

班级：整合科学综合实验课程 2

学号：2200017797

姓名：侯书洋

实验名称：高通量微流芯片的设计与加工

实验日期：2023 年 12 月 8 日、12 月 15 日、12 月 22 日、12 月 29 日

一. 实验目的与基本内容：

实验目的：

学习微流芯片设计与加工的基本流程，并尝试利用所设计的微流芯片进行高通量的单细胞层面上的实验。

基本内容：

1. 学习微流芯片(Chips)的基本知识，掌握微流芯片进行高通量(High-Throughput)细胞实验的基本原理；
2. 利用 L-Edit 软件设计微流芯片上的图案(包括液流通道和细胞腔室两个部分)；
3. 将设计好的图案激光直写到铬板(正性光胶)上，制作成掩光模具(Photo Mask)；
4. 利用上述掩光模具，在紫外光下对硅板(负性光胶)进行刻蚀，制成底板模具；
5. 利用底板模具制作 PDMS 为基材料的芯片，并用 Plasma 将其与载玻片键合；
6. 利用加工完成的微流芯片，在显微环境中观测酵母细胞受盐离子胁迫的行为。

二. 实验原理：

(一) 光刻中的明暗场光罩与正负性光胶：

光刻中最基本的原理：一束平行光打在光罩(Mask)上后会在底板上形成特定的图案。从芯片设计到芯片的加工实现，“图案”会通常经历三个阶段的转变：设计者软件中定义的图形(版图)；版图转化为实物图形(光罩)；光罩图形转化为芯片图形(芯片加工)。

通常，将有大面积透光区域的掩光模具称为明场光罩板(Clear Mask)，将有大面积不透光区域的掩光模具称为暗场光罩板(Dark Mask)。我们在利用诸如 L-Edit 等软件设计图案时，一定要注意标注所绘制的图案究竟对应于掩光模具上的保留部分(不透光区域)还是去除部分(透光区域)。

正性光刻胶(Positive Photoresist)是指：衬底(Substrate)上的光胶在曝光后，曝光的部分在显影液中的溶解度较未曝光部分在显影液中的溶解度显著增加。显影操作后衬底上剩余的光刻胶图案与光罩板上不透光区域的图案一致。

负性光刻胶(Negative Photoresist)是指：衬底上的光胶在曝光后，曝光区域的光胶发生交联反应而硬化因此无法溶解于显影液中，未曝光区域的光胶仍然在显影液中有较高的溶解度。显影操作后衬底上剩余的光刻胶图案与光罩板上透光区域的图案一致。

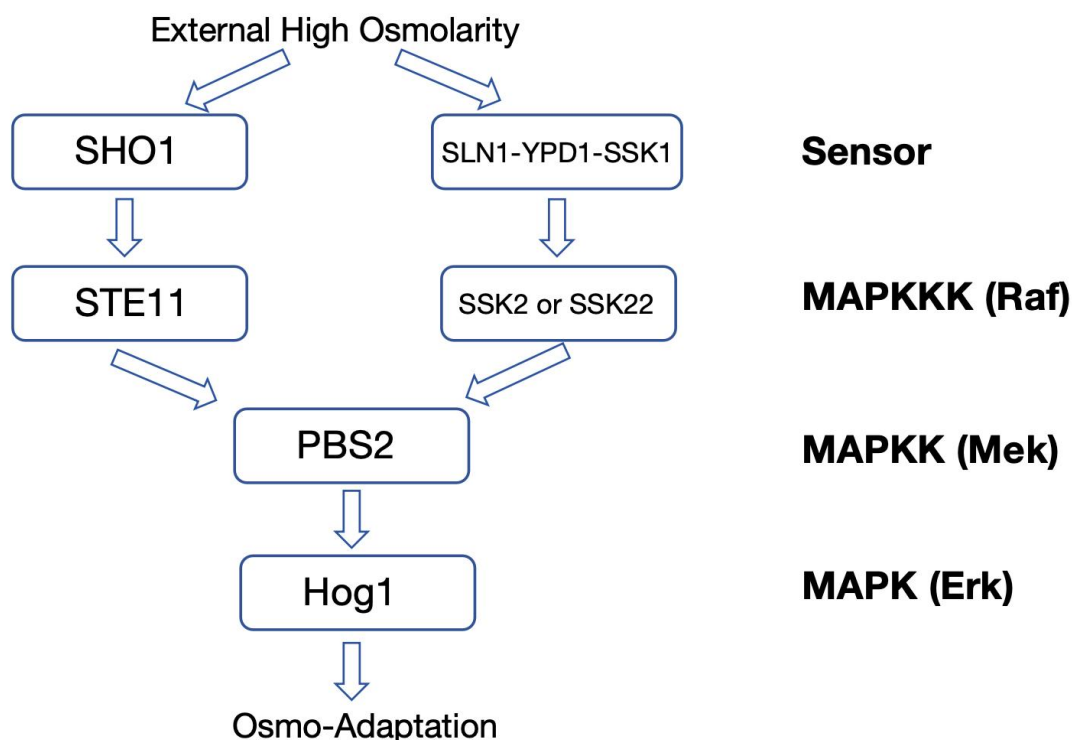
在暗场光罩板下，习惯将正性光刻胶曝光后在衬底上形成的图案称为孔区，将负性光刻胶曝光后在衬底上形成的图案称为岛区。

(二) 酵母细胞对盐离子胁迫的经典响应通路：

酵母细胞对各种胁迫因子(温度、饥饿、渗透压等)都建立了相应高效的响应机制，其中一种维持细胞内稳态的机制是激活相应的丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK)信号通路(Raf-Mek-Erk 级联放大通路)。高渗甘油响应通路(High-Osmolarity Glycerol pathway, HOG pathway)是酵母细胞特定响应胞外高渗胁迫的一条信号通路，其下游的调控效应蛋白是 MAPK 家族的 Hog1 蛋白。当酵母细胞受到胞外盐离子等高渗胁迫时，通过 HOG 通路上调 Hog1 蛋白的磷酸化水平，由此促进 Hog1 蛋白(低磷酸化水平时通常位于胞浆内)向细胞核迁移(进核)；在细胞核内 Hog1 与相应的转录调控因子(Transcription Factor, TF)作用，从而实现靶向基因转录过程的调控^[1]。研究已经证实，在酵母细胞中，HOG 通路至少受两种独立的渗透压感受器

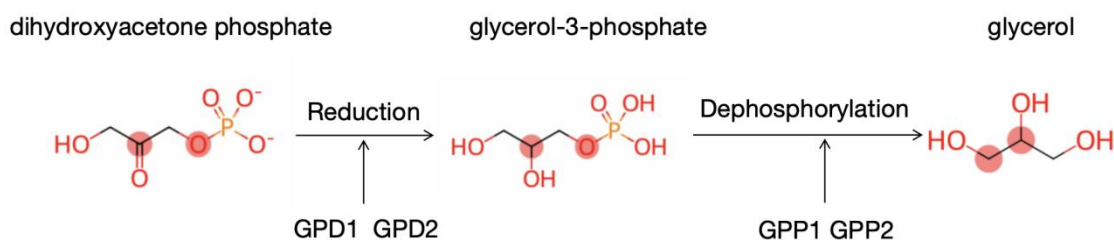
^[1] Azad, G. K., Singh, V., ... & Thakare, M. J. (2014) Mitogen-activated protein kinase Hog1 is activated in

(Osmosensor)的调控 (Pic. 1, 仿自 Posas, F. & Saito, H)。



Pic. 1: Two Independent Osmosensors Regulate the HOG MAPK Pathway ^[2]

早期研究者们就发现，当酵母细胞处于高渗环境的胁迫下时，其会上调胞内甘油 (Glycerol) 的合成与积累速率，即酵母细胞把甘油作为对高渗胁迫的“阻抗匹配因子” (Compatible Solute) 来实现对高渗环境的适应。芽殖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 胞内合成甘油主要分为两步^[3] (Pic. 2)：即从甘油合成前体物质二羟丙酮磷酸开始，先还原至 3-磷酸甘油，再脱磷酸化形成甘油；参与还原步骤的酶是 NAD^+ 依赖性的 3-磷酸甘油脱氢酶 (NAD^+ -dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPD)，主要有 GPD1、GPD2 两种；参与脱磷酸步骤的酶是 3-磷酸甘油磷酸酶 (glycerol-3-phosphate phosphatase, GPP)，主要有 GPP1、GPP2 两种。



Pic. 2: The production of glycerol in *Saccharomyces cerevisiae*

response to curcumin exposure in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol* (14), 317. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0317-0>

^[2] Posas, F., & Saito, H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* (276), 5319

^[3] Norbeck, J., Akhtar, N., Blomberg, A., & Adler, L. (1996) Purification and Characterization of Two Isoenzymes of DL-Glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* (271), 23.

