

飞秒激光直写制备蛋白质功能化器件

孙思明¹ 孙允陆¹ 刘东旭¹ 陈岐岱¹ 董文飞¹ 孙洪波^{1,2}

(¹ 吉林大学电子科学与工程学院 集成光电子国家重点联合实验室, 吉林 长春 130012)

² 吉林大学物理学院, 吉林 长春 130023

摘要 飞秒激光双光子(多光子)微纳加工技术,因其优异的可设计三维加工能力、高空间分辨率和低附加损伤,不仅得到了广泛而深入的研究,而且越来越多地具体应用在诸多前沿领域。介绍了飞秒激光直写技术在多种材料和多个领域的最新具体应用和进展,并着重介绍了生物材料的飞秒激光直写的相关工作。尤其是蛋白质类材料,以其独特的物理、化学、生物特性,结合飞秒激光直写的先进加工手段,使得多样化、功能化的生物相关微纳器件和系统得以实现。

关键词 飞秒激光直写; 生物材料; 蛋白质; 微纳加工

中图分类号 O439 **文献标识码** A **doi:** 10.3788/LOP50.080003

Protein Functional Devices Manufactured by Femtosecond Laser Direct Writing

Sun Siming¹ Sun Yunlu¹ Liu Dongxu¹ Chen Qidai¹

Dong Wenfei¹ Sun Hongbo^{1,2}

(¹ State Key Laboratory on Integrated Optoelectronics, College of Electronic Science and Engineering, Jilin University, Changchun, Jilin 130012, China

² College of Physics, Jilin University, Changchun, Jilin 130023, China

Abstract Femtosecond laser two-photon (multi-photon) micro/nano-processing technology gets the extensive and in-depth research, and is more specifically applied in many frontier fields because of its excellent designable three-dimensional (3D) processing capacity, high spatial resolution, and low additional damage. In this review, we introduce the latest concrete applications and progress of femtosecond laser direct writing (fsLDW) technology in diverse fields with various materials, emphatically, the related work on biological materials' fsLDW processing. Especially, by combining with the advanced fsLDW technology, protein-based materials have been studied and explored in various functional bio-related micro/nano-devices and systems based on their unique physical, chemical, and biological characteristics.

Key words femtosecond laser direct writing; biomaterial; protein; micro/nano-fabrication

OCIS codes 140.3390; 350.3390

1 引言

近年来,飞秒(脉冲)激光(多光子)直写技术(fsLDW)得到迅速的发展和广泛的应用、研究。这一技术同时具备了三维(3D)加工能力、可设计任意形状、高加工分辨率(远低于衍射极限,小于等于 10 nm)和适用材料广谱等独特的优势,使其能够被用于解决众多科学前沿乃至产业制造领域的难题^[1-2]。飞秒(脉冲)激光(多光子)直写技术,近期已初步进入应用拓展的阶段——以其材料和应用的多样性与可设计性,在诸多领域的实用化应用探索得到了越来越多的报道。例如,在微电子、微流控芯片、微机械和微光学等前沿领域,飞秒(脉冲)激光(多光子)直写技术因其特殊优势和巨大应用潜力,被用来实现多种三维微纳器件或系统。

尤其是,飞秒激光直写技术在生物医学、生物材料等领域,乃至相关交叉学科中的应用,正在甚至已经成

收稿日期: 2013-07-19; 收到修改稿日期: 2013-07-22; 网络出版日期: 2013-08-02

基金项目: 国家自然科学基金(61077066,61008035,61137001,60977056,91123029)

作者简介: 孙思明(1991—),男,硕士研究生,主要从事微纳加工及相关应用方面的研究。

导师简介: 孙洪波(1969—),男,教授,主要从事超快光子学方面的研究。E-mail: hbsun@jlu.edu.cn

为一个新的具有巨大潜力的研究热点和应用方向^[2]。一方面,飞秒激光直写技术无需复杂流程即能够实现无掩模、非接触的复杂真三维元器件构建,从而在保证加工简易度和最低限度外界污染引入的同时,实现三维细胞培养腔、三维组织培养支架等的加工制备。另一方面,飞秒脉冲激光的激光能量,在时间上,被高度压缩在远低于热弛豫时间的飞秒量级的脉冲长度上;而在空间上,被高度聚焦在焦点区域。结合多光子过程的强阈值选择特性,这一技术可以实现极低的附带损伤,从而在最大程度上克服各种其他激光加工的高附带损伤的缺点^[1-3]。这一优点对于生物材料的加工尤为重要——不仅可以减少甚至避免生物材料(尤其是蛋白质等功能化生物材料)在加工过程中的物理、生物和化学特性和功能的破坏,而且还可以使得“活”细胞或者组织存在情况下的“原位”加工得以实现,进而实现“活”细胞或者组织的“原位”、“实时”的诱导和操控^[4-6]。此外,通过有机地结合生物材料和飞秒(脉冲)激光直写技术各自的特点和优势,多种多样的功能化微纳元器件乃至系统可以被构建,并且被赋予诸多特性与功能,进而被应用于生物光子和电子学、生物传感检测、环境友好化替代材料等重要前沿领域^[7-9]。

基于以上,蛋白质类材料,作为一种自然产物类生物材料,与飞秒激光直写技术相结合,在同时充分发挥和利用加工技术和材料两者的特点、优点的基础上,实现了诸多极具代表性的多领域、多样化的应用^[3-6,8-16]。本文,将介绍飞秒(脉冲)激光直写技术作为一种日趋成熟的高科技含量的加工手段在诸多领域的最新具体应用,并着重介绍以蛋白质类材料为代表的生物材料飞秒激光直写技术的最新进展和相关应用。

2 飞秒激光直写最新进展

飞秒激光直写的具体实现通常是由一紧聚焦的激光束,按照设计好的方式从底层到顶层逐渐扫描,直到所期望的三维结构构建完成。图 1 中的纳米牛微雕塑是飞秒激光直写技术的典型例子^[1],光源是一台参数为 76 MHz、780 nm 波长和 150 fs 脉冲宽度的锁模钛蓝宝石激光器。激光由高数值孔径(1.4)的物镜聚焦。由于其极高的瞬态功率密度,焦点区域光功率密度可达到 $10^{13} \text{ W}/\mu\text{m}^2$,在此区域光子以非线性形式被吸收(双光子或多光子形式),即超过双光子吸收聚合阈值区域的体积其尺寸要远小于飞秒激光波长。因此,飞秒激光直写技术得以实现较高的空间分辨率,远远小于光学衍射极限(小于等于 10 nm)。为了充分利用这一光非线性吸收特性,近红外波长激光是较优的选择。紧聚焦的激光的焦点位于材料内部,在高于光强密度阈值的区域内发生较强的非线性吸收,因此可以在材料内部进行加工,进而实现了飞秒激光的三维加工能力。

目前,不同材料包括有机分子、电介质、金属及半导体材料等都会在飞秒激光辐照下发生反应,即飞秒激光直写技术具有材料广泛适用性。此外,对于不同材料,飞秒激光直写也表现出不同机制,如光聚合、光致同

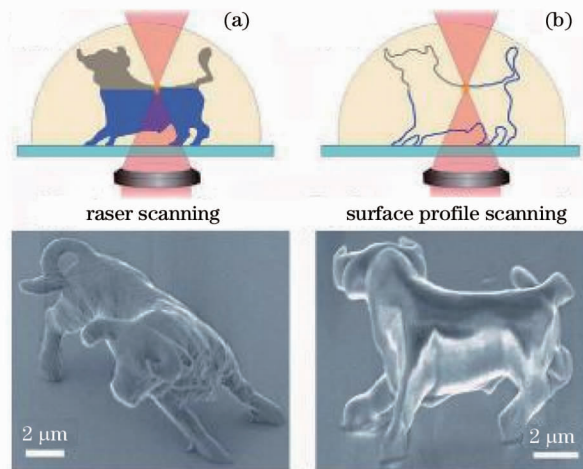


图 1 具有超越衍射极限分辨率的微纳加工的例子。(a) 通过光栅扫描方式制备的牛雕塑方案和扫描电镜图像,过程持续 180 min。(b) 通过表层扫描和随后的汞灯固化过程制备的牛雕塑,过程持续 13 min

Fig.1 Examples of micro/nano-fabrication with sub-diffraction-limit resolution. (a) Scheme and scanning electron microscope (SEM) images of bull sculpture fabricated by raster scanning; the process takes 180 min. (b) bull sculpture fabricated by surface-profile scanning and subsequent solidification under a mercury lamp; the process takes 13 min

分异构化、光致还原,及透明材料内部加工引起的烧蚀等^[2]。

将以飞秒激光直写技术在多个领域的相关实用化应用为切入点,介绍包括本课题组相关工作在内的飞秒激光直写技术的最新进展。

2.1 人工聚合物材料

飞秒激光直写技术最早发端之一,即为人工聚合物材料的双(多)光子聚合微纳加工(即多光子光刻印刷术)的实现。以其为基础获得的三维微纳结构和器件,涉及并应用于包括集成光学、微(纳)机械、微流体等前沿技术在内的众多领域。多种多样的微型器件乃至系统,都可以以其为材料,并结合飞秒激光直写技术,高度可设计地按需加工获得。

2.1.1 传统聚合物材料

作为传统的飞秒激光直写用的人工聚合物材料,商用光刻胶(SU-8、NOA 系列等)是飞秒激光直写的最常用的材料之一^[2,17-29]。其中,SU-8 是一种传统的商业环氧树脂负性光刻胶,由于其对可见近红外波长光具有较高透射率,具有较低的聚合收缩效应,具有良好的机械性质及较高的热稳定性,使得其成为一种较好的微光学制备材料。吉林大学孙洪波等^[27]通过飞秒激光加工采用双光子聚合的手段,克服了传统方法制备非球面微透镜的一些缺点,得到具有 100% 填充率的双曲面透镜阵列,表面粗糙度在 10 nm 左右,且所有透镜焦距高度统一,透镜轮廓的相对误差不到 10%,如图 2(a)所示。图 2(b)是采用飞秒激光加工的衍射效率高达 37.6% 的 SU8 衍射光学元件^[28]。图 2(c)是 Wang 等^[29]利用激光直写在微流控芯片中设计的基于 SU8 材料的单向阀,这再次证明了飞秒激光直写的强大能力。

