

文章编号: 1001-3806(2009)06-0561-04

石英微通道内测量细胞表面电荷的研究

陈德良, 冯彩玲, 秦水介*

(贵州大学 贵州省光电子技术与应用重点实验室, 贵阳 550025)

摘要: 为了具体测量细胞表面电荷量,设计了一种利用光镊、微通道和电泳测量细胞表面电荷的方法,并利用该方法测量得到酵母菌细胞表面电荷大约为 10^{-10} C。结果表明,可以利用该方法测量细胞表面电荷变化。对测量系统进一步开发,可做成测量细胞表面电荷的生物分析芯片。

关键词: 医用光学与生物技术;细胞表面电荷;光镊;石英微通道;电泳

中图分类号: Q631;Q66 **文献标识码:** A **doi:**10.3969/j.issn.1001-3806.2009.06.001

Study on measuring surface-charges of cells in a quartz microchannel

CHEN De-liang, FENG Cai-ling, QIN Shui-jie

(Laboratory for Photoelectric Technology and Application of Guizhou, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The surface-charges of cells are very important to study the vital characteristic of cells. Common methods only measure the changes of cell electrophoresis mobility (EPM) instead of the quantity of cell surface-charges. In order to measure the surface-charges of cells, a novel method to measure the surface-charges of cells by means of optical tweezers and electrophoresis in a microchannel was designed. With this method, the quantity of the electric charge of yeast cells was measured about 10^{-10} C. Experimental results prove that this method can be used to measure the changes of cell surface-charges. A lab-on-chip (LOC) for measuring the surface-charge of cells might be developed after improving this measuring system.

Key words: medical optics and biotechnology; surface-charges of cells; optical tweezers; quartz microchannels; electrophoresis

引言

细胞表面电荷与细胞的生长周期有非常密切的关系,与细胞的生理功能的改变直接相关。细胞表面电荷在细胞分化、细胞识别、细胞间的粘附、细胞吞噬以及正常细胞向肿瘤细胞的转化中起重要作用^[1-2]。随着人们对细胞表面电荷作用的不断深入了解,对其电量的测量显得更加重要,相应的测量方法也在不断改进和拓展。目前常用的研究方法有细胞显微电泳技术^[1,3]和激光多普勒电泳技术等^[2],这些方法只是通过测量细胞或胶体颗粒电泳迁移率(electrophoresis mobility, EPM)来研究其表面电荷,并没有测得其电荷量。通过研究细胞或粒子电泳迁移率变化可以说明其表面电荷变化了,但具体增加或减少了多少,并没有体

现,而细胞表面电荷具体变化量对进一步研究细胞生理特性有重要意义。

光镊是美国贝尔实验室科学家 ASHKIN 于 1986 年首先用于生命科学的激光技术^[4-5]。光镊利用高度聚焦的激光微束所形成的光学梯度力势阱来实现对微米及亚微米级样品的束缚与操纵。光镊技术在生命科学领域获得了广泛的应用,目前人们可用光镊对细胞、细胞器及染色体进行捕获、分选、操纵、弯曲细胞骨架、克服分子马达力引起的细菌旋转动力、测定马达蛋白作用力及对膜体系进行定量研究^[6-11]等。本文中设计将光镊技术用于对细胞表面电荷进行测量的实验研究。利用光镊技术、微通道和电泳来研究和测量细胞表面电荷,测量了酵母菌细胞表面电荷量。YAN 等人^[12]曾从理论上分析利用这一技术测量细胞表面电荷的可行性,但没有进行具体的实验测量。作者在理论和实验方法上有所改进,并进行了具体的实验测量,实验结果证实了利用该方法可以测量细胞生理变化前后表面电荷的具体变化量。这一方法解决了常用方法不能解决的问题,对进一步研究细胞生理特性提供了参考依据。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(60666001);贵州省科学技术基金资助项目(黔科合J字[2007]2201)

