

# 用于流式细胞仪的超声聚焦系统的仿真与设计

程 振<sup>1</sup>, 杨 斌<sup>1</sup>, 徐友春<sup>2</sup>

(1. 清华大学精密仪器系 北京 100084; 2. 清华大学生物医学工程系 北京 100084)

**摘要:**介绍了一种利用超声驻波对颗粒进行二维聚焦的方案,其可用于流式细胞仪中微量(少于82  $\mu\text{L}$ )细胞样品的上样,无需鞘液即可实现颗粒在管道中央的逐个排列,并能以高至0.5 mL/min的速度依次通过检测区。该方案避免了颗粒在管道中的随机分布现象,提高了流式细胞检测的准确性,分析后的样品还能被无稀释地回收再利用。从驻波形成、声阻抗匹配、颗粒在声场中的受力分析等理论出发,着重仿真分析了驻波场中颗粒在不同参数下的运动路径。在理论模型的基础上搭建了1.462 MHz频率驱动的方形毛细管实验平台,利用10和20  $\mu\text{m}$ 直径的聚苯乙烯微球验证了超声聚焦颗粒的可行性,实验表明低流速、高声场强度时聚焦更紧密,大颗粒比小颗粒更易聚焦。该结论与仿真结果一致。

**关键词:** 超声聚焦; 单细胞排列; 无鞘液; 流式细胞仪; 仿真分析

中图分类号: R318.6 TH77 文献标识码: A 国家标准学科分类代码: 310.6110

## Simulation and design of an acoustic focusing system for flow cytometer

Cheng Zhen<sup>1</sup>, Yang Bin<sup>1</sup>, Xu Youchun<sup>2</sup>

(1. Department of Precision Instrument, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. Department of Biomedical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** This work demonstrates a standing wave focusing method to complete two-dimension and sheath-free focusing of particles for flow cytometer. Cells or beads in a volume of less than 82  $\mu\text{L}$  are forced to cross the detection area one by one under a flow rate higher than 0.5 mL/min, which can improve the analysis accuracy and realize undiluted sample recovery. The principle of standing wave formation, acoustic resistance matching and the particle force equilibrium are discussed, and the motion trajectory of particle under different parameters is simulated. Referring to this model, an acoustic focusing experimental platform driving in a frequency of 1.462 MHz is built to verify the feasibility and performance by polystyrene beads in diameters of 10 and 20  $\mu\text{m}$ . The results showed that beads in random distribution can be focused into a plane, and more tightly focusing can be achieved at low flow rate and high driving voltage. It is proved that the bigger beads are focused more easily than the smaller ones. All the experimental results coincides well with the simulation.

**Keywords:** acoustic focusing; single-cell arrangement; sheath-free; flow cytometer; simulation analysis

## 1 引言

流式细胞仪是一种对快速直线流动中的单个细胞依次进行散射光与荧光等多参数定量分析的仪器,其光学检测光斑尺寸通常为几十微米,因此形成位置固定的聚焦单细胞流是流式分析的核心问题之一<sup>[1]</sup>。传统流式细胞仪在流动室中利用高速流动的鞘液包裹样品液,使细

胞经流动聚焦后依次从中心轴以直径20  $\mu\text{m}$ 的聚焦宽度流过检测区;若要增加分析速度则需加大进样速度,这将导致样品流直径变宽,易偏离检测高斯光斑的中心,进而导致激发光强变化并降低仪器分辨率。同时聚焦所需的鞘液也会大量稀释细胞样品,不适用于样品的回收与后续分析。近期研究者尝试了一些非鞘液聚焦技术来避免这些问题,如基于磁力<sup>[2]</sup>、电渗力<sup>[3]</sup>或介电泳力<sup>[4]</sup>等外力的细胞聚焦方式。这些方法需要在细胞表面标记上磁性

材料,或者直接与强电磁场接触,均可能损伤细胞。而螺旋、蛇形等管道结构的惯性力聚焦<sup>[5]</sup>,对大小不同的细胞的聚焦稳定性较差,且对样品的流速和细胞浓度范围有一定要求。基于驻波声场的超声聚焦<sup>[6]</sup>可通过长距离聚焦将颗粒紧密排列在管道中央,是一种非接触无损的细胞操纵方式,被用于最新的 Attune 流式细胞仪中,用于辅助鞘液聚焦,实现高流速下细胞的准确检测。

超声聚焦是在颗粒直径远小于波长的条件下,颗粒因与溶液介质的密度或压缩率性质的不同而受到非线性声场中声辐射力的作用而运动到压力势能函数最低的位置的一种现象。驻波场是常用的非线性声场,其声波施加在微粒上的力由主声学辐射力和二次声学辐射力两方面组成<sup>[7]</sup>,其中主声学力直接作用于颗粒是聚焦主要原因,它促使颗粒快速聚焦到低势能位置;而次声学力来自粒子间散射的声波,其数量级较小<sup>[8]</sup>,只在微粒间距离非常近时促进颗粒进一步汇聚。基于此原理,驻波声场的声学力可将细胞紧密聚焦在流道中央,保证流式细胞检测的灵敏度和精确度<sup>[9]</sup>。

