

微流控芯片在细胞分选中的分析技术进展

刘琳¹ 厉坤鹏² 胡志敏¹ 董军磊¹ 欧元³ 李彩霞³ 赵兴春³ 叶健^{3*}
(¹中国人民公安大学, 北京 100038; ²上海市第一人民医院, 上海 200080; ³公安部物证鉴定中心, 北京 100038)

摘要 微流控芯片分析技术以其快速、高效、高能量、低消耗、集成化和微型化等特点在多个研究领域发展非常迅速。该文根据分选原理不同, 将微流控芯片上的细胞分选方法分为主动式细胞分选与被动式细胞分选, 从这两方面总结了目前微芯片分选细胞的进展, 并对该技术在细胞分选中的应用前景作了进一步的展望。

关键词 微流控芯片; 细胞分选; 细胞分离

Progress in Analytical Techniques of Microfluidic Chip on Cell Sorting

Liu Lin¹, Li Kunpeng², Hu Zhimin¹, Dong Junlei¹, Ou Yuan³, Li Caixia³, Zhao Xingchun³, Ye Jian^{3*}
(¹People's Public Security University of China, Beijing 100038, China; ²Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200080, China; ³Institute of Forensic Science Ministry of Public Security, Beijing 100038, China)

Abstract Microfluidic chip techniques develop very fast owing to its high rate, high efficiency, high power, low reagent cost, integrating and miniaturization in many research fields. Based on the operating principles, the various cell sorting methods on microfluidic chip are broadly categorized as active or passive techniques in this article. Recent research progress of microfluidic chip techniques on cell sorting are summarized mainly in the two aspects. In addition, the application prospect of microfluidic chip on cell sorting is also briefly discussed.

Key words microfluidic chip; cell sorting; cell separation

20世纪90年代初, Manz等^[1]提出了微型全分析系统(miniaturized total analysis systems, μ -TAS)的概念, 又称微流控芯片(microfluidic chip)或芯片实验室(lab-on-a-chip), 是通过分析化学、电子学、材料学、生物学、医学及微机电加工、计算机技术的交叉将化学、生物学等领域所涉及的样品制备、生物与化学反应、分选和检测等过程, 缩微或基本缩微到一块几平方厘米的芯片上, 并对其结果进行检测与分析, 从而实现从试样处理到检测的整体微型化、自动化、集成化和便携化的技术^[2]。这一技术使原来

必须在一个综合实验室内完成的工作, 简缩在一张芯片上即可, 不仅减少了检材和试剂的消耗, 大大降低了成本, 而且使灵敏度提到微升甚至纳升级, 分析速度提高数十倍, 现已成为国内外分析化学、生物化学、环境监测及法医学等领域的研究热点。

微流控技术和微型化芯片实验室装置对细胞生物学的影响不断加深, 以其可进行集成样品预处理和血液系列分析为优势, 将会更温和、快速、一致地操控和分选活细胞, 有利于更准确高效地提取血液等体液样品中的信息, 非常适用于血细胞、癌

收稿日期: 2012-12-27 接受日期: 2013-01-21

公安部科技强警基础工作专项(批准号: 2011GABJC028)和公安部物证鉴定中心基本科研业务费专项资金(批准号: 2012JB012)资助的课题

*通讯作者。Tel/Fax: 010-66269548, E-mail: yejian77@126.com

Received: December 27, 2012 Accepted: January 21, 2013

This work was supported by the Foundation of Ministry of Public Security Works Special on Intensifying the Police with Science and Technology (Grant No.2011GABJC028) and the Basic Scientific Research Business Expenses Special Funds by Institute of Forensic Science Ministry of Public Security (Grant No.2012JB012)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-66269548, E-mail: yejian77@126.com

细胞等体细胞的分选。本文依据细胞分选原理的不同,将各种细胞分选方法分为主动式与被动式^[3],对使用微流控技术进行细胞分选的相关研究作一概述(表1)。

1 主动式细胞分选

利用微流控技术进行主动式细胞分选的方法是在微流控装置上通过采集不同细胞所带有的特征信号,借助外力进行分选。

1.1 荧光激活细胞分类术分选法

荧光激活细胞分类术(fluorescence-activated cell sorter, FACS)或流式细胞分析术由于其本身具有的

灵敏度高、高通量、技术发展成熟等特点已经成为许多生物学家进行细胞分选的首选方法。FACS的原理是通过压力驱动和鞘液夹流等技术实现样品聚焦,使经特异性荧光染色的目标细胞所制成的单细胞悬液呈单粒子排列,进入检测区域,检测器按照其产生的散射光和激发荧光信号的不同进行识别与记录,进而据其特性施以外力操控,实现细胞分选^[4]。通常,由带有荧光分子标记的特异性抗体来对细胞表面的标记物进行识别。自从Fu等^[5]将FACS与微流控设备结合,用于分选细胞以来,各种驱动力与微流控-流式细胞仪的组合应运而生,包括流体力驱动^[6]、电渗力驱动^[7]、静电力驱动^[8]、动电力驱动^[9]、介电电

