文章编号:1007 - 4252(2022)05 - 0005 - 458 DOI:10.20027/j.gncq.2022.0052

微流控电阻抗检测系统构建及测试

周 扬[1],方维翰[2],刘 婷[1],贾春平[1,*],赵建龙[1,*]
(1. 中国科学院上海微系统与信息技术研究所,上海 200050; 2. 上海市民办平和学校,上海 201203)

摘要:基于电阻抗的细胞分析是一种无标记、非侵入性技术,已广泛用于分析和识别各种应用中的细胞特征,如组织培养、细胞生长及活力检测等。微流体(也称为“芯片实验室”)技术能够将涉及样品制备、操作和基于阻抗检测的分析过程集成到单片芯片上,最大限度地减少系统尺寸、重量。本文搭建了一种简便的微流控电阻抗检测系统,设计了微流控阻抗芯片,采用自制的锁相放大器放大感应信号,并在 MATLAB 上利用自研算法处理,提取出特征参数并进行分析。该芯片可根据电学差异对体积相近的不同微粒进行区分,具有成本低、易集成、非标记等优势,未来可进一步用于现场细胞即时检测。

关键词:微流控;流式阻抗分析;锁相放大器;聚苯乙烯微球
中图分类号:TP212.3 **文献标志码**:A

Construction of Microfluidic Electrical Impedance Detection System and Its Application

ZHOU Yang[1], FANG Wei-han[2], LIU Ting[1], JIA Chun-ping[1,*], ZHAO Jian-long[1,*]
(1. Shanghai Institute of Microsystems and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China; 2. Shanghai Pinghe School, Shanghai 201203, China)

Abstract: Cell analysis based on electrical impedance is a label-free and non-invasive technique, which has been widely used to analyze and identify cell characteristics in various applications, such as tissue culture, cell growth and viability detection. Microfluidic (also known as "Lab on a Chip") technology can integrate analytical processes involving sample preparation, operation and impedance-based detection into a single chip, minimizing the size and weight of the system. In this paper, a simple microfluidic impedance detection system is built, and a microfluidic impedance chip is designed. The induction signal is amplified by a self-made lock-in amplifier and processed by self-developed algorithm on MATLAB, and the characteristic parameters are extracted and analyzed. Different particles of similar size can be distinguished according to electrical differences, which has the advantages of low cost, easy integration and non-labeling, and can be further used for on-site cell real-time detection in the future.

收稿日期:2022-09-02; **修订日期**:2022-10-10
基金项目:中国科学院关键技术研发团队项目(GJJSTD20210006).
通信作者:贾春平(1973-),女,博士,副教授,主要研究方向为纳米生物传感器、生物芯片、肿瘤检测方面(E-mail:jiachp@mail.sim.ac.cn).

Key words: Microfluidics; Flow Impedance Analysis; Lock-in Amplifier; Polystyrene Microspheres

0　引言

作为一种非侵入性技术,阻抗测量被用于活细胞分析和活细胞长期监测[1-2],在细胞分选[3]、癌症研究[4]、药物筛选[5]等领域具有广泛的应用。除了量化细胞浓度外,宽频率范围内的阻抗测量还提供了有关细胞大小、膜电容、细胞质电导率和细胞质介电常数随频率变化的信息[6]。这些特征可用于区分不同细胞群而无需荧光、磁性或其他细胞标记[7]。

传统的基于荧光的流式细胞术(FACS),是根据细胞特定的荧光素激发出的荧光差异进行分析或分选细胞。然而,通过 FACS 进行细胞分析通常需要应用抗原抗体进行荧光标记。当一些细胞表面无法产生特异性的表面蛋白(如干细胞),则无法进行荧光流式分析。其他采用标记的分析方法(如磁性微球标记)都有类似的缺陷。微流控芯片中微米级通道与细胞尺寸相当,能精确控制细胞微环境,利于对细胞的操控和表征。与传统的流式细胞仪相比,阻抗流式细胞仪具有无需标记、易于集成等优点,结合微流控芯片,可以方便高效地检测和分析微量细胞样品[8]。

国内外现在大多采用台式阻抗测试仪进行流式阻抗实验,如苏黎世系列和美国斯坦福 SR 系列,这类仪器功能齐全,但是体积较大、价格昂贵、不便于集成。本文搭建了一种简便的微流控电阻抗检测系统,采用自制的锁相放大器放大感应信号,并利用自研算法处理信号,提取出特征参数并进行分析。该系统为便携式阻抗流式分析提供了新的手段。

