

引文格式:

王忠, 崔金明, Tokuyasu TA. 高通量小间距细胞电穿孔装置设计及实验测试 [J]. 集成技术, 2021, 10(5): 67-71.

Wang Z, Cui JM, Tokuyasu TA. A novel design and experimental tests of a small distance device for high throughput electroporation [J]. Journal of Integration Technology, 2021, 10(5): 67-71.

高通量小间距细胞电穿孔装置设计及实验测试

王 忠¹ 崔金明^{1*} TOKUYASU Taku Andrew^{2*}

¹(广州中国科学院先进技术研究所 广州 511458)

²(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

摘 要 细胞电穿孔技术是指通过施加一定的电场强度可逆地击穿细胞膜, 在细胞膜上形成小孔或通路, 从而使遗传物质引入细胞内。传统的细胞电穿孔装置往往需要几百伏到几千伏的电压, 操作十分危险。该研究采用电绝缘的聚氯乙烯 (PVC) 薄膜, 制作了一种电极间距为 80 μm 的小间距电穿孔装置, 并且可以进行高通量操作。经测试, 所提出的小间距电穿孔装置实现细胞电穿孔所需的电压比 1 mm 标准电击杯降低了一个数量级, 极大地提高了实验操作的安全性。高通量操作也极大地提高了实验效率, 但由于电穿孔转化效率比 1 mm 标准电击杯低了一个数量级, 因此实验参数需要进一步优化。

关键词 细胞电穿孔; 小间距; 高通量; 转化效率

中图分类号 TH 79 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20210427006

A Novel Design and Experimental Tests of a Small Distance Device for High Throughput Electroporation

WANG Zhong¹ CUI Jinming^{1*} TOKUYASU Taku Andrew^{2*}

¹(Guangzhou Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 511458, China)

²(Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

*Corresponding Author: jm.cui@giat.ac.cn; tokuyasu@siat.ac.cn

Abstract Electroporation technology can penetrate the cell membrane by reversibly applying a certain electric field, forming holes or pathways in the cell membrane, so that the genetic material can be transferred into the cell. Traditional electroporation devices often require several hundred to several thousand volts and are very dangerous to operate. In this study, an electrically insulated polyvinyl chloride (PVC) film was used to make a small distance electroporation device with the electrodes' distance of 80 μm , which can undertake high flux operation. The experiments show that the proposed small distance electroporation device facilitates

收稿日期: 2021-04-27 修回日期: 2021-05-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31971338); 广东省水利科技创新项目 (2020-32); 深圳市科技创新委员会项目 (KQTD2015033117210153)

作者简介: 王忠, 工程师, 研究方向为生物实验仪器研发; 崔金明 (通讯作者), 副研究员, 研究方向为分子生物学, E-mail: jm.cui@giat.ac.cn; TOKUYASU Taku Andrew (通讯作者), 教授, 研究方向为计算机科学, E-mail: tokuyasu@siat.ac.cn.

cell electroporation with the voltage one order of magnitude lower than the 1 mm standard shock cup, greatly enhance the safety of the experimental operation, high flux also greatly improves the efficiency of experimental operation. But the electroporation efficiency is one order of magnitude lower, and experimental parameters need to be further optimized.

Keywords cell electroporation; small distance; high flux; electroporation efficiency

Funding This work is supported by National Natural Science Foundation of China (31971338), Guangdong Water Resources Science and Technology Project (2020-32), Shenzhen Science Technology and Innovation Commission Project (KQTD2015033117210153)

