

图 4-1 以蜡为疏水性材料制备普通纸质微流控芯片 A 用蜡制备纸芯片的三种方法：1) 蜡笔描绘；2) 喷墨打印结合蜡笔描绘；3) 喷蜡打印；B 用三种方法分别制备的纸芯片；C 喷蜡打印的滤纸在烘烤前后背面的变化比较。

Figure 4-1 A Schematic illustration of the processes to produce patterned paper with wax ① hand drawing with a wax pen; ② printing

with an inkjet printer followed by painting with a wax; ③ printing with a wax printer; B The images of filter paper patterned with wax in three different ways a hand drawing with a wax pen; b printing with an inkjet printer followed by painting with a wax pen; c printing with a wax printer directly; C Comparison of the back side of patterned paper produced by wax printer before and after heating in oven (150 °C). a before heating; b after heating (1 mm is the width of the micro-channels).

2, 首先在电脑上设计所需要的图案, 用喷墨打印机 (HP LaserJet 1000 series, USA) 在滤纸上打印出图案, 然后再用蜡笔和烘箱完成方法 1 中的步骤, 即可得到纸芯片 (图 4-1B (b))。

3, 首先在电脑上设计所需要的各种图案, 然后用喷蜡打印机在滤纸上打印出来 (打印分辨率为 2400 dpi × 2400 dpi) [19, 20], 这样滤纸表面上就粘附有一薄层蜡, 再将其放入烘箱中烘烤。在此过程中, 蜡会熔化并透过滤纸, 形成封闭的亲疏水相间的区域, 得到了所需的纸芯片 (图 4-1B (c))。滤纸在烘箱中烘烤的时间取决于烘烤的温度, 比如烘烤的温度为 110°C, 则需要 5 min 的时间让蜡透过滤纸。如果将温度提高到 130°C, 则整个过程则只需要 30 s。我们在实验中采用 150°C 烘箱中烘烤 2 min 的条件, 以缩短蜡扩散达到平衡的时间。图 4-1 C 中为喷蜡打印 1mm 的渠道的背面在烘箱中烘烤前后的比较, 从图片中可以看到蜡在烘烤的过程中熔化并透过了滤纸, 形成了封闭的亲水通道。同时由于蜡的扩散, 1mm 的渠道在烘烤之后缩小为 500 μm。

4.3 结果与讨论

4.3.1 以蜡为疏水性材料快速制备普通纸质微流控芯片

以蜡为疏水性材料制备纸芯片包括三种方法：1) 蜡笔描绘；2) 喷墨打印结合蜡笔描绘；3) 喷蜡打印。第一种方法简单快速，可以减少对昂贵设备的依赖，但是所形成的图案比较简单，通道边缘比较粗糙。第二种方法可以得到比第一种方法稍微复杂的图形，但通道边缘仍嫌粗糙。第三种方法喷蜡打印的方法最为优越，也最具有发展潜力。喷蜡打印简便、直接、快速（1分钟可以打印 30 张 A4 尺寸的纸），成本低，非常适合于大规模制备、生产低成本的纸芯片。

4.3.2 用蜡制备的纸芯片的性能考察

我们首先用绿色染料溶液对用蜡制备的纸芯片进行了性能考察。在一个放射状纸芯片的中心加样区加入绿色染料溶液，溶液在表面张力的作用下立即浸润了滤纸，并沿着蜡限定的通道向 6 个分支通道流动。从图 2 可以看出，绿色溶液没有流出蜡限定的区域，蜡很好的完成了其作为疏水性围堰的作用。

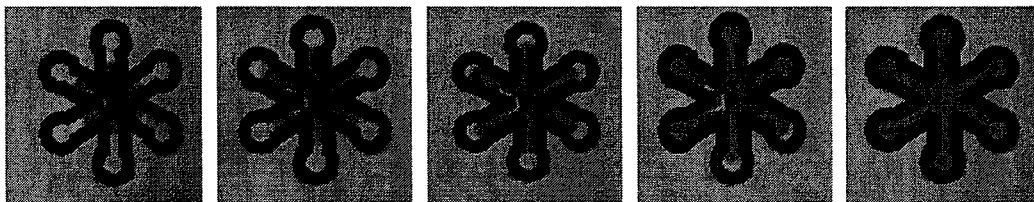


图 4-2 绿色染料溶液在纸芯片上的流动

Figure 4-2 Demonstration of the performance of patterned paper to form defined microchannels by filling the green ink solution (green ink is absorbed by capillary force present in paper).

