用于原代细胞基因递送的高通量集成式涡旋辅助电穿孔平台

Hyun Woo Sung[1] 和 Soojung Claire Hur[2-4]

[1]约翰斯·霍普金斯大学化学与生物分子工程系，美利坚合众国马里兰州巴尔的摩

[2]约翰斯·霍普金斯大学机械工程系，美利坚合众国马里兰州巴尔的摩

[3]约翰斯·霍普金斯医院西德尼·金梅尔综合癌症中心，美利坚合众国马里兰州巴尔的摩

[4]约翰斯·霍普金斯大学纳米生物技术研究所，美利坚合众国马里兰州巴尔的摩

摘要

人原代细胞最能忠实代表人体生理学，但将外源遗传物质导入其中的困难限制了其实际应用价值。电穿孔提供了一种前景广阔的非病毒基因递送方法；然而，传统批量系统缺乏异质性原代细胞样本所需的均一性和集成性。在此，我们提出了一种涡旋辅助电穿孔平台，将尺寸选择性细胞捕获与增强通量相结合，并实现了跨缓冲液和电学条件的参数优化，以及在原代细胞中对质粒DNA和体外转录信使 RNA的稳健递送。该集成平台提供了统一的工作流程，能够应对样本异质性、通量需求和递送效率等问题，从而推动非病毒基因递送更广泛地应用于原代细胞研究和转化应用。

1 引言

1.1 动机

人原代细胞直接从人体组织或器官中分离而来，最能忠实地再现人体的自然生理状态，因此是研究患者相关疾病机制的关键。然而，要将外源遗传物质导入细胞以进行基因操作和功能研究，仍面临诸多挑战，限制了其更广泛的应用。与永生化细胞系相比，原代细胞的增殖能力有限[1,2]，且膜特性和细胞大小存在显著异质性[3],，使高效的细胞内递送更加困难。

化学和病毒基因递送方法存在一些众所周知的局限性，包括依赖外源性载体材料、细胞毒性、免疫原性、潜在的基因组整合风险，以及复杂的预筛选流程[4]。电穿孔是一种前景广阔的非病毒、无载体物理方法，可递送多种载荷，包括质粒、信使 RNA 和蛋白质[5]，其效果可通过调节电场强度、脉冲持续时间和缓冲液组成进行控制[6–10]。然而，传统的大体积电穿孔系统需要较高电压，会产生不均匀的电场，且精度不足以适应异质性原代细胞样本，导致递送效率低且重复性差[5,11]。

集成于微流控平台中的微尺度电穿孔，通过实现对电场生成与定位、流体处理及细胞操控的精确控制，解决了其中许多局限[12–15]。已有多种微流控系统采用微电极阵列[16]，、连续流电穿孔系统[14,15,17,18]，和液滴式构型[19,20]等设计，成功实现了对原代细胞的基因递送。然而，现有平台大多只专注于转染步骤，缺少上游的尺寸选择性细胞分离或富集环节，实际上假定输入样本已经预先纯化且尺寸分布集中。因此，这些平台在处理异质性真实生物样本时用途有限。工作流程缺乏整合，对于涉及异质性样本的应用构成了重大障碍，因为这类应用需要在统一系统中兼顾通量和处理需求。

为满足这一需求，我们此前开发了一种将基于涡旋的细胞捕获与可调电穿孔相结合的平台[21–24]。涡旋捕获已被用于从复杂生物流体中富集稀有的人体细胞[25–27]，而将其与电穿孔集成则已证明多分子递送的可行性[21–24]。不过，早期研究主要验证了捕获与转染本身的集成[21–23]；近期研究则将这一方法拓展至掺入全血中的永生化细胞，涵盖了异质性生物样本的关键特征[24]。

在此，我们介绍一种完全集成、处理通量更高的涡旋辅助电穿孔平台（**图 1**），专为尺寸选择性原代细胞转染而设计。该平台以经商业验证、已用于复杂生物流体中稀有细胞富集的涡旋捕获几何结构为基础[25–27]，并采用重新设计的微尺度电极阵列，在保持对电参数精确控制的同时，大幅提高处理通量。我们使用人原代细胞，系统考察了关键电穿孔变量，包括缓冲液组成、电场强度和货物浓度。我们还通过递送质粒DNA和

体外转录（IVT）mRNA，进一步探索了该平台的通用性，从而评估其与尺寸及表达特征各异的遗传货物的兼容性。

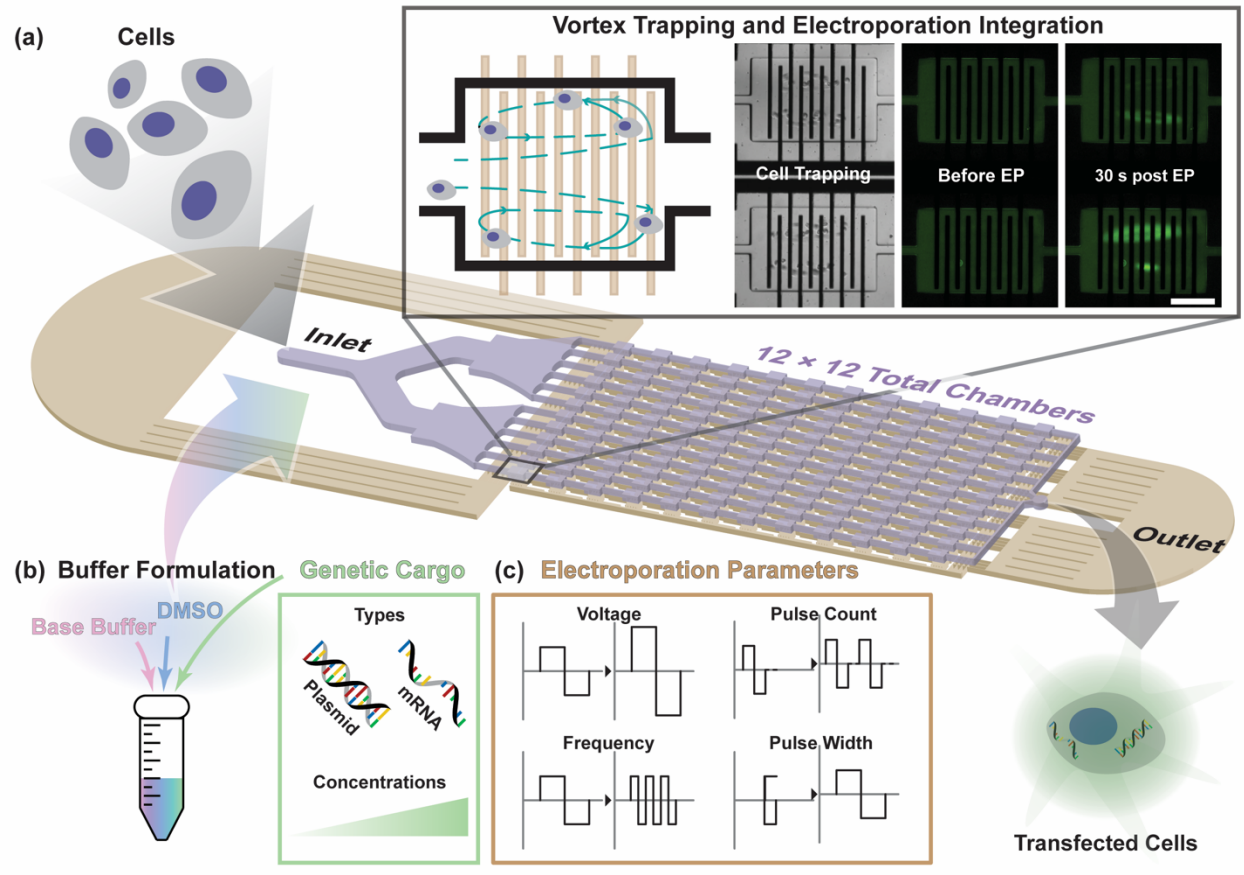

图 1：系统概述。(a) 涡旋辅助电穿孔平台示意图，该平台具有更高的通量。细胞从入口进入，并以尺寸选择性方式在微尺度涡旋腔室内通过流体动力学捕获，保留直径高于设定阈值的细胞，以便使用集成电极阵列进行电穿孔。代表性的明场和荧光图像展示了脉冲施加前后细胞捕获和电穿孔的情况。电穿孔后，转染细胞从出口收集。**(b)** 缓冲液配方与载荷模块化。电穿孔缓冲液由常用实验室试剂配制而成，包括添加了二甲基亚砜和遗传货物的基础缓冲液。该配方策略可灵活选择和调整不同类型的缓冲液组成，同时支持递送多种载荷类型，包括质粒DNA和信使 RNA，并可通过调节货物浓度来优化性能。**(c)** 电穿孔参数控制。平台可独立调节电压幅值、脉冲次数、脉冲频率和脉冲宽度，从而在电穿孔过程中精确控制电刺激。

2 结果

2.1 电穿孔阵列设计中的通量与电场均匀性平衡

在提升电穿孔通量的同时保持电场精度和一致性，需要采用一种新的电极阵列架构，以扩展此前的4×10 布局（4排平行横向排列、10列纵向排列；共40个腔室）[23,24]。更新后的阵列扩大了处理能力，同时解决了关键工程限制，包括腔室间的电场均匀性，以及入口和出口布线区域的电压降；这些问题否则可能损害并联电穿孔系统中的电场均匀性。重新设计的首要目标是确保施加电压能够高效、均匀地转化为所有电穿孔腔室中一致的电场，这是并联系统实现可重复基因递送的必要条件。

设计工作受到多项物理和制造限制的影响：(1) 标准显微镜载玻片所允许的最大器件占地面积；(2) 为确保光刻制造稳健且具有高成品率而选择的特征尺寸；(3) 形成充分发展涡旋流所需的腔室间距[25],；以及 (4) 为保留裸露玻璃、确保PDMS与玻璃之间无泄漏键合而对电极走线宽度和厚度的要求。这些限制缩小了阵列尺寸的可选范围，并要求在有限区域内对布线通路进行仔细优化。

我们评估了几种候选电极阵列配置，以兼顾细胞捕获能力与电场均匀性。每种布局均包含三个主要功能部分：入口布线路径、电极阵列和出口布线路径（**图2a**）。我们比较了三种阵列配置——16×12 （VTX-1 风格，192 个腔室）[25]、16×9 （144 个腔室）和最终的 12×12 （144 个腔室）——以评估电场均匀性与电气效率之间的权衡。每个腔室均包含五对叉指电极，可产生局部电场，对涡旋捕获的细胞进行电穿孔（**图2b**）。根据先前的研究[23],，我们针对每种几何结构调整了连接阳极和阴极焊盘的入口与出口电极部分，以在适应布局相关布线的同时维持电气性能。

整体电极示意图被转换为等效的集成电路重点仿真程序（SPICE）模型，用于表示串联和并联电阻网络（**图2c**）。要实现均匀且高效的电穿孔，腔室间的电压变异必须尽可能小，同时电压效率要高；电压效率定义为输入电压在阵列两端降落的比例。我们对每种配置的这些指标进行了量化，并确定了达到900V/cm平均电场所需的输入电压

（这是哺乳动物细胞可逆电穿孔的典型值[6,28,29]），该值通过 SPICE 电路仿真确定。

此前的经验[23] 表明，采用分叉式入口和出口布线路径，使阵列中的电阻均衡，有助于最大限度地降低腔室间变异（**图2d**）。这种方法最初应用于 VTX-1 型16×12 腔室布局[25]。尽管这种几何结构最大限度地提高了细胞捕获通量，SPICE 仿真却显示，由 12 个串联电极形成的较长布线会产生显著的电阻损耗。要产生 900 V/cm 的平均电场，需要 39.1 V（电压效率为 48.8 ±0.87%），且电压变异达到 7.70%，表明电压传递效率低且不稳定（**图2f**）。

