

软光刻法制备具有表面微结构的角蛋白膜

朱水洪^a 罗文昊^a 曾文斌^a 林友辉^{*,a} 刘向阳^{*,a,b}

(^a厦门大学物理系 生物仿生及软物质研究院 福建省柔性功能材料重点实验室 厦门 361005)

(^b新加坡国立大学物理系 新加坡 117542)

摘要 近年来,使用微纳米制造工艺将蛋白质或多肽进行高精度空间图案化,推动了细胞生物学、组织工程学、药物科学等领域的发展。同时,羊毛角蛋白作为一种储量大的天然生物蛋白质,具有优异的水溶性、良好的生物相容性和可控的降解性,但羊毛角蛋白通常不能自组装形成凝胶网络或其他不溶形式,因此,使用羊毛角蛋白制备如纤维、薄膜、凝胶等的成型结构存在很大困难。本工作通过使用化学修饰的方法,在角蛋白上接枝功能基团,使角蛋白获得光敏感性,探究了共价交联法制备具有表面微结构角蛋白膜的可行性。并用3D激光扫描显微镜、紫外可见近红外光谱仪和傅里叶变换显微红外光谱仪对薄膜结构进行了表征。结果表明,使用软光刻法可以得到表面微结构完整度很高的角蛋白膜。本工作对羊毛角蛋白共价交联法进行了实验探索,实验结果不仅为人们提供了一种软光刻技术制备具有表面微结构的角蛋白膜的方法,而且为羊毛角蛋白制备成型结构提供了新的途径。

关键词 羊毛角蛋白; 软光刻; 共价交联; 图案化; 表面微结构

Preparation of Free-standing Micropatterned Keratin Films by Soft Lithography

Zhu, Shuihong^a Luo, Wenhao^a Zeng, Wenbin^a Lin, Youhui^{*,a} Liu, Xiang Yang^{*,a,b}

(^a Department of Physics, Research Institute for Biomimetics and Soft Matter, Fujian Provincial Key Laboratory for Soft Functional Materials Research, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

(^b Department of Physics, National University of Singapore, 2 Science Drive 3, Singapore, 117542)

Abstract Recently, the use of micro-nano manufacturing processes to fabricate high-precision spatial patterns of proteins or peptides has provided important applications in cell biology, tissue engineering, pharmaceutical science, and optoelectronics. As a natural biological protein, wool keratin (WK) have excellent water solubility, good biocompatibility, and controllable degradability. However, WK usually cannot self-assemble to form a gel network or other insoluble forms. Therefore, it is difficult to prepare molded WK materials, such as a fiber, a film, and a gel. To solve this problem, this paper explores the feasibility of preparing photocrosslinkable WK. WK was extracted from wool fibres, and its side groups were reacted with the reagent 2-isocyanatoethyl methacrylate (IEM), yielding a photoactive WK precursor. And then, WK films with patterned microstructures were obtained by a covalent cross-linking method. This method can also be used to obtain other forms of WK materials. The as-prepared WK films were characterized by 3D laser scanning microscopy, UV-visible near-infrared spectroscopy and Fourier transform infrared microscopy. The experimental results showed that after two pattern shifts, the pattern on the WK film still maintained good integrity and conformed to the original pattern on the silicon wafer, which indicated that the pattern transfer method can achieve perfect reproduction of the pattern. In addition, we also demonstrated that the formation of structural colors caused by periodically arranged microstructures on WK films. Our experimental results not only provide a facile method to prepare WK films with surface microstructures by soft lithography but also give a new way for the preparation of molded WK. We expect the good optical properties and controlled degradation properties of WK open up new directions for the manufacture of biodegradable optics and implantable flexible microelectronic devices.

Keywords wool keratin; soft lithography; covalent cross-linking; patterns; surface microstructure

1 引言

软光刻技术作为一种易操作、环境友好、成本低廉、

功能多样化的图案化技术,在生物微纳米结构材料领域有很大的应用^[1]。其中,使用聚二甲基硅氧烷(PDMS)模板制备图案化蛋白质结构材料尤为受人关注^[2,3]。目前,

* E-mail: linyouhui@xmu.edu.cn; phyliuxy@nus.edu.sg

Received February 11, 2019; published April 29, 2019.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21771150, 21401154, U1405226), the 111 Project (No. B16029), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2014A030310005) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (No. 20720170011).

