

## 第一章 微流控芯片实验室泵阀及电泳进样检测技术研究进展

### 1.1 微流控芯片实验室概述

微流控芯片实验室( lab-on-a-chip )又称微流控芯片( microfluidic chip ),指的是把生化领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米(甚至更小)的芯片上,由微通道形成网络,以可控流体贯穿整个系统,用以取代常规生物或化学实验室的各种功能的一种技术[1-5]。它是微纳米技术的重要组成部分,也是系统生物学研究的主要技术平台之一。

微流控芯片系统原则上适用于从核酸、蛋白质到有机、无机小分子的各种不同类型分子的反应、分离和检测,涉及到了很大一部分生物和非生物过程中的化学问题,尤其是随着芯片上各种单元技术的发展,各种传统的生物、化学领域的实验向芯片转移的速度大大加快,致使微流控芯片系统无论就其内涵还是外延而言,都远远超出了分析的范畴。

微流控芯片实验室的发展大体上可以分为三个阶段:

#### ①微全分析系统概念的提出和芯片电泳的初步实现

微流控芯片最早的雏型是由瑞士科学家 A. Manz 教授等于 1990 年以微全分析系统 (Micro total analysis system,  $\mu$ -TAS) 的概念提出的[6],并把微系统的主要构型定位为面积为数平方厘米至十几平方厘米的平板芯片上。1992 年, Harrision[7]等人首次将毛细管电泳系统移植到微流控芯片系统上,显示了微全分析系统的发展潜力,引起科学界的广泛关注。在此后的发展中,研究者迅速将  $\mu$ -TAS 的发展重点定位于基于微机电加工(MEMS)技术实现毛细管电泳系到芯片电泳的移植[8]。芯片的主体材料主要为玻璃和石英等。

## ②芯片电泳逐步被接受和微流控芯片上的大规模集成

1994 年开始, Ramsey 课题组[9-11]在微流控芯片电泳平台上开展了一系列的研究, 改进了芯片毛细管电泳的进样方法, 提高了其性能与实用性。Mathies 课题组在微流控芯片上实现了 DNA 的高通量测序[12, 13], 微流控芯片的商业开发价值开始初步显现。同时, 包括聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 和聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA) [14]材质芯片的出现, 大大降低了芯片的制作成本。随着软光刻技术 (Soft Lithography) 的诞生[15-18], 大大降低了微流控芯片的芯片技术门槛, 使更多的研究者投入到微流控芯片这一领域。

微流控芯片实验室中的一个重要核心是对芯片上微小通道内的流体控制 [1], 而在芯片上成功集成微泵阀是实现其需求不可或缺的技术。2000 年 Quake 研究小组利用多层软光刻技术实现了微流控芯片中气动微泵阀的制作 [19], 并于 2002 年在 Science 上发表了集成有上千个阀和几百个反应器的微流控芯片[20], 显示了芯片由简单的单元操作到大规模多功能集成芯片实验室的飞跃, 成为微流控芯片发展过程中的一个重要里程碑。

## ③微流控芯片上多种功能单元各种新技术、新方法

近十几年来, 随着人们对微流控芯片认识水平的不断提高, 该技术得到了非常飞速的发展[2, 21], 各种新技术、新方法层出不穷。其涵盖的领域也从最初的化学领域迅速延伸到了生物学、物理学、医学等众多领域; 芯片功能由最初的简单芯片电泳到如今可实现包括细胞分析、免疫分析、药物筛选、疾病诊断、有机合成等众多功能, 微流控芯片的发展正迎来它的春天。尤其是进入二十一世纪以来, 有关微流控芯片系统的相关报道呈现几何数式增长, 仅以 “Microfluidic”为关键词在 “Web of Science”数据库检索, 搜索到的论文数目就已达 15181 篇。

现在, 芯片电泳已仅仅是微流控芯片实验室中众多单元操作中的一种,

芯片实验室所具有的多种单元技术灵活组合、整体可控和规模集成的特点，使其在研究过程中呈现出单一的单元技术无法比拟的特点，以及由此产生的难以估量的潜在能力。它已被公认为 21 世纪最重要的前沿技术之一。2003 年 10 月 Forbes（福布斯）杂志在纪念其创刊 85 周年的一期特刊上列出影响人类未来的 15 件最重要的发明，芯片实验室名列其中，之后的 2004 年 9 月，美国 Business 2.0 杂志的封面文章称，芯片实验室是“改变未来的七种技术”之一[1]。

## 1.2 微流控芯片加工技术

微流控芯片最重要的结构特征就是通过在复杂而有序的微通道网络集成多种不同的功能区域，如样品预处理区、流体操控区、生化反应区、产物分离检测区等等。这些功能能否实现，首先取决于微加工的技术水平。现有的微流控芯片加工技术是在微机电加工技术（MEMS）的基础上发展起来的，尤以光刻技术为核心，如图1-1所示。

微流控技术的成功取决于联合、技术和应用，这三个因素是相关的。而实现上述研究的基础之一是芯片的制造。随着科学技术的发展，微流控芯片所使用的种类也日益繁多。按照其使用基质材料的种类可大致分为两类：一类是以单晶硅、石英和玻璃为代表的刚性无机材料；第二大类是高分子聚合物，其中包括如聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）和聚碳酸酯（PC）等硬质高分子聚合物；以及聚二甲基硅氧烷（PDMS），特富龙（TEFLON）等弹性高分子聚合物[3, 14]。下面对这两大类材料分别予以介绍。

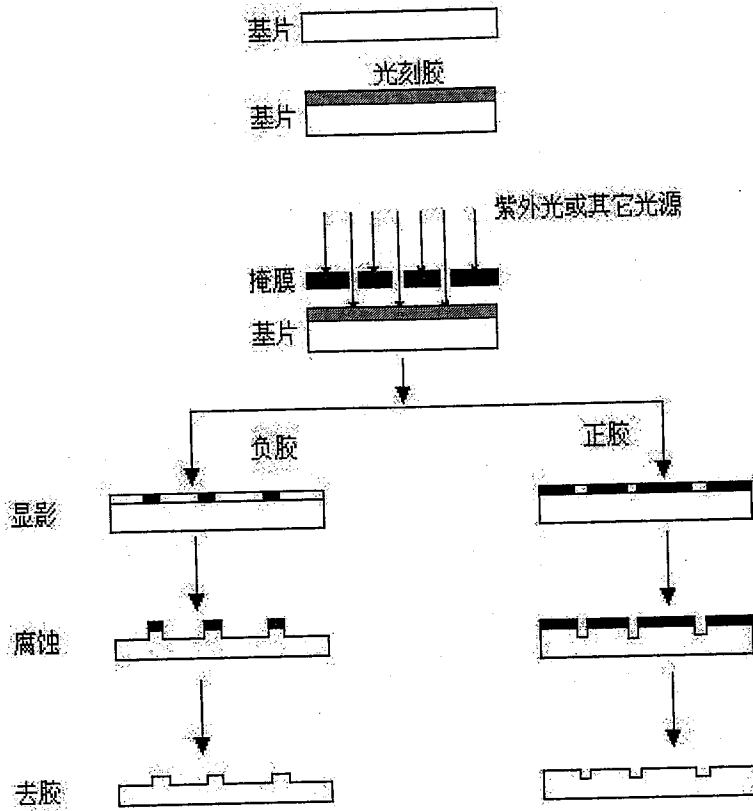


图 1-1 光刻与蚀刻的制作步骤

Fig.1-1 The fabrication process for microchip's lithography and etching.

### 1.2.1 刚性无机材料芯片的加工方法

单晶硅是 MEMS 技术的基础材料，广泛应用于电子、制造等行业，单晶硅生产工艺和微细加工技术已趋成熟，人们可以很容易的在硅片上加工出高精度的二维甚至三维结构。因而也最先被应用到微流控芯片领域。但是单晶硅的介电性、光透明和抗腐蚀性能难以满足生化分析的需求特点，表面化

学行为也较复杂，这很大程度上限制了其在微流控芯片中的应用。

石英和玻璃具有与单晶硅类似的加工条件，且弥补了单晶硅在表面化学行为和光学性质上的不足，质优价廉，现已成为微流控分析芯片的主要基材之一。尤其对于芯片上集成微泵阀芯片和电泳分离来说，玻璃芯片易于加工，光透和气密性良好，易于与 PDMS 等其它材质封接，因而是微流控芯片的首选材料之一。

石英对紫外光有着良好的透光性，是紫外分光光度法检测的最佳材质。但由于在石英和玻璃上很难加工出较复杂的三维微结构，因此在集成化微流控芯片的研究中受到了一定的限制。

### 1.2.2 高分子聚合物材料芯片的加工方法

高聚物芯片具有材料价格低廉，制作工艺简单，生产成本低，可一次性大批量制作芯片等优点。常用于微流控芯片的材料有：聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）、聚碳酸酯（PC）、聚二甲基硅烷（PDMS）以及特富龙（TEFLON）等。高分子聚合物微流控芯片的制作技术分为两类。对于 PMMA 和 PC 等硬质聚合物材料，其上的微通道结构一般是通过模具转移的。对于 PDMS,TEFLON 通常采用多层软刻蚀技术来制备芯片。

硬质聚合物材料常用的模具转移的微通道加工方法主要包括注塑法[22, 23]、热压法[24]和激光烧蚀[25]等方法，可在微米尺度范围内加工具有复杂微通道网络的高聚物芯片。注塑法是通过光刻和蚀刻技术在硅片上刻蚀出电泳芯片阴模，然后电铸成阳模，经加工后将此阳模相嵌入金属件中加工成可用于注塑机上使用的金属模具，将此模具安装在注塑机上进行大批量生产聚合物电泳芯片的方法。该方法适合于工业化大规模生产。作者实验室就利用该技术自行开发并建立了一套 PMMA 芯片的大批量生产工艺，该芯片极具

价格优势，并应用于 DNA 的电泳筛分研究[26, 27]。热压法是一种快速复制电泳微通道的芯片制作技术，但其缺点是只能制作简单的微通道。激光烧蚀法（Laser ablation）是一种非接触式的新的微细加工技术，相比而言，此方法对环境要求低，步骤简单，精度良好。但需要紫外激光器，设备价格昂贵。

PDMS 具有良好的物理和化学性质，包括良好的透光性、独特的弹性、生物惰性、低导电性、气体通透性，是微流控芯片研究中应用最多的芯片材料，已经占据文献报道的 65%以上。PDMS 芯片相对于其它芯片材料的最大优势在于加工方法非常简单和灵活，成本低廉，易于制作。同时，PDMS 具有良好的弹性，可在压力的作用下发生形变，使之成为芯片中集成微泵阀最常用的活动部通过用正胶或负胶 SU8 制作模板，通过多层软刻蚀技术可以获得相应的立体结构，实现各种复杂功能单元的设计和制作。但是 PDMS 微流控芯片表面问题非常复杂，最近有文献报道，用 TEFLON 材质可以有效克服 PDMS 的非特异性吸附的缺点，并已经应用于芯片上集成微泵阀的研究中[28, 29]。

### 1.3 微流控芯片中微泵阀技术

微流控芯片早期是以毛细管电泳分离为主要应用出口，但随着研究的发展和深入，微流控芯片已经发展成为一个物理、化学、微加工与生物技术等多学科组成的交叉领域，集成的操作单元越来越多，规模越来越大，而微泵阀技术作为芯片单元集成中的一个基本技术，更加扮演着举足轻重的作用。微流控芯片上已经实现的微泵阀原理各异，种类也较多，有的构架只能形成微阀的功能，有的即可实现阀的功能也能实现泵的功能，本节将根据其工作原理的不同逐一分类介绍。

### 1.3.1 扭矩微阀

扭矩微阀[30]所用的材质一般为 PDMS 弹性体，阀的开关状态通过固定于 PDMS 芯片通道上方的螺丝来控制，螺丝末端与流体通道间留有一薄膜作为形变部件，如图 1-2 所示。施加压力时，在外力的挤压作用下使 PDMS 发生形变，从而造成微通道的关闭；撤销外力后，PDMS 恢复原来形态，通道重新开启,如图 1-2 所示。

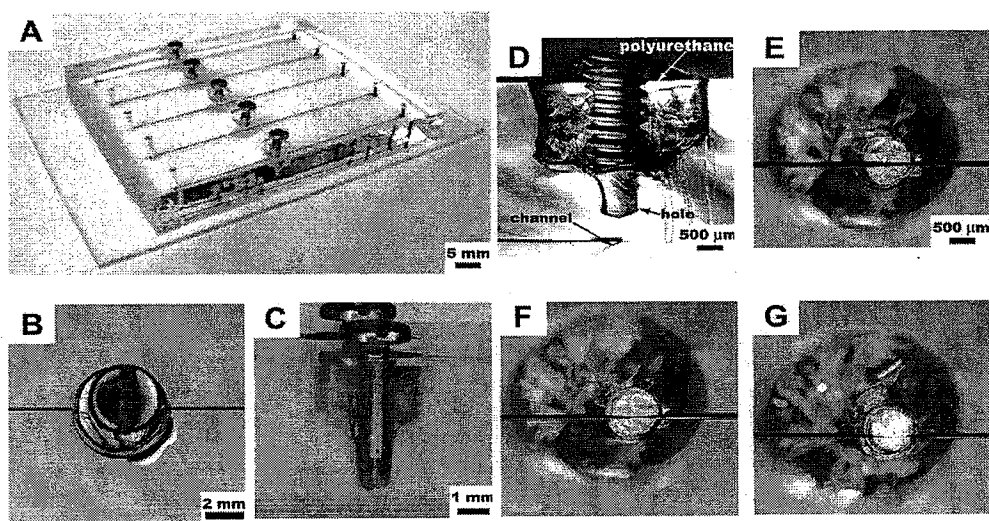


图 1-2 扭矩微阀示意图 (A) 扭矩微阀芯片 (B) 扭矩微阀俯视图 (C) 扭矩微阀侧视图 (D) 螺丝拧入截面图 (E) 扭矩微阀仰视图，通道敞开 (F) 通道被部分关闭 (G) 通道被完全关闭

Fig. 1-2 Images of TWIST valves. (A) A microfluidic device in PDMS containing five parallel channels with TWIST valves; the PDMS channels are bonded to a glass slide and have been filled with food coloring to make them easier to visualize. (B) Top view of a TWIST valve on the device. (C) Side view of a TWIST valve. (D) A

cross section of a TWIST valve with the screw removed. (E) Bottom view of a channel filled with food coloring positioned above a TWIST valve (1-mm diameter); the valve is open. (F) Bottom view of a channel that has been partially closed by rotating the valve. (G) Bottom view of a channel that has been completely closed by rotating the valve.

