



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105363505 B

(45)授权公告日 2017.05.31

(21)申请号 201510920232.3

(22)申请日 2015.12.11

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105363505 A

(43)申请公布日 2016.03.02

(73)专利权人 武汉纺织大学

地址 430200 湖北省武汉市江夏区阳光大道1号

(72)发明人 张南刚 周琼伟 刘侃 刘松林

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 王敏锋

(51)Int.Cl.

B01L 3/00(2006.01)

审查员 何东芮

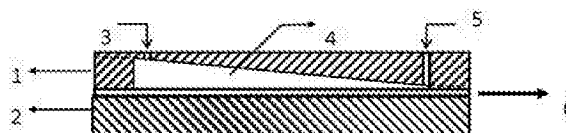
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种三维结构的细胞捕获与释放芯片及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种三维结构的细胞捕获及释放芯片,包括上部盖片和下部基片,上层盖片的背面刻蚀有微流沟道,盖片的微流沟道两端分别设置入口和出口,基片上有一层壳聚糖薄膜,盖片和基片通过粘合剂粘合,利用这种结构可以捕获和释放细胞/颗粒,将待测液通过微流控芯片的三维结构通道,通过这种三维结构的高度特性进行捕获特定大小的细胞/颗粒,在捕获完成后通过特定的方法增大三维芯片内部沟道的高度,最终将细胞/颗粒释放。这种细胞的捕获与释放的操作方法方便,响应迅速,对细胞无损害,适用于微米尺度的细胞和颗粒的捕获和释放。本发明的制备方法工艺简单,制备出来的三维结构芯片具有微型化的特点,可广泛的用于分析领域。



1. 一种三维结构的细胞捕获及释放芯片的制备方法,其步骤如下:

(a) 基底的选择及清洗:选取盖片和基片的材料为硅片、石英或玻璃,将选择好的盖片和基片进行清洗,去除表面的油污等杂质;

(b) 刻蚀掩膜处理:对清洗好的盖片和基片在 $50^{\circ}\text{C}\sim 100^{\circ}\text{C}$ 的烘箱中进行烘干处理,烘干处理之后在盖片的上下表面粘附耐化学腐蚀性的掩膜,通过激光切割,把即将要刻蚀的区域部分切出来,除去切割出来的防腐蚀掩膜,得到要刻蚀的区域;

(c) 湿法刻蚀:将掩膜处理好的盖片,通过夹具按照 $0.01\text{ mm /min}\sim 1\text{ mm/min}$ 的速率垂直缓慢的放入到刻蚀液中进行刻蚀,盖片上刻蚀出的微流沟道为楔形的三维结构;

(d) 打孔:去除掉盖片表面的刻蚀掩膜,使整个盖片完整的裸露出来,盖片进行清洗处理之后对盖片进行打孔,在盖片的至少两个不同等高面的区域打孔,两个孔分别为入口孔和出口孔;

(e) 壳聚糖薄膜的制备:使用脱乙酰度 $60\%\sim 95\%$ 的壳聚糖,使 $0.3\text{g}\sim 2.0\text{g}$ 壳聚糖融入体积为 10ml 的 0.1mol/L 醋酸溶液中,经过 $1.5\text{h}\sim 2.5\text{h}$ 的搅拌形成壳聚糖胶体;使用移液枪吸取 $1\text{ml}\sim 5\text{ml}$ 壳聚糖凝胶溶液滴至基片上,将基片放置在匀胶机上,转速依次为 800r/min 和 1500r/min ,各转 15s ,均匀铺设后静置,直至胶体成膜;

(f) 盖片与基片的组合:基片和盖片贴合后,在它们的边沿涂上PDMS,等待 $10\sim 20\text{min}$ 后放入马弗炉进行加热,加热温度范围为 $200\sim 450^{\circ}\text{C}$,便得到了基于三维结构的细胞捕获及释放芯片;

所述的三维结构的细胞捕获及释放芯片包括上部盖片(1)和下部基片(2),上层盖片(1)的背面刻蚀有微流沟道(4),盖片(1)的微流沟道(4)两端分别设置入口(3)和出口(4),基片(2)上有一层壳聚糖薄膜(6),盖片(1)和基片(2)通过粘合剂粘合。

2. 采用权利要求1所述的芯片进行捕获及释放细胞的方法,其步骤如下:

(1) 细胞的捕获:

(a) 将待检测含有细胞的液体样本通过注射泵以 $0.01\text{ul/min}\sim 1\text{ul/min}$ 的速率从入口孔注入到键合完全的芯片中;

