控制病毒蚀斑定点形成的微注射芯片

许娜, 王计, 杨宇君, 王琰, 张志凌*, 庞代文

生物医学与分析化学教育部重点实验室; 病毒学国家重点实验室; 武汉大学化学与分子科学学院, 武汉 430072

*通讯作者, E-mail: zlzhang@whu.edu.cn

收稿日期: 2015-11-16; 接受日期: 2016-02-24; 网络版发表日期: 2016-04-25

国家高技术研究发展计划(编号: 2013AA032204)、国家自然科学基金(编号: 21175100, 21475099)及湖北省创新研究群体项目(编号: 2014CFA003)资助项目

摘要 蚀斑实验是研究病毒感染动力学最常用的方法, 也是研究病毒与细胞相互作用的方法之一. 但是, 病毒颗粒在溶液中的随机分布导致蚀斑在细胞层上的形成位置难以确定, 因此难以对蚀斑进行长时间的示踪观察. 本文通过设计微流控芯片内微通道的结构和尺寸, 实现了对样品的定点微注射, 研究了喷嘴尺寸和流体流速对微注射的影响. 将该芯片与开放的细胞培养区域结合, 成功实现了牛痘病毒的定点微注射; 对牛痘病毒感染宿主细胞形成的蚀斑及蚀斑的变化进行长时间示踪, 研究了牛痘病毒在宿主细胞之间的传播速率. 本文中设计的微注射芯片解决了长期示踪蚀斑的难题, 为病毒感染动力学研究及病毒与细胞相互作用研究提供了一个新的方法和平台.

关键词 微流控芯片, 微注射, 病毒侵染, 病毒传播

1 引言

病毒是威胁人类健康的主要病原体之一. 2014 年爆发于西非的埃博拉病毒持续一年之久, 在全球范围造成上万人死亡; 埃博拉疫情还未完全结束, 美洲的寨卡病毒出现传播的势头, 迅速升级为全球紧急公共卫生事件^[1]. 病毒的快速传播和扩散是病毒爆发和致命的主要原因. 病毒在宿主体内细胞之间的快速传播也是病毒疫情难以有效控制的原因. 因此, 揭示病毒在细胞间的传播机制, 对于研发切断病毒传播的药物、控制病毒传播和病毒疫情具有重要的意义.

蚀斑实验是病毒学研究中应用最广的体外分析方法, 常用于测定病毒滴度, 研究病毒在胞间的传播

行为等^[2]. 蚀斑是因病毒感染在致密的单层宿主细胞上形成的空斑. 传统的蚀斑实验是将病毒液稀释到一定程度, 以很低的病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)感染宿主细胞, 孵育一段时间后, 观察并分析蚀斑的形成及变化^[3].

尽管传统的蚀斑实验为研究病毒的胞间传播行为提供了方法, 但是蚀斑在单细胞层上形成的位置随机且不可控, 这为研究蚀斑的形成和发展带来一定的困难. 首先, 蚀斑的形成是一个缓慢过程, 需要对荧光标记的病毒进行长时间的示踪和观察^[2,4]. 荧光激发光源在示踪期间需要不间断地开着, 这大大降低了仪器的使用效率, 也严重影响光源的使用寿命. 其次, 由于蚀斑位置不确定, 示踪时必须在带有

引用格式: 许娜, 王计, 杨宇君, 王琰, 张志凌, 庞代文. 控制病毒蚀斑定点形成的微注射芯片. 中国科学: 化学, 2016, 46: 525–532
Xu N, Wang J, Yang YJ, Wang C, Zhang ZL, Pang DW. A microinjector for site-specific formation of virus-induced plaque. *Sci Sin Chim*, 2016, 46: 525–532, doi: 10.1360/N032015-00234

记忆功能的电动载物平台上进行, 通过多视野扫描获得大量的有效数据. 这需要昂贵的仪器, 限制了蚀斑实验的应用范围. 因此, 开发一种能定点注射病毒的微注射装置, 固定蚀斑的形成位置, 将解决蚀斑长期示踪的难题, 为研究病毒的胞间传播行为提供新的方法和平台.

