

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12N 15/87 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610011111.8

[43] 公开日 2007年7月11日

[11] 公开号 CN 1995361A

[22] 申请日 2006.1.6

[21] 申请号 200610011111.8

[71] 申请人 博奥生物有限公司

地址 102206 北京市昌平区生命科学园路 18 号

共同申请人 清华大学

[72] 发明人 王 磊 王 磊 郭 旻 程 京

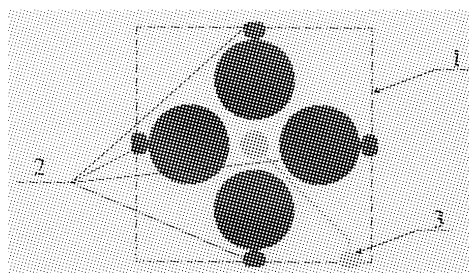
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

### [54] 发明名称

利用介电电泳辅助细胞定位借以提高电穿孔效率的方法

### [57] 摘要

本发明涉及生物芯片领域用的利用介电电泳辅助细胞定位借以提高电穿孔效率的方法。该方法的特征在于：在施加电穿孔电场导致细胞电穿孔之前，首先利用细胞的介电性质，用介电电泳的方法将细胞定位在能够产生足够电场强度以导致细胞电穿孔的有效电极区域，借以提高细胞电穿孔时的穿孔效率。本发明是利用细胞介电电泳的手段来提高传统微流体生物芯片上原位细胞电穿孔的效率，以期达到改善由于细胞不能被定位在有效的电场强度的区域而造成电穿孔效率低下这一状况的目的。由于该方法采用利用控制电场来操纵细胞的方法，因而，非常有利于在微流体生物芯片上进行微系统集成，可以实现全自动化的细胞操纵和细胞电穿孔操作。



1. 利用介电电泳辅助细胞定位借以提高电穿孔效率的方法，其特征在于：在使用该方法的器件上同时存在用于介电电泳和电穿孔的两种电极，在进行电穿孔前，首先在用于介电电泳的电极上施加电信号，使得细胞在介电电泳力的作用下定位在能够产生足够电场强度以导致细胞电穿孔的区域范围之内，然后撤销介电电泳的电极上的电信号，并在用于电穿孔的电极上施加电压幅值大于介电电泳电压的电信号，进行细胞电穿孔。

2. 利用介电电泳辅助细胞定位借以提高电穿孔效率的方法，其特征在于：在使用该方法的器件上同时存在用于介电电泳和电穿孔的两种电极，在进行电穿孔前，首先在用于介电电泳的电极上施加电信号，使得细胞在介电电泳力的作用下定位在能够产生足够电场强度以导致细胞电穿孔的区域范围之内，然后维持介电电泳电极上的电信号，在介电电泳电场的基础上借助于电穿孔电极再叠加一个电穿孔电场，使得叠加后的电场的电场强度足以使得细胞穿孔。

3. 如权利要求 1、2 中任何一项所述的利用介电电泳辅助细胞定位借以提高电穿孔效率的方法，其特征在于，所述的细胞介电电泳是在溶液中进行，该溶液是包含自然培养基或各种其他缓冲溶液体系在内的溶液体系。

4. 如权利要求 1、2 中任何一项所述的利用介电电泳辅助细胞定位借以提高电穿孔效率的方法，其特征在于，所述细胞在用介电电泳的方法，使细胞聚集在预想的区域后，在原位培养一段时间后再进行电穿孔，或者立即进行电穿孔。

5. 如权利要求 1、2 中任何一项所述的利用介电电泳辅助细胞定位借以提高电穿孔效率的方法，其特征在于，所述的细胞介电电泳是负向常规介电电泳，或者是正向常规介电电泳，即在细胞介电电泳时，或向电场强度最弱的地方聚集，或向电场强度最强的地方聚集。

6. 如权利要求 1、2 中任何一项所述的利用介电电泳辅助细胞定位借以提高电穿孔效率的方法，其特征在于，所述的细胞在介电电泳时，由外界施加交流电压而导致的非均匀电场，或由导电的电极直接造成，或是由其他绝缘介质间接造成。

