

微图形化技术及其在生物医学研究中的应用*

任大海** 崔明洋 夏亦秋 尤 政

(清华大学精密仪器与机械学系, 精密测试技术及仪器国家重点实验室, 北京 100084)

摘要 结合生物物理学与生物化学的微细加工技术已可以获得与生物大分子相近的特征尺寸, 推动了微图形化技术在药物筛选与新药开发、组织工程、疾病诊断等领域的应用。综述了微图形化技术在生物医学领域的发展, 讨论了光刻、软光刻、模板辅助构图、扫描探针加工、喷墨构图、激光诱导图形化等方法, 分析了各种方法的优势、局限性与适用范围, 指出分辨力与精度、图形化规模、实验加工条件等是选择不同图形化方法的主要依据。而基于生物物理学和生物化学等对纳米尺度的处理过程进行定量分析、进一步提高其生物兼容性及材料适应性、发展适合图形化芯片的体内微环境模拟技术等是微图形化技术进一步发展的方向。

关键词 生物微系统, 微图形化, 光刻, 表面修饰, 生物传感器

学科分类号 TH79, Q819

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00228

近年来, 生物技术和医疗技术的发展对生化检测技术提出了更高的要求, 面向生化研究的检测技术和仪器不断出现, 其中以基于微系统(microsystem)技术的生物器件——生物微机电系统(bio micro electro mechanical systems, BioMEMS)发展最为快速。相对传统用于疾病诊治的常用技术来说, 生物微机电系统具有高通量、高灵敏性、低成本及快速性等特点, 大大促进了生物医学领域的研究。现代医学需要在分子水平对生化物质进行研究, 微图形化(micropatterning)技术可以使生物分子处于所需的形态, 固定于生物传感器的特定部位, 以保证特异性生物反应的发生, 并能被准确检测, 在近十几年内得到了极大的发展^[1-3]。

本文主要关注基于生物物理与生物化学的表面设计方法, 为精确控制生物分子黏附、散布而采用的工程技术, 介绍了在生化物质图形化、生物传感器方面为解决特定问题而创造的新方法或新工具, 描述了每种技术的概念、基本结构及优劣势。

早期的图形化技术较多为“自上而下”的加工方法, 主要源于微电子领域技术的推进, 如光刻法(photolithography)等, 这些技术可以达到 10 nm 左右较高的分辨率, 但具有成本高、环境要求高、采用的有机物质及部分工艺可能改变生物分子原有结

构的缺点。另外一些“自上而下”的图形化技术源于印刷工业的传统技术, 如喷墨构图(jet patterning)技术, 该技术在生命科学领域拥有众多潜在应用, 但目前其分辨率还仅局限于微米量级。后期发展的表面加工技术则是通过“自下而上”的方法完成的, 如分子自组装(molecular self-assembly)技术, 现已达到 5~50 nm 的表面形态学尺度^[4-5]。实际上, 最新研究中更多的是采用上述两种方式相互结合的方法, 如软光刻(soft lithography)、扫描探针加工(scanning-probe lithography)及纳米压印(nanoimprint lithography)技术等。下面我们将分别讨论这些方法, 并介绍激光诱导图形化(laser guided patterning)等最新技术。

1 光刻法

在图形化技术中, 光刻法(photolithography)具

* 国家自然科学基金资助项目(61071002), 国家重大科学仪器设备开发专项项目资助(2011YQ030134), 教育部留学回国人员科研启动基金和国家重点实验室基金资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62776000, E-mail: rendh@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2011-08-12, 接受日期: 2011-09-29

有精度高、重复性好、图形尺寸范围宽(从十几纳米到几百微米)等优点^[6-7], 尤其是光刻法能够精确对准预制于芯片上的微电极等传感元件, 因此非常适合于集成化生物传感器的制作. 利用光刻技术进行细胞图形化的过程如图 1 所示, 具体过程可分为匀胶、前烘、光刻、显影等. 此时基片分为裸露的基底材料及由光刻胶覆盖的基底材料两部分. 之后, 可根据研究需要选择两种处理方法: a. 涂布薄层(金属或生物活性分子, 如铝、钛、缩氨酸、蛋白质、聚合物等), 在有机溶剂中(如丙酮等)利用剥离(lift-off)工艺除去光刻胶及其上的表面修饰材料, 形成图形化的薄层. b. 将光刻胶覆盖层作为掩模进行干法刻蚀, 去除匀胶之前沉积在基底上的金属层, 在有机溶剂中利用剥离(lift-off)工艺洗脱光刻胶, 形成图形化的金属薄层. 由于表面材料的不同, 生物活性分子将有选择地生长, 从而实现图形化.

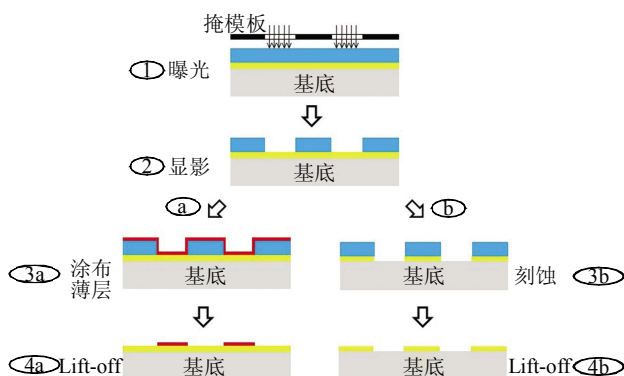


Fig. 1 Regular photolithography procedure^[4]

图 1 光刻法微图形制备典型流程图^[4]

1: 光源通过掩膜照射至光刻胶; 2: 通过显影剂使图样转移至光刻胶上; 3a: 涂布表面修饰薄层; 4a: 剥离(Lift-off)工艺一并去除光刻胶及其表面修饰薄层, 形成图样; 3b: 刻蚀工艺去除基底上事先沉积的薄层; 4b: Lift-off 工艺去除光刻胶并形成促进 / 抑制相关生物分子黏附的图样.

Scotchford 等^[8]用方法 a 实现了在基底上分布两种金属氧化物的图形化芯片, 并证明连接有蛋白纤维胶原的细胞较易在 TiO_2 、 Nb_2O_5 及 V_2O_5 上生长. Healy 等^[9]用同样方法实现了氨基硅烷及烷基硅烷的图形化分布, 并检测到在血清培养下, 大鼠成骨细胞更易在具有氨基硅烷修饰的表面生长.

由于上述方法都没有从本质上避免蛋白质黏附, 所以并不能形成完美的亲细胞 / 疏细胞图样对比^[10], 为此, Lussi 等^[11]发明了一种选择性分子自组装图形化方法 (selective molecular assembly

patterning, SMAP), 利用分子之间的相互作用及协同效应进行图形化. Zhang 等^[12]通过 2 次甩涂光刻胶, 实现一区域促进细胞生长的同时, 另一区域抑制细胞生长的图形化结果, 如图 2 所示, 当接种神经细胞时, 聚-L-赖氨酸(poly-L-lysine)促进细胞生长, 而 SU8 抑制生长, 从而制造出对比明显的图形化芯片.

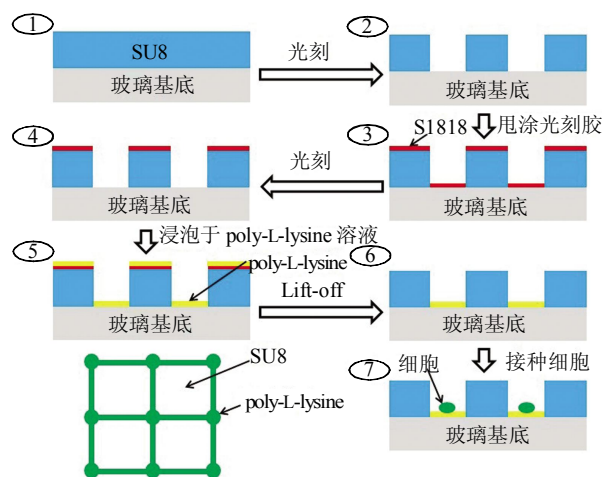


Fig. 2 Two-time photolithography processes for micropatterning^[12]

图 2 两次甩涂光刻胶进行图形化^[12]

1: 甩涂 SU8 光刻胶; 2: 曝光显影; 3: 甩涂 SU1818 光刻胶; 4: 曝光显影; 5: 接种 poly-L-lysine; 6: 剥离(Lift-off)工艺一并去除 SU1818 及其表面修饰的聚-L-赖氨酸(poly-L-lysine); 7: SU8 与 poly-L-lysine 形成抑制 / 促进细胞生长的图样.

