

应用于肿瘤细胞基因表达水平分析的微流控芯片

张宝月 冯鸿涛 舒伟良 陈 艳

(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

摘 要 近年来快速发展的微流控技术为单细胞基因诊断的基础研究提供了一个有力的平台,微流控芯片具有样品和试剂低消耗、快速实时、大量样本平行处理等优点,还可以使分析过程自动化、防止污染以及完成自动高效的重复实验。本文主要介绍一种用于高通量单细胞基因表达水平分析的微流控芯片技术平台。芯片集成了单细胞捕获、裂解、纯化、逆转录等生物样品处理单元,通过内置气动微阀实现细胞反应腔的独立寻址,从而实现单细胞处理与分析整个过程的自动化操控。实验结果显示了此平台可以实现基因表达水平稳定性的评估,具有应用于肿瘤早期诊断领域的潜力。

关键词 微流控芯片; 单细胞; 基因表达分析

Elaboration of Microfluidic Biochip for Cancer Cell Gene Expression Analysis

ZHANG Bao-yue FENG Hong-tao SHU Wei-liang CHEN Yan

(Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055)

Abstract Microfluidic devices provide powerful platforms for single-cell transcriptome analysis for many advantages such as highly parallel processing and low consumption of reagents. We have elaborated an integrated system with individual controller for effective single-cell transcriptome analysis. Inside this integrated microfluidic device, the cells are individually manipulated and isolated in an array using micro sieve structures, then transferred into different nanoliter reaction chambers for parallel processing of single-cell transcriptome analysis. The result demonstrates that this platform has the potential for assessment of genetic stability in cancer diagnosis.

Keywords microfluidic device; single cell; gene expression analysis

1 引 言

近年来,高通量的单细胞分析技术广泛引起了科学家们的研究兴趣,细胞分析是目前生命科学和分析化学的前沿研究领域,而细胞内涵物(例如核酸、蛋白质等)的分析是细胞分析的重要内容之一。传统的分析细胞内涵物的方法以分析大量细胞为前提,获取某一内涵物(如核酸)含量的总值,再由该值与细胞数量的比值推测单细胞内涵物质的含量,这种传统的平均化的生物学方法会使某些细胞的特异表达无法显示出来。单细胞内涵物分析有助于获得特异细胞的信息,

并可应用于疾病的早期诊断。单细胞基因表达分析在干细胞和肿瘤疾病研究中具有非常重要的意义^[1-2]。在细胞群中,深入理解基因表达的异质性是了解肿瘤的发生、发展阶段的重要因素^[3],同时在评估基因稳定性、鉴定生物标志物和个性化治疗方面具有巨大的应用前景^[4]。

在传统的生化反应中,反应物的损耗是单细胞分子生物学分析的重要障碍之一^[5]。目前,生物细胞学反应普遍用的细胞悬液体积为微升级以上,相当于纳升级的 10^6 倍。我们先前发表的工作已经可以在微流控芯片上实现纳升级的逆转录(RT)反应^[6]。RT反应为一步反应,不像聚合酶链反应(PCR)是一个不断重复

基金项目:此研究获国家自然科学基金项目(61106128),广东省创新科研团队及中国科学院知识创新工程项目(KGCX2-YW-904)支持。张宝月,研究助理,研究方向为微流控生物芯片设计与制作。冯鸿涛,研究助理,研究方向为微流控光学系统。舒伟良,研究助理,研究方向为微流控生物芯片细胞培养。通讯作者:陈艳,副研究员,研究方向为微流控生物芯片。E-mail:yan.chen@siat.ac.cn。

的多步反应。在RT反应中，RNA的浓度（一个哺乳动物细胞中含20-40pg^[7]）是反应是否有效进行的一个非常重要的影响因素。利用微流控技术，我们将反应体积缩小到皮升或纳升级，以调控RNA的浓度到一定水平，从而能有效进行cDNA合成反应。尽管如此，为了获取统计学上显著的数据，仍需要对多个单细胞进行大规模的平行分析。值得一提的是这些来自单个细胞基因的分析数据不同于来自一大群细胞基因分析的平均数据，因为这些平均数据隐藏了单个细胞的生物异质性。

