



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103205360 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 17

(21) 申请号 201310117091. 2

(22) 申请日 2013. 04. 07

(71) 申请人 中国科学院力学研究所
地址 100190 北京市海淀区北四环西路 15 号

(72) 发明人 龙勉 章燕 高宇欣

(74) 专利代理机构 北京和信华成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11390
代理人 胡剑辉

(51) Int. Cl.
C12M 1/36(2006. 01)
C12M 1/34(2006. 01)

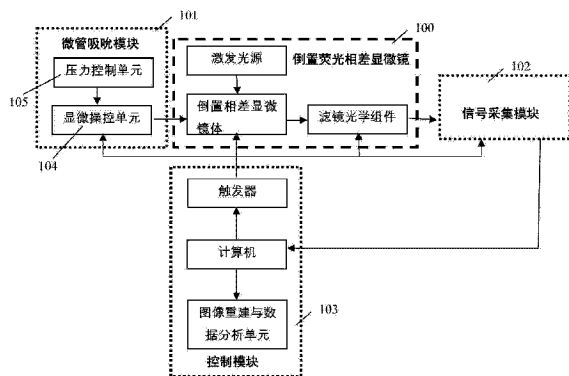
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种可同步实现吸吮加载与荧光观测的细胞力学装置

(57) 摘要

本发明公开了一种可同步实现吸吮加载与荧光观测的细胞力学装置,包括:微管吸吮模块,用于对样品池内细胞的捕获、吸吮和微操控;倒置荧光相差显微镜,用于对所述细胞进行荧光激发;信号采集模块,用于对微弱荧光信号的采集;控制模块,用于对微管吸吮和荧光采集的同步触发,并进行数据分析和处理。本发明突破现有细胞-分子生物力学研究中力学加载与光学检测方法之时间-空间分离的局限,建立微管吸吮力学加载-荧光观测耦合的分子-细胞动力学实时原位观测系统,完善活细胞与分子力学行为的研究平台,为深入理解分子-细胞层面力学-化学、力学-生物学耦合规律服务。



1. 一种可同步实现吸吮加载与荧光观测的细胞力学装置,其特征在于,包括:
微管吸吮模块,用于对样品池内细胞的捕获、吸吮和微操控;
倒置荧光相差显微镜,用于对所述细胞进行荧光激发;
信号采集模块,用于对微弱荧光信号的采集;
控制模块,用于对微管吸吮和荧光采集的同步触发,并进行数据分析和处理。
2. 如权利要求 1 所述的装置,其特征在于,所述微管吸吮模块包括:
微管吸吮实验腔,用于保持生物样品的活性,便于显微操控器对生物样品的捕获;
显微操控单元,用于对微管吸吮实验腔中的样品进行精确的捕获和移动;
压力控制单元,用于给予显微操控单元夹持的微吸吮管一定的负压,将生物样品以负压吸附的方式固定在微吸吮管顶端。
3. 如权利要求 2 所述的装置,其特征在于,所述倒置荧光相差显微镜包括:倒置相差显微镜体、显微镜聚光器支柱、激发光源和滤镜光学组件。
4. 如权利要求 3 所述的装置,其特征在于,所述显微操控单元安装于所述显微镜聚光器支柱上,所述显微操控单元包括:粗调显微操作器、细调显微操作器、吸吮表征有目标分子的细胞或小球的微管、控制微管运动的压电陶瓷驱动器。
5. 如权利要求 4 所述的装置,其特征在于,所述压力控制单元包括:调控所述微管管口与贮水瓶间水位差的运动部件、量化水位差的数码显示器。
6. 如权利要求 5 所述的装置,其特征在于,所述信息采集模块为 EMCCD。
7. 如权利要求 6 所述的装置,其特征在于,所述控制模块包括:
控制计算机,用于安装用户编写的控制软件,通过触发器对压电陶瓷控制器、EMCCD、滤镜光学组件的运动和开关进行控制;
触发器,用于接受控制计算机发出的数字控制信号,将其转为模拟电平信号,用于对压电陶瓷控制器、EMCCD、滤镜光学组件的运动和开关的同步触发;
图像重建和数据分析单元,用于对 EMCCD 获得的图像行数据分析和处理,获得图像各部分的量化信息和图像的时间序列重建和三维重建信息。

