



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105483002 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 13

(21) 申请号 201610057063. X

(22) 申请日 2016. 01. 27

(71) 申请人 河海大学常州校区

地址 213000 江苏省常州市新北区晋陵北路
200 号

(72) 发明人 吕品 朱晓璐 纪爱敏 王祥冰
刘源

(74) 专利代理机构 常州市科谊专利代理事务所
32225

代理人 孙彬

(51) Int. Cl.

C12M 1/42(2006. 01)

C12M 1/26(2006. 01)

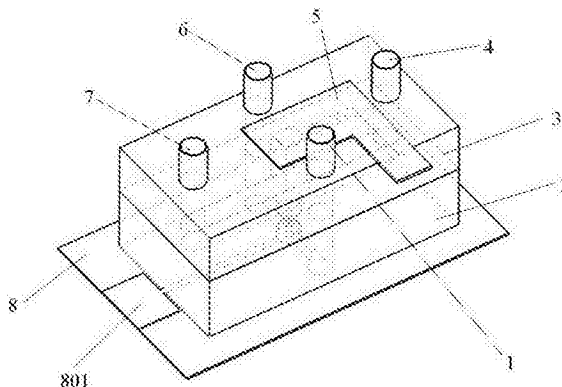
权利要求书2页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

可控剂量显微注射装置及其操作方法

(57) 摘要

本发明公开了一种可控剂量显微注射装置及其操作方法,所述显微注射装置的内部设置有显微注射微流道,显微注射微流道的一端固定有显微注射针,显微注射微流道上安装有第一电极,显微注射微流道的另一端部安装有第二电极。本发明还提供了一种可控剂量显微注射装置的操作方法,包括以下步骤:在第一电极上施加交流电并调节交流电频率,使细胞被显微注射针刺入;将第一电极上的交流电转换成直流电,将第二电极接地,使待注射外源物质溶液在电渗流的作用下通过显微注射针注入细胞内。本发明的显微注射针固定,通过电渗技术对细胞进行相对精确的定量注射,避免了传统方法中通过压力驱动显微注射针内外源物质溶液移动而带来的注射剂量难以精确控制问题。



1. 一种可控剂量显微注射装置,其特征在于:所述可控剂量显微注射装置的内部设置有显微注射微流道(202),显微注射微流道(202)的一端固定有显微注射针(9),显微注射针(9)的针头朝向显微注射微流道(202)的另一端,显微注射微流道(202)上固定有显微注射针(9)的端部安装有第一电极(801),显微注射微流道(202)的另一端部安装有第二电极(501),以通过第一电极(801)与第二电极(501)的配合对细胞的移动进行控制,以及对待注射外源物质注入细胞的剂量进行控制。

2. 根据权利要求1所述的可控剂量显微注射装置,其特征在于:所述的可控剂量显微注射装置还包括用于密封显微注射微流道的石英基片(5,8),且所述第一电极(801)和第二电极(501)安装在该石英基片(5,8)上。

3. 根据权利要求2所述的可控剂量显微注射装置,其特征在于:所述的可控剂量显微注射装置还包括用于输送待注射外源物质的外源物质溶液输送流道(204),外源物质溶液输送流道(204)与所述显微注射微流道(202)相交且连通,所述的显微注射针(9)与上述相交且连通的区域相连通,以使外源物质通过显微注射针(9)注入细胞内。

4. 根据权利要求3所述的可控剂量显微注射装置,其特征在于:所述的可控剂量显微注射装置还包括用于输送细胞的细胞输送微流道(201),显微注射针针头所在处的显微注射微流道区域为注射区域,所述细胞输送微流道(201)与显微注射微流道(202)相交且连通,并且该连通位置位于注射区域上方。

5. 根据权利要求4所述的可控剂量显微注射装置,其特征在于:所述细胞输送微流道(201)的深度为 $H1$, $d < H1 < 2d$,细胞输送微流道(201)的宽度为 $D1$, $D1 < 2d$, d 为细胞直径。

6. 根据权利要求5所述的可控剂量显微注射装置,其特征在于:所述的可控剂量显微注射装置分为上层基板(3)和下层基板(2),所述的显微注射微流道(202)、外源物质溶液输送流道(204)和细胞输送微流道(201)均嵌在上层基板(3)与下层基板(2)内部,上、下层基板相互键合在一起,以使上、下层基板内部各微流道密封。

