

生物激光打印技术及其应用

陈燕平¹ 杨如松² 柳 琰³ 魏立安² 冯 莹² 向 洋¹

¹长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南 长沙 410000

²国防科学技术大学光电科学与工程学院, 湖南 长沙 410073

³国防科学技术大学理学院, 湖南 长沙 410073

摘要 生物激光打印(BioLP)能够将含生物材料的极微量溶液精确打印在不同的位置而不致生物活性受损,是一种新型的生物打印技术。介绍了生物激光打印技术的原理、设备及其关键处理技术,以及该技术近年来的研究进展,并对其未来发展和挑战进行了展望。

关键词 生物光学; 生物激光打印; 组织工程; 微阵列; 单细胞分离

中图分类号 R318.51 **文献标识码** A

doi: 10.3788/LOP53.040001

Biological Laser Printing Technology and Its Applications

Chen Yanping¹ Yang Rusong² Liu Long³ Wei Li'an² Feng Ying² Xiang Yang¹

¹College of Chemical and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410000, China

²College of OptoElectronic Science and Engineering, National University of Defense Technology, Changsha, Hunan 410073, China

³College of Science, National University of Defense Technology, Changsha, Hunan 410073, China

Abstract Biological laser printing (BioLP) is a new cell printing technology, which can precisely print a trace amount of biomaterial droplets at different locations without bioactive damage. An overview of the biological laser printing is provided, including theory, equipment, key treatment techniques and latest progress. Finally, the challenges and future development of BioLP is forecasted.

Key words biotechnology; biological laser printing; tissue engineering; microarrays; isolation of single cells

OCIS codes 170.1420; 140.3450; 160.1435

1 引言

生物打印是在快速成型技术的基础上,结合生命科学、信息科学、材料科学和制造科学等发展而来的一种新型的组织工程技术。传统的生物打印技术大多基于挤出、喷射原理,利用热技术或者压电技术,促使液体通过由计算机控制的喷嘴产生液滴,按预先设定好的模型喷射液滴,从而实现具有一定结构的生物材料体系。传统生物打印技术的最大优势是成本较低,几乎所有的台式喷墨打印机经重装后都可用于生物材料的打印,因此发展相对完善^[1]。但是,喷墨打印技术在生物领域中应用时仍有很大局限^[2]:1) 喷墨针管的尺寸很小,故在打印过程中容易出现堵塞现象且不能进行高粘度液体打印;2) 墨水的频繁回填易造成生物材料之间的交叉污染;3) 打印过程中喷嘴的剪切应力和热环境极易造成对生物材料的损伤,使打印后生物材料活性降低。基于激光诱导前向转移(LIFT)的生物激光打印技术(BioLP)为克服传统生物打印技术的不足提供了新的可能。

生物激光打印技术是近年来在激光诱导前向转移基础上发展而来的。LIFT是一种直写技术,可将不同的材料打印成不同图案,并具有高空间分辨率。该技术最初用于转移固体薄膜材料^[3-4],通常是一束激光透过透明基体聚焦在固体薄膜上,使一小部分固体薄膜加热至熔融状态并凝结在接收基片上。然而,这种情

收稿日期: 2015-10-08; 收到修改稿日期: 2015-11-11; 网络出版日期: 2016-02-17

作者简介: 陈燕平(1990—),女,硕士研究生,主要从事生物激光打印等方面的研究。E-mail: 1250236651@qq.com

导师简介: 向 洋(1959—),男,教授,主要从事天然生物质化学方面的研究。E-mail: 1715056557@qq.com(通信联系人)

况显然不可能用于生物材料,因为过热会导致生物分子发生不可逆分解。随后人们开始尝试改进 LIFT 技术,改进后的 LIFT 分为两个阶段:第一阶段是 1999 年由美国海军实验室研究的基质辅助脉冲激光溅射直写技术(MAPLE-DW)^[6]。在被转移材料中掺杂经过冷冻处理的溶剂材料,结合 LIFT 技术,曾成功打印活的大肠杆菌和小鼠多能胚胎癌细胞^[6-7];第二阶段则把 MAPLE-DW 改进成为专门用于生物沉积,即由 Barron 等^[8]在 2004 年创建并命名为 BioLP 的生物打印技术。与 MAPLE-DW 技术相比较,BioLP 技术在靶板中的透明基体和生物材料之间增加了激光吸收层,这样不仅可避免激光与生物材料的直接作用,有效消除激光对生物材料的热损伤,而且由于溶液对部分常用激光器波长吸收系数小,引入吸收层可扩展可用激光波段^[9],因此在生物打印领域中,MAPLE-DW 技术逐渐被 BioLP 技术取代。

