

捕获-培养双区集成的单细胞微流控芯片

何美莹¹, 吕秋娟¹, 王鑫峰¹, 赵少宁¹, 施斌凯¹, 张子轲²

(1.火箭军工程大学 基础部, 陕西 西安 710025; 2.长安大学 科学研究院, 陕西 西安 710018)

摘 要:单细胞培养一直以来都是生物工程的难点和热点。针对现有单细胞微流控芯片中存在的细胞培养空间受制于细胞捕获空间,导致细胞无法长期培养的问题,设计了一种捕获-培养双区集成芯片。在单个单元中集成细胞捕获与细胞培养 2 种功能区域,设计出简单高效的芯片布置方式,实现了 91.93% 的微球捕获率和 60.1% 的细胞捕获率。以小鼠成纤维细胞 L929(细胞系平均直径 10 μm) 为研究对象,通过理论计算和模拟仿真建立细胞悬液在芯片中的流动模型。在保证细胞活性的前提下,微通道宽度 60 μm 时可以得到较好的捕获效果。为了验证芯片性能,在细胞(微球)进样密度为 1×10^5 cell/mL,进样流速为 300 $\mu\text{m}/\text{s}$ 时,细胞进入芯片后状态良好;芯片微通道宽度为 60 μm 时,可获得捕获率和单细胞率较好且键合稳定的单细胞微流控芯片。文中设计的芯片结构简单、制备方便,有望为单细胞研究提供新工具。

关 键 词:捕获-培养双区集成芯片;微流控;单细胞捕获;流体力学仿真

中图分类号:Q658

文献标志码:A

文章编号:1000-2758(2026)02-0435-07

生物的生殖发育、遗传机制、神经活动等重大生命现象的研究,都建立在以细胞培养为基础的一系列生物学实验之上。一般而言,细胞培养是以群体为单位,得到的是群体的指征^[1],无法观测每一个细胞的实际响应^[2]。已有研究表明,单细胞层面的研究能够实现细胞的准确表征^[3-4],为重大疾病早期诊断及治疗^[5-6]、药物筛选^[7-8]和细胞间相互作用^[9]等研究提供可靠的科学依据。

微流控技术由于具有较强的单细胞处理能力,已成为实现单细胞培养的重要手段^[8]。单细胞捕获是单细胞培养的必要步骤,基于流体动力和液滴微流控技术的单细胞捕获主要是通过合理地设计微流控芯片中的微结构,当细胞悬液以一定流速流过时实现单细胞捕获,捕获过程不需要施加其他外力^[10]。目前应用较多的单细胞捕获多采用微井结构。Wang 等^[11]制备了一种用于单细胞捕获的双圆柱形微井。该结构由 PDMS 制备出串联的双圆柱微

井,单个微井包括下侧尺寸较小的单细胞捕获井(直径 15 μm)和上侧尺寸较大的反应井(直径 100 μm);将细胞悬液注入芯片,细胞依靠重力沉积到捕获井中,之后多余的细胞在反应井中被冲走。这种结构捕获井尺寸较小且 PDMS 基底的亲水性较差,不利于细胞后续长期贴壁生长。Zhai 等^[12]设计制备了一种用于单细胞捕获和培养的矩形微井,该结构由 4 个四棱柱围成半开放式的 20 $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ 的正方形凹坑中,加入细胞悬液后,单细胞依靠重力作用落入微井,之后冲走多余细胞。在进样密度为 2×10^5 cell/mL 时,能够得到 20% 的捕获率。这种结构限制了细胞的贴壁铺展空间^[13],且捕获效率较低。

为了对单细胞进行长期培养,需要提供足够的细胞贴壁生长空间^[13],解决细胞捕获所需小空间与细胞培养所需大空间的矛盾。本文设计了捕获与培养双区集成的单元;通过仿真确定单元尺寸,设计并对比 4 种微通道宽度尺寸,分析芯片内部液体流速和压力;采用光刻技术和复制模塑技术制备出阵列排布的捕获和培养双区集成 PDMS 层,与玻片层键合得到芯片。进一步地,通过微球实验和小鼠成纤维细胞实验进行验证,最终得到可靠性与效率兼顾

收稿日期:2025-06-09

基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划(2023-JC-QN-2677)与中国博士后科学基金面上项目(2022M723887)资助