项目受国家自然科学基金(Nos. 21771150, 21401154, U1405226)、111计划(No. B16029)、广东省自然科学基金(No. 2014A030310005)及中央高校基本业务费(No. 20720170011)资助。

“自上而下”的刻蚀技术和“自下而上”自组装的技术,例如软刻蚀^[4,5]、浇铸^[6]、喷墨打印^[7,8]和压印^[9]等,促进了蛋白质微纳米结构的构建,同时力求平衡包括精度、易用性、可扩展性、可持续性、成本以及对蛋白质微纳米结构日益增加的复杂要求意味着更多的挑战^[10~13]。作为用于生物方面的微结构技术,软光刻克服了光刻的许多缺点^[14],提供了控制表面分子结构和生物学相关的复杂分子的能力,可以用于制造适合微流体的通道结构^[15]和控制细胞生长^[16~18]。

由于羊毛角蛋白(WK)具有良好的生物相容性,优异的机械性能和可控的生物降解性,从羊毛纤维获得的羊毛角蛋白在生物医学和制药领域中具有广泛的应用^[19]。但另一方面,由于羊毛角蛋白不易自组装的特性,羊毛角蛋白很难制备凝胶、纤维、薄膜和生物支架等结构,限制了羊毛角蛋白更广泛的实际应用^[20]。迄今,关于羊毛角蛋白制备成型的蛋白质结构的研究相对较少。对羊毛角蛋白进行简单地修饰,接枝上功能基团,使角蛋白获得光敏感性,与少量光引发剂混合后在紫外光作用下发生共价交联,从而形成不溶于水的空间网络结构,有望获得结构稳定的羊毛角蛋白薄膜。

本文结合软光刻技术与光刻技术,在没有显著改变蛋白结构和功能的前提下,得到表面带有微结构的羊毛角蛋白薄膜。最后使用 3D 激光扫描显微镜和傅里叶变换显微红外光谱仪等对所形成的蛋白质结构进行了形貌和结构的表征。

2 结果与讨论

2.1 光敏性角蛋白交联的机理

光敏性角蛋白属于负性光刻胶,即紫外光照射的区域发生交联,在后续显影的过程中不溶于显影液(本实验中显影液为水)中。光敏性角蛋白与光引发剂 Irgacure 2959 均匀混合,离心后旋涂在硅片或玻璃基底上以形成可控厚度的抗蚀剂层,然后通过光掩模在紫外光下曝光,光引发剂在紫外光的作用下产生自由基,自由基攻击丙烯酸根基团上的碳碳双键,发生聚合反应形成不溶于水的蛋白质共价化学交联网络,接着将未曝光的角蛋白光刻胶直接用水显影的方法去除,最后得到预期的角蛋白图案化微结构。

2.2 光敏性角蛋白的结构表征

为了证明羊毛角蛋白经过化学修饰之后, IEM 成功地接枝到角蛋白上,对修饰之后的羊毛角蛋白进行红外光谱分析和紫外-可见光谱分析。如图 1 所示,化学修饰之后的角蛋白(蓝色)相对纯角蛋白(绿色)在 1170 cm^{-1} (C—O 键伸缩振动)和 1720 cm^{-1} (C=O 键伸缩振动)处显示两个明显的峰位,这两个峰位是由修饰之后的 IEM 引入的,表明功能基团已成功修饰到蛋白质上。另外,在修饰之后的角蛋白红外谱图上不再观察到 IEM 中异

氰酸酯基团的峰位(2260 cm^{-1}),这表明修饰后的蛋白无残留异氰酸酯基团,该基团已在透析过程中水解或除去。为了进一步验证修饰之后的羊毛角蛋白可以在紫外光的作用下发生交联,对修饰之后的角蛋白进行紫外可见近红外光谱分析。如图 2 所示,将纯角蛋白、修饰之后未经光照的角蛋白和修饰之后进行紫外光照的角蛋白分别浸入水中,取上层清液做紫外可见近红外光谱分析。

