



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114438012 A

(43) 申请公布日 2022. 05. 06

(21) 申请号 202210090805.4

(22) 申请日 2022.01.26

(71) 申请人 合肥工业大学

地址 230009 安徽省合肥市包河区屯溪路
193号

(72) 发明人 张晨初 赵强强

(74) 专利代理机构 合肥市泽信专利代理事务所
(普通合伙) 34144

专利代理师 潘飞

(51) Int. Cl.

G12N 5/00 (2006.01)

G12M 1/36 (2006.01)

G12M 1/00 (2006.01)

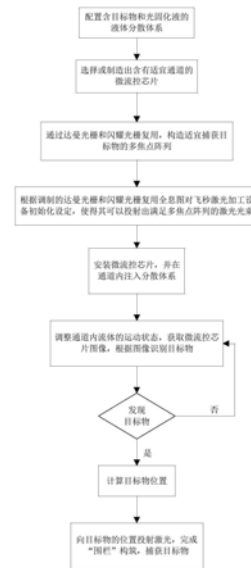
权利要求书3页 说明书11页 附图6页

(54) 发明名称

一种微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法

(57) 摘要

本发明属于细胞生物学领域,具体涉及一种微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法。该方法先将目标物分散到光刻胶中。然后针对目标物设计一个适应其外形的“围栏”,以栏杆点为焦点调制出多焦点阵列。接着将光固化剂注入到微流控芯片的通道内,再从微流控芯片内通过物镜找到待捕获的目标物。最后利用飞秒激光加工设备在微流控芯片通道内的目标物周围进行定点照射,固化光刻胶得到微柱阵列,构成完成预先设置“围栏”,捕获目标物。捕获过程依次包括分散体系配置-微流控芯片选型-飞秒激光加工设备调试-目标物锁定-光固化捕获,共五个阶段。本发明解决了现有微粒捕获方法的捕获效率低,容易造成目标物损伤,对不同目标物的通用性差等问题。



1. 一种微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法,其特征在於,其用於捕获微米级别的粒子或细胞;定义待捕获的粒子或细胞为目标物;所述柔性捕获方法包括如下步骤:

S1: 将含有待捕获的目标物的物质均匀分散在含有光固化特性的分散液中,得到稳定的液态分散体系;

S2: 根据目标物尺寸选择相应的微流控芯片,所述微流控芯片中供所述分散体系流通的通道的高度大于一个目标物的粒径且小于两个目标物的粒径;

S3: 通过达曼光栅和闪耀光栅的复用,构建出一个焦点强度均匀可调的多焦点阵列;所述多焦点阵列的相邻焦点间连线构成一个多边形,所述多边形对应的内切圆大于所述目标物的最大截面圆,且所述多焦点阵列中任意两个相邻焦点的间距小于目标物的粒径;

S4: 根据上步骤多焦点阵列构建过程中的达曼光栅和闪耀光栅的全息图,调制飞秒激光加工设备中空间光调制器的工作参数,使得飞秒激光加工设备可以在加工平台上投射出满足所述多焦点阵列的多条平行光束;

S5: 将微流控芯片安装在飞秒激光加工设备的加工平台上,驱动所述分散体系在所述微流控芯片中流动,并在完全排除通道内空气后控制通道内的流体静止;

S6: 获取流体静止状态下的微流控芯片的图像,通过图像处理和特征识别的方法分辨出通道内是否存在可供捕获的目标物:

(1) 是则锁定待捕获的目标物,并计算出目标物的相对坐标;

(2) 否则返回步骤S5,驱动通道内的流体继续正向流动,替换微流控芯片内的流体;

S7: 根据目标物的相对坐标调整所述飞秒激光加工设备中光线照射的目标区域,使得激光束的焦点恰好投射到微流控芯片中锁定的目标物的周围;

S8: 开启激光器,通过激光固化激光束路径上的光固化剂,在目标物周围构筑由固化后的微柱组成的“围栏”,完成对目标物的捕获。

2. 如权利要求1所述的微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法,其特征在於:步骤S1中,所述分散体系中,目标物的颗粒溶解度不高于30000/mL;且分散体系透明;所述分散体系还经过除杂处理去除其中粒径大于所述目标物的杂质;除杂处理的方法包括离心和/或过滤。

3. 如权利要求1所述的微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法,其特征在於:步骤S2中,所述微流控芯片采用高透明度的无机玻璃、高分子材料或二者的复合材料制备而成;所述微流控芯片中通道的宽度不小于所述通道的高度;微流控芯片的选型过程中,通道的高度取决于待捕获的目标物的粒径,所述通道的高度满足使得分散体系中游离的单个目标物可顺畅通过,但是粘连的多个目标物组成的聚合体无法通过。

4. 如权利要求3所述的微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法,其特征在於:所述微流控芯片由基板和槽盖复合而成,所述槽盖中含有单条或多条等截面的流体通道;且每条流体通道的两端分别开设流体入口和流体出口;所述基板采用玻璃材料制备而成,所述槽盖采用聚二甲基硅氧烷材料制备,所述微流控芯片的制备方法如下:

(1) 在硅片上涂覆一层光刻胶;匀胶后对光刻胶层进行前烘处理,处理后的光刻胶层的厚度等于拟加工的通道的高度;

(2) 在光刻胶层上方覆盖掩膜,掩膜中含有与拟加工的通道的长度和宽度相符的沟槽;然后进行紫外线曝光,去除掩膜覆盖部分的光刻胶;

(3) 对曝光后的剩余光刻胶层进行后烘显影得到芯片模板,芯片模板中的光刻胶层呈

与拟加工的通道规格相符的条带状；

(4) 在芯片模板上倒入已经混合均匀的聚二甲基硅氧烷混合液；抽真空处理后，在65℃条件下固化不少于12h，得到成型后的槽盖；

(5) 将上步骤的槽盖脱模后，在通道的两端打孔，形成通道对应的流体入口和流体出口；

(6) 将开孔后的槽盖与玻璃基板密封，得到复合体即为所需的微流控芯片。

5. 如权利要求1所述的微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法，其特征在于：步骤S3中，所述多焦点阵列构建过程中，焦点数量为 $2n$ ($n \in \mathbb{N}, n \geq 2$) 个， n 为使用的达曼光栅和闪耀光栅的和；通过调整使用的光栅数量达到预设的多焦点阵列中焦点数量；通过调整达曼光栅的周期调整多焦点阵列中各个焦点间的间距；通过将其中的一个或多个达曼光栅替换为闪耀光栅，并调整闪耀光栅的相位深度进而改变焦点的光强，使得多焦点阵列中各个焦点出的光强大小分布均匀。

6. 如权利要求1所述的微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法，其特征在于：步骤S5中，通过微流泵驱动流体在微流控芯片内流动，微流泵的控制精度为 $\mu\text{L}/\text{min}$ 量级；在初始状态，微流泵按照最小排放速率将分散体系注入到微流控芯片的通道内；当步骤S6中经图像识别未发现有效的可供捕获的目标物后，微流泵再以最小排放速率缓慢注入新的分散体系，将通道内原有的分散体系完全排净；直至通道内的分散体系中存在满足捕获标准的目标物。

7. 如权利要求1所述的微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法，其特征在于：步骤S6中，可供捕获的目标物的选择标准包括：

(1) 选定的目标物结构完整；

(2) 选定的目标物呈单一的游离状态不发生团聚，且与周围其它目标物的最小间距大于目标物的直径；

(3) 选定的目标物靠近通道中央，且与通道两侧内壁的间距大于拟生成的固化的微柱的直径。

8. 如权利要求7所述的微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法，其特征在于：所述飞秒激光加工设备的工作机台上方设置设有聚焦物镜，聚焦物镜正上方设置一个与水平面呈45夹角的二向色镜，二向色镜正上方设置用于获取聚焦物镜下方微流控芯片图像的相机；固化用激光光束沿水平方向透射到二向色镜上，经折射后进入聚焦物镜并照射在微流控芯片上；

相机获取的原始图像数据输入到一个上位机中，上位机包含或连接有一个显示组件；上位机获取图像数据后经过图像处理和特征识别后选定区域内包含的所有目标物；然后由人工选择其中包含的可供捕获的目标物；上位机再根据选定的目标物在原始图像中的像素位置计算出目标物的相对坐标，进而使得发出的激光光束锁定目标物。

9. 如权利要求1所述的微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法，其特征在于：在针对特定类型的目标物进行初次捕获之后，通过控制微流泵反复正反流动，使得栅栏内的目标物反复碰撞微柱，测试微柱的结构强度；当某个微柱断裂后，标记微柱对应的焦点的序号，然后返回步骤S3，重新调整达曼光栅和闪耀光栅的参数，增大相应焦点处的光强。

