

微流控技术在细胞转染中的应用

徐海明, 蒋稼欢

重庆大学 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400044

摘 要: 微流控技术是在微米级、纳米级结构中操控纳升至皮升体积流体的技术与科学, 具有液体流动可控、消耗试样和试剂极少等优点。近年来, 细胞转染技术有逐渐向微型化技术途径发展的趋势, 这也给了研究者从微尺度角度审视细胞转染技术过程的新机会。以下介绍了基于微流控技术的细胞转染方法, 包括微阵列方式的转染技术、缩微流动空间中的转染、微流控液滴技术应用于细胞转染、微流控注射技术以及微流控电穿孔技术, 并阐述了影响转染效率的因素或改善途径。

关键词: 微流控, 转染, 基因, 效率

Application of microfluidics in cell transfection: a review

Haiming Xu, and Jiahuan Jiang

Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China

Abstract: Microfluidics deals with the manipulation of fluidics in the structure with dimensions of micrometers or nanometers. As an emerging field, microfluidics has numerous advantages, such as controllable fluid flow and reduced reagents consumption. Recently, microfluidic has been applied into the area of cell transfection, providing opportunities to investigate cell transfection process on microscale. This review summarizes recent technical development of cell transfection based on microfluidics, including transfected microarray, transfection established in miniaturization flowing space, microdrops, microinjection and microfluidic electroporation. The factors that affect the transfection efficiency and improvement approaches are also discussed.

Keywords: microfluidic, transfection, gene, efficiency

生命科学中持续的研究热点之一是修饰 (或者重编程) 细胞基因组进而影响特定蛋白质的合成、沉默某些基因、获得选择的细胞特性^[1], 其具体研究中必备的一项基础技术是将外源核酸导入

到细胞中, 这一技术过程通常被称之为细胞转染。到目前, 人们已经先后发展出诸多技术类型, 并可归纳为生物学的、化学的、物理的途径^[2], 无论哪条途径或技术, 要达成细胞转染的成功, 都要使外

Received: March 3, 2011; **Accepted:** May 16, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30870607), Natural Science Foundation of Chongqing (No. CSTC2008BB5192), International Cooperation Key Project of Science and Technology (No. 2005DFA00190), National 111 Project (No. B06023).

Corresponding author: Jiahuan Jiang. Tel: +86-23-65112677; E-mail: jhuan@cqu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30870607), 重庆市自然科学基金 (No. CSTC2008BB5192), 科技部国际科技合作重点项目 (No. 2005DFA00190), 国家“111 计划” (No. B06023) 资助。

源核酸在物理化学性、代谢性方面克服质膜与/或核膜等胞内障碍,抵达并无损地整合到细胞中。其中,病毒介导的生物学途径尽管有很高效率,但因为免疫性与毒性方面的安全问题,采用这种转染技术越来越谨慎。

近十年来,众多文献持续探讨、综述细胞转染的机制以及已有各种转染技术的优劣。在转染机制的基础研究方面,从细胞膜胞吞过程^[3]到细胞内遗传物质与载体之间的释放机制与代谢途径^[4]再到核质传输过程^[5],关注点是外源遗传物质在载体介导下进入细胞后的命运,为比较不同转染技术效率提供理解基础。显然,不同技术背后所涉及的转染过程很不相同,许多文献综述了特定技术途径的发展现状或其中的一些侧面。例如,Escoffre 等^[6]针对质粒 DNA 在许多活体组织类型中的转染方法的应用及如何克服转染障碍的现状作了综述。Rao 等^[3]对脂介导途径所涉及的细胞过程作了十分详细的综述与评论。化学途径中,纳米粒子以及结合脂复合体介导的转染方法发展迅速^[7]。物理途径方面, Sophie 等^[8]、Villemejane 等^[9]先后作出较为全面的综述;其中不同的具体技术,如电穿孔^[10-16]、声穿孔^[17]、光穿孔^[18]等也有作者作出专门综述。这方面,尤其令人注意的,电穿孔转染技术是一个热点,先后有 Golzio 等^[19]、Favard 等^[20-21]、Zaharoff 等^[21]、Escoffre 等^[22-23]、Fox 等^[23]、Wang 等^[24]从不同侧面不同角度作出精彩评述或综述。

在阅读这些文献过程中,我们注意到在细胞转染技术领域,朝着改进细胞转染效率、提高安全性方向,近年来有逐渐向微型化技术途径方面发展的趋势。例如,转染试剂纳米化^[25],在纳米粒子辅助下以层层涂覆方式改善转染^[26],提出所谓纳米级的基因载体 (Nano vectors)^[27];以微阵列方式点印核酸片段的表面上以常规转染试剂孵育细胞,构成转染微阵列^[28];尤其是,离体培养细胞的电穿孔技术出现了许多与微流控技术相结合的形式^[10-16]等。

这些新发展,给我们从微尺度角度审视细胞转

染技术过程的新机会。一般地看,任何的转染流程,在外源核酸分子或其与载体的复合物在进入胞内之前,必须实现 2 个关键过程,一是要使核酸尽可能接触到膜,二是要诱导细胞质膜发生可逆变化,如使膜上能够瞬间开孔 (达成瞬间通透),使外源核酸分子在该通透处进入到膜内的细胞质中。许多物理途径如微注射^[29]等方法均是实现上述步骤而发展出的技术形式。因为细胞尺度、核酸及其载体尺度的限定,介质的流动特性,使得以研究微尺度上的流动行为、流动控制或操纵为对象的新兴微流控学正在成为实现上述过程的技术新角度^[30]。本文试图对近年来涉及细胞转染的微流控技术作出综述,以期对此领域有一个全面的了解。

