КАНТИЛЕВЕРНЫЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРУСОВ И БАКТЕРИЙ CANTILEVER BIOSENSORS FOR DETECTION OF VIRUSES AND BACTERIA

УДК 543.07

Д. Колесов*, И. Яминский*, А. Ахметова*, О. Синицына*, Г. Мешков* / yaminsky@nanoscopy.net
D. Kolesov*, I. Yaminsky*, A. Ahmetova*, O. Sinitsyna*, G. Meshkov*

Кантилеверные биосенсоры являются многообещающей платформой для создания высокочувствительных и селективных сенсорных устройств. В первой части статьи рассмотрены история вопроса, свойства микрокантилеверов, технологии их производства и биофункционализации, а также способы детекции.

Cantilever biosensors are a promising platform for development of highly sensitive and selective sensors. The first part of the paper describes the background of the problem, properties of microcantilevers, technologies of their production and biofunctionalisation, and also detection methods.

Кантилевер является основным измерительным элементом атомно-силовой микроскопии [1]. Он представляет собой тонкую длинную пластинку, закрепленную одним концом на массивном чипе с иглой на противоположном конце. Впервые метод фотолитографии для создания микрокантилевера из нитрида кремния был применен Томом Альбрехтом в 1989 году. Сейчас наиболее часто используемыми материалами для производства кантилеверов являются кремний, оксид кремния и нитрид кремния. Ранние исследования по использованию микрокантилеверов для химического детектирования проводились около 20 лет назад в исследовательской лаборатории IBM (Цюрих, Швейцария) и Университете Базеля (Швейцария) [2]. Авторы продемонстрировали статический изгиб кантилевера в результате химической реакции каталитического превращения водорода и кислорода в воду. Первое применение кантилеверных сенсоров для биологических систем было представлено в 1996 году на примере неспецифической адсорбции белка бычьего сывороточного альбумина [3]. С тех пор появилось множество работ, демонстрирующих потенциал микромеханических кантилеверов для создания высокочувствительных химических и биологических сенсоров.

Существуют два основных режима работы кантилеверных сенсоров: статический и динамический (рис.1). Благодаря малой толщине, консоль кантилевера очень чувствительна к латеральным напряжениям, возникающим на ее поверхности. Биоспецифичное связывание молекул аналита с рецепторным слоем на одной из поверхностей кантилевера ведет к возникновению латеральных напряжений в слое, что вызывает изгиб консоли. Напряжения могут быть как растягивающими, так и растягивающими. При этом отклонение свободного конца консоли кантилевера от положения равновесия в простейшем случае связано с латеральным напряжением формулой Стоуни:

$$\Delta\sigma \approx \frac{E\Gamma^2}{3(1-\nu)L^2}\Delta z,$$

где $\Delta\sigma$ – изменение поверхностного напряжения, Δz – относительное отклонение кантилевера, ν – коэффициент Пуассона, E – модуль Юнга материала кантилевера, T и L – его толщина и длина. Таким образом, измеряя отклонение кантилевера в результате биоспецифического связывания, мы можем рассчитать поверхностное напряжение, которое зависит от концентрации искомого вещества в окружающей среде.

* МГУ им. М.В.Ломоносова, НПП «Центр перспективных технологий» / Lomonosov Moscow State University, Advanced Technologies Center.

Рис.1. Принципы статического (слева) и динамического (справа) режимов работы кантилеверных сенсоров
 Fig.1. Principles of static (left) and dynamic (right) modes of operation of cantilever sensors

Динамический режим работы кантилеверных сенсоров основан на изменении резонансной частоты кантилевера при связывании аналита из раствора. Кантилевер является высокочастотным резонатором, чья резонансная частота зависит от эффективной массы и жесткости консоли. В результате взаимодействия молекул аналита с рецепторным слоем, одна или обе эти характеристики могут изменяться, что может быть зарегистрировано в виде сдвига резонансной частоты кантилевера [4]:

$$\Delta f = \frac{1}{2} f_n \left(\frac{\Delta k}{k} - \frac{\Delta m}{m} \right),$$

где Δf , Δk , Δm – изменения резонансной частоты, жесткости и массы кантилевера, а f_n , k и m – первоначальные значения этих параметров.

РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОКАНТИЛЕВЕРОВ И ИХ СВОЙСТВА, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ БИОСЕНСОРОВ

В первых экспериментах по созданию микромеханических сенсоров использовались стандартные коммерческие кантилеверы для зондовой микроскопии. В связи с развитием данного направления появились кантилеверы без иглы для сканирования поверхности, специально адаптированные для использования в биосенсорах. Кантилеверы для статического режима имеют

The cantilever is the basic measuring element of atomic force microscopy [1]. It is a thin long plate, fixed at one end to a massive chip with a needle at the opposite end. Thomas Albrecht in 1989 has first used photolithography to create microcantilever of silicon nitride. Now the most commonly used materials for the production of cantilevers are silicon, silicon oxide and silicon nitride. Early researches on the use of microcantilevers for chemical detection was carried out about 20 years ago in IBM research laboratory (Zurich, Switzerland) and in the University of Basel [2]. The authors

demonstrated static bending of the cantilever as a result of chemical reactions of catalytic conversion of hydrogen and oxygen into water. The first application of cantilever sensors for biological systems was introduced in 1996 on the example of nonspecific adsorption of the protein of bovine serum albumin [3]. Since then a lot of projects have demonstrated the potential of micromechanical cantilevers to create a highly sensitive chemical and biological sensors.

There are two basic modes of operation of cantilever sensors: static and dynamic (Fig.1). Due to the low thickness, the console of

the cantilever is very sensitive to the lateral stresses on its surface. Biospecific binding of analyte molecules to the receptor layer on one surface of the cantilever leads to lateral stresses in the layer, which causes bending of the cantilever. Stress can be both a tightening and stretching. Thus the deviation of the free end of the console from its equilibrium position in the simplest case is connected with the lateral voltage via Stoney's formula:

$$\Delta \sigma \approx \frac{ET^2}{3(1-\nu)L^2} \Delta z,$$

Рис.2. Конструкции кантилеверных датчиков

Fig.2. Designs of cantilever sensors

длинную и тонкую консоль с низкой жесткостью. Кантилеверы для резонансного режима характеризуются высокой жесткостью и, соответственно, большей резонансной частотой. Обычно кантилеверы имеют золотое покрытие на одной стороне, которое служит двум целям: улучшает отражательные свойства и обеспечивает селективную модификацию только одной стороны кантилевера. Возможно размещение нескольких консолей на одном чипе для многофакторного анализа.

Благодаря распространению техник фотолитографии многие научные группы создают собственные конфигурации кантилеверов различных форм и размеров для решения конкретных задач. Традиционной формой кантилевера является прямоугольная. При этом возможно различное соотношение длины, ширины и толщины. В статическом режиме латеральные размеры напря-

мую не влияют на чувствительность датчика, так как поверхностное напряжение изотропно и равномерно по всей его активной поверхности [5]. Однако они могут влиять на чувствительность системы детекции, например, лазерно-оптической системы, в которой измеряется перемещение свободного конца кантилевера, квадратично зависящее от его длины. При этом толщина кантилевера должна быть минимальной. Для резонансных кантилеверов было показано, что уменьшение соотношения длины и ширины при постоянной толщине ведет к повышению чувствительности молекулярного связывания ангиопоэтина-1 в жидкости [6]. Данный результат закономерен, так как от указанного соотношения зависят резонансная частота и добротность.

Кантилеверы могут иметь и не прямоугольную форму. Так, например, треугольные канти-

where $\Delta\sigma$ is the change in surface stress, ΔZ is the relative deflection of the cantilever, ν is Poisson's ratio, E is young's modulus of the cantilever material, T and L are its thickness and length. Thus, by measuring the deflection of the cantilever as the result of biospecific binding, we can calculate the surface tension, which depends on the concentration of the target substance in the environment.

Dynamic mode of the cantilever sensors is based on the change in resonance frequency of the cantilever upon binding of analyte from a solution. The cantilever is

a high- q resonator whose resonant frequency depends on the effective mass and stiffness of the console. As a result of interaction of analyte molecules with the receptor layer, one or both of these characteristics can change, which can be registered in a shift of the resonance frequency of the cantilever [4]:

$$\Delta f = \frac{1}{2} f_n \left(\frac{\Delta k}{k} - \frac{\Delta m}{m} \right),$$

where Δf , Δk , Δm are changes of the resonance frequency, stiffness and mass of the cantilever and f_n , k and m are the initial values of these parameters.

