

DNA 超微量注射及亲水/憎水材料在其中的应用

姜成山, 章云, 杨宜民, 熊红艳

(广东工业大学 自动化所, 广东 广州 510090)

摘要:分析了转基因中 DNA 超微量注射的技术状况及微量流体控制系统的研究现状,给出了用亲水/憎水材料来控制离散微量流体的原理及系统方案。

关键词:DNA 超微量注射;亲水/憎水材料;微流体控制系统

中图分类号: TH38;Q78

文献标识码: A

文章编号: 1007-7162(2000)04-0056-05

转基因是近年来在生命科学领域广泛应用的新兴技术,其基因导入和细胞操作方法大致有两种,化学法和显微操作法。因为化学法常使胚胎形成嵌合体,需要进一步筛选,花费的时间较长,成功率也低,显微操作法导入的外源基因往往是在细胞期就整合到受体染色体上,发育成的体细胞和生殖细胞一般都能整合上外源基因而获得好的表达。因此显微操作法日益受到生物界科研人员的信赖。目前 80% 以上的转基因动物模型都是利用显微注射构建完成的^[1]。

显微注射作为对生物质的外操作,对胚胎发育的影响关乎到两方面的问题,注射针尖对胚胎的机械性损伤;胚胎是否能够容受注射的剂量。注射方式和注射剂量的不同直接影响到胚胎体外发育的存活率乃至影响整个转基因动物的成功率。中山医科大学动物实验中心进行的大量实验表明,注射针尖端直径小于 0.1 μm 时,导致细胞损伤和影响胚胎发育的主要因素是注射剂量的大小^[1]。

目前国内外生物工程界使用的显微操作仪基本上都是由 Olympus、Nikon、Leica、Opton、Bio-Rad 等公司提供的。它一般由显微镜、操作器、作业台 3 个子系统组成^[2]。这些系统中的 DNA 超微量注射都是基于手工经验或开环控制的。前者完全凭操作者的经验进行控制,费时费力,效率低,也不符合现代人机工程学原理;后者为开环控制,在尚未完全掌握出流规律的情况下,控制精度很难保证。

1 流动控制方法分类与微滴的驱动

DNA 超微量注射具有超微量性与个体性的特点,是转基因操作的关键之处。基因液注射的量过少,达不到目的;过多,又容易超过细胞的容受量而使其胀破。同时,为减小注射过程对生物物质造成的机械性损伤,应尽可能缩短注射针在细胞中的停留时间。因此,基因液超微量注射控制技术是转基因微操作系统必须解决的问题。

收稿日期:2000-03-20

基金项目:国家 863 计划(9914-01);广东省重点学科(省 970004)资助项目。

作者简介:姜成山(1975-),男,博士研究生;主要研究方向:微细作业系统,图像处理。

1.1 流动控制方法的分类

实现有效流动控制系统的潜在意义很大,可用以降低粘滞力、改变截面速度形、增加升力、增加/减小紊流度、降低噪音等。

根据能量消耗方式可将流动控制方案分为不需要辅助能量的被动型和需要消耗能量的主动型。主动控制通常需要驱动器,可进一步分为预决定型及反应型两种。预决定型(图1(a))没有传感器,控制环为开式的,控制过程中施加稳定或不稳定的能量而不管流动的具体状况。反应型控制,控制输入量根据系统某一参量的检测值连续进行调节,控制环可以是前向开式的(图1(b)),也可能是反馈闭式的(图1(c))。

