

微流控芯片细胞捕获分离方法概述*

董盛华¹⁾ 张 晶²⁾ 葛胜祥^{2)**}

⁽¹⁾ 厦门大学生命科学院, 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 厦门 361100;

⁽²⁾ 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 厦门 361100)

摘要 细胞捕获分离是免疫学、诊断检测、病理研究等学科经常用到的生物学实验方法。近年来, 微流控芯片平台的细胞捕获分离方式花样繁多, 层出不穷, 它具有可快速检测、所需样本量少、节约试剂、成本低廉等优势。本文主要对近年来多种微流控细胞捕获分离的方法, 以免疫捕获分离和无标签细胞分离两类对其进行介绍。免疫捕获分离是较为传统的细胞捕获分离方式, 它的特异性好、捕获分离后的细胞纯度较高。无标签细胞分离是近几年热门发展的技术手段, 它采用物理学与生物学相结合的方式, 能较好地保持细胞的完整性和生物活性。细胞捕获分离在微流控平台的应用虽然发展迅速, 但其在工业化生产和微型化整合等方面还存在一些问题, 只有解决生产问题, 细胞捕获分离在微流控平台的应用才真正具有实际价值, 可以真正作为一种技术手段用于日常的实验操作和医学检测中。就目前而言, 细胞捕获分离在微流控芯片中仍具有很大的发展前景。

关键词 微流控芯片, 细胞分离, 免疫捕获, 无标签细胞分离

学科分类号 Q81, R44

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0147

细胞捕获分离是指把在液体中的多种混合细胞通过物理学、化学、生物学等手段, 从液体中分离出一种或几种细胞的过程。细胞捕获分离作为生物学、医疗诊断、毒理监测等方面的重要实验内容, 一直是实验室研究的一个热点。细胞捕获分离后可用于细胞计数、细胞培养、细胞免疫及细胞周期状态观测等后续实验, 是一种必不可少的实验手段。

在很多时候, 细胞计数与细胞捕获分离的区分并不明确, 细胞计数常会用到细胞捕获分离作为前置手段, 但很多细胞计数的手段和方法并不能适用于细胞捕获分离。细胞计数只要求得到规定样品中目的细胞数, 可以通过破坏细胞结构^[1]或在混合样品中直接针对特定细胞的电容、电阻进行测定^[2], 并不一定要对目的细胞进行捕获分离。而细胞分离则需要从样本中有针对性地分离出所需细胞, 往往对收集后的细胞还有较高的要求, 需要保持细胞原有的形态, 甚至一些实验还要求细胞生长状态正常, 以便对其进一步地观察和研究。这就大大限制了细胞分离的方法, 提高了难度。

细胞计数主要包括白细胞、红细胞、循环肿瘤细胞等细胞计数。白细胞计数(包括 CD3⁺/CD4⁺

CD8⁺T 淋巴细胞计数等^[3])常用于检测炎症反应、人体免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染^[4]、寄生虫感染等与人体免疫相关的疾病^[5], 其数值的升高和降低都会对体内免疫系统产生巨大影响, 常作为人体健康状况的重要参照指标。红细胞计数作为血常规的一个检测指标, 常用于贫血、白血病等病症的检测。另外, 近年来针对癌症相关研究的不断突破, 计数检测外周血中痕量循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)也成为了癌症诊断的一个生物标志物, 可以检测癌细胞的迁移^[6]。除细胞计数外, 生物科学和医疗诊断的前期实验也常需要细胞分离技术, 为后续如药物刺激、细胞培养等实验研究做准备。

目前细胞分离的手段多种多样, 如流式细胞分离、蔗糖密度梯度离心细胞分离、介电电泳分离^[7]等, 在本文中就不做赘述。本文具体介绍的是这几

* 国家自然科学基金资助项目(81371711)。

** 通讯联系人。

Tel: 13515965194, E-mail: sxge@xmu.edu.cn

收稿日期: 2016-06-27, 接受日期: 2016-10-20

年迅速发展起来的微流控平台的细胞捕获分离技术.

1 微流控芯片发展介绍

微流控芯片技术是指把生物学、化学等实验的基本操作过程集成到一块芯片上, 其芯片内部结构中至少有一维为微米甚至纳米尺度规格结构, 可以自动完成实验及分析的全过程. 由于微流控芯片具有集成性、高通量、检测快速、操作便利、所需样本量少、低耗能、低成本等优点, 近年来其在药物筛选、环境检测、司法检测、临床诊断和生物医药研究等众多科研与生活领域拥有越来越广阔的应用前景^[2].

微流控芯片主要是在微米尺度下操控的流通技术, 但是与传统的流通技术相比, 微流控系统一个最重要特征就是微型化, 而且同时要考虑便于携带和检测, 微流控芯片在精细结构上要比流体技术更为复杂. 微流控芯片的主要构成部分根据不同的实验目的与需求会有很大的不同, 有关细胞捕获分离的微流控芯片, 大多包括进样管路、细胞捕获或分离区域、废液收集区和反应检测区几部分(图 1). 进样管路和废液收集区域属于基本构造, 大部分微流控芯片的构造也基本相近, 并非是影响实验和微流控芯片的关键部分. 而微流控芯片主要的功能区在于捕获分离区和反应检测区, 这两部分也是不同微流控芯片的关键和特色区域. 在捕获分离区主要是根据细胞的大小形态等物理特性对目的细胞进行分离拦截或特异性结合捕获目的细胞. 在反应检测区域, 应用光学传感器是一类较为广泛的检测方法, 此外还有表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)、波导管、荧光、单细胞表征分析和化学发光等检测方法^[8].

