

文章编号 1004-924X(2003)05-0432-06

细胞注射玻璃微针拉针器的研制

刘天军,章维一,侯丽雅

(南京理工大学 机械工程学院,江苏 南京 210094)

摘要:为了解决拉针器国产化的问题,设计出温度、拉力、拉伸速度等参数可变的试验机。以国产玻璃毛细管为拉制原材料,进行了基于方差分析基础上的4组加热温度、拉力、拉伸速度的不同配置的系列实验,分析了在毛细玻璃管拉伸预拉力在1 280~1 310 g强度允许范围内变化及加热温度对针的长度影响,在试验机上进行了用于微流量分析的圆形玻璃微管道控制试验,研究了拉伸行程及加热温度对微管道内径的影响,实现了仪器的性能多样化。最后提出了拉针器商品化的设计方案。

关键词:微注射;拉针器;微玻璃针;微管道

中图分类号:TQ171.74 文献标识码:A

Development of cell injection pipette puller

LIU Tian-Jun, ZHANG Wei-Yi, HOU Li-Ya

(School of Mechanical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, China)

Abstract: In order to be able to produce cell injection pipette pullers in China, tests were run on test machines using Chinese-made material at different heating temperatures, pulling forces and pulling velocities based on variance analysis to study the variation of glass capillary pre-pull force within the permissible strength limits of 1 280 g ~ 1 310 g, and the effect of heating temperature on length of pipette. Round pipettes to be used for micro-flow analysis were trial produced on test machines to study the effect of pull stroke and heating temperature on the inner diameter of pipette and diversify the performance of instruments. A design scheme is proposed for commercialization of pipette pullers.

Key words: microinjection; micropipette puller; glass micropipette; microchannel

1 引言

近年来,随着生物工程技术的发展,细胞操作及微量液体检测的应用越来越广泛。细胞操作主要包括细胞核移植、细胞内药物注射、细胞核内DNA注射、胚胎注射及细胞单个分离。主要操作

工具是玻璃微针,对普通细胞注射要求针尖内孔直径在0.5~4 μm,细胞质内单精子注射中针尖内孔直径在4~5 μm,精原干细胞移植研究中卵细胞注射时针尖内孔直径在40 μm,细胞核移植及细胞单个分离要求将玻璃微针针尖磨制或锻烧成指定的形状用于吸持或勾取细胞^[1]。微量检

收稿日期:2003-03-16;修订日期:2003-08-20.

基金项目:国家“十五”863计划(No. 2001AA423220)

江苏省高技术研究计划(BG2001023)

博士学科点专项科研基金(No. 2001028801)

测要求的微管道内径在 $50\ \mu\text{m}$ 以下,而且两端应能有宏观尺度上的连接并有足够的强度。由于微操作的成功率仅在 10% 左右,玻璃微针只能一次性使用,因此我国每年消耗的玻璃微针数量巨大。

玻璃微针的生产在微操作附属设备上进行。目前我国的微操作设备全部依赖进口,外商一般以微注射器与微拉针器、磨针器、锻针器等附属设备进行捆绑式销售。世界上较著名的制造商有美国的 Sutter 公司和日本的 Nikon 公司。微拉针器的售价约在 3 000 美元左右,配售专用拉针所需的毛细玻璃管单只售价近 1 元人民币。由于所售微拉针器在拉制微针时是根据该配售毛细玻璃管材料及规格制定的,拉伸工艺参数制作成数个模式固化到机器的控制芯片中。当我国用户试图利用该拉针器以国产毛细玻璃管为原材料拉制微针时基本上达不到微注射的基本要求,只能购买进口毛细玻璃管,所耗费用极高,因此微拉针器的国产化是一个非常紧迫性的课题^[2]。

