

基于回音壁谐振模的无标记光学生物传感技术

江俊峰¹, 刘铁根¹, 李海伟¹, 惠荣庆², 刘 琨¹, 张以谟¹

1. 天津大学精密仪器与光电子工程学院, 光电信息技术科学教育部重点实验室, 天津 300072
2. 美国堪萨斯大学电子工程与计算科学系, 美国 堪萨斯州 66045

摘 要 光学生物传感器在新药研制和生命科学等领域得到广泛关注, 重点对基于回音壁谐振模的无标记光学生物传感器做了评述。根据谐振腔结构将传感器分为三类。基于微球的生物传感器由于微球腔的高品质因子而成为最初研究的重点, 已实验研究了对蛋白质分子、病毒和细菌的传感响应, 建立了基于单光子谐振能量和微扰理论的理论模型; 基于微盘的生物传感器能够利用成熟的平面光刻微加工技术, 传感构想提出更早, 但直到回流热处理技术的应用才使得微盘品质因子大幅提高, 从而实现了单分子测量; 基于微环的生物传感器具有简单的谐振模式, 有利于信号探测, 已采用聚合物, 氮化硅, 以及硅基二氧化硅等材料制作成功, 作为其在三维上的扩展, 微管式传感器由于能够将光通道和流体通道合二为一而在近年得到关注。

关键词 回音壁谐振模; 无标记光学生物传感; 微球; 微盘; 微环

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)11-3076-05

引 言

采用生物传感器进行生物分子相互作用动态分析能有效地观察分子复合物生成和分解时变过程, 已成为新药研制和生命科学等领域研究的一个重要组成部分^[1]。基于折射率测量的无标记光学生物传感器是一种通用型传感器, 可直接测量生物分子相互作用, 无需待测分析物具有荧光、特征吸收或散射带等特殊性质^[2], 能实现生物分子相互作用的实时反应动力学检测和定量分析。由于避免了间接型荧光标记生物传感器所需的专用荧光标记物、复杂的标记处理、因标记带来的生物活性减弱和对反应自身存在干扰等不利影响, 检测可信度高, 测量对象范围得到大为扩展, 能够探测蛋白质, DNA, 病毒, 甚至整个细胞行为, 从而为医学诊断, 药品研制, 食物监测, 环境监测, 军事科学等领域提供了有力的分析工具。国内外研究人员基于表面等离子体共振 (SPR), 谐振镜, 干涉仪, 光纤 Bragg 光栅, 长周期光栅, 光子晶体光纤等提出了多种无标记光学生物传感研究方案^[3]。

然而上述传感技术中光与生物分子的有效作用距离较短, 有效作用距离通常仅为光传输时的单向行程或者是较少

次数的往复行程 (驻波谐振)。相比而言, 光在高品质因子 (Q 值) 谐振腔的谐振传输次数则可以很高, 因此利用高 Q 值谐振腔构建传感器, 将增加光与生物分子相互作用的有效距离, 进而提高检测灵敏度。回音壁谐振模 (whisper gallery mode, WGM) 通过行波谐振提供高 Q 值谐振, 尽管 20 世纪 60 年代起就已开始在光通讯用滤波器, 微激光器和微波光子学等领域得到研究^[4], 但其在生物传感的潜力直到近年才被发掘。光由光密介质向光疏介质传播时存在全反射现象, 由此可利用这一现象将光完全约束在微腔内, 形成稳定的回音壁谐振模, 在光谱上表现为梳状谱。由于是全反射, 泄漏损耗非常小, 当选用材料的吸收损耗很小时, 光谱线宽窄, 可以很小的尺寸获得很高的 Q 值。当光在微腔表面发生全反射时, 在表面形成消逝波, 其向外范围约在 ~ 200 nm, 因此可以测量微小范围的生物分子及其范围。基于回音壁谐振的无标记光学生物传感器本质是一个折射率传感器, 消逝场的存在使微腔有效折射率随着微腔外面的待检测物而变化, 进而引起谐振波长的移动。根据所采用微腔结构可以分为三类, 即微球, 微盘和微环式, 由于均具有高灵敏度, 无需标记, 体积小等优点, 相关研究已引起广泛关注。