作者简介:陈德良(1980-),男,硕士研究生,主要从事激光技术与应用的学习与研究。

* 通讯联系人。E-mail: sjqin@mail.gzst.gov.cn

收稿日期:2009-01-06;收到修改稿日期:2009-03-01

1 测量原理

表面带电细胞悬浮于液体环境的微通道中,在外加电场的作用下,细胞产生电泳,液体产生电渗,细胞与微通道产生相对运动,电渗速度为 v_0 。开始时,细胞被光阱捕获,微通道两端电压为 0,即 $E=0$;增加电场强度,细胞仍保持被光镊捕获状态,图 1 所示细胞所受

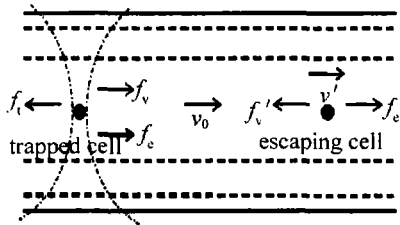


Fig. 1 Force on a captured and escaped cell

的电场力、光镊阱力和粘滞力达到力学平衡,受力分析(规定电渗方向为正方向)有:

$$f_t = f_v + f_e \quad (1)$$

式中, f_t 为光镊阱力, f_v 为细胞相对液体流动的粘滞力, f_e 为细胞所受的电场力。继续加大电场,直到细胞刚脱离光阱,刚脱离时的细胞受到的阱力为最大横向阱力,记为 $f_{t,max}$ 。保持电场强度不变,脱离光阱后的细胞速度逐渐增大,最后达到恒定速度 v' (逃逸速度)。图 1 所示细胞所受的电场力与粘滞力达到平衡,此时再对细胞受力分析有:

$$f_v' = f_e \quad (2)$$

f_v, f_v' 由 Stokes 公式给出:

$$f_v = 6\pi r\eta v_0, f_v' = 6\pi r\eta(v' - v_0) \quad (3)$$

式中, r 为细胞半径, η 为粘滞系数, v_0 为细胞刚脱离光阱时的电渗流速度, v' 为最后逃逸速度。把(2)式、(3)式代入(1)式整理可得:

$$f_{t,max} = 6\pi r\eta v' \quad (4)$$

由(2)式~(4)式得:

$$f_e = f_{t,max} - 6\pi r\eta v_0 \quad (5)$$

由电场力公式有:

$$qE = f_{t,max} - 6\pi r\eta v_0 \quad (6)$$

$$q = (f_{t,max} - 6\pi r\eta v_0)/E \quad (7)$$

由电泳理论知:

$$E = V/L \quad (8)$$

式中, E 为通道内电场强度, L 为微通道总长度, V 为微通道两端所加电压。把(8)式代入(7)式得:

$$q = (f_{t,max} - 6\pi r\eta v_0)L/V \quad (9)$$

式中,只要得到电压加到 V 时对应的 $f_{t,max}$ 和 v_0 值,即可计算细胞表面电荷 q 。

2 测量仪器及实验准备

实验中使用西安光学精密机械研究所研制的激光

光镊微操纵仪装置(型号:XSZ-2G),与一个 CCD 高速摄像机(厂家:Views,型号:VC-913D)和计算机组成单光阱光镊实验系统,如图 2 所示。光镊仪所使用的

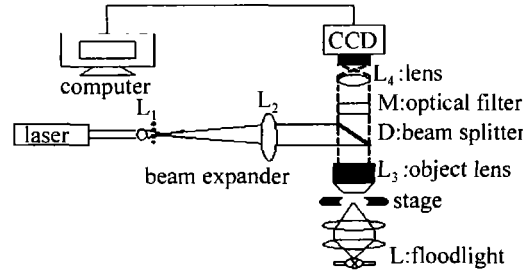


Fig. 2 The sketch of a single optical tweezer experimental system

激光器是波长为 808nm 的半导体激光器,激光功率最大值为 300mW,通过光学衰减器可以对功率连续调节。照明光通过聚光镜照明操作平台上微通道,微通道中细胞被捕获和操控的图像经物镜及双向分束镜后,到达 CCD 高速摄像机,CCD 获取的信息可以由计算机采集和处理。

