

微电极阵列芯片的脂质体电融合研究

蒋凤¹ 杨军^{*1} 王振宇¹ 胡宁¹ 郑小林¹ 谢琳² 杨忠³ 陈洁⁴

¹(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,重庆 400030)

²(第三军医大学大坪医院野战外科研究所眼科,重庆 400042)

³(第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

⁴(重庆医科大学附属儿童医院儿童营养研究中心,重庆 400014)

摘 要 利用旋转蒸发法制作基于大豆卵磷脂的一种大型脂质体,在微电极阵列芯片上进行脂质体电融合实验研究。在电融合过程中,利用介电电泳力实现脂质体在微流控芯片中的排队,再利用高场强的电脉冲使脂质体膜发生可逆性电穿孔,在持续的介电电泳力作用下,使穿孔的脂质体实现融合。芯片上脂质体的融合率可以达到 20%左右。而且,玻璃基底材料和低深宽比的通道结构更有利于脂质体融合过程的观察与控制。

关键词 微流控;脂质体;介电电泳;电融合;微电极

1 引 言

脂质体是一种人工双层的脂质小囊,外部为脂双层薄膜,内部为包裹的液体成分。自从 1965 年被发现以来,脂质体在医药、生物化学研究和美容产品研制等领域被广泛使用^[1]。脂质体可采用一种类似细胞膜的方式将内外物质分隔开来,通过在内部包裹特定物质实现载体功能,还可以通过表面修饰实现物质的定向传递。脂质体融合是采用人工方法将两个脂质体融合到一起,它是脂质体与细胞融合研究的基础。这些技术在超小仿生反应器、生物膜的相互作用研究、基因转染、细胞器监测、药物定点传送、细胞膜融合机理研究及细胞膜蛋白的生物物理学研究等方面发挥着越来越大的作用^[2~4]。与细胞融合类似,脂质体融合过程中,先需要使两个脂质体互相紧密接触,再使用不同的诱导方法使它们融合成一个更大的脂质体。

早期的脂质体融合采用钙离子促融法,它主要应用在纳米级脂质体中,脂质体的相互接触和融合过程均不可控,常常导致多个脂质体聚集融合^[5]。此后,一些可控的融合方法被提出,如碳纤维电极控制的脂质体融合^[6],光镊和纳米吸管控制的脂质体融合^[7],光镊和激光操作的脂质体穿孔融合^[8]。这些方法虽然实现了脂质体的可控融合,但是效率很低,而且光镊操作所用设备精密昂贵,不适用于稳定性较差的单层大型脂质体。

2004 年,Tresset 等研制了一种用于脂质体电融合的微流控芯片,并实现了脂质体融合^[2]。此后,他们又在芯片的可观察性以及包裹纳米结构和大分子的脂质体融合方面做了进一步研究^[4]。这些研究表明,微电极芯片可以更准确地控制脂质体,实现精确排队和高效融合。而且,由于芯片上电极间距大大缩小,融合所需电压也从传统电融合使用的上千伏电压降低到一百伏以内,对电信号发生器的要求也相应降低,这更有助于该技术的广泛应用。但是,现有脂质体融合芯片采用高深宽比的电极设计,电极间的微通道很深,常常达到数百微米,不利于脂质体融合过程的观察。同时,由于脂质体质量很小,很容易在液体中悬浮呈多层分布,难以在这种电极间有效排队和融合。而且,现有芯片中微电极数目不多,一次可同时控制的脂质体也较少,效率较低。

本研究在已有的细胞电融合芯片研究^[9,10]基础上,设计并制作了一种硅玻基底的微电极阵列芯片。通过高密度的电极阵列设计来同时控制大量脂质体的排队、融合,从而提高脂质体融合的产率。而且,低深宽比的通道设计和玻璃基底更利于脂质体的融合和观察。

