



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104651441 B

(45)授权公告日 2017.02.08

(21)申请号 201310598694.9

审查员 蔡放

(22)申请日 2013.11.21

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104651441 A

(43)申请公布日 2015.05.27

(73)专利权人 中国科学院沈阳自动化研究所

地址 110016 辽宁省沈阳市东陵区南塔街

114号

(72)发明人 刘连庆 梁文峰 李文荣 刘斌

李密 肖秀斌

(74)专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限

公司 21002

代理人 周秀梅 许宗富

(51)Int. Cl.

G12Q 1/02(2006.01)

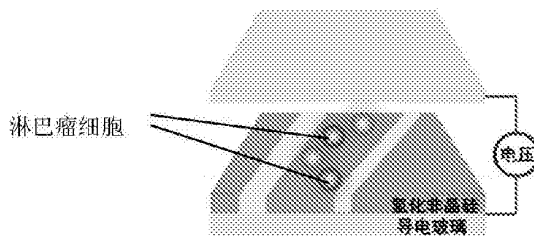
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

机器人化无损细胞筛选方法

(57)摘要

本发明涉及机器人化无损细胞筛选方法,包括以下步骤:将包含两种细胞的样本悬浮于光电子镊芯片中,并平行投射两束宽度不同的第一入射光线和第二入射光线;设置第一入射光线静止并设置第二入射光线水平向第一入射光线移动,由于两种细胞所受的第二入射光线激发的光诱导介电泳机械力大于第一入射光线激发的光诱导介电泳机械力,两种细胞被推向第一入射光线;第二入射光线继续向第一入射光线移动并静止,此时在光诱导介电泳机械力作用下一种细胞越过第一入射光线,另一种细胞仍位于第一入射光线和第二入射光线之间,实现了两种细胞的筛选。本发明是一种免标记无损细胞的方法,且具有自动化、批量化及吞吐量高的优点。



1. 机器人化无损细胞筛选方法,其特征在于包括以下步骤:

将包含两种细胞的样本悬浮于光电子镊芯片中,并平行投射两束宽度不同的第一入射光线和第二入射光线;

设置第一入射光线静止并设置第二入射光线水平向第一入射光线移动,由于两种细胞所受的第二入射光线激发的光诱导介电泳机械力大于第一入射光线激发的光诱导介电泳机械力,两种细胞被推向第一入射光线;

第二入射光线继续向第一入射光线移动并静止,此时在光诱导介电泳机械力作用下一种细胞越过第一入射光线,另一种细胞仍位于第一入射光线和第二入射光线之间,实现了两种细胞的筛选;

所述两种细胞的电特性和/或直径不同;分别为淋巴瘤细胞和红细胞;

第一入射光线与第二入射光线的宽度比为1:2,且第二入射光线宽度范围为20~40 $\mu\text{m}$ ,两个光线相邻的边间距为12~100 $\mu\text{m}$ ;

所述光电子镊芯片的输入电压为交流电,幅值为5V~10V,频率为40~70kHz。

2. 按权利要求1所述的机器人化无损细胞筛选方法,其特征在于:所述第一入射光线和第二入射光线垂直于光电子镊芯片的底面。

3. 按权利要求1所述的机器人化无损细胞筛选方法,其特征在于:所述第二入射光线继续向第一入射光线移动并静止具体为:第二入射光线继续向第一入射光线匀速移动,直至两个光线相邻的边间距为一种细胞的直径时静止。

## 机器人化无损细胞筛选方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及机器人技术在生命科学中的应用,具体地说是一种免标记无损细胞筛选方法。

### 背景技术

[0002] 实现两种细胞分离或筛选,传统方法为利用流式细胞仪来实现。流式细胞仪分离细胞需要对细胞做荧光处理,并通过差异性的荧光效应实现两种细胞的分离或筛选。然而,由于荧光后的细胞受到损害,因此显著影响后续的生物学应用及研究。

