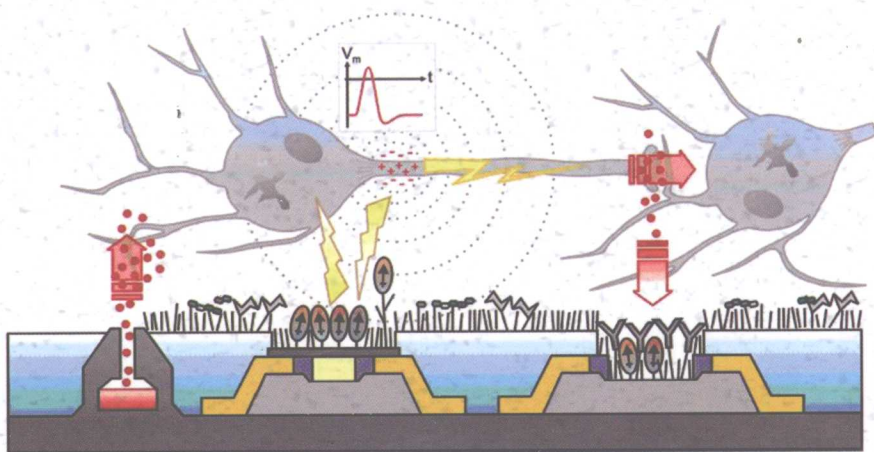


— Cell-based Biosensor —

细胞传感器

王平等著



细胞传感器

王平等著

图书在版编目(CIP)数据

细胞传感器 / 王平等著. — 北京: 科学出版社, 2003

(当代生物科学)

ISBN 7-03-030669-4

I. ①细… II. 王… III. 细胞传感器 IV. Q811.4

中国版本图书馆CIP数据核字(2003)第173003号

责任编辑: 李 斌 封面设计: 李 斌
责任印制: 李 斌 印刷: 李 斌 装订: 李 斌

科学出版社

北京海淀区中关村大街27号

邮政编码: 100080

<http://www.science.cn>

电话: 010-64015000

发行: 科学出版社发行部

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书介绍了作者近年来进行的有关细胞传感器方面的研究成果及目前国际上在此领域的研究进展。全书共 10 章,分别论述了细胞的生理特性及其选择与培养、细胞传感器机理及模型分析,以及微电极阵列(MEA)细胞传感器、场效应晶体管(FET)细胞传感器、光寻址电位细胞传感器(LAPCS)、膜片钳细胞传感器、免疫细胞传感器、嗅觉与味觉细胞传感器的工作原理及在生物医学等领域中的应用,最后介绍了细胞传感器的发展趋势。其中大部分内容属于当今国际上的研究热点和前沿。

本书适合于生物医学传感技术有关的生物医学工程、生物化学传感技术、神经生理学、电子信息科学,以及人工智能等科学工作者,也适合于对交叉学科感兴趣的科技工作者阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞传感器/王平等著. —北京:科学出版社, 2007
(现代生物技术前沿)

ISBN 978-7-03-020666-4

I. 细… II. 王… III. 生物传感器 IV. Q811.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 173907 号

责任编辑:李 悦 彭克里 席 慧/责任校对:陈玉凤

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新 蕾 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007 年 12 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2007 年 12 月第一次印刷 印张:23 1/2 插页:1

印数:1—2 000 字数:535 000

定价:65.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换(环伟))