(b) 继续在入口注入磷酸盐缓冲溶液,以 $50\text{ul/min}\sim 100\text{ul/min}$ 的速度注入进行清洗;

(c) 在入口注入示踪物质或加入免疫试剂,对目标细胞进行识别;

(d) 再次在入口注入磷酸盐缓冲溶液进行清洗,将芯片放置在显微镜下观察捕获的目标细胞;

(2) 细胞的释放:

(a) 芯片捕获到特定捕获大小的细胞卡在相应的位置,其他的细胞由出口流出芯片;

(b) 在芯片入口注入体积分数为 $3\%\sim 5\%$ 的醋酸溶液,通入速度为 $50\text{ul/min}\sim 80\text{ul/min}$;

(c) 继续在入口注入磷酸盐缓冲溶液,以 $50\text{ul/min}\sim 100\text{ul/min}$ 的速度注入进行清洗,芯片中壳聚糖薄膜被溶解掉,芯片内部高度变大,被捕获住的细胞有芯片的出口处被冲出来。

一种三维结构的细胞捕获与释放芯片及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微流控芯片的制备方法,具体的是一种三维结构的细胞捕获与释放芯片,及采用该芯片来捕获和释放细胞的方法,适用于微米尺度的细胞和颗粒的捕获和释放。

背景技术

[0002] 微流芯片是微分析系统的核心,微流芯片的发明及应用给化学、食品、环境、医学等科学领域提供了很大的便利,促使了一些分析的微型化、集成化、自动化及便捷化。大大的节省了一些化学反应对贵重化学试剂的消耗,也大大的提高了分析效率、降低了费用。

[0003] 通常捕获细胞的微流芯片主要是运用机械分离法、电诱导分离法和磁操控分离法。目前运用机械分离法制作的微流芯片,捕获效率达97%,但是也具有本身的一些缺点,其缺点可以概括为制作工艺复杂,孔道容易堵塞,不能满足大批量的检测需求。

[0004] 目前制备的微流芯片主要采用光刻和化学刻蚀。主要使用的材料有石英、玻璃和高聚物等,使用高聚物制作的微流芯片多采用光刻制备的方法,刻蚀出来的微流芯片沟道形状规则,且光刻的工艺复杂成本高,不宜推广应用。在玻璃及石英等硅基介质制作出来的微流芯片主要采用化学刻蚀的方法来制备,其制作出来的微流芯片稳定性好,使用寿命长。但是传统的化学刻蚀的方法刻蚀出来的微流芯片的沟道都很规则,无法刻蚀出具有特殊形状的微流沟道的微流芯片。传统的刻蚀方法不能够刻蚀出特殊形状沟道的微流芯片。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服上述现有技术的不足,提供一种三维结构的细胞捕获及释放芯片及其制备方法,其特点包括加工简单,不堵塞,效率高,适合大批量生产与检测芯片,具有良好的化学稳定性。另一个目的在于提供一种基于三维结构的芯片进行捕获及释放细胞的方法,捕获效率高,释放出的细胞完整度好。

[0006] 为了实现上述目的,本发明解决上述技术问题所采用的技术方案是:

[0007] 一种三维结构的细胞捕获及释放芯片,包括上部盖片和下部基片,上层盖片的背面刻蚀有微流沟道,盖片的微流沟道两端分别设置入口和出口,基片上有一层壳聚糖薄膜,盖片和基片通过粘合剂粘合。

[0008] 上述三维结构的细胞捕获及释放芯片制备方法,其步骤如下:

[0009] (1) 芯片的制备:

[0010] (a) 基底的选择及清洗:选取盖片和基片的材料可以是硅片、石英或玻璃等硬质材料且至少有一个材料是透明的,将选择好的盖片和基片进行清洗,去除表面的油污等杂质;

[0011] (b) 刻蚀掩膜处理:对清洗好的盖片和基片在50℃~100℃的烘箱中进行烘干处理,烘干处理之后在盖片的上下表面粘附耐化学腐蚀性的掩膜,通过激光切割,把即将要刻蚀的区域部分切出来,除去切割出来的防腐蚀掩膜,得到要刻蚀的区域;

[0012] 掩膜处理的目的在于裸露出需要进行刻蚀的基片的一部分,把不需要进行刻蚀的基片的其他部分保护起来。

[0013] (c)湿法刻蚀:将处理好的盖片,通过夹具按照0.01mm/min-1mm/min的速率垂直缓慢的放入到刻蚀液中进行刻蚀,因为进入刻蚀液有先后顺序,所以导致刻蚀的时间不相同,导致了刻蚀的深度不同,从而盖片上刻蚀出的微流沟道为楔形的三维结构;

