

超声聚焦微喷制备脂质体微阵列研究*

韩鑫¹ 张波² 李笋³ 张德远³

(1. 山东理工大学农业工程与食品科学学院, 淄博 255049;

2. 中国航空规划建设发展有限公司, 北京 100120;

3. 北京航空航天大学仿生与微纳生物制造技术研究中心, 北京 100191)

【摘要】 设计了基于超声换能器和球面声透镜的超声聚焦微喷头及向下隔离喷射机构, 实现了无喷嘴、无堵塞、非接触、低消耗、高精度的微阵列制备。为验证其生物相容性, 以载有 F_0F_1 -ATP 酶的分子马达脂质体为对象, 制备出了形状规则、定位准确的脂质体微阵列, 并对其 ATP 水解活性和合成活性进行了检测。实验结果表明, 所制备的微阵列生物芯片在相关光化学刺激下具有良好的 ATP 水解与合成活性, 从而证实该方法在微阵列生物芯片制备过程中能够较好地保持样品的生物活性。

关键词: 微阵列 生物芯片 脂质体 超声聚焦 微喷

中图分类号: TB559; Q735 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2011)11-0231-04

Fabrication of the Liposome Microarrays Based on the Ultrasonic Focusing Microjet System

Han Xin¹ Zhang Bo² Li Sun³ Zhang Deyuan³

(1. School of Agricultural and Food Engineering, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China

2. China Aeronautical Project and Design Institute, Beijing 100120, China

3. Bionic and Micro/Nano/Bio Manufacturing Technology Research Center, Beihang University, Beijing 100191, China)

Abstract

Focusing on the problems existing in the biochip microarray manufacturing methods such as low maintenance in bioactivity, microjet head blockage and high consumption in biological reagent and so on, the ultrasonic transducer and spherical acoustic lens based on ultrasonic focusing microjet head as well as the downward isolated jetting mechanism was designed. Based on this, no nozzle, non blockage, non contact, low consumption and high accuracy was gained in the microarray manufacture. To verify the biocompatibility of the microjet system, the F_0F_1 -ATP molecular-motor assembled liposome microarrays with regular shape and accurate location was prepared. Furthermore, the ATP hydrolysis activity and the ATP synthesis activity of the liposome microarrays were tested respectively. Experimental results indicated that the liposome microarrays fabricated this way showed favorable ATP hydrolysis activity and synthesis activity, which confirmed that the ultrasonic focusing microjet method has favorable biocompatibility in manufacturing biological microarrays. The investigation elaborated here explored a new manufacturing approach for biological microarrays.

Key words Microarray, Biochip, Liposome, Ultrasonic focusing, Microjet

引言

脂质体是由磷脂双层构成的脂质微囊, 由于其

在结构和性能上接近天然生物膜, 因而对绑定和检测各类功能蛋白具有独特能力。将脂质体搭载功能蛋白并实现阵列化和器件化, 可制造生物传感器, 广

泛用于生化检测、疾病诊断、基因筛选以及药物筛选等方面^[1]。高生物活性、高精度、高通量、低成本是脂质体阵列化的重要指标^[2]。目前所采用的阵列化方法多为接触式点样^[3]、接触式喷样^[4]以及以光刻和印章为代表的半导体方法^[5~6]等,但存在生物活性不易保持、易堵塞、试剂用量大等不足。

超声聚焦微喷是一种无喷嘴、无堵塞、非接触、不易破坏生物样品、低样品消耗的先进喷射方式^[7],适用于要求操作过程温和、节约用量的生物微阵列的制作。本文以载有 F_0F_1-ATP 酶的分子马达脂质体^[8]为超声聚焦微喷的实施对象,研究并分析其阵列化工艺性能。

1 超声聚焦微喷系统设计

1.1 超声聚焦微喷头及向下隔离喷射设计

超声聚焦微喷头是超声聚焦微喷系统的核心工作部件,在结构上主要由超声换能器、球面声透镜以及必要的声学阻抗匹配材料和电学阻抗匹配电路构成。其工作原理是:借助球面声透镜将脉冲调制的高频超声波聚焦到自由液面上,在局部范围内形成很高的声压来克服液体表面张力,从而形成微小的液滴并喷射出去,且以该方式喷射出来的液滴直径完全由超声波频率和液体的声学性能决定。本研究设计的超声聚焦微喷头如图 1 所示,所用压电陶瓷片(汕头超声研究所)谐振频率 20 MHz,直径 5 mm,所用球面声透镜球面半径 3 mm。经验证,该微喷头具有良好的微喷能力^[7]。



