

# 一步成形法制备单细胞培养芯片

叶芳<sup>1,2</sup>, 何美莹<sup>1,2</sup>, 谢晋<sup>3</sup>, 谢丽<sup>4,5</sup>, 常洪龙<sup>1,2</sup>, 苑伟政<sup>1,2</sup>

(1.西北工业大学 机电学院, 陕西 西安 710072; 2.空天微纳系统教育部重点实验室, 陕西 西安 710072;  
3.中国工程物理研究院电子工程研究所, 四川 绵阳 621000; 4.西北工业大学 生命学院, 陕西 西安 710072;  
5.空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 陕西 西安 710072)

**摘要:**越来越多的生物学研究聚焦在单细胞层面,然而现有基于化学表面修饰的单细胞定位培养芯片存在制备工艺复杂,且细胞定位层图形质量较差影响细胞定位效果的问题。为此,提出一种一步成形的办法,利用聚甲基丙烯酸2-羟乙酯(poly 2-hydroxyethyl methacrylate, PolyHEMA)抑制细胞粘附的特性并结合毛细微模塑技术制备芯片。细胞验证结果表明,该芯片具有制备过程简单,图形完整性和稳定性良好的特点,为基于单细胞的生物学研究提供了一种新方法。

**关键词:**单细胞培养;图形化;毛细微模塑技术;PolyHEMA

**中图分类号:**Q658

**文献标志码:**A

**文章编号:**1000-2758(2018)01-0132-07

细胞是构成有机体的基本单位,针对单细胞的研究对于有机体的生长发育、遗传信息的传递、以及组织工程、再生医学等,有着至关重要的作用。在单细胞层面研究细胞样品时,细胞的实际响应,特别是细胞的一些微弱响应,可以实现准确表征<sup>[1]</sup>。在传统的细胞生物学研究中,以培养皿为培养工具,得到的数据为组群的平均值,无法满足单细胞研究的需要。随着微机电系统(MEMS)技术的出现,使得单细胞培养成为可能。细胞定位培养是目前MEMS技术应用于细胞研究的核心内容之一。其基本出发点是将所研究的细胞限制在特定的空间位置上,从而在某种水平上实现人们控制细胞生长,甚至以单细胞为研究对象的愿望。由于定位培养芯片能够控制细胞的位置,因此被认为是理解细胞功能的强有力工具。

目前应用比较多的一类实现单细胞培养的方法是化学表面修饰,即在芯片表面上形成促进细胞粘附的“亲细胞”区域和抑制细胞粘附的“斥细胞”区域。细胞定位培养效果主要取决于芯片表面化学材料薄膜所形成图形的质量。微接触压印技术(microcontact printing,  $\mu$ CP)是使用较为广泛的一类化

学表面修饰方法<sup>[2-3]</sup>,微接触压印的过程类似于盖章的过程,所不同的是它由表面具有凹凸图形的弹性模具充当“印章”,用具有自组装性质的高分子化合物、蛋白质、凝胶等充当“印泥”<sup>[4]</sup>。由于在压印时施力的方向和大小难以精确控制,实验过程受人为因素影响较多,导致实验的可重复性降低。为解决该问题,人们采用毛细微模塑技术(micromolding in capillary, MIMIC)制备单细胞培养芯片:带沟槽的聚二甲基硅氧烷(poly-dimethylsiloxane, PDMS)模板与基底贴合形成微通道,再将填充液体置于微通道的入口处,液体在毛细力的作用下自发地填充微通道,待液态填充物干燥或固化后,将PDMS模版移去,即可得到微图形。与微接触压印技术相比,该方法的优点是在填充液体确定的情况下,溶液的填充效果一致性较好,片间差异小;对于实验操作人员的相关经验要求较少,成本较低。韩国忠南大学的Lee教授等人以聚电解质(polyelectrolyte, PEL)为芯片基底,分别采用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)/聚丙交酯(poly lactide, PLA)、琼脂糖作为填充材料,制备得到包含PEG/PEL<sup>[5]</sup>和琼脂糖/PEL<sup>[6]</sup>的“亲细胞”/“斥细胞”图形交替细胞定位培

收稿日期:2017-05-12

基金项目:国家自然科学基金(51375398)、国家重大仪器设备开发专项(2013YQ190467)、111引智项目(B13044)以及陕西省科技统筹创新工程重点实验室项目资助

