

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01357

## 微流控芯片光学检测技术在细胞研究中的应用与进展

霍丹群<sup>1</sup> 刘振<sup>1</sup> 侯长军\*<sup>1</sup> 杨军<sup>1</sup> 罗小刚<sup>1</sup> 法焕宝<sup>2</sup>  
董家乐<sup>1</sup> 张玉婵<sup>1</sup> 张国平<sup>1</sup> 李俊杰<sup>1</sup>

(重庆大学生物工程学院生物流变科学与技术教育部重点实验室<sup>1</sup>, 化学化工学院<sup>2</sup>, 重庆 400044)

**摘 要** 重点综述了芯片上细胞培养和实时检测的微系统研究及相应检测方法和技术的近年来的进展。总结了多种光学检测方法和技术的优缺点及发展趋势, 讨论了各种方法技术对细胞研究模型的研究适用范围, 探讨各种检测方法和技术的活细胞、单细胞实时无损无标记检测和传感发展前景和研究进展。最后对整个芯片实验室框架下细胞研究及传感微系统的发展方向进行了有益的思路和方法展望。

**关键词** 微流控芯片; 细胞研究; 光学检测; 综述

### 1 引 言

微流控分析芯片是通过微加工技术将微管道、微泵、微阀、微储液器、微电极、微检测元件、窗口和连接器等功能元器件, 像集成电路一样集成在芯片材料上的微全分析系统<sup>[1]</sup>。微流控分析技术已经成为重要的化学及生物分析手段, 其分析的优越性(材料及试剂的低耗、原位分析、快速实时等)在细胞、分子水平检测得以应用和展现, 尤其在细胞研究及应用方面, 由于微流道尺度与细胞良好的相容性, 可以在体外实现对体内细胞环境的高度模拟, 所以在生命科学中的细胞培养、细胞操纵、试样处理及细胞检测方面有诸多应用<sup>[2-4]</sup>, 成为细胞及单个细胞实时检测和研究的平台。许多微流控芯片研究致力于设计创造多功能微系统整合细胞检测中的分析步骤<sup>[5,6]</sup>, 从而在微系统上实现细胞特别是单细胞生理、病理及药理等方面的研究。微流控芯片自身的设计和制作技术、芯片上细胞研究模型和方法的建立离不开检测方法和技术的探索与应用。

目前, 微流控芯片上细胞研究中的检测技术主要采用光学检测和电化学检测<sup>[7,8]</sup>。光学检测灵敏度高、设备简单且易于与微流控芯片相结合, 更有潜力应用于活细胞实时检测。微流控芯片上光学检测方法依原理可分为荧光检测、化学发光和生物发光检测、拉曼光谱检测、折射率检测、热透镜光谱检测和表面等离子激元共振检测等。本文对近年来微流控芯片上细胞研究中的光学检测方法与技术进行综述。

### 2 荧光( Fluorescence ) 检测

荧光化合物在一定的激发波长下可以释放特定的荧光, 而其它物质对特定荧光物质的信号交叉干扰很小, 故而利用荧光光谱可以灵敏地检测荧光物质。荧光检测灵敏度高且易与微流控芯片相结合, 从而使其成为微流控技术中最主要的光学检测方法之一。

荧光检测初时主要通过对细胞成像显示检测芯片上细胞的生长和活动状况<sup>[9,10]</sup>, 后来逐渐应用到细胞膜和细胞组分的研究中。Yager 研究组<sup>[11]</sup>在微流控芯片上对大肠杆菌进行溶膜、提取细胞中  $\beta$ -半乳糖苷酶, 并用荧光标记底物试卤灵-半乳吡喃糖苷( RBG ) 检测  $\beta$ -半乳糖苷酶含量, 最大可以提取到 165 nmol/L 的  $\beta$ -gal, 应用不同的流速设置还可以用于分析其它细胞组分。Farinas 等<sup>[12]</sup>在微流控芯片上用荧光检测分析人 T 淋巴细胞的离子通道活动情况, 用毛细管从微培养板中吸取测试样本与 THP-1

2009-11-26 收稿; 2010-01-31 接受

本文系国家自然科学基金( Nos. 30770568, 30770569 )、国家“863”项目( No. 2006AA04Z349 )、重庆大学研究生创新团队( No. 200909B1008 )资助

\* E-mail: houcj@cqu.edu.cn

细胞混合并进一步与微流道中的电势敏感荧光染料混合,利用膜去极化和超极化时阴离子染料 DiBAC4 和阳离子染料 Syto62 的荧光比率变化测量单细胞膜电势,相对于膜片钳技术而言,是一种简单的细胞离子通道活力检测的方法。

激光诱导荧光(LIF)可以精确控制激发光的参数,其敏感性更高,检出限一般在  $10^{-13} \sim 10^{-9}$  mol/L 之间,因而用 LIF 进行微流控上细胞及其裂解物的检测非常普遍。微流控芯片上 LIF 检测有非共聚焦和共聚焦检测系统两种。激光共聚焦技术可以有效减小样品照射体积,从而减小散射光对灵敏度的影响,因而共聚焦检测系统的信噪比(SNR)较非共聚焦系统高。李永新等<sup>[13]</sup>用 LIF 检测微流控芯片上电泳分离的四种病原微生物 DNA,可检测出  $1 \times 10^2$  cfu/mL 的病原菌。Hellmich 等<sup>[14,15]</sup>用共聚焦 LIF-微流控芯片系统(见图 1)检测单细胞的裂解组分。系统在可见光区可检测  $1 \times 10^{-13}$  mol/L 的荧光素;在紫外区内利用 Trp、Tyr 和 Phe 3 种氨基酸的 LIF 特性完成对蛋白质的分离和无荧光标记检测。他们后续通过减小入射激光的功率和校正共聚焦的针孔将蛋白质和氨基酸的检出限降低了 2 个数量级;再通过在 PDMS 中整合炭黑颗粒和涂覆基于聚氧乙烯的三嵌段共聚物 F108 层芯片表面修饰进一步提高了微流道中蛋白质的分离效率和 LIF 检测的灵敏度,对氨基酸的检出限达到  $2.5 \times 10^{-8}$  mol/L,并在芯片上实现对单细胞中低浓度蛋白质的无标记检测。

