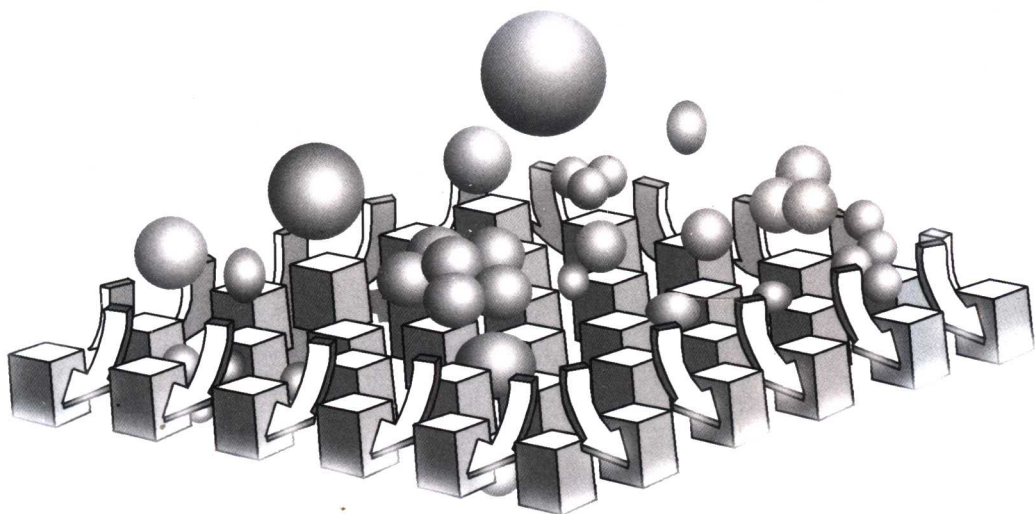


蒋稼欢 编著

生物医学微系统 技术及应用



Chemical Industry Press



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

生物医学微系统技术及应用

蒋稼欢 编著



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

生物医学微系统技术及应用/蒋稼欢编著. —北京:
化学工业出版社, 2005.12
ISBN 7-5025-8054-9

I. 生… II. 蒋… III. 生物医学工程 IV. R318

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 151472 号

生物医学微系统技术及应用

蒋稼欢 编著

责任编辑: 麻雪丽

责任校对: 顾淑云

封面设计: 王湘燕

*

化学工业出版社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

化学工业出版社印刷厂印装

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 24 $\frac{1}{4}$ 字数 623 千字

2006 年 3 月第 1 版 2006 年 3 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8054-9

定 价: 59.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

首先要说的是, 聚拢于我笔端的是我一段时间收集到的在这一领域中全世界杰出工程师和科学家们的近年来智慧作品的小小一部分。即使是这么小小的一部分, 也折射出这些学者们高超科学技艺中的首创精神和激人遐想的感染力。

确实, 自 20 世纪 90 年代以来, 微型化的技术手段与生命科学问题日益紧密地结合起来, 几乎同时涌现出诸如基因芯片、微阵列、微全分析系统 (μ TAS)、芯片上实验室 lab-on-a-chip 等技术概念和形式, 并正在不断地推出各种适于解决特定生命科学问题的微结构、微器件、微装置及微系统。微型化技术的进展已经对化学、工程与生命科学之间的交叉产生了巨大影响, 尤其是微图型化技术和微流动技术等, 正在彻底改变生物工程与生命科学研究中分析方法学的面貌, 并在不同程度上已构成或正在构成生命科学中众多热点领域 (如基因组、蛋白质组、高通量药物筛选、组织工程、转基因技术甚至克隆技术等) 中的许多复杂操作过程的新一代重要的技术手段。国际上, 众多力量纷纷介入这一令人激动的科学与技术前沿领域, 已举办了多种形式的定期会议, 如 Chip to Hits (每两年一次)、BioMEMS、BioMEMS & Biomedical Nanotechnology (每年一次) 等; 不但众多著名杂志不断一浪接一浪地报道这些领域的进展, 还创办了专门的主题杂志, 如 Biomedical Microdevices、Lab-on-a-chip 等。从日益增多的文献及专利申请氛围中, 我们似乎感觉到未来的生命科学研究或生物医学工程实践中的众多操作和创新活动很大程度上将是在这些微器件或微系统基础上展开的, 也终将形成新颖的微型化生产技术。

微型化不啻是技术概念, 也透露着人类希望了解物质世界全景的心绪, 至少是在尺度上的。不但要辽阔, 也要信手拈来“细胞”, 见微着著, 诚如人们一直追问的一个哲学命题: “一粒沙子是否会反映出整个宇宙”?

恰如表体比的尺寸效应那样, 在生物医学微系统领域中的探索越深入, 内容越会丰富。作者在本书中, 选取涉及该领域中一些关键的技术进展, 以其真实报道的数据和逻辑勾画、串联汇之于笔端, 其中许多例子介绍得十分详细, 已可作为继续深入研究很好的起点。同时作者也意识到, 在该领域中已演绎出的丰富多彩的内容, 难以在本书中囊括全面, 比如“微尺度下的生物传感”、“生物样本的微流动注入分析”等; 另外, 本书所指的微技术主要界定在微米尺度上, 但它将与纳技术一起构成生物医学中微型化过程的两个紧密衔接的必要手段。期望我所着墨的这些知识, 既是照耀我研究道路的“光芒”, 也会对读者有所裨益。

要指出的是, 因篇幅所限, 许多重要文献不能一一列出, 在此期待相关作者与广大读者能予以谅解。

我要在此特别感谢国家自然科学基金课题 (3997202 和 10272122) 对本书中一些工作探索的支持。还要感谢剑桥大学的 Wilhelm Huck 博士及其小组, 尤其是 Sullivan Terena P.、Majad Khan、Steve Edmondson 等对我的学术所给予的支持; 感谢尚在剑桥攀登学术顶峰的 Hongwei Li 博士、Xiulai Xu 博士、Zhongqiang Yang 博士与我在剑桥期间一起共事探讨和互相鼓励; 同时也要感谢重庆大学吴云鹏教授、杨瑞芳教授、蔡绍哲教授以及李晓红教

授等长期以来对我涉足本书提到的科学领域所给予的关切和指导。最后，也要感谢我妻子王静在我将时间和精力付诸斯书时为我承担的所有其他劳动。

蒋稼欢

2005 年春于嘉陵江畔·重庆大学

(e-mail: jhuan@cqu.edu.cn)

