



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101772697 A

(43) 申请公布日 2010.07.07

(21) 申请号 200880101686.6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.06.05

G01N 15/00(2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 11/04(2006.01)

60/924,998 2007.06.07 US

G01N 33/53(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.02.02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IL2008/000772 2008.06.05

(87) PCT申请的公布数据

W02008/149365 EN 2008.12.11

(71) 申请人 技术研究及发展基金有限公司

地址 以色列海法

(72) 发明人 亚历山大·莱申斯基

阿维谢伊·布兰斯基

科琳·纳塔尼尔

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 武晶晶 郑霞

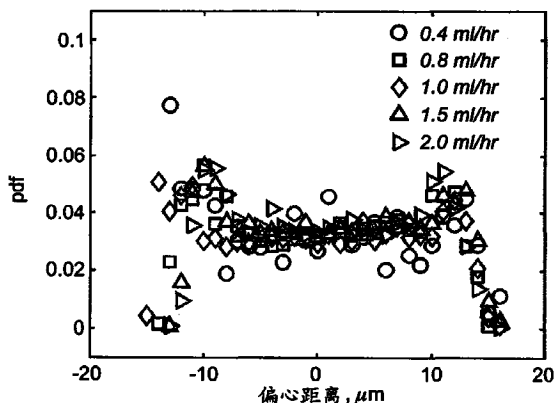
权利要求书 3 页 说明书 17 页 附图 9 页

(54) 发明名称

用于聚集颗粒的系统和方法

(57) 摘要

提供了一种聚集颗粒的方法,该方法包括:提供所述颗粒在悬浮介质中的悬浮液;以及使该悬浮液沿着通道流动,使得该流动悬浮液占据具有至少一种小于 100 μm 的截面尺寸的一定体积。所述悬浮介质具有这样的粘弹性,使得所述悬浮液在通道中流动将颗粒中的至少一些向在所述一定体积中包含的聚集区域引导。



1. 一种聚集颗粒的方法,所述方法包括:
提供所述颗粒在第一悬浮介质中的悬浮液;以及
使所述悬浮液沿着具有至少一种小于 $100\ \mu\text{m}$ 的截面尺寸的通道流动;
其中所述第一悬浮介质具有这样的粘弹性,以使得所述悬浮液在所述通道中的流动增加了所述颗粒在所述通道内的聚集区域中的浓度。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述聚集区域是在所述通道的高度的一半处。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述聚集区域具有与所述通道的长度垂直的截面,所述截面具有与在相同位置的所述通道的截面相同的形状,但更小。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述聚集区域与所述通道同轴。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中:
所述悬浮液包括多种尺寸的颗粒;以及
所述粘弹性使得所述悬浮液在所述通道中的流动优先将较大的颗粒向所述聚集区域引导。
6. 根据权利要求 1 或 5 所述的方法,其中提供悬浮液包括:
获得所述颗粒在第二悬浮介质中的悬浮液;以及
将所述第二悬浮介质与所述第一悬浮介质交换。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的方法,其中提供悬浮液包括:
提供具有各种粘弹性的多种悬浮介质;
响应所述介质的粘弹性,从所述多种悬浮介质中选择所述第一悬浮介质;以及
将所述颗粒悬浮于所选择的悬浮介质中。
8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中选择包括:响应所述颗粒的尺寸来选择。
9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的方法,其中提供悬浮液包括:
将所述颗粒悬浮于试验悬浮介质中;
使所述悬浮液沿着微通道流动,使得流动悬浮液具有至少一种小于 $100\ \mu\text{m}$ 的尺寸;
估计聚集质量;以及
增大所述试验悬浮介质的弹性,以改进聚集质量。
10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的方法,其包括:
以一定流速流动;
估计聚集质量;以及
增大所述流速以改进聚集质量。
11. 根据权利要求 9 所述的方法,其中增大所述试验悬浮介质的弹性包括将高分子量聚合物添加到所述悬浮液中。
12. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的方法,其中所述通道的深度小于 $100\ \mu\text{m}$ 。
13. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的方法,其中所述通道的宽度小于 $100\ \mu\text{m}$ 。
14. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的方法,其中所述通道具有各自小于 $100\ \mu\text{m}$ 的深度和宽度。
15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述颗粒是细胞。
16. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述第二悬浮介质包括血清。
17. 一种用于聚集流动颗粒的系统,所述系统包括:

通道,其具有壁和所述壁之间的底部;
流体源,其包括样品流体;以及
流体引导系统,其被配置成将所述样品流体从所述流体源通过入口导入所述通道中,

其中所述样品流体包括悬浮于液体中的所述颗粒,所述液体具有粘弹性,所述粘弹性减轻了施加外力场以在聚集区域聚集所述颗粒的需要。

18. 根据权利要求 17 所述的系统,其中所述聚集区域是在所述通道的高度的一半处。

19. 根据权利要求 17 或权利要求 18 所述的系统,其包括:

光源,其在所述入口的下游的检查区提供与所述聚集区域传感连通的探测光束;以及
检测器,其被配置成使用探测光束检测所述检查区中的所述颗粒。

20. 根据权利要求 17-19 中任一项所述的系统,其中所述颗粒包括细胞。

21. 根据权利要求 17-20 中任一项所述的系统,其中所述通道具有在 $5\ \mu\text{m}$ 和 $100\ \mu\text{m}$ 之间的至少一种截面尺寸。

22. 根据权利要求 21 所述的系统,其中所述至少一种截面尺寸包括与所述通道的底部垂直的截面的尺寸。

23. 根据权利要求 17-22 中任一项所述的系统,其中所述通道具有底部和壁,且在所述壁之间的距离大于 $100\ \mu\text{m}$ 。

24. 根据权利要求 17-23 中任一项所述的系统,其包括各自具有不同粘弹性的多种流体以及使用每一种流体来聚集不同尺寸的颗粒的说明书。

25. 一种试剂盒,其包括:

多种流体,各自独立地被包装在带有尺寸范围指示的包装物中;以及
说明书,其使用所述多种流体中的每一种来聚集指定尺寸范围的颗粒。

26. 一种评价液体的弹性的方法,所述方法包括:

向介质中添加单分散粒度分布的颗粒以获得悬浮液;
使所述悬浮液在具有至少一种 $100\ \mu\text{m}$ 或更小的截面尺寸的通道中流动;
在所述颗粒在所述通道中流经给定距离之后获得所述颗粒的空间分布;以及
分析所述空间分布以获得所述介质的弹性。

27. 根据权利要求 26 所述的方法,其中分析包括:响应所述介质的粘度进行分析,且所述方法包括获得所述介质的粘度。

28. 根据权利要求 27 所述的方法,其中获得所述介质的粘度包括测定所述介质的粘度。

29. 根据权利要求 26-28 中任一项所述的方法,其中所述颗粒在获得的悬浮液中的体积分数是在 0.001% 和 1% 之间。

30. 根据权利要求 26-28 中任一项所述的方法,其中获得的悬浮液的体积分数是 0.1% 。

31. 一种评价颗粒和粘合剂之间的相互作用的方法,其包括:

将所述颗粒聚集在通道的底部以上的层;以及
使所述聚集的颗粒在固定于所述底部的粘合剂以上流动。

32. 根据权利要求 31 所述的方法,其中将所述颗粒聚集,使得至少 90% 的所述颗粒的

中心是在具有小于所述通道的高度的一半的厚度的层中。

33. 根据权利要求 31 或权利要求 32 所述的方法,其中聚集所述颗粒包括在根据权利要求 1-16 中任一项所述的方法中聚集。

34. 根据权利要求 31-33 中任一项所述的方法,其包括进行多次所述方法,每次用不同高度的通道。

35. 一种用于评价颗粒和粘合剂之间的相互作用的装置,所述装置包括:

多个系统,各自根据权利要求 17-24 中任一项,且所述系统中的至少一个具有通道,所述通道具有固定于所述通道的底部的至少一部分之处的所述粘合剂。

36. 根据权利要求 35 所述的装置,其中所述多个系统具有共同的流体源。

37. 根据权利要求 35 或权利要求 36 所述的装置,其中所述多个系统具有共同的流体引导系统。

38. 根据权利要求 35-37 中任一项所述的装置,其具有控制器,所述控制器用于在与其它系统独立的各系统中控制流体进入所述通道的流速。

39. 根据权利要求 35-38 中任一项所述的装置,其具有固定于所述通道中的至少一个的至少一部分之处的粘合剂。

40. 根据权利要求 35-39 中任一项所述的装置,其中并非所有的所述通道都具有相同深度。

41. 根据权利要求 40 所述的装置,其中所述通道中的每一个具有与所有其它通道不同的深度。

42. 根据权利要求 35-41 中任一项所述的装置,其被配置成在所有的所述通道中以相同聚集质量聚集所述颗粒。

用于聚集颗粒的系统和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2008 年 6 月 7 日提交的美国临时专利申请第 60/924, 998 号的优先权。

[0003] 发明的领域和背景

[0004] 在本发明的一些实施方案中, 本发明涉及流式细胞术, 更具体但不排他地涉及荧光激活细胞分选 (FACS)。

[0005] 流式细胞术是用于同时多参数分析单个细胞的物理和 / 或化学特征的一种技术。流式细胞术允许对细胞 (或其它微观颗粒) 进行计数、检查和分选, 并提供单个颗粒的物理和 / 或化学特征的多参数分析。所要分析的细胞向检查点流动, 且该流动被设计成使得颗粒依次运动到达检查点, 所以每一颗粒被单独地分析。

[0006] 一种特定的流式细胞术被称为荧光激活细胞分选 (FACS)。FACS 根据每一个细胞的具体光散射和荧光特征, 将生物细胞或其它颗粒的多相混合物分选到两个或更多个容器中, 每一次一个细胞。它是一种有用的科学仪器, 因为它提供了来自单个细胞的荧光信号的快速、客观且定量的记录以及有特定兴趣的细胞的物理分离。

[0007] 该技术在许多领域中具有应用, 包括分子生物学、病理学、免疫学、植物生物学和海洋生物学。

[0008] 例如, 在细胞生物学和免疫学的领域中, 它与荧光标记抗体一起使用, 该荧光标记抗体与特异性靶细胞结合, 并允许定量分析血细胞计数器中的抗原。该方法广泛用于研究蛋白质表达和蛋白质定位、细胞表面抗原定量 (在不同临床病变例如白血病中的血液细胞上的 CD 标记物)、细胞内抗原和核抗原 (调节性 T 细胞中的转录因子如 FoxP3 的激活)、细胞活力 (通过 Annexin/PI 染色来定量凋亡细胞) 以及其它。

[0009] 流式细胞术和 FACS 在医学中也具有广泛应用, 尤其是在移植、血液学、肿瘤免疫学和化疗、遗传学和体外受精 (IVF) 中的精子分选。

[0010] 一般, 在流动血细胞计数器中, 光束指向流体流, 其中颗粒在该流体中一个接一个排列。许多检测器指向流体流通过光束的位点。通过光束的每一个悬浮的颗粒以某种方式 (例如散射光) 与所述光相互作用, 且来自所述颗粒的光被所述检测器拾取。检测到的光被分析, 以提供关于每一单个颗粒的物理和化学结构的各种类型的信息。

[0011] 流动血细胞计数器通常具有 5 个主要组件 :

[0012] 流动池, 其中液体流运载和排列所述细胞, 使得它们依次运动通过用于感测的光束 ;

[0013] 光源 ;

[0014] 检测器 ;

[0015] 放大系统 ; 以及

[0016] 用于分析放大的检测信号的计算机。

[0017] 在流动池中排列颗粒通过将外力施加于颗粒来实现。在市场上可获得的流动血细胞计数器中所使用的施加外力的一种方法在本领域中称为“鞘流”。其它方法包括将光和超声施加于颗粒。

[0018] 发明概述

[0019] 在一些实施方案中,本发明涉及流式细胞术,更具体但不排他地涉及荧光激活的细胞分选 (FACS)。

[0020] 本发明的一些实施方案的一个方面涉及排列颗粒,以便它们依次运动例如通过流动血细胞计数器的光束。

[0021] 因此,本发明的一些实施方案的一个方面涉及聚集颗粒的方法,该方法包括:

[0022] 提供颗粒在第一悬浮介质中的悬浮液;以及

[0023] 使该悬浮液沿着具有至少一种小于 100 μm 的截面尺寸的通道流动;