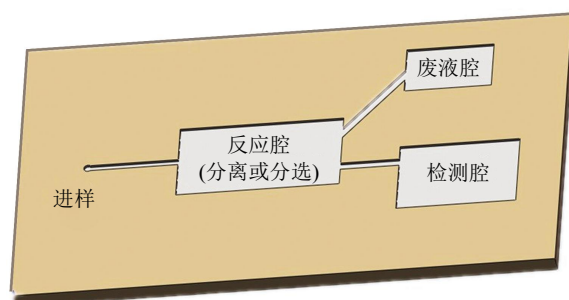


Fig. 1 The structure diagram of microfluidic chips
图 1 微流控芯片结构示意图

2 微流控芯片细胞捕获分离主要方法

本文主要归类分析不同实验目的的微流控芯片在细胞捕获分离区域的不同构造原理, 比较不同捕获分离方式的特点及优劣性. 常见的微流控芯片细胞捕获分离方法有磁珠捕获分离^[9-10]、微矩阵捕获、微液滴分选^[11-12]、声波分离等方法, 按最终捕获分离细胞的状态可分为免疫捕获细胞分离和无标签细胞分离两种(表 1).

2.1 免疫捕获细胞分离

免疫捕获细胞分离的方法目前在生物学领域应用较广, 该类方法主要根据抗体可以特异性结合目的细胞表面抗原, 借此分离目的细胞. 其优点在于可以特异性地捕获目的细胞, 所得到的细胞纯度较高, 也是目前普遍使用的细胞捕获、计数方法. 其缺点在于捕获分离后的细胞表面多带有捕获抗体甚至其他标记荧光、微珠等, 不利于后续细胞的培养和状态性质的进一步观察研究, 多用于细胞计数等检测手段.

2.1.1 抗体特异性细胞捕获

抗体特异性细胞捕获是生物学上最常用到的捕获方法, 通过细胞表面的抗原与特异性抗体结合, 固定抗体以捕获细胞. 对于抗体特异性捕获细胞, 抗体相对于捕获细胞靶点的亲和性是十分重要的. 但是由于一个完整细胞要比抗原、抗体大很多, 用一个或几个抗原-抗体相结合很难抓住一个细胞, 所以在抗体特异性细胞捕获中, 往往需要控制流速、采用多个结合点多次拦截捕获细胞的方法^[13-14], 加大细胞被捕获的几率(图 2a).

Bio-Acoustic-MEMS in Medicine (BAMM) 实验室及其合作单位集成微流控芯片, 采用无透镜成像即时检验(point-of-care testing, POCT)方式进行 CD4⁺T 淋巴细胞计数, 在微流控通道内固定 CD4 抗体, 控制进样流速在合适范围, 捕获细胞为下一步无透镜成像做准备. 这种方法对于 CD4⁺T 淋巴细胞的捕获效率在(70.2±6.5)%、特异性为(88.5±5.4)%^[15-16]. 在微流控芯片上直接包被抗体去捕获细胞, 芯片制作和加工相对简单, 细胞捕获的特异性也很高, 但全血样品需要稀释处理, 而且样品和洗液的进样速度对于捕获效率有较大影响, 这并不利于全血中 CD4⁺T 淋巴细胞的精确定量.

Table 1 Comparison of the methods employed in microfluidic chips to capture and separate cells

表 1 微流控芯片细胞捕获分离方法比较			
分类	方法	原理	特点
免疫捕获细胞分离方法	抗体特异性细胞捕获	抗体包被在芯片表面，全血等流过 后抗体特异性捕获目的细胞	抗体捕获细胞特异性好，得到细胞 纯度较高，但捕获后细胞不易收集， 难以从芯片中分离用于后续实验
	磁珠细胞分离	磁珠标记抗体后特异性捕获全血等 液体中目的细胞，之后利用磁力分 离磁珠	分离细胞方法灵活，方便细胞富集， 但细胞结合磁珠后部分状态可能发 生改变，影响对细胞生长及状态的 进一步分析
	非混相屏障细胞筛选	利用不相容液相表面张力，通过离 心分离目的细胞与背景杂质	可以免去洗涤步骤的繁琐及可能对 实验带来的损失和干扰，但细胞需 要结合磁珠、荧光染料等物质，不 利于细胞进一步培养。
无标签细胞分离方法	小孔径拦截细胞分离	酯膜小孔径拦截，较大的白细胞等 会被拦在膜上，红细胞、血浆、血 小板等小颗粒可以通过酯膜，从而 达到分离效果	操作简单，单纯物理方法拦截，对 细胞没有过强机械损伤，对全血中 白血病的拦截效率能达到 95%，但 同时会吸附很多其他细胞，只能用于 粒径大小差异较大的细胞分离
	非对称流分离系统细胞分离	通过不对称分子模式的瞬间作用力， 让质量体积不同的细胞发生不同角 度的偏转，从而达到不同细胞的分 离效果	可以避免不可逆的细胞捕获，能较 好地分离物理性质差异大的细胞， 但无法特异性分离几种大小形状近 似的细胞，且不同缓冲条件会对细 胞分离带来影响
	taSSAW 技术声波细胞分离	通过微通道两侧的声波对细胞施加 外力，由于细胞的大小、质量等物 理性质不同，所受声波力不同，使 细胞发生不同偏转角度，达到细胞 分离目的	声波对细胞施加外力小，造成的机 械损伤小，可以通过声波强弱及角 度分离不同种类细胞，但在分离外 周血祖细胞中目的细胞的回收率 65%相对较低，且回收率及细胞纯 度容易受到细胞所处环境影响
	微液滴细胞分离	整合荧光激活细胞分离和微液滴芯 片技术，样品被鞘液包裹形成小液 滴，目的细胞标识荧光后通过检测 器，利用荧光信号分离细胞	细胞分离的灵敏度和特异性都较高， 可用于少量或单个细胞的分离，但 该方法对设备要求条件较高，且不 适合复杂环境下的细胞分离
	多路复用螺旋微流控芯片细 胞分离	利用曲线微通道中迪恩漩涡流动力 原理，通道壁与细胞浮力的相互作 用，分离体积质量不同的细胞	物理方法对分离出的细胞没有明显伤 害，但可分离细胞需要与其他非目的 细胞在大小形态上有较大差异，且分 离出目的细胞中会混有其他细胞