1 微阵列方式的转染技术

微阵列技术一般是在固态表面上以阵列化方式间隔排布相互作用体系中的一方,而另一方则以流动方式与阵列化的一方接触,实现其中相互作用的完成。2001 年 Ziauddin 和 Sabatini^[28]首次将这种技术方式应用于细胞转染。其做法是,将 (相同或不同) 质粒 DNA 片段混溶在明胶溶液中,采用在 DNA 微阵列技术中发展的纳升级点样仪,在载玻片上点样形成微阵列,待干化后,将这些质粒 DNA 微点阵列浸浴于脂转染试剂中,片刻后吸走脂转染试液,并在这些微阵列上孵育动物细胞。这些细胞在贴壁生长过程中摄入其底部明胶微点中的质粒 DNA,分裂 2~3 次后在载玻片上形成由转染细胞簇所组成的转染细胞微阵列 (Transfected cell microarrays),阵列微点的直径约 100~120 μm (相互间隔 300~400 μm),其中包含的转染细胞数通常为 30~80 个。因为这种方式与常规的转染做法在细胞与 DNA 加样顺序上相反,这些作者也将这种转染技术称为逆向转染 (Reverse transfection)。其中也可以将脂转染试剂点样操作之前加入在质粒 DNA 的明胶溶液中。此方法的优点是,由于转染细胞簇之间间隔不到 400 μm ,其阵列化排布的细胞簇密度是 384 孔板的 200 倍,

大大地增加了转染及后续分析通量,而且这种缩微对质粒用量需求大为减少,被固化在明胶中的 cDNA 还可稳定保存 4 个月。

近来,通过这种逆向转染阵列方式构建出 RNAi 微阵列,被应用来系统地制备敲除基因的细胞,并进行丧失某些细胞功能的高通量筛选^[31],德国 Sturzl 等^[32]对这一技术作了较为全面的综述。

2 缩微流动空间中的转染

2.1 简单微通道

直微通道是微流控技术中最基本的构件,但即使是这样简单的微尺度空间,也可以为细胞转染提供可行的微环境。Li 等^[33]利用简单微通道构成的微空间来实施细胞的脂质体介导转染。PDMS 通过与玻璃键和形成微管道,其长/宽/高分别为 1 cm/900 μm /60 μm 。他们讨论了在这样一种简易的微芯片装置上利用阳离子脂质体介导法将含有加强绿色荧光蛋白基因的质粒 pEGFP-N2 导入 COS-7 细胞的过程,并探讨了最适宜的脂质体浓度等问题。他们所用的装置很简单,构成的芯片可以创造微环境来进行细胞培养和基因转染,其中在将细胞种植在微通道之前需要先用 0.01% (W/V) Poly-L-Lysine

(PLL, Sigma, USA) 孵育通道以促进细胞的粘附。

转染效率可以通过绿色荧光蛋白的表达确定。脂质体介导的转染效率与阳离子脂质体和 DNA 的比率、阳离子脂质体的结构及脂质体颗粒的大小等有关。他们得出转染效率会随着脂质体浓度的增大而提高,当含脂质体为 1 μL 的时候为 COS-7 细胞转染的最适条件即高的转染效率和细胞存活率,当达到 2 μL 的时候,微通道中细胞数量会急剧减少也就是细胞存活率很低但转染效率却很高。不过最适的转染效率和细胞存活率会随质粒 DNA 的纯度和脂质体的浓度而变化,另外质粒必须是无内毒素的,否则也会有很大的负面作用。这种阳离子脂质体介导的转染方法不需要太多的设备、特殊的芯片或是电极等,在一般实验室可以方便地进行试验。

2.2 直微通道与微孔阵列的简单结合

Nagamine 等^[34]实现了用微流控芯片对大肠杆菌细胞的转化,如图 1 所示。所用的装置由 PDMS 通道和一个硅衬底组成,PDMS 微通道的长宽高分别为 5.0 mm/500 μm /25 μm ,硅底片上有两排锥形孔,微孔的大开口为 400 \times 400 μm^2 ,小开口为 100 \times 100 μm^2 。两者键合后,首先将质粒 DNA 溶液通过微通道口加入并干燥于硅片上的锥形孔中,再

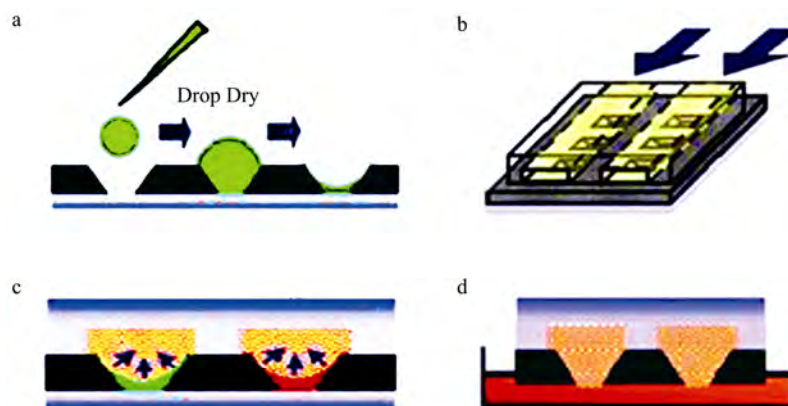


图 1 质粒转化过程^[34]

Fig. 1 Protocol of on-chip transformation of *E. coli*^[34]. (a) Immobilization of plasmid DNA. (b) Injection collagen-*E. coli* cells mixture solution into PDMS microfluidic channels. (c) Introduction the plasmid DNA into the *E. coli* cells. (d) Induction the gene expression.