缩短串联路径后得到16×9 配置，将所需输入电压降至 32.2 V，相应地将电压效率提高至 53.4 ± 0.80%，同时将腔室间变异降至 4.51%（**图2f**）。然而，即使降低至 32.2 V，16×9 布局所需的电压仍超出微图案化电极走线的结构耐受范围。局部电流密度升高会引发电化学腐蚀，形成空隙，并最终损害器件稳定性[30,31] （图 S1）。

评估了另一种12×12 配置，该配置采用更短的布线路径和加宽的入口/出口走线（**图2e**）。与16×9 几何结构相比，这种布局使总布线路径电阻降低了2.5倍，使输入电压有更大比例降落在阵列上。达到900 V/cm电场仅需24.0 V（**图2f**），电压效率提高至79.4 ± 2.28%。尽管腔室间变异略微上升至11.1%，但所需输入电压降低，减轻了与电压相关的电阻损耗，并提高了器件稳定性。

由于此次重新设计改变了阵列几何形状和布线架构，因此接下来评估其对通量和捕获性能的影响。以经商业验证的 VTX-1（16×12）配置[25,26] 为基准，可直接比较集成电穿孔条件下的通量；在此条件下，额外的电气和材料限制会制约可实现的流速。VTX-1 系统使用多注射器泵时，流速达到 8 mL/min（*Re* = 170.6）；而集成电穿孔12×12 器件由于微图案化金-玻璃界面处发生 PDMS 脱层，流速被限制在 5.2 mL/min（*Re* = 140.1）。正如腔室数量减少（从 192 个降至 144 个）所预期的那样，12×12 器件的总体捕获效率低于 VTX-1（**图2**）。按腔室数量归一化后，单腔室捕获率基本相当（每个腔室捕获率分别为 0.11% 和 0.14%），表明在12×12 布局中保留了基于尺寸的选择性捕获特性（图 S2）。这种捕获性能的保持，加上电气效率和器件

稳定性的大幅提升，支持在后续电穿孔实验中采用12×12 布局架构。

总体而言，12×12 配置在电场生成、电阻性能和运行稳健性之间实现了最理想的平衡。12×12 阵列的最终示意图和电阻网络见图S3，后续所有电穿孔实验均采用此配置。

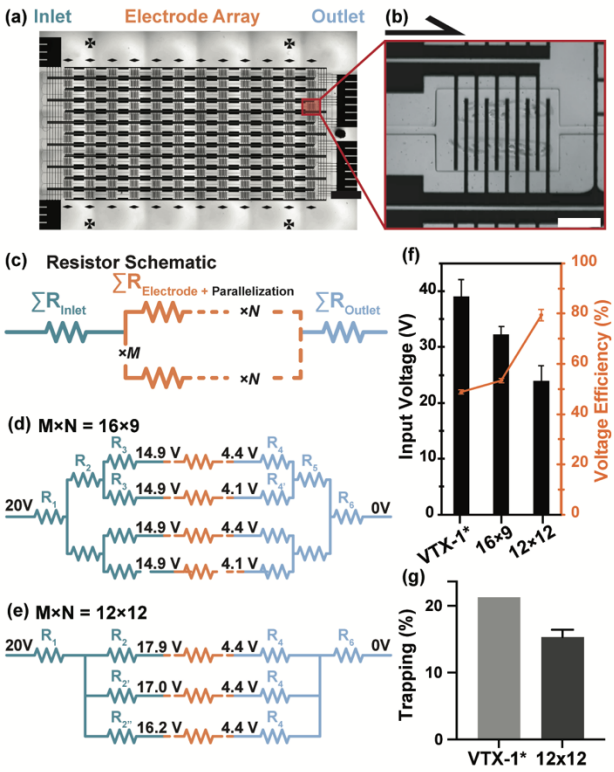

图2. 增强通量电穿孔阵列的设计与电气优化。(a) 电穿孔芯片上电极布局的明场图像，由入口（青绿色）、电穿孔阵列（橙色）和出口布线区（浅蓝色）组成。比例尺 = 2 mm。**(b)** 单个电穿孔腔室的放大明场图像，显示细胞捕获在围绕叉指电极循环的涡旋中。比例尺 = 250 µm。**(c)** 电极阵列的简化电阻网络表示，划分为入口布线区、电极阵列区和出口布线区。阵列并联化（M×N）表示通过基础电极单元的横向（M）和纵向（N）复制所形成的电穿孔腔室数量。**(d)** 对应于16×9 布局的电阻网络，其中入口布线电极的对称分叉形成两条主要电阻路径，从而降低腔室间变异。**(e)** 对应于12×12 布局的电阻网络，采用缩短的布线路径并降低入口和出口

电阻，从而使更大比例的施加电压降落在电极阵列上，提高电压效率，但会增加电阻不对称性。对于所有显示的电阻网络，标注的电压值（黑色）表示在施加20伏电势时各区域之间模拟的电压降。图中仅展示网络的上半部分（M/2），因为对称性使上下两部分具有相同的电阻行为。**(f)** 在电极阵列内达到900 V/cm平均电场所需的输入电压（左轴）及相应的电压效率（右轴）。与16×9 和VTX-1配置相比，12×12 配置所需的输入电压显著更低，同时电压效率更高。输入电压的误差线表示各腔室间的空间电压变异性（标准差），而电压效率的误差线表示逐行变异性。**(g)** 超高通量装置（VTX-1；数据引自文献[25,26]，仅用于纯化的平台）与集成式12×12 电穿孔装置的首轮细胞捕获效率比较。误差线表示均值±均值标准误（n = 3）。

2.2 集成式捕获-电穿孔性能表征

此前已证明涡旋辅助电穿孔的可行性，包括在我们早期的4x10平台上，该平台通过尺寸选择性预浓缩和电学参数的实时控制，实现了高效的多货物递送[21,23,32]。在此基础上，采用MCF7细胞对重新设计的12x12阵列进行了评估；MCF7细胞是一种此前用于评估涡旋捕获和微尺度电穿孔的模型细胞系[23,25],，以确定在增强通量运行条件下，集成式捕获与电穿孔性能是否得以保持。

使用YOYO-1和钙黄绿素AM红色染料对电穿孔效率和存活率进行定量分析，结果显示了预期的细胞膜通透化与细胞完整性之间的权衡：提高输入电压可提升递送效率，但也会加剧膜损伤和电化学应激，从而导致存活率和总体细胞回收率下降（**图3a**）。观察到的最高电穿孔效率为23伏时的85.9%，但同时伴随较低的存活率（41.5%）和细胞回收率（78.0%）。与我们此前使用低通量4x10涡旋辅助电穿孔仪的经验一致[23,32],，必须适度降低转染效率，才能达到实用水平的存活率和细胞回收率。因此，20伏提供了最为平衡的运行条件，实现了74.9%的递送效率、65.7%的存活率和88.0%的细胞回收率（**图3a**，蓝色阴影区域）。这些结果展示了电穿孔系统中递送效率与细胞健康之间的典型权衡。

电极阵列的并行化提高了样品处理能力，同时保持了各行实现稳定涡旋捕获所需的雷诺数。在这些条件下，集成溶液交换系统后，设备可持续以 5.2 mL/min 的流速运行，相较于 4×10 平台 1.0 mL/min 的通量提高了五倍（**图 3b**）。尽管处理能力有所提升，12x12阵列在递送效率和存活率指标上的电穿孔表现仍与 4x10 系统相当（**图 3c-e**），表明并行化能够提高通量，同时不会明显损害递送效果。这些观察结果表明，重新设计的 12x12阵列在提高通量的运行条件下，仍能有效实现涡旋捕获并保持电穿孔性能，为后续针对异质性原代细胞样本的研究提供了基线。

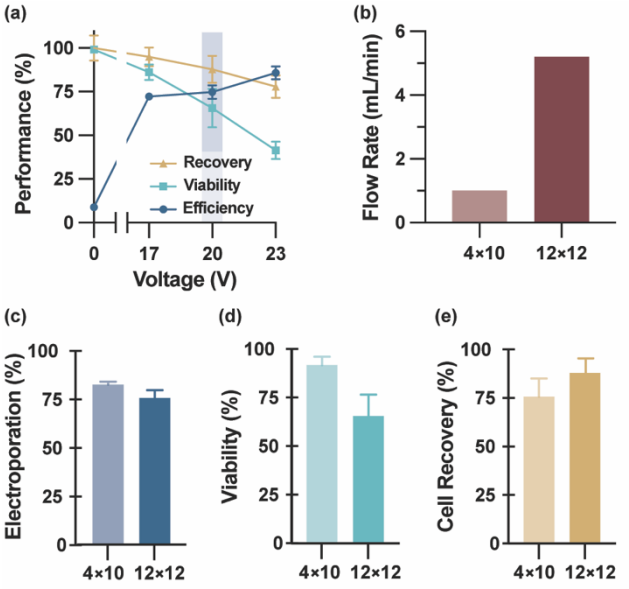

图 3。 电穿孔性能与通量扩展。 **(a)** 通过膜不透性染料摄取并在电穿孔后进行活力复染，定量评估 MCF-7 细胞的电穿孔性能。图 S4 展示了用于识别成功电穿孔细胞的门控策略。处理前进行核标记，有助于准确计数细胞。灰色阴影区域表示最佳工作电压范围。数据以均值 ± 均值标准误表示（n = 3；每个重复实验含 >300 个细胞）。**(b)** 在 40 psi 下运行的 4×10 和 12×12 腔室配置之间的样品通量比较，显示阵列扩展使通量增加了 >5倍。对优化条件下4×10 和 12×12 设备的 **(c)** 电穿孔效率、**(d)** 细胞活力以及 **(e)** 细胞回收率进行定量比较。数据以均值 ± 均值标准误表示（n= 3）。

2.3 人原代细胞电穿孔参数的优化 ls

涡旋辅助电穿孔在永生化细胞系中表现稳健[21,23,32],，但由于人原代细胞的细胞膜脆弱、增殖能力有限且对压力更加敏感[3]，将其应用于人原代细胞还需要进一步优化。我们研究了通过调整电学和化学参数能否实现原代细胞的有效转染，并使用人乳腺成纤维细胞（HMFs）确定支持细胞膜通透化的操作条件。

通过不可透膜的 YOYO-1 摄取量对电穿孔效率、存活率和细胞回收率进行定量（**图 4a**），结果显示的趋势与永生化细胞系一致：提高输入电压可增强细胞膜通透化和递送效率，但同时也会导致存活率和恢复率随电压升高而下降。在中等电压（16-20V）下，操作条件实现了良好平衡：递送效率显著提高，同时细胞健康状况保持在可接受水平，从而为后续质粒递送研究确立了电学条件。

随后，研究将优化工作扩展至电学参数，使用杜氏磷酸盐缓冲液（DPBS）作为电穿孔缓冲液，并加入 50 μg/mL ZsGreen 质粒。尽管 DPBS 可将 ZsGreen 导入 HEK 293 细胞，效率达到 37.5%（归一化效率为 0.617；图 S6），但原代人乳腺成纤维细胞（HMFs）的转染率极低（0.25%；归一化效率为 0.019，图 S6），即使对电压、脉冲宽度、脉冲次数和波形进行了广泛调试，结果仍然如此（图 S7）。这些结果表明，仅优化电学参数不足以实现原代细胞的有效转染，因此有必要在调节电学参数之外，进一步研究化学参数调控。

已知电穿孔缓冲液的组成会显著影响细胞膜通透化和细胞存活[7,33,34]。传统的大体积电穿孔系统通常依赖专有缓冲液，以减轻高压脉冲造成的细胞应激。因此，我们针对原代细胞转染考察了非专有缓冲液配方，首先测试了二甲基亚砜（DMSO）——一种细胞膜修饰剂[35]，已知可稳定亲水孔并降低通透化所需的电场阈值[36–38]。然而，在 DPBS 中补充 1%（v/v）DMSO 几乎未能改善 HMF转染（图 S8a），这表明即使加入细胞膜通透化添加剂，DPBS 配方仍不足以满足需求。

