

微纳制造、微流控及生物介观仿真

陈 勇

(江汉大学 交叉学科研究院,光电化学材料与器件省部共建教育部重点实验室(江汉大学),湖北 武汉 430056)

摘 要: 首先解释了生物介观仿真的重要性,然后简要介绍了生物介观仿真的两个基本方法,即微纳制造和微流控技术,并描述了将这两种技术应用于生物介观仿真的几个例子。鉴于生命科学中各学科领域的飞速发展,相信发展以微纳制造和微流控技术为基础的介观仿真工程对基础和应用研究都会有很大的推动。

关键词: 微纳制造;微流控;生物介观仿真

中图分类号: TH16;TN3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-0143(2014)03-0005-04

Micro and Nanofabrication, Microfluidics and Mesoscopic biomimetics

CHEN Yong

(Key Laboratory of Optoelectronic Chemical Materials and Devices of Ministry of Education, Institute for Interdisciplinary Research, Jiangnan University, Wuhan 430056, Hubei, China)

Abstract: We first introduce the concept of mesoscopic biomimetics. Then, we briefly describe the methods of nanofabrication and microfluidics, followed by a few examples of their applications in mesoscopic bioengineering. Taking into account the rapid progress in all areas of life sciences, we believe that this interdisciplinary approach will general great impact for both fundamental and applied researches.

Keywords: micro and nanofabrication; microfluidics; mesoscopic biomimetics

0 引言

生物在地球上进化,适者生存;细胞在生物体内演变,生老病死;如此,个体与环境合二为一,自然而然,源远流长,此乃道。然而,现代细胞生物学经常要将人体细胞取出研究,并须将其放置于培养皿中进行体外培养。这无疑会使细胞赖以生存的微环境发生根本的改变;简单地说,细胞在体内所处的环境是三维的(细胞外基质构像)和动态的(可溶因子分布),而被放置于培养皿中的细胞所处的环境是二维的(平面培养皿基

底)和静态的(培养皿中的培养液)。因此很难想象在体外所观察的细胞生物学现象能够很好地反映细胞在体内的情况。为此,有必要对体内的细胞微环境进行仿真,包括细胞外基质的重构、细胞周围可溶性因子的调控、细胞与细胞相互作用和其他物理量的模拟等,以利更好地研究人体细胞的行为和演变过程。这便是生物介观仿真的主要内容和目的。

众所周知,现代生命科学对生物分子、基因、细胞及组织器官的结构和功能已有了深入的了解,相对而言,我们对细胞微环境的认识和仿真

收稿日期: 2014-02-27

作者简介: 陈 勇(1957—),男,教授,博士生导师,楚天学者。研究方向: 先进纳米制造、微流控技术、微纳光学、微纳材料、生物检测、生物工程及再生医学。

还十分有限。近年来,人们对诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell)的各种应用寄予了很大的希望,但对其扩增和分化过程的调控还不尽人意。这是因为诱导多能干细胞的扩增和分化对细胞微环境依赖特别敏感,而已有的细胞培养体系并不是基于这种细胞对细胞微环境的特殊依赖性所建立或发展的,所以有必要尽快建立以生物介观仿真为基础的细胞微环境仿真模型,增强其调控细胞扩增和分化的能力,从而改进相关的生物医疗技术,为细胞治疗、组织工程及再生医学提供更好的实验方法和技术。

生物介观仿真是一个前沿交叉课题,它的基础是细胞生物学、生物材料及微纳制造和微流控技术。就微纳制造技术而言,其方法还很少从生物应用这一角度来考虑,例如我们到现在还没有一种好的方法可用来对自然生物材料进行图案化微纳结构的制造。就微流控技术而言,其发展可谓如火如荼,所涉及的不仅有细胞和分子生物学、疾病检测和药物筛选,还包括个性化治疗、组织工程和再生医学等,但遗憾的是这方面的应用十分有限。笔者认为,微纳制造及微流控技术和生命科学的交叉与融合不仅对基础研究具有十分重要的意义,介观生物仿真还将引领一些新的产业发展方向。本文旨在介绍微纳制造和微流控技术及目前作者实验室进行的几个研究课题。

