



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104328084 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 04

(21) 申请号 201310308469. 7

(22) 申请日 2013. 07. 22

(71) 申请人 中国科学院沈阳自动化研究所
地址 110016 辽宁省沈阳市东陵区南塔街
114 号

(72) 发明人 刘连庆 刘娜 李文荣 王越超
于海波 董再励

(74) 专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司 21002
代理人 周秀梅 许宗富

(51) Int. Cl.
C12N 5/09 (2010. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种快速无模板的细胞图形化方法

(57) 摘要

本发明涉及一种新型的细胞图形化技术, 具体是一种基于光诱导介电泳(ODEP)技术的细胞图形化方法。利用光诱导介电泳技术在氢化非晶硅上形成图案可控的水凝胶并用于控制细胞生长的方法。由光斑诱导出的非均匀电场在溶液中可以在诱导微米粒子的运动及溶液的运动, 产生介电泳和电渗流的现象。利用这种微图形制作方法, 可以不需要物理模板, 直接根据所需形状设计光斑即可得到所需的 PEGDA 水凝胶微图形, 并且可以动态化的控制 PEGDA 水凝胶微图形的大小和位置。通过本发明这种方法, 可以控制细胞的生长位置, 生长图形, 并且可以通过改变 PEGDA 水凝胶微图形的形状和尺寸调节细胞的形状, 研究微观环境对细胞行为的影响。

1. 一种快速无模板的细胞图形化方法,其特征在于:利用光诱导介电泳技术在氢化非晶硅上形成图案可控的水凝胶并用于控制细胞生长的方法。

2. 按权利要求 1 所述快速无模板的细胞图形化方法,其特征在于:具体步骤为:

①将聚乙二醇双丙烯酸酯(PEGDA)溶液注入光诱导介电泳(ODEP)芯片,利用外接交流电源和光斑照射的双重作用,使得聚乙二醇双丙烯酸酯在非晶硅玻璃上有光照的地方发生交联固化反应形成 PEGDA 水凝胶,固化的水凝胶形状与光斑形状一致,②将修饰好水凝胶的氢化非晶硅玻璃放入细胞培养皿,加入培养液和细胞悬浮液,将细胞培养皿放入细胞培养箱培养。

3. 按权利要求 2 所述快速无模板的细胞图形化方法,其特征在于:所述光诱导介电泳芯片主要分为可拆卸的三层结构,从上到下依次为 ITO 玻璃、溶液层、氢化非晶硅玻璃,其中,氢化非晶硅玻璃为三层结构组成,从上到下依次氢化非晶硅层、ITO 玻璃层,玻璃层。

4. 按权利要求 2 或 3 所述快速无模板的细胞图形化方法,其特征在于:所述聚乙二醇双丙烯酸酯溶液注入光诱导介电泳芯片,是将聚乙二醇双丙烯酸酯溶液注入光诱导介电泳芯片的溶液层,使固化后的 PEGDA 水凝胶粘附在氢化非晶硅玻璃的氢化非晶硅层上。

5. 按权利要求 2 所述快速无模板的细胞图形化方法,其特征在于:所述外接交流电源施加在光诱导介电泳芯片上,利用信号发生器在光诱导介电泳芯片两端施加一个正弦交流信号,信号频率为 1-5kHz,幅值为 20Vpp。

6. 按权利要求 2 所述快速无模板的细胞图形化方法,其特征在于:所述光斑照射是利用电脑画图后,通过投影仪射出。

7. 按权利要求 2 所述快速无模板的细胞图形化方法,其特征在于:所述细胞培养液为 RPMI-1640,加入量为 6-8ml;所述细胞悬浮液为 100u1 乳腺癌细胞(MCF-7)浓度为 2×10^6 细胞悬浮液。

一种快速无模板的细胞图形化方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新型的细胞图形化技术,具体是一种基于光诱导介电泳(ODEP)技术的细胞图形化方法。

