



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110703372 B

(45) 授权公告日 2021.05.07

(21) 申请号 201910881861.8

C12N 9/36 (2006.01)

(22) 申请日 2019.09.18

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110703372 A

CN 109810167 A, 2019.05.28

WO 2010126640 A2, 2010.11.04

(43) 申请公布日 2020.01.17

Yaoming Liu et al. 3D femtosecond

laser patterning of collagen for directed cell attachment. 《Biomaterials》. 2005, 第26卷(第22期),

(73) 专利权人 清华大学  
地址 100084 北京市海淀区清华园1号  
专利权人 北京理工大学

孙思明等. 飞秒激光直写制备蛋白质功能化器件. 《激光与光电子学进展》. 2013,

(72) 发明人 姜澜 俞嘉晨 闫剑锋

Anatoliy Y. Vorobyev et al. Direct

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11201

femtosecond laser surface

代理人 罗文群

nanomicrostructuring and its

(51) Int. Cl.

applications. 《LASER & PHOTONICS REVIEWS》

G02B 5/18 (2006.01)

.2012,

G01N 21/01 (2006.01)

审查员 董亚方

G02B 1/04 (2006.01)

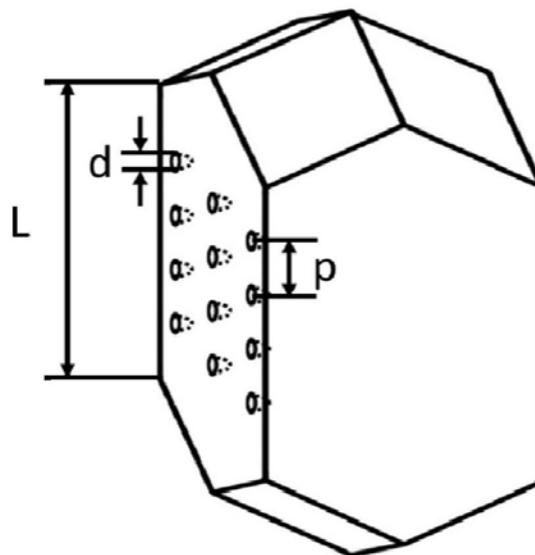
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

## (54) 发明名称

一种蛋白质基体微透镜阵列衍射器件及其制备方法

## (57) 摘要

本发明涉及一种蛋白质基体微透镜阵列衍射器件及其制备方法,属于生物检测设备技术领域。该蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的基体为蛋白质晶体,蛋白质晶体上最大边长L所在的一个表面上加工有微透镜状凸起阵列。本发明d1蛋白质基体微透镜阵列衍射器件,将测量量转化为衍射图样的形状、分布、间距等更容易测量的物理量,提高了检测精度和灵活性。本发明的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件制备方法,使用蛋白质单晶作为微透镜阵列衍射器件的基体,在溶液环境中更稳定,使用寿命更长,使用范围更广泛。本发明的微透镜阵列加工的方法为使用飞秒激光加工,直接形成微凸起,加工简便,热损伤小。



1. 一种蛋白质基体微透镜阵列衍射器件,其主要特征在于:该蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的基体为蛋白质结晶体,蛋白质结晶体的最大边长 $L$ 为 $100-500\mu\text{m}$ ;蛋白质结晶体上最大边长 $L$ 所在的一个表面上加工有微透镜状凸起阵列,微透镜状凸起阵列中各微透镜状凸起之间的间距 $p$ 为 $10-100\mu\text{m}$ ;微透镜状凸起的直径 $d$ 为 $2-10\mu\text{m}$ ,微透镜状凸起的高度 $h$ 为 $0.05-2\mu\text{m}$ 。

2. 一种蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的制备方法,其特征在于该制备方法包括以下步骤:

(1) 制备蛋白质结晶体,过程如下:

(1-1) 将蛋白质固体与质量百分比浓度为 $2\%-5\%$ 的盐溶液相互混合,得到蛋白质溶液,蛋白质溶液中,蛋白质的质量分数为饱和溶液质量分数的 $1\sim 3$ 倍,调节蛋白质溶液的 $\text{pH}$ 值为 $4\sim 6$ ,所述的盐为氯化钠和乙酸钠;

