



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111266140 A

(43)申请公布日 2020.06.12

(21)申请号 202010158129.0

(22)申请日 2020.03.09

(71)申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明区思明南路422号

(72)发明人 王秋泉 周阳 陈张倩

(74)专利代理机构 厦门南强之路专利事务所
(普通合伙) 35200

代理人 马应森

(51) Int. Cl.

B01L 3/00(2006.01)

G01N 27/62(2006.01)

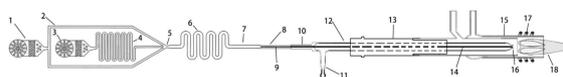
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

无油分选-直接注入-ICPMS单细胞分析系统

(57)摘要

无油分选-直接注入-ICPMS单细胞分析系统,涉及单细胞分析平台。集成细胞分选、操控和单细胞直接注入的进样装置,并耦合ICPMS质谱检测进行高效单细胞分析。包括双直线-弯曲-直线型微流控芯片和直接注入式微喷器件;双直线-弯曲-直线型微流控芯片包括缓冲液入口、缓冲液通道、悬浮液入口、两级分离通道;缓冲液和悬浮液入口主体为一个圆柱结构,三叉式连接的两级分离通道由若干个“直线-弯曲-直线”的结构组成;直接注入式微喷器件包括一个带载气支管的外壳,外壳末端逐渐变细形成喷嘴;进样毛细管从外壳尾端插入相对于喷嘴略有缩进,并剥去一段毛细管表面的聚酰亚胺涂层,在喷嘴处在线形成微空腔。整个系统使用碳酸氢氨缓冲液。



1. 无油分选-直接注入-ICPMS单细胞分析系统,其特征在于包括双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片和直接注入式微喷器件;

所述双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片包括缓冲液入口、缓冲液通道、悬浮液入口、第一级细胞分离通道、连接部分和第二级细胞分离通道;所述缓冲液入口主体为一个圆柱结构,用于样品的注入,入口后端通道逐渐变细与缓冲通道三叉式连接,所述缓冲通道设于悬浮液入口和第一级细胞分离通道外围并以一定夹角与第二级细胞分离通道连接;所述悬浮液入口结构与缓冲液入口结构相同,悬浮液入口后端与第一级细胞分离通道连接;所述缓冲液入口和悬浮液入口内均设有若干个六边形小柱,用于过滤样品中的杂质以及对细胞进行预分离;所述第一级细胞分离通道由若干个“直线-弯曲-直线”的结构组成,用于将细胞在惯性升力和迪恩拖曳力的共同作用下,于微通道中逐渐分离开,实现细胞单道有序排列;所述连接部分用于将缓冲液通道、第一级细胞分离通道合并后连接至第二级细胞分离通道,所述第二级细胞分离通道用于调控细胞之间的间隔时间,细胞经第二级细胞分离通道后进一步排列与分离至所需的细胞间隔时间,第二级细胞分离通道的直线出口端通过连接的毛细管与直接注入式微喷器件相连;

所述直接注入式微喷器件包括一个带载气支管的外壳,外壳末端逐渐变细形成喷嘴;用于样品传输的进样毛细管从外壳尾端插入直到相对于喷嘴略有缩进,并剥去一段毛细管表面的聚酰亚胺涂层,在喷嘴处在线形成一个微空腔,以使液体样品与载气充分相互作用,达到雾化的目的;进样毛细管另一端与双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片的出口毛细管连接。

2. 如权利要求1所述无油分选-直接注入-ICPMS单细胞分析系统,其特征在于所述双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片使用的缓冲液为碳酸氢铵缓冲溶液。

3. 如权利要求1所述无油分选-直接注入-ICPMS单细胞分析系统,其特征在于所述双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片的材料包括但不限于聚二甲基硅氧烷或玻璃和石英材料。

4. 如权利要求1所述无油分选-直接注入-ICPMS单细胞分析系统,其特征在于所述双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片通过聚四氟乙烯软管与进样的注射器口连接。

5. 如权利要求1所述无油分选-直接注入-ICPMS单细胞分析系统,其特征在于所述喷嘴的内径大于进样毛细管的外径。

6. 如权利要求1所述无油分选-直接注入-ICPMS单细胞分析系统,其特征在于所述进样毛细管的尺寸与微流控芯片出口的毛细管尺寸相同;所述进样毛细管末端相对外壳喷嘴略微缩进。

7. 如权利要求1所述无油分选-直接注入-ICPMS单细胞分析系统,其特征在于所述直接注入式微喷器件用于替代ICPMS炬管的中心通道。

8. 如权利要求1所述无油分选-直接注入-ICPMS单细胞分析系统,其特征在于所述进样毛细管另一端与双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片的出口毛细管连接是通过一个聚四氟乙烯套管零死体积连接。

9. 如权利要求1所述无油分选-直接注入-ICPMS单细胞分析系统,其特征在于所述直接注入式微喷器件的外壳采用玻璃或石英材料,外壳的长度、外径,以及载气支管的长度随不同类型的ICPMS仪器进行调整。

