

基于微通道电容参数的细胞检测方法研究

张学超, 龚静 (铜仁学院大数据学院, 贵州铜仁 554300)

摘要 以随机采集的新鲜牛奶和培养的 K562 细胞为基础, 配制不同细胞含量的待测奶样, 并在 10~1 000 Hz 低频测试区域内使用多频电容测试技术对配制的不同奶样进行测试。结果表明, 微通道传感器的牛奶细胞数检测下限可达 40 万个/mL; 细胞体积电容值与细胞含量之间具有一定的线性相关性, 细胞体积电容参数可以作为一个检测细胞含量的重要指标。

关键词 微通道传感器; 电容; 细胞检测; 牛奶

中图分类号 S854.4⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)05-0010-02

Research on Determination Method of Cells Based on Microchannel Capacitance Parameters

ZHANG Xue-chao, GONG Jing (School of Data Science, Tongren University, Tongren, Guizhou 554300)

Abstract Based on randomly collected fresh milk and cultured K562 cell, some milk samples with different cell contents were prepared, and tested by multi-frequency capacitance testing technology within 10-1 000 Hz. Results showed as followed: the determination low limit of milk cell number of microchannel sensor could reach 200 thousand individuals per milliliter; the cell volume capacitance had certain linear relationship with cell content, so the cell volume capacitance could be as an important index for determining cell content.

Key words Microchannel sensor; Capacitance; Cell determination; Milk

牛奶体细胞数是评价奶牛乳腺炎患病等级的重要标准之一, 是预测新鲜牛奶产量和质量的重要量化指标^[1]。因此, 准确、快速地检测新鲜牛奶中的体细胞数非常重要。然而, 在体细胞数的所有检测方法中, 电检测法被公认为是同时具有检测成本低、快速准确、操作简单等众多优点的检测方法^[2]。因此, 研发具有检测准确、使用便捷、样品消耗少、能实现在线检测的微通道传感器有着很好的市场前景。

细胞具有完整的膜结构, 当其被置于外电场中时, 细胞膜内的自由离子在受到电场力的作用下会在细胞膜表面堆积, 从而使细胞表现出微小的电容效应^[3-4]。崔传金等^[5]研究表明, 乳汁的电容作为预测乳腺炎的新型参数是完全可行的。鉴于此, 笔者采用微流控技术构建两电极微通道传感器, 测取了不同细胞含量奶样的电容值, 以达到诊断奶牛乳腺炎疾病的目的。

1 材料与与方法

1.1 仪器 美国 GAMRY REFERENCE 600 电化学工作站; 美国 HERA CELL 150i 二氧化碳培养箱; 日本 OLYMPUS CKX301 倒置显微镜; 79-1 磁力加热搅拌器(北京科伟永兴仪器有限公司); DC-0515 低温恒温槽(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); BCD-219SKDE 冷藏柜等。

1.2 测试试验

1.2.1 奶样采集。 奶样采自正常生理期内的同一头黑白花奶牛。采样时先用温开水擦拭乳头, 然后用 75% 乙醇对乳头进行消毒, 并用干净的医用棉签擦干, 且弃去前 2 次挤出的牛奶, 再进行奶样采集。每个乳区的牛奶分别挤入 50 mL 干净的带有编号的玻璃瓶内密封, 在运输的过程中放入装有冰袋的隔热泡沫塑料盒内进行保鲜。最后将当天采集的奶样带回实验室测试, 无法立刻测试的奶样需在 4 °C 条件下冷藏

保存, 防止牛奶变质而影响测试效果。

1.2.2 测试奶样的配制。 将采集回来的奶样放入低温恒温槽中, 在 40 °C 恒温条件下恒温 15 min 后取出^[6], 用磁力加热搅拌器搅拌 3 min, 将奶样置入 5 μm 干净砂芯中进行负压过滤, 去除新鲜牛奶中的杂质和原有体细胞, 得到无细胞含量的奶样。

