



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105092679 B

(45)授权公告日 2018.07.03

(21)申请号 201510501121.9

审查员 吴爱坪

(22)申请日 2015.08.14

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105092679 A

(43)申请公布日 2015.11.25

(73)专利权人 深圳大学

地址 518060 广东省深圳市南山区南海大道3688号

(72)发明人 李志 张光烈 李文荣

(74)专利代理机构 深圳市君胜知识产权代理事务所(普通合伙) 44268

代理人 王永文 刘文求

(51)Int.Cl.

G01N 27/447(2006.01)

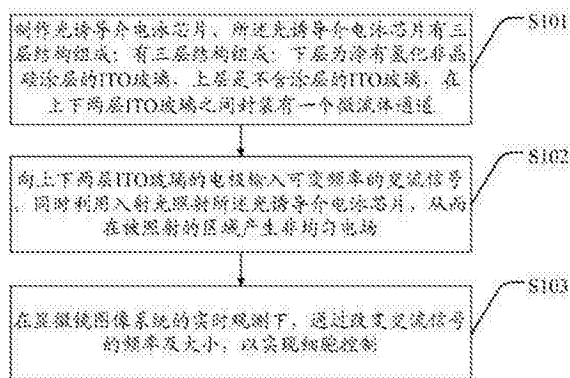
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法

(57)摘要

本发明公开一种基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法。本发明具有以下优点：第一，成本低，本发明采用的光诱导介电泳平台成本低。第二，操作简单，整个控制过程基本是自动化的，只需把培养好的细胞放入容器中，其他过程全部由软件完成。第三，效率高，由于控制过程的自动化，本发明可在很短的时间内完成大量细胞的分类。本发明很好的解决了传统介电泳芯片需要复杂且精细的电极加工的问题，通过光学投影设备动态的生成不同形状的虚拟电极，从而产生非均匀的电场，介电泳力作用于细胞，在显微镜图像系统的实时观测下，实现对细胞的操纵。



1. 一种基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法,其特征在于,包括步骤:

A、制作光诱导介电泳芯片,所述光诱导介电泳芯片有三层结构组成:有三层结构组成:下层为涂有氢化非晶硅涂层的ITO玻璃,上层是不含涂层的ITO玻璃,在上下两层ITO玻璃之间封装有一个微流体通道,用于注射所需操作的溶液;

B、向上下两层ITO玻璃的电极输入可变频率的交流信号,同时利用入射光照射所述光诱导介电泳芯片,从而在被照射的区域产生非均匀电场;

C、在显微镜图像系统的实时观测下,通过改变交流信号的频率及大小,以实现细胞控制;

所述步骤B中,首先搭建光诱导介电泳平台,所述平台包括光诱导介电泳芯片、一台光学显微镜、一台光学投影仪、一个可编程信号发生电路和主机系统,构成显微镜图像系统;所述主机系统包括:图像采集模块、显微视觉算法处理模块、生物芯片驱动控制器、虚拟电极生成模块以及显示输出模块;所述图像采集模块用来采集光学显微镜的图像,并交由显微视觉算法处理模块来进行处理并通过显示输出模块来显示,所述显微视觉算法处理模块还向生物芯片驱动控制器及虚拟电极生成模块发出信号用来控制二者工作;所述生物芯片驱动控制器连接所述可编程信号发生电路来改变信号频率和大小;所述可编程信号发生电路通过电极连接所述光诱导介电泳;所述光学投影仪设置在光诱导介电泳下方,用来对其进行入射光照射;所述虚拟电极生成模块连接所述投影仪;在平台搭建好后,通过生物芯片驱动控制器向可编程信号发生电路发出信号,然后可编程信号发生电路向上下两层ITO玻璃的电极输入可变频率的交流信号,同时光学投影仪利用入射光照射所述光诱导介电泳芯片,从而在被照射的区域产生非均匀电场。

2. 根据权利要求1所述的基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法,其特征在于,所述步骤A中,制作光诱导介电泳芯片的步骤具体包括:

A1、清理ITO玻璃基质;

A2、在ITO玻璃基质上沉积氢化非晶硅涂层;

A3、在氢化非晶硅涂层上涂光刻胶;

A4、在光刻胶上进行板印;

A5、接触腐蚀至ITO玻璃基质;

