

基于惯性微流原理的微流控芯片用于血浆分离

黄炜东^{①②}, 张何^{②③}, 徐涛^②, 李卓荣^②, 周雷激^{①*}, 杨梦甦^{②*}

① 厦门大学化学化工学院化学系, 厦门 361005;

② 香港城市大学深圳研究院, 深圳 518057;

③ 湖南工程学院, 湘潭 411104

* 联系人, E-mail: ljzhou@xmu.edu.cn; bhmyang@cityu.edu.hk

2010-12-18 收稿, 2011-03-08 接受

国家自然科学基金(20775065, 20835005)、教育部高校博士点基金(20070384023)、深圳市药用生物芯片重点实验室和深圳市双百计划资助项目

摘要 血浆是临床生化检验中一类广泛使用的样品, 从全血中分离血浆是生命医学研究领域一项非常重要的技术. 惯性微流(inertial microfluidics)原理的主要特点是无需施加任何外力如电磁力等, 仅依靠液体流动就可以在微通道内实现一定尺寸的微粒或细胞的聚焦流动. 本研究基于惯性微流原理, 设计并制备了具有不对称弯管结构通道的微流控芯片. 采用制备的荧光微球作为模型样品考察了装置的性能, 发现尺寸越大的微球保持惯性聚集流动的流速范围也越大. 在此基础上, 利用发展的芯片平台成功实现从稀释的血液样品中将血浆分离. 使用芯片对样品进行两次分离, 即二级分离后, 血液中血红细胞的分离效率超过 90%. 该装置具有结构简单、体积小、操作方便等特点, 不仅可以快速分离血浆, 而且对血细胞基本无损, 易于作为功能模块与现有的一些芯片实验室(lab on a chip, LOC)系统集成结合.

关键词

惯性微流
微流控芯片
血浆
分离

在现代临床生化检验中, 样品制备对于复杂生物样品的检测至关重要. 因为血细胞或者血红素会干扰一些光学检测方法的分析^[1], 因此在许多血液标志物的分析中, 通常都需要先将血浆从血液样品中分离出来, 然后用于检测分析. 离心法和膜过滤法是目前最普遍使用的血浆分离方法, 但是这两种方法仍然存在一些不足. 离心法的操作是间歇分批式的, 设备体积庞大, 费用昂贵, 操作技术繁杂. 膜过滤法最大的缺点就是膜孔易被血细胞堵塞, 导致分离效率降低、样品损失和污染等. 此外, 这两种血浆分离方法不能与其他的分析检测装置集成或结合, 无法应用于构建更为复杂的微全分析系统, 已经无法满足日新月异的血液检测的要求.

近年来, 许多文献报道了使用微流控芯片分离血浆的研究工作. 最为普遍的方法就是在微通道中设计一些特殊的结构使血细胞无法通过, 达到过滤

血细胞、分离血浆的目的, 包括死端过滤(dead end filtration)^[2,3]和错流过滤(cross-flow filtration)^[3-6]. 死端过滤普遍存在孔隙易堵塞, 分离效率低的问题, 如 Moorthy 等人^[2]在微通道中通过乳液光聚合(emulsion photo-polymerization)原位组装多孔膜并用于过滤血细胞, 横截面尺寸为 1000 μm \times 150 μm 的多孔膜仅能过滤约 20 μL 稀释血液. 而错流过滤虽然可以极大降低孔隙堵塞的可能性, 但是样品分离时流量小, 速度慢, 而且血浆产率, 即分离的血浆体积与分离前血液样品的体积比低, 如 VanDelinder 等人^[5]设计制作的装置, 在大约 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流量条件下, 血浆的产率大约为 10%左右, 即每分钟约分离出 0.1 μL 的血浆. 另一种分离血浆的方法是血浆撇取(plasma skimming)或称作 Fahraeus 效应^[7,8], 即在一定流速条件下, 血细胞会聚集在通道中间流动, 同时在通道壁附近产生低血细胞含量的血浆层, 设计合适的侧通道便可

收集到血浆. 但是该方法分离血浆的产率较低, 如 Jaggi 等人^[7]设计制作的装置, 血浆产率仅为 2.5%. Faivre 等人^[8]在通道中加入一段宽度远小于主通道的收缩通道, 显著提高了血浆层的宽度, 从而提高血浆的产率, 达到 24%, 但是分离速度却大大降低, 样品流量仅有 200 $\mu\text{L}/\text{h}$, 从而直接导致血浆产量降低. Zweifach-Fung 效应也被用于血浆的分离, 其基本原理是在血液循环中, 当血细胞流经一个毛细血管的分支区域时, 它们会倾向流入流速更高的分支血管中, 而只有很少的血细胞会流入流速较低的分支血管中. 因此设计合适的分支通道结构, 使其产生足够的流速差, 就可以使血细胞集中流入其中一个分支通道, 从而在另一个分支通道得到较为纯净的血浆. Yang 等人^[9,10]根据此原理设计制作的装置分离血浆的产率虽然达到了约 25%, 但是分离速度却很低(10 $\mu\text{L}/\text{h}$), 满足不了快速、高通量地分离血浆的需要. Kersaudy-Kerhoas 等人^[11]设计制作的装置则将 Fahraeus 效应和 Zweifach-Fung 效应结合应用, 使得分离血浆的速度和产率都显著提高, 但是血浆的纯度却明显降低, 分离的人血浆纯度仅有 53%. Rodriguez-Villarreal 等人^[12]不仅应用了 Fahraeus 效应和 Zweifach-Fung 效应, 还进一步结合了挤压流分级效应(pinch flow fractionation effect), 设计制作的装置在一定流速和温度范围内实现了血浆的分离, 但是分离血浆的产率仅有 3.47%, 远远不能满足实际应用的需要. 此外, 一些借助外力的微流控芯片方法也有报道, 比如离心^[13]、介电泳^[14]、超声驻波^[15]等都被用于血浆的分离, 但是这些方法势必会增加分离装置的复杂程度和制作成本, 而且使得分离操作更加复杂, 不利于方法的推广和使用.

