

用于批量快速筛选最佳低温保存程序的生物芯片技术

于丽娜¹ 刘静¹ 周一欣¹ 华泽钊²

(¹中国科学院理化技术研究所 北京 100080)

(²上海理工大学动力工程学院 上海 200093)

摘要:低温生物学应用中,筛选最佳的冻结、复温程序以及相应的保护剂配方,通常需要大量繁琐、费时且高度重复性的测试工作。将样品准备及其活性检测功能加以集成,首次在低温保存程序优化方面引入了生物芯片技术的概念。设计制作了相应的原型器件并开展实验研究。结果表明,流道式芯片用于样品分配时效果不佳,而点样式芯片则可实现快速、可靠的样品加载,红外实验进一步表明其传热一致性较好。在此基础上,利用点样式芯片与集成化的半导体制冷器件相结合,对多种生物样品的低温冷冻及复温效果进行了测试,基于对结果的比较分析可以筛选出最优的降温、复温程序及低温保护剂浓度配比。此外,还对批量测定低温保护剂溶液的热物性也进行了考察。研究表明,借助于功能集成化及检测自动化的生物芯片,可以实现大规模快速优化复杂低温保存程序。

关键词:生物芯片 低温保存 活性检测 冷冻损伤 生物材料 微分析系统

中图分类号: TB 611 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6516(2006)01-0021-06

Biological chip technology for quickly batch selecting optimum cryopreservation procedure

Yu Lina¹ Liu Jing¹ Zhou Yixin¹ Hua Zezhao²

(¹ Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(² School of Power Engineering, Shanghai University for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: In the practices of cryobiology, selection of an optimum freeze/thawing program and idealistic cryo-protective agent often requests rather tedious, time consuming and repetitive tests. Integrating the functions of sample preparation and viability detection, the concept of biochip technology to the field of cryopreservation, aiming to quickly find out an optimum freezing and thawing program is introduced. The prototype devices were fabricated and the corresponding experimental tests were performed. It was shown that microflow-channel chip could not realize a high quality solution distribution. As an alternative, the spot-dropping chip provides an excellent way to load the sample quickly and reliably. Infrared thermal mapping on such a chip shows that it has a rather uniform heat transfer boundary. Applying the spot-dropping chip combined with the semiconductor cooling device, the final output of cryopreservation of multiple samples was tested, and the optimal freeze/thawing program as well as the potentially best concentration of the cryo-protective agent was found out by analyzing the results. The application of this technique to measure

收稿日期: 2005-07-23; 修订日期: 2006-01-09

基金项目: 国家自然科学基金(50575219及50436030)资助项目。

作者简介: 于丽娜,女,26岁,硕士。

the thermo-physical properties of the cryoprotective agent was investigated. This study demonstrates that the biochip with integrated automatic loading and the inspection units can make it possible for massive optimization on the complex cryopreservation program to be a much quick and economic way.

Key words: biological chip; cryopreservation; viability evaluation; freeze injury; biological material; micro analysis system

1 引言

低温冻存技术是实现生物材料长期保存的重要方法,在组织工程、器官移植等领域有广泛应用。生物材料可以在低温下长期保存,但却极易在降温 and 复温过程中受溶液冻结、融化以及溶液渗透压变化等因素的作用而损伤^[1~8]。根据 Mazur“两因素损伤”假说,对于不同的生物样品,均存在一个最佳冷却速率,可使其损伤最小^[6,9]。另一方面,低温保护剂的引入虽可大大减小生物材料的低温损伤,但不合适的浓度则对保存无益甚至会对细胞产生毒性^[4,10]。因此,建立合适的保存程序及添加理想的保护剂是成功保存生物材料的关键。