一种可同步实现吸吮加载与荧光观测的细胞力学装置

技术领域

[0001] 本发明涉及一种微管吸吮力学加载和显微荧光观测相结合的细胞力学装置。

背景技术

[0002] 人体始终处于力学环境之中,其生物学过程受到不同力学环境的调控,表现为多因素、非线性、交互作用等基本特征,需要在微观层次定量认识其耦合规律。细胞不仅处在复杂的生物化学环境中,也处在不同的生物力学环境中;细胞力学可阐明细胞如何感受、修饰、并对细胞环境的物理特性做出响应;细胞之间通过化学和物理信号实现信息交换,从而参与胚胎发生、伤口愈合、炎症反应、肿瘤转移等一系列的生物过程;细胞对力学刺激的影响在内环境稳态和许多疾病中至关重要。

[0003] 细胞力学-生物学耦合研究不仅可定量认识细胞-细胞、细胞-表面相互作用的基本规律,同时还是组织工程、再生医学、介入治疗等的重要科学基础。因此,在生物大分子相互作用、亚细胞动力学过程、细胞整体生命活动及其调控规律等方面开展定量化和模型化研究,可为认识生命现象、保障人类健康提供新概念和新方法。

[0004] 目前,分子-细胞生物力学领域的发展瓶颈在于有关力学信号在细胞内的传递和转导、细胞骨架和胞内信号分子的结构变化、以及蛋白质相互作用与组装过程的动力学行为等实验数据十分缺乏,因而难以对力学信号转导途径及细胞动态响应、生物大分子反应动力学及力学-化学耦合等规律进行统一描述。

[0005] 目前分子-细胞层面力学-化学、力学-生物学耦合研究的实验技术主要分为两大类:力学加载实验(力谱)技术和荧光检测(荧光谱)技术。力学加载实验技术:对细胞或分子施加力学作用是针对细胞或分子所处的生理力学环境进行模拟,无法实现力学刺激下活细胞动力学行为(迁移、增殖、分化等)和活细胞内细胞骨架、离子和分子活动和变化的实时动态检测,并且由于细胞培养、探针标记和力学加载不能原位进行,导致测试结果难以定量、时-空耦合难以实现。基于分子光学标记的荧光检测分析成像技术能实现对分子或细胞的力学加载、也难以观测分子-细胞的力学-化学、力学生物学耦合过程。

发明内容

[0006] 针对现有技术存在的问题,本发明的目的在于提供一种实现微管吸吮加载与荧光观测相结合的可同步实现吸吮加载与荧光观测的细胞力学装置,可以实现对单个细胞的拉/压力学加载以及荧光观测之间的同步化。

[0007] 本发明的一种可同步实现吸吮加载与荧光观测的细胞力学装置包括:

[0008] 微管吸吮模块,用于对样品池内细胞的捕获、吸吮和微操控;

[0009] 倒置荧光相差显微镜,用于对所述细胞进行荧光激发;

[0010] 信号采集模块,用于对微弱荧光信号的采集;

[0011] 控制模块,用于对微管吸吮和荧光采集的同步触发,并进行数据分析和处理。

[0012] 优选地,所述微管吸吮模块包括:

[0013] 微管吸吮实验腔,用于保持生物样品的活性,便于显微操控器对生物样品(细胞)的捕获;

[0014] 显微操控单元,用于对微管吸吮实验腔中的样品进行精确的捕获和移动;

