

基于 LSCM 的细胞培养、染色和原位观察的智能集成系统

郭凤, 田少因*

(中国科学院 过程工程研究所 模块化平台公共仪器中心, 北京 100190)

摘要: 对细胞进行原位培养、染色和观察可以获得其生理及相互作用过程的更准确、直观的信息, 帮助人们更全面深入地认识细胞个体差异及细胞间相互作用等问题。为了实现原位培养、染色和观察, 本文设计了一种小型的原位的可以与倒置激光共聚焦显微镜等检测设备相结合的细胞培养装置。该系统通过软件控制实现对培养环境的实时监测、显示并储存。文中通过对人宫颈癌细胞 HeLa 细胞的培养及原位观察实验验证了装置的培养、染色效果。

关键词: 细胞培养; 细胞染色; 原位观察

Intelligent integrated system for cell culture, staining and in situ observation based on LSCM

Guo Feng, Tian Shaonan*

(Modular Platform Public Instrument Center, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: In situ culture, staining and observation of cells can obtain more accurate and intuitive information about their physiology and interaction process, and help people to understand the individual differences of cells and the interactions between cells more comprehensively and deeply. In order to bring the in situ culture, staining and observation of cells into reality, this paper designed a small in situ cell culture device that can be combined with detection equipment such as inverted laser confocal microscope. The system realizes real-time monitoring, display and storage of the culture environment through software control. In this paper, the culture and staining effect of the device was verified by culturing and in situ observation of human cervical cancer cells HeLa cells.

Keywords: cell culture; cellular staining; detection in situ;

引言

活细胞成像系统是生物医学研究学科和实验室研究的重要分析工具^[1,2]，在生命科学实验室中起着至关重要的作用，通过研究细胞的生长行为和调节途径，更深入地了解疾病机制、功能和对药物治疗的响应，并从细胞中获得最大信息。随着活细胞成像技术的发展，原位培养^[3,4]成为活细胞成像研究必不可少的技术和工具，通过原位培养可以保证细胞培养的稳定性和连续性，避免移动培养皿对细胞贴壁等生长状态的影响。

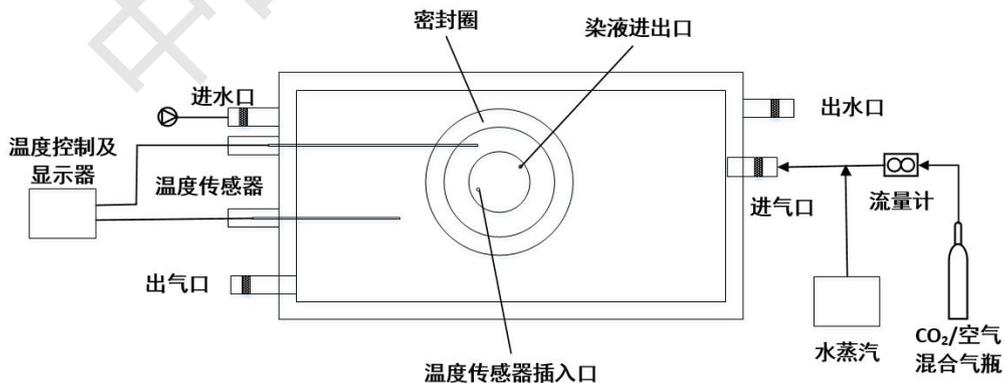
在细胞原位培养系统方面国内外的学者已经取得了不少成果，目前主要集中在通过微流控芯片实现细胞的原位培养在显微镜下观测方面的研究^[5,6]。DANIEL^[7]等通过微型加热器加热培养皿，为细胞培养提供温度环境，培养箱与显微成像系统兼容实现实时检测。谭逸斌^[8]等以细胞培养微室和单片机为核心搭建了一套细胞原位培养装置，能够对细胞进行原位监测，未涉及原位染色等方面研究。

