



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107629958 B

(45)授权公告日 2020.07.14

(21)申请号 201710670200.1

(22)申请日 2017.08.08

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107629958 A

(43)申请公布日 2018.01.26

(73)专利权人 浙江理工大学

地址 310018 浙江省杭州市江干经济开发区2号大街928号

(72)发明人 刘爱萍 陈本永 王夏华 吴化平
邢赞 许为中 周奇

(74)专利代理机构 杭州求是专利事务有限公司 33200

代理人 黄欢娣 邱启旺

(51)Int.Cl.

C12M 3/00(2006.01)

C12M 1/34(2006.01)

G01N 27/02(2006.01)

(56)对比文件

CN 103528928 A,2014.01.22,

CN 104749232 A,2015.07.01,

CN 106513066 A,2017.03.22,

US 2016116432 A1,2016.04.28,

US 2016228846 A1,2016.08.11,

WO 2017106727 A1,2017.06.22,

Yoon HJ, et al..Sensitive capture of circulating tumour cells by functionalized graphene oxide nanosheets..《Nat Nanotechnol.》.2013,第8卷(第10期),

Ali MA, et al..Microfluidic Immuno-Biochip for Detection of Breast Cancer Biomarkers Using Hierarchical Composite of Porous Graphene and Titanium Dioxide Nanofibers..《ACS Appl Mater Interfaces.》.2016,第8卷(第32期),

Zhang P, et al..Ultrasensitive microfluidic analysis of circulating exosomes using a nanostructured graphene oxide/polydopamine coating..《Lab Chip.》.2016,第16卷(第16期),

Liu F, et al..Three-dimensional graphene micropillar based electrochemical sensor for phenol detection..《Biosens Bioelectron.》.2013,第50卷

审查员 张临政

权利要求书2页 说明书7页 附图15页

(54)发明名称

一种三维石墨烯界面的微流控芯片及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种三维石墨烯界面的微流控芯片及其制备方法,该微流控芯片通过设计不同尺寸的微柱捕获凹槽,利用流体动力学,实现对单细胞及双细胞的捕获,通过三维石墨烯微柱电极实时定量采集单个或两个细胞的微运动(如细胞吸附,细胞迁移,细胞增殖和细胞增殖)时的阻抗电信号,为癌症病理和单细胞检测提供新的思路和方法。该微流控芯片的制备包括有图案化的金电极阵列、立体的石墨烯微柱电极阵列、

PDMS流道、可以打开的PDMS盖板等环节的制备加工。这种方法加工的微流控芯片具有良好的生物兼容性,制备方法条件温和,简单易行,工艺参数可控,并且检测得到单细胞的电信号强度是普通微流控芯片的2倍。

1. 一种三维石墨烯界面的微流控芯片, 包含子芯片, 所述子芯片布置于一测试流道(21)中, 测试流道(21)的两端分别连接一储液槽(22); 两个储液槽(22)和测试流道(11)构成一H形流道; 子芯片上布置有细胞电极, 细胞电极(10)关于设置在子芯片对称轴位置的参考电极(20)对称布置, 一侧构成工作电极, 另一侧构成对电极, 两侧细胞电极(10)的捕获方向相反, 且垂直于中心参考电极(20); 多个细胞电极(10)之间相互独立, 分别通过引线与布置在微流控芯片边缘的接线端子相连; 所述细胞电极(10)包括电极底座(11)和位于电极底座(11)上的捕获槽(12), 所述捕获槽(12)高度为 $30\mu\text{m}$; 由多个微电极组成, 相邻的微电极之间具有 $5\mu\text{m}$ 的缝隙(13); 多个微电极有序排列构成一个垂直于电极底座(11)的弧形捕获面, 其弧线为沿短轴分割的半椭圆; 电极底座(11)包括金层和位于金层上表面的石墨烯层(14), 捕获结构的弧形捕获面覆盖有石墨烯层(14), 石墨烯层(14)与金层导通; 所述石墨烯层(14)具有和细胞表面的丝状伪足相匹配的微纳褶皱和纹理结构; 所述细胞电极(10)为单细胞电极或双细胞电极, 对于单细胞电极, 其弧形捕获面对应的半椭圆的短轴长度为 $16\text{--}20\mu\text{m}$, 长轴长度为 $32\text{--}36\mu\text{m}$; 对于双细胞电极, 其弧形捕获面对应的半椭圆的短轴长度为 $27\text{--}33\mu\text{m}$, 长轴长度为 $40\text{--}45\mu\text{m}$ 。

2. 一种权利要求1所述的三维石墨烯界面的微流控芯片的制备方法, 其特征在于, 该方法包括构建由两个储液槽和位于两个储液槽(22)之间的测试流道(21)构成H形PDMS流道, 以及在测试流道(21)中固定排布有细胞电极(10)的子芯片; 其中, 细胞电极(10)的制备方法如下:

(1) 通过剥离工艺在玻璃基板上形成多个相互独立的电极单元; 所述电极单元具有三层结构, 从上到下依次为Ti/Au/Cr;

(2) 用质量分数为1%氢氟酸冲洗钛层, 得到完整的图案化金电极阵列;

(3) 通过软光刻在电极单元上形成垂直于电极单元的捕获槽, 所述捕获槽(12)由多个微电极组成, 相邻的微电极之间具有 $5\mu\text{m}$ 的缝隙(13); 多个微电极有序排列构成一个垂直于电极单元的弧形捕获面, 其弧线为沿短轴分割的半椭圆;

(4) 用 O_2 等离子体以20W功率处理1分钟, 然后浸泡于10ml 20%的聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)水溶液中20min, 并在 35°C 的培养箱中静置1小时;

(5) 洗涤干燥后, 将 $300\mu\text{L}$ 1mg/mL 的GO溶液通过雾化的方法进行喷涂, 在 40°C 的室温中干燥12小时, 然后还原GO;

(6) 在干燥的氮气气流中 200°C 下退火2小时;

(7) 用 $0.8\text{J}/\text{cm}^2$ 能量密度的激光束对连续的石墨烯膜进行图案化, 得到各个相互独立的细胞电极。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述步骤1具体为:

(1.1) 在玻璃基板上以2500rpm旋涂正光刻胶S1818以产生 $2\mu\text{m}$ 厚的PR层, 通过UV曝光和显影将掩模版上的图案转印到玻璃基板上;

(1.2) 通过磁控溅射的方法依次将Cr/Au/Ti通过溅射到经过剥离工艺处理的玻璃基板上, Cr/Au/Ti的厚度为 $10\text{nm}/100\text{nm}/100\text{nm}$;

(1.3) 浸入丙酮溶液中半小时, 然后用乙醇和去离子水漂洗, 以完全洗掉光致抗蚀剂层, 形成图案化的金电极层。

4. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述步骤5中, 采用水合肼蒸汽在 80°C 下还

原10小时。

5. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 还包括键合于所述PDMS流道的PDMS盖板, PDMS流道的PDMS盖板均通过模板法加工得到。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其特征在于, PDMS盖板通过显微切割分成三部分, 位于子芯片上方的盖板部分可打开, 用于细胞形貌的显微记录。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其特征在于, 位于储液槽上方的PDMS盖板具有开孔, 都是通过打孔器打孔得到, 用于注入或排出细胞液。

8. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述连接细胞电极(10)和接线端子的引线在构建电极单元的同时进行铺设, 然后通过等离子体增强化学气相沉积(PECVD)沉积厚度为600nm的SiO₂涂层, 然后采用光刻胶作为掩模阻挡电极单元以外的区域, 使用反应离子蚀刻技术(RIE)来蚀刻掉电极单元上的SiO₂层, 而引线被SiO₂涂层覆盖。

一种三维石墨烯界面的微流控芯片及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于微纳加工 (MEMS) 和传感器制备领域, 具体涉及一种三维石墨烯界面的微流控芯片及其制备方法。

背景技术

[0002] 微流控芯片指的是在一块几平方厘米的芯片上构建的化学或生物实验室。它将化学和生物等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测, 细胞培养、分选、裂解等基本操作单元集成到一块很小的芯片, 用以实现常规化学或生物实验室的各种功能。

[0003] 微流控芯片特征主要是其容纳流体的有效结构 (通道、反应室和其它某些功能部件) 至少在一个纬度上为微米级尺度。由于微米级的结构, 流体在其中显示和产生了与宏观尺度不同的特殊性能。因此采用独特的分析能够产生特殊的性能。微流控芯片具有液体流动可控、消耗试样和试剂极少、分析速度成十倍上百倍地提高等特点, 它可以在几分钟甚至更短的时间内进行上百个样品的同时分析, 并且可以在线实现样品的预处理及分析全过程。目前微流控芯片的制备方法主要是通过光刻、热压等方法制作出一些简单的纳米尺寸流道的芯片, 然后将其和盖片键合得到, 用于简单的细胞捕获研究。而目前光刻、热压等方法只能获得平面的二维结构, 难以获得真正的三维流道, 而三维的微流道可以实现更好的试剂混合、不同试剂的相互反应。如果在微流道内通入细胞培养液的话, 使用三维微流道便于从各个方向对细胞进行培养、刺激、观察等。因而三维微流道具有更为重要的应用价值。近年来微流控芯片受到研究人员的广泛关注, 如基于微流控芯片的传感器、用于制备液滴的离心式微流控芯片和纸质微流控芯片等。但很少有人关注微流控芯片用于细胞传感性能的研究, 尤其是单细胞。这样一来, 芯片的电极就是芯片至关重要的一部分, 电极涉及到细胞的捕获及细胞信号的检测和传导。目前大多数微流控芯片的传感电极都是经典的是平面二维金电极结构, 此电极与细胞的接触面积小, 获取的细胞信号微弱, 而且不能反应细胞在竖直方向上的微运动和迁移, 因此不利于研究细胞生物学特性, 尤其是单细胞。而我们充分利用剥离工艺、光刻技术。磁控溅射、反应离子蚀刻技术、尤其是雾化沉积石墨烯薄膜等生产工艺制造出一种集成三维石墨烯界面的微流控芯片, 本微流控芯片可用于高效率的单细胞捕获和超灵敏的单细胞电信号的检测, 对癌细胞的研究和诊断有一定的指导意义。而且对于单细胞检测来说, 此微流控芯片摒弃了传统的芯片需要复杂的化学修饰和化学标记等过程对细胞的活性有很大的影响, 而且操作复杂, 条件苛刻。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于针对现有技术的不足, 提出一种三维石墨烯界面的微流控芯片及其制备方法。该微流控芯片在保证高效的单细胞捕获效率的同时, 显著的增强了捕获后单细胞传感的灵敏度, 与传统的平面金电极相比单细胞的电信号传感性能提高了一倍。