10. 如权利要求1所述无油分选-直接注入-ICPMS单细胞分析系统,其特征在于所述直

接注入式微喷器件和进样毛细管为可拆换设计。

无油分选-直接注入-ICPMS单细胞分析系统

技术领域

[0001] 本发明涉及单细胞分析平台,尤其是涉及一种无油分选-直接注入-电感耦合等离子体质谱(ICPMS)单细胞分析系统。

背景技术

[0002] 随着生命科学和精准医学的不断发展,单细胞分析的重要性日渐凸显。微流控技术是一种理想的单细胞操控技术(1.Di Carlo,D.;Irimia,D.;Tompkins,R.G.;Toner,M.Continuous Inertial Focusing,Ordering,and Separation of Particles in Microchannels.P.Natl.Acad.Sci.USA2007,104,18892-18897),而电感耦合等离子体质谱(ICPMS)进行元素分析时具有极高的灵敏度和同位素稀释-多元素同时定量检测的能力(2.Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Its Applications.2nd ed.Edited by Steve J.Hill.Blackwell Pub.,2006)。二者的有机结合便于细胞的精确操控,进而实现单细胞的准确分析。现有技术通常利用互不相溶的水相和有机相(油相)在微流控芯片通道中形成液滴,液滴包裹细胞实现细胞的分离(3.Tenje,M.;Fornell,A.;Ohlin,M.;Nilsson,J.Particle Manipulation Methods in Droplet Microfluidics.Anal.Chem.2018,90,1434-1443)。但是,为了保证一个液滴中不会包裹两个及两个以上的细胞,需要降低细胞悬浮液的浓度,限制了细胞分析的通量;油相的使用严重影响ICPMS的离子化效率和质谱本身的稳定性;以及现有的链接细胞分选芯片与ICPMS间的接口,因为配备了较大体积的雾化室致使细胞的传输效率(进样效率)很低,限制了细胞检测效率的提高。总之,现有技术不能满足高通量和高效率的单细胞ICPMS分析。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于针对现有技术存在的上述缺陷,提供可以实现单细胞的本征元素和其中的外源元素和无机纳米材料组成和含量以及元素编码标记的重要蛋白质和核酸分子等的多参数定量分析的一种无油分选-直接注入-电感耦合等离子体质谱(ICPMS)单细胞分析系统。

[0004] 本发明所述无油分选-直接注入-电感耦合等离子体质谱(ICPMS)单细胞分析系统包括双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片和直接注入式微喷器件;

[0005] 所述双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片包括缓冲液入口、缓冲液通道、悬浮液入口、第一级细胞分离通道、连接部分和第二级细胞分离通道;所述缓冲液入口主体为一个圆柱结构,用于样品的注入,入口后端通道逐渐变细与缓冲通道三叉式连接,所述缓冲通道设于悬浮液入口和第一级细胞分离通道外围并以一定夹角与第二级细胞分离通道连接;所述悬浮液入口结构与缓冲液入口结构相同,悬浮液入口后端与第一级细胞分离通道连接;所述缓冲液入口和悬浮液入口内均设有若干个六边形小柱,用于过滤样品中的杂质以及对细胞进行预分离;所述第一级细胞分离通道由若干个“直线-弯曲-直线”的结构组成,用于将细胞在惯性升力和迪恩拖曳力的共同作用下,于微通道中逐渐分离开,实现细胞单道有序

排列;所述连接部分用于将缓冲液通道、第一级细胞分离通道合并后连接至第二级细胞分离通道,所述第二级细胞分离通道用于调控细胞之间的间隔时间,细胞经第二级细胞分离通道后进一步排列与分离至所需的细胞间隔时间,第二级细胞分离通道的直线出口端通过连接的毛细管与直接注入式微喷器件相连;

[0006] 所述直接注入式微喷器件包括一个带载气支管的外壳,外壳末端逐渐变细形成喷嘴;用于样品传输的进样毛细管从外壳尾端插入直到相对于喷嘴略有缩进,并剥去一段毛细管表面的聚酰亚胺涂层,在喷嘴处在线形成一个微空腔,以使液体样品与载气充分相互作用,达到雾化的目的;进样毛细管另一端与双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片的出口毛细管连接。

[0007] 进一步的:

[0008] 所述双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片使用的缓冲液为碳酸氢铵缓冲溶液,用于细胞的列队操控,细胞分离过程中不需要加入任何有机相(油相)或有机高分子添加剂。

[0009] 所述双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片包括但不限于聚二甲基硅氧烷(PDMS)、玻璃和石英材料。

[0010] 所述双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片可通过聚四氟乙烯(PTFE)软管与进样的注射器口连接。

[0011] 所述喷嘴的内径应大于进样毛细管的外径。

[0012] 所述进样毛细管的尺寸与微流控芯片出口毛细管的尺寸相同。

[0013] 所述进样毛细管末端相对外壳喷嘴略微缩进。

[0014] 所述直接注入式微喷器件可以直接替代ICPMS炬管的中心通道。

[0015] 所述进样毛细管另一端与双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片的出口毛细管连接可通过一个聚四氟乙烯(PTFE)套管零死体积连接。