VARIETY OF MICROCANTILEVERS AND THEIR PROPERTIES THAT DETERMINE POSSIBILITY OF THEIR USE AS BIOSENSORS

The first experiments in the field of creation of micromechanical sensors have used standard commercial cantilevers for scanning probe microscopy. Due to the development of this area the cantilevers without a needle for scanning of a surface, who are specially adapted for use in biosensors began to be developed. The cantilevers for static modes have a long and thin console with low rigidity. The cantilever for resonance mode are characterized by high stiffness and, respectively, by a higher resonant frequency.

леверы из нитрида кремния имеют меньшую жесткость, а значит более чувствительны в статическом режиме. Изменение формы кантилевера для резонансного режима может иметь следующие предпосылки: изменение моды колебаний, выборочное возбуждение колебаний, увеличение добротности и уменьшение затухания в жидкости и, как результат, увеличение чувствительности. Например, Т-образный пьезоэлектрический резонатор показал чувствительность на уровне фемтограмм [7].

Помимо разных форм, кантилевер может содержать несколько слоев из разных материалов. Часто дополнительные слои применяются для интеграции в датчик системы регистрации или возбуждения колебаний [8]. Активные слои для возбуждения колебаний часто выполнены из пьезоэлектрического или магнитоэластичного материала. Кантилевер может содержать и пассивные слои, разделяющие активные или изменяющие его свойства, например, жесткость. Простейшим вариантом являются биморфы, состоящие из двух слоев одинаковой длины. Более сложными системами являются кантилеверы, содержащие слои разной длины и геометрии. Такие системы имеют внутренние неоднородности, приводящие к уникальным резонансным свойствам [9].

Датчик может представлять собой не просто отдельный кантилевер, но может быть совмещен с другими элементами сенсора, например измерительной камерой. Так, в [10] авторы использовали кантилеверы, совмещенные с микрофлюид-

Рис.3. Два кантилевера в микрофлюидном канале [10]

Fig.3. Two cantilevers in a microfluidic channel [10]

ным каналом, по которому течет образец (рис.3). С помощью канала, сформированного внутри кантилевера, удалось достичь высокой чувствительности при измерении массы в резонансном режиме [11].

Существуют сенсоры, работающие на основе измерения латеральных напряжений, в которых вместо зафиксированного с одного конца кантилевера используются мембраны, закрепленные по периметру [12] или в нескольких точках. Такие сенсоры имеют ряд преимуществ. Например, обратная сторона мембраны может быть изолирована от контакта с образцом, что уменьшает влияние неспецифического связывания. Было показано, что мембранный сенсор, закрепленный с четырех сторон небольшими "мостиками" (рис.4),

Usually the cantilevers have a gold coating on one side that serves two purposes: enhances the reflective properties and provides selective modification on only one side of the cantilever. Placement of several consoles on one chip for multivariate analysis is possible.

Thanks to the development of photolithography many scientific groups create their own configurations of cantilevers of different shapes and sizes for specific tasks. The traditional form of the cantilever is rectangular. It is possible to vary the ratio of length, width and thickness. In the static mode, the lateral dimensions do not directly

affect the sensitivity of the sensor, because the surface tension is isotropic and uniformly over the entire active surface [5]. However, they can affect the sensitivity of the detection system, for example, of laser-optical system, in which the displacement of the free end of the cantilever, which quadratically depends on its length, is measured. At the same time the thickness of the cantilever should be minimal. For a resonant cantilever has been shown that the decrease of the ratio of the length and width at a constant thickness leads to the increased sensitivity of molecular binding of angiopoietin-1 in the fluid [6]. This result is logical,

as the resonant frequency and q-factor depend on the specified ratio.

The cantilevers may have not a rectangular shape. So, for example, triangular cantilevers of silicon nitride have lower stiffness and therefore are more sensitive in static mode. Changing the shape of the cantilever for resonance mode can have the following background: change the vibration modes, selective excitation of vibrations, the increase of q-factor and decrease of damping in the fluid and, as a result, increase of sensitivity. For example, a T-shaped piezoelectric resonator showed a sensitivity of the order of femtograms [7].