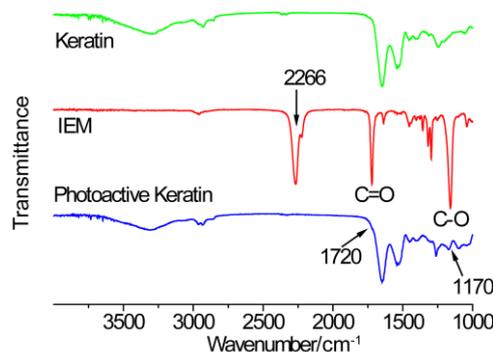


图 1 纯角蛋白, IEM 和光敏性角蛋白的红外光谱
Figure 1 Fourier transform infrared spectra of pure keratin, IEM and photosensitive keratin

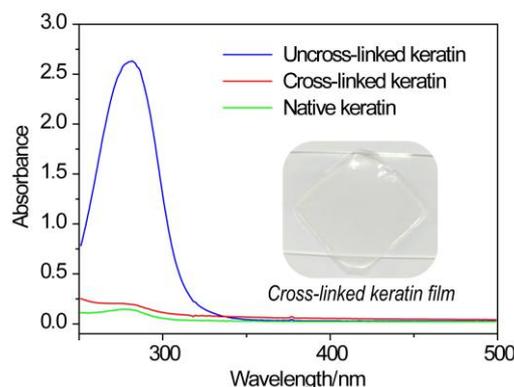


图 2 未交联的角蛋白、交联的角蛋白和纯角蛋白与水溶解后溶液的紫外可见光谱
Figure 2 UV-visible spectra of aqueous solutions of dissolved uncross-linked keratin, cross-linked keratin and pure keratin

从图 2 可以看到,交联之后的角蛋白性质稳定,在浸入水中之后基本不发生溶解,而未交联的角蛋白在浸水中后发生溶解,由于其中光引发剂 Irgacure 2959 的存在,吸光度在 270 nm 左右存在一个明显的特征峰,说明未经光照的角蛋白没有发生交联。图 2 中的插图也展示了,经过交联的角蛋白膜浸入水中之后也不发生明显的溶胀或者变形的现象,进一步说明经过交联之后的角蛋白膜的稳定性。

2.3 紫外光刻制备图案化聚二甲基硅氧烷(PDMS)模板

在光刻工艺中,加工及制备工艺都对最终得到的图

案有很大影响. 在清洗硅片时, 可以通过有机清洗和无机清洗两步清洗过程得到洁净表面的硅片, 再使用双氧水-浓硫酸清洗硅片表面, 在其表面修饰羟基基团. 清洗后的硅片需严格烘干, 提高光刻胶的黏附效果, 防止光刻胶在后续的显影过程中脱落. 在旋涂过程中, 转速对光刻胶层的厚度有很大影响, 而光刻胶的厚度越薄光刻图形分辨率也越高, 在经过多次试验探索后, 最终确定转速为 4000 r/min. 本实验采用 S-1805 型号的正性光刻胶, 经过紫外曝光之后, 曝光的区域在显影过程中被溶解, 而未被曝光的区域则不溶于显影液, 最终在硅片上得到与掩模板设计一致的图案. 将 PDMS 混合交联剂后倒在硅片表面上, 置于 60 °C 的烘箱中 4 h 使其交联成形, 得到图案化的 PDMS 模板.

2.4 不同间距的角蛋白光栅图形

修饰后的羊毛角蛋白具有光敏感性, 使用已修饰 IEM 的羊毛角蛋白作为光刻蚀剂, 制备图案化的角蛋白膜. 图 3 为修饰之后的羊毛角蛋白与 PDMS 模板通过流延法得到图案化的角蛋白膜的示意图. 将光敏性的角蛋白均匀地涂覆在 PDMS 模板上, 控制温湿度使其均匀成膜, 在紫外光下曝光 2 min, 使用镊子揭下, 即得到性质稳定的图案化角蛋白膜.