[0024] 其中所述第一悬浮介质具有这样的粘弹性,以使得所述悬浮液在所述通道中的流动增加了颗粒在所述通道内的聚集区域中的浓度。

[0025] 在示例性实施方案中,聚集区域是在通道的高度的一半处。

[0026] 在一些实施方案中,所述聚集区域具有与通道的长度垂直的截面,所述截面具有与在相同位置的通道的截面相同的形状,但更小。

[0027] 可选择地,所述聚集区域与所述通道同轴。

[0028] 在本发明的一些示例性实施方案中,所述悬浮液包括多种尺寸的颗粒;以及

[0029] 所述粘弹性使得悬浮液在所述通道中的流动优先将较大的颗粒向所述聚集区域引导。

[0030] 可选择地,提供悬浮液包括:

[0031] 获得所述颗粒在第二悬浮介质中的悬浮液;以及

[0032] 将所述第二悬浮介质与所述第一悬浮介质交换。

[0033] 可选择地,提供悬浮液包括:

[0034] 提供具有各种粘弹性的多种悬浮介质;

[0035] 响应所述介质的粘弹性,从所述多种悬浮介质中选择所述第一悬浮介质;以及

[0036] 将颗粒悬浮于所选择的悬浮介质中。

[0037] 在一些实施方案中,选择包括:响应所述颗粒的尺寸来选择。

[0038] 在示例性实施方案中,提供悬浮液包括:

[0039] 将颗粒悬浮于试验悬浮介质中;

[0040] 使该悬浮液沿着微通道流动,使得该流动悬浮液具有至少一种小于 100 μm 的尺寸;

[0041] 估计聚集质量;以及

[0042] 改变所述试验悬浮介质的粘弹性,以改进聚集质量。

[0043] 可选择地,该方法包括:

[0044] 使该悬浮液以一定流速流动;

[0045] 估计聚集质量;以及

[0046] 增大所述流速以改进聚集质量。

[0047] 可选择地,增大所述试验悬浮介质的粘弹性包括将高分子量聚合物添加到该悬浮液中。

[0048] 可选择地,该通道的深度小于 100 μm 。

[0049] 可选择地,该通道的宽度小于 100 μm 。

- [0050] 可选择地,该通道具有各自小于 100 μm 的深度和宽度。
- [0051] 在一些示例性实施方案中,所述颗粒是细胞。
- [0052] 在一些示例性实施方案中,第二悬浮介质包括血清。
- [0053] 根据本发明的一些实施方案的另一个方面,还提供了用于聚集流动颗粒的系统,该系统包括:
- [0054] 通道,其具有壁和壁之间的底部;
- [0055] 流体源,其包括样品流体;以及
- [0056] 流体引导系统 (fluid direction system),其被配置成将所述样品流体从所述流体源通过入口导入所述通道中,
- [0057] 其中所述样品流体包括悬浮于液体中的颗粒,所述液体具有粘弹性,该粘弹性减轻了施加外力场以在聚集区域聚集颗粒的需要。
- [0058] 在示例性实施方案中,所述聚集区域是在所述通道的高度的一半处。
- [0059] 根据一些示例性实施方案,该系统包括:
- [0060] 光源,其在所述入口的下游的检查区提供与所述聚集区域传感连通 (sensory communication) 的探测光束;以及
- [0061] 检测器,其被配置成使用探测光束检测所述检查区中的颗粒。
- [0062] 可选择地,所述颗粒包括细胞。
- [0063] 在一些实施方案中,所述通道具有在 5 μm 和 100 μm 之间的至少一种截面尺寸。
- [0064] 可选择地,所述至少一种截面尺寸包括与所述通道的底部垂直的截面的尺寸。
- [0065] 可选择地,所述通道具有底部和壁,且在所述壁之间的距离大于 100 μm 。
- [0066] 可选择地,所述系统包括各自具有不同粘弹性的多种流体以及使用每一种流体来聚集不同尺寸的颗粒的说明书。
- [0067] 根据本发明的一些实施方案,提供了一种试剂盒,其包括:
- [0068] 多种流体,各自独立地被包装在带有尺寸范围指示的包装物中;以及
- [0069] 说明书,其使用所述多种流体中的每一种来聚集指定尺寸范围的颗粒。
- [0070] 本发明的一些实施方案的一个方面涉及评价液体的弹性的方法,该方法包括:
- [0071] 向介质中添加单分散粒度分布的颗粒以获得悬浮液;
- [0072] 使该悬浮液在具有至少一种 100 μm 或更小的截面尺寸的通道中流动;
- [0073] 在颗粒在通道中流经给定距离之后获得颗粒的空间分布;以及
- [0074] 分析所述空间分布以获得介质的弹性。
- [0075] 可选择地,分析包括:响应介质的粘度进行分析,且所述方法包括获得介质的粘度。
- [0076] 可选择地,获得所述介质的粘度包括测定所述介质的粘度。
- [0077] 在一些实施方案中,所述颗粒在获得的悬浮液中的体积分数是在 0.001% 和 1% 之间。
- [0078] 可选择地,获得的悬浮液的体积分数是 0.1%。
- [0079] 根据本发明的一些实施方案的一个方面,还提供了一种评价颗粒和粘合剂之间的相互作用的方法,其包括:
- [0080] 将所述颗粒聚集在通道的底部以上的层;以及

- [0081] 使所述聚集的颗粒在固定于所述底部的粘合剂以上流动。
- [0082] 可选择地,将所述颗粒聚集,使得至少 90%的颗粒的中心是在具有小于通道的高度的一半的厚度的层中。
- [0083] 在一些实施方案中,聚集颗粒包括在根据本发明的实施方案的方法中聚集。
- [0084] 在一些实施方案中,评价颗粒和粘合剂之间的相互作用包括进行多次以上方法,每次用不同深度的通道。
- [0085] 本发明的一些实施方案的一个方面涉及用于评价颗粒和粘合剂之间的相互作用的装置,该装置包括:
- [0086] 多个系统,各自根据本发明的实施方案,且所述系统中的至少一个具有通道,该通道具有固定于所述通道的底部的至少一部分之处的粘合剂。
- [0087] 可选择地,所述多个系统具有共同的流体源。
- [0088] 可选择地,所述多个系统具有共同的流体引导系统。
- [0089] 可选择地,该装置具有控制器,所述控制器用于在与其它系统独立的各系统中控制流体进入通道的流速。
- [0090] 可选择地,并非所有的通道都具有相同深度。
- [0091] 可选择地,通道中的每一个具有与所有其它通道不同的深度。
- [0092] 在一些实施方案中,该装置被配置成在所有的通道中以相同聚集质量聚集颗粒。
- [0093] 除非另有规定,本文所使用的所有技术术语和 / 或科学术语具有与本发明所述领域普通技术人员所普遍理解的含义相同的含义。虽然类似或等同于文中所述的方法和材料的方法和材料可以用于实施或试验本发明的实施方案,但在以下描述了示例性方法和 / 或材料。在冲突的情况下,将以包括定义在内的专利说明书为准。另外,材料、方法和实施例仅是示例性的,而不期望必定是限制性的。
- [0094] 附图简述
- [0095] 在这里仅仅作为例子参考附图描述了本发明的一些实施方案。现在详细地具体参考附图,强调所显示的细节作为例子,用于示例性论述本发明的实施方案。在这方面,参考附图的说明使本领域技术人员清楚本发明的实施方案如何实施。
- [0096] 在附图中:
- [0097] 图 1 是根据本发明的一个示例性实施方案的聚集颗粒的方法中采取的操作的流程图。
- [0098] 图 2A 是根据本发明的一个示例性实施方案的用于聚集流动颗粒的系统的示意图。
- [0099] 图 2B 是根据本发明的该实施方案的通道的示意图。
- [0100] 图 3 是根据本发明的一个实施方案的试剂盒的图示描述。
- [0101] 图 4A 是根据本发明的一个实施方案的 FACS 仪器的示意图。
- [0102] 图 4B 是根据本发明的一个示例性实施方案的测定介质的流变性质的方法中采取的操作的流程图。
- [0103] 图 4C 是根据本发明的一个示例性实施方案的研究颗粒 - 粘合剂相互作用的装置的示意图。
- [0104] 图 5A 是显示 $8\mu\text{m}$ 直径聚苯乙烯微球在甘油溶液中的 PDF (粒度分布函数) 实验

值与垂直偏心距离的关系曲线的图。空心符号为实验结果。

[0105] 图 5B 是显示在与图 5A 中所述的实验类似、但用聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 溶液的实验中获得的实验结果的图。空心符号为实验结果。实线是对实验结果的高斯拟合。

[0106] 图 6 是显示在双对数坐标图上聚合物溶液 PVP (头朝上三角) 和 PAA (头朝下三角) 的刚性模量 G' 与振荡频率 ω 的关系曲线的图。插图显示了聚合物溶液的剪切粘度 η (方形) 和复数粘度 $|\eta^*|$ (Δ, ∇) (三角, 如上) 分别与 γ 和 ω 的关系曲线。

[0107] 图 7 是显示实验结果 (空心符号) 和理论预测 (实曲线) 之间的对比的图: $8 \mu\text{m}$ 颗粒, PVP 溶液 (Δ); $8 \mu\text{m}$ 颗粒, PAA 溶液 (\square); $5 \mu\text{m}$ 颗粒, PAA 溶液 (\diamond)。对应于 PAA 溶液的理论曲线没有可调节的参数。

[0108] 图 8A 和 8B 是显示悬浮于 PAA 溶液中的 PS 微球的 PDF 与垂直偏心位置的关系曲线的图。空心符号为实验结果。图 8A 显示了 $8 \mu\text{m}$ 直径颗粒的结果; 以及图 8B 显示了 $5 \mu\text{m}$ 直径颗粒的结果。实线用于引导眼睛。

[0109] 图 9A 是在根据本发明的一个实施方案的给定流动系统中预测给定悬浮介质的聚集质量的方法 900 中采取的操作的流程图。

[0110] 图 9B 是在根据本发明的一个实施方案的给定流动系统中预测给定悬浮介质的聚集质量的简化方法 900' 中采取的操作的流程图。

[0111] 发明的具体实施方案的描述

[0112] 综述

[0113] 在本发明的一些实施方案中, 本发明涉及流式细胞术, 更具体但不排他地涉及荧光激活细胞分选 (FACS)。

[0114] 一些实施方案提供了使用微观流体流的颗粒聚集的方法或装置。

[0115] 本发明的一些实施方案可以用一般不认为是微观流体的通道来实施。用任何给定尺寸的通道在离开入口的距离 x/d 可以获得相同的聚集质量, 只要以下表达式保持其值:

$$[0116] \left(\frac{a}{d}\right)^2 \left(\frac{\bar{U}}{d}\right)^{\beta-n}$$

[0117] 其中 a 为颗粒的半径, d 为通道最小尺寸的一半, \bar{U} 是流速, 以及 β 和 n 表示悬浮介质的粘弹性。鉴于上述情况, 关于放大的可能性的进一步的细节从以下在标题“理论指导”下提供的理论分析可以清楚看出。

[0118] 在示例性实施方案中, 聚集包括使颗粒在具有减轻对颗粒施加外场以使之聚集的需要的这种粘弹性的悬浮介质中流动。

[0119] 在一些示例性实施方案中, 所述颗粒包括细胞, 例如血细胞、细菌和 / 或癌细胞。可选择地, 所述颗粒包括用对可溶性因子如配体、成形受体、抗原和抗体特异的抗体覆盖的大分子、囊泡、微珠。尽管如此, 术语“颗粒”不必限于这些例子。

[0120] 在一些示例性实施方案中, 所述颗粒在通道内部在悬浮介质中流动, 并且在通道的一定部分中浓缩, 这里称为“聚集区域”。可选择地, 聚集区域是在通道的中心, 例如在底部的中心从通道垂直延伸的容积中。

[0121] 应该注意, 术语“通道”在这里用于表示具有至少一种小于 $100 \mu\text{m}$ 的尺寸且具有远远大于 $100 \mu\text{m}$ 例如 1mm 、 10mm 、 50mm 、 100mm 、 1000mm 或任何中间值或长度的长度的任何结构。在一些实施方案中, 通道是在实心体的上表面上的沟槽。在一些实施方案中, 通道是管。

与通道的长度垂直的通道的截面可选择地是长方形、正方形、圆形或球形。

[0122] 长方形或正方形截面的通道可选择地使用石印术例如软石印术 (soft lithography) 和光刻法来获得。这类制造方法允许容易且以精确质量制造带有微通道的实体,例如实验室芯片 (lab-on-chip)。

[0123] 如果该通道类似地较长且颗粒类似地较大,则聚集质量可选择地用具有较大的最小尺寸的通道来获得。如果该通道具有大于 $100\ \mu\text{m}$ 的最小尺寸和颗粒是大约 $1\text{--}10\ \mu\text{m}$,则聚集质量降低。