[0015] 压力控制单元,用于给予显微操控单元夹持的微吸吮管一定的负压,将生物样品以负压吸附的方式固定在微吸吮管顶端。

[0016] 优选地,所述倒置荧光相差显微镜包括:倒置相差显微镜体、显微镜聚光器支柱、激发光源和滤镜光学组件。

[0017] 优选地,所述显微操控单元安装于所述显微镜聚光器支柱上,所述显微操控单元包括:粗调显微操作器、细调显微操作器、吸吮表征有目标分子的细胞或小球的微管、控制微管运动的压电陶瓷驱动器(用于施加一定的电场使压电介质发生形变而带动微管运动)。

[0018] 优选地,所述压力控制单元包括:调控所述微管管口与贮水瓶间水位差的运动部件、量化水位差的数码显示器。

[0019] 优选地,所述信息采集模块为 EMCCD (电子倍增电荷耦合器件)。

[0020] 优选地,所述控制模块包括:

[0021] 控制计算机,用于安装用户编写的控制软件,通过触发器对压电陶瓷控制器、EMCCD、滤镜光学组件的运动和开关进行控制;

[0022] 触发器,用于接受控制计算机发出的数字控制信号,将其转为模拟电平信号,用于对压电陶瓷控制器、EMCCD、滤镜光学组件的运动和开关的同步触发;

[0023] 图像重建和数据分析单元,用于对 EMCCD 获得的图像行数据分析和处理,获得图像各部分的量化信息(比如:荧光强度、面积等)和图像的时间序列重建和三维重建信息。

[0024] 本发明具有如下优点:

[0025] 1) 本发明突破现有细胞-分子生物力学研究中力学加载与光学检测方法之时间-空间分离的局限,建立微管吸吮力学加载-荧光观测耦合的分子-细胞动力学实时原位观测系统,完善活细胞与分子力学行为的研究平台,为深入理解分子-细胞层面力学-化学、力学-生物学耦合规律服务;

[0026] 2) 本发明在倒置荧光相差显微镜上,通过选取特殊的滤片组合对位于样品平面的细胞进行激发,通过微管吸吮模块对细胞施加吸吮/挤压加载,通过控制模块使力学刺激和荧光激发同步进行,采用 EMCCD 对数据进行采样,采用图像重建和数据分析单元对图像进行重建和数据分析,实现了对细胞的微管吸吮力学加载和荧光观测相结合。

附图说明

[0027] 图 1 为本发明的原理框图;

[0028] 图 2 为本发明的结构示意图;

[0029] 图 3a 为微管吸吮模块的结构示意图;图 3b 为微管吸吮实验腔模式图;图 3c 为微管吸吮实验腔内细胞被捕获的示意图。

[0030] 图 4 为触发器运控示意图。

具体实施方式

[0031] 如图 1、2、3 所示,本发明一种可实现吸吮与荧光观测的细胞力学装置由倒置荧光

相差显微镜 100、微管吸吮模块 101、信号采集模块 102 和控制模块 103 组成。

[0032] 倒置荧光相差显微镜 100 包括显微镜体 1、激发滤镜 2、激发光源 3、发射滤镜 4、物镜 5 和载物台 6。本实施例中显微镜体 1 采用 Olympus IX71 倒置显微镜,工作镜头为 100 倍的油镜(NA1.30)。本实施例中样品细胞采用 CFP (Cyan Fluorescence Protein,青色荧光蛋白)(433/475nm 激发 / 发射)进行标记;激发光源 3 采用汞灯(100W),在汞灯前方放置带通的激发滤镜 4(420/20nm),允许波长在 410-430nm 范围的光对样品进行激发,激发光经过显微镜的外荧光通路耦合进显微镜,通过物镜 5 照射到载物台上的平行平板流动腔 7(图 1,图 2)。实验中细胞所标记的 CFP 被激发,发射的荧光通过物镜收集,经过显微镜光路传输,经发射滤镜 5 (475/40nm) 滤波,被信号采集模块 102 (EMCCD) 接收。本实施例中采用 EMCCD 前方放置带通滤光片 4 (475/40nm),只允许波长在 455-495nm 的激发光进入 EMCCD,提高了系统的信噪比。