收稿日期: 2010-01-10, 修订日期: 2010-04-20

基金项目: 国家重点基础研究发展 (973 计划) 项目 (2010CB327802), 国家自然科学基金项目 (60627002, 11004150), 教育部博士点新教师基金项目 (200800561020), 博士后科学基金项目 (20090460690), 天津大学青年教师培养基金项目 (TJU-YFF-08B47) 和深圳市传感技术重点实验室开放基金项目 (SST201013) 资助

作者简介: 江俊峰, 1977 年生, 天津大学精密仪器与光电子工程学院副教授 e-mail: jiangjfxu@tju.edu.cn

1 基于微球的无标记光学生物传感技术

Vollmer 等利用高 Q 值的光微球谐振腔, 首次提出了微球光学生物传感器并将其用于检测蛋白质分子^[5]。微球腔利用丁烷火焰加热单模二氧化硅光纤端部制作而成, 直径约为 $300\ \mu\text{m}$, 微球腔 Q 值为 $\sim 2 \times 10^6$, 微球表面采用氨丙基三甲氧基硅烷处理, 再将另一单模光纤直径通过氢氟酸蚀刻成 $4\ \mu\text{m}$ 实现消逝场耦合输入输出, 然后利用生物素修饰的牛血清白蛋白和亲和素结合实验展示了 WGM 模对微腔表面折射率的响应, 实验系统如图 1 所示。在此实验基础上, Arnold 等从单光子谐振能量的角度给出了吸收单个蛋白质分子的微球 WGM 模频移分析公式, 理论分析表明一个大分子即可产生可探测的 WGM 频移^[6], 传感器测量极限可达 $50\ \text{Da}$, 小于 SPR 技术的 $180\ \text{Da}$ 。随后 Teraoka 等利用电磁场矢量波动方程的一阶微扰理论分析了微球 WGM 模频移^[7], 并利用该理论建立了折射率的均匀体传感模型, 均匀表面传感模型和径向函数的体传感模型。2006 年 Teraoka 等又在上述理论的基础上去除了折射率分布必须是径向函数的限制, 并将其用于微球腔外单个球形微粒和单个柱状微粒的 WGM 频移分析^[8]。2007 年 Ren 等进行了圆柱状的大肠杆菌检测实验, 采用直径 $340\ \mu\text{m}$ 微球腔获得了表面密度为 $120\ \text{个} \cdot \text{mm}^{-2}$ 的检测灵敏度^[9]。Vollmer 利用微球腔实现了单个球状流感 A 病毒的检测, 通常流感 A 病毒的半径分布在 $45 \sim 55\ \text{nm}$ 之间, 而实验中测得该病毒的半径为 $47\ \text{nm}$, 质量为 $5.2 \times 10^{-16}\ \text{g}$, 结果与预期非常吻合^[10]。

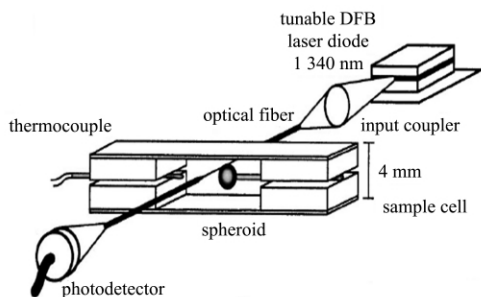


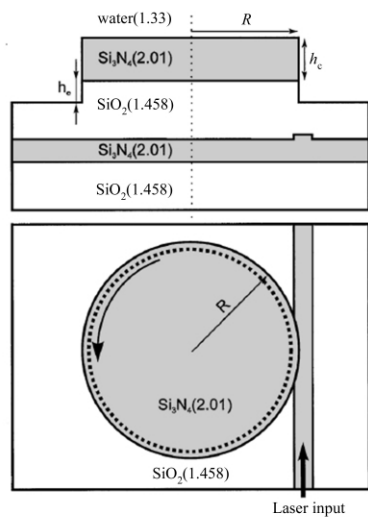
Fig 1 Microsphere WGM sensing system^[6]

