

光流控流式细胞术的研究进展

罗 栋^{1,2} 鲁远甫^{1*} 焦国华¹ 董玉明¹ 刘 鹏¹ 陈四海¹ 吕建成¹

(¹ 中国科学院深圳先进技术研究院光电工程技术中心, 深圳生物医学光电传感技术工程实验室, 广东 深圳 518055)

² 华中科技大学武汉光电国家实验室(筹), 湖北 武汉 430074

摘要 光流控是一项将光学和微流控技术结合起来, 在微芯片上实现部分种类细胞计数、分选等功能的新技术。近些年来伴随着光流控技术的蓬勃发展, 流式细胞仪小型化、价格下降以及更紧凑的趋势逐渐明显, 而这将会给医疗保健诊断以及某些疾病的预防检测带来极大的便利。对目前该领域液流控制、照明及探测光学、新型分选装置等方面的最新进展进行了介绍。

关键词 生物技术; 光流控技术; 流式细胞术; 细胞分选

中图分类号 TN409 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP50.120004

Research Progress of Optofluidic Flow Cytometry

Luo Dong^{1,2} Lu Yuanfu¹ Jiao Guohua¹ Dong Yuming¹ Liu Peng¹

Chen Sihai¹ Lü Jiancheng¹

¹ Biomedical Engineering Laboratory for Photoelectric Sensing Technology, Engineering Center for Optoelectronic Technologies, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen, Guangdong 518055, China

² Wuhan National Laboratory for Optoelectronics, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China

Abstract Optofluidic technology is a new technology which combines optics and microfluidic technology to achieve cell counting and sorting of some species and other functions on the microchip. Miniaturization, lower prices and more compact structure of flow cytometry have been a trend with the vigorous development of optofluidic technologies in recent years. It brings great convenience to health-care diagnostics, prevention and detection of certain diseases, that will improve the living standards of people. We introduce the lighting and detection optics, novel sorting equipment and other aspects of the latest developments in this field.

Key words biotechnology; optofluidic technology; flow cytometry; cell sorting

OCIS codes 170.1530; 230.3990; 060.2380; 290.5820

1 引言

1968年第一台流式细胞计试制了成功, 1972年细胞分选器得到了改进, 能检测到细胞上的微弱荧光信号, 1973年设计出一种实现细胞计数以及细胞分选的双能装置, 这些进展为流式细胞仪免疫检测技术的应用奠定了基础^[1]。特别是随着仪器、方法的不断完善, 流式细胞术的应用领域日益扩大。但由于常规仪器体积大, 价格昂贵, 其广泛应用受到制约。因此, 流式细胞术小型化、微型化的设想开始为人们所考虑, 其中光流控技术由于具有集成度高、体积小、消耗样品少的特点, 可以很好地实现细胞的检测以及分选, 从而得到了

收稿日期: 2013-07-30; 收到修改稿日期: 2013-10-15; 网络出版日期: 2013-11-19

基金项目: 国家自然科学基金(61205101)、深圳市基础研究计划(JCYJ20120617152256889)

作者简介: 罗 栋(1989—), 男, 博士研究生, 主要从事全光纤微流控芯片方面的研究。E-mail: dong.luo@siat.ac.cn

导师简介: 陈四海(1973—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事激光扫描器以及红外探测方面的研究。

E-mail: cshai99@163.com

* 通信联系人。E-mail: yf.lu@siat.ac.cn

本文电子版彩色效果请详见中国光学期刊网 www.opticsjournal.net

国内外很多研究机构的关注。

光流控流式细胞术主要包括三部分:样品聚焦、信号探测以及细胞分选^[2],分别与液流系统、光学探测系统以及分选系统相对应。其基本工作原理为:用注射泵等一类工具产生压力通过鞘液夹流方式来实现样品的聚焦,使被荧光标记的细胞呈单粒子排列经过检测区域,然后入射光照射到细胞上产生荧光或散射光,通过检测器信号变化实现检测,最后根据检测器反馈的信号判断细胞种类等信息,通过施加外力场操控细胞液的流向实现细胞分选。本文将从三个主要系统的最新研究成果来展示近些年光流控流式细胞术的研究进展。

2 液流系统

光流控流式细胞术需要将微粒呈单排排列经过检测区域,这对细胞探测计数以及细胞分选都是至关重要的,其借鉴了台式流式细胞仪夹流聚焦的方法,利用鞘液夹流方式来实现细胞微粒的单排排列。20世纪之前的聚焦方式基本上是二维(2D)聚焦,常见的聚焦方法有水动力聚焦以及电渗流聚焦等。

2.1 二维聚焦

在传统的流式细胞仪中,电渗流聚焦方式尽管简单方便,但是高压电场容易破坏细胞的活性,介电泳(DEP)聚焦方式的加工又比较复杂^[2],故目前采用水动力聚焦方式的占多数。其利用注射泵将样品与鞘液同时压入流动室,样品细胞在周围鞘液的挤压下,流径会被压缩,通过调节鞘液和样品液的流速,即可控制样品流径的大小。1998年,Knight等^[3]将鞘液通道与样品通道加工成垂直的方向,成功地将 $10\ \mu\text{m}$ 宽的微通道中的样品流径压缩至 $50\ \text{nm}$ 。2001年, Lee等^[4]在水动力聚焦方式上做了大量研究,建立了相应的数学模型,并制作了一个“Y”型结构的芯片利用注射泵控制鞘液及样品流速来控制样品流径,如图1所示。他们的实验结果表明在直径为 $2.4\ \text{mm}$ 的圆通道中可以将样品流径控制到和微米尺寸颗粒同一量级的程度。