作者简介:何美莹(1992—),讲师

通信作者:张子轲(1993—),助理研究员 e-mail:zzk@chd.edu.cn

的单细胞微流控芯片。

1 材料与方法

1.1 芯片结构设计

芯片结构设计包括捕获-培养单元结构与芯片总体结构设计。

捕获-培养单元在功能上要分离出单细胞并进行培养。将单元前侧设计为捕获区域,后侧设计为培养区域,为使细胞能够顺利地从前侧捕获区域进入到培养区域,结构外壁与捕获微柱构成“门”,以保证单细胞顺利通过。其中,捕获区域用以分离单细胞,从尺寸上看其大小可容纳1~2个细胞。本文以小鼠成纤维细胞为研究对象,该体系细胞的平均直径为10 μm,在设计时,使捕获区域每次只可通过1个细胞。而培养区域的主要任务是给予细胞足够的贴壁生长空间,保证细胞的长期培养。为使培养区域面积达到3 000 μm²以上^[14],设计培养区域边长为60 μm,结构外壁边长为100 μm,结构外壁厚为20 μm,如图1所示。

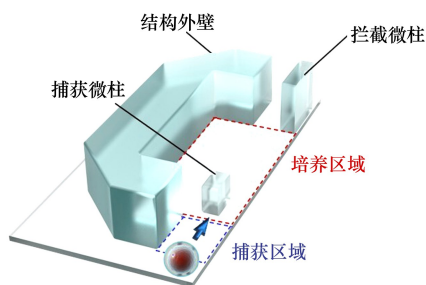


图1 捕获-培养单元结构示意图

芯片总体结构包括2个进样口、2个出样口和阵列区域。捕获-培养单元之间会构成微通道。为使细胞在芯片内尽量保持单层,设计微通道高度 $H=20\text{ }\mu\text{m}$,宽度 $W=20,40,60,80\text{ }\mu\text{m}$,如图2所示。

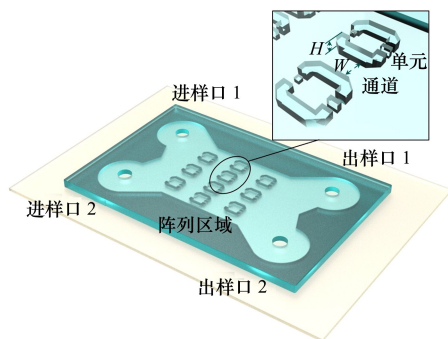


图2 芯片总体结构示意图

1.2 有限元分析

为了保证细胞活性,并提高芯片的效率,采用Comsol Multiphysics 分别对单元和阵列进行仿真。

液体在流动时内部会产生剪切应力,剪切应力过大会破坏细胞膜造成细胞死亡。根据托克斯流理论^[15],计算分析得到的最大剪切应力与流量的关系如(1)式所示。

$$\tau_{\text{cell-max}} = 2.95 \frac{6\mu Q}{H^2 W} \quad (1)$$

式中: H 表示微通道高度; W 表示微通道宽度; μ 表示介质黏度; Q 表示流量。

流速和流量的关系如(2)式所示。

$$v = \frac{Q}{HW} \quad (2)$$

式中: v 表示液体流速; Q 表示流量; H 表示微通道高度; W 表示微通道宽度。

当剪切应力在0.2~0.5 Pa之间时,细胞开始变形,当剪切应力超过0.5 Pa时,细胞则开始死亡^[16]。为使细胞保持良好的形态而实现长期培养,选择最大应力小于0.2 Pa,根据计算可得液体进样流速应小于338.98 μm/s,此时流量小于 1.22×10^{-3} L/s。

在此流速下,使用有限元分析芯片内部细胞悬液的流动速度和方向,以保证细胞活性。细胞培养液的主要成分包含水(80%~90%)、氨基酸、维生素等。本文选取水作为近似仿真流体,取密度 ρ 为1 000 kg/m³,动力黏度 μ 为0.001 Pa·s,选取进样流速为 3×10^{-4} m/s,利用稳态纳维-斯托克斯方程(N-S)解决不可压缩流体 Comsol 仿真^[17],如(3)式所示,通道壁选取无滑移边界条件。

$$\rho(\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} = -\nabla p + \mu \nabla^2 \quad (3)$$