然后在同样设计的纸芯片上进行了简单的显色反应。首先在如图 4-3 所示的纸芯片的 3 个相间通道中加入 0.2 mL 5×10^{-5} mol/L HRP (辣根过氧化物酶) 溶液, 让其在空气中自然干燥, 然后在中心加液处加入 HRP 的底物 TMB 溶液[21]。从图 4-3B 中可以看出, 预先加有酶溶液的地方发生了酶反应, 蓝色反应产物沉积在酶的位置, 而没有加酶溶液的位置则没有蓝色产物生成。这说明 6 个通道的反应没有相互干扰。将混入一定的杂质的 TMB 溶液加入同样的预先储存有 HRP 的纸芯片上, 从图 4-3C 中可以看出, 这些杂质可以被滤纸所截留, 具有一定的样品预处理能力。

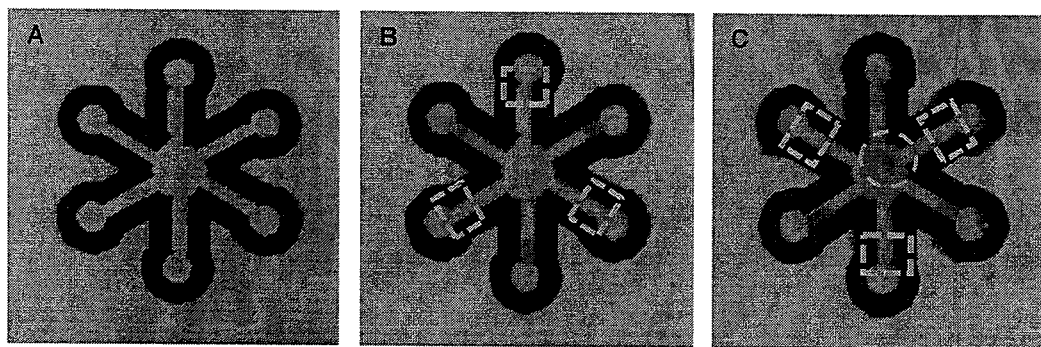


图 4-3 利用酶和底物反应考察纸芯片

Figure 4-3 Image results of colorimetric assay between HRP and TMB
A spotted the HRP reagent; B HRP reacted with TMB to produce blue color products ;C HRP reacted with TMB contaminated with dirt (the green dashed line showed the control channels and the orange dashed circle showed the dirt retained on the paper).

4.3.3 用蜡制备的纸芯片的方法与光刻等方法的比较

与文献报道的方法相比, 我们采用蜡制备纸芯片的方法具有如下的优点:

1, 成本低廉。光刻的方法需要用到的光刻胶、曝光机、掩模等, 而用蜡

的方法在只需要喷蜡打印机（甚至蜡笔）和烘箱，物料成本大大降低。

2, 制备方法简便, 速度快。光刻的方法过程繁琐, 有匀胶, 前烘, 曝光, 后烘, 显影和固化等步骤, 整个耗时为几个小时甚至一天。而现行方法仅有打印与烘烤两个步骤, 整个过程可以在 10 min 之内完成。

3, 环保。光刻的制作方法中到的光刻胶、显影剂等均有有机溶剂的存在, 而本方法则不需要有机溶剂, 同时用蜡制备的纸芯片在用完之后可以进行焚烧处理, 更为环保。

但是上述用蜡制备纸芯片也有一些缺点, 由于目前所用滤纸的孔径较大, 蜡扩散的过程较快, 难以控制, 因而得到的通道边缘较粗糙, 尺寸分辨率无法同光刻技术相比。在本论文的第五章, 我们采用孔径均匀、精细的滤纸如硝酸纤维素膜代替普通滤纸, 这一状况得到很大的改善。同时, 蜡可以被很多有机溶剂所溶解, 因而用蜡制备的纸芯片不适合涉及到有机溶剂的应用。对于以生物体液如血清、尿样等的生化反应的应用, 上述纸芯片则完全可以满足要求。