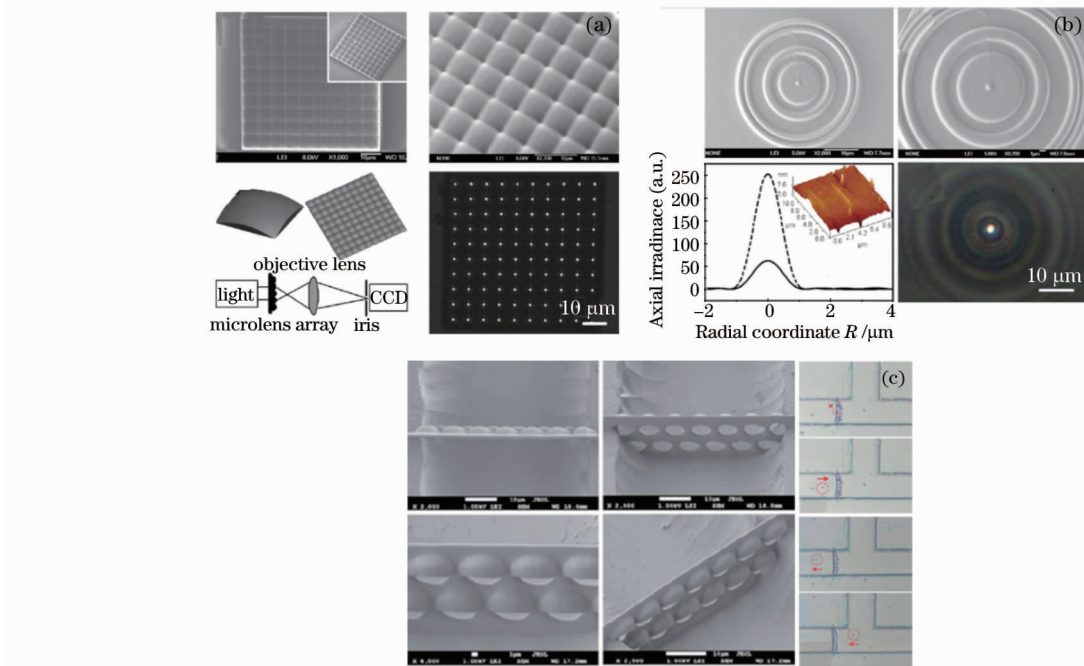


图 2 (a) 具有 100% 填充因子的平方微透镜阵列及其卤素灯下的焦平面焦斑图像; (b) 相位型微透镜的扫描电镜图像、焦斑图像及相位和振幅强度分布的模拟; (c) 单向阀的顶视图和侧视图及粒子通过单向阀的效果展示

Fig. 2 (a) 100% fill-factor square microlens arrays and focal spot image obtained at the focal plane under illumination by a halogen lamp; (b) SEM image, focal spot image and simulated intensity distribution of phase (dashed curve) and amplitude (solid curve) of micro-phase-type lens; (c) top view and side view of the one way valves, and the effect that particles pass the one way valves

2.1.2 功能化新型聚合物基材料

虽然传统聚合物材料的飞秒激光直写已有较多报道,但是传统聚合物材料较单一的特性和功能极大地限制了其进一步的发展与应用。新型的功能化聚合物基材料是实现具有独特功能的微纳器件所必须的。因此,开发和应用新型功能化材料,是飞秒激光直写技术进一步发展和完善的必需条件和必然趋势^[30-35]。

远程可操作的基于磁性化聚合物的磁响应微机械即是飞秒激光直写功能化新型聚合物基材料的重要方向和成果之一。图 3(a)、(b)所示是本课题组的代表性工作^[33]。通过飞秒激光双光子聚合诱导,加工透明均匀且稳定的由修饰了四氧化三铁的甲基丙烯酸酯和光阻剂组成的低铁流体树脂,设计并制作得到了可远程磁力控制的微弹簧,如图 3(a)所示;图 3(b)是关于微型涡轮的工作。微弹簧可以通过磁力进行拉伸或压缩控制,也可以左右摆动,不同周期的弹簧具有不同的伸长比,左右摆动角度也可以不同,非常灵活。微涡轮的转速可以 0~6 r/s 调节,预计这种涡轮将会在微流控领域起到重大作用。通过外部磁铁的控制可以很容易地操作这两种微机械去执行所需任务。激光加工技术与可以光聚合的低铁流体树脂的结合带来了具有广泛应用范围的微纳制造技术和远程操控微机械技术的突破。

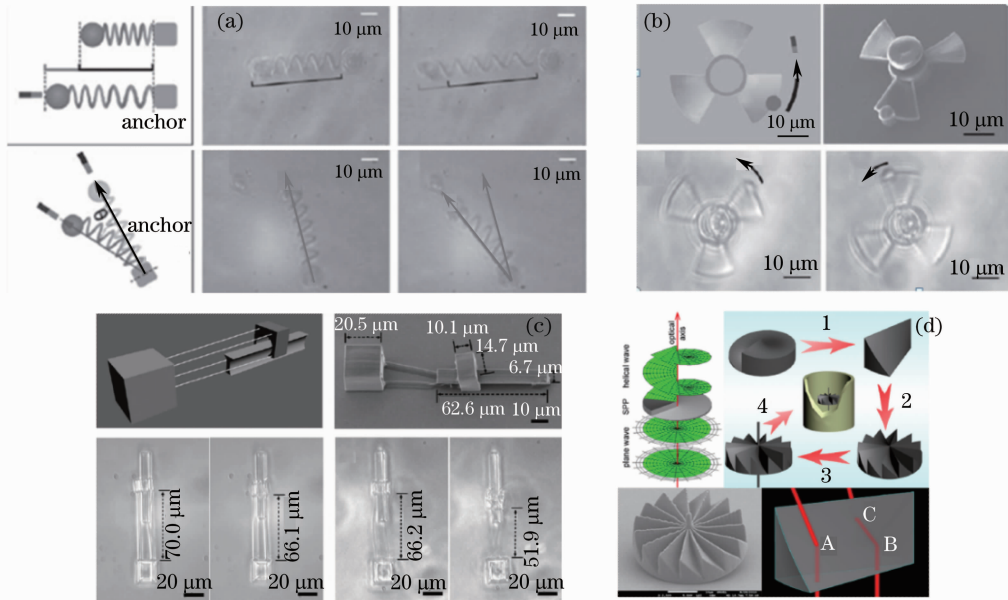


图 3 (a) 磁性微弹簧的拉伸及摇摆的远程控制展示; (b) 磁性微涡轮的 SEM 图像和远程控制下的旋转展示; (c) 滑块微装置的模型图和 SEM 图像, 及不同溶液中由不同粗度的纳米线牵引的运动展示; (d) 由光直接驱动微型转子

Fig. 3 (a) Remote control of the micro-spring for stretch and swing; (b) SEM image of the magnetic micro-turbine and spin under remote control; (c) 3D model of the slipping-block microdevice and SEM image, and the show of the slipping-block micro-device's moving dragged by different thick nanowires under different solutions; (d) micro-rotor can be driven by light directly

图 3(c)、(d)是本课题组利用飞秒激光双光子聚合,以甲基丙烯酸酯基材料为主要材料,制备得到的响应微机械^[34-35]。图 3(c)的工作主要利用的是甲基丙烯酸酯光聚合后得到的光聚合物网络,与传统大体积的聚合物相比,和周围溶剂的接触面积更大。这种特性可以使加工得到的微器件敏感地感知周围溶剂的极性变化,进行收缩或膨胀。通过改变激光加工点间距可以仔细调整纳米线的收缩程度,从而对后面的轨道滑块进行精确控制^[34]。这个工作的意义在于可能开创了一个新的微机械或微驱动的驱动机制,这种机制可能会在微型装置,如芯片实验室(LOC)系统或聚合物微机电系统中起重要作用。图 3(d)是设计得到的具有相位型螺旋扇叶的微型转子,可以直接进行从光能到机械能的转化效率的研究。这种微转子的转速利用光驱动能达到 500 r/min,平均光能转换效率实验测定高达 $34.55 h/\text{photon}$ (其中 h 为普朗克常数)。这种微转子可应用在微流体中,想要实现搅拌、抽泵和流量控制等功能,这种高效率、大体积的微转子是必须的^[35]。

2.2 金属等无机材料

因为在等离子体、微机械、微纳电子学等领域的重要作用,金属微纳结构和器件的加工与制备就显得极为重要。利用飞秒激光直写,可以实现纳米尺度的金属三维布线和构型搭建;通过光致还原剂对金属离子还原,形成纳米单晶,然后通过光压作用形成金属纳米级多晶^[36-39]。

图 4 是 Xu 等^[38-39]利用飞秒激光直写进行的金属等硬质材料加工的工作。图 4(a)是采用柠檬酸三钠

为还原剂对硝酸银溶液进行还原,沿着激光轨迹形成了银的多晶纳米线,及在微通道中制备的银的微加热线圈装置。当功率在 1.2 mW 时,纳米线最细可达到 125 nm^[38]。图 4(b)是在半球表面及五个平截头椎体表面进行的银的纳米布线,展示了飞秒激光微纳加工最大的特点之一:灵活集成性。这展现了很强大的电路或电子互联的潜力,例如可以在微通道内集成微型加热器来控制微流控反应,也可以在微电子行业、微机电系统(MEMS)、LoC 或其他智能微系统中更灵活地对电路设计或是集成^[38]。图 4(c)是在微流控通道中制备的银的微花形状阵列结构,这种结构也是通过飞秒激光诱导银离子还原得到的,这种银阵列具有较高的催化活性,且会形成表面等离子体,等离子体强度随着被催化溶液浓度的变化而变化。该工作是本课题组第一次提出并实现的原位催化及原位监测的效果^[39]。

