文章编号: 1007 - 4252(2020) 06 - 0006 - 412

一种新型单细胞微流控捕获芯片的制作及系统搭建

何玲宇[1], 王疏影[1], 赵飞[1], 龙妍婷[1], 陈翔[1,*]
(1. 上海交通大学 微纳电子学系 微米/纳米加工技术国家级重点实验室, 上海 200240)

摘要: 本文基于捕获检测释放的机制, 采用集成片上阀门的三层微流控芯片工艺, 设计并制作了一种用于捕获和释放单细胞的芯片。利用 COMSOL 仿真优化芯片结构来增大细胞被捕获率。比较了芯片阀门在不同聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS) 制作比例、不同进样压力时的状态以及长时间工作的性能, 测试了芯片捕获与释放机制的有效性, 能实现捕获、检测及释放过程。芯片的制作工艺简单, 成品率可达 95% 以上, 这种先捕获检测后再释放的方式为单细胞分离收集提供了新的技术途径。

关键词: 微流控; 片上阀门; 三层芯片; 单细胞
中图分类号: O35　　**文献标志码**: A

Fabrication of a new single-cell microfluidic capture chip and system construction

HE Ling-yu[1], WANG Shu-ying[1], ZHAO Fei[1], LONG Yan-ting[1], CHEN Xiang[1,*]
(1. National Key Laboratory of Science and Technology on Micro /Nano Fabrication, Department of Micro /Nano Electronics, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China.)

Abstract: Based on the mechanism of capture, detection and release, this paper designs and produces a chip for capturing and releasing single cells by using the three-layer microfluidic chip technology of the valve on the integrated chip. COMSOL simulation is used to optimize the chip structure to increase the capture rate of cells. The performance of the valve in different Polydimethylsiloxane (PDMS) combination and different sample loading pressures are compared. And the ability of the valve to operate for a long time is verified. The effectiveness of the capture and release mechanism of the chip is tested and the process of capture, detection and release can be realized. The fabrication process of the chip is simple, and the yield can reach more than 95%. This method of capturing and detecting before releasing provides a new technical approach for single cell separation and collection.

Key words: Microfluidic; On-board valve; Three layers of the chip; Single cell

收稿日期: 2020-11-30;　　**修订日期**: 2020-12-14
基金项目: 上海市科委基础重大研发计划资助项目(17JC1401001) .
作者简介: 陈翔(1974-) , 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为生物芯片、MEMS、自动化(E-mail: xiangchen@ sjtu.edu.cn) .

0　引言

单细胞分析是在单个细胞水平上研究细胞的基因或蛋白表达、克隆等,在肿瘤机制研究、药物筛选等具有广阔前景,这其中单细胞分离是其关键技术,例如 B 细胞抗体药物筛选是先分离获得带有合适抗体的单个 B 细胞并打印到 96 孔板或 384 孔板中进行克隆扩增,再进行药理实验[1]。此外,单细胞测序[2]、以及细胞因子检测[3]等也需要在获得单个细胞后用于后续分析。

目前传统的单细胞分离的技术[4]主要有基于流式细胞仪的荧光激活细胞分选(Fluorescence Activated Cell Sorting , FACS) [5],磁激活流式细胞分选(Magnetic-Activated Cell Sorting, MACS) [6],激光显微切割(Laser Capture Microdissection, LCM) [7],手动细胞选择[8]和微流控技术等。FACS 能实现高通量的单细胞分离,但其仪器设备成本较高,需要一定量的起始细胞数目,且快速流动产生的剪切力和非特异性荧光分子会损害分选细胞的活性,不利于后续的单细胞扩增。MACS 只能利用细胞表面分子作为标记来分离活细胞,且成本高昂。LCM 通过在显微镜下检查细胞形态来鉴定目标细胞,再利用机械臂等自动化工作站挑选细胞,设备成本高,需要专业人员来执行,通量低。而微流控技术兼具高精度的流体控制、低样品消耗以及与可与细胞尺寸匹配等优势[9],是单细胞分析的有利工具,其主要通过水油液滴隔离[10]、气动阀[11]及基于流体动力学的细胞阵列式捕获结构[12]等方式分离单个细胞,微流控技术还可与 FACS[13]等不同的单细胞分离方式相结合使用,能有效减少样品消耗。基于微流控的单细胞分离方法已广泛用于多种生物医学和临床应用的筛查,体现了其在未来生物医学等领域发展的重要作用[14]。