10. 如权利要求9所述的微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法，其特征在于：在完成目标物的捕获之后，通过微流泵向微流控芯片注入工作液体，置换其中含有光固化特性的分

散液,使得目标物位于拟设置的工作液体中,以便进行后续应用;分散液完全置换结束后,还通过微流泵控制微流控芯片内的流体往复流动,测试捕获的目标物是否与微柱发生粘连,是则说明捕获失败需要重新进行捕获,否则说明捕获成功。

一种微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法

技术领域

[0001] 本发明属于细胞生物学领域,具体涉及一种微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法。

背景技术

[0002] 近年来,单细胞分析在分子诊断、医学治疗、细胞生物学等领域发挥了关键作用。微捕获技术可以抓取细胞/颗粒进一步分析,为生物医学和生化研究提供了一个重要的平台。在微捕获技术中,基于微流控芯片的微捕获技术具有很多优点,如成本低、试剂消耗少、便于细胞操作。

[0003] 目前,已经有一些方法通过在微流控芯片中集成捕集陷阱,实现大量悬浮颗粒的捕获方法。例如,用声波陷阱、微孔、介电电泳和微结构阵列形成的水动力陷阱来捕获微粒或细胞。与上述方法相比,流体动力阵列捕获方法是微流体系统中最常用的方法,它具有操作简单的优点。具体的捕获过程是:首先预先制造与目标颗粒大小相对应的微陷阱阵列,然后将混合着颗粒或细胞的液体注入微流控芯片中,最后由该微陷阱阵列捕获。该方法的原理是在流体通道内预先设置“陷阱”,陷阱相相当于一个“栅栏”。粒子经过陷阱则被阻拦,未通过陷阱则可以正常通过。因此,在该方法中想要稳固地困住粒子或者细胞,需要保持恒定的单向外压力。这导致目标物的捕获操作过程较为复杂,操作繁琐。

[0004] 而且在现有的捕获方法中,由于微通道的水力阻力小于捕集器阵列的水力阻力,大部分颗粒会绕过捕集器,导致捕集效率相对较低(10%)。此外,现有微通道内的水动力陷阱通常仅适用于特定尺寸的目标进行捕获,无法有效针对不同结构,不同尺寸的粒子或细胞进行适应性设计。这不仅会导致陷阱的捕获率低,还容易对捕获的目标物造成损伤。

发明内容

[0005] 为了解决现有微粒捕获方法的捕获效率低,容易造成目标物损伤,对不同目标物的通用性差等问题,本发明提供一种微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法。

[0006] 本发明采用以下技术方案实现:

[0007] 一种微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法,该方法用于捕获微米级别的粒子或细胞。待捕获的粒子或细胞即为该方法中的目标物,该方法能够对任意形状或尺寸的目标物进行稳定捕获,且不会对目标物造成损伤。本发明提供的柔性捕获方法包括如下步骤:

[0008] S1:将含有待捕获的目标物的物质均匀分散在含有光固化特性的分散液中,得到稳定的液态分散体系。

[0009] S2:根据目标物尺寸选择相应的微流控芯片,微流控芯片中供分散体系流通的通道的高度大于一个目标物的粒径且小于两个目标物的粒径。

[0010] S3:通过达曼光栅和闪耀光栅的复用,构建出一个焦点强度均匀可调的多焦点阵列;所述多焦点阵列的相邻焦点间连线构成一个多边形,所述多边形对应的内切圆大于所述目标物的最大截面圆,且所述多焦点阵列中任意两个相邻焦点的间距小于目标物的粒

径。

[0011] S4:根据上步骤多焦点阵列构建过程中的达曼光栅和闪耀光栅的全息图,调制所述飞秒激光加工设备中空间光调制器的工作参数,使得飞秒激光加工设备可以在加工平台上投射出满足所述多焦点阵列的多条平行光束。

[0012] S5:将微流控芯片安装在飞秒激光加工设备的加工平台上,驱动所述分散体系在所述微流控芯片中流动,并在完全排除通道内空气后控制通道内的流体静止。

[0013] S6:获取流体静止状态下的微流控芯片的图像,通过图像处理和特征识别的方法分辨出通道内是否存在可供捕获的目标物:

[0014] (1) 是则锁定待捕获的目标物,并计算出目标物的相对坐标。

[0015] (2) 否则返回步骤S5,驱动通道内的流体继续正向流动,替换微流控芯片内的流体。

[0016] S7:根据目标物的相对坐标调整飞秒激光加工设备中光线照射的目标区域,使得激光束的焦点恰好投射到微流控芯片中锁定的目标物的周围。

[0017] S8:开启激光器,通过激光固化激光束路径上的光固化剂,在目标物周围构筑由固化后的微柱组成的“围栏”,完成对目标物的捕获。

[0018] 作为本发明进一步地改进,步骤S1中,分散体系中,目标物的颗粒溶解度小于等于30000/mL;且分散体系透明。分散体系还经过除杂处理去除其中粒径大于目标物的杂质;除杂处理的方法包括离心和/或过滤。

[0019] 作为本发明进一步地改进,步骤S2中,微流控芯片采用高透明度的无机玻璃、高分子材料或二者的复合材料制备而成。微流控芯片中通道的宽度不小于通道的高度。微流控芯片的选型过程中,通道的高度取决于待捕获的目标物的粒径,通道的高度满足使得分散体系中游离的单个目标物可顺利通过,但是粘连的多个目标物组成的聚合体无法通过。

[0020] 作为本发明进一步地改进,微流控芯片由基板和槽盖复合而成,槽盖中含有单条或多条等截面的流体通道;且每条流体通道的两端分别开设流体入口和流体出口;基板采用玻璃材料制备而成,槽盖采用聚二甲基硅氧烷材料制备,微流控芯片的制备方法如下:

[0021] (1) 在硅片上涂覆一层光刻胶;匀胶后对光刻胶层进行前烘处理,处理后的光刻胶层的厚度等于拟加工的通道的高度。

[0022] (2) 在光刻胶层上方覆盖掩膜,掩膜中含有与拟加工的通道的长度和宽度相符的沟槽;然后进行紫外线曝光,去除掩膜覆盖部分的光刻胶。

[0023] (3) 对曝光后的剩余光刻胶层进行后烘显影得到芯片模板,芯片模板中的光刻胶层呈与拟加工的通道规格相符的条带状。

[0024] (4) 在芯片模板上倒入已经混合均匀的聚二甲基硅氧烷混合液;抽真空处理后,在65℃条件下固化不少于12h,得到成型后的槽盖。

[0025] (5) 将上步骤的槽盖脱模后,在通道的两端打孔,形成通道对应的流体入口和流体出口。

[0026] (6) 将开孔后的槽盖与玻璃基板密封,得到复合体即为所需的微流控芯片。

[0027] 作为本发明进一步地改进,步骤S3中,多焦点阵列构建过程中,焦点数量为 $2n$ ($n \in \mathbb{N}, n \geq 2$) 个, n 为使用的达曼光栅和闪耀光栅的和。通过调整使用的光栅数量达到预设的多焦点阵列中焦点数量。通过调整达曼光栅的周期调整多焦点阵列中各个焦点间的间距;通

过将其中的一个或多个达曼光栅替换为闪耀光栅,并调整闪耀光栅的相位深度进而改变焦点的光强,使得多焦点阵列中各个焦点出的光强大小分布均匀。

[0028] 作为本发明进一步地改进,步骤S5中,通过微流泵驱动流体在微流控芯片内流动,微流泵的控制精度为 $\mu\text{L}/\text{min}$ 量级;在初始状态,微流泵按照最小排放速率将分散体系注入到微流控芯片的通道内。当步骤S6中经图像识别未发现有效的可供捕获的目标物后,微流泵再以最小排放速率缓慢注入新的分散体系,将通道内原有的分散体系完全排净;直至通道内的分散体系中存在满足捕获标准的目标物。

[0029] 作为本发明进一步地改进,步骤S6中,可供捕获的目标物的选择标准包括:

[0030] (1) 选定的目标物结构完整。

[0031] (2) 选定的目标物呈单一的游离状态不发生团聚,且与周围其它目标物的最小间距大于目标物的直径。

[0032] (3) 选定的目标物靠近通道中央,且与通道两侧内壁的间距大于拟生成的固化的微柱的直径。

[0033] 作为本发明进一步地改进,飞秒激光加工设备的工作机台上方设置设有聚焦物镜,聚焦物镜正上方设置一个与水平面呈45夹角的二向色镜,二向色镜正上方设置用于获取聚焦物镜下方微流控芯片图像的相机;固化用激光光束沿水平方向透射到二向色镜上,经折射后进入聚焦物镜并照射在微流控芯片上。

