

2011-08-28

Fabrication of ITO Micro-pore Electrochemical Sensor and the Detection of Exocytosis

Hui ZHAO

Ling LI

Pin-Gang HE

Yu-Zhi FANG

Recommended Citation

Hui ZHAO, Ling LI, Pin-Gang HE, Yu-Zhi FANG. Fabrication of ITO Micro-pore Electrochemical Sensor and the Detection of Exocytosis[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2011 , 17(3): Article 7.

DOI: 10.61558/2993-074X.2840

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol17/iss3/7>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

ITO 微孔电化学传感器的构建及细胞胞吐的监测

赵 辉, 李 玲, 何品刚*, 方禹之

(华东师范大学化学系, 上海 200062)

摘要: 胞吐是细胞之间传递信号的主要方式之一, 安培法监测细胞胞吐是研究细胞间通讯的基本方法. 本研究采用 ITO (Indium Tin Oxide) 导电玻璃与紫外光刻技术构建了一种新型 ITO 微孔电化学传感器, 用于细胞胞吐现象的监测并取得较好的效果. 相比传统方法, ITO 微孔电化学传感器不仅可以取代传统的碳纤维微电极, 而且可与荧光或化学发光等方法联用, 运用多种手段同时对细胞的生理现象进行监测.

关键词: 胞吐; SH-SY5Y; 单细胞分析; ITO

中图分类号: Q256

文献标识码: A

细胞作为有机体结构与生命活动的基本单位, 在新陈代谢、信息传递等方面有着重要的地位. 研究生物体生命活动的规律, 必须以细胞为依据, 考察细胞的结构、功能, 探索细胞的生命活动. 细胞之间的通讯, 特别是以胞吐形式释放特定的生化或化学成分, 在生命的进程中起着重要的作用. 基于对胞吐的研究, 可以从中获得很多医学与生物学领域的信息, 这在神经生物学、细胞生物学乃至临床、病理、药理等诸多学科的研究方面都具有非常重要的意义.

由于生物组织的不均匀性, 同种细胞在大小、形状、生物活性及其生理状态等方面均有差异. 一般而言, 由细胞群体分析法研究获得的统计结果难免抹杀了单细胞个体之间的差异, 因而无法提供生物学及医学等领域必需的准确信息. 例如人类癌症的发病, 早期总是局部的极少数细胞发生了癌变. 若以传统方法进行检测, 癌变信号通常被大量正常细胞的信号所掩盖, 从而往往错失了癌症发现和治疗的最佳时刻. 单细胞分析 (Single Cell Analysis, SCA) 能够弥补群体细胞分析的不足. 由于单细胞的超微体积以及待测物质的微量乃至痕量, 加之细胞内生化学物质反应时间快 (通常是 ms 级) 等特征, 单细胞分析技术必须满足高选择性、高灵敏度、快速响应和超小体积等 4 个重要指标的要求^[1-2]. 上世纪 80 年代末, 碳纤维微电极被用于

单细胞胞吐现象的检测^[3-5]. 相比于膜电容法, 碳纤维微电极法有很多优点, 例如胞吐活动的监测不受胞吞活动的干扰、可直接监测释放的物质 (而不是模型参数)、可量化测量单个囊胞的分泌和无创伤测量等. 但碳纤维微电极也有其局限性, 例如当细胞表面分泌活性区域不均匀时, 也有可能造成测试结果不具备代表性. 虽然多电极同时监测也曾被应用, 但其实验操作较为繁琐, 结果也不尽如人意. 近年来, ITO (Indium Tin Oxide) 电极的出现, 克服了碳纤维电极技术的活性区域小和细胞之间的位置难以控制等缺点. Amatore 等的研究表明, 使用 ITO 电极监测细胞胞吐现象是可行的, 且有较好的重现性. 与传统的碳纤维微电极相比, 二者的准确性相近, 而且还可以与荧光法或化学发光法等多种方法联用^[6]. Amatore 等将悬浮的细胞滴加到 ITO 电极表面, 静置 10 ~ 30 min 后于室温下实验. 但这种实验方法可能造成细胞活性低和细胞贴壁不牢, 一旦实验中发生轻微的震动或因微型注射器施加的液流刺激都可能改变细胞的位置和形态, 并将在实验的过程中产生严重的影响. 本研究尝试利用 ITO 与 UV 光刻技术相结合, 构建响应灵敏、性能稳定的 ITO 微孔电化学传感器, 在传感器内培养细胞并对胞吐现象作监测. 此处, 不采取一般在平衡液中或者在细胞培养液中经短期的适应后再立即测定. 结果表明, 与 ITO 传统方