惯性微流(inertial microfluidics)^[16-25]原理是近年来出现的一个研究热点, 其主要特点是无需施加任何外力如电磁力, 就可以在微通道内实现一定尺寸微粒的聚焦流动. 目前已经有报道在直线形通道^[20-22]、不对称弯管通道^[16-18]和螺旋形弯管通道^[23-25]中分别实现了微球或者细胞的惯性聚焦流动, 但是针对血浆分离, 研究血浆产率和血浆纯度, 这方面的报道还未见到. 惯性微流原理在已有的研究中已经展现出了它的很多优势. 首先, 该方法的装置结构简单, 无需机械或电子部件, 易于作为功能模块与现有的一些芯片实验室系统集成结合. 其次, 该方法采用高流速实现微粒聚焦流动, 大大提高了处理样

品的通量, 甚至可以与宏观尺度的装置相媲美. 此外, 惯性微流原理对于刚性粒子(如聚合物微球)和可变形粒子(如细胞)都适用. 已有的研究表明, 在惯性聚焦流速下, 细胞活力未受到损害^[17,24], 这一优点使其有望在生物分析和临床医学等领域得到广泛应用.

对于血浆分离方法, 很重要的两点要求是: (1) 快速、高通量地分离血浆; (2) 避免分离过程中出现溶血现象. 惯性微流原理正好在这些方面都具有其明显的优势. 本研究基于惯性微流原理, 设计和制备了具有不对称弯管结构通道的微流控芯片, 成功将其应用于血浆的分离, 得到高纯度、高产率的血浆, 并且对血细胞基本无损伤. 该方法处理样品血浆分离效率高、流速大, 提高了血浆产量. 此外, 由于所采用的流速远远高于其他方法, 为血液样品进行前处理, 实现血浆的快速分离, 以及实现血液样品快速检测提供了可能.

1 原理

当流体在直线形通道中呈层流流动时, 靠近通道壁的流体会受到通道壁的摩擦力作用, 阻碍其运动, 使得靠近通道壁的流体速度最低. 由于靠近通道壁的流体与其他层间流体存在速度的差异, 使得靠近通道壁的流体与邻近层的流体产生内摩擦力, 降低邻近层流体速度. 这种效应进一步在离通道壁较远的流体层中传递. 最终, 使得流速呈现一种抛物线状的分布: 通道中间的流体速度最大, 然后随着流体层靠近通道壁速度以一定比例降低, 离通道壁最近的流体速度最小, 如图 1 所示. 伴随这种抛物线状的流速分布产生了一种剪切力梯度, 这种剪切力梯度诱导产生的升力(shear-induced lift force)会将悬浮在流体中的颗粒推向通道壁. 当颗粒移到距离通道壁足够近的位置, 通道壁诱导产生的升力(wall-induced lift force)又会将颗粒推离通道壁. 这两种方向相反的升力的合力被称为惯性升力(inertial lift force or net lift force, F_L). 惯性升力作用在颗粒上, 会使颗粒在通道横截面中产生相对移动. 当颗粒移动到横截面中平衡位置, 即颗粒在横截面这一位置时, 受到的惯性升力为零, 颗粒就会稳定在横截面这一位置. 从而颗粒聚焦在横截面中稳定点, 形成聚焦流动, 流向下游. 颗粒在直线形通道横截面中受力平衡位置的数量与通道横截面的形状有关^[20-22].

