

纳米尺度激光紧聚焦光穿孔技术

梁晓轩^{1,2}, 王晶^{1,2}, 张镇西^{1,2}

(1. 西安交通大学生命科学与技术学院, 710049, 西安;

2. 西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室, 710049, 西安)

摘要: 论述了一种新型的细胞转导方法——纳米尺度激光紧聚焦光穿孔技术. 按照光穿孔可能的物理机制, 分 4 类讨论了现在主流的光穿孔技术: 连续激光光穿孔, 其中最前沿的技术是紫外二极管激光光穿孔; 纳秒、皮秒激光脉冲和经放大的千赫兹飞秒激光脉冲光穿孔, 其中应用范围最广的是 Nd:YAG 激光器; 飞秒激光振荡器发出的兆赫兹脉冲序列光穿孔, 该技术在多尺度、跨学科及在体研究中扮演重要角色; 最新出现的利用双脉冲微射流进行光穿孔, 这是光穿孔技术中仅有的一种将外源物主动引入细胞内的方法. 可以预见: 当激光紧聚焦技术结合了双光子荧光显微镜、微芯片实验室、膜片钳技术等各种单细胞分析技术后, 必将在细胞间通信、干细胞谱系提交、癌症转移、激光基因疗法、胚胎发育学以及神经功能再生等学科领域中产生重大影响.

关键词: 光穿孔; 激光紧聚焦; 细胞微手术; 空化气泡; 微射流; 飞秒激光

中图分类号: Q631; O437; O427 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2012)10-0107-09

Nano-Scale Photoporation by Tightly Focused Lasers: A Survey

LIANG Xiaoxuan^{1,2}, WANG Jing^{1,2}, ZHANG Zhenxi^{1,2}

(1. School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China; 2. The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: A novel cellular transfer method, nano-scale photoporation by tightly focused laser, is introduced. According to the underlying physical mechanisms, four main-stream photoporation methods are discussed — Photoporation by CW lasers, whose cutting edge technology is photoporation by violet diode laser; Photoporation with nanosecond, picosecond or amplified kHz femtosecond laser pulses, whose most commonly used laser is Nd:YAG laser; Photoporation based on MHz femtosecond pulse series from femtosecond oscillator, which plays a big role in multi-scale, interdisciplinary and in vivo research; The newly developed photoporation based on micro-jet induced by two pulses, which is regarded as the unique active photoporation method. It is predicted that photoporation, combined with the other techniques, such as two-photon microscope, lab-on-a-chip, catch-clamp, can strongly affect cell-cell communication, stem cell lineage commitment, cancer metastasis, laser gene therapy, embryology and nerve regeneration.

Keywords: photoporation; tightly focused condition; cellular surgery; cavitation; micro-jet; femtosecond laser

1953 年沃森和克里克提出遗传物质 DNA 的双螺旋结构模型和 1972 年 DNA 重组技术的诞生, 开

辟了分子生物学和现代生物技术的新纪元^[1]. 2001 年人类基因组草图绘制完成, 昭示着人类已经全

收稿日期: 2012-02-18. 作者简介: 梁晓轩(1986—), 男, 博士生; 张镇西(通信作者), 男, 教授, 博士生导师. 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(60927011, 61120106013); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(200806980024).

网络出版时间: 2012-07-05

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1069.T.20120705.1028.002.html>

面进入了后基因组时代. 后基因组工作的深入展开将推动生物制药、农业生物技术、基因疗法等相关科学领域的发展,造福全人类.

在后基因组时代,蛋白质组学是其中的一项重要研究内容,其目的在于弄清基因的全部蛋白质产物的结构和功能. 因为通过蛋白质结构的研究可以寻找到治疗癌症、艾滋病等严重威胁人类健康的重大疾病的最佳途径. 在现代细胞与分子生物学中,识别未知蛋白质功能的常用方法包括将外源性生物分子(DNA、RNA、siRNA、蛋白质等)引入到活细胞中,然后借此观察蛋白质位置、蛋白质的生化状态或者生物分子干预蛋白质功能表达.

到目前为止,科学家们已经发展出了很多将外源性生物分子转移到细胞内的方法,包括直接转导法、载体介导转导法以及细胞膜瞬态渗透法^[2]. 这些方法在细胞存活率、转导效率、适用性和技术要求上各有优劣,具体见表 1.

表 1 各种转导技术及其优劣比较

转导技术	参考文献	优点	缺点
毛细管微注射 ^①	[4]	高效率和高存活率、定量、适用性广	昂贵、技术难、处理细胞少
蛋白质转导 ^②	[5]	与表面受体无关、同时转导大量细胞、可在体应用	受被转导分子大小限制
脂质体介导法 ^②	[6]	高效、不受生物分子大小限制、可转导各种分子	与磷脂代谢冲突
基因枪 ^②	[7]	可转导各种细胞、非常适用于在体基因疗法	需特殊仪器
重组系统 ^③	[8]	可以交换整个胞液、廉价、易用、可处理大量细胞	细胞是半完整的
SL-O 渗透法 ^③	[9]	廉价、易用、高效、同时处理大量细胞	被转导分子需小于 100 kDa
电穿孔 ^③	[10]	同时处理大量细胞(包括植物细胞)、适用性广	需要特殊仪器、细胞悬液佳
光穿孔 ^③	[3]	非接触、单细胞操作、高效、适用各种细胞、在体研究、无菌环境、可用于芯片实验室	处理细胞数目有限

①:直接转导法;②:载体介导转导法;③:细胞膜瞬态渗透法

1 激光紧聚焦光穿孔技术

就光穿孔技术而言,主要有两种方法学上的分支:①通过紧聚焦激光束直接照射细胞膜,实现细胞膜的瞬时可逆性通透,进而让外源性生物大分子进入细胞膜内;②利用纳米颗粒,如纳米胶体金、金纳米棒等通过抗原抗体靶向与细胞螯合,利用激光照射整合体,通过靶向能量沉积实现光穿孔,能在多个抗体靶向的位点同时改变细胞膜的通透性. 本文着重讨论第一个分支,第二个分支可参考本课题组撰写的文献[11].