为增强传感灵敏度, 在微球外涂覆一层高折射率的涂覆层的方法被提出, 涂覆层能够聚焦微球腔的径向模, 从而在微球腔表面获得更强的场分布和更窄的谱线宽^[11], 而采用聚苯乙烯涂覆的二氧化硅微球和 NaCl 溶液的实验验证了这一想法, 在 $340\ \text{nm}$ 涂覆层厚度下, 微球腔灵敏度提高了 7 倍^[12]。理论分析还进一步扩展到多层涂覆的微球 WGM 模^[13], 如采用高折射率层, 低折射率层和高折射率层的微球腔三层结构。正向传播和反向传播 WGM 模的简并问题也得到关注^[14]。

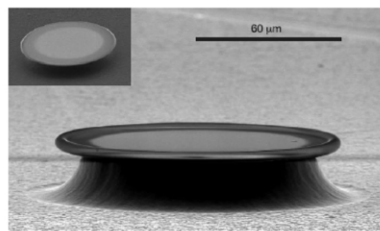
微球腔通常利用表面张力制作而成, 理论上具有最高的品质因子, Q 值可高达 10^{10} , 但由于是一个三维结构, 固定夹持困难, 制作时的尺寸控制困难, 不容易实现集成。

2 基于微盘的无标记光学生物传感技术

Blair 等提出利用微柱谐振腔的 WGM 谐振增强荧光生物传感器灵敏度的方法^[15], 受此启发, 同年 Boyd 和 Heebner 等描述了基于微盘构建无标记光学生物传感器的理论模型^[16], 指出该微盘腔可以采用现有平面微加工的方式制作, 在假定微盘表面覆盖抗体层的条件下计算分析了传感灵敏度, 表明测量分辨率可达 100 个多巴胺生物分子。Krioukov 等采用传统光刻技术和 Si_3N_4 材料制作成微盘式回音壁谐振模集成传感器, 直波导的光通过垂直耦合的方式耦合进入微盘, 其结构布局如图 2(a) 所示^[17], 但 Q 值只有 5 000, 折射率测量分辨率为 $10^{-4}\ \text{RIU}$ 。



(a)



(b)

Fig 2 (a) microdisk WGM biosensor^[17]; (b) microtoroid WGM biosensor^[18]

Armani 等利用硅基二氧化硅材料制作成一种特殊的微盘 (Microtoroid), 如图 2(b) 所示, 他们首先光刻形成盘状掩模, 然后用氢氟酸蚀刻二氧化硅层形成微盘, 再利用 XeF_2 蚀刻硅层形成硅微支柱, 使微盘悬空, 最后采用 CO_2 激光器进行回流热处理^[18], 由于硅比二氧化硅的材料导热性强 100 倍, 故仅微盘边缘熔化收缩成圆形, 表面张力作用使表面光滑, 因此形成的微腔 Q 值得以超过 10^8 。利用该微谐振腔, 该课题组的 Armani 等进一步成功地实现了对单个白介素-2 分子的探测^[19], 指出由于微腔的超高 Q 值, 除了通常极化机制引起谐振波长红移外还存在热光机制, 即在其中环行光的强度足够高可以加热生物分子, 生物分子受热升温后, 通过

