



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ 1-0051220
(51)^{2020.01} **B01L 3/00**; G01N 33/48; G01N 35/08; (13) **B**
G01N 27/02

(21) 1-2021-00160 (22) 13/01/2021
(45) 25/09/2025 450 (43) 25/03/2021 396A
(73) Trường Đại học Công nghệ (VN)
Nhà E3, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội
(72) Bùi Thanh Tùng (VN); Đỗ Quang Lộc (VN); Chử Đức Trình (VN).

(54) THIẾT BỊ VI LƯU ĐỀ TÁCH LỘC VÀ ĐỊNH LƯỢNG TẾ BÀO ĐÍCH VÀ QUY
TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG TẾ BÀO ĐÍCH

(21) 1-2021-00160

(57) Sáng chế đề cập đến thiết bị vi lưu để tách lọc và định lượng tế bào đích thông qua vi điện cực áp trên dòng chảy tế bào quy trình đếm định lượng tế bào đích từ hỗn hợp tế bào bằng thiết bị này trên cơ sở xác định trở kháng vi sai. Thiết bị theo sáng chế sử dụng các vi kênh với các cửa nạp mẫu sinh phẩm, nạp mẫu hạt nano từ tính, nạp dung dịch đệm độc lập và cơ cấu từ tính bố trí sát với vi kênh cho phép nạp, trộn, ủ và tách đặc hiệu tế bào đích được gắn hạt nano từ tính. Bằng cách bố trí cơ cấu từ tính sát với vi kênh, thiết bị cho phép làm giàu tập trung tế bào đích trong mẫu sinh phẩm cần xét nghiệm, cùng với cấu trúc trở kháng vi sai, thiết bị cho phép tăng độ nhạy trong việc định lượng tế bào đích. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến quy trình định lượng tế bào đích bằng thiết bị theo sáng chế.

Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế thuộc lĩnh vực y sinh và thiết bị phân tích, cụ thể là sáng chế đề cập đến thiết bị vi lưu để tách lọc định lượng tế bào đích thông qua phương pháp xác định trở kháng vi sai và quy trình định lượng tế bào đích bằng thiết bị này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc phát hiện và đếm số lượng tế bào đích trong mẫu xét nghiệm dung dịch lỏng đóng vai trò quan trọng và ứng dụng trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu và thiết bị khác nhau như thiết bị y sinh, thiết bị theo dõi và chăm sóc sức khỏe. Việc xác định định lượng được số lượng tế bào đích cho phép xác định nồng độ tế bào trong mẫu xét nghiệm, tạo điều kiện trong việc chẩn đoán bệnh sớm và theo dõi, tiên lượng bệnh để đưa ra phác đồ điều trị phù hợp. Với mong muốn đưa ra các thiết bị “phòng thí nghiệm tích hợp trên chip”, nhiều nhóm nghiên cứu đã thực hiện nghiên cứu và đề xuất nhiều thiết bị vi lưu khác nhau cho các ứng dụng cụ thể. Dưới góc nhìn kỹ thuật, các xét nghiệm tế bào đích sử dụng thiết bị vi lưu bao gồm các bước cơ bản: chuẩn bị mẫu, tách lọc tế bào đích, và phát hiện và định lượng số lượng tế bào đích trong mẫu xét nghiệm. Ở bước chuẩn bị mẫu đầu tiên, các mẫu xét nghiệm cần được tiền xử lý với các dung dịch đệm thích hợp (ví dụ như dung dịch ly giải sử dụng trong việc loại bỏ hồng cầu khỏi dung dịch tế bào máu). Ở bước tách lọc tế bào đích, các thiết bị hiện nay thường sử dụng nhiều phương pháp khác nhau để tách lọc được tế bào đích ra khỏi hỗn hợp mẫu xét nghiệm. Hiện nay có một số phương pháp được thực hiện như tương tác kháng nguyên kháng thể hoặc tương tác aptamer-receptor, phương pháp tách lọc dựa trên tính chất vật lý của các dòng tế bào đích bao gồm kích thước tế bào, mật độ tế bào, và các tính chất điện khác. Ở bước cuối cùng, hiện giờ cũng có một số phương pháp được sử dụng để thực hiện việc phát hiện tế bào đích đích sau khi đã được tách lọc như phương pháp hiển vi, phân tích tế bào dòng chảy, phân tích trở kháng tế bào, phương pháp quang lỏng hay RT-PCR.

Để định lượng, cụ thể là đếm số lượng tế bào đích trong mẫu xét nghiệm, đã có nhiều phương pháp khác nhau như: phương pháp pha loãng giới hạn (limiting-dilution culture) là phương pháp đầu tiên được sử dụng để xác định số lượng tế bào T, phương

pháp xét nghiệm ELISPOT và phương pháp phân loại tế bào đánh dấu huỳnh quang (Flourescence-Activated Cell Sorting: FACS) dựa theo nguyên lý phân tích tế bào trong dòng chảy (Flow cytometry). Trong nguyên lý FACS, các tế bào đích được đưa qua kênh vi lưu hẹp và được chiếu bởi chùm laser, các tín hiệu ánh sáng tán xạ được phát hiện dựa trên đặc trưng huỳnh quang của từng loại đánh dấu sinh học gắn trên tế bào. Số lượng tế bào đích chảy qua kênh vi lưu hẹp có thể được xác định thông qua việc phân tích các tín hiệu ghi nhận từ các cảm biến quang học.

Khả năng định tính và định lượng tế bào một cách nhanh chóng bằng cách sử dụng các kỹ thuật đếm dòng chảy (flow cytometry) là rất quan trọng để chẩn đoán một số bệnh truyền nhiễm và xác định một số tham số bất thường của mẫu xét nghiệm. Tuy nhiên các thiết bị đếm dòng chảy dựa trên phương pháp đánh dấu huỳnh quang vẫn có một số trở ngại nhất định do yêu cầu kỹ thuật viên chuẩn bị mẫu và vận hành thiết bị, phương pháp này có giá thành cao, không thích hợp sử dụng trong trường hợp nguồn lực hạn chế. Vì vậy, đã có nhiều nghiên cứu tập trung phát triển thiết bị nhằm giảm kích thước và thiết bị xét nghiệm nhằm giảm giá thành theo hướng hạn chế sử dụng các ống kính, thiết bị quang học đắt tiền, phát hiện không gắn nhãn (label free), đơn giản hóa cấu trúc, và chip vi lưu đã được phát triển để định lượng tế bào đích một cách đơn giản, nhanh chóng và hợp lý, đặc biệt thích hợp cho việc theo dõi giám sát tế bào đích trong các điều kiện cơ sở vật chất hạn chế.

Trên thực tế, các thiết bị, hệ thống quang học có nhược điểm là cồng kềnh và chi phí sản xuất cao. Một phương pháp khác có thể sử dụng để hạn chế nhược điểm này là phương pháp đếm các tế bào bằng tính chất điện. Một số nghiên cứu gần đây phát triển bộ đếm điện tử dựa trên nguyên lý đếm điện dung vì sai không tiếp xúc ứng dụng công nghệ vi cơ lỏng, có khả năng đếm được từng tế bào, rất thích hợp cho việc xác định số lượng tế bào miễn dịch.

Vì vậy, việc phát triển các thiết bị có kích thước nhỏ, có khả năng phát hiện các tế bào đích hiệu quả là yêu cầu cấp thiết hiện nay. Các thiết bị này cần phải có đầy đủ các chức năng từ sàng lọc tế bào, làm giàu tế bào, bẫy và bắt các tế bào đích, đo nồng độ tế bào, chuyển sang thông tin điện tử để xử lý trong các bộ vi điều khiển. Cùng với sự phát triển công nghệ vi chế tạo, công nghệ vi lưu đã đạt được nhiều thành tựu đáng kể trong những năm vừa qua. Các chip vi lưu tích hợp nhiều chức năng trên một chip đã được nghiên cứu phát triển.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, sáng chế đề cập đến thiết bị vi lưu để định tính và định lượng tế bào đích trên cơ sở đếm dòng chảy tế bào và quy trình định lượng tế bào đích cho phép tăng độ nhạy, độ đặc hiệu để sử dụng trong các ứng dụng yêu cầu xác định định lượng tế bào đích.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến thiết bị vi lưu để tách lọc và định lượng tế bào đích cụ thể, trong đó thiết bị này bao gồm phần đế được ghép với khối chứa cấu trúc vi kênh, vi điện cực, hệ dây dẫn và cơ cấu từ tính, trong đó:

- phần đế được làm bằng thủy tinh có cấu trúc hình chữ nhật phẳng để đỡ toàn bộ thiết bị vi lỏng;

- khối chứa cấu trúc vi kênh có cấu trúc hình khối được làm từ vật liệu polydimethylsiloxan (PDMS), trên một mặt của khối được khắc cấu trúc vi kênh bao gồm buồng trộn vi lưu và ủ tế bào cấu trúc dạng kênh dẫn để tăng cường phối trộn mẫu, một đầu của buồng trộn vi lưu và ủ tế bào này được nối với ít nhất hai cửa nạp mẫu, một đầu được nối với kênh của cấu trúc tách lọc từ tính đến bộ tập trung dòng chảy để pha dòng chứa tế bào sau khi tách từ kênh chính của cấu trúc tách lọc từ tính với dung dịch đệm được nạp từ cửa nạp dung dịch đệm đến kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến tới cửa thoát, ở cấu trúc tách lọc từ tính có bố trí kênh phụ nối với cửa xả mẫu để xả tế bào không đặc hiệu, các cửa nạp dung dịch đệm, cửa nạp mẫu, cửa xả mẫu, cửa thoát được bố trí xuyên qua khối chứa cấu trúc vi kênh đến mặt đối diện và gắn với các đầu nối để kết nối với bộ phận nạp mẫu, bộ phận nạp dung dịch đệm, bộ phận thu mẫu;

- cơ cấu từ tính nằm trong khối chứa cấu trúc vi kênh và được bố trí sát với cấu trúc tách lọc từ tính ở phía đối diện với kênh phụ để cấp từ tính cho dòng mẫu chảy qua cấu trúc tách lọc từ tính nhằm hướng đặc hiệu tế bào đích được gắn hạt nano từ tính di chuyển theo kênh chính của cấu trúc tách lọc từ tính và hướng tế bào khác di chuyển về kênh phụ thoát ra cửa xả mẫu;

- vi điện cực được bố trí trên phần đế và áp trên kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến tiếp xúc với dòng chảy, được làm từ vàng hoặc indium thiếc oxit (ITO) có cấu trúc dạng hình chữ nhật, trên vi điện cực này bao gồm một điện cực trung tâm có dạng hình chữ nhật nằm ở giữa, tiếp đó là các điện cực cảm biến là các điện cực hình chữ

nhật được bố trí đối xứng nhau qua điện cực trung tâm, đầu của các điện cực này được gắn lần lượt với hệ dây dẫn kết nối để độc lập kết nối với thiết bị ngoại vi; và

