

半径,  $r$  是径向的变量, 在  $r=R$  处产生最大的变形量  $z_{\max}$ ,

$$z = -\frac{1}{4} \left[ \frac{24(1-\nu^2)P}{E} \right]^{1/3} \frac{R^{4/3}}{t^{1/3}} \quad (2-2)$$

如图 2-11 所示

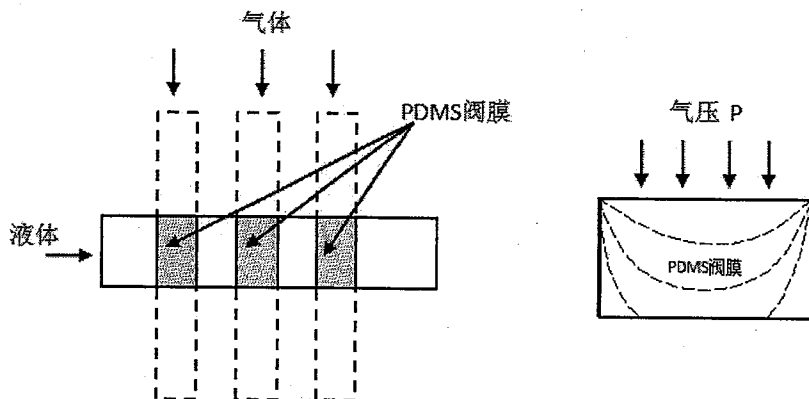


图 2-11 PDMS 微阀工作结构原理示意图

Fig. 2-11. The illustration of PDMS microvalve's function structure.

利用上面的原理, 我们制作了如图 2-12 的不同尺寸的 PDMS 微阀和微泵, 尺寸分别为“100×50”, “100×150”和“100×200”的微阀, 在 60KPa 和 -40KPa 下可以顺利实现微阀的关闭和开启, 证明了这种微阀良好的普适性。

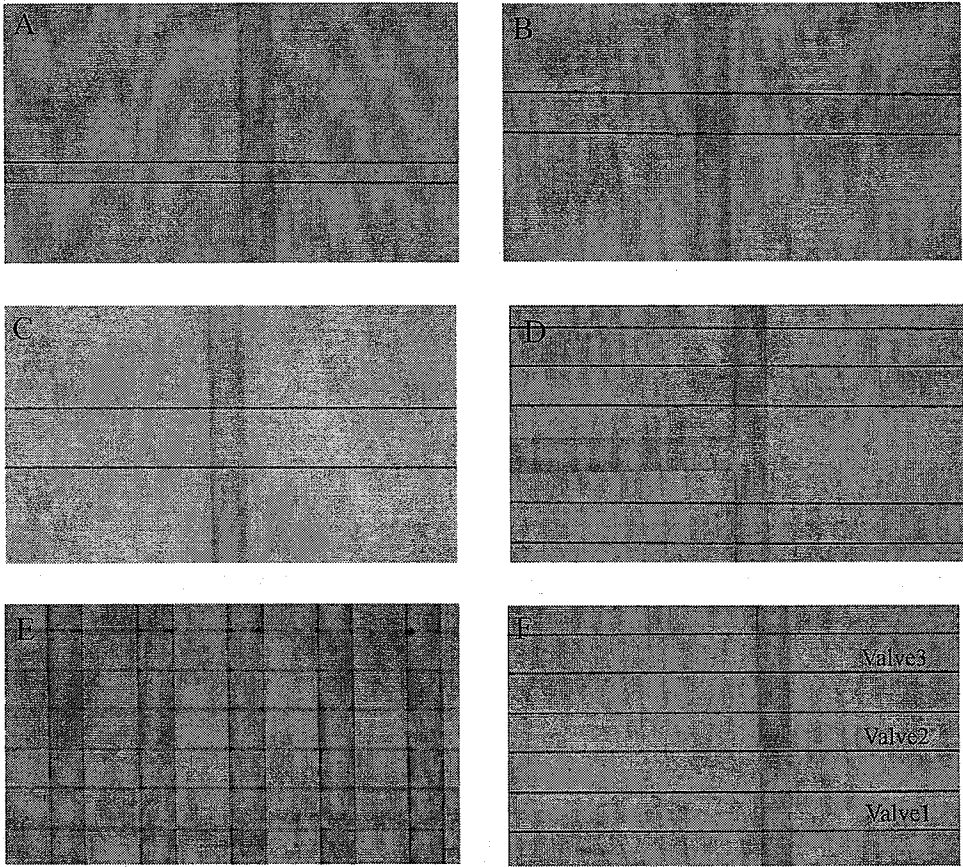


图 2-12 不同尺寸的微泵阀图像

Fig.2-12 Optical micrographs of different valve and pump configurations; control lines are oriented vertically. Optical micrographs of different valve and pump configuration (A) Simple on-off valve with 100- $\mu\text{m}$  control line and 50- $\mu\text{m}$  flow line ( "100 $\times$ 50" ). (B) "100 $\times$ 150" valve (C) "100 $\times$ 200" valve. (D) A switching valve. (E) Parallel micropump (F) Single micropump.

### 2.3.1.2 PDMS—PDMS 微泵性能考察

“PDMS—PDMS 型微阀”是一种常开型微阀，当没有外力作用下，通道保持液体流通，当有外力施加时，流路被阻断。3个上述 PDMS 气动微阀依次排列，在计算机程序控制下提供不同的开启和关闭压力，可以实现蠕动泵的功能。这种构架的微泵具有响应时间快，零死体积，易于集成等特点。

用“0”代表阀关闭的状态，“1”代表阀开启的状态，三个数字“XXX”的排列代表此时的 valve1、2、3 的状态，其工作步骤为：“000”，“100”，“110”，“010”，“011”，“001”。图 2-13 为作者课题组制作的微泵工作时 3 个微阀开启/关闭相对应的工作实时图像。从图中可以看出，在这种集成于芯片中的微泵的作用下，液体从通道下方被运输到通道上方。

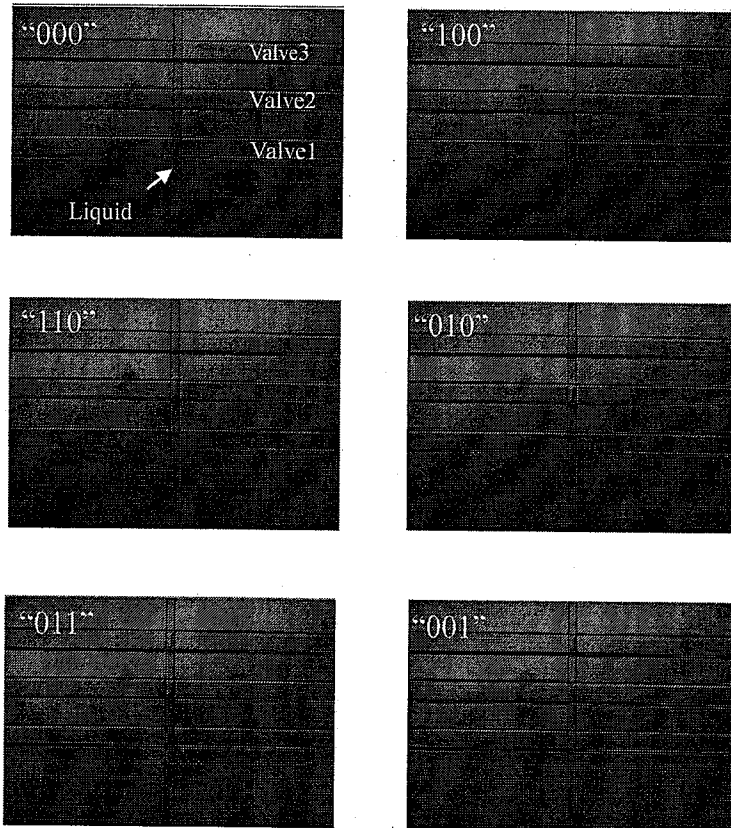


图 2-13 PDMS 微泵实时工作图像

Fig. 2-13 The images show one cycle of PDMS micropump composed of three valves, 2, 3 in sequence. "0" indicates valve closed and "1" indicates valve open. (A) "000", (B) "100", (C) "110", (D) "010", (E) "011", (F) "001".

### 2.3.2 玻璃-PDMS 杂交芯片微泵阀

但是 PDMS 材质的芯片自身有一定的缺陷, PDMS 未修饰状态下呈疏水性, 对许多生物样品具有非特异性吸附, 不利于芯片电泳上样品的分离, 同时芯片本身不利于集成电极、加热等功能单元。因此 2003 年 mathies 课题组提出了一种玻璃-PDMS 杂交芯片的设计[12], 引起了广泛关注, 并被成功应用于核酸分析、基因测序等领域[13-17]。

#### 2.3.2.1 玻璃-PDMS 杂交芯片原理

玻璃-PDMS 杂交芯片可以有三种和四层两种结构(图 2-14)[12]。

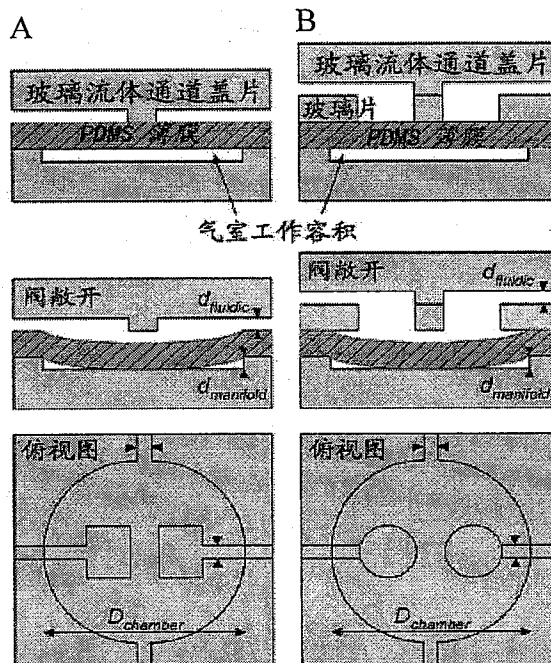


图 2—14 玻璃—PDMS 杂交芯片微阀 3 层和 4 层构架侧视和俯视图。

Fig. 2-14 Cross sectional, top and side view of (A) three-layer and (B) four layer diaphragm microvalve on Glass-PDMS microchip.

三层结构上下两层分别为流体通道和气路通道，材质为玻璃芯片；中间层为PDMS薄膜，在压力的作用下可以发生形变，形成微阀。四层结构为三层结构的改进版，主要是为了减小PDMS薄膜和流体样品的接触。芯片上流体通道全为玻璃材质，仅在阀的位置通过两个小孔与PDMS薄膜相接触，这种设计有效克服了PDMS非特异性吸附的缺点，适合于核酸、蛋白等物质的分析研究。

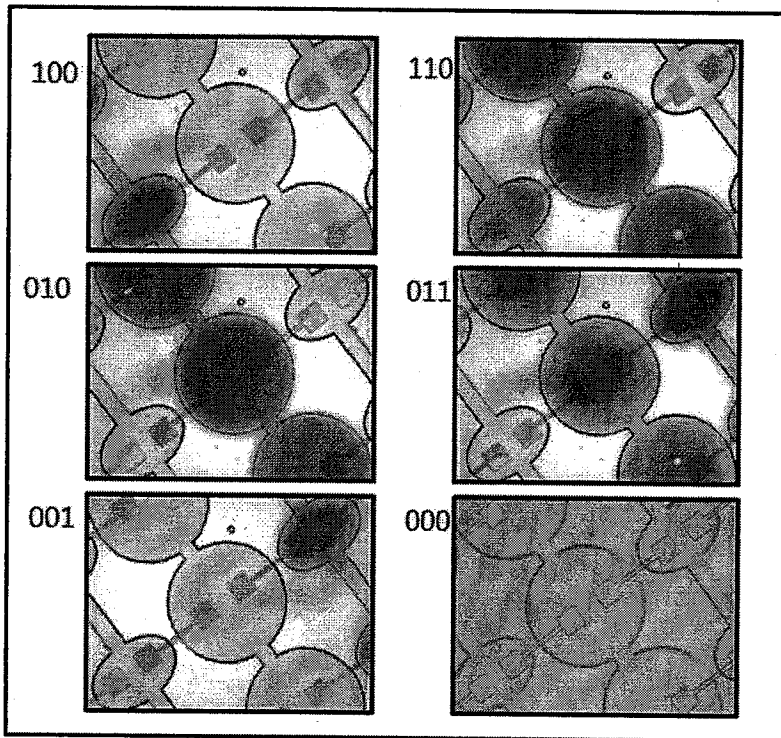


图 2—15 三层杂交芯片微泵实时工作示意图

Fig.2-15 The photographs of the liquid's transportation on the three-layers hybrid microchip

图 2-15 为我们制作的三层构架的玻璃-PDMS 芯片微泵运输液体的实时图像, 微泵由三个微阀组成, 左右两端微阀尺寸均为  $1.3\text{mm} \times 0.8\text{mm}$ , 中间的隔膜阀尺寸为  $1.7\text{mm}$  直径的圆形。黑色区域表示液体被泵入微阀中, 白色区域表示微阀内无液体。从图中可以清楚看到一个循环中液体从左端被运输到右端的实时过程。