将感受态细胞注入微通道中,从而使感受态细胞暴露于质粒面前,之后经过热休克促进转化后把上面的 PDMS 微通道剥离,硅底片在细胞培养基中培养,以下的工作包括质粒表达的鉴定和转化效率等同传统方法差不多,研究发现不同质粒的转化效率也不同,可能缘于质粒 DNA 长度和结构的不同。

3 微流控液滴技术应用于细胞转染

目前文献可见有两种利用液滴来实施细胞转染。一是操纵液滴使其溶解混入基因片段,并投送给目标细胞^[35];二是操纵液滴包封细胞,利用电穿孔方式进行转染^[36]。

Wu 等^[35]利用微流控生成的微液滴作为转染细胞的载体。他们首先制作了一个大小可调且产生的液滴均一(尺寸差别 $<7.1\%$)的微流控芯片,在一个 T 型交叉微通道靠近交叉点的上方添加一个充有压缩空气的薄膜腔,通过空气压缩薄膜对液滴大小进行调节。在相同的连续相和分散相的流速比率下,施加在薄膜上的压力越大产生的液滴越小,产生液滴的频率越快,薄膜的调节由一个电磁阀开关和一个压缩机控制。

完成了第一步即按需产生大小均一的液滴后,就为下一步的利用液滴转染打下了基础。液滴可以被用作载体将质粒 DNA 导入到 COS-7 细胞中,将脂质的药物依赖性抗体溶于鲨烯油中来产生液滴而表面带负电的质粒 DNA 可以结合在这些液滴的表面从而使液滴成为了载体。液滴由于重力作用会下沉到连接的培养皿底部进而增加了与细胞的接触机会。当给 COS-7 细胞裂解物加入荧光素和 ATP 后,基因的转染就可以通过发射光来表征。研究表明,液滴越小转染效率越高,这源于液滴越小表面积对体积比值越大,能够携带更多的 DNA。但该工作有待完善的地方在于在实施细胞转染时,该工作还没有将形成 DNA 液滴与转染过程实现集成。

而 Xiao 等^[36]同样利用 T 型结构的微流控装置进

行了液滴转染,不过利用液滴的方法不同,他们是将细胞包到微液滴(直径 50 μm 左右)中后再进行电穿孔转染,这可以有效避免传统电穿孔的复杂过程,并能精确操纵细胞。另外其优势还在于:控制包埋细胞的液滴比水溶液中的单个细胞更容易和精确,能将电极处的电化学反应降低到最低。Zhan 等^[37]亦在基于液滴的微流控芯片上实现了电穿孔转染。这两种方式的转染都是将液滴作为了一个运输载体,并达到了转染的目的。

4 微流控注射技术

毛细管微注射 (Capillary microinjection)——其转染是在显微镜下通过精密微操纵器将微注射针直接插入细胞的方式来实施的。

按照转染试剂流控传输机制的不同,有两种毛细管微注射方式,一种是利用毛细管压差驱动 (Capillary pressure microinjection, CPM),另一种是基于动电原理的离子电泳 (Ionophoresis)。毛细管微注射技术可以达到很高的转染效率,细胞毒性也很低^[38]。其中前一种方式,实现技术相对简单,也很直接^[8],但是,毛细管压差驱动方式的不足在于向细胞传输的试剂体积变动很大(甚至达 5 倍以上),因此转染结果可重复性差^[39],另外,注射量以及施加压力对于注射针直径大小有约束,现有商业化的微注射系统中,大多施加 500 kPa 的压力,相应的微针尖端直径被限制在 200~500 μm ,显然这一尺寸对于大多数细胞而言仍旧显得太大。为了采用直径更小的微针,有必要采用离子电泳方式来驱动试剂向细胞的传输。离子电泳是这样来实现的,将一对微电极分别插入注射微针与细胞介质中,两电极施加电压后诱导试剂电泳,显然这就克服微注射对针尖直径的限制^[40],但是这种转染过程速度很慢,并依赖于所注射的试剂离子性质,而且传输试剂的定量化仍旧存在问题^[41]。无论哪种方式,转染的通量与操作技术的复杂度也约束着这类技术的实用性。

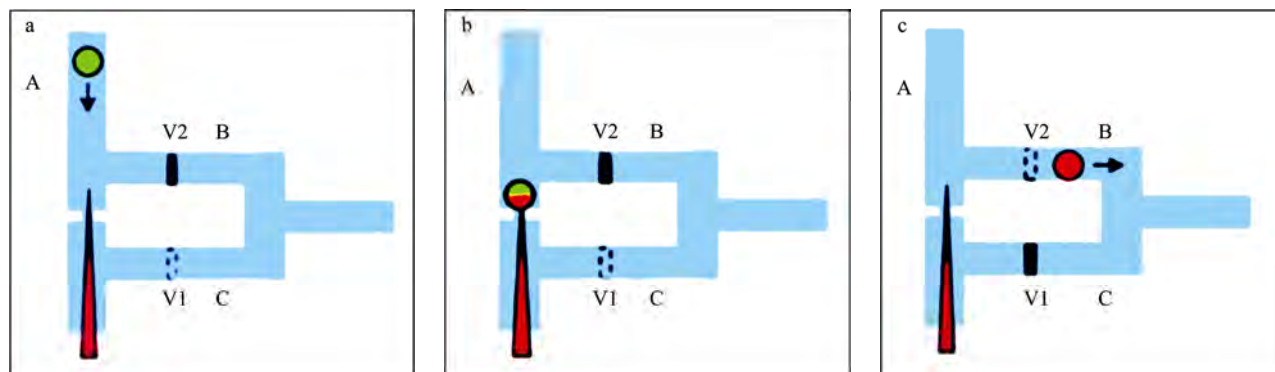


图 2 微流控芯片中的单细胞微注射系统^[29]

Fig. 2 Schematic representation of the microfluidics based single cells microinjection system^[29].