- hệ dây dẫn được bố trí sát phần đế thủy tinh, trong đó hệ dây dẫn này độc lập kết nối các đầu điện cực trung tâm, điện cực cảm biến để kết nối với thiết bị ngoại vi;

khi được lắp ghép, hệ dây dẫn nối với các điện cực trên vi điện cực được đặt sát với phần đế, tiếp đó phần đế này được ghép với cấu trúc vi kênh sao cho mặt khắc trên cấu trúc vi kênh được ép sát với phần đế và vi điện cực được bố trí áp sát và giữa kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến, tạo cấu trúc vi kênh kín với các cửa nạp dung dịch đệm, cửa nạp mẫu, cửa thoát và cửa xả mẫu thông nhau được gắn với các đầu nối để kết nối với bộ phận nạp mẫu, bộ phận nạp dung dịch đệm, bộ phận thu mẫu tạo thiết bị vi lỏng hoàn chỉnh;

theo đó, khi hoạt động, mẫu sinh phẩm và mẫu hạt nano từ tính được nạp vào thiết bị qua cửa nạp một cách độc lập và đi vào buồng trộn vi lưu và ủ tế bào có cấu trúc dạng kênh để phối trộn mẫu sinh phẩm và hạt nano từ tính, sau khi phối trộn và ủ, mẫu được chuyển đến cấu trúc tách lọc từ tính và các tế bào không gắn hạt từ tính sẽ di chuyển theo kênh phụ của cấu trúc tách lọc từ tính và thoát ra ngoài qua cửa xả mẫu, tế bào đích cụ thể được gắn hạt nano từ tính dưới tác dụng của cơ cấu từ tính sẽ di chuyển theo kênh chính của cấu trúc tách lọc từ tính đến bộ tập trung dòng chảy, tại đây mẫu được trộn với dung dịch đệm được nạp từ cửa nạp và vào kênh giữa của bộ tập trung dòng chảy nhằm tách từng dòng chảy đơn tế bào di chuyển trong kênh dẫn vi lưu đến kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến, điện cực trung tâm được cấp điện và đo trở kháng vi sai ứng với các điện cực cảm biến để định lượng sự xuất hiện của tế bào đích cụ thể trong kênh dẫn vi lưu dựa trên sự thay đổi vi dòng của dòng chảy, các tế bào này thoát ra khỏi thiết bị qua cửa thoát ra ngoài.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó số lượng cửa nạp mẫu có từ 2 đến 10 cửa được bố trí độc lập để có thể nạp nhiều mẫu sinh phẩm, mẫu hạt nano từ tính vào buồng trộn vi lưu và ủ tế bào.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó buồng trộn vi lưu và ủ tế bào có cấu trúc kênh được kết hợp từ nhiều kênh dẫn nối với nhiều cửa nạp mẫu và có kích thước kênh cao x rộng khoảng 50x50 μm để có thể trộn đều và ủ mẫu sinh phẩm và mẫu hạt nano từ tính để phản ứng gắn kết xảy ra.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó cấu trúc tách lọc từ tính có kênh phụ được bố trí lệch góc so với nhánh chính từ 30 đến 45 độ theo chiều dòng chảy và mỗi kênh có kích thước cao x rộng khoảng 50x50 μm .

Theo một phương án ưu tiên, trong đó cấu trúc tập trung dòng chảy được bố trí hai nhánh để dẫn dung dịch đệm từ cửa nạp dung dịch đệm hợp lưu ở hai phía đối diện trên kênh của cấu trúc tách lọc từ tính để pha loãng mẫu mà không ảnh hưởng đến hướng di chuyển mẫu trong kênh chính.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó cơ cấu từ tính sử dụng nam châm vĩnh cửu hoặc nam châm điện và được đặt cách cấu trúc tách lọc từ tính một khoảng từ 100 đến 200 μm đối diện với nhánh phụ của cấu trúc tách lọc từ tính.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó vi điện cực trong kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến có chiều dày khoảng 1 μm .

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kích thước độ rộng của mỗi điện cực trong vi điện cực khoảng 30 μm , khoảng cách giữa các điện cực khoảng 30 μm .

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình định lượng tế bào đích cụ thể bằng thiết bị vi lưu theo sáng chế, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị thiết bị vi lưu, trong đó thiết bị vi lưu theo sáng chế được bơm dung dịch rửa và sau đó bơm nước cất để rửa vi kênh, các cực của hệ dây dẫn được nối với thiết bị đo ngoại vi, hạt nano từ tính được ủ để gắn với kháng thể đặc hiệu với dòng tế bào đích;

b) cố định hạt nano từ tính gắn kháng thể đặc hiệu lên tế bào đích bằng cách bơm đồng thời dung dịch chứa hạt nano từ tính đã được gắn với kháng thể đặc hiệu với dòng tế bào đích vào cửa nạp mẫu thứ nhất và mẫu sinh phẩm vào cửa nạp mẫu thứ hai theo nồng độ định trước vào buồng trộn vi lưu và ủ tế bào và tiến hành ủ trong khoảng 60 phút hạt nano từ tính gắn kháng thể đặc hiệu được gắn cố định lên bề mặt tế bào đích;

c) tách lọc tế bào đích bằng cách bơm liên tục dung dịch PBS vào cửa nạp mẫu với tốc độ 10 μL /giây để đẩy dung dịch trong buồng trộn vi lưu và ủ tế bào chứa tế bào được gắn hạt nano từ tính đến cấu trúc tách lọc, lực từ của cơ cấu từ tính sẽ tác động lên các tế bào đích được gắn hạt nano từ tính và lái tế bào dịch chuyển theo kênh chính

của cấu trúc tách lọc từ tính đến tới cấu trúc tập trung dòng chảy, trong khi tế bào được gắn hạt nano từ tính sẽ di chuyển theo kênh phụ và thoát ra ngoài theo cửa xả mẫu của thiết bị;

d) pha loãng mẫu bằng cách bơm bổ sung dung dịch đệm vào cửa nạp dung dịch đệm để dung dịch đệm này hợp lưu với mẫu chứa tế bào đích gắn hạt nano từ tính tại cấu trúc tập trung dòng chảy của thiết bị, duy trì tốc độ di chuyển của mẫu qua kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến với tốc độ $10 \mu\text{L}/\text{giây}$; và

e) định lượng tế bào đích gắn hạt nano từ tính bằng cách cho dòng mẫu di chuyển qua khu vực cảm biến và đo trở kháng vi sai giữa vi điện cực trung tâm và 2 vi điện cực cảm biến, từ đó định lượng được tế bào đích di chuyển qua khu vực cảm biến căn cứ vào tín hiệu trở kháng vi sai của vi điện cực.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó tần số khảo sát trở kháng giữa hai điện cực cảm biến và điện cực trung tâm nằm trong khoảng 10 KHz đến 1 MHz.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó biên độ tín hiệu khảo sát trở kháng giữa hai điện cực cảm biến và điện cực trung tâm là nhỏ hơn 10 V.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó tín hiệu chênh lệch trở kháng giữa hai cặp điện cực bao gồm điện cực trung tâm với hai điện cực cảm biến được xác định thông qua các mạch khuếch đại vi sai và khuếch đại ngoại vi để đếm lượng tế bào đích gắn hạt nano từ tính di chuyển qua tại khu vực cảm biến.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó biên độ tín hiệu khảo sát trở kháng vi sai giữa hai cặp điện cực nhỏ hơn 10 V.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó tần số tín hiệu khảo sát trở kháng vi sai giữa hai cặp điện cực dưới 1 MHz.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình vẽ mô tả thiết bị vi lưu để tách lọc và định lượng tế bào đích, (A) mô tả sơ đồ lắp ghép các thành phần của thiết bị vi lỏng, (B) mô tả sơ đồ của cấu trúc vi kênh trong khối chứa cấu trúc vi kênh; (C) mô tả sơ đồ cấu trúc tách lọc từ tính của thiết bị vi lưu.

Hình 2 là hình vẽ mô tả sơ đồ của vi điện cực, trong đó có bố trí điện cực trung tâm ở chính giữa, các điện cực cảm thụ được bố trí đối xứng nhau quanh điện cực trung tâm.

Hình 3 là hình vẽ mô tả quy trình khắc cấu trúc vi kênh lên khối chứa cấu trúc vi kênh bằng các quy trình bốc bay, ăn mòn, tạo lớp cách ly bề mặt và đóng gói để thu được cấu trúc vi kênh của thiết bị theo sáng chế.

Hình 4 minh họa quy trình chuẩn bị hạt nano từ tính gắn kháng thể và sơ đồ nguyên lý quá trình gắn hạt nano này lên tế bào và nguyên tắc làm giàu tế bào đích trong thiết bị vi lưu theo sáng chế.

Hình 5 minh họa hình ảnh kênh hiển vi cấu trúc kênh dẫn chính vi lưu qua khu vực cảm biến sử dụng cấu trúc vi điện cực vi sai được chế tạo bằng vàng

Hình 6 thể hiện ví dụ về kết quả tín hiệu lỗi ra tương ứng với một tế bào T CD4+ di chuyển qua cảm biến ghi nhận trên LabVIEW trong quá trình thử nghiệm cấu trúc cảm biến trở kháng vi sai trong điều kiện thí nghiệm tế bào T CD4+ được ủ với hạt nano từ tính gắn kháng thể kháng-CD4 trong 30 phút và giữ trong môi trường dung dịch RPMI

Hình 7 thể hiện ví dụ về kết quả tín hiệu lỗi ra ghi nhận trên phần mềm LabVIEW trong quá trình thử nghiệm cấu trúc cảm biến trở kháng vi sai trong điều kiện thử nghiệm tế bào T CD4+ giữ trong môi trường dung dịch RPMI và được bơm trực tiếp vào kênh vi dẫn

Hình 8 cho thấy dạng tín hiệu điện áp đầu ra tương ứng với trường hợp thử nghiệm cấp dung dịch chứa tế bào A549 đi qua khu vực cảm biến trong dung dịch : (A) Dung dịch Sucrose 8.6%, (B) Dung dịch PBS 1X.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện có viện dẫn đến hình vẽ, tuy nhiên, các phương án này chỉ là các ví dụ thực hiện cụ thể nhằm mục đích bộc lộ các phương án thực hiện sáng chế mà không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Hình 1 mô tả cấu trúc của thiết bị vi lưu để tách lọc và định lượng tế bào đích thông qua phương pháp xác định trở kháng vi sai theo một phương án cụ thể của sáng

ché. Theo Hình 1A mô tả một phương án của thiết bị vi lưu theo sáng chế bao gồm phần đế 114 được ghép với khối chứa cấu trúc vi kênh 111, vi điện cực 112, hệ dây dẫn 113 và cấu trúc tách lọc từ tính 104. Hình 1B mô tả sơ đồ cấu trúc vi kênh trong khối chứa cấu trúc vi kênh. Hình 1C mô tả sơ đồ cấu trúc tách lọc từ tính của thiết bị vi lưu theo sáng chế.

Phần đế 114 được làm bằng thủy tinh có cấu trúc hình chữ nhật phẳng để đỡ toàn bộ thiết bị vi lỏng.

Khối chứa cấu trúc vi kênh 111 có cấu trúc hình khối được làm từ vật liệu polydimethylsiloxan (PDMS), trên một mặt của khối được khắc cấu trúc vi kênh bao gồm buồng trộn vi lưu và ủ tế bào 103 cấu trúc dạng kênh dẫn để tăng cường phối trộn mẫu. Một đầu của buồng trộn vi lưu và ủ tế bào 103 này được nối với ít nhất hai cửa nạp mẫu 102. Một đầu còn lại của buồng trộn vi lưu và ủ tế bào 103 này được nối với kênh của cấu trúc tách lọc từ tính 104 đến cấu trúc tập trung dòng chảy 106. Theo một phương án ưu tiên, buồng trộn vi lưu và ủ tế bào 103 có cấu trúc kênh được kết hợp từ nhiều cửa nạp mẫu 102 để trộn đều vật liệu cấp từ các cửa nạp mẫu 102 này.

Cấu trúc tập trung dòng chảy 106 là cơ cấu hợp lưu để pha dòng chứa tế bào sau khi tách từ kênh chính của cấu trúc tách lọc từ tính 104 với dung dịch đệm được nạp từ cửa nạp dung dịch đệm 101 nhằm mục đích tạo thành cấu hình dòng chảy đơn tế bào cho phép cấu trúc cảm biến trở kháng phát hiện đơn tế bào để đếm số lượng tế bào di chuyển qua khu vực cảm biến 107. Tại đây tế bào được pha loãng bởi dung dịch đệm và được chuyển đến kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến 107 tới cửa thoát 108 và thoát ra ngoài.

Tại cấu trúc tách lọc từ tính 104 có bố trí kênh phụ nối với cửa xả mẫu 105 để xả tế bào không đặc hiệu. Các cửa nạp dung dịch đệm 101, cửa nạp mẫu 102, cửa xả mẫu 105, cửa thoát 108 được bố trí xuyên qua khối chứa cấu trúc vi kênh 111 đến mặt đối diện và gắn với các đầu nối 109 để kết nối với bộ phận nạp mẫu, bộ phận nạp dung dịch đệm, bộ phận thu mẫu. Tốt hơn là các đầu nối 109 này có dạng chữ L để thuận lợi cho việc ghép nối với thiết bị ngoại vi. Theo đó, khi mẫu hoặc dung dịch rửa, nước hoặc dung dịch đệm được dẫn qua đầu nối 109 của cửa nạp dung dịch đệm 101 hoặc cửa nạp mẫu 102 vào buồng trộn vi lưu và ủ tế bào 103 để trộn theo nồng độ định trước sẽ đi vào khoang làm giàu, được tách tại cấu trúc tách lọc từ tính 104 và tập

trung tại cấu trúc tập trung dòng chảy 106 và sau đó có thể được dẫn qua cửa thoát 108 ra ngoài.

