



扫描电化学显微镜在水凝胶微孔阵列表征中的新应用

杜晓静^①, 徐峰^{②③}, 李菲^{①②*}, 陈咏梅^{①②*}

① 西安交通大学理学院化学系, 非平衡物质结构及量子调控教育部重点实验室, 西安 710049

② 西安交通大学仿生工程与生物力学中心(BEBC), 西安 710049

③ 西安交通大学生命科学与技术学院, 生物医学信息工程教育部重点实验室, 西安 710049

* 通讯作者, E-mail: feili@mail.xjtu.edu.cn; chenym@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2014-02-09; 接受日期: 2014-03-23; 网络版发表日期: 2014-09-05

doi: 10.1360/N032014-00063

摘要 水凝胶微孔阵列是细胞培养的新型基板软材料, 其微孔形貌对细胞的行为产生直接的影响. 但传统水凝胶微孔阵列形貌的表征手段缺乏在水溶液中原位和可逆表征的能力. 本文以水溶液中的氧气为还原电对, 应用扫描电化学显微镜(SECM)对水溶液中的聚乙二醇二甲基丙烯酸酯水凝胶微孔阵列的形貌进行了原位表征, 得到了水凝胶微孔阵列表面的二维孔径和三维形貌信息, 开发出采用 SECM 对水凝胶微孔阵列形貌进行原位、可逆、无损表征及提供三维形貌信息的新方法.

关键词

扫描电化学显微镜
水凝胶微孔阵列
光掩模法
模板法

1 引言

微孔阵列(microwell array)是用于培养和分析细胞的新型基板材料^[1]. 与传统的二维细胞培养基板相比, 具有高密度三维微孔结构的微孔阵列更有利于观察细胞的形态(如单细胞的分化形态和团聚体的状态)^[2]和高通量地捕获、筛选细胞^[3]. 水凝胶^[4-9]是一种具有化学或物理交联结构、可吸收大量水分但不溶于水的高分子软材料, 并具有以下特点: (1) 三维网络结构与细胞外基质极为类似, 有利于细胞的增殖和铺展; (2) 物理、化学性质易调控, 可满足细胞培养的特殊要求; (3) 透明度高, 有利于细胞培养过程中观察细胞. 基于微孔阵列和水凝胶的优点, 水凝胶微孔阵列作为细胞培养的新型基板软材料受到广泛的关注, 在细胞培养方面显示出较为广阔的应用前景^[10, 11]. 光掩模法^[12]和模板法^[13]是制备水凝胶微孔阵列的两种主要技术, 可制备不同形貌和孔径的水凝胶微孔

阵列, 并各有优缺点. 光掩模法的制备工艺较简单, 但由于受到光程的限制, 不适合制备较厚和孔较深的水凝胶微孔阵列; 模板法可精确控制水凝胶微孔阵列的孔径和孔深, 但由于需要定做模具, 制备工艺较复杂.

水凝胶微孔阵列的微孔形貌、孔径和孔深对其中培养的细胞的行为产生直接的影响^[1, 14-16]. 例如, Khademhosseini 小组^[14]的研究表明相对于圆柱形和锥形的水凝胶微孔阵列, 半球形的水凝胶微孔阵列更有利于形成球形的细胞团聚体; 水凝胶微孔阵列中微孔的大小直接影响其中培养的胚胎干细胞的分化能力^[16], 如直径 450 μm 的微孔有利于胚胎干细胞向心肌细胞的分化, 而直径 150 μm 的微孔有利于胚胎干细胞向内皮细胞的分化; 孔深的不同也对细胞的活性和行为产生不同程度的影响^[1], 如孔深 50 μm 的水凝胶微孔底部的剪切力小于孔深 20 μm 的, 而剪切力的大小又影响细胞的分化行为. 因此, 对水凝胶

微孔阵列中微孔形貌的表征是研究其用于细胞培养的重要步骤. 表征水凝胶微孔阵列形貌的传统手段主要为光学显微镜(如相差显微镜^[1]和激光共聚焦显微镜^[10])和电子显微镜(如扫描电子显微镜^[17]). 但这些方法存在一些缺陷, 如都缺乏在水溶液中对水凝胶微孔阵列进行原位、可逆表征的能力. 如相差显微镜虽能给出水凝胶微孔阵列的形貌和孔径等信息, 但由于表征时水凝胶的水分会对光产生折射等作用, 在水溶液环境中很难得到清晰的水凝胶微孔阵列的立体图像; 激光共聚焦显微镜虽然可以较好地给出水凝胶微孔阵列的三维信息, 但在表征前需要对水凝胶进行染色前处理, 是一种不可逆的非原位表征手段; 扫描电子显微镜虽然在三维表征和最小分辨率方面优于前两种表征手段, 但表征水凝胶样品前, 需对其进行冷冻、干燥、喷金等前处理, 不仅对水凝胶样品产生破坏, 并且得到的是干燥后的水凝胶微孔阵列的形貌, 不能真实反映水溶液中水凝胶微孔阵列的自然形貌, 是一种有损伤且非原位的表征手段. 因此, 需要一种可在水溶液中无损、可逆且原位表征水凝胶微孔阵列形貌信息的新方法.