与传统生物打印技术相比,BioLP 技术有明显的优势。首先,作为一种无针管、无喷嘴技术,BioLP 可以有效解决常规打印方法中出现的问题,如微针点样或喷墨打印技术的针孔、喷嘴易堵塞的问题;其次,BioLP 是一种非接触式打印方法,可以采用多靶板沉积不同种类的生物材料而无需反复回填、清洗靶板,同时也避免了样品污染和培养基损坏;再者,由于激光本身具有峰值能量密度高、激光光斑尺寸小、方向性好、脉宽窄等特点,利用生物激光打印技术可制作微米量级甚至亚微米量级结构,具有极高的分辨率;除此之外,BioLP 所需的样品量极少,通常只需 5~10 μL 甚至更少,可以有效节省试剂费用并解决样品稀缺的问题;最后,BioLP 技术中的激光吸收层在溶液发生转移前可吸收激光的大部分热量,对溶液中所含生物物质的热损伤很小或几乎没有^[10],打印后的生物物质活性几乎可保持 100% 并且无明显损害^[11]。综上分析,生物激光打印技术能够将含生物材料的极微量溶液精确打印在不同的位置而不致生物活性受损,在生物医药和组织工程领域中有着广阔的发展前景^[12]。

2 生物激光打印设备及关键技术

生物激光打印技术是基于 LIFT 原理改进而来的,即脉冲激光透过透明基质聚焦在激光吸收层上,激光吸收层吸收了大部分热量,靠近激光吸收层的生物材料薄膜吸收少量热量后形成蒸汽泡,蒸汽泡在生物薄膜和空气交界处膨胀变形,从而迫使极微量的生物材料离开供体玻片沉积在接收玻片上。基于此原理,BioLP 设备主要由激光源、靶板和接收基片三部分组成,如图 1 所示。其中激光源主要采用单波长、单脉冲激光器,靶板则由透明基片、激光吸收层、生物溶液涂覆层组成,接收基片即涂覆缓冲层的载玻片。靶板中的透明基片通常采用对激光几乎零吸收的石英载玻片,激光吸收层则大多数采用金属或金属氧化物镀膜而成,也有少数采用高分子聚合物薄膜作为激光吸收层。生物溶液涂覆层是生物材料,如脱氧核糖核酸(DNA)、蛋白质、细胞等,配制而成的溶液。相对应的 BioLP 的关键技术也可以分为激光器的调制、靶板的制备、接收基板的处理三个部分。

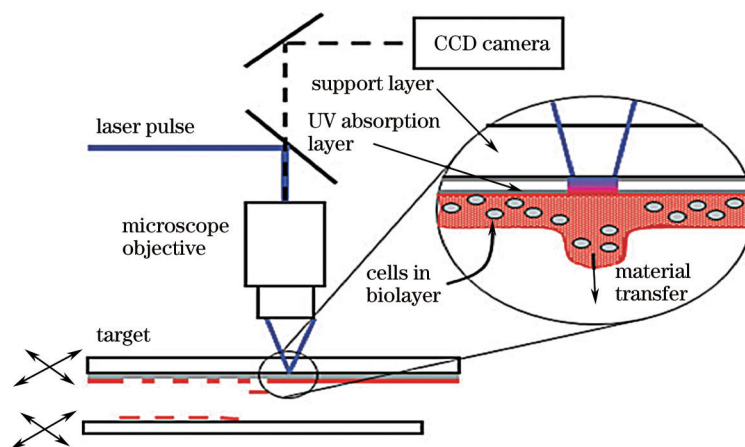


图 1 BioLP 原理、设备简图

Fig.1 Schematic of BioLP apparatus

2.1 激光的调制

在 BioLP 中,激光起到热源的作用,激光的能量密度、脉冲持续时间、脉冲频率、脉冲能量等参数,均对

打印过程及结果有明显的影响。Guillemot等^[13]理论分析说明,液膜中产生的气泡形态对射流过程有直接影响。射流产生要依靠气泡的挤压^[14],根据气泡产生位置距液面距离 h 与气泡半径 R 的比值,可以将射流过程分为低于阈值区域、射流区域、爆破区域,如图2所示。

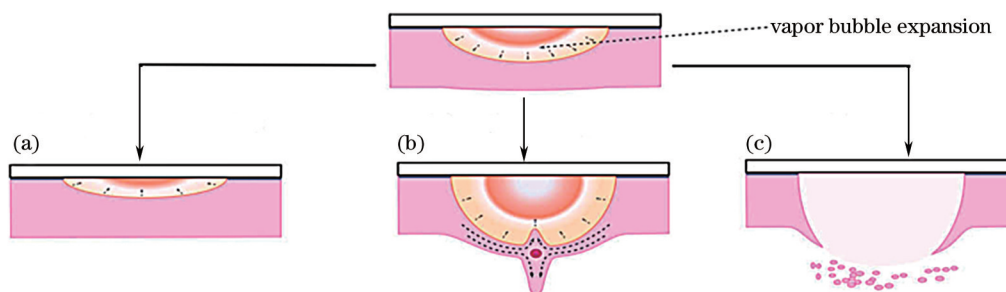


图2 三种不同的射流过程。(a) 低于阈值区域;(b) 射流区域;(c) 爆破区域

Fig.2 Three different jetting regimes. (a) Sub-threshold regime; (b) jetting regime; (c) plume regime