背景技术

[0002] 细胞生物学(Cell Biology)是在显微、亚显微和分子水平三个层次上,研究细胞的结构、功能和各种生命规律的一门科学。细胞生物学是生命科学重要的基础学科之一,是分子生物学与个体生物学之间承上启下的学科。在我国基础学科发展规划中,细胞生物学与分子生物学,神经生物学和生态学并列为生命科学的四大基础学科,其中由于细胞生物学与生命活动基本规律最为相关,因而成为全球生命科学界关注的热点。从上个世纪50年代开始,细胞生物学研究就成为获颁诺贝尔奖最多的领域,以本世纪前十年为例,已经有美国的Leland Hartwell、英国的Sydney Brenner、卢森堡的Jules A. Hoffmann等16位科学家因为在细胞周期调控、程序性死亡、免疫机理等方面的研究获得诺贝尔奖,这也见证了细胞生物学研究对于人类了解生命本质过程的重要意义。

[0003] 细胞生物学的研究主要对象是细胞,数以万计的细胞组成形态和功能各异的组织与器官,支撑着生命的基本功能与运行。然而复杂多样的信号如何在正确的时间和空间调控细胞的生长、分化和发育,使得细胞具有特定组织器官所要求的功能,是细胞生物学新的前沿分支——细胞行为学的主要研究内容。通过对细胞差别生长、细胞迁移、区别粘附、细胞连接和细胞融合等细胞行为的研究,不仅可以揭示生命活动的本质和细节,同时也能够在细胞水平上对生命科学领域内重大疾病(如癌症等)的诊治、个性化治疗以及新药研发提供依据和验证手段。然而在生物活体内直接研究细胞行为是非常困难的,因为生物活体内的细胞微环境时刻变化,每一时刻都有不同的因素诱导细胞行为的变化,无法直接获得单一因素对细胞行为的影响,并且在生物活体内直接观察细胞行为是非常昂贵的。所以一种能够在体外模拟体内微环境用于研究细胞微环境对细胞行为影响的方法对细胞行为学的研究乃至整个细胞生物学都有重大的意义。

[0004] 目前,细胞图形化方法已经被证实是一种用于研究细胞行为的有效方法。传统利用微纳技术实现细胞图形化一般有两种方案,一种是通过表面进行修饰,形成细胞贴附生长的图形化区域,使细胞选择性地贴附生长形成细胞图形;另一种方法是通过可移除的物理阻隔层将细胞限制在图形化区域生长,形成细胞图形。基于上述两种原理,结合微系统技术,发展出了很多细胞图形化技术。如光刻、软光刻、模板辅助构图、掩膜辅助的表面等离子体处理、特殊界面材料激光处理等。缺点大部分的方法都需要掩膜版校准,复杂的化学表面修饰。

发明内容

[0005] 为克服以上的不足,我们研究开发出一套利用ODEP技术的无掩模板,动态化不需要任何表面修饰的细胞图形化方法。

[0006] 本发明的技术方案是：

[0007] 一种快速无模板的细胞图形化方法，利用光诱导介电泳技术在氢化非晶硅上形成图案可控的水凝胶并用于控制细胞生长的方法。

[0008] 具体步骤为：

[0009] ①将聚乙二醇双丙烯酸酯(PEGDA)溶液注入光诱导介电泳(ODEP)芯片，利用外接交流电源和光斑照射的双重作用，使得聚乙二醇双丙烯酸酯在非晶硅玻璃上有光照的地方发生交联固化反应形成 PEGDA 水凝胶，固化的水凝胶形状与光斑形状一致，②将修饰好水凝胶的氢化非晶硅玻璃放入细胞培养皿，加入培养液和细胞悬浮液，将细胞培养皿放入细胞培养箱培养。

[0010] 所述光诱导介电泳芯片主要分为可拆卸的三层结构，从上到下依次为 ITO 玻璃、溶液层、氢化非晶硅玻璃，其中，氢化非晶硅玻璃为三层结构组成，从上到下依次氢化非晶硅层、ITO 玻璃层，玻璃层。

[0011] 所述聚乙二醇双丙烯酸酯溶液注入光诱导介电泳芯片，是将聚乙二醇双丙烯酸酯溶液注入光诱导介电泳芯片的溶液层，使固化后的 PEGDA 水凝胶粘附在氢化非晶硅玻璃的氢化非晶硅层上。