试验所需的体细胞用培养后的 K562 细胞进行替代^[3]。将培养好的 K562 细胞与过滤后的无细胞奶样分别配制为 40 万、80 万、160 万、320 万、640 万个/mL 的待测奶样, 并进行碘酞染液染色、细胞计数板计数。测试时, 同一奶样重复镜检计数 3 次, 取其平均值作为最终细胞值含量。并根据加利福尼亚 CMT 标准^[7], 将奶样划分为 5 个等级(表 1)。

表 1 CMT 法检测奶牛乳腺炎的标准

Table 1 The standard for determining cow mastitis by CMT method

CMT 等级 CMT grade	体细胞含量 Somatic cell content 万个/mL	奶牛患病情况 The condition of cow disease
N	0~20	健康(阴性)
T	20~40	可疑
1	40~120	隐性乳腺炎
2	120~500	较严重感染
3	>500	严重感染

1.2.3 微通道传感器的构建。 采用光刻剥离工艺制备两电极微通道传感器, 同时考虑微通道结构、通道尺寸、电极形状和尺寸、电极位置、电极材料、管体材料、奶样进样口布局等方面, 将设计好的图纸由博奥公司进行加工。微通道传感器的实物如图 1、2 所示。

1.2.4 多频奶样容抗值的测量。 因为温度对牛奶的容抗值影响较大, 故在进行试验测试时将奶样测试温度固定在 25 °C 左右。将配制好的奶样注入到半圆柱形电极面积为 60 μm × 60 μm, 长 3 mm、宽和深均为 100 μm 的两电极微通道传感器中。最后用电化学工作站完成多频奶样容抗值的

基金项目 贵州省教育厅自然科学项目(黔教合人才团队字[2015]67号)。

作者简介 张学超(1988—), 男, 河北唐山人, 助教, 硕士, 从事生物传感器、测控技术与智能仪器研究。

收稿日期 2017-11-22

测量。每个奶样测试完毕后,所用注射器和传感器都必须用蒸馏水冲洗干净,并用下一个待测奶样冲洗3次。所有的奶样均在采集后的12 h内测试完毕。



图1 微通道传感器实物
Fig.1 Microchannel sensor

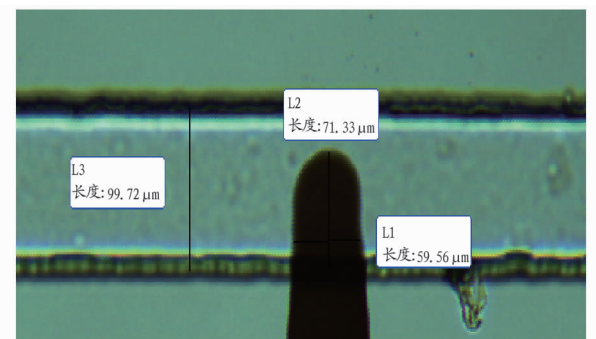


图2 电极具体形状和尺寸
Fig.2 Shape and size of electrode

2 结果与分析

2.1 多频奶样容抗值 通过在微通道传感器的两电极上加测试电信号,使用电化学工作站的测得的不同细胞含量奶样的多频容抗谱(图3)。不同细胞含量的容抗谱自上而下排列,测试奶样的细胞含量分别为640万、320万、160万、80万、40万个/mL的奶样。由此可知,不同细胞含量奶样的容抗谱排列整齐、区分明显,初步判定传感器的细胞数检测下限可达40万个/mL。

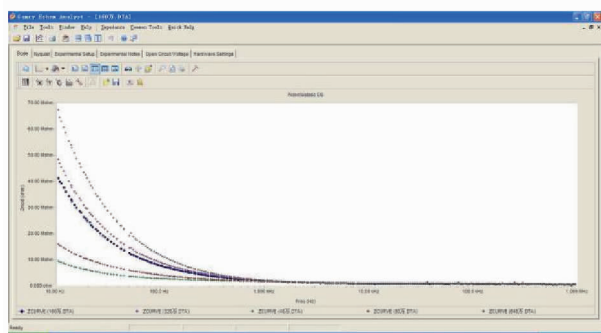


图3 测试奶样容抗谱

Fig.3 Capacitive reactance spectrum of determined milk sample

2.2 容抗谱分析 由图3的容抗谱可知,随着测试频率的增加,容抗会迅速地减小然后基本保持在一个基本恒定的值上,说明在1 000 Hz以上频率段,牛奶电容形成的容抗对总阻抗的影响很小,在这些频率段电阻是总阻抗的主要贡献