作者简介:叶芳(1969—),女,西北工业大学副教授、博士,主要从事生物微机电系统及生物芯片技术研究。

养芯片。基底材料需要将聚烯丙基胺盐酸盐 (polyallylamine hydrochloride, PAH) 和聚苯乙烯磺酸盐铵盐 (polystyrene sulfonate ammonium salt, PSS) 2 种材料依次包被 PEL 表面, 因而制备过程复杂。德国洛约拉马利蒙特大学的 Radler 教授等人<sup>[7]</sup> 制备出聚乙二醇/聚苯乙烯 (polyethylene glycol-Polystyrene, PEG/PS) 细胞定位培养芯片, 由于聚乙二醇需要进行紫外固化处理, 造成工艺复杂, 图形质量难以保证, 细胞定位率降低。

针对以上问题, 本文提出采用抑制细胞粘附的材料——聚甲基丙烯酸 2-羟乙酯 (Poly 2-hydroxyethyl methacrylate, PolyHEMA) 与 MIMIC 技术相结合制备 PolyHEMA/玻璃单细胞定位培养芯片。采用玻璃作为基底亲细胞材料结合 PolyHEMA 的斥细胞材料, 这些商业化材料容易获得且使用广泛, 芯片制备一步成形, 大大减小了由于制备工艺复杂造成的片间差异, 提高了后续实验的可重复性。本文拟在对毛细理论进行分析的基础上, 着重研究图形完整性和稳定性影响因素, 最终得到定位效果良好的单细胞培养芯片。

## 1 材料与方法

图 1 所示为一步成形法制备的单细胞培养芯片结构示意图。其中的“亲细胞”区域为玻璃, “斥细胞”区域为利用毛细微塑技术制备的 PolyHEMA 图形。本文将着重围绕决定 PolyHEMA 微图形质量的关键因素——微图形尺寸以及图形的完整性和稳定性等方面进行讨论。

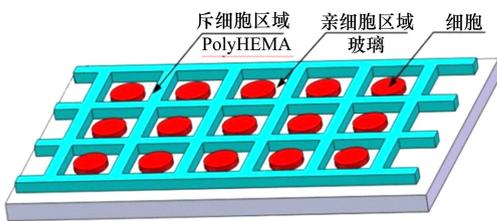


图 1 PolyHEMA-玻璃单细胞定位培养芯片结构示意图

### 1.1 PolyHEMA 微图形设计

PolyHEMA 的化学式为  $(C_6H_{10}O_3)_n$ , 溶于乙醇, 饱和溶解度为 120 mg/mL。它在强酸 (或强碱) 的条件下, 可以发生水解反应, 生成链状羧酸 (或羧酸盐) 和乙二醇。而培养液的 PH 值为 7.2~7.4, 其中的主要物质是氨基酸, 既含有羧基 (呈弱酸性) 又含

有氨基 (呈弱碱性), 因此, PolyHEMA 在细胞定位培养液中, 不会发生水解反应而变质。PolyHEMA 常温下是一种白色粉末状的高分子聚合物, 具有溶胀性和良好的生物兼容性, PolyHEMA 水凝胶可以用于制作隐形眼镜和三维支架等。在常规细胞培养板表面包被一定厚度的 PolyHEMA, 相比于未包被的细胞培养板, 细胞的铺展面积变小, 粘附性变差<sup>[8]</sup>, 表明 PolyHEMA 具有抑制细胞粘附的特性。

采用化学修饰实现细胞定位培养的关键在于“亲细胞”/“斥细胞”图形的质量。为了得到高质量的连续图形, 将带有凹槽结构的 PDMS 贴附在玻璃共同构成微米级毛细通道。当液体被施加到通道入口时, 将自发地沿着通道流动, 这种现象可以用固-液-气界面系统的能量转换来解释。在界面上, 总的界面系统能量表示如下:

$$U_T = A_{sl}\gamma_{sl} + A_{sa}\gamma_{sa} + A_{la}\gamma_{la} \quad (1)$$

式中,  $A_{sl}, A_{sa}, A_{la}$  是固-液, 固-气和液-气的面积;  $\gamma_{sl}, \gamma_{sa}, \gamma_{la}$  是相对应的单位表面自由能。