当流体在弯形通道中流动时, 情况比直线形通

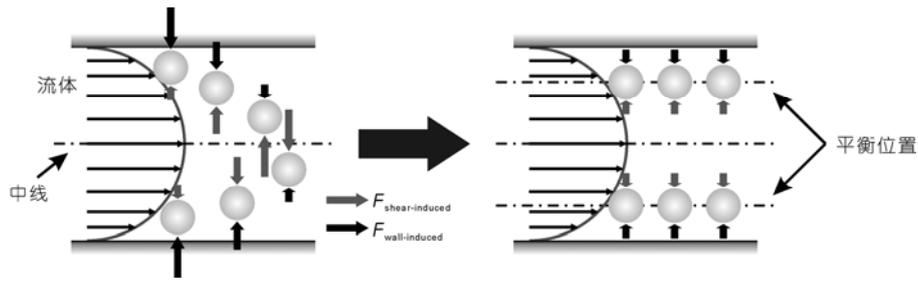


图1 直线形通道中颗粒惯性聚焦流动示意图

在直线形通道中, 颗粒在剪切力和通道壁分别诱导产生的两种升力的共同作用下产生惯性聚焦流动. 流动方向为从左向右

道中的更复杂. 呈抛物线流动的流体, 在通道中间速度最大. 在经过通道转弯处时, 通道中间流体受到的离心力最大, 从而流向通道外侧边缘. 靠近通道壁的流体流速最小, 所受离心力也最小, 从而受到中间流体的挤压. 为了保持流体中各处质量守恒, 在垂直于流体流动的方向上, 形成一对反向旋转且对称的涡流, 分别位于通道横截面的上部和下部, 由此产生一种被称作迪恩涡流(Dean vortices)的二次流, 如图 2(a)所示. 迪恩涡流会对流体中的颗粒产生曳力作用, 被称为迪恩曳力(Dean drag force, F_D). 因此在弯形通道中, 流动的颗粒会同时受到惯性升力 F_L 和迪恩曳力 F_D 的作用, 这两种力的相对大小决定颗粒在弯形通道中流动的流动情况^[16-19]. 惯性升力 F_L 的大小表达式^[16,17]如下:

$$F_L = \frac{\mu^2}{\rho} R_p^2 f_c(R_c, x_c) = \frac{\rho U_m^2 a^4}{D_h^2} f_c(R_c, x_c), \quad (1)$$

式中, R_c 和 R_p 分别为通道雷诺数和颗粒雷诺数 ($R_p = R_c a^2 / D_h^2 = \rho U_m a^2 / \mu D_h$); ρ 为流体的密度; μ 为流体的黏度; U_m 为通道中的最大流速; a 为颗粒的直

径; D_h 为通道的水力直径 ($D_h = 2wh / (w + h)$), w 和 h 分别为通道的宽度和高度); $f_c(R_c, x_c)$ 为升力系数, 其大小与通道雷诺数 R_c 和颗粒在通道横截面上的位置 x_c 有关. 迪恩曳力 F_D 的尺度^[16,17]为

$$F_D \sim \rho U_m^2 a D_h^2 / r, \quad (2)$$

式中 r 为弯管的曲率半径. 惯性升力 F_L 和迪恩曳力的 F_D 比值定义为 R_f , R_f 的尺度^[16,17]为

$$R_f = \frac{F_L}{F_D} \sim \frac{1}{\delta} \left(\frac{a}{D_h} \right)^3 f_c(R_c, x_c), \quad (3)$$

式中, δ 为曲率比 ($\delta = D_h / 2r$). 当 $R_f \geq 1$ 时, 惯性升力占据优势, 会将颗粒推向平衡位置; 当 $R_f < 1$ 时, 迪恩曳力大于惯性升力, 将使颗粒流动变得混乱无序.

基于上述原理, 本研究设计的微流控芯片采用不对称弯管结构的通道, 使微球或细胞在合适的流速条件下只在通道横截面的一侧产生受力平衡, 实现单束聚焦流动, 如图 2(b)所示.

2 材料和方法

(i) 仪器与试剂. Zeiss Axio observer Z1 型倒置

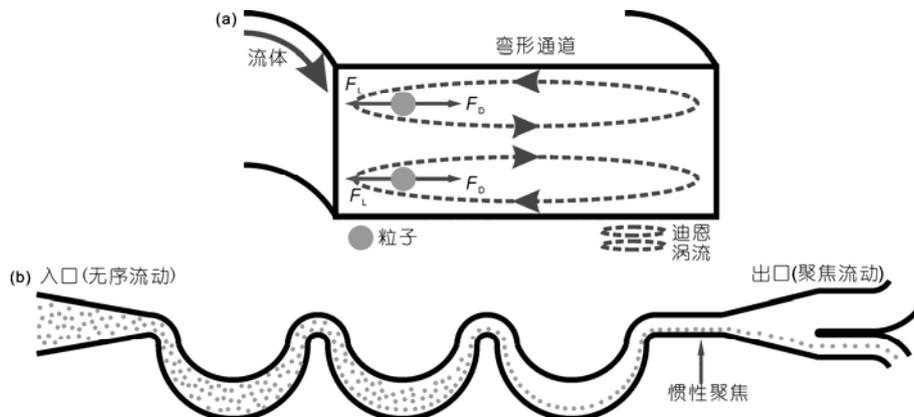


图2 弯形通道横截面上颗粒受力情况示意图(a)和不对称弯管结构通道中颗粒惯性聚焦流动示意图(b)

在弯形通道中, 颗粒受到惯性升力和迪恩曳力的共同作用, 在通道横截面的某处平衡稳定, 形成惯性聚焦流动

荧光显微镜(蔡司光学仪器(上海)国际贸易有限公司); LSP04-1A 型注射泵(保定兰格恒流泵有限公司); KVB-30 型紫外曝光机(台湾金电子股份有限公司); PDC-M 型等离子清洗器(成都铭恒科技发展有限公司); Multisizer3 库尔特颗粒计数仪(美国贝克曼库尔特有限公司); U-2800 型紫外可见分光光度计(日本日立公司).

感光电路板(规格: 10 cm×15 cm×0.16 cm, 深圳市金主向科技有限责任公司); Sylgard 184 型聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)预聚体及固化剂(Dow Corning Corp., USA); 聚苯乙烯微球(深圳市纳微科技有限公司), 直径分别为 5 和 10 μm, 采用溶胀包裹荧光染料的方法制备成荧光微球后使用; 人全血, 从一位健康的志愿者身上采集, 加入少量抗凝血剂后保存于 4℃ 冰箱中, 使用前轻微摇晃后进行稀释.