现在微流控技术有可能克服这一技术方式中存在的上述诸多问题^[42]。在微流控芯片上, 可以把细胞微注射操作的前后过程如细胞培养、分类、可行性测试等集合在一起完成。如图 2a 中实现了在微流控操纵下将细胞引导到接近固定的微注射针尖处, 此时阀 1 打开阀 2 关闭; 图 2b 中细胞触及微针尖, 细胞膜被刺破形成穿孔, 微注射即得以实现; 图 2c 中阀 2 打开阀 1 关闭时流体便会带动细胞从通道 B 流到细胞收集器中。这样的微流控操纵过程不仅实现了定点微注射^[29], 也能减小由于细胞环境的改变而带来的潜在危害。

5 微流控电穿孔技术

电穿孔是指通过电场施加电脉冲后, 在细胞膜表面会产生多个短暂细孔, 分子可以被转入或转出细胞^[43], 电穿孔转染便是将外源基因转入细胞并进行表达。进行电穿孔转染的微流控芯片各式各样却也大同小异, 其基本上分为两类: 针对多细胞的和针对单细胞的电穿孔芯片。

5.1 微流控芯片中的多细胞电穿孔

这类芯片转染以 Lin^[14]设计的 4 种电穿孔微芯片最具有代表性和普遍性。Lin^[14]利用 MEMS 技术设计制作了 4 种电穿孔微芯片来进行基因转染。第 1 种是有微通道和平板电极的流动式电穿孔芯片 (图 3a), 用于将质粒导入悬浮细胞中, 质粒和细胞

流入微通道中后用短暂电脉冲进行电穿孔; 第 2 种是双电极电穿孔芯片 (图 3b), 主要用于粘附细胞的基因转染; 第 3 种是用成角度的叉指电极对双电极电穿孔芯片的改进版 (图 3c), 主要可以降低电压和提高场强; 第 4 种是整合了 DNA 预富集功能的叉指电极电穿孔芯片 (图 3d), 是利用电泳吸引力可以增加细胞表面质粒 DNA 的浓度并提高转染效率。这 4 种芯片各有自己的特点, 当然第 4 种的效果好些, 不仅细胞和质粒的需要量少, 电穿孔电压低, 并且细胞的培养和准备过程也较简单, 还可以得到聚集的 DNA。Lin 通过实验得出了第 4 种芯片的最适参数, 即电极间距 50 μm 、质粒浓度 80 $\mu\text{g/mL}$ 、脉冲电压 6 V、脉冲 2 Hz。在此条件下, 将质粒 pEGFP-N1 导入 BCC (基底细胞癌的细胞株) 的平均转染效率达到 35.89%。

芯片上的电穿孔需要利用电压击穿细胞膜, 所以就要有不同的电压产生电场来满足实际需要。为此, Kim 等^[13]设计了一种多通道电穿孔微芯片, 在这个芯片中有 5 个不同长度的微通道, 所以能够在同一个芯片中在相同电压下同时产生 5 种不同梯度的场强, 也就相应的有 5 种不同的转染效率和细胞存活率。这对于探索基因转染的最佳条件更加方便和快速。

在将绿色荧光蛋白质粒分别导入 HEK-293 细胞和 CHO 细胞后得到了各自最高表达的场强条件, 而

细胞转染效率和细胞存活率都比较高时的条件便是最佳条件,在最佳条件下转染效率能超过 80%并保证细胞存活率在 70%以上。虽然高的电场强度更有利于基因进入细胞但却会导致细胞死亡,使整体转染效率降低。所以在这种多通道芯片中就能方便找到高转染效率和高细胞存活率的并存的条件。另外,施加越高的电场,脉冲持续时间应该越短或者相同时间内连续的脉冲相比单一的脉冲更能得到高转染效率和高细胞存活率。脉冲的波形也会对转染效率和细胞存活率产生影响。

一般电穿孔试验中在金属电极附近会产生气泡、化学污染或是由于电极产生局部高温造成细胞热休克,这些对转染都会有不良影响作用,为了解决这个问题, Kim 等^[12]利用聚二烯二甲基氯化铵溶液中 (pDADMAC) 离子的导电性来构建盐桥而避

免了气泡的产生。pDADMAC 用来对微通道中细胞提供电势差。pDADMAC 的导电率约为 16 S/m,当输入电压为 10 V 时可以产生 0.9 kV/cm 的电场,这满足电穿孔所需要的条件。利用此微流控装置对人体的 K562 白血病细胞转染时,输入电压 15 V,转染效率可达到 60%并且细胞存活率为 80%,而在恒定的电势差下每分钟可以转染约 10^5 个细胞,即也可以进行高通量的细胞转染。

此外, Zhan 等^[37]提出了一种利用液滴进行电穿孔的方法,将细胞液滴形成在油相中,包含细胞的液滴随油相流动到固定在下流通道某处的微电极表面,电极施加电压时,可跨液滴使其内细胞实现电穿孔。电穿孔的间隔时间和强度可根据液滴的尺寸 (长约 60~386 μm) 和流速 (1.38~8.86 m/min) 决定,两电极间距约 20 μm ,施加电压大小 5~9 V。