微流控芯片是基于微通道网络的新型分析平台, 具有试剂消耗量少、高通量、易集成、便于微型化等特点, 广泛应用于细胞培养、药物筛选、环境监测等研究中^[5-8]. 微流控芯片中的通道尺寸为微米或纳米级, 为微注射提供了有利的条件. 通过湿法刻蚀, 在硅片或玻璃上刻蚀出微米级的喷嘴, 可以实现液滴的微注射^[9-11]. 但是, 在刚性材质上制备微通道, 方法复杂, 材料成本高, 限制了微注射装置的制作和应用. 聚二甲基硅氧烷(PDMS)是一种弹性高分子材料, 可塑性强, 生物相容性好, 通过软光刻技术可以实现大规模制备, 成本较低, 是微流控芯片的常用材料. Jeon 等^[12]设计了带有微阀、通道宽度为 10 μm 的 PDMS 微流控芯片, 通过微阀控制实现了不同样品的间歇性进样. 此外, PDMS 微通道可以与开放的细胞培养区域相连, 便于细胞培养和操控. Chen 等^[13]制作出含宽度为 8 μm 的喷嘴结构的 PDMS 微流控芯片, 将喷嘴与细胞培养区域相连, 用于细胞对药物刺激应答的研究. 微通道与开放的细胞培养小室相连, 还可用于研究细胞的定向迁移行为^[14,15].

基于以上想法, 本文设计了一种开放式的定点微注射芯片, 芯片由大尺寸的主通道和小尺寸的喷嘴组成, 喷嘴外部是开放式的细胞培养区域, 病毒通过喷嘴出口接种在固定的位置, 感染宿主细胞后形成蚀斑. 通过注射荧光素(FITC)和荧光球, 考察了小分子和小粒径颗粒的微注射效果. 通过控制喷嘴的尺寸和流体的流速, 病毒颗粒数可控制在 4 个左右, 成功实现了病毒的定点微量注射. 示踪喷嘴出口位置的蚀斑形成及变化, 只需要普通的荧光倒置显微镜, 大大减少了蚀斑实验对仪器的依赖性, 为研究病毒传播行为提供了便利.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

精密镀铬玻璃板掩膜由深圳市路维光电股份有

限公司(中国)制作, 胶片掩膜由上海凯盛电子有限公司(中国)制作. 单晶硅片(2 英寸)购自上海智研电子科技有限公司(中国). 光刻胶 AZ4620 和显影液 AZ400K 均购自安智电子材料有限公司(美国). SU8-2002 光刻胶购于 Micro Chem 公司(美国). 聚二甲基硅氧烷(PDMS, 包括 RTV615A 和 RTV615B)购于东芝有机硅股份有限公司(日本). 苯乙烯丙烯酰胺共聚荧光球(直径约 200 nm)由本实验室合成^[16]. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)培养基和 Gibco 胎牛血清(FBS)均购自 Invitrogen 公司(美国).

紫外光刻机(型号: G-17)购于成都鑫南光机械设备有限公司(中国). 等离子清洗器(型号: PDC-M)购于成都铭恒科技发展有限公司(中国). 流动注射泵购于保定兰格恒流泵有限公司(中国). 细胞培养箱(型号: 3111)购于 Thermo Fisher Scientific 公司(美国). Nikon 倒置荧光显微镜(型号: TE2000-U)购于尼康公司(日本).

非洲绿猴肾细胞(Vero)购于武汉大学典型微生物保藏中心(中国). 携带绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)表达基因的牛痘病毒(vaccinia virus, VACV)由中国科学院武汉病毒研究所王汉中研究员提供.

2.2 实验方法

2.2.1 模板的设计和制作

微注射芯片(图 1(A))由主通道和喷嘴两部分组成. 主通道的宽度为 100 μm , 高度约 20 μm , 喷嘴的长度为 1 mm, 高度约 2 μm , 宽度设计为 10、5 和 2 μm 3 种类型.

芯片的模板通过两步光刻法来制作, 过程如图 1(B)所示. 第一步, 制备喷嘴的模板. 将 SU8-2002 光刻胶旋涂(5000 r/min, 60 s)在硅片上, 烘干后, 在上面覆盖玻璃板掩膜, 在紫外光($I=5\text{ A}$)下曝光 15 s, 经过后烘处理后, 用 SU8 显影液显影, 并用异丙醇冲洗. 第二步, 制备主通道的模板. 在第一步光刻的基础上, 将 AZ4620 旋涂在硅片上, 烘干. 在上面覆盖胶片掩膜, 胶片掩膜的标记符号“+”要与硅片上的“+”号对齐, 然后在紫外光下曝光. 显影后即可得到模板.