[0016] 所述直接注入式微喷器件的外壳可采用玻璃或石英材料,外壳的长度、外径,以及载气支管的长度可以随不同类型的ICPMS仪器进行调整。

[0017] 所述直接注入式微喷器件和进样毛细管为可拆换设计,可根据需要随时拆换。

[0018] 使用时,从培养皿上酶解下来的细胞先保存于PBS中,进行实验前,将细胞离心后,弃上清液,重新悬浮于碳酸氢铵(NH_4HCO_3)缓冲液中进行单细胞分析。在惯性力和迪恩拖曳力的作用下,细胞在双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片的微通道中实现分选列队和细胞间隔时间的调控;芯片出口与一个“直接注入式在线单细胞进样微喷器件”连接,具有一定时间间隔排列好的细胞直接注入到ICPMS中,实现定量进样和高效ICPMS检测。

[0019] 本发明可配合任何类型的ICPMS,包括但不限于四级杆、三重四级杆、飞行时间质谱和扇形场高分辨质谱。

[0020] 本发明的核心内容由两部分组成:

[0021] 1) 设计制备了一个双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片。仅仅使用具有热分解特性的碳酸氢铵(NH_4HCO_3)缓冲溶液来实现细胞在芯片微通道中的分选排列和细胞间隔时间的操控,细胞分离过程中不需要加入任何有机相(油相)或有机高分子添加剂,这样一方面避免使用对ICPMS离子化和稳定性有不利影响的有机相(油相)或高分子表面活性剂,另一方面可调节的细胞间隔时间有利于与具有不同瞬时信号采集时间的质谱仪器的契合。

[0022] 2) 设计制作了一个直接注入式微喷器件,其由一个带载气引入接口的玻璃(或石

英)外壳和顶端剥离聚酰亚胺外层的缩进石英毛细管组成。其可直接替换电感耦合等离子体炬管的中心通道,另一端与双“直线-弯曲-直线”型细胞分选和操控芯片相连,列队的单细胞在线直接引入到电感耦合等离子体中离子化,实现电感耦合等离子体质谱(ICPMS)单细胞分析。克服了由于单细胞悬浮液进样速率很慢($\mu\text{L}/\text{min}$)而雾室的体积很大(几毫升到几十毫升)致使的细胞在雾室内的再次混合以及雾室对液滴的筛选效应,可实现细胞的定量传输(进样)和单细胞的高效率检测。

[0023] 综上,本发明开发了高效的单细胞ICPMS分析系统,集成了细胞分选、操控和单细胞直接注入的进样装置,并耦合电感耦合等离子体质谱(ICPMS)检测进行高效的单细胞分析。通过本发明可以实现单细胞的本征元素和其中的外源元素和无机纳米材料组成和含量以及元素编码标记的重要蛋白质和核酸分子等的多参数定量分析。单细胞分选和操控在一个双“直线-弯曲-直线”型芯片的微通道中完成;由载气引入接口的玻璃(或石英)外壳和顶端剥离聚酰亚胺外层的缩进石英毛细管组成的直接注入式微喷器件可直接替换电感耦合等离子体炬管的中心通道,分选出的单细胞可在线引入到电感耦合等离子体中离子化,实现电感耦合等离子体质谱(ICPMS)单细胞分析。调节细胞悬浮液密度和流速可以在第一级“直线-弯转-直线”通道中实现细胞的分离和排列;通过连接第二级“直线-弯曲-直线”通道的分叉节点调节流体的流速可以实现细胞间隔时间的调控,以适应不同质谱仪瞬时信号读出时间的要求。链接芯片和质谱的直接注入式在线单细胞进样微喷器件使单细胞传输效率达到100%。整个过程中仅仅使用具有热解特性的碳酸氢铵(NH_4HCO_3)缓冲溶液,避免了油相和高分子表面活性剂的使用,提高了质谱分析的稳定性、准确度,检测效率得到极大地提高。所研发的单细胞分析系统可以实现单细胞中本征元素和外源元素、无机纳米材料组成和含量以及元素编码标记的重要蛋白质和核酸分子的多参数高效分析。

附图说明

- [0024] 图1是本发明实施例的结构组成示意图。
[0025] 图2是双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片的分解结构示意图。
[0026] 图3是直接注入式微喷器件的分解结构示意图。
[0027] 图4是微喷器件喷嘴的结构放大示意图。
[0028] 图5是对空白 NH_4HCO_3 缓冲液中 ^{66}Zn 的信号图。
[0029] 图6是对HeLa细胞内锌(^{66}Zn)元素检测的结果图。
[0030] 图7是空白 NH_4HCO_3 缓冲液中 ^{197}Au 的信号图。
[0031] 图8是经AuNPs培养的HeLa细胞内金(^{197}Au)元素的检测结果图。

具体实施方式

- [0032] 以下实施例将结合附图对本发明作进一步的说明。
[0033] 如图1所示,本发明实施例主体由双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片和直接注入式微喷器件组成;两者的毛细管通过一个聚四氟乙烯(PTFE)套管实现无死体积的连接。
[0034] 所述双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片包括 NH_4HCO_3 缓冲调节液入口1、 NH_4HCO_3 缓冲调节液通道2、悬浮液入口3、第一级细胞分离通道4和第二级细胞分离通道6;直接注入式微喷器件包括直接注入式微喷器件尾端10、载气支管11、载气通道12、细胞注入毛细管14和

