

DOI: 10.3969/j.issn.1673-6141.2024.01.003

# 藻细胞显微成像中微流控自动进样 分段控制方法

陈志浩<sup>1,2,3</sup>, 赵南京<sup>2,3\*</sup>, 殷高方<sup>2,3</sup>, 马明俊<sup>1,2,3</sup>,  
董鸣<sup>1,2,3</sup>, 华卉<sup>1,2,3</sup>, 丁志超<sup>1,2,3</sup>

(1 中国科学技术大学环境科学与光电技术学院, 安徽 合肥 230026;

2 中国科学院合肥物质科学研究院安徽光学精密机械研究所, 中国科学院环境光学与技术重点实验室,

安徽 合肥 230031;

3 安徽省环境光学监测技术重点实验室, 安徽 合肥 230031)

**摘要:** 藻细胞显微图像快速自动获取具有重要的应用价值。针对微流控-显微成像技术中样品进样效率与细胞成像质量问题, 研究了基于藻细胞通过荧光检测窗口持续时间的样品平均流速检测方法, 并提出基于体积流量调节的微流控自动进样分段控制方法。结果表明, 进样速度在 10~30  $\mu\text{L}/\text{min}$  范围内, 样品平均流速检测误差小于 5%; 分段控制实现了藻细胞显微图像的高质量自动获取, 与显微镜成像质量基本一致, 且样品进样速度提升 68% 以上。研究结果为藻细胞显微图像高效自动获取提供了有效实用方法。

**关键词:** 藻细胞; 微流控-显微成像; 流速检测; 分段控制; 自动进样

中图分类号: Q-334

文献标识码: A

文章编号: 1673-6141(2024)01-038-009

## A subsection control method of microfluidic automatic sampling in algal cell microscopic imaging

CHEN Zhihao<sup>1,2,3</sup>, ZHAO Nanjing<sup>2,3\*</sup>, YIN Gaofang<sup>2,3</sup>, MA Mingjun<sup>1,2,3</sup>,  
DONG Ming<sup>1,2,3</sup>, HUA Hui<sup>1,2,3</sup>, DING Zhichao<sup>1,2,3</sup>

(1 School of Environmental Science and Optoelectronic Technology, University of Science and Technology of China,  
Hefei 230026, China;

2 Key Laboratory of Environment Optics and Technology, Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, HFIPS,  
Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

3 Key Laboratory of Optical Monitoring Technology for Environment, Anhui Province, Hefei 230031, China)

**Abstract:** The rapid and automatic acquisition of microscopic images of algae cells has important application value. To address the issues of sample injection efficiency and cell imaging quality in

基金项目: 国家自然科学基金 (61875207, 62005001)

作者简介: 陈志浩 (1996-), 湖北黄冈人, 硕士研究生, 主要从事微流控细胞显微成像方面的研究。E-mail: zhchen@aiofm.ac.cn

导师简介: 赵南京 (1976-), 安徽砀山人, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事环境光学监测技术于研究与系统研发工作。

E-mail: njzhao@aiofm.ac.cn

收稿日期: 2021-04-08; 修改日期: 2021-05-20

\*通信作者。

microfluidic-microscopic imaging technology, a method for detecting the average flow rate of samples based on the duration of algal cells passing through the fluorescence detection window is studied, and a segmented control method of microfluidic auto-injection based on volume flow regulation is proposed. The results show that the average flow rate detection error of the sample is less than 5% when the sampling speed is within the range of 10-30  $\mu\text{L}/\text{min}$ , and the segmented control realizes the automatic acquisition of high-quality microscopic images for algae cells. The quality of the microscopic images is basically consistent with that of microscopy, while the sample injection speed is increased by more than 68%. The research results provide an effective and practical method for efficient and automatic acquisition of microscopic images of algae cells.