[0124] 在几个方面,在通道的中心处聚集可以比在通道的其它区域聚集更有优势。例如,在通道的中心,流速高于偏心处。因此,在通道的中心处聚集的颗粒流动更快,且可以在更高的生产量下处理。在另一个例子中,当处理的颗粒为小布朗颗粒,例如小于 $1\ \mu\text{m}$ 时,它们趋向于在流动方向上垂直扩散,且横向扩散性通过剪切(本领域中被称为泰勒分散的效应)来增强。该趋势在其中剪切速率最小的通道的中心处是最小的,且因此,由于横向剪切增强的扩散,颗粒沿着流动方向的更快运动可以用最小的样品宽度增宽来实现。在另一个例子中,如果颗粒具有吸附到通道的壁上的趋势,那么在中心聚集颗粒将它们与壁的相互作用最小化且降低了吸附/粘附现象。

[0125] 在本发明的一些实施方案中,聚集是水平的,即,颗粒聚集在接近通道深度的一半的有限深度的水平区域。水平聚集可以是有利的,例如,当颗粒要可选地用定位在通道以上的光学装置进行光学分析时。在这些情况下,水平聚集可以使得所有颗粒处在光学分析仪的焦点内,这允许与颗粒垂直聚集的情况所允许的相比更快地分析颗粒。本发明的一些实施方案实际上与重力无关。虽然如此,因为在一些实施方案中颗粒使用光束分析,把术语“水平”和“垂直”解释为表示与光束成直线是方便的,例如界定光束沿着垂直方向到达。

[0126] 当通道的垂直尺寸(即通道的高度)为 $100\ \mu\text{m}$ 或更小时,可选择地获得了水平聚集。

[0127] 在一些实施方案中,聚集是在垂直方向上,即,颗粒在与通道的底部垂直、在通道的宽度的大约一半的聚集区域中浓缩。当通道的水平尺寸(即通道的宽度)为大约 $100\ \mu\text{m}$ 或更小时,可选择地获得了垂直聚集。

[0128] 在一些实施方案中,在颗粒流动离开通道的底部和上壁以及也流动离开通道壁、并且在不延伸至接触任何通道壁的容积中浓缩的意义上,发生了三维(3-D)聚集。用具有大约 $100\ \mu\text{m}$ 或更小的高度和宽度的通道可选择地获得了二维聚集。

[0129] 可选择地,在其一维中用 $100\ \mu\text{m}$ 或更小的通道获得三维聚集,在另一维中聚集通过其它方法获得,所述其它方法同样不必按照本发明的实施方案,例如鞘流聚集,也称为流体动力聚集(hydrodynamic focusing)。

[0130] 可选择地,鞘流聚集或其它已知的聚集方法与粘弹性聚集结合使用。

[0131] 在一些实施方案中,聚集的颗粒排成一行,任选一个接一个,使得颗粒的很大一部分的中心是在具有大约与所述颗粒的典型半径相同的半径的圆柱体内。在一些实施方案中,这种聚集明显减小了颗粒的纵向弥散且获得了更高生产量。改进的生产量可能是由于颗粒聚集在中心,其中压力驱动的流动的速度预计是最大的。

[0132] 可选择地,所述很大一部分是颗粒的 90% 或更高,可选择地超过 95%,可选择地超过 99%。

[0133] 可选择地,圆柱体的半径小于颗粒典型半径的 120%。

[0134] 在非球形颗粒的情况下,所述颗粒典型尺寸对应颗粒的最小尺寸。例如,具有 1 μm 直径的底部和 10 μm 高度的圆柱形颗粒与 1 μm 直径的球形颗粒类似地聚集。

[0135] 在本发明的示例性实施方案中,聚集颗粒的方法包括使所述颗粒的悬浮液在具有至少一种小于 100 μm 的尺寸的长通道中流动。

[0136] 可选择地,在使所述颗粒向前流动相对短的距离之后发生了显著的聚集。例如,在使颗粒向前流动 10cm 或更小例如在 5cm、2cm 或 1cm 之后,能够发生 90% 的颗粒聚集在在具有比所述颗粒半径大 20% 的半径的圆柱体内。

[0137] 在一个示例性实施方案中,该悬浮液包括颗粒和悬浮介质,且该悬浮介质被选择和 / 或控制为具有导致所需聚集的粘弹性,并减轻对流动悬浮液施加外场以获得聚集的需要。

[0138] 在本发明的一些示例性实施方案中,该悬浮介质在通道内的所有地方具有相同的密度。可选择地,聚集不需要密度梯度。

[0139] 控制悬浮介质的粘弹性任选包括将改性剂添加到该悬浮介质中,所述改性剂改变该悬浮液的粘弹性。可选择地,所述改性剂是高分子量聚合物,例如具有在大约 50 千道尔顿和大约 1000 千道尔顿之间的分子量的聚合物。优选地,所述改性剂以可溶于分散介质的量添加。可选择地,所述改性剂是生物相容的。当颗粒包括生物材料例如活细胞或微珠时,该选择可以是有利的。

[0140] 可用于各种实施方案的一些改性剂的例子包括但不限于:聚丙烯酰胺 (PAA)、聚乙二醇 (PEG)、聚蔗糖 (Ficoll™)、聚葡萄糖 (葡聚糖)、甲基纤维素和黄原胶。

[0141] 可能影响聚集的一些粘弹性包括:粘度、弹性、以及在悬浮介质不是牛顿性的情况下所述介质的剪切稀化。

[0142] 粘度可选择地以帕斯卡-秒或泊来测量。一般,较高的粘度导致了较低效率的聚集。

[0143] 弹性可选择地通过第一法向应力差来定义,通常表示为 N_1 。 N_1 与可使用可商业上获得的流变仪实验测定的储能模量或弹性模量 G' 相关。通常,较高的弹性导致了更有效的聚集。

[0144] 剪切稀化是响应剪切速率的改变的粘度改变。通常,较高剪切稀化导致了更有效的聚集。

[0145] 用具有减轻了使用外力场来获得聚集的需要的这种粘弹性的悬浮介质进行的颗粒聚集在本文称为“粘弹性聚集”。

[0146] 在一些实施方案中,聚集受管内的悬浮液的流速的影响。一般,较高的流速导致更有效的聚集。然而,在一些其它实施方案中,聚集几乎独立于流速。在聚集独立于流速的情况下,减轻了精确控制流速的需要,且利用独立于流速的聚集的系统可以比使用依赖于流速的聚集的实施方案制作得更简单和更稳健。例如,在独立于流速的实施方案中,流速能够具有小得多的精确性。用于获得独立于流速的聚集的条件在图 9A 的上下文和在“理论指导”下进行了论述。

[0147] 在详细说明本发明的至少一个实施方案之前,应该理解的是,本发明在其应用上不必限于在以下描述中阐述和 / 或在附图和 / 或实施例中示例的组分和 / 或方法的构造和

布置的细节。本发明能够包括其它实施方案或能够以多种方式实践和 / 或实施。

[0148] 现在参照附图,图 1 是在根据本发明的一个示例性实施方案的聚集颗粒的方法 (2) 中所采取的操作的流程图。

[0149] 操作 4 包括提供颗粒在悬浮介质中的悬浮液。该悬浮介质具有当该悬浮液在适当尺寸的通道中流动时使得至少一些颗粒被引向所述通道内的聚集区域的这种粘弹性。

[0150] 在一些实施方案中,与通道的长度垂直的聚集区域截面具有基本上等于所述通道的宽度的宽度,以及比所述通道的深度小得多的长度。在这些情况下,聚集在这里被称为“水平的”。

[0151] 在一些实施方案中,与通道的长度垂直的聚集区域截面具有基本上等于所述通道的深度的深度,以及比所述通道的宽度小得多的宽度。在这些情况下,聚集在这里被称为“垂直的”。

[0152] 在一些实施方案中,与通道的长度垂直的聚集区域截面具有基本上小于所述通道的深度的高度,以及比所述通道的宽度小得多的宽度。在这些情况下,所述聚集在这里被称为 3-D。

[0153] 在本发明的一个示例性实施方案中,所述通道的深度小于 $100\ \mu\text{m}$,具有更浅的通道,允许更容易的聚集(在其它类似条件下)。限制所述通道的深度的两个因素是通道太小而堵塞的趋势,以及为了在较小通道内使流体流动所需的较高入口压力。

[0154] 可选择地,所述通道还具有小于 $100\ \mu\text{m}$ 的宽度,在该情况下,获得了 2-D 聚集,并且颗粒离开通道的底壁和顶壁以及还离开通道的垂直壁而聚集。在 3-D 聚集,所述聚集区域可选择地具有与通道的截面类似但更小的截面。可选择地,3-D 聚集区域与所述通道同轴。

[0155] 操作 6 包括使所述悬浮液沿着通道流动。

[0156] 在一些示例性实施方案中,方法 2 导致了将所述颗粒一个接一个排列,允许在流动血细胞计数器中检查它们。

[0157] 在一些实施方案中,所述悬浮液包括多种尺寸的颗粒,且所述悬浮液体的粘弹性使得悬浮液在通道中流动选择性地给给定尺寸的颗粒向所述聚集区域引导。例如,在以下关于图 5A 和图 5B 所述的一些实施方案中,95% -99% 的 $8\ \mu\text{m}$ 直径的颗粒被引向所述聚集区域,而仅仅 35% -40% 的 $5\ \mu\text{m}$ 直径的颗粒被引向相同的聚集区域。

[0158] 提供悬浮介质的示例性方式

[0159] 在一些实施方案中,所述颗粒是干燥的,且悬浮于根据介质粘弹性选择的悬浮介质中。

[0160] 在一些实施方案中,所述颗粒在悬浮于不适合的介质中时提供。

[0161] 可选择地,添加过量的适合的悬浮介质,以便控制或消除所提供的悬浮介质的不适合的粘弹性的效果。

[0162] 可选择地或另外地,所述悬浮介质与具有适合的粘弹性的另一悬浮介质交换。

[0163] 例如,在许多实施方案中,血液被处理,且要分选的颗粒为血细胞,提供为悬浮于血清中。

[0164] 在一些实施方案中,将盐水加入到血液中。可选择地,所添加的血清的量是血液量的大约 15 倍、20 倍或 25 倍。

[0165] 在一些实施方案中,血清与盐水交换。可选择地,这种交换包括离心血液样品、提取血浆、以及用盐水悬浮该提取的血浆。

[0166] 在一些实施方案中,用于替换血清的盐水和 / 或加到血清中的盐水包括如上所述的改性剂。

[0167] 在一些实施方案中,提供了多种可选择的悬浮介质,且根据悬浮介质粘弹性和应该被聚集或分选的颗粒的性质例如颗粒的尺寸来选择它们中的一种。

[0168] 可选择地,响应颗粒的尺寸和变形性来选择所述悬浮介质。可选择地,使用变形性来定义有效半径,且响应定义的有效半径来选择所述悬浮介质。

[0169] 可选择地,对于不同尺寸和变形性的颗粒提供不同的悬浮介质。

[0170] 在一些实施方案中,首先使用试验性悬浮介质,且使得所述颗粒沿着某些路径在试验性悬浮介质中在微通道中流动,并评价聚集质量。聚集质量可选择地被定义为在以给定流速在通道中流动给定距离之后聚集在给定尺寸的聚集区域的颗粒的百分率。

[0171] 如果聚集不充分,可选择地改良所述悬浮介质。可选择地,所述悬浮介质通过将改性剂添加到其中来改良,所述改性剂改变所述悬浮介质的粘弹性。可选择地,所述改性剂包括会提高溶解了它的液体的弹性的高分子量聚合物如聚丙烯酰胺 (PAA)。可选择地或另外,所述改性剂包括已知会改变溶解了它的液体的粘度的高分子量聚合物,例如甘油。可选择地,一种聚合物同时改变粘度和弹性。可选择地,一种或多种聚合物用于改变弹性,且一种或多种聚合物用于改变粘度。

[0172] 在本发明的一个示例性实施方案中,聚集质量根据 95% 的聚集颗粒的中心所位于的最薄层的宽度来估计。可选择地,该层越薄,聚集越好。可选择地,聚集质量根据其中心位于给定厚度的层内的聚集颗粒的百分率来估计。

[0173] 另外地或可选择地,聚集质量根据颗粒在通道中行进以聚集到一定程度的路径的长度来估计。例如,在一个实施方案中,如果 95% 的颗粒浓集在离开入口 20mm 的 2 μ m 厚的层中,则认为该聚集优于如果颗粒浓集在离开入口 50mm 的 2 μ m 厚的层中。