根据 Young 方程, 表面自由能有以下的关系:

$$\gamma_{sa} = \gamma_{sl} + \gamma_{la} \cos\theta_c \quad (2)$$

式中,  $\theta_c$  是液体的平衡接触角;  $U_0$  是常数。

系统总的自由能是引入液体体积的函数。弯曲液面的附加压强由下式给出:

$$P = \frac{dU_l}{dV_l} = \gamma_{la} \left( \cos\theta_c \frac{dA_{sl}}{dV_l} - \frac{dA_{la}}{dV_l} \right) \quad (3)$$

当  $P$  是正值时, 毛细驱动压力将推动液体向前流动; 而当  $P$  是负值时, 毛细驱动压力将阻止液体流动。在矩形微通道中, 液-气界面的毛细驱动压力  $P^{[9,10]}$  可由方程 (3) 来推导, 得:

$$P = \gamma \cdot \left[ \frac{\cos\theta_b + \cos\theta_l}{h} + \frac{\cos\theta_l + \cos\theta_r}{w} \right] \quad (4)$$

式中,  $\gamma$  是液体的表面张力;  $\theta_b, \theta_l, \theta_r$  是液体在微通道底壁、顶壁、左壁和右壁各自的静态接触角,  $\theta_b = \theta_r = \theta_l = \theta_{PDMS}$ ;  $h$  和  $w$  是微通道截面的高度和宽度。

若侧面静态接触角小于  $90^\circ$ , 即  $0^\circ < \theta_{PDMS} < 90^\circ$ , 矩形截面的 PDMS-玻璃微通道发生毛细填充的条件是:

$$\frac{h}{w} > - \frac{\cos\theta_{PDMS} + \cos\theta_{glass}}{2\cos\theta_{PDMS}} \quad (5)$$

若侧面静态接触角大于  $90^\circ$  即  $\theta_{PDMS} > 90^\circ$ , 矩形截面的 PDMS-玻璃微通道发生毛细填充的条件是:

$$\frac{h}{w} > -\frac{\cos\theta_{\text{PDMS}} + \cos\theta_{\text{glass}}}{2\cos\theta_{\text{PDMS}}} \quad (6)$$

根据 Takashi 等人的研究数据可知,以乙醇作为填充溶液时,PDMS 表面的乙醇接触角为  $25^\circ$ <sup>[11]</sup>,玻璃表面乙醇接触角接近  $0^\circ$ 。侧壁静态接触角,即 PDMS 的乙醇接触角,小于  $90^\circ$ ,将具体数值代入公式(6),得

$$\frac{h}{w} > -\frac{\cos\theta_{\text{PDMS}} + \cos\theta_{\text{glass}}}{2\cos\theta_{\text{PDMS}}} = \frac{\cos 25^\circ + \cos 0^\circ}{2\cos 25^\circ} = -1.004 \quad (7)$$

(7)式的计算结果说明,乙醇填充 PDMS-玻璃微通道时,毛细微通道的宽高比不影响毛细作用。但是,PolyHEMA 乙醇溶液不同于纯乙醇,参考邓永波等人的研究<sup>[12]</sup>,为了得到理想的毛细填充效果,将微通道的高度和宽度比限制在 1 以内。本文选取宽高比为 0.25 进行研究。

## 2.2 细胞培养芯片制备工艺设计

本文采用标准电感耦合等离子体刻蚀 (inductively coupled plasma etch, ICP 刻蚀) 制备具有图案的硅模板,制备工艺如图 2a) 所示。利用复制模塑技术将硅模板上的图案转移至 PDMS 上,形成 PDMS 模板。如图 2b) 所示,将分割好的 PDMS 模板有微图案的一面轻轻放置在准备好的玻璃片上,静置一段时间以使两表面之间的气体排出,形成用于毛细填充的微通道。用微量移液器吸取一定量填充物溶液,滴加在微通道入口处,在毛细力的作用下,溶液会自发的快速填充微通道。待乙醇从 Poly-HEMA/乙醇溶液中完全挥发,在微通道中留下固态的 PolyHEMA,剥离 PDMS 模板后得到芯片。

而良好的规约能力依赖于图形的完整性。图形完整性要求尽可能小的图形漂移以及尽可能小的图形畸变<sup>[13]</sup>。本文将从填充溶液浓度以及微通道尺寸两方面研究图形的完整性。