扫描电化学显微镜(scanning electrochemical microscopy, SECM)是一种应用微米级电极为探针, 通过记录电解质溶液中物质的氧化或还原电流得到基底物质的表面形貌和化学信息的新型电化学表征技术^[18-25]. 由于具有可在水溶液中原位、可逆且无损地表征样品, 并具有高空间分辨率和可提供样品三维信息的特点, SECM已被用于表征细胞培养的基板材料中^[18, 26-28]. 目前, SECM用于表征水凝胶形貌的研究还处于起始阶段, 只有近期发表的2篇相关报道^[18, 29]. 2010年, Jeerage等^[18]首次应用SECM对水溶液中的聚乙二醇水凝胶的表面微孔形貌进行了无损表征, 但实验中他们向水溶液中额外加入了甲醇二茂铁作为电对, 该方法不适用于细胞培养体系中对水凝胶基板材料进行原位表征. 2013年, 我们课题组^[29]基于氧气这种水溶液中的天然电对在SECM探针附近的还原电流, 首次应用SECM原位跟踪了水溶液中自愈水凝胶形貌随时间变化的三维信息. 该方法的优势在于不需要在表征体系中加入任何其他化学物质, 利用水溶液中的氧气便可实现对水凝胶材料的原位表征, 为细胞培养体系中水凝胶基板材料的原位表征奠定了基础. SECM的以上优点和应用实例预示着利用水溶液中氧气对水溶液中的水凝

胶微孔阵列进行表征应用的可行性.

本文基于水溶液中氧气这种天然电对, 应用SECM对水溶液中的聚乙二醇二甲基丙烯酸酯水凝胶微孔阵列的形貌进行了原位表征, 得到了水凝胶微孔阵列表面的二维孔径和三维形貌信息. 相比光学显微镜和电子显微镜的常规表征手段, SECM是可在水溶液中对水凝胶微孔阵列形貌进行原位、可逆、无损表征及提供三维形貌信息的新方法.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

聚乙二醇二甲基丙烯酸酯(polyethylene glycol dimethacrylate, PEGDMA, 相对分子量约为 1000 g mol⁻¹, Polysciences 公司, 美国)为制备水凝胶的单体, 2-羟基-2-甲基苯丙酮(Tokyo Chemical Industry 公司, 日本)为制备水凝胶的引发剂, 3-丙基甲基丙烯酸酯(3-(trimethoxysilyl) propylmethacrylate, TMSP-MA, 阿拉丁公司, 中国)用于处理盖玻片, 氯化钾(Sigma-Aldrich 公司, 美国), 氢氧化钠(国药集团, 中国), 无水乙醇(天津致远化学试剂有限公司, 中国). 以上试剂均为分析纯. 聚碳酸酯光掩模(深圳清溢光电股份有限公司, 中国), 聚二甲基硅氧烷模板(SYLGARD 184, 道康宁公司, 美国). 制备水凝胶过程中使用的盖玻片(江苏飞舟玻塑有限公司, 中国)分为两种, 分别为厚度 150 μm、尺寸 18 mm × 18 mm(种类一)和厚度 150 μm、尺寸 24 mm × 50 mm(种类二). 实验所用的水溶液由 Milli-Q Reference System 制备的超纯水(25℃时电阻 > 18.2 MΩ cm)配制.

所有的电化学实验在 CHI920C 扫描电化学显微镜(上海辰华, 中国)上完成, 制备水凝胶所用的紫外交联仪是 XLE-1000 A/F(Spectroline, 美国), 水凝胶微孔阵列的光学表征使用奥林巴斯倒置相差显微镜(IX 81, 日本).

2.2 实验过程

2.2.1 水凝胶微孔阵列的制备

本研究中采用光掩模法和模板法分别制备含不同孔径和孔深的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列. 制备水凝胶前, 需先配制水凝胶的前聚体溶液. 另外, 在表征过程中, 为了使水凝胶更好地粘附在盖玻片上

而不至脱落, 需对制备水凝胶的盖玻片进行前处理. 具体过程如下.

水凝胶前聚体溶液的配制^[5]: 称取 0.5 g 水凝胶单体 PEGDMA 和 25 μL 引发剂 2-羟基-2-甲基苯丙酮于离心管中, 加入 5 mL 去离子水混匀, 得到质量分数为 10% 的 PEGDMA 和体积分数为 0.5% 的 2-羟基-2-甲基苯丙酮溶液.

盖玻片的前处理^[10]: 将盖玻片(种类一)完全浸泡于浓度为 10% 的 NaOH 溶液中 24 h 后, 分别用超纯水和无水乙醇将盖玻片冲洗三遍, 置于烘箱中 80 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 1 h. 待盖玻片烘干后, 滴加 30 μL TMSPPMA 溶液于盖玻片上, 30 min 后用铝箔包裹盖玻片, 在烘箱中 80 $^{\circ}\text{C}$ 再干燥 24 h. 最后, 依次用超纯水和无水乙醇冲洗盖玻片三遍并风干, 用铝箔包裹备用.

(1) 光掩膜法制备水凝胶微孔阵列: 本研究中使用的光掩膜通过 AutoCAD 软件设计后在聚碳酸酯膜上制备完成. 根据以往文献报道中的常用微孔尺寸, 光掩膜上的孔径大小依次设定为 400 μm , 300 和 200 μm , 孔与孔的边沿间距为 200 μm ^[14, 17]. 具体光掩膜法制备 PEGDMA 水凝胶微孔阵列的流程如图 1(a)所示, 首先取 30 μL 配好的水凝胶前聚体溶液滴加在培养皿上, 前聚体液滴的两边加一片盖玻片(种类二)作为垫片调节水凝胶微孔阵列的厚度及孔深. 然后, 从下到上依次盖上经 TMSPPMA 处理过的盖玻片和光掩膜, 用功率为 80 mW cm^{-2} 的紫外光照射水凝胶前聚体溶液 25 s, 即得到 PEGDMA 水凝胶微孔阵列(图 1(a)中所示的黑色圆圈区域为因紫外光未透过而未生成水凝胶的部分). 最后, 取下光掩膜和附着在盖玻片表面的水凝胶, 用超纯水冲洗制得的水凝胶微孔阵列后进行下一步实验.

