

文章编号 1004-924X(2015)增-0286-05

基于微流体脉冲惯性力驱动 虾卵细胞的液滴包裹

王洪成¹, 朱 丽^{2*}, 杨利军², 朱晓阳², 戴振东¹

(1. 南京航空航天大学 航天学院, 江苏 南京 210016;

2. 南京理工大学 机械工程学院, 江苏 南京 210094)

摘要: 现有微流控等液滴单细胞包裹技术通常用来包裹平均粒径约 10 μm 左右的小尺度细胞, 存在着细胞包裹率不高和存活率较低的问题。考虑到微流体脉冲驱动技术能够实现油相中水相微液喷射且能精确控制微液滴的尺寸大小, 本文提出了基于微流体脉冲惯性力驱动的虾卵细胞液滴包裹方法。搭建了基于微流体脉冲惯性力驱动的大尺度细胞(虾卵细胞)液滴单细胞包裹的实验装置, 研究了微流体驱动参数对水相微液滴大小和单细胞包裹率的影响规律, 通过调整微喷嘴尺寸和驱动电压, 在油相中获得了直径为 70~180 μm 的水相微液滴; 实现了微喷嘴内虾卵细胞在沿微喷嘴轴线上不同位置处的规则排列, 完成了 1、2、3 个或多个虾卵细胞的单液滴包裹, 单细胞包裹率可达 40%。本文的研究结果也可为大尺度细胞的液滴包裹方法提供参考。

关键词: 微流体脉冲驱动; 脉冲惯性力; 微液滴; 细胞分析; 卵细胞

中图分类号: Q813; TP271.3 **文献标识码:** A **doi:** 10.3788/OPE.20152313.0286

Droplet-based encapsulating of shrimp oocyte actuated by microfluidic pulse inertial force

WANG Hong-cheng¹, ZHU Li^{2*}, YANG Li-jun², ZHU Xiao-yang², DAI Zhen-dong¹

(1. College of Astronautics, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China;

2. School of Mechanical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

* Corresponding author, E-mail: nlgzl@163.com

Abstract: The existing droplet-based single cell encapsulation technology controlled by micro-fluidics is usually used to encapsulate micro cells with the scale of 10 micrometer and it shows disadvantages of low single cell encapsulating rates and low survival rates. In consideration of the microfluidic pulse driving technology can produce aqueous phase droplets in an oil phase environment and can precisely control the droplet size, this paper proposes a droplet-based encapsulating method of shrimp oocyte actuated by microfluidic pulse inertia force and establishes an experiment device for encapsulating large

收稿日期: 2015-04-20; 修订日期: 2015-05-21.

基金项目: 江苏省三维打印装备与制造重点实验室开放课题资助项目(No. BM2013006); 江苏省博士后科研基金资助项目(No. 1402006B); 中国博士后科学基金资助项目(No. 2014M551584)

scale cells into single micro droplet. It researches the influence of microfluidic driving parameters on the droplet size and single cell encapsulating rate. By adjusting the size of a micro-nozzle and driving voltage, the aqueous phase micro droplet with a diameter of 70–180 μm is obtained, and the regular arrangement of shrimp oocyte in the micro-nozzle is implemented in different locations on the axis direction of the nozzle arrangement. A single droplet randomly encapsulated with one, two, three or four cells is realized. The single cell encapsulating rate has reached by 40%. The results can provide references for larger scale cell encapsulation method.

