

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Н. Домарацкий, Л. Н. Иванов. Общий подход к структурному построению оперативных статистических анализаторов.— *Автометрия*, 1975, № 2.
2. Р. Н. Вильданов, А. Н. Домарацкий, Л. Н. Иванов, В. А. Попов, А. Н. Смородинов, Ю. И. Юрлов. Многоцелевой статистический анализатор САДКО.— В кн.: *Уникальные приборы*. М., СЭВ, 1972, № 10.
3. А. Н. Домарацкий, Л. Н. Иванов, Е. Н. Карышев, В. А. Попов, А. И. Скурлатов, А. Н. Смородинов. Коррелятор. Авт. свид. № 292169.— *ОИПОТЗ*, 1971, № 4.
4. Р. Н. Вильданов, А. Н. Домарацкий, Л. Н. Иванов, В. А. Попов, А. Н. Смородинов, Ю. И. Юрлов. Выбор параметров алгоритмов прикладного статистического анализа.— *Автометрия*, 1971, № 1.

Поступила в редакцию 27 сентября 1974 г.

УДК 532.584; 615.471; 573.0 87.8

**Л. А. АНДРИАНОВ, М. А. АХМАМЕТЬЕВ, В. А. МЕЗЕНЦЕВ,
К. М. СОБОЛЕВСКИЙ, Е. В. ХИЖНЯК**

(Новосибирск)

ЦИФРОВОЙ КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИЙ СЧЕТЧИК МИКРОЧАСТИЦ

В связи с необходимостью автоматизации эксперимента во многих областях научных исследований (биологии, медицине, химии и др.) все чаще возникает потребность в автоматическом определении числа микрочастиц, содержащихся в единице объема (обычно в 1 см^3) тех или иных растворов. В частности, для автоматизации биофизических исследований перспективным оказалось [1, 2] использование кондуктометрического метода [3, 4], предложенного Каултером [5]. К сожалению, до последнего времени соответствующая серийная аппаратура в СССР не выпускалась. Поэтому в связи с исследованием клеток культуры ткани необходимую аппаратуру потребовалось изготовить в индивидуальном порядке. Однако имевшиеся в литературе сведения не были достаточными для практической реализации метода, и изготовление аппаратуры потребовало самостоятельной разработки ряда ее узлов. В результате выполненной работы создан компактный цифровой счетчик микрочастиц СМ-1, построенный с использованием транзисторов и микросхем. Ниже дана техническая характеристика созданного прибора* и рассмотрено устройство его основных узлов.

Основным назначением прибора СМ-1 является измерение концентрации клеток культуры ткани в условиях их культивирования, т. е. в средах, представляющих собой примерно однопроцентный раствор NaCl в воде с добавками питательных веществ. Прибор может быть использован также для измерения концентраций микрочастиц других типов, если выполняются те же условия измерения (а именно: микрочастицы находятся в однопроцентном растворе NaCl и их проводимость более чем на порядок отличается от проводимости раствора).

Прибор состоит из двух частей: устройства дозирования суспензии и устройства счета клеток. Первое из этих устройств предназначено

* Прибор СМ-1 демонстрировался на выставке «Сибирский прибор-73»; за разработку прибора авторскому коллективу присужден диплом Президиума СО АН СССР второй степени.

для протягивания суспензии через датчик и задания моментов начала и окончания процесса прохождения через датчик счетного объема суспензии. Второе устройство обеспечивает получение электрических импульсов, амплитуда которых прямо пропорциональна объему клеток, и задание порога ограничения импульсов с целью исключения из результата измерения тех клеток, объем которых меньше заданного, а также формирование и счет импульсов, амплитуда которых превышает порог ограничения.