近年来,利用微流控技术分离单细胞的研究中取得了很大进展,包括基于流式细胞仪的分离技术、压电式分离和先捕获后释放等方式。

Isozaki[13]提出的智能图像激活细胞分选流式细胞分选技术,集成 FPGA (field-programmable gate array) ,采用光机流成像、深度学习方法,可达 2000 个细胞的高通量分选,但对光机成像设备等的要求高,成本高昂。另一种基于流式细胞仪的单细胞分离的技术包括细胞封装成乳液、液滴检测、外部分选和收集几个过程,根据液滴检测结果,依靠芯片内压电片改变乳液流动方向,再在出口位置添加鞘流增大乳液间距实现收集[15],或者在芯片出口末端与收集平台之间设置电场,生成乳滴后,再移动平台收集所需乳滴[16],这种方式的分离效率受细胞封装速度及封装率的影响较大。

区别于流式的分离技术,Gross[17]等直接在芯片出口集成压电片,挤压生成液滴,通过相机系统检测和分类,含单细胞的液滴滴落到孔板中,其他液滴则被吸回,实现每个液滴包含一个细胞的打印模式。基于此原理,Cytena 公司推出了细胞分离装置 cyClone,用于分离培养活性单细胞,但设备成本高昂。这种方式需要在芯片末端集成相机系统以及吸收装备,所需设备空间大,灵活性较差,且打印准确性较差。

集成片上阀门,通过先捕获细胞再检测后释放的方式虽然在通量上不能和上述流式分离技术相比,但是其结构简单,能有效提升后续目标细胞收集的准确性。因此这种单细胞分离方式在较低通量有其特殊的优势。如 2020 年,Chen[18]等报道了一种含相邻阀门的微流控芯片,可限制收集的单细胞大小的上限和下限,但需要精确控制薄膜变形程度。Stanford 的 Quake 课题组提出的双层芯片[19]由阀门薄膜变形控制流道层液体流动,薄膜不能太厚又要覆盖结构,两层芯片的 PDMS 比例不同,在未完全固化时扩散键合,需要精确控制时间和温度等参数,制作难度大。

我们设计并制作了一种基于三层工艺的微流控芯片,用于捕获和释放单细胞,结合捕获区域加旁路通道的设计模式,利用流阻原理以及仿真分析对捕获区域的结构进一步优化,增大了细胞被捕获机率。采用深硅刻加正胶光刻的方式提升了硅模具的可重复使用性。微流控三层芯片的制作工艺只用控制中间薄膜的厚度,降低阀门层和流道层制作复杂度,成品率提升至 95%。常规进样压力下,阀门于低压时(<100 kPa) 就可完全关断,在 1000 次开闭后依旧能正常工作。为验证芯片功能,采用 10 μm 荧光微球,可完成单个微粒捕获、识别以及释放过程,该芯片在为未来阀芯片制作以及单细胞分离打印方式提供了新的技术途径。

1 正文

1.1 实验材料及设备

正光刻胶 AZ4903，显影液，安智电子材料公司；MA6 型双面对准光刻机，RC8 型匀胶机，Karl Suss 公司；甲基三氯硅烷（CAS: 75-79-6），北京百灵威科技有限公司；PDMS（Sygard 184），Dow Corning 公司；HP-303DU 型加热板，SmartLab 公司；FA1004 分析电子天平，上海良平仪器仪表有限公司；DZF-6020 型真空干燥箱，上海新苗医疗器械制造有限公司；PE-100-RIE 型氧等离子体去胶机，Plasma Etch 公司。