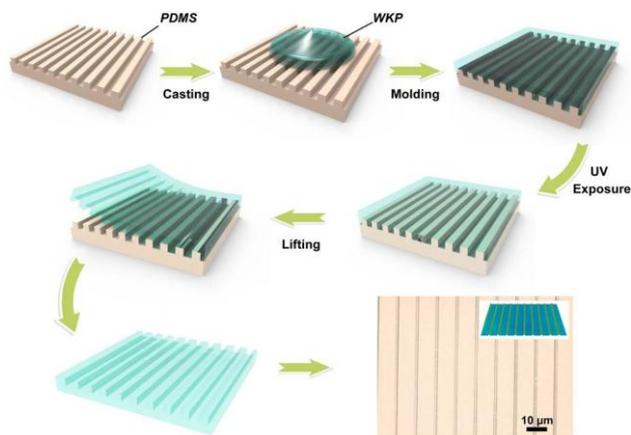


图 3 软光刻法制备具有表面微结构的羊毛角蛋白膜的示意图
Figure 3 Schematic illustration of preparation of wool keratin film with surface microstructure by soft lithography

如图 4 所示, 通过上述制备方法, 得到不同间距的光栅图形. 图 4a, 4b, 4c, 4d 的线宽都为 2 μm , 图 4a 的线间距为 2 μm , 图 4b 的线间距为 6 μm , 图 4c 为线间距 8 μm (左边)和线间距为 2 μm (右边)的线条, 图 4d 的线间距为 8 μm . 利用 3D 激光扫描显微镜, 通过激光三维扫描模式得到样品光学图像及其形貌的三维信息. 通过“VK 分析软件”处理图像数据得到图 4 中右上角的 3D 合成图.

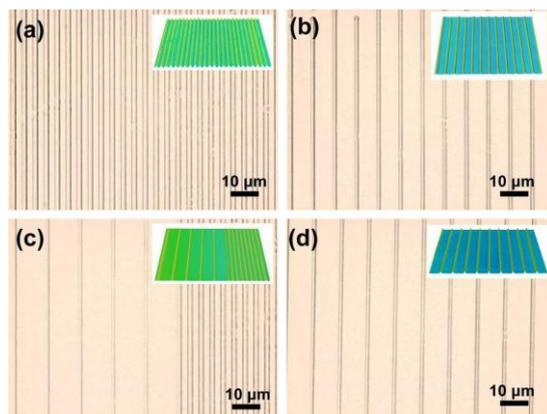


图 4 线宽为 2 μm 的不同间距线条角蛋白图案的激光扫描显微图像. (a) 线间距为 2 μm . (b) 线间距为 6 μm . (c) 线间距为 8 μm (左边)和线间距为 2 μm (右边). (d) 线间距为 8 μm

Figure 4 Laser scanning microscopy images of linear keratin microstructures with a line width of 2 μm and different spacings. (a) The line spacing is 2 μm . (b) The line spacing is 6 μm . (c) Line spacing is 8 μm (left) and line spacing is 2 μm (right). (d) Line spacing is 8 μm

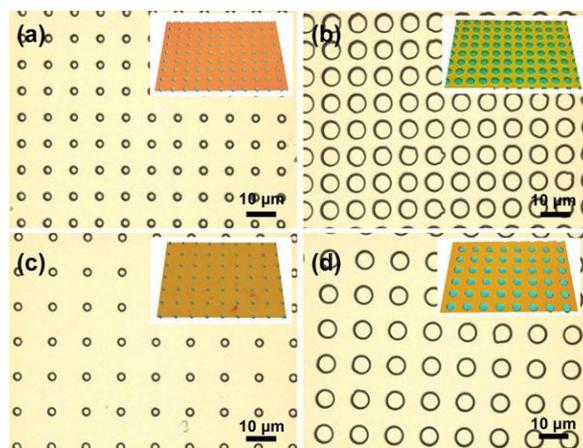


图 5 不同直径和间距的圆孔角蛋白图案的激光扫描显微图像
Figure 5 Laser scanning microscopic images of circular keratin microstructures with different diameters and spacings

2.5 不同直径和间距的圆孔角蛋白图案

如图 5 所示, 通过上述的制备方法, 也可得到不同直径和间距的圆孔羊毛角蛋白图案. 图 5a 是直径为 3 μm , 间距为 6 μm 的圆孔, 图 5b 是直径为 6 μm , 间距为 3 μm 的圆孔. 图 5c 是直径为 3 μm , 间距为 9 μm 的圆孔. 图 5d 是直径为 6 μm , 间距为 6 μm 的圆孔. 利用 3D 激光扫描显微镜, 通过激光三维扫描模式得到样品光学图像及其形貌的三维信息.