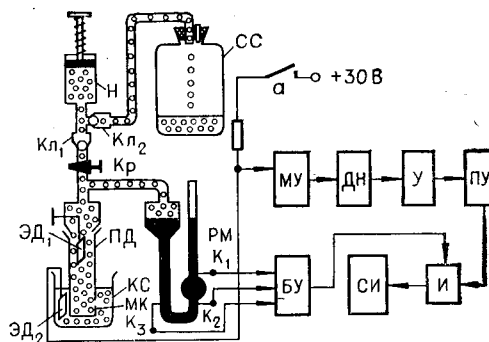


Рис. 1.

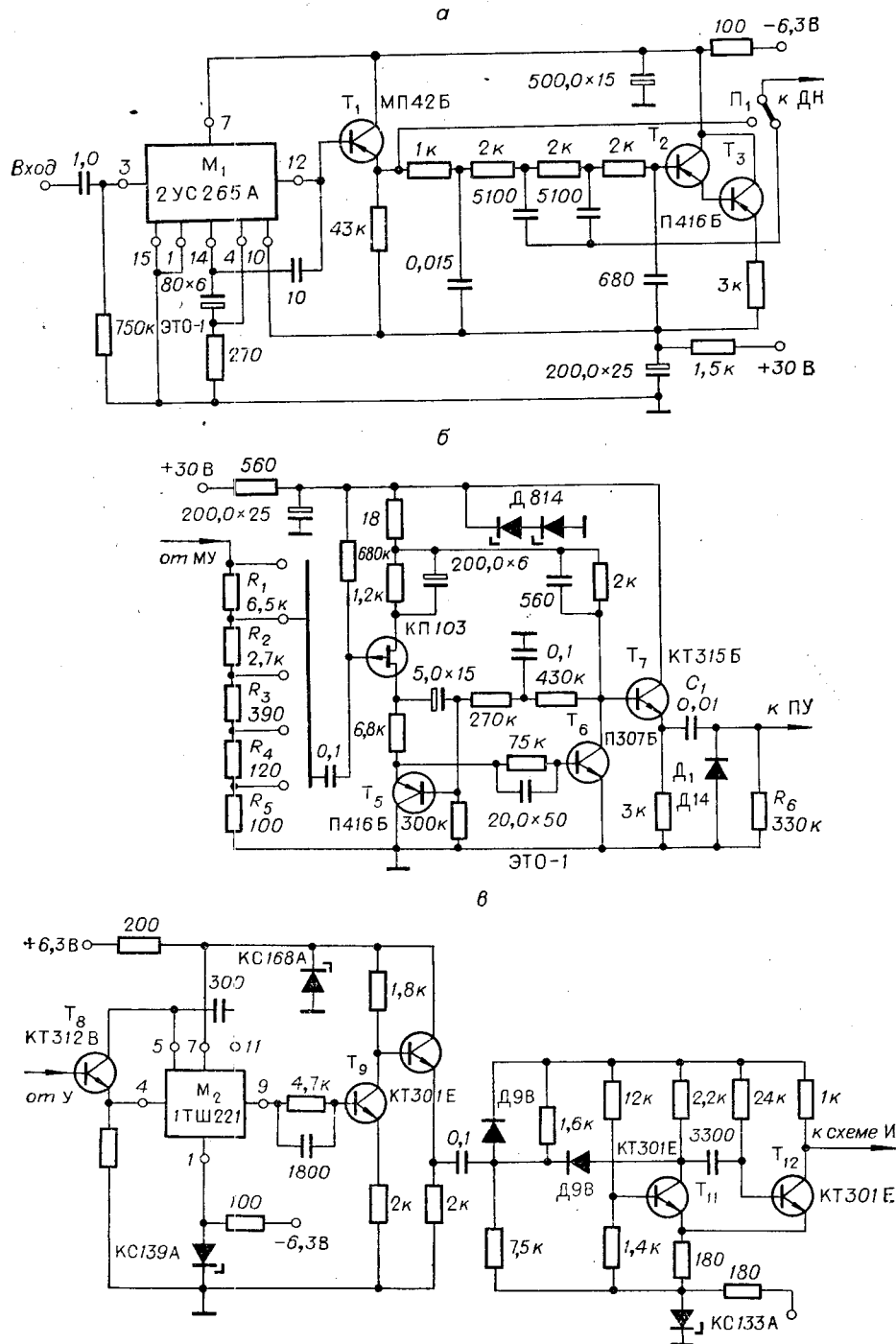
Устройство дозирования счетного объема суспензии (см. блок-схему прибора СМ-1 — рис. 1) состоит из пробирки датчика ПД, ртутного манометра РМ, крана Кр, насоса Н с впускным Кл₁ и выпускным Кл₂ клапанами и сливного сосуда СС. Пробирка датчика ПД имеет сверху шлифовое соединение, обеспечивающее быстрый съем и смену пробирок, а внизу микроканал МК, выполненный в виде впаянного в стекло часового камня типа СЦ 1015×0,2*. Боковое расположение микроканала уменьшает вероятность его засорения. Плоское дно пробирки обеспечивает возможность работы с малыми дозами исследуемых суспензий. Ртутный манометр, выполненный из стеклянного капилляра, имеет две сферические полости и три платиновых контакта К₁, К₂, К₃, используемых для управления счетчиком. Объем левой верхней полости составляет примерно 8 см³, а правой нижней полости — 1 см³. Ртуть в левом колене манометра, присоединенного к системе с помощью сферического шлифа, соприкасается с солевым раствором датчика, а в правом колене, оканчивающемся устройством защиты от прямого вытескивания ртути, — с воздухом. В качестве насоса использован стандартный шприц на 5 см³ с клапанами, которые соединяются с системой с помощью резиновых шлангов. Использование столь простого насоса стало возможным благодаря тому, что протягивание жидкости через микроканал в процессе измерения и собственно дозирование счетного объема осуществляются ртутным манометром, а насос служит только для приведения последнего в исходное состояние перед измерением.