许多研究者在微流控荧光检测系统的小型化方面做了有益尝试,将光源和其它微设备组件整合,发展出各种小型化系统用于细胞及生物分子分析<sup>[16-18]</sup>。Joo 等<sup>[17]</sup>将一个发光二极管(LED)、一个固态光电倍增管(SSPM)、聚电解质凝胶电极(PEGs)与玻璃微流控芯片组装在体积  $15 \text{ cm} \times 10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$  的微系统中,这个便携式的微流控细胞计数器可以简单而快速地区用电阻抗和荧光两种检测方式区分细胞和微粒子。Kuhn 等<sup>[18]</sup>设计出小型化的完全芯片整合的电光学陷阱,其激发能水平比常规光学陷阱低 5 个数量级,并运用荧光检测完成大肠杆菌 DNA 的光漂白动力学研究。

微流控荧光检测灵敏性高,影响其自身灵敏度的因素主要来自瑞利和拉曼散射,同时芯片本身背景荧光的去除是提高检测精确度的重要因素,此外检测的小型化将更便于对细胞生理生化反应的检测。特异的荧光探针如量子点及免疫方法的结合,微流控表面图案的设计<sup>[19]</sup>可以省去对分析物的纯化步骤,为芯片上实时、高灵敏度检测提供思路。

### 3 化学发光检测和生物发光检测

化学发光(Chemiluminescence, CL)或是生物发光(Bioluminescence, BL)的强度可以用于确定分析物的浓度,其灵敏度和选择性高、线性反应范围宽,利于对分析物的定量分析。相比于 LIF 检测,由于检测不需要外来光源,因而减少了干扰,也简化了设备对光源的要求,只需要一个光电倍增管和光电二极管作为检测器即可。化学发光及生物发光检测为微芯片检测系统提供简单而相对便宜的设备,符合芯片实验室小型化发展趋势。Heyries 等<sup>[20]</sup>利用化学发光在微流控芯片上实现对过敏特异抗体的检测。用  $\beta$ -乳球蛋白、花生植物凝血素和人 IgG3 种蛋白质作为过敏抗体检测的捕捉试剂,经过一种“PDMS 弹性体大分子转移”法固定在微流控芯片上。在经流体实验得到的最优流速( $20 \mu\text{L}/\text{min}$ )条件下对过敏病人的血清进行测定,均得到阳性免疫反应。证明用微流控技术快速、灵敏地检测蛋白质的小型化学发光 ELISA 的可行性。

电化学发光(ECL)是由电化学反应刺激而产生的化学发光。ECL 不但保持了 CL 的优点,而且光释放反应的时间和位点也可以由电化学反应控制。ECL 试剂的电化学循环产生化学发光试剂信号释

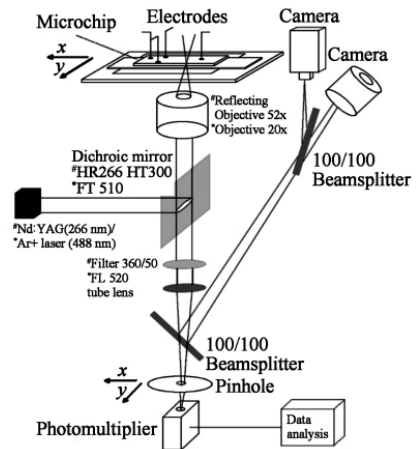


图 1 紫外和可见激光诱导荧光检测系统<sup>[14]</sup>  
Fig. 1 Scheme of setup for UV (#) and VIS (\*) laser induced fluorescence (LIF) detection systems realized on an inverted optical microscope<sup>[14]</sup>

放,可以实现低检出限检测。检测采用较多的是联吡啶钌  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  反应体系,也有许多采用三胺衍生物探针进行羧酸类物质的 ECL 检测<sup>[21]</sup>。Hosono 等<sup>[22,23]</sup>组装了一个由 PDMS 基底流道和玻璃基底三电极组成的微流控系统,可以完成微流道传输、溶液混合和 ECL 检测。通过控制流道中的两个金电极传输并混合氨基酸溶液和联吡啶钌  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ ,再由混合通道中的铂电极施加电场引发 ECL 进行检测。检测 5 种氨基酸 Leu, Val, Pro, Lys 和 His, 显示 ECL 的强度与氨基酸浓度正相关,其中 Pro 的检出限达到 nmol/L 级。之后在此系统中引入自动化阀控制溶液混合并由芯片上电极电势调节 pH 值的恒定,提高了自控性。Pittet 等<sup>[24]</sup>用印刷电路板 (PCB) 技术设计电极和封装环氧基质在微流控芯片上进行 ECL 检测,降低了系统成本。Naseri 等<sup>[25]</sup>则开发了一种微流控芯片上注塑聚苯乙烯导电电极的技术,通过在其表面电子束蒸金或银及电化学形成 AgCl 形成不同的电极,芯片系统可用于 ECL 和伏安法电化学检测。

微流控芯片上 BL 检测则利用细胞自身的发光性质,如利用细胞中具有发光性质的酶,然后依照外界物质对其催化产生发光产物的 BL 信号的影响而检测<sup>[26]</sup>。Elman 等<sup>[27]</sup>首次开发一个包含有全细胞传感器、微光机电系统 (MOEMS) 调幅器和固相光探测器的芯片系统(见图 2)。在细胞传感器模块中应用转化了 lac 启动子质粒的 E. Coli 做为细胞传感模块,用 IPTG (半乳糖苷酶基因的诱导剂) 评价整个系统的检测能力,能检测到 0.1 mmol/L IPTG 作用下细胞的 BL,证明其应用于细胞毒性检测的潜力。Yoo 等<sup>[28]</sup>利用微流控芯片上固定的生物发光细菌检测细胞毒性物质。用聚乙烯乙醇-苯乙炔吡啶 (PVA-SbQ) 在芯片上固定细胞,生物发光随着细胞氧化损伤程度增加而加强,0.88 mmol/L 过氧化氢的加入使得生物发光强度增加 10 倍。Liu 等<sup>[29]</sup>则设计了“Y”型微通道用于样本制备、分离并进行与 ATP 及 ATP 偶联代谢的荧光素-荧光素酶 BL 检测。定量分析表明 ATP 呈现动态的线性范围,检出限低至亚微摩尔。