(2) 模板法制备水凝胶微孔阵列: 本研究中所使用的聚二甲基硅氧烷模板由软刻蚀技术加工而成^[30]. 参照以往文献报道中的常用模板^[31], 选取圆柱直径 800 μm /高度 400 μm 和圆柱直径 400 μm /高度 200 μm 的两种模板制备水凝胶微孔阵列(模板中圆柱直径决定水凝胶微孔阵列中微孔的孔径, 圆柱高度决定微孔的深度). 图 1(b)为模板法制备 PEGDMA 水凝胶微孔阵列的流程图: 首先移取 30 μL 配好的水凝胶前聚体溶液滴加在模板上, 然后盖上经 TMSPPMA 处理过的盖玻片, 用功率为 80 mW cm^{-2} 的紫外光照射水凝胶前聚体溶

液 25 s 后, 即得 PEGDMA 水凝胶微孔阵列. 然后, 取下附着在盖玻片表面的水凝胶, 并用超纯水冲洗制得的水凝胶微孔阵列后用于下一步实验. 需要注意, 每次用模板法制备水凝胶后, 模板需用超纯水和无水乙醇进行清洗以避免模板上粘有的残留水凝胶对下次制备产生影响.

2.2.2 相差显微镜表征

在用相差显微镜对制备的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列的孔径和孔深进行表征前, 微孔阵列表面和周围的水分用滤纸吸干. 在表征微孔阵列的孔深时, 将制备的水凝胶沿微孔处直线侧切后, 垂直放置于相差显微镜下方, 侧面观察得到孔深值.

2.2.3 SECM 实验

SECM 实验采用三电极体系: 直径 10 μm 的 Pt 圆盘电极($RG(b/a) = 3\sim 4$, b 为整个电极的半径, a 为 Pt 丝的半径)为工作电极和 SECM 探头, Ag/AgCl 电极为参比电极, Pt 丝为对电极. 具体实验体系如图 1(c)所示, 将 1 $\text{cm} \times 1 \text{cm}$ 的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列样品置于含 0.1 mol L^{-1} KCl 水溶液的 SECM 电化学池底部, SECM 探头浸于水溶液中并置于微孔阵列样品的正上方. SECM 实验中探头的施加电位(-0.7 V(vs. Ag/AgCl 参比电极))通过扫描氧气在水溶液中的线扫描伏安曲线得到(扫速: 20 mV s^{-1}). SECM 扫描时起点处探头-PEGDMA 水凝胶表面的距离通过记录探头到水凝胶表面的渐进曲线(探头施加电位: -0.7 V(vs. Ag/AgCl 参比电极), 渐进速度: 2 $\mu\text{m s}^{-1}$)得到. PEGDMA 水凝胶微孔阵列的 SECM 图像扫描应用恒高度模式(探头-PEGDMA 水凝胶表面距离 $\sim 10 \mu\text{m}$, 探头电位-0.7 V(vs. Ag/AgCl 参比电极)). 所有 SECM 实验均在室温下进行. 为了避免 SECM 扫描过程中水溶液中的水凝胶微孔阵列由于吸水产生的溶胀变形导致水凝胶形貌产生变化, SECM 实验前将水凝胶微孔阵列样品在 0.1 mol L^{-1} KCl 水溶液中浸泡 2 h 使其中的含水量达到饱和.

3 结果与讨论

3.1 水凝胶微孔阵列表面形貌的光学表征

光掩膜法和模板法分别制备的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列形貌的相差显微镜的表征结果见图 2. 由图

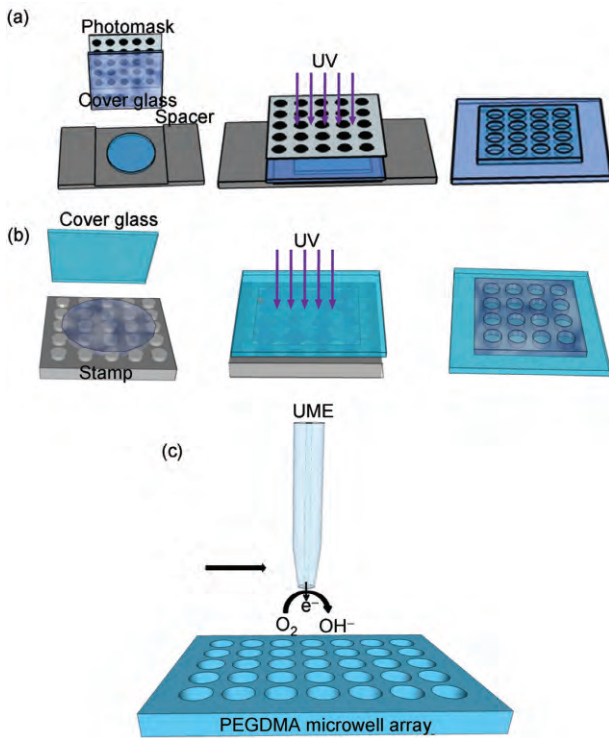


图1 (a) 采用光掩模法制备 PEGDMA 水凝胶微孔阵列的实验流程图; (b) 采用模板法制备 PEGDMA 水凝胶微孔阵列的实验流程图; (c) 应用 SECM 表征 PEGDMA 水凝胶微孔阵列表面形貌的实验原理图