7. 如权利要求 1、2 中任何一项所述的利用介电电泳辅助细胞定位借以提高电穿孔效率的方法，其特征在于，该方法所涉及的器件的电极是包含金属、或非金属或他们的组合在内的导体材料。

8. 如权利要求 1、2 中任何一项所述的利用介电电泳辅助细胞定位借以提高电穿孔效率的方法，其特征在于，所述的绝缘介质的材料是包含玻璃、或硅、或高分子聚合物材料或它们的组合在内的生物相容性好的绝缘材料。

## 利用介电电泳辅助细胞定位借以提高电穿孔效率的方法

### 技术领域

本发明涉及生物芯片，特别是微流体芯片领域，是一种利用介电电泳辅助细胞定位，借以提高细胞电穿孔效率的方法。本发明利用细胞介电电泳的手段来提高传统微流体生物芯片上原位细胞电穿孔的效率，以期达到改善由于细胞不能被定位在有效的电场强度的区域而造成电穿孔效率低下这一状况的目的。由于该方法采用利用控制电场来操纵细胞的方法，因而，非常有利于在微流体生物芯片上进行微系统集成，可以实现全自动化的操作。

### 背景技术

在生命科学和医学领域，基因转移技术正在受到人们越来越多的关注，把外源基因、蛋白质、药物等导入细胞（即转染）在生命科学和医学中有着非常重要和广泛的应用，其范围涵盖了从研究细胞的基因调控，重组蛋白质的表达以及基因治疗。因而寻找一种安全、有效、毒性小而又效率高的转染手段成为生命科学和医学领域人们非常关注的课题。

病毒能够侵染细胞，因而成为进行细胞转染的一种载体，目前，人们已经对多种病毒进行处理，使其携带外源基因，转染细胞，取得了很好的效果(Kim YC et al. *Oncogene*. 20, 16-23)。不过，利用病毒进行细胞转染也存在着诸如存在感染和免疫反应的风险，而且病毒载体的构建和大规模生产也是非常困难的。

由于利用病毒作为转染载体存在其先天的缺陷，人们开发了一系列化学转染的方法，利用非病毒系统进行细胞转染，例如采用阳离子脂质的方法(Felgner et al. *Proc Natl Acad Sci*, 84, 7413-7417)，但是这种转染方法的转染效率一般比较低下，通常低于病毒转染的转染效率，同时也存在着具有化学毒性、不利于在微流体生物芯片系统中集成等问题，因而发展收到很大限制。

利用电场进行转染（即电穿孔）是人们提出的又一个解决方案(Leikin et al. *Biol. Membr.*, 3, 944-951)，这种方法通过施加电场（对于哺乳动物细胞而言，通常是1—4KV/cm），使得细胞膜内外产生一定的电势差，导致细胞膜瞬间穿孔，外源的核酸、蛋白质以及平时不能进入细胞的药物分子便可以进入细胞，完成转染。电穿孔相对与其余常规转染方式具有如下优势：

相对于传统转染方式，转染效率要高。

这是一种纯粹生物物理手段，没有化学药品污染或病毒感染的危险；

免去穿孔后洗涤、清洗程序，这一点使得这种方法非常有利于与微流体芯片进行系统继承；

操作方便、容易重复、过程容易控制，并可以用于各种不同细胞，既包括悬浮生长细胞，

也包括贴壁细胞。

但是，在电穿孔过程中，由于细胞不能全部集中于具有足够电场强度的区域，电穿孔往往难于控制，穿孔效率不容易提高。为了使得多数细胞位于电穿孔的有效区域，往往需要增加穿孔电压，以扩大有效区域的范围，使得更多的细胞被电穿孔。而增加电压又会使得电场强度比较强的区域的细胞由于过度穿孔而死亡，最终使得电穿孔效率难以提高，因而如何使得细胞能够有效的集中在电穿孔的有效区域，然后进行电穿孔，成为提高电穿孔效率的重要课题。