1 引 言

细胞电穿孔技术又称电转染技术,是细胞转染技术中常用的一种途径,最早在 1982 年由 Neumann 等^[1]报道。该技术通过施加一定的电场强度可逆地击穿细胞膜,在细胞膜上形成小孔或通路,从而将遗传物质引入细胞内^[2],是基因工程领域以及新兴的合成生物学领域的重要环节。目前,市场上的电穿孔仪多为传统电穿孔仪,包括一个电压发生器和一个带有两个金属电极的标准电击杯。其中,标准电击杯的电极间距一般为 1 mm,电穿孔时需要对其施加几百伏到几千伏的电压,存在操作危险、依赖人工操作、难以实现自动化运行等局限性。为解决传统电穿孔仪的局限,微型电穿孔技术在 2000 年被首次提出^[3]。微型电穿孔仪弥补了传统电穿孔仪的部分不足,能够提高细胞存活率和细胞转染率,甚至实现了对单个细胞的电穿孔操作^[4-9],但微型电穿孔仪处理的细胞数量偏少,而在生物学实际应用中,往往需要一定的细胞数量,才能获得足够的基因型和表型多样性用于筛选。为此,本实验设计了一种高通量小间距细胞电穿孔装置,既降低了细胞电穿孔所需电压,又能高通量操作,提高细胞处理量。

2 高通量小间距细胞电穿孔装置设计

细胞电穿孔的成功率主要受电场强度、电压波

形、电压持续时间、温度和 pH 等多种因素的影响^[10-16]。本研究从降低细胞电穿孔所需电压以及提高细胞处理量的角度出发,设计了一种由绝缘薄膜隔离电极的高通量小间距细胞电穿孔装置。其中,采用电绝缘的聚氯乙烯(Polyvinyl Chloride, PVC)薄膜来隔离两个电极,二者的间距完全由 PVC 薄膜的厚度决定。本实验采用厚度为 0.08 mm (80 μm) 的 PVC 薄膜,因而电极间距为 80 μm 。

该细胞电穿孔装置的电极间距比实验室常用的标准电击杯(毫米级)低了一个数量级,但又比微型电穿孔仪采用的电极间距(微米级)高了一个数量级,因而实现细胞电穿孔所需的电压比标准电击杯明显降低,而每次细胞电穿孔的处理量又比微型电穿孔仪多;同时,装置的出入口可以通过硅胶软管与蠕动泵或注射器相连,实现高通量操作,显著提高细胞处理量,提高实验效率。该细胞电穿孔装置的实物图、三维模型的剖视图和爆炸视图如图 1 和图 2 所示。

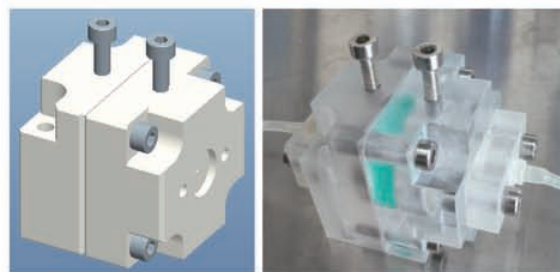


图 1 由薄膜隔离电极的高通量小间距细胞电穿孔装置

Fig. 1 High throughput and small distance electroporation device with thin film isolated electrodes

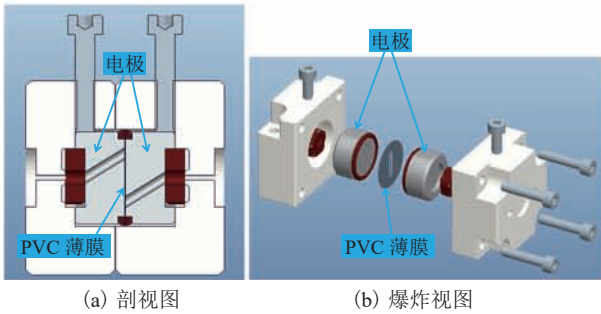


图 2 剖视图和爆炸视图

Fig. 2 Cutaway view and explosion view

3 实验测试

为了验证所设计装置的细胞电穿孔情况并测量电穿孔的效率, 分别采用大肠杆菌 MG1655 转染质粒 pUC57、毕次酵母 GS115 转染质粒 pPIC9K 进行电穿孔实验测试。为了避免引入其他不确定因素, 采用实验室常用的 Bio-Rad MicroPulser 电穿孔仪作为脉冲发生器, 对该高通量小间距细胞电穿孔装置和 1 mm 标准电击杯进行对比测试。为能测试不同电压条件下的电穿孔效果, 在电穿孔电路中设置了一个分压电阻。电穿孔实验原理图和实物图分别如图 3 和图 4 所示。