如图 1 所示,激光束通过高倍物镜(数值孔径 ≥ 0.8)聚焦于焦平面. 在此紧聚焦条件下,激光光斑大

在这些转导技术中,有一种在近十年间伴随激光技术迅速发展起来的新型方法—光穿孔. 光穿孔技术是一种利用激光靶向性对细胞膜进行操作,达到提高膜通透性或者产生纳米尺度可逆细胞膜损伤的一种细胞膜微手术方法. 在学术上它有很多术语,例如光穿孔、光学转染、光注射,在本文中我们统称为光穿孔. 由于激光能量的空间分布能够精确控制,以及激光本身具有非接触、无污染、无细胞毒性等优点,使得激光技术在保证细胞的完整性的条件下能够实现细胞膜纳米级的操控. 正是因为这种操控的微创性和瞬时性,使它在基因转染、药物递送等方面具有一定的科学意义^[3]. 比如,可以在不影响细胞活性的情况下将 DNA 质粒、mRNA、siRNA、重组基因或其他物质(如纳米颗粒、荧光染料、量子点等)导入到活细胞中^[3]. 因此,光穿孔技术已成为近年来科学家们研究的重点和热点之一,并将逐渐发展成为一种新型的生物工程手段.

小接近光学衍射极限($\approx 1\ \mu\text{m}$),这一尺寸远远小于细胞尺寸($\approx 10\ \mu\text{m}$). 通过调控焦点处激光脉冲能量、重复频率等,能够对细胞膜、细胞器进行微操控,这一方法学上的研究称为激光紧聚焦微手术. 将该方法应用于细胞膜通透性的研究上,称为激光紧聚焦光穿孔技术,简称激光光穿孔或光穿孔.

实现该技术最关键的因素是选择合适的泵浦激光源、激光参数和聚焦条件,因为不同脉冲宽度的激光所对应的光穿孔的物理机制是非常迥异的. 目前,紧聚焦光穿孔技术按照其可能的物理机制大致可分为 4 类:连续激光光穿孔;纳秒、皮秒激光脉冲和经放大的千赫兹飞秒脉冲光穿孔;飞秒激光振荡器发出的兆赫兹脉冲序列光穿孔;最新出现的一种双脉

冲射流光穿孔.

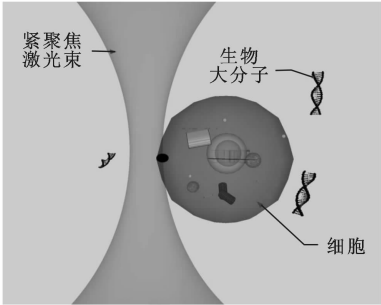


图 1 激光紧聚焦光穿孔方法示意图

1.1 连续激光或紫外二极管激光器等长脉宽激光

自莱曼 1960 年发明世界上第一台红宝石激光器后仅 3 年, Saks 等人就将该激光应用在光穿孔的研究中^[12], 他们利用一台脉宽 500 μs 、波长 694 nm 的红宝石激光器在海藻细胞壁上凿出了 20 μm 左右的小孔, 开创了细胞微手术和光穿孔的先河, 然而他们并未能将外源性物质转入细胞内. 1996 年, Palumbo 等人^[13]开始研究利用连续氩离子激光器($\lambda=488\text{ nm}$)对真核细胞进行光穿孔研究, 并成功地将质粒 DNA 转染到老鼠的成纤维细胞中(murine NIH_{3T3} fibroblasts). 为了提高转染成功率, 他们采取了两种措施: ①在细胞培养液中加入酚红, 一种吸收峰在 480 nm 左右的线性吸收染料; ②让激光束通过 100 倍物镜(数值孔径 ≈ 1.2)聚焦在细胞膜表面. 他们认为, 在酚红协助下, 膜表面局部温度的升高导致膜磷脂分子状态的改变是引起膜通透性增加的根本原因. 紧随 Palumbo 的工作, 采用同样

的激光器和线性吸收染料, 在紧聚焦条件下, Schneckenburger 等人^[14]将编码绿色荧光蛋白的质粒(GFP plasmid)转入到中国仓鼠卵巢细胞中(CHO-K1); Nikolskaya^[15]将荧光染料 propidium iodide (PI)、外源性膜标记染料 FM1-43 和 GFP plasmid 成功转染到新生小鼠的心肌细胞中. 我们课题组也对细胞微手术进行了一系列的研究^[16-17].

考虑到氩离子激光器体积相对庞大, 英国 Dholakia 课题组采用非常小巧的紫外二极管激光器($\lambda=405\text{ nm}$)将质粒 DNA 和干扰 RNA 转染到 CHO-K1 细胞和人胚胎肾细胞 HEK293 中^[18-19]. 利用此光源的一个显著优点是紫外二极管激光器非常小巧并且成本相对低廉, 很适合集成到通用显微镜中. 特别值得一提的是, 文献 [18]系统地研究了激光参数(激光功率和照射时间)对 CHO-K1 和 HEK293 细胞转染率的影响, 得出最优激光参数和转染结果为: 激光功率为 2.1 mW, 照射时间为 1 s; HEK293 细胞和 CHO-K1 细胞的最高转染率分别为 40% 和 24%. 接着他们将一段由 25bp 核苷酸组成的小干扰 RNA 转染到 TRex willin-GFP-HEK 细胞中, 成功沉默了绿色荧光蛋白基因(willin-GFP)的表达. 最后他们通过理论计算得出: 由酚红(42.2 $\mu\text{mol/L}$)线性吸收导致的细胞膜温度的升高仅为 0.02 K, 不足以改变膜磷脂分子的物理状态. 所以, 他们认为光化学反应生成的活性氧成分(ROS)是导致膜通透性改变的根本原因. 以上连续激光光穿孔技术总结在表 2 中.