GPP1 与 GPP2 均受到 HOG 通路的调控, 当胞外渗透压上升时, HOG 通路激活使得胞内 Hog1 磷酸化水平上调, Hog1 蛋白入核与 GPP1、GPP2 的转录因子相互作用, 从而上调 GPP1、GPP2 基因表达水平, 最终使得胞内 Gpd1、Gpd2 蛋白含量上调, 酵母细胞合成甘油的速率增加, 从而适应胞外高渗环境^[4]。

三. 实验仪器与实验用品:

1. 超净工作室:

小型激光直写仪(Heidelberg uPG 501); 紫外曝光机(Lithography Machine, BG-401A); 台阶仪(Surface Profiler, Alpha-Step IQ); 真空泵; 等离子清洁仪(Plasma Cleaner, Harrick PDC-M-01); 金属浴台; 烘箱;

SU-8 3000 系列光胶; 显影液; 硅片; 铬板; PDMS 的 A 胶、B 胶;

2. 细胞工作室:

SD 培养基; GFP - Hog1/Gpp1 芽殖酵母菌株母液; 超净工作台; 电子天平;

3. 显微工作室:

适配微流芯片的荧光显微镜; 机械注射泵系统;

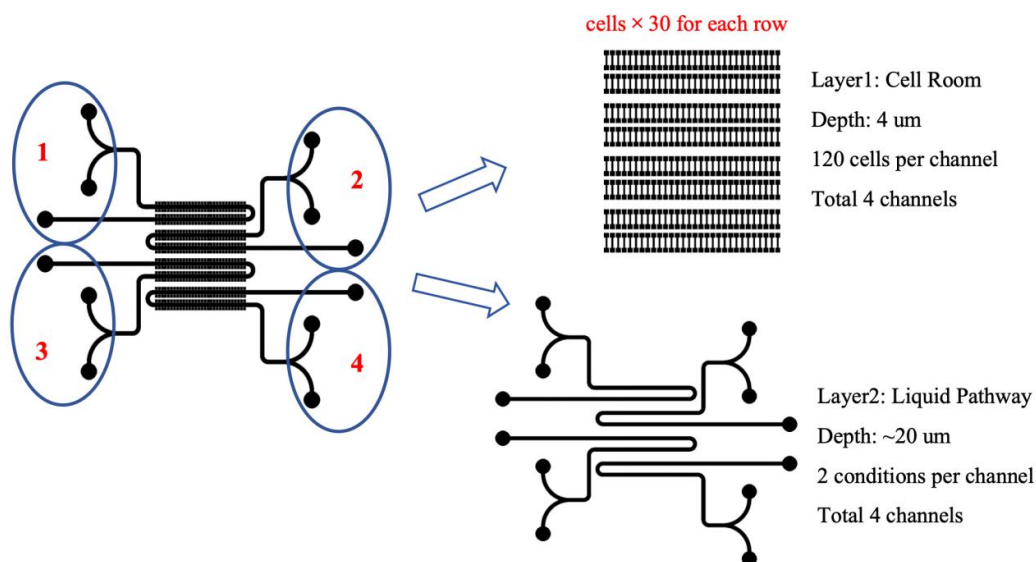
四. 实验流程:

Noted: 除了芯片图纸设计和显微环境观察外, 实验操作均在超净工作室中进行; 进入超净工作室之前需要确保开启氮气发生器和空气循环净化系统, 并且穿上实验服和鞋套。

(一) 微流芯片图案设计与掩光模具的制作

1. 分别利用 L-Edit 软件设计微流芯片中液流通道和细胞腔室的图案(注意在两层图案中加入对位标记孔); 液流通道和细胞腔室图案的示意图如 Pic. 3 所示;

2. 将 L-Edit 中设计好的两层图案导出并传递至激光直写仪中; 选用铬板作为掩光模具的基材料, 控制激光直写仪分别完成两层图案对应铬板的刻蚀;



Pic. 3: The Pattern Designed on the Chip (Fabricated from Chen, S. J.)

3. 将激光直写仪刻蚀后的铬板浸没在显影液中, 显影 1.5 min 后取出; 用蒸馏水充分冲洗铬板表面后, 利用氮气喷枪干燥铬板表面。

^[4] Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S., & Adler, L. (2001) The Yeast Glycerol 3-Phosphatases Gpp1p and Gpp2p Are Required for Glycerol Biosynthesis and Differentially Involved in the Cellular Responses to Osmotic, Anaerobic, and Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry* (276), 5.

(二) 底板模具的制作:

1. 选取尺寸合适的硅片作为底板模具的基材料; 将硅片进行 180°C、5 min 的金属浴(磨砂面朝下)以干燥硅片表面; 金属浴完成后将硅片置于洁净滤纸上自然冷却至接近室温;
2. 将干燥完毕的硅片正中放置(磨砂面朝下)于匀胶仪的载物平台上, 吸真空固定硅片;
3. 选取 SU-8 3000 系类中 3005 胶型, 于固定后硅片的正中心缓慢倾倒, 直到硅片上的光胶量达到约硅片半径的二分之一处时停止注胶; 倾倒光胶时应避免气泡的产生;
4. 设定匀胶仪运转程序: 先以 500 rpm 预匀胶 10 s, 再以 4000 rpm 匀胶 30 s (Pic. 4);

图案层	胶型	匀胶仪转速	匀胶时长	目标厚度
Layer 1: Cell Room	3005	4000 rpm	30 s	~ 5 μm
Layer 2: Liquid Pathway	3025	4000 rpm	30 s	~ 20 μm
Noted: 匀胶前 500 rpm 预转 10 s				

Pic. 4: The Parameter of the Photoresist on the Silicon Substrate

5. 旋转匀胶完毕后, 将硅片光胶面朝上进行 95°C、2 min 金属浴作为前烘操作; 前烘完毕后将硅片光胶面朝上置于洁净滤纸上自然冷却至接近室温;

6. 打开紫外曝光机和汞灯, 将冷却后的硅片置于圆形载物板上, 并将 Layer 1 对应的掩光模具置于掩模板上(图案面朝下对向硅片光胶面), 两者均吸真空固定(注意整个装载过程中避免掩光模具与硅片之间的擦碰); 装载完毕后确认载物板与掩模板之间相互贴合, 设定紫外曝光机的曝光程序让硅片紫外刻蚀 40 s;

7. 取出紫外曝光后的硅片, 光胶面朝上进行 95°C、2 min 金属浴作为后烘操作; 后烘完毕后将硅片光胶面朝上置于洁净滤纸上自然冷却至接近室温;

8. 将后烘完毕的硅片完全浸没于 SU-8 显影液中, 显影操作 1.5 min; 显影完毕后用蒸馏水充分清洗硅片的正反两面(注意将光胶面被显影的区域洗净), 用氮气喷枪干燥; 此时我们得到了底板模具的第一层图案;

9. 在以上操作基础上继续在硅片上套刻第二层图案; 先用胶带将硅片上已经刻蚀完毕的第一层图案中的对位标记蒙盖上, 避免其在第二次匀胶时被光胶覆盖而导致无法完成对位;

10. 选取 SU-8 3000 系列中 3025 胶型, 重复操作 3. 和操作 4. 中步骤 (Pic. 3);

11. 将前烘时长改为 8 min, 重复操作 5. 中步骤; 冷却完毕后用镊子翘去覆盖于第一层图案上对位标记处的光胶和胶带;

12. 再次打开紫外曝光机和汞灯, 并且打开显微显示器的屏幕, 将冷却后的硅片置于圆形载物板上, 再将与 Layer 2 对应的掩光模具置于掩模板上(图案面朝下对向硅片光胶面); 利用显微显示屏不断调整掩光模具和硅片之间的相互位置, 直到两者图案中含有的对位标记相互吻合, 此时两者吸真空固定(注意整个装载和调整过程中应避免掩光模具与硅片之间的擦碰); 装载完毕后确认载物板与掩模板之间相互贴合, 并设定紫外曝光机的曝光程序让硅片紫外刻蚀 60 s;

13. 将后烘时长改为 4 min, 重复操作 7. 中步骤;

14. 将 SU-8 显影时长改为 4 min, 重复操作 8. 中步骤; 此时我们得到了多层套刻的底板模具 (Silicon Substrate with Layer 1 and Layer 2);

15. 将硅片置于台阶仪的载物台面并调整至合适位置, 利用台阶仪对所得到的多层套刻底板模具进行表面光胶高度的表征: 先设定程序让针头扫描表征液流通道的高度, 再设定程序让针头扫描表征细胞腔室的高度; 得到相应数据后与目标厚度相比对以检测底板模具是否质量合格, 并将相应的实验参数记录于工作室中的实验记录册上;

16. 制作成型的硅片可在常温条件下临时封装保存在模具皿中。

(三) PDMS 注模与芯片键合:

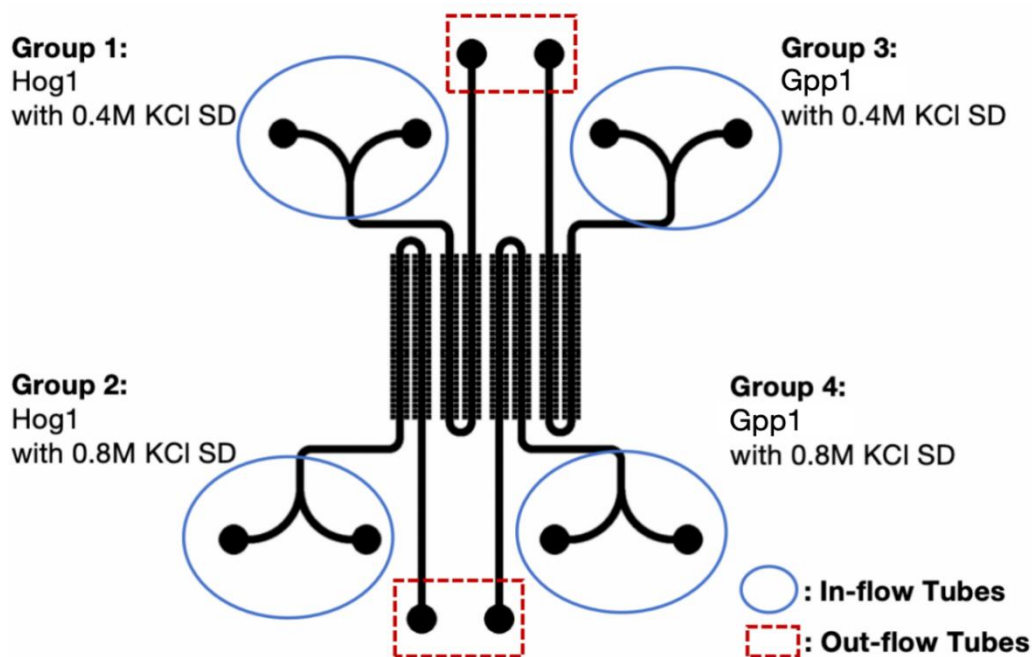
1. 取出制作成型的硅片置于空白模具皿中, 使得硅片图案区域位于模具皿正中央; 在非图案区用 PDMS(可以借助残余的 PDMS)填注, 从而使底板模具固定获得成型的芯片模盒;
2. 将 PDMS 的 A 胶与 B 胶以 7:1 的配比用电子天平取出(实验中取 A 胶 21.0 g, B 胶 3.0 g); 在塑料杯中混合后用搅拌均匀均匀搅拌至胶液中充满绵密的气泡;
3. 将搅拌均匀的 PDMS 缓慢倒注入制作成型的芯片模盒中, 使得 PDMS 填满芯片模盒中图案区域的上方空间;
4. 将倒注好 PDMS 的芯片模盒置于真空泵中抽真空 10-15 min; 取出后, 用氮气喷枪或者洗耳球吹走 PDMS 表面和内部中存在的小气泡; 重复操作 4. 步骤直至气泡完全消失;
5. 将除尽 PDMS 中气泡的芯片模盒置于 75°C 的烘箱中加热固化 40 min 左右;
6. 从烘箱中取出芯片模盒, 用切模刀沿硅片的边缘切割 PDMS(注意用力适中, 不要切碎 PDMS 和硅片); 再沿图案中的分界线将切割下的 PDMS 模型拆分成长方形样芯片;
7. 选取合适的长方形样芯片, 将其图案面朝上, 用与芯片图案上圆孔相匹配的打孔器按照图案要求进行打孔操作(注意打出的孔道垂直于芯片表面, 并尽量不偏离规定的范围);
8. 另取一片载玻片, 用蒸馏水洗净载玻片两面并用氮气喷枪干燥;
9. 将长方形样 PDMS 芯片和清洁后的载玻片一同置于等离子清洁仪中, 设定程序进行 1-1.5 min 的等离子体(Plasma)打靶处理(注意将 PDMS 芯片放在等离子处理器载物区外侧, 将载玻片置于载物区内侧; PDMS 芯片图案面朝上);
10. 取出等离子体处理完毕后的载玻片和 PDMS 芯片, 及时将两者 Plasma 处理面相互贴合在一起(注意贴合过程中细致操作, 避免气泡的产生);
11. 贴合完毕后置于 75°C 烘箱中 4-6 h, 取出后即得到实验所需的微流芯片; 所得微流芯片可在 25°C 左右避光保存。

(四) 实验所需酵母菌株的活化与盐溶液的配备:

1. 取出实验中所需要的酵母菌株母液(均用绿色荧光蛋白标记了 Hog1 和 Gpp1 蛋白);
2. 在超净工作台上, 分别将 Hog1、Gpp1 菌株母液与 SD 培养基按 50:1000 的比例稀释到洁净的试管中(实验中用微量可调移液器取菌株母液 50 μ L, 取 SD 培养基 1000 μ L);
3. 将稀释后的菌液置于 30°C、220 rpm 的摇床中活化培养 3-5 小时, 取出后若检测其 OD 在 0.6-1.2 区间内即可为实验所用; 剩余的酵母菌株母液重新置于 4°C 冷室中保存;
4. 各取活化后 Hog1、Gpp1 酵母培养液 1 mL 于 1.5 mL 灭菌离心管中, 进行 4000 rpm、1 min 的离心; 用微量可调移液器汲取离心后 900 μ L 上清液后, 吹打混匀沉淀物和上清液; 此时我们得到了用于装载入微流芯片的 Hog1、Gpp1 酵母浓缩液;
5. 分取 500 mL SD 培养基, 并分别用电子天平称量 29.82 g (0.4 mol)、14.91 g (0.2 mol) KCl 固体; 充分溶解于 SD 培养基后可得实验所需 0.8 M、0.4 M KCl 的 SD 培养基。

(五) 显微环境的架设:

1. 挑选出实验所需的微流芯片, 将其置于真空泵中处理 30 min 以上;
2. 规划微流芯片上并行实验的排布; 本实验布局结果如 Pic. 5 所示;



Pic. 5: Layout of the Microchip Used in the Experiment

3. 将针头注射器内汲满相应溶液(SD 培养基, 0.4M KCl SD, 0.8M KCl SD), 去除注射器管内残余的气泡后与适配口径的塑料管相连接, 由此准备好针头推注组;
4. 取出真空泵中微流芯片, 依据 Pic. 4 装载酵母细胞: 取一小段塑料管将同一实验组中的两个入液口(In-flow Tube)相互连接, 利用针头注射器向相匹配的出液口(Out-flow Tube)推注酵母细胞浓缩液; 当发现入液口处塑料管中出现上升液段时, 停止出液口处酵母浓缩液的注射, 并借助入液口处塑料管内气压用针头注射器反复吹吸酵母液;
5. 对照组: 将每个组别的一个入液口分别连接上装载 SD 培养基的针头注射器, 并记录相应位置信息; 实验组: 将每个组别剩余的一个入液口分别按照 Pic. 4 中信息装载上相应的针头注射器(0.4M KCl SD or 0.8M KCl SD), 并记录相应位置信息;
6. 将微流芯片上剩余的出液口分别与长度近似相同的塑料管相连, 作为出口导液端; 至此微流芯片的通道已完全架设完毕;
7. 将通道架设完毕的微流芯片用胶带固定在荧光显微镜的载物平台上; 将所有出口导液端的塑料管(实验中共 4 个)用胶带聚拢共同导向收集废液的导管中; 将所有入液口处的针头推注组(实验中共 8 个)分别架设在荧光显微镜旁的机械推注系统上, 设定推注程序为 50 $\mu\text{L}/\text{hour}$ 、无限期(实验设定 10 h, 长于实验预期时间), 并记录相应位置信息;
8. 在与荧光显微镜配套的 NIS 软件中选用 x60 物镜(油镜), 并在微流芯片与物镜相对的位置刷上镜油; 至此, 显微实验所需的芯片架设工作完毕;
9. 在 NIS 软件中选定显微系统所需抓拍的位点(共 40 个位点): 每个组别选取 8 个观测位点(共选取 32 个观测位点), 每个组别内每竖列细胞腔室(一个组别内有 4 列, 见 Pic. 5)选取 2 个观测位点; 此外, 在首观测位点和尾观测位点间插入 8 个过渡位点;
(Noted: 每个观测位点之间距离尽量不超过 1, 否则实验拍摄过程中显微镜头可能失焦)
10. 在 NIS 软件中设定实验总时长为 10 h, 每轮拍摄间隔 2.5 min(共 241 轮次); 每个位点同时拍摄亮场、绿色荧光场两张照片; 至此, 显微实验适配的软件环境准备完毕;
11. 显微环境准备完毕后, 操纵机械推注系统开始对照组针头注射器的推注, 操纵 NIS 系统开始实验进程, 记录对照组开始时刻; 在实验进行 3 h 左右后, 操纵机械推注系统关闭对照组针头注射器的推注, 开启实验组针头注射器的推注, 并记录实验组开始时刻;

	总轮次 / turn	总时长	推注通道
对照组	75	3 h, 7.5 min	SD 培养基
实验组	166	6 h, 52.5 min	0.4M、0.8M KCl SD