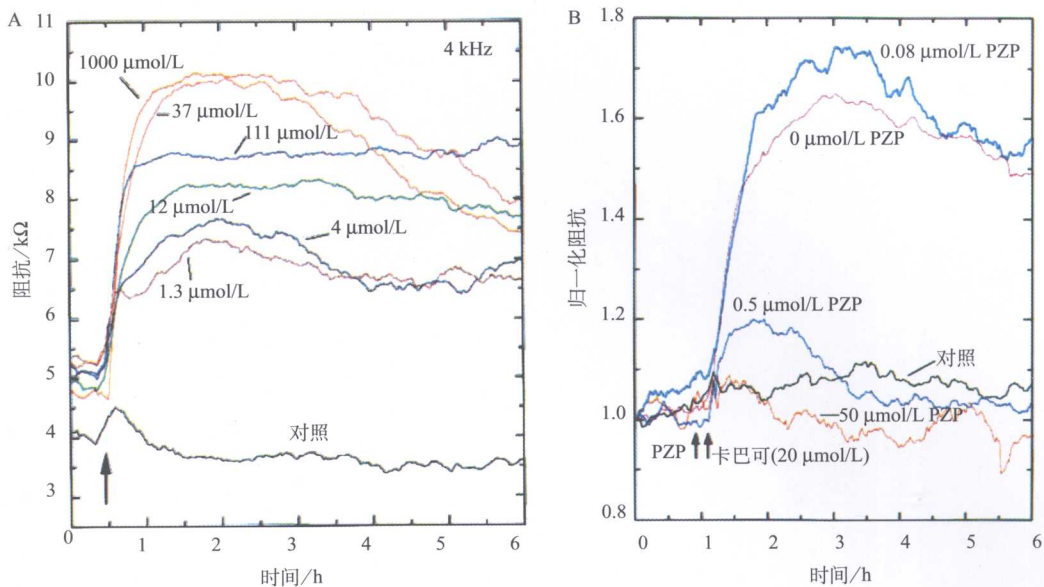


图 4.54 ECIS 用于同种药物不同剂量下的阻抗测试

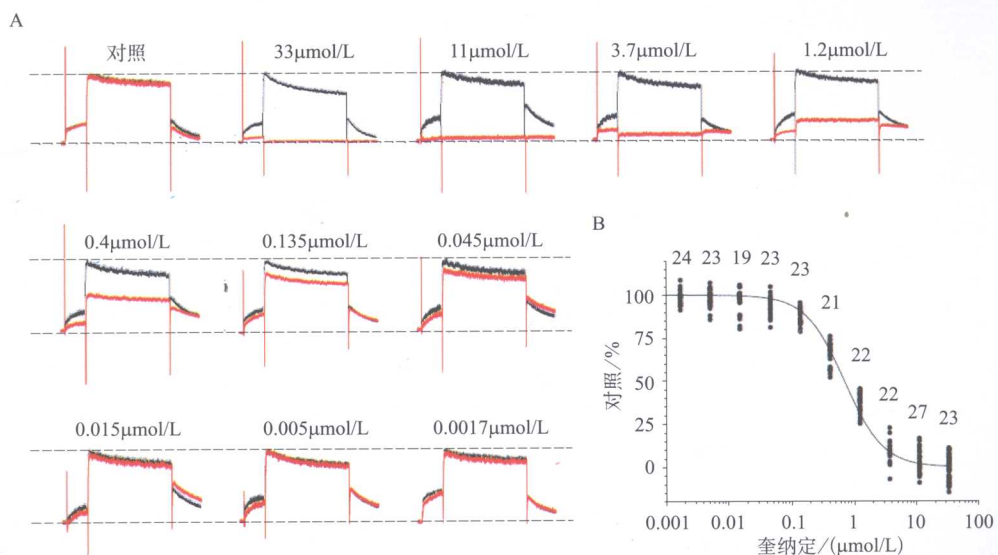


图 7.44 奎纳定对 hERG 通道的作用 (<http://www.moleculardevices.com>)

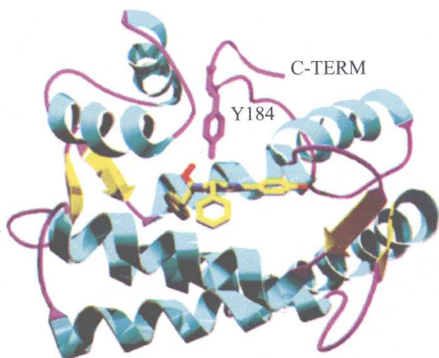


图 8.13 Aequorin/Coelenterazine 复合体的结构示意图
绿色条带代表 Aequorin 二级结构中 α 落选, 用棍状图显示的分别是蛋白质侧链的 Tyr 184 残基和 Coelenterazine

前言

生命科学是 21 世纪的前沿领域之一，而生命科学的发展离不开研究手段的发展和创新。细胞作为有机体结构与生命活动的基本单位，在生物体的新陈代谢、信息传递等方面起着关键作用。因此，对细胞及细胞网络进行研究和分析具有十分重要的意义。近十年来，随着微电子技术、材料科学，以及细胞生物学和分子生物学的迅速发展，我们能

用最新的传感技术在生命活动的基本单位——细胞和分子水平上研究生物和医学的现象。目前，细胞电生理技术已经取得了很大的成就，例如，膜片钳和共聚焦显微技术等精密的分析仪器在探测细胞的微观离子、受体及生理学变化等方面取得了巨大的成功。然而，这些方法也存在着一些缺点，如耗时、不能够长时间连续工作等。被分离的细胞具有高度能动性，并且常在一定时间内远离记录电极，这样使得单细胞的长期记录难以进行，此外，在检测相同的培养物中细胞之间存在的导电现象或连通性时，采用膜片钳等专用仪器会遇到一定困难。

实时活体监测细胞是全面了解细胞生理行为及其机制的重要基础，这就要求能够定量测量和分析细胞的内外微环境。测定细胞内自由离子浓度的较好方法是采用离子敏感微电极 (ISME)，组合不同的 ISME 可以并行测量细胞内多种离子，如 NH_4^+ 、 Cl^- 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 等。细胞内生理状态的改变，会引起细胞外代谢物（如离子、分子等）的相应变化。因此，测量细胞代谢后胞外微环境的相关参数，可以监测细胞的生理变化。