Для подготовки прибора к измерению производится нажатие штока насоса Н — жидкость из внутренней полости насоса через клапан Кл₂ выталкивается в сливной сосуд СС. После отпущения шток с поршнем под действием пружины стремится вверх, клапан Кл₂ закрывается и во внутренней полости насоса создается разрежение. Кран Кр из позиции «Измерение» переводится в позицию «Подготовка» (кран открывается) и действие разрежения распространяется на ртутный манометр. Ртуть в левом колене манометра поднимается, заполняя верхнюю полость, а в правом колене — опускается, размыкая поочередно контакты К₁ и К₂. В момент размыкания контакта К₁ блок управления БУ подключает электрод датчика ЭД₂ к источнику питания +30В и через микроканал МК между электродами ЭД₁, ЭД₂ начинает течь ток. В момент замыкания контакта К₂ блок управления БУ вырабатывает сигнал «Сброс», который устанавливает цифровые индикаторы счетчика им-

* ГОСТ 7137-73. Камни часовые.

пульсов СИ в нулевое состояние, сигнализирующее о том, что «Подготовка» прибора к измерению закончена.

Режим измерения устанавливается переводом крана Кр из позиции «Подготовка» в позицию «Измерение»; при этом насос отключается от системы дозирования, а соединение внутренней полости датчика ПД с полостью манометра РМ сохраняется. Под действием силы, обу-