Рис.4. Схематичное изображение мембранного сенсора напряжений [13]

Fig.4. Schematic representation of membrane stress sensor [13]

имеет более высокую чувствительность по измерению латеральных напряжений по сравнению с обычными кантилеверами [13].

ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА МИКРОКАНТИЛЕВЕРОВ

Основной технологией производства микрокантилеверов является фотолитография. Доступны коммерческие кантилеверы из кремния, нитрида кремния или оксида кремния любых форм и размеров длиной от 10 до 500 мкм и толщиной вплоть до 12 нм. Однако для специфических задач, в том числе достижения максимальной

чувствительности, кантилеверы должны быть специально разработаны и произведены, чтобы удовлетворять всем требованиям. Кантилеверы изготавливаются с использованием хорошо отработанной тонкопленочной технологии, обеспечивающей низкую стоимость, хороший выход продукции и воспроизводимость. Она включает нанесение тонкой пленки материала, структурирование с помощью фотолитографии и травление, а также последующую микрообработку. Обычно перед основным материалом на подложку наносится защитный слой для облегчения последующего отделения изделия.

Чувствительность кантилеверного сенсора в статическом режиме зависит от модуля Юнга материала кантилевера. Кремний имеет достаточно большое значение модуля Юнга, поэтому кантилеверы, произведенные из более мягких материалов, будут более чувствительными. Распространение получили полимерные материалы, такие как SU-8 и полиметилметакрилат (ПММА). Поскольку они являются фоторезистами, для них подходят технологии прямой фотолитографии, однако могут применяться и другие технологии, например, отливка или трафаретная печать [14]. В работе [15] авторы изготавливали кантилеверы из 6-мкм пленки полиэтилентерефталата, вырезая пластинки необходимой формы при помощи УФ-лазера. В итоге получился массив из трех кантилеверов длиной 600 мкм, шириной 250 мкм и толщиной 6 мкм. На базе таких кантилеверов был создан биосенсор

In addition to different shapes, the cantilever may include multiple layers of different materials. Additional layers are often used to integrate in the sensor of system for registration or excitation of oscillations [8]. An active layers for excitation of oscillations are often made of piezoelectric or magnetoelastic material. The cantilever may contain also passive layers that separate the active or change its properties, e.g., stiffness. The simplest option are bimorphs, consisting of two layers of equal length. The cantilevers with layers of different length and geometry are more complex systems. Such systems have internal heterogeneity,

leading to a unique resonance properties [9].

The sensor can contain not only the cantilever, but can be combined with other elements of the sensor, e.g. measuring chamber. So, in [10], the authors used cantilevers combined with a microfluidic channel through which the sample flows (Fig.3). Using the channel in the cantilever it was succeeded to achieve high sensitivity in the measurement of mass in the resonance mode [11].

Also the sensors are developed that operate based on the measurement of lateral stresses, in which instead of the cantilevers the membranes that are fixed on perimeter [12] or in several

points are used. Such sensors have several advantages. For example, the reverse side of the membrane can be isolated from contact with the sample which reduces the effect of nonspecific binding. It was shown that the membrane sensor, fixed by the four small "bridges" (Fig.4), has a high sensitivity for the measurement of the lateral stress compared with conventional cantilevers [13].

TECHNOLOGIES FOR PRODUCTION OF MICROCANTILEVERS

Photolithography is the main technology for the production of microcantilevers. Commercial cantilevers of silicon, silicon nitride or silicon oxide in

для регистрации одноцепочечной ДНК: одна сторона кантилевера покрывалась слоем золота толщиной 50 нм, на который прикреплялась ДНК, комплементарная к детектируемой. В эксперименте удалось обнаружить концентрации ДНК до 0,01 мкМ в объеме 0,2 мл.

ТЕХНОЛОГИИ БИОФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ МИКРОКАНТИЛЕВЕРОВ

Сенсорный слой является ключевым элементом кантилеверных сенсоров. Его характеристики определяют чувствительность и селективность биосенсора. Такой слой обычно состоит из рецепторных молекул, обладающих свойством биоспецифического связывания, и вспомогательных молекул, обеспечивающих надежную фиксацию и правильное расположение рецепторов. Антитела и нуклеиновые кислоты (ДНК-зонды) являются наиболее часто используемыми рецепторными молекулами для детекции патогенных агентов.