近年来，国际上 MEMS（微机电系统）技术已向生物医学传感器微系统方向发展，出现了 BioMEMS（生物微机电系统）、 μTAS （微全分析系统）和 BioNEMS（生物纳米机电系统）等。这些基于芯片技术的传感器和相应的分析仪器在医学临床检测和环境检测领域具有广阔的应用前景。 μTAS 包括微流控驱动系统微泵、注入阀门、反应腔和检测系统。微流控的特点是利用微细加工工艺，在硅片或玻璃等材料上集成样品预处理器、微反应器、微分离管道、微检测器等微型生物化学功能器件，以及电子器件和微流量器件的微型生物化学分析系统。与传统的分析仪器相比，微型生物化学分析系统除了体积小以外，还具有分析时间短、样品消耗少、能耗低和效率高等优点。因此，它将广泛用于生物医学检测领域。

另一方面，随着电子和微加工技术的快速发展，采用细胞芯片监测细胞电活动的手段得到了应用。胞外微电极阵列提供了一种长期无损监测细胞电活动的方法，记录电极提供了一个大量的数据采集通道，把从具有电活性的细胞构成的神经网络获得的数据传递出来。传统的细胞胞内记录技术在细胞生理研究中已经取得了很大的突破，但是，在研究信号在细胞之间的传输路径方面，大部分电生理实验室所依赖的玻璃微吸管无法实现胞间传播信号的测量（如神经元的突触传递，或者细胞之间的间隙连接进行的信号传播）。此外，细胞内记录和电压敏感染料是有损的测量方法，限制了标准电生理测量和光学方法的应用。所以，阵列芯片技术已经成为细胞网络动力学长期记录的一种强有力的工具。

目前,国际上采用细胞传感芯片技术代替膜片钳等传统技术的研究已经开始出现,如因发明膜片钳而获得诺贝尔奖的德国的 Erwin Neher 在 *Nature* 上撰文分析了采用半导体器件检测活细胞生理特性的技术发展前景。Straub 等一些著名的学者研究活细胞与微电子技术相结合,并取得了快速的发展。细胞传感器可以直接检测细胞膜上的通道,对于研究细胞生理及其响应机理具有重要的意义。基于平面微电极的细胞芯片,不但能研究神经、心肌细胞生长和电信号传递过程,而且能进行神经网络和其他细胞的电生理检测和分析,将为仿生传感器研究和药物检测等提供重要的技术手段。

本书首先介绍了细胞传感器的研究目的、细胞传感器在国际上的发展状况。其次,介绍了各类典型的细胞传感器,分析了细胞传感器的特点和特殊要求。第 2 章介绍了细胞电生理及细胞的选择与培养,包括细胞膜的化学组成和分子结构、生物电信号及细胞膜上的离子转运、细胞的选择与培养技术。第 3~6 章是本书的重点,主要介绍了细胞-硅器件界面特性,包括细胞-硅器件的界面模型、细胞-传感器界面测量原理、细胞传感器的设计与制备及实验测试系统、测试分析平台和观察平台等。第 7~9 章介绍了细胞传感器中最新发展的技术及我们课题组目前正在进行的研究内容,具有较强的挑战性。最后,在第 10 章中,展望了细胞传感器未来的发展趋势。

本著作吸收了目前国际上广泛采用的微型化、集成化传感器设计和微加工技术,结合相应的生物、电子、光学检测技术,较全面地介绍了细胞传感器的原理、结构及检测方法。最后结合典型的传感器介绍了细胞传感器在生物医学、环境科学、医药卫生和健康工程等方面的应用。本著作可供生物医学工程学、生物医学传感技术、生物医学电子学、检测技术及仪器、应用电子技术,以及细胞生物学、神经生理等专业的师生和相关科技人员参考。

浙江大学生物医学工程与仪器科学学院生物传感器国家专业实验室的王平教授负责本书第 1 章和第 10 章的编写,博士后刘清君负责第 9 章,博士研究生徐莹负责第 4 章和第 5 章,博士研究生蔡华负责第 3 章和第 6 章,博士研究生张威负责第 2 章,博士研究生陈培华负责第 7 章,博士研究生王丽江、吴春生负责第 8 章的编写。此外还有博士研究生周俊、余辉等也参与编写了部分内容。全书由王平统稿。蔡华负责全书图表等设计和编排。封面插图得到 Borghs 教授的许可。科学出版社的李悦编辑对本书的出版给予了大力的支持,在此一并表示由衷的谢意。

作者还要感谢中国科学院对出版本书给予的资金支持。

由于细胞传感器涉及的知识领域非常广泛,作者很难对各个方面都处理得十分准确和恰当,加上作者的知识和经验所限,错误和不妥之处在所难免,诚恳地希望得到广大读者的批评和帮助。