7. 根据权利要求6所述的可控剂量显微注射装置,其特征在于:所述的上层基板(3)上设有与外源物质溶液输送流道(204)进口相连通的第一端口(6)、与外源物质溶液输送流道出口相连通的第二端口(1)、与细胞输送微流道进口相连通的第三端口(4),以及与细胞输送微流道(201)出口相连通的第四端口(7)。

8. 一种可控剂量显微注射装置的操作方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤S1,在第一电极(801)上施加交流电并调节交流电频率,使处于注射区域上方的细胞因受到正介电泳力而向显微注射针(9)方向运动,并被注射区域底部的显微注射针(9)刺入;

步骤S2,将第一电极(801)上的交流电转换成直流电,将第二电极(501)接地,即在显微注射流道(202)内产生均强电场,显微注射针(9)内的流体产生运动进而在第一电极(801)与第二电极(501)之间产生电渗流,使待注射外源物质溶液在电渗流的作用下通过显微注射针(9)注入细胞内,完成注射。

9. 根据权利要求8所述的可控剂量显微注射装置的操作方法,其特征在于:在所述步骤S2中注射完成后,将第一电极(801)上的直流电转换成交流电,并调节交流电频率,使细胞因受到负介电泳力的作用而悬浮至细胞输送微流道(201)内。

10. 根据权利要求9所述的可控剂量显微注射装置的操作方法,其特征在于:所述显微

注射装置包括外源物质溶液输送流道(204)和细胞输送微流道(201),在步骤S1之前,将载有待注射细胞的培养液输入细胞输送微流道(201);并且,将含有待注射外源物质的溶液输入外源物质溶液输送流道(204)。

可控剂量显微注射装置及其操作方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可控剂量显微注射装置及其操作方法,属于细胞生物学研究技术领域。

背景技术

[0002] 显微注射技术是在显微镜视野内将被注射细胞调整固定后,利用玻璃微注射针将外源物质注入细胞内的一种技术,是现代细胞工程的重要手段之一,尤其是转基因、克隆和试管婴儿等细胞工程领域,此外在药物筛选测试等领域也有重要应用。与其他技术相比,显微注射的优点是注射效率稳定、注射基因大小不受限制、无需载体以及操作对象物特殊要求等,在濒危动物保护、生殖与健康、物种改良和细胞内核质研究中得到广泛应用。现有的显微注射装置是通过位移分辨率较高的机电装置上连接的持针器固定细胞,再用另外一套同样的装置上连接的显微注射针对细胞进行显微注射;其中固定细胞的持针器是端口尺寸比细胞尺寸略大的拉制玻璃管,通过玻璃管内产生负压来吸持固定细胞,而显微注射针也是玻璃管拉制而成,但其尺寸远比细胞小,通过压力驱动显微注射针内外源物质移动来完成细胞的显微注射操作。这种装置虽然可以明显提高准确率,减少注射针对细胞膜的损伤,但是其也存在设备复杂,操作难度程度大,成本较高,效率和自动化程度低等问题,尤其是通过压力驱动注射针内外源物质移动时,其注射剂量难以精确控制且显微注射针会震动,降低细胞注射后的成活率。定剂量注射对注射不同尺寸的细胞具有重要意义。针对以上问题有必要提出解决方案。

发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题是:克服现有技术的不足,提供一种可控剂量显微注射装置及其操作方法,以解决注射剂量难以精确控制的技术问题。

[0004] 为了解决上述技术问题,本发明的技术方案是:一种可控剂量显微注射装置,所述可控剂量显微注射装置的内部设置有显微注射微流道,显微注射微流道的一端固定有显微注射针,显微注射针的针头朝向显微注射微流道的另一端,显微注射微流道上固定有显微注射针的端部安装有第一电极,显微注射微流道的另一端部安装有第二电极,以通过第一电极与第二电极的配合对细胞的移动进行控制,以及对待注射外源物质注入细胞的剂量进行控制。

[0005] 进一步为了密封显微注射微流道,所述的可控剂量显微注射装置包括用于密封显微注射微流道的石英基片,且所述电极安装在该石英基片上。

[0006] 进一步为了便于输送待注射外源物质,所述的可控剂量显微注射装置还包括用于输送待注射外源物质的外源物质溶液输送流道,外源物质溶液输送流道与所述显微注射微流道相交且连通,所述的显微注射针与上述相交且连通的区域相连通,以使外源物质通过显微注射针注入细胞内。

