

一种基于非接触式介电泳捕获微颗粒和癌细胞的微流控芯片的研究

金 璠^{1,2}, 王 浩^{1,2}, 王艳敏³, 张潇分⁴, 贾春平^{1*}, 赵建龙¹

(1.中国科学院上海微系统与信息技术研究所,上海 200050; 2.中国科学院大学,北京 100049;
3.上海师范大学,上海 200030; 4.南通大学附属医院医学检验科,江苏 南通 226001)

摘要:介电泳(DEP)是一种基于尺寸或电性质分离和鉴定悬浮在介质溶液中的微颗粒技术。为了克服传统接触式介电泳电极污染样品和芯片工艺复杂等问题,采用液体电极代替金属电极或薄膜电极。在该芯片中,电极通过电介质阻挡层电容耦合到流体通道,用非接触式液体沟道电极代替传统接触式金属电极。实验中,分别考察了电压和频率对液体电极捕获微球和细胞的影响。结果表明,电压和频率对液体电极捕获微球和细胞均有重大影响,同时没有发现被捕获的细胞有裂解现象,活力良好。芯片中不同细胞的电旋转速度明显不同,说明该芯片具有通过微颗粒/细胞自身独特电特性捕获和识别不同微颗粒/细胞的能力。

关键词:介电泳;液体电极;微流控;细胞捕获;电旋转

中图分类号:TQ460.4

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2020)01-0145-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2020.01.031

Microfluidic chip for capturing microparticles and circulating tumor cells through contactless dielectrophoresis

JIN Liu^{1,2}, WANG Hao^{1,2}, WANG Yan-min³, ZHANG Xiao-fen⁴, JIA Chun-ping^{1*}, ZHAO Jian-long¹

(1.Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Shanghai 200050, China;

2.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3.Shanghai Normal University, Shanghai 200030, China;

4.Department of Medical Laboratory, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

Abstract: Dielectrophoresis (DEP) is a technique for separating and identifying micro-particles and cells suspended in the medium solution based on size or electrical properties. In order to solve the problems that the electrode of traditional contacting-type dielectrophoresis can contaminate sample and the chip production process is complicated, liquid electrode is used instead of metal electrode or film electrode. In the chip, the electrode is coupled to the fluid channel through the capacitance of dielectric barrier layer, and the non-contact liquid channel electrode replaces traditional contact metal electrode. In the experiments, the effects of voltage and frequency on the capture of microspheres and cells are investigated. The results show that both voltage and frequency have significant effects on the capture of microspheres and cells by the liquid electrode, and no cracking phenomenon is found in the captured cells. The electrical rotation speed of different cells in the chip is obviously different, indicating that the chip has the ability to capture and recognize different micro-particles/cells through their own unique electrical characteristics.

Key words: dielectrophoresis; liquid electrode; microfluidics; cell capture; electro-rotation

循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)是肿瘤原发灶脱落进入外周血的肿瘤细胞,目前,CTCs检测的方法包括富集技术和分析技术^[1]。由于CTC含量较为稀少,所以在检测之前进行CTC富集非常必要。目前用于样品制备的富集技术包括基于密度梯度的离心或膜过滤、磁性激活细胞分选(F/MACS)等。这些技术在实际操作中存在芯片容易堵塞、需标记细胞、损伤细胞等问题^[2]。本研究

课题组设计了一个新的微流控芯片,采用非接触式介电泳技术(cDEP),该技术基于微颗粒自身的介电特性用来实现对单独微小颗粒或细胞的操控捕获和识别,无需标记,不会对颗粒或细胞产生机械性损伤^[3-7]。

介电泳(Dielectrophoresis, DEP)技术描述的是位于非匀称电场的中性微粒由于介电极化的作用而产生的平移运动^[8]。目前,传统的介电泳装置采用放置在通道底部的薄膜交叉电极阵列或者在沟道

收稿日期:2019-03-13;修回日期:2019-11-19

基金项目:国家自然科学基金项目(81472751);成套技术示范与转移服务(KFJ-STZ-ZDTP-061)