Số lượng cửa nạp mẫu 102 tốt nhất là có từ 2 đến 10 cửa nạp và kênh dẫn được bố trí độc lập để có thể nạp nhiều mẫu sinh phẩm, mẫu hạt nano từ tính vào buồng trộn vi lưu và ủ tế bào 103. Theo các phương án ưu tiên, số lượng cửa nạp mẫu này là 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 cửa. Số lượng cửa nạp và kênh dẫn này có thể được bố trí theo nhiều cách khác nhau và tùy vào số lượng mẫu, dung môi, chất đệm được cấp cho thiết bị để có thể tăng hoặc giảm số lượng cửa nạp và kênh dẫn này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hoàn toàn hiểu rằng, với số lượng cửa nạp và kênh dẫn khác nhau thích hợp mục đích để thuận lợi và tự động hóa quá trình phân tích và hoàn toàn có thể bố trí các cửa nạp và kênh dẫn theo mục đích phân tích mẫu.

Buồng trộn vi lưu và ủ tế bào 103 có cấu trúc kênh được kết hợp từ nhiều kênh dẫn nối với nhiều cửa nạp mẫu 102 (trên hình gồm 2 cửa nạp mẫu 102). Buồng trộn vi lưu có kích thước kênh cao x rộng khoảng $50 \times 50 \mu\text{m}$ để có thể trộn đều và ủ mẫu sinh phẩm và mẫu hạt nano từ tính để phản ứng gắn kết xảy ra.

Cơ cấu từ tính 110 nằm trong khối chứa cấu trúc vi kênh 111. Cơ cấu này được bố trí sát với cấu trúc tách lọc từ tính 104 ở phía đối diện với kênh phụ. Theo đó, cơ cấu này không tiếp xúc với dòng chảy, nhưng cấp từ tính cho dòng mẫu chảy qua cấu trúc tách lọc từ tính 104 nhằm hướng đặc hiệu tế bào đích được gắn hạt nano từ tính di chuyển theo kênh chính của cấu trúc tách lọc từ tính 104. Các tế bào không được gắn hạt nano từ tính được định hướng di chuyển về kênh phụ thoát ra cửa xả mẫu 105.

Cơ cấu từ tính 110 tốt hơn là sử dụng nam châm vĩnh cửu hoặc nam châm điện và được đặt cách cấu trúc tách lọc từ tính 104 một khoảng từ 100 đến $200 \mu\text{m}$ đối diện với nhánh phụ để của cấu trúc tách lọc từ tính 104.

Cấu trúc tách lọc từ tính 104 có kênh phụ được bố trí lệch góc so với kênh chính từ 30 đến 45 độ theo chiều dòng chảy và có mỗi kênh có kích thước cao x rộng khoảng $50 \times 50 \mu\text{m}$ (Hình 1C).

Cấu trúc tập trung dòng chảy 106 được bố trí hai nhánh để dẫn dung dịch đệm từ cửa nạp dung dịch đệm 101 hợp lưu ở hai phía đối diện trên kênh của cấu trúc tách lọc từ tính 104 để pha loãng mẫu mà không ảnh hưởng đến hướng di chuyển mẫu trong kênh chính và cho phép tạo thành cấu hình dòng chảy đơn tế bào cho phép cấu trúc

cảm biến trở kháng phát hiện đơn tế bào để đếm số lượng tế bào di chuyển qua khu vực cảm biến 107.

Vi điện cực 112 được bố trí trên phần đế 114. Vi điện cực này được áp trên kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến 107 tiếp xúc với dòng chảy. Vi điện cực này được làm từ vàng hoặc indium thiếc oxit (ITO) có cấu trúc dạng hình chữ nhật. Trên vi điện cực 112 này bao gồm một điện cực trung tâm 115 có dạng hình chữ nhật nằm ở giữa. Tiếp đó là các điện cực cảm biến 116 là các điện cực hình chữ nhật được bố trí đối xứng nhau qua điện cực trung tâm 115. Đầu của các điện cực này được gắn lần lượt với hệ dây dẫn 113 để độc lập kết nối với thiết bị ngoại vi.

Vi điện cực 112 trong kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến tốt nhất là loại vi điện cực có chiều dày khoảng 1 μm . Độ rộng của mỗi điện cực trong vi điện cực 112 khoảng 30 μm . Khoảng cách giữa các điện cực khoảng 30 μm .

Hệ dây dẫn 113 được bố trí sát phần đế 114, trong đó hệ dây dẫn này độc lập kết nối các đầu điện cực trung tâm 115, điện cực cảm biến 116 để kết nối với thiết bị ngoại vi. Hệ dây dẫn này có trách nhiệm chuyển tín hiệu trở kháng từ điện cực đến thiết bị ngoại vi để thiết lập và ghi tín hiệu nhằm đưa ra số liệu liên quan đến quá trình định tính, định lượng mẫu.

Khi được lắp ghép, hệ dây dẫn 113 được nối với các điện cực trên vi điện cực 112 và được đặt sát với phần đế 114. Tiếp đó phần đế 114 này được ghép với cấu trúc vi kênh 111 sao cho mặt khắc trên cấu trúc vi kênh 111 được ép sát với phần đế 114. Vi điện cực 112 được bố trí áp sát và giữa kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến 107. Với các ghép này sẽ tạo cấu trúc vi kênh kín với các cửa nạp dung dịch đệm 101, cửa nạp mẫu 102, cửa thoát 108 và cửa xả mẫu 105 thông nhau. Các cửa nạp dung dịch đệm 101, cửa nạp mẫu 102, cửa thoát 108 và cửa xả mẫu 105 này được gắn với các đầu nối 109 để kết nối với bộ phận nạp mẫu, bộ phận nạp dung dịch đệm, bộ phận thu mẫu tương ứng để tạo ra thiết bị vi lỏng hoàn chỉnh.

Khi hoạt động, mẫu sinh phẩm và mẫu hạt nano từ tính được độc lập nạp vào thiết bị qua cửa nạp mẫu 102. Các mẫu này đi vào buồng trộn vi lưu và ủ tế bào 103 có cấu trúc dạng kênh. Tại đây mẫu sinh phẩm và hạt nano từ tính được phối trộn và ủ. Sau khi phối trộn và ủ, mẫu được chuyển đến cấu trúc tách lọc từ tính 104. Tại cấu trúc tách lọc từ tính, các tế bào không gắn hạt từ tính sẽ chuyển theo kênh phụ của cấu

trúc tách lọc từ tính 104 và thoát ra ngoài qua cửa xả mẫu 105. Tế bào đích được gắn hạt nano từ tính dưới tác dụng của cơ cấu từ tính 110 sẽ di chuyển theo kênh chính của cấu trúc tách lọc từ tính 104 đến cấu trúc tập trung dòng chảy 106. Tại cấu trúc tập trung dòng chảy 106 này mẫu được trộn với dung dịch đệm được nạp từ cửa nạp dung dịch đệm 101 và vào kênh giữa của cấu trúc tập trung dòng chảy 106 để tách từng dòng chảy đơn tế bào di chuyển trong kênh dẫn vi lưu đến kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến 107. Điện cực trung tâm 115 được cấp điện và đo trở kháng vi sai ứng với các điện cực cảm biến 116 để định lượng sự xuất hiện của tế bào đích trong kênh dẫn vi lưu dựa trên sự thay đổi vi dòng của dòng chảy. Sau khi đo, các tế bào được thoát ra khỏi thiết bị qua cửa thoát 108 ra ngoài. Tín hiệu được truyền đến bộ phận ngoại vi để xử lý và đưa ra kết quả.

Hình 2 thể hiện cấu trúc chi tiết của vi điện cực 112, vi điện cực 112 được làm từ vàng hoặc indium thiếc oxit (ITO) có cấu trúc dạng 3 điện cực đồng phẳng đặt xen kẽ nhau. Theo một phương án ưu tiên, vi điện cực 112 trong kênh dẫn chính để đếm tế bào có chiều dày khoảng 1 μm . Theo một phương án ưu tiên, vi điện cực này được chế tạo từ vàng, theo một phương án ưu tiên khác, vi điện cực này được chế tạo từ indium thiếc oxit (ITO). Trên vi điện cực 112 này bao gồm điện cực trung tâm 115 có dạng hình chữ nhật nằm ở tâm của cấu trúc vi điện cực 112. Điện cực trung tâm 115 là điện cực được sử dụng để cung cấp tín hiệu điện thế kích thích vào khu vực cảm biến để đo tín hiệu điện đo độ chênh lệch trở kháng lấy trên các điện cực cảm biến 116. Các điện cực cảm biến 116 có hình dạng chữ nhật và cũng được bố trí đối xứng qua điện cực trung tâm 115. Bằng cách bố trí này, khi tế bào di chuyển qua khu vực vi điện cực 112, việc so sánh trở kháng giữa điện cực trung tâm 115 và các điện cực cảm biến 116 sẽ xác định được tế bào đích di chuyển trong kênh dẫn chính để đếm tế bào thông qua việc xác định độ chênh lệch trở kháng.

Hình 3 là hình vẽ mô tả quy trình khắc cấu trúc vi kênh lên khối chứa cấu trúc vi kênh bằng các quy trình bốc bay, ăn mòn, tạo lớp cách ly bề mặt để thu được cấu trúc vi kênh của thiết bị theo sáng chế như mô tả trong Ví dụ 1. Trong đó PDMS được trộn và đổ lên khuôn, sau khi gia nhiệt ở 70°C trong 6 giờ, tiến hành tách và đục lỗ để tạo tấm chứa cấu trúc vi kênh. Phần đế thủy tinh được tiến hành phủ khuôn và bốc bay, ăn mòn để tạo ra hệ dây dẫn và các điện cực. Tiếp đó tiến hành kích hoạt bề mặt PDMS và

bề mặt để thủy tinh bằng O_2 plasma và đóng gói sản phẩm thu được thiết bị vi lỏng theo sáng chế có các vi kênh được khắc.

Hình 4 minh họa quy trình chuẩn bị hạt nano từ tính gắn kháng thể và sơ đồ nguyên lý quá trình gắn hạt nano này lên tế bào và nguyên tắc làm giàu tế bào đích trong thiết bị vi lưu theo sáng chế. Các mẫu hạt nano đa chức năng từ tính được ủ với kháng thể đặc hiệu với dòng tế bào đích phía bên ngoài chip. Sau khi ủ, mẫu dung dịch sẽ chứa các hạt nano từ tính đã được cố định kháng thể trên bề mặt. Tiếp đó, mẫu xét nghiệm chứa các tế bào đích và tế bào không phải tế bào đích được đưa vào cấu trúc chip vi lưu theo đề xuất của sáng chế, hỗn hợp hai dung dịch được trộn một cách thụ động sử dụng cấu trúc trộn vi lưu và được đưa đến buồng ủ để ủ tế bào với dung dịch chứa hạt nano đa chức năng đã được cố định trên bề mặt tế bào. Tiếp đó, các tế bào không phải tế bào đích được tách ra khỏi hỗn dịch thông qua phương pháp tách lọc tế bào từ tính sử dụng cơ cấu từ tính, cụ thể là nam châm vĩnh cửu hoặc nam châm điện. Hỗn dịch ra khỏi cấu trúc tách lọc tế bào từ tính bao gồm các tế bào đích đã được cố định các hạt nano đa chức năng trên bề mặt màng tế bào. Lượng tế bào đích này được đưa qua kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến để thực hiện phát hiện và đếm số lượng tế bào có trong mẫu trước khi đi qua cửa ra chip vi lưu ra ngoài.