经过两次图案转移步骤, 图形从硅片转移至 PDMS 上变为阴性图形(图形与硅片相反), 再从 PDMS 转移至角蛋白膜上, 重新变为阳性图形, 不同线间距的图案化角蛋白膜仍能保持良好的图案完整性, 并与硅片上的原始图案相一致, 符合设计效果, 证明该图形转移方法能够实现图案的完整复制.

2.6 图案化角蛋白膜的结构光效果

微结构诱导产生的结构色在光子学、光电子学等领域有很大的应用. 结构色可以通过表面的相干或非相干光散射产生. 当光子结构周期小于光波长的一半时发生相干散射. 散射光产生精确有序的相长或相消干涉, 这导致光子禁带的产生, 只能看到几个波长的光. 相反, 当光子结构周期大于光的波长时发生非相干散射, 其中散射光的相位关系是随机的. 因此, 由于光的非相干散射, 二维周期性微结构阵列可能产生结构诱导的彩虹色. 在特定的视角下, 只有少数特定波长的光会产生相长干涉, 因此这些彩色光可以被观察到, 并且随着视角的改变会观察到色调的变化^[21~24]. 如图 6 所示, 字母“B”由 2 μm 的线条构成, 并且随着观察角度的变化, 其色调也会发生变化, 这是由光栅的衍射引起的. 角蛋白微图案产生的结构诱导彩虹开拓了角蛋白生物材料和软物质材料在光电子学上的应用前景, 并为这种多功能材料增加了重要功能.

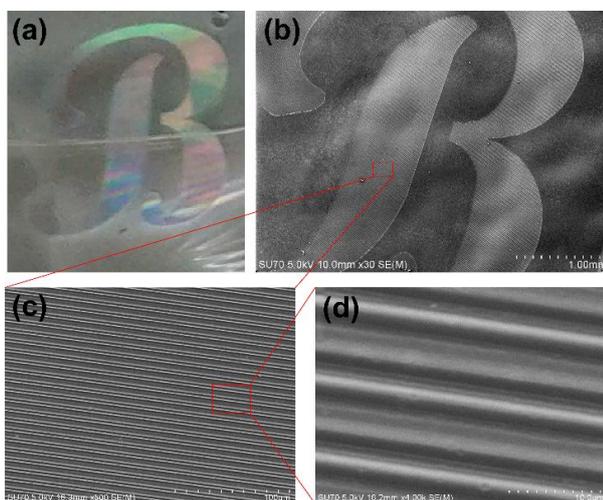


图 6 结构诱导彩虹色的图像(字母“B”)和扫描电子显微镜的放大图像

Figure 6 Structure-induced iridescent images (letter “B”) and corresponding magnified images of SEM

2.7 角蛋白膜的力学性能测试

为了研究紫外曝光前后羊毛角蛋白膜的机械性能变化, 使用微小拉力仪对紫外曝光前后的羊毛角蛋白膜进行拉伸测试, 对比交联前后羊毛角蛋白膜的力学性能变化. 在拉伸测试前, 使用膜厚仪测试角蛋白膜厚度为 $150 \pm 20 \mu\text{m}$. 如图 7 所示, 经过紫外光照交联的角蛋白膜相对未紫外光照交联的角蛋白膜的断裂强度提升, 可拉伸长度减小, 这是因为光照形成了空间交联的网络结构, 加强了角蛋白之间的结合力, 使断裂强度提升, 同时可拉伸的长度也减小.

2.8 角蛋白共价交联图案化的研究

经过化学修饰的羊毛角蛋白不仅可以通过软光刻制备图案化的角蛋白膜, 还可以利用光刻技术制备各种

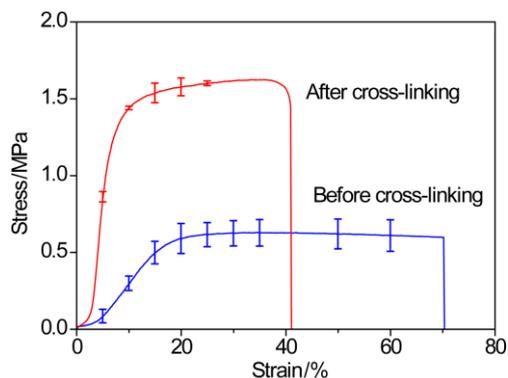


图 7 紫外光照前后角蛋白膜的力学性能测试

Figure 7 Mechanical properties test of keratin films before and after activation with ultraviolet light

复杂的微结构. 如图 8 所示, 利用化学修饰之后的角蛋白作为光刻蚀剂, 直接在玻璃/硅片基底上制备各种复杂形状图案.