但是上述方法的缺陷在于它并不能控制细胞或蛋白质密度, Falconnet 等^[13]采用了一种籍由 lift-off 工艺的分子自组装方法, 避免生物活性物黏附, 实现细胞图形化. 如图 3 所示, 该方法可以通过调整

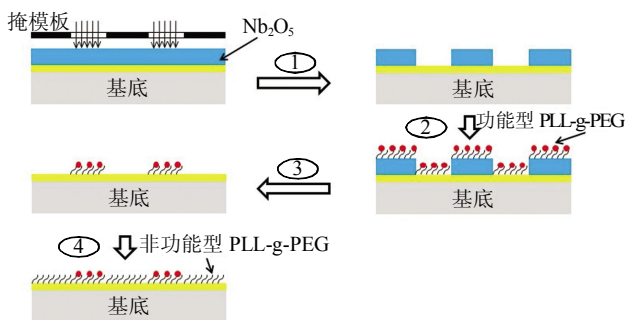


Fig. 3 Molecular assembly patterning by lift-off with surface density in control^[13]

图 3 可控密度的分子自组装图形化方法^[13]

1: 通过掩模板对 Nb_2O_5 进行曝光, 显影; 2: 接种密度调节好的功能 PLL-g-PEG 基团; 3: Lift-off 工艺去除 Nb_2O_5 及其表面修饰基团; 4: 接种非功能基团形成对比图样.

生物活性分子与聚乙醇接枝的聚-L-赖氨酸(PLL-g-PEG)的比例精确调节接种生物分子的密度。

作为微电子工艺中一项成熟技术, 光刻法操作简单、灵活性大, 但对环境要求高, 需要专用设备, 尤其对于细胞研究等生物应用来说, 由于它是通过“lift-off”工艺剥离光刻胶及其表面吸附的特异性蛋白来获得所需要的图形, 剩余光刻胶和显影加工过程中的化学药剂会对细胞及用于结合细胞的表面蛋白造成影响, 并且往往比较严重。另一方面, 一些生物试剂也可能污染相关加工设备, 也就是说, 相应微电子制造工艺与生物样品的兼容性差^[14]。为此, 一些研究者开始探索减轻光刻法毒性的方法及其替代步骤。

Ilic^[15]及 Orth^[16]等用一种机械剥离的方法替代lift-off步骤, 以避免生物分子与有机溶剂的接触, 但该方法需要繁琐的预处理程序并需要特殊仪器, 随着聚合物模板的发展, 一些繁琐步骤得到了一定程度的简化。Gray等^[17]通过在每个细胞定位点下用光刻法等微制造技术产生电场源, 用电场力捕获细胞实现图形化, 这种技术的优点在于它不再依赖不可控的细胞接种, 而是通过主动驱动细胞形成图样。相似的, Cheng等^[18]通过光刻法等技术产生的热驱动源实现细胞图形化。

光刻胶毒性研究方面, 佐治亚理工学院的Vernekar等^[19]评价了SU-8 2000光刻胶分别在真空加热、加热超声处理及辉光放电等方法作用下的去毒程度, 美国南加州大学Wei等^[20]、美国加州理工学院的Carrico等^[21]及韩国KAIST研究院的Kim等^[22]对光刻胶开展了改进研究, 如采用异丁烯酸甲酯(methylmethacrylate)及3叔丁氧羰基-N-乙烯基-2吡咯酮[3-(t-butoxycarbonyl)-N-vinyl-2-pyrrolidone]等合成的具有一定生物活性的光刻胶, 可在曝光后直接接种细胞形成微图案, 而不需显影、清洗等与有机溶剂接触的步骤。Dubey等^[23]则通过生物素和氯烷烃分别固定同一溶液中的抗生物素蛋白链菌素及卤代烷脱卤素酶(Halo Tag)。虽然近年出现了借助蛋白质、聚糖、多肽等各种生物活性分子的方法, 但在阵列准确性、芯片覆盖率等方面还不够令人满意, 尚未得到广泛认可^[14]。

2 软光刻法

软光刻技术(soft lithography)是在传统光刻法基础上发展而来的一种微图形转移和制作技术, 由于其不再依赖超净间和昂贵的设备, 目前已在微细加

工领域得到了广泛的应用。软光刻法以分子自组装技术和高聚合物弹性印章为基础, 通过微接触压印(microcontact printing, μ CP)或微流体构图(microfluidic patterning, μ FLP)的方法实现表面微细结构加工和图形化。由于聚二甲基硅氧烷(PDMS)化学性质稳定, 与基底贴合严密, 常采用这种材料复制微加工技术制作的模具来制备高聚合物弹性印章, 且因其柔软还可用于多种形状的基底表面^[24]。

软光刻技术首先需要通过在模具上浇注高聚合物来制备弹性印章, 对于微接触压印技术, 将所需的表面修饰材料吸附于制作好的弹性印章表面, 并贴合到基底上, 可以在基片与印章接触的区域形成自组装分子层, 揭除印章即可形成微图案。接下来可以选择直接接种生化物质, 或进一步在基底未修饰的区域涂布一层功能相反的基团, 使图形对比更为强烈, 典型流程图如图4a所示。在制备印章过程中, 有时会采用一些特异性基团修饰印章表面, 以获得更具单一性的生物基团。如Bernard等^[25]在印章表面修饰了待接种分子神经细胞胶质细胞黏连分子(NgCAM)的特异性抗体, 从而在浸润及贴合阶段获得更纯净的NgCAM细胞。

在背景区域进行反功能基团修饰(即钝化剂)方面, 各国学者也进行了广泛研究, 疏水性聚苯乙烯(PS)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚二甲基硅氧

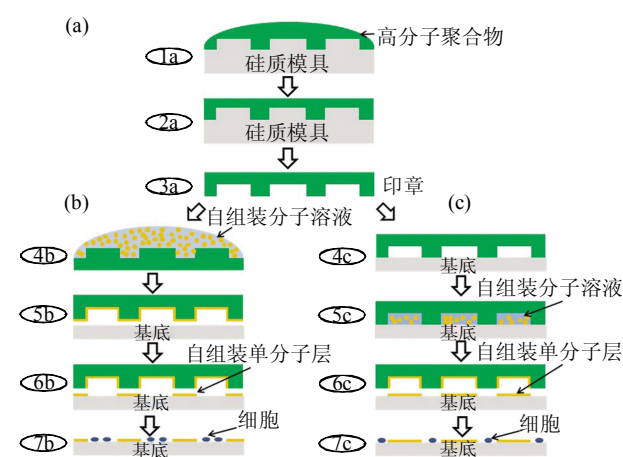


Fig. 4 Schematic illustration of the microcontact printing and microfluidic patterning techniques^[4]

图4 微接触压印与微流体构图两种软光刻技术原理图^[4]

(a)制作软光刻弹性印章。(b)微接触压印法。4b: 浸染自组装分子溶液; 5b: 将印章与基底贴合; 6b: 揭除印章, 基底上形成图形化的自组装分子层; 7b: 接种细胞形成图形。(c)微流体构图法。4c: 印章与基底贴合形成微通道网络; 5c: 微通道中通入表面修饰材料溶液; 6c: 揭除印章, 基底上形成图形化的自组装分子层; 7c: 接种细胞形成图形。

烷(PDMS)、聚乙二醇(PEG)、聚乙醇接枝的聚 L-赖氨酸(PLL-g-PEG)等众多聚合物都被证明可作为钝化剂抑制细胞吸附^[26-30]。

对于微流体构图技术,则是直接将制作好的弹性印章贴合于基底表面,通过自密闭作用形成微通道网络,之后在此网络内通入液态的表面修饰材料。由于被印章贴合的区域不能被液体浸润,所以溶液只会在其流过的表面形成由生化材料构成的薄层,使接种后的细胞特异性地生长于该区域,如图 4b 所示^[24]。虽然微流体构图技术是目前最容易实现的微图形化技术,且相对微接触压印技术更便于控制生化物质密度,但它主要用于形成连续分布的细胞图案,具有一定局限性。

另外,对 μ CP、 μ FLP 的结合使用,可以同时发挥两种方法的优势,Cuvelier 等^[31]在贴合印章形成抑制蛋白质或细胞黏附区域的同时,在印章与基底形成的微管网络中灌注生物素酰交联剂,使该区域形成促进细胞或蛋白质黏附的区域,完成了具有显著对比的微图形制作。

近些年,众多学者开展了软光刻的研究。瑞士联邦科技学院的 Marc 等^[32]研究了聚苯乙烯芯片利用无任何表面特征结构的印章将物质转移至具有所谓 2.5 维结构的基底上,国立新加坡大学的 Lim^[33]研究了具有球面结构的微流体芯片,美国麻省理工学院的 Giovanni 等^[34]结合等离子体修饰方法开展了所谓微流网络技术在管道内实现的细胞图形化。但是,由于软光刻技术一方面需要印章材料具备足够的弹性以保证其与基底间的充分接触,另一方面考虑到图形的精度又要求材料具备一定的刚性,这个矛盾使得软光刻技术目前并不能达到较高的分辨率,其结构最小线性尺寸仅在百纳米量级^[5]。

通过将压印技术与光刻技术两者结合,一种新的纳米压印光刻(nanoimprint lithography)技术得到了应用,这种技术既可避免光刻技术中各种试剂对生物活性物质的危害,又可提高压印法的分辨率,其原理如图 5 所示:首先利用光刻法或其他方法制作印章,再将其压于涂有热塑性材料的基底上,加热至热塑性材料的熔点温度,并对印章加压,使得溶化的聚合物在印章的作用下图形化,待热塑性材料冷却凝固后撤移印章,刻蚀基底并进一步处理获得促进/抑制蛋白质黏附区域形成图形。该方法具有低成本、高通量、高分辨率的特征^[35-36]。Maury

