基于分子间作用力的敏感效应与痕量检测生化传感器

李昕欣*

中国科学院上海微系统与信息技术研究所传感技术国家重点实验室, 上海 200050

* E-mail: xxli@mail.sim.ac.cn

收稿日期: 2015-01-25; 接受日期: 2015-04-17

国家自然科学基金(批准号: 91323304, 91023046, 61161120322)资助项目

摘要 在微纳米尺度的机电敏感结构表面进行功能分子层修饰, 通过与目标靶分子特异性结合, 在表面形成 Gibbs 自由能的变化, 由此产生的纳机械表面应力可被结构上集成的机电敏感元件转换成实时电信号输出. 首先对固体表面分子层自组装产生纳机械表面应力的机制进行研究, 将表面上形成的单分子层(self-assembled monolayer, SAM)按作用原理在纵向(即分子层厚度方向)上分为头基、分子链和尾基三层结构分别进行了基于纳机械敏感实验的原理揭示, 在此基础上发明了一种作图法来定量评估和分析自组装分子层对表面能变化的作用. 为使分子作用产生纳机械敏感效应在痕量生化分子快速检测识别中得到应用, 首次将纵向分子特异性作用和相邻分子间横向作用区分开来, 通过不同类型分子间作用的分析 and 实验验证得到如下结论: 横向分子作用是产生表面应力值大小和正负(张应力或压应力)的决定性因素, 而分子纵向作用主要是通过对分子层自组装有序性的调节来影响表面应力产生. 在对各种横向分子作用机制分析的基础上, 提出并用实验验证了分子间氢键作用可产生最高灵敏度的纳机械敏感效应. 此后介绍了特异性分子作用产生表面应力的敏感效应在生化痕量快速检测传感器的应用. 采用微纳悬臂梁作为敏感效应的转换器, 将表面应力转换为悬臂梁弯曲, 利用集成在悬臂梁内的压阻器件进行电信号输出. 通过在悬臂梁表面金薄膜上修饰巯基双层分子敏感基团, 实现了对 ppb 量级有机磷毒害蒸气的快速检测. 为实现敏感分子层长期稳定工作, 针对 TNT 爆炸物分子检测提出并实现了在悬臂梁硅表面直接两次嫁接自组装硅烷基敏感基团, 进而解决了传感器对 ppt 量级 TNT 检测的长期稳定性问题. 通过对传感器电绝缘的有效处理, 又实现了对 1.5×10^{-11} mol/mL 浓度链霉亲和素的生物溶液在线检测.

关键词

分子特异性作用
纳机械敏感效应
表面应力
生化传感器

1 引言

随着食品安全、环境监控以及生物医药事业的发

展, 对生化分子现场快速检测识别的需求变得越来越迫切. 而目前生化传感器能很好应用和产品化的技术相对物理量传感器而言还是很少的. 物理类传

引用格式: 李昕欣. 基于分子间作用力的敏感效应与痕量检测生化传感器. 中国科学: 技术科学, 2015, 45: 687–704

Li X X. Sensing effects and trace-level bio/chemical sensors based on molecular interaction induced nano-mechanical force (in Chinese). Sci Sin Tech, 2015, 45: 687–704, doi: 10.1360/N092014-00361

传感器在集成电路技术和 MEMS 技术产业化大潮的推进下, 已经在工业自动化、汽车电子和智能消费类电子等领域获得了规模化的系列产品应用。深入分析生化传感器与物理传感器目前技术状态的不同, 可以认为生化传感器比物理传感器在技术上更为复杂, 主要体现在生化传感器比物理传感器在传感机制上多出了一个信息转换界面。对于大多数物理类传感器如惯性传感器、温度传感器和压力传感器, 其内部一般都有一个将外界物理量输入引发的某种物理敏感效应转换为可检测电信号的传感信息界面。以悬臂梁—质量块结构的微型加速度传感器为例, 所检测的加速度在传感器质量块上产生的惯性力可产生悬臂梁弯曲应力或质量块的位移, 这些物理变化可直接转变成压阻效应下的电阻值变化或间距变化下的电容值变化, 因此在接口电路的帮助下都能够以电压或电流的形式直接进行电信号输出。而对于生化传感器而言, 其内部传感机制如图 1 所示。除了具有与物理传感器一样的从物理敏感效应向电信号转换的第二界面外, 生化传感器的敏感机制中还多出了一个界面, 可称之为第一界面。在第一界面上, 生化传感器要将分子特异性结合/反应(如免疫反应、酶作用、DNA 杂交、分子吸附等)先转换为某种物理敏感效应(如电流、热量、质量变化、机械力学响应、光产生等), 此后才能在第二界面上再转变成电信号输出。与相对更加成熟的第二界面技术相比, 第一界面上的核心问题是特异性分子作用的精确可靠表征问题。在纷杂环境下, 对痕量的分子特异性作用向物理敏感效应进行快速的敏感信息的可靠转换, 确实

是一个科学难题。为了解决该第一界面的问题, 很多科学研究都在寻找各种分子作用表征方法来实现和完善该第一界面的敏感表征。本论文主要叙述微纳结构固体表面上分子特异性作用所产生的纳机械(nano-mechanical)敏感效应和机制。由于纳机械敏感效应易于被集成和固化在微纳机电系统技术形成的微纳传感器结构所表征, 进而可以将前述的第一界面和第二界面很好地结合起来, 因此近期被广泛关注和寄予希望。

对表面进行纳米表征和分子成像的原子力显微镜(AFM)和扫描探针显微镜(SPM)是国际公认的成功纳机械表征技术^[1,2]。借助微纳机械悬臂梁结构对纳米针尖与表面分子的力的作用, 将产生的悬臂梁力学弯曲用激光束的偏转进行表征, 实现了原子级可分辨的探测能力。针对纳机械应力的敏感效应表征, 如果把 AFM 的激光测量方法用在硅悬臂梁上集成的压阻敏感器件来代替, 就可以实现直接的电信号输出^[3]。而将纳米针尖对表面原子/分子的痕量力作用转换成分子特异性作用在悬臂梁上引起的力学敏感效应, 则可以模拟 AFM 的方式来设计开发生化微纳传感器。

SPM(包括 AFMAFM 等)利用纳机械探针进行表面纳米特性扫描, 主要有两种工作模式, 一种为静态接触模式, 另一种为动态敲击模式。而同样, 对界面作用下的生化分子进行纳机电敏感探测, 也存在与此相似的两种模式, 即静态表面应力表征模式和动态频率检测模式^[4,5]。科学家们在对 SPM 探测研究过程中发现了很多环境因素引入的信号干扰, 经过

图 1 (网络版彩图)生化传感器原理性结构示意图

其内部包含从生化分子作用向物理敏感效应转换和从物理效应向电信号转换这两个信息的转换界面

反向思考确认了微纳悬臂梁也是一个对表面分子作用极为敏感的表面载体. IBM 和美国橡树岭国家实验室等研究机构发现固体表面的分子层自组装或界面分子间特异性作用可以产生纳机械表面应力, 进而用微纳悬臂梁的弯曲实现了敏感表征^[6-10]. 同样利用敏感悬臂梁对特异性作用对被测物分子的俘获, 通过探测有限个数分子在悬臂梁上的质量增加, 用谐振频率变化信号实现了 10^{-18} g(ag) 甚至是 10^{-21} g(zg) 的痕量检测^[11-15]. 通过科学家对该动态敏感机制检测极限的分析, 提出了在近期去实现对单个碳原子质量(1 个道尔顿)量级测量的目标^[16].

对于纳机械静态敏感效应和基于微纳悬臂梁的表征方法, 虽然国际上很多研究机构都在研究中采用, 但对于其敏感机制, 始终没有一个完善的敏感效应模型. 以往一些研究, 通常只是就具体实验中发现的现象进行个体现象分析^[17,18], 研究目标较为分散, 在对界面分子作用产生纳机械信号的本源探讨方面还存在一定的片面性, 还较难对整个敏感机制和模型进行全面阐述, 因此需要进一步深入研究. 本文将力图对分子界面作用引起的纳机械敏感效应、机制和传感器构筑进行详细的论述.