内 容 提 要

生物医学微系统是指涉及生命科学和技术各领域中具有在微米级尺度上起功能效用的微结构或微组件及其集成物。

本书旨在刻画利用微系统技术去解决生物医学分析问题的方法和思路,内容包括微阵列芯片在内的微图型化技术、与生物分子及细胞生物学中研究和流程紧密结合的微流动技术等,主要反映软刻技术思路在生物科学和生物工程领域中的结合与渗透,并描述从生物分子水平到细胞水平中所展现的相当丰富的微技术形式和过程,使读者既能领略这一前沿领域的发展轮廓,又可把其中一些细节及数据作为继续深入研究的起点。

本书适合从事生物医学微米-纳米技术及相关专业的科研工作者、教师、研究生和本科生阅读参考。

目 录

第 1 章 微型化技术的基本概念	1
1.1 微、纳的概念	2
1.2 微型化空间的可利用性	7
1.3 微型化过程中的观察与加工	10
1.4 微米尺度上的生命活动与事件	17
参考文献	22
第 2 章 软刻类技术与相关工艺	24
2.1 自组装	25
2.1.1 自组装单层	25
2.1.2 自组装双分子层	34
2.1.3 自组装多层膜	40
2.1.4 其他自组装技术	44
2.2 微接触压印	47
2.2.1 操作方法和应用	47
2.2.2 在非平表面上形成微结构	51
2.2.3 用 POPS 实现聚电解质树状分支 结构定向生长	52
2.2.4 多层转移压印	53
2.2.5 多级台阶印章	54
2.3 微模塑	54
2.3.1 复制模塑	54
2.3.2 微转移模塑	55
2.3.3 毛细微模塑	55
2.3.4 毛细作用力印刷	57
2.3.5 有溶剂辅助的微模塑	58
2.4 热压纹工艺	58
2.5 注模工艺	59
2.6 多层软刻工艺	60
2.7 微通道内加工方法	61
2.8 LIGA 工艺	64
2.9 激光消融技术	66
2.10 三维直写技术	72
2.11 键合封装	74
参考文献	76
第 3 章 生物样本在基底上的微图型化	80
3.1 阵列和图型的含义	80
3.2 微图型化的技术途径	81
3.2.1 光刻途径	81
3.2.2 非光刻法途径	84
3.2.3 微阵列构建技术	90
3.3 DNA 微阵列	105
3.3.1 DNA 微阵列类型和构建	105
3.3.2 DNA 微阵列的应用概况	109
3.4 蛋白质微阵列和图型化	111
3.4.1 蛋白质在表面上的吸附行为	112
3.4.2 蛋白质微阵列技术	121
3.4.3 蛋白质微图型化	144
3.5 脂膜的图型化	159
3.5.1 侧向隔离策略基础上的脂膜图 型化	160
3.5.2 双重图型化	162
3.5.3 脂膜图型化方法比较	165
3.5.4 脂微阵列	165
3.6 糖微阵列和图型化	166
3.6.1 糖微阵列构建途径	167
3.6.2 糖的图型化	171
3.7 细胞微图型化	173
3.7.1 细胞在微米-纳米尺度上的响应 行为	175
3.7.2 细胞微图型化技术	183
参考文献	220
第 4 章 微流动技术基础	228
4.1 微流动的操纵方式	228
4.1.1 压力驱动的微流动	229
4.1.2 电渗流动	229
4.1.3 电毛细作用力驱动	232
4.1.4 基于 Marangoni 效应的驱动 方式	233
4.1.5 微流动中粒子/液滴的操纵方式	235
4.2 微流动通道基本组合方式	241
4.3 微通道中样本流动的基本动电操作	242
4.4 微流动处理与控制的连续方式、离散 方式及其集成途径	244
4.4.1 连续方式中存在的挑战	244
4.4.2 微阀及其集成	244
4.4.3 微流动非线性特性与数字化	249
4.4.4 微流动的离散处理方式	250
参考文献	259
第 5 章 生物样本处理和微流动技术	262
5.1 毛细管电泳芯片	263

5.1.1	概述	263	5.6.6	微量样本制备	304
5.1.2	电泳芯片的加工	265	5.6.7	样本制备与 CE 集成举例	305
5.1.3	芯片毛细管电泳上的检测方法	267	5.6.8	蛋白质结晶	305
5.1.4	毛细管阵列电泳	273	5.6.9	抽提点样微装置	308
5.1.5	双向凝胶电泳芯片	274	5.6.10	微注射装置	308
5.1.6	芯片电泳的优点和不足	275	5.7	细胞分离培养分析微装置	310
5.1.7	芯片毛细管电色谱	275	5.7.1	细胞的分离分选	311
5.2	微流动免疫测试格式举例	276	5.7.2	细胞裂解微装置	324
5.2.1	芯片毛细管电泳基础上的免疫 测试	276	5.7.3	细胞分离、裂解与反应/检测步骤 的集成	326
5.2.2	T 形传感器	278	5.7.4	细胞培养微装置	328
5.3	磁泳分离芯片	281	5.7.5	单细胞分析微装置	335
5.4	布朗棘齿微装置	281	5.8	高度集成举例	341
5.5	聚合酶链反应芯片及其集成	283	5.8.1	用于 DNA 分析过程集成的例子	341
5.5.1	微腔聚合酶链反应	283	5.8.2	基于电湿润的“数字式”微流动 芯片实验室	344
5.5.2	连续流过式聚合酶链反应	284	5.9	基于离心力的微分析装置	347
5.5.3	聚合酶链反应与逆转录过程的 结合	288	参考文献	351	
5.5.4	聚合酶链反应-毛细管电泳的 集成	289	第 6 章	药物传递和转基因过程中的微技术	356
5.5.5	聚合酶链反应-电化学的集成	292	6.1	微针阵列	357
5.5.6	聚合酶链反应-寡核苷酸微阵列的 集成	292	6.1.1	实心微针	357
5.6	样本处理和传递过程中的芯片技术	293	6.1.2	中空微针	358
5.6.1	概述	293	6.1.3	转基因	361
5.6.2	微过滤器	294	6.2	微电穿孔类装置	362
5.6.3	预浓聚和抽提	300	6.3	控释微芯片	364
5.6.4	微透析样本清洗芯片	303	6.4	微粒子应用于药物靶向传递	368
5.6.5	微扩散稀释器	303	6.5	多孔膜(生物胶囊)	369
			参考文献	371	
			附录	关于聚二甲硅氧烷	373