表1 主动式与被动式细胞分选方法概述

Table 1 Overview of various active and passive cell sorting methods

分类 Category	方法 Methods	分离机制 Separation mechanism	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
主动式细胞分选	荧光激活细胞分类术分选法	识别目标细胞经特异荧光染色后所产生的散射光和激发荧光信号以实现分离	灵敏度高, 精准度高, 应用广泛, 可用于多种细胞的分选	设备昂贵, 微通道易阻塞, 样品易污染, 分离的连续性无法保证, 细胞存活率不高
	磁操控分选法	通过抗原抗体反应与相应的免疫磁珠结合(免疫磁分选技术)或利用梯度磁力分离磁性极弱的微粒(高梯度磁分选技术)	速度快、效率高、重复性好; 操作简单、无需昂贵的仪器设备; 分离过程无毒无污染; 被分离细胞的存活率高	目的细胞上独特抗原的特异性抗体的筛选是该技术的重点与难点, 是制约该技术推广使用的瓶颈
	双向电泳分选法	利用细胞介电特性、电导率和形状不同, 在电场中分离	可对细胞直接进行无接触的选择性操控、定位与分选, 无需特异性细胞标记或修饰, 外围设备简单, 操作简便	生物细胞在电场中存活率较低, 且该方法特异性较差, 对于介电特性、电导率、形状等性质相似的细胞无法实现精确分离
	光学镊子分选法	利用光独特的光学极化效应实现细胞分离	灵敏度极高, 即使细胞间相互作用后产生的形变极其微小也可改变光的状态, 进而通过光信号实现细胞分选	细胞分离的效率与FACS等相比仍较低
	超声波分选法	利用超声波辐射力对不同直径、密度的细胞进行分选	分选效率较高, 无需复杂的大型设备	对设备材质的要求较高, 价格昂贵, 对操作人员的专业素质要求也较为苛刻, 不利于推广使用
被动式细胞分选	机械操控分选法	根据目的细胞的物理形态, 调整功能单元的孔径大小以实现分选	检测时间短、实验过程简单、结构紧凑、重现性好	仅基于尺寸进行简单的过滤分选, 选择性差, 大小形状相似的细胞无法精确分选, 限制了其在细胞分析微流体上的应用
	流体动力分选法	在流体动力作用下细胞由小至大依次被滤出微通道, 最终实现不同直径细胞的分离	操作简便, 无需复杂的实验设备, 较易推广普及, 对于特异性要求不高的细胞分选较为适合	流体动力分选是单纯基于流体性质而实现的, 分支孔径堵塞现象时有发生, 有待进一步改进
	捏流分选法	基于细胞大小的差异, 将各种细胞以流体聚焦的形式在微流控装置中分散开来, 从而得以分离筛选	对于稀释的细胞悬液分选效果较好, 可以通过调整缓冲液流速简便高效的实现不同大小细胞的分选	最快仅可每分钟通过4 000个细胞, 若流速更高会由于惯性的限制而影响分选效率
	亲和性分选法	通过在微通道内壁连接针对目的细胞表面独特抗原的特异性抗体或适配体而实现分选	特异性高, 灵敏度高, 能有效分选形状、大小、密度相似的不同种细胞	针对不同的目的细胞筛选最适的特异性抗体并选择最适的缓冲液是该技术的重点与难点
	惯性微流分选法	在惯性升力的作用下利用聚焦流动原理实现大小、形状不同的细胞的分离	装置结构简单; 微粒的聚焦流动快速、高通量, 且对于细胞的损伤极小, 细胞存活率亦较高	细胞间相互作用会大大降低分选效率, 该技术仅适用于稀释后的样品溶液, 故必须进行样品的前处理