围绕这些问题,学术界进行了大量研究,但以往工作大多是针对某种生物样品开展降温试验,或添加特定保护剂予以考察,得出的结果不具有普遍性。要想筛选出最佳的低温保存程序及低温保护剂配比,通常需要依赖于大量繁琐、耗费昂贵的重复性检测^[11,12]。因此,若能将保存过程中各个环节结合起来,发展快速、廉价而有效的生物样品最佳低温保存程序筛选措施,对于推动低温生物医学技术的进步具有重要意义。本课题借鉴生物芯片技术的概念,对上述问题提出了相应的解决方案^[13],并发展了两种用于筛选低温保存程序的芯片装置。本文报道其中的一些研究结果。

2 微流道式芯片分配流体特性

为实现样品、水溶液及低温保护剂按一定比例进行快速分配,设计了一种微流道式芯片。图 1 给出一种 4 级分叉结构,流体可在其中完成从一份来流分配为多份流体。微流道入口和出口处设置有微阀门,以控制流体的导入和排出。样品阵列容器对应于微流道的输出末端,样品与保护剂在此处掺混。虽然,该结构以往在大量的生化分析中得到重要应用^[14],但本文实验表明,这一流道不易实现流体的均匀分配。究其原因,主要是由于流道各个通路的流动阻力不同

所致。为此,应重新设计流道,以保证流体的均匀分配。研究了另一种快速实施流体分配的方法——点样法。

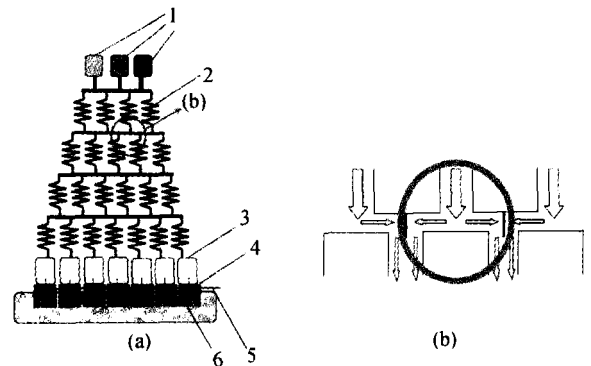


图 1 流道式分析芯片示意

(a) 总体结构; (b) 局部流道放大图

1. 溶液进口; 2. 微流道; 3. 样品阵列容器; 4. 温度传感器;
5. Peltier半导体制冷元件; 6. 散热肋片。

Fig 1 Schematic for microflow channel analytical chip (a) Profile; (b) Channel detail

3 点样式芯片实验

3.1 装置原理与实现方法

参照生物芯片进行样品分配的方法,设计了微孔阵列容器,并采用微注射器进行点样,实现低温保护剂和样品的均匀分配。在样品活性评价方面,可在微孔阵列容器中设置测温装置,并采用前期发展的降温动力学曲线法来筛选低温保护剂最佳浓度和降温程序^[15]。由于生物样品的相变冻结温度强烈地依赖于细胞膜脂双层的组分、链长及饱和度,因而经受损伤后,其降温曲线会与正常者存在大的偏离。因而,取一定量经过冻结并复温后的样品再度进行降温,比较其降温曲线与正常样品降温曲线之间的偏离度,即可对所冻存的样品活性或损伤程度作出定量评价。这一操作十分简单,测试结果不会因人而异,定量化程度高,而且对于几乎所有的冻存生物样品均适用。