溶液的浓度决定了溶液的粘度,从而影响毛细填充的速率。George 等人<sup>[14]</sup>在研究毛细填充现象中提出毛细填充的速率与黏度负相关。为了保证毛细填充的速率,毛细填充中常用的是低黏度(黏度  $< 0.3 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ) 的液体。由于旋转柱体法特别适用于粗分散体系液体黏度测量,本文选用旋转柱体法测量  $50 \text{ mg/mL}$ 、 $70 \text{ mg/mL}$  和  $90 \text{ mg/mL}$  的 PolyHEMA/乙醇溶液黏度,并分别进行毛细填充的实验,待图形完全干燥后,对图形进行完整程度对比,采用台阶仪对厚度进行测量。

完整、连续的微图形需要合理的微通道尺寸。为此本文研究了毛细填充的长度与微通道尺寸的关系,即毛细填充的动力学特性。

本文涉及的毛细微模塑过程为水平毛细填充,填充液体的重力及惯性力对液体在毛细管内的流动几乎不起作用,而液体的毛细驱动力和黏性阻力对液体的流动起到支配作用,所以参照竖直毛细现象的 3 个上升阶段的划分,水平毛细流动属于稳定的层流流动,所以采用描述圆管内黏性不可压缩流体的定常层流流动的 Hagen-Poiseuille 方程来计算液体的前进速率和填充长度<sup>[15]</sup>。其中,液体的前进速率可表示为:

$$\frac{dl}{dt} = \frac{\sum P}{8R^2\eta l} (R^4 + 4\epsilon R^3) = \frac{\gamma \cos\theta}{4\eta l} (R + 4\epsilon) \quad (8)$$

式中,  $\sum P$  是总有效驱动压力,包括非平衡大气压  $P_A$  ( $P_A = 0$ )、静水压力  $P_h$  ( $P_h = 0$ ) 和毛细压力  $P_c$  ( $P_c = 2\gamma \cos\theta/R$ )/Pa; $\eta$  是液体的黏度/Pa·s; $R$  是圆管半径/m,若为矩形截面,则等效半径  $R = bh/(b+h)$ ;  $l$  是圆管内液体已填充长度/m; $\theta$  是静态接触角,与壁面材料相关/ $^\circ$ ; $\epsilon$  是速度滑移系数。

可以看出,当壁面材料不同时,毛细通道内液体的前进速率和填充长度都有所不同,但是毛细通道内液体的前进速率均与毛细通道的等效半径正相关,与已填充长度负相关;液体的填充长度均与毛细通道的等效半径正相关。

## 2.4 图形稳定性研究

由于体外细胞培养是通过培养基这种液体环境,使细胞从中得到生长、增殖所需的氨基酸、维生

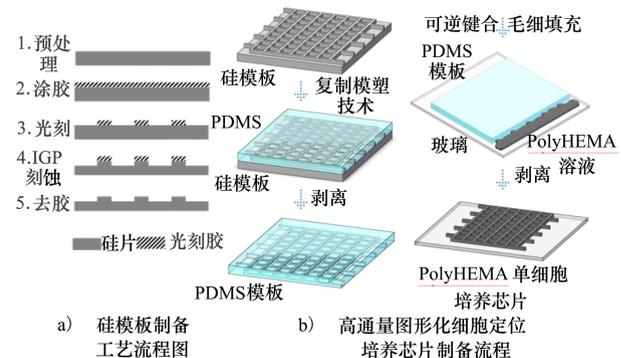


图 2 芯片制备工艺流程图

## 2.3 图形完整性研究

细胞定位效果取决于图形对细胞的规约能力,

素、糖类等营养物质,所以 PolyHEMA 微结构将在 37℃ 的培养基中浸泡 48 h 以上。能否在培养液中继续保持良好的 PolyHEMA 图形形状对于保持图形抗细胞粘附能力,从而保证细胞定位培养的成功至关重要。

由于 PolyHEMA 具有溶胀特性,因此 PolyHEMA 薄膜厚度是决定图形稳定性的重要因素之一。结合所选取的细胞研究对象,确定微井尺寸为 50  $\mu\text{m}$ ;结合 2.1 小节的分析结果,确定微通道的深宽比为 0.25,设计 3 组芯片通道尺寸(如表 1 所示)进行稳定性实验:利用细胞培养液进行浸泡实验,相同时间间隔记录细胞定位培养芯片图形的尺寸,对比不同 PolyHEMA 薄膜厚度下图形失真的情况。