本文描述了一种基于方形毛细管的超声驻波场对微球等颗粒进行二维聚焦进样的方案,其可在管道中将颗粒紧密排列在平面上,并促使颗粒以小于 20  $\mu\text{m}$  的聚焦宽度依次经过检测区。该超声聚焦方案能在 0.5 mL/min 的流速下,替代现有传统流式细胞仪中采用的鞘液聚焦方案,具备相同的颗粒聚焦效果。同时该方案为无鞘液聚焦方式,无需额外试剂消耗,可实现对少于 82  $\mu\text{L}$  样品的无稀释回收。

本文首先分析了超声驻波场的形成和管道的声阻抗的匹配,进而论述了微粒超声聚焦的原理,给出驻波场中颗粒的受力分析,建立其运动的参数模型并进行仿真分析;搭建了毛细管驻波测试平台,实验验证超声聚焦的可行性,并进行了聚焦效果与声场强度、样品流速、颗粒大小等多参数的关联测试,得到了与理论仿真一致的关系结果;本文为当前流式细胞仪高流速下检测灵敏度和通量不能兼得的难题提供了可行方案。

## 2 理论分析

### 2.1 毛细管道中驻波的形成与声阻抗匹配

驻波声场稳定的波腹和波节位置可作为颗粒的平衡点,该声场经历声源发射、介质传播等过程而建立,各介质层的声阻抗关系决定了驻波场的声强度。稳定的超声驻波既可以通过两个相反方向的同步声源产生,也可以通过在单超声发生器的对立面上装上声波反射器来形成。本文采用了后者的方法<sup>[10]</sup>,设计一个宽度为半波长奇数倍的毛细管谐振器,并调节激励频率与该谐振腔体相匹配。该毛细管中形成垂直于流体运动方向的声驻波场,

它是两列同频率同振幅传播方向相反的平面声波叠加<sup>[11]</sup>,形成的驻波方程为:

$$p(x, y) = 2A_{\text{sw}} \sin\left(\frac{2\pi}{\lambda}y\right) \cdot \cos(\omega t) \quad (1)$$

$$v(x, y) = \frac{P_0}{\rho_0 c} \sin\left(\frac{2\pi}{\lambda}y\right) \cdot \cos(\omega t) \quad (2)$$

式中: $A_{\text{sw}}$ 是初始振幅, $\lambda$ 为声波波长, $\omega$ 为角频率。

常见的用于驻波形成的层状谐振器结构如图 1 所示,其每层都承担着不同的作用。压电片发射平面声波;其上方的耦合层应最大限度地把声波耦合到谐振管道中,并减少声波反射的衰减;传输层是谐振管道腔的底部。而流体层包含流体介质和悬浮的颗粒,是超声聚焦的作用区;顶部反射层应尽可能多地反射声波,其与入射波叠加形成稳定的驻波。

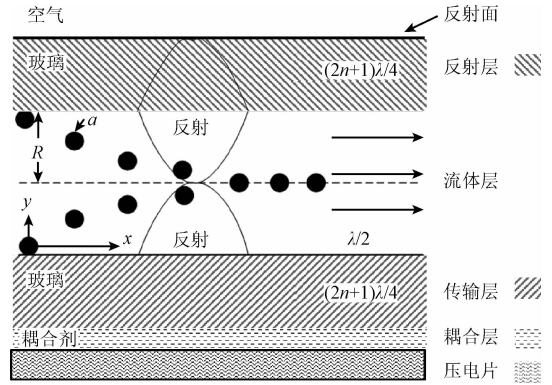


图1 超声在管道中形成驻波示意图

Fig. 1 Illustration of acoustic standing wave formation in capillary tube

上述各层声场的透射与反射强度由各层材料的厚度与声阻抗匹配情况决定,层状谐振器的尺寸应保证传输层和反射层厚度为 1/4 波长奇数倍,流体层厚度为半个波长奇数倍<sup>[12]</sup>。声波作平面波近似时由声波方程<sup>[13]</sup>可得到多介质层的声波传播规律,各界面层的输入阻抗  $Z_{\text{m}}^{(n)}$  和整体的反射系数  $R$  为:

$$Z_{\text{m}}^{(n)} = Z_n \frac{Z_{\text{m}}^{(n-1)} - jZ_n \tan(k_n d_n \cos\theta_n)}{Z_n - jZ_{\text{m}}^{(n-1)} \tan(k_n d_n \cos\theta_n)} \quad (3)$$

$$R = \frac{Z_{\text{m}}^{(n)} - Z_{n+1}}{Z_{\text{m}}^{(n)} + Z_{n+1}} \quad (4)$$

