

Sensor Chip for Cell Counting and Analyzing*

LIU Qingjun^{1,2}, HU Ning¹, YE Weiwei¹, YU Hui¹, JI Qinqin³, FANG Qun³, WANG Ping^{1,2*}

(1. Biosensor National Special Laboratory, Department of Biomedical Engineering, Key Laboratory of Biomedical Engineering of National Education Ministry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;
2. State Key Laboratory of Transducer Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China;
3. Institute of Microanalytical Systems, Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Cell counting and analyzing is widely applied in medical and scientific research fields. This study presents a cell counting and analyzing sensor chip combined with microfluidic analysis and cell-based biosensor technology. Polydimethylsiloxane (PDMS) micro-channel was fabricated by micro fabrication technology, and the PDMS chip was bonded onto the surface of light-addressable potentiometric sensor (LAPS), to form a cross microfluidic channel with the width of 100 μm and depth of 30 μm on the silicon substrate. By measuring the photo-current of LAPS, rat blood cells which driven by gravity system were counted and analyzed. The study with microfluidic technology and cell-based biosensor was conducive to achieving miniaturization and multifunction of cell counting analytical instruments by cell chips.

Key words: cell-based biosensor; light-addressable potentiometric sensor; microfluidic chip; cell counting and analyzing

EEACC: 230J

细胞计数分析传感器芯片的研究*

刘清君^{1,2}, 胡 宁¹, 叶伟伟¹, 余 辉¹, 季勤勤³, 方 群³, 王 平^{1,2*}

(1. 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院, 生物医学工程教育部重点实验室, 生物传感器国家专业实验室, 杭州 310027;
2. 中国科学院, 传感技术联合国家重点实验室, 上海 200050;
3. 浙江大学化学系微分析系统研究所, 杭州 310058)

摘 要: 细胞计数分析在医疗和科学研究方面有着广泛的应用, 本论文叙述了一种有效结合了微流控分析和细胞传感器技术, 并能够进行细胞计数分析的传感器芯片。通过微加工技术制备的聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 微通道, 并将 PDMS 芯片键合在光寻址电位传感器 (light-addressable potentiometric sensor, LAPS) 的芯片表面, 使其在硅基底上形成十字形、100 μm 宽、30 μm 深的微流控通道, 通过 LAPS 光生电流的传感测量, 对重力驱动的大鼠血细胞进行了计数分析。该研究将微流控技术引入细胞传感器的研究, 有利于后续通过细胞芯片实现细胞计数分析仪器的微型化和多功能化。

关键词: 细胞传感器; 光寻址电位传感器; 微流控芯片; 细胞计数分析

中图分类号: TP212.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-1699(2010)06-0753-04

人体血液具有多种细胞类型且各自数量相对稳定, 是临床医疗过程中重要的生理和病理特征参数, 对靶细胞的计数分析是疾病诊断、健康标准评价的重要方法。在科学研究领域, 细胞计数分析同样也可用于评价细胞体外培养的结果, 并对其分类, 甚至用以评估药物作用的效果。目前, 有多种方法用于细胞计数研究, 其中典型的是流式细胞术, 它是细胞

计数常用的有效方法, 已广泛应用于科研和医学领域。然而, 以流式细胞仪为代表的这类仪器, 存在着诸多有待改进的方面, 比如体积庞大, 便携性不佳, 且价格昂贵, 在中小型的研究和社区医疗单位难以普及。因此, 近年来随着微流控芯片 (microfluidic chip) 技术的不断发展, 人们开始逐步探索采用微机械技工技术, 制备出能够有效进行细胞计数与分析

项目来源: 国家自然科学基金资助 (30700167); 浙江省自然科学基金资助 (Y2080673); 传感技术联合国家重点实验室基金资助 (Skt0702)

收稿日期: 2009-11-11

修改日期: 2009-12-15

的细胞计数芯片 (cell counting chip)^[1-2]。该类芯片体积微小,操作简单,成本低廉,符合微型化发展的要求,具有良好的开发与应用前景。

细胞传感器 (cell-based biosensor), 以其对体外培养细胞的长时程无损测量等优点, 已广泛的应用于细胞代谢微环境测量、胞外电位的测量, 以及细胞阻抗的测量等不同领域, 成为生物传感器研究的一个重要内容。其中, 基于光寻址电位传感器 (light-addressable potentiometric sensor, LAPS) 的细胞传感器, 以其制备方法简单、成本低廉, 并且性能稳定等诸多优势, 已经成为构建细胞传感器的最主要半导体器件之一, 广泛的应用于生物医学与环境检测领域^[3-5]。