### 2.3.2.2 玻璃-PDMS 微泵性能考察

对玻璃-PDMS 微泵进行性能考察, 该芯片由 6 组微泵组成, 芯片尺寸为  $63\text{mm} \times 63\text{mm}$ , 芯片设计膜图如图 2-16 (B, C) 所示。设计了一系列具有不同隔膜阀大小的微泵用于性能考察。6 个微泵 (泵 1-6) 中隔膜阀的尺寸从小到大直径依次别为  $0.5\text{mm}$ ,  $1\text{mm}$ ,  $1.5\text{mm}$ ,  $2\text{mm}$ ,  $2.5\text{mm}$  和  $3\text{mm}$ 。左右两端的阀大小相同, 都采用  $2\text{mm} \times 1\text{mm}$  的椭圆。三个微阀在程序的有序控制下可以形成一个微泵, 如图 2-16A, 其中左右两端的阀主要起通道内液流的方向控制作用, 每组泵中间的阀为隔膜阀(diaphragm valve), 它的大小直接影响微泵的流速[12]。

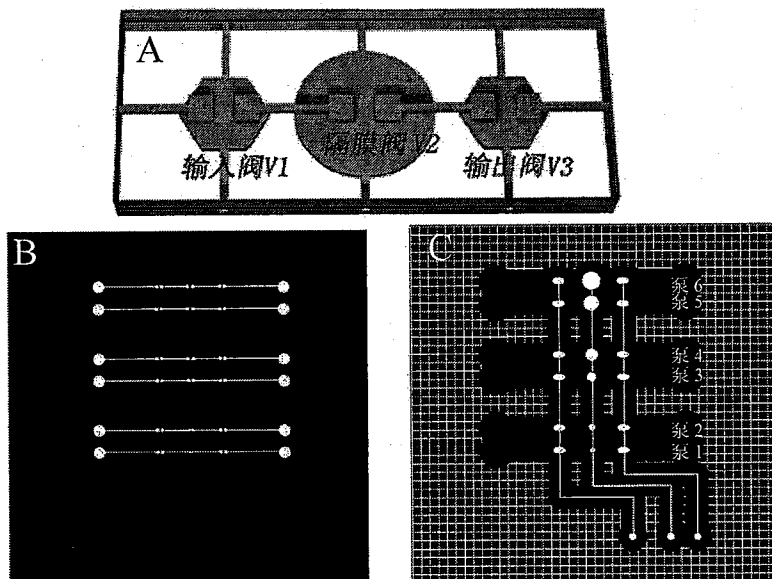


图 2-16 (A) 三个微阀组成的微泵示意图 (B, C) 三层玻璃-PDMS 杂交

芯片气路液路掩膜,集成 6 组不同尺寸的微泵,微泵流速通过中间的隔膜控制,6 个隔膜阀直径从小到大分别为 0.5mm, 1mm, 1.5mm, 2mm, 2.5mm 和 3mm。

Fig.2-16 (A)The micropump include input, diaphragm, output valves. (B, C)The six different microcpumps integrated on microchip and their diaphragm valve' s diameter are 0.5mm, 1mm, 1.5mm, 2mm, 2.5mm and 3mm, respectively.

表 2-1 微阀顺序做动形成微泵参数表

微阀步骤	第一步	第二步	第三步	第四步	第五步	第六步
微阀状态	100	110	010	011	001	000
制动时间	T1	T2	T3	T4	T5	T6

其中“1”代表微阀开启,“0”代表微阀关闭的状态,三个数字“XXX”的排列代表微泵中从左至右的输入阀、隔膜阀、输出阀的状态。

### 1. 微泵尺寸大小对流速的影响

各步微阀制动时间(T1-T6)均为 500ms。理论上说,当微阀逐渐变大时,其可传递的液体流量也随之增加,因此微泵的流速和微阀的大小应该成正比关系。从图 2-17B, 18B, 19B 中我们可以看出这种线性关系;但是当微阀继续增大时,腔室内的液体也需要更长的作用时间才能被运出,而如果不相应延长微阀的制动时间(actuation time),将会导致整个泵流速的降低;从图 2-16A 中可以发现当微阀大小大于 2.5mm 之后,流速不再微阀体积的增大而增大,反而降低,线性关系遭到破坏,这与我们的理论分析相一致。

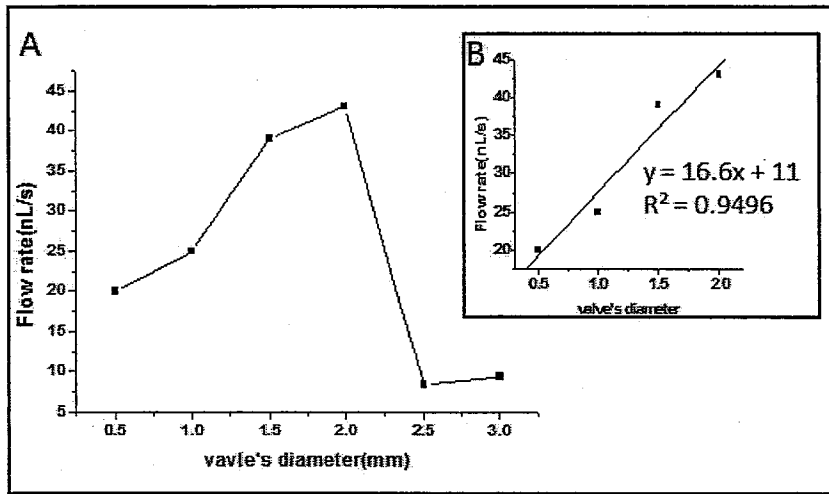


图 2-17 (A) 微阀制动时间 (T1-T6) 均为 500ms 时微泵流速图 (B) 其中泵 1-4 的流速和微阀尺寸成线性关系

Fig. 2-17 (A) The diagram shows the relationship of pump's flow rate with the actuation time that is 500ms (B) Linear plotting the flow rate of pump 1-4.

我们又将各步的微阀制动时间 (T1-T6) 调整到了 1000ms 进行考察。从图 2-18B 可以看出, 在微阀尺寸小于 2mm 时, 其流速和体积依然成线性关系, 当微阀直径大于 2.5mm 时, 流速不再和隔膜阀大小成正比 (图 2-18A)。同时比较图 2-17A 和 2-18A, 可以看出, 当时间从 500ms 延长到 1000ms 时, 泵 5 (直径 2.5mm) 和泵 6 (直径 3.5mm) 的流速在 1000ms 时较其在 500ms 时流速要快, 这是由于 500ms 的制动时间腔室内的液体运输不充分, 当时间增大到 1000ms 时, 有了更多的时间进行运输, 致使流速相应增快。

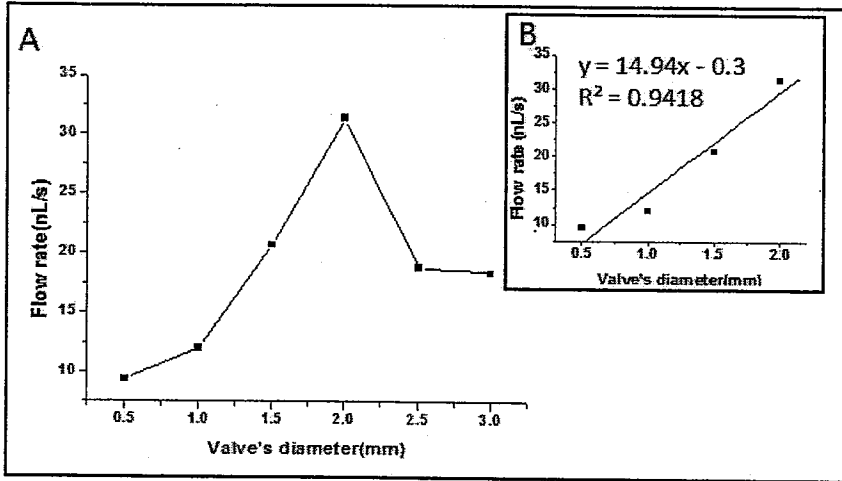


图 2-18 (A) 微阀制动时间 (T1-T6) 均为 1000ms 时微泵流速图 (B) 其中泵 1-4 的流速和微阀尺寸成线性关系

Fig. 2-18 (A) The diagram shows the relationship of pump's flow rate with the actuation time that is 1000ms (B) Linear plotting the flow rate of pump 1-4 .

为了进一步验证这种关系, 我们又将制动时间缩短到 300ms 进行考察。如图 2-19 所示。结果发现, 当时间从 500ms 缩短到 300ms 时, 泵 4 (直径 2mm) 腔室内的液体也运输不充分, 致使其不再和时间成正比关系。这个结果与我们前面所分析的相一致。

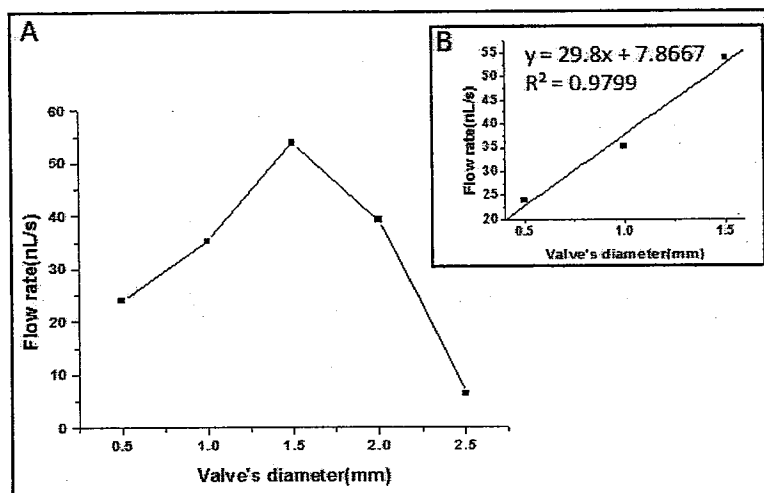


图 2—19 (A) 微阀制动时间 (T1—T6) 均为 300ms 时微泵流速图 (B) 其中泵 1, 2, 3 的流速和微阀尺寸成线性关系

Fig.2-19 (A) The diagram shows the relationship of pump's flow rate with the actuation time that is 300ms (B) Linear plotting the flow rate of pump 1-3.

综上所述, 当微阀制动时间等于其完全泵入和泵出液体所需时间时, 微泵的流速和微阀的大小成正比。对于较小尺寸的阀, 较短的制动时间就可满足其完全泵入泵出条件, 因此可以选择较短的时间; 反之, 较大尺寸阀需要设置较长时间才能得到较高流速。

## 2. 调整泵入、泵出时间对流速的影响

在所有 6 步中, 第二步时间 T2 为泵入时间和第五步 T5 为泵出时间, 这两步时间对泵的流速起决定作用[12]。因此我们在同一尺寸微泵上对驱动时间 T2, T5 进行了考察。T1, T3, T4, T6 保持 1000ms 不变, 调整 T2, T5 分别为 1000ms、2000ms、3000ms、4000ms, 来研究泵入、泵出时间对流速的影响。

从微泵尺寸对流速大小的分析可知, 当时间较大时, 微泵的隔膜阀需要加大尺寸才能容纳足够的液体, 因此选取隔膜阀尺寸为 3mm 和 2.5mm 的微泵考察。其流速图如图 2-20 所示。

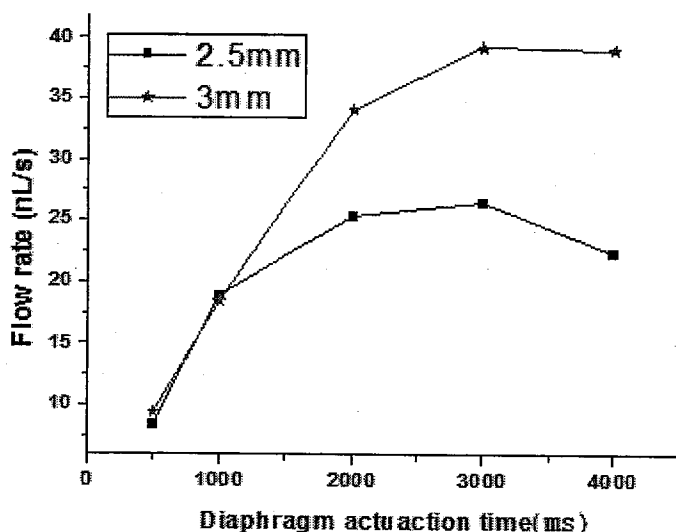


图 2-20 泵入、泵出时间对流速的影响

Fig. 2-20 The relationship of the diaphragm actuation time with the flow rate.

