

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 200325057

UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

光刻法及激光诱导法制作细胞微图案

Cell Micropatterning by Photolithography or CO<sub>2</sub> Laser

陈良格

指导教师姓名: 林华水 副教授

专业名称: 物理化学

论文提交日期: 2006年5月

论文答辩时间: 2006年6月

学位授予日期: 2006年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评阅人: \_\_\_\_\_

2006年5月

# 厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在            年解密后适用本授权书。

2、不保密（  ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期：     年   月   日

导师签名：

日期：     年   月   日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目录

摘要 .....	I
Abstract .....	II
<b>第一章 绪论 .....</b>	<b>1</b>
<b>§1-1 细胞微阵列生物芯片的背景及意义 .....</b>	<b>1</b>
<b>§1-2 细胞粘附 .....</b>	<b>2</b>
<b>§1-3 目前细胞微阵列生物芯片的构建方法 .....</b>	<b>4</b>
§1-3-1 光刻法 .....	5
§1-3-2 软光刻法 .....	5
§1-3-2-1 微印章技术 .....	5
§1-3-2-2 微流体图案技术 .....	10
§1-3-3 墨水喷印技术 .....	10
§1-3-4 模板辅助图案技术 .....	11
§1-3-5 激光诱导直写细胞技术 .....	12
§1-3-6 光固定及光化学构建微阵列技术 .....	13
§1-3-7 等离子聚合及光刻法或激光剥离法 .....	14
§1-3-8 电化学图案化技术 .....	15
§1-3-9 其它制作方法 .....	17
<b>§1-4 本论文的背景意义及研究内容 .....</b>	<b>17</b>
参考文献 .....	19
<b>第二章 光刻法制作细胞微图案 .....</b>	<b>28</b>
<b>§2-1 前言 .....</b>	<b>28</b>
§2-1-1 选择性分子组装 .....	30
§2-1-2 剥离法分子自组装图案法 .....	31

<b>§2-2 实验材料、试剂及仪器设备</b> .....	<b>33</b>
§2.2.1 仪器装置 .....	33
§2.2.2 实验试剂及材料 .....	33
§2.2.3 掩膜板制作 .....	34
§2.2.4 基底材料的选择 .....	34
§2.2.5 细胞培养 .....	34
<b>§2-3 光刻法制作细胞微图案</b> .....	<b>35</b>
§2.3.1 实验步骤 .....	35
§2.3.2 结果与讨论 .....	37
<b>§2-3 本章小结</b> .....	<b>43</b>
<b>参考文献</b> .....	<b>44</b>
<b>第三章 激光诱导制作细胞微图案</b> .....	<b>47</b>
<b>§3-1 引言</b> .....	<b>47</b>
<b>§3-2 实验材料、试剂及仪器设备</b> .....	<b>48</b>
§3.2.1 实验材料及试剂 .....	48
§3.2.2 实验仪器及部分仪器原理 .....	49
<b>§3-3 实验原理及方法</b> .....	<b>50</b>
§3.3.1 实验原理 .....	50
§3.3.2 实验步骤 .....	50
§3.3.3 实验结果表征方法 .....	52
<b>§3-4 PMMA 为基底的细胞图案化</b> .....	<b>52</b>
§3.4.1 PMMA 表面活化 .....	52
§3.4.2 氟硅烷修饰 .....	55
§3.4.3 牛血清白蛋白修饰 .....	56
§3.4.4 溴水诱导蛋白质变性 .....	57

§3.4.5 细胞粘附 .....	58
<b>§3-5 石英玻璃为基底的细胞图案化.....</b>	<b>59</b>
§3.5.1 实验结果表征 .....	59
§3.5.2 细胞粘附结果 .....	61
§3.5.3 细胞粘附影响因素 .....	63
§3.5.4 细胞粘附机理 .....	66
§3.5.4 本章小结 .....	68
<b>§3-6 下一步工作及展望.....</b>	<b>69</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>71</b>
附录.....	73
作者在攻读硕士期间发表的论文.....	75
致谢.....	77