在微量化学分析仪器、微流量传感器和微供给等系统中,由于分析液体的微量,要求承载液体管道内径在 $10\sim 50\ \mu\text{m}$ 之间,这在金属材料上用去除金属的方法是无法得到的。目前 $50\ \mu\text{m}$ 以内的微管道几乎全部是在硅上光刻而成^[3],硅微加工技术制作的微管道一般呈矩形,流动阻力比圆截面微管尺寸大,从性能、成本和产量上都不可能得到广泛应用。

内径在 $100\ \mu\text{m}$ 的圆截面玻璃微管道具有流动阻力小及管壁光滑的优点,目前还未发现国内外成功制造出内径在 $60\ \mu\text{m}$ 以下的圆截面玻璃微管道,主要技术障碍是如何在得到微小内径和较好强度的同时保证微管道与外部连接方便可靠。

2 微玻璃针拉制参数化试验

由玻璃成型理论可知,玻璃液的粘度值决定了玻璃成型的温度范围,固化速度值决定了玻璃成型中各个操作工序的延续时间,拉制工艺的控制失调,将导致针管弯曲,在针管处出现气线、条纹、结石、析晶等现象^[4]。拉制的加热温度、加热时间、拉伸速度、加热和拉伸之间的顺序和时间间隔都是关键的工艺参数。设计了可改变各项参数的微针拉制试验机,目的是通过试验总结出各项

拉制工艺参数并优化出模式,同时在设计时使其具备微管道的拉制功能,具体拉制原理见图 1。

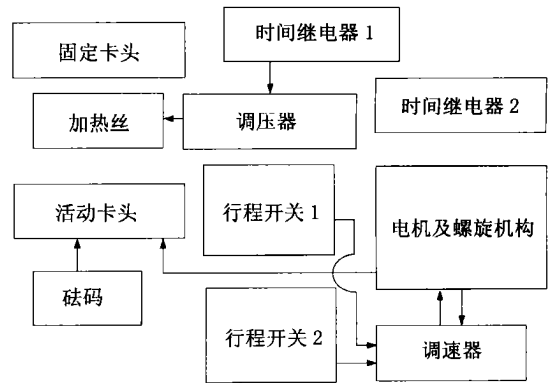


图 1 微针拉制试验机工作原理图

Fig. 1 Working principle of the micropipette pulling experimental apparatus

2.1 微针的拉制过程

图 2 表示细胞注射用的微针形状,针尖部分的内径 d 应小于 $1\ \mu\text{m}$,在长 $10\sim 20\ \text{mm}$ 的斜度范围内把内径为 mm 级的管控制到 μm 级。实验证明采用等速拉伸不能满足要求,玻璃加热的溶化时间也不能精确控制,这意味着通过检测玻璃管熔化温度控制拉伸的开始时间,通过电机及螺旋传动使卡头下移拉制微针的工艺方案不可行。实验表明,只有拉伸速度逐渐加快才能拉制出如此细的针头。由于拉制时间仅 $1\ \text{s}$ 左右,靠机械调速方式达不到如此快的反应速度。电磁螺线管卡头变速拉伸和重物拉伸符合变速拉伸要求。卡头变速拉伸可通过调节卡头线圈电流的变化调节拉伸速度及拉力,但在制造之前必须了解速度及拉力的大小及变化规律;而重物拉伸的速度变化惟一旦可知,拉伸力可以通过增减砝码来调节以适应不同规格的玻璃管,结构简单成本低且工艺稳定。在以重物砝码拉制微玻璃针的大量试验基础上,总结出拉制微针的工艺参数,为商品化拉针器的制造提供技术基础。

(1) 确定拉制材料。用于拉制微针的毛细管要求有较好的强度及拉细到 μm 级尺寸后有足够的韧性,国内目前并无专用作拉制微针的毛细玻璃管。经试验选择国内作电极用的规格为外径 $1.6\ \text{mm}$ 、内径 $1.0\ \text{mm}$ 的中空毛细玻璃管。

