

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01812275.2

[51] Int. Cl.

G12M 1/34 (2006.01)
G12N 11/00 (2006.01)
G01N 27/00 (2006.01)
G01N 31/00 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年2月4日

[11] 授权公告号 CN 100457887C

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

[22] 申请日 2001.5.2 [21] 申请号 01812275.2

[30] 优先权

[32] 2000.5.3 [33] US [31] 60/201,603

[86] 国际申请 PCT/US2001/014257 2001.5.2

[87] 国际公布 WO2001/083674 英 2001.11.8

[85] 进入国家阶段日期 2003.1.3

[73] 专利权人 高振智

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 高振智

[56] 参考文献

WO9817464A 1997.5.22

US5849486A 1998.12.15

GB2335278A 1999.9.15

审查员 王佩兰

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 徐雁漪

权利要求书 2 页 说明书 30 页 附图 19 页

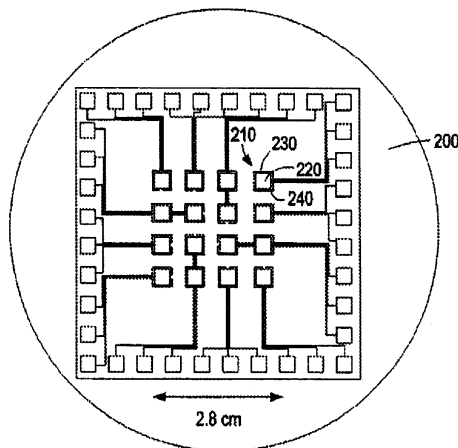
[54] 发明名称

具有集成生物传感器芯片的生物识别系统

[57] 摘要

一基于微电子机械系统 (MEMS) 及集成电路 (IC) 的生物传感器可被用于感测或检测不同的离子及大分子 (DNA、RNA 或蛋白质)。基于微电子机械系统 (MEMS) 的生物传感器可以利用杂交、酶扩增方法及一电化学检测方法, 以提高灵敏度及缩小系统体积。所述生物传感器整合于单一基质上。所述生物传感器系统包含至少两个电极。这些电极包括一工作电极, 一参考电极和一反电极 (辅助电极)。此生物传感器还提供了利用表面张力将试剂和/或溶液小规模限制在所述生物传感器上的装置和方法。该试剂限制系统利用可控制的表面特性及表面张力, 使试剂和/或溶液可控制性地与传感器元件 (例如电极) 接触。该试剂限制系统也可以将生物传感器整合在便携式或手持式装置上, 并且不怕振荡及翻转。本发明还提供了与集成电路技术整合的

生物传感器。优选将整个传感器系统制造于单一 IC 基质或芯片上而无需外接元件及/或仪器以构成完整的系统。该系统优选利用 IC 方法制造在硅基质上。



1. 一种检测样品试剂中靶分析物的存在或测定其数量的方法，其包括：

让电化学生物传感器与样品试剂接触，所述电化学生物传感器包括：

基质；

至少三个导电电极，每一个导电电极由单层导电金属组成；和包括直接结合于每个电极的生物素化硫醇分子的自我组装的单层；

让样品试剂与导电电极接触；

测定电化学生物传感器的电信号输出；并且

由输出的信号确定样品试剂中靶分析物的存在和/或数量。

2. 权利要求1的方法，其中电化学生物传感器还包括在每一个电极下面的粘接剂，该粘接剂使得电极与基质的粘附更好。

3. 权利要求1的方法，其中样品试剂是含有大分子的生物流体。

4. 权利要求1的方法，其中样品试剂是含有离子分子或原子的生物流体。

5. 权利要求1的方法，其中基质选自硅、砷化镓、塑料和玻璃。

6. 权利要求1的方法，其中基质包括由硅制造的材料。

7. 权利要求1的方法，其中导电金属选自金、铝、铬、铜、铂、镍和钛。

8. 权利要求1的方法，其中导电金属为金。

9. 权利要求1的方法，其中基质还包括含有至少一个电极的孔结构。

10. 权利要求1的方法，其中由输出的信号确定样品中存在靶分析物和/或其量进一步包括：

用含有已知量的待测定靶分析物的第一校正溶液和含有未测定量的待测定靶分析物的第二校正溶液校正电化学传感器；

得到参考输出信号；并且

比较参考信号与测定的信号以确定样品试剂中该分子的存在和/或数量。

11. 权利要求10的方法，其中基质选自硅、砷化镓、塑料和玻璃。

12. 权利要求 10 的方法，其中导电金属选自金、铝、铬、铜、铂、镍和钛。

13. 权利要求 10 的方法，其中导电金属为金。

14. 权利要求 10 的方法，其中基质还包括在至少一个电极下面的孔结构。

15. 权利要求 10 的方法，其中至少一个电极的表面经表面改性以锚定大分子。

16. 一种电化学生物传感器，包括：

硅基质；

三个在基质相同侧面上以测定氧化还原的导电电极，每一个导电电极由单层金组成；和

包括直接结合于每个电极的生物素化硫醇分子的自我组装的单层。

17. 权利要求 1 的方法，其中在电化学生物传感器与样品试剂接触之前，将自我组装的单层置于至少一个电极上。

18. 权利要求 17 的方法，其进一步包含在至少一个电极上形成自我组装的单层。

19. 权利要求 17 的方法，其中电极包括工作电极、参考电极，并且检测电化学生物传感器的电信号输出包括在检测通过工作电极的电流时控制参考电极和工作电极之间的电压差，其中

控制电压以便在样品组分和工作电极之间引起氧化还原反应，并且

通过工作电极的电流被通过反电极的电流所平衡。

20. 权利要求 19 的方法，其中自我组装单层被置于工作电极上。

21. 权利要求 1 的方法，其中电极包括工作电极、参考电极，并且检测电化学生物传感器的电信号输出包括在检测通过工作电极的电流时控制参考电极和工作电极之间的电压差，其中

控制电压以便在样品组分和工作电极之间引起氧化还原反应，并且

通过工作电极的电流被通过反电极的电流所平衡。

22. 权利要求 1 的方法，其中电极通过集成电路技术制造在基质上。

具有集成生物传感器芯片的生物识别系统

本专利申请要求于2000年5月3日所提交的美国临时专利申请流水号No. 60/201,603的优先权。

关于美国联邦资助研究及开发的声明

本发明由美国政府，经由海军部门研究计划No. N66001-96-C-8632所资助。美国政府拥有本发明的某些权益。

发明领域

本发明总体上涉及感测或检测不同的靶分析物，包括离子（例如铁、铬、铅、铜、钙、或者是钾）以及大分子（例如DNA、RNA或蛋白质）的设备与方法，特别是生物传感器、使用生物传感器的方法及制造生物传感器的方法。

发明背景

许多生物传感器已被发展用于检测生物材料，例如致病菌。传统检测病菌的方法通常涉及有机体的形态学评估或依赖于（通常是必须的）培养进行这种评估所需数目的有机体；此种方法通常耗时而且不适用于野外应用。快速检测的需求及便携性促成了将病菌识别与信号传导结合的系统的的发展。光学及电化学的细菌检测皆有文献报导（Ivnitski, et. al., 1999, T. Wang, et. al., 2000）（文献引用详细列于此叙述后），然而发明人认为电化学方法在微型化上具有相对的优势。

理想的传感器标准包括高精确性、高灵敏度及可在相对短时间内完成的方案。并且，可被微型化及自动化的系统与现有技术相比有明显的优势，特别是当检测需要在野外进行时。

电化学方法使用电路完成的原理。为完成此电路，一反电极（Counterelectrode）被用于提供回到样品溶液或者试剂的返回路径；一个参考电极被用作确定其他电极（通常为工作电极或测量电极）电位的参考点。此种接触必须由电化学方法提供，即浸入化学溶液或

试剂中的金属电极，因此电极上所产生的串联电位无法避免。传统的电化方法学理论要求参考电极电位非常稳定而且不受溶液中化学变化影响。因此可提供非常稳定参考电位的银/氯化银参考电极，是目前最常被使用的参考电极。

在图1中，一个传统的银/氯化银参考电极10包括一个氯化银导线1（银导线包着一层氯化银）浸在用氯化银（AgCl）饱和的氯化钾（3.5MKCL）溶液5中。此内部填充液5经由一多孔的陶瓷接头20缓慢渗出电极，作为参考元件1及样品的电流连接。氯化钾因其低成本及不影响测量而被使用。此溶液5还包含氯化银，以防止参考元件1的涂层溶解。因此，由一溶液填充孔40来维持电极10中溶液5的水平。

然而发明人认为，坚固及精确的生物检测可用电化学方法完成，更精确的说，是使用氧化还原（Reduction-Oxidation）方法检测，而不用具有上述已知的参考电极电位的双层参考电极结构（一层氯化银涂在一层银上）。

图2中，电化学方法还需要一个专用稳压器（Potentiostat）50，此仪器是将检测元件置于所述回路上的控制放大器。此方法的目的是藉由放大通过第三个辅助电极（反电极）的电流，以控制测试电极（工作电极）和参考电极之间的电位差异。实际上，用极少的元件即可制造出一相当好的稳压器。据图所示电路中，90A和90B为1.22伏特能阶的参考二极管，用于连接正极和负极电源线。电位计100是用于设定所需的电池的极性，以连接于主控制放大器110的非反向输入端。工作电极60连接到电路的地线上，而参考电极70接到主控制放大器110的反向输入端。为了提高输出容量（多数操作放大器受限于约20mA且不能很好地承受电容负载），所以一个整体增益缓冲放大器120被使用于此电路中。增益缓冲放大器120优选具有比主控制器放大器110高的频宽，不然线路会因驱动电容元件而产生振荡。放大器120的输出端经由一电流测量电阻140连接到辅助电极80上。差异放大器130用于测量此电阻140的电压降，以转换成地线的参考输出电压。

微电子机械系统（MEMS）技术提供了适用在各种不同工程领域中检测及致动的换能器。MEMS技术的重要性在于，使微米级的机械元件能整合于电子元件上，并能大批量生产。MEMS装置是由显微机械加工方法制造出来的，此批量制造方法运用了平版印刷术（Lithography）。

显微机械加工主要依赖于使用此平版印刷方法，通过事先设计的图样（掩模）来制造三维空间的结构（Ho and Tai, 1996, 1998）。MEMS技术适用于显微制造的元件或其相关方面。显微制造的装置通常被定义为使用MEMS和/或集成电路（IC）技术制造的装置。集成电路（IC）被定义为在它上面蚀刻或印制了复杂的电子元件及连接线的一极小的基质材料芯片。

发明人认为电化学方法所固有的微型化及携带性使此方法成为整合到MEMS装置上的最佳候选者，而且将MEMS技术与生物检测方式结合将更有利于检测不同的离子及大分子（DNA、RNA或蛋白质）。

发明人认为，在细菌的生物检测领域中，提高专一性最有效的方法为检测细菌的遗传材料（例如rRNA、mRNA、变性DNA）。通过选择其序列只互补于靶细菌rRNA或ssDNA的单链DNA探针，监测杂交事件，可以选择性地检测靶细胞。为提高灵敏度，将杂交事件与酶促反应关联来作信号放大，因为每一种底物与产物的转换会对总的信号作出贡献。本发明中运用酶促反应来放大DNA杂交的生物检测过程，以在合理的短时间内完成。

因此，业已根据以上测定和技术开发出了用于大肠杆菌（*E. coli*）的原型电流检测仪（Chen, et al., 2000, Gau, et al., 2000）。MEMS、自我组装的单层（SAMs）、DNA杂交、和扩增都导致了微型化、专一性和灵敏的大肠杆菌检测仪的设计。早先业已报导了DNA电化学探头（Wang, et al., 1997, Marrazza, et al., 1999），该探头采用了石墨或碳电极。还可以获得用于检测来自大肠杆菌DNA的电流的商用装置，该装置采用了在一次性检测条上通过丝网印刷形成的碳电极。丝网印刷的优点是成本低；不过，不容易获得高度的尺寸精确性。因此，发明人认为，需要开发一种使用平板印刷术的方法，以使用诸如金属（例如，金和银）和碳的材料印刷出微米级大小的精确的图案。不过，使用表面改性，如生物素-DAD-C12-SH十二烷酰胺的自我组装的单层（SAM）是一种选择性地分子固定在MEMS表面上的优选方法。业已深入研究过在金、银和其他金属上形成SAMs（Revell等, 1998, Motesharei等, 1998, Xia等, 1998, Lahiri等, 1999），并且可以通过SAMS将蛋白质和其他生物分子方便地固定在诸如金的表面上（Ostuni等, 1999, Kane等, 1999, Spinke等, 1993, Haussling等,

1991)。业已证实了将SAMs用在电极上的电流测定方法的成功检测靶分析物的能力(Sun等,1998,Hou等,1998,Murthy等,1998)。

在该大肠杆菌检测系统中,本发明确定并利用了每一种方法所固有的某些优点。采用DNA杂交和酶扩增,本发明获得了所需要的专一性和灵敏度。发明人使用MEMS和SAMs生产出了一种可以发展成便携式仪器的微型化系统。最后,本发明证实,本发明的检测系统可应用于多种致病菌。例如,适用于检测尿路致病性大肠杆菌,并且鉴定能导致中耳炎的微生物。

