

以电阻为基础的微电子细胞传感器芯片

陈业 (艾森生物 (杭州) 有限公司, 杭州 310030)

中图分类号: R9- 331

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2008)08-0783-04

由艾森生物 (杭州) 有限公司和艾康生物技术 (杭州) 有限公司联合承担的“杭州高通量新药筛选中心”建设了低、中、高三个通量级别的药物筛选平台。2007年3月, 艾森生物自主研发并且拥有国际专利的抗肿瘤 I 类化学新药——氟莱哌素及氟莱哌素注射液正式上报浙江省食品与药物监督管理局申请新药注册, 并获得国家食品与药物监督管理局的注册受理号。这是药筛中心的第一个研究成果, 该中心的高通量筛选的核心是采用以电阻为基础的装置和检测方法的测试系统。

这个方法涉及到以细胞与分子为基础的生物传感器领域。特别是, 它提供了一种生物传感器装置可以检测电子元件间的电阻变化, 通过电阻的变化, 显示细胞或分子在样品溶液中的存在, 行为, 数量及变化情况。这个传感器装置可以监测细胞或微粒的黏附 (接触), 生长, 移植; 也可以确定细胞接触, 生长与移植的调节器。这个传感器还可以用于分

子的分析与检测。该系统的核心是把微电子细胞传感器芯片整合到表面适于细胞贴附与生长的细胞检测板的底部或细胞浸润迁移板的微孔膜。图 1 演示这个方法的原理:

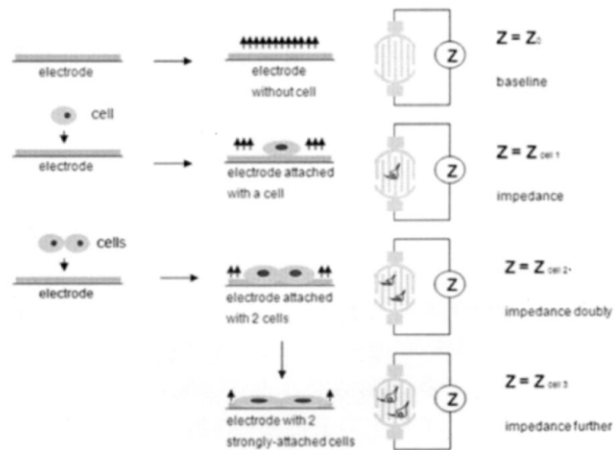


图 1 方法原理演示

作者简介: 陈业, 男, 工程师 Tel (0571) 81751799

微电极阻抗主要由点及周边的离子环境决定,当电场加在上面的时候可以测量到一个基线阻抗。细胞的有无以及贴壁程度的改变都会影响电极传感器表面电子和离子的通过。没有细胞时,检测孔底部排列的微电极阵列的阻抗分布近似均匀;加入细胞后,细胞会和电极表面接触黏附,影响电极和溶液间的离子环境,导致阻抗的升高,细胞越多阻抗增加越多。此外,细胞与电极的相互作用也会影响电阻。细胞在上述表面上的贴壁或生长可引起各个电极阵列的电极结构的阻抗变化。细胞的贴壁程度紧密与否也会使电阻抗发生变化。因此,黏附在电极表面的细胞越多,细胞指数越大。同样的,细胞与电极表面黏附越紧密伸展,电阻抗增加越大。测量电极间阻抗可提供关于电极上细胞生物状态的重要信息。当细胞生物状态发生变化时,系统可以实时并自动获取其模拟电信号,并可以转换成数字信号以进行进一步的分析。电阻抗即反映为细胞指数的值,在多种实验中用于指示细胞生长、伸展、形态变化、死亡和贴壁程度等一系列生理状态。

本系统的主要优点在于:

- 高信息量:可连续检测生物反应的全过程,提供大量重要的动态反应信息。
- 无标记:分析无需昂贵的标记或报告。
- 无创伤:电子检测不会干扰细胞生长和分析。
- 高准确度和精确度:定量衡量细胞生长,提供高于2个数量级的动态范围,孔对孔 CV通常低于5%。
- 自动实时检测:整个实验过程自动收集数据,实时分析,大大改善仅仅在最终点分析的结果。以下我们通过几个典型案例来了解它在具体实践中的应用:

案例一:通过电阻的检测(分析)来定量探测本装置中的纤连蛋白。

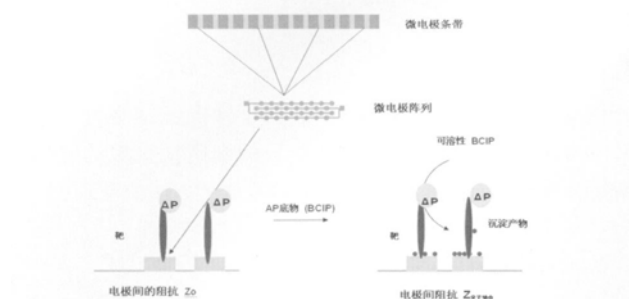


图2 案例一演示图

当样本加入到塑料孔中后,电极结构单位被暴露于实验液体样本中。不同数量的纤连蛋白(5 ng, 500 pg和50 pg)被加入到塑料孔中,并在室温下孵育2 h。这个孵育的步骤导致装置的表面被覆盖上了一层纤连蛋白分子。装置的表面再用3%奶粉在室温下封闭1 h。再用PBS简单洗涤后,鼠抗纤连蛋白(1:200稀释)被加入到装置中4℃下孵育过夜。过夜的孵育导致装置表面的纤连蛋白与鼠抗纤连蛋白分子相连。清洗过后,AP标记的羊抗鼠IgG被加入,在室温下孵育1 h,然后充分洗涤。这个1 h的孵育的导致AP标记的羊抗鼠IgG与鼠抗纤连蛋白在装置表面相结合。碱性磷酸酶BCIP/NBT(来自Sigma, BCIP: 5-brom o-4-chloro-3-indoyl

phosphate; NBT:四唑氮蓝)被加入到溶液中,塑料孔中电极结构间的电阻被电阻检测仪所检测。AP介导的反应(AP的底物BCIP/NBT已被加入到沉淀中)在电极结构单位表面产生沉淀。这种沉淀导致电极结构单位间电阻的增加。随着时间的推移更加多的沉淀在电极表面产生,更加高的电阻被检测到。在图形中可看到加入底物BCIP/NBT 30 min后有明显的电阻的改变。在图示中可以看到这个装置可以检测到装置表面覆盖的少于(少至)50 pg的纤连蛋白。