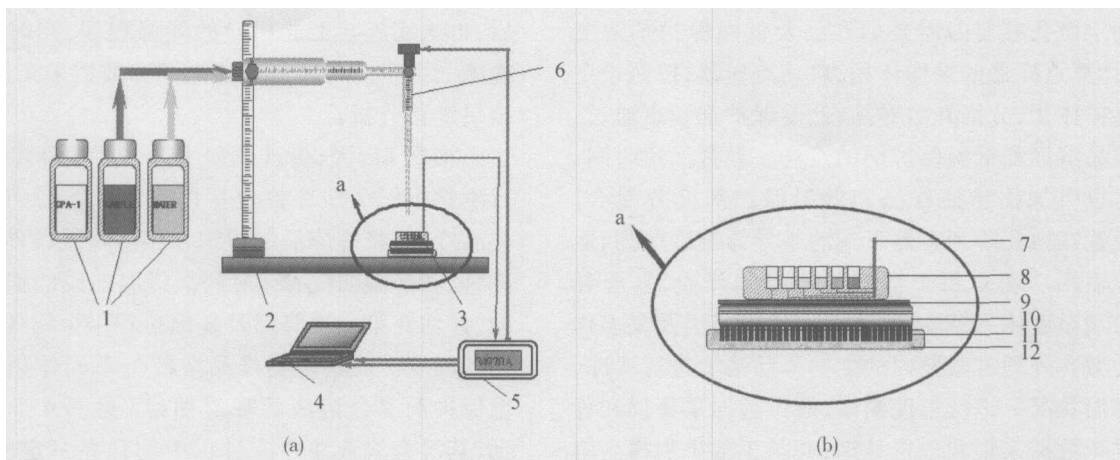


图 2 点样分析系统结构示意图 (a) 系统组成; (b) 分析芯片

- 1. 储液罐; 2. 点样台; 3. 分析芯片; 4. 计算机; 5. 数据采集仪; 6. 自动点样器;
- 7. 温度传感器; 8. 微孔阵列容器; 9. 铜片; 10. 半导体制冷片; 11. 散热器; 12. 冷却水。

Fig 2 Schematic for spot - dropping analytical chip system (a) Profile; (b) Analytical chip

点样式芯片实验装置如图 2a 所示。该装置可以完成样品和低温保护剂的点样、冷冻、复温及评价功能,其中,微孔阵列容器用以盛装样品和低温保护剂的混合溶液,内设温度传感器,下置半导体制冷器(其相对位置见图 2b)。半导体制冷器与样品阵列容器之间填充有高导热性硅油,以减小接触热阻。实验中采用了对各个样品容器统一降温的方法,即将样品阵列容器置于一个半导体制冷器上,各样品容器的底面降温速率一致。当调制冷冷器的电流大小时,每个样品容器的制冷速率均改变。这种降温方法可以对整个芯片实施整体降温、升温,保证所有样品的降温、升温条件一致。

实验中采用的样品容器由不锈钢板作为基底,在其上加工出 6 个直径为 6 mm 深 3 mm 的圆柱形孔。加工时应保证底面和圆柱孔内部平整,以确保容器阵列与制冷器间接触良好,从而达到较均匀的降温性能。图 3a 所示为圆形孔阵列的试验装置图。温度传感器选用 T 型(即铜 - 康铜式热电偶),所有的热电偶使用前均用冰水混合物校准过,误差控制在 ± 0.1 以内。热电偶安置在圆柱形孔的底部中心处,但不与底面接触,热电偶头部置于样品之中,用于检测实验过程中样品的温度变化。实验中温度的测量通过美国 Agilent 公司生产的 48 通道 34970 数据采集仪实现。

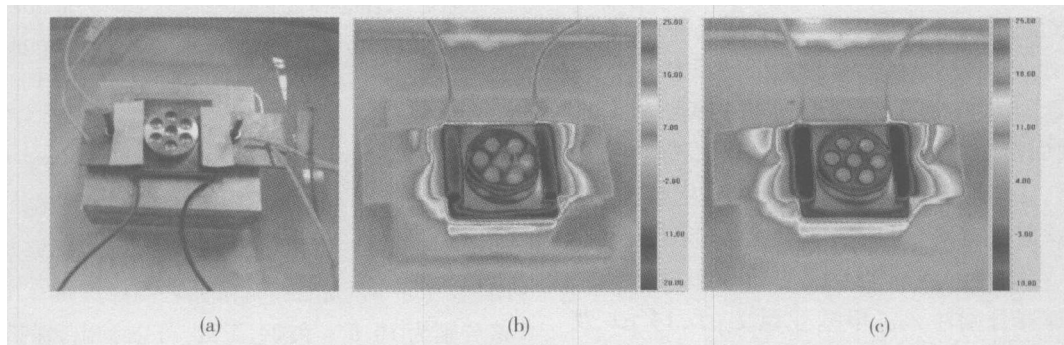


图 3 圆形微孔阵列容器及其均温性刻画 (a) 器件; (b) 降温热图; (c) 复温热图

Fig 3 Micro hole container array and characterization on its temperature uniformity (a) Device; (b) Infrared temperature mapping during freezing; (c) Infrared temperature mapping during rewarming