2.1.2 磁珠细胞分离

磁珠标记抗体特异性结合目的细胞，再通过磁力分离目的细胞，是实验中经常会用到的方法。磁珠捕获细胞分离的方法应用范围广泛，只要有可以与目的细胞特异性结合的抗体就可以有针对性地捕获细胞。而且大多数情况下，磁珠捕获细胞的特异性很高，但是磁珠的大小、抗体对细胞表面抗原的亲性和强弱以及细胞所在缓冲液的黏稠度等因素对于目的细胞捕获效率影响很大，尤其在细胞环境较复杂(如全血条件)时磁珠的捕获效率较低。

在 Glynn 等^[17]设计的微流控芯片中，用巧妙的方法解决了磁珠捕获中一个很大的问题——磁珠与样品难以混合均匀，尤其是黏稠度较高的样品(如

全血)，从而影响磁珠与目的细胞的结合效率。他们的芯片设计有两个内腔，可以通过来回按压两个腔室促进样品与磁珠混合，之后收集分离目的细胞(图 2b)。这个芯片优势在于不需要电动机等设备，只需要用手指按压弹性膜就可以达到全血与磁珠的混合效果，他们用这种方法可以高效捕获全血中 CD4⁺T 细胞，捕获率高达(93.0±3.3)%。

2.1.3 表面张力不相容过滤筛选 / 非混相屏障细胞筛选

表面张力不相容过滤筛选(immiscible filtration assisted by surface tension, IFAST)是通过微尺寸物理现象建立的不相容液体流向壁垒(非混相屏障)^[18]，不相容液相界面间具有较高的能量，形成一道屏

障, 可以阻止不想要的细胞或其他杂质通过. Scott 及其实验室利用 IFAST 方法从混合型的基质细胞、荧光、全血中特异性分离乳腺癌细胞, 效率大约为 70%, 纯度 > 80%, 还可以通过多级非混相屏障提高分离纯度. 该方法符合微流控芯片操作特点, 成本低廉、操作简便、反应快速, 而且不需要洗去多

余成分步骤, 降低了洗涤步骤带来的不确定性, 但利用 IFAST 方法分离, 在进样腔内需要先用磁珠捕获目的细胞, 再利用磁铁把目的细胞从非混相腔吸出到收集腔(图 2c), 细胞结合磁珠可能对细胞的后续操作会有影响, 如果可以寻找方法从非混相腔中直接获得目的细胞, 利用范围会更广.