表 2 连续激光或紫外二极管激光器光穿孔技术

激光类型	参考文献	转染物质	聚焦条件	细胞类型
红宝石激光器	[12]	无	未知	海藻细胞
连续氩离子激光 $\lambda=488\text{ nm}$	[13]	质粒	100 倍物镜	NIH _{3T3}
	[14]	质粒	孔径为 0.6 ~ 0.9	CHO-K1
	[15]	PI, FM 1-43, 质粒	孔径为 0.45	新生老鼠心肌细胞
连续紫外二极管激光 $\lambda=405\text{ nm}$	[18]	质粒	孔径为 1.3	CHO-K1
	[19]	质粒, 小干扰 RNA	孔径为 1.2	CHO-K1; HEK293

1.2 纳秒、皮秒激光脉冲和经放大的千赫兹飞秒脉冲光穿孔

与连续激光依赖线性吸收改变膜通透性不同, 使用纳秒、皮秒或者经放大的数个飞秒激光脉冲序列由于激光脉冲强度很大, 可以在水中引起多光子电离、隧道电离和雪崩电离等现象, 形成低密度等离子体, 并最终导致光致击穿现象^[20]. 利用光致击穿

所引起的机械效应可以在细胞膜表面“凿出”一个小孔, 外源性物质通过扩散作用由细胞外转入细胞内. 在纳秒、皮秒激光光穿孔领域中, 使用最广的激光器是 Nd: YAG 激光^[21-24], 所选用脉宽从 0.5 ns 到 17 ns, 波长从紫外波段 355 nm 到近红外波段 1 064 nm. 其他激光器包括脉宽 6 ns、波长 308 nm 的准分子激光器^[25]和脉宽 3 ns、波长 337 nm 的

氮气激光器^[26]. 被转入的细胞包括人体纤维肉瘤细胞 HT1080-6TG^[21]、人乳腺癌细胞 MCF-7^[22]、稻米细胞^[23]、小麦细胞^[25]和牛的卵子细胞^[26]. 被转入

的外源性物质包括各种质粒^[21-23], 生物小分子和牛的精子^[26], 如表 3 所总结.

表 3 纳秒、皮秒或者经放大的数个飞秒激光脉冲序列光穿孔技术

激光类型	参考文献	转染物质	聚焦条件	细胞类型
Nd:YAG, UV, 10 ns	[21]	质粒	32 倍物镜	HT1080-6TG
Nd:YAG, IR, 17 ns	[22]	PI, 质粒等	100 倍物镜	MCF-7
Nd:YAG, UV, 15 ns	[23]	质粒	未知	稻米细胞
Nd:YAG, UV VIS IP, 0.5 ns	[24]	各种外源性物质	孔径为 0.25	各种类型细胞
准分子激光 308 nm, 6 ns	[25]	质粒	37 倍物镜	小麦细胞
氮气激光 337 nm, 3 ns	[26]	牛精子	孔径为 1.35	牛卵子细胞
Ti:sapphire 激光 800 nm, 120 fs	[27]	纳米金	孔径为 1.25	NIH _{3T3}

注:UV 为紫外光,λ=355 nm;VIS 为可见光,λ=532 nm;IR 为红外光,λ=1 064 nm.

文献[24]开发出一套能够自动进行高效转染的光穿孔系统(LEAPTM),能够对各种细胞进行转染,所转染的外源性物质包括:离子、生物小分子、右旋糖苷(dextran)、小干扰 RNA(siRNA)、质粒、蛋白质以及半导体纳米晶体. 在研究中,他们对各种细胞 HeLa、NIH_{3T3}、293T、HepG2、NTERA-2、PFSK-1、SUDHL-4、CEM 和 184A1 进行了转染,并通过聚合酶链式反应技术(PCR)、蛋白质免疫印记等生物技术对转染率进行了评估.

在经放大的飞秒激光脉冲光穿孔技术中,文献[27]利用一台 800 nm,120 fs 的 Ti:sapphire 激光器在成纤维细胞 NIH_{3T3} 表面产生空化气泡,利用空化气泡破裂时产生的微射流将包裹有荧光染料的纳米金颗粒推入细胞内. 这里需要说明的是,由于放大的飞秒激光光源价格昂贵以及重复频率过低(kHz 范围内)不适于成像,所以它在光穿孔上的应用相对较少.

1.3 飞秒激光振荡器发出的兆赫兹脉冲序列光穿孔

与放大的飞秒激光脉冲不同,从飞秒激光振荡器发出的脉冲序列在光穿孔技术中有着广泛的应用. 飞秒激光的强度非常容易达到 10¹² W/cm² 数量级,它与水或生物介质的作用也是经过多光子电离、隧道电离和雪崩电离形成低密度等离子体. 与纳秒脉冲的区别在于,飞秒激光的脉宽小于其热弛豫时间,在空化气泡形成之前可以形成一个广泛可调的低密度等离子体区域(10¹³ ~ 10²¹ cm⁻³)^[20]. 很多激光辅助细胞微手术都依赖于此可调低密度等离子体,如图 2 所示. 我们课题组与德国 Vogel 教授课题组在飞秒激光诱导等离子体形成及飞秒激光光穿孔中开展了深入合作研究^[20]. 如图 2 所示,随着飞秒激光强度的增强(右侧箭头),水中等离子体密度