Key words: micro fluidic pulse actuation; pulse inertial force; micro-droplet ; cell analyzing; oocyte

1 引 言

细胞作为生命体结构和生命活动的基本单元,生殖发育、遗传和神经活动等一切生命现象的研究都要以细胞为基础。表型相同的细胞在基因表达、代谢物或离子的浓度、对外界刺激的响应模式等方面均存在较大的个体差异^[1-2]。然而,细胞尺寸较小,直径通常为几微米或几十微米,细胞所包含的 DNA/RNA、蛋白质等大分子及糖类、维生素、脂肪酸等有机小分子的含量一般在 $10^{-21} \sim 10^{-15}$ mol 内。因此,为获得足够的细胞内待检测物含量,受分析和检测方法的制约,传统的细胞分析往往采取对细胞群体的分析手段来获得细胞中的化学信息,忽视或掩盖了单细胞间的个体差异,单细胞水平的研究能够提供更加丰富、准确的信息,可以克服现有群体分析中平均结果对个别信息掩盖的局限性,对医学、生物学及其它学科的进一步研究具有重要意义^[3]。

体积大小为飞升 (fL, 10^{-15} L) 至纳升 (nL, 10^{-9} L) 的微液滴作为离散的反应器,将反应物和产物束缚在一个狭小的区域内,限制了扩散,加速了混合,降低了样品消耗,适合于单细胞中极少生物分子的检测和分析^[4]。利用微液滴进行单细胞分析的基本过程是:首先将待分析的单细胞包裹于单个液滴之中,即单个液滴中有且仅有一个细胞,在此基础上,通过对细胞液滴的分离^[5]、分选^[6-7]、移动、融合^[8]、试剂引入^[9]等操纵实现对单细胞的分析 and 检测。因此,对适用于液滴单细胞包裹及分析的微流体器件的设计及制作、微流体系统尤其是微纳流体的驱动方法开展深入研究具有重要的理论和现实意义。

微流体脉冲驱动技术^[10-11]是以脉冲当地惯性力为主动力的微流体驱动技术,同时适用于气相^[12-13]和液相^[14]中液滴微喷射场合。基于微流体脉冲惯性力驱动的液相中液体微喷射量分辨率

可达飞升级 (10^{-15} L) 且能够实现按需喷射^[15]。本文采用微流体脉冲驱动技术进行虾卵细胞的液滴单细胞包裹实验,实现几百微米尺度的液滴单细胞包裹。

2 实 验

2.1 实验系统

基于微流体脉冲惯性力驱动的虾卵细胞液滴包裹装置如图 1 所示,系统由工控机、压电致动器驱动电源和压电致动器 (P-844. 10, 德国 PI 公司)、三维度调节架、显微 CCD 摄像机和微喷嘴等组成。压电致动器左侧(固定端)固定在机架上,右侧(可动端)通过夹具 A 与微喷嘴刚性连接。压电致动器可在驱动电压信号作用下沿极化轴方向在原长 L 的基础上瞬间产生伸长量 ΔL 。其驱动电压波形、幅值 U_0 和频率 f_0 以及玻璃为喷嘴内径 d 可作为基于微流体脉冲惯性力驱动的虾卵细胞液滴包裹的驱动-控制参量。微喷嘴由内径为 4.6 mm、外径为 6.3 mm 的硼硅酸盐玻璃管经玻璃冷热加工工艺制备而成,硼硅酸盐玻璃管

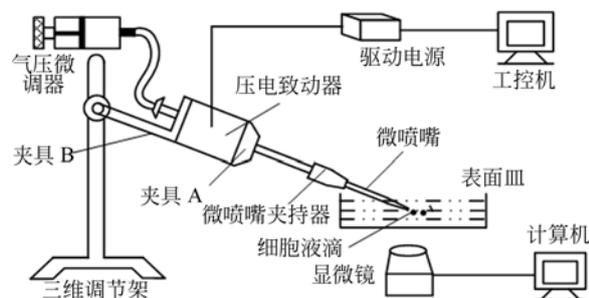


图 1 基于微流体脉冲惯性力驱动的虾卵细胞液滴包裹装置

Fig. 1 Device for encapsulating shrimp oocyte cells into monodisperse picolitre droplets actuated by microfluidic pulse inertia force

