

# 应用于流式细胞仪检测植物 DNA 含量的植物细胞核提取装置

杨素华, 赵长征

(中国科学院 植物研究所, 北京 100093)

**摘要:** 针对流式细胞仪植物DNA含量检测过程中存在的植物细胞核提取问题, 研制了应用于流式细胞仪的植物细胞核提取装置。该设备以运动控制平台为核心, 以植物样品为处理对象, 通过刀头的上下运动实现拟人的植物样品切削过程。样品处理环境温度实现闭环控制, 刀头通过超声清洗的方式进行清洁, 避免样品间的污染, 植物细胞核的悬浮液通过精密的自动移液枪过滤转移至离心管。实验结果表明, 系统在植物细胞核提取过程中运行稳定, 完整率高, 能更效率的实现流式细胞仪植物DNA含量的检测过程。

**关键词:** 细胞核提取;植物样品前处理;运动控制平台

## Plant Nuclear Extraction Device Applied To The Detection of Plant DNA Content by Flow Cytometry

Yang Suhua, Zhao Changzheng

(Chinese Academy of Sciences, Institute of Botany, Beijing 100093, China)

**Abstract:** Aiming at the problem of extracting plant nucleus in the process of detecting plant DNA content by flow cytometry, a plant nucleus extraction device applied to flow cytometry was developed. The equipment takes the motion control platform as the core, takes plant samples as the processing objects, and realizes the anthropomorphic cutting process of plant samples through the up and down movement of the cutter head. The environmental temperature of sample processing is controlled in a closed loop. The cutter head is cleaned by ultrasonic cleaning to avoid contamination between samples. The dissociated liquid of plant nuclei is transferred to the centrifuge tube through a precision automatic pipette gun. The experimental results show that the system runs stably in the process of pretreatment of plant samples, and the survival rate of nuclei is high. It can more efficiently realize the detection of plant DNA content by flow cytometry.

**Keywords:** Nuclear extraction; Pretreatment of plant samples; Motion control platform

流式细胞术是一种能够对液流中的细胞或其他微粒进行多参数快速分析和分选的技术<sup>[1,2,3,4]</sup>。流式细胞仪一经问世,就在血液学、免疫学、肿瘤学、分子生物学和细胞生物学等学科的基础研究及临床检验中得到了广泛应用。但由于植物细胞不同于动物及微生物细胞的特殊结构,使得流式细胞仪在植物科学中的应用滞后于其它学科。在植物学研究领域中,其主要应用于流式细胞仪检测植物细胞核DNA含量和倍性分析<sup>[5,6,7,8,9,10]</sup>,这对描述物种特征及入侵、植物分类学、逆境植物学、植物病理学以及植物遗传育种研究都有十分重要的意义。植物细胞(如细胞壁、中央液泡、叶绿体等)复杂结构以及次生代谢产物等特殊成分,使得样品在进行流式细胞术前需要复杂的前处理。制备动物细胞悬浮液常用的酶解法、网搓法、研磨法等,应用到植物细胞上都无法得到较好的提取效果,这限制了流式细胞术在植物细胞分析领域中的应用。直至1983年Galbraith以刀片代替酶解的方式裂解细胞<sup>[11]</sup>,流式细胞仪才真正开始应用于植物科学领域。以刀片切剥方式制备完整的植物细胞核是流式细胞仪进行植物学实验并取得成功的关键,其步骤很是繁琐,一般是采用双面刀片在培养皿中的裂解液中对植物组织进行上百次的手工切剥,经过过滤、离心等步骤得到细胞核,然后染色、上机测试。

手工切剥植物组织制备植物细胞核的方法有很多弊端。首先,制备结果因人而异,相同的条件下,有人可以切出高质量的细胞核,而有些人切出的全部变成碎片,这是因为每个人对使用刀片的程度和时间把控不同。其次,温度不能精确控制,植物细胞核对外界温度敏感,提取的植物细胞放入在0-4度冰箱,几个甚至十几个小时后,大部分仍然可以保持完整,但如果放到常温下,细胞核会很快大量破损。再次,样品前处理耗时耗力,每处理一个样品平均需要10分钟左右,极大地影响了仪器的检测效率,对一些特殊的植物或植物部位,如松针、种子和花粉等的切剥过程非常困难。此外,通常裂解液中含有EDTA、Triton X-100、DTT、 $\beta$ -巯基乙醇等化学物质,对皮肤、眼睛、呼吸道有刺激作用,危害操作人员的健康;常年高强度的切剥动作,也会使操作人员患上了职业病---手腕、肩周、颈椎疼痛。