气泡的形态主要由激光的特性决定。Mezel等^[15]利用数值模拟分析了不同激光能量密度对射流过程的影响,发现激光能量密度会显著影响气泡大小,进而影响射流过程。该工作从理论上说明只有当激光能量密度达到某一阈值时,才能够产生射流。Serra等^[9]经实验研究表明,BioLP最终沉积的液滴尺寸与激光能量密度和激光光斑直径有关,如图3所示。随着激光光斑直径的增加,液滴体积也会变大,但光斑尺寸并不会改变产生射流的基本能量阈值 F_0 ,而在基本能量阈值之上,当激光的能量密度达到 F_1 ,所产生的射流才能够到达接收基片,从而在接收基片上形成液滴。

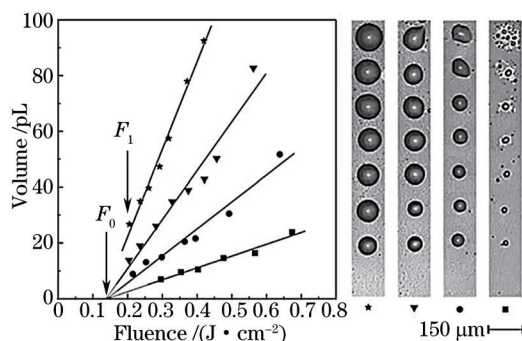


图3 液滴体积与不同激光光斑尺寸下激光能量密度的关系

Fig.3 Plot of transferred droplet volume versus laser pulse fluence with different beam dimensions

综上所述,为确保生物激光打印中液体能正常喷射,必须对激光能量进行调制,避免能量过低导致液滴无法喷射,或能量过高导致液滴的飞溅现象和生物材料失活。激光能量可以通过调谐激光功率或光阑孔径等方式来调制^[13]。

2.2 靶板的处理

靶板是一块经过处理的透明石英载玻片。该载玻片的一面首先涂覆一层厚为1~100 nm的金属或金属氧化物薄膜作为激光吸收层,再在激光吸收层上涂覆一层厚为10~100 μm 的生物材料膜。

2.2.1 激光吸收层

选择何种金属作为激光吸收层时必须考虑到金属的吸收系数和趋肤深度^[13],其必须具有较高的吸收系数,且涂层厚度要略高于趋肤深度。在现有的报道中,通常选用Ti、TiO₂或Au作为金属吸收层^[8,16],如表1所示。在红外波长范围内,由于钛的吸收系数比金更高(钛的吸收系数为45%,金的吸收系数为0.9%),钛更适合作为激光吸收层。而在紫外波长范围内,二者吸收系数(钛的吸收系数为55%,金的吸收系数为65.5%)近似,均可作为激光吸收层。除此之外,有许多不同类型的紫外吸收层,如聚合物薄膜也被证实可以达到类似打印效果。

值得指出的是,激光吸收层的热传递对吸收材料的厚度依赖性较小,只要激光吸收层的厚度大于穿透深度(表皮深度)即可。实验表明,激光能量经激光吸收层吸收转化后,剩余渗透到生物材料层厚度的热能可

以忽略不计(生物层厚度为 10~100 μm , 热能渗透厚度为 0~1 μm)。根据当前模型预测, 仅最接近吸收层的生物材料的 5% 受到热能影响, 且可能实际受影响的材料还要少得多, 因此, BioLP 打印后生物材料的活性几乎不受损。

表 1 BioLP 中金属吸收层使用的不同材料

Table 1 Different materials used in BioLP metal absorption layers

Laser absorption material	Thickness of materials used in BioLP /nm	Conductivity $/(\Omega^{-1} \cdot \text{m}^{-1})$	Skin depth /nm
Au	35	4.5×10^7	2.2
Ti	75	2.4×10^6	9.7
TiO ₂	85		10.5

2.2.2 生物材料层

生物材料层即被打印的“墨水”^[17], 细胞墨水由细胞、细胞培养基及基质材料的混合体构成^[17-19]。用于混合细胞的基质材料应尽可能模仿细胞外基质的结构和成分, 在大部分生物激光打印实验中采用具有良好生物相容性和成型特性且对细胞毒性低、易降解的海藻酸钠或 MatrigelTM 作为基质材料。蛋白质、DNA 则配成含少量表面活性剂 SDS(十二烷基磺酸钠)的去离子水或 PBS(磷酸缓冲液)溶液用于 BioLP 打印^[20-24]。除此之外, 为防止生物材料的混合液在转移过程中蒸发和干燥, 还需向混合液中添加甘油。由于甘油对于细胞生长存在一定有害影响, 有研究者使用其他添加剂, 如甲基纤维素, 降低甘油的有害影响。

靶板上生物材料的厚度可以通过将 SU-8 光刻胶或者 3M 铁氟龙胶带 (PTFE FILM TAPE#63) 贴在激光吸收层上形成深 20~100 μm 的吸收小孔来控制^[8,18], 如图 4 所示, 每个孔的尺寸大约为 0.01~4 cm^2 。