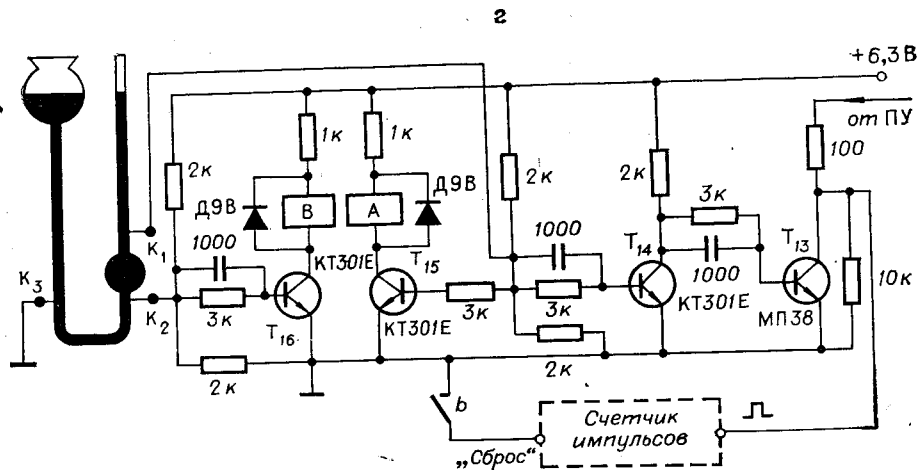


Рис. 2.

словленной разностью уровней ртути в манометре РМ (в нашем случае 100 ± 15 мм), суспензия с клетками всасывается в полость датчика через микроканал МК. Прохождение клетки через микроканал сопровождается изменением электрического сопротивления датчика и возникновением на его электродах ЭД₁, ЭД₂ импульса напряжения, амплитуда которого прямо пропорциональна объему клетки. При концентрации клеток в суспензии не более 10^4 кл/см³ можно считать, что клетки проходят через микроканал поочередно и каждый импульс соответствует одной клетке. Импульсы напряжения, поступающие с датчика на вход маломощного усилителя МУ, усиливаются в 100 раз и через делитель напряжения ДН и масштабный усилитель У подаются на вход порогового устройства ПУ. Пороговое устройство вырабатывает нормированный по амплитуде и длительности импульс всякий раз, как только амплитуда входного импульса превышает его порог. Выходные импульсы ПУ поступают на схему совпадений И, которая пропускает их на счетный вход счетчика импульсов СИ по сигналу с блока управления БУ. Счет импульсов начнется в момент, когда, поднимаясь, ртуть замкнет контакт К₂, и закончится, когда ртуть замкнет контакт К₁. Одновременно с замыканием К₁ блок управления выключает ток датчика. Если в системе дозирования нет воздуха, а этого можно добиться путем предварительного протягивания растворов без клеток, то счетный объем суспензии, прошедший через микроканал во время измерения, равен объему ртути, заключенному в полости манометра между контактами К₂ и К₁, с погрешностью не более 1%. Поскольку счетный объем равен 1 см³, то число, показываемое цифровыми индикаторами СИ, прямо дает концентрацию клеток в исследуемой суспензии.

В процессе эксплуатации счетчика СМ-1 в лабораторных условиях было установлено, что прибор успешно осуществляет подсчет различных клеток, в частности — нормальных эмбриональных фибробластов мыши, фибробластоподобных клеток линии L, эпителиальных клеток штамма МТР [6]. Нестабильность определения средней концентрации при пяти повторных измерениях для одной и той же суспензии не превышала 5%, а в большинстве случаев была меньше 1% (см. таблицу). Такая воспроизводимость результата измерения, полученная при использовании обычных методов разведения, когда ошибки разведения могут достигать нескольких процентов, является вполне приемлемой для контроля культур ткани.

Определение средних концентраций клеток в суспензиях различных культур по пяти повторным измерениям на приборе СМ-1

Клетки	Число измерений одной и той же суспензии	Среднее число клеток в 1 см ³ разбавленной суспензии (\bar{N})	Абсолютная случайная погрешность ($\sigma_{\bar{N}}$)	$\frac{\sigma_{\bar{N}}}{\bar{N}}$, %	Дата
Эмбриональные мышечные фибробласты	5	28 065	148	< 1	30.VI.72
	5	5488	24	< 1	13.VI.72
	5	45 850	215	< 1	13.VI.72
Клетки L-штамма	5	1 732	85	5	13.VI.72
	5	13 842	103	< 1	13.VI.72
	5	6 121	150	< 3	31.VII.72
Клетки штамма МТР	5	20 618	64	< 1	31.VII.72
	5	6 553	70	< 2	31.VII.72
	5	16 566	142	< 1	26.VII.72
	5	11 593	201	< 2	26.VII.72

Принципиальные электрические схемы основных узлов прибора приведены на рис. 2.