(1-2) 将步骤(1-1)配置的蛋白质溶液置于容器中,在室温下静置 $6\sim 24\text{h}$ ,通过蛋白质溶液中的水自然蒸发,析出蛋白质结晶体;

(2) 使飞秒激光入射到步骤(1)得到的蛋白质结晶体表面,所述的飞秒激光的脉冲持续时间为 $35\sim 120\text{fs}$ ,飞秒激光单脉冲能量为蛋白质烧蚀阈值的 $0.5$ 倍,飞秒激光重复频率为 $1\sim 1000\text{Hz}$ 。

## 一种蛋白质基体微透镜阵列衍射器件及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种蛋白质基体微透镜阵列衍射器件及其制备方法,属于生物检测设备技术领域。

### 背景技术

[0002] 蛋白质材料由于生物相容性和独特的生物活性在许多领域得到了广泛的应用。由于蛋白质分子具有多级结构,其结构受到外界温度、环境中其它分子或离子的影响,其分子结构、物理化学性质等会产生相应变化,因此基于蛋白质材料的微结构或器件对于环境具有独特的相应特性。

[0003] 目前有一些研究中将生物材料的这一性质应用在了生物传感器领域,实现了对于环境pH等的检测,主要原理是通过蛋白质基体的光波导对周围环境的响应,改变光波导的光学性质,从而改变了光波导输出的光强。这类方法由于测量参数只有光波导后方的光强,可以测量的维度较少且对于传感器要求较高,同时会受到其它一些因素的干扰,还没有得到广泛的应用。另外非晶态的蛋白质在环境中稳定性较差,容易降解。

[0004] 一种新型的光学器件微透镜阵列通过将结构均匀的微透镜按照一定周期排列在一平面上,在微光学系统、光束整形、光学传感等功能。例如专利“微透镜阵列、光学检测装置及微透镜阵列制备方法”(申请号201711429305.4)描述了一种集成于微流道系统中的微透镜阵列,可以实现对微流道内纳米物体的检测。但目前的微透镜阵列主要材料还是无机材料,对于环境的响应依赖于折射率等光学性质,对生物监测的能力较弱。

[0005] 因此,蛋白质基体的微阵列器件是一种有可观实用前景的生物检测器件。受限于蛋白质材料本身对于环境温度等因素等的敏感性,基于蛋白质的微器件加工本身存在一定的挑战,尽量减小蛋白质材料加工过程中的热影响,简化加工步骤也是蛋白质微加工的主要挑战。目前一些方法利用飞秒激光等加工手段,实现了高精度、热影响区域小、使用材料范围广泛的微纳加工,已经被应用于许多生物材料、透明材料等的加工中。例如申请中的专利“飞秒激光在单个蛋白质晶体上加工微纳结构的方法及系统”(申请号2019103009814)提出了利用飞秒激光加工蛋白质单晶的方法及系统,可以在蛋白质单晶上烧蚀出精度在1-10  $\mu\text{m}$ 的微结构,但是这种方法主要是利用了高于蛋白质烧蚀阈值的飞秒激光脉冲,对于利用低于烧蚀阈值的飞秒激光改性实现微凸起结构制备微透镜还没有相关方法。

### 发明内容

[0006] 本发明提出了一种蛋白质基体微透镜阵列衍射器件及其制备方法,对已有的飞秒激光加工蛋白质单晶的方法进行改进,利用低于烧蚀阈值的飞秒激光改性,实现微凸起结构制备微透镜,在蛋白质结晶体的表面上加工出周期性排列的微透镜阵列形成的器件。

[0007] 本发明提出的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件,该蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的基体为蛋白质结晶体,蛋白质结晶体的最大边长L为100-500 $\mu\text{m}$ ;蛋白质结晶体上最大边长L所在的一个表面上加工有微透镜状凸起阵列,微透镜状凸起阵列中各微透镜状凸起

之间的间距 $p$ 为 $10-100\mu\text{m}$ ;微透镜状凸起的直径 $d$ 为 $2-10\mu\text{m}$ ,微透镜状凸起的高度 $h$ 为 $0.05-2\mu\text{m}$ 。

[0008] 本发明提出的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的制备方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 制备蛋白质结晶体,过程如下:

[0010] (1-1) 将蛋白质固体与质量百分比浓度为 $2\%-5\%$ 的盐溶液相互混合,得到蛋白质溶液,蛋白质溶液中,蛋白质的质量分数为饱和溶液质量分数的 $1\sim 3$ 倍,调节蛋白质溶液的 $\text{pH}$ 值为 $4\sim 6$ ;

[0011] (1-2) 将步骤(1-1)配置的蛋白质溶液置于容器中,在室温下静置 $6\sim 24\text{h}$ ,通过蛋白质溶液中的水自然蒸发,析出蛋白质结晶体;

[0012] (2) 使飞秒激光入射到步骤(1)得到的蛋白质结晶体表面,所述的飞秒激光的脉冲持续时间为 $35\sim 120\text{fs}$ ,飞秒激光单脉冲能量为蛋白质烧蚀阈值的 $0.5-1$ 倍,飞秒激光重复频率为 $1\sim 1000\text{Hz}$ 。

[0013] 本发明提出的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件及其制备方法,其优点是:

[0014] 1、利用本发明方法制备的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件,作为生物检测器件,具有独特的响应特性,生物相容性好的特点;与已有的利用生物材料的检测器件,例如利用蛋白质基体光波导检测光波导输出光强变化实现生物检测的方法等相比,本发明的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件,将测量量转化为衍射图样的形状、分布、间距等更容易测量的物理量,提高了检测精度和灵活性。

[0015] 2、本发明的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件制备方法,使用蛋白质单晶作为微透镜阵列衍射器件的基体,在溶液环境中更稳定,使用寿命更长,使用范围更广泛。

[0016] 3、本发明的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件制备方法,微透镜阵列加工的方法为使用飞秒激光加工,直接形成微凸起,加工简便,热损伤小。

## 附图说明

[0017] 图1为本发明方法制备的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的结构示意图。

[0018] 图2为微透镜阵列中每一个微透镜的侧面放大示意图。

[0019] 图3为本发明实施例制备的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的使用状态图。

[0020] 图4为本发明实施例制备的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的结构图和使用效果图,其中(a)是微凸起状的微透镜阵列示意图,(b)是待微透镜阵列衍射器件在待测溶液环境中时形成的衍射图案。

[0021] 图3中,1是连续激光器,2是蛋白质基体微透镜阵列衍射器件,3为透明比色皿,4为蛋白质基体微透镜的后焦面,5是镜筒,6是成像系统。

## 具体实施方式

[0022] 本发明提出的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件,其结构如图1所示,该蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的基体为蛋白质结晶体,蛋白质结晶体的最大边长 $L$ 为 $100-500\mu\text{m}$ ;蛋白质结晶体上最大边长 $L$ 所在的一个表面上加工有微透镜状凸起阵列,微透镜状凸起阵列中各微透镜状凸起之间的间距 $p$ 为 $10-100\mu\text{m}$ ;微透镜状凸起的直径 $d$ 为 $2-10\mu\text{m}$ ,微透镜状凸起的高度 $h$ 为 $0.05-2\mu\text{m}$ 。

[0023] 本发明提出的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的制备方法,包括以下步骤:

[0024] (1) 制备蛋白质结晶体,过程如下:

[0025] (1-1) 将蛋白质固体与质量百分比浓度为2%-5%的盐溶液相互混合,得到蛋白质溶液,蛋白质溶液中,蛋白质的质量分数为饱和溶液质量分数的1~3倍,调节蛋白质溶液的pH值为4~6;

[0026] (1-2) 将步骤(1-1)配置的蛋白质溶液置于容器中,在室温下静置6~24h,通过蛋白质溶液中的水自然蒸发,析出蛋白质结晶体;

[0027] (2) 使飞秒激光入射到步骤(1)得到的蛋白质结晶体表面,所述的飞秒激光的脉冲持续时间为35~120fs,飞秒激光单脉冲能量低于蛋白质的烧蚀阈值,但能够使蛋白质改性并形成微凸起,取为蛋白质烧蚀阈值的0.5-1倍,飞秒激光重复频率为1~1000Hz。通过控制加工光路中的衰减片控制飞秒激光单脉冲能量,通过控制加工光路中的快门和平移台,将飞秒激光聚焦在成周期性排列的待加工微透镜的位置,逐个加工出微凸起结构,形成微透镜阵列衍射器件。