(2) 规范加热器件。首先规范加热电阻丝的

规格,加热线圈要求直径小且加热效率高。经初步实验选用直径为 1.2 mm 的镍铬电阻丝,经测量长度为 40 mm,电阻为 5 Ω,绕成图 3 所示标准形状,在 8 V 左右的电压下加热 20 s 可使毛细玻璃管向熔融态变化, s 取 1 mm, D 取 4 mm。

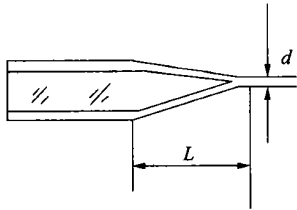


图 2 微针示意图

Fig. 2 Micropipette sketch map

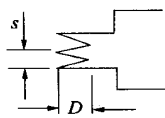


图 3 加热丝示意图

Fig. 3 Heating filament sketch map

(3) 试验过程。未加热前在活动卡头上加砝码,在控制过程中,砝码重量和拉伸速度变化梯度成正比,但又不能在未加热时产生静拉断现象。经试验砝码重量大约在 1 300 g 左右较合适,经试验得知当调压电压超过 10 V 时,加热温度过高致使微玻璃针针尖部分的柔韧性降低,在进行细胞注射时针尖部分极易断裂,因此调压器电压调至 10 V 以下。由于毛细管处于砝码重量的预拉力作用,一旦加热到熔融状态便自动开始拉伸,毛细管逐渐变细,内部抗拉应力逐渐减小,砝码拉力是不变的,这样拉伸速度会愈来愈快,最后拉断。拉伸加速度及速度方程为:

$$(G + m/2)g - s^2 = (G + mg/2)a/g$$

$$v = at^2 = [(G + m/2) - s^2]gt^2 / (G + m/2), \tag{1}$$

G —砝码质量(kg)

m —毛细玻璃管质量(kg)

—熔融过程中毛细玻璃管内部抗拉应力(MPa)

s —逐渐变细的毛细玻璃管截面积(mm²)

t —拉伸时间(s)

v —拉伸速度(s/m)

在(1)式中,毛细玻璃管质量 m 远小于砝码质量 G ,在拉伸阶段毛细玻璃管内部抗拉应力很小,逐渐变细的毛细玻璃管截面积 s 也极小,故式(1)为: $v = gt^2/2$,拉伸速度近似于自由落体运动规律。记录开始加热到拉断所需时间,以该时间调定时间继电器,后面的实验中加热丝的通断由时间继电器控制,保证加热丝在玻璃毛细管被拉断的瞬间及时地切断。

2.2 控制力对微针几何形状的影响

在高倍显微镜下观察到当毛细管在中间被拉断制成微针后,针尖尖端外径大约 0.5 μm 以下,一般处于不通状态,可用微磨针器将针尖磨成内径 μm 级尺寸以便用于细胞微量注射。控制微针主要是控制针的斜度部分长度 L ,因为 L 的大小影响微针注射时由于针尖的微尺度产生的毛细阻力及沿程损失。改变砝码质量和调压电压取得 16 组斜度部分长度数值,采用二元方差分析方法来分析影响的显著性。取砝码质量为因子 A 、调压电压为因子 B , A 及 B 都有 4 种水平,互相组合得到的实验数据见表 1,二元方差分析结果见表 2。

表 1 实验数据 L (mm)

Tab. 1 Experimental data L (mm)

因子 B (v)	6	7	8	9
因子 A (g)				
1 280	10.8	11.5	11.8	12.7
1 290	10.5	10.7	12.2	12.6
1 300	10.9	11.2	12.3	12.9
1 310	10.4	10.9	11.6	12.2

表 2 二元方差分析

Tab. 2 Dualistic variance analysis

来源	离差平方和	自由度	均方离差	F 分布
因子 A	1.895	3	0.631	6.063
因子 B	9.264	3	3.088	29.61
误差	0.942	9	0.104	
总和	11.40	15		

从表 1 中分析砝码质量增加,拉伸速度虽仍近似于自由落体运动,但仍然略有增加,反映到微针上其斜度长度 L 随后减少。加热电压增加,玻璃毛细管熔融加快,斜度长度 L 增加。