[0003] 通常淋巴瘤细胞病理样本是通过抽取淋巴瘤病人的骨髓细胞得到,然而在我们前期的研究过程中,发现制作的样本中包含大量血红细胞,即淋巴瘤细胞被掩盖于大量的正常细胞中。目前,临床上解决该问题主要靠有经验的从医人员利用显微镜观测,这是一种定性的方法,同时,往往因为寻找淋巴瘤细胞而耗费大量的时间和精力,并且依靠上述的经验方法进行淋巴瘤细胞和血红细胞的区分非常容易产生混淆或误判。因此对应实现淋巴瘤细胞的筛选需要增加可靠性、准确性及科学性。

### 发明内容

[0004] 为解决上述问题,本发明的目的是提供一种基于光诱导介电泳机械力的机器人化无损细胞筛选新方法。

[0005] 本发明采用的技术方案是:机器人化无损细胞筛选方法,包括以下步骤:

[0006] 将包含两种细胞的样本悬浮于光电子镊芯片中,并平行投射两束宽度不同的第一入射光线和第二入射光线;

[0007] 设置第一入射光线静止并设置第二入射光线水平向第一入射光线移动,由于两种细胞所受的第二入射光线激发的光诱导介电泳机械力大于第一入射光线激发的光诱导介电泳机械力,两种细胞被推向第一入射光线;

[0008] 第二入射光线继续向第一入射光线移动并静止,此时在光诱导介电泳机械力作用下一种细胞越过第一入射光线,另一种细胞仍位于第一入射光线和第二入射光线之间,实现了两种细胞的筛选。

[0009] 所述两种细胞的电特性和/或直径不同。

[0010] 所述第一入射光线和第二入射光线垂直于光电子镊芯片的底面。

[0011] 第一入射光线与第二入射光线的宽度比为1:2,且第二入射光线宽度范围为20~40 $\mu\text{m}$ ,两个光线相邻的边间距为12~100 $\mu\text{m}$ 。

[0012] 所述光电子镊芯片的输入电压为交流电,幅值为5V~10V,频率为40~70kHz。

[0013] 所述第二入射光线继续向第一入射光线移动并静止具体为:第二入射光线继续向第一入射光线匀速移动,直至两个光线相邻的边间距为一种细胞的直径时静止。

[0014] 本发明的优点与积极效果为:

[0015] 1. 本发明无需制备特异性结构的金属微电极,并且光电子镊芯片成本低廉且可重

复利用。

[0016] 2. 本发明可实现数字化、机器人化的细胞实时在线筛选, 可实现原位及可视化筛选, 无需通过传统的抗体标记筛选。

[0017] 3. 本发明是一种免标记无损细胞的方法, 且具有自动化、批量化及吞吐量高的优点。

[0018] 4. 本发明依据血红细胞与淋巴瘤细胞的物理、化学及电生理特性差异, 可实现利用光诱导介电泳机械力实现淋巴瘤细胞的筛选, 该方法准确率高, 无需抗体标记且对细胞无损害性。

#### 附图说明

[0019] 图1为本发明筛选淋巴瘤细胞与血红细胞原理图一;

[0020] 图2为本发明筛选淋巴瘤细胞与血红细胞原理图二;

[0021] 图3为本发明筛选淋巴瘤细胞与血红细胞原理图三;

[0022] 图4为本发明筛选淋巴瘤细胞与血红细胞原理图四;

[0023] 图5为淋巴瘤细胞与血红细胞极化特性频谱图;

[0024] 图6为两束不同宽度光线产生的光诱导介电泳机械力三维分布图;