2.2.2 芯片的制作

将 PDMS 的 A 胶和 B 胶以 10:1 的比例混合搅匀,

图 1 (A) 开放式微注射芯片的示意图. i) 俯视图; ii) 三维图. (B) 两步法光刻的示意图. i) 用 SU-8 光刻胶制作喷嘴层; ii) 用 AZ4620 光刻胶制作主通道层. (C) 芯片实物图. i) 芯片和培养皿对接后的装置实物图; ii) 侧视图; iii) 俯视图(网络版彩图)

消泡后倒在模板上. 在 75°C 下放置 2 h, 使其固化. 将固化后的 PDMS 剥离下来, 用手术刀沿喷嘴出口截面切开, 去掉多余的 PDMS. 用平头针在主通道的出入口处打孔, 然后将 PDMS 与载玻片键合, 用于 FITC 和荧光球的微注射(图 1(C)). PDMS 与盖玻片键合, 高压灭菌后, 固定于细胞培养皿中, 用于细胞培养和蚀斑实验. 在培养皿的盖子上打两个孔, 插入平头针, 用于注射病毒样品(图 1(C)).

2.2.3 流体场模拟

采用 Comsol Multiphysics 4.0 软件, 利用有限元分析法, 模拟微通道内流体的流动. 主通道的参数设定为高度 $20\text{ }\mu\text{m}$ 、长度 2 mm 、宽度 $100\text{ }\mu\text{m}$, 喷嘴的高度 $2\text{ }\mu\text{m}$ 、长度 1 mm . 喷嘴宽度分别设为 10 、 5 或 $2\text{ }\mu\text{m}$, 考察喷嘴宽度对喷嘴出口处流体流速的影响. 主通道入口处流体流速分别设定为 5 、 10 或 $30\text{ }\mu\text{L/h}$, 考察主通道入口流体的流速对喷嘴出口处流体流速

的影响. 主通道出口和喷嘴出口处的压力设为 0 Pa . 主通道的空间采用大网格划分, 喷嘴内的空间采用最精细的网格划分.

2.2.4 荧光素微注射实验

采用异硫氰酸荧光素(FITC, $1.0\times 10^{-3}\text{ mg/mL}$)考察芯片定点微注射的效果. 利用恒流泵以一定流速向主通道内注入 FITC, 保持 $15\sim 30\text{ min}$; 然后关闭恒流泵, 保持芯片静止不动, 观察 FITC 的扩散情况. 在荧光显微镜下采集 FITC 的荧光信号变化, 每隔 30 s 成像一次.

利用 FITC 考察主通道注入流体的流速、喷嘴宽度和扩散介质对微注射液滴的有效半径和喷出时间的影响. 液滴的有效半径定义为喷嘴出口至荧光强度下降到 90% 最大荧光强度(扣除背景后)的位置. 喷出时间定义为从开始注射至喷嘴出口有溶液喷出的间隔时间. 固定喷嘴宽度为 $5\text{ }\mu\text{m}$, 扩散介质为水, 考察主通道注入流体的流速分别为 10 和 $30\text{ }\mu\text{L/h}$ 时的有效半径和喷出时间. 固定主通道注入流体的流速为 $30\text{ }\mu\text{L/h}$, 扩散介质为水, 考察喷嘴宽度为 10 和 $5\text{ }\mu\text{m}$ 时的有效半径和喷出时间. 固定喷嘴宽度为 $10\text{ }\mu\text{m}$, 注入流速为 $30\text{ }\mu\text{L/h}$, 考察扩散介质为水和琼脂糖时的有效半径和喷出时间.

2.2.5 荧光球微注射实验

为更真实地模拟病毒的微注射效果, 采用与病毒颗粒相近(直径约 200 nm)的荧光球进行微注射, 观察荧光球的注射效果. 固定喷嘴宽度为 $5\text{ }\mu\text{m}$, 注入流速为 $10\text{ }\mu\text{L/h}$, 荧光球的浓度为 $1.0\times 10^9\text{ 个/mL}$, 考察微注射的有效半径和喷出时间.

