

DOI:10.3969/j.issn.1001-4551.2016.07.007

流式分选仪液滴延迟自动校准方法研究*

韩天昊,王 鹏*,余兴龙
(清华大学 精密仪器系,北京 100084)

摘要:针对现有流式分选仪在工作压力发生变化时难以维持液滴延迟稳定的问题,基于液滴延迟产生机理和射流不稳定性理论,在推导出射流速度随工作压力的数学关系后,又推导出了液滴延迟与工作压力和压电激励幅值的数学关系,提出了通过监测工作压力实现自动校准液滴延迟的方法。通过实验验证了射流速度随工作压力、液滴延迟与工作压力和压电激励幅值的理论计算结果,同时还完成了根据工作压力调节压电幅值后实现液滴延迟稳定的实验。研究结果表明,实验结果与理论计算结果基本一致,进一步研究后还能得到改善;根据工作压力调节压电幅值后实现液滴延迟稳定的方法行之有效, T 值误差仅为 0.06。这些研究结果可用于指导根据工作压力变化调节压电激励幅度,实现自动校准液滴延迟,提高细胞分选精度。

关键词:流式分选仪;液滴延迟;数学模型;自动校准

中图分类号:TH79

文献标志码:A

文章编号:1001-4551(2016)07-0810-05

Automated method of calibrating drop delay for flow cytometry

HAN Tian-hao, WANG Peng, YU Xing-long

(Department of Precision Instruments, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: In order to solve the problem of instability of drop delay in a flow cytometer when the driving pressure changes, a mathematic relationship of jet velocity and the driving pressure was deduced and thereafter a mathematic relation between drop delay and relevant parameters was obtained. The experimental curve of jet velocity and the driving pressure, as well as the relation curves of drop delay and the driving pressure or the piezoelectric signal amplitude were obtained by manual calibration. An experiment of maintaining the drop delay through regulating the piezoelectric signal amplitude according to the driving pressure was conducted as well. A good agreement between the experiment results and the mathematical model was found. The results indicate that, with other conditions unchanged, the drop delay remains stable if the driving pressure and the piezoelectric signal amplitude are kept in certain relationship and it is feasible to maintain the drop delay through monitoring the driving pressure.

Key words: flow cytometry; drop delay; mathematical model; automatic calibration

0 引 言

流式分选已成为一种最常用和有效的分离细胞方法^[1]。其原理是:通过对喷嘴喷出的射流施加周期扰动,迫使射流逐渐断裂成包裹细胞的液滴。当一束激光透过刚从喷嘴喷出的射流时,包裹其中的一个细胞所产生的散射光投射到光电倍增管,转换为电信号,即被识别了。液流中依次排列的每个细胞,都一一识别。

就在包含该细胞的液滴从液流脱离的瞬间使其带电,不同的细胞的液滴充电量不同。接着,带电液滴在下落过程中受到高压电场的作用,会偏离自由落体轨迹。不同细胞液滴所带的电荷量不同,偏离角度也不同,落下后可被处在不同位置上的试管收集^[2]。在这过程中,从细胞被识别到含着该细胞的液滴脱离液流的时间称为液滴延迟,若设置的液滴延迟与实际不一致,会导致液滴充电时机不准确,从而引起细胞分选的混乱。因此,液滴延迟是决定分选精度的一个重要参数,也使

收稿日期:2016-03-25

基金项目:国家重大科学仪器设备专项资助项目(2011YQ030134);清华大学自主研究计划资助项目(20131089190)

作者简介:韩天昊(1990-),男,河北沧州人,硕士研究生,主要从事传感器和智能仪器方面的研究。E-mail: hth13@mails.tsinghua.edu.cn

通信联系人:王鹏,男,博士,副研究员。E-mail: pen@mail.tsinghua.edu.cn

得精确测定并稳定控制液滴延迟一直是流式分选的研究热点。

传统流式分选仪的液滴延迟获取方法是:在预先设定的液滴延迟下,分选一定数量的荧光微球并观察分选效果,之后改变液滴延迟的设定值并重复分选实验,反复进行多次,比较结果,直到分选效果达到最好^[3]。其过程繁琐,需要丰富经验,且无法维持液滴延迟稳定。面对不足,有关厂家提出了各自的自动液滴延迟获得方法。例如,BD公司通过激光检测代替人工观察,确定分选出液流中包含的微球数目^[4],提高了获得液滴延迟的效率和精度;BeckmanCoulter公司则是利用摄像机拍摄液流,获得高分辨率图像,经图像处理得到相应的液滴延迟^[5],提高了精度。两者方法各异,然而都是通过调节压电激励的幅度来维持液滴断点位置固定不变^[6],从而保证液滴延迟稳定。可是,当工作压力发生波动即变化时,维持液滴断点位置固定并不能保证液滴延迟的稳定,也会影响分选精度。