[0005] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的: 一种三维石墨烯界面的微流控芯片, 包含子芯片, 所述子芯片布置于一测试流道中, 测试流道的两端分别连接一储液槽; 两个储

液槽和测试流道构成一H形流道。子芯片上布置有细胞电极,细胞电极且关于设置在子芯片对称轴位置的参考电极对称布置,一侧构成工作电极,另一侧构成对电极,两侧细胞电极的捕获方向相反,且垂直于中心参考电极。多个细胞电极之间相互独立,分别通过引线与布置在微流控芯片边缘的接线端子相连;所述细胞电极包括电极底座和位于电极底座上的捕获槽,所述捕获槽高度为 $30\mu\text{m}$;由多个微电极组成,相邻的微电极之间具有 $5\mu\text{m}$ 的缝隙;多个微电极有序排列构成一个垂直于电极底座的弧形捕获面,其弧线为沿短轴分割的半椭圆。电极底座包括金层和位于金层上表面的石墨烯层,所述捕获结构的弧形捕获面覆盖有石墨烯层,石墨烯层与金层导通;所述石墨烯层具有和细胞表面的丝状伪足相匹配的微纳褶皱和纹理结构。所述细胞电极为单细胞电极或双细胞电极,对于单细胞电极,其弧形捕获面对应的半椭圆的短轴长度为 $16\text{--}20\mu\text{m}$,长轴长度为 $32\text{--}36\mu\text{m}$;对于双细胞电极,其弧形捕获面对应的半椭圆的短轴长度为 $27\text{--}33\mu\text{m}$,长轴长度为 $40\text{--}45\mu\text{m}$ 。

[0006] 一种三维石墨烯界面的微流控芯片的制备方法,该方法包括构建由两个储液槽和位于两个储液槽之间的测试流道构成H形PDMS流道,以及在测试流道中固定排布有细胞电极的子芯片;细胞电极的制备方法如下:

[0007] (1) 通过剥离工艺在玻璃基板上形成多个相互独立的电极单元;所述电极单元具有三层结构,从上到下依次为Ti/Au/Cr。

[0008] (2) 用质量分数为1%氢氟酸冲洗钛层,得到完整的图案化金电极阵列。

[0009] (3) 通过软光刻在电极单元上形成垂直于电极单元的捕获槽,所述捕获槽由多个微电极组成,相邻的微电极之间具有 $5\mu\text{m}$ 的缝隙;多个微电极有序排列构成一个垂直于电极单元的弧形捕获面,其弧线为沿短轴分割的半椭圆。

[0010] (4) 用 O_2 等离子体以20W功率处理1分钟,然后浸泡于10ml 20%的聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)水溶液中20min,并在 35°C 的培养箱中静置1小时。

[0011] (5) 洗涤干燥后,将 $300\mu\text{L}$ 1mg/mL 的GO溶液通过雾化的方法进行喷涂,在 40°C 的室温中干燥12小时,然后还原GO。

[0012] (6) 在干燥的氮气气流中 200°C 下退火2小时。

[0013] (7) 用 $0.8\text{J}/\text{cm}^2$ 能量密度的激光束对连续的石墨烯膜进行图案化,得到各个相互独立的细胞电极。

[0014] 进一步地,所述步骤1具体为:

[0015] (1.1) 在玻璃基板上以2500rpm旋涂正光刻(S1818)以产生 $2\mu\text{m}$ 厚的PR层。通过UV曝光和显影将掩模版上的图案转印到玻璃基板上。

[0016] (1.2) 通过磁控溅射的方法依次将Cr/Au/Ti (10nm/100nm/100nm)通过溅射到经过剥离工艺处理的玻璃基板上。

[0017] (1.3) 浸入丙酮溶液中半小时,然后用乙醇和去离子水漂洗,以完全洗掉光致抗蚀剂层,形成图案化的金电极层。

[0018] 进一步地,所述步骤5中,采用水合肼蒸汽在 80°C 下还原10小时。

[0019] 进一步地,还包括键合于所述PDMS流道的PDMS盖板,PDMS流道的PDMS盖板均通过模板法加工得到。

[0020] 进一步地,PDMS盖板通过显微切割分成三部分,位于子芯片上方的盖板部分可打开,用于细胞形貌的显微记录。

[0021] 进一步地,位于储液槽上方的PDMS盖板具有开孔,都是通过打孔器打孔得到,用于注入或排出细胞液。

[0022] 进一步地,所述连接细胞电极和接线端子的引线在构建电极单元的同时进行铺设,然后通过等离子体增强化学气相沉积(PECVD)沉积厚度为600nm的SiO₂涂层,然后采用光刻胶作为掩模阻挡电极单元以外的区域,使用反应离子蚀刻技术(RIE)来蚀刻掉电极单元上的SiO₂层,而引线被SiO₂涂层覆盖。

[0023] 本发明具有以下优点:制备得到的三维还原氧化石墨烯微柱电极具有一个和细胞大小、形状一致的弧面凹槽,显著的增大了细胞和电极的接触面积,与传统的平面金电极相比,将细胞和电极的接触从二维平面延伸到三维空间,使得采集到的电信号不但能够反应细胞水平方面的运动而且可以反应细胞垂直方向上的迁移。而且石墨烯薄膜界面的纳米结构和纹理和细胞表面的丝状伪足微结构十分的一致,增大了细胞和电极之间的相互作用,从而使得传感性能和灵敏度有个很大程度的提高,与传感的金电极相比传感性能平均提高了一倍;H形PDMS流道的设计可以防止细胞缓冲液注入时造成通道阻塞。打开H形通道的水平排上方的盖子,光学显微镜的目标可以直接进入内部的流动通道,因此可以非常清楚地观察细胞的运动。而且本发明制备得到的微流控芯片可以多次循环使用,提高了芯片的利用率和成本,具有良好的应用前景。这种方法加工的微流控芯片具有良好的生物兼容性,制备方法条件温和,简单易行,工艺参数可控,并且检测单细胞的电信号强度是普通微流控芯片的2倍。本发明制备得到的微流控芯片通过连接阻抗分析仪和光学显微镜可以研究单细胞的吸附,生长、增殖和转移等特性,主要应用于不同癌变时期的单个癌细胞区分、抗药性和细胞形态学等相关领域。为细胞检测领域提供新检测方法,为细胞生物学提供新研究技术。

附图说明

[0024] 图1为整个微流控芯片的结构示意图;

[0025] 图2为微流控芯片的平面结构部位图;

[0026] 图3为放大的芯片捕获区域的效果图;

[0027] 图4为单细胞阻抗电极的结构示意图;

[0028] 图5为具有三维石墨烯仿生界面的单细胞阻抗电极捕获细胞的效果图,具有微纳褶皱和纹理的石墨烯界面4清晰可见;

[0029] 图6为图案化的金电极阵列形成的过程;

[0030] 图7为用光刻的方法加工不同尺寸的捕获微柱,接着在微柱上修饰上石墨烯薄膜并用激光束将其图案化成单个传感单元德的过程;

[0031] 图8为用标准模板法加工PDMS流道和PDMS盖板的过程,以及键合打孔;

[0032] 图9为所设计的微流控芯片的实物图和修饰石墨烯后微柱电极的显微图片;

[0033] 图10为石墨烯微柱电极和整个微流控芯片的性能表征;

[0034] 图11为单细胞和双细胞捕获在金界面和石墨烯界面凹槽上的显微照片;

[0035] 图12为单个转移性强的乳腺癌细胞(MDA-MB-231)在2D金界面和3D石墨烯界面上不同接种阶段的伯德阻抗谱和相位谱;

[0036] 图13为五次重复实验阻抗幅值做统计分析得到结果(图示是五次重复实验的均值

±方差)；

[0037] 图14为用有限元计算得到的捕获微柱内部和周围流速分布模拟图；

[0038] 图15为用有限元计算得到的捕获细胞后电场分布模拟图；

[0039] 图中,细胞电极10、电极底座11、捕获槽12、缝隙13、石墨烯层14、中心参考电极20、测试流道21、储液槽22、开孔23。

具体实施方式

[0040] 本发明的目的在于制备一种三维石墨烯界面的微流控芯片,该微流控芯片包括由两个储液槽和位于两个储液槽之间的测试流道构成H形PDMS流道,以及布置在测试流道21中的子芯片,如图1所示,还可以包括可打开的PDMS盖板(图1阴影部分);平面结构部位如图2和3所示,H形PDMS流道可以防止细胞注入是微流控芯片的阻塞。所述子芯片包括中心参考电极20,以及对称布置于中心参考电极20两侧的一个或多个相互独立的细胞电极。

[0041] 子芯片采用如图4所示的细胞电极10,包括电极底座11和位于电极底座11上的捕获槽12,所述捕获槽12由多个微电极组成,相邻的微电极之间具有5 μ m的缝隙13;多个微电极有序排列构成一个垂直于电极底座11的弧形捕获面,其弧线为沿短轴分割的半椭圆。其中,捕获槽12具有一个切合细胞大小、形状的弧面凹槽,最大限度的增加了细胞膜和电极材料作用的接触点和接触力。与传统的平面金电极相比,将细胞和电极的接触从二维平面延伸到三维空间,使得采集到的电信号不但能够反应细胞水平方面的运动而且可以反应细胞垂直方向上的迁移。而狭缝13的设计,允许细胞缓冲液流动,但不排出细胞,以确保微柱的弧形捕获区域不会积累太多的细胞缓冲液而影响细胞捕获效率。