2.2.6 蚀斑实验

Vero 细胞用 0.25% 的胰酶消化, 制成细胞悬浮液, 接种到芯片侧面的开放式细胞培养区域, 然后将装置置于细胞培养箱中(37°C , $5\%\text{ CO}_2$), 培养 24 h , 使之形成致密的细胞单层. 用 1 mL 无菌注射器吸取一定体积的牛痘病毒悬浮液(滴度为 $5.62\times 10^6\text{ PFU/mL}$), 置于恒流泵上, 将注射器与芯片(喷嘴宽度 $5\text{ }\mu\text{m}$)连接后静置 15 min , 使培养皿内的液体稳定. 启动恒流泵注射牛痘病毒, 以 $10\text{ }\mu\text{L/h}$ 的流速注射 30 min 后, 关闭恒流泵, 在培养箱中孵育 30 min , 使病毒吸附. 随后撤掉注射器, 加入柠檬酸缓冲液($\text{pH } 3.0$, 含有

40 mmol/L 柠檬酸钠, 10 mmol/L KCl, 135 mmol/L NaCl)灭活未吸附的病毒, 用 1×PBS 清洗 3 次. 然后加入 0.5% 的低熔点琼脂糖半固体培养基(用含 2% FBS 的 DMEM 培养基配制), 在 4℃ 下放置 10 min 使琼脂糖固化. 将装置放入培养箱中, 每隔一定时间在倒置荧光显微镜下成像.

3 结果与讨论

3.1 流体模拟

为了研究芯片微通道内流体的流速分布, 我们利用 Comsol Multiphysics 4.0 软件模拟了芯片内流体的流动. 图 2 展示的是注入流速 10 $\mu\text{L/h}$, 喷嘴的宽度分别为 10、5 和 2 μm 时, 各通道内的流体剖面图. 从图 2 可以看出, 主通道内的流体为层流状(图 2(a~c)); 在喷嘴入口处, 横截面上流体的流速变化不均匀, 呈湍流状(图 2(d~f)); 在喷嘴出口处, 横截面上流速的分布比入口处均匀(图 2(g~i)), 并表现为层流状. 可见, 由于喷嘴的存在, 在主通道内呈层流状的流体在喷嘴入口处会产生小的湍流, 从而在与主通道垂直的喷嘴方向产生流体分速度, 推动流体从喷嘴喷出, 实现该芯片的微注射功能.

表 1 是不同的喷嘴宽度和注入流速对各通道内最大线性流速的影响. 表 1 显示, 主通道内流体的流速与注入流速相关, 与喷嘴宽度无关. 注入流速为 5 $\mu\text{L/h}$, 喷嘴宽度分别为 10、5 和 2 μm 时, 主通道中心处流体的最大线性流速均约为 $(6.73\pm 0.11)\times 10^{-3}$ m/s. 当注入流速由 5 $\mu\text{L/h}$ 增加至 30 $\mu\text{L/h}$ 时, 主通道内的流速增加至 $(4.04\pm 0.67)\times 10^{-2}$ m/s, 与注入流速呈等比例增加.

喷嘴入口和出口处的流速同时受到喷嘴宽度和注入流速的影响, 且喷嘴出口处的流速低于喷嘴入口处的流速. 以注入流速 10 $\mu\text{L/h}$ 为例, 喷嘴宽度为 10、5 和 2 μm 时, 喷嘴入口处的最大线性流速分别为 2.26×10^{-4} 、 1.98×10^{-4} 和 1.22×10^{-4} m/s, 喷嘴出口处的最大线性流速分别为 1.21×10^{-4} 、 1.24×10^{-4} 和 6.14×10^{-5} m/s, 随喷嘴宽度的减小而降低. 但是, 当喷嘴宽度由 10 μm 降至 5 μm 时, 喷嘴入口处和出口处流体的流速降低的趋势不明显; 当喷嘴宽度降到 2 μm 时, 喷嘴入口和出口处的流速都明显减小. 这说明喷嘴入口处产生湍流的大小与喷嘴的尺寸密切相关. 从模拟的结果看出, 喷嘴的长度、宽度和高度

三者之中尺寸最小的物理量可能是喷嘴内流体分速度的决定因素.