2 产生纳机械表面应力敏感效应的 3 层分子作用能量模型

固体表面上自组装的 SAM 目前主要包括在金(111)表面上自组装巯基化合物分子和在硅/氧化硅表面自组装硅烷基化合物分子这两大类, 主要目的是在固体表面形成功能化如表面钝化、特异性敏感和吸附等, 也可为进一步固定生化分子提供中间层的交

联作用. 分子自组装是一种自发的纳米构筑行为, 自组装的过程自然伴随着表面(界面)Gibbs 自由能的变化. 很长时间以来, 对分子层自组装过程中表面能量变化规律缺乏实验表征方法和定量化的模型. 其实表面自由能的变化可以产生表面应力或释放已有的表面应力, 它们的物理量纲 N/m 与 J/m^2 其实也是完全相同的. 将自组装的表面放置在一个微米或纳米厚度的悬臂梁上, 所产生的纳机械表面应力会导致悬臂梁产生微弱的弯曲. 该弯曲与表面应力的关系可以用如下的 Stoney 方程^[19]来表示:

$$\frac{1}{R} = \frac{6(1-\nu)}{Et^2} \sigma, \quad (1)$$

其中 R , t , ν , E 和 σ 分别为悬臂梁弯曲曲率半径、厚度、材料泊松比、杨氏模量和表面应力. 除了可以像 AFM 一样用光束的偏转来检测该表面应力引起的弯曲外, 本研究组研制的 $1\ \mu\text{m}$ 厚氧化硅悬臂梁在内部集成了被氧化层绝缘体包裹的单晶硅压阻敏感薄层^[20], 可以将表面应力引起悬臂梁弯曲转变成悬臂梁体弯曲应力用压阻效应进行直接的电学输出表征^[21]. 氧化硅具有比硅更低的杨氏模量即更高的力学弯曲灵敏度, 而氧化硅包裹的硅压阻元件比传统 PN 结隔离的压阻元件具有更低的噪声效应即更高的传感信噪比.

只有实验的表征手段还远远不够. 如果还是将表面分子层自组装引起的效应看成是发生在无限薄(即没有厚度)的界面上, 从纳米尺度下的微观角度来看是不科学的. 以巯基化合物分子在金表面上自组装为例, 如图 2 所示, 将该分子层自组装的界面从厚度上分为固体表面/头基层、分子链层和尾基/环境层这样 3 个相对独立且有代表性的层次. 根据不同层的

图 2 (网络版彩图) (a) Au(111)表面自组装 SAM 的 3 层相互作用模型示意图; (b) SiO_2 微悬臂梁的扫描电子显微镜(SEM)图和表面结构示意图^[25]

结构特点, 我们的结构模型中保留了各层内相邻结构的横向作用. 在悬臂梁上表面淀积了纳米厚度的金, 而将悬臂梁的下表面预先修饰了超低表面能的氟硅烷分子层 FAS-17, 这样可以保证悬臂梁的弯曲不受环境水分子吸附对悬臂梁下表面的影响.

3 个结构层对表面能变化的贡献分别来自: 1) 第 1 层上有金—硫间配位键作用, 被广泛认为是相邻电偶极子库伦排斥引起的金晶格弛豫或表面重构^[22-24]; 2) 第二层上有相邻分子链间的作用, 还包括了平衡自组装间隙与金晶格尺度间差异所造成的体位作用, 因此有限链长的作用被认为与链长成正比; 3) 尾基与环境间的作用, 其值可以用表面接触角测量实验来直接获得. 3 个次作用相互叠加后, 总的作用对界面能变化的贡献可以表达为

$$\Delta G = (\Delta G_{\text{Au-initial}} + \Delta G_{\text{Au-S}}) + \Delta G_c + \Delta G_t, \quad (2)$$

$\Delta G_{\text{Au-initial}}$ 是暴露在自组装介质中的金表面能量与纯净金表面能量的差值, $\Delta G_{\text{Au-S}}$ 是 Au-S 键导致的界面自由能变化, ΔG_c 体现分子链间作用的贡献, 而 ΔG_t 是尾基与环境作用的贡献. 与表面自由能变化相对应, 分子自组装界面上产生的等效表面应力也可相应进行三个层面的分解而表达为

$$\Delta \sigma = (\Delta \sigma_{\text{Au-initial}} + \Delta \sigma_{\text{Au-S}}) + \Delta \sigma_c + \Delta \sigma_t, \quad (3)$$

式中每层作用对表面应力的贡献在数值上等于其对总界面自由能变化的贡献值. 为了显示出不同层结构独特的作用效果, 我们在表征自组装导致悬臂梁表面应力的实验中专门选取了如下四种巯基化合物分子: 十二烷基硫醇(DDT)、十六烷基硫醇(HDT)、

十七氟癸基硫醇(FAT-17)和 3-巯基丙酸(3-MPA). 这些分子均含有一个共同的 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ 结构. 由于相隔 2 个亚甲基, 可以认为连接在这个结构上的分子链对硫原子产生的电子效应可以忽略, 因此在自组装过程中, Au-S 键结合界面层的作用对总界面能变化的贡献值相同. 所以, 这些化合物分子自组装产生的界面自由能变化的大小主要取决于 Au 的初始界面自由能、分子链间的作用以及末端基与周围介质的作用.

采用图 2 中所示的本实验室研制的集成压阻微悬臂梁, 在悬臂梁上表面的金薄膜上对四种巯基化合物分子分别进行自组装与表面应力实时在线记录, 而所有的自组装实验又分别在极性溶剂乙醇和乙腈、非极性溶剂正己烷以及空气等四种反应介质中顺序进行. 图 3 是悬臂梁传感器记录的所有检测结果. 通过实验分析和分子间结构对比, 我们得到了如下几点重要的结论.

1) 自组装介质对初始界面能的影响很大. 在不同的介质中生长巯基化合物 SAM, 尽管最终形成 SAM 的结构完全相同, 但是由于其所处的介质环境不同, 其所产生的界面能的变化量就大不相同. 而初始界面能是自组装反应的能量变化起点, 对 SAM 形成过程中产生的界面能变化非常重要. 这些巯基化合物在乙醇介质中自组装产生界面能变化的顺序与在空气中的完全相同, 只是响应值都比在空气中更大, 从图中数据对比可以看出, 同一化合物在这两种不同介质中自组装导致的界面能变化的差值都在 0.6 J/m^2 左右, 这主要是由于 Au 的初始界面能不同所致.

图 3 (网络版彩图)悬臂梁传感器测量自组装过程的响应曲线

(a)和(b)分别是 DDT 和 FAT-17 在四种不同介质中的自组装结果; (c)和(d)分别是在空气和乙醇介质中四种巯基化合物自组装引起的传感器响应^[25]

由此我们认为, 巯基化合物在 Au 表面结合后, 形成了 $\text{Au}^+\text{-S}^-$ 界面层, 从而改变了 Au 表面上的原子间相互作用能的大小, 这可以很大程度地降低 Au 的表面能. 因此导致表面能降低多少, 这很大程度上取决于 Au 的初始界面能, Au 的初始界面能越大, 其在自组装过程中降低的趋势就越大, 由自组装导致的界面能改变也越大.

2) 对于不同巯基化合物在同一介质中的自组装过程, 方程(2)中括号内的两项可以被认为是相同的, 其不同之处主要在于烷基链之间的作用以及末端基与环境介质间的作用对界面能变化带来的贡献. 从实验结果中可以看出, HDT 自组装产生的响应值比 DDT 略大, 两种烷基硫醇的响应值要小于氟烷基硫醇 FAT-17 但大于 3-MPA. 这说明巯基化合物的分子链间作用对界面能变化的贡献十分显著, 该结果与 Berger 等人^[6]和 Desikan 等人^[22]所观察到的实验现象相吻合. 而对于氟烷基硫醇来说, 由于氟原子的直径比氢大, 其分子链间的平衡距离也大于烷基硫醇, 因而对于相同长度的分子碳链来说, 由氟烷基分子链间相互作用导致的表面能变化要大于一般烷基链间的作用. 从图 4 的实验结果可以清楚看到这一点. 对有限链长的同种分子来说, 其链长部分对表面能变化的贡献是基本呈线性关系的, 图 4 中烷基硫醇链长作用已由经过 3 种链长(分别为 3, 12 和 14 个碳链)烷基硫醇实验点所画的直线来表示. 而对应于链长为 10 的地方, 氟烷基硫醇的链长作用明显比普通烷基的要大很多.

3) 末端基与环境介质之间的相互作用可以用界

图 4 分子自组装相关的各层对界面能变化贡献的定量模型推算示意图^[25]

面能的大小来表征. 基于水和十六烷接触角测量数据, 用 OWRK 方法^[23,24]可以计算得到不同 SAM 在空气中的表面能, 由此进一步可计算出末端基与介质之间的界面能. 总的来说, 末端基与介质的作用对界面能变化的贡献显然要小于链间相互作用和头基相互作用的贡献. 尤其是对于长链巯基化合物来说, 末端基与介质作用的贡献可以忽略.