4.3.4 用蜡制备的纸芯片用于 BSA 与葡萄糖的生化分析

我们在对蜡制备的纸芯片进行了初步考察后, 在上面进行 BSA (牛血清白蛋白) 和葡萄糖的检测, 实验原理是利用干化学方法在纸芯片预先储存检测试剂, 然后加样完成显色反应, 得到检测结果。对于 BSA 检测: 首先在试纸的通道的外围圆处加入 $0.5\ \mu\text{L}$ 的 0.3M 的柠檬酸缓冲液 ($\text{pH}=1.8$), 然后上面加上 $0.5\ \mu\text{L}$ 的溴酚蓝溶液 (3.3mM 乙醇溶液) [22]; 对于葡萄糖检测: 首先在试纸的通道的外围圆处滴加 $0.5\ \mu\text{L}$ 的碘化钾溶液 (0.6M), 然后上面滴加 $0.5\ \mu\text{L}$ 的辣根过氧化物酶和葡萄糖氧化酶的溶液 [9, 16, 23]。待上面的溶液在空气中干燥后, 在中心加样处加入葡萄糖和 BSA 的混合溶液, 样

品会自动流向各个分支，并与上面的干燥试剂反应并显色。其中 BSA 会在酸性条件下于溴酚蓝反应得到蓝色产物，葡萄糖会在葡萄糖氧化酶与辣根过氧化物酶的催化反应下于碘化钾反应产生黄色产物。产物颜色越深，表明其对应的分析物浓度越高，显色结果如图 4-4 所示。

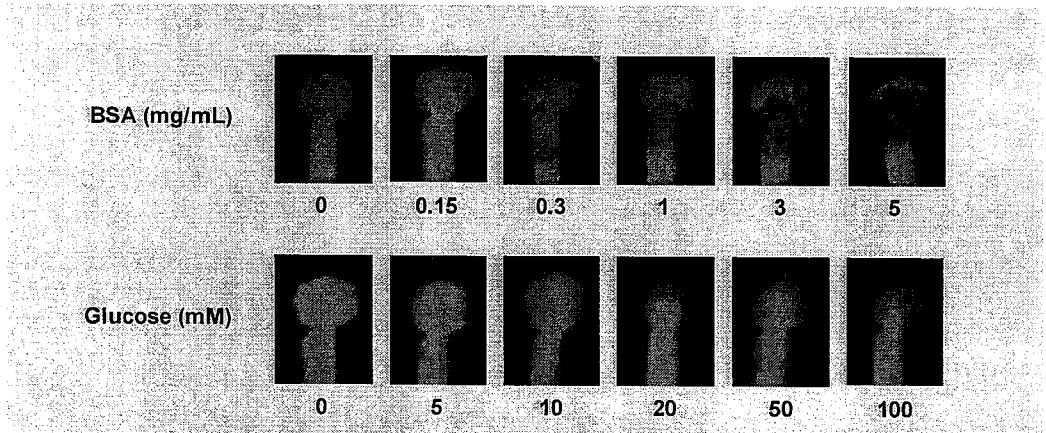


图 4-4 纸芯片上牛血清白蛋白和葡萄糖生化检测的结果

Figure 4-4 BSA and glucose assay on patterned paper with varied concentrations

4.4 本章小结

我们采用蜡作为疏水性材料结合普通滤纸制备了纸芯片，成本低廉，制备方法简单，制备过程快速、环保。特别是所提出的喷蜡打印的方法，制备速度特别快、操作可以自动化，具有大规模制备一次性使用的纸芯片的应用前景。

参考文献

- [1] Becker, H., Locascio, L. E., Polymer microfluidic devices. *Talanta*, 2002, 56(2): 267-287.
- [2] 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.
- [3] Miki, N., Wafer bonding techniques for MEMS. *Sensor Letters*, 2005, 3(4): 263-273.
- [4] Peterson, D. S., Solid supports for micro analytical systems. *Lab on a Chip*, 2005, 5(2): 132-139.
- [5] Becker, H., Gartner, C., Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis*, 2000, 21(1): 12-26.
- [6] Wang, J., Pumera, M., Chatrathi, M. P., Escarpa, A., Konrad, R., Griebel, A., Dorner, W., Lowe, H., Towards disposable lab-on-a-chip: Poly(methylmethacrylate) microchip electrophoresis device with electrochemical detection. *Electrophoresis*, 2002, 23(4): 596-601.
- [7] Zhan, W., Seong, G. H., Crooks, R. M., Hydrogel-based microreactors as a functional component of microfluidic systems. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(18): 4647-4652.
- [8] Becker, H., Gartner, C., Polymer microfabrication technologies