等^[37]已利用该方法实现了红、绿荧光蛋白的图形化分布。

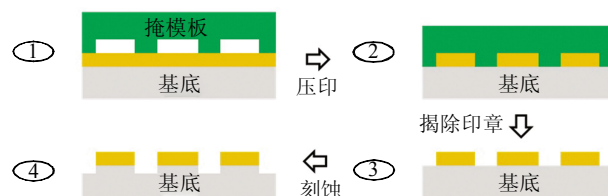


Fig. 5 Schematic illustration of the nanoimprint lithography technique^[35]

图 5 纳米压印光刻技术原理示意图^[35]

1: 将印章压于涂有热塑性材料的基底上; 2: 加热至热塑性材料融化,并在印章压力作用下形成图形; 3: 揭除印章; 4: 刻蚀基底或进一步处理形成对比明显的细胞图形。

3 模板辅助构图法

模板辅助构图法(stencil-assisted patterning)是将有通孔的模具贴合于基底上,接种细胞,待细胞贴附后,剥离模具,只在模具没有保护的基底部分才有细胞黏附生长,从而形成图形^[24]。若通孔外没有阻碍细胞扩散的生化材料,当模板揭除后,已图形化的细胞会快速分裂,并扩散到原本限制的区域外,所以这种方法也常被用于研究细胞扩散机制及多种细胞的共同培养^[4]。

早期该方法使用的金属模具因难于进行微尺度制造,且与基底结合不紧密而不利于微图形的制作。为此,人们开展了很多改进工作。美国麻省医院的 Albert 等^[38]首先采用聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)作为模板,其制作方式如图 6 所示。PDMS 模具具有化学性质稳定、可重复使用且与基底结合紧密的特点,这使得 PDMS 模具能够精确地复制模具上的图案形成印章,同时,由于其柔软的特性,它还可用于多种形状、多种类型的基底表面、生物分子及各种细胞的图形化^[24]。此外,哈佛大学的 Emanuele 等^[39]提出了 MEMPAT 镂空膜,哈佛大学医学院的 Dylan 等^[40]提出了一种基于聚对二甲苯的具有可逆性、可重复使用的镂空模板并用于蛋白质和细胞的图形化。

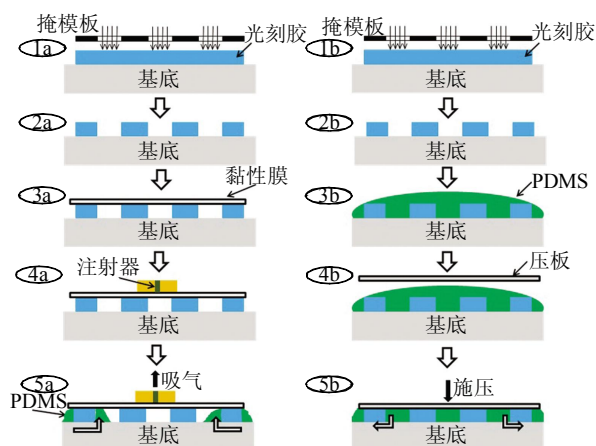


Fig. 6 Schematic illustration of procedure to fabricate PDMS film^[38]

图 6 模板辅助构图 PDMS 薄膜制备流程图^[38]

1: 光刻. 2: 显影. 3a: 用中间带孔的粘性膜盖住光刻胶形成微流腔; 4a: 在中间穿孔处安装外接注射器; 5a: 将 PDMS 由晶片边缘吸向中心充满微流腔, 形成 PDMS 薄膜. 3b: 在晶片上涂布 PDMS; 4b: 将板材压于晶片上; 5b: 对板材施压使剩余 PDMS 流出, 形成图形化薄膜.

Tourovskaja 等^[41]提出了一种在模板去除后仍能保持细胞图形的方法, 如图 7 所示, 由于互穿网络有效抑制了纤连蛋白的吸附及细胞的扩散, 通过这种方法制作的细胞图样可保持 60 天之久.

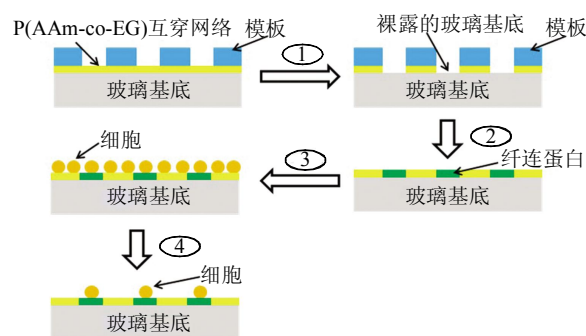


Fig. 7 Schematic illustration of the stencil-assisted patterning technique^[41]

图 7 模板辅助构图技术原理示意图^[41]

1: 在玻璃基底上接枝具有抑制蛋白质、细胞吸附作用的聚合物互穿网络, 并贴合模板, 在模板作用下进行离子刻蚀, 去除通孔区域的聚合物; 2: 在非互穿网络区域接种纤连蛋白; 3: 接种细胞; 4: 移除未黏附细胞形成图形.

模板辅助构图法的优点在于一旦制得模板, 后续过程就不需繁琐的步骤或特殊仪器及复杂的化学

处理, 具有易操作性、大范围及成本较低的特点. 另外, 该方法还能更广泛地适用于众多基底材料, 如金属、氧化物、各种硬或软的聚合物等, 而对有机溶剂的避免也是这种方法的一大特点.

4 扫描探针加工技术

随着科学研究的逐步深入, 早期用于材料表面三维形貌观察的扫描探针显微镜逐渐被用于纳米加工及纳米图案制备^[42]. 由于这种方法是对单个分子、原子或纳米粒子的操作, 所以具有极高的分辨率, 其中, 原子力显微镜(ATM)在这方面的应用最为广泛^[43].

扫描探针加工技术(scanning-probe lithography, SPL)最简单的应用就是利用探针与材料表面的物理接触进行刻蚀动作^[44]. 这需要将探针固定在一定高度, 并施加足够大的力切割基底表面, 该方法可以刻蚀出线及矩形, 已被用于聚合物、金属、无机混合物及半导体等诸多材料的加工^[45]. 为了减小探针的损害, 热机械切割被用于扫描探针加工技术中. Yang 等^[46]利用加热的 AFM 探针在聚合物表面进行构图. 由于加热使得聚合物变得柔软, 从而减小了作用力, 这也使得采用探针阵列进行构图的技术成为可能, 极大地提高了图形化效率^[47]. 利用扫描隧道显微镜(STM)也可对纳米粒子、纳米晶体、DNA、蛋白质及原子进行操作^[48-50]. 这是通过将探针置于与微粒足够近的位置(nm 量级), 使二者之间产生隧道反应, 从而产生驱动力对粒子进行操作^[51-52].

众多 SPL 方法都依赖于探针与基底的物理接触, 但事实上, 利用扫描探针的图形化技术也可以通过探针 - 样品间的电场实现, 由于两者间的电势差, 探针 - 基底间可产生极大的电场, 并引发诸如阳极氧化、场蒸发等物理、化学反应, 从而实现图形化^[53].

探针阳极氧化图形化技术是最常用的方法之一^[54]. 带有电势的探针通过适宜的溶液与待沉积分子发生关联, 通过氧化还原反应提供氢氧离子(OH⁻)促进氧化膜的生长, 该技术已在硅基、自组装分子层等表面得到了应用, 如图 8 所示^[55]. 由于探针与基底之间的距离足够小, 传统需要局部电压达到 10~100MV 才能产生的原子电离、喷发现象, 即所谓场蒸发, 在 SPL 方法中, 仅需要不到 5V 即可实现, 如 Mamin 等^[56]在超高真空的 STM 中施加小于 5V 的电势, 实现了 Au 原子的沉积.

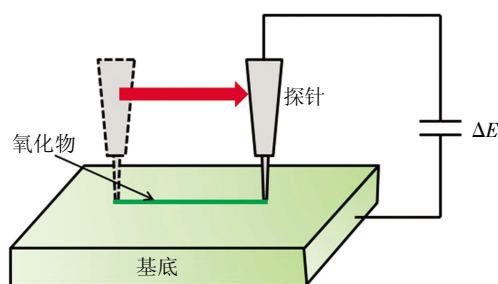


Fig. 8 Schematic illustration of the anodic oxidation technique^[55]

图 8 探针阳极氧化图形化技术^[55]

另外一种 SPL 技术是 Mrikin 发明的基于 AFM 直接在材料表面进行书写的技术 (dip-pen nanolithography, DPN), 如图 9 所示, AFM 探针作为“笔”浸入待黏附粒子的溶液, 将粒子作为“墨水”吸附于探针上, 随后通过微毛细管作用, 将粒子从探针转移至基底表面形成图形, 探针尖端的尺寸决定了可以将微粒“书写”于基底表面的最小结构, 目前已可以制造小于 15 nm 的结构^[57-59]. 随着 DPN 技术的发展, 其已被广泛用于表面高分子聚合物图案制备、纳米粒子及胶体粒子图案制备, 在生化方面, DPN 也已实现 DNA、多肽、蛋白质、病毒及细菌的图形化制备, 虽然这种方法具有分辨率高、使用灵活等诸多优点, 但早期由于它的低通量性, 无法批量生产成为其主要限制因素^[60-62]. 不过在 2006 年, Salaita 等^[63]制造了大规模并行二维探针阵列用于图形化金微粒, 通量率达到 $3 \times 10^7 \mu\text{m}^2/\text{h}$, 极大地提高了 DPN 技术的效率. Sheehan 等^[64]则提出了一种热 DPN 技术, 该技术利用易于熔化的固体墨水及特殊的可加热悬臂梁克服了传统 DPN 不能控制“书写”间断的缺点.