[0042] 如图5所示,上述电极底座11包括金层和位于金层上表面的石墨烯层14,构成三维石墨烯仿生界面。石墨烯层14具有和细胞表面的丝状伪足相匹配的微纳褶皱和纹理结构,可以大大增强细胞和电极材料之间的地形相互作用和纹理作用,显著的提高细胞传感性能。

[0043] 制备方法如下:(1)通过剥离工艺在玻璃基板上形成多个相互独立的电极单元,用于构建电极底座11,此时,可以设计连接电极和芯片边缘接线端子的多根引线;所述电极具有三层结构,从上到下依次为Ti/Au/Cr。如图6所示,通常采用以下方法:

[0044] (1.1)在玻璃基板(图6a)上以2500rpm旋涂正光刻(S1818)以产生2 μ m厚的PR层(图6b),通过UV曝光(图6c)和显影(图6d)将掩模版上的图案转印到玻璃基板上。

[0045] (1.2)通过磁控溅射的方法分别将Cr/Au/Ti(10nm/100nm/100nm)通过溅射到经过剥离工艺处理的玻璃基板上(图6e)。其中铬用作玻璃和金的连接层,钛用作反应离子蚀刻的阻挡层。

[0046] (1.3)将溅射后的基板芯片浸入丙酮溶液中半小时,然后用乙醇和去离子水漂洗,以完全洗掉下面的光致抗蚀剂层,形成图案化的金电极层(图6f)。

[0047] (2)为了消除引线对单细胞信号的干扰,需要通过一系列的操作来盖住所有的引线,只暴露捕获细胞的区域。通过等离子体增强化学气相沉积(PECVD)沉积SiO₂涂层,然后采用光刻胶作为掩膜来通过反应离子刻蚀技术蚀刻金电极上方的SiO₂涂层。通常采用以下方法:

[0048] (2.1)通过等离子体增强化学气相沉积(PECVD)工艺以沉积厚度为600nm的SiO₂在

加工好的基地上(图6j)。

[0049] (2.2) 接着,使用相同的剥离方法,用光刻胶作为掩模阻挡微电极阵列以外的区域。使用反应离子蚀刻技术(RIE)来蚀刻掉微电极阵列上的阻挡层以暴露捕获区(图6g、图6h、图6i)。

[0050] (2.3) 用质量分数为1%氢氟酸冲洗钛保护层,得到完整的图案化金电极阵列(图6k)。

[0051] (3) 通过软光刻在金电极上形成垂直于电极底座11的捕获槽,所述捕获槽12由多个微电极组成,相邻的微电极之间具有5 μ m的缝隙13;多个微电极有序排列构成一个垂直于电极底座11的弧形捕获面,其弧线为沿短轴分割的半椭圆。具体为:将30 μ m厚的负性光刻胶SU-8旋涂在图案化金电极阵列的平面基底上(图7a),然后通过UV曝光(图7c、图7d)显影产生大约30 μ m高的空心半圆柱微柱阵列(图7e),用于捕获细胞。

[0052] (4) 为了更好的在微柱上修饰石墨烯薄膜,需要使光刻胶的微柱变得亲水,从而将处理完成的玻璃基板用O₂等离子体(Ke You, China)以20W功率处理1分钟(图7f)。接着将微芯片浸泡在10ml 20%的聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)(Sigma Aldrich)水溶液中20min(图7g),用于增强微柱对于G0(氧化石墨烯)的吸附,并在35℃的培养箱中静置1小时。用蒸馏水多次洗涤芯片并在60℃的培养箱中干燥3小时。

[0053] (5) 将300 μ L 1mg/mL的G0溶液通过雾化的方法喷涂在微流控芯片的捕获位置(图7h),在40℃的室温中干燥12小时,得到多层G0片均匀包裹的空心半圆柱形微柱阵列。接着将G0修饰的芯片在80℃的水合肼(Sigma)蒸气下处理10小时,以使G0薄膜还原成rG0(还原氧化石墨烯)薄膜(图7i)。

[0054] (6) 将整个芯片在干燥的氮气气流中200℃温度下退火2小时,来增强金电极和石墨烯之间的欧姆接触。

[0055] (7) 用0.8J/cm²能量密度的激光束对连续的石墨烯膜进行图案化,得到各个相互独立的细胞电极(图7j)。

[0056] 细胞电极10可以设计成关于芯片对称轴位置的参考电极(20)(2cm*2mm)对称布置,一侧构成工作电极,另一侧构成对电极,两侧细胞电极的捕获方向相反。细胞电极对称设计,分别形成工作电极和对电极,对电极可以除去细胞缓冲液的阻抗对细胞阻抗的影响,即工作电极阻抗值和对电极阻抗值的差分结果是细胞的电阻抗,而且工作电极和对电极可以交换使用,增加了芯片的使用寿命。使用时,将工作电极、对电极、参考电极分别与阻抗仪相连,阻抗仪向参比电极输出电信号,以施加电场;同时获取工作电极和对电极采集的细胞信号。通过两侧细胞电极的反向设置,对两侧电极获得的电信号做差分,即得到细胞生理行为引起的阻抗信号。

[0057] H形流道由PDMS构成,可通过模板法加工得到。可防止注入细胞时流道发生阻塞。制作工艺如图8所示,具体为:(a)用剥离工艺在玻璃基底上形成40 μ m高的图案,接着将液态的PDMS浇铸在基底上,固化剥离就形成了40 μ m高的PDMS流道;(b)PDMS盖板通过相同的方法形成。最后将两部分对准键合,整个芯片的封装如图1所示,包括流道、注入和留出孔、盖子。特别的,我们盖子是可以随时打开的,保证显微物镜和细胞表面的距离小于1mm,从而拍到单细胞状态变化时的大倍率照片。

[0058] 图9为所设计的微流控芯片的实物图。(a)是芯片的实物图;(b)捕获位置的显微照

片；(c) 形状测量显微镜得到捕获微柱的高度大约 $30\mu\text{m}$ ，略大于单细胞的高度；(d) 为修饰石墨烯后微柱电极的显微图片；(e) 为微柱狭缝的放大显微照片；(f) 为微柱内壁的大倍率扫描电镜照片，可以看到有明显的表面纹理；(g) 是原子力显微镜得到的微柱内壁的粗糙形貌；(h) 为飞秒激光刻蚀后得到单细胞捕获单元；(i) 是切割后单个细胞捕获单元。

[0059] 图10是微槽的性能表征，包括拉曼、四探针电阻、伏安特性曲线。(a) 和 (b) 分别是平面和微柱位置的拉曼测试，表明氧化石墨烯已经连续的修饰在平面和微柱上，并被还原；(c) 是用四探针法测得氧化石墨烯和不同厚度的还原氧化石墨烯薄膜的电导性，其中 $2\mu\text{m}$ 厚的还原氧化石墨烯的电阻达到千欧，基本可以传感单个细胞的信号；(d) 是氧化石墨烯和石墨烯薄膜的循环伏安曲线测试，氧化石墨烯基本没有电化学活性，而石墨烯膜有明显的氧化还原峰，证明制备得到的石墨烯微柱具有很好的电化学活性。

[0060] 图11为单细胞和双细胞捕获在金界面和石墨烯界面凹槽上的显微照片。(a) 是金界面捕获单细胞；(b) 是金界面捕获双细胞；(c、d) 分别是石墨烯界面捕获多个单细胞和双细胞；细胞捕获在石墨烯界面上后，单细胞会被石墨烯微柱的凹槽紧紧的包裹(e) 并且和微柱内壁有明显的挤压接触并产生一定数量的细胞丝状伪足(g)；双细胞会被石墨烯微柱的凹槽紧紧的包裹(f) 并且和微柱内壁有明显的挤压接触并产生一定数量的细胞丝状伪足(h)。

[0061] 图12为单个转移性强的乳腺癌细胞(MDA-MB-231) 在2D金界面和本发明的3D石墨烯界面上不同接种阶段，包括：空载、捕获、贴附(培养2h)、迁移(培养5h) 和增殖(培养9h) 等的伯德阻抗谱和相位谱。(a、b) 分别是癌变中期乳腺癌细胞接种在金界面上各个生理行为的伯德阻抗谱和相位谱，(c、d) 是相应石墨烯界面的情况，由图可知，石墨烯界面的阻抗值和相位值都比金界面的高，更重要的是石墨烯界面上各条曲线间距更大，证明细胞每种生理行为在石墨烯界面上反应的更为强烈。

[0062] 图13是将单个转移性强的乳腺癌细胞(MDA-MB-231) 接种在2D金界面和本发明的3D石墨烯界面上不同接种阶段，包括：空载、捕获、贴附(培养2h)、迁移(培养5h) 和增殖(培养9h) 等的五次重复实验阻抗幅值做统计分析得到结果(图示是五次重复实验的均值 \pm 方差)。由图可知，石墨烯界面的传感效果是经典金界面的2倍。

[0063] 通过有限元计算(COMSOL软件) 的方法模拟上述三维阻抗电极的流速分布和捕获细胞前后的电场分布，流速分布模拟结果如图14所示，从速度分布的模拟结果可以看出，弧形凹槽的捕获区的流速远小于侧间隙。由于每个弧形凹槽的内部空间仅能容纳一个细胞或者两个细胞，并且捕获区和外部狭缝之间的速度差，所以设计的捕获结构捕获细胞概率可以证明为100%。电场分布计算时电极、细胞以及溶液的介电常数和电导率如表1所示，电场分布的计算结果在图15中，最中间没有捕获细胞的凹槽电场基本为0，两侧捕获细胞的凹槽电场有明显的增强，说明制作的电极可以很有效传感单细胞的信号，并且增加的电场转化为电极增加的电阻抗，这与实验现象保持一致。

[0064] 表1

[0065]

Parameters	Values
cell diameter	$20\mu\text{m}$
cell relative permittivity	200
cell conductivity	0.84S/m

medium relative permittivity	80
medium conductivity	0.01S/m
graphene relative permittivity	4.5
graphene conductivity	6.5S/m