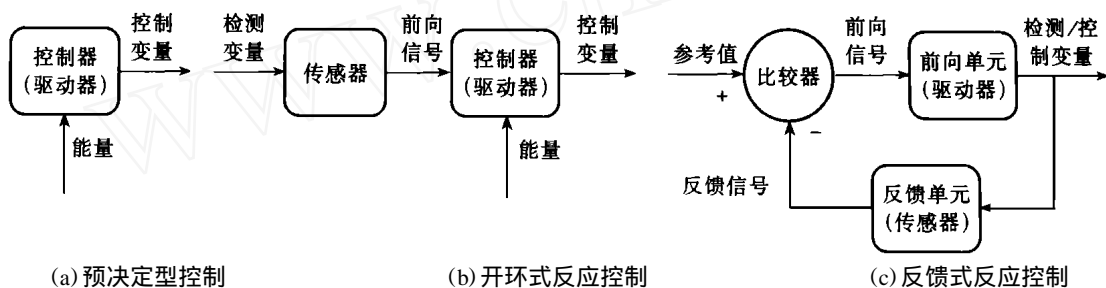


图1 按控制环分类的主动控制类型

前向型控制,检测量与控制量不是同一量。例如可以在上游进行压力、速度的检测,根据一定的控制规律利用检测结果触发驱动器进而又影响下游点的速度。在反馈控制中,必须对控制量进行检测、反馈并与参考输入进行比较。反应型反馈控制可细分为四种类型:适应型、基于物理模型型、基于动态系统型和优化控制型。

1.2 基于MEMS的微滴驱动

布置用以反映微滴量的传感器是用传统的机构来精确定量控制微滴的困难之处。基于MEMS的微量流体控制系统集微型泵、微型阀、微流量传感器等微流体元件于一体,可进行微量流体运动的压力、流量及方向控制,具有传统闭环控制系统的特点,易于集成化与大批量生产。同时,由于尺寸微小可减小流体系统中的无效体积,能耗低且响应快。这些特点非常适合于DNA超微量注射的作业要求,为DNA超微量注射系统的研制指明了方向。但现有的微流体及其控制方面的文献多是基于场的观点对连续流进行理论与实验研究,开发出的微流体器件与微量流体控制系统也多适合于连续流的泵送与控制。完全针对微滴的驱动与控制的文献尚不多。但鉴于微滴的驱动与控制在微全分析系统、超微量注射等方面有着广阔的应用前景,该领域正在受到越来越多的关注。

喷墨打印机中广泛使用的气泡驱动利用了欧姆加热的闪蒸作用,实践证明这种驱动方法是有效的。Burns等^[4]利用温度效应在前、后界面产生的表面张力差来驱动微滴。S. W. Lee等^[6]制作的微注射器可连接在血管内窥镜末端,进行药物注射。注射器包括药物室和驱动器室,两者被中间的硅树脂橡胶膜隔离开。注射器通过喷嘴释放的液体药物量级为 $1\mu\text{L}$ 。Koichi^[3]开发的泵基于流液体、汽两相间的热特性的巨大差异。这种机理的构件结构简单,没有移动件,非常适于微泵。Anderson等^[5]采用微加工的气孔和一半透性憎水膜来定位微升级的采样液体,并用外部气阀对其移动。

DNA超微量注射的另一显著特点是注射过程中涉及的是活的生物物质。因此,在超微量注射控制设备的开发过程中,必须考虑到操作工艺与活的生物物质的兼容性。以上介绍的基于MEMS

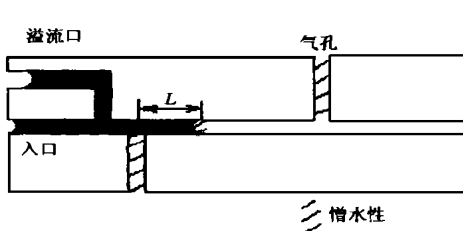
的微滴驱动/控制方法在工艺的兼容性上或注射量上不能适应 DNA 超微量注射. 因此, 有必要探索适合于 DNA 超微量注射的微滴驱动/控制原理与方法. 本文以下介绍亲水/憎水材料在这方面的应用.

2 用亲水/憎水材料控制 DNA 微滴的原理

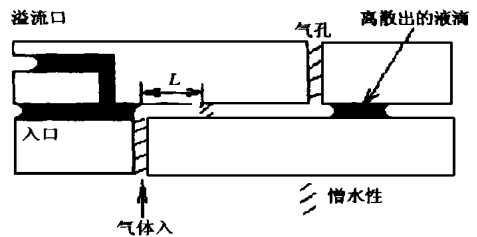
亲水/憎水材料利用了某些物质的亲水/憎水性, 在工程中有着广泛的应用, 以下给出的是利用亲水/憎水涂层控制 DNA 微滴的原理与方案.