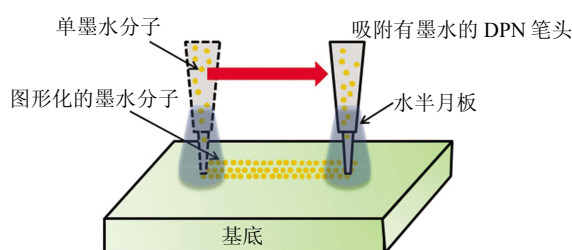


Fig. 9 Schematic illustration of dip-pen nanolithography^[57]

图 9 DPN 技术原理示意图^[57]

在上述技术的基础上, 纳米移植(nanografting)技术被提出并应用. 该技术是在分子自组装薄层上操作, 通过将探头控制在分子自组装层的位置, 利用机械接触剥离原有薄层, 同时促进溶液中的其他分子黏附在因探头切割原分子层而产生的裸露表面上, 如图 10 所示^[65]. 由于自组装层本身即是黏附到基底表面的, 所以实现 nanografting 所要求的驱动力较小(约 2nN 左右), 减小了对探头的损坏. 结合 DPN 技术, 纳米移植可以实现对原有图样的擦除、修改等操作, 取决于 AFM 探头上黏附的粒子类型^[66].

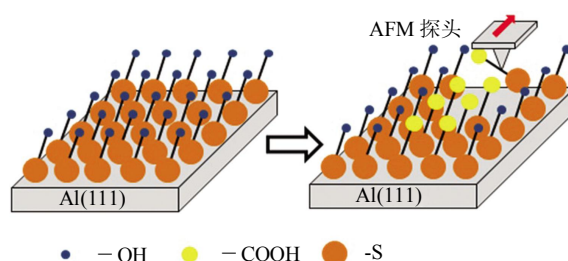


Fig. 10 Schematic illustration of the nanografting technique^[65]

图 10 纳米移植原理示意图^[65]

5 喷墨构图技术

喷墨构图技术(jet patterning)包括制备“墨水”材料、沉积“墨水”液滴等步骤, 喷墨之后, 液滴往往通过溶剂蒸发、化学变化(如与聚合物交联)或冷凝(如结晶或玻璃化)等过程形成固体. 其基本原理如图 11 所示, 当“墨水”进入印刷头之后, 通过激励源(如压电陶瓷等)加压, 或通过液滴自重破坏表面张力, 使液滴通过喷嘴, 再使带电液滴在电场中偏移进行构图. Sanjana 等^[67]提出了一种基于喷墨打印方法的细胞图形化制作技术. 利用喷墨打印机在基底上相应区域喷涂上易于细胞黏附的材料, 可以实现神经细胞的图形化. 这种喷墨技术可以向快速化、低廉化及灵活化方向发展, 尤其在基底材料的选择上, 该技术限制因素较少. 但同时, 喷墨技术的墨点大小及分辨率受打印机、喷嘴直径及“墨水”表面张力的限制, 早先其最小尺寸只能达到 100 μm 左右. 为此, Vaillancourt 等^[68]开发了一种浮粒喷墨技术, 如图 12 所示. 该技术首先将液体材料通入喷雾器中, 通过超声或气压雾化法产生直径为 1~5 μm 的微液滴, 在氮气的承载下流

入沉积管, 通过环形气流校准并喷在基底上, 形成 $5\sim 150\ \mu\text{m}$ 的液滴, 显著提高了喷墨构图法的分辨率. 该技术在制造单细胞阵列芯片方面具有较大的发展潜能.

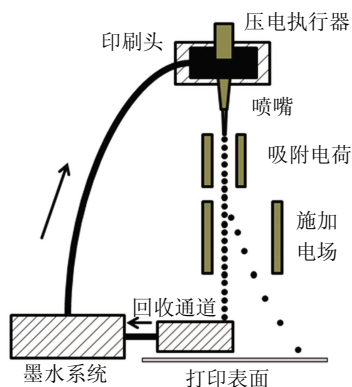


Fig. 11 Schematic illustration of the inkjet-based patterning^[1]

图 11 喷墨构图技术原理示意图^[1]

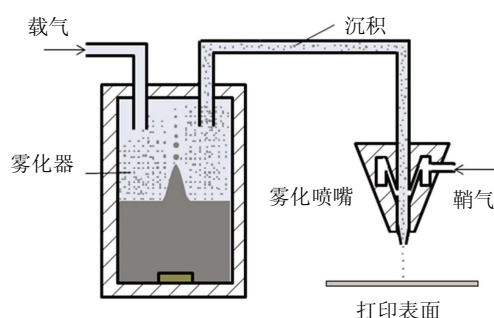


Fig. 12 Schematic diagram of the aerosol jet patterning^[67]

图 12 浮粒喷墨技术原理示意图^[67]

6 激光诱导图形化技术

近年来, 随着激光技术的发展, 利用激光诱导实现生物大分子图形化的技术 (laser guided patterning) 被提出. Fan 等^[69]提出一种利用激光诱导转移沉积生物分子的方法, 如图 13 所示. 在基底上方 $25\sim 100\ \mu\text{m}$ 处平行放置一块盖有待沉积生物分子薄膜的吸收剂材料 (或称牺牲层), 激光局部加热该材料, 使其熔化形成包含待沉积生物分子的溶液, 落于下方基底上, 形成图样. 利用该技术, Fernandez 等^[70]将马哈鱼精子 DNA 沉积在盖有 poly-L-lysine 薄膜的基底上, 另外, 蛋白质、细胞

等生物物质也能通过此方法进行图形化^[71]. 由于激光吸收深度在 $2.2\sim 10.5\ \text{nm}$ 之间, 所以可以很大程度地避免激光与生物分子相互反应, 但受限于牺牲层熔点、考虑生物兼容性下的激光功率及光束直径, 该技术分辨率目前仅为 μm 量级^[72].

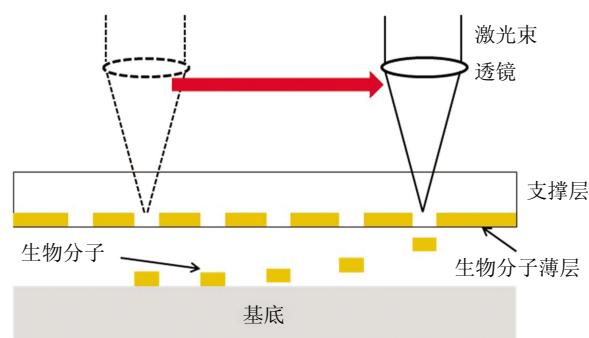


Fig. 13 Schematic illustration of the laser-induced forward transfer technique^[69]

图 13 激光诱导沉积技术原理示意图^[69]

Pique 等^[73]将上述方法改进, 使待沉积物质从下方通过黏附剂贴附在吸热透明载体上, 激光聚焦于吸热载体, 使黏附剂分解为挥发物质, 引起待沉积物质脱离并沉积于基底上. 通过这种改进, 避免了待沉积物与吸收剂的混合及待沉积物结构、功能的潜在改变.

另外一种激光诱导图形化方法是通过光作用力引导细胞或生物分子沉积在基底表面特定位置实现的. 当待沉积微粒或细胞具有相比周围环境更高的折射率时, 将趋向于被激光限制在光强度最大的区域, 即所谓的光阱中, 这种光镊技术可以对细胞、微粒进行移位. 此光作用力源于细胞所处环境光强不同导致的动量差, 大小在 pN 量级. 光焦点距微粒越远, 光作用力越小, 当距离足够远时, 自然对流将超越光作用力成为主导微粒运动趋势的因素. Nahmias 等^[74]利用聚焦激光, 将光路径上距焦点 $300\ \mu\text{m}$ 内的微粒引导于介质表面进行图形化, 但当该距离大于 $300\ \mu\text{m}$ 时, 由于溶液自然对流作用强于光作用, 将不能有效引导微粒, 为此, Nahmias 等引入了光纤, 使激光在其中全反射传输, 克服了上述限制, 提高引导距离至接近 $7\ \text{mm}$, 如图 14 所示. 目前, 利用光镊技术已成功完成了对金属、硅、聚合物、细菌及多种细胞的图形化.