激光诱导等离子体是研究激光与物质相互作用的重要课题,利用高强度的脉冲激光对材料的烧蚀可以获得瞬变的高温等离子体,激光加工过程中伴随产生的等离子体可在一定条件下控制用于石英的微钻孔,从而在块状石英中产生微通道^[13]。此方法加工的通道比较精细,适合用来做生物分析。图 3 所示的石英微通道测量系统,即为采用参考文献[13]中介绍的激

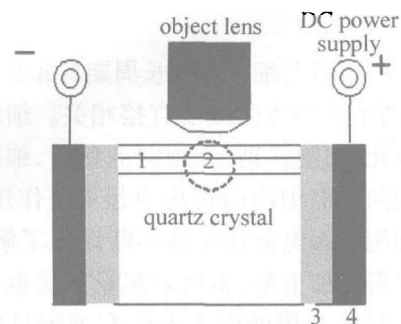


Fig. 3 The sketch map of a quartz microchannel measuring system, 1—microchannel; 2—observing chamber; 3—salt bridge; 4—Cu-electrode

光诱导等离子体加工方法加工而成。采用石英微通道来制作测量系统,是因为微通道的尺寸比较小,远远小于参考文献[12]中用的电动样品池,根据流体力学理论,通道尺寸越小,环流效果影响越小,通道内电渗流速度越稳定,因而测量结果就越精确;同时,由于微通道尺寸小,样品的使用量相对较少。

石英晶体尺寸为 8mm × 8mm × 8mm,为了便于显微镜观察,加工微通道时,控制通道到观察面的距离(通道壁厚)约为 1mm。微通道总长度为 8mm,直径为 100μm,加工所用的激光波长为 1064nm、最大功率为 20W 的可调 Q Nd:YAG 激光器的 2 倍频光,脉冲设为 20Hz。利用调 Q 产生的高功率密度激光进行微

通道加工,加工孔径明显减小,孔的形状较为规则,精度得到大大提高^[14]。加工过程中实时移动精密移动平台控制等离子体始终朝钻孔方向移动,保证加工的微通道内壁比较光滑均匀,防止等离子体回串对已钻通的微通道造成破坏。

把6粒干酵母菌细胞颗粒放入盛有20mL生理盐水的烧杯中,充分混合,静置6h~8h使细胞恢复活性。然后摇匀烧杯中的酵母菌溶液,把带有微通道结构的石英晶体放入烧杯中,通过毛细力作用实现通道进样。用刚做好还未完全凝固的琼脂与氯化钠溶液的凝胶(按琼脂0.5g、氯化钠4.0g、蒸馏水40mL比例加热溶化后冷却而成)均匀涂抹通道口及周围作为盐桥(盐桥含盐浓度大,其作用是减小盐桥厚度造成的电压降,使绝大多数电压降作用于微通道内的溶液中)。迅速贴上铜电极,待凝胶完全凝结后,轻轻把做好的测量系统(见图3)放于光镊的操纵平台上。选择10倍物镜调好焦距,使激光聚焦于微通道中实现细胞的捕获,如图4所示。

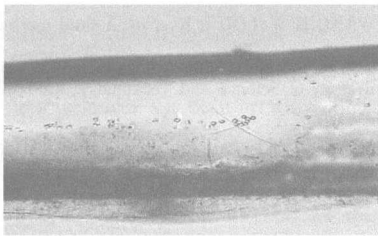


Fig. 4 Capturing and controlling yeast cells in a microchannel with the optical tweezer