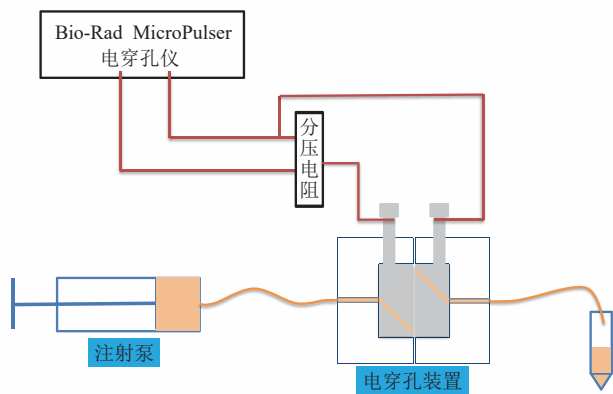


图 3 电穿孔实验原理图

Fig. 3 Schematic diagram of the electroporation experiment

3.1 大肠杆菌 MG1655 转染质粒 pUC57 测试

(1) 菌株: *E. coli* MG1655 购自 Invitrogen 公司。

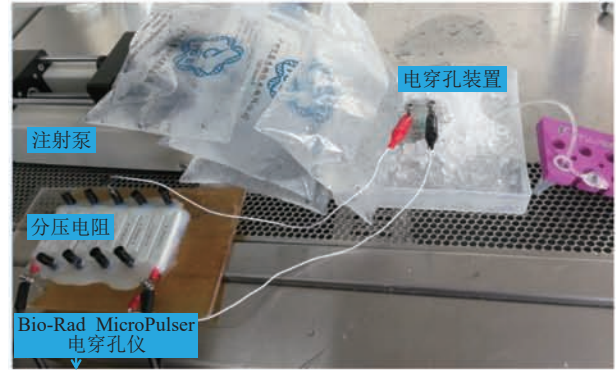


图 4 电穿孔实验实物图

Fig. 4 Picture of the electroporation experiment

(2) 质粒: pUC57 购自 Novagen 公司, 质粒浓度为 122.127 ng/ μ L。

(3) 实验参数: 选择 Bio-Rad MicroPulser 电穿孔仪的 Manual 模式, 设定脉冲电压; 该高通量小间距电穿孔装置的两个电极之间的电穿孔腔体体积为 2 μ L, 控制脉冲发生器每 5 s 施加一次脉冲电压, 设定注射泵的注射速度为 0.4 μ L/s, 以确保流过装置的细胞液完全接受脉冲电压的作用。

(4) 实验过程: 往 100 μ L 的感受态细胞液内加入 1 μ L 质粒, 混匀后通过注射泵以 0.4 μ L/s 的速度注入电穿孔装置进行电穿孔(整个操作在冰水环绕环境下进行)。为了探索不同电压情况下的细胞电穿孔效果, 分别采用 200 V、220 V、240 V、260 V、280 V 和 300 V 电压进行实验。作为对照组, 往 100 μ L 的感受态细胞液内加入 1 μ L 质粒, 置于 1 mm 标准电击杯内, 施加大肠杆菌通常采用的 1.8 kV 脉冲电压进行细胞电穿孔。电穿孔后, 先将细胞液与 900 μ L SOC 缓冲液混合, 放入 37 $^{\circ}$ C 摇床复苏 1 h; 然后, 将细胞液涂布于含卡那霉素(终浓度为 50 mg/ μ L)的 LB (Luria-Bertani) 琼脂培养基上, 放入 37 $^{\circ}$ C 温箱过夜培养, 第 2 天早上统计 LB 琼脂板上的菌落数。

(5) 实验结果: 第 2 天早上发现 6 种测试电压下的 LB 琼脂板上均有菌落长出, 表明这些电压条件下都有细胞成功电穿孔, 菌落数量及转化

效率计算结果如表 1 所示。其中,电穿孔转化效率计算公式为:

$$\text{转化效率 (CFU}/\mu\text{g DNA)} = \frac{\text{克隆数 (CFU)} \times \text{稀释倍数}}{\text{DNA 量} (\mu\text{g})} \quad (1)$$