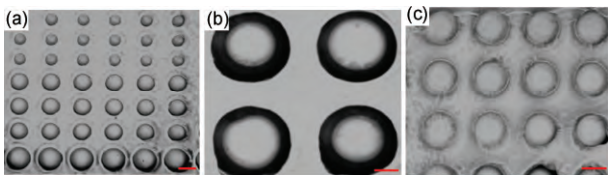


图2 (a) 光掩模法和(b, c) 模板法制备的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列的相差显微镜正视图. 标尺: 400 μm

2(a)测得光掩模法制备的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列的微孔直径大小依次为 $399.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 、 $301.0 \pm 1.1 \mu\text{m}$ 和 $201.6 \pm 1.1 \mu\text{m}$, 与光掩膜设计的理论孔径大小一致; 通过微孔阵列的侧切观察得到其孔深大致为 $140.0 \pm 2.5 \mu\text{m}$, 与水凝胶微孔阵列制备过程中使用 $150 \mu\text{m}$ 厚度的盖玻片作为垫片调节微孔深度的理论预期基本一致. 由图 2(b)和图 2(c)得到模板法制备的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列的微孔直径分别为 $801.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$ (图 2(b))和 $401.8 \pm 0.6 \mu\text{m}$ (图 2(c)), 与模板上的圆柱直径值($800 \mu\text{m}$ 和 $400 \mu\text{m}$)基本一致; 通过微孔阵列的侧切观察得到两个微孔阵列的孔深大致为

$400.0 \pm 2.5 \mu\text{m}$ 和 $200.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$, 与模板上圆柱高度值 $400 \mu\text{m}$ 和 $200 \mu\text{m}$ 基本一致.

3.2 水凝胶微孔阵列形貌的扫描电化学显微镜表征

本研究应用 SECM 对 PEGDMA 水凝胶微孔阵列的形貌表征中, 选取的电对为水溶液中存在的天然物质——氧气. 通过记录水溶液中 PEGDMA 水凝胶微孔列表面的 O_2 在 SECM 探针附近还原电流的分布图, 可间接得到水凝胶微孔列表面的形貌图. 由于 O_2 还原是一个比较复杂的反应(O_2 可能发生 2 电子还原生成 H_2O_2 或发生 4 电子还原反应生成 OH^-)^[19], 在应用 SECM 对 PEGDMA 水凝胶微孔列表面进行扫描前, 首先需要确定本研究中发生的具体 O_2 还原反应以及 O_2 还原反应发生的电位, 进而确定 SECM 实验中的探头施加电位.

图 3(a)为 $10 \mu\text{m}$ 直径的 Pt 探头上记录的 O_2 在 $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ 本体水溶液中的线扫伏安曲线. 由图可知本体溶液中 O_2 还原反应的稳态电流值($i_{T,\infty} = 3.4 \text{ nA}$), 根据 $i_{T,\infty}$ 与 O_2 还原反应转移的电子数(n)存在的如下关系(公式(1)),

$$i_{T,\infty} = 4nFDC_{\text{O}_2}^* \quad (1)$$

式中 F 为法拉第常数, D 为 O_2 在水溶液中的扩散系数($2.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [19]), $C_{\text{O}_2}^*$ 为 O_2 在本体水溶液中的浓度($2.5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ [19]), 计算得到 $n \approx 4$, 即本实验中 Pt 探头上 O_2 发生 4 电子还原反应生成 OH^- (反应式(2)), 这与之前的报道一致[15].



另外, 由图 3(a)得到 O_2 在 Pt 探针上的还原电位区间为 $-0.6 \sim -0.8 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl RE), 由此设定 SECM 实验中 Pt 探头的施加电位为 -0.7 V (vs. Ag/AgCl RE). SECM 扫描起点处的探头-PEGDMA 水凝胶表面的距离可通过记录 Z 方向上探头逼近水凝胶表面时的 O_2 还原反应的渐进曲线确定. 图 3(b)中虚线为记录的 Pt 探针到 PEGDMA 水凝胶表面的渐进曲线. 图中纵坐标为归一化的探头电流($i_T/i_{T,\infty}$, 即渐近时探头记录的 O_2 还原电流值 i_T 除以本体溶液中 O_2 还原的稳态电流值 $i_{T,\infty}$), 横坐标为归一化的距离($L = d/a$, 即渐近时探头到 PEGDMA 水凝胶表面的距离 d 除以探头铂丝的半径 a). 如图所示, 得到的实验渐进曲线为负反馈曲线, 这主要由于类似绝缘基底的水凝胶表面阻碍了

水溶液中的 O_2 向探针表面的扩散. 当探头十分接近水凝胶表面时(如 $L < 4$ 时), 实验渐近曲线的 $i_T/i_{T,\infty}$ 比探头接近玻璃纯绝缘基底的理论渐近曲线(图 3(b)中实线部分)的电流值高, 并且实验渐近曲线末端存在一个拐点, 这与之前的研究发现一致^[18]. 这主要由于水凝胶微孔内水溶液中以及水凝胶本身的孔状结构中含有 O_2 , 当探针十分接近水凝胶表面时, O_2 在探针表面发生的还原反应导致 O_2 浓度降低, 诱导了微孔内水溶液中以及水凝胶本身所含 O_2 向探针表面的扩散, 用以补充探头上消耗的 O_2 , 从而使水凝胶表面的 O_2 浓度值高于无孔的玻璃绝缘基底表面的 O_2 浓度

值, 造成水凝胶表面渐近曲线的 O_2 还原电流值高于玻璃绝缘基底的 O_2 还原电流值. 造成渐近曲线末端存在拐点的原因是探针接触软弹性的水凝胶表面时造成的渐近曲线的变形. 在由渐近曲线确定探针到水凝胶表面的绝对零点距离后, 考虑到水凝胶的软材料特性和其表面的非绝对平整, SECM 扫描前将探针上提 $10 \mu\text{m}$, 即 SECM 扫描起点处的探针-PEGDMA 水凝胶表面的距离 d 设定为 $10 \mu\text{m}$.