式中: $\theta$ 为入射角, $Z$ 为各介质的声阻抗,反射系数  $R$  越小则声波透射越多。两式对声波能量传递、各界面阻抗计算有重要意义,现对流体层的反射系数考虑以下特殊情况:

$$k_2 d \cos\theta_2 = n\pi \quad n = 1, 2, 3, \dots \text{时, 半波长}$$

$$Z_{\text{m}}^{(2)} = Z_1, \quad R = \frac{Z_1 - Z_3}{Z_1 + Z_3} \quad (5)$$

式中:1、2、3 分别是声波传播的前中后 3 种介质,当声波垂

直入射  $\theta_2 = 0$ , 且中间流体层介质厚度为半波长奇数倍时满足式(5)。此时好像中间层  $Z_2$  不存在, 对声波的能量传递不起作用, 反射如同发生在流体层的前后分界面上, 流体层中的驻波不参与能量传递, 即满足驻波的生成条件。

此时若前后传输层和反射层的材料相同, 则反射系数  $R = 0$ , 声波在传输层和流体层界面处没有衰减。同时它们各取四分波长(奇数倍)时, 相加的半波长也使得反射波恰为一个完整波, 保证了初始相位的稳定性, 此时:

$$k_2 d \cos \theta_2 = \frac{1}{2} \pi \quad n = 1, 2, 3, \dots \text{时}, 1/4 \text{ 波长}$$

$$Z_m^{(2)} = \frac{(Z_2)^2}{Z_1}, \quad R = \frac{Z_2^2 - Z_1 Z_3}{Z_2^2 + Z_1 Z_3} \quad (6)$$

式中: 厚度为  $d = \lambda/4$  为  $1/4$  波层, 当阻抗匹配  $Z_1 \cdot Z_m^{(2)} = (Z_2)^2$  时, 即传输层声阻的平方等于前后介质耦合层和流体层声阻的乘积时,  $R = 0$  即耦合层和传输层界面没有反射, 为耦合胶的选取条件。而反射层的后介质为空气, 声阻抗很小反射系数接近于 1, 即空气会反射大部分超声能量, 满足前述将超声能量最大限度地集中在流体层中的要求。

### 2.2 颗粒在驻波声场中的受力分析

在超声聚焦中, 驻波场主声学力的径向分量占支配地位, 颗粒在其作用下迅速地沿着声波传播的方向移动。当颗粒被聚集到驻波的波节(或波腹)平面时, 粒子间的平均距离将减小, 二次辐射力将粒子向声波的轴线方向进一步聚集。球形颗粒在任意超声场中的超声力(忽略粘滞和热传导), 可写作超声辐射压力势能函数  $U^{rad}$  的梯度, 而颗粒会定位到势能函数最小的位置。Gor'kov L. P.<sup>[14]</sup> 给出了驻波场中单个粒子上的表达式为:

$$U^{rad} = V_p \left[ \frac{\kappa_o - \kappa_p}{\kappa_o} \langle PE \rangle - \frac{3(\rho_p - \rho_o)}{\rho_o + 2\rho_p} \langle KE \rangle \right] \quad (7)$$

式中:  $\kappa_o$  为介质的压缩率,  $\kappa_p$  为颗粒的压缩率,  $\rho_o$  为介质的密度,  $\rho_p$  为颗粒的密度,  $V_p$  为颗粒的体积,  $\langle PE \rangle$  为声波的时间平均势能密度,  $\langle KE \rangle$  为声波的时间平均动能密度, 三角括号表示对时间的积分。平面波中的势能极小值点就是压力节点或反节点, 而势函数最小点的是稳定点。

若使用正弦波超声激励, 在理想条件下可得到沿振动方向上的主声学力大小<sup>[15]</sup>为:

$$F_{rad} = \left( \frac{\pi P_o^2 V_p \kappa_p}{2\lambda} \right) \cdot \phi(\rho, \kappa) \cdot \sin\left(\frac{4\pi y}{\lambda}\right) \quad (8)$$

$$\phi(\rho, \kappa) = \frac{5\rho_p - 2\rho_o}{2\rho_p + \rho_o} - \frac{\kappa_p}{\kappa_o} \quad (9)$$

式中:  $\phi(\rho, \kappa)$  为声学对比因子, 在主声波辐射力下, 该因子为正的粒子(如大多数细胞)将聚焦到压力波节, 声学对比因子为负的粒子(如气泡和脂肪粒等)将聚焦到压力波腹。该式也说明声波力正比于声压振幅的平方  $P_o^2$  和微粒体积  $V_p$ , 而超声产生的加速度与颗粒大小无关。