者。而在10~1 000 Hz,牛奶电容形成的容抗对总阻抗的影响较大,说明低频电容是总阻抗的主要贡献者。因此,确定容抗谱测试不同细胞奶样的有效测试频率范围。

两电极微通道传感器的通道宽度和高度只有100 μm,通道宽度与管道长度、通道高度与管道长度的比值均只有1:30。因此,在进行奶样细胞测试试验时,可以近似认为奶样中的细胞在传感器的微通道内整体呈现串联排列形式,从而使得细胞含量越高的奶样样本的电容值越小,即容抗值较大,所以奶样细胞含量高的测试样本分布在其他容抗谱的上部。

2.3 微通道传感器等效电路模型 斯特恩界面双电层模型是针对电极/溶液界面处形成的双电层结构电容而言的,是一种经典的电极/溶液界面模型^[8]。该研究将斯特恩模型应用于两电极测试试验体系,并结合两电极微通道传感器的实际物理结构,考虑溶液电阻(奶体电阻)和界面电阻对整个电化学测试体系的作用,经合理等效简化后得到如图4所示的等效电路图。其中, R_i 为界面电阻(传感器测试电极与奶体界面之间形成的电阻), C_i 为界面电容(传感器测试电极与奶体界面之间形成的电容), R_m 为奶体电阻(奶体本身形成的电阻), C_m 为奶体电容(奶体中的细胞所形成的电容)。

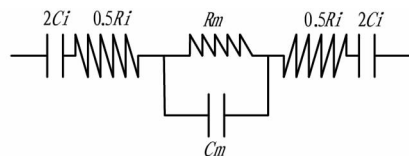


图4 微通道传感器等效电路模型

Fig.4 Equivalent circuit model of microchannel sensor

2.4 等效电路模型结果分析 根据等效电路模型求得的不同细胞含量奶样的奶体电容值与细胞含量之间的线性关系如图5所示。结果表明,不同细胞含量的奶体电容值与奶样细胞含量之间的线性相关性只有 $R=0.72$,绝对系数 $R^2=0.52$ 。这说明奶体电容值可以在一定程度上反映不同细胞含量的奶样,但其相关性并不显著;决定系数 R^2 也偏低,表明奶体电容值并未很好地反映奶样细胞数的变化。产生这种结果的原因是两电极微通道传感器在检测牛奶细胞数方面还存在进一步改进的空间,如进一步减小界面电容对奶体电容造成的测试干扰。