因此,本发明的目的是提供新型生物传感器,使用该生物传感器的新方法,以及生产该生物传感器的新方法。这一目的是通过披露了本发明的进一步的优选实施方案的独立权利要求和从属权利要求的特征的组合而实现的。

发明概述

本发明的概述不一定披露在说明书中详细说明的所有必要特征,并且,本发明还可存在于这里所披露的以及本说明书其他部分所披露的特征的次级组合中。

本发明的第一方面提供了一种利用整合在单一基质(硅、玻璃、塑料等)上的生物传感器感测或检测特别是包括大分子(例如DNA、RNA或蛋白质)以及离子分子(例如铁、铬、铅、铜、钙或钾)在内的各种靶分析物装置和方法。所述基质化的生物传感器系统包括至少两个电极,这两个电极通常是通过单一的系列显微制造工艺步骤,一起在所述基质上生产的。不过,还可以用连续的显微制造步骤来生产所述系统。

在一种优选实施方案中,所述电极都是由纯金属制成的(例如,与现有技术中的银/氯化银电极不同)。在另一种优选实施方案中,所述基质化的生物传感器系统包括一个工作电极、一个参考电极和一个反电极(辅助电极)。所述基质化的生物传感器系统优选具有与常规电化学生物传感器相同的电化学性能。另外,所述基质化的生物传感器系统应当与集成电路(IC)和/或MEMS生产方法兼容,并且能够在一个小面积上制造。

本发明的第二方面提供了一种利用表面张力以小的规模将试剂和

/或溶液限制在生物传感器中的装置和方法。所述试剂和/或溶液还有进行生物学检测所需要的电解质和/或分析物。

在一种优选实施方案中，本发明的装置和方法在需要电解质和/或分析物时，通过利用可控制的表面特性和小规模的表面张力可以让用于感测和检测各种离子分子（例如，铁、铬、铅、铜、钙、或钾）和大分子（例如、DNA、RNA或蛋白质）的每一个电极选择性地接触所述试剂和/或溶液。

在另一种优选实施方案中，利用表面张力限制试剂和/或溶液（并因此限制所述试剂和/或溶液中的电解质和/或分析物）的装置和方法与一种便携式或手持式装置整合在一起，并且能抗对该装置的振荡。另外，即使在生物传感器被翻转颠倒时，也能通过表面张力将所述试剂和/或溶液稳定地保持在原位。

本发明的第三方面提供了一种利用集成电路（IC）技术将电化学传感器（例如电极）的元件和其他需要的电子电路元件（例如放大器）集成在一个电化学传感器上的装置和方法。所有的传感器系统可以整合在单一的IC基质或芯片上，如单一的半导体元件（例如，硅或砷化镓）基质或芯片。优选不需要或者需要很少的外部元件或仪器来完成该系统。该传感器优选用IC技术制造。

在用于大分子电化学检测的任何实施方案中，本发明的一个优选特征是对至少一个电极的表面进行改性。优选对所述表面进行改性，以便将大分子固定在该表面上。优选用诸如生物素-链亲和素的自我组装的单层（SAM）对所述表面进行改性。优选将SAM放置在电化学传感器的工作电极的表面上。可以选择性地用诸如溶胶和/或碳糊的材料对所述表面进行改性（用于取代SAM或与SAM组合）。

上面的“发明概述”提供的只是例子而不是限定。通过下面的对本发明的详细说明，可以了解本发明的其他实施方案以及亚组合、改进、改变和改良。

附图说明

在附图中，在若干幅附图中的相同的编号表示相同的部件：

图1是传统参考电极的一种实施方案的示意图。

图2是用于本发明电化学方法中的稳压器的一种实施方案的示意

图。

图3是本发明的存在于一个圆形基质芯片上的多个电化学生物传感器的实施方案的示意图。

图4是本发明的存在于一个方形基质芯片上的多个电化学生物传感器的另一种实施方案的示意图。

图5是本发明基质上的电化学生物传感器的另一种实施方案的示意图。

图6是随时间而进行的周期性伏安测定(CV)扫描电位的曲线图。

图7是用本发明的生物传感器获得的一个周期的周期性伏安测定(电流对偏电位)。

图8是用本发明的生物传感器以不同的扫描速度获得的周期性伏安测定(电流对偏电位)。

图9是通过本发明的生物传感器获得的扫描速度对峰值电流的平方根的曲线图。

图10是用本发明的生物传感器以稳定的扫描速度进行的多轮周期性伏安测定(电流对偏电位)。

图11(A), (B), 和(C)是表示通过表面张力以及本发明处理限制的试剂和/或溶液的示意图。

图12是仅在本发明的生物传感器的工作电极上选择地进行试剂和/或溶液限制的示意图。

图13是表示在本发明生物传感器的所有电极上进行试剂和/或溶液限制的示意图。

图14是表示生产本发明生物传感器的一种实施方案第一步骤的侧视图。

图15是表示生产所述生物传感器的第二步骤的示意图。

图16是表示生产所述生物传感器的第三步骤的示意图。

图17是表示生产所述生物传感器的第四步骤的示意图。

图18是表示生产所述生物传感器的第五步骤的示意图。

图19是表示生产所述生物传感器的第六步骤的示意图。

图20表示如何对本发明生物传感器的实施方案的表面进行改性以便避免非专一性结合的示意图。

图21是表示图20中的对生物传感器表面进行改性的最终结果的示

意图。

图22是具有与集成电路元件整合在一起的生物传感器的本发明的生物传感器系统的一种实施方案的剖视图。

图23是本发明的将多个生物传感器整合在集成电路元件上的一种实施方案的示意图。

图24是一个生物传感器单元的剖视图，该单元与其他类似单元一起组成了与图24中的集成电路元件整合的多个生物传感器。

图25是通过集成电路（IC）技术生产本发明的（传感器-芯片）的一种实施方案的第一个步骤的示意图，将CMOS元件集成到所述生物传感器（传感器-芯片）本身上面。

图26是表示通过集成电路（IC）技术生产所述生物传感器（传感器-芯片）的第二步骤的示意图。

图27是通过集成电路（IC）技术生产所述生物传感器（传感器-芯片）的第三步骤的示意图。

图28是通过集成电路（IC）技术生产所述生物传感器（传感器-芯片）的第四步骤的示意图。

图29是通过集成电路（IC）技术生产所述生物传感器（传感器-芯片）的第五步骤的示意图。

图30是通过集成电路（IC）技术生产所述生物传感器（传感器-芯片）的第六步骤的示意图。

图31是表示如何利用本发明的生物传感器的一种实施方案检测离子分析物（或分子）的示意图。

图32是用图31的传感器获得的周期性伏安测定（电流对偏电位）的曲线图。

图33是将本发明的生物传感器的一种实施方案用于检测大分子（例如DNS、RNA、蛋白质）的第一步骤的示意图。

图34是表示检测所述大分子（DNA、RNA、蛋白质）的第二步骤的示意图。

图35是表示检测大分子（DNA、RNA、蛋白质）的第三步骤的示意图。

优选实施方案详述

尽管下面将要结合附图介绍本发明的特定实施方案，但应当理解的是，在不超出本发明的精神、范围和构思的前提下，可以进行各种改变和改进。实际上，这里所提供的视图和说明是举例形式的，而不是限定形式的。

本发明第一方面涉及利用电化学检测原理检测各种靶分析物，特别是离子分子（例如，铁、铬、铅、铜、钙或钾）以及大分子（例如，DNA、RNA或蛋白质）。电化学检测原理需要使用氧化还原电池以及在该电池中的电化学反应。

氧化还原电池是这样一种装置：当该电池中发生化学反应时，能将化学能量转换为电能或者相反。通常，所述电池包括浸入含水液体（电解质）中的三个电极，电极反应发生在电极-溶液表面上。

所述电池由两个导电相组成（例如，固体或液体金属、半导体等），这两个相通过导离子相连接（例如，水溶液或非水溶液、熔化的盐、导离子固体）。在电流通过时，它必须将电流模式转换成离子流模式，并且再返回成离子流模式。这种导流模式的变化伴随着还原-氧化反应。每一种模式转换反应被称为半电池。

每一种电化学反应是发生在氧化还原电池中的还原-氧化（还原氧化反应）。例如，在由氧将氢氧化成水期间发生的自发的“化学反应”中，电子从氢直接转移到氧。相反，在所述氧化还原电池中的自发电化学反应中，两个独立的电极反应基本上同时进行或者依次进行。

氧化还原电池的一个重要特征是同时进行的氧化还原反应在空间上是隔离的。例如，氢气是在阳极通过将电子转移到阳极电极而被氧化的，而氧气是在阴极通过获得来自阴极的电子而被还原的。总的电化学反应是这两个电极反应的总和。在所述电极反应中所产生的离子——在这里是正的氢离子和负的氢氧根离子——在溶液中重新结合，形成反应的最终产物：水。

在这一过程中，所述电子从阳极通过一个外部电路导向阴极，在所述外部电路上可以测定所述电流。还可以逆转所述反应；通过施加所述电解池中的电力将水分解成氢气和氧气。

本发明的三电极系统是包括工作电极，反电极（或辅助电极）和参考电极的电化学电池。电流可以在工作电极和反电极之间流动，同

时测定工作电极相对参考电极的电位。该装置可于基础研究中，研究发生在工作电极表面上的电极反应的动力学和机制，或者用于电分析目的。用于本发明的优选实施方案中的检测组件是以三电极系统为基础的。

利用所述反电极与所述电解质形成电连接，以便可以将电流施加在所述工作电极上。反电极通常是用惰性材料（贵金属或碳/石墨）制成的，以避免其分解。在本发明中业已发现在大的电流通过反电极时，所述反电极的一个小的特征或小的横截面会将周围的溶液加热。如果电流连续过流的话，就会产生气泡，并最终分解所述电极。因此，通过控制电流和/或电极的尺寸可以避免气泡的形成。在本发明的一种优选实施方案中，所述反电极的宽度大到足以避免甚至是在有大的电流的情况下出现加热问题。

将参考电极用作参考点，通过它可以测定电化学电池中其他电极的电位（通常是工作电极或测定电极的电位）。少数的常用（并且通常通过商业渠道获得）电极组件都具有独立于在该电池中所使用的电解质的电极电位，如银/氯化银电极、甘汞电极或氢电极。不过，发明人业已确定，单层电极，如单层金电极能够满足参考电极的要求。另外，诸如银、铅、铂、铬、铝、钛、镍的其他材料在正确的条件下也可用于单层参考电极。

所述工作电极在本发明的电化学生物传感器中起着中心作用。发生在工作电极上的反应可被用于对电解质溶液进行电化学分析。它可以起着阳极或阴极的作用，这要取决于所采用的极性。某些“传统双电极”电池中的一个电极还可以被认为是“工作”（测定、指示或检测）电极，例如，在电位测定电分析装置上，测定电极的电位（相对参考电极的电位）是有关溶液中一种成分浓度的指标。

在优选的三电极实施方案中，将反电极和参考电极设计成大体上延伸到生物传感器的工作电极周围。例如，在图3，4，5，12，13和23中可以看到合适的设计。

在一种优选实施方案中，所述电化学生物传感器是用微电子机械系统（MEMS）技术生产的。参见图3，在裸露的硅晶片200（一级，p型（100），厚度500-550微米）上沉积一层二氧化硅（ SiO_2 , 1000埃），并用作氮化硅（ Si_3N_4 , 1000埃）的底层，以便消除张力并改善粘附。用

各种尺寸的工作电极(例如工作电极220)生产多种MEMS生物传感器(例如生物传感器210)。优选对每一个工作电极进行蚀刻,以便形成深度最高达350微米的孔。

在氟化硅所覆盖的硅晶片上印刷图案,并且用氢氧化钾沿着[111]和[100]晶体平面进行蚀刻,通过氢氧化钾蚀刻时间和温度控制孔的深度。宽度为100微米的辅助电极(如辅助电极230)和参考电极(如参考电极240)与相应的工作电极220分开200微米。图3表示用于产生MEMS生物传感器(例如生物传感器210)图案的示意图。

通过氟化氢蚀刻除去氟化物和氧化物以便释放内部张力,并且沉积另一个氧化物层(5000埃),以便形成电隔离。PR5214光阻影像反转技术及Au(2000埃)/Cr(200埃)的电子束沉积lift-off技术被用来形成电极的图案。最后,将晶片200放在150℃的六甲基二硅胺烷(HMDS)中浸泡10分钟,然后在其蒸汽中沐浴3分钟,以便在硅部位周围产生疏水性表面。所述周围部位的疏水特性以及工作电极(如工作电极220)的三维特征,使得能够在将溶液中的感兴趣的分子固定到工作电极上起始的检测步骤中,在工作电极220上包含一个液滴。这种设计有效减少了生物分子与MEMS排列的其他部位的非专一性结合。

用于所有电化学电极的材料优选是金(Au)。将在MEMS技术中所使用的若干种导电材料通过lift-off方法印刷在硅基质上,并通过用铁氰化物溶液进行周期性伏安测定,测定该三电极系统的特征。试验金、铂、钛和铝电极的不同组合,并且,金/金/金三电极系统能产生最佳的C-V曲线和氧化还原特性。

