纪念王威琪院士诞辰 85 周年

基于氧化锌薄膜声表面波器件的细胞富集方法*

李英银^{1,2} 周 伟¹ 彭本贤¹ 张春秋¹ 全 浩^{1,2} 孟 龙^{1†}

(1 中国科学院深圳先进技术研究院 劳特伯生物医学成像研究中心 深圳 518055)
(2 东北大学 医学与生物信息工程学院 沈阳 110004)
2023 年 12 月 25 日收到
2024 年 4 月 1 日定稿

摘要 针对常见的铌酸锂等压电单晶在高温易碎裂且不能弯曲等问题,提出了一种区别于传统压电单晶富集细胞的方法。通 过磁控溅射技术在硅衬底上制备了厚度为 3.83 μm 的氧化锌薄膜,并用扫描电子显微镜与 X 射线衍射表征了薄膜性能,在薄 膜表面制备了频率为 195 MHz 的叉指换能器,插入损耗为-33.8 dB,且仿真分析了该器件的声场。结果表明,表面波声束 集中在换能器声孔径处,液滴位于声束边缘。实验结果表明,该器件能够驱动液滴产生 3.9×10⁻³ m/s 流速的涡旋,并在 20 s 内富集了悬浮于液滴中的微球和人体淋巴细胞,将液滴中细胞的浓度提升 55 倍。

关键词 声表面波,声镊,声流,氧化锌,压电基底,细胞富集

PACS数 43.38

DOI: 10.12395/0371-0025.2023308

Cell enrichment method based on zinc oxide thin film surface acoustic wave device

LI Yingyin^{1,2} ZHOU Wei¹ PENG Benxian¹ ZHANG Chunqiu¹ QUAN Hao^{1,2} MENG Long^{1†}

(1 Paul C. Lauterbur Research Center for Biomedical Imaging, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences Shenzhen 518055)

(2 College of Medicine and Biological Information Engineering, Northeastern University Shenyang 110004)

Received Dec. 25, 2023

Revised Apr. 1, 2024

Abstract To address common issues such as fragility and lack of flexibility at high temperatures in traditional piezoelectric single crystals like LiNbO₃, an approach diverging from conventional cell-enrichment piezoelectric crystals is proposed. This approach involves the fabrication of a zinc oxide (ZnO) film, approximately 3.83 μ m thick, on a silicon substrate using magnetron sputtering technology. The performance of the film was characterized using scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD). Furthermore, a 195 MHz interdigital transducer (IDT) was prepared on the film's surface, exhibiting an insertion loss of -33.8 dB. The acoustic field of the device was simulated and analyzed. The results show that the surface wave acoustic beam is concentrated at the acoustic aperture of the transducer, and the droplets are located at the edge of the acoustic beam. Experimental findings demonstrated that the device was capable of inducing droplet vortex formation with a flow velocity of 3.9×10^{-3} m/s. Moreover, the device effectively enriched suspended microspheres and human lymphocytes within the droplet, resulting in a 55-fold increase in cell concentration within 20 seconds.

Keywords Surface acoustic wave, Acoustic tweezer, Acoustic streaming, Zinc oxide, Piezoelectric substrate, Cell enrichment

引言

声镊可以通过调节声波的参数,如频率、强度和 相位等,实现对微观粒子的高精度操控^[1],且可同时 操控多个颗粒,也可在不同介质中进行操作^[2]。因其 不需要直接接触样品,避免了对生物学样品的污染 和损伤,广泛应用于细胞、细菌、外泌体等生物学颗 粒的操控,使其从复杂的血液组织中分离^[3],并保持 其生物活性,用于疾病的诊断和治疗。

^{*} 国家自然科学基金项目 (12227809) 资助

[†] 通讯作者: 孟龙, long.meng@siat.ac.cn

通常利用叉指换能器产生声表面波,其制备工 艺为标准微纳加工工艺,常用的压电基底如铌酸锂、 钽酸锂、石英等单晶材料具有良好的机械性能。但 这些压电单晶材料较脆,随着输入功率的增加,容易 出现碎裂的情况,且刚性材料无法弯曲,限制了其应 用范围。氧化锌是一种理想的压电薄膜材料,厚度 可达微米量级,且可通过控制其微观结构和成分来 调节其压电性能从而满足不同应用的要求^[4-5],也为 柔性可穿戴超声设备提供了新手段。相比于铌酸锂 等传统压电单晶,氧化锌压电薄膜还可以生长在玻 璃等透明材料上^[6],避免了铌酸锂在倒置显微镜下的 光学折射效应,也可以在柔性衬底上实现弯曲。

