

[研究简报]

基于错流过滤原理的微流控细胞分离芯片的研制

陈 兴, 崔大付, 刘长春, 李 辉, 耿照新
(中国科学院电子学研究所传感技术国家重点实验室, 北京 100080)

关键词 微流控芯片; 细胞分离芯片; 错流过滤; MEMS

中图分类号 O657; TP212.3

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2007)01-0059-03

随着 MEMS 技术与分析科学、材料学及生命科学等学科交叉研究的深入, 微全分析系统 (μ TAS) 得到了迅速的发展. 目前, DNA 芯片及电泳分离芯片等的研究较多^[1~3], 而细胞分离芯片的报道较少. Huang^[4] 和 Cheng^[5] 等报道了介电电泳细胞分离芯片, 成功地分离了单核细胞和 T 细胞, 但由于需要特殊缓冲液而使其应用受到限制. Studer 等^[6] 报道了基于荧光检测的细胞分离芯片的研制, 但需要较为复杂的光学系统. Edwards 等^[7] 报道了基于场效应原理的颗粒分离芯片, 分别利用温度场及电场在硅微芯片上实现了粒径为 5 nm ~ 1 μ m 颗粒的分离. 另外, 还有超声波法^[8] 及磁法^[9] 等分离方法. Wilding 等^[10] 利用 MEMS 技术制备了基于微过滤原理细胞分离芯片, 采用盲端过滤进行细胞分离, 但在细胞分离后期易出现芯片堵塞问题. 微过滤是指通过柱状、弯曲沟道、梳状、堰状及筛等微结构, 根据不同颗粒(或细胞)尺寸的差异进行物理分离的一种方法, 要求不同颗粒间有明显的尺寸差异. 已知老鼠外周血中红细胞呈双凹圆盘形, 平均直径为 6 ~ 9 μ m, 厚为 2 μ m, 并且红细胞易变形, 可通过尺寸小于本身的缝隙; 白细胞一般成球形, 部分白细胞直径大于 10 μ m, 基本满足过滤原理分离要求. 本文首次提出并制备了一种错流过滤式细胞分离微流控芯片.

1 实验部分

1.1 仪器与材料 MA6 型曝光机(德国 Karl suss 公司), AMS100SE 型深刻蚀机(法国 Adixen 公司), ME-3A 型离子刻蚀机(中国科学院微电子中心), SB6 键合机(德国 Karl suss 公司), L4514-088 氧扩散炉(青岛旭光公司), A 型超声波打孔机(北京祥云电子技术研究所), 蠕动泵(美国 Scientific Support 公司). 实验所用外周血取自普通小鼠, 采用肝素抗凝后分装 10 μ L 备用.

1.2 结构与制备 根据老鼠外周血细胞尺寸设计并制备了细胞分离微流控芯片, 如图 1 所示.

微流控细胞分离芯片由玻璃盖片和硅质基片阳极键合而成, 芯片尺寸为 2 cm \times 1 cm. 硅质基片上包含有 3 个流通池和微流体沟道, 沟道宽为 200 μ m, 深为 30 μ m, 沟道被两排过滤微结构隔成 3 个分离微沟道, 玻璃盖片上包含分别与硅质基片上的 3 个流通池相对应的进样孔、红细胞出样孔和白细胞出样孔. 采用 L-Edit 软件设计了柱式和坝式两种过滤微结构的掩膜图形, 并利用 MEMS 技术制备柱式和坝式微流控细胞分离芯片. 柱式微流控细胞分离芯片的细胞分离示意图如图 2(A) 所示, 硅质基片上的过滤微结构是直径为 20 μ m、高为 30 μ m 和间隙为 5 μ m 的微柱阵列, 其扫描电镜图见图 2(C). 坝式微流控细胞分离芯片的细胞分离示意图见图 2(B), 硅质基片上的过滤微结构是宽为 20 μ m、高为 26 μ m 和间隙为 4 μ m 的两条坝结构, 其扫描

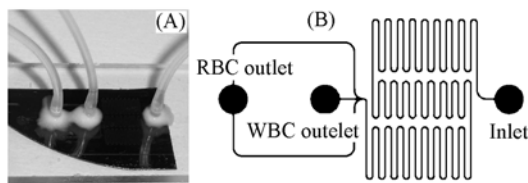


Fig. 1 Photograph of the microfluidic chip(A) and the schematic diagram of the silicon substrate(B)

收稿日期: 2006-04-25.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20299030, 60427001 和 60501020) 和国家“八六三”项目(批准号: 2006AA04Z355)资助.

联系人简介: 崔大付(1941 年出生), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事微流控芯片、MEMS、微传感器与微系统的研究.

E-mail: dfcui@mail.ie.ac.cn

电镜图如图 2(D) 所示. 柱式微流控芯片的制备过程如下: 清洗硅片, 光刻, 深刻蚀出微柱阵列和沟道, 经热氧化使硅质基片和玻璃盖片阳极键合, 最后在玻璃盖片上粘接进、出口软管. 坝式微流控芯片的制备工艺与柱式芯片类似, 其差别在于硅质基片上坝式结构要进行 2 次光刻和 2 次深刻蚀工艺.

