

细胞低电压破碎及其效果的光学检测方法

陈建军^{1,2} 廖红华¹ 王 骏¹ 韩鹤友² 于 军¹

(¹ 华中科技大学电子科学与技术系, 湖北 武汉 430074; ² 华中农业大学理学院, 湖北 武汉 430070)

摘要 为获取细胞的内容物(蛋白质,DNA,RNA等),探讨光电子技术在细胞破碎方面的应用,理论上引入了BHK21(幼仓鼠肾细胞)的初始跨膜电位,对BHK21细胞跨膜电压模型进行修正。设计了细胞破碎的控制及检测系统。制作的细胞破碎芯片电极的宽度和间距均为50 μm,每个电极的长度为0.4 cm,电极厚度为0.5 μm。搭建了用于细胞破碎、控制及自动检测的检测系统,系统中以倒置显微镜作为主要光路部件,采用300万像素的CCD摄像头采集图像信息,并基于显微数字图像处理软件实现细胞图像处理。实验表明,BHK21细胞破碎的最佳电压幅度为3 V,脉冲宽度为3 ms,所搭建的光学检测系统能够自动识别BHK21数字图像,并能对在显微视窗中的BHK21细胞实现自动计数等功能。

关键词 光电子学;细胞破碎;微流控芯片;低电压;光学检测

中图分类号 TN247 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS200828s2.0143

Crushing Cells under Low-Voltage and Its Optical Testing Method

Chen Jianjun^{1,2} Liao Honghua¹ Wang Jun¹ Han Heyou² Yu Jun¹

¹ Department of Electronics Science and Technology,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China
² Science College, Huazhong Agriculture University, Wuhan, Hubei 430070, China

Abstract It is intended to obtain the cell contents (protein, DNA, RNA etc.) and probe into the application of optoelectronic technology for crushing cell. In theory BHK21 initial transmembrane voltage is introduced to modify the voltage model. Control and detecting systems for crushing cells are made as follows: crushing cells chip electrodes 50 μm in both width and pitch interval, with a length of 0.4 cm and thickness of 0.5 μm each. The system could be used in cells crushing, controlling and automatic testing. It takes inverted microscope as the main light path system, collects pictures with 3 mega pixel CCD camera and deals them with processing software of micro-digital image. The experiment shows that this optical testing system could automatically identify and count BHK21 in micro-windows. For crushing BHK21 cells, the most suitable voltage range and pulse width are 3 V and 3 ms.

Key words optoelectronics; crushing cells; microfluidic chip; low voltage; optical testing

1 引 言

样品制备是任何一个完整的生物和医学分析检测过程都必须经历的一个起始程序,在微流控芯片上进行检测分析也不例外。如果不实现样品制备,后续的生化反应和检测分析就无从谈起。国外有直流胞解装置的报道^[1~4],但其所需要的电压较高。本文结合实际课题需要,搭建了一种能实现细胞低电压破碎、控制及自动检测的系统平台,并基于自制的微

流控芯片实现了幼仓鼠肾细胞(BHK21)的破碎、自动检测等。

2 细胞破碎原理

假设细胞是标准的圆球形,并认为细胞膜是具有双层结构的电介质,细胞相当于绝缘体。在对细胞施加了电场之后,引起膜两边的电解质离子极化。一个球形细胞处于外加电场中,靠近正负电极表面

基金项目:教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-05-0668)资助项目。

作者简介:陈建军(1978—),男,讲师,博士研究生,主要从事光电测控技术方面的研究。

E-mail: chenjianjun@mail.hzau.edu.cn

导师简介:于 军(1946—),男,教授,博士生导师,主要从事光电子器件与材料等方面的研究。

E-mail: jyu@mail.hust.edu.cn (通信联系人)

的地方离子会迅速积聚,细胞膜朝向电极正极的那一面会被超极化,而朝向负极的那一面会被去极化,从而形成了外加的膜电位差,Vladimir L. Sukhorukov 等^[5]指出细胞跨膜电位为

$$\Delta U_m(t) = 1.5RE(f, \delta) \cos \theta [1 - \exp(-t/\tau_m)], \quad (1)$$

式中 $\Delta U_m(t)$ 表示电场作用后,细胞上形成的跨膜电位; $E(f, \delta)$ 为外加脉冲电场, f 表示外加脉冲电场的频率, δ 为脉冲电场的占空比; R 表示球形细胞半径; τ_m 为细胞膜的时间常数。但是细胞在未受刺激时存在细胞膜内外两侧的电位差 U_0 , 细胞膜的初始跨膜电位大多为 $-40 \sim -100$ mV, 所以总的跨膜电位为

$$U_m(t) = U_0 + \Delta U_m(t). \quad (2)$$

3 控制及检测系统的搭建

细胞低电压破碎控制系统及光学检测系统结构框图如图 1 所示,它由细胞破碎子系统和光学检测子系统组成。细胞破碎子系统由细胞破碎微流控芯片、脉冲信号发生器和计算机组成。光学检测子系统由倒置显微镜,300 万像素的 CCD 和计算机组成。