1 微纳制造技术

微纳制造的发展可以追溯到1950年代。当时为制造半导体集成电路的芯片开发了一整套芯片图形复制和转移的技术。随着社会经济的发展和社会需求的增加,半导体芯片技术特别是其核心光学曝光和刻蚀技术也得到了不断发展。目前的半导体集成电路加工工艺以深紫外光光刻(193纳米光源)技术为基础,虽然它已经突破了100纳米的极限,但由于材料的限制,进一步发展该技术将会有很大的困难。很多年来,微电子工业界都在寻求新的纳米制造工艺例如极限紫外光光刻技术(13纳米光源)来实现深纳米线宽的集成芯片。除了极限紫外光光刻技术以外,还有其他新一代纳米级的刻蚀技术,如X光光刻,电子或离子束投影光刻,微型电子束阵列光刻,等等。这些技术,都存在相当的技术难题,工业界趋向选择的极限紫外光光刻技术,但这种技术的研发和应用的投资都空前巨大,工艺条件也极其苛刻,

不适合用于实验室的科学研究及非半导体器件的生产。

因此,非传统的微纳制造技术在近些年得到了广泛的重视和发展。这些技术方法简单、制作成本低、可应用面广,可以在非极限条件下大面积复制各种图案化的纳米结构。例如基于模压技术的纳米压印技术(nanoimprint lithography)便是这种非传统微纳制造技术的典型代表。纳米压印是通过加温将模板上的纳米图案复制到涂在基片上的聚合物薄膜层上,然后再对其进行刻蚀或剥离处理以得到所需的纳米结构。这一技术复制分辨率和产额高、工艺简单而且成本低,因此具有很强的竞争力和广阔的应用前景。其不足之处是需要高温和高压,不利于图形的精确定位与套刻。因此我们在前些年提出了紫外光纳米压印技术:先在基片上旋涂一层流动性很好的感光聚合物材料,然后用透明的模板压印并用紫外光照射使感光材料凝固,退模后再用离子反应刻蚀或其他方法进行图案转移的后续加工。因为不需要高温和高压,这一方法的优点十分突出。随后,我们又提出了紫外光软膜纳米压印技术,即用软光刻的方法复制具有一定弹性和易退模的聚甲基乙氧基硅烷(PDMS)结构作为压印软模,只需用很小的压力就可将这种软模上的图案转移到感光聚合物材料的涂层上,经紫外光固化和退模后便可得到所需的图案。与热压印相比,这种紫外光软膜纳米压印技术可更好地保证大面积纳米复制的均一性。

2 微流控技术

微流控是一种芯片技术。用微纳制造的方法可以在玻璃、塑料或硅基材料上制作与集成电路类似的微流体芯片,并用它对微量液体或气体进行精确操作并完成各种化学和生物学方面的实验。微流芯片基本结构单元的几何尺寸一般在几十到几百微米的范围之间。

虽然微流芯片可用玻璃和硅等材料制备,但用聚合物材料如塑料和PDMS制作微流芯片具有工艺简单、成本低及生物兼容性好的优势。例如,可以将液态的PDMS及其催化剂混合物浇铸在一个用普通光刻方法制成的光胶模板上,经半小时热处理PDMS固化,剥离后可打孔,然后经等离子表面处理并粘贴在玻璃基片上即得到实用的微流芯片。在微流芯片的制作过程中,材料的

表面处理具有特别重要的意义。一方面,微流通道的亲水性直接影响了微流样品的输运,通过物理或化学的表面改性可以使流体样品的浸润性得到提高。另一方面,表面处理的好坏,也决定了芯片键合及封装的成功与否。常用的表面处理方法如等离子清洗、化学清洗和分子自组装等方法都可以用在微流芯片的加工制作过程中。

微流芯片可以被看作一个微量流体的操作和反应系统。最简单的芯片可由微流通道和与之相连的进样口和出样口组成。稍微复杂一点的芯片也可加入微反应池、微混合器、微分离单元、微探测器和其他一些功能单元。功能更强一些的微流芯片有微泵和微阀,以便对微量流体进行有效的操作。但微流芯片中液体的驱动不一定是由机械泵来实现的,很多其他类型的驱动力诸如压强(液压、气动、热膨胀)、毛细力、电泳、电渗、介电力、表面声学波等都能有效地应用于微流液体的驱动。