本研究将微流控芯片技术引入细胞传感器的研究, 将在 LAPS 芯片表面制备出微流控通道, 通过 LAPS 的光电检测, 构建出能对血细胞进行计数分析的新型传感检测平台, 以此探讨微流控技术在细胞传感器研究中的良好应用。

1 LAPS 测量原理

在细胞传感器的研究中, 通常采用具有电解液/绝缘层/半导体 (electrolyte/insulator/semiconductor, EIS) 结构的 LAPS 系统。其基本原理是半导体的内光电效应, 即当半导体受到一定波长的光照射时, 半导体吸收光子, 发生禁带到导带的跃迁, 即产生电子空穴对。一般情况下, 电子空穴对很快复合, 外电路中是测不到电流。如果给 LAPS 外加反向偏置电压 (N 型硅加负压, P 型硅加正压), 半导体中产生耗尽层, 这时靠近耗尽层的电子空穴对就被耗尽层拉开。当固定光强时, 就会产生光电压。LAPS 采用强度调制的光照射在器件表面, 就可以在外电路中测量到电流。电流大小与光强、耗尽层的厚度 (即外偏压) 等有关。

如图 1 所示, 关于 LAPS 心肌细胞传感器的前期研究发现, 如果将心肌细胞直接培养在 LAPS 表面, 并将 LAPS 光源直接寻址照射在目标细胞所在位点, 伴随细胞搏动时形态的改变, 其胞外电位也会

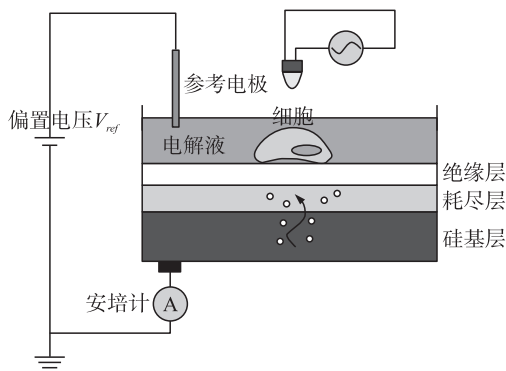


图 1 LAPS 细胞传感器的测量原理示意图

相应的发生改变^[4]。细胞搏动过程中所产生的胞外电位的改变, 尤其是细胞形态改变对激光束的不同调制, 正好可以从光强与外偏压两个方面改变传感器的输出。因为伴随细胞收缩和舒张的交替进行, 细胞胞外电位发生改变的同时, 细胞会起到一个类似透镜的作用, 而将光源相应的进行汇聚或发散^[6]。可见, 如果将 LAPS 和微流控细胞计数分析芯片有效结合, 通过微通道的细胞可以以类似的方式对 LAPS 的光源产生调制, 从而通过光生电流的改变对细胞信息进行记录。

2 微通道的制备

2.1 LAPS 传感芯片的制备

LAPS 的制备, 选用 $\langle 100 \rangle$ n 型单晶硅片作为 LAPS 的衬底, 经 $1180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 氧化 20 min , 使硅片正面生长一层约 30 nm 的 SiO_2 薄膜, 并用真空镀膜方法 (真空度 $< 2 \times 10^{-5}$) 在硅片背面蒸铝 $1\text{ }\mu\text{m}$ 以作欧姆接触^[7-9]。将硅片用导电胶粘附于相应管座上, 同时将铂丝接于管座, 使其在 LAPS 表面形成参考电极。

