



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103255053 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201310154255. 9

页第 1 段, 说明书附图 1.

(22) 申请日 2013. 04. 28

CN 102533546 A, 2012. 07. 04, 说明书第

19-22 段, 说明书附图 1-4.

(73) 专利权人 中国科学院力学研究所

US 2004/0126874 A1, 2004. 07. 01, 全文.

地址 100190 北京市海淀区北四环西路 15 号

WO 00/52211 A1, 2000. 09. 08, 说明书第 4 页

第 1 段 - 第 7 页第 3 段, 第 14 页最后一段 - 第 15 页第 1 段, 说明书附图 1.

(72) 发明人 章燕 龙勉 高宇欣

审查员 吴漾

(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)

(56) 对比文件

WO 00/52211 A1, 2000. 09. 08, 说明书第 4 页
第 1 段 - 第 7 页第 3 段, 第 14 页最后一段 - 第 15

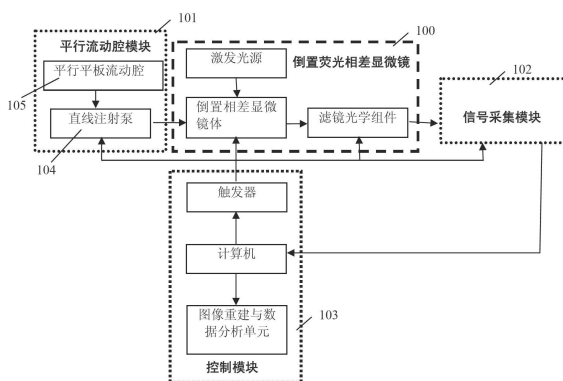
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种可同步实现流动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流动加载与荧光观测的细胞力学装置, 包括: 平行流动腔模块, 用于在剪切流动条件下模拟细胞在人体的流体动力环境; 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, 用于对平行流动腔模块、倒置荧光相差显微镜和信号采集模块的同步触发, 并进行数据分析和处理。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样品平面的细胞进行激发, 通过平行流动腔装置对细胞施加力学刺激, 通过控制模块使力学刺激和荧光激发、采集同步进行, 采用 EMCCD 对数据进行采样, 并对图像进行重建和数据分析, 实现了对群体细胞的流体动力学加载和荧光观测的实时动态结合。



1. 一种可同步实现流动加载与荧光观测的细胞力学装置,其特征在于,包括:

平行流动腔模块,用于在可控的剪切流动条件下模拟细胞在人体的流体动力环境;所述平行流动腔模块包括:平行平板流动腔,形成有流体区域的宽度大于流体区域的高度至少二十倍的腔体;直线注射泵,用于向所述腔体注入细胞悬液;

倒置荧光相差显微镜,用于对所述细胞进行荧光激发,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;

信号采集模块,用于对微弱荧光信号的采集;所述信息采集模块为 EMCCD;

控制模块,用于对平行流动腔模块、倒置荧光相差显微镜和信号采集模块的同步触发,并进行数据分析和处理;所述控制模块进一步包括:

控制计算机,用于安装用户编写的控制软件,通过触发器对直线注射泵、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,用于直线注射泵、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 获得的图像进行数据分析和处理,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;

所述计算机控制信号触发器,启动精密注射泵、显微镜的激发光源、滤镜组和信号采集模块在不同或相同的时序工作,实现流动剪切动力学加载与荧光观测同步进行,以观测到细胞在特定流体剪切作用下的特定时间位点的同步荧光信号的变化。

一种可同步实现流动加载与荧光观测的细胞力学装置

技术领域

[0001] 本发明涉及一种流体动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;细胞对力学刺激的响应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不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对细胞的流体动力学加载与荧光观测相结合的可同步实现流动加载与荧光观测的细胞力学装置,可以实现对群体细胞的动态力学加载以及荧光观测之间的同步化,从而了解力学加载条件下细胞骨架和胞内信号分子的实时动态变化。

[0007] 本发明的一种可同步实现流动加载与荧光观测的细胞力学装置包括:

[0008] 平行流动腔模块,用于在可控的剪切流动条件下模拟细胞在人体的流体动力环境;

[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,用于对平行流动腔模块、倒置荧光相差显微镜和信号采集模块的同步触发,并进行数据分析和处理。

[0012] 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。

[0013] 优选地,所述平行流动腔模块包括:

[0014] 平行平板流动腔,形成有流体区域的宽度远大于流体区域的高度至少二十倍的腔体;

[0015] 直线注射泵,用于向所述腔体注入细胞悬液。

[0016] 优选地,所述信息采集模块为 EMCCD。

[0017] 优选地,所述控制模块包括:

[0018] 控制计算机,用于安装用户编写的控制软件,通过触发器对直线注射泵、EMCCD、滤镜光学组件的运动和开关进行控制;

[0019] 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,用于直线注射泵、EMCCD、滤镜光学组件的运动和开关的同步触发;

[0020] 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。

[0021] 本发明具有如下优点:

[0022] 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,建立力谱-荧光谱耦合的分子-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;

[0023] 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样品平面的细胞进行激发,通过平行流动腔装置对细胞施加力学刺激,通过控制模块使力学刺激和荧光激发、采集同步进行,采用 EMCCD 对数据进行采样,并对图像进行重建和数据分析,实现了对群体细胞的流体动力学加载和荧光观测的实时动态结合。

附图说明

[0024] 图 1 为本发明的原理框图;

[0025] 图 2 为本发明的结构示意图;

[0026] 图 3a 为本发明的平行流动腔的分拆立体结构示意图;

[0027] 图 3b 为平行流动腔腔体的安装结构示意图;

[0028] 图 4 为平行流动腔腔体内细胞剪切的示意图;

[0029] 图 5 为触发器运控示意图。

具体实施方式

[0030] 如图 1、2 所示,本发明一种可实现流动与荧光观测的细胞力学装置由倒置荧光相差显微镜 100、平行流动腔模块 101、信号采集模块 102 和控制模块 103 组成。

[0031] 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、图 3a、图 3b)。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 9EMCCD 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。

[0032] 平行流动腔模块由平行流动腔体 7、精密直线注射泵 8 和管路组成。本实施例中平行流动腔(图 3a、图 3b) 由带有入口和出口的聚碳酸酯底板 71、密封垫圈 72、包被目标细胞的玻片 73、100 μm 厚且不可压缩变形塑料垫圈 74 和聚碳酸酯盖板 75 构成平板流动腔的主要部分。塑料垫圈 74 中间 25 μm \times 76 μm 的方型区域, 即为流体施加的区域。螺丝通过聚碳酸酯盖板 75 上的螺孔与底板 71 的铝制底板拧紧固定。底板 71 和显微镜载物台 6 固定。在玻片 73 和聚碳酸酯底板 71 间夹着 100 μm 厚的可变形的密封垫圈 72, 可以均匀螺丝拧紧后的压力, 从而达到较好的密封流室、在流体流过流室时不渗漏的目的。本实施例中平板流动腔流体区域高度即为垫圈的高度 $h=100\ \mu\text{m}$, 流体区域的宽度为 $W=20\text{mm}$ 、长度为 $L=65\text{mm}$ 。上述流体区域的宽度远大于流体区域的高度至少二十倍, 使得流体流动为层流, 流体的速度分布在空间上只依赖其距离底面的距离。

[0033] 本实施例中由精密的直线注射泵 8 (Harvard apparatus, Pump11Pico Plus, MA170-2213) 驱动的装有缓冲液的注射器(20ml, 内径 19mm), 通过管路连接到组装好的平板流动腔装置的入口, 流动腔装置的出口通过管路连接到细胞悬液。注射泵驱动的注射器、另外一个装有缓冲液的注射器和连接流动腔的管路通过三通连接, 另外的这个装有缓冲液的注射器用来排出管路内的气泡。实验时细胞悬液在注射泵驱动的下通过流动腔装置, 在倒置显微镜相差显微镜(Olympus, IX71) 下观察玻片中间包有目标细胞(图 3 下) 的区域。