[0025] 图7为淋巴瘤细胞与血红细胞受到的光诱导介电泳机械力图。

#### 具体实施方式

[0026] 下面结合附图对本发明作进一步详述。

[0027] 本发明公开一种机器人化无损细胞筛选方法, 是将机器人技术融入生命科学, 利用计算机控制的数字化可编程入射光, 经投影仪投射于光电子镊芯片从而激发诱导产生空间虚拟非均匀电场; 该电场与悬浮于芯片中的细胞相互作用而产生光诱导介电泳机械力, 利用光诱导介电泳机械力实现细胞的实时在线感知、驱动、控制; 由于细胞受到的光诱导介电泳机械力强度、大小与方向取决于细胞自身的物理、化学及电生理特性, 因此不同频率的交流电压作用下, 其力学特性不同, 由于不同种类的细胞在电场作用下其极化机制不同, 因此, 可利用光诱导介电泳机械力实现癌细胞的免标记筛选。

[0028] 本发明采用两束不同宽度的直线型图案作为入射光类型; 宽度较小的光线设置为静止, 而宽度较大的光线设置为运动; 由于宽度较大的光线产生的光诱导介电泳机械力较大, 因此, 可实现受力较大的淋巴瘤细胞首先越过静止的光线, 从而实现淋巴瘤细胞的免标记筛选。

[0029] 其中, 两束直线型入射光从芯片底部入射, 两束光宽度比为2:1, 且较宽的光线宽度范围为20~40 $\mu\text{m}$ , 入射角度与芯片表面成90°; 两束入射光相邻的两个边的间隔为12 $\mu\text{m}$ ~100 $\mu\text{m}$ , 最外侧的两个边的间隔为72 $\mu\text{m}$ ~160 $\mu\text{m}$ ; 在驱动细胞所需电压为幅值为5~10V的交流电, 频率为40~70kHz。

[0030] 当可编程的数字化入射光通过投影仪照射于光电子镊芯片时, 入射光激发半导体光敏材料产生电子空穴对, 使得入射光明亮处的电阻显著减小, 从而在溶液层中产生空间非均匀电场; 空间非均匀电场与悬浮于溶液层中的细胞相互作用, 产生的光诱导介电泳机械力作用于细胞; 由于入射光可实时在线控制, 因此可通过控制入射光而实现细胞筛选; 淋

淋巴瘤细胞尺寸大于红细胞,且极化特性也存在频率化差异,因此,淋巴瘤细胞受到的光诱导介电泳机械力较大。

[0031] 癌细胞与正常细胞之间差异性的物理、化学及电生理特性,引起细胞受到的机械力具有不同的频谱特性。本发明以筛选淋巴瘤病人血液中的淋巴瘤B细胞(Raji细胞)为例,具体如下:

[0032] 处于光诱导非均匀电场中的细胞,由于被非均匀电场极化而产生可控性运动的行为称为介电泳机械力,光电子镊芯片中的细胞受到的介电泳力称为光诱导介电泳机械力,对于细胞,其表达式为:

$$[0033] \quad F_{DEP} = 2\pi abc \epsilon_m \text{Re}[K(\omega)] \nabla E^2 \quad (1)$$

[0034] 其中a,b,c分别为细胞的半轴长,E为电场强度,K( $\omega$ )表达式为:

$$[0035] \quad K(\omega) = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{3(\epsilon_p^* - \epsilon_m^*)A_j + 3\epsilon_m^*} \quad (2)$$

[0036] 其中 $\epsilon^*$ 为复介电常数,表达式为 $\epsilon^* = \epsilon - j\sigma/\omega$ , $\epsilon$ 、 $\sigma$ 分别为介电常数和电导率, $\omega$ 为角频率,下角标p、m分别代表细胞和液体, $A_j$ 为沿着j(j=x,y,z)轴的极化系数。 $K(\omega)$ 为Clausius-Mossotti(CM)因子,代表细胞在电场中的极化强度,其与细胞的电特性密切相关;E为电场强度; $\omega$ 为交流电压角频率。当CM因子大于零时,细胞受正介电泳机械力,向电场强度梯度最大值区域运动,进而聚集于入射光处;反之,被操纵细胞远离入射光处。

[0037] 淋巴瘤B细胞一般被看作为球形单层核壳结构,其复介电常数表达式为:

$$[0038] \quad \epsilon_p^* = \epsilon_{mem}^* R \frac{j\omega\tau_c + 1}{j\omega(\tau_c + \tau_m) + 1} \quad (3)$$