正是由于手动切剥提取植物细胞核存在种种弊端,使流式细胞仪得不到有效且充分的利用。通过反复实验摸索到一些植物样品前处理的自动化的方法,本文致力于在此方法基础上研发一台植物细胞核提取仪,克服手动切剥提取的弊端,使得流式细胞仪更好的服务于植物学研究,促进其在更大范围的应用。

## 1 总体设计方案

应用于流式细胞仪植物DNA含量检测的植物细胞核提取装置研究路线如下：首先对植物样品进行调研，确定样品特征与试验条件、试验目标与方法等，然后确定植物细胞核提取装置的性能指标和技术方案，进而确定项目的研究内容，最终研制成功样机并通过试验验证。如图1所示，应用于流式细胞仪植物DNA含量检测的植物细胞核提取装置由电路控制单元、液路控制单元及运动切削机构三部分组成。

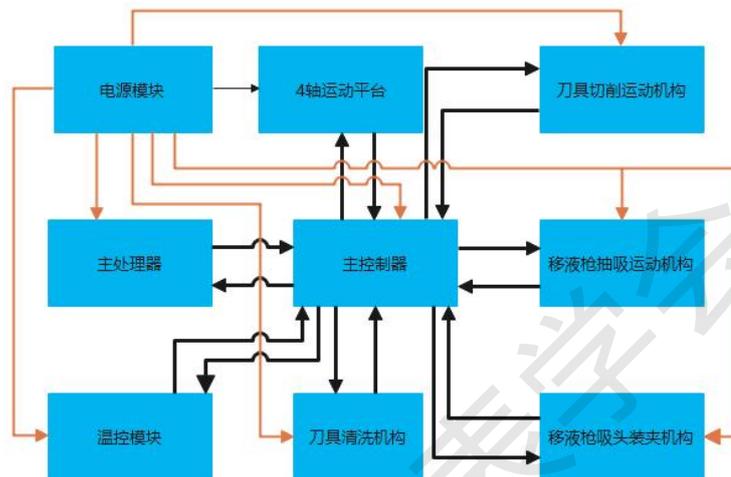


图1 植物细胞核提取装置系统框图

电路控制单元主要实现人机交互和运动控制两方面的功能。人机交互通过HMI实现操作指令的下发和装置当前状态的显示。运动控制主要是主控单元通过电机控制电路实现四轴运动平台、超声清洗单元等的运动控制。此外，主控单元还通过PID算法实现样品前处理全过程的环境温度控制。

液路控制单元包含裂解液汲取及细胞核悬浮液的过滤过程。裂解液通过注射泵由裂解液瓶中进行吸取，然后注入含有植物样品的容器中。细胞核悬浮液通过自动移液枪由容器中汲取，并通过滤布注入离心管中，滤纸起到隔离植物样品杂质的作用，避免流式细胞仪喷嘴产生堵塞。

运动切削机构主要实现植物样品切削、刀头/注射泵/移液枪等的运动。其中植物样品切削是植物细胞核提取装置的核心动作，也是实现细胞核成功裂解出来的保证。刀头用来进行切削动作，注射泵用来进行裂解液的移液和定量滴加。移液枪用来进行含细胞核悬浮液的移液和过滤。

系统总体工作流程如图2所示。

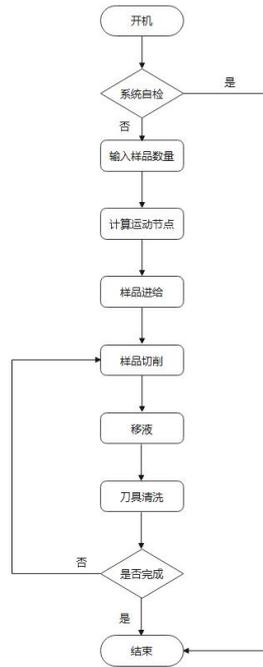


图2 四植物细胞核提取装置 workflow

## 2 系统硬件设计

### 2.1 运动切削机构

运动切削机构主要包括四轴位移平台及切削机构，其实现植物样品切削、刀头/注射泵/移液枪等的运动。

如图3所示，四轴位移平台主要包括丝杠滑杆、电机及驱动器、运动控制器及框架结构组成。

根据样品处理需要，本文选择双X轴的位移平台，其中左侧X轴滑块用来装载样品盒，右侧X轴滑块用来装载离心管及冷却装置。在两个滑块间装有刀头超声清洗装置。Y轴实现刀头、裂解液注射泵及移液枪的横向移动。Z轴实现刀头的上下重复切削动作。