[0033] 微管吸吮模块 101 包括微管吸吮实验腔 7、显微操作单元 104 和压力控制单元 105。本实施例中显微操作单元 104 包括显微操作器 12、微管 14 和压电陶瓷驱动器,显微操作器 12 采用机械调节的粗调显微操作器(MMN-1, Narishige, Japan) 和油压驱动的细调显微操作器(MM0-20, Narishige, Japan) 组成左、右显微操作手安装于显微镜聚光器支柱上,在油压细调显微操作器上配有夹针器连着一个压电陶瓷传感器 12 (PI, Germany),由计算机 11 精确控制压电陶瓷控制器使得压电晶体带动连在上面的微管 14 运动。

[0034] 本实施例中的微吸吮管为外径 1mm、内径 0.7mm 的硼酸盐玻璃管,通过拉针器和微铸造仪(Narishige, Japan) 制备而成。通过调节拉针器和微铸造仪的参数,可以得到不同内径(2 ~ 6 μm)、不同管口形状(开口与闭口;端部垂直与管轴、无尖刺)的微吸吮管 12,以用来吸吮、或施压于不同大小的细胞。压力调节系统采用合适强度的橡胶管将微管 14 和贮水瓶 16 连通起来,通过精确调节控制贮水瓶 16 高度的数码高度尺 15 来改变微管吸吮细胞的压力。微管吸吮系统不仅可以通过控制贮水瓶 16 高度来给被吸吮细胞施加一定的压力,而且还可在负压捕获的情况下,通过显微操作器操控细胞与样品池底面接触,从而给细胞施加一定的压力。

[0035] 微管吸吮实验腔(图 3b)由两块干净的盖玻片和一个中间开口的不锈钢架子组成。将两片盖玻片对齐后,一上一下分别贴于不锈钢架子的开口处,从而形成一个腔室。微管 14 可以从腔体的两侧开口处进入,并进行显微操作和实时图像采集。

[0036] 本实施例中,将采用青色荧光蛋白 CFP 标记的细胞(如 HL-60 细胞)加入微管实验腔。实验腔中的工作缓冲液由双蒸水和含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 Hanks 平衡盐溶液等比例组成,并加入了 1% 的牛血清白蛋白,渗透压约为 150mOsm/kg。利用压力系统调节微管零压后,给予微管一定的负压(0.1 ~ 15mm H₂O)用于吸住 HL-60 细胞,通过显微操作器精确聚焦后,由计算机 11 给触发器 10 触发信号,压电晶体 13 带动微管 14 运动使被吸吮的细胞与实验腔底面挤压而给细胞施加一定的压力(图 3c)。同时,触发信号同时触发显微镜的激发光源 3、启动精密注射泵 8、显微镜的激发光源 3、滤镜组(包括发射滤镜 2 和激发滤镜 4)和信号采集模块 101 在不同或相同的时序工作,实现细胞的吸吮力学加载与荧光观测同步进行,有利于观测到细胞在被吸吮和挤压过程的同步荧光信号的变化。

[0037] 实验图像由信号采集模块 101 采集,存储于计算机 11 内,采用图像重建和数据分析单元进行在线和离线的数据分析。

[0038] 本实施例中触发波形如图4,压电晶体控制器8和压电晶体13工作后,滤镜转轮同时转换到目的发射滤镜2和激发滤镜4,EMCCD在一个脉冲后触发采集,曝光时间为1个脉冲长度,然后滤镜组回转,EMCCD停止工作,两个脉冲后重复同样采集过程。可控时序采集不仅能得到长时间的力学加载下荧光实时信息,而且避免了连续采集数据量过大的缺点。

