

## 生物素-亲和素微模式表面的制备与细胞定位

胡 江 王战会 陶祖莱\*

(中国科学院力学研究所微重力室,北京 100080)

**摘 要** 细胞在模式化表面的定位培养对于组织工程、生物传感器技术和细胞生物学基础研究具有重要意义。研究基于软光刻技术的生物素-亲和素微模式表面快速制备方法,并用所制备的模式进行牛主动脉血管内皮细胞的定位培养。表明该技术可在细胞尺度上有效地控制细胞生长的空间位置。

**关键词** 模式化表面,软光刻,生物素-亲和素,定位生长

**中图分类号** Q81 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)05-0619-03

在材料表面实现细胞的定位生长,对于组织工程、生物传感器技术和细胞生物学基础研究具有重要意义<sup>[1]</sup>。其中,通过软光刻方法在材料表面制作模式取得了较大的进展<sup>[2]</sup>。但是其单分子自组装层模式的制备过程仍较复杂,且限于特制的基底,难以应用于常规的组织工程支架材料或生物传感器的基片<sup>[3]</sup>。本文探讨了新的基于软光刻技术的快速表面模式制作方法,即通过通常用于软光刻技术的硅橡胶模,在材料表面制作生物素-亲和素的蛋白吸附微模式,利用生物素和亲和素之间的特异相互作用,介导生物素化的细胞在模式化的材料表面特异性地定位。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

生物素(Biotin)、亲和素(Avidin)、磺酸琥珀酰亚胺基-6-(生物素酰氨基)己酸盐(Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido) hexanoate, NHS-LC-biotin)、生物素化的牛血清白蛋白(BSA-biotin, BSA-b)、牛血清白蛋白(BSA)、荧光素标记的亲和素(FITC-Avidin)、荧光染料 DAPI 购自 Sigma 公司;硅橡胶聚二甲硅氧烷(Poly-dimethylsiloxane, PDMS)购自 Dow Corning 公司;1640 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司;其余试剂为国产化学分析纯试剂;牛主动脉血管内皮细胞(Bovine aortic endothelial cell, BAEC)为原代培养 5~

11 代,本室保存。

#### 1.2 方法

**1.2.1 硅橡胶模的制备:**利用光刻技术制作光刻胶的模式表面,在其上利用软光刻技术制作对应反转格式的硅橡胶模<sup>[2]</sup>,所用模式为间隔排列的条带凹槽,条带的尺寸为 1mm 长,3.8 $\mu$ m 高,宽度为 10~50 $\mu$ m。

**1.2.2 蛋白分子膜层的制备与显示:**硅片分别用 BSA-b 1mg/mL 和 BSA 1mg/mL 处理 0.5h 后达到饱和和吸附,然后加 0.5mg/mL 的 Avidin 处理 0.5h,再加 0.33mg/mL 的 BSA-b 作用 0.5h。椭圆偏光显微镜显示膜层厚度<sup>[4]</sup>。

**1.2.3 蛋白层模式的制作:**将 PDMS 模反扣在硅片上形成紧密接触,条带凹槽与硅片表面组成微吸管,在一侧滴加 1mg/mL 的 BSA-b 溶液,溶液由于毛细作用进入微管内部,放置 0.5h 蛋白在硅表面吸附后,在揭起 PDMS 模的同时用大量超纯水冲洗去除未吸附的 BSA-b,然后用 1mg/mL 的 BSA 封闭 0.5h。加 0.5mg/mL 的 FITC-Avidin 作用 0.5h, PBS 洗后封片在荧光显微镜下观察条带格式、采集图像。

**1.2.4 生物素化细胞的空间定位:**硅片表面用 BSA-b 和 BSA 形成模式化吸附层后,加 0.5mg/mL Avidin 作用 0.5h, PBS 洗。BAEC 用 1640 培养基、10%胎牛血清培养, PBS 洗后加 1mmol/L 的 NHS-LC-biotin 处理 30min, PBS 洗去未掺入细胞膜上的 NHS-

收稿日期:2002-03-15,修回日期:2002-06-18。

基金项目:国家 973 重点基础研究发展规划项目基金资助(No. G1999054307)。

\*通讯作者。 Tel: 86-10-62558142; E-mail: hujohn@sina.com

LC-biotin,用 10mmol/L 的 EDTA 消化细胞制成单细胞悬液。对于模式化表面,接种细胞 30min,用 Hank's 液洗去未粘附的细胞,甲醛固定后 DAPI 染色。荧光显微镜观察、采集图像。

