

阵列式对电极介电电泳芯片及其 用于细胞分离富集研究

徐 溢, 曹 强, 曾 雪, 吴永杰, 张文品

(新型微纳器件与系统技术国防重点学科实验室, 微纳系统及新材料技术国际研发中心,
重庆大学化学化工学院, 重庆 400030)

摘要 基于介电电泳原理, 设计并制作了一种新型的能够用于细胞分离和富集的微流控介电电泳芯片. 该芯片由沉积有金电极的石英基片和带有微管道的聚二甲基硅氧烷(PDMS)盖片组成. 通过在管道底部布置间距不同的对电极阵列, 增大了正介电电泳力在管道中的有效作用范围, 能够在降低施加电压的同时, 实现对流动体系中细胞样品的捕获. 在 3 V 和 3 MHz 条件下, 该 DEP 芯片对人血红细胞的捕获效率达到 83%; 进一步通过将肝癌细胞捕获在芯片电极上可实现对红细胞和肝癌细胞混合样品的分离, 在 5 V 和 400 kHz 条件下对肝癌细胞的捕获效率达到 86%.

关键词 阵列式对电极; 介电电泳芯片; 细胞分离与富集

中图分类号 O652

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)05-0876-06

近年来, 集成了各种生化微粒操纵技术的微流控芯片已广泛应用于临床检验和诊断、食品质量监控和环境监测领域. 目前用于微流控芯片的生化微粒操纵技术主要有电渗、电泳、介电电泳(Dielectrophoresis, DEP)、激光光钳、声表面波及机械屏障等, 其中介电电泳由于其无需表面修饰和荧光标记等繁琐的前处理, 以及能对不同介电性质的细胞进行操纵等特点. DEP 芯片的性能取决于芯片电极的结构. Becker 等^[1]采用堡式电极 DEP 芯片将血样中细胞全部富集在电极表面, 然后通过变频实现了血清中乳腺癌细胞的分离; Aldaeus 等^[2]在叉指式电极 DEP 芯片上通过多步施加电压模式实现了聚苯乙烯微粒的分离; 另外一些课题组采用这两种 DEP 芯片进行了相关研究^[3~7]. 但是传统的堡式和叉指式电极芯片一般是将样品细胞注入分离管道, 在静态下施加电场对受到正介电电泳的细胞进行捕获, 然后以缓冲液将受负介电电泳和较小正介电电泳的细胞冲走从而实现分离, 但分析时间较长, 难以满足高效快速的要求. 随着介电电泳芯片研究的深入, 出现了许多新颖的电极结构. Li^[8]和 Doh 等^[9]对平行电极进行了改良, 均实现了对死-活酵母菌的分离; Choi 等^[10]设计了一种梯形电极阵列(TEA), 对直径分别为 6 和 15 μm 的聚苯乙烯进行分离; Cheung 等^[11]设计了具有夹板式三维电极的介电电泳芯片, 对经过不同处理的红细胞进行分离; 此外, 文献[12~14]也设计了具有三维电极结构的 DEP 芯片, 对聚苯乙烯微粒进行了分离. 本文提出了一种二维电极结构的阵列式对电极 DEP 芯片, 采用递进间距的对电极阵列, 增大了正介电电泳力在管道中的有效作用范围, 减小了电压变化对管道内介电电泳力的影响, 通过将目标细胞捕获在芯片电极上, 实现了对流动体系中细胞样品的分离和富集.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

阵列式对电极 DEP 芯片, 33220A 可调式信号发生器(安捷伦科技有限公司, 美国), IX71 倒置荧

收稿日期: 2009-01-12.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20675089, 90307015)、科技部“八六三”计划项目(批准号: 2006AA04Z345)、国际科技合作项目(批准号: 2006DFA13510)、重庆市自然科学基金重点项目(批准号: 2006BA4012)和重庆大学研究生创新基金(批准号: 200801A1A0230282)资助.

联系人简介: 徐 溢, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事集成生化微分析系统研究. E-mail: xuyibbd@sina.com

光显微镜(奥林巴斯株式会社, 日本), SenIION5 便携式电导仪(哈希公司, 美国).