(ii) 芯片设计. 根据惯性聚焦原理, 采用适当的大小弯管宽度、曲率半径等参数^[16], 可以设计出不对称弯管结构通道, 满足通道的不对称性, 实现颗粒的单束惯性聚焦流动. 设计重复单元数量、分支出口宽度等参数以提高血浆分离效率和分离产率. 芯片结构主要由一个入口、分离区域和收集区域组成(如图 3 所示). 分离区域由两种不同尺寸的弯管组成, 一种是宽度为 280 μm 的小弯管, 平均曲率半径为 300 μm; 另一种是宽度为 550 μm 的大弯管, 平均曲率半径为 980 μm. 整个分离区域由小弯管和大弯管交替组成, 一个大弯管和一个小弯管组成一个单元, 整个芯片共有 18 个这样的单元. 在收集区域通道宽度逐渐增加到 970 μm 左右. 收集区域有两个样品收集出口, 出口 1 的通道宽度为 330 μm, 出口 2 的通道

宽度为 560 μm. 整个芯片通道高度约为 30 μm.

(iii) 芯片制作. 芯片采用以感光电路板(PCB)为模板的光刻蚀技术制备^[26]. 首先绘制芯片掩膜版图, 并使用高分辨率的激光打印机打印在透明胶片上制得光掩膜. 将光掩膜覆盖在 PCB 板并置于紫外曝光机中曝光 110 s, 然后将 PCB 板放入 100 mL 显像液(显像剂:水=1:20)中显像 6 min, 再用水冲洗掉溶解的光刻胶和残余的显像液. 将显像完毕的 PCB 板放入 200 mL 刻蚀液($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:水=1:2, 质量体积比)静置刻蚀 45 min, 刻蚀深度约为 30 μm. 刻蚀完毕用自来水彻底冲洗 PCB 板, 并用丙酮洗掉残余的光刻胶. 将 PDMS 预聚体与固化剂按一定比例(12:1, 质量分数)均匀混合, 真空除气后倒在 PCB 模板表面, 65℃ 条件下固化 3 h.

将固化完成的 PDMS 片从模板上剥离, 在预先设计的储液池位置打孔. 然后将 PDMS 片和洗净的载玻片置于等离子清洗器中, 用氧等离子体对二者表面进行处理(功率 50 W, 时间 3 min, 空气流量 1200 mL/min), 处理后将二者迅速加压贴合, 得到不可逆封接的芯片. 贴合后的芯片再放入 75℃ 烘箱中后烘 6 h 以增强 PDMS 与载玻片的键合. 最后在芯片表面安装进样接口和出样收集装置, 得到实验用的微流控装置.

(iv) 实验方法. 芯片在使用前先通入牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶液(0.5%, 质量体积比)封闭 3 h, 再通入样品载液冲洗通道. 进样前将芯片置于显微镜下观察, 确保通道内没有气泡或杂质. 样品导入一支普通 5 mL 医用注射器内, 注射器针头通过聚乙烯导管与芯片的进样接口连接, 使用

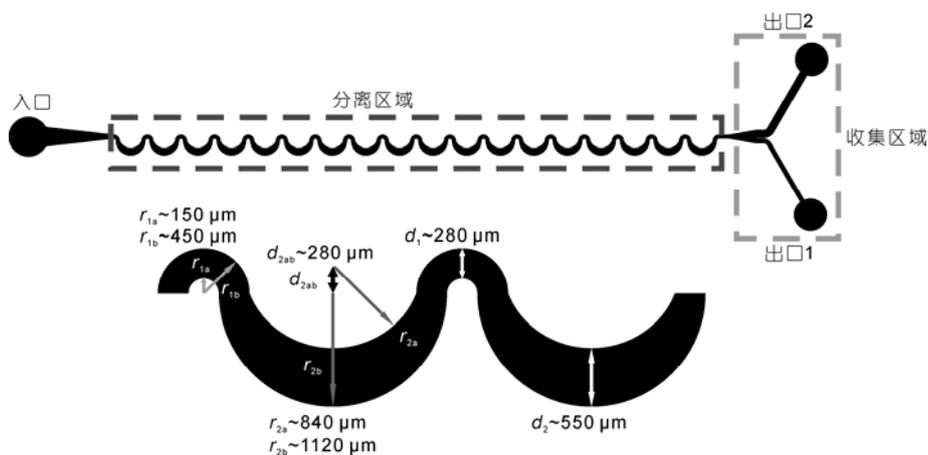


图 3 微流控芯片结构示意图

注射泵按照设定的流量条件将样品注入芯片通道内。

(1) 荧光微球实验. 将自制的荧光微球用 4% NaCl 溶液(防止微球在进样过程中沉降过快, 另含有 0.1% Tween-20 表面活性剂以防止微球团聚)稀释配制成 0.1%(质量体积比)的荧光微球样品. 按照设定的流量将荧光微球样品通入芯片通道中, 通过倒置荧光显微镜观测和记录微球的流动情况。