鉴于杜氏磷酸盐缓冲液的局限性，接下来我们评估了 Opti-MEM™。这是一种含较低血清、以碳酸氢钠缓冲的培养基，据报道可在电穿孔[9,39],过程中维持细胞活力，因此被选作替代基础缓冲液。直接比较 Opti-MEM + 二甲基亚砜与杜氏磷酸盐缓冲液 + 二甲基亚砜后发现，转染效率随电压升高而显著提升，其中

Opti-MEM 在较高电压下带来的改善最大，而在较低电压下提升较小（**图4b**）。为便于比较不同条件下的结果，我们将所有结果归一化至各配方最佳电压下杜氏磷酸盐缓冲液中含 1%（v/v）二甲基亚砜的基线。随后，我们使用二甲基亚砜-Opti-MEM 缓冲液，系统评估电压和质粒浓度对 HMF转染的联合作用。

根据 YOYO-1 通透化数据，在中等电压下膜可及性相近，因此将条件分为低电压（<18 V）和高电压（≥18V）两类。提高质粒浓度始终能增强递送效果；在高电压条件下，质粒浓度为 200 μg/mL 时效率最高，较基线提高 46.5 倍，达到 Lipofectamine 效果的 88%（图S3.3.4a）。然而，较高电压会降低后续细胞回收率（图S3.3.4b），凸显了提高递送效率与维持原代细胞存活率之间固有的权衡。在此框架下，质粒浓度为 200 μg/mL、施加电压为中等水平（16 -18 V）时，HMF转染的整体表现最为均衡；由于恢复率较低，因此不采用 20V。

高效的原代细胞电穿孔需要协同优化电学和化学参数。尽管 DMSO-Opti-MEM配方显著提升了对 HMF细胞的递送效果，但不同原代细胞类型的转染要求差异很大。该平台的多入口架构支持实时混合配方并精确控制溶液组成[21,32],，为今后自动化和组合式筛选电穿孔条件奠定了基础。

2.4 影响原代细胞转染的货物与细胞因素 n

要在多种应用中实现稳健的电穿孔效果，需要了解货物特性和细胞状态如何共同影响递送结果。在上述基于报告基因的验证基础上，我们接着将分析扩展至一种大型非报告基因质粒货物：血凝素（HA标签）标记的人端粒酶逆转录酶（hTERT）构建体（9.0 kb），并将其递送至 HMF细胞中。hTERT 是端粒酶复合物的催化亚基，在原代体细胞中受到严格调控[40–42]。鉴于细胞衰老会改变成纤维细胞膜特性和基因表达[43–45]，我们比较了低传代（群体倍增数（PD）< 14）与高传代（PD 14–30）人乳腺成纤维细胞的电穿孔结果；Ki67染色（图 S9）证实两者的增殖活性不同。

在 16 V（E = 960 V/cm）下，转染效率分别为 4.07%（低传代）和 7.84%（高传代）；而将电压提高至 18 V（E = 1080 V/cm）后，表达率分别降至 2.15% 和 3.82%，表明电压依赖性并非单调变化，且较高场强会降低递送效果（**图 4c-d**）。高传代 HMF 细胞始终表现出更高的 hTERT 表达，提示衰老相关变化可能会提高细胞对电穿孔的易感性。总体转染效率低于 ZsGreen，可能是因为 hTERT 质粒较大（9.0 kb，而 ZsGreen 为 4.7 kb）。这种随质粒大小增加而导致的效率下降，与既往研究结果一致：较大的质粒（6–16 kb）需要更大程度的膜破坏，且电穿孔后恢复较慢，因此递送效率较低[46]。这些结果表明，该平台能够递送并表达大型非报告基因遗传货物；递送效率同时取决于质粒大小和细胞状态，这些都是针对不同原代细胞类型制定电穿孔方案时需要考虑的重要因素。

为评估该平台在质粒DNA之外的通用性，我们考察了mRNA电穿孔。该方法可绕过核导入和转录过程，从而实现快速的蛋白质表达[47]。由于化学修饰mRNA能够提高翻译效率并降低先天免疫激活[48,49]，，我们合成了三种具有不同加帽和核苷化学修饰的eGFP mRNA构建体，并确定N1-甲基假尿苷（N1MePsU）取代、采用CleanCap AG加帽的变体为性能最佳的候选物（图S10）。在0-30 μg/mL的mRNA浓度范围内，对该优化构建体进行电穿孔，在18V（E=1080 V/cm）条件下获得了最高76.2%的表达效率，相当于使用Lipofectamine所达到效率的78%（**图4e-f**）。 进一步降低mRNA剂量可减少细胞毒性，凸显了mRNA相较于质粒DNA在原代细胞应用中的优势。

这些结果表明，与mRNA相比，质粒载荷（ZsGreen和hTERT）所观察到的较低递送效率源于载荷特异性的限制因素——例如大小、核导入和转录依赖性——而非电穿孔平台本身的限制。相比之下，mRNA（~900 nt）可绕过这些障碍，以较低的细胞毒性负担实现快速且高效的蛋白质表达。该平台支持多种核酸货物的递送，其效率接近化学转染方法，同时通量达到此前涡旋辅助电穿孔系统的五倍。该性能使该平台适用于原代细胞中的多模式基因递送应用。

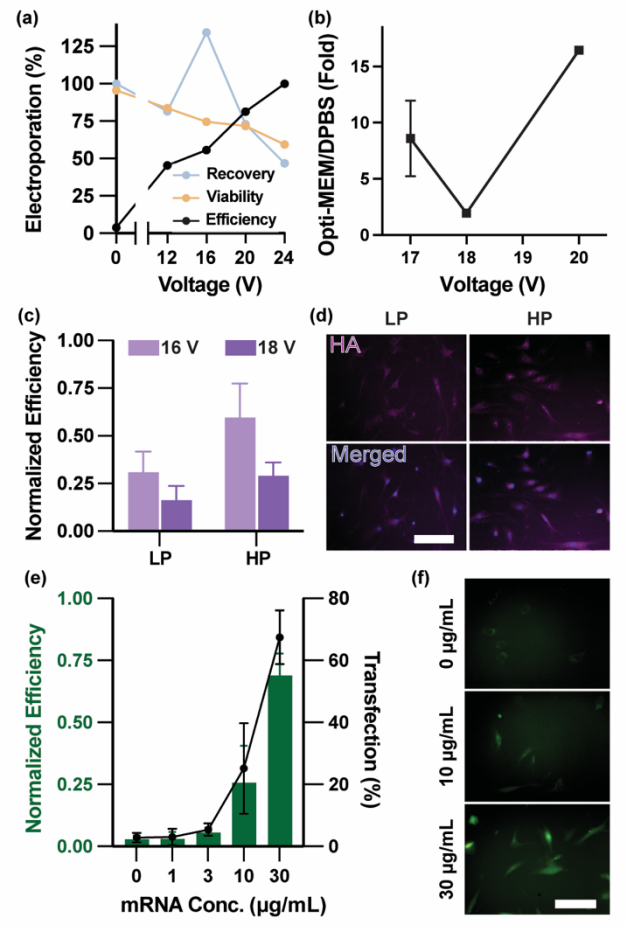

图 4。 电学与化学优化实现原代细胞的多模态基因递送。 **(a)** 在杜氏磷酸盐缓冲液中，人乳腺成纤维细胞（HMFs）的电穿孔表现随施加电压的变化；通过膜不透性 YOYO-1 的摄取，量化递送效率、存活率和恢复率。 **(b)** 在不同电压下，使用 Opti-MEM + 二甲基亚砜进行 50 µg/mL ZsGreen 质粒转染的效率相对于杜氏磷酸盐缓冲液 + 二甲基亚砜的倍数变化，显示出电压依赖性增强；在测试的电压范围内，Opti-MEM + 二甲基亚砜的表现始终优于杜氏磷酸盐缓冲液 + 二甲基亚砜。 **(c)** hTERT 质粒

低传代（LP，PD<14）和高传代（HP，PD>14）人乳腺成纤维细胞在16V和18V下的转染效率，以Lipofectamine介导的递送为基准进行归一化。细胞在Opti-MEM + 二甲基亚砜中接受电穿孔处理，质粒浓度为200 μg/mL，并在电穿孔后48小时进行免疫染色。**(d)** LP和HP人乳腺成纤维细胞中HA标签hTERT表达的免疫荧光成像，显示DAPI核染色、HA免疫染色及合并通道。比例尺= 100 μm。**(e)** 人乳腺成纤维细胞中eGFP mRNA电穿孔的剂量-反应分析。左侧y轴显示相对于mRNA Lipofectamine对照（Messenger Max, 0.1 μg/孔）归一化的效率，右侧y轴显示绝对转染效率。**(f)** 代表性荧光显微镜图像，显示mRNA电穿孔后随剂量变化的eGFP表达（0、10、 30 μg/mL）。比例尺= 100 μm。

3 结论

本研究通过整合尺寸选择性细胞捕获、芯片上溶液交换以及电学和化学参数的系统优化，开发了一种用于原代细胞转染、具有更高通量的涡旋集成电穿孔平台。重新设计电极阵列架构使处理通量提高了五倍，同时保留了实时可调性、无载体操作以及与敏感细胞类型的兼容性。所选用的12x12阵列提高了电压效率，并在降低输入电压的情况下保持了稳定性能。

对电穿孔参数进行逐步优化后发现，缓冲液组成和货物特异性属性都会对递送效率产生关键影响。优化后的 Opti-MEM/二甲基亚砜配方可在人乳腺成纤维细胞中实现高效质粒转染；进一步调优后，DNA 和信使 RNA 递送效率分别达到 Lipofectamine 基准水平的 88% 和 78%。而 Lipofectamine 通常依赖预先筛选的均一细胞群体。该平台成功递送了报告基因和功能基因，包括 hTERT 等大型质粒，并揭示了原代细胞转染存在传代依赖性差异。配套的信使 RNA 研究则凸显了货物化学性质、分子大小和电场强度对效率与存活率之间权衡的影响。

本研究的若干方面仍有进一步完善的空间。验证仅限于一组特定细胞类型；当前评估侧重于短期表达，而非长期功能；通量也受到材料限制和一定程度腔室间变异的制约。正在开展及未来的工作将把评估扩展至更多原代细胞，纳入功能性货物，并利用多入口架构进行原位组合式缓冲液筛选。材料和系统设计方面的并行改进将致力于提升稳定性和并行化程度，同时通过纵向检测评估表型持久性。

我们的工作建立了一个适用于原代细胞的多功能、可扩展电穿孔平台，可高效递送多种核酸货物，并实时优化递送条件。集成式流体结构为自动化、多模态基因工程工作流程奠定了基础。

4 方法

4.1 器件制造

该装置由一层聚二甲基硅氧烷（PDMS）构成，其中的涡旋细胞捕获腔室[23,25] 由表面带有微加工金电极阵列的玻璃载玻片封闭

该阵列经过图案化。详细的制备流程见我们此前的报告[24]。简而言之，该装置由一层PDMS（货号：4019862，Dow）构成，并通过等离子体键合至一片经微图案化的金电极玻璃载玻片（货号：48300-026，Avantor）。PDMS 层是一种微流控芯片，包含一个可容纳多个溶液接口的入口、一组微通道网络以及一个出口。为防止生物流体中的碎屑堵塞微通道，在微通道形成之前压印了粗滤器。该装置设有一个出口接口，用于冲洗并清除 bu7er 废液、进行样本循环再利用以及收集样本。入口和出口接口使用 20号钝头针（货号：90120050D，CML Supply）打孔制成。等离子体处理步骤完成后，使用体视显微镜将 PDMS 芯片手动对准电极阵列（Reactive Ion Etch Series 800 等离子体系统，MICRO-RIE）。