- for microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 390(1): 89-111.
- [9] Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J., Whitesides, G. M., Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, 46(8): 1318-1320.
- [10] Martinez, A. W., Phillips, S. T., Wiley, B. J., Gupta, M., Whitesides, G. M., FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 2008, 8(12): 2146-2150.
- [11] Zhao, W. A., van den Berg, A., Lab on paper. *Lab on a Chip*, 2008, 8(12): 1988-1991.
- [12] Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M., Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(50): 19606-19611.
- [13] Abe, K., Suzuki, K., Citterio, D., Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(18): 6928-6934.
- [14] Li, X., Tian, J. F., Nguyen, T., Shen, W., Paper-Based Microfluidic Devices by Plasma Treatment. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(23): 9131-9134.
- [15] Bruzewicz, D. A., Reches, M., Whitesides, G. M., Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define

- microchannels in paper. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(9): 3387-3392.
- [16] Martinez, A. W., Phillips, S. T., Carrilho, E., Thomas, S. W., Sindi, H., Whitesides, G. M., Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(10): 3699-3707.
- [17] Ellerbee, A. K., Phillips, S. T., Siegel, A. C., Mirica, K. A., Martinez, A. W., Striehl, P., Jain, N., Prentiss, M., Whitesides, G. M., Quantifying Colorimetric Assays in Paper-Based Microfluidic Devices by Measuring the Transmission of Light through Paper. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(20): 8447-8452.
- [18] Dungchai, W., Chailapakul, O., Henry, C. S., Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(14): 5821-5826.
- [19] Kaigala, G. V., Ho, S., Penterman, R., Backhouse, C. J., Rapid prototyping of microfluidic devices with a wax printer. *Lab on a Chip*, 2007, 7(3): 384-387.
- [20] Maltezos, G., Garcia, E., Hanrahan, G., Gomez, F. A., Vyawahare, S., van Dam, R. M., Chen, Y., Scherer, A., Design and fabrication of chemically robust three-dimensional microfluidic valves. *Lab on a Chip*, 2007, 7(9): 1209-1211.
- [21] Jia, M., He, Z. H., Jin, W. R., Capillary electrophoretic enzyme immunoassay with electrochemical detection for cortisol.

Journal of Chromatography A, 2002, 966(1-2): 187-194.

- [22] Wei, Y. J., Li, K. A., Tong, S. Y., The interaction of Bromophenol Blue with proteins in acidic solution. *Talanta*, 1996, 43(1): 1-10.
- [23] Peele, J. D., Gadsden, R. H., Crews, R., SEMIAUTOMATED VS VISUAL READING OF URINALYSIS DIPSTICKS. *Clinical Chemistry*, 1977, 23(12): 2242-2246.

第五章 喷蜡打印硝酸纤维素膜纸芯片的研制及其初步应用

5.1 引言

纸芯片是以纸为基底材料的一种新型的微流控芯片，是由哈佛大学 whitesides 小组于 2007 年首先提出[1]。以纸为基底材料制备微流控芯片具有一些独特的优点，如成本低廉、操作简便、便携化和一次性使用等，而纸本身所具有的吸水性的特点，又使纸质微流控芯片的操作可以无需外界的动力设备。基于以上的优点，纸芯片非常适合于现场即时诊断的应用。近年来，这一领域正在得到越来越多的研究人员的关注[2-13]。

目前文献中报道的纸芯片的制作材料均为纯纤维素组成的普通滤纸，这种滤纸成本低廉、易于获得，可以满足一些常用的的分析需求，如显色反应等。但这种材料蛋白吸附性能差，基于免疫反应的分析操作难以在这种芯片上完成。硝酸纤维素膜作为一种常用的蛋白固定材料具有很强的蛋白吸附能力，目前在 western blotting, dot ELISA 和免疫试纸条上均有广泛的应用[14-16]，由此我们提出以硝酸纤维素膜作为制备纸芯片的基底材料。硝酸纤维素膜作为芯片基底材料具有如下的优点：1) 硝酸纤维素膜蛋白吸附能力强，因而基于蛋白质固定的一些反应、分析过程可以在这种纸芯片上完成；2) 我们所用的硝酸纤维素膜的孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ ，尺寸比普通滤纸 ($10\ \mu\text{m}$ — $100\ \mu\text{m}$) 小很多，因而打印的蜡在烘烤熔化并透过纸的过程可以得到更好的控制，目前在硝酸纤维素膜上用喷蜡打印得到的宽度最小为 $100\ \mu\text{m}$ 的纸通道，结果可与操作繁琐的光刻法相媲美；3) 硝酸纤维素膜的孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ ，因而样品中微米尺寸的杂质可以在这种材料的芯片上去除；4) 硝酸纤维素膜的表面更为光滑和均匀，使液体在这种材质的芯片上流动的均匀性和重复性大