Mạch xử lý tín hiệu cảm tay được thiết kế và chế tạo để điều chỉnh tín hiệu điện áp được lấy từ hai điện cực thu. Hệ thống vi điện cực tích hợp trong chip vi lưu được kết nối với mạch xử lý ngoại vi. Một tín hiệu điện áp hình sin được cấp vào khu vực điện cực trung tâm. Các tín hiệu cảm biến từ hai điện cực thu nhận được thu thập và truyền đến mạch xử lý để phát hiện sự thay đổi trở kháng giữa điện cực kích thích và điện cực thu tương ứng. Mạch xử lý tín hiệu được thiết kế bao gồm bộ khuếch đại dụng cụ tốc độ cao và tầng khuếch đại lock in với việc sử dụng chip IC điều chế/giải điều chế cân bằng chính xác cao trong cấu hình bộ khuếch đại lock-in. Tín hiệu hình sin kích thích cung cấp cho điện cực trung tâm được sử dụng làm tín hiệu tham chiếu cho quá trình khuếch đại lock-in để loại bỏ nhiễu đồng pha (common noise) và tín hiệu nền không mong muốn. Tín hiệu thu nhận được sau quá trình khuếch đại lock in được xử lý bởi bộ lọc thông thấp thụ động và bộ đệm điện áp trước khi chuyển sang bộ ghi dữ liệu ngoài thông qua đầu nối SMA.

Hình 5 minh họa hình ảnh kênh hiển vi cấu trúc kênh dẫn chính vi lưu qua khu vực cảm biến sử dụng cấu trúc vi điện cực vi sai được chế tạo bằng vàng. Dựa trên các

qui trình vi chế tạo đã được thực hiện trong Ví dụ 1, cấu trúc điện cực cảm biến, cấu trúc kênh dẫn vi lỏng đã được thực hiện chế tạo thành công. Nhờ qui trình vi chế tạo, các kích thước của cấu trúc chế tạo có thể đạt kích thước xuống khoảng 30 μm mà vẫn đảm bảo cấu trúc và hình dạng của cảm biến. Như kết quả thu nhận thông qua hình ảnh hiển vi cấu trúc kênh dẫn tích hợp điện cực cảm biến trở kháng, có thể thấy rằng cấu trúc vi điện cực đã được đóng gói và tích hợp thành công với cấu trúc kênh dẫn vi lỏng với độ chính xác cao, đảm bảo được độ tin cậy trong các phép đo tế bào và phép đo trở kháng phía sau. Cấu trúc kênh dẫn được tích hợp trên nền đế thủy tinh bằng phương pháp plasma bề mặt giúp đảm bảo tính vững chắc và độ kết dính giữa đế PDMS chứa kênh dẫn và đế thủy tinh chứa cấu trúc vi điện cực của cảm biến trở kháng.

Hình 6 thể hiện kết quả thử nghiệm cấu trúc cảm biến trở kháng vi sai trong điều kiện thí nghiệm tế bào T CD4⁺ được ủ với hạt nano đa chức năng gắn kháng thể kháng CD4 trong 30 phút và giữ trong môi trường dung dịch RPMI. Hình 7 thể hiện kết quả thử nghiệm cấu trúc cảm biến trở kháng vi sai trong điều kiện thí nghiệm tế bào T CD4⁺ giữ trong môi trường dung dịch RPMI và bơm trực tiếp vào kênh dẫn vi lưu. Kết quả cho thấy khả năng phát hiện tế bào dựa trên phương pháp trở kháng vi sai khi các tế bào T CD4⁺ di chuyển qua khu vực cảm biến. Bằng cách sử dụng mạch điện tích hợp bộ khuếch đại dụng cụ và bộ khuếch đại lock-in có khả năng phát hiện tín hiệu nhỏ trong nền nhiễu lớn kết hợp cùng với kỹ thuật trở kháng vi sai, mạch điện cho phép cung cấp giá trị điện thế lõi ra phụ thuộc vào độ chênh lệch trở kháng giữa điện cực kích thích và hai điện cực cảm biến. Kết quả cho thấy dạng điện áp lõi ra tương ứng với vị trí tế bào khi di chuyển qua khu vực cảm biến ở dạng một đỉnh lưỡng cực, được gây ra bởi sự chuyển động của tế bào di chuyển qua lần lượt hai cặp điện cực cảm biến. Đỉnh cực phân cực âm và phân cực dương xảy ra khi tế bào đi qua tương ứng cặp điện cực thứ nhất và thứ hai. Khi tế bào di chuyển trong kênh dẫn chính qua khu vực điện cực cảm biến, trở kháng giữa hai cặp điện cực cảm biến được khuếch đại vi sai bằng cách sử dụng bộ khuếch đại dụng cụ.

Hình 8 cho thấy dạng tín hiệu điện áp đầu ra tương ứng với trường hợp thử nghiệm cấp dung dịch chứa tế bào A549 đi qua khu vực cảm biến theo qui trình trong Ví dụ 3. Dữ liệu đo được cũng cho thấy rằng độ nhạy của hệ thống cảm biến được đề xuất giảm khi tăng độ dẫn điện của dung dịch nền. Như được thể hiện trong Hình 8, sự

thay đổi điện áp tối đa là khoảng 180 mV đối với dung dịch Sucrose 8.6%. So với trường hợp tế bào được chứa trong dung dịch Sucrose 8.6%, hiệu suất phát hiện tế bào trong dung dịch PBS 1x cung cấp cường độ tín hiệu tăng thay đổi thấp hơn (khoảng 60 mV).

Theo khía cạnh thứ hai sáng chế đề cập đến quy trình định lượng tế bào đích bằng thiết bị vi lưu theo sáng chế, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị thiết bị vi lưu; b) cố định hạt nano từ tính; c) tách lọc tế bào đích; d) pha loãng mẫu; và e) định lượng tế bào đích gắn hạt nano từ tính.

Trong bước chuẩn bị thiết bị vi lưu, thiết bị vi lưu theo sáng chế trước khi sử dụng được bơm dung dịch rửa và sau đó bơm nước cất để rửa vi kênh. Các cực của hệ dây dẫn được nối với thiết bị đo ngoại vi. Hạt nano từ tính được ủ để gắn với kháng thể đặc hiệu với dòng tế bào đích.

Trong bước cố định hạt nano từ tính gắn kháng thể đặc hiệu lên tế bào đích, tiến hành bơm đồng thời dung dịch chứa hạt nano từ tính đã được gắn với kháng thể đặc hiệu với dòng tế bào đích vào cửa nạp mẫu thứ nhất và mẫu sinh phẩm vào cửa nạp mẫu thứ hai theo nồng độ định trước. Mẫu sinh phẩm và hạt nano từ tính được gắn với kháng thể này độc lập đi theo các kênh khác nhau vào buồng trộn vi lưu và ủ tế bào. Quá trình trộn và ủ tế bào được thực hiện đồng thời khi mẫu sinh phẩm và hạt từ tính đồng thời vào buồng trộn vi lưu và ủ tế bào. Tiến hành ủ trong khoảng 60 phút để hạt nano từ tính gắn kháng thể đặc hiệu được gắn cố định lên bề mặt tế bào đích.

Trong bước tách lọc tế bào đích, tiến hành bơm liên tục dung dịch PBS vào cửa nạp mẫu với tốc độ 10 μL /giây. Việc bơm dung dịch PBS này nhằm đẩy dung dịch trong buồng trộn vi lưu và ủ tế bào chứa tế bào được gắn hạt nano từ tính dịch chuyển đến cấu trúc tách lọc. Tại đây, lực từ của cơ cấu từ tính sẽ tác động lên các tế bào đích được gắn hạt nano từ tính và lái tế bào dịch chuyển theo kênh chính của cấu trúc tách lọc từ tính đến tới cấu trúc tập trung dòng chảy. Ngược lại, tế bào được gắn hạt nano từ tính sẽ di chuyển theo kênh phụ và thoát ra ngoài theo cửa xả mẫu của thiết bị.

Trong bước pha loãng mẫu, tiến hành bơm bổ sung dung dịch đệm vào cửa nạp dung dịch đệm để dung dịch đệm này hợp lưu với mẫu chứa tế bào đích gắn hạt nano từ tính tại cấu trúc tập trung dòng chảy của thiết bị. Duy trì tốc độ di chuyển của mẫu qua kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến với tốc độ 10 μL /giây.

Trong bước định lượng tế bào đích gắn hạt nano từ tính, cho dòng mẫu di chuyển đều qua khu vực cảm biến và đo trở kháng vi sai giữa vi điện cực trung tâm và 2 vi điện cực cảm biến. Dựa trên sự thay đổi trở kháng vi sai có thể định lượng được tế bào đích di chuyển qua khu vực cảm biến căn cứ vào tín hiệu trở kháng vi sai của vi điện cực.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó tần số khảo sát trở kháng giữa hai điện cực cảm biến và điện cực trung tâm nằm trong khoảng 10 KHz đến 1 MHz.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó biên độ tín hiệu khảo sát trở kháng giữa hai điện cực cảm biến và điện cực trung tâm là nhỏ hơn 10 V.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó tín hiệu chênh lệch trở kháng giữa hai cặp điện cực bao gồm điện cực trung tâm với hai điện cực cảm biến được xác định thông qua các mạch khuếch đại vi sai và khuếch đại ngoại vi để đếm lượng tế bào đích gắn hạt nano từ tính di chuyển qua tại khu vực cảm biến.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sản xuất thiết bị vi lưu để tách lọc và định lượng tế bào đích

Tạo cấu trúc vi kênh của thiết bị vi lỏng

Để thực hiện chế tạo được kênh dẫn bằng vật liệu PDMS, các quy trình vi chế tạo dựa trên phương pháp quang khắc (photolithography) đã được thực hiện trên phiên silic với chất cản quang photoresist âm tính dựa trên epoxy SU-8.

Chuẩn bị, làm sạch phiên silic bằng cách ngâm phiên trong dung dịch piranha (hỗn hợp dung dịch với tỷ lệ $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2 = 3 : 1$) ở nhiệt độ 120°C trong 2 giờ. Thực hiện quay phủ lớp chất cản quang SU-8 lên bề mặt phiên silic với các bước như sau: Bước 1 quay phủ ở tốc độ 500 vòng/phút trong 20 giây. Bước 2 quay phủ trong 35 giây ở tốc độ 1000 vòng/phút hoặc 2250 vòng/phút để tạo ra lớp SU-8 có độ dày tương ứng lần lượt là 100 μm và 50 μm .

Nung phiên silic đã được quay phủ SU-8 (2050, MicroChem Corp., Newton, MA, USA) từ nhiệt độ phòng lên đến 95°C . Trong đó, cách mỗi 2 phút, tăng nhiệt độ thêm 5 độ. Bước tăng nhiệt độ từ 60°C đến 65°C được giữ trong khoảng thời gian 10 phút và bước tăng nhiệt độ từ 90°C lên 95°C được giữ trong thời gian 30 phút. Sau đó, phiên silic được hạ nhiệt độ về nhiệt độ phòng trong tối thiểu 2 giờ đồng hồ.

Thực hiện phơi sáng phiên silic đã được hạ nhiệt độ về nhiệt độ phòng dưới tia UV. Phiên silic được thiết lập cùng với mặt nạ với các cấu trúc xác định được đặt phía trên phiên. Năng lượng phơi sáng được thiết lập theo yêu cầu của nhà cung cấp chất cản quang, trong trường hợp này, năng lượng được thiết lập ở mức 200 mJ/cm².

Thực hiện nung nóng phiên vừa được phơi sáng từ nhiệt độ phòng lên đến 95 °C. Trong đó, cách mỗi 2 phút, tăng nhiệt độ thêm 5 độ. Bước tăng nhiệt độ từ 60 °C đến 65 °C được giữ trong khoảng thời gian 10 phút và bước tăng nhiệt độ từ 90 °C lên 95 °C được giữ trong thời gian 30 phút. Sau đó, phiên silic được hạ nhiệt độ về nhiệt độ phòng trong tối thiểu 2 giờ đồng hồ.

Thực hiện hiện hình chất cản quang SU-8 bằng dung dịch hiện hình SU-8 Developer để rửa trôi những phần chất cản quang không mong muốn. Phần chất cản quang SU-8 còn lại sẽ được sử dụng để làm khuôn cho vi kênh lỏng.