使用时,将待筛选生物样品溶液及低温保护剂分别加入储液罐 1 的各个容器中,根据低温保护剂的种

类或浓度进行容器个数的增减,保证不同种低温保护剂采用不同的容器,并用导管将其分别与点样器相

连。确定微孔容器内需要的样品及低温保护剂浓度配比,计算点样器的采样体积,启动点样器,按照设定好的点样体积,分别开启样品、低温保护剂和水通道,完成样品溶液和低温保护剂的点样。静置一定时间,需要时也可加摇床使样品和低温保护剂充分混合。启动设置在微孔阵列容器下端的半导体制冷阵列,通过调节输入功率对每个微容器池启动降温、复温程序。启动温度传感器阵列,再次对完成降温及复温作用后的微孔阵列容器池内的生物样品溶液进行冷冻,并在降温状况下进行温度测量,通过数据采集仪和计算机进行数据采集和分析处理,并与正常生物样品溶液的降温曲线进行比较,得出相差最小的生物样品所采用的低温保存程序,即为最合适的低温保存程序。

3.2 红外热像法评价样品阵列容器温度分布均匀性

图 3b 给出了 3 A 制冷电流下,样品阵列容器在 2 min 时的红外热像图。从中可以看出,样品容器的底面温度基本一致。由于红外热像仪具有较高的空间温度分辨率(0.06 °C),由此可以认为,样品阵列容器在冷冻过程中的降温一致性较好。图 3c 为制冷电流 3 A 情况下的制冷器停止工作后,样品阵列容器在空气中复温 1 min 时的红外热像图。可以看到,复温过程中样品阵列容器的底面温度分布相当均一。这就为生物样品和低温保护剂混合溶液实现统一的降温升温条件提供了保证,排除了进行最佳保存程序的筛选过程中样品容器边界条件不一致造成的不确定性因素。

3.3 筛选生物样品最佳低温保护剂体积分数实验

为验证采用芯片快速分析低温保存程序的有效性,以蛋清作为样品,在特定的降温程序下进行了低温保护剂浓度的筛选试验。其中采用二甲基亚砜(DMSO)与水的混合物为低温保护剂。具体过程如下:将一定量蛋清溶液、低温保护剂二甲基亚砜和水分别加入到如图 2 所示的样品储液罐、低温保护剂容器和水容器,并用导管与点样器相联接。为便于比较实验结果,这里仅考察 3 种典型低温保护剂体积分数配比情况。在微孔阵列样品容器中选择相间的 3 个微孔,用点样器分别注入二甲基亚砜 7 μL 、14 μL 及 21 μL ,对应容器水的注入容积分别为 21 μL 、14 μL 及 7 μL ,这样即得到纯水、体积分数为 25%、50% 和 75% 的二甲基亚砜水溶液各 28 μL 。加入 28 μL 的蛋清溶液,摇动使样品和低温保护剂充分混合,静置 5 min。开启数据采集仪,进行温度记录。稳定 1 min 后开启制冷器电源,保持 3 A 电流,制冷 3 min。然后关闭制冷器电源,使样品在空气中自然复温。待完毕