要研制一个高效率单细胞分析平台，具备独立寻址功能的生物样品操控技术非常重要。许多科学家在研究大规模单细胞分析集成芯片方面做了大量的工作，包括细胞基因表达分析、单细胞操控^[8, 9]，RNA纯化和cDNA合成^[10-12]，微流控芯片PCR^[13]以及微流控芯片RT-qPCR分析^[14]，这些生物反应已被证明可实现，但是大多数的这些微流控平台（包括我们研发的第一代设备）在捕获单细胞环节带有随机性或可操控性不强^[12-14]。我们先前的工作已经实现在微流控芯片里完成从mRNA到cDNA的逆转录反应，反应体积仅10纳升，尽管如此，细胞的捕获和操控单细胞能力仍然有限。可见，此芯片的网络结构设计还需要完善，处理效率还有很大提高空间。基于我们之前的微流控芯片工作基础，我们将新增独立寻址功能以及流体力学捕获细胞结构单元，形成用于实现高效的单细胞基因分析的集成微流控芯片系统。在此系统平台上实现捕获单细胞，同时并行地裂解细胞，提取和纯化核酸，此外，此芯片设计适配于通用的实时荧光PCR设备。在现在的新一代装置中，我们采用了特殊的装载细胞方法确保每个反应微室捕获一个细胞，芯片设计中集成的捕获细胞结构类似于已经报道的能快速固定单细胞的力学阻拦结构^[15]和形成均一细胞分布的U-型结构^[16]。细胞捕获结构设计中的凹沟仅能抓住一个细胞并且能使细胞快速转移到反应混合器。同时，多通道控制器也发挥其独立寻址功能，从而执行细胞的转移操控工作。利用独立寻址功能，我们可以灵活地排除抓住两个以上细胞或者未抓住细胞的捕获单元，因此，可提高微流控芯片的处理效率。运用此集成微流控生物芯片平台，我们检测了Hela and 293T细胞的基因表达水平，证明了检测每个单细胞的基因表达水平可以评估一个哺乳动物细胞群的基因稳定性。本论文研究的平台显示了应用于癌症早期诊断及评估细胞群体基因稳定性的潜力。

2 材料与方法

2.1 微流控芯片制作

微流控单细胞分析芯片以弹性材料聚二甲基硅氧烷（Polydimethylsiloxane, PDMS, RTV 615, GE）为主要材料，采用多层软光刻技术加工制作而成。我们用光刻技术分开制作两块模板，一块用于反应流道层，另一块用于控制层。控制层模板采用SU8-25光刻胶制作。反应流体层包括细胞捕获筛子结构和流道，细胞筛结构采用SU8-10负性光刻胶，而流道部分采用AZ 50XT正性光刻胶。所有模板在浇铸PDMS之前用三甲基氯甲硅烷硅烷化，促使PDMS与模板之间容易剥离。

本芯片集成气动微阀，含有三层弹性体结构。对于流道层，将PDMS与固化剂按5:1混合，搅拌均匀后注入容器，然后抽真空以去除搅拌过程中产生的大量气泡。然后浇铸到模板上，在80℃下烘烤45分钟；对于控制层将PDMS与固化剂按20:1混合，80℃下烘烤30分钟；最后两层分别剥离模板，打孔，与另一块较薄的PDMS膜贴合，再烘烤。鉴于环烯烃共聚物（Cyclic Olefin copolymer）具有良好的光学性能和较低的吸水率^[18]，我们选择此种材料作为芯片的支撑底板，并且在底板上压印32个反应池。最后，三层PDMS芯片与塑料板贴合并烘烤过夜。