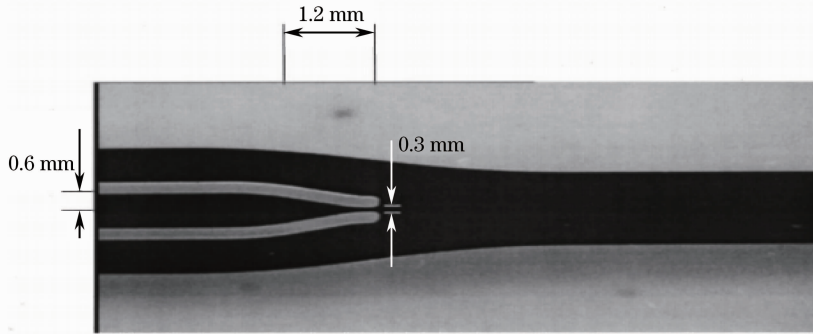


图1 流控流式细胞仪液流系统结构图^[4]

Fig.1 Flow system structure of optofluidic flow cytometer^[4]

2.2 三维聚焦

仅仅达到微粒的二维聚焦,还是会对后续的光学探测、细胞计数以及细胞分选的精度和准确性造成影响,如何用最简单的结构以及微型的器件实现微粒的三维(3D)聚焦成了一个相当重要的课题。目前三维聚焦主要采用的是水动力聚焦,此方式在最近几年不断发展^[5-9],不过还是存在一些问题。大部分基于此种方式的三维水动力聚焦系统采用了多层微流通道,这会使微芯片的制作过程和操控方法更加复杂。不过采用三维聚焦方式是一个必然趋势。

最近, Lin等^[10]设计了一个单通道、单鞘液入口的三维水动力聚焦装置,仿真表明,此结构三维水动力聚焦在合适的水流条件下是可以实现的,用荧光玻璃粉以及荧光标定细胞的实验均取得了不错的探测效果,有望用于实现光流控流式细胞术液流系统的小型化。

传统的流式细胞仪都在很大程度上依赖鞘流将微粒聚焦,为此不惜使用复杂的结构装置来形成合适的鞘流。而微流控流式细胞术往往通过将芯片分层或嵌入微电极来提供电力^[11]、介电泳力或者表面声波^[12]等引导鞘流^[13]。若能在不用鞘流的同时又将微粒聚焦,则能避免复杂的鞘流驱动设计,从而达到小型化的目的。

Yang 等^[14]提出了一种新型的无鞘流三维聚焦方法,并称之为“弹性力-惯性力微粒聚焦”。其不需要提供任何外力,仅需添加弹性力增强剂聚氧化乙烯。仿真结果如图 2 所示,其中 Re 为表征微流体惯性力的雷诺数, Wi 为表征微流体弹性力的魏森贝格数。图 2(a)中, $Re>0, Wi\approx 0$,即相当于惯性力处于主导地位时,微粒的平衡位置会围绕在矩形微通道的中心线上;图 2(b)中, $Re\approx 0, Wi>0$,即相当于弹性力处于主导地位,微粒的平衡位置会在中心线上以及矩形微通道角落上;图 2(c)中, $Re>0, Wi>0$,此情形下惯性力和弹性力同时存在,微粒的平衡位置可以处于矩形微通道的中心线上。实验采用了 $5.9\ \mu\text{m}$ 以及 $2.3\ \mu\text{m}$ 微粒并研究了其惯性-弹性效应,取得了不错的结果。尽管人们还不清楚很多生物聚合物大分子如蛋白质等的惯性-弹性效应对微粒移动的影响,但是这种简便方法可以给未来的液流系统微型化设计提供新的思路。

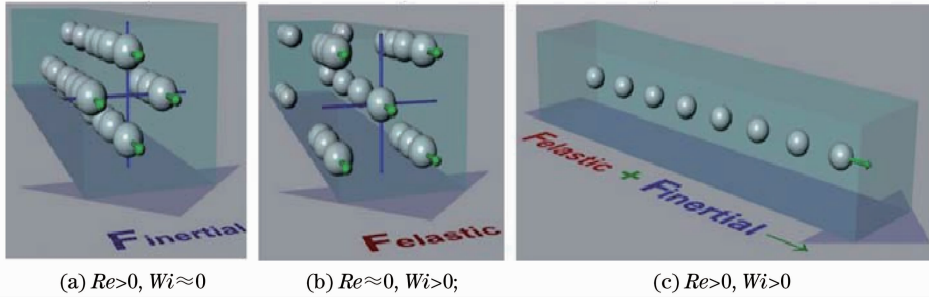


图 2 三维水动力聚焦原理图^[14]