3 实验结果及分析

光镊最大横向阱力的测量和标定采用流体力学方法。给定激光输出功率,最大横向阱力的测量就是找出操控粒子相对于周围液体运动所能达到的最大速度 v ,当粒子相对周围液体的速度大于这一最大速度时,液体对粒子的粘滞力就大于光镊最大横向阱力,粒子就将从光阱中逃逸,这一速度称为粒子在光阱中的逃逸速度。实验中选取半径为 $2.55\mu\text{m}$ 的酵母细胞作为测量细胞,细胞悬浮于微通道中,设定光镊激光功率,用光镊捕获此酵母细胞。实验中光镊不动,移动精密微动平台,逐渐增大移动速度,直到细胞脱离光阱。此时的速度即为细胞的逃逸速度。整个过程由CCD录制下来。通过图像处理软件提取录像中细胞刚脱离光阱前后两张图像,利用mivnt纳米分辨率的位移测量系统测量细胞在两个时刻相对微通道参考点的水平位移差,然后与间隔时间相比即为细胞的瞬时速度,也就是逃逸速度。细胞在逃逸速度下相应的流体粘滞阻力称为临界粘滞力 f ,在此逃逸速度下,光镊最大横向捕

获力 F 与临界粘滞力 f 大小相等,方向相反。根据Stokes公式(3)式,可求出光镊最大横向光阱力(实验条件下的粘滞系数为 1.50mPa)。理论和实验表明:对于确定的系统,粒子所受到的最大横向阱力与光镊激光光源的功率呈线性增加关系^[15]。因此对测量数据进行线性拟合,拟合结果如图5(每一数据点是测量20次求平均的结果)所示。在测量细胞表面电荷时,利用该图关系得出光镊最大横向阱力。

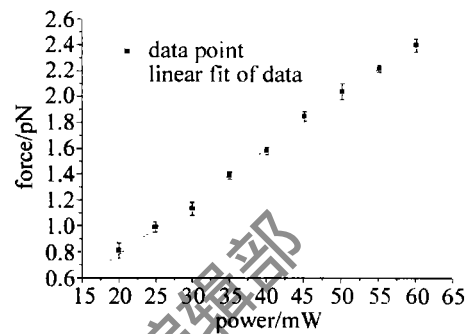


Fig. 5 The dependence of the optical force on yeast cells on the laser power

激光功率设定为 55mW ,捕获刚刚操纵的酵母细胞移动至微通道中间位置(通道扩散层位置),作用于酵母细胞的最大横向阱力 $f_{l,\text{max}}$ 由图5得到为 2.22pN 。调节直流电源,逐渐增加电压,电压调节精度为 0.01V 。当电压增加到 32.95V 时,细胞刚脱离光阱,保持电压不变,经过一段时间细胞所受电场力与粘滞阻力平衡。根据测量原理,再得出此时电压下微通道内液体的电渗速度,即可利用(9)式估算酵母细胞表面电荷 q 。

罗丹明123分子(Rh123)在 $\text{pH}=9$ 和 $\text{pH}=10$ 的条件下有中性分子存在,而中性分子的移动速度等于电渗流速度,因此,可以直接以Rh123中性分子为标记物测定电渗流速度^[16]。本实验中把所用溶液 pH 值调节到10,在 32.95V 电压的条件下,测得Rh123分子在微通道内迁移速度 $v_0 \approx 2.47\mu\text{m/s}$ 。

把已知和测量的数据代入(9)式计算可得被测酵母细胞表面电荷约为 $4.96 \times 10^{-10}\text{C}$ 。此结果只是近似估算,酵母细胞个体差异不同,其电荷也不相同,但其电荷的量级应该相差不大,在 10^{-10}C 左右。通过直接测量细胞表面电荷量,可以得到细胞生理变化前后细胞表面电荷变化量,比常用方法只测量电泳迁移率更加直观。

4 结论

本文中介绍的方法与文献[12]中的方法相比,避免了直接测量细胞的最后逃逸速度来求最大横向光阱力,而是事先采用流体力学方法测得了激光功率与最大横向阱力的关系。如果细胞带电量比较大,那么它