图4表示在一个方形基质300(如硅、砷化镓、塑料和/或玻璃)上生产的生物传感器的实施方案,它具有多个圆形生物传感器,如生物传感器310。生物传感器310包括一个工作电极320,一个参考电极330和一个反(辅助)电极340。正如上面所提到的,所述电极优选是由可以从MEMS技术中获得的单层导电材料制成。另外,所有电极都优选由金制成。

图5表示本发明的另一种优选实施方案。生物传感器410包括在所述基质上制造的一个工作电极420,一个参考电极430和一个反(辅助)电极440。所述电极优选是用金制成的。工作电极420是在所述基质上内置的深度达350微米的孔450中形成的。孔450被设计成用于将需要的

试剂限制在该孔所形成的空间内。如图5所示，通过本文所披露的显微制造方法生产的孔450在氢氧化钾蚀刻之后以(111)硅平面为边界。通过上述显微制造方法形成的工作电极420覆盖整个孔450表面。

在工作时，上述实施方案具有容易生产的优点，并可以作为单一系列的显微制造方法步骤在所述基质上一起生产。不过，还可以用连续的显微制造步骤进行生产。另外，正如下面的分析和实验所证实，这种低成本并且容易制造的生物传感器是可以再利用的，并且具有与传统生物传感器相同的稳定性和可逆转的电化学性能。

在一种实施方案中，使用周期性伏安测定(CV)分析技术。CV是用于研究电活性物质和鉴定生物传感器的用途最广泛的分析技术之一。它被广泛用作工业和学术研究工具，用于电化学系统的基础鉴定。在周期性伏安测定中，电位以受控制的(通常是固定的)扫描速度(V/秒)由起始电位(E_0)提高到最大电位(E_n)。图6表示这种概念。分析物还原和氧化的反复循环导致了交替的阳性和阴性电流流入和流出工作电极。由于没有搅动溶液和/或试剂，在不同分析物浓度和不同扫描速度下观察到了扩散效应。

阴极(i_{pa})和阳极(i_{pc})峰值电流的分离可被用于预测参与氧化还原反应的电子数量。所述峰值电流还直接与分析物浓度C和扫描速度v成正比。实验结果通常以电流与电位的形式进行作图，类似于图7所示的曲线图。

在图7所示的CV扫描中，电位是沿X轴作图的，更正一些的(或氧化性)的电位在右侧作图，更负一些的(或还原性的)的电位在左侧作图。电流沿Y轴作图，阴极(还原性)电流沿负方向向下作图，阳性(即氧化性)电流沿正方向作图。

用于以下对照实验中的分析物是铁氰化钾 $K_3Fe(CN)_6$ (329.26g/mol)它含有存在于硝酸钾的缓冲溶液中的+3氧化状态的铁原子(Fe^{III})(101.11g/mol)。在工作电极表面，可以将一个电子添加到铁氰化物阴离子上。这样会导致将它还原成铁氰化物离子 $Fe^{II}(CN)_6^{4-}$ ，它含有+2氧化态的铁离子(Fe^{II})。在分析物和电极之间的这种一个电子的交换是一种常见的可逆的反应。这意味着所述分析物能够方便地还原成 $Fe^{II}(CN)_6^{4-}$ ，并且能容易地再氧化成 $Fe^{III}(CN)_6^{3-}$ 。

氧化还原偶是一对仅仅在氧化状态方面存在差别的分析物。

$\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$ 氧化还原偶的半反应如下:

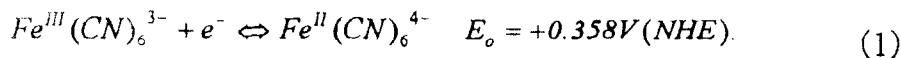


图8所示的伏安图表示两个不对称的峰,一个是阴极峰 (i_{pc}),另一个是阳极峰 (i_{pa})。使用诸如普通氢电极 (NHE) 的标准参考电极,与该半反应相关的表观电位接近为+358mV。如果将所述工作电极保持在比400mV电极更正一些的电位上,所述分析物倾向于被氧化成 $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6^{3-}$ 形式。发生在工作电极上的这种氧化反应会导致电子从所述溶液进入所述电极,从而产生阳极电流。在比400mV更负一些的电位下,所述分析物倾向于被还原成 $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$ 。发生在工作电极上的这种还原反应会导致电子从所述电极上流出的电子进入所述溶液,从而产生阴极电流。由于本发明的优选传感器设计实施方案不采用诸如NHE、银/氯化银或饱和甘汞电极 (SCE) 的标准参考电极,并且由于所有三个电极都是金 (Au),在该实验中的静止 (非偏压) 电位接近零伏。

周期性伏安图的重要参数是阴极和阳极峰值电流的大小 (分别为 i_{pc} 和 i_{pa}), 以及在上述电流下出现的电位 (分别为 E_{pc} 和 E_{pa})。使用上述参数,可计算出表观还原电位 (E_0 ——它是 E_{pc} 和 E_{pa} 的平均值), 以及在电荷转移反应中转移的电子的数量 (n)。

峰值电流 (i_{pa} 或 i_{pc}) 可以用Randles-Sevcik公式表示如下:

$$i_p = 0.4463nFAC \left(\frac{nFvD}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

其中, n =在氧化还原偶的半反应中出现的电子数量

F =法拉第常数 (96,485C/mol)

A =电极面积 (cm^2)

v =电位扫描速度 (V/sec)

D =分析物扩散系数 (cm^2/sec)

R =通用气体常数 (8.314J/molK)

T =绝对温度 (K)

在25℃时，Randles-Sevcik公式可被简化为

$$i_p = (2.687 \times 10^5) n^{3/2} \nu^{1/2} D^{1/2} AC \quad (3)$$

其中，有关常数的单位是 $2.687 \times 10^5 \text{Cmol}^{-1} \text{V}^{-1/2}$ 。

根据Randles-Sevcik公式可以预测，当伏安图是以不同的扫描速度获得的时候，峰值电流应当与扫描速度的平方根成正比。如图9所示，用峰值电流与扫描速度的平方根作图，绘出一条直线。Randles-Sevcik公式可被修改以计算此直线的斜率如下：

$$\text{斜率} = (2.687 \times 10^5 \text{Cmol}^{-1} \text{V}^{-1/2}) n^{3/2} D^{1/2} AC \quad (4)$$

峰值电位和峰值电流对扫描速度的依赖性可被用于评估参与氧化还原的电子的数量，并且提供总体反应的可逆性程度的定性量。根据峰值电位之间的距离 ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$) 确定可逆性氧化还原偶的电极反应中所转移的电子的数量 (n)。对于可逆的（快速的）氧化还原偶来说，阳极和阴极峰电流的比例应当等于1。用本发明的优选传感器设计进行实验的结果仅仅略微偏离1。大的偏差可能表示干扰了与电极加工相关的化学反应，而小的偏差仅仅意味着是一种非理想系统。图10所示12个连续周期的CV扫描，与第一个周期相比只有微小的偏差。以上结果清楚地表明，这是一种高度可逆的系统并具有稳定的电池设计。

本发明除了低成本、易制造同时具有与传统传感器相同的性能之外，本发明的上述实施方案还具有与集成电路（IC）和MEMS生产方法兼容的优点。另外，如图3和图4所示，所述实施方案可以在小的面积上以一系列生物传感器的形式制造。

本发明的第二方面涉及利用表面张力将少量试剂和/或溶液限制在生物传感器中。所述试剂和/或溶液含有生物检测所需要的靶分析物和/或化合物。

生物传感器的性能主要由它的精确度和灵敏度所决定。将所述试剂限制在诸如硅的基质上的概念是在与本发明相关的研究中发现的，该试剂是一种用于降低高水平的检测干扰的溶液，所述干扰是由于分析物或其他试剂或溶液成分，如辣根过氧化物酶（HRP）非专一性结合

在工作电极周围的区域所导致的，并且会导致高的检测干扰以及产生高的假阳性比例。在实施例HRP被用作信号酶。为了证实所述干扰不是由于在所述表面残留的HRP所导致的，进行一个简单的测试，以便评估这种不需要的结合的作用。将HRP导入裸露的硅芯片，然后进行若干个洗涤步骤，然后添加所述底物溶液。在添加所述底物溶液之后，马上会出现很高水平的酶促反应。

正如所预料的，与其他蛋白一样，HRP很容易粘附在硅表面上并且粘附力非常强。对若干种商业化洗涤溶液和隔离蛋白进行了实验，但对于降低非专一性结合没有明显的改善。因此认为，避免不需要的结合的影响的最佳方式是首先预防发生这种情况的发生。本发明生物传感器的工作电极外的区域并不需要与HRP溶液接触，以便完成生物学检测。不过，在现有技术中，一直将所有三个电极浸入含水溶液中，并且所有试剂都会通过所有的表面流动。

发明人发现，将某种试剂限制在由孔限定的空间内的最简单的方法是在生物传感器上形成一个孔。如图5所示，通过氢氧化钾蚀刻所形成的显微制造的孔，其周围是硅晶体平面400。通过LIFT-OFF技术形成的工作电极420覆盖整个孔的表面。因此，首先将含有能够非专一性结合的成分（例如HRP）的试剂或溶液限制在所述孔部位，以便在该孔中实现所需要的与电极的结合（优选为工作电极）。同时避免与生物传感器周围区域的非专一性结合。然后将所述试剂或溶液从生物传感器上洗掉，并且随后添加其他的试剂或溶液，以便完成检测过程。

在设计生物传感器时，不能低估表面和材料科学的重要性。在所述洗涤过程中仍然会出现不可接受的程度的非专一性结合，同时被稀释会流到芯片表面周围。例如，含有HRP的清洗溶液留在所述周围区域的时间远远大于结合时间常数。因此，除了制造所述孔结构外，优选通过其他方式对周围区域的表面进行保护。

因此，避免所述表面接触不需要的试剂或结合成分的另一方法是使其变成疏水性。硅表面的硅烷化被广泛用于防止悬吊结构通过表面张力与底物粘接。在本发明中，该方法被用于防止生物分子与所述硅基质周围区域直接接触。

业已将具有各种功能端基的硅烷基分子用于改变硅晶片、氮化硅芯片和原子力显微镜（AFM）头的表面特性。由于水解末端Si(Cl)₃或

SiO-C₂H₅基团的结果,用于表面改性的硅烷化合物形成了与氧化硅表面化学结合的坚固的单层。

通过两种材料的表面相互作用确定与生物学系统接触的人工材料的性能。由于表面相互作用会导致干扰的增强和结构的破坏,表面改性是避免这一问题的一条途径。改变所示结构表面特性的最简单的方法是使用塑料材料。为了将所示表面转化成生物兼容的或生物惰性的表面,需要将非专一性相互作用降低到最低限度。通过生成一个与所示表面牢固结合的分析层而将这种非专一性相互作用消除。最常使用的方法是使用来自硫醇分子的自我组装的单层(SAM),按照在80年代主要由C. D. Bain和G. M. Whitesides所开发的业已完善的方法通过化学吸附将它吸附到金表面和硅烷分子上,以便在氧化硅表面上形成SAM。还可将诸如溶胶和碳糊的其他材料用于改变所述表面。

参见图11(a),在操作中,通过亲水性工作电极使所述试剂成型,并且在金工作电极表面很好地形成一个液滴。图11(b)表明,随着所述试剂体积的增加,由所述试剂覆盖的面积逐渐扩大,并且随后覆盖其他两个电极。图11(c)表示当通过移液使用了过量的试剂时,将会形成一个试剂球465,而不是在疏水性硅基质上扩散开。

参见图12和13,只有在需要的时候通过利用可控制的表面特性和表面张力使每一个独立的电极与电解质和/或分析物和其他成分509小规模接触。参见图13,为了进行电化学检测,只有在进行检测时才将所有电极浸泡在电解质和/或分析物509中。如图12所示,对于大多数用途来说,大部分时间被花费在制备样品上,以便将电解质和/或分析物509固定在工作电极510上。在图12和13所示的实施方案中,通过表面特性和试剂体积520控制覆盖在所述电极上的电解质和/或分析物509的覆盖面。

因此,上述实施方案利用了小规模的表面张力来限制电解质和/或分析物以及其他成分。另外,上述实施方案需要少得多的试剂(pL至mL级);并消除了对本体溶液的需要。另外,由于使用少量试剂,上述实施方案具有使分析物接近电极的优点(pm到mm)。因此,仅通过扩散作用本身就能够实现分析物适当接触所述电极,因此没有必要搅拌或以其他方式混合。上述实施方案的另一个优点是便于控制和/或改变覆盖在所述电极上的电解质或/或分析物覆盖面。另外,上述

试剂和/或溶液限制实施方案通过大大减少非专一性结合,从而减少了靶分析物的损失,并且提高了该生物传感器的灵敏度。另外,上述实施方案比较抗对所述生物传感器的振荡,因此适用作为便携式或手持式系统。最后,由于表面张力限制作用,即使当传感器被翻转颠倒时,也能通过表面张力稳定保持所述试剂。

如图12和图13所示,所述生物传感器实施方案可以选择性地装配反应孔530,以便帮助将试剂520保持在原位,并且控制试剂520的形状。不过,这样的孔530是不需要的,并且通过一个简单的平面实现对试剂520的限制。