Pic. 6: The Whole Process of the Microchip Experiment

12. NIS 实验进程完毕后，获取实验数据；至此，微流芯片的显微实验完毕；
13. 拆卸显微实验装置，整理显微实验室。

(六) 数据处理:

利用 imageJ、MatLab 等软件，分析所获图片数据中单个酵母细胞荧光强度的时序变化情况；作出单个细胞荧光强度和组别内酵母细胞平均荧光强度的时序变化图像。

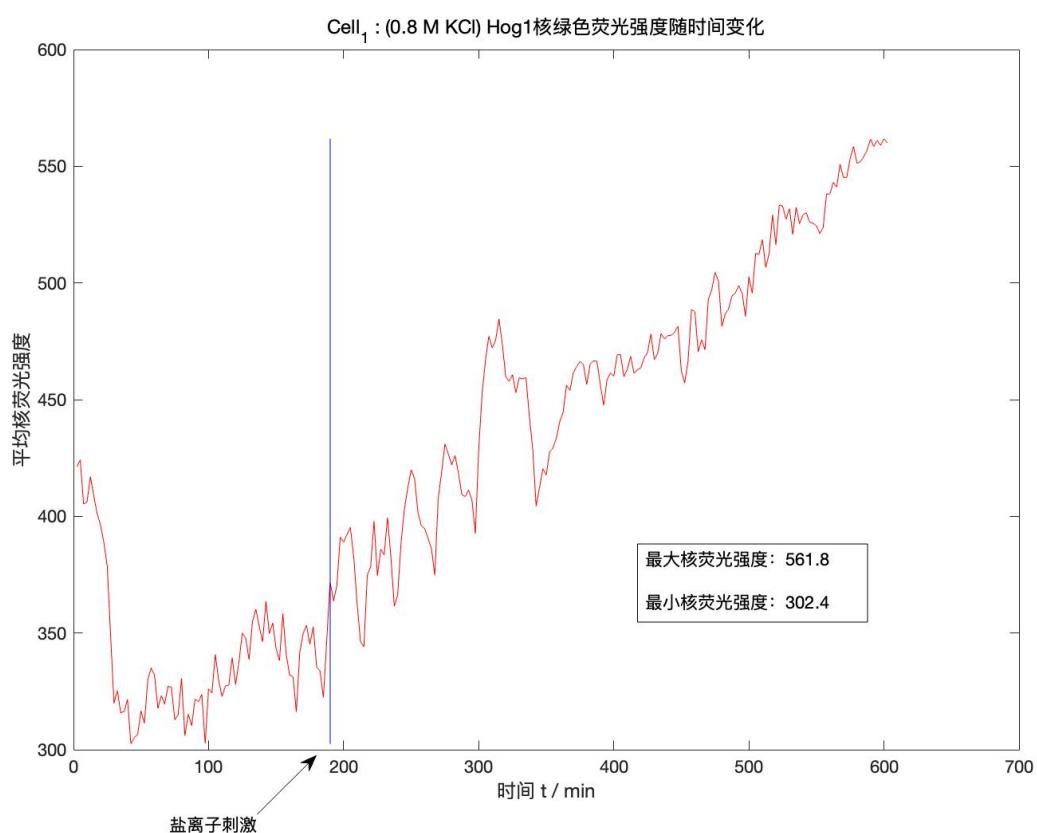
五. 实验结果:

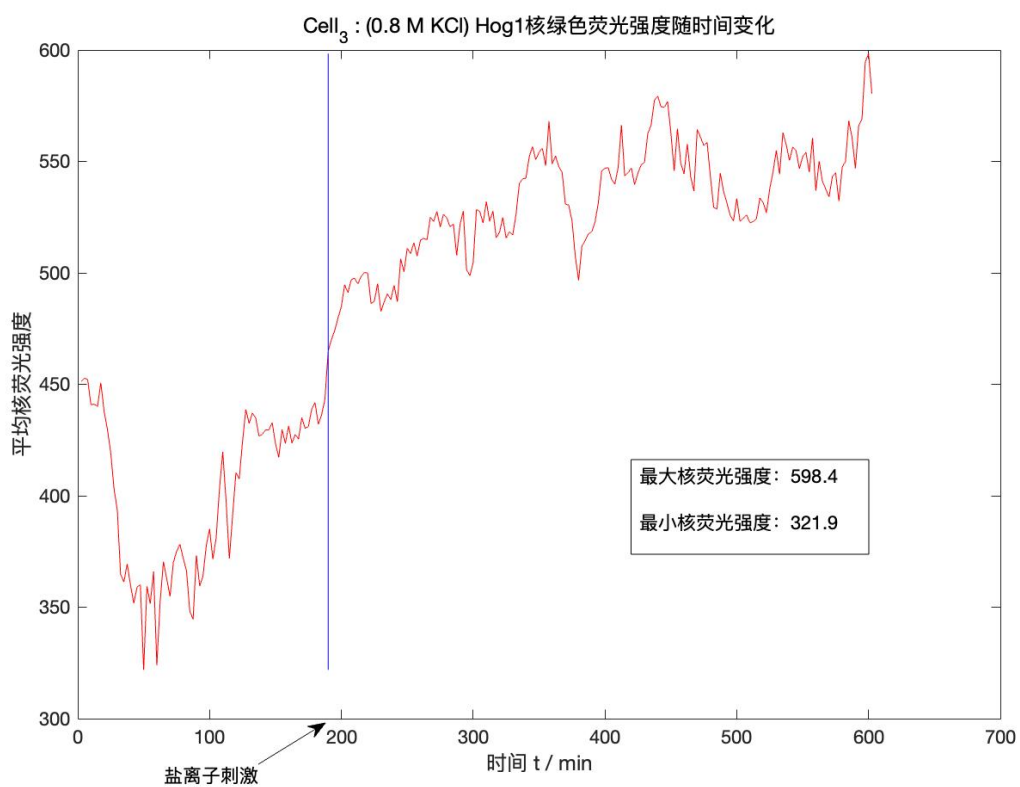
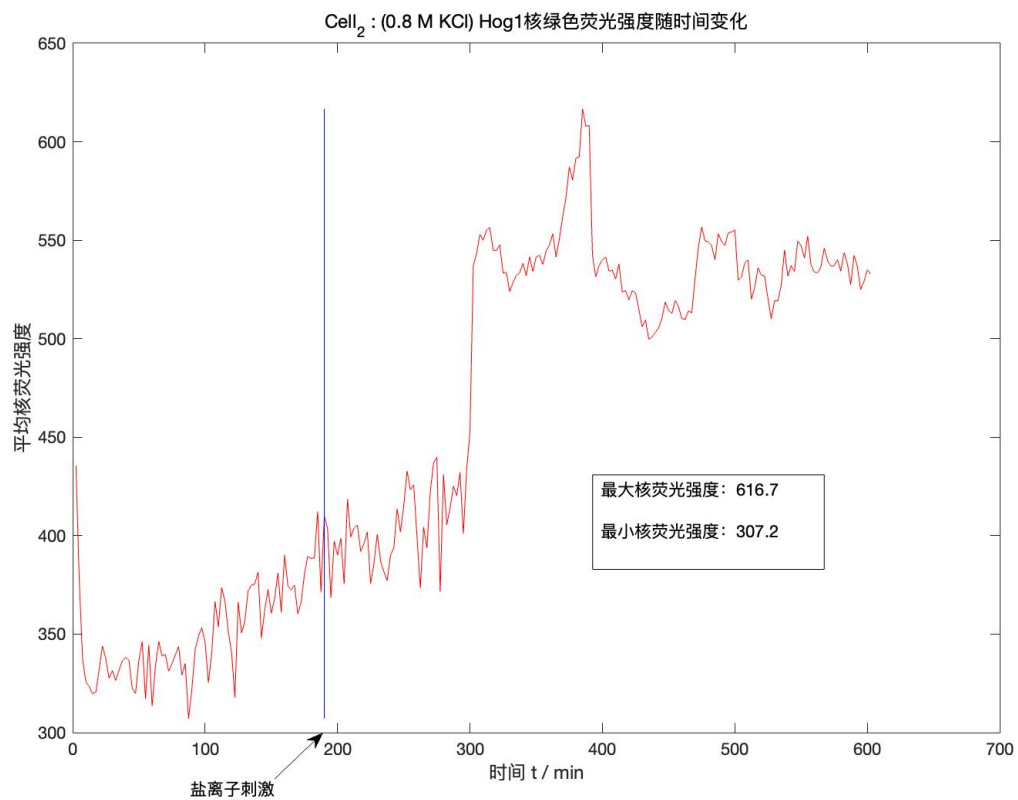
实验中制成硅片底板模具的台阶仪平均数据为:

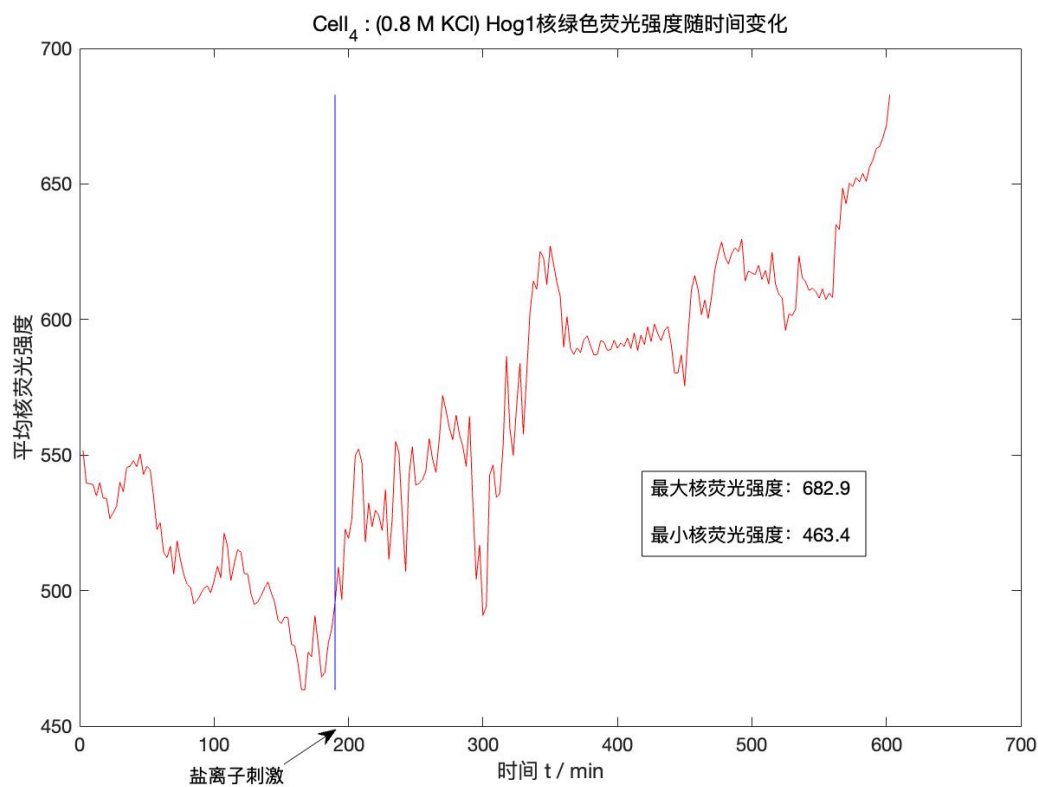
Layer 1: 5.6 μm , Layer 2: 23.5 μm

与 Pic. 4 中所期望的目标尺寸厚度相近, 说明该底板模具可以投入微流芯片注模过程的使用。

(一) Hog1 细胞核平均荧光强度随时间变化 (SD with 0.8 M KCl)

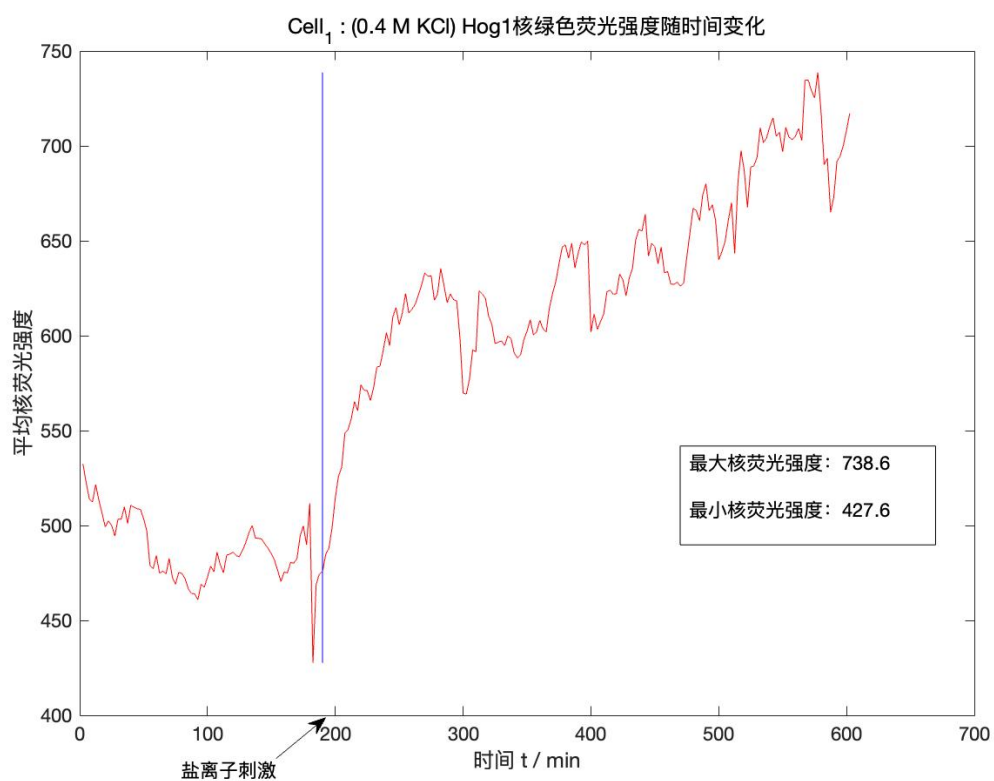


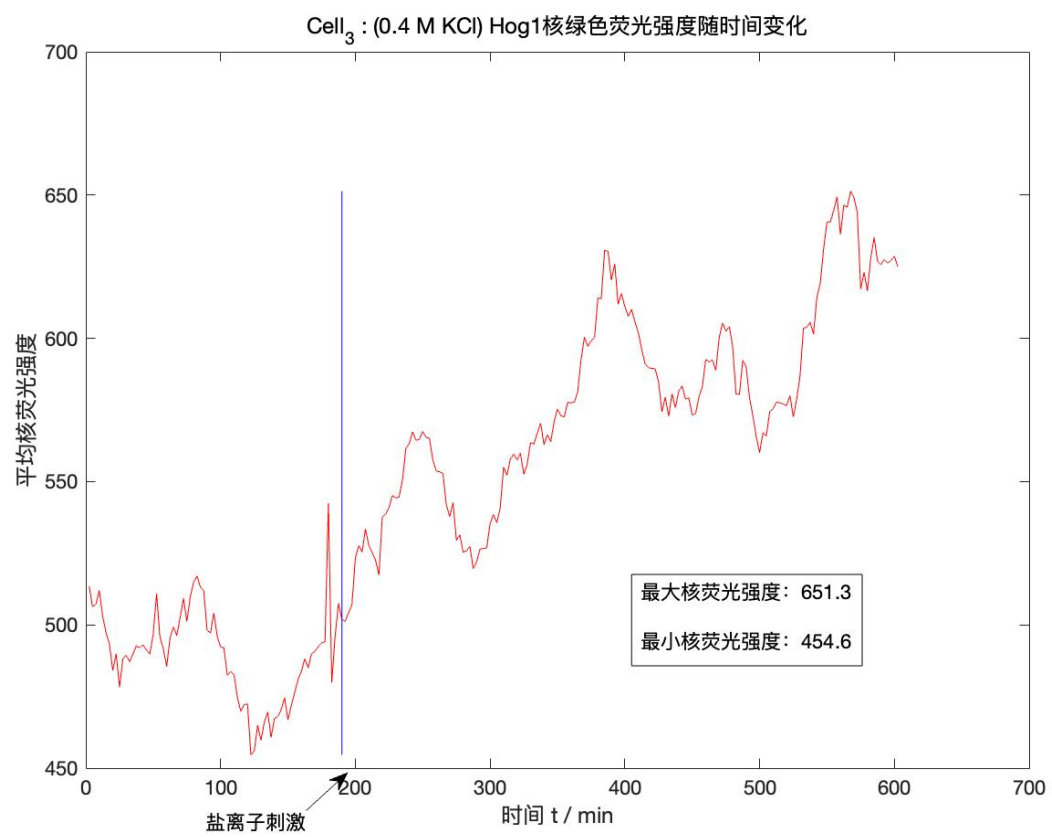
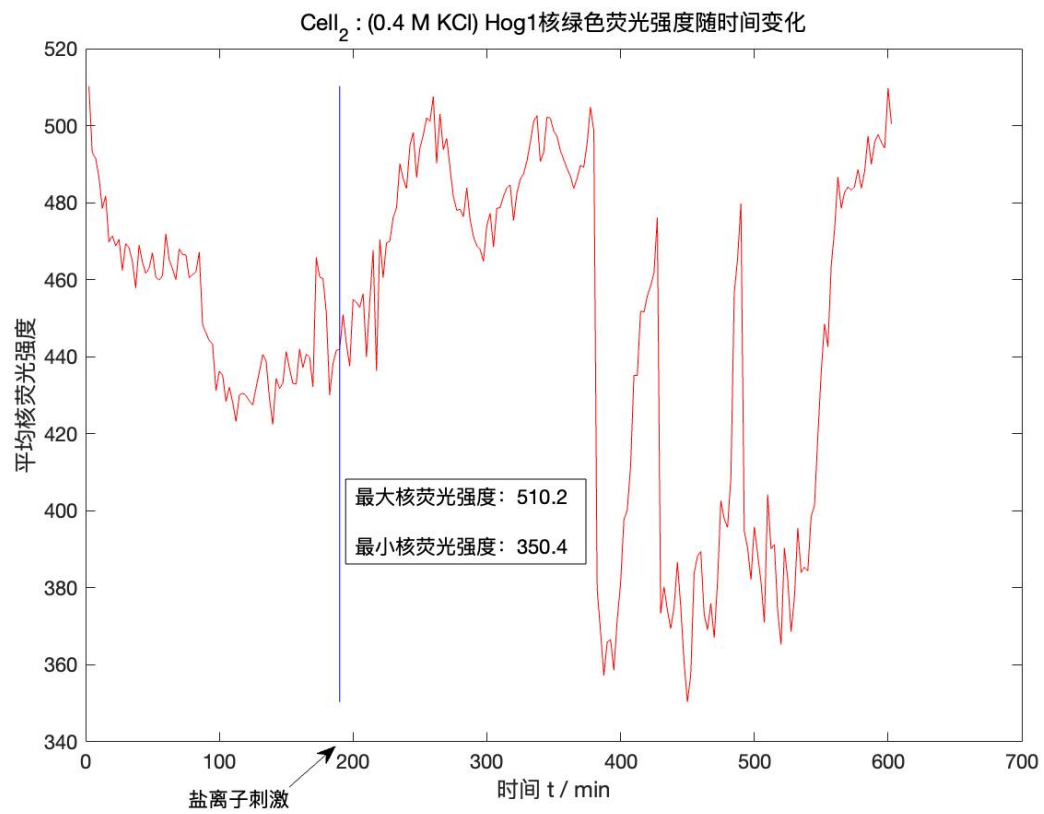