Fig. 2 Schematic diagram of three-dimensional hydrodynamic focusing^[14]

3 光学探测系统

微流控流式细胞术中的微粒检测技术分为光学检测和阻抗检测^[15],其中光学检测分为荧光检测和散射光检测,散射光包含前向散射(FSC)及侧向散射(SSC)。入射光纤与探测光纤之间的角度比较小(约 $3^\circ\sim 12^\circ$)的时候,微流控芯片探测的是前向散射光信号;角度接近 90° 时探测的是侧向散射光信号。若入射光纤与探测光纤完全平行,可以用于荧光探测以及阻抗探测,这种结构制作较容易。这几种方法都是将光电信号转换成计算机能识别的信号,然后加以处理分析,进而反映微粒的大小、形态甚至细胞的表面特征。阻抗检测尽管制作方便,不需要复杂的光学系统,便于小型化,但是其在分析精度、特异性以及分析参数上还是与光学检测有些差距。下面将主要介绍基于不同光传导方式的光学探测系统。

最近,Barat 等^[16]用玻璃衬底以及 SU-8 材料设计制成了一种新型的微流控流式细胞仪,如图 3(a)所示,其拥有目前已知的三种不同的探测方式:荧光探测、散射光探测以及阻抗探测,并且这几种方式可以同时

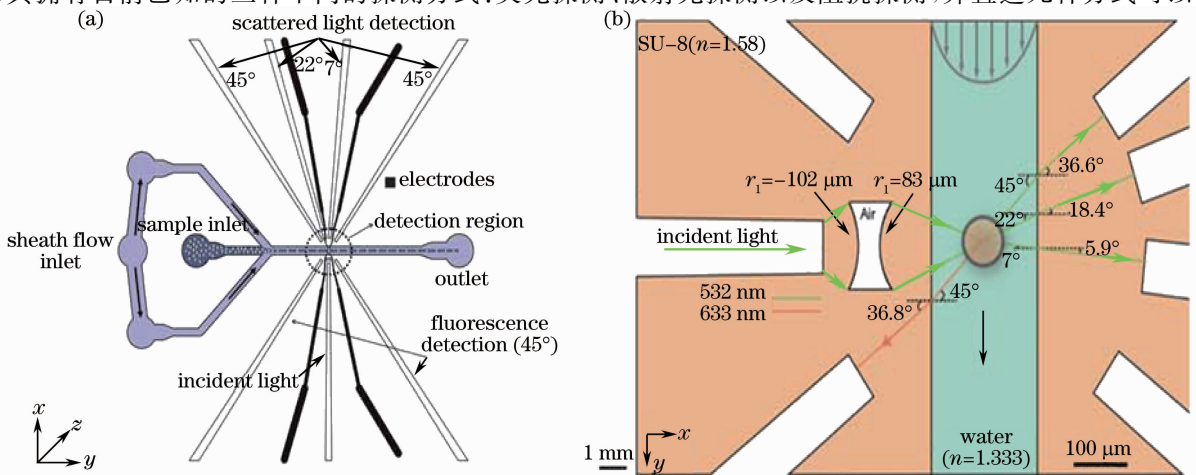


图 3 光学探测系统。(a)一种微流控流式细胞仪结构图; (b)光学探测区域示意图^[16]

Fig. 3 Optical detection system. (a) A microfluidic flow cytometry structure diagram; (b) schematic diagram of the optical detection region^[16]

进行。如图 3(b)所示,入射光从左边进入,通过棱镜聚焦到经过的微粒上,与入射光同一侧的两条波导为荧光探测通道,与入射光异侧的四条波导为散射光探测通道。进行阻抗检测所需的微电极在微粒液流通道的上方,即在图 3(b)中 z 轴方向上,图中并没有画出。他们用不同直径的玻璃粉(7,10,15,20,25,31 μm)测试了仪器的性能并与传统的台式流式细胞仪进行了比较,结果表明几种探测方式均可有效地辨别不同尺寸的玻璃粉,在直径为 15 μm 的玻璃粉检测准确度上比较接近台式设备的性能,但是整体上还是有一定的差距。

3.1 光纤

20 世纪 80 年代,流式细胞术光学探测系统中开始使用光纤,因为光纤制作容易,结构简单,很容易嵌入到已设计好的微流控芯片中。Pamme 等^[17]在用发光器给样品照明后,通过光纤收集 15° 以及 45° 光散射信号,最后得到的细胞计数误差系数(CV)在 25%~30%之间,离预计的 5%还有很大距离。内壁粗糙度、入射光发散度、样品的聚焦程度等一系列问题均可影响误差系数。Rene 等^[18]申请了一个用穿孔光纤制作微流控流式细胞术探测系统的专利,专利中详细介绍了光学系统的结构,创新点在于入射光纤与出射光纤是同一根光纤,所以只需在光纤上用飞秒激光器或 CO_2 激光器钻一个孔作为细胞微粒的通道即可。此种方式不但结构简单,而且检测灵敏度很高,但是制作过程需要用到激光精密加工技术,并且细胞通量比较小。