细胞富集对于促进生物医学领域的发展和临床 应用具有非常重要的意义,对于深入了解细胞功能、 代谢和疾病机制至关重要,在细胞治疗和再生医学 中,富集特定细胞有助于治疗和修复受损组织。此 外,细胞富集还有助于筛选药物靶点^[7]和研发新治 疗方法。目前已研发多种方法实现颗粒浓缩,例如 磁镊^[8]、声镊^[9-10]、光镊^[11]和介电泳^[12]方法,其中,声 镊操控颗粒的富集方法具有高通量、无标记、灵敏 度高且生物相容性好等优点,受到了广泛的关注。 这些利用声镊技术对细胞富集的研究多是基于刚性 材料的叉指换能器实现的[13-14], 而通过氧化锌压电 薄膜的柔性器件[15-16]进行细胞操控不仅可以解决 前文提到的问题,而且芯片与生物结合方式更加多 样^[17],相比于刚性材料其应用范围更广泛。此外,氧 化锌器件频率通常较高,相比于块状压电单晶材料 更容易产生声流。块状单晶材料温升明显,细胞对 温度非常敏感,温升很容易造成细胞的损伤。氧化 锌薄膜器件散热较好,可有效避免温度升高,保障了 细胞的活性和安全。

本研究使用磁控溅射方法^[18]制备了氧化锌薄 膜,并将其应用于声表面波器件。通过优化工艺参 数和表征手段,制备了厚度 3.83 µm 的氧化锌压电薄 膜和叉指换能器,并利用该器件产生涡旋声流,在声 流的驱动下富集了液滴中的聚苯乙烯微球和淋巴细 胞,实现了区别于传统压电单晶富集细胞的方法。

1 ZnO 压电薄膜与叉指换能器制备

本实验使用 4 英寸 Si 作为衬底, 厚度 500 µm, 其 表面有一层 475 nm 厚的 SiO₂。使用 DM-250 双靶磁 控溅射仪, 通过磁控溅射技术在衬底上制备氧化锌 薄膜。使用纯度 99.995% 规格 Φ 50×5 nm 的纯锌靶 材。溅射过程中, 氩气气体通量为 48 Sccm, 氧气气 体通量为 24 Sccm, 压力 1.5 Pa, 功率 180 W, 偏压电源 设置为-75 V。一次溅射时间为 1 h, 间隔 15 min, 周期性重复溅射。制备了厚度为 3.83 µm 的氧化锌 薄膜, 溅射时间共计 4 h, 最后在 300 °C 下进行了加 热退火 1 h 处理以释放应力, 提高薄膜稳定性。

得到氧化锌压电薄膜后,在其表面制备叉指换 能器。叉指指条宽度和指间宽度设计为5 µm, 对应 的声波波长为 20 μm, 叉指对数 40 对。使用 AZ5214 光刻胶, 通过旋涂仪 (WS-650Mz-23NP PB) 涂胶, 转 速 3000 r/min, 时间 30 s。然后在恒温加热板上 115 ℃ 烘 2 min。使用 EVG610 光刻机, 曝光剂量 30 mJ/cm², 曝光后在 300MIF 显影液中显影 40 s。光刻后使用 磁控溅射技术镀金叉指电极。首先对基底表面进行 等离子清洗,通过镀铬的方式增加金与基底的粘附 性, 功率为 60 W, 氩气通量为 20 Sccm, 溅射时间为 1 min, 最后使用金靶材, 功率设为 70 W, 氩气通量为 20 Sccm, 溅射时间为4 min。将镀金后的硅片放入丙 酮液体中剥离,经过5h后,完成叉指电极的制备。 按叉指图形切割后,固定在 PCB (Printed Circuit Board) 板上,使用绑线机将叉指电极连接到 SMA 接口,制 作完成的芯片如图1所示,制备流程如图2所示。



图 1 硅衬底的氧化锌叉指换能器芯片



图 2 氧化锌薄膜叉指换能器制备工艺流程

2 ZnO 薄膜与叉指换能器性能表征

2.1 扫描电子显微镜与 X 射线衍射表征

本次实验中制备了厚度为 3.83 µm 的氧化锌薄 膜,通过扫描电子显微镜 (SEM) 观察其内部结构。 氧化锌层的形貌如图 3 所示,其呈现为均匀柱状, ZnO 薄膜由垂直于衬底的高度取向的柱状纳米晶组 成,有良好的 z 向生长。

在制备氧化锌薄膜时,更好的(002)取向将会有更好的压电效应,通过扫描X射线衍射(X-ray Diffraction, XRD)得到的结果如图4所示,其中强度单位CPS表示每秒计数。在34.42°的位置产生了明显衍射峰,制备的氧化锌表现出良好的(002)取向,说明制备的氧化锌薄膜具有良好的结构。