Sau khi tạo thành công khuôn cho vi kênh bằng vật liệu SU-8, hỗn hợp polyme PDMS được chuẩn bị bằng cách trộn lẫn hai phần PDMS (PDMS phần A và phần B, Sylgard-184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning, Midland, MI, USA) theo tỷ lệ khối lượng là 10:1, và được khuấy đều trước khi đổ và khuôn kênh SU-8. Hỗn hợp PDMS được hút chân không để loại bỏ các bọt khí trong và trên mặt hỗn hợp polyme. Tiếp đó, cả khuôn kênh và hỗn hợp PDMS được nung nóng ở 65 °C trong vòng 2 giờ để đông cứng hỗn hợp polyme PDMS. Sau đó, khuôn kênh và PDMS được hạ về nhiệt độ phòng và thực hiện tách khuôn. Các đường dẫn lối vào và lối ra cho vi kênh được tạo bằng phương pháp đục lỗ thủ công.

Tạo cấu trúc điện cực thao tác và điện cực cảm biến của thiết bị vi lỏng

Phương pháp quang khắc (photolithography) cần mặt nạ và nguồn sáng UV để tạo cấu trúc trên một lớp polyme cản quang với các cấu trúc và mục đích mong muốn phù hợp với các cấu trúc của mặt nạ. Tùy thuộc vào nhu cầu độ phân giải, mặt nạ có thể được in bằng tia laze trên nền trong suốt (1200 dpi hoặc độ phân giải 250 µm), độ phân giải cao trên vật liệu phim trong suốt mỏng (10.000 dpi / 30 µm) hoặc mặt nạ với cấu trúc được in bằng phương pháp lắng đọng Chromium trên thạch anh (420.000 dpi / 600 nm). Mặt nạ có độ phân giải cao nhất thường có giá thành đắt hơn và hạn chế kích thước của tổng thể thiết bị vi lỏng cỡ khoảng 100 mm mỗi cạnh.

Các cấu trúc vi điện cực được chế tạo dựa trên quy trình quang khắc (photolithography) và quy trình ăn mòn ướt cụ thể với các bước như sau:

Phủ quay lớp chất cản quang S1813 (Shipley 1813, MicroChem Co., Ltd., Westborough, MA, USA) lên bề mặt phiến thủy tinh đã được phún xạ lớp chrominum và lớp vàng trên bề mặt. Tốc độ quay phủ được thiết lập ở hai giai đoạn: tốc độ 700 vòng/phút trong 10 giây đầu quá trình và tốc độ 1700 vòng/phút trong 20 giây tiếp theo của quá trình tương ứng với việc tạo lớp chất cản quang dày 2 μm trên bề mặt phiến. Sau đó, phiến được nung nóng ở 90 °C trong 2 phút.

Thực hiện phơi sáng lớp cản quang vừa được quay phủ dưới ánh sáng UV ở mức năng lượng 90 mJ/cm^2 . Thực hiện nung nóng phiến ở 90 °C trong 3 phút sau khi phơi sáng.

Chuẩn bị chất hiện hình bằng cách hòa dung dịch MP 351 với nước DI ở tỷ lệ 2 : 9. Thực hiện hiện hình các phần chất cản quang đã được ánh sáng UV kích hoạt trong bước phơi sáng bằng cách ngâm phiến trong dung dịch hiện hình trong khoảng 9 giây. Rửa lại phiến bằng nước DI và làm khô bằng khí N_2 . Sau đó, nung phiến ở 120 °C trong 3 phút để loại bỏ hoàn toàn hơi nước còn lại trên bề mặt phiến.

Thực hiện ăn mòn lớp vàng không bị chất cản quang che phủ bằng cách ngâm phiến trong dung dịch ăn mòn vàng (Gold Etchant) trong khoảng 15 giây. Rửa lại phiến bằng nước DI và làm khô bằng khí N_2 .

Thực hiện ăn mòn lớp chrominum không bị chất cản quang che phủ bằng cách ngâm phiến trong dung dịch ăn mòn Chrominum (Chrominum Etchant) trong khoảng 10 s. Rửa lại phiến bằng nước DI và làm khô bằng khí N_2 .

Loại bỏ lớp chất cản quang bằng cách rửa phiến lần lượt với dung dịch Acetone và Ethanol. Rửa lại phiến bằng nước DI và làm khô bằng khí N_2 .

Để tạo lớp cách ly giữa vi điện cực và môi trường kênh lòng, buồng lòng, một lớp chất cản quang có thể được tạo ra bằng phương pháp tương tự với mặt nạ được thiết kế riêng.

Tạo cấu trúc điện cực bao gồm các điện cực thao tác và điện cực cảm biến với cấu trúc kênh dẫn vi lòng

Để PDMS chứa cấu trúc vi kênh lỏng sau khi hoàn thành sẽ không kết dính với các cấu trúc vật liệu khác và bề mặt thể hiện tính kỵ nước. Có một số phương pháp xử lý bề mặt PDMS để giảm tính kỵ nước đó và giúp PDMS có thể kết nối với vật liệu khác đó là phori bề mặt vật liệu PDMS trong oxy plasma. Để đóng gói được phần cấu trúc vi kênh được chế tạo bằng vật liệu PDMS với phiên thủy tinh có cấu trúc vi điện cực kim loại, cả hai phiên PDMS và phiên thủy tinh được thực hiện oxy plasma để làm sạch và kích hoạt bề mặt sử dụng buồng plasma (Model PDC-32G, Harrick Plasma Corp., Ithaca, NY, USA) trước khi được gắn với nhau. Để có thể gắn chính xác vi kênh với cấu trúc điện cực trên phiên thủy tinh, một camera theo dõi trong quá trình gắn đã được sử dụng để điều chỉnh vị trí của phiên vi kênh PDMS trước khi hai phiên thực sự được gắn với nhau. Bên cạnh đó, trong quá trình điều chỉnh vị trí để đóng gói vi kênh và cấu trúc điện cực, một lượng nhỏ methanol có thể được sử dụng để giữ hai bề mặt phân tách tạm thời trong thời gian ngắn trước khi được gắn kín với nhau thu được thiết bị với cấu trúc như thể hiện trên Hình 1. Hình 5 là hình ảnh kênh hiển vi cấu trúc kênh dẫn chính vi lưu qua khu vực cảm biến sử dụng cấu trúc vi điện cực vi sai được chế tạo bằng vàng.

Ví dụ 2. Phát hiện dòng tế bào T CD4+ bằng thiết bị để tách lọc và định lượng tế bào T CD4+

Điều chế dung dịch chứa tế bào đích T CD4+

Lấy 4-5 ml máu chia vào các ống đựng máu K2 EDTA. Pha loãng mẫu máu bằng dung dịch PBS 1X với tỷ lệ 1:1 theo thể tích. Phủ dung dịch máu đã pha loãng lên dung dịch Pancoll trong ống chứa sẵn Pancoll theo tỷ lệ thể tích 1:1. Thao tác chính xác để dung dịch PANCOL và máu không lẫn vào nhau. Thực hiện ly tâm trên thiết bị ly tâm ở 800 x g trong 10 phút ở 20 °C, gia tốc 9, độ hãm 3. Sau khi ly tâm, thực hiện thu lại phần tế bào bạch cầu ngoại vi đơn nhân (PBMC) nằm giữa phân lớp huyết tương và phân lớp PANCOL, đưa dung dịch bạch cầu ngoại vi đơn nhân vào ống nghiệm mới. Pha loãng dung dịch chứa tế bào bạch cầu ngoại vi đơn nhân bằng dung dịch PBS hoàn chỉnh với tỷ lệ thể tích dung dịch PBS 1X và dung dịch chứa tế bào bạch cầu là 2:1. Thực hiện ly tâm trên thiết bị ly tâm vắng ở 300 x g trong 7 phút ở 20 °C, gia tốc 9, độ hãm 5. Sau khi ly tâm, thực hiện loại bỏ dịch nổi, pha loãng dung dịch tủa dưới đáy ống để khôi phục thể tích mẫu về 500 ul dung dịch PBS hoàn chỉnh.

Xác định nồng độ tế bào trong mẫu PBMC đã tách được ở bước trên sử dụng buồng đếm hồng cầu và kính hiển vi quang học. Sau khi xác định được nồng độ tế bào trong mẫu, chuyển $1,1 \times 10^7$ tế bào sang một ống mới và đưa thể tích mẫu về 1 ml bằng dung dịch PBS hoàn chỉnh, thu được 1ml dung dịch chứa tế bào với nồng độ $1,1 \times 10^4$ tế bào PBMC/ μ l. Mẫu dung dịch này được chuyển qua phân tích trên hệ thống FACS (FACS Calibur) với thể tích mẫu là 50 μ l, lượng còn lại được sử dụng để tách tế bào T CD4+ từ PBMC.

Tách lọc tế bào bạch cầu CD4 từ mẫu dung dịch chứa tế bào bạch cầu

Chuyển 900 μ l mẫu tế bào ngoại vi đơn nhân PBMC đã chuẩn bị vào ống mới, thêm 50 μ l dung dịch chứa hạt nano đa chức năng từ tính đã được gắn kháng thể kháng-CD4 (BD-CD4) vào ống, trộn đều bằng pipet. Thực hiện ủ hỗn hợp dung dịch trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ phòng để tạo các tương tác kháng nguyên kháng thể. Đặt ống chứa hỗn dịch lên giá từ và để trong 10 phút. Trong khi ống mẫu vẫn để trên giá từ, loại bỏ phần dịch nổi, phần tế bào được gắn với hạt từ sẽ được giữ lại. Đưa ống ra khỏi giá từ, bổ sung 1 mL dung dịch PBS hoàn chỉnh, trộn đều mẫu bằng pipet. Đặt ống chứa hỗn dịch lên giá từ và để trong 10 phút. Trong khi ống mẫu vẫn để trên giá từ, loại bỏ phần dịch nổi, đưa ống ra khỏi giá từ. Khôi phục thể tích mẫu về 900 μ l với dung dịch RPMI. Từ mẫu dung dịch tế bào PBMC này, thực hiện pha loãng vào các ống nghiệm với các nồng độ pha loãng 1 lần, 2 lần, 8 lần. Các ống dung dịch này sẽ được sử dụng để đưa vào hệ thống vi lưu nhằm kiểm tra hoạt động của cấu trúc cảm biến.

Cấp dung dịch chứa dòng tế bào T CD4+ vào hệ thống cảm biến của thiết bị vi lưu theo sáng chế

Thiết bị vi lỏng được chuẩn bị theo Ví dụ 1 được làm sạch bằng cách nạp đầy bằng dung dịch PBS 1x khoảng 5 lần. Lấy 50 μ l dung dịch chứa tế bào được chuẩn bị ở trên cấp vào hệ thống vi lưu thông qua cửa vào thứ nhất và kênh dẫn lối vào thứ nhất của thiết bị vi lưu phát hiện và đếm tế bào T CD4+. Lấy 100 μ l dung dịch RPMI cấp vào buồng trộn vi lỏng thông qua cửa vào thứ hai và kênh dẫn lối vào thứ hai của thiết bị vi lưu phát hiện và đếm tế bào T CD4+. Hai dung dịch trên được đưa vào thiết bị vi lưu thông qua thiết bị vi bơm được kết nối với ống dẫn dung dịch mẫu và được thiết lập ở tốc độ bơm vi lỏng 100 μ l/phút. Sau khi dung dịch mẫu và dung dịch RPMI được

trộn ở buồng trộn vi lưu và ủ tế bào, dung dịch hỗn hợp được tiếp tục bơm đẩy đến hệ thống tách lọc từ tính, cấu trúc tập trung dòng chảy bao gồm tế bào T CD4⁺ trong dung dịch sucroza 8,6%. Lấy 1 ml dung dịch RPMI cấp vào cấu trúc tập trung dòng chảy thông qua cửa vào dung dịch đệm cho cấu trúc tập trung dòng chảy. Dung dịch bao gồm tế bào T CD4⁺ trong dung dịch RPMI được tiếp tục bơm đẩy đến kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến. Tiếp theo, các điện cực trung tâm và điện cực cảm biến được kết nối tới lõi vào cảm biến của mạch đo trở kháng vi sai. Tín hiệu kích thích được cung cấp vào điện cực trung tâm có biên độ từ 1 đến 5 Vp-p và tần số nằm trong khoảng 100 KHz đến 1 MHz. Dữ liệu về giá trị trở kháng phụ thuộc theo tần số được truyền tới máy tính để xử lý thông qua giao diện phần mềm LabView.