[0007] 进一步为了便于输送待注射细胞,所述可控剂量显微注射装置还包括用于输送细

胞的细胞输送微流道,显微注射针针头所在处的显微注射微流道区域为注射区域,所述细胞输送微流道与显微注射微流道相交且连通,并且该连通位置位于注射区域上方。

[0008] 进一步为了细胞一个一个依次通过微流道而不产生“并排”移动,所述细胞输送微流道的深度为 $H1$, $d < H1 < 2d$,细胞输送微流道的宽度为 $D1$, $D1 < 2d$, d 为细胞直径。

[0009] 进一步,所述的可控剂量显微注射装置分为上层基板和下层基板,所述的显微注射微流道、外源物质溶液输送流道和细胞输送微流道均嵌在上层基板与下层基板内部,上、下层基板相互键合在一起,以使上、下层基板内部的各微流道密封。

[0010] 进一步,所述的上层基板上设有与外源物质溶液输送流道进口相连通的第一端口、与外源物质溶液输送流道出口相连通的第二端口、与细胞输送微流道进口相连通的第二端口,以及与细胞输送微流道出口相连通的第二端口。

[0011] 本发明还提供了一种可控剂量显微注射装置的操作方法,包括以下步骤:

[0012] 步骤S1,在第一电极上施加交流电并调节交流电频率,使处于注射区域上方的细胞因受到正介电泳力而向显微注射针方向运动,并被注射区域底部的显微注射针刺入;

[0013] 步骤S2,将第一电极上的交流电转换成直流电,将第二电极接地,即在显微注射流道内产生均强电场,显微注射针内的流体产生运动进而在第一电极与第二电极之间产生电渗流,使待注射外源物质溶液在电渗流的作用下过显微注射针注入细胞内,完成注射。

[0014] 进一步使完成注射的细胞自动回到细胞输送微流道内,在所述步骤S2中注射完成后,将第一电极上的直流电转换成交流电,并调节交流电频率,使细胞因受到负介电泳力的作用而悬浮至细胞输送微流道内。

[0015] 进一步,所述可控剂量显微注射装置包括外源物质溶液输送流道和细胞输送微流道,在步骤S1之前,将载有待注射细胞的培养液输入细胞输送微流道;并且,将含有待注射外源物质的溶液输入外源物质溶液输送流道。

[0016] 采用了上述技术方案后,本发明的显微注射针固定,通过电渗技术对细胞进行相对精确的定剂量注射,这避免了传统方法中通过压力驱动显微注射针内外源物质溶液移动而带来的注射剂量难以精确控制、显微注射针抖动导致细胞死亡的问题;此外在对同一个细胞注入不同的外源物质方面,定剂量注射有着非常重要的应用价值;本发明在大大降低设备成本和显微注射操作复杂程度的同时,还大大提高了细胞被注射后的成活率,有利于推广应用。

附图说明

[0017] 图1为本发明的立体结构示意图;

[0018] 图2为本发明的主视剖视图;

[0019] 图3为图2的A-A剖视图;

[0020] 图4为图3的B部放大图;

[0021] 图5为上层基板的结构示意图;

[0022] 图6为下层基板的结构示意图;

[0023] 图7为下层石英基片的结构示意图;

[0024] 图8为上层石英基片的结构示意图;

[0025] 图中,1、第二端口,2、下层基板,201、细胞输送微流道,202、显微注射微流道,203、

收集区,204、外源物质溶液输送流道,3、上层基板,4、第三端口,5、上层石英基片,501、第二电极,6、第一端口,7、第四端口,8、下层石英基片,801、第一电极,9、显微注射针。

具体实施方式

[0026] 为了使本发明的内容更容易被清楚地理解,下面根据具体实施例并结合附图,对本发明作进一步详细的说明。

[0027] 如图1~8所示,一种可控剂量显微注射装置,所述可控剂量显微注射装置的内部设置有显微注射微流道202,显微注射微流道202的一端固定有显微注射针9,显微注射针9的针头朝向显微注射微流道202的另一端,显微注射微流道202上固定有显微注射针9的端部安装有第一电极801,显微注射微流道202的另一端部安装有第二电极501,以适于控制细胞的移动,以及用于控制显微注射针内的待注射外源物质注入细胞的剂量。

[0028] 如图1~8所示,可控剂量显微注射装置还包括用于密封显微注射微流道202的石英基片,分别为下层石英基片8,和上层石英基片5,第一电极801安装在下层石英基片8上,第二电极501安装在上层石英基片5上,第一电极801和第二电极501通过溅射工艺制作于上、下层石英基片上,上、下层石英基片将显微注射微流道202的两端密封。