[0039] 其中 $\tau_c = \epsilon_c/\sigma_c$ , $\tau_m = C_{mem}R/\sigma_c$ , $\epsilon_c = 6.8E-10F/m$ , $\sigma_c = 0.58S/m$ , $C_{mem} = 1E-2F/m^2$ , $R = 6\mu m$ , $\epsilon_c$ 与 $\sigma_c$ 分别为淋巴瘤B细胞的细胞质介电常数与电导率, $C_{mem}$ 为细胞膜电容, $\omega$ 为交流电压角频率。

[0040] 红细胞呈不规则形状,一般被看作为具有扁椭球形的单层核壳结构,其半轴的长度分别为a,b,c,且满足a=b>c。红细胞的复介电常数表达式表示为:

$$[0041] \quad \epsilon_p^* = \epsilon_{mem}^* \left( \frac{\epsilon_{mem}^* + (\epsilon_c^* - \epsilon_{mem}^*)(A_j + v(1 - A_j))}{\epsilon_{mem}^* + (\epsilon_c^* - \epsilon_{mem}^*)(A_j - vA_j)} \right) \quad (4)$$

$$[0042] \quad A_j = 0.5(e^2 \arctan(e^2 - 1)^{0.5} - (e^2 - 1)^{0.5}) / (e^2 - 1)^{1.5} \quad (5)$$

[0043] 其中 $\epsilon_{mem}^*$ 为红细胞的细胞膜复介电常数,其表达式为 $\epsilon_{mem}^* = \epsilon_{mem} - j\sigma_{mem}/\omega$ , $\epsilon_{mem}$ 与 $\sigma_{mem}$ 分别为红细胞细胞膜的介电常数与电导率, $\epsilon_{mem} = 7.2E-11F/m$ , $\sigma_{mem} = 1.6E-6S/m$ ;  $\epsilon_c^*$ 为红细胞的细胞质复介电常数,其表达式为 $\epsilon_c^* = \epsilon_c - j\sigma_c/\omega$ , $\epsilon_c$ 与 $\sigma_c$ 分别为红细胞细胞质的介电常数与电导率, $\epsilon_c = 6.8E-10F/m$ , $\sigma_c = 0.5S/m$ ;  $a = 3.5\mu m$ , $e = a/c = 4$ , $d = 8nm$ , $\omega$ 为交流电压角频率,v为细胞内部体积分量,其表达式为 $v = (c-d)(a-d)^2/ca^2$ 。

[0044] 如图1所示,为筛选淋巴瘤细胞与红细胞原理图。悬浮于光电子镊芯片中的淋巴瘤细胞与红细胞,在两束宽度分别为 $20\mu m$ (图中左侧粗线)与 $10\mu m$ (图中右侧细线)的入射光线作用下,由于受到负介电泳力作用而远离入射光处,如图1所示;设置 $10\mu m$ 光线静止并

设置 $20\mu\text{m}$ 光线为水平向右匀速移动,其速度设置为 $10\sim 20\mu\text{m}/\text{s}$ ,由于 $20\mu\text{m}$ 光线激发的光诱导介电泳机械力较大,因此,两类细胞被推向 $10\mu\text{m}$ 光线处,如图2所示; $20\mu\text{m}$ 光线进一步向右移动,当两束光线间距为 $12\mu\text{m}$ ,即为淋巴瘤B细胞直径时,受到光诱导介电泳机械力较大的淋巴瘤B细胞首先越过 $10\mu\text{m}$ 静止光线,如图3所示;两束光线均静止,如图4所示,从而实现淋巴瘤细胞的筛选。样品的浓度为 $5\times 10^7$ 个 $\sim 1\times 10^5$ 个每毫升,可以保证细胞分离的纯度同时具有应用价值。