CL 和 BL 检测选择性和特异性高,但是只适合于特定化学发光试剂和细胞的研究,微流控芯片的设计中多个芯片层及分析检测模块的整合很重要。此外, ECL 中电极的排布应避免分离电极的影响,由此增加了芯片设计和制作的复杂度;选择更广泛的检测试剂将会扩大检测的应用范围。

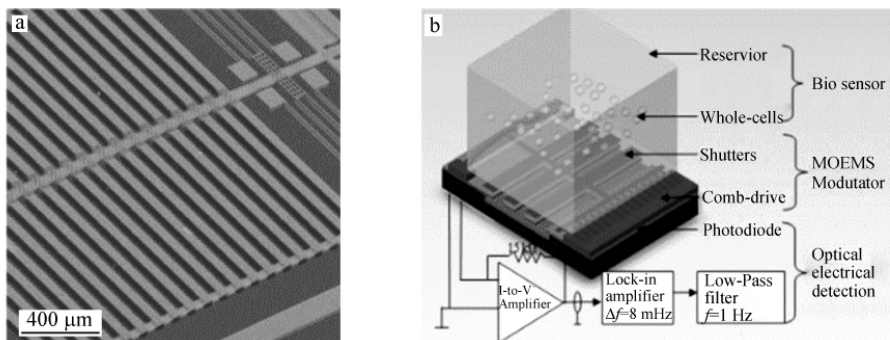


图 2 整合的微光机电系统 (MOEMS) (a) 和细胞传感生物传感芯片实验室系统 (b)<sup>[27]</sup>

Fig. 2 (a) SEM image of a micro-opto-electro-mechanical system (MOEMS) modulator composed of an electrostatic actuator (comb-drive), springs (suspensions), and the shutters. (b) Schematic diagram of integrated device<sup>[27]</sup>

## 4 拉曼 (Raman) 检测

拉曼光谱用来研究系统中分子的震动、转动及其它低频率震荡模型,这些光谱提供的“化学指纹”可以用来鉴定特定分析物。不同于分子红外光谱,极性分子和非极性分子都能产生拉曼光谱,而且由于水分子不会对其光谱产生影响,拉曼光谱不需要分析物绝对干燥。

激光诱导拉曼显微术结合微流控芯片适于对微环境下样本的混合、结构性质的原位探测,结合应用纳米探针<sup>[30]</sup>、染料标记<sup>[31]</sup>、流道表面修饰<sup>[32]</sup>、光学镊子<sup>[32-35]</sup>等技术对细胞及其代谢物无标记实时监测,微芯片拉曼检测是细胞分选、细胞药理、病理研究的新平台。Ramser 等<sup>[32]</sup>将共聚焦微拉曼装置、光学镊子及微流控系统相结合检测单个红细胞在环境刺激中其血红蛋白的氧循环变化过程。采集微流道

中光镊束缚下红细胞在近红外区的拉曼共振光谱,光谱的变化与血红蛋白在光诱导作用下的转换变化相同。这使得细胞内氧合作用循环的实时检测和光诱导化学效应的观察成为可能。黄超等<sup>[33]</sup>用类似体系检测红细胞,证明与常规方法相比,微流控拉曼检测对正常及病例红细胞的区分度更好,检测进程更快。Huang 等<sup>[34]</sup>利用吡啶二羧酸钙(Ca-DPA)在 $1017\text{ cm}^{-1}$ 的特异拉曼光谱,检测光镊束缚下杆菌类单个孢子中 Ca-DPA 含量变化,同时也研究了 SpoVA 蛋白在杆菌孢子化的过程中对 Ca-DPA 摄入的作用,在杆菌细胞孢子化的研究方法上有所创新。此外, Lau 等<sup>[35]</sup>开发了一套拉曼激活细胞分选(RACS)体系进行无标记细胞识别和自动化细胞连续分选,分选了两种白血病细胞系。Wang 等<sup>[36]</sup>则利用相干反斯托克斯拉曼散射(CARS)结合 PDMS 微流控装置(见图 3)进行流式细胞计量。在芯片上横向聚焦液体核心扫描微流道中流动目标,对鼠脂肪细胞进行数量测定。CARS 有很强的反斯托克斯强度,其蓝移导致其很容易与荧光分离,而且有确定的散射方向,比普通拉曼散射更易得到理想的检测信号,故而 CARS 细胞计量术是一种较好的具有震动选择性的定量分析模式。

表面增强拉曼散射(SERS)显微术通过表面共振增强技术可进一步提高拉曼光谱的灵敏度<sup>[37]</sup>,SERS 不仅可以对样品进行光谱研究,还能进行功能性成像,提高了分子分析的信息量。Zhang 等<sup>[38]</sup>将微流控和 SERS 及共聚焦显微分光镜结合原位检测单个 CHO(中国仓鼠卵巢)细胞的光谱,注入伊屋诺霉素连续流并监测细胞在药物诱发下  $\text{Ca}^{2+}$  流的实时拉曼光谱反应。这种方法可用于研究细胞对外界条件刺激下的响应。Li 等<sup>[39]</sup>在硅基质上刻蚀纳米结构形成模板,用此模板构建具有纳米结构的 PDMS 微流道,然后在其上沉积银膜,形成纳米阱(nanowell)结构,实验证明在纳米阱上 Ag SERS 基质的拉曼散射信号比普通 PDMS 上平滑 Ag 镀层的信号强  $10^7$  倍。此外,在微流道中形成微液滴再进行 SERS 检测也是一种有效的定量分析方法,细胞和微生物可被包被到微液滴中,然后进行实时 SERS 检测和定量分析。Popp 等<sup>[40,41]</sup>用 SERS 检测微流道中液/液片流中的分析物,微片流的体积小至 180 nL。这种方法克服了常规粘附胶体/分析聚合物在光学玻璃上留下的曲线痕迹(即记忆效应)的影响,提高了定量分析的重复性。进一步地用同位素标记液液片流作为内标准进行烟碱和吡啶 SERS 光谱的定量分析。这种微流道中内标准的建立进一步提高了 SERS 光谱分析的可重复性和对照性。