[0029] 如图2、3、4所示,可控剂量显微注射装置还包括用于输送待注射外源物质的外源物质溶液输送流道204,外源物质溶液输送流道204与上述显微注射微流道202相交且连通,显微注射针9与上述相交且连通的区域相连通,以使外源物质通过显微注射针9注入细胞内。

[0030] 如图2、3、4所示,可控剂量显微注射装置还包括用于输送细胞的细胞输送微流道201,显微注射针针头所在处的显微注射微流道区域为注射区域,细胞输送微流道201与显微注射微流道202相交且连通,并且该连通位置位于注射区域上方,外源物质溶液输送流道204与细胞输送微流道201通过显微注射针9相连。

[0031] 细胞输送微流道201的深度为 $H1$, $d < H1 < 2d$,细胞输送微流道201的宽度为 $D1$, $D1 < 2d$, d 为细胞直径。

[0032] 如图1~8所示,可控剂量显微注射装置分为上层基板3和下层基板2,显微注射微流道202、外源物质溶液输送流道204和细胞输送微流道201均嵌在上层基板3与下层基板2内部,上、下层基板相互键合在一起,以使上、下层基板内部的各微流道密封,上层基板3和下层基板2均由聚二甲基硅氧烷制成,聚二甲基硅氧烷制成简称PDMS。

[0033] 如图1所示,上层基板3上设有与外源物质溶液输送流道204进口相连通的第一端口6、与外源物质溶液输送流道出口相连通的第二端口1、与细胞输送微流道进口相连通的第三端口4,以及与细胞输送微流道201出口相连通的第四端口7,第一端口6通过微流泵注入待注射外源物质的溶液,第三端口4通过微流泵注入含有细胞的培养液,第二端口1和第四端口7均与培养皿相连通。

[0034] 本发明只是整个显微注射系统中对细胞进行显微注射操作的执行构件。为了完成显微注射任务,还需要倒置显微镜、CCD相机和计算机等实时图像采集系统,硅胶软管,微阀和不同型号的微流泵。本发明只涉及这种显微注射装置。

[0035] 一种可控剂量显微注射装置的操作方法,包括以下步骤:

[0036] 步骤S1,在第一电极801上施加5V交流电并调节交流电频率,使处于注射区域上方

的细胞因受到正介电泳力而向显微注射针9方向运动,并被注射区域底部的显微注射针9刺入;

[0037] 步骤S2,将第一电极801上的交流电转换成25V直流电,将第二电极501接地,即在显微注射流道202内产生均强电场,显微注射针9内的流体产生运动进而在第一电极801与第二电极501之间产生电渗流,使待注射外源物质溶液在电渗流的作用下通过显微注射针9注入细胞内,完成注射。

[0038] 在步骤S2中注射完成后,将第一电极801上的直流电转换成交流电,并调节交流电频率,使细胞因受到负介电泳力的作用而悬浮至细胞输送微流道201内。

[0039] 可控剂量显微注射装置包括外源物质溶液输送流道204和细胞输送微流道201,在步骤S1之前,将载有待注射细胞的培养液输入细胞输送微流道201;并且,将含有待注射外源物质的溶液输入外源物质溶液输送流道204,清洗完后使待注射外源物质溶液充满整个外源物质溶液输送流道204,使含有细胞的培养液充满整个细胞输送微流道201。

[0040] 本发明的工作原理如下:

[0041] 对细胞进行显微注射时,用微流泵将载有待注射细胞的培养液通过第三端口4注入细胞输送微流道201,使细胞培养液从第四端口7排出,细胞在微流体的驱动下向显微注射微流道202的正上方运动,此时在第一电极801上施加5V交流电并调节交流电频率,使处于注射区域正上方的细胞因受到正介电泳力而竖直向下运动,并被显微注射区域202底部的显微注射针9刺入,将第一电极801上的5V交流电转换成25V直流电,且第二电极501接地,在竖直方向的显微注射流道202内产生均强电场,在该电场的作用下显微注射针9内壁表面形成双电层,此时显微注射针9内壁表面双电层内的物质会因受到电场力作用而运动,进而带动显微注射针9内壁附近的流体运动,由于流体的粘性,带动整个显微注射针内流体运动,进而在两电极之间产生电渗流,此时处于第一电极801上方,收集区203内的待注射外源物质溶液会因受电渗流的作用通过显微注射针9移动至细胞内;通过计算电渗流的流速,结合显微注射针9任意截面口径,可以得出单位时间内注入细胞内外源物质溶液的体积,以此来实现定剂量注射。