可以看到隔膜阀为 2.5mm 微泵大约在 2-3 秒左右, 流速达到峰值。而隔膜阀为 3mm 微泵在 3-4 秒左右, 流速达到峰值。表明了不同尺寸的隔膜阀的制动时间不同, 一般来说, 随着直径的增加其时间也会相应增加。

因此, 当阀尺寸较小时, 第二步泵入时间和第五步泵出时间较小即可实现液体的充分运输; 但当阀尺寸较大时, 为了实现液体的充分运输, 第二步泵入时间和第五步泵出时间需要适当延长, 才能得到理想的流速。

## 2.4 小结

成功搭建了微流控芯片微泵阀控制系统,包括软件的编写,电路板的设计及调试,掌握了“PDMS-PDMS型”和“玻璃-PDMS杂交型”两种芯片类型制作工艺,考察了微泵的性能参数,为自行设计微泵和调控流速提供了积累。特别是,鉴于微小通道内流体的控制,对于芯片实验室构建的重要性,该平台的搭建,为实现芯片上由微通道形成网络,以可控流体贯穿整个系统来实现多个不同单元的灵活组合、规模集成提供了强有力的技术保障和支持。

## 2.5 参考文献

- [1] 张树兵,戴红,陈哲, Visual Basic 6.0 入门与提高. 北京:清华大学出版社, 1999.
- [2] 李长林, Visual Basic 串口通信技术与典型实例 北京:清华大学出版社, 2003.
- [3] 李肇庆, 串行端口技术(最新硬件接口技术应用与开发系列). 国防工业出版社, 2004.
- [4] 童长飞, C8051F 系列单片机开发与 C 语言编程. 北京:北京航空航天大学出版社, 2005.
- [5] 马忠梅, 籍顺心, 张凯, 马岩, 单片机的 C 语言应用程序设计(第三版). 北京:北京航空航天大学出版社, 2003.
- [6] Lee, C. C., Sui, G. D., Elizarov, A., Shu, C. Y. J., Shin, Y. S., Dooley, A. N., Huang, J., Daridon, A., Wyatt, P., Stout, D., Kolb, H. C., Witte, O. N., Satyamurthy, N., Heath, J. R., Phelps, M. E.,

- Quake, S. R., Tseng, H. R., Multistep synthesis of a radiolabeled imaging probe using integrated microfluidics. *Science*, 2005, 310(5755): 1793-1796.
- [7] Hong, J. W., Studer, V., Hang, G., Anderson, W. F., Quake, S. R., A nanoliter-scale nucleic acid processor with parallel architecture. *Nature Biotechnology*, 2004, 22(4): 435-439.
- [8] Unger, M. A., Chou, H. P., Thorsen, T., Scherer, A., Quake, S. R., Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 2000, 288(5463): 113-116.
- [9] Thorsen, T., Maerkl, S. J., Quake, S. R., Microfluidic large-scale integration. *Science*, 2002, 298(5593): 580-584.
- [10] Studer, V., Hang, G., Pandolfi, A., Ortiz, M., Anderson, W. F., Quake, S. R., Scaling properties of a low-actuation pressure microfluidic valve. *Journal of Applied Physics*, 2004, 95(1): 393-398.
- [11] Landau, Lifshitz, *Theory of Elasticity*. New York : Pergamon Press, 1986.
- [12] Grover, W. H., Skelley, A. M., Liu, C. N., Lagally, E. T., Mathies, R. A., Monolithic membrane valves and diaphragm pumps for practical large-scale integration into glass microfluidic devices. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2003, 89(3): 315-323.
- [13] Liu, C. N., Toriello, N. M., Mathies, R. A., Multichannel PCR-CE microdevice for genetic analysis. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(15): 5474-5479.

- [14] Easley, C. J., Karlinsey, J. M., Bienvenue, J. M., Legendre, L. A., Roper, M. G., Feldman, S. H., Hughes, M. A., Hewlett, E. L., Merkel, T. J., Ferrance, J. P., Landers, J. P., A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(51): 19272-19277.
- [15] Lagally, E. T., Scherer, J. R., Blazej, R. G., Toriello, N. M., Diep, B. A., Ramchandani, M., Sensabaugh, G. F., Riley, L. W., Mathies, R. A., Integrated portable genetic analysis microsystem for pathogen/infectious disease detection. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(11): 3162-3170.
- [16] Blazej, R. G., Kumaresan, P., Mathies, R. A., Microfabricated bioprocessor for integrated nanoliter-scale Sanger DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(19): 7240-7245.
- [17] Liu, P., Seo, T. S., Beyor, N., Shin, K. J., Scherer, J. R., Mathies, R. A., Integrated portable polymerase chain reaction-capillary electrophoresis microsystem for rapid forensic short tandem repeat typing. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(5): 1881-1889.

## 第三章 集成微泵阀负压驱动技术用于芯片电泳研究

### 3.1 引言

自上个世纪九十年代初 Manz 等提出微全分析系统 (Miniaturized total chemical analysis system,  $\mu$ -TAS) 概念以来[1], 在这十几年中微流控芯片技术得到了飞速发展[2, 3]。芯片电泳作为微流控芯片分离分析的一个重要工具和手段, 一直是人们研究和关心的热点[4, 5]。芯片电泳是指以电场为驱动力, 依靠分子或者离子在电迁移分配行为上的差异, 对复杂试样中的一种或多种组分进行分离分析的技术。

微流控毛细管电泳芯片 (Microfluidic capillary electrophoresis chip) 分析是将常规毛细管电泳分析技术移植到芯片上, 通过对外加电场的调节来控制样品的进样和分离。芯片电泳进样是芯片电泳的核心技术, 其包括上样 (loading) 和取样 (dispensing) 两个步骤[6, 7]。上样是指利用一个或一组微通道与分离通道相交形成网络, 通过电动力或压力控制样品在网络中的流动, 最终在分离通道内形成一段样品区带。取样指的是在分离通道两端施加电场将样品区带输入分离通道。

在上述两个步骤中, 通常来说取样步骤基本相同, 区别主要在于上样步骤的不同, 使芯片上的电泳进样有多种类型, 按照驱动力的不同主要分为电驱动力和压力驱动两大类。

电驱动力一般包括电泳和电渗两种驱动方式, 它易于产生和控制, 因此在微流控芯片中的研究起步较早也较为全面, 按照微通道网络构架的不同, 可分为 T 型[8], 双 T 型[9], 十字交叉型[10], 双十字交叉[11], 多 T 型[12] 等。上样方法也可分为简单上样[10]、悬浮上样 [8]、夹流上样[10, 13, 14]、

门式上样[15]、聚焦[16]等不同的方式。其中采用夹流上样方式可以使样品区带收缩变窄,有利于样品的分离,可以取得较好的分离效果。

不过由于通道表面带电状况的复杂性,复杂样品因为其不同物质电泳淌度的不同,容易产生“电歧视效应”[17, 18]和“电堆积效应”;这在一定程度上限制了电驱动进样在微流控芯片中的应用,尤其是在定量分离分析中的应用。

压力驱动由于不存在上述效应,近年来得到了受到了人们的青睐[19, 20]。压力驱动主要包括静压力(重力法和表面张力法)[7, 21]和泵致压力[18, 19, 22](外接注射泵和芯片集成微泵)等方式来实现。静压力驱动一般是依靠液面高度差产生压力,具有方法简单,无需外部设备等优点,但是随着时间的延长,液面高度会发生变化,导致静压力也随之变化甚至消失。泵致压力早期研究主要是通过外接的注射泵/注射器装置来向微通道内施加压力,驱动流体,有效克服了电歧视效应等缺点,但是其接口复杂,同时微流控芯片中通道内的体积一般是纳升级,为控制合理的流速,需要价格昂贵的精确注射泵来实现操控。而在芯片内集成微泵阀可以有效克服上述缺点。

本工作通过在芯片上集成微泵阀实现了样品的负压夹流进样(negative pressure pinched(NPP) injection),并通过荧光素钠和氨基酸为对象对该方法进行了考察,该方法的建立,可以有效消除样品歧视效应,为微流控芯片进样方法的发展提供了有力的支持。同时芯片内集成的微泵阀可以方便的和其它更多功能单元相集成,为实现人们更多的对芯片实验室的需求提供保障。

## 3.2 实验部分

### 3.2.1 实验仪器和试剂

荧光素钠购自天津染料研究所。十二烷基磺酸钠 (SDS), 氨基酸: 精氨酸 Arginine (Arg), 甘氨酸 Glycine (Gly) 和丝氨酸 Serine (Ser) 购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO, USA)。FITC 购自 Ameresco 公司 (Solon, OH, USA)。硼酸、NaOH 于沈阳化学试剂厂购得。除特殊说明外, 本章中提及的化学试剂均为分析纯, 水溶液均用二次水配制。

本章研究工作采用自行搭建的微流控芯片分析仪, 此仪器激光发射波长为 473nm 的激光器, 功率 10mW, 检测的发射波长为 520 nm。计算机控制的步进马达可以控制检测点的位置, 确保检测点位于我们实验所需要的位置。以 CCD 作为聚焦调节和监测器, 与荧光信号接受部分同处于一个可转换平台上, 通过 CCD 在电脑显示器屏幕上所形成的图像进行激光聚焦的三位调节, 可以保证准确聚焦。芯片中的微阀由自行搭建的微泵阀控制装置通过 VB 程序进行控制, 其详细介绍见第二章。高压电源可在计算机控制下提供 0—4000V 高压, 实验数据通过 AD/DA 模块进行实时采集和保存。

### 3.2.2 芯片的制作和封接

#### 3.2.2.1 芯片的制作

芯片采用玻璃—PDMS—玻璃芯片杂交构架, 上下两层分别为  $6.3 \times 6.3 \text{ cm}^2$  大小的玻璃芯片, 上层为液路芯片, 下层为气路芯片, 中间为厚度为  $250 \mu\text{m}$  的 PDMS 薄膜。玻璃芯片采用标准光刻和化学湿法刻蚀法, 微流控芯片的通道设计用 Macromedia Freehand 软件绘制, 包含通道设计的图片以负片形式输出

到塑料薄膜上作为掩膜。掩膜放置在涂有正光刻胶的玻璃基片（长沙韶光铬板有限公司），曝光固化后用刻蚀液为HF/HNO<sub>3</sub>（210/95，体积比）进行湿法刻蚀，刻蚀速率约为1 μm/min。芯片刻蚀后在超声波打孔仪（CK-250L，广东汕头市金士达上海分公司）上打直径2.5cm的孔供盛装样品和试剂之用，之后将芯片置入浓硫酸/双氧水（3：1）溶液中酸煮沸40min，然后用纯净水超声清洗干净；上层为液体流路层，通道宽80 μm，深20 μm；下层为气路层，通道宽200 μm，深80 μm。

### 3.2.2.2 芯片的封接

先将上下两层玻璃芯片用（10:1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）洗净后用二次蒸馏水清洗烘干，中间层为PDMS薄膜，厚度为254 μm。在超净台或者超净间中把PDMS可逆封接于两层玻璃芯片中间，气路芯片画有网格，有利于排出芯片中局部位置的气泡，可逆封接确认无气泡后用夹子加紧；将其放入80℃烘箱中10分钟。取出后自然冷却至室温，在气路口施加正负压，确认每个阀开关状态良好。

### 3.2.3 微阀/微泵控制的芯片负压进样方法过程

首先进行样品准备，微流控芯片在使用前用二次蒸馏水冲洗干净，将待分析的荧光素钠和FITC标记的氨基酸样品加于样品池中，缓冲溶液为（20mM 硼酸盐缓冲溶液（pH=9.2）+0.1%SDS）。

芯片负压进样方法过程如下：

- 1) 阀1打开，其余阀门关闭，保持500毫秒
- 2) 阀1、2开启，阀3、4关闭，保持500毫秒，此时样品区带在负压作用下被夹流形成狭窄区带（图3-3A）

3) 在缓冲液池和缓冲液废液池施加电压进行电泳分离, 待分离完毕后不再施加电压

4) 阀2继续保持开启, 其它阀门关闭, 保持100毫秒

5) 阀2, 3开启, 阀门1, 4关闭, 保持1000毫秒

6) 阀3开启, 其余阀门关闭, 保持500毫秒

7) 阀3, 4开启, 阀1, 2关闭, 保持300毫秒

8) 阀4开启, 其余阀门关闭, 保持300毫秒

9) 阀门全部关闭, 保持300毫秒

4个阀的状态, “1”表示微阀打开。“0”表示微阀关闭。

表3-1 芯片负压进样操作步骤

	阀1	阀2	阀3	阀4	施加电压	时间 (ms)
Step1	1	0	0	0	/	500
Step2	1	1	0	0	/	500
Step3	加电分离				1800V	19000
Step4	0	1	0	0	/	100
Step5	0	1	1	0	/	1000
Step6	0	0	1	0	/	500
Step7	0	0	1	1	/	300
Step8	0	0	0	1	/	300
Step9	0	0	0	0	/	300

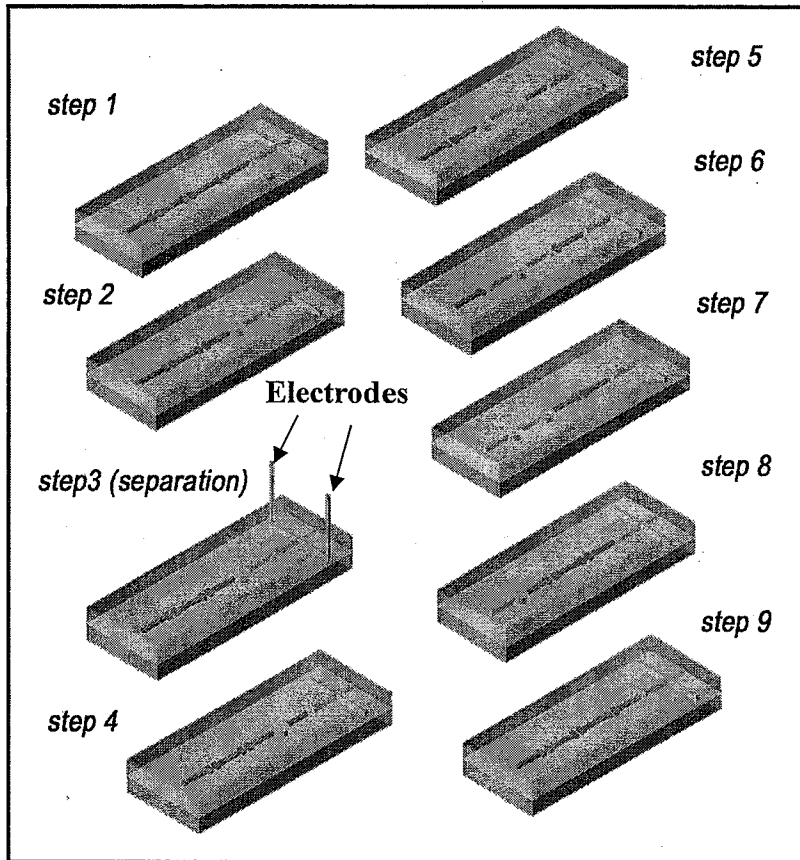


图3—1 微泵阀负压驱动夹流进样过程示意图 (9步)

Fig.3-1 Schematic diagram of the valve's actuation used to generate negative pressure in sequence (9 steps). "0" means valve closed and "1" means valve opened. "1000", "1100", "1100", "0100", "0110", "0010", "0011", "0001" and "0000" mean different valves' states in one injection cycle. Cambridge blue: liquid in the channels, red part: no liquid in channels; pink part: two platinum electrodes (one for high voltage, one for ground) used for separation.