[0034] 如图 4 所示, 本实施例中, 将用青色荧光蛋白 CFP 标记的细胞(HL60 细胞)悬液(本实施例中为含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 HBSS) 通过注射器和三通连接管路注入平行流动腔, 保证整个流动腔的管路和流室内不能有任何气泡, 以免影响层流的稳定。流动腔底板预先包被可与 HL-60 细胞发生特异性反应的贴壁细胞, 本实施例中为 HUVEC 细胞。注射泵分别设置为 0.6ml/h、1.5ml/h、3ml/h, 计算机控制信号触发器, 启动精密注射泵 8、显微镜的激发光源 3、滤镜组(2、4) 和信号采集模块 9 在不同或相同的时序工作, 实现流动剪切动力学加载与荧光观测同步进行, 有利于观测到细胞在特定流体剪切作用下(胞所受壁面剪切应力分别为 0.2dyne/cm²、0.5dyne/cm²、1dyne/cm²) 的特定时间位点的同步荧光信号的变化。

[0035] 本实施例中触发波形如图 5, 精密直线注射泵 8 工作后, 滤镜转轮同时转换到目的滤镜(2, 4), 数据采集模块 EMCCD9 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。在实验图像由信号采集模块 9 采集, 存储于计算机内, 采用图像重建和数据分析模块进行在线和离线的数据分析。