由于尺寸的减小,微流样品在芯片中的行为与宏观影像有着很大的差别。首先,在微流沟道中流体的速度分布是很不均匀的。简单的说,由于粘滞力的作用,流体在通道中心的流速最大,越靠近管壁,流速越小。微流系统的尺度效应也表现在毛细效应、黏弹性、电动效应等物理过程中,从而导致一些特异的微流现象。特别重要的是,表面作用将随着尺度的减小不断加强,这使得在宏观流动中常被忽略的效应如液体的表面张力、粒子电离后产生的库仑力、分子极化产生的范德华力、空间位形力等成为必须考虑的因素。如果处理的对象是比较复杂的流体,如电解质溶液、高分子溶液、有悬浮粒子的液体甚至是凝胶液,多相流体,有化学反应的流体等,问题将更复杂。此时,应当用宏观流体力学与微观分子动力学结合起来的介观理论来表达特征尺度为微、纳米量级的流动问题。例如用微流芯片在非溶性的两相流体中产生稳定的液体串并对其进行分裂、聚合等一系列操作。也可在微滴内进行不同的化学反应,以达到高通筛选的目的。

3 微纳制造、微流控技术的应用

3.1 微纳制造技术的应用

微纳制造技术的应用极其广泛。就纳米压印技术而言,它可以用来制作纳米光学器件如亚波长纳米光栅、光子晶体、半导体光源及显示屏的增

光膜等,也可用来制造超高密度磁碟、场效应晶体管、单电子器件等。纳米压印技术在生命科学中的应用主要包括基因电泳芯片和仿真细胞外基质的制作等。

组织工程和再生医学的核心是建立由细胞和生物材料构成的三维空间复合体,由此形成具有生命力的活体组织,对病损组织进行形态、结构和功能的重建并达到永久性替代。例如可用少量的组织细胞通过体外扩增,进行大块组织缺损的修复。由于可按组织器官的缺损情况进行任意塑形,有望达到形态的完美修复。已经证明,体外细胞生长的形态受基底材料和基底材料表面纳米结构的影响。

我们注意到,现有的微纳制造工艺主要适用于合成聚合物材料如感光乳胶薄层的图案化,而理想的细胞外基质材料应该是可降解的自然生物材料如胶原蛋白(collagen)等。传统的微纳制造方法显然对这类自然生物材料的图案化不适用。根据对生物兼容性和持续发展的考虑,我们提出了一个天然生物材料图化的新方法:首先通过负压干燥的方法将PDMS的纳米图案复制在明胶(gelatin)薄层上,然后通过化学处理使明胶层的纳米结构固定。由此得到的自然生物材料的纳米图案可以用于细胞培养及细胞的三维支架即细胞外基质介观生物材料的仿真。

另一个例子是外周血中稀有细胞(如循环肿瘤细胞)的高效捕获。肿瘤细胞进入血液循环就有可能发生转移,但因其数量非常稀少(每毫升病人样品或每千万个血细胞中不到一个循环肿瘤细胞),故检测具有很大的挑战性。目前所用的捕获技术有两种:一是根据循环肿瘤细胞的特定标志物来修饰磁颗粒或固体的表面,当循环肿瘤细胞与这些材料的表面发生免疫作用时就可被捕获,其他细胞则可被清洗掉。二是根据循环肿瘤细胞与血细胞的大小或形变能力的不同来设计有一定孔径的过滤膜,当样品通过过滤膜时,循环肿瘤细胞可被捕获而血细胞则可通过。因为没有免疫作用,细胞不会受损,所捕获的循环肿瘤细胞可用来进行培养、观察及药理实验等,这种过滤膜技术被十分看好。但问题是用这种方法所截留的不仅仅是循环肿瘤细胞,且还有相当数量的血细胞,所以选择性不是太好。最近,我们用微纳制造的方法,设计并制造了一种特殊的过滤膜,使其对循环肿瘤细胞捕获的选择性大大地提