[0174] 示例性系统

[0175] 图 2A 是根据本发明的一个示例性实施方案的用于聚集流动的颗粒的系统 100 的示意图。该图显示了通过流体引导系统 145 与流体源 125 流体连通的通道 (105)。提供了流体引导系统 145,用于通过入口 127 将样品流体从流体源 125 引导入通道 105 并引导向检查区 128。可选择地,流体引导系统 145 包括注射泵,它的活塞以恒定和受控制的速率被推动。可商业上获得的适合的流体引导系统的例子是 KD Scientific Inc. (美国) 的 KDS210 Scientific。

[0176] 图 2B 是通道 105 的示意图。该图显示通道 105 具有壁 110 和 115、底部 120 和顶壁 122。

[0177] 样品流体 130 包括悬浮于悬浮介质中的颗粒 135。该悬浮介质具有有利于颗粒 130 在通道 105 的一部分 140 中聚集的粘弹性,且减轻施加外场以获得聚集的需要。虽然如此,在一些实施方案中,如本领域已知的那样施加外场,可选择地,以便增强聚集,可选择地或另外地以便沿着其它方向聚集所述颗粒。

[0178] 在操作中,流体 130 通过流体引导系统 145 被引导至 105,且颗粒 135 被引导至包封在通道 105 中的聚集区域 140。

[0179] 通道 105 是微通道,具有与底部 120 垂直的高度 h 以及在壁 110 和 115 之间的宽度 w 。高度 h 和宽度 w 的至少一个小于 $100\ \mu\text{m}$,可选择地在约 $5\ \mu\text{m}$ 和约 $100\ \mu\text{m}$ 之间,例如 $10\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ 、 $50\ \mu\text{m}$ 、 $80\ \mu\text{m}$ 或 $100\ \mu\text{m}$ 。可选择地,在壁 110 和 115 之间的距离 w 也小于 $100\ \mu\text{m}$ 。可选择地, h 或 w 的一个大于 $100\ \mu\text{m}$ 。在一个示例性实施方案中, w 为 1mm 且 h 为 $50\ \mu\text{m}$ 。

[0180] 可选择地,系统 100 还包括图 3 中所图示的试剂盒 200。试剂盒 200 包括多个包装物 205,其在图示的实施方案中为瓶,且各个包装物含有悬浮介质 210,所述悬浮介质 210 具有适合于聚集给定尺寸的颗粒的粘弹性。各个瓶 205 带有标记 215,指示了要被悬浮在其中以使用系统 100 聚集的颗粒的尺寸。可选择地,该标记指示了用于不同流速的不同粒度。可选择地,该标记指示了对于不同尺寸的系统的不同粒度。

[0181] 可选择地,试剂盒 200(和/或系统 100)还包括哪些颗粒应该用什么悬浮介质聚集的说明书。可选择地,该指示提到了粒度。另外地或可选择地,该指示提到了某些类型的细胞,例如:红细胞、白细胞、癌细胞和/或细菌。

[0182] 示例性悬浮介质

[0183] 在本发明的一些实施方案中,用尝试法选择或挑选悬浮介质。

[0184] 例如,磷酸盐缓冲盐水(PBS)的粘弹性可以通过向其添加 360 千道尔顿的 PVP 来改变。可选择地,添加 PVP 以形成大约 2%、5%、8% 或任何中间浓度的分散介质。在另一例子中,PBS 的粘弹性通过添加类似量的具有高于 7 千道尔顿的分子量的葡聚糖来改变。另外地或可选择地,将 5-100ppm 的 PAA 和/或甲基纤维素添加到该盐水中。

[0185] 在一些实施方案中,使用理论分析来指导尝试法。例如,计算用于在给定通道中聚集一定粒度的颗粒所需的粘弹性,且使用具有类似粘弹性的介质作为试验性悬浮介质,以及如果必要,如以上所说明的那样改变。

[0186] 示例性应用

[0187] 示例性 FACS 仪器

[0188] 图 4A 是利用根据本发明的一个实施方案的系统的 FACS 仪器 400 的示意图。仪器 400 包括可选择的上述类型的且在图 2A 和图 2B 中所示的颗粒聚集系统 100。流体源中的流体包括悬浮于适合粘弹性的悬浮介质中的颗粒。系统 100 在颗粒通过通道 105 流到检查区 405(图 1A 中的 128)之后从流体源输出颗粒。

[0189] 仪器 400 还包括光源 410,光源 410 将光束指向检查区 405,以便照射从系统 100 到达检查区的颗粒。可选择地,由系统 100 提供的聚集使得颗粒一个接一个地到达检查区。每一颗粒与从光源 410 到达的光相互作用,可选择地通过散射所述光。另外或可选择地,颗粒中的一些还发射荧光。

[0190] 可选择地,光源 410 从以上通道 105 照射所述颗粒。在其中聚集区域与通道的高度的中间成水平的(即与底部 120 平行)且在通道的高度的中间的实施方案中,所述光源被调节以聚集在所述颗粒聚集的层上,用于接收来自分布于整个通道 105 的宽度且浓集在所述通道的中间高度(mid-height)的颗粒的散射光和/或荧光。散射的和/或发射的光通过检测器(415)检测;并且用计算机 420 分析。

[0191] 可选择地,计算机 420 控制开关 425,其响应分析结果,将每个颗粒引导至多个目的地 430 之一。例如,较强荧光的颗粒被引导至一个目的地,而较弱荧光的颗粒被引导至另

一个目的地。

[0192] 示例性流变学测量

[0193] 本发明的一些实施方案的一个方面涉及测量介质的流变性质,可选择地,达到前所未有的准确度。该方法是基于介质的弹性与可用该介质获得的聚集程度之间的关系。

[0194] 图 4B 是根据本发明的一个示例性实施方案的测定介质的流变性质的方法 500 中采取的操作的流程图。

[0195] 在 502,已知粒度和尖锐粒度分布的颗粒被悬浮在介质中。可选择地,颗粒的量使得获得的悬浮液的体积浓度(即颗粒占据的悬浮液体积的分数)是在大约 0.01%和 1%之间,例如 0.1%。

[0196] 在 504,在 502 中获得的悬浮液流过微通道。

[0197] 在 506,离开入口一定距离的颗粒的空间分布例如,如以下在标题“理论指导”部分中所述测定。

[0198] 在 508,该悬浮介质的流变性质使用以下在标题“理论指导”部分中提供的方程式由测量的空间分布来推断出。

[0199] 可选择地,所述分析使用介质的粘度的数据。可选择地,所述方法包括测量这种数据。

[0200] 可选择地,相比于提供了 ± 10 帕斯卡的准确度的可商业获得的流变仪,方法 500 允许以大约 ± 0.01 至 ± 0.001 帕斯卡的准确度测量介质的弹性。

[0201] 示例性结合试验

[0202] 许多类型的颗粒例如细胞和大分子,显示了附着于表面的趋势。该趋势有时可以用于分析颗粒的试验。例如,在一个示例性实施方案中,研究了单克隆抗体结合于固定抗原的趋势或者受体结合于固定于通道的内表面的配体的趋势。在另一个示例性实施方案中,研究了白细胞结合于固定配体的趋势(本领域中已知为“体外滚动试验(in-vitro rolling assay)”)。

[0203] 在一个示例性实施方案中,颗粒被聚集在通道底部以上的给定高度处的薄层中的悬浮介质中,并且研究了聚集的颗粒附着到固定于底部的粘合剂的能力。

[0204] 在后一种情况下,聚集可以用作用于微调自由悬浮的颗粒和固定于通道底部的粘合剂之间的有效相互作用范围的特别有用的工具。这种微调可以用于改进试验的空间分辨率。

[0205] 可选择地,所述通道具有接近入口且没有固定于底部的粘合剂的第一部分,以及在第一部分的下游且具有固定的粘合剂的第二部分。

[0206] 可选择地,所述第一部分足够长,以允许大多数例如 95%的颗粒具有位于比通道的高度薄得多,例如所述高度的 5%的层中的中心。

[0207] 可选择地,所述第二部分具有与第一部分相同的高度,且没有被吸引到固定粘合剂上的颗粒与其在第一部分中运动基本上相同地在第二部分中运动。可选择地,所述第二部分足够长,以便结合可以结合于粘合剂的大多数颗粒,例如全部颗粒的 95%,且仅仅没有结合的颗粒从所述第二部分离开。

[0208] 可选择地,使用多个通道,每一个通道具有不同的高度,使得在固定于底部的粘合剂和聚集在高度的一半的薄层中的颗粒之间的相互作用 - 距离,是以其中附着于粘合剂的

颗粒是在第一阈值以下的最小通道高度和其中附着于粘合剂的颗粒是在第二阈值以上的最大通道高度为基础。例如,该相互作用距离可以定义为在其中吸附了少于5%的颗粒的最小高度和其中吸附了至少95%的颗粒的最大高度之间的中点。

[0209] 可选择地,在所述粘合剂和所述颗粒之间的相互作用距离基于距所述第二部分的起点的一定距离处的结合来评价。

[0210] 可选择地,所有通道具有相同长度的第一部分。可选择地,不同通道具有被设计成在所有通道中以相同程度聚集颗粒的第一部分。可选择地,这用不同长度的第一部分来实现,且较长的第一部分与较深的通道相关联。可选择地或另外,使所有第一部分具有相同聚集力通过调节流体引导系统来获得,所述流体引导系统将流体引导至不同通道,以便以较高流量将流体引导至较深的通道。

[0211] 图4C是根据本发明的一个示例性实施方案的用于研究颗粒-粘合剂相互作用的装置的示意图。

[0212] 装置600包括多个通道605,通道605各自接收来自储器610的样品流体。可选择地,各个通道105具有其自身的流体引导系统645,所述流体引导系统645可选择地是可控制的以将样品流体引导入与之连接的通道中,流速独立于将流体引导至其它通道中的任一个中的流速。

[0213] 在所述实施方案中,各个通道605具有第一部分620。可选择地,各个流体引导系统被操作为使得在第一部分的末端,大约90%的颗粒的中心占据在所述通道的高度中间的薄层。

[0214] 在所述实施方案中还显示了第二部分625,其中粘合剂被固定于所述通道的底部。在各个通道上面,在第二部分开始之后的一定距离处,显示了照相机(camera)630,该照相机630使该照相机以下的通道中的颗粒成像,以评价到达该位置的颗粒的数目。

[0215] 可选择地,根据进入第二部分的颗粒的数目和离开第二部分的颗粒的数目之间的比率来评价结合的数量。

[0216] 理论指导

[0217] 在下面,提供理论来帮助技术人员选择适合于聚集给定粒度的颗粒的悬浮介质,且报告实验结果来支持该理论和本发明的一些实施方案的可使用性。

[0218] 本发明的一个方面涉及以流通几何学被动和可调节地聚集稀释悬浮液中的颗粒或细胞的方法学。该方法学由微观流体实验的结果支持,该实验证明了稀释聚合物溶液的压力驱动的流动中产生的内在非线性弹性力(intrinsic nonlinear elastic force)如何可以被开发来以可控方式驱动颗粒离开壁,朝向所述通道的中平面。我们提供了分析模型的结果来描述基础迁移机制且提出了用于微调横向粒度分布的方法。最后,提供且彻底论述了被设计来证明理论预测的实验结果。

[0219] 在我们的实验中,我们使用截面 $h \times w = 45 \times 10^3 \mu m^2$ 的浅的微观流体通道,该微观流体通道采用如在此处通过引入并入的A.Bransky等人,Biosens. Bioelectron. 22, 165(2006); Microvasc. Res. 73,7(2007)(下文:Bransky等人,2007)中所述的光刻法在显微镜盖玻片中制造。使用注射泵(KDS 210, KD Scientific),来以各种恒定的流速(在0.1-1cm/s的典型速度下)通过微通道入口灌注聚苯乙烯(PS)微球(Duke Scientific)的稀释的(<0.1体积%)分散悬浮液。将高速CCD照相机(CPL MS1000 Canadian

PhotonicLabs) 安装在直立显微镜 (Nikon 80i) 上。在各种深度下在微通道的中心 (离开侧壁 $w/2$ 的距离) 从入口向下游流动 20mm 的微球膜被直接记录到 PC, 用于通过定制设计的图像处理软件进一步分析, 如 Bransky 等人, 2007 所述。该算法能够计数颗粒且计算它们在 $\sim 1 \mu\text{m}$ 深度的薄垂直层中的速度。