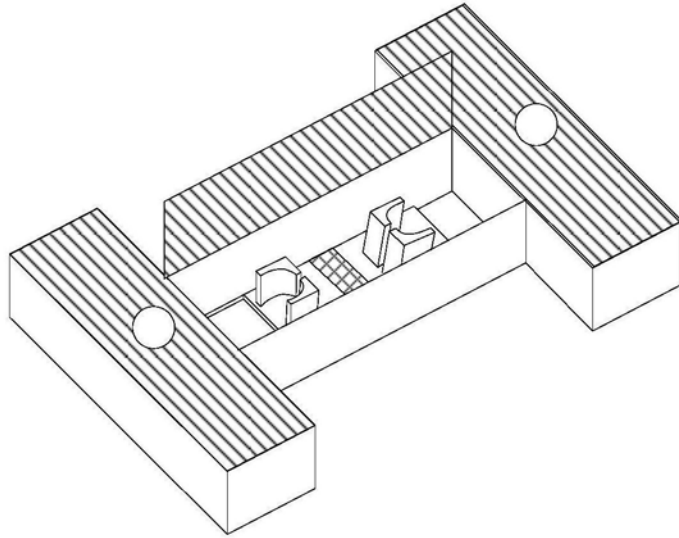


图1

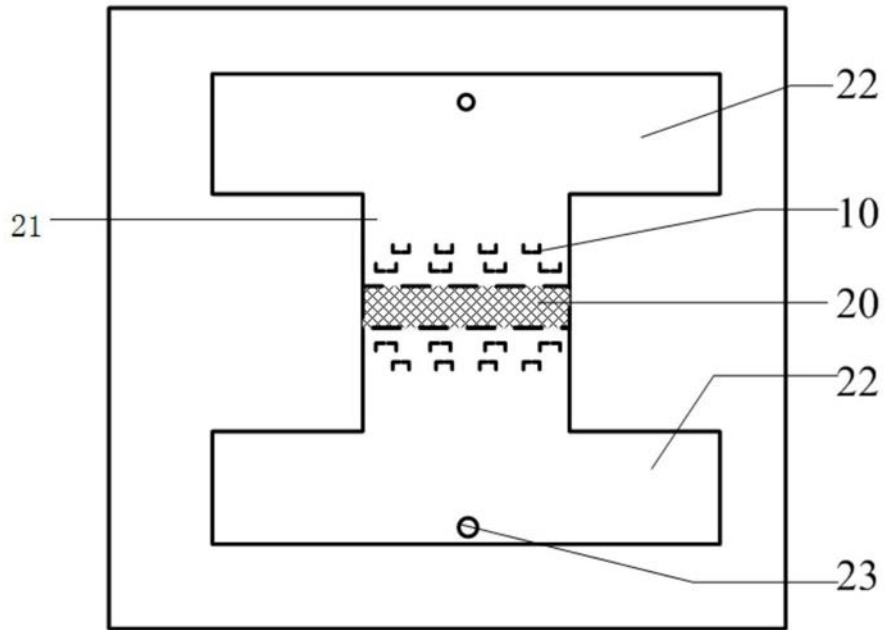


图2

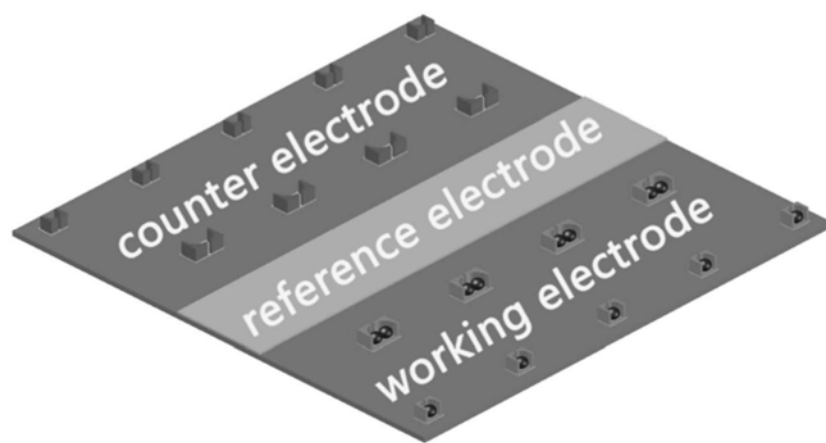


图3

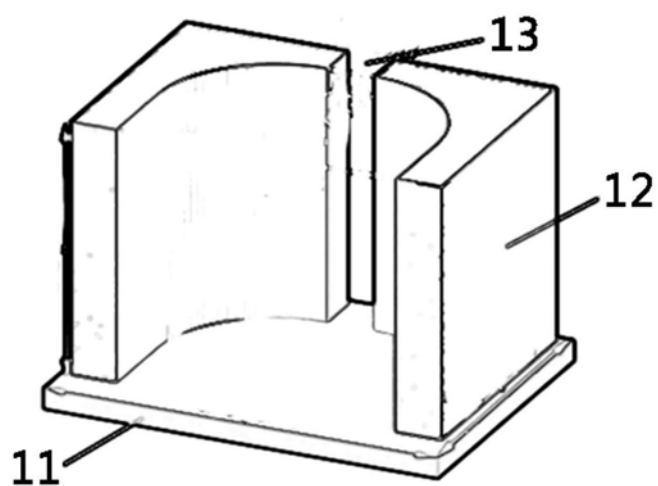