### 3.3 结果与讨论

#### 3.3.1 芯片设计

芯片采用玻璃和PDMS杂交结构，上下两层分别为玻璃芯片，中间为厚度为250 $\mu\text{m}$ 的PDMS薄膜，上层为液路芯片，下层为气路芯片。玻璃芯片清洗干净后将PDMS薄膜可逆封接于两层玻璃芯片当中。

芯片如图3-2所示，芯片的分离通道为36mm，进样通道32mm，并于该芯片进样通道端集成了4个微阀V1, V2, V3, V4(图3-2E)，四个微阀可以组成两组微泵，用于产生负向的压力，泵1包含V1、V2、V3；泵2包含V2、V3、V4；其中V2, V3为两组微泵所共有。

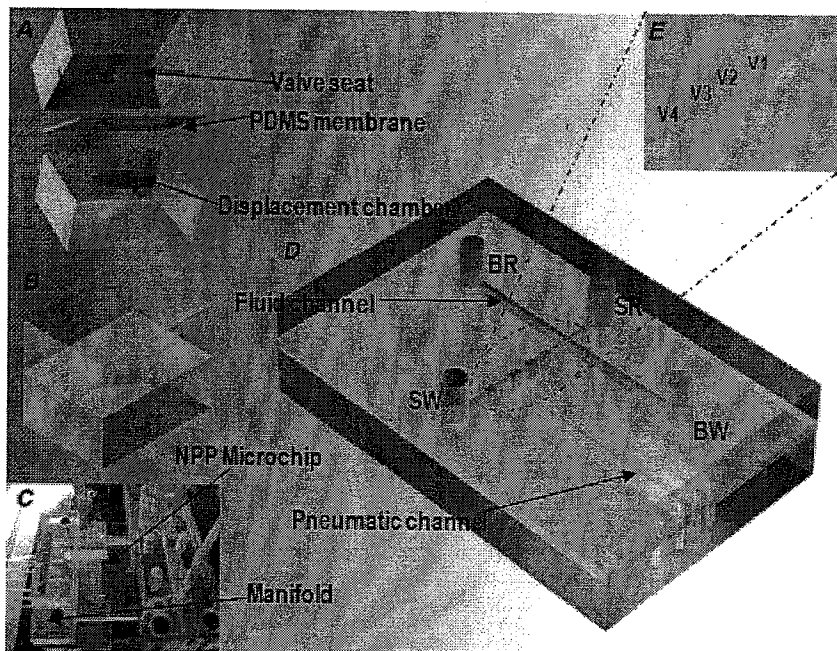


图 3-2 集成微泵阀负压进样微流控芯片图 (A, B) 芯片装配图 (C) 芯片实物图 (D) 芯片三维构架图 (E) 微阀部分放大示意图 (泵 1: V1、

V2、V3; 泵 2: V2、V3、V4。

Fig. 3-2 Schematic diagram of microchip integrated with diaphragm micropump for NPP injection. (A, B) Exploded and assembled illustrations of a single monolithic valve. (C) Picture of NPP microchip with its manifold on the top of the instrument. (D) Layout of the NPP microchip. The distance from cross-T intersection to reservoirs: SR 0.8cm; SW, 2.4cm; BR, 1.8cm; BW, 1.8cm. (E) Partial enlarged image of four microvalves and two pumps. Pump1: V1, V2, V3. Pump2: V2, V3, V4.

### 3.3.2 微阀设计

在实验初, 我们设计了三个微阀形成一个泵来实现负压力进样的微流控芯片, 但是由于离十字交叉口处最近的阀在实验中有“push back (回压)”效应, 即阀在关闭时, 阀室内的液体会被压回到十字交叉口, 因此我们做了一些实验的设计的改进。首先我们减小了阀1 (V1) 的体积来减小回流的液体量, 理论上说阀1应该越小越好, 但同时为了保证阀1的功能, 它又不能无限的小。因此我们又考虑如果能在阀1关闭的同时, 尽可能的吸出其阀室内的液体至样品废液池, 将会大大的减小回压效应。因此我们又在此基础上设计了两组微泵的结构, 泵1用来抽液体产生负压, 泵2用来抽取阀1关闭的时阀室内的液体。4个阀的体积大小为 $V_3 > V_2 > V_4 > V_1$ , 四个微阀具体参数如表3-2所示。通过上述设计, 有效的减小了回压效应, 同时也体现了微流控芯片各功能单元灵活组成、设计方便的特点。

表3-2 微阀 (V1、V2、V3、V4) 尺寸参数表

参数 \ 阀	阀座边长 (正方形)	阀座间距	阀隔膜腔室 (椭圆型)	
			长轴直径	短轴直径
V1	100 $\mu\text{m}$	300 $\mu\text{m}$	600 $\mu\text{m}$	400 $\mu\text{m}$
V2	400 $\mu\text{m}$	400 $\mu\text{m}$	1700 $\mu\text{m}$	900 $\mu\text{m}$
V3	400 $\mu\text{m}$	400 $\mu\text{m}$	2000 $\mu\text{m}$	900 $\mu\text{m}$
V4	300 $\mu\text{m}$	300 $\mu\text{m}$	1200 $\mu\text{m}$	700 $\mu\text{m}$

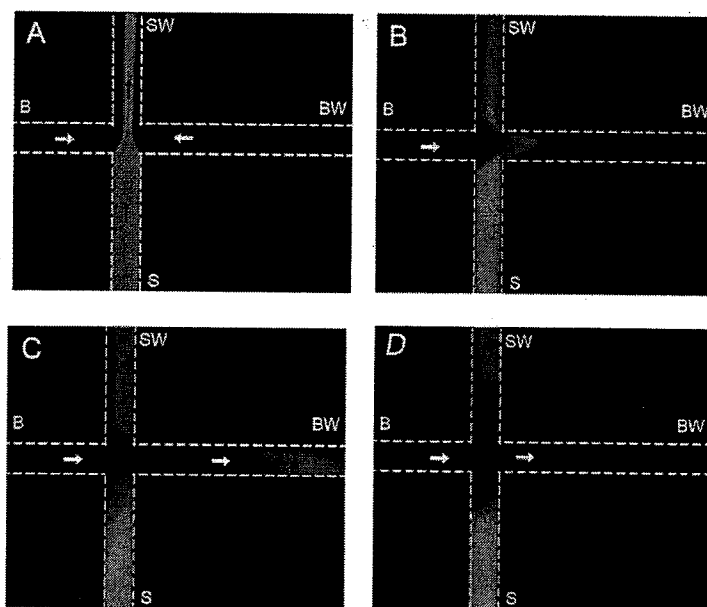


图3-3 负压夹流进样荧光谱图 (A) 上样过程中, 样品在十字交叉处形成夹流区带 (B-D) 电泳力推动样品迁移实时谱图

Fig. 3-3 Fluorescence images depicting negative pressure pinched sample injection (A) At loading step, the pinched plug was

formed by integrated micropumps. (B) At dispensing step, electrokinetic force made sample migrate. (C,D) Fluorescence images of electrokinetic dispensing at 1s and 2s, respectively. Sodium fluorescein:  $5 \times 10^{-5}$ M. Separation buffer: 20 mM sodium borate buffer (pH 9.2) with 0.1%SDS, separation electric field= 560V/cm.

### 3.3.3 条件优化

因为是首次运用微泵阀来实现进样,需要对实验条件进行优化,主要包括微阀开启时间的影响、电压对进样过程的影响以及液面高度对分离的影响。

#### 3.3.3.1 阀开启时间对进样的影响

常规的外接泵的压力是一直保持恒定的,而集成于芯片中的微泵的压力是通过PDMS的形变产生,因此不是恒定不变的,会随着时间的延长而逐渐变小。当阀2开启时(第二步,微阀参数为“1100”),样品会在通道的十字交叉点产生夹流区带,该区带受到微泵产生的负压力和分子本身扩散力的作用,当负压力大于分子扩散力作用时,区带变的狭长,但随着时间的延长,负压力会逐渐减小,分子扩散力开始逐渐占据主导地位,导致区带展宽,影响分离分析的结果。

因此我们对产生夹流区带时的微阀的开启时间对进样的影响进行了考察。图3-4是微阀不同开启时间的电泳谱图。由表3-1可知,当微阀2开启时,样品受到吸力的作用,在十字通道处形成夹流区带。在微阀2开启时间分别100ms, 500ms, 800ms, 1000ms, 1500ms, 2000ms时,对荧光素钠样品连续进样5次。结果表明,其相对应的RSD分别为2.5%, 1.5%, 2.3%, 4.7%和10.7% ( $n=5$ )。500ms的时候效果较好,同时从谱图上可以看出随着时间的延长,尤其是在800ms以后,电泳峰是显著降低的,因此我们选择500ms作为优化后的实

验条件。

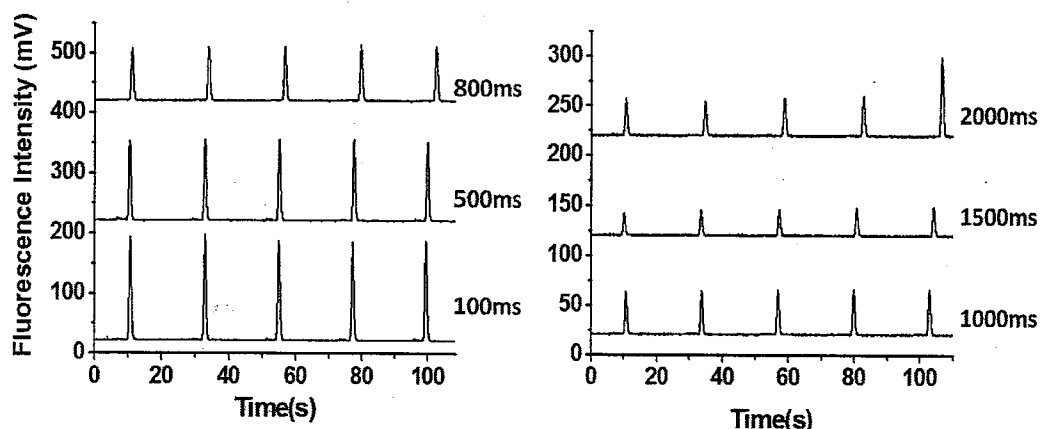


图3-4 微阀2开启时间对进样影响的电泳谱图,时间分别为100ms、500ms、800ms、1000ms、1500ms、2000ms。

Fig.3-4 The electropherograms of serial separation of sodium fluorescein ( $1 \times 10^{-6}$  M) when the valves 1 and 2 open forming pinched plugs with different times. Running buffer: 20mM sodium borate buffer (pH 9.2) with 0.1% SDS, separation electric field=560 V/cm.