参见图14,它表示本发明生物传感器(传感器-芯片)的一种优选生产实施方案的第一个步骤。如图14所示,首先在裸露的硅晶片610(一级或测试级,p-型或n-型(100),厚度为500-550微米)上沉积一层二氧化硅(SiO_2 , 1000埃)620,二氧化硅620起着氮化硅630(Si_3N_4 , 1000埃)的底层的作用,以便释放张力并提高粘性。

下面参见图15和16,通过掩模640,并用氢氧化钾沿[111]和[100]晶体平面进行整体蚀刻,在氮化物晶片600(图15)上形成图案(图16)。所述蚀刻产生了孔650,并且通过氢氧化钾蚀刻时间和温度,控制孔650的深度(最高达350微米)。

参见图17,然后通过氟化氢蚀刻去掉氮化物630和氧化物620,以便释放内部张力,沉积另一个氧化物660层(5000埃)用于电隔离。

图18和18表示生产必需电极的Lift-Off方法。通过使用二氧化硅层660上的PR5214光阻层670,在基质610上印刷用于生物检测的电极670。然后通过逆成像方法用掩模671将需要的图案转移到光阻层670上(包括去掉不必要的光阻层670)。通过电子束沉积将一层金(2000埃)680沉积在具有需要的光阻图案层670的二氧化硅层660上。在沉积金(2000埃)680之前,先沉积诸如铬(Cr 200埃)的粘接剂690,以便提高将金粘接在二氧化硅层660上的粘性。另外,还可以将诸如钛或胶水的其他材料用作粘接剂。最后,参见图19,通过溶解光阻图案层670除去任何电阻层670和不需要的金680和铬690。

最后,将晶片600浸泡在150℃的热溶液中10分钟,然后在六甲基二硅胺烷(HMDS)蒸汽中沐浴3分钟,以便在硅部位周围形成一个疏水性表面。

优选通过表面改性步骤将所述生物传感器（传感器-芯片）的表面改性，以便抑制非专一性结合。举例20来说，可以通过以下步骤对大分子生物传感器表面进行改性：首先用浓缩的“Piranha”溶液（70vol%H₂SO₄，30vol%H₂O₂）清洗金表面680，并用去离子水（dH₂O）彻底漂洗。下面参见图20，沉积表面改性材料，如生物素-DAD-C12-SH（12-巯基（8-生物素酰胺-3,6-二恶辛基）十二烷酰胺）的SAM，Roche GmbH，德国。为了沉积生物素-DAD-C12-SH的SAM，使用Spinke等（1993）的方法，其中将样品放在用4.5x10⁻⁴M 11-巯基-1-十一醇（Aldrich Chemical Co.，44，752-8）的乙醇制备的50mM生物素-DAD-C12-SH溶液中培养大约18小时，并且用乙醇和水漂洗。最后，参见图21，让用生物素包衣的金表面700接触1.0mg/ml的链亲和素溶液大约10分钟，并且再次用去离子水漂洗，以便形成链亲和素包衣的金表面710。

本发明的第三方面涉及将完整的电学（氧化还原）生物传感器整合在单一的集成电路（IC）芯片上。集成电路（IC）被定义为在它上面蚀刻或印刷了复杂的电子元件及其连接线的小基质材料晶片。

由于小的原因，MEMS元件具有独特的特性，不过由基于MEMS传感器所发出的信号水平与传统传感器相比较低。通过使用无芯片（off-chip）放大组件能够提高灵敏度，但这也会增加干扰和系统的体积。因此，发明人设计了一种基于芯片的放大电路（结合在生物传感器芯片上的放大电路）和检测电路（如提供偏电位，电流测定，顺序控制和信号处理）以便降低芯片之间的相互干扰。通过采用双极性转换器（BJT）和/或互补的金属氧化物半导体（CMOS）装置，可以提供所述检测电路和放大电路。

在本实施方案中，将一个连接在芯片上的放大装置安装在所述工作电极下面，这里通常是电学传感器电池的最大的部位。与开放基础的双极性（BJT）光学传感器相似，所述基础部分接受来自换能器的电流，电流增加量 β 在80-150范围内。有两种类型的BJT可以采用电学电池：垂直的BJT和水平的BJT。电流增加量是通过基础部分的长度测定的。在垂直BJT中，该长度受离子注入能量和掺杂剂浓度影响。在水平BJT中，所述长度受平板印刷术的分辨率，离子注入角和热扩散的影响。由于上述原因，在芯片与芯片之间或芯片内的增加量的一致

性而言，垂直式BJT更为可靠。

图22表示芯片内放大电路的一种实施方案的剖视图，它优选包括一个生物传感器，该传感器包括三个用于电化学检测的金属电极。以上三个电极优选是用集成电路方法生产的，并且具有用于相互连接和隔离的较大的区域。将整个生物传感器-芯片700堆成两个平台（电化学传感平台730和双极换能器（BJT）放大平台720），并且，金工作电极710可以起着BJT装置720的电磁屏障的作用。工作电极的触点（如触点733、734、735、736、737和738）与接触界面740接触，并同时增加了工作电极710的表面积以便产生更强的信号。所有触点和电极表面可以用诸如金的金属单层制成。另外，生物传感器-芯片700包括一个硅基质744。硅基质744包括一个底部743，一个集电器742和发射器741。基础部分743接受来自工作电极710的电子流。集电器742与一个电源连接，并在特定的基础条件下提供电流增加量，以便用于放大。然后在发射器741上测定所产生的来自基础部分743和集电器742的电流。

参见图22，金属连接头750与信号输出端（未示出）和发射器741连接。金工作电极710通过第一层二氧化硅760与底部743连接，该底部是通过蚀刻形成的。第二层二氧化硅770隔离BJT720和信号传输线，而第一层760隔离三个电极（工作电极710，参考电极780，和反电极790）。工作电极710上的触点（如触点733、734、735、736、737和738）能增加其表面积，并且还能形成与BJT720的固定接触。所述触点的尺寸（分别为大约几十微米）远远大于工作电极710上选择性蛋白质SAM的尺寸（大约几十埃），以便不会影响蛋白质的吸附。

图24表示生物传感器装置800的另一种优选实施方案的剖视图，它表现的是在图23所示的基质805上具有多个生物传感器的优选实施方案。如图24所示，生物传感器装置800包括一个CMOS和/或BJT层830，一个电化学层840和一个试剂容纳层850，并且总体上类似于上面所披露的图22的实施方案。

因此，如图22、23和24所示，本发明的第三方面涉及一种生物检测系统，它可以在不进行芯片与芯片连接的前提下直接将传感器上的元件与生物学检测其他元件直接集成在一起。该系统不需要外部元件（仪器）或者只需要少量的外部元件来构成完整的系统。另外，这种

一体化的生物传感系统降低了生物学检测的成本和干扰水平，并且简化了所述检测的过程。

参见图25，它表示优选通过集成电路（IC）技术用CMOS装置生产本发明的生物传感器（传感器-芯片）的实施例的例子。另外，还可以包括BJT装置（未示出）。如图25所示，在具有一层二氧化硅层905的半导体基质900上制造集成电路，在主动孔部位909上面具有一个聚硅开关907。聚硅开关907是用非晶态硅制成的，并且被用于开、关包括低电阻源917和排泄管919的换能器。

参见图26，然后在基质900上沉积一个氧化物层（5000埃）920，以便形成电隔离。参见图27，然后选择性地通过平板印刷术和蚀刻方法对二氧化硅层920进行蚀刻，以便形成一个电连接孔940。参见图28，然后将一个导电塞950安装在接触孔940中。导电塞950在导电电极960与低电阻源917和/或排泄管919之间起着相互连接作用。

图29表示用于生产所述必需电极的Lift-Off方法。通过使用二氧化硅层920上面的PR5214光阻层970，在基质900上印刷用于生物检测的电极。然后，利用掩模921通过逆成像方法将需要的图案转移到光阻层970上（该方法包括除掉不必要的光阻层970）。通过电子束沉积将一层金（2000埃）960和/或铬（200埃）沉积在具有需要的光阻层970的二氧化硅层920上。最后，参见图30，通过溶解电阻图案层970去掉所有电阻层970和不需要的金/铬960。

参见图30，它显示如何将本发明中的生物传感器的一种实施方案（传感器-芯片）优选用于检测离子分子，如铁（Fe）的例子。在本实施方案中，传感器表面1010没有进行过改性，并且在进行了如上文所述的生产实施方案中的生产后清洗之后马上就可以使用。本实施方案中所使用的分析物是铁氰化钾 $K_3Fe(CN)_6$ (329.26g/mol)，它在硝酸钾 KNO_3 缓冲液(101.11g/mol)中含有三价氧化态的铁离子(Fe^{III})。如图31所示，将含有分析物的混合溶液1020（或含有电解质的试剂）涂在所有电极上（工作电极1030，参考电极1040，和反电极1050）。调整溶液1020的体积，以便通过表面张力将液滴限制在所有三个电极上。

参见图32，使用具有微微安加强器和法拉第盒的CH仪器660A电化学工作站测定周期性伏安测定（CV）电流和偏电位。所述电位在0.1伏至-0.4伏之间摆动，并且通过工作电极1030测定电流。

在所述测定之后，如果要再次使用传感器1000的话，用丙酮、酒精和浓缩Piranha溶液(70vol%H₂SO₄, 30vol%H₂O₂)清洗金表面，并且用去离子水(dH₂O)彻底漂洗。

图33表示用于大分子(DNA、RNA和蛋白质)检测的实施方案。大分子(DNA、RNA和蛋白质)浓度的检测包括生物素/链亲和素层的传感器表面改性。用合适的生物化学溶液对传感器表面进行改性，以便在经过生产后清洗以后形成链亲和素层，如在上文所述的表面改性方法中所述。在对生物传感器的表面1100进行改性之后，对病原体进行电流测定生物检测：首先将50ml裂解试剂(0.4M NaOH)添加到250ml细菌样品溶液中，并在室温下培养5分钟。然后添加100mL探针溶液(固定探针和信号探针)，并且在65℃下培养10分钟。然后将5微升裂解的大肠杆菌/探针溶液混合物1120放在生物传感器1100的用链亲和素包衣的工作电极1130上，并在室温下培养10分钟。

参见图34，随后用生物素洗涤溶液(Kirkegaard and Perry Laboratories, 50-63-06)洗涤生物传感器1100。接着，将用稀释剂(PBS/0.5%酪蛋白)稀释到0.75U/ml或0.15U/ml的5微升抗-F1-POD1140(抗荧光素过氧化物酶, 150U, RocheInc., 1426346)放置在工作电极1130上，并在室温下培养10分钟。

参见图35，再次用洗涤溶液洗涤所述生物传感器。在洗涤之后，将10微升K-blue底物1160(Neogen Corp., 300176)放置在生物传感器上，使所有三个电极(工作电极1130, 参考电极1140, 反电极1150)都被所述底物溶液1160覆盖。

最后，马上进行电化学(更具体地讲是氧化还原)测定。用具有微微安加强器和法拉第盒的CH仪器660A电化学工作站电流测定安培电流与时间。然后依次测定生物传感器上的样品。将电压固定在-0.1伏(相对参考电极)，阴极的电流(安培信号)读数应当在20秒内完成，因为在20秒时电流值就会达到稳态。通过使用系列稀释液和培养平板计数确定细胞浓度(细胞数量)。

在所述测定之后，如果要再次使用传感器1000的话，用丙酮、酒精和浓缩Piranha溶液(70vol%H₂SO₄, 30vol%H₂O₂)清洗金表面，并且用去离子水(DH₂O)彻底漂洗。

在上述任何生物传感器实施方案中，在实际进行样品检测之前，

优选对生物传感器进行校正。优选含有已知量的靶分析物的校正溶液和含有无法检测量的（例如为零）靶分析物的另一种校正缓冲液进行校正。还可以选择性地用多种校正溶液校正所述生物传感器。所述多种校正溶液的每一种分别含有已知量的靶分析物。所述校正溶液优选含有不同浓度水平的靶分析物。通过上述检测方法测定生物传感器上的校正溶液，以便获得参考信号。然后将该参考信号与用样品溶液测定的信号加以比较，以便确定样品试剂中分析物的存在和含量。可以通过传统生物学插补方法测定，确定分析物的存在和含量（例如浓度和绝对含量）。附录A提供了用于进一步说明本发明的其他材料。

在除本文之外的所有参考文献，包括在本申请附录中所提到的参考文献被以能补充、解释，提供背景的程度作为本说明所采用的方法、技术和/或组合物的参考文献。另外，在下面所列举的参考文献也被以能补充、解释，提供背景的程度作为本说明所采用的方法、技术和/或组合物的参考文献。

参考文献:

“USAF PAMPHLET ON THE MEDICAL DEFENSE AGAINST BIOLOGICAL MATERIAL - Medical Defense Against Biological Material”
Defense Technical Information Center, released on 11 Feb 1997

Abbott, N.L.; Gorman, C.B.; Whitesides, G.M. “Active control of wetting using applied electrical potentials and self-assembled monolayers” *Langmuir*, 11, Issue 1, January 1995, 16-18

Abbott, N.L.; Rolison, D.R.; Whitesides, G.M., “Combining micromachining and molecular self-assembly to fabricate microelectrodes” *Langmuir*, 10, Issue 8, August 1994, 2672-2682

Abdel-Hamid, I. Ivnitski, D., Atanasov, P., Wilkins, E., 1998. Fast Amperometric Assay for E. coli 0157:H7 using partially immersed immunoelectrodes. *Electroanalysis* 10 (11), 758-763.