第1章

微型化技术的基本概念

1959年12月29日在加州理工学院举行的美国物理学年会上, Richard Feynman 在其题为“*There is plenty of room at the bottom*”中尽其所能地列举了将物理定律应用到微型化过程的潜力。自此以后, 从微电子学领域开始, 工程界掀起了微加工的技术革命, 随着手段的更新, 芯片密度按照摩尔定律(请跟踪 <http://www.intel.com/research/silicon/moores-law.htm>)翻新, 随后是微电子机械系统(microelectromechanical system, MEMS)技术、纳米技术接踵而来。至于在化学领域与生命科学领域中, 人们只是近十多年来才开始理解到微型化的潜力。著名的 Feynman 报告过去了40多年, 才有第一个芯片上实验室(Lab on a Chip)产品出现, 尽管如此, 伴随着一些印象很深的微型化组件与系统原型的开发, 在生命科学与医学工程领域中相关的微型化科学与技术研究的充分潜力与影响正在变得日益明显起来。

微型化(miniaturization)是人们试图在更小的尺度上实现降低运行成本与创建前所未有的新功能的重要努力方向。通常所说的微型化技术, 一方面是指在尺度上从大到小(top-down)地缩微到微米/纳米水平的技术; 另一方面是指在相反的尺度方向, 即从小到大(bottom-up)以处于原子或分子或分子聚集体等作为构建新功能结构物起点的技术。其目的在于实现宏观上已有的功能, 或实现新功能的创建, 或达到在这些尺度上新现象、新原理的发现。

本书所指的生物医学微系统是指涉及生命科学与技术各领域中, 以解决特定生物医学问题为指向的, 具有在微米尺度上起功能效用的微结构或微组件及其组合物或集成物, 是一系列基于微型化技术加工过程的产物, 或表现为宏观对应器械的缩微, 或呈现为独特功能的微工具、微型生物性机构等。其中, 微型化技术是实现各种各样生物医学微系统技术或产品的关键; 而系统则是取其最通常的工程性含义, 即具有特定功能的组件的组合或集成; 显然, 微系统则是指任何具有微米尺度特征的系统, 微结构是指那些尺度在微米级的结构, 由微结构所构成的微结构物具有由这种微结构形态所支持的技术功能。微系统则组合或集成数个微结构或微组件及其功能, 优化成一个整体系统, 从而提供一个或数个特定的功能。从上述意义, 目前以生物微电子机械系统(bioMEMS)、生物微系统(biomicrosystem)、生物芯片(biochip)以及针对生命科学的微流动(microfluidics)或芯片上实验室(lab-on-a-chip)或微全分析系统(micro-total analysis system, μ TAS)等冠名的领域均在所指的生物与/或医学微系统(bio-medical microsystem)的范畴之内。

当代微流动技术可以追溯到20世纪70年代中后期斯坦福大学开发硅基微气相色谱和IBM开发喷墨打印机微喷嘴的工作。Stevet Terry等的微气相色谱系统的所有组件(包括柱、注入器与检测器)均被构建在一块直径为75mm的硅芯片上。虽然这一工作被视为具有里程碑意义, 但是此后一段时期, 这个领域的工作几乎没有激发出人们更大热情。

不过,在 20 世纪 80 年代后期与 20 世纪 90 年代早期,生物医学微系统技术方面有两个重要进展,一个是建立在硅中一系列面积为 $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ 、深 $50\mu\text{m}$ 的孔阵列基础上的光可编址 pH 生理传感器(LAPS),这种装置的目的是检测评价细胞代谢;另一个是 i-STAT 分析仪,这种可一次性使用的装置是在硅片上加工有微电极和固定酶电极的阵列,用于传统全血分析(如血气、电解质、葡萄糖与血球压积等)。

尽管这些装置是很惊人的成就,但是集成的微流动装置的概念,直到 20 世纪 90 年代早期由瑞士 Ciba-Geigy 研究所 Manz 等提出以微全分析系统(micro-total analysis system, μTAS)的概念来替代特殊分析化学传感器这个传统概念时,这一领域似乎得到了巨大的推动。但是,微流动技术概念的实质也还常常被掩盖在更为广义通俗的分类称谓——芯片上实验室或微全分析系统的名下。所谓芯片上实验室或全微分析系统的技术概念则可能受到微机械学家们早期工作的启发。一些微机械学家设想用硅材料来构建不同类型的机械与微电子机械系统。他们的工作表明,通过微加工是可以构建出微米级的构建,例如齿轮、可动微镜、微扳手,甚至带有马达的复杂机械装置。随后多年出现一些具有实用意义的 MEMS 传感器装置,如用于汽车弹射气囊的微加速度器、测量引擎中熔流流动传感器以及测血压用的压力传感器。

随后,微型化分析技术作为一个研究主题很快兴起。1994 年在荷兰 MESA 研究所举办了首次专业会议(The $\mu\text{TAS} 94'$ Workshop),会议提交的研究论文集集中在传感器状的系统,芯片上实现电泳似乎是最有前景的微型化分析技术。但自此以后的 μTAS 会议上,微型化的范围几乎触及化学研究领域的所有方面,并逐步延伸到生物医学领域。

1.1 微、纳的概念

人类对事物认识的尺度存在着许多级别,诸如“宇观”、“宏观”、“介观”、“微观”、“纳观”、“渺观”等。尽管在数学上长度是连续的, $1\text{m} = 10^3\text{mm} = 10^6\mu\text{m} = 10^9\text{nm}$,但在不同的长度尺度上,事物有不同的行为表现与客观规律。按照目前人类所认识到的这些不同尺度上的物质行为与规律,以及人们所掌握的技术能力,人们普遍将纳米技术所处理的尺度范围定在大约 $0.1 \sim 100\text{nm}$ 之间,而微米技术所处理的尺度范围则在大约 $0.1 \sim 100\mu\text{m}$ 之间,本书即以这两个定量的尺度范围来定义微型化技术中的“纳”与“微”的概念^①。