除了声场导致的力外, 颗粒在流体场中运动还要受到和运动方向相反的流体粘滞力的作用:

$$F_D = 6\mu\pi a [v(x, y) - u_p(x, y)] \quad (10)$$

式中:  $\mu$  为粘滞力系数,  $u_p$  是微粒的瞬时速度, 故对相同材料的颗粒其半径越大, 粘滞力产生的力越大, 但加速度越小。最后颗粒自身的重力与浮力合力也可写为:

$$F_B = V_p g (\rho_o - \rho_p) \quad (11)$$

粒子受到的其他力, 如剪切力、壁面力、范德华力等相比较于声学力和粘滞力较小, 暂不考虑。

### 3 理论仿真

根据以上驻波和颗粒受力理论分析, 可以对颗粒在不同参数下的聚焦情况进行参数仿真。设定超声作用于方形流动管道, 由条状压电换能器产生正弦激励的平面声波, 流体层厚度为半波长。对毛细管道使用层状流体模型, 其管道截面上的流速满足泊肃叶抛物线分布。设毛细管道内径为  $240 \mu\text{m}$ , 平均流速为  $0.1 \text{ m/s}$ 。根据式(8)可得到微粒在驻波中受力情况, 管道中央为声压力平衡点, 势能函数最低。靠近流体层底部的颗粒受到向上的超声力, 流体层顶部的颗粒受到向下的超声力, 将颗粒聚焦到中央。

按照上述微粒所受合力分析, 由式(2)、(8)、(10)和(11)综合超声力、粘滞力、重力与浮力可对微粒运动轨迹进行仿真, 其实现借助了 MATLAB 中的 ode45 工具箱。不同大小颗粒在不同驱动幅值下, 在管道中的运动轨迹如图 2 所示。图中微粒在声场中随着  $y$  轴向前流动, 并逐渐聚焦到管道中央。半径越大, 聚集速度越快, 这是由于大微粒因粘滞阻力产生的加速度小。而当激励电压越大时, 由于主辐射力和输入信号的幅值成正比, 因而聚集速度也越快。

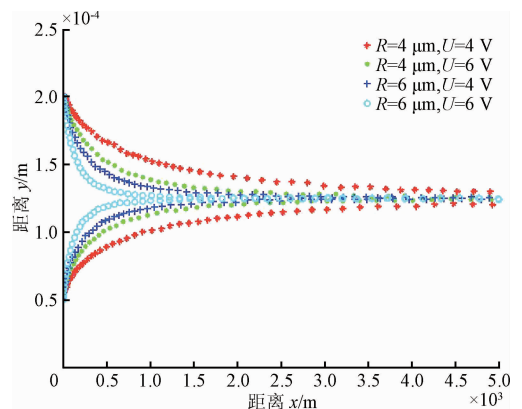


图2 不同颗粒半径与激励电压时运动轨迹的仿真结果  
Fig.2 Stimulation results of moving trajectory under different beads diameter and driving voltage

图3所示为在不同流速和粘滞系数时的聚焦仿真结果,它指出了颗粒流速越小,轴向流动越慢,则聚集点距离越近,聚焦越紧密;而粘度系数越小,粘滞阻力小,聚集速度也相应加快。

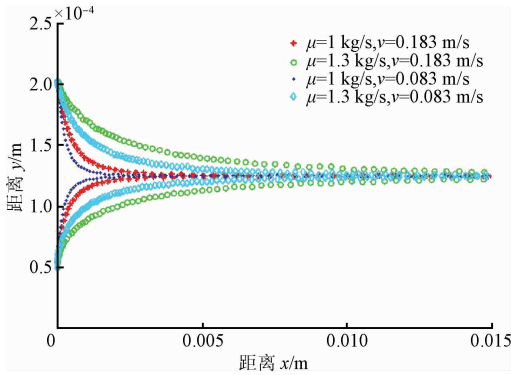


图3 不同流速与粘滞系数时运动轨迹的仿真结果  
Fig.3 Stimulation results of moving trajectory under different flow velocity and viscosity coefficient

进行类似的仿真,还可发现声学对比因子越大,聚集速度越快。声场辐射力和激励频率成正比,激励频率越大,聚集速度越快。但在固定管径下,频率的改变会导致反射波相位变化,改变聚焦平面位置。这些仿真分析指出了影响聚焦收敛速度的参数,为系统设计和实验分析指明方向。

## 4 系统设计

### 4.1 实验平台搭建

实验设计的超声聚焦系统如图4所示,其中毛细管芯片是该聚焦系统的核心部件,由毛细玻璃管和压电换能器贴合而成。注射泵连接至毛细管入口端,用于样品的自动进样;信号发生器产生正弦信号,经过功率放大器后驱动压电片产生声波。管道中颗粒的运动状态可于倒置显微镜上观察,并用相机拍照记录以便后续分析。