Входной малощумящий усилитель МУ, собранный на микросхеме M_1 [7] (см. рис. 2, а), имеет на выходе повторитель напряжения на транзисторе T_1 и активный фильтр низких частот, собранный на транзисторах T_2, T_3 [8]. Верхняя граничная частота среза (30 кГц) выбрана из условия неискажающей передачи фильтром входных колоколообразных импульсов [9] длительностью 40 мкс. В приборе предусмотрены два режима работы: с фильтром и без него, для чего имеется переключатель Π_1 . Фильтр ограничивает сверху полосу частот входного усилителя, улучшая соотношение сигнал/шум.

Делитель напряжения (ДН), обеспечивающий возможность оценки распределения клеток по объему, собран на резисторах R_1-R_5 (см. рис. 2, б). Он имеет на выходе пятипозиционный переключатель Π_2 для выбора требуемого коэффициента деления. Каждый из коэффициентов деления соответствует определенному граничному значению размера клеток, указывающему минимальный диаметр считаемых клеток. Шкала коэффициентов деления выбрана так, чтобы граничные размеры клеток отличались от наименьшего в 1,5; 2,5; 3,5 и 4,5 раза. Шкалу граничных размеров можно сдвигать в сторону меньших или больших размеров, изменяя размеры микроканала или ток датчика (в диапазоне 0,25—1 мА). Масштабный усилитель (У), собранный на транзисторах T_4-T_7 (см. рис. 2, б), подобен использованному в [1] и имеет на выходе такой же восстановитель нулевого уровня (на конденсаторе C_1 , диоде D_1 и резисторе R_6).

Пороговое устройство состоит (см. рис. 2, в) из триггера Шмитта, собранного на микросхеме M_2 и транзисторах T_8-T_{10} , и одновибратора, собранного на транзисторах T_{11}, T_{12} . Одновибратор формирует нормированные импульсы положительной полярности амплитудой 6В и длительностью 50 мкс.

Схема И, собранная на транзисторе T_{13} (см. рис. 2, г), управляется от инвертора, собранного на транзисторе T_{14} , который в свою очередь управляется контактом K_1 ртутного манометра. Транзисторы T_{15} и T_{16} в блоке управления (см. рис. 2, г) используются для возбуждения катушек А, В магнитоуправляемых контактов а (см. рис. 1) и б (см. рис. 2, г). Контакт а, замыкающийся при размыкании ртутного

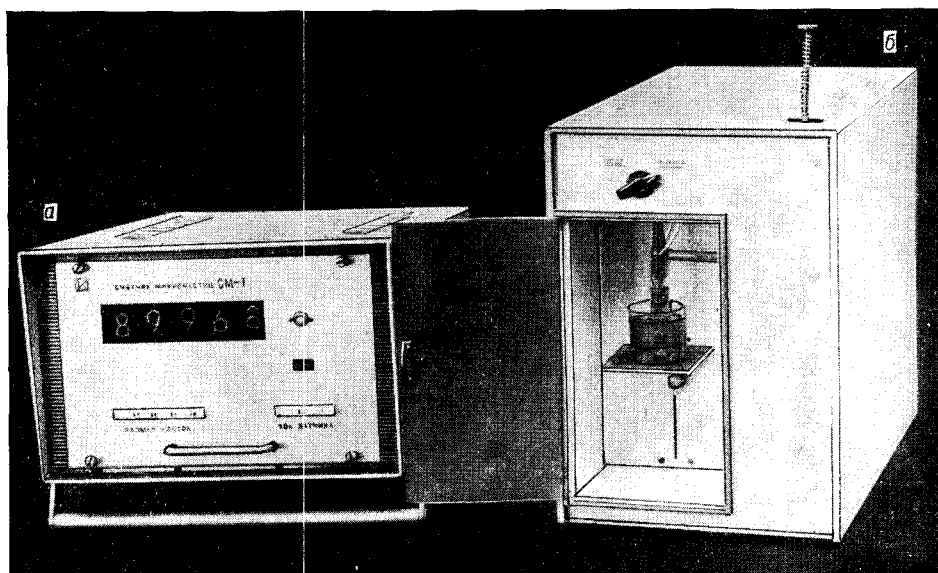


Рис. 3.