2011-08-26 收稿;2011-11-23 接受

本文系国家自然科学基金(No. 81071278),教育部“新世纪优秀人才支持计划”(No. NCET-09-0842),重庆市科技计划(No. CSTC2009AB5081)和重庆大学研究生创新团队建设(No. 200909A1002)资助项目

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

2 实验部分

2.1 微芯片的设计及加工

2.1.1 微电极阵列 微电极阵列芯片加工在 $2.4\text{ cm} \times 1.2\text{ cm}$ 的玻璃基底上,由交叉的两个梳状微电极阵列组成。微电极排布于梳齿上,相邻梳齿上的微电极呈交错式结构排列;同时,梳状微电极阵列也是微通道的侧壁。芯片共集成了 6000 对微电极,微电极自梳脊向通道中心突出,其宽度和长度均为 $20\text{ }\mu\text{m}$,微通道同侧上微电极的间距为 $60\text{ }\mu\text{m}$ 。微通道宽度为 $100\text{ }\mu\text{m}$,深度为 $42\text{ }\mu\text{m}$ (图 1)。

2.2.2 芯片加工 芯片的加工流程:采用静电热键合技术将硅片和玻璃片键合在一起,键合温度为 $400\text{ }^{\circ}\text{C}$,电压为 600 V 。玻璃基片选用厚度为 $500\text{ }\mu\text{m}$ 的 Corning 7740 玻璃片;硅片选用电导率为 $7\sim 9\text{ }\Omega\cdot\text{m}$ 的低阻硅片,厚度为 $40\text{ }\mu\text{m}$ 。较长的梳脊电阻可能引起芯片内部电场分布不均匀,因此,采用磁控溅射技术在低阻硅表面溅射厚度为 $2\text{ }\mu\text{m}$ 的金膜,以提高电极的电气性能。同时,金具有良好的生物相容性和良好的抗氧化、抗腐蚀能力。为提高金膜与低阻硅之间的粘附力,在溅射金前预先溅射 50 nm 厚的铬层。利用 KI 溶液腐蚀金属引线层,可以获得与微电极阵列结构一致的金属引线。利用感应耦合等离子刻蚀低阻硅层直至底部的玻璃基底,获得所需的微电极阵列结构。

加工得到的裸片采用金丝键合工艺进行封装:在 PCB 基板上制备与芯片键合点对应的镀金键合点以及微电极阵列区域对应的光窗。利用 TCR3303 UV 胶将芯片固定于光窗上,选用直径为 $75\text{ }\mu\text{m}$ 的金丝,利用金丝键合工艺在 PCB 与芯片的键合点之间形成电气连接,以导入外界电信号(图 2)。

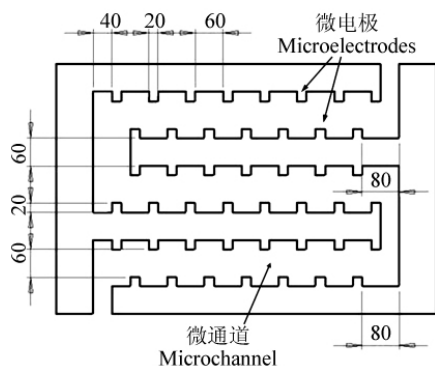


图 1 微电极阵列芯片结构示意图

Fig. 1 Schematic of microelectrode array electrofusion chip

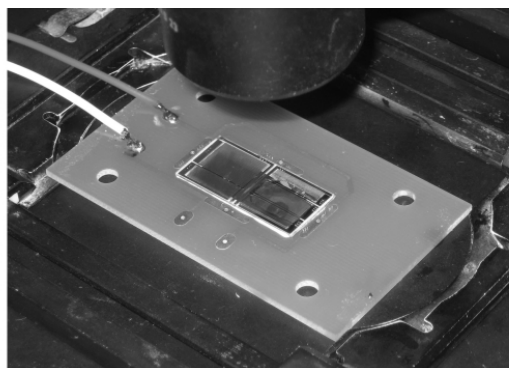


图 2 微电极阵列芯片

Fig. 2 Microelectrode array chip

2.2 仪器与材料

DMI4000 B 倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司); RE-52A 旋转蒸发器(亚荣生化公司); SHB-III 循环水真空泵(长城科工贸公司); Centrifuge 5417R 离心机(德国 Eppendorf 公司); 细胞型 1820A 摩尔超纯水机(中国); EE1410 合成函数信号发生器(新联电讯仪器公司); 自制电融合仪及芯片。