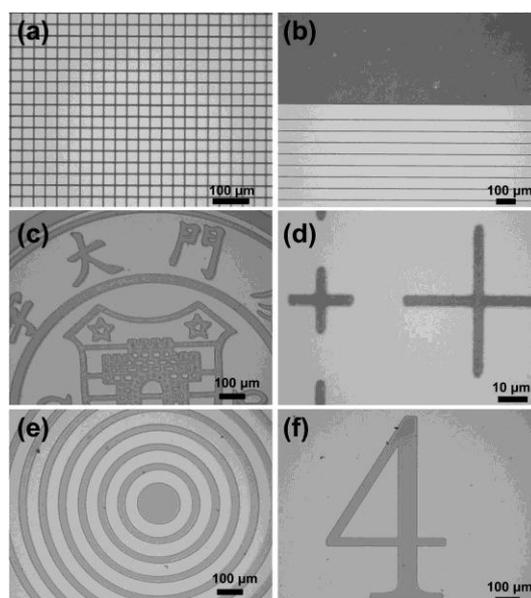


图 8 通过光刻法在硅片上形成不同角蛋白微结构的光学显微镜图像

Figure 8 Optical microscope images of different kinds of keratin microstructures on the silicon wafer by photolithography

3 结论

作为最具应用前景的图案化方法之一, 软光刻技术具有易操作、环境友好、成本低廉、功能多样化等优势. 本文展示了水溶性羊毛角蛋白的生物化学修饰的方法, 赋予角蛋白光致抗蚀性能, 使其可以通过软光刻法获得具有图案化结构的羊毛角蛋白膜, 解决了目前羊毛角蛋白很难制备成型结构的难题, 使羊毛角蛋白获得更广泛的应用. 结果证明, 经过两次图案转移步骤, 角蛋白膜上的图案仍能保持良好的完整性, 并与硅片上的原始图案相一致, 证明该图形转移方法能够实现图案的完

美复制. 另外, 本文也展示了在羊毛角蛋白膜上形成由周期性排列的微结构导致的结构色. 实验结果不仅有助于人们了解制备具有表面微结构的角蛋白膜的方法, 而且为羊毛角蛋白制备成型结构提供了新的途径. 羊毛角蛋白良好的光学性能和可控的降解性能也为制造可生物降解的光学器件和可植入柔性微电子器件开拓了新的发展方向. 此外, 由于生物蛋白的生物兼容性好, 该材料有望被进一步应用于生物医学领域^[25].

4 实验部分

4.1 角蛋白冻干粉的制备

取 6 g 九水合硫化钠, 24 g 脲素和 1.44 g 十二烷基硫酸钠(SDS), 依次加入到反应瓶中, 加超纯水至 50 mL, 并超声至完全溶解. 随后取 5 g 羊毛加入到反应瓶中, 使羊毛完全浸没于溶液中, 将反应瓶放入 60 °C 恒温干燥箱中, 保温溶解 8 h. 待羊毛完全溶解后, 将羊毛角蛋白溶液用 8500 r/min 的转速离心, 除去不溶的残渣, 将溶液装入截留分子量为 3500 Da 的透析袋中, 用去离子水进行透析处理 72 h, 即得到透明的角蛋白溶液^[26]. 将透析得到的角蛋白溶液放入 PEG-20000 (15 wt%) 溶液中进行反透析, 浓缩至浓度大于 5 wt%, 将得到的高浓度角蛋白溶液置于 -80 °C 的冰箱中冷冻, 最后, 将冷冻好的角蛋白溶液放入 -107 °C 冻干机中, 放置 72 h 使其冻干成粉末待用.