**Key words:** algae cells; microfluidic-microscopic imaging; flow rate detection; segmented control; automatic sampling

## 0 引言

藻类分类鉴别<sup>[1-4]</sup>及定量分析在水生态环境保护、水质安全监测、生物研究等领域具有重要的应用价值。基于形态学的藻类分类鉴别方法是当前发展方向之一,其中藻细胞图像的高质量自动获取是分类鉴别的基础。

流式细胞术与显微摄像结合是实现藻类显微成像的一种有效方式<sup>[5]</sup>。微流控芯片具有低成本、易制造、高透光性等优点,被广泛应用在细胞研究方面<sup>[6]</sup>,可与显微成像技术耦合实现细胞显微成像。国外一些研究人员结合手机成像和微流控芯片技术设计了细胞检测装置,并实现了实时图像处理<sup>[7-9]</sup>。Heo等<sup>[10]</sup>利用微流控芯片通过极少的硬件获取了单细胞图像,用以分析细胞群。Goudar等<sup>[11]</sup>利用自组装细胞阵列芯片上获取肿瘤细胞图像自动获取。Fan等<sup>[12]</sup>通过微流体平台与点阵光片显微镜构建了成像系统,实现了亚细胞分辨率的细胞图像连续获取。国内楚惠<sup>[13]</sup>基于手机图像采集结合微流控技术实现了海洋藻类细胞形态特征的提取与辨别。显微成像中进样速度与细胞图像质量往往不能兼顾,因此,进样速度较快时,常采用高速相机以获取高质量图像,但此时存在因数据量大而难以储存和处理的缺陷<sup>[14]</sup>;进样速度较慢时,检测效率低<sup>[15]</sup>,实现藻类细胞进入成像区域之前的进样控制,在保证藻细胞成像质量的同时,可快速自动获取藻细胞图像并提高进样效率,将具有重大的应用价值。因此,当样品流中无藻细胞存在时,自动进样可高速进行;当有藻细胞存在时,需降低进样速度以便成像检测,然而其中关键在于如何预知藻细胞进入显微成像区域的时间,以及如何进行进样控制以实现藻细胞图像的有效获取。基于此,本文研究了基于藻细胞通过荧光检测窗口持续时间的样品平均流速检测方法,以及基于体积流量调节的微流控自动进样分段控制方法。

## 1 实验装置与方法

### 1.1 实验装置

设计的微流控-显微成像藻细胞检测实验装置由细胞检测、显微成像和微流路控制三部分组成,如图1所示。其中细胞检测部分由激光二极管(LD)、60x物镜、窄带滤光片、光电探测器组成,以LD激光激发藻细

胞产生荧光, 判定藻细胞是否存在, 然后基于藻细胞通过荧光检测窗口持续时间分析样品流速; 显微成像部分由微通道芯片 (深度和宽度均为  $100\ \mu\text{m}$ )、60x 显微物镜和互补金属氧化物半导体 (COMS) 相机组成, 可实现藻细胞慢速经过显微成像区域时的图像采集; 微流路部分由高精度注射泵、电磁阀、聚乙烯 (PE) 导管 (内径  $280\ \mu\text{m}$ )、微流控芯片等组成, 可实现样品自动进样与速度调节。