2.2 PDMS 微通道的制备

制备微流控芯片的步骤, 主要包括玻璃模具的制备和 PDMS 微通道的制作。使用 AutoCAD 软件绘制设计的微流控图形, 并用激光照排机在照相底片上制得光刻掩膜。镀膜之后再均匀地涂上光刻胶, 用紫外光照射进行曝光 10 s , 显影 30 s ; 将玻璃片浸入铬的刻蚀液中进行刻蚀后, 浸入含 HF 和 HNO_3 刻蚀液中进行湿法刻蚀, 制作出所需的模具。将 PDMS 前聚物与固化剂以质量比 $10:1$ 的比例混合均匀后浇灌于模具上, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固化 1 h 后, 脱模得到 PDMS 微通道结构如图 2(a) 所示的十字形微沟道, 其中包括两个聚焦入口, 一个细胞样品入口, 和一个废液出口, 微通道宽为 $100\text{ }\mu\text{m}$, 深为 $30\text{ }\mu\text{m}$, 图 2(b) 为芯片实物图。

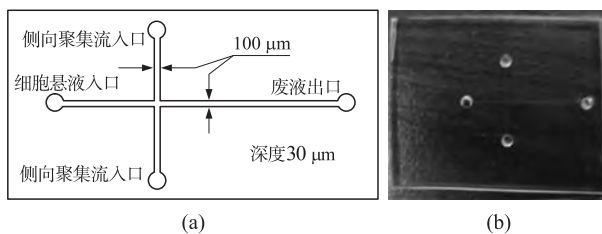


图 2 PDMS 微流控芯片示意图(a)与实物图(b)

2.3 芯片的封接

细胞计数传感器芯片的制作过程就是把 LAPS 传感器芯片和微流控芯片相结合, 即需要将硅芯片和 PDMS 芯片进行封接。我们将 PDMS 芯片清洗后, 采用等离子氧化的方法进行了处理。具体方法为: 将用于封装的 LAPS 表面和 PDMS 芯片均表面

朝上,放入氧离子刻蚀机内处理约 1 min 后取出,立即进行接触粘合。

PDMS 经氧等离子体处理后,其表面引入了亲水性质的 $-OH$ 基团,并代替了 $-CH_3$ 基团上的 H,从而使 PDMS 表面表现出极强的亲水性质。同时,由于 LAPS 传感器硅片表面含有大量 Si-O 键,在氧等离子体处理的过程中 Si-O 键被打断,从而在表面形成大量的 Si^+ 悬挂键,通过吸收空气中 $-OH$,形成了硅醇键。脱水缩合后在 LAPS 传感器硅基底与 PDMS 之间形成了牢固的 Si-O-C 键,现实了芯片的键合。

3 重力驱动与传感器检测

3.1 重力驱动系统

在进行细胞计数时,细胞样品液和聚焦液进入微流控芯片内都需要驱动^[10,11]。我们采用的是重力驱动系统,它在常规的流动分析系统中有广泛的应用,如流动注射分析中的高位瓶。图 3 是我们重力驱动系统的示意图。

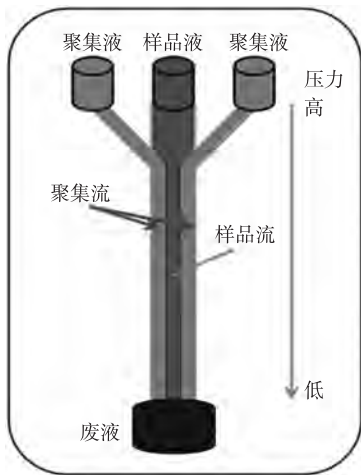


图3 重力驱动系统示意图

细胞计数微流控芯片十字微通道的主通道是细胞样品液流入流出所经过的通道,而侧向通道是聚焦通道,利用微流控聚焦的基本原理,可对细胞样品液产生聚焦作用。因而当细胞在流过聚焦十字口时,会由于聚焦作用的影响而从正中心通过主通道。

3.2 传感测量系统

测量中,先用电荷耦合器件(charge coupled device, CCD)成像系统观察细胞在微通道中的流通情况。用 He-Ne 激光器(波长 543.5 nm、功率 5 mW, Coherent Co.)作为光源,产生直径为 10 μm 的调制光,并利用成像系统使其垂直照射于 PDMS 微通道正中心部位。通过恒电位/电流仪(EG&G Princeton Applied Research, M273A)自带的三电极电路检测出 LAPS 光生电流并转换成电压,经过前置放大器及模拟滤波器进