经自制拉制仪拉制后和截取后的显微图片如图 2 所示,其出口内径可达 $10\ \mu\text{m}\sim 1\ 000\ \mu\text{m}$ 以上。

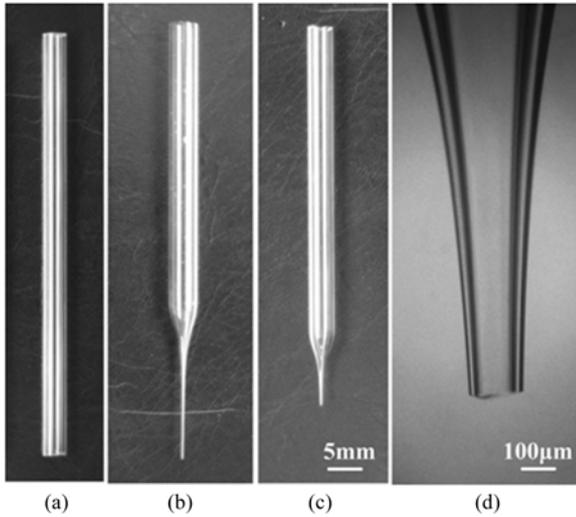


图 2 硼硅酸盐玻璃管微喷嘴制备过程:(a)硼硅酸盐玻璃管;(b)拉制后的微喷嘴;(c)截取后的微喷嘴实物图;(d)截取后的微喷嘴显微图

Fig. 2 Fabrication of borosilicate glass micro-nozzle: (a) borosilicate glass pipe; (b) micro-nozzle after being pulled; (c) micro-nozzle after being cut; (d) micrograph of micro-nozzle after being cut

2.2 实验过程

2.2.1 虾卵细胞的处理

采用 HyClone 0.25%胰蛋白酶溶液冲洗虾腹部使虾卵脱落并盛放在培养皿中,在通风橱中使用吸管吸取量溶液不断吹扫黏附在一起的虾卵群,使虾卵尽可能地分散,分散后的成熟虾卵细胞显微照片如图 3 所示。向分散后的虾卵悬浮液中滴加 5 ml RPMI1640 胎牛血清(上海博升生物科

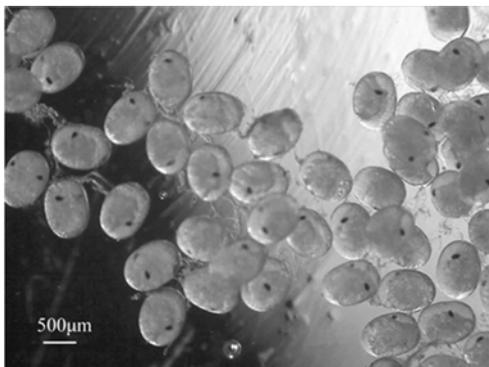


图 3 虾卵细胞显微照片

Fig. 3 Micrograph of shrimp oocyte cells

技有限公司),来提高虾卵的存活率。单个虾卵细胞呈椭球形态,椭球平均长轴约 $800\ \mu\text{m}$,椭球平均短轴约 $500\ \mu\text{m}$,具有较好的单分散性,细胞膜界面清晰,细胞内部细胞质清晰有规则。

2.2.2 油相中水相微液滴脉冲喷射实验

油相中水相微液滴脉冲稳定喷射是进行鱼卵细胞液滴包裹的前提,因此,首先进行了油相中水相微液滴脉冲喷射实验,以探索较出口内径微喷嘴在脉冲惯性力作用的微液滴脉冲喷射效果。其中油相和水相分别为矿物油(M5904, Sigma-Aldrich)和胰蛋白酶溶液,矿物油中滴加 10%的 Span80 分散剂后摇匀静置 2 h,使油相呈均一稳定的混合物。