A6、去除光刻胶;

A7、在ITO玻璃基质上未覆盖氢化非晶硅涂层的区域涂导电粘合剂。

3. 根据权利要求1所述的基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法,其特征在于,所述细胞在非均匀电场中的所受到的平均介电泳力用如下公式描述:

$$\vec{F}_{DEP} = 2\pi R^3 \epsilon_m \operatorname{Re}[f_{CM}] \vec{\nabla}(E_{rms}^2)$$

其中 F_{DEP} 是作用到细胞上的平均介电泳力, R 是细胞的半径, ϵ_m 是细胞所在溶液的介电常数, E_{rms} 为所施加交流信号的均方根值, f_{CM} 为Clausius-Mossotti因子,在计算平均介电泳力时取该因子的实部 $\operatorname{Re}[f_{CM}]$ 。

4. 根据权利要求3所述的基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法,其特征在于, f_{CM} 因子定义如下:

$$f_{CM} = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*}$$

ε_p^* 和 ε_m^* 分别是细胞和溶液的复介电常数。

5. 根据权利要求4所述的基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法,其特征在于,所述复介电常数表示为:

$$\varepsilon^* = \varepsilon - j \frac{\sigma}{\omega}$$

其中, ε 是溶液的介电常数, σ 是导电率, ω 是所施加交流信号的频率。

6. 根据权利要求5所述的基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法,其特征在于,细胞旋转速度为:

$$R(\Omega) = -\frac{\varepsilon_m \operatorname{Im}[f_{CM}] |E|^2}{2\eta} K$$

其中E是电场强度, η 是溶液的黏稠度, $\operatorname{Im}[f_{CM}]$ 是Clausius-Mossotti因子的虚部,K为系数。

一种基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法

技术领域

[0001] 本发明涉及单细胞动力学领域,尤其涉及一种基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法。

背景技术

[0002] 单细胞控制是分析化学、生物学和医学之间渗透发展形成的跨学科前沿领域。

[0003] 现有的单细胞控制技术主要包括膜片钳结合原子力显微镜技术,德国蒂宾根大学的Langer于1997年率先对膜片钳技术和原子力显微镜(AFM)首先进行了尝试。纽约大学的Zhang在2001年利用膜片钳/原子力显微镜系统对细胞所特有的膜运动、膜电位和离子电流测量功能进行了研究。德国慕尼黑大学的Pamir等人在2008年将原子力显微镜与平面膜片钳技术相结合,在淋巴细胞上研究了外界机械刺激和膜电位和离子通道电流间的调控关系。

[0004] 如何对单细胞精准的定量的纳米级的机械刺激并同时自动检测细胞的生理信息,一直以来受到国内外科研人员的广泛关注。多数研究停留在简单试验阶段。

[0005] 在平面膜片钳与原子力显微镜相结合的技术中,原子力显微镜只可以提供一个外界刺激,没有更多的用途,这使得提供外界机械刺激的方式比较单一。并且其操作非常繁琐,成本高,耗时长。

[0006] 因此,现有技术还有待于改进和发展。

发明内容

[0007] 鉴于上述现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法,旨在解决现有的单细胞控制方法操作非常繁琐,成本高,耗时长以及没有视觉反馈的问题。

[0008] 本发明的技术方案如下:

[0009] 一种基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法,其中,包括步骤:

[0010] A、制作光诱导介电泳芯片,所述光诱导介电泳芯片有三层结构组成:有三层结构组成:下层为涂有氢化非晶硅涂层的ITO玻璃,上层是不含涂层的ITO玻璃,在上下两层ITO玻璃之间封装有一个微流体通道,用于注射所需操作的溶液;

[0011] B、向上下两层ITO玻璃的电极输入可变频率的交流信号,同时利用入射光照射所述光诱导介电泳芯片,从而在被照射的区域产生非均匀电场;

[0012] C、在显微镜图像系统的实时观测下,通过改变交流信号的频率及大小,以实现细胞控制。

[0013] 所述的基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法,其中,所述步骤A中,制作光诱导介电泳芯片的步骤具体包括:

[0014] A1、清理ITO玻璃基质;

[0015] A2、在ITO玻璃基质上沉积氢化非晶硅涂层;