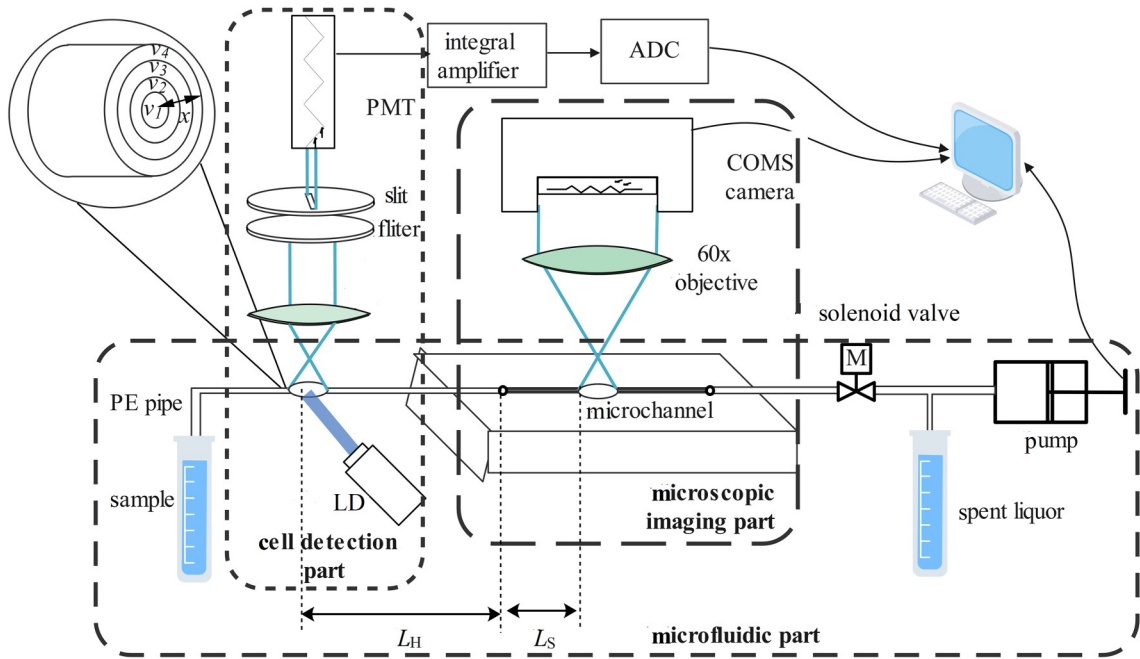


图 1 实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of experiment system

## 1.2 样品流速检测方法

样品流速直接影响细胞成像质量和进样检测效率。细胞进样过程中微流路由于存在层流特性, 管道内同截面液体流速并不一致, 常规进样控制方式并不能简单适用<sup>[16-18]</sup>。因此, 藻细胞在不同层流内的速度检测是实现快速自动进样的前提。本研究提出了一种基于藻细胞经过荧光检测窗口持续时间反演藻细胞速度方法, 并以此计算样品流速, 细胞速度检测原理如图 2 所示。

1) 记录藻细胞通过荧光检测窗口  $W$  时的特征荧光信号 [图 2 (b)]; 2) 以一定检测阈值对特征荧光信号进行二值化处理 [图 2 (a)], 得到连续非零信号持续时间  $T$ ; 3) 连续非零信号长度反映了藻细胞通过荧光检测窗口的时间, 荧光检测窗口宽度由狭缝确定 [图 2 (c)], 因此藻细胞速度  $v = W/T$ , 最后以藻细胞移动速度反映样品流速。

## 1.3 自动进样分段控制方法

显微成像区域在微流路中所占体积为  $0.004\ \mu\text{L}$ , 最高成像分辨率为  $3704 \times 2778$ , 曝光时间为  $10\ \text{ms}$  时, COMS 相机传出帧率为 10, 藻细胞经过显微成像区域时间大于  $1\ \text{s}$  时均能获得较高质量图像 (拖影约  $0.4\ \mu\text{m}$ , 可忽略), 此时低速运输藻细胞的体积流量不能超过  $0.24\ \mu\text{L}/\text{min}$ 。

藻细胞在荧光检测窗口被检测到后, 在进入显微成像区域之前, 管道分为 PE 导管长度  $L_H$  ( $100\ \text{mm}$ ) 和微通道长度  $L_S$  ( $10\ \text{mm}$ ) 两个部分, 体积分别为  $6.16\ \mu\text{L}$  和  $0.10\ \mu\text{L}$ , 如图 3 所示。测量中若以体积流量  $0.24$

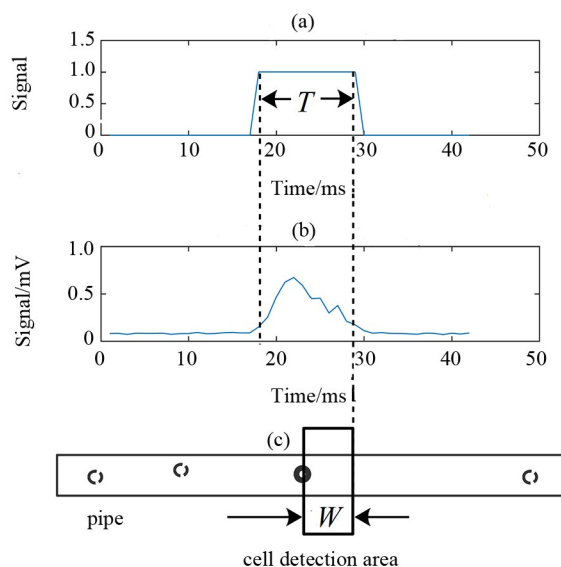


图 2 细胞速度检测原理示意图。(a) 二值化处理的荧光信号; (b) 藻细胞荧光信号; (c) 藻细胞荧光检测过程  
 Fig. 2 Schematic diagram of cell detection device. (a) Binarized fluorescence signal; (b) fluorescence signal of algal cell;  
 (c) detection process of algal cell fluorescence