人们大概是从加工的微马达行为开始实际认识到尺度微小的深远影响。1988 年美国加州大学 Berkeley 分校 Fan 等首次用表面微机械加工技术制成了一系列直径为 $60 \sim 120\mu\text{m}$ (相当于一根头发丝粗细)的同步式静电微马达,利用中心的四极转子和外围的多个定子之间的静电引力而工作,如图 1-1 所示。可近似地把一对定子与转子看作一个平行板电容器,忽略边界效应,则其电容为

$$C_x = \frac{\epsilon\epsilon_0 h x}{d}$$

式中, h 为该马达所用多晶硅材料的厚度; d 为定子与转子间的间隙距离; x 为定子与转子交叠的宽度; ϵ_0 为真空的介电系数; ϵ 为介质的相对介电系数。在定子与转子间施加恒定电压 V 时,这对转子-定子电极间的吸引力 F_1 为

$$F_1 = -\frac{\partial}{\partial x} \left(-\frac{1}{2} C V^2 \right) = \frac{\epsilon\epsilon_0 h V^2}{2d}$$

① 多孔材料的尺度定义可能有一些混淆。因为国际纯粹与应用化学联合会(International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC)有一套与微米-纳米尺寸不对应的定义,其中将直径小于 2nm 的孔称为微孔(micropore),直径在 $2 \sim 50\text{nm}$ 范围的称为介孔(mesopore),而直径大于 50nm 的孔为大孔(macropore),而没有纳孔(nanopore)的定义。

本书中也出现介观概念,按照通用的看法,为 $100\text{nm} \sim 100\mu\text{m}$ 。

设 $h=2\mu\text{m}$, $d=2\mu\text{m}$, $\epsilon_0=8.85\times 10^{-12}$
 $\text{C}/(\text{V}\cdot\text{m})$, $\epsilon=1$ 和 $V=50\text{V}$, 则

$$F_1=1.1\times 10^{-8}\text{N}$$

四对电极的力的总和则为

$$F=4F_1=4.4\times 10^{-8}\text{N}$$

如转子半径 r 为 $50\mu\text{m}$, 则可算得该马达的扭矩为

$$T=Fr=2.2\times 10^{-12}\text{N}\cdot\text{m}$$

为了对这个马达静电力的大小有一个概念, 再估算一下这个转子的重量。设转子的重量是直径为 $100\mu\text{m}$ 的多晶硅圆盘重量的一半, 则其重量 W 为

$$W=\frac{1}{2}\pi r^2 h \rho g$$

式中, ρ 为多晶硅材料的密度 (近似采用体硅的密度 $3.3\text{g}/\text{cm}^3$); g 为重力加速度 $9.8\text{m}/\text{s}^2$, 则可算得

$$W=1.8\times 10^{-10}\text{N}$$

两相比较, 可见静电力比转子重量大了约 2 个数量级。从宏观经验来看, 如果转子的摩擦力不比它的重量大很多的话, 静电马达应当很容易地转动起来。但是实际上发现, 马达转子的摩擦力要比预计大得多。要使这样根据宏观摩擦经验构建出来的马达转动起来, 还必须加较高的驱动电压 ($60\sim 100\text{V}$) 或者从工艺上进一步减小定子与转子之间的间隙 d (如减至 $1\mu\text{m}$), 即使这样, 其实际转速也比预计的低微静电马达在异步格式中的情形有较大改善, 主要是几种有利因素被用来对抗其中大的表面摩擦力。详细的计算表明, 介电材料形成的间隙在施加电压时其中的静电作用力变化十分复杂。这些结果使人们意识到在微尺度上, 宏观物体的摩擦理论不再成立, 在此条件下, 接触表面之间的静电力或黏附力远比重力大, 成了这种微尺度上的支配因素。

由类似这样在微加工例子中遇到的问题, 人们不禁怀疑当物体尺度不断缩小时, 现有的宏观经验还能用吗?

Trimmer 曾对一些作用力的数量级随系统缩微时的变化程度做过估计。假定选取系统的特征尺寸为 s , 并且当 s 缩微时系统的所有维度尺寸也缩微; 那么所考察的一些作用力的大小相对于 s 呈现出不同的数量级, 大致分别为静电力 (s^1)、表面张力 (s^1)、弹性力 (s^2) 与黏性力 (s^2)、惯性力 (s^3) 与磁场力 (s^3) 等。例如, 当系统的特征尺寸缩小为它的 $1/100$ 时, 其静电力与表面张力也将降低为它的 $1/100$, 弹性力与黏性力则降低为它的 $1/1000$, 而惯性力与磁场力则降低 $1/10000$ 。这说明, 与 s 高次方成比例的惯性力与磁场力在系统缩微后作用减小显著, 而与 s 低次方成比例的静电力、表面张力等的作用减小的幅度相对不大。因而, 在微尺度领域中, 各种作用力的相对重要性产生了逆转: 那些在宏观领域作用微小的力和现象, 如表面张力与界面现象, 在那里可能起着重要的作用; 许多情形的考察中纯运动学可以替代动力学。

许多研究表明, 微流动行为与人们宏观流体力学知识和经验有相当大的差别。例如, 微通道内的流动基本上是层流; 低雷诺数流动、Stokes 流动一般是线性的, 然而, 这种线性在微流动条件下并不能确保有简单解, 尤其是当微流动的尺度并不比大分子 (如 DNA/RNA 或蛋白质等) 的大小大很多时。换句话说, 连续性的基本假设被打破了。微装置中的

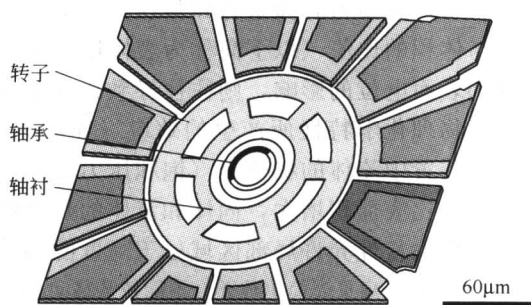


图 1-1 同步式静电微马达

流体驱动机制多为表面张力和黏性力，呈现出不同的阻力特性；由于在微装置中具有大的表面积与体积的比值（以下简称为表体比），流动中的大分子离微装置的表面并不很远，其运动受到表面电位的影响，则往往导致尚未确切理解的尺度效应区域。因而微通道固-液界面的微观物理化学特性所产生的效应（如电泳、电渗）对微流体的力学行为有重要影响。此时，微装置中流体的相变点（饱和压力和温度）不再是常数，将随尺度减小而降低；随着尺度减小，比表面积增大，固体和流体的热惯性减小，化学反应和热传递将加快；另外，微结构的热传输特性允许局部区域处于高度的耦合或分离状态……