以喷嘴宽度 10 μm 为例, 当注入流速为 5、10 和 30 $\mu\text{L/h}$ 时, 喷嘴出口处的最大流速分别为 6.54×10^{-5} 、 1.21×10^{-4} 和 3.93×10^{-4} m/s, 与注入流速呈正相关, 说明喷嘴内流体的流速与主通道内流体流速有关.

3.2 FITC 的微注射

为了确认芯片的微注射功能, 选择 FITC 为小分子样品进行分析测试. 图 3 展示了以 30 $\mu\text{L/h}$ 的流速向喷嘴宽度为 10 μm 的芯片内注入 FITC, 喷嘴外介

图 2 微通道内的流体模拟(主通道注入流体的流速为 10 $\mu\text{L/h}$). (a~c) 分别为喷嘴宽度为 10、5 和 2 μm 时, 主通道内的流体场分布; (d~f) 分别为对应宽度喷嘴入口处的流体场分布; (g~i) 分别为对应宽度喷嘴出口处的流体场分布(网络版彩图)

表 1 微通道内流体的流速

注入流速 ($\mu\text{L/h}$)	喷嘴宽度 (μm)	主通道内中 心流速(m/s)	喷嘴入口处 最大流速 (m/s)	喷嘴出口处 中心流速 (m/s)
5	10	6.60×10^{-3}	8.61×10^{-5}	6.54×10^{-5}
	5	6.78×10^{-3}	7.34×10^{-5}	6.48×10^{-5}
	2	6.80×10^{-3}	3.37×10^{-5}	2.29×10^{-5}
10	10	1.33×10^{-2}	2.26×10^{-4}	1.21×10^{-4}
	5	1.31×10^{-2}	1.98×10^{-4}	1.24×10^{-4}
	2	1.34×10^{-2}	1.22×10^{-4}	6.14×10^{-5}
30	10	3.96×10^{-2}	5.17×10^{-4}	3.93×10^{-4}
	5	4.07×10^{-2}	4.40×10^{-4}	3.89×10^{-4}
	2	4.08×10^{-2}	2.02×10^{-4}	1.37×10^{-4}

图 3 FITC 的微注射效果(注入流速 30 $\mu\text{L/h}$, 喷嘴宽度 10 μm). (a) 芯片的明场图和 FITC 的注射效果; (b) 停止注射后, FITC 在水中的扩散效果(网络版彩图)

质为水时, FITC 的喷出(图 3(a))和扩散(图 3(b))效果. 结果显示, 喷嘴处 FITC 呈液滴状, 其有效半径随注入时间而增加, 在注入 10 min 后, 有效半径保持稳定. 在喷嘴出口处, FITC 浓度不断积累, 同时 FITC 向外扩散, 待积累和扩散达到动态平衡稳定时, 宏观呈现出一个稳定的“源”. 停止注入 FITC 后, “源”内的 FITC 逐渐向外扩散, “源”的荧光强度逐渐减弱, 15 min 后基本消失.

3.3 注入流速、喷嘴宽度和扩散介质对 FITC 微注射的影响

为了优化微注射的条件, 我们考察了注入流速、喷嘴宽度和扩散介质对有效半径和喷出时间的影响, 对微注射的效果进行定量分析. 有效半径的计算方法是以喷嘴处为起点, 沿平行于喷嘴的方向取一射线(图 4(a)), 测量线上的 FITC 的荧光强度, 然后扣除背景荧光, 以最大荧光强度的 90% 为临界值, 临界点与喷嘴出口的距离为有效半径. 从 FITC 开始注入到喷嘴出口处喷出 FITC 所需要的时间定义为喷出时间, 用于估算被注入样品的体积.

图 4 展示的是喷嘴宽度为 5 μm , FITC 的注入流速分别为 30 和 10 $\mu\text{L/h}$ 时, 荧光强度的变化曲线. 从荧光强度变化曲线(图 4(b, c))和对有效半径的定量分析(图 4(d))看出, 在同一流速下, 有效半径随时间增加而增大, 并逐渐趋于稳定; 达到稳定的时间与注入流速相关, 当注入流速为 30 $\mu\text{L/h}$ 时, 注射约 8 min 后,

有效半径达到稳定; 当注入流速为 10 $\mu\text{L/h}$ 时, 注射约 10 min 后, 有效半径达到稳定.