Abdel-Hamid, I., Ivnitski, D., Atanasov, P., Wilkins, E., 1999. Flow-through immunofiltration assay system for rapid detection of E. coli 0157:H7. *Biosens. Bioelect.* 14, 309-316.

Andrade, J.D., "Surface and Interface Aspects of Biomedical Polymers: Protein Adsorption" Plenum, New York, 1985

Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y.T.;Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G., *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 321

Baxter, Ian; Cother, Lisa D.; Dupuy, Carole; Lickiss, Paul D.; White, Andrew J.P.; and Williams, David J. "Hydrogen Bonding to Silanols" Department of Chemistry, Imperial College of Science, Technology and Medicine, London SW7 2AY, UK

Beam, K.E. "Anisotropic Etching of Silicon," *IEEE Transactions on Electron Devices*, October, 1978

Becker, E.W.; Betz, H.; Ehrfeld, W.; Glashauser, W.; Heuberger, A.; Michel, H. J.; Munchmeyer, D.; Pongratz, S.; and Siemens, R.V. "Production of Separation Nozzle Systems for Uranium Enrichment by a Combination of X-Ray Lithography and Galvano-plastics," *Naturwissenschaften*, 69, (1982), 520 to

523.

Blake, C., Gould, B. J., 1984. Use of enzymes in immunoassay techniques. A review. *Analyst* 109, 533—547.

Brody, J.P.; Yager, P.; Goldstein, R. E. and Austin, R. H.
"Biotechnology at low Reynolds numbers" *J. Biophys.* 71, 1996,
3430-3441

Chen, Y.F., Yang, J.M., Gau, J.J., Ho, C.M., Tai, Y.C.,
2000. Microfluidic System for Biological Agent Detection.
Proceedings of the 3rd International conference on the
interaction of art and fluid mechanics, Zurich, Switzerland.

Chen, Y.F.; Yang, J.M.; Gau, J.J.; Ho, C.M.; and Tai, Y.C.,
"Microfluidic System for Biological Agent Detection" The 3rd
International conference on the interaction of Art and Fluid
Mechanics, Zurich, Switzerland, 2000.

Cooper, N. "The Human Genome Project," *Los Alamos Lab,
Science*, 20, 1-338. 1992.

Cussler, E. L., *Diffusion — mass transfer in fluid
systems*, 2nd edition, , Cambridge University Press, 1997

Darst, S.A.; Ahlers, M.; Meller, P.H.; Kubalek, E.W.;
Blankenburg, R.; Ribl, H.O.; Ringsdorf, H.; Kornberg, R.,
"Two-Dimensional Crystals of Streptavidin on Biotinylated
Lipid Layers," *Biophys J.* 59 (1991) 387-396.

Dunford, H. B., 1991. Horseradish peroxidase: structure
and kinetic properties. In: Everse, J., Everse, K. E., Grisham,

M. B. (Eds.), *Peroxidases in Chemistry and Biology*, vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-24.

Ehteshami, G.; Rana, N.; Raghu, P.; and Shadman, F.
“Interactions of impurities with Silicon and Silicon dioxide during oxidation”, Center for Micro-contamination Control, NSF I/U CRC

Feynman, Richard P. “There’s Plenty of Room at the Bottom”
Engineering and Science, Caltech, February 1960

Gau, J. J., Lan, E. H., Dunn, B., Ho, C. M., 2000.
Enzyme-based electrochemical biosensor with DNA array chip.
Proceedings of the fourth International Symposium on Micro
Total Analysis Systems (TAS), Enschede, The Netherlands.

Ghindilis, A. L., Atanasov, P., Wilkins, E., 1997.
Enzyme-catalyzed direct electron transfer: Fundamentals and
analytical applications. *Electroanalysis* 9, 661—674.

Gorton, L., Lindgren, A., Larsson, T., Munteanu, F. D.,
Ruzgas, T., Gazaryan, I., 1999. Direct electron transfer
between heme-containing enzymes and electrodes as basis for
third generation biosensors. *Anal. Chim. Acta* 400, 91—108.

Hall, E. A. H., 1991. *Biosensors*. Prentice Hall,
Englewood Cliffs, New Jersey.

Haussling, L., Ringsdorf, H., Schmitt, F. J., Knoll, W.,
1991. Biotin-functionalized self-assembled monolayers on
gold: surface plasmon optical studies of specific
recognition reactions. *Langmuir* 7 (9), 1837-1840.

Ho, C.M., Tai, Y.C., 1996. Review: MEMS and its applications for flow control. J. Fluids Eng. 118, 437-447.

Ho, C.M., Tai, Y.C., 1998. Micro-electro-mechanical systems (MEMS) and fluid flows. Ann. Rev. Fluid Mech. 30, 579-612.

Hou, S.F., Yang, K.S., Fang, H.Q., Chen, H.Y., 1998. Amperometric glucose enzyme electrode by immobilizing glucose oxidase in multilayers on self-assembled monolayers surface. Talanta 47, 561-567.

Howe, R.T. and Muller, R.S. "Polycrystalline Silicon Micromechanical Beams," Journal of the Electrochemical Society: Solid State Science and Technology, June, 1983.

Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P., Wilkins, E., 1999. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. Biosens. Bioelect. 14, 599-624.

Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P., Wilkins, E., Stricker, S., 2000. Application of Electrochemical Biosensors for Detection of Food Pathogenic Bacteria. Electroanalysis 12 (5), 317-325.

Jung, L.S., Nelson, K.E., Campbell, C.T., Stayton, P.S., Yee, S.S., Perez-Luna, V., Lopez, G.P., 1999. Surface plasmon resonance measurement of binding and dissociation of wild-type and mutant streptavidin on mixed biotin-containing alkylthiolate monolayers. Sensors Actuators B 54, 137-144.

Kane, R.S., Takayama, S., Ostuni, E., Ingber, D.E., Whitesides, G.M., 1999. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* 20, 2363-2376.

Kevles, D., and L. Hood. "The Code of Codes: Scientific and Social Issues in the Human Genome Project", Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1992.

Lahiri, J., Ostuni, E., Whitesides, G.M., 1999. Patterning Ligands on Reactive SAMs by Microcontact Printing. *Langmuir* 15 (6), 2055-2060.

Lindgren, A., Munteanu, F.-D., Gazaryan, I.G., Ruzgas, T., Gorton, L., 1998. Comparison of rotating disk and wall-jet electrode systems for studying the kinetics of direct and mediated electron transfer for horseradish peroxidase on a graphite electrode. *J. Electroanal. Chem.* 458, 113-120.

Marrazza, G.; Chianella, I.; Mascini, M., "Disposable DNA Electrochemical Biosensors for Environmental Monitoring", *Analytica Chimica Acta* 387 (1999), 297-307.

Motesharei, K., Myles, D.C., 1998. Molecular recognition on functionalized self-assembled monolayers of alkanethiols on gold. *J. Am. Chem. Soc.* 120 (29), 7328-7336.

Murthy, A.S.N, Sharma, J., 1998. Glucose oxidase bound to self-assembled monolayers of bis(4-pyridyl) disulfide at a gold electrode: Amperometric determination of glucose. *Anal. Chim. Acta* 363, 215-220.

Nathanson, H.C.; Newell, W.E.; Wickstrom, R.A.; and Davis,

J. R., Jr., "The Resonant Gate Transistor," IEEE Transactions on Electron Devices, March, 1967.

Ooka, A. A., Kuhar, K.A., Cho, N., Garrell, G.L., 1999. Surface Interactions of a Homologous Series of α , ω -Amino Acids on Colloidal Silver and Gold. Biospectroscopy 5, 9-17.

Ostuni, E., Yan, L., Whitesides, G.M., 1999. The interaction of proteins and cells with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold and silver. Colloids Surfaces B 15, 3-30.

Rao, J., Yan, L., Xu, B., and Whitesides, G.M., 1999. Using surface plasmon resonance to study the binding of vancomycin and its dimer to self-assembled monolayers presenting D-Ala-D-Ala. J. Am. Chem. Soc. 121 (11), 2029-2030.

Revell, D.J., Knight, J.R., Blyth, D.J., Haines, A.H., Russell, D.A., 1998. Self-assembled carbohydrate monolayers: formation and surface selective molecular recognition. Langmuir 14 (16) 4517-4524.

Ruzgas, T., Gorton, L., Emneus, J., Marko-Varga, G., 1995. Kinetic models of horseradish peroxidase action on a graphite electrode. J. Electroanal. Chem. 391, 41-49.

Ruzgas, T.; Csregi, E.; Emnus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G., "Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application", Analytica Chimica Acta 330 (1996), 123-138.

Sieval, A.B.; Demirel, A.L.; Nissink, J.W.M.; Linford,

M. R.; van der Maas, J. H.; de Jeu, W. H.; Zuilhof, H. and Sudhler, E. J. R. "Highly stable Si-C linked functionalized monolayers on the silicon(100) surface." *Langmuir* 1998, 14, 1759-1768.

Sieval, A. B.; Zuilhof, H.; Sudhler, E. J. R.; Schuurmans, F. M.; and Sinke, W. C. "Surface passivation of silicon by organic monolayers." *Proceedings of the 2nd World Conference and Exhibition on Photovoltaic Solar Energy Conversion, Vienna, 1998*

Sigal, G. B., Bamdad, C., Barberis, A., Strominger, J., and Whitesides, G. M., 1996. A self-assembled monolayer for the binding and study of histidine-tagged proteins by surface plasmon resonance. *Anal. Chem.* 68, 490-497.

Spinke, J., Liley, M., Guder, H. J., Angermaier, L., Knoll, W., 1993. Molecular recognition at self-assembled monolayers: the construction of multicomponent multilayers. *Langmuir* 9 (7), 1821-1825.

Sun, X., He, P., Liu, S., Ye, Jiannog, Fang, Y., 1998. Immobilization of single-stranded deoxyribonucleic acid on gold electrode with self-assembled aminoethanethiol monolayer for DNA electrochemical sensor applications. *Talanta* 47, 487-495.

Taylor, Robert "Bioterrorism Special Report: All fall down", *New Scientist*, Volume 150, Issue 2029, 11 May 1996

Trimmer, W. S. N. "Microrobots and Micromechanical Systems" *Sensors and Actuators*, 19, Number 3, September 1989, 267 - 287

Trimmer, William "Grand in Purpose, Insignificant in Size" The tenth Annual International Workshop on MEMS, Nagoya, Japan, Proceedings IEEE Catalog Number 97CH36021, 1997, 9 — 13.

Ulman, A. Ultrathin Organic Films from Langmuir Blodgett to Self-Assembly; Academic Press: New York, 1991.

Ulman, A., An Introduction to Ultrathin Organic Films From Langmuir Blodgett to Self-Assembly, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1991

Ulman, A., Ed. Characterization of Organic Thin Films; Butterworth-Heinemann: Boston, 1995.

Voet, Donald; Voet, J. " Biochemistry, 2nd edition" Wiley, New York, 916-919

Wagner, P.; Hegner, M.; Guntherodt, H-J; Semenza, G., " Formation and in Situ Modification of Monolayers Chemisorbed on Ultraflat Template-Stripped Gold Surfaces," Langmuir 11 (1995) 3867-75.

Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M., Farias, P. A. M, Valera, F. S., Grant, D. H., Ozsoz, M., Flair, M. N., 1997. DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A Review. Anal. Chim. Acta 347, 1-8.

Wang, T. H., Chen Y. F., Masset S., Ho, C. M., Tai, Y. C., 2000. Molecular beacon based micro biological detection system.

Proceedings of the 2000 International Conference on Mathematics and Engineering Techniques in Medicine and Biological Sciences (METMBS' 2000) Las Vegas, Nevada.

Weber, P.C., Ohlendorf, D.H., Wendoloski, J.J., Salemme, F.R., 1989. Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding to Streptavidin. *Science* 243, 85-88.

Whitesides, G. M.; Laibinis, P. E., *Langmuir* 1990, 6, 87.

Wink, Th.; van Zuilen, S.J.; Bult, A.; and van Bennekom, W.P., "Self-assembled Monolayers for Biosensors" *Analyst*, April 1997, 122, 43R-50R

Wise, K.D.; Jackson, T.N.; Masnari, N.A.; Robinson, M.B.; Solomon, D.E.; Wuttke, G.H.; and Rensel, W.B. "Fabrication of Hemispherical Structures Using Semiconductor Technology for Use in Thermonuclear Fusion Research," *Journal of Vacuum Science Technology*, May/June, 1979.

Xia, Y., Whitesides, G.M., 1998. *Soft Lithography*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, 550-575.