泳驱动^[10]等。Krivacic等^[11]运用该技术,在微流控芯片上以 $3 \times 10^4/s$ 细胞的高速实现了对癌细胞高纯度分选。Cho等^[12]也使用微流控-流式细胞仪成功实现了对人类哺乳动物细胞的高纯度富集与分选,富集浓度达到230倍。

在微流控芯片上运用FACS完成细胞分选的优势:(1)灵敏性高,能够在单个细胞水平上实现细胞的逐一分离;(2)精准度高,细胞逐个通过检测器后被精确分类而得以分选;(3)应用广泛,涉及的被分类物质种类广泛,可用于多种细胞的分选。但其缺陷在于:设备昂贵,微通道易阻塞,样品易污染,分离的连续性无法保证,在检测、分离过程中细胞受到的撞击力大,导致细胞最终的存活率不高。这些缺陷有待进一步研究与改善。

1.2 磁操控分选法

在微流控芯片上运用磁操控分选法进行细胞分选筛选简便易行,易于作为前处理部分集成再用于细胞分析的微流控芯片上。磁操控分选法的高特异性与高效性使其在细胞分选方面具有相当大的优势。免疫磁分选技术和高梯度磁分选技术是目前微流控芯片磁操控细胞分选主要应用的方法。

1.2.1 免疫磁分选技术 该技术中细胞的分选是基于目的细胞表面的独特抗原与免疫磁性微球(或免疫磁珠)上的特异性抗体通过抗原抗体反应结合,在外加磁场作用下,仅与免疫磁珠结合的目的细胞被滞留在磁场中,无法与免疫磁珠结合的成分则被滤去,从而达到分离靶细胞的目的。在微流控芯片上利用免疫磁分选技术所分离出的目的细胞可直接用于后续的分析与检测,从而简化了操作步骤,提高了效率,便于连续化、集成化、自动化的实现。Kim等^[13]利用C2A蛋白标记的磁珠,在微流控芯片上运用免疫磁分选技术,成功地使细胞悬液中的Jurkat凋亡细胞获得高效分离。Forbes等^[14]在微流控装置上运用免疫磁分选技术,实现了对磁标记乳腺癌mcf7细胞的高纯度分离,大大提高了临床诊断的准确性。

1.2.2 高梯度磁分选技术 20世纪60年代后期开始发展起来的高梯度磁分选技术(high gradient magnetic separation, HGMS),主要用于分离磁性极弱的微粒,例如直径在100 nm以内的顺磁性或逆磁性微粒。高梯度磁分选系统通常由填充有易磁化超细金属丝的柱形过滤器和电磁场组成,金属丝在电

磁场的作用下产生磁场梯度,使处于该区域的已被磁化了的微粒被梯度磁力吸引而固定,而样品中的其他非磁性成分则不会在该区域滞留,从而实现目的微粒的分选。Adams等^[15]制作了一个微流控芯片连续高梯度磁泳分选器,运用高梯度磁分选技术实现了对目标细胞的连续快速高纯度分离。夏恒^[16]利用相关软件,通过仿真模拟,将微通道的构型做了优化与改进,在微流控装置上实现了磁泳连续高效细胞分选。

微流控芯片上的磁操控分选法具有如下优势:(1)分选速度快、效率高、重复性好;(2)操作简单、无需昂贵的仪器设备,便于实现高通量、自动化;(3)分离过程无毒无污染,并可同时产生富集、纯化效果;(4)被分离细胞的存活率高,且生物学性状与功能不受影响。但是,目的细胞上独特抗原的特异性抗体的筛选是该技术的重点与难点,是制约该技术推广使用的瓶颈。

1.3 双向电泳分选法

双向电泳(dielectrophoresis, DEP),又称介电电泳,是微流控芯片上较常采用的细胞分选法,该方法利用芯片上的交流电场将样品溶液中的目的细胞分离,可利用细胞大小不同,同时完成对细胞的浓缩、操控和分选,是一种高效率且高选择性的方法。其原理是细胞在高频电场作用下产生极化,因介电特性、电导率和形状不同,不同种类细胞感应出不同的偶电极,从而受到不同的介电力,致使它们以不同速率向电场的正极或负极定向移动,从而在电场中实现分离。Gascoyne等^[17]使用双向电泳-场流分级(dielectrophoresis-field-flow-fractionation, DEP-FFF)技术成功的从患者血液中分离出了感染疟原虫后的病态红细胞。由于红细胞感染疟原虫后,细胞膜表面蛋白发生改变,因此病态细胞等电点与正常细胞存在差异,在正旋交流电的作用下,病态红细胞以异常的泳动速度在微通道分离腔中实现分选。Zhu等^[18]采用双向电泳技术,在微流控芯片上实现了对直径在4~8 μm 的酵母细胞的连续高效分选。