后,再次实施与上述相同的降温程序,同时进行温度检测。完毕后关闭制冷器电源和数据采集仪,对实验结果进行分析。

根据 Liu 及 Zhou 的研究^[15],利用降温曲线法进行生物组织活性评价包括以下两个步骤:1. 取新鲜样品冷冻,将冷冻后的组织在相同降温条件下再次冷冻,监测降温曲线;2. 对两次降温曲线的偏差进行比较,评估在第一次降温及复温过程中生物样品受到损伤的程度。观察生物样品溶液与不同体积分数的低温保护剂混合溶液的降温曲线(见图 4、5),可以看到,其混合溶液在冷冻过程中均存在一定的过冷度,达到最大过冷度时,由于相变释热,低温保护剂水溶液的温度曲线将出现温度突跳。当样品受到损伤后,生物样品由于其内部组织结构改变,引起热物理性质的改变,表现在降温曲线上,可以看到相变的温度突跳时间点与未损伤的样品存在很大差异,其偏离度反映了低温损伤的程度^[15]。

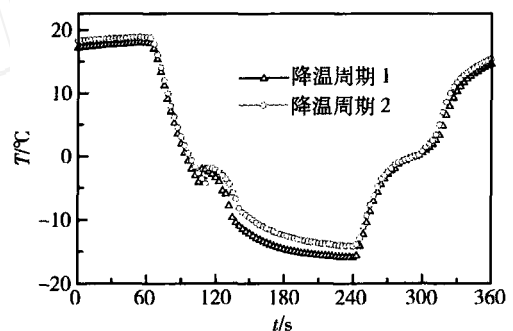


图 4 生物样品与低温保护剂混合溶液降温曲线(低温保护剂体积分数 25%)

Fig 4 Temperature decreasing curve for the solution mixture between biological sample and cryoprotectant (at concentration of 25%)

从图 4 可以看出,低温保护剂体积分数为 25% 时,两冷冻循环的温度突跳点分别出现在 106.5 s 和 112 s,相差 5.5 s。而保护剂体积分数为 50% (结果未示出) 和 75% 时(见图 5),两循环温度突跳点出现的时间差分别为 10.5 s 和 24.5 s。可以看出,保护剂体分数为 25% 时,两降温曲线相差最小,降温曲线中温度突跳点的出现时间也相差最小;相反,当保护剂体分数为 75% 时,降温曲线中温度突跳点的出现时间则相差最大。按照活性评价准则,可以认为在该降温速率(约为 10 °C/min)下,样品在低温保护剂体积分数为 25% 时受到的冷冻损伤较小,样品的活性较高。

利用上述方法还可以增加实验的样本容量,每组

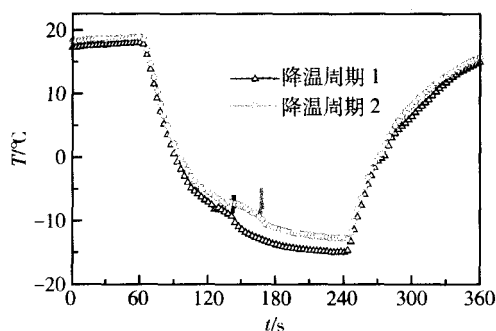


图 5 样品与低温保护剂混合溶液
降温曲线 (低温保护剂体积分数 75%)

Fig 5 Temperature decreasing curve for the solution mixture between biological sample and cryoprotectant agent (at concentration of 75%)

实验采取更多的低温保护剂体积分数配比进行实验,以筛选最合适的低温保护剂体积分数。也应指出,生物样品对低温保护剂体积分数的敏感性决定了本实验方法的灵敏度,因此,利用降温曲线方法可以识别出的低温保护剂体积分数差异的最小值需要今后进一步通过实验测定。

3.4 低温保护剂过冷度测量实验与结果分析

上述点样冷冻系统不仅可以进行保护剂不同体积分数的快速分配,还可对降温过程进行检测,因此除完成不同低温保护剂体积分数下生物活性的快速测试,还可用于测量不同体积分数保护剂的过冷度等热物理性质。这在低温生物学中也是十分基础、重要的工作。以 3 个不同体积分数的低温保护剂水溶液的实验为例,说明这类应用的实验过程及初步结果。