高,有望在短期内进入临床试验和大规模应用。

3.2 微流控技术的应用

微流控技术可用于各种生化分析及相关的物理和化学实验。微流控特别适用于细胞分析、基因测序、核糖核酸的提取和纯化、蛋白质结晶等。这一技术还提供了一种单细胞和分子操控的有效方法。无论在动物或植物体内,微流体都在无时无刻地维持或参与着整个的生命过程。可以想象,对生物体内微流体运动的介观仿真将推动生物医疗技术的深入发展。

从生物学的角度看,微流控技术的优势一目了然。微流控芯片体积小、可集成度高、低成本和可大批量生产,可以在同一个芯片上集成不同功能的单元,如样品提取、分子筛选、分离和分析等,从而一次性完成生物实验的全过程。也可以在同一芯片上平行完成需要重复的分析(如基因解码、聚合酶链扩增反应、蛋白质结晶等)并通过实验参数的系统调控达到高通筛选的目的。

显然,阵列式集成的微流细胞芯片也有可能大规模地应用于干细胞分化因子的调控、生物毒性的检测及药物高通筛选等方面的试验。总之,芯片上的多通道、多功能和多系统的集成(样品处理、PCR、电泳分离、片上监测自动化与计算机化)将成为生物芯片技术总的发展趋势之一。但目前许多功能性单元需要进一步研究和优化。今后可望在高速基因测序、基因工程、蛋白质学和细胞分析等众多领域得到大规模的发展和应用。

微流控细胞分析仍然是当前的研究热点。我们注意到,在此类芯片中细胞培养大多是灌注的,即细胞在微流通道或与微流通道紧密相邻的微池中。由于细胞表面剪切力的限制,这种方法不利于流体的动态调节。从仿真的角度看,细胞在体内处于毛细血管之间的狭小空间中,其营养物质及信息因子的运输最终是通过扩散来完成的。因此,要设计类似于毛细血管的微流扩散网络以进行细胞长期培养和相应的组织结构形成。

微流控技术与纳米压印技术有很好的兼容性。将其结合,我们成功地实现了基因的快速分

离。首先将不同尺寸和不同间距的纳米点阵及微流通道分别用纳米压印和光刻技术复制到基片上,刻蚀后再将含有微流通道结构的PDMS膜与之封装。在电场作用下样品中的基因片段会通过各个纳米点阵。由于大小不同的基因片段受到纳米列阵的阻碍是不同的,样品中的基因片段可以被很快地分离开来。而且纳米压印技术的低成本,该种纳米器件应该有一定的商业化前景。

4 结语

综上所述,微纳制造、微流控芯片及介观仿真在生命科学领域有很好的应用前景。如何抓住这一机遇,率先建立交叉学科的优势和有效的应用模式,是当前必须考虑和实践的重要课题。据此,笔者在认真开展各项基础研究的同时,开发了一些微纳制造和微流控芯片应用与生物医学的新设备和新方法。从所积累的经验看,这一模式是可行的,但必须更深层次地参与相关的医疗检测和临床应用。只有在基础研究和商业开发相互协调与相互促进的条件下,才有希望使微纳制造和微流芯片技术在生物医学领域得以健康和迅速的发展。

参考文献(References)

- [1] CHEN Y, PÉPIN A. Emerging Nanolithographic Methods [M]. HOUDY H S P, DUPAS C, LAMANY M. Nanoscience. Berlin: Springer, 2007:157-175.
- [2] BUGUIN A, CHEN Y, SILBERZAN P. Microfluidics: Concepts and Applications to the Life Sciences [M]//BOISSEAU P, HOUDY P, LAHMANI M. Nanoscience. Berlin: Springer, 2009:743-774.
- [3] 石剑,陈勇.紫外光软模纳米压印技术[G]//陈勇.前沿科学的交叉与融合:留法学者跨学科研究论文集.北京:北京大学出版社,2008:30-49.
- [4] 陈勇.微流芯片技术与微流芯片实验室[G]//陈勇.前沿科学的交叉与融合:留法学者跨学科研究论文集.北京:北京大学出版社,2008:156-176.

(责任编辑:叶冰)