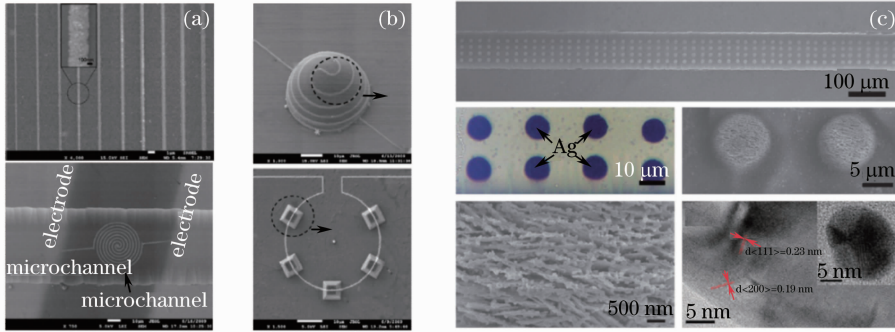


图 4 (a) 银纳米线和微通道中银的微加热线圈的 SEM 图像; (b) 在半球和截棱锥上的银的纳米布线; (c) 具有催化及监测能力的微通道中的银纳米花阵列

Fig. 4 (a) SEM image of the silver nanowires and microheater; (b) wiring nanowires on the hemisphere or frustum of a pyramid; (c) silver nano-flower array that has the ability of catalysis and monitoring

2.3 纳米材料

纳米材料一直是科学家们比较关注的话题,激光加工的手段对于一些纳米材料也具有独特优势^[40-43]。人们对量子点(QD)的研究兴趣近年来迅速增加,这是由于其独特的光学和电学特性可以被许多领域研究和应用。图 5(a)所示为利用飞秒激光直写加工碲化镉量子点纳米材料得到的螺旋线阵列结构,将这种结构浸泡在不同浓度的重金属离子溶液中,碲化镉量子点的激发发射光谱会有变化^[41]。利用飞秒激光加工得到的量子点分辨率最高约 170 nm。且飞秒激光脉冲可以有效抑制热弛豫过程,从而避免热诱导导致的量子点纳米晶的生长,因此通过激光加工程序化装配得到的量子点结构保留了量子点原始的光学特性。这种量子点微观结构可以应用在特定的微器件中,例如在微流控芯片中,量子点微结构可以检测重金属离子。

图 5(b)是利用飞秒激光直写金纳米颗粒得到的具有较高电导率的金纳米线结构^[42]。不同于被广泛报

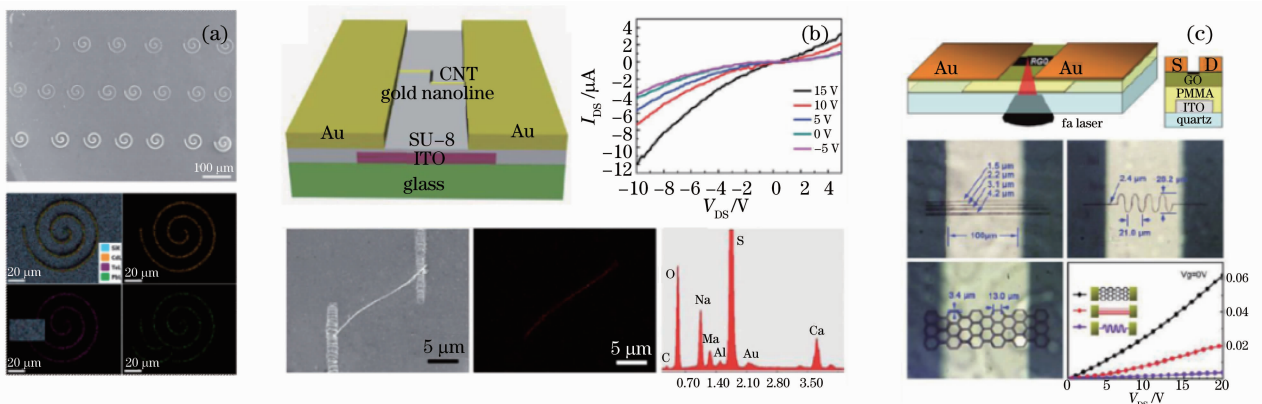


图 5 (a) 碲化镉量子点微循环阵列的 SEM 图像及不同 Pb^{2+} 浓度下的荧光成像; (b) 金纳米线及其导电能力测试; (c) 基于石墨烯的场效应晶体管及其性能测试

Fig. 5 (a) SEM image of CdTe QDs micro-circle arrays and the fluorescent light under different concentrations of Pb^{2+} ; (b) goldnanowires and the testing of conductivity; (c) field-effect transistor (FET) based on graphene and the property testing

道的金属离子还原机制,这种金纳米颗粒的加工是利用激光焦点附近产生的梯度力将 1.5~4 nm 的金纳米颗粒捕获、沉积并在焦点区域聚合完成的。这将成为连接纳米级物体的崭新方法,例如连接任意基底上的碳纳米管(CNT),尤其是没有电极时我们仍然可以将任意碳纳米管连接。这种利用激光梯度力诱导将金纳米颗粒形成具有传导性能的微纳结构的方法将会对各种纳米材料的功能化层状结构的发展起到有利作用,或许会形成另一种基于薄膜的纳米结构的构建模式。

如图 5(c)所示,利用飞秒激光对石墨烯氧化物进行能带调制,进行了具有代表性的测试,并制备了以石墨烯为底门的场效应晶体管^[43]。能带大小的调节主要通过改变激光功率从而改变石墨烯氧化物的氧含量进行,当激光功率从 0 到 23 mW 变化时,石墨烯氧化物能带从 2.4~0.9 eV 变化。在室温下,通过激光功率对石墨烯能带的调节,得到最优化的晶体管开关频率为 56 Hz。飞秒激光可以对石墨烯氧化物能带进行调节对于基于石墨烯的微器件来说意义重大,它甚至可能保证了纳米电子器件的光明未来。

2.4 蛋白质等生物材料的飞秒激光直写

近年来一个新的前沿和应用热点是使用飞秒激光直写技术加工处理蛋白质、水凝胶类(例如聚乙二醇等)等生物材料,从而获得无毒无害、生物适应性好的功能化微纳单元,进而应用于细胞微环境培养、神经纤维诱导、三维组织培养等生物学相关领域。此外,基于很多生物材料(尤其是蛋白质等自然产物)的无毒害性和可降解性,结合飞秒激光直写技术,来实现新一代环境友好替代材料的优选、制备乃至加工等一揽子技术方案,也正受到越来越多的关注。

综上所述,激光双(多)光子吸收固化微纳加工技术已经用于多种材料的三维加工。其中,将其用于蛋白质基材料的加工也已经得以实现和发展,并正在或者已经成为新的研究和应用热点。

3 蛋白质类材料的飞秒激光直写

3.1 飞秒激光直写中蛋白质聚合的机理

关于蛋白质双光子吸收聚合的机理,由于蛋白质种类的多样性,这一聚合过程也具有多样化特征,在此举两个例子:1) 以 FMN 为光敏剂,其分子吸收双光子后,处于三线态的 FMN 从 Tyr 吸收一个氧原子,这样就形成了一个 Tyr 自由基和 FMN 自由基,前者进一步促成了蛋白质的交联;2) 光敏剂吸收双光子能量之后,产生游离单氧,单氧再进一步引发蛋白质交联,如图 6 所示^[44]。目前使用的以亚甲基蓝等为光敏剂的材料体系是按照图 6 中所示的机理进行交联的。当然,由于不同的蛋白质分子是由多种氨基酸分子按不同顺序构成,又具有

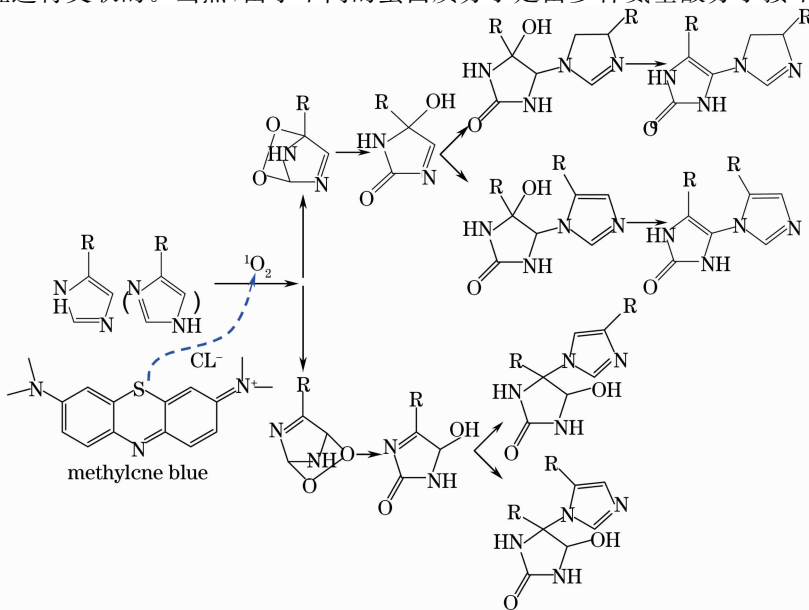


图 6 亚甲基蓝做光敏剂时由单线态氧引发的组氨酸残留基团交联的反应途径^[14]

Fig. 6 Reaction pathways of singlet oxygen mediated crosslinking of histidine residues when methylene blue is used as a photosensitizer^[14]