为提高。

在本章中我们用硝酸纤维素膜作为纸芯片的制作材料，用喷蜡打印技术制备纸芯片。整个制作过程包括打印、烘烤两步，可在 10 分钟内完成。对硝酸纤维素膜的种类、打印模式和烘烤时间等参数进行了优化，并将所得纸芯片用于蛋白质包被、免疫分析和样品过滤等分析过程中。

5.2 实验部分

5.2.1 仪器与试剂

三种不同的硝酸纤维素膜分别购于 Pall (USA), Amersham (Amersham Biosciences, Pharmacia, USA) 和 Whatman (Protran, GE, USA)。喷蜡打印机的型号为 FUJIXEROX Phaser 8560DN (Japan)。羊抗人 IgG, 人 IgG 和 FITC 标记羊抗人 IgG 均购自大连博瑞得生物公司。胶体金标记羊抗人 IgG (15nm) 购于北京博奥森公司。牛血清白蛋白 (BSA) 购自 Roche 公司。实验用水为娃哈哈纯净水。

荧光检测仪器为 Olympus 公司 (日本) 的 IX 71 型倒置荧光显微镜。

5.2.2 喷蜡打印制备硝酸纤维素膜纸芯片

喷蜡打印硝酸纤维素膜为基底材料的纸质微流控芯片的制作流程如图 5-1 所示，主要包括喷蜡打印和烘烤两步 (需首先在电脑上利用绘图软件如 Freehand 等设计各种图案) [4, 9, 17, 18]: 1), 用喷蜡打印机在硝酸纤维素膜上打印出所设计的图案; 2), 将喷蜡打印的硝酸纤维素膜置入 125 °C 烘箱中烘烤 5 min, 让打印的蜡熔化并透过膜形成封闭的疏水围堰。整个制备过程可以在 10 min 之内完成。