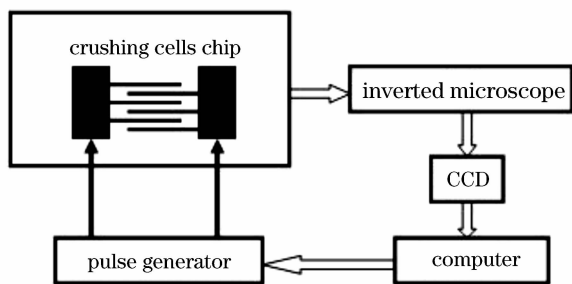


图 1 细胞破碎系统结构框图

Fig. 1 Schematic diagram of crushing cells system

细胞破碎微流控芯片是细胞破碎子系统的主要部分,该芯片采用微电子工艺制作方法,把电极间距缩小至细胞尺寸(微米级)且略大于细胞直径,可将胞解所需电压降到较低。理论上引入了细胞初始跨膜电位,对细胞跨膜电压模型进行修正,运用 CFDRC 软件对微流控芯片进行优化设计,如图 2 所示。其中每个电极的宽度和电极间距均为 $50 \mu\text{m}$, 电极的长度均为 0.4 cm。左右两边比较大的空白区域是为了方便电极的引出。细胞破碎芯片的加工采用射频磁控溅射方法,在玻璃基底上制备 Ti/Pt 微电极,采用标准的 lift-off 工艺,获得由六个电极对组成的微电极图形,利用 lift-off 工艺得到的 SiO_2 基 Ti/Pt 电极微细图形,如图 3 所示。通过向微电极

对施加脉冲电压得到胞解所需的高场强约为 0.6 kV/cm。



图 2 微电极掩膜图

Fig. 2 Microelectrode masking

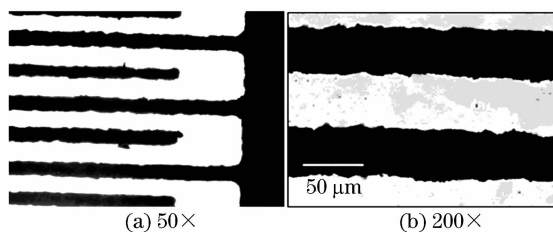


图 3 微电极局部实物图

Fig. 3 Part of microelectrode

光学检测子系统中倒置显微镜的标准载物台上放置细胞破碎芯片,芯片的微电极用细铜线与脉冲信号发生器的输出导线连接。计算机控制调节脉冲信号发生器的参数,可提供公式(1)中所需的外加脉冲电场,实施细胞破碎。通过调节倒置显微镜的升降架及移动尺对芯片进行调焦,可观察到芯片上的细胞。CCD 与倒置显微镜连接,将采集到的信息传送到计算机,可实时观测细胞破碎情况。采用专用的显微数字图像处理软件对采集到的图像进行去噪、阈值分割、取反、腐蚀等处理,最终实现 BHK21 细胞的自动识别与计数^[6]。

4 实 验

4.1 试剂与试样

BHK21 细胞的培养都采用悬浮培养方法,采用贴壁细胞株,0.25%胰酶,DMEM 培养基(含 10%胎牛血清)等试剂,由华中农业大学提供。

4.2 实验方法

芯片使用前用双蒸水冲洗通道,将芯片置于倒置显微镜标准载物台上,再将样品加入芯片中,通过计算机调节脉冲信号源的电压幅度、脉宽、周期等参数,对 BHK21 细胞进行了破碎实验。每次破碎完毕后,用双蒸水冲洗通道,使芯片重复使用。

5 结果与讨论

调节倒置显微镜的放大倍数为:物镜倍率 $40\times$,

目镜倍率 $10\times$ ，观察到 BHK21 细胞的直径范围为 $16.25\sim 27.5\ \mu\text{m}$ ，通过倒置显微镜可以观察到脉冲电场使得两种细胞都裂解了。图 4 为 BHK21 的胞解过程录像截面图，(a) 为加脉冲之前；(b)，(c) 为细胞膜开始裂解；(d) 为细胞完全裂解。采用 $500\ \mu\text{s}$ ， $1\ \text{ms}$ ， $3\ \text{ms}$ 三种脉冲宽度的脉冲，胞解所需的最佳外加电压在 $3\ \text{V}$ 左右。高于此电压会产生气泡和造成电极损耗，胞解率并不能随电压增高有明显的提高。由于胞解电压很低，随脉冲宽度的增大，胞解所需的电压有比较细微的减小。BHK21 细胞破碎的最佳