图4

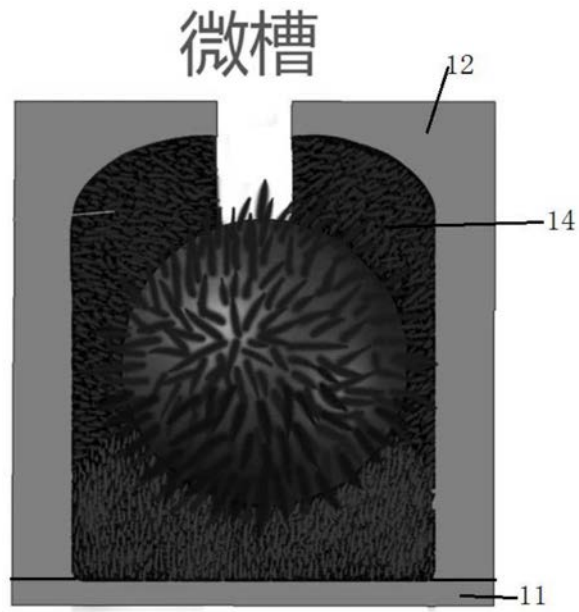


图5

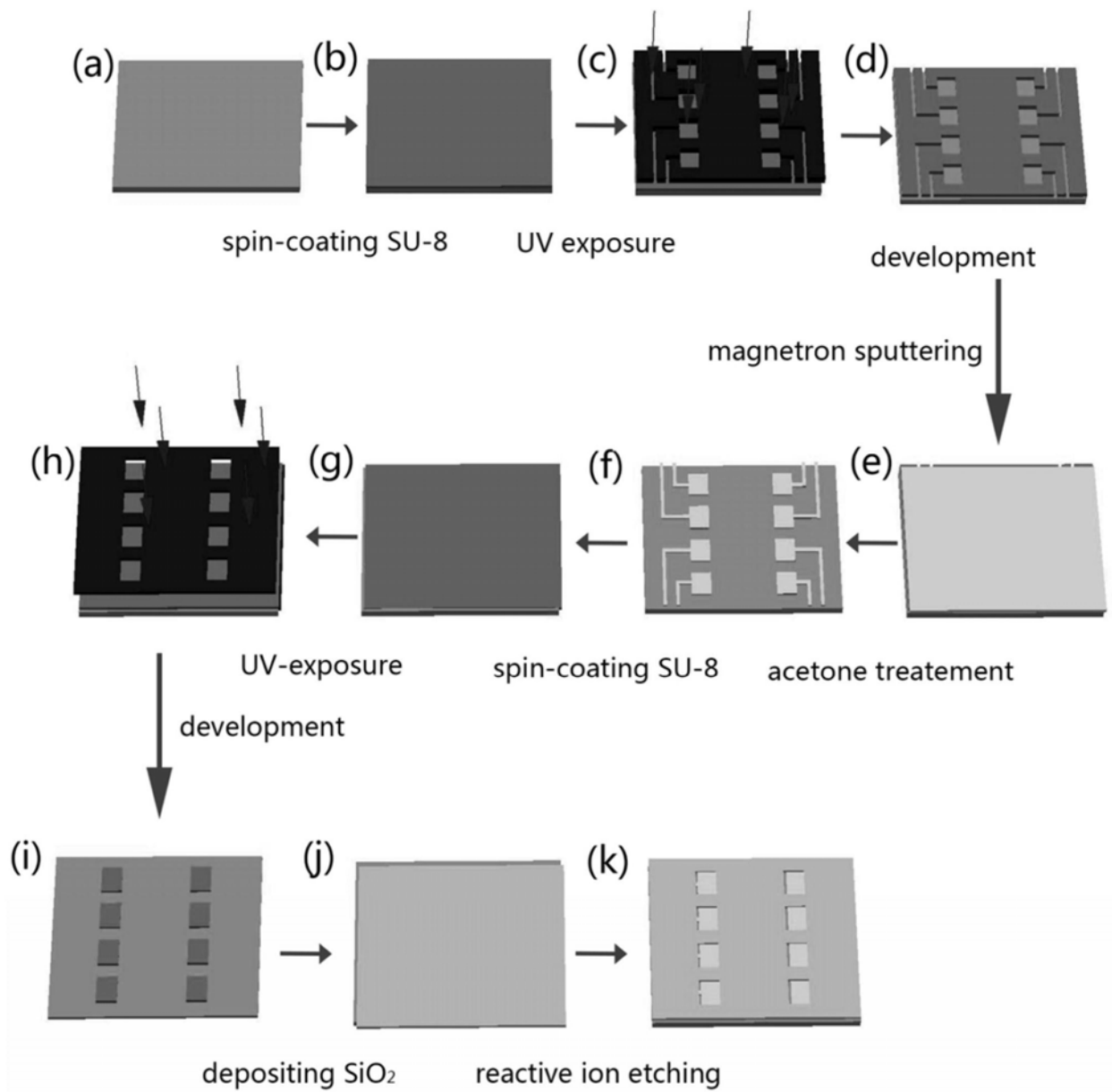


图6

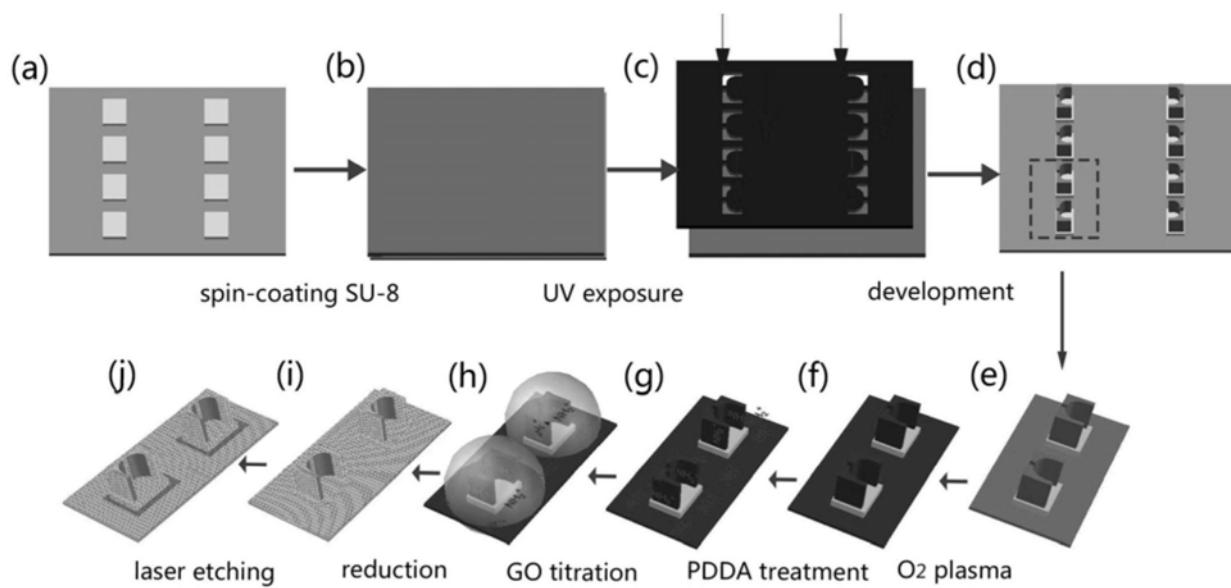


图7