4.2 角蛋白的化学修饰

角蛋白光刻胶的合成是通过角蛋白上的羟基与甲基丙烯酸异氰基乙酯(IEM)的异氰酸根基团发生化学反应形成氨基酯键, 使角蛋白接枝上 IEM 分子. 在反应开始前, 将所有试剂和玻璃器皿彻底干燥以防止 IEM 过早的水解和分解. 所有玻璃器皿在 120 °C 下彻底干燥 24 h, 角蛋白则在 60 °C 下真空干燥 24 h. 将 0.75 g 角蛋白干粉以 1.5% (w/V) 的浓度溶解在二甲基亚砜(50 mL)中, 在整个溶解过程中, 该混合物在通入高纯氮气的气氛下持续搅拌, 在 60 °C 下反应 45 min 使角蛋白完全溶解. 随后将 IEM 以一定化学计量(94 μ L)加入到已经完全溶解的角蛋白溶液中, 在 60 °C 下反应 8 h, 使 IEM 与角蛋白上的羟基充分反应^[27,28]. 紧接着将产物转移到截留分子量为 3500 Da 的透析袋中, 在去离子水中透析 72 h, 将角蛋白原有的溶剂二甲基亚砜替换为水, 得到水基的角蛋白光刻胶.

4.3 微图案的设计与制备

用 CAD 制图软件设计所需要的微图案, 使用电子束曝光系统(EVES)制备具有设计图案的铬膜玻璃掩模板(深圳路维光电公司代加工). 将 S-1805 光刻胶滴加到硅片上, 以 4000 r/min 的转速旋转 30 s 使光刻胶均匀地涂覆在硅片表面. 再将硅片放置于 96 °C 烘胶台上烘干 4 min 除去光刻胶中的溶剂. 使用 MA6 光刻机进行光

刻, 选择硬接触曝光模式, 以 365 nm 宽带光源曝光 4 s 后取出硅片, 在显影液中显影 30 s, 溶解掉曝光区域的光刻胶, 未被曝光的区域不溶解在显影液中使光刻图形显现出来, 最后用氮气吹干.

4.4 聚二甲基硅氧烷模板的制备

分别称取一定质量的聚二甲基硅氧烷(PDMS)和交联剂溶液(w/w 10 : 1), 混合均匀后放入真空干燥箱中, 降低压力至 50 kPa 静置 15 min 除去气泡. 用 50 μ L 硅烷化试剂(二甲基二氯硅烷)处理图案化硅片 30 min, 增大其疏水性便于 PDMS 脱模. 将 PDMS 混合溶液倒入带有微图案的硅片表面, 待 PDMS 铺满表面后, 将其置于 60 °C 烘箱中交联 4 h 使 PDMS 固化成形. 用镊子将 PDMS 从硅片表面揭下, 得到表面带有微图案的 PDMS 模板^[29,30].

4.5 图案化角蛋白膜的制备

光引发剂 Irgacure 2959 以 2% (w/V) 的浓度溶解在已经修饰的角蛋白溶液中, 将溶液以 10000 r/min 的转速离心 15 min, 除去不溶的杂质, 得到澄清的角蛋白光刻胶溶液. 滴加 200 μ L 角蛋白光刻胶溶液至 PDMS 模板上, 使溶液均匀地涂覆在 PDMS 表面, 随后在 25 °C 恒温恒湿箱中放置 24 h, 使其形成平整透明的图案化角蛋白薄膜, 用镊子将其从 PDMS 表面揭下得到角蛋白薄膜. 该角蛋白薄膜需要进行后续的紫外光固化处理^[29,30] (曝光 2 min), 使角蛋白共价交联形成不溶于水的空间网络结构, 从而获得稳定的图案化角蛋白膜.

致谢

感谢厦门大学张秀明、于瑞、杨丽坤对于本研究样品表征的支持.