案例二:检测和辨别DNA核苷代入法。

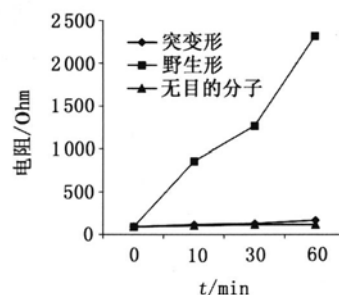


图3 用ACEA仪检测单个DNA核苷突变

在使用前,装置的表面用1M HCl处理15 min,再用去离子纯净水处理。三个衣原体16S核糖体的特异寡聚核苷酸序列(添加号为D85722)在实验中被合成。它们是(1)一个40碱基对长度,5'末端巯基化改良的俘获寡聚核苷酸序列(5'-ZZZZGATTGAGCGTACCAGGTAAAGAAGCACCGGCTA-ACTCCG), (2)一个20个碱基对长度,5'末端生物素标记的野生型目的寡聚核苷酸序列(5'-bio-CGGTGCTCTTTACCTGGTA)和(3)一个20碱基对长度,5'末端生物素标记,单核苷酸替代的目的寡聚核苷酸序列和(C到A在9号位上)。在这个实验中,俘获寡聚核苷酸序列溶解在去离子水中,浓缩为2M。Tonya M Heme和Michael J Tarlov^[1]报道了一种更好的DNA被覆效率(在1 mol·L⁻¹ KH₂PO₄比H₂O更好)为了将寡聚核苷酸序列覆到传感器表面,100 μL 2的俘获寡聚核苷酸被加入到每个传感器中,室温下孵育2 h,再用PBS进行清洗。清洗后,传感器表面用0.3% BSA封闭30 min,再用PBS清洗。为了与DNA杂交,在杂交液(1.0 mol·L⁻¹ NaCl和10 mmol·L⁻¹ Tris buffer, pH 7.4和1 mmol·L⁻¹ EDTA)中加入100 μL 1 nM野生型或1 nM突变型寡聚核苷酸序列,而后加入俘获寡聚核苷酸覆盖的传感器。作为非特异性对照,目的DNA不被加入。杂交在42℃进行30 min,再用含50 mmol·L⁻¹ NaCl的磷酸盐溶液清洗。为了检测DNA杂交和辨别单核苷酸替代,100 μL链霉亲和素标记的碱性磷酸酶(Tris缓冲液1:2000稀释)被加入到每个传感器中,并在室温下孵育30 min,再用Tris缓冲液清洗。清洗后,100 μL碱性磷酸酶底物混合物,BCIP/NBT被加入并且反应可以通过即时(时实)的电阻检测检测而被监测到。从外形上来看,在俘获序列和野生型目的序列之间的特殊杂交(杂合)物可以在电极装置上被稳定的检测到,在60 min时,感受器上杂合物的信号高于非特异性对照产生的信号92.6倍。这里的信号是在5 kHz下每个孔中的电极结构之

间电阻。特别的,由单核苷酸序列替代产生的突变序列与野生型的序列相比仅产生了非常微弱的信号。60 min时,野生型序列产生的信号是突变型产生的信号的 30倍。

案例三:实时监测细胞的增殖。

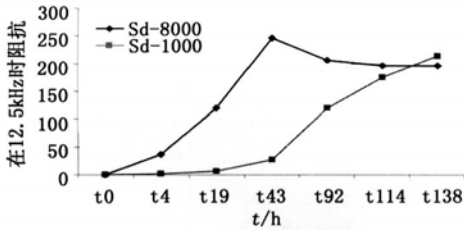


图 4 细胞生长曲线

PAE细胞以不同的密度(8,000细胞·孔⁻¹或1,000个细胞·孔⁻¹)接种到有涂层的电极上。为了监测细胞的增殖,电阻与电抗在不同的时间间隔上被检测。“t0”指示了接种细胞后的即时检测。电阻值的增加指示了随着培养时间两个接种密度的细胞的增殖情况。高接种密度的细胞要比低接种密度的细胞快的多。Sd:接种密度。

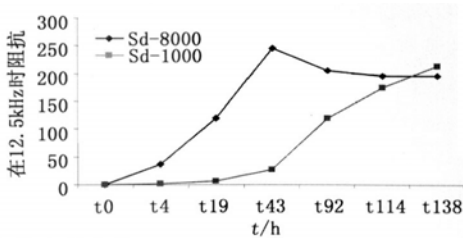


图 5 细胞生长曲线

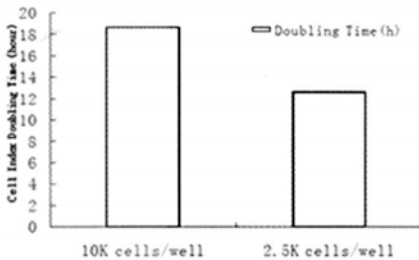


图 6 细胞倍增时间

将癌细胞 H460 以不同密度(2 000个细胞·孔⁻¹及10 000个细胞·孔⁻¹)接种,系统可以实时自动监测细胞的生长曲线,见图 5。从数据中可以计算出细胞指数倍增时间,表明了细胞倍增时间,见图 6。从系统获得的数据与 ATP 含量检测实验一致。