给定置信概率为 99%, $\alpha = 1\%$,由于因子 A 及 B 都有 4 种水平,即: $r = s = 4$, $F [r - 1, (r - 1)(s - 1)] = F [s - 1, (r - 1)(s - 1)] = F_{0.01}(3,$

9) = 8.02, $F_A = 6.063 < 8.02$ 接受假设检验, $F_B = 29.61 > 8.02$ 拒绝假设检验,故从实验数据分析得出结论,砝码质量对针斜度部分长度 L 影响不显著,调压电压对斜度部分长度 L 影响是显著的。

2.3 实验小结

上述实验及分析表明对于前指定规格的玻璃毛细管,优化可以拉制出适合于细胞注射的玻璃微针各拉制参数。参数为:砝码质量 $G = 1\ 300\text{ g}$,加热电压 $V = 8\text{ V}$ 。

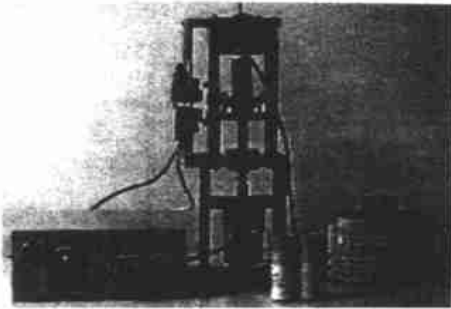


图 4 多参数拉针试验机

Fig. 4 Micropipette pulling experimental apparatus



图 5 CCD 下玻璃微针

Fig. 5 Micropipette image with CCD

优化参数的目的是保证拉制微针质量,同时也为将来的芯片模式拉针器提供标准参数。图 4 为研制的多参数拉针试验机照片,图 5 是在高倍显微镜下 CCD 摄制的拉制的微针尖部图像。

3 微管道的拉制

微管道的尺寸要求在长度方向上直径相等,因此只有采用等速拉伸才能获得。活动卡头由电机通过螺旋机构驱动拉伸,卡头的行程即为微管道的拉伸长度,该长度可由行程开关在有精确刻

度的标尺上调节。调速器可以调节卡头拉伸速度,两个时间继电器用来控制加热的时间以及加热起始与拉伸起始之间的时间间隔。经初步实验,拉伸速度和调压电压对微管的内径影响不明显,而拉伸长度对行程的影响很大,表 3 为在调压电压为 8 V,拉伸速度为 3 mm/s 的条件下不同的拉伸长度得到的微管内径。该微管内径用基于 CCD 拼接技术的高精度直径测量方法测量^[5],图 6 为高倍显微镜下 CCD 摄制的拉制的微管道图像。