### 3.3.3.2 电压对进样过程的影响

分离电压的大小直接决定了样品在分离通道内的电渗流速度,因此必然影响到样品的电泳行为,图3-5显示了在1000V~1800V的进样电压范围内所得电泳谱峰的变化。在电压大于1400V时,峰面积的RSD都不超过2.5%(n=5),明显优于1200V和1000V电压时的3.9%和3.6%(n=5)。考虑到较高的电压可以增加电渗流,减少分析时间,以后的实验选取1800V为实验条件。

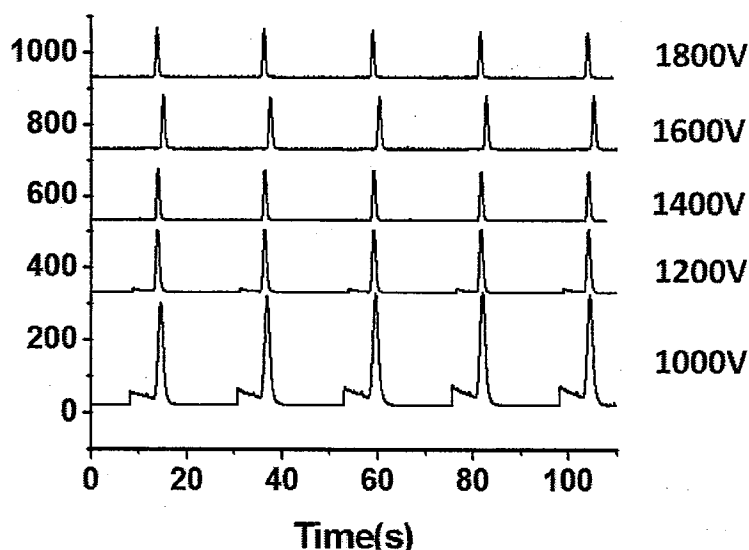


图3-5 不同电压(1000v, 1200v, 1400v, 1600v, 1800v)条件下荧光素钠电泳谱图

Fig. 3-5 electropherograms for series of sodium fluorescein with different separation voltages (1000v, 1200v, 1400v, 1600v, 1800v)

### 3.3.3.3 液面高度对分离的影响

在电动进样方式中, 样品的泄漏都是通过施加抑制电压实现的。在本工作中, 如果不施加任何措施, 样品通常会由样品通道进入到分离通道中, 这一现象方[23]、罗都有报导[7]。因此我们采用静压力的方法来抑止样品的泄漏, 主要是提高缓冲液池和缓冲液废液池中的样品液面高度。液体在样品池(S)、缓冲液池(B)和缓冲液废液池中(BW)的高度分别用 $H_{\text{样品池}}$ 、 $H_{\text{缓冲池}}$ 、 $H_{\text{缓冲液废液池}}$ 表示, 理论上抑制泄漏至少要满足下列关系 $H_{\text{缓冲池}} = H_{\text{缓冲液废液池}} > H_{\text{样品池}}$ 即可, 经过优化选取 $H_{\text{缓冲池}} = H_{\text{缓冲液废液池}} = 1.5 \text{ cm}$ ,  $H_{\text{样品池}} = 0.5 \text{ cm}$ , 无需施加抑制电压也不会

产生样品泄漏。

### 3.3.4 集成微泵阀负压进样方法性能考察

我们通过集成的微泵阀来产生负向压力，实现样品的夹流进样。为了考察该方法的重现性和可靠性，我们对荧光素钠样品 ( $1 \times 10^{-6} \text{M/L}$ ) 连续进样分离25次 (图3-6(A))，其荧光素钠的峰迁移时间和峰高的RSD分别为0.5%和2.1% ( $n=25$ )。从中依次抽取峰1, 6, 11, 16, 21五组谱峰，其峰高、峰面积、迁移时间无明显差异，其谱图几乎完全重合，如图3-6(B)所示。可得出如下结论：(1) 连续多次进样，峰重叠完好，证明其不存在样品歧视效应(2) 利用集成的微泵阀实现负压进样方法的重复性和稳定性良好。

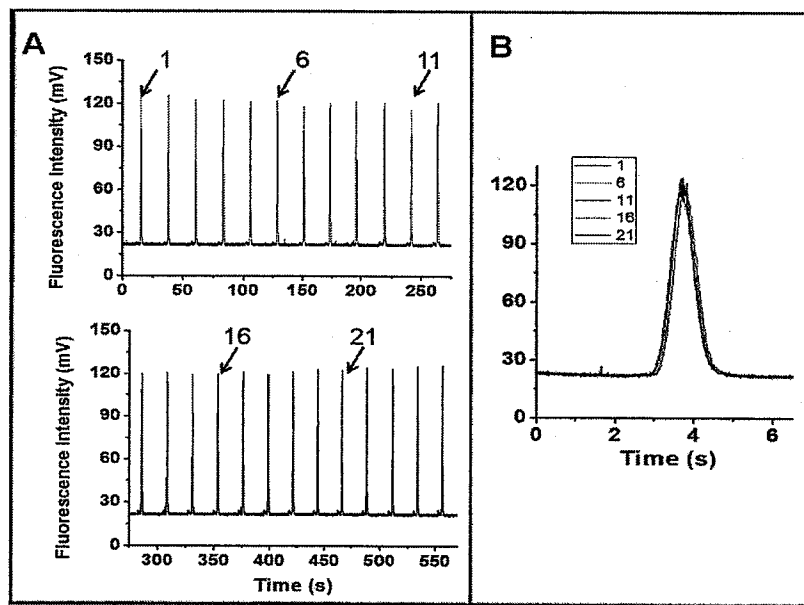


图3-6 (A) 连续进样25次荧光素钠 ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) 的电泳谱图，峰迁移时间的RSD为0.5% ( $n=25$ )。(B) 微泵阀驱动负压进样方法中峰1, 6, 11, 16, 21的重叠谱图。

Fig. 3—6 (A) Reproducibility for sequential 25 injections and separations of  $1 \times 10^{-6}$  M sodium fluorescein, RSD (peak migration time) is 0.5% ( $n=25$ ). Separation buffer: 20 mM sodium borate buffer (pH 9.2) with 0.1% SDS, separation electric field= 560V/cm. (B) Overlay of run 1, 6, 11, 16, 21 for NPP injection (marked by arrows in frame A).

### 3.3.5 集成微泵阀负压进样用于氨基酸样品分离

#### 3.3.5.1 FITC 标记氨基酸样品

氨基酸样品精氨酸、甘氨酸和丝氨酸采用荧光素异硫氰酸酯 (FITC) 进行衍生标记。FITC 用二甲亚砜溶液溶解后配制为  $2 \times 10^{-2}$  M 和  $2 \times 10^{-3}$  M (临用前新鲜配置)。

将  $10 \mu\text{L}$   $1 \times 10^{-2}$  M 精氨酸和色氨酸样品分别用  $10 \mu\text{L}$   $2 \times 10^{-2}$  M FITC 标记, 溶于  $80 \mu\text{L}$  100mM 的碳酸氢钠溶液 (PH=9.2)。氨基酸和 FITC 摩尔比为 1: 10, FITC 过量。

将  $5 \mu\text{L}$   $1 \times 10^{-2}$  M 色氨酸与  $5 \mu\text{L}$   $1 \times 10^{-2}$  M 甘氨酸分别用  $5 \mu\text{L}$   $2 \times 10^{-3}$  M FITC 标记。再将标记溶液混合后溶于  $80 \mu\text{L}$  100mM 的碳酸氢钠溶液 (PH=9.2)。氨基酸和 FITC 摩尔比为 10: 1, 氨基酸过量。将上述溶液室温避光反应 2 小时。放置 4 度冰箱内备用。

实验时取上述溶液  $10 \mu\text{L}$  溶于  $90 \mu\text{L}$  二次水中。

#### 3.3.5.2 氨基酸样品分离

分别对 FITC 过量 and 氨基酸过量的两种样品用集成微泵阀的负压进样的方法进行了分析, 图 3—7 为氨基酸样品和 FITC 摩尔比率比为 1: 10, 因为 FITC 过量, 因此 FITC 峰高于氨基酸样品的峰。

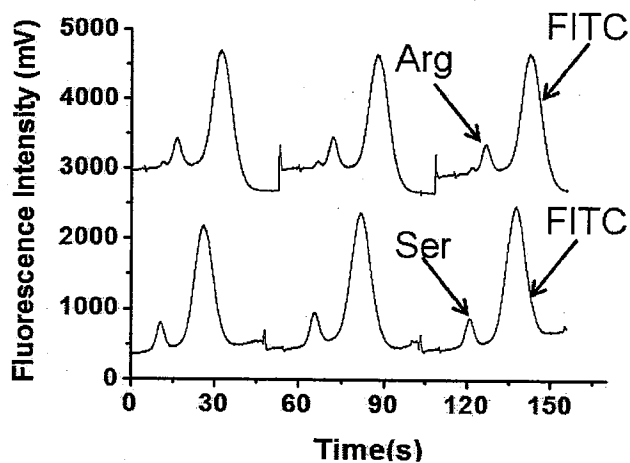


图3-7 集成微泵阀负压进样方法用于氨基酸样品分离

Fig. 3-7 The negative pressure pinched injection for separation of amino acids on microchip. Electropherograms of  $1 \times 10^{-4}$ M Arginine labeled with  $2 \times 10^{-4}$ M FITC and  $1 \times 10^{-4}$ M Serine at labeled with  $2 \times 10^{-4}$ M FITC, respectively.

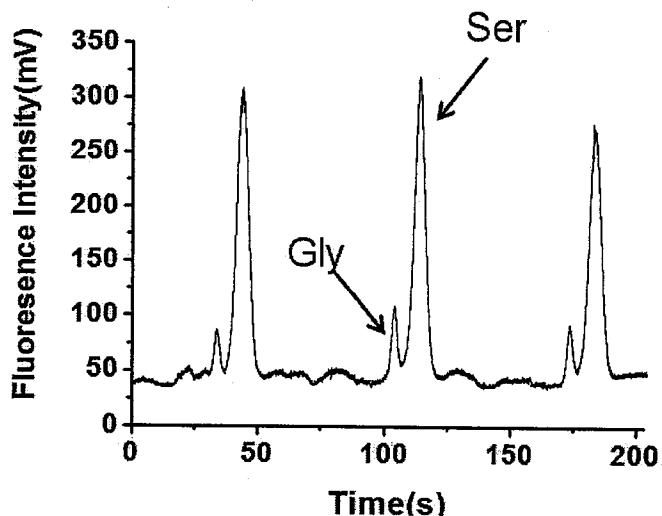


图3-8 FITC标记的甘氨酸和丝氨酸分离电泳谱图

Fig 3-8. Electropherograms of the mixture of  $5 \times 10^{-5}$  M Serine-FITC and  $5 \times 10^{-5}$  M Glycine-FITC. Separation buffer: 20 mM sodium borate buffer (pH 9.2) with 0.1% SDS, separation electric field = 560 V/cm.

图3-8为氨基酸样品和FITC摩尔比率为1:10, 因为氨基酸完全过量, 因此电泳谱图无FITC电泳峰。运用该方法, 甘氨酸和丝氨酸得到了有效分离。

在集成微泵阀负压力进样用于氨基酸电泳分离的实验中我们观察到了基线不稳的现象, 造成这一现象的主要原因是因为芯片中间层的PDMS薄膜未经任何表面改性和修饰, 因此PDMS会对氨基酸产生非特异性吸附, 对信号造成干扰。但本工作的重点是建立一种新的进样方法, 因此未将PDMS的修饰工作作为重点考察对象。同时微流控电泳芯片上PDMS的表面修饰的方法已较为成熟和完善, 包括动态改性[24, 25]、静态改性[26-29]等, 如果将上述PDMS进行修饰后, 相信氨基酸样品能获得更好的分离效果。

### 3.4 小结

发展了芯片集成微泵阀负压力夹流进样的方法, 证明该方法能有效的消除传统方法电动进样所存在的电歧视效应。利用这种方法连续进样25次, 峰迁移时间和峰高的RSD分别为0.5%和2.1%, 显示了良好的重现性。该方法操作简便, 只需一个高压电源即可完成所需分离分析过程; 集成的微泵阀易于和更多的其它操作单元组合, 为完成更复杂分离分析研究提供了有力的技术支持。

## 3.5 参考文献

- [1] Manz, A., Graber, N., Widmer, H. M., Miniaturized Total Chemical-Analysis Systems - a Novel Concept for Chemical Sensing. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 1990, 1(1-6): 244-248.
- [2] Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A., Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(12): 3887-3907.
- [3] West, J., Becker, M., Tombrink, S., Manz, A., Micro total analysis systems: Latest achievements. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(12): 4403-4419.
- [4] 林炳承, 秦建华, 微流控芯片实验室. 北京: 科学出版社, 2006.
- [5] 林炳承, 秦建华, 图解微流控芯片实验室. 北京: 科学出版社, 2008.
- [6] Gai, H. W., Yu, L. F., Dai, Z. P., Ma, Y. F., Lin, B. C., Injection by hydrostatic pressure in conjunction with electrokinetic force on a microfluidic chip. *Electrophoresis*, 2004, 25(12): 1888-1894.
- [7] Luo, Y., Wu, D. P., Zeng, S. J., Gai, H. W., Long, Z. C., Shen, Z., Dai, Z. P., Qin, J. H., Lin, B. C., Double-cross hydrostatic pressure sample injection for chip CE: Variable sample plug volume and minimum number of electrodes. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(17): 6074-6080.
- [8] Harrison, D. J., Manz, A., Fan, Z. H., Ludi, H., Widmer, H. M.,

- CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND SAMPLE INJECTION SYSTEMS INTEGRATED ON A PLANAR GLASS CHIP. *Analytical Chemistry*, 1992, 64(17): 1926-1932.
- [9] Effenhauser, C. S., Manz, A., Widmer, H. M., GLASS CHIPS FOR HIGH-SPEED CAPILLARY ELECTROPHORESIS SEPARATIONS WITH SUBMICROMETER PLATE HEIGHTS. *Analytical Chemistry*, 1993, 65(19): 2637-2642.
- [10] Jacobson, S. C., Hergenroder, R., Koutny, L. B., Warmack, R. J., Ramsey, J. M., EFFECTS OF INJECTION SCHEMES AND COLUMN GEOMETRY ON THE PERFORMANCE OF MICROCHIP ELECTROPHORESIS DEVICES. *Analytical Chemistry*, 1994, 66(7): 1107-1113.
- [11] Fu, L. M., Yang, R. J., Lee, G. B., Pan, Y. J., Multiple injection techniques for microfluidic sample handling. *Electrophoresis*, 2003, 24(17): 3026-3032.
- [12] Fu, L. M., Yang, R. J., Lee, G. B., Liu, H. H., Electrokinetic injection techniques in microfluidic chips. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(19): 5084-5091.
- [13] Ermakov, S. V., Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., Computer simulations of electrokinetic injection techniques in microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(15): 3512-3517.
- [14] Thomas, C. D., Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., Strategy for repetitive pinched injections on a microfluidic device. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(20): 6053-6057.