增加(左侧箭头),所对应的物理效应和细胞微手术效应(小括号所示)也逐渐增强. 从效应(1)到(9)分别为:单个自由电子的生产;双光子显微镜扫描造成细胞损伤;细胞内切割;细胞光穿孔;水温度升到

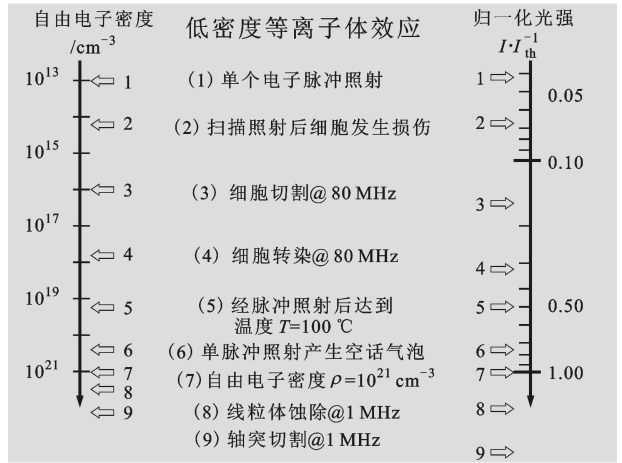


图 2 飞秒激光引起的可调低密度等离子体

100 °C; 空化气泡形成; 等离子体密度达到 10²¹ cm⁻³; 线粒体蚀除; 神经轴突切割. 在飞秒脉冲光穿孔技术中,人们普遍认为低密度等离子引起的活性氧成分是造成光穿孔的根本原因^[20]. 此外,利用飞秒激光的双光子效应,可以在穿孔前后对靶细胞进行双光子荧光显微成像.

在飞秒激光光穿孔中使用最为广泛的是钛宝石激光器,中心波长一般为 800 nm,脉冲重复频率在 80 MHz 左右,脉冲宽度从 10~200 fs 不等^[28-34]. 被转入的细胞包括人体干细胞^[28]、人体各种肿瘤细胞和癌细胞^[31]、来自动物的癌细胞^[28,30,32,34]和神经元细胞^[33]. 被转入的外源性物质包括各种质粒、纳米金颗粒、生物大分子和各种膜不透荧光染料. 所使用的都为高倍物镜,数值孔径从 0.8 到 1.4. 表 4 总结了这些信息.

König 课题组在这一领域做了开创性的工作,他们利用飞秒激光脉冲序列将含有绿色荧光蛋白的质粒转入 CHO-K1 和 PtK2 细胞中,并宣称此方法的转染率能达到 100%^[28]. 2006 年,Dholakia 课题组在基于 4 000 个 CHO-K1 细胞样本的转染实验上,发现转染率为 50 ± 10%^[32],虽只有宣称数值的一半,但这个转染率还是大大高于化学转染法或电穿孔等传统方法. 随着此技术的蓬勃发展,现在的趋势是将飞秒激光光穿孔技术与其他光学、生物技

术结合起来,进行多尺度研究. 这些技术包括:飞秒光穿孔与双光子高分辨率荧光显微镜的结合^[29],飞秒光穿孔与膜片钳技术的结合^[34],飞秒光穿孔与光镊的结合^[30]等.

除光穿孔外,飞秒激光紧聚焦技术还在诸如亚细胞切割^[35]、细胞融合^[36]、神经功能再生^[37]、细胞纯化^[38]、干细胞分化^[29]、发育生物学^[39]和基因失活^[40]等领域有广阔的应用前景和很高的学术价值.

表 4 Ti:sapphire 飞秒激光振荡器发出的脉冲序列光穿孔技术

激光类型	参考文献	转染物质	聚焦条件	细胞类型
800 nm, 80 MHz	[28]	质粒	高倍物镜	CHO-K1, PtK2
800 nm, 12 fs, 75 MHz	[29]	溴化乙锭,质粒	孔径为 1.25~1.3	人体干细胞
780 nm, 100 fs, 83 MHz	[30]	纳米金颗粒	孔径为 1.4	CHO-K1
800 nm, 170 fs, 90 MHz	[31]	FITC-dextran, 荧光染料, 质粒	孔径为 1.3	CHO-K1, SK-Mel28 NG108-15, T47D
800 nm, 120 fs, 80 MHz	[32]	质粒	孔径为 0.85	CHO-K1
800 nm, 100 fs, 80 MHz	[33]	Elk1 mRNA	孔径为 0.8	大鼠神经元细胞
800 nm, 140 fs, 90 MHz	[34]	质粒, 荧光染料	孔径为 0.8	MTH53a, GFSHR-17

注: PtK2 为鼠袋鼠肾上皮细胞, SK-Mel28 为人体黑色素瘤, NG108-15 为小鼠成神经细胞瘤与大鼠神经胶质瘤杂交体, T47D 为人乳腺癌细胞, FITC-dextran 为平均分子质量为 500kDa 的荧光标记的生物大分子, MTH53a 为犬细胞, GFSHR-17 为大鼠粒层细胞, Elk1 为神经树突内的一种核转录因子.

1.4 双脉冲射流法

在光穿孔技术中,通常情况下,不论采用何种泵浦激光源,人们一般会避免激光能量超过光致击穿阈值. 原因在于,此时会产生巨大的空化气泡(直径 >10 μm),这种气泡膨胀或坍塌时引起的剧烈机械效应很容易撕裂细胞. 但是,Sankin 等人巧妙地利用空化气泡坍塌时产生的微射流成功地在大鼠乳腺癌细胞上凿出了 200 nm 到 2 μm 大小的孔,并将外源性荧光染料转入细胞内^[41].