[0034] 相机获取的原始图像数据输入到一个上位机中,上位机包含或连接有一个显示组件。上位机获取图像数据后经过图像处理 and 特征识别后选定区域内包含的所有目标物。然后由人工选择其中包含的可供捕获的目标物;上位机再根据选定的目标物在原始图像中的像素位置计算出目标物的相对坐标,进而使得发出的激光光束锁定目标物。

[0035] 作为本发明进一步地改进,在针对特定类型的目标物进行初次捕获之后,通过控制微流泵反复正反流动,使得栅栏内的目标物反复碰撞微柱,测试微柱的结构强度。当某个微柱断裂后,标记微柱对应的焦点的序号,然后返回步骤S3,重新调整达曼光栅和闪耀光栅的参数,增大相应焦点处的光强。

[0036] 作为本发明进一步地改进,在完成目标物的捕获之后,通过微流泵向微流控芯片注入工作液体,置换其中含有光固化特性的分散液,使得目标物位于拟设置的工作液体中,以便进行后续应用。分散液完全置换结束后,还通过微流泵控制微流控芯片内的流体往复流动,测试捕获的目标物是否与微柱发生粘连,是则说明捕获失败需要重新进行捕获,否则说明捕获成功。

[0037] 本发明提供的技术方案,具有如下有益效果:

[0038] 本发明提供的柔性捕获方法可以构筑一个适用不同结构粒子或细胞的仿形“围栏”,该方法捕获目标粒子的稳定性高,无需进行持续提供定向的外部压力,可以降低操作难度和成本。对任意结构的粒子或细胞均具有良好的捕获效果,并且不会对细胞或粒子造成损伤,属于非常“柔性”的捕获方式。

[0039] 本发明提供的方法还大大提高了现有的单目标、单陷阱粒子捕获方法在捕获效率上的不足。例如,本发明方法的准备阶段,可以通过达曼光栅、微透镜阵列预先生成全息图,得到不同的聚焦阵列;而目标物的分散体系也可以预先完成配置。因此,在设备开机过程中可以一次性识别多个目标,并针对不同目标同步构筑不同的“陷阱围栏”;进而在一次曝光

中同步捕获多个相同或不同的目标物,大幅节省目标物的捕集效率。

[0040] 本发明的方法中采用不同类型光栅的复用,产生强度分布可调的多焦点阵列;进而通过二维达曼光栅与发光光栅复用来控制焦点强度分布。这比传统的加权Gerchberg-Saxton (GS) 算法等积分方法更有效。此外,本发明根据目标粒子捕获的需要,通过改变光栅的参数来轻松地调整聚焦阵列的排列方式和间隙大小。因此对于复杂形状的多种目标粒子或细胞均具有良好的捕获效果。

附图说明

[0041] 图1为本发明实施例1提供的一种微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法的步骤流程图。

[0042] 图2为本发明实施例1中在目标粒子周围通过曝光构筑“围栏”的示意图。

[0043] 图3为本发明实施例1中微流控芯片制备过程的工艺流程图。

[0044] 图4为本发明实施例1中二维达曼光栅生成矩形四焦点阵列的示意图。

[0045] 图5为本发明实施例1中三维达曼光栅生成矩正六边形的六焦点阵列的示意图。

[0046] 图6为图4的四焦点阵列中焦点间距调节过程的原理图。

[0047] 图7为图5的六焦点阵列中焦点间距调节过程的原理图。

[0048] 图8为本发明实施例1中采用达曼光栅与闪耀光栅相结合的方法实现了多焦点阵列中焦点光强可调的过程的原理示意图。

[0049] 图9为达曼光栅与闪耀光栅复用结构中,0级和1级衍射效率与发光光栅调制深度的关系曲线。

[0050] 图10为达曼光栅与闪耀光栅复用结构中,调制深度 $\varphi = 0.6\pi$ 时焦点的二维分布和强度分布关系图。

[0051] 图11为达曼光栅与闪耀光栅复用结构中,实验测试的一阶和0阶强度与发光光栅调制相位深度的关系曲线。

[0052] 图12为常规的飞秒激光加工平台的框架简图。

[0053] 图13为本发明实施例1中应用的飞秒激光加工平台的结构部署图。

[0054] 图14为目标粒子被捕获后,在“围栏中”进行自由度测试过程的电镜图。

具体实施方式

[0055] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步地详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0056] 实施例1

[0057] 本实施例提供一种微米级的粒子或细胞的柔性捕获方法,该方法用于捕获微米级别的粒子或细胞。待捕获的粒子或细胞即为该方法中的目标物,该方法能够对任意形状或尺寸的目标物进行稳定捕获,且不会对目标物造成损伤。本实施例提供的柔性捕获方法包括如图1所示的下述步骤:

[0058] S1:将含有待捕获的目标物的物质均匀分散在含有光固化特性的分散液中,得到稳定的液态分散体系。

[0059] 其中,分散体系中,目标物的颗粒溶解度不高于30000/mL;且分散体系透明。分散体系还经过除杂处理去除其中粒径大于目标物的杂质;除杂处理的方法包括离心和/或过滤。

[0060] S2:根据目标物尺寸选择相应的微流控芯片,微流控芯片中供分散体系流通的通道的高度大于一个目标物的粒径且小于两个目标物的粒径。

[0061] S3:通过达曼光栅和闪耀光栅的复用,构建出一个焦点强度均匀可调的多焦点阵列;多焦点阵列的相邻焦点间连线构成一个多边形,多边形对应的内切圆大于目标物的最大截面圆,且多焦点阵列中任意两个相邻焦点的间距小于目标物的粒径。其中,多焦点阵列实际围合的多边形应当比目标物的最大外轮廓略大;多余的空间作为后期捕获过程的预留空间。

[0062] S4:根据上步骤多焦点阵列构建过程中的达曼光栅和闪耀光栅的全息图,调制所述飞秒激光加工设备中空间光调制器的工作参数,使得飞秒激光加工设备可以在加工平台上投射出满足所述多焦点阵列的多条平行光束。

[0063] S5:将微流控芯片安装在飞秒激光加工设备的加工平台上,驱动分散体系在微流控芯片中流动,并在完全排除通道内空气后控制通道内的流体静止。

[0064] 具体地,本实施例的系统通过微流泵驱动流体在微流控芯片内流动。微流泵的控制精度为 $\mu\text{L}/\text{min}$ 量级;因而可以使得流体在微流控芯片的通道内进行微米级别的位移控制。

[0065] S6:获取流体静止状态下的微流控芯片的图像,通过图像处理和特征识别的方法分辨出通道内是否存在可供捕获的目标物:

[0066] (1) 是则锁定待捕获的目标物,并计算出目标物的相对坐标。

[0067] (2) 否则返回步骤S5,驱动通道内的流体继续正向流动,替换微流控芯片内的流体。

[0068] S7:根据目标物的相对坐标调整飞秒激光加工设备中光线照射的目标区域,使得激光束的焦点恰好投射到微流控芯片中锁定的目标物的周围。

[0069] S8:开启激光器,通过激光固化激光束路径上的光固化剂,在目标物周围构筑由固化后的微柱组成的“围栏”,完成对目标物的捕获。

[0070] 本实施例提供捕获方法总结如下,先将目标物分散到光刻胶中。然后针对目标物设计一个可以完成捕获但不会对目标物造成损伤的“围栏”,“围栏”造型适应目标物的外形,并以围栏中各个栏杆位置为焦点调制出多焦点阵列。接着将光固化剂注入到微流控芯片的通道内,再从微流控芯片内通过物镜找到待捕获的目标物。最后,如图2所示,利用飞秒激光加工设备在微流控芯片通道内的目标物周围进行定点照射,固化光刻胶得到微柱阵列,构成完成预先设置“围栏”,捕获目标物。根据上述方法的总结,完成的目标物捕获过程依次包括如下五个阶段,分别是:“分散体系配置-微流控芯片选型-飞秒激光加工设备调试-目标物锁定-光固化捕获”。

[0071] 一、分散体系配置

[0072] 本实施例中的分散体系通过将含有目标物的物质充分分散在具有光固化特征的分散液中得到。在分散体系的配置过程中,目标物的浓度根据经验进行调整,达到目标物在分散体系中足够丰富,便于在后期进行搜寻和捕获的目的。同时目标物的浓度也不宜过高,