4.2 电极设计与建模

我们采用了电极设计与建模方法，并在先前已确立的方法基础上[23]，进行了关键改进，以提高通量，同时保持电穿孔性能。我们的重点是开发一种新的电极排列，在维持每个腔室的涡旋辅助电穿孔性能与先前低通量设计相当的同时，提高样本处理通量。为实现所有腔室间均匀的电压分布和同步运行，腔室电极采用串并联配置进行连接，在平衡电负载的同时，保持高效的电穿孔条件。我们通过将图案化金电极转换为等效电路图（图S3）对其进行了评估。图案化金电极的每个分段均近似为横截面和材料组成均匀的矩形部分，分段电阻*R*根据电阻率，"计算如下：

$$R = \rho \frac{l}{A} = \rho \frac{l}{wh}$$

其中，r 为金（Au）的电阻率（计算中取 2.44×10^{-8} W·m），l 为线段长度，*A* 为由宽度 *w* 和高度 *h* 定义的横截面积。电极厚度 *t* 固定为 300 nm，以确保 PDMS 与玻璃载玻片之间能够实现稳定的等离子体键合。每个腔室使用五对叉指电极（长度 450 μm，宽度 20 μm），并通过公共母线以相反极性连接（图S3b）。使用 COMSOL Multiphysics 仿真并以杜氏磷酸盐缓冲液作为细胞悬浮介质，估算每个腔室电极网络的电阻为 401.6 Ω。最终的电极示意图及电阻估算结果被转换为 SPICE模型，用于模拟每个电极上的电压降（图S3b）。

4.3 细胞培养

永生化细胞系（MCF-7 和 HEK 293 细胞）购自 ATCC，并使用杜尔贝科改良伊格尔培养基（DMEM）（货号#11995065，赛默飞世尔）培养，培养基中补充了 10%（v/v）热灭活胎牛血清（HI-FBS）（货号#16140071，赛默飞世尔）和 1%（v/v）青霉素-链霉素（货号#15140122，赛默飞世尔）。细胞在汇合度达到 70% 时传代。

HMF（货号#7630，ScienCell）按照制造商方案，在37 °C、5% CO_2 加湿培养箱中进行培养。细胞在汇合度达到90%时进行传代。群体倍增数（PD）通过计算传代培养前收集的总细胞数与分入新培养容器中的总细胞数之比的以2为底的对数得出。以第1次传代时PD为0开始，低传代和高传代细胞的PD分别介于7–14和14–30之间。除非另有说明，所有质粒和mRNA电穿孔实验均使用PD < 14 的HMF细胞。

我们实验中使用的所有细胞均按照标准方案，使用以磷酸盐缓冲液稀释的0.05%（v/v）胰蛋白酶-EDTA（货号#25200056，赛默飞世尔）进行传代培养。

4.4 电穿孔缓冲液配制

本研究使用DPBS（货号#14190144，赛默飞世尔）和Opti-MEM™（货号#51985034，赛默飞世尔）作为基础电穿孔缓冲液（EP）。质粒和mRNA直接稀释于基础EP缓冲液中。对于向电穿孔缓冲液中添加二甲基亚砜的实验，在电穿孔前立即向每份电穿孔缓冲液中直接加入1%（v/v）的二甲基亚砜（DMSO）（货号#45001-118，Corning），以最大程度减少其与遗传货物之间的碱基配对相互作用。

4.5 溶液交换系统

本研究采用了我们在先前工作中所描述的正压气动流量控制系统进行溶液交换[22–24]。为使该系统能够与标准实验室器皿连接，我们通过3D打印制作了一个管架，将气动管路连接至标准50 mL Falcon 离心管（货号#21008-178，Avantor），从而能够将溶液受控地注入微流控器件。为评估细胞捕获效率，我们将两个溶液接口——一个用于杜氏磷酸盐缓冲液清洗液，另一个用于细胞悬液——连接至器件的入口。对于基因递送实验，我们将三个溶液接口——含1%（v/v）二甲基亚砜的杜氏磷酸盐缓冲液清洗液、定制电穿孔缓冲液以及细胞悬液（重悬于生长培养基中的细胞）——连接至器件的入口。

4.6 捕获效率实验步骤

MCF-7细胞经胰蛋白酶消化后，在1100 rpm下离心5分钟，收集细胞沉淀，并用新鲜培养基稀释至最终浓度为5×10^3 细胞/mL。随后对细胞进行染色

在细胞捕获效率实验前，使用1 μM Calcein AM（货号#564061，BD Pharmingen）染色10分钟。每次注射器测试中，取200 μL该细胞悬液加入40 mL培养基中进行稀释（1×10^3 细胞，25细胞/mL），并装入50 mL注射器（货号#13-689-8，Fisher Scientific）。装载注射器时，确保处理的总体积不超过注射器容量的80%（即对于50 mL注射器，将200 μL细胞悬液加入39.8 mL培养基中）。在细胞捕获注射器操作序列中，首先以40 psi的压力从DPBS小瓶中引入液体30秒，以预先形成涡旋捕获流。随后，注射泵（货号#70-3007，Harvard Apparatus）以4 mL/min的流速注入细胞悬液50秒（通过装置的总流速为~ 5 mL/min，Re = 136），然后以0.5 mL/min的流速进行30秒的抽取。该抽取步骤对于确保在收集过程中仅收集涡旋捕获细胞是必要的。处理后，将细胞收集至96孔板（货号#07-000-162，Fisher Scientific）中，并在2小时内成像。使用基于强度的图像识别分析，从荧光图像中测量细胞直径，具体方法如前所述[24]。

4.7 Mem膜不透性分子电穿孔实验流程 e

MCF-7细胞经胰蛋白酶消化后，以 1100 rpm 离心 5 min 收集，并重悬于新鲜培养基中，终浓度为 1×10^3 细胞/mL。随后，按照制造商的方案使用细胞核染料 NucBlueTM Live ReadyProbesTM 对细胞进行染色，以标记电穿孔前的活细胞（货号 R37605，赛默飞世尔）。将 4 mL 悬液装入 5 mL 注射器。完成细胞捕获注射器程序后，将溶液端口从杜氏磷酸盐缓冲液清洗液瓶切换至电穿孔缓冲液瓶。所有膜不透性分子递送实验均以杜氏磷酸盐缓冲液作为基础电穿孔缓冲液。递送 YOYO-1 时，电学参数为：以 10 kHz 施加 10 个持续 1 ms 的交流方波脉冲，脉冲间隔为 1 s。完成后，将溶液瓶压力从 40 psi 降至 30 psi 并维持 10 s，以收集细胞；随后以 5 psi 将细胞转移至 96孔板中，持续 10 s。收集后立即向每孔加入 100 μL 预热的杜氏磷酸盐缓冲液，其中含有 2 μM Calcein Red AM（孔内终浓度 ~1μM），并将 96孔板置于 37 °C、5% CO_2 的加湿培养箱中。收集后 20 min，将溶液更换为 100 μL 预热的杜氏磷酸盐缓冲液，并使用荧光显微镜对各孔进行成像。

4.8 质粒制备与提取

质粒 pZsGreen1-C1（下文简称 ZsGreen）购自 Takara Bio（货号：632447）。质粒 pcDNA-3xHA-hTERT 购自 Addgene（ID：51637）。质粒 pcDNA3.1(+) eGFP 购自 Addgene（ID：129020）。质粒转化入 *E. coli* DH5α 细胞（货号：18265-017，赛默飞世尔）中进行扩增，

除非另有说明。转化细胞按照制造商的方案在 Luria-Bertani broth（货号：12795027，赛默飞世尔）中培养。将接种后的肉汤与用高压灭菌水稀释的 50%（v/v）无菌甘油（货号：M153-100ML，Pantek Technologies）按 1:1 混合制备甘油菌种，并储存于 -80°C。

用甘油菌种接种 5 mL 种子培养物，在 37 °C 下以恒定转速（240 rpm）培养过夜。随后将种子培养物扩增至大规模（>100 mL）培养物，在 37 °C 下以较低转速（160 rpm）培养 12 hr，以尽量减少起泡。按照制造商的方案，使用 Plasmid Plus Maxi Prep（货号 #12963，QIAGEN）提取质粒。使用分光光度计（Take3微量体积板，BioTek Cytation 5）的 Nanodrop模式测定质粒浓度和纯度。

为进行定量比较，将微尺度电穿孔转染效率归一化至使用常规转染试剂获得的效率。质粒转染所用的常规试剂为 LipofectamineTM 3000（货号 #L3000001，赛默飞世尔），信使 RNA转染所用的常规试剂为 LipofectamineTM MessengerMAXTM（货号 # LMRNA001，赛默飞世尔）。所有转染均按照制造商的方案进行。荧光阈值设为未经过电穿孔的细胞所发出的最大信号。

4.9 体外信使 RNA合成

质粒 pcDNA3.1(+) eGFP（下文简称 eGFP）购自 Addgene（ID: 129020）。使用甘油菌种接种 5mL 种子培养物，在 37 °C 下持续振荡（240 rpm）过夜培养。随后按照制造商的方案，使用离心小量制备试剂盒（货号#27104，QIAGEN）提取质粒，并按照制造商的说明，通过单个位点限制性酶切（BbsI-HF，货号#R3539S 或 PmeI，货号# R0560S，New England Biolabs）将其线性化。使用 T7 RNA聚合酶（货号#M0251S，New England Biolabs）进行体外转录（IVT），并采用 CleanCap Reagent AG（货号# N-7113，TriLink Biotechnologies）或抗反向帽类似物（ARCA）（货号#S1411S，New England Biolabs）；同时以 N1-甲基假尿苷-5'-三磷酸（N1MePsU）（货号# N-1081，TriLink Biotechnologies）完全取代尿苷。使用 Q5热启动高保真DNA聚合酶试剂盒（货号#M0493S，New England Biolabs）进行定点诱变，在 T7 启动子位点之后立即引入正确的 5'-AG-3' 起始序列，以用于 CleanCap Reagent AG mRNA 的合成；所用引物如下：正向："- ACT CAC TAT AAG GAG ACC CAA G -"，反向："- CGT ATT AAT TTC GAT AAG CCA G -"（Integrated DNA Technologies）。通过桑格测序确认模板中的突变。ARCA加帽mRNA由未突变的模板合成。使用 大肠杆菌 多聚腺苷酸聚合酶（货号#M0276L，New England Biolabs）向 mRNA 添加约 100 nt 的多聚腺苷酸尾

产物。每个步骤完成后，均使用 RNA纯化试剂盒（货号#T2050S，New England Biolabs）纯化 RNA 产物。使用 Nanodrop分光光度计评估 RNA 浓度和纯度。购买了市售的含 5-甲氧基尿苷（5moU）替代尿苷的 eGFP mRNA（货号#L-7201，TriLink Biotechnologies），用于比较体外转录信使RNA产物的翻译效率。

4.10 电穿孔介导的转染流程

将 HEK293 和 HMF 细胞进行胰蛋白酶消化，以 1100 rpm 离心 5 min 后收集细胞沉淀，再用新鲜培养基重悬至最终浓度为 1×10^3 cells/mL。将 4 mL 该细胞悬液装入 5 mL 注射器（货号 75846-756，Avantor Science）。按照前文所述的注射器操作顺序，使细胞在微涡旋中额外滞留 2 min，然后将活性溶液端口从洗涤缓冲液切换至电穿孔缓冲液。在电穿孔缓冲液中维持 40 psi 的灌注压力，同时施加电穿孔脉冲。除非另有说明，用于基因递送的电学参数为：施加 20 个持续 1 ms、频率为 10 kHz 的交流方波脉冲，脉冲间隔为 1 s。完成后，将管内压力从 40 psi 降至 30 psi 并维持 10 s，以收集细胞；随后以 5 psi 将细胞转移至 96孔板，持续 10 s。收集后立即向每个孔中加入 100 µL 预热培养基，并将 96孔板置于 37 °C、5% CO_2 的加湿培养箱中。收集后 1 hr，更换培养基，每孔加入 100 µL 预热培养基，以彻底去除残留的电穿孔缓冲液。通过在电穿孔后 24 hr（信使 RNA）和 48 hr（质粒）成像，统计报告基因阳性细胞（例如绿色荧光蛋白或HA标签），并使用绿色荧光蛋白的直接报告荧光和 HA标签的免疫荧光来定量转染结果。