1　正文

1.1　实验材料和设备

负性光刻胶(SU8 3025, Micro Chem, USA)、聚二甲基硅氧烷 PDMS (Sylgard 184, Dow Corning, USA)、显影液(PGMEA, Sigma Aldrich, USA)。接触式光刻机(MA6, Karl Suss, Germany)、等离子清洗机(成都铭恒科技发展有限公司)、倒置显微镜(IX73, OLYMPUS, Japan)、CCD 相机(optiMOS, Q-IMAGING, Canada)、精密注射泵(PHD 2000, Harvard Apparatus, USA)。

1x 磷酸缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)和牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)购自中国上海生工生物工程有限公司,5 μm(DSM05)和 10 μm(DSM10)聚苯乙烯微球购自上海辉质生物科技有限公司。

微球溶液配置:称取 4 g 牛血清白蛋白,加入 36 g PBS 溶液中,不停搅拌直至固体全部溶解,配置成 1% BSA 溶液,将配制好的 BSA 溶液放置在 4 ℃冰箱中备用。将 5 μm、10 μm 微球母液和 1% BSA 溶液分别按照 1 ∶ 50、1 ∶ 20 比例稀释(采用 BSA 溶液稀释的原因是 BSA 有助于让微球分散,不易聚集),在显微镜下观察计数,微球浓度范围控制在 5×10^6/mL 左右。

肝癌细胞系(HepG2)购自中国科学院细胞库,在 5% CO_2,37 ℃的细胞培养箱中培养,所用的培养基是包含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基(细胞培养所需试剂购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司)。

细胞悬液制备:当细胞贴壁生长,总覆盖面积达到培养瓶底部的 70% ~80% 左右时,加入 1.5 mL 胰酶(含 0.25% EDTA)消化处理,消化 1.5 min。当在显微镜下观察到细胞完全脱落,悬浮在溶液中时,加入 1.5 mL 培养基终止消化;轻柔吹打细胞,然后转移到离心管中 1 000 rpm 离心 3 min,弃上清后,加入 1 mL 1% BSA 溶液重悬细胞,吹打均匀后在 4 ℃下保存备用。

1.2　微流控芯片的设计与制作

本实验采用的微流控阻抗检测芯片主要分为三层:微通道层、电极层和引线层(图 1(a))。微通道层主要提供细胞流动通道,电极层用来感测阻抗变化,引线层连接信号的输入与输出。检测电极采用剥离工艺(lift off),在玻璃上形成金电极(Au/Cr,厚度 200 nm/50 nm),检测电极宽度 30 μm,间隔 15 μm。检测口流道宽度 30 μm,高度 30 μm。微通道模具为 SU-8 结构,由匀胶、前烘、曝光、显影、硬烘等步骤制成[9]。将 PDMS 预聚物与固化剂(10∶1)混合后浇筑在模具上,80 ℃烘箱烘烤 90 min 后脱模,然后将微通道层和电极层通过氧等离子对准

键合(图 1(c)),最后焊接电极和 PCB 引线层,完成微流控阻抗检测芯片的制作,如图 1(b)。

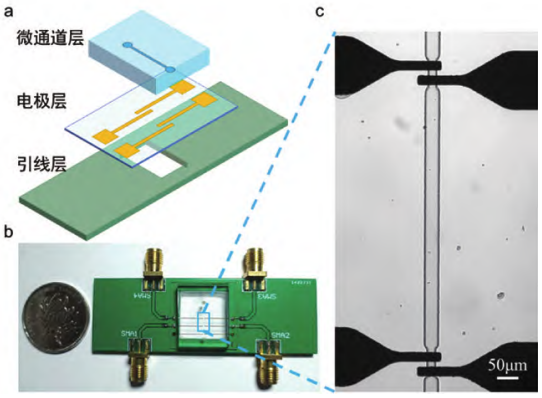

图 1 细胞阻抗检测芯片设计(a)芯片结构;(b) 最终制作出的检测芯片;(c) 微通道层和电极层的键合

Fig. 1 Design of cell impedance detection chip (a) architecture of the chip; (b) final detection chip; (c) bonding between microchannel layer and electrode layer