最近,Shen 等^[19]用传统的软刻蚀技术制作了一个可以探测微滴外形特征的微流控芯片,实验使用的是硅油和去离子水的混合液。如图 4 所示,由于通道中经过的是硅油和去离子水液滴,两者反射率不一样,因此当硅油通过探测区域时对应了图 4(d)中矩形波波谷的蓝色区段;当去离子水液滴刚到达探测区域时,反射光强会逐渐上升,代表着矩形波上升的绿色区段;当去离子水完全在探测区域时,反射光强会持续为最高值,代表着矩形波波峰的红色区域。因为波形图上各段区域是可以测量比较的,绿色区域段代表的即是光束宽度,而光束宽度是已知的,因此通过比较即可计算出去离子水液滴的尺寸长度。

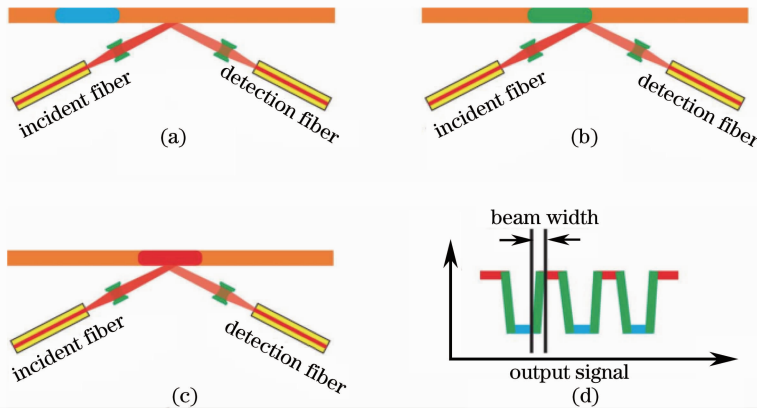


图 4 微滴外形尺寸探测原理示意图^[19]

Fig. 4 Detection schematic diagram of the droplet outline dimensions^[19]

3.2 整合波导

波导的作用是限制光的传输路径,和光纤的作用相似,但是在制作形式上却更为灵活。前面描述的光纤需要在微流控芯片上做好微槽,然后埋入光纤。而波导可以在微流控芯片上做好光通道后,直接往里填充高折射率的液体,一样可以限制光在里面传输,与光纤的作用一样。根据填充物和外围包层的不同,液态波导又分为液-液波导^[20-21]以及液芯波导^[22-24]。通过使用液态波导,近年来出现了许多新型应用,如充气型可调谐激光器^[25]、波导染料激光器^[26]以及马赫-曾德尔干涉仪(MZI)^[27]等。

大多数的液-液波导由连续液流形成,这样可以调节折射率和某些光学部件的形状,其光学性能稳定性取决于液流稳定性,从而增加了设备控制的复杂度。液芯波导指的是在刻蚀形成的通道中注入高折射率液态物质,来限制光在其中传输。Fei 等^[22]使用软刻蚀技术将聚二甲基硅氧烷(PDMS)加工出一个微流控芯片,其中的波导槽靠近微粒通道端是封闭的,注射一种折射率稍高于 PDMS 材料的液体形成液芯波导。与使用光纤和其他波导相比,这种方法制作过程更简单,花费也比较少。

光学系统中用光纤或波导来传输光,由于光纤或波导与微粒主流通道还有一段距离,光束在经过光纤或

波导时会有一个发散角,为此目前大多微流控流式细胞仪均会在光纤或波导出口处添加一个独立棱镜。如图 5 所示,在 Rosenauer 等^[5]的光学系统设计中独立棱镜起着相当重要的作用,曲率半径为 R_1 的棱镜左端面将具有一定发散角的人射光线准直,然后曲率半径为 R_2 的棱镜右端面将接下来的光线聚焦,最大程度地提高入射光的使用率。

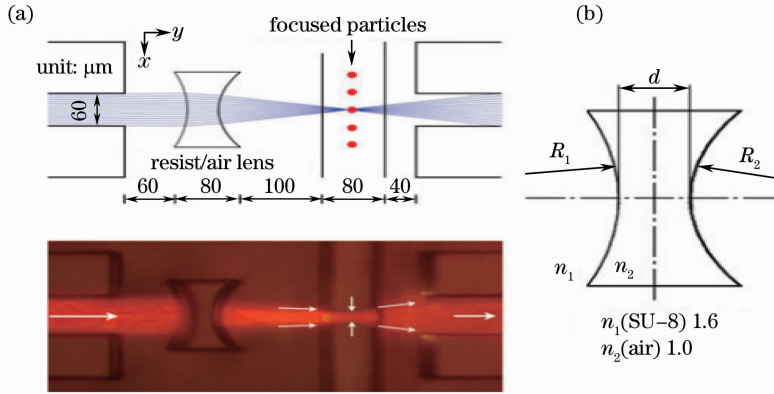


图 5 整合波导光路图。(a)光线聚焦仿真图;(b)带有两个不同曲率半径的凹透镜;(c)光学探测区域的显微照片^[5]