Физическая сорбция – простейший способ иммобилизации антител на поверхности кантилевера, при этом их активность может снизиться в результате денатурации или неправильной ориентации. Регенерация подобных сенсорных слоев также представляется затруднительной, так как физически адсорбированные молекулы могут быть легко смыты. Более предпочтительна ковалентная пришивка антител, при которой используются вспомогательные молекулы, выполняющие роль линкеров.

Для создания на поверхности кантилевера сенсорного слоя часто используются самоорганизующиеся монослои (СОМ) на основе тиолов [16] для золотой поверхности или силатранов [17] – для кремниевой. Соединения на основе органосиланов создают развитую поверхность. Для достижения наилучшей активности в качестве рецепторов могут использоваться только Fab-фрагменты антител [18]. Олигонуклеотиды могут быть легко модифицированы тиольной группой и пришиты напрямую на золотую поверхность кантилевера [19].

Нанесение сенсорного слоя может осуществляться путем полного погружения кантилевера в модифицирующий раствор [20], однако данный способ неприменим, если кантилевер имеет несколько консолей. Модификация каждой консоли разными веществами является трудной задачей. Одно из решений – использование набора капилляров подходящего размера для каждой консоли [21]. Технология микропечати, аналогичная применяемой при создании ДНК чипов, также пригодна для нанесения сенсорного слоя [22].

СПОСОБЫ ДЕТЕКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОКАНТИЛЕВЕРОВ

Основным способом детекции отклонения кантилевера от положения равновесия является оптический (рис.5), который, как и сам кантилевер, пришел из зондовой микроскопии. Лазерный луч направляется на кончик консоли

a variety of shapes and sizes of length from 10 to 500 μm and thickness up to 12 nm are available. However, for specific tasks, including achievement of the maximum sensitivity, the cantilever should be specially designed and produced to meet all requirements. The cantilevers are manufactured using well-established thin-film technology providing low cost, good production yield and reproducibility. It comprises applying a thin film of material, structuring via photolithography and etching, and subsequent micromachining. Usually a protective layer is applied on a substrate before the main material to facilitate the subsequent separation of the product.

The sensitivity of cantilever sensors in the static mode depends on the young's modulus of the material of the cantilever. Silicon has a large young's modulus, therefore, the cantilever made of soft materials will be more sensitive. Polymeric materials such as SU-8 and polymethylmethacrylate (PMMA) are widely used. Since they are photoresists, the direct photolithography is suitable, but other technologies, for example, molding or screen printing can also be applied [14]. In [15], the authors fabricated the cantilevers using 6- μm film of polyethylene terephthalate. Plates of the required forms were cut with a UV laser. The result is an array of three

cantilevers that are 600 μm long with a width of 250 μm and a thickness of 6 μm . On the basis of such cantilevers the biosensor for registration of single-stranded DNA has been created: one side of a cantilever was coated with a 50 nm thick layer of gold on which DNA, complementary to a detected was attached. In the experiment were able to detect concentrations of DNA to 0.01 μM in a volume of 0.2 ml.

TECHNOLOGIES FOR BIOFUNCTIONALIZATION OF MICROCANTILEVERS

The sensor layer is a key element of cantilever sensors. Its

Рис.5. Схема лазерно-оптической системы регистрации изображения

Fig.5. Scheme of laser-optical system for image registration

Рис.6. Схема пьезорезистивной системы регистрации отклонения [25]

Fig.6. Scheme of the piezoresistive system for registration of deviation [25]

кантилевера и, отражаясь от него, попадает на детектор положения. Детектором может служить чувствительный фотодиод [23] или ПЗС-камера [24]. При отклонении кантилевера от первоначального положения, отраженный луч перемещается по детектору, причем его перемещение усиливается за счет "оптического плеча". Такой метод регистрации является чрезвычайно точным, позволяя детектировать даже субнанометровые перемещения, но имеет и ряд недостатков, например, довольно большие геометрические размеры системы, так как необходимость

усиливать перемещение луча по фотодиоду приводит к увеличению расстояния от кантилевера до детектора. Кроме того, сфокусированное лазерное излучение может служить причиной локального нагрева образца и датчика. Для достижения максимальной чувствительности необходимо использовать качественные источник излучения и детектор, что делает всю систему достаточно дорогостоящей.