应用 SECM 对光掩膜法制备的孔深较浅($140.0 \pm 2.5 \mu\text{m}$)和不同孔径的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列表面的 X - Y 方向(即水平方向)的扫描结果见图 4. 由图

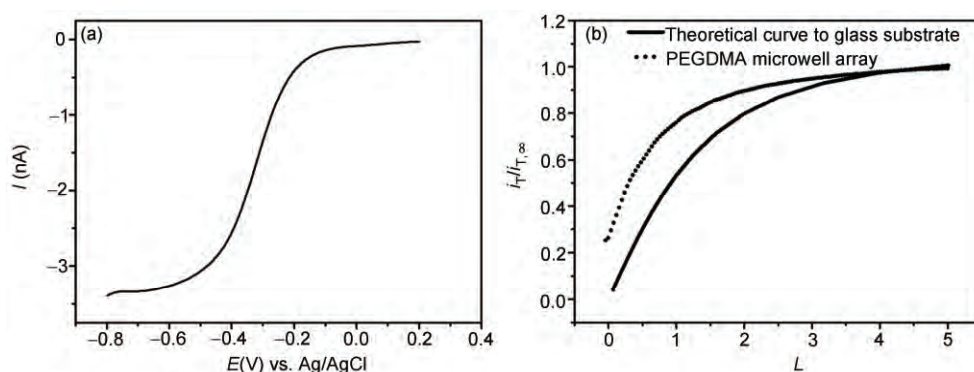


图 3 (a) 直径 $10 \mu\text{m}$ 的 Pt 圆盘电极上记录的 0.1 mol L^{-1} KCl 水溶液中 O_2 还原的线扫伏安曲线(扫描速度: 20 mV s^{-1}); (b) SECM 渐近曲线(虚线为探头逼近 PEGDMA 水凝胶表面的实验渐近曲线, 实线为探头逼近玻璃表面的理论渐近曲线, 探头电位: -0.7 V (vs. Ag/AgCl), 渐近速率为 $2 \mu\text{m s}^{-1}$)

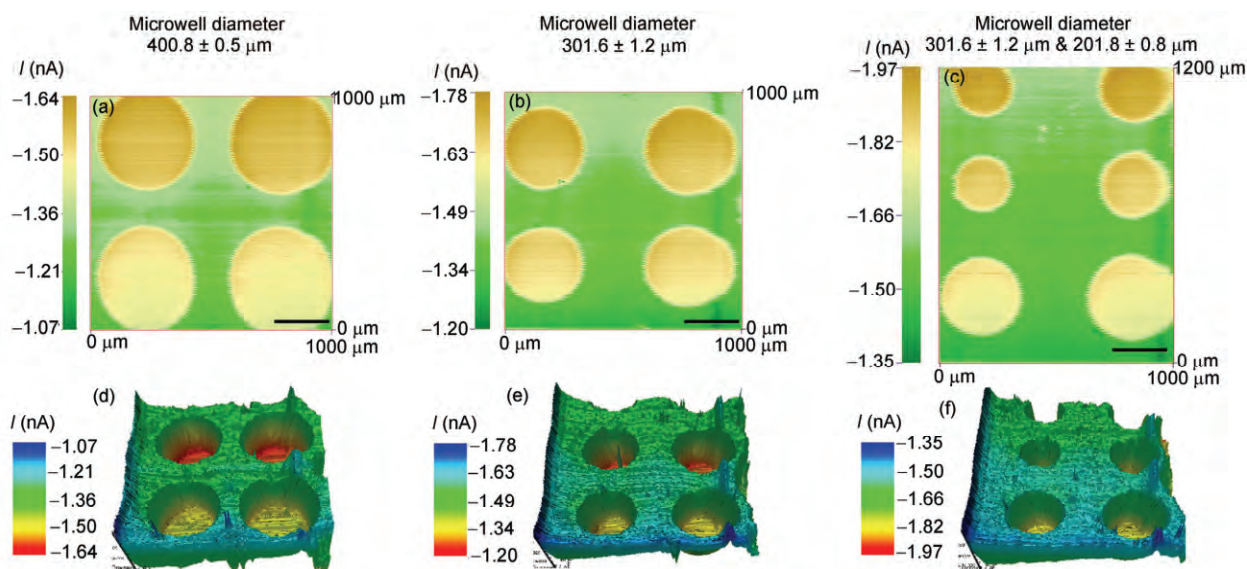


图 4 光掩膜法制备的含孔深 $140.0 \pm 2.5 \mu\text{m}$ 和不同孔径的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列表面的 SECM (a-c) 二维扫描图和(d-f) 三维形貌图(探头电位: -0.7 V (vs. Ag/AgCl RE), 探头-PEGDMA 水凝胶表面距离: $\sim 10 \mu\text{m}$, 扫描速率: $250 \mu\text{m s}^{-1}$, 图中标尺: $200 \mu\text{m}$). 微孔直径依次为: (a) $400.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$; (b) $301.6 \pm 1.2 \mu\text{m}$; (c) $301.6 \pm 1.2 \mu\text{m}$ 和 $201.8 \pm 0.8 \mu\text{m}$