2.2 自动化装置

本研究自主研制的气动控制系统包括两部分，单片机和多个电池阀组。把生物实验步骤转换成程序语言，写入单片机中，电磁阀将按程序执行操作，运用气压操控芯片中的控制层，实现每一步反应。

3 结果与讨论

运用本芯片进行生化反应的步骤如图1所示，芯片集成了单细胞捕获、裂解、纯化、逆转录等生物样品处理单元。此微流控芯片平台具有高效率、高通量特性，具有同时处理几十个单细胞而完成基因转录分析的能力。芯片中的细胞捕获单元能同时捕获多个单细胞并进行后续分析。通过芯片上设计的两套多通道控制器能实现细胞操控和微珠柱生成的独立寻址，从而达到高通量单细胞分析。图2显示了一个自制的单片机芯片控制系统，可控制芯片中微阀的开关以及独立寻址。芯片中的气动微阀，通过数字控制键便捷地切换开关状态以精确平稳地驱动液体进入芯片微反应器，这些特性大大提高了同时处理大量细胞的能力。

在单细胞裂解后，用固相微珠柱可实现纯化mRNA^[12]。纯化的原理是采用带有oligo-dTs的微磁珠通过碱基互补配对结合mRNA，带有oligo(dT)₂₅的微磁珠除了提取mRNA外，还充当了合成cDNA所需的引物。

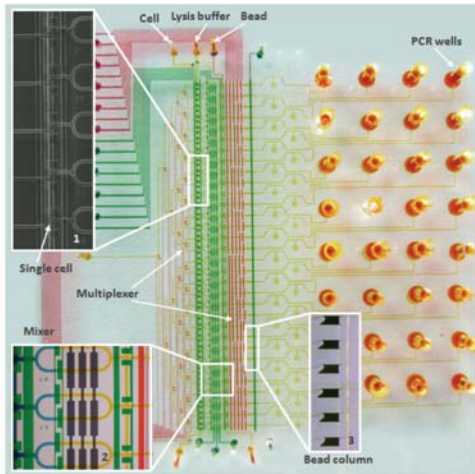


图1 多层单细胞分析微流控芯片图。图中所有通道用食品染料着色：反应流道层（黄色）；控制微阀（绿色）；多通道控制层（红色）。插图1显示五个细胞分别被捕获在捕获单元处；插图2显示细胞裂解元件，即通过基于微泵的微混合器混合裂解液（黄色）和细胞（蓝色）。通过两套多通道控制器实现细胞操控和微珠柱生成的独立寻址，从而达到高通量单细胞分析。插图3显示在半开微阀处形成6排带oligo-dT的微珠柱，细胞裂解物流过微珠柱，并在此捕获mRNA和合成cDNA。最后，收集微珠带合成的cDNA到PCR微池进行基因扩增，从而实现RT-PCR

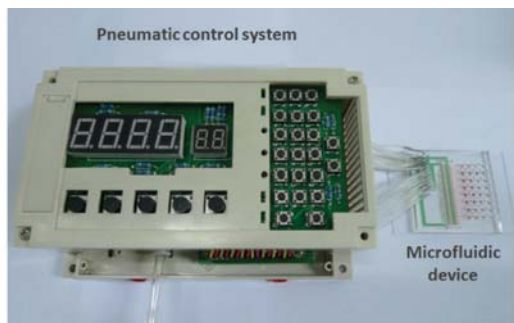


图2 微流控芯片气动控制系统。气动控制系统包括单片机和电池阀组两部分，单片机写入了控制程序以实现自动化操控

4 总结

基因表达分析技术包括多个生物反应步骤，具有工作强度大，分析通量低的缺点。其中还伴随多种液体转移，容易引起样品污染，繁琐、费时、费力，这大大限制了单细胞基因分析在实际中的应用。为了研制一个能从进样到出分析结果的集成化微流控系统，需要集成大量的操作组件，包括微阀、微混合器和多通道控制器等以实现生物化学反应和缓冲液输送。本