$\mu\text{L}/\text{min}$  作为恒定进样速度, 则进样时间长, 检测效率低。本研究提出了基于体积流量分段控制的自动进样方法, 即荧光信号被检测到作为藻细胞存在的判定, 此时样品在高速运动区域快速通过, 根据细胞速度自动计算运输时间并在低速运动区域减速, 以低速进入显微成像区域, 从而实现藻细胞图像的自动获取, 提高进样检测效率。

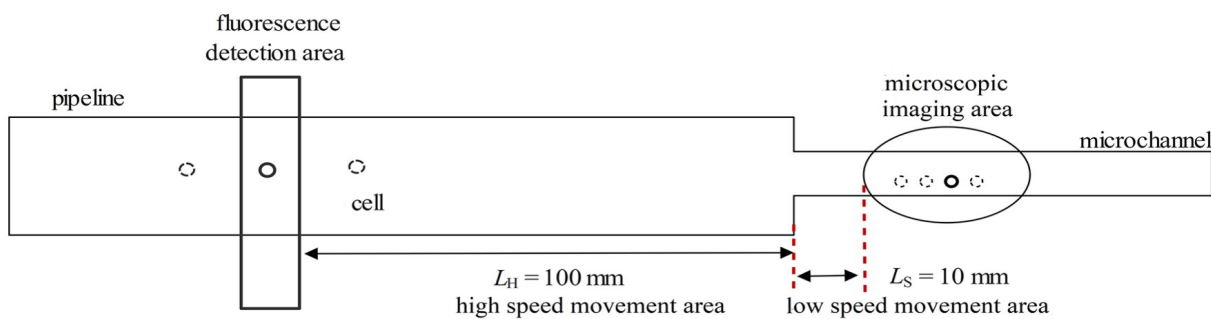


图 3 进样分段控制示意图  
 Fig. 3 Schematic diagram of Injection segment control

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞荧光检测实验分析

#### 2.1.1 荧光检测装置有效性验证

为了验证荧光检测装置具备单个细胞与其被激发的荧光信号一一对应的特性, 实现单细胞检测高灵敏度, 实验验证如下: 降低藻细胞含量进样, 利用 COMS 相机观察管道内藻细胞个数, 确定每次通过管道内藻细胞为单个细胞时的藻溶液的细胞含量; 利用荧光检测窗口对此细胞含量下的藻液进行检测, 由于通道内每次只有单个细胞通过, 则此时荧光信号为单个细胞荧光, 结果如图 4 所示。

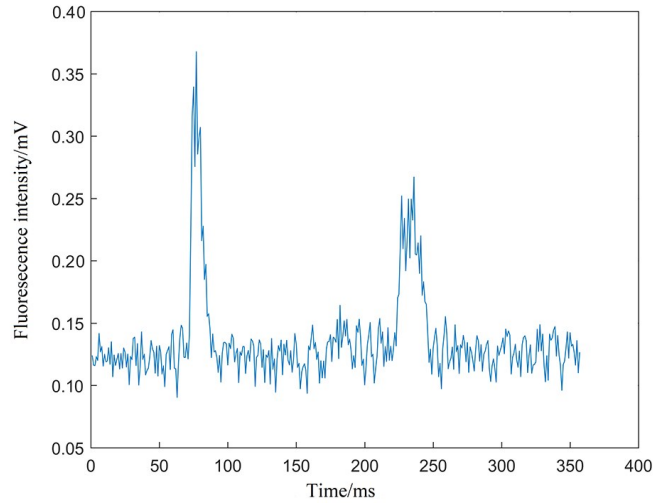


图4 单细胞荧光信号

Fig. 4 Fluorescence signal of single cell

由图可以看出,在保证管路中每次只要单个细胞通过时,单个细胞荧光信号显著且具有较高的独立性,细胞间无相互影响,则荧光检测装置检测细胞具有较高检测可靠性。此外,实际实验中气泡的大小是明显与细胞大小相异的,其带来的误检影响可忽略,即使产生类似的信号,在成像过程中气泡与细胞颜色、形状等完全不同,在图像采集也可规避其带来的误检影响。