[0220] 我们将粒度分布函数 (PDF) 定义为在一定深度的聚集中记录的颗粒除以它们的顺流速度 (streamwise velocity) 且归一化至单位元素 (unity) 的分数。根据该定义, PDF 必须是恒定的且独立于流速, 条件是颗粒遵循绕流的流线。我们首先用悬浮于粘性牛顿液体的 $8 \mu\text{m}$ 直径 PS 微球进行参照实验, 该牛顿液体在去离子水中含有 84 体积% 甘油。该溶液剪切粘度使用应变控制的流变仪 (ARES, Rheometric Scientific) 来测量, 并被认为在 25°C 下是 $0.063 \text{Pa} \cdot \text{s}$ 。图 5a 表示在改变流速时的实验 PDF 与偏心垂直距离的关系曲线。各点对应于基于数百个单独测量的平均值。很容易看出, 粒度分布并没有随流速变化, 且大多数是均匀的。我们用悬浮于 8wt% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP, $MW \approx 3.6 \times 10^5$; Sigma-Adrich) 水溶液的 PS 微球重复该实验, 并且在图 5b 中绘制了所得 PDF。很容易看出, 颗粒趋向于从壁迁移离开且浓集在中平面, 同时该聚集随着流速的增加而加强。以前提出的在没有外场的情况下的颗粒聚集的解释 (变形诱发的迁移、惯性效应和剪切诱发的迁移) 似乎全部不足以解释图 5a 和图 5b 中所示的结果。明显地, 变形诱发的迁移对于刚性微球不起作用; 惯性效应应该在两种溶液中产生类似结果, 而剪切诱发的迁移仅仅在浓缩悬浮液中观测到。因此, 应该提供新的解释。

[0221] 我们接下来证明, 侧向颗粒迁移由压缩非线性弹性力的不平衡来驱动。在剪流中的这些力分别按照第一法向应力差和第二法向应力差: $N_1(\dot{\gamma}) = \sigma_{xx} - \sigma_{yy}$ 和 $N_2(\dot{\gamma}) = \sigma_{yy} - \sigma_{zz}$ 来描述 (这里 σ_{ii} 代表应力张量的对角线分量 (diagonal component), x 表示流动方向, y 是速度梯度的方向, 且 z 是涡量方向 (vorticity direction))。用于二阶粘弹性流体的分析上易处理的情况的平面泊肃叶流动 (plane Poiseuille flow) 的侧向颗粒迁移的严格分析显示, $N_1 > 0$ 、 $N_2 < 0$ 二者均起到将颗粒驱动向通道的中心的作用 (参见 B. P. Ho 和 L. G. Leal, J. Fluid Mech. 76, 783 (1976))。为了尽可能保持一般分析, 我们基于缩放自变量 (scaling argument) 构建了简单的理论。我们忽略了 N_2 贡献且假定施加于颗粒上的横向弹性力与 N_1 相比于颗粒粒度的变化 $F_e \sim a^3 (\partial N_1 / \partial y)$ 成比例, 且被斯托克斯阻力 $F_\eta = 6\pi\eta aV$ 所抵消。在这里, V 是侧向迁移的速度, a 是颗粒的半径, $-d \leq y \leq d$, d 是通道的一半深度, η 是动态粘度, 它通常是局部剪切速率 $\dot{\gamma}$ 的函数。使 F_e 和 F_η 相等则获得了侧向迁移速度的表达式:

$$[0222] \quad V \sim -\frac{a^2}{6\pi\eta} \frac{\partial N_1}{\partial y} \frac{\partial \dot{\gamma}}{\partial y} \quad (1)$$

[0223] 对于 $w/h \approx 22$ 的长宽比, 我们近似为按照平面泊肃叶剖面 (plane Poiseuille profile) 流动。对于幂律流体, $\eta = m\dot{\gamma}^{n-1}$ $\dot{\gamma} = |du/dy|$, 通过

$u(y) = \frac{1+2n}{1+n} \bar{U} \left[1 - \left(\frac{y}{d} \right)^{1+1/n} \right]$ 来给出解, 其中 \bar{U} 是平均速度。对于高分子量聚合

物的稀溶液预计为幂律行为 $N_1 = A\dot{\gamma}^\beta$ ($1 < \beta \leq 2$) [16]。因此, 将 N_1 和 $\dot{\gamma}$ 代入 (1) 中, 我们获得了:

$$[0224] \quad V = C \alpha \bar{U} \lambda |\zeta|^{(\lambda-n)/n} \quad (2)$$

[0225] 其中 $\alpha = \frac{a^2 \beta A}{6\pi m n d} \left(\frac{1+2n}{n d} \right)^\lambda$ 具有 $[L/T]^{n-\beta}$ 的因次 (dimension), $\lambda = 1 + \beta - n$ 和

$\zeta = y/d$ 是缩放的横向坐标 (scaled transverse coordinate), 且 C 是后来通过将该模型拟合到实验数据所确定的常数。

[0226] 可选择地, (2) 中的深度 - 平均侧向速度能够容易地求出为:

$$[0227] \quad \bar{V} = \delta a^2 Wi \left(\frac{\partial \dot{\gamma}}{\partial y} \right)_m \quad (2a)$$

[0228] 其中 $Wi = N_1/\tau$ 是等于弹性应力 N_1 与粘性应力 $\tau = \eta \dot{\gamma}$ 的比率的平均魏森贝格数 (Weissenberg Number), 二者均在平均剪切速率

$$\dot{\gamma}_m = \frac{(1+2n)\bar{U}}{(1+n)d}, \left(\frac{\partial \dot{\gamma}}{\partial y} \right)_m = \frac{1+2n}{n} \frac{\bar{U}}{d^2} \text{ 和常数 } \delta = \frac{C\beta}{6\pi\lambda} \left(\frac{1+n}{n} \right)^{\lambda-1} \text{ 下测定。}$$

[0229] 我们进一步忽略了布朗力、在颗粒之间以及与壁之间的流体动力学相互作用, 并且假定颗粒的顺流速度 U 大致上等于在其中心的未扰动流的速度 u [18]。因此, 颗粒的轨迹是以下方程式的解:

$$[0230] \quad \frac{d\zeta}{d\xi} = \frac{V}{U} = - \frac{1+n}{1+2n} \frac{C\alpha \bar{U}^{\lambda-1} |\zeta|^{(\lambda-n)/n}}{1-\zeta^{(n+1)/n}} \quad (3)$$

[0231] 其中 $\xi = x/d$ 是缩放的轴向坐标。方程式 (3) 可以容易地求积分, 且获得了隐含解:

$$[0232] \quad F(\zeta, \zeta_0) = C\alpha \bar{U}^{\lambda-1} \xi \quad (4)$$

[0233] 假设最初穿过通道截面的粒度分布是均匀的, 我们能够估计在由于“粘弹性聚集”而从入口离开的距离处的含有 95% 的颗粒的中心芯 (central core) 的半宽度 y_{95} 。因为芯的包迹 (envelope) 是轨迹, 我们能够基于 (3) 的解比较图 1(b) 中的实验结果与理论模型。在 25°C 下用 ARES 流变仪测量的 PVP 溶液的剪切粘度被测得为等于 $\sim 0.064 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 。观察到的剪切稀化是较小的, 因为粘度在 $0.1-250 \text{ s}^{-1}$ 的剪切速率范围内减小少于 3% (参见图 6 的插图), 且因此, 对于 PVP 溶液, 我们使用 $n = 1$ 。

[0234] PVP 溶液的 N_1 的数量级太低, 而不能在稳定的剪切试验中可靠地被测量。反而, 我们进行了作为振荡频率 ω 的函数的动态刚性 (“储能模量”) G' 的小幅度振荡剪切测量 (参见图 6)。使用在 $\dot{\gamma}$ 和 ω 的低值下保持在 G' 和 N_1 之间的流变关系 $G'/\omega^2 \sim N_1/2\dot{\gamma}^2$, 我

们能够估计 $N_1 \approx 0.94\dot{\gamma}^{1.54}$ mPa 的值。类似的 Cox-Merz 关系保持在剪切粘度 $\eta(\dot{\gamma})$ 和复数粘度的绝对值 $|\eta^*(\omega)|$ 之间,如在图 6 的插图中所确认的。

[0235] 给定流变性质和通道尺寸,我们能够直接计算 α ,并然后将 (3) 的解拟合到实验数据而发现倍增常数 C 。对应于 y_{95} (μm) 的值由图 5b 中所示的对于各种流速的数据来计算,并且在图 7 中提供为开放三角。图 7 中的中间曲线对应于理论模型与实验数据的最佳拟合,且在二者之间具有优异的一致。最佳拟合获得了倍增常数 $C \approx 0.301$ 。

[0236] 由于稳态下的布朗力的 PDF 的缩放宽度 $2\zeta_B$ 能够由条件 $Pe = aV/D_0 = 1$ 来估计,其中 V 由 (2) 给出, D_0 是单一颗粒的斯托克斯-爱因斯坦扩散率 (Stokes-Einstein diffusivity),且 Pe 是佩克莱特数 (Péclet number)。对于 $\alpha = 0.5$ 和 $\bar{U} = 1\text{cm/s}$ 的典型平均速度,获得了 $\zeta_B \approx 0.004$,所以对于 μm 尺寸的颗粒,布朗转运能够完全被忽略。

[0237] 表达式 (2) 获得了 $V/\bar{U} \sim \alpha \bar{U}^{\beta-n}V$,其中聚集的强度通过 $\alpha \sim Aa^2/\eta$ 来控制。剪切稀化 (即, $n < 1$) 可以增强聚集。剪切稀化和牛顿液体 (具有相同的弹性和零剪切速率

粘度) 的深度平均迁移速度的比率归纳为 $\left(\frac{1+2n}{n}\right)^{1-n} \text{s}^{1-n}$, 且对于 $\bar{U}/d > 1\text{s}^{-1}$, 该表达式

大于 1, 因为 $n < 1$ 。因此,通过改变粒度和改变悬浮介质的弹性和 / 或粘度,能够控制在下游一定距离的粒度分布的宽度。例如,如果 N_1 指数为 $\lambda \sim 1$,则粒度分布预计对流速不敏感。为了证明理论预测的有效性,我们使用基于高分子量聚丙烯酰胺 (PAA) 的稀溶液的粘弹性液体重复所述实验,所述稀溶液使用 76wt% 甘油的溶剂与 45ppm PAA (Separan AP30; Dow Chemical Co.) 来制备。剪切粘度在 $0.1\text{--}450\text{s}^{-1}$ 的剪切速率范围内从 $0.052\text{Pa}\cdot\text{s}$ 改变至 $0.036\text{Pa}\cdot\text{s}$,并且最近似于 $\eta = 0.047\dot{\gamma}^{-0.06} \text{Pa}\cdot\text{s}$ (参见图 6 中的插图)。动态刚性 (G') 测量获得了 $N_1 = 0.0116\dot{\gamma}^{1.09} \text{Pa}$ (参见图 6)。PAA 的稀溶液的动态刚性的频率依赖性预计为 $G' \sim \omega^2$,以及该指数偏离于预期值 2,甚至在测试的最低频率下 (参见图 6),这可以归因于在实验中使用的聚合物的高的多分散性。

[0238] 因此, $V/\bar{U} \sim \bar{U}^{0.15}$ 以及 PDF 对流速的较弱的依赖性被预期。另一方面,指前因子 (pre-exponential factor) A 大约在高于对 PVP 溶液测量的指前因子的数量级,且因此,在 PAA 溶液中预计有更强的聚集效果。

[0239] 所获得的 $8\mu\text{m}$ 和 $5\mu\text{m}$ 微球的 PDF 分别在图 8a 和图 8b 中给出。能够容易地看出,如预计的那样,PDF 几乎独立于流速。粒度效果是明显的:PDF 分布对于较大颗粒更窄。 y_{95} 的相应值可以由图 8 中的 PDF 来计算,且它们在图 7 中作为 $5\mu\text{m}$ 颗粒 (开放菱形) 和 $8\mu\text{m}$ 颗粒 (开放正方形) 的流速的关系曲线而被描绘。PAA 溶液的 y_{95} 的理论预测 [图 7 中的顶部曲线和底部曲线] 基于具有 $C = 0.301$ 的方程式 (3) 的解,并且不牵涉到任何可调节的参数。如所预计的那样, $8\mu\text{m}$ 颗粒的聚集效果在 PAA 溶液中比在 PVP 溶液中更强,且粒度的效果是相当可观的。在理论估计 (没有可调节的参数) 和实验数据之间的对比显示了优异的一致并且验证了粘弹性聚集的假说。图 7 中对于 PAA 溶液中 $8\mu\text{m}$ 颗粒的理论预测和实验之间的一致没有对于 $5\mu\text{m}$ 颗粒的理论预测和实验之间的一致那样精确,因为在前一情况下的实验分辨率不足:颗粒被聚集在小于 $4\mu\text{m}$ 的非常薄的层中,参见图 8(a)。

