GM11473 and GM00039) 和正常的人类成纤维细胞。将芯片放入自制的细胞培养盒中待细胞状态稳定后,如上述步骤开始免疫荧光染色实验。用共聚焦显微镜观察拍摄图像如图 5 所示,计算结果如图 6 所示。

[0047] 实验结果

[0048] 1、实验结果

[0049] 适宜的固定时间、抗体浓度及冲洗溶液的配比成分,对获取高质量的免疫荧光染色结果具有重要作用。图 2(a)-(d) 展示了使用不同配比试剂的染色结果,其中图 2(d) 是优化结果, LAMP1 形态清晰,抗体的非特异性吸附低。

[0050] 图 2(f) 和 (h) 分别为 LAMP1 单染及 LAMP1 和 LC3 双染在芯片上的结果,与之对应的是使用传统方法得到的染色图片 (e) 和 (g)。二者的图片质量具有可比性,且芯片操作更省时省力。

[0051] 图 3 展示了按一定时间序列对饥饿细胞中的 LC3 进行免疫荧光染色的结果,如图所示,我们分别取了 0 到 7 小时,间隔 1 小时的固定结果。LC3 的表达量及分布随细胞饥饿时间的延长明显增多,至饥饿 4 到 5 小时,其表达量达到最高值,随后逐渐降低。

[0052] 图 5 展示了 7 种溶酶体贮积症病人细胞系及正常成纤维细胞免疫荧光染色结果。(b) 到 (d) 分别为 X 染色体连锁的鱼鳞病 (X-linked ichthyosis)、III 型高血氏病 (Gaucher disease type III)、尼曼 - 匹克氏病 (Wolman disease), (e) 到 (h) 均为糖代谢异常疾病,分别为 I 型粘多糖积累症 (mucopolysaccharidosis type I, MPS I), 赫尔勒氏综合症 (Hurler syndrome), β - 半乳糖苷酶相关的神经氨酸酶缺陷 (neuraminidase deficiency with betagalactosidase deficiency) 和 IIIB 型粘多糖积累症 (MPS type IIIB)。

[0053] 图 6(a) 为图 5 中的图片经 Image Pro Plus 计算的结果,可以看出疾病组细胞中溶酶体的数量比正常成纤维细胞中明显增加,并且分布有差异,而且不同的疾病组之间溶酶体的数量和分布也有不同。图 6(b) 是经 Matlab 计算,分别以图片中亮点的平均亮度、LAMP1 荧光强度的变差系数及细胞中单位面积的亮点数为 x、y 和 z 轴做图,图 6(c)、(d) 和 (e) 为图 6(b) 的二维分解图。如图 5 所示, LSD 细胞在 LAMP1 的荧光强度、溶酶体数量和溶酶体点大小上都与控制组细胞有明显区别。其中样本 3 和样本 8 中絮状溶酶体点的荧光强度只有控制组的 30% 和 70%, 且覆盖了约 50% 的细胞面积。样本 2 中溶酶体同样在整个细

胞范围内分布广泛,荧光强度与控制组相似,点大小仅有控制组的 70%。溶酶体点在样本 4 和样本 6 种成聚集状态,大小分别为控制组的 2 倍和 1.5 倍左右。此外,有些溶酶体点在某些 LSD 细胞中呈现特征分布。比如在样本 7 中,溶酶体点在细胞核的长轴上呈不对称分布;而在样本 6 中,85%的溶酶体点集中在细胞核周围 35%的范围内。

[0054] 2、结论

[0055] 我们将免疫荧光染色实验中一系列繁复的步骤集成在一块微流控芯片上。以验证溶酶体贮积症中 LAMP1 的检测为例,展示了微流控芯片作为新型的优化实验条件、省时省力、降低样品消耗的实验平台的优势,并且获得了同样高质量的实验结果。此结果还有希望应用于其他基于蛋白共定位的多色染色实验,应用于临床检验及诊断中。