作者简介:金璠(1992-),男,硕士生,研究方向为生物传感器,jinliu@mail.sim.ac.cn;贾春平(1973-),女,博士,副研究员,研究方向为纳米生物传感器及生物芯片在肿瘤诊断及检测方面的应用研究,通讯联系人,jiachp@mail.sim.ac.cn。

底部淀积对称金属电极的方式,用以在沟道中形成非均匀电场^[9]。但传统的介电泳装置有样品污染、电热影响和芯片工艺复杂的缺陷。非接触式介电泳(cDEP)是在传统介电泳技术上发展而来的新技术^[10-15],利用了 DEP 的固有优势,同时还避免了传统 DEP 的缺陷。cDEP 不使用金属电极,而是利用导电液体在样品沟道中产生非均匀电场^[16-19]。芯片中导电液体被放置在单独的电极沟道中,电极沟道避免微粒或细胞-电极接触,消除对样品的接触污染、焦耳加热以及电化学效应等。

1 非接触式介电泳原理

介电泳是极化粒子在非均匀电场中向高(正 DEP)或低(负 DEP)电场运动的现象。其中非接触式介电泳是在传统介电泳基础上发展而来,以液体电极代替金属或薄膜电极,其中介电泳力的理论计算式为^[3]:

$$F_{\text{DEP}} = 2\pi\epsilon_m r^3 \text{Re}[f_{\text{CM}}] \nabla |E|^2 \quad (1)$$

其中: ϵ_m 为悬浮介质的介电常数; r 为微颗粒或细胞半径; E 为外加电场; $\text{Re}[f_{\text{CM}}]$ 为 Clausius-Mossotti 因子 f_{CM} 的实部。Clausius-Mossotti 因子实部表达式为:

$$f_{\text{CM}} = (\epsilon_p^* - \epsilon_m^*) / (\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*) \quad (2)$$

其中: ϵ_p^* 和 ϵ_m^* 为颗粒/细胞和悬浮介质的复合介电常数, $\epsilon^* = \epsilon - j\sigma/\omega$,其中 ϵ 、 σ 、 ω 、 j 分别是实介电常数、电导率、外加电场频率和虚数单位。

2 实验部分

2.1 非接触式介电泳芯微流控芯片的设计与制作

为了消除传统接触式电极带来的缺陷,采用非接触式液体沟道电极,消除传统电极缺陷的同时可以完美地实现对微颗粒或循环肿瘤细胞的操控捕获。

在〈100〉硅衬底上制造硅片模具,用 AutoCAD 画图软件绘制出所需要的结构图形,制作掩模版,选用 4 英寸 P 型 Si 片,用深反应离子刻蚀,刻蚀深度为 40 μm 的沟道,得到制作完成的硅片模具。

2.2 芯片键合

将从硅片模具上揭下的 PDMS 膜切割打孔,清洗干净之后,将 PDMS 膜和干净的载玻片通过等离子处理 1 min,将 PDMS 膜有图案一面与载玻片按压在一起,使得 PDMS 膜和载玻片粘合在一起。

2.3 样品的准备

将直径为 5、10 μm 聚苯乙烯微球用去离子水

清洗震荡离心 2 次,重悬于 DEP 缓冲液 1[去离子水加 PBS(含 0.05% Tween),将电导率调为 10 mS/m]中,备用。

取 3 种肺癌细胞株 H446、H1975、A549 和外周血血液样本提取的白细胞,将细胞用 PBS(含 0.05% Tween)清洗震荡离心 2 次,然后重悬于 DEP 缓冲液 2(8.5% 蔗糖、0.3% 葡萄糖和 0.725% RPMI1640)中,电导率调为 10 mS/m;另用去离子水、NaCl、红墨水配置 500 mS/m 的电极液,备用。

2.4 进样过程

用 2 支 100 μL 微量注射器分别吸取 80 μL 样品和缓冲液,将注射器固定于进样泵上,用配置 CCD 的倒置显微镜观察进样情况。函数发生器输出信号物理参数设置分别为 2、3、4、5、6 V;100、150 kHz;方波;高压放大器设置固定放大倍数 200 倍。