(2) 血液样品实验. 将人全血用生理盐水(0.9% NaCl 溶液)稀释配制成 1%(体积分数)的血液样品. 将初始血液样品以 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流量条件通入芯片通道中, 从出口收集分离后的产物. 使用第二块芯片重复分离实验, 样品是第一块芯片的出口 2 收集到的产物, 流量同样是 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. 增加第二块芯片实验的目的是模拟这种结构串联使用的分离效果. 收集产物后, 测定各个出口产物的体积. 初始血液样品和两次分离后得到的产物中红细胞的含量使用库尔特颗粒计数仪进行测定. 为满足库尔特颗粒计数仪测定的浓度要求, 初始血液样品和产物都用生理盐水再稀释 150 倍. 分离效率 E 和产率 Y 分别定义如下:

$$E = \left(1 - \frac{N_s}{N_i}\right) \times 100\% = \left(1 - \frac{C_s V_s}{C_i V_i}\right) \times 100\%, \quad (4)$$

$$Y = \frac{V_s}{V_i} \times 100\%. \quad (5)$$

式中, N_s, N_i 分别为产物和初始样品中红细胞的数目, C_s, C_i 分别为产物和初始样品中红细胞的浓度, V_s, V_i 分别为产物和初始样品的体积。

分离过程导致的溶血情况通过测定样品中游离

血红蛋白的吸光度来评估. 首先将上述配制的初始血液样品用去离子水稀释 5 倍, 使红细胞由于低渗透压完全破裂溶解, 释放出血红蛋白, 得到阳性对照样品. 另外将初始血液样品离心(1500 r/min, 5 min)后吸取上层清液, 得到空白对照样品. 将分离后的从不同出口收集到的产物再混合, 同样离心后吸取上层清液, 得到产物样品. 为与阳性对照样品进行比较, 空白对照样品和产物样品也都用去离子水稀释 5 倍. 使用紫外可见分光光度计测定 3 种样品在 414 nm 波长条件下的吸光度^[22].

3 结果与讨论

3.1 流速对不同尺寸微球流动情况的影响

先采用自制荧光微球作为模型样品, 摸索装置的操作条件. 图 4 分别是 5 和 10 μm 微球在不同流速条件下流动的荧光图像. 在低流速条件下, 微球的流动未出现惯性聚焦情况. 随着流速提高, 在靠近小弯的内侧壁(即大弯的外侧壁)的位置开始逐渐出现一条微球聚焦形成的条带. 当流速进一步提高后, 5 μm 微球聚焦条带逐渐变宽、变散, 惯性聚焦现象消失, 而 10 μm 微球依然保持惯性聚焦的现象, 而且聚焦程度进一步提高。

从上面所述的惯性微流原理中可知, 颗粒在弯形通道中的流动状态由惯性升力 F_L 和迪恩曳力 F_D 的相对大小决定. 在两种力的比值关系式(3)中, 因为升力系数 $f_c(R_c, x_c) \sim R_c^n, (n < 0)$, 所以式(3)可以改写

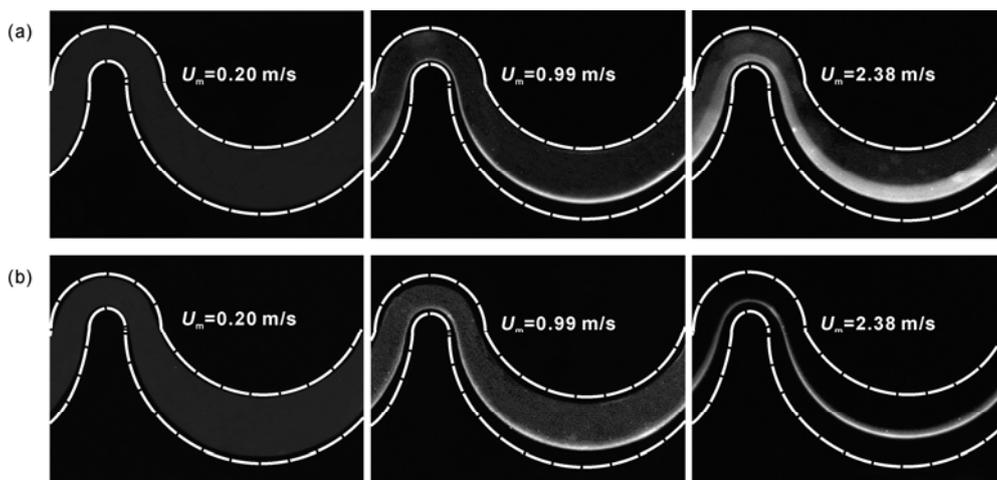


图 4 5 μm (a)和 10 μm (b)微球在不同流速条件下的流动现象图

为 $R_f \sim \frac{1}{\delta} \left(\frac{a}{D_h} \right)^3 \left(\frac{\rho U_m D_h}{\mu} \right)^n$, ($n < 0$)^[16]. 从上式可以

看出流速是影响颗粒流动状态的重要因素. 从式(1)和式(2)可以看出惯性升力和迪恩曳力的大小都与流速成正比, 在低流速条件下, 虽然 $R_f \geq 1$, 但是这两种力都很小, 因此不足以使微球在有限的通道长度内移动到平衡位置, 没有惯性聚焦现象出现. 随着流速提高, 惯性升力和迪恩曳力逐渐增大. 在 R_f 值仍然大于或等于 1 时, 惯性升力占据优势, 而迪恩曳力可以加速微球的横向移动, 使微球可以迅速移动到平衡位置, 因此形成惯性聚焦流动. 当流速过高时 $R_f < 1$, 迪恩曳力的大小超过惯性升力, 使得微球的受力平衡被破坏, 微球不会出现聚焦流动. 但是在同样的高流速条件下, 10 μm 微球的惯性聚焦现象却没有像 5 μm 微球那样消失, 原因在于惯性升力和迪恩曳力的比值 R_f 与颗粒直径的三次方成正比关系, 因此对于较大粒径的微球若要 $R_f < 1$, 则必须有更高的流速条件才能实现. 在本研究设计制备的装置所能承受的流速范围内, 未观察到 10 μm 微球惯性聚焦流动消失的现象.