式中: $\mathbf{v}$ 表示速度矢量; p 表示压强。

经过网格划分并求解得到流体在通道内的速度、压强等参数,合理地选择微通道宽度 W ,保证细胞活性。

1.3 芯片制备

芯片由生物相容性好的PDMS和玻片通过键合制备而成。采用标准电感耦合等离子体刻蚀(ICP刻蚀)技术制备硅模板。利用复制模塑技术,将硅模板上的图案转移至PDMS上,形成PDMS模板。玻片层将作为细胞黏附贴壁的基底,因此采用铬酸洗液浸泡24 h并用极性溶液浸泡处理。将吹干的玻片层和打好孔的PDMS层用电晕放电仪处理30 s左右,80℃烘烤1 h,即可实现不可逆键合^[18],制备

工艺如图 3 所示。

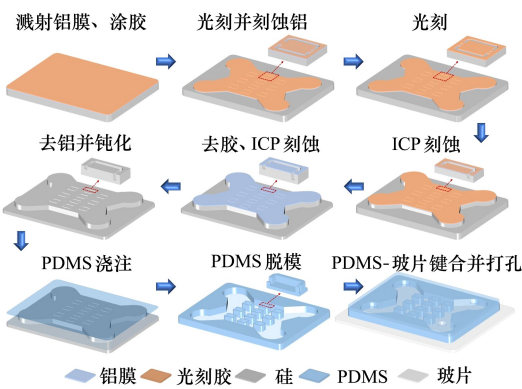


图 3 芯片制备工艺流程图

1.4 实验验证

为了验证芯片的性能,本文首先采用微球进行预实验,在此基础上采用小鼠成纤维细胞(L929)进行验证实验。

1.4.1 平台搭建及微球实验验证

首先将微球作为实验对象进行验证实验。微球的性质和尺寸单一且一致性好,能够模拟细胞在微通道中的运动状态及流动特性,进而评估芯片的流体力学性能;另一方面,与细胞相比,微球对于实验时间和空间的要求较低,适合作为预实验对象来研究。本文采用 SpheroTech 公司的聚苯乙烯荧光微球(RFP-100-2)进行实验,微球直径为 10.7 μm,密度为 1.05×10³ kg/m³。使用去离子水,将微球溶液配制成 1×10⁵ cell/mL 的溶液。微球的密度略大于溶液密度,长期放置必定会产生沉淀以及抱团现象,因此在使用前应当充分吹匀,立即使用。由于酒精在 PDMS-玻璃的芯片内具有较好的流动性,可以使用酒精快速排出芯片内的气体,避免死区出现。

实验平台流路系统使用外径为 0.6 mm 的针头配在驱动注射器上,针头连接内径为 0.3 mm 的聚四氟乙烯(PTFE)毛细管,该材料具有良好的化学惰性、耐热性和生物相容性^[19-20]。毛细管的另一头接在芯片进样口中,采用倒置显微镜(明美 MI52)进行观察,最后样片废液从芯片出样口经过毛细管流出,进入废液池,实现流路的搭建。

1.4.2 细胞实验验证

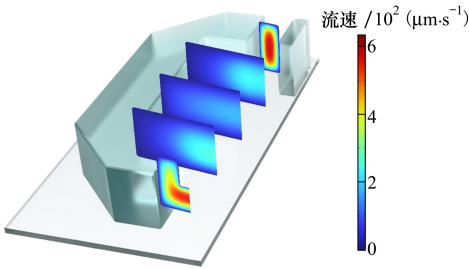
与微球实验不同,体外培养的细胞缺乏抗感染能力,防止污染是决定培养成功或失败的首要条件,因此采用紫外线照射 12 h 进行灭菌。

为了验证芯片对单细胞的捕获能力,本文采用小鼠成纤维细胞进行实验。小鼠成纤维细胞在含有 10% 胎牛血清(四季青)、1% 青霉素-链霉素混合溶液(Invitrogn)、1% 谷氨酰胺溶液的 α-MEM 培养基(Hyclone)于 37 ℃,5% CO₂ 的培养箱中培养。采用 0.25% 胰蛋白酶(Invitrogn)消化细胞约 3 min,使用离心机设置转速 1 000 r/min,10 min 后收集细胞。细胞接种前采用紫外线将所需芯片、管道、接头等设备进行灭菌照射 12 h 以上。为了和微球实验结果作对比,将细胞配置成 1×10⁵ cell/mL 的细胞悬液,利用微量进样泵加入芯片。使用酒精为芯片排气后,加入足够多的 PBS 缓冲液,将芯片内部的酒精完全排出以供细胞后续生长。另外由于细胞的贴壁性质,将细胞配置成悬液后尽快加样,防止细胞抱团。