多种多样的空间构型,其化学物理性质千差万别,其双光子吸收交联的机理也就变得复杂多样。

如上文所述,飞秒激光直写加工技术最突出的优点在于:1)可以实现极高的加工分辨率(十几纳米);2)可简单易行且低成本地实现任意三维微纳结构的制备;3)飞秒量级的脉冲宽度有效地降低了激光的热效应,从而实现了极低的附加热损伤。而蛋白质的飞秒激光三维直写加工,则充分地发挥了这一多光子光刻技术的三大优势,从而在能够获得具有微纳尺度特征尺寸的真三维蛋白质水凝胶结构和器件的同时,还使其保留一定的蛋白质生化活性。这是其他的蛋白质加工方法所难以实现的。相对于其他蛋白质材料加工方法,例如微纳压印等,一方面,以蛋白质三维激光直写的整个加工过程是在相对温和的水溶液环境下非接触地进行的,再结合飞秒激光直写的低热损伤特点,能够在获得生物相容性极好的三维微米/亚微米结构和器件的同时,使蛋白质的部分生化活性得以保留,甚至实现活细胞存在下的原位激光微加工(这是其他材料体系的激光直写加工所难以实现的);另一方面,蛋白质的种类成千上万,相应的材料特性也多种多样,而且还可以通过基因工程、蛋白质工程和化学修饰等方法对蛋白质分子进行人为的改造乃至设计构建,从而获得具有崭新特性的蛋白质材料,从而在加工材料和加工手段上实现“双重任意性”,这就极大地有助于飞秒激光三维直写加工技术的应用拓展。此外,由于每次加工使用的蛋白质药品仅为数毫克到数十毫克量级,而某些蛋白质价格较为昂贵,这又极大地减少了这种蛋白质亚微米结构搭建技术的成本。

3.2 蛋白质基材料的飞秒激光直写的实现

常用的蛋白质飞秒激光直写的加工系统如图7所示,其中激光源通常是钛宝石激光器。考虑到钛宝石激光器比较昂贵,Kaehr等^[45]已经将Nd:YAG激光器应用于蛋白质的三维加工,这又进一步极大地降低了其成本。

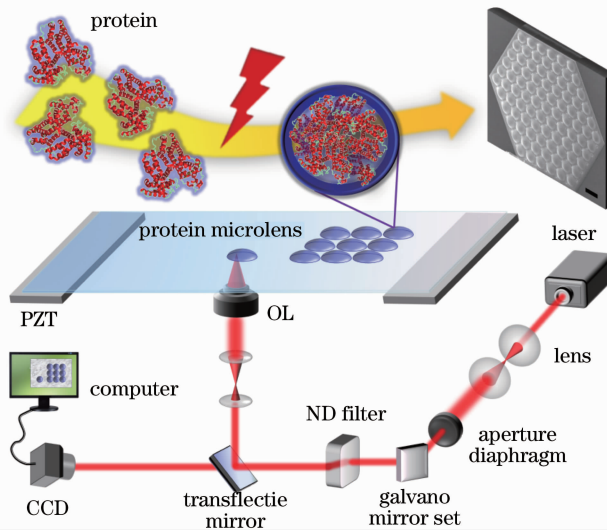


图7 激光双(多)光子吸收固化微纳加工的实验装置示意图

Fig. 7 Micro/nano-processing schematic drawing of laboratory equipment for laser double-(multi)-photon absorption curing

如图7所示,激光器发射的激光先经透镜组进行扩束,接着光束经过孔径光阑,这是为了得到光束中心质量较好的高斯光束。之后激光束经过电控制转镜系统,转镜系统可以控制光束的 x, y 二维方向移动, z 方向的控制是由存放加工材料的压电平台控制的,转镜和压电平台都由计算机程序控制,从而控制激光焦点在所加工材料中三维运动,直写得到所设计的三维微结构。光束在经过转镜后会经过一个光闸,通过计算机控制光闸的闭合和开启来控制光束的通断,从而控制单点曝光时间。光束一般被高倍率(60倍或100倍等)油浸物镜(OL)聚焦,物镜下部安装镀膜的电介质镜(对于飞秒激光透射99%以上,对于短波长光全透),照明光源为光纤灯,它发出的光经过所加工材料后透过电介质镜,进入CCD摄像头,从而对整个加工过程进行实时监测。

3.3 蛋白质基材料飞秒激光直写的相关进展

利用这一水相、非接触、无掩模的蛋白质飞秒激光直写加工技术,国内外研究人员开发出多种多样的功能化蛋白质微纳器件和系统,并将其应用于众多科学前沿领域。

目前,Allen 等^[46-47]已经对蛋白质的激光双光子吸收三维加工进行了多年的研究,在早些时候就已经系统研究并测试了蛋白质微凝胶的机械特性,实现了玻璃片上的立体加工和透明质酸中完全的三维蛋白质结构构建,并将获得的蛋白质水凝胶结构用于智能环境感应微机械元件,活细胞的微腔培养、诱导生长,蛋白质生物电学研究,以及某些物质的梯度释放等^[45]。

3.3.1 细胞培养和组织工程等生物医学领域应用

细胞培养和组织工程的工作与医疗卫生事业息息相关。这个研究方向也得到了科学家们的青睐。如图 8(a)所示,Kaehr 等^[4]采用模板法进行飞秒激光直写创建了基于牛血清白蛋白(BSA)的三维细胞培养微腔,这种微腔可以对单独的细胞实现捕获和生物培养,可以在受控环境中探测细胞属性。当单个细菌通过微腔小孔进入微腔后,利用一个交联的 BSA 插头封住微腔来限制细胞,细胞就可在微腔中进行分裂。这种蛋白质微腔的一大优点是,交联后的蛋白质结构具有一定孔隙度,可以使细胞所需的培养液和所产生废液通过扩散作用进行交换。这不同于通过其他方式及材料制备的需要通过流体进行营养液供给的微腔,因此避免了不必要的浪费。早在 2004 年 Kaehr 等^[5]就实现了神经细胞的二维的实时和原位诱导,图 8(b)是 Seidlits 等^[6]利用飞秒激光直写模仿生物体内物理或化学属性而制备的基于 BSA 的三维微结构,作者证明了这种结构有利于神经细胞的生长。

图 8(c)是 Gittard 等^[10]利用飞秒激光进行多焦点直写制备的组织工程支架以及可应用于生物医学的微针阵列。相关工作还有很多^[11-14]。

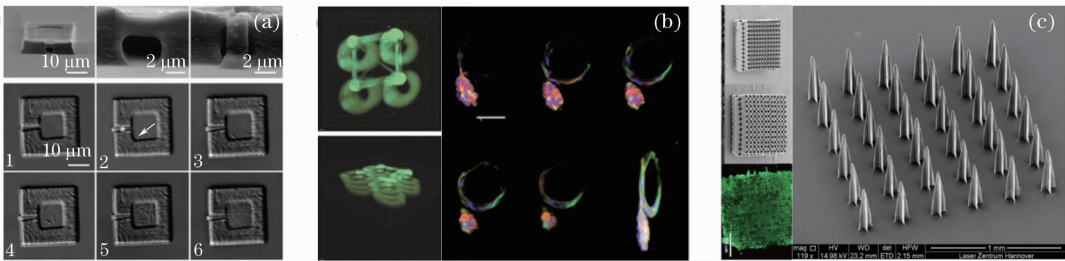


图 8 (a) 基于 BSA 的细胞培养微腔; (b) 神经细胞的三维诱导微结构; (c) 基于蛋白质的组织工程支架及微针阵列

Fig. 8 (a) Microcontainer for culturing bacterium based on BSA; (b) 3D microstructure for guiding of nerve cell; (c) tissue engineering scaffolds and microneedle array based on protein

3.3.2 微机械

图 9 为 Kaehr 等^[48]利用飞秒激光直写制备的基于蛋白质的响应微机械。图 9(a)是基于蛋白质的拴着小球

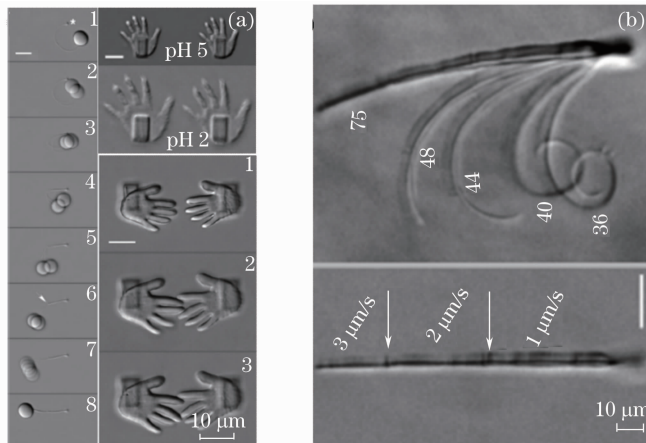


图 9 具有微响应能力的蛋白质的(a)线状,手型及(b)棒状结构

Fig. 9 (a) Protein wire, hand and (b) stick shaped protein wires, that have the ability of microresponse

的线状结构及两个对称的手状结构。当溶液的 pH 值变化时线状结构会带动小球运动,手状结构会产生接触或分离效果。图 9(b)是飞秒激光直写得到的蛋白质的响应梯度棒,沿着棒的方向改变激光直写的扫描速度及曝光水平,从而改变沿棒方向的蛋白质密度,可以导致对溶液离子强度变化的响应率沿棒方向逐渐增加,从而导致棒状结构在溶液中的弯曲效果。运用激光加工的手段可以对微观水凝胶进行高度有序的加工,可以使所得微结构进行一些复杂微机械运动,例如可弯曲的棒就可以通过化学方法实现远距离的微尺度物体的传递。就在最近,通过进一步优化直写技术,Spivey 等^[15]在极高浓度蛋白质中获得了复杂的真三维悬空蛋白质微机械器件,因为蛋白质类材料飞秒激光直写通常是在水相条件下进行的,因此获得真三维悬空微纳器件就变得相对困难(缺乏周围固体介质的足够支撑),但是进一步优化直写方案,例如使用可控蒸发提高溶液浓度和机械强度等方法,他们克服了这一难题,使这一水相直写技术具备了悬空三维器件的加工能力。