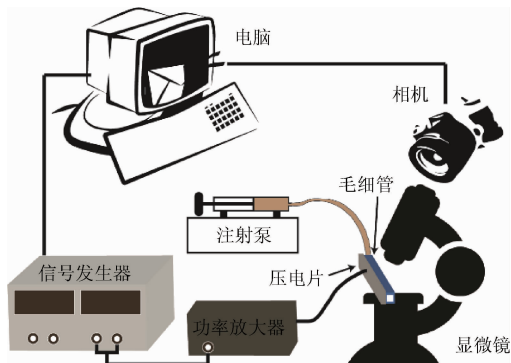


图4 超声聚焦系统的示意图

Fig.4 Illustration of acoustic focusing systems

毛细管芯片中,压电换能器贴在方形毛细管水平侧壁外并施加驱动超声波,该声波被另一侧壁外空气反射回来叠加形成驻波,以在管道中央形成单个聚焦节面。根据图1的结构与声阻抗匹配理论计算,选择石英玻璃毛细管的尺寸,使得其管道内径为半波长,管道壁厚为1/4波长。

根据式(8)可知,频率较大时声场辐射力大,聚焦效果更好;但对应的毛细管内径太小,不易加工获得。结合现有条件,设计和最终获取的毛细管尺寸如表1所示。

表1 毛细管的参数设置

Table 1 Parameter settings of capillary tube

参数	声速/ ( $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ )	设计尺寸值 ( $f=2 \text{ MHz}$ )/mm	实际尺寸值 ( $f=1.47 \text{ MHz}$ )/mm
石英玻璃	5 639	$\lambda_{\text{石英}} \approx 2.8$	$\lambda_{\text{石英}} \approx 3.8$
去离子水	1 473	$\lambda_{\text{水}} \approx 0.74$	$\lambda_{\text{水}} \approx 1.0$
毛细管	-	$D_{\text{内径}} \approx 0.37$	$D_{\text{内径}} \approx 0.5$
对应尺寸	-	$d_{\text{外径}} \approx 1.77$	$d_{\text{外径}} \approx 2.5$

压电片作为核心驱动部件,在谐振点有稳定的驱动频率和最大功率输出,应尽量保证工作在谐振频率点附近。实验选取长宽高各为25、4和1 mm的长条状压电片,并实测其并联谐振点为1.462 MHz。

### 4.2 实验材料与步骤

由于空气耦合效率较低<sup>[16]</sup>,实验中需使用超声耦合剂(Dove公司)作为耦合层,把声波最大限度地耦合到毛细管中。进样管为聚四氟乙烯管,通过内径1.6 mm的硅橡胶管套接至毛细管,并由AB胶粘接固定。采用聚苯乙烯微球模拟细胞,其直径为20和10  $\mu\text{m}$ (Thermo公司, Duke 4220, 4210产品),超纯水稀释至 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 密度,并添加0.2%溴酚蓝染色剂,增强成像对比度。微球加样前需吹打混匀,由注射泵抽取82  $\mu\text{L}$ 溶液,连续注入到毛细管中。由于无鞘液稀释,可在出口处回收样品用于后续的重复实验。

功率放大器的输出信号范围为1.5~10 MHz,供电电源16 V、37 dB固定增益。芯片以4倍物镜观测,照相机曝光时间为1/50 ms,可50帧/s实时记录。实验中打开压电换能器驱动,由注射泵自动上样,相机观察记录实验现象。重复实验时,需酒精清洗芯片,颗粒溶液混匀后再进样分析,确保实验条件的一致性。记录得到的视频存储为AVI格式文件,并在ImageJ软件中进行图像处理和颗粒运动分析。

## 5 结果与讨论

### 5.1 聚焦可行性

当换能器处于关闭状态时,进样微粒在毛细管中呈

随机散布状态,如图 5(a)所示。而当压电换能器打开时,微粒被聚集在管道中央呈直线运动,如图 5(b)所示。对视频连续观察,发现颗粒均在管道中央。通过图像处理软件设置阈值二值化,再将图像叠加,可得到 6 s 颗粒的累积运动轨迹,来分析颗粒分布情况。

图 5(c)所示为超声关闭时的累加图像,说明颗粒的确在管道各处随机进样;而图 5(d)所示为超声开启时颗粒的累加图像,证实了其在超声作用下颗粒会汇聚至管道中央。图像识别还可得到每幅图中各颗粒的质心位置来进行统计分析。