4.11 免疫荧光

除非另有说明，所有免疫荧光实验均在96孔板中进行。使用4%多聚甲醛（货号#15710，Electron Microscopy Sciences）固定细胞20分钟，再用杜氏磷酸盐缓冲液中的0.1% Triton X-100（货号#T8787，Sigma Aldrich）处理2分钟以透化。将针对HA的兔抗HA抗体C29F4（货号#3724S，Cell Signaling Technology，稀释比例1:200）或针对Ki67的小鼠抗Ki67抗体8D5（货号#9449S，Cell Signaling Technology，稀释比例1:500）用10%正常山羊血清（货号#50062Z，赛默飞世尔）稀释，并在室温下于加湿培养箱中孵育1小时。随后，将细胞与Alexa Fluor偶联二抗（抗兔，货号#4414S，Cell Signaling Technology，稀释比例1:3000）（抗小鼠，货号#A- 11001，赛默飞世尔，稀释比例1:1000）以及DAPI细胞核复染剂（0.2 µg/孔；货号#D3571，赛默飞世尔）孵育；两者均用10%正常山羊血清稀释，室温下孵育1小时

在加湿培养箱中进行。每个步骤之间，使用PBS-Tween缓冲液（0.05% v/v；货号# 85113，赛默飞世尔）清洗每孔三次。

5 致谢

本研究部分经费由苏珊·G·科曼职业催化研究基金（CCR19609203）和美国国立卫生研究院 R21CA229024 项目提供。作者谨此感谢马里兰大学的 Jung Soo Suk 博士慷慨赠送质粒 pZsGreen1-C1，感谢 Huy Vo 和惠廷工程学院惠特克微细加工实验室在光刻和器件制造方面提供的支持，感谢约翰斯·霍普金斯大学 RNA 创新中心的 Je7 Coller 博士和 Zachary Mandell 博士在 mRNA 体外转录方面提供的指导，并感谢约翰斯·霍普金斯医学研究所遗传资源核心设施（GRCF）提供测序服务。我们还要感谢 Anne N. Connor 提供编辑支持，该支持由约翰斯·霍普金斯大学研究副教务长办公室提供。我们使用了 OpenAI 开发的语言模型 ChatGPT，以提升稿件措辞的清晰度。

数据可用性

本研究结果所依据的数据可应合理请求向通讯作者获取。

利益冲突

SCH 在 Vortex Biosciences, Inc. 拥有经济利益，并因本研究使用的知识产权而获得版税。HWS 声明不存在潜在利益冲突。

1. Arul, M., Roslani, A. C. & Cheah, S. H. 癌细胞的异质性：不同原发性和继发性结直肠癌细胞系在体外的药物反应差异。*VitroCell. Dev. Biol. - Anim.* **53**, 435–447 (2017)。

2. Richter, M. 等 从供体到实验室：原代细胞系的奇妙旅程。*Front. Cell Dev. Biol.* **9**, （2021年）。

3. Kucharski, M.、Mrowiec, P. 和 Ocłoń, E. 原代成纤维细胞转染相关的现行标准与常见陷阱。*Biotechnol. Prog.* **37**，e3152（2021年）。

4. Thomas, C. E.、Ehrhardt, A. 和 Kay, M. A. 病毒载体用于基因治疗的进展与问题。*Nat. Rev. Genet.* **4**，346–358（2003年）。

5. Yarmush, M. L.、Golberg, A.、Serša, G.、Kotnik, T. 和 Miklavčič, D. 基于电穿孔技术的医学应用：原理、应用与挑战。*Annu. Rev. Biomed.Eng.* **16**，295–320（2014年）。

6. Rols, M.-P. & Teissié, J. 哺乳动物细胞大分子电致通透化：脉冲持续时间的调控。*Biophys. J.* **75**, 1415–1423 (1998).

7. Jordan, E. T., Collins, M., Terefe, J., Ugozzoli, L. & Rubio, T. 优化原代细胞及其他难以转染细胞的电穿孔条件。*J. Biomol. Tech. JBT* **19**, 328– 334 (2008).

8. Zhang, Z., Qiu, S., Zhang, X. & Chen, W. 优化用于原代人T细胞工程的DNA电穿孔。*BMC Biotechnol.* **18**, 4 (2018).

9. Hyder, I., Eghbalsaied, S. & Kues, W. A. 牛原代成纤维细胞方波电穿孔条件的系统优化。*BMC Mol. Cell Biol.* **21**, 9（2020年）。

10. Wu, M. H. 等通过电穿孔优化培养条件以增强人类 CD34+ 细胞的转染效果。《骨髓移植》 **27**, 1201–1209（2001）。

11. Kotnik, T., Rems, L., Tarek, M. 与 Miklavčič, D. 膜电穿孔与电致通透化：机制与模型。《生物物理学年度评论》 **48**，63–91（2019年）。

12. Choi, S.-E., Khoo, H. 与 Hur, S. C. 微尺度电穿孔的最新进展。《化学评论》 **122**, 11247–11286（2022年）。

13. Chang, A.-Y. 等 微流控电穿孔：结合纳秒和毫秒脉冲，促进 DNA 在细胞疗法中的快速摄取与增强表达。《科学报告》 **10**，6061（2020年）。

14. Lissandrello, C. A. 等 将信使 RNA 通过高通量连续流微流控电穿孔导入人原代 T 细胞，用于细胞治疗生产。《科学报告》 **10**，18045（2020年）。

15. VanderBurgh, J. A., Corso, G. T., Levy, S. L. & Craighead, H. G. 一种用于高效细胞转染的多重微流控连续流电穿孔系统。《生物医学微器件》 **26**, 10 (2024年)。

16. Duckert, B. 等 高精度电穿孔：在微电极阵列上实现精准、高效的转染。《控释杂志》 **352**, 61–73 (2022年)。

17. Huang, D. 等 在弯曲通道中实现高细胞活力的微流控电穿孔。《传感器与执行器 *B*：化学》 **250**，703–711（2017）。

18. Welch, M. 等 用于细胞治疗生产的微流控器件中人原代 T 细胞的高通量 CRISPR/Cas9 介导基因编辑。《先进材料技术》 **8**，2300275（2023）。

19. Little, S. R. 等 利用数字微流控，通过三液滴液体结构在原代哺乳动物细胞中实现高效细胞内递送。*Adv. Mater. Technol.* **8**, 2300719 (2023)。

20. Zhan, Y., Wang, J., Bao, N. & Lu, C. 微流控液滴中的细胞电穿孔。*Anal. Chem.* **81**, 2027–2031 (2009)。

21. Vickers, D. A. L., Ouyang, M., Choi, C. H. & Hur, S. C. 利用微尺度涡旋辅助电穿孔直接进行药物组合分析。*Anal. Chem.* **86**, 10099–10105 (2014)。

22. Yun, H. & Hur, S. C. 利用涡旋辅助电穿孔进行顺序多分子递送。*Lab. Chip* **13**, 2764–2772 (2013)。

23. Ouyang, M., Hill, W., Lee, J. H. & Hur, S. C. 微尺度对称电穿孔器阵列：一种多功能分子递送系统。《科学报告》 **7**, 44757 (2017)。

24. Sung, H. W. 等。 使用微流控电穿孔仪使血液中的耐药癌细胞增敏。*PLOS ONE* **17**, e0264907 (2022年)。

25. Che, J. 等。 利用超高通量微流控涡旋技术对分离出的较大循环肿瘤细胞进行分类。*Oncotarget* **7**, 12748–12760 (2016)。

26. Lemaire, C. A. 等 从血液中快速无标记分离循环肿瘤细胞：从研究用微流控平台到自动化流体仪器 VTX-1液体活检系统。*SLAS Technol.* **23**, 16–29（2018年）。

27. Hur, S. C., Mach, A. J. & Di Carlo, D. 利用微尺度涡旋进行高通量基于尺寸的稀有细胞富集。生物微流体 **5**, 022206（2011年）。

28. Fox, M. B. 等 微流控器件中的细胞电穿孔：综述。*Anal.Bioanal. Chem.* **385**, 474–485（2006年）。

29. Weaver, J. C. 电穿孔：操控细胞和组织的一种普遍现象。*J. Cell. Biochem.* **51**, 426–435（1993年）。

30. Black, J. R. 电迁移——简要概述及近期的一些成果。*IEEE Trans.Electron Devices* **16**, 338–347（1969年）。

31. Hummel, R. E. 集成电路互连线中的电迁移及相关失效机制。*Int. Mater. Rev.* **39**, 97–112（1994年）。

32. Sung, H. W. 等 使用微流控电穿孔仪使血液中的耐药癌细胞增敏。*PLOS ONE* **17**, e0264907（2022年）。

33. Sherba, J. J. 等 电穿孔缓冲液成分对细胞活力和电转染效率的影响。《科学报告》*10*, 3053 (2020年)。

34. Alawar, N., Schirra, C., Hohmann, M. & Becherer, U. 一种高效电穿孔原代细胞毒性T淋巴细胞的方法。*BMC Biotechnol.* **24**, 16 (2024年)。

35. Fernández, M. L. & Reigada, R. 二甲基亚砜对脂质膜电穿孔的影响。*J. Phys. Chem. B* **118**, 9306–9312 (2014年)。

36. Melkonyan, H., Sorg, C. & Klempt, M. 二甲基亚砜（DMSO）可提高哺乳动物细胞的电穿孔效率。《核酸研究》 **24**, 4356–4357 (1996年)。

37. Gironi, B. 等二甲基亚砜对模型膜和生物膜的力学与结构性质的影响。*Biophys. J.* **119**, 274–286（2020年）。

38. Ménorval, M.-A. de, Mir, L. M., Fernández, M. L. & Reigada, R. 二甲基亚砜对含胆固醇脂质膜的影响：实验、计算机模拟和细胞实验的比较研究。*PLOS ONE* **7**, e41733（2012）。

39. Eghbalsaied, S. & Kues, W. A. 一种用于 CRISPR 介导的绵羊胚胎成纤维细胞基因编辑的电化学方案。*Cells Tissues Organs* **212**, 176–184（2023）。

40. Soares, J., Lowe, M. M. & Jarstfer, M. B. 人端粒酶的催化亚基是半胱天冬酶-6和半胱天冬酶-7的独特底物。*Biochemistry* **50**, 9046–9055（2011年）。

41. Bryan, T. M. & Cohen, S. B. 端粒酶。载于核酸化学生物学手册 1291–1316（施普林格，新加坡，2023）。doi:10.1007/978-981-19-9776-1_47。

42. Tran, D. A., Wong, T. C., Schep, A. N. & Drewell, R. A. 哺乳动物端粒酶逆转录酶基因处一个超保守的推定顺式调控模块的表征。*DNA Cell Biol.* **29**, 499–508（2010）。

43. Lou, P.-J., Chiu, M.-Y., Chou, C.-C., Liao, B.-W. & Young, T.-H. 聚（乙烯-共-乙烯醇）对人真皮成纤维细胞衰老相关改变的影响。生物材料 **31**, 1568–1577 (2010年)。

44. Chen, X. 等。 整合素连接激酶可诱导衰老心脏成纤维细胞发生衰老相关改变并组装细胞外纤连蛋白。*J.Gerontol. Ser. A* **61**, 1232–1245 (2006年)。

45. Macieira-Coelho, A. 与细胞衰老相关的膜特性变化。载于《国际细胞学评论》（编者：Bourne, G. H.、Danielli, J. F. & Jeon, K. W.），第83卷，183–220页（学术出版社，1983年）。

46. Lesueur，L. L.、Mir, L. M. & André，F. M. 克服大型质粒在原代细胞体外电转移中的特异性毒性。《分子治疗：核酸》**5**，（2016年）。

47. Youn，H. & Chung，J.-K. 修饰的信使RNA作为质粒DNA（pDNA）的替代物，用于转录本替代和疫苗治疗。《生物治疗专家意见》 **15**，1337–1348（2015年）。

48. Parr，C. J. C. 等。N1-甲基假尿苷替代可增强合成信使RNA开关在细胞中的性能。《核酸研究》 **48**，e35（2020年）。

49. Roy，B. 信使RNA修饰对翻译的影响：概述。载于*RNA*修饰：方法与方案（编者：McMahon，M.），327–356（施普林格美国，纽约州纽约市，2021年）。doi:10.1007/978-1-0716-1374-0_20。