[0016] A3、在氢化非晶硅涂层上涂光刻胶；

[0017] A4、在光刻胶上进行板印；

[0018] A5、接触腐蚀至ITO玻璃基质；

[0019] A6、去除光刻胶；

[0020] A7、在ITO玻璃基质上未覆盖氢化非晶硅涂层的区域涂导电粘合剂。

[0021] 所述的基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法，其中，所述细胞在非均匀电场中的所受到的平均介电泳力用如下公式描述：

$$[0022] \quad \vec{F}_{DEP} = 2\pi R^3 \epsilon_m \operatorname{Re}[f_{CM}] \vec{\nabla}(E_{rms}^2)$$

[0023] 其中 F_{DEP} 是作用到细胞上的平均介电泳力， R 是细胞的半径， ϵ_m 是细胞所在溶液的介电常数， E_{rms} 为所施加交流信号的均方根值， f_{CM} 为Clausius-Mossotti因子，在计算平均介电泳力时取该因子的实部 $\operatorname{Re}[f_{CM}]$ 。

[0024] 所述的基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法，其中， f_{CM} 因子定义如下：

$$[0025] \quad f_{CM} = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*}$$

[0026] ϵ_p^* 和 ϵ_m^* 分别是细胞和溶液的复介电常数。

[0027] 所述的基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法，其中，所述复介电常数表示为：

$$[0028] \quad \epsilon^* = \epsilon - j \frac{\sigma}{\omega}$$

[0029] 其中， ϵ 是溶液的介电常数， σ 是导电率， ω 是所施加交流信号的频率。

[0030] 所述的基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法，其中，细胞旋转速度为：

$$[0031] \quad R(\Omega) = -\frac{\epsilon_m \operatorname{Im}[f_{CM}] |E|^2}{2\eta} K$$

[0032] 其中 E 是电场强度， η 是溶液的黏稠度， $\operatorname{Im}[f_{CM}]$ 是Clausius-Mossotti因子的虚部， K 为系数。

[0033] 有益效果：本发明具有以下优点：第一，成本低，本发明采用的光诱导介电泳平台成本低。第二，操作简单，整个控制过程基本是自动化的，只需把培养好的细胞放入容器中，其他过程全部由软件完成。第三，效率高，由于控制过程的自动化，本发明可在很短的时间内完成大量细胞的操作。第四，高精度实时化操作，通过视觉的反馈实时操作细胞，提高了操作的精度。

附图说明

[0034] 图1为本发明一种基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法较佳实施例的流程图。

[0035] 图2为本发明中的光诱导介电泳平台的结构示意图。

具体实施方式

[0036] 本发明提供一种基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法，为使本发明的目的、

技术方案及效果更加清楚、明确,以下对本发明进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0037] 请参阅图1,图1为本发明一种基于光诱导介电泳技术的单细胞控制方法较佳实施例的流程图,如图所示,其包括步骤:

[0038] S100、制作光诱导介电泳芯片(ODEP芯片),所述光诱导介电泳芯片有三层结构组成:下层为涂有氢化非晶硅涂层的ITO玻璃,上层是不含涂层(即不含氢化非晶硅涂层)的ITO玻璃,在上下两层ITO玻璃之间封装有一个微流体通道,用于注射所需操作的溶液;

[0039] S200、向上下两层ITO玻璃的电极输入可变频率的交流信号,同时利用入射光照射所述光诱导介电泳芯片,从而在被照射的区域产生非均匀电场;可先向微流体通道注入细胞和介质(介质即所需操作的溶液,即细胞所在溶液)。然后输入交流信号。

[0040] S300、在显微镜图像系统的实时观测下,通过改变交流信号的频率及大小,以实现细胞控制。

[0041] 进一步,所述的步骤S100中,制作光诱导介电泳芯片的步骤具体包括:

[0042] S101、清理ITO玻璃基质;

[0043] 清理ITO玻璃基质的表面,保证接触面的洁净度。

[0044] S102、在ITO玻璃基质上沉积氢化非晶硅涂层(a-Si:H);

[0045] 在ITO玻璃基质表面沉积一层氢化非晶硅,厚度为1微米。

[0046] S103、在氢化非晶硅涂层上涂光刻胶;

[0047] S104、在光刻胶上进行板印;