针对上述不足,本研究力求在分析液滴延迟形成机理的基础上,建立液滴延迟与工作压力和压电信号幅值等参数的数学关系,并经实验验证,为根据工作压力变化调节压电激励幅度来实现自动校准液滴延迟提供理论指导。

1 模型建立与理论计算

液滴延迟既与压电激励幅度有关,又与射流速度有关,射流速度却受工作压力影响。因此,深入分析射流速度与工作压力、液滴延迟与工作压力以及液滴延迟与压电激励幅值等关系,都是十分必要的。

1.1 射流速度与工作压力的关系

流式分选仪采用高压气体驱动液体流动,显然,气体压力(又称工作压力)决定射流速度,射流速度则影响液滴延迟。因此,首先应确定工作压力与射流速度的关系。

由于样品流量远小于鞘液流量,忽略其影响。这样,在喷嘴结构尺寸、管路直径和长度以及流体性质一

定时,喷嘴出口流速只与工作压力有关,可用伯努利方程^[7-11]概括表示:

$$\frac{p_i}{\rho g} + \frac{\alpha_i v_i^2}{2g} + h_i = \frac{p_o}{\rho g} + \frac{\alpha_o v_o^2}{2g} + h_f + h_m \quad (1)$$

式中: α_i, α_o —动能修正系数; p_i —工作压力; p_o —喷嘴出口压力; v_i —入口流速; v_o —射流速度; h —入口到出口的高度差; ρ —液体密度; g —重力加速度; h_f —由入口到出口的沿程损失, $h_f = \sum \lambda(l/d) \cdot (v^2/2g)$,其中: l, d —各段管路的长度和直径, λ —相应的沿程损失系数,假设在管路中各处均为圆管层流,则: $\lambda = 64\mu/\rho v d$; h_m —管口扩张或收缩引起的局部损失 $h_m = \sum \xi(v^2/2g)$; ξ —局部损失系数,可利用经验公式或查表获得。

由于各段管路直径不一致,以上各式中的流速 v 也不相同。根据质量守恒可得,不同直径 d 的管路中液体流速 $v = v_o d_o^2/d^2$ 。

将方程(1)整理后得到关于射流速度 v_o 和压力 p_i 的方程:

$$A v_o^2 + B v_o - \frac{p_i}{\rho g} - h_i = 0 \quad (2)$$

求解得到:

$$v_o = \frac{\sqrt{B^2 + 4A(p_i/\rho g + h_i)} - B}{2A} \quad (3)$$

其中:

$$\begin{cases} A = \frac{\alpha_o}{2g} + \sum \frac{\xi}{2g} \frac{d_o^2}{d^4} \\ B = \sum \frac{32\mu l}{\rho g} \frac{d_o^2}{d^4} \end{cases}$$

式(3)表明,在管路结构和流体性质确定时,射流速度 v_o 仅与工作压力 p_i 有关,射流速度 v_o 随 p_i 增大而增大,呈现二次函数关系,即工作压力决定射流速度。

先根据实验条件确定管路结构和流体性质等相关参数的值(模型计算涉及参数如表1所示),再利用式(3)可以计算出不同工作压力下的射流速度,其结果将在3.1节中与实验结果进行比较和讨论。

表1 模型计算涉及参数

液体密度 ρ /($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)	空气密度 ρ_a /($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)	液体粘度 μ /pa · s	表面张力 λ /($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$)	重力加速度 g / $\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$	局部损失 系数 ξ	系数 k
1 010	1.25	0.001 1	0.073	10	0.5	0.8e - 9

$d_o/\mu\text{m}$	l_o/mm	d_1/mm	l_1/m	d_i/mm	l_i/m	h_i/m	α_o	α_i
70	0.3	0.75	0.3	1.5	0.5	-0.05	1	1