法相比,被测细胞具有较高的活性而且贴壁更紧密。

随着人口老龄化的日益严重,神经退行性疾病如帕金森症等愈加受到关注。作为拟神经细胞模型的SH-SY5Y细胞系,在细胞形态、生理和生化功能等方面与正常神经细胞相似,且具有多种受体,因而被广泛应用于神经系统疾病的发病机制和防治措施的研究^[7]。目前文献大多是有关SH-SY5Y多细胞胞吐的实验报道,时保宪^[8]等使用2,3-萘二甲醛(NDA)作SH-SY5Y细胞处理,监测到该细胞的胞吐信号,但至今尚未见直接检测SH-SY5Y单细胞胞吐的报道。

1 实验

1.1 仪器与试剂

IX51 荧光倒置显微镜(Olympus, 日本), MHW-103 显微操作仪(Narishige, 日本)和IM-9B微量注射器(Narishige, 日本)用于细胞的显微操作。EPC10 双通道膜片钳放大器(HEKA, 德国)监测细胞胞吐并测试传感器稳定性。循环伏安扫描使用CHI660A 电化学工作站(上海辰华)。实验用ITO导电玻璃购自珠海凯为电子元件公司。

本实验SH-SY5Y细胞由华东师范大学生命科学学院袁崇刚教授提供。细胞培养用品、PBS缓冲溶液为GIBCO产品,其它试剂均为分析纯或优级纯。

1.2 ITO微电化学传感器的构建

ITO玻璃具有低电阻、高度透明的性质。本实验选用的ITO导电玻璃透光率 $\geq 83\%$,面电阻 $\leq 10 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ 。ITO玻璃表面微孔制备借助照相平板光刻技术,经以下两个步骤完成。首先控制实验条件,在ITO表面涂覆厚度为 $5 \mu\text{m}$ 左右的UV绝缘光刻正胶。利用电热板将胶膜干燥后,再于胶膜上覆盖由激光刻录好的微孔模板,并在紫外曝光下显影。如此,直径为 $20 \sim 200 \mu\text{m}$ 的微孔即被刻划在ITO玻璃表面。微传感器的构造示意图如图1。其中,把电解池粘附在ITO微孔的上方,用于固定参比电极和盛放细胞培养液。该电解池可以很方便地粘附和移除,实验结束经消毒处理后可重复利用。

1.3 细胞培养

SH-SY5Y细胞在含10%胎牛血清、1%的青霉素和链霉素的DEME培养基中,于 37°C ,5%的

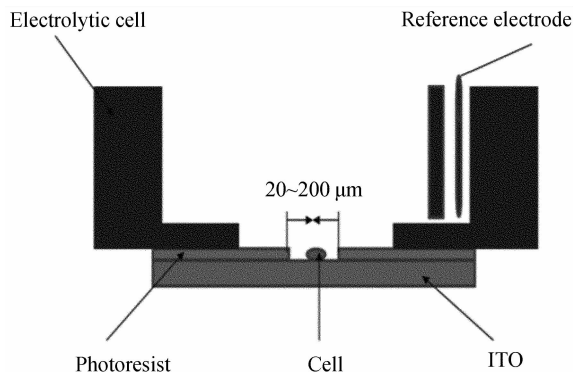


图1 ITO微孔电化学传感器构造示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the ITO micro-pore electrochemical sensor

二氧化碳及饱和湿度的条件下常规培养。每 $2 \sim 3\text{d}$ 更换培养液并传代。细胞培养后经胰酶消化、离心分离,加入一定体积的培养基使其分散。吸取一定体积含有适量浓度细胞的培养基滴入到ITO微孔电化学传感器电解池内。根据传感器微孔大小控制培养基体积,最终有 $1 \sim 2$ 个细胞附着在ITO微孔表面。在常规条件下培养一段时间后,去除培养基,用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的PBS($\text{pH} = 7.4$)洗涤 $1 \sim 2$ 次,于电解池内加入PBS($\text{pH} = 7.4$) $500 \sim 600 \mu\text{L}$,进行随后的细胞胞吐实验。