2.1 外部气压控制的原理

图 2 为分离并用外气压控制纳升级的液体运动的原理图. 入口处的液体由表面力吸入后, 停留在憎水界面处(图 2(a)). 在憎水侧管注入适当压力的空气, 分离出一长度为 L 微滴, 其体积取决于长度 L 和管道截面积. 为消除气压作用于入口侧产生的不利影响, 可堵住入口和溢流孔或在入口和溢流孔中加载足够量的微滴以增加流动阻力.



(a) 外源气体操作原理图



(b) 外源气体分离、移动/制动液滴示意图

图 2 液体运动原理图

微滴通过下游的憎水气孔后, 空气从气孔逸出而不再驱动液滴. 将气孔堵住就可重新驱动液滴. 将憎水气压施加点、憎水气孔及各种配合的开/闭孔进行适当的组合, 就可来回移动微滴以进行混合, 或将其移动到管道网络中的某一精确位置以完成相应的操作.

2.2 内部产生气压进行控制的原理

除了利用外部气压, 也可用内部产生的气压来完成分离、移动液滴的任务. 连接在主管道的气室中的空气因受热而压力增加(图 3、图 4). 体积为 V 的气室, 压力增加的幅度与温度的增加

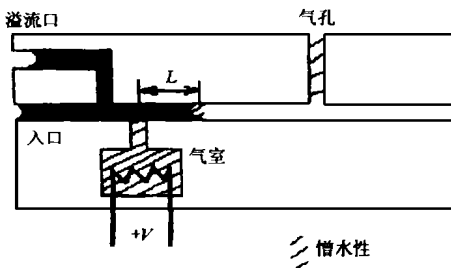


图 3 内气压操作原理图

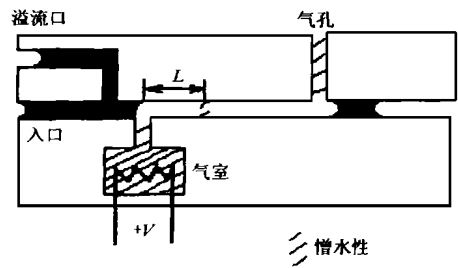


图 4 内气压分离、移动/制动液滴示意图

幅度有关, 可由理想气体关系方程式进行估算:

$$PV = NR T,$$

式中, R 为气体常数, N 为气室中的气体摩尔数.

因为气室体积越小, 压力升高得越快, 因此小的气室有助于提高液滴初始运动的响应速度.

空气受热后,气室中的压力相应增加.适当控制加热温度可将微滴分离并将其移动到憎水段处.这项技术是一项简单的片上驱动机制,利用了蚀刻气室、管道和加热器.其中没有机械移动件,易于制作.

2.3 设置溢流孔的目的

操作过程中,如果将一受控的液体放在入口处,液体前端面就停留在憎水段处.但是,如果液体过量,就可能越过憎水段处.管道截面积越小,越容易产生这种现象.这是由于液体与憎水段的接触角太小,不足以克服将液体注入管道的注射力.特别地,入口处过量液体的凸性产生一高压,会迫使液体越过憎水段处.在结构中设置一溢流孔,进行适当操作就可阻止液体越过憎水段处.

3 系统方案设计

基于上述原理,制作一玻璃-硅键合器件(图5),用以在实验过程中显示微滴注射和移动.上部的玻璃侧刻蚀有管道和气室,下部的硅基底设有加热器和阻性温度传感器.用于实际微量出流控制系统时,如果精度要求不是很高,在保证系统可重复性的前提下,制作一带累加器的闭环系统即可.其中的累加器用于计数系统被驱动的次数.如果对系统出流量精度要求比较高,可在系统中布置反映出流量的流量传感器和积分器.系统中没有机械移动件,易于制作.结构简单、操作工艺与DNA等活体生物物质相兼容是该系统的明显优势.此时,气室气体和温升是设计与制作过程中须慎重处理的关键因素.图6为用亲水/憎水涂层工艺制作的用于控制DNA注射与运动的整体系统原理图.初步实验结果表明设计思想合理,控制效果良好.