拉曼光谱的空间和时间分辨率高,适于对细胞及其生物分子的实时监测,微流道表面的处理和样液处理方式非常重要,检测时要选择微流控芯片的基质种类和厚度及检测波长以减小背景荧光干扰。

## 5 折射率(Refractive index, RI) 检测

材料的折射率是电磁波在真空中的传播速度与它在介质中的传播速度的比值,是一个衡量电磁波在材料内部传播减慢的物理量。折射率检测对于环境温度、压力或是流速非常敏感,与微流控设备结合并精确地控制外部条件后可以检测多种分析物,尤适于荧光等其它方法不能检测的非离子、无紫外吸收、无荧光的物质如蔗糖、PEG 等的检测。

细胞的折射率是一个显著的细胞生物物理性质,折射率依细胞和细胞核的大小及表面性质的不同而有差异。折射率也对外围的缓冲液非常敏感,对细胞 RI 的检测有潜力用于癌症和疾病的诊断。Lue 等<sup>[42]</sup>在微流道上对细胞用希尔伯特相显微镜法进行定量相位显像提取,测量培养细胞的平均折射率。而许多有效的 RI 检测是在微流控芯片上构造法布里-珀罗谐振腔,在其中固定单个细胞,然后依照细胞自身性质的不同及测量条件的改变而区分不同单细胞。依此方法,Shao 等<sup>[43,44]</sup>在微流控芯片上实现

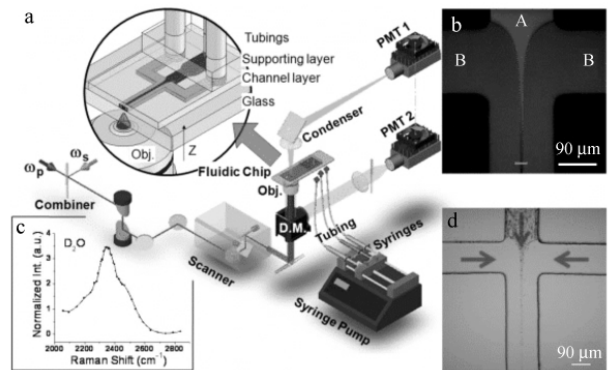


图 3 CARS 细胞计量检测系统和芯片上流体聚焦效应<sup>[36]</sup>

Fig. 3 Schematic diagram of coherent anti-stokes Raman scattering(CARS) cytometry and imaging illustration of the hydrodynamic focusing effect<sup>[36]</sup>

了红细胞、白细胞和酵母细胞的区分,也通过正常淋巴细胞和两类淋巴瘤细胞系(Oswald 和 1771)间细胞核的差异导致的内腔式光谱的不同结合有效折射率模型计算区分细胞。Liu 领导的研究组利用相同的原理设计小型 RI 检测的微流控芯片并进行对细胞 RI 检测的研究<sup>[45,46]</sup>。检测系统由微芯片上微通道、小角膜接触镜和外部空腔激光器组成。光源是尺度为  $215\ \mu\text{m} \times 300\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$  的激光二极管,用镀金的镜面构建外围空腔,设计了一个微镜头使得激光器可以聚焦到单个细胞上。实验结果证明,5 种癌细胞的折射率(1.392 ~ 1.401)高于正常细胞的折射率(1.35 ~ 1.37)。随后他们<sup>[47]</sup>在微流控芯片上构建光栅共振腔,用光纤引导激光进行单个活细胞 RI 检测,微流控芯片集成细胞注入、液滴分离、缓冲液调节和纤维布拉格光栅(FBG)功能(见图 4)。这种光学陷阱技术减小了不确定因素和对细胞的损伤,使得单细胞检测简便、无损。类似的,St-Gelais 等<sup>[48]</sup>发展了一个集成有垂直刻蚀的硅布拉格反射镜的微芯片 RI 传感器,进行芯片上法布里-珀罗谐振光谱 RI 检测,得到 907 nm/RIU 敏感度和  $1.7 \times 10^{-5}$  RIU 的分辨率。

此外,Ymeti 等<sup>[49]</sup>将一个光学四通道小干涉仪整合在微流控系统中,形成一个小光学传感系统。4 个微流道为进样分析通道,而光学四通道小干涉仪为传感窗口。在相互反应长度为 4 mm 的情况下,折射率的分辨率相当于  $6 \times 10^{-8}$ ,对应于蛋白质的质量覆盖分辨率为  $20\ \text{fg}/\text{mm}^2$ 。Kim 等<sup>[50]</sup>通过扫描玻璃样本中的激光脉冲串将光学波导结构整合到微流道中进行单个红细胞处理和折射率及荧光检测。

RI 检测避免了荧光标记和化学修饰对细胞的影响,适于对细胞自然状态的监测。检测对激光光源及对外部条件如温度、压力和流速的控制要求很高,特殊光学检测结构的设计及光纤等的应用使得微流控 RI 检测系统更接近于芯片实验室的概念。

## 6 热透镜显微(Thermal lens microscopy, TLM) 检测

热透镜技术有两个激光器产生两柱激光,其中激发光柱激发样本,探针光柱测量折射率的变化。由于光吸收分子的浓度与热透镜效应成线性相关关系,所以通过测量由于 TLS 导致的探针光柱的会聚或分散可以进行定量分析<sup>[51]</sup>。TLM 适于结合微流道检测,因为微流控芯片中矩形流道中的检测比在圆形的毛细管中更容易校准。Kitamori 及其研究组在微流控芯片上细胞培养及 TLM 检测分析方面多有建树<sup>[52~58]</sup>。

