DOI: 10.13718/j. cnki. xdzk. 2015. 04. 026

介电电泳细胞分析芯片结构设计及实验研究。

顾雯雯

西南大学 工程技术学院 电子与控制工程系,重庆 400715

摘要:为了研制高富集效率的介电电泳细胞分析芯片,首先从介电电泳力出发,推导了悬浮细胞所受的介电电泳 力公式.通过对比常规微电极的电场强度,选择又指式阵列微电极构建介电电泳芯片模型,对不同结构参数下微通 道中的电场分布进行模拟,由此对芯片结构参数进行优化设计.为了对模拟结果进行验证,采用微加工技术制作了 介电电泳细胞分析芯片.以HepG2 肝癌细胞为待测样品,当芯片所施加正弦交流电压为5V,频率为4 MHz时,获 得了 88.89%的富集效率.

介电电泳芯片(Electrophoresis Chip, EC)是随着微全分析系统(micro total analysis system, μTAS)和 微机电系统(Micro Electro-Mechanical System, MEMS)的发展而出现的微型器件^[1].通过在玻璃基、硅基 以及高分子聚合物(如聚甲基丙烯酸甲酯 polymethyl methacrylate, PMMA,聚二甲基硅氧烷 polydimethylsiloxane, PDMS)等衬底材料上制作微米量级的微通道以及微电极,在微电极上施加交流或直流电压信 号作为介电电泳富集分离的控制电压,从而使介电电泳过程在平方厘米大小的基片上实现^[2-3].介电电泳 技术可在不进行样品预处理的情况下直接对待测样品进行富集分离操控,从而可以最大限度地维持待测样 品的生理活性.介电电泳芯片所具有的低试剂消耗量、非侵入性等优点,使其在细胞分析以及药物筛选等 领域具有相当重要的研究意义和实用价值^[4-9].

为了研制高富集效率的介电电泳细胞分析芯片,本文从介电电泳力出发,推导出了悬浮细胞所受的介 电电泳力公式,并对其影响因素进行了讨论.为了设计满足需求的介电电泳细胞分析芯片,在分析对比常 规微电极的电场强度分布后,选择叉指式阵列微电极构建介电电泳芯片模型,对不同结构参数下微通道中 的电场分布进行模拟,由此对芯片的结构参数进行优化设计.利用微加工技术制作了介电电泳细胞分析芯 片,通过实验方式对模拟结果进行了验证.

1 介电电泳力理论分析

介电电泳(Dielectrophoresis)指悬浮于气体或液体介质中的微粒,在高频交变电场的作用下因极化作用,使微粒与介质接触的表面诱导出感应电荷,致使微粒发生定向迁移的现象^[10].利用该现象,改变激励电场的电压大小和频率,或采用不同形状的电极组合,可对电场内不同微粒进行富集、分离和输运等操控.

对于一个半径为 R 的微粒所受的介电电泳力可表示为[11]

$$F = 2\pi R^3 \varepsilon_{\rm m} K \nabla \mid E \mid^2 \tag{1}$$

① 收稿日期: 2014-09-18

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(cstc2014jcyjA40038);中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(XDJK2013C011);西南大 学科研基金资助项目(SWU112050).

作者简介:顾雯雯(1983-),女,重庆人,博士,讲师,主要从事生化微系统方面的研究.

其中, ϵ_m 为悬浮介质的介电常数; *K* 称之为 Clausius-Mossotti 因子, 对于均匀球形微粒, Clausius-Mossotti 因子定义为

$$K = (\varepsilon_{\rm p} - \varepsilon_{\rm m}) / (\varepsilon_{\rm p} + 2\varepsilon_{\rm m})$$
⁽²⁾

其中,ε,表示微粒的介电常数.