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>II</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>§1-1 The background of the cell micropattern</b> .....	<b>1</b>
<b>§1.2 Mechanisms of cell adhesion</b> .....	<b>2</b>
<b>§1-2 Cell micropatterning methods</b> .....	<b>4</b>
§1-2-1 Photolithography .....	5
§1-2-2 Soft-lithography .....	5
§1-2-2-1 $\mu$ CP .....	5
§1-2-2-2 $\mu$ FLP .....	10
§1-2-3 Ink-jet patterning .....	10
§1-2-4 Stencil-assisted patterning .....	11
§1-2-5 Laser-guided writing with cells .....	12
§1-2-6 Photoimmobilization and Photochemically generated patterns .....	13
§1-2-7 Plasma ploymerization combined with laser ablation or photolithography .....	14
§1-2-8 Electrochemistry patterning .....	15
§1-2-9 Other methods .....	17
<b>§1-3 The meaning and content of this dissertation</b> .....	<b>17</b>
<b>References</b> .....	<b>19</b>
<b>Chapter 2 Cell micropatterning by photolithography</b> .....	<b>28</b>
<b>§2.1 Introduction</b> .....	<b>28</b>
§2-1-1 Selective molecular assembly patterning .....	30
§2-1-2 Molecular assembly patterning by lift-off .....	31



<b>§2.2 Materials, reagents and instruments .....</b>	<b>33</b>
§2.2.1 Instruments.....	33
§2.2.2 Materials and reagents .....	33
§2.2.3 Fabrication of mask.....	34
§2.2.4 The selection of substrate materials .....	34
§2.2.5 Cell culture.....	34
<b>§2-3 cell micropatterning by photolithography .....</b>	<b>35</b>
§2.3.1 Processes of experiments .....	35
§2.3.2 FITC-BSA modification results .....	41
§2.3.3 Cell micropattern results .....	41
<b>§2.3 Conclusions .....</b>	<b>43</b>
<b>References .....</b>	<b>46</b>
<b>Chapter 3 Cell micropattern by CO<sub>2</sub> laser .....</b>	<b>46</b>
<b>§3.1 Introduction .....</b>	<b>46</b>
<b>§3.2 Materials, reagents and instruments .....</b>	<b>47</b>
§3.2.1 Materials and reagents .....	47
§3.2.2 Instruments.....	48
<b>§3.3 Principle and method of experiments .....</b>	<b>49</b>
§3.3.1 Principle of experiments .....	49
§3.3.2 Processes of experiments .....	59
§3.3.3 Detect methods of the experimental results .....	51
<b>§3.4 Cell micropatterning on PMMA .....</b>	<b>51</b>
§3.4.1 Activation of PMMA surface .....	51
§3.4.2 FSA Modified.....	54
§3.4.3 BSA modification.....	55
§3.4.4 Denature BSA by Br <sub>2</sub> water .....	56

---

§3.4.5 Cell attachment results .....	56
<b>§3.5 Cell micropatterning on SiO<sub>2</sub> glass .....</b>	<b>58</b>
§3.5.1 Results .....	58
§3.5.2 Results of cell attachment .....	60
§3.5.3 Parameters effect on cell attachment .....	62
§3.5.4 Mechanism of cell attachment .....	65
§3.5.4 Conclusions .....	67
<b>§3.6 Next step .....</b>	<b>68</b>
<b>References .....</b>	<b>70</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>73</b>
<b>Publications list during M.D. study .....</b>	<b>75</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>77</b>

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘要

细胞微图型化技术是一个多学科高度交叉的领域，它在许多方面有着重要的潜在应用：第一，可应用于大规模的药物发现与筛选；第二，是细胞传感器上用于固定细胞的一个重要手段；第三，是组织工程学的研究基础；第四，为分子细胞基础生物学的研究提供另外一种方法。构建细胞微图案也是我课题组进行细胞相关研究的基础。

目前已经发展了许多种细胞微图案的制作方法。主要有光刻法、软光刻法(包括微印章技术及微流体技术)、“墨水”喷印技术、模板辅助图案技术、激光诱导直写技术、电化学图案化技术等。这些方法各有各的优缺点，但它们的制作均较为复杂，操作较为困难。

本论文主要是运用光刻法及二氧化碳激光诱导法制作细胞微图案，主要的研究内容及获得的结果如下：

1. 建立了以光刻法为基础的细胞微图案技术，得到了蛋白质微阵列及初步的细胞差异化图案。
2. 利用四氢铝锂对 PMMA 表面进行化学活化，活化后的表面可以进一步修饰各种分子基团，从而提高 PMMA 表面的可修饰性及细胞可贴附性。并用 HeLa 细胞进行了验证。
3. 利用具有强氧化性的溴水诱导牛血清白蛋白变性，验证了牛血清白蛋白可抑制动物细胞的非特异性粘附，而牛血清白蛋白变性后的表面则可进行细胞粘附。
4. 提出并建立了以二氧化碳激光诱导蛋白质变性为基础制作细胞微图案技术。利用二氧化碳激光诱导自组装在基底上的牛血清白蛋白变性，得到了变性/非变性的牛血清白蛋白微图案，进一步接种上 HeLa 细胞后可得到细胞微图案。此法可以实现快速简便地制作复杂的细胞微图案。若使用较小激光光斑诱导 BSA 变性，理论上可以得到单细胞微图案。