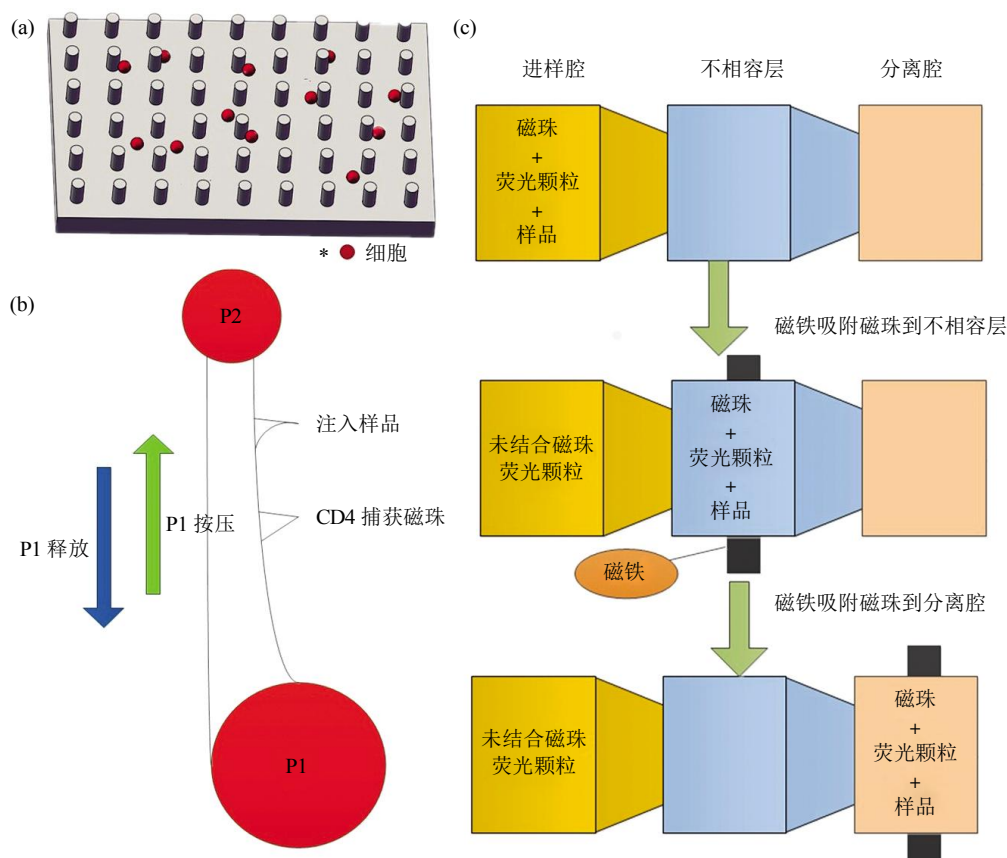


Fig. 2 Structure diagrams of the immunocapture cell-separation microfluidic chips

图 2 免疫捕获细胞分离芯片结构示意图

(a) 抗体特异性细胞捕获示意图. (b) 磁珠细胞分离芯片示意图. (c) 表面张力不相容过滤筛选芯片示意图.

2.2 无标签细胞分离方法

无标签细胞分离大多采用物理学中流体力学、惯性力等方法^[19-20], 根据细胞自身物理形态或利用黏附分子等对细胞表面施加瞬间作用力, 使不同细胞在微流控通道所受外力不同, 从而达到细胞分离的目的. 无标签细胞分离方法优势在于分离出的细胞表面无任何其他修饰, 可以继续培养及观察细胞理化性质. 但无标签细胞分离由于是通过物理分离法, 得到目的细胞常常纯度不高, 其中混杂有其他杂质或非目的细胞.

2.2.1 小孔径拦截细胞分离

近几年来, 交叉学科的研究应用越来越被人们所重视. 由于不同细胞在大小、形态、刚性、透光度等方面都会有所差别, 借由物理方法可以对细胞进行分离. 目前所用物理方法分离细胞的手段也越来越多样化, 最基本的是根据细胞大小和外形差异, 直接进行分离.

McDevitt 等利用径迹蚀刻聚碳酸酯膜嵌入式捕获细胞的方法, 在酯膜上通过重离子加速器对膜进行射击, 再用化学试剂清洗来控制孔径大小, 利用

双层酯膜孔径大小对全血中细胞进行吸附分离. 这种方法利用膜上的孔径拦截不能通过的细胞(白细胞等), 而血浆、红细胞、血小板等小体积颗粒可以通过, 由此把目的细胞从全血中分离(图 3a). 他们选用此方法拦截全血中的 CD4⁺T 细胞后, 在整合的纳米生物芯片系统中通过半导体量子点对全血中的 CD4⁺T 细胞进行计数^[21-23]. 这种方法的捕获效率能达到 95%, 但是特异性不高, 会有很多其他细胞也吸附拦截在膜上, 所以后续需要用特异性抗体识别标记后再计数.

2.2.2 非对称流系统细胞分离

非对称流分离系统(asymmetrical flow field-flow fractionation, AFF)是通过不对称分子模式的瞬间作用力, 在物理方面广泛运用的侧向位移, 同时延长了分子特异性标签的长度, 可以有效地从全血的持续液流中分离出白细胞. 相对于垂直作用力的细胞连续分离方式(如电泳法、声波法、引力作用、惯性作用、外磁场力等), 非对称流分离系统通过黏附分子对细胞施加瞬间不对称作用力, 偏转流动过程中细胞的垂直方向作用力, 不需要捕获而达到细胞分离效果. 这种微流控芯片的滚动附着力是通过在微流控通道中修饰一层黏附分子 P 选择素, 施力作用于淋巴细胞表达的 P 选择素糖蛋白配体 1 (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1), 使淋巴细胞滚动方向发生偏移(图 3b)^[24]. 这种微流控芯片可以分离复杂环境中的目的细胞, 细胞不需要标记标签, 避免不可逆的细胞捕获, 分离后细胞有较高的存活率及功能完整性^[25].

2.2.3 声波细胞分离

声波细胞分离是在芯片微通道两侧, 通过声波对细胞施加外力, 由于细胞的大小、质量、密度等物理性质不同, 所受声波力不同, 使细胞在微通道中偏转角度改变, 不同种细胞会流成几股液流, 在不同方向收集, 以达到细胞分离目的. 为了区分一些物理状态相似细胞, 也可以特异性标记一些微珠在目的细胞表面, 以此改变细胞的物理特性, 而更好地分离出目的细胞.

Lenshof 和他的同事^[26]通过声波方法, 利用磁珠或荧光激活分离条件, 以达到分离或去除外周血祖细胞(peripheral blood progenitor cell, PBPC)中特异性细胞的目的. 这种方法是特异性抗体标记磁珠后与目的细胞结合, 目的细胞结合磁珠后大小质量等物理特征有别于未标记细胞, 再通过声波分离出目的细胞. 单纯用免疫磁珠分离得到细胞纯度是

(96±3)%, 回收率是 56%; 结合声波方法的细胞分离纯度是(87±12)%, 回收率是 65%. 从 Lenshof 的实验结果可以看出, 只通过磁珠捕获细胞后分离的纯度较高, 但捕获效率较低, 结合声波辅助分离可以提高捕获效率, 但是对细胞纯度会有些许影响. 另外, Lenshof 实验中用到的磁珠标记抗体捕获细胞后, 可通过蛋白酶把与磁珠相连的细胞分开, 细胞可进一步培养.