图3 四轴位移平台

本文采用4个步进电机实现各轴的精确运动，重复运动精度可达0.2mm，能够准确的进行各项操作，尤其是移液枪的加吸头操作。电机采用步进电机驱动器进行驱动。

运动控制卡选用ISA总线运动控制卡，本身支持8轴，支持点位运动、直线插补、连续插补运动，可以实现实时的运动控制和优化。

如图4所示，样品切削机构由三部分组成，分别为舵机、刀头夹持工装、连接杆。其工作原理如下：通过刀头加持工装将刀片固定，并使得多个刀片的刃面在同一平面上，以保证切削时的同步。刀头夹持工装加工有磁铁安装槽，通过磁铁对刀片的磁力可实现刀片快换。舵机的作用是通过连接杆实现刀头的旋转，使得刀片不断旋转角度以保证切削的质量和效率。四轴位移平台的Z轴带动切削机构整体实现上下运动进行切削。通过以上方式，还原了手动切削的过程，且细胞核完整率远远大于手工切割。

此外，本文通过在刀具夹持工装上安装弹簧的方式，使得切削样品后刀具触碰样品盒底部的过程中得到有效的保护，有效的延长了刀具的适用寿命，改变了手动操作过程中每个样品需要消耗一个刀片的情况，经过改进后，在处理近十个样品后，样品的完整率仍能满足试验分析的要求。

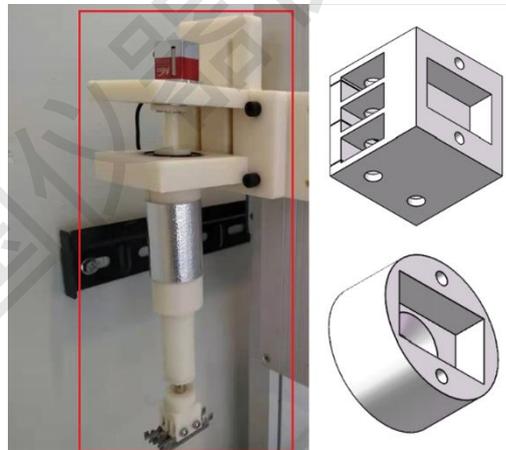


图4 样品切削机构

如图5所示为待切削的样品盒。本文设计的植物细胞核提取装置一次可实现8个样品的处理，样品盒也是8个一组。样品盒材质为聚四氟乙烯，硬度适中，同时不易吸附，容易清洗。为实现样品的充分利用，本文在样品盒下方安置有顶升电机，以便在移液枪吸液时可吸取足够的样品。



图5 样品盒

## 2.2 液路控制单元

液路控制单元主要包括移液模块、裂解液加注模块及超声清洗杯三部分。

### (1) 移液模块

在植物细胞核由植物样品中解离出之后，需要将含细胞核的悬浮液由样品切削盒中转移到离心管中，此过程包括以下几个过程：一，将移液枪准确装载吸头；二，将移液枪的吸头准确的浸入样品盒含细胞核的悬浮液中；三，倾斜样品盒；四，吸液；五，将吸头对准滤膜，并排出移液管中的悬浮液；六，卸载吸头。

针对上述流程，本文重点分析了操作需求及现有手动移液枪结构，设计了直线电机与注射泵于一体的自动移液枪，实现了移液模块的一体化设计，大大提高了操作的可靠性。如图6所示，自动移液枪为自研模块，后端采用驱动一体化步进电机驱动。前端采用气体活塞结构，活塞采用不锈钢材料，重复精度高。此外，还在滤膜排液过程中模拟人的动作，采用反复抽吸排液的方式，消除了样品杂质堵塞吸头的现象。



图6 自动移液枪

### (2) 裂解液加注模块

裂解液加注模块主要实现裂解液的加注。

具体工作流程如下：裂解液注射泵从处于保温状态的广口瓶中吸取定量的裂解液，然后注射泵移动至样品盒上方并将裂解液定量加注至样品中。其中，如图7所示，裂解液注射泵选用腔体、电机及驱动器一体的串口总线注射泵，重复注射精度为1.5 $\mu$ L。腔体的材质为聚四氟乙烯材料，不易吸附，容易清洗。