热光效应引起谐振腔谐振波长红移,故灵敏度可随 Q 值的平方变化,Armani 的实验充分表明了光微谐振腔生物传感器的灵敏度优势。

3 基于微环的无标记光学生物传感技术

由于微环的模式结构比微盘要简单,便于探测,且同样可以采用平面微加工的方式进行集成,因此采用聚合物材料或硅材料制作的微环式生物传感器不断提出。Guo 课题组开始利用聚苯乙烯材料通过纳米压印的方法制作跑道形微环生物传感器^[20],如图 3(a)所示,直波导中故意制作两处偏移引起部分反射是为了形成 Fano 谐振谱线以增强灵敏度,实验中对葡萄糖的浓度探测分辨率能到 0.024%。随后该课题组又提出利用热回流后处理(在 95 °C 保持 60 s)的方式来减小表面粗糙度引起的表面散射损耗^[21],同时采用支撑结构和衬底采用硅基二氧化硅材料减小泄露模损失,使微环腔 Q 值达到 20 000,折射率测量分辨率达到 10^{-7} RIU^[22]。

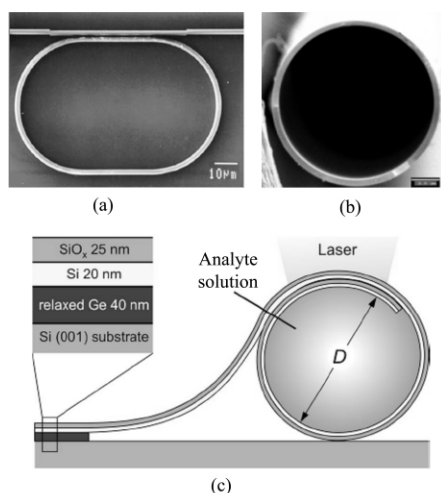


Fig 3 (a) microring WGM biosensor^[20]; (b) microtube WGM sensor based on capillary^[28]; (c) microtube WGM sensor based on rolled-up nanotech^[30]

Ksendzov 等利用 SixNy/SiO₂ 材料制作成微环集成式无标记生物传感器,并通过生物素和亲和素反应系统验证传感器具有 0.1 nmol · L⁻¹ 的测量分辨率,由于采用热电冷却装置进行微环谐振谱的热扫描,微环尺寸较大,在毫米量级^[23]。Yalcim 等在玻璃基材料(Hydex™)制作了垂直耦合的微环生物传感器,垂直耦合避免了横向耦合时生物表面修饰处理时难于将直波导隔离的问题,且垂直耦合系数在制作时更易控制,在微环半径为 60 μm,微环 Q 值达到 12 000,折射率测量分辨率达到 1.8×10^{-5} RIU^[24]。SOI(Silicon-on-Insulator)是成熟的 CMOS 微电子材料,若采用该材料,不但加工技术成熟、成本低,而且便于和电路集成,基于这一考虑,2007 年 Katrien 等提出在 SOI 制作跑道形微环生物传感器,由于硅的高折射率,所制作的半径为 5 μm 微环 Q 值能达到 20 000,折射率测量分辨率为 10^{-5} RIU。Zhang 等研究了在 SOI 制作的双微环结构的互耦合效应^[25],并探讨了

其在生物传感的应用,计算了外环半径为 5 μm 的情况下分别以环顶部和内环与外环间隙为传感区域的谐振波长漂移灵敏度,获得了最大 683 nm · RIU⁻¹ 的谐振波长漂移灵敏度^[26]。