[0014] (d)打孔:去除掉盖片表面的刻蚀掩膜,使整个盖片完整的裸露出来,盖片进行清洗处理之后对盖片进行打孔,在盖片的至少两个不同等高面的区域打孔,两个孔分别为入口孔和出口孔;

[0015] (e)壳聚糖薄膜的制备:使用脱乙酰度60%-95%的壳聚糖,使0.3g-2.0g壳聚糖融入体积为10ml的0.1mol/L醋酸溶液中,经过1.5-2.5h的搅拌形成壳聚糖胶体;使用移液枪吸取1ml-5ml壳聚糖凝胶溶液滴至基片上,将基片放置在匀胶机上,转速依次为800r/min和1500r/min,各转15s,均匀铺设后静置,直至胶体成膜;

[0016] (f)盖片与基片的组合:基片和盖片贴合后,在它们的边沿涂上PDMS (polydimethylsiloxane,聚二甲基硅氧烷胶),等待10-20min后放入马弗炉进行加热,加热温度范围为200-450℃,便得到了基于三维结构的细胞捕获及释放芯片。

[0017] 一种基于三维结构的芯片进行捕获及释放细胞的方法,其步骤如下:

[0018] (1)细胞的捕获:

[0019] (a)将待检测含有细胞的液体样本通过注射泵以0.01ul/min-1ul/min的速率从入口孔注入到键合完全的芯片中;

[0020] (b)继续在入口注入磷酸盐缓冲溶液(即PBS溶液),以50-100ul/min的速度注入进行清洗;

[0021] (c)在入口注入示踪物质(如:染细胞核的荧光染料如DAPI或者Hoechst染料)或加入免疫试剂,对目标细胞进行识别;

[0022] (d)再次在入口注入磷酸盐缓冲溶液进行清洗,将芯片放置在显微镜下观察捕获的目标细胞;

[0023] (2)细胞的释放:

[0024] (a)芯片捕获到特定捕获大小的细胞卡在相应的位置,其他的细胞由出口流出芯片;

[0025] (b)在芯片入口注入体积分数为3%-5%的醋酸溶液,通入速度为50ul/min-80ul/min;

[0026] (c)继续在入口注入磷酸盐缓冲溶液(即PBS溶液),以50-100ul/min的速度注入进行清洗,芯片中壳聚糖薄膜被溶解掉,芯片内部高度变大,被捕获住的细胞有芯片的出口处被冲出来。

[0027] 由于采用了以上技术方案,本发明改变了以往只针对不同细胞尺寸制作不同芯片的情况且该情况经常发生阻塞。本发明的制备方法,加工工艺简单,制备出来捕获和释放细胞/颗粒的芯片具有微型化结构的特点,捕获时间短且效率高,可广泛的用于分析领域。

附图说明

[0028] 图1.芯片的俯视图。

[0029] 图2.芯片的剖视图。

[0030] 图3.芯片捕获细胞后的剖视图。

[0031] 图4. 芯片捕获细胞后的俯视图。

[0032] 图5. 芯片细胞释放剖视图。

[0033] 图6. 芯片细胞释放俯视图。

[0034] 其中:1-盖片,2-基底,3-入口,4-微流沟道,5-出口,6-壳聚糖薄膜,7-ctc循环肿瘤细胞。

具体实施方式

[0035] 下面结合实施实例对本发明进行进一步说明。

[0036] 实施例1:

[0037] 如图1-2所示,一种三维结构的细胞捕获及释放芯片,包括上部盖片1和下部基片2,上层盖片1的背面刻蚀有微流沟道4,盖片1的微流沟道4两端分别设置入口3和出口4,基片2上有一层壳聚糖薄膜6,盖片1和基片2通过粘合剂粘合。

[0038] 上述三维结构的细胞捕获及释放芯片的制备方法,步骤如下:

[0039] (a) 选取盖片和基片材料玻璃或者硅片或者石英,将选择好的盖片和基片进行清洗,去除表面的油污等杂质;

[0040] (b) 对清洗好的盖片和基片在50℃~100℃的烘箱中进行烘干处理,烘干处理之后在盖片的上下表面粘附耐化学腐蚀性的掩膜,通过激光切割,把即将要刻蚀的区域部分切出来,除去切割出来的防腐蚀掩膜,得到要刻蚀的区域;