图7 裂解液注射泵

### (3) 超声清洗杯

超声清洗杯主要实现刀头的清洗功能。具体工作流程如下：刀头在样品切削完成后，切削机构将刀头浸入超声清洗杯中。超声激励启动，使刀片表面的附着物振动脱离。

如图8所示，超声清洗杯包括环形压电陶瓷和驱动器。

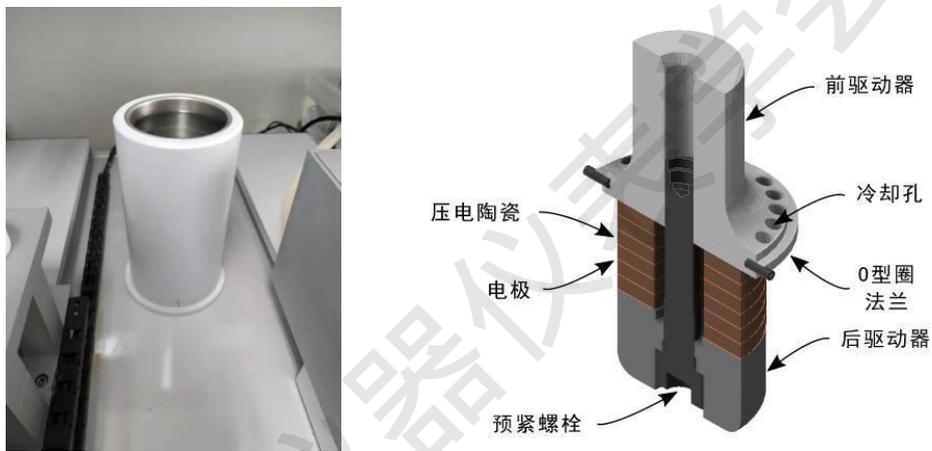


图8 超声清洗杯及系统框图

## 2.3 电路控制单元

电路控制单元包括电源模块、处理控制模块及温控模块三部分。

### (1) 电源模块

电源模块主要为处理控制模块、各执行机构和传感器供电。如图9所示，电源主要为24V工控系统电源，5V传感器和处理控制模块电源。

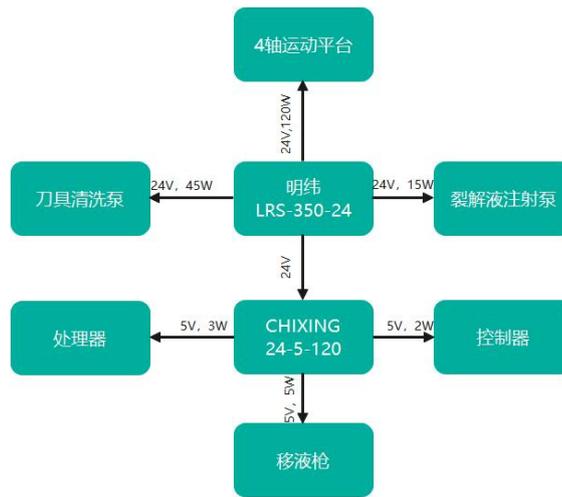


图9 系统电源模块框图

### (2) 处理控制模块

处理控制电路如图 10 所示，控制器基于美国 TI 的 TMS320C6748 型号 DSP 处理器实现。该处理器主频可达 456MHz，能够满足运动控制算法的计算需求。

处理控制电路主要完成如下功能。

- 1) 完成运动机构的控制；
- 2) 完成人机输入输出的执行；
- 3) 完成与处理器的数据交互；
- 4) 完成与上位机的通信。
- 5) 完成运动位置的解算；
- 6) 完成控制命令字的生成；
- 7) 完成于控制器的数据交互。