该方法操作简单，但是外加挤压装置和芯片的接口制作较为困难，也不能实现微泵的功能，目前只有 whitesides 课题组有相关应用[31, 32]，不具有普适性。

### 1.3.2 相变微阀

相变阀是利用石蜡等物质固液态的相变点比较低，通过改变温度来实现固液不同相态的变化，实现微阀开启和关闭的功能，如图 1-3 所示[33]。

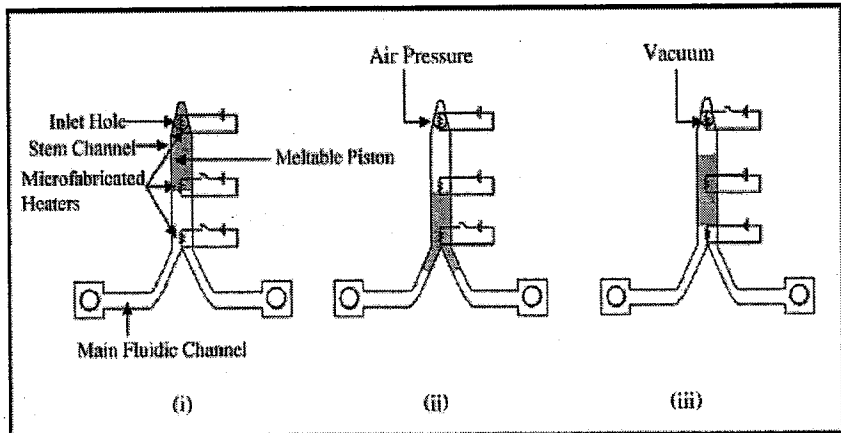


图 1-3 相变微阀工作原理示意图

Fig. 1-3 Illustration of the principle of phase change valve.

Burns 等设计一种相变阀就是借助石蜡的这种特性。首先在进口处灌入石蜡，同时启动芯片下的微加热器使石蜡熔化；然后在进口施加一个气压，石蜡在推力作用下于主通道拐角处凝固，流体通道关闭；阀开启时，启动微加热器并在进口处施加负压，石蜡流回内通道，通道导通。利用这种相变阀，作者在此芯片上同时成功完成了 PCR 扩增[34].

Motorola 公司利用上述相变阀的机理，研制了一种基于 PC 材质的全集成 DNA 分析系统[35]，它能完成在线细胞磁珠捕获、富集、纯化、裂解到 DNA PCR 扩增后电化学检测等所有核酸分析过程，充分显示了微流控芯片实验室多功能单元灵活组合的特点。

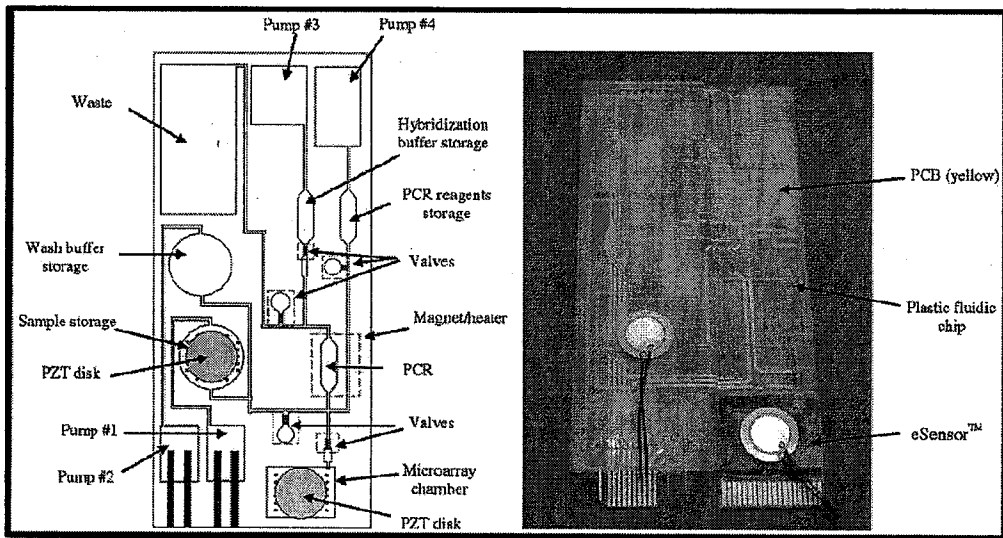


图 1-4 全集成 DNA 分析芯片系统

Fig.1-4 Genetic analysis microfluidic system integrating sample phase valve/purification/ PCR and detection.

虽然相变微阀的方法简单，易于实施，但是阀制作前需要灌入石蜡等物

质，石蜡注入以所形成微阀的长度和所需位置都有一定难度，同时样品易受石蜡等物质的干扰，这些都是亟待解决的问题。

### 1.3.3 压电微泵阀

压电微泵通常采用压电晶体和金属电极制作活动部件，利用压电效应产生的形变作为流体的驱动源。Smits 采用三个压电致动器制成蠕动型微泵 [36]。它是采用阳离子异相刻蚀在硅晶片上层刻出阀的位置，下层刻出微通道，然后用玻璃芯片进行阳离子封接。上层的玻璃芯片刻出的阀的位置用压电晶片进行键合。图 1-5 所示，是它工作时候的状态，在 15Hz 的频率下，其最大流速能达到 100ul/分钟，最大泵压为 60000Pa。

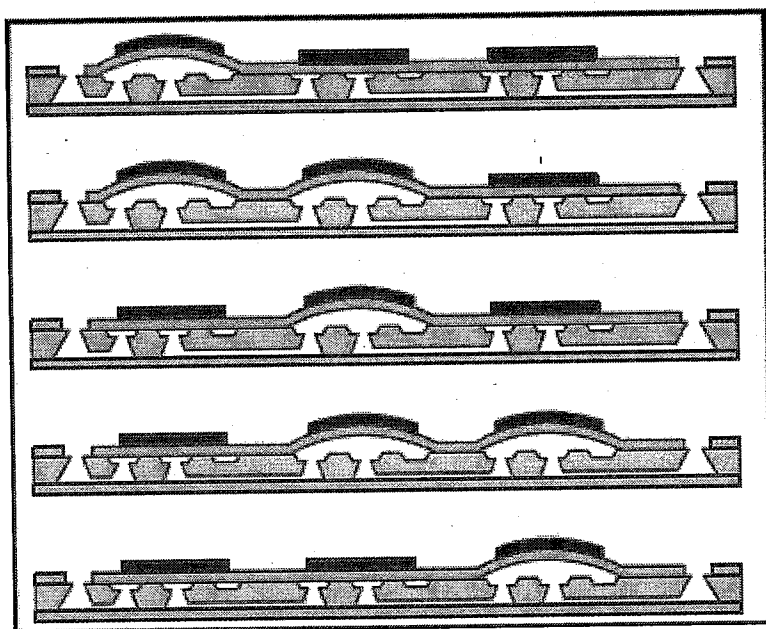


图 1-5 压电蠕动微泵示意图

Fig.1-5 The illustration of peristaltic piezoelectric pump.

### 1.3.4 热气微泵

热气微泵的工作原理与压电微泵类似，不同之处是采用了气体加热膨胀的原理来驱动弹性薄膜形变产生驱动力，完成流体的驱动。典型的热气微泵如图 1-6 所示[37]，基本构架由可形变弹性薄膜（如 PDMS 膜）、气室、泵腔、加热电阻和两个单向阀组成。泵液操作时，控制加热电阻使气室中的气体受热膨胀，产生的压力使得气室下方的弹性隔膜发生形变，进而压迫泵腔内的液体形成向外的液流；吸液时则停止加热，气室中的热气体自然冷却收缩，弹性隔膜恢复原样，泵腔内产生负压而吸入液体。在两侧单向阀的配合下，循环进行泵液和吸液操作，就可形成沿同一方向的连续液流。

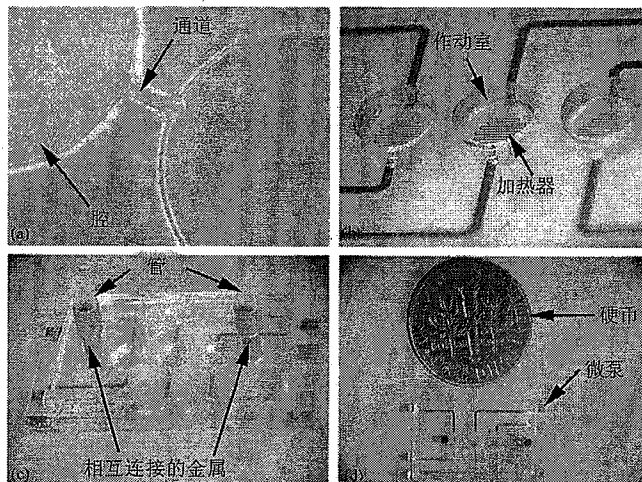


图 1-6 热气微泵示意图

Fig 1-6. The schematic of hot air micropump.

### 1.3.5 气动微泵阀

#### 1.3.5.1 PDMS 构架微泵阀

2000 年,Quake 研究组利用 PDMS 材质的自身弹性,率先在 science 发表

了“多层软光刻技术整体合成微泵阀”的一种新型的气动微泵阀的制作技术[19]，并利用该技术又在2002年实现了微流控芯片中泵阀的大规模集成[20]。该方法制作工艺简单，极大地降低了微流控芯片中泵阀集成的难度和进入门槛，同时还具有控制精确、灵活等优点，目前该技术已被普遍使用并得到了广泛应用[38-47]。

PDMS 构架微泵阀如图 1-7 所示，芯片包括液体流路层和气路控制层，全部采用 PDMS 材质，利用 SU8 制作气路控制层，正胶制作液体流路层，根据微阀薄膜和液路通道位置的不同，分为下压（push down）和上推（push up）两种类型[48]。气体通道位于液路通道层的正交位置，当与气路通道施加正向压力，PDMS 薄膜发生形变，将流体微通道的流路断开，解除压力后流路恢复通畅。通过程序控制电磁阀可对气路的压力进行实时切换。同时串联三个以上的微阀，并按照一定的时间相差施加正负压，可以实现芯片上微泵的功能。

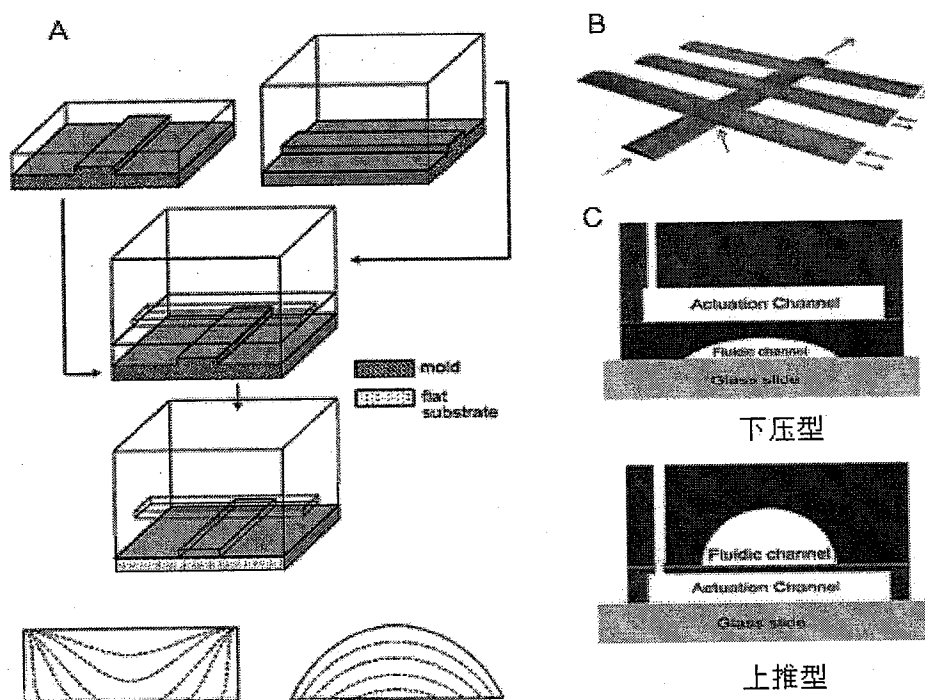


图 1-7 PDMS 气动微泵阀结构示意图 (A) 将气路层和液路层 PDMS 经过等离子体不可逆封接, 形成微阀 (B) 三个串联的微阀按照一定的时间差施加正负压形成一个蠕动微泵 (C) 下压型和上推型两种微阀构架

Fig.1-7 Schematic structure of the pneumatic microvalve and pump.