否则可能会造成目标物团聚影响对单个目标物的捕获。

[0073] 本实施例在分散液中使用的具有光固化特性的材料为Nanoscribe公司生产的液体光刻胶IPL。光刻胶的选型不局限于该型号,事实上,本实施例使用的光刻胶的选型过程中至少包括如下三个标准:

[0074] (1) 光刻胶呈液体,流动性好,可以形成稳定的固(指目标物)液(指分散胶)分散体系。

[0075] (2) 光刻胶应当呈透明状或颜色足够浅,至少能够便于有效准确分辨出其中含有的目标物以及不可去除的杂质。

[0076] (3) 光刻胶除具有光固化特性外,应当在常规状态下保持性状稳定,不与目标物或杂质发生理化反应。

[0077] 只要满足上述标准的光刻胶,均可以作为本实施例中使用的光刻胶。此外,为了保持分散系统的性质稳定,在不影响最终的应用效果的情况下,还可以在其中适量加入防凝剂、抗氧化剂等加工助剂。

[0078] 在将目标物均匀分散在分散液中形成稳定的分散体系之前或之后,还需要对目标物进行初步除杂,除杂的目标是去除其中含有的大粒径杂质,这些杂质在后期可能导致通道堵塞,或被当做目标物而误捕获。例如在捕获特定粒子时,应当尽量选择该物质的纯净物,然后分散在分散液中。对于已经存在的杂质,则可以通过过滤、离心等方式去除。目标物和分散液的分散性过程中可以采用搅拌、超声分散处理等方式尽量提高目标物在分散体系中的均匀度;避免目标物出现团聚。

[0079] 此外,针对活性的细胞,还应当使得配置的分散体系适于细胞存活。分散体系的性状应当保持稳定且适宜,并且选择对活性细胞无害的各类产品进行配置。

[0080] 二、微流控芯片选型

[0081] 本实施例中的微流控芯片主要作为对粒子或细胞进行捕获的装置。考虑到后期需要边缘对其中的目标物进行观测,并且保证固化用激光光束的透过性。微流控芯片主要用于提供一个供分散体系流通的通道。结构上则由基板和槽盖复合而成,槽盖中含有单条或多条等截面的流体通道;且每条流体通道的两端分别开设流体入口和流体出口。

[0082] 在本实施例只要满足透明度、结构强度和耐候性等性能的要求,对微流控芯片的材料和加工工艺不做限定。在材料上,可以采用高透明度的无机玻璃、高分子材料或二者的复合材料制备而成。使用的高分子材料包括透明柔性硅胶(PDMS,聚二甲基硅氧烷)和有机玻璃(PMMA,聚甲基丙烯酸甲酯)。

[0083] 微流控芯片中通道的宽度通常不小于通道的高度。而通道的高度取决于待捕获的目标物的粒径。通道的高度满足使得分散体系中游离的单个目标物可顺利通过,但是粘连的多个目标物组成的聚合体无法通过。

[0084] 例如,当某个目标物的粒径为 $15\mu\text{m}$ 时,考虑到便于目标物通过,则通道的高度应当大于 $15\mu\text{m}$ 且小于 $30\mu\text{m}$ 。优选1.3-1.5倍目标物粒径,即:高度约 $20\mu\text{m}$ 。通道的宽度至少要和高度等大,但是考虑到便于观测和发现目标物,同时便于在目标物周围设置“围栏”。因此通道的宽度可以适当放大,甚至允许多个目标物并行通过。此时宽度应当大于 $15\mu\text{m}$,优选为2倍目标物粒径,即:宽度为 $30\mu\text{m}$ 。

[0085] 本实施例中,微流控芯片中通道的截面呈矩形,这非常方便观测和加工。事实上,

在不影响最终的捕获效率的前提下,微流控芯片中的通道截面也可以为其它任意形状。

[0086] 此外,考虑到微流控芯片中的通道均为微米级孔道,常规的机加工设备难以形成如此精密的通道结构,本实施例还提供了一种光刻法生成微流控芯片的方法。该方法生产的微流控芯片的基板采用玻璃材料制备而成,槽盖采用聚二甲基硅氧烷材料制备。具体的生产流程如图3所示。分别包括如下步骤:

[0087] (1) 在硅片上涂覆一层光刻胶;匀胶后对光刻胶层进行前烘处理,处理后的光刻胶层的厚度等于拟加工的通道的高度。

[0088] (2) 在光刻胶层上方覆盖掩膜,掩膜中含有与拟加工的通道的长度和宽度相符的沟槽;然后进行紫外线曝光,去除掩膜覆盖部分的光刻胶。

[0089] (3) 对曝光后的剩余光刻胶层进行后烘显影得到芯片模板,芯片模板中的光刻胶层呈与拟加工的通道规格相符的条带状。

[0090] (4) 在芯片模板上倒入已经混合均匀的聚二甲基硅氧烷混合液;抽真空处理后,在65℃条件下固化不少于12h,得到成型后的槽盖。

[0091] (5) 将上步骤的槽盖脱模后,在通道的两端打孔,形成通道对应的流体入口和流体出口。

[0092] (6) 将开孔后的槽盖与玻璃基板密封,得到复合体即为所需的微流控芯片。

[0093] 本实施例提供的方法加工出来的微流控芯片为可拆卸的分体式结构,该结构可以便与槽盖和基板打开,提取出其中捕获的目标粒子或细胞;减少对粒子或细胞造成的损伤。同时分体式结构也使得该微流控芯片可以进行重复利用。

[0094] 当然,在其它实施例中,也可以通过3D打印等方式制备一体式的微流控芯片;例如使用PMMA材料或玻璃基材料进行3D打印。只要生产的微流控芯片能够达到相似的使用效果即可。

[0095] 三、飞秒激光加工设备调试

[0096] 本实施例提供的柔性捕获方法拟通过飞秒激光加工设备在微流控芯片上构筑符合目标物外形的“围栏”,用围栏圈住目标物,进而对围栏内的目标物进行捕获。因此,在准备捕获特定目标物后,应当先分析目标物的粒子轮廓,然后设计相应的多焦点阵列,再利用达曼光栅和闪耀光栅调制出相应的多焦点阵列。

[0097] 构建的多焦点阵列即为用于困住目标物的“围栏”中各个“栏杆”的分布位置,每个焦点对应一根“栏杆”。因此多焦点阵列的焦点数、焦点的位置分布,以及焦点对应的光强大小是需要控制的核心参数。对于一个待捕获的目标物来说,目标物越大则需要使用更多数量的“栏杆”以保证稳定的捕获效果。对于一个不规则的目标物粒子来说,相邻“栏杆”之间的间距要大于目标物的最小粒径,以防止目标物“逃脱”。

[0098] 多焦点阵列构建过程中,焦点数量为 $2n$ ($n \in \mathbb{N}, n \geq 2$) 个, n 为使用的达曼光栅和闪耀光栅的和。通过调整使用的光栅数量达到预设的多焦点阵列中焦点数量。通过调整达曼光栅的周期调整多焦点阵列中各个焦点间的间距;通过将其中的一个或多个达曼光栅替换为闪耀光栅,并调整闪耀光栅的相位深度进而改变焦点的光强,使得多焦点阵列中各个焦点出的光强大小分布均匀。

[0099] 对于常规的微米级粒子或细胞来说,4焦点阵列和6焦点阵列通常已经可以达到要求。

[0100] 以下以一个4焦点阵列对光栅的调制过程进行说明：

[0101] 首先使用达曼光栅生成2个均匀分布的点；然后在达曼光栅上加入相位深度可调的闪耀光栅，此时闪耀光栅也会产生2个均匀分布的两个焦点。接着通过调整达曼光栅的光栅周期以及闪耀光栅的相位，形成距离和光强大小合适的四边形焦点阵列。最后，将调制好的达曼光栅与闪耀光栅复用全息图加载到空间光调制器中。

[0102] 当需要调制出具有更多焦点数且强度均匀的多焦点阵列时，则使用更多数量的光栅，并按照上述方法进行调整即可。以下介绍光栅复用时的调制过程步骤和原理：

[0103] 结合图4-7，可以总结出达曼光栅多路复用产生可控焦点阵列的过程和原理如下：

[0104] 如图4所示，当采用一个一维达曼光栅的旋转角度为0度，另一个一维达曼光栅的旋转角度为90°时，复用的二维达曼光栅的全息图产生阵列图案为正方形。

[0105] 如图5所示，当采用三个一维达曼光栅，并分别将旋转角度设置为0°、60°、120°时，复用的三维达曼光栅的全息图产生的阵列图案为正六边形。

[0106] 如图6和7所示，通过改变达曼光栅周期来调节焦距，可以改变多焦点阵列中各个焦点间的间距。图6为正方形焦点阵列中调整过程的示意图；图7为正六边形焦点阵列中调整过程的示意图。在图6和图7中，上半部对应于达曼光栅的周期变化过程；下半部分对应于所生成的不同焦距的阵列电镜图像的变化过程。