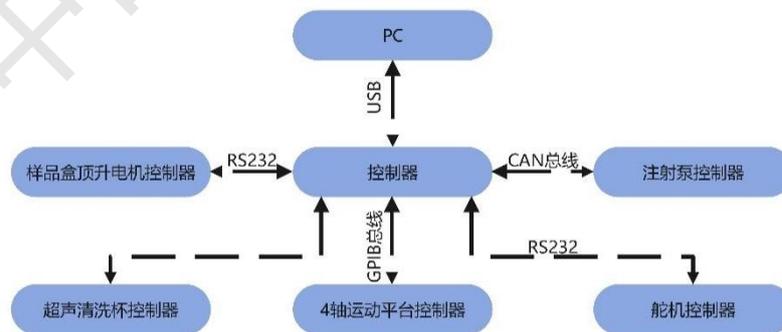


图 10 系统电路框图

### (3) 温控模块

温控系统主要为裂解液及细胞核悬浮液提供可控的温度环境，以保证其活性不被损害或损毁。考虑系统体积的限制，本文采用半导体制冷片的方式进行环境温度的控制。本项目中

的温控系统主要包括：脉冲调制温控电路、铂电阻测温传感器、半导体制冷片、散热片、冷水散热片、水泵和水箱。其中，冷水散热片通过水管与水泵相连接，水泵置于水箱之中。散热片粘接于半导体制冷片的上方。铂测温电阻分别放置于温控腔体的中心、边角和散热片的内部。半导体制冷片粘接于冷水散热片的上方。

温控系统中温度控制为自动控制的方式，在提高控制精度的同时也排除了人为因素带来的影响。控制算法为 PID 算法，具有算法简单、鲁棒性好、可靠性高、控制精确度高等优势。本次控制算法主要分为三步，第一步相关参数的设定，其中包括比例系数、积分系数、微分系数、目标温度几个参数值的设定；第二步将采集到的温度传感器反馈值与目标温度进行比较，然后通过 PID 算法计算出输出值。需要注意的细胞核提取仪主控制输出的 PWM 范围是 0~255，前期目标温度和实时温度差值比较大，所以经过 PID 算法计算出的输出值远远大于 255，后期随着温度降低，当目标温度接近实时温度时，积分部分和微分部分随着积累量的增加会导致输出值为负，同时积分部分可能会出现过饱和状态，为了防止积分过饱和和输出量超限，需要对输出值和积分部分进行限幅处理；第三步是将输出值进行 A/D 转换，将 PID 计算出的数字量转换为能够驱动半导体制冷片工作的电压量。



图 11 温控系统测试结果

如图 11 所示，经测试验证，温控系统温度控制精度小于  $0.1^{\circ}\text{C}$ ，满足裂解液及细胞核悬浮液的储存要求。

### 3 实验验证

植物细胞核提取装置通过流式细胞仪检测植物细胞核悬浮液验证了该系统的功能和性能，详细检测数据如图 12、图 13 所示。图 12 图 13 的植物样品分别为番茄叶片及拟南芥叶片，人工处理的细胞核完整率分别为 3.74%和 7.25%，而仪器处理的细胞核完整率分别为 6.62%和 25.01%，分别增加了 1.8 倍及 3.4 倍，大大优于人工处理方式。