图 1 实验用超声聚焦微喷头

Fig. 1 Experiment used ultrasonic focusing microjet head

为提高微阵列中各喷点的定位精度,提高阵列密度,同时有效减少昂贵的生物试剂用量,本研究提出了向下隔离喷射的工作方式,如图 2 所示。一方面,在微喷头下方搭建锥形(容积约 0.05 cm³,底面直径为 2 mm)贯通式试剂小池,并通过流道注入所喷射生物试剂,借助液体的表面张力使其形成自由液面而不致下漏;另一方面,在待喷射试剂与换能器间用透明塑料薄膜隔离,利用水作耦合液传递声波。超声聚焦微喷头及向下隔离喷射机构在微动台上的安装位置如图 3 所示。

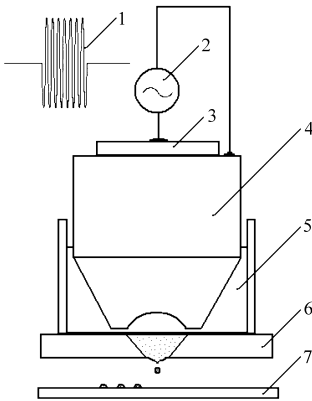


图 2 向下隔离喷射工作原理

Fig. 2 Illustrations of the downward isolated jetting

1. 脉冲调制射频信号 2. 信号源 3. 超声换能器 4. 球面声透镜 5. 耦合液 6. 试剂池 7. 基片

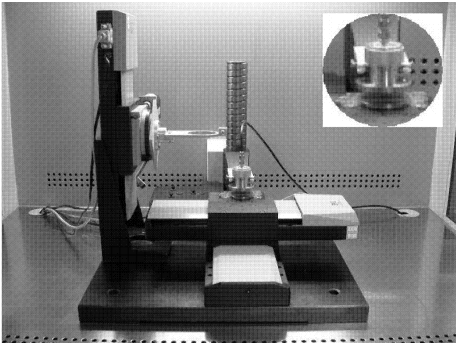


图 3 微喷头及隔离喷射机构安装图

Fig. 3 Installation of the microjet head and the downward isolated jetting mechanism

与向上喷射方式相比,向下隔离喷射有以下优势:①所喷射液滴以加速“坠落”方式到达基片形成喷点,其定位精度将得到有效提高。②由于喷射液滴所需动能的降低,所需脉冲宽度也将减少,而脉宽的减小使得液滴(喷点)直径也相应减小,其结果是除生物试剂减少消耗外,微阵列上喷点的密度进一步提高,这有利于制备高通量的生物芯片。

与现有微阵列生物芯片制备方法相比,超声聚焦微喷有以下优势:①微喷头不与待喷生物试剂发生直接接触,从而有效避免对其生物活性的损害。②由于液面与透镜间的空间必须用液体占据,而以纯水作耦合液取代生物试剂填充该空间,必然有效降低生物试剂用量,进一步降低生物芯片的制作成本。③无喷嘴的喷射方式避免了喷头被生物试剂堵塞现象的发生。

1.2 超声聚焦微喷系统构成

超声聚焦微喷系统主要由环境控制模块、运动控制模块、信号控制模块以及阵列微喷模块 4 部分组成,如图 4 所示。所用主要仪器及参数如下:①洁净度为 100 级,温度、湿度视生物活性保持的需要可调。②微动台:德国 PI 公司 C-844 型直流电动机

微动台,其最小增量位移精度 0.1 μm,全程位移精度 1 μm,最高速度 5 cm/s,最大行程 102 mm。③脉冲信号发生器:南通南锋 NF1511A,脉宽在 0 ~ 100 μs连续可调。④频率控制器:辽宁奥创 RF-600,频率 0 ~ 50 Hz。⑤频率合成器:德国哈迈 HM8134,调制模式为 GATE 模式。

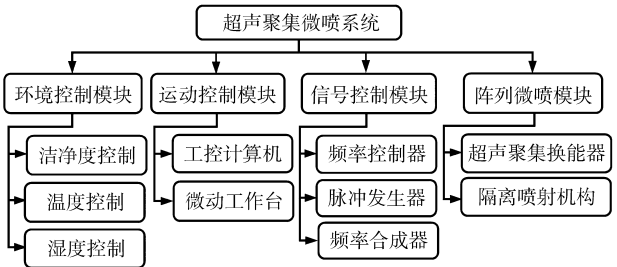


图 4 超声聚焦微喷射系统组成

Fig.4 Composition of the ultrasonic focusing microjet system

2 脂质体阵列超声聚焦微喷射实验

2.1 脂质体微喷射工作液制取

所用脂质体微喷射工作液是载有 F_0F_1 -ATP 酶的脂质体(合酶载色体),该脂质体是一种分子马达脂质体。其制取过程是^[9]:①对工程化嗜盐菌株(*Rhodospirillum rubrum*)细胞采用超声破碎法提取出脂质体。②将所得脂质体进行光敏生物素修饰后,再进行 pH 敏荧光探针(F1300,上海中科)标记处理。③将荧光标记后的脂质体注入 pH 值 8.0 的三甲甘氨酸(Tricine,Amresco Inc.)生物缓冲液并在 4℃下避光保存即得到实验用微喷射工作液。