[0042] 细胞完成显微注射后,在此将电极801上的电信号转换成5V交流电,并调节交流电频率,使细胞因受到负介电泳力的作用而悬浮至细胞输送微流道201内,保持电信号不变,通过第三端口4向细胞输送微流道201持续通入细胞培养液,将细胞通过第四端口7驱离该显微注射装置至培养皿中,从而完成细胞的显微注射操作。

[0043] 计算注入细胞内外源物质溶液的体积V的方法如下:

[0044] (1)首先通过相关仪器测出外源物质溶液的相对介电常数 ϵ_r ;

[0045] (2)通过如下公式求得直流电渗流速 v_{eo} :

[0046]
$$v_{eo} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \xi E}{\mu}$$

[0047] 其中: ϵ_0 为真空绝对介电常数, ϵ_r 为外源物质溶液相对介电常数, ξ 为通道壁面的zeta电势, \vec{E} 为外加电场强度, μ 为外源物质溶液的粘度。

[0048] (3)求得显微注射针底部截面面积: $S = \pi R^2$,R为该截面半径。

[0049] (4)则可求得单位时间内注入细胞内外源物质溶液的体积V有:

[0050] $V=S \times v_{eo}$

[0051] 本发明的显微注射针9固定,通过电渗技术对细胞进行相对精确的定剂量注射,这避免了传统方法中通过压力驱动显微注射针内外源物质溶液移动而带来的注射剂量难以精确控制、显微注射针抖动导致细胞死亡的问题;此外在对同一个细胞注入不同的外源物质方面,定剂量注射有着非常重要的应用价值;本发明在大大降低设备成本和显微注射操作复杂程度的同时,还大大提高了细胞被注射后的成活率,有利于推广应用。

[0052] 以上所述的具体实施例,对本发明解决的技术问题、技术方案和有益效果进行了进一步详细说明,所应理解的是,以上所述仅为本发明的具体实施例而已,并不用于限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