- [15] Jacobson, S. C., Hergenroder, R., Moore, A. W., Ramsey, J. M., PRECOLUMN REACTIONS WITH ELECTROPHORETIC ANALYSIS INTEGRATED ON A MICROCHIP. *Analytical Chemistry*, 1994, 66(23): 4127-4132.
- [16] Fu, L. M., Yang, R. J., Lee, G. B., Electrokinetic focusing injection methods on microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(8): 1905-1910.
- [17] Alarie, J. P., Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., Electrophoretic injection bias in a microchip valving scheme. *Electrophoresis*, 2001, 22(2): 312-317.
- [18] Karlinsey, J. M., Monahan, J., Marchiarullo, D. J., Ferrance, J. P., Landers, J. P., Pressure injection on a valved microdevice for electrophoretic analysis of submicroliter samples. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(11): 3637-3643.
- [19] Bai, X. X., Lee, H. J., Rossier, J. S., Reymond, F., Schafer, H., Wossner, M., Girault, H. H., Pressure pinched injection of nanolitre volumes in planar micro-analytical devices. *Lab on a Chip*, 2002, 2(1): 45-49.
- [20] Crabtree, H. J., Cheong, E. C. S., Tilroe, D. A., Backhouse, C. J., Microchip injection and separation anomalies due to pressure effects. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(17): 4079-4086.
- [21] Yao, B., Luo, G. A., Feng, X., Wang, W., Chen, L. X., Wang, Y. M., A microfluidic device based on gravity and electric force

- driving for flow cytometry and fluorescence activated cell sorting. *Lab on a Chip*, 2004, 4(6): 603-607.
- [22] Moehlenbrock, M. J., Martin, R. S., Development of an on-chip injector for microchip-based flow analyses using laminar flow. *Lab on a Chip*, 2007, 7: 1589-1596.
- [23] Zhang, L., Yin, X. F., Fang, Z. L., Negative pressure pinched sample injection for microchip-based electrophoresis. *Lab on a Chip*, 2006, 6(2): 258-264.
- [24] Roman, G. T., McDaniel, K., Culbertson, C. T., High efficiency micellar electrokinetic chromatography of hydrophobic analytes on poly(dimethylsiloxane) microchips. *Analyst*, 2006, 131(2): 194-201.
- [25] Wang, A. J., Xu, J. J., Chen, H. Y., Nonionic surfactant dynamic coating of poly(dimethylsiloxane) channel surface for microchip electrophoresis of amino acids. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 569(1-2): 188-194.
- [26] Wang, B., Chen, L., Abdulali-Kanji, Z., Horton, J. H., Oleschuk, R. D., Aging effects on oxidized and amine-modified poly(dimethylsiloxane) surfaces studied with chemical forced titrations: Effects on electroosmotic flow rate in microfluidic channels. *Langmuir*, 2003, 19(23): 9792-9798.
- [27] Hu, S. W., Ren, X. Q., Bachman, M., Sims, C. E., Li, G. P., Allbritton, N., Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices by ultraviolet polymer grafting.

Analytical Chemistry, 2002, 74(16): 4117-4123.

- [28] Hu, S. W., Ren, X. Q., Bachman, M., Sims, C. E., Li, G. P., Allbritton, N. L., Surface-directed, graft polymerization within microfluidic channels. Analytical Chemistry, 2004, 76(7): 1865-1870.
- [29] Wu, D. P., Zhao, B. X., Dai, Z. P., Qin, J. H., Lin, B. C., Grafting epoxy-modified hydrophilic polymers onto poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip to resist nonspecific protein adsorption. Lab on a Chip, 2006, 6(7): 942-947.

## 第四章 集成微泵阀负压驱动技术在平行阵列芯片电泳中的应用

### 4.1 引言

微流控芯片是21世纪最为重要的前沿技术之一，它的基本特征和最大优势是多种单元技术在微小平台上的灵活组合和规模集成[1]。而微流控芯片阵列毛细管电泳 (microfluidic chip capillary array electrophoresis 简称MCAE) 作为微流控芯片中一种快速的高通量检测方法, 可以极少量的样品获得极大的信息量, 同时它还具有快速、低消耗、易于自动化等优点, 改变传统DNA分析方法费时费力、自动性差等缺陷, 并能满足后基因组时代多种不同生化分析仪器的要求, 因此对DNA测序、免疫分析、药物筛选、疾病诊断等领域研究都具有重要意义[2, 3]。

目前, 国内外这一领域的工作已经如火如荼的展开[3-11]。Mathies研究小组在微流控芯片阵列电泳领域做了一系列高通量DNA基因测序及分型的工作, 其阵列通道数目从12[4], 48[5, 12], 96[7, 13], 一直到384通道[3]; 尤其是其利用384通道的阵列毛细管电泳芯片, 在325秒内对384个DNA样品进行了基因分型和测序, 充分展示了该技术在DNA测序领域的高通量分析的应用前景。Ehrlich等人在此基础上发展了一种768根阵列芯片电泳检测技术, 对172000个DNA碱基对进行了分析, 准确率达到了99%[6]。

除此之外, Harrison将多通道亲和芯片电泳技术应用于免疫分析领域[14]。Ewing研究组在多通道阵列芯片电泳平台上分析了DNA[8]、氨基酸[9]、酶化物[15]等多种生物样品。我们课题组也在此领域有所建树。沈铮搭建了阵列微流控芯片系统并分析了多种生物对象[10], 高雁在此平台进行了手性化合物多通道手性拆分研究[11]。

上述工作大多采用电动进样分析的方式，为了减少电极的数量“十字通道结构”也被简化为“单T”结构通道[3, 4]。但是随着通道数目的增加，其对高压电源数量的依赖也随之增加，这大大增加了仪器的复杂性以及仪器的建造成本。同时芯片上大多数目的电极会给实验操作人员带来很大的安全隐患，因此仅仅从改变通道构架上无法根本改变其对昂贵高压电源的依赖。

而压力进样可以有效避免样品歧视，缩短进样时间，并且可以极大程度上减少其对高压电源的需求[16, 17]。因此人们开始利用压力进样来实现微流控芯片阵列电泳（MCAE）高通量分析。Akira [18]和高[11]等利用静压力实现了多通道样品分析。但是静压力不稳定，随着时间的变化不同样品池液面高度差力差会发生改变。Zhang等人利用外接泵，在芯片上实现了对罗丹明123和荧光素钠的多通道分离检测[19]。

我们在第三章的工作基础上，提出了集成微泵阀的负压夹流进样方法应用于阵列芯片电泳分析检测[20]。它主要具有以下优点：

1. 采用负压力进样的方法，仅需一个高压电源用于样品电泳分离，大大降低了对高压电源的需求，简化了仪器装置和降低仪器制造成本。
2. 消除了样品歧视效应，上样（loading）时间缩短至1秒，降低了高通量样品分析的上样时间。同时采用夹流进样的方法有利于提高分离效率[21, 22]。
3. 芯片集成微泵阀提供了芯片中的通用接口，便于与它功能单元进行集成，来满足更复杂样品分析的需要。

## 4.2 实验部分

### 4.2.1 材料与试剂

十二烷基磺酸钠(SDS), 氨基酸: YOYO-1购自探针公司(Eugene OR, USA)。三羟甲基氨基甲烷(Tris), EDTA, 硼酸(Boric acid)、NaOH均于沈阳化学试剂厂购得。荧光素钠购自天津染料研究所。DNA marker (100-bp ladder, 100bp-600bp) 购自北京天为时代公司; Ex-Taq DNA聚合酶及其他PCR试剂均购自大连宝生物公司; 核酸扩增荧光定量检测试剂盒购自深圳匹基生物(PG BioTech); 羟丙基甲基纤维素 HPMC-50, HPMC-4000购自sigama公司; 除特殊说明外, 本章中提及的化学试剂均为分析纯, 水溶液均用二次水配制。

DNA 筛分介质: 0.5% HPMC-4000 (hydroxypropylmethylcellulose) + TBE buffer (100mM Tris, 100mM boric acid, 2mM EDTA) + 0.1% PVP + 6% 甘露醇。

乙肝病毒 DNA 样品来自大连医科大学附属第二医院, 血清样品采用核酸扩增荧光定量检测试剂盒提取其中的 DNA。

引物 S1 序列为正义链: 5' -GACTCGTGGTGGACTTCTCTCA-3', 反义链: 5' -GAGGACAAACGGGCAACATACC-3', 目标产物片段为 229bp。

PCR 反应液包括: 10×Buffer 5μL, 2.5μM dNTP 4μL, primer 2 μL, DNA 模板 1.5 μL, Ex-Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 二次蒸馏水 H<sub>2</sub>O 37 μL。

扩增条件:

1. 94 °C for 5min
2. 94 °C for 30 s, 56 °C for 45 s, and 72 °C for 30s, 扩增 30 个循环
3. 72 °C for 10min

PCR 扩增仪型号为 GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA)。

#### 4.2.2 仪器

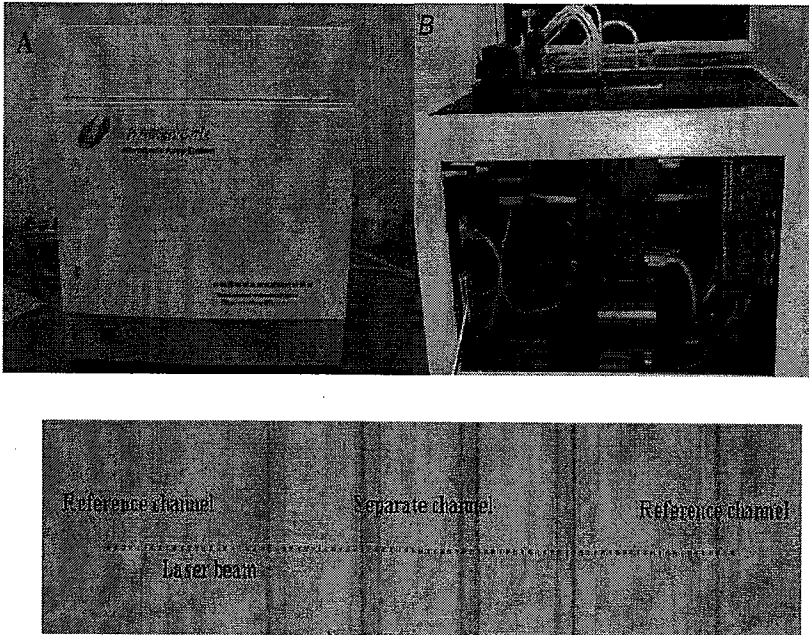


图4-1 多通道微流控芯片阵列检测装置 (A) 仪器外观图 (B) 多通道阵列检测光学系统实物图 (C) 多通道荧光信号采集示意图

Fig. 4-1 Schematic of multi-channel fluorescence detection (A) Photograph of analyzer (B) Photograph of optical system (C) Schematic of multi-channel fluorescence signal detection.

本章研究工作采用自行搭建的阵列微流控芯片分析仪，仪器装置图见图4-1。此仪器激光发射波长为473nm 的 激光器，功率10mw，激光束经发射光滤光片(473±10nm) 滤去杂光后被柱面镜拉成一窄线，再由30 度角方向成像透镜聚焦在芯片阵列微通道上，从而激发阵列微通道中的荧光物质产生荧光，发出的荧光经同另一垂直成像透镜所收集，经过激发光滤光片 (520±20nm)

滤去背景杂散光，最后由12 bit CCD 摄像头（重庆港宇高科技开发公司）以25 帧/秒的频率检测。仪器的对焦部分通过开启芯片上部的白色照明灯，芯片阵列微通道影像经聚焦物镜收集，进入CCD 靶面成像，实现芯片对焦和图像监测功能。检测原理图如图4-2所示。

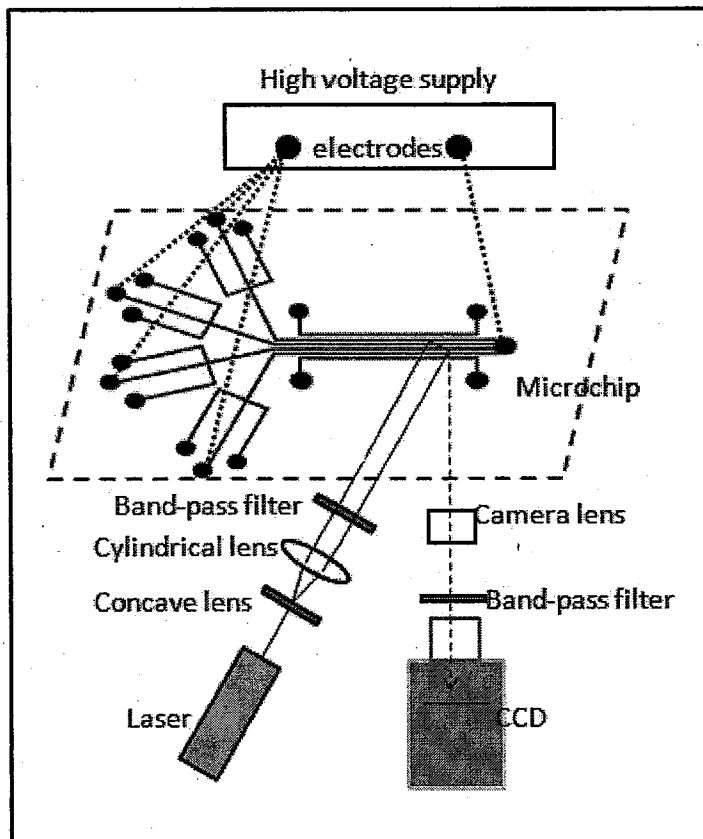


图4-2 阵列微流控芯片平台负压进样示意图

Fig.4-2 (A) Schematic scheme of the instrumentation setup. LIF detection was achieved by focusing the laser beam into a line across the array of microfluidic channels at a  $30^\circ$  C incidence angle relative to the vertical. The excited fluorescence was collected by a CCD camera.