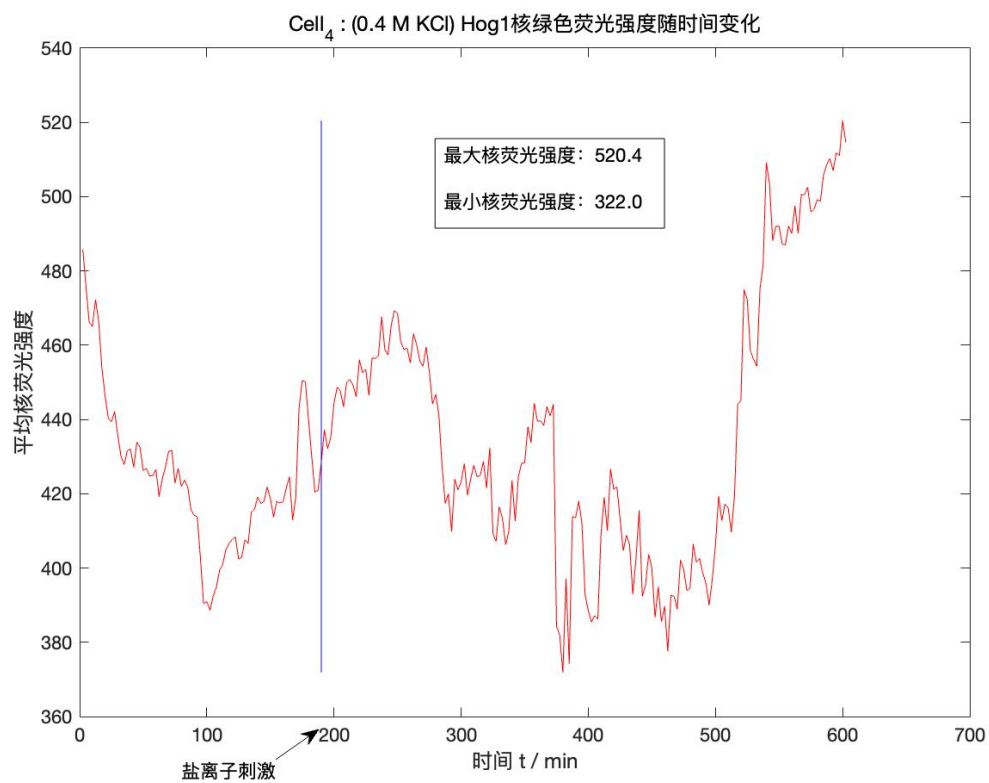


Pic. 7: The GFP nuclear fluorescence intensity of Hog1 (0.8 M KCl)

(二) Hog1 细胞核平均荧光强度随时间变化 (SD with 0.4 M KCl)