4(a~c)的 X-Y 二维扫描图可得到清晰的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列表面的形貌图(电流较高的黄色圆形部分对应微孔, 周围电流较低的部分对应微孔周围的水凝胶表面). 造成 O_2 还原电流值在微孔表面比在周围水凝胶表面高的原因可能是: (1) SECM 探头的电流值与探头-样品表面的距离有关^[20]. 探头距离类似绝缘基底的水凝胶表面越近, 越阻碍溶液中的 O_2 向探针表面的扩散, 使检测到的水凝胶表面的 O_2 还原电流值越小; (2) 当探针经过水凝胶表面和微孔表面时, O_2 在探针表面的还原反应导致 O_2 浓度降低, 诱导了微孔内水溶液或水凝胶本身所含 O_2 向探针表面的扩散^[19, 32]. 由于微孔内水溶液中含有的 O_2 浓度比水凝胶本身所含的 O_2 浓度高, 由微孔中水溶液补充的 O_2 量比水凝胶补充的 O_2 量多, 由此造成微孔表面的 O_2 浓度值高于水凝胶表面的 O_2 浓度值. 因此, 微孔表面的 O_2 还原电流值要高于水凝胶表面的 O_2 还原电流值. 另外, 由图 4(a~c)可测得微孔的孔径依次约为 $400.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$, $301.6 \pm 1.2 \mu\text{m}$ 和 $201.8 \pm 0.8 \mu\text{m}$, 这与光掩膜上设计的微孔直径以及相差显微镜的表征结果($399.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 、 $301.0 \pm 1.1 \mu\text{m}$ 和 $201.6 \pm$

$1.1 \mu\text{m}$)基本一致. 由此证明了 SECM 可在水溶液中原位表征水凝胶微孔阵列表面形貌的实验设想. 另外, SECM 扫描还可提供 PEGDMA 微孔阵列的三维形貌图(如图 4(d, e)). 相比二维图像, 三维图像可提供微孔(如微孔的内部形貌)及微孔周围水凝胶表面的细节信息(如平整度), 由此证实 SECM 在水凝胶微孔阵列形貌表征中可提供微孔三维信息的优点. 上述的 SECM 扫描结果表明, 经过 2 h 的水溶液浸泡后, 由于 PEGDMA 水凝胶微孔阵列的厚度较薄, 并且牢固地固定于盖玻片表面, 水凝胶微孔阵列的形貌在 SECM 扫描过程中几乎没有受到水凝胶在水溶液中溶胀的影响.

应用 SECM 对模板法制备的孔深较深和孔径较大的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列表面形貌的扫描结果见图 5. 由图 5(a, b)可得到清晰的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列的表面形貌图, 并准确测得微孔直径分别为 $801.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ 和 $402.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$, 该结果与相差显微镜的表征结果($801.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$ 和 $401.8 \pm 0.6 \mu\text{m}$)基本一致. 但得到的两种孔深($400.0 \pm 2.5 \mu\text{m}$ (图 5(a)) 和 $200.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$ (图 5(b))的水凝胶微孔阵列的微孔表面

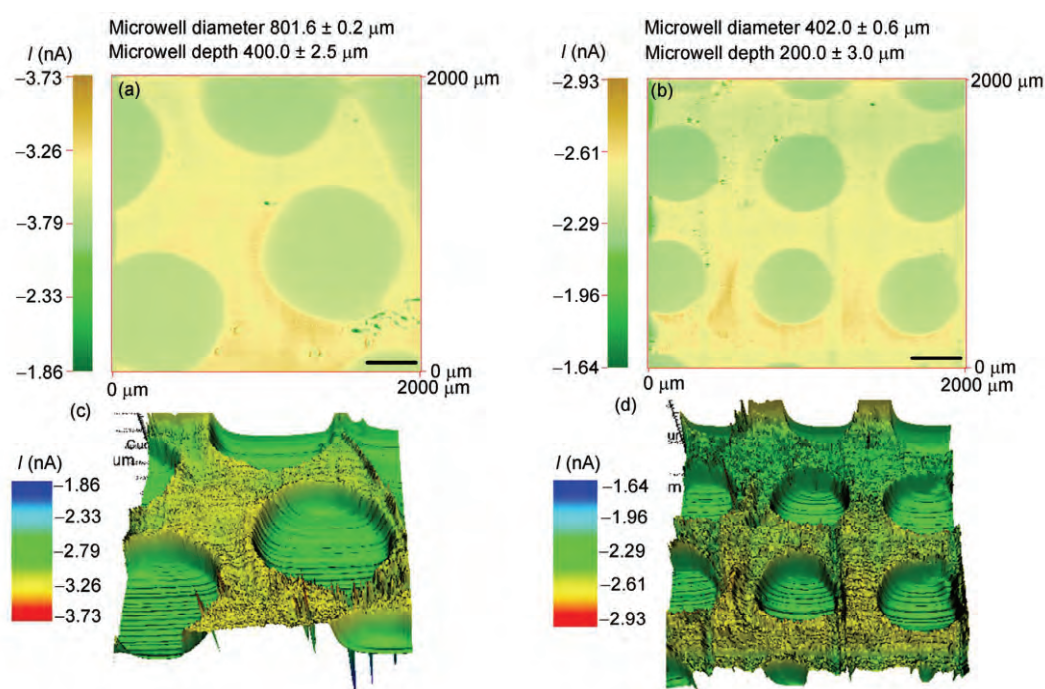


图 5 模板法制备的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列表面的 SECM (a, b) 二维扫描图; (c, d) 三维形貌图(探头电位: -0.7 V (vs. Ag/AgCl RE), 探头-PEGDMA 水凝胶表面距离: $\sim 10 \mu\text{m}$, 扫描速率: $500 \mu\text{m s}^{-1}$, 图中标尺: $400 \mu\text{m}$). (a) 微孔直径: $801.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$, 微孔深度: $400.0 \pm 2.5 \mu\text{m}$; (b) 微孔直径: $402.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$, 微孔深度: $200.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$