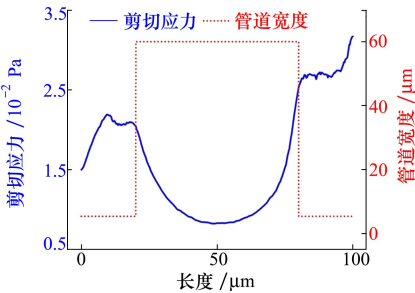
2 结果与讨论

2.1 有限元仿真结果

单元仿真结果如图 4 所示。单元内剪切应力最大区域分别在捕获微柱、拦截微柱处,最大值为 0.031 Pa,远小于细胞所能承受最大剪切应力 0.2 Pa^[16]。培养区域内部速度和剪切应力数值平稳,适合细胞长期培养。



a) 单元流速分布图



b) 单元内剪切应力变化图

图 4 单元仿真结果

芯片内微流体速度仿真结果如图 5 所示。其中速度反映剪切应力的水平,平均速度随着微通道宽度 W 缓慢减小;最大速度也呈现减小态势,且在微通道宽度 W 由 $20\text{ }\mu\text{m}$ 增大到 $40\text{ }\mu\text{m}$ 时大幅减小。微流体最大速度与平均速度的比值反映芯片内部的微流体速度差幅,这个值随微通道宽度 W 增大而减小,变化趋势与最大速度曲线相似。

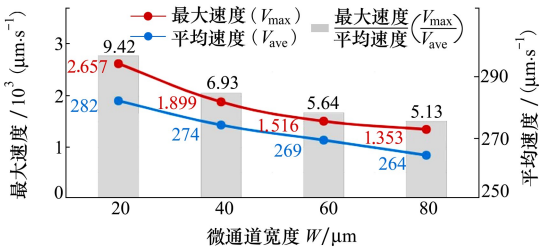


图 5 芯片微流体速度变化仿真情况

芯片阵列微流体压力仿真结果如图 6 所示。可以看出微流体的最大压力和平均压力均随微通道宽度 W 增大而减小,且在微通道宽度 W 由 $20\text{ }\mu\text{m}$ 增大到 $40\text{ }\mu\text{m}$ 时大幅减小。而最大压力和平均压力的比值则随着微通道宽度增大而缓慢增大。

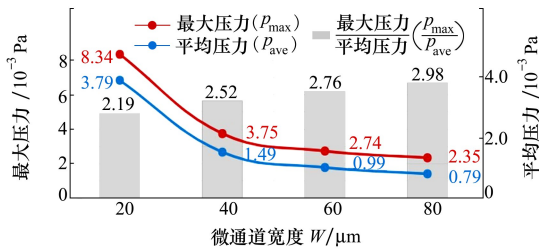


图 6 芯片微流体压力变化仿真情况

综合以上结果可以看出,一定的进样流速下,微通道宽度 W 越大,芯片内部的速度、压力越趋于均匀,对细胞的捕获和培养越有利;但通道尺寸过大可能会出现键合失效的可能。

2.2 芯片制备

本文所设计的微流控芯片,经过 ICP 技术制备硅模板,并经复制模塑技术由硅模板制备而成 PDMS 模板,硅模板的扫描电镜结果如图 7 所示,与设计尺寸相比,实际尺寸偏差率最大为 5.33%,具有较好的一致性,满足使用要求。

芯片阵列区域的键合效率与键合面积相关。为了表征键合效率,本文定义键合面积比为阵列区域 $500\text{ }\mu\text{m}\times 500\text{ }\mu\text{m}$ 内,键合面积所占比值。如图 8 所