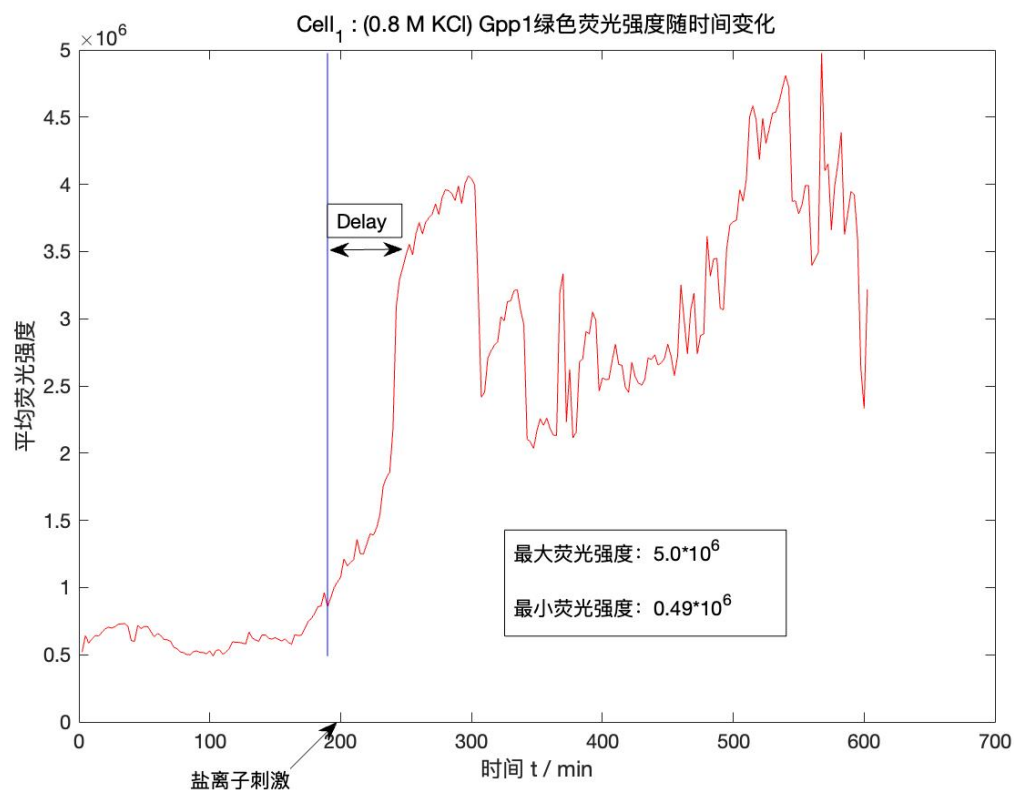


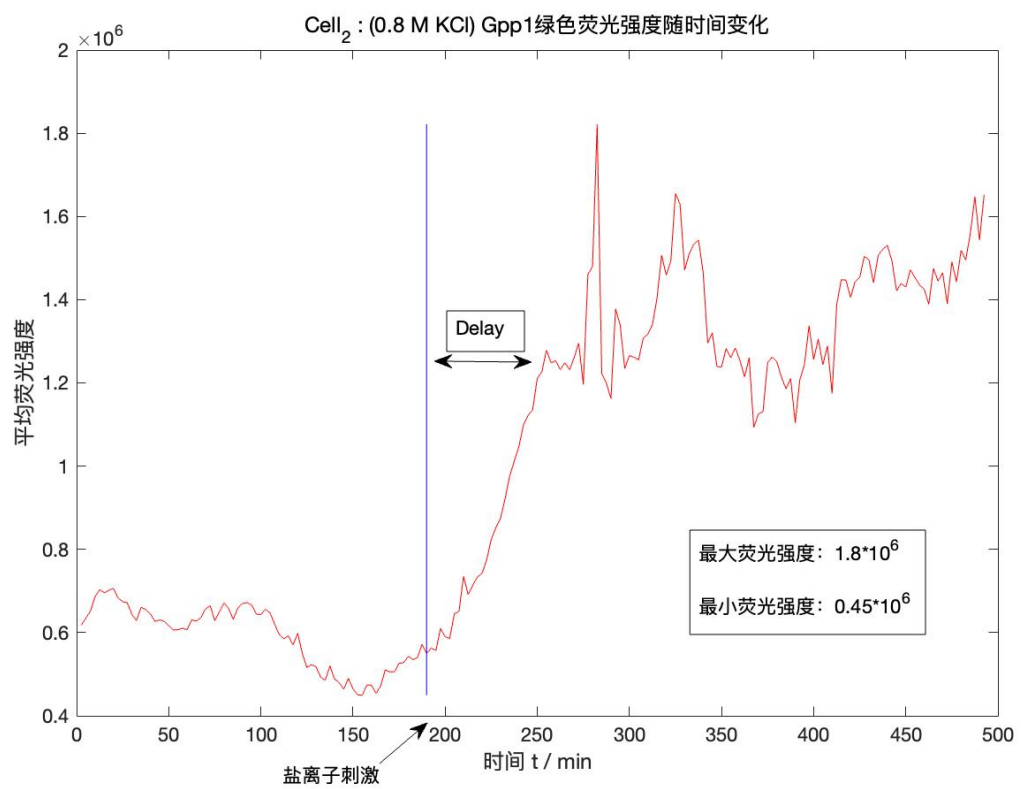
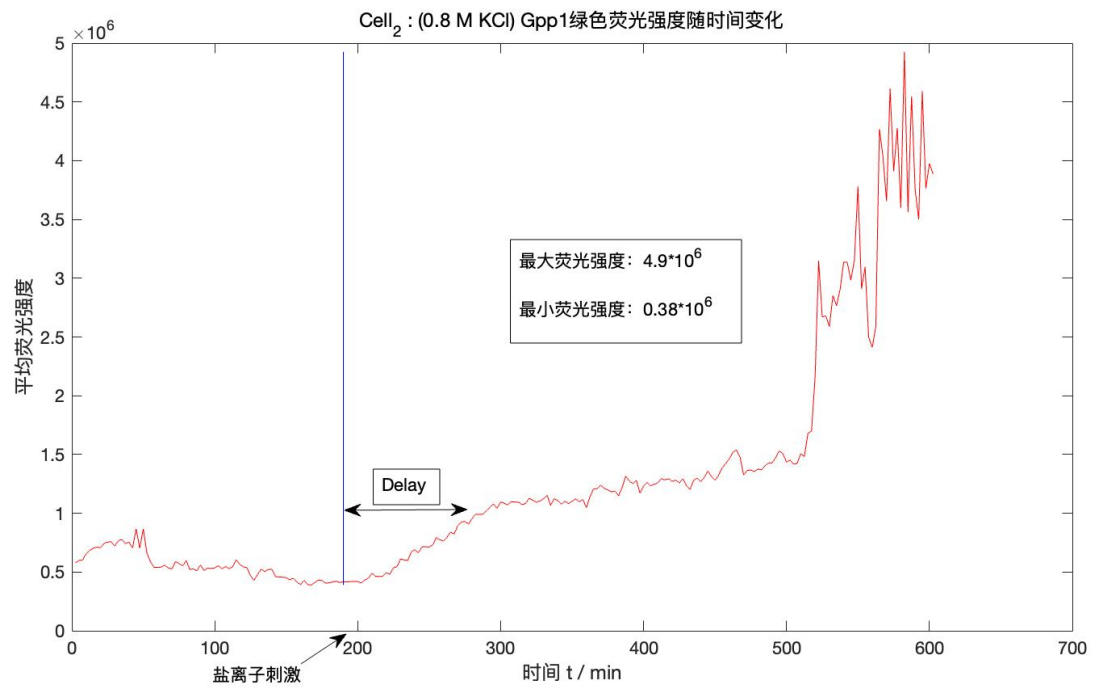


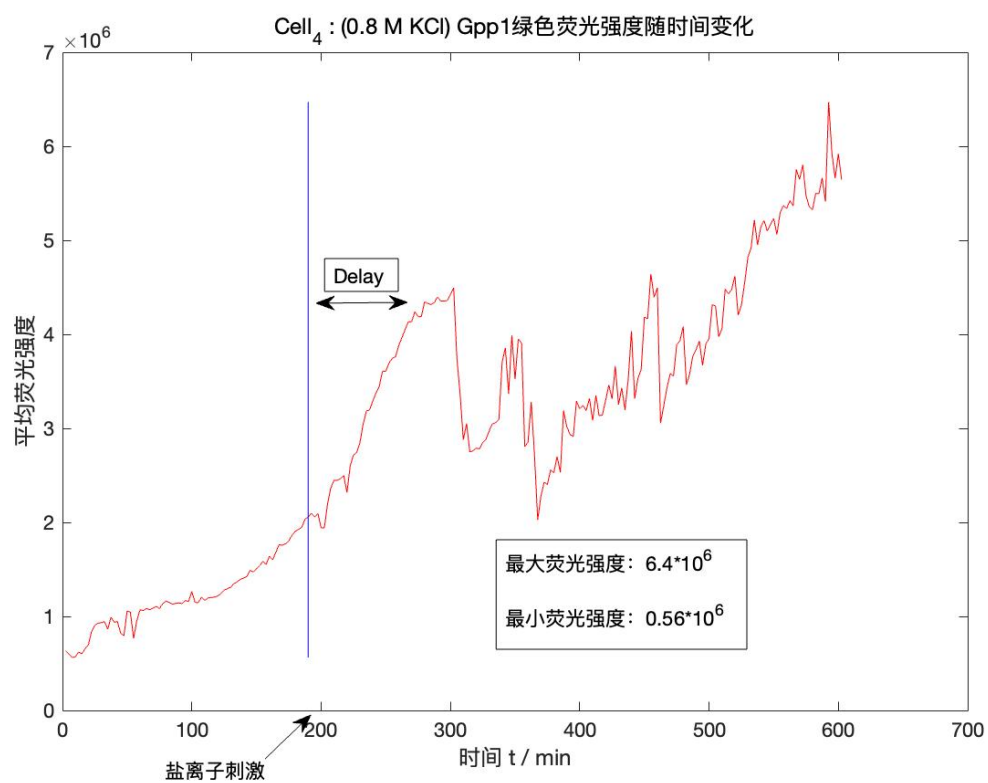


Pic. 8: The GFP nuclear fluorescence intensity of Hog1 (0.4 M KCl)

(三) Gpp1 胞内平均荧光强度随时间变化 (SD with 0.8 M KCl)