表 2 为不同注入流速、喷嘴宽度和扩散介质对有效半径和喷出时间的影响. 结果显示, 当喷嘴宽度为 5 μm , 注入流速由 10 $\mu\text{L/h}$ 增加到 30 $\mu\text{L/h}$ 时, 有效半径由 $292 \pm 51 \mu\text{m}$ 增加到 $368 \pm 17 \mu\text{m}$, 喷出时间由 $690 \pm 98 \text{ s}$ 降低到 $185 \pm 37 \text{ s}$. 可见, 有效半径随注入流速的增加而增加, 喷出时间则相反. 当固定注入流速为 30 $\mu\text{L/h}$, 喷嘴宽度由 5 μm 增加至 10 μm 时, 有效半径增加至 $488 \pm 13 \mu\text{m}$, 喷出时间降低至 $145 \pm 29 \text{ s}$.

当固定注入流速为 30 $\mu\text{L/h}$, 喷嘴宽度 10 μm , 将扩散介质改成琼脂糖半固体培养基时, 样品有效半径增加到 $813 \pm 82 \mu\text{m}$, 喷出时间降为 $101 \pm 21 \text{ s}$. 这可能是由水和琼脂糖的物理状态差异决定的. 当流体从主通道入口注入, 从喷嘴出口处喷出时, 其驱动力是入口和出口处的压力差. 当开放区域的介质改变时, 介质的物理状态(相、密度、孔隙)会影响入口和出口的压力差. 与液态的水相比, 半固体状态的琼脂糖具有一定的孔隙, 压力差相对较大, 因此, 样品的喷出速度相对更快.

3.4 荧光球的微注射

为更真实地模拟病毒颗粒的微注射和扩散, 采用与牛痘病毒粒径相近的荧光球(直径约 200 nm)进行了模拟实验. 荧光球的浓度为 1.0×10^9 个/mL, 呈单分散状, 在显微镜下可以观察到单颗球的荧光. 在流速 10 $\mu\text{L/h}$, 喷嘴宽 5 μm 条件下进行荧光球注入模拟, 得出图 5 所示结果. 从图中可以看出, 随着注射时间的增加, 荧光球的数目逐渐增多, 扩散半径也随之增加; 在注射 15 min 后, 荧光球扩散半径增加速率变慢; 30 min 时停止注射. 停止注射后, 大多数荧光球在自身所在位置附近运动, 仅个别的荧光球会向外扩散, 可扩散的最大半径为 $275 \pm 38 \mu\text{m}$. 荧光球的微注射现象与 FITC 略有不同, 喷嘴出口处荧光球的荧光不会消失, 且有效半径达平衡所需时间较长. 这是由于 FITC 是小分子物质, 在浓度差的作用下, 由高浓度区域向低浓度区域扩散, 扩散至足够低的浓度时, 就难以观察到荧光. 而荧光球的体积较大, 在单颗粒状态下也可观察到荧光, 不会由于扩散而导致荧光“消失”; 荧光球的有效半径达到稳定的时间较长, 可能是因为荧光球的扩散速率比 FITC 慢. 在注入流速 10 $\mu\text{L/h}$, 喷嘴宽度为 5 μm 时, 荧光球的喷出时间为

图 4 (a) FITC 微注射效果的分析方法示意图; (b, c) 流速分别为 30 和 10 $\mu\text{L/h}$ 时, 荧光强度的变化曲线; (d) 不同流速时, FITC 的有效半径随注射时间的变化曲线(网络版彩图)

表 2 注入流速、喷嘴宽度和扩散介质对有效半径和喷出时间的影响

注入流速 ($\mu\text{L/h}$)	喷嘴宽度 (μm)	扩散介质	有效半径 (μm)	喷出时间(s)
10	5	水	292 ± 51	690 ± 98
30	5	水	368 ± 17	185 ± 37
30	10	水	488 ± 13	145 ± 29
30	10	琼脂糖	813 ± 82	101 ± 21