**关键词：**细胞微图案；牛血清白蛋白；CO<sub>2</sub>激光诱导

## Abstract

Cell micropatterning is an interdisciplinary technology and has great potential applications on many fields. First, it is a valuable approach towards fundamental cell-biology studies. Second, it can be applied to the cell-based drug discovery and selection on large scale. Third, it is an important tool for organizing cells on transducers for cell-based sensing. The last one, the ability to produce patterns of cells through precise surface engineering is the basic of tissue engineering. Also, it is the basic to our group for further relative research on cells.

At present, there are many methods to fabricate cell micropattern. Such as photolithography, soft-lithography ( $\mu$ CP and  $\mu$ FLP), ink-jet technology, stencil assisted patterning, laser-guided writing with cells, electrode-assisted patterning and so on. Each of the techniques has its own specific advantages and limitations. The main purpose of this thesis is to develop a new method to fabricate cell micropattern easily and quickly. The main work and results are summarized as follow:

1. Fabricated protein and cell micropattern by photolithography.
2. Modified PMMA surface with  $\text{LiAlH}_4$ , then the surface can graft other molecules. The process improves the modification ability and cell adhesion of PMMA, which is proved by HeLa cells adhesion.
3. Denature the BSA by strong oxidizer—bromic water. It proved that nature BSA can prevent non-specific absorption of cells, but denature one can't.
4. Proposed a new method to fabricate cell micro-patterns by  $\text{CO}_2$  laser induced BSA denaturized. The BSA modified on surface was denatured by  $\text{CO}_2$  laser beam selectively, and then we can get nature/denature BSA micro-patterns and get cell micropattern after cells adhesion on the surface 2.5 hours. We can get complex cell micropattern quickly and easily and single cell pattern in theoretic if the BSA was induced by excimer laser.

**Key words:** Cell Micropattern; BSA;  $\text{CO}_2$  Laser

## 第一章 绪论

### § 1-1 细胞微阵列生物芯片的背景及意义

微阵列生物芯片是 20 世纪 90 年代生命科学领域中迅速发展起来的一项新技术。其本质是通过平面微加工技术或是超分子自组装技术,把大量具有生物识别功能的分子探针有序点阵排列集成到一个微小的固相载体表面上,可以同时实现对蛋白质、核酸、细胞等的高通量、快速、低成本、高平行化的检测和分析。

细胞微阵列生物芯片(细胞微图案化),也就是将所研究的细胞规约在限定的空间位置上,它在许多方面有着重要的潜在应用。目前已有相关的应用报告:

第一,药物开发。利用细胞微阵列可大大降低药物开发的成本,并且更为准确地预示结果。细胞阵列介于基因、蛋白质与动物之间,被认为更适用于药物筛选。Bhadriraju 的综述<sup>[1]</sup>介绍了如何用细胞微阵列来提高药物开发及测试效率。美国匹兹堡 Cellomics 公司将生物标志物与细胞阵列技术结合,以高信息量筛选技术(High content screening)应用于大规模的药物发现与筛选,将先导化合物优化周期所需时间缩短了一半,并对药物开发决策产生重要影响。Ziauddin 等<sup>[2]</sup>利用确定位点上打印形成的 DNA 去转染各个位置上导入的细胞,形成可表达确定 cDNAs 的细胞微阵列,为细胞基因组(cellular genomics)<sup>[3]</sup>与蛋白质组的结合提供了很好的预示。

第二,细胞传感器<sup>[4]</sup>。细胞的微阵列化技术是细胞传感器上用于固定细胞的一个重要手段。

第三,组织工程学。干细胞生长成不同的细胞系很大程度上取决于细胞的形状,暗示着通过控制细胞生长微环境的表面工程有可能是研究功能化细胞的一种手段,更有可能对用于细胞组织工程的基底设计非常关键。同时,在体组织中的细胞实际上也以有序的方式排列着,从细胞共培养技术的发展来看,未来的工程化组织制造的一种模式,很可能是先造就细胞微阵列的图式,作为进一步立体化组织构造的基础。

第四,细胞基础生物学。在分子细胞基础生物学研究中,实现细胞在基底表面上粘附与铺展的规约或控制的技术,可能是细胞与基底、细胞与细胞相互作用

研究获得深入认识的关键，它提供了全新的方法来深入研究细胞粘附于材料表面，细胞的繁殖、扩散及分子信号通道的各种影响因素。由于细胞的“活”的特性，大部分组织细胞在表面上的粘附与铺展特征，实质上是生化途径及其网络特性与生物物理特性呈现的结合体。微阵列技术体现在细胞水平上的一个发展趋势，就是使细胞在适宜基底表面上呈现特定排列以及功能，此即所谓细胞图型化 (cell micropatterning) 技术。