的 O_2 还原电流比周围水凝胶表面低, 这一现象与图 4(a~c)相反. 造成这一现象的原因可能是探头检测到的 O_2 还原电流除了受探头-水凝胶表面的距离以及由探头表面 O_2 消耗诱导的溶液中 O_2 向探头表面扩散的影响外, O_2 从微孔内水溶液中向 SECM 探头表面的扩散还与微孔深度有关. 微孔越深, O_2 从孔内到达探头表面的扩散距离越长, 扩散所需的时间越久, 因此不能立即补充探头表面由于还原所消耗的 O_2 , 从而导致 $400.0 \pm 2.5 \mu\text{m}$ 和 $200.0 \pm 3.0 \mu\text{m}$ 两种孔深的微孔表面测得的 O_2 还原电流值较周围水凝胶表面低. 同上, SECM 扫描也可提供模板法制备的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列表面的三维形貌图(图 5(c, d)).

4 结论

本文基于氧气这种水溶液中的天然电对在 SECM 探针附近的还原电流, 应用 SECM 对水溶液中的 PEGDMA 水凝胶微孔阵列的形貌进行了原位扫描, 同时得到水凝胶微孔阵列表面二维孔径和三维形貌信息. 相比于常规的光学显微镜和电子显微镜的表征方法, SECM 具有能在水溶液中对样品进行原位、可逆且无损表征并给出三维形貌信息的优点. 该 SECM 测试方法为水凝胶材料的形貌表征提供了新的方法和思路, 将来可进一步拓展用于研究水凝胶材料的性质以及水凝胶的微环境对细胞行为的影响.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(21105079, 51173144, 51073127, 11372243)、教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(2013 回国基金 16)、陕西省科学技术研究发展计划项目(2012K08-18, 2013KW32-03)、陕西省重点科技创新团队(2013KCT-05)、高等学校博士学科点专项科研基金(20100201110040)和中央高校基本科研业务费专项资金资助, 特此一并致谢.

参考文献

- 1 Moeller HC, Mian MK, Shrivastava S, Chung BG, Khademhosseini A. A microwell array system for stem cell culture. *Biomaterials*, 2008, 29: 752-763
- 2 Kobel SA, Lutolf MP. Fabrication of PEG hydrogel microwell arrays for high-throughput single stem cell culture and analysis. *Methods Mol Biol*, 2012, 811: 101-112
- 3 Gobaa S, Hoehnel S, Roccio M, Negro A, Kobel S, Lutolf MP. Artificial niche microarrays for probing single stem cell fate in high throughput. *Nat methods*, 2011, 8: 949-955
- 4 Occhetta P, Sadr N, Piraino F, Redaelli A, Moretti M, Rasponi M. Fabrication of 3D cell-laden hydrogel microstructures through photo-mold patterning. *Biofabrication*, 2013, 5: 035002
- 5 Han YL, Yang YS, Liu SB, Wu JH, Chen YM, Lu TJ, Xu F. Directed self-assembly of microscale hydrogels by electrostatic interaction. *Biofabrication*, 2013, 5: 035004
- 6 Chen YM, Ogawa R, Kakugo A, Osada Y, Gong JP. Dynamic cell behavior on synthetic hydrogels with different charge densities. *Soft Matter*, 2009, 5: 1804-1811
- 7 Chen YM, Shiraiishi N, Satokawa H, Kakugo A, Narita T, Gong JP, Osada Y, Yamamoto K, Ando J. Cultivation of endothelial cells on adhesive protein-free synthetic polymer gels. *Biomaterials*, 2005, 26: 4588-4596
- 8 Chen YM, Tanaka M, Gong JP, Yasuda K, Yamamoto S, Shimomura M, Osada Y. Platelet adhesion to human umbilical vein endothelial cells cultured on anionic hydrogel scaffolds. *Biomaterials*, 2007, 28: 1752-1760
- 9 Chen YM, Dong K, Liu ZQ, Xu F. Double network hydrogel with high mechanical strength: performance, progress and future perspective. *Sci China: Technol Sci*, 2012, 55: 2241-2254
- 10 Cordey M, Limacher M, Kobel S, Taylor V, Lutolf MP. Enhancing the reliability and throughput of neurosphere culture on hydrogel microwell arrays. *Stem Cells*, 2008, 26: 2586-2594
- 11 Kobel S, Limacher M, Gobaa S, Laroche T, Lutolf MP. Micropatterning of hydrogels by soft embossing. *Langmuir*, 2009, 25: 8774-8779
- 12 Kang L, Hancock MJ, Brigham MD, Khademhosseini A. Cell confinement in patterned nanoliter droplets in a microwell array by wiping. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 93: 547-557
- 13 Schukur L, Zorlutuna P, Cha JM, Bae H, Khademhosseini A. Directed differentiation of size-controlled embryoid bodies towards endothelial and cardiac lineages in RGD-Modified poly(Ethylene Glycol) hydrogels. *Adv healthcare mater*, 2013, 2: 195-205
- 14 Choi YY, Chung BG, Lee DH, Khademhosseini A, Kim JH, Lee SH. Controlled-size embryoid body formation in concave microwell arrays.