Yang, R.H., Wang, K.M., Xiao, D., Luo, K. and Yang, X.H., A renewable liquid drop sensor for di- or trinitrophenol based on fluorescence quenching of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, *Analyst*, 2000, 125, 877-882

因此，一全新的生物检测系统在此被加以详细描述。在不会偏离本发明的精神及范围的前提下，可以理所当然地对本发明进行各种不同的改进。例如，本发明所提及的生物传感器可被用来感测或检测非生物因子和化合物。因此本发明除了下列的专利申请范围外，不为此所限制。

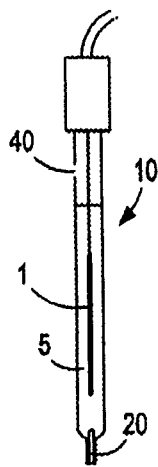


图 1

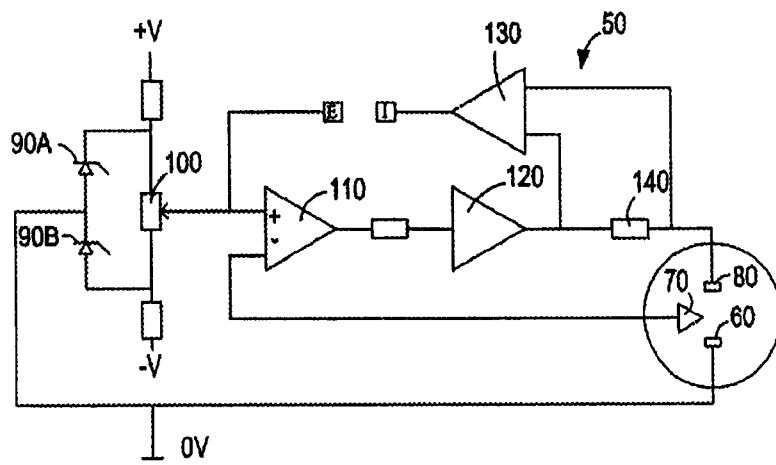


图 2

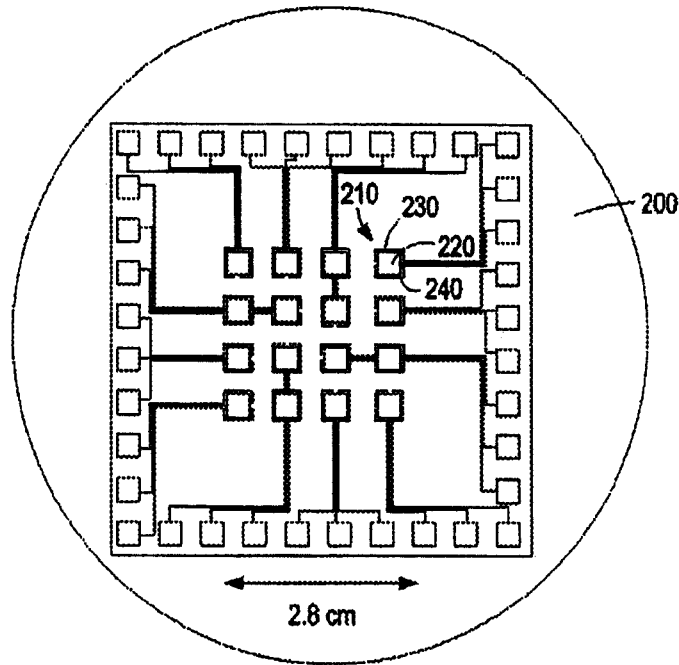


图 3

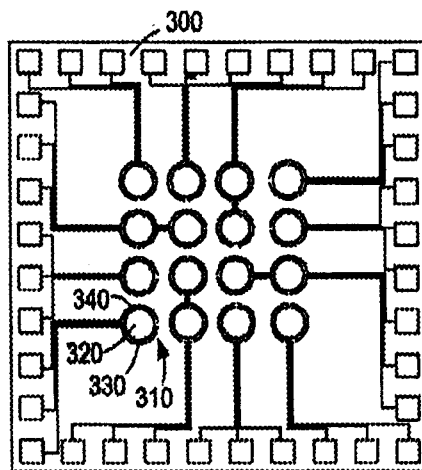


图 4

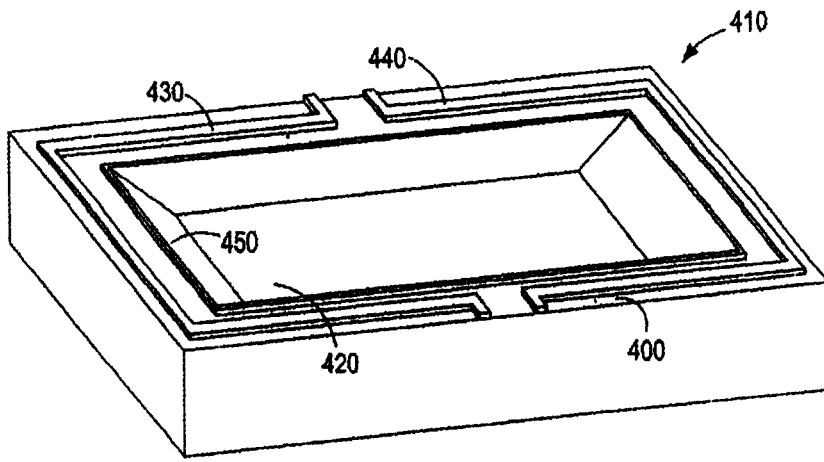


图 5

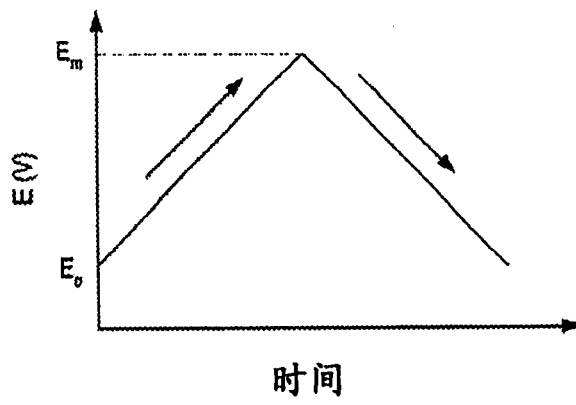


图 6

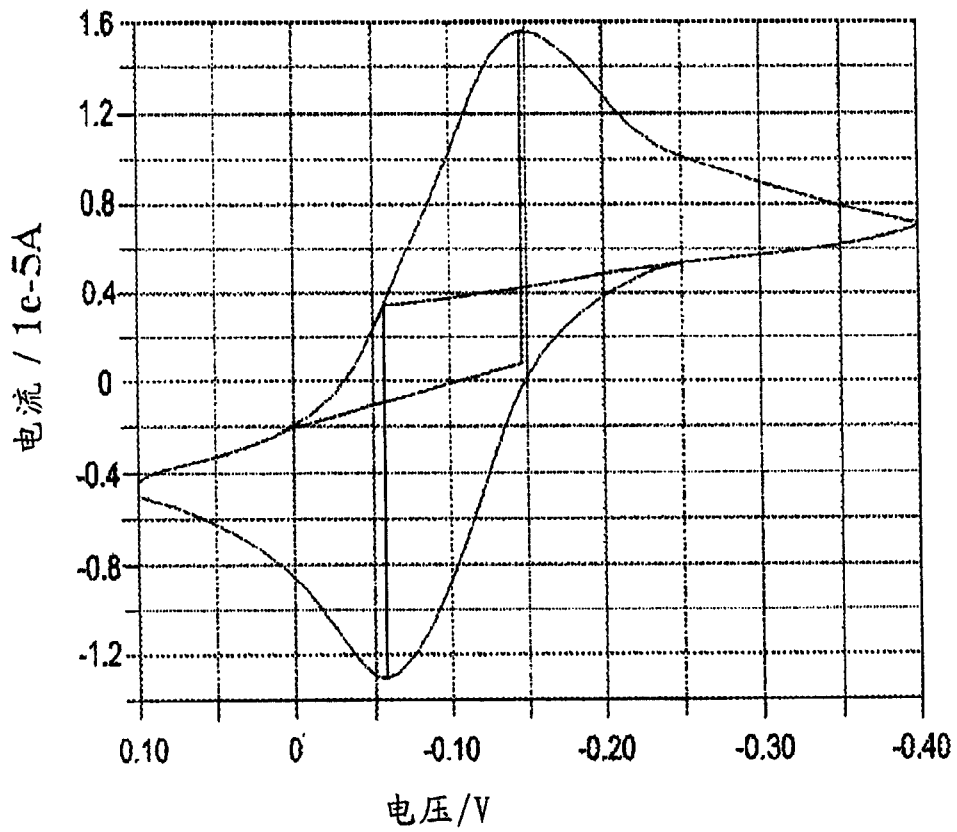