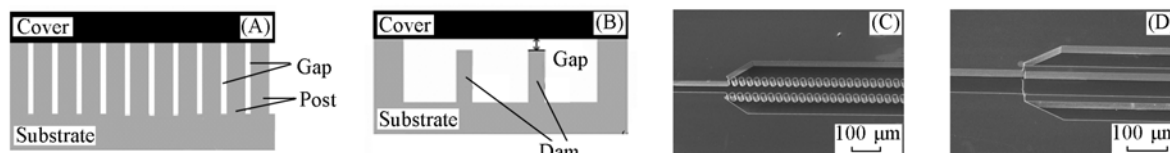


Fig. 2 Schematic diagrams of microfluidic cell separation chip of post-type(A), microfluidic cell separation chip of dam-type(B), SEM images of the silicon substrate of post-type(C) and the silicon substrate of dam-type(D)

1.3 血细胞分离实验 老鼠外周血样品经稀释后由蠕动泵从进样口导入微流控芯片, 入口速度为 $5 \mu\text{L}/\text{min}$, 分别收集白细胞出样口和红细胞出样口的溶液并进行血细胞计数.

2 结果与讨论

微过滤包括盲端过滤和错流过滤. 盲端过滤是指水流动垂直于过滤微结构表面, 大尺寸颗粒被过滤微结构截流, 逐步形成滤饼, 使过滤速度减慢, 分离效率降低; 错流过滤是指水流动平行于过滤微结构表面, 在过滤表面形成较大的剪切力, 造成过滤微结构阻塞物质始终处于悬浮状态, 减少阻塞物质在过滤微结构内的聚集, 能有效地避免芯片的堵塞问题. 错流过滤分离血细胞时, 尺寸较大的白细胞不能从过滤微结构的间隙通过, 只能在中间沟道中随着液体向前流动, 最后从白细胞出样口流出; 尺寸较小的红细胞从过滤微结构间隙通过后在两侧沟道流动, 并随着液体向前流动, 最终从红细胞出样口流出, 在液体流动过程中实现血细胞的分离. 由于老鼠外周血中红细胞数为白细胞数的 1000 倍, 只有当红细胞分离效率较高时, 研究白细胞的分离效率才有意义. 首先分析血样中细胞浓度对红细胞分离效率的影响, 分别对原始血样稀释 5, 10, 30, 50 和 100 倍, 在沟道长 160 mm 的柱式芯片上进行分离实验, 收集出口溶液并进行红细胞计数, 计算红细胞分离效率. 血样稀释倍数对红细胞分离效率的影响如图 3 所示. 可见, 随着稀释倍数的增加和细胞浓度的减少, 红细胞分离效率逐渐增加. 当稀释 50 倍时, 即细胞浓度约为 $10^5/\mu\text{L}$ 时, 红细胞分离效率为 82.3%, 但当稀释继续增加到 100 倍时, 红细胞分离效率提高不明显. 以下实验均采用 50 倍稀释血液样品进行血细胞分离实验.

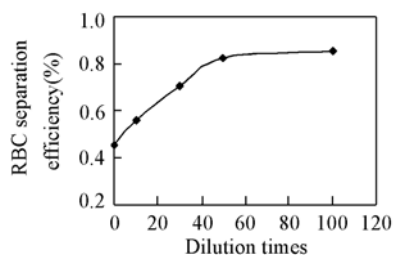


Fig. 3 Effect of dilution times on the RBC separation efficiencies

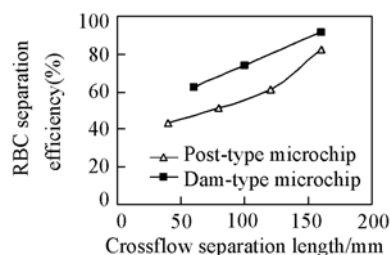


Fig. 4 Effect of variation of separation length on the RBC separation efficiencies

研究了不同过滤微结构和沟道长度对细胞分离效率的影响. 制备不同沟道长度的柱式和坝式微流控细胞分离芯片, 并分别进行分离实验, 结果如图 4 所示. 随着分离沟道的增加, 红细胞分离效率大大提高; 同时坝式分离芯片的分离效率明显高于柱式芯片. 对于沟道长 160 mm 的坝式分离芯片, 红细胞分离效率可达到 91.2%. 增加沟道长度可提高红细胞的分离效率, 但也会增大整个芯片尺寸, 不利于芯片的微型化和集成化. 还可将出口溶液再次导入芯片进行循环分离, 不增加沟道长度而提高细胞的分离效率. 白细胞出口溶液进行 3 次循环分离, 红细胞的分离效率可提高到 95% 以上.