该课题组在 2002 年实现了微流控芯片中泵阀的大规模集成, 他们在一块  $2.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$  的芯片上集成了 2056 个微阀和 256 个可寻址的微反应室[20], 如图 1-8 所示。

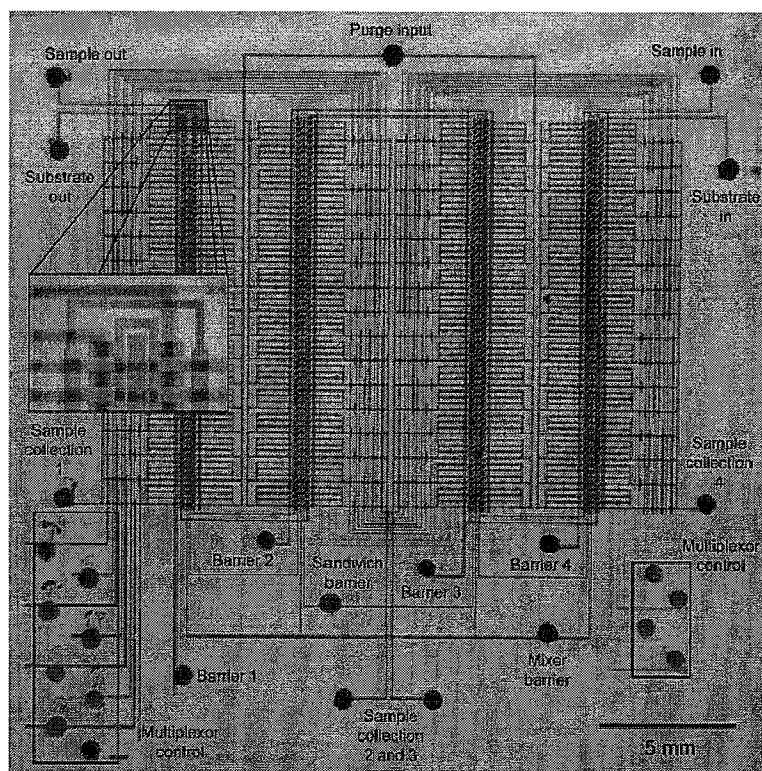


图 1-8 气动微阀微泵组成的大规模集成微流控芯片

Fig.1-8 A large-scale integrated microfluidic device which consists 2056 pneumatic valves and 256 addresssubnanoliter reaction chambers.

如何在微流控芯片中进行有效混合一直微流控芯片技术的热点问题之一，目前的混合方式主要包括被动混合和主动混合，前者单纯地利用几何形状或流体特性产生混合效果[49-51]，速度较慢；而后者则借助电场力、磁力、声场等外力实现混合[52-54]，具有快速高效的特点。Quake 研究小组就基于上述气动微泵的原理，成功设计了一种微混合泵（图 1-9）[55]，在样品混合和化学反应方面显示了很好的应用前景。

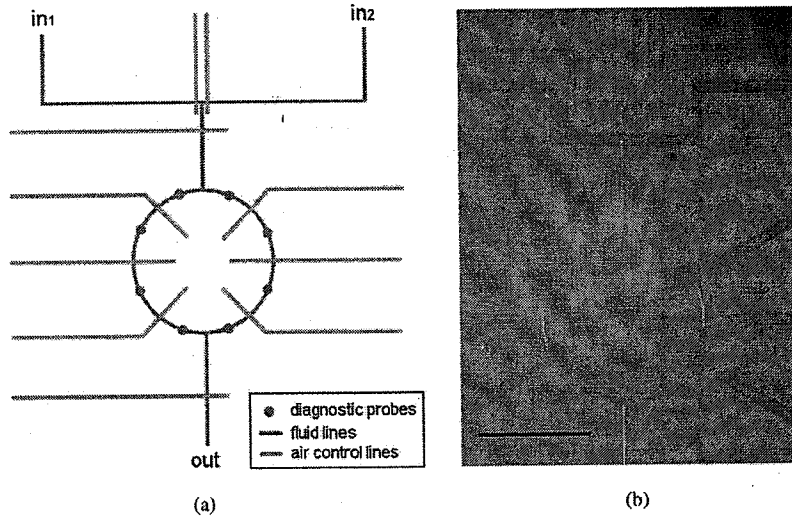


图1-9 气动微混合泵

Fig. 1-9 A pneumatic rotary pump (a) the schematic diagram of the design of a rotary pump. Two layers of channel patterns are

used here. Any intersection of a fluid channel and an air control line forms a microvalve. (b) A snapshot of a microfabricated chip rotary pump device.

### “Quake型”微泵阀应用

芯片实验室技术的核心和精髓是芯片上微小通道内流体的控制，随着微泵阀技术的完善，人们可以灵活方便的控制通道内流体的运动，为应用于诸多重要的化学、生物领域的研究打下了坚实基础。Quake 研究组利用这一关键技术，将其应用于化学合成[56]、蛋白结晶[39, 41]、细胞[43, 57]、细菌监测[58]、核酸研究[40]等众多生物化学领域，如图1-10所示，实现其分析和操作的高通量和自动化，让微流控研究领域研究达到了一个新的高潮。

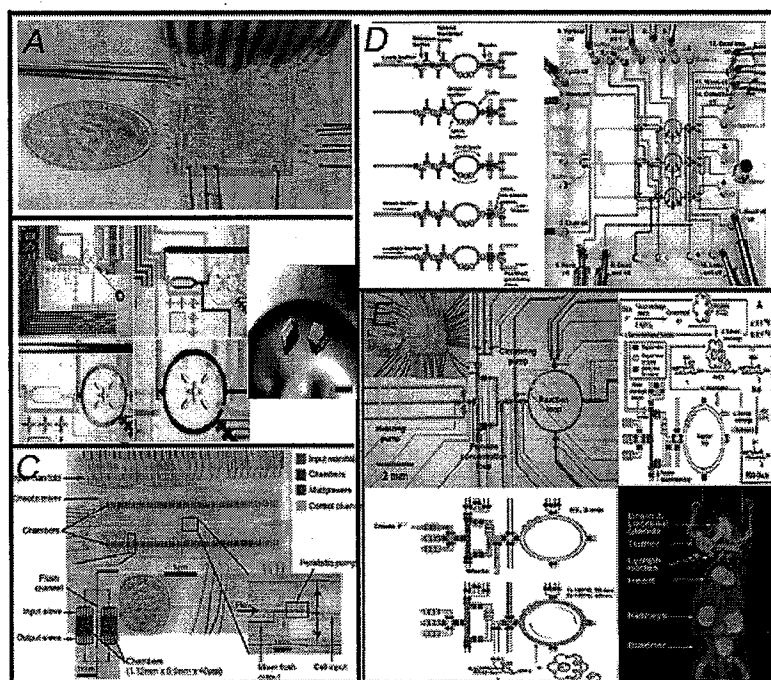


图 1-10 微流控微泵阀规模集成应用于诸多研究领域 (A) 细菌监测 [58] (B) 蛋白结晶 [41] (C) 细胞分析 [57] (D) 核酸分析 [40] (E) 有机合成 [56]

Fig.1-10 The applications of microfluidic integrated microvalves for bacteria monitoring, protein crystallography, cell analysis, genetic analysis and chemical synthesis.

### 1.3.5.2 玻璃-PDMS 杂交构架微泵阀

但是“PDMS-PDMS” PDMS材质构架的芯片也有一些缺陷, 主要是因为其全部材质均为PDMS, 不利于集成电极、加热装置, 同时PDMS材质对许多生物样品具有非特异性吸附, 不利于芯片电泳的分离。因此mathies课题组在此基础上设计了玻璃-PDMS杂交芯片, 如图1-11A所示, 图1-11B是其微泵实时工作时图像。

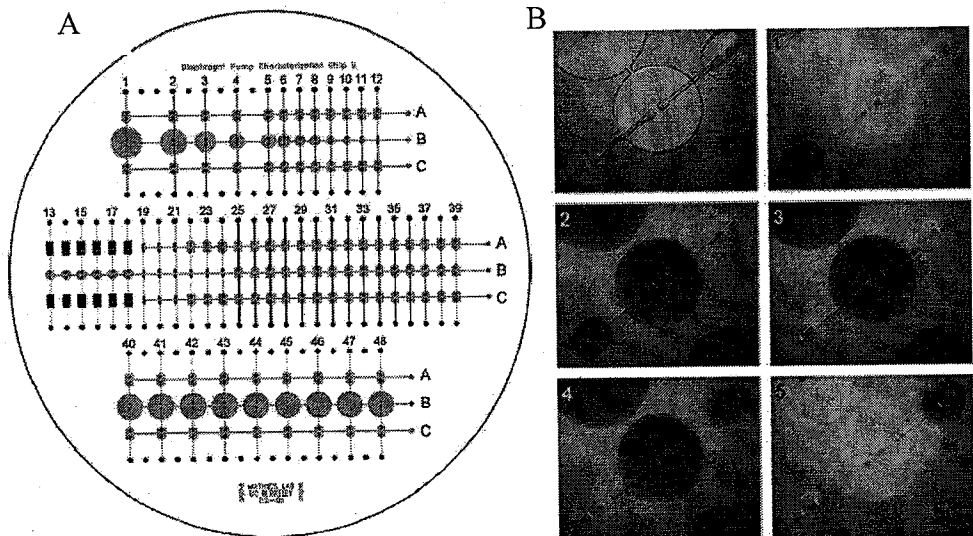
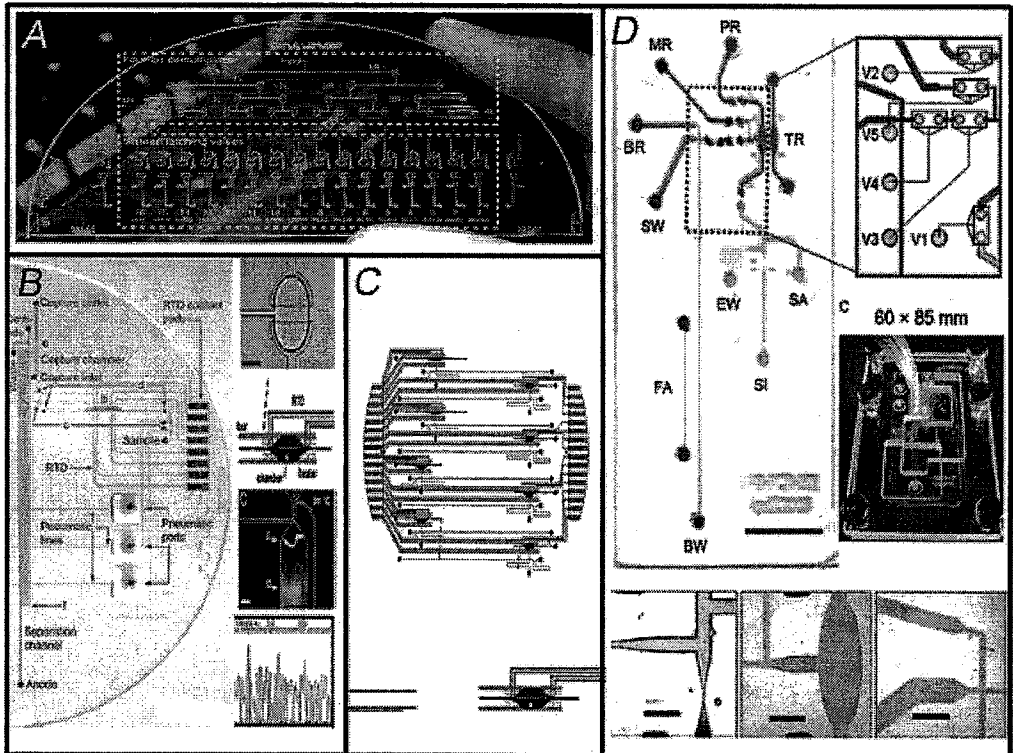


图1-11 玻璃-PDMS杂交芯片及微泵阀工作图像。

Fig. 1-11 The illustrations of the liquid's transportation on the Glass-PDMS hybrid 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，成为微阀。四层结构中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，适合于核酸分析研究。

目前研究的热点主要包括芯片上的PCR反应[59]、基因分析[60, 61]、疾病诊断[62]、DNA分型测序[63, 64]等领域，如图1-12所示。集成化的微泵阀为实现微通道内复杂流体的灵活控制提供了有力支持，其相关应用也已经取得了很多人振奋的成果。



### 图1-12 “Mathies型”微泵阀的应用

Fig. 1-12 The application of “integrated mathies microvalves” for PCR, disease diagnose, DNA genotype and sequencing.

## 1.4 微流控芯片电泳进样技术

微流控芯片技术作为一种把实验室中各种操作集成于芯片上的技术，必然需要对各种物质的分离分析检测，其中最常用的技术是芯片毛细管电泳技术 (chip-based capillary electrophoresis)，一般包括两步，首先是上样 (loading step)，指的是样品从样品源引入芯片样品处理通道。输送的驱动力包括电力或者压力，后者可以通过外接注射泵 (器)、液面高度不同产生的静压力以及集成于芯片上的微泵等方法实现。然后是分离 (dispensing step)，指的是在电场力作用下，样品进入分离通道，并且根据其离子或者分子在电迁移或分配行为上的差异，导致不同物质间的分离。

### 1.4.1 电动驱动进样技术

在芯片毛细管电泳中，最主要的电驱动方式是通过电渗力产生[65]。电渗是一种液体相对于带电管壁移动的现象，它的驱动原理是利用微通道表面存在的固定电荷进行驱动。电渗的产生与偶电层 (double layers) 有关，在 $\text{pH} > 3$  的条件下，微通道管壁带负电，于是在贴近管壁附近的液体表面形成了一个和同管壁电荷异号的偶电层 (包含stern层和diffuse层)，在平行于通道表面的外电场作用下，偶电层中水合阳离子或质子引起通道内的流体朝负极方向的运动 (图1-13)，这种运动即称为电渗。

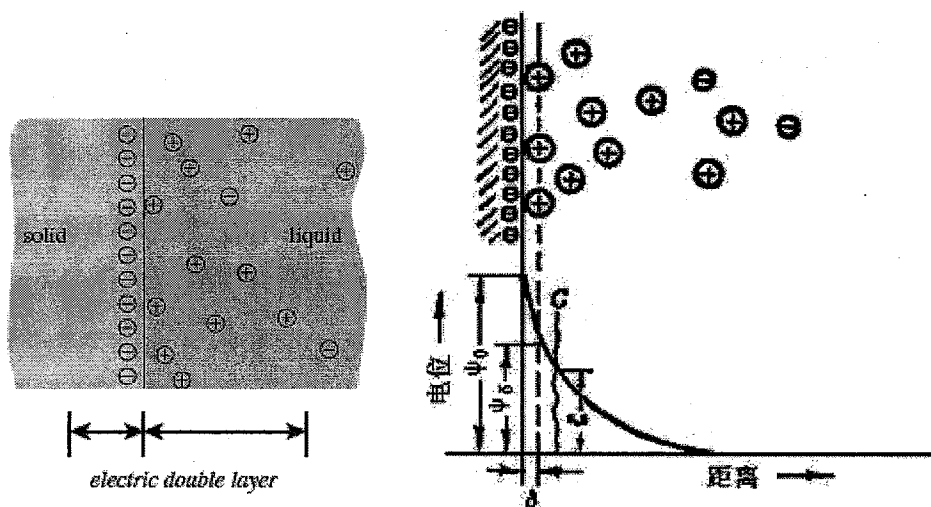


图1-13 双电层形成结构示意图

Fig.1-13 the schematic scheme of the electric double layer.