在 2009 年, 美国宾州州立大学的科学家研制出一种以声音作为镊子的系统, 其小至可以放置在芯片上, 对单个细胞或纳米大小的颗粒进行操控^[27]. 但是由于所需芯片无法批量生产, 实际运用难度较大, 不利于常规实验操作. 之后麻省理工、宾夕法尼亚州立大学和 Carnegie Mellon 大学的研究人员, 发明了一种以声波为基础的新型细胞分离技术. 通过声波对细胞外加力场, 依据细胞的可压缩性、细胞内质密度和细胞所在液态环境对细胞进行分离. 而相对于其他声波分离细胞方法, Li 等^[29]采用斜角表面声波技术(tilted-angle standing surface acoustic waves, taSSAW), 提高了声波分离的精确性和准确度(图 3c). 其可应用于外周血中分离 CD4⁺T 细胞、从白细胞(white blood cells, WBCs)中分离检测 CTCs 细胞, 且具有很高的灵敏性, 能从中分离出比例很少的细胞^[28]. 这类声波细胞分离的优势在于不需要对细胞进行人工标记或施加较强的机械外力一类有可能对细胞造成损伤的作用力. 声波是十分温和的, 对细胞的干扰很小, 有利于把分离出来的细胞继续培养或做细胞状态观测. 目前这种技术已应用于 CTCs 检测, 可以在癌症患者的血液里检测到极为罕见的肿瘤细胞, 有助于医生们判断肿瘤是否会发生扩散.

2.2.4 微液滴细胞分离 / 荧光激活细胞分选

流式细胞术是细胞计数、分选及性质分析中常用的手段, 微液滴细胞分离所用原理与其类似, 但简化了流式细胞仪的复杂构造. 微液滴细胞分选整合了荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)^[30]和微液滴芯片技术^[31], 从单向微流控芯片技术改为 T 型结构或流动汇聚型结构, 样品被鞘液包裹形成小液滴, 目的细胞标识荧光染料后通过检测器^[32], 激光激活染料荧光再利用光信号收集所要的目的细胞. 微液滴细胞分离的精确度和纯度都较其他微流控芯片方法更好, 但芯片所需配套设备复杂, 而且并不适合如全血等复杂环境下的细胞分离.

Mazutis 实验室^[33]利用这种方法制作了微液滴单细胞分析分选芯片, 用于分选小鼠免疫后的单克隆细胞. 其主要通过液滴包裹单个单克隆细胞、荧光探针和包被鼠抗 IgG 抗体的玻璃微珠, 在单克隆细胞分泌抗体后抗体可与微珠结合, 荧光探针再特异性结合细胞分泌抗体, 让荧光聚集在微珠表面, 通过激光激发分选分泌所需抗体的单克隆细胞(图 3d). 这种方法极大缩短了筛选单克隆抗体的时间, 分选少于 100 万个细胞只需要 2~6 h, 而整个单克隆筛选过程, 包括芯片准备和细胞培养也只需要

5~7 天.

2.2.5 多路复用螺旋微流控芯片细胞分离

螺旋微流控芯片分离细胞是利用曲线微通道中迪恩旋涡流动力原理, 较大的 CTCs 在通道中的惯性上升力与内壁作用力相抵消在螺旋通道内壁流动, 而血液中其他较小的物质则靠近外壁一侧流动(图 3e), 可以借此利用迪恩涡心力实现 CTCs 从全血中的分离^[34].