本文通过设计细胞原位培养系统，通过细胞培养实验证明系统的稳定性，并进行了原位染色实验等，验证细胞状态。

1 系统设计与操作方法

1.1 系统设计

基于激光共聚焦显微镜（LSCM）的细胞培养、染色和原位观察的智能集成系统包括细胞原位培养池模块、温度控制模块、气体控制模块、湿度控制模块和环境采集软件模块，采用系统化控制设计思路，系统设计框图如图 1 所示。



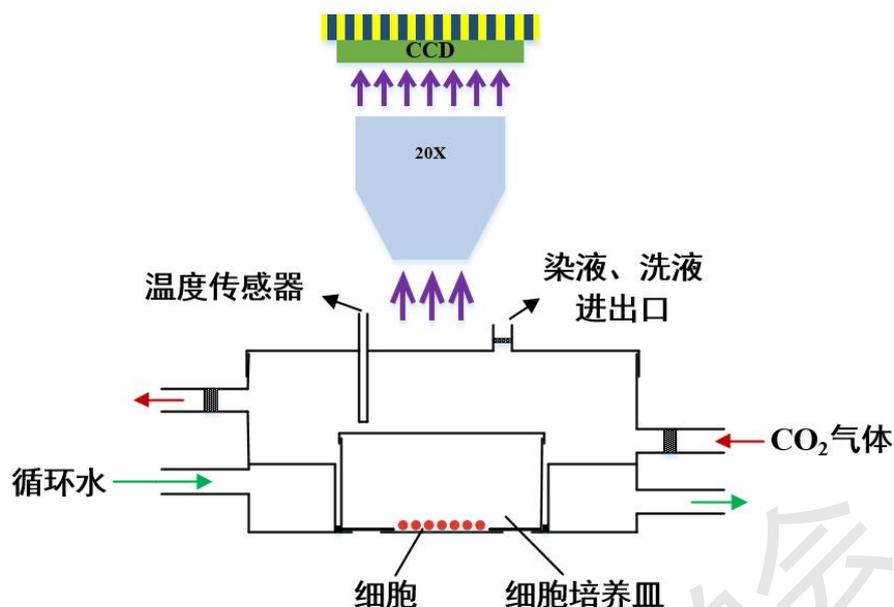


图 1 装置结构示意图

Fig.1 Schematic diagram of device structure

(1) 细胞原位培养池模块：主要包括池体和细胞培养皿，池体的主要作用是提供放置细胞培养器皿的空间，池体包含池壁、池底和池盖，池壁上设置进气口、出气口、进水口和出水口，池底设有显微镜观察口，池盖设有染液、洗液进出口、测温口等。

(2) 温度控制模块

为维持细胞培养需要的最佳温度 37°C ，采用池体间壁循环水加热，尽管池体采用导热系数低、容重轻、耐高温、保温性好的树脂材料，在间壁循环水加热过程中依然会存在热传导损失，为抵消这部分热量的散失，需要增加系统能耗。系统能耗的补偿方式采用多点位校验池体内温度与循环水温度的差异，直到 10 次内部测量平均温度稳定在 $37\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ，10 次循环水的平均显示温度设为循环水的温度，并实时检测池体内温度。

(3) 气体控制模块

采用气体质量流量计控制 5% CO_2 气体的流量，保证细胞培养所需的 pH 值环境。细胞培养过程中持续控制通入浓度为 5% 的 CO_2 气体，使 pH 值保持在 7.2~7.4 之间，也可以在细胞培养液中加入 10 mmol/L 的 HEPES 缓冲溶液，可保证在较长时间内控制 pH 值保持在 7.2~7.4。

(4) 湿度控制模块

因细胞原位培养池相对较小，对于湿度的控制，采用简易的方式处理，因细胞周围的

溶液需要在一定时间内更换，能保证细胞生存的湿度环境。也可在细胞原位培养池内与培养皿外的空间加入过滤后的无菌水以保证细胞培养池内的湿度环境，可满足整个细胞原位培养周期的使用。