介电电泳是一种利用电场对微观粒子，如细胞进行操纵的方法，当细胞等微观粒子在溶液中受到由于施加了非均匀交流电场而产生的介电电泳力的作用时，会发生定向运动，利用介电电泳可以使得细胞运动并定位在可以产生电穿孔的有效穿孔区域。

介电电泳力是指在幅值不均匀分布的交流电场作用下微粒上产生的力。当一个微粒（如细胞）受到不均匀电场作用时，由于电场和微粒上感生电偶极矩的相互作用，微粒就受到一个介电电泳力的作用。

介电电泳力的表达式为：

$$\vec{F}_{DEP} = 2\pi\epsilon_m r^3 \left( \text{Re}(f_{CM}) \nabla E_{rms}^2 + \text{Im}(f_{CM}) (E_{x0}^2 \nabla \varphi_x + E_{y0}^2 \nabla \varphi_y + E_{z0}^2 \nabla \varphi_z) \right) \quad (1)$$

其中  $r$  是微粒半径， $\epsilon_m$  是微粒悬浮介质的介电常数， $E_{rms}$  是电场均方根值，因子  $f_{CM} = (\epsilon_p^* - \epsilon_m^*) / (\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*)$  是介电极化因子（Clausius-Mossotti 因子）。复式介电常数定义为  $\epsilon_x^* = \epsilon_x - j\sigma_x / (2\pi f)$ 。介电极化因子与外加电场的频率  $f$ 、电导率  $\sigma_x$ 、微粒介电常数（记为  $p$ ）、微粒悬浮介质的介电常数（记为  $m$ ）有关。

从公式（1）可以看出，介电电泳力一般由两个分量构成：即常规介电电泳（cDEP）力和行波介电电泳（twDEP）力。常规介电电泳力和与场强梯度（ $\nabla E_{rms}^2$ ）相互作用的电场感生极化的同步（in-phase）分量有关，该感生极化项  $\text{Re}(f_{CM})$ ，即因子  $f_{CM}$  的实部，是常规介电电泳的极化因子。行波介电电泳力与和电场相位梯度（ $\nabla \varphi_x, \nabla \varphi_y, \nabla \varphi_z$ ）发生交互作用的电场感生极化的异步（out-of-phase）分量有关，该感生极化项  $\text{Im}(f_{CM})$ ，即因子  $f_{CM}$  的虚部，是行波介电电泳的极化因子。值得指出的是，若一个电场其场强分量的相位是不均匀分布的，则该电场是一个行波电场。电场沿着随位置不同而相位值递减的方向延伸。理想行进电场的相位分布沿电场行进方向是位置的线性函数。这样，常规介电电泳力是指因交流电场场强不均匀分布而在微粒上产生的力。

半径为  $r$ 、受交变电场不均匀分布场强作用的微粒所受的常规介电电泳力  $\vec{F}_{cDEP}$  为

$$\vec{F}_{cDEP} = 2\pi\epsilon_m r^3 \chi_{DEP} \nabla E_{rms}^2 \quad (2)$$

其中  $E_{rms}$  是场强的均方根值,  $\epsilon_m$  是介质的介电常数。表示常规介电电泳力的公式 (2) 与上述的介电电泳力的一般表达式一致。因子  $\chi_{cDEP}$  是微粒的常规介电电泳极化因子, 可以表示为:

$$\chi_{cDEP} = \text{Re} \left( \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right) \quad (3)$$

这里 Re 是复数的实部, 符号  $\epsilon_x^* = \epsilon_x - j\sigma_x / (2\pi f)$  是复介电常数。参数  $\epsilon_p$ 、 $\sigma_p$  分别是微粒的有效介电常数和电导率 (可能与外加频率有关)。例如, 典型的生物细胞将具有与频率相关的电导率和介电常数 (至少部分上是由于细胞质膜极化引发的)。