[0240] 聚集预测方法

[0241] 图 9A 是在根据本发明的一个实施方案的给定流动系统中预测给定悬浮介质的聚

集质量的方法 900 中采取的操作的流程图。

[0242] 在操作 902, 提供系统的物理尺寸。这些尺寸可选择地包括:

[0243] 微观流体通道的几何尺寸, 包括它的宽度 w 、深度 h (或代表通道一半深度的 $d = h/2$)、以及在入口和检查区之间的长度; 以及

[0244] 要聚集的颗粒的估计尺寸。

[0245] 在 903, 选择用于实验设置的流速 Q , 以及由方程式 $\bar{U} = Q/A$ 来估计平均顺流速度 \bar{U} , 其中 $A = h \times w$ 。

[0246] 在 904, 估计给定悬浮介质的流变性质。估计的流变性质可选择地包括: 动态粘度 η ($\text{Pa} \cdot \text{s}$), 其作为剪切速率 $\dot{\gamma}$ 的函数; 以及弹性模量 G' (Pa), 其作为振荡频率 ω 的函数。可选择地, 这些估计基于在文献中可获得的数据。可选择地, 这些数据通过实验收集, 例如用可商业上获得的流变仪。

[0247] 在 906, 估计在方程式 $N_1 = A\dot{\gamma}^\beta$ 中的常数 A 和 β 。

[0248] 可选择地, 该估计是基于在 904 中采取的测量, 用流变相等性 (rheometric equality) $N_1 \approx 2G'$ 。

[0249] 如果 N_1 大得足以通过可商业上获得的流变仪 (通常以大约数十 Pa 的数量级) 来测量, 则可选择地直接测量 N_1 。

[0250] 在 908, 估计方程式 $\eta = m\dot{\gamma}^{n-1}$ 中的参数 m 和 n 。该估计可选择地基于在文献中可获得的数据。可选择地, 该估计包括将测量的流变性质拟合到以上方程式。

[0251] 在 910, 通过使用在操作 902 和 903 中提供的数据和在操作 904-908 中获得的估计求解以上方程式 4 来估计聚集质量。可选择地, 聚集质量通过试验颗粒的无量纲位置 (dimensionless position) $\zeta = y/d$ 来估计。例如, 如果想要知道多少百分率的颗粒将在流动方向上离开入口 20mm 的距离处、在具有 $d = 40 \mu\text{m}$ 的一半深度的微通道中、在深度 $4 \mu\text{m}$ 的中心层中垂直聚集, 应该用 $\zeta = 4/40 = 0.1$ 和 $\xi = 2000/40 = 50$ 来求解方程式 (4) 的 ζ_0 。例如, $\zeta_0 = 0.75$ 的结果值意味着大约 75% 的颗粒将在离开入口 20mm 的距离处的、深度 $4 \mu\text{m}$ 的中心层内聚集。

[0252] 单分散线性聚合物的许多稀溶液表现了特定的良好界定的流变行为 (在本领域中称为鲍格液体): 据此, $\eta \approx \text{常数}$, $N_1 = A\dot{\gamma}^2$ 。

[0253] 在本上下文术语“单分散聚合物”用于表示具有窄分子量分布的聚合物。在稀溶液中提供鲍格液体行为的线性聚合物的例子包括单分散聚丙烯酰胺和聚乙二醇。

[0254] 在鲍格液体的情况下, $n = 1$ 且 $\beta = 2$, 且聚集质量的估计明显简化。这种简化方法的流程图 (900') 在图 9b 中提供。

[0255] 图 9B 是在根据本发明的一个实施方案的给定流动系统中预测给定悬浮介质的聚集质量的方法 900 中采取的操作的流程图。

[0256] 图 9b 中的操作 902 和 903 正如图 9a 中的相同操作一样。

[0257] 在 904', 平均剪切速率和剪切速率的平均梯度由在操作 902 和 903 中提供的值根据式: $\dot{\gamma}_m = 3\bar{U}/2d$ 和 $(\partial\dot{\gamma}/\partial y)_m = 3\bar{U}/d^2$ 计算。

[0258] 在 906', 测量粘性应力 τ 和法向应力 N_1 的值, 且计算 $Wi = N_1/\tau$ 。 τ 和 N_1 的测量可选择地用商用流变仪来进行。这些值可选择地仅仅在一个剪切速率下测定, 这等于 904'

计算的 $\dot{\gamma}_m$ 。

[0259] 精确的法向应力测量通常不能由商用流变仪来获得,因此法向应力可选择地由弹性模量 G' 来估计,该弹性模量 G' 在振荡剪切测量中使用商用流变仪在单一频率 $\omega = \dot{\gamma}_m$ 下测定,并使用关系式 $N_1 \approx 2G'$ 以便由测量的数据获得法向应力。

[0260] 在 908', 使用在 906' 获得的数据计算魏森贝格数 $Wi = N_1 / \tau$ 。

[0261] 在 908', 颗粒的平均侧向速度 \bar{v} 根据在 904-908 计算的量以及方程式 (2a) 和对于鲍格液体的输入 $\delta = 0.6/6\pi$ 来计算。

[0262] 在 910', 颗粒将完全聚集到所述通道的中心水平平面的流向距离被估计为 $1 \sim (\bar{U}/\bar{v})d$ 。

[0263] 一般注释

[0264] 预计,在由本申请成熟的专利的寿命期间,许多相关的悬浮介质、流动血细胞计数器和 FACS 仪器将被开发出来,因此根据推理,相应术语的术语范围意图包括所有这些新技术。

[0265] 术语“包括 (comprises)”、“包括 (comprising)”、“包括 (includes)”、“包括 (including)”、“具有 (having)”和它们的变化形式是指“包括但不限于”。

[0266] 术语“示例性”是指“用作实例、例子或示例”。

[0267] 在本文中不论是在何处指出数值范围,均意图包括在所指出的范围内的任何列举数字(分数或整数)。短语“在”第一指示数值和第二指示数值“之间的范围”和“从”第一指示数值“到”第二指示数值“的范围”在本文可互换地使用,且意图包括第一指示数值和第二指示数值以及在它们之间的所有分数和整数。

[0268] 应该领会,为了清楚而在单独实施方案的上下文中描述的本发明的某些特征还可以在单个实施方案中组合提供。相反,为了简洁,在单个实施方案的上下文中描述的本发明的各种特征还可以单独地提供,或者以任何适当的子组合(subcombination)提供,或者如果适合在本发明的任何其它所述实施方案中提供。在各种实施方案的上下文中描述的某些特征不应被认为是这些实施方案的必要特征,除非该实施方案没有这些要素就不能操作。

[0269] 虽然结合本发明的具体实施方案描述了本发明,但明显地,许多替代、更改和变化对于本领域技术人员来说是明显的。因此,意图包括落入所附权利要求的精神和宽范围内的所有这些替代、更改和变化。

[0270] 在本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请在此处通过引用以其整体并入到本说明书中,其程度就好象每一单独出版物、专利或专利申请被具体和单独地指出在此处通过引用并入。另外,本申请中的任何参考文献的引用或确认不应被理解为承认这种参考文献可作为本发明的现有技术获得。就使用节段标题而言,它们不应被认为是一定是限制性的。