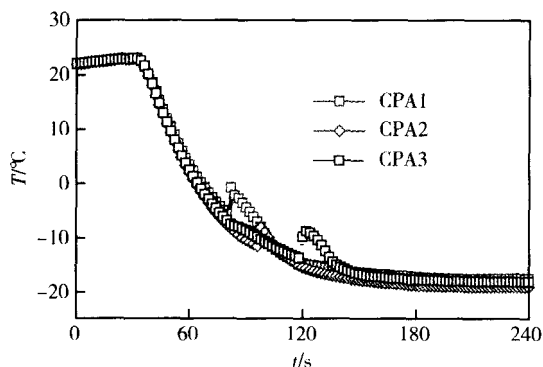


图 6 不同体积分数低温保护剂 (DM SO)
水溶液降温过程曲线

Fig 6 Temperature decreasing curve for water solution uploaded with cryoprotectant agent DM SO at different concentrations

实验方法与前述类似,在微孔阵列样品容器中选择相隔的 3 个微孔,用点样器分别注入体积比体积分数为 50% 的二甲基亚砷 (DMSO) 溶液 7 μL , 14 μL 和 28 μL , 对应容器水的注入容积分别为 28 μL , 21 μL 和 7 μL , 这样就得到了纯水、体积分数为 10%, 20% 和 40% 的 DMSO 水溶液各 35 μL 。借助摇动使样品和低温保护剂充分混合,静置 5 min。开启数据采集仪,进行温度记录。稳定 0.5 min 后开启制冷器电源,保持 3 A 电流,制冷 3 min。然后关闭制冷器电源,使样品在空气中自然复温,之后关闭数据采集仪,对实验结果进行分析。

如图 6 所示,不同 DMSO 水溶液在冷冻过程中均存在一定的过冷度,达到最大过冷度时,由于相变释热,低温保护剂水溶液的温度曲线也会出现温度突跳。在不同体积分数 DMSO 的降温过程中,最大过冷度的值和出现的时间不同。在体积分数为 10% 时,最大过冷度为 -6.11,而在体积分数为 20% 和 40% 时,其值为 -11.47 和 -13.72。可以看出,随着 DMSO 体积分数的增大,溶液的最大过冷度增大。这在以往的 DMSO 溶液的热物理性质测量中也是得到了证实的。最大过冷度反映了低温保护剂的结冰状况,直接决定了低温保护剂的性质和生物材料的冻存效果,是生物材料低温保存中需要测量的重要参数。特别是当低温保护剂溶液由多种组分构成时,其热物理性质未知,需要通过大量的重复实验进行测量。利用该点样冷冻系统可以快速分配多种组分的低温保护剂溶液,直接测出最大过冷度等重要参数。

4 讨论

上述试验中,热电偶置于样品阵列容器的底部,贴近但不接触底面。尽管各个容器中热电偶测温点位置相对固定,但其彼此位置的不一致性也在一定程度上对测温造成影响。文献 [15] 给出了水滴测温点的改变对温度影响的实验曲线,可以看到,测温位置对整个装置的测量精度影响明显。今后的应用中应注意这一现象,对热电偶进行精确定位,同时,将各个容器中的热电偶进行温度校验,纠正由于测温位置不同而导致的偏差。

另外,本课题采用的降温装置也可进一步改进,包括采用专门的程序降温仪,严格进行降温速率的控制;应对装置加隔热屏和保护罩,以隔绝由于外界辐射和对流引起的干扰,提高测量精度。进行低温保存程序筛选优化的样品不仅限于液态样品,也可以是固

态样品通过粉碎或切削而成的小块。而检测样品活性的方法也可有其他选择,如电阻抗测量法等。这只需要在现有装置上进行改进,安置检测电极,就可实现温度、电阻抗的同时检测。由此获得的生物活性的信息将更加全面、准确。

