

Design of Single Cell Image Observation System Based on Microfluidic Chip

SUN Hui-qin¹, LIU Zhi-lan², LI Xin¹, LIU Nan-ping^{3*}, LI Feng⁴

1. College of Electronic Information, Tianjin Professional College, Tianjin 300402, China;
2. Laboratory, Tianjin Second Hospital, Tianjin 300000, China;
3. College of Physics and Electronic Information, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China;
4. Automation Department, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

Abstract: Microcosmic detection for the pathology experiment of single cell was fixed by formalin. Under constant temperature, culturing intravital cell on microfluidic chip dyes staining DNA of cell nuclear, delivering the cell to the observation position by the ways of hydrostatic pressure and electro-osmosis drive, soaked with 10% formalin solution, observing the morphological differentiation of the cell fixed process. The single cell image observation system based on microfluidic chip had effect on drawing the conclusion of the effect and the value that the histiocyte was fixed by formalin. As a special process drawing the conclusion of the effect and the value that the histiocyte was fixed by formalin had effect on providing reference for practice, increasing content of the profession, and on improving quality of pathological section.

Key words: microfluidic analysis; single cell image observation; fix; formalin; pathological section
EEACC:7230J

基于微流控芯片的单细胞图像观测系统的设计

孙惠芹¹, 刘志兰², 李 新¹, 刘南平^{3*}, 李 峰⁴

1. 天津职业大学电子信息工程学院, 天津 300402; 2. 天津第二医院化验室, 天津 300000;
(3. 天津师范大学物理与电子信息学院, 天津 300074; 4. 上海交通大学自动化系, 上海 200030)

摘 要: 目的: 微观检测福尔马林固定单细胞病理实验的固定过程。方法: 在恒温条件下, 在微流控芯片上培养活体细胞样品, 对细胞核 DNA 进行染色, 利用液体静压力驱动和电渗驱动相结合的方式将细胞输送到图像观测位置, 注入 10% 中性福尔马林浸泡, 利用荧光显微镜观察细胞固定过程中的形态变化。结果: 基于微流控芯片的单细胞图像观测系统的设计认知和总结福尔马林对组织细胞“固定”的作用效果和应用价值。结论: 对福尔马林细胞固定作用效果的总结, 使工作实践有所借鉴, 充实专业内容, 进一步提高病理制片质量。

关键词: 微流控分析; 单细胞图像观测; 固定; 福尔马林; 病理切片

中图分类号: TP212. 2

文献标识码: A

文章编号: 1004-1699(2008)12-1977-04

微流控芯片技术是 20 世纪 90 年代由瑞士的 Widmer 和 Manz 提出的, 它是通过微细加工技术在约为几平方厘米的芯片上构建储液池、微反应室、微管道、微检测等微功能元件构成具有微流路控制的分析系统^[1]。微流控芯片具有网络式通道结构, 具备高度微型化、集成化和设计灵活等特点。该项技术发展迅速, 应用领域不断扩展, 近年来微流控芯片系统用于细胞分析是该技术发展的一个热点, 因而受到越来越多的关注^[1-3]。

微流控芯片扩展了在细胞和亚细胞水平进行生命科学的能力, 为单细胞研究提供了一个新的平台。在微流控芯片通道中, 利用气压、液压和电压, 或利用介电泳、光学陷阱、行波介电泳以及磁场等技术, 可以操纵细胞通过或驻留在通道内的任意位置, 从而使单细胞计数、筛选以及检测分析等操作大大简化。

在病理学研究和诊断中通常是借助光学显微镜

观察组织或细胞的结构。在此过程中一般是将组织制成切片或将细胞制成涂片,用不同方法染色后,在光学显微镜下从细胞水平观察分析其形态结构的变化和特点,以便于对细胞或组织性质作出相应的病理诊断。在制作病理切片之前,为了尽可能使组织或细胞的镜下结构保持接近活体时的形态,需要用福尔马林作为固定剂防止组织或细胞的结构分解变化^[4-5]。优秀组织学制片的基础是适当而完全的固定,固定不良在以后的检测、诊断等阶段均不能补救。作为重要的实验步骤,其作用机理、作用过程和作用导致的蛋白质空间构象的变化效果,在现有理论中尚未有描述,组织细胞在从膜性溶胶状转变至固定成型的固定过程的微观情况,在医学研究中还没有相关文献记载。