表 1 电穿孔实验结果

Table 1 Results of electroporation experiments

测试电压	菌落数 (个)	转化效率 (CFU/ $\mu\text{g DNA}$)
200 V	23	188.329
220 V	35	286.587
240 V	5	40.941
260 V	34	278.399
280 V	21	171.952
300 V	33	270.211
1 mm 标准电击杯对照 (稀释 10 倍后)	48	3 930.335

E. coli MG1655 转染质粒 pUC57 的电穿孔实验结果表明,相比于采用 1 mm 标准电击杯,虽然该电穿孔装置成功进行电穿孔所需的电压降低了一个数量级,但是电穿孔转化效率也降低了一个数量级。

3.2 毕次酵母转染质粒 pPIC9K 测试

(1) 菌株: *Pichia pastoris* GS115 购自 Invitrogen 公司。

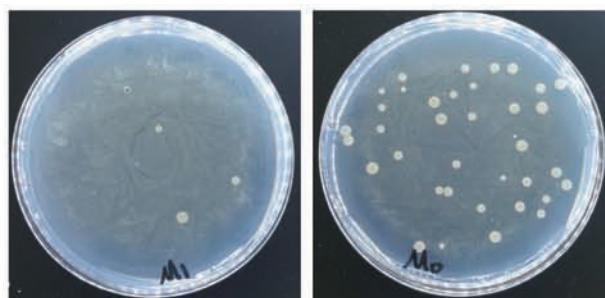
(2) 质粒: pPIC9K 购自 Invitrogen 公司,质粒浓度为 224.600 ng/ μL 。

(3) 实验参数:依然选择 Bio-Rad MicroPulser 电穿孔仪的 Manual 模式,设定脉冲电压;控制脉冲发生器每 5 s 施加一次脉冲电压,设定注射泵的注射速度为 0.4 $\mu\text{L/s}$,以确保流过装置的细胞液完全接受脉冲电压的作用。

(4) 实验过程:往 100 μL 的感受态细胞液内加入 1 μL 质粒,混匀后通过注射泵以 0.4 $\mu\text{L/s}$ 的速度注入电穿孔装置进行电穿孔(整个操作在冰水环绕环境下进行),电穿孔电压采用 150 V。作为对照组,往 100 μL 的感受态细胞液内加入 1 μL 质粒,置于 1 mm 标准电击杯内,施加毕次酵母通常采用的 1.5 kV 脉冲电压进行细胞电穿孔。电穿孔后,先将细胞液与 900 μL 1 mol/L 的

D-山梨醇溶液混合,放入 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床复苏 1 h; 然后,将细胞液涂布于 MD (Minimal Dextrase) 培养基平板上,放入 30 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中培养 3 天,第 4 天早上统计 MD 平板上的菌落数。

(5) 实验结果:第 4 天早上发现实验组的 MD 平板上有菌落长出,但菌落数量比对照组低了一个数量级,如图 5 所示。



(a) 电穿孔装置实验结果 (b) 1 mm 标准电击杯实验结果

图 5 毕次酵母转染质粒 pPIC9K 实验结果

Fig. 5 Results of plasmid pPIC9K transfected by *Pichia pastoris*

毕次酵母转染质粒 pPIC9K 的实验结果表明,相比于采用 1 mm 标准电击杯,该电穿孔装置成功进行电穿孔所需的电压降低了一个数量级,但电穿孔转化效率也降低了一个数量级。

4 结 语

本实验采用电绝缘的 PVC 薄膜,设计了一种电极间距为 0.08 mm (80 μm) 的电穿孔装置,加工制作方便,而且电极间距可以通过选用不同厚度的 PVC 薄膜来改变;相比实验室常用的 1 mm 标准电击杯,实现细胞电穿孔所需的电压降低了一个数量级,提高了电穿孔实验的安全性;相比微型电穿孔仪,细胞处理量得到较大提高;而且装置可以通过硅胶软管与蠕动泵或注射器相连,实现高通量操作,提高了细胞处理量和实验效率。