表 1 稳定性实验所采用的微通道结构参数 单位:  $\mu\text{m}$

组号	微通道宽度 $b$	微通道高度 $h$
1	20	5
2	40	10
3	60	15

PolyHEMA 图形与基底表面之间结合的强度是决定图形稳定性的另一个重要因素。针对基底材料的表面预处理可以增加 PolyHEMA 与基底间的结合强度。本文采用玻璃表面的亲水处理进行表面改性,即采用铬酸洗液浸泡玻璃基底 24 h 以上,然后将基底改性前与改性后的芯片分别进行浸泡实验,以对比改性效果。

图形形状对于图形稳定性同样重要。正方形的微井 4 个尖角处由于尺寸突变,存在应力集中现象,所以当细胞培养时间较长时,变形量较大的是尖角处,容易导致图形的失效。宏观机械中改善应力集中的措施包括避免尖角(尖角被圆角或过渡圆角代替)、改善零件外形(曲率半径逐步变化的外形)等。为了改善微图形尖角的应力集中现象,本文选用避免尖角的方法。PolyHEMA 图形形状的设计如图 3 所示,圆角不断变大( $R=0 \mu\text{m}$ ;  $R=5 \mu\text{m}$ ;  $R=10 \mu\text{m}$ ;  $R=15 \mu\text{m}$ ;  $R=20 \mu\text{m}$ ;  $R=25 \mu\text{m}$ ),正方形逐渐被圆形代替,制备得到芯片后,采用细胞培养液浸泡的方式研究长期培养的细胞定位培养芯片图形的稳定性。

## 2.5 芯片性能细胞培养实验验证

为了验证芯片图形对细胞的规约能力,采用贴壁生长的小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 来进行细胞实

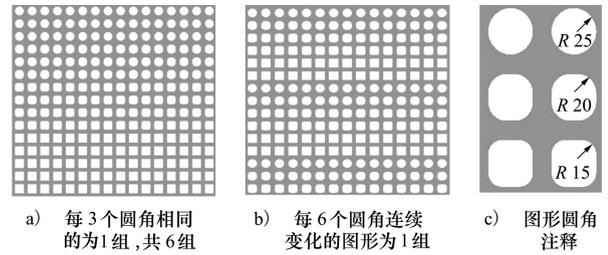


图 3 研究 PolyHEMA 图形形状对图形稳定性影响的芯片图形设计

验,将细胞在芯片上培养 48 h 并进行固定和免疫荧光染色。

小鼠成骨细胞在含有 10% 胎牛血清(四季青)、1% 青霉素-链霉素混合溶液(invitrogn) 1% 谷氨酰胺溶液的  $\alpha$ -MEM 培养基(hyclone)于 37℃、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。消化细胞采用 0.25% 胰蛋白酶(invitrogn)约 3 min,使用离心机在 1 000 r/min,10 min 收集细胞。细胞接种前采用 60Co 灭菌并且在三蒸水中浸泡 24 h 以上。将细胞接种芯片样品中。在恒温培养箱中培养 48 h 后,用显微镜观察并记录细胞生长状态。

采用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min。0.1% Triton X-100 穿孔以提高细胞通透性。加入鬼笔环肽-FITC(5mg/ml, sigma),使用 Hoechst33258(2 mg/ml, sigma)复染细胞核。使用荧光倒置显微镜观察并拍摄照片,并利用 Image Pro Plus 进行数据处理。

## 3 结果与讨论

### 3.1 填充溶液浓度对图形完整性的影响

Shim 等人<sup>[11]</sup>的研究证实,  $6.5 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$  (25℃) PEG-DMA 溶液由于低黏度能快速挤出微通道内的空气,完成毛细填充。本文采用旋柱法测得室温(25℃)条件下,浓度为 50 mg/mL 的 PolyHEMA 乙醇溶液黏度为  $2.1 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ,浓度为 70 mg/mL 的 PolyHEMA 乙醇溶液黏度为  $6.6 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 。参考 Shim 等人的研究结果可知,50 mg/mL 的 PolyHEMA 乙醇溶液的黏度相比于 PEG-DMA 溶液的  $6.5 \times 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ,溶液黏度较小,故毛细填充的速率更快,更易实现毛细通道的完整填充。