在微流控芯片上利用双向电泳技术可对细胞直接进行无接触的选择性操控、定位与分选,无需特异性细胞标记或修饰,外围设备简单,操作简便。但是生物细胞在电场中存活率较低,且该方法特异性较差,对于介电特性、电导率、形状等性质相似的细胞无法实现精确分离。

1.4 光学镊子分选法

在微流控装置上运用光学镊子分选法操控细胞分离时,由于光独特的光学极化效应,无需接触待分离的细胞,因而避免了机械接触所造成的污染与损伤,大大提高了分选后细胞的存活率,该技术已受到越来越多研究者的关注。光学镊子分选法主要根据目的细胞的大小和折射指数,在光干涉测量模式下,激光聚集可形成光阱,微小物体受光压而被束缚在光阱处,移动光束使微小物体随光阱移动,借此可对目的细胞进行捕获与分选^[19]。捕获束的控制位置位于两个单纤维之间的微球上,微球的位置决定两纤维间的耦合程度,并决定光在二者间是聚焦还是偏斜,进而将产生的光信号与微通道内的电解质颗粒偶联,最终通过电场梯度截获电解质颗粒而捕获靶细胞。Wang等^[20]利用光学镊子分选技术,在微流控芯片上分别实现了对酵母细胞和人类胚胎干细胞的操控与分离。

虽然,该技术的效率与FACS等相比仍较低,但其优势在于灵敏度极高,即使细胞间相互作用后产生的形变极其微小也可改变光的状态,进而通过光信号实现细胞分选。Chiou等^[21]对细胞间相互作用及聚焦激光束进行深入研究后,对微流控装置加以改进,从而实现了高通量进样,大大提高了分选效率。

1.5 超声波分选法

利用超声波辐射力对悬液中的粒子进行分离提取,已被广泛应用于传统的化学工程与材料科学领域。超声波分选技术是利用超声波辐射力所具有的空化效应、机械效应、热效应,以及超声空化过程中气泡的剧烈变化所产生的附加湍动效应、界面效应、聚能效应等,通过提高传质系数,增大介质分子的运动速度,增强介质的穿透力以强化分离过程^[22]。由压电材料在微通道中引发的超声共振效应可以产生超声波辐射力,从而产生上述效应,当细胞以流体的形式在微通道内移动时,不同直径、密度、可压缩性的细胞在上述多种效应的作用下,会产生不同的迁移率,进而可根据通过检测窗的先后顺序,完成细胞在微流控芯片上的分选。Pettersson等^[23]利用该原理,在微流控芯片上以自由流体声波电泳的方式,完成了对直径在2~10 μm 之间的粒子的分选,并将该技术应用于医学领域,实现了对血液中红细胞、白细胞、血小板的连续高效分选。该技术在应

用过程中,细胞于超声波辐射力的作用下能否存活成为许多研究者关注的问题。Evander等^[24]研究了细胞在超声共振效应中所受到的力以及微通道中温度升高的幅度,实现了对神经干细胞的高存活率分离,得到的目的细胞在微通道中可以存活十五分钟以上。

该技术分选效率较高,无需复杂的大型设备,但对设备材质的要求较高,价格昂贵,对操作人员的专业素质要求也较为苛刻,不利于推广使用。

2 被动式细胞分选

利用微流控技术进行被动式细胞分选的方法是在微流控装置上根据细胞自身差异,在特定外界环境中会受到不同程度的作用力而实现分选。

2.1 机械操控分选法

机械操控分选法是目前在微流控芯片上使用最多、亦是最简单的一种方法。该方法通常是在微芯片结构中引入特殊的微结构功能单元,根据目的细胞的物理形态,通过调整功能单元的孔径大小等,限制某些细胞通过,从而实现对靶细胞的分选。常用的微结构功能单元有微过滤器^[25]、微池^[26]、微钳^[27]、微坝^[28]、微沙袋^[29]等。Panaro等^[30]制作了一个基于机械过滤结构的集细胞分选与PCR扩增于一体的硅-玻璃微芯片,芯片主要由具有一定长度和深度的矩形、平行通道组成的围堰型过滤器构成,这些平行通道由跨越流动腔的蚀刻硅坝形成,当血液进入过滤器时,白细胞等大细胞被截留在围堰处,体积小、易变形的双凹红细胞则可通过平行通道,因此白细胞得以分选,并可直接进行后续的PCR扩增。Mohamed等^[31]利用相似原理在芯片上连续阵列不同尺寸的微通道,通过限制这些通道的宽或高,使那些超过通道尺寸的细胞不能进入而实现血液样品中肿瘤细胞的分选。