王 平

2007 年 8 月于浙江大学

目 录

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 细胞传感器研究的目的	2
1.3 细胞在芯片上的培养技术	3
1.4 细胞传感器在国际上的发展现状	4
1.4.1 传统的电生理测量方法——电压钳	4
1.4.2 经典的电生理测量方法——膜片钳	5
1.4.3 场效应晶体管 (FET) 细胞传感器	6
1.4.4 微电极阵列 (MEA) 细胞传感器	8
1.4.5 光寻址电位传感器 (LAPS)	9
1.4.6 膜片钳细胞传感器	11
1.4.7 免疫细胞传感器	12
1.5 小结	12
第 2 章 细胞的生理特性及其选择与培养	14
2.1 细胞的基本结构	14
2.2 细胞膜结构和跨膜转运	15
2.2.1 细胞膜脂质双分子层结构	15
2.2.2 细胞膜跨膜物质转运	18
2.2.3 细胞膜跨膜信号转导	20
2.3 细胞膜离子转运和 Donnan 平衡	23
2.3.1 细胞膜的离子转运	24
2.3.2 细胞的静息电位和动作电位	26
2.3.3 电压钳技术和膜片钳技术	29
2.4 细胞的选择与培养	30
2.4.1 细胞的分离培养方式	31
2.4.2 细胞传感器的培养条件	37
2.5 细胞固定和生长的影响因素	38
2.5.1 细胞固定和生长的影响因素	39
2.5.2 促进细胞附着和生长的方法	41
2.5.3 细胞传感器的生物相容性	43
2.6 小结	43
第 3 章 细胞传感器机理及模型分析	45

3.1 概述	45
3.1.1 细胞膜的特点	45
3.1.2 可兴奋细胞及其离子通道的等效电路	45
3.1.3 固体-电解质界面	48
3.2 细胞代谢微环境检测	56
3.2.1 细胞代谢微环境	56
3.2.2 细胞代谢微环境的检测方法	58
3.2.3 离子的检测基础	58
3.2.4 生物膜敏感器件	62
3.3 细胞电生理参数测量	63
3.3.1 细胞-硅器件的界面模型	63
3.3.2 细胞-金属电极界面模型	64
3.4 细胞黏附阻抗谱检测	66
3.5 细胞传感器中的噪声	69
3.5.1 电极噪声	69
3.5.2 电磁干扰	70
3.5.3 生物噪声	70
3.6 小结	70
第4章 微电极阵列 (MEA) 细胞传感器	72
4.1 基于微电子机械系统技术的细胞传感器工艺概述	72
4.1.1 微电子机械系统 (MEMS) 概述	72
4.1.2 MEMS 器件及应用	75
4.1.3 结合 IC 和 MEMS 技术的细胞传感器	76
4.1.4 与细胞传感器相关的工艺过程	77
4.2 MEA 的历史及发展	83
4.3 MEA 的工作原理概述	86
4.3.1 MEA 通道寄生电容模型分析	87
4.3.2 MEA 的设计分类	88
4.3.3 电极阻抗特性测试	90
4.4 MEA 器件设计	93
4.4.1 在溶液中的 MEA 阻抗	93
4.4.2 MEA 的尺寸和定位	94
4.4.3 MEA 基底的选择	94
4.4.4 MEA 电极材料的选择	95
4.4.5 MEA 引线材料的选择	95
4.4.6 MEA 钝化层的选择	95
4.4.7 MEA 制作流程及封装	96
4.5 细胞-硅器件的界面特点及表面处理	97

4.5.1	接种细胞前的器件预备	98
4.5.2	接种细胞的类型选择	99
4.5.3	不同器件界面对表面处理的影响	100
4.5.4	MEA 表面处理的电化学测试	101
4.6	器件封装、测试平台及特性测试	107
4.6.1	封装	107
4.6.2	硬件平台	107
4.6.3	软件	109
4.6.4	特性测试	110
4.6.5	数据采集及噪声分析	111
4.6.6	MEA 器件的重复性	112
4.7	MEA 应用	114
4.7.1	MEA 对电活性细胞参数测试	114
4.7.2	MEA 在药物测试方面的研究	119
4.7.3	MEA 便携化与仪器化发展	124
4.7.4	ECIS 应用	125
第 5 章	场效应晶体管 (FET) 细胞传感器	129
5.1	FET 细胞传感器的发展历史	129
5.2	FET 传感器的原理与基本结构	131
5.2.1	结型场效应晶体管	131
5.2.2	绝缘栅型场效应晶体管	133
5.2.3	基于 FET 的生物传感器检测原理	136
5.3	器件设计与制作	143
5.3.1	CBFET 器件的制作过程	143
5.3.2	CBFET 器件的设计	144
5.3.3	ISFET 设计与制备	151
5.3.4	EGFET 设计	154
5.3.5	其他新型 FET 结构	156
5.4	细胞与 FET 等硅材料器件结合的生物相容性	157
5.4.1	FET 与不同细胞的耦合过程	157
5.4.2	结合存在的问题	159
5.4.3	表面处理及细胞培养方法	160
5.5	FET 系统	161
5.5.1	CBFET 系统工作流程	161
5.5.2	EGFET 的细胞传感器测试电路	163
5.5.3	ISFET 测试系统	165
5.6	FET 应用	165
5.6.1	CBFET 用于细胞电生理测试	165