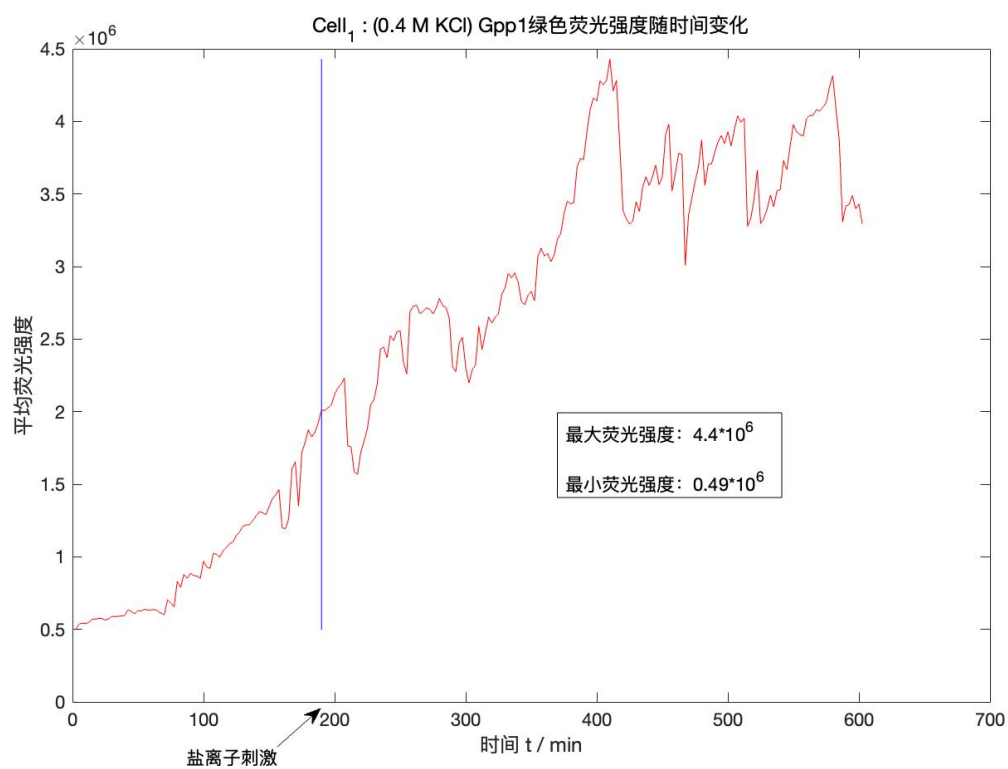


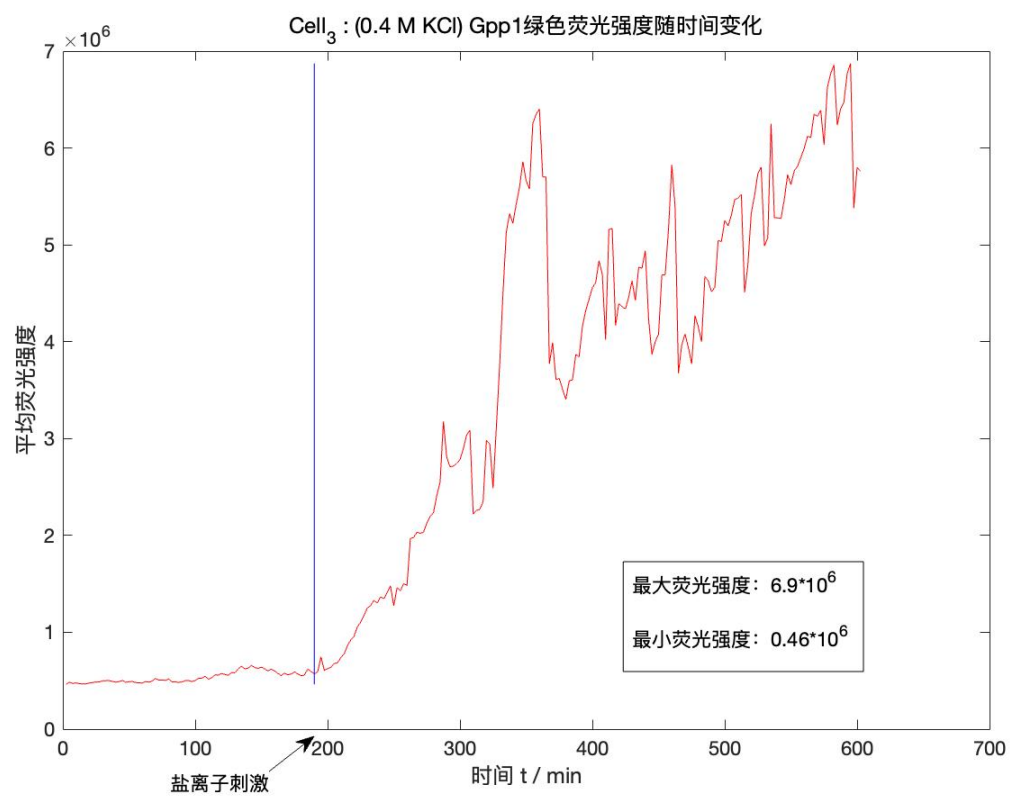
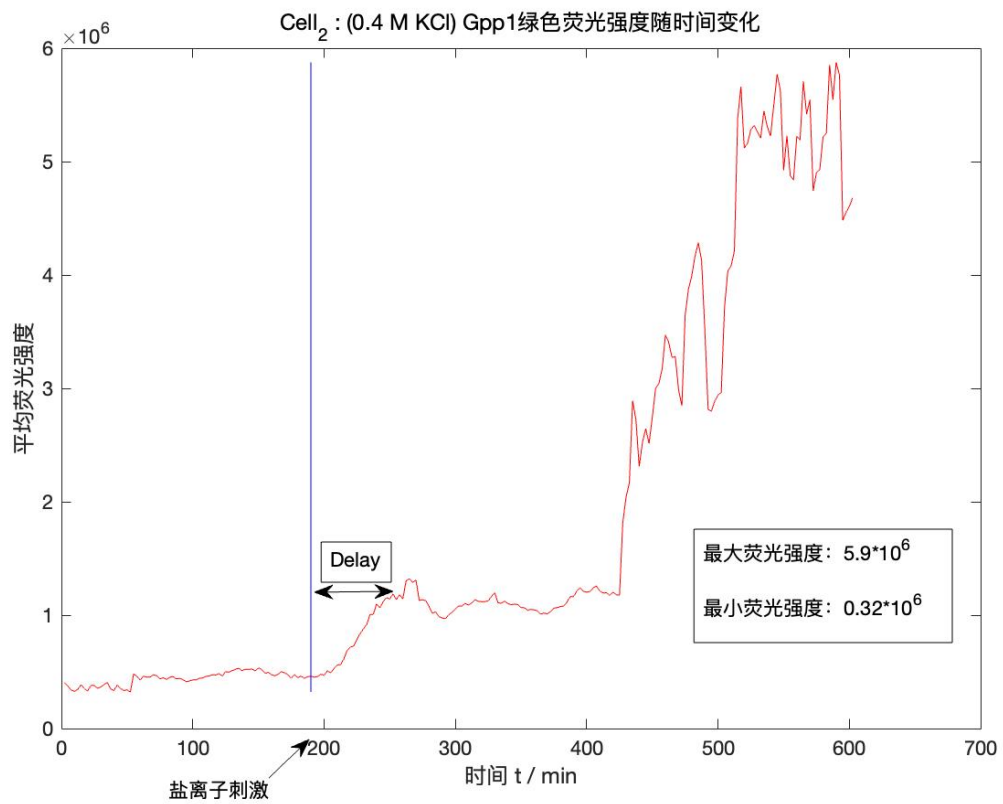


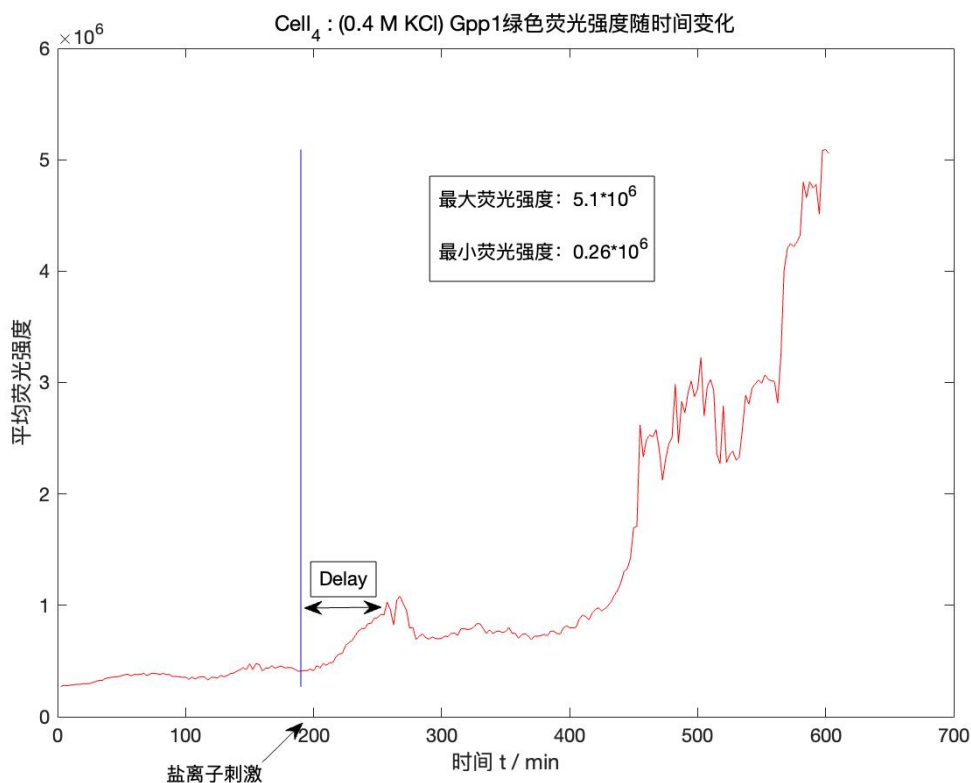


Pic. 9: The GFP cytoplasmic fluorescence intensity of Gpp1 (0.8 M KCl)

(四) Gpp1 胞内平均荧光强度随时间变化 (SD with 0.4 M KCl)







Pic. 10: The GFP cytoplasmic fluorescence intensity of Gpp1 (0.4 M KCl)

六. 讨论:

1. Hog1 的周期性入核与 Gpp1 的本底浓度:

对比组图 Pic. 7、Pic. 8 与组图 Pic. 9、Pic. 10 可见:

在未受盐离子刺激前与受盐离子刺激后, Hog1 的细胞核平均荧光强度均处于一个周期性振荡的形式。对比之下, 在未受盐离子刺激前, Gpp1 细胞内平均荧光强度处于一个相对稳定的水平; 在受盐离子刺激后, Gpp1 细胞内平均荧光强度有所波动。

此外, 在整个实验过程中, Gpp1 细胞内平均荧光强度比 Hog1 细胞核内平均荧光强度平均大 3 至 4 个数量级。可见, 酵母细胞即使处于正常状态下也会表达较高水平的 Gpp1。

2. Gpp1 对盐离子刺激响应的时延性:

在 Pic. 9、Pic. 10 中可以看出(已用双箭头标识), 对比 Hog1, Gpp1 受盐离子刺激后平均荧光强度的上调有较为明显的时延现象。

这也可以在一定程度上说明, Gpp1 是处于下游的被调控蛋白, 而 Hog1 则受“受体-第二信使”信号通路(MAPK 信号通路)的直接调控。

3. 响应强度:

将组图 Pic.7、Pic. 9 与组图 Pic. 8、Pic. 10 进行对比, 可以发现高盐胁迫下酵母细胞的 Hog1 入核率、Gpp1 胞内含量上调幅度明显高于低盐胁迫下 Hog1 入核率、Gpp1 胞内含量上调幅度。