3.3.3 生物微电子学

图 10 是 Hill 等^[7]采用飞秒激光直写进行的简单生物微电子学工作。运用飞秒激光在蛋白质溶液中直写,得到蛋白质支架模型,一部分与衬底相连,一部分具有生物活性。然后通过定向沉积进行金属纳米粒子的生长对蛋白质支架有选择地金属化,就得到高电导的蛋白质电子学材料。这是一种在化学敏感环境制备电子材料的全新方法。

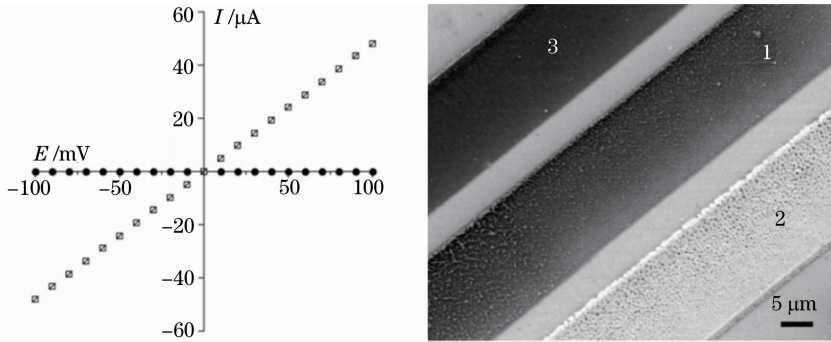


图 10 掺杂金纳米粒子的具有导电能力的蛋白质基材料

Fig. 10 Protein material doped with gold nanoparticle that can conduct

3.3.4 微流体

如图 11(a)是利用飞秒激光进行动态掩模直接曝光的方式进行的多焦点多光子加工方式的工作^[49]。如图 11(a)中每一个迷宫由众多焦点中的一个加工完成,图 11(b)中的微圆柱体阵列也是此方法制备得到^[49]。本质上讲这种方法可快速地加工任意的三维结构,同时也是一种可以高效地制备大型、高分辨率的微结构的

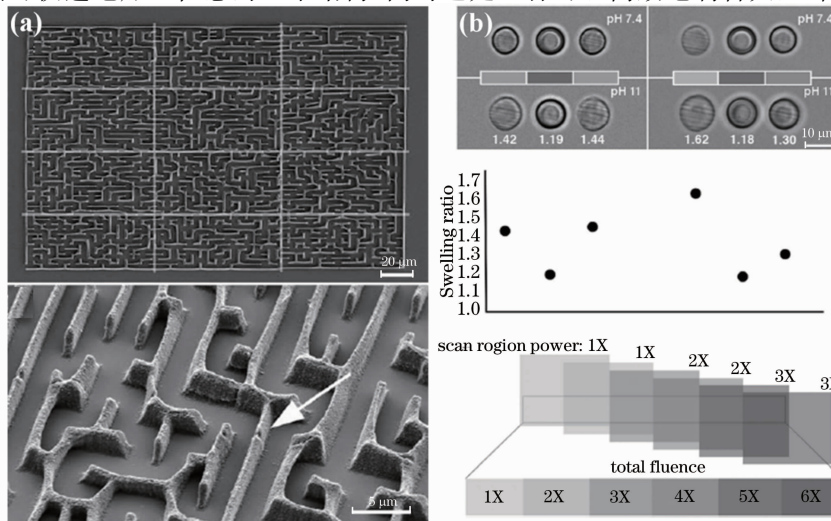


图 11 多焦点加工得到的(a)迷宫结构及(b)微圆柱阵列结构

Fig. 11 (a) Micromaze and (b) microcylinder array obtained by multi laser focus

方式。这种加工方法尤其对于芯片实验室可以起到重要影响,例如对芯片实验室中的三维微孔阵列、微机械包括微齿轮、微流控阀门及微通道的制备将起到重要作用。

3.3.5 其他典型工作

关于蛋白质激光加工的典型工作还有很多,以下做一简要介绍。经过飞秒激光加工得到的生物材料的活性保留程度,对于基于生物材料的微器件的性能影响至关重要。图 12(a),是 Turunen 等^[3]进行的激光加工后蛋白质剩余活性的研究。作者主要基于牛血清白蛋白,采用不同功率和单点曝光时间制备蛋白质微结构,然后将事先与荧光标签绑定的生物素或链霉素亲和素绑定在蛋白质微结构上,通过测试最终的荧光强度,判断蛋白质经激光加工后的剩余绑定能力即剩余活性。实验显示,功率降低或是扫描速度增加都会使加工后的蛋白质活性降低。

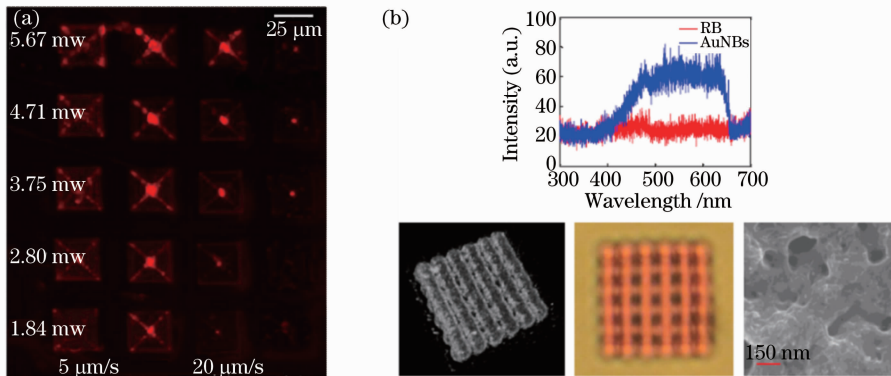


图 12 (a) 不同加工功率及扫描速度得到的蛋白质微结构具有不同的荧光成像能力;(b) 掺杂金纳米棒的 BSA 微结构

Fig. 12 (a) Microstructures obtained by laser with different powers and scanning speeds have different ability for fluorescence imaging; (b) BSA microstructure doped with gold nanorod

图 12(b)为利用飞秒激光将金纳米棒与牛血清白蛋白掺杂的工作^[16]。作者在加工过程中注意了激光波长的选择,做到只满足光敏剂的双光子吸收且同时避免金纳米棒的等离子体共振的增强。最终成功制备了掺杂金纳米棒的蛋白质微结构。这种掺有金纳米棒的微观结构可以应用到具有双光子荧光成像能力和光热现象的生物学支架领域。

3.4 本课题组关于蛋白质微纳光子学的相关研究进展

目前,研究人员已经将蛋白质材料应用到各种光电器件中,例如有机发光二极管(OLED)、有机场效应晶体管(OFET)、微纳波导和存储器件等等。在以上这些研究中,引入蛋白质材料的原因不仅在于其来源丰富、廉价和可降解性(环境友好性),也在于其独特的生物相容性和环境响应变化性质。这些优点对于仿生微光学元件的制备和研究来说同样具有巨大的吸引力,例如各种微型仿生透镜(阵列)成像系统等。然而在此之前,形貌可自由设计并且可精确定位的蛋白质微透镜制备仍然难以实现。吉林大学的 Sun 等^[8],利用蛋白质飞秒激光直写技术,制备出了多种蛋白质水凝胶基的三维微光学器件(图 13~19),例如多种蛋白质水凝胶微透镜(阵列),并且验证和实现了其良好的光学性能[图 13(a),2]、优异的生物相容性[图 13(a),3]和“智能”环境响应动态调谐性能[图 13(c),(d)]等。通过优化加工参数控制凝胶交联密度与交联密度的均匀分布,同时实现了合适的机械强度和优良的光学性能,使得微透镜在液相环境、空气中和调谐的过程中都能保持良好的光学性能。蛋白质材料优良的生物相容性,使其在生物环境下的应用成为可能。这种微型水凝胶“智能”“软”微透镜可通过环境刺激实现透镜本身的变化,进而来调节焦距与成像。即在外界某些化学刺激下会有内部网络结构的收缩和膨胀,从而导致整个结构的缩胀、形变以及折射率的改变,从而实现蛋白质微透镜的环境响应“智能”动态调谐(例如 pH 响应调谐)。利用不同蛋白质的生化性质,还有可能进一步实现微光学元件的生理、生化信号的响应调谐。此外,基于飞秒激光三维直写加工附带热损伤小的特点,光诱导交联后的蛋白质仍有可能保留一定生化活性,或者通过二次的修饰等方法,实现其功能化。

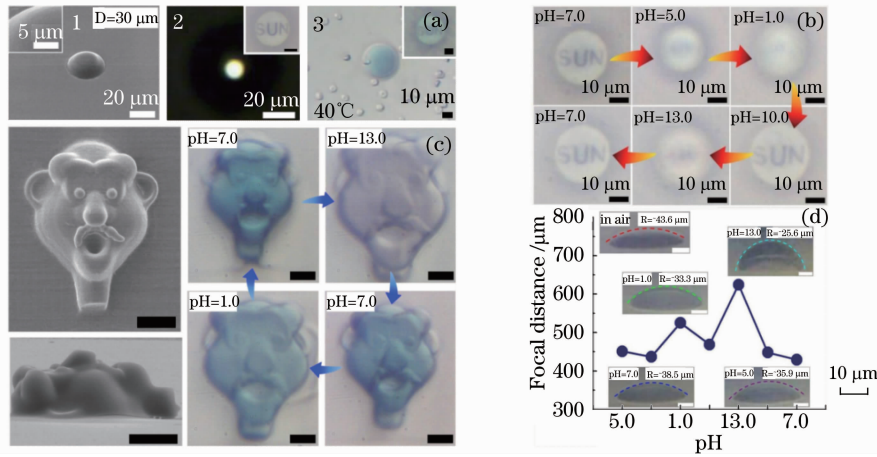


图 13 (a) 1, 一个蛋白质球面微透镜的 SEM 斜视图(45° 角); 2, 通过光学显微镜的光学性能表征; 3, 在兔血清和红细胞混合溶液中, 蛋白质微透镜表现出良好的生物相容性及极少的生物淤积性。(b) 左侧图为三维空间的人脸浮雕的 SEM 图片展示, 证明激光加工获得复杂三维微结构的能力, 右侧图为通过 pH 变化调节引起的老人脸表情的可逆变化。(c) 通过 pH 变化引起的具有可调谐能力的微透镜成像性能的可逆变化。(d) 对于 pH 变化引起的 BSA 球冠微透镜的焦距变化。插图: 蛋白质微透镜在不同 pH 溶液中和在空气中的斜视图。透镜半径为 $20\ \mu\text{m}$, 高度为 $5\ \mu\text{m}$ (pH 7.4)