[0048] 板印是按照指定图形制作遮盖物,将遮盖物放在光刻胶表面,用紫外线照射遮盖物,没有被遮盖的光刻胶在紫外线作用下溶解,最终得到与遮盖物形状相同的光刻胶层。

[0049] S105、接触腐蚀至ITO玻璃基质;具体是用草酸腐蚀制作的光诱导介电泳芯片表层,以去除没有覆盖光刻胶的氢化非晶硅涂层。

[0050] S106、去除光刻胶;即将光刻胶从氢化非晶硅涂层表面去除。

[0051] S107、在ITO玻璃基质上未覆盖氢化非晶硅涂层的区域涂导电粘合剂。即在ITO玻璃的表面没有覆盖氢化非晶硅涂层的位置添加一个导电触点。

[0052] 而上层的ITO玻璃清理干净之后,涂导电粘合剂即可。

[0053] 在上下两层ITO玻璃之间封装有一个微流体通道,具体是通过PDMS或是双面胶封装出一个微流体通道。

[0054] 在步骤S200中,如图2所示,首先搭建光诱导介电泳平台。除了步骤S100制作的ODEP芯片20,平台还需要一台光学显微镜10、一台光学投影仪(高分辨率)、一个可编程信号发生电路和主机系统,构成显微镜图像系统。所述主机系统包括:图像采集模块、显微视觉算法处理模块、生物芯片驱动控制器、虚拟电极生成模块以及显示输出模块。所述图像采集模块用来采集光学显微镜10的图像,并交由显微视觉算法处理模块来进行处理并通过显示输出模块来显示,所述显微视觉算法处理模块还向生物芯片驱动控制器及虚拟电极生成模块发出信号用来控制二者工作。所述生物芯片驱动控制器连接所述可编程信号发生电路来改变信号频率和大小。所述可编程信号发生电路通过电极连接所述ODEP芯片20。所述光学投影仪设置在ODEP芯片20下方,用来对其进行入射光照射。所述虚拟电极生成模块连接所述投影仪。

[0055] 其中光学显微镜参数如下：

[0056] 尼康CFI60无限远光学系统；

[0057] 电动对焦，可上下移动（上13mm/下2mm）；

[0058] 三目镜筒，光分布：目镜/相机100%/0, 20%/100%, 0/100%；

[0059] 目镜放大倍率：10x；

[0060] 聚光器：防水，工作距离：7.2mm；

[0061] 物镜：20x，高度消色透镜，纳米结晶涂层；

[0062] 载物台：电动X轴和Y轴，分辨率：0.1微米；

[0063] 紫外线截止滤光块；

[0064] 荧光滤波套装：FITC/GFP。

[0065] 在平台搭建好后，可通过生物芯片驱动控制器向可编程信号发生电路发出信号，然后可编程信号发生电路向上下两层ITO玻璃的电极输入可变频率的交流信号，同时光学投影仪利用入射光照射所述光诱导介电泳芯片，从而在被照射的区域产生非均匀电场。

[0066] 在所述步骤S300中，在显微镜图像系统的实时观测下，通过改变交流信号的频率及大小，来改变细胞所受到的介电泳力的方向与大小，以控制细胞运动方向，实现高速实时操纵微纳米实体。

[0067] 下面着重介绍下，如何实现由改变交流信号的频率及大小来控制细胞运动方向。

[0068] 细胞在非均匀电场中的所受到的平均介电泳力可以用如下公式描述：

$$[0069] \quad \vec{F}_{DEP} = 2\pi R^3 \varepsilon_m \operatorname{Re}[f_{CM}] \vec{\nabla}(E_{rms}^2) \quad (1)$$

[0070] 其中 F_{DEP} 是作用到细胞上的平均介电泳力， R 是细胞的半径， ε_m 是细胞所在溶液的介电常数， E_{rms} 为所施加电场（交流信号）的均方根值， f_{CM} 为Clausius-Mossotti因子，在计算平均介电泳力时取该因子的实部 $\operatorname{Re}[f_{CM}]$ ，该因子定义如下：

$$[0071] \quad f_{CM} = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*} \quad (2)$$