电渗的淌度 $\mu$ 可由下式计算[1-1]

$$\mu = \xi \varepsilon E / 4 \pi \eta \quad (1-1)$$

$\xi$  为Zeta 电势 (stern 层与diffuse 层之间的电势差, 图1-13),  $\varepsilon$  为流体的介电常量,  $E$ 为外电场,  $\eta$  为介质的粘度。

从公式可知, 电渗流的大小和外电场力 $E$ 成正比, 通过调节 $E$ 的大小, 可以简单方便的控制电渗流的大小。

其从芯片构架上主要包括十字进样、单T、双T等方式, 下面将逐一作一介绍。

#### 1.4.1.1 十字通道进样技术

十字通道交叉型进样, 是目前最广泛应用于芯片电泳的进样方式。上样指的是样品从储液池进入辅助通道 (又称上样通道), 并充满十字交叉口。

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[66]。

十字通道进样技术又根据施加电场力作用的不同，分为简单上样 (simple) [10]、悬浮上样 (floated) [67]、夹流上样 (pinched) [10, 68, 69]、门式上样 (gated) [11]等方式。其基本原理如图1-14所示。

其中夹流进样是指通过控制缓冲液造成样品区带收缩实现进样分析。因为样品区带被有效压缩，有利于分离效率的提高[10, 68]。

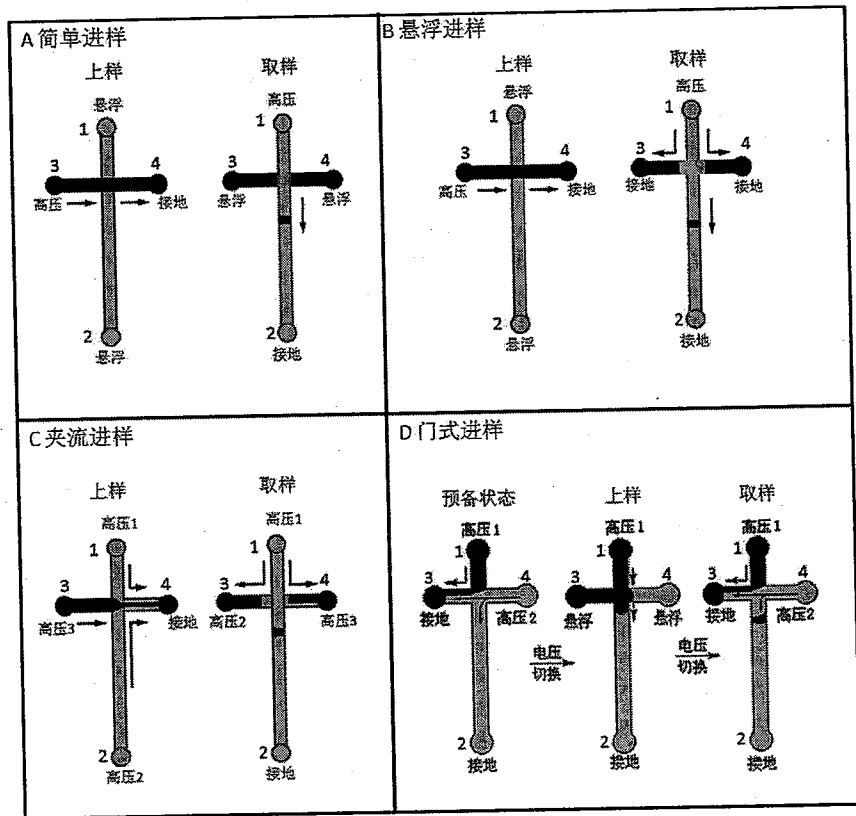


图 1-14 十字通道进样模式 (A) 简单进样 (B)悬浮进样 (C)夹流进样 (D) 门式进样

Fig.1-14 The cross-intersection injection modes. (A) simple (B) floated (C) pinched (D) gated.

#### 1.4.1.2 单 T 进样技术

单T进样技术是芯片上最早提出的一种进样方式。1992年, Harrsion[7]等人发表了第一篇关于毛细管电泳芯片分离的文章, 他们利用T型通道, 成功分析了荧光素钠样品。在样品池和废液池间的电场作用下, 样品进入分离通道, 上样一段时间后, 再将电压切换至缓冲液池与废液池之间实施取样。这种进样方法的样品进样量依赖于进样时间, 目前应用相对较少。但该法芯片设计简单且仅需三个电极, 因此在芯片阵列电泳中显示出较大的潜力。Mathies课题组利用T型通道进样的原理, 成功在96根[70], 348根[71]阵列通道上对DNA进行了高通量测序研究。

#### 1.4.1.3 双 T 进样技术

但当被检测物质浓度较低时, 芯片电泳需要较大的进样量来提高检测信号, 采用十字进样技术因其样品体积较小而不能满足需要。Manz等通过将十字交叉通道改为双“T”型通道可有效增加进样量[72]。这种增加没有改变通道的宽度和外加电场配置, 因而对分离提供了较大的便利。

#### 1.4.2 压力驱动进样技术

但是在电动进样中, 当被分析物质为复杂样品时, 由于各组分电动性质相异, 导致样品区带不能代表实际样品组成, 这种效应即通常所说的“电歧视效应”[73, 74], 为了消除歧视效应, 研究人员采用了压力作为驱动力来实现芯片上的进样和电泳分析[75]。其主要包括静压力驱动、外接泵压力驱动以及集成微泵驱动进样技术[66, 73, 76-78]。

### 1.4.2.1 静压力驱动进样技术

静压力进样是以芯片上样品池与样品废液池间的液面高度差所产生的静压力作为上样驱动力的进样方法。静压力驱动具有方法简单，无需外部设备等优点。盖在十字通道芯片上首先实现了简单静压力进样[66]，但在其取样过程中，样品因静压力会持续流入十字交叉口，随即在电场作用下转入分离通道，造成电泳谱图基线升高，从而影响到分离和分析的质量（图1-15A）。罗发展了这一方法[77]，通过多通道辅助进样技术，对罗丹明123进行了有效分离（图1-15B）。

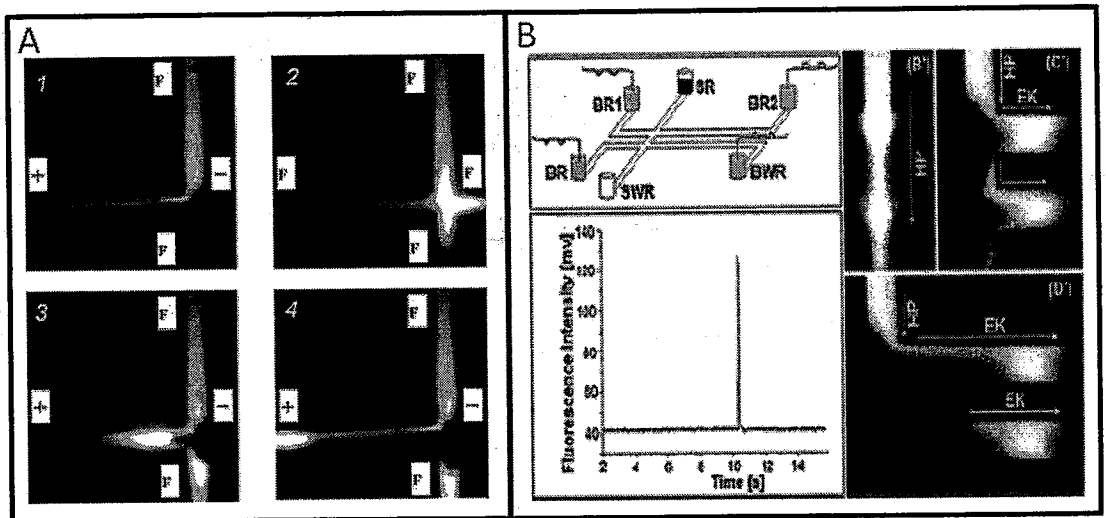


图1-15 静压力驱动进样技术 (A) 简单十字芯片静压力进样 (B) 多通道辅助芯片静压力进样。

Fig. 1-15 (A) hydrostatic pressure on a cross-channel microfluidic chips (B) double-cross chip hydrostatic injection.

### 1.4.2.2 外接泵压力驱动进样技术

但是静压力是由各储液池之间液面高度差产生的，随着时间推移，各储液池液面高度会发生变化，导致静压力也随之变化，这种不稳定状态影响了

它的进一步应用。因此一些研究者尝试采用外接泵或者注射器的方式来实现压力驱动。Bai等利用芯片色谱中的八通阀和进样装置构架了芯片上的压力进样系统，如图1-16A所示[76]。张磊等利用外接泵实现了芯片上的负压进样（图1-16B）[79]。

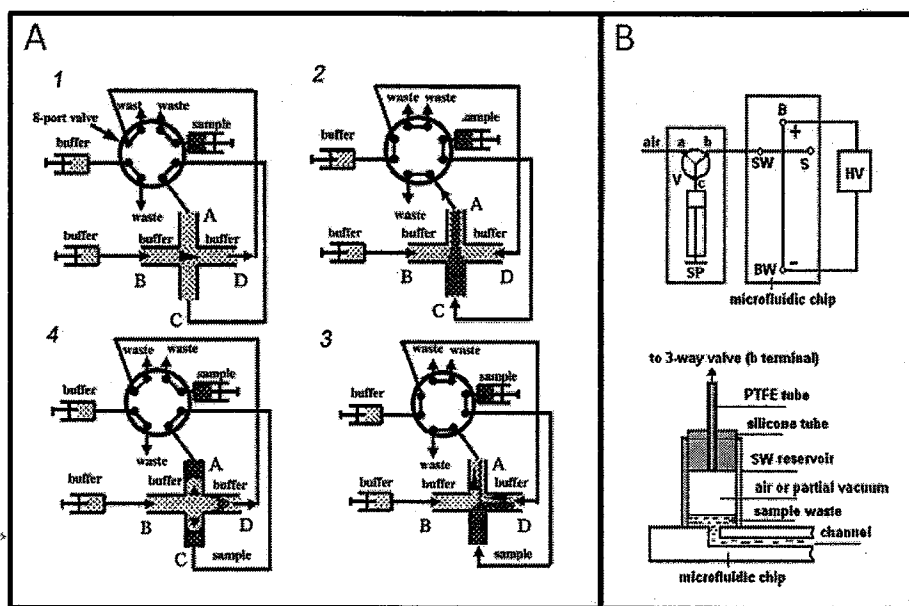


图1-16 压力驱动进样 (A) 利用八通阀实现压力进样 (B) 利用外接泵实现芯片压力进样

Fig.1-16 The pressure injection mode (A) Schematic diagram of a two-way micro-8-port valve for injection (B) The illustration of pressure injection on microchip by external pump.

#### 1.4.2.3 集成微泵驱动进样技术

但是外接泵压力驱动技术通常需要复杂的外部设备，同时这些装置一般都在微升或毫升级别，与芯片微通道的偶联也是很大的技术难点，因此将微

泵集成于芯片内部能够有效的简化装置的复杂性，有利于和其它功能单元集成。Landers首先实现了集成微泵阀的正向压力进样[73]，作者所在课题组运用集成微泵阀技术实现了芯片上样品的夹流进样[80]，并将其应用于阵列芯片电泳，降低了仪器搭建难度和成本，同时分离效率也有很大提高[10, 68]。

### 1.5 阵列微流控芯片平行检测技术

1992年加州大学伯克利分校的mathies小组率先研制成功“毛细管阵列电泳仪 (Capillary Array Electrophoresis, CAE)”系统[12]，采用多通道毛细管凝胶电泳技术进行了DNA测序，建立了阵列毛细管电泳的雏型。阵列微流控芯片系统是在阵列毛细管电泳基础上发展起来的(图1-17所示)，它具有高通量，易于集成，试剂消耗量小，检测时间迅速等优点。

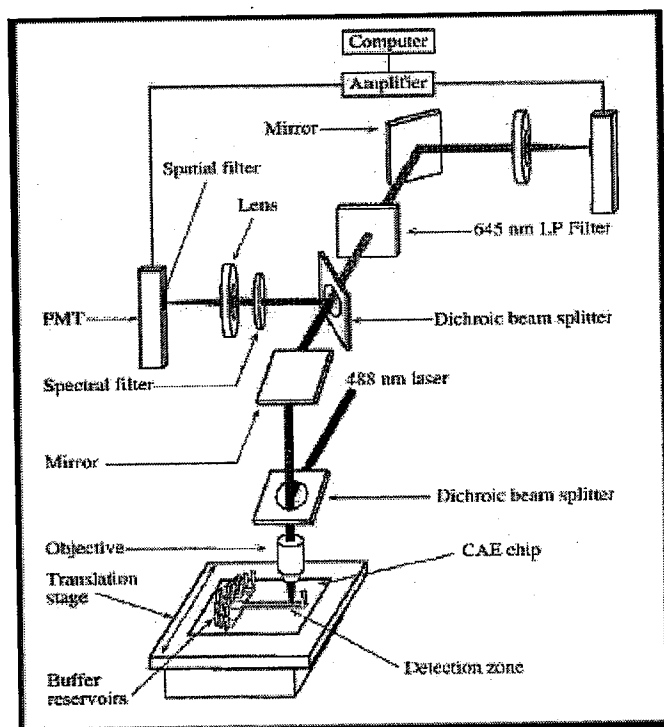


图 1-17 首台阵列微流控芯片系统光路示意图

Fig. 1-17 The schematic of optical path in the first microfluidic array system.