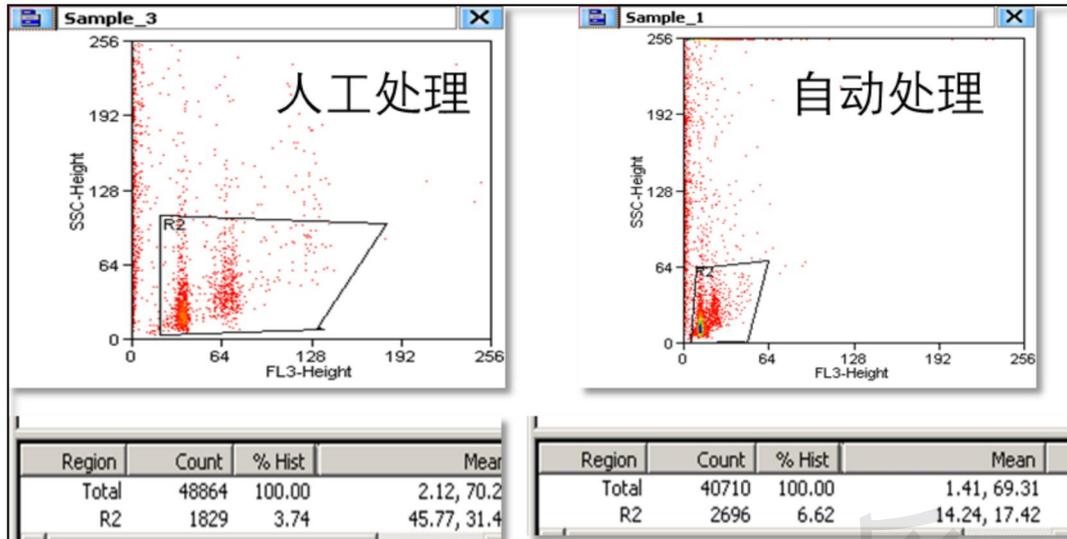


图 12 番茄叶片细胞核提取结果对比

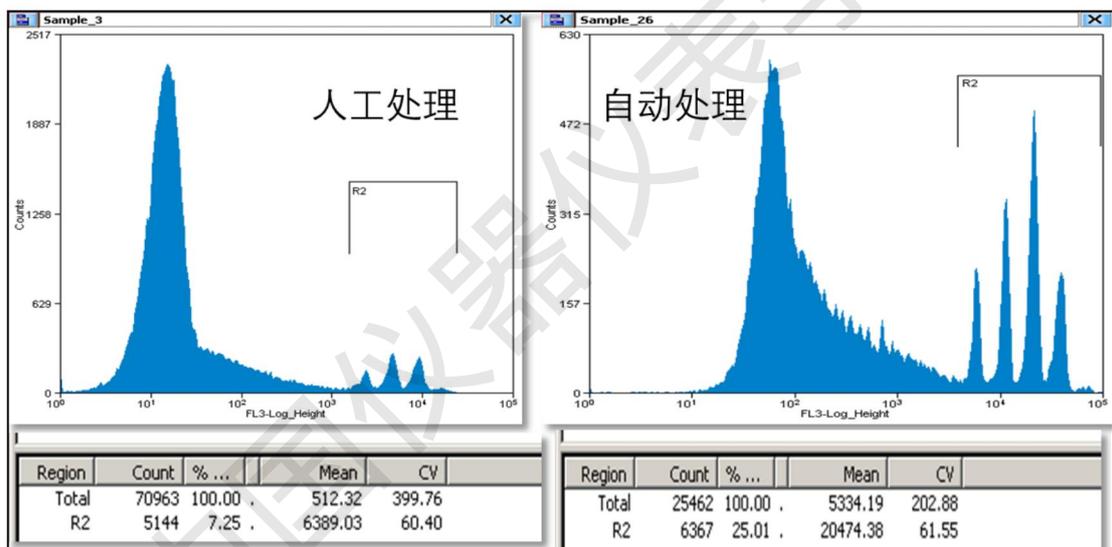


图 13 番茄叶片细胞核提取结果对比

## 4 结论

本文设计并研制了国内外第一套用于流式细胞仪检测植物 DNA 含量的样品前处理装置-植物细胞核提取装置。重点解决了植物细胞核提取过程中的控温、安全、切削自动化及移液自动化等问题，提高了植物细胞核的提取速度及完整率，提升了样品质量的一致性。

### 参考文献:

- [1] Kamensky LA, Melamed MR, Derman H. Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. Science, 1965, 150: 630-631.

- [2] Dittrich W, Göhde W. Impulsfluorometrie bei Einzellen in Suspensionen. Zeitschrift für Naturforschung, 1969, 24b: 360–361.
- [3] Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. Science, 1969, 163: 1213–1214.
- [4] Fluwyler, M. J. Electronic Separation of Biological Cells by Volume. Science, 1965, 150, 910-911.
- [5] Hülgenhof E, Weidhase RA, Schlegel R, Tewes A. Flow cytometric determination of DNA content in isolated nuclei of cereals. Genome , 1988, 30: 565–569.
- [6] Roux N, Toloza A, Radecki Z, Zapata-Arias FJ, Doležel J. Rapid detection of aneuploidy in Musa using flow cytometry. Plant Cell Reports, 2003, 21: 483–490.
- [7] Barow M, Meister A. Endopolyploidy in seed plants is differently correlated to systematics, organ, life strategy and genome size. Plant, Cell and Environment, 2003, 26: 571–584.
- [8] Sandoval A, Hocker V, Verdeil JL. Flow cytometric analysis of the cell cycle in different coconut palm (*Cocos nucifera* L.) tissues cultured in vitro. Plant Cell Reports, 2003, 22: 25–31.
- [9] Dolezel J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. Phytochemical Analysis, 1991, 2: 143–154.
- [10] Price HJ, Johnston JS. Influence of light on DNA content of *Helianthus annuus* Linnaeus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1996, 93: 11264–11267.
- [11] Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science, 1983, 220: 1049–1051.