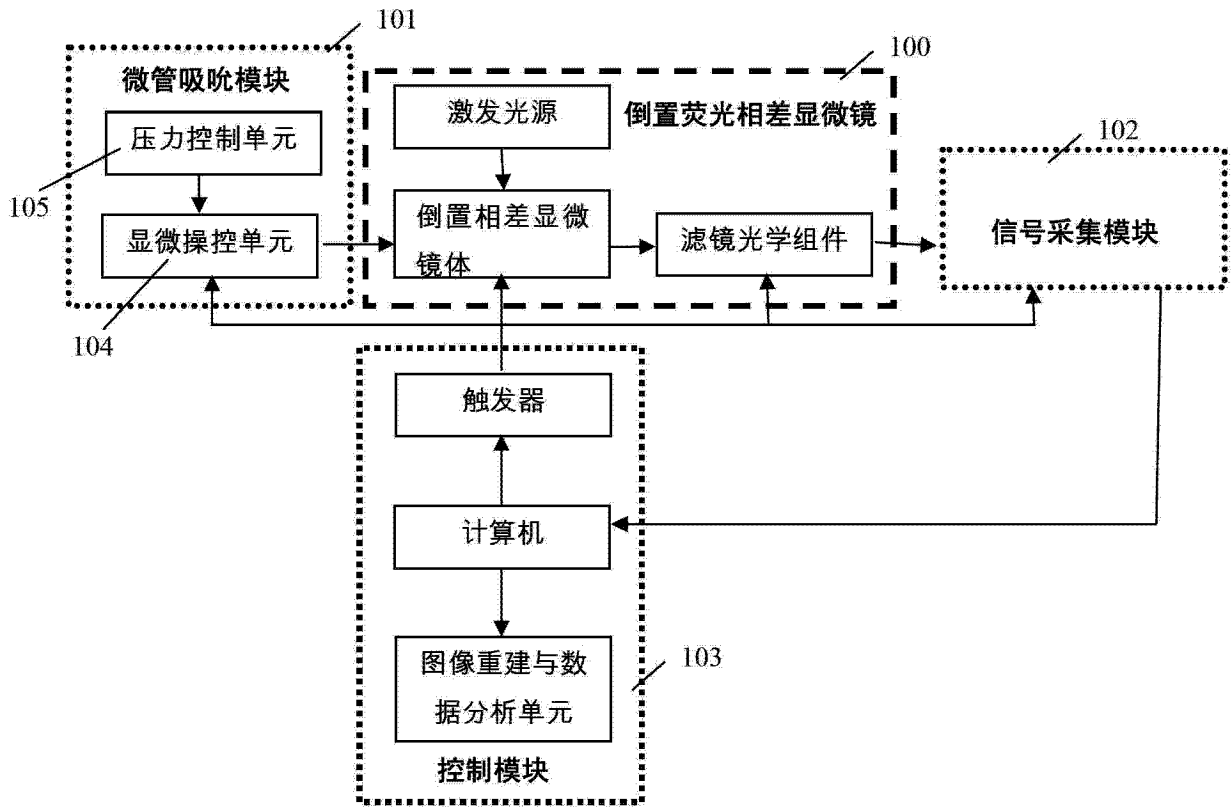


图 1

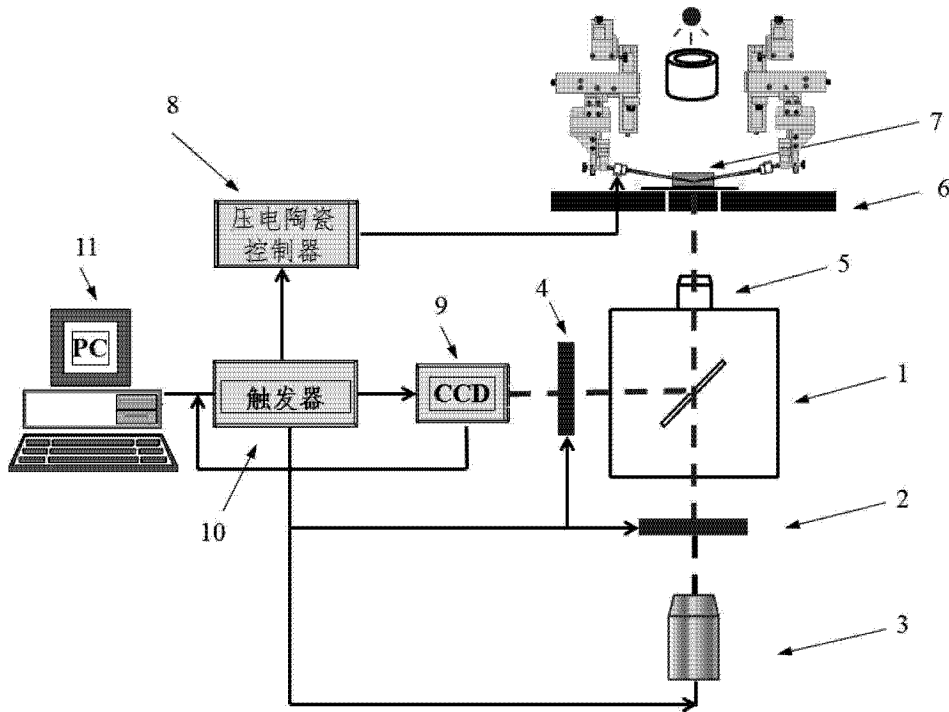


图 2