1.3 阻抗测试平台的搭建

锁相放大器能够将微弱的阻抗脉冲信号从噪声中提取出来,原理如图 2,锁相放大器首先将输入信号经过运算放大器 OPA657 实现跨阻放大后,采用高速乘法器 AD835 与参考信号混频,然后通过低通滤波器进行滤波,将期望频率的信号从其他频率信号中分离出来。

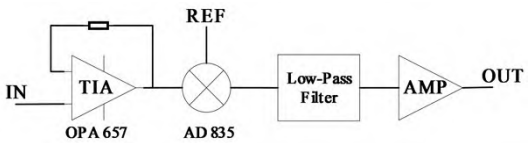

图 2 锁相放大电路原理

Fig. 2 Principle of phase-locked amplifier circuit

目前用于微流控阻抗检测的锁相放大器主要有苏黎世系列和美国斯坦福 SR 系列,但是商用仪器体积较大,不易集成。本实验采用运算放大器和乘法器自行设计出模拟锁相放大器,并基于此搭建流式阻抗检测系统,如图 3 所示。芯片放置在显微镜上观察,由注射泵进样,信号源施加激励信号,锁相电路放大感应信号,然后数据通过采集卡传输到电脑进行显示、储存和分析。

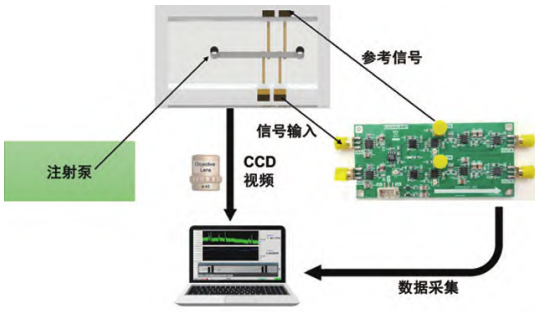

图 3 流式阻抗检测系统

Fig. 3 Flow impedance detection system

1.4 检测实验

首先选取不同粒径的微球验证系统的阻抗检测能力。5 μm 和 10 μm 的聚苯乙烯微球溶液,浓度约 5×10^6/mL,进样前先摇匀。样品流速设置为 0.5 μL/min,激励信号幅值为 5 V_{pp},上游第一对电极频率为 500 kHz,下游第二对电极频率为 5 MHz,采集粒子的阻抗信号。一种样品实验完毕后,用 PBS 溶液冲洗干净通道后,再进样另一种样品。

为了验证系统对相似粒径下不同颗粒的区分能力,选取与 10 μm 微球类似大小的 HEPG2 肝癌细胞,流速和激励信号与上文一致,记录其阻抗信号以进行对比分析。

1.5 数据处理

将采集到的信号在 MATLAB 中进行处理分析。采集卡的采样率为 5 kHz,采集的原始信号为电压信号,经过平滑滤波去除噪声后,用高斯函数拟合峰形,最后得出脉冲峰的阻抗特征。图 4 显示了芯片检测原始信号以及信号特征提取结果。首先从原始信号中识别脉冲,超过一定阈值且两通道临近时间内出现脉冲才能认定为一个颗粒的脉冲事件。阈值一般设定为基底噪声信号的三倍以上,而临近时间为两电极距离与样品流速之比。在一个脉冲事件中,利用高斯函数(式 1)拟合,提取出代表幅值的参数 A。

$$y=A\times e^{-\frac{(x-B)^2}{2C^2}} \tag{1}$$

其中 A 为峰值高度,B 为峰值位置,C 为半峰宽。x 表示时间,y 为被拟合的采集信号。

电不透明度,定义为高频测量信号幅度与低频信号幅度之比[10],电不透明度反映了颗粒内容物的

信息,已被广泛应用于细胞阻抗表征。本实验中通过两对微电极分别检测的细胞流动过程中高频、低频阻抗幅值为 A_{HF} 和 A_{LF},则电不透明度 OPA 可由 $OPA=A_{HF}/A_{LF}$ 计算。