3.2 血浆分离

本研究设计制作的基于惯性微流原理的微流控芯片用来分离血液中的血细胞从而得到血浆, 即使得血细胞聚焦流动后, 通过适当设计的出口将惯性聚焦富集的血细胞收集, 同时在另一个出口得到低血细胞含量的血浆. 如图3所示, 芯片具有两个出口, 其中出口1主要收集惯性聚焦流动的血细胞, 而出口2收集到的就是低血细胞含量的血浆.

血液主要由血细胞和血浆两部分组成, 其中红细胞的数量占到血细胞总量的 90% 以上. 红细胞是呈双凹圆盘状的细胞, 其直径为 6~8 μm , 厚度为 2 μm 左右^[1]. 基于上述装置操作条件得出的结果, 采用 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ ($U_m = 0.79 \text{ m/s}$) 的流量条件用于分离血浆的实验. 分离血浆实验使用了两块芯片进行级联分离, 模拟这种结构串联使用的分离效果, 第一块芯片进行一级分离得到的产物分别命名为 S1 和 S2, 分别对应出口1和出口2收集的产物. 第二块芯片进行二级分离得到的产物则分别命名为 S2-1 和 S2-2, 分别对应出口1和出口2.

从图5(a)可以看出, 初始样品(Initial)、产物 S2 和 S2-2 的颜色逐级变淡, 说明其中的红细胞含量逐渐

减少. 从三者的显微镜明场照片中也可以看出, 细胞含量逐级递减. 库尔特颗粒计数仪的测定结果表明, 经过二级分离后, 产物 S2-2 中的红细胞含量大约只有初始样品中的 1/10. 图5(b)是两级分离效率图, 经过二级分离后, 可以将超过 90% 的红细胞移除. 上述结果表明, 可以通过将这种结构多级串联使用的方式不断降低分离产物中血细胞的含量, 提高分离产物的纯度. 尽管如此, 分离产率也是应当考虑的问题. 图5(c)是两级分离产率图, 每次分离从出口2收集的产物体积大约只有通入样品体积的 70%, 两级分离后得到的最终产物体积大约只有初始样品体积的 50%. 采用结构串联使用提高分离产物纯度的同时, 势必会导致分离产物体积的减少, 因此, 在应用时要根据实际情况决定结构串联的级数. 近年来发展用于血液检测的芯片实验室已经成为血液分析领域的一项研究热点^[1], 传统的离心分离血浆的方法显然无法胜任这项任务. 本研究采用的基于惯性微流原理的芯片结构则容易与现有的一些芯片实验室系统集成结合, 可以为搭建芯片实验室提供样品处理装置. 现在虽然也有一些分离血浆的微流控芯片装置^[2-12]的报道, 但是这些装置的分离速度或者血浆产率较低, 还无法充分满足搭建血液芯片实验室的需要. 本研究采用的装置分离血浆的速度达到了近 1 m/s , 大大缩短了分离时间, 而且二级分离后血浆的产率将近 50%, 这两点都明显优于其他分离血浆的微流控芯片装置.

因为严重的溶血会影响产物用于后续的血液标志物, 如血糖、血脂等的光学方法检测, 所以溶血也是常规血浆分析检测过程中需要关注的问题. 采用惯性聚焦原理进行血浆分离时, 为了使得血细胞惯性聚焦, 在分离过程中采用了较高流速 ($U_m = 0.79 \text{ m/s}$). 而高流速可能会导致红细胞发生溶血, 所以这里对惯性聚焦引起红细胞溶血情况进行评估. 红细胞的溶血情况可以通过测定血红素的含量进行表征, 如果红细胞溶血破裂, 细胞内的血红素就会逸散到溶液中. 血红素在 414 nm 波长条件下具有最大吸光度, 通过测定样品在 414 nm 条件下的吸光度可以表征样品中血红素的含量. 产物离心后得到的上层清液在 414 nm 波长条件下的吸光度越大, 表明其中游离血红素的含量越高, 分离过程导致的红细胞溶血情况也越严重. 图6是阳性对照、空白对照和产物3种样品在 414 nm 条件下的吸光度比较. 从图上可以看出,

