

自组装技术在细胞传感器相容性设计中的应用

张 威, 胡 靓, 肖丽丹, 胡朝颖, 王 平

(浙江大学 生物医学工程与仪器科学学院, 生物传感器国家专业实验室, 生物医学工程教育部重点实验室, 浙江 杭州 310027)

摘 要: 为了提高细胞传感器表面的生物相容性并引导细胞定向定位生长, 采用自组装单分子层(SAM)技术修饰细胞传感器表面, 利用有机分子各官能团之间相互作用的范德华力层层组装成纳米尺寸薄膜, 使电极测试区域吸引细胞, 而背景区域排斥细胞, 有效地引导细胞贴附在电极区域上, 并使用荧光标记, 电化学扫描和实时阻抗扫描方法对 SAM 修饰后表面评估。结果表明, 该表面适合细胞生存生长, 具有良好的生物相容性和稳定的电化学特性, 能够大大提高细胞定位的成功率。在 SAM 技术修饰的微电极阵列传感器(MEA)表面培养大鼠心肌细胞并进行胞外电位检测实验, 进一步表明 SAM 技术可被应用于细胞电生理研究领域。

关键词: 细胞传感器; 自组装单分子层(SAM); 表面处理; 细胞电生理

中图分类号: TP 212.3

文献标志码: A

文章编号: 1008-973X(2012)02-345-06

The application of SAM technology in biocompatibility design of cell-based biosensor

ZHANG Wei, HU Liang, XIAO Li-dan, HU Zhao-ying, WANG Ping

(Biosensor National Special Laboratory, Key Laboratory of Biomedical Engineering of Ministry of Education, Department of Biomedical Engineering Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: To improve the biocompatibility of cell-based biosensor and immobilize cells in target position, self-assembled monolayer (SAM) technology was applied to modify the surface of cell-based biosensor. It utilized the Van der Waals attraction among different functional groups in organic molecular to assemble a thin film layer-by-layer in nano-scale, which made electrode region attracting cells, while background expelling cells. In this manner, cells were guided to adhere onto electrode region efficiently. Fluorescent imaging, electrochemical test and real-time impedance scanning were employed to evaluate the modified surface. The results demonstrate it behaved excellent biocompatibility and stable electrochemical properties, which is suitable for cell viability. Meanwhile, it can promote cells to adhere on target position successfully. Sequentially, we manage to culture cardiac myocytes from newborn rat on SAM modified MEA chip. And extracellular electrophysiological measurement is also carried out. It exhibits a promising prospect in further application of cell electrophysiological field.

Key words: cell-based biosensor; self-assembled monolayer (SAM); surface modification; cell electrophysiology

随着材料科学和微加工技术的飞速发展, 细胞传感器作为细胞胞外测试的有力工具, 正在朝着多元化、集成化、小型化的方向发展。产生于 20 世纪

70 年代微电极阵列芯片, 为细胞胞外电位的检测提供了一项无损、稳定、长期的手段^[1]。微电极阵列是一种常用的细胞外电位检测器件, 具有电兴奋性的

收稿日期: 2010-08-12.

浙江大学学报(工学版)网址: www.journals.zju.edu.cn/eng

基金项目: 国家杰出青年科学基金资助项目(60725102); 国家自然科学基金资助项目(30970765).

作者简介: 张威(1982—), 女, 博士生, 从事细胞传感器相容性设计以及细胞电生理研究. E-mail: windfairy@zju.edu.cn

通信联系人: 王平, 男, 教授, 博导. E-mail: cnpwang@zju.edu.cn

组织或细胞被直接固定在器件表面作为敏感单元. 神经元细胞和脑片组织被首先固定于微电极阵列(microelectrode array, MEA)芯片上^[2-5], 它们能够接收外界的刺激, 并发送生物信号, 这些信号都可以被传感器捕捉并收集. 这类传感器可以使用传统的微加工工艺进行加工, 最显著的优点在于它能同时检测多个位点, 因此被广泛用于电兴奋性细胞以及组织的特性研究. 以往的研究表明, 离体培养在MEA表面的细胞可以保持比较好的活性, 作为敏感单元感知周围微环境细微的变化, 因此被 Gross 等^[6]用来进行一些药物的筛选和评估.