上述由公式(1)定义的介电电泳力, 仅认为微粒相当于一个无电荷的电偶极子. 对于溶液中的悬浮细胞, 需要考虑其内外离子电荷的诱导机理及介电损失.设细胞及其悬浮液均为均匀电介质, 分别具有介电常数 ε_p,ε_m 和电导率 σ_p,σ_m, 考虑介电损失后的细胞及其悬浮液的介电常数 ε_p^{*} 和 ε^{*}_m 可表示为

$$\varepsilon_{p}^{*} = \varepsilon_{p} + \frac{\sigma_{p}}{j\omega}, \ \varepsilon_{m}^{*} = \varepsilon_{m} + \frac{\sigma_{m}}{j\omega}$$
(3)

则考虑介电损失后的 Clausius-Mossotti 因子 K*可以表示为

$$K^* = \frac{(\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*)}{(\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*)} = K_\infty + \frac{K_0 - K_\infty}{j\omega T_M + 1}$$
(4)

其中,

$$K_{\infty} = \frac{\varepsilon_{\rm p} - \varepsilon_{\rm m}}{\varepsilon_{\rm p} + 2\varepsilon_{\rm m}}, \ K_{\rm 0} = \frac{\sigma_{\rm p} - \sigma_{\rm m}}{\sigma_{\rm p} + 2\sigma_{\rm m}}, \ T_{\rm M} = \frac{\varepsilon_{\rm p} + 2\varepsilon_{\rm m}}{\sigma_{\rm p} + 2\sigma_{\rm m}}$$
(5)

由此得到溶液中悬浮细胞所受的介电电泳力 F_{cell}

$$F_{\text{cell}} = \left[(4\pi\varepsilon_{\text{m}}K^*R^3E) \cdot \nabla \right] E = 2\pi R^3 \varepsilon_{\text{m}} \operatorname{Re}(K^*) \nabla |E|^2$$
(6)

由式(6)可知细胞所受介电电泳力 F_{cell}具有如下特点:

1) 介电电泳力的大小与电场强度平方的梯度和细胞半径的三次方成正比;

2)不同细胞所受介电电泳力的电学特性仅通过 Clausius-Mossotti 因子体现(细胞介电常数 ε_p 及电导率 σ_p).

2 介电电泳细胞分析芯片结构设计

2.1 模型建立

通过对比相同微通道占有率条件下的锥尖微电极、抛物线微电极、叉指式阵列微电极、堡式微电极 4 种构建介电电泳芯片的常规微电极的电场分布^[12],发现叉指式阵列微电极的电场强度极小值和极大值、极 大值与极小值的差值最大(如表 1 所示).由式(6)可知, ▽ | *E* |² 是影响介电电泳力大小的关键因素之一, 因此选择叉指式阵列微电极构建介电电泳芯片.

微电极	极大值/	极小值/	差值/
	$(V \cdot m^{-1})$	$(V \cdot m^{-1})$	$(V \cdot m^{-1})$
抛物线型	2.50 $\times 10^{5}$	6. 00×10^3	2. 50×10^5
锥尖型	2.25 $\times 10^{5}$	1. 40×10^4	2. 11×10^{5}
堡式	1.95 $\times 10^{5}$	1. 40×10^{5}	5. 50×10^4
叉指式	3. 25×10^{5}	1.75 $\times 10^{5}$	1.50×10^{5}

表1 不同微电极产生的电场强度值比较

图 1(a)所示为叉指式阵列微电极介电电泳芯片的三维结构示意图.其中,微电极加工于衬底表面;微 通道加工于盖片,衬底和盖片通过键合工艺形成介电电泳芯片.*x*,*y*,*z* 轴方向分别表示沿电极宽度方向、 沿电极厚度方向(亦即微通道深度方向),沿电极长度方向.叉指式阵列微电极长度的特征尺寸通常为 2~ 10 mm,远远大于电极间距尺寸、电极宽度尺寸,以及微通道深度尺寸(三者尺寸均为微米数量级),因此 可将芯片的三维模型简化为*x*-*y*平面的二维模型,如图 1(b)所示,其中 *d*_e和 *d*_g分别表示电极宽度和电 极间距;*H*_s和 *H*_e分别表示衬底厚度和盖片厚度;*H*表示微通道深度.另一方面,由于叉指式阵列微电极 的电场分布具有周期性,所以只选取一对电极进行仿真分析,从而大大简化仿真分析的计算量.