[0028] 以下结合附图,详细介绍本发明内容:

[0029] 如图1所示为微透镜阵列衍射器件的示意图,该蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的基体为蛋白质自然结晶体,自然晶体的最大边长L为100-500 $\mu\text{m}$ ;自然晶体的最大边长L所在的表面上加工有微透镜状凸起阵列,微透镜状凸起阵列中各微透镜状凸起之间的间距p为10-100 $\mu\text{m}$ ;如图2所示为阵列中每一个微透镜的侧面放大示意图,阴影部分为蛋白质,微透镜状凸起的直径d为2-10 $\mu\text{m}$ ,微透镜状凸起的高度h为0.05-2 $\mu\text{m}$ 。箭头为光线方向,平行入射的光可以通过曲面被聚焦,由几何关系可得微透镜的焦距f可以由下式求得,其中n为蛋白质晶体折射率:

$$[0030] \quad f = \frac{h^2 + d^2 / 4}{2h(n-1)}。$$

[0031] 对本发明蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的验证光路如图3所示,当一束激光垂直入射加工有微透镜阵列的晶体表面后,在微透镜的后焦面会形成衍射图案。对于不同的环境溶液,其衍射图案的位置、形状、强度分布与蛋白质及周围环境的形状参数和光学性质有关,这些参数受到环境中溶液分子、离子浓度影响。通过这一原理,可以实现对于不同溶液中的分子、离子浓度的检测。

[0032] 本发明还提出的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的制备方法,包括以下步骤:

[0033] (1) 制备蛋白质结晶体,过程如下:

[0034] (1-1) 将蛋白质固体与质量百分比浓度为2%-5%的盐溶液相互混合,得到蛋白质溶液,蛋白质溶液中,蛋白质的质量分数为饱和溶液质量分数的1~3倍,调节蛋白质溶液的pH值为4~6;

[0035] (1-2) 将步骤(1-1)配置的蛋白质溶液置于容器中,在室温下静置6~24h,通过蛋白质溶液中的水自然蒸发,析出蛋白质结晶体;

[0036] (2) 使飞秒激光入射到步骤(1)得到的蛋白质结晶体表面,所述的飞秒激光的脉冲持续时间为35~120fs,单脉冲能量低于蛋白质的烧蚀阈值但能够使蛋白质改性并形成微凸起,取为蛋白质烧蚀阈值的0.5-1倍,重复频率为1~1000Hz。通过控制加工光路中的衰减片控制飞秒激光单脉冲能量,通过控制加工光路中的快门和平移台,每次将飞秒激光聚焦

在成周期性排列的待加工微透镜的位置,逐个加工出微凸起结构,形成微透镜阵列衍射器件。

[0037] 上述方法中的盐为氯化钠和乙酸钠。

[0038] 下面结合实施例,进一步介绍本发明的内容:

[0039] 本实施例以鸡蛋白溶菌酶晶体为例,在蛋白质晶体表面加工出微透镜阵列,器件结构如图1所示,其中蛋白质晶体为通过一般结晶方法培养的最大边长 $L$ 在 $100-500\mu\text{m}$ 的鸡蛋白溶菌酶晶体;晶体表面的微透镜阵列的间距为 $10\mu\text{m}$ ;微透镜的半径和高度,在设计加工参数下,由原子力显微镜表征得到 $d=3\mu\text{m}$ , $h=1\mu\text{m}$ 。

[0040] 本发明方法中使用的飞秒激光器为Coherent公司生产的钛蓝宝石飞秒激光器,中心波长 $800\text{nm}$ ,脉宽 $<35\text{fs}$ 。

[0041] 实施例1:在蛋白质晶体表面制备间距为 $10\mu\text{m}$ 的微凸起状的微透镜阵列:

[0042] (1-1) 本实施例中以鸡蛋白溶菌酶作为蛋白质原料,过饱和溶液的成分为:鸡蛋白溶菌酶粉末 $30\text{mg/ml}$ ,氯化钠 $2.5\%$ (质量分数),乙酸钠 $1.36\%$ (质量分数)。