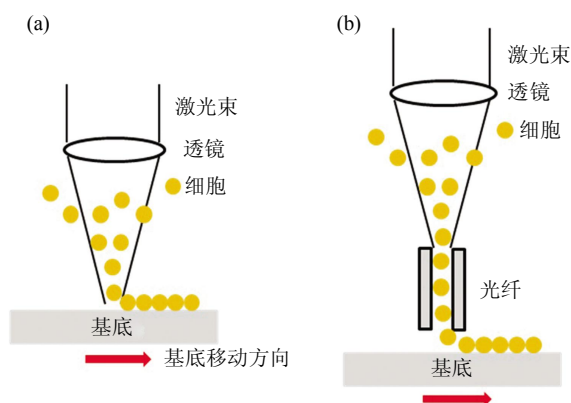


Fig. 14 Schematic illustration of the optical tweezers technique^[75]

图 14 光镊技术原理示意图^[75]

(a) 利用光镊技术将距焦点 300 μm 内的微粒引导于介质表面. (b) 在光镊技术中引入光纤以引导距焦点更远的微粒.

光镊技术的分辨率可以达到 μm 量级, 且在构造由不同细胞组成的图形化结构方面具备潜能, 尤其非常适于构造具有多层次的 3D 图形结构^[4]. 但同时, 由于激光光强有可能影响细胞或生物分子的结构或功能, 所以其在引导距离、构图速率等方面存在一定限制^[73]. 另外, 为了使细胞在进行光镊作用后可以保持在原有位置, 此技术还需要结合特定的表面化学技术以实现更好的图形化效果^[75].

7 现有方法的对比分析

从以上各节的论述可以看出, 目前研究的微图形化方法总体上可归为基于光刻相关技术的并行加工方法和基于直接写入技术的微细加工方法. 各种微图形化方法都具有不同的优点与局限性.

光刻法作为一种发展成熟的微图形加工技术, 具有精度高、重复性好、制作的图形尺寸范围宽、能够精确对准等优点, 但其高昂的运营成本、对超净间的依赖仍是这种方法的一大限制因素. 同时, 尽管一些能够避免传统有机溶剂处理步骤的光刻方法被提出, 但其图样质量仍不能令人满意, 生物相容性在未来很长一段时间内还是该方法需要解决的主要矛盾.

软光刻法针对传统光刻法的缺陷入手, 不再依赖高昂的仪器与超净间, 以其出众的生物相容性、低成本优势及简单的加工过程成为了光刻法的一种替代技术. 软光刻法避免了对光刻机的使用, 所以其分辨率也不再受制于衍射极限, 而由分子动力学

及分子间相互作用制约, 理论上可以达到分子尺度量级. 然而, 由于没有多次压印间精确对准的机制, 所以软光刻在制作复杂图形方面还不能与光刻法比拟.

模板辅助构图法从本质上来讲与软光刻法并无不同, 都是借助弹性较好的模板贴合基底来制造微图形, 从而不再依赖于光刻机、超净间及有机溶剂的处理. 制作完成的模板可以重复多次使用, 更使得其无论在成本、生物相容性、加工过程上都存在着较大的优势. 当然, 作为一种简单的图形化工具, 这种技术还不能加工复杂、多层的图形结构.

以上技术都属于并行加工的范畴, 而下述直接写入技术则提供了另一种微图形化加工理念.

扫描探针加工技术牺牲了并行加工方式速度较快的优势, 针对少量微粒甚至单个微粒进行写入操作, 可以构造几纳米至几百纳米的具有极高分辨率的微结构, 可以在金属或绝热材料表面沉积, 如有机分子、聚合物、纳米粒子、大生物分子及无机物等众多材料. 不需要特殊的加工环境, 使得其成为了唯一能够在大气环境中构造小于 50 nm 特征尺寸图形的方法. 近十几年来, 通过探针的阵列化, 该技术正逐渐转变为一种高通量的纳米图形化技术, 但仍存在因探针阵列精确度不够导致的过渡切割、刻蚀及图形错线、漏线等缺陷, 实现“墨水”的关、开也是其重点发展方向.

喷墨构图技术不同于其他主要应用于实验室中的图形化技术, 而是将产业化应用扩展到了生物医学研究领域, 其具有设备简单、成本低廉的特点. 但目前该技术仅能达到 10 μm 左右的分辨率, 其在液滴形成、液滴与基底接触过程及固化过程等方面需要更深入的研究, 在墨水材料适应性方面也需要进一步提高.

激光诱导沉积技术运用激光功率密度大的特点, 最大限度地减小加工过程对生化材料的影响, 使其可以无损地对各种生物分子, 甚至于活细胞、组织进行图形化, 同时便于控制图形厚度, 而这正是喷墨打印法力求突破的问题. 但受限于激光光束直径, 该技术分辨率还只能达到 μm 量级, 成本高, 沉积物质具有局限性也是该技术未来需要解决的难题.

光镊技术是近十几年刚刚兴起的新方法, 该技术利用光学力对单微粒进行操作, 避免了扫描探针加工技术中高精度探针制造的问题, 具有灵活性、精确性的特点, 可以无损地图形化生物物质及细

胞, 但必要的液体环境使其目前仅适用于微小微粒的图形化, 增加微粒黏附力, 提高构图速率是其未来主要发展方向。

8 微图形化技术在生物医学领域的应用

微图形化技术的出现及发展使人们得以在分子水平上进行生物医学方面的研究, 它为人们理解生物机理、药物作用及生化反应提供了一种快速、实时、精确的检测手段及研究工具。微图形化技术在药物筛选与新药开发、组织工程、疾病诊断等方面的应用, 促进了这些领域的快速发展。

8.1 药物筛选与新药开发

传统的药物筛选与新药开发方法主要针对动物组织进行, 通过追踪病理的生化途径, 寻找对病变起关键作用的生物物质进行提纯, 然后采用各种可能的药物与靶分子作用进行药物筛选^[76]。这种筛选方式具有技术复杂、检测效率低、自动化程度低、低通量、动物实验多、药物用量大、成本高等缺点^[77]。微图形化技术的发展不仅提供了一种替代昂贵、费时的动物实验的研究手段, 更将研究层级提高到了细胞甚至基因水平, 其高通量的优势大大减小了药物筛选与新药开发的周期。

通过微图形化技术将细胞固定在传感器的敏感位点, 可以快速、实时、精确地检测细胞对药物的反应, 从而进行药物筛选。例如, 神经细胞的状态往往可以由其轴突、树突的生长状态反映^[78], 制作具有特定距离的神经细胞点阵可以避免相邻细胞神经突覆盖而导致的突触长度测量困难, 使得自动化监控药物作用下细胞的神经突数目及长度成为了可能^[79]。Castillo 等^[80]在细胞培养基底部制造微电极, 并将敏感化学物固定于电极表面, 用于选择性检测谷氨酸盐, 将神经细胞植入后, 该生物传感器可以实时监测细胞对谷氨酸盐的释放和摄入, 可以用于探索潜在的脑功能障碍治疗药物。

进一步地, 微图形化技术与基因芯片技术结合可以将药物机理研究层级提高到基因水平, 便于研究药物分子的作用机制, 已在药物筛选中得到了广泛应用^[81]。所有药物都是直接或间接地通过修饰、改变相关基因的表达及表达产物的功能而生效^[82], 利用平行测定基因的表达方式来发现有意义的靶标, 或直接筛选基因文库以选择药物靶点, 往往需要具有众多靶分子的系统来对药物的效率、特异性、毒性及代谢能力等进行综合评价, 结合微图形化技术设计相应的基因芯片, 生成一种基底上包含

大量信息的 DNA 探针阵列, 通过杂交测序方法检测探针位置, 可以快速获取样本信息, 从而大大提高药物筛选效率^[83]。

8.2 组织工程

利用生物材料刺激组织再生、修复已成为组织工程的重要发展方向。生物材料只有在很好地适应其植入位点的环境时才能发挥其应有的功用, 而界面特征对生物过程起着至关重要的作用, 细胞接触界面的化学基团、界面形态及弹性决定了细胞的贴附、生长、分裂、迁移过程^[84]。为了得到期望的细胞反应, 对界面上发生的生物过程进行深入研究十分必要, 而微图形化技术正为这种研究提供了一个全新的平台。

神经修复的研究一直是组织工程面临的一大问题^[84], 目前治疗神经损伤的主流方法是自体神经移植, 但其具有两个显著缺点: 一是由于移植神经组织形状与损伤部位的不匹配导致的不完全修复, 二是由于自体移植所引入的对其他健康组织的再损伤^[85]。Kidambi 等^[86]利用神经细胞相对胶质细胞更易在柔性材料上生长的特性, 通过微接触压印技术控制两种细胞的贴附位置, 诱导了神经细胞的再生。利用微图形化技术构造具有渐变刚度特征的表面, Lamoureux 等^[87]发现, 神经细胞会向表面刚度低的方向生长, 此外, 层粘连蛋白(laminin)、神经生长因子、I 型胶原凝胶及表面的亲水性等都有引导神经突触生长方向的作用^[88-90]。在针对其他细胞的研究中, 表面电荷、功能团类型及密度、粗糙度、表面形貌等因素均可能影响细胞的贴附、生长、迁移、繁殖过程, 利用微图形化技术控制这些参量, 使人们得以更好地控制细胞及组织行为^[91]。