### 2.1.2 样品流速分析

在微尺度上,常规  $\mu\text{L}/\text{min}$  或  $\mu\text{L}/\text{s}$  数量级的进样速度条件下微流路中多数流体为低雷诺数层流,各层流间速度差异较大,流体中  $10\ \mu\text{m}$  以下粒径粒子速度与该粒子所在层流的流速近似相同<sup>[19]</sup>。基于藻细胞荧光检测得到的细胞速度为某个层流速度,与基于流量计算出的平均流速不能直接对比。通过统计单位时间内通过管路某一截面均匀分布的大量粒子速度概率分布(图5),进行加权平均可实现管路粒子理论平均速度计算。因此,假设藻细胞在样品流中均匀分布,基于统计单位时间内通过荧光检测窗口藻细胞速度分布,可实现样品流速平均速度分析。

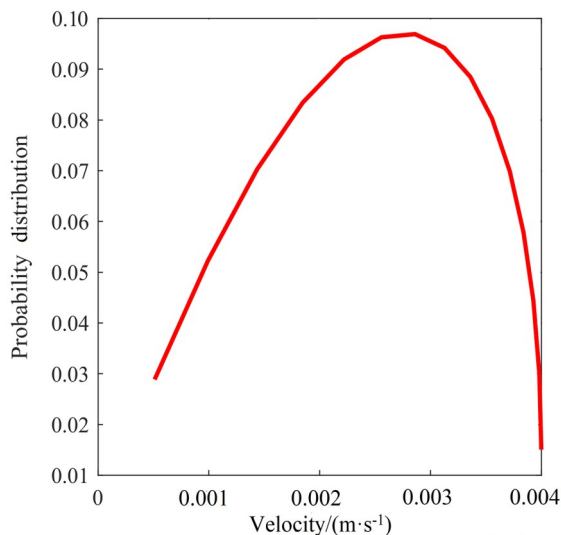


图5 单位时间内通过某截面的粒子速度概率分布

Fig. 5 Probability distribution of particle velocity passing through a section in unit time

在流体粒子速度检测实验中, 将注射泵体积流量设定为 5、10、20、30、40、60、80  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 分别统计了 10 min 内不同体积流量进样速度下的藻细胞速度分布规律, 如图 6 所示。