仪器中片中的微阀控制部分由自行搭建的微泵阀控制系统完成,其详细介绍见第二章。高压电源可在计算机控制下提供0—4000V高压,实验数据通过AD/DA模块进行实时采集和保存。

#### 4.2.3 芯片制作

芯片为三层的玻璃—PDMS 杂交芯片。上下两层均为玻璃芯片,上层为流体液路层,下层为气路层,玻璃芯片采用标准光刻和化学湿法刻蚀法,具体过程详见第三章第二节。PDMS 薄膜厚度为 250 $\mu\text{m}$ ,可逆封接于两层玻璃芯片中间,使用前确认每个阀开启关闭状态良好。

#### 4.2.4 微阀/微泵控制的芯片负压进样方法过程

首先进行样品准备,微流控芯片在使用前用二次蒸馏水冲洗30分钟后将DNA筛分试剂灌入所有缓冲液池、样品池,缓冲废液池接真空泵,在抽力作用下DNA筛分试剂被均匀灌入通道内。待其完全充满分离通道后将DNA样品加入样品池中,DNA筛分试剂加入样品废液池。调节液面高度为 $H_{\text{缓冲}}=H_{\text{缓冲废液}}=1.5\text{ cm}$ , $H_{\text{样品}}=0.5\text{ cm}$ (见芯片性能考察)。参比通道中灌入荧光素钠溶液用于确定四通道内检测点的位置(如图4—2C)。

芯片负压进样方法过程如下:

- 1) 阀1打开,其余阀门关闭,保持500毫秒
- 2) 阀1、2开启,阀3、4关闭,保持500毫秒,此时样品区带在负压作用下被夹流形成狭窄区带。
- 3) 在缓冲液池和缓冲液废液池施加电压进行电泳分离,待分离完毕后不再施加电压,时间为300秒。
- 4) 阀2继续保持开启,其它阀门关闭,保持100毫秒

- 5) 阀2, 3开启, 阀门1, 4关闭, 保持1000毫秒
- 6) 阀3开启, 其余阀门关闭, 保持500毫秒
- 7) 阀3, 4开启, 阀1, 2关闭, 保持300毫秒
- 8) 阀4开启, 其余阀门关闭, 保持300毫秒
- 9) 阀门全部关闭, 保持300毫秒

4个阀的状态, “1”表示微阀打开。“0”表示微阀关闭。

表4-1 集成微泵阀负压多通道进样操作步骤

	阀1	阀2	阀3	阀4	施加电压	时间 (ms)
Step1	1	0	0	0	/	500
Step2	1	1	0	0	/	500
Step3	加电分离					300000
Step4	0	1	0	0	/	100
Step5	0	1	1	0	/	1000
Step6	0	0	1	0	/	500
Step7	0	0	1	1	/	300
Step8	0	0	0	1	/	300
Step9	0	0	0	0	/	300

### 4.3 结果与讨论

#### 4.3.1 芯片设计

集成微泵阀的采用玻璃和PDMS杂交构架，上下两层分别为玻璃芯片，中间为厚度为 $250\mu\text{m}$ 的PDMS薄膜，上层为液路芯片，下层为气路芯片。玻璃芯片清洗干净后将PDMS薄膜可逆封接于两层玻璃芯片当中。该芯片如图4-3所示，含有2个参比通道 (Reference channel)，4个分离通道及公用缓冲废液池。芯片上一共集成16个微阀，被相应的分为4组，每组4个微阀分别用V1, V2, V3, V4表示，用以实现集成微泵的负压进样的功能，其中V1与分离通道相联，V4与样品废液池相联。阵列检测点距离芯片十字交叉点距离为 $32\text{mm}$ 。

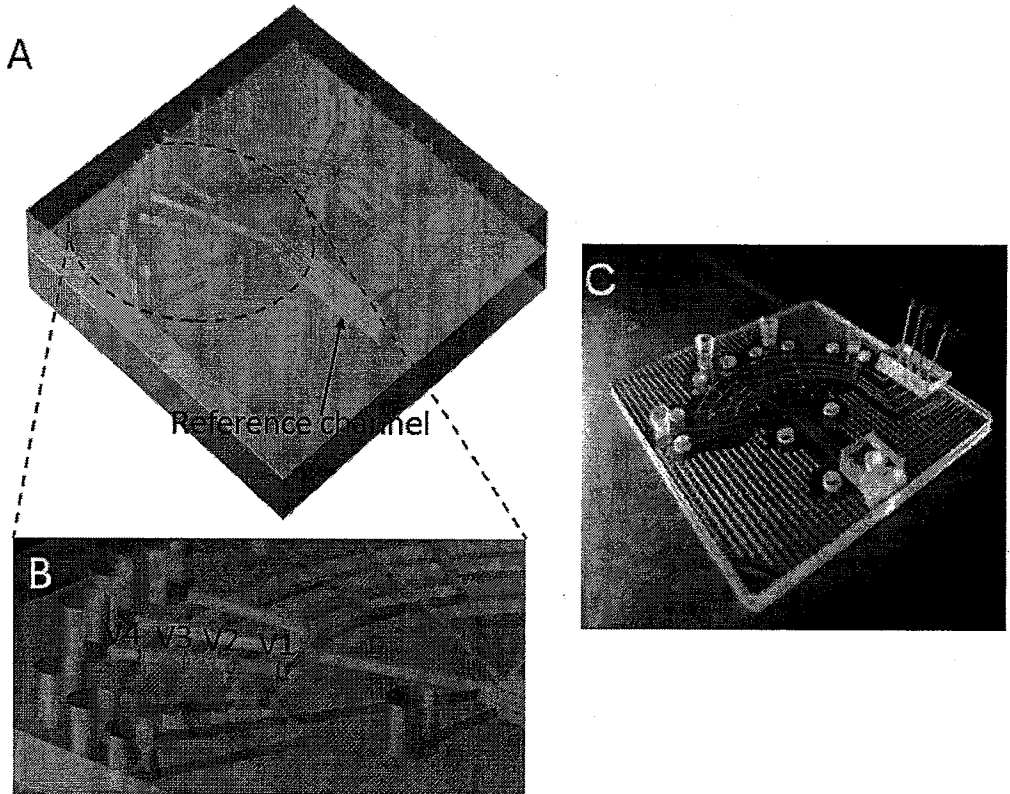


图 4-3 集成微泵阀阵列负压芯片图 (A) 4 通道阵列负压进样芯片 3D 示意图 (B) 微阀结构局部放大图, 每个单元含有 4 个微阀 (V1, V2, V3, V4) (C) 4 通道阵列负压进样芯片实物图

Fig. 4-3 (A) Schematic diagram of negative pressure injection array microfluidic chip actuated by microvalves. (B) The enlarged image of two of four parallel separation units. V1, V2, V3, V4 : the integrated microvalves in one unit. (C) Photograph of the four-channel array microfluidic chip used in our approach.

### 4.3.2 微阀结构尺寸

经过多次实验优化后, 四组微阀的尺寸如表 4-2 所示。其中将 V1 设计的很小, 是为了降低第三章所提到的“push back 效应”。

表 4-2 每组四个微阀(V1, V2, V3, V4)尺寸参数

参数 阀	阀座边长 (正方形)	阀座间距	阀隔膜腔室 (椭圆型)	
			长轴半径	短轴半径
阀1 (V1)	100 $\mu\text{m}$	300 $\mu\text{m}$	600 $\mu\text{m}$	400 $\mu\text{m}$
阀2 (V2)	400 $\mu\text{m}$	400 $\mu\text{m}$	1700 $\mu\text{m}$	900 $\mu\text{m}$
阀3 (V3)	400 $\mu\text{m}$	400 $\mu\text{m}$	2200 $\mu\text{m}$	1000 $\mu\text{m}$
阀4 (V4)	300 $\mu\text{m}$	300 $\mu\text{m}$	1500 $\mu\text{m}$	700 $\mu\text{m}$

### 4.3.3 芯片性能考察

我们设计的芯片采用了四组集成于芯片内部的微泵阀来实现各自通道的

负压进样。为了考察芯片设计的合理性，实验采用荧光素钠样品为对象，对四通道夹流进样的实时流型进行了拍摄。经过微阀大小尺寸后，得到了稳定一致的多通道夹流进样区带如图 4-4 所示，从图中可以看出，各个通道之间流型无显著性差别，为下一步的以 DNA 为对象的电泳分离分析提供了研究基础。

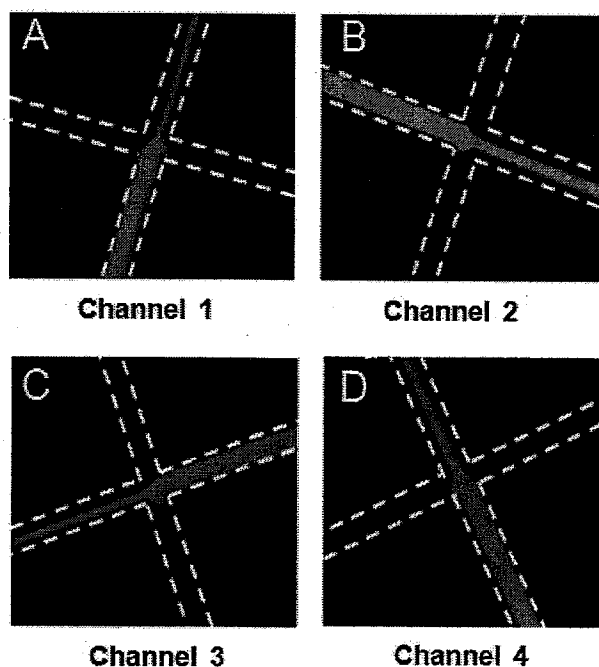


图 4-4 四通道负压夹流区带实时图像。(A-D)分别为四个通道内的荧光素钠夹流进样区带图像。

Fig.4-4 Fluorescence images depicting the negative pressure pinched sample plugs in four channels, respectively.

因为采用了压力作为进样方式，因此该方法仅需要一个高压电源，但同时为了避免进样过程中的样品泄漏效应，我们采取了静压力的方法来抑制泄

漏效应, 优化各液面高度为  $H_{\text{缓冲}}=H_{\text{缓冲废液}}=1.5\text{ cm}$ ,  $H_{\text{样品}}=0.5\text{ cm}$  后得到了理想的电泳谱图。以荧光素钠为对象, 对整个过程进行动态拍照, 来证实该方法的可靠性, 如图 4-5 所示, 实验通道选取一号通道。

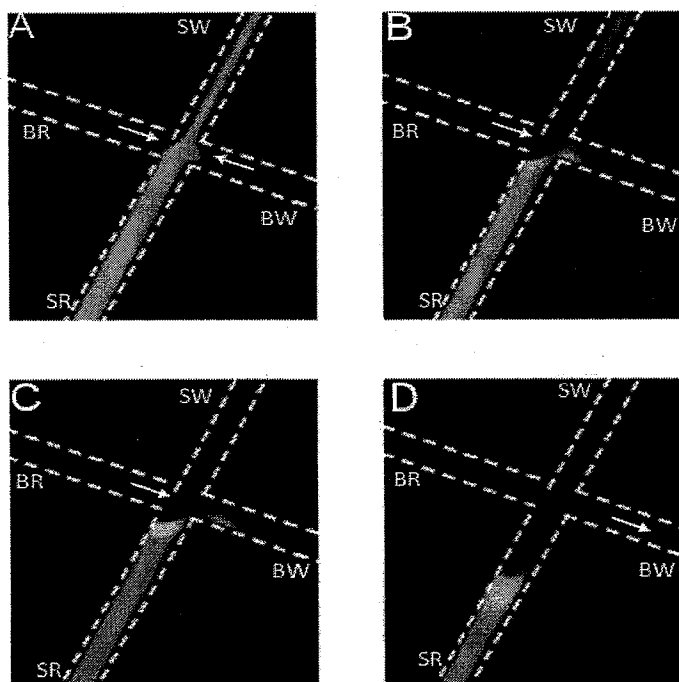


图 4-5 多通道芯片上负压进样荧光素钠实时电泳图像

Fig. 4-5 (A) The negative pressure to form pinched plug actuated by the microvalve in channel 1 on array microfluidic chip. (B) At the dispensing step, electrokinetic force made the sample migrate (C, D) Fluorescence images of fluorescein sodium's electrokinetic dispensing at 0.4s, 2.5s after sample loading, respectively. Buffer: 20mM sodium borate buffer (pH 9.2) with 0.1% SDS.