微流控芯片上细胞培养和对流体的控制,可以高度模拟细胞在体内的真实环境<sup>[52]</sup>,而 TLM 可以实时无标记地监测细胞对外界刺激条件的响应。Jang 等<sup>[53]</sup>用 TLM 在微流控芯片上研究了流体切应力对成骨细胞分泌表达蛋白的影响。在连续灌流的玻璃微芯片系统中培养可表达 GFP 标记基因的鼠 MC-3T3 E1 成骨细胞,用 TLM 测量芯片上碱性磷酸酶(ALP)的表达,证明在微流道中,切应力( $0.07\ \text{dyne}/\text{cm}^2$ )作用能增加成骨细胞的 GFP 表达和分化;另外在含有骨形成蛋白 2 的分化培养基中,微流道中细胞培养上清液中 ALP 活性达到常规 48 孔板静态培养下活性的 10 倍。此微芯片细胞培养系统能自动化长时期(10 天)监测细胞并进行成骨细胞分化分析。Sato 等<sup>[54]</sup>用石英玻璃微流控芯片培养鼠海马神经细胞模拟神经网络,然后将含有神经递质谷氨酸的溶液注入到芯片上刺激培养的神经元释放逆行信使分子花生四烯酸,之后用 UV-TLM 检测分析。测量的信号强度依赖于谷氨酸溶液的浓度,而且神经元释放逆行信使分子也与谷氨酸溶液的浓度相关。这个系统适合于细胞释放超痕量化学物质的时间变化监测。

微流控芯片 TLM 检测系统还可以模拟和监测细胞体内环境下对多种刺激条件的细胞响应,用于代谢和药物筛选。Goto 等<sup>[55]</sup>在玻璃芯片上培养巨噬细胞样细胞,通过控温设备控制芯片 3 个不同区域温度不同,然后用 TLM 监测细胞在脂多糖刺激下 NO 的释放过程(见图 5)。与常规方法相比,对于 NO 的检出限从  $1 \times 10^{-6}\ \text{mol}/\text{L}$  降低到  $7 \times 10^{-8}\ \text{mol}/\text{L}$ ,检测时间由 24 h 缩短到 4 h。

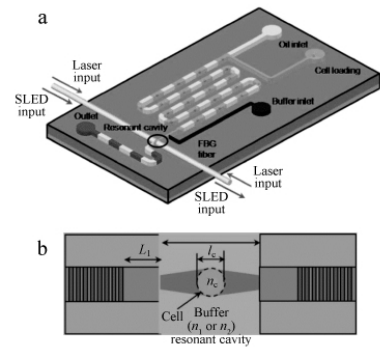


图 4 生物芯片和纤维布拉格光栅<sup>[47]</sup>

Fig. 4 (a) Schematic diagram of bioChip design and (b) fiber Bragg grating(FBG) resonant cavity<sup>[47]</sup>

TLM 由于其高检测灵敏性和高分辨率,还用于监测微流道上单个细胞表面<sup>[56, 57]</sup>及内部分子<sup>[58]</sup>的分布情况,并且可以定量检测识别目标分子。Tamaki 等<sup>[58]</sup>用小型 TLM 结合微芯片监测成神经细胞瘤-神经胶质瘤杂交细胞中细胞色素 C 在凋亡过程中由线粒体到胞质溶胶中的分布过程。在芯片微槽(体积为 1  $\mu\text{L}$ )中培养细胞以模拟细胞的体内环境,在微流道进行流体操纵和检测,细胞色素 C 的含量约为  $10^{-20}$  mol。此外 Kakuta 等<sup>[59]</sup>发展了一种芯片上 TLM 免疫分析检测方法,在凝胶上检测了脑钠素与其抗体相互作用的结合活性。

TLM 检测极其灵敏,与微流控结合对于细胞研究的模型已经建立起来,可以对单个细胞无创、实时检测,将是微系统的一个重要发展应用技术。检测时需要精细的光学校准以达到检测的最佳配置。

## 7 表面等离子激元共振(Surface plasmon resonance, SPR)检测

微流控 SPR 检测最主要的特点是对界面上生物分子相互作用的无标记实时监测,通过对生物反应过程中 SPR 的动态变化监测获取生物分子相互作用的特异信号。检测对象一般是具有配体和受体特异结合性质的核酸、蛋白质、酶及抗体等生物分子,尤其适合对免疫反应的过程监测和定量分析,这种对分子特异反应的实时监测也用于细胞的检测和传感。

微流控芯片对流体控制可以减少反应时间和样本消耗,同时增加配体与膜表面受体的结合特性,SPR 图像实时监测生物分子复合体的形成及变化。Garcia-Aljaro 等<sup>[60]</sup>用微流控 SPR 传感器检测废水中的大肠杆菌噬菌体。利用卵白素-生物素将噬菌体宿主 E. coli WG5 固定在金传感芯片上,然后加入大肠杆菌噬菌体检测 SPR 的特异信号。噬菌体-宿主间相互作用使 E. coli WG5 裂解使得传感芯片表面质量密度增加,实时记录相应的 SPR 信号进行检测,检出限约为 102 PFU/mL。Lei 等<sup>[61]</sup>将微泵、微通道和 SPR 生物传感器集成在一个 PMMA 芯片上(见图 6),用 SPR 信号监测芯片上 RPMI-1640 培养基中鼠 L929 细胞在胰酶加入前后的细胞粘附与脱附过程,整个体系对于监测细胞在药物作用下活力的变化非常实用,而且是研究溶液体系的变化对特定生物分子间相互作用影响的有效平台。

SPR 检测另外一个特点是可以检测溶液中可被捕获或是沉积在界面表面上的分子及细胞,因而无需分离纯化溶液中的特异分析物。Kim 等<sup>[62]</sup>在微芯片上集可表达 GST-GFP(谷胱甘肽 S 转移酶绿色荧光蛋白)的 E. Coli 细胞培养、溶膜、及 GST-GFP-谷胱甘肽酰金表面亲和纯化及 SPR 图像检测于一体,可在芯片上直接进行 SPR 检测,省去了 GST-GFP 的纯化步骤,整个检测敏感而且特异。类似地, Yang 等<sup>[63]</sup>在微流道中快速定量分析唾液中皮升级的 IL-8,依照其含量辅助诊断口腔癌细胞的存在,对唾液中 IL-8 的检出限为 184 pmol/L。另外 SPR 只检测与抗体结合的细胞,溶液中的细胞并不被检测到,故适用于细胞在自然状态下与表面相互作用的研究。Suraniti 等<sup>[64]</sup>用一个 SPR 抗体微阵列金薄层芯片选择性地检测血液中的淋巴细胞。在芯片表面固定吡