葡萄糖、蔗糖、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠及氯化钾均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司). 细胞实验缓冲液为 8.5% 蔗糖、0.3% 葡萄糖溶液, 用电导率仪测定悬浮液的电导率, 以磷酸盐缓冲液(PBS 缓冲液: 2.67 mmol/L KCl, 138.00 mmol/L NaCl, 8.10 mmol/L Na₂HPO₄, 1.47 mmol/L KH₂PO₄)调节成实验所需的电导率.

人血红细胞由健康人血液离心得到. 将血液放入离心管中, 以 2000 r/min 离心 10 min, 离心结束后弃去上层清液, 加入 PBS 缓冲液, 摇匀, 进行第二次离心. 重复操作 3 次, 得到红细胞悬浮液. 实验时将该细胞悬液以实验缓冲液稀释至所需浓度即可.

肝癌细胞由重庆医科大学附属第一医院提供. 将肝癌细胞悬液以 1000 r/min 离心 5 min, 弃去上层溶液, 加入试验用缓冲液重悬, 再次离心, 重复 3 次即得实验用细胞悬液.

1.2 介电电泳原理及 DEP 芯片设计

由 Pohl^[15]发现的介电电泳现象是在非均匀电场中, 由于微粒极化所产生的偶极子受力不均衡, 导致微粒向电场强度高的区域或电场强度低的区域运动, 分别称为正介电电泳现象和负介电电泳现象. 微粒所受到的介电电泳力可以用下式^[16]表示:

$$F_{\text{DEP}} = 2\pi r^3 \text{Re}[K(\omega)] \nabla E_{\text{rms}}^2 \quad (1)$$

式中, r 为微粒的半径, ∇ 为矢量算符, E_{rms} 为施加电场的均方根, $\text{Re}[K(\omega)]$ 为卡尔休斯-莫索提因子的实部, 该因子的表达式为

$$K(\omega) = (\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*) / (\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*) \quad (2)$$

式中, ε_p^* 和 ε_m^* 分别为微粒和缓冲液的复合介电常数($\varepsilon^* = \varepsilon - j\sigma/\omega$, 其中 ε 为介电常数, j 为 $\sqrt{-1}$, σ 为电导率, ω 为施加电场的角频率). 显然, 了解电极附近的电场分布对 DEP 芯片的设计具有重要的意义. 根据 Laplace 方程:

$$\vec{E} = -\nabla \phi \quad (3)$$

可见, 由于所施加的是无旋场, 即电场强度的散度为零, 因此 $\nabla \cdot \vec{E} = 0$, 从而得到

$$\nabla^2 \phi = 0 \quad (4)$$

式中, ∇^2 为拉普拉斯(Laplace)算子. 通过 CoventorWare 软件对该偏微分方程进行有限元法的求解, 可以计算出电极附近电场的强度, 从而得到电极附近电场的分布情况.

依据本课题组在微流控芯片 MEMS 设计的前期研究^[17], 结合介电电泳原理, 设计了图 1(A)所示的阵列式对电极 DEP 芯片, 其微电极阵列由 25 对电极构成, 每 5 对电极组成一个电极组, 5 组电极对的间距分别为 100, 70, 50, 30 和 10 μm , 呈梯度减小, 每组电极间的距离为 20 μm , 整个 DEP 芯片长