生物相容性最初应用于评价植入性材料在体内长期与生物体内物质的相互作用. 在离体试验中, 将细胞在传感器上贴附、生长状况视作传感器生物相容性的初步评价指标. 生物传感器芯片多以半导体硅材料为基底, 上面覆盖二氧化硅或者氮化硅作为绝缘层. 绝缘层材料表面比较光滑, 亲水性不够, 没有适合细胞固定的亲合性基团. 传统的表面修饰方法大多通过修饰改进基底材料的物理化学特性(包括材料的粗糙度, 亲水性, 表面官能团等), 使细胞更容易贴附生长^[7-8]. 近年来, 一系列新型方法被应用到细胞固定上, 这些方法通常分为如下2类: 1) 是直接在电极上构筑三维微型结构^[9], 利用晶体硅、琼脂、SU-8光刻胶等材料加工成与细胞尺度接近的微井. 不足之处是容易对神经元造成性伤害. 2) 是借用流场、电场或者磁场从外部辅助细胞定位到电极所在的区域^[10-12]. 相比第一类方法, 这些手段都对细胞造成的直接性伤害比较小, 缺点是芯片设计、加工复杂, 实验设备昂贵, 并且不能完全忽略电场、磁场对细胞的影响.

自组装单分子层(self-assembled monolayer, SAM)是依靠化学性吸附或化学反应自发形成的一种有序分子薄膜. 通过精确的化学控制, 设计合成各种类型的SAM, 应用于微电极修饰、细胞传感器、电催化和分子器件等领域^[13-16]. Palyvoda 等^[17]利用SAM技术成功将神经元培养在金区域表面. Franks 等^[18]在CMOS器件表面上沉积纳米厚度的SAM薄膜, 使二氧化硅表面上带有疏水的基团, 而金电极区域上则沉积了促进细胞贴附生长的细胞外基质蛋白. 以上的研究从材料学方面对SAM进行了评估, 对SAM修饰后传感器表面的电学特性的研究仍然不足.

本文采用SAM技术对细胞传感器表面进行简单有效的修饰, 利用免疫荧光蛋白标记, 循环伏安电化学扫描和交流阻抗扫描等方法对修饰后表面的电

学特性进行评价, 并在SAM修饰后的微电极阵列上进行乳鼠心肌细胞的培养及电位测试. 结果表明经SAM修饰后的传感器表面生物相容性好、薄膜均一性好、电化学性质稳定并且基底噪声较低, 可以进一步应用于细胞电生理研究.

1 材料和方法

1.1 自组装单分子层的沉积

实验采用 Asphahani 等^[19]的方法: 使用长短链相间的、按一定比例掺杂的巯基烷烃分子修饰金区域表面, 而在背景上进行疏水处理. 在芯片上沉积SAM之前, 为了确保表面的洁净, 需要将芯片首先在丙酮溶液中超声清洗10 min, 接着在乙醇和超纯水中再分别清洗5 min. 然后将芯片浸入到20 mmol/L的11-Mercaptopropionic acid (11-MUA, Aldrich)和3-Mercaptopropionic (3-MPA, Aldrich)体积比为1:10混合溶液中至少16 h, 在金区域表面自组装一层末端为-COOH的单分子层. 接下来使用30 mmol/L的N-hydroxysuccinimide (NHS)和150 mmol/L的1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide (EDAC)混合溶液浸泡30 min, 这可以活化烷烃长链末端的羧基, 以利于后续的羧基与氨基的键合. 将芯片在质量浓度为10 mg/mL、温度为60℃的Methoxy (polyethyleneoxy) propyl trimethoxysilane (M-PEG-silane, 460~590 Da, Gelest, Morrisville, PA)的甲苯溶液中浸泡4 h, 使用50 mg/mL的三乙胺作为催化剂, 对金电极之外的区域进行疏水处理. 然后将芯片浸入75%的乙醇溶液15 min进行消毒, 放入0.1 mg/mL的L-多聚赖氨酸(poly-L-lysine)的磷酸缓冲液中处理30 min. 在每一步处理之后, 都需要使用相应的溶剂清洗5 min, 然后再用去离子水清洗5 min, 以洗脱芯片上未结合的基团和分子. SAM沉积过程的示意图详见图1.