1.2 芯片设计原理

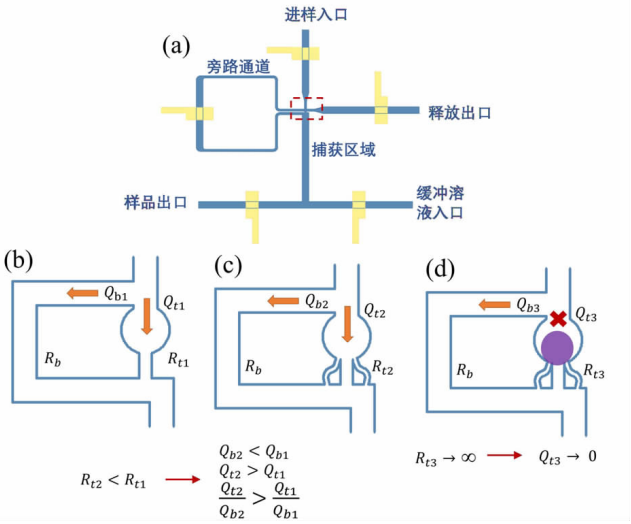

图 1 （a）微流控芯片原理，蓝色为流道，黄色为阀门；（b）~（c）分别为无侧通道、含侧通道及捕获后的流阻分配 Q 代表流量，R 代表流阻

Fig.1 (a) Schematic of Microfluidic chip, Blue is the flow layer and yellow is the valve layer; (b) ~(c) are the distribution of flow resistance without side channel, with side channel and after capture. Q stands for flow rate, and R stands for flow resistance

我们设计了一款用于捕获和释放单个细胞的微流控芯片，设计原理如图 1（a）所示，包括进样入口、捕获区域、旁路通道、样品出口、缓冲溶液入口以及释放出口，除捕获区域外，每个通道都配有对应的阀门来控制开闭。捕获区域的限制通道宽度为 7 μm，高度 10 μm，使流经细胞能被限制在该区域。主流道中与阀门层十字交叉的区域的长 150 μm，宽 80 μm，其余流道宽 25 μm，高 20 μm。

基于流阻分配原理，常用电路等效替代液体流动，用电阻等效流阻，电流等效液体流量，电压等效压力[20]，如公示（1），

$$\Delta P = R^* \ Q \tag{1}$$

其中 ΔP 为通道两端压力差，R 为流阻，Q 是流量。通道流阻大小受通道长度 l，宽度 w 和高度 h 影响，如公式（2），其中 a 为无量纲常数，μ 为流体动力粘度，

$$R = \frac{a\mu l}{w\,h^3} \tag{2}$$

细胞捕获时，进样入口、旁路通道以及样品出口打开，其余关闭。在无侧通道时，如图 1（b），尽管限制通道的长度小于旁路通道的长度，但限制通道的高度和宽度都小于旁路通道的，捕获区域与旁路通道流阻比值仍旧较大，捕获区域与旁路通道流量比 Q_{t1}/Q_{b1} 较小，细胞被捕获机率小。为进一步增大流量比，需要增大旁路通道流阻或减小捕获区域流阻，但增加旁路通道流阻会增大整个芯片尺寸，因此我们在限制通道两侧增加侧管道来增大捕获区域流量，如图 1（c），等价于并联流阻，增大通道横截面积，捕获区域流阻 $R_{t2} < R_{t1}$，捕获区域与旁路通道流量比增大，即 $(Q_{t2}/Q_{b2}) > (Q_{t1}/Q_{b1})$。

细胞被捕获后，R_{t3} 急剧增大，此时 Q_{t3} 较小，基本等同于断路，几乎所有液体都从旁路通道流过，如图 1（d）。细胞释放时，缓冲溶液入口及释放出口打开，其余关闭。

1.3 三层芯片原理

本研究设计了一种用于捕获与释放单细胞的三层微流控芯片，芯片包括阀门层、中间薄膜层及流道层，阀门层的通道中都充满液体，与流道层呈十字交叉，通过对阀门层通道液体施加压力来控制中间薄膜层的变形，实现流道层流道的开闭，如图 2 所示。

1.4 模拟仿真

利用 COMSOL Multiphysics 5.2 仿真分析限制通道两侧不同侧通道数、芯片高度对捕获区域流量与旁路通道的流量的影响，基于以下参数进行计算：入口设置为压力进样，大小为 1 kPa，进样液体为水，密度为 1×10^3 kg/m^3，动态粘度为 1×10^{-3} Pa·s。