行信号的放大和预处理,由 16 位 PCI6035 数据采集卡和 LABVIEW 软件控制数据的采集、分析和存储。

4 细胞计数分析结果与讨论

采用本实验建立的 LAPS 微流控系统,经重力对大鼠血细胞驱动之后,图 4 是 CCD 摄像机拍摄的微流控芯片通道的细胞视频截图。可见,细胞从主通道的侧边通过时,侧向聚焦流会对细胞产生明显的侧向聚焦作用,会使细胞在通过十字通道后,沿着主通道的正中心通过,这样就能使细胞通过有效的传感器检测区域,以免发生漏检。

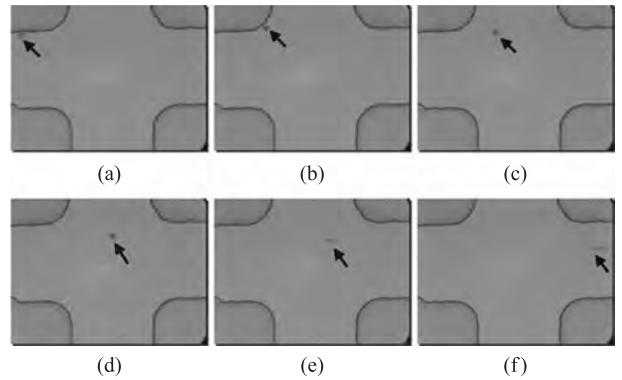


图4 大鼠血细胞通过十字通道:(a)(b)(c)(d)(e)(f)中箭头所指依次为细胞从左至右流过通道的视频截图

经多次细胞计数实验后,得到了细胞计数信号。图 5 为细胞计数传感器检测系统采集的一组原始细胞信号。将其导入 MATLAB 中,对信号进行观察发现:其中包含多个相似的尖峰信号(如图中虚线所示),这些尖峰信号与噪声信号相比有着较长的时程(约 0.8 s)和较大的幅值(归一化值约 0.001 2),且尖峰信号从负向变为正向(如图中放大部分)。每分钟检测到的细胞数目约为 30 个,与用显微镜观察细胞通过检测区域的时间相近。在理论上比较符合细胞通过检测区域时,先挡住照射激光,光生电流变小,随后细胞离开检测区域,光生电流变大的实验设计原理。因此,尖峰信号可能就是细胞通过传感器检测区域时产生的脉冲信号。

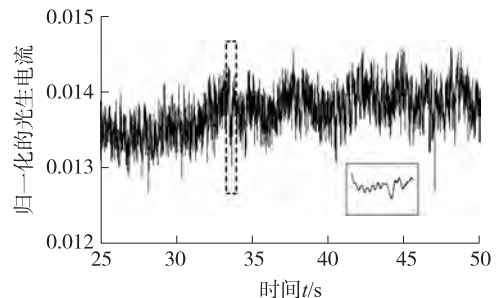


图5 LAPS记录的细胞计数信号(其中右下图为虚线框内的信号波形)

由于在原始信号中基线不平,并且噪声较大。同时,由于这是一种新型的细胞计数方法,计数信号的特征(如频率、幅值、峰的时程等),没有可供参考的模板,单纯采用传统滤波并不将对疑似信号进行有效提取。图6所示,是我们采用传统滤波与平滑处理相结合对图5相应信号进行处理的结果。考虑到计数信号频率的不确定性,所以只让信号通过高通滤波器截止频率 $\omega = 1$ Hz,从而消除基线信号,随后对信号进行多次平滑处理,可见能在降低噪声的同时,较好的保留疑似计数信号的幅值和时程等特征。

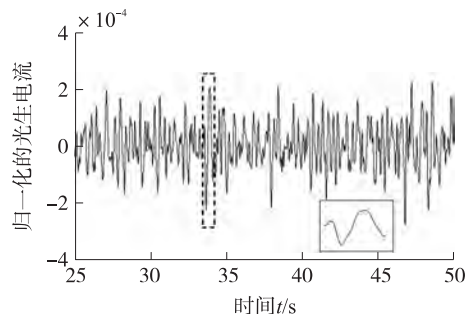


图6 滤波与平滑处理后的细胞计数信号
(其中右下图为虚线框内的信号波形)