1.2 FITC 荧光标记 L-多聚赖氨酸蛋白

SAM沉积后的芯片表面上的L-多聚赖氨酸是常用的细胞外基质蛋白, 可以与细胞表面糖蛋白的特定区域结合进而易化细胞在表面的贴附过程. Fluorescein isothiocyanate (FITC)购于Sigma公司, 为常用的荧光标记染料, 该染料可与蛋白质中的游离氨基结合进行标记. 将FITC粉末溶解于二甲基亚砜溶液(DMSO)中, 最终质量浓度为1 mg/mL. 取适量该混合溶液加入碳酸盐缓冲液(Na_2CO_3 4.3 g, NaHCO_3 8.6 g, 加蒸馏水至500 mL)中, 暗

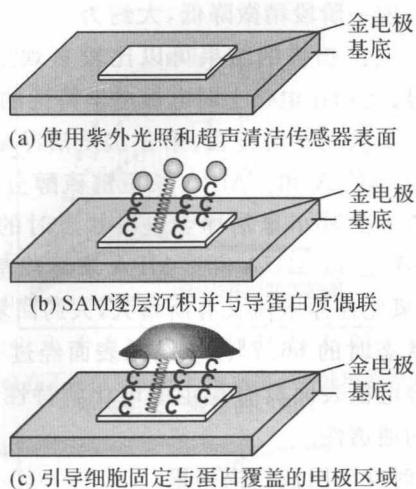


图1 SAM沉积步骤

Fig. 1 SAM deposit process

处静置 1 h 后,即可使用荧光显微镜观察拍照。

1.3 电化学特性测试

SAM 沉积到芯片的金电极区域后会改变该区域原有的一些表面特性。首先,电极表面被烷烃分子和蛋白质覆盖,虽然这些分子可以促进细胞在该区域的贴附,但烷烃分子和蛋白质等有机分子常规条件下并不导电,当电极被这些分子覆盖后金属电极原来的导电特性会受到一定的影响。所以,在细胞电生理信号测试之前,需要先检测芯片 SAM 沉积之后的表面对电子的通透性。

采用 10 mmol/L 的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液作为氧化-还原性电解质溶液,扫描速率为 50 mV/s。测试中使用的仪器为 CHI660A 电化学工作站。

1.4 实时细胞贴附阻抗测试

细胞在不同表面的接触、贴附和生长是一个动态的过程,在整个过程中,许多特殊的细胞表面受体、结构蛋白、信号蛋白以及细胞骨架等都发挥各自的作用。因此,使用实时阻抗扫描可以监测细胞贴附到表面的动态过程,并且阻抗值的大小可以作为评价细胞膜与传感器表面耦合程度的一个主要指标。

在细胞贴附阻抗测试中使用的是人脐静脉内皮细胞系 EVC 304。阻抗测试系统为 ACEA 公司的 RT-CESTM 芯片系统(ACEA Biosciences, Inc.)。该系统主要由前端传感器 E-plate 芯片、电子传感器分析器以及测试工作站 3 部分组成。每个 E-plate 芯片有 16 个独立的测试通道,可以同时进行记录,圆形电极直径为 90 μm 。实验中将 16 个通道分为 SAM 组(使用 SAM 膜修饰)、PLL 组(使用 L-多聚赖氨酸修饰)和对照组三组。将内皮细胞制成细胞数目分别为 2×10^4 /孔和 1×10^4 /孔的细胞悬液各 200