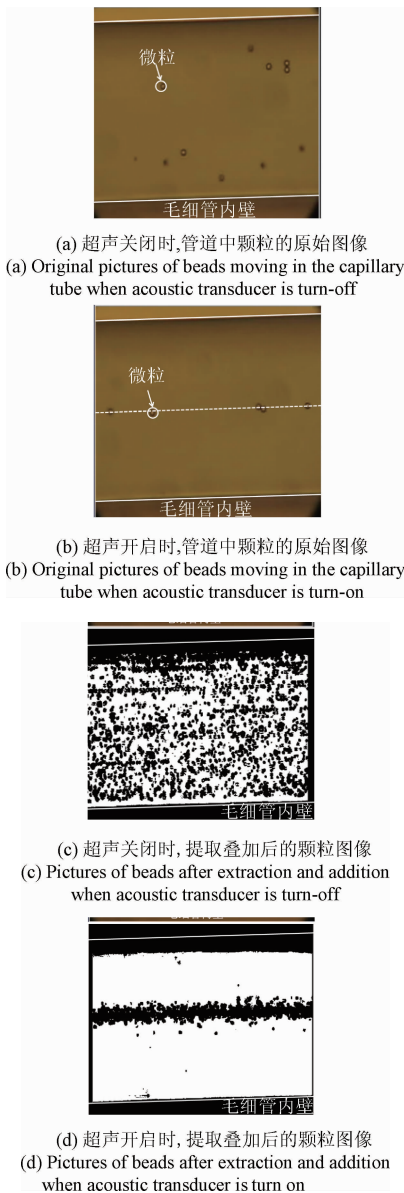


图 5 不同工作状态下运动颗粒的原始和处理后的图像

Fig. 5 Original and processed pictures of moving beads under different working conditions

超声开启时,将焦面调整到管道的不同高度位置,发现颗粒均在一条直线上,说明超声驻波可以将微粒聚焦在毛细管中央的平面上,为二维聚焦。同时压电片要工作在谐振工作点附近,频率偏移较大后,功率输出降低,且无聚焦现象。实验中还发现耦合层的贴合与匹配不当也可能导致无聚焦效果,其关键在于声阻抗匹配优化设计,保证管道内的能量耦合上。实验中也观察到超声开启后,从受力区立即流出的颗粒并未聚焦,而后续流出的颗粒才逐渐汇聚并稳定聚焦,说明聚焦需要一定的作用时间,压电片长度不应太短。

### 5.2 样品流速的影响

为了验证聚焦与样品流速的关系,在 11 V 的驱动电压下设计了样品流速为 8.2 ~ 32.8 mm/s 的不同组实验,测试两种大小微粒的聚焦情况,并利用图像分析软件得到每帧图片中其质心的坐标,统计 8 s 内流经的颗粒(数目大于 500)在管道截面内 y 方向的分布情况,并计算位置的平均值和平均绝对偏差,其实验结果如图 6 所示。

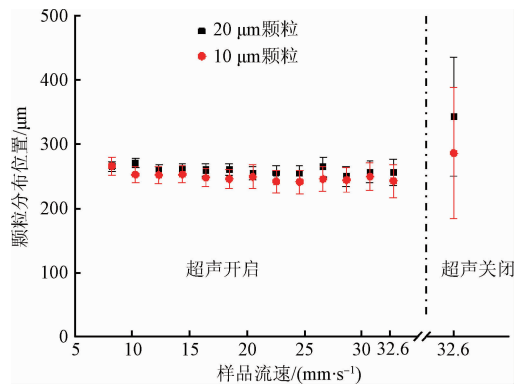


图 6 不同流速时颗粒位置分布的统计结果

Fig. 6 Statistical results of beads position distribution under different flow velocity

图 6 中数据点为颗粒的平均分布位置,误差棒为平均分布宽度。可知超声关闭时颗粒平均分布宽度约为 100  $\mu\text{m}$ ,且平均分布位置偏离管道中央(可能由进样硅橡胶管弯曲导致)。而超声开启后,两种大小的颗粒均被汇聚到管道中央 250  $\mu\text{m}$  位置附近,宽度收缩至 20  $\mu\text{m}$  内,且不同大小的颗粒结果比较一致,说明了颗粒在不同流速下均能比较好地聚焦到管道中央。不同流速下的颗粒分布宽度的具体数值如图 7 所示。

其中分布宽度为颗粒质心位置的标准偏差,图 7 表明流速越慢,颗粒聚焦紧密度越高,分布宽度越窄。同时直径大的颗粒粘滞加速度小,聚焦越快,在相同流速下的聚集紧密度略优于直径小的颗粒,与仿真结果一致。超声聚焦使得颗粒的平均分布宽度缩小至 7.2  $\mu\text{m}$ ,质心分布宽度缩减至无超声驱动时的 1/14。