[0012] 所述外接交流电源施加在光诱导介电泳芯片上，利用信号发生器在光诱导介电泳芯片两端施加一个正弦交流信号，信号频率为 1-5kHz，幅值为 20Vpp。

[0013] 所述光斑照射是利用电脑画图后，通过投影仪射出。

[0014] 所述细胞培养液为 RPMI-1640，加入量为 6-8ml；所述细胞悬浮液为 100u1 乳腺癌细胞(MCF-7)浓度为 2×10^6 细胞悬浮液。

[0015] 利用光诱导介电泳芯片，光诱导介电泳芯片具有以下特点(如图 1 所示)：

[0016] 1：ODEP 芯片主要分为可拆卸的三层结构，从上到下依次为 ITO 玻璃(包括：玻璃层、ITO 玻璃层)、溶液层、氢化非晶硅玻璃(包括：氢化非晶硅层、ITO 玻璃层，玻璃层)。其厚度为：ITO 玻璃(厚约 1mm，大小 3cm×3cm)，溶液层(厚 60 μ m)，氢化非晶硅(a-Si:H)玻璃(厚 1mm，大小 3cm×3cm)组成一个汉堡结构。

[0017] 2：氢化非晶硅玻璃由一层 1 μ m 厚的氢化非晶硅，250nm 厚的 ITO 玻璃。氢化非晶硅层在一定强度的光照下会由于电子空穴对的产生使得光照区域的电阻大大减小，有光照的其电导率会从 10^{-9} S/m 增加到 10^{-5} S/m。由于光照区域的电导率升高使得其电阻降低，使得外加电压大部分转移到溶液层两端，也就是说在外加交流信号的作用下，可以把光照区域看成一个微电极，会在溶液层产生非均匀电场如图 1 所示。

[0018] 本发明具有如下优点：

[0019] 本发明可实现动态化，程序化的细胞图形化方法，并且不需要任何物理模板及化学表面修饰。具体具有以下特点：

[0020] 1：由光斑诱导出的非均匀电场在溶液中可以在诱导微米粒子的运动及溶液的运动，产生介电泳和电渗流的现象。

[0021] 2：利用聚乙二醇双丙烯酸酯(PEGDA)在光能和电能的作用下会交联固化形成 PEGDA 水凝胶的特点，可以通过控制照在非晶硅层光斑的形状控制 PEGDA 较链固化的形状，制作出各种图案。利用这种微图形制作方法，可以不需要物理模板，直接根据所需形状设计光斑即可得到所需的 PEGDA 水凝胶微图形，并且可以动态化的控制 PEGDA 水凝胶微图形的

大小和位置。

[0022] 3: 由于水凝胶是一种良好的生物材料, 具有很好的防蛋白质粘附, 防细胞粘附的作用。而氢化非晶硅层由于其表面亲水性及刚度强的物理性质有益于细胞在其表面的粘附培养。通过上述这种方法, 可以控制细胞的生长位置, 生长图形, 并且可以通过改变 PEGDA 水凝胶微图形的形状和尺寸调节细胞的形状, 研究微观环境对细胞行为的影响。

附图说明

[0023] 图 1 为本发明的过程示意图。图 1 (A) 芯片连接外部电源后的电路原理示意图。图 1(B 为原理图), ITO 的电阻很小, 所以在电路中其电阻可以忽略不计, 溶液层 (solution) 与氢化非晶硅 (a-Si:H) 层均可以看成是一个电阻与电容并联作用。在光照下, 氢化非晶硅局部电阻变小, 使得与之串联的溶液层局部分压变大, 形成一个非均匀电场。

[0024] 图 2 为光学显微图片。图 2(A) 为固化后 PEGDA 水凝胶后的结果图, 图 2(B) 为细胞图形化后的结果图。

具体实施方式

[0025] 本发明基于 OEDP 的细胞图形化方法: 通过 ODEP 技术控制, 即当光诱导介电泳芯片两端施加有交流电压时, 照射在氢化非晶硅表面的光斑会形成一个电极的作用, 并在溶液中产生非均匀电场, 当施加的正弦信号频率为 1-5kHz, 信号的电压峰峰值为 20V 时, 溶液中的 PEGDA 分子会在有光的地方发生交联反应, 形成固化的水凝胶微结构, 而 PEGDA 水凝胶的形状与照射的光斑形状的大小和形状一致, 因此通过控制光斑的位置和形状, 就能在氢化非晶硅表面的任意位置形成任意形状的水凝胶微结构。因此, 利用细胞不在水凝胶上生长, 而在氢化非晶硅表面生长的特点, 可以通过控制细 PEGDA 微结构形状的位置和图形来控制细胞生长位置和形状。