补充材料

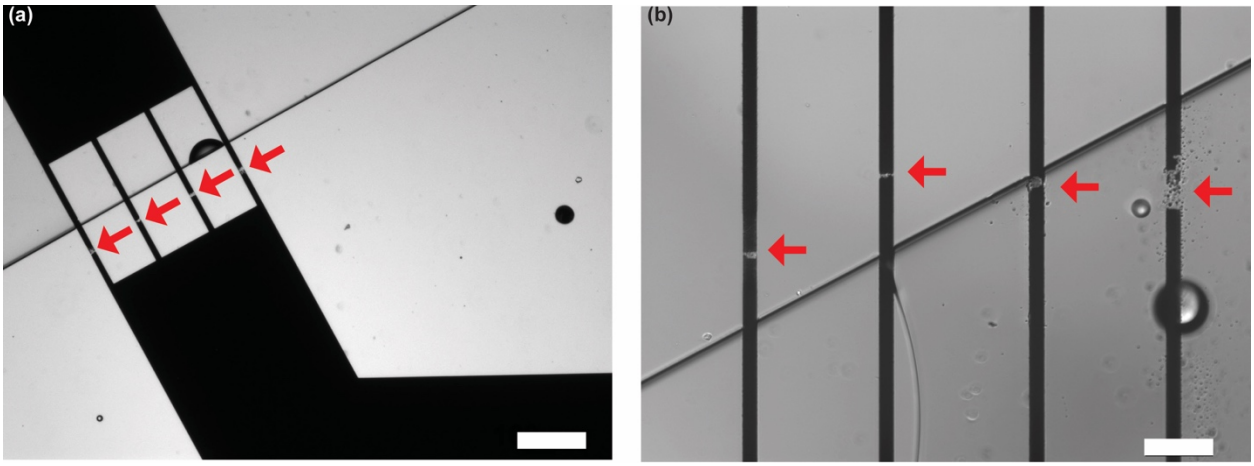

图 S1：高压电穿孔条件下的电极退化。（a）明场显微图像显示，在高压操作后，薄电极区域内沿公共母线出现了电极侵蚀和空洞形成（红色箭头）。在电阻升高的区域，退化现象最为明显，这与局部电流拥挤和电化学损伤相一致。比例尺 = 250 µm。（b）与（a）中所示区域相对应的代表性侵蚀和空洞形成位点的高倍图像。比例尺 = 100 µm。

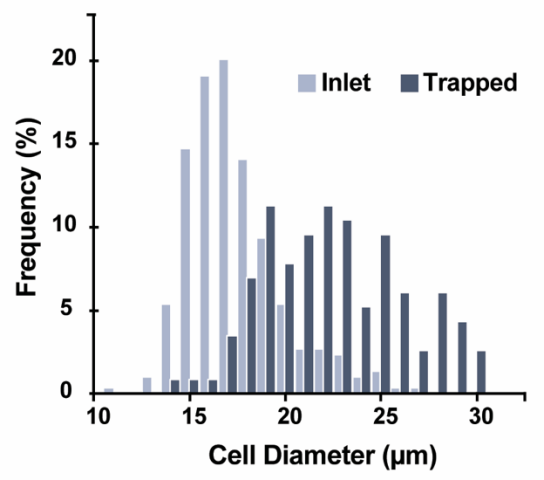

图 S2 器件入口处及涡旋捕获后的 MCF-7细胞直径分布。叠加的直方图显示了入口处（浅灰色）和涡旋捕获细胞（深灰色）的细胞尺寸分布，表明较大细胞得到了选择性富集。平均细胞直径从入口处的 16.9 ± 2.5 µm 增加到捕获后的 22.1 ± 3.6 µm。

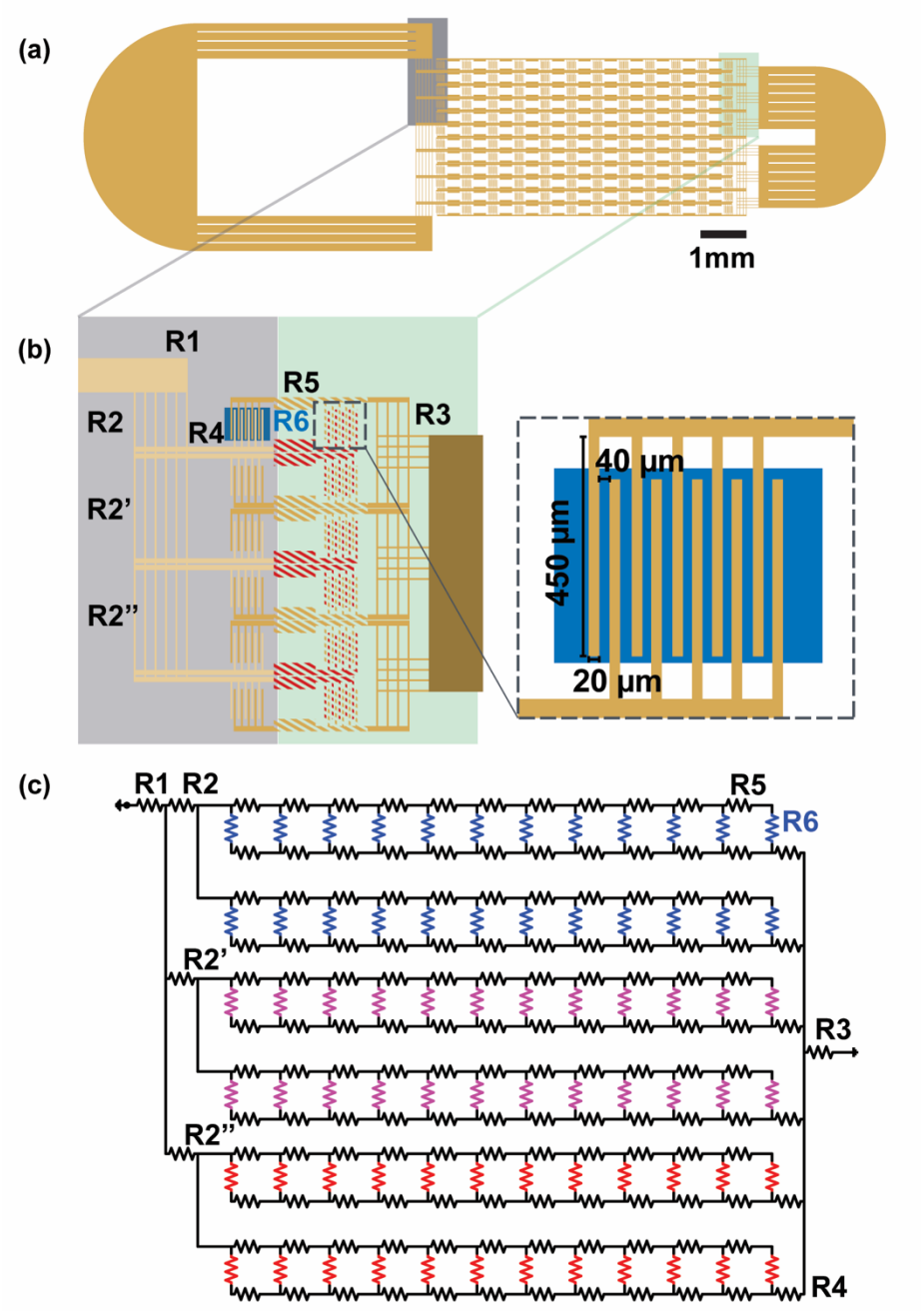

图 S.1.13：器件架构和电学建模示意图。 (a) 用于涡旋辅助电穿孔的图案化金电极布局的 CAD 渲染图，显示了整体电极几何形状和布线通路。虚线框标出了电穿孔腔室阵列。比例尺 = 1 mm。(b) 电极布局和布线架构的放大图。标记的电阻元件（R1–R6）对应于用于电路建模的不同电极和布线区域。各区域的几何尺寸和电阻值汇总于**表 S2.1.1**。虚线框显示了单个电穿孔腔室的放大图，其中包含五对叉指电极，并标出了关键

所示几何尺寸。(c) 用于对电极阵列进行 SPICE 建模的等效电阻网络。各个电阻器分别代表几何形状不同的电极和布线段，颜色编码对应不同的电阻区域。由于器件对称性，两半部分具有相同的电阻行为，因此仅显示网络的上半部分。

名称 电阻器	组件	入口/出口	长度 *(μm)*	宽度 *(μm)*	*CS Area* *(μm2)*	*R (Ω)*	*# in* 并联	并联 电阻 *(Ω)*	总计 电阻
R1	E1	入口	15440	500	150	2.51	4	0.63	**0.63**
R2	E2	入口	760	20	6	3.09	6	0.52	**0.92**
R2'	E3	入口	2484	20	6	10.10	6	1.68	**2.09**
R2''	E4	入口	4280	20	6	17.41	6	2.90	**3.31**
	E1	中间区域	800	80	24	0.81	2	0.41	
R6	腔室	中间区域			*COMSOL* 仿真				**401.77**
R5	E1	出口	920	80	24	0.94	1	0.94	
	E2	出口	800	180	54	0.36	1	0.36	**1.30**
R4	E1	入口	800	80	24	0.81	1	0.81	
	E2	入口	451	20	6	1.83	4	0.46	**1.27**
R3	E1	出口	800	20	6	3.25	12	0.27	
	E2	出口	3080	500	150	0.50	12	0.04	**0.31**

常数			
	电阻率	*0.0244*	*[Ω*μm]*
	厚度	*0.3*	*μm*

表 S1： 涡旋辅助电穿孔器件 SPICE 建模的电阻参数。根据 CAD 设计提取了图 S2.1.1 中与电阻器 R1–R6 对应的电极和布线区域的几何尺寸，并使用金的电阻率（0.0244 Ω·μm）和 0.3 μm 的沉积电极厚度将其转换为电阻值。电阻计算考虑了线段长度、宽度、横截面积和并联电路配置。根据电路拓扑组合各个电阻，以确定每个器件区域的有效电阻。电穿孔腔室电阻（R6）通过 COMSOL 有限元仿真获得。这些参数用于基于 SPICE 的电压分布和电场均匀性建模。