虽然机械操控分选法具有检测时间短、实验过程简单、结构紧凑、重现性好等许多优点,但是由于该法仅是基于尺寸进行简单的过滤分选,固选择性较差,不能将大小形状相似的不同种细胞精确分选,限制了其在细胞分析微流体上的应用。

2.2 流体动力分选法

流体动力分选法是另一种基于细胞大小进行被动式细胞分选的方法。流体动力细胞分选法是将细胞悬液抽吸到一个侧面有多个分支出口的微通道中,靠近悬液入口处(即上游)的分支出口口径较小,

可只将通道中的液体排出,使得细胞在主通道侧壁上呈直线排列。细胞大小的差异使得较小的细胞形成的直线距主通道侧壁更近。因此在下游的分支出口孔径逐渐变大时,细胞由小至大依次被滤出,最终实现不同直径细胞的分离。Shevkoplyas等^[32]模拟出人体血管中的血细胞环境,在微流控装置上运用流体动力分选原理实现了白细胞的自动分选。Seo等^[33]将流体动力与磁泳结合,在微流控装置上分别进行了Jurkat细胞株和血细胞的分选实验,分选效率有较大提高,有望将该技术用于临床快速诊断。

流体动力分选操作简便,无需复杂的实验设备,较易推广普及,对于特异性要求不高的细胞分选较为适合。但由于流体动力分选是单纯基于流体性质而实现的,分支孔径堵塞现象时有发生,如何通过改进微通道的几何结构,以最大程度的减少分支堵塞、提高分选效率,期待进一步的研究。

2.3 捏流分选法

捏流分选(*pinched flow fractionation*, PFF)是基于细胞大小的差异,将各种细胞以流体聚焦的形式在微流控装置中分散开来,从而得以分离筛选的一种特殊的流体动力细胞分选法。PFF是将样品溶液引流入具有特定几何形状的微通道中,通过控制缓冲液的流速,使悬浮于缓冲液中的细胞在微通道中贴壁成直线排列。在惯性与流体作用下,尺寸较小的细胞形成的直线会比尺寸较大的细胞形成的直线,距离微通道更近。不同大小的细胞在微通道中所处的位置不同,最终会进入不同的出口以实现分选。Yamada等^[34]首次将PFF技术与微流控芯片结合,应用于聚合物微粒的分选,获得了较好的分选效果。Cupelli等^[35]将PFF技术进行改进,在微流控装置上成功地将通道边缘的白细胞与通道中央的红细胞分离,并最终完成对白细胞的高纯度富集。

PFF技术对于稀释的细胞悬液分选效果较好,可以通过调整缓冲液流速简便高效的实现不同大小细胞的分选,但最快仅可每分钟通过4 000个细胞,若流速更高会由于惯性的限制而影响分选效率。

2.4 亲和性分选法

微流控芯片上的亲和性分选是通过在微通道内壁连接针对目的细胞表面独特抗原的特异性抗体或适配体而实现的,与免疫磁分选技术有相似性,但因无需借助外力,固大多数研究者更倾向于将亲和性分选法归为被动性细胞分选法。当混合细胞

悬液流经微通道时,目的细胞表面的独特抗原可与微通道内壁的抗体或适配体结合而被滞留,悬液中其他成分则被滤除。更换缓冲液则可以洗脱目的细胞,从而实现分选。Murthy等^[36]使用CD5和CD19单克隆抗体,实现了T淋巴细胞与B淋巴细胞的分选,分选纯度高达97%,并证明了在悬液中的目的细胞浓度很低时,仍能获得较高的分选纯度,这对于研究参与炎症反应免疫应答的淋巴细胞亚群很有帮助。Dharmasiri等^[37]将针对前列腺特异性膜抗原(*prostate-specific membrane antigen*, PSMA)的特异性适配体固定于微通道的表面,成功地从患者外周血中分选出了前列腺癌的循环瘤细胞(*circulating tumor cells*, CTCs),对该疾病的监测与预后有重要的临床意义。