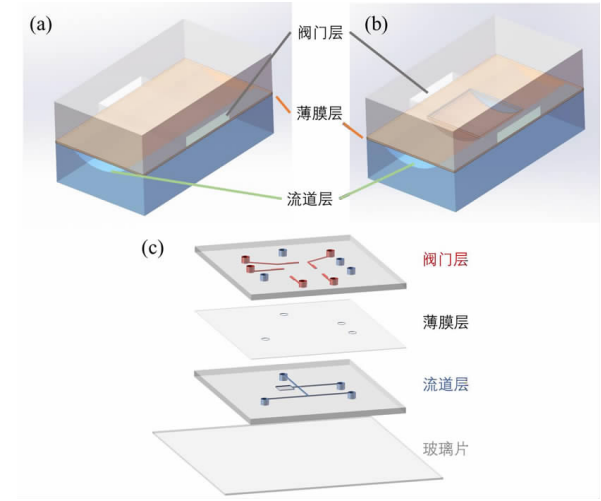

图 2　三层芯片原理图(a) 阀门层未施加压力,薄膜不变形,流道打开; (b) 阀门层施加压力,薄膜变形,流道关闭; (c) 芯片三维结构示意图

Fig.2 Schematic of three - layer chip (a) The valve layer is not under pressure, the film is not deformed and the flow layer is open; (b) Pressure exerted on the valve layer, the film is deformed and the flow layer is closed; (c) Three - dimensional structure diagram of the chip

1.5　微流控芯片制作

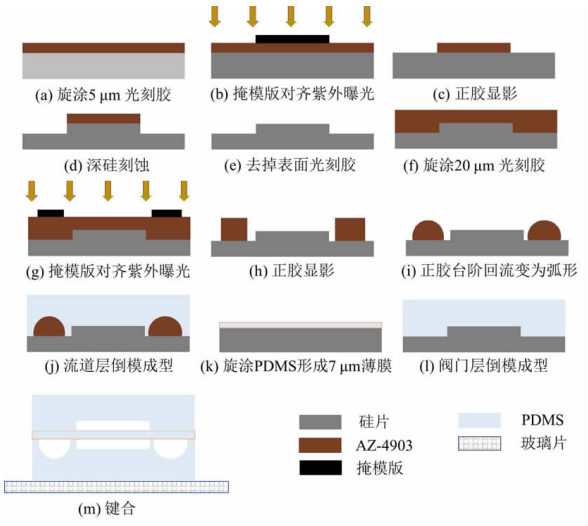

图 3　芯片制作流程

Fig.3 Processing of Microfluidics chip fabrication

掩模版由 AutoCAD 制图软件绘制,模具由正胶光刻与深硅刻蚀制成,阀门层模具制作工艺如图 3(a) ~(e) ,流道层模具制作工艺如图 3(a) ~(i) 。微流控芯片的制作工艺如图 3(j) ~(m) 。预聚物和固化剂以 10: 1 的比例配制 PDMS 到模具上,固化成型后制作阀门层和流道层; 预聚物和固化剂按 25: 1 比例配制 PDMS,倒在无结构空硅片上,500 rpm 预转 30 秒,再 10000 rpm 旋涂 150 秒,形成厚度约为 7 μm 的薄膜。再分别将阀门层、薄膜、流道层与玻璃片依次用等离子去胶机处理 30 秒后键合。

1.6　硬件搭建

为实现单细胞的分离的自动化,本研究设计了集成低压进样、光学图像采集以及收集平台的微流控硬件系统,并设计了可视化界面如图 4 所示,集成电气比例阀控制(ITV0010,SMC) 、电磁阀(S070B - 58G,SMC) 控制、电机位移控制及图像显示等功能,界面程序运行在树莓派上,简化了实验中的操作。低压进样加压控制可以参见课题组之前工作[21]。

图 4　可视化界面

Fig.4 GUI

1.7　实验与讨论

1.7.1 仿真结果

为进一步增大细胞被捕获的机率,合理设计芯片结构,增大捕获区域和旁路通道的流量比值至关重要。由于我们采用了深硅刻蚀与正胶光刻的工艺,可分别设置捕获区域限制限制通道的高度和主通道(包含旁路通道) 的高度,如图 5(a) 所示。