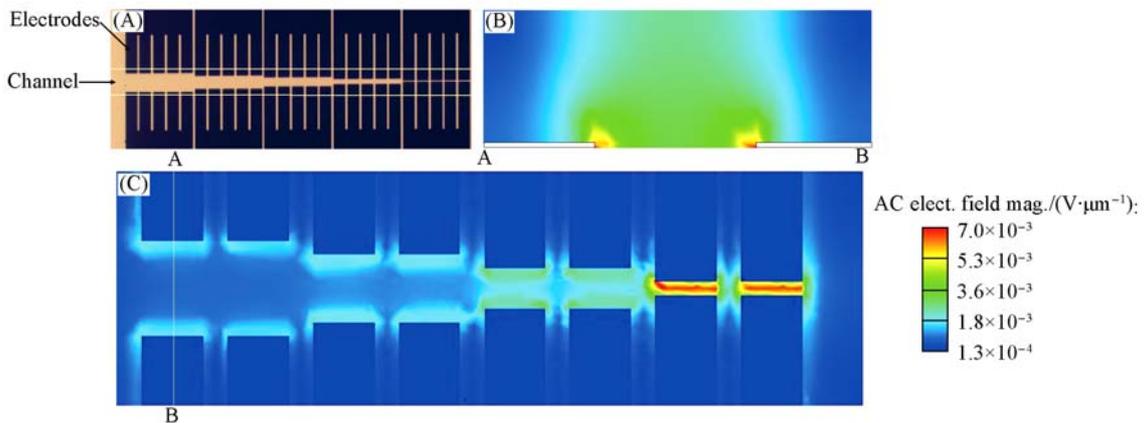


Fig. 1 Scheme of microfluidic DEP chip with arrayed electrodes and the simulation results of electric field distribution on the designed chip

(A) Micrograph of electrode array; (B) numerical simulation of the electric field distribution over the single pairs of electrodes at the cross-section (A-A) in Fig. 1(C); (C) numerical simulation of the electric field distribution in the whole micro-channel.

4 cm, 宽 1 cm. 采用 MEMS 设计的 Coventor 有限元软件对所设计的 DEP 芯片进行模拟分析, 图 1(B) 和(C) 分别为单对电极和阵列式对电极 DEP 芯片微管道中电极覆盖区域的电场模拟图, 其中矩形的深色区域为电极, 电极附近区域的电场大小以颜色梯度表示. 图 1(B) 显示每组电极对会在垂直于流体的方向产生一个非均匀电场, 而电极的边缘处电场强度最大, 当含有细胞的溶液流经 DEP 芯片微管道时, 受正介电电泳作用的细胞会被捕获在电极边缘, 而受负介电电泳作用的细胞则会远离电极边缘; 由图 1(C) 可见, 随着电极间距的减小, 电极的正介电电泳区域逐渐向管道中心移动, 使得整个管道都有较强的正介电电泳力存在, 这将有利于芯片在流动体系中克服流体力实现对目标细胞的捕获.

1.3 DEP 芯片及其分析系统

采用金电极作为阵列式对电极 DEP 芯片的微电极, 先在玻璃片上镀钛膜, 对镀金膜进行光刻, 将设计好的电极结构图形转移到芯片上, 然后脱金脱钛, 再经高温固化后完成玻璃基片上微电极组的制作. PDMS 盖片采用直接浇注法制作, 先由 SU-8 材料制作微流管道的阳模, 然后采用 PDMS 预聚物直接倒模、固化及剥离后制得 PDMS 盖片. 含微电极结构的石英玻璃基片和含微管道网络的 PDMS 盖片通过直接键合方式得到实验用复合式 DEP 芯片. DEP 芯片分离分析系统(图 2)主要由安捷伦 33220A 可调式信号发生器、奥林巴斯 IX71 倒置荧光显微镜和阵列式对电极 DEP 芯片组成. 实验时在显微镜下将 PDMS 盖片准确盖在芯片电极上, 接通导线, 将细胞样品注入芯片储液池, 通过控制储液池中液面的高度控制管道内细胞的流速, 施加信号后在显微镜下观测细胞在 DEP 芯片微管阵列电极上的运动情况, 并通过配置的 CCD 系统进行图像信号的采集.

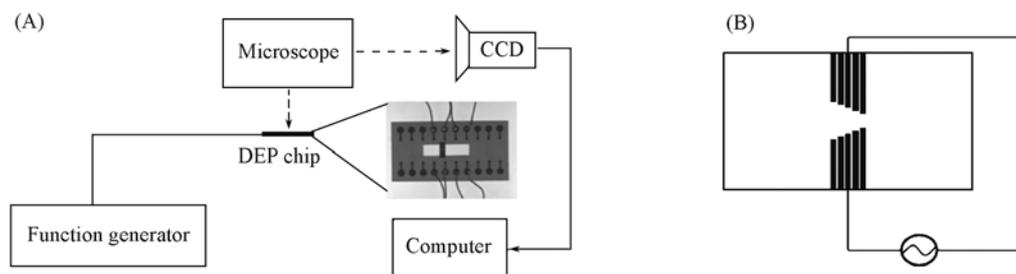


Fig. 2 Schematic representation of experimental setup

(A) Scheme of the analysis system with the microfluidic DEP chip with arrayed opposite electrodes;

(B) scheme of electrodes connected with the function generator.