在河流中，扇贝壳简单地开合不能使其移动。这种现象在微尺度流动中也同样存在。在微流体中，周期性地以相同方式（时间与作用力）向前与向后拍打流体，丝毫不能进退。这是因为在黏性起支配作用的流体中，前后用力所做的功互相抵消的缘故。Ali Najafi 等设计了一种简单微型游泳装置，其微机构是由 3 个轮子组成，它们通过两根轴状臂以线性排列方式连在一起。中轮有一个驱动源可以驱动两条臂的伸展和收缩。开始时，后臂收缩，然后前臂收缩，之后后臂伸展，最后前臂伸展。这种时间非对称性的周期运动可以在黏性流体中实现泳动前进。

表面张力是一种独特的力，它直接与长度相关。当尺度缩微到亚毫米级时，与压力（表面力）或质量（体积力）相比，表面张力就起支配作用。如果我们人类在尺度上是亚微米级的生物，那么我们日常所对付的力主要是表面张力了。要真是那样，可以想像我们人类所发明的许多机器将通过基于表面张力的马达来驱动，而惯性力则可能是一种奇怪的力，正如我们现在觉得表面张力一样。对于微装置而言，表面力是一种最典型的操作阻碍因素。对于表面微机械加工，表面张力与静态摩擦问题紧密相关。但是事实上，在微米级水平上表面张力也有许多有益的应用，例如可以防止喷墨打印头微喷嘴的漏液，维持液滴的稳定。在人体上最为著名的例子要数新生胎儿的第一声啼哭，其中最要紧的是羊膜液与空气之间的表面张力。表面张力也控制着肺泡的扩张。大自然选择脂双层膜作为细胞膜，每层膜的一侧是亲水性的，另一侧是疏水性，然后将蛋白质分子包埋其中，使得其中的表面张力（表面能）成为生命的最基本参数之一。表面张力显然也是导致血栓与炎症发生的一个主要因素。另见本章“荷叶效应”。

只要在液-液界面或液-固界面形成表面张力之差，用表面张力来诱导运动通常是可能的。有几种途径可以被应用来控制表面张力，例如化学的途径（如水蜘蛛的运动）、热的途径（如 Marangoni 力）、电的方法（如电湿润、电毛细作用、连续电湿润）。

当物体尺度继续缩小至与粒子运行的平均自由程同一数量级时，则介质连续性等宏观假定不再成立，此时进入纳米尺度领域。

我们现在大体上了解到，在纳米尺度领域内，当样本的尺寸、粒子的大小或者域的大小微小到可与特定的物理尺度作比较的话，如平均自由程、磁畴尺寸、声子的相干长度或者超导体中基态的相关距离等，那么其相应的物理现象及性质会受到尺度上的强烈影响，即被概括为纳米级上的尺度限制效应。例如，如果纳米级结构的尺寸接近电子或光子散射的特征长度（平均自由程），电子或光子被局限在纳米空间内，它们的运输受到限制，局域性和相干性增强，导致电子流或光传输的新模式。而且，长度尺度的变化将伴以物理现象的特征时间尺度的变化。

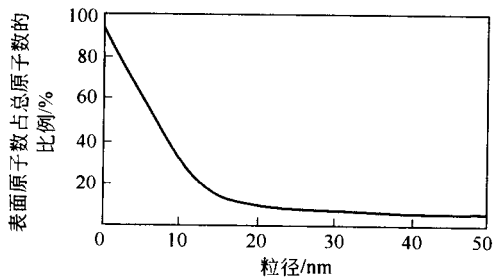


图 1-2 表面原子数与粒径的关系

此外，尺度下降使纳米体系包含的原子数大大降低，宏观固定的准连续能带消失了，而表现为分裂的能级，量子尺寸效应十分显著，这便使纳米体系的光、热、电、磁等物理性质与常规材料不同，出现许多新特性。

图 1-2 所示的是纳米颗粒的表面原子数与粒径的关系。

从图 1-2 可以看出，随着物质粒径的减小，

比表面积大大增加。粒径在 10nm 以下，增加表面原子数所占比例将迅速增加。粒径为 5nm 的颗粒，表面原子数占颗粒总原子数的 50%；粒径为 2nm 时，则增加到 80%。当粒径降到 1nm 时，表面原子数所占比例达到约 90% 以上，原子几乎全部集中到纳米粒子的表面。有人大致计算过，1g 纳米粒子表面积的总和可高达 100m² 以上。庞大的比表面积，键态严重失配，使物质具有高表面能，出现许多活性中心，使这些原子易与其他原子相结合而稳定下来，故具有极强的吸附能力或化学活性。若用高倍电子显微镜对金纳米粒子进行电视摄像，实时观察发现，这些粒子没有固定的形态，随着时间的变化会自动形成各种形状（如八面体、十面体、二十面体多孪晶等），它既不同于一般固体，又不同于液体，是一种准固体。在电子显微镜的电子束照射下，表面原子仿佛进入了沸腾状态。尺寸大于 10nm 后才看不到这种粒子结构的不稳定性，微米尺度粒子倒是具有稳定的结构状态。与微米尺度下的现象相比，纳米尺度上的表面效应又呈现出另一番惊人的景象。因此，纳米级不仅仅是“缩微再缩微”过程中的一步，而且是伴随有质的变化的一个新尺度范围。

像大肠杆菌、沙门菌之类的细菌，在水中是靠旋转鞭毛而前进的（利用生物体内的氢离子浓度差而动作）。它每秒可前进相当于自己体长的 5~10 倍，相当于普通摩托车的速度。根据计算，它所耗费的能量为 10⁻¹⁶J/s，相当于 10⁻¹⁶W 的功率。一个细菌质量约为 10⁻¹⁵kg，故相当于每千克体重只使用 0.1W 的动力。如换算到体重为 60kg 的人，则只要 6W 的动力（约 10⁻²hp）便可做与其相当的运动。

这种“质的飞跃”的例子是非常明显的，还可以从马达——分子马达的效率体会到。如图 1-3 是一种由 ATP 酶驱动的肌动蛋白马达，肌动蛋白纤维结合到热稳定的 F₁-ATP 酶的 γ 亚基上，水解时 F₁-ATP 酶的 γ 亚基在三个等距的催化位点转换，驱动肌动蛋白纤维臂的旋转。实验分析得出，这种酶所做的功在 80pN·nm 以上，几乎达到 100% 的效率。在所产生的力的基础上，在无载荷时这种马达的速度约为 17r/s。这充分说明，在纳米尺度上运行的这种 ATP 酶-肌动蛋白组合起来的马达具有优质旋转特性。