2.2 电场模拟及结构参数优化

采用 COMSOL Multiphysics 对叉指式阵列微电极介电电泳芯片不同结构参数下微通道中的电场分布 进行模拟,以此优化芯片的结构参数.由于介电电泳力的空间相关性仅通过▽ | *E* |² 体现,因此后续对电场





图 1 介电电泳芯片示意图

2.2.1 微通道深度对电场的影响

模拟参数设置: 令电极宽度和电极间距均为10 μm, 在相邻电极上分别施加±1 V 电势后, 考察微通道 内电极上方电场强度的变化情况.

图 2 给出了距离电极上方 1,5,10,20,30 μ m(分别对应 y 为 1,5,10,20,30 μ m), $\nabla |E|^2$ 的对数 值(lg $\nabla |E|^2$)随电极位置的变化曲线. 模拟结果表明,随着远离电极表面距离的增加, lg $\nabla |E|^2$ 迅速 衰减;同一高度处, lg $\nabla |E|^2$ 在电极间距中心和电极边缘处分别出现极小值和极大值.

选取 $\lg \nabla |E|^2$ 极大值与极小值出现的位置坐标($x_{max} = 10 \ \mu m$ 和 $x_{min} = 25 \ \mu m$),观察 $\lg \nabla |E|^2$ 随微 通道深度方向的变化情况,如图 3 所示.随着 y 值的增大,极大值与极小值的差异减小,当 $y = 30 \ \mu m$ 时, $\lg \nabla |E|^2$ 的极大值与极小值的差异小于 1,不利于样品的分离.另一方面,微通道深度尺寸是决定 细胞进样量的因素之一,深度越小细胞进样量越少.综合考虑两方面因素,将微通道深度设置为 30 μm .



图 2 电极上方不同高度处 $\lg \nabla |E|^2$ 随电极位置的变化曲线

2.2.2 电极间距对电场的影响

模拟参数设置: 令电极宽度为 10 μm, 微通道深 度为 30 μm 时, 在相邻电极上分别施加±1 V 电势 后,考察微通道内电极上方电场强度的变化情况.

表 2 给出了电极间距分别为 5,10,15,20,25, 40 μm时,电极边缘和电极间距中心处分别获得的 $\nabla |E|^2$ 极大值与极小值以及极大值与极小值对数 值的差值 lg($\nabla |E|^2_{max}$)-lg($\nabla |E|^2_{min}$). 模拟结果表 明,随着电极间距的增大,极大值与极小值减小;当 电极间距小于 20 μm 时,电极间距每增大 5 μm,极 小值衰减 10 倍;当电极间距大于 20 μm 时,极小值



表 2 不同电极间距获得的 $\nabla E ^2$ 极大值、极小值及其对数差值				
$d_{ m g}/$	$\nabla E ^2/(\mathrm{V}^{-2}\cdot\mu\mathrm{m}^{-3})$		$lg(\nabla E ^2_{max}) - lg(\nabla E ^2_{min})/$	
$\mu\mathrm{m}$	电极边缘处极大值	电极间距中心处极小值	$(V^{-2} \cdot \mu m^{-3})$	
5	2.68 $\times 10^{17}$	1.42×10^{15}	15.146 1	
10	1.74×10^{17}	1.05×10^{14}	14.021 2	
15	1.60×10^{17}	2. 51×10^{13}	13.397 9	
20	1.44×10^{17}	4.00 $\times 10^{12}$	12.602 1	
25	1.32×10^{17}	2. 22×10^{12}	12.342 4	
40	1.24×10^{17}	2.00 $\times 10^{12}$	12.301 0	

变化缓慢 综合老虎细胞几何尺度 芯片微加工工艺等因素,将由极间距设置为 30 um

3 介电电泳芯片加工

本文研制的介电电泳细胞分析芯片采用玻璃作为整体芯片的基底,在其上制作叉指式阵列微电极;采 用 PDMS 作为整体芯片的盖片,在其上制作储液池腔体及微通道,通过对 PDMS 盖片和玻璃基底的可逆式 键合,获得介电电泳细胞分析芯片.图4所示为工艺流程示意图,其主要工艺步骤描述如下.