μL 。每组分别加入高低 2 个浓度的细胞悬液。加入细胞悬液的 E-Plate 前端芯片置于细胞培养箱中,可以同时进行长时程的细胞贴附阻抗实时检测。

1.5 心肌细胞电生理测试

为了进一步检验 SAM 修饰后的表面在细胞电生理测试中应用的可行性。将新生 1~3 d 的 SD 乳鼠断头处死,取心肌细胞剪成小块。将组织块放在 0.25% 的胰酶中在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下消化约 30 min,差速法静置 40~60 min 后取未贴壁的细胞接种在 SAM 修饰后的微电极阵列芯片表面上。心肌细胞接种密度约为 5×10^5 个/mL。培养液使用新鲜配置的 DMEM 高糖培养基(购于 Gibco 公司)并在培养基中加入 10% 的胎牛血清。将芯片放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱 5% 的 CO_2 中培养 1~3 d 后即可进行电生理测试。

在实验中使用的微电极阵列芯片使用标准微加工工艺进行加工。首先在硅基底上热氧化生长一层致密的二氧化硅薄层,然后溅射上纳米厚度的铬,并沉积上 300 nm 的金。方形微电极尺寸为 50 μm ,电极间距为 200 μm ,最窄线宽为 30 μm 。测试系统使用的是德国 Multichannel⁺ 公司出产的 16 通道 MEA 前置放大器和采集卡,增益为 1 200 倍。采用 MC_rack, Clamfit 等软件实现信号的实时显示和后续处理。

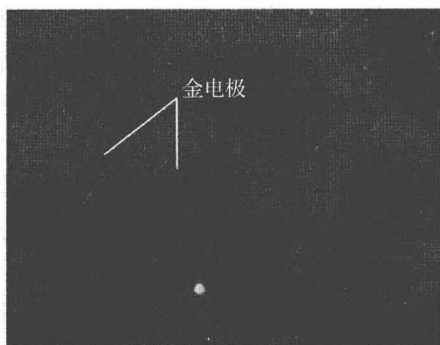
2 结果与讨论

2.1 荧光标记结果

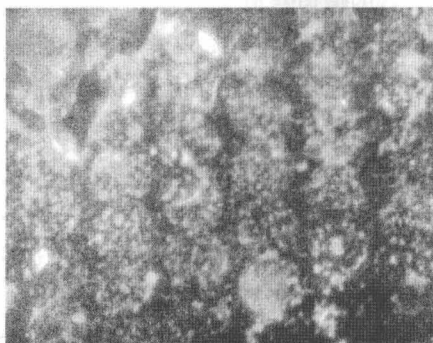
采用 SAM 自组装修饰 E-Plate 芯片的原理是利用金原子与巯基基团的特异性结合,11-MUA 和 3-MPA 长短链硫醇分子掺杂排布于金电极区域表面形成第 1 层膜,随后的长链末端的羧基被活化之后与 L-多聚赖氨酸中的氨基结合,形成 SAM 的第 2 层膜。L-多聚赖氨酸残基中的氨基可以吸附荧光染料 FITC。E-Plate 芯片如图 2(a), (b) 所示,未有 SAM 沉积的金电极表面没有荧光,而被 SAM 修饰成功的金电极可以被 FITC 标记,被激发时显出绿色荧光。

2.2 循环伏安法扫描结果

使用循环伏安法扫描 SAM 每层沉积的结果如图 3 所示,在相同的初始电压和扫描条件下,最初的洁净金电极对电荷的通透性最佳,氧化还原峰电流大小约为 1.5×10^{-3} A,为一对可逆的氧化还原峰,表现为可逆的电化学行为。溶液中的氧化还原电子对都可以到达金电极表面。11-MUA 和 3-MPA 沉积在电极后,有机分子的掺杂降低了分子层对电子