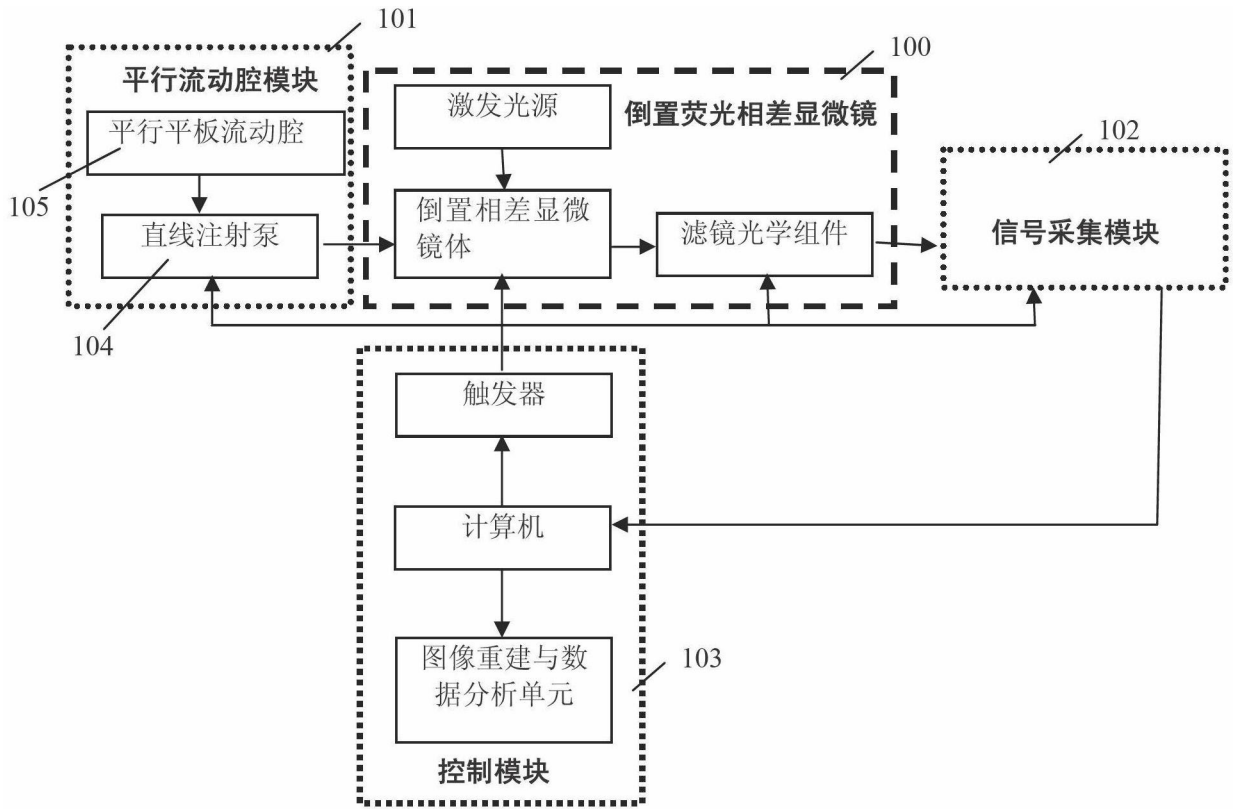


图 1

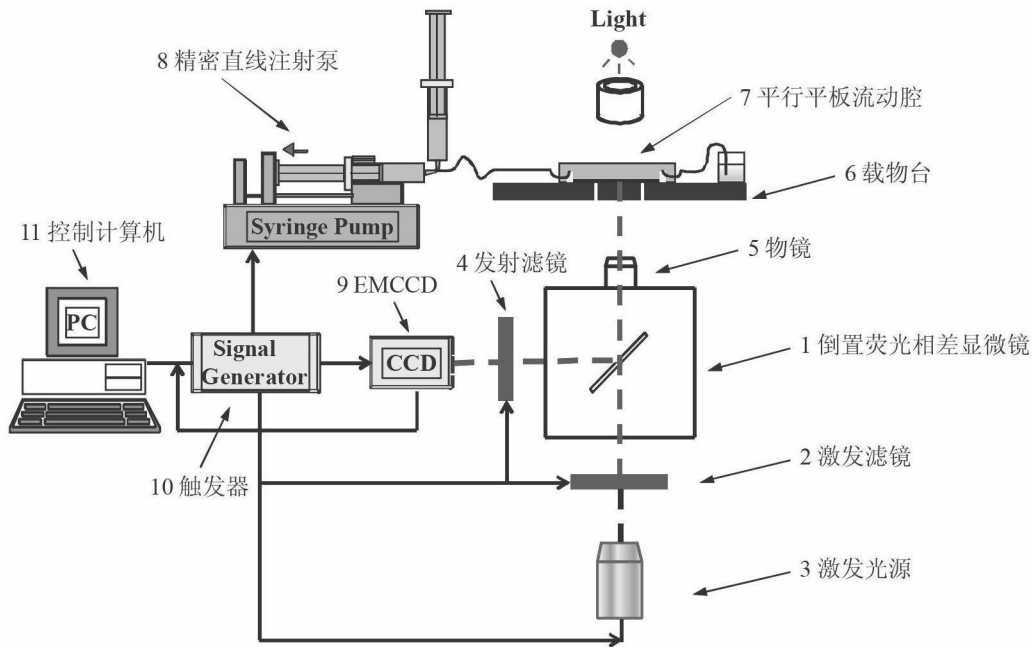


图 2

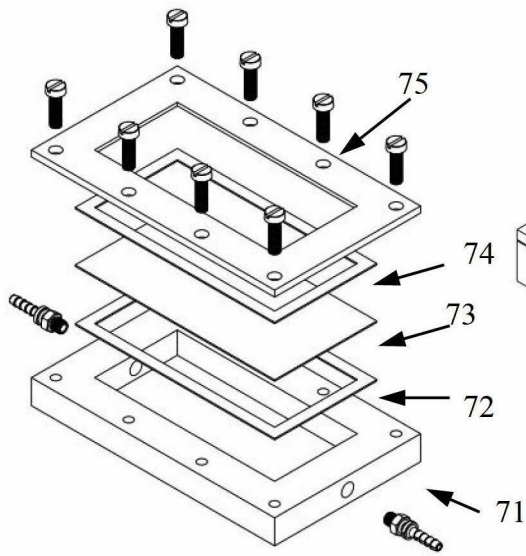


图 3a