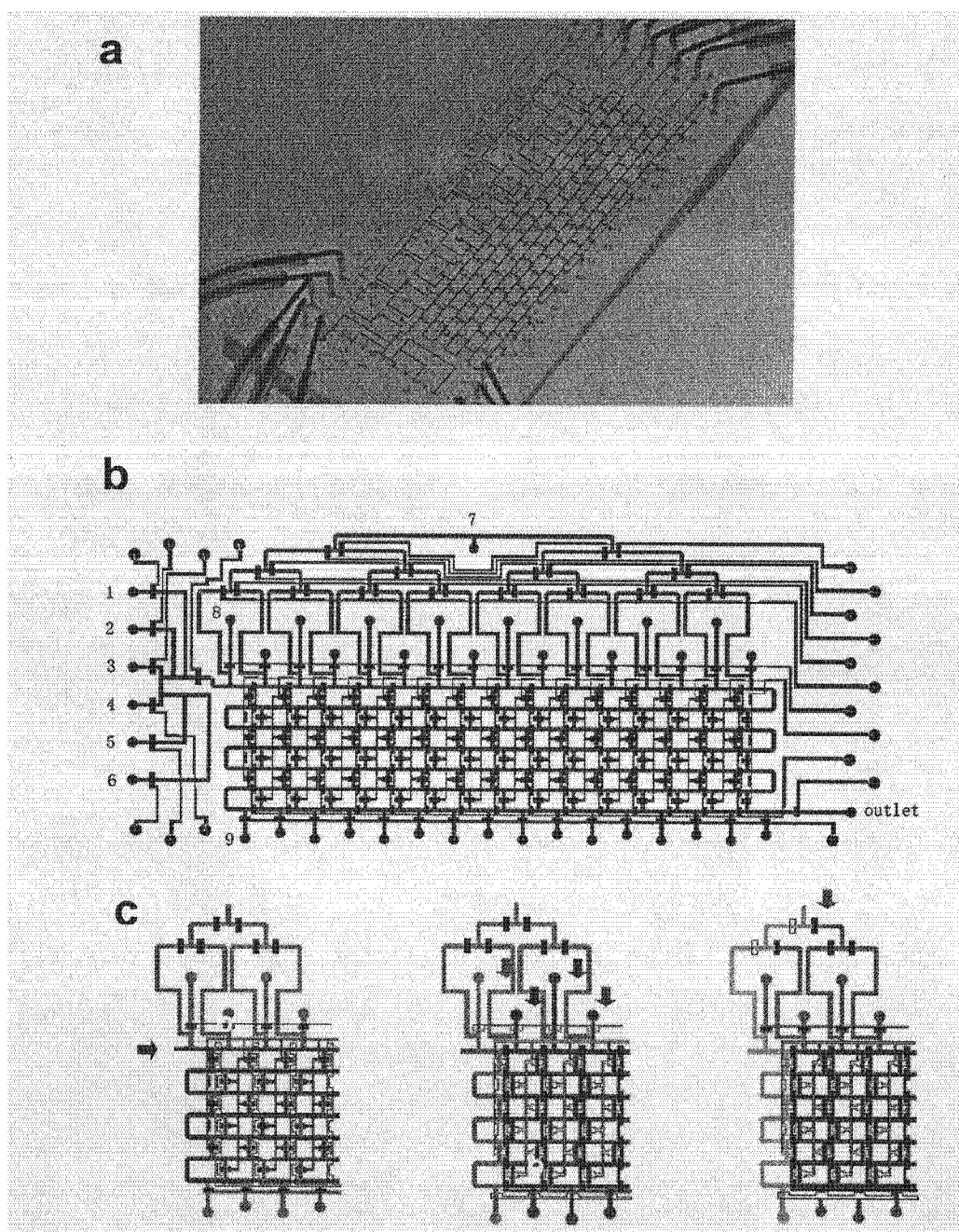


图 1

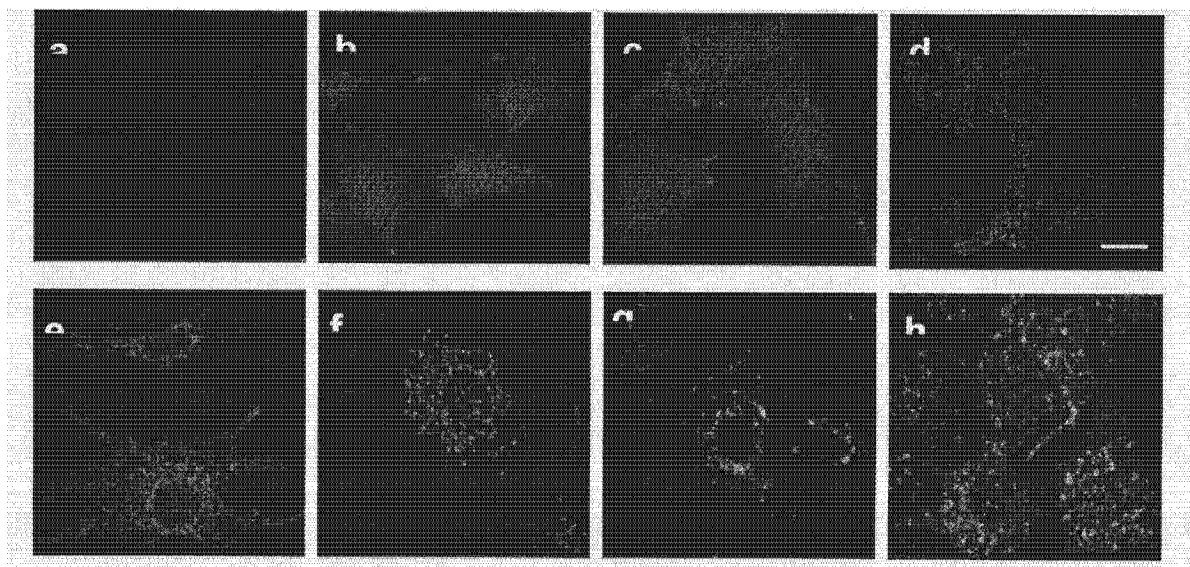


图 2

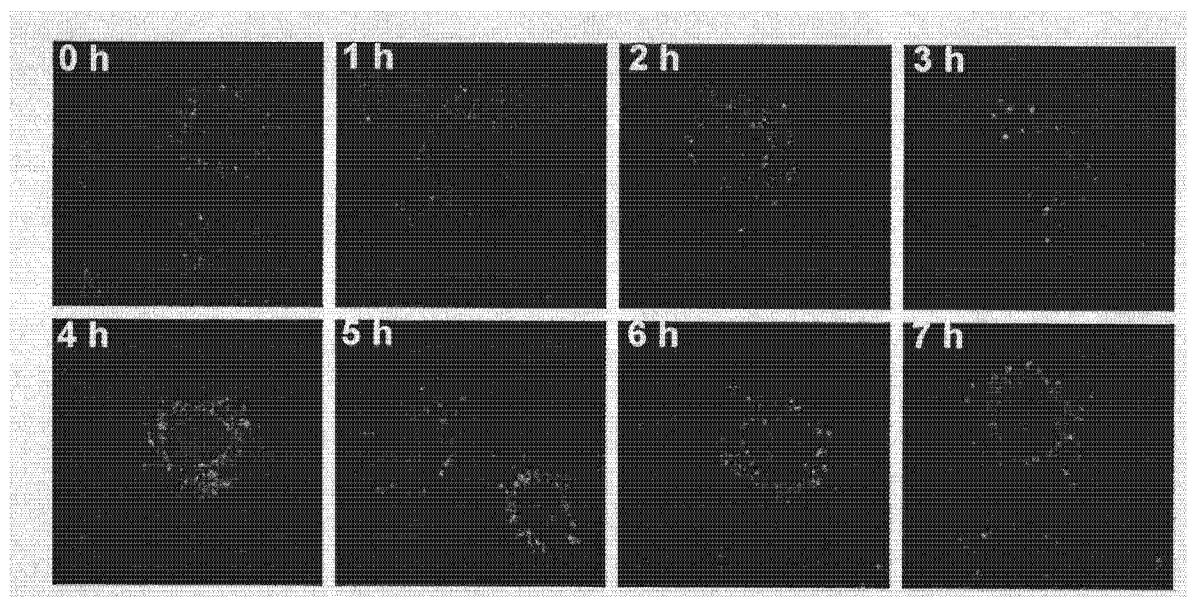


图 3

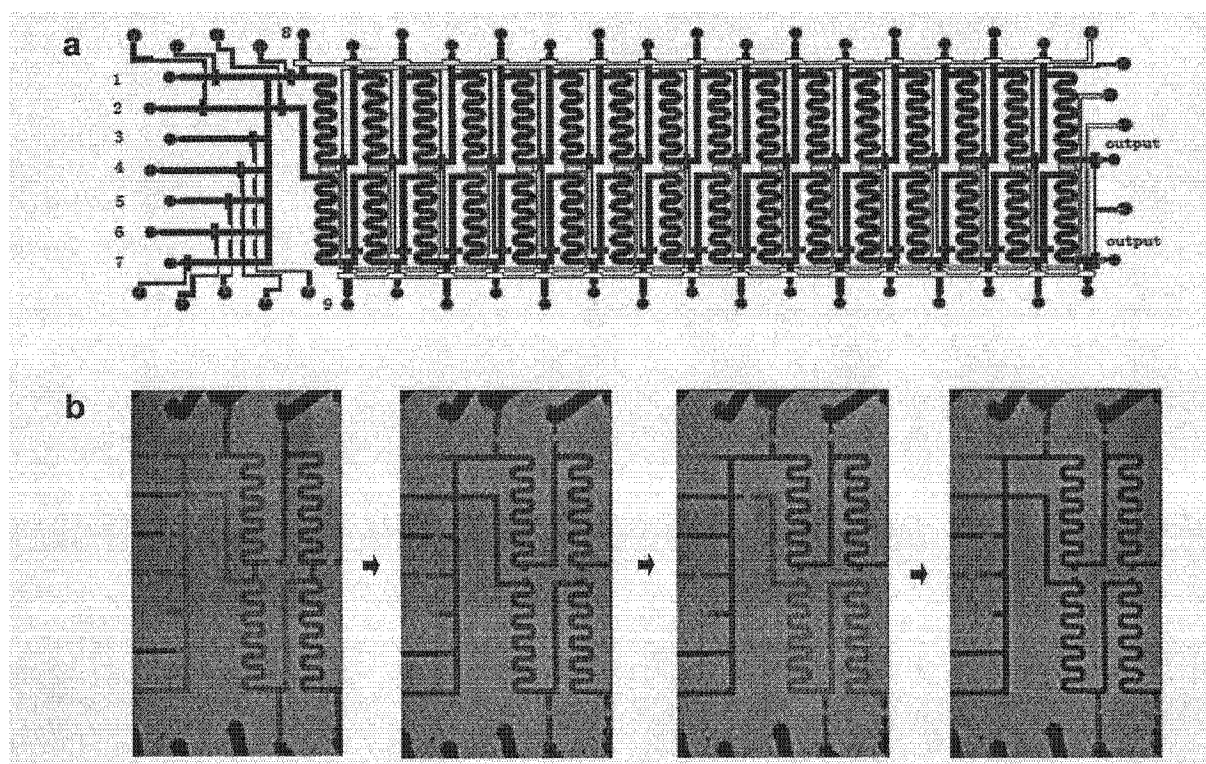