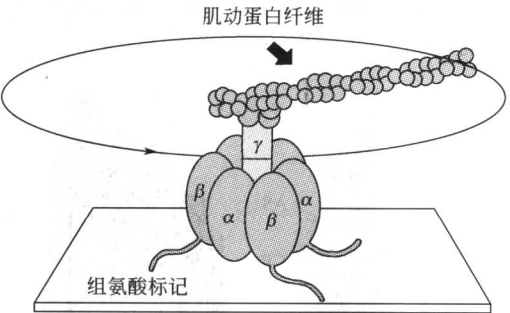


图 1-3 肌动蛋白马达

仿照这种原理，美国康乃尔大学的 Montemagno 博士领导的一个研究小组研制出一种生物分子电机。该电机由一个 ATP 分子、一个金属镍制成的桨片（直径为 150nm，长 750nm）和一个金属镍柱体（直径为 80nm，高 200nm）所组成。测量其特性时，发现这样构成的纳米马达的平均速度可达 4.8r/s，运行时间长达 40min 至 2.5h。

有了上述的微米-纳米尺度及效应的一般了解，再来看看细胞生命中的一些实际尺度体现。先打个比方，将一个边长为 1cm 的立方体分割成 10¹² 个、边长为 1 μ m 的微小立方体，那么这些 10¹² 个微小立方体的全部表面积将是这个大立方体的 10000 倍。细胞内微腔室的典型大小：分子膜孔为 10⁻²⁰L，细胞器为 10⁻¹⁸L，整个细菌细胞为 10⁻¹²L [典型的原核生物细胞如大肠杆菌的体积大小约为 10fL (大多为 1.5~2.5 μ m³)，典型的真核生物细胞体积估计为 10pL]，可见它们的比表面积奇大无比。而正是利用这些微米-纳米级腔室，细胞实现了其并行化的物质管理方式。细胞内部的大多数化学过程是在表面上驱动的，而不是在体相溶液中。另一方面，细胞的反应物浓度在细胞体积下却是相当高的。例如，直径为 5 μ m 的细胞中，以仅有 4000 个分子的拷贝数表达的蛋白质相当于浓度为微摩每升数量级。而且，

细胞的化学过程通常发生在特定的亚细胞腔中，如核糖体、线粒体与核等，其体积实际更小，从而使其拥有更高的局部浓度，可达到较高的微摩每升数量级，这显然将对反应动力学产生重大的影响。

糖、氨基酸、激素和 DNA 大约是 1nm 大小。将一个细胞与另一个细胞或者一个细胞器与另一个细胞器相互隔开的膜则是它们的 5 倍左右。蛋白质则在数十纳米左右。数十纳米的离子如钾与钠可以产生神经脉冲。RNA-蛋白质复合体，其线度在 15~20nm 之间。人 DNA 大约长 6mm，有 2×10^8 个核苷酸，被紧密包封在 $500\mu\text{m}^3$ 的体积中；如果按 3 个核苷酸为 1byte 计算，那么其信息的线密度为 $1\text{kb}/\mu\text{m}$ ，体积密度为 $1.2\text{Mb}/\mu\text{m}^3$ 。细胞可以对比其自身小的纳米结构（大小为细胞的 $1/5000 \sim 1/1000$ ，比如 5nm）作出反应。当然细胞必须与这种目标结构靠得很近。细胞还可以在离开其质膜周围 3~15nm 的地方作许多黏附点。细胞生存的基底中的胶原纤维的直径只有 66nm。生物体内的多种病毒，也是纳米粒子。10nm 以下的粒子比血液中的红细胞还要小，因而可以在血管中自由流动。红细胞与白细胞直径为 $5\mu\text{m}$ 左右，人头发丝粗约 $50\mu\text{m}$ 。有研究表明，人的牙齿之所以具有很高的强度，也因为它是由磷酸钙等纳米材料构成的。

毛细胞是包括人在内的脊椎动物内耳中听觉通路上接受外界声音振动的第一个接受者。毛细胞的力学转换器实际上是一束特化的短小微绒毛（纤毛），它们在毛细胞顶面如同天线一样伸在胞外空间，感受声刺激。这束纤毛一般可细分为 10~200 根刚毛 [由 F 肌动蛋白 (F-actin) 组成]，以高度渐次下降（或上升）的方式（ $2 \sim 60\mu\text{m}$ ），呈六角形状排列，其中最高的一根往往是动纤毛。这些刚毛之间又以不同的连接结构相互联系在一起（如图 1-4）。

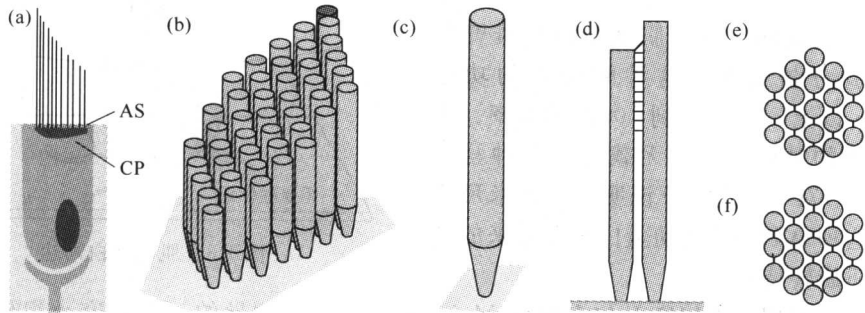


图 1-4 毛细胞及其微结构

(a) 毛细胞及其伸出在其顶面 (AS) 作为声振动转换器的纤毛，CP 为角质层；(b) 束状纤毛中的刚毛按高度渐次下降的方式作三维排列；(c) 刚毛根部一般呈锥形；(d)~(f) 刚毛之间的连接

电子显微镜观察表明，在趋磁细菌体内通常含有直径约为 35~120nm 的磁性氧化物颗粒，其大小刚好处于磁性氧化物颗粒的永久单磁畴的尺寸范围内。例如，*A. magnetotacticum* 菌体中的 Fe_3O_4 磁畴的大小为 50nm，22 个这样的磁畴排成的链可以产生 $1.3 \times 10^{-15} \text{N} \cdot \text{m}$ 的磁矩。磁性纳米颗粒实质上是一个生物磁罗盘，生活在水中的趋磁细菌依靠它游向营养丰富的水底。在鸽子、海豚、蝴蝶、蜜蜂等生物体中也存在超微的磁性颗粒，使这类生物在地磁场导航下能辨别方向，具有回归的本领。