示,经计算键合面积比随微通道宽度增大而减小,键合强度降低,键合失效可能性增大。

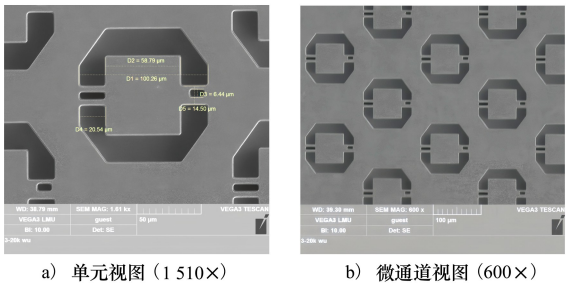


图 7 硅模板微结构扫描电镜图

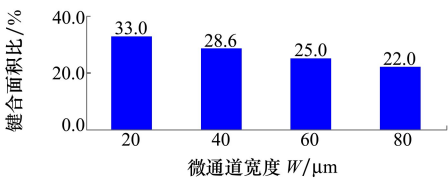


图 8 键合面积比变化情况

2.3 微球捕获实验

4 种微通道宽度的微球实验显微结果如图 9 所示。

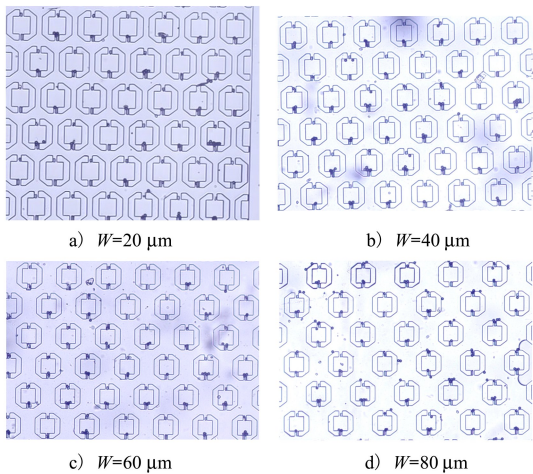


图 9 不同微通道宽度微球捕获实验结果

为了量化表征芯片的单细胞捕获和培养能力,定义“捕获率 R_p ”为有细胞(或微球)的单元个数 N_c 与该视野中所有单元个数的比值 N_A ,如(4)式所示;“单细胞率 R_s ”为仅有单个细胞(或微球)的单元个数 N_{sc} 与视野中所有单元个数的比值 N_A ,如(5)式所示。

$$R_p = \frac{N_c}{N_A} \times 100\%$$

(4)

$$R_s = \frac{N_{sc}}{N_A} \times 100\% \tag{5}$$

统计结果如图 10 所示,捕获率随着微通道宽度 W 的增大而呈现增大趋势,尤其是当微通道宽度 W 由 20 μm 增大到 40 μm 时,捕获率显著提升;而当微通道宽度 W 从 40 μm 增大到 80 μm 时,捕获率仅缓慢增加。单细胞率在 4 组实验中,微通道宽度 $W=60\ \mu\text{m}$ 时效果较好。综上,当微通道宽度 $W=20\ \mu\text{m}$ 时,捕获率和单细胞率效果较差,且芯片内部速度变化幅度较大,细胞受到较大的剪切应力,很难进行后续长期培养,不适合进一步的细胞实验研究;当微通道宽度 $W=60\ \mu\text{m}$ 时可获得较好的捕获率和单细胞率。

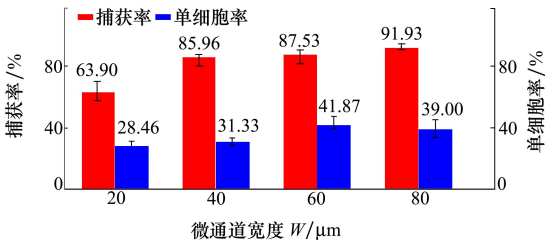


图 10 不同微通道宽度下微球实验 3 次统计结果

2.4 细胞实验

细胞实验结果如图 11~12 所示,可以看出捕获率在微通道宽度 $W=60\ \mu\text{m}$ 时最好,而单细胞率则随微通道宽度 W 的增大而缓慢增大。当微通道宽度