[0072] ε_p^* 和 ε_m^* 分别是细胞和溶液的复介电常数，公式2中的复介电常数（包括 ε_p^* 和 ε_m^* ）可表示为：

$$[0073] \quad \varepsilon^* = \varepsilon - j \frac{\sigma}{\omega} \quad (3)$$

[0074] 其中， ε 是溶液的介电常数， σ 是导电率， ω 是所施加电场（交流信号）的频率。

[0075] 可以看出 f_{CM} 是一个和频率相关的可变因子。考虑在施加不同频率的交变电场下，当介电泳力与电场强度变化方向相同时，称为正介电泳现象；当所受到的介电泳力与电场强度变化方向相反，称为负介电泳现象。因而可以通过改变所施加的电场的频率，来改变细胞所受到的介电泳力的方向，达到控制细胞运动方向的目的。

[0076] 由于生物细胞受到非均匀电场的极化作用而产生偶极矩，根据其介电泳力所产生的转矩与所在介质中受到的摩擦力矩达到平衡，细胞旋转速度为：

$$[0077] \quad R(\Omega) = - \frac{\varepsilon_m \operatorname{Im}[f_{CM}] |E|^2}{2\eta} K \quad (4)$$

[0078] 其中 E 是电场强度(交流信号强度), $\text{Im}[f_{\text{CM}}]$ 是Clausius-Mossotti因子的虚部, K 为系数, η 是溶液的黏稠度。根据细胞的旋转速度与细胞的介电常数的关系可以对细胞的介电特性进行估算。

[0079] 细胞受到的介电泳力强度与方向主要取决于介质与细胞的介电特性,如形状、尺寸与电场频率。本发明利用光诱导介电泳力(ODEP)(当施加某频段,电液动力学的一种主导力)以识别与操纵生物细胞,分离纳米尺度的聚合物颗粒。ODEP芯片由可变频率的交流信号驱动,交流信号通过上下两层ITO玻璃的导电触点输入,此时在溶液层只有一小部分分压,并在溶液层中产生均匀电场。当入射光照射ODEP芯片,a-Si:H的光导率由于电子空穴对数的增多而增加几个数量级。由于入射光区域电阻减小,在溶液层中的分压会大大增大,于是入射光区域的a-Si:H将成为一个有效的虚拟电极产生非均匀电场。这种光诱导的非均匀电场会极化区域内的颗粒产生介电泳力,也就是光诱导介电泳力(ODEP)。通过光学显微镜与主机系统可实现程序化的动态运动,且不需要任何手工界面而实现微纳米实体的自动化捕获、操纵、分离与组装。因此,本发明的ODEP芯片可提供一种有效实现高速操纵微纳米实体的方法。

[0080] 综上所述,本发明具有以下优点:第一,成本低,本发明采用的光诱导介电泳平台成本低。第二,操作简单,整个控制过程基本是自动化的,只需把培养好的细胞放入容器中,其他过程全部由软件完成。第三,效率高,由于控制过程的自动化,本发明可在很短的时间内完成大量细胞的分类。第四,高精度实时化操作,通过视觉的反馈实时操作细胞,提高了操作的精度。

[0081] 本发明的方法很好的解决了传统介电泳芯片需要复杂且精细的电极加工的问题,通过光学投影设备动态的生成不同形状的虚拟电极,从而产生非均匀的电场,介电泳力作用于微纳颗粒,实现对微纳颗粒的实时操纵,及图像实时输出。

[0082] 应当理解的是,本发明的应用不限于上述的举例,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

