

## 用于巨型脂质体制备及收集的微流控芯片研究

王振宇<sup>1 2</sup> 王琼<sup>2</sup> 王万刚<sup>2 3</sup> 李文满<sup>2</sup> 胡宁<sup>2</sup> 杨军<sup>\* 2</sup>

<sup>1</sup>(重庆医科大学附属第一医院分子肿瘤及表观遗传学重庆市重点实验室,重庆 400016)

<sup>2</sup>(重庆大学生物工程学院,生物流变科学与技术教育部重点实验室  
视觉损伤与再生修复重庆市重点实验室,重庆 400030)

<sup>3</sup>(重庆城市管理职业学院电子信息工程系,重庆 400055)

**摘要** 构建了一种集成制备和收集功能的微流控芯片系统。利用微流控技术将脂质溶液输入微电极阵列中形成脂质膜,在微电极阵列产生的聚焦电场作用下,高效形成一定粒径范围的巨型脂质体。稳定的巨型球形脂质体的最高产率可以达到 60%;然后将制备的脂质体经微通道输送到收集腔室,通过重力作用和微孔滤膜的筛选可得到 90% 以上,尺寸在 10 ~ 50  $\mu\text{m}$  的稳定巨型球形脂质体。此芯片系统有效地克服了目前巨型脂质体制备方法效率低、脂质体粒径分布广、难筛选和难收集等缺点。

**关键词** 巨型脂质体;微流控;制备;收集

### 1 引言

巨型脂质体为粒径大于 1  $\mu\text{m}$  的脂质体<sup>[1]</sup>,由于其尺寸巨大,在光学显微镜下易于观察和操控;膜结构类似细胞膜,可模拟细胞膜或细胞;具有双亲性,可以包载水溶性和脂溶性物质。它可用作细胞膜或细胞模型来研究其物理性质等<sup>[2~5]</sup>;模拟细胞环境,进行蛋白质表达或者细胞功能等研究<sup>[6~8]</sup>;用于运载蛋白质、DNA 等,研究基因转移、药物传送等<sup>[9]</sup>;作为生化反应器,提供超小反应体积等<sup>[10]</sup>。因此,这一脂质结构可应用于分子生物学、细胞生物学、生物化学、医药等多个领域。

微米级巨型脂质体成型能力和稳定性都较纳米级常规脂质体差,因而更难制备。现有制备方法主要包括温和水合法、溶剂蒸发法、微流控注入法、电形成法<sup>[11,12]</sup>。相较而言,电形成法通过电场作用实现巨型脂质体的制备,具有速度快、可控性高、反应条件温和、环境污染小等优点,得到了越来越多关注<sup>[13]</sup>。但是,电形成法,特别是各种微型制备装置的研究起步较晚,很不成熟,还有一些问题有待解决。例如:制备效率不高、脂质体粒径分布广、制备得到的脂质体缺乏高效收集方法。现有收集方法常需要复杂的后处理操作,很多脂质体损坏或丢失,对实际制备产率造成了很大影响。

本研究提出一种基于微电极阵列的制备及收集微流控芯片,利用微电极阵列、多微通道结构精确控制巨型脂质体的形成,提高效率 and 粒径均匀性;通过集成过滤收集模块,可实现巨型脂质体的温和、高效收集,从而实现一种简单、高效的巨型脂质体制备方法。

### 2 实验部分

#### 2.1 微芯片的设计及加工

微流控芯片包括制备和分选收集两个部分,之间通过微通道连接。用函数信号发生器向微电极阵列提供电信号,通过注射泵向微通道注入脂质溶液、收集缓冲液,抽出废液等(图 1A)。

在制备腔室中包含两种微电极阵列结构进行对比分析。一种为交错电极阵列结构(图 1B),包括两个互不接触、交叉排布的梳状微电极阵列,每个梳脊上分布有多个梳齿,梳脊宽度为 200  $\mu\text{m}$ ,梳齿宽度为 80  $\mu\text{m}$ ;梳齿上微电极宽度和长度均为 20  $\mu\text{m}$ 。每个梳齿上均匀地分布有大量微电极,相邻微电极间距为 60  $\mu\text{m}$ ,相对微电极距离也为 60  $\mu\text{m}$ 。阵列中电场非均匀分布,微电极顶端电场强度最大(图 1B)。