Việc phát hiện tế bào T CD4⁺ trong kênh vi lưu đã được thực hiện thử nghiệm và khảo sát với chip vi lưu đã chế tạo và bo mạch xử lý tín hiệu được đề xuất. Các tín hiệu điện đáp ứng với quá trình di chuyển của tế bào T CD4⁺ qua khu vực cảm biến trong các thí nghiệm đã được thu thập, xử lý và phân tích. Chuyển động của một tế bào đích trong vùng cảm biến của kênh vi lỏng làm thay đổi tín hiệu đầu ra của mạch xử lý tín hiệu, được ghi nhận là sự thay đổi điện áp phụ thuộc thời gian. Hình 6 và Hình 7 thể hiện kết quả sau khi thực hiện thành công việc sử dụng mạch phát hiện trở kháng vi sai. Hình 6 thể hiện kết quả thử nghiệm cấu trúc cảm biến trở kháng vi sai trong điều kiện thí nghiệm tế bào T CD4⁺ được ủ với hạt nano đa chức năng gắn kháng thể kháng-CD4 trong 30 phút và giữ trong môi trường dung dịch RPMI và Hình 7 thể hiện kết quả thử nghiệm cấu trúc cảm biến trở kháng vi sai trong điều kiện thí nghiệm tế bào T CD4⁺ giữ trong môi trường dung dịch RPMI và bơm trực tiếp vào kênh dẫn vi lưu.

Kết quả cho thấy khả năng phát hiện tế bào dựa trên phương pháp trở kháng vi sai khi các tế bào T CD4⁺ di chuyển qua khu vực cảm biến. Bằng cách sử dụng mạch điện tích hợp bộ khuếch đại dụng cụ và bộ khuếch đại lock-in có khả năng phát hiện tín hiệu nhỏ trong nền nhiễu lớn kết hợp cùng với kỹ thuật trở kháng vi sai, mạch điện cho phép cung cấp giá trị điện thế lõi ra phụ thuộc vào độ chênh lệch trở kháng giữa điện cực kích thích và hai điện cực cảm biến. Kết quả cho thấy dạng điện áp lõi ra tương ứng với vị trí tế bào khi di chuyển qua khu vực cảm biến ở dạng một đỉnh lưỡng cực, được gây ra bởi sự chuyển động của tế bào di chuyển qua lần lượt hai cặp điện cực cảm biến. Đỉnh cực phân cực âm và phân cực dương xảy ra khi tế bào đi qua

tương ứng cặp điện cực thứ nhất và thứ hai. Khi tế bào di chuyển trong kênh dẫn chính qua khu vực điện cực cảm biến, trở kháng giữa hai cặp điện cực cảm biến được khuếch đại vì sai bằng cách sử dụng bộ khuếch đại dụng cụ.

Ví dụ 3. Phát hiện tế bào A549 và ghi dữ liệu điện thế lối ra sử dụng thiết bị thu thập số liệu

Điều chế dung dịch chứa tế bào A549

Tiến hành nuôi cấy dòng tế bào ung thư phổi A549 theo qui trình chuẩn từ đĩa Petri nuôi cấy tế bào A549. Loại bỏ môi trường cũ. Rửa tế bào bằng dung dịch PBS 1x (khoảng 2 ml/10 cm² bề mặt nuôi cấy): Nhẹ nhàng thả dung dịch vào thành của chai nuôi cấy để tránh tác động trực tiếp lên lớp tế bào. Lắc nhẹ chai nuôi cấy vài lần. Loại bỏ dung dịch rửa. Bổ sung dung dịch tách tế bào Trypsin 10% (đã được làm ấm ở 37 °C) vào thành chai nuôi cấy. Sử dụng vừa đủ thể tích dung dịch tách (0.5 ml/10 cm²). Nhẹ nhàng lắc như bước trên. Ủ chai nuôi cấy trong tủ ấm ở nhiệt độ 37 °C trong khoảng thời gian 3 phút 30 giây. Kiểm tra dưới kính hiển vi soi ngược xem mức độ tách khỏi mặt đáy của tế bào. Nếu dưới 90 % tế bào tách thì để thêm thời gian ủ khoảng vài phút nữa. Kiểm tra sự tách tế bào trong mỗi 30 giây. Khi trên 90% tế bào tách, bổ sung môi trường nuôi cấy hoàn chỉnh (gồm 1 % kháng sinh, 9 % FBS, 90 % môi trường nuôi cấy DMEM) đã được làm ấm dung dịch tách. Trải đều môi trường lên bề mặt lớp tế bào trước khi chuyển toàn bộ dung dịch tế bào sang ống 15 ml và li tâm tại 500 rpm trong 5 phút. Loại bỏ môi trường nuôi cấy có enzym. Cho tế bào vào ống nghiệm 1.5 mL để sử dụng ở các bước tiếp theo

Phát hiện tế bào bằng cách sử dụng mạch cảm tay đo trở kháng vi sai

Cấu trúc kênh dẫn vi lưu tích hợp cảm biến trở kháng vi sai 3 điện cực của thiết bị vi lỏng được chuẩn bị theo Ví dụ 1. Cấu trúc này được làm sạch bằng cách nạp 100 µL dung dịch PBS 1x khoảng 5 lần. Việc phát hiện tế bào A549 trong kênh vi lưu đã được thực hiện thử nghiệm và khảo sát với chip vi lưu đã chế tạo và hệ thống mạch điện tử xử lý tín hiệu được đề xuất. Các tín hiệu điện đáp ứng với quá trình di chuyển của tế bào A549 qua khu vực cảm biến trong các thí nghiệm đã được thu thập, xử lý và phân tích. Chuyển động của một tế bào đích trong vùng cảm biến của kênh vi lỏng làm thay đổi tín hiệu đầu ra của mạch xử lý tín hiệu, được ghi nhận là sự thay đổi điện áp phụ thuộc thời gian theo tương đương kết quả ghi nhận trong Ví dụ 2.

Lấy 50 μL dung dịch chứa tế bào A549 ở nồng độ pha loãng 8 lần trong hai môi trường dung dịch Sucrose 8.6 % và dung dịch PBS 1X đã được chuẩn bị ở trên cấp vào hệ thống vi lưu thông qua cửa vào và kênh dẫn lối vào của thiết bị vi lưu phát hiện và đếm tế bào đích ở lưu lượng 1 $\mu\text{L}/\text{phút}$.

Các tế bào A549 ở dạng huyền phù trong các dung dịch Sucrose 8.6% và PBS 1X đã được sử dụng để khảo sát hoạt động của thiết bị khi được bơm qua kênh dẫn vi lưu tích hợp cảm biến. Hình 8 cho thấy dạng tín hiệu điện áp đầu ra tương ứng với trường hợp có nhiều tế bào đi qua khu vực cảm biến, có thể được xem là các đỉnh lưỡng cực liên tục trên tín hiệu nền. Các giá trị đường cơ sở của điện áp đầu ra tương ứng với các dung dịch đậm Sucrose 8,6% (Hình 8A) và PBS 1X (Hình 8B) lần lượt là khoảng 0,14 V và -1,97 V, do sự khác biệt về độ dẫn điện của hai dung dịch. Biên độ cực đại của điện áp đầu ra bị ảnh hưởng bởi kích thước và vị trí của tế bào đích trong kênh dẫn vi lỏng: tín hiệu từ các tế bào nhỏ hơn có cường độ thấp hơn so với các tế bào có kích thước lớn hơn. Ngoài ra, khi tế bào di chuyển càng gần đáy kênh, thay đổi của tín hiệu đầu ra sẽ trở nên lớn hơn. Dữ liệu đo được cũng cho thấy rằng độ nhạy của hệ thống cảm biến được đề xuất giảm khi tăng độ dẫn điện của dung dịch nền. Như được thể hiện trong Hình 8, sự thay đổi điện áp tối đa là khoảng 180 mV đối với dung dịch Sucrose 8,6%. So với trường hợp tế bào được chứa trong dung dịch Sucrose 8,6%, hiệu suất phát hiện tế bào trong dung dịch PBS 1x cung cấp cường độ tín hiệu tăng thay đổi thấp hơn (khoảng 60 mV).

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sáng chế đề cập đến thiết bị vi lưu có khả năng tách lọc và đếm số lượng tế bào đích thông qua phương pháp xác định trở kháng vi sai và quy trình đếm số lượng tế bào đích bằng thiết bị này. Thiết bị theo sáng chế có các buồng trộn vi lưu và ủ tế bào để ủ tế bào với các hạt nano đa chức năng từ tính, cấu trúc tách lọc từ tính để loại bỏ tế bào không phải tế bào đích trong mẫu xét nghiệm, cấu trúc tập trung dòng chảy kết hợp cùng cấu trúc trở kháng vi sai để tăng độ nhạy cho các phép đo phát hiện và đếm tế bào.

Thiết bị vi lưu theo sáng chế cho phép tách lọc và đếm số lượng tế bào đích thông qua phương pháp xác định trở kháng vi sai và quy trình đếm số lượng tế bào đích cho phép ứng dụng trong chẩn đoán phát hiện và điều trị một số bệnh thường gặp.

Thiết bị cho phép phân tích đặc hiệu dựa trên khả năng tách lọc đặc hiệu tế bào đích bằng phương pháp từ tính và cảm biến trở kháng vi sai, giúp tăng hiệu suất phát hiện tế bào đặc hiệu.

Bằng cách bố trí các hệ thống cấu trúc vi kênh như buồng trộn vi lưu và ủ tế bào, bộ tách lọc đặc hiệu từ tính, cấu trúc kênh dẫn kết hợp vi điện cực cảm biến trở kháng, thiết bị vi lưu theo sáng chế cho phép phân tích với một lượng nhỏ mẫu xét nghiệm cũng như có khả năng phân tích hiệu suất cao với khả năng tách lọc đặc hiệu bằng cách gắn đặc hiệu hạt nano đa chức năng từ tính trên tế bào, làm giàu và so sánh độ chênh lệch trở kháng giữa các điện cực, điều này cho phép không chỉ tăng hiệu suất phát hiện mà còn giúp giảm giá thành xét nghiệm. Ngoài ra, với cách thiết kế vi kênh gồm nhiều cửa nạp cũng như khả năng tách lọc từ tính tế bào đích hiệu năng cao nhờ từ trường, thiết bị cho phép tự động hóa quy trình phát hiện tế bào đích từ hỗn hợp tế bào và giảm thời gian xét nghiệm.