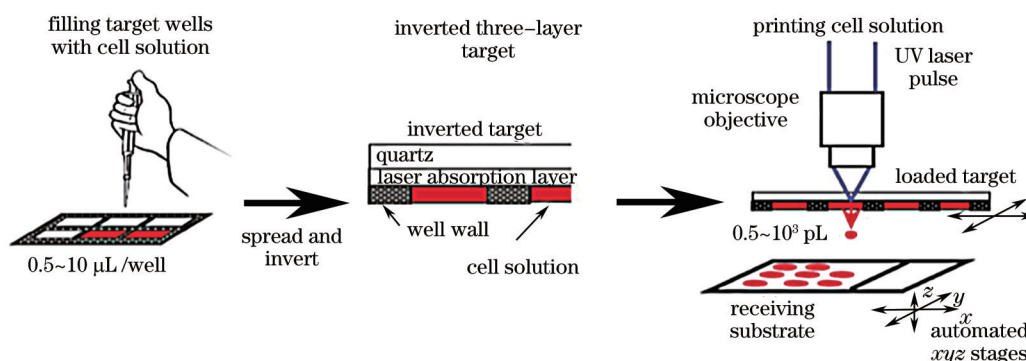


图 4 控制靶板上生物材料厚度的处理方法

Fig.4 Processing method to control the thickness of biological materials

2.3 接收基板处理

接收基板通常是一块表面涂有水凝胶层的载玻片, 平行置于靶板的下方, 并与靶板一同放置在三维移动平台上, 以接收被打印的生物液滴。接收基板上的水凝胶层对保持被打印后生物材料的活性起着重要作用。首先, 它可作为缓冲垫, 能有效减小生物材料打印在接收基层的冲击力时所造成的剪切损伤。其次, 水凝胶可以水合生物材料以防止微量的液滴从接收基底上蒸发。最后, 水凝胶中含有许多生长因子, 包括胶原蛋白和层粘连蛋白, 有利于打印后的生物体(细胞和细菌等)粘附在接收基底上并不断分化。Ringeisen 等^[7]发现打印多功能胚胎癌细胞时, 接收基板的涂层厚度对细胞活性有影响, 如果接收基板不放置任何缓冲物质, 则打印细胞的活性为 5%, 将接收基板上的涂层厚度从 20 μm 改为 40 μm 时, 细胞的活性也从 50% 升高至 95%。

3 生物激光打印的应用

3.1 BioLP 制备微米级微阵列

生物活性分子如 DNA 或蛋白质的微阵列^[25], 是发展基因组学、蛋白质组学、基因表达研究和生物医学诊断的基本工具^[26-29]。传统蛋白质微阵列的制备方式主要依赖于微针点样、喷墨点样和压电毛细管点样技术^[30-33]。这些方法因简单易行已较为成熟, 但也存在一些局限性, 如打印后生物分子活性不高及空间分辨不能满足要求等问题。一般情况下, 传统微阵列制备方法所沉积的生物分子活性在 75%~88% 之间, 沉积的微

点直径为 75~600 μm , 体积在 0.30~100 nL 范围内, 极少可以达到生物分子活性为 100%、液滴体积为皮升级或更小的微阵列的精确分布。传统微阵列制备方法的局限性促生了 BioLP 在微阵列制备中的应用, 成为制备微阵列最有潜力的技术之一。例如, Barron 等^[20]使用 BioLP 设备在 20~50 mJ/cm^2 激光能量密度范围内成功打印了牛血清蛋白(BSA)微阵列, 微滴直径在 30~125 μm 范围内, 微滴体积最小可达 0.5 pL, 所需的样品体积仅为 0.5~5 μL , 这有利于解决样品稀缺问题。此外, Colina 等^[18]利用 BioLP 技术成功打印了含 cDNA 的液滴到涂覆 L-聚赖氨酸的基片上, 形成了 90 μm (微滴可以更小, 但为保持和微针点样一致才设置此尺寸) 的规则微阵列, 并且通过与微针点样的 DNA 阵列的遗传信号对比, 发现 BioLP 打印后 DNA 的遗传信号与微针点样保持一致, 表明 BioLP 中的激光脉冲对 DNA 几乎不造成损伤。在制备微阵列的基础上, 开始对 BioLP 在医学检测和生化反应中的应用进行了进一步探究。Duocastella 等^[34]应用 BioLP 技术制备了含有兔免疫球蛋白(兔 IgG)的液滴微阵列, 在 1~8 μJ 的激光脉冲能量条件下沉积的微滴平均体积为 0.5~10.5 pL, 每个微阵列所消耗样品体积为 20 μL 。该实验组还将 BioLP 打印的兔 IgG 微阵列与 Cy5-兔抗 IgG 结合。实验结果表明, 二者发生良好的特异性免疫反应, 同时也证实了被转移的兔 IgG 仍保持着活性。

为了更高效地制造生物分子微阵列, 大量研究探讨了如何确定 BioLP 打印的各参数及各参数对打印效果的影响。Duocastella 等^[35]对 BioLP 不同参数的设置与沉积点形态的相关性进行了研究, 结果显示打印后的微滴体积与激光能量近似呈线性关系, 如图 5(a) 所示, 并且要使材料转移发生必须克服能量的最小阈值。还发现随着液体薄膜厚度的减小, 打印后液滴尺寸逐渐变小, 最小可以得到直径为 10 μm 的液滴。Guillotín 等^[36]发现生物墨水的黏度、激光能量和激光打印速度对 BioLP 细胞打印分辨率存在着不同程度的影响, 如生物墨水的黏度过小会引起溅射, 黏度过高会导致激光能量最小阈值的提高而使材料不易转移; 激光能量大小与液滴尺寸和均匀性有良好的相关性等。该课题组结合计算机辅助控制系统, 利用 BioLP 成功构建了奥运五环的特殊图案和人内皮细胞的微型组织结构, 如图 5(b) 所示。