5.6.2	场效应晶体管细胞传感器与离子图像传感器的结合	167
5.6.3	化学离子敏传感器在生物医学上的应用	167
5.6.4	生物纳米 FET 芯片	170
5.6.5	FET 测试需要注意的问题	171
第 6 章	光寻址电位传感器 (LAPS)	174
6.1	概述	174
6.2	光寻址电位传感器 (LAPS) 的基本应用	174
6.2.1	LAPS 的图像传感器应用	174
6.2.2	LAPS 用于生物信号测量	176
6.3	LAPS 测量原理	178
6.3.1	LAPS 原理概述	178
6.3.2	LAPS 电路模型	178
6.3.3	LAPS 基本特性	183
6.3.4	LAPS 的响应时间	187
6.3.5	光源对 LAPS 特性的影响	188
6.4	LAPS 器件制备	192
6.4.1	LAPS 芯片的加工	192
6.4.2	LAPS 器件的封装	193
6.5	LAPS 测量系统	194
6.5.1	系统平台	195
6.5.2	硬件设计	198
6.5.3	软件控制	200
6.6	多光源 LAPS 测试系统	202
6.6.1	MLAPS 系统结构	202
6.6.2	MLAPS 系统测试	205
6.6.3	MLAPS 系统分析	209
6.7	光寻址电位细胞传感器 (LAPCS)	209
6.7.1	LAPCS 胞外电位检测	209
6.7.2	LAPCS 微生理计	213
6.8	小结	220
第 7 章	膜片钳细胞传感器	221
7.1	传统膜片钳技术	221
7.1.1	通道电流的记录模式	221
7.1.2	实验系统	223
7.1.3	实验技术	224
7.2	膜片钳芯片技术的发展	224
7.3	膜片钳芯片测量原理	226
7.3.1	膜片钳芯片工作原理	226

7.3.2	膜片钳芯片记录模式和等效电路	227
7.3.3	细胞类型的选择	228
7.3.4	保证高阻抗封接的条件	228
7.4	膜片钳芯片器件制备	229
7.4.1	基于硅材料的膜片钳芯片器件制备	229
7.4.2	基于玻璃的膜片钳芯片器件制备	230
7.4.3	基于聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 的膜片钳芯片器件制备	232
7.4.4	基于聚酰亚胺的膜片钳芯片器件制备	234
7.5	膜片钳芯片测量系统	236
7.5.1	细胞的引导	236
7.5.2	膜片钳放大器	237
7.5.3	数据采集和数字化	241
7.5.4	计算机及软件	241
7.5.5	外部噪声和 Faraday 笼	242
7.6	全细胞电流记录和数据分析	242
7.6.1	电压激活的电流	242
7.6.2	非电压激活的电流	248
7.7	单通道电流记录和数据分析	248
7.7.1	离子通道的识别	249
7.7.2	电流数据分析	249
7.7.3	与全细胞记录的关系	251
7.8	膜片钳芯片的应用	251
7.8.1	用于离子通道的研究	252
7.8.2	用于高通量药物筛选	257
7.9	小结	266
第 8 章	免疫细胞传感器	267
8.1	概述	267
8.1.1	免疫系统基础	267
8.1.2	免疫细胞类型及其功能	268
8.1.3	免疫细胞作为生物传感器的敏感元件	274
8.2	免疫细胞传感器的原理基础	274
8.2.1	免疫细胞分子识别的基本特征	274
8.2.2	热转换检测原理	276
8.2.3	光转换检测原理	279
8.3	免疫细胞传感器的器件制备	281
8.3.1	热检测装置	281
8.3.2	发光检测装置	283
8.3.3	免疫细胞芯片	286