Việc bố trí thiết kế điện cực theo cấu hình trở kháng vi sai cho phép thiết bị có khả năng phát hiện và phân tích, đếm số lượng từng tế bào đơn lẻ di chuyển trong kênh dẫn vi lưu qua khu vực điện cực cảm biến kết hợp với khả năng tách lọc đặc hiệu từ tính tế bào đích, đây được xem như là một cách đánh giá khả năng vượt trội của thiết bị so với các nghiên cứu và thiết bị khác.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thiết bị vi lưu để tách lọc và định lượng tế bào đích, trong đó thiết bị này bao gồm phần đế (114) được ghép với khối chứa cấu trúc vi kênh (111), vi điện cực (112), hệ dây dẫn (113) và cấu trúc tách lọc từ tính (104), trong đó:

- phần đế (114) được làm bằng thủy tinh có cấu trúc hình chữ nhật phẳng để đỡ toàn bộ thiết bị vi lỏng;
- khối chứa cấu trúc vi kênh (111) có cấu trúc hình khối được làm từ vật liệu polydimethylsiloxan (PDMS), trên một mặt của khối được khắc cấu trúc vi kênh bao gồm buồng trộn vi lưu và ủ tế bào (103) cấu trúc dạng kênh dẫn để tăng cường phối trộn mẫu, một đầu của buồng trộn vi lưu và ủ tế bào (103) này được nối với ít nhất hai cửa nạp mẫu (102), một đầu được nối với kênh của cấu trúc tách lọc từ tính (104) đến cấu trúc tập trung dòng chảy (106) để pha dòng chứa tế bào sau khi tách từ kênh chính của cấu trúc tách lọc từ tính (104) với dung dịch đệm được nạp từ cửa nạp dung dịch đệm (101) đến kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến (107) tới cửa thoát (108), ở cấu trúc tách lọc từ tính (104) có bố trí kênh phụ nối với cửa xả mẫu (105) để xả tế bào không đặc hiệu, các cửa nạp dung dịch đệm (101), cửa nạp mẫu (102), cửa xả mẫu (105), cửa thoát (108) được bố trí xuyên qua khối chứa cấu trúc vi kênh (111) đến mặt đối diện và gắn với các đầu nối (109) để kết nối với bộ phận nạp mẫu, bộ phận nạp dung dịch đệm, bộ phận thu mẫu;
- cơ cấu từ tính (110) nằm trong khối chứa cấu trúc vi kênh (111) và được bố trí sát với cấu trúc tách lọc từ tính (104) ở phía đối diện với kênh phụ để cấp từ tính cho dòng mẫu chảy qua cấu trúc tách lọc từ tính (104) nhằm hướng đặc hiệu tế bào đích được gắn hạt nano từ tính di chuyển theo kênh chính của cấu trúc tách lọc từ tính (104) và hướng tế bào khác di chuyển về kênh phụ thoát ra cửa xả mẫu (105);
- vi điện cực (112) được bố trí trên phần đế (114) và áp trên kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến (107) tiếp xúc với dòng chảy, được làm từ vàng hoặc indium thiếc oxit (ITO) có cấu trúc dạng hình chữ nhật, trên vi điện cực (112) này bao gồm một điện cực trung tâm (115) có dạng hình chữ nhật nằm ở giữa, tiếp đó là các điện cực cảm biến (116) là các điện cực hình chữ nhật được bố trí đối xứng nhau qua điện cực trung tâm (115), đầu của các điện cực này được gắn lần lượt với hệ dây dẫn (113) để độc lập kết nối với thiết bị ngoại vi; và

- hệ dây dẫn (113) được bố trí sát phần đế (114), trong đó hệ dây dẫn này độc lập kết nối các đầu điện cực trung tâm (115), điện cực cảm biến (116) để kết nối với thiết bị ngoại vi;

khi được lắp ghép, hệ dây dẫn (113) nối với các điện cực trên vi điện cực (112) được đặt sát với phần đế (114), tiếp đó phần đế (114) này được ghép với cấu trúc vi kênh (111) sao cho mặt khắc trên cấu trúc vi kênh (111) được ép sát với phần đế (114) và vi điện cực (112) được bố trí áp sát và giữa kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến (107), tạo cấu trúc vi kênh kín với các cửa nạp dung dịch đệm (101), cửa nạp mẫu (102), cửa thoát (108) và cửa xả mẫu (105) thông nhau được gắn với các đầu nối (109) để kết nối với bộ phận nạp mẫu, bộ phận nạp dung dịch đệm, bộ phận thu mẫu tạo thiết bị vi lỏng hoàn chỉnh;

theo đó, khi hoạt động, mẫu sinh phẩm và mẫu hạt nano từ tính được nạp vào thiết bị qua cửa nạp mẫu (102) một cách độc lập và đi vào buồng trộn vi lưu và ủ tế bào (103) có cấu trúc dạng kênh để phối trộn mẫu sinh phẩm và hạt nano từ tính, sau khi phối trộn và ủ, mẫu được chuyển đến cấu trúc tách lọc từ tính (104) và các tế bào không gắn hạt từ tính sẽ chuyển theo kênh phụ của cấu trúc tách lọc từ tính (104) và thoát ra ngoài qua cửa xả mẫu (105), tế bào đích được gắn hạt nano từ tính dưới tác dụng của cơ cấu từ tính (110) sẽ di chuyển theo kênh chính của cấu trúc tách lọc từ tính (104) đến cấu trúc tập trung dòng chảy (106), tại đây mẫu được trộn với dung dịch đệm được nạp từ cửa nạp dung dịch đệm (101) và vào kênh giữa của cấu trúc tập trung dòng chảy (106) nhằm mục đích tạo thành cấu hình dòng chảy đơn tế bào cho phép cấu trúc cảm biến trở kháng phát hiện đơn tế bào để đếm số lượng tế bào di chuyển qua khu vực cảm biến (107), điện cực trung tâm (115) được cấp điện và đo trở kháng vi sai ứng với các điện cực cảm biến (116) để định lượng sự xuất hiện của tế bào đích trong kênh dẫn vi lưu dựa trên sự thay đổi vi dòng của dòng chảy, các tế bào này thoát ra khỏi thiết bị qua cửa thoát (108) ra ngoài.

2. Thiết bị theo điểm 1, trong đó số lượng cửa nạp mẫu (102) có từ 2 đến 10 cửa được bố trí độc lập để có thể nạp nhiều mẫu sinh phẩm, mẫu hạt nano từ tính vào buồng trộn vi lưu và ủ tế bào (103).

3. Thiết bị theo điểm 1 hoặc 2, trong đó buồng trộn vi lưu và ủ tế bào (103) có cấu trúc kênh được kết hợp từ nhiều kênh dẫn nối với nhiều cửa nạp mẫu (102) và có kích

thước kênh cao $\times$ rộng khoảng $50 \times 50 \mu\text{m}$ để có thể trộn đều và ủ mẫu sinh phẩm và mẫu hạt nano từ tính để phản ứng gắn kết xảy ra.

4. Thiết bị theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó cấu trúc tách lọc từ tính (104) có kênh phụ được bố trí lệch góc so với nhánh chính từ 30 đến 45 độ theo chiều dòng chảy và có mỗi kênh có kích thước cao $\times$ rộng khoảng $50 \times 50 \mu\text{m}$.

5. Thiết bị theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó cấu trúc tập trung dòng chảy được bố trí hai nhánh để dẫn dung dịch đệm từ cửa nạp dung dịch đệm (101) hợp lưu ở hai phía đối diện trên kênh của cấu trúc tách lọc từ tính (104) để pha loãng mẫu mà không ảnh hưởng đến hướng di chuyển mẫu trong kênh chính.

6. Thiết bị theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó cơ cấu từ tính (110) sử dụng nam châm vĩnh cửu hoặc nam châm điện và được đặt cách cấu trúc tách lọc từ tính (104) một khoảng từ 100 đến 200 μm đối diện với nhánh phụ để của cấu trúc tách lọc từ tính (104).

7. Thiết bị theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó cấu trúc vi điện cực (112) trong kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến có chiều dày khoảng 1 μm .

8. Thiết bị theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kích thước độ rộng của mỗi điện cực trong vi điện cực (112) khoảng 30 μm , khoảng cách giữa các điện cực khoảng 30 μm .

9. Quy trình định lượng tế bào đích bằng thiết bị vi lưu theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị thiết bị vi lưu, trong đó thiết bị vi lưu theo điểm bất kỳ từ 1 đến 9 được bơm dung dịch rửa và sau đó bơm nước cất để rửa vi kênh, các cực của hệ dây dẫn được nối với thiết bị đo ngoại vi, hạt nano từ tính được ủ để gắn với kháng thể đặc hiệu với dòng tế bào đích;

b) cố định hạt nano từ tính gắn kháng thể đặc hiệu lên tế bào đích bằng cách bơm dòng thời dung dịch chứa hạt nano từ tính đã được gắn với kháng thể đặc hiệu với dòng tế bào đích vào cửa nạp mẫu thứ nhất và mẫu sinh phẩm vào cửa nạp mẫu thứ hai theo nồng độ định trước vào buồng trộn vi lưu và ủ tế bào và tiến hành ủ trong khoảng 60 phút hạt nano từ tính gắn kháng thể đặc hiệu được gắn cố định lên bề mặt tế bào đích;

c) tách lọc tế bào đích bằng cách bơm liên tục dung dịch PBS vào cửa nạp mẫu với tốc độ $10 \mu\text{L}/\text{giây}$ để đẩy dung dịch trong buồng trộn vi lưu và ủ tế bào chứa tế bào được gắn hạt nano từ tính đến cấu trúc tách lọc, lực từ của cơ cấu từ tính sẽ tác động lên các tế bào đích được gắn hạt nano từ tính và lái tế bào dịch chuyển theo kênh chính của cấu trúc tách lọc từ tính đến tới cấu trúc tập trung dòng chảy, trong khi tế bào không được gắn hạt nano từ tính sẽ di chuyển theo kênh phụ và thoát ra ngoài theo cửa xả mẫu của thiết bị;

d) pha loãng mẫu bằng cách bơm bổ sung dung dịch đệm vào cửa nạp dung dịch đệm để dung dịch đệm này hợp lưu với mẫu chứa tế bào đích gắn hạt nano từ tính tại cấu trúc tập trung dòng chảy của thiết bị, duy trì tốc độ di chuyển của mẫu qua kênh dẫn chính qua khu vực cảm biến với tốc độ $10 \mu\text{L}/\text{giây}$; và

e) định lượng tế bào đích gắn hạt nano từ tính bằng cách cho dòng mẫu di chuyển qua khu vực cảm biến bằng cách đo trở kháng vi sai giữa vi điện cực trung tâm và 2 vi điện cực cảm biến, từ đó định lượng được tế bào đích di chuyển qua khu vực cảm biến căn cứ vào tín hiệu trở kháng vi sai của vi điện cực.

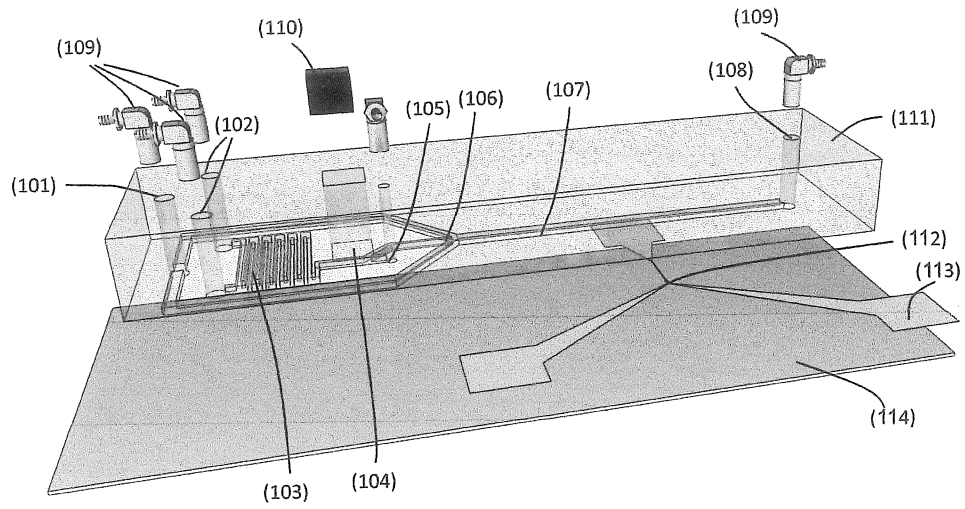
10. Quy trình theo điểm 9, trong đó tần số khảo sát trở kháng giữa hai điện cực cảm biến và điện cực trung tâm nằm trong khoảng 10 KHz đến 1 MHz.

11. Quy trình theo điểm 10, trong đó biên độ tín hiệu khảo sát trở kháng giữa hai điện cực cảm biến và điện cực trung tâm là nhỏ hơn 10 V.

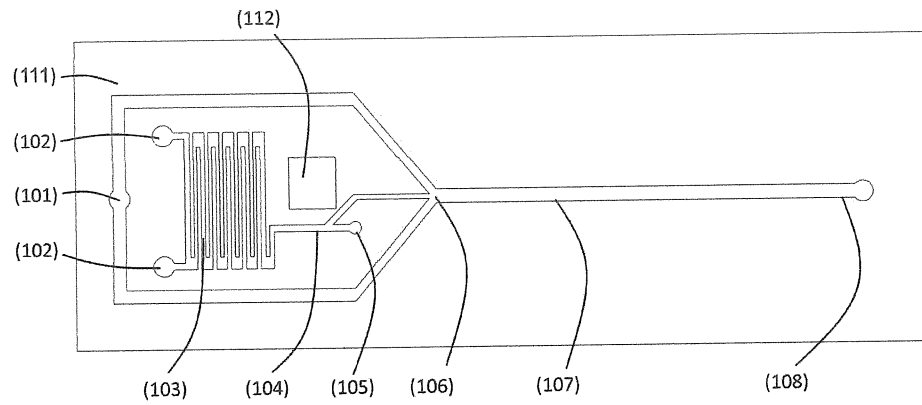
12. Quy trình theo điểm 11, trong đó tín hiệu chênh lệch trở kháng giữa hai cặp điện cực bao gồm điện cực trung tâm với hai điện cực cảm biến được xác định thông qua các mạch khuếch đại vi sai và khuếch đại ngoại vi để đếm lượng tế bào đích gắn hạt nano từ tính di chuyển qua tại khu vực cảm biến.