3 结果与分析

3.1 介电泳芯片的数值仿真

电泳芯片需要在主样品沟道施加 1 个高频非均匀电场,依据尖端效应,电极尖端曲率越大,电荷聚集越密集,场强也越强,故本芯片中沟道电极的尖端形状设计有差别。对电极区域电场分布用 Comsol 进行了仿真,仿真结果符合设计预期,表 1 是各材料和溶液的介电参数,仿真结果如图 1 所示。

表 1 材料和溶液的介电参数

电气特性材料	电导率/($\text{mS}\cdot\text{m}^{-1}$)	相对介电常数
PDMS	0.83×10^{-9}	2.7
PBS	140	80
DEP 缓冲液 1	10	80
DEP 缓冲液 2	10	80

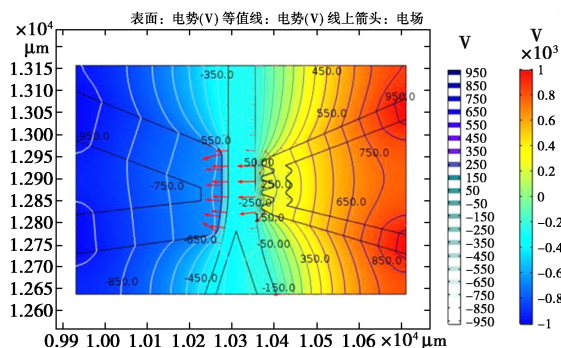


图 1 芯片中介电泳区域电场分布图

3.2 不同外加电压幅值对 cDEP 介电泳芯片捕获不同尺寸微球的影响

选用制备的聚苯乙烯微球悬浮液为进样样品,鞘液选用配置好的 DEP 缓冲液 1。函数发生器输出信

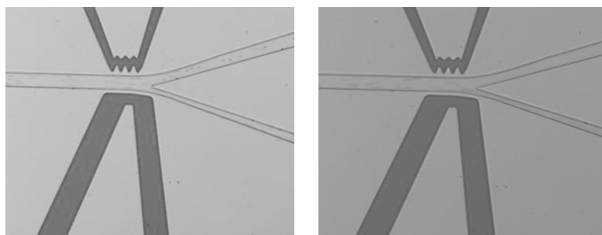
号物理参数分别为 2、3、4、5、6 V; 100 kHz; 方波; 高压放大器放大倍数为 200; 进样流速为 20 mL/h。

3.2.1 选取 5 μm 聚苯乙烯微球为进样样品

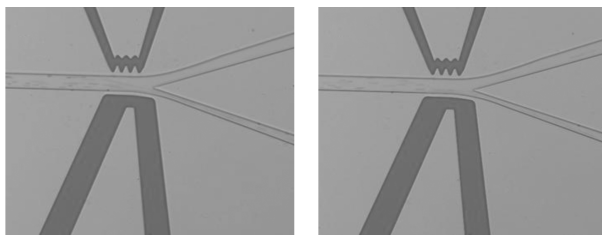
选取 5 μm 微球进样时, 施加不同物理参数电场, 具体参数如表 2 所示。在施加不同的电压大小时, 沟道电极产生的介电力对微球运动产生影响。在施加不同 AC 电压情况下, 单帧进样图和多次实验后记录的粒子运动轨迹曲线如图 2 所示。

表 2 5 μm 微球进样时施加电场的物理参数 (流速设定为 20 mL/h)

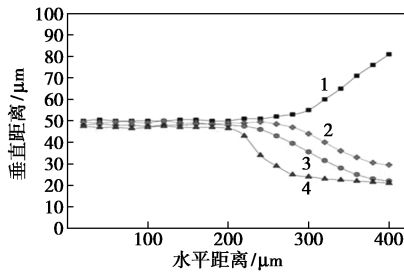
DEP 悬浮溶液	电压/ (V _{p-p})	频率/ kHz	微球尺寸/ μm	微球进样 轨迹
DEP 缓冲液 1	0	100	5	图 2(a)
DEP 缓冲液 1	400	100	5	图 2(b)
DEP 缓冲液 1	600	100	5	图 2(c)
DEP 缓冲液 1	800	100	5	图 2(d)