Han 及其工作团队通过设计这种微流控芯片分离富集全血中 CTCs, 首先需要对全血样本进行处

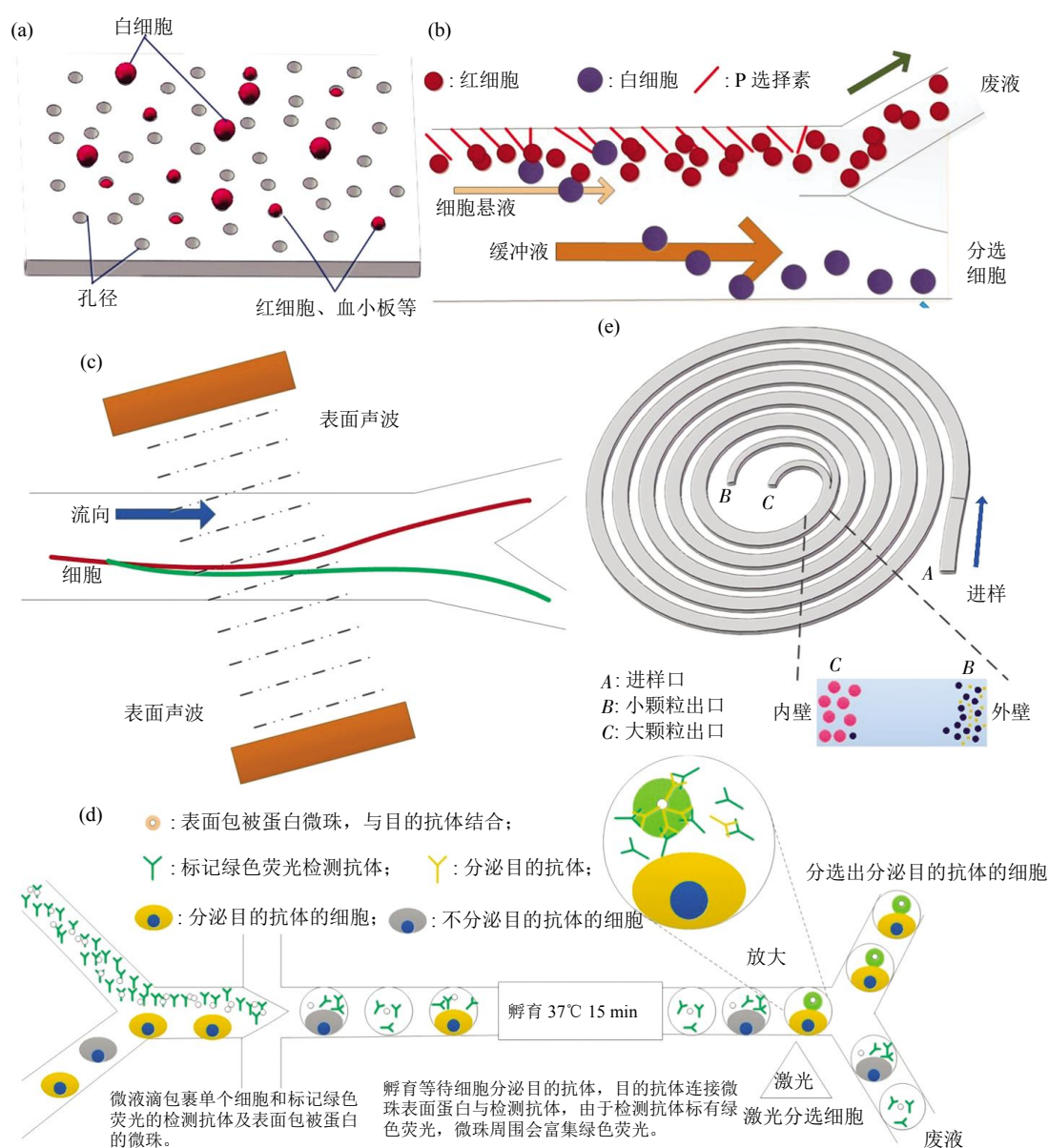


Fig. 3 Principles of microfluidic design for label-free cell separation

图 3 无标签细胞分离方法芯片结构示意图

(a) 小孔径拦截酯膜电泳图. (b) 非对称流系统细胞分离示意图. (c) 斜角表面声波技术细胞分离. (d) 微液滴细胞分选. (e) 多路复用螺旋微流控芯片细胞分离示意图.

理, 离心分离血清后加裂解液裂解红细胞, 下层为有核细胞, 再通过多路复用螺旋微流控芯片分离 WBCs 和 CTCs, 收集 CTCs 后可用于细胞培养、免疫荧光染色、单细胞分析等各种检测. 该芯片分离 CTCs 的效率较高, 几乎能收集全部 CTCs, 但其中会混杂有少量 WBCs, 细胞计数需要后续荧光染色、原位杂交等辅助手段. 螺旋微流控芯片分离细胞的优势在于构造简单、成本低廉、可以高效分离出外周血中的 CTCs. 但由于该芯片单纯靠物理方法分离, 主要依靠 CTCs 的体积远大于血液中其他细胞^[35], 对于其他细胞并不适用, 而且分离出的 CTCs 细胞中可能会混有少量 WBCs, 无法直接计数, 还需要后期标记处理^[36].

3 总结与展望

细胞捕获分离一直是免疫学、诊断检测、病理研究等学科经常用到的生物学实验方法. 微流控芯片的主要优势在于: a. 上样体积小, 节约原料、试剂与样本; b. 检测结果单个周期短, 可以实现快速测量, 节约时间; c. 适用于高通量检测或宏观尺度无法实现的实验操作, 具有低成本、高效快速的特点, 在细胞分离过程中更易做到微观操控、精准分析.

在微流控芯片中, 通过抗体捕获、荧光标记等标签标记目的细胞后, 多数情况下会对细胞本身产生一定的影响, 大多只能用于捕获分离后的细胞计数. 无标签细胞分离多数是通过物理方法, 利用微流控芯片的流体力学原理, 从细胞大小、尺寸等方面实现细胞分离. 无标签细胞分离优势在于分离后的细胞既可用于细胞计数, 也可用于细胞理化性质观察、细胞增殖培养等后续实验, 也是目前细胞分离方法的主要发展方向, 但相对于标签捕获分离的方法, 在纯度和特异性上还需要提高. 今后微流控芯片在细胞捕获方面可能更倾向于非标签方式的捕获分离, 结合物理学与生物学的方法, 根据所做实验的需要, 在捕获效率与纯度方面更好协调, 高效方便快捷地实现细胞分离的目的.