PolyHEMA 膜厚越厚,越有利于图形的稳定以及抑制细胞的粘附<sup>[16]</sup>。在 50 mg/mL, 70 mg/mL, 90

mg/mL 3 种浓度的对比实验中,浓度的变化引起 PolyHEMA 微结构厚度的变化,实验结果如图 4 所示。

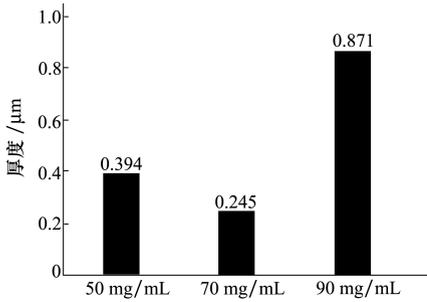


图 4 PolyHEMA/乙醇溶液浓度对微结构厚度 ( $\mu\text{m}$ ) 的影响

综合考虑溶液黏度和膜厚 2 个方面,确定 50 mg/mL 作为毛细填充的最佳浓度。

### 3.2 基底材料表面预处理对图形稳定性的影响

对比了玻璃基底表面经亲水处理和不经亲水处理 2 种情况下,未在细胞培养液中浸泡和浸泡 48 h 后的 PolyHEMA 图形的差异,结果如图 5 所示。

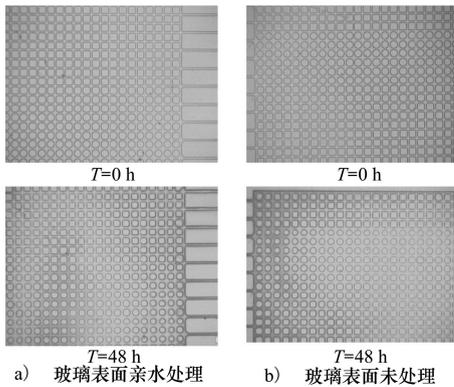


图 5 玻璃表面亲水处理对图形稳定性的影响

表 2 玻璃表面亲水处理对图形稳定性的影响(浸泡 48 h)

尺寸变化	A	B
$\Delta a_{\max}$	-0.151 9(正方形)	-0.184 7(正方形)
	-0.028 76	-0.071 62
$\Delta a_{\min}$	(圆角 $R = 20 \mu\text{m}$ )	(圆角 $R = 15 \mu\text{m}$ )

注: A 为玻璃表面亲水处理;B 为玻璃未表面处理; $\Delta a$  为微井尺寸变化率。

表 2 所示为取点测量计算后得到的 PolyHEMA 图形尺寸变化的最大值和最小值。显然,在浸泡相同时间后,经过亲水处理的细胞定位培养芯片图形

损失小于未经表面处理的芯片。

因此,玻璃表面进行亲水处理可以提高细胞定位培养芯片图形的稳定性。

### 3.3 图形形状对稳定性的影响

将芯片在细胞培养液中浸泡 48 h 后,图形尺寸变化如表 3 所示。

表 3 PolyHEMA 图形形状对图形稳定性影响的数据分析(浸泡 48 h)

尺寸变化	A	B
$\Delta a(R=0)$	-0.151 9	-0.154 1
$\Delta a(R=5)$	-0.102 9	-0.112 5
$\Delta a(R=10)$	-0.050 3	-0.129 7
$\Delta a(R=15)$	-0.110 7	-0.060 6
$\Delta a(R=20)$	-0.028 8	-0.109 3
$\Delta a(R=25)$	-0.037 1	-0.025 2

其中,A 为每 3 个圆角相同的为 1 组,共 6 组;B 为每 6 个圆角连续变化的图形为 1 组; $\Delta a$  为微井尺寸变化率。

相同条件下,芯片浸泡 48 h 后,各种形状均有不同程度的缩小,其中正方形的图形尺寸变化率最大,而圆角的变化对图形质量的影响没有一定的变化规律,但是圆形的图形尺寸变化率都小于正方形的图形尺寸变化率,所以可以通过尖角变圆角的方式提高细胞定位培养芯片图形稳定性。

### 3.4 细胞定位性能验证

以小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 为研究对象进行了 48 h 的细胞培养实验,结果如图 6 所示。