目前的阵列微流控芯片研究主要是对基于样品的分析,包括 DNA 基因分型和测序[64, 71, 81-83]、药物筛选[84]、免疫检测[85]等方面。尤其随着人类基因组计划测序于 2006 年的完成,对于阵列微流控芯片系统的单元功能将不仅仅局限于芯片电泳,人们希望具有更多功能的操作单元被集成于芯片上,来完成更为复杂的研究需求。而 1.3 节中所述的 Quake 提供的大规模微泵阀集成技术[20],为有效集成更为多样化的功能单元提供了基础,也为阵列微流控芯片系统大规模多功能集成指明了方向。2008 年末,ismagilov 提出了一种“化学电极”的新思路[86],也可能使之成为一种新的阵列微流控芯片检测技术。

### 1.5.1 阵列微流控芯片扫描式检测技术

加州大学伯克利分校的Mahties小组1997年成功将毛细管阵列电泳迁移到了在微流控芯片平台。他们采用共聚焦扫描检测的方式,如图1-17所示,同时检测了12个通道内的荧光信号[13]。旋转扫描共聚焦装置是通过多组反射镜,使激光光源通过旋转光路聚焦于单根通道上,然后通过步进电机对旋转光路进行高速旋转,使激光聚焦点高速圆盘式扫过通道的每个点,由PMT进行采集,如图1-18所示[70]。该方法灵敏度高,不受芯片通道数目限制,但是扫描式检测的装置搭建难度高,对机械加工和控制精度都有很高的要求。

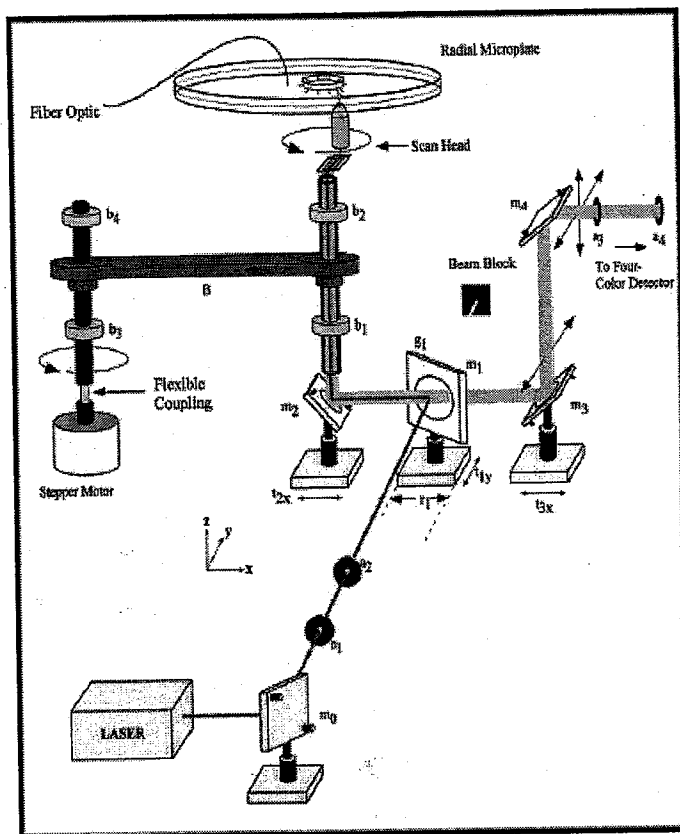


图 1-18 旋转扫描共聚焦荧光检测装置示意图

Fig.1-18 Schematic of the rotary confocal fluorescence scanner.

利用该平台他们先后实现了48通道[81, 87]、96通道[70, 83]和384通道[71]上高通量DNA基因分型和测序工作。图1-19为阵列微流控芯片扫描式检测的代表性工作。Mathies小组在半径为100mm的圆形芯片上集成了384个检测单元用于高通量的DNA基因分析研究。所有通道呈放射状排布, 通道长度为8cm, 通过四色荧光旋转共聚焦扫描平台进行检测。

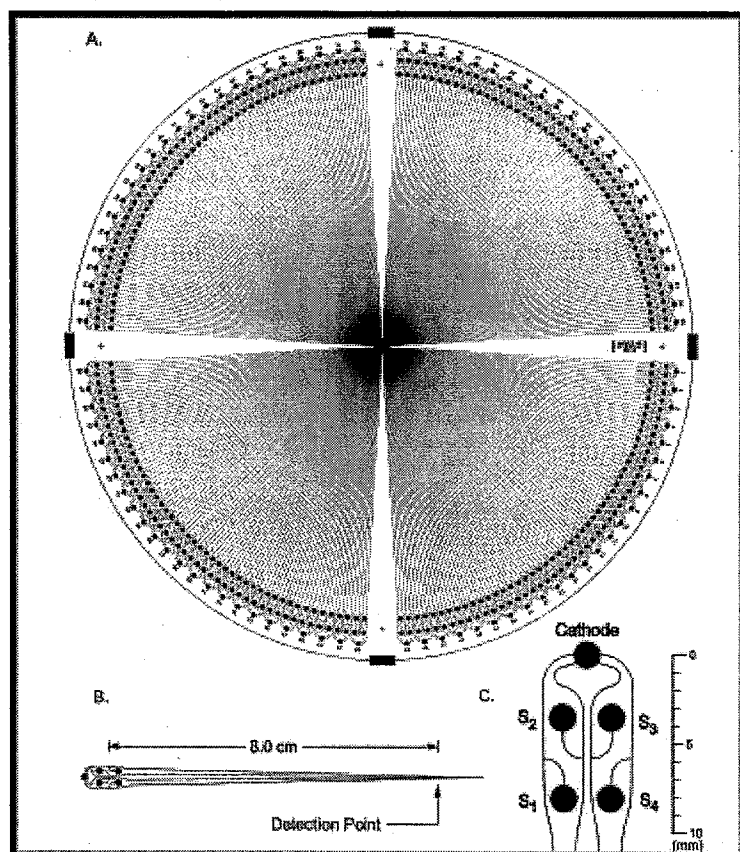


图1-19 (A) 半径100mm玻璃芯片上集成有384根微毛细管阵列电泳通道示意图 (B) 单一通道示意图 (C) 进样单元放大示意图

Fig. 1-19 (A) Layout of the 384-lane  $\mu$ -CAE device on a 200-mm diameter wafer. (B) Expanded view of a single quartet of channels with their injectors. (C) All channels in a quartet share a common cathode reservoir located closest to the edge of the wafer. The injector design for every channel is shown at right. S1 -S4 indicate individual sample reservoirs.

### 1.5.2 阵列微流控芯片成像式检测技术

阵列式成像式检测,顾名思义,就是通过成像的方式进行检测。其原理是先将激光光源拉长成窄线,通过透镜聚焦到微流控芯片阵列通道上,调节芯片位置使所有需要同时检测的通道都处在激光聚焦区域,在电渗流的作用下,阵列通道中含有荧光物质的样品流过激光聚焦处,可以被激发出荧光,信号通过CCD器件将检测区域的图像以一定的频率记录下来,在检测完毕后,将记录的图像进行图像处理,转换为直观的电泳谱图。成像式检测仪器较易搭建,但激光被拉宽成一窄线后有一定范围,过度拉宽激光,将影响正常的激光高斯分布,直接导致激光聚焦窄线的光强度不均匀,使得各个通道的检测信号不一致。因此检测的通道数目上受激光聚焦范围的限制,这也一定程度上限制了其应用。

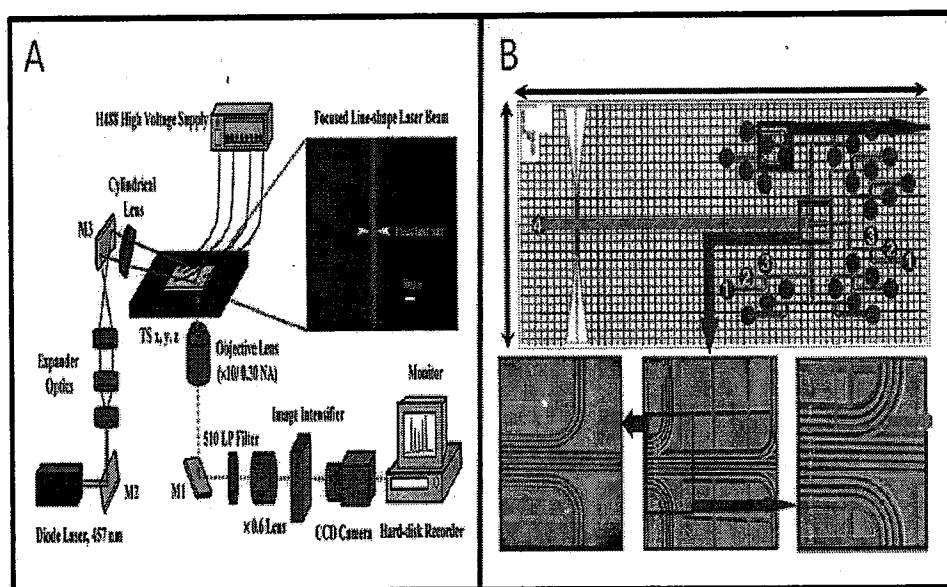


图 1-20 (A)多通道阵列微流控芯片检测装置 (B)10 通道阵列芯片

Fig. 1-20 (A) Schematic of multi-channel array microfluidic detector (B) photograph of 10 channels microfluidic chip.

2005年,日本Baba小组在PMMA芯片上实现了10通道的阵列成像检测[88, 89],图1-20为其仪器光路图,如上所述,激光通过多组光学透镜后,成一直线聚焦于10通道阵列芯片上,信号采用CCD检测器收集和检测。并被其它研究小组所应用。本课题组也在国内首次自主搭建了激光诱导荧光阵列检测装置[90]并在此平台上实现了手性化合物拆分[84]及DNA样品检测[91]。

### 1.5.3 其它检测技术

随着美国哈佛大学whitesides研究小组将微型雪崩二极管埋入PDMS基板中作为集成式的感光原件[92],波导元件在芯片中的集成研究也日益增多。同时波导原件的集成可以简化检测装置,提高阵列芯片的集成度,Mogensen等人在一块芯片上刻蚀一系列并行的光波导结构,可将一束激光分成128个平行光束,而且仅需一个PMT就可同时检测所有波导通道。他们利用该芯片测定了荧光微粒在微通道中的流速(图1-21)[93]。

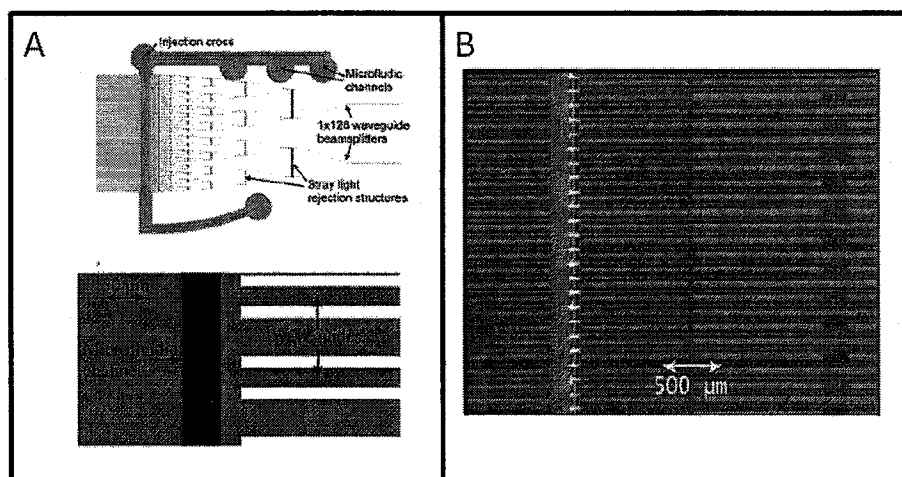


图1-21 (A)集成光波导结构微流控芯片 (B)集成128路平行光束波导检测荧光图

Fig.1-21 (A) the chip design where the waveguides intersect the microfluidic channel (B) The fluorescence image of the detection channels integrated 128 waveguide beam splitter.

液滴是今年来在微流控芯片上发展起来的一种全新的操纵微小体积液体的技术[94-98]。Monpichar 实现了液滴中 DNA 的高通量检测[99]。芝加哥大学 Ismagilov 研究小组利用液滴技术，可灵活的将液滴进行分割[51]，然后进行多通道中多方法的平行检测，如图 1-22 所示。这种技术的出现，很大程度上拓展了阵列微流控芯片检测的应用领域。

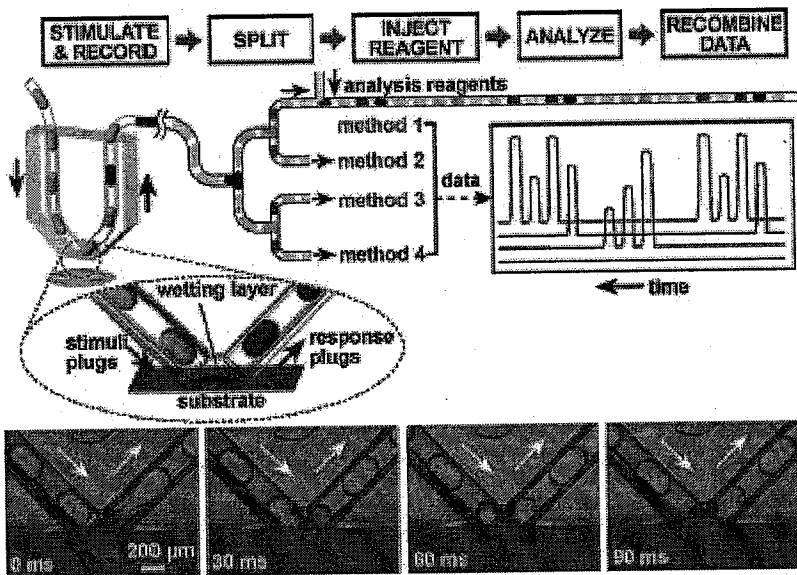


图1-22 利用液滴技术实现多通道检测

Fig.1-22 The droplet technique is used for parallel analysis.