沟道长 160 mm 的坝式分离芯片对白细胞的分离效率为 27.4%, 是 Wilding 等^[10]报道的盲端式分离芯片白细胞分离率(约 10% ~ 15%)的 2 倍. 但白细胞分离效率较低, 其主要原因是在分离过程中, 血细胞在液体压力的驱动下进行流动和分离, 白细胞在压力作用下发生形变而从过滤微结构的间隙通过, 另外, 还有约占 10% 的白细胞本身尺寸较小也可通过微流控芯片中的过滤微结构.

错流式芯片还可平行分离多种尺寸的颗粒, 实现不同颗粒的同时分离和收集. 本文设计并制备了可同时分离白细胞、红细胞和血浆的柱式多级分离芯片, 分离过程见图 5. 四排微柱阵列把主沟道分成了 5 个次级沟道, 中间两排微柱阵列间隙为 $5\ \mu\text{m}$ 用以分离白细胞和红细胞, 两侧微柱阵列间隙为 $3\ \mu\text{m}$, 用以分离红细胞和血浆. 分离后的白细胞、红细胞和血浆分别从各自出口流出, 通过进行血细胞计数可评价多级分离芯片性能.

综上所述, 基于错流过滤原理, 利用 MEMS 技术研制的单级和多级细胞分离芯片, 由于采用错流式分离有效地避免了芯片堵塞问题, 可实现两种或多种颗粒的平行分离和收集. 错流式芯片比盲端式芯片具有更高的白细胞分离效率, 而且坝式分离芯片较柱式分离芯片具有更高的红细胞分离效率. 更重要的是, 错流式微流控细胞分离芯片的研究为微全分析系统(μTAS)的实现奠定了良好的基础.

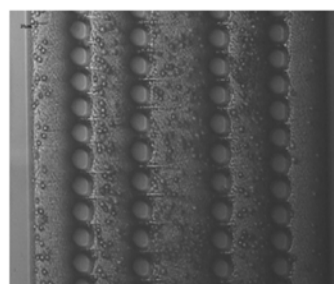


Fig. 5 Schematic diagram of multilevel crossflow filter of post-type when the blood was separated

参 考 文 献

- [1] Woolley A. T. , Hadley D. , Landre P. , *et al.* . Anal. Chem. [J] , 1996 , **68** : 4081—4086
- [2] CHEN Xing(陈兴) , CUI Da-Fu(崔大付) , LIU Chang-Chun(刘长春) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J] , 2006 , **27**(4) : 618—621
- [3] Martin U. K. , Andrew J. M. , Andreas M. . Science[J] , 1998 , **280** : 1046—1048
- [4] Huang Y. , Joo S. , Duhon M. , *et al.* . Anal. Chem. [J] , 2002 , **74** : 3362—3371
- [5] Cheng J. , Sheldon E. L. , Wu L. , *et al.* . Anal. Chem. [J] , 1998 , **70** : 2321—2326
- [6] Studer V. , Jameson R. , Pellereau E. , *et al.* . Microelectronic Engineering[J] , 2004 , (73/74) : 852—857
- [7] Edwards T. , Gale B. K. , Frazier A. B. . Biomedical Microdevices[J] , 2001 , **3**(3) : 211—218
- [8] Townsend R. J. , Hill M. , Harris N. R. , *et al.* . Ultrasonics[J] , 2004 , **42** : 319—324
- [9] Smistrup K. , Hansen O. , Bruus H. , *et al.* . J. Magnetism and Magnetic Materials[J] , 2005 , **293**(1) : 597—604
- [10] Wilding P. , Kricka L. J. , Cheng J. , *et al.* . Analytical Biochemistry[J] , 1998 , **257** : 95—100

Microfluidic Cell Separation Chips Based on Crossflow Filtration

CHEN Xing, CUI Da-Fu^{*}, LIU Chang-Chun, LI Hui, GENG Zhao-Xin

(State Key Laboratory of Transducer Technology, Institute of Electronics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract In this work, two kinds of novel microfluidic cells separation chips were described on the principle of crossflow filtration by using micro-electro mechanical systems(MEMS) technology. Whole blood is a complex mixture of various cells, such as red blood cells(RBC), white blood cells(WBC) and so on. Separation and collection of different kinds of cells is the required first step for the subsequent clinical and basic research assays. One-level filtration microfluidic chips with three coiled channels spaced by two arrays of parallel microfabricated filtration barriers of post-type or dam-type along the stream, were successfully used to separate and collect RBC and WBC from whole blood *via* their different sizes. The effects of the dilution times and the length of separation channels with different filtration barriers on RBC separation efficiency were investigated. When the whole blood was diluted by 50 times, the RBC separation efficiency was 91.2% and the WBC separation efficiency was 27.4% by using the microfluidic chip with dam-type filtration barriers of 160 mm long. The WBC separation efficiency was two times more than that by using microfluidic chip based on the dead-end filtration principle. The second kind of microfluidic chip had multilevel filtration barriers of post-type which was used to separate and collect plasma, RBC and WBC from whole blood.

Keywords Microfluidic; Cell separation chip; Crossflow filtration; MEMS

(Ed. : A, G)