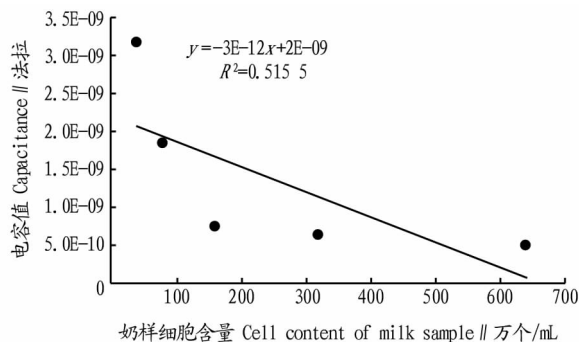


图5 细胞含量与电容值曲线

Fig.5 The curve relationship between cell content and capacitance

参考文献

- [1] GADD G M. Interactions of fungi with toxic metals[J]. *Phytologist*, 1993, 124:25-60.
- [2] GADD G M, WHITE C. Removal of thorium from simulated acid process streams by fungal biomass: Potential for thorium desorption and reuse of biomass and desorbent[J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 1992, 55(1):39-44.
- [3] WANG J L, CHEN C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review[J]. *Biotechnology advances*, 2006, 24(5):427-451.
- [4] BRADY D, ROSE P D, DUNCAN J R. The use of hollow fiber cross flow microfiltration in bioaccumulation and continuous removal of heavy metals from solution by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44(11):1362-1366.
- [5] AKTHAR N, SASTRY S, MOHAN P M. Biosorption of silver ions by processed *Aspergillus niger* biomass[J]. *Biotechnol Lett*, 1995, 17(5):551-556.
- [6] AWOFOLU O R, OKONKWO J O, VAN DER MERWE R R, et al. A new approach to chemical modification protocols of *Aspergillus niger* and sorption of lead ion by fungal species[J]. *Electron J Biotechnol*, 2006, 9(4):340-348.
- [7] BAPAT P M, KUNDU S, WANGIKAR P P. An optimized method for *Aspergillus niger* spore production on natural carrier substrates[J]. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(6):1683-1688.
- [8] KUREK E, MAJEWSKA M. *In vitro* remobilization of Cd immobilized by fungal biomass[J]. *Geoderma*, 2004, 122(2/3/4):235-246.
- [9] SUH J H, YUN J W, KIM D S, et al. Comparative study on Pb²⁺ accumulation between *Saccharomyces cerevisiae* and *Aureobasidium pullulans* by SEM (Scanning Electron Microscopy) and EDX (Energy Dispersive X-Ray) analyses[J]. *Journal of bioscience and bioengineering*, 1999, 87(1):112-115.
- [10] LOAËC M, OLIER R, GUEZENNEC J. Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide[J]. *Water research*, 1997, 31(5):1171-1179.
- [11] MANASI, RAJESH V, KUMAR A S K, et al. Biosorption of cadmium using a novel bacterium isolated from an electronic industry effluent[J]. *Chemical engineering journal*, 2014, 235:176-185.
- [12] FILIPOVIC-KOVACEVIC Ž, SIPOS L, BRISKI F. Biosorption of chromium, copper, nickel and zinc ions onto fungal pellets of *Aspergillus niger* 405 from aqueous solutions[J]. *Food Technol Biotechnol*, 2000, 38(3):211-216.
- [13] BHAINSA K C, D'SOUZA S F. Biosorption of uranium(VI) by *Aspergillus fumigatus*[J]. *Biotechnology techniques*, 1999, 13(10):695-699.
- [14] FOUREST E, CANAL C, ROUX J C. Improvement of heavy metal biosorption by mycelial dead biomasses (*Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei* and *Penicillium chrysogenum*): pH control and cationic activation[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1994, 14(4):325-332.
- [15] DAVIS T A, VOLESKY B, MUCCI A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae[J]. *Water Res*, 2003, 37(18):4311-4330.
- [16] BRINZA L, DRING M J, GAVRILESCU M. Marine micro-and macro-algal species as biosorbents for heavy metals[J]. *Environ Eng Manage J*, 2007, 6(3):237-251.
- [17] FIGUEIRA M M, VOLESKY B, CIMINELLI V S T, et al. Biosorption of metals in brown seaweed biomass[J]. *Water Res*, 2000, 34(1):196-204.
- [18] CHEN C, WANG J L. Cation (K⁺, Mg²⁺, Na⁺, Ca²⁺) release during Zn (II) biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Huan jing ke xue*, 2006, 27(11):2261-2267.
- [19] DOSTALEK P, PATZAK M, MATEJKA P. Influence of specific growth limitation on biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2004, 54(2/3):203-207.
- [20] CHEUNGA K H, GU J D. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review[J]. *International biodeterioration & biodegradation*, 2007, 59(1):8-15.
- [21] FURUKAWA K, TONOMURA K. Cytochrome *c* involved in the reductive decomposition of organic mercurials. Purification of cytochrome *c-I* from mercury-resistant *Pseudomonas* and reactivity of cytochromes *c* from various kinds of bacteria[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 1973, 325(3):413-423.
- [22] LLOYD J R. Microbial reduction of metals and radionuclides[J]. *FEMS Microbiology Review*, 2003, 27(2/3):411-425.
- [23] STRANDBERG G W, SHUMATE S E, PARROTT J R. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: Accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Applied and environmental microbiology*, 1981, 41(1):237-245.
- [24] CHANG J S, LAW R, CHANG C C. Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21[J]. *Water research*, 1997, 31(7):1651-1658.
- [25] CHEN X C, WANG Y P, LIN Q, et al. Biosorption of copper(II) and zinc(II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1[J]. *Colloid Surf B-Biointerfaces*, 2005, 46(2):101-107.
- [26] VOLESKY B, MAY H, HOLAN Z R. Cadmium biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and bioengineering*, 1993, 41(8):826-829.
- [27] SCOTT J A, PALMER S J. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 1990, 33(2):221-225.
- [28] VIJVER M G, VAN GESTEL C A M, LANNO R P, et al. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: A review[J]. *Environmental science & technology*, 2004, 38(18):4705-4712.
- [29] DAY R, DENIZLI A, ARICA M Y. Biosorption of cadmium(II), lead(II) and copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Bioresour Technol*, 2001, 76(1):67-70.
- [30] AKSU Z, ACIKEL U, KUTSAL T. Application of multicomponent adsorption isotherms to simultaneous biosorption of iron(III) and chromium(VI) on *C. vulgaris*[J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 1997, 70(4):368-378.