[0041] (c) 将处理好的盖片,通过夹具按照0.5mm/min的速率垂直缓慢的放入到刻蚀液中进行刻蚀,从盖片进入刻蚀液到刻蚀完成,总共耗时为1小时,因为进入刻蚀液有先后顺序,所以导致刻蚀的时间不相同,导致了刻蚀的深度不同,从而盖片上刻蚀出的微流沟道为楔形的三维结构;

[0042] 所述的刻蚀液为典型的缓冲氧化硅蚀刻液,其中含氟化铵,(BOE: Buffer Oxide Etcher)与去离子水按1:10的质量比例勾兑而成。

[0043] (d) 去除掉盖片表面的刻蚀掩膜,使整个盖片和基片完整的裸露出来,对盖片和基片进行清洗处理之后,对盖片进行打孔,在盖片的至少两个不同等高面的区域打孔,直径为0.6mm,两个孔分别为入口孔和出口孔;

[0044] (e) 使用脱乙酰度60%~95%的壳聚糖,使0.3g壳聚糖融入体积为10ml的0.1mol/L醋酸溶液中,经过2h的搅拌形成壳聚糖胶体;使用移液枪吸取1ml~5ml壳聚糖凝胶溶液滴至下片上,将下片放置在匀胶机上,转速依次为800r/min和1500r/min,各转15s,均匀铺设后静置,直至胶体成膜;

[0045] (f) 基片和盖片贴合后,在它们的边沿涂上PDMS (polydimethylsiloxane, 聚二甲基硅氧烷胶),等待15min后放入马弗炉进行加热,加热温度范围为300℃处理,便得到了基于三维结构的细胞捕获及释放芯片。

[0046] 实施例2:

[0047] 一种三维结构的细胞捕获及释放芯片的制备方法,步骤如下:

[0048] (a) 选取盖片和基片材料或玻璃为玻璃或者硅片或者石英,将选择好的盖片和基片进行清洗,去除表面的油污等杂质;

[0049] (b) 对清洗好的盖片和基片在50℃~100℃的烘箱中进行烘干处理,烘干处理之后

在盖片的上下表面粘附耐化学腐蚀性的掩膜,通过激光切割,把即将要刻蚀的区域部分切出来,除去切割出来的防腐蚀掩膜,得到要刻蚀的区域;

[0050] (c) 将处理好的盖片,通过夹具按照0.01mm/min或0.1mm/min或0.25mm/min或0.75mm/min或1mm/min的速率垂直缓慢的放入到刻蚀液中进行刻蚀,刻蚀1小时,因为进入刻蚀液有先后顺序,所以导致刻蚀的时间不相同,导致了刻蚀的深度不同,从而盖片上刻蚀出的微流沟道为楔形的三维结构;

[0051] 所述的刻蚀液为典型的缓冲氧化硅蚀刻液,其中含氟化铵,(BOE: Buffer Oxide Etcher)与去离子水按1:10的质量比例勾兑而成。

[0052] (d) 去除掉盖片表面的刻蚀掩膜,使整个盖片和基片完整的裸露出来,对盖片和基片进行清洗处理之后,对盖片进行打孔,在盖片的至少两个不同等高面的区域打孔,直径为0.6mm,两个孔分别为入口孔和出口孔;

[0053] (e) 使用脱乙酰度60%–95%的壳聚糖,使0.5g或0.8g或1g或1.5g或2g壳聚糖融入体积为10ml的0.1mol/L醋酸溶液中,经过1.5或2.5h的搅拌形成壳聚糖胶体;使用移液枪吸取1ml–5ml壳聚糖凝胶溶液滴至下片上,将下片放置在匀胶机上,转速依次为800r/min和1500r/min,各转15s,均匀铺设后静置,直至胶体成膜;

[0054] (f) 基片和盖片贴合后,在它们的边沿涂上PDMS (polydimethylsiloxane,聚二甲基硅氧烷胶),等待100min或20min后放入马弗炉进行加热,加热温度范围为200℃或350℃或400℃或450℃处理,便得到了基于三维结构的细胞捕获及释放芯片。

[0055] 实施例3:

[0056] 一种基于三维结构的芯片进行捕获及释放细胞的方法,其步骤如下:

[0057] (1) 如图3-4所示,细胞的捕获:

[0058] (a) 将待检测含有ctc循环肿瘤细胞的液体样本通过注射泵以0.5 μ l/min的速率从入口孔注入到实施例1的芯片中;