(a) 对照组照片



(b) SAM标记芯片后的荧光照片

图2 FITC荧光标记SAM沉积后的E-Plate芯片

Fig. 2 E-Plate with SAM deposition labeled with FITC

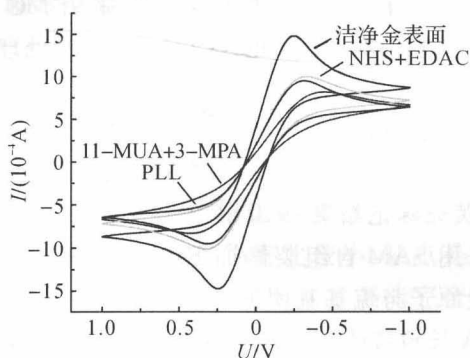


图3 SAM沉积过程中循环伏安扫描曲线

Fig. 3 Cyclic Voltammetry scanning curve during SAM deposit process

的通透性能,使得SAM的膜电阻增大,体系的导电性变差,氧化还原峰电流显著降低,约为 0.7×10^{-3} A,但是仍有少量的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 到达电极表面发生氧化还原反应。将长短链烷烃分子按比例掺杂后沉积在金电极区域一方面可以更充分利用有限的空间,捕捉固定更多细胞;另一方面还可以形成高低起伏的表面形貌,构造出具有一定粗糙度的细胞接触面,更有利于细胞贴附生长。加入NHS,EDAC活化烷烃链末端的羧基基团,氧化还原峰电流又有比较显著的升高,大约为 1.0×10^{-3} A。PLL中的氨基基团与活化后的羧基基团发生缩聚反应,氧化还原

峰电流较前一阶段稍微降低,大约为 0.9×10^{-3} A。循环伏安电位扫描的结果可以比较直观地反应出SAM各层沉积在电极上时电极电学特性的变化。主要出现了2次突变的过程:第1次是洁净金表面上沉积了11-MUA和3-MPA长短链硫醇分子,氧化还原电流突然减小至洁净金电极状态时的50%左右。第2次是11-MUA和3-MPA末端羧基基团被活化后,氧化还原电流又有所增大,大约回复至洁净金电极状态时的66.7%。该结果表面经过SAM修饰后的金电极表面具有稳定的电化学特性,对电子有良好的通透性。

2.3 实时交流阻抗扫描结果

为了量化细胞在基底上贴附引起的阻抗变化情况,引入了细胞指数的概念。细胞指数(cell index, CI)定义如下

$$\text{CI} = \max_{i=1, \dots, N} \left(\frac{R_{\text{cell}}(f_i)}{R_b(f_i)} - 1 \right).$$

式中: $R_b(f_i)$ 和 $R_{\text{cell}}(f_i)$ 分别代表未接种细胞时空白电极交流阻抗和接种细胞后的电极交流阻抗。 N 代表设定的阻抗测试频率点^[20]。由此可得出,CI可以定量的表征出细胞与电极接触后的耦合状态。当接种细胞类型、密度以及测试条件相同的情况下,CI值越大就表示细胞贴附前后电极阻抗变化越大,即细胞在电极上贴附得越紧密,形成的细胞膜与电极的封接阻抗越高,细胞膜上离子通道电流就可以更有效的传递到电极表面。CI实质上就是将有效贴附的细胞数目与细胞贴附状态的互相依赖的关系通过阻抗频谱测试所得到的一个无量纲的参数。当未加入细胞悬液或者细胞与测试电极贴壁不良时,细胞指数理想状态下应为零;在相同的测试条件下,加入测试腔的细胞越多细胞指数越大;此外,细胞形态,位置迁移以及细胞生长等细胞状态的变化都会导致细胞指数发生改变。