HÌNH 1

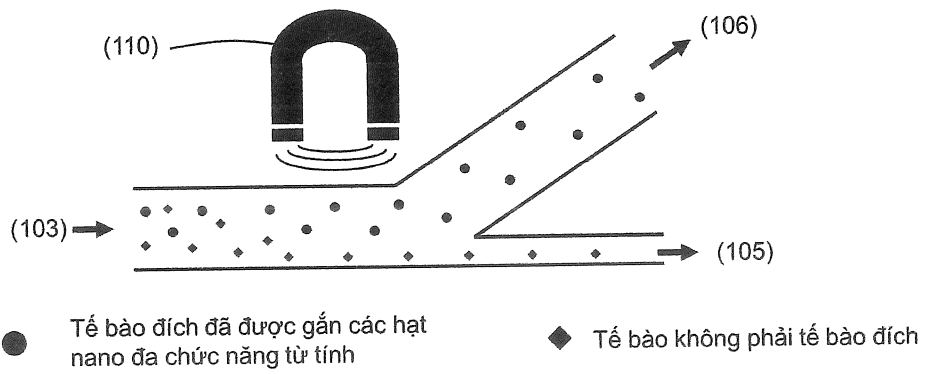
(A)



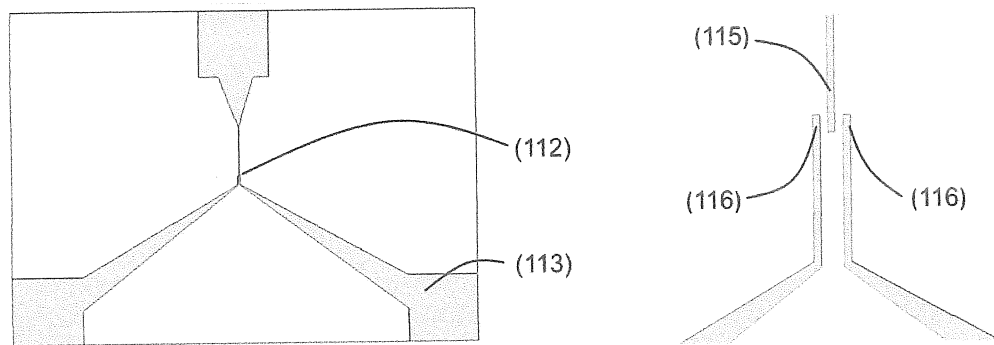
(B)



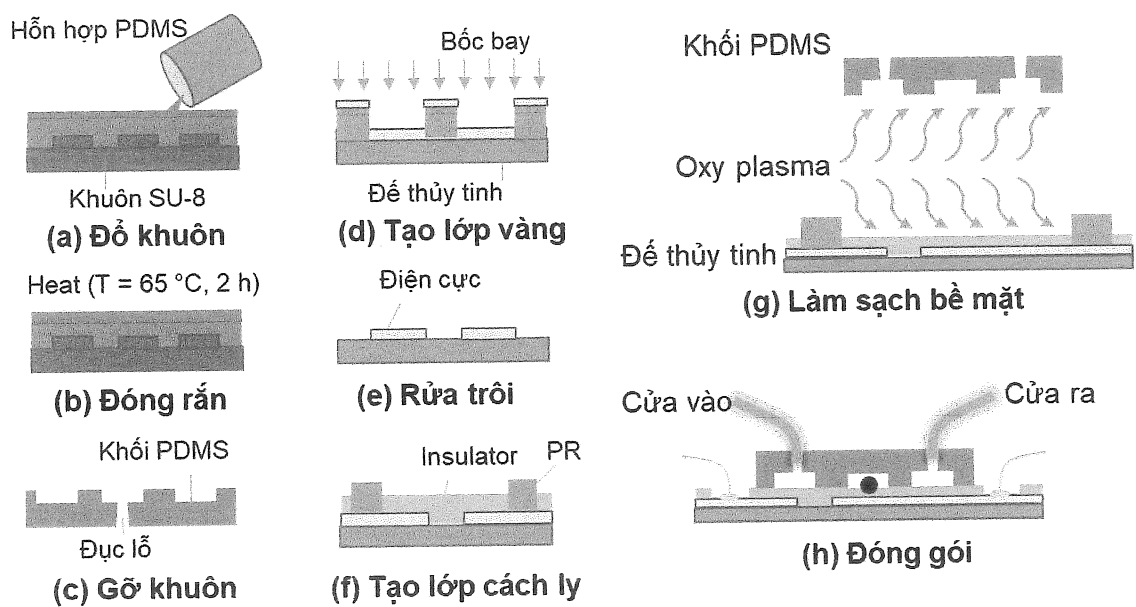
(C)



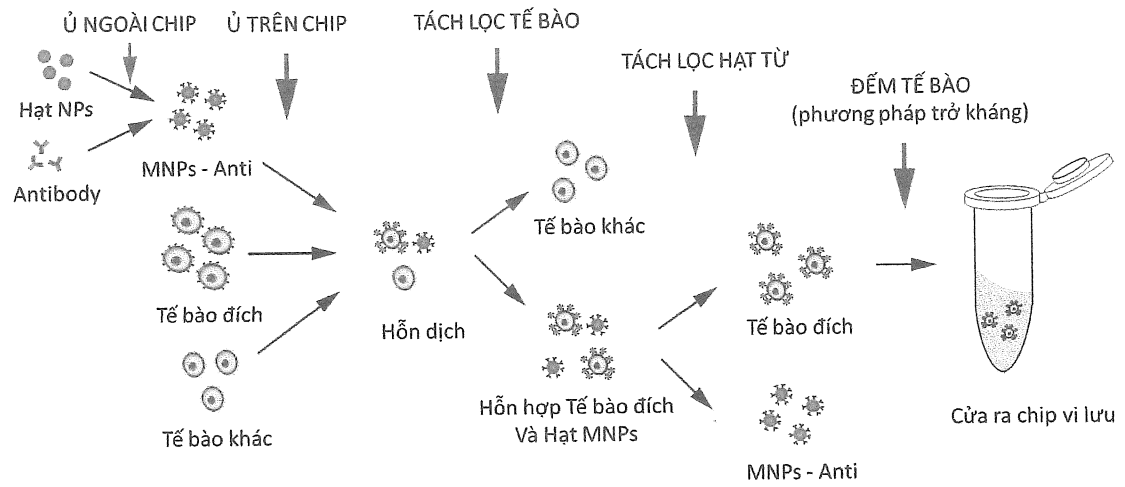
HÌNH 2



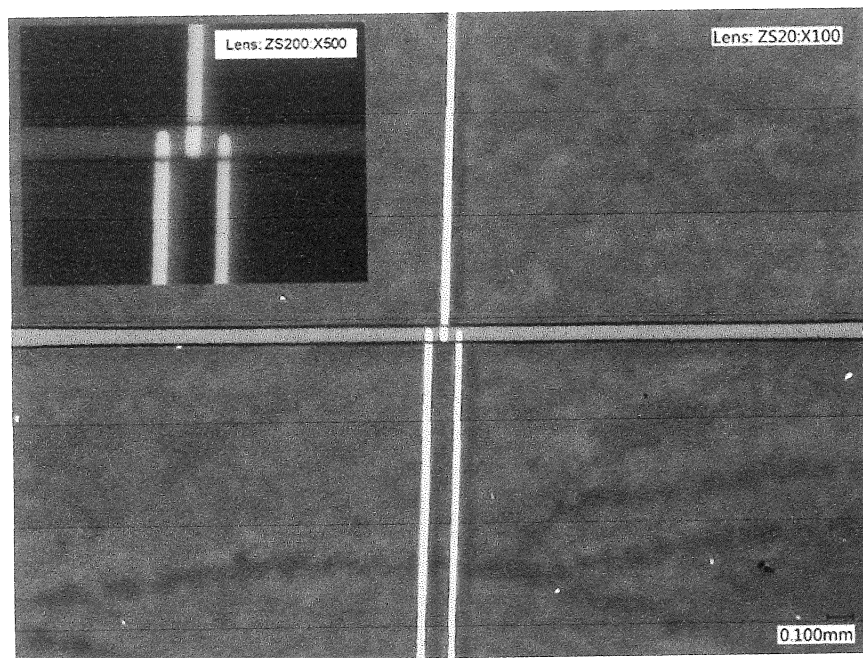
HÌNH 3



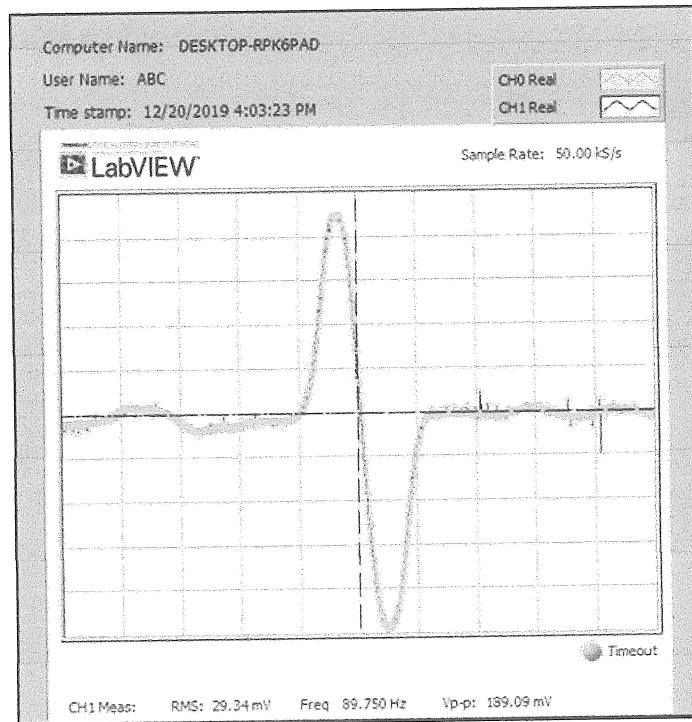
HÌNH 4



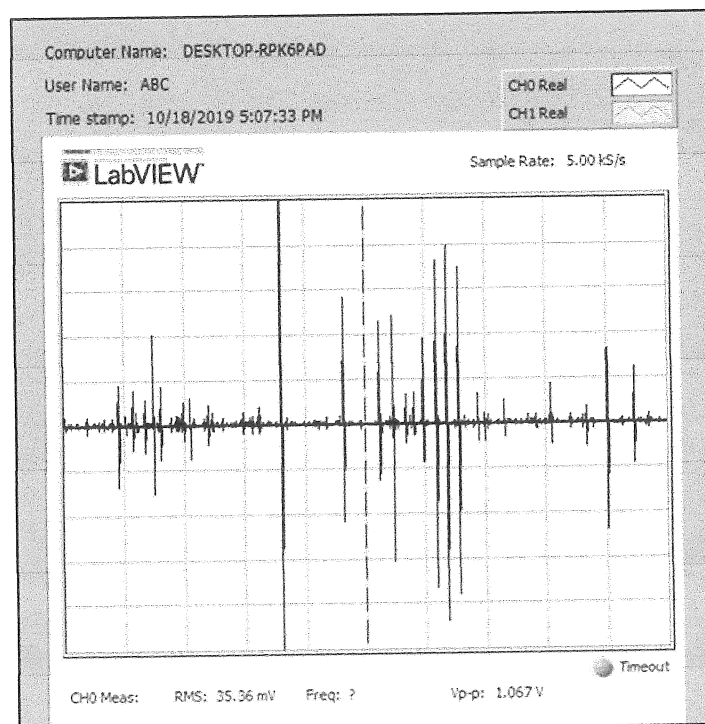
HÌNH 5



HÌNH 6



HÌNH 7



HÌNH 8