大豆卵磷脂(科龙化工公司); 胆固醇(分析纯,金渡化工公司); 氯仿、乙醚、NaCl、NaOH、无水 CaCl_2 (分析纯,川东化工公司); KH_2PO_4 (分析纯,博艺化学公司)。

2.3 融合缓冲液

电融合缓冲液为含有 $0.01\text{ mmol/L Ca}^{2+}$ 和 $0.02\text{ mmol/L Mg}^{2+}$ 的等渗山梨醇溶液(每 100 mL 水中含 5.463 g 山梨酸)。

3 结果与讨论

3.1 脂质体的制备研究

脂质体的制备方法有多种,可以制备不同特性的脂质体^[1,7]。本研究选用其中一种,制备容易观察融合过程的大型脂质体^[7]:称取一定比例的卵磷脂和胆固醇置于 200 mL 圆底烧瓶中,加入适量乙醚直至卵磷脂和胆固醇完全溶解,再倒入与乙醚量相当的生理盐水(提前预热至 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$)。在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴下用旋转蒸发器除去乙醚,得到乳白色的脂质体悬浮液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。这种方法制得的脂质体多为大型脂质体

(图 3A), 粒径主要在 10^{-5} m 级(图 3B)。

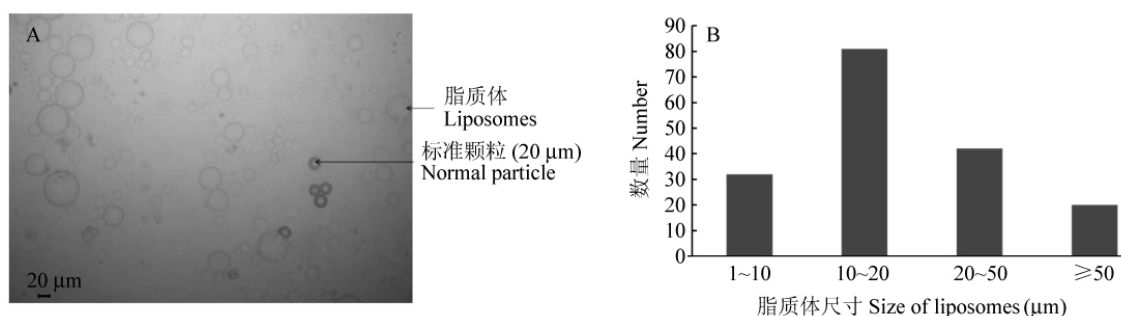


图 3 脂质体制备结果:(A)显微照片,(B)脂质体尺寸分布

Fig. 3 Preparation of liposomes. (A) microscopic image, (B) size distribution of liposomes

融合实验前需要对脂质体进行预处理:在 20 °C 以 2500 r/min 离心 2 次,将收集到的脂质体转移到融合缓冲液中,制成悬浮液。

在卵磷脂中添加胆固醇,对脂质体的尺寸和产率基本无影响。但是,未加胆固醇的脂质体在离心处理时几乎全部破碎,而加入胆固醇的脂质体韧性有所提高。胆固醇还影响脂质体膜的通透性^[11]。实验表明,当卵磷脂与胆固醇的质量比为 6:1 时,制得的脂质体膜的稳定性和通透性均能满足融合实验要求。