1.4 阵列式对电极 DEP 芯片实验

1.4.1 DEP 操作频率优化 选择电导率为 $600 \mu\text{S}/\text{cm}$ 的缓冲液, 将红细胞稀释至 1.5×10^4 个/mL, 控制每分钟流经管道的细胞约为 75 个, 施加电压为 10 V, 频率分别为 1, 2, 3, 4 和 5 MHz 的交变电压, 于 1 min 后对电极上捕获的细胞进行计数, 可以计算出单位时间内阵列式对电极 DEP 芯片对细胞的捕获效率, 以捕获效率作为指标对频率条件进行选择.

1.4.2 血红细胞 DEP 富集 采用优化后的频率条件, 分别施加大小为 1, 3, 5, 7 和 10 V 的交变电压, 选择缓冲液电导为 $600 \mu\text{S}/\text{cm}$, 将红细胞稀释至 1.5×10^4 个/mL, 控制每分钟流经管道的细胞数约为 100 个, 考察不同电压下芯片对红细胞捕获效率的变化.

1.4.3 混合血红细胞和肝癌细胞的 DEP 分离 从式(1)可以看出, 细胞所受介电电泳力的方向, 除了取决于细胞的介电性质外, 还与缓冲液的电导率和施加电场的频率有关. 临界频率是指在固定电导率的缓冲液中, 细胞受到介电电泳力为零时所施加的电场频率, 也称零点频率^[18]. 由式(2)可以看出, 临界频率能够反应细胞的介电性质. 介电电泳正是基于这种在相同缓冲液中, 不同细胞的临界频率不同的特点, 通过控制施加电场的频率, 使得待分离的细胞分别受到正、负介电电泳力的作用而向不同的电场区域移动, 从而实现细胞的分离. 因此, 针对分离的目标细胞选择合适电导率的缓冲液和实验电场频率, 是能否实现介电电泳分离的关键. 临界频率的测定采用抛物线电极芯片在静态下进行, 实验的频率范围从 10 kHz 到 1 MHz, 施加电压为 5 V. 分别测定人血红细胞和肝癌细胞在电导率为 200, 400, 600 和 $800 \mu\text{S}/\text{cm}$ 的缓冲液条件下的临界频率, 根据两种细胞临界频率的差值选择合适的

缓冲液和分离频率. 然后在流动体系中对浓度为 1.5×10^4 个/mL, 红细胞和肝癌细胞混合比例为 10:1 的混合样品进行分离, 控制每分钟流经管道的细胞数约为 100 个, 1 min 后对实际通过管道的肝癌细胞和捕获到的肝癌细胞进行计数, 从而得到阵列式对电极 DEP 芯片的实际捕获效率.

2 结果与讨论

2.1 阵列式对电极 DEP 芯片对细胞的富集

2.1.1 DEP 操作频率的优化 由公式(1)可知, $\text{Re}[K(\omega)]$ 不仅能够影响介电电泳力大小, 而且直接影响其方向. 因此, 在采用 DEP 芯片进行细胞富集的实验中, 对操作频率的选择和优化显得尤为重要. 如果将细胞视为一个单壳模型, 在低频时, 随着施加电场频率的增加, $\text{Re}[K(\omega)]$ 逐渐增加并由负变正, 在某个频率时达到最大值, 此时 $\text{Re}[K(\omega)]$ 值基本保持恒定, 不再随施加电场频率的变化而变化, 当频率继续增加到某个值时, $\text{Re}[K(\omega)]$ 开始减小, 最终由正变负, 两个频率拐点的出现与细胞的性质有关^[19]. 图 3 为采用 1~5 MHz 的频率时, 红细胞在 DEP 芯片上的平均捕获效率, 实验在流动状态中进行, 细胞的捕获效率是介电电泳力和流体力等其它作用力综合作用的结果, 可见, 当频率为 3 MHz 时, 芯片对红细胞的捕获效率达到最大值 86.3%. 考虑到高频电压对细胞的不利影响和实际试验的效果, 最终选择 3 MHz 作为红细胞富集实验的频率条件.