## 2 结 果

### 2.1 蛋白分子膜层的椭偏成像显示

用椭偏成像技术显示蛋白分子膜层的几何厚度分布。结果表明,硅片上吸附的第一层蛋白(BSA, BSA-b)厚度一致,均达到饱和吸附。第二层的亲和素蛋白层有明显差异,在 BSA-b 表面结合大量的 Avidin,而在 BSA 表面只有极少量的结合且是非特异的,因为在再次加入 BSA-b,在溶液中的 BSA-b 作用下发生了脱吸附,第三层的厚度反而减小(见图 1B)。对于 BSA-b 表面,在第二层的 Avidin 桥接下,可结合大量的 BSA-b(见图 1A),表明该表面可特异性地结合生物素标记的分子。

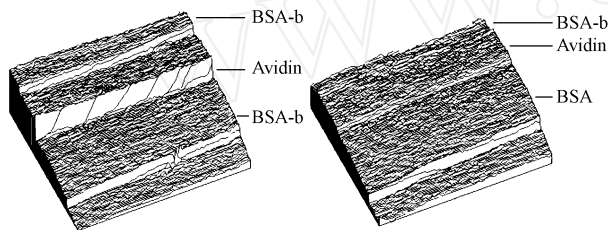


图 1 蛋白分子膜层的椭偏显示

Fig. 1 The visualization of protein layers by imaging ellipsometry

- A. The protein layers on BSA-b surface. The first layer was BSA-b, the second layer was Avidin and the third was BSA-b;  
B. The protein layers on BSA surface. The first layer was BSA, the second layer was Avidin and the third was BSA-b

### 2.2 蛋白层的模式化分布

所用 PDMS 模为 50 $\mu$ m 凹槽-30 $\mu$ m 间隔。用 FITC 标记的 Avidin 显示 BSA-b 和 BSA 的空间分布,发现 BSA-b 区域呈现出 50 $\mu$ m 宽的明亮的荧光条

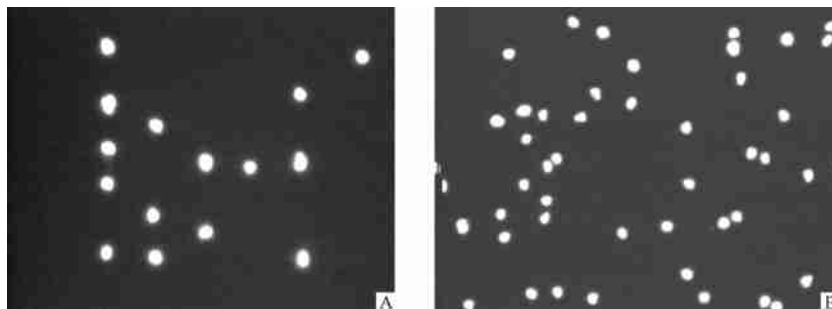


图 3 生物素化细胞的空间定位

Fig. 3 The micropatterning of biotinylated cells

- A. Cell adhesion on micropattern surfaces; B. Cell adhesion on non-patterned BSA-b-Avidin surface

带,而 BSA 不结合并封闭 FITC-Avidin 的吸附,呈现出 30 $\mu$ m 宽的暗条带(见图 2)。其分布与所用 PDMS 模的几何尺寸是完全一致的。

### 2.3 生物素化细胞的空间定位

将生物素化的 BAEC 细胞与 BSA-b/BSA-Avidin 蛋白模式表面(所用 PDMS 模的模式为 10 $\mu$ m 凹槽-50 $\mu$ m 间隔)孵育,PBS 洗去未结合的细胞,3.7% 甲醛固定后 DAPI 染色显示细胞,发现细胞沿 10 $\mu$ m 的 BSA-b-Avidin 条带区域排列(图 3A),而对于无模式的 BSA-b 吸附表面,细胞随机分布(图 3B)。表明该方法有效地实现了细胞的定位。细胞不粘附在 BSA 封闭的表面。