图 4 介电电泳芯片加工工艺流程

1) 玻璃基底上涂覆 S1813 光刻胶, 如图 4(a) 所示;

2)利用含叉指式阵列微电极的光刻板光刻、显影,形成微电极图形区域,如图 4(b)所示:

3) 电子束蒸发形成厚度为 20 nm 的 TiW 薄膜层,作为粘附层,再在其上蒸发形成厚度为 100 nm 的金 薄膜层,作为传感电极层,如图 4(c)所示;

- 4) 在丙酮中溶解光刻胶,得到叉指式阵列微电极,如图 4(d)所示;
- 5) 玻璃基底上涂覆 SU-8 光刻胶, 厚度为 30 µm, 如图 4(e)所示;
- 6) 光刻、显影, 形成深度为 30 μm 的微通道, 如图 4(f)所示;

7)以带有微通道的 SU-8 阳模作为模板,在其上浇注液态 PDMS,厚度 2~3 mm,如图 4(g)所示;

8) 待 PDMS 固化后,将其从 SU-8 阳模上剥离,得到含微通道的 PDMS 盖片,如图 4(h)所示:

9) 将含叉指式阵列微电极的玻璃基底和含微通道的 PDMS 盖片键合,得到整体芯片,如图 4(i)所示.

4 实验与结果

图 5 所示为采用上述加工工艺流程研制成功的介电电泳细胞分析芯片实物图照片. PDMS 盖片顶部构建了 4 个 PDMS 储液池,用于细胞的进样和存储.为了方便对芯片进行操作和系统定位,采用 PCB 对芯片进行封装,通过硅铝丝实现芯片焊点与 PCB 焊盘的电气连接.

采用图 5 所示的介电电泳细胞分析芯片进行了 HepG₂ 肝癌细胞(重庆医科大学第一附属医院)的介电 电泳富集效率实验研究.实验过程中,选取浓度为 10⁴ cell/L 的 HepG₂ 肝癌细胞,采用微注射泵(Harvard 55-2226,美国 Harvard 仪器公司)将细胞悬浮液通过介电电泳芯片的样品池注入微通道中.对进样后样品 池中的 HepG₂ 肝癌细胞进行计数,得到 M_1 =360.待细胞悬浮液充满芯片的整个微通道后,将芯片置于荧 光倒置显微镜(IX71, Olympus)下,通过与之配套的 Qcapture Pro 软件观察 HepG₂ 肝癌细胞在介电电泳 芯片微通道中的富集情况.当通过叉指式阵列微电极施加的正弦交流电压峰峰值为 5 V,频率为 4 MHz 时 获得了如图 6 所示的 HepG₂ 肝癌细胞的介电电泳富集显微图.实验结束后,对叉指式阵列微电极表面的 HepG₂ 肝癌细胞进行计数,得到 M_2 =320.最后,通过计算得到 HepG₂ 肝癌细胞的富集效率 $M=M_2/M_1$ ×100%=320/360×100%=88.89%.

纵观国内外研究现状,虽然有诸多关于介电电泳芯片细胞富集的研究报道,但是由于实验对象及实验 条件的差异性,很难找到对同种细胞的富集研究数据比对.通过查阅文献,通常情况下只通过介电电泳实 现细胞富集的效率小于 80%.因此认为 88.89%实现了 HepG₂ 肝癌细胞的高效富集.



图 5 介电电泳细胞分析芯片实物图(PCB 封装)



图 6 HepG₂ 肝癌细胞介电电泳 富集显微图(V_{p-p}=5 V, f=4 MHz)

5 结 论

为了研制高富集效率的介电电泳细胞分析芯片,本文首先从介电电泳力出发,推导了悬浮细胞所受的 介电电泳力公式,由此获得了影响细胞介电电泳富集的主要因素.通过对比常规微电极的电场强度分布, 选择叉指式阵列微电极构建了介电电泳芯片模型,在此基础上通过 COMSOL Multiphysics 专业仿真分析 软件,模拟了微通道深度以及电极间距对介电电泳芯片微通道中电场分布的影响,由此确定了芯片的微通 道深度尺寸和电极间距均为 30 μm.为了对模拟结果进行验证,利用微加工技术制作了介电电泳细胞分析 芯片.以 HepG₂ 肝癌细胞为待测样品,当介电电泳芯片所施加正弦交流电压为 5 V,频率为 4 MHz 时,获 得了 88.89%的富集效率.