如图 3 所示,Sankin 等人采用脉宽为 5 ns,波长分别为 1 064 nm、532 nm 的两台 Nd:YAG 激光器,透过一个高倍物镜(63 倍)聚焦在一个特制的培养皿中. 两束激光焦点间距离 Δ 可调,两束激光脉冲时间间隔由一台数字延时发生器控制. 该培养皿中液体的高度只有 25 μm,几乎相当于单个细胞的高度,内部布有铂丝,可以将杂乱摆放的细胞有规则的摆成一个阵列. 实验装置中还有 3 部高速摄像机(速度约为 10⁶ 帧/s)分别记录空化气泡-空化气泡-细胞之间的相互作用和气泡动力学;荧光染料进入到细胞内的整个扩散过程;以及研究空化气泡相互作用时产生的漩涡场. 综合而言,这些举措是为实验提供一个无菌的单细胞层的细胞阵列,并严密监视

整个物理过程.

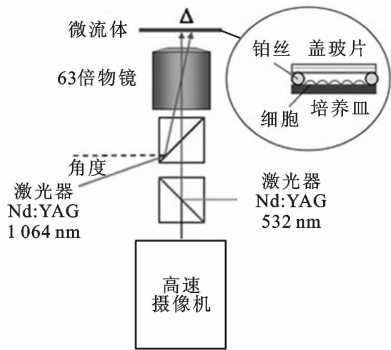


图 3 双脉冲射流法实验示意图

图 4 是高速摄像机拍摄的双脉冲产生微射流以及微射流与细胞相互作用的动态过程. 当第一个空化气泡 B_1 在第 4 μs 膨胀到 50 μm 时,第二个空化气泡 B_2 恰好产生,此时这两个空化气泡是反相位耦合的. 结果 B_1 的坍塌伴随着 B_2 的膨胀,导致空化气泡非对称的变形并形成由 B_2 指向 B_1 的微射流,如第 6 μs 图所示. 随后 B_2 开始坍塌,其与 B_1 接触的尖端势能最大收缩最快,这样形成了由 B_1 指向 B_2 的第二个微射流,如第 8~13 μs 图所示. 微射流最高的速度可达到 10 m/s,利用此微射流可以

对细胞膜进行穿孔.

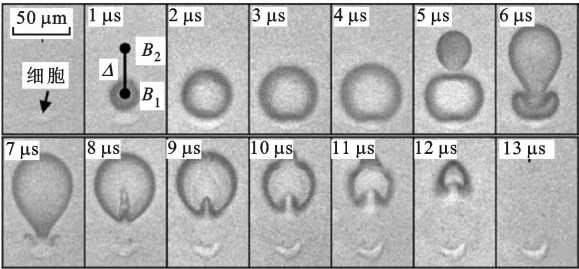
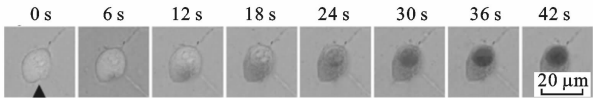
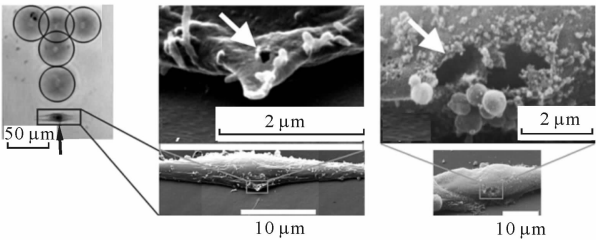


图 4 高速摄影拍摄的双脉冲产生微射流动态过程

图 5 显示了微射流在细胞膜表面所凿孔的大小以及外源性荧光染料由胞外扩散进入胞内的过程. 图 5a 显示了膜不可透细胞核染料 Trypan blue 逐渐将细胞核染成深色的过程. 图 5b 为培养皿下的标记(圆圈所示), 用来标示微射流作用的细胞(方框所示). 图 5c 和 5d 分别显示了利用扫描电子显微镜(SEM)观察到的被凿穿的直径为 200 nm 的单个小孔和 2 μm 左右的两个连续小孔. 该研究将微流控、超高速摄影、流场跟踪和分析技术、SEM 技术等综合应用在细胞膜转入这一传统生物工程学领域中, 为光穿孔技术开辟了一条新的途径.



(a) Trypan blue 逐渐扩散进入细胞内动态过程



(b)被穿孔 (c)直径为 200 nm 的单个小孔 (d)直径为 2 μm 的两个连续小孔

图 5 利用双脉冲射流法在细胞膜上凿孔动态过程

2 在体光穿孔研究

综上所述的光穿孔技术几乎都是离体研究,随着工程技术手段的进步,人们越来越多的将光穿孔技术应用到在体研究中. Zeira 等人^[42]在 小鼠 胫骨肌肉中实现了稳定的光穿孔,他们将 10 μg 绿色荧光蛋白(GFP)、DNA 质粒和老鼠红细胞生成素基因直接注入到小鼠胫骨肌肉中,然后在组织 2 mm 深处扫描了 95 $\mu\text{m} \times 95 \mu\text{m}$ 面积的肌肉细胞,发现与传统的电穿孔相比,光穿孔有更高的存活率、更少的细胞凋亡和组织学上更好的形态,这为激光基因疗法(LBGT)在临床应用提供了很好的证据. 但是,近红外激光在生物组织中的穿透深度仅为 2 mm,大大限制了激光基因疗法的在体应用. 随着基于光纤传输的光穿孔技术的进步,人们现在可以克服深层组织光穿孔的问题. Tsampoula 等人^[43]展示了将一个锥透镜通过微加工方式蚀刻到光纤的尖端,然后将近红外飞秒激光束通过光纤靶向定位到单个细胞上进行光穿孔,最后将一种表达红色荧光蛋白的质粒成功转入到细胞内.