[0045] 如图5所示为淋巴瘤细胞与血红细胞的极化强度频谱图,其中插图为淋巴瘤细胞与血红细胞的几何结构模型图。该图表明:淋巴瘤细胞的极化强度取值范围为 $-0.5\sim 1$ ,血红细胞的极化强度取值范围为 $-0.5\sim 2$ ;当外交交流电压频率低于 $70\text{kHz}$ 时,两类细胞均受到负介电泳机械力,即远离入射光处,且淋巴瘤细胞极化强度大于血红细胞。

[0046] 如图6所示为利用有限元仿真方法,仿真得出的两束宽度分别为 $20\mu\text{m}$ 与 $10\mu\text{m}$ 的入射光线激发的光诱导介电泳机械力空间三维分布,两类细胞在两束光线激发的光诱导介电泳机械力作用下位于这两束光线形成的中间区域。

[0047] 如图7所示为仿真计算求取的两束光线激发的作用于淋巴瘤细胞与血红细胞两类细胞的光诱导介电泳机械力速度分布图,结果表明,淋巴瘤细胞受到的光诱导介电泳机械力大于血红细胞,且 $20\mu\text{m}$ 光线激发的光诱导介电泳机械力强度大于 $10\mu\text{m}$ 光线激发的光诱导介电泳机械力强度,证明了利用两束不同宽度光线实现淋巴瘤细胞筛选的可行性与科学性。