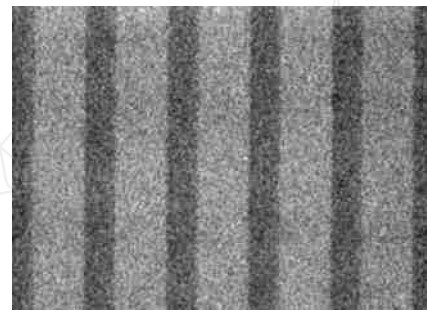


图 2 BSA-b 和 BSA 蛋白层条带的模式化分布  
Fig. 2 Micropatterning of BSA-b and BSA bands

## 3 讨 论

模式化表面在多个领域有应用潜力。较小的模式可以控制细胞生长的形态,而较大的模式可以控制细胞群体的生长区域,实现不同细胞的共培养生长。Chen 等用粘附岛研究了牛毛细血管内皮细胞生长对粘附区域大小的依赖性<sup>[5]</sup>;Bhatia 等用模式表面进行组织工程肝的构建<sup>[6]</sup>;而神经细胞在模式化表面的定位生长有望实现神经通路的定向连接<sup>[7]</sup>。从微观结构看,粘附的本质是细胞表面与所

粘附的表面之间有大量的受体-配体相互作用,其化学键作用形成了粘附力。因此,通过控制单位表面特异性化学键的密度,可以控制细胞在表面粘附力的大小。生物素和亲和素之间可发生特异性的结合,亲和常数为  $10^{15} \text{M}^{-1}$ ,且每个亲和素分子有 4 个生物素结合位点,当生物素结合了大分子量的分子后,仍可被亲和素识别并结合,这一相互作用已广泛应用于生物医学研究中的特异性标记技术。本文利用基于软光刻技术的蛋白吸附法,制作了生物素-亲和素在表面的微小条带格式,并实现了细胞在其表面的定位生长。该方法对材料的要求较低,在玻璃和高分子聚合物表面也可快速形成细胞粘附的微模式。由于该方法是利用生物素-亲和素的特异相互作用,因此对非贴壁粘附的悬浮细胞也有一定的适用性。这种定位技术可应用于生物器件的组装,在生物芯片和传感器领域有应用价值。

#### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Blawas A S , Reichert W M. Protein patterning. *Biomaterials* , 1998 , **19**(7~9) :595 ~ 609
- [ 2 ] Kane R S , Takayama S , Ostuni E *et al.* Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* , 1999 , **20** (23 ~ 24) :2363 ~ 2367
- [ 3 ] Mrksich M , Whitesides GM. Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* , 1996 , **25** :55 ~ 78
- [ 4 ] WANG ZH(王战会) , JIN G(靳刚) . Visualization of the interaction between IL-6 and IL-6R by imaging ellipsometry. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) ,2002 ,**18**(1) :99 ~ 101
- [ 5 ] Chen C S , Mrksich M , Huang S *et al.* Geometric control of cell life and death. *Science* , 1997 , **276**(5317) : 1425 ~ 1428
- [ 6 ] Bhatia S N , Toner M , Tompkins R G. Selected adhesion of hepatocytes on patterned surfaces. *Annal NY Acad Sci* , 1994 , **745** : 187 ~ 209
- [ 7 ] Martinoia S , Bove M , Tedesco M *et al.* A simple microfluidic system for patterning populations of neurons on silicon micromachined substrates. *J Neurosci Method* , 1999 , **87** (1) : 35 ~ 44

### Micropatterning of Biotin-Avidin Layers and Cell Location

HU Jiang WANG Zhan Hui TAO Zi-Lai \*

(Lab of Microgravity , Institute of Mechanics , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

**Abstract** The located culture of cells on patterned surfaces is useful for tissue engineering , biosensor development and fundamental research of cell biology. It is presented here a rapid fabrication method of Biotin-Avidin protein layers micropattern , which is based on soft-lithography technology. The bovine aortic endothelial cells are cultured on the micropatterned surface. It is found that cell location can be controlled on the scale of individual cell by this method.

**Key words** patterned surfaces , soft lithography , Biotin-Avidin , located growth

Received : 03-15-2002

This work was supported by Grant from the state 973 plan (No. G1999054307) .

\* Corresponding author. Tel : 86-10-62558142 ; E-mail : hujohn@sina.com

### 本刊加入《中国学术期刊(光盘版)》声明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《生物工程学报》编辑部