亲和性分选的特异性高、灵敏度高,能有效分选形状、大小、密度相似的不同种细胞。其难点与技术瓶颈在于,针对目的细胞的特异性抗体的选择,以及抗原抗体结合缓冲液和洗脱缓冲液的配制,不同的目的细胞表面的独特抗原不同,所需的结合环境与洗脱环境也不同,最适的特异性抗体与最适的缓冲液才能保证最佳的分选效率。

2.5 惯性微流分选法

早在20世纪60年代,Segre等^[38]就在他们的实验室进行了关于惯性力操控细胞分选的研究,近年来才有人将惯性力与微流控芯片结合,形成惯性微流技术,完成细胞的操控与分选。当流体在直线型微通道内呈层流流动时,悬浮其中的细胞在剪切力梯度诱导产生的升力(*shear-induced lift force*)的作用下,会向靠近通道壁的方向移动,当细胞距离微通道壁足够近时,由通道壁诱导产生的升力(*wall-induced lift force*)又会将细胞推离通道壁。这两种反向力叠加的合力称为惯性升力(*inertial lift force or net lift force*)。在惯性升力的作用下,细胞会在微通道横截面上产生相对位移,当细胞移动到所受惯性升力为零的平衡位置时,就会在该位置达到相对稳定的状态。细胞所受惯性升力与细胞自身的大小形状有关,大小形状相似的同类细胞会聚焦在横截面中同一稳定点,形成聚焦流动,流向下游,从而实现不同种类细胞的分选。Kuntaegowdanahalli等^[39]在螺旋形微通道中成功地将80%的神经母细胞瘤细胞从与胶质瘤细胞形成的混合瘤细胞中分选出来,且分选出的瘤细胞存活率高达90%以上。Hur等^[40]应用惯性

微流技术在微流控芯片上完成了对肾上腺皮质源细胞的高存活率分选与富集,分选所得目的细胞可在试管中培养达十天以上,这一研究对于再生医学有很大的推进作用。黄炜东等^[41]设计并制作了具有不对称弯管通道的微流控芯片,利用惯性微流原理实现了血浆、红细胞的快速分选,分选率超过90%,且血细胞基本无损。惯性微流技术的优势在于装置结构简单,易于作为功能部件与现有的微流控芯片结合;微粒的聚焦流动快速、高通量,且对于细胞的损伤极小,使得分选效率高,细胞存活率亦较高。然而,由于细胞间相互作用会大大降低分选效率,所以该技术仅适用于稀释后的样品溶液,因此样品的前处理必不可少,如何减少操作步骤,减少细胞间相互作用成为该技术的改进方向。

3 总结与展望

微流控芯片技术由于自身特点在细胞分选方面有良好的优势,经过十几年的发展,该技术在细胞分选中的应用越来越广泛,以其芯片体积小、重量轻、速度快、效率高、能量大、操作简便、低样品和试剂消耗、可多通量检测、易在片集成多种用途的功能组件等,有望在将来成为细胞分选的主要工具。但此项技术由于还在发展中,不可避免的尚存在一些问题,如有些微流控芯片造价昂贵,不利于推广使用;微芯片上通道空间过小,在实验过程中极易被堵塞,通道的重复使用率不高;在进行复杂细胞分选时难以保证细胞的活性等。如何避免微流控芯片在进行细胞分选时所遇到的一系列问题,充分发挥其优势,值得研究者进一步探索。相信在不久的将来,微流控芯片技术在细胞分选方面的应用将更加成熟,并在更加广泛的领域中得到应用。

参考文献 (References)