案例四:利用测试装置和 MTT检测定量检测细胞。

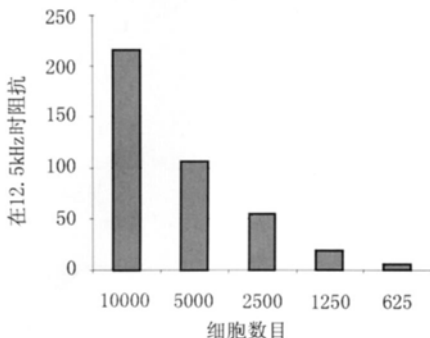


图 7 检测板 NIH3T3细胞定量

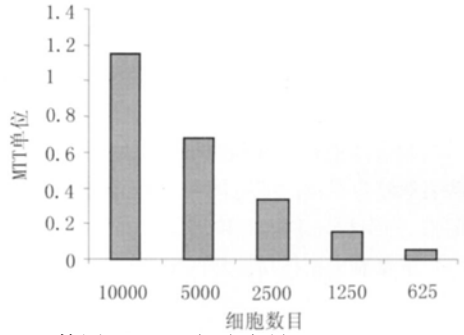


图 8 MTT检测 NIH3T3细胞定量

连续稀释 NIH3T3细胞(10 000个细胞,5 000个细胞,2 500个细胞,1 250个细胞和 625个细胞),接种入纤维素素覆盖的测试装置或 96孔培养板中。利用装置的检测,电阻在接种 16 h后被检测。对于 MTT检测,接种 16 h后细胞被 MTT染色,而后在 ELISA 板上 540 nm处读数。如图 7和 8所示,装置可以定量的检测细胞数目的改变。两种方法的结果是非常一致的。

案例五:系统可用于实时定量检测细胞的贴壁和增殖状况。

由于细胞固有的黏附性质,细胞形态及细胞分裂速率不同,原代细胞和培养细胞株显示完全不同的黏附和生长动态曲线。不同来源、代数的 HUVEC细胞呈现完全不同的特征。

案例六:系统可动态监测化合物介导的细胞毒作用及起作用时间。

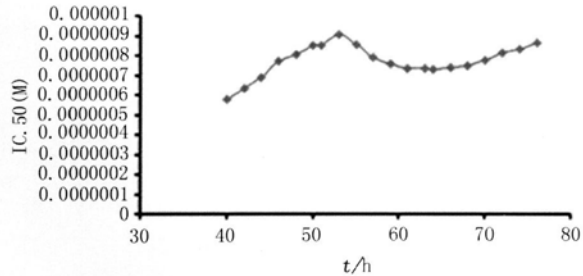


图 9 实时 IC50值

将蛋白酶抑制剂 MGI 32加至已接种于微电子检测板上生长的 H460肺癌细胞中。经实时监测可知化合物的细胞毒作用可计算出实时的 IC50值,见图 9。

使用该方法系统亦可获得化合物的特征曲线,见图 10。由系统所得到的实时阻抗数据可用于产生依赖于化合物生物学机制的特征曲线。在此例中,具有不同生物学机制的化合物使 A549肺癌细胞产生不同的特征性曲线。这些特征可能用于预测未知活性的化合物的可能活性。

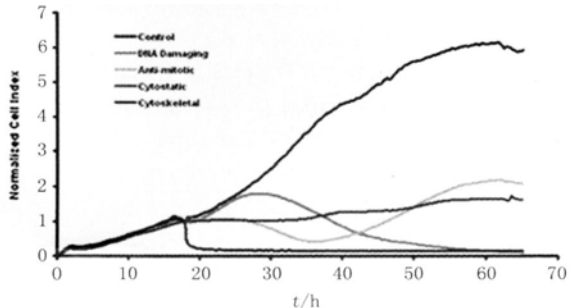


图 10 化合物特征曲线

案例七:实时监测细胞介导的细胞毒作用。

将 A549 肿瘤细胞接种于微电子检测板中生长约 45 h, 加入不同浓度的自然杀伤细胞 NK - 92。系统可监测 NK - 92 细胞对 A549 细胞的细胞毒性作用, 见图 11。