E. coli MG1655 转染质粒 pUC57 实验以及

Pichia pastoris GS115 转染质粒 pPIC9K 实验结果表明, 本文提出的高通量小间距细胞电穿孔装置可以成功实现细胞电穿孔, 所需要的电压比 1 mm 标准电击杯降低了一个数量级, 显著提高了实验操作的安全性, 但电穿孔效率比 1 mm 标准电击杯低了一个数量级。

电穿孔效率低的原因可能有两方面: (1) 该装置电穿孔腔横截面的长宽比(长度 2 mm、宽度 0.08 mm)较大, 导致更多细胞处于靠近电极的区域, 而该区域在施加电压过程中的温度、pH 变化较大, 影响电穿孔效率; (2) 针对该电穿孔装置所采用的电压波形、持续时间等参数不够理想。若想实现更高的电穿孔效率, 则需对 PVC 薄膜通道的形状(影响电穿孔腔横截面的长宽比)、细胞电穿孔施加的电压波形、大小等实验参数进一步优化。

参 考 文 献

- [1] Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, et al. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields [J]. *The EMBO Journal*, 1982, 1(7): 841-845.
- [2] Wanda KN, John CN. *Cardiac Bioelectric Therapy* [M]. USA: Springer, 2009: 133-161.
- [3] Huang Y, Rubinsky B. Micro-electroporation: improving the efficiency and understanding of electrical permeabilization of cells [J]. *Biomedical Microdevices*, 1999, 2(2): 145-150.
- [4] Movahed S, Li DQ. Microfluidics cell electroporation [J]. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2011, 10(4): 703-734.
- [5] Wiegert JS, Christine EG, Thomas GO. Single-cell electroporation of neurons [J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017, 2: 135-139.
- [6] Zhang XL, Hu N, Chen X, et al. Controllable cell electroporation using microcavity electrodes [J]. *Sensors and Actuators B*, 2017, 240: 434-442.
- [7] Bao N, Wang J, Lu C. Microfluidic electroporation for selective release of intracellular molecules at the single-cell level [J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(14): 2939-2944.
- [8] Kim SK, Kim JH, Kim KP, et al. Continuous low voltage dc electroporation on a microfluidic chip with polyelectrolytic salt bridges [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(20): 7761-7766.
- [9] Berekméria E, Deáka O, Téglás T, et al. Targeted single-cell electroporation loading of Ca^{2+} indicators in the mature hemicochlea preparation [J]. *Hearing Research*, 2019, 371: 75-86.
- [10] Sarkar A, Mitra B, Shastry A, et al. A low voltage single cell electroporator with a microfabricated sense-porate aperture [C] // *The 17th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*, 2004.
- [11] Kim JA, Cho K, Shin MS, et al. A novel electroporation method using a capillary and wire-type electrode [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 23: 1353-1360.
- [12] Talele S, Gaynor P, Cree MJ, et al. Modelling single cell electroporation with bipolar pulse parameters and dynamic pore radii [J]. *Journal of Electrostatics*, 2010, 68(3): 261-274.
- [13] Lo YJ, Lei U. A continuous flow-through microfluidic device for electrical lysis of cells [J]. *Micromachines*, 2019, 10(4): 247.
- [14] 张放, 周载鑫, 张丹丹, 等. 电穿孔法转染人原代成纤维细胞条件的优化 [J]. *第二军医大学学报*, 2017, 38(10): 1311-1314.
Zhang F, Zhou ZX, Zhang DD, et al. Optimization of transfection conditions of human primary fibroblasts by electroporation [J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2017, 38(10): 1311-1314.
- [15] 樊亮. 单细胞电穿孔电刺激系统的实现 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
Fan L. Single-cell electroporation electrical stimulation system [D]. Wuhan: Huazhong University of Science & Technology, 2012.
- [16] 张玉, 张琳, 刘欣, 等. 纳秒脉冲作用下球形细胞电穿孔过程仿真 [J]. *高压电技术*, 2018, 44(10): 3307-3313.
Zhang Y, Zhang L, Liu X, et al. Simulation of electroporation process of spherical cell with nanosecond pulsed electric fields [J]. *High Voltage Engineering*, 2018, 44(10): 3307-3313.