事实上，如果说细胞就是一个活生生的微型机器，那么细胞中的很多结构单元都是执行某种功能的纳米机器：核糖体是按照基因密码的指令安排氨基酸顺序制造蛋白质分子的加工器；高尔基体是给新制造的蛋白质进行修饰的加工厂；加工好的蛋白质可以按照信号肽的指

令由膜囊泡运送到确定的部位发挥功能；完成了功能使命的蛋白质还会被贴上标签送去水解成氨基酸再备用。细胞中的每一个酶分子均是一个个活生生的纳米机器人，蛋白质构象的变化使酶分子中不同结构域的动作就像是纳米机器人在移动和重新安排底物分子的原子排列顺序。细胞的生命过程就是这样一批又一批功能相关的蛋白质组群不断替换更新行使功能的过程。总之，许多生物学基本过程（如信息储存、转录、翻译、基因调节、有丝分裂与细胞通信等）均发生在微米-纳米级，这是一幅存于空间尺度“底部”何等不可思议的生命图景！

尽管纳米尺度上的科学进展迅速，已经演绎出十分精彩的篇章，但本书内容主要仍是在“微米”这个尺度上来展开的，基本意图在于认识围绕微米尺度（包括空间的与时间的）及其上下相关范围内的物质运动规律，尤其针对生命科学领域，构建在这些尺度上起功能作用的微装置或系统，处理这些相关尺度上的事件，达成人们用宏观手段不能实现的目的。这里所指的微米尺度及其上下相关范围，主要是指“微米”尺度的“承上启下”（如“毫米”尺度、“纳米”尺度等）；因为尺度本来是连续的，事物本来是整体的，以“微米”着眼，主要是选择一个观察与处理事件或对象的切入点。如微米尺度上实现的功能，不光可用来处理微米级事件，也将用来控制和操纵纳米级的事件，甚或毫米尺度、厘米尺度等上的事件。

1.2 微型化空间的可利用性

让我们先来“看一看”微世界中的空间配置。先拆开一口机械钟，机械钟中有许许多多的小部件。将其中的一个小金属齿轮（10mm左右）置于地板上，并且想像缩小你自己，一直缩小到与这个齿轮那样小，大约是你自己的1/200。举起你的手，与齿轮的小齿比较。它们虽然大小差不多，但是小齿上没有什么特征，而你缩小了的手上有手指、指甲、肌肉、血管等。接着，你继续缩小为刚才的1/10，此时你大概只有1mm高，你将很容易观察到小金属齿轮表面是粗糙的，它们是随机的，没有什么指向；但相对于这口钟的尺度，部件足够平滑，它可以工作得很好。但你会偶尔发现看上去一粒沙那样的东西——细菌在齿轮表面上爬行。细菌只有齿轮大小的1/10000，但它可是一台具有全功能的高度复杂的精巧机器！它含有化学工厂、导航系统、自我修复的机构以及数据储存和搜索系统。对此，小齿轮的景象就相形见绌了。你会极有兴趣看清并了解这种细菌的机构，所以你继续缩小你自己，如又缩小至1/1000之后，你的大小相当于一个单细胞了，相当于你头发丝直径的1/100。在这个尺度下，你将可以看到细菌内的“斑点”：其中一些是制造蛋白质的核糖体，另一些是化合物的“仓库”。你还会发现在细菌尾部有一根像你缩小了的拳头那样粗但比你那缩小了的身高还要长的鞭毛。鞭毛是细菌的泳动器官，里面有马达驱动着旋转。注意你现在已经缩小至200万分之一。你将可以瞥见小金属齿轮上的金属晶体，如果在此基础上再缩小至1/20，你将可以很清楚地观察到细菌鞭毛中的马达了，而这种马达中排列的原子正好是你此时缩小程度的手指那样大小。此时由于热噪声作用，你会感觉到这些原子如同一簇沸腾的水泡在扭动，但事实上这种马达却是在以每秒300000个氢离子的速度运转着以提供能量动力。而相比之下，齿轮恰似一堆毫无规律的金属原子——整个齿轮的体积中充斥着极度浪费的空间！

显然，在微米-纳米尺度上，正等待着人们去剔除大量死空间，构建新功能。

再来看看分析技术缩微时对功能组件与分析对象物的空间需求。根据 J. M. Ramsey 等的实验与计算，一个分析系统的四个相关参数（溶液体积、分析物分子数、空间密度与扩散时间）随检测微管道的横截面的直径 d (1~1000 μm) 的变化可以图 1-5 表示。从图中可以看

出分析系统缩微的性能的改善。

(1) 关于扩散时间 任何物质分子的扩散可用扩散系数 $D(\text{cm}^2/\text{s})$ 来表征。对于最简单的球形分子

$$D = \frac{\kappa T}{6\pi\eta r}$$

式中, $\kappa = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$; T 是绝对温度, K; η 是绝对黏度, $\text{g}/(\text{cm} \cdot \text{s})$; r 是水动力半径。一个相对分子质量约为 500~1000 的小分子的扩散系数可为 $5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。在这个条件下, 分子扩散路程为 $1 \mu\text{m}$ 时需要时间大约 2ms。如为 $50 \mu\text{m}$ 的路程, 则需要 5s; 扩散路程为 $1000 \mu\text{m}$ 时则需要扩散时间 $2 \times 10^3 \text{ s}$! 这也表明试剂的纯扩散混合只有在 $100 \mu\text{m}$ 以下才是可行的。图 1-6 表示的是微流动通道中比表面积和分子扩散时间对尺度的依赖性。

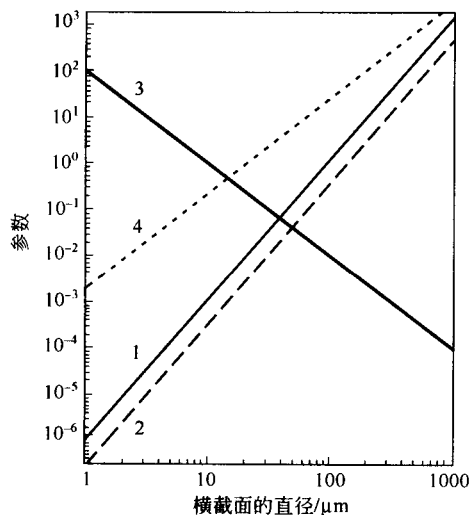


图 1-5 分析参数随管道横截面缩微时的变化情况

1—溶液体积 (10^{-9} L); 2—分析物分子数 (10^6);
3—空间密度 (10^6 cm^{-2}); 4—扩散混合时间 (s)
分析在直径为 d 的圆管内进行, 溶液浓度为
 0.5 nmol/L , 扩散系数为 $5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