更进一步的组织再生、修复治疗方法是在支架中植入源干细胞。寻找可以诱导分化方向的因素对于干细胞研究及组织修复治疗具有重要意义^[92], 利用微图形化技术则可大大提高相关实验的效率。Engler 等^[93]发现, 通过改变神经细胞、成肌细胞及成骨细胞贴附表面的刚度, 可以控制这些细胞的分化, 而 PEG、polyallylamine 可以促进干细胞的软骨分化, 胺基修饰表面与羧基修饰表面对干细胞分化的影响明显^[94]。除了表面生化分子会对干细胞分化方向产生影响外, 表面形貌也具有显著作用。培养于圆柱形结构或方形结构间隙间的干细胞表现出了不同的分化程度, 无序的表面图形会刺激干细胞的软骨分化^[95-96]。利用微图形化技术可以在一块芯片上构造由不同聚合物组成的尺寸不一的图形, 在

这种多特征表面对干细胞的贴附、繁殖、分化现象进行研究,可大大加快研究进程.

8.3 疾病诊断

作为快速、灵敏、高通量的检测手段,生物传感器在预防、诊断疾病方面已经发挥了非常重要的作用,但是在一些重大疾病诊断方向仍急需更深入的研究.例如,癌症疾病细分多达 200 余种,对癌症的归类和早期检测对尽早开展针对特定癌症的治疗具有重要意义,但是,由于生物系统的复杂性,常需要几十个传感器来共同检测,从而确诊^[97].应用微图形化技术,则可以尝试将多种生物受体集成在一片可寻址传感器上,通过对样本的并行、高通量检测,简化癌症确诊流程,为疾病治疗赢得宝贵的时间.

借助微图形化技术的基因芯片技术也在疾病诊断方面具有重要应用,例如,单核苷酸多态性文库是人类 DNA 序列中数量众多的变异区,这些变异区常导致临近区域的病变.根据该文库设计的基因诊断芯片,不但可以快速诊断相关遗传病,还有助于人们发现新的导致疾病的突变基因,从而深入了解疾病的致病机理^[82].

9 结论与展望

微图形化技术大大促进了生物医学领域的发展,为提高人类生命的质量提供了一种全新的研究手段.现有技术中有些尚处于发展初期,如激光诱导图形化技术,有些则已较为成熟并被广泛应用.微图形化技术将早先人们仅能在毫米尺度控制生物组织的状况提高到了纳米水平,使我们能够精确地固定细胞、蛋白质甚至更小的生物微粒,以进行更深入的研究.

从应用的角度来看,我们可以得出以下结论:

a. 现有微图形化技术覆盖了从 mm 到 nm 尺度的大范围加工需要,分辨力与精度、图形化规模、实验加工条件等是选择不同图形化方法的主要依据;
b. 目前的微图形化技术已可以将生化材料沉积在平、曲、圆、弹性甚至不规则基底上,从而大大扩展了该技术在生物医学领域的应用范围;
c. 多种现有图形化技术的结合或图形化技术与其他新的微加工技术的结合是未来微图形化技术的发展方向,类似于纳米压印技术的混合技术将更多地出现.

从目前发展来看,未来微图形化技术还存在众多挑战与难题,主要包括:a. 目前微图形化技术还或多或少地依赖于化学药剂的辅助处理,从而显

著影响了该技术的生物兼容性,这将是未来发展中需重点克服的问题;
b. 在现有实验研究基础上,需要基于生物物理、生物化学等对分子、纳米尺度的微粒进行理化分析,并对微图形化过程中的各参数进行更深入地定量研究,以揭示不同过程的内在机理;
c. 进一步提高表面修饰材料的黏附力,并提高分辨率、覆盖准确率等指标,以提高其实际应用水平;
d. 优化材料及加工流程,减少微图形化技术对环境的要求及处理过程对环境的影响,进一步拓展其应用范围;
e. 在体外模拟体内复杂的微环境,使得这一体外分析技术能够更好地反映细胞迁移、生长、变异、衰老、凋亡、自噬或病变的过程,以使其发挥更大作用.

参 考 文 献

- [1] Hon K K B, Li L, Hutchings I M. Direct writing technology—advances and developments. *Manufacturing Technology*, 2008, **57**(2): 601–620
- [2] Ogaki R, Alexander M, Kingshott P. Chemical patterning in biointerface science. *Materials today*, 2010, **13**(4): 22–35
- [3] Lisboa P, Valsesia A, Colpo P, *et al.* Nanopatterned surfaces for bio-detection. *Biosensors*, 2010, **43**(10): 1556–1571
- [4] Falconnet D, Csucs G, Grandina H M, *et al.* Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. *Biomaterials*, 2006, **27**(16): 3044–3063
- [5] Saavedra H M, Mullen T J, Zhang P P, *et al.* Hybrid strategies in nanolithography. *Reports on Progress in Physics*, 2010, **73**(3): 36501–36541
- [6] Salem A K, Stevens R, Pearson R G, *et al.* Interactions of 3T3 fibroblasts and endothelial cells with defined pore features. *J Biomed Mater Res*, 2002, **61**(2): 212–217
- [7] Winkelmann M, Goldb J, Hauert R, *et al.* Chemically patterned, metal oxide based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell-surface interactions. I : Microfabrication and surface characterization. *Biomaterials*, 2003, **24**(7): 1133–1145
- [8] Scotchford C A, Ball M, Winkelmann M, *et al.* Chemically patterned, metal-oxide-based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein- and cell- interactions. II : Protein adsorption and early cell interactions. *Biomaterials*, 2003, **24**(7): 1147–1158
- [9] Healy K E, Thomas C H, Rezanian A, *et al.* Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. *Biomaterials*, 1996, **17**(2): 195–208
- [10] Veis M, Wickes B T, Castner D G, *et al.* Guided cell patterning on gold-silicon dioxide substrates by surface molecular engineering. *Biomaterials*, 2004, **25**(16): 3315–3324
- [11] Lussi J W, Michel R, Reviakine I, *et al.* A novel generic platform for chemical patterning of surfaces. *Prog Sur Sci*, 2004, **76**(3–5): 55–69