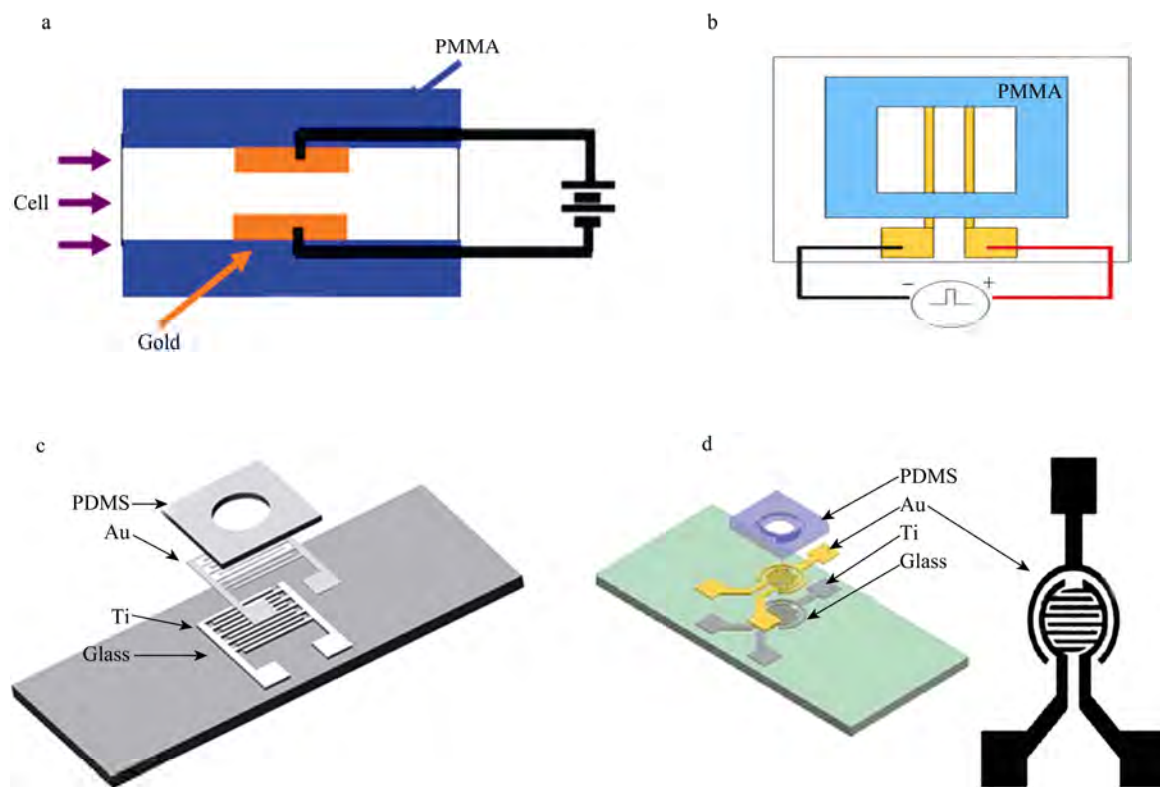


图 3 四种电穿孔芯片^[14]

Fig. 3 Four electroporation-chips^[14].

使用此装置,他们将含有增强绿色荧光蛋白(EGFP)的质粒成功地导入到CHO细胞中表达。虽然实验中同时发现细胞存活率会随着电压的升高而降低,但是,利用操纵微液滴这种确定的微小空间实现将外源基因导入细胞的灵活便利是显而易见的。

Geng等^[10]设计了一种流动式的电穿孔芯片,在恒定电压下通过流动进行大量的细胞转染,其中流速为20 mL/min,转染效率依然可以达到75%。同时设备简单、价格低廉的特点也便于平普通实验室的使用。Huang等^[16]同样利用流动式的电穿孔芯片达到高效转染和操纵细胞的目的,并在此基础上实现了单细胞的转染,加载的细胞通过微流控通道可以逐个地被电通透到转染点,实现对细胞的100%的操控率,也就可以对单个细胞进行转染。Wang等^[11]制作了一种蛇形半连续流动的芯片,在这种芯片里由于气泡和焦耳热产生的少,避免了细胞裂解产生过多的细胞碎片,使细胞的存活率超过50%,基因表达效率约为10%~15%。

芯片上进行电穿孔转染的优势在于PDMS的可透性给我们提供了可以看到转染过程的机会。在电穿孔芯片上通过可视图化研究,有利于更好理解电转染的机制,提高我们对通道中细胞的原位实时监测能力^[15]。

5.2 微流控芯片中的单细胞电穿孔

不同于多细胞电穿孔中的大量转染,单细胞电穿孔中电场是施加于单个细胞的,许多大量转染无法解决的问题可以由单细胞的电穿孔转染来完成。Wang等^[24]就曾针对这一方面进行过综述。单细胞电穿孔可以用于基因和蛋白表达的高通量筛选,对于药物发现、细胞内在机制以及干细胞的研究都有重要意义。

人体THP-1(单核白血球)细胞在白血病的研究中有重要作用,但常规的转染进行基因修复却很难得到,并且进行大量的电穿孔转染时绝大多数这种细胞不能表达外来基因,细胞的存活率也相当低。

Uitert等^[44]设计了一种单细胞电穿孔微流控芯片来解决这个问题,且提高了转染效率。该芯片由两条微通道组成,通道中间由9个细胞捕获结构连接。通道的一侧为平板电极,另一侧对应的是9个宽度与细胞直径相当的电极。当细胞样从进样口加入后,在两电极之间被捕获,而此种结构可以一次性对9个单细胞同时电穿孔,因此有利于进行高通量的单细胞转染,转染效率也相应提高。

此外,Cho等^[45]提出了一种3D的单细胞电穿孔芯片,该芯片是由一条通道和用于产生电场的悬臂式微电极对组成,其中微通道的尺寸是:长4 mm、宽10~40 μm 、深20 μm ,双悬臂梁之间的间距是10~20 μm ,与靶细胞的尺寸相当。这种电极装置的特点是可以将低电压放大并可在两电极之间捕获单个细胞,因此样本细胞从入口处经由微通道到达两电极之间时,细胞膜便在此处被放大的电压击穿形成穿孔。这样细胞在电穿孔过程中受到的损伤很小,转染效率和细胞存活率也就相应增高。这种芯片的特点是:所需电压更低;有不均匀的电场;电极与细胞间的间距更小。当在两个电极之间施加0.7 V的电压时在尖端的最大场强可以达到 $3 \times 10^4 \text{ V/m}$ 。当流动的细胞连续加入该电穿孔芯片时可以进行高通量的电穿孔转染。