1.4 SH-SY5Y细胞胞吐监测

将上述准备好的细胞置于倒置显微镜上,借助微操纵器将内径为 $20 \sim 50 \mu\text{m}$ 的毛细玻璃管移至距离细胞 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ 处,使用微型注射器注射 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl刺激剂至细胞附近。设置ITO微孔电化学传感器电位为 0.78 V (vs. Ag/AgCl),采样间隔为 0.1 ms ,双通道膜片钳的设置采用电压钳模式,分别监测单细胞和多细胞的胞吐现象。

2 结果和讨论

2.1 ITO微孔电化学传感器性能

ITO微孔电化学传感器要求应具有稳定的性能和较高的灵敏度。图2给出在ITO微孔电化学传感器内分别加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS和浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 去甲肾上腺素PBS溶液的循环伏安扫描曲线。

图中曲线a平滑,无明显氧化还原电流信号。而曲线b则显示在去甲肾上腺素-PBS溶液中有明显的氧化还原电流响应,表明该ITO微孔传感器对SH-SY5Y细胞释放出的主要产物——微量的

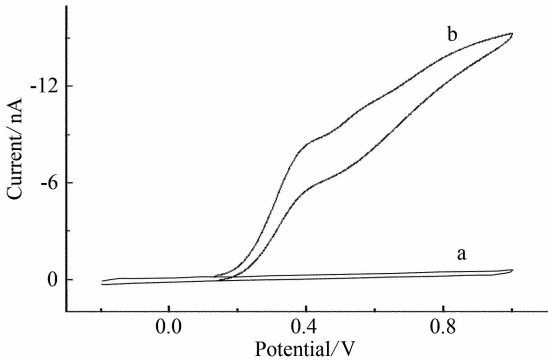


图2 孔径为 50 μm 的 ITO 微孔电化学传感器在 0.1 mol · L⁻¹ PBS 溶液中(a) (pH 7.4) 及在 0.5 mmol · L⁻¹ 去甲肾上腺素 PBS 溶液中(b) 的循环伏安曲线(扫描速率为 50 mV/s)

Fig. 2 Cyclic voltammograms of the ITO micro-pore electrode with diameter of 50 μm (a) in 0.1 mol · L⁻¹ phosphate buffer solution (pH 7.4), and in 0.5 mmol · L⁻¹ norepinephrine in phosphate buffer solution (pH 7.4) (b) (scan rate: 50 mV/s)

去甲肾上腺素具有灵敏的电化学响应.

ITO 微孔电化学传感器的稳定性测定方法如下:将细胞培养基放入 ITO 微孔电化学传感器的电解池内,在 37 °C、5% 的二氧化碳及饱和湿度的条件下搁置 3 h. 去除培养基后,加入 0.1 mol · L⁻¹ PBS (pH = 7.4) 溶液 500 ~ 600 μL. 设置工作电极电位 0.78 V (vs. Ag/AgCl), 采样时间间隔为 0.1 ms. 使用 EPC10 USB 双通道膜片钳放大器,在电压钳模式下连续扫描 30 次,每次周期 3 min,实验结果如图 3 所示.

过程中,倘如 ITO 与电解池结合不紧密,出现渗

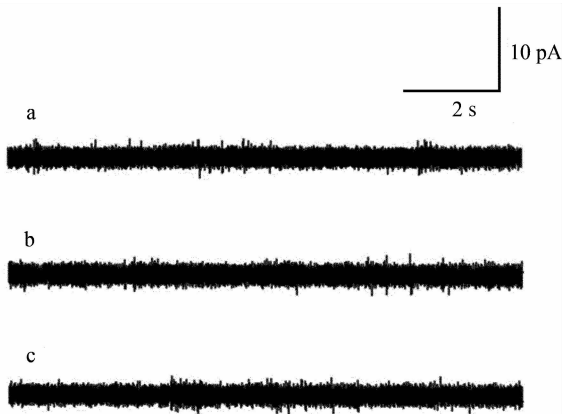


图3 微孔传感器稳定性试验安培响应曲线
a. 第 1 次扫描; b. 第 20 次扫描; c. 第 30 次扫描
Fig. 3 Stability tests of the ITO micro-pore electrode amperometric curve: a. 1th; b. 20th; c. 30th

漏,或在特定的氧化电位下,传感器的性能不稳定,都将对实验结果造成严重影响. 据图 3 可见,第 1(a)、第 20(b) 和第 30(c) 次扫描的安培响应曲线都很平整、无明显差异. 表明该 ITO 微孔电化学传感器经培养基浸泡和在 $I \sim t$ 模式下经多次扫描后,电流信号一直平稳,电解池也无渗漏,各部位结合紧密,从而性能稳定.