首先,我们仿真分析了限制通道侧管道数捕获区域流量的影响,流量为速度在截面上的积分,进样压力 1 kPa,限制通道高度 h_t 为 10 μm,主通道高度 h_m 25 μm,无侧通道、单侧通道、双侧通道的捕获区域和旁路通道的截面流量,捕获区域与旁路通道的

流量比值为 2.25、2.67、2.88，如图 5(b) ~(d) 所示，含单侧通道和双侧通道的捕获区域的流量与旁路通道的流量比相较于无侧通道时的流量比提升 19% 和 28%，限制通道含双侧通道的结构显著增大流经捕获区域的流量。其次是芯片高度对流量比值的影响，设置含双侧通道的限制通道高度为 h_t 10 μm 不变，改变主通道高度 h_m 为 20 μm 和 15 μm，捕获区域与旁路通道的流量比值 3.09 和 2.95。

因此当其余流道高度设置为 20 μm，限制区域含双侧通道时，捕获区域流量最大，细胞被捕获的机率最高，后续的芯片制作以及实验都基于这个参数进行。

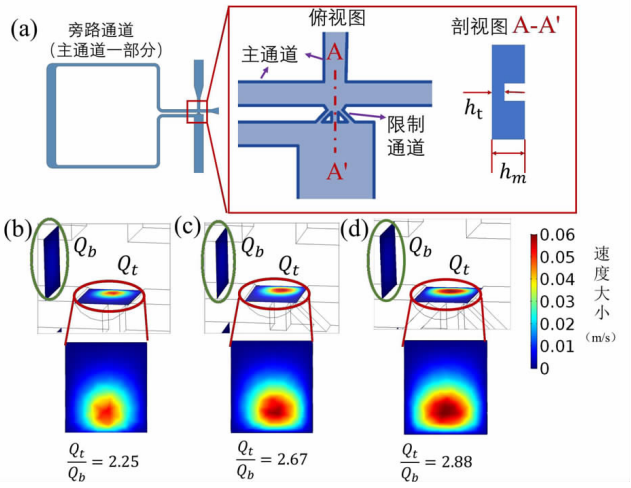

图 5 芯片高度示意及仿真结果(a) 主通道(包含旁路通道) 与限制通道高度示意; (b) 无侧管道时截面流量; (c) 含单侧管道时截面流量; (d) 含双侧管道时截面流量。h_m 和 h_t 为主通道和捕获结构高度，Q_b 和 Q_t 为旁路通道和捕获区域速度在截面上的积分即流量。

Fig.5 Chip height diagram and simulation results (a) Main channel (including bypass channel) and limited channel height diagram; (b) Cross section flow when without side pipeline; (c) Cross section flow with unilateral pipeline; (d) Cross section flow with bilateral pipelines. h_m and h_t are the height of main channel and capture structure. Q_b and Q_t are the cross section flow of bypass channel and capture area.

1.7.2 微流控芯片及硬件系统

传统 SU8 负性光刻胶模具无法包含高深宽比结构且与光刻胶结合力差，因此我们提出了一种深硅刻蚀加正胶回流的方式来制作硅模具。传统的阀门薄膜[19]既要覆盖住阀门结构又不能太厚，芯片键合依靠 2 种不同比例 PDMS 在未完全固化时扩散实现，受环境及工艺条件影响大，成品率低。而我们采用的三层夹心式[18]的微流控芯片将薄膜与阀门层的制作分开，尽管增长了芯片制作周期，但降低了对阀门层灌注厚度的限制，只用单独控制中间薄膜层厚度，每一层由 Plasma 等离子表面处理后键合，受温度以及湿度等环境因素的影响小，制作简单，芯片成品率可达 95%，质控高。微流控芯片实物如图 6(a) ~(c) 所示，阀门层、薄膜层与流道层可稳定键合且能正常工作。配套搭建的硬件系统如图 6(d) ，可实现低压进样、位移平台移动以及图像采集等功能。