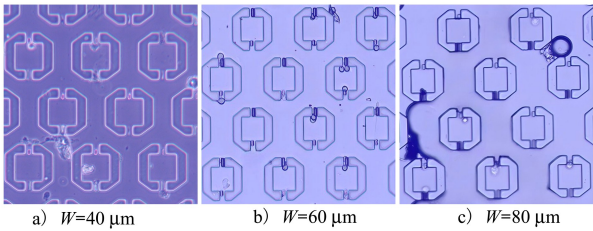


图 11 不同微通道宽度下细胞实验显微结果

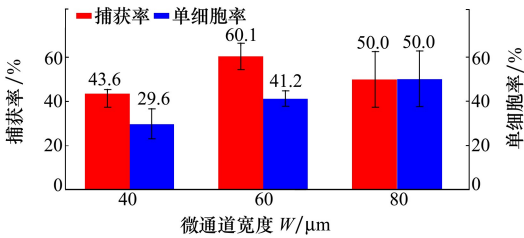


图 12 不同微通道宽度下细胞实验 3 次统计结果

$W=80\ \mu\text{m}$ 时,单细胞率较微球实验高,这是由于实验过程中,键合面积比低,出现部分结构键合失效。综合单细胞率和捕获率 2 个因素,微通道宽度 $W=60\ \mu\text{m}$ 时效果较好,与微球实验结论一致。

3 结 论

本文以小鼠成纤维细胞为对象,设计了一种在单元内集成细胞捕获和培养双区集成的单细胞微流控芯片,利用小空间分离单细胞,同时为单细胞提供大空间实现贴壁生长。根据仿真结果,单元内捕获微柱和拦截微柱处具有较大的流速和剪切应力,且单元内最大剪切应力为 0.031 Pa,远小于细胞所能承受的最大剪切应力 0.2 Pa。在进样流速为 300 $\mu\text{m}/\text{s}$ 时,芯片内液体流速和压力分布随微通道尺寸 W 的增大而逐渐平稳均匀,有利于细胞长期培养。利用微球和小鼠成纤维细胞进行实验验证,结果显示捕获率总体上随微通道宽度增大而提高;当微通道宽度增大到 80 μm 时,捕获率和单细胞率略有下降,且实验过程中存在键合失效而出现气泡进入芯片的情况。当微通道宽度 W 为 60 μm 时,可获得单细胞率、捕获率和键合质量较好的芯片,实现单细胞捕获与培养双功能。

参考文献:

[1] VASDEKIS A E, STEPHANOPOULOS G. Review of methods to probe single cell metabolism and bioenergetics[J]. Metabolic Engineering, 2015, 27: 115-135.

[2] PANG L, DING J, LIU, X, et al. Microfluidics-based single-cell research for intercellular interaction[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 680307.

[3] YE H C F, HSU C H. Microfluidic techniques for single-cell culture[M] // Single-cell omics. New York: Academic Press, 2019: 137-151.

[4] ZHANG X, WEI X, WEI Y, et al. The up-to-date strategies for the isolation and manipulation of single cells[J]. Talanta, 2021, 234: 123456.

2020, 218: 121147.