微喷器件喷嘴16。

[0035] NH_4HCO_3 缓冲调节液入口1主体为一个圆柱结构, NH_4HCO_3 缓冲调节液从该入口注入, 入口后端通道逐渐变细与 NH_4HCO_3 缓冲调节液通道2连接, 所述 NH_4HCO_3 缓冲调节液通道2设于悬浮液入口3和第一级细胞分离通道4, 悬浮液入口3结构与 NH_4HCO_3 缓冲调节液入口1结构相同, 主体为一个圆柱结构, 悬浮液入口3出口接第一级细胞分离通道4, 第一级细胞分离通道4由若干个“直线-弯曲-直线”的结构组成, NH_4HCO_3 缓冲调节液入口1和悬浮液入口3内均设有若干个六边形小柱, 用于过滤样品中的杂质以及对细胞进行预分离; NH_4HCO_3 缓冲调节液通道2以一定的夹角与第一级细胞分离通道4后端直线延伸段相连后逐渐拓宽与第二级细胞分离通道6宽度相同并相连, 形成分叉连接部分5; 第二级细胞分离通道6也呈若干个“直线-弯曲-直线”的结构, 用于调控细胞之间的间隔时间, 第二级细胞分离通道6的直线出口端通过芯片出口7处的芯片出口毛细管9及套在毛细管外的PTFE套管8与直接注入式微喷器件尾端10相连, 芯片出口毛细管9和细胞注入毛细管14通过PTFE套管8实现无死体积的连接, 载气支管11设在载气通道12前端下部, 载气支管11用于连接载气管路, 载气通过载气支管11进入载气通道12进而与液体样品相互作用, 载气通道12末端逐渐变细形成微喷器件喷嘴16, ICPMS炬管底座13套设在直接注入式微喷器件中端外部, ICPMS炬管15与ICPMS炬管底座13相连; 17为射频线圈; 18为ICP。

[0036] 双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片的分解结构如图2所示, 主要由4个部分构成: 1) 样品入口。样品入口主体为一个圆柱结构, 用于样品的注入, 入口后端通道逐渐变细, 与后面细胞分离的通道相连接; 其中还有若干个六边形小柱, 用于过滤样品中的杂质以及对细胞进行预分离。芯片上有两个相同的入口结构, 悬浮液入口3和 NH_4HCO_3 缓冲调节液入口1分别用于细胞悬浮液的引入以及 NH_4HCO_3 缓冲调节液的引入。2) 第一级细胞分离通道4。该通道由若干个“直线-弯曲-直线”的结构组成。在惯性升力(inertial lift force)和迪恩拖曳力(dean drag force)的共同作用下, 细胞在微通道中逐渐分离, 实现单道的排列。3) 连接部分5: 细胞悬浮液与 NH_4HCO_3 缓冲调节液通道的分叉连接部分5的作用是将细胞悬浮液通道、调节液通道与第二级细胞间隔时间调控通道进行连接。两个调节液通道以一定的夹角与细胞悬浮液通道连通, 之后逐渐拓宽与第二级通道宽度相同。4) 第二级细胞分离通道6。通过调节调节液的流速, 可以在该区域实现对细胞之间的间隔时间的调控。引入了调节液后, 细胞在该通道内进行进一步的排列与分离至所需的细胞间隔时间, 最终通过连接的毛细管引入到直接注入式微喷器件中。

[0037] 所述双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片可采用以下方法制备: 首先采用标准软性光刻技术在硅片上用SU-8 2050光刻胶制作母版, 并用1H, 1H, 2H, 2H-全氟辛基二甲基氯硅烷在85℃下处理三次以防止PDMS与硅片模版粘结在一起。硅酮树脂184基底与固化剂按10:1的比例混合, 真空脱气, 浇注在母版上以制备PDMS。75℃孵育40min后, 将固化的PDMS切割下来, 并且使用冲针在其上钻两个孔以与进样管连接。具有通道结构和不具有通道结构的两块PDMS分别用氧等离子体处理1min, 处理完后马上将两块PDMS叠在一起即可完成芯片的键合, 最后在芯片出口处沿轴向插入一根毛细管用于与后面的直接注入式微喷器件连接。

[0038] 直接注入式微喷器件的结构如图3和4所示, 其主体结构为一根带有载气支管的玻璃管或石英管, 并且其末端逐渐变细形成喷嘴。用于样品传输的毛细管从玻璃管尾端插入直到相对于喷嘴略有缩进, 并剥去一段毛细管表面的聚酰亚胺外层, 这样可以在喷嘴处形

成一个在线微空腔,以使液体样品与载气充分相互作用,达到雾化的目的。样品毛细管另一端通过PTFE套管与双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片的出口毛细管零死体积连接。直接注入式在线单细胞进样微喷器件可直接替换电感耦合等离子体炬管的中心通道,顶端剥离聚酰亚胺外层的缩进石英毛细管与外壳喷嘴之间在线形成了一个微区,紧邻于ICP火焰尾端,无需配备额外的雾室。另一端与双“直线-弯曲-直线”型细胞分选和操控芯片相连,列队的单细胞在线直接引入到电感耦合等离子体中离子化,实现电感耦合等离子体质谱(ICPMS)单细胞分析。