Fig. 5 Optical path diagram in integrated waveguide. (a) Simulation diagram of the focusing light; (b) concave lens with two different radii of curvature; (c) aphotomicrograph of optical detection region^[5]

4 荧光细胞分选

光流控流式细胞仪的发展趋势将是微型化、整合化及智能化。目前台式细胞仪功能已经较为齐全,商用产品不断涌现却价格昂贵,因此微型流式细胞仪的发展受到了大家的关注,其各项功能也将不断完善。关于细胞分选系统,目前可分为两类,一类是荧光激活细胞分选系统(μ FACS),另一类是非荧光激活细胞分选系统。关于非荧光激活细胞分选,有磁导入分选^[28]、声学驻波分选^[29]等,由于应用不广泛本文不做详细介绍,有兴趣读者可以查阅最近的一些文献^[8-9,30]。

关于微流控荧光细胞分选机制,也有很多类别,如电渗分选^[31-32]、介电泳分选^[33-34]、压电分选^[35-36]、水动力分选^[37]、光学分选^[38-39]等。光流控流式细胞仪需要尽可能地缩小各部分装置体积,由于目前水动力驱动和光学驱动力的细胞分选装置体积太过庞大,因此下面将重点介绍电渗分选、介电泳分选以及压电分选等方式。

4.1 电渗分选

电渗分选结构因为其相当成熟的制作工艺以及比较简单易控制的液流方式而最早被研究。Fu 等^[31]率先用电渗流驱动方式成功实现了细胞微粒的分选,他们使用 PDMS 制作了一个“T”型的结构,用电动开关来实现细胞的分选;Dittrich 等^[32]利用电渗流效应来改变目标细胞的流动方向,从而实现细胞分选。在鞘液的作用下,样品聚焦形成合适的流经通过荧光探测区域,根据荧光信号的变化控制垂直于主通道上的液流电压来产生电渗流,从而改变细胞的流动方向,进入到各自的收集通道中,如图 6 所示。

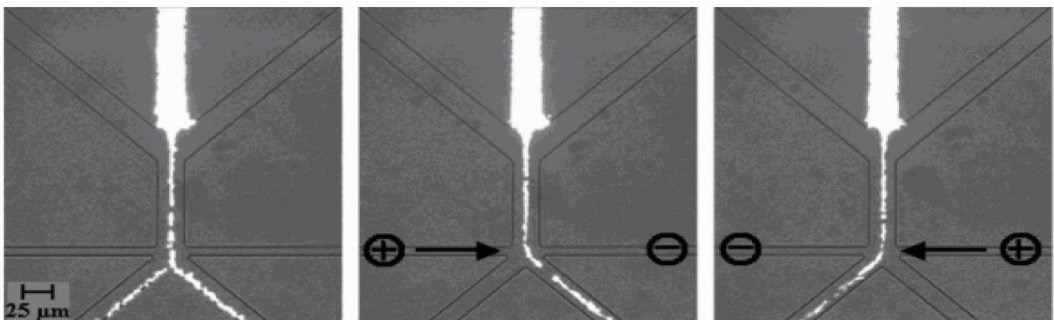


图 6 电渗驱动分选细胞示意图^[32]

Fig. 6 Schematic diagram of the electroosmotic driven sorting^[32]

4.2 介电泳分选

上述电渗流细胞分选尽管制作较简单、操作方便,但是需要比较大的电压(超过 100 V),这将对细胞造成不可逆的伤害,因此电压强度需求较低的介电泳驱动细胞分选被提出。早期人们将介电泳驱动的方法用于捕获细胞,Fiedler 等^[33]就将其用于捕获 L929 细胞;随后人们开始将其用于细胞分选。

Lin 等^[34]利用光学诱导的方法制作了一个可以进行计数和分选的流式细胞仪,该仪器没有使用注射泵,仅靠倾斜芯片来用重力驱动微粒。该装置用光诱导的介电泳驱动的方式来进行微粒的分选。如图 7 所示,实验采用了直径分别为 20.9 μm 和 9.7 μm 的两种聚苯乙烯微粒,较大的颗粒会被较弱的光介电泳开关诱导偏离到下通道,而较小的颗粒会渗透穿过较弱的光介电泳开关,然后被较强的光介电泳开关诱导偏离到上通道,从而达到分选不同微粒的目的。

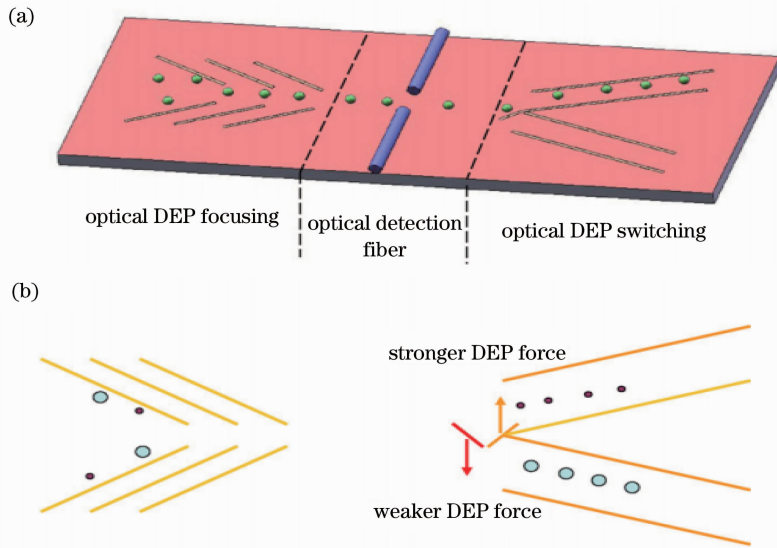


图 7 介电泳分选细胞原理图^[34]