由如图4(a)所示中可以看出加入细胞悬液后,细胞指数随着细胞在电极上贴附从零开始逐渐增大。并且,细胞悬液的浓度越高,细胞指数增加得越大。在第9 h末,加入高浓度的 HgCl_2 溶液,死亡的细胞逐步从电极上脱落导致细胞指数快速下降至相对平稳的状态,未降低到零可能因为有些细胞残片仍滞留在电极上。作为空白对照的电极上加入同细胞悬液等量的培养液,在加入 HgCl_2 溶液前后没有明显变化。在如图4(b)所示中表现了在相同细胞密度下,3组不同表面处理后细胞指数的相对关系。可以看出随着细胞在电极上的贴附,洁净未处理的金表面的细胞指数上升的速率最快,代表阻抗相对变

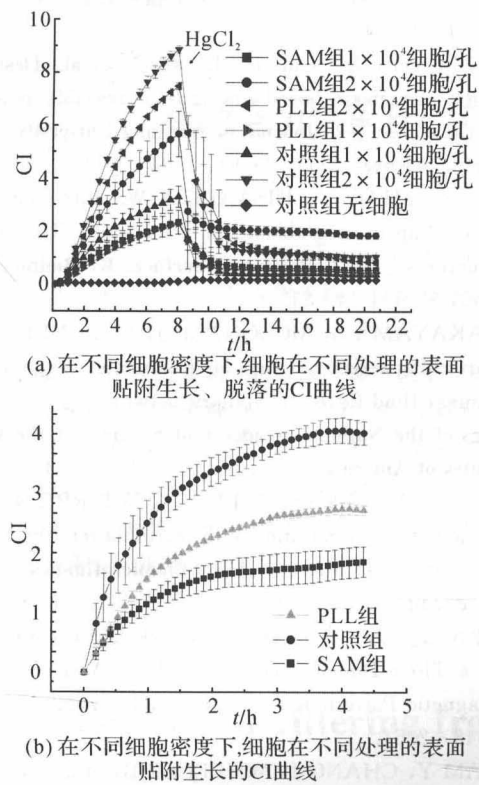


图 4 EVC 304 细胞贴附在电极表面的实时阻抗测试结果

Fig. 4 Real-time impedance test results of EVC 304 cells adhering onto electrode surface

化的 CI 值的变化最大,这说明对照组的表面对细胞贴附引起的阻抗变化最敏感.在电极上进行修饰会不可避免的增加了细胞和电极直接的距离,影响电极的敏感性.由于 SAM 沉积的步骤要多于 L-多聚赖氨酸沉积的过程,所以 SAM 组处理后的电极表面对细胞贴附引起的阻抗变化敏感性稍差.

通过对培养后金电极上的细胞进行染色计数统计,定义贴附在金电极上细胞数目占总数的百分比 R 为细胞在电极区域的有效贴附率.如图 5 所示,在每个通道分别加入 2×10^4 和 1×10^4 的细胞悬液时, SAM 组约有分别占总数 72.8% 和 69.9% 的细胞的贴附在金电极区域,而 PLL 组分别约有 57.6% 和 56.8% 细胞贴附在金电极上,空白组分别约有 52.1% 和 50.4% 的细胞贴附在金电极上.统计结果显示在电极上沉积 SAM 薄膜能够显著地提高细胞在电极区域的贴附率,有效地引导细胞在目标区域定位生长.结果反映了增加细胞接种数目可以在一定程度上提高细胞的贴附率,但效果十分有限.

综上所述,虽然经 SAM 的 3 个步骤修饰后的电极基底阻抗有略微增加,一定程度上降低了电极的敏感度,但与传统 L-多聚赖氨酸涂布法相比, SAM 方法处理后的表面具有良好的生物相容性和

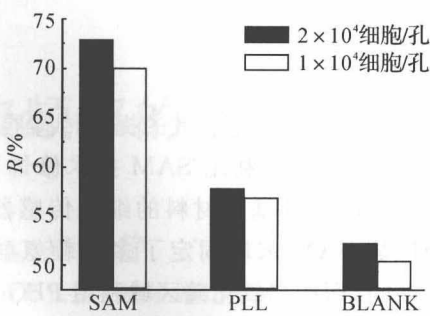


图 5 高低 2 种密度的细胞在金电极上选择贴附率统计结果

Fig. 5 Selective adhesion rate statistics of high-and low-densities cells on gold electrode

电化学特性,并且能够有效地提高细胞定位在金电极的成功率.