Fig. 13 (a) 1: Oblique view SEM image (45° tilted) of a protein spherical microlens; 2: optical performances characterized by optical microscopy, 3: the protein microlenses performed well in a mixture of rabbit serum and red blood cells proving the good biocompatibility and lack of biofouling. (b) Left: SEM pictures of a 3D relief of a man's face demonstrating our approach's ability of obtaining complicated 3D microstructures. Right: reversible change of an old man's expression caused by pH stimuli. (c) Reversible imaging tunability caused by pH's change. (d) Focal distance's variation of a BSA spherical crown microlens to pH change. Inset: oblique views of protein microlens under different pH values and in air. The lens' designed radius is $20\ \mu\text{m}$ and height is $5\ \mu\text{m}$ (pH 7.4)

$$h = p\lambda_0 / (n_{\text{hydrogel}} - n_s)$$

图 14 连续浮雕型谐波衍射微透镜的原理图, $\lambda_0 = 550\ \text{nm}$, $p = 3$ 。基本参数为透镜厚度 $h = 3.3\ \mu\text{m}$, 周围介质折射率 n_s (空气为 1.0), 蛋白质水凝胶折射率为 n_{hydrogel} (约为 1.50)

Fig. 14 Schematic diagram of the design of continuous-relief harmonic diffractive microlens. $\lambda_0 = 550\ \text{nm}$, $p = 3$. The element's thickness is h ($3.3\ \mu\text{m}$). n_s (1.0 for air) is the refractive index of surrounding, and n_{hydrogel} (about 1.50) is the refractive index of protein hydrogel

除了最常用的球面微透镜, Sun 等^[49]还实现了具有更多结构细节的蛋白质谐波衍射微透镜, 如图 15, 16 所示。谐波衍射微透镜是一种衍射成像微光学器件, 其每个单环之间的光程差是设计波长的整数倍。与折射透镜相比, 谐波衍射微透镜在具有更小的器件厚度的情况下, 仍能获得同样好的成像和聚焦效果[图 15(b)]。更重要的是, 谐波衍射微透镜具有介于折射和衍射透镜之间的光学特性, 即对于可见波段内的一些孤立的波长具有相同的焦距。这一特性极大地抑制了衍射透镜色差较大的问题, 尤其是与非涅耳透镜或者菲涅耳波带片相比, 虽然其仍具有一定的负色差效应。因此, 谐波衍射微透镜在光学系统的设计(消除光学系统色差)和光学系统的微型化集成中, 得以广泛应用。但是, 对于传统材料的谐波衍射微透镜, 例如玻璃、石英、聚合物等, 环境响应特性和生物兼容性的缺失限制了其应用[图 15(c)]。此外, 不同于其他可调节微型折射或者衍射透镜(液体可调谐透镜、基于液晶的可调谐菲涅耳波带片、基于水凝胶微球的可调谐微透镜等等), 可调谐的谐波衍射微透镜很少被报道。Sun 等^[9]使用飞秒激光直写技术, 首次获得了可调谐的蛋白质连续浮雕谐波衍射透镜(图 16)。由于飞秒激光直写技术具备的优异的三维形貌(形状和表面质量)控制, 蛋白质谐波衍射微透镜的独特光学特性(受抑制的负色差)和优良的聚焦与成像性能得以实现。此外, 由于使用蛋白质分子作为“搭建材料”, 蛋白质谐波衍射透镜也被赋予了优良的生物兼容性。

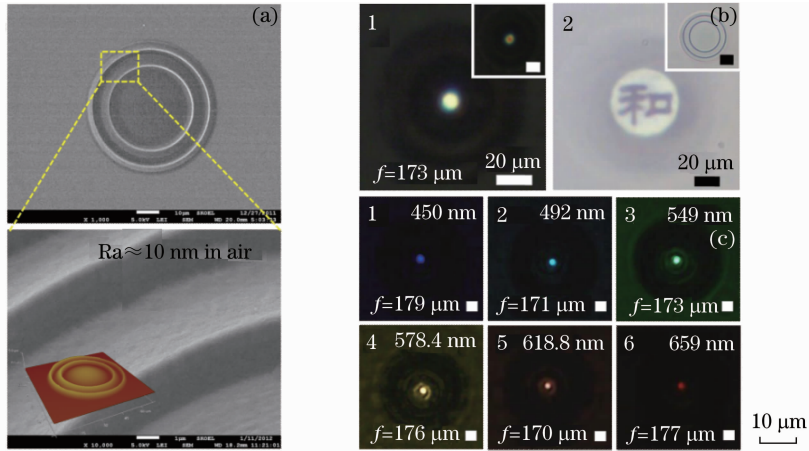


图 15 (a) 谐波衍射微透镜的 SEM 图和标记区域的放大图(30°角)。谐波衍射微透镜的原子力量显微镜照片显示器件平均粗糙度为 10 nm。(b)1,空气中谐波衍射微透镜的焦点测试,表明谐波衍射微透镜在空气中具有负的色散性质。2,谐波衍射微透镜的聚焦成像图片,成像图片为谐波衍射微透镜在水中的光学显微镜照片。(c)空气中对于不同波长的单色光谐波衍射微透镜具有不同焦距

Fig. 15 (a) SEM image protein harmonic diffractive microlens (PHDM) and the enlarged view (30° tilted) of the marked area. Inset: atomic force microscope (AFM) image of the PHDM with average roughness of about 10 nm. (b) 1: The focusing test of a PHDM in air. Inset: the minus chromatic dispersion property of the PHDM in air. 2: The focused imaging picture of the PHDM. Inset: optical microscopy picture of a PHDM in water. (c) Focal lengths of the PHDM for monochromatic light with different wavelengths in air

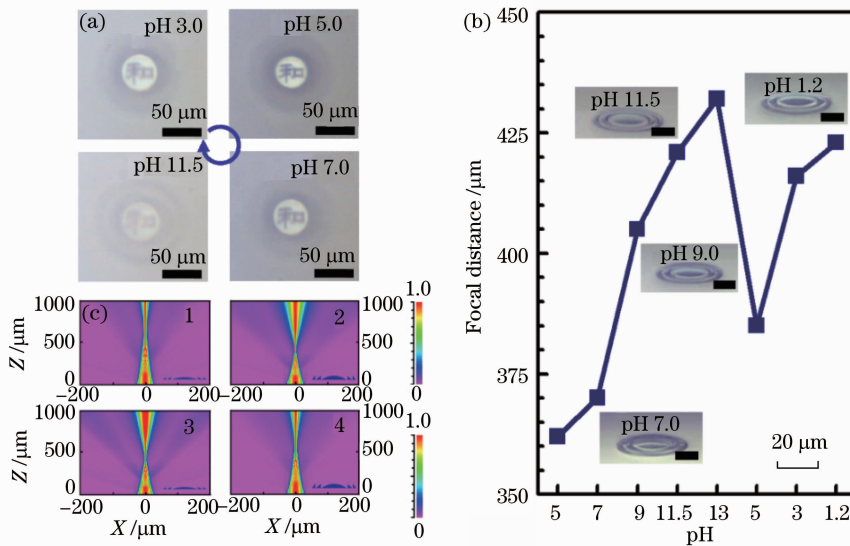


图 16 (a) pH 从 3.0 到 11.5 变化得到的可逆的成像变化。(b)在不同 pH 溶液中谐波衍射微透镜的焦距不同。

插图为不同 pH 中谐波衍射微透镜的 SEM 表征侧视图。(c)焦距对 pH 响应的 Rsoft 仿真模拟

Fig. 16 (a) Reversible imaging adjustment by pH changing from 3.0 to 11.5. (b) Focal lengths of the PHDM in buffers versus pH value. Inset: SEM images of side view of the PHDM under different pH. (c) Rsoft simulation of pH-responsive focal lengths

Shear 等^[47]利用原子力显微镜技术测定和研究了飞秒激光直写技术获得的蛋白质微凝胶的机械性质。如表 1 所列,是几类蛋白质微凝胶的弹性模量的调节范围。通过改变加工参数,可以调节蛋白质水凝胶的交联度,进而得到可定制的蛋白质微凝胶的机械性质。对于飞秒激光直写中常用的几类蛋白质,可以实现较大跨度的弹性模量的调节。在此基础上,孙洪波等^[50]实现了蛋白质柔性微光学器件(开诺型相位微透镜)如图

17~19 所示,展示了其独特而优良的光学特性,并初步验证了其生物降解特性,即其绿色环境友好特性。其相关工作证明,利用飞秒激光直写技术获得蛋白质基微纳器件,为新一代环境友好化聚合物柔性器件的实现提供了一个新的途径和选项。