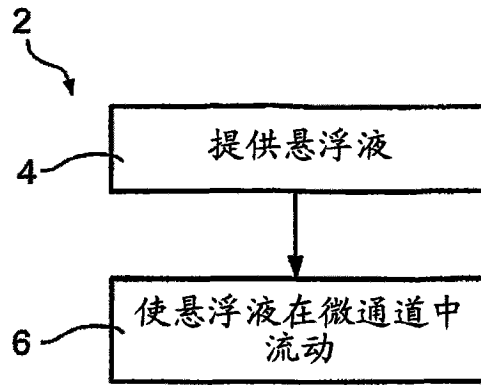


图 1

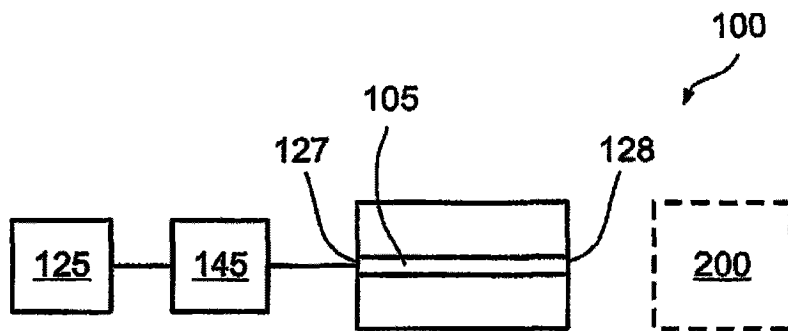


图 2A

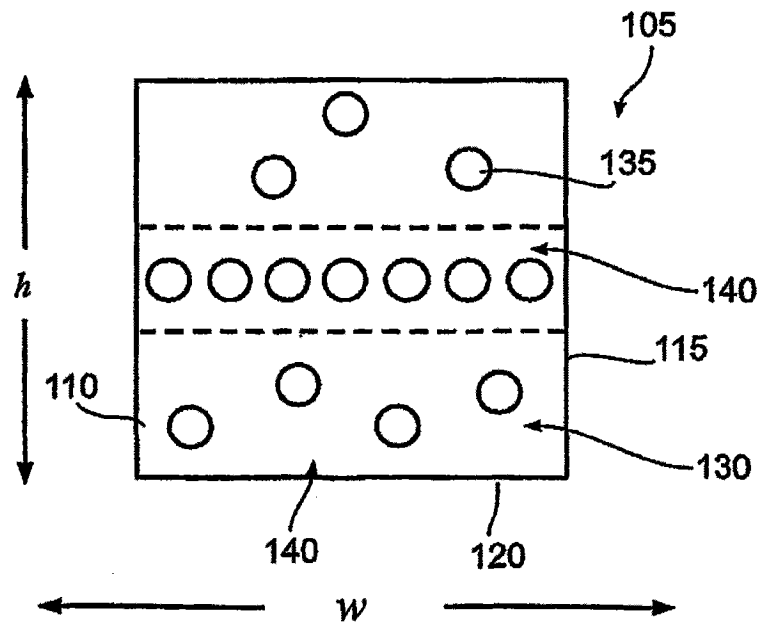


图 2B

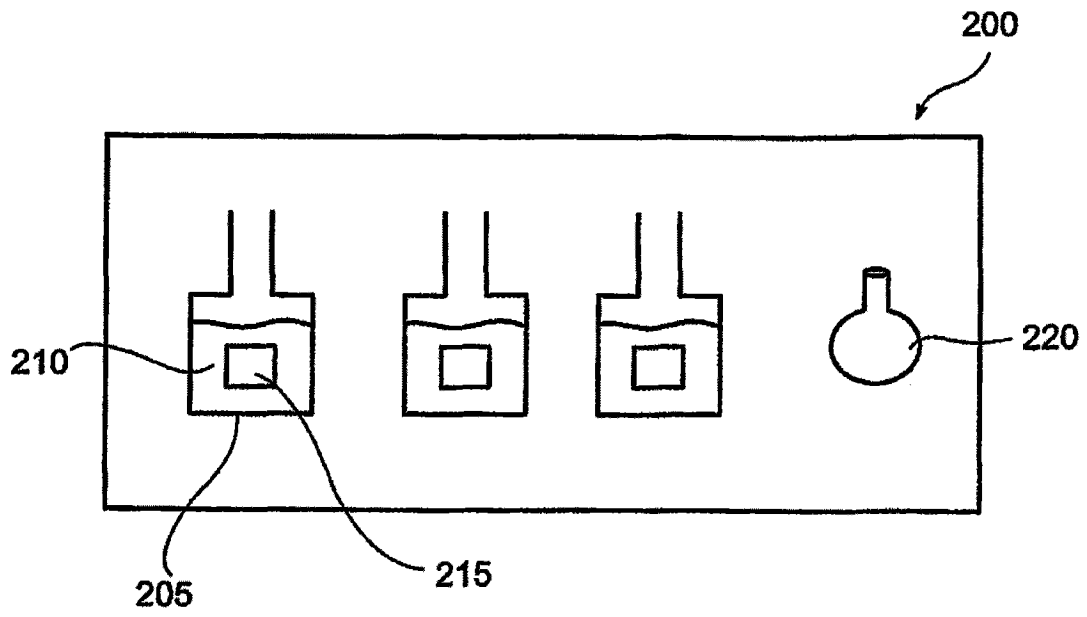


图 3

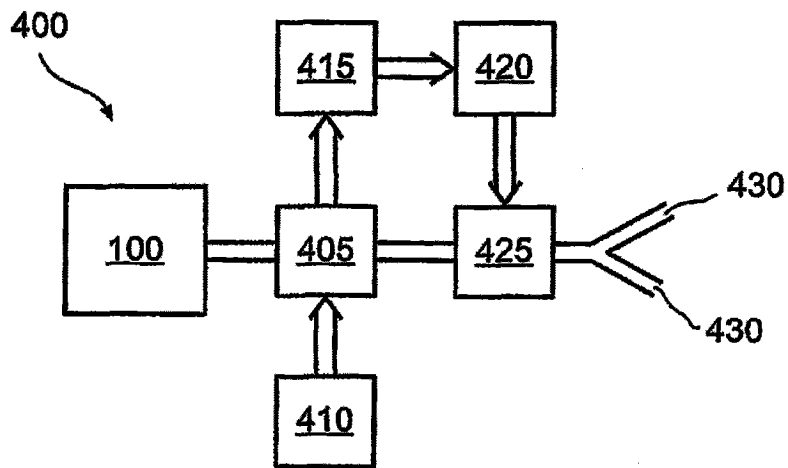


图 4A

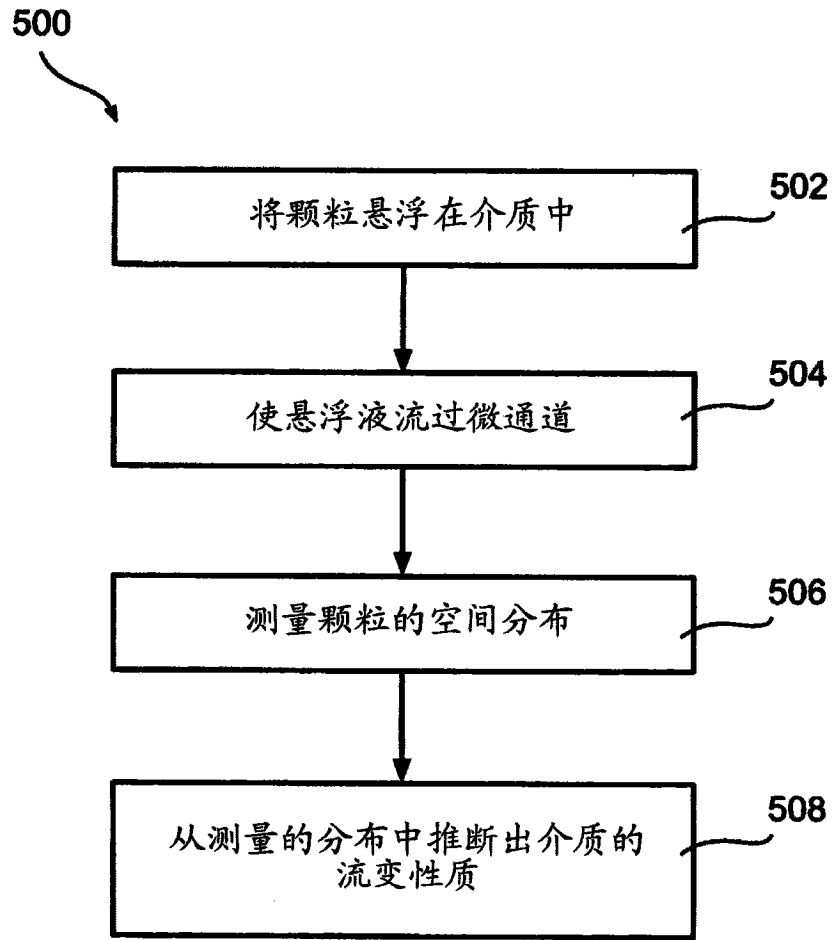


图 4B

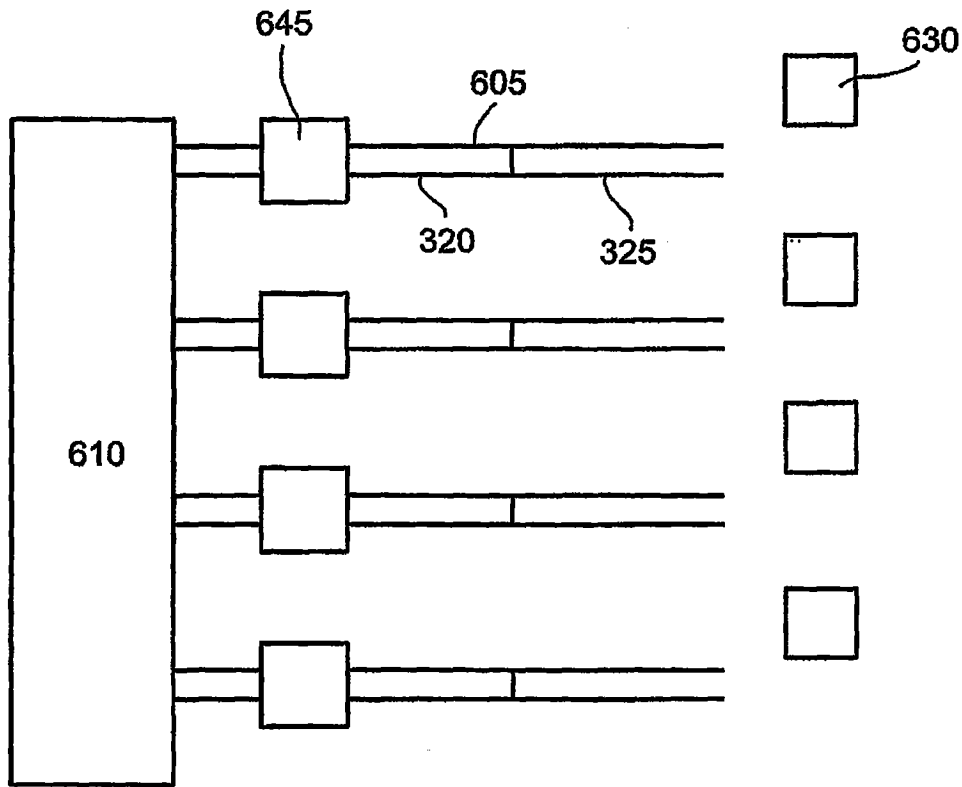


图 4C

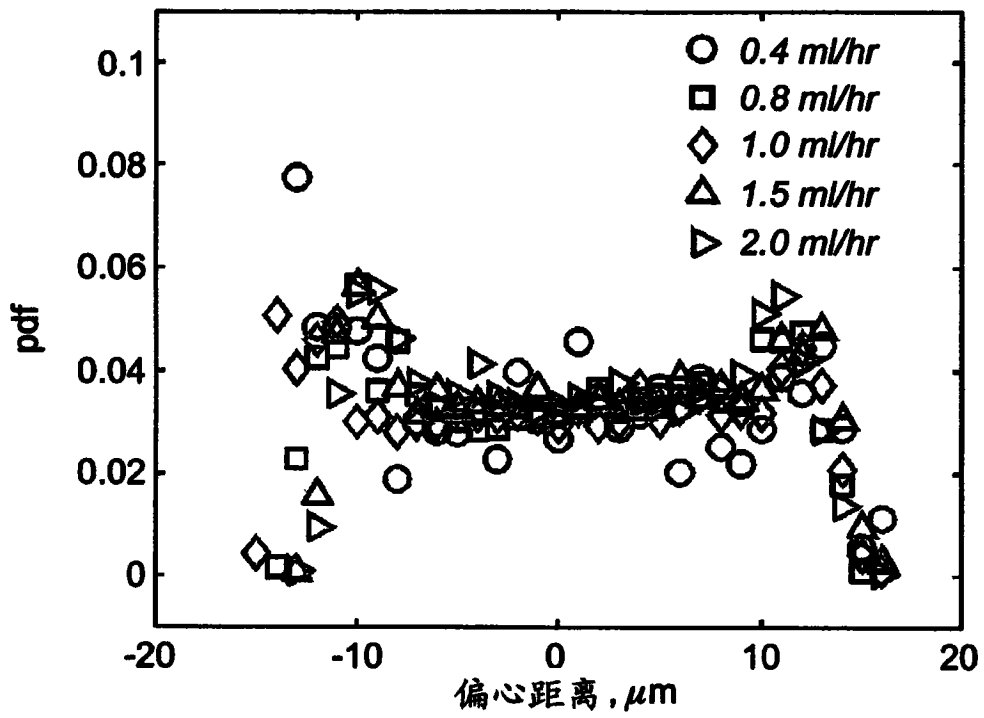


图 5A

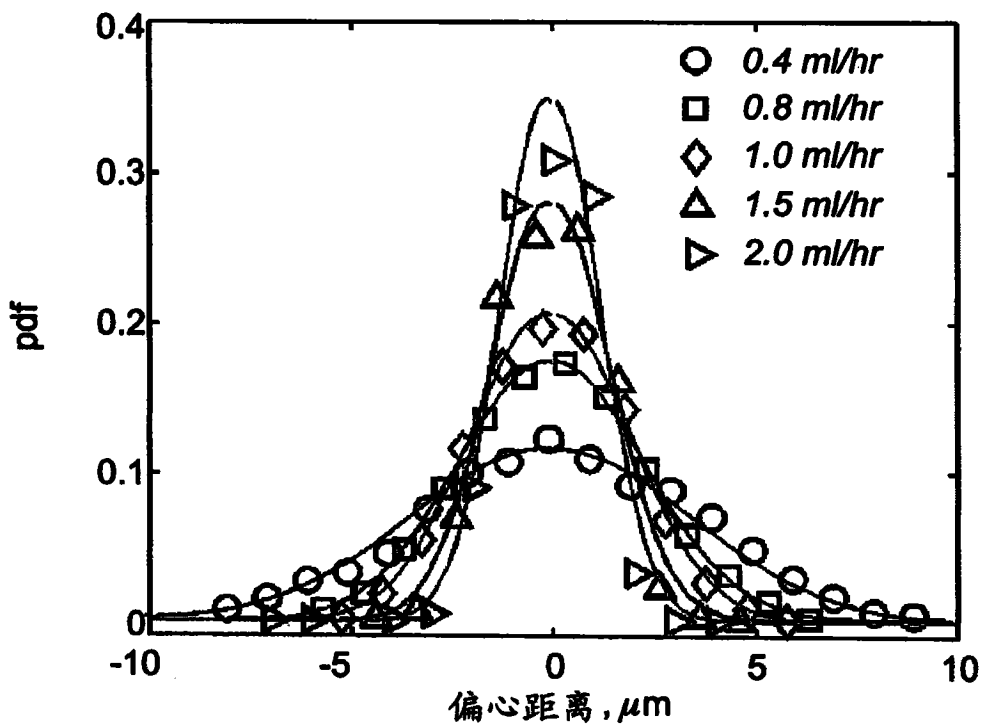


图 5B

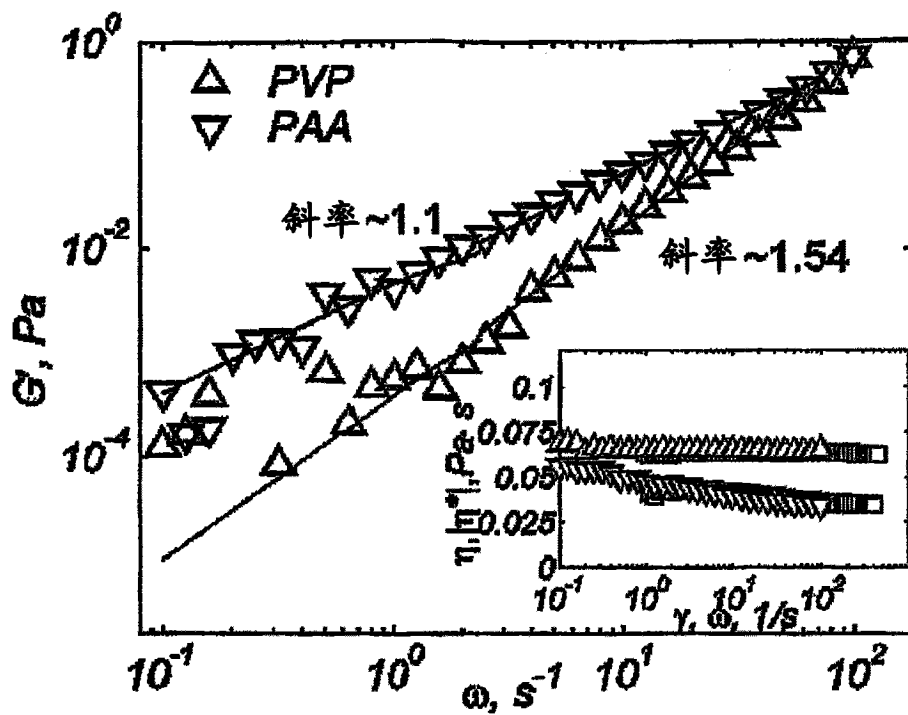


图 6

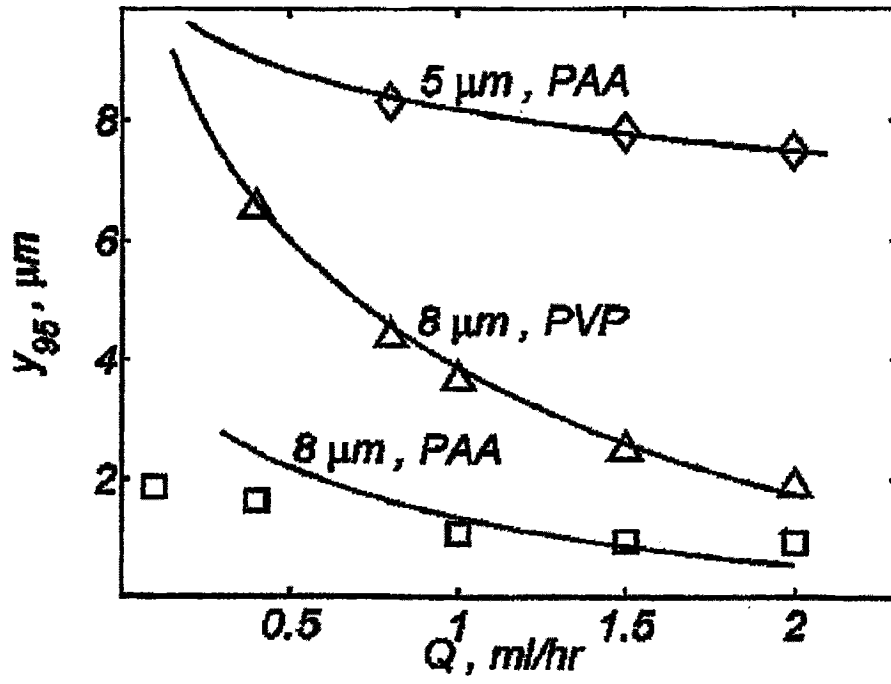


图 7

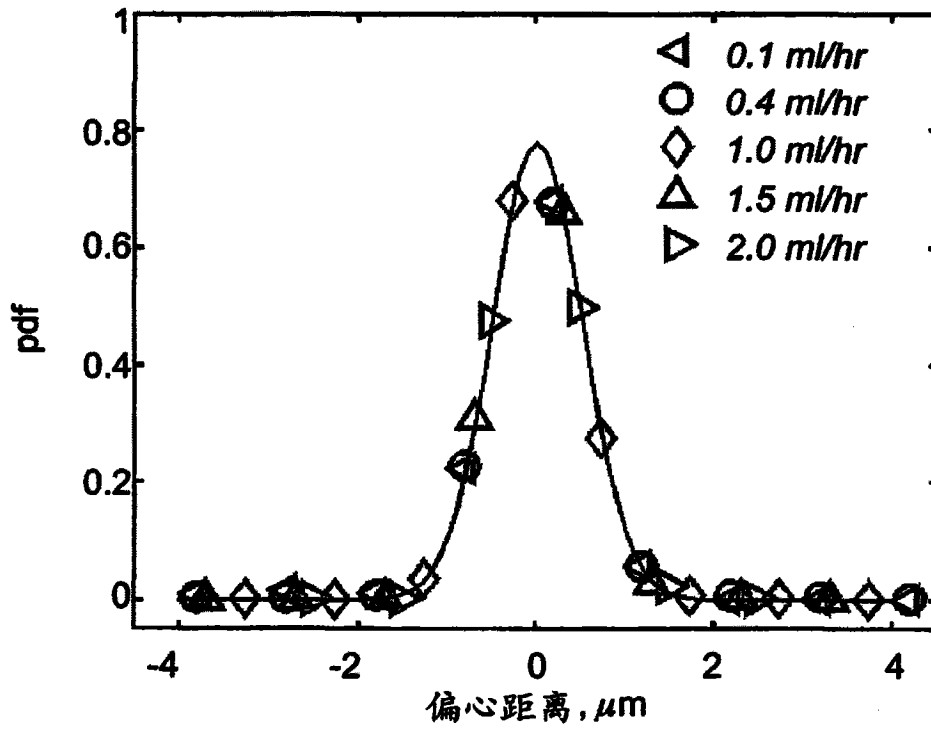


图 8A

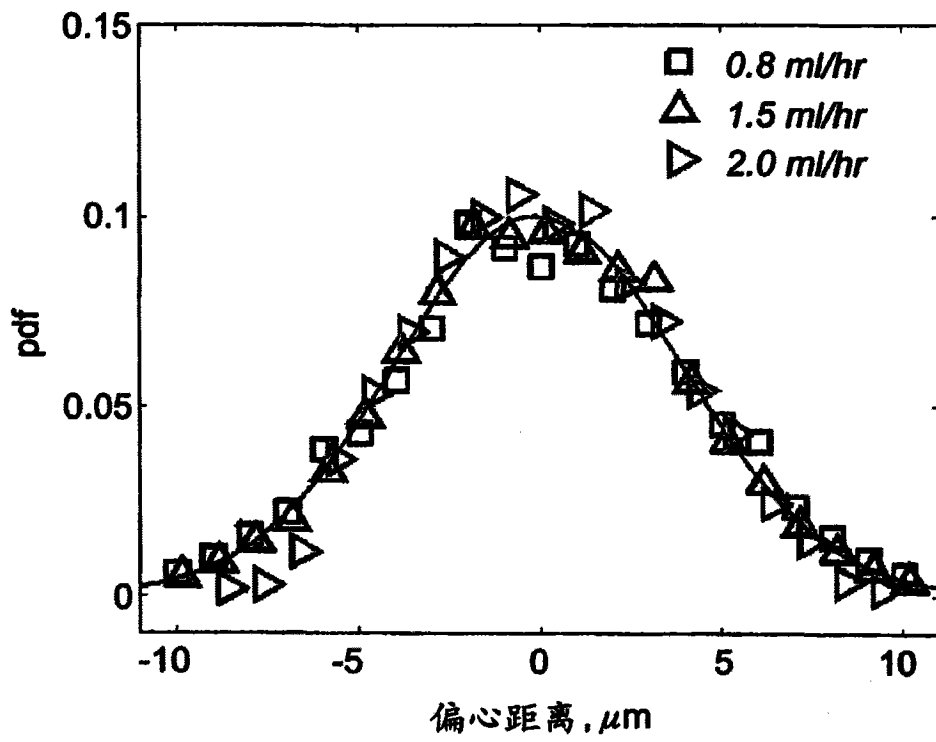


图 8B

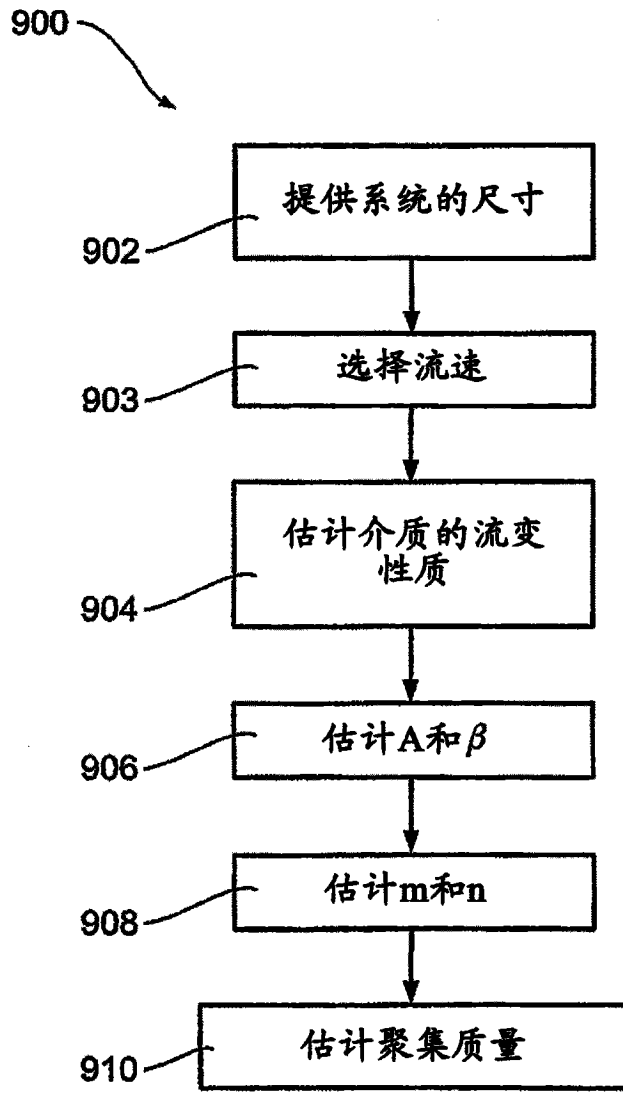


图 9A

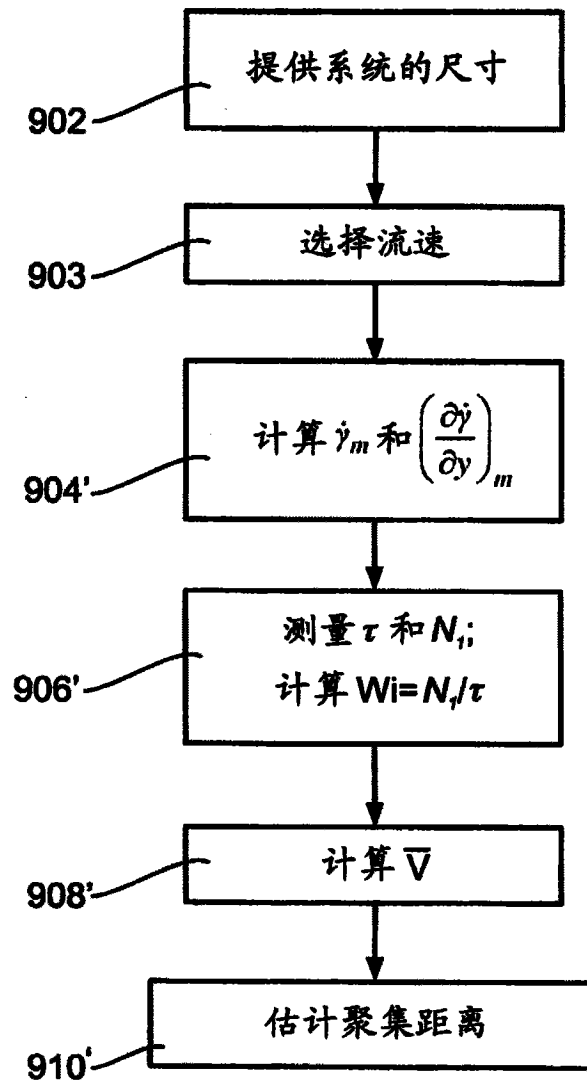