而当前,干细胞的研究是一个热点,即把人体骨髓间质干细胞(MSCs)的基因修复用于自身修复或他人移植,而将干细胞与微流控芯片结合起来探讨,也是现在研究中的一个趋势。Valero等^[46]就在微流控装置中利用单细胞的电穿孔研究了干细胞中的基因转染和蛋白质动力学。他们通过实验得出在微流控装置中不仅可以高效地转染MSCs,还可以保持细胞的生存能力和对其生存环境改变作出反应的能力。这对于比较稀少且作为有限的人类生命源泉的MSCs来说,是非常重要的。通过呈现细胞微环境中的生长因素和对细胞内部蛋白质动力学高分辨率的成像,可达到操纵单个细胞的目的。

微流控芯片上的单细胞电穿孔可以避免大量电

穿孔时已经转染的和没有转染的细胞混合在一起后的分离,这样也就没有必要去鉴别细胞是否转染。同时,单细胞电穿孔对细胞的损伤更小,并且所用细胞和反应试剂的量也更少。而微流控芯片可以用于单个细胞的获取和阻抗的测量^[47-48],利用微电极的电阻抗微芯片可以有利于细胞转染过程的评估^[49]。不仅如此,微流控芯片还可以将靶细胞定位在特定位点上^[50],利用单细胞电穿孔技术操纵组织切片、细胞培养中的单个靶细胞,从而也为靶细胞的遗传、代谢、合成开启了一扇新的窗户。

6 微流控条件下细胞转染效率的影响因素及改善途径

长期以来的转染实验,人们已经认识到约束转染效率提高的因素,例如:DNA 质量的好坏、转染方法的不同等,但在微条件下的相同转染方法中,细胞包被物^[51-52]、流动因素^[53-54]、微通道宽度^[13,15,54]、比表面积^[23,54]等也会对转染效率产生很大影响。

Uchimura 等^[51]通过对 PC12 细胞在微流控芯片上转染的研究,认为 IV 型胶原作为一种合适的表面涂层物对于 PC12 细胞转染得到高的转染效率是非常便利的,而纤连蛋白对局部转染效率有重要作用。同时 Yoshikawa 等^[52]通过对人体骨髓间充质干细胞在微阵列上的转染也发现纤连蛋白可以明显提高细胞在芯片上的转染效率。对于一些难转染的细胞,在其细胞表面包被一层细胞外基质可以显著提高转染效率。

在微通道中进行细胞转染,细胞处于悬浮(流动),处于固定(静止),在这两种状态下转染效率是不一样的。分子信标在静态的微通道中的转染效率要比传统在细胞培养皿中的低^[54]。在流动状态下会受到其他一些因素的影响。为此, Li 等^[53]通过模拟计算和试验两种方式比较了在传统细胞培养皿中和微流控细胞培养系统中有或没有流动因素对分子信

标转染效率的影响。通过对比细胞培养皿和静态的微流控系统中细胞的转染,得出分子信标的转染受制于扩散和反应;而对微流控系统施以一定的范围的流体剪应力和传质速率后,较大的流体剪应力会破坏转染试剂/分子信标混合物与细胞膜的结合,并且占主导作用以至于超过加强的传质。也就是说,在静态的微通道中,每个细胞可用的转染试剂/分子信标混合物的量会由于微通道高度的限制而少于传统培养皿中的量,因而转染效率也低。而在流动的微通道中,流体剪应力会对转染起负面作用,因为流体剪应力能够去除掉细胞膜表面的转染试剂/分子信标混合物,从而导致转染效率降低。

利用电穿孔芯片技术进行转染,需要注意所使用的脉冲电压。当使用指数衰退型脉冲电机时,电转染会受到微通道宽度的影响,因为电压脉冲的波形会受影响而变化^[13-14]。而在微通道中比表面积相对较大,所以可以使每个单位表面的热量更快地分散^[23]。这可以尽量减少细胞的死亡,以余存更多的细胞进行转染,提高总转染效率。

除此之外,将 DNA 与磁性纳米粒子结合可以在磁场条件下被吸引到细胞表面的特定区域,从而可以大大提高该特定区域的 DNA 的浓度。相对于电场条件下的静电吸引力,磁电穿孔中的磁引力可以有更高的转运效率(63.5%对没有任何引力时的 31.45%),这样转染效率也就大大提高^[7]。同样,用 21 个碱基巯基寡核苷酸修饰的金纳米颗粒做运输载体,不但可以用紫外线来检测运输效率,并且在电穿孔中结合有纳米颗粒的转运效率也相对更高^[55]。

相似的是合理利用电场也会有如上磁场的效果。利用图 3c 中的微流控装置,当正极连通其中的一个电极后, DNA 由于带负电荷所以会被吸引积聚到阳极上,也就增加了这个电极的 DNA 浓度,然后再打开电源开关进行电穿孔。这也就是通过电场吸引力将 DNA 引到特定位点后转染,如此细胞表面的 DNA 浓度会达到普通电穿孔的数千倍,进而基