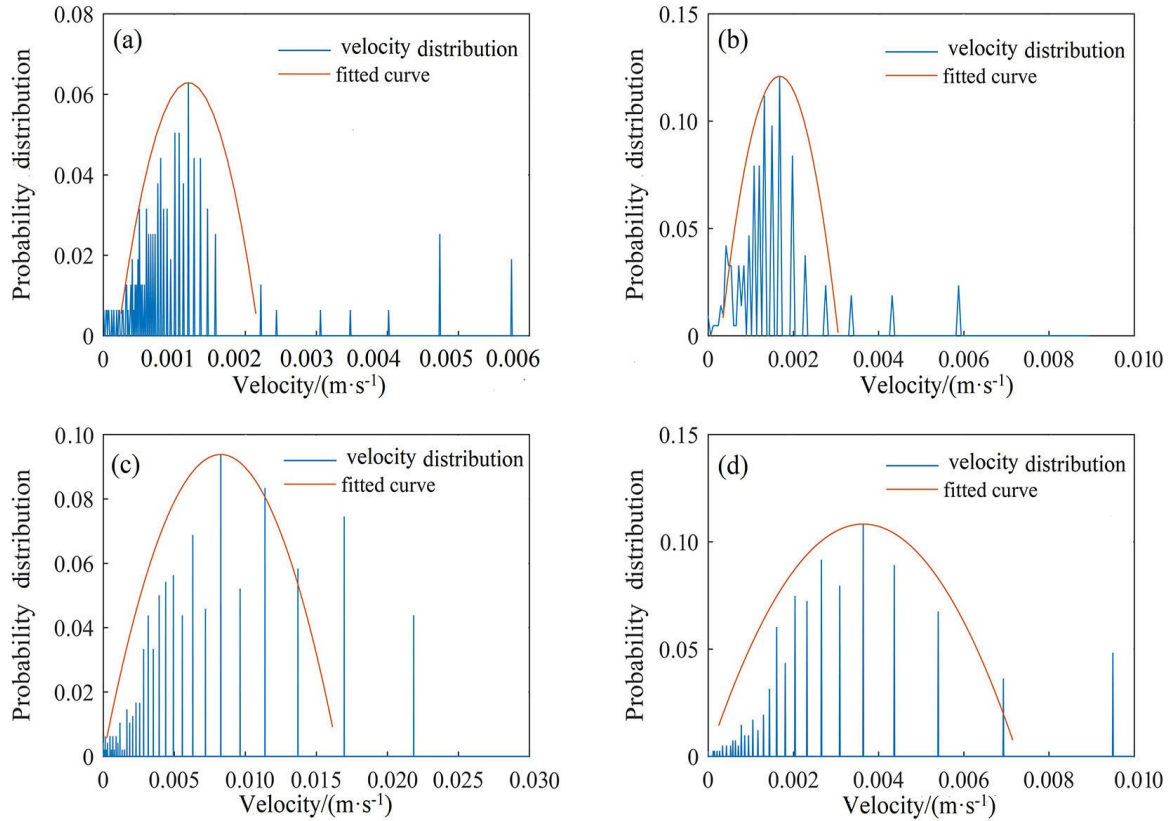


图 6 不同体积流量进样速度下藻细胞速度分布及拟合曲线。(a) 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; (b) 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; (c) 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; (d) 40  $\mu\text{L}/\text{min}$

Fig. 6 Velocity distribution of algae cells under different volumetric flow rates and fitted curve.

(a) 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; (b) 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; (c) 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; (d) 40  $\mu\text{L}/\text{min}$

采用加权平均方法得到单位时间内通过荧光检测窗口藻细胞的平均速度, 作为样品平均流速, 并与理论平均速度对比分析, 结果如表 1 所示。由表可知, 在 10~30  $\mu\text{L}/\text{min}$  流速下, 实验结果与理论计算值误差小于 5%; 在 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  以下及 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  以上误差较大。其原因在于: 较低流速时细胞可能存在自身运动及层流间运动影响, 高流速下细胞通过荧光检测窗口时间较短, 与采样间隔接近导致误差增大。

表 1 样品平均流速与理论结果对比

Table 1 Comparison of sample average flow rate and theoretical rate results

Flow rate/ $(\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1})$	5	10	20	30	40	60	80
Theoretical velocity/ $(\text{mm} \cdot \text{s}^{-1})$	1.35	2.71	5.41	8.12	10.83	16.24	21.65
Experimental Velocity/ $(\text{mm} \cdot \text{s}^{-1})$	1.11	2.76	5.19	7.81	10.18	12.14	27.21
Deviation/%	18.00	1.80	3.98	3.77	5.96	25.25	25.68

## 2.2 藻细胞成像分析

不同流速下自动获取的藻细胞图像与显微镜检结果如图 7 所示, 其中图 7 (a)、(b)、(c) 依次为体积速度在

0.24、1.50、6.00  $\mu\text{L}/\text{min}$  时自动获取的藻细胞图像, 图7 (d) 为显微镜检的藻细胞图像。由图7 (b) 和图7 (c) 可知, 自动获取图像模糊且拖影明显。基于平均梯度算法进行的图像清晰度表征结果如表2所示。由表可以看出, 低流速下自动获取图像清晰度与显微镜检结果相对偏差为1.31%, 且能反映出图像纹理和细节; 当流速大于一定阈值, 自动获取图像清晰度与显微镜检结果相差78.34%以上。