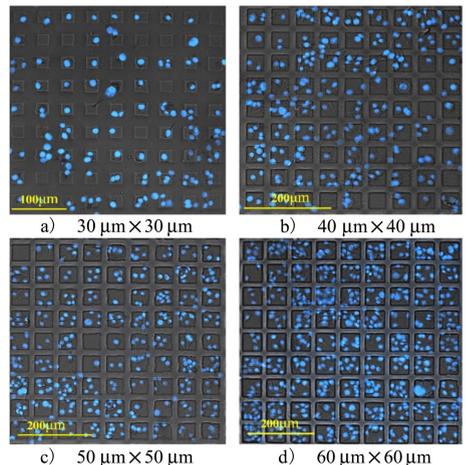


图 6 细胞定位培养效果

从图中可以很直观地看到,绝大多数细胞都被限定在芯片上的特定位点:没有被 PolyHEMA 溶液填充而露出的玻璃表面。表明本文提出的一步成形法制备的单细胞培养芯片能够满足常规单细胞研究对细胞定位效果的要求。

研究同时发现,恰当的单细胞定位培养区域尺寸能够得到较高的细胞定位率。当定位培养区域尺寸不低于悬浮状态细胞尺寸时,培养区域尺寸越小,单细胞率越高;但是,细胞贴壁后必须要有足够的铺展空间,否则会导致细胞死亡,不能实现长期培养<sup>[17]</sup>。解决单细胞率与长期培养的矛盾,需要充分考虑所研究细胞本身的尺寸。图 7 所示为培养区域尺寸不同时,小鼠成骨细胞的粘附情况统计结果。定义“细胞定位率”为粘附细胞的培养区域个数与

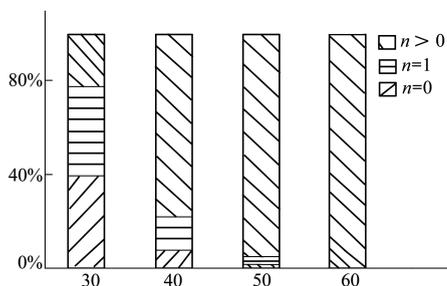


图 7 细胞定位培养区域尺寸与细胞定位率的关系

所有定位培养区域个数的比值,“单细胞定位率”为仅粘附单个细胞的培养区域个数与所有定位培养区域个数的比值。当定位培养区域尺寸从  $30 \mu\text{m}$  逐渐增大到  $60 \mu\text{m}$ , 细胞定位率从 85.2%, 95.1%, 97.5% 逐渐增大到 100%, 而单细胞定位率从 55.6%, 14.8%, 3.7% 逐渐减小到 0%; 当定位培养区域尺寸为  $30 \mu\text{m}$  时, 单细胞定位率最高可以达到 55.6%。

## 4 结 论

本文将毛细微模塑技术与抑制细胞粘附的化学材料 PolyHEMA 相结合, 提出了一步成形制备单细胞定位培养芯片的新技术, 并从保证图形的稳定性与完整性两方面出发, 研究了溶液浓度、PolyHEMA 图形薄膜厚度、基底材料预处理方法以及图形结构等因素对图形质量的影响, 最终制备得到了图形质量可靠的单细胞培养芯片。芯片性能验证结果表明,  $50 \text{ mg/ml}$  的 PolyHEMA/乙醇溶液可以保证浸泡 72 h 以上图形的完整性; 表面亲水处理后的玻璃片表面当 PolyHEMA 薄膜厚度为  $0.4 \mu\text{m}$  且采用圆角图形时, 可以保证浸泡 72 h 以上的图形稳定性。高质量的图形使得细胞定位效果良好, 完全能够满足常规细胞实验的生长要求。

## 参考文献:

- [1] Di Carlo D, Tse H T K, Gossett D R. Introduction: Why Analyze Single Cells[M]. New York, Single-Cell Analysis Humana Press, 2012: 1-10
- [2] Rape A D, Guo W, Wang Y. The Regulation of Traction Force in Relation to Cell Shape and Focal Adhesions[J]. Biomaterials, 2011, 32(8): 2043-2051
- [3] Rodríguez-Hernández J, Cortajarena A L. Design of Polymeric Platforms for Selective Biorecognition [M]. Berlin, Springer, 2015
- [4] Keenan T M, Folch A. Biomolecular Gradients in Cell Culture Systems[J]. Lab on a Chip, 2008, 8(1): 34-57
- [5] Lee J H, Kim H E, Im J H, et al. Preparation of Orthogonally Functionalized Surface Using Micromolding in Capillaries Technique for the Control of Cellular Adhesion[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008, 64(1): 126-134
- [6] Jeong H H, Lee J H, Noh Y M, et al. Generation of Uniform Agarose Microwells for Cell Patterning by Micromolding in Capillaries[J]. Macromolecular Research, 2013, 21(5): 534-540
- [7] Marel A K, Rappl S, Piera Alberola A, et al. Arraying Cell Cultures Using PEG-DMA Micromolding in Standard Culture Dishes [J]. Macromolecular Bioscience, 2013, 13(5): 595-602
- [8] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]2版. 上海: 世界图书出版公司, 2007  
Situ Zhenqiang, Wu Junzheng. Cell Culture[M]2nd Ed. Shanghai, World Publishing Corporation, 2007 (in Chinese)
- [9] 林炳承. 毛细管电泳导论[M]. 北京: 科学出版社, 1996  
Lin Bingcheng. Introduction of Capillary Electrophoresis[M]. Beijing, Science Press, 1996 (in Chinese)
- [10] Jokinen V, Franssila S. Capillarity in Microfluidic Channels with Hydrophilic and Hydrophobic Walls[J]. Microfluidics and