2.2 叉指换能器性能表征

插入损耗 (S₂₁) 和回波损耗 (S₁₁) 是评估 SAW 器件性能的两个重要指标。较低的插入损耗意味着 SAW 器件对信号的衰减较小,能够更有效地产生声 波信号,较高的回波损耗意味着 SAW 器件能够更好 地抑制信号回波,减少信号的干扰和反射。使用网 络分析仪测量插入损耗和回波损耗,结果如图 5 所示。

由网络分析仪的测试结果可知,该器件的S11和S21



图 5 氧化锌器件的 S11 和 S21 测试结果

在 195 MHz 左右产生明显共振, *S*₁₁ 为-1.8 dB, *S*₂₁ 为 -33.8 dB。峰值所在的频率不严格对应的原因可能 是一对换能器在制备过程中不是完全相同的,导致 一对叉指换能器之间的频率存在一定的偏差,本实 验中富集粒子只用了单个叉指换能器。对于理想的 ZnO 压电薄膜, 瑞利波速为 2650 m/s^[19], 表面波在硅 上的传播速度为 4680 m/s, 通过频率与波长的乘积计 算得到该器件的声表面波声速为 3900 m/s, 介于 2650 m/s 和 4680 m/s 之间, 这是因为设计的波长为 20 μm, 大于氧化锌膜厚 3.83 μm, 使得一部分声表面 波在氧化锌薄膜中传播, 另一部分在硅和二氧化硅 介质中传播。

3 粒子与细胞的富集

采用微粒验证富集效果,实验采用 5 μm 的 PS (Polystyrene)小球模拟淋巴细胞进行富集实验。将 5 μm 荧光小球与 PBS 溶液以 1:10 的比例混合,取 0.2 μL 的液滴滴在叉指换能器声孔径处,声场与液滴 分布位置关系如图 6 所示,声场有一部分穿过液滴, 推动液滴产生涡旋,从而富集液滴中粒子。

通过有限元仿真得到的结果如图 7 所示。液滴 放置于声表面波声束的边缘,导致声波在液滴内部 能量呈非对称分布,破坏了液滴内部的能量平衡。 当声表面波进入液滴后,发生模式转换,转化为体波, 液滴吸收体波的能量将产生声流,由于声波能量在 液滴内的非对称分布,导致液滴内部形成涡旋声



图 6 叉指换能器与液滴示意图



图 7 换能器声场分布与液滴位置



图 8 PS 声流富集 5 µm PS 小球

流。利用涡旋声流可操控液滴内部颗粒,细胞受到 涡旋声流的作用,将被富集在液滴的中心。

将信号发生器频率设置为 195 MHz,并与功率 放大器相连,通过功率计测量得到输入电功率为 2.8 W,接入声表面波芯片产生声波。如图 8 所示, 在 *t*=0 s 时带有粒子的液滴在初始状态下小球在液 滴中均匀随机分布,当信号发生器激发叉指换能器 产生声波信号时,液滴中出现涡旋现象,液滴中的小 球在 20 s 后逐渐富集到涡旋的中心。

小球的富集现象表明氧化锌叉指换能器有良好的性能,可驱动粒子产生运动。粒子成像测速(PIV) 是一种通过追踪流体中添加的微粒(如烟雾或颜料 粒子)测量流体速度的技术。使用平面粒子成像测 速模块描绘粒子运动形成涡旋的轨迹,比较两张图 片中微粒的位置变化,计算微粒位移,从而重建流体 速度场。如图9所示,涡旋产生的粘性拽力驱动颗 粒产生运动,并逐步富集到中心位置。

进一步研究人体淋巴细胞富集,实验中对 opti-mem 培养基中的淋巴细胞使用浓度为 1% 的



图 9 PS 小球富集轨迹

Calcein-AM 染色处理 5 min, 再与 PBS 溶液以 1:8 的 比例混合, 与操控粒子实验相同, 取 0.2 µL 带有淋巴 细胞的液滴滴在叉指换能器声孔径处。将信号发生 器频率设置为 195 MHz, 将输入电功率设置为 6 W, 超声波激发后, 带有细胞的液滴产生了涡旋现象, 经 过 17 s 后, 涡旋中的淋巴细胞逐渐富集到涡旋的中 心, 如图 10 所示, 富集前液滴的半径在 386 µm, 富集 后缩小到 52 µm, 经过富集使得淋巴细胞的浓度提升 了 55 倍。通过 pivlab 模块计算声流流场, 图 11 是淋 巴细胞在 8.5 s 时刻下各个方向的瞬时速度和涡旋的