2015-04-23 收稿;2015-06-23 接受

本文系国家自然科学基金(No. 81371691),重庆市自然科学基金(Nos. 2013jjB10011, 2012jjA10144),教育部重点实验室访问学者基金(No. CQKLBST-2014-005)资助

\* E-mail: bioyangjun@cqu.edu.cn

另一种微电极阵列为简单的平板电极阵列结构(图 1C),也由两个互不接触、交叉排布的梳状微电极阵列共同组成,每个梳状微电极上不再有梳齿,因而电场分布均匀,强度弱于交错电极电场的较大区域(图 1C)。微电极阵列也构成了微通道的侧壁,所形成通道深度为 42  $\mu\text{m}$ 。

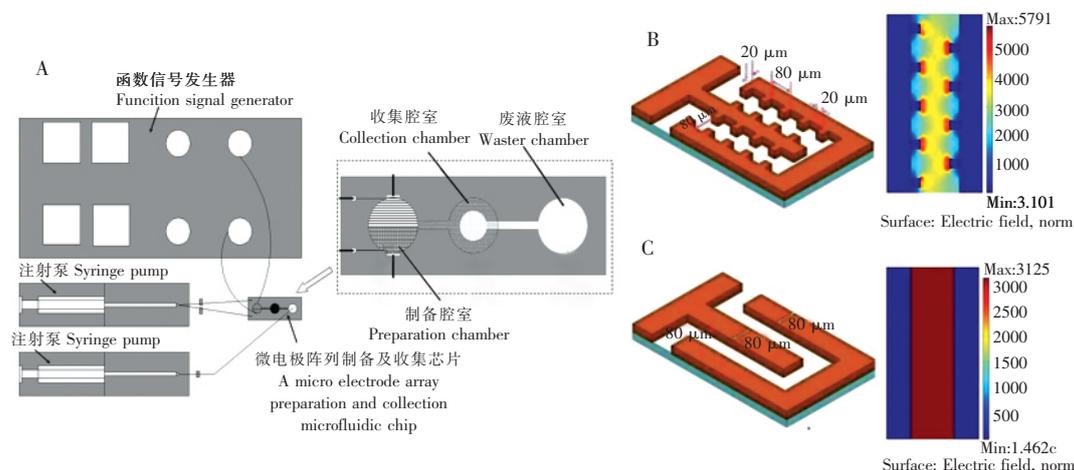


图 1 芯片设计。(A) 芯片结构及实验平台,(B) 交错电极阵列结构及电场分布仿真,(C) 平板电极阵列结构及电场分布仿真

Fig. 1 Chip design. (A) Chip structure and experimental platform, (B) interdigital electrode array and simulation of electric field, (C) planar electrode array and simulation of electric field

分选收集部分包含收集腔室和废液腔室(图 1A),采用聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)构建。收集腔室分上下两层,上层直径为 14 mm,下层直径为 8 mm,两层腔室之间通过微孔滤膜(10.0  $\mu\text{m}$  圆形滤孔,滤膜直径 13 mm,每盒 100 张滤膜,Whatman, Britain)分隔,制备腔室通过微通道与收集腔室上层连接,收集腔室下层通过微通道连接贯穿上下层 PDMS 的废液腔室(直径 14 mm)。

微电极阵列部分采用 MEMS 加工工艺,先将石英玻璃基底和硅片键合;在硅表面溅射一层厚度为 20 nm 的 Cr 以提高硅与金属层(金)之间的粘附性;在 Cr 金属层上溅射一层厚度为 2  $\mu\text{m}$  的金层(Au),进一步降低微电极阵列的电阻率,提高其电气性能;使用 KI 溶液腐蚀 Cr-Au 双金属层;采用感应耦合等离子工艺刻蚀硅,形成微电极阵列。

微通道和腔室部分则主要采用 PDMS 进行复制模塑法加工:光刻聚丙烯基板作为模板;将 PDMS 预聚物与固化剂按照 10:1 的比例调配后倒于模板上固化,复制模板图形;然后将复制有结构的 PDMS 层与基底键合,构成腔室和微通道结构;微孔滤膜用 PDMS 固定于收集腔室上层与下层交界处。