[0039] 无油分选-直接注入单细胞电感耦合等离子体质谱(ICPMS)分析系统。首先,将直接注入式微喷器件替换ICP炬管的中心通道以及雾化器和雾室,调节直接注入式微喷器件的喷嘴位于与ICP炬管内管口相距约2mm处,将载气管路与直接注入式微喷器件的支管连接,完成直接注入式微喷器件的安装。然后,分别在两个适当体积的注射器中吸入分散在碳酸氢铵(NH_4HCO_3)缓冲液中的细胞悬浮液和 NH_4HCO_3 缓冲调节液,将两个注射器分别安装在注射泵上。注射器出口用PTFE管与芯片入口连接(细胞悬浮液与悬浮液入口连接, NH_4HCO_3 缓冲调节液与缓冲液入口连接)。芯片出口的毛细管用PTFE套管与直接注入式微喷器件的毛细管连接,完成分析系统的搭建。

[0040] 单细胞ICPMS分析。ICPMS点炬,在ICPMS工作站控制软件中将检测模式设置为时间分辨模式,设置合适的驻留时间和数据采集数;设置两个注射泵的流速使细胞间的间隔时间大于或等于当前ICPMS的设定驻留时间,即可进行ICPMS检测,获得单细胞中目标元素的瞬时脉冲信号图谱。

[0041] 以下给出具体实施例,需要指出:本发明并不局限于以下实施例。以下实施例中的任何技术特征和实施方案均为多种可选技术特征和多种可选实施方案中的一种或几种。为了描述简便需要,本发明无法穷举本发明所包含的所有可替代技术特征和实施方案,因此本领域的技术人员应知晓:本实施例内的任何技术特征和实施方案均不限制本发明的保护范围,该保护范围包括所有本领域技术人员不付出创造性劳动所采取的任何替代技术特征和实施方案。具体地说,将本发明中的任意技术特征进行替换或将本发明提供的任意两个及以上技术特征进行相互组合所得到的实施方案均应在本发明的保护范围内。本实施例中使用的ICPMS虽为带有动态反应池的四级杆ICPMS,但是该分析系统也同样适用于其它类型的ICPMS。实施例中未注明的具体技术和条件者,按照本领域内文献所描述的技术和条件或按照产品说明书进行,所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购得到的常规产品。

[0042] 实施例1:HeLa细胞内Zn的测定

[0043] 1、双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片。芯片的制备如上文所述,本实施例中使用的微流控芯片的尺寸规格如下所述:所用通道的高度均为 $46\mu\text{m}$,其中 NH_4HCO_3 缓冲调节液入口1和悬浮液入口3主要包含一个半径 $550\mu\text{m}$ 的圆柱结构,用于样品的注入,入口后端通道逐渐变细至 $100\mu\text{m}$,与后面细胞分离的通道相连接。其中还有56个直径 $50\mu\text{m}$ 的六边形小柱,用于过滤样品中的杂质以及对细胞进行预分离。第一级细胞分离通道4由12个直线-弯曲的结构($12 \times 1500\mu\text{m}$ 长 $\times 100\mu\text{m}$ 宽的直线通道和14个外径 $150\mu\text{m}$,内径 $50\mu\text{m}$ 的弯曲通道)组成。在惯性力和迪恩拖曳力的作用下,细胞在这些通道中逐渐分离开,实现单道的有序排列。连接部分5由2个 $100\mu\text{m}$ 宽的 NH_4HCO_3 缓冲调节液通道以 30° 的夹角与 $100\mu\text{m}$ 宽的细胞悬浮液通道连

通,之后以 9° 的角度拓宽至 $200\mu\text{m}$ 进入第二级分离通道6 ($7\times 1200\mu\text{m}$ 长 $\times 200\mu\text{m}$ 宽的直线通道和9个外径 $300\mu\text{m}$,内径 $100\mu\text{m}$ 的弯曲通道),出口7宽度为 $200\mu\text{m}$,通过连接的毛细管($365\mu\text{m}$ 外径 $\times 75\mu\text{m}$ 内径)与直接注入式微喷器件连接。

[0044] 制备好的芯片通道内先注入全氟硅油聚合物溶液, 135°C 处理 15min 。去除全氟硅油后,在使用前再用 $1\text{wt}\%$ 的普朗尼克F-127在 $5\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速下冲洗通道 15min ,在室温下静置 10min 。该处理过程的目的是防止通道表面与细胞发生吸附作用。

[0045] 2、安装直接注入式微喷器件。本实施例中使用的直接注入式微喷器件的尺寸规格如下:总长 208mm ,载气通道12外径 7mm ,内径 4mm ,载气支管11长度为 25mm 。直接注入式微喷器件喷嘴16处渐变至内径 0.4mm 。用于样品传输的毛细管14 ($365\mu\text{m}$ 外径 $\times 75\mu\text{m}$ 内径)从直接注入式微喷器件尾端10插入至与喷嘴相距 0.5mm 的位置,毛细管表面的聚合物涂料被剥去 2mm ,以在喷嘴处形成一个体积约为 0.03mm^3 的微空腔,载气出口的面积 0.0105mm^2 。样品毛细管尾端通过PTFE套管8与芯片出口毛细管零死体积连接。该直接注入式微喷器件使用的载气流速为 $0.4\text{L}/\text{min}$ 。安装直接注入式微喷器件时,首先取下ICPMS上的常规进样雾化器和雾室。拆下炬管,取出中心管,将直接注入式微喷器件替换到中心管位置。直接注入式微喷器件的喷嘴相对炬管内管口缩进 2mm 。将安装了直接注入式微喷器件的炬管安装到ICPMS上,再将载气管路与直接注入式微喷器件的支管11连接,即完成安装。