#### 4.3.4 阵列负压进样用于多通道 DNA 样品分离

在进行实际乙肝病毒样品检测前, 首先以 YOYO-1 标记的 DNA-marker 样品评估了此四通道芯片电泳平台的性能, 四组通道的电泳结果见图 4-6。不同通道间 DNA-marker 的峰迁移时间和峰高的标准偏差分别小于 1% 和 3%。结果表明此多通道芯片电泳系统具有较好的重现性, 具有在其上开展乙肝病毒样品检测的可行性。

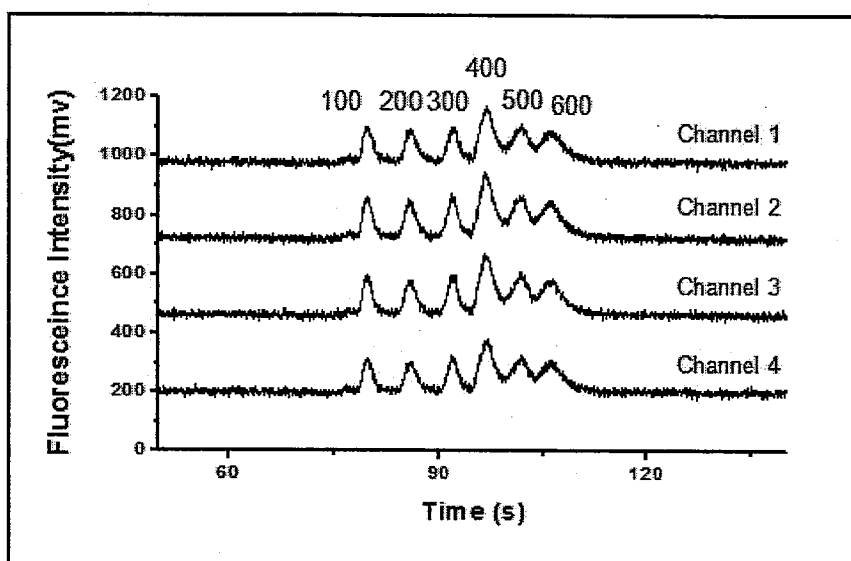


图 4-6 集成微泵阀阵列负压进样用于多通道分析 DNA 标准样品谱图

Fig. 4-6 Electropherograms of parallel separations of 100bp DNA marker used negative pressure with integrated micropumps. Separation buffer: TBE buffer (100mM Tris, 100mM boric acid, 2mM EDTA) containing 0.5% HPMC (4000 cps), 0.1%PVP, 6% mannitol and 20 $\mu$ M YOYO-1. Separation electric field: 400V/cm.

在此基础上,用该系统对乙肝病毒样品进行了分析,如图 4-7 所示。乙肝病毒 DNA 样品采自大连医科大学附属第二医院,分别为两个乙肝病毒阴性样品和一个乙肝病毒阳性样品,处理步骤详见(本章 4.2),在 GeneAmp® PCR System 2700 扩增 30 个循环后取出,将两个不同的阴性 PCR 扩增产物分别加入样品池 1 和 2,将乙肝病毒阳性 PCR 扩增产物加入样品池 3,样品池 4 为 100bp 系列 DNA marker。

筛分试剂为 0.5% HPMC-4000 (hydroxypropylmethylcellulose) + TBE buffer (100mM Tris, 100mM boric acid, 2mM EDTA) + 0.1% PVP + 6% 甘露醇 + 20 $\mu$ M YOYO-1。电场强度为 230V/cm。

运用集成微泵阀负压进样的方法对乙肝病毒 PCR 扩增样品进行多通道分离检测。如图 4-7 所示,对比 100bp 系列的 DNA 标准样品 (DNA marker),我们可以清楚的判断出通道 3 乙肝病毒 DNA 扩增产物为阳性。通道 1, 2 为阴性,其对应的小峰可能为引物峰。相比于传统的单通道 DNA 分析方法,该方法全部检测时间在 240 秒以内,可以同时多个样品进行检测,随着通道数目的增加,可以大大提高工作通量和效率,显示了该方法应用于疾病诊断的潜在应用。

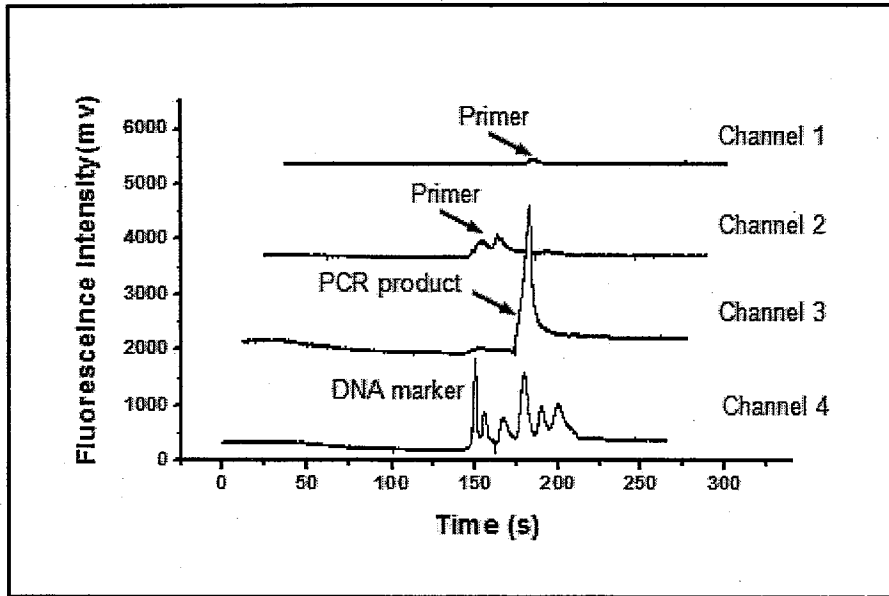


图 4-7 集成微泵阀阵列负压进样用于乙肝病毒 DNA 样品分析谱图

Fig. 4-7 Electropherograms of parallel separations of human HBV PCR samples. Channel 1 and 2: two different negative HBV sample PCR product. Channel 3: positive HBV sample PCR product (229bp). Channel 4: DNA marker (100bp-600bp). Separation buffer: TBE buffer (100mM Tris, 100mM boric acid, 2mM EDTA) containing 0.5% HPMC (4000 cps), 0.1% PVP, 6% mannitol and 20 $\mu$ M YOYO-1. Separation electric field: 230V/cm.

#### 4.4 小结

提供了一种简单便捷的集成微泵阀夹流进样方法实现阵列式多样品分离分析。该方法能消除样品歧视效应，提高了分离效率。特别是，无论所设计的通道数目有多少，它仅仅需要一个高压电源，就可完成全部分离分析的过程，因此在很大程度上降低了装置的复杂性和仪器搭建成本。本方法采用压力进样的方式，进样时间可被缩短至 1 秒。已采用本方法在芯片上实现多个

乙肝病毒 DNA 样品高通量分离检测, 初步显示了该方法在疾病诊断领域的潜在应用价值。

#### 4.5 参考文献

- [1] 林炳承, 秦建华, 微流控芯片实验室. 北京: 科学出版社, 2006.
- [2] Lin, B. C., Qin, J. H., Lab on a chip: A potential platform for point of care testing and drug screening. Proceedings of the First Shenyang International Colloquium on Microfluidics, 2007: 36-37.
- [3] Emrich, C. A., Tian, H. J., Medintz, I. L., Mathies, R. A., Microfabricated 384-lane capillary array electrophoresis bioanalyzer for ultrahigh-throughput genetic analysis. Analytical Chemistry, 2002, 74(19): 5076-5083.
- [4] Woolley, A. T., Sensabaugh, G. F., Mathies, R. A., High-speed DNA genotyping using microfabricated capillary array electrophoresis chips. Analytical Chemistry, 1997, 69(11): 2181-2186.
- [5] Simpson, P. C., Roach, D., Woolley, A. T., Thorsen, T., Johnston, R., Sensabaugh, G. F., Mathies, R. A., High-throughput genetic analysis using microfabricated 96-sample capillary array electrophoresis microplates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(5): 2256-2261.

[6] Aborn, J. H., El-Difrawy, S. A., Novotny, M., Gismondi, E. A., Lam, R., Matsudaira, P., McKenna, B. K., O'Neil, T., Streechon, P., Ehrlich, D. J., A 768-lane microfabricated system for high-throughput DNA sequencing. *Lab on a Chip*, 2005, 5(6): 669-674.

[7] Shi, Y. N., Simpson, P. C., Scherer, J. R., Wexler, D., Skibola, C., Smith, M. T., Mathies, R. A., Radial capillary array electrophoresis microplate and scanner for high-performance nucleic acid analysis. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(23): 5354-5361.

[8] Smith, E. M., Xu, H. W., Ewing, A. G., DNA separations in microfabricated devices with automated capillary sample introduction. *Electrophoresis*, 2001, 22(2): 363-370.

[9] Xu, X. M., Roddy, T. P., Lapos, J. A., Ewing, A. G., Parallel analysis with optically gated sample introduction on a multichannel microchip. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(21): 5517-5522.

[10] Shen, H., Fang, Q., Fang, Z. L., A microfluidic chip based sequential injection system with trapped droplet liquid-liquid extraction and chemiluminescence detection. *Lab on a Chip*, 2006, 6(10): 1387-1389.

[11] Gao, Y., Luo, Y., Qin, J. H., Lin, B. C., A multichannel electrophoresis microchip platform for rapid chiral selector screening. *Electrophoresis*, 2008, 29(9):

1918-1923.

[12] Bromberg, A., Mathies, R. A., Multichannel homogeneous immunoassay for detection of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) using a microfabricated capillary array electrophoresis chip. *Electrophoresis*, 2004, 25(12): 1895-1900.

[13] Paegel, B. M., Emrich, C. A., Weyemayer, G. J., Scherer, J. R., Mathies, R. A., High throughput DNA sequencing with a microfabricated 96-lane capillary array electrophoresis bioprocessor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(2): 574-579.

[14] Cheng, S. B., Skinner, C. D., Taylor, J., Attiya, S., Lee, W. E., Picelli, G., Harrison, D. J., Development of a multichannel microfluidic analysis system employing affinity capillary electrophoresis for immunoassay. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(7): 1472-1479.

[15] Xu, H. W., Ewing, A. G., A rapid enzyme assay for beta-galactosidase using optically gated sample introduction on a microfabricated chip. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378(7): 1710-1715.

[16] Crabtree, H. J., Cheong, E. C. S., Tilroe, D. A., Backhouse, C. J., Microchip injection and separation anomalies due to pressure effects. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(17): 4079-4086.

[17] Luo, Y., Wu, D. P., Zeng, S. J., Gai, H. W., Long,

Z. C., Shen, Z., Dai, Z. P., Qin, J. H., Lin, B. C., Double-cross hydrostatic pressure sample injection for chip CE: Variable sample plug volume and minimum number of electrodes. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(17): 6074-6080.

[18] Inoue, A., Ito, T., Makino, K., Hosokawa, K., Maeda, M., I-shaped microchannel array chip for parallel electrophoretic analyses. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(5): 2168-2173.

[19] Zhang, L., Yin, X. F., Parallel separation of multiple samples with negative pressure sample injection on a 3-D microfluidic array chip. *Electrophoresis*, 2007, 28(8): 1281-1288.

[20] Li, B., Jiang, L., Gao, Y., Xie, H., Qin, J., Lin, B., Development of micropump-actuated negative pressure pinched injection for parallel electrophoresis on array microfluidic chip. *Electrophoresis*, 2009: submitted.

[21] Jacobson, S. C., Hergenroder, R., Koutny, L. B., Warmack, R. J., Ramsey, J. M., EFFECTS OF INJECTION SCHEMES AND COLUMN GEOMETRY ON THE PERFORMANCE OF MICROCHIP ELECTROPHORESIS DEVICES. *Analytical Chemistry*, 1994, 66(7): 1107-1113.

[22] Ermakov, S. V., Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., Computer simulations of electrokinetic injection techniques in microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(15): 3512-3517.

## 总 结 论

本论文以微流控芯片为平台，搭建了微泵阀芯片控制系统，掌握了其相关技术，并利用该系统发展了微流控芯片样品负压进样技术，主要结论如下：

1. 搭建了微泵阀芯片控制系统，掌握了两种不同芯片中气动泵阀制作和操控的关键技术，考察了基本性能，研制了相关仪器和相关控制程序。

2. 集成微泵阀负压力夹流进样芯片可以实现样品的实时自动进样，消除了电歧视效应，集成化微泵不必使用外部泵，通用化接口易于和其它功能单元集成，可实现更加复杂目的的样品分离分析。

3. 发展了一种集成微泵阀阵列式负压夹流进样芯片，大大减少阵列进样中所需要的电极数目，对乙肝病毒（HBV）实际样品进行了分析，展示了其在阵列式高通量样品检测中的应用前景。