基于上述原因开发设计了基于微流控芯片的单细胞图像观测系统,对福尔马林固定组织细胞,使其由膜性溶胶状转变至固定成型的过程进行微观条件下观察,借其实验现象表达,进一步认知和总结福尔马林对组织细胞“固定”的作用效果和应用价值,充实专业内容,使工作实践有所借鉴,进一步提高病理制片质量。同时,以单细胞形态检测为基础,为活体单细胞的其他检测提供相应的检测手段。

1 系统设计

系统采用的总体技术方案如图1所示。将微流控芯片放置在具有保温功能的工作台上,在微流控芯片上活体细胞样品经培养后,使用 HO33342 (Hoechst 33342)对细胞核 DNA 进行染色,然后利用液体静压力驱动和电渗驱动相结合的方式将细胞输送到图像观测位置,注入 10% 中性福尔马林对细胞进行浸泡,利用荧光显微镜观察细胞固定过程中的形态变化^[6]。

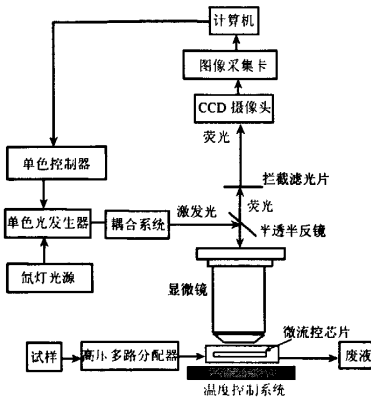
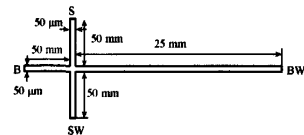


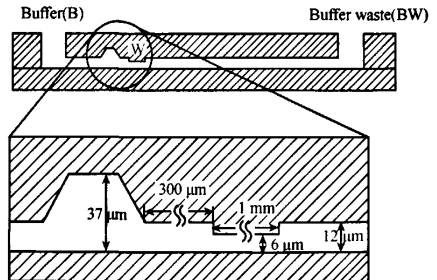
图1 总体技术方案框图

(1)微流控分析芯片的制造

微流控分析芯片采用湿法刻蚀(wet etching)的方法加工成如图2所示的十字型芯片结构^[7-9]。其中 S 为采样通道(Sample Waste)用于样品注入。B 为图像观测通道(Buffer Waste),用来观测细胞的形态。利用光刻技术在基片上雕刻出十字图案后,可以经过三步来完成芯片的制造。第一步,把一段长 1 mm 的未曝光的光胶贴到距交叉点 0.3 mm 处,在刻蚀时起保护作用。其他未保护的地方用 1 mol/LHF 和 1 mol/LNH₄F 刻蚀 6 min。第二步,去除保护光胶,所有的通道都继续刻蚀 6 min。第三步,图像观测通道贴上保护光胶,采样通道刻蚀 25 min。每次刻蚀完之后都要用水流速度较强的水流去除残留的刻蚀剂。另外,在每个通道的末端都要钻一个半径为 2 mm 的小孔,每个孔又与一个内径为 4 mm 高 6 mm 的微型管相连接,形成 S、B、SW、BW 四个储液池。最后在一定的温度下,与另外一块基片永久性的粘合,这样可以得到如图 2(b)所示的结构。其中,采样通道和图像观测通道的宽度都是 50 μm。为了增加细胞在通道内的流动速度和避免细胞与通道内壁的粘连,采样通道的深度设计为 37 μm。检测通道在距离交叉点右方 300 μm 的地方,由原有的 12 μm 深度变成了 6 μm 深度,在此处设计了一个长 1 mm 厚 6 μm 的“挡板”,目的是准确固定细胞位置,为细胞形态的图像观测做必要的保障。