当一个微粒的常规介电电泳极化因子为正 ( $\chi_{cDEP} > 0$ ) 时, 微粒受常规介电电泳力作用向强场区域运动, 这称为正向常规介电电泳。导致微粒作正向常规介电电泳运动的常规介电电泳力称为正向常规介电电泳力。当一个微粒的常规介电电泳极化因子为负 ( $\chi_{cDEP} < 0$ ) 时, 微粒受常规介电电泳力作用远离强场区域向弱场区域运动, 这称为负向常规介电电泳。导致微粒作负向常规介电电泳运动的常规介电电泳力称为负向的常规介电电泳力。

综上所述, 利用介电电泳对即将做电穿孔的细胞进行操纵, 可以使其被集中在能够进行电穿孔的有效区域内, 这时, 再施加电场进行电穿孔操作, 可以有效的提高电穿孔的穿孔效率。

常规电穿孔没有用介电电泳进行辅助, 使得其穿孔效率比较低, 当利用细胞的介电性质将细胞定位在能够产生足够电场强度以导致细胞电穿孔的区域范围之内, 再进行电穿孔可以有效提高穿孔效率。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种利用介电电泳辅助细胞定位, 借以提高细胞电穿孔效率的方法。本发明利用细胞介电电泳的手段来提高传统微流体生物芯片上原位细胞电穿孔的效率, 以期达到改善由于细胞不能被定位在有效的电场强度的区域而造成电穿孔效率低下这一状况的目的。由于该方法采用利用控制电场来操纵细胞的方法, 因而, 非常有利于在微流体生物芯片上进行微系统集成, 可以实现全自动化的操作。

本发明的特征之一在于: 在使用该方法的器件上同时存在用于介电电泳和电穿孔的两种电极, 在进行电穿孔前, 首先在用于介电电泳的电极上施加电信号, 使得细胞在介电电泳力的作用下定位在能够产生足够电场强度以导致细胞电穿孔的区域范围之内, 然后撤销介电电泳的电极上的电信号, 并在用于电穿孔的电极上施加电压幅值大于介电电泳电压的电信号, 进行细胞电穿孔。之二在于: 在使用该方法的器件上同时存在用于介电电泳和电穿孔的两种

电极，在进行电穿孔前，首先在用于介电电泳的电极上施加电信号，使得细胞在介电电泳力的作用下定位在能够产生足够电场强度以导致细胞电穿孔的区域范围之内，然后维持介电电泳电极上的电信号，在介电电泳电场的基础上借助于电穿孔电极再叠加一个电穿孔电场，使得叠加后的电场的电场强度足以使得细胞穿孔。

其中，所述的细胞介电电泳是在溶液中进行，该溶液是包含自然培养基或各种其他缓冲溶液体系在内的溶液体系。所述细胞在用介电电泳的方法，使细胞聚集在预想的区域后，在原位培养一段时间后再进行电穿孔，或者立即进行电穿孔。所述的细胞介电电泳是负向常规介电电泳，或者是正向常规介电电泳，即在细胞介电电泳时，或向电场强度最弱的地方聚集，或向电场强度最强的地方聚集。所述的细胞在介电电泳时，由外界施加交流电压而导致的非均匀电场，或由导电的电极直接造成，或是由其他绝缘介质间接造成。该方法所涉及的器件的电极是包含金属、或非金属或他们的组合在内的导体材料。所述的绝缘介质的材料是包含玻璃、或硅、或高分子聚合物材料或它们的组合在内的生物相容性好的绝缘材料。

由于采用了介电电泳辅助细胞定位，使得细胞集中在有效的电穿孔区域，这种方法可以很大的提高电穿孔的穿孔效率，尤其在微流体生物芯片领域将有非常重要的应用。

#### 附图说明

图 1，利用介电电泳辅助细胞定位并进行电穿孔的原理图：1、用以实现该发明的生物芯片器件；2、介电电泳电极；3、电穿孔电极。

#### 具体实施方式

本发明的技术方案是在利用微加工技术在微流体芯片上加工电极或电极阵列，其电极包含两组，第一组用于产生介电电泳力，以进行细胞操纵和细胞定位，第二组用于进行细胞电穿孔。在进行细胞电穿孔之前，首先，将混合好细胞的培养基或其他缓冲溶液加入微流体芯片，然后在第一组电极上施加一定频率和幅值的电压（频率和幅值取决于细胞的介电性质，随细胞种类不同而不同），促使细胞集中到设计好的电穿孔的有效区域内。