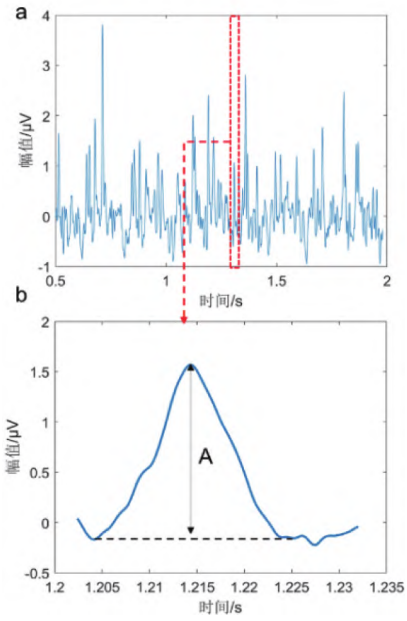

图 4　芯片检测原始信号(a)及信号特征提取(b)

Fig. 4 Chip detection of original signal (a) and signal feature extraction (b)

2　结果

2.1　不同粒径微球的区分

采用直径分别为 5 μm 和 10 μm 的聚苯乙烯微球进行实验,分别取 728 和 797 个点进行统计,得到电不透明度-低频幅值散点图及电不透明度和低频幅值直方图(图 5(a))、幅值的均值及标准差(图 5(b))。5 μm 和 10 μm 的聚苯乙烯低频幅值分别为 0.15±0.07 μV 和 0.77±0.32 μV。经 u 检验,5 μm 微球低频幅值与 10 μm 微球比较,$u=33.56$,$P<0.01$,具有显著性差异;而 5 μm 微球电不透明度与 10 μm 微球分别为 0.46±0.27 和 0.49±0.35,经 u 检验,5 μm 微球电不透明度与 10 μm 微球比较,$u=0.59$,$P>0.05$,二者差异无显著性。两种粒子低频幅值差异明显,重叠较少,可进行有效区分,验证了该系统具有根据电学特征区分粒子体积的功能。电不透明度反映样品内容物的信息,两者均为同等材质的微球,故通过电不透明度无法区分。5 μm 微球的变异系数 CV 为 46.67%,与文献[11]中采用标准仪器测得的未校正数据(CV 约 40%)相比,处于同一水平。与微球制备商公布的 CV 值 3% 相比,差距原因是流动过程中微球与电极的距离不一致,测得的阻抗数值波动变大。

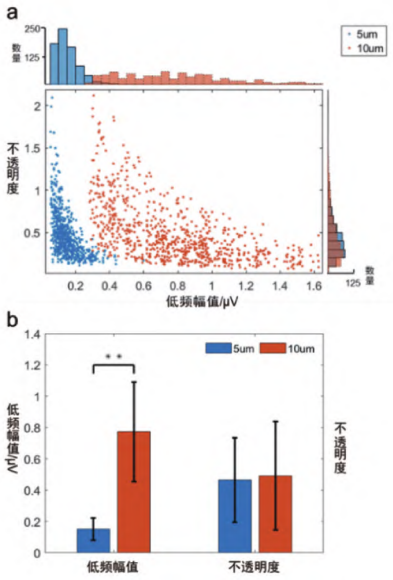

图 5　不同粒径聚苯乙烯微球检测 (a) 电不透明度-低频幅值散点图及电不透明度和低频幅值直方图;(b) 幅值的均值及标准差

Fig. 5 Detection of polystyrene microspheres with different particle sizes (a) electrical opacity - low frequency amplitude scatter plot and histogram of electrical opacity and low frequency amplitude; (b) mean and standard deviation of amplitude

2.2　相似粒径微球和细胞的区分

为验证系统对相似粒径不同粒子的区分能力,采用 HEPG2 肝癌细胞和 10 μm 的聚苯乙烯微球进行实验。HEPG2 肝癌细胞的尺寸约 12 μm[12]。分别取 755 和 797 个点进行数据处理,获得电不透明度-低频幅值散点图及电不透明度和低频幅值直方图(图 6(a))。HEPG2 肝癌细胞和 10 μm 的聚苯乙烯低频幅值分别为 0.79±0.26 μV 和 0.77±0.32 μV。经 u 检验,HEPG2 肝癌细胞低频幅值与 10 μm 微球比较,$u=1.75$,$P>0.05$,二者差异无显著性;而 HEPG2 肝癌细胞电不透明度与 10 μm 微球分别为 0.88±0.46 和 0.49±0.35,经 u 检验,HEPG2 肝癌细胞电不透明度与 10 μm 微球比较,$u=18.79$,$P<0.01$,具有显著性差异。由此看出,在粒径上区分不开的两种微粒,可以通过电不透明度区分,电不透明