2.4 乳鼠心肌细胞培养测试结果

心肌细胞为贴壁生长的细胞,在接种最初的 0.5~1 h 内就可以在芯片表面着陆,并逐渐贴附、铺展、贴壁生长.接种 2~3 d 后的心肌细胞可以产生自发的搏动,成团簇状自律性收缩,并产生动作电位.心肌细胞在芯片上的生长结果如图 6(a)、(b) 中所示,心肌细胞在电极上成团生长,细胞大小约为 $15 \sim 20 \mu\text{m}$.去甲肾上腺素(NE)可使心肌收缩幅度变强,收缩频率增加.使用浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 的 NE 来刺激心肌细胞得到的心肌胞外电位信号如图 6(c) 中所示.信号为典型的双相波形,幅度约为 $80 \sim 100 \mu\text{V}$,信号时程约为 $100 \sim 120 \text{ ms}$.双相信号的产生是由钠离子的快速内流以及钾离子的缓慢外流,钙离子的内流共同作用的结果.

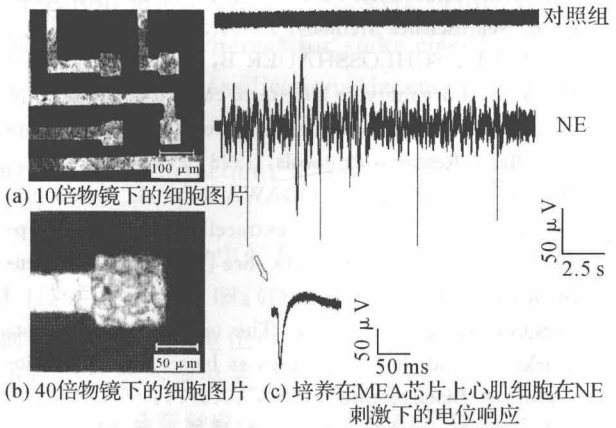


图 6 心肌细胞在 SAM 方法处理的 MEA 芯片培养照片以及胞外电位测试结果

Fig. 6 Images of cardiac myocytes cultured on MEA chip surface modified with SAM technology and extracellular potential measurements

3 结 语

本文阐述了一种简单有效的提高传感器表面生物相容性的修饰方法. 利用 SAM 技术修饰同时存在金和二氧化硅 2 种基底材料的细胞传感器表面, 在金电极区域 SAM 末端固定了多聚赖氨酸, 使其促进细胞贴附, 而在二氧化硅区域利用 PEG 硅烷进行疏水化处理, 避免细胞贴附, 以此引导细胞在金电极区域定位贴附生长. 使用荧光标记、电化学方法扫描以及实时阻抗扫描等方法对修饰后的表面进行评估. 实验结果证实 SAM 薄膜表面均一, 电子的通透性良好, 并且适宜细胞存活, 具有良好的生物相容性. 虽然 SAM 膜增加了基底阻抗, 但是大大提高了细胞在目标电极区域的选择性贴附率. 随后, 应用 SAM 技术处理微电极阵列传感器表面并成功进行了原代乳鼠心肌细胞培养, 进行了胞外电位记录, 表明 SAM 技术作为一种便捷可靠的传感器表面修饰方法可以进一步应用于细胞的电生理研究领域中.