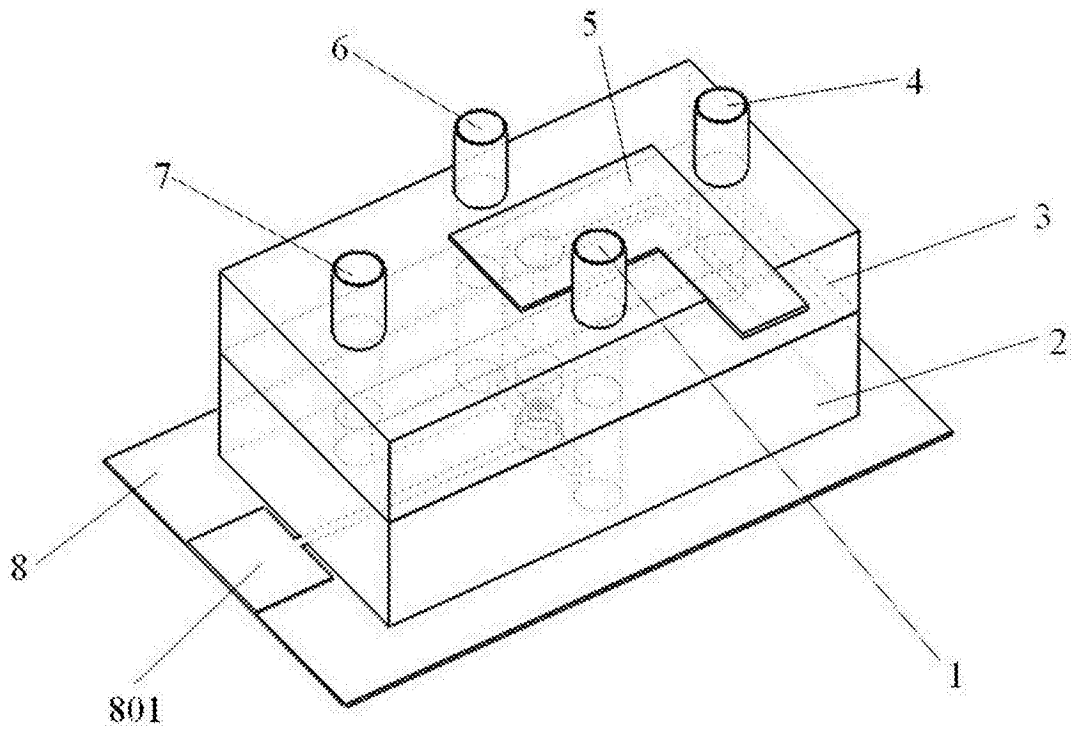


图1

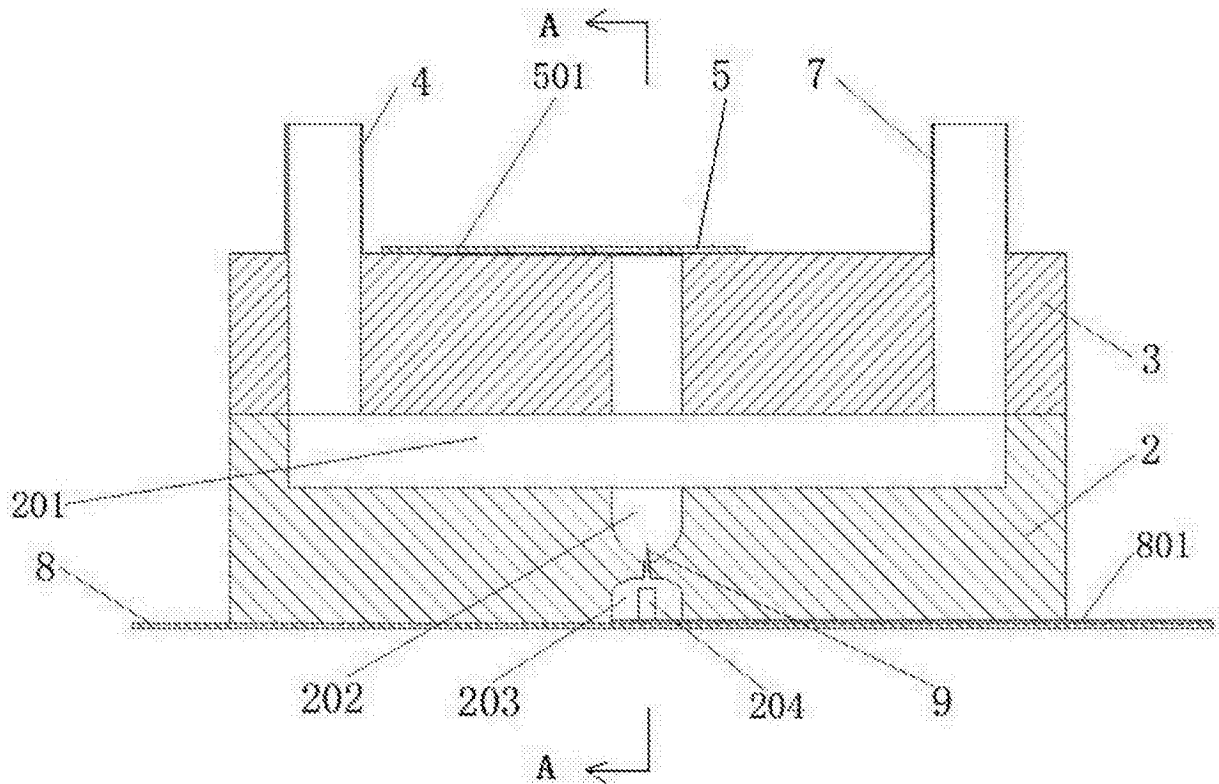


图2