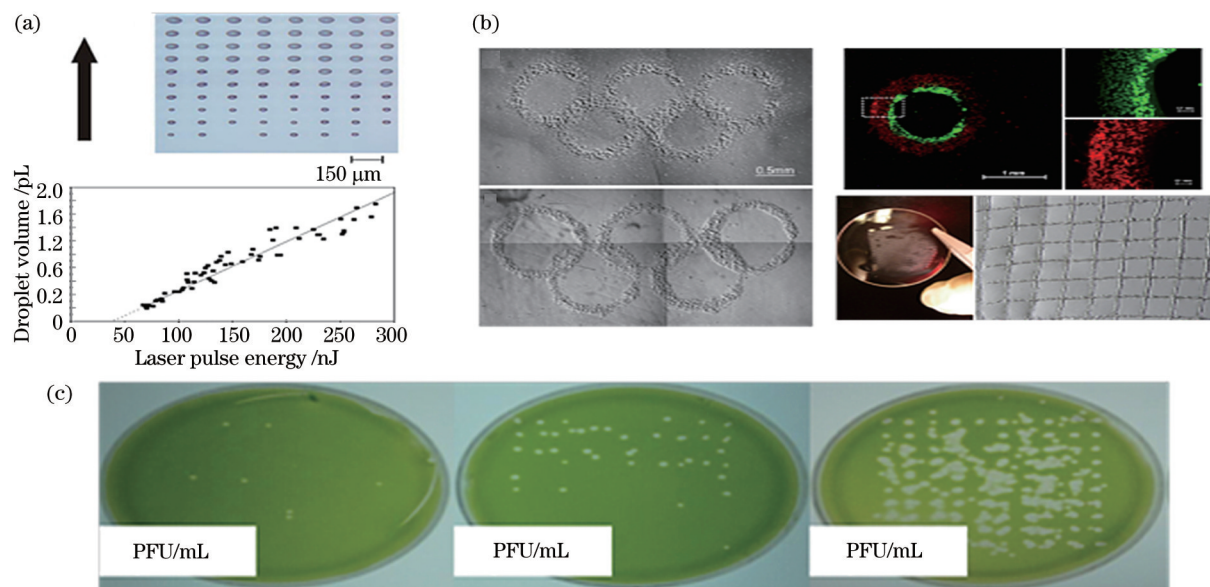


图 5 (a) BioLP 制备 DNA、蛋白质微阵列; (b) BioLP 在细胞图案化中的应用; (c) BioLP 分离单个小球藻病毒粒子
Fig.5 (a) BioLP applications on DNA, protein microarrays; (b) BioLP applications on cell patterning; (c) BioLP for isolating individual Chlorella virus particles

3.2 BioLP 打印单细胞、单孢子

单细胞、单孢子分离在生物工程中具有重要的意义。单细胞、单孢子诱变和选择可以使育种选种工作微生物化^[37-39], 从而大大提高无性系变异和选择的效率。传统的单细胞、单孢子分离法是在显微镜下使用单孢子分离器进行机械操作, 挑取单孢子或单细胞进行培养。这种单细胞分离法的难度与细胞或个体的大小成反比, 较大的微生物如藻类、原生动物较容易, 个体较小的细菌则较难。由于激光本身具有光斑尺寸小、方向性好、脉宽窄等优势, BioLP 可将单细胞、单孢子从组织或培养体上一步分离, 免除了传统分离方法的繁琐操作, 为单细胞、单孢子分离带来了福音。2005 年, Barron 等^[18]成功实现了人骨肉瘤单细胞的分离, 且活

性分析表明 BioLP 沉积的单个细胞活性达 100%。Ringeisen 等^[17]利用 BioLP 技术显微切割前列腺组织切片中的恶性单细胞,如图 6(b)所示,为 BioLP 技术在肿瘤医学研究中的应用奠定了基础。Fitzgerald 等^[40]首次报道了 BioLP 可用于打印小球藻病毒并成功从浓缩的病毒悬浮液中分离出单个病毒粒子,如图 5(c)所示,病毒悬浮液在低浓度(10^8 PFU/mL)时,每个沉积点所含病毒颗粒斑点 1 个或 0 个,浓度越高沉积点所含病毒斑点越多。实验中每个阵列所消耗的病毒悬浮液仅 2 μ L,沉积速率达每秒 10 滴,这不仅有利于快速筛查环境样品以发现新的病毒,还可以节省试剂费用并解决样品稀缺问题。