8.4	免疫细胞传感器的测量系统	288
8.4.1	基于热检测的测量系统	288
8.4.2	基于光检测的测量系统	292
8.5	免疫细胞传感器的应用	294
8.5.1	应用于微生物检测	294
8.5.2	应用于药物筛选	295
8.5.3	其他方面的应用	296
8.5.4	未来的主要发展方向	296
第9章	嗅觉与味觉细胞传感器	297
9.1	概述	297
9.1.1	嗅觉传感器	297
9.1.2	仿生嗅觉传感器	300
9.1.3	味觉传感器	301
9.1.4	仿生味觉传感器	303
9.2	嗅觉细胞传感器	304
9.2.1	嗅觉感受的生物学基础	304
9.2.2	嗅觉编码方式	307
9.2.3	嗅觉细胞培养	310
9.3	味觉细胞传感器	312
9.3.1	味觉感受的生物学基础	312
9.3.2	味觉传导编码	314
9.3.3	味觉细胞培养技术	317
9.4	嗅觉与味觉细胞传感器的应用	322
9.4.1	嗅觉细胞传感器的应用	322
9.4.2	味觉细胞传感器的应用	326
9.5	小结	329
第10章	细胞传感器的发展趋势	330
10.1	概述	330
10.2	微加工与集成技术的发展	330
10.2.1	集成多功能细胞芯片的研究	330
10.2.2	微探针技术的发展	331
10.3	纳米细胞分子传感器的发展	335
10.3.1	纳米颗粒的特性	335
10.3.2	纳米颗粒的制备和修饰	336
10.3.3	纳米生物传感器	338
10.4	与微流控技术的结合	339
10.5	康复工程的应用	343
10.5.1	感觉器官的修复	343

10.5.2 植入式芯片技术的发展	350
10.6 小结	352
主要参考文献	353

第1章 绪 论

1.1 引言

细胞传感器 (cell-based biosensor) 的定义是, 使用固定化的生物活体细胞结合传感器或换能器, 用来检测胞内或胞外的微环境生理代谢化学物质、细胞动作电位变化或与免疫细胞等起特异性交互作用后产生响应的一种装置, 如图 1.1 所示。细胞传感器由两个关键部分构成, 一部分来自于活体细胞, 是细胞传感器信号产生的部分; 另一部分属于传感器件或硬件电路组件部分, 主要是信号转换的部分。因此, 如何提取、分离、纯化细胞, 以及设计与检测细胞所匹配的特定的传感器件, 使它们耦合紧密、结合精确而且响应快速, 是细胞传感器的主要研究内容。

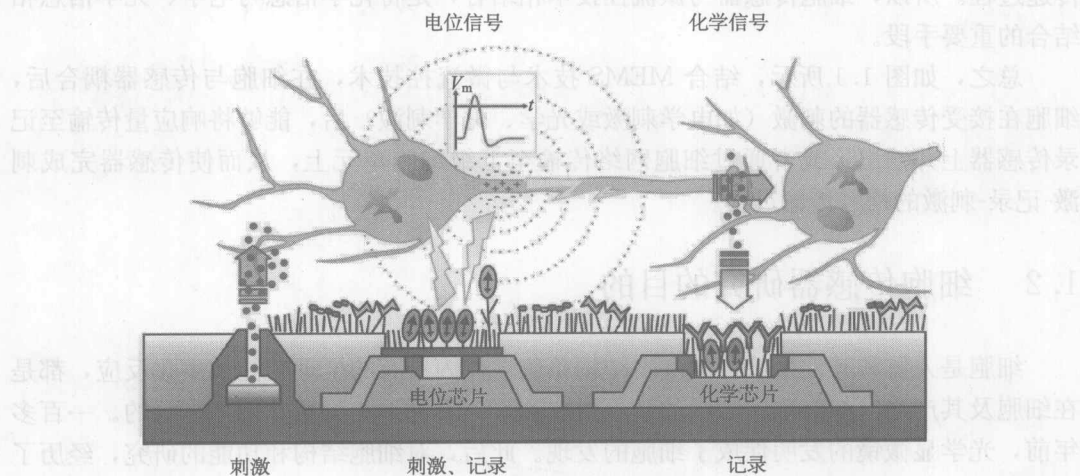


图 1.1 细胞传感器的示意图 (Borghs, 2003)

由生物传感器的特点可知, 生物耦合性、电学、化学、光学信号的刺激及传导问题是细胞传感器研究的重要研究内容。

在生物相容性方面, 要检测细胞的电生理活性, 细胞与器件表面必须很好地耦合, 因此, 器件表面的生物相容性需要很好地改善, 使得细胞在其表面容易贴附生长。目前, 人们已经研究了增加表面粗糙度的物理方法, 以及各种表面化学修饰方法来改善其生物相容性, 取得了一定成果, 但距离期望结果还有一定的距离。例如, 生长发育期的神经细胞会在芯片上移动, 如何将神经细胞固定在芯片上或者如何将多个神经元按照研究意图进行生长连接就是需要解决的问题。

其次, 从半导体传感器件方面来说, 神经细胞的电位信号检测尚需提高器件的灵敏

度,以便达到对细胞电生理信号(如电位改变)的测量。需要开发出微纳米尺度的,能够对轴突动作电位甚至单个离子通道、单个突触后电位进行测量的高灵敏性、高集成度神经芯片,这样才能对神经细胞动作电位的信息处理机制从“神经整合”的角度进行整体把握。当然,在能够进行电位检测的同时,开发研制出易于操作的神经元微纳米刺激激励电极,也是神经芯片技术的内在需要之一。只有将刺激和记录系统进行整合,才能对细胞的生物电信号进行人工控制,进而研究其发生与转导的内在生物机制。