[0107] 图8反映了采用达曼光栅与闪耀光栅相结合的方法实现了多焦点阵列中焦点光强可调的实施过程。在调整过程中：先使用达曼光栅生成2个均匀分布的点。然后在达曼光栅上加入相位深度可调的闪耀光栅。此时，闪耀光栅会与达曼光栅共同产生4个焦点。再通过调整达曼光栅的光栅周期以及闪耀光栅的相位，来调节四个焦点强度大小分布和位置分布。

[0108] 在这种光栅复用结构中，图9展示了0级和1级衍射效率与发光光栅调制深度的关系。图10展示了当调制深度 $\varphi = 0.6\pi$ 时4个焦点的二维分布（图中左半部分），以及左图虚线沿线的强度分布（图中右半部分）。图11则反映了实验测试当闪耀光栅相位深度为 π 时的一阶（上点）和0阶（下点）强度与发光光栅调制相位深度的关系。结合图9和10可以发现，通过改变闪耀光栅的相位深度，可以调节光栅产生的每个焦点的强度。

[0109] 在现有技术中，常规的飞秒激光加工平台的框架简图大致如图12所示，图中，1为上位机，2为飞秒激光器，3为衰减镜，4为振镜，5为加工平台。上位机控制飞秒激光器的光闸开关，飞秒激光器发射的激光光束首先通过衰减片，衰减片调节激光光束的功率大小，然后激光光束到达振镜，通过上位机控制振镜的加工形状，激光光束通过振镜后，对加工平台上的样品进行加工。

[0110] 本实施例中，应用的飞秒激光加工平台的结构部署如图13所示。图中，飞秒激光器的型号为Coherent, Chameleon Vision-S；飞秒激光器首先出射飞秒激光，飞秒激光器产生的激光光源的波长为800nm，频率80MHZ，脉宽75fs，输出功率为2.2W。激光能量和偏振方向通过半波片(P0)与格兰泰勒棱镜(H0)配合来调节，为了达到最好的调制效果，入射激光的偏振方向要和液晶分子的方向相同。

[0111] 接着，调整后的激光经过扩束镜后将飞秒激光扩束，扩束后的激光光斑直径约为10mm，略大于空间光调制器(SLM)的面板，从而保证飞秒激光能够完全覆盖住空间光调制器的面板，充分利用空间光调制器上面的像素点。本实施例中使用的空间光调制器为德国

Holoeye公司的Holoeye Pluto NIR-2,该空间光调制器的分辨率为 1920×1080 ,实际加工时使用中心的 1080×1080 像素(单个像素大小为 $8\mu\text{m}$);扩束后的激光照射到加载调制好的闪耀光栅与达曼光栅复用全息图空间光调制器后,入射光被成功调制。

[0112] 然后,经过空间光调制器调制后的激光光束到达由透镜一(Lens1)、光阑(P)和透镜二(Lens2)构成的4f系统中。本实施例中,考虑到空间光调制器也是一个衍射光学元件,被调制的飞秒激光中会出现多个衍射级;因此采用4f系统对光束进行过滤。在4f系统中,激光光束经过透镜一聚焦后,到达光阑处,光阑滤除未经调制的0级光;其余的经过调制的激光光束由与透镜一共焦的透镜二处理后变为缩束后的平行激光光束。

[0113] 最后,在飞秒激光加工设备的工作机台上方还设有聚焦物镜,聚焦物镜正上方设置一个与水平面呈 45° 夹角的二向色镜(图中倾斜 45° 的镜片),4f系统出射的平行激光光束沿水平方向入射到二向色镜上,经二向色镜折射后进入聚焦物镜并照射在加工平台中的微流控芯片上,经过聚焦物镜($50\times$, $\text{NA}=0.8$)后的激光光束按照预设的焦点阵列对微流控芯片进行加工,在微流控芯片中目标物周围形成固化的微柱。

[0114] 四、目标物锁定

[0115] 飞秒激光加工设备调试完成后,就可以将微流控芯片固定在加工平台的目标区域内。然后通过微流泵将分散体系注入到微流控芯片内;进而找到分散体系内包含的目标物,确定微流控芯片的通道内的目标物的坐标。

[0116] 在初始状态,微流泵按照最小排放速率将分散体系注入到微流控芯片的通道内。微流泵的注入分散体系的过程应当非常缓慢,这可以降低对粒子或细胞造成的损伤,同时避免粒子或细胞团聚,难以有效分辨。基于此,本实施例中的微流泵采用控制精度达到 $\mu\text{L}/\text{min}$ 量级的产品。

[0117] 在微流控芯片内的无法发现目标物时,在需要对其中的分散体系进行更换。此时,微流泵再以最小排放速率缓慢注入新的分散体系,将通道内原有的分散体系完全排净;直至通道内的分散体系中存在满足捕获标准的目标物。

[0118] 为了发现目标物,本实施例的飞秒激光加工设备中设有于获取聚焦物镜下方微流控芯片图像的相机,相加中采用了高分辨率的工业级CCD(charge coupled device)传感器。相机安装在二向色镜上方。二向色镜具有对于特定波长的光线全反射,而对于其它波长的光线可以完全透过的特性。本实施例选择对于激光光线的波长可以全反射,但是对于自然光波长的光线可以全透过的二向色镜。并采用如本实施例中图的 45° 布置方式后,激光光束可以完全反射到加工平台上,实现光固化加工。同时加工平台出的光线可以全透过二向色镜到达上方的CCD处,便于相机获取加工平台上微流控芯片的图像。

[0119] 本实施例中,微流控芯片的图像是由相机通过聚焦物镜获取的,聚焦物镜对于相机而言相当于一个显微镜。相机获取的图像会上传到上位机中,上位机对获取的图像进行预处理,例如进行亮度调整、降噪等,提高图像质量。然后再针对图像进行识别,识别出目标包含图像内的所有目标物。为了降低工作人员的工作负担,本实施例中的图像识别任务可以由现有的基于神经网络的各类识别算法来完成,图像识别算法属于成熟的技术,在本实施例不再赘述。

[0120] 针对算法初步识别出目标物,还可以由人工或上位机按照预先设定的标准进行选择,确定其中可供捕获的目标物。具体地,可供捕获的目标物的选择标准包括:A.选定的目

标物结构完整。B.选定的目标物呈单一的游离状态不发生团聚,且与周围其它目标物的最小间距大于目标物的直径。C.选定的目标物靠近通道中央,且与通道两侧内壁的间距大于拟生成的固化的微柱的直径。

[0121] 以上选择标准总结来说就是希望目标物呈游离状态,周围不要有任何干扰物,同时目标物周围由足够的加工空间,便于在目标物周围构筑“围栏”。

[0122] 当确定出图像中可供捕获的目标物之后,上位机根据该目标物在原始图像中的像素位置,就可以计算出目标物在加工平台上的详细坐标,进而得到目标物在飞秒激光加工设备中的相对坐标。该坐标对应的目标区域就是激光光束理论上应当照射的位置。

[0123] 五、光固化捕获

[0124] 锁定待捕获的目标物后,就可以“收网”了,即进入最后的捕获实施阶段。在该阶段中,飞秒激光器出射的激光经过预设的光路和组件调制后,在聚焦物镜下形成的多条平行的激光光束。平行的激光光束按照预设的多焦点阵列的排布方式透射到锁定的目标物周围,在激光的激发状态下,分散体系中的光刻胶IPL迅速固化形成多条竖直排列的微柱,微柱围绕在目标物周围,像“围栏”一样将目标物困住;进而实现对目标粒子或细胞的“捕获”。

[0125] 如图14所示,在本实施例中,对特定类型的目标物进行初次捕获时,还需要通过微流泵控制微流控芯片内的流体进行往复式流动。使得栅栏内的目标物反复碰撞微柱,测试微柱的结构强度。当某个微柱断裂后,这说明该微柱对应的焦点处的光强较低,但不到预设的固化物强度要求。此时应当标记微柱对应的焦点的序号,然后重新调整达曼光栅或闪耀光栅,增大相应焦点处的光强。当光强调试完成后,保存该达曼光栅和闪耀光栅复用的全息图的相关参数,以后再次捕获该特定目标物,均可以应用该参数,无需重复调试。