## 2.2 仪器、试剂与材料

DMI4000 B 倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司),BT223S 电子天平(德国 Sartorius 公司),细胞型 1820A 摩尔超纯水机(摩尔水处理设备公司),真空干燥箱(科恒达仪器公司),EE1410 合成函数信号发生器(新联电讯仪器公司),显微镜专用温控平台(江南永新光学公司)。

磷脂酰胆碱(1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PC)、胆固醇(3 $\beta$ -Hydroxy-5-cholestene, cholesterol, Chol)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;乙醚、NaCl、蔗糖、葡萄糖购自中国科龙化工公司;PDMS 购自美国 Dow Corning 公司。聚丙烯基板(2 mm 厚)购自中国新涛公司;玻璃片、ITO 玻璃、导电胶布购自中国珠海凯为公司。

## 3 结果与讨论

### 3.1 巨型脂质体制备

脂质膜的情况和电场参数是影响巨型脂质体电形成效果的重要因素。其中,脂质膜的形成由脂质溶液的浓度、体积、腔室的形状及尺寸等决定;电场参数涉及电场分布、电压、频率、施加时间等。在两种微电

极阵列中分别开展多种参数(脂质溶液浓度、电压、频率、施加时间,见表1)的脂质体制备实验。根据前期研究结果<sup>[14]</sup>,磷脂酰胆碱(PC)和胆固醇(Chol)浓度比维持在5:1。

将脂质溶液输入并充满两种微电极阵列所在微通道,真空干燥后,使溶剂完全蒸发形成脂质膜;注入水溶液后,在45℃下施加交流电场(正弦信号)观察巨型脂质体形成情况。

在电形成过程的最初阶段,巨型脂质体形成主要受脂质膜影响。电极附近的脂质膜较微通道中间厚,更利于巨型脂质体的形成。当脂质溶液浓度较低时(0.5 mg/mL PC和0.1 mg/mL Chol),仅电极附近的脂质膜厚度足以膨胀形成单层巨型脂质体,但是产量很低。之后,巨型脂质体的电形成产量、比率和速度随脂质溶液浓度增加而递增,但其浓度超出了一个阈值(9 mg/mL PC和1.8 mg/mL Chol)后,所形成巨型脂质体互相叠加为不稳定条状结构(图2),巨型球形脂质体产量也不再增加。当PC和Chol浓度分别为6和1.2 mg/mL时,巨型球形脂质体产率较高。

在电形成过程后期,电场分布、幅值、频率、电场施加时间均对巨型脂质体的形成有影响(图3)。在电场较强区域,脂质体能更快膨胀形成。两种不同的微电极阵列中形成的巨型脂质体形状较相似,但交错电极阵列上的形成速率更快。此外,当脂质浓度逐渐增大时,在平板电极阵列中脂质体形成于整个通道,到后期边缘和中间的脂质体的膨胀会逐渐受到阻碍;而交错电极阵列上的巨型脂质体常形成在电极附近,中间位置的脂质膜就几乎不膨胀。在电场强的位置,脂质膜的膨胀速度也快于平板电极阵列,所形成巨型脂质体的形态也更好。这表明电场强度的增加有助于脂质体的快速形成。随着电场幅值的增加,脂质体膨胀形成速度增加,但由此产生的大粒径球形脂质体(粒径>50 μm)稳定性减弱、容易损坏,所以最终收集到的巨型脂质体比例在电压增加后并没有明显增加。在微电极阵列中,由于较小的电极间距有助于产生更大的场强,很小的电压就足以实现巨型脂质体(球形,粒径≤50 μm)的快速电形成,实验结果最佳的电压为0.45 V。