## § 1-2 细胞粘附

当细胞接近于另外的细胞或是一个固体基质，在适宜的条件下，借助物理化学作用力，它们之间可能发生粘附<sup>[5-6]</sup>。细胞粘附在多细胞生物的发育与组织修复过程中的形态建成和功能维持上起着非常重要的作用。细胞粘附在许多细胞生理过程中发挥调节功能，如细胞生长、分化和运动、性细胞结合、免疫网络的细胞活化等。根据粘附对象的不同，细胞粘附可分为两大类：细胞与非细胞表面的粘附和细胞之间的粘附。粘附过程涉及非特异性的相互作用（静电、水化和立体空间等性质的相互作用）或者特异性的相互作用（锁与钥匙的分子互相作用）。细胞粘附能力强弱差别很大，它不仅取决于粘附细胞本身，还取决于被粘附的细胞或基质，影响相互作用的因素包括细胞或基质的类型及它们的表面特性、细胞的生理状况和环境条件（如离子强度、pH、蛋白质组成等）。

细胞表面之间或细胞与固体表面之间的涉及物理上的作用力<sup>[7,8,9]</sup>，例如静电相互作用力（如静电斥力、多价离子键），定向力（范德华-基森）、诱导力（范德华-德拜）以及最重要的色散力（范德华-洛多恩）。上述各类非平衡的表面力赋予表面以自由能。从根本上说，粘附过程中，表面自由能的降低提供了驱动细胞间或细胞与基质之间相互作用的力。也就是说，如果系统的自由能（F）降低有利于粘附过程的发生；反之，系统自由能升高，粘附过程在热力学上就不可能进行。自由能降低得愈多，粘附过程就愈可能发生。

如果不考虑细胞粘附中任何特殊的生物化学相互作用（即把细胞当作可变形的多聚体颗粒）和忽略重力等系统外力，细胞粘附（于固体表面）过程中的表面自由能变化 $\Delta F^{\text{adh}}$ 可以由图 1-1 的式中给出，式中  $\gamma_{\text{PS}}$  和  $\gamma_{\text{PL}}$  分别为细胞-固体基质和细胞-液体介质之间的界面自由能， $\gamma_{\text{SL}}$  则为固体基质-液体介质的界面自由

能。这样，形成的细胞-固体基质界面自由能部分也破坏了细胞-液体介质和固体基质-液体介质的界面。自由能之差等于细胞粘附于表面过程中能够获得的最大的功。当 $\Delta F^{\text{adh}}$ 是负值时，从热力学讲，粘附过程就可能自发进行。在式中各界面自由能实际上是与细胞、固体基质和液体介质的表面疏水性相关的。三者相互影响，相互作用而决定粘附过程中系统的自由能变化。由此，不仅被吸附的表面而且环境液体介质的表面张力都对细胞吸附产生重大甚至决定性影响。例如，当液体介质表面自由能大于粘附细胞的表面时与细胞相互作用的表面的疏水性愈强（表面自由能减少）就愈容易发生粘附。


$$\Delta F^{\text{adh}} = \gamma_{\text{PS}} - \gamma_{\text{PL}} - \gamma_{\text{SL}}$$


图 1-1 细胞粘附过程中的表面自由能变化

上述简化的粘附模型虽然一定程度上阐明了涉及表面粘附的自由能变化及某些重要的热力学条件，但是由于细胞表面结构的复杂性，细胞的粘附涉及的作用力不仅表面张力有关，而且涉及细胞与被吸附表面之间复杂的相互作用。

细胞与细胞及细胞与非细胞表面的粘附都有两种基本结构，即暂时粘附（Transient adhesion）和永久性细胞连接（Permanent cell junctions）。两种细胞表面的粘附结构都有许多粘附分子和其他结构成分参与，有些分子参与两类粘附结构。大多数细胞粘附和细胞连接结构主要由跨膜的粘附因子（或连接蛋白）、细胞外配体、细胞内连系的细胞骨架和胞内一些小的连系蛋白 4 部分组成。

细胞主要是通过其细胞表面粘附分子（CAMs）与其它细胞或固体基质粘着的，不同的细胞表面粘附分子介导不同类型的细胞粘附。在体外细胞培养中，细胞能够粘附和生长在玻璃或塑料基底表面，体内细胞赖以粘附的固体基质则是细



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库