- [12] Zhang J, Venkataramani S, Xu H, *et al.* Combined topographical and chemical micropatterns for templating neuronal networks. *Biomaterials*, 2007, **27**(33): 5734–5739
- [13] Falconnet D, Koenig A, Assi F, *et al.* A combined photolithographic and molecular-assembly approach to produce functional micropatterns for applications in the biosciences. *Adv Func Mat*, 2004, **14**(8): 749–756
- [14] El-Ali J, Sorger P K, Jensen K F. Cells on chips. *Nature*, 2006, **442**(7101): 403–411
- [15] Ilic B, Craighead H G. Topographical patterning of chemically sensitive biological materials using a polymer-based dry lift off. *Biomed Microd*, 2000, **2**(4): 317–322
- [16] Orth R N, Wu M, Holowka D A, *et al.* Mast cell activation on patterned lipid bilayers of subcellular dimensions. *Langmuir*, 2003, **19**(5): 1599–1605
- [17] Gray D S, Tan J L, Voldman J, *et al.* Dielectrophoretic registration of living cells to a microelectrode array. *Biosens Bioelectron*, 2004, **19**(7): 771–780
- [18] Cheng X H, Wang Y B, Hanein Yae, *et al.* Novel cell patterning using microheater-controlled thermoresponsive plasma films. *J Biomed Mater Res*, 2004, **70A**(2): 159–168
- [19] Vernekar V N, Cullen D K, Fogleman N, *et al.* SU-8 2000 rendered cytocompatible for neuronal bioMEMS applications. *J Biomed Mater Res*, 2009, **89A**(1): 138–151
- [20] Wei H, Kenneth E G, John H, *et al.* Synthesis, characterisation, and preliminary biological study of poly (3- (tert-butoxycarbonyl)-N-vinyl-2-pyrrolidone). *Biomacromolecules*, 2003, **4**(1): 75–79
- [21] Carrico I S, Maskarinec S A, Heilshorn S C, *et al.* Lithographic patterning of photoreactive cell-adhesive proteins. *J Amer Chem Soc*, 2007, **129**(16): 4874–4875
- [22] Kim J B, Ganesan R, Yun H J, *et al.* Photobleachable silicon-containing molecular resist for deep UV lithography. *J Mater Chem*, 2006, **16**(34): 3448–3451
- [23] Dubey M E, Kazunori, Takahashi H, *et al.* Affinity-Based protein surface pattern formation by ligand self-selection from mixed protein solutions. *Adv Func Mat*, 2009, **19**(19): 3046–3055
- [24] 邵建波, 金庆辉, 赵建龙. 基于微系统技术的细胞微操控、细胞图形化方法及应用. *中国生物工程杂志*, 2007, **27**(7): 106–111
- Shao J B, Jin Q H, Zhao J L. *Chin Biotech*, 2007, **27**(7): 106–111
- [25] Bernard A, Fitzli D, Sonderegger P, *et al.* Affinity capture of proteins from solution and their dissociation by contact printing. *Nat Biotech*, 2001, **19**(9): 866–869
- [26] Vogt A K, Stefani F D, Best A, *et al.* Impact of micropatterned surfaces on neuronal polarity. *J Neurosci Methods*, 2004, **134**(2): 191–198
- [27] Schmalenberg K E, Buettner H M, Uhrich K E. Microcontact printing of proteins on oxygen plasma-activated poly (methyl methacrylate). *Biomaterials*, 2004, **25**(10): 1851–1857
- [28] De Silva M N, Desai R, Odde D J. Micro-patterning of animal cells on PDMS substrates in the presence of serum without use of adhesion inhibitors. *Biomed Microd*, 2004, **6**(3): 219–222
- [29] Patel N, Bhandari R, Shakesheff K M, *et al.* Printing patterns of biospecifically-adsorbed protein. *J Biomat Sci—Polym E*, 2000, **11**(3): 319–331
- [30] Csucs G, Michel R, Lussi J W, *et al.* Microcontact printing of novel co-polymers in combination with proteins for cellbiological applications. *Biomaterials*, 2003, **24**(10): 1713–1720
- [31] Cuvelier D, Rossier O, Bassereau P, *et al.* Micropatterned "adherent/repellent" glass surfaces for studying the spreading kinetics of individual red blood cells onto protein-decorated substrates. *Euro Biophy J Biophys Lett*, 2003, **32**(4): 342–354
- [32] Marc R D, Schlaepfer D, Koch M, *et al.* An inverted microcontact printing method on topographically structured polystyrene chips for arrayed micro-3-D culturing of single cells. *Biomaterials*, 2005, **26**(29): 5917–5925
- [33] Lim C T, Zhang Y. Novel dome-shaped structures for high-efficiency patterning of individual microbeads in amicrofluidic device. *SMALL*, 2007, **3**(4): 573–579
- [34] Giovanni T F, Ni B, Ling Y B, *et al.* A controlled-release strategy for the generation of cross-linked hydrogel microstructures. *J Amer Chem Soc*, 2006, **128**(47): 15064–15065
- [35] Bogdanski N, Wissen M, Mollenbeck S, *et al.* Polymers below the critical molecular weight for thermal imprint lithography. *Microelec Engin*, 2008, **85**(5–6): 825–829
- [36] He Y, Fu J Z, Chen Z C. Research on optimization of the hot embossing process. *J Micromech Microeng*, 2007, **17**(12): 2420–2425
- [37] Maury P, Escalante M, Peter M, *et al.* Creating nanopatterns of his-tagged proteins on surfaces by nanoimprint lithography using specific NiNTA-Histidine interactions. *SMALL*, 2007, **3**(9): 1584–1592
- [38] Albert F, Byung H J, Byung H H, *et al.* Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures. *J Biomed Mater Res*, 2000, **52**(2): 346–353
- [39] Emanuele O, Ravi K, Christopher S, *et al.* Patterning mammalian cells using elastomeric membranes. *Langmuir*, 2000, **16** (20): 7811–7819
- [40] Dylan W, Bimalraj Rajalingam, Jeffrey M Karp, *et al.* Reusable, reversibly sealable parylene membranes for cell and protein patterning. *J Biomed Mater Res*, 2008, **85**(2): 530–538
- [41] Tourovskaia A, Barber T, Wickes B T, *et al.* Micropatterns of chemisorbed cell adhesion-repellentfilms using oxygen plasma etching and elastomeric masks. *Langmuir*, 2009, **19**(11): 4754–4764
- [42] Li X D, Nardi P, Baek C W, *et al.* Direct nanomechanical machining of gold nanowires using a nanoindenter and an atomic force microscope. *J Micromech Microeng*, 2005, **15**(3): 551–556
- [43] Gnecco E, Bennewitz R, Meyer E. Abrasive wear on the atomic scale. *Phys Rev Lett*, 2002, **88**(21): 215501
- [44] Hyon C K, Choi S C, Hwang S W, *et al.* Direct nanometer-scale patterning by the cantilever oscillation of an atomic force microscope. *Appl Phys Lett*, 1999, **75**(2): 292–294
- [45] Schumacher H W, Keyser U F, Zeitler U, *et al.* Nanomachining of mesoscopic electronic devices using an atomic force microscope. *Appl Phys Lett*, 1999, **75**(8): 1107–1109

- [46] Yang F, Wornyo E, Gall K, *et al.* Nanoscale indent formation in shape memory polymers using a heated probe tip. *Nanotechnology*, 2007, **18**(28): 5302
- [47] Eigler D M, Schweizer E K. Positioning single atoms with a scanning tunneling microscope. *Nature*, 1990, **344**(6266): 524–526
- [48] Ritter C, Heyde M, Schwarz U D, *et al.* Controlled translational manipulation of small latex spheres by dynamic force microscopy. *Langmuir*, 2002, **18**(21): 7798–7803
- [49] Hla S W, Braun K F, Rieder K H. Single-atom manipulation mechanisms during a quantum corral construction. *Phys Rev B*, 2003, **67**(20): 1402
- [50] Moore A M, Weiss P S. Functional and spectroscopic measurements with scanning tunneling microscopy. *Annu Rev Anal Chem*, 2008, **1**: 857–882
- [51] Celotta R J, Strosio J A. Trapping and moving atoms on surfaces. *Adv Atom Mol Opt Phys*, 2005, **51**: 363–383
- [52] Fernandez-Torres L C, Sykes E C H, Nanayakkara S U, *et al.* Dynamics and spectroscopy of hydrogen atoms on Pd. *J Phys Chem B*, 2006, **110**(14): 7380–7384
- [53] Xie X N, Chung H J, Sow C H, *et al.* Nanoscale materials patterning and engineering by atomic force microscopy nanolithography. *Mat Sci Engin: R*, 2006, **54**(1–2): 1–48
- [54] Xie X N, Chung H J, Sow C H, *et al.* Microdroplet and atomic force microscopy probe assisted formation of acidic thin layers for silicon nanostructuring. *Adv Func Mater*, 2007, **17**(6): 919–926
- [55] Rolandi M, Suez I, Dai H J, *et al.* Dendrimer monolayers as negative and positive tone resists for scanning probe lithography. *Nano Lett*, 2004, **4**(5): 889–893
- [56] Mamin H J, Chiang S, Birk H, *et al.* Gold deposition from a scanning tunneling microscope tip. *J Vacu Sci Techn*, 1991, **9**(2): 1398–1402
- [57] Piner R D, Zhu J, Xu F, *et al.* 'Dip-pen' nanolithography. *Science*, 1999, **283**(5402): 661–663
- [58] Rozhok S, Piner R, Mirkin C A. Dip-pen nanolithography: what controls ink transport. *J Phys Chem B*, 2003, **107**(3): 751–757
- [59] Schwartz D K, Steinberg S, Israelachvili J, *et al.* Growth of a self-assembled monolayer by fractal aggregation. *Phys Rev Lett*, 1992, **69**(23): 3354–3357
- [60] Jang J Y, Schatz G C, Ratner M A. Liquid meniscus condensation in dip-pen nanolithography. *J Chem Phys*, 2002, **116**(9): 3875–3886
- [61] Salaita K, Wang Y H, Mirkin C A. Applications of dip-pen nanolithography. *Nat Nanotech*, 2007, **2**(3): 145–155
- [62] Manandhar P, Jang J, Schatz G C, *et al.* Anomalous surface diffusion in nanoscale direct deposition processes. *Phys Rev Lett*, 2003, **90**(11): 55051–55054
- [63] Salaita K, Wang Y, Fragala J, *et al.* Massively parallel dip-pen nanolithography with 55000-pen two-dimensional arrays. *Angew Chem*, 2006, **118**(43): 7378–7381
- [64] Sheehan P E, King W P, Laracuente A R, *et al.* Thermal dip pen nanolithography. *Chemical Biochemical Research NRL Review*, 2006: 1–2
- [65] Gamo J C, Zangmeister C D, Batteas J D. Directed electroless growth of metal nanostructures on patterned self-assembled monolayers. *Langmuir*, 2007, **23**(14): 7874–7879
- [66] Jang J W, MasPOCH D, Fujigaya T, *et al.* A 'molecular eraser' for dip-pen nanolithography. *SMALL*, 2007, **3**(4): 600–605
- [67] Sanjana N E, Fuller S B. A fastflexible ink-jet printing method for patterning dissociated neurons in culture. *J Neuroscience Methods*, 2004, **136**(2): 151–163
- [68] Vaillancourt J, Zhang H, Vasinajindakaw P, *et al.* All ink-jet-printed carbon nanotube thin-film transistor on a polyimide substrate with an ultrahigh operating frequency of over 5 GHz. *Appl Phys Lett*, 2008, **93**(24): 3301
- [69] Fan H, Reed S, Baer T, *et al.* Hierarchically structured functional porous silica and composite produced by evaporation-induced self-assembly. *Micro Meso Mater*, 2001, **44**(45): 625–637
- [70] Fernandez-Pradas J M, Colina M, Serra P, *et al.* Laserinduced forward tranfer of biomolecules. *Thin Solid Films*, 2004, **453**(54): 27–30
- [71] Barron J A, Wu P, Ladouceur H D, *et al.* Biological laser printing: A novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. *Biomed Microdev*, 2004, **6**(2): 139–147
- [72] Colina M, Serra P, Fernandez-Pradas J M, *et al.* DNA deposition through laser induced forward transfer. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, **20**(8): 1638–1642
- [73] Pique A, Chrisey D B, Auyeung R C, *et al.* A novel laser transfer process for direct writing of electronic and sensor materials. *Appl Phys A*, 1999, **69**(1): S279–S284
- [74] Nahmias Y K, Gao B Z, Odde D J. Dimensionless parameters for the design of optical traps and laser guidance systems. *Appl Opt*, 2004, **43**(20): 3999–4006
- [75] Nahmias Y, Schwartz R E, Verfaillie C M, *et al.* Laser-guided direct writing for three-dimensional tissue engineering. *Biotech Bioengin*, 2005, **92**(2): 129–136
- [76] 潘继红, 韩金祥. 生物芯片与新药筛选研究. 国外医学药学分册, 2002, **29**(2): 69–74
Pan J H, Han J X. Foreign Medical Sciences Section On Pharmacy, 2002, **29**(2): 69–74
- [77] 沈红, 李焕荣, 陈葵, 等. 生物芯片技术在药理学和毒理学研究中的应用. 北京农学院学报, 2004, **19**(4): 77–80
Shen H, Li H R, Chen K, *et al.* J Beijing Agri Coll, 2004, **19**(4): 77–80
- [78] Radio N M, Mundy W R. Developmental neurotoxicity testing *in vitro*: Models for assessing chemical effects on neurite outgrowth. *Neuro Toxicology*, 2008, **29**(3): 361–376
- [79] Frimat J P, Sisnaiske J, Subbiah S, *et al.* The network formation assay: a spatially standardized neurite outgrowth analytical display for neurotoxicity screening. *Lab Chip*, 2010, **10**(6): 701–709
- [80] Castillo J, Gáspár S, Leth S, *et al.* Biosensors for life quality design, development and applications. *Sensors and Actuators*, 2004, **102**(B): 179–194
- [81] 陆祖宏, 何农跃, 孙啸. 基因芯片技术在药物研究和开发中的应用. 中国医药大学学报, 2001, **32**(2): 81–86