1.2 液滴延迟与工作压力和压电激励幅值的关系

液滴形成过程如图1所示。根据射流不稳定理论,喷嘴喷出的射流在外界扰动的作用下会破断成一个一个的液滴^[12]。早在1878年, Lord. Rayleigh^[13]就基于

流体力学基本方程分析了毛细射流在外界扰动下破断成液滴的机理,他提出,射流在轴对称扰动下,当扰动的波长大于射流的周长时,射流表面受到的扰动可表达为:

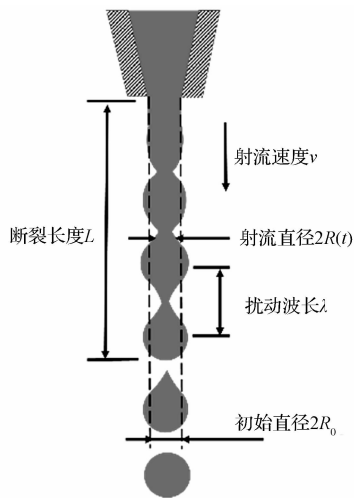


图 1 液滴形成过程示意图

$$\varepsilon = R(t) - R_0 = \varepsilon_0 e^{\beta t} \cos kz \quad (4)$$

式中: $R(t)$ —时间函数的射流半径; R_0 —射流的初始半径; ε_0 —初始扰动; β —扰动增长率; k —波数, $k = 2\pi/\lambda = 2\pi f/v$; λ —扰动波长; v —射流速度; f —扰动频率; z —射流向下发展的长度。

当射流表面初始小扰动增长到与初始射流半径相等时射流断裂,液滴形成,即有:

$$\varepsilon_0 e^{\beta t_b} = R_0 \quad (5)$$

对式(5)求解,便可得到液流从喷嘴喷出到发生断裂的时间,即液滴延迟时间则为:

$$t_b = \frac{1}{\beta} \ln \frac{R_0}{\varepsilon_0} \quad (6)$$

通常,用压电晶体产生振荡来扰动射流,实验结果也表明初始扰动的大小与压电激励幅值 A 成正比^[14]。液滴延迟常用液滴周期数表示,假设 $\varepsilon_n = kA$,则液滴延迟可表示为:

$$T = t_b f = \frac{f}{\beta} \ln \frac{R_0}{KA} = \frac{f}{\beta} \ln \frac{R_0}{k} - \frac{f}{\beta} \ln A \quad (7)$$

式(7)表明,当射流的初始半径和扰动频率确定后,液滴延迟 T 与压电信号幅值 A 成对数关系,与扰动增长率 β 成反比。研究表明,扰动增长率 β 与流体和环境介质的性质以及射流速度 v 有关^[15-17]。

液滴延迟理论计算过程,首先是根据式(3)计算出不同工作压力下射流速度,再利用文献[11]所述的修正算法,选用表1所述的物性值及其他相关参数,计算出不同射流速度下的 β 值(修正参数 A 取 0.175)。然后,根据式(7),完成两项理论计算:

(1) 固定压电幅值 A , 利用不同工作压力下的值,计算出液滴延迟 T 。其结果将在 3.2 节中与实验结果进行比较和讨论。

(2) 固定某个工作压力下的 β 值。利用不同的压电幅值 A , 计算出液滴延迟 T 。其结果将在 3.3 节中与实验结果进行比较和讨论。

2 实验系统和实验操作

实验系统利用所在实验已有的分选平台,示意图如图 2 所示。

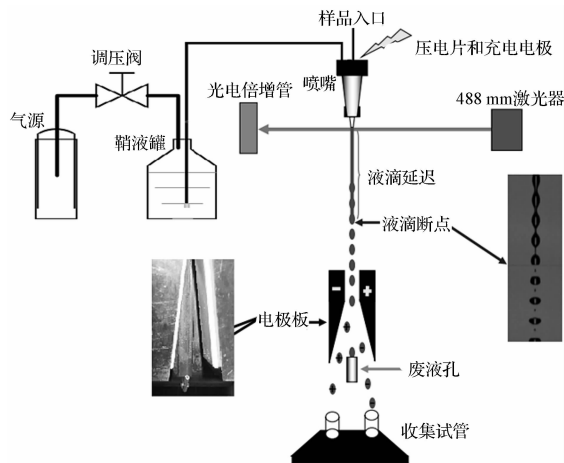


图 2 分选平台示意图

实验中,以高压气体作为气源,经调压阀调节压力后驱动鞘液喷出喷嘴,输出压力范围 0 ~ 45 psi,喷嘴出口直径约为 70 μm 。检测光源采用波长为 488 nm 的固体激光器;样品选择荧光微球,发射波长 532 nm,直径 10 μm ;用光电倍增管检测前向和侧向光信号;压电振荡频率为 10 kHz ~ 100 kHz 可调,幅值为 0 ~ 100 V 可调。系统分选速度超过 8 000/s,分选纯度高于 90%。同时,使用与压电振荡频率相同的高频闪光灯照射液流,用摄像头观察液流状态,其中液滴断点位置的改变可以反映出液滴延迟的变化。

实验操作方法:

(1) 先后打开气路和液路阀门,接着旋转调压阀,将工作压力调整到设定值。

(2) 待流速稳定后,使用量筒收集一定体积的喷出液体,同时记录收集时间。

(3) 通过摄像头观察液滴并调节压电信号频率和幅值,使液滴形成状态较为理想。

(4) 将制备好的荧光微球悬液放入上样器,打开进样开关,微球悬液在气压驱动下通过管路缓慢流入喷嘴。待检测到微球事件后,微调样品压力使事件速率约为 400/s。然后调节光路和光电倍增管增益,直到散点图呈现为清晰的一团。

(5) 在初定的延迟周期(即液滴延迟整数部分)下,分选 160 个液滴,使用显微镜观察并统计分选到的

微球数量。改变设定延迟周期并重复以上实验,比较各个延迟周期下的分选结果,以分选到微球数最多的延迟周期作为当前系统的延迟周期。

(6)在步骤(5)确定的延迟周期下,设定延迟相位(即液滴延迟小数部分,分辨率为1/16个液滴周期),分选10个液滴,使用显微镜观察并统计分选到的微球数量。改变设定延迟相位并重复以上实验,比较不同延迟相位下的分选结果,以分选到微球数最多的延迟相位作为当前系统的延迟相位。这样,前一步所确定的延迟周期与这次所确定的延迟相位之和即为液滴延迟。

(7)停止上样,冲洗管路。先后关闭液路和气路阀门。

3 实验结果分析

3.1 射流速度随工作压力变化

按照前述实验操作,在工作压力为5 psi~40 psi之间,以5 psi为间隔,分别采集一定体积的液体,而后根据单位时间流量计算出射流速度,实验结果如图3所示。

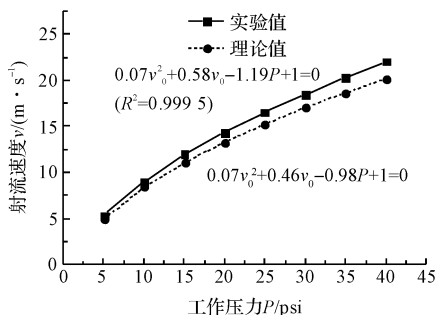


图3 射流速度随工作压力变化

为了便于分析,也将1.2节所述的理论计算结果表示在其中。

从图3可见,实验结果与理论计算的变化趋势一致,曲线形状都是对称轴沿横轴的抛物线。从图3中还可可见,实验拟合方程与理论方程的形式完全相同,这说明射流速度随工作压力变化的数学模型是合理的。不同之处是实验曲线在理论曲线之上,即实验值大于理论值,其拟合方程系数差异与之吻合。分析原因,可能是计算中所使用的管路直径偏小,过高估计了局部损失以及部分结构参数的测量不准确导致的。

3.2 液滴延迟随工作压力变化

压电信号频率和幅值分别选定在52 kHz和100 V。依照前述实验操作,在工作压力为22 psi~38 psi之间,以2 psi为间隔,使用人工校准方法分别获取其液滴延迟,实验结果如图4所示。