3.2 脂质体的排队研究

将脂质体悬浮液注入电融合芯片中,在相对电极上施加频率为 300 kHz 的正弦信号,观察排队效果。正弦信号的峰值(V_{pp})在 1~5 V 变化。当 $V_{pp}=2$ V 时,脂质体开始在介电电泳力的作用下运动。当 $V_{pp}=3$ V 时,大部分脂质体移动到电极附近,相互靠在一起排队(图 4)。与细胞排队相比,脂质体排队所需电信号略低。这是由于脂质体尺寸较大,所受介电电泳力也大;同时脂质体的重量小。

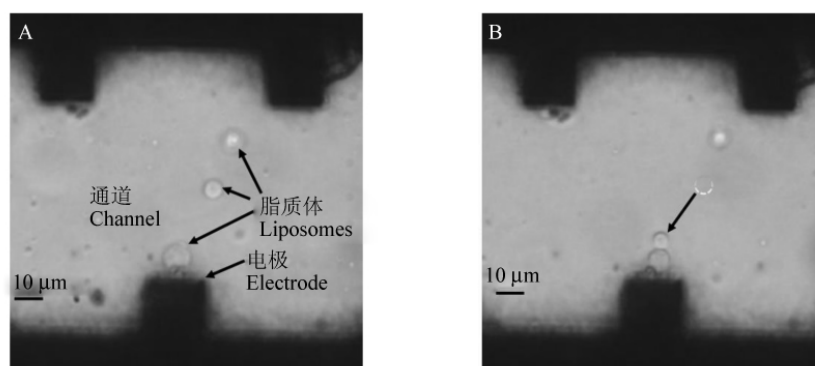


图 4 脂质体排队过程。(A)排队前,(B)排队后

Fig. 4 Alignment of liposomes, (A) before and (B) after alignment

根据仿真分析^[9,12,13],交错微电极阵列中微电极尖角向对侧电极最近尖角方向有较强的电场强度及电场梯度。根据介电电泳原理^[14],脂质体应沿着相对电极尖角间连线成串排列,类似芯片上的细胞排队^[9]。然而,由于脂质体内不像细胞那样具有细胞骨架和细胞器,质量极轻且极易变形。因此,除了介电电泳力外,环境中的其它作用力,如液体流动、实验台不平和谐振动产生的细微作用,都可以使脂质体受力变形而发生位置改变。因此,脂质体的排列位置虽然大体落在高电场区,但不一定能够处于电场最强的位置(图 4),这对融合有一定影响。

将固定视野内施加排队电信号后两两排队脂质体的数量与该视野内脂质体总数之比称为排队率,实验中排队率约为 40%~50%。多种因素都可能对排队率产生影响,如悬浮液中脂质体的浓度以及杂质含量。

3.3 脂质体的融合研究

当脂质体排队完成后,将排队信号切换为电穿孔信号,即系列脉冲信号。信号峰值(V_{pp})为 60 V,

脉宽为 50 μs , 脉冲间隔为 200 ms, 脉冲个数为 6 个。在穿孔信号后紧接着施加一组衰减的正弦信号, 以维持脂质体对的紧密贴合, 利于融合的发生。

在融合实验中, 部分脂质体在施加脉冲电压后发生穿孔, 并迅速融合, 不同脂质体对的融合情况有所区别。如图 5 所示, 在相邻电极上排队的 3 对脂质体中, 施加一组脉冲后, 第 1 对和第 3 对脂质体发生融合; 重复施加另一组脉冲后, 第 2 对脂质体融合。有少量脂质体对在脉冲作用下相互挤压变形, 并有弹跳现象, 未发生融合。实验表明, 大小相近的脂质体对容易融合, 而尺寸相差太大的脂质体则不易融合, 这可能是由于不同尺寸脂质体的穿孔电压差别较大所引起的。除了尺寸差异, 其它因素也可能影响脂质体融合。如多层脂质体融合更困难; 制备或离心过程中产生的磷脂碎片等杂质若位于两个排队脂质体的接触点, 将阻碍脂质体融合; 制备脂质体时加入适量的胆固醇, 有助于脂质体膜的流动性和稳定性, 但过量胆固醇会使得脂质体柔韧性过高, 而不利穿孔融合。