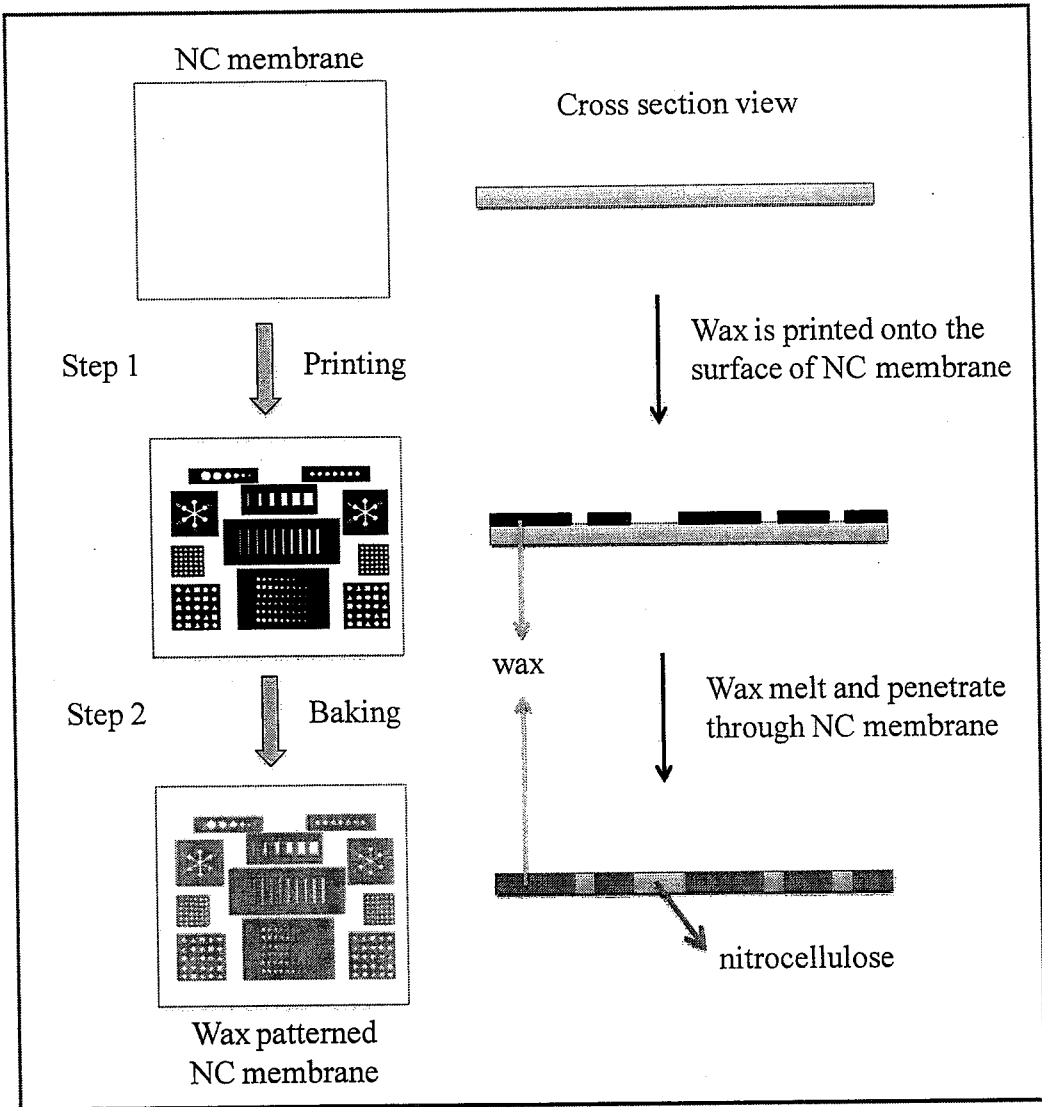


图 5-1 喷蜡打印硝酸纤维素膜纸芯片的流程图

Figure 5-1 Schematic illustration of processes to fabricate paper based microfluidics in NC membrane by wax printing. It includes mainly two steps: step 1 is to print the wax pattern onto the surface of a native NC membrane with a wax printer; step 2 is to bake the wax printed NC membrane in an oven of 125 °C for 5 minutes to let the wax melt and penetrate through the membrane fully.

5.3 结果与讨论

5.3.1 硝酸纤维素膜的选择

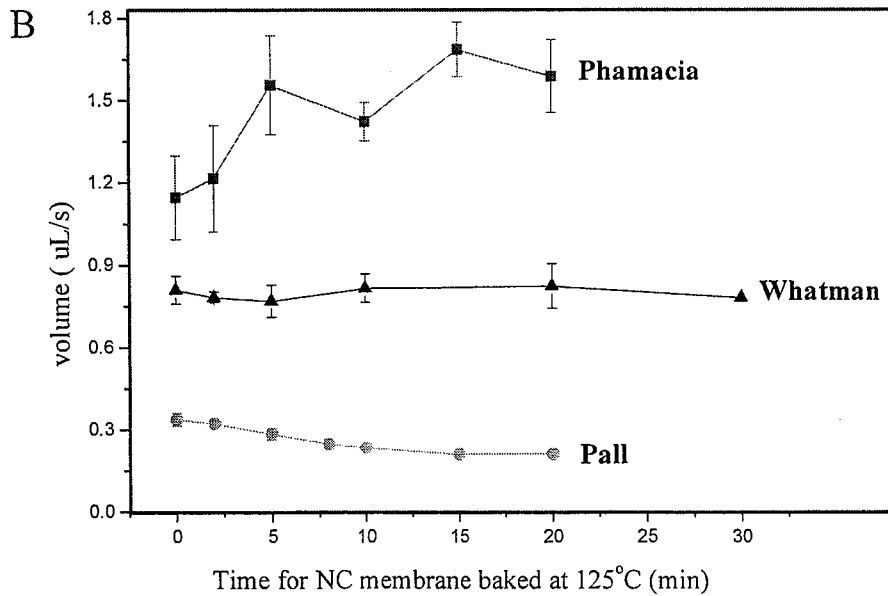
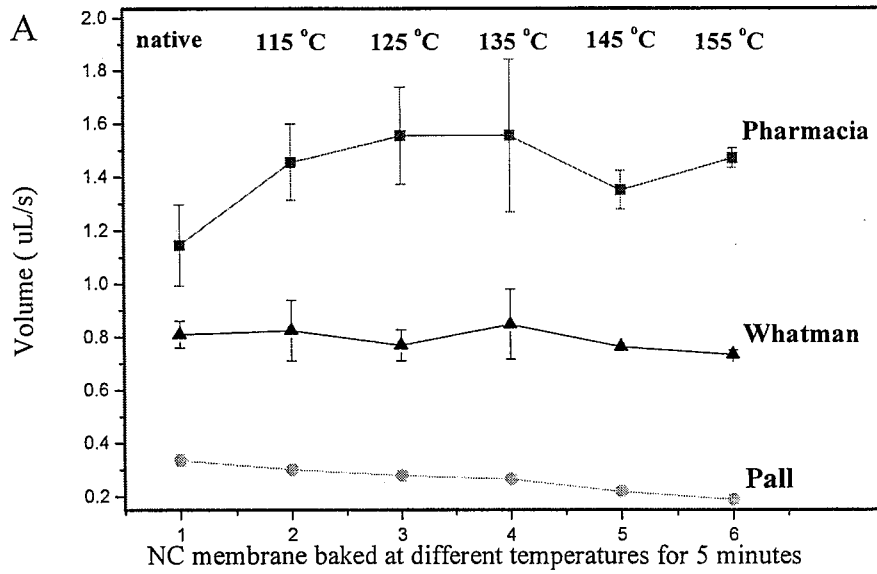