$668\pm81\text{ s}$, 与 FITC 的结果没有显著性差异。

3.5 病毒的微量注射和蚀斑的定点形成

理论上, 一个蚀斑应该是由一颗病毒颗粒感染而引起的。因此, 利用微注射芯片进行蚀斑实验时, 注入病毒的颗粒数越少, 颗粒越集中, 就越能满足蚀斑实验的要求。根据 FITC 和荧光球的模拟实验可知, 注入流速越小, 喷嘴宽度越小, 注射时间越短, 被注射样品有效半径就越小, 样品的注射量也越少。然而在实际操作中, 可操作的注入流速和喷嘴宽度受到仪器设备的限制。因此, 综合考虑各种因素, 选择的蚀斑实验的条件为: 主通道入口流速为 $10\text{ }\mu\text{L/h}$, 喷嘴宽度为 $5\text{ }\mu\text{m}$, 高度为 $2\text{ }\mu\text{m}$, 培养基溶液作为开放区域介质。

图 5 荧光球的微注射效果(注入流速为 $10\text{ }\mu\text{L/h}$, 喷嘴宽度 $5\text{ }\mu\text{m}$)。 (a) 注射 15、20 和 30 min 荧光球的扩散效果; (b) 停止注射后 10、20 和 30 min 的荧光球的扩散。虚线半圆内的亮点为荧光球

根据不可压缩理想流体的 Navier-Stokes 方程, 喷嘴处流体的体积流速 Q 为:

$$Q = \frac{1}{2} A v$$

因此, 注入牛痘病毒的数目为:

$$N = Qtc = \frac{1}{2} Avtc \times 10^9$$

式中 A (m^2) 为喷嘴横截面的面积, v (m/s) 为喷嘴出口处的中心流速, t (s) 为病毒注入的时间, t = 注射总时间 - 喷出时间, c (PFU/mL) 为牛痘病毒的滴度。

在实验条件下, 喷嘴出口处流体的中心流速为 $1.24 \times 10^{-4} \text{ m/s}$, 流体喷出时间为 $668 \pm 81 \text{ s}$. 实验中使用的牛痘病毒的滴度为 $5.62 \times 10^6 \text{ PFU/mL}$, 总注射时间为 30 min . 据此计算, 牛痘病毒的数目约为 4. 对细胞核间距进行统计分析, 发现细胞伸展的尺寸为 $16.96 \pm 2.51 \text{ } \mu\text{m/cell}$, 因此, 病毒最多可以扩散到喷嘴附近 12~21 个细胞的位置处, 后续对蚀斑进行示踪时, 只需要示踪喷嘴附近的位置即可。

将牛痘病毒液注入到芯片中, 并在培养箱中孵育, 得到牛痘病毒感染产生的蚀斑(图 6(a)). 在注入病毒 9 h 后, 可观察到表达了绿色荧光蛋白的被感染细胞, 从图中可以看到, 只有喷嘴出口附近的细胞才能被感染. 随着感染时间的增加, 牛痘病毒逐渐向邻近的细胞传播, 产生的蚀斑逐渐增大. 以蚀斑半径对感染时间作图, 并进行线性拟合(图 6(b)), 得到的直线斜率即牛痘病毒在细胞间传播的速率, 约为 $10.99 \pm 0.42 \text{ } \mu\text{m/h}$.

4 结论

在本研究中, 我们设计了一种具有定点微注射功能的开放式微流控芯片. 该芯片由一个大尺寸的主通道和垂直方向上的喷嘴组成, 喷嘴出口外是开放式的细胞培养区域. 有限元模拟分析显示, 微注射的驱动力主要来自流体流动, 主通道内层流的流体在喷嘴和主通道交界处产生湍流, 流体在垂直方向产生分速度, 从喷嘴喷出. 利用 FITC 和荧光球研究了微注射的效果, 发现有效半径和喷出时间与主通道内流体的流速、喷嘴宽度和开放区域的介质有关。

致谢 本研究中的牛痘病毒由中国科学院武汉病毒研究所王汉中研究员无偿提供, 特此致谢。

参考文献

- 1 洪志恒, 任瑞琦, 罗莉, 李越, 王亚丽, 向妮娟, 涂文校, 孟玲, 金连梅, 倪大新. 疾病监测, 2015, 30: 990-993
- 2 Doceul V, Hollinshead M, van der Linden L, Smith GL. *Science*, 2010, 327: 873-876
- 3 Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 5th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publisher, 2007. 36-37
- 4 Xu N, Wang J, Zhang ZF, Pang DW, Wang HZ, Zhang ZL. *Biomaterial*, 2014, 35: 5049-5055