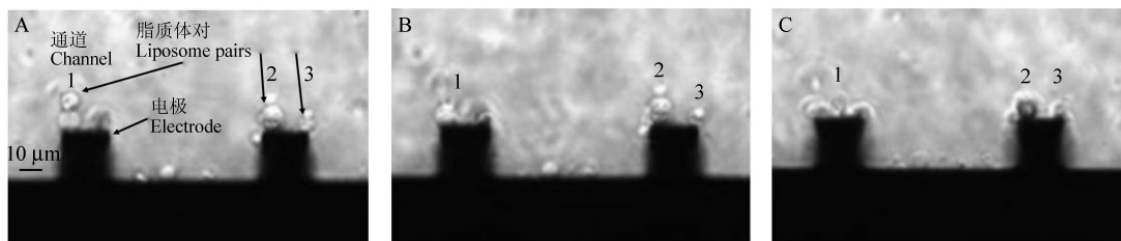


图 5 芯片上的脂质体融合: (A) 排队, (B) 穿孔, (C) 融合

Fig. 5 On-chip liposome fusion; (A) alignment, (B) electroporation, (C) fusion

固定视野内排队脂质体中发生融合的对数与其总数之比称为融合率。两两排队脂质体的最高融合率达到 20% 左右, 这比相似情况下细胞的融合率低很多, 主要是由于脂质体大小不均一, 不同尺寸脂质体所需的穿孔电压不同^[2]。如果排队的两个脂质体尺寸差别较大, 二者的融合就比较困难。因此, 在脂质体制备过程中提高脂质体的均一性可提高融合率。另外, 脂质体中缺乏骨架和蛋白质等结构, 柔韧性很好, 穿孔和膜重建都较困难。

本实验表明, 脂质体制备过程中合适的胆固醇浓度对脂质体柔韧性有较大影响, 且直接影响后面的处理过程和融合实验。在芯片上, 由于微电极对间距小, 所需排队和融合电压也较低。高密度电极阵列一次可操作大量脂质体, 选择合理的微通道的深度与宽度的比值, 可使脂质体排队和观察都更加容易。基于微电极阵列芯片的脂质体融合方法在基础和应用研究中将更具效率。但是, 目前脂质体的融合率仍低于细胞融合, 还有很多方面有待改进。例如, 在脂质体制备方法中, 脂质体粒径分布较宽, 影响排队和融合效果, 需要探索更好的脂质体制备方法(如微芯片脂质体制备方法)。另外, 脂质体重量极轻, 又没有类似细胞骨架的支撑, 因此其柔韧性好, 不易穿孔融合, 需要在脂质体制备材料和脂质体内容物方面进行优化研究。

References

- 1 Alving C R. *Nature*, **1987**, 330(6670): 189~190
- 2 Tresset G, Takeuchi S. *Biomed. Microdevices*, **2004**, 6(3): 213~218
- 3 WANG Zhen-Yu, YANG Jun, HU Ning, ZHENG Xiao-Lin, YANG Zhong. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2012**, 40(3): 331~338
王振宇, 杨军, 胡宁, 郑小林, 杨忠. *分析化学*, **2012**, 40(3): 331~338
- 4 Tresset G, Takeuchi S. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(9): 2795~2801
- 5 Papahadjopoulos D, Nir S, Duzgunes N. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **1990**, 22(2): 157~179
- 6 Chiu D T, Wilson C F, Ryttsen F, Stromberg A, Farre C, Karlsson A, Nordholm S, Gaggari A, Modi B P, Moscho A, Garza-Lopez R A, Orwar O, Zare R N. *Science*, **1999**, 283(5409): 1892~1895
- 7 Wilson C F. *Biomimetic Microreactors*. Doctoral Dissertation, Stanford University, **2002**
- 8 Kulin S, Kishore R, Helmersson K, Locascio L. *Langmuir*, **2003**, 19(20): 8206~8210