为了便于分析,本研究也将1.2节所述液滴延迟

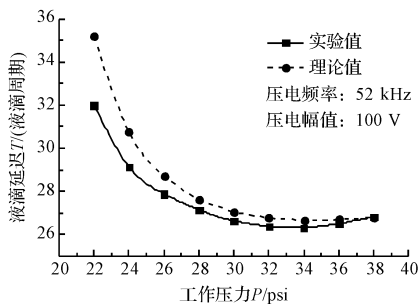


图4 液滴延迟随工作压力变化

随工作压力变化的理论计算结果表示在其中。

由图4可见,实验曲线与理论曲线的变化趋势一致:在所选择的参数范围内,一开始液滴延迟随工作压力增大迅速减小,且减小速率逐渐变缓;在工作压力的一定区间内,液滴延迟T几乎不变;曲线存在拐点,工作压力过了拐点后,液滴延迟又缓慢增大。同时,还不难看出,实验值小于理论值,对应曲线也更平缓,实验曲线要先于理论曲线出现拐点。分析其原因:一是在推导增长率过程中,线性近似不完全符合真实流体的复杂运动,势必引起误差;二是计算时所选用的相关参数和实际情况存在差异,也会造成偏差。在实际应用中,可通过标定来获得不同工作压力下的实际增长率,使理论值与实测值等同或接近。

3.3 液滴延迟随压电信号幅值变化

工作压力和压电信号频率分别选定在30 psi和52 kHz。依照前述实验操作,在压电幅值分别为5 V、10 V、20 V、40 V、60 V、80 V、100 V的条件下,使用人工校准方法分别获取其液滴延迟,实验结果如图5所示。

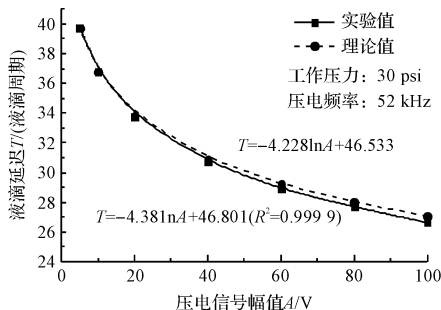


图5 液滴延迟随压电信号幅值变化曲线

为了便于分析,本研究同样将1.2节所述液滴延迟随压电幅值变化的理论计算结果表示在其中。

由图5可见,在所选择的参数范围内,实验曲线与理论曲线的变化趋势一致,液滴延迟T随着压电激励幅值A增大而减小。同时还可可见,实验拟合方程与理论方程的形式完全相同,均呈对数关系且所含系数非常接近,说明液滴延迟随压电信号幅值变化的数学模型原理正确。然而,理论曲线在实验曲线之上,表明前者稍大一点,其拟合方程的系数差异也与之吻合。分析引起原

因,可能是增长率的计算值与实际情况存在偏差所致。

3.4 根据工作压力调节压电幅值保持液滴延迟稳定

按照 3.3 节所述方法,压电频率固定在 52 kHz,分别先在工作压力为 28 psi、30 psi 和 32 psi 的条件下校准液滴延迟,再根据校准结果得出对应的液滴延迟随压电幅值变化的拟合方程。其中:

$$28 \text{ psi}: T = -4.643 \ln A + 48.589 \quad (8)$$

$$30 \text{ psi}: T = -4.38 \ln A + 46.801 \quad (9)$$

$$32 \text{ psi}: T = -4.167 \ln A + 45.778 \quad (10)$$

令液滴延迟 $T = 30$,代入式(8)中,可得到压电激励幅值 $A = 54.8 \text{ V}$,这说明工作压力为 28 psi 时,压电激励幅值应为 54.8 V,液滴延迟才能维持在 30。同理, $T = 30$ 代入式(9)和式(10)后,可知工作压力分别为 30 psi 和 32 psi 时,压电信号幅值应分别为 46.3 V 和为 44.1 V 时,对应的液滴延迟才能稳定在 30。