因转染效率相比没有电场吸引力的 6.3 倍之高。这种方法对基因治疗的特定定位点的基因修复提供了一个研究平台^[43]。

7 结语

将微流控技术与生命科学中的热点结合起来研究是现在的一个趋势,相对于传统的转染方法,利用微流控技术进行转染的优势是显而易见的。首先,比传统的方法耗费溶剂和反应试剂量少,并且所需细胞样体积也非常小,这对于某些较难得到的细胞来说是非常重要的,而转染效率和细胞存活率也相对较高。其次,微流控环境更接近于细胞的直径大小,有利于单个细胞研究,而这种微环境也可以有效模拟体内细胞生长的微环境,对研究细胞及其小生境或是细胞在体外的分离培养有重要意义。再次,微流控环境可以进行原位可视观察和实时监测,对于整个转染过程可以有更好的把握,进而有利于转染机制的研究。最后,利用微流控技术进行细胞转染可以与微流控技术中的其他许多技术相结合,如细胞操纵^[10,16,36]、细胞传感^[56]、PCR 反应^[57]及电泳^[58]等。

总之,微流控技术带来了巨大的多功能性,它能够促进传统细胞生物研究和基因组数据的整合,为系统的基因研究提供研究平台,并在生物医学、环境监测和药物开发等领域带来新的启示和重要应用。

REFERENCES

- [1] Hanna J, Saha K, Pando B, et al. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*, 2009, 462(7273): 595–601.
- [2] Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(8): 3173–3178.
- [3] Rao NM, Gopal V. Cell biological and biophysical aspects of lipid-mediated gene delivery. *Biosci Rep*, 2006, 26(4): 301–324.
- [4] Shimizu N, Kamezaki F, Shigematsu S. Tracking of microinjected DNA in live cells reveals the intracellular behavior and elimination of extrachromosomal genetic material. *Nucl Acids Res*, 2005, 33(19): 6296–6307.
- [5] Lachish-Zalait A, Lau CK, Fichtman B, et al. Transportin mediates nuclear entry of DNA in vertebrate systems. *Traffic*, 2009, 10(10): 1414–1428.
- [6] Escoffre JM, Teissie J, Rols MP. Gene transfer: how can the biological barriers be overcome? *J Membrane Biol*, 2010, 236(1): 61–74.
- [7] Li M, Lin YC, Su KC. Using magnetic nanoparticles to enhance gene transfection on magneto-electroporation microchips. *Mat Sci Forum*, 2005, 505/507(2): 661–666.
- [8] Mehier-Humbert S, Guy RH. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Del Rev*, 2005, 57(5): 733–753.
- [9] Villemejeane J, Mir LM. Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. *Brit J Pharmacol*, 2009, 157(2): 207–219.
- [10] Geng T, Zhan YH, Wang HY, et al. Flow-through electroporation based on constant voltage for large-volume transfection of cells. *J Control Release*, 2010, 144(1): 91–100.
- [11] Wang SN, Zhang XL, Wang WX, et al. Semicontinuous flow electroporation chip for high-throughput transfection on mammalian cells. *Anal Chem*, 2009, 81(11): 4414–4421.
- [12] Kim SK, Kim JY, Kim KP, et al. Continuous low-voltage dc electroporation on a microfluidic chip with polyelectrolytic salt bridges. *Anal Chem*, 2007, 79(20): 7761–7766.
- [13] Kim JA, Cho K, Shin YS, et al. A multi-channel electroporation microchip for gene transfection in mammalian cells. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22(12): 3273–3277.
- [14] Lin YC. Electroporation microchips for gene transfection. 2005 Emerging Information Technology Conference, 2005: 4.
- [15] Shin YS, Cho K, Kim JK et al. Electrotransfection of mammalian cells using microchannel-type electroporation chip. *Anal Chem*, 2004, 76(23): 7045–7052.
- [16] Huang Y, Rubinsky B. Flow-through micro-electroporation chip for high efficiency single-cell genetic manipulation. *Sensor Actuat A: Phys*, 2003, 104(3): 205–212.
- [17] Rodamporn S. Microfluidic systems for cell transfection