微管作为微环的三维扩展,在支持 WGM 谐振的同时,还可用作流体输送通道,避免了另外设计流体通道的不便,这是微管式生物传感器的显著优势所在。White 采用石英毛细管作为微谐振腔进行了折射率传感实验研究,采用熔融拉锥和氢氟酸蚀刻的方式制作了外径为 50 μm 和壁厚为 3 μm 的微管,微管 Q 值达到 4.1×10^5 ,谐振波长漂移灵敏度为 2.6 nm · RIU⁻¹,折射率测量分辨率为 1.8×10^{-5} RIU^[27]。Zamora 等制作了壁厚小于 1 μm 的石英微管,如图 3(b)所示,所制作的外径为 5 μm 和壁厚为 0.8 μm 的微管对 TE 模获得了高达 179 nm · RIU⁻¹ 的谐振波长漂移灵敏度,但 Q 值只有 500 左右,使得折射率测量分辨率只有 10^{-4} RIU^[28]。Ling 等则利用棱镜耦合激发厚壁石英微管高阶模^[29],通过调节入射光角度,在壁厚 34 μm 的微管中实现了高达 600 nm · RIU⁻¹ 谐振波长漂移灵敏度,从而使折射率测量分辨率达到 5×10^{-6} RIU。

为了进一步综合微管和平面微环的优点,Bernardi 等基于卷筒纳米技术提出微管折射率传感器^[30]。其材料结构布局如图 3(c)所示,在硅衬底层利用分子束外延技术生长一层塑性变形的锗牺牲层,然后再生长一层厚 20 nm 的应力张紧的硅层,最后利用热处理的方法生长 25 nm 厚的 SiO_x 层。当采用 30% 浓度的 H₂O₂ 蚀刻掉锗牺牲层时,其上的 Si/SiO_x 层在应力作用下将卷起而形成微管,微管直径一般在 2~3 μm,管长一般在 100 μm 到 1 mm 之间。当在 850 °C 下退火 30 min,则可在 SiO_x 层形成纳米簇作为微管的光有源介质,以便采用 532 nm 的激光激发出 600~1 000 nm 的荧光。采用糖溶液的实验表明,直径 2 μm 的微管可获得 62 nm · RIU⁻¹ 的谐振波长漂移灵敏度,但目前该类型微管的 Q 值还很低,测量灵敏度只有 0.05 RIU。

4 结 论

基于回音壁谐振模的无标记光学生物传感器的高测量分辨率已经从理论和实验上得到验证。但是该类传感器目前仍处于发展阶段,如在高通量检测和便携式等方面研究尚很少,因此在生物检测的研究应用还不广泛。高通量检测要求可以通过多个微腔传感单元空间并行检测来满足。由于微腔制作时尺寸并不容易控制,夹持固定不方便,空间并行检测集成并不容易。微盘和微环式传感器则可以采用成熟的光刻技术大批量制作,但是仍需要为每个微腔单元设计单独的待检测流体输送通道,因此也存在很多困难。相比而言,在微环基础上扩展的微管技术能够将光通道和流体输送通道合二为一,从而绕开了流体输送通道设计的困难,是一种新型的光微流体结构,基于卷筒纳米技术的微管则试图将微管的流体输送优势和平面微环可大规模制作的优势结合起来,从而成为该类传感器的一个重要发展方向。