References

- [1] Kane, R. S.; Takayama, S.; Ostuni, E.; Ingber, D. E.; Whitesides, G. M. *Biomaterials* **1999**, *20*, 2363.
- [2] Xia, Y. N.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem.-Int. Ed.* **1998**, *37*, 550.
- [3] Duffy, D. C.; McDonald, J. C.; Schueller, O. J. A.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4974.
- [4] Boots, J. N. M.; Fokkink, R.; van der Gucht, J.; Kodger, T. E. *Rev. Sci. Instrum.* **2019**, *90*, 015108.
- [5] Wehner, M.; Truby, R. L.; Fitzgerald, D. J.; Mosadegh, B.; Whitesides, G. M.; Lewis, J. A.; Wood, R. J. *Nature* **2016**, *536*, 451.
- [6] Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 325.
- [7] Tao, H.; Marelli, B.; Yang, M.; An, B.; Onses, M. S.; Rogers, J. A.; Kaplan, D. L.; Omenetto, F. G. **2015**, *27*, 4273.
- [8] Kuang, M.; Wang, J.; Wang, L.; Song, Y. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 1889. (邝旻旻, 王京霞, 王利彬, 宋延林, 化学学报, **2012**, *70*, 1889.)
- [9] Bernard, A.; Renault, J. P.; Michel, B.; Bosshard, H. R.; Delamarche, E. *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 1067.
- [10] Nie, Z. H.; Kumacheva, E. *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 277.
- [11] Wang, Y.; Zhu, G.; Qi, W.; Li, Y.; Song, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *85*, 777.
- [12] Ye, C.; Kulkarni, D. D.; Dai, H.; Tsukruk, V. V. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 4364.
- [13] Luo, W.; Zhu, S.; Lin, Y.; Liu, X. Y. *Acta Chim. Sinica* **2017**, *75*, 1010. (罗文昊, 朱水洪, 林友辉, 刘向阳, 化学学报, **2017**, *75*, 1010.)

- [14] Unger, M. A.; Chou, H. P.; Thorsen, T.; Scherer, A.; Quake, S. R. *Science* **2000**, 288, 113.
- [15] Lin, Z.-Y.; Xue, S.-F.; Chen, Z.-H.; Han, X.-Y.; Shi, G.; Zhang, M. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 8248.
- [16] Filippini, L.; Livingston, P.; Kaspar, O.; Tokarova, V.; Nicolau, D. V. *Biomed. Microdevices* **2016**, 18, 9.
- [17] Galeotti, F.; Andicsova, A.; Yunus, S.; Botta, C. *Soft Matter* **2012**, 8, 4815.
- [18] Fernandes, T. G.; Diogo, M. M.; Cabral, J. M. S. In *Stem Cell Bioprocessing: For Cellular Therapy, Diagnostics and Drug Development*, Vol. 5, Woodhead, Netherlands, **2013**, p. 143.
- [19] Rouse, J. G.; Van Dyke, M. E. *Materials* **2010**, 3, 999.
- [20] Tu, H.; Yu, R.; Lin, Z.; Zhang, L.; Lin, N.; Yu, W. D.; Liu, X. Y. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, 26, 9032.
- [21] Pal, R. K.; Kurland, N. E.; Wang, C.; Kundu, S. C.; Yadavalli, V. K. *ACS Appl. Mater. Inter.* **2015**, 7, 8809.
- [22] Guglielmelli, A.; Nematii, S. H.; Vasdekis, A. E.; De Sio, L. *J. Phy. D: Appl. Phys.* **2019**, 52, 053001.
- [23] Yang, M. S.; Song, C.; Choi, J.; Jo, J. S.; Choi, J. H.; Moon, B. K.; Noh, H.; Jang, J. W. *Nanoscale* **2019**, 11, 2326.
- [24] Prum, R. O.; Torres, R. H.; Williamson, S.; Dyck, J. *Nature* **1998**, 396, 28.
- [25] Yin, J.; Duan, Y.; Shao, Z. *Acta Chim. Sinica* **2014**, 72, 51. (尹建伟, 段郁, 邵正中, *化学学报*, **2014**, 72, 51.)
- [26] Shavandi, A.; Silva, T. H.; Bekhit, A. A.; Bekhit, A. E. A. *Biomater. Sci.* **2017**, 5, 1699.
- [27] Kurland, N. E.; Dey, T.; Kundu, S. C.; Yadavalli, V. K. *Adv. Mater.* **2013**, 25, 6207.
- [28] Kurland, N. E.; Dey, T.; Wang, C.; Kundu, S. C.; Yadavalli, V. K. *Adv. Mater.* **2014**, 26, 4431.
- [29] Sun, Y.; Jallerat, Q.; Szymanski, J. M.; Feinberg, A. W. *Nat. Methods* **2015**, 12, 134.
- [30] Whitesides, G. M.; Ostuni, E.; Takayama, S.; Jiang, X. Y.; Ingber, D. E. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2001**, 3, 335.

(Cheng, B.)