从以上实验结果可以看出^[25], 自发的自组装过程是由于过剩的界面自由能导致的, 这一过程通常伴随界面自由能的下降和界面张力的释放. 这就等价于在这个表面产生了压应力. 理想的 Au 表面具有很高的表面能, 将其置于不同环境介质中时, 其表面能将出现不同程度的下降, 成为了 Au 在不同介质中的初始界面能. 当 Au 表面结合巯基化合物形成 SAM 后, Au 的表面能将下降至一个固定值 $G_{\text{Au-S}}$. 在此基础上, 分子链的相互作用将导致界面能进一步下降, 分子链作用能的大小因链长和链的种类不同而改变. 此外, 末端基与介质的作用也可以一定程度上影响界面能变化的大小. 引起界面能改变的 3 层作用可以定量地进行模型表征, 本文利用画图法建立了该定量表征模型, 显示在图 4 中. 假设分子链间作用对界面能变化的贡献与链长成正比, 由测量得到的总表面能变化和末端基与介质的界面能变化数据推算, 可以得到链长为 0 时, 即 $\text{Au}^+\text{-S}^-$ 键结合后的界面能的相对位置 $G_{\text{Au-S}}$, 这是巯基化合物与 Au 结合的第 1 层. 对于研究中选用的这几种巯基化合物, 无论其初始界面能大小如何, 头基与 Au 表面结合后形成 $\text{Au}^+\text{-S}^-$ 界面层的 $G_{\text{Au-S}}$ 大小总是固定的. 尽管目前还没有办法估算出 $G_{\text{Au-S}}$ 的绝对值大小, 但是我们可以通过实验测量得到的数据, 计算出它与初始界面能以及链作用导致界面能变化的差值. 计算得到了 $G_{\text{Au-adatom}}$ 和 $G_{\text{Au-S}}$ 间的差值约为 0.16 J/m^2 , $G_{\text{Au-air}}$ 和 $G_{\text{Au-S}}$ 的差值约为 0.76 J/m^2 . 烷基链间作用的贡献与长度的关系约为每节碳链 0.015 J/m^2 ; 而氟烷基分子链间具有更强的作用, 贡献约为每节碳链 0.032 J/m^2 .

我们通过建立巯基化合物自组装层在 Au 表面的 3 层表面能作用模型, 描述了巯基化合物在 Au 表面自组装导致的界面能变化, 进一步用悬臂梁测量结果对模型进行了验证, 并基本定量地估算出每层作用对总界面能变化的贡献^[25]. 这种作用模型可以使人们进一步用于解释传感器的敏感响应机制, 还可以用来设计传感器实现纳机械表面应力灵敏度的优化.

3 分子间横向作用产生纳机械敏感信号的机制分析

我们的很多实验结果都表明,垂直于界面的纵向分子作用并不是影响悬臂梁表面应力产生的唯一因素.当被检测分子吸附于固体表面时,相邻的分子间将产生各种相互作用,以达到能量最低的平衡状态.也可以这样说,基于分子层间特异性的纵向作用(即敏感材料分子层对被感知的分子产生的吸附作用),分子结合特异性的高低对结合速度和吸附分子表面覆盖率有最大的影响.但该纵向作用对界面上产生纳机械敏感信号大小的直接贡献并不大,其更重要的功能是借助特异性快速形成致密而有序分子吸附层.而在纵向作用帮助下,致密有序分子层形成后会产生相邻分子间的横向相互作用(图 5).虽然在上一节中我们简单讨论了分子链间横向作用,但那里实验所采用的分子都是横向作用相对较弱的,体现的纳机械敏感效应与头基界面层相比而言并不显著.基于更多的实验和作用机理分析,本文深入研究了界面上被吸附分子间横向作用对表面应力产生的影响原理,讨论了包括空间位阻作用、范德华力、静电力和氢键作用等分子间横向作用对产生表面应力效应的机制^[26].

3.1 空间位阻作用

空间位阻作用是可以显著影响特异性吸附所产生表面应力大小的一个重要因素,在某些情况下,甚至可以决定所产生表面应力的方向即产生张应力或压应力.据报道,2个配对的单链DNA(ssDNA)杂交所导致的构型熵变化可实现对静态微悬臂梁产生弯曲方向的控制^[27].除了DNA分子复杂之外,我们在实验中还发现,爆炸物TNT分子在吸附于结构敏感层上后也可以产生方向相反的表面应力.我们实验中分别使用4-巯基苯甲酸(4-MBA)修饰在金表面作

图5 (网络版彩图) 固体表面上分子层形成过程中分子特异性纵向作用和分子间横向作用的示意

为敏感层以及末端基为 $-ph-COOH$ 的双分子层修饰在二氧化硅表面作为敏感层,对同一浓度的TNT气体分子进行了检测,实验所得相反方向的悬臂梁表面应力响应结果如图6所示^[26].值得注意的是,虽然在本试验中悬臂梁均为向下弯曲,但是金是在悬臂梁的上表面,所以产生的表面应力为压应力,而 SiO_2 是在悬臂梁的下表面,所以产生的表面应力为张应力.由此,两组对比实验所产生的表面应力方向是截然相反的.

对于间硝基芳香化合物(如TNT或DNT等)来说,苯环的作用使得两个相邻硝基的位置相对固定,用Gaussian03软件计算两个相邻硝基上最临近氧原子的距离为4.92~5.03 Å.被检测的TNT分子与甲基比

图6 (网络版彩图) (a) TNT在修饰金表面的微悬臂梁器件上的吸附产生压应力; (b) TNT在修饰 SiO_2 表面的微悬臂梁器件上的吸附产生张应力; (c) DNT在微悬臂梁器件上的吸附产生压应力; (d) TMAH在微悬臂梁器件上的吸附产生张应力^[26]

(a)和(b)是不同敏感层对TNT蒸气的器件响应结果,显示出相反方向表面应力; (c)和(d)的结果显示出同一敏感层对不同尺寸的分子的响应产生了方向相反的表面应力

邻的 2 个硝基上最近氧原子的优化距离为 5.2 Å. 当特异性吸附反应发生时, 1 个 TNT 分子恰好可以结合敏感层上 2 个相邻的 -COOH 基团, 这种结合显现了较好的立体方位选择性.

作为敏感层的 6-MNA SAM, 2 个相邻分子上的 -COOH 的距离与(111)面上 2 个 Au 原子的距离同样都是 4.97 Å^[28-30]. 如图 6(a)中的插入图所示, TNT 分子上 2 个相邻的硝基可以与表面上 2 个相邻的 -COOH 结合, 形成图中所示的结构. 由于 Au 表面上固定的巯基敏感分子之间的距离小于吸附了 TNT 分子之后的平衡距离, 因此产生了向下的压应力.

对于硅氧烷双分子层而言, 首先, 必须考虑 SiO₂ 表面羟基的密度对于硅氧烷自组装的影响. 在 SiO₂ 表面进行硅氧烷分子自组装的化学反应为

我们认为, SiO₂ 表面的硅羟基(≡Si-OH)密度对于硅氧烷分子自组装程度具有决定性的影响. 根据文献[31], 在不考虑表面缺陷并认为硅氧烷分子理想致密组装的情况下, 理论计算得到的 SiO₂ 表面自组装硅氧烷化合物分子的最大密度为每平方米 5×10^{18} 个分子. 由此可以计算得出表面上相邻的 2 个硅氧烷分子之间距离的最小值为 $d=0.44$ nm. 本实验中^[26], 在 SiO₂ 表面进行第 1 层硅氧烷分子自组装之前, 虽然用 Piranha 溶液对表面进行了羟基增强处理, 但实际操作中 SiO₂ 表面的羟基密度必然大大低于理论计算值. 也就是说, 在第 1 层硅氧烷分子自组装之前, SiO₂ 表面两相邻硅羟基之间的距离要大于 0.44 nm. 其次, 在第 1 层硅氧烷分子自组装反应的无水条件下, SiO₂ 表面 2 个相邻硅羟基间会自发地进行缩聚反应而形成表面惰性位点^[32]. 在惰性位点处硅氧烷分子则无法进行自组装, 导致相邻 2 个硅羟基之间的距离甚至达到原来的 3 倍, 从而导致硅羟基密度进一步降低. 基于上述两方面的原因, 当用硅氧烷敏感双层膜修饰的悬臂梁检测 TNT 爆炸物蒸气时, 相邻的两个敏感双层膜的羧基(-COOH)将吸附 1 个 TNT 分子上的 2 个硝基(-NO₂)并形成氢键. 由于相邻 2 个 -COOH 之间的距离要远大于 2 个 -NO₂ 之间的距离, 分子之间的相互作用会产生相互吸引的作用力, 从而产生表面张应力, 导致悬臂梁向下弯曲, 情形如图 6(b)中的插入图所示.

本实验中所用的两组敏感层, 其用以特异性捕

捉 TNT 分子的末端基团均为 -Ph-COOH, 我们可以近似地认为, 两组敏感层与 TNT 分子发生特异性结合的强度是相同的. 但由于不同的体位作用所产生的巨大差别, 最终使 TNT 在两组敏感层上发生吸附时分别产生了相反方向的表面应力信号^[26].