另一个在体研究的例子是 Kohli 等人^[44]在斑马鱼的胚胎中成功实现了光穿孔和基因转染. 斑马鱼胚胎是发育生物学中的一个经典模式,因为斑马鱼面胚胎可以在受精后 24 h 内被连续荧光扫描成像,所以最近受到越来越多的注意. 利用脉宽小于 10 fs 的 Ti:sapphire 超短飞秒激光脉冲,在单个斑马鱼受精卵细胞分裂成 2、4、8、16 个细胞阶段时分别对它们进行光穿孔,观察到绿色荧光蛋白质粒(GFP plasmid)被成功转入到受精卵中,在受精后 24 h 的幼虫中也观察到了绿色荧光蛋白的广泛分布. Kohli 等人同样实现了荧光素异硫氰酸酯和量子点的光穿孔转染,转染率高达 78%,胚胎存活率高达 89%. 后续的研究证实,经光穿孔转染的斑马鱼在形态学上与对照组相比没有太大差异,经转染的胚胎也能发育成具有完全功能的斑马鱼. 这是光穿孔技术首次应用在胚胎发育学中,显示了良好的应用前景.

表 5 在体光穿孔研究

激光类型	参考文献	转染物质	聚焦条件	组织或细胞类型
780 nm, 76 MHz, 200 fs	[42]	mEpo gene	孔径为 0.5	小鼠胫骨肌肉
790 nm, 80 MHz, 100 fs	[43]	DNA 质粒, GFP 质粒	光纤-锥透镜	CHO-K1
800 nm, 80 MHz, <10 fs	[44]	量子点, DNA, 荧光报告分子	孔径为 1.0	斑马鱼胚胎

注: mEpo gene 为一种能表达老鼠红细胞生成素蛋白的裸 DNA.

3 光穿孔技术的发展趋势

光穿孔技术未来的价值最有可能体现在单细胞分析中,特别是与各种单细胞分析技术有机的结合使用. 现在在分子生物学和细胞生物学中有一个普遍的趋势就是化验小型化(或称为微分析)、单细胞化和自动化. 传统采用吸液管和 Eppendorf 试管的微升量级的实验方法正在逐渐被自动的微流控系统所取代,因为后者可以实现纳升或皮升的自动加样. 很多传统上对成百上千个细胞进行大型化验的方法正逐渐应用在单细胞分析中,例如单细胞聚合酶链式反应技术^[33], 基因表达分析^[33], 膜片钳技术^[34], 离子化飞行时间质谱仪, 毛细管电泳, 电生理功能测定仪, 拉曼光谱仪和微流控、微芯片实验室等. 这些新技术与传统的荧光显微镜或高分辨率双光子荧光显微镜^[30] 结合后,将在很多学科中帮助人们展开深入的研究,例如细胞间通讯、微环境对干细胞分化时的影响、干细胞谱系提交、癌症转移、激光基因疗法^[42]、胚胎发育学^[43] 以及神经功能再生等.

紧聚焦光穿孔技术为这种小型化的趋势提供了一种简洁、方便的转入方法,它能在显微镜观察下通过定位-穿孔两个步骤将外源性物质转入细胞内. 飞秒激光光穿孔技术必将在未来的单细胞研究中起到关键性作用,人们甚至可以想象到一种结合了微芯片实验室、单细胞培养皿,单细胞微操控(如光镊)以及单细胞生化分析的综合方法. 与此同时,生化分析终端可以在单细胞生长、新陈代谢和细胞微环境中,通过检查 DNA、RNA 和蛋白质水平帮助人们揭示很多基本的细胞和疾病过程. 同时,工程技术的进步也在推动光穿孔领域朝着安全、快速、高效、紧凑和便宜集成化的光穿孔系统(仪器化)的方向发展,比如开发我们前文提到的 LEAP™ 系统. 当这种成型的光穿孔系统在生物学界广泛使用时,它的威力才会真正显现出来.

4 结 论

本文论述了一种新型的细胞转导方法——纳米尺度激光紧聚焦光穿孔技术. 按照光穿孔可能的物理机制,我们分 4 类讨论了现在主流的光穿孔方法: ① 连续激光光穿孔;② 纳秒、皮秒激光脉冲和经放大的 kHz 飞秒脉冲光穿孔;③ 飞秒激光振荡器发出的 MHz 脉冲序列光穿孔;④ 利用双脉冲射流进行光穿孔的方法. 在连续激光光穿孔中,最前沿的技术是紫外二极管激光光穿孔技术;在纳秒激光光穿

孔技术中应用范围最广的是 Nd:YAG 激光器;在飞秒激光光穿孔中,使用最普遍的是近红外的钛宝石激光器,该技术在跨学科、多尺度、在体研究中扮演重要角色;双脉冲微射流光穿孔作为一种新出现的光穿孔方法是目前仅有的一种将外源物主动引入细胞内的方法.

激光紧聚焦光穿孔现已成功将各种质粒、纳米金颗粒、mRNA、siRNA、各种荧光染料、量子点甚至精子成功转入到各种动物癌细胞、神经元细胞、干细胞、卵子细胞或植物细胞中,显示出了广泛的适用性. 除了离体研究外,光穿孔技术还在在体研究中显示出了良好的应用前景. 总之,激光紧聚焦光穿孔技术为生物技术中的微分析趋势提供了一种简洁、方便的转入方法,它能在显微镜观察下通过定位、穿孔两个步骤让外源性物质转入细胞内. 该方法必将在细胞间通讯、微环境与干细胞分化、干细胞谱系提交、癌症转移、激光基因疗法、胚胎发育学以及神经功能再生等学科领域中产生重大影响.