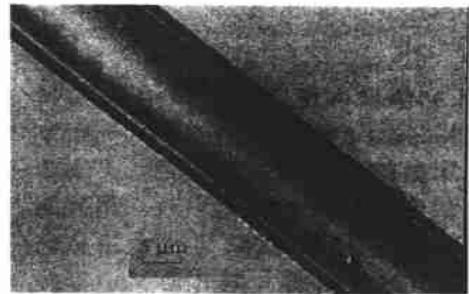


图 6 CCD 下玻璃微管道

Fig. 6 Microchannel image with CCD

表 3 微管道实验数据

Tab. 3 Microchannel experimental data

拉伸长度 (mm)	30	31	33	34	35	36	37	39
微管内径 (μm)	69	63	55	48	43	37	30	折断

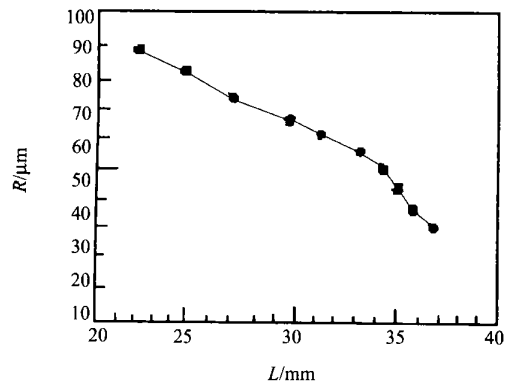


图 7 微管内径与拉伸长度关系

Fig. 7 Relationship between the microchannel internal diameter and pull length

4 商品化拉针器设计方案

优化出参数后,固定大部分工艺参数,使控制系统的控制精度更加精确。商品化拉针器要求体积小、成本低,保证控制质量的稳定及操作的简单化,图 8 为商品化拉针器设计方案。采用单片机控制电磁螺线管卡头完成拉制过程,摒弃了传统的电器元件及机械拉伸式设计方法。

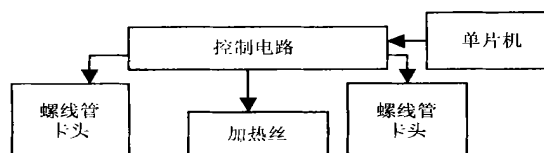


图 8 商品化拉针器工作原理

Fig. 8 Working principle of the micropipette puller

在单片机芯片中固化控制微针及微管道的不同模式,通过编程控制加热和拉伸之间的时间间隔及顺序。在拉制微针时,启动微针拉制模式 1,单片机通过控制电路中电流的变化规律控制电磁螺线管卡头的拉力及拉伸速度的变化,使拉力控制在 1 300 g,卡头模拟式(1)所示为加速运动规律。在拉制微管道时,启动拉制模式 2,单片机通过控制电路中电流的变化规律控制电磁卡头等速运动;通过行程模式 2 控制拉伸速度大小及拉制

时间来控制行程,从而进一步控制微管道内径。

由于卡头在水平轨道上运动,操作空间大,放置毛细管和取针方便,使用性能稳定,具有拉制微针及微管道双重功能。

5 结 论

(1)在微针及微管道拉制过程中,虽然拉制工艺参数较多,但由于实验设计时参数可调,通过多次实验可以总结出各参数对拉伸的影响,优化出较合理的拉伸工艺和拉伸参数,从而为以国产玻璃毛细管为拉制材料的拉针器的国产化提供了技术准备,使商品化拉针器具有轻便、操作容易、工作性能稳定、美观、造价低廉的优点。

(2)下一步考虑在微管的拉制过程中设计光学检测系统来实时检测拉伸过程中管道的内径,把反馈的值与预定内径尺寸相比较来控制拉伸系统,实现拉制尺寸的闭环控制^[6-8]。

(3)目前国内对于流体在 μm 级的微小逐渐收缩的管道中的流动特性的研究还没有开展,这方面的研究对于细胞微注射及微系统领域中微喷嘴等微小器件的研制和开发尤为关键。利用上述实验方法可以拉制出不同长度和斜度的微针,为进行微米级的微小逐渐收缩的管道中的流动特性研究提供了研究器件。

参考文献:

- [1] 杨益寿. 小鼠卵细胞质内显微注入单精子受精的实验研究[J]. 解剖学报, 1998, 29(4): 441-445
YANG Y SH. Experimental study on intracytoplasmic sperm injection in the mouse egg[J]. *Acta Anatomica Sinica*, 1998, 29(4): 441-445. (in Chinese)
- [2] 章维一, 侯丽雅. 微系统领域的关键技术[J]. 中国机械工程, 2000, 11(11): 1305-1312.
ZHANG W Y, HOU L Y. The key technologies of micro systems[J]. *China Mechanical Engineering*, 2000, 11(11): 1305-1312. (in Chinese)
- [3] 周兆英, 叶雄英, 李勇, 等. 微流量系统的基础技术研究[J]. 中国机械工程, 1999, 10(9): 991-994.
ZHOU ZH Y, YE X Y, LI Y, et al. Research on the fundamental technologies of micro fluidic systems[J]. *China Mechanical Engineering*, 1999, 10(9): 991-994. (in Chinese)
- [4] 陈兴悟. 一种新型玻管外径及壁厚自动测控仪器[J]. 天津大学学报, 1996, 29(3): 388-394.
CHEN X W. A new automatic measurement and control instrument for glass tube outer diameter and wall thickness[J]. *Journal of Tianjin University*, 1996, 29(3): 388-394. (in Chinese)
- [5] 仲思东, 徐锐. 基于 CCD 拼接的细玻璃管直径测量技术[J]. 武汉大学学报, 2002, 27(6): 647-651.
ZHONG S D, XU R. Diameter measuring of slender glass tube based on CCD assembling technique[J]. *Journal of Wuhan University*, 2002, 27(6): 647-651. (in Chinese)
- [6] 周明宝, 林大键. 微结构表面形貌的测量[J]. 光学 精密工程, 1999, 7(3): 7-13.

- ZHOU M B , L I N D J . Measurement of microstructures topography[J]. *Optics and Precision Engineering* , 1999 ,7(3) :7-13. (in Chinese)
- [7] 唐祯安,王立鼎. 关于微尺度理论[J]. *光学精密工程* ,2001 ,9(6) : 493-498.
TANG ZH A , WANG L D . On microscale theory[J]. *Optics and Precision Engineering* , 2001 ,9(6) :493-498. (in Chinese)
- [8] PFAHLER J . Liquid transport in micron and submicron channels[J]. *Sensors and Actuators* , 1990 ,A21-23 :431-434.

作者简介:刘天军(1965 -) ,男,黑龙江拜泉人,南京理工大学机械制造与自动化专业博士生,常州工学院讲师,主要从事微系统、振动与噪声控制方面的研究工作。

向您推荐《液晶与显示》期刊

《液晶与显示》是中国最早的液晶学科期刊,也是中国惟一的液晶学科和显示领域中综合性学术期刊。它由中国科学院长春光学精密机械与物理研究所和中国光学光电子行业协会液晶专业分会主办,科学出版社出版。

《液晶与显示》以研究报告、研究快报、综合评述、信息与动态和产品信息等栏目集中报道国内外液晶学科和显示领域中最新理论研究、科研成果和创新能力,及时反映国内外本学科领域及产业信息动态。本刊是英国《科学文摘》(SA)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(P)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)和“中国科学引文数据库”、“中国科技论文统计源期刊”等国内外著名检索刊物和文献数据库来源期刊。

《液晶与显示》以创新性、综合性、实用性为办刊特色,其内容丰富,信息量大,涵盖面广,可读性强。既是启迪科技人员开拓创新思路的参考期刊,又是从事液晶和显示技术研究的广大科技人员、大专院校师生及相关领域的科技工作者进行学术交流的良好园地,也是图书、情报等部门必不可少的信息来源。《液晶与显示》热忱欢迎广大作者、读者广为利用,踊跃投稿,将您的科技创新、产品信息、企业风貌通过这一窗口展示出来。同时,竭诚欢迎社会各界洽谈广告业务、合作组织技术交流与信息发布会。

《液晶与显示》为双月刊,A4开本,80页,国内定价10.00元,国内外公开发行。国际标准刊号:ISSN 1007 - 2780,国内统一刊号:CN 22 - 1259/O4,国际刊名代码(CODEN):YYXIFY。广告经营许可证号:200004100137。国内邮发代号:12 - 203;国外发行代号:4868Q。同时,《液晶与显示》编辑部将竭诚为广大读者服务,随时办理订阅。

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登产品信息

地 址: 吉林省长春市东南湖大路 16 号	中国科学院长春光学精密机械与物理研究所
《液晶与显示》编辑部	邮 编: 130031
电 话: (0431) 6176862	传 真: (0431) 5682346
E-mail: yjxs@ciomp.ac.cn	网 址: www.ciom.ac.cn