用于细胞捕获分离的微流控芯片需根据实验要求选择合适材料, 如果要进一步培养观察分离出的细胞, 还要确定细胞所在芯片环境是否无菌无毒, 是否利于细胞存活生长. 微流控芯片材料一般有聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)、聚甲基丙烯酸甲酯(polymethyl methacrylate, PMMA)、聚苯乙烯(polystyrene, PS)、玻璃、硅片等. 近年

来微流控芯片制作比较普遍用到的主要是高分子聚合物材料, 其中 PDMS 应用最为广泛, 尤其在细胞捕获分离实验中, PDMS 具有较好的生物相容性和一定的透气性, 更有利于实验中细胞的生长存活及性质分析, 但芯片微结构易变形, 所以较难应用于商业化大批量生产, 而更适用于科研过程中芯片结构及实验效果摸索. PMMA 随着材料及切割技术的发展越来越普及, 在微流控芯片的实验室发展过程中逐渐得到了广泛应用. 相信随着微流控芯片技术和材料科学的不断进步, 更多适用于实验要求的材料也会不断为芯片的制作及商业化生产提供强有力的推动, 促进微流控芯片技术更快更好地发展^[37-38].

微流控芯片目前的发展策略主要有两个方向: 一类是利用微流控芯片高通量、上样量小等优势, 在科研过程中使用, 解决一些在宏观层面不易达成的实验问题, 这类芯片并不一定要求最终结果直接在芯片中显示出来, 而是作为一个高精密度的反应容器, 最后可利用实验室内的其他仪器配合实验, 分析结果. 另一类是以商品形式面向普通群众为主要目的芯片, 这类芯片往往需要有高度整合性, 同时配备微型化的检测及数据处理装置, 具有可手持诊断、价格适中、方便操作等优点, 使用者只需做简单加样就可由仪器经过暗箱处理后直接得到最终结果, 体现了微流控芯片小型、简便、快速测定的优势. 微流控芯片在细胞捕获分离方面, 目前主要集中于实验室层面, 配合其他仪器使用, 而后一类高度集成的微流控芯片还相对较少, 且实现难度远高于前一种形式. 但相信随着微流控技术和构造方法的进一步发展, 细胞捕获分离技术的持续创新, 基于微流控芯片的细胞捕获、分离将在科学研究和临床诊断中逐渐得到广泛应用, 为提升人类健康水平做出贡献.

参 考 文 献

- [1] Nguyen J, Wei Y, Zheng Y, *et al.* On-chip sample preparation for complete blood count from raw blood. *Lab on a Chip*, 2015, **15**(6): 1533-1544
- [2] Primiceri E, Chiriac M S, Rinaldi R, *et al.* Cell chips as new tools for cell biology—results, perspectives and opportunities. *Lab on a Chip*, 2013, **13**(19): 3789-3802
- [3] Glynn M T, Kinahan D J, Ducree J. CD4 counting technologies for HIV therapy monitoring in resource-poor settings—state-of-the-art and emerging microtechnologies. *Lab on a Chip*, 2013, **13**(14): 2731-2748
- [4] Shafiee H, Wang S, Inci F, *et al.* Emerging technologies for