实时监测抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 的检测。将表达特定受体的细胞接种于电子检测板的孔中。在图示时间点, 分别加入 PBMC 和不同浓度的特异性抗体。数据可见在目的细胞中抗体所介导的 PBMC 毒性作用, 见图 12。

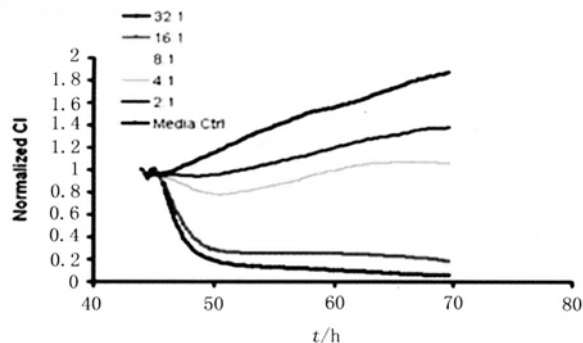


图 11 不同浓度 NK - 92 细胞的毒性作用

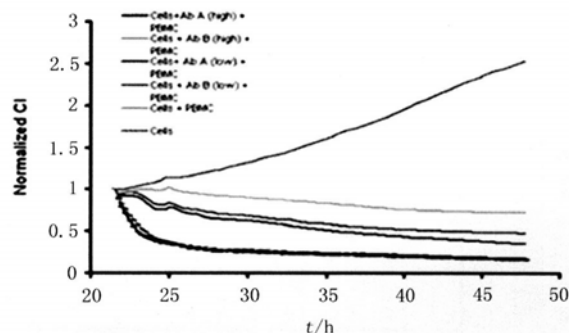


图 12 特异性抗体所介导的 PBMC 毒性作用

案例八:实时监测细胞黏附及伸展过程。

可用基质蛋白以及抗体包被电极传感器。将 NIH3T3 细胞接种于多聚 L 赖氨酸或者纤连蛋白包被的电子检测板的孔中, 可实时监测与细胞形态变化相应的细胞贴壁与伸展状况。

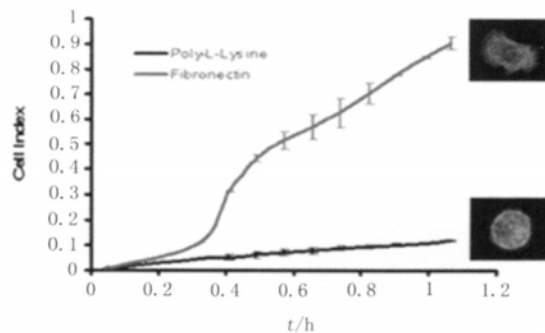


图 13 细胞贴壁与伸展状况

基于以上这些优点, 使它的应用领域很广泛。包括: 抗肿瘤药物筛选和研制, 抗肿瘤转移药物筛选和研究, 抗肿瘤药物疗效观察, G 蛋白偶联受体相关疾病药物的筛选和研究, 药物毒理学分析, 现代中药的开发和药理机制分析, 基因诊断及药物疗效的基因学分析, 细胞生长、分裂和死亡的机制研究, 细胞生长、分化微环境研究, 细胞表面受体配体结合研究, 细胞生长因子的生物学功能研究, 基因功能研究等。必将在未来的生物领域发挥重要作用。

参考文献

- [1] HERNE T M, TARLOV M J. Characterization of DAN Probes Immobilized on Gold Surfaces[J]. J Am Chem Soc, 1997, 119: 8916-8920.