值得指出的是,在本课题中先进行了低温保护剂溶液的配备,再将生物样品加入,摇动使其混合均匀,对各个容器内的生物样品采用了相同的低温保护剂渗透时间。事实上,先加入生物样品,然后控制低温保护剂的加入顺序和时间,可以对不同的低温保护剂采取不同的渗透时间,以使低温保护剂的作用效果多样化,从而比较不同渗透时间下的低温保存效果的差别。也可以同时控制和监测降温过程,在降温过程中进行低温保护剂的加载,测试不同的加载温度对生物样品低温保存效果的影响。这些工作有待于今后进一步展开。

5 小结

将生物样品分配和活性检测装置加以集成化和微型化,提出了用以筛选生物材料低温保存程序的芯片技术。实验表明,流道式芯片不利于样品的均匀分配,而点样式芯片加载样品则快速、可靠,且样品室在降温、升温过程中底面温度均一,传热边界一致性较好。利用该点样冷冻系统进行实验,可以得到在特定降温、复温程序下生物样品与低温保护剂的最佳浓度配比。同时,该系统也可用于测定低温保护剂混合溶液的热物理性质,或考察低温保护剂加载条件对生物样品冻存效果影响等实验。利用芯片分析技术,可使系统简单,操作简便、经济,从而由此快速批量筛选生物材料冻存程序,因而具有重要的实用价值。

参 考 文 献

1 Wesley S J, Walters C, Berjak P, et al The influence of water content,

cooling and warming rate upon survival of embryonic axes of poncius trifoliata Cryoletters, 2004, 25 (2): 129 ~ 138

- 2 Thirumala S, Ferrer M S, Jarrah A A, et al Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents Cryobiology, 2003, 47 (2): 109 ~ 124
- 3 Karlsson J O M, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues Biomaterials, 1996, 17 (3): 243 ~ 256
- 4 Pegg D E The history and principles of cryopreservation. Seminars In Reproductive Medicine, 2002, 20 (1): 5 ~ 13
- 5 Wisniewski R. Large-scale cryopreservation of cells, cell components, and biological solutions Biopharm-The Applied Technologies of Biopharmaceutical Development, 1998, 11 (9): 42 ~ 50
- 6 华泽钊,任禾盛. 低温生物医学技术. 北京: 科学出版社, 1994
- 7 Labbe C, Crowe L M, Crowe J H. Stability of the lipid component of trout sperm plasma membrane during freeze-thawing Cryobiology 1997, 34: 176 ~ 182
- 8 Byrd W. Cryopreservation, thawing, and transfer of human embryos Seminars In Reproductive Medicine, 2002, 20 (1): 37 ~ 43
- 9 Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing J Gen Physiol, 1963, 47: 347 ~ 369
- 10 Elford B C, Walter C A. Effect of electrolyte composition and function of smooth muscle cooled to - 79 in unfrozen media Cryobiology, 1972, 9: 82 ~ 100
- 11 Smith A U. Biological Effect of Freezing And Supercooling London: Edward Arnold; 1961
- 12 刘金刚,刘作斌 主编. 低温医学. 北京: 人民卫生出版社, 1993
- 13 刘 静,于丽娜. 快速确定生物样品最佳低温保存参数的芯片式测定装置, 中国发明专利 CN200410037318. 3, 2004
- 14 Dertinger S K W, Chiu D T, Jeon N L, et al Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks Anal Chem. , 2001, 73: 1240 ~ 1246
- 15 Liu J, Zhou Y X. Freezing curve-based monitoring to quickly evaluate the viability of biological materials subject to freezing or thermal injury. Anal Bioanal Chem, 2003, 377: 173 ~ 181

致 谢

2005年,以下低温技术专家对《低温工程》的编辑工作给予了大力支持,使本刊的学术水平不断提高。在此,本刊编辑部谨对这些专家的辛勤工作致以深深的谢意(排名不分先后)。

张 亮 李来风 卢定伟 陈国邦 陈光明 厉彦忠 徐 烈 汪荣顺 华泽钊 刘新民 刘玉涛
王占林 禹天福 董文华 王 岩 刘国青 刘宝琴 何 涛 章小芳 刘波涛 张福忠 何家声
潘雁频