2.2 超声聚焦微喷射实验

清洗向下隔离喷射机构内试剂池液室,避光加入微喷射工作液。采用试喷法确定超声聚焦微喷头处于可喷射状态,方法如下:设置频率控制器发出频率为 50 Hz、幅值为 2 V RMS 的连续信号输入到脉冲信号源中,产生宽度为 20 μs、幅值为 5 V 的脉冲对频率合成器输出的 20 MHz 信号进行脉冲调制;脉冲调制信号经功率放大后输入给超声聚焦换能器,由此产生频率为 20 MHz、持续 20 μs 的声脉冲;利用微量注射器调整工作液液面,当其位于超声聚焦换能器焦点区域时便可形成 50 Hz 的连续喷射。

采用活化处理后的 Poly-L-Lysine 载玻片(Corning Inc.)作为固定脂质体微阵列的基片,并将其装夹在微动台上。将微喷射系统的喷射频率控制由频率控制器切换到工控机,发出移动指令使微动台按加速—保持—减速的步骤开始运动,加速度最大脉冲频率值 10 000 cm/s²。为确保微动台移动到位并达稳定状态,运动指令发出后,计算机等待 2s 后再发出喷射指令。指令发出后,便在液面形成单个

喷射。设定微阵列行间距和列间距均为 120 μm。经由以上步骤,即可制得脂质体微阵列芯片。

图 5 所示为采用 BK-FL 型荧光显微镜(重庆奥特)采集的脂质体微阵列荧光显微照片。可以看出,采用超声聚焦微喷射方法制备的脂质体微阵列较为规整,行与列排列整齐,喷点呈均匀的圆形;尽管该脂质体微喷射工作液在活化处理后基片上的浸润性较强,铺展面积较大,但喷点独立性较好,彼此间无交叉重叠现象。

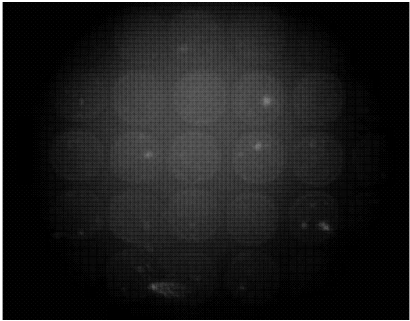


图 5 脂质体微阵列的荧光显微照片(10 × 25)

Fig.5 Fluorescence micrograph of the liposome microarray (10 × 25)

3 结果及分析

以生物活性保持作为检验超声聚焦微喷射制备生物微阵列芯片性能的重要指标。针对微喷射对象 F_0F_1 -ATP 合酶载色体,主要包括 ATP 水解活性检测和 ATP 合成活性检测,其所依据的检测原理是^[1]: F_0F_1 -ATP 合酶载色体作为自然界天然存在的一类分子马达,具有典型的脂质体双层膜结构特征和光生物化学反应功能,其在光照刺激下能够发生光合磷酸化反应产生 ATP(三磷酸腺苷,酸性),而在避光条件下该光合磷酸化反应终止,ATP 会自然水解(反应体系酸性降低)。因此,实验中利用对 pH 值变化敏感的荧光探针 F1300 来探测 F_0F_1 -ATP 合酶载色体在光照与避光条件下的生物活性。这种荧光探针的亮度随 pH 值升高而增强。

所采用的数据采集方法是:通过荧光显微镜连接数码相机(Nikon CoolPix4500)拍摄待测微阵列的荧光亮度随时间变化的序列照片,然后进行图像处理,分割并提取时间序列照片红通道信息,设定灰度阈值 10 滤掉背景杂波,对分割出的 9 个中央阵列点求像素平均灰度。