电压幅度为 $3\ \text{V}$ ，脉冲宽度为 $3\ \text{ms}$ 。

用 300 万像素的 CCD 摄像头采集图像信息输入计算机并进行图像处理，如图 5 所示，其中 (a) 为将 BHK21 原始图像直接灰值化变换，(b) 为对 BHK21 原始图像进行 Roberts 边缘检测后负像，(c) 为在 (b) 图的基础上进行灰值化，(d) 为在 (c) 图的基础上进行灰值腐蚀。在实现细胞图像的正确分割后，就可以跟踪图像获取区域信息，如区域面积、周长、圆度、中心等，根据这些参数对细胞进行识别与计数。

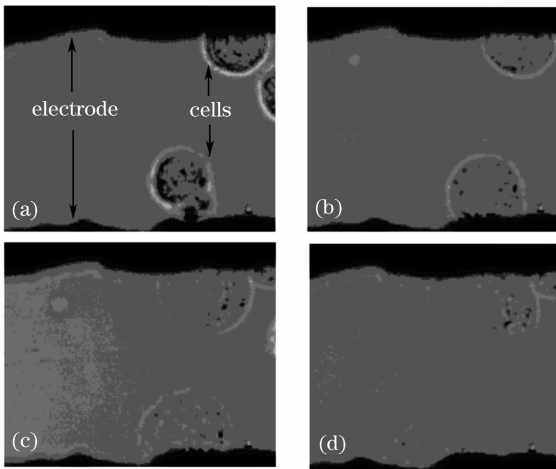


图 4 BHK21 破碎过程图
Fig. 4 Crushing procedure of BHK21

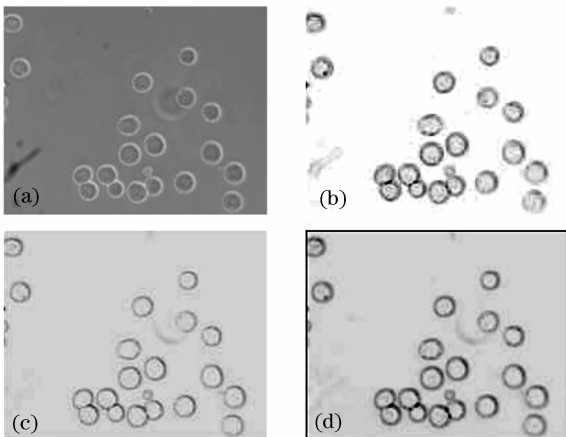


图 5 BHK21 图像处理
Fig. 5 BHK21 image processing

6 结 论

采用细胞低电压破碎控制系统及光学检测系统，对 BHK21 细胞进行了测试，成功地在倒置显微镜下面观察到并用 CCD 记录下了细胞破碎的程。微流控芯片低电压细胞破碎，并通过光学检测系统实时监控，获取了较好的细胞内容物，是生物样品初级处理的良好方法，为后续细胞内容物的分离及检测奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Sang-Wook Lee, Yu-Chong Tai, Caltech. A micro cell lysis device [J]. *Sensors and Actuators*, 1999, **73**:74~79
- 2 Hsiang-Yu Wang, Arun K. Bhunia, Chang Lu. A microfluidic flow-through device for high throughput electrical lysis of bacterial cells based on continuous dc voltage [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, **22**:582~588
- 3 Dong Woo Lee, Young Ho Cho. A continuous electrical cell lysis device using a low dc voltage for a cell transport and rupture [J]. *Sensors and Actuators*, 2007, **124**:84~89
- 4 Huiqi He, Donald. C. Chang, Yi-Kuen Lee. Using a micro electroporation chip to determine the optimal physical parameters in the uptake of bio-molecules in HeLa cells [J]. *Bioelectrochemistry*, 2007, **70**:363~368
- 5 Vladimir L. Sukhorukov, Randolph Reuss, Jorg M. Endter *et al.*. A biophysical approach to the optimization of dendritic-tumour cell electrofusion [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, **346**:829~839
- 6 Huang Hongmei, Wang Na, Peng Qingyu. Recognition and counting of suspension cells based on regional information [J]. *Journal of Jinan University (Natural Science)*, 2007, **28**(5):466~469

黄红梅,王 娜,彭青玉. 基于区域信息的悬浮细胞识别与计数 [J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2007, **28**(5):466~469