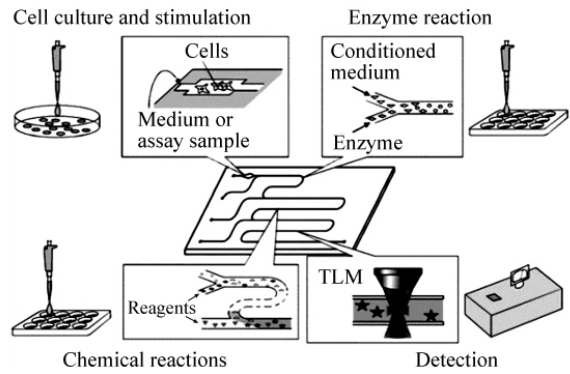


图 5 基于微芯片的生物分析系统<sup>[55]</sup>

Fig. 5 Concept of the microchip-based integrated bioassay system<sup>[55]</sup>

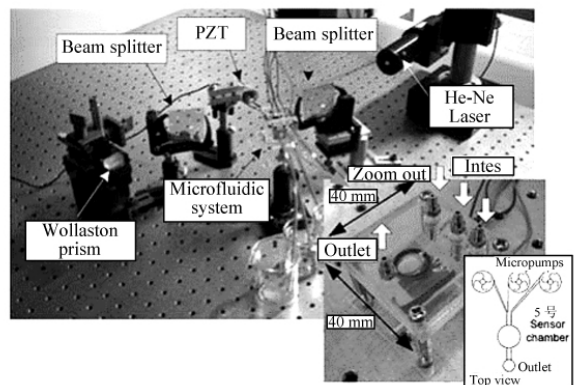


图 6 微流控 SPR 生物传感器<sup>[61]</sup>

Fig. 6 A photograph of the polymer-based microfluidic system integrated with a SPR biosensor. The size of the whole chip is 40 mm  $\times$  40 mm. There are three independent inlets for three different solutions<sup>[61]</sup>

咯偶联的抗体,然后检测流经的血液样品,采集不同细胞加入时阵列中抗体反射率的变化曲线和 SPR 图像而实时监测抗体对应淋巴细胞的存在和数量。这个系统适用于细胞粘附动力学研究及小型诊断系统的开发应用。

此外在微流控芯片上运用阵列的方式可以同时进行对照及平行样实验,在提高检测通量的同时增加数据的质量<sup>[65]</sup>。因为芯片上内部对照的设计可以校正反应中非特异性结合及仪器漂变。Taylor 等<sup>[66]</sup>用前后十字交叉的方法制备 3×3 微阵列,并在其表面组装液体柱双层阵列进行可寻址生物传感,实时监测不同蛋白质的活力,整个分析检测步骤都由 SPR 实时监测便于对问题的发现及对反应过程条件的优化。

SPR 检测结合免疫学方法可以实时无标记监测细胞及其代谢物分子的变化,良好的表面反应特性结合高特异的免疫学反应,是微系统上细胞研究的良好平台,芯片的制作要求较高,检测需要对微流道表面镀金膜或是与有金膜的芯片相结合,但是可以用于长时间的监测。

## 8 总结与展望

微流控芯片的光学检测方法多样,而且一个芯片上可以集成多种检测辅助手段,利用微流控芯片对细胞的操纵如流体切应力作用、液滴化处理,再结合使用光学镊子、纳米技术、表面处理等手段往往可以使检测更加灵敏和简便;此外多种检测技术的结合应用可以扩展检测的信号范围和精度<sup>[17,50]</sup>,显示了微流控芯片检测方法的多样化和集成化。另外一个趋势是向着小型化、便携化发展,通过将光源、激光器、分析组件等检测元件小型化,减小检测的损耗和体积,发展出简易的现场、实时检测分析系统,向着芯片实验室的方向发展。

微流控上细胞研究中光学检测技术的发展使得细胞及生物分子的检测进入微米级、纳米级及更小级别的检测,对试剂的低耗、试样的痕量、高精度分析使得微流控高通量检测更加成熟,为生物微纳系统的发展起着重要的促进作用。但现有检测方法对活细胞不同生命周期无创、实时、多成分的动态信息检测和传感仍有很大挑战,新的检测思路和方法仍需发展,同时芯片上细胞检测及传感应当越简单实用越好,最好用图像及颜色信息就可以分析。如仅仅采用 CCD<sup>[67]</sup>或是微流控光学显微镜(OFM)<sup>[68]</sup>就可以完成信号采集,这样利于对细胞的无损检测及系统的小型化和便携化,也更便于现场实时检测。微流控芯片上微阵列、新敏感材料如卟啉、特异探针和形状记忆聚合物等的应用将为微流控系统上细胞检测提供有益的思路和借鉴。另外小型化设备及微电子系统如小型二极管激光器、LED、光纤及 ARM 嵌入式系统的应用将使检测系统的成本更低廉,更便于使用。