2.2 SH-SY5Y 细胞胞吐特性

SH-SY5Y 细胞存在多种受体,当其受到高钾、烟碱等物质刺激时,就会发生胞吐,释放出以去甲肾上腺素为主的儿茶酚胺类物质^[9]. 本实验处在 ITO 微孔电化学传感器内的 SH-SY5Y 细胞受到高钾刺激时,伴随去极化而发生胞吐. 在设置的氧化电位下,SH-SY5Y 释放的去甲肾上腺素在传感器内被氧化,并于对应的安培响应曲线上产生了电流峰,从而可达到监测细胞胞吐的实验目的.

图 4、5 各示明,经过细胞培养,可在 ITO 微孔电极上分别得到单细胞和多细胞两种状态. 与其对应的受激胞吐的安培响应曲线则分别见图 4B

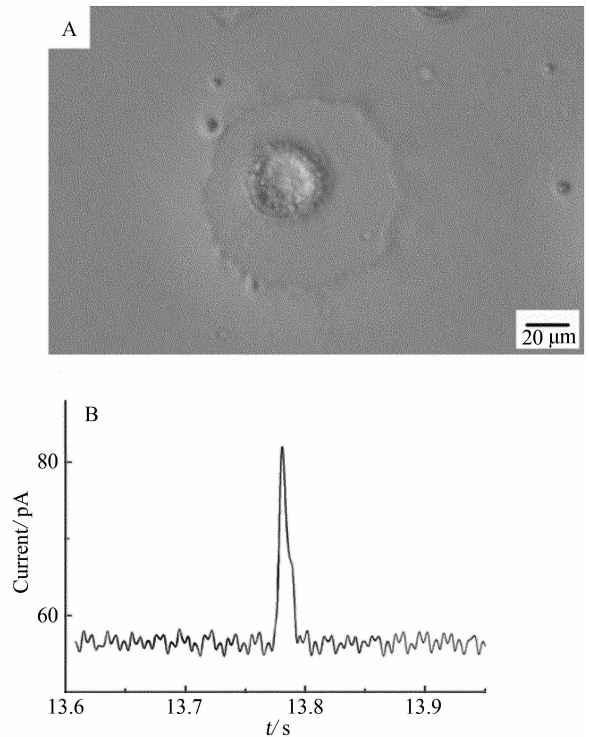


图4 ITO 微孔电化学传感器培养的单 SH-SY5Y 细胞 (A) 及单细胞对高 K⁺ 刺激胞吐的安培响应 (B)
Fig. 4 The single SH-SY5Y cell on the ITO micro-pore electrode (A) and the amperometric response to high K⁺ stimulation from the single cell (B)

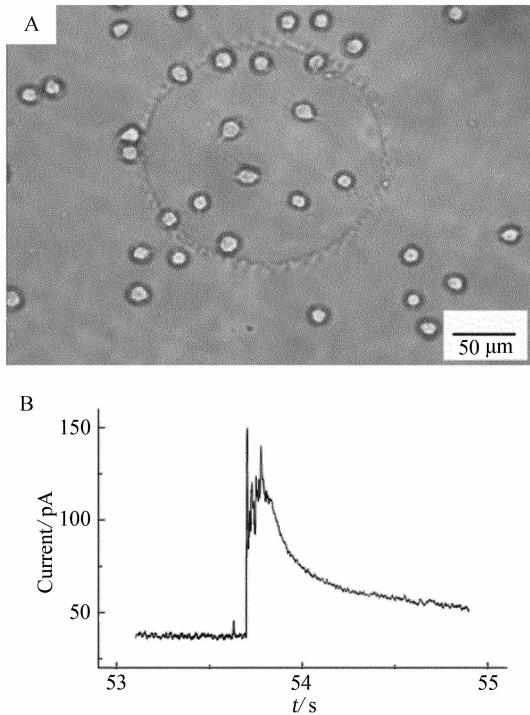


图5 ITO 微孔电化学传感器上培养的多个 SH-SY5Y 细胞(A) 及多细胞对高 K^+ 刺激胞吐的安培响应 (B)

Fig. 5 The multiple cells on the ITO micro-pore electrode (A) and the amperometric response to high K^+ stimulate from the multiple cells (B)

及图 5B. 如图,单细胞胞吐的安培响应曲线上出现尖锐的电流峰,可根据对其峰高、半峰宽等参数的测定,研判细胞的生理状态及其活性等. 而当多(个)细胞同时发生胞吐时,对应的电流响应信号通常出现相互叠加,所以很难分辨个别细胞的信息.