图 4

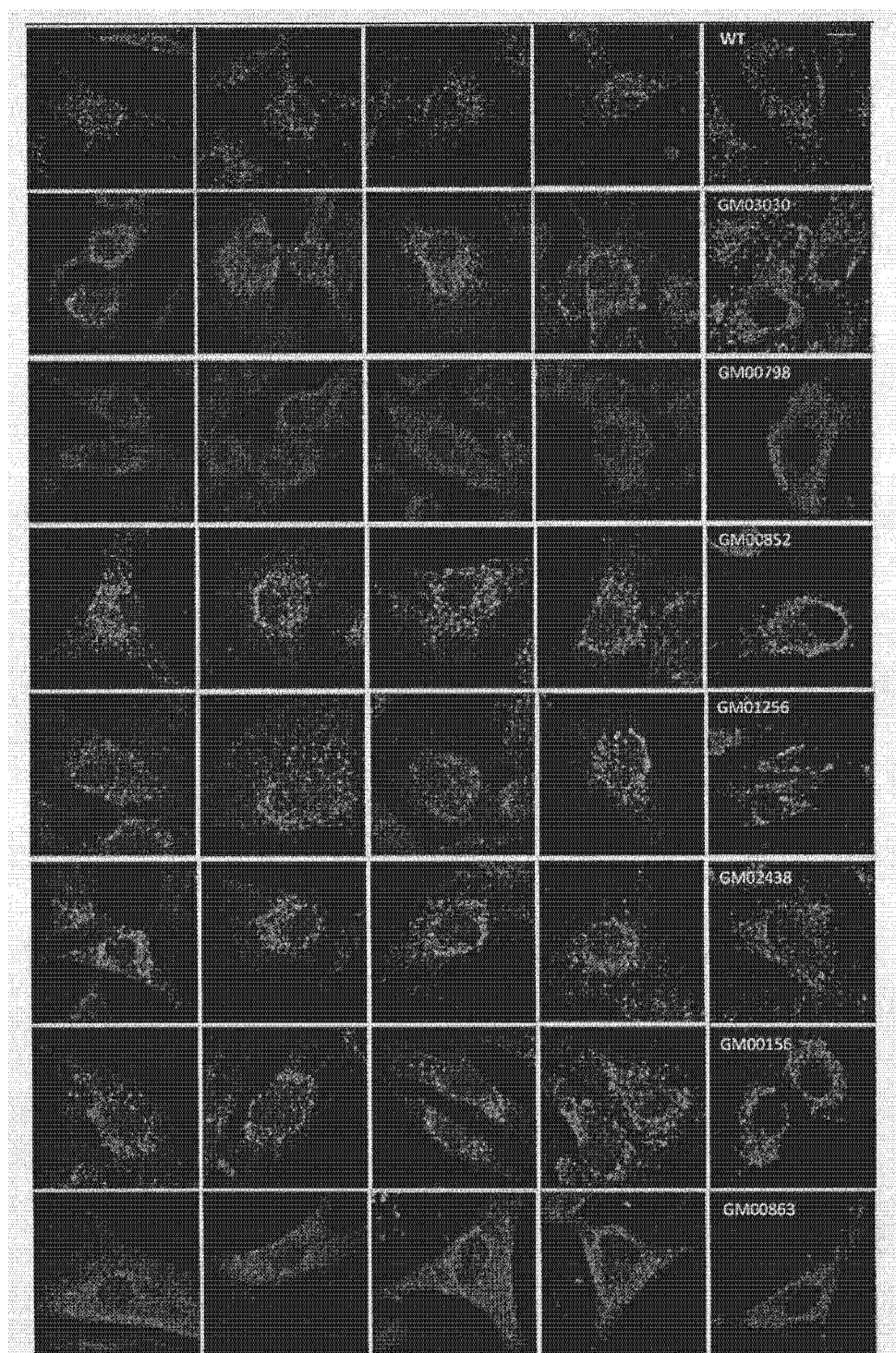


图 5

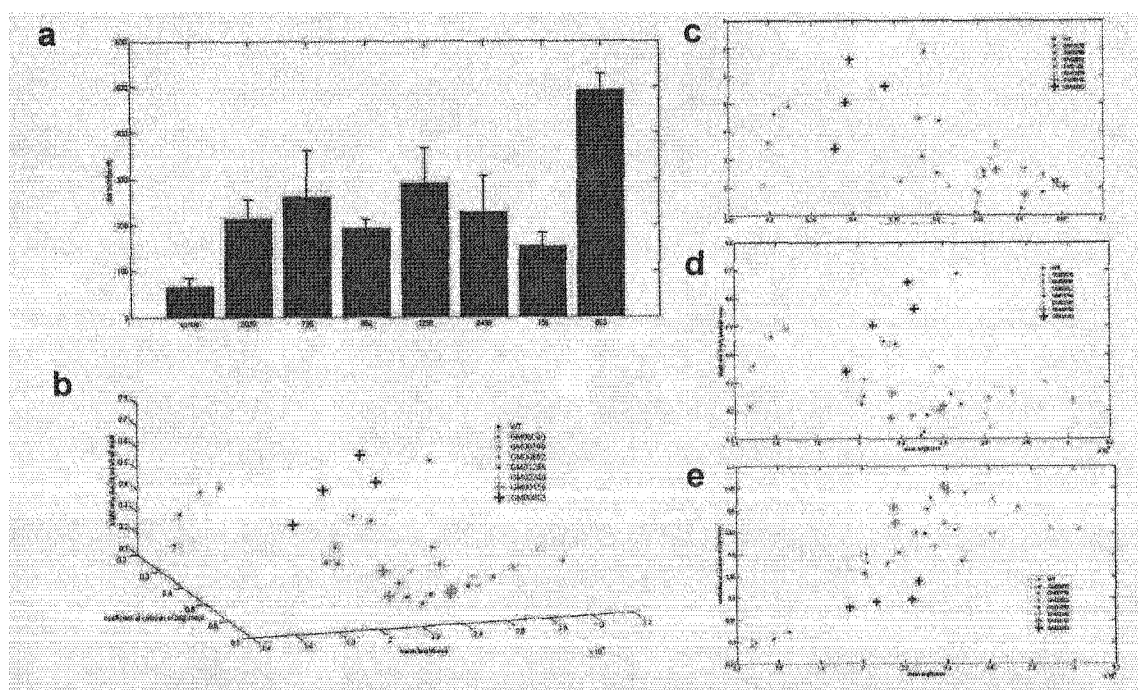


图 6

专利名称(译)	一种可用于细胞免疫荧光分析的微流芯片		
公开(公告)号	CN102500439A	公开(公告)日	2012-06-20
申请号	CN201110331113.6	申请日	2011-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学		
申请(专利权)人(译)	北京大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学		
[标]发明人	黄岩谊 俞立 庞玉宏 申洁 周莹		
发明人	黄岩谊 俞立 庞玉宏 申洁 周莹		
IPC分类号	B01L3/00 G01N21/64 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种可用于细胞免疫荧光分析的微流芯片，包括微流层、控制层以及将微流层和控制层连接起来的连接层；微流层具有纵向、横向两组微流通道，纵向微流通道具有m条微流通道、横向微流通道n条微流通道，m、n均为大于或等于2的正整数，每一条微流通道与同组的微流通道不相交，与另一组微流通道中的每一条相交一次，共形成 $m \times n$ 个交汇点；控制层具有2条以上的控制通道，每一条控制通道与至少一条微流通道形成至少一个交叠点，所述交叠点位置的连接层由弹性体材料构成，称为弹性体阀门；任意两个交汇点之间有且仅有一个交叠点；每一组微流通道中至少一条微流通道具有一个出口和一个入口与外界相通。