(a) 通道外部结构示意图



(b) 通道内部结构示意图

图2 微流控芯片通道设计示意图

微流控芯片研究的主要内容是活体单细胞的培养、图像观测及试剂进给的一体化^[10]。在微流控芯片上刻蚀的用于细胞样品与试剂流动的微通道及储

液池, 按照细胞图像观测要求在微流控芯片上先后完成细胞定位、细胞培养、试剂注入以及细胞固定等操作。

(2) 细胞、试剂的驱动

就目前微流控芯片技术, 微流体的驱动主要有两种形式: 机械和非机械驱动^[11-12]。机械驱动系统主要包括: 压电微泵、热气动微泵、静电微泵、气动微泵、电化制动泵、无阀往复微泵、离心力驱动系统、剪切力驱动系统。非机械驱动系统主要包括: 电渗流体驱动系统、电流体动力泵、磁流体动力泵、重力驱动系统、热气动微泵、表面张力微泵等。由于本微流控检测系统是对细胞样品、缓冲液, 固定试剂等分时、分类驱动, 如果采用机械驱动方式, 会增大结构的复杂性, 不易于操作控制, 更换液体也不方便, 所以, 本系统中采用非机械驱动结构中的静压力和电渗流体驱动。

实验开始时, 分别向 B、BW、SW 储液池注入 100 μL 、100 μL 、50 μL 电解液, 然后向 S 储液池中注入 150 μL 细胞样品, 这样几个储液池就会产生不同高度的液面, 在静压力的作用下细胞就会从 S 储液池向 SW 储液池流动。当细胞运动到十字交叉口时, 对四个储液池施加不同的电压, 其中将 BW 储液池接地, B 储液池的电位为 1 200 V, S 储液池和 SW 储液池的电位都为 700 V, 如图 3 所示。这样在电场力的驱动下, 细胞就会由交叉口转向检测通道并向 BW 储液池流动, 直到“挡板”位置被固定, 大约 16 s 后就可以观测到细胞已经固定在检测区。

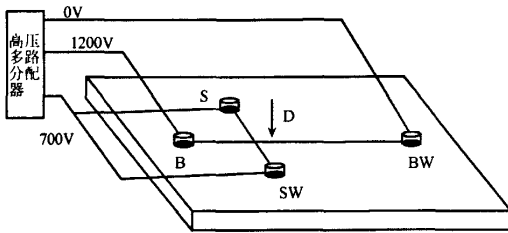


图 3 微流控芯片电渗驱动示意图

(3) 37℃ 恒温的实现方法

在单细胞 DNA 染色的过程中要保持实验温度为 37℃ 恒温, 精确的温度控制对染色效果的好坏以及接下来的检测过程起着很重要的作用。本系统以氧化铟锡 (Indium Tin Oxide, ITO) 透明导电玻璃作为加热元件^[13], 根据所承载的微流控芯片的大小, 将氧化铟锡导电膜玻璃用玻璃刀切割成相应尺寸大小, 作为加热元件; 在 ITO 玻璃片的两侧用导电胶粘接 100 μm 厚的铜箔作为连接电源的引线, 将 2 mm^2 大小的贴片式铂电阻温度传感器粘接在

ITO 玻璃片上, 以此做为温度的采样量。采用 LabVIEW 软件及 PID 算法编写控制程序, 实现对微流控系统温度的精确控制。

PID 算法就是将连续形式的 PID 微分方程转化成离散形式的 PID 差分方程。在运用计算机实现时, 可写成:

$$p(n) = p(n-1) + K_p[e(n) - e(n-1)] + K_i e(n) + K_d[e(n) - 2e(n-1) + e(n-2)]$$

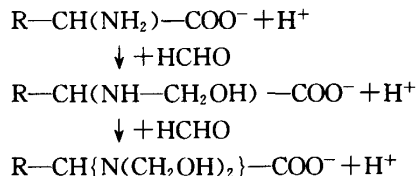
式中积分常数 $K_i = K_p T / T_i$, 微分常数 $K_d = K_p T_d / T$ 。由此可得 PID 增量式控制算法

$$\Delta p(n) = p(n) - p(n-1) = K_p[e(n) - e(n-1)] + K_i e(n) + K_d[e(n) - 2e(n-1) + e(n-2)]$$

可见计算 $p(n)$ 时, 只需知道 $e(n)$ 、 $e(n-1)$ 、 $e(n-2)$ 即可。PID 算法还具有输出增量不大, 系统受操作切换冲击影响较小, 不产生积分失控, 输出较平稳和易于获得较好调节效果等优点。利用 LabVIEW 软件的强大模拟控制对象的功能, 进行 PID 仿真的参数整定, 调节参数获得理想温度反馈调节, 实现系统温度的精确控制。