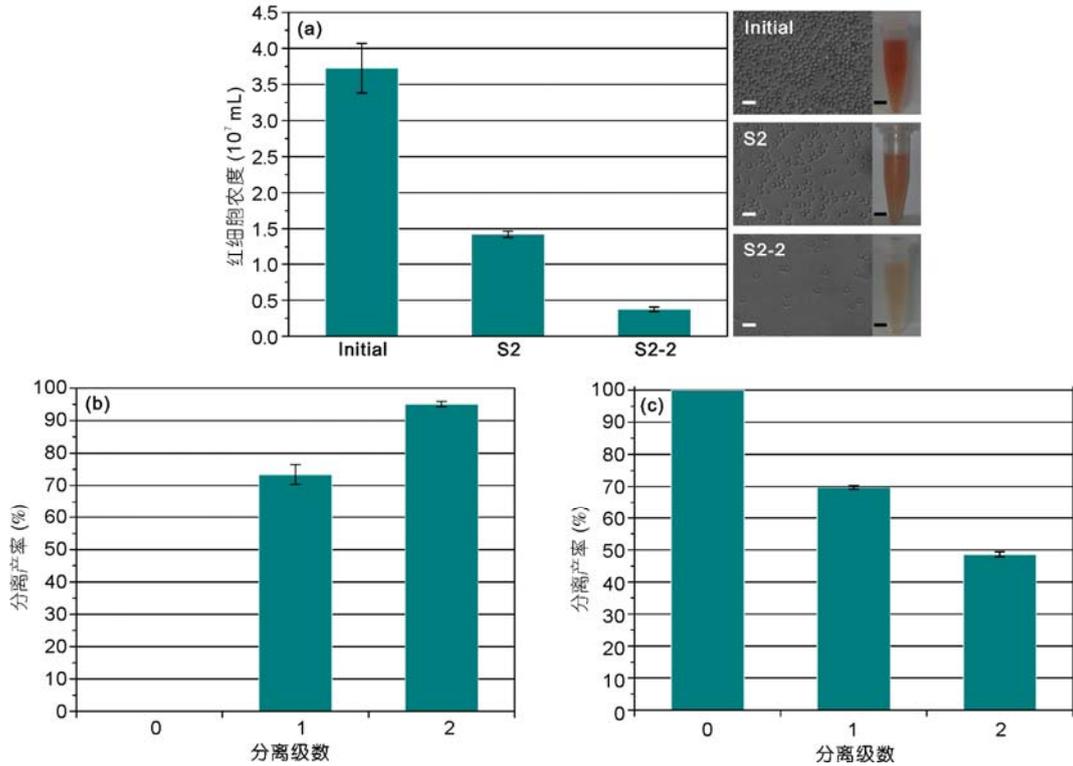


图 5 初始样品和两级分离产物中红细胞含量的比较(a)、两级分离效率图(b)和两级分离产率图(c)
白色比例尺为 20 μm , 黑色比例尺为 0.5 cm

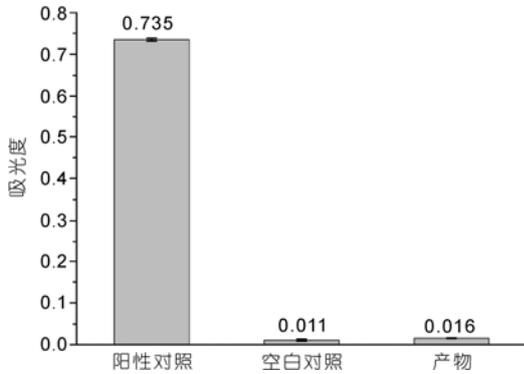


图 6 阳性对照、空白对照和产物 3 种样品在 414 nm 波长条件下的吸光度比较

分离过程导致的红细胞溶血情况很轻微。由于吸光度与血红素的浓度成线性关系，通过计算可知，只有不到 1% 的红细胞在分离后发生了溶血，可见本研究采用的分离装置对于分离产物的影响很小。

4 结论

本研究报道了一种基于惯性微流原理的微流控

芯片，具有结构简单、体积小、操作方便、价格低廉等特点。首先采用 5 和 10 μm 的自制荧光微球作为模型样品考察了装置的性能，优化实验条件，成功地在一定流速范围内实现了这两种尺寸微球的惯性聚焦流动。根据微球模型实验的结果将该装置应用于稀释血液样品中的血浆分离，在 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流量条件下成功将血细胞进行惯性聚焦，从而将血细胞分离，得到血浆，二级串联血细胞的分离效率达到 90% 以上，分离产率接近 50%，而溶血率不到 1%。结果表明，该方法的样品用量少，分离时间短，分离产率高，尤其适合法医的现场微量血迹分析等工作的样品制备。此外该方法对于血液中血细胞的影响小，溶血率低，对于血糖、血脂等血液标志物的光学方法检测尤为有利。该装置还可以很容易作为功能模块与现有的一些芯片实验室系统集成结合，直接将分离得到的血浆样品用于即时分析，尤其适合应用于临床现场实时检测(point-of-care testing)。作为一种新的研究方向，惯性微流原理固有的诸多优势和特点必将使其在生物分析和临床诊断等领域中具有广阔的应用前景。