E1–E4 表示电极区域；CS面积，横截面积；并联数量，并联电阻元件的数量；并联电阻，并联等效电阻。

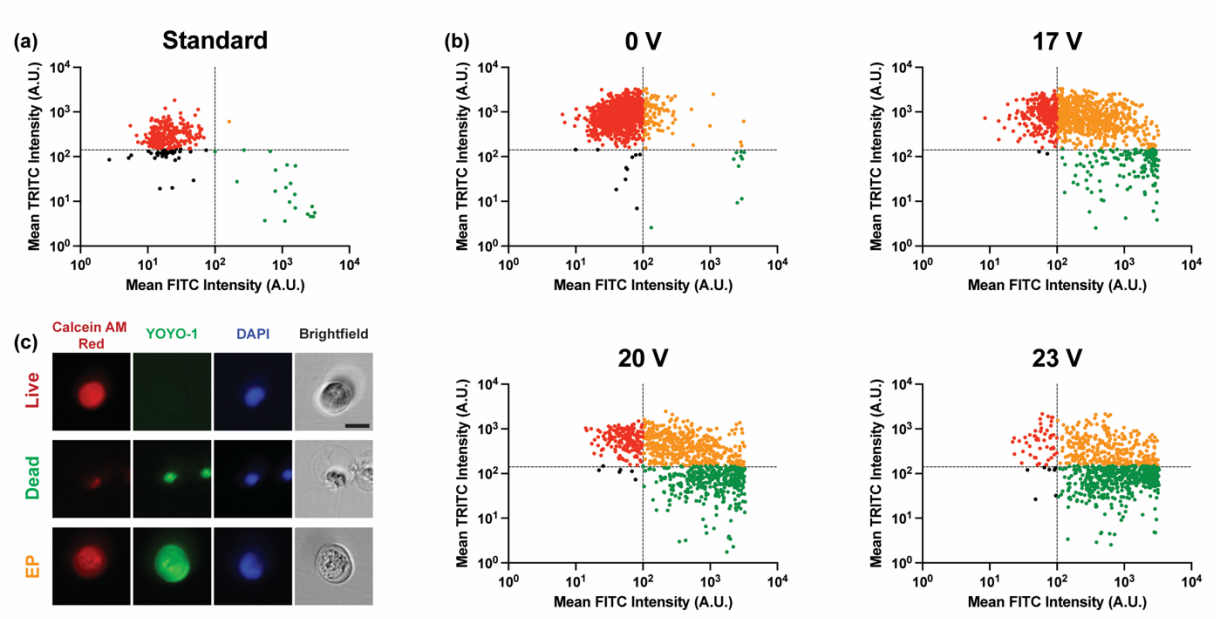

图 S4. 用于确定电穿孔效率的门控策略。 (a) 用于设定细胞活力和电穿孔状态荧光强度阈值的标准对照。为尽量减少假阳性分类，活力阈值（Calcein Red-AM，y轴）设为死细胞的最大荧光强度。电穿孔阈值（YOYO-1，x轴）的定义标准为：超过该值的存活对照细胞少于 1%。(b) 将标准化门控阈值应用于不同施加电压（0–23 V）下的电穿孔细胞群。颜色标示的亚群分别对应存活的非电穿孔细胞（红色）、存活的电穿孔细胞（橙色）以及因电穿孔诱导的膜损伤而死亡或裂解的细胞（绿色）。低于活力和电穿孔阈值的事件（黑色）不纳入效率计算。群体分布随电压发生的变化表明，在中等电压下出现最佳电穿孔条件。(c) 存活细胞、电穿孔细胞和死细胞的代表性荧光图像及明场图像，分别展示 Calcein Red-AM、YOYO-1、DAPI 和对应的明场通道。比例尺 = 20 µm。

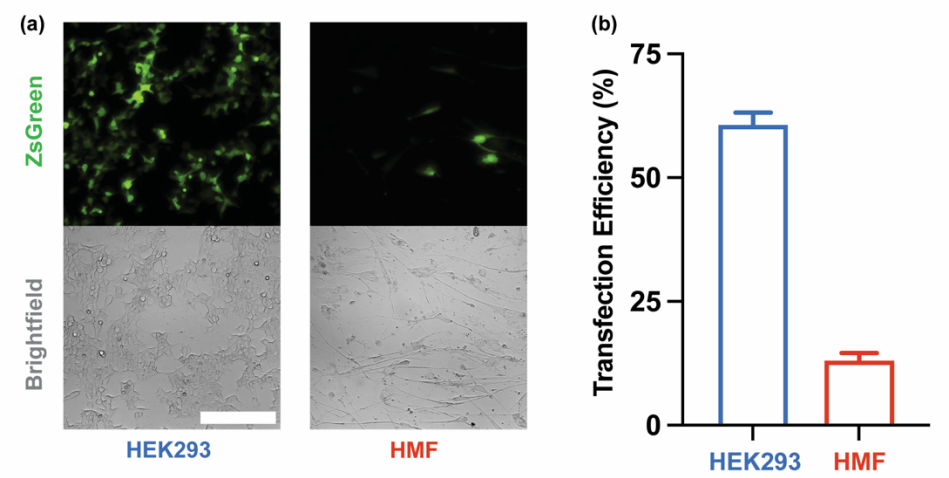

图 S5：永生化细胞和原代细胞中常规转染效率的比较。 (a) 使用常规化学转染试剂转染后 24 小时，HEK293（永生化）细胞和人乳腺成纤维细胞（HMF，原代）的代表性荧光（ZsGreen）及相应明场显微镜成像图。比例尺 = 100 µm。（b）转染后 24 小时转染效率的定量结果，计算方法为 ZsGreen 阳性细胞数占 DAPI 阳性细胞总数的比例。数据以均值 ± 均值标准误表示（n = 3；每个重复 >200 个细胞）。

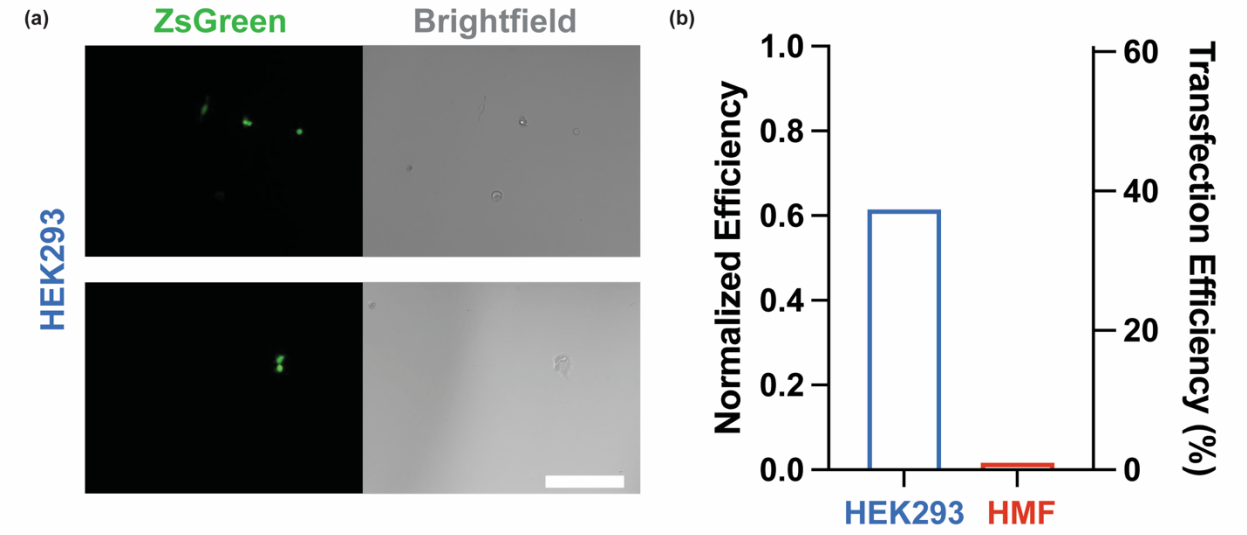

图 S6：永生化细胞和原代细胞中涡旋辅助电穿孔效率的比较。 (a) 在不含二甲基亚砜的杜氏磷酸盐缓冲液基础缓冲液中，通过基于器件的电穿孔处理 HEK293（永生化）细胞后的代表性荧光（ZsGreen）及相应明场显微镜成像图（质粒 50 µg/mL；输入电压 20 伏，频率 10 kHz，20 个脉冲）。图像采集于电穿孔后 24 小时。较低的表观细胞密度在

HEK293样本反映了与较小细胞大小相关的捕获效率降低。图中未显示 HFM（原代）细胞。比例尺 = 100 μm。(b) 在相同操作条件下，对比 HEK293 与 HMF细胞的电穿孔效率。左侧 y 轴显示归一化后的电穿孔效率，归一化基准为针对各细胞类型测得的 Lipofectamine 介导转染效率（图 S5），从而能够跨细胞类型比较递送性能。右侧 y 轴显示相应观测到的电穿孔转染效率。

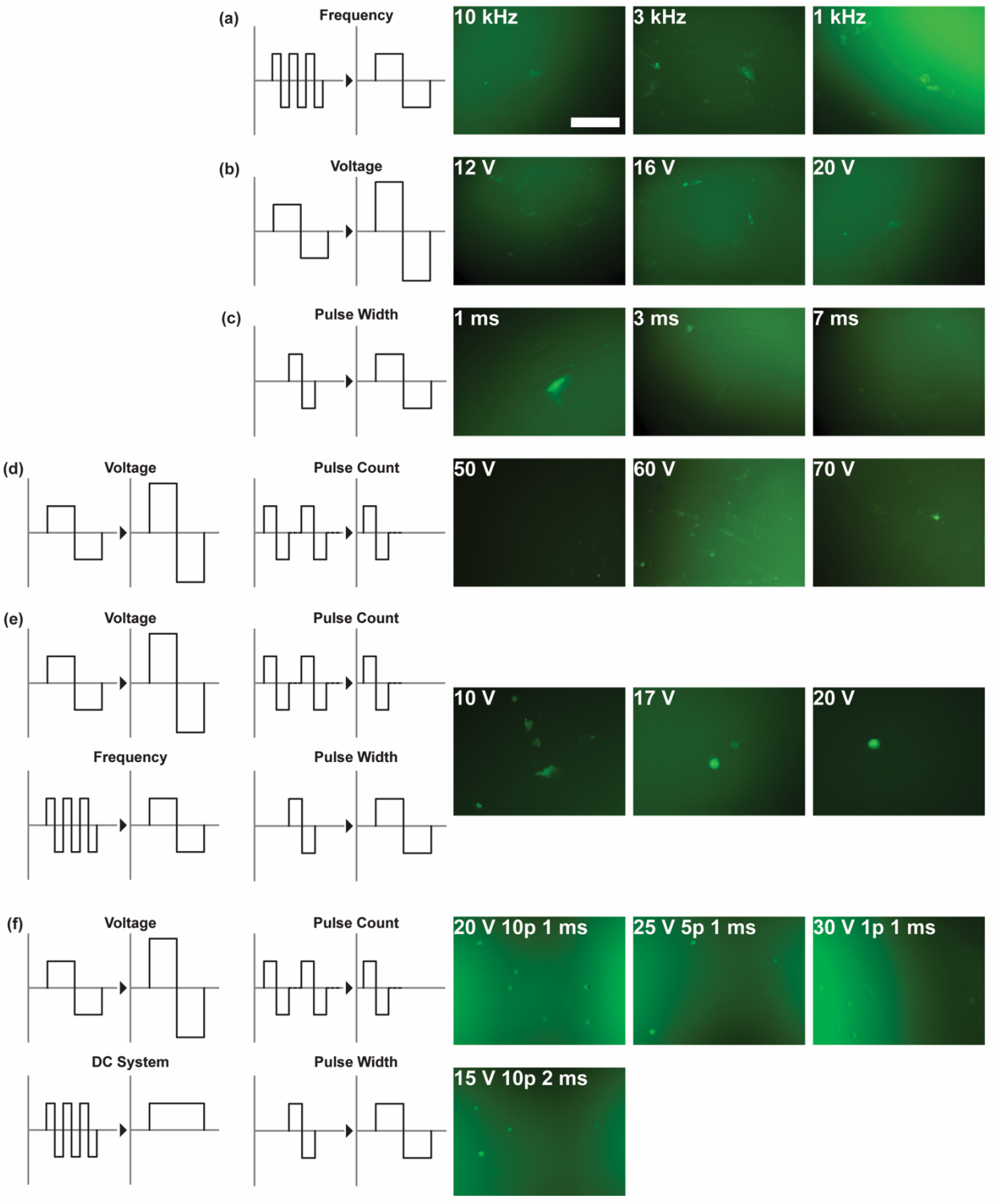

图 S7： 系统性电参数优化表明原代细胞中的转染效率不足。 示意波形（左）展示了各条件下改变的电学参数。除非另有说明，基础电穿孔参数为：以 20伏、10 kHz 施加 20 个脉宽为 1 ms 的交流方波脉冲，间隔 1 s

脉冲间隔。荧光显微镜图像（右）显示电穿孔后 72 h 采集的 HMF 细胞中 ZsGreen 的表达。术语说明：V，电压；kHz，千赫兹；p，脉冲次数。(a–c) 单参数优化实验，展示电穿孔结果随以下参数变化的情况：(a) 脉冲频率（10、3 和 1 kHz），(b) 电压幅值（12、16 和 20 伏），以及 (c) 脉冲宽度（1、3 和 7 ms）。(d) 双参数优化，将较高的电压幅值（50–70 V）与较少的脉冲次数（2 个脉冲）相结合，以减轻电极侵蚀。(e) 四参数多参数优化，综合调整电压、脉冲次数、频率和脉冲宽度。代表性条件（10、17 和 20 V）下的荧光强度持续偏低，尽管波形复杂度有所增加。(f) 使用直流电穿孔系统进行多参数优化。上排显示脉冲条件（20 V，10 个脉冲，1 ms；25 V，5 个脉冲，1 ms；30 V，1 个脉冲，1 ms），下排显示直流条件（15 V，100 个脉冲，2 ms）。