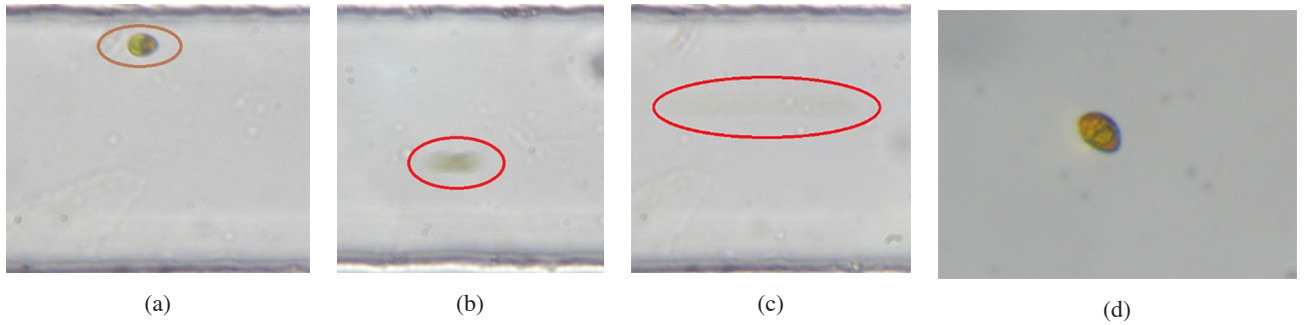


图7 不同流速下藻细胞自动获取图像与显微镜检结果。(a) 0.24  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; (b) 1.50  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; (c) 6.00  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; (d) 镜检图像  
Fig. 7 Automatic acquisition of algae cell images at different flow rates and microscopy results. (a) 0.24  $\mu\text{L}/\text{min}$ ;  
(b) 1.50  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; (c) 6.00  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; (d) images obtained through microscope

表2 成像质量对比

Tabel 2 Comparison of image quality

Image	Fig.7 (a)	Fig.7 (b)	Fig.7 (c)	Fig.7 (d)
Velocity/ $(\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1})$	0.24	1.50	6.00	0.00
Average gradient value	14.42	3.16	1.21	14.61
Deviation/%	1.31	78.34	91.75	0.00

### 2.3 分段控制进样效率分析

为了验证进样分段控制效果, 实验中高速运动区域体积流速设为10  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 低速运动区域体积流速设为0.24  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 进行8组实验, 每次进样三次。对比不同藻细胞运输至显微成像区域所需时间, 并与慢速进样时间对比分析, 以平均进样时间评价分段控制效果, 如表3所示。从表中可以看出, 在速度控制下工作模式的进样时间对比低速条件下的进样时间(275 s), 其中部分细胞进样时间只需23.33 s、24.33 s, 此时单个细胞的进样效率提了90%以上, 但其中也存在进样时间较久的情形如173.00、166.33、156.33 s, 此时细胞进

表3 分段控制和慢速进样的进样时间对比

Tabel 3 Comparison of injection times between segmented control and slow injection

Group	1	2	3	4	5	6	7	8
Injection time under segmented control/s	61.00	58.00	173.00	36.00	76.67	85.00	146.00	156.33
	115.67	37.00	131.67	71.33	40.00	96.67	102.33	128.00
	51.33	24.33	23.33	108.67	55.67	114.33	34.67	166.33
Average time under segmented control/s					87.22			
Theoretical slow injection time/s					275.00			
Improvement/%					68.28			

样效率提高了 37% 以上, 而整体的平均进样时间为 87.22 s, 整体效率提高了 68% 以上, 实现了进样效率的大幅度提升。

### 3 结 论

基于藻细胞通过荧光检测窗口持续时间的样品平均流速检测方法能够实现藻细胞的快速移动速度检测, 在流速 10~30  $\mu\text{L}/\text{min}$  范围具有较高检测可靠性; 基于体积流量调节的微流控自动进样分段控制方法能够自动获取高质量藻细胞图像, 同时样品进样速度提升 68% 以上; 本研究方法解决了样品进样效率与细胞成像质量不能同时兼顾的难题, 为微流控-显微成像技术的进一步应用提供了方法基础。