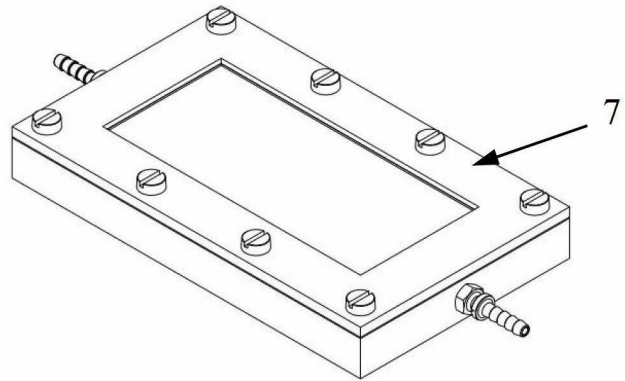


图 3b

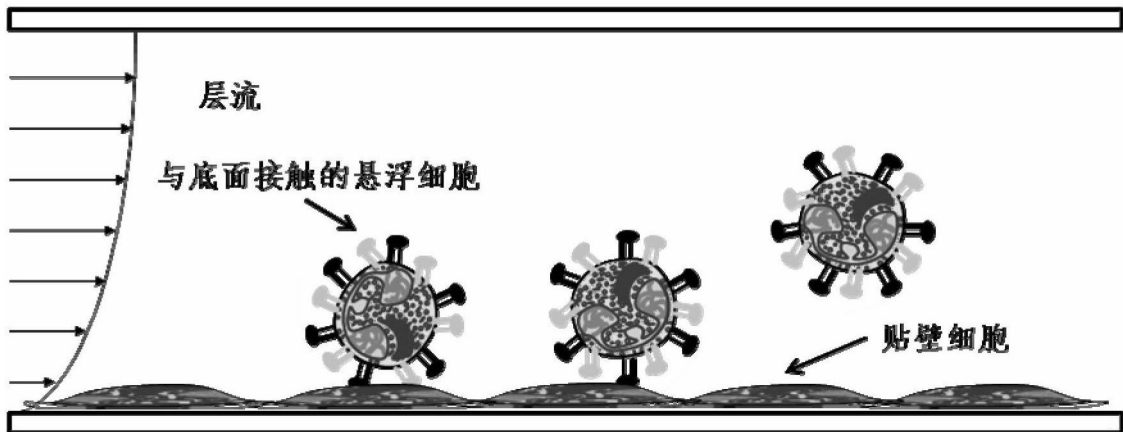


图 4

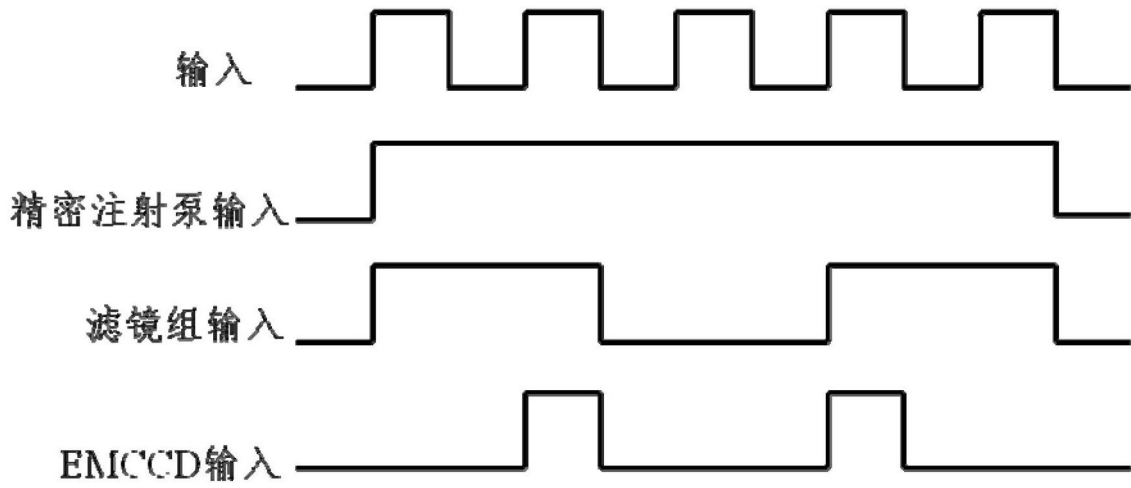


图 5