换一个角度进行实验, 当使用同一种敏感层检测不同的被测分子时, 由于被吸附分子尺寸上的巨大差别, 也可以导致产生方向相反的表面应力信号. 本文使用了三巯基丙酸(3-MPA)修饰的悬臂梁器件来检测爆炸物 DNT(2,4-二硝基甲苯)和 MEMS 界广泛使用的硅微机械腐蚀液四甲基氢氧化铵(TMAH)这两种不同大小的目标分子. 实验所得相反方向的悬臂梁表面应力响应结果如图 6(c)和(d)所示. 如前所述, 金(111)面上生长的巯基化合物之间的平衡距离为 4.97 Å, 而 DNT 分子中的最大间距为 7.04 Å, TMAH 分子中的最大间距却为 4.22 Å. 对于相同的悬臂梁传感器, 不同的目标分子与悬臂梁上相同的敏感层分子特异性结合, 产生了不同方向的表面应力, 使得悬臂梁朝着不同的方向发生微纳机械弯曲. 具体地说, 具有更小尺寸的 TMAH 分子在悬臂梁表面产生了张应力纳机械信号, 使得悬臂梁向上弯曲; 相反地, 分子尺寸相对更大的 DNT 分子在悬臂梁表面的特异性吸附却产生了压应力, 使得悬臂梁向下弯曲.

3.2 范德华力作用

我们进行的分子自组装实验表明, 在空气中 DDT 和 HDT 向金表面的自组装, 所产生的表面应力在大小上存在一定差别. HDT 在金表面自组装时所产生的表面应力要大于 DDT 在金表面自组装时所产生的表面应力. 分析后认为这是由于范德华力的作用而导致的差别. 范德华力在前人的文献中作为解释分子特异性吸附导致悬臂梁弯曲的机理已得到了实验证实^[33]. 使用 Lifshitz 理论对范德华力的精确计算需要用到复杂的多层作用模型, 并且对不同的敏感层及吸附质分子, 需要做不同的讨论. 此处, 本文将模型简化, 近似将分子看作为一个质点, 对 Lennard-Jones 势的表达如下:

$$V(r_{ij}) = \frac{A}{r_{ij}^6} + \frac{B}{r_{ij}^{12}}, \quad (4)$$

其中, r_{ij} 是分子 i 与分子 j 之间的距离, A 和 B 是 Lennard-Jones 常数. 根据文献[33]中的计算, 由于范德华力而导致的表面应力变化可以表达为

$$\Delta\sigma_{vdw} = \frac{3Q}{r^7} \left[2A_2 + \frac{A_1}{\left[1/4 + \left(\frac{d}{r} \right)^2 \right]^4} \right] + \frac{6Q}{r^{13}} \left[2B_2 + \frac{B_1}{\left[1/4 + \left(\frac{d}{r} \right)^2 \right]^7} \right], \quad (5)$$

其中 Q 是表面应力引起悬臂梁弯曲前的数密度 (number per width). 经过分析可以看出, 作为一个分子间的短程作用力, 与其他引起表面应力变化的因素相比较, 范德华力对总体表面应力变化的贡献不是很大. 以烷烃巯基化合物在金表面的自组装为例, 烷基链之间的范德华力总的来说对产生表面应力值的贡献虽不大, 但它将导致烷基链自组装层产生一个与法线方向的倾斜角, 对产生平衡有序的表面分子链排布十分有利^[17].

3.3 静电力作用

静电力作用也被提出作为一种解释特异性分子吸附导致悬臂梁弯曲的机理, 尤其是解释系统中存在带电荷离子或电子转移过程的情况. 从微观角度进行计算, 根据文献[33], 该种力产生表面应力的表达式为

$$\Delta\sigma_e = \frac{Qq^2}{2\pi\epsilon_0 r^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \left[-1 + \left(1 + \frac{d^2}{r^2 n^2} \right)^{-3/2} \right], \quad (6)$$

其中, q 为所带电荷电量, ϵ_0 是介电常数. 在不带电荷离子的大多数系统情况下, 静电力作用可以被考虑为偶极子之间通过静电场的相互作用. 此时, 静电作用对最终产生的表面应力数值影响不是很大. 并且由于相邻电偶极子的带点特性完全相同, 它们间的作用力一定是排斥力, 因此所产生的表面应力一定是压应力. 但是在吸附质为阳离子/阴离子的情况下, 静电作用对表面应力变化将产生非常大的影响, 且由于是相互吸引作用, 一定会产生表面张应力. Sushko 等人^[34]研究了相邻羧酸根离子($-\text{COO}^-$)之间的静电排斥作用所产生的表面压应力. 但在我们小组使用羧酸根阴离子对铵根阳离子进行检测的实验中, 正如图 7 中显示的那样, 所测正离子对两侧敏感材料分子的负离子敏感基团静电吸引, 所以产生的表面应力为张应力^[35].

图 7 悬臂梁在 TMAH 水溶液溶液中对 $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ 离子检测产生的表面张应力由实验测到^[26]

3.4 分子间氢键的横向作用

在生化检测实验中, 人们常常使用某一敏感层对一类物质进行检测, 根据敏感层与吸附质之间的作用强度进行推断, 希望得到有规律性响应结果. 然而, 在某些情况下, 实验结果却与预期相反, 不能用原有的机理进行合理的解释. 我们使用了一种以羧基为尾端基团的敏感层对一系列的胺类化合物(分别为一甲胺、二甲胺和三甲胺)进行了检测, 并结合谐振式微悬臂梁传感器频率信号对吸附质量的微称重 (micro-gravimetry) 原理检测, 对表面应力型微悬臂梁传感器的结果进行分析^[26].

图 8 给出了谐振式悬臂梁传感器与应力型悬臂梁传感器对胺类同系物的联合检测结果. 图中可以看出, 按照甲胺、二甲胺、三甲胺的顺序来看, 随着分子中甲基数目的增加, 谐振式微悬臂梁传感器的测试相应幅度是依次递增的, 而应力型静态微悬臂梁传感器的测试结果反而却是依次递减的. 根据气相分子的碱度理论, 由于甲基具有给出电子的诱导效应, 界面上特异性吸附反应强度顺序应与吸附质气相碱度的大小顺序一致, 顺序为: $\text{MeNH}_2 < \text{Me}_2\text{NH} < \text{Me}_3\text{N}$. 这与质量型谐振式微悬臂梁的测试结果一致. 从图 8(a), (b)和(c)中可以看到, 谐振悬臂梁对 1 ppm 浓度的甲胺、二甲胺以及三甲胺气体的响应值分别为 11.9, 43 和 65 Hz. 考虑到选取的 3 种胺类同系物存在分子量的差别 ($M_{\text{甲胺}}:M_{\text{二甲胺}}:M_{\text{三甲胺}}=31:45:59$), 可以进一步计算出传感器对同一浓度胺类同系物的吸附摩尔比为 1:2.47:2.85. 然而, 应力型静态微悬臂梁的检测信号幅度顺序却恰恰相反, 其大小顺序为 $\text{MeNH}_2 \gg \text{Me}_2\text{NH} \gg \text{Me}_3\text{N}$, 从图 8 (d), (e)和(f)中可以

图 8 (网络版彩图) 谐振式悬臂梁传感器与应力型悬臂梁传感器对胺类同系物的响应结果

(a)~(c) 谐振式传感器分别对三甲胺、二甲胺和甲胺的响应; (d)~(f) 应力型传感器分别对三甲胺、二甲胺和甲胺的响应^[26]

看到, 响应大小的巨大差异达到了几倍甚至一个数量级^[26].

这一组胺类同系物分子从结构、大小和性质上都非常类似, 对实验得到的应力型静态悬臂梁上特异性吸附响应信号大小顺序, 用之前提到的界面纵向作用、位阻作用及其它作用模型都无法解释. 经过分析, 我们首次使用氢键理论对其进行了解释. 胺类同系物分子在性质上具有很大的相似性, 但其形成分子间氢键的能力却各有不同. 如图 9 的横向分子间作用模型所示, 三甲胺由于氮原子上连接了 3 个甲基, 没有活泼氢存在, 故不能形成分子间氢键. 二甲胺分子中, 有 1 个甲基被氢原子所取代, 导致氮原子上所带负电荷增加, 形成活泼氢, 可以与相邻的二甲胺分子下面结合的敏感基团形成 1 个横向作用的分子间氢键. 类似地, 在甲胺分子中, 有 2 个甲基被氢原子所取代, 氮原子数所带电荷进一步增加, 与相邻甲胺分子所形成氢键的强度也显著增加. 由于分子间氢键的形成, 横向分子间氢键作用成为影响悬臂梁表面应力的主要因素, 导致三甲胺与二甲胺之间敏感响应大小上出现了数量级的差异. 由于甲胺分子间氢键的作用强度要强于二甲胺, 甲胺分子在悬臂梁表面的吸附将导致更大的表面应力变化, 其响应大

图 9 (网络版彩图) 甲胺(a)、二甲胺(b)和三甲胺(c)分子在表面特异性吸附后横向氢键作用几何构型模型^[5]