达到最后的逃逸速度时,就超出了实验显微观察区,测量比较困难,而且还要求微通道足够长。该方法测量细胞表面电荷,对微通道的长度没有特殊的要求,易实现在微通道内对细胞表面电荷的测量。测量结果 q 值为负说明细胞带负电荷, q 值等于0或非常小,表明细胞不带电, q 值为正说明细胞带正电。因此,利用该系统不但可以测量细胞表面电荷,还可以判断其正负电性。对测量系统继续开发,可做成专门用来测量细胞表面电荷的生物分析芯片。

参 考 文 献

- [1] SU Y H, PENG X, JIAO N Ch, *et al.* Changes of cell surface charge of K_{562} cells during apoptosis induced by arsenic trioxide [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2004, 9(3): 308-311 (in Chinese).
- [2] MA Q, LI A Zh, LIU J, *et al.* Surface charge of MA737 cell measured with the technique of laser Doppler electrophoresis [J]. Journal of Optoelectronics · Laser, 1990, 1(5): 256-261 (in Chinese).
- [3] ZHAO J Y, TIAN K, ZHANG X M. A study on the modern detecting technology of surface electricity properties of W/O emulsion particles [J]. Chemical Research and Application, 2002, 14(1): 37-40 (in Chinese).
- [4] ASHKIN A, DZIEDZIC J M, BJORKHOLM J E, *et al.* Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles [J]. Opt Lett, 1986, 11(5): 288-290.
- [5] ASHKIN A, DZIEDZIC J M. Optical levitation of liquid drops by radiation pressure [J]. Science, 1975, 187(4181): 1073-1075.
- [6] MEHTA A D, RIEF M, SPUDICH J A, *et al.* Single-molecule biomechanics with optical methods [J]. Science, 1999, 283(5408): 1689-1695.
- [7] PIFFERI A, TORRICELLI A, TARONI P, *et al.* Optical biopsy of bone tissue: a step toward the diagnosis of bone pathologies [J]. Journal of Biomedical Optics, 2004, 9(3): 474-480.
- [8] XU Sh H, LOU L R, LI Y M, *et al.* On the aggregation kinetics of two particles trapped in an optical tweezers [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects, 2005, 255(1/3): 159-163.
- [9] WANG H W, LIU X H, LI Y M, *et al.* Isolation of a single rice chromosome by optical micromanipulation [J]. J Optics, 2004, A6(1): 89-93.
- [10] ZHOU H, LI X F, LI Y M, *et al.* A new method to measure red cell membrane elasticity using single optical tweezers [J]. Progress in Biophysics and Biophysics, 2001, 28(6): 904 (in Chinese).
- [11] SMITH D E, TANS S J, SMITH S B, *et al.* The bacteriophage $\phi 29$ portal motor can package DNA against a large internal force [J]. Nature, 2001, 413(6857): 748-752.
- [12] YAN Q L, ZHANG Z X, YU Y L, *et al.* The research on application and measuring method of surface-charges of cells [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2008, 17(2): 261-264 (in Chinese).
- [13] QIN S J, LI W J. Micromachining of complex channel systems in 3-D quartz substrates using Q-switched Nd:YAG laser [J]. Appl Phys, 2002, A74(6): 773-777.
- [14] XIN F L, WANG Zh Y, LIU X Sh, *et al.* Study on laser microdrilling nearby the last threshold [J]. Laser Technology, 2006, 30(3): 292-294 (in Chinese).
- [15] LI Y M, WANG H W, LOU L R, *et al.* A fluid mechanical measurement system for pN trapping force of optical tweezers [J]. Journal of China University of Science and Technology, 2000, 30(2): 179-184 (in Chinese).
- [16] SUN Y, SHEN Zh B, ZENG Ch Q. A novel method for the direct measurement of electroosmotic flow velocity on microfluidic chips [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2008, 25(5): 690-693 (in Chinese).

· 简 讯 ·

欢迎投稿!

为了增大信息量,缩短出版周期,更好地为广大科研工作者和大专院校师生服务,本刊从2010年第1期开始,将增加版面至144页,并且出版日期从双月25号提前至单月25号。欢迎大家踊跃投稿!

《激光技术》编辑部