参考文献

- 1 Toner M, Irimia D. Blood on a chip. *Annu Rev Biomed Eng*, 2005, 7: 77–103
- 2 Moorthy J, Beebe D J. *In situ* fabricated porous filters for microsystems. *Lab Chip*, 2003, 3: 62–66
- 3 Ji H M, Samper V, Chen Y, et al. Silicon-based microfilters for whole blood cell separation. *Biomed Microdevices*, 2008, 10: 251–257
- 4 Crowley T A, Pizziconi V. Isolation of plasma from whole blood using planar microfilters for lab-on-a-chip applications. *Lab Chip*, 2005, 5: 922–929
- 5 VanDelinder V, Groisman A. Separation of plasma from whole human blood in a continuous cross-flow in a molded microfluidic device. *Anal Chem*, 2006, 78: 3765–3771
- 6 Tachi T, Kaji N, Tokeshi M, et al. Simultaneous separation, metering, and dilution of plasma from human whole blood in a microfluidic system. *Anal Chem*, 2009, 81: 3194–3198
- 7 Jaggi R D, Sandoz R, Effenhauser C S. Microfluidic depletion of red blood cells from whole blood in high-aspect-ratio microchannels. *Microfluid Nanofluid*, 2007, 3: 47–53
- 8 Faivre M, Abkarian M, Bickraj K, et al. Geometrical focusing of cells in a microfluidic device: An approach to separate blood plasma. *Biorheology*, 2006, 43: 147–159
- 9 Yang S, Undar A, Zahn J D. Blood plasma separation in microfluidic channels using flow rate control. *ASAIO J*, 2005, 51: 585–590
- 10 Yang S, Undar A, Zahn J D. A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation. *Lab Chip*, 2006, 6: 871–880
- 11 Kersaudy-Kerhoas M, Dhariwal R, Desmulliez M P Y, et al. Hydrodynamic blood plasma separation in microfluidic channels. *Microfluid Nanofluid*, 2010, 8: 105–114
- 12 Rodriguez -Villarreal A I, Arundell M, Carmona M, et al. High flow rate microfluidic device for blood plasma separation using a range of temperatures. *Lab Chip*, 2010, 10: 211–219
- 13 Haeberle S, Brenner T, Zengerle R, et al. Centrifugal extraction of plasma from whole blood on a rotating disk. *Lab Chip*, 2006, 6: 776–781
- 14 Nakashima Y, Hata S, Yasuda T. Blood plasma separation and extraction from a minute amount of blood using dielectrophoretic and capillary forces. *Sens Actuators B: Chem*, 2010, 145: 561–569
- 15 Lenshof A, Ahmad-Tajudin A, Jaras K, et al. Acoustic whole blood plasmapheresis chip for prostate specific antigen microarray diagnostics. *Anal Chem*, 2009, 81: 6030–6037
- 16 Di Carlo D, Irimia D, Tompkins R G, et al. Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 18892–18897
- 17 Di Carlo D, Edd J F, Irimia D, et al. Equilibrium separation and filtration of particles using differential inertial focusing. *Anal Chem*, 2008, 80: 2204–2211
- 18 Gossett D R, Di Carlo D. Particle focusing mechanisms in curving confined flows. *Anal Chem*, 2009, 81: 8459–8465
- 19 Di Carlo D. Inertial microfluidics. *Lab Chip*, 2009, 9: 3038–3046
- 20 Bhagat A A S, Kuntaegowdanahalli S S, Papautsky I. Enhanced particle filtration in straight microchannels using shear-modulated inertial migration. *Phys Fluids*, 2008, 20: 101702
- 21 Bhagat A A S, Kuntaegowdanahalli S S, Papautsky I. Inertial microfluidics for continuous particle filtration and extraction. *Microfluid Nanofluid*, 2009, 7: 217–226
- 22 Mach A J, Di Carlo D. Continuous scalable blood filtration device using inertial microfluidics. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 107: 302–311
- 23 Bhagat A A S, Kuntaegowdanahalli S S, Papautsky I. Continuous particle separation in spiral microchannels using dean flows and differential migration. *Lab Chip*, 2008, 8: 1906–1914
- 24 Kuntaegowdanahalli S S, Bhagat A A S, Kumar G, et al. Inertial microfluidics for continuous particle separation in spiral microchannels. *Lab Chip*, 2009, 9: 2973–2980
- 25 Russom A, Gupta A K, Nagrath S, et al. Differential inertial focusing of particles in curved low-aspect-ratio microchannels. *New J Phys*, 2009, 11: 075025
- 26 Li C W, Cheung C N, Yang J, et al. PDMS-based microfluidic device with multi-height structures fabricated by single-step photolithography using printed circuit board as masters. *Analyst*, 2003, 128: 1137–1142

Separation of blood plasma by inertial focusing using microfluidic chips

HUANG WeiDong^{1,2}, ZHANG He^{2,3}, XU Tao², LI CheukWing², ZHOU LeiJi¹ & YANG MengSu²

¹Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

²City University of Hong Kong Shenzhen Research Institute, Shenzhen 518057, China;

³Hunan Institute of Engineering, Xiangtan 411104, China

Blood plasma is widely used in clinical and biochemical tests, and techniques for plasma separation are essential for biomedical research. The technique of inertial microfluidics provides the capability to focus microparticles or cells in microchannels without the need for active device components. Based on the theory of inertial focusing, we designed and fabricated microfluidic chips with asymmetrically curved channels. Focusing performance was evaluated using homemade fluorescent microspheres as models. We found that the flow velocities required for maintenance of stable inertial focusing varied significantly among microspheres of different sizes. The microdevice was further employed for the separation of plasma from diluted blood samples. We achieved a 90% separation efficiency when the sample was separated twice in the device. These data suggest that microdevices can separate plasma efficiently without damaging blood cells, and can be readily integrated with other analytical devices.

inertial focusing, microfluidics, plasma, separation

doi: 10.1360/972010-2380