经数年发展, BioLP 对单细胞、单孢子的分离逐渐扩展到环境工程领域。在自然条件下,微生物常常在各种生态系统中群居杂聚。为了生产和科研的需要,人们常常需要从自然界混杂的微生物群体中分离出具有特殊功能的纯种微生物。传统的从环境样品如土壤或沉积物中分离微生物的方法一般需要经过预处理,即将固相土壤样品用无菌水配成菌悬液,进而提取微生物。这种方法往往破坏了对培养和研究微生物至关重要的邻近微生态系统。Ringeisen 等^[41]描述了一种既可以分离微生物培养基又可可将微生物群落直接从固相复合环境样品中进行空间分离的自动化、高通量的方法,即 BioLP。他们指出,利用 BioLP 可以实现环境微生物直接从土壤中一步分离,并且可通过调节 BioLP 的各个参数来控制打印后的土壤量,调节后土壤的沉积速率可超过 20 particle/s。他们还打印后的土壤微粒中微生物的活性、可培养性、形态进行了分析论证,结果表明 BioLP 可用于纯化微生物培养基或菌落,且使微生物的培养环境接近于自然环境的邻近微生态系统。

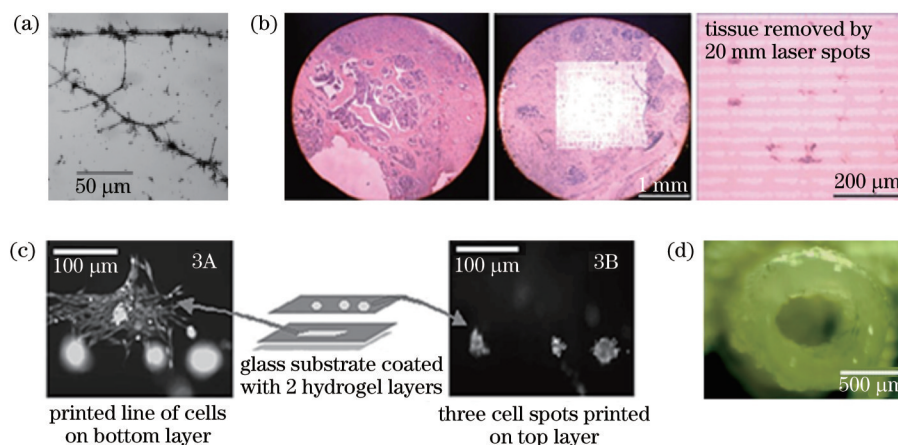


图 6 BioLP 在组织工程中的应用

Fig.6 BioLP applications on tissue engineering

3.3 BioLP 构建微管腔结构

人体组织是由多种类型的细胞和基质成分组成的复杂三维结构。自利用细胞打印技术构建体外组织结构的理念^[42]提出以来,越来越多课题组开始致力于开发各种适用于组织工程的新型细胞打印方法。然而,绝大部分细胞打印技术仍不能满足组织工程中微血管、神经系统构建时 10 μ m 以下的精度要求。生物激光打印技术的出现,使人们看到了解决该难题的可喜前景。Ringeisen 等^[17]发现通过 BioLP 技术不仅可以构建嗅鞘细胞的三维支架来植入体内以修复受损脊髓,而且可以用于不同细胞如嗅鞘细胞和大鼠皮层神经元细胞之间的相互作用的体外研究。还利用此技术创建了内皮细胞-平滑肌的有序网络,如图 6(a)所示,形成基本的干、枝船舶结构和微毛细管图形,使组织工程中最难解决的管腔结构的形成成为可能。

对于组织工程应用和组织修复中复合结构的构建而言,三维打印是关键技术^[43]。最初, Barron 等^[8]成功实现了对人骨肉瘤细胞的沉积,并用活/死测定法证明了细胞打印后存活率达到了 95%,且利用逐层叠加原理初步实现了细胞在三维空间的打印,如图 6(c)所示。之后 BioLP 三维打印日益成为研究热点, Guillemot 等^[43]提出了一个快速原型工作站并使用该工作在描述的实验条件(包括细胞密度、激光参数等)下实现了高通量高分辨率打印纳米羟基磷灰石,并得到了一些典型的多组分和三维打印模型。Yan 等^[44]在 2013 年成功地将非常粘稠的材料如藻酸盐打印成为具有良好结构的环形长管结构,如图 6(d)所示,通过调节激光能量密度和激光光斑尺寸,成功打印了直径为 3 mm 的 3D 海藻酸盐短管构建体。这些成果为进一步研究细胞

BioLP的3D打印提供了很好的借鉴,有助于人类实现体外制造与人体组织和器官具有相似生物功能的三维构造体。

4 结束语

生物激光打印技术是最具潜力的生物打印技术之一,国内外生物激光打印技术正处在蓬勃兴起的阶段,深入研究生物激光打印技术对我国生命科学的发展具有十分重要的意义。近年来生物激光打印技术虽在实现生物材料高分辨率高活性的空间分布方面取得了突破性的进展,但采用的生物激光打印技术沉积的多为二维微阵列结构或简单的细胞与生物材料复合层,仅探索性地开展了体外三维构造体的研究。虽然生物激光打印技术解决了组织工程中管腔结构的构建问题,使得体外再造复杂的组织或器官成为可能,但仍然面临着高通量打印生物材料的挑战,故与其他打印技术相结合,取长补短,将成为生物激光打印技术的另一个发展方向。