图 10 声流富集淋巴细胞



图 11 淋巴细胞的运动轨迹

轨迹。

4 结论

利用磁控溅射方法成功制备了厚度 3.83 μm 的 氧化锌压电薄膜,通过调整工艺参数和制备方法,优 化了氧化锌的薄膜结构和压电性能。测试结果表明, 制备的氧化锌在扫描电子显微镜下有良好的 z 向生 长。在此基础上,制备了叉指换能器用于富集细胞, 该器件能够驱动液滴产生 3.9×10⁻³ m/s 流速的涡旋 声流,在声流的驱动下富集了液滴中 5 μm 的聚苯乙 烯微球和淋巴细胞,将淋巴细胞的浓度提升了 55 倍。本文为氧化锌压电薄膜在声表面波器件领域 的应用提供了有力支持,并为细胞富集的研究和应 用提供了新的思路和方法。

参考文献

- Ozcelik A, Rufo J, Guo F, *et al*. Acoustic tweezers for the life sciences. *Nat. Methods*, 2018; 15: 1021–1028
- 2 张洁, 刘春泽, 王欢, 等. 基于超声驻波场的水下颗粒操控研究. 声学技术, 2022; 41(2): 220-227
- 3 Lu X, Martín A C, Soto F, *et al.* Parallel label-free isolation of cancer cells using arrays of acoustic microstreaming traps. *Adv. Mater. Technol.*, 2018; 4: 1800374
- Zhou F M, Li Z, Fan L. Experimental study of love wave immunosensors based on ZnO/LiTaO3 structures. *Ultrasonics*, 2010; 50(3): 411-415
- 5 Wang Y, Zhang S Y, Fan L, *et al.* Surface acoustic wave humidity sensors based on (1120) ZnO piezoelectric films sputtered on R-sapphire substrates. *Chin. Phys. Lett.*, 2015; **32**(8): 086802
- 6 Huang J J, Wang Z Y, Liu R, *et al.* ZnO/glass-based SAW tweezer for dexterous particle patterning and patterned cell culturing.

Microfluid. Nanofluid., 2023; 27: 34

- 7 Bhadra J, Sridhar N, Fajrial A K. Acoustic streaming enabled moderate swimming exercise reduces neurodegeneration in *C. el*egans. Sci. Adv., 2023; 9(8): eadf5056
- 8 Liu P, Pascal Jonkheijm, Leon W M M, et al. Magnetic particles for ctc enrichment. *Cancers*, 2020; 12: 3525
- 9 Gu Y, Chen C, Mao Z, et al. Acoustofluidic centrifuge for nanoparticle enrichment and separation. Sci. Adv., 2021; 7: eabc0467
- 10 Liu, P, Tian Z, Hao N, *et al.* Acoustofluidic multi-well plates for enrichment of micro/nano particles and cells. *Lab Chip*, 2020; 20: 3399–3409
- 11 Armon N, Greenberg E, Layani M, *et al.* Continuous nanoparticle assembly by a modulated photo-induced microbubble for fabrication of micrometric conductive patterns. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017; 9: 44214–44221
- 12 Han S I, Kim H S, Han A. In-droplet cell concentration using dielectrophoresis. *Biosens. Bioelectron.*, 2017; 97: 41–45
- 13 Mao Z, Li P, Wu M, et al. Enriching nanoparticles via acoustofluidics. ACS Nano, 2017; 11(1): 603–612
- 14 Zhang A L, Liu W Y, Jiang Z D, *et al.* Rapid concentration of particle and bioparticle suspension based on surface acoustic wave. *Appl. Acoust.*, 2009; **70**(8): 1137–1142
- 15 周剑, 何兴理, 金浩, 等. 基于 ZnO 压电薄膜的柔性声表面波器 件. 光学精密工程, 2014; 22(2): 436-350
- 16 Jin H, Zhou J, He X L, *et al.* Flexible surface acoustic wave resonators built on disposable plastic film for electronics and lab-on-achip applications. *Sci. Rep.*, 2013; **3**: 2140
- 17 Fu Y Q, Luo J K, Du X Y, *et al.* Recent developments on ZnO films for acoustic wave based bio-sensing and microfluidic applications: A review. *Sens. Actuators, B*, 2010; **143**(2): 606–619
- 18 Min Y, Tuller H L, Palzer S, *et al.* Gas response of reactive sputtered ZnO films on Si-based micro array. *Sens. Actuators, B*, 2003; **93**(1-3): 435–441
- 19 Kalantar-Zadeh K, Wlodarski W, Trinchi A. A novel love mode SAW sensor with ZnO layer operating in gas and liquid media. *IEEE Ultrason. Symosium*, 2001; 1: 353–356