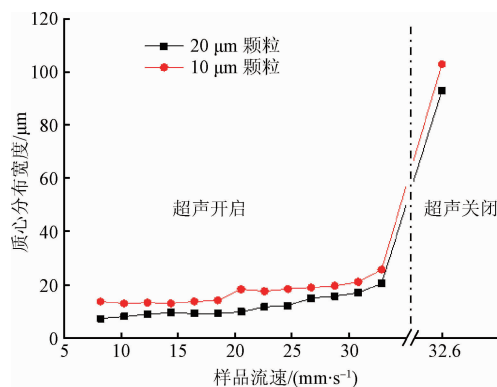


图7 不同流速时颗粒分布宽度的统计结果

Fig.7 Statistical results of beads distribution width under different flow velocity

### 5.3 施加电压的影响

由于超声强度大小正比于电压值,为了验证聚焦紧密度与超声强度的关系,在 $8.2 \text{ mm/s}$ 的样品流速下设计了驱动电压为 $2 \sim 15 \text{ V}$ 的多组对比实验,同样测试不同微粒的聚焦情况如图8所示。

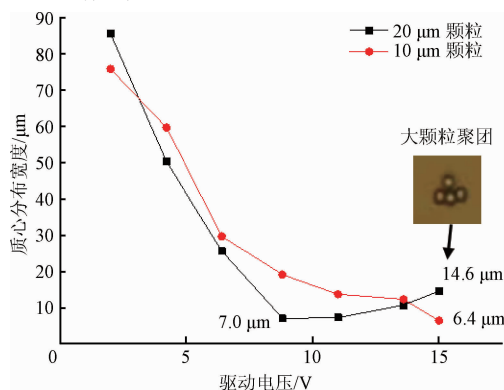


图8 不同驱动电压时颗粒分布宽度的统计结果

Fig.8 Statistical results of beads distribution width under different driving voltage

图8中 $10 \mu\text{m}$ 颗粒的分布宽度随着驱动电压的升高,声场力增大而逐渐减小。即紧密度随电压而加大,并最终收敛到 $6.4 \mu\text{m}$ 的分布宽度内。而大颗粒的分布宽度也随驱动电压的升高而更快速减少,至最小点 $7.0 \mu\text{m}$ 分布宽度,然后分布宽度略有抬升。分析视频发现电压过高时颗粒开始发生聚团,导致分布宽度加大,但质心的分布宽度小于颗粒的直径 $20 \mu\text{m}$ 。

分布宽度下降速度的差异,也验证了颗粒直径越大,粘滞加速度越小,聚焦越稳定,这些实验结果与仿真结论相一致。大颗粒在过高电压驱动下易聚团的问题,可以通过调整样品浓度,以及选择合适的驱动电压范围来解决。

## 6 应用说明

流式细胞术已广泛应用于生物医学基础研究和临床诊断领域,尤其在免疫学、血液学、肿瘤学等各学科得到广泛应用,其国内市场总体量约在20亿元,其中试剂使用成本占了多数。以行业巨头碧迪医疗器械公司鞘液为例,其费用约45元/L,仅供1h使用。因此本文提出的超声驻波进行无鞘液聚焦的方案,避免了流式细胞仪的鞘液使用带来巨大经济效益的同时,还实现了传统鞘液聚焦的性能,且分析后的样品还能被无稀释地回收再利用。

该超声聚焦设计也为流式细胞仪的研究提供了新思路,实现了小于 $20 \mu\text{m}$ 聚焦宽度的颗粒分布。经构建的实验平台验证,该无鞘液方案在 $0.5 \text{ mL/min}$ 以内的流速下,具备和传统鞘液技术相同的颗粒聚焦宽度,但避免了大量鞘液试剂的使用,具有很高经济价值。该无鞘液聚焦研究,不仅避免了复杂的管道结构<sup>[17]</sup>,缩减了仪器使用成本,还可实现对少于 $82 \mu\text{L}$ 样品的无稀释回收,在具备经济价值的同时,对提高单细胞光学检测的准确度也有着重要的理论意义。同时该超声聚焦技术还具备用于样品浓缩与纯化、细胞分离、免疫反应产物提取等其他场合的应用价值。

## 7 结论

超声除了传统的成像和损伤探测<sup>[18]</sup>等应用外,还能被聚焦形成驻波,进而操纵生物粒子,可无需鞘液就能将细胞等颗粒紧密地聚焦在检测点的轴线上。本文对驻波声场的建立,微粒在声场中的受力进行了理论分析,并仿真得到了细胞在不同参数下的运动轨迹。实验验证了 $1.462 \text{ MHz}$ 频率驱动的超声驻波,能将原本随机分布的颗粒聚焦至一个 $7.2 \mu\text{m}$ 的平面内,实现流式细胞仪的单细胞的照明与检测。且颗粒直径越大,流速越慢,驱动幅值越大,聚焦紧密度越高,实验结果与理论仿真一致。新仪器设计中还可以继续开展不同声学对比因子、粘滞系数、驱动频率、聚焦时间等更多参数的相关研究。