[0126] 此外,在每次完成目标物的捕获之后,目标物周围的分散液仍然是含有光刻胶的分散液。本实施例还通过微流泵向微流控芯片注入工作液体,置换其中含有光固化特性的分散液,使得目标物位于拟设置的工作液体中,以便进行后续应用。在这个过程中微流泵应当具有两组供液系统,一组使用含有目标物和光刻胶的分散体系,另一组使用目标物对应的工作液体。例如:在捕获二氧化硅粒子时,可以选择乙醇作为工作液体;在捕获活细胞时,则应当选择PBS缓冲液作为工作液体。当前也可以在微流控芯片的通道上开设两组出入口,通过两组供液系统和微流泵分别用于注入分散体系或工作液体。

[0127] 分散液完全置换结束后,还需要再次通过微流泵控制微流控芯片内的流体往复流动,测试捕获的目标物是否与微柱发生粘连。当流体流动时,中央的目标物不能够随着流体流向轻微移动,则可能是因为固化形成的微柱将目标物粘住了,此时“围栏”对目标物造成了损伤,说明本次捕获任务失败,需要重新选择新的目标物再次捕获。当流体往复流动时,目标物可以在“围栏”内随流体自动地移动,则说明固化微柱与目标物无接触,捕获任务成功。

[0128] 以上测试过程同样解释了在多焦点阵列构建时,阵列的多边形尺寸应当比待捕获的目标物的外径略大一些。多焦点阵列内超过目标粒子外径的部分给微柱的加工过程预留了加工空间和一定的裕度。防止微柱固化成型时对目标粒子造成损伤,实现最终“柔性”捕获的技术效果。

[0129] 此外,需要强调的是,以上内容仅是针对一次捕获一个目标物所作出的解释说明。事实上,在本实施例的方法和系统的应用过程中,可以在一次激光照射过程同时锁定多个

目标物,并在不同位置构筑多个围栏,进而大幅提升对目标物的捕获效率。事实上,基于相同的原理,该方法甚至可以在一次捕获实施过程中分别同步捕获到不同类型的多种粒子或细胞,捕获效率非常高。