(5) 环境控制采集软件模块

为了方便设置细胞原位培养池的工作参数，开发了配套的控制采集软件系统，如图 2 所示。系统硬件部分包含 CO₂ 流量控制器、循环水及细胞原位培养池内温度控制检测器、CO₂ 浓度监测传感器等。软件系统具备参数设置、数据存储、实时数据、曲线显示、报警等功能。参数的设置可通过软件设置 CO₂ 气体流量、循环水温度。可实时监测存储 CO₂ 出口浓度、培养室温度、循环水温度、CO₂ 气体流量。可对采集的每一条实时数据设定报警上下限，数值超过限值后软件界面对应数值控件会变红并闪烁提示。

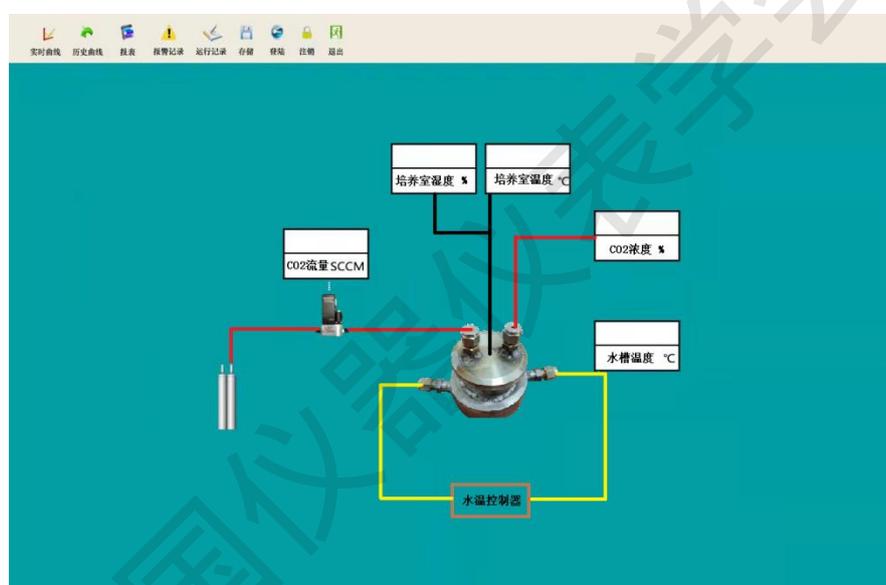


图 2 环境控制采集软件模块

Fig.2 Schematic diagram of environmental control and data collection software

1.2 系统操作方法

为保证细胞原位培养池内的无菌环境，整个细胞原位培养池设计为封闭结构，气体进出口、染液洗液进出口均连接 0.22um 的膜过滤器。培养皿采用商业细胞培养皿保证细胞贴壁生长，便于显微观测。首先将池体和培养皿紫外消毒后置于无菌操作台中，将细胞接种在培养皿中，并将接种后的培养皿转移到池体内，池底的开口有密封圈，通过培养皿压紧培养池实现密封，在细胞原位培养池内与培养皿外的空间加入过滤后的无菌水以保证细胞培养池内的湿度环境，盖上池盖，放到 Leica TCS SP5 倒置生物显微镜上，调节池体中的 CO₂ 气体流量和温度，调节焦平面，即可进行实时观察。

染色操作：细胞在原位培养池培养 48 h 后，用针管通过染液进出口将培养皿内的培养液吸出，然后将 PBS 通过染液进出口输入原位培养池内的细胞培养皿中清洗，然后再吸出，如此反复 3 次，然后输入用 4%多聚甲醛细胞固定液常温固定 15 min，固定结束后，继续用 PBS 洗 3 遍，将配置好的 DAPI 染液（DAPI 原液：PBS=1:1000 稀释）输入原位培养池内的细胞培养皿中，孵育 15 min 将细胞核染色，然后用 PBS 洗 3 遍。打开激光共聚焦显微镜，调节焦平面，即可进行实时观察。

2 结果与讨论

2.1 装置稳定性测试

细胞培养、染色和原位观察的智能集成系统经过系统的设计搭建，加上显微成像单元可以对细胞生长状态进行实时观测，能够实现细胞的培养全过程、细胞周围温度的调节控制、细胞周围湿度的测定、细胞的实时显微成像。该系统完成搭建后，首先进行了装置的稳定性测试。