实验过程中,微喷嘴尺寸分别为 80 、 100 、 120 、 140 和 $160\ \mu\text{m}$,驱动电压频率设置为较低值 $2\ \text{Hz}$,尽可能地降低相邻两个细胞包裹过程的干涉程度,驱动电压分别为 10 、 30 、 50 和 $70\ \text{V}$ 。

2.2.3 虾卵细胞液滴包裹实验

选择合适的微喷嘴尺寸和驱动电压参数进行鱼卵细胞的液滴包裹,应遵循两个基本原则:(1)微喷嘴出口内径尺寸应略大于细胞长轴尺寸;(2)球形微液滴尺寸应为细胞长轴尺寸的 $1.1\sim 2$ 倍。

3 实验结果与分析

3.1 油相中水相微液滴脉冲喷射

图 4 所示为微喷嘴尺寸和驱动电压对液滴大小的影响,当微喷嘴出口内径较小时(大于 $100\ \mu\text{m}$),在较低的驱动电压下,微液滴难以喷出或喷射不稳定。通过调整微喷嘴尺寸 d 和驱动电压 U_0 可获得直径在 $70\sim 180\ \mu\text{m}$ 内微液滴的稳定喷射。当 $d=80\ \mu\text{m}$ 且 $U_0=50\ \text{V}$,微液滴大小获得

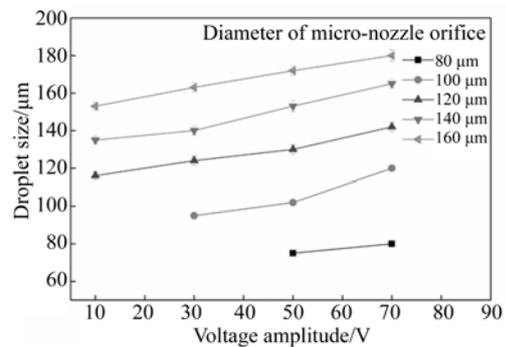


图 4 微喷嘴尺寸和驱动电压对液滴大小的影响

Fig. 4 Variation of droplet size with voltage amplitude and micro-nozzle outlet diameters

最小值 $70 \mu\text{m}$; 当 $d=160 \mu\text{m}$ 且 $U_0=70 \text{V}$, 微液滴大小获得最小值 $180 \mu\text{m}$ 。图 5 所示为水相胰蛋白酶溶液在矿物油中的脉冲喷射效果显微照片, 微液滴呈球形且大小一致。

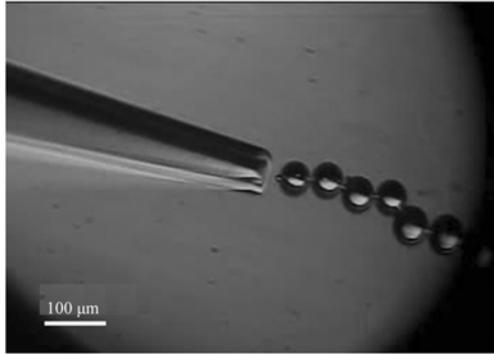


图 5 油相中水相微液滴喷射显微照片

Fig. 5 Micrograph of aqueous phase micro droplets produced in oil phase

3.2 虾卵细胞液滴包裹

根据本文提出的微喷嘴尺寸和驱动电压参数选用准则, 在虾卵细胞液滴包裹实验中, 选择微喷嘴出口内径尺寸 $d=120 \mu\text{m}$, 驱动电压 $U_0=50 \text{V}$ 为细胞包裹参数。微喷嘴内虾卵细胞在沿微喷嘴轴线方向上不同位置处的排列情况如图 6 所示。由图中可以看出, 脉冲惯性力作用能够促使尺寸均匀的虾卵细胞在微喷嘴内整齐排列, 且虾卵细胞长轴轴线方向与微喷嘴轴线近似垂直。设微喷嘴任一横截面内径尺寸为 d_i , 虾卵细胞长轴尺寸为 d_L 。当微喷嘴 d_i 处于细胞尺寸 d_L 的 2~3 倍之间时, 细胞上下间隔呈紧密排列状; 当 d_i 处于粉体粒径 d_0 的 1.5~2.5 倍之间时, 细胞呈类“锯齿”状排列, 上下两排交错排列; 当微喷嘴内径 d_i