参 考 文 献

- 1 Yang Qiang, Cao Liangcai, Jin Guofan. Progress in optical focusing techniques aiming to suppress scattering effect in biomedical tissues[J]. Chinese J Lasers, 2015, 42(9): 0901001.
杨 强, 曹良才, 金国藩. 可抑制生物组织散射效应的光学聚焦技术研究进展[J]. 中国激光, 2015, 42(9): 0901001.
- 2 Skaradal A, Atala A. Biomaterials for integration with 3-D bioprinting[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2015, 43(3): 730-746.
- 3 Bohandy J, Kim B F, Adrian F J. Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser[J]. Journal of Applied Physics, 1986, 60(4): 1538-1539.
- 4 Fogarassy E, Fuchs C, Kerherve F, *et al.*. Laser-induced forward transfer of high-TcYBaCuO and BiSrCaCuO superconducting thin films[J]. Journal of Applied Physics, 1989, 66(1): 457-459.
- 5 Piqué A, Chrisey D B, Auyeung R C Y, *et al.*. A novel laser transfer process for direct writing of electronic and sensor materials [J]. Applied Physics A, 1999, 69(s1): S279-S284.
- 6 Ringeisen B R, Chrisey D B, Piqué A, *et al.*. Generation of mesoscopic patterns of viable *Escherichia coli* by ambient laser transfer[J]. Biomaterials, 2002, 23(1): 161-166.
- 7 Ringeisen B R, Kim H, Barron J A, *et al.*. Laser printing of pluripotent embryonal carcinoma cells[J]. Tissue Engineering Part A, 2004, 10(3-4): 483-491.
- 8 Barron J A, Wu P, Ladouceur H D, *et al.*. Biological laser printing: A novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns[J]. Biomedical Microdevices, 2004, 6(2): 139-147.
- 9 Serra P, Duocastella M, Fernández-Pradas J M, *et al.*. Laser-induced forward transfer: A laser-based technique for biomolecules printing[M]. //Ringeisen B R, Spargo B J, Wu P K. Cell and organ printing. Netherlands: Springer, 2010: 53-74.
- 10 Wang Xiaona, Xu Xi, Cao Chaojie, *et al.*. Research of heat accumulation of laser irradiated biological cells[J]. Acta Optica Sinica, 2015, 35(s1): s117001.
王晓娜, 徐 夕, 曹超杰, 等. 激光辐照生物细胞时热累积的研究[J]. 光学学报, 2015, 35(s1): s117001.
- 11 Chen C Y, Barron J A, Ringeisen B R. Cell patterning without chemical surface modification: Cell-cell interactions between printed bovine aortic endothelial cells (BAEC) on a homogeneous cell-adherent hydrogel[J]. Applied Surface Science, 2006, 252(24): 8641-8645.
- 12 Wang Ling, Tu Pei, Shi Ran, *et al.*. Quantitative evaluation of three-dimensional bio-printed hydrogel scaffolds by optical coherence tomography[J]. Chinese J Lasers, 2015, 42(8): 0804003.
王 玲, 涂 沛, 石 然, 等. 光学相干层析成像技术用于三维生物打印水凝胶支架结构的定量评价研究[J]. 中国激光, 2015, 42(8): 0804003.
- 13 Guillemot F, Guillotin B, Catros S, *et al.*. High-throughput biological laser printing: Droplet ejection mechanism, integration of a dedicated workstation, and bioprinting of cells and biomaterials[M]. //Ringeisen B R, Spargo B J, Wu P K. Cell and organ printing. Netherlands: Springer, 2010: 95-113.
- 14 Li Xuwei, Chen Chuanguo, Zhang Xianzeng, *et al.*. Influence of different defocus conditions on vapor channel induced by pulsed CO₂ laser[J]. Acta Optica Sinica, 2015, 35(2): 0217001.