## 1.6 本论文的研究目的和主要研究内容

本论文所介绍的工作一方面为微流控芯片泵阀关键技术研究，包括仪器研制、软件开发以及芯片制作和性能测试等；另一方面利用该系统提出了一种集成微泵阀的负压夹流进样方法，并将其发展应用于多通道阵列检测，分析检测了包括荧光素钠、氨基酸、DNA等多种物质。

本论文共分为四章。第一章是文献综述，第二、三、四章为本论文的研究工作部分。其中第二章是微流控芯片泵阀控制系统研制及关键技术研究；第三章为集成微泵阀负压驱动技术用于芯片电泳研究；第四章为集成微泵阀芯片负压驱动技术在平行阵列芯片电泳中的应用。

## 1.7 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] West, J., Becker, M., Tombrink, S., Manz, A., Micro total analysis systems: Latest achievements. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(12): 4403-4419.
- [3] 林炳承, 秦建华, 微流控芯片实验室. 色谱, 2005, 23(5): 456-463.
- [4] Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 2006, 442(7101): 368-373.
- [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] 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.
- [7] 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.
- [8] Harrison, D. J., Fluri, K., Seiler, K., Fan, Z. H., Effenhauser, C. S., Manz, A., MICROMACHINING A MINIATURIZED CAPILLARY ELECTROPHORESIS-BASED CHEMICAL-ANALYSIS SYSTEM ON A CHIP. *Science*, 1993, 261(5123): 895-897.
- [9] Jacobson, S. C., Hergenroder, R., Koutny, L. B., Ramsey, J. M., HIGH-SPEED SEPARATIONS ON A MICROCHIP. *Analytical Chemistry*,

- 1994, 66(7): 1114-1118.
- [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] 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.
- [12] Huang, X. H. C., Quesada, M. A., Mathies, R. A., Capillary Array Electrophoresis Using Laser-Excited Confocal Fluorescence Detection. *Analytical Chemistry*, 1992, 64(8): 967-972.
- [13] 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.
- [14] 方肇伦, 微流控分析芯片的制作及应用. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [15] McDonald, J. C., Duffy, D. C., Anderson, J. R., Chiu, D. T., Wu, H. K., Schueller, O. J. A., Whitesides, G. M., Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 2000, 21(1): 27-40.
- [16] Xia, Y. N., Whitesides, G. M., Soft lithography. *Annual*

- Review of Materials Science, 1998, 28: 153-184.
- [17] Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J. A., Whitesides, G. M., Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, 1998, 70(23): 4974-4984.
- [18] McDonald, J. C., Whitesides, G. M., Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Accounts of Chemical Research*, 2002, 35(7): 491-499.
- [19] 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.
- [20] Thorsen, T., Maerkl, S. J., Quake, S. R., Microfluidic large-scale integration. *Science*, 2002, 298(5593): 580-584.
- [21] Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A., Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(12): 3887-3907.
- [22] McCormick, R. M., Nelson, R. J., AlonsoAmigo, M. G., Benvegna, J., Hooper, H. H., Microchannel electrophoretic separations of DNA in injection-molded plastic substrates. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(14): 2626-2630.
- [23] Yang, Y. N., Kameoka, J., Wachs, T., Henion, J. D., Craighead, H. G., Quantitative mass spectrometric determination of methylphenidate concentration in urine using an electrospray ionization source integrated with a polymer

- microchip. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(9): 2568-2574.
- [24] Martynova, L., Locascio, L. E., Gaitan, M., Kramer, G. W., Christensen, R. G., MacCrehan, W. A., Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(23): 4783-4789.
- [25] Bowden, M., Geschke, O., Kutter, J. P., Diamond, D., CO<sub>2</sub> laser microfabrication of an integrated polymer microfluidic manifold for the determination of phosphorus. *Lab on a Chip*, 2003, 3(4): 221-223.
- [26] 周小棉, 戴., 罗勇, 刘大渔, 王辉, 毛秀丽, 吴大朋, 林炳承, 注塑型聚甲基丙烯酸甲酯多通道微流控芯片的研制和性能考察. *高等学校化学学报*, 2005, 26(1): 52-54.
- [27] Zhou, X. M., Dai, Z. P., Liu, X., Luo, Y., Wang, H., Lin, B. C., Modification of a poly(methyl methacrylate) injection-molded microchip and its use for high performance analysis of DNA. *Journal of Separation Science*, 2005, 28(3): 225-233.
- [28] Willis, P. A., Hunt, B. D., White, V. E., Lee, M. C., Ikeda, M., Bae, S., Pelletier, M. J., Grunthaner, F. J., Monolithic Teflon (R) membrane valves and pumps for harsh chemical and low-temperature use. *Lab on a Chip*, 2007, 7: 1469-1474.
- [29] Grover, W. H., von Muhlen, M. G., Manalis, S. R., Teflon films for chemically-inert microfluidic valves and pumps. *Lab on a Chip*, 2008, 8(6): 913-918.
- [30] Weibel, D. B., Kruithof, M., Potenta, S., Sia, S. K., Lee,

- A., Whitesides, G. M., Torque-actuated valves for microfluidics. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(15): 4726-4733.
- [31] Garstecki, P., Fuerstman, M. J., Fischbach, M. A., Sia, S. K., Whitesides, G. M., Mixing with bubbles: a practical technology for use with portable microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 2006, 6(2): 207-212.
- [32] Weibel, D. B., Siegel, A. C., Lee, A., George, A. H., Whitesides, G. M., Pumping fluids in microfluidic systems using the elastic deformation of poly(dimethylsiloxane). *Lab on a Chip*, 2007, 7: 1832-1836.
- [33] Pal, R., Yang, M., Johnson, B. N., Burke, D. T., Burns, M. A., Phase change microvalve for integrated devices. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(13): 3740-3748.
- [34] Pal, R., Yang, M., Lin, R., Johnson, B. N., Srivastava, N., Razzacki, S. Z., Chomistek, K. J., Heldsinger, D. C., Haque, R. M., Ugaz, V. M., Thwar, P. K., Chen, Z., Alfano, K., Yim, M. B., Krishnan, M., Fuller, A. O., Larson, R. G., Burke, D. T., Burns, M. A., An integrated microfluidic device for influenza and other genetic analyses. *Lab on a Chip*, 2005, 5(10): 1024-1032.
- [35] Liu, R. H., Yang, J. N., Lenigk, R., Bonanno, J., Grodzinski, P., Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(7): 1824-

1831.

- [36] Smits, J. G., Piezoelectric Micropump with 3 Valves Working Peristaltically. *Sensors and Actuators a-Physical*, 1990, 21(1-3): 203-206.
- [37] Jeong, O. C., Park, S. W., Yang, S. S., Pak, J. J., Fabrication of a peristaltic PDMS micropump. *Sensors and Actuators a-Physical*, 2005, 123-24: 453-458.
- [38] Wu, H. K., Wheeler, A., Zare, R. N., Chemical cytometry on a picoliter-scale integrated microfluidic chip. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(35): 12809-12813.
- [39] Hansen, C. L., Classen, S., Berger, J. M., Quake, S. R., A microfluidic device for kinetic optimization of protein crystallization and in situ structure determination. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(10): 3142-3143.
- [40] 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.
- [41] Hansen, C. L., Sommer, M. O. A., Quake, S. R., Systematic investigation of protein phase behavior with a microfluidic formulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(40): 14431-14436.
- [42] Urbanski, J. P., Thies, W., Rhodes, C., Amarasinghe, S., Thorsen, T., Digital microfluidics using soft lithography. *Lab*

- on a Chip, 2006, 6(1): 96-104.
- [43] Marcus, J. S., Anderson, W. F., Quake, S. R., Microfluidic single-cell mRNA isolation and analysis. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(9): 3084-3089.
- [44] Agrawal, N., Toner, M., Irimia, D., Neutrophil migration assay from a drop of blood. *Lab on a Chip*, 2008, 8(12): 2054-2061.
- [45] Lau, B. T. C., Baitz, C. A., Dong, X. P., Hansen, C. L., A complete microfluidic screening platform for rational protein crystallization. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129: 454-455.
- [46] Kamei, K. I., Guo, S. L., Yu, Z. T. F., Takahashi, H., Gschwend, E., Suh, C., Wang, X. P., Tang, J. G., McLaughlin, J., Witte, O. N., Lee, K. B., Tseng, H. R., An integrated microfluidic culture device for quantitative analysis of human embryonic stem cells. *Lab on a Chip*, 2009, 9(4): 555-563.
- [47] Kartalov, E. P., Quake, S. R., Microfluidic device reads up to four consecutive base pairs in DNA sequencing-by-synthesis. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(9): 2873-2879.
- [48] 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.
- [49] Jen, C. P., Wu, C. Y., Lin, Y. C., Wu, C. Y., Design and

- simulation of the micromixer with chaotic advection in twisted microchannels. *Lab on a Chip*, 2003, 3(2): 77-81.
- [50] Xia, H. M., Wan, S. Y. M., Shu, C., Chew, Y. T., Chaotic micromixers using two-layer crossing channels to exhibit fast mixing at low Reynolds numbers. *Lab on a Chip*, 2005, 5(7): 748-755.
- [51] Song, H., Tice, J. D., Ismagilov, R. F., A microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2003, 42(7): 768-772.
- [52] Liu, R. H., Yang, J. N., Pindera, M. Z., Athavale, M., Grodzinski, P., Bubble-induced acoustic micromixing. *Lab on a Chip*, 2002, 2(3): 151-157.
- [53] Knight, J. B., Vishwanath, A., Brody, J. P., Austin, R. H., Hydrodynamic focusing on a silicon chip: Mixing nanoliters in microseconds. *Physical Review Letters*, 1998, 80(17): 3863-3866.
- [54] Ryu, K. S., Shaikh, K., Goluch, E., Fan, Z. F., Liu, C., Micro magnetic stir-bar mixer integrated with parylene microfluidic channels. *Lab on a Chip*, 2004, 4(6): 608-613.
- [55] Chou HP, U. M., Quake SR, A Microfabricated Rotary Pump. *Biomedical Microdevices* 2001, 3: 323-330.
- [56] 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.
- [57] Gomez-Sjoberg, R., Leyrat, A. A., Pirone, D. M., Chen, C. S., Quake, S. R., Versatile, fully automated, microfluidic cell culture system. *Analytical Chemistry*, 2007, 79: 8557-8563.
- [58] Balagadde, F. K., You, L. C., Hansen, C. L., Arnold, F. H., Quake, S. R., Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. *Science*, 2005, 309(5731): 137-140.
- [59] 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.
- [60] Liu, C. N., Toriello, N. M., Mathies, R. A., Multichannel PCR-CE microdevice for genetic analysis. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(15): 5474-5479.
- [61] Lagally, E. T., Emrich, C. A., Mathies, R. A., Fully integrated PCR-capillary electrophoresis microsystem for DNA analysis. *Lab on a Chip*, 2001, 1(2): 102-107.
- [62] 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.
- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] 林炳承, 毛细管电泳导论. 北京: 科学出版社, 1996.
- [66] 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.
- [67] 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.
- [68] 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.

- [69] 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.
- [70] 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.
- [71] 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.
- [72] 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.
- [73] 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.
- [74] Alarie, J. P., Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., Electrophoretic injection bias in a microchip valving scheme. *Electrophoresis*, 2001, 22(2): 312-317.

- [75] 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.
- [76] 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.
- [77] 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.
- [78] Solignac, D., Gijs, M. A. M., Pressure pulse injection: a powerful alternative to electrokinetic sample loading in electrophoresis microchips. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(7): 1652-1657.
- [79] 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.
- [80] Wu, D. P., Qin, J. H., Lin, B. C., Electrophoretic separations on microfluidic chips. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1184(1-2): 542-559.
- [81] 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.
- [82] 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.
- [83] 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.
- [84] 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.
- [85] 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.
- [86] Chen, D., Du, W. B., Liu, Y., Liu, W. S., Kuznetsov, A.,

- Mendez, F. E., Philipson, L. H., Ismagilov, R. F., The chemistode: A droplet-based microfluidic device for stimulation and recording with high temporal, spatial, and chemical resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(44): 16843-16848.
- [87] 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.
- [88] Dang, F. Q., Tabata, O., Kurokawa, M., Ewis, A. A., Zhang, L. H., Yamaoka, Y., Shinohara, S., Shinohara, Y., Ishikawa, M., Baba, Y., High-performance genetic analysis on microfabricated capillary array electrophoresis plastic chips fabricated by injection molding. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(7): 2140-2146.
- [89] Dang, F., Shinohara, S., Tabata, O., Yamaoka, Y., Kurokawa, M., Shinohara, Y., Ishikawa, M., Baba, Y., Replica multichannel polymer chips with a network of sacrificial channels sealed by adhesive printing method. *Lab on a Chip*, 2005, 5(4): 472-478.
- [90] 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.
- [91] 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.
- [92] Chabinyk, M. L., Chiu, D. T., McDonald, J. C., Stroock, A. D., Christian, J. F., Karger, A. M., Whitesides, G. M., An integrated fluorescence detection system in poly(dimethylsiloxane) for microfluidic applications. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(18): 4491-4498.
- [93] Mogensen, K. B., Kwok, Y. C., Eijkel, J. C. T., Petersen, N. J., Manz, A., Kutter, J. P., A microfluidic device with an integrated waveguide beam splitter for velocity measurements of flowing particles by Fourier transformation. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(18): 4931-4936.
- [94] Tan, Y. C., Fisher, J. S., Lee, A. I., Cristini, V., Lee, A. P., Design of microfluidic channel geometries for the control of droplet volume, chemical concentration, and sorting. *Lab on a Chip*, 2004, 4(4): 292-298.
- [95] Song, H., Chen, D. L., Ismagilov, R. F., Reactions in droplets in microfluidic channels. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, 45(44): 7336-7356.
- [96] Zheng, B., Tice, J. D., Ismagilov, R. F., Formation of droplets of in microfluidic channels alternating composition

- and applications to indexing of concentrations in droplet-based assays. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(17): 4977-4982.
- [97] Paik, P., Pamula, V. K., Pollack, M. G., Fair, R. B., Electrowetting-based droplet mixers for microfluidic systems. *Lab on a Chip*, 2003, 3(1): 28-33.
- [98] Thorsen, T., Roberts, R. W., Arnold, F. H., Quake, S. R., Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Physical Review Letters*, 2001, 86(18): 4163-4166.
- [99] Srisa-Art, M., deMello, A. J., Edel, J. B., High-throughput DNA droplet assays using picoliter reactor volumes. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(17): 6682-6689.