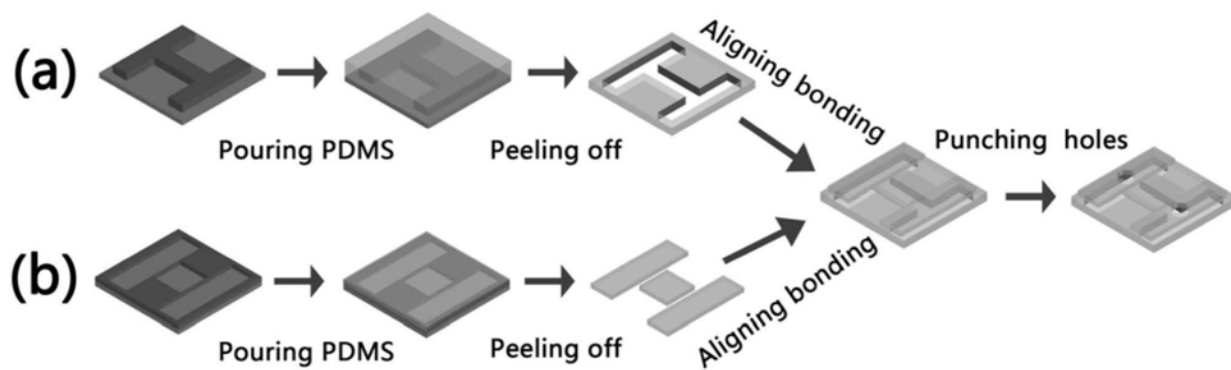


图8

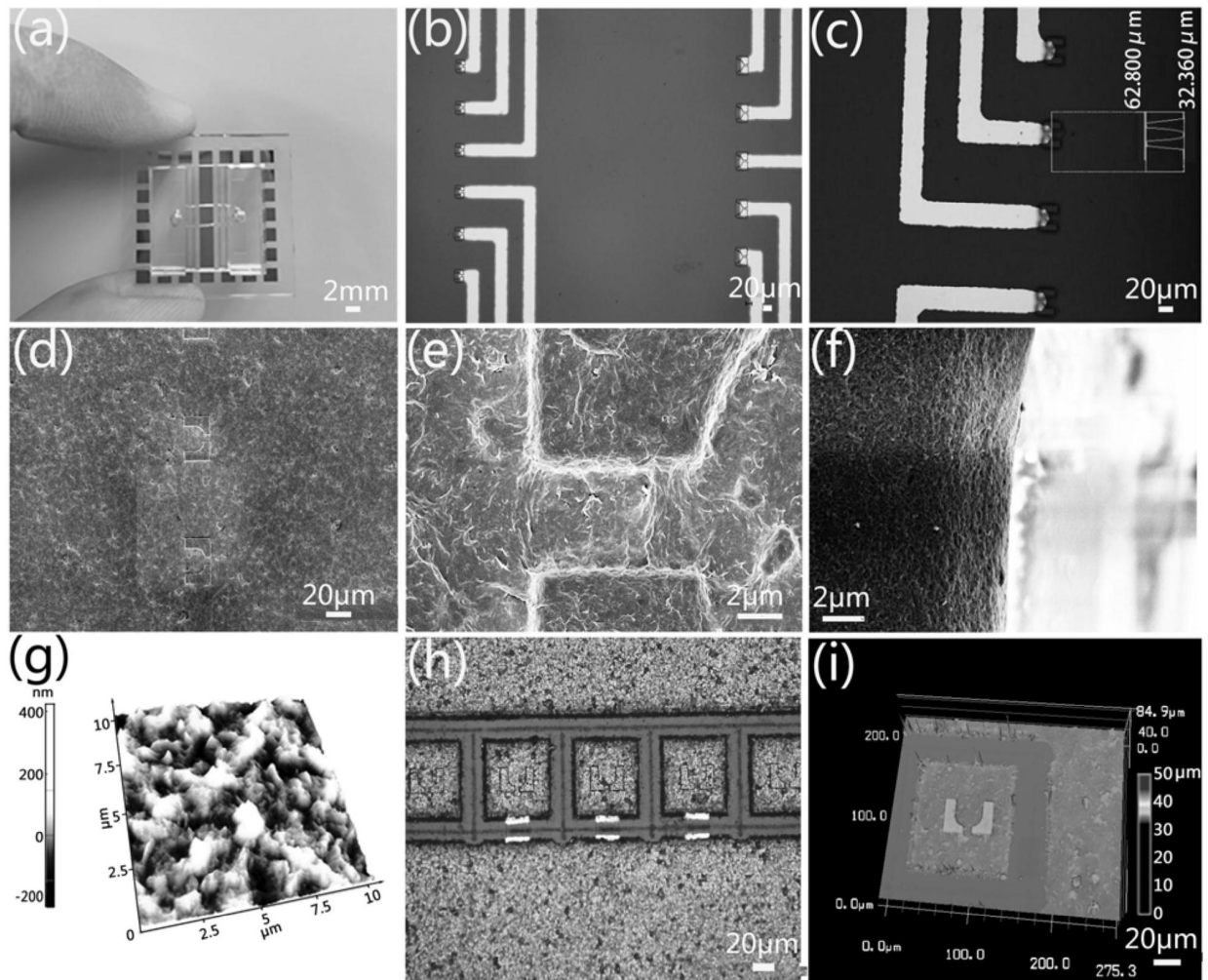


图9

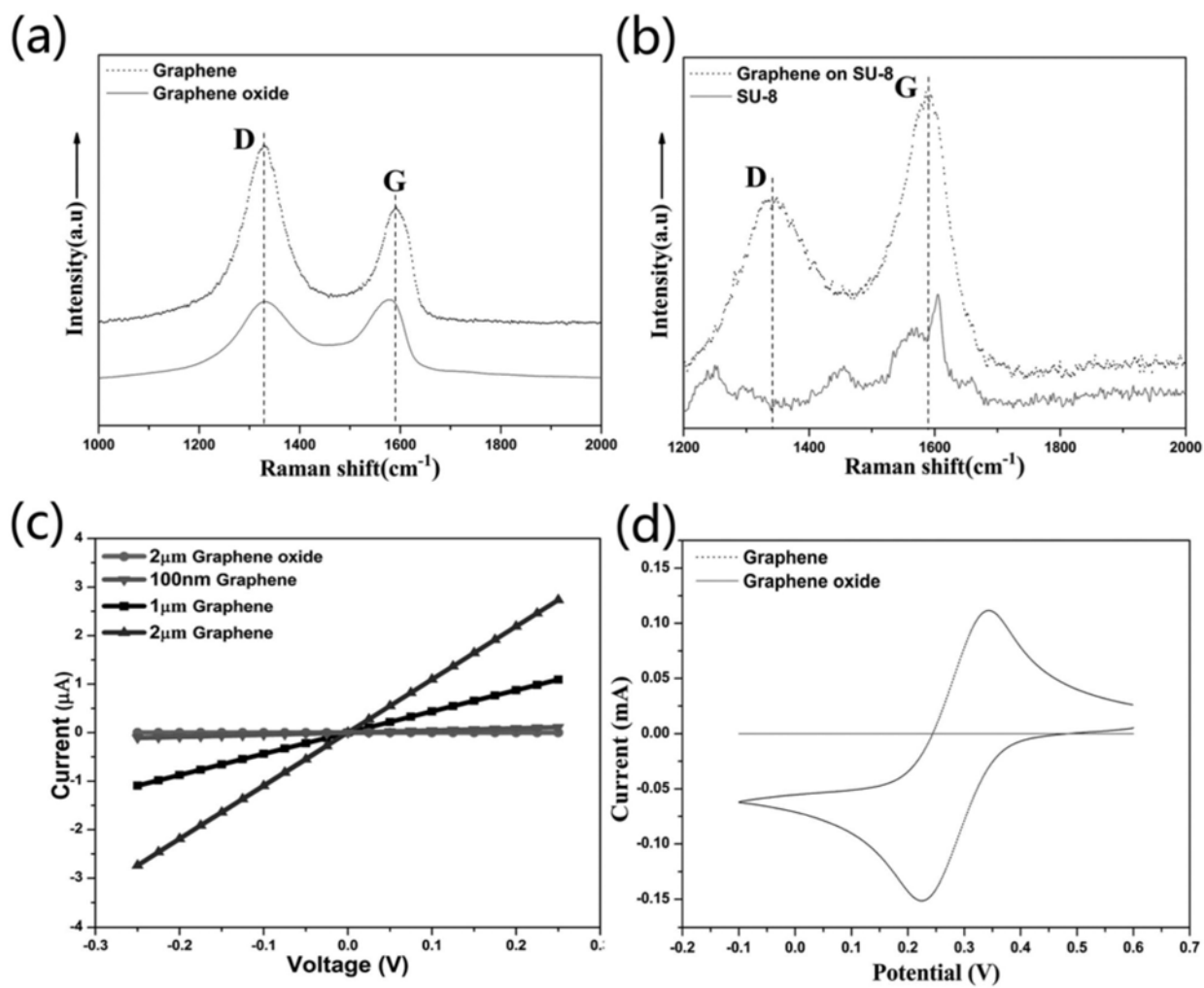


图10

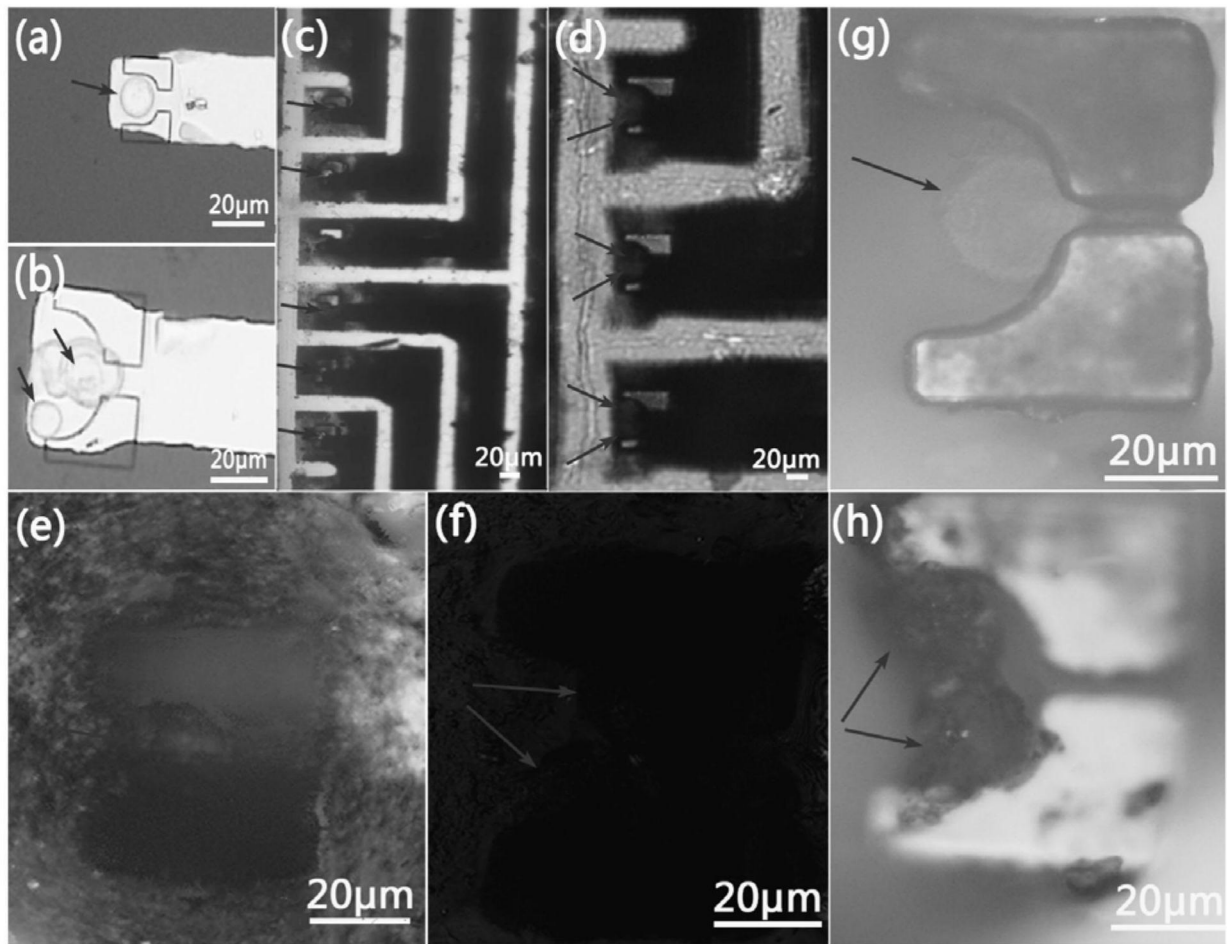