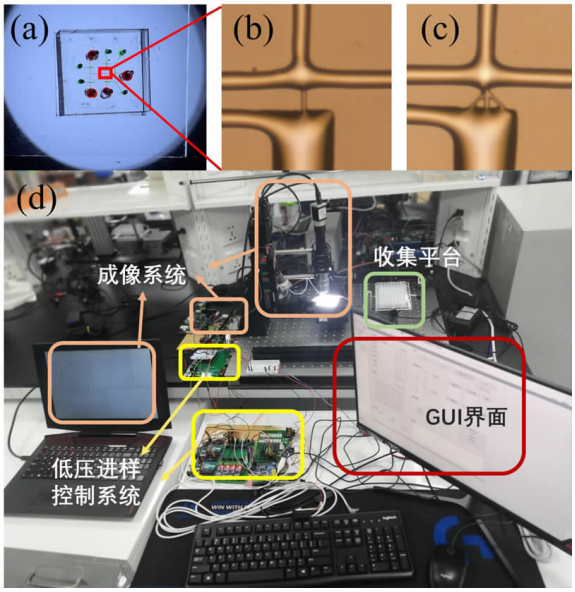

图 6 芯片及硬件系统实物图(a) 三层微流控芯片; (b) 未加侧管道捕获区域; (c) 含双侧管道的捕获区域; (d) 硬件系统

Fig.6 Picture of Microfluidic chip and hardware system (a) Three-layer microfluidic chip; (b) Unlined pipe capture area; (c) The capture area containing the two-sided pipes; (d) Hardware system

1.7.3 阀门测试

为能在低压(< 100 kPa) 情况下关断阀门，我们通过制作并测试了不同比例预聚物和固化剂的薄膜在阀门层施加不同压力下的性能，如图 7 所示。在阀门压力为 45 kPa 时，比例为 10: 1 的薄膜变形不大，比例为 25: 1 的薄膜有一半变形，比例为 30: 1 的薄膜变形区域较大，呈现较好的效果; 随着阀门层压力增大为 95 kPa，各比例的薄膜变形效果更加明显，

但比例为 10: 1 薄膜变形效果仍旧较差,25: 1 的薄膜效果较为稳定,而 30: 1 的薄膜向边缘扩张,不能承受更大压力,且该比例的薄膜容易破裂。结合我们阀门测试结果,我们选取 25: 1 的比例来制作用于捕获释放单细胞的芯片。

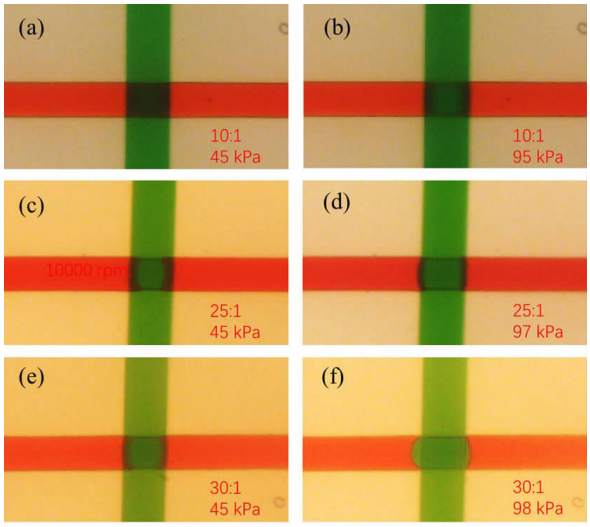

图 7　不同预聚物和固化剂比例、不同压力阀门变形

Fig.7 Valve deformation of different proportion of prepolymer and curing agent, valve pressure

在实际应用中需一次性获得成百上千的单细胞,会多次开闭芯片上的阀门,因此对芯片进行阀门有效性测试,实际中细胞溶液进样压力不超过 10 kPa,阀门的压力为 50 kPa 即可关闭流道。设置程序控制阀门每 2 秒开断一次,持续 1000 次,薄膜形态完好,阀门可正常工作。