随着频率增加,脂质体膨胀和封闭也更快。当频率达到1000 Hz时,收集到的巨型脂质体较多,而频率继续增高时收集量没有明显的增加;电场施加时间影响巨型脂质体的膨胀和封闭,在时间远小于60 min时,巨型脂质体还较少形成,很多巨型脂质体还在膨胀过程中;当时间达到60 min后,多数巨型脂质体基本形成;进一步增加电场施加时间,产量没有明显的变化。因此,就本研究所采用的芯片制备装置,适宜的脂质浓度、电场分布、电压、频率、电场施加时间等参数分别为:磷脂酰胆碱和胆固醇浓度为6.0和1.2 mg/mL,交错电极、0.45 V,1000 Hz、60 min。此时,稳定的巨型球形脂质体的产率可以达到约60%。采用目前常用的ITO玻璃电极+PDMS垫片搭建的电形成腔室进行对照实验,在相同腔室体积、脂质用量、已报道的实验参数<sup>[15]</sup>,巨型球形脂质体的产率仅为32%。

表1 制备实验参数

Tab 1 Preparation experiment parameters

实验参数 Experimental parameters	范围及类型 Range and type
电场分布 Distribution of electric field	均匀 Uniform 非均匀 Non-uniform
脂质浓度 Concentration of lipid solution	PC: 0.5 ~ 12 mg/mL, Chol: 0.1 ~ 2.4 mg/mL
电压 Voltage	V <sub>pp</sub> : 0.05 ~ 0.85 V
频率 Frequency	2 ~ 10000 Hz
施加电场时间 Time	15 ~ 120 min

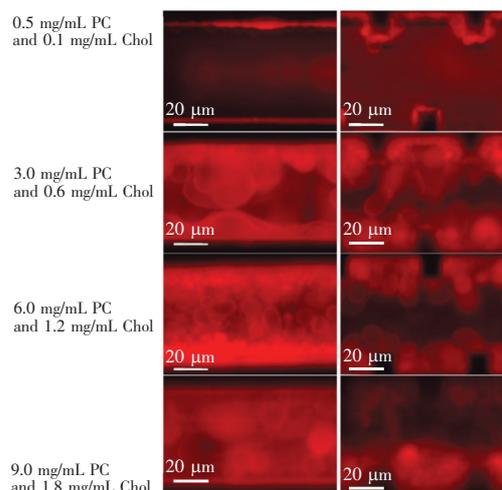


图2 巨型脂质体制备实验结果。电场信号加载1 h后,平板电极(左列)和交错微电极(右列)部分巨型脂质体电形成情况的荧光图像

Fig. 2 Experimental results of the preparation of giant vesicles. On-chip electroformation of giant vesicles in 1 h in the device with planar electrode array (left column) and protruding electrode array (right column)

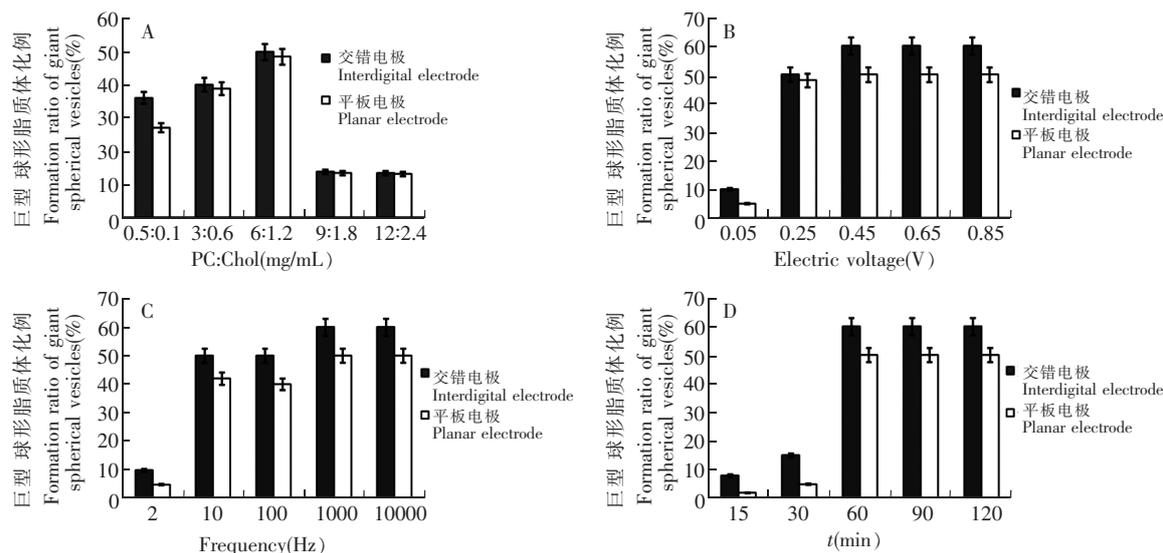


图 3 不同因素对巨型球形脂质体形成的影响。(A) 脂质浓度, (B) 电压, (C) 频率, (D) 时间

Fig. 3 Effect of different factors on giant spherical vesicles electroformation. (A) lipid concentration, (B) electric voltage, (C) frequency, (D) time