图11

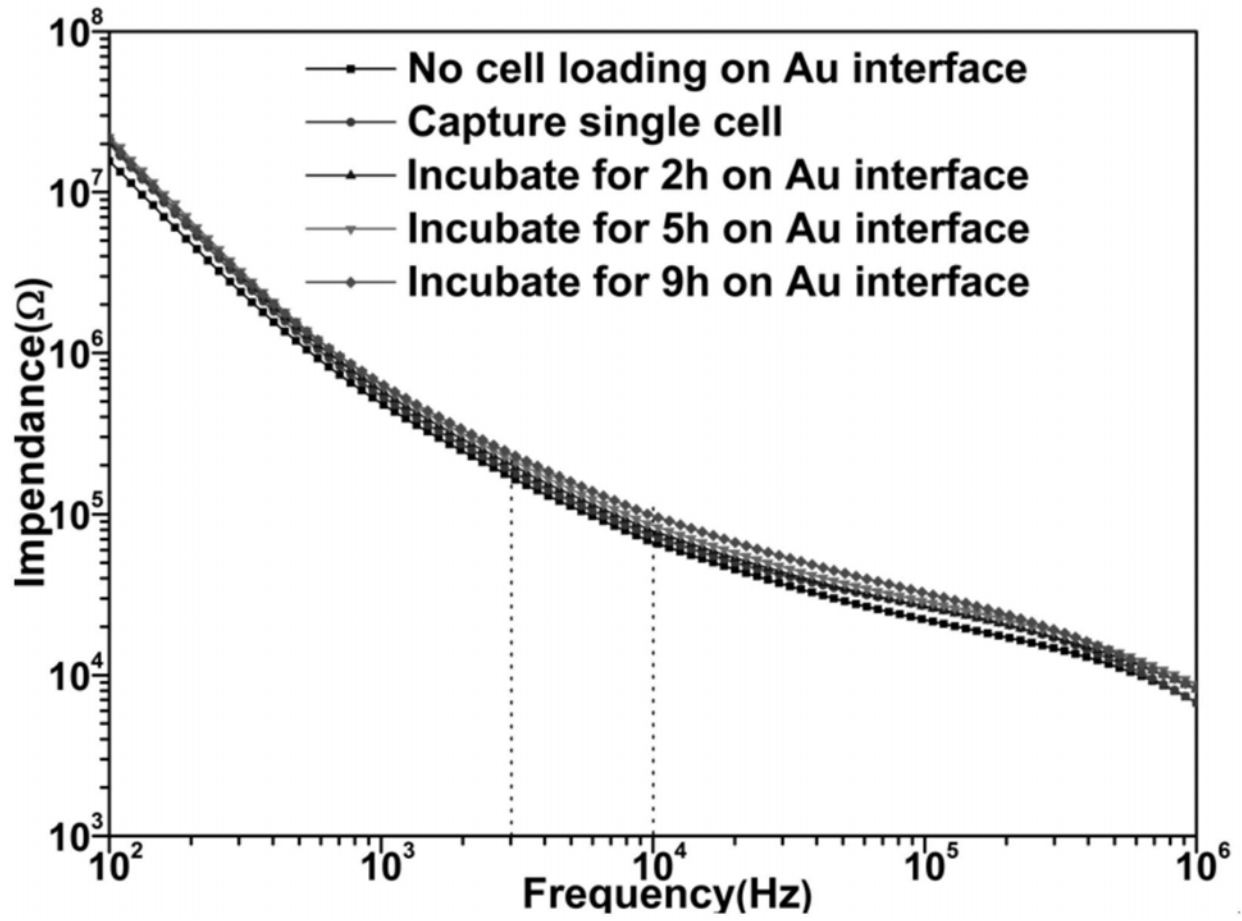


图12a

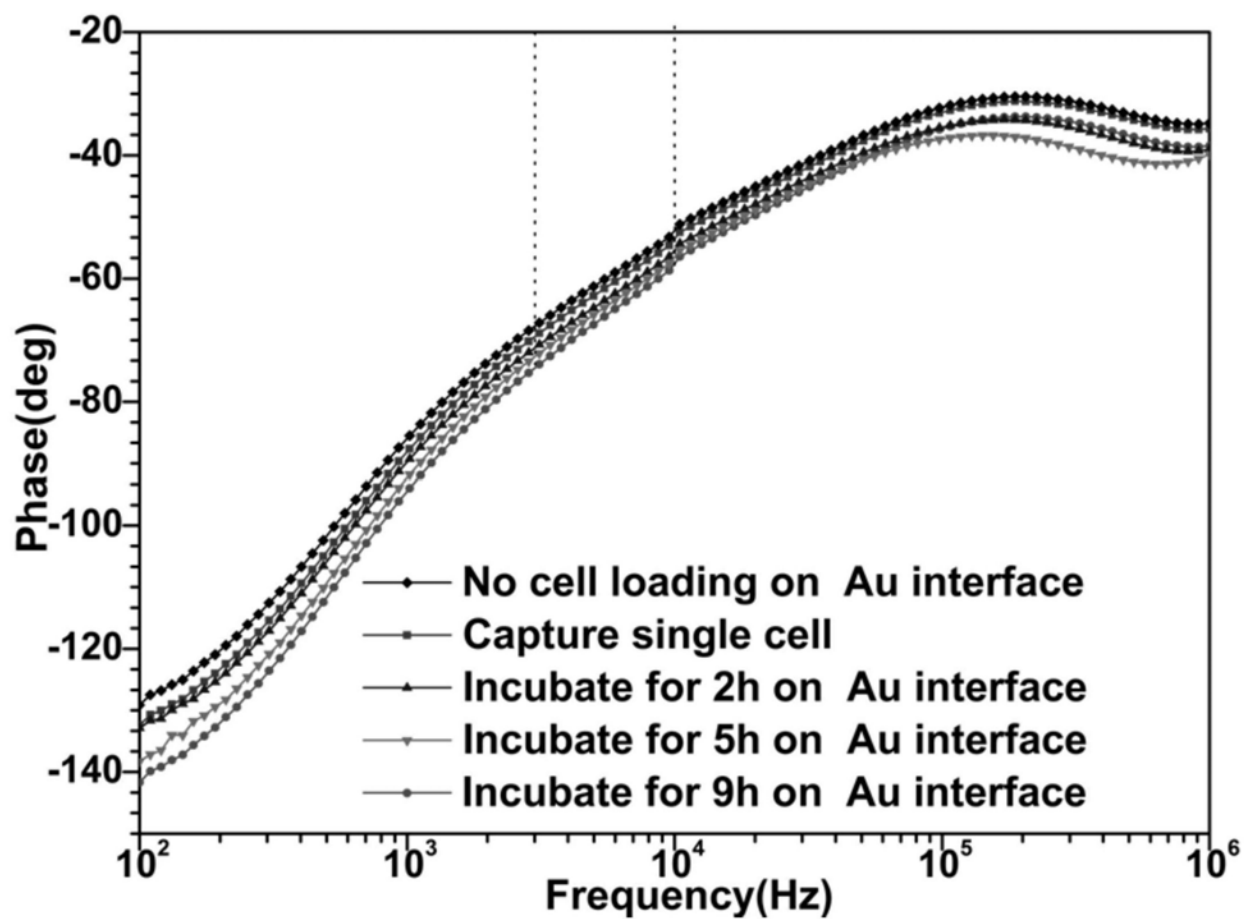


图12b

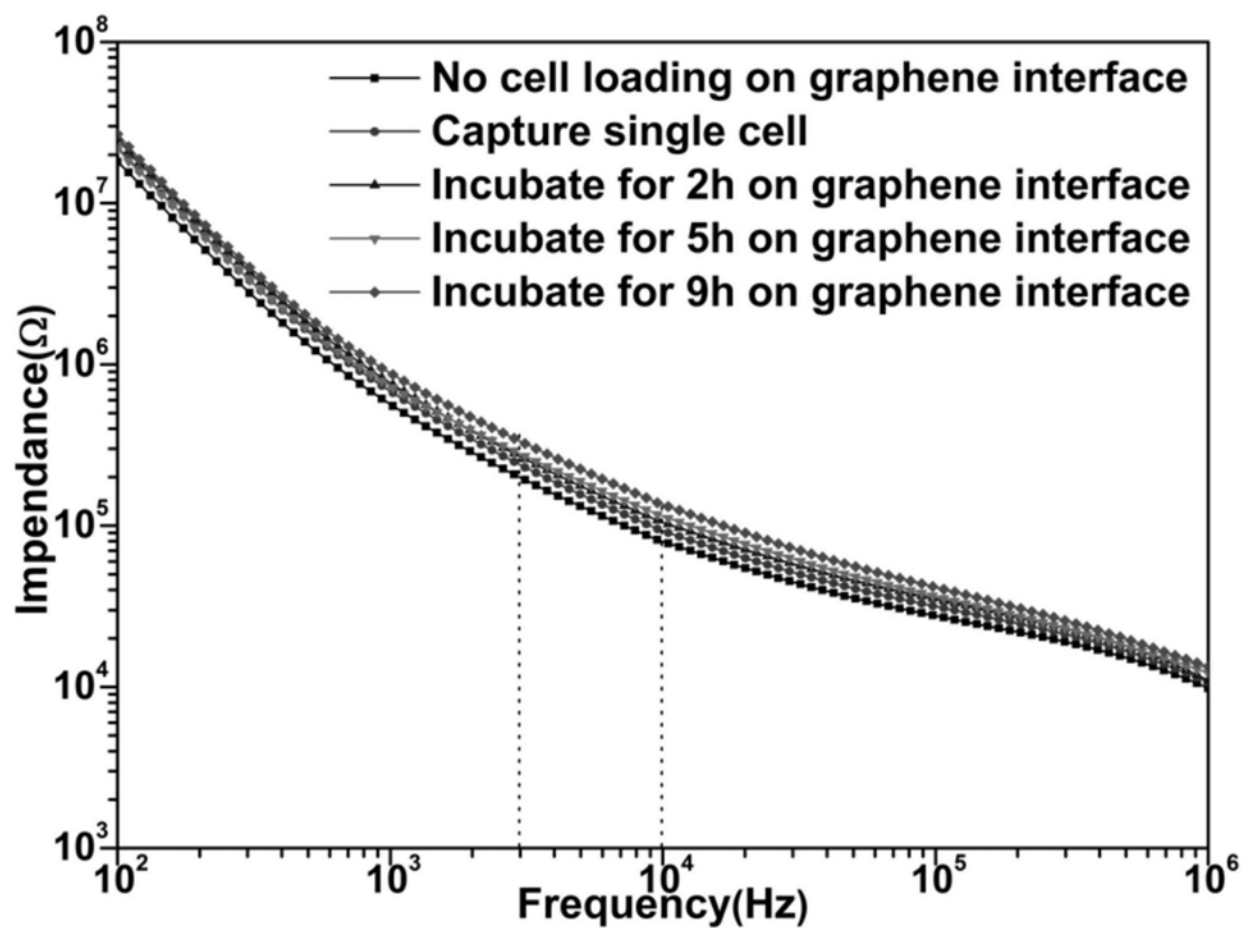


图12c