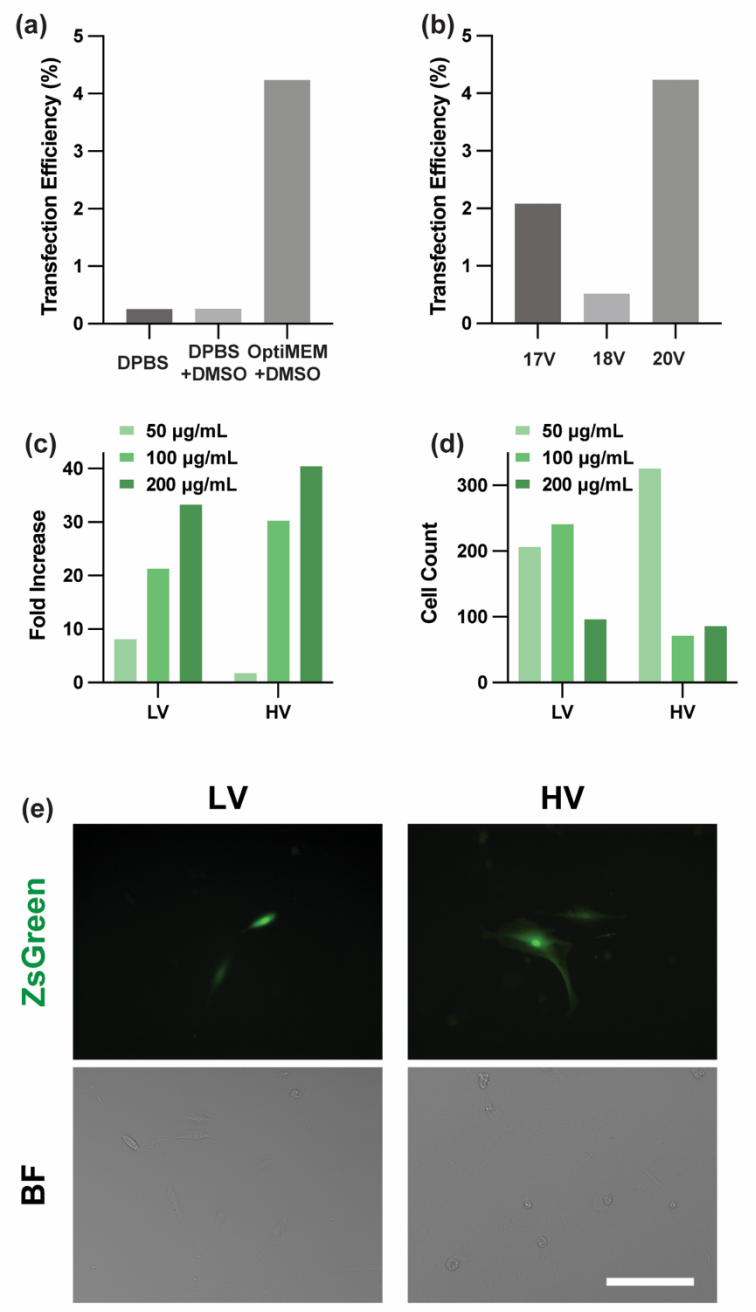

图 S8 原代细胞中质粒电穿孔的缓冲液和电压依赖性调控。(a) 使用 50 µg/mL 质粒时，20伏下 ZsGreen 质粒转染的绝对效率，比较杜氏磷酸盐缓冲液、杜氏磷酸盐缓冲液 + 二甲基亚砜和 Opti-MEM + 二甲基亚砜缓冲液配方。(b) 使用 Opti-MEM + 二甲基亚砜且质粒浓度固定为 50 µg/mL 时，ZsGreen 质粒转染效率随施加电压（17、18 和 20 V）的变化。(c) 在不同质粒浓度（50、100 和 200 µg/mL）下，低电压（LV）和高电压（HV）范围内相对于杜氏磷酸盐缓冲液 + 二甲基亚砜基线的转染效率倍数增加。(d) 与 (c) 所示低电压和高电压条件对应的细胞计数，显示出降低的

高电压下的恢复率。(e) 使用 200 μg/mL 质粒，在 LV 和 HV 条件下对 HMF细胞进行电穿孔后，具有代表性的荧光（ZsGreen）和对应的明场（BF）显微镜图像。HV 条件下观察到爆裂细胞发生率升高。比例尺 = 100 μm。

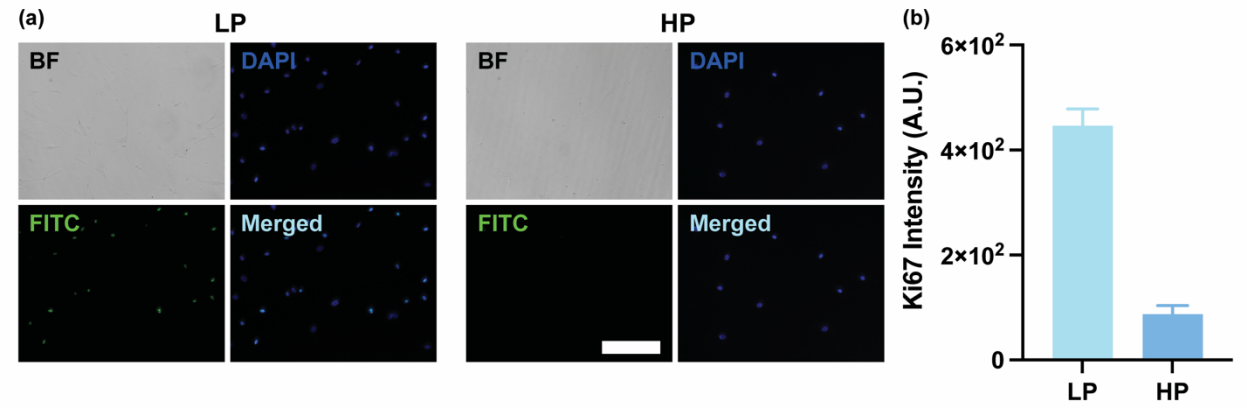

图 S9：低传代和高传代 HMF细胞中的 Ki67 表达。(a) 低传代（LP，左）和高传代（HP，右）人乳腺成纤维细胞（HMF细胞）中 Ki67 免疫染色的代表性明场（BF）和荧光显微镜图像。图中显示 DAPI核染色（蓝色）、Ki67 免疫荧光（FITC，绿色）和合并通道。比例尺 = 100 μm。(b) 每个细胞的 Ki67 荧光强度定量分析，结果显示 LP 细胞的增殖活性显著高于 HP HMF细胞。误差线表示均值 ± 均值标准误（每种条件下 >200 个细胞）。

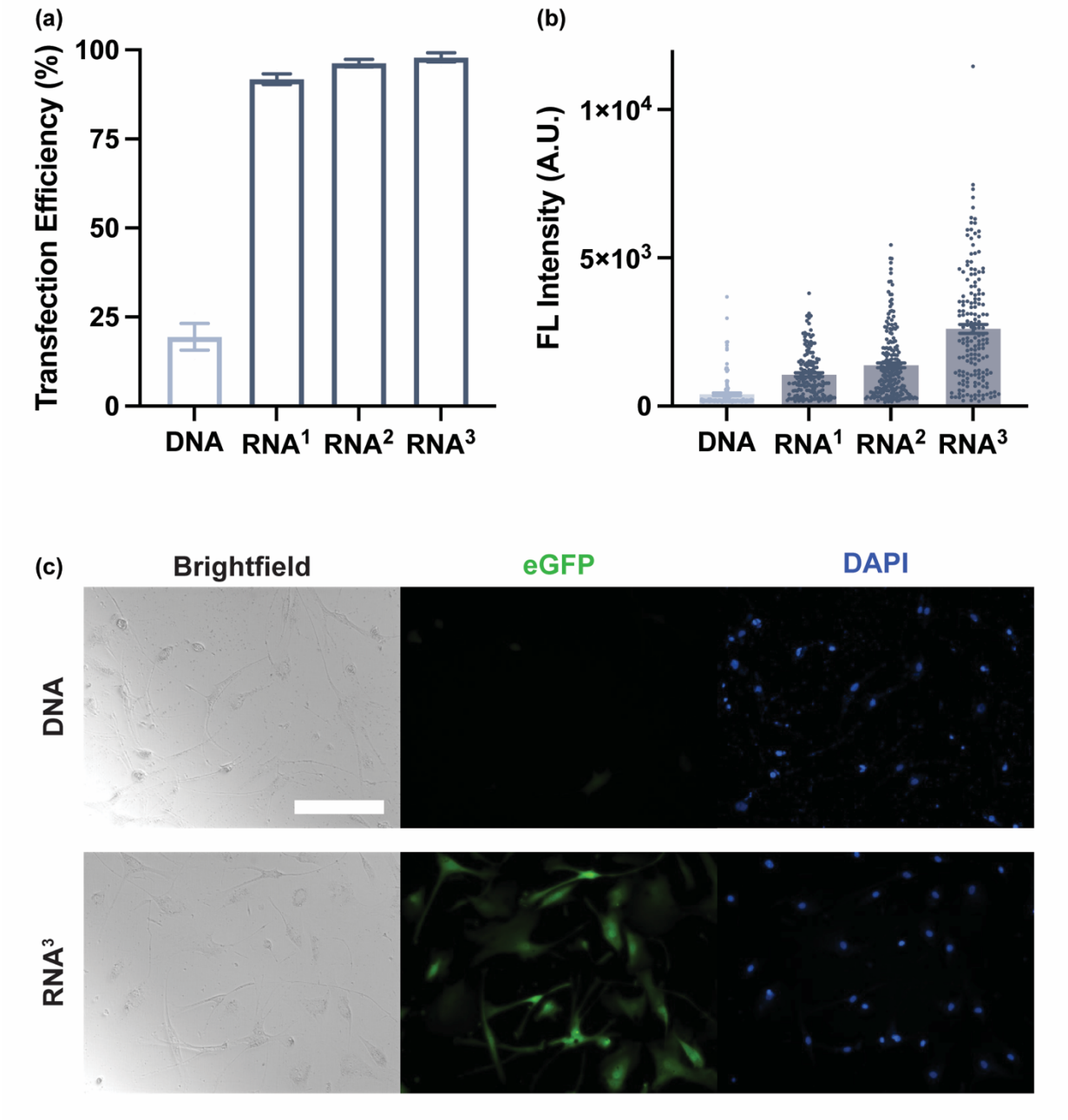

图 S10：使用常规试剂在原代 HMF 细胞中进行质粒 DNA 与信使 RNA 转染的比较。(a) 绿色荧光蛋白质粒 DNA 与三种绿色荧光蛋白信使 RNA 变体的转染效率比较：RNA1（ARCA 帽结构、N1-甲基假尿苷）、RNA2（CleanCap AG、5-甲氧基尿苷）和 RNA3（CleanCap AG、N1-甲基假尿苷）。信使 RNA 的命名分别表示帽类似物和尿苷修饰。误差线表示均值 ± 均值标准误（n = 3）。(b) 单细胞荧光强度分析显示，尽管不同载荷类型的转染效率相近，其表达水平仍存在差异。RNA3 在 HMF细胞中表现出最高的 eGFP表达，因此被选用于后续基于设备的 mRNA 电穿孔实验。误差线表示均值 ±

均值标准误（n > 150 细胞）。（c）使用特异于载荷的常规转染试剂，将增强型绿色荧光蛋白质粒DNA（DNA）或增强型绿色荧光蛋白信使 RNA（RNA3）转染至HMF细胞后的代表性明场和荧光显微镜图像。图像依次显示明场（左）、eGFP荧光（中）和DAPI核染色（右）。比例尺 = 100 μm。