1.7.4 芯片功能测试

在准备捕获细胞时,样品溶液(红色) 从上方流道进样时,缓冲溶液入口和释放出口的阀门关闭,其余阀门打开,液体只能从中间捕获区域或者旁路通道流过,如图 8(a) 和(c) 所示。待捕获到细胞后,样品入口、旁路通道及样品出口阀门关闭,其余阀门打开,流体流经捕获区域经右侧流道流出芯片,如图 8(b) 和(d) 所示。

1.7.5 荧光微粒及细胞的捕获与释放

以荧光微粒测试三层芯片功能,其中芯片主通道 20 μm 和限制通道高度为 10 μm,宽度 7μm,粒子直径 10 μm,经过捕获、检测、释放三个过程,如图 9 所示。粒子被捕获后,经图像处理后被释放,这个过程仅需几秒时间。

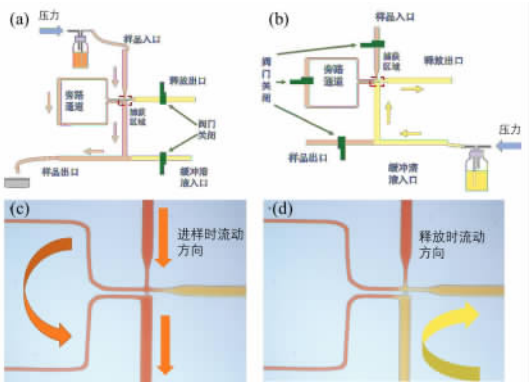

图 8　进样捕获时和释放时流体流动示意(a) 捕获时原理图; (b) 释放时原理图; (c) 捕获时液体流动测试; (d) 释放时液体流动测试

Fig. 8 Diagram of fluid flow during capture and release (a) Schematic diagram of capture; (b) Schematic diagram of release; (c) Fluid flow tests for capture; (d) Fluid flow test for release

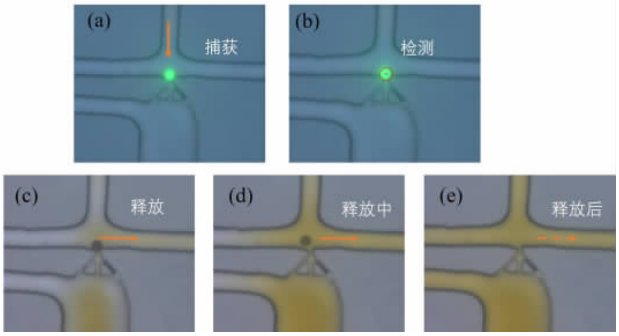

图 9　粒子捕获(a) 捕获; (b) 检测; (c) ~(e) 释放

Fig.9 Particle capture (a) capture; (b) detection; (c) ~ (e) release

使用 DAPI 染色后的干细胞验证了芯片捕获与释放单细胞的能力,细胞悬液经上方通道进入芯片后,单个细胞被捕获,如图 10(a) ,经检测后被释放,如图 10(b) 和(c) 。

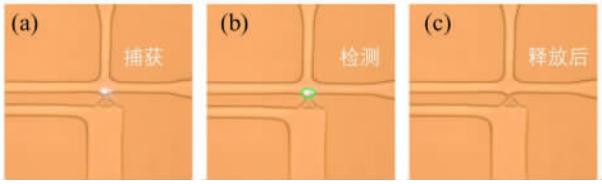

图 10　细胞捕获(a) 捕获; (b) 检测; (c) 释放

Fig.10 Cell capture (a) capture; (b) detection; (c) release

2 结论

我们设计并制作了一款可用于捕获释放单细胞的微流控芯片，通过在捕获区域增加限制流道的通道数来降低该区域流阻，增大该区域的流量，提高单个细胞被捕获的机率，并利用 COMSOL 仿真软件分析了不同侧通道数以及高度对流量的影响。我们提出了一种制备三层微流控芯片的工艺，包括阀门层、薄膜层以及流道层，采用深硅刻加光刻的技术提升了硅模具的重复使用率，改用中间薄膜结构降低了制作难度，芯片成品率可达 95%。采用该工艺制备的芯片阀门在 1000 次开闭后依旧有效，能很好地控制内部液体流动，包括进样捕获和释放流出。该微流控芯片可以用于捕获和释放单个微球和单个细胞。此外，利用树莓派、Arduino 等低成本硬件控制系统搭建用于便捷操作及监控的硬件系统，简化了实验操作复杂性。

参考文献:

[1] Zhai J, Yi S, Jia Y, et al. Cell-based drug screening on microfluidics [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019, 117: 231-241.