### 参考文献

- [1] HOWARD S. Practical flow cytometry [M]. New York: John Wiley & Sons, 2005.
- [2] MARTIN G, FREDERIC L, ULRIKE L. Microfluidic applications of magnetic particles for biological analysis and catalysis [J]. Chemical Reviews, 2010, 110(3): 1518-1563.
- [3] SCHRUM D P, CULBERTSON C T, JACOBSON S C, et al. Microchip flow cytometry using electrokinetic

- focusing [J]. *Analytical Chemistry*, 1999, 71 (19): 4173-4177.
- [4] KIM H J, MOON H-S, KWAK B S, et al. Microfluidic device to separate micro-beads with various fluorescence intensities [J]. *Sensors & Actuators B Chemical*, 2011, 160(1): 1536-1543.
- [5] 黄炜东, 张何, 徐涛, 等. 基于惯性微流原理的微流控芯片用于血浆分离 [J]. *科学通报*, 2011, 56(21): 1711-1719.  
HUANG W D, ZHANG H, XU T, et al. Separation of blood plasma by inertial focusing using microfluidic chips [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2011, 56(21): 1711-1719.
- [6] 耿翠肖. 基于超声驻波微纳粒子收集机理及实验研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.  
GENG C X. Mechanism and experiment research of micro and nano particles trapping by ultrasonic standing wave [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2013.
- [7] HENRIK B. Acoustofluidics 7: The acoustic radiation force on small particles [J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(6): 1014-1021.
- [8] GROSCHL M. Ultrasonic separation of suspended particles - part I: Fundamentals [J]. *Acta Acustica United with Acustica*, 1998, 84(84):432-447.
- [9] GODDARD G, MARTIN J C, GRAVES S W, et al. Ultrasonic particle-concentration for sheathless focusing of particles for analysis in a flow cytometer [J]. *Cytometry Part A*, 2006, 69A(2):66-74.
- [10] PETERSSON F, ABERG L, SWARD-NILSSON AM, et al. Free flow acoustophoresis: Microfluidic-based mode of particle and cell separation [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(14): 5117-5123.
- [11] 马大猷. 现代声学理论基础[M]. 北京: 科学出版社, 2004.  
MA D Y. Theoretical foundation of modern acoustics [M]. Beijing: Science Press, 2004.
- [12] LENSCHOF A, EVANDER M, LAURELL T, et al. Acoustofluidics 5: Building microfluidic acoustic resonators [J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(4): 684-695.
- [13] 张海澜. 理论声学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.  
ZHANG H L. Theoretical acoustics [M]. Beijing: Higher Education Press, 2007.
- [14] GOR' KOV L P. On the forces acting on a small particle in an acoustical field in an ideal fluid [J]. *Soviet Physics Doklady*, 1962, 6(1):773-775.
- [15] LAURELL T, PETERSSON F, NILSSON A. Chip integrated strategies for acoustic separation and manipulation of cells and particles [J]. *Chemical Society Reviews*, 2007, 36(3):492-506.
- [16] 张慧, 赵晓楠, 张雯, 等. 空气耦合式电容微超声换能器的设计与分析[J]. *仪器仪表学报*, 2016, 37(10): 2218-2225.  
ZHANG H, ZHAO X N, ZHANG W, et al. Design and analysis of air coupled capacitive micromachined ultrasonic transducers [J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2016, 37(10):2218-2225.
- [17] ELURU G, JULIUS L A N, GORTHI S S. Single-layer microfluidic device to realize hydrodynamic 3D flow focusing [J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(21): 4133-4141.
- [18] 黄刚. 基于超声透射时差法的金属棒缺陷检测研究[J]. *仪器仪表学报*, 2016, 37(4):818-826  
HUANG G. Research on defect detection system for material based on ultrasonic transmission method [J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2016, 37(4): 818-826.

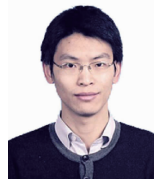
### 作者简介



程振, 2012年于华中科技大学获得学士学位, 现为清华大学博士研究生, 主要研究方向为流式细胞仪的设计。

E-mail: chengz12@mails.tsinghua.edu.cn

**Cheng Zhen** received his B. Sc. degree from Huazhong University of Science and Technology in 2012. He is currently a Ph. D. candidate in Tsinghua University. His main research interest is instrument design of flow cytometer.



徐友春(通讯作者), 2006年于清华大学获得学士学位, 现为清华大学助理研究员, 主要研究方向为用于健康监护和疾病诊断的生物芯片技术。

E-mail: xyc2012@mail.tsinghua.edu.cn

**Xu Youchun** (Corresponding author) received his B. Sc. degree from Tsinghua University in 2006. He is currently an assistant professor in Tsinghua University. His main research interest is biochip technology for health monitoring and disease diagnosis.