参考文献:

- [1] TALUKDER Z JUBERY, SOUMYA K SRIVASTAVA, PRASHANTA DUTTA. Dielectrophoretic Separation of Bioparticles in Microdevices: A Review [J]. Electrophoresis, 2014, 35(5): 691-713.
- [2] LI M, LI W H, ZHANG J, et al. A Review of Microfabrication Techniques and Dielectrophoretic Microdevices for Particle Manipulation and Separation [J]. Journal of Physics D: Applied Physics, 2014, 47(6): 1-30.
- [3] YAGMUR DEMIRCAN, EBRU OZGUR, HALUK KULAH. Dielectrophoresis: Applications and Future Outlook in

Point of Care [J]. Electrophoresis, 2013, 34(7): 1008-1027.

- [4] SAURIN PATEL, DANIEL SHOWERS, PALLAVI VEDANTAM, et al. Microfluidic Separation of Live and Dead Yeast Cells Using Reservoir-Based Dielectrophoresis [J]. Biomicrofluidics, 2012, 6(3): 1-13.
- [5] HADI SHAFIEE, MICHAEL B SANO, ERIN A HENSLEE, et al. Selective Isolation of Live/Dead Cells Using Contactless Dielectrophoresis (cDEP) [J]. Lab on a Chip, 2010, 10(4): 438-445.
- [6] YANG Feng, YANG Xiao-ming, JIANG Hong, et al. Dielectrophoretic Separation of Prostate Cancer Cells [J]. Technology in Cancer Research & Treatment, 2013, 12(1): 61-70.
- [7] MOHAMMED ALSHAREEF, NICHOLAS METRAKOS, EVA JUAREZ PEREZ, et al. Separation of Tumor Cells with Dielectrophoresis-Based Microfluidic Chip [J]. Biomicrofluidics, 2013, 7(1): 1–13.
- [8] YANG Li-ju. A Review of Multifunctions of Dielectrophoresis in Biosensors and Biochips for Bacteria Detection [J]. Analytical Letters, 2012, 45(2-3): 187-201.
- [9] HE Xiao-xiao, HU Chong, GUO Qian, et al. Rapid and Ultrasensitive Salmonella Typhimurium Quantification Using Positive Dielectrophoresis Driven On-Line Enrichment and Fluorescent Nanoparticles Label [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 42: 460-466.
- [10] 顾雯雯. 集成介电电泳检测芯片系统关键技术研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2012: 6.
- [11] 李战华,吴健康,胡国庆等. 微流控芯片中的流体流动 [M]. 北京:科学出版社, 2012.
- [12] REN Yu-kun, WE Hong-chi, FENG Guo-jing, et al. Effects of Chip Geometries on Dielectrophoresis and Electrorotation Investigation [J]. Chinese Journal of Mechanical Engineering, 2014, 27(1): 103-110.

Structural Design and Experimental Study of Dielectrophoresis Chip for Cell Analysis

GU Wen-wen

Department of Electronic and Control Engineering, School of Engineering and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: In order to fabricate dielectrophoresis (DEP) chips with higher enrichment efficiency, a formula of the dielectrophoresis force applied in suspended cells was theoretically deduced. After comparing the electric field contribution for conventional micro electrodes, the interdigitated array microelectrodes were chosen to model the dielectrophoresis chip. The parameters for the dielectrophoresis chip were designed and optimized by COMSOL Multiphysics software. In order to validate the simulation results, the micro processing technology was used to fabricate the dielectrophoresis cell analysis chip. HepG₂ hepatoma carcinoma cells were used as the testing sample. When the sinusoidal alternating voltage with a peak-to-peak amplitude of 5V and a frequency of 4MHz was applied on the dielectrophoresis chip, the enrichment efficiency for the HepG₂ hepatoma carcinoma cells was as high as 88.89%.

Key words: microfluidic chip; dielectrophoresis; interdigitated array microelectrode; electric field simulation; cell enrichment

责任编辑 汤振金