[0130] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

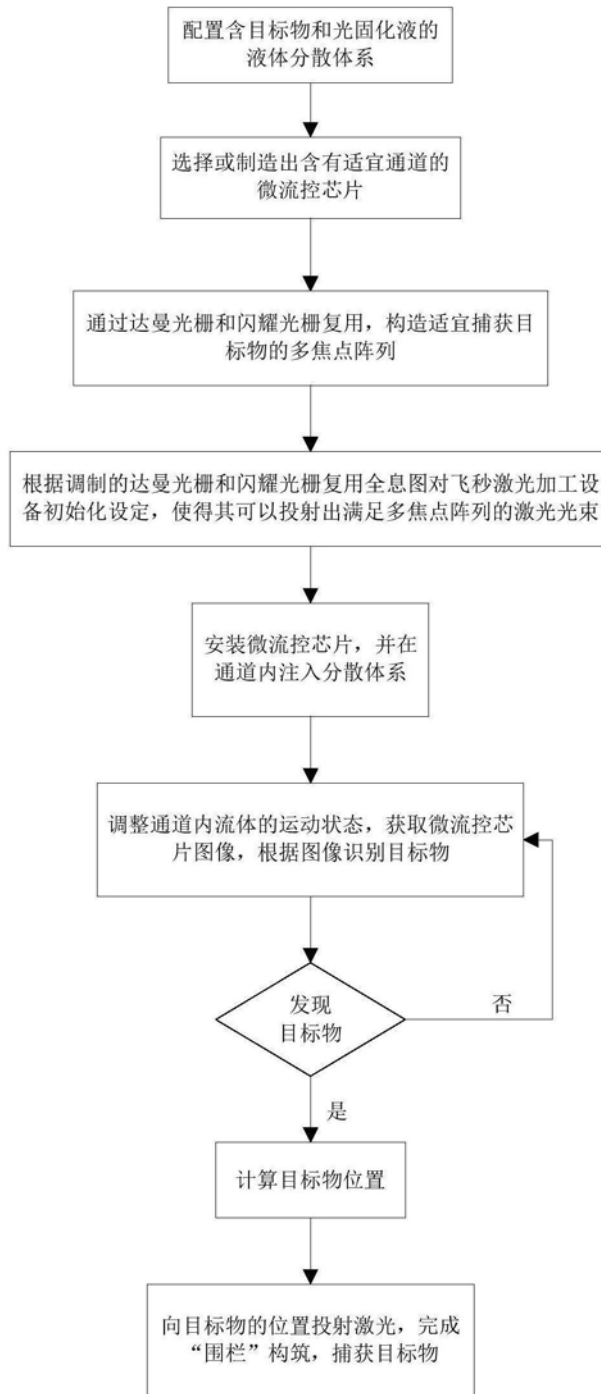


图1

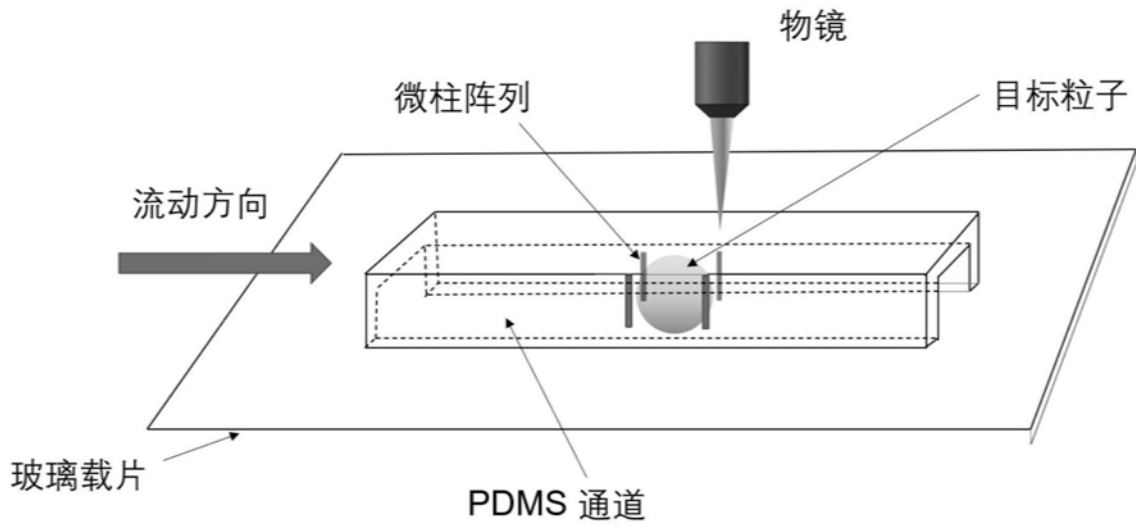


图2

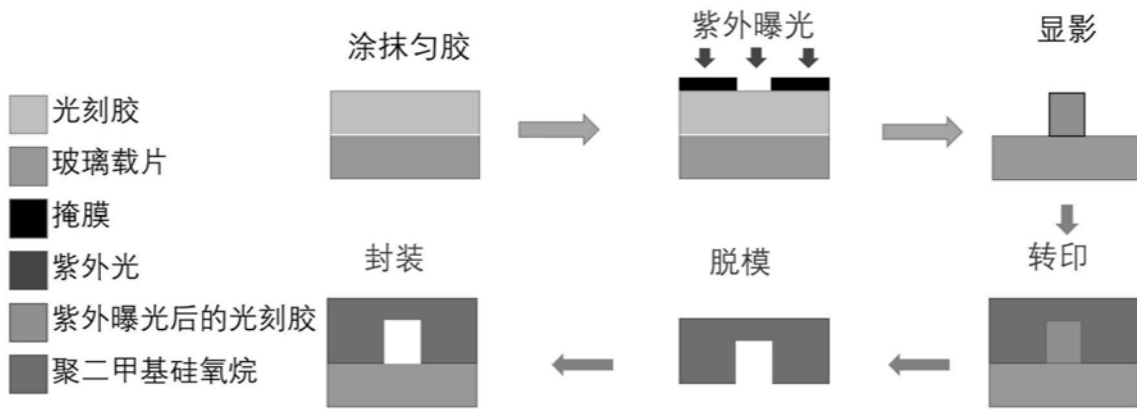


图3

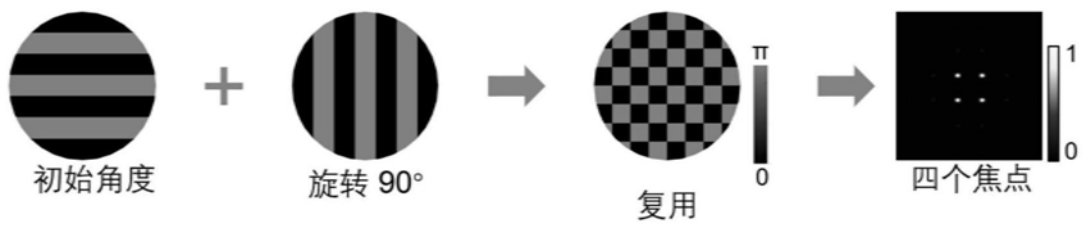


图4

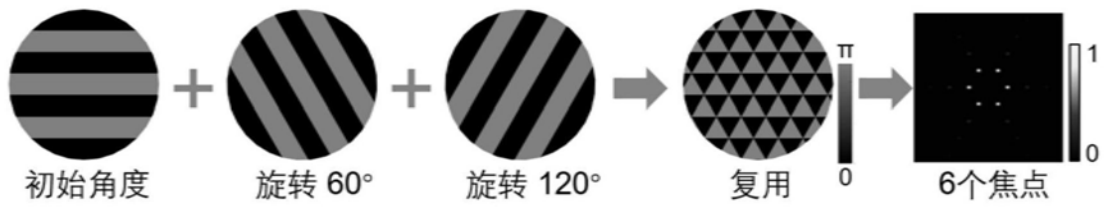


图5

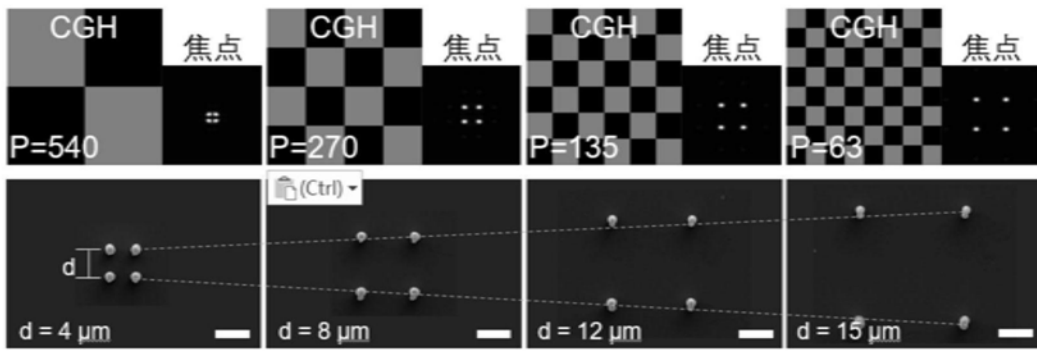


图6

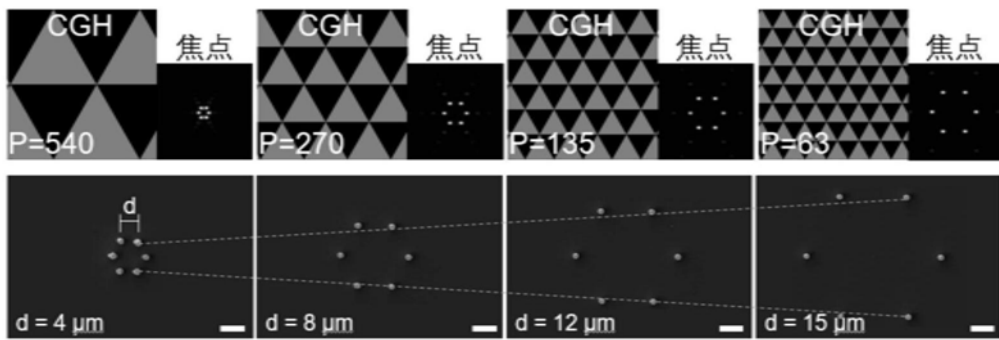


图7

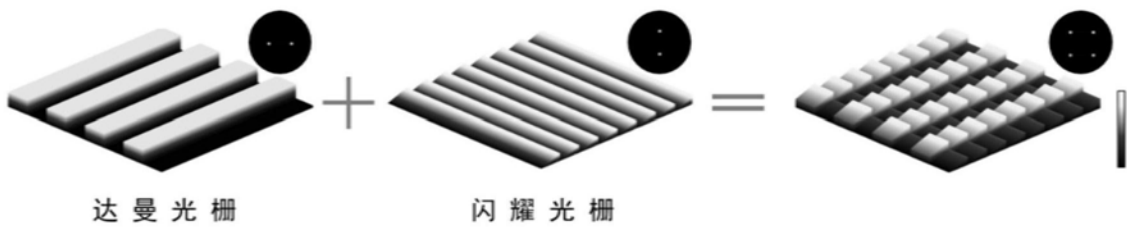


图8

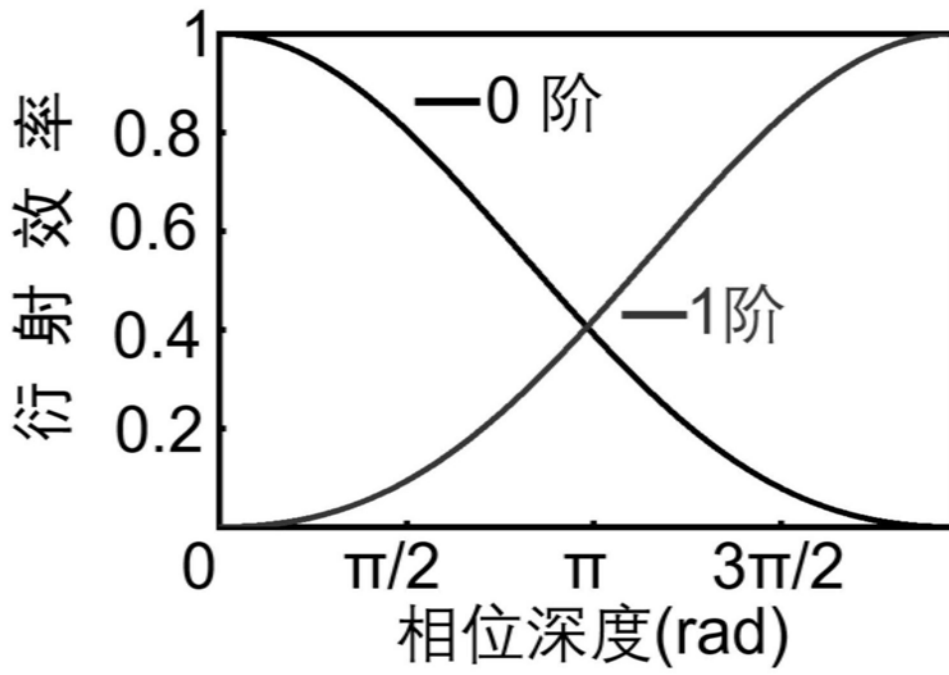
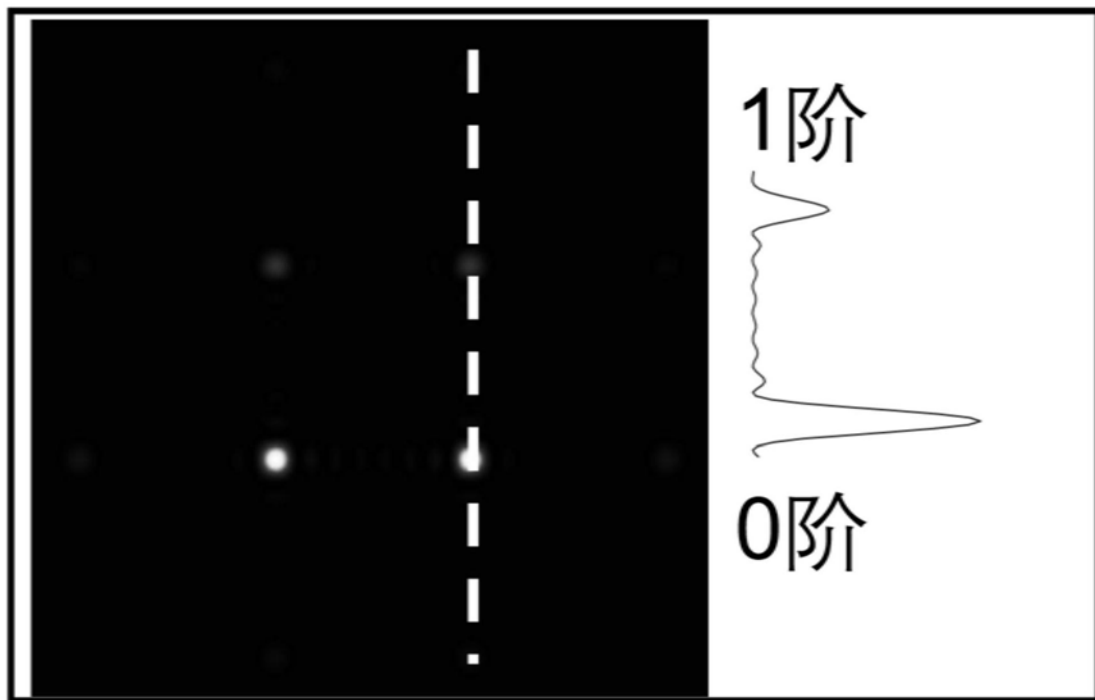