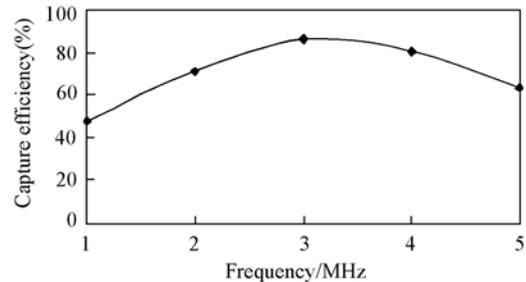


Fig. 3 Effects of frequency on cell capture efficiency on the designed DEP chip

2.1.2 阵列式对电极 DEP 芯片上红细胞的富集 在细胞 DEP 芯片分析中, 一方面细胞受到的介电电泳力会随外加电压增大而增大, 另一方面, 细胞性质也会随着施加电场的增大而产生变化, 甚至丧失活性. 因此, 在不影响分离富集效率的情况下, 减小细胞在电场中的暴露时间和降低电压, 对细胞分析具有重要的意义. 本文设计的阵列式对电极 DEP 芯片采用递进式间距的电极对组合设计, 从单组阵列电极对来看, 电压的降低会减小电极对在管道中的正介电电泳捕获范围, 而对于整个管道而言, 正介电电泳的覆盖区域并不会显著减少, 只有当电压降低到一定值, 介电电泳力的变化超过了电极对能够产生有效捕获的范围时, 芯片的捕获效率才会急剧降低.

表 1 列出了不同电压条件下各电极组上捕获的平均细胞数以及总的捕获效率, 其中电极编号 1~5 分别代表间距为 100, 70, 50, 30 和 10 μm 的电极组.

Table 1 Average capture efficiency and the number of cells captured on each electrode pair at different voltages

Voltage/V	Average number of cells captured on each electrode pair					Capture efficiency(%)
	1	2	3	4	5	
1	0	0	0	2	48	50
3	6	22	39	15	1	83
5	21	37	29	2	0	89
7	35	34	11	5	0	85
10	46	35	5	1	0	87

可见, 随着施加电压的减小, 细胞在芯片上的富集区域逐渐后移. 当施加 10 V 的电压时, 第 1, 2 组电极对捕获的细胞占总捕获细胞的 93.4% [如图 4(B) 所示], 说明此时这两组电极对产生的介电电泳力几乎覆盖了整个芯片管道; 当电压降低到 7 V 时, 第 1 组电极对捕获的细胞数量减少, 但是前两组电极对捕获的细胞仍然占到总捕获细胞的 81.2%, 说明此时第 3 组电极对虽然开始发挥作用, 但并不明显; 当电压降低到 5 V 时, 第 3 组电极对的捕获效率增加到 32.5%, 前面 3 组电极对捕获的细胞数量趋于平衡; 继续降低电压至 3 V, 此时第一组电极对的有效捕获范围急剧减小, 但第 4 组电极开始发挥作用, 所以整个芯片的捕获效率并没有显著的变化. 但是当电压降低至 1 V 时, 大部分被捕获的细胞集中在第 5 组电极对上 [图 4(A)], 说明此时前面 3 组电极对产生的介电电泳力已经不足以捕获流动中的细胞, 从而导致富集效率急剧下降. 由此可见, 梯度间距的电极对设计能够显著减小电压降

低对单个电极对捕获效率的影响,采用该电极设计的阵列式对电极 DEP 芯片能够在 3 V 的电压下实现对流动体系中红细胞的捕获,其捕获效率达到 83%.

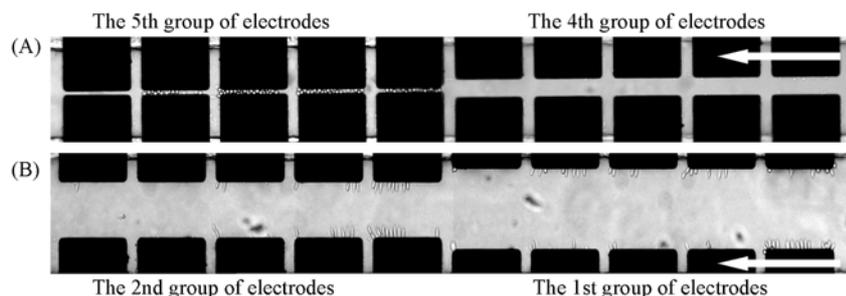


Fig. 4 Micrograph of RBCs captured on different pairs of electrodes in microfluidic DEP chip with different voltages

(A) 1 V, the 4th and 5th pairs of electrodes; (B) 10 V, the 1st and 2nd pairs of electrodes.