实验结果如图 6 所示。

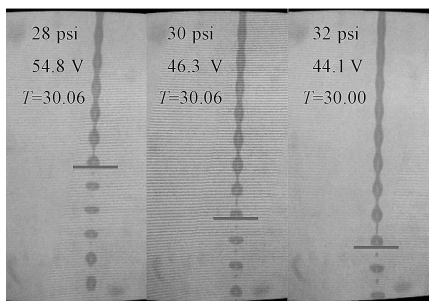


图 6 根据压力调节压电幅值保持液滴延迟稳定的实验结果

由图 6 清楚可见,根据预设液滴延迟 $T = 30$ 计算出的 3 个实验条件下,测量得实际液滴延迟分别为 30.06、30.06、30,误差为 0.06,包含拟合方程不准确引起的计算误差和实验误差。液滴延迟测量值与预设值基本一致,说明根据标定数据调节压电激励幅值的方法行之有效。但是,随工作压力增加,液滴断点却明显发生了向下移动,充分表明当工作压力发生变化时,若要保证液滴延迟不变,液滴断点位置必然会发生变化。换言之,工作压力发生变化,如果还维持液滴断点位置固定不变,就不可能保证液滴延迟的稳定。

4 结束语

综合上述理论计算、实验结果以及相关分析,不难看出如下结论:

(1)射流速度随工作压力变化,呈现二次函数关系;

(2)液滴延迟随工作压力增大而变小,变化速率先大后小,到达拐点后又缓慢变大;

(3)液滴延迟随压电信号的幅值变化呈对数关系;

(4)根据工作压力调节压电幅值能够实现液滴延迟稳定, T 值误差仅为 0.062。

以上结果可用于指导根据工作压力变化调节压电激励幅度,实现自动校准液滴延迟,提高细胞分选精度。笔者将进一步加强实验研究,摸索行之有效的途径,促使该方法能实用化。

参考文献(References):

- [1] 周宏伟,林波海. 流式细胞分选装置的研制与发展[J]. 生物物理学报,1997,13(3):512-518.
- [2] 宋平根. 流式细胞术的原理与应用[M]. 北京:北京师范大学出版社,1992.
- [3] DEGEAL J W, BBY C S, STANTON E A, et al. Flow cytometer sorter: US, US8889072[P]. 2014.
- [4] EHRlich S B, MACHADO E T M, SEDOGlavich N, et al. Particle sorting apparatus and method: WO, WO 2012106294 A1[P]. 2012.
- [5] NECKELS D, COURTER K. Calculate drop delay for flow cytometry systems and methods: US, US 20110221892 A1[P]. 2014.
- [6] NORTON P O, AZERSKY V. Automated set-up for cell sorting: , US8975595[P]. 2015.
- [7] 李 莉. 均匀液滴喷射过程的理论建模与数值模拟[D]. 西安:西北工业大学机电学院,2006.
- [8] 王惠民. 流体力学基础[M]. 北京:清华大学出版社,2005.
- [9] 于 洋,史耀武,夏志东,等. 均匀液滴喷射成球法的射流速度计算[J]. 电子元件与材料,2007,26(10):57-59.
- [10] 翁建松,刘根凡,麦浚申. 径向喷射规整旋流器内部流场研究[J].
- [11] 张为荣. 一种新型液压驱动燃油喷油器不同方案的仿真研究[J]. 液压气动与密封,2014,34(1):35-36.
- [12] EGGERS J, VILLERMAUX E. Physics of liquid jets[J]. **Reports on Progress in Physics**,2008,71(3):509-514.
- [13] STRUTT J W, RAYLEIGH L. On the instability of jets [J]. **Proc. London Math. Soc.**,2015,10(1):4-13.
- [14] ATTANÉ P. Response to "Comment on 'Breakup length of forced liquid jet'"[J]. **Physics of Fluids**,2006,18(1):019102.
- [15] WEBER C, ANGREW Z. The decomposition of a liquid jet [J]. **Z. Angew. Math. Mech**,1931(11):136-154.
- [16] KALAAJI A, LOPEZ B, ATTANÉ P, et al. Breakup length of forced liquid jets[J]. **Physics of Fluids**,2003,15(15):2469-2479.
- [17] STERLING A M, SLEICHER C A. The instability of capillary jets[J]. **Journal of Fluid Mechanics**,1975,68(3):477-495.

[编辑:李 辉]

本文引用格式:

韩天昊,王 鹏,余兴龙. 流式分选仪液滴延迟自动校准方法研究[J]. 机电工程,2016,33(7):810-814.

HAN Tian-hao, Wang Peng, YU Xing-long. Automated method of calibrating drop delay for flow cytometry[J]. Journal of Mechanical & Electrical Engineering, 2016,33(7):810-814.

《机电工程》杂志: <http://www.meem.com.cn>