Fig. 7 Schematic diagram of the dielectrophoresis sorting^[34]

4.3 压电分选

压电驱动细胞分选的方法是 2009 年 Chen 等^[35]最早提出的,相较于其他分选方式采用的体积庞大的致动器,该方法所用压电驱动装置和体积比较小。另外其系统细胞通量可达 330 s^{-1} ,分选正确率达到了 70%。随后,Cho 等^[36]用压电驱动细胞分选机制制作了一个便携、廉价的高性能荧光激活细胞分选微系统,如图 8 所示。

在图 8(a)中,空间滤波器可以将光电倍增管(PMT)收集到的探测信号转换成临时的调制波形,这种调

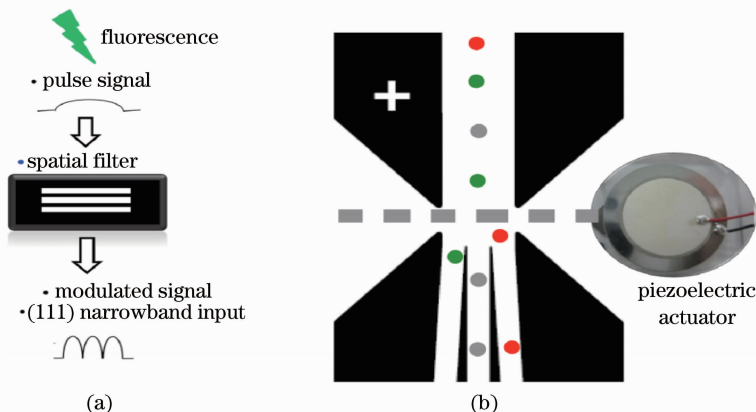


图 8 压电分选。(a)时空编码;(b)压电分选机制的原理图^[36]

Fig. 8 Piezoelectric sorting. (a) Space-time coding; (b) schematic diagram of the piezoelectric sorting^[36]

制波形有多个峰值,是一种对应于不同荧光探测信号编码后的时域信号。然后通过匹配滤波器对应的算法就可以辨别不同的荧光探测信号,即可以达到一个 PMT 探测不同荧光信号的目的,这对于探测多种微粒的微流控流式细胞仪的小型化非常有利。在图 8(b)中,可以看到体积较小也很便宜的压电致动器很适合整合到微流控芯片中去,并且其能重复使用。压电致动器可以在低于 10 V 的电压下工作,其响应时间短于 1 ms,因此用压电分选的微流控流式细胞仪理论上可以达到大于 1000 s^{-1} 的分选速度,这是很多其他方式分选的装置不能比拟的。图中红色和绿色代表的是不同种类的标定细胞,灰色的是未标定的无用颗粒。当红色或绿色的标定细胞经过探测区域的时候,PMT 收集到探测信号,然后通过空间滤波器以及匹配滤波器产生一个电压脉冲,其会触发压电致动器使标定细胞进入到对应的两侧通道;当无用颗粒经过探测区域时不会产生荧光信号,所以不会有电压脉冲触发,无用颗粒将不会改变方向而直接进入中间通道。

4.4 小结

关于各种类别的细胞分选机制优缺点之间的比较如表 1 所示,这些信息也随着技术的发展而不断地更新。水动力分选和光学分选由于装置体积比较庞大而不利于发展,但是如果能够将阀门气压泵微小化,水动力驱动分选将会有有一个很大的发展空间;光学分选急需利用光电二极管等微小的发光器件替代激光器。电渗分选输入电压高,相比较而言介电泳分选以及压电分选的发展空间会更大。

表 1 各种细胞分选机制之间的比较^[40]

Table 1 Comparison between various cell sorting mechanisms^[40]

Sorting mechanism	Advantages	Disadvantages
Hydrodynamic	High throughput (higher than 10000 s^{-1}); low-cell damage; easy fabrication; high enriching capability	Slow response; requiring bulky external actuators; low purity
Optical forces	Contactless manipulation; low-cell damage; fluid flow-independent particle movement; high purity	Limited throughput; extensive optical setup
Electroosmosis	Easy fabrication; simple control; uniform flow pattern	High input voltage (100 V); ion depletion; low-cell viability; low throughput
Dielectrophoresis	Able to trap cells; low-cell damage; fluid flow-independent particle movement	Cell property-dependent; low throughput; requiring use of buffer of different ionic strength; complex fabrication
Piezoelectric	High throughput (higher than 10000 s^{-1}); fast response; low-cell damage; easy fabrication; high enriching capability	Low medium purity