### 3.2 巨型脂质体收集

制备完成后,向制备腔室中缓慢注入等渗的葡萄糖、NaCl 的水溶液(504  $\mu\text{L}$ ),可在一定程度上避免巨型脂质体粒径大、易形变、整体强度较差,在操作时容易破裂等问题。利用液流运动轻柔地将制备腔室里的巨型脂质体等物质输送到收集腔室。经重力沉降和微孔滤膜过滤作用,符合要求的巨型脂质体留在收集腔室上层(图 4),尺寸较小的物质则通过滤膜进入腔室下层,经微通道流入废液腔室。多次重复实验表明,在收集腔室中可以收集得到 90% 以上的巨型脂质体(粒径在 10 ~ 50  $\mu\text{m}$ ,大多为球形、较稳定)。交错微电极阵列制备的巨型脂质体收集效果优于平板微电极阵列,这也证明交错微电极阵列可以得到更多,更稳定的巨型脂质体。但仍有少部分尺寸较小的物质由于本身质量太轻,在浮力作用下仍然停留在收集腔室上层。针对这部分物质,今后可在腔室下层增加轻柔抽吸作用加以去除。

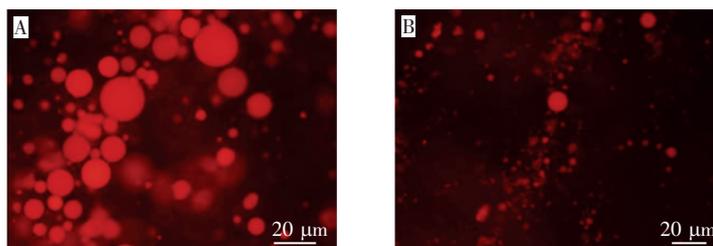


图 4 收集到的巨型脂质体。(A) 交错电极阵列, (B) 平板电极阵列, 标尺为 20  $\mu\text{m}$

Fig. 4 Collected giant vesicles. (A) interdigital electrode array, (B) planar electrode array, scale bars = 20  $\mu\text{m}$

## 4 结论

本研究采用了微流控芯片收集方法,获得了更好的巨型脂质体制备效果,并尽量多地收集所需的稳定巨型球形脂质体。通过构建两种不同微电极阵列结构,进行了多种脂质浓度、电压、频率、电场施加时间的实验研究。结果表明,交错电极对电场的聚焦作用有利于局部高电场区脂质体的膨胀形成,因此更适合巨型脂质体的制备。不同脂质浓度和电场参数对巨型脂质体的电形成有明显的影响,多参数探索表明,在微电极阵列芯片中选择磷脂酰胆碱和胆固醇浓度为 6.0 mg/mL 和 1.2 mg/mL,电场参数为电压 0.45 V、频率 1000 Hz、加载时间 60 min 可以得到很好的制备效果。此时稳定的巨型球形脂质体的产率可以达到 60%,明显优于常规制备方法。

在制备研究基础上开展了收集芯片模块的研究,通过不同组分在收集腔室和废液腔室间的分选操作,可以在收集腔室中大量获得巨型脂质体(粒径在 10 ~ 50  $\mu\text{m}$  范围内,大多为球形、较稳定),为巨型脂质体的进一步应用奠定了良好基础。