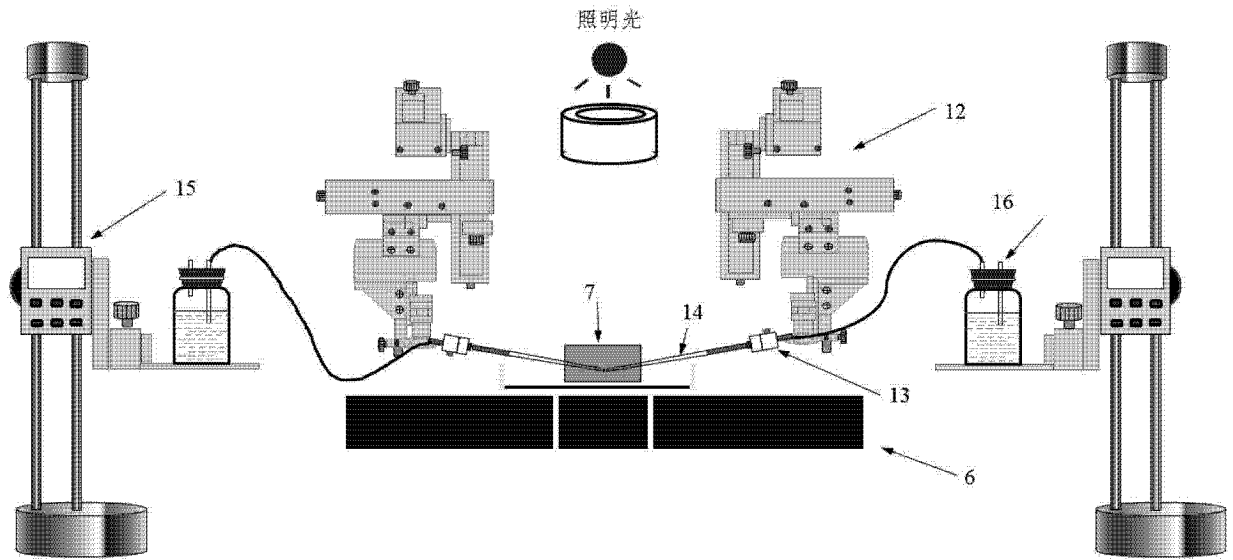


图 3a

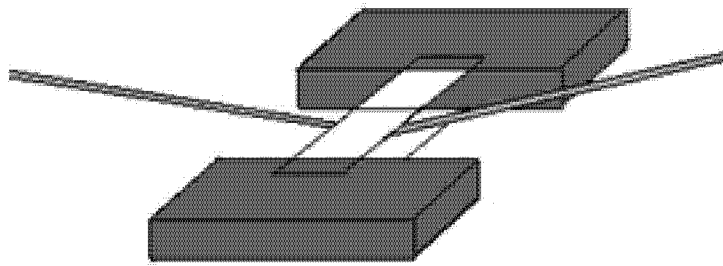


图 3b