[0046] 3、细胞的处理。将一盘长满的HeLa细胞用胰蛋白酶从培养皿底部酶解下来后,使用 $1\times \text{PBS}$ 洗涤5次以去除细胞表面吸附的培养基。最后一次洗涤结束后,离心沉淀细胞,并重悬于 $10\text{mmol}/\text{L}$ 的 NH_4HCO_3 缓冲液中,进行细胞计数。将细胞悬浮液用 NH_4HCO_3 缓冲液稀释到 1.8×10^4 细胞/ mL 后,吸取到注射器中。

[0047] 4、分析平台的搭建。另取一支注射器,在其中充入 $10\text{mmol}/\text{L}$ 的 NH_4HCO_3 缓冲调节液。将两支注射器分别安装到注射泵上,并且使用PTFE的软管(0.88mm 外径 $\times 0.38\text{mm}$ 内径)与芯片上的悬浮液入口3和 NH_4HCO_3 缓冲调节液入口1连接。芯片出口处的毛细管9通过PTFE套管8与直接注入式微喷器件的进样毛细管连接。

[0048] 5、ICPMS设置。ICPMS点炬,设置载气流量为 $0.4\text{L}/\text{min}$ 。打开方法文件,选择 ^{66}Zn 为待测元素,数据采集方式设置为peak hopping,驻留时间设置为 10ms ,采集数据总数设置为3000。

[0049] 6、空白值测定。打开注射泵,将细胞悬浮液的流量设置为 $0\mu\text{L}/\text{min}$, $10\text{mmol}/\text{L}$ 的 NH_4HCO_3 缓冲调节液流量设置为 $13\mu\text{L}/\text{min}$ 。待液体进入直接注入式微喷器件后,点击测样按钮,完成数据采集。采集的图像如图5所示。

[0050] 7、样品测定。打开注射泵,将细胞悬浮液的流量设置为 $6\mu\text{L}/\text{min}$, $10\text{mmol}/\text{L}$ 的 NH_4HCO_3 缓冲液流量设置为 $7\mu\text{L}/\text{min}$ 。点击测样按钮,完成数据采集。采集的图像如图6所示。

[0051] 8、完成测样。测样结束后,进行必要的清洗后,直接关闭注射泵,熄灭ICP。

[0052] 实施例2: AuNPs孵育的HeLa细胞内Au的测定

[0053] 1、双“直线-弯曲-直线”型微流控芯片。芯片的尺寸规格及制备方式与实施例1相同。

[0054] 2、安装直接注入式微喷器件。其尺寸规格及安装方法与实施例1相同。

[0055] 3、细胞的处理。向一盘生长中的HeLa细胞中加入尺寸为 15nm 的金纳米粒子至最终浓度为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$, 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 的条件下培养 4h 。之后将细胞用胰蛋白酶从培养皿底部酶解

下来,使用 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤5次以去除细胞表面吸附的培养基。最后一次洗涤结束后,离心沉淀细胞,并重悬于 10mmol/L 的 NH_4HCO_3 缓冲液中,进行细胞计数。将细胞悬浮液用 NH_4HCO_3 缓冲液稀释到 1.8×10^4 细胞/mL后,吸取到注射器中。

[0056] 4、分析平台的搭建。搭建方法与实施例1相同。

[0057] 5、ICPMS设置。ICPMS点炬,设置载气流量为 0.4L/min 。打开方法文件,选择 ^{197}Au 为待测元素,数据采集方式设置为peak hopping,驻留时间设置为 10ms ,采集数据总数设置为3000。

[0058] 6、空白值测定。打开注射泵,将细胞悬浮液的流量设置为 $0 \mu\text{L/min}$, 10mmol/L 的 NH_4HCO_3 缓冲调节液流量设置为 $13 \mu\text{L/min}$ 。待液体进入直接注入式雾化器后,点击测样按钮,完成数据采集。采集的图像如图7所示。

[0059] 7、样品测定。打开注射泵,将细胞悬浮液的流量设置为 $6 \mu\text{L/min}$, 10mmol/L 的 NH_4HCO_3 缓冲调节液流量设置为 $7 \mu\text{L/min}$ 。点击测样按钮,完成数据采集。采集的图像如图8所示。

[0060] 8、完成测样。进行必要的清洗后,直接关闭注射泵,熄灭ICP。

[0061] 本发明提供了一种无油分选-直接注入-电感耦合等离子体质谱(ICPMS)单细胞分析系统,涉及一种集成了细胞分选、操控和单细胞直接注入的进样装置,并耦合电感耦合等离子体质谱(ICPMS)进行单细胞分析。单细胞分选和操控在一个双“直线-弯曲-直线”型芯片的微通道中完成;由带载气引入接口的玻璃外壳和顶端剥离聚酰亚胺外层的缩进石英毛细管组成的直接注入式微喷器件可直接替换电感耦合等离子体矩管的中心通道,分选出的单细胞可在线引入到电感耦合等离子体中离子化,实现电感耦合等离子体质谱(ICPMS)单细胞分析。调节细胞悬浮液密度和流速可以在第一级“直线-弯曲-直线”通道中实现细胞的分离和排列;通过连接第二级“直线-弯曲-直线”通道的分叉节点调节流体的流速可以实现细胞间隔时间的调控,以适应不同质谱仪瞬时信号读出时间的要求。链接芯片和质谱的直接注入式在线单细胞进样微喷器件使单细胞传输效率达到100%。整个过程中仅仅使用具有热解特性的碳酸氢铵缓冲溶液,避免了油相和高分子表面活性剂的使用,提高了质谱分析的稳定性、准确度,检测效率得到极大地提高。所研发的单细胞分析系统可以实现单细胞中本征元素和外源元素、无机纳米材料组成和含量以及元素编码标记的重要蛋白质和核酸分子的多参数高效分析。