与文献报道相比,本实验给出的电流峰高和半峰宽均略小于文献值,原因是本实验未使用文献中所谓的可使胞吐信号放大的 2,3-萘二甲醛 NDA 等试剂,属于直接检测,从而电流峰高略小于文献报道值. 另外,实验还使用了分辨率更高的仪器,可以把原来相重合或部分叠加的电流峰分开,如此也可能造成半峰宽缩小的情形,所得结果与文献中类似现象的分析相符合^[8].

3 结 论

ITO 微孔电化学传感器具有良好的电化学性能和灵敏性,适用于监测细胞胞吐等生理现象. 根据文献报道,细胞生长的形态与其所处的环境有着密切的关系,而同一种类不同形态细胞在生理

活性、细胞功能等方面会有差异. 经过适当的表面处理,ITO 微孔电化学传感器可应用于细胞培养. 作者下一步将尝试直接在传感器表面培养细胞,获取不同形态的细胞,探讨细胞形态与功能之间的相互关系. 由于 ITO 玻璃具有较好的透光性,为荧光或者化学发光等之利用提供了便利条件. 如能将上述多种分析手段组合成一种新型传感器,将为生命科学的深入探索建立新的平台.

致谢:感谢华东师范大学电子工程系王连卫教授、王斐博士在传感器制备过程中提供的多方帮助. 感谢华东师范大学生命科学学院袁崇刚教授、俞国华博士、许媛媛博士对本文实验的指导与技术支持.

参考文献 (References) :

- [1] Anselmetti D. Single cell analysis technologies and applications [M]. Weinheim; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009; v-vi.
- [2] Cheng Jie-ke (程介克). Single cell analysis [M]. Beijing: The Science Press (科学出版社), 2005; iii, 383.
- [3] Wightman R M, Jankowski J A, Kennedy R T, et al. Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 10754-10758.
- [4] Kawagoe K T, Jankowski J A, Wightman R M. Etched carbon-fiber electrodes as amperometric detectors of catecholamine secretion from isolated biological cells [J]. Anal Chem, 1991, 63: 1589-1594.
- [5] Chow R H, Von Ruden L, Neher E. Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells [J]. Nature, 1992, 356: 60-63.
- [6] Amatore C, Arbault S, Chen Y, et al. Coupling of electrochemistry and fluorescence microscopy at indium tin oxide microelectrodes for the analysis of single exocytotic events [J]. Angew Chem Int Ed, 2006, 45: 4000-4003.
- [7] Vaughan P F T, Peers C, Walker J H. The use of the human neuroblastoma SH-SY5Y to study the effect of second messenger on noradrenaline release [J]. General Pharmacology, 1995, 26: 1191-1201.
- [8] Shi B X, Wang Y, Lam T L, et al. Release monitoring of single cells on a microfluidic device coupled with fluorescence microscopy and electrochemistry [J]. Biomicrofluidics, 2010, 4: 1-9.
- [9] Andres M I, Forsby A, Walum E. Polygodial-induced noradrenaline release in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. Toxicology in Vitro, 1997, 11: 509-511.

Fabrication of ITO Micro-Pore Electrochemical Sensor and the Detection of Exocytosis

ZHAO Hui, LI Ling, HE Pin-gang^{*}, FANG Yu-zhi

(*Department of Chemistry, East China Normal University, Shanghai 200062, China*)

Abstract: Exocytosis is one of the major means for cells to transmit messages. Amperometric detection of exocytosis is an important method in studying communication between cells. In this study a new type of ITO micro-pore electrochemical sensor was fabricated by means of ITO and UV light lithographic mask and was used in the detection of exocytosis with promising results. Compared with the conventional method, the ITO micro-pore sensor not only can replace the carbon fiber electrode, but also can combine with fluorescent or chemiluminescent methods in detecting the physiological phenomena of cells.

Key words: exocytosis; SH-SY5Y; single cell analysis; ITO