(a) 5 μm, 0 V 进样轨迹 (b) 5 μm, 400 V, 100 kHz 进样轨迹



(c) 5 μm, 600 V, 100 kHz 进样轨迹 (d) 5 μm, 800 V, 100 kHz 进样轨迹



1—5 μm, 0 V; 2—5 μm, 400 V, 100 kHz; 3—5 μm, 600 V, 100 kHz; 4—5 μm, 800 V, 100 kHz

(e) 微球运动轨迹曲线

图 2 不同 AC 电压条件下 5 μm 微球单帧进样图和微球运动轨迹曲线

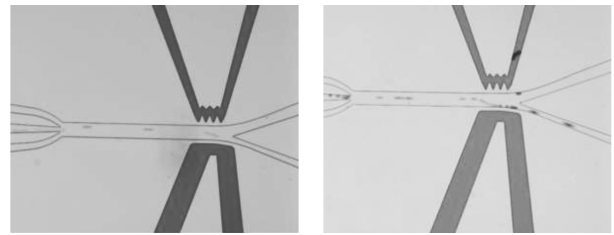
由图 2 可知, 5 μm 聚苯乙烯微球在该介电电泳体系中一直受到负向的介电电泳力, 由式(1)可得外加电压的强度越大, 颗粒所受的介电电泳力也越大。

3.2.2 选取 10 μm 微球为进样样品

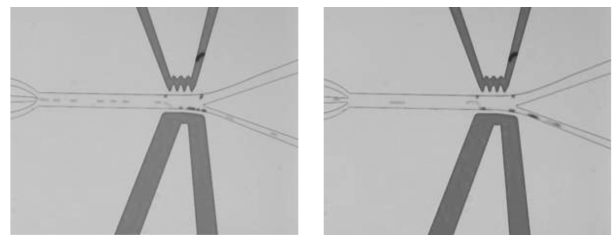
10 μm 微球进样时施加的电场物理参数如表 3 所示, 不同 AC 电压条件下 10 μm 微球单帧进样图和微球运动轨迹曲线如图 3 所示。

表 3 10 μm 微球进样时施加的电场物理参数 (流速设定为 20 mL/h)

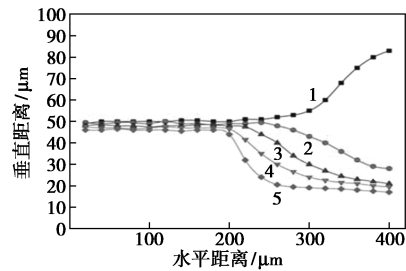
DEP 悬浮溶液	电压/ (V _{p-p})	频率/ kHz	微球尺寸/ μm	微球进样 轨迹
DEP 缓冲液 1	600	100	10	图 3(a)
DEP 缓冲液 1	800	100	10	图 3(b)
DEP 缓冲液 1	1000	100	10	图 3(c)
DEP 缓冲液 1	1200	100	10	图 3(d)



(a) 10 μm, 600 V, 100 kHz 进样轨迹 (b) 10 μm, 800 V, 100 kHz 进样轨迹



(c) 10 μm, 1 000 V, 100 kHz 进样轨迹 (d) 10 μm, 1 200 V, 100 kHz 进样轨迹



1—10 μm, 0 V; 2—10 μm, 600 V, 100 kHz; 3—10 μm, 800 V, 100 kHz; 4—10 μm, 1 000 V, 100 kHz; 5—10 μm, 1 200 V, 100 kHz