[0062] 综上,本发明不仅可以用于对细胞内本征元素(如Zn)和细胞从外界摄入的金属纳米粒子(例如纳米金)的测定,同样也适用于元素标签靶向标记了的细胞的检测。对上述所公开实施例的说明,是为了使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种调整方式对本领域的专业技术人员将是显而易见的。本发明所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会限于本发明所示的这些实施例,而是要符合与本发明所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

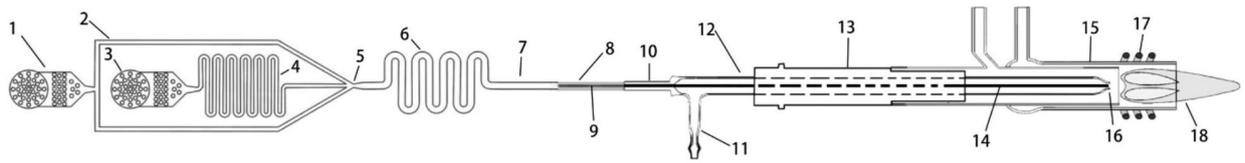


图1

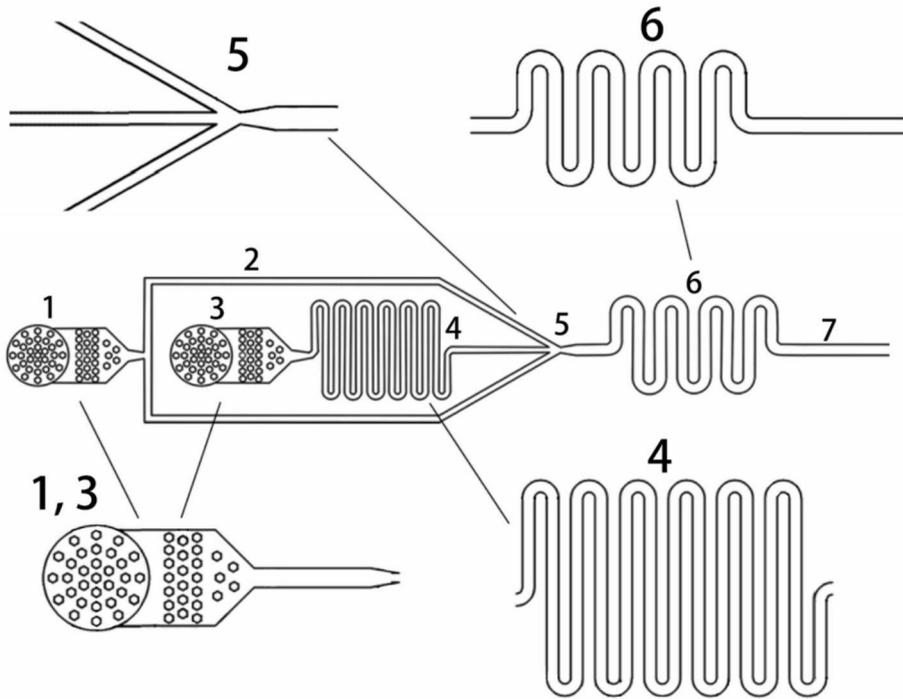


图2

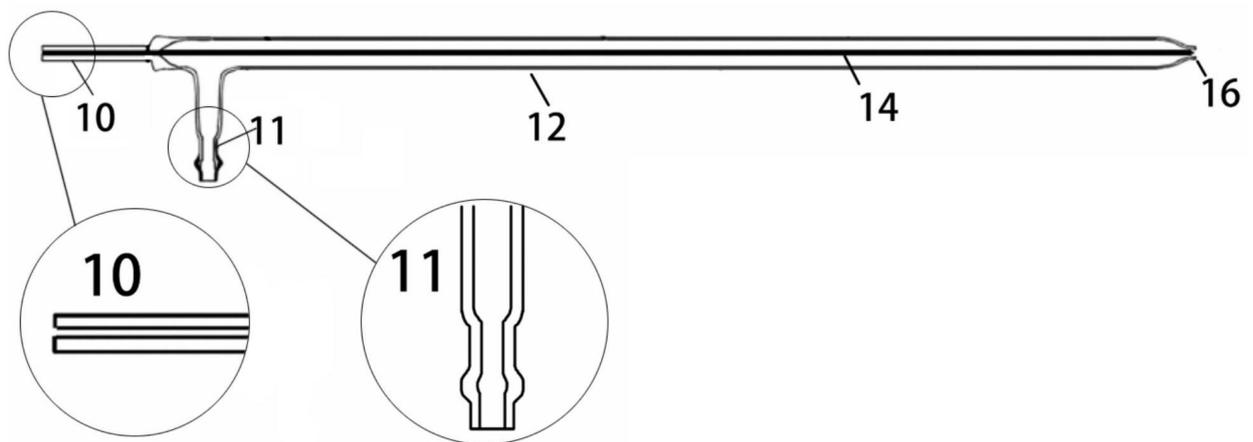


图3

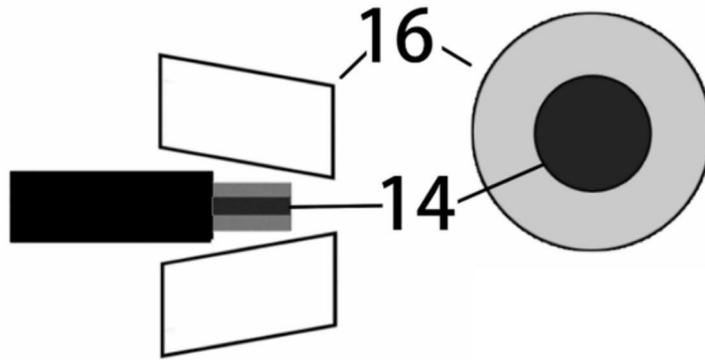


图4

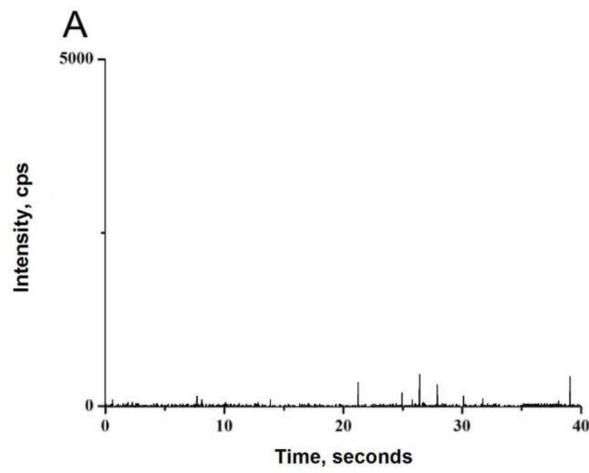


图5

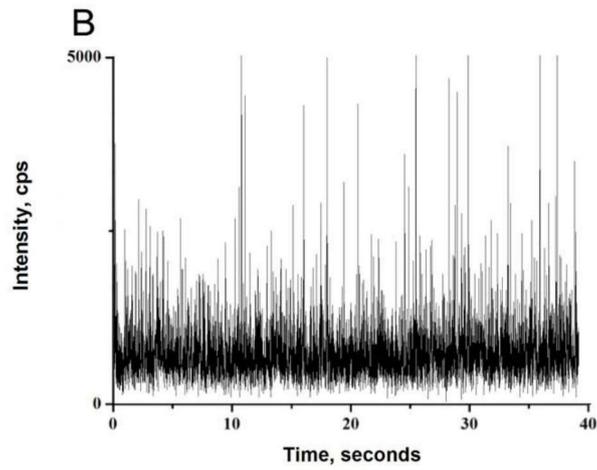


图6

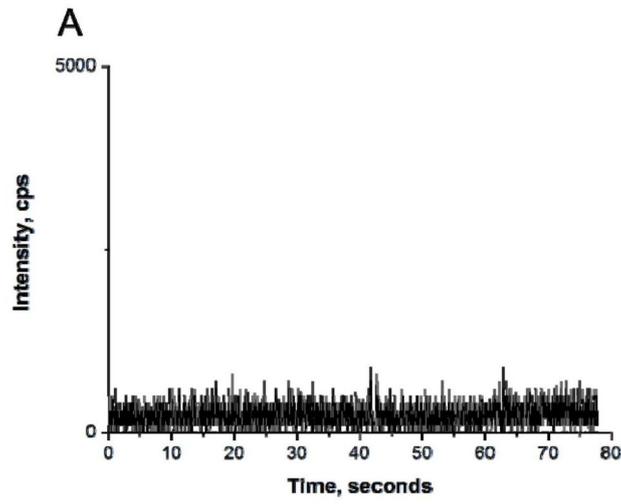


图7

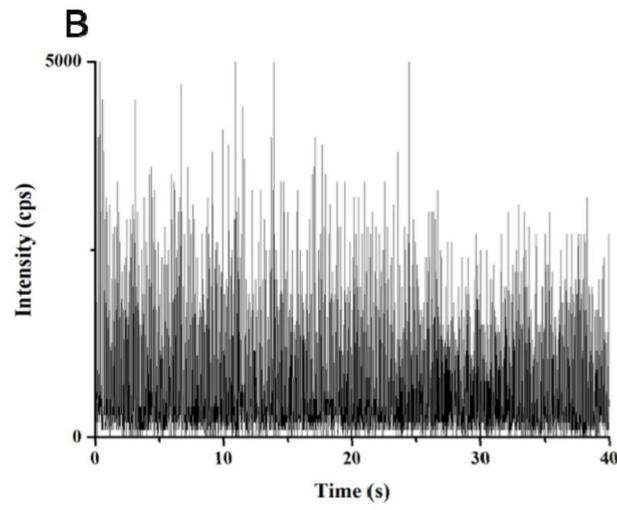


图8