2.1.1 温度控制信号

温度会直接影响到细胞培养的最终结果。实验选用的人宫颈癌细胞 HeLa 细胞在最佳环境下会贴壁生长，如果温度长时间高于 38°C，则几乎所有的细胞均会淬灭死亡；而如果温度低于 36°C，细胞会逐渐脱落，形状逐渐变圆，状态不佳，但不会立刻死亡。该系统采用的是 PID 控制液体的温度来控制细胞培养腔室的，温度波动为 0.1°C，因此细胞培养腔室表面温度会在小范围内不断波动，保证动态稳定。72 小时的温度监测数据如图 3 所示，温度基本维持在 36.3-37.4 °C，满足细胞生长所需的温度条件。

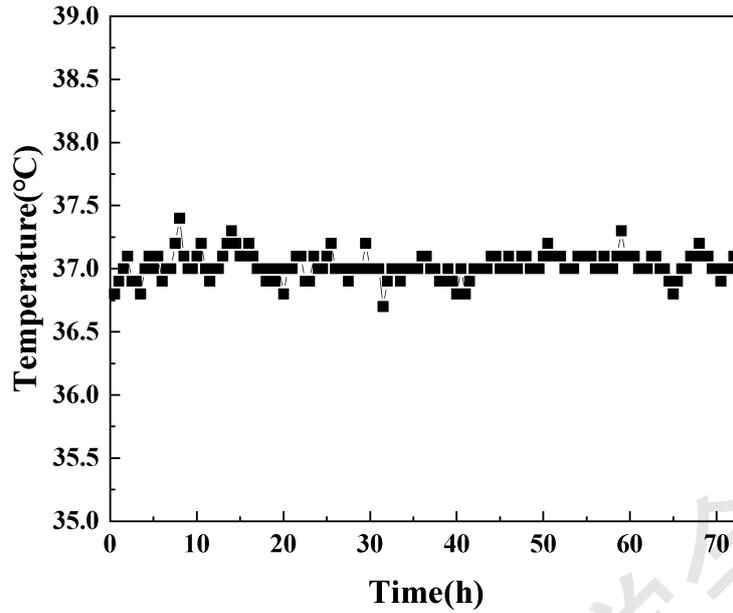


图3 72小时内温度曲线

Fig.3 Temperature curve over 72 h

2.1.2 CO₂ 气体流量稳定性信号

采用标准气体 5% 的 CO₂，平衡气为 N₂，采用最大量程为 10 mL/min 的质量流量计定量控制气体流量为 1 mL/min。通过 72 h 软件检测，结果如图 4 所示，CO₂ 标气流量基本维持在 1 mL/min，与常规细胞培养箱相比，小型装置的抗干扰性相对差一些，因此气体流量的稳定性，对细胞的成功培养起至关重要的作用。