度反映了颗粒内容物的信息,细胞与微球内容物的确不一样,两者电学差异较大,实验结果与实际相符。

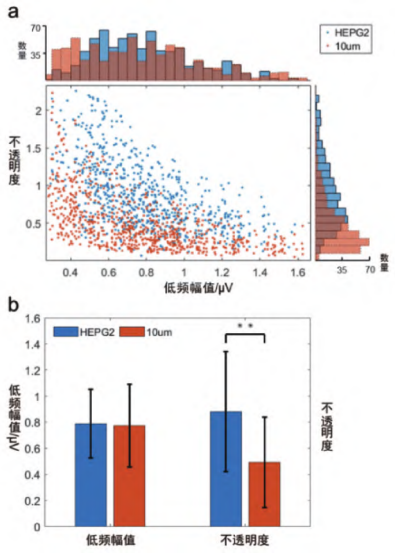

图 6 相似粒径聚苯乙烯微球和细胞检测(a)电不透明度-低频幅值散点图及电不透明度和低频幅值直方图;(b)幅值的均值及标准差

Fig. 6 Detection of polystyrene microspheres and cells with similar size (a) electrical opacity-low frequency amplitude scatter plot and histogram of electrical opacity and low frequency amplitude; (b) mean and standard deviation of amplitude

3 结论

本文通过自行搭建的微流控阻抗流式系统,实现了对不同粒径的聚苯乙烯微球和细胞的无标记检测。锁相放大电路可以实现微粒信号的放大并通过算法提取。通过聚苯乙烯微球和细胞验证了系统的性能。5 μm 微球低频幅值与 10 μm 微球差异明显,HEPG2 肝癌细胞电不透明度与 10 μm 微球比较具有一定差异,表明该系统具有根据电学特征区分粒子体积和内容物的功能,为微流控阻抗流式研究开辟了一个有应用前景的平台。

参考文献:

[1] Song H J, Wang Y, Rosano J M, et al. A microfluidic impedance flow cytometer for identification of differentiation state of stem cells [J]. Lab on a Chip, 2013, 13(12): 2300-2310.

[2] Xu Y C, Xie X W, Duan Y, et al. A review of impedance measurements of whole cells [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2016, 77: 824-836.

[3] Holmes D, Pettigrew D, Reccius C H, et al. Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry [J]. Lab on a Chip, 2009, 9(20): 2881-2889.

[4] Hong J, Kandasamy K, Marimuthu M, et al. Electrical cell-substrate impedance sensing as a non-invasive tool for cancer cell study [J]. Analyst, 2011, 136(2): 237-245.

[5] Pick H, Terrettza S, Baud O, et al. Monitoring proliferative activities of hormone-like odorants in human breast cancer cells by gene transcription profiling and electrical impedance spectroscopy [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 50: 431-436.

[6] Hedayatipour A, Aslanzadeh S, Mcfarlane N. CMOS based whole cell impedance sensing: Challenges and future outlook [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2019, 143: 111600.

[7] Cheung K, Gawad S, Renaud P. Impedance spectroscopy flow cytometry: On-chip label-free cell differentiation [J]. Cytometry Part A, 2005, 65A(2): 124-132.

[8] Honrado C, Bisegna P, Swami N S, et al. Single-cell microfluidic impedance cytometry: from raw signals to cell phenotypes using data analytics [J]. Lab on a Chip, 2021, 21(1): 22-54.

[9] Whitesides G M, Ostuni E, Takayama S, et al. Soft lithography in biology and biochemistry [J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2001, 3: 335-373.

[10] Gawad S, Schild L, Renaud P. Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing [J]. Lab on a Chip, 2001, 1(1): 76-82.

[11] De Bruijn D S, Jorissen K F A, Olthuis W, et al. Determining Particle Size and Position in a Coplanar Electrode Setup Using Measured Opacity for Microfluidic Cytometry [J]. Biosensors-Basel, 2021, 11(10): 353.

[12] Milo R, Jorgensen P, Moran U, et al. BioNumbers-the database of key numbers in molecular and cell biology [J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38: D750-D753.