[0043] (1-2) 取 $3\text{ml}$ (1-1)中所配的溶液加入透明比色皿中,在温度为 $23^\circ\text{C}$ ,相对湿度 $30\%$ 环境中自然蒸发 $24\text{h}$ ,直到在透明比色皿的侧壁上观察到结晶出的最大边长为 $100-500\mu\text{m}$ 左右的蛋白质晶体。

[0044] (2-1) 使飞秒激光从侧面入射到装有蛋白质晶体的透明比色皿表面,并通过10倍物镜聚焦在蛋白质晶体与透明比色皿侧壁平行的表面,通过光路中的衰减片控制激光能量,通过光路中的快门的开闭控制激光是否入射。首先打开快门,用单脉冲能量为 $100\text{nJ}$ 的飞秒激光聚焦后加工蛋白质晶体表面,烧蚀坑所在位置标记为激光焦点所在位置。

[0045] (2-2) 采用飞秒激光,飞秒激光的中心波长为 $800\text{nm}$ ,脉冲持续时间在 $35\text{fs}$ ,使蛋白质改性并产生微凸起的脉冲能量为单脉冲烧蚀阈值的(对于鸡蛋白溶菌酶是 $80\text{nJ}$ )的 $0.5-1$ 倍,因此选择飞秒激光参数为单脉冲能量 $40\text{nJ}$ ,重复频率为 $1000\text{Hz}$ ,脉冲个数为 $100$ 个(通过控制快门打开时间为 $0.1$ 秒实现)。调节衰减片改变单脉冲能量为 $40\text{nJ}$ ,打开快门 $0.1$ 秒后关闭,加工出微凸起结构。

[0046] (2-3) 通过控制平移台和快门,每次移动蛋白质晶体 $10\mu\text{m}$ ,使激光焦点位置移动至下一个待加工点,重复步骤(2-2)中的方法加工出每一个微凸起,最终实现微透镜阵列衍射器件。制备得到的间距为 $10\mu\text{m}$ 的微凸起状的微透镜阵列如图4(a)所示。

[0047] 图4(a)所示的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的验证光路如图3所示。其中1为波长 $650\text{nm}$ 的连续激光器,作为衍射的光源;2为上述加工所得的蛋白质基体微透镜阵列衍射器件;3为装有待测溶液的透明比色皿;4为微透镜的后焦面,激光通过蛋白质基体微透镜阵列衍射器件在这个平面上形成衍射图案;可调焦距的镜筒5与CCD 6构成成像系统。

[0048] 在侧壁装有上述蛋白质基体微透镜阵列衍射器件的透明比色皿3中加入液体,本实施例中的液体的成分为氯化钠 $2.5\%$ (质量分数)和三水合乙酸钠 $1.36\%$ (质量分数)。打开连续激光器1,激光通过微透镜阵列衍射器件2,在微透镜的后焦面4上得到衍射图像,调节可调焦距的镜筒5,使得焦面4上的图像经镜筒成像在CCD6上,记录下微透镜阵列衍射器件在该液体环境中形成的衍射图案,如图4(b)所示。