(4) 福尔马林固定细胞模型的搭建

在制作病理切片之前, 为了尽可能使组织或细胞的镜下结构保持接近活体时的形态, 需要用一定的药品进行处理, 防止结构的分解变化, 这一过程称为固定。福尔马林是最常用的固定剂。其对组织和细胞的固定, 是基于蛋白质的甲醛反应实现的^[14-15]。在中性或碱性条件下, 甲醛与氨基酸(不饱和胺)加成反应生成相对稳定的单羟甲基(一羟甲基)和二羟甲基(二羟甲基)的衍生物, 使细胞的活性丧失而达到固定目的。氨基酸与甲醛的化学反应式如下所示:



实验中, 制取活体单个单核细胞悬液, 吸取 200 μL 注入 S 采样池, 同时向 B 和 SW 储液池中注入 200 μL 的 PBS 缓冲液, 在静压力下悬浊液就会向 BW 储液池流动, 为缓解细胞在储液池和芯片通道中的沉降和对管壁的黏附作用, 按照图 3 所示分别对各储液池施加不同电压驱动细胞顺畅流动, 保证细胞到达检测位置, 5 min 后再分别向 S、B、SW 储液池中注入 200 μL PI(propidium iodid 5 mg/100 mL), 在 37℃ 恒温条件下孵育 30 min, 对 DNA 进行染色; 继续向 S、B、SW 储液池注入 PBS 缓冲液洗脱残余染料; 然后分别向

三个储液池中注入10%中性福尔马林替换PBS缓冲液,开始固定细胞并计时,达到用10%福尔马林浸泡细胞的目的,使细胞逐渐死亡达到稳定的形态,利用荧光显微镜观察荧光物质所表达的细胞形态变化,周期性的采集图像。

2 结束语

基于微流控芯片的单细胞图像观测系统,对福尔马林固定组织细胞,使其由膜性溶胶状转变至固定成型的过程进行微观条件下观察,借其实验现象表达,可以进一步认知和总结福尔马林对组织细胞“固定”的作用效果和应用价值,充实了病理学专业内容,使工作实践有所借鉴,可进一步提高病理制片质量。从而填补国内外此项内容的空白。

本系统具有以下的创新之处:构建了福尔马林固定细胞模型图像资料;在微流控芯片上实现活体单细胞培养、试剂进给、细胞图像观测一体化,并可将其用于单细胞形态检测;利用液体静压力驱动和电渗驱动相结合的方式实现细胞和试剂的驱动;利用微通道深度的变化来固定细胞位置,简单易操作;本系统的实验观测了活体单细胞用福尔马林固定前后的形态变化,为细胞构象理论提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Stone H A, Stroock A D, Ajdad A. *Annu. Rev[J]. Fluid Mech.* 2004, 36, 381.
- [2] Haab B B, Mathies R A. *Single Molecule Detection of DNA Separations in Microfabricated Capillary Electrophoresis Chips Employing Focused Molecular Streams[J]. Anal. Chem.* 1999 (71); 5137-5145.
- [3] Hong J W, Chen Y, Anderson W F, Quake S R J. *Phys. Condens[J]. Matter* 2006, 18, S691.
- [4] Lin C H, Lee G B, Lin Y H, Chang G L J. *Micromech[J]. Microeng.* 2001, 11, 726.
- [5] 徐景达, 有机化学[M]. 北京: 人民卫生出版社. 1998. 53, 106.
- [6] 殷学锋, 沈宏, 方肇伦, 分析化学[M]. 2003, 37, 116.
- [7] 慕轩, 胡坪, 罗国安. 微流控芯片技术在临床检测中的应用进展[J]. 分析测试学报, 26(4); 587-591.
- [8] 蓝悠, 李全文, 陈瓊光. 微流控芯片技术在蛋白质分析中的应用进展[J]. 化学研究与应用, 19(4); 345-349.
- [9] Timothy BS, Frantisek S, Jean MJF. *Chip Electrochromatography [J]. Journal of Chromatography A.* 2004, 1044(1-2); 97-111.
- [10] 梅年松, 黄庆安. MEMS 薄膜纵向断裂强度的静电测试结构模型与模拟[J]. 传感技术学报, 2004, 25(1); 82.
- [11] 陈慧清, 朱庆欢, 许海娟. 微流控芯片荧光检测的研究[J]. 实验室研究与探索, 26(6); 24-25.
- [12] 陈强, 李刚, 潘爱平. 玻璃微流控芯片廉价快速制作方法的研究[J]. 化学学报, 2007, 65(17); 1863-1868.
- [13] 孙悦, 沈志滨, 曾常青. 一种直接测定微流控芯片电渗流速度的新方法[J]. 色谱, 25(5); 690-693.
- [14] Fang, Z. - L. *Microfluidic Analysis Ch[M]. Science Press, Beijing,* 2003; 267-273 (in Chinese).
- [15] LIU Y, GARICA C D, HENRY C S[J]. *Analyst*, 2003, 128 (8); 1002-1008.