由于活性检测需在微阵列中进行必要的生化反应,为此,喷射微阵列前应在避光环境下的基板上粘贴打有直径为 5mm 圆孔的胶带,建立加液小池。

实验在中科院生物物理研究所进行。图 6 所示为实验用 F_0F_1 -ATP 合酶载色体的 ATP 水解活性

变化曲线。可以看出,避光条件下荧光探针的亮度随时间逐渐降低,这表示微阵列中脂质体囊泡内侧的 pH 值发生了由高到低的变化,而避光条件下 pH 值变化与 ATP 水解的反应同时发生,从而表明载有 F_0F_1 - ATP 酶的脂质体微阵列具有水解 ATP 的活性。

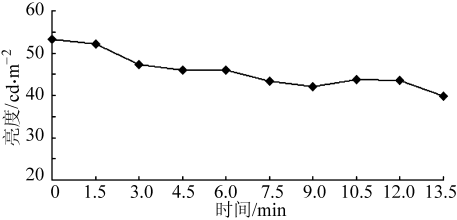


图 6 实测 ATP 水解活性变化曲线

Fig. 6 Curves of the ATP hydrolysis activity

如图 7 所示,将该微阵列在避光、低温、保湿条件下静置 60 h 以使 ATP 发生完全水解,此时观察荧光亮度,发现荧光强度较高;对其光照 1 h 后,发现其荧光亮度大大降低,说明有 ATP 被合成;再次采取避光措施后,荧光亮度又明显增强。该曲线表明微阵列具有合成 ATP 的活性。

上述生物活性检测实验证实,载有 F_0F_1 - ATP 酶的脂质体经超声聚焦微喷后在相关光化学刺激下

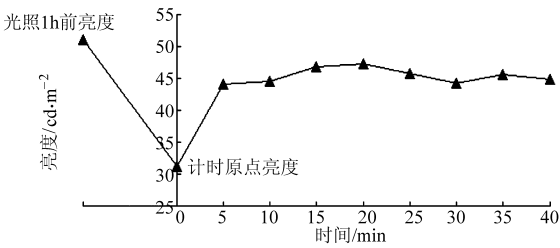


图 7 实测 ATP 合成活性变化曲线

Fig. 7 Curves of the ATP synthesis activity

仍具有良好的水解活性和合成活性,从而证实该方法在制备脂质体微阵列芯片方面具有可行性。

4 结论

(1) 与现有微阵列制备方法相比,超声聚焦微喷技术借助其超声聚焦微喷头及向下隔离喷射设计,能够实现无喷嘴、无堵塞、非接触、低消耗的生物微阵列制备。

(2) F_0F_1 - ATP 合酶载色体生物活性检测结果表明,采用超声聚焦微喷工艺制备出的脂质体微阵列芯片在相关光化学刺激下仍具有良好的 ATP 水解活性和合成活性,从而证实该方法在微阵列生物芯片制备过程中具有较好的生物相容性。

参 考 文 献

1 邓意辉,徐晖. 脂质体[M]. 北京:化学工业出版社,2007:245~260.

2 米勒,罗德. 实验者系列:微阵列芯片[M]. 北京:科学出版社,2007:168~176.

3 赵东,周强,毕树生,等. 用于生物芯片制备的点样机器人系统[J]. 机器人,2002,24(2):149~192.
Zhao Dong, Zhou Qiang, Bi Shusheng, et al. Robot system to make biochip microarrays [J]. Robot, 2002, 24(2): 149 ~ 192. (in Chinese)

4 Patrick Cooley, David Wallace, Bogdan Antohe. Applications of ink-jet printing technology to bioMEMS and microfluidic systems [J]. JALA, 2002, 7 (5): 33~39.

5 Joydeep Lahiri, Steven J Jonas, Anthony G, et al. Lipid microarrays [J]. Biomedical Micro-devices, 2001, 3 (2): 157~164.

6 Hee Yong Shima, Sang Hoon Leea, Dong June Ahna, et al. Micro-patterning of diacetylenic liposomes on glass surfaces [J]. Materials Science and Engineering: C, 2004, 24(1~2): 157~161.

7 张波,蒋永刚,韩鑫,等. 用于制作生物微阵列的压电超声聚焦微喷系统[J]. 压电与声光,2007,29(1):50~52.
Zhang Bo, Jiang Yonggang, Han Xin, et al. A piezoelectric ultrasonic focusing system for jetting biological microarrays [J]. Piezoelectrics & Acoustooptics, 2007, 29(1): 50~52. (in Chinese)

8 崔元波,张英豪,乐加昌,等. 光驱动 F_0F_1 - ATP 合酶复合物顺时针旋转的观察[J]. 科学通报,2004,49(10):971~976.

9 李笋,张波,崔元波,等. 分子马达脂质体阵列化工艺研究[C] //2005 年中国机械工程学会年会论文集,2005.