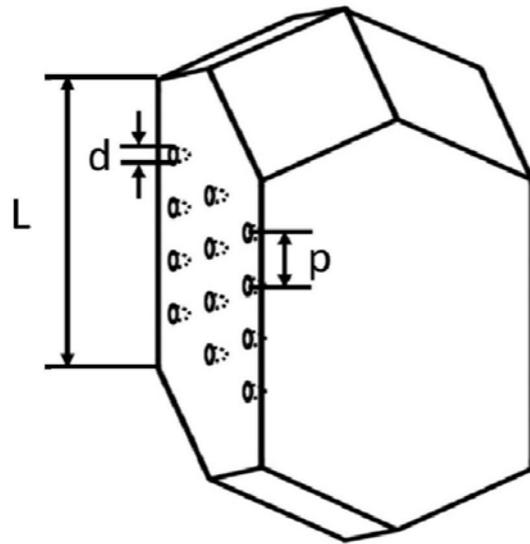


图1

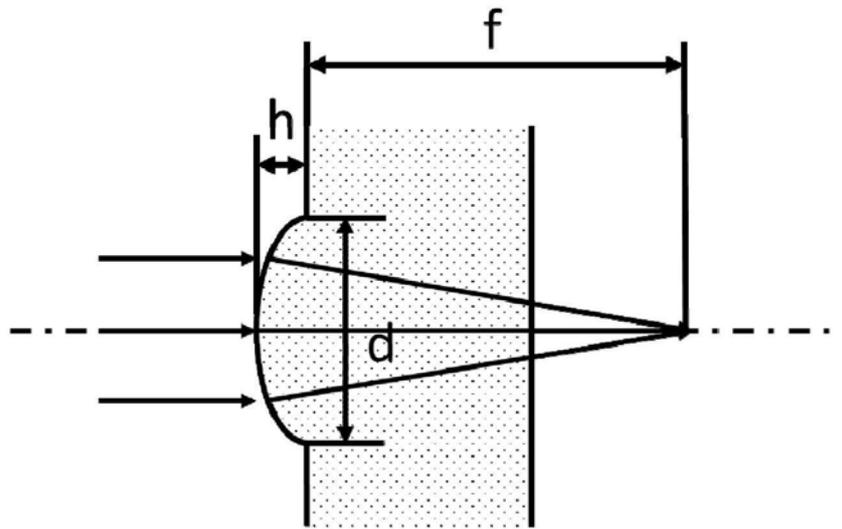


图2

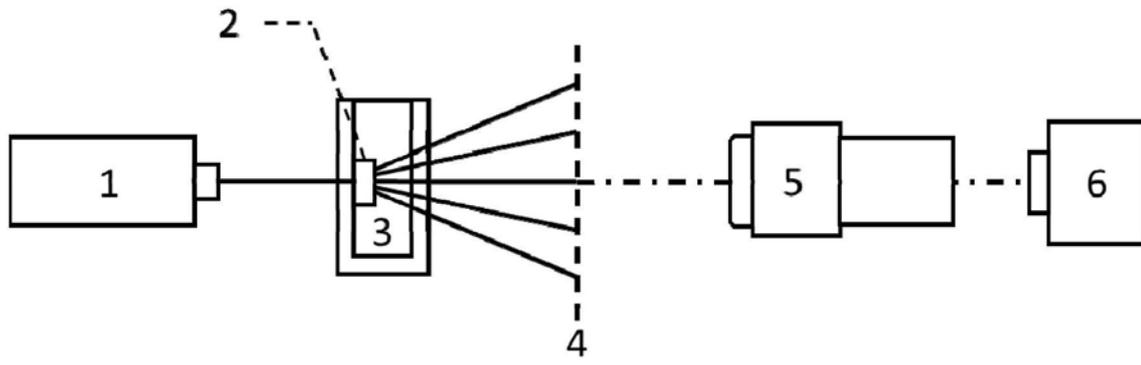


图3

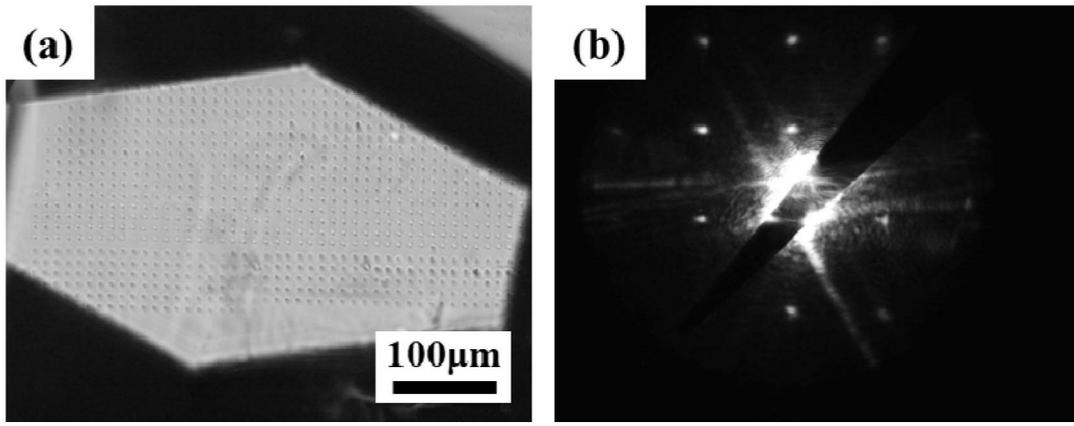


图4