表 1 几类蛋白质微凝胶的弹性模量的调节范围

Table 1 Tunable elastic modulus of several proteins

	Lysozyme	Albumin	Avidin
Elastic modulus /MPa	0.2~12	0.03~3	0.6~9

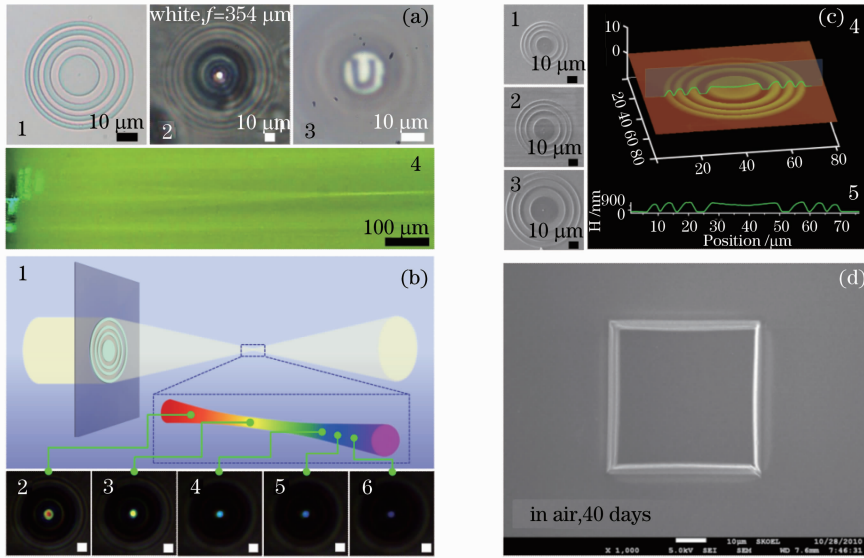


图 17 (a) 1,玻璃基底上的直径 $50 \mu\text{m}$ 的蛋白质微相位波带片。2,空气中,在卤素灯的白光照射下的 1 相位波带片的焦点图像。经测试,它的焦距约为 $354 \mu\text{m}$ 。3,1 蛋白质微相位波带片的成像光学显微镜表征。4,在罗丹明 B 水溶液中由直径 $100 \mu\text{m}$ 的蛋白质微相位波带片会聚和整形的 532 nm 的激光光束。(b)1,空气中蛋白质微相位波带片的负色散。示意图显示白光沿光轴分散。2~6,白光中包含的几种单色光的光学显微镜的焦点成像。这些焦点是在白光照明下的波带片光轴上不同位置得到的,比例尺为 $20 \mu\text{m}$ 。(c)1~3,直径分别为 $50, 60, 80 \mu\text{m}$,厚度为 $1 \mu\text{m}$ 的玻璃盖玻片上的蛋白质微相位波带片的 SEM 图像。4, AFM 表征得到的蛋白质微相位波带片的 3D 形态,波带片表面粗糙度约为 10 nm (直径约为 $60 \mu\text{m}$)。5,由 AFM 表征得到的蛋白质微相位波带片的中心线截面示意, H 代表蛋白质微相位波底片的厚度。(d) 长时间放置空气中的玻璃盖玻片上的 BSA 微正方形的 SEM 图片(放置 40 天)

Fig. 17 (a) 1: Protein micro-KPL with a diameter of $50 \mu\text{m}$ fabricated on a glass coverslip. 2: Focusing images of the protein micro-KPL in 1 in air under illumination with white light from a halogen lamp. Its focal length is measured to be about $354 \mu\text{m}$. 3: Optical microscope characterization of the imaging of the protein micro-KPL in 1. 4: Focusing and shaping of a 532 nm laser beam by the protein micro-KPL with the diameter of $100 \mu\text{m}$ when immersed in rhodamine B aqueous solution. (b) 1: Minus chromatic dispersion of a protein micro-KPL in air. The schematic shows that the white light is dispersed along the optical axis. 2~6: Optical microscope images of the focal spots of several monochromatic lights contained in the white incident light, caught at different locations on the optical axis under white light illumination, scale bar, $20 \mu\text{m}$. (c) 1~3: SEM images of protein micro-KPLs on a glass coverslip with thickness of about $1 \mu\text{m}$ but different diameters of $50 \mu\text{m}$, $60 \mu\text{m}$ and $80 \mu\text{m}$, respectively. 4: AFM characterization exhibiting 3D morphology and about 10 nm average roughness of the protein micro-KPL (diameter of about $60 \mu\text{m}$). 5: Cross section at the central line of the protein micro-KPL in 4 by AFM. H stands for the thickness of the protein micro-KPL. (d) SEM images of BSA microsquares on a glass coverslip after long term storage in air (40 days)

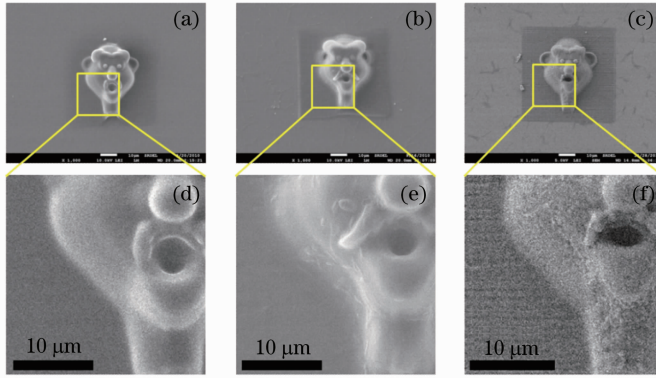


图 18 室温下(约 22 ℃)放在雨水中的玻璃盖玻片上的 BSA 微凝胶的生物降解。(a~c),室温下,分别在雨水中放置 1 天, 7 天,14 天的 BSA 微凝胶的 SEM 图片;(d~f)分别为(a~c)的局部放大的 SEM 图片

Fig.18 Biodegradation of BSA microhydrogels on a glass coverslip in rain water under room temperature (about 22 ℃). (a~c) SEM images of the BSA microhydrogel in rain water for 1 day, 7 days, and 14 days, respectively. (d~f) SEM images of partially enlarged details of (a~c), respectively

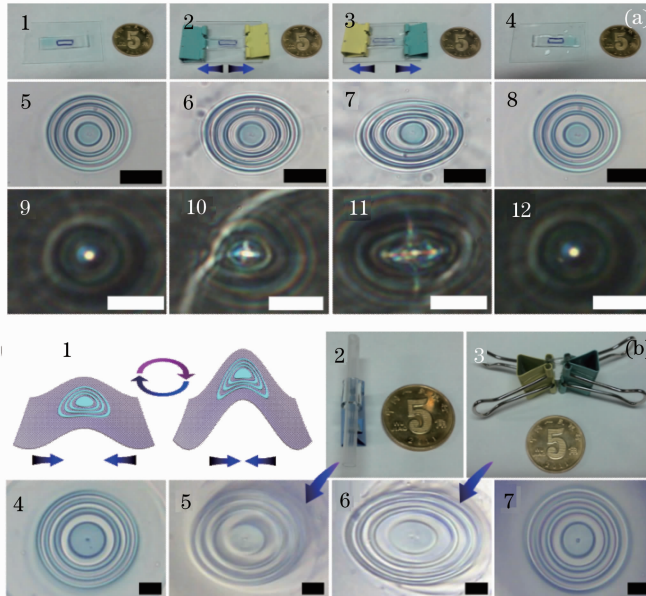


图 19 在聚二甲硅氧烷(PDMS)薄片基底上基于 BSA 的微相位波带片的灵活加工。(a)在 PDMS 基底上的 BSA 微相位波带片的伸展能力的展示,比例尺为 50 μm。(b)在 PDMS 基底上的 BSA 微相位波带片的弯曲能力的展示,比例尺 20 μm,硬币直径为 20.5 mm

Fig.19 Flexibility of the BSA micro-KPL fabricated on a polydimethylsiloxane (PDMS) slice as the matrix. (a) Exhibition of the stretching ability of the BSA micro-KPL on a PDMS matrix, scale bar, 50 μm. (b) Exhibition of the bending ability of the BSA micro-KPL on a PDMS matrix, scale bar, 20 μm, and diameter of the coin is 20.5 mm

4 结束语

飞秒(脉冲)激光直写技术因其高精度、低损伤的三维可设计加工能力,近年来备受关注,并已经应用于多种材料的加工和多个科学前沿领域。其中,生物材料,尤其是蛋白质类材料的飞秒激光直写加工的相关研究和应用,正在甚至已经成为新的热点。通过有机结合蛋白质等生物材料独特的生物、化学、物理特性与飞秒激光直写技术的诸多优点,可以得到多种多样的生物相容性高、环境友好的三维微纳元器件乃至系统。

进一步的发展趋势可能在于,直接利用自然界中种类和功能丰富的蛋白质本身的性质,甚至运用基因工程、蛋白质工程或者化学修饰等方法,对蛋白质进行特定的按需功能化设计,从而可能实现高度功能化的蛋白质微纳器件和系统,例如前文提到的蛋白质环境响应“智能”动态调谐微光学器件,以及本课题组正在进行

的直接使用探针蛋白质构建的蛋白质纳米线生物传感器,等等。相信在科研人员的努力下,蛋白质类材料的飞秒(脉冲)激光直写技术将会愈加成熟,并被更广泛和深入地应用于生物医学、生物电子学、生物光子学以及环境友好化替代材料等诸多相关领域。