[2] Gawad C, Koh W, Quake S R. Single-cell genome sequencing: current state of the science [J]. Nature Reviews Genetics, 2016, 17(3): 175-188.

[3] Abdullah M A A, Wang J. Ultrasimple Single-Cell Detection of Multiple Cytokines by a Nanowell Chip Integrated with Encoded Microarrays [J]. ACS Sensors, 2019, 4(9): 2296-2302.

[4] Hu P, Zhang W, Xin H, et al.Single Cell Isolation and Analysis. Frontiers in cell and developmental biology [J], 2016, 4: 116.

[5] Reichard A, Asosingh K, Best Practices for Preparing a Single Cell Suspension from Solid Tissues for FlowCytometry [J]. Cytometry Part A, 2019, 95(2): 219-226.

[6] Lin S, Zhi X, Chen D, et al. A flyover style microfluidic chip for highly purified magnetic cell separation. Biosensors and Bioelectronics [J], 129: 175-181.

[7] Kummari E, Guo-Ross S X, Eells J B. Laser capture microdissection-a demonstration of the isolation of individual dopamine neurons and the entire ventral tegmental area [J]. Journal of Visualized Experiments, 2015(96): e52336.

[8] Citri A, Pang Z P, Südhof T C, et al. Comprehensive qPCR profiling of gene expression in single neuronal cells [J]. Nature Protocols, 2012, 7(1): 118-127.

[9] Whitesides G M. The origins and the future of microfluidics [J]. Nature, 2006, 442(7101): 368-373.

[10] Babahosseini H, Misteli T, Devoe D L. Microfluidic on-demand droplet generation, storage, retrieval, and merging for single-cell pairing [J]. Lab on a Chip, 2019, 19(3): 493-502.

[11] Hu B, Liu Y, Deng J, et al. An on-chip valve-assisted microfluidic chip for quantitative and multiplexed detection of biomarkers [J]. Analytical Methods, 2018, 10(21): 2470-2480.

[12] Zhang M, Zou Y, Xu X, et al. Highly parallel and efficient single cell mRNA sequencing with paired picoliter chambers [J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 2118.

[13] Isozaki A, Mikami H, Tezuka H, et al. 2020. Intelligent image-activated cell sorting 2.0. Lab on a Chip [J], 20: 2263-2273.

[14] Carey T R, Cotner K L, Li B, et al. Developments in label - free microfluidic methods for single - cell analysis and sorting [J]. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2019, 11(1): e1529.

[15] Nan L, Lai M Y A, Tang M Y H, et al.On-Demand Droplet Collection for Capturing Single Cells [J]. Small, 2020, 16(9): 1902889.

[16] Qin Y L, Wu L, Wang J, et al.A Fluorescence-Activated Single-Droplet Dispenser for High Accuracy Single-Droplet and Single-Cell Sorting and Dispensing [J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(10): 6815-6819.

[17] Gross A, Schondube J, Niekrawitz S, et al. Single-cell printer: automated, on demand, and label free. [J]. Journal of Laboratory Automation, 2013, 18(6): 504-518.

[18] Chen C, Chang X, Dong B, et al.Dynamic screening and printing of single cells using a microfluidic chip with dual microvalves [J]. Lab on a Chip, 2020, 20(7): 1227-1237.

[19] Unger M A, Chou H P, Thorsen T, et al. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography [J]. Science, 2000, 288(5463): 113-116.

[20] Chen X, Ren C. A microfluidic chip integrated with droplet generation, pairing, trapping, merging, mixing and releasing [J]. Rsc Advances, 2017, 7(27): 16738-16750.

[21] 杨光，何玲宇，高林耿，et al. 基于微流控芯片的流式线虫机器学习图像识别系统 [J].功能材料与器件学报，2019，25(04): 286-292.