- 李旭伟, 陈传国, 张先增, 等. 聚焦辐照条件对脉冲 CO₂激光诱导液体气穴通道效应的影响[J]. 光学学报, 2015, 35(2): 0217001.
- 15 Mézel C, Souquet A, Hallo L, *et al.*. Bioprinting by laser-induced forward transfer for tissue engineering applications: Jet formation modeling[J]. *Biofabrication*, 2010, 2(1): 65–117.
- 16 Patrascioiu A, Fernández-Pradas J M, Morenza J L, *et al.*. Film-free laser printing: Jetting dynamics analyzed through time-resolved imaging[J]. *Applied Surface Science*, 2014, 302(5): 303–308.
- 17 Ringeisen B R, Othon C M, Wu X, *et al.*. Biological laser printing (BioLP) for high resolution cell deposition[M]. //Ringeisen B R, Spargo B J, Wu P K. *Cell and organ printing*. Netherlands: Springer, 2010: 81–93.
- 18 Barron J A, Krizman D B, Ringeisen B R. Laser printing of single cells: Statistical analysis, cell viability, and stress[J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2005, 33(2): 121–130.
- 19 Koch L, Kuhn S H, Gruene M, *et al.*. Laser printing of skin cells and human stem cells[J]. *Tissue Engineering Part C*, 2009, 16(5): 847–854.
- 20 Barron J A, Young H D, Dlott D D, *et al.*. Printing of protein microarrays via a capillary-free fluid jetting mechanism[J]. *Proteomics*, 2005, 5(16): 4138–4144.
- 21 Ringeisen B R, Wu P K, Kim H, *et al.*. Picoliter-scale protein microarrays by laser direct write[J]. *Biotechnology Progress*, 2002, 18(5): 1126–1129.
- 22 Coliina M, Serra P, Fernandez-Pradas J M, *et al.*. DNA deposition through laser induced forward transfer[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2005, 20(8): 1638–1642.
- 23 Fernandezpradas J. Laser-induced forward transfer of biomolecules[J]. *Thin Solid Films*, 2004, 453(2): 27–30.
- 24 Serra P, Colina M, Fernández-Pradas J M, *et al.*. Preparation of functional DNA microarrays through laser-induced forward transfer[J]. *Applied Physics Letters*, 2004, 85(9): 1639–1641.
- 25 Wang Jiawei, Feng Ying, Wei Li'an. Reflectivity difference biosensor based on dual incident angles[J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(s2): s217002.
- 王佳伟, 冯莹, 魏立安. 基于双入射角度的反射率差分型生物传感器[J]. 光学学报, 2014, 34(s2): s217002.
- 26 Ahmad H, Sutherland A, Shin Y S, *et al.*. A robotics platform for automated batch fabrication of high density, microfluidics-based DNA microarrays, with applications to single cell, multiplex assays of secreted proteins[J]. *Review of Scientific Instruments*, 2011, 82(9): 094301.
- 27 Nagpal J K, Das B R. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management[J]. *Oral Oncology*, 2003, 39(3): 213–221.
- 28 Shalon D, Smith S J, Brown P O. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization[J]. *Genome Research*, 1996, 6(7): 639–645.
- 29 Wilson D S, Steffen N. Recent developments in protein microarray technology[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2003, 42(5): 494–500.
- 30 Schena M, Heller R A, Theriault T P, *et al.*. Microarrays: Biotechnology's discovery platform for functional genomics[J]. *Trends in Biotechnology*, 1998, 16(7): 301–306.
- 31 Hughes T R, Mao M, Jones A R, *et al.*. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(4): 342–347.
- 32 Rickman D S, Herbert C J, Aggerbeck L P. Optimizing spotting solutions for increased reproducibility of cDNA microarrays [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 31(18): e109.
- 33 Park J, Moon J, Shin H, *et al.*. Direct-write fabrication of colloidal photonic crystal microarrays by ink-jet printing[J]. *Journal of Colloid & Interface Science*, 2006, 298(2): 713–719.
- 34 Duocastella M, Colina M, Fernández-Pradas J M, *et al.*. Study of the laser-induced forward transfer of liquids for laser bioprinting[J]. *Applied Surface Science*, 2007, 253(19): 7855–7859.
- 35 Duocastella M, Fernández-Pradas J M, Domínguez J, *et al.*. Printing biological solutions through laser-induced forward transfer[J]. *Applied Physics A*, 2008, 93(4): 941–945.
- 36 Guillotin B, Souquet A, Catros S, *et al.*. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(28): 7250–7256.
- 37 Wu Jie, He Junrong, Qu Huijuan, *et al.*. Preliminary study on mutation of single-cells in potato by 60Co- γ irradiation[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(27): 57–61.
- 吴洁, 何俊蓉, 屈会娟, 等. 马铃薯单细胞 60Co- γ 辐射诱变的初步研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(27): 57–61.

- 38 Ono J K, McCaman R E. Identification of additional histaminergic neurons in Aplysia: Improvement of single cell isolation techniques for in tandem physiological and chemical studies[J]. *Neuroscience*, 1980, 5(5): 835–840.
- 39 Marcus J S, Anderson W F, Quake S R. Microfluidic single-cell mRNA isolation and analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(9): 3084–3089.
- 40 Fitzgerald L A, Wu P K, Gurnon J R, *et al.*. Isolation of the phycodnavirus PBCV-1 by biological laser printing[J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 167(2): 223–225.
- 41 Ringeisen B R, Rincon K, Fitzgerald L A, *et al.*. Printing soil: A single-step, high-throughput method to isolate micro-organisms and near-neighbour microbial consortia from a complex environmental sample[J]. *Methods in Ecology & Evolution*, 2015, 6(2): 209–217.
- 42 Thomas B, Valadimir M, Anna G, *et al.*. Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels[J]. *Anatomical Record Part A*, 2003, 272(2): 497–502.
- 43 Pirlo R K, Wu P, Liu J, *et al.*. PLGA/hydrogel biopapers as a stackable substrate for printing HUVEC networks via BioLP[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2011, 109(1): 262–273.
- 44 Yan J, Huang Y, Chrisey D B. Laser-assisted printing of alginate long tubes and annular constructs[J]. *Biofabrication*, 2013, 5(1): 015002.

栏目编辑: 吴秀娟