孙惠芹(1968-),女,硕士,本科毕业于天津医科大学生物医学工程系,研究生毕业于天津大学电子信息工程学院通信与信息系统专业。本科毕业后在天津黄河医院从事医疗设备开发工作,后调入天津职业大学从事教学工作。研究方向为检测仪器仪表,shqfxy@sina.com



刘南平,副教授,毕业于东南大学无线电系,河北工业大学博士,专业方向为电子技术。

基于微流控芯片的单细胞图像观测系统的设计

作者: [孙惠芹](#), [刘志兰](#), [李新](#), [刘南平](#), [李峰](#), [SUN Hui-qin](#), [LIU Zhi-lan](#), [LI Xin](#),
[LIU Nan-ping](#), [LI Feng](#)

作者单位: [孙惠芹, 李新, SUN Hui-qin, LI Xin\(天津职业大学电子信息工程学院, 天津, 300402\)](#), [刘志兰, LIU Zhi-lan\(天津第二医院化实验室, 天津, 300000\)](#), [刘南平, LIU Nan-ping\(天津师范大学物理与电子信息学院, 天津, 300074\)](#), [李峰, LI Feng\(上海交通大学自动化系, 上海, 2000300\)](#)

刊名: [传感技术学报](#) 

英文刊名: [CHINESE JOURNAL OF SENSORS AND ACTUATORS](#)

年, 卷(期): 2008, 21(12)

引用次数: 0次

参考文献(15条)

1. Stone H A, Stroock A D, Ajdad A [查看详情](#) 2004
2. Heab B B, Mathies R A [Single Molecule Detection of DNA Separations in Microfabricated Capillary Electrophoresis Chips Employing Focused Molecular Streams](#) 1999(71)
3. Hong J W, Chen Y, Anderson W F, Quake S R J [查看详情](#) 2006
4. Lin C H, Lee G B, Lin Y H, Chang G L J [查看详情](#) 2001
5. 徐景达 [有机化学](#) 1998
6. 殷学锋, 沈宏, 方肇伦 [制造玻璃微流控芯片的简易加工技术](#)[期刊论文]-[分析化学](#) 2003(1)
7. 慕轩, 胡坪, 罗国安, 姚波 [微流控芯片技术在临床检测中的应用进展](#)[期刊论文]-[分析测试学报](#) 2007(4)
8. 蓝悠, 李全文, 陈缙光 [微流控芯片技术在蛋白质分析中的应用进展](#)[期刊论文]-[化学研究与应用](#) 2007(4)
9. Timothy BS, Frantisek S, Jean MJF [Chip Electrochromatography](#) 2004(1-2)
10. 梅年松, 黄庆安 [iVIEMS薄膜纵向断裂强度的静电测试结构模型与模拟](#) 2004(1)
11. 陈慧清, 朱庆欢, 许海娟 [微流控芯片荧光检测的研究](#)[期刊论文]-[实验室研究与探索](#) 2007(6)
12. 陈强, 李刚, 潘爱平, 金庆辉, 赵建龙, 程建功, 徐元森 [玻璃微流控芯片廉价快速制作方法的研究](#)[期刊论文]-[化学学报](#) 2007(17)
13. 孙悦, 沈志滨, 曾常青 [一种直接测定微流控芯片电渗流速度的新方法](#)[期刊论文]-[色谱](#) 2007(5)
14. Fang, Z. -L [Microfluidic Analysis Ch](#) 2003
15. LIU Y, GARICA C D, HENRY C S [查看详情](#) 2003(8)

相似文献(0条)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_cgjsxb200812005.aspx

下载时间: 2010年4月15日