以上信号处理方法能在一定程度上消除噪声信号,并且能提取出部分的特征信号,但总体来说,信号相比于噪声还是比较微小。可以考虑进一步对细胞计数传感系统进行改进,例如:对LAPS芯片进行进一步结构优化,提高传感器灵敏度;对LAPS系统在实验中调试其各种参数,选择合适的实验参数,从而达到适合细胞计数的要求;可搭建微控制系统进行流路驱动,以达到对细胞的精确操纵。总之,现在细胞计数芯片还处于研究阶段,需要经大量实验验证其性能和实用性后,才可以进一步研制一套新型的细胞计数分析传感器系统。由于细胞芯片的成本低,制作简便等优点,能降低整套检测系统的成本,这样就可以使其部分地取代现有的流式细胞分析仪

器^[12]。随着细胞芯片技术的不断成熟,越来越多的产品会涌现出来,使细胞芯片计数分析技术最终能被广泛地应用于在科研和医疗领域。

参考文献:

- [1] Cheung K, Gawad S, Renaud P. Impedance Spectroscopy Flow Cytometry: On-Chip Label-Free Cell Differentiation[J]. Cytometry A. 2005, 65(2): 124-132.
- [2] Yang S Y, Hsiung S K, Hung Y C, et al. A Cell Counting/Sorting System Incorporated with a Microfabricated Flow Cytometer Chip[J]. Meas. Sci. Technol. 2006, 17(7): 2001-2009.
- [3] Liu Q, Cai H, Xu Y, et al. Detection of Heavy Metal Toxicity Using Cardiac Cell-Based Biosensor [J]. Biosens. Bioelectron. 2007, 22(12): 3224-3229.
- [4] 刘清君,蔡华,徐莹,等. 心肌搏动细胞传感器及其在药物筛选中的应用[J]. 浙江大学学报工学版. 2007,41(5):742-745.
- [5] 刘清君,叶伟伟,杜立萍,等. 小波变换在神经细胞传感器信号去噪中的应用[J]. 传感技术学报. 2009,22(11):1586-1590.
- [6] Parak W J, George M, Domke J, et al. Can the Light-Addressable Potentiometric Sensor (LAPS) Detect Extracellular Potentials of Cardiac Myocytes? [J]. IEEE Trans Biomed Eng. 2000, 47(8): 1106-1113.
- [7] Hafeman D G, Parce J W, McConnell H M. Light-Addressable Potentiometric Sensor for Biochemical Systems [J]. Science, 1988, 240(4856): 1182-1185.
- [8] Ismail A B, Yoshinobu T, Iwasaki H, et al. Investigation on Light-Addressable Potentiometric Sensor As a Possible cell-Semiconductor Hybrid. Biosens. Bioelectron. 2003, 18(12): 1509-1514.
- [9] Stein B, George M, Gaub H E, et al. Extracellular Measurements of Averaged Ionic Currents with the Light-Addressable Potentiometric Sensor (LAPS). Sens. Actuators B 2004, 98(2-3): 299-304.
- [10] Romen R, Oscar C, Miquel G, et al. High-Speed Particle Detection in a Micro-Coulter Counter with Two-Dimensional Adjustable Aperture[J]. Biosens. Bioelectron. 2008, 24(2): 290-296.
- [11] Elisabetta P, Maria S C, Rodica E I, et al. Development of EIS Cell Chips and Their Application for Cell Analysis[J]. Microelectron. Eng. 2009, 86(4-6): 1477-1480.
- [12] Yager P, Edwards T, Fu E, et al. Microfluidic Diagnostic Technologies for Global Public Health[J]. Nature. 2006, 442: 412-418.



刘清君(1975-)男,浙江大学生物传感器国家专业实验室副教授。中国仪器仪表学会传感器分会理事。全国百篇优秀博士学位论文提名论文获得者。主要研究兴趣为细胞传感器、嗅觉味觉传感器等新型生物传感器及其在生物医学中的应用, qjliu@zju.edu.cn;



王平(1962-)男,教授,博士生导师。浙江大学生物传感器国家专业实验室主任,生物医学工程国家教育部重点实验室常务副主任。国家杰出青年基金获得者。主要研究方向为传感器与检测技术、生物芯片与生物电子学、人工嗅觉与人工味觉等, cnpwang@zju.edu.cn.