图 7

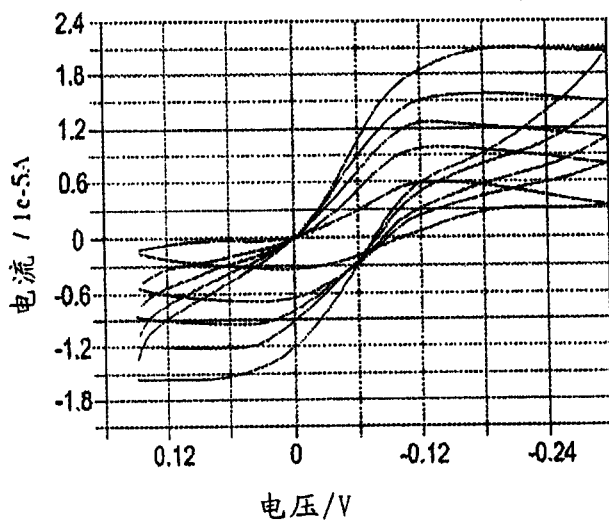


图 8

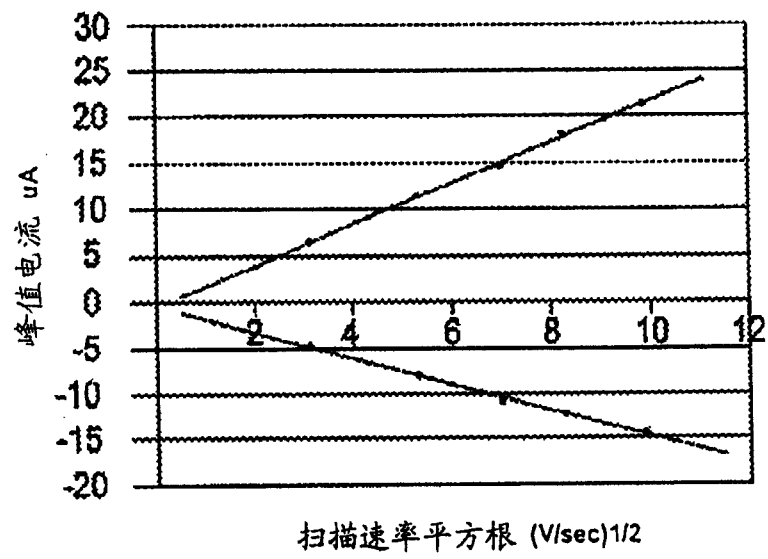


图 9

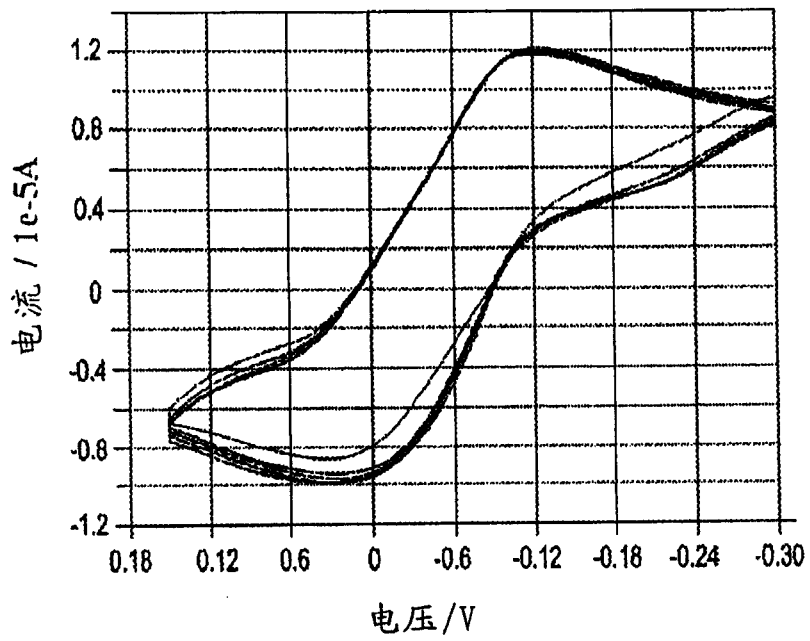


图 10

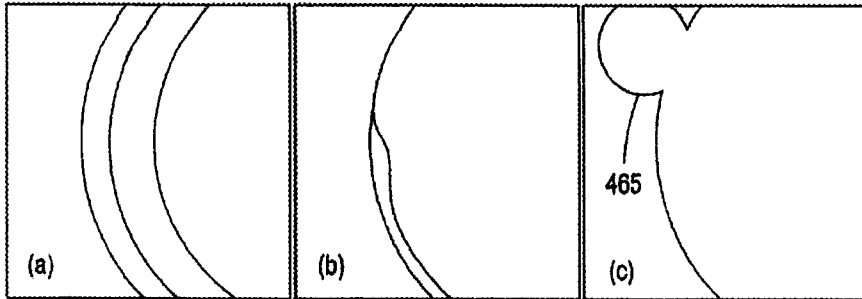


图 11

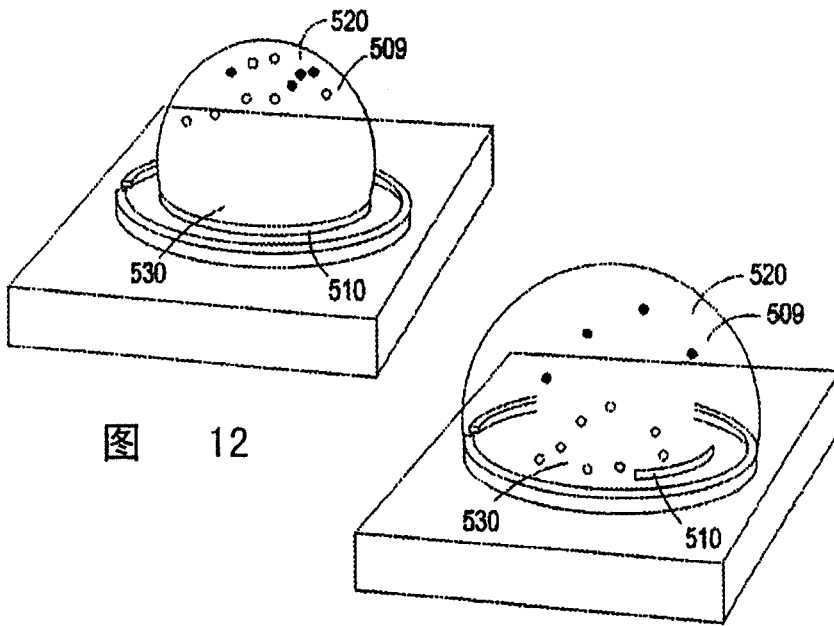


图 12

图 13

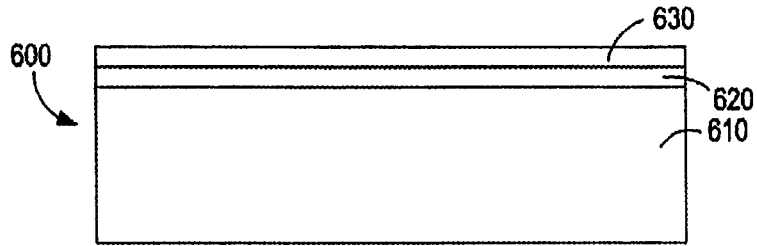


图 14

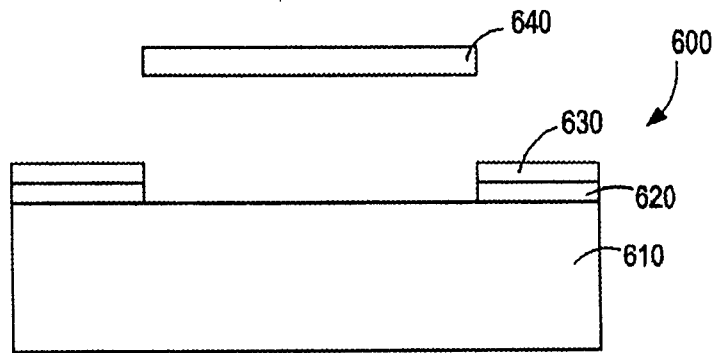


图 15

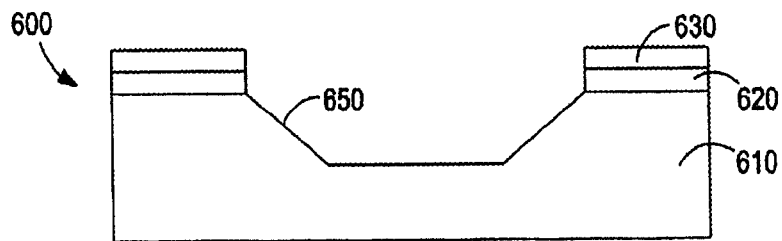


图 16

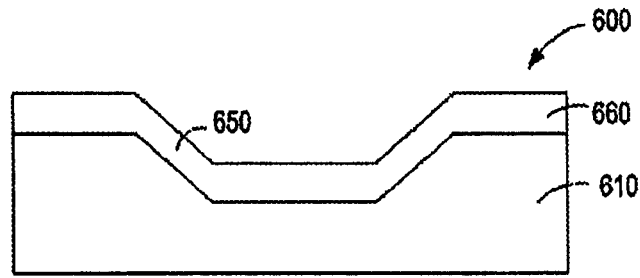


图 17

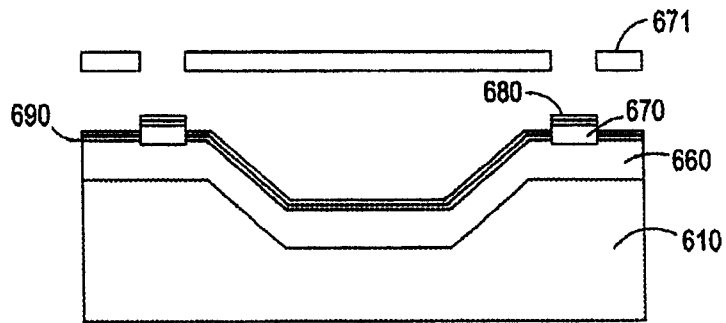


图 18

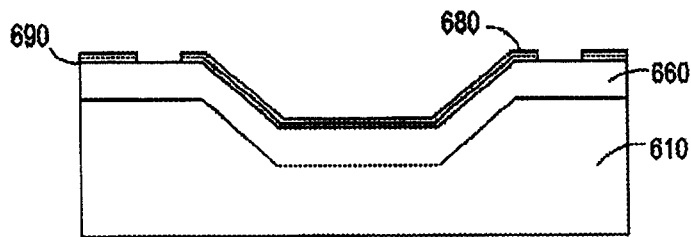


图 19

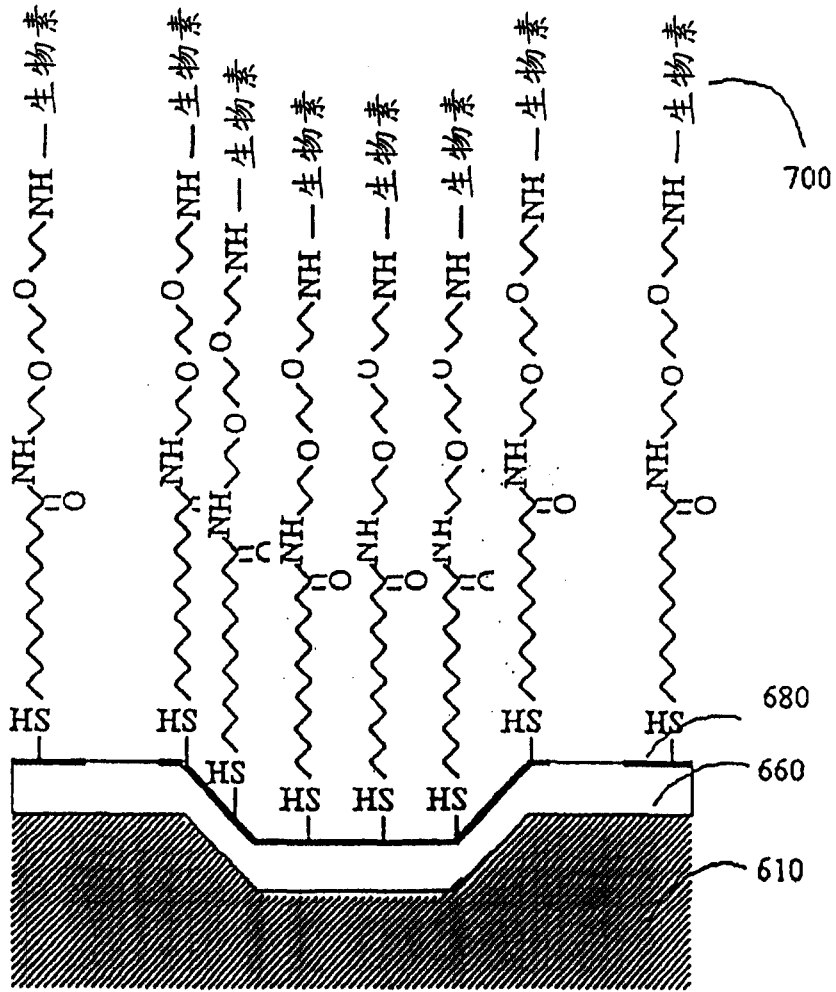


图 20

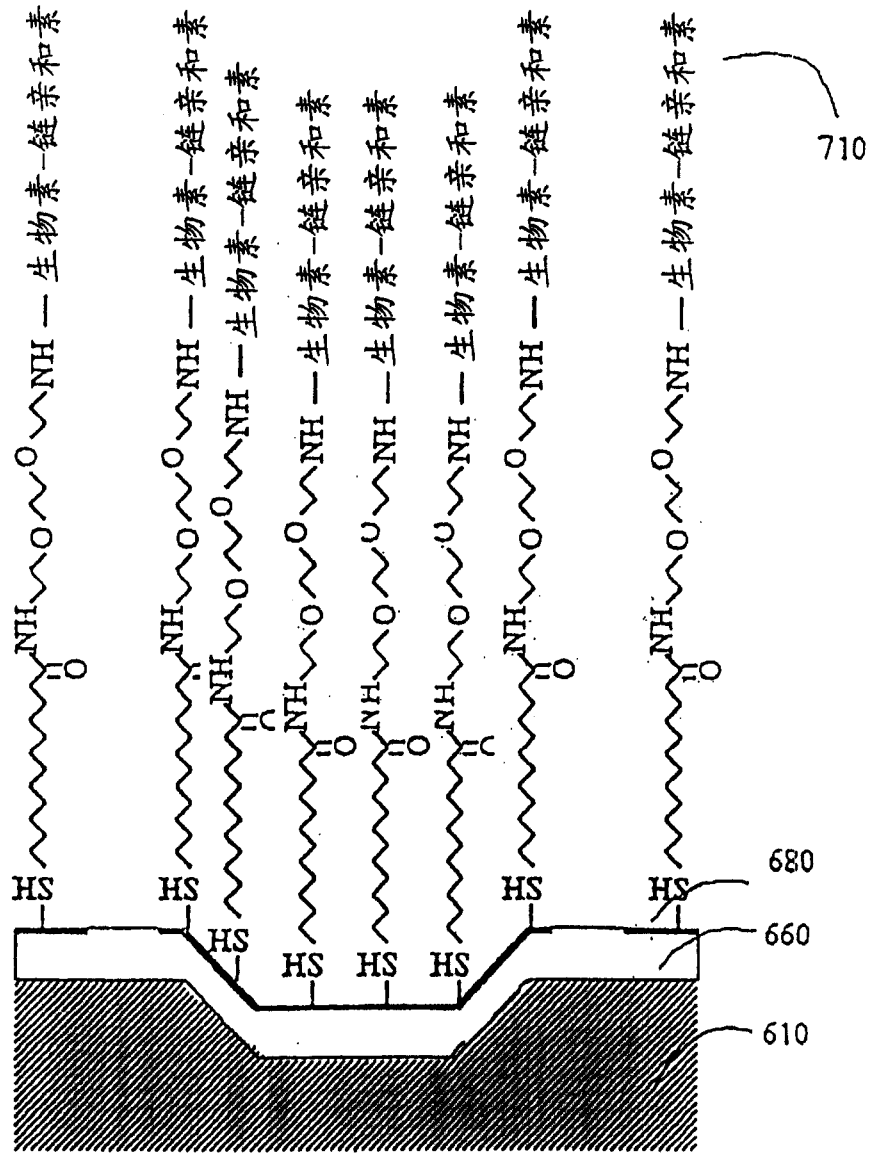


图 21