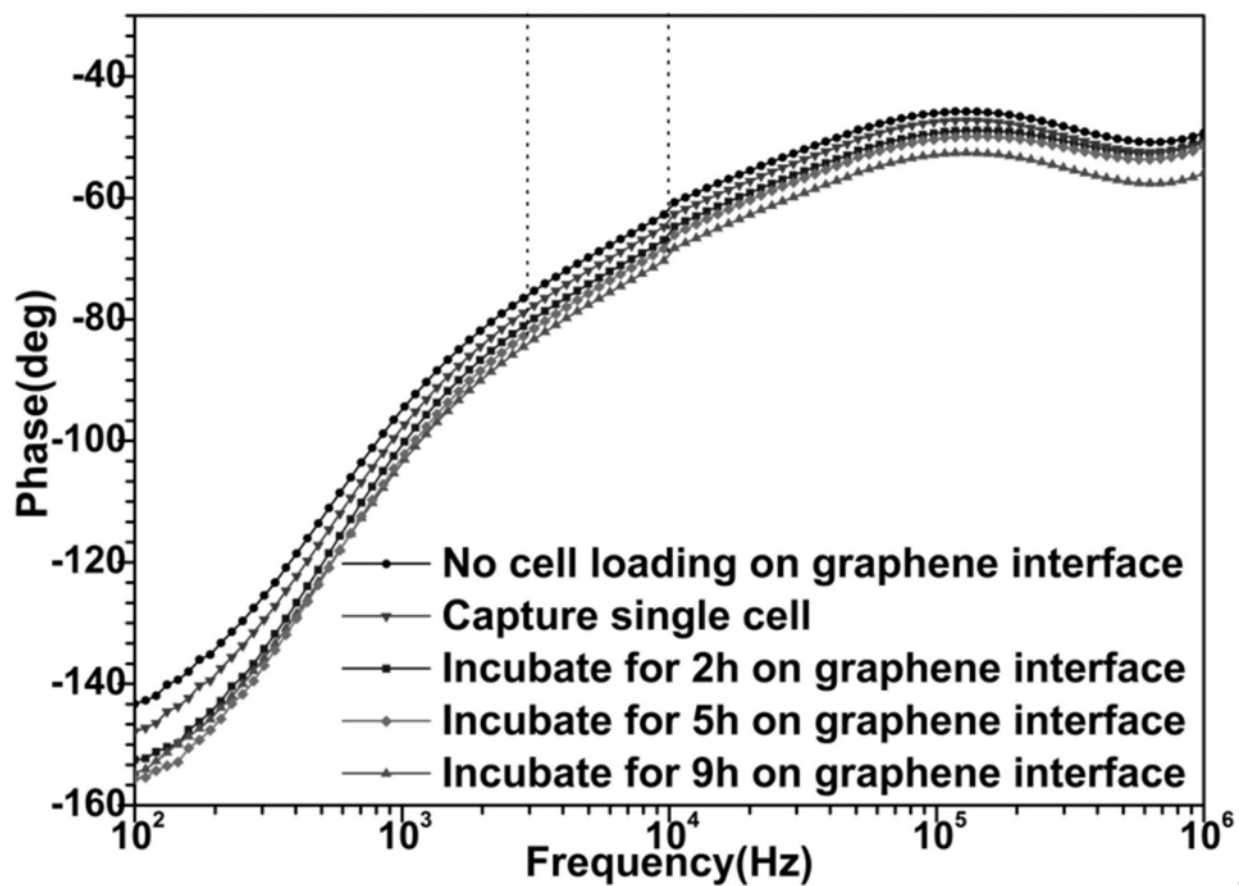


图12d

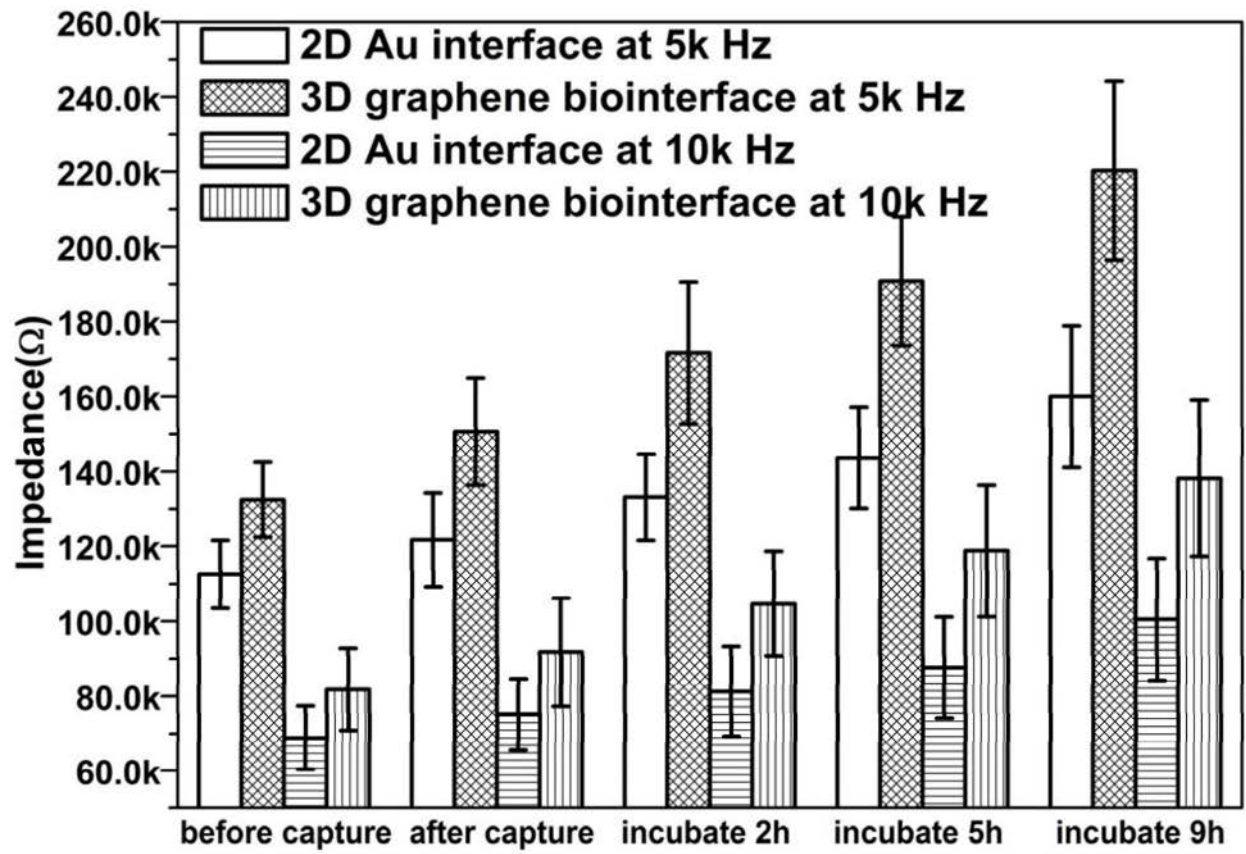


图13

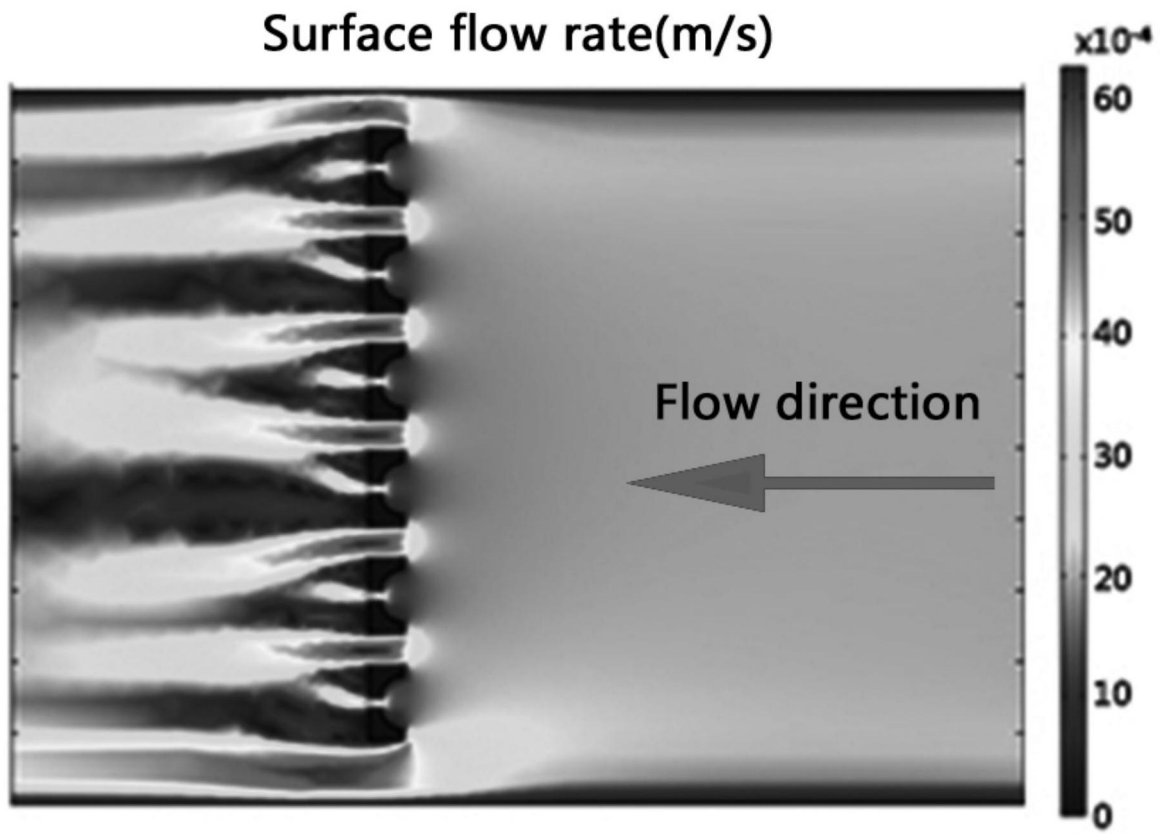


图14

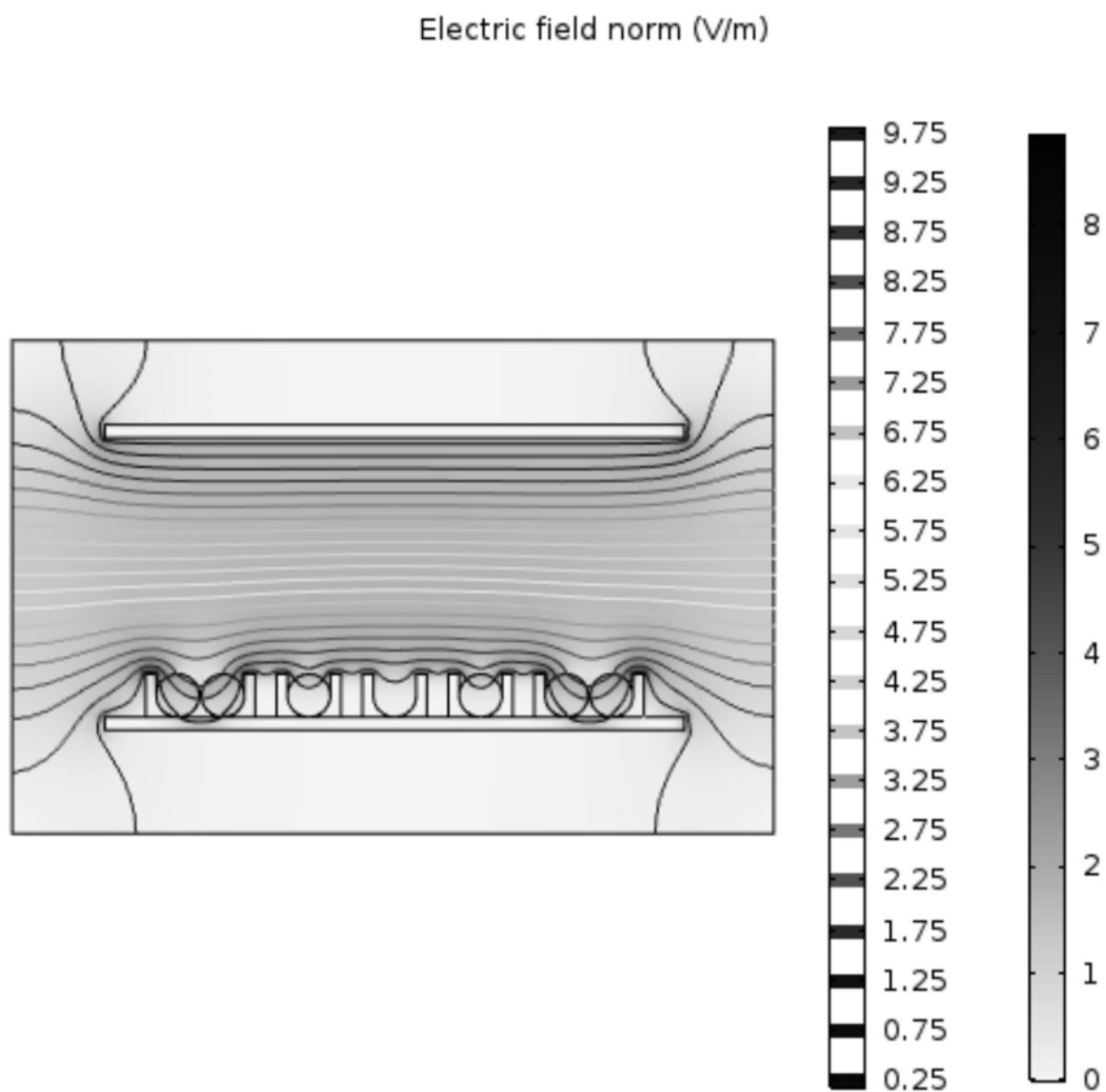


图15