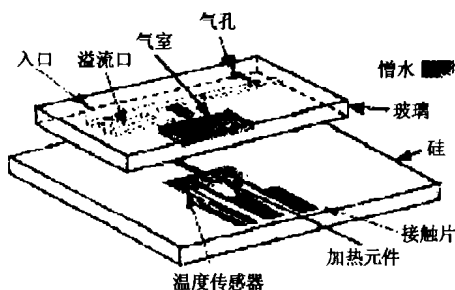


图5 液滴实验器件结构示意图

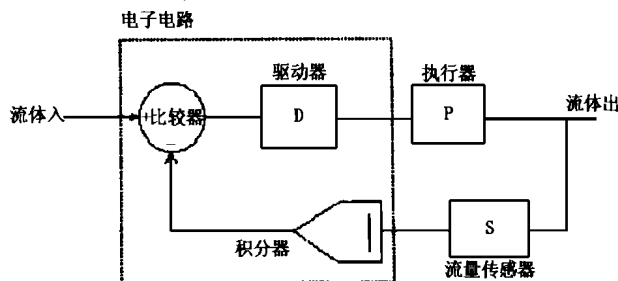


图6 用于控制DNA注射与运动的整体系统原理图

4 结语

转基因是近年来在生物工程领域广泛应用的新兴技术.由于DNA注射具有超微量性、个体性,同时为减小注射针尖对生物物质的机械损伤,需尽量缩短注射针尖在生物物质中的停留时间.目前,基本上都是采用手工经验或开环控制,在注射精度和效率、成功率方面存在诸多问题,尚没有完全适用的方法来进行此操作,极大限制了这项技术的普及和发展.本文给出的基于亲水/憎水材料的控制方案,与DNA超微量注射过程有较好的适用性.但DNA及转基因操作都有其自身的特殊性,对其接口部分尚需做进一步的研究.

参考文献:

- [1]李智,俞生,都同功,黄冰,等. 转基因显微注射的剂量控制与效果分析[J]. 中国实验动物学,1998,8(1):65-69.
- [2]毕树生,宗光华,赵玮,张建勋,等. 生物工程中的微操作机器人系统. 高技术通讯,1998,(11):53-57.
- [3]Koichi OZAKI. Pumping mechanism using periodic phase changes of a fluid[M]. Proc. IEEE microelectromechanical systems workshop,1995. 31-36.
- [4]M A Burns,C H Mastrangelo,T Ss Ssammarco,et al.. Microfabricated structures for integrated DNA analysis[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996,93:5556-5561.
- [5]R C Anderson,G J Bogdan,Z Barniv,T D Dawes,J Winkler,K Roy,et al.. Microfluidic Biochemical Analysis System Transducers 97,pp.477-480,1997.
- [6]S W Lee,O Jeong,S S Yang,et al.. The fabrication of a micro injector actuated by boiling and/or electrolysis[M]. Proc. IEEE microelectromechanical systems workshop,1998,51-56.

DNA Ultramicroinjection and Application of Hydrophilic/ hydrophobic Materials in this Field

JIANG Cheng-shan,ZHANG Yun,YANG Yi-min,XIONG Hong-yan
(Automation Institute,Guangdong University of Technology,Guangzhou 510090,China)

Abstract: The present situation of DNA ultramicroinjection and the research situation of microfluid control systems in gene transfer were first analyzed in this paper. Then the principle and the scheme to control DNA droplet using hydrophobic/ hydrophilic materials were described.

Key words: DNA Ultramicroinjection; Hydrophilic/ hydrophobic materials; Microfluid control system

(上接第 46 页)

An Object-oriented Examination Integration System Based on Web

XU Xiao-yuan
(Computing Center, GDUT, Guangzhou 51009, China)

Abstract: A system developed by object-oriented method can concentratively deal with the examinations for multi-course and multi-class. This integration system consists of test question library, electronic test paper, web examination, grading test paper, score report and statistical analysis. It can be used for both examination and exercise. Because of being based on web, this examination system can be used for not only LAN education, but also Internet remote teaching.

Key words: Internet; Web; Examination; Object-oriented