- Manz A, Graber N, Widmer HM. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sens Actuators B Chem* 1990; 1: 244-8.
- 郭明星, 赵保胜, 高晓燕. 微流控技术在医药领域的研究进展. *中国实验方剂学杂志*(Guo Mingxing, Zhao Baosheng, Gao Xiaoyan. Research progress and prospect of microfluidics in medical field. *Chin J Exp Med Formul*) 2012; 18(18): 323-7.
- 杨静, 杨军, 许蓉, 曹毅, 胡宁, 郑小林. 一种微流控细胞分离芯片及其流场分析. *仪器仪表学报*(Yang Jing, Yang Jun, Xu Rong, Cao Yi, Hu Ning, Zheng Xiaolin. Microfluidic cell sorting chip and its flow field simulation. *Chin J Sci Instrum*) 2009; 30(7): 1508-11.
- 刘守坤, 苏显中, 金庆辉, 景奉香, 赵建龙. 微流控芯片流式细胞术. *微电子学*(Liu Shoukun, Su Xianzhong, Jin Qinghui, Jing Fengxiang, Zhao Jianlong. *Microfluidic chip flow cytometry. Microelectronics*) 2009; 39(5): 696-703.
- Fu AY, Spence C, Scherer A, Arnold FH, Quake SR. A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. *Nat Biotechnol* 1999; 17(11): 1109-11.
- Chena CC, Zappe S, Sahin O, Zhang XJ, Fish M, Scott M, *et al.* Design and operation of a microfluidic sorter for *Drosophila* embryos. *Sens Actuators B Chem* 2004; 102(1): 59-66.
- Johann R, Renaud P. A simple mechanism for reliable particle sorting in a microdevice with combined electroosmotic and pressure-driven flow. *Electrophoresis* 2004; 25(21/22): 3720-9.
- Takahashi K, Hattori A, Suzuki I, Ichiki T, Yasuda K. Non-destructive on-chip cell sorting system with real-time, microscopic image processing. *J Nanobiotechnology* 2004; 2(1): 5.
- McClain MA, Culbertson CT, Jacobson SC, Ramsey JM. Flow cytometry of *Escherichia coli* on microfluidic devices. *Anal Chem* 2001; 73(21): 5334-8.
- Holmes D, Sandison ME, Green NG, Morgan H. High speed particle sorting: Combining dielectrophoresis and fluid flow. *Proc microTAS* 2004; 1: 6-8.
- Krivacic RT, Ladanyi A, Curry DN, Hsieh HB, Kuhn P, Bergsrud DE. A rare-cell detector for cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(29): 10501-4.
- Cho SH, Chen CH, Tsai FS, Godin JM, Lo YH. Human mammalian cell sorting using a highly integrated microfabricated fluorescence-activated cell sorter (μ FACS). *Lab Chip* 2010; 10(12): 1567-73.
- Kim HS, Son OT, Kim KH, Kim SH, Maeng S, Jung H. Separation of apoptotic cells using a microfluidic device. *Biotechnol Lett* 2007; 29(11): 1659-63.
- Forbes TP, Forry SP. Microfluidic magnetophoretic separations of immunomagnetically labeled rare mammalian cells. *Lab Chip* 2012; 12(8): 1471-9.
- Adams JD, Soh HT. Perspectives on utilizing unique features of microfluidics technology for particle and cell sorting. *JALA Charlottesv Va* 2009; 14(6): 331-40.
- 夏恒. 磁泳细胞分选微流控芯片通道构型优化设计. 上海交通大学(Xia Heng. Optimization design of the configuration of the microchannel of the Lab-on-a-chip for magnetophoresis cell Sorting. Shanghai Jiao Tong University) 2012.
- Gascoyne P, Satayavivad J, Ruchirawat M. Microfluidic approaches to malaria detection. *Acta Trop* 2004; 89(3): 357-69.
- Zhu J, Canter RC, Ketten G, Vedantam P, Tzeng RJ, Xuan X. Continuous-flow particle and cell separations in a serpentine microchannel via curvature-induced dielectrophoresis. *Microfluid Nanofluid* 2011; 11(6): 743-52.
- 姚琳, 白亮, 吴亮其, 丁永胜. 微流控芯片技术在细胞生物学研究中的应用进展. *中国细胞生物学学报*(Yao Lin, Bai Liang, Wu Liangqi, Ding Yongsheng. Recent applications of microfluidic technology in the field of cell biology. *Chinese Journal Cell Biology*) 2011; 33(11): 254-66.
- Wang X, Chen S, Kong M, Wang Z, Costa KD, Li RA, *et al.* Enhanced cell sorting and manipulation with combined optical tweezer and microfluidic chip technologies. *Lab Chip* 2011; 11(21): 3656-62.