(e) 微球运动轨迹曲线

图 3 不同 AC 电压条件下 10 μm 微球单帧进样图和微球运动轨迹曲线

由图 3 可以看出,随着施加的 AC 电压的增大,微粒运动轨迹向下偏转角度越大。对于 $5\ \mu\text{m}$ 微粒施加 $800\ \text{V}$ 电压时,微粒运动轨迹的偏移曲线接近于施加 $1\ 200\ \text{V}$ 时 $10\ \mu\text{m}$ 的微粒的偏移曲线。根据式(1)可知,电场参数、微粒尺寸都会影响微粒的介电力的大小。

3.3 不同外加电场频率对 cDEP 介电泳芯片捕获细胞的影响

利用该介电泳微流控芯片对肿瘤细胞 H446、H1975 和 A549 进行捕获实验,由于细胞是核壳结构,介电情况比较复杂,为了不损伤细胞,选用的悬浮介质是配置的渗透压和细胞相近的糖水溶液 (DEP 缓冲溶液 2),而在该溶液中整体介电响应较弱。故为了使介电现象更明显,调低进样泵流速为 $15\ \mu\text{L}/\text{h}$ 。

3.3.1 电场频率为 $100\ \text{kHz}$ 时细胞捕获的结果

在 $1\ 200\ \text{V}$ 、 $100\ \text{kHz}$ 时,细胞被捕获轨迹如图 4 所示。

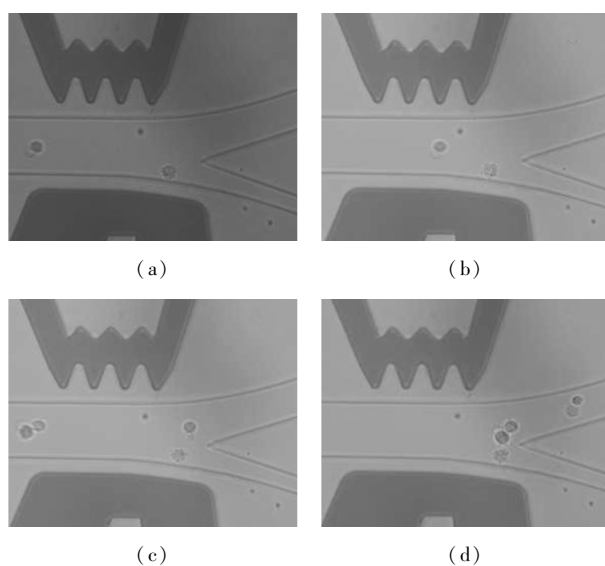


图 4 电场为 $1\ 200\ \text{V}$ 、 $100\ \text{kHz}$ 时细胞被捕获轨迹图

癌细胞的尺寸大于 $15\ \mu\text{m}$,故所需的介电力增大,施加的电压也相应增大,但电压增大到一定程度,液体电极尖端会积攒大量的焦耳热,容易烧穿电极。根据式(1)、式(2)可知,还可以通过增高电场频率来增强电场梯度。在电场设置为 $1\ 200\ \text{V}$ 、 $100\ \text{kHz}$ 时,2 组细胞向右运动,细胞在该低频率段受负向介电泳力,且只有第 2 组细胞在流经电极区域时被电极捕获,可知在 $1\ 200\ \text{V}$ 、 $100\ \text{kHz}$ 电场参数时,主沟道中的电场梯度不够强,因而电极不足以捕获所有流经电极区域的细胞。

3.3.2 电场频率为 $150\ \text{kHz}$ 时细胞捕获的结果

为了使电极稳定地捕获流经电极区域的细胞,将施加的电场频率继续增高,电场参数设置为 $1\ 200\ \text{V}$ 、 $150\ \text{kHz}$ 时,细胞被捕获的结果如图 5 所示。由图 5 可以看出,流经液体电极区域的细胞均被电极捕获,且没有细胞发生裂解,捕获细胞保持完整。