小也达到了二甲胺的数倍。

氢键作用是一种较强的分子间力, 在许多化学/生化作用中, 都起着非常大的作用。氢键的作用强度远大于范德华力, 仅比共价键和离子键稍弱, 属于次级键的一种, 键能在 42 kJ/mol 以内。在生化传感器的应用中, 氢键作用已被利用于作为敏感层与被吸附分子之间的特异性反应, 许多生化传感器的敏感层都是依靠氢键作用来捕获目标分子的。然而, 之前没有研究报道明确表明横向分子间氢键作用可用来产生更大的表面应力敏感信号。我们的实验结果表明, 横向作用中的分子间氢键可对静态应力型微悬臂梁生化传感器的响应可产生决定性的影响, 有无分子间氢键形成甚至可导致高达一个数量级的表面应力变化差别。这为静态应力型微悬臂梁生化传感器的发展提出了新的敏感方法和提高传感器灵敏度设计的依据。

综上所述, 分子特异性吸附导致表面应力的产生, 是许多因素共同作用的结果。除了界面上的纵向作用之外, 分子间的横向作用对表面应力的产生起着至关重要的作用。在大部分传感器应用中, 范德华力和静电力对表面应力的贡献不大。而位阻作用的影响有时可导致相反方向的表面应力。对于位阻作用影响不大的情况, 分子间的横向氢键作用则可以作为引起表面应力变化最重要的作用方法, 利用该作用可以设计出高灵敏效应的传感器。

4 基于分子间作用纳机械敏感效应的生化传感器

4.1 SiO₂ 包覆的硅压阻悬臂梁、金表面修饰巯基敏感基团与 ppb 痕量沙林传感器

静态弯曲悬臂梁是一种表征分子特异性作用引起纳机械表面应力的新型微纳敏感结构。当悬臂梁的一个表面在纳机械表面应力作用下发生弯曲时, 这种弯曲的机械响应可转化成电学信号读出。最早用于检测微悬臂梁弯曲的技术借鉴于 AFM 光学杠杆检测系统, 是微悬臂梁传感器的传统检测方式。光学检测的最大优点在于其超高的灵敏度和相对简单的检测平台。通常, 直接采用分立的仪器式光学位移检测器结合微悬臂梁, 就能够形成微悬臂梁传感系统, 这种检测方式在空气和溶液中(透明)都有很好的表

现。但该检测方式的缺点在于: 微悬臂梁要特别设计有足够光亮、足够大的光反射面, 整个系统需要构建在光学减震设备上以减少干扰, 激光及监视设备体积庞大且调节比较麻烦。另外, 在浑浊的液体环境该光检测方法很难实现。为了克服这些缺点, 直接集成自检测器件在微悬臂梁上近期成为公认的现场检测方式。硅是很好的压阻材料, 在悬臂梁上集成硅压阻可直接检测悬臂梁的弯曲应力获得高灵敏度信号。通过优化设计和制作工艺, 集成式力敏悬臂梁检测已经达到了原子级的位移分辨率。通过将压阻元件连接成电桥而将其电阻值的变化转化成电压差动输出, 压阻检测方式可以接近达到光学检测的灵敏度。而且, 其最大的优势在于制作简单并与 MEMS 和 IC 工艺兼容, 因此集成压阻悬臂梁成为检测纳机械表面应力传感器的近期研究热点, 可用来进行生化分子识别和在线监测。

悬臂梁的机械响应灵敏度除了与所受的应力相关之外, 还取决于悬臂梁的几何形状和材料本身的性质。图 10(a)示意了一种集成压阻 SiO₂ 微悬臂梁器件, 用来实现化学分子的超微量检测^[37]。悬臂梁的主体由 SiO₂ 材料构成, 长 90, 宽 21, 厚 1 μm。单晶硅压阻敏感电阻厚 100 nm, 硅上生长的 SiO₂ 绝缘层厚 80 nm。正如图 10(b)对所制造的微悬臂梁照片所示, 对于检测用微悬臂梁, 为了便于敏感分子层的选择性固定, 在悬臂梁表面蒸镀了一层 5 nm/50 nm 厚度的 Cr/Au 薄膜。

在表面应力的作用下, 由于 SiO₂ 的杨氏模量远比硅的小, SiO₂ 悬臂梁可以产生比传统的 Si 或 SiN_x 悬臂梁更大的弯曲灵敏度, 因此采用 SiO₂ 制作悬臂梁可以使器件具有更高的纳机械灵敏度。另一方面, 由于硅压阻元件完全被 SiO₂ 所包覆, 相比传统的硅 PN 结绝缘可以减少漏电噪声, 从而大大减小背景漂移和噪声水平, 进一步提高检测分辨率。从设计的悬臂梁结构, 可以从理论上计算出悬臂梁的表面应力敏感度为 $\sigma^{-1} \Delta R/R = 8.37 \times 10^{-4} \text{ (m/N)}$, 这其中 $\Delta R/R$ 是压阻的相对变化。

基于 SOI(绝缘体上的硅)材料, 采用图 10(c)列出的硅微机械工艺流程, 制作出了集成压阻于梁上的表面应力内检测传感器结构。如图 10(d)所示, 在芯片上共集成了 2 根悬臂梁即敏感梁和参考梁。每根悬臂梁上都集成了 1 个“几字”形的单晶硅压阻检测元件, 这种形状一方面可以保证形成的电阻值足够大, 另

图 10 (网络版彩图) SiO₂ 包覆的压阻微悬臂梁传感器

(a) 集成压阻悬臂梁的结构示意图; (b) 制成的敏感悬臂梁顶视照片, 梁表面蒸镀有金薄膜; (c) 悬臂梁的微机械制造工艺流程图; (d) 制造的悬臂梁传感器 SEM 图像以及连接成惠斯通电桥的结构示意图^[20,36]

一方面可以使压阻沿悬臂梁长宽方向分布以检测微悬臂梁的双轴弯曲应力。其中敏感梁表面有金薄膜覆盖以便于修饰巯基敏感分子层, 而参考梁上没有金薄膜。当微悬臂梁弯曲时, 相应会在压敏电阻中产生应力变化, 由于压阻效应, 压敏电阻中的应力变化将直接导致其的阻值变化。将两个悬臂梁上的压阻与在衬底上制作的 2 个电阻通过惠斯顿电桥方式进行连接, 如图中的插图所示。给电桥两端输入一定的电压, 通过测量电压信号来表征压敏电阻的变化值。图 10(d) 的传感器结构包括一根正面有敏感膜(在正面的金薄膜上生长)的敏感悬臂梁和另一根没有敏感层的参考悬臂梁。由于 2 根硅梁的主体结构相同, 具有相近的温度特性, 可以利用惠斯通电桥的连接方式来消除大部分环境温度变化造成的噪声信号, 如敏感压阻元件的温度漂移系数等。

在上述硅压阻悬臂梁生化分子检测传感器的设计和制造方面, 有如下因素需要着重考虑。首先要保证悬臂梁结构具有较小的残余应力以提高检测分辨能力。如在图 10 总所展示的包裹了单晶硅压阻层的氧化硅悬臂梁结构, 需要使作为力学结构材料的氧化硅厚度远大于作为压阻敏感层的单晶硅厚度, 才

能尽可能地降低两种材料热不匹配所带来的残余热应力效应(即双金属效应)。反之, 当两种材料厚度相近时, 温度变化造成的双金属效应会严重地影响检测信号的稳定性。在设计和制造中, 悬臂梁总的厚度不能太厚, 反之悬臂梁表面分子间作用产生的较小量值的表面应力将不会引起悬臂梁的较强烈弯曲, 以致使压阻检测的灵敏度过低。当然, 为了保证压阻敏感硅层有一定厚度, 以确保有足够的电桥检测电流流过压阻元件, 悬臂梁的厚度减薄程度是受到限制的。为使传感器具有抗外界振动冲击干扰的可靠性, 需要将悬臂梁的固有谐振频率设计到远离常见环境振动频谱的区域, 一般应在 10 kHz 以上。

以有机磷化合物为代表的神经性毒剂一直被认为是目前最毒的化学毒剂, 沙林(甲氟磷酸异丙酯)是其中的典型代表, 在极低浓度下就可以造成人员中毒伤亡, 在 10^{-3} mg/L 即 200 ppb 浓度下, 数分钟就可以致人死亡。因此, 它是目前化学反恐的主要目标化合物之一。沙林的超微量检测是一个急待解决的难题, 实验室通常采用甲基磷酸二甲酯(DMMP)作为沙林的模拟剂进行研究。沙林和 DMMP 的化学结构非常相似, 它们都含有 $-P=O$ 和 $-P-O-$ 键, 但因 DMMP 的

毒性很小, 实验室模拟检测时操作相对比较安全. 因此, 研究经常采用 DMMP 作为沙林模拟剂开展研究, 获得可用于有机磷化合物检测的传感器.