Nanofluidics, 2008, 5(4): 443-448 (in Chinese)

- [11] Miyata T, Nakanishi Y, Uragami T. Ethanol Permselectivity of Poly(Dimethylsiloxane) Membranes Controlled by Simple Surface Modifications Using Polymer Additives[J]. *Macromolecules*, 1997, 30(18): 5563-5565
- [12] 邓永波, 张平, 杜新, 等. 亲/疏水性不同壁面组成微通道的深宽比与通道内液体的自发毛细流动[J]. *光学精密工程*, 2010, 18(7): 1562  
Deng Yongbo, Zhang Ping, Du Xin, et al. Aspect Ratio for Micro-Channels with Nonuniform Surface Properties and Spontaneous Capillary[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2010, 18(7): 1562 (in Chinese)
- [13] 曾庆光, 侯永生, 张丽婴, 等. 外延生长工艺条件对图形完整性的影响[C]//上海市有色金属学会、上海市金属学会半导体材料专委会学术年会. 2004  
Zeng Qingguang, Hou Yongsheng, Zhang Liying. et al. The Effects of Epitaxy Process on the Pattern Integrity[C]// Annual Conference on Semiconductor Materials of the Shanghai Society of Metals, 2004 (in Chinese)
- [14] Kim E, Xia Y, Whitesides G M. Micromolding in Capillaries: Applications in Materials Science[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1996, 118(24): 5722-5731
- [15] 杜新, 张平, 刘永顺, 等. 基于 PDMS 和玻璃材料的毛细管被动阀临界压力分析[J]. *光学精密工程*, 2011(8): 1852-1858  
Du Xin, Zhang Ping, Liu Yongshun, et al. Burst Pressure of Capillary Burst Valve Based on Glass and PDMS[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2011(8): 1852-1858 (in Chinese)
- [16] Fang Y, Jin J, Chang H, et al. Improved Single-Cell Culture Achieved Using Micromolding in Capillaries Technology Coupled with Poly(HEMA)[J]. *Biomicrofluidics*, 2015, 9(4): 044106
- [17] Chen C S, Mrksich M, Huang S, et al. Geometric control of Cell Life and Death[J]. *Science*, 1997, 276(5317): 1425-1428

## A Novel Single Cell Culture Chip Based on One-Step Method

Ye Fang<sup>1,2</sup>, He Meiyang<sup>1,2</sup>, Xie Jin<sup>3</sup>, Xie Li<sup>4,5</sup>,

Chang Honglong<sup>1,2</sup>, Yuan Weizheng<sup>1,2</sup>

- 1.School of Mechanical Engineering, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China;  
2.Key Laboratory of Micro/Nano Systems for Aerospace, Ministry of Education,  
Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China;  
3.Institute of Electronic Engineering, China Academy of Engineering Physics, Mianyang 621000, China;  
4.School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China;  
5.Key Laboratory of Space Bioscience and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics,  
Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China

**Abstract:** More and more basic biology research focus on the single cell level. However, the way to fabricate a chemically patterned surface exist some questions such as complex fabrication process, graphic quality puzzle and so on. In this paper, we present a One-Step method based on Poly 2-hydroxyethyl methacrylate (PolyHEMA) and micromolding in capillaries (MIMIC) technology to fabricate single cell culture chip. Experimental evidence indicates that the integrity and stability of the PolyHEMA pattern can perfectly satisfy the need of long-term cell culture.

**Keywords:** single cell culture; micropattern; MIMIC; PolyHEMA