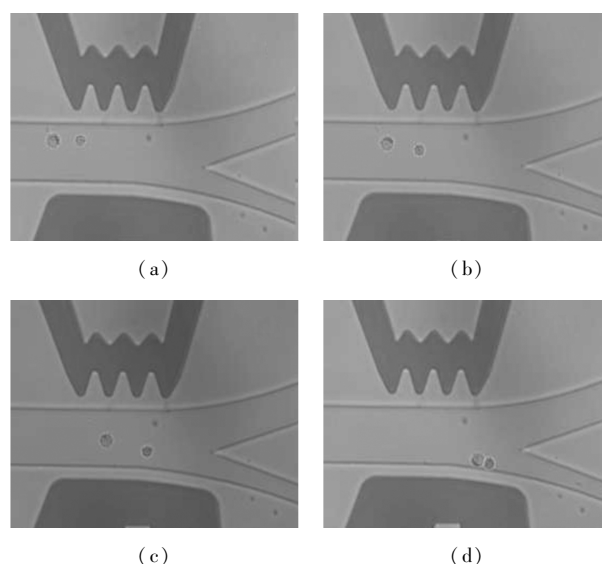


图 5 电场为 $1\ 200\ \text{V}$ 、 $150\ \text{kHz}$ 时细胞被捕获轨迹图

在多次实验后,确定了捕获细胞的合适电场参数为 $1\ 200\ \text{V}$ 、 $150\ \text{kHz}$ 。在施加该电场后,可以观察到白细胞、H446 和 H1975 细胞被捕获运动轨迹开始偏移。而在相同的电边界条件下,没有观察到 A549 肿瘤细胞有任何捕获或运动轨迹偏移的情况,说明在 cDEP 装置中,可以基于细胞自身的介电参数来区分和分离不同类型的细胞,同时被捕获的细胞没有受到明显的破坏、裂解,细胞的活力保持相对较好。

3.4 不同细胞的电旋转情况

在施加合适参数的 AC 电场 ($1\ 200\ \text{V}$ 、 $150\ \text{kHz}$) 后,流经介电泳区域的细胞被电极捕获时细胞会在捕获区开始自转,细胞的旋转速度是其电特性、介质动态黏度以及电场特性的函数。在主通道的一个点测量了实验中捕获的白细胞和 H446、H1975、A549 细胞的平均旋转速度。白细胞、H446、H1975 肿瘤细胞的平均尺寸如表 4 所示,在测量点的平均旋转速度如图 6 所示。

表 4 不同细胞系的平均直径

不同细胞系	A-549	H-1975	H-446	白细胞
平均直径/ μm	17.7 ± 0.5	16.8 ± 0.5	15.3 ± 0.3	8.5 ± 0.5

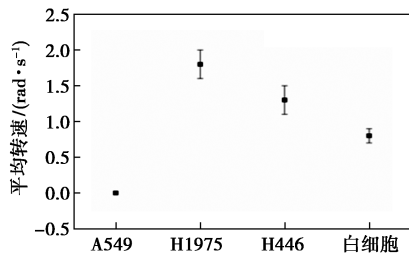


图6 4种细胞在1 200 V、150 kHz下的平均电旋转速度

4 结论

设计了一种新的介电泳微流控芯片,将高频AC电信号耦合到微流体通道电极,形成介电泳芯片,该芯片可以实现对电中性微颗粒或者循环肿瘤细胞的捕获。在本微流控芯片中观察到不同尺寸的聚苯乙烯微球在不同电压下被液体电极捕获的情况,以及不同电场频率对电极捕获不同细胞的影响,可以通过调节电压值和电场频率来实现对微颗粒和细胞的稳定捕获。

在相同的电场参数下不同细胞的电旋转速度明显不同,故该芯片有识别不同细胞的能力。此外,由于本设计中电极沟道和主通道是同时设计、同时制造,由导电液代替金属或薄膜电极,且与主通道不直接接触,故电极在工作时传导到主通道的焦耳热可以忽略不计,因此具有无污染、不损伤样品的优点。芯片键合也不需要精细对准操作,从而解决传统介电泳芯片工艺复杂、芯片成本较高的缺陷。后续将继续优化悬浮介质和电场的参数,做到片上无标记分离,使该芯片在癌症的临床诊断和愈后方面得以运用。