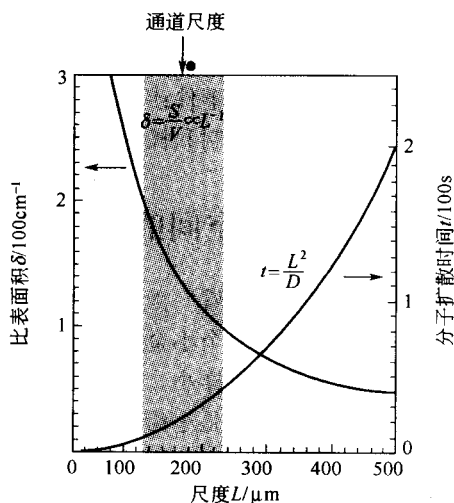


图 1-6 微流动通道中比表面积 σ 和分子扩散时间 t 对尺度 L 的依赖性

其中 L 、 D 、 S 和 V 分别为分子扩散距离、扩散系数、界面面积和体积

(2) 关于检测体积和分子数 从图 1-5 中可知, 在横截面的直径 d 为 $1 \mu\text{m}$ 时, 探测的体积约 1 fL 。对于一个浓度为 $5 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ 的溶液, 意味着在该体积单元中在任意时刻拥有平均不到 1 个目标分子。在这样的条件下检测是极端困难的, 虽然使用先进检测技术 (需要高度浓聚) 不是不可能。在 d 为 $50 \mu\text{m}$ 时, 探测的体积约 125 pL , 其中含有约 75000 个分子, 在这个水平可以使用许多检测方案, 很容易实现检测。在 d 为 1 mm 时, 探测体积是 $1 \mu\text{L}$, 其中至少含有 6 亿个分子!

因而存在着最小可探测浓度的尺度效应问题。假定分子分布是均匀的, 那么包含单个分子 (sm) 所需要的体积为:

$$V_{\text{sm}} = \frac{1}{C N_A}$$

式中, C 是分子的聚集度, mol/L ; N_A 是阿伏伽德罗常数, $N_A = 6.022 \times 10^{23} / \text{mol}$ 。从上式可见, 对于一个能探测到单个分子的完美探测器, 当目标分子的浓度下降时, 被探测

器采样的体积必须增加；反之，当目标分子的浓度增大时，采样体积则可减小。例如，用传感器去探测边长为 $10\mu\text{m}$ 的立方体，其体积为 1pL ，理论上单个分子探测的极限浓度是 $1.7\times 10^{-12}\text{mol/L}$ 。通过检测和估算提示，对于分子溶液，微管道的直径应为 $10\sim 100\mu\text{m}$ 。

这个问题对于筛选非均一的复杂生物样本成分时，也很突出。例如，母体血液中正常含有的胎儿胚胎细胞的数量为 $1/1000000$ 甚至以下，当样本体积不断缩小时，如在从母体抽取微升级血样，则其中很难包含有这类稀有细胞。

如图 1-7，在人血液中蛋白质的浓度与数量存在线性对数关系。典型地，当考察血液时，白蛋白、免疫球蛋白与转铁蛋白的浓度落在可观察的范围，而心脏标志物如肌钙蛋白处于纳摩每升级，胰岛素及胰岛素类生长因子则在皮摩每升级，甲状腺激素在低的皮摩每升级，肿瘤坏死因子处于飞摩每升级。如果在人体中大约有 300000 个蛋白质（5~6 倍于基因的数量），可能可以发现体内的任何一个蛋白质，但也许在总的血液体积中有一个蛋白质处于阿伏伽德罗常数之下（血浆中蛋白质的浓度为 1 个/ 1L ）。因为人体只有 6~7L 血液，血浆则约占 4L，如果 4L 中只有 1 个蛋白质，那么它的浓度低到幺摩每升级（ 10^{-24} ）。因为目前，双向凝胶电泳（2D-PAGE）的动态范围最低限也只有 10^{-4} ，所以不可能检测到微摩每升级以下的浓度。如果起始样本为 1mL ，可能检测到纳摩每升级的浓度。要实现在低的皮摩每升级的检测，可则能需要的样本（如血浆）体积为 5~10L。

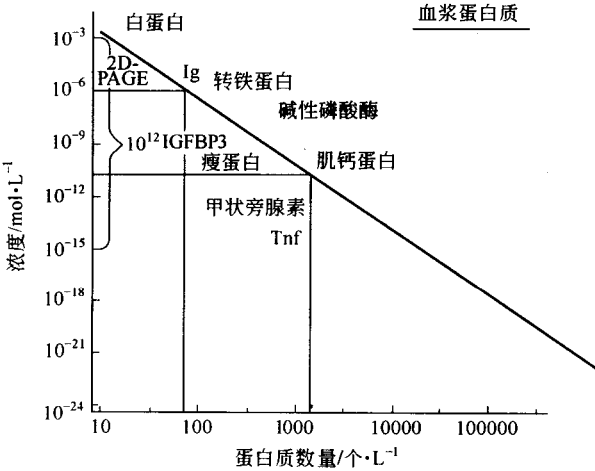


图 1-7 在各种浓度水平上可观察到的潜在血浆蛋白质

(3) 关于集成的规模 集成（装置密度）的潜在规模对并行处理与成本而言显然是有意义的，也具有商业化意义。从图 1-5 中可知，装置的密度与 $1/d^2$ 成比例，因而在 d 为 $1\mu\text{m}$ 时，理论上可能集成的装置是 10^8cm^{-2} 。如果 d 为 $1000\mu\text{m}$ ，那么装置密度下降为 10^2cm^{-2} 。显然较小的横截面尺寸较为有利，当然这需要更加精密的加工技术。

由此可见，在分析问题上，缩微具有明显的技术效果：测试样本的微量化导致试剂消耗降低，有害物产生量降低，缩小有害物（如致病病毒等）的暴露；降低样本处理时间，加快分析过程；并行化可实现同时测试多个样本，因而实现高通量分析。降低功耗，足以用电池来供电；降低对工作空间的依赖，在位或原位测量与分析变得相当可行。有经验表明，连续性分析系统缩小至原来的 $1/10$ ，可能使其中执行扩散控制的反应或混合的速度增加 100 倍，分离的速度也增加 100 倍；缩小至原有体积的 $1/1000$ 的分析体积将可以降低 90% 的试剂消耗。