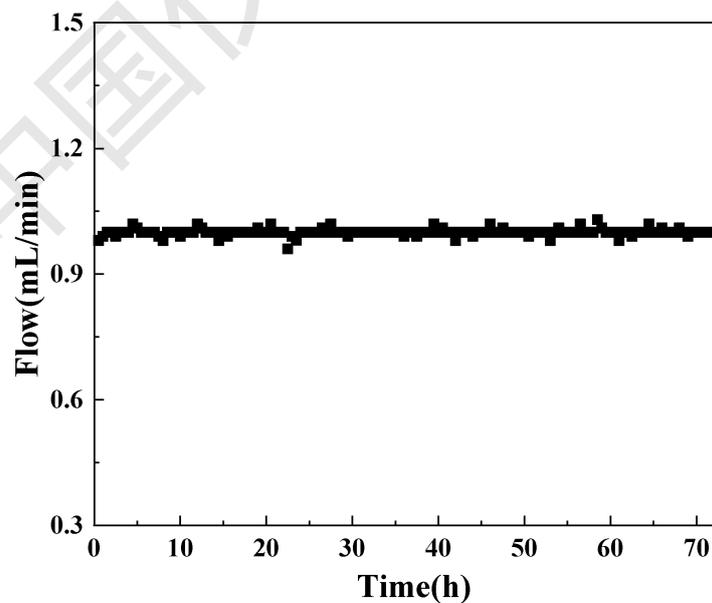


图4 72小时内CO₂标气流量控制曲线

Fig.4 CO₂ standard gas flow curve over 72 h

2.1.3 湿度显示信号

因细胞原位培养池相对较小，对于湿度的控制，采用简易的方式处理，在细胞原位培养池内与培养皿外的空间加入过滤后的无菌水以保证细胞培养池内的湿度环境，可满足整个细胞原位培养周期使用。采用插针式湿度计测环境湿度，测试结果如图 5 所示，前 3 小时湿度持续增加，之后基本稳定在 95%，72 小时内可满足细胞生长所需的湿度条件。

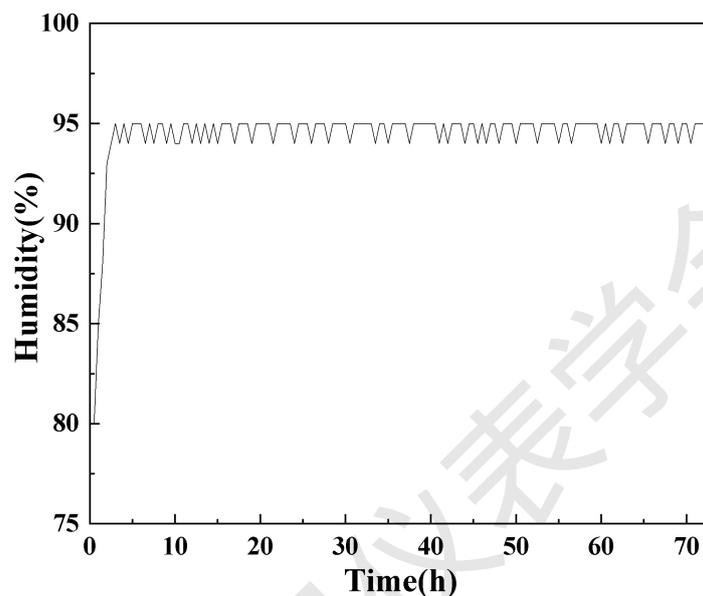


图 5 72 小时内湿度曲线

Fig.5 Humidity curve over 72 h

2.1.4 72 小时无菌环境情况

通过过滤器实现无菌环境，培养池进出口设置 0.22 μ m 的膜过滤器，疏水性滤膜允许空气和气体自由通过，但会阻止水溶液和气溶胶污染物。可以过滤掉细菌等污染物。72 小时后，取培养液涂覆于琼脂细菌培养基上进行培养，培养 48 小时，观察无菌落，避免细胞培养过程中外界细菌的干扰。

2.2 细胞培养实验

2.2.1 实验过程及器材

将冻存人宫颈癌细胞 HeLa 细胞从液氮中取出后，在 37 °C 水浴内不断摇动融化。移入 15 ml 离心管中，加入 10 ml 预热的 DMEM 完全培养基，轻轻吹匀，1500 rpm/min 离心 2 min，弃上清液。加入 10ml DMEM 培养基重悬，接种于直径 33 mm 的培养皿中，在含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。每天观察细胞密度，当细胞密度达到 80% 以上需进行传代，抽掉培养皿中的培养液，用 PBS 溶液清洗后，加入 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (EDTA) 消化液消化，待细胞脱落后，加入完全培养基终止消化，离心分离重悬并进行细胞计数后置入 30 mm

的培养皿内，加入培养液后分别在原位反应池和常规 CO₂ 培养箱内进行培养，采用倒置显微镜观察 72 h 内的细胞生长情况。在进行细胞培养时，为了保证使细胞状态比较好，在最初几个小时内，对细胞的观测频率较高，等细胞状态稳定之后，增大观测间隔时间，降低观测频率。为了方便调整细胞培养的各种参数，也为了避免染菌，在细胞接种、培养液更换等操作均在超净工作台内进行。胰蛋白酶-EDTA 消化液，高糖型改良杜氏伊格尔（DMEM）培养液，胎牛血清由广州源井生物科技有限公司提供，CO₂ 培养箱为 Thermo HERA Cell 150 培养箱。原位反应池中培养的细胞采用连续观察模式，显微镜为 Leica TCS SP5 倒置生物显微镜；CO₂ 培养箱中培养的细胞采用定时取出观察模式，显微镜为 Leica TCS SP5 倒置生物显微镜。