2.2 阵列式对电极 DEP 芯片对混合细胞样品的分离实验

2.2.1 分离缓冲液的选择 由图 5 可以看出,抛物线电极正、负介电泳区域区分十分明显,细胞在抛物线电极周围作正、负介电泳运动容易判断且准确度较高,由于实验时细胞在水平方向只受到介电泳力的作用(无流体力存在),所以通过观察细胞的运动方向,可以准确地判断细胞受到的介电泳力的正负.细胞停止运动,表示细胞受到的介电泳力为零,此时所施加的电场频率即为细胞的临界频率.红细胞一般呈扁平的椭圆形,且没有细胞核,而肝癌细胞一般呈球形,含有细胞核,两种细胞无论是在形态学还是在性质上都存在较大的差异,实验测得两种细胞的临界频率如图 6 所示.

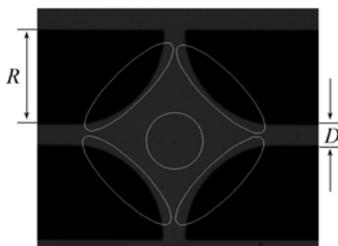


Fig. 5 Scheme of parabolic electrodes DEP chip

$R = 200 \mu\text{m}$, $D = 50 \mu\text{m}$, ellipse and rotundity represented positive DEP and negative DEP area, respectively.

由图 6 可以看到,两种细胞的临界频率差异较大,且随着缓冲液电导率的增加,临界频率差异也随之增大,当缓冲液电导率达到 $600 \mu\text{S}/\text{cm}$ 时,两种细胞的临界频率差异超过 300 kHz,可满足分离要求.为了避免由于缓冲液电导率过大造成的热效应,选择缓冲液电导率为 $600 \mu\text{S}/\text{cm}$ 进行分离实验.

2.2.2 阵列式对电极 DEP 芯片上的细胞分离 在缓冲液电导率为 $600 \mu\text{S}/\text{cm}$ 条件下,施加频率为

400 kHz、电压为 5 V 的电场,对人血红细胞和肝癌细胞 10:1 的混合样品进行分离,根据临界频率的测定结果可见,此时肝癌细胞受到正介电泳力,将被捕获在芯片电极上,而红细胞受到负介电泳力,不会在芯片电极上停留.由图 7 可见,肝癌细胞被捕获在芯片电极上,红细胞则在流体力作用下随缓冲液流入废液池,其对肝癌细胞的平均捕获效率达到 86%.实验结果显示,阵列式对电极 DEP 芯片能够通过将目标细胞捕获在芯片电极上,实现对混合细胞样品的分离.

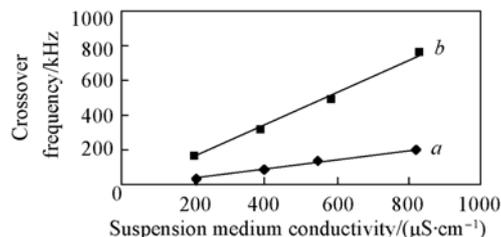


Fig. 6 Dependencies of the crossover frequency versus suspension medium conductivity for HepG2 (a) and RBC (b)

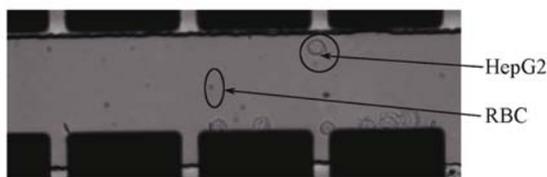


Fig. 7 Micrograph of HepG2 and RBC separated in the microfluidic DEP chip

3 结 论

本文设计并制作了一种新型阵列式对电极 DEP 芯片,据此建立了能够用于细胞分离富集的 DEP

芯片细胞分析系统. 通过优化芯片 DEP 操作条件, 实现了对流动状态下红细胞的捕获. 结果显示, 阵列式对电极 DEP 芯片能够在不影响捕获效率的情况下显著减小实验电压. 在流动状态下对肝癌细胞进行捕获从而实现了混合细胞样品的分离, 大大缩短了操作时间.