- using sonoporation and electroporation[D]. Southampton: University of Southampton, School of Electronics and Computer Science, 2010.
- [18] Stevenson DJ, Gunn-Moore FJ, Campbell P, et al. Single cell optical transfection. *J R Soc Interface*, 2010, 7(47): 863–871.
- [19] Golzio M, Teissié J, Rols MP. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(3): 1292–1297.
- [20] Favard C, Dean DS, Rols MP. Electrotransfer as a non viral method of gene delivery. *Curr Gene Ther*, 2007, 7(1): 67–77.
- [21] Zaharoff DA, Henshaw JW, Mossop B, et al. Mechanistic analysis of electroporation-induced cellular uptake of macromolecules. *Exp Biol Med*, 2008, 233(1): 94–105.
- [22] Escoffre JM, Portet T, Wasungu L, et al. What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol Biotechnol*, 2009, 41(3): 286–295.
- [23] Fox MB, Esveld DC, Valero A, et al. Electroporation of cells in microfluidic devices: a review. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 385(3): 474–485.
- [24] Wang MY, Orwar O, Olofsson J, et al. Single-cell electroporation. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(8): 3235–3248.
- [25] Kovtun A, Heumann R, Eppe M. Calcium phosphate nanoparticles for the transfection of cells. *Bio-Med Mater Eng*, 2009, 19(2/3): 241–247.
- [26] Nault L, Cumbo A, Pretot R F, et al. Cell transfection using layer-by-layer (LbL) coated calixarene-based solid lipid nanoparticles (SLNs). *Chem Commun*, 2010, 46(30): 5581–5583.
- [27] Nakanishi M, Inoh Y, Kitamoto D, et al. Nano vectors with a biosurfactant for gene transfection and drug delivery. *J Drug Deliv Sci Tech*, 2009, 19(3): 165–169.
- [28] Ziauddin J, Sabatini DM. Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature*, 2001, 411(6833): 107–110.
- [29] Adamo A, Jensen KF. Microfluidic based single cell microinjection. *Lab Chip*, 2008, 8(8): 1258–1261.
- [30] Salieb-Beugelaar GB, Simone G, Arora A, et al. Latest developments in microfluidic cell biology and analysis systems. *Anal Chem*, 2010, 82(12): 4848–4864.
- [31] Silva JM, Mizuno H, Brady A, et al. RNA interference microarrays: high-throughput loss-of-function genetics in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(17): 6548–6552.
- [32] Sturzl M, Konrad A, Sander G, et al. High throughput screening of gene functions in mammalian cells using reversely transfected cell arrays: review and protocol. *Comb Chem High Thr Scr*, 2008, 11(2): 159–172.
- [33] Li L, Nie Y, Ye D, et al. An easy protocol for on-chip transfection of COS-7 cells with a cationic lipid-based reagent. *Lab Chip*, 2009, 9(15): 2230–2233.
- [34] Nagamine K, Onodera S, Torisawa YS, et al. On-chip transformation of bacteria. *Anal Chem*, 2005, 77(13): 4278–4281.
- [35] Wu HW, Huang YC, Wu CL, et al. Exploitation of a microfluidic device capable of generating size-tunable droplets for gene delivery. *Microfluid Nanofluid*, 2009, 7(1): 45–56.
- [36] Xiao K, Zhang MY, Chen SY, et al. Electroporation of micro-droplet encapsulated HeLa cells in oil phase. *Electrophoresis*, 2010, 31(18): 3175–3180.
- [37] Zhan YH, Wang J, Bao N, et al. Electroporation of cells in microfluidic droplets. *Anal Chem*, 2009, 81(5): 2027–2031.
- [38] Zhang Y, Yu LC. Single-cell microinjection technology in cell biology. *Bioessays*, 2008, 30(6): 606–610.
- [39] Minaschek G, Bereiter-Hahn J, Bertholdt G. Quantitation of the volume of liquid injected into cells by means of pressure. *Exp Cell Res*, 1989, 183(2): 434–442.
- [40] Purves RD. The physics of iontophoretic pipettes. *J Neurosci Meth*, 1979, 1(2): 165–178.
- [41] Purves R. Ionophoresis-progress and pitfalls. *Trends Neurosci*, 1980, 3(10): 245–247.
- [42] Fukui Y, Lee ES, Araki N. Effect of medium renewal during culture in two different culture systems on development to blastocysts from in vitro produced early bovine embryos. *J Anim Sci*, 1996, 74(11): 2752–2758.
- [43] Jen CP, Wu WM, Li M, et al. Site-specific enhancement of gene transfection utilizing an attracting electric field for DNA plasmids on the electroporation microchip. *J Microelectr Sys*, 2004, 13(6): 947–955.
- [44] van Uitert I, van den Berg A. Gene transfection protocols in single THP-1 cells using a microfabricated electroporation chip. *Nanotech Montreux conference*, Montreux, Switzerland, 2007.
- [45] Cho YH, Lee SW, Le Pioufle B, et al. High-throughput single-cell electroporation microchip with three dimensional si microelectrodes for gene transfection.

- TRANSDUCERS '07 and Eurosensors XXI, 2007 14th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, 2007: 939–942.
- [46] Valero A, Post JN, van Nieuwkastele JW, et al. Gene transfer and protein dynamics in stem cells using single cell electroporation in a microfluidic device. *Lab Chip*, 2008, 8(1): 62–67.
- [47] Kurz CM, Büth H, Thielecke H. Influence of transfection process on single cell impedance. *J Phys: Conf Ser*, 2010, 224(1): 12082.
- [48] Jang LS, Wang MH. Microfluidic device for cell capture and impedance measurement. *Biomed Microd*, 2007, 9(5): 737–743.
- [49] Wu Y, Xiang Y, Bai JJ, et al. Electrical impedance microchip using microelectrodes. 2008 7th World Congress on Intelligent Control and Automation, 2008: 3595–3598.
- [50] Olofsson J, Nolkranz K, Ryttsén F, et al. Single-cell electroporation. *Curr Opin Biotech*, 2003, 14(1): 29–34.
- [51] Uchimura E, Yamada S, Uebersax L, et al. On-chip transfection of PC12 cells based on the rational understanding of the role of ECM molecules: efficient, non-viral transfection of PC12 cells using collagen IV. *Neurosci Lett*, 2005, 378(1): 40–43.
- [52] Yoshikawa T, Uchimura E, Kishi M, et al. Transfection microarray of human mesenchymal stem cells and on-chip siRNA gene knockdown. *J Control Release*, 2004, 96(2): 227–232.
- [53] Li N, Wong PK, Lin J, et al. Transfection of molecular beacons in microchannels under flow and no-flow conditions. *Mems 2008: 21st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Technical Digest*, 2008: 260–263.
- [54] Li N, Wong PK, Lin J, et al. Single cell transfection dynamics in a microfluidic system//*Proceedings of MicroTAS 2006*. Tokyo, Japan, 2006: 969–971.
- [55] Jen CP, Chen YH, Fan CS, et al. A nonviral transfection approach in vitro: the design of a gold nanoparticle vector joint with microelectromechanical systems. *Langmuir*, 2004, 20(4): 1369–1374.
- [56] Shao ML, Bai HJ, Gou HL, et al. Cytosensing and evaluation of cell surface glycoprotein based on a biocompatible poly (diallyldimethylammonium) doped poly (dimethylsiloxane) film. *Langmuir*, 2009, 25(5): 3089–3095.
- [57] Xiang Q, Xu B, Fu R, et al. Real time PCR on disposable PDMS chip with a miniaturized thermal cycler. *Biomed Microd*, 2005, 7(4): 273–279.
- [58] Ionescu-Zanetti C, Blatz A, Khine M. Electrophoresis-assisted single-cell electroporation for efficient intracellular delivery. *Biomed Microd*, 2008, 10(1): 113–116.