### 参考文献:

- [1] Wang S Z, Li J G, Gao Z, *et al.* Optical spectral discrimination and titer of phytoplankton & suspension [J]. *Ocean Technology*, 2001, 20(1): 97-103.  
王世忠, 李继刚, 高志, 等. 海水藻类和悬浮物浓度测量仪应用研究 [J]. 海洋技术, 2001, 20(1): 97-103.
- [2] Zhang Q Q, Lei S H, Wang X L, *et al.* Research on discrimination of 3D fluorescence spectra of phytoplanktons [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2004, 24(10): 1227-1229.  
张前前, 类淑河, 王修林, 等. 浮游植物活体三维荧光光谱分类判别方法研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(10): 1227-1229.
- [3] Wang H L, Hong H S, Xu L. Separation and determination of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton by rp-hplc [J]. *Marine Sciences*, 1999, 23(4): 6-9.  
王海黎, 洪华生, 徐立. 反相高效液相色谱法分离、测定海洋浮游植物的叶绿素和类胡萝卜素 [J]. 海洋科学, 1999, 23(4): 6-9.
- [4] Zhang W. *Research on Algae Image Texture Recognition Algorithm Based on Morphology and Incomplete Tree Wavelet Decomposition* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.  
张雯. 基于形态学与不完全树形小波分解的藻类图像纹理识别算法的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [5] Qiao X Y. Research on imbalanced microscopic image classification of harmful algae [J]. *IEEE Access*, 2020, 8: 125438-125446.
- [6] Wang L K, Feng X Z. Microfluidic network for research and application in life sciences [J]. *Progress in Chemistry*, 2005, 17(3): 482-498.  
王立凯, 冯喜增. 微流控芯片技术在生命科学研究中的应用 [J]. 化学进展, 2005, 17(3): 482-498.
- [7] Zhu H Y, Mavandadi S, Coskun A F, *et al.* Optofluidic fluorescent imaging cytometry on a cell phone [J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 83(17): 6641-6647.
- [8] Smith Z J, Chu K Q, Espenson A R, *et al.* Cell-phone-based platform for biomedical device development and education applications [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17150.
- [9] Liang C, Liu Y C, Niu A Y, *et al.* Smartphone-app based point-of-care testing for myocardial infarction biomarker cTnI using an autonomous capillary microfluidic chip with self-aligned on-chip focusing (SOF) lenses [J]. *Lab on a Chip*, 2019, 19(10): 1797-1807.
- [10] Heo Y J, Lee D, Kang J S, *et al.* Real-time image processing for microscopy-based label-free imaging flow cytometry in a



- microfluidic chip [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 11651.
- [11] Goudar V S, Yeh P H, Wu S Y, *et al.* Live circulating tumour cells selection on digitized self-assembled cell array (Digi-saca) chip by in-parallel/in-situ image analysis, cell capture, and cultivation [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 316: 128002.
- [12] Fan Y J, Hsieh H Y, Tsai S F, *et al.* Microfluidic channel integrated with a lattice lightsheet microscopic system for continuous cell imaging [J]. *Lab on a Chip*, 2021, 21(2): 344-354.
- [13] Chu H. *Design of Microalgae Detection System Based on Image Flow Cytometry* [D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2016.
- 楚惠. 基于图像流式细胞技术的微藻检测系统设计 [D]. 大连: 大连海事大学, 2016.
- [14] Han Y Y, Gu Y, Zhang A C, *et al.* Review: Imaging technologies for flow cytometry [J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(24): 4639-4647.
- [15] Hassan S U, Tariq A, Noreen Z, *et al.* Capillary-driven flow microfluidics combined with smartphone detection: An emerging tool for point-of-care diagnostics [J]. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 2020, 10(8): 509.
- [16] Shoji S, Kawai K. Flow control methods and devices in micrometer scale channels [J]. *Topics in Current Chemistry*, 2011, 304: 1-25.
- [17] Campo-Deaño L. *Fluid-flow Characterization in Microfluidics* [M]. Francisco J G R. Complex Fluid-Flows in Microfluidics. Cham: Springer International Publishing, 2017.
- [18] Huang W H, Cheng W, Zhang Z, *et al.* Transport, location, and quantal release monitoring of single cells on a microfluidic device [J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(2): 483-488.
- [19] 姜楠. 谈谈流体中微粒的“功”与“过” [J]. *力学与实践*, 2013, 35(6): 107-110.