[0026] 实施例一

[0027] 1. 将一片 ITO 玻璃和一片氢化非晶硅玻璃利用 99% 浓的乙醇超声清洗两次, 每次 15 分钟。利用氮气将芯片吹干待用。

[0028] 2. 将洗净后的 ITO 玻璃和氢化非晶硅玻璃, 利用两条 $2\text{cm} \times 1\text{mm} \times 60\ \mu\text{m}$ 的双面胶贴在一起, 形成如图 1(A) 所示的结构。由于双面胶的存在, 在 ITO 玻璃和氢化非晶硅玻璃之前具有 $60\ \mu\text{m}$ 高的空间可用于容纳溶液, 所以该层被称为溶液层。组装好后形成光诱导介电泳 (ODEP) 芯片。

[0029] 3. 利用微移液器将聚乙二醇双丙烯酸酯 (PEGDA) 溶液注入光诱导介电泳芯片溶液层待用。并且在 ITO 玻璃上的 ITO 层与氢化非晶硅上的 ITO 层接上导线, 以便跟信号发生器的正负极连接。

[0030] 4. 将 ODEP 芯片放置在架子上, 在电脑中绘制需要的图片形状 (五角星图形如图 2 (A) 右下角的光斑), 通过投影仪照射在 ODEP 芯片上, 同时将信号发生器的正负极于步骤 3 所述的两导线连接, 就可以实现对 ODEP 芯片施加外接交流电源 (利用信号发生器在 ODEP 芯片两端施加一个正弦交流信号, 信号频率为 1-5kHz, 幅值为 20Vpp, 作用时间为 3-5 秒), PEGDA 分子会在氢化非晶硅表面有光照的地方发生交联固化反应 (固化时间为 3-5 秒), 在外加交流信号的作用下, 投影仪射到氢化非晶硅玻璃上的图形会诱导聚乙二醇双丙烯酸酯

固化形成 PEGDA 水凝胶固化的水凝胶黏附在氢化非晶硅玻璃上的氢化非晶硅层,形成具有三维网络结构的水凝胶,而水凝胶的形状与投射的光斑形状一致。如图 2. (A) 所示,在图 2. (A) 中,灰色区域为 PEGDA 水凝胶,黑色区域为裸露的氢化非晶硅基底。

[0031] 5. 将修饰有 PEGDA 水凝胶微结构的氢化非晶硅玻璃放入细胞培养皿,加入 RPMI-1640 培养液 7ml,并且放入 100u1 乳腺癌细胞(MCF-7)浓度为 2×10^6 细胞悬浮液。将细胞培养皿放入细胞培养箱培养(37°C, CO₂ 为 5%,每天(24 小时)更换培养液和观察,记录细胞状态。因为细胞不生长在水凝胶上而生长在氢化非晶硅表面,所以细胞就长成了特定的形状,如图 2. (B) 所示,MCF-7 细胞生长在氢化非晶硅基底上,形成一个五角星图形。

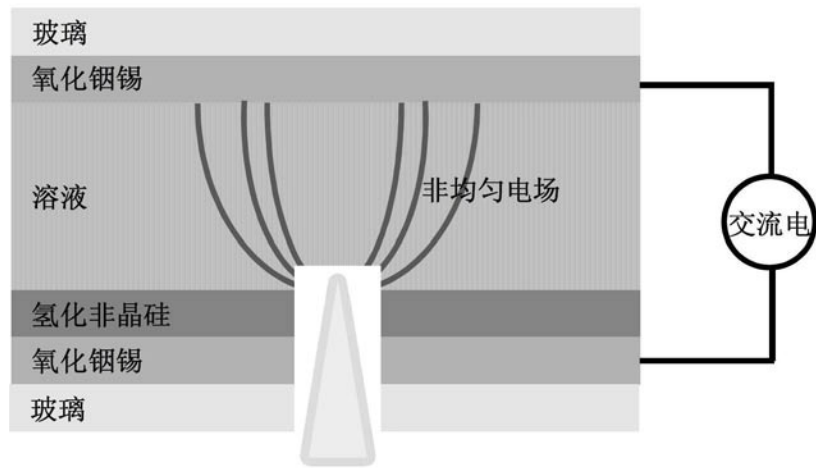


图 1(A)