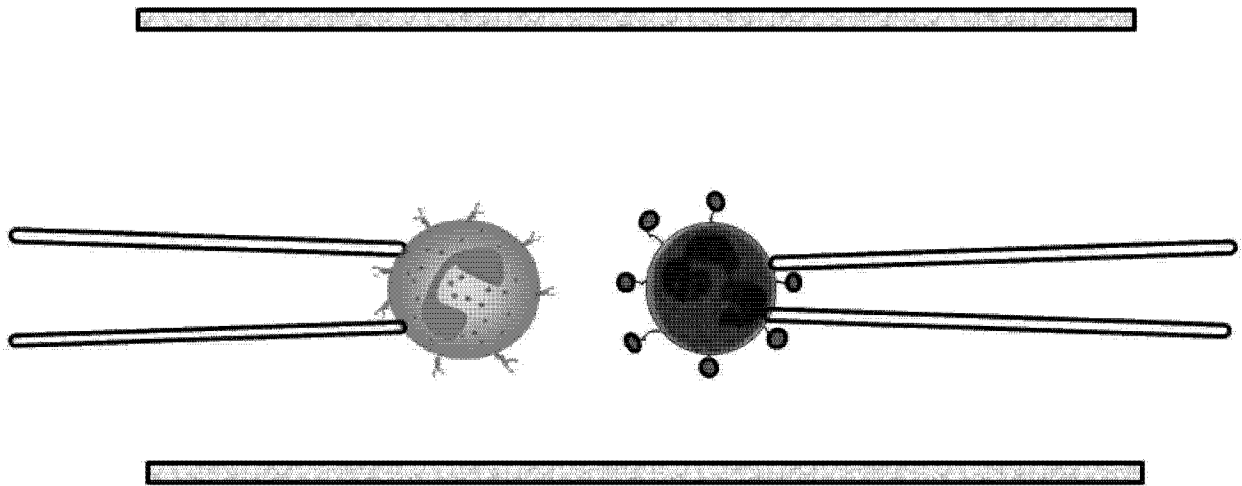


图 3c

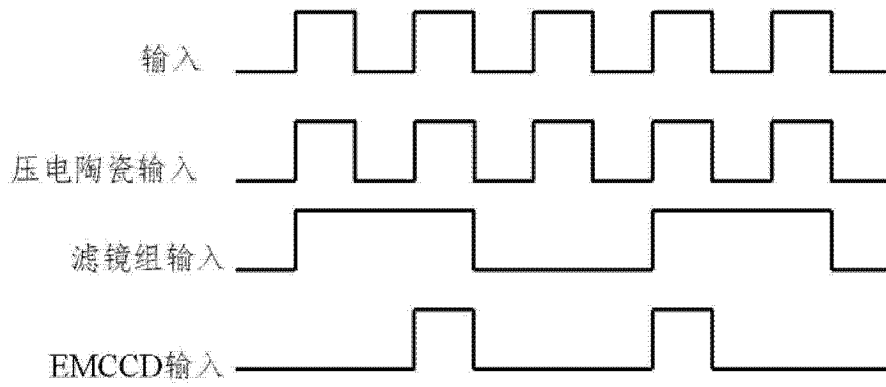


图 4