(上接第 11 页)

3 结论与讨论

通过构建两电极微通道传感器,使用电化学工作站在 $10 \sim 1 \times 10^6$ Hz 频率对不同细胞含量的奶样进行测试试验。从测得的 $10 \sim 1000$ Hz 频率段奶样容抗值可以初步确定具有该结构参数的传感器细胞数检测下限可达 40 万个/mL;又分析了传感器的等效电路结构,提取出不同细胞含量奶样的奶体电容值,进一步分析奶体电容值与细胞含量之间的线性关系,发现两者之间具有一定的线性相关性,确定奶体电容值可以作为细胞含量检测的一个重要指标。最后提出两电极微通道传感器的结构还有待进一步的优化,例如,如何减小界面电容对奶体电容造成的干扰、如何设计更加合理的等效电路模型来准确提取奶体电容值等,以此来提高传感器的牛奶细胞数检测下限和奶体电容值作为细胞含量检测指标的

准确度。

参考文献

- [1] DOS REIS C B M, BARREIRO J R, MORENO J F G, et al. Evaluation of somatic cell count thresholds to detect subclinical mastitis in Gyr cows[J]. *J Dairy Sci*, 2011, 94(4):4406-4412.
- [2] 崔传金, 陈至坤, 张学超, 等. 基于体细胞数的奶牛乳腺炎检测方法研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2013, 41(7):44-47.
- [3] SENGUPTA S, BATTIGELLI D A, CHANG H C. A micro-scale multi-frequency reactance measurement technique to detect bacterial growth at low bio-particle concentrations[J]. *Lab on a Chip*, 2006(5):682-692.
- [4] CLAES J E, VAN LMPE J F. On-line estimation of the specific growth rate based on viable biomass measurements: Experimental validation[J]. *Bioproc Eng*, 1999, 21(5):389-395.
- [5] 崔传金, 古少鹏, 左月明. 基于电参数与神经网络的奶牛乳腺炎检测方法[J]. *农业机械学报*, 2011, 42(1):193-197.
- [6] SIERRA D, SANCHEZ A, LUENGO C, et al. Temperature effects on somatic cell counts in goat milk[J]. *Int Dairy J*, 2006, 16(4):385-387.
- [7] 刘峰, 迟玉杰. 乳房炎乳的检测方法[J]. *现代食品科技*, 2005, 21(1):129-131.
- [8] 李荻. 电化学原理[M]. 3版. 北京:北京航空航天大学出版社, 2008.