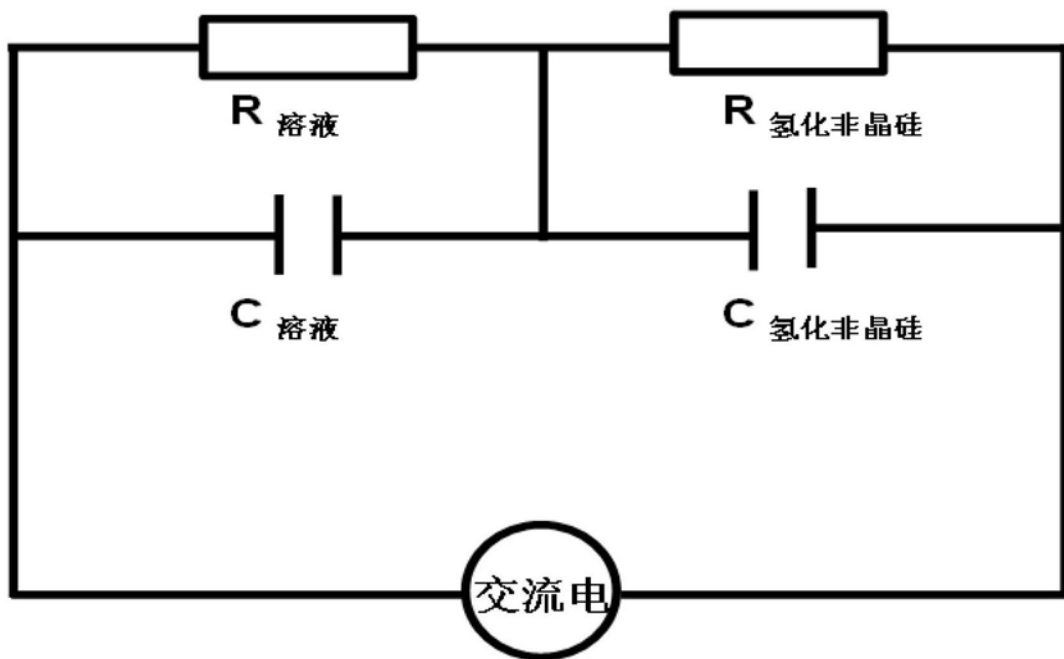


图 1(B)

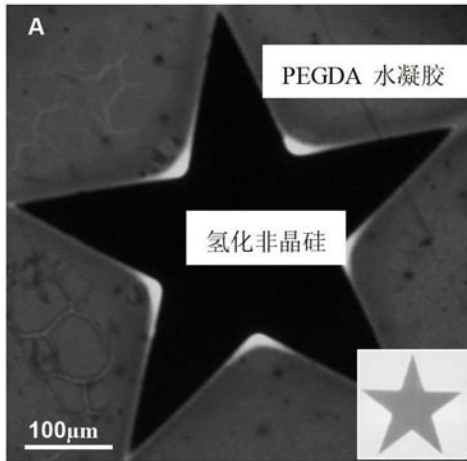


图 2(A)

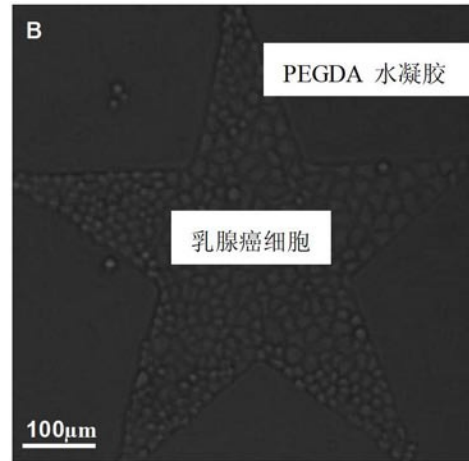


图 2(B)