传感器的识别能力主要决定于敏感层的结构. 针对有机磷化合物的结构特点和悬臂梁敏感结构的特性, 在文献[37]的研究中设计了一种 Cu^{2+} /巯基十一酸(11-MUA)双分子层来识别和捕获有机磷化合物. 由于 Cu^{2+} 离子与磷酸键有很好的配位作用, 可以形

成 $\text{P}=\text{O}-\text{Cu}^{2+}$ 配位结构, 二者的作用力也属于中等作用力, 因此可以利用 Cu^{2+} 的配位作用来识别有机磷化合物中的磷酸键^[38-40]. 以 DMMP 分子为例, 其与 Cu^{2+} /11-MUA 双分子层作用导致悬臂梁产生应变的过程和机制如图 11(a)所示. 敏感微悬臂梁上 Cu^{2+} /11-MUA 双分子敏感层采用自组装和嫁接修饰方法获得, 其结构以及在悬臂梁 Au 基底上的形成过程和 DMMP 分子在 Cu^{2+} /11-MUA 层上吸附与解吸过程如图 11(b)

图 11 (网络版彩图) (a) DMMP 分子在 Cu^{2+} /11-MUA 双分子敏感层上特异性吸附产生表面压应力致使悬臂梁下弯的示意图; (b) DMMP 分子在双分子敏感层上吸附和解附的原理示意图; (c) 在金表面修饰 11-MUA 前后的表面 AFM 相貌差别; (d) 传感器对 20 ppb~1 ppm 浓度 DMMP 实时检测的电桥差压输出信号^[37]

所示. 利用 AFM 和衰减全反射-傅里叶红外光谱(ATR-FTIR)对自组装前后的表面进行了表征. 图 11(c)显示了 11-MUA 自组装前 Au 基底和自组装后 SAM 表面的 AFM 扫描图像. 从图中可以看出, 在 Au 表面组装 SAM 后, 表面趋于平坦化, 并呈现出颗粒状结构. 从 11-MUA SAM 在 Au 表面生长后的 ATR-FTIR 分析结果显示: 主要吸收峰与 11-MUA SAM 结构完全吻合. 表明利用此方法可以在悬臂梁的 Au 的表面形成良好的 11-MUA SAM^[39,40]. 此后, 铜离子在 11-MUA 上的嫁接也就取得了成功.

图 11(d)给出了传感器对不同 ppm 浓度 DMMP 蒸气的响应曲线. 当传感器暴露于 DMMP 氛围后, 立即产生负电压响应, 约 8 min 响应信号趋于平稳. 再次用氮气吹扫检测池时, 传感器的响应电压又逐渐恢复至基线位置. 传感器对 20 ppb(10^{-4} mg/L)浓度的 DMMP 都有着很明显的响应. 同时, 传感器的响应信号随着 DMMP 浓度的变大而增强. 此外由输出电压的基线可以看出, 传感器的噪声仅为 0.3 μ V, 这表明压阻式悬臂梁传感器经 SiO₂ 完全包覆绝缘后, 漏电流噪声很低, 从而实现较高的分辨率. 假定传感器的响应电压大小正比于被吸附的 DMMP 分子数, 基于 Langmuir 吸附等温曲线模型可以估算出传感器对 DMMP 的最小检测浓度约为几 ppb.

4.2 在悬臂梁 SiO₂ 表面直接修饰硅烷基敏感基团及痕量 TNT 爆炸物传感器^[36]

在贵金属表面自组装的巯基 SAM 在生物传感器方面得到了广泛应用, 但是巯基 SAM 在空气环境中的稳定性决定着其是否能够得到长期可靠应用. Schoenfish 和 Pemberton^[41], Scott 等人^[42], Willy 等人^[43]对于暴露在空气中的巯基 SAM 进行的研究表明: 巯基在空气环境中会迅速地被氧化, 生成亚磺酸盐以及磺酸盐, 进而会从金表面脱附. 计算表明 Au-S 键能只有 1.6 eV^[44,45], 相当微弱. 在 Au-S 键形成的过程中, 每个 Au 原子上约有 0.30e(0.48×10^{-19} C)的电荷转移至 S 原子上. 由此, 在 Au-S 结合的界面上将形成一层带有正电荷的 Au 原子层和带有负电荷的 S 原子层, 这将直接导致层内原子间的库仑排斥作用. 有关巯基化合物的研究表明, 巯基 SAM 在温度升高到 60°C 以上的条件下也会逐渐从 Au 表面解吸附^[46], 说明在温度变化的环境下, 金表面的巯基 SAM 不够稳定. 以上原因都造成了巯基 SAM 易于从金属表面

脱附. 当巯基 SAM 中部分分子从金表面脱附后, 失去了致密排布的巯基分子之间的距离大大增加. 对于检测爆炸物 TNT(三硝基甲苯)分子来说, 可能只有一个硝基结合在羧基头基上, 另外的 1 个硝基悬空, 这样就无法产生分子间的排斥作用了. 此外, 在稀疏分布的巯基 SAM 上吸附的 TNT 分子之间由于无法紧密分布, 也不会产生足够的横向作用效应敏感信号. 为了解决巯基敏感层稳定性的弱点, 在悬臂梁 SiO₂ 表面直接修饰硅氧烷敏感膜的方法成为一个解决方案, 原因是这样的敏感分子层采用的是稳定而可靠的共价键结合.

对于 TNT 分子的检测, 一般选取对于硝基具有特异性敏感的氢键酸类化合物, 如羧酸. 已有研究证明, 这一类的化合物对于硝基类爆炸物的蒸气具有良好的特异性^[8], 因而可以用作敏感基团. 而硅氧烷化合物一般是通过硅甲氧基与氧化硅表面的硅羟基反应形成 Si-O 键固定的. 如果能够合成一种能在氧化硅表面固定的、又能够对于 TNT 分子敏感的化合物, 就可以达到我们的设计目标. 但不幸的是, 满足这两项要求的硅氧烷基团和羧基基团之间会自发地发生缩聚反应. 缩聚反应后, 对 TNT 敏感的羧基将不存在. 因此, 类似于巯基敏感层在溶液中直接自组装到悬臂梁表面的方法是不可行的, 因为缩聚反应致使敏感基团无法真正形成在悬臂梁的表面. 基于同样原因, 也很难通过化学合成的方法制备这种末端是羧基的硅氧烷化合物.

为了解决这个问题, 文献[36]中报道的研究提出了一种分两步合成的方法: 首先在 SiO₂ 表面自组装 1 层硅氧烷化合物, 该化合物的尾端在一定的化学反应条件在可以进行嫁接, 将第 2 层带有敏感头基的分子连接到第 1 层硅氧烷自组装层上, 从而形成敏感双层膜. 在构筑敏感双层膜的过程中, 嫁接过程需要控制在严格条件下. 研究选择了尾端是环氧基团的硅氧烷化合物. 由于环氧基团在无水条件下比较稳定, 遇水后易于水解, 反应条件的控制相对容易, 因此研究选择了环氧基团作为分子层间嫁接平台. 其具体过程如图 12 所示.

完成了硅氧烷自组装敏感双层膜在 SiO₂ 悬臂梁传感器的修饰之后, 用器件对 TNT 蒸气进行了敏感检测试验. TNT 分子被悬臂梁表面敏感层上的羧基特异性地吸附从而产生表面应力, 导致悬臂梁的弯曲, 输出压阻信号. 需要指出的是, 在这里的修饰过程中,

图 12 悬臂梁 SiO_2 表面上修饰硅氧烷自组装敏感双分子层的示意图^[36]

硅氧烷自组装敏感双层膜修饰在敏感悬臂梁的 SiO_2 下表面, 而不是在敏感悬臂梁的 Au 表面进行修饰,

特异性吸附将会使悬臂梁产生弯曲. 而对于参考悬臂梁, 其上下表面都是 SiO_2 , 2 个表面上由于特异性吸附导致的弯曲作用会相互抵消, 不会造成悬臂梁产生弯曲, 如图 13 所示.