参 考 文 献

- [1] Rebecca L. Rich David G. Myszka J. Mol. Recgnit. , 2008, 21: 355.
- [2] Rebecca L Rich, David G Myszka. J. Mol. Recgnit. , 2007, 20: 300.
- [3] Ye Fang. Sensor, 2007, 7: 2316.
- [4] Ilchenko V S, A. B. Matsko A B. IEEE J. Selected Topics Quantum Electron. , 2006, 12(1): 15.
- [5] Vollmer F, Braun D, Libchaber A. Appl. Phys. Lett. , 2002, 80(21): 4057.
- [6] Arnold S, Khoshhsima M, Teraoka I, et al. Opt. Lett. , 2003, 28(4): 272.
- [7] Teraoka I, Arnold S, Vollmer F. J. Opt. Soc. Am. B, 2003, 20(9): 1937.
- [8] Teraoka I, Arnold S. J. Opt. Soc. Am. B, 2006, 23(7): 1381.
- [9] Ren H, Vollmer F, Arnold S, et al. Opt. Express, 2007, 15(25): 17410.
- [10] Vollmer F, Arnold S, Keng D. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105: 20701.
- [11] Teraoka I, Arnold S. J. Opt. Soc. Am. B, 2006, 23(7): 1434.
- [12] Gaathon O, Culic-Viskota J, Mihnev M, et al. , Appl. Phys. Lett. , 2006, 89(22): 223901.
- [13] Teraoka I, Arnold S. Opt. Lett. , 2007, 32(9): 1147.
- [14] Teraoka I, Arnold S. J. Opt. Soc. Am. B, 2009, 26(7): 1321.
- [15] Blair S, Chen Y. Appl. Opt. , 2001, 40(4): 570.
- [16] Boyd R W, Heebner J E. Appl. Opt. , 2001, 40(31): 5742.
- [17] Krioukov E, Klunder D J W, Driessen A, et al. Opt. Lett. , 2002, 27(7): 512.
- [18] Armani D K, Kippenberg T J, Spillance S M, et al. Nature, 2003, 421: 925.
- [19] Armani A M, Kulkarni R P, Fraser S E, et al. Science, 2007, 317: 783.
- [20] Chao C Y, Luo L J. Appl. Phys. Lett. , 2003, 83(8): 1527.
- [21] Chao C Y, Guo L J. Appl. Phys. Lett. , 2004, 84(14): 2479.
- [22] Chao C Y, Fung W, Guo L J. IEEE J. Selected Topics Quantum Electron. , 2006, 12(1): 134.
- [23] Ksendzov A, Lin Y. Opt. Lett. , 2005, 30(24): 3344.
- [24] Yalcin A, Popat K C, Aldridge J C, et al. IEEE J. Selected Topics Quantum Electron. , 2006, 12(1): 148.
- [25] Zhan Z Y, Dainese M, Wosinski L, et al. Opt. Express, 2008, 16(7): 4621.
- [26] Li X, Zhang Z, Qin S, et al. Appl. Opt. , 2009, 48(25): 90.
- [27] White I M, Oveys H, Fan X. Opt. Lett. , 2006, 31(9): 1329.
- [28] Zamora V, Diez A, Andres M V, et al. Opt. Express, 2007, 15(19): 12011.
- [29] Ling T, Guo L J. Opt. Express, 2007, 15(25): 17424.
- [30] Bernardi A, Kiravittaya S, Rastelli A, et al. Appl. Phys. Lett. , 2008, 93(9): 094106.

Review on Label-Free Optical Bio-Sensing Technology Based on Whisper-Gallery-Mode

JIANG Jun-feng¹, LIU Tie-gen¹, LI Hai-wei¹, HUI Rong-qing², LIU Kun¹, ZHANG Yi-mo¹

1. College of Precision Instrument & Optoelectronics Engineering, Key Lab of Optoelectronics Information Technology & Science, Ministry of Education, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2. Electrical Engineering & Computer Science, University of Kansas, Lawrence, KS 66045, USA

Abstract Optical biosensors are becoming an important tool for drug research and life science, and the label-free optical biosensor based on whisper-gallery-mode (WGM) is reviewed in the present paper. The WGM-based sensors are categorized into three types according to the microcavity structure. The biosensor using microsphere got extensive research because of high quality factor, and its response to protein, virus, and bacteria had been studied. The models based on single photon resonant state and perturbation theory were established. The biosensor using microdisk was proposed early since it can make use of mature lithography technology; however, the quality factor was increased greatly only after the thermal reflow process was introduced and single molecule measurement was then realized. The biosensor using microring has simpler mode structure and materials such as polymer, silicon nitride and silicon-on-insulator had been used for sensor fabrication. As a 3-dimension expansion, sensor using microtube can combine the optical channel and fluidic channel, which attracting more and more attention.

Keywords Whisper-gallery-mode; Label-free optical biosensor; Microsphere; Microdisk; Microring

(Received Jan. 10, 2010; accepted Apr. 20, 2010)