参 考 文 献

- [1] Becker F. F., Wang X. B., Huang Y., *et al.*. Proceedings of the National Academy of Sciences[J], 1995, **92**(3): 860—864
- [2] Aldaeus F., Lin Y., Amberg G., *et al.*. Journal of Chromatography A[J], 2006, **1131**(1/2): 261—266
- [3] Golan S., Elata D., Orenstein M., *et al.*. Electrophoresis[J], 2006, **27**(24): 4919—4926
- [4] Chen D. F., Du H., Li H. W.. Sensors and Actuators A[J], 2007, **133**(2): 329—334
- [5] Li H., Bashir R.. Sensors and Actuators B[J], 2002, **86**: 215—221
- [6] Zhou H., White R. L., Tilton D. R.. Journal of Colloid and Interface Science[J], 2005, **5**: 179—191
- [7] Aldaeus F., Lin Y., Amberg G., *et al.*. Journal of Chromatography A[J], 2006, **1131**: 261—266
- [8] Li Y., Dalton C., Crabtree H. J., *et al.*. Lab Chip[J], 2007, **7**(2): 239—248
- [9] Doh I., Cho Y. H.. Sensors and Actuators A[J], 2005, **121**(1): 59—65
- [10] Choi S., Park J. K.. Lab Chip[J], 2005, **5**(10): 1161—1167
- [11] Cheung K., Gawad S., Renaud P.. Cytometry Part A[J], 2005, **65A**(2): 124—132
- [12] Wang L., Flanagan A. L., Jeon L. N.. Lab Chip[J], 2007, **7**(9): 1114—1120
- [13] Yasukawa T., Suzuki M., Sekiya T.. Biosensors and Bioelectronics[J], 2007, **22**(11): 2730—2736
- [14] Dürr M., Kentsch J., Müller T.. Electrophoresis[J], 2003, **24**(4): 722—731
- [15] Pohl H. A.. J. Appl. Phys. [J], 1951, **22**: 869—871
- [16] Gonzalez F. C., Remcho T. V.. Journal of Chromatography[J], 2005, **1079**: 59—68
- [17] ZENG Xue(曾雪), XU Yi(徐溢), CAO Qiang(曹强), *et al.*. Micronanoelectronic Technology(微纳电子技术)[J], 2009, **45**(1): 34—40
- [18] Huang Y., Wang X. B., Becker F. F., *et al.*. Biochimica et Biophysica Acta[J], 1996, **1282**: 76—84
- [19] Lionel M. B., Fatima H. L., Michael P. H.. Phys. Med. Biol. [J], 2005, **50**: 2267—2274

Research of Cell Concentration and Separation on the Dielectrophoretic Chip with Arrayed Opposite Electrodes

XU Yi*, CAO Qiang, ZENG Xue, WU Yong-Jie, ZHANG Wen-Pin

(Key Disciplines Lab of Novel Micro-nano Devices and System Technology,
International R & D Center of Micro-nano Systems and New Materials Technology,
Chemistry and Chemical Engineering College, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract A prototype microfluidic dielectrophoretic (DEP) chip for cell separation and concentration based on principle of DEP was presented in this paper. The proposed microfluidic DEP chip was bonded directly with glass substrate deposited Au micro electrodes and polydimethylsiloxane (PDMS) cover plate with designed micro-channels. The effective area of positive DEP was increased by the designed electrode array which composed of several groups of opposite electrodes with different distances on the bottom of glass chip. It also made the DEP chip to capture the target cells from fluid suspension at low AC electric field. Under the condition of 3 V and 3 MHz, the capture efficiency of human red blood cell (RBC) achieved 83%. Furthermore, mixture of RBC and liver cancer cells (HepG2) was separated by capture the HepG2 on the electrode array at 5 V and 400 kHz, and the capture efficiency of HepG2 achieve 86% on the designed DEP chip.

Keywords Arrayed opposite electrodes; Microfluidic DEP chip; Separation and concentration of cells

(Ed.: A, G)