[0059] (b) 继续在入口注入磷酸盐缓冲溶液(即PBS溶液),以50 μ l/min的速度注入进行清洗;

[0060] (c) 在入口注入示踪物质(如:染细胞核的荧光染料如DAPI或者Hoechst染料),对目标细胞进行识别;

[0061] (d) 再次在入口注入磷酸盐缓冲溶液进行清洗,将芯片放置在显微镜下观察捕获的目标细胞;

[0062] (2) 如图5-6所示,细胞的释放:

[0063] (a) 芯片捕获到特定捕获大小的细胞卡在相应的位置,其他的细胞由出口流出芯片;

[0064] (b) 在芯片入口注入体积分数为3%的醋酸溶液,通入速度为50 μ l/min;

[0065] (c) 继续在入口注入磷酸盐缓冲溶液(即PBS溶液),以50 μ l/min的速度注入进行清洗,芯片中壳聚糖薄膜被溶解掉,芯片内部高度变大,被捕获住的细胞有芯片的出口处被冲出来。

[0066] 捕获效率最高达到96%,通过将上述方法捕捉到的细胞通过显微镜进行观察,发现捕获到的细胞结构完整,无破损现象。采用的细胞捕获效率是通过最后停留在芯片中的细胞数量与实验开始时注入的与捕获细胞相同大小的细胞数量的比值来计算细胞的捕获效

率的。

[0067] 实施例4:

[0068] 一种基于三维结构的芯片进行捕获及释放细胞的方法,其步骤如下:

[0069] (1)细胞的捕获:

[0070] (a) 将待检测含有ctc循环肿瘤细胞的液体样本,通过注射泵以0.01ul/min或0.11ul/min或0.51ul/min或0.81ul/min或1ul/min的速率从入口孔注入到键合完全的芯片中;

[0071] (b) 继续在入口注入磷酸盐缓冲溶液(即PBS溶液),以100ul/min的速度注入进行清洗;

[0072] (c) 在入口注入示踪物质(如:染细胞核的荧光染料如DAPI或者Hoechst染料),对目标细胞进行识别;

[0073] (d) 再次在入口注入磷酸盐缓冲溶液进行清洗,将芯片放置在显微镜下观察捕获的目标细胞;

[0074] (2)细胞的释放:

[0075] (a) 芯片捕获到特定捕获大小的细胞卡在相应的位置,其他的细胞由出口流出芯片;

[0076] (b) 在芯片入口注入体积分数为4%或5%的醋酸溶液,通入速度为80ul/min;

[0077] (c) 继续在入口注入磷酸盐缓冲溶液(即PBS溶液),以100ul/min的速度注入进行清洗,芯片中壳聚糖薄膜被溶解掉,芯片内部高度变大,被捕获住的细胞有芯片的出口处被冲出来。

[0078] 捕获效率最高达到90%,通过将上述方法捕捉到的细胞通过显微镜进行观察,发现捕获到的细胞结构完整,无破损现象。采用的细胞捕获效率是通过最后停留在芯片中的细胞数量与实验开始时注入的与捕获细胞相同大小的细胞数量的比值来计算细胞的捕获效率的。