Biomaterials, 2010, 31: 4296–4303

- 15 Park JY, Lee DH, Lee EJ, Lee SH. Study of cellular behaviors on concave and convex microstructures fabricated from elastic PDMS membranes. *Lab chip*, 2009, 9: 2043–2049
- 16 Hwang YS, Chung BG, Ortmann D, Hattori N, Moeller HC, Khademhosseini A. Microwell-mediated control of embryoid body size regulates embryonic stem cell fate via differential expression of WNT5a and WNT11. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106: 16978–16983
- 17 Selimovic S, Piraino F, Bae H, Rasponi M, Redaelli A, Khademhosseini A. Microfabricated polyester conical microwells for cell culture applications. *Lab chip*, 2011, 11: 2325–2332
- 18 Jeerage KM, LaNasa SM, Hughes HA, Lauria DS, Bryant SJ, Slifka AJ. Scanning electrochemical microscopy measurements of photopolymerized poly(ethylene glycol) hydrogels. *Polym J*, 2010, 51: 5456–5461
- 19 Macpherson JV, O'Hare D, Unwin PR, Winlove CP. Quantitative spatially resolved measurements of mass transfer through laryngeal cartilage. *Biophys J*, 1997, 73: 2771–2781
- 20 Bard AJ, Mirkin MV. *Scanning Electrochemical Microscopy*. New York: Marcel Dekker, 2001
- 21 Bard AJ, Li X, Zhan W. Chemically imaging living cells by scanning electrochemical microscopy. *Biosens bioelectron*, 2006, 22: 461–472
- 22 Sun P, Laforge FO, Mirkin MV. Scanning electrochemical microscopy in the 21st century. *Phys Chem Chem Phys*, 2007, 9: 802–823
- 23 Amemiya S, Bard AJ, Fan FR, Mirkin MV, Unwin PR. Scanning electrochemical microscopy. *Ann Rev Anal Chem*, 2008, 1: 95–131
- 24 陈忠, 沈丽, 谢书宝, 何莎莉, 静平, 徐晓东, 邵元华. 不同亲水性探针分子在金电极上硫醇自组装跨膜动力学研究. *高等学校化学学报*, 2008, 29: 700–704
- 25 Bergner S, Vatsyayan P, Matysik FM. Recent advances in high resolution scanning electrochemical microscopy of living cells. *Anal Chim Acta*, 2013, 775: 1–13
- 26 Kaya T, Numai D, Nagamine K, Aoyagi S, Shikua H, Shikua T. Respiration activity of escherichia coli entrapped in a cone-shaped microwell and cylindrical micropore monitored by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Analyst*, 2004, 129: 529–534
- 27 Shiku H, Shiraishi T, Aoyagi S, Utsumi Y, Matsudaira M, Abe H, Hoshi H, Kasai S, Ohya H, Matsue T. Respiration activity of single bovine embryos entrapped in a cone-shaped microwell monitored by scanning electrochemical microscopy. *Anal Chim Acta*, 2004, 522: 51–58
- 28 Saito T, Wu CC, Shiku H, Yasukawa T, Yokoo M, Ito-Sasaki T, Abe H, Hoshi H, Matsue T. Oxygen consumption of cell suspension in a poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchannel estimated by scanning electrochemical microscopy. *Analyst*, 2006, 131: 1006–1011
- 29 Wei Z, Yang JH, Du XJ, Xu F, Zrinyi M, Osada Y, Li F, Chen YM. Dextran-based self-healing hydrogels formed by reversible diels–alder reaction under physiological conditions. *Macromol Rapid Commun*, 2013, 34: 1464–1469
- 30 Kang G, Lee JH, Lee CS, Nam Y. Agarose microwell based neuronal micro-circuit arrays on microelectrode arrays for high throughput drug testing. *Lab Chip*, 2009, 9: 3236–3242
- 31 Zorlutuna P, Annabi N, Camci-Unal G, Nikkiah M, Cha JM, Nichol JW, Manbachi A, Bae H, Chen S, Khademhosseini A. Microfabricated biomaterials for engineering 3D tissues. *Adv Mater*, 2012, 24: 1782–1804
- 32 Gonsalves M, Barker AL, Macpherson JV, Unwin PR, O'Hare D, Winlove CP. Scanning electrochemical microscopy as a local probe of oxygen permeability in cartilage. *Biophys J*, 2000, 78: 1578–1588

New application of scanning electrochemical microscopy in characterization of hydrogel microwell arrays

DU XiaoJing¹, XU Feng^{2,3}, LI Fei^{1,2*}, CHEN YongMei^{1,2*}

¹ Department of Chemistry, School of Sciences, MOE Key Laboratory for Non-Equilibrium Synthesis and Modulation of Condensed Matter, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

² Bioinspired Engineering and Biomechanics Center (BEBC), Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

³ The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

*Corresponding authors (email: feili@mail.xjtu.edu.cn; chenym@mail.xjtu.edu.cn)

Abstract: Hydrogel microwell arrays are new soft substrates for cell cultivation. The microwell morphology has direct influence on the behavior of cells cultured within microwells. But the conventional morphology characterization techniques of hydrogel microwell arrays can not *in situ* characterize hydrogel microwell arrays in aqueous solution and also not in a reversible way. Using the oxygen dissolved in water as the redox mediator, scanning electrochemical microscopy (SECM) was applied to *in situ* characterize the morphology of microwell array made of polyethylene glycol dimethacrylate (PEGDMA) hydrogel in aqueous solution. Both the two-dimensional and three-dimensional surface morphology images of PEGDMA microwell arrays were obtained. This work demonstrates that SECM is a new method of *in situ* characterization of hydrogel microwell arrays in a non-destructive and reversible way with providing three-dimensional surface morphology information.

Keywords: scanning electrochemical microscopy (SECM), hydrogel microwell array, photomask method, template method