## References

- 1 Qin D, Xia Y N, Rogers J A, Jackman R J, Zhao X M, Whitesides G M. *Top. Curr. Chem.*, **1998**, 194: 1 ~ 20
- 2 Ye N N, Qin J H, Shi W W, Liu X, Lin B C. *Lab. Chip*, **2007**, 7(12): 1696 ~ 1704
- 3 Luo C X, Zhu X J, Yu T, Luo X J, Ouyang Q, Ji H, Chen Y. *Biotechnol. Bioeng.*, **2008**, 101(1): 190 ~ 195
- 4 Tan H Y, Loke W K, Tan Y T, Nguyen N T. *Lab. Chip*, **2008**, 8(6): 885 ~ 891
- 5 Dittrich P S, Manz A. *Nature Rev. Drug Discov.*, **2006**, 5(3): 210 ~ 218
- 6 Ma B, Zhang G H, Qin J H, Lin B C. *Lab. Chip*, **2009**, 9(2): 232 ~ 238
- 7 Cheng H, Huang W H, Chen R S, Wang Z L, Cheng J K. *Electrophoresis*, **2007**, 28(10): 1579 ~ 1586
- 8 Wang L, Zhu J, Deng C, Xing W L, Cheng J. *Lab. Chip*, **2008**, 8(6): 872 ~ 878
- 9 Inoue I, Wakamoto Y, Moriguchi H, Okano K, Yasuda K. *Lab. Chip*, **2001**, 1(1): 50 ~ 55
- 10 Li H B, Bashir R. *Sens. Actuators B*, **2002**, 86(2-3): 215 ~ 221
- 11 Schilling E A, Kamholz A E, Yager P. *Anal. Chem.*, **2002**, 74(8): 1798 ~ 1804
- 12 Farinas J, Chow A W, Wada H G. *Anal. Biochem.*, **2001**, 295(2): 138 ~ 142
- 13 Li Yong-Xin(李永新), Li Yuan-Qian(黎源倩), Qu Ling-Li(渠凌丽), He Cheng-Yan(何成艳). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(12): 1667 ~ 1671
- 14 Hellmich W, Pelargus C, Leffhalm K, Ros A, Anselmetti D. *Electrophoresis*, **2005**, 26(19): 3689 ~ 3696
- 15 Hellmich W, Greif D, Pelargus C, Anselmetti D, Ros A. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1130(2): 195 ~ 200

- 16 CHENG Yong-Qiang(程永强), ZHANG Tao(张涛), WANG E(王鶚), WANG Wei(王伟), XU Guang-Ming(徐光明), FANG Qun(方群). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(1): 127 ~ 131
- 17 Joo S, Kim K H, Kim H C, Chung T D. *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 25(6): 1509 ~ 1515
- 18 Kuhn S, Phillips B S, Lunt E J, Hawkins A R, Schmidt H. *Lab Chip*, **2010**, 10(2): 189 ~ 194
- 19 Gleghorn J P, Pratt E D, Denning D, Liu H, Bander N H, Tagawa S T, Nanus D M, Giannakakou P A, Kirby B J. *Lab. Chip*, **2010**, 10(1): 27 ~ 29
- 20 Heyries K A, Loughran M G, Hoffmann D, Homsy A, Blum L J, Marquette C A. *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 23: 1812 ~ 1818
- 21 Yin X B, Du Y, Yang X R, Wang E K. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1091(1-2): 158 ~ 162
- 22 Hosono H, Satoh W, Fukuda J, Suzuki H. *Sens. Actuators B* **2007**, 122(2): 542 ~ 548
- 23 Hosono H, Satoh W, Toya M, Morimoto K, Fukuda J, Suzuki H. *Sens. Actuators B* **2008**, 132(2): 614 ~ 622
- 24 Pittet P, Lu G N, Galvan J M, Ferrigno R, Stephan K, Blum L J, Bouvier B L. *Mater. Sci. Eng. C* **2008**, 28: 891 ~ 895
- 25 Naseri N G, Baldock S J, Economou A, Goddard N J, Fielden P R. *lectroanalysis*, **2008**, 20(4): 448 ~ 454
- 26 Maehana K, Tani H, Kamidate T. *Anal. Chim. Acta.*, **2006**, 560(1-2): 24 ~ 29
- 27 Elman N M, Yoav H B, Sternheim M, Rosen R, Krylov S, Diamand Y S. *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 23(1): 1631 ~ 1636
- 28 Yoo S K, Lee J H, Yun S S, Gu M B, Lee J H. *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, 22(8): 1586 ~ 1592
- 29 Liu B F, Ozaki M, Hisamoto H, Luo Q M, Utsumi Y, Hattori T, Terabe S. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(2): 573 ~ 578
- 30 Liu G, Rosa-Bauza Y, Salisbury C, Craik C, Ellman J, Chen F, Lee L. *J. Nanoscience Nanotechnology*, **2007**, 7(7): 2323 ~ 2330
- 31 Park T, Lee S, Seong G H, Choo J, Lee E K, Kim Y S, Ji W H, Hwang S Y, Gweond D G, Lee S. *Lab. Chip*, **2005**, 5(4): 437 ~ 442
- 32 Ramser K, Enger J, Goksör M, Hanstorp D, Logg K, Käll M. *Lab. Chip*, **2005**, 5(4): 431 ~ 436
- 33 HUANG Chao(黄超), WANG Qiang(王强), YAO Hui-Lu(姚辉璐), WANG Gui-Wen(王桂文), LI Yong-Qing(黎永青). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(10): 1410 ~ 1414
- 34 Huang S, Chen D, Pelczar P, Vepachedu V, Setlow P, Li Y. *J. Bacteriol.*, **2007**, 189(13): 4681 ~ 4687
- 35 Lau A, Lee L. *Chan J. Lab Chip*, **2008**, 8(7): 1116 ~ 1120
- 36 Wang H W, Bao N, Le T T, Lu C, Cheng J X. *Opt. Express*, **2008**, 16(8): 5782 ~ 5789
- 37 Yea K H, Lee S, Kyong J B, Choo J, Lee E K, Jooc S W, Lee S. *Analyst*, **2005**, 130(7): 1009 ~ 1011
- 38 Zhang X, Yin H, Cooper J, Haswell S. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 390(3): 833 ~ 840
- 39 Li G L, Lee L P. *Appl. Phys. Lett.*, **2005**, 87(7): 074101-1 ~ 074101-3
- 40 Strehle K, Cialla D, Rosch P, Henkel T, Kohler M, Popp J. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(4): 1542 ~ 1547
- 41 Marz A, Ackermann K, Malsch D, Bocklitz T, Henkel T, Popp J. *J. Biophotonics*, **2009**, 2(4): 232 ~ 242
- 42 Lue N, Popescu G, Ikeda T, Dasari R R, Badizadegan K, Feld M S. *Optics Letters*, **2006**, 31(8): 2759 ~ 2761
- 43 Shao H, Kumar D, Lear K L. *Ieee Sens. J.*, **2006**, 6(6): 1543 ~ 1550
- 44 Shao H, Wang W N, Lana S E, Lear K L. *Ieee Photonics Technol. Letters*, **2008**, 20(5-8): 493 ~ 495
- 45 Liang X J, Liu A Q, Lim C S, Ayi T C, Yap P H. *Sens. Actuators A*, **2007**, 133(2): 349 ~ 354
- 46 Song W Z, Zhang X M, Liu A Q, Lim C S, Yap P H, Hosseini H M M. *Appl. Phys. Lett.*, **2006**, 89(20): 203901
- 47 Chin L K, Liu A Q, Lim C S, Zhang X M, Ng J H, Hao J Z, Takahashi S. *Appl. Phys. Lett.*, **2007**, 91(24): 234901
- 48 St-Gelais R, Masson J, Peter Y A. *Appl. Phys. Lett.*, **2009**, 94(24): 243905-1 ~ 2
- 49 Ymeti A, Kanger J S, Greve J, Besselink G A J, Lambeck P V, Wijn R, Heideman R G. *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 20(7): 1417 ~ 1421
- 50 Kim M, Hwang D J, Jeon H, Hiromatsu K, Grigoropoulos C P. *Lab. Chip*, **2009**, 9(2): 311 ~ 318
- 51 Uchiyama K, Hibara A, Kimura H, Sawada T, Kitamori T. *Jpn. J. Appl. Phys.*, **2000**, 39(9A): 5316 ~ 5322
- 52 Tanaka Y, Kikukawa Y, Sato K, Sugh Y, Kitamori T. *Anal. Sci.*, **2007**, 23(3): 261 ~ 266
- 53 Jang K, Sato K, Igawa K, Chung U I, Kitamori T. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 390(3): 825 ~ 832
- 54 Sato K, Egami A, Odake T, Tokeshi M, Aihara M, Kitamori T. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1111(2): 228 ~ 232
- 55 Goto M, Sato K, Murakami A, Tokeshi M, Kitamori T. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(7): 2125 ~ 2131