- 21 Chiou PY, Ohta AT, Wu MC. Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images. *Nature* 2005; 436(7049): 370-2.
- 22 赵峰, 杨江帆, 林河通. 超声波技术在食品加工中的应用. 武夷学院报(Zhao Feng, Yang Jiangfan, Lin Hetong. *Ultrasound and its application in food industry. Journal of Wuyi University*) 2010; 29(2): 21-2.
- 23 Petersson F, Aberg L, Swärd-Nilsson AM, Laurell T. Free flow acoustophoresis: Microfluidic-based mode of particle and cell separation. *Anal Chem* 2007; 79(14): 5117-23.
- 24 Evander M, Johansson L, Lilliehorn T, Piskur J, Lindvall M, Johansson S, *et al.* Noninvasive acoustic cell trapping in a microfluidic perfusion system for online bioassays. *Anal Chem* 2007; 79(7): 2984-91.
- 25 Zhu L, Zhang Q, Feng H, Ang S, Chau FS, Liu WT. Filter-based microfluidic device as a platform for immunofluorescent assay of microbial cells. *Lab Chip* 2004; 4(4): 337-41.
- 26 Khademhosseini A, Yeh J, Jon S, Eng G, Suh KY, Burdick JA, *et al.* Molded polyethylene glycol microstructures for capturing cells within microfluidic channels. *Lab Chip* 2004; 4(5): 425-30.
- 27 Chronis N, Lee LP. Electrothermally activated SU-8 microgripper for single cell manipulation in solution. *IEEE J Microelectromech S* 2005; 14(4): 857-63.
- 28 Yang JY, Li CW, Yang MS. Hydrodynamic simulation of cell docking in microfluidic channels with different dam structures. *Lab Chip* 2004; 4(1): 53-9.
- 29 Li CW, Cheung CN, Yang J, Tzang CH, Yang M. PDMS-based microfluidic device with multi-height structures fabricated by single step photolithography using printed circuit board as masters. *Analyst* 2003; 128(9): 1137-42.
- 30 Panaro NJ, Lou XJ, Fortina P, Kricka LJ, Wilding P. Micropillararray chip for integrated white blood cell isolation and PCR. *Biomol Eng* 2005; 21(6): 157-62.
- 31 Mohamed H, McCurdy LD, Szarowski DH, Duva S, Turner JN, Caggana M. Development of a rare cell fractionation device: Application for cancer detection. *IEEE Trans Nanobioscience* 2004; 3(4): 251-6.
- 32 Shevkopyas SS, Yoshida T, Munn LL, Bitensky MW. Biomimetic autoseparation of leukocytes from whole blood in a microfluidic device. *Anal Chem* 2005; 77(3): 933-7.
- 33 Seo HK, Kim YH, Kim HO, Kim YJ. Hybrid cell sorters for on-chip cell separation by hydrodynamics and magnetophoresis. *J Micromech Microeng* 2010; 20(9): 95019-25.
- 34 Yamada M, Nakashima M, Seki M. Pinched flow fractionation: Continuous size separation of particles utilizing a laminar flow profile in a pinched microchannel. *Anal Chem* 2004; 76(18): 5465-71.
- 35 Cupelli C, Borchardt T, Steiner T, Nils P, Roland Z, Mark S. Leukocyte enrichment based on a modified pinched flow fractionation approach. *Microfluid Nanofluid* 2013; 14(3/4): 551-63.
- 36 Murthy SK, Sin A, Tompkins RG, Toner M. Effect of flow and surface conditions on human lymphocyte isolation using microfluidic chambers. *Langmuir* 2004; 20(26): 11649-55.
- 37 Dharmasiri U, Balamurugan S, Adams AA, Okagbare PI, Obubuafo A, Soper SA. Highly efficient capture and enumeration of low abundance prostate cancer cells using prostate-specific membrane antigen aptamers immobilized to a polymeric microfluidic device. *Electrophoresis* 2009; 30(18): 3289-300.
- 38 Segre G, Silberberg A. Radial particle displacements in poiseuille flow of suspensions. *Nature* 1961; 189: 209-10.
- 39 Kuntaegowdanahalli SS, Bhagat AA, Kumar G, Papautsky I. Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels. *Lab Chip* 2009; 9(20): 2973-80.
- 40 Hur SC, Brinckerhoff TZ, Walthers CM, Dunn JC, Carlo DD. Label-free enrichment of adrenal cortical progenitor cells using inertial microfluidics. *PLoS One* 2012; 7(10): e46550.
- 41 黄炜东, 张何, 徐涛, 李卓荣, 周雷激, 杨梦魁. 基于惯性微流原理的微流控芯片用于血浆分选. 科学通报(Huang Weidong, Zhang He, Xu Tao, Li Zhuorong, Zhou Leiji, Yang Mengsu. *Separation of blood plasma by inertial focusing using microfluidic chips. Chin Sci Bull*) 2011; 56(21): 1711-9.