图9



强度分布

图10

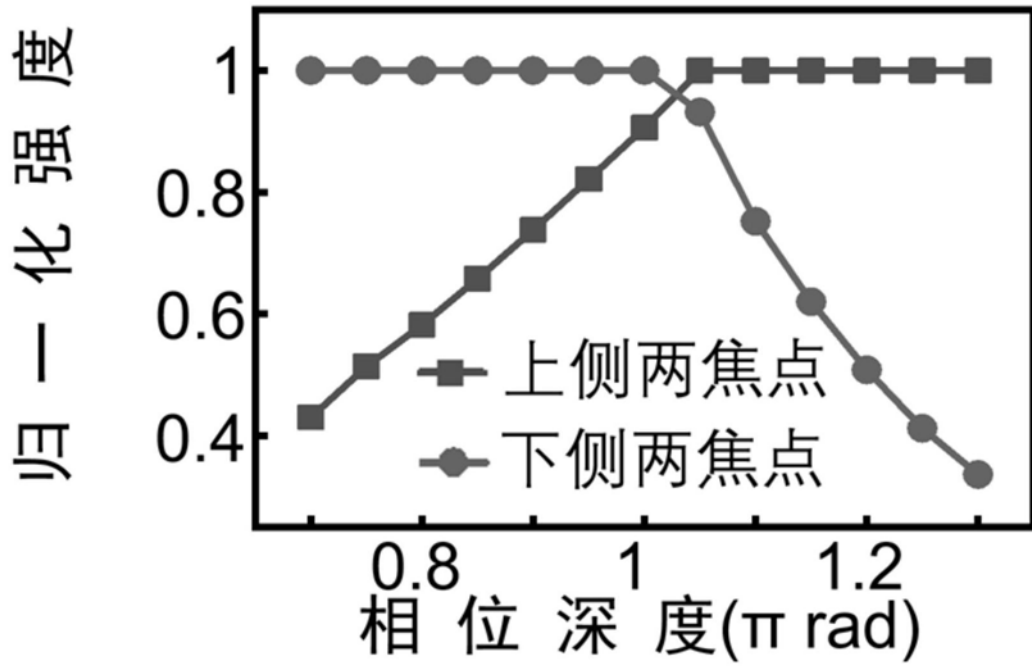


图11

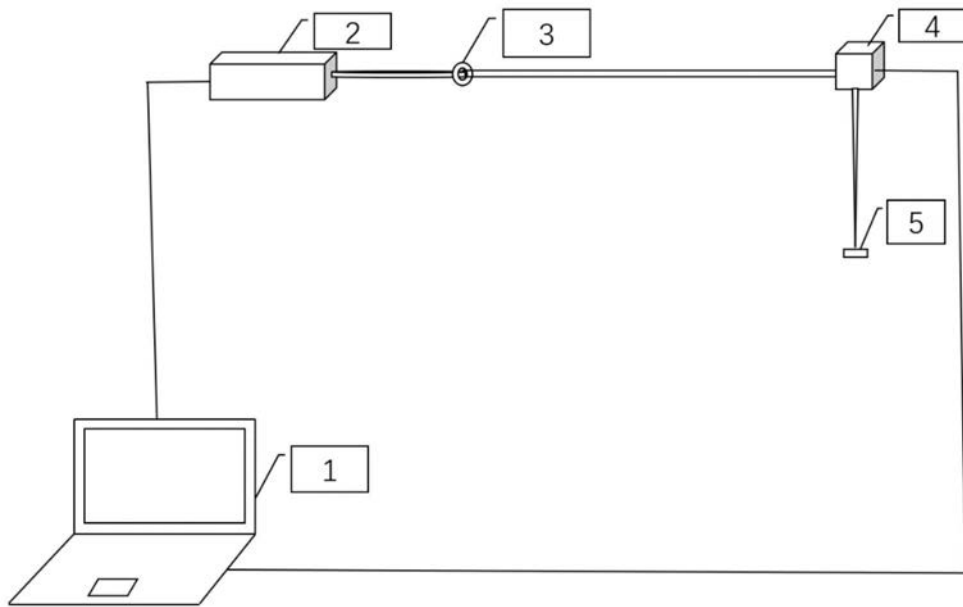


图12

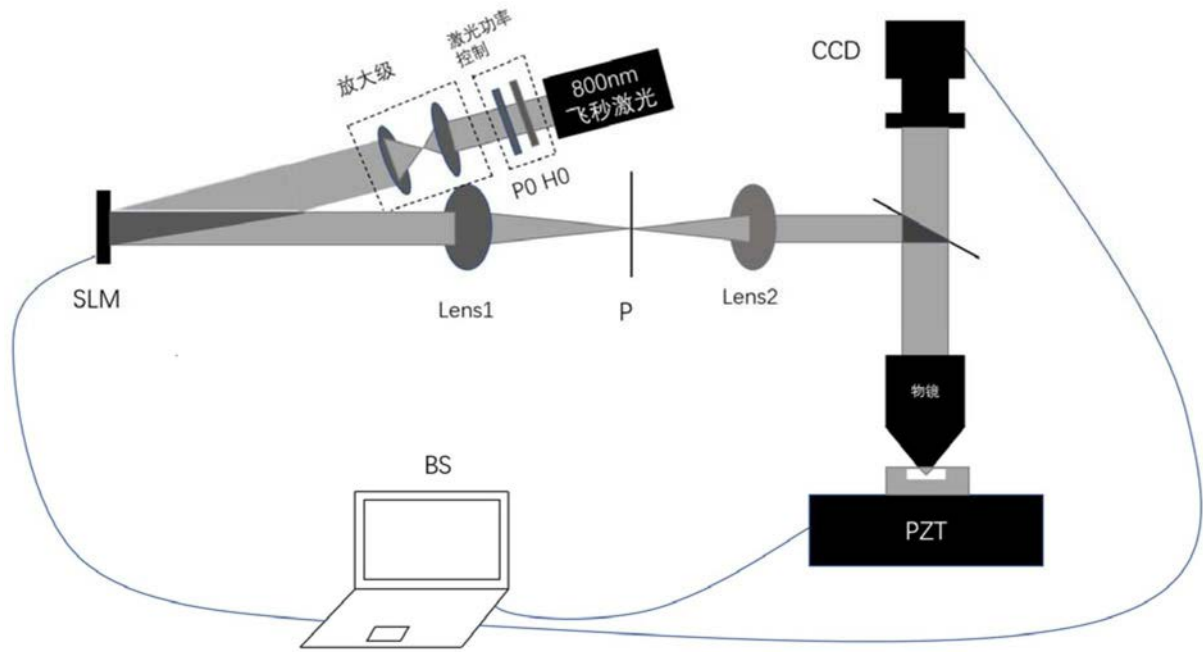


图13

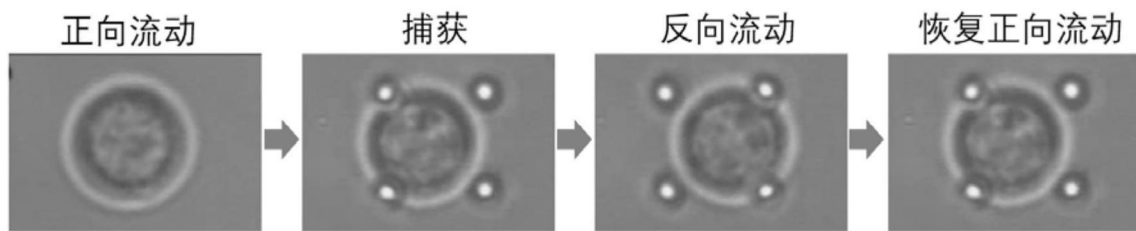


图14