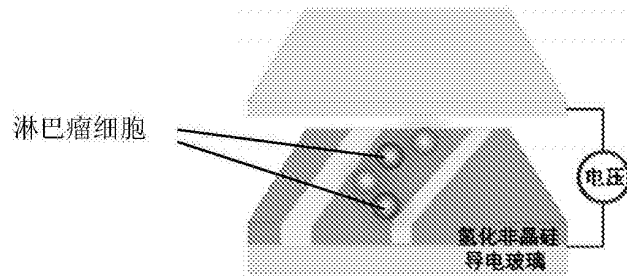


图1

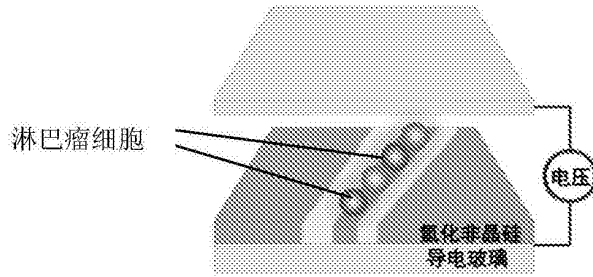


图2

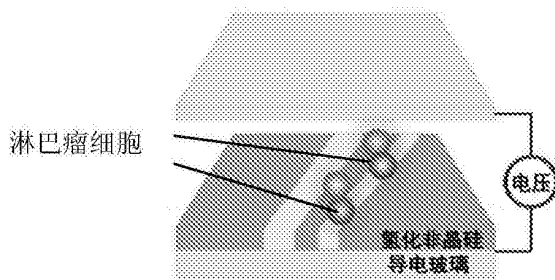


图3

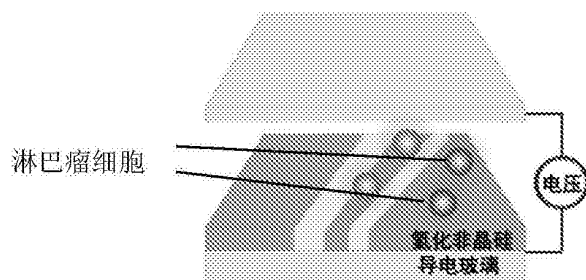


图4

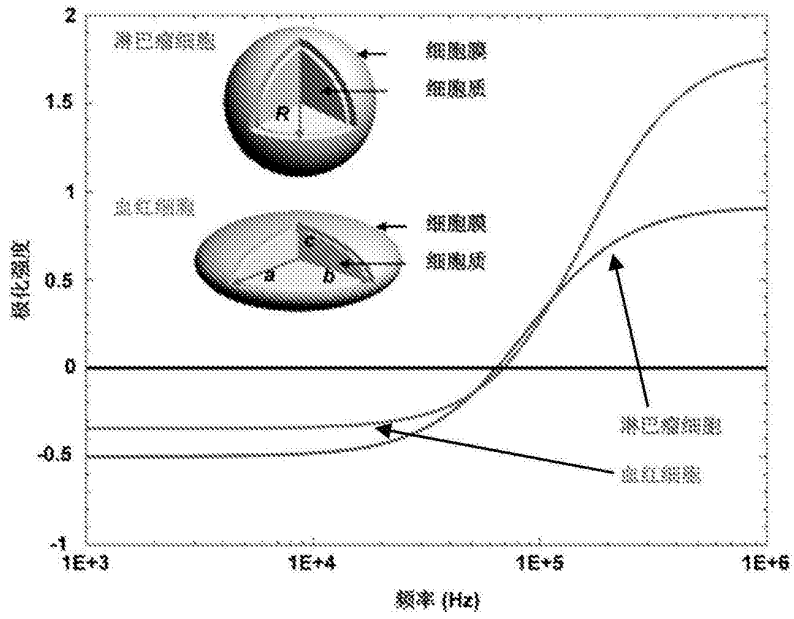


图5

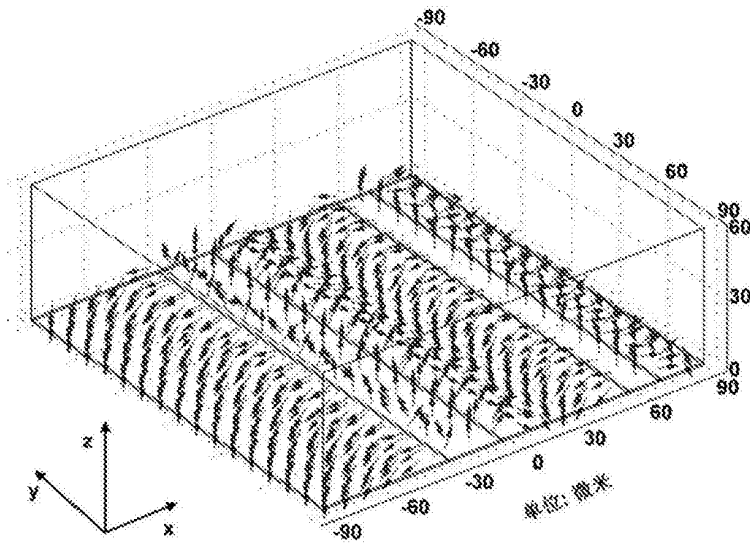


图6



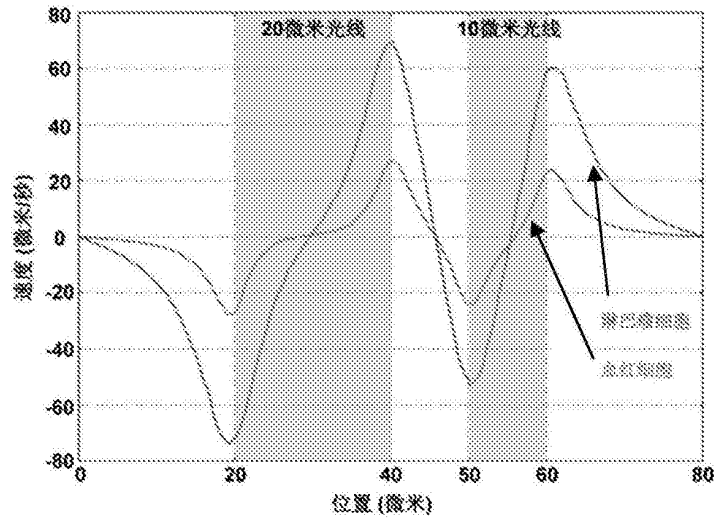


图7