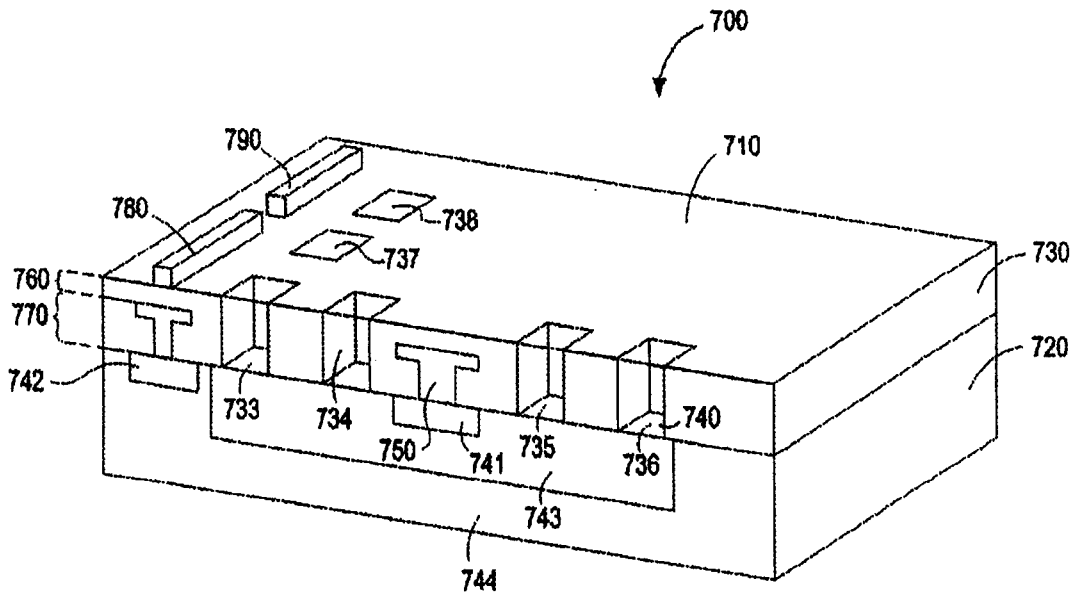


图 22

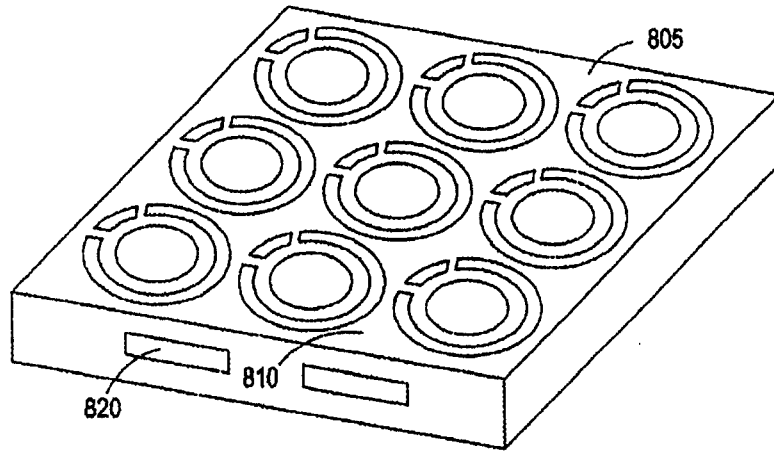


图 23

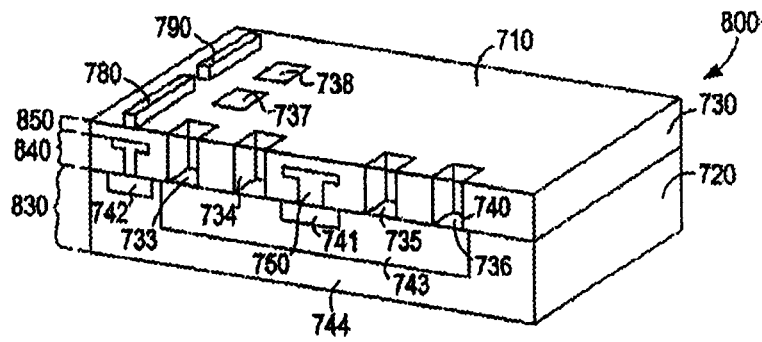


图 24

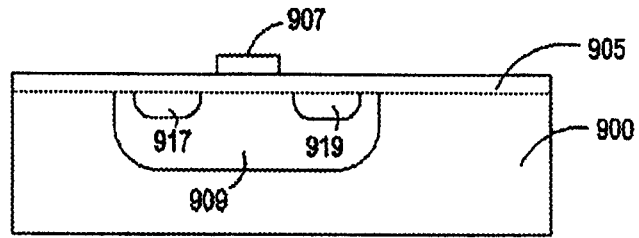


图 25

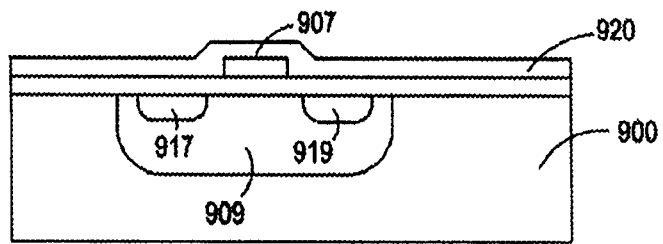


图 26

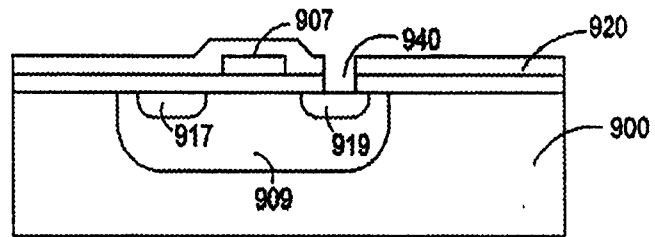


图 27

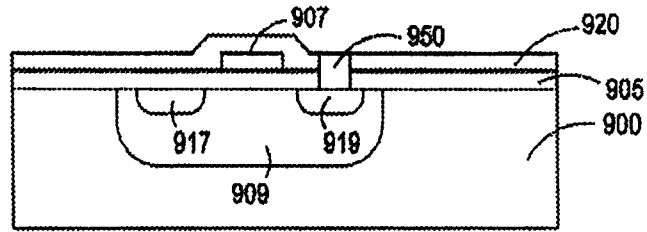


图 28

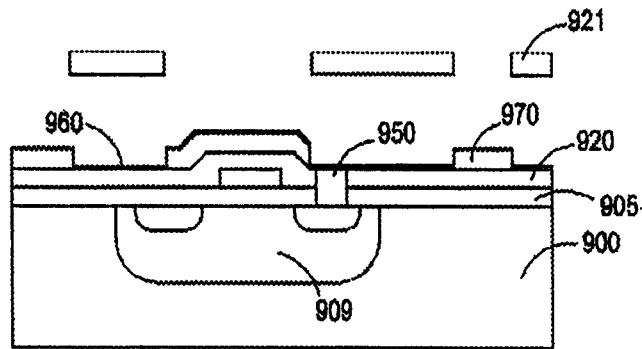


图 29

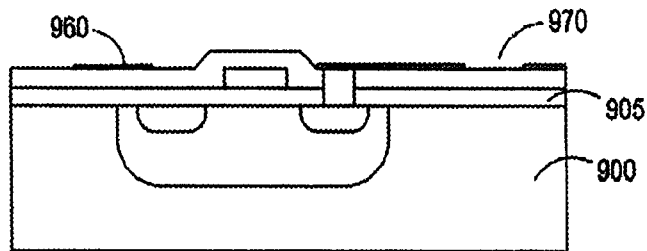


图 30

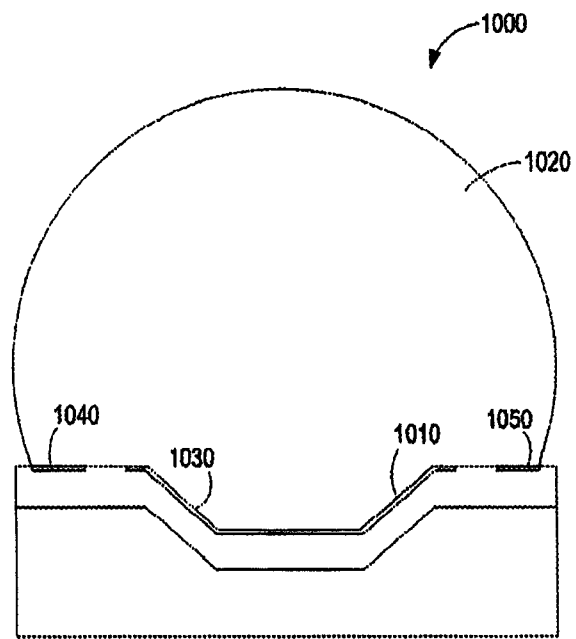


图 31

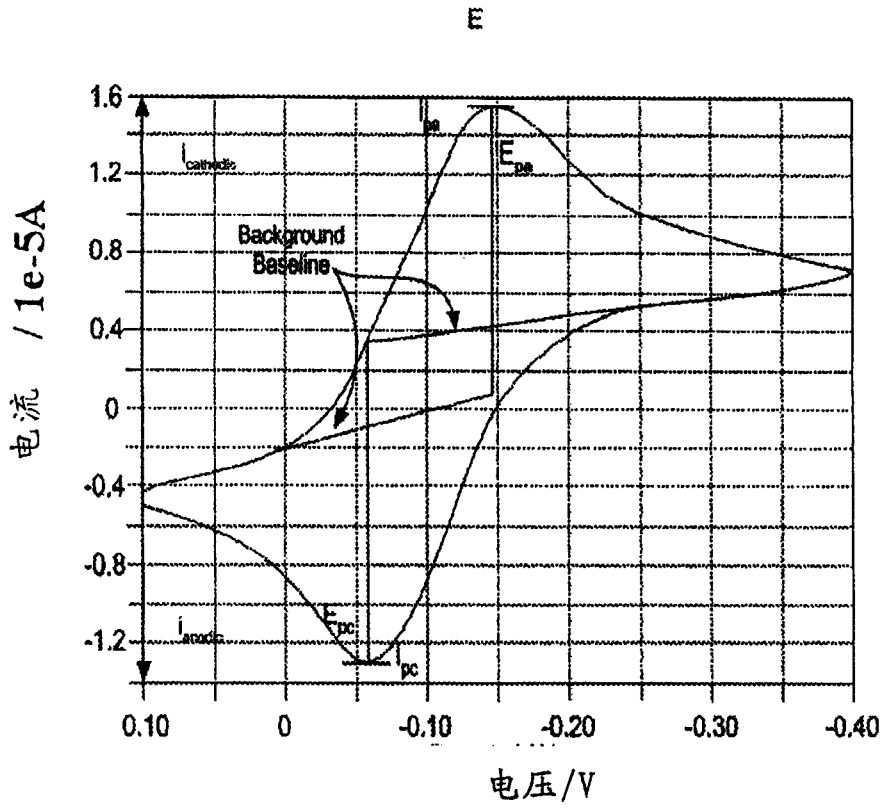


图 32

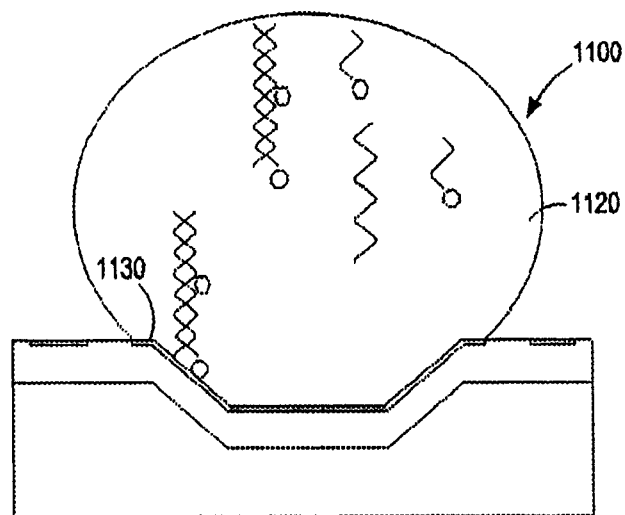


图 33

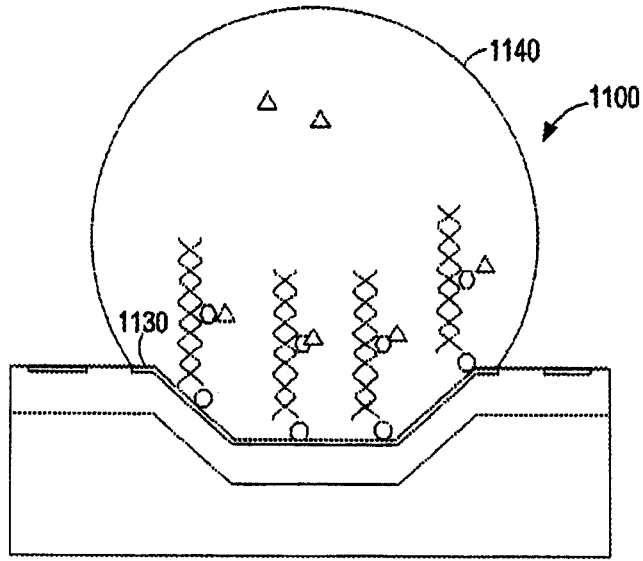


图 34

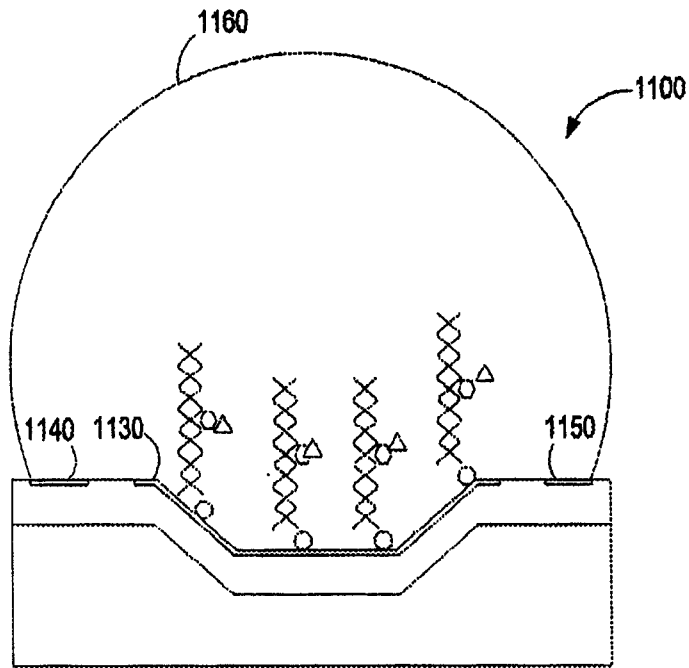


图 35