- point-of-care management of HIV infection. *Annual Review of Medicine*, 2015, **66**: 387–405
- [5] Thielen N, Richter J, Baldauf M, *et al.* Leukemic stem cell quantification in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients predicts response to nilotinib therapy. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2016, **22**(16): 4030–4038
- [6] Chen Y, Li P, Huang P H, *et al.* Rare cell isolation and analysis in microfluidics. *Lab on a Chip*, 2014, **14**(4): 626–645
- [7] Tatsumi K, Kawano K, Okui H, *et al.* Analysis and measurement of dielectrophoretic manipulation of particles and lymphocytes using rail-type electrodes. *Medical Engineering & Physics*, 2016, **38**(1): 24–32
- [8] Liu B, Deng Y, Qin B B, *et al.* Application of microfluidics technology in bioanalysis. *Jan*, 2011, **4**(1): 150–155
- [9] Liu F, Kc P, Zhang G, *et al.* Microfluidic magnetic bead assay for cell detection. *Analytical Chemistry*, 2016, **88**(1): 711–717
- [10] Volden T A, Reyelts C D, Hoke T A, *et al.* Validation of flow cytometry and magnetic bead-based methods to enrich CNS single cell suspensions for quiescent microglia. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: the Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 2015, **10**(4): 655–665
- [11] Seemann R, Brinkmann M, Pföhl T, *et al.* Droplet based microfluidics. *Reports on Progress in Physics Physical Society (Great Britain)*, 2012, **75**(1): 016601
- [12] Lim S W, Tran T M, Abate A R. PCR-activated cell sorting for cultivation-free enrichment and sequencing of rare microbes. *PloS One*, 2015, **10**(1): e0113549
- [13] Autebert J, Coudert B, Champ J, *et al.* High purity microfluidic sorting and analysis of circulating tumor cells: towards routine mutation detection. *Lab on a Chip*, 2015, **15**(9): 2090–2101
- [14] Wang Z, Chin S Y, Chin C D, *et al.* Microfluidic CD4⁺ T-cell counting device using chemiluminescence-based detection. *Analytical Chemistry*, 2010, **82**(1): 36–40
- [15] Moon S, Gurkan U A, Blander J, *et al.* Enumeration of CD4⁺ T-cells using a portable microchip count platform in Tanzanian HIV-infected patients. *PloS One*, 2011, **6**(7): e21409
- [16] Moon S, Keles H O, Ozcan A, *et al.* Integrating microfluidics and lensless imaging for point-of-care testing. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, **24**(11): 3208–3214
- [17] Glynn M T, Kinahan D J, Ducree J. Rapid, low-cost and instrument-free CD4⁺ cell counting for HIV diagnostics in resource-poor settings. *Lab on a Chip*, 2014, **14**(15): 2844–2851
- [18] Berry S M, Alarid E T, Beebe D J. One-step purification of nucleic acid for gene expression analysis *via* Immiscible Filtration Assisted by Surface Tension (IFAST). *Lab on a Chip*, 2011, **11**(10): 1747–1753
- [19] Wang X, Zandi M, Ho C C, *et al.* Single stream inertial focusing in a straight microchannel. *Lab on a Chip*, 2015, **15**(8): 1812–1821
- [20] Fan L L, Han Y, He X K, *et al.* High-throughput, single-stream microparticle focusing using a microchannel with asymmetric sharp corners. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2014, **17**(4): 639–646
- [21] Jokerst J V, Floriano P N, Christodoulides N, *et al.* Integration of semiconductor quantum dots into nano-bio-chip systems for enumeration of CD4⁺ T cell counts at the point-of-need. *Lab on a Chip*, 2008, **8**(12): 2079–2090
- [22] Weigum S E, Floriano P N, Christodoulides N, *et al.* Cell-based sensor for analysis of EGFR biomarker expression in oral cancer. *Lab on a Chip*, 2007, **7**(8): 995–1003
- [23] Shih Y Y, Hung C C, Gong G C, *et al.* Enhanced particulate organic carbon export at eddy edges in the oligotrophic western north pacific ocean. *PloS One*, 2015, **10**(7): e0131538
- [24] Edington C, Murata H, Koepsel R, *et al.* Tailoring the trajectory of cell rolling with cytotoxic surfaces. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 2011, **27**(24): 15345–15351
- [25] Bose S, Singh R, Hanewich-Hollatz M, *et al.* Affinity flow fractionation of cells *via* transient interactions with asymmetric molecular patterns. *Scientific Reports*, 2013, **3**: 2329
- [26] Lenshof A, Jamal A, Dykes J, *et al.* Efficient purification of CD4⁺ lymphocytes from peripheral blood progenitor cell products using affinity bead acoustophoresis. *Cytometry Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2014, **85**(11): 933–941
- [27] 多功能微型声镊面世. *中国医疗器械杂志*, 2009, **33**(5): 343
- Chinese Journal of Medical Instrumentation, 2009, **33**(5): 343
- [28] Ding X, Peng Z, Lin S C, *et al.* Cell separation using tilted-angle standing surface acoustic waves. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(36): 12992–12997
- [29] Li P, Mao Z, Peng Z, *et al.* Acoustic separation of circulating tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(16): 4970–4975
- [30] Piyasena M E, Graves S W. The intersection of flow cytometry with microfluidics and microfabrication. *Lab on a Chip*, 2014, **14**(6): 1044–1059
- [31] Bai Y, Weibull E, Joensson H N, *et al.* Interfacing picoliter droplet microfluidics with addressable microliter compartments using fluorescence activated cell sorting. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2014, **194**: 249–254
- [32] Guo J, Liu X, Kang K, *et al.* A compact optofluidic cytometer for detection and enumeration of tumor cells. *Journal of Lightwave Technology*, 2015, **33**(16): 3433–3438
- [33] Mazutis L, Gilbert J, Ung W L, *et al.* Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nature Protocols*, 2013, **8**(5): 870–891
- [34] Warkiani M E, Guan G, Luan K B, *et al.* Slanted spiral microfluidics for the ultra-fast, label-free isolation of circulating tumor cells. *Lab on a Chip*, 2014, **14**(1): 128–137
- [35] Esmailsabzali H, Beischlag T V, Cox M E, *et al.* Detection and isolation of circulating tumor cells: principles and methods. *Biotechnology Advances*, 2013, **31**(7): 1063–1084
- [36] Khoo B L, Warkiani M E, Tan D S, *et al.* Clinical validation of an ultra high-throughput spiral microfluidics for the detection and enrichment of viable circulating tumor cells. *PloS One*, 2014, **9**(7): e99409
- [37] Chin C D, Linder V, Sia S K. Commercialization of microfluidic

- point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, 2012, **12** (12): 2118–2134
- [38] Sackmann E K, Fulton A L, Beebe D J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, 2014, **507** (7491): 181–189

Microfluidic Chips for Cell Capturing and Separation*

DONG Sheng-Hua¹⁾, ZHANG Jing²⁾, GE Sheng-Xiang^{2)**}

⁽¹⁾ School of Life Sciences, Xiamen University, National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen 361100, China;

⁽²⁾ National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen 361100, China)

Abstract Cell capturing and separation is frequently involved in researches in immunology, diagnostics and pathology. In recent years, different new methods for cell capturing and separation based on microfluidic platform have been developed. With microfluidic chip, rapid and low cost detection can be implemented with small sample and reagent volumes. In this review, two methods of microfluidic cell separation, immune-capture and label-free separation, are introduced. Immuno-capture, a more traditional method, can separate cells with high specificity and provide highly purified target cells. Newly developed label-free method performs separation by utilizing the physical and biological features of target cells, and can keep cell's integrity and activity. Although there are a couple of issues to be resolved before microfluidic cell separation gets widespread commercial use, such as multi-system integration and industrial-scale manufacture, it has already attracted extraordinary research attention and has been in the path on rapid development. It is believed that cell capturing and separation methods based on microfluidic chip have broad application prospect in life science and biomedical field.

Key words microfluidic chips, cell separation, immunocapture, label-free cell separation

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0147

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81371711).

**Corresponding author.

Tel: 86-13515965194, E-mail: sxge@xmu.edu.cn

Received: June 27, 2016 Accepted: October 20, 2016