- Lu Z H, He N Y, Sun X. J Chin Pharm Univ, 2001, **32**(2): 81–86
- [82] 李卫红. 生物芯片: 本世纪最大的产业. 中国家禽, 2002 (7): 46–47
- Li W H. China Poultry, 2002 (7): 46–47
- [83] Yang Z, Zhang Y O, Wong M S, *et al.* Application of genomics and biochip technology in research and development of chinese materia medica. Acta Pharmaceutica Sin, 2002, **37**(6): 490–496
- [84] Bouaidat S, Berendsen C, Thomsen P, *et al.* Micro patterning of cell and protein non-adhesive plasmapolymerized coatings for biochip applications. Miniaturisation for Chemistry, Bioloty & Bioengineering, 2004, **4**(6): 632–637
- [85] Meyer R S, Abrams R A, Botte M J, *et al.* Functional recovery following neuroorrhaphy of the rat sciatic nerve by epineurial repair compared with tubulization. J Orthopaedic Research, 1997, **15**(8): 664–669
- [86] Kidambi S, Lee I, Chan C. Primary neuron/astrocyte co-culture on polyelectrolyte multilayer films: A template for studying astrocyte-mediated oxidative stress in neurons. Adv Func Mat, 2008, **18**(2): 294–301
- [87] Lamoureux P, Ruthel G, Buxbaum R E, *et al.* Mechanical tension can specify axonal fate in hippocampal neurons. J Cell Biol, 2002, **159**(3): 499–508
- [88] Deister C, Aljabari S, Schmidt C E. Effects of collagen 1, fibronectin, laminin and hyaluronic acid concentration in multi-component gels on neurite extension. J Biomat Sci Poly Ed, 2007, **18**(8): 983–997
- [89] Dodla M C, Bellamkonda R V. Differences between the effect of anisotropic and isotropic laminin and nerve growth factor presenting scaffolds on nerve regeneration across long peripheral nerve gaps. Biomaterials, 2008, **29**(1): 33–46
- [90] Clark P, Britland S, Connolly P. Growth cone guidance and neuron morphology on micropatterned laminin surfaces. J Cell Sci, 1993, **105**(1): 203–212
- [91] Mei Y, Saha K, Bogatyrev S R, *et al.* Combinatorial development of biomaterials for clonal growth of human pluripotent stem cells. Nat Mat, 2010, **9**(9): 768–778
- [92] Ron McKay. Stem cells—hype and hope. Nature, 2000, **406**(6794): 361–364
- [93] Engler A J, Sen S, Sweeney H L, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell, 2006, **126**(4): 677–689
- [94] Curran J M, Chen R, Hunt J A. The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation *in vitro* by controlled modifications to the cell substrate. Biomaterials, 2006, **27** (27): 4783–4793
- [95] Engel E, Martinez E, Mills C A, *et al.* Mesenchymal stem cell differentiation on microstructured poly (methyl methacrylate) substrates. Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger, 2009, **191**(1): 136–144
- [96] Tsuruma A, Tanaka M, Yamamoto S, *et al.* Control of neural stem cell differentiation on honeycomb films. Coll Surf A: Physicochem Eng Asp, 2008, **313**: 536–540
- [97] Sadik O A, Aluoch A O, Zhou A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. Biosensors Bioe, 2009, **24**(9): 2749–2765

Micropatterning and Its Applications in Biomedical Research*

REN Da-Hai**, CUI Ming-Yang, XIA Yi-Qiu, YOU Zheng

(¹) State Key Laboratory of Precision Measurement Technology & Instruments, Department of Precision Instruments and Mechanics, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Based on the micro-fabrication techniques combining with biochemistry and biophysics, we can get function structures with feature sizes close to the biomacromolecule scale, which promotes the applications of micropatterning in many research fields such as drug screening and discovery, tissue engineering and disease diagnosis. This review summarizes the development of micropatterning techniques in biomedical field and analyzes the advantages, limitations and application scopes of each micropatterning approach including photolithography, soft lithography, stencil-assisted patterning, scanning-probe lithography, jet patterning and laser guided patterning. Photolithography usually includes several steps such as exposure, development, lift-off and so on. Although it has the advantages of high accuracy, high efficiency and accurate alignment system, it depends on super-clean labs and lift-off processes, which means high cost and unsatisfied bio-compatibility. Soft lithography and stencil-assisted patterning methods avoid exposure and lift-off steps by using elastomeric stamps, which can enhance the bio-compatibility and reduce the cost. However, these two methods have deficiencies in alignment accuracy. Different from above methods, scanning-probe lithography is a kind of direct-writing technique, which sacrifices the advantage of high efficiency to improve its accuracy. Jet patterning is developed from industry with the advantages of low complexity and cost. However, its low accuracy of 10 μm scale is the limitation. Two novel laser based micropatterning techniques are also discussed. Although laser-induced transfer method solves the problem of jet patterning technique in the patterning thickness control, the low accuracy is still a problem. Optical tweezers technique offers a substitution for the scanning-probe lithography, although it has a long way to go in terms of liquor environment limitation and efficiency. It is indicated that current micropatterning methods already have the ability to make micro devices featured from nanometer scale to millimeter scale on a variety of surface materials different in geometry, stiffness and so on. The resolution and accuracy, the patterning scale and the processing condition are the bases for choosing micropatterning methods. The development of micropatterning techniques provides a rapid, real time, and accurate study tool in biological mechanism, drug action and biochemical reaction research. Micropatterning methods can enhance the sensitivity, the automation degree and the integration scale biosensors, which will further improve the efficiency of drug screening and diseases diagnosis. Also by micropatterning techniques, we can control the cells action easily, accurately and concurrently, which is helpful to shorten the development cycle. The main trends of micropatterning research are the further physicochemical analyses of the particles on nano-scale based on biochemistry and biophysics, the further enhancement of its bio-compatibility and material adaptability, as well as the development of *in vivo* microenvironment simulations suitable for micropatterning chips.

Key words BioMEMS, micropatterning, photolithography, surface modification, biosensors

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00228

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (61071002), National Program for Significant Scientific Instruments Development of China (2011YQ030134), The Scientific Research Foundation for Returned Overseas Chinese Scholars and The Foundation of State Key Laboratory of Precision Measurement Technology & Instruments.

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62776000, E-mail: rendh@tsinghua.edu.cn

Received: August 12, 2011 Accepted: September 29, 2011