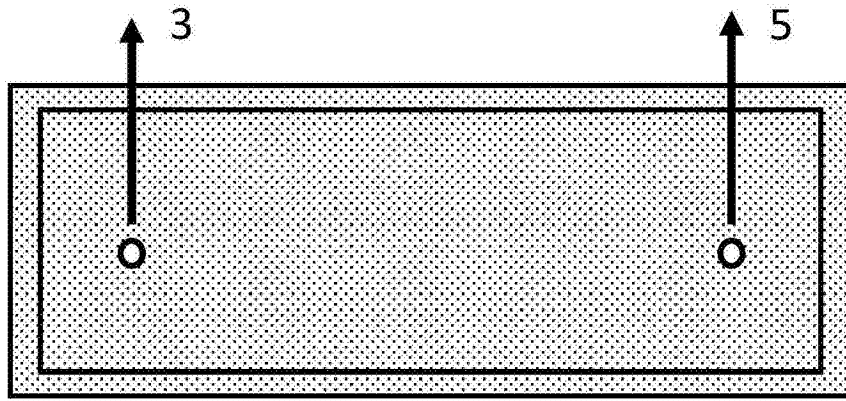


图1

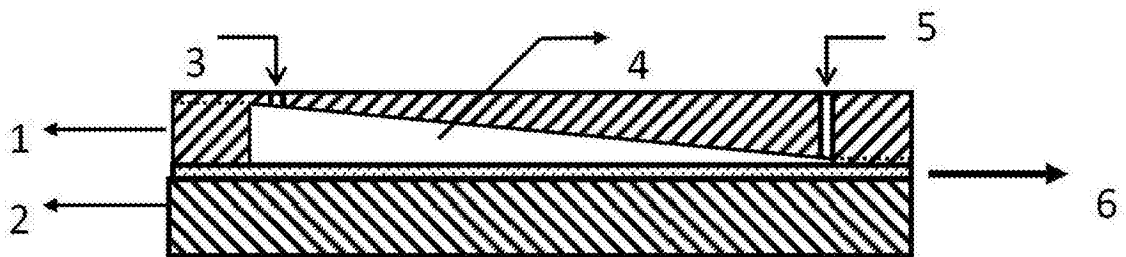


图2

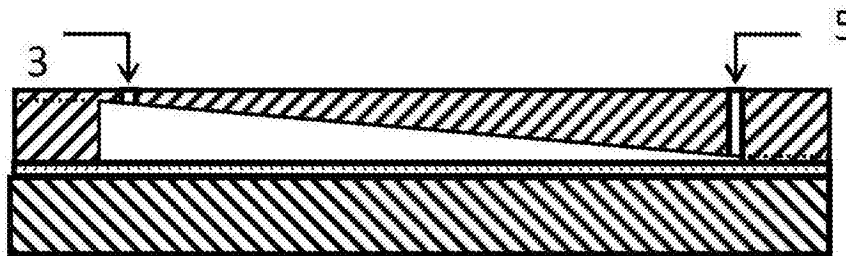


图3

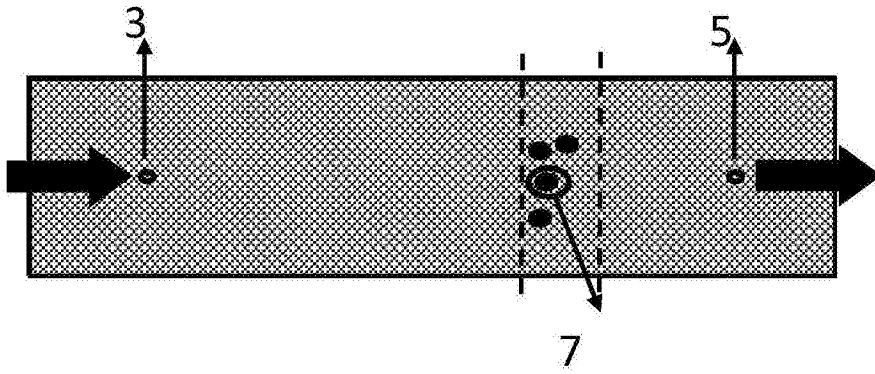


图4

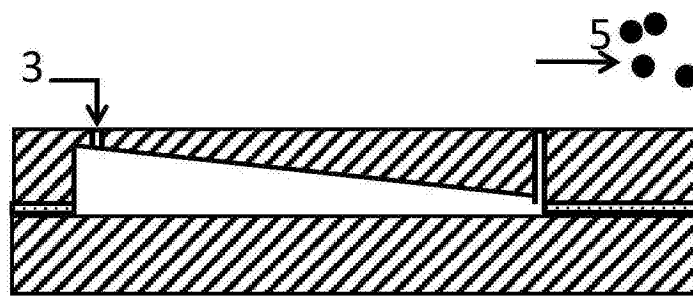


图5

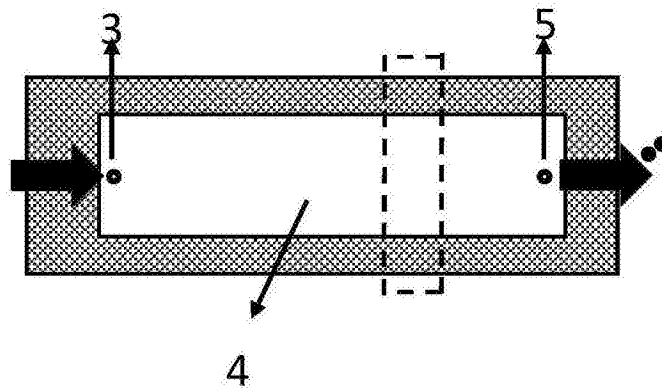


图6