参考文献:

[1] CRICK F. Central dogma of molecular biology [J]. Nature, 1970, 227(5258): 561-563.

[2] STEPHENS D J, PEPPERKOK R. The many ways to cross the plasma membrane [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(8): 4295-4298.

[3] STEVENSON D, GUNN-MOORE F, CAMPBELL P, et al. Single cell optical transfection [J]. Journal of Royal Society Interface, 2010,(47)7: 863-871.

[4] PEPPERKOK R, SAFFRICH R, ANSORGE W. Computer automated and semiautomated capillary microinjection of macromolecules into diving cells [M] // Cell Biology: A Laboratory Handbook: Volume 4. San Diego, USA: Academic Press, 1998: 23-30.

[5] SCHWARZE S R, HRUSKA K A, DOWDY S F. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells [J]. Trends in Cell Biology, 2000, 10(7): 290-295.

[6] TILKINS M L, HAWLEY-NELSON P, CICCARONE V. Transfection of mamallian and invertebrate cells using cationic lipids [M] // Cell Biology: A Laboratory Handbook: Volume 4. San Diego, USA: Academic Press, 1998: 145-154.

[7] KLEIN T M, FITZPATRICK-MCELLIGOTT S. Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues [J]. Current Opinion in

- Biotechnology, 1993, 4(5):583-590.
- [8] PIMPLIKAR W S, SIMONS K. Regulation of apical transport in epithelial cells by a Gs class of heterotrimeric G protein [J]. *Nature*, 1993, 362(6419): 456-458.
 - [9] WALEV I, BHAKDI S C, HOFMANN F, et al. Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(6): 3185-3190.
 - [10] KNIGHT D E, SCRUTTON M C. Gaining access to the cytosol-the technique and some applications of electroporation [J]. *Biochemical Journal*, 1986, 234(3): 497-506.
 - [11] YAO C P, ZHANG Z X, RAHMANZADEH R, et al. Laser-based gene transfection and gene therapy [J]. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 2008, 7(2): 111-119.
 - [12] SAKS N M, ROTH C A. Ruby laser as a microsurgical instrument [J]. *Science*, 1963, 141(3575): 46-47.
 - [13] PALUMBO G, CARUSO M, CRESCENZI E. Targeted gene transfer in eucaryotic cells by dye-assisted laser optoporation [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology: B Biology*, 1996, 36(1): 41-46.
 - [14] SCHNECKENBURGER H, HENDINGER A, SAILER R. Laser-assisted optoporation of single cells [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2002, 7(3): 410-416.
 - [15] NIKOLSKAYA V A, NIKOLSKI P V, EFIMOV R I. Gene printer: laser-scanning targeted transfection of cultured cardiac neonatal rat cells [J]. *Cell Communication and Adhesion*, 2006, 13(4): 217-222.
 - [16] 张镇西, 姚翠萍, 王晶, 等. 激光细胞微手术的发展和应[用]. *光学学报*, 2011, 30(9): 0900124.
ZHANG Zhenxi, YAO Cuiping, WANG Jing, et al. The development and application of the laser cell microsurgery [J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, 30(9): 0900124.
 - [17] 姚翠萍, 李政, 张镇西. 激光高精度细胞微手术机理的研究 [J]. *光学学报*, 2005, 25(12): 1664-1669.
YAO Cuiping, LI Zheng, ZHANG Zhenxi. Study on the fundamental of the laser high-precision microsurgery [J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, 25(12): 1664-1669.
 - [18] PATERSON L, AGATE B, COMRIE M, et al. Photoporation and cell transfection using a violet diode laser [J]. *Optics Express*, 2005, 13(2): 595-600.
 - [19] TORRES-MAPA M L, ANGUS L, PLOSCHNER M, et al. Transient transfection of mammalian cells using a violet diode laser [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 15(4): 041506.
 - [20] VOGEL A, LINZ N, FREIDANK S, et al. Controlled nonlinear energy deposition in transparent materials: experiments and theory [J]. *AIP Conf Proc*, 2010, 1278: 51-55.
 - [21] TAO W, WILKINSON J, STANBRIDGE E J, et al. Direct gene transfer into human cultured cells facilitated by laser micropuncture of the cell membrane [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(12): 4180-4184.
 - [22] MOHANTY K S, SHARMA M, GUPTA K P. Laser-assisted microinjection into targeted animal cells [J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(11): 895-899.
 - [23] GUO Y D, LIANG H, BERNIS M W. Laser-mediated gene transfer in rice [J]. *Physiologia Plantarum*, 1995, 93(1): 19-24.
 - [24] CLARK B I, HANANIA G E, STEVENS J. Optoinjection for efficient targeted delivery of a broad range of compounds and macromolecules into diverse cell types [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 11(1): 014034.
 - [25] BADR A Y, KEREIM A M, YEHIA A M, et al. Production of fertile transgenic wheat plants by laser micropuncture [J]. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2005, 4(10): 803-807.
 - [26] CLEMENT-SENCEWALD A, SCHUTZE K, ASHKIN A, et al. Fertilization of bovine oocytes induced solely with combined laser microbeam and optical tweezers [J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1996, 13(3): 259-265.
 - [27] YAMAGUCHI A, HOSOKAWA Y, LOUIT G, et al. Nanoparticle injection to single animal cells using femtosecond laser-induced impulsive force [J]. *Applied Physics: A*, 2008, 93(1): 39-43.
 - [28] TIRLAPUR K U, KÖNIG K. Targeted transfection by femtosecond laser [J]. *Nature*, 2002, 418(6895): 290-291.
 - [29] UCHUGONOVA A, KÖNIG K, BUECKLE R, et al. Targeted transfection of stem cells with sub-20 femtosecond laser pulses [J]. *Optics Express*, 2008, 16(13): 9357-9364.
 - [30] MCDUGALL C, STEVENSON J D, BROWN A T C, et al. Targeted optical injection of gold nanoparticles into single mammalian cells [J]. *Journal of Biophotonics*, 2009, 2(12): 736-743.