另外,在前面所介绍的探测系统中可以将散射光和荧光检测相结合,同样地,在细胞分选装置中,也可以将非荧光激活细胞分选和荧光激活细胞分选结合在一起,这也会是一个新的发展方向。

5 结束语

目前基于光流控的流式细胞仪与传统的流式细胞仪相比,其性能在某些方面还有一定的不足,具体体现在:1)光流控流式细胞术目前主要用于分析纯度较高的简单样品,很难处理复杂样品;2)现在的光流控流式细胞术大多还采用二维聚焦,这会使探测精度和细胞分选受到影响;3)光流控流式细胞术的检测精度还是低于传统的流式细胞仪。在将来,光流控流式细胞仪为了提高探测精度必然采用三维聚焦方式。为了增强对复杂样品的处理能力,必须使所有不同尺寸的细胞在不同速率的液流里均能速度一致地经过液流通道,这对于光学检测和细胞分选相当重要。激光器、探测器、注射泵、致动器以及一些电子设备仍会使最终的芯片外接系统过于庞大,外围设备需要尽可能地集成到芯片上。随着光流控技术的不断发展,由于其微型、便捷的特性,在医疗、疾病预防等诸多领域将会展现更多不可替代的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Wei Xiyin, Niu Ruifang. The development history, mechanism and application of flow cytometer [J]. Modern Instruments

- and Medical Treatment, 2006, (4): 8–11.
- 魏熙胤, 牛瑞芳. 流式细胞仪的发展历史及其原理和应用进展[J]. 现代仪器, 2006, (4): 8–11.
- 2 Liu Shoukun, Su Xianzhong, Jin Qinghui, *et al.*. Microfluidic chip flow cytometry [J]. Microelectronics, 2009, 39(5): 696–703.
- 刘守坤, 苏显中, 金庆辉, 等. 微流控芯片流式细胞术[J]. 微电子学, 2009, 39(5): 696–703.
- 3 J Knight, A Vishwanath, J Brody, *et al.*. Hydrodynamic focusing on a silicon chip: mixing nanoliters in microseconds [J]. Phys Rev Lett, 1998, 80(17): 3863–3866.
- 4 G Lee, C Hung, B Ke, *et al.*. Hydrodynamic focusing for a micromachined flow cytometer [J]. J Fluids Engineering, 2001, 123(3): 672–679.
- 5 M Rosenauer, W Buchegger, I Finoulet, *et al.*. Miniaturized flow cytometer with 3D hydrodynamic particle focusing and integrated optical elements applying silicon photodiodes [J]. Microfluidics and Nanofluidics, 2011, 10(4): 761–771.
- 6 S Hong, P Tsou, C Chou, *et al.*. Microfluidic three-dimensional hydrodynamic flow focusing for the rapid protein concentration analysis [J]. Biomicrofluidics, 2012, 6(2): 024132.
- 7 G Testa, R Bernini. Micro flow cytometer with 3D hydrodynamic focusing [C]. SPIE, 2012, 8212: 82120H.
- 8 J Godin, C Chen, S Cho, *et al.*. Microfluidics and photonics for bio-system-on-a-chip: a review of advancements in technology towards a microfluidic flow cytometry chip [J]. J Biophotonics, 2008, 1(5): 355–376.
- 9 T D Chung, H C Kim. Recent advances in miniaturized microfluidic flow cytometry for clinical use [J]. Electrophoresis, 2007, 28(24): 4511–4520.
- 10 S Lin, P Yen, C Peng, *et al.*. Single channel layer, single sheath-flow inlet microfluidic flow cytometer with three-dimensional hydrodynamic focusing [J]. Lab Chip, 2012, 12(17): 3135–3141.
- 11 Y W Kim, J Y Yoo. Axisymmetric flow focusing of particles in a single microchannel [J]. Lab Chip, 2009, 9(8): 1043–1045.
- 12 J Shi, X Mao, D Ahmed, *et al.*. Focusing microparticles in a microfluidic channel with standing surface acoustic waves (SSAW) [J]. Lab Chip, 2008, 8(2): 221–223.
- 13 Wan Jing, Liang Zhongcheng. New techniques of optofluidic chip on actuation of liquid [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2010, 47(9): 091302.
- 万 静, 梁忠诚. 微流控光学芯片中新型液体驱动技术[J]. 激光与光电子学进展, 2010, 47(9): 091302.
- 14 S Yang, J Y Kim, S J Lee, *et al.*. Sheathless elasto-inertial particle focusing and continuous separation in a straight rectangular microchannel [J]. Lab Chip, 2011, 11(2): 266–273.
- 15 S Emaminejad, M Javanmard, R W Dutton, *et al.*. Microfluidic diagnostic tool for the developing world: contactless impedance flow cytometry [J]. Lab Chip, 2012, 12(21): 4499–4507.
- 16 D Barat, D Spencer, G Benazzi, *et al.*. Simultaneous high speed optical and impedance analysis of single particles with a microfluidic cytometer [J]. Lab Chip, 2012, 12(1): 118–126.
- 17 N Pamme, R Koyama, A Manz. Counting and sizing of particles and particle agglomerates in a microfluidic device using laser light scattering: application to a particle-enhanced immunoassay [J]. Lab Chip, 2003, 3(3): 187–192.
- 18 B Rene, F Michel, C Alain. Flow Cytometry Analysis Across Optical Fiber [P]. World Patent, WO2007/022641, 2007-03-01.
- 19 Z Shen, Y Zou, X Chen. Characterization of microdroplets using optofluidic signals [J]. Lab Chip, 2012, 12(19): 3816–3820.
- 20 S K Tang, B T Mayers, D V Vezenov, *et al.*. Optical waveguiding using thermal gradients across homogeneous liquids in microfluidic channels [J]. Appl Phys Lett, 2006, 88(6): 061112.
- 21 Y Yang, A Q Liu, L K Chin, *et al.*. Optofluidic waveguide as a transformation optics device for lightwave bending and manipulation [J]. Nature Commun, 2012, 3(1): 651.
- 22 P Fei, Z Chen, Y Men, *et al.*. A compact optofluidic cytometer with integrated liquid-core/PDMS-cladding waveguides [J]. Lab Chip, 2012, 12(19): 3700–3706.
- 23 N Gopalakrishnan, K S Sagar, M B Christiansen, *et al.*. UV patterned nanoporous solid-liquid core waveguides [J]. Opt Express, 2010, 18(12): 12903–12908.
- 24 H C Sung, J Godin, L Yu-Hwa. Optofluidic waveguides in teflon AF-coated PDMS microfluidic channels [J]. IEEE Photon Technol Lett, 2009, 21(15): 1057–1059.
- 25 W Song, D Psaltis. Pneumatically tunable optofluidic dye laser [J]. Appl Phys Lett, 2010, 96(8): 081101.
- 26 Y Yang, A Q Liu, L K Chin, *et al.*. A tunable 3D optofluidic waveguide dye laser via two centrifugal Dean flow streams