当然,化学性突触传递是细胞间进行信息传递的主要方式,活体细胞只有通过突触与其他细胞相连,形成细胞网络,才可能实现其快速精确的信息传递,并对信息加以分析、处理及整合。因此,细胞传感器的研究除了开发高灵敏度的电位芯片以检测微弱电信号外,尚需重视开发能够对细胞代谢微环境进行传感检测的生物化学芯片。通过这些芯片的生物检测可以对细胞的机制(如神经细胞递质的释放、失活以及回收等)进行更好地把握。目前,多年来的生物传感器研究,如已开展的如蛋白质生物传感器、抗原抗体生物传感器等,都为化学芯片的研究奠定了一定的基础。同时,也可以通过显微操作系统开发出能够模拟递质释放的给药系统,用以整体把握化学信息在细胞膜上的转导与传递过程。所以,细胞传感器与微流控技术相结合,是将化学信息与电学、光学信息相结合的重要手段。

总之,如图 1.1 所示,结合 MEMS 技术与微流控技术,在细胞与传感器耦合后,细胞在接受传感器的刺激(如电学刺激或光学、化学刺激)后,能够将响应量传输至记录传感器上并输出,或者通过细胞网络传输至下级细胞单元上,从而使传感器完成刺激-记录-刺激的信号传输过程。

1.2 细胞传感器研究的目的

细胞是人体和其他生物体的基本结构单位。体内所有的生理功能和生化反应,都是在细胞及其产物(如细胞间隙中的胶原蛋白和蛋白聚糖)的物质基础上进行的。一百多年前,光学显微镜的发明促成了细胞的发现。此后,对细胞结构和功能的研究,经历了细胞水平、亚细胞水平和分子水平等具有时代特征的研究层次,从细胞这个小小的单位里揭示出众多生命现象的机制,积累了极其丰富的科学资料。可以认为,离开了对细胞及构成细胞的各种细胞器的分子组成和功能认识,要阐明物种进化、生物遗传、个体的新陈代谢和各种生命活动以及生长、发育、衰老等生物学现象,要阐明整个人体和各系统、器官的功能活动的机制,是不可能的。事实上,细胞生理学和分子生物学的实验技术和理论,已经迅速地基础医学和临床医学等各部门渗透。同时,对细胞生物学的研究,也要求工程技术人员提供更多的研究方法和研究工具,以提高研究的准确性和效率。

随着细胞培养技术和半导体微细加工技术的发展,以活细胞作为敏感元件的细胞传感器和神经芯片,已成为生物传感器研究领域的一大热点。活细胞作为传感器的敏感元件,对于很多可以引起细胞电化学状态变化的物质,都具有高度敏感性,而半导体器件的惰性可以提供一种稳定、无损、长时间的监测。通常,按照识别元件可将生物传感器

分为三类：基于分子（酶、抗原或抗体、受体、核酸、脂质体等）的、基于细胞的和基于组织切片的。就敏感元件而言，前者是固定化的生物体成分，后两者是生物体本身。基于分子的生物传感器具有高度选择性和敏感性，只对靶分子有响应。正因为这种高度选择性，可能会使某些具有相同功能的相关分子检测不到。而将活细胞作为探测单元，可以检测到许多未知的物质。已经有人将这种细胞传感器用于环境监测（生化武器、地下水污染等）、药物筛选、新药开发和基础神经学等研究。

细胞传感器能定性、定量测量和分析未知物质的信息，即确定某类物质存在与否及浓度大小。例如，把具有某一类型受体的细胞当作传感器，由受体-配体的结合常数可推导出该传感器对某种激动剂的敏感度，测定该传感器的响应就可以计算出该激动剂的浓度。更重要的是，细胞传感器能够测量功能性信息，即监测被分析物对活细胞生理功能的影响，从而能解决一些与功能性信息相关的问题。例如，复合药物各成分对生理系统的影响是什么；被分析物相对于给定的受体是否是抑制剂或激动剂（现代药物筛选和开发的核心问题）；被分析物是否以其他方式来影响细胞的新陈代谢，如第二信使或酶；待测物是否对细胞有毒副作用；环境是否受到污染。