- [31] STRACKE F, RIEMANN I, KÖNIG K. Optical nanoinjection of macromolecules into vital cells [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology, 2005, 81(3): 136-142.
- [32] STEVENSON D, AGATE B, TSAMPOULA X, et al. Femtosecond optical transfection of cells: viability and efficiency [J]. Optics Express, 2006, 14(16): 7125-7133.
- [33] BARRETT E L, SUL J Y, TAKANO H, et al. Region-directed phototransfection reveals the functional significance of a dendritically synthesized transcription factor [J]. Nature Methods, 2006, 3(6): 455-460.
- [34] BAUMGART J, BINTIG W, NGEZAHAYO A, et al. Quantified femtosecond laser based optoperforation of living GFHR-17 and MTH53a cells [J]. Optics Express, 2008, 16(5): 3021-3031.
- [35] HEISTERKAMP A, MAXWELL I Z, MAZUR E, et al. Pulse energy dependence of subcellular dissection by femtosecond laser pulses [J]. Optics Express, 2005, 13(10): 3690-3696.
- [36] GONG J X, ZHAO X M, XING Q R, et al. Femtosecond laser-induced cell fusion [J]. Applied Physics Letters, 2008, 92(9): 093901.
- [37] YANIK M F, CINAR H, CINAR H N, et al. Neurosurgery: functional regeneration after laser axotomy [J]. Nature, 2004, 432(7019): 822.
- [38] KOLLER M R, HANANIA E G, STEVENS J, et al. High-throughput laser-mediated in situ cell purification with high purity and yield [J]. Cytometry: Part A, 2004, 61A(2): 153-161.
- [39] BERNS M W, AIST J, EDWARDS J, et al. Laser microsurgery in cell and developmental biology [J]. Science, 1981, 213(4507): 505-513.
- [40] BERNS M W, WANG Z F, DUNN A, et al. Gene inactivation by multiphoton-targeted photochemistry [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(17): 9504-9507.
- [41] SANKIN F, YUAN F, ZHONG P. Pulsating tandem microbubble for localized and directional single-cell membrane poration [J]. Physical Review Letter, 2010, 105(7): 1-4.
- [42] ZEIRA E, MANEVITCH A, KHATCHATOURIANTS A, et al. Femtosecond infrared laser: an efficient and safe in vivo gene delivery system for prolonged expression [J]. Molecular Therapy, 2003, 8(2): 342-350.

- [43] TSAMPOULA X, TAGUCHI K, CIZMÀR T, et al. Fibre based cellular transfection [J]. Optics Express, 2008, 16(21): 17007-17013.
- [44] KOHLI V, ROBLES V, CANCELA M L, et al. An alternative method for delivering exogenous material into developing zebrafish embryos [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 98(6): 1230-1241.

[本刊相关文献链接]

- 刘晔,惠培智,褚俊龙,等. 利用泰勒展开式的光学电流互感器补偿方法和仿真研究. 2012,46(8):22-26.
- 王延杰,王永泉,陈花玲,等. 新型智能材料微小型光学镜头致动器的设计与性能研究. 2012,46(5):79-84.
- 赵一博,韩妙飞,闫相国. 几种漫射光学成像图像重建算法的比较研究. 2012,46(4):106-111.
- 张平,张小栋,刘春翔. 双圈同轴式光纤位移传感器的输出特性. 2012,46(3):27-30.
- 秦王伟,赵宏,庄仲琴. 热光源谱域光学相干层析成像系统. 2011,45(11):63-67.
- 陈思翰,刘福兴. 用选择性激光烧结技术制作陶瓷原件研究. 2011,45(11):116-120.
- 夏玉静,管自生,贺涛. Co 掺杂 ZnO 纳米粉体的结构和光学性能. 2011,45(7):65-69.
- 王恪典,段文强,梅雪松,等. 毫秒激光加工小孔与重铸层的后处理工艺. 2011,45(7):45-49.
- 费致根,郭俊杰,马小军,等. 微型五坐标测量机激光测头安装误差的标定. 2011,45(5):64-68.
- 王金栋,郭俊杰,邓玉芬,等. 应用激光跟踪仪的数控机床几何精度检测. 2011,45(3):85-90.
- 皮刚,张安峰,朱刚贤,等. 激光金属直接成形中形貌自稳定效应的研究. 2010,44(11):77-81.
- 张德海,梁晋,郭成. 板料成形回弹三维光学测量技术研究. 2009,43(9):51-55.
- 刘杰,孙胜,管延锦. 激光偏振特性在微尺度工件激光弯曲成形中的作用. 2009,43(7):96-100.
- 姚翠萍,张镇西. 激光照射金纳米微粒靶向细胞对细胞膜通透性的影. 2008,42(12):1560-1564.
- 王伊卿,赵万华,施乐平,等. 光固化快速成型高分辨激光液位检测系统的开发. 2008,42(11):1394-1397.
- 陈玉平,赵宏,杨琦,等. 谱域光学相干层析成像系统的实验研究. 2008,42(7):815-817.
- 李明涛,苏进展,周朝晖,等. ZnIn2S4 薄膜喷雾热分解制备及其光电化学性质. 2008,42(1):106-109.
- 席文明,钟辉,郭阿全,等. 细胞注射显微系统的空间精确定位方法. 2007,41(7): 829-832.

(编辑 杜秀杰)