- 9 Cao Y, Yang J, Yin Z Q, Luo H Y, Yang M, Hu N, Yang J, Huo D Q, Hou C J, Jiang Z Z, Zhang R Q, Xu R, Zheng X L. *Microfluid. Nanofluid.*, **2008**, 5(5): 669~675
- 10 HU Ning, YANG Jun, ZHENG Xiao-Lin, YIN Zheng-Qin, XU Hai-Wei, ZHANG Xing-Guo, CAO Yi, YANG Jing, XIA Bin, XU Rong, YAN Jia-Wen, JIANG Feng. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2009**, 37(8): 1247~1250
胡宁, 杨军, 郑小林, 阴正勤, 徐海伟, 张兴国, 曹毅, 杨静, 夏斌, 许蓉, 鄢佳文, 蒋凤. 分析化学, **2009**, 37(8): 1247~1250
- 11 Aghdaei S, Sandison M E, Zagnoni M, Green N G, Morgan H. *Lab Chip*, **2008**, 8(10): 1617~1620
- 12 CAO Yi, YANG Jun, YIN Zheng-Qin, HOU Wen-Sheng, ZHENG Xiao-Lin, HU Ning, YANG Jing, XU Rong, ZHANG Rui-Qiang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2008**, 36(5): 593~598
曹毅, 杨军, 阴正勤, 侯文生, 郑小林, 胡宁, 杨静, 许蓉, 张瑞强. 分析化学, **2008**, 36(5): 593~598
- 13 Ai Y, Qian S Z. *J. Colloid Interface Sci.*, **2010**, 346(2): 448~454
- 14 Cao J, Cheng P, Hong F J. *J. Electrostat.*, **2008**, 66(11-12): 620~626

Study of Liposome Electrofusion on Microelectrode Array Chip

JIANG Feng¹, YANG Jun^{*1}, WANG Zhen-Yu¹, HU Ning¹, ZHENG Xiao-Lin¹,
XIE Lin², YANG Zhong³, CHEN Jie⁴

¹(Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education,
Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

²(Department of Ophthalmology, Research Institute of Field and Surgery of Daping Hospital,
Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

³(Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

⁴(Nutritional Research Center, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract Large liposomes that electrofused on a microelectrode array based microchip were prepared by using soybean lecithin and the co-evaporating method. In the electrofusion process, liposomes were aligned by the dielectrophoretic force, electroporated by using high-strength electric pulses, and subsequently fused by using continuous dielectrophoretic force. Experimental results showed that 20% liposomes could be fused on the chip, and the glass substrate and low depth-width ratio channel were helpful for the observation and control of the liposome fusion.

Keywords Microfluidics; Liposome; Dielectrophoresis; Electrofusion; Microelectrode

(Received 26 August 2011; accepted 23 November 2011)

—————

化学计量学方法与分子光谱分析技术 (ISBN 978-7-122-10600-1)

全书由 7 章构成:化学计量学方法、紫外-可见光谱、中红外光谱、近红外光谱、拉曼光谱及若干问题的讨论。各章内容系统详尽,既独立自成体系,又相互联系。涉及到光谱理论、光谱与物质结构的相互关系、数据处理方法、实验技巧、工程化技术及其实际应用等诸多主题。该书既阐述了较成熟的分子光谱实用技术,又集中了该领域最新的研究现状和前沿问题,融入了作者多年的工作成果和思考,还兼顾作为教学用书的系统性要求。因此,该书适合作为从事分析仪器、仪器分析、过程控制等相关领域的科研和技术人员的参考书,也可用作相关专业的本科生和研究生的选修教材或参考书,以及分析检测专业技术培训的教材。

该书由化学工业出版社出版,冯计民 著,定价 78.0 元。