1.3 细胞在芯片上的培养技术

现代组织培养技术的建立和发展，已经走过近一个世纪的历程。21 世纪初，在各种类型细胞特性研究中，体外组织培养逐渐发展成为一项可行的技术。早期的体外培养，实际上只是器官培养。随着对器官、组织和细胞的深入研究，以及各种精细测量仪器的发展，研究人员开始分离组织样本得到单个细胞，细胞可以在基底上培养成为贴壁单层细胞，也可以在培养液中形成细胞悬液，这种技术已经是细胞培养领域的内容了：可以从组织培养、原代细胞培养或克隆细胞系得到并且培养单个细胞。细胞培养系统与在体系统并不一致，它使我们可以在体外有效设计实验、深入研究细胞活动，而不受系统变化的复杂性的影响，通常，这种复杂性是由于正常动物生理引起的或是有损实验过程引入的。目前，组织、细胞培养已成为一种在医学和生物学研究中普遍应用的手段，在神经科学研究中的应用尤为突出（图 1.2）。

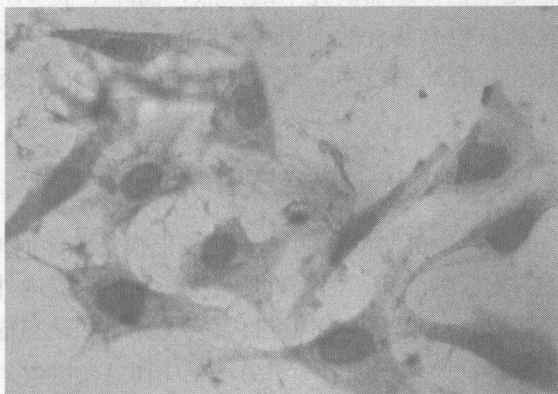


图 1.2 体外培养上皮细胞

从细胞的来源来看,细胞培养可以直接由活体组织获得,也可以由已有的原代细胞或者克隆细胞系获得。不管是哪种情况下得到的,细胞都需要通过结合酶、机械力和(或)化学力来分离。虽然当细胞系通过基因工程改性,可以使其表达期望的特性,但本文所使用的细胞仅限于原代细胞,在第6章将会提到,根据实验需要,我们培养的细胞有乳鼠的肾细胞、脑皮层细胞、嗅上皮细胞和嗅球细胞。

动物体内所有的细胞都生活在十分精确控制的环境里。体内的细胞对其他组织和器官有着密切的依赖关系:它们依靠肝、肾和肺来控制组织液的成分、pH 和渗透压;依靠造血组织来防御外来的感染;依靠神经系统来调节温度。在体内,细胞的表面膜暴露于细胞外组织液中,并从组织液中取得细胞存活所必需的物质,如水、无机盐、氨基酸、维生素、葡萄糖、氧气等,同时,又将代谢产物排入其中。组织液的某些特性保持在一定的小范围内,例如,哺乳动物体液的 pH 保持在 7.4,渗透压与 0.9% 的 NaCl 溶液的渗透压相当,并且在正常情况下是无菌的。当从动物体切取活的细胞时,它们便立即失去所有这些生理性的支持和保护机制。如果要让这些细胞在体外继续存活,那么必须给予它们一个尽可能类似于体内的人造环境。

无论是什么细胞类型,培养环境都要求严格控制温度、培养液的 pH、培养液离子浓度、整体溶液渗透压、 O_2 和 CO_2 , 这些因素共同组成了细胞培养的理化环境。同时,像生长因子、荷尔蒙等也是控制细胞培养环境的重要因素,通常需要添加含有血清的介质或者不能被人工合成、只能由活的生物机体衍生而来的混合物。细胞培养是一种程序复杂、要求严格的实验性工作,培养的质量将直接影响到研究工作的进展,因为细胞是实验的对象和基本材料,细胞培养不好将导致“无米之炊”,而且,培养的质量也将影响实验结果的真实性和可靠性。因此,细胞培养不仅仅是一种操作性技术,更是一门要求严格的科学艺术。将活细胞与硅器件耦合制备杂合型生物传感器,是将这种艺术与微电子加工技术相融合,极富挑战性。

1.4 细胞传感器在国际上的发展现状

目前,细胞传感器是生物传感器研究中的热点,国际上很多研究小组在从事关于细胞传感器的研究,相应的,也有各种对细胞传感器的分类方法。此处,我们先简单介绍细胞研究中经典的电压钳、膜片钳技术,然后按与细胞耦合的二级传感器的不同,将细胞传感器分类介绍。

1.4.1 传统的电生理测量方法——电压钳

Hodgkin 等对动作电位产生机制的说明,关键在于膜受刺激时对 Na^+ 、 K^+ 的通透性发生了选择,而时间也有先后的改变,但这只是根据所测得的膜内外电位改变对照 Nernst 公式进行的推论,实验并没有对膜的通透性进行直接的测量和动态描述。为此,他们又应用当时最先进的电子学技术,设计并进行了著名的电压钳(voltage clamp)实验。

A1、A2 是两个高增益的集成运算放大器,其中 A2 的同相端输入信号发生器产生控制电压,电极 1 测得电位值经放大后同时输给 A2,如果二者有差值,A2 就会通过电极 2