- [J]. *Lab Chip*, 2011, 11(18): 3182–3187.
- 27 R Bernini, G Testa, L Zeni, *et al.*. Integrated optofluidic Mach-Zehnder interferometer based on liquid core waveguides [J]. *Appl Phys Lett*, 2008, 93(1): 011106.
- 28 N Pamme, A Manz. On-chip free-flow magnetophoresis; continuous flow separation of magnetic particles and agglomerates [J]. *Anal Chem*, 2004, 76(24): 7250–7256.
- 29 T Laurell, F Petersson, A Nilsson. Chip integrated strategies for acoustic separation and manipulation of cells and particles [J]. *Chem Soc Rev*, 2007, 36(3): 492–506.
- 30 N Pamme. Continuous flow separations in microfluidic devices [J]. *Lab Chip*, 2007, 7(12): 1644–1659.
- 31 A Y Fu, C Spence, A Scherer, *et al.*. A microfabricated fluorescence-activated cell sorter [J]. *Nature Biotechnol*, 1999, 17(11): 1109–1111.
- 32 P S Dittrich, P Schuille. An integrated microfluidic system for reaction, high-sensitivity detection, and sorting of fluorescent cells and particles [J]. *Anal Chem*, 2003, 75(21): 5767–5774.
- 33 S Fiedler, R Hagedorn, T Schnelle, *et al.*. Diffusional electrotitration: generation of pH gradients over arrays of ultramicroelectrodes detected by fluorescence [J]. *Anal Chem*, 1995, 67(5): 820–828.
- 34 Y Lin, G Lee. Optically induced flow cytometry for continuous microparticle counting and sorting [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 24(4): 572–578.
- 35 C H Chen, S H Cho, F Tsai, *et al.*. Microfluidic cell sorter with integrated piezoelectric actuator [J]. *Biomedical Microdevices*, 2009, 11(6): 1223–1231.
- 36 S H Cho, C H Chen, Y H Lo. Optofluidic biosensors-miniaturized multi-color flow cytometer and fluorescence-activated cell sorter (microFACS) [C]. *SPIE*, 2011, 8089: 80990F.
- 37 A Wolff, I R Perch-Nielsen, U D Larsen, *et al.*. Integrating advanced functionality in a microfabricated high-throughput fluorescent-activated cell sorter [J]. *Lab Chip*, 2003, 3(1): 22–27.
- 38 M M Wang, E Tu, D E Raymond, *et al.*. Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching [J]. *Nature Biotechnol*, 2005, 23(1): 83–87.
- 39 Zhou Yanhuang, Li Jingfang, Ren Youjian, *et al.*. Optical tweezers arrays based on double-plate shearing interference for microfluidic particle sorter [J]. *Chinese J Lasers*, 2010, 37(6): 1659–1664.
周妍煌, 李婧方, 任有健, 等. 适用于微流控芯片颗粒分选的阵列光镊系统[J]. *中国激光*, 2010, 37(6): 1659–1664.
- 40 S H Cho, J M Godin, C H Chen, *et al.*. Recent advancements in optofluidic flow cytometer [J]. *Biomicrofluidics*, 2010, 4(4): 043001.