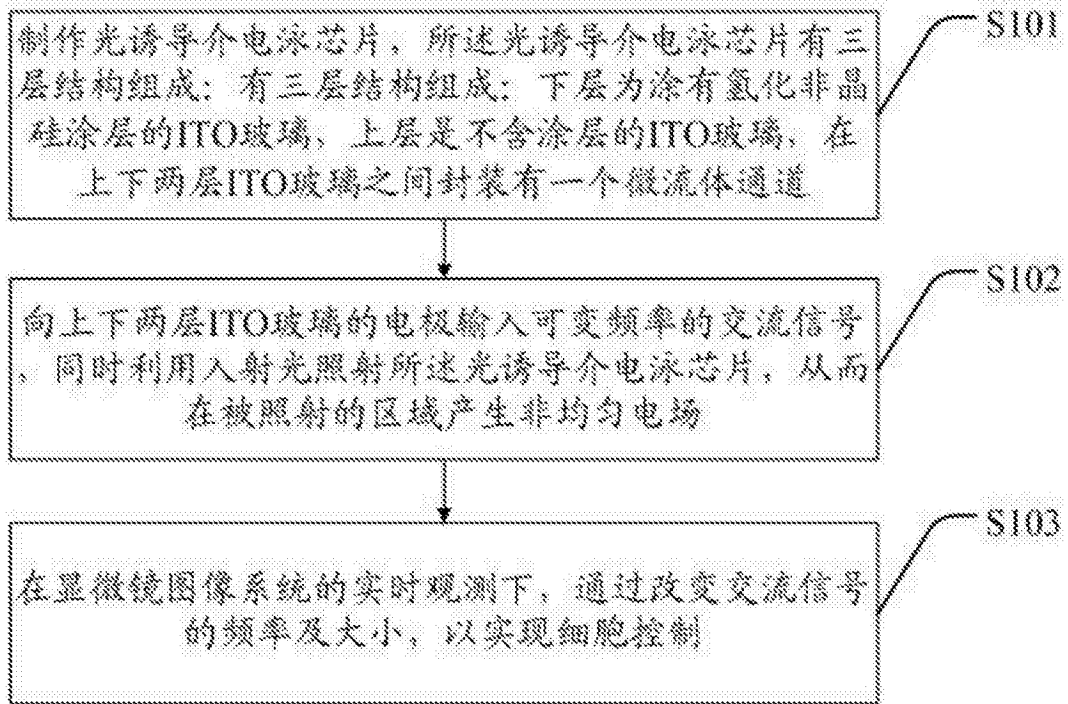


图1

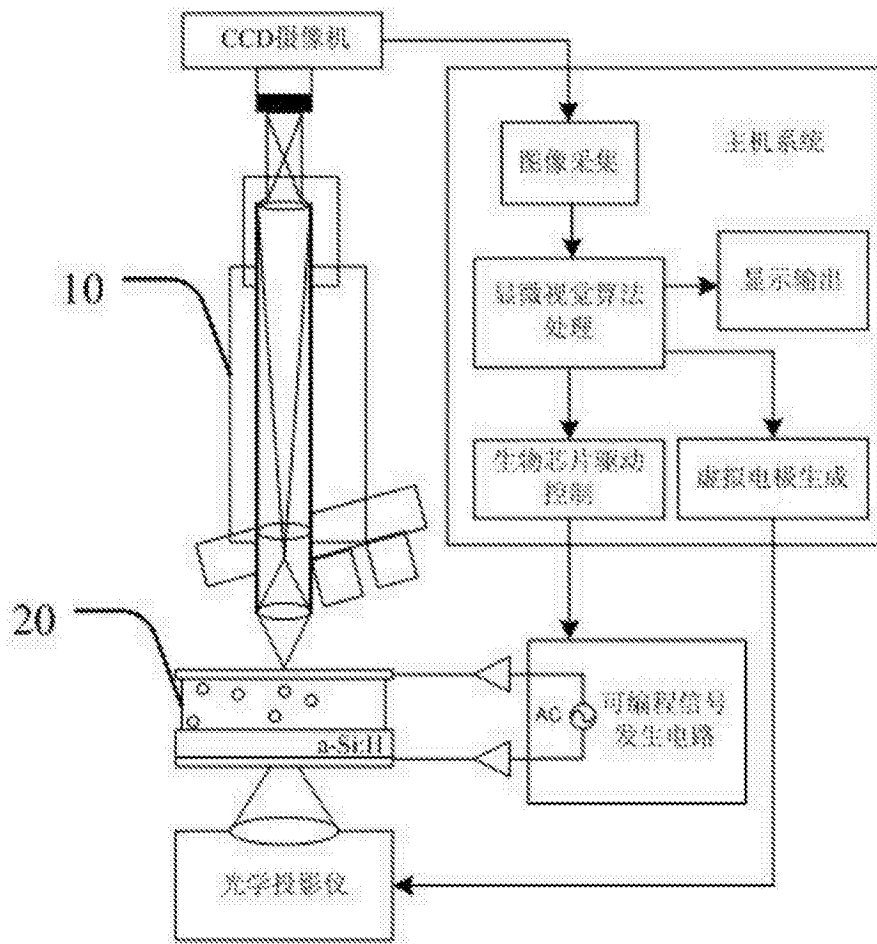


图2