Альтернативным методом детекции, получившим распространение в последнее десятилетие благодаря высокому уровню развития литогра-

characteristics determine the sensitivity and selectivity of the biosensor. This layer usually consists of receptor molecules, having the property of biospecifically binding, and accessory molecules that provide a secure fit and correct location of the receptors. Antibodies and nucleic acids (DNA probes) are the most commonly used receptor molecules for the detection of pathogenic agents.

Physical adsorption is the simplest method of immobilization of antibodies on the surface of the cantilever, however, their activity may decline as a result of denaturation or the wrong orientation.

Regeneration of such sensitive layers is also difficult, since physically adsorbed molecules can be easily washed away. Covalent attachment of antibodies, which uses a helper molecule that performs the role of linkers, is more preferred.

Self-organizing monolayers (SOM) based on thiols [16] for a gold surface or on silatranes [17] for silicon, are often used to create a sensor layer on the surface of the cantilever. Compounds on the basis of organosilanes create a developed surface. For achievement of the best activity only Fab-fragments of antibodies can be used as receptors [18]. The oligonucleotides can be

easily modified by thiol group and attached directly on the gold surface of the cantilever [19].

The application of a sensor layer may be performed by full immersion of the cantilever in the modifier solution [20], however, this method does not apply if the cantilever has a few consoles. Modification of each console by different substances is a difficult task. One of the possible solutions is the use of a set of capillaries of a suitable size for each console [21]. Micro-printing technology that is similar to used in the creation of DNA chips, is also suitable for deposition of sensor layer [22].

фических техник, является пьезорезистивная система. Она основана на изменении сопротивления датчика, находящегося на поверхности кантилевера, в ответ на возникновение поверхностного напряжения при изгибе консоли. Таким датчиком может служить простой золотой электрод нанометровой толщины, нанесенный на поверхность кантилевера (рис.6). Часто для измерений с помощью пьезорезистивного кантилевера применяется электрическая схема на основе моста Уитстона [25]. Данный метод обладает большим потенциалом для создания компактных сенсорных устройств с высокой степенью интеграции, однако обычно обладает на порядок меньшей чувствительностью. Также для производства кантилеверов со встроенным пьезорезистивным датчиком требуется специальное оборудование, что оправдано только при большом объеме производства.

Другие методы детекции не получили широкого распространения. Например, емкостной метод, основанный на измерении емкости плоского конденсатора, одной из обкладок которого является микрокантилеверный датчик [26], позволяет с высокой точностью регистрировать изгиб кантилевера, однако не применим в растворах электролитов. Также существует оптический метод, основанный на интерференции отраженного от кантилевера луча с опорным лазерным лучом [27, 28]. Сколотый конец оптического волокна помещается вблизи поверхности кантилевера, и одна часть излучения отражается

от границы оптоволоконка и среды, а вторая – от поверхности кантилевера. Эти два излучения интерферируют внутри волокна и интерференционный сигнал может быть измерен фотодетектором. Данный метод является чрезвычайно чувствительным, позволяя измерять отклонения до 0,1 Å, но не подходит для больших перемещений и сложен из-за необходимости очень точно позиционировать оптоволоконно.

Оптические методы детекции отличаются самым большим разнообразием. Кантилевер сам может выступать в качестве волновода [29]. Его отклонение может быть зарегистрировано с помощью дифракционной решетки или по изменению интерференционной картины на его поверхности.

В работе [30] продемонстрирован интересный подход к измерению поверхностного напряжения путем встраивания полевого транзистора на основе перехода металл-оксид-полупроводник в основание кантилевера. Затвор полевого транзистора увеличивается с возникновением поверхностного напряжения, вызывая уменьшение тока стока при отклонении. Авторы исследования декларируют низкий шум и высокую чувствительность данного метода.

Продолжение в следующем номере.