## 第二章 微泵阀芯片控制系统及关键技术研究

### 2.1 引言

设计并搭建了微泵阀芯片控制系统, 自主设计的电路板可以通过计算机串口同时独立控制十六路电磁阀和一个高压电源装置, 自行编写了相关电磁阀控制程序和下位机电路控制程序。设计制作了两种不同类型的微泵阀芯片(玻璃-PDMS 杂交芯片和 PDMS), 对微泵阀制作工艺及其相关性能进行了考察, 解析了芯片中微阀大小、时间和流速之间的相互关系。

### 2.2 实验部分

#### 2.2.1 零配件及试剂

石英铬版购自长沙韶光微电子有限公司(长沙, 中国), 荧光素钠购自天津染料研究所。聚二甲基硅氧烷(PDMS)购自 Dow Corning 公司(Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA), SU-8 2025 型和 2075 型光刻胶均购自 Microchem 公司, 正胶 AZ4260 购自 AZ 公司(AZ electric material company)。乳酸乙酯、异丙醇和二甲基亚砷(DMSO)均购自沈阳化学试剂厂。水全部采用二次蒸馏水。

SC-1B 型匀胶机购自北京创威纳科技有限公司。紫外光刻机购自 ThermoOriel 公司。IX-71 型倒置荧光显微镜购自 Olympus 公司(Japan)。等离子体清洗器购自 Harrick 公司。仪器采用自制的微泵阀芯片控制装置, 主控芯片采用 silicon labs 的 C8051F350 型芯片。电路板采用 protel 软件自行设计, 高压元件: EMCO C40 高压模块(最大输出为 4000V, 美国 EMCO

公司), 电磁阀: LHDA 0523111H ( Lee 公司, 美国)

### 2.2.2 仪器的原理及设计

我们自行设计并搭建了微泵阀芯片控制装置, 其外观及内部电路如图 2-1 所示。

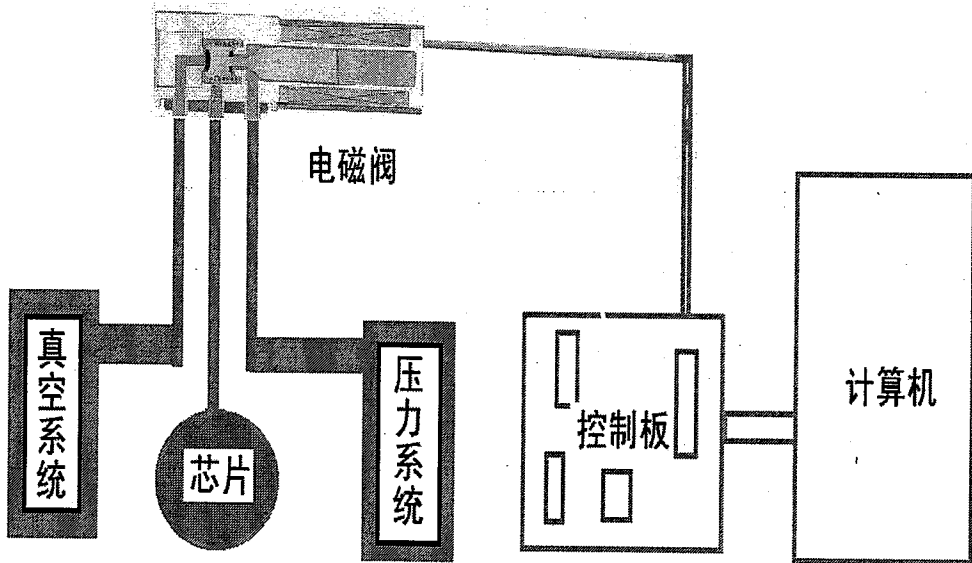


图 2-1 微泵阀控制系统示意图

Fig. 2-1 The schematic of pneumatic microvalve system.

系统采用 silicon labs 的 C8051F350 作为电路板主控芯片, 通过 CP2101 连接的 USB 口发送和采集信号, 由单片机通过 I/O 控制原件可以独立控制 16 路电磁阀的开启关闭状态, 上位机程序采用 Visual Basic 编写, 下位机 C8051F350 中程序采用 C++ 语言编写。电磁阀采用 lee 公司产品 (LHDA

0523111H, Lee Co., USA), 具有死体积小, 响应时间短(频率最高可达 1Hz), 电磁阀采用两路三通构架, 含有两路进气口(正向压力/负向压力)和一路出气口, 出口处由导气管连接到芯片泵阀控制气路入口, 通过程序控制可实时快速的为微阀提供正向压力和负向压力, 来提供微阀工作时 PDMS 产生形变所需压力。同时系统还有 1 个 EMC0-C40 高压电源模块和接地模块, 高压模块可以给仪器提供 4000V 高压, 并通过 VB 程序实现控制。

### 2.2.3 芯片微泵阀控制系统程序设计

软件采用 Visual Basic 软件编写[1], 早期程序如图 2-2 所示, 只能简单控制 3 路电磁阀, 同时因只采用了一个 Timer 控件对电磁阀进行控制, 所以控制过程中的 6 步中阀的频率相同, 仅能满足简单实验所需。

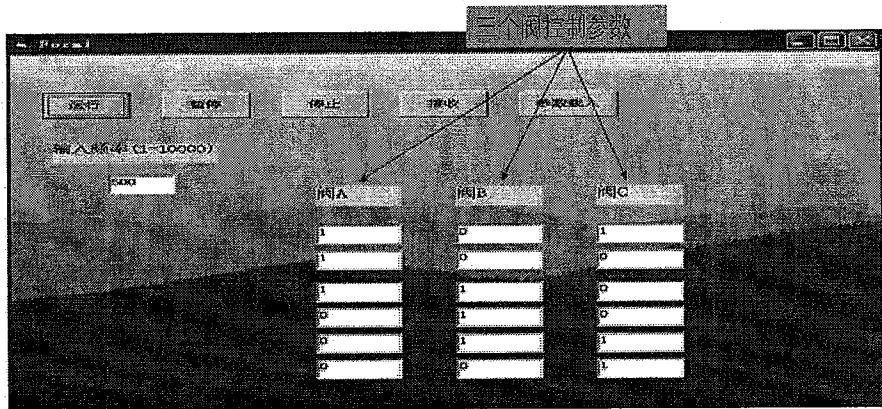


图 2-2 早期三路微阀控制程序界面

Fig.2-2 The program for controlling 3-port solenoid valves at earlier time

随着试验的进一步深入, 上述程序已经很难满足试验的需要, 因此对程

序重新进行了设计,优化后的程序界面如图 2-3 所示。通过计算机串口进行通讯,用二进制数值“1”和“0”来代表微阀的开关状态,可以独立控制十六路电磁阀。并且通过发送指令的方式可以同时控制一个 4000 伏的高压电源,用于电泳分离工作。

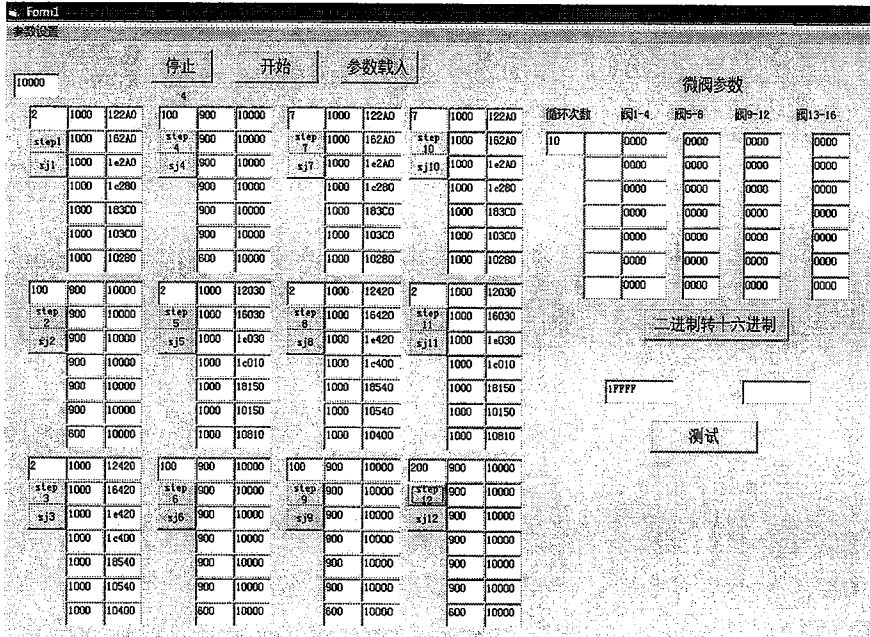


图 2-3 十六路微阀控制程序主界面

Fig. 2-3 The program for controlling 16-port solenoid valves.

主程序中包括电磁阀参数转换程序、电磁阀控制程序、文件管理程序以及串口通讯设置等模块。

### 2.2.3.1 参数转换程序

从图 2-4 可以看出,软件中的程序可以分别独立控制 16 路电磁阀,完全能够满足实验的要求。微阀开启和关闭的状态分别由二进制“1”或者

“0”表示，4个为一组，通过二进制转十六进制程序，可以将4个二进制代码转换为一个十六位进制代码；16路电磁阀只需要4个十六进制数组即可实现，通过这个设计，大大提高了计算机和单片机中数据传输的效率，为实现更多电磁阀的控制提供了一种可靠迅速的解决方法。

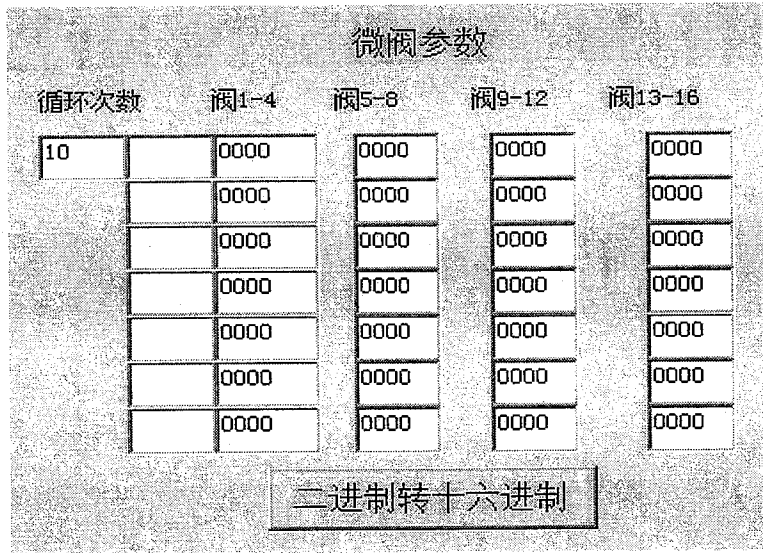


图 2-4 十六路电磁阀参数转换程序图模块

Fig.2-4 The picture of 16-port solenoid valves' binary- to-hex number parameter change program

### 2.2.3.2 电磁阀控制程序

电磁阀控制程序如图 2-5 所示，程序一共有 12 个循环步数，其中每个循环又分为 7 小步，可以对其过程中所有电磁阀状态和所需要的制动时间 (actuation time) 进行实时控制。点击相应的载入按钮，可以将图 2-5 中的十六进制参数自动载入到相应的阀状态参数中，时间控件采用 VB 的 TIMER 控件。采用该程序可以实现 16 路电磁阀独立实时控制。

2	1000	122A0	100	900	10000	7	1000	122A0	7	1000	122A0
step1	1000	162A0	step 4	900	10000	step 7	1000	162A0	step 10	1000	162A0
sj1	1000	1e2A0	sj4	900	10000	sj7	1000	1e2A0	sj10	1000	1e2A0
	1000	1c280		900	10000		1000	1c280		1000	1c280
	1000	183C0		900	10000		1000	183C0		1000	183C0
	1000	103C0		900	10000		1000	103C0		1000	103C0
	1000	10280		600	10000		1000	10280		1000	10280
100	900	10000	2	1000	12030	2	1000	12420	2	1000	12030
step 2	900	10000	step 5	1000	16030	step 8	1000	16420	step 11	1000	16030
sj2	900	10000	sj5	1000	1e030	sj8	1000	1e420	sj11	1000	1e030
	900	10000		1000	1c010		1000	1c400		1000	1c010
	900	10000		1000	18150		1000	18540		1000	18150
	900	10000		1000	10150		1000	10540		1000	10150
	600	10000		1000	10810		1000	10400		1000	10810
2	1000	12420	100	900	10000	100	900	10000	200	900	10000
step 3	1000	16420	step 6	900	10000	step 9	900	10000	step 12	900	10000
sj3	1000	1e420	sj6	900	10000	sj9	900	10000	sj12	900	10000
	1000	1c400		900	10000		900	10000		900	10000
	1000	18540		900	10000		900	10000		900	10000
	1000	10540		900	10000		900	10000		900	10000
	1000	10400		600	10000		600	10000		600	10000

图 2-5 电磁阀控制程序界面

Fig.2-5 The program interface for controlling the solenoid valves.