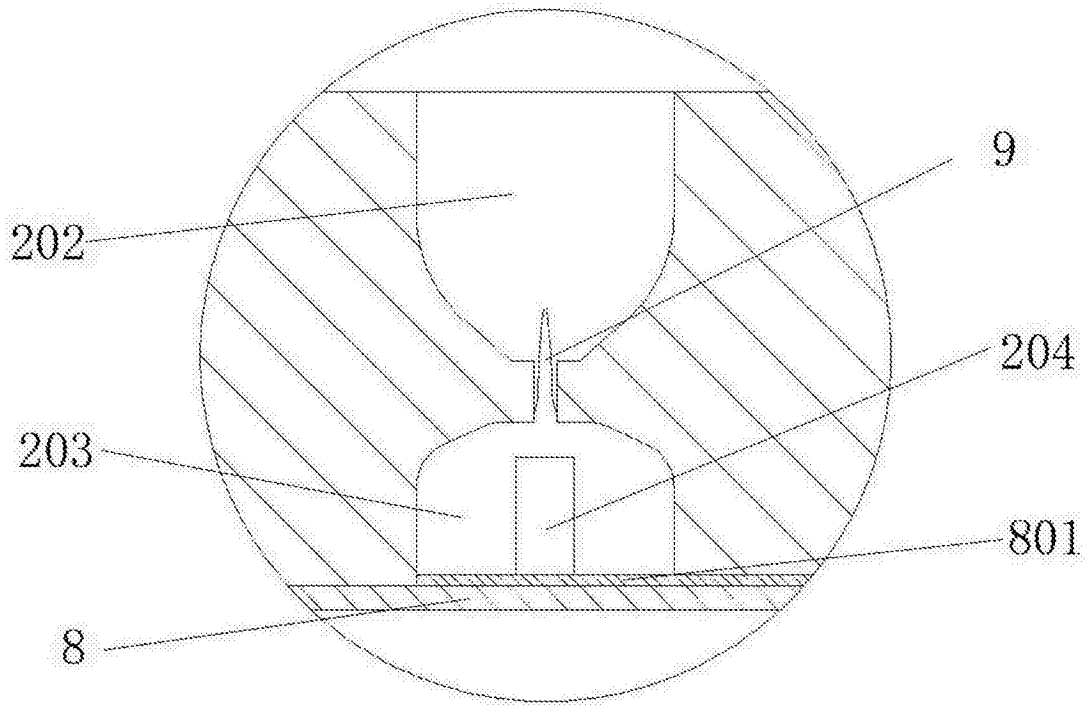


图4

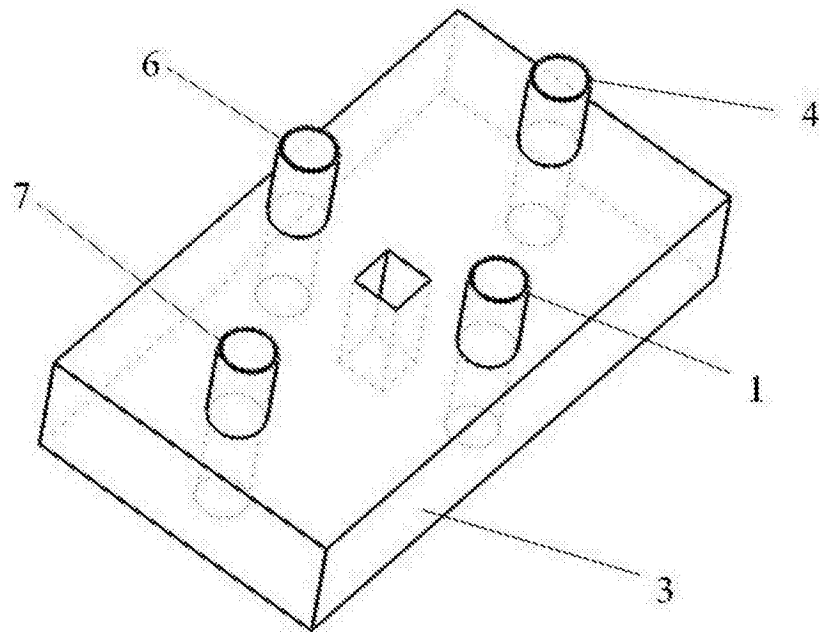


图5

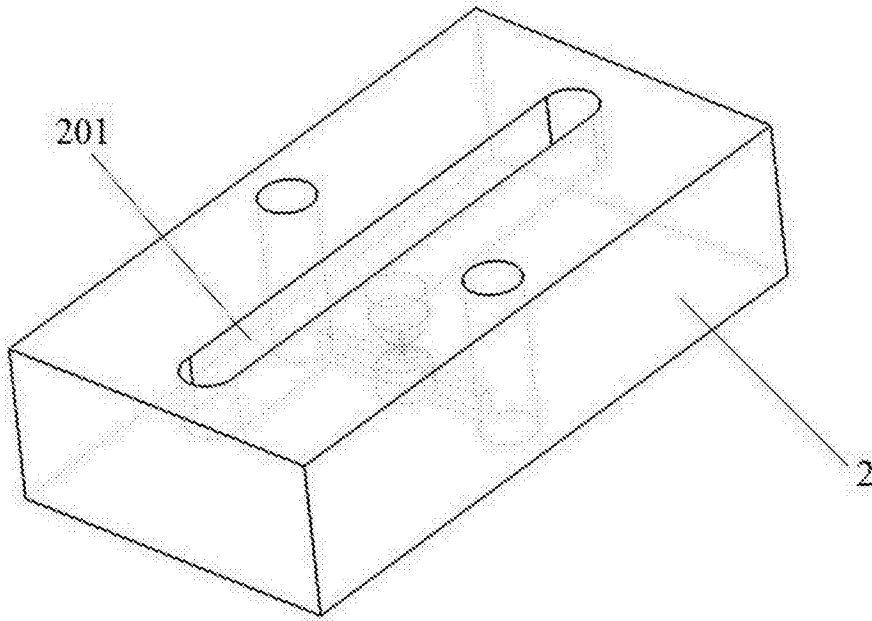