传感器对于不同浓度 TNT 蒸气的敏感响应在图 14(a)中所示. 从图中可以看出, 传感器对 0.1 ppb 的 TNT 蒸气的响应非常明显, 有近 $4 \mu\text{V}$. 对于 7.6 和 25 ppb 浓度的 TNT 分别有 17, 30 μV 左右的响应信号. 根据信噪比可以估算, 传感器对于 TNT 蒸气的检测浓度下限可以达到数十 ppt(十亿分之一)的水平. 为了研究硅氧烷敏感双层膜的工作寿命, 我们使用同一只传感器对于浓度为 7.6 ppb 的 TNT 蒸气进行了测试, 并在 140 d 之后重复测试相同浓度的 TNT 蒸气, 在这期间, 器件放置于培养皿中, 并保存在普通实验室的环境中. 结果如图 14(b)所示. 可以看出, 第一次测试的响应信号约为 17.2 μV , 第二次测试的响应信

图 13 (网络版彩图)敏感悬臂梁(a)和参考悬臂梁(b)SEM 照片

(a) 插图 of 硅氧烷敏感双层膜修饰在悬臂梁下表面的示意图; (b) 插图 of 敏感膜修饰在悬臂梁上下两个表面的示意图^[36]

图 14 (a) 传感器对于不同浓度 TNT 蒸气的响应; (b) 同一只传感器对 7.6 ppb 浓度 TNT 的首次测试响应以及 140 d 后再次测试响应^[36]

号没有明显的衰减, 为 $16.5 \mu\text{V}$, 响应过程保持了迅速且可逆的优点, 证明了使用硅氧烷敏感双层膜修饰的传感器具备较长的工作寿命. 相对于以往的疏基 SAM 敏感修饰方法, 这种使用硅氧烷自组装敏感双层膜修饰的新方法明显地改善了悬臂梁化学传感器的长期工作可靠性和稳定性, 也使该研究的 TNT 传感器朝着实际应用前进了一步.

4.3 液相检测的悬臂梁生物传感器^[35]

在传统悬臂梁生化传感器中, 最为常见的是利用光学方法检测的悬臂梁, 通过检测入射到悬臂梁自由端的激光束位置的微小偏移来检测悬臂梁的弯曲. 然而, 这种光学检测方法会受到溶液透明度差和溶液折射率变化等因素导致激光束检测精度受到影响. 此外光学检测装置体积庞大, 使用过程中经常需要进行光学校准, 操作复杂且耗时^[47]. 而文献[35]报道的研究中制作了集成超薄单晶硅压敏电阻的 SiO_2 悬臂梁, 将悬臂梁的弯曲转换为电学信号输出, 避免了上述在溶液中进行光学检测遇到的问题, 更适宜在线检测在溶液中进行反应, 而且检测电路简单便宜.

对于集成有压阻的 SiO_2 悬臂梁来说, 尽管压阻完全包裹在 SiO_2 绝缘层内, 但是压阻检测的信号需要引线输出, 芯片表面必然排布着金属导线, 而生化反应中的检测溶液多为导电性溶液, 会在溶液中造成短路而无法检测. 为了解决这个问题, 该研究在金属引线上制作一层光敏的聚合物 SU-8 绝缘层进行屏蔽, 仅仅在压焊盘处保留金属焊盘. 在敏感压焊封装完成之后, 使用硅橡胶将其封闭, 这样可以使整个器件的电路绝缘, 以便于在溶液中进行检测, 所制成的可在液态环境中检测的悬臂梁传感器如图 15(a)所示.

这里需要指出的是, 该 SU-8 绝缘层结构光刻与区域选择性腐蚀工艺与原悬臂梁的制造工艺相兼容, 并且与化学生物分子修饰过程相兼容.

对于传感器的液相生物检测试验, 研究中选择了生物素与亲和素之间的特异性反应进行检测. 生物素与亲和素两者具有高度特异的亲和性, 他们之间的亲和性, 至少是抗原与抗体之间作用强度的一万倍以上, 不受外界干扰, 且复合物非常稳定^[48,49]. 生物素经过活化后可以与蛋白质、糖类或多种物质结合形成生物素标记的结合物. 研究中设计了在悬臂梁 SiO_2 表面修饰硅氧烷分子, 然后通过溶液中的化学反应使生物素固定到硅氧烷分子上, 形成了检测亲和素的敏感探针. 最终, 修饰了敏感探针的悬臂梁在溶液中与亲和素发生特异性的结合, 实现对亲和素的实时在线检测. 生物素在硅氧烷分子上的固定以及生物素与亲和素间特异性结合产生悬臂梁弯曲的原理示意如图 15(b)所示. 我们使用同一只悬臂梁传感器对于生物素在硅氧烷分子上的特异性结合过程以及亲和素-生物素特异性结合过程进行了在线检测.

对于修饰了硅氧烷分子 APTES 的悬臂梁传感器, 其尾端是胺基, 而活化的生物素具有一个羧基, 两者可以通过酰胺反应相结合. 反应在液相检测池中进行. 由于在 SiO_2 表面完成自组装的 APTES 敏感层具有良好的稳定性, 这一步修饰可以进行批量操作并保存, 需要进行亲和素检测时只需要修饰生物素即可. 由于硅氧烷分子修饰所需时间较长, 而生物素的修饰时间较短, 可在进行亲和素检测之前进行批量修饰并提前预备, 因此缩短了实验时间.

在检测生物素与硅氧烷分子的特异性结合时, 首先在检测池中注入 PBS 溶液并将悬臂梁传感器浸

图 15 (a) 液相检测悬臂梁的 SEM 照片, 右侧为敏感悬臂梁, 左侧为参考悬臂梁, 金属引线被 SU-8 绝缘层所覆盖; (b) 在 SiO_2 表面固定生物素以及生物素-亲和素特异性结合在悬臂梁表面结合产生压应力使悬臂梁弯曲的示意^[35]

图 16 (a) 活化的生物素与悬臂梁表面的 APTES 硅氧烷敏感层结合的在线检测响应; (b) 链霉亲和素与悬臂梁上生物素的特异性结合的在线检测响应^[35]

没,待基线平稳后开始记录.向检测池中注入活化的生物素溶液(浓度为 10^{-6} mol/mL),实时记录半小时内传感器的响应,如图 16(a)所示.活化的生物素与 APTES 通过酰胺反应结合到 SiO_2 悬臂梁表面,响应的压阻输出信号在 $2\text{ }\mu\text{V}$ 左右,可以清晰识别出悬臂梁是向上弯曲,表明表面受到了压应力.

在 SiO_2 悬臂梁表面固定了可以检测亲和素的探针并用 BSA 封闭之后,检测了荧光标记的链霉亲和素.先将传感器浸没于 PBS 溶液中,待基线平稳后,加入荧光标记的链霉亲和素并在线检测 1 小时.如图 16(b)所示,传感器对于浓度为 1.5×10^{-11} mol/mL 的链霉亲和素的响应信号约为 $2.5\text{ }\mu\text{V}$.特异性反应使得悬臂梁向上弯曲.测试完成后,使用荧光显微镜观察到了悬臂梁上有明显的绿色荧光,证明了检测信号确实来自于亲和素与生物素之间成功的结合作用.

5 讨论与展望

利用探针分子与目标探测分子间相互作用产生的纳机械敏感效应来探测生化分子,是一个很有前途的研究方向.基于该敏感原理的传感器结构如微纳悬臂梁等将会像 AFM 探针一样在不远的将来取得痕量分子探测方面突破性的进展,最终实现所谓单分子和单原子级的敏感探测水平.为了更好地实现这样的目标,一方面要在现有基础上进一步建立分子作用产生纳机械信号的定量化模型,进而指导敏感结构和材料的优化设计,不断提高检测水平.另一方面,采用 MEMS/NEMS 技术在未来会开发出越来越敏感和越来越廉价的微纳传感器以及传感器集成阵列,实现在线的多通道痕量生化分子检测识别,最终真正广泛应用到生物医药、食品安全和环境保护等重要领域中.

参考文献

- 1 Binnig G, Rohrer H. Scanning tunneling microscopy. *Helv Phys Acta*, 1982, 55: 726–735
- 2 Binnig G, Quate C, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 1986, 56: 930–933
- 3 Yang Z, Li Xinxin, Wang Y, et al. Micro cantilever probe array integrated with piezoresistive sensor. *Microelectr J*, 2004, 35: 479–483
- 4 Li X X, Lee D W. Integrated micro-cantilevers for ultra-resoluble sensing and probing. *Meas Sci Technol*, 2012, 23: 022001
- 5 Yu H T, Yang T T, Chen Y, et al. Chemo-mechanical Joint-detection with both dynamic and static micro-cantilevers for inter-homologue molecular identification. *Anal Chem*, 2012, 84: 6679–6685
- 6 Berger R, Delamarche E, Lang H, et al. Surface stress in the self-assembly of alkanethiols on gold. *Science*, 1997, 276: 2021–2024
- 7 Fritz J, Baller M, Lang H, et al. Translating biomolecular recognition into nanomechanics. *Science*, 2000, 288: 316–318
- 8 Senesac L, Thundat T. Nanosensors for trace explosive detection. *Mater Today*, 2008, 11: 28–36
- 9 Ji H, Finot E, Dabestani R, et al. A novel self-assembled monolayer (SAM) coated microcantilever for low level caesium detection. *Chem Commun*, 2000, 6: 457–458
- 10 Pinnaduwaage L, Boiadjev V, Hawk J, et al. Sensitive detection of plastic explosives with self-assembled monolayer-coated