Наша искренняя благодарность РФФИ (проект 15-04-07678) и Министерству образования и науки за финансовую поддержку (проект 02.G25.31.0135)

METHODS OF DETECTION USING MICROCANTILEVERS

The main method of detection of the deviation of the cantilever from the equilibrium position is the optical method (Fig.5), which, as the cantilever came from the AFM. The laser beam is directed to the console tip of the cantilever and reflected from it, falls on the position detector. Sensitive photodiode [23] or CCD camera [24] can be used as a detector. When the cantilever is deflected from the initial position, the reflected beam moves across the detector, and its movement is enhanced by the "optical leverage". This method of registration is extremely precise, allowing the

detection of even subnanometre move, but has a number of disadvantages, for example, relatively large geometric size of the system, as the need to strengthen the movement of the beam on the photodiode leads to an increase in the distance from the cantilever to the detector. In addition, focused laser radiation can cause local heating of the sample and the sensor. To achieve maximum sensitivity it is necessary to use a quality radiation source and detector, which makes the whole system quite expensive.

An alternative method of detection that has been widely used in the last decade due to the high level of development of the lithographic techniques is

the piezoresistive system. It is based on the change in resistance of the sensor as a result of surface stresses during the bending of the cantilever. A plain gold electrode of nanometer thickness deposited on the surface of the cantilever (Fig.6) can be used as such a sensor. The electric circuit based on the Wheatstone bridge is also often used for measurements using piezoresistive cantilever [25]. This method has great potential for the creation of compact sensor devices with a high degree of integration, however, typically has an order of magnitude lower sensitivity. In addition, the production of cantilevers with integrated piezoresistive sensor requires special equipment that

ЛИТЕРАТУРА

1. Колесов Д.В., Яминский И.В. Кантилеверы для сканирующей зондовой микроскопии // Нано- и микросистемная техника. 2007. № 11(86). С. 5–11.
2. Gimzewski J.K., Gerber C., Meyer E., Schlittler R.R. Observation of a chemical reaction using a micromechanical sensor // Chem. Phys. Lett. 1994. 217. P. 589–594.
3. Butt H.-J. A Sensitive Method to Measure Changes in the Surface Stress of Solids // J. Colloid Interface Sci. 1996. 180. P. 251–260.
4. Chen G.Y., Thundat T., Wachter E.A., Warmack R.J. J. Appl. Phys. 1995. 77 (8). 3618–3622.
5. Sang S. et al. Surface stress-based biosensors Biosensors and Bioelectronics, 51(2014), 124–135.
6. Ricciardi C., Canavese G., Castagna R., Ferrante I., Ricci A., Marasso S.L., Napione L., Bussolino F. Biosens. Bioelectron. 2010. № 26(4). P. 1565–1570.
7. Pang W., Yan L., Zhang H., Yu H.Y., Kim E.S., Tang W.C. 2006. Appl. Phys. Lett. 88 (24). 243503.
8. Hwang K.S., Lee J.H., Park J., Yoon D.S., Park J.H., Kim T.S. 2004. Lab. Chip. 4(6), 547–552.
9. Johnson B.N., Mutharasan, R., 2011a. Sens. Actuators 155 (2), 868–877.
10. Nordström M., Zauner D.A., Calleja M., Hübner J., Boisen A. Integrated optical readout for miniaturization of cantilever-based sensor system// Appl. Phys. Lett. 91, 103512 2007.
11. Burg T.P. et al. Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. Nature 446, 1066–1069 (2007).
12. Chatzipetrou M., Tsekenis G., Tsouti V., Chatzandroulis S., Zergioti I. 2013. Applied Surface Science 278, 250–254.
13. Yoshikawa G., Akiyama T., Loizeau F., Shiba K., Gautsch S., Nakayama T., Vettiger P., Rooij N., Aono M. 2012. Sensors 12, 15873–15887.
14. Lucat C., Ginet P., Ménil F. New Sacrificial Layer Based Screen-Printing Process for Free-Standing Thick-Films Applied to MEMS, Inter. Journal of microelectronic and electronic packaging. 2007. 4. 86–92.
15. Zhang X.R., Xu X. Development of a biosensor based on laser-fabricated polymer microcantilevers. Appl. Phys. Lett. 2004. 85(12). PP. 2423–2425.
16. Berger R. et al. Surface stress in the self-assembly of alkanethiols on gold, Science. 1997. 276. 2021.
17. Hsieh S., Hsieh S.-L., Hsieh C., Lin P.-Ch., Wu Ch.-H. Label-Free Glucose Detection Using Cantilever Sensor Technology Based on Gravimetric Detection Principles, Journal of Analytical Methods in Chemistry. 2013. Vol. 2013, Article ID 687265, 5 pages.
18. Rao S.V., Anderson K.W., Bachas L.G. (1998) Oriented immobilization of proteins. Mikrochim Acta 128: 127–143.
19. Hagan M.F., Majumdar A., Chakraborty A.K. (2002) Nanomechanical forces generated by surface grafted DNA. J Phys Chem B 106: 10163–10173.

is reasonable only in case of large volume of production.