参 考 文 献

- 1 S Kawata, Sun Hongbo, T Tanaka, *et al.*. Finer features for functional microdevices[J]. *Nature*, 2001, 412(6848): 697–698.
- 2 Zang Yonglai, Chen Qidai, Xia Hong, *et al.*. Designable 3D nanofabrication by femtosecond laser direct writing[J]. *Nano Today*, 2010, 5(5): 435–448.
- 3 S Turunen, E Kapyla, K Terzaki, *et al.*. Pico- and femtosecond laser-induced crosslinking of protein microstructures; evaluation of processability and bioactivity[J]. *Biofabrication*, 2011, 3(4): 045002.
- 4 Bryan Kaehr, Jason B Shear. Mask-directed multiphoton lithography[J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129(7): 1904–1905.
- 5 Bryan Kaehr, Richard Allen, David J Javier, *et al.*. Guiding neuronal development with in situ microfabrication[J]. *PNAS*, 2004, 101(46): 16104–16108.
- 6 Stephanie K Seidlits, Christine E Schmidt, Jason B Shear, *et al.*. High-resolution patterning of hydrogels in three dimensions using direct-write photofabrication for cell guidance[J]. *Adv Funct Mater*, 2009, 19: 3543–3551.
- 7 Ryan T Hill, Jennifer L Lyon, Richard Allen, *et al.*. Microfabrication of three-dimensional bioelectronic architectures[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(30): 10707–10711.
- 8 Sun Yunlu, Dong Wenfei, Yang Ruizhu, *et al.*. Dynamically tunable protein microlenses[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51(7): 1558–1562.
- 9 Sun Yunlu, Liu Dongxu, Dong Wenfei, *et al.*. Tunable protein harmonic diffractive micro-optical elements[J]. *Opt Lett*, 2012, 37(14): 2973–2975.
- 10 Shaun D Gittard, Alexander Nguyen, Kotaro Obata, *et al.*. Fabrication of microscale medical devices by two-photon polymerization with multiple foci via a spatial light modulator[J]. *Biomed Opt Express*, 2011, 2(11): 3167–3178.
- 11 J D Pitts, P J Campagnola, G A Epling, *et al.*. Submicron multiphoton free-form fabrication of proteins and polymers: studies of reaction efficiencies and applications in sustained release[J]. *Macromol*, 2000, 33(5): 1514–1523.
- 12 J D Pitts, A R Howell, R Taboada, *et al.*. New photoactivators for multiphoton excited three-dimensional submicron cross-linking of proteins; bovine serum albumin and type 1 collagen[J]. *Photochem Photobiol*, 2002, 76(2): 135–144.
- 13 A Ovsianikov, A Deiwick, S Van Vlierberghe, *et al.*. Laser fabrication of 3D gelatin scaffolds for the generation of bioartificial tissues[J]. *Materials*, 2011, 4(1): 288–299.
- 14 A Ovsianikov, A Deiwick, S Van Vlierberghe, *et al.*. Laser fabrication of three-dimensional CAD scaffolds from photosensitive gelatin for applications in tissue engineering[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(4): 851–858.
- 15 Eric C Spivey, Eric T Ritschdorff, Jodi L Connell, *et al.*. Multiphoton lithography of unconstrained three-dimensional protein microstructures[J]. *Adv Funct Mater*, 2013, 23(3): 333–339.
- 16 Chi-Hsiang Lien, Wen-Shuo Kuo, Keng-Chi Cho, *et al.*. Fabrication of gold nanorods-doped, bovine serum albumin microstructures via multiphoton excited photochemistry[J]. *Opt Express*, 2011, 19(7): 6260–6268.
- 17 He Yan, Huang Bailing, Lu Dongxu, *et al.*. “Overpass” at the junction of a crossed microchannel; an enabler for 3D microfluidic chips[J]. *Lab Chip*, 2012, 12(20): 3866–3869.
- 18 Kenji Takada, Wu Dong, Chen Qidai, *et al.*. Size-dependent behaviors of femtosecond laser-prototyped polymer microwires[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(5): 566–568.
- 19 Ku Jinfeng, Chen Qidai, Zhang Ran, *et al.*. Whispering-gallery-mode microdisk lasers produced by femtosecond laser direct writing[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(15): 2871–2873.
- 20 Koshiro Kaneko, Kazuo Yamamoto, Satoshi Kawata, *et al.*. Metal-nanoshelled three-dimensional photonic lattices[J]. *Optics Letters*, 2008, 33(17): 1999–2001.
- 21 Lin Xiaofeng, Chen Qidai, Niu Ligang, *et al.*. Mask-free production of integratable monolithic micro logarithmic axicon lenses[J]. *J Lightwave Technol*, 2010, 28(8): 1256–1260.
- 22 Chen Qidai, Lin Xiaofeng, Niu Ligang, *et al.*. Dammann gratings as integratable micro-optical elements created by laser micromanufacturing via two-photon photopolymerization[J]. *Opt Lett*, 2008, 33(21): 2559–2561.
- 23 Sana Nakanishi, Satoru Shoji, Satoshi Kawata, *et al.*. Giant elasticity of photopolymer nanowires[J]. *Appl Phys Lett*, 2007, 91(6): 063122.
- 24 Kenji Takada, Koshiro Kaneko, Yu-Dong Li, *et al.*. Temperature effects on pinpoint photopolymerization and polymerized microwire structures[J]. *Appl Phys Lett*, 2008, 92(4): 041902.
- 25 Wu Dong, Wu Sizhu, Niu Ligang, *et al.*. High numerical aperture microlens arrays of close packing[J]. *Appl Phys Lett*, 2010, 97(3): 031109.
- 26 Wu Dong, Chen Qidai, Niu Ligang, *et al.*. Femtosecond laser rapid prototyping of nanoshells and suspending components towards microfluidic devices[J]. *Lab Chip*, 2009, 9(10): 2391–2394.

- 27 Wu Dong, Chen Qidai, Niu Ligang, *et al.*. 100% Fill-factor aspheric microlens arrays (AMLA) with sub-20-nm precision [J]. IEEE Photon Technol Lett, 2009, 21(20): 1535–1537.
- 28 Wu Dong, Niu Ligang, Chen Qidai, *et al.*. High efficiency multilevel phase-type fractal zone plates[J]. Opt Lett, 2008, 33(24): 2913–2915.
- 29 Wang Juan, He Yan, Xia Hong, *et al.*. Embellishment of microfluidic devices via femtosecond laser micronanofabrication for chip functionalization[J]. Lab Chip, 2010, 10(15): 1993–1996.
- 30 Tian Ye, Zhang Yonglai, Ku Jinfeng, *et al.*. High performance magnetically controllable microturbines[J]. Lab Chip, 2010, 10(21): 2902–2905.
- 31 Wang Juan, Xia Hong, Xu Binbin, *et al.*. Remote manipulation of micronanomachines containing magnetic nanoparticles [J]. Opt Lett, 2009, 34(5): 581–583.
- 32 Xia Hong, Zhang Wenyi, Wang Fangfang, *et al.*. Three-dimensional micronanofabrication via two-photon-excited photoisomerization[J]. Appl Phys Lett, 2009, 95(8): 083118.
- 33 Xia Hong, Wang Juan, Tian Ye, *et al.*. Ferrofluids for fabrication of remotely controllable micro-nanomachines by two-photon polymerization[J]. Adv Mater, 2010, 22(29): 3204–3207.
- 34 Tian Ye, Zhang Yonglai, Xia Hong, *et al.*. Solvent response of polymers for micromachine manipulation[J]. Phys Chem Chem Phys, 2011, 13(11): 4835–4838.
- 35 Lin Xiaofeng, Hu Guoqing, Chen Qidai, *et al.*. A light-driven turbine-like micro-rotor and study on its light-to-mechanical power conversion efficiency[J]. Appl Phys Lett, 2012, 101(11): 113901.
- 36 Guo Li, Xia Hong, Fan Huitao, *et al.*. Femtosecond laser direct patterning of sensing materials toward flexible integration of micronanosensors[J]. Opt Lett, 2010, 35(10): 1695–1697.
- 37 Xu Binbin, Ma Zhuochen, Wang Huan, *et al.*. A SERS-active microfluidic device with tunable surface plasmon resonances [J]. Electrophoresis, 2011, 32(23): 3378–3384.
- 38 Xu Binbin, Xia Hong, Niu Ligang, *et al.*. Flexible nanowiring of metal on nonplanar substrates by femtosecond-laser-induced electroless plating[J]. Small, 2010, 6(16): 1762–1766.
- 39 Xu Binbin, Zhang Ran, Liu Xueqing, *et al.*. On-chip fabrication of silver microflower arrays as a catalytic microreactor for allowing in situ SERS monitoring[J]. Chem Commun, 2012, 48(11): 1680–1682.
- 40 Zhang Yonglai, Guo Li, Wei Shu, *et al.*. Direct imprinting of microcircuits on graphene oxides film by femtosecond laser reduction[J]. Nano Today, 2010, 5(1): 15–20.
- 41 Xu Binbin, Zhang Yonglai, Zhang Ran, *et al.*. Programmable assembly of CdTe quantum dots into microstructures by femtosecond laser direct writing[J]. J Mater Chem C, 2013, doi: 10.1039/c3tc30666f.
- 42 Xu Binbin, Zhang Ran, Wang Huan, *et al.*. Laser patterning of conductive gold micronanostructures from nanodots[J]. Nanoscale, 2012, 4(22): 6955–6958.
- 43 Guo Li, Shao Ruiqiang, Zhang Yonglai, *et al.*. Bandgap tailoring and synchronous microdevices patterning of graphene oxides[J]. J Phys Chem C, 2012, 116(5): 3594–3599.
- 44 Ryan Toler Hill. Active Three-Dimensional Protein Microstructures[D]. Austin: The University of Texas at Austin, 2006. 9–12.
- 45 Bryan Kaehr, Nusret Ertas, Rex Nielson, *et al.*. Direct-write fabrication of functional protein matrixes using a low-cost Q-switched laser[J]. Anal Chem, 2006, 78(9): 3198–3202.
- 46 Richard Allen, Rex Nielson, Dana D Wise, *et al.*. Catalytic three-dimensional protein architectures[J]. Anal Chem, 2005, 77(16): 5089–5095.
- 47 Constantine Y Khripin, C Jeffrey Brinker, Bryan Kaehr. Mechanically tunable multiphoton fabricated protein hydrogels investigated using atomic force microscopy[J]. Soft Matter, 2010, 6(12): 2842–2848.
- 48 Bryan Kaehr, Jason B Shear. Multiphoton fabrication of chemically responsive protein hydrogels for microactuation[J]. PNAS, 2008, 105(26): 8850–8854.
- 49 Eric T Ritschdorff, Rex Nielson, Jason B Shear. Multi-focal multiphoton lithography[J]. Lab Chip, 2012, 12(5): 867–871.