这时，有两个技术路线可供选择。第一，是可以直接施加电穿孔电压，对尚处在悬浮状态下的细胞进行电穿孔操作；第二，是可以让细胞在原位生长一段时间，达到比较好的细胞生长状态，然后再进行原位的细胞电穿孔。两种技术路线，可以根据细胞种类和具体需要进行选择。

在此所用，“有效的电穿孔区域”是指电场强度能够达到使得细胞发生电穿孔的区域，其包括但不限于电穿孔电极区域。

本发明中，用于阻抗测量的器件是在玻璃基质上用微加工中常用的光刻工艺，刻出电极的图形，然后用真空蒸镀工艺将金蒸镀在玻璃基质表面，去处光刻胶后形成器件的电极部分。

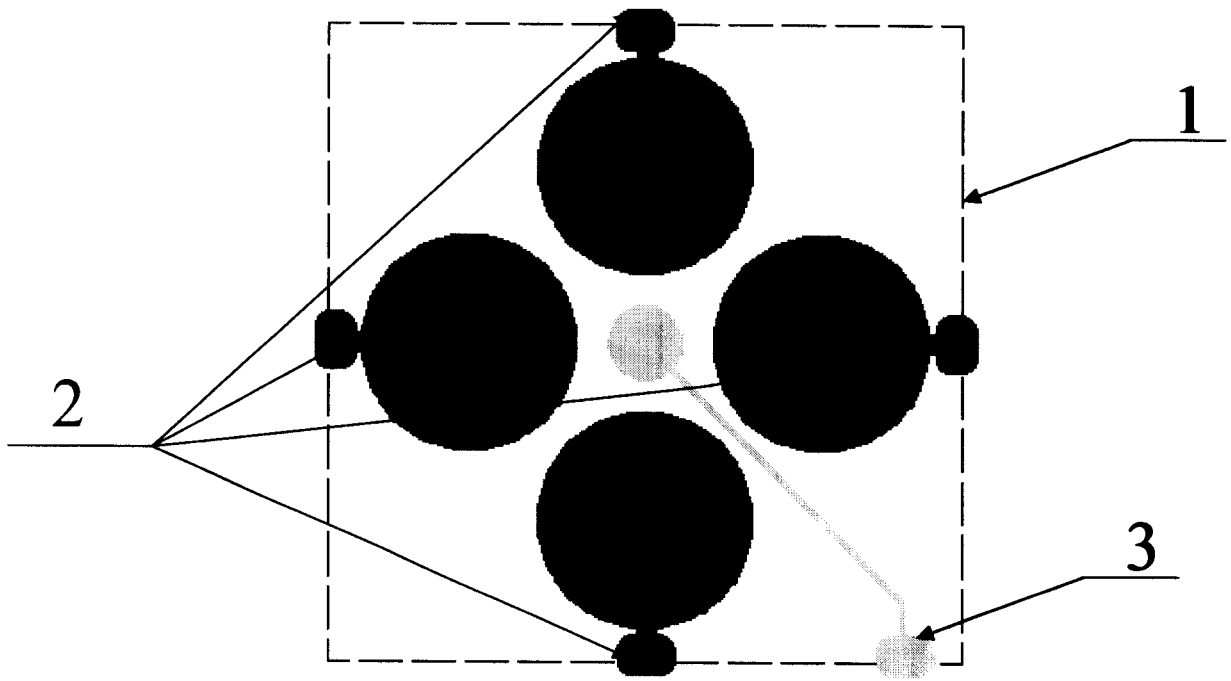


图 1