## References

- 1 Jesorka A , Orwar O. *Ann. Rev. Anal. Chem.* , **2008** , 1: 801–832
- 2 Vorselen D , Roos W H , van Loon J J W A , Wuite G J L. *Biophys. J.* , **2013** , 104 ( 2 ) : 620A–620A
- 3 DeNardis N I , Ruzic I , Pecar-Hlic J , El Shawish S , Zihlerl P. *Bioelectrochem.* , **2012** , 88: 48–56
- 4 Guo B H , Cheng Y , Li N Y , Li X F , Jin M Z , Li T , Li J. *J. Drug Target* , **2013** , 21 ( 3 ) : 257–264
- 5 Portet T , Mauroy C , Demery V , Houles T , Escoffre J M , Dean D S , Rols M P. *J. Membr. Biol.* , **2012** , 245 ( 9 ) : 555–564
- 6 Mikelj M , Praper T , Demic R , Hodnik V , Turk T , Anderluh G. *Anal. Biochem.* , **2013** , 435 ( 2 ) : 174–180
- 7 Shimanouchi T , Umakoshi H , Kuboib R. *J. Colloid Interface Sci.* , **2013** , 394: 269–276
- 8 Natsume Y , Toyota T. *Chem. Lett.* , **2013** , 42 ( 3 ) : 295–297
- 9 Kang Y J , Wostein H S , Majd S. *Biophys. J.* , **2014** , 106 ( 2 ) : 632a
- 10 Tsumoto K , Nomura S M , Nakatani Y , Yoshikawa K. *Langmuir* , **2001** , 17 ( 23 ) : 7225–7228
- 11 Hu P C C , Li S , Malmstadt N. *ACS Appl. Mater. Interfaces* , **2011** , 3 ( 5 ) : 1434–1440
- 12 Patil Y P , Jadhav S. *Chem. Phys. Lipids* , **2014** , 177: 8–18
- 13 Mikelj M , Praper T , Demic R , Hodnik V , Turk T , Anderluh G. *Anal. Biochem.* , **2013** , 435 ( 2 ) : 174–180
- 14 Wang Z Y , Hu N , Yeh L H , Zheng X L , Yang J , Joo S W , Qian S Z. *Colloids Surf B Biointerfaces* , **2013** , 110: 81–87
- 15 Kuribayashi K , Tresset G , Coquet P , Fujita H , Takeuchi S. *Meas. Sci. Technol.* , **2006** , 17: 3121–3126

## Microfluidic Chips for Preparation and Collection of Giant Vesicles

WANG Zhen-Yu<sup>1,2</sup> , WANG Qiong<sup>2</sup> , WANG Wan-Gang<sup>2,3</sup> , LI Wen-Man<sup>2</sup> , HU Ning<sup>2</sup> , YANG Jun<sup>\* 2</sup>

<sup>1</sup>( *Chongqing Key Laboratory of Molecular Oncology and Epigenetics* ,

*the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University , Chongqing 400016 , China* )

<sup>2</sup>( *Key Laboratory of Biorheological Science and Technology ( Chongqing University )* ,

*Ministry of Education , Key Lab of Visual Damage and Regeneration & Restoration of Chongqing , Bioengineering College , Chongqing University , Chongqing 400030 , China* )

<sup>3</sup>( *Department of Electronic Engineering , Chongqing City Management College , Chongqing 400055 , China* )

**Abstract** A microfluidic chip with the preparation module and collection module was fabricated , in which microfluidic technology and microelectrode array were used for the preparation of giant vesicles. First , lipid solution was loaded into the microelectrode array through microchannels to form lipid film , then an electric field was subsequently loaded on the microelectrode array and the giant vesicles with a controlled diameter were formed efficiently. The ratio of the formed stable giant spherical vesicles could reach up to 60% . Giant vesicles and other materials were flushed into the upper layer of the collection chamber by microchannel. 90% of the stable giant spherical vesicles with 10–50  $\mu\text{m}$  diameter could be sorted in the upper layer of the collection chamber by using micropore filter and gravity depositing. This microfluidic chip could overcome some defects existing in the current preparation method such as low efficiency , wide distribution of diameters , as well as difficult for screening and collection.

**Keywords** Giant vesicle; Microfluidic; Preparation; Collection

( Received 23 April 2015; accepted 23 June 2015 )

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China ( No. 81371691 ) , the Natural Science Foundation of Chongqing ( Nos. cstc2013jjB10011 , cstc2012jjA10144 ) , and the Visiting Scholar Foundation of Key Laboratory of Biorheological Science and Technology ( Chongqing University ) , Ministry of Education ( No. CQKLBST-2014-005 )