参考文献 (References):

- [1] THOMAS C, SPRINGER P, LOEB G, et al. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells [J]. *Experimental Cell Research*, 1972, 74(1): 61-66.
- [2] GROSS G, RIESKE E, KREUTZBERG G, et al. A new fixed-array multimicroelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro [J]. *Neuroscience Letters*, 1977, 6(2/3): 101-105.
- [3] PINE J. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 1980, 2(1): 19-31.
- [4] EGERT U, SCHLOSSHAUER B, FENNRICH S, et al. A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays [J]. *Brain Research Protocols*, 1998, 2(4): 229-242.
- [5] OKA H, SHIMONO K, OGAWA R, et al. A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 1999, 93(1): 61-67.
- [6] GROSS G, RHOADES B. The use of neuronal networks on multielectrode arrays as biosensors [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 1995, 10(6/7): 553-567.
- [7] 徐莹, 叶学松, 许改霞, 等. 细胞传感器表面处理技术的研究进展 [J]. *传感技术学报*, 2004, 17(2): 342-348.
XU Ying, YE Xue-song, XU Gai-xia, et al. The research and development of the surface processing technique for cell-based biosensors [J]. *Chinese Journal of Sensors and Actuators*, 2004, 17(2): 342-348.
- [8] 秦利锋, 许改霞, 李蓉, 等. 基于光寻址电位传感器的单细胞传感器设计 [J]. *浙江大学学报: 工学版*, 2005, 39(9): 1404-1408.
- [9] QIN Li-feng, XU Gai-xia, LI Rong, et al. Design of single-cell sensor based on light-addressable potentiometric sensor [J]. *Journal of Zhejiang University: Engineering Science*, 2005, 39(9): 1404-1408.
- [10] WU Z, ZHAO Y, KISAALITA W. Interfacing SH-SY5Y human neuroblastoma cells with SU-8 microstructures [J]. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 2006, 52(1): 14-21.
- [11] TAKAYAMA S, MCDONALD J, OSTUNI E, et al. Patterning cells and their environments using multiple laminar fluid flows in capillary networks [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(10): 5545-5548.
- [12] VALERO A, BRASCHLER T, DEMIERRE N, et al. A miniaturized continuous dielectrophoretic cell sorter and its applications [J]. *Biomicrofluidics*, 2010, 4: 022807.
- [13] FRASCA G, GAZEAU F, WILHELM C. Formation of a Three-Dimensional Multicellular Assembly Using Magnetic Patterning [J]. *Langmuir*, 2009, 25(4): 2348-2354.
- [14] NAM Y, CHANG J, WHEELER B, et al. Gold-coated microelectrode array with thiol linked self-assembled monolayers for engineering neuronal cultures [J]. *IEEE Transactions on Bio-medical Engineering*, 2004, 51(1): 158-165.
- [15] KELM J, ITTNER L, BORN W, et al. Self-assembly of sensory neurons into ganglia-like microtissues [J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 121(1/2): 86-101.
- [16] FAUCHEUX N, SCHWEISS R, LUTZOW K, et al. Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(14): 2721-2730.
- [17] SCHAFERLING M, WU M, ENDERLEIN J, et al. Time-resolved luminescence imaging of hydrogen peroxide using sensor membranes in a microwell format [J]. *Applied Spectroscopy*, 2003, 57(11): 1386-1392.
- [18] PALYVODA O, CHEN C, AUNER G. Culturing neuron cells on electrode with self-assembly monolayer [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2007, 22(9/10): 2346-2350.
- [19] FRANKS W, TOSATTI S, HEER F, et al. Patterned cell adhesion by self-assembled structures for use with a CMOS cell-based biosensor [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2007, 22(7): 1426-1433.
- [20] ASPHAHANI F, THEIN M, VEISEH O, et al. Influence of cell adhesion and spreading on impedance characteristics of cell-based sensors [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2008, 23(8): 1307-1313.
- [21] ATIENZA J, ZHU J, WANG X, et al. Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays [J]. *Journal of Biomolecular Screening*, 2005, 10(8): 795-805.