图6

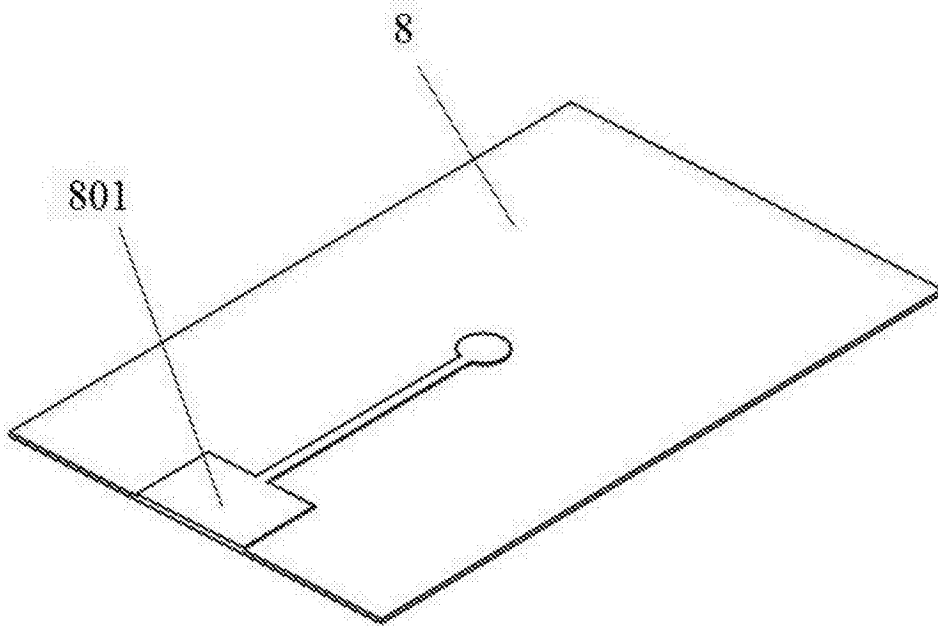


图7

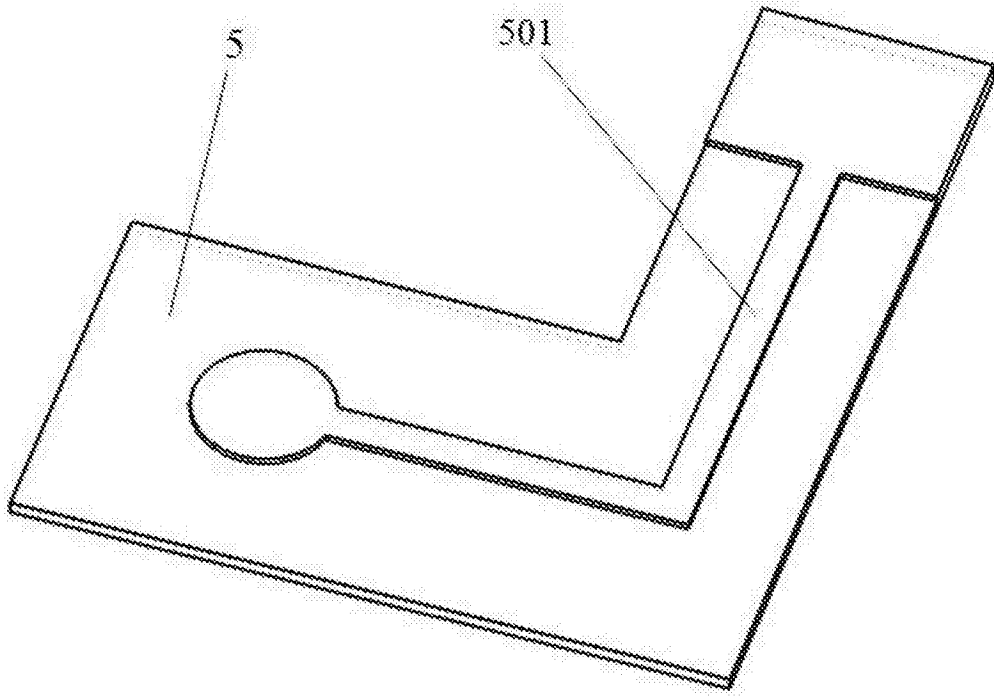


图8