图 9B

专利名称(译)	用于聚集颗粒的系统和方法		
公开(公告)号	CN101772697A	公开(公告)日	2010-07-07
申请号	CN200880101686.6	申请日	2008-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	技术研究及发展基金有限公司		
申请(专利权)人(译)	技术研究及发展基金有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	技术研究及发展基金有限公司		
[标]发明人	亚历山大莱申斯基 阿维谢伊布兰斯基 科琳纳塔尼尔		
发明人	亚历山大·莱申斯基 阿维谢伊·布兰斯基 科琳·纳塔尼尔		
IPC分类号	G01N15/00 G01N11/04 G01N33/53		
CPC分类号	G01N15/1404 G01N2015/1409 G01N2203/0094 G01N33/5306 B01L3/502776		
代理人(译)	武晶晶 郑霞		
优先权	60/924998 2007-06-07 US		
其他公开文献	CN101772697B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了一种聚集颗粒的方法，该方法包括：提供所述颗粒在悬浮介质中的悬浮液；以及使该悬浮液沿着通道流动，使得该流动悬浮液占据具有至少一种小于100 μm 的截面尺寸的一定体积。所述悬浮介质具有这样的粘弹性，使得所述悬浮液在通道中流动将颗粒中的至少一些向在所述一定体积中包含的聚集区域引导。