图 6 (a) 牛痘病毒在微注射芯片上形成的蚀斑随感染时间的变化; (b) 蚀斑的半径随感染时间的变化和线性拟合图(网络版彩图)

当喷嘴宽度控制在 5 μm , 主通道流速为 10 $\mu\text{L/h}$ 时, 牛痘病毒的注射量成功地被控制在 4 颗左右, 感染细胞的位置被控制在喷嘴附近. 通过蚀斑半径的变化, 我们计算出牛痘病毒在 Vero 细胞间的传播速率为 $10.99 \pm 0.42 \text{ } \mu\text{m/h}$. 本文设计的微注射芯片除了可以应用于病毒样品的注射之外, 还可以用于药物、染料等生化试剂的注射. 本装置不仅为病毒蚀斑的相关研究提供了一个有力的平台, 也为进一步揭示病毒与细胞的相互作用提供了新的技术手段。

- 5 Mark D, Haeberle S, Roth G, Von SF, Zengerle R. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 1153–1182
- 6 Jokerst JC, Emory JM, Henry CS. *Analyst*, 2012, 137: 24–34
- 7 刘雯婷, 陈红梅, 聂富强. 科学通报, 2016, 61: 364–373
- 8 Kovarik ML, Gach PC, Ornoff DM, Wang Y, Balowski J, Farrag L, Allbritton NL. *Anal Chem*, 2012, 84: 516–540
- 9 Tseng FG, Kim CJ, Ho CM. *J Microelectromech S*, 2002, 11: 427–437
- 10 Tseng FG, Kim CJ, Ho CM. *J Microelectromech S*, 2002, 11: 437–447
- 11 Delubac D, Highley CB, Witzberger-Krajcovic M, Ayoob JC, Furbee EC, Minden JS, Zappe S. *Lab Chip*, 2012, 12: 4911–4919
- 12 Jeon NL, Chung BG, Lin F. *Lab Chip*, 2006, 6: 764–768
- 13 Chen Y, Li X, Liu L, Wang L, Kamei K, Yuan QH, Zhang F, Shi J, Kusumi A, Xie M, Zhao ZJ. *Lab Chip*, 2011, 11: 2612–2617
- 14 Keenan TM, Frevert CW, Wu A, Wong V, Folch A. *Lab Chip*, 2010, 10: 116–122
- 15 Jowhar D, Wright G, Samson PC, Wikswo JP, Janetopoulos C. *Integr Biol*, 2010, 2: 648–658
- 16 Xie HY, Zuo C, Liu Y, Zhang ZL, Pang DW, Li XL, Gong JP, Dickinson C, Zhou WZ. *Small*, 2005, 1: 506–509

A microinjector for site-specific formation of virus-induced plaque

Na Xu, Ji Wang, Yu-Jun Yang, Cheng Wang, Zhi-Ling Zhang^{*}, Dai-Wen Pang

Key Laboratory of Analytical Chemistry for Biology and Medicine (Ministry of Education); State Key Laboratory of Virology; College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

^{*}Corresponding author (email: zlzhang@whu.edu.cn)

Abstract: Virus-induced plaque is the most commonly used method for the research of virus dynamics and the interaction between viruses and their host cells. However, it is difficult to achieve the real-time and long-term monitoring of the virus-induced plaques due to the random formation situation on the cell layer. In this paper, we designed a microfluidic chip with a virus injection nozzle and an open cell culture area to generate the virus-induced plaque at a fixed location. The injection property was evaluated by FITC and fluorescent sphere and the fluid dynamics was theoretically simulated. The number of injected virus particles can be controlled through regulating flow rate, nozzle width and injection time. Plaques were formed at the output location of nozzle. The formation and growth of vaccinia virus-induced plaques were tracked and the spreading speed of the virus among the host cells was analyzed. Our work provided a new platform for virus research, which will help to reveal the mechanism of virus spread and the interaction between viruses and the host cells.

Keywords: microinjection, microfluidic chip, virus infection, virus spread

doi: 10.1360/N032015-00234