课题研发的气动控制系统能快速、精确和高效地操控每个集成于芯片上的组件，为集成化的便携式微流控芯片基因分析提供了一个有用的技术平台。

本研究结果显示，这一集成化的分析平台具有发展成为研究基因表达稳定性的强有力工具的潜力。在下一步的工作中，我们将此平台应用进一步拓展，将肿瘤细胞基因表达稳定性的评价更深入地应用于肿瘤的早期诊断分析研究中。

参考文献

- [1] Dalerba P, Kalisky T, Sahoo D, et al. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors [J]. *Nature Biotechnology*, 2011,29(12):1120-U1111.
- [2] Lecault V, Vaninsberghe M, Sekulovic S, et al. High-throughput analysis of single hematopoietic stem cell proliferation in microfluidic cell culture arrays [J]. *Nature Methods*, 2011,8(7):581-U593.
- [3] Klein C A, Seidl S, Petat-Dutter K, et al. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells [J]. *Nature Biotechnology*, 2002,20(4):387-392.
- [4] Riethdorf S, Wikman H and Pantel K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients [J]. *International Journal of Cancer*, 2008,123(9):1991-2006.
- [5] Bengtsson M, Stahlberg A, Rorsman P, et al. Gene expression profiling in single cells from the pancreatic islets of Langerhans reveals lognormal distribution of mRNA levels [J]. *Genome Research*, 2005,15(10):1388-1392.
- [6] Chen Y and Zhong J F. Microfluidic devices for high-throughput gene expression profiling of single hESC-derived neural stem cells [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2008,438(293-303).
- [7] Uemura E. AGE-RELATED-CHANGES IN NEURONAL RNA-CONTENT IN RHESUS-MONKEYS (MACACA-MULATTA) [J]. *Brain Research Bulletin*, 1980,5(2):117-119.
- [8] Gong Y A, Ogunniyi A O and Love J C. Massively parallel detection of gene expression in single cells using subnanolitre wells [J]. *Lab on a Chip*, 2010,10(18):2334-2337.
- [9] Skelley A M, Kirak O, Suh H, et al. Microfluidic control of cell pairing and fusion [J]. *Nature Methods*, 2009,6(2):147-152.
- [10] Marcus J S, Anderson W F and Quake S R. Microfluidic single-cell mRNA isolation and analysis [J]. *Analytical Chemistry*, 2006,78(9):3084-3089.
- [11] Bontoux N, Dauphinot L, Vitalis T, et al. Integrating whole transcriptome assays on a lab-on-a-chip for single cell gene profiling [J]. *Lab on a Chip*, 2008,8(3):443-450.
- [12] Zhong J F, Chen Y, Marcus J S, et al. A microfluidic processor for gene expression profiling of single human embryonic stem

- cells [J]. *Lab on a Chip*, 2008,8(1):68-74.
- [13] Toriello N M, Douglas E S, Thaitrong N, et al. Integrated microfluidic bioprocessor for single-cell gene expression analysis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008,105(51):20173-20178.
- [14] White A K, Vaninsberghe M, Petriv O I, et al. High-throughput microfluidic single-cell RT-qPCR [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011,108(34):13999-14004.
- [15] Di Carlo D, Wu L Y and Lee L P. Dynamic single cell culture array [J]. *Lab on a Chip*, 2006,6(11):1445-1449.
- [16] Wang Z H, Kim M C, Marquez M, et al. High-density microfluidic arrays for cell cytotoxicity analysis [J]. *Lab on a Chip*, 2007,7(6):740-745.
- [17] Unger M A, Chou H P, Thorsen T, et al. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography [J]. *Science*, 2000,288(5463):113-116.
- [18] Nunes P S, Ohlsson P D, Ordeig O, et al. Cyclic olefin polymers: emerging materials for lab-on-a-chip applications [J]. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2010,9(2-3):145-161.