контакта K_1 , включает ток датчика. Контакт b , замыкающийся при размыкании ртутного контакта K_2 , сбрасывает показания цифровых индикаторов счетчика импульсов в нуль.

Стабилизированные источники питания прибора имеют коэффициент стабилизации 100 и пульсации менее 1 мВ.

В качестве счетчика импульсов (СИ) может быть использован любой пятидекадный счетчик, обеспечивающий требуемое быстродействие. В приборе СМ-1 счетчик собран на микросхемах серии 117.

Конструктивно прибор выполнен (рис. 3) в виде блока электроники (а) и блока дозирования (б), в котором наряду с устройством дозирования счетного объема и подвижным столиком для кюветы с суспензией расположен также входной малошумящий усилитель.

Технические характеристики прибора: диаметр микроканала 150 мкм; диаметры контролируемых клеток $10 \div 50$ мкм; счетный объем суспензии 1 см³; время одного измерения концентрации 20 с; допустимые концентрации клеток в суспензии не более 10^4 кл/см³; разброс показаний при многократных измерениях не более $\pm 5\%$; потребляемая мощность 30 ВА (220 В $\pm 10\%$, 50 Гц); габариты блока электроники $280 \times 180 \times 360$; вес прибора 15 кг.

Таким образом, прибор СМ-1 собран из доступных элементов и сравнительно прост в изготовлении: блок дозирования может быть изготовлен в любой стеклотрувной мастерской, а блок электроники — в радиотехнической лаборатории. Работоспособность прибора и удобство его применения подтверждены полуторагодовым использованием его в ИАЭ СО АН СССР при биофизических исследованиях культуры ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. А. Андрианов, М. А. Ахмаметьев, В. А. Мезенцев, К. М. Соболевский, Е. В. Хижняк. Об автоматическом измерении концентрации клеток в биологических суспензиях. — В кн.: Измерение комплексных проводимостей в физико-химическом эксперименте. Новосибирск, Изд. ИАЭ СО АН СССР, 1972.

2. Л. А. Андрианов, М. А. Ахмаметьев, Б. М. Мецгер, Е. В. Хижняк, М. И. Штокман. Использование спектра распределения клеток культуры ткани по объемам в изучении механизмов действия биологически активных соединений.— Препринт № 12. Новосибирск, Изд. ИАЭ СО АН СССР, 1973.
3. Ф. М. Рабинович. Кондуктометрический метод дисперсионного анализа. Л., «Химия», 1970.
4. Ф. М. Рабинович. Кондуктометрические счетчики частиц и их применение в медицине. М., «Медицина», 1972.
5. W. C. Coulter. US. Patent № 2565508, 1953.
6. Ю. М. Васильев, А. Г. Маленков. Клеточная поверхность и реакции клетки. Л., «Медицина», 1968.
7. В. С. Минаев, А. М. Рогалев, В. Г. Федорин, Я. В. Дементьев. Гибридно-плёночные усилители низкой частоты с высоким входным сопротивлением.— В кн.: Интегральные схемы. Вып. 1. Усилители низкой частоты серии 226 в микроисполнении. Новосибирск, «Наука», 1972.
8. П. А. Ветчинов, В. И. Титков. Об одной схеме коррекции трехзвенного активного фильтра на основе повторителя напряжения.— В кн.: Измерение комплексных проводимостей в физико-химическом эксперименте. Новосибирск, Изд. ИАЭ СО АН СССР, 1972.
9. Я. С. Ицхоки. Импульсные устройства. М., «Советское радио», 1959.

Поступила в редакцию 17 июня 1974 г.