- 56 Kimura H , Nagao F , Kitamura A , Sekiguchi K , Kitamori T , Sawada T. *Anal. Biochem.* , **2000** , 283( 1) : 27 ~ 32
- 57 Kimura H , Sekiguchi K , Kitamori T , Sawada T , Mukaida M. *Anal. Chem.* , **2001** , 73( 17) : 4333 ~ 4337
- 58 Tamaki E , Sato K , Tokeshi M , Sato K , Aihara M , Kitamori T. *Anal. Chem.* , **2002** , 74( 7) : 1560 ~ 1564
- 59 Kakuta M , Takahashi H , Kazuno S , Murayama K , Ueno T , Tokeshi M. *Meas. Sci. Technol.* , **2006** , 17( 12) : 3189 ~ 3194
- 60 Garcia-Aljaro C , Munoz-Berbel X , Jenkins A T A , Blanch A R , Munoz F X. *Appl. Environ. Microbiol.* , **2008** , 74( 13) : 4054 ~ 4058
- 61 Lei K F , Law W C , Suen Y K , Li W J , Yam Y , Ho H P , Kong S K. *Proc. IMechE , Part H* **2007** , 221( 2) : 129 ~ 141
- 62 Kim M , Lee S Y , Choi H , Shin Y B , Jung S O , Kim M G , Chung B H. *Eur Biophys J* , **2006** , 35( 8) : 655 ~ 662
- 63 Yang C Y , Brooks E , Li Y , Denny P , Ho C M , Qi F X , Shi W Y , Wolinsky L , Wu B , Wong D T W , Montemagno C D. *Lab. Chip* , **2005** , 5( 10) : 1017 ~ 1023
- 64 Suraniti E , Sollier E , Calemczuk R , Livache T , Marche P N , Villiers M B , Roupioz Y. *Lab. Chip* , **2007** , 7( 9) : 1206 ~ 1208
- 65 Eddings M A , Eckman J W , Arana C A , Papalia G A , Connolly J E , Gale B K , Myszka D G. *Anal. Biochem.* , **2009** , 385( 2) : 309 ~ 313
- 66 Taylor J D , Phillips K S , Cheng Q. *Lab. Chip* , **2007** , 7( 9) : 927 ~ 930
- 67 Hui W C , Yobas Y , Samper V D , Heng C K , Liw S , Ji H M , Chen Y , Cong L , Li J , Lim T M. *Sens. Actuators A* , **2007** , 133( 2) : 335 ~ 339
- 68 Lee L M , Cui X Q , Yang C H. *Biomed. Microdevices* , **2009** , 11( 5) : 951 ~ 958

## Recent Advances on Optical Detection Methods and Techniques for Cell-Based Microfluidic Systems

HUO Dan-Qun<sup>1</sup> , LIU Zhen<sup>1</sup> , HOU Chang-Jun\*<sup>1</sup> , YANG Jun<sup>1</sup> , LUO Xiao-Gang<sup>1</sup> ,  
FA Huan-Bao<sup>2</sup> , DONG Jia-Le<sup>1</sup> , ZHANG Yu-Chan<sup>1</sup> , ZHANG Guo-Ping<sup>1</sup> , LI Jun-Jie<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( Key Laboratory of Biorheological Science and Technology , Ministry of Education , Bioengineering College ,  
Chongqing University , Chongqing 400044)

<sup>2</sup>( College of Chemistry and Chemical Engineering , Chongqing University , Chongqing 400044)

**Abstract** Recent advances on optical detection methods and techniques applied in cell-based microfluidic systems are reviewed. Microsystems that integrate on chip cell culture and real-time detection , and recent advances on correlated detection methods and techniques are mainly focused. Comparison of six optical detection methods and techniques are summarized , and their research applicability for cell study is proposed. Trend and development perspective of each technique applied for living cell label-free and real-time detection and sensing are discussed. Finally , an assessment of future directions for lab chip based cell research and sensing microsystem are concluded.

**Keywords** Microfluidic chip; Cell research; Optical detection; Review

( Received 26 November 2009; accepted 31 February 2010)