### 2.2.3.4 文件管理程序

在实验的开始阶段，电磁阀的参数不能保存，每次实验需要输入大量的控制参数，给实验造成了极大不便。因此对程序进行了改进，增加了文件管理界面，通过调用 VB 的 commondialog、richtextbox 等组件将所有参数，包

括微阀状态、循环时间、循环步骤以 txt 文件的形式进行实时保存和读取，方便了下次实验时进行调用，省去了每次输入大量实验参数的重复劳动；更为重要的是，这种直接保存和读取方式完全避免了输入过程中的误输入带给实验的不利影响。程序界面如图 2-6 所示。

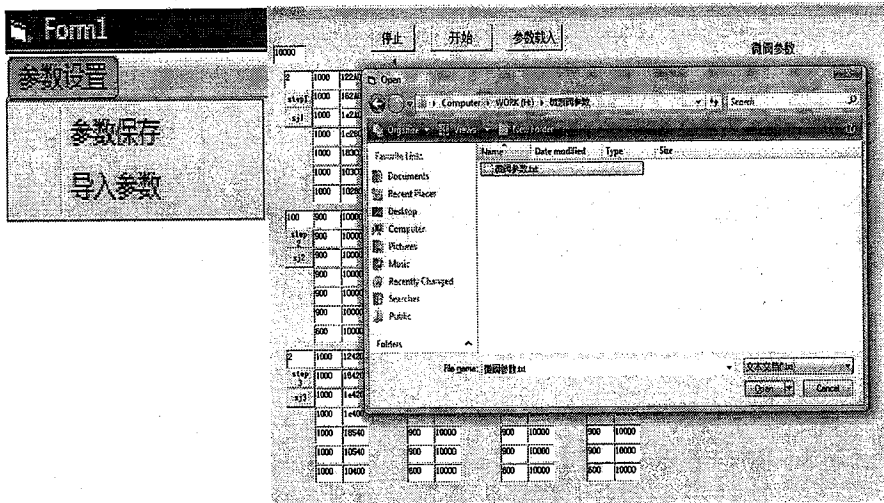


图 2-6 文件管理程序模块

Fig.2-6 The program module for file management.

### 2.2.3.3 串口通讯设置

对程序的通讯进行了设置，主要采用 VB 里的 MSComm 模块进行上位机和下位机的通讯联系，如图 2-7 所示，通讯协议采取串口通讯协议 (115200, n, 8, 1)，波特率为 115200，端口号设置为 3。

编写方案参照了相关书籍[2, 3]。并选用串口助手软件协助调试，加快了调试速度。

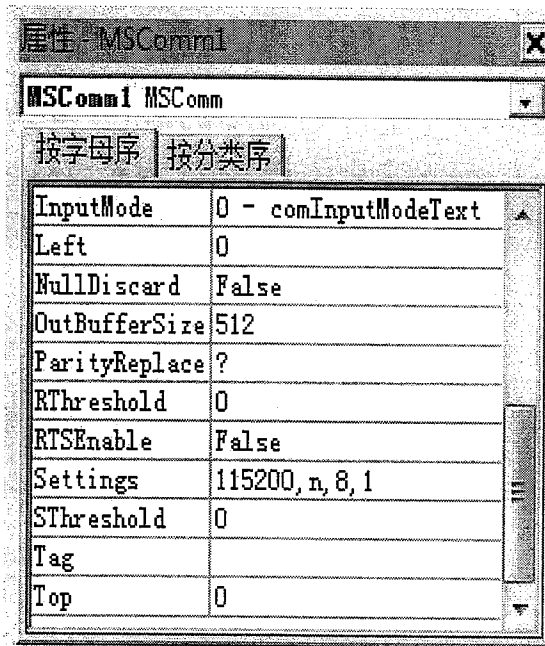


图 2-7 串口通讯设置模块

Fig. 2-7 Serial port communication setting.

## 2.2.4 芯片微泵阀控制系统硬件设计

### 2.2.4.1 控制电路设计

控制电路采用 protel 软件进行设计(与姜雷共同设计),图 2-8A 为电路原理图,图 2-8B 为电路板 PCB 图。控制板基于 silicon 公司的八位单片机 C8051F350,系统时钟为 24M。通过 I/O 口控制 ULN2803 原件实现对多路电磁阀和高压电源的控制。

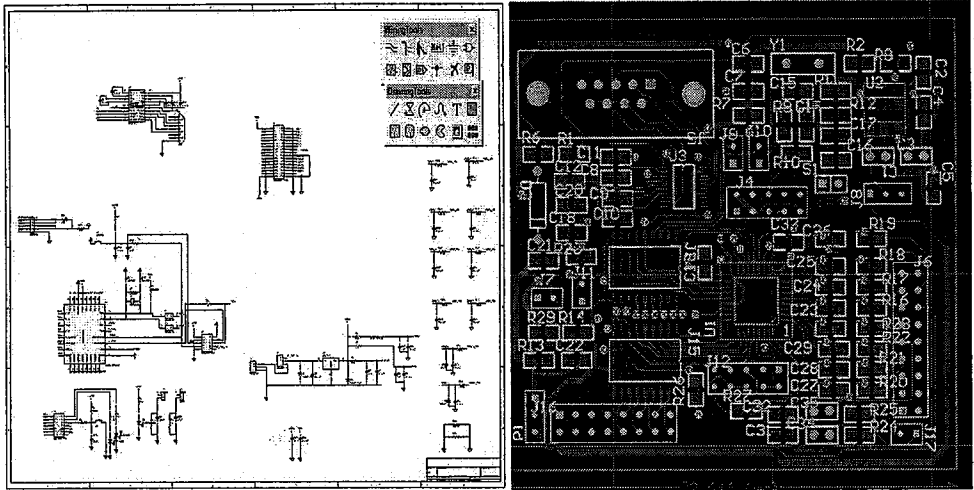


图 2—8 微泵阀控制装置原理图和 PCB 设计图

Fig.2-8 Schematic of the home-made controlling pneumatic valves device.

下图 2—9A 为微泵阀控制装置实物图,图 2—9B 为十六路电磁阀实物图。

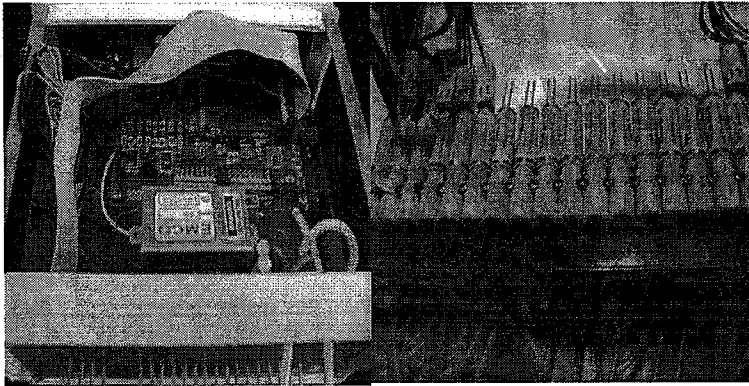


图 2—9 (A) 微泵阀芯片控制装置实物图 (B)十六路电磁阀实物图。

Fig.2-9 (A) The photograph of pneumatic microvalve device (B)The picture of solenoid valves.

### 2.2.4.2 电路板程序设计

单片机 C8051F350 程序开发工具为 silicon lab IDE 软件, 采用 C++ 语言编写, 程序设计方法参照单片机 C 语言编程书籍[4, 5], 通过计算机串口发送和接收协议及指令, 通过 I/O 实现对仪器电磁阀和高压电源的控制。单片机 C8051F350 开发界面如下图所示。发送数据格式为“1XXXX”或者“2XXXX”, 其中“XXXX”代表十六位进制数值, 当第一个字母为“1”时, 将后四位十六进制数值转换为 16 位二进制数值, 对电磁阀开关状态进行操控。当第一个字母为“2”时, 将后四位十六进制数值转换为电压值, 控制高压电源电压输出。因此可以在此仪器上同时实现电磁阀状态和高压电源电压输出的控制, 为第三章和第四章的工作搭建了技术平台。

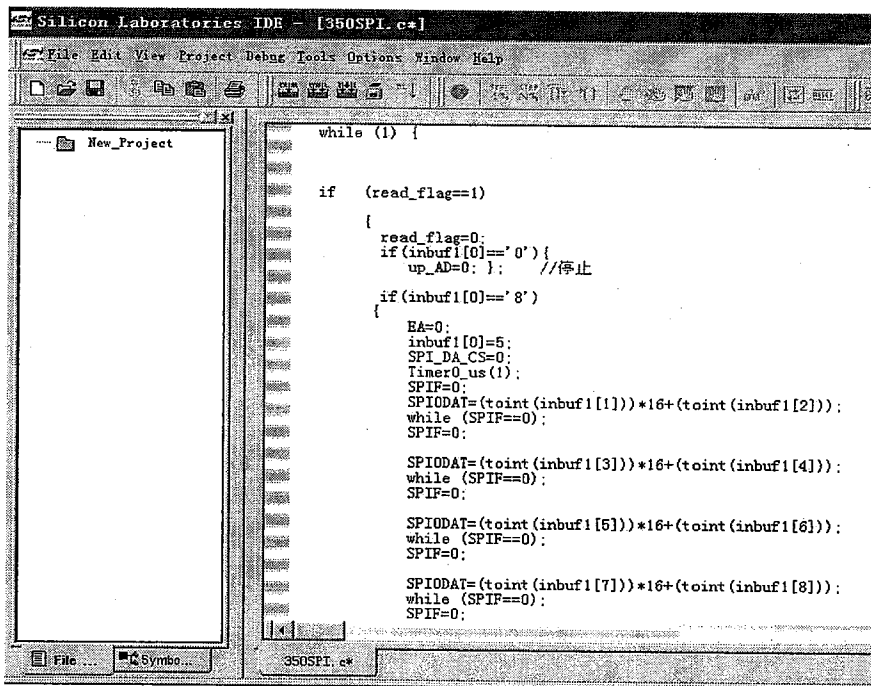


图 2-10 单片机程序开发界面图

Fig.2-10 The interface for writing microprogrammed control unit(MCU)' s program.

## 2.2.5 微泵阀芯片制作

### 2.2.5.1 PDMS - PDMS 芯片制作

PDMS 芯片采用上推 (push up) 型构架。

将玻璃片或硅片放入  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  煮沸半个小时, 然后于  $200\text{ }^\circ\text{C}$  烘箱加热脱水, 自然冷却至室温。

SU8 模板制作:

将 45 毫米厚的 SU8-2025 胶甩于硅片上, 在烘箱中,  $65\text{ }^\circ\text{C}$  烘烤 15 分钟, 升温至  $90\text{ }^\circ\text{C}$  烘烤 10 分钟。

紫外曝光 30 秒后, 将曝光后的芯片重新放于烘箱中烘烤,  $65\text{ }^\circ\text{C}$  15 分钟,  $90\text{ }^\circ\text{C}$  10 分钟。自然冷却后取出。显影液显影完全后, 于  $190\text{ }^\circ\text{C}$  烘箱中坚膜一个小时。

正胶模板制作:

将正胶 AZ-4260 平铺于芯片上, 调节匀胶机转速为 1500rpm, 得到厚度大约为  $13\mu\text{m}$  的正胶。甩胶完毕, 将硅片放于  $110\text{ }^\circ\text{C}$  热板上加热 3 分钟。然后曝光 70 秒, 用显影液显影完全即可使用。如果需要弧形通道, 需要对上述模板加热成弧 (reflow)。Reflow 时, 将模板放置  $140\text{--}145\text{ }^\circ\text{C}$  的烘箱中烘烤 40 分钟, 自然冷却即可。

配置单体和引发剂比例分别为 20: 1 和 5: 1 的 PDMS [6, 7]。

液路层制作:将 5:1 的 PDMS 倒于 SU8 模板上,在 80 °C 烘箱中恒温 15 分钟取出后与模板剥离,得到带有微通道的 PDMS 液路层。

气路层制作:将 20:1 的 PDMS 平铺于正胶模板上,调节转速为 1500rpm,得到厚度大约为 35 $\mu\text{m}$  的气路层,放置于 80 °C 烘箱中恒温 15 分钟取出。

在显微镜下将带有微通道的 PDMS 液路层和气路层对准后,于 80 °C 烘箱中恒温 1 个小时。由于分子扩散作用,不同比例的 PDMS 会在两层芯片封接处形成稳定的交联结构。最后将该芯片从正胶模板剥离,打孔,与干净的玻璃基片不可逆封接完成整个芯片的制作过程。

#### 2.2.5.2 玻璃-PDMS 杂合芯片制作

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。三层构架上层为液体流路层,通道宽 80 $\mu\text{m}$ ,深 20 $\mu\text{m}$ ;下层为气路通道,通道宽 200 $\mu\text{m}$ ,深 80 $\mu\text{m}$ 。四层构架中先将液路芯片与玻璃基片高温键和,再与 PDMS 和气路芯片可逆封接。

PDMS 薄膜购自 Rogers 公司 (HT6240, Bisco Silicones, Rogers, Shanghai, China),也可采用夹膜的方法制作,将光滑玻璃基片在二氯甲基硅烷蒸气中放置 5 分钟取出,然后将 10:1 的 PDMS 液体倒于此玻璃基片上,基片四角各垫一 250 $\mu\text{m}$  厚度的垫片,除去气泡后用另一玻璃片夹合,在 80 °C 烘箱固化 60 分钟后取出,于超净台中将 PDMS 薄膜和玻璃片分开,即可得到实验所需 PDMS 薄膜。

在超净环境中,将上述 PDMS 薄膜可逆封接于含有气路和液路玻璃芯片中

间,将四角用夹子夹子夹紧,放置于80℃烘箱中恒温10分钟后取出,将其自然冷却至室温,在气路入口施加正负压,确认每个阀开启关闭状态良好后即可使用。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 PDMS-PDMS 型微泵阀

2000年,Quake课题组提出了利用PDMS的自身弹性,通过多层软光刻技术来实现芯片中的微阀微泵集成[8]。并在2002年利用这一技术实现了微泵阀的大规模集成[9]。

PDMS 构架微泵阀就是指芯片包括液体流路层和气路控制层,全部采用PDMS材质,我们简称其为“Quake型”微泵阀,根据微阀薄膜和液路通道位置的不同,分为“push down(下压型)”和“push up(上推型)”两种类型(如图1-6C所示)[10],其制作过程基本相同。但是“push down(下压型)”微阀需要较大的压力才能关闭微阀,因此本论文中“PDMS-PDMS微泵阀”都采用“上推型”构架,气路控制层模板由SU8制作,液体流路层模板采用正胶AZ4260制作[6]。

#### 2.3.1.1 PDMS 微阀弹性形变的理论推导

对于一个周围固定的弹性圆形薄膜,在施加均匀分布的压力P之后,薄膜的变形由下面的公式2-1给出[11],

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

其中,P—压力,E—Young's 模量,ν—Possion比,t—厚度,R—薄膜的