- microcantilevers. *Appl Phys Lett*, 2003, 83: 1471–1473
- 11 Ono T, Li X X, Miyashita H, Esashi M. Mass sensing of adsorbed molecules in sub-picogram sample with ultrathin silicon resonator. *Rev Sci Instrum*. 2003, 74: 1240–1243
- 12 Hanay M, Kelber S, Naik A, et al. Single-protein nanomechanical mass spectrometry in real time. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7: 602–608
- 13 Arlett J L, Myers E B, Roukes M L. Comparative advantages of mechanical biosensors. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6: 203–215
- 14 Yang Y, Callegari C, Feng X, et al. Zeptogram-scale nanomechanical mass sensing. *Nano Lett*, 2006, 6: 583–586
- 15 McCaig H C, Myers E, Lewis N S, et al. Vapor sensing characteristics of nanoelectromechanical chemical sensors functionalized using surface-initiated polymerization. *Nano Lett*, 2014, 14: 3728–3732
- 16 Chaste J, Eichler A, Moser J, et al. A nanomechanical mass sensor with yoctogram resolution. *Nat Nanotechnol*, 2012, 7: 301–304
- 17 Godin M, Tabard-Cossa V, Miyahara Y, et al. Cantilever-based sensing: The origin of surface stress and optimization strategies. *Nanotechnology*, 2010, 21: 075501
- 18 Godin M, Williams P, Tabard-Cossa V, et al. Surface stress, kinetics, and structure of alkanethiol self-assembled monolayers. *Langmuir*, 2004, 20: 7090–7096
- 19 Stoney G. The tension of metallic films deposited by electrolysis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*. Vol 82. Edinburgh: The Royal Society, 1909. 172–175
- 20 Li P, Li X X. A single-sided micromachined piezoresistive SiO₂ cantilever sensor for ultra-sensitive detection of gaseous chemicals. *J Micromech Microeng*, 2006, 16: 2539–2546
- 21 Li P, Li X X, Zuo G, et al. Silicon dioxide microcantilever with piezoresistive element integrated for portable ultrasensitive gaseous detection. *Appl Phys Lett*, 2006, 89: 074104
- 22 Desikan R, Lee I, Thundat T. Effect of nanometer surface morphology on surface stress and adsorption kinetics of alkanethiol self-assembled monolayers. *Ultramicroscopy*, 2006, 106: 795–799
- 23 Zhang F. *Fundamentals of Molecular Interface Chemistry*. Shanghai: Shanghai science and technology literature press, 2006
- 24 Adamson A, Gast A. *Physical Chemistry of Surfaces*. 6th ed. New York: John Wiley & Son, 1997
- 25 Zuo G, Li X X. A three-layer model of self-assembly induced surface-energy variation experimentally extracted by using nanomechanically sensitive cantilevers. *Nanotechnology*, 2011, 22: 045501
- 26 Yang T, Li X X, Chen Y, et al. Adsorption induced surface-stress sensing signal originated from both vertical interface effects and intermolecular lateral interactions. *Analyst*, 2011, 136: 5261–5269
- 27 Wu G, Ji H, Hansen K, et al. Origin of nanomechanical cantilever motion generated from biomolecular interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 1560–1564
- 28 Love J C, Estroff L A., Kriebel J K, et al. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev*, 2005, 105: 1103–1169
- 29 Ulman A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem Rev*, 1996, 96: 1533–1554
- 30 Laibinis P E, Whitesides G M, Allara D L, et al. Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of *n*-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold. *J Am Chem Soc*, 1991, 113: 7152–7167
- 31 Feng X, Fryxell G E, Wang L Q, et al. Functionalized monolayers on ordered mesoporous supports. *Science*, 1997, 276: 923–926
- 32 Wight A P, Davis M E. Design and preparation of organic-inorganic hybrid catalysts. *Chem Rev*, 2002, 102: 3589–3613
- 33 Dareing D W, Thundat T. Simulation of adsorption-induced stress of a microcantilever sensor. *J Appl Phys*, 2005, 97: 043526
- 34 Sushko M L, Harding J H, Shluger A L, et al. Physics of Nanomechanical biosensing on cantilever arrays. *Adv Mater*, 2008, 20: 3848–3853
- 35 Chen Y, Xu P C, Liu M, et al. Bio/chemical detection in liquid with self-sensing Pr-Oxi-Lever (piezo-resistive SiO₂ cantilever) sensors. *Microelectron Eng*, 2010, 87: 2468–2474
- 36 Chen Y, Xu P, Li X X. Self-assembling siloxane bilayer directly on SiO₂ surface of micro-cantilevers for long-term highly repeatable sensing to trace explosives. *Nanotechnology*, 2010, 21: 265501
- 37 Zuo G, Li X X, Li P, et al. Detection of trace organophosphorus vapor with a self-assembled bilayer functionalized SiO₂ microcantilever piezoresistive sensor. *Anal Chim Acta*, 2006, 580: 123–127
- 38 Crooks R, Ricco A. New organic materials suitable for use in chemical sensor arrays. *Acc Chem Res*, 1998, 31: 219–227
- 39 Kepley L, Crooks R, Ricco A. Selective surface acoustic wave-based organophosphonate chemical sensor employing a self-assembled composite monolayer: A new paradigm for sensor design. *Anal Chem*, 1992, 64: 3191–3193
- 40 Crooks R, Yang H, McEllistrem L, et al. Interactions between self-assembled monolayers and an organophosphonate. *Faraday Discuss*, 1997, 107: 285–305

- 41 Schoenfish M H, Pemberton J E. Air stability of alkanethiol self-assembled monolayers on silver and gold surfaces. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 4502–4513
- 42 Scott J R, Baker L S, Everett W R, et al. Laser desorption fourier transform mass spectrometry exchange studies of air-oxidized alkanethiol self-assembled monolayers on gold. *Anal Chem*, 1997, 69: 2636–2639
- 43 Willey T M, Vance A L, van Buuren T, et al. Rapid degradation of alkanethiol-based self-assembled monolayers on gold in ambient laboratory conditions. *Surf Sci*, 2005, 576: 188–196
- 44 Ulman A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem Rev*, 1996, 96: 1533–1554
- 45 Dubois L H, Nuzzo R G. Synthesis, structure, and properties of model organic-surfaces. *Annu Rev Phys Chem*, 1992, 43: 437–463
- 46 Xiao X D, Wang B, Zhang C, et al. Thermal annealing effect of alkanethiol monolayers on Au(111) in air. *Surf Sci*, 2001, 472: 41–50
- 47 Lavrik N V, Sepaniak M J, Datskos P G. Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors. *Rev Sci Instrum*, 2004, 75: 2229–2253
- 48 Wilchek M, Bayer E A. The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal Biochem*, 1988, 171: 1–32
- 49 Zhao W, Xu J J, Chen H Y. Electrochemical biosensors based on layer-by-layer assemblies. *Electroanal*, 2006, 18: 1737–1748

Sensing effects and trace-level bio/chemical sensors based on molecular interaction induced nano-mechanical force

LI XinXin

State Key Lab of Transducer Technology, Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Shanghai 200050, China

Surface Gibbs free energy can be changed by specific interaction between the targeted molecules and the functionalized molecule-layers pre-modified on MEMS/NEMS sensing structures. The generated nanomachining surface-stress can be electrically read out by the sensing element integrated on the MEMS/NEMS device. To explore the surface-stress generating mechanism that is originated from SAM (self-assembled monolayer) growth, we individually study on the three parts of head-group, molecule chain and tail-group. Based on the analysis of individual contribution from each part to surface energy change, a plotting method is developed to quantitatively assess and evaluate the effect of the grown SAM on surface energy change, i.e., generated surface-stress. In order to apply the nanomachining sensing effect into rapid biochemical detection and recognition, for the first time, we separately investigate the sensing effect from vertical specific interaction and lateral interaction between adjacent molecules. Following conclusion is finally declared based on theoretical analysis and experiment: the sign and the magnitude of the surface-stress are mainly determined by the lateral effect, while the vertical effect can make the molecule layer into ordered status thereby helping to the lateral effect. Besides, among various lateral molecule interaction, hydrogen-bond effect is the most effective one to generate the most significant sensing signal. Based on the nanomachining sensing mechanism, micro/nano cantilever sensors have been recently developed for rapid detection of trace-level biochemical molecules, which translate the surface-stress into cantilever bending and read out electric sensing signal by integrated piezoresistors. By modifying double-layer sensing molecules on gold surface of the cantilever, ppb-level organophorous agent is detected. To improve long-term stability of the sensing layer for TNT detection, a double-layer grafting technique is developed to directly modify siloxane sensing-groups on silicon surface of cantilever, thereby realizing long-term reliable detection to ppt-level TNT explosive. Finally, a SU8 selectively coated cantilever is developed for biological detection in liquid, with which 1.5×10^{-11} mol/mL streptavidin is real-time detected in solution.

specific molecule interaction, nano-mechanical sensing effect, surface stress, bio/chemical sensors

doi: 10.1360/N092014-00361