2.2.2 细胞对照实验

分别采用原位培养池与常规细胞培养箱对两组细胞培养 48 h 后分别用 DAPI 进行细胞核染色，相同染色条件下，20 倍物镜下观察结果如图 6 所示。从明场图片 6 (A) 和 (B) 细胞形态来看，两组细胞均已贴壁且细胞形态呈梭形，表明两组细胞生长状况良好。为了进一步验证培养效果，分别对两组细胞进行了细胞核染色，结果如图 6 (a) 和 (b) 所示，由图可知两组细胞核染色效果没有明显的区别，进一步说明原位培养池不仅能实现常规的大型细胞培养箱对温度、湿度和 CO₂ 流量的稳定控制，还能实现细胞的原位培养、原位染色及原位观察，可准确、直观的提供细胞的状态及染色情况。

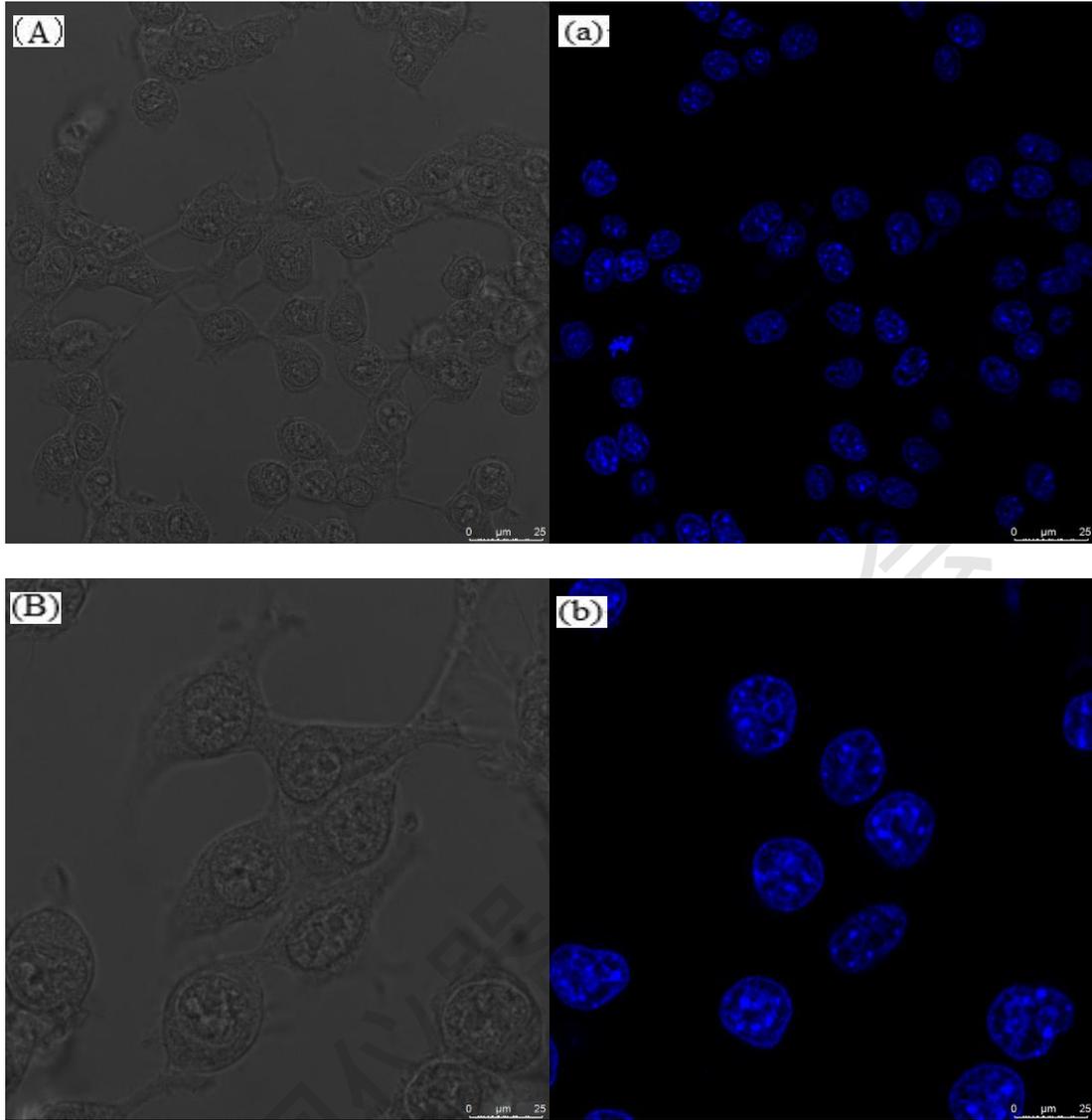


图 6 对比实验图

(A)、(a) 为原位培养池培养染色后的细胞；(B)、(b) 为常规培养箱培养染色后的细胞

Fig. 6 Contrast experiment diagram

(A)、(a) Cultured and stained cells in in situ culture tank; (B)、(b) Cultured and stained cells in conventional culture chamber

3 结论与展望

本文设计搭建的基于激光共聚焦显微镜的细胞培养、染色和原位观察的智能集成系统，能够对细胞周围温度、湿度、CO₂ 流量的控制与监测，实现细胞原位生长状态、细胞原位染色的显微成像功能。经过 72 小时温度、湿度、CO₂ 气体流量及无菌环境情况的数据观察，得出细胞原位培养池可以满足细胞原位培养、原位染色、原位观察的基本要求；细胞原位培养池与常规细胞培养箱对两组细胞分别培养 48 h 后进行染色、观察，得出细胞生长状况及

细胞核染色效果两者没有明显的区别,进一步表明细胞原位培养池不仅能实现对温度、湿度、无菌环境和 CO₂ 流量的稳定控制,还能实现细胞的原位培养、原位染色及原位观察,可以准确、直观的观察细胞的状态及染色情况,帮助人们更全面深入地认识细胞个体差异及细胞间相互作用等问题。

参考文献:

- [1] Lauterbach M A, Keller J, Schoenel A, et al. Comparing video-rate STED nanoscopy and confocal microscopy of living neurons[J]. *Biophotonics*, 2010, 3 (7) : 417-424