- [5] LIU Y, CHEN L, YU J, et al. Advances in single-cell toxicogenomics in environmental toxicology[J]. Environmental Science & Technology, 2022, 56(16): 11132-11145.
- [6] BOORA G S, CHAUHAN A, PAL A. Tumour immune microenvironment as the origin of heterotypic circulating tumour cell clusters and their impact on metastasis: an hypothesis[J]. Medical Hypotheses, 2023, 181: 111209.
- [7] ABDULLA A, ZHANG Z, AHMAD K Z, et al. Rapid and efficient capturing of circulating tumor cells from breast cancer patient's whole blood via the antibody functionalized microfluidic (AFM) chip [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 201: 113965.
- [8] DOOST N F, SRIVASTAVA S K. A comprehensive review of organ-on-a-chip technology and its applications[J]. Biosensors, 2024, 14(5): 225.
- [9] PARK J, PARK C, SUGITANI Y, et al. An electroactive microwell array device to realize simultaneous trapping of single cancer cells and clusters[J]. Lab Chip, 2022, 22(16): 3000-3007.
- [10] LIU Y, FAN Z, QIAO L, et al. Advances in microfluidic strategies for Single-cell research[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2022, 157: 116822.
- [11] WANG C, LIU W, WEI Q, et al. A novel dual-well array chip for efficiently trapping single-cell in large isolated micro-well without complicated accessory equipment[J]. Biomicrofluidics, 2018, 12(3): 034103.
- [12] ZHAI J, LI H, WONG H, et al. A digital microfluidic system with 3D microstructures for single-cell culture[J]. Microsystems & Nanoengineering, 2020, 6(1): 10.
- [13] ROSELLINI E, VOZZI G, BARBANI N, et al. Three-dimensional microfabricated scaffolds with cardiac extracellular matrix-like architecture[J]. International Journal of Artificial Organs, 2010, 33(12): 885-894.
- [14] CHEN C S, MRKSICH M, HUANG S, et al. Geometric control of cell life and death[J]. Science, 1997, 276(5317): 1425-1428.
- [15] MANBACHI A, SHRIVASTAVA S, CIOFFI M, et al. Microcirculation within grooved substrates regulates cell positioning and cell docking inside microfluidic channels[J]. Lab Chip, 2008, 8(5): 747-754.
- [16] JOONG Yull Park, MINA Morgan, AARON N Sachs, et al. Single cell trapping in larger microwells capable of supporting cell spreading and proliferation[J]. Microfluid Nanofluid, 2010, 8: 263-268.
- [17] YANG S, XIAN Q, LIU Y, et al. A silicon-based PDMS-PEG copolymer microfluidic chip for real-time polymerase chain reaction diagnosis[J]. Journal of Functional Biomaterials, 2023, 14(4): 208.
- [18] NICHOLAS, FAJAR F M, RAMADHANTY S, et al. Study of plasma treatment for PDMS surface modification on the fabrication of microfluidic devices[C]//3rd Biomedical Engineering's Recent Progress in Biomaterials, Drugs Development, and Medical Devices: Proceedings of the International Symposium of Biomedical Engineering(ISBE) , 2019.
- [19] DHANUMALAYAN E, JOSHI G M. Performance properties and applications of polytetrafluoroethylene(PTFE): a review[J]. Advanced Composites and Hybrid Materials, 2018, 1(2): 247-268.
- [20] BANERJEE U, IQBAL R, HAZRA S, et al. Droplet microfluidics: a tool for biosensing and bioengineering applications[M]// JOSHI S N, CHANDRA P. Advanced micro-and nano-manufacturing technologies, materials horizons: from nature to nanomaterials. Singapore: Springer Singapore, 2022.

Capture-culture dual-zone integrated unit array for
single-cell microfluidic chips

HE Meiying¹, LYU Qiujuan¹, WANG Xinfeng¹, ZHAO Shaoning¹,
SHI binkai¹, ZHANG Zike²

(1.Department of Basic, Rocket Force University of Engineering, Xi'an 710025, China;
2.Science Research Institute, Chang'an University, Xi'an 710018, China)

Abstract: Single-cell culture has long posed a significant challenge and remained a hot topic in biomedical engineering. To address the limitations in existing microfluidic single-cell chips, where cell culture space is constrained by the capture zones——impeding long-term cultivation. This study presents a capture-culture dual-zone integrated microfluidic chip, which integrates cell capture and culture functional region within a single unit. Through optimized chip layout design, the device achieves a microsphere capture rate of 91.93% and a cell capture rate of 60.1%. This study employs mouse fibroblast L929 cells (average diameter: 10 μm) as the model system, establishing a hydrodynamic flow model of cell suspension within the chip through theoretical calculations and computational simulations. To ensure cell viability, a microchannel width of 60 μm achieves optimal capture efficiency. To validate the chip performance, under conditions of a cell (or microsphere) input density of 1×10⁵ cell/mL and a flow velocity of 300 μm/s, the cells exhibited stable post-entry conditions. With a microchannel width of 60 μm, the chip achieved both high capture efficiency and single-cell isolation rates, yielding a robust single-cell microfluidic device with stable bonding. This chip demonstrates a simple structure and straightforward fabrication process, serving as a novel tool for single-cell analysis and research.

Keywords: capture-culture dual zones integrated chips; microfluidics; single-cell capture; computational fluid dynamics(CFD)

引用格式:何美莹, 吕秋娟, 王鑫峰, 等. 捕获-培养双区集成的单细胞微流控芯片[J]. 西北工业大学学报, 2026, 44(2): 435-441.

HE Meiying, LYU Qiujuan, WANG Xinfeng, et al. Capture-culture dual-zone integrated unit array for single-cell microfluidic chips[J]. Journal of Northwestern Polytechnical University, 2026, 44(2): 435-441. (in Chinese)