参考文献

- [1] Arya S K, Lim B, Rahman A R A. Enrichment, detection and clinical significance of circulating tumor cells[J]. *Lab on A Chip*, 2013, 13(11): 1995–2027.
- [2] Qian W, Zhang Y, Chen W. Circulating tumor cells; Capturing cancer: Emerging microfluidic technologies for the capture and characterization of circulating tumor cells (Small 32/2015) [J]. *Small*, 2015, 11(32): 3849–3849.
- [3] Shafiee H, Caldwell J L, Sano M B, *et al.* Contactless dielectrophoresis: A new technique for cell manipulation[J]. *Biomedical Microdevices*, 2009, 11(5): 997–1006.
- [4] Lewpiriyawong N, Yang C, Lam Y C. Continuous sorting and separation of microparticles by size using AC dielectrophoresis in a PDMS microfluidic device with 3-D conducting PDMS composite electrodes[J]. *Electrophoresis*, 2010, 31(15): 2622–2631.
- [5] Chan J Y, Ahmad Kayani A B, Md Ali M A, *et al.* Dielectrophoresis-based microfluidic platforms for cancer diagnostics[J]. *Biomicrofluidics*, 2018, 12(1): 011503.
- [6] Valero A, Braschler T, Renaud P. A unified approach to dielectric single cell analysis: Impedance and dielectrophoretic force spectroscopy[J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(17): 2216–2225.
- [7] Di Martino R, Camarda M, Cascio M, *et al.* Analysis of the role of elution buffers on the separation capabilities of dielectrophoretic devices[J]. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2016, 7: 162–167.
- [8] Kua C H, Lam Y C, Rodriguez I, *et al.* Cell motion model for moving dielectrophoresis[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(14): 5454–5461.
- [9] Alazzam A, Stiharu I, Bhat R, *et al.* Interdigitated comb-like electrodes for continuous separation of malignant cells from blood using dielectrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2011, 32(11): 1327–1336.
- [10] Sano M B, Caldwell J L, Davalos R V. Modeling and development of a low frequency contactless dielectrophoresis (cDEP) platform to sort cancer cells from dilute whole blood samples[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 30(1): 13–20.
- [11] Henslee E A, Sano M B, Rojas A D, *et al.* Selective concentration of human cancer cells using contactless dielectrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2011, 32(18): 2523–2529.
- [12] Sancho M, Martínez G, Muñoz S, *et al.* Interaction between cells in dielectrophoresis and electrorotation experiments[J]. *Biomicrofluidics*, 2010, 4(2): 022802.
- [13] Su H W, Prieto J L, Voldman J. Rapid dielectrophoretic characterization of single cells using the dielectrophoretic spring[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13(20): 4109–4117.
- [14] Gupta V, Jafferji I, Garza M, *et al.* ApoStream™ a new dielectrophoretic device for antibody independent isolation and recovery of viable cancer cells from blood [J]. *Biomicrofluidics*, 2012, 6(2): 24133.
- [15] Han S I, Joo Y D, Han K H. Impedance-activated microseparator based on amplitude modulation sensing and dielectrophoretic switching methods[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, 171–172: 1312–1320.
- [16] Sciambi A, Abate A R. Accurate microfluidic sorting of droplets at 30 kHz[J]. *Lab Chip*, 2015, 15(1): 47–51.
- [17] Ma Z, Zhou Y, Collins D J, *et al.* Fluorescence activated cell sorting via a focused traveling surface acoustic beam[J]. *Lab on a Chip*, 2017, 17(18): 3176–3185.
- [18] Colbourne T R, Hill I G, Kreplak L. Electric field induced assembly of vimentin microscavolds around metallic electrodes[J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10(7): 1986–1991.
- [19] Shafiee H, Sano M B, Henslee E A, *et al.* Selective isolation of live/dead cells using contactless dielectrophoresis (cDEP) [J]. *Lab on a Chip*, 2010, 10(4): 438–445. ■