- [2] Westphal V, Rizzoli S O, Lauterbach M A, et al. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement[J]. *Science*, 2008, 320 (5873) : 246-249.
- [3] Houseman L, Edwards M, Phillips I R, et al. Isolation and Culture of Mouse Hepatocytes: Gender-Specific Gene Expression Responses to Chemical Treatments[J]. *Methods Mol Biol*, 2015. 1250: 3-12.
- [4] 高立永, 刘霞, 柳红, 等. 人胃癌原代细胞培养方法的探讨[J]. *基础医学论坛*, 2007, 11 (3) : 206-207.
- [5] Giulitti S, Magrofuoco E, Prevedello L, et al. Optimal Periodic Perfusion Strategy for Robust Long-term Microfluidic Cell Culture[J]. *Lab on a Chip*, 2013, 13 (22) : 4430-4441.
- [6] 江洋, 刘冲, 魏娟, 等. 微流控芯片细胞动态培养装置的设计与制作[J]. *光学精密工程*, 2019, 27 (9) : 2020-2027.
- [7] Nieto D, Mcglynn P, Delafuente M, et al. Laser Microfabrication of a Microheater Chip for Cell Culture Outside a Cell Incubator[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 154: 263-269.
- [8] 谭逸斌, 张宇翔, 李中源, 等. 一种可实现原位监测的细胞培养信息化装置[J]. *科学通报*, 2014, 59 (11) : 1026-1032.