Other detection methods have not received wide use. For example, a capacitive method, based on measuring capacitance of a plane capacitor, one of electrodes of which is microcantilever sensor [26], allows high accuracy of registration of the bending of the cantilever, however, is not applicable to solutions of electrolytes. There is also an optical technique based on interference of reflected from a cantilever beam with a reference laser beam [27; 28]. The cleaved end of the optical fiber is placed near the surface of the cantilever, and one part of radiation is reflected from the

boundary of the fiber and the environment, and the second part – from the surface of the cantilever. These two radiation interfere inside the fiber and the interference signal can be measured by a photodetector. This method is extremely sensitive, allowing to measure deviation of 0.1 Å, but is not suitable for large displacements and is complex because of the need very precisely position the optical fiber.

Optical detection methods differ by the big variety. The cantilever itself can act as a waveguide [29]. Its deviation can be registered by using a diffraction grating or by changing the interference pattern on its surface.

An interesting approach to the measurement of surface tension by embedding a MOSFET transistor in the base of the cantilever is shown in [30]. The shutter of the field transistor increases with increasing of surface tension, causing a decrease of drain current upon deviation. The authors declare low noise and high sensitivity of this method. ■

To be continued in the next issue

Our sincere gratitude to the RFBR (project 15-04-07678) and the Ministry of education and science (project 02.G25.31.0135) for financial support

20. Fritz J., Baller M.K., Lang H.P., Strunz T., Meyer E., Guntherodt H.-J., Delamarche E., Gerber Ch. and Gimzewski J.K. 2000 *Langmuir* 16 9694.
21. McKendry R., Zhang J., Arntz Y., Strunz T., Hegner M., Lang H.P., Baller M.K., Certa U., Meyer E., Güntherodt H.J., Gerber C. Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array // *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 2002 Jul 23; 99(15):9783-8.
22. Bietsch A. et al. Rapid functionalization of cantilever array sensors by inkjet printing // *Nanotechnology*. 2004. 15(8). 873.
23. Meyer G., Amer N.M. (1988) Novel optical approach to atomic force microscopy // *Appl. Phys. Lett.*, 53(12), 1045-47.
24. Kim B.H., Mader O., Weimar U., Brock R. & Kern D.P. (2003) Detection of antibody peptide interaction using microcantilevers as surface stress sensors. *J. Vac. Sci. Technol. B*, 21(4), 1472-1475.
25. Nordström M., Keller S., Lillemose M., Johansson A., Dohn S., Haefliger D., Blagoi G., Havsteen-Jakobsen M., Boise A. SU-8 Cantilevers for Bio/chemical Sensing; Fabrication, Characterisation and Development of Novel Read-out Methods // *Sensors* 2008. 8(3). 1595-1612.
26. Blanc N., Brugger J., Rooij N.F.D., Durig U. (1996) Scanning Force Microscopy in the Dynamic Mode Using Microfabricated Capacitive Sensors // *J Vac. Sci. Technol. B*, 14(2), 901-05.
27. Erlandsson R., McClelland G.M., Mate C.M., Chiang S. (1988) Atomic force microscopy using optical interferometry // *J. Vac. Sci. Technol. A*, 6(2), 266-70.
28. Rugar D., Mamin H.J., Guethner P. (1989) Improved fiber-optic interferometer for atomic force microscopy // *Appl. Phys. Lett.*, 55(25), 2588-90.
29. Zinoviev K., Domínguez C., Plaza J.A., Cadalso Busto V.J., Lechuga L.M. A novel optical waveguide microcantilever sensor for the detection of nanomechanical forces // *J. Lightw. Technol.* 2006. 24. 2133-2138.
30. Shekhawat G., Tark S.H., Dravid V.P. MOSFET-embedded microcantilevers for measuring deflection in biomolecular sensors // *Science*. 2009. 311 : 1592-95.