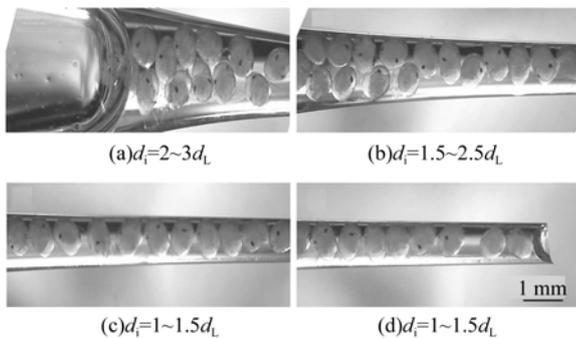


图 6 微喷嘴中虾卵细胞排列状态

Fig. 6 Micrograph of shrimp oocyte cells dispersing state uniform order status in micro-nozzle when they are micro-fed one by one

进一步缩小, 细胞排列状态由“锯齿”状逐步过渡到等间距地直线排列。如图 6(d) 所示, 在微喷嘴出口处, 在使细胞作“前进”运动的余弦修圆波形的驱动下, 相邻细胞在脉冲惯性力作用下形成等间距的间隔, 有利于细胞依次稳定从喷嘴的小孔中喷出。

图 7 所示为虾卵细胞被微液滴包裹后的显微照片, 单个液滴中随机包裹了 1 个或多个虾卵细胞。统计了其中 100 个微液滴样本, 统计结果如表 1 所示, 其中有 40% 的微液滴中包裹了单个细胞, 在显微镜下观察细胞形态正常, 无明显死亡细胞。

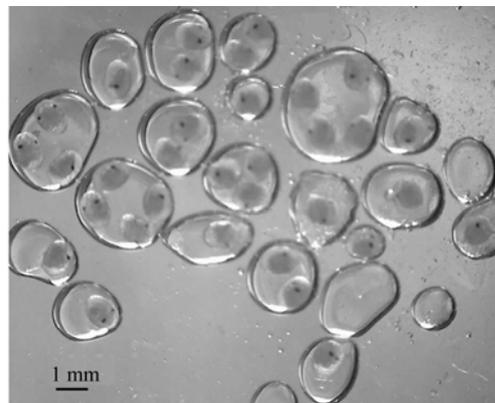


图 7 虾卵细胞液滴包裹显微照片

Fig. 7 Micrograph of micro droplets being encapsulated with one, two, three or four shrimp oocyte cells

表 1 微液滴中包裹细胞数统计

Tab. 1 Statistical table of number of cells in a single droplet

细胞个数	0	1	2	3	4
微液滴数量	5	40	22	7	6

4 结 论

本文搭建了基于微流体脉冲惯性力驱动大尺度细胞(虾卵细胞)液滴单细胞包裹的实验装置。通过调整微喷嘴尺寸 d 和驱动电压 U_0 在油相中获得了直径在 $70\sim 180 \mu\text{m}$ 内的水相微液滴。实现了微喷嘴内虾卵细胞在沿微喷嘴轴线方向上不同位置处的规则排列。实现了 1 个、2 个、3 个或多个虾卵细胞的单液滴包裹, 单细胞包裹率可达 40%。

参考文献:

- [1] RAO C V, WOLF D M, ARKIN A P. Exploitation and tolerance of intracellular noise [J]. *Nature*, 2002, 420: 231-237.
- [2] DAVID G S, CHRISTOPHER D W, DAVID A R. Measurement of single-cell dynamics [J]. *Nature*, 2010, 465: 736-745.
- [3] SAVAS T, JACOB J. H, TIMOTHY K L. Single cell dynamic reveal digital activation and analogue information processing [J]. *Nature*, 2010, 466: 276-271.
- [4] JOENSSON H N, SVAHN H A. Droplet microfluidics—A tool for single-cell analysis [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(49): 12176-12192.
- [5] MASAHITO H, YURI H, YOHEI N, *et al.*. Droplet-based microfluidics for high-throughput screening of a metagenomic library for isolation of microbial enzymes [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 67: 379-385.
- [6] YUNPENG B, EMILIE W, HAAKAN N J. Interfacing picoliter droplet microfluidics with addressable microliter compartments using fluorescence activated cell sorting [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 194: 249-254.
- [7] TENG YANG J, RAMESH R, MAJID E, *et al.*. Jetting microfluidics with size-sorting capability for single-cell protease detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 66: 19-23.
- [8] FEDERICO B, VANNI R, MAURO Z. Lipid droplets fusion in a dipocyte differentiated 3T3-L1 cells: A Monte Carlo simulation [J]. *Experimental Cell Research*, 2014, 321: 201-208.
- [9] 姚波, 何巧红, 杜文斌, 等. 微流控高通量试样引入技术的研究进展 [J]. *色谱*, 2009, 27(5): 662-666. YAO B, HE Q H, DU W B, *et al.*. Development of high-throughput microfluidic sample introduction techniques [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2009, 27(5): 662-666. (in Chinese)
- [10] 章维一, 侯丽雅. 影响流体流动的方法及其装置和应用 [P]. 中国: ZL03152948.8, 2006-5-24. ZHANG W Y, HOU L Y. Method, apparatus and application of affecting fluid flow [P]. China: ZL03152948.8, 2006. (in Chinese)
- [11] 王洪成, 侯丽雅, 章维一. 驱动电压波形修圆对微流体脉冲惯性和驱动效果的影响 [J]. *光学精密工程*, 2012, 20(10): 2251-2259. WANG H CH, HOU L Y, ZHANG W Y. Influence of rounded driving voltage waves on microfluidic pulse inertia force and driving effects [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2012, 20(10): 2251-2259. (in Chinese)
- [12] 朱晓阳, 侯丽雅, 郑悦, 等. 微流体数字化技术制备聚合物微透镜阵列. *光学精密工程*, 2014, 22(2): 360-368. ZHU X Y, HOU L Y, ZHENG Y, *et al.*. Fabrication of polymer micro-lens array by micro-fluid digitalization [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2014, 22(2): 360-368.
- [13] WANG H C, HOU L Y, ZHANG W Y. A drop-on-demand droplet generator for coating catalytic materials on microhotplates of micropellistor [J]. *Sensors and Actuators B: chemical*, 2013, 183: 342-349.
- [14] WANG H C, ZHANG W Y, DAI Z D. A novel approach for encapsulating cells into monodisperse picolitre droplets actuated by microfluidic pulse inertia force [J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(24): 9754-9760.
- [15] 章维一, 侯丽雅. 微流体数字化的科学与技术问题 (I): 概念、方法和效果 [J]. *科技导报*, 2005, 23(8): 4-9. ZHANG W Y, HOU L Y. Scientific and technological problems of digitalization of microfluidics (part I): concept, method and result [J]. *Science & Technology Review*, 2005, 23(8): 4-9. (in Chinese)

作者简介:



王洪成(1985—),男,江苏淮安人,博士后,2008年于南京工程学院获得学士学位,2013年于南京理工大学获得博士学位,主要从事机械设计,微流体驱动-控制技术及其应用、机电一体化系统设计等方面的研究。E-mail: whch31@163.com



朱丽(1977—),女,江苏扬州人,副研究员,1999年,2003年,2009年在南京理工大学分别获得学士、硕士、博士学位,主要从事微流体系统、微反应等方面的研究。E-mail: nlgzl@163.com