图 5-2 三种不同硝酸纤维素膜在经过烘烤后亲水性的变化

A 在不同温度下烘烤 5 min; B 在 125°C 下烘烤不同的时间

Figure 5-2 Wettability characterization of three different brands of NC membrane. A, before and after baking at different temperatures for 5 minutes (n=3). B, baked at 125 °C for different time periods (n=3).

本实验中所用的硝酸纤维素膜必须首先满足一个条件：在高温烘烤后不会丧失亲水性。我们首先对三种硝酸纤维素膜 (Pall、Amersham 和 Whatman) 在烘烤之后的亲水性进行了考察：在不同的温度下 (115°C, 125°C, 135°C, 145°C, 155°C) 对三种硝酸纤维素膜烘烤 5 min 和在 125°C 下烘烤不同的时间。我们用硝酸纤维素膜完全吸收 10 μL 红色染料所用的时间来作为其亲水性量化的指标，吸收完所用时间越短，亲水性越好，反之，则越差。从图上 5-2 可以看出 Whatman 和 Pharmacia 生产的硝酸纤维素膜在烘烤后其亲水性仍然良好，但 Whatman 出产的硝酸纤维素膜的亲水性较为稳定，因而我们选用 Whatman (BA 85, 0.45 μm pore size) 这种膜来制备微流控芯片。

5.3.2 喷蜡打印条件的选择

我们首先将硝酸纤维素膜裁成一定的尺寸（在本实验中我们采用 15 cm \times 20 cm 的尺寸），然后将其放入打印机的纸盒 1 中。在实验所用喷蜡打印机附带的打印软件中，有三种打印模式：1，普通；2，增强；3，高分辨率。实验表明，这三种打印模式均能满足我们的制备需求。我们利用这三种打印模式分别在投影胶片 (CG33000, 3M, USA) 上打印一层蜡，然后利用螺旋测微器（广陆，中国）测量在三种打印模式下打印上的蜡的厚度。结果表明，在这

三种模式下打印的蜡的厚度均为 $10\ \mu\text{m}$ 左右 (标准打印模式为 $10.29\ \mu\text{m} \pm 0.15\ \mu\text{m}$; 增强打印模式为 $9.175\ \mu\text{m} \pm 0.26\ \mu\text{m}$; 高分辨率打印模式为 $11.56\ \mu\text{m} \pm 0.41\ \mu\text{m}$; $n=16$)。但是高分辨率打印模式下打印的蜡的密度更大 (所得到的图案颜色更深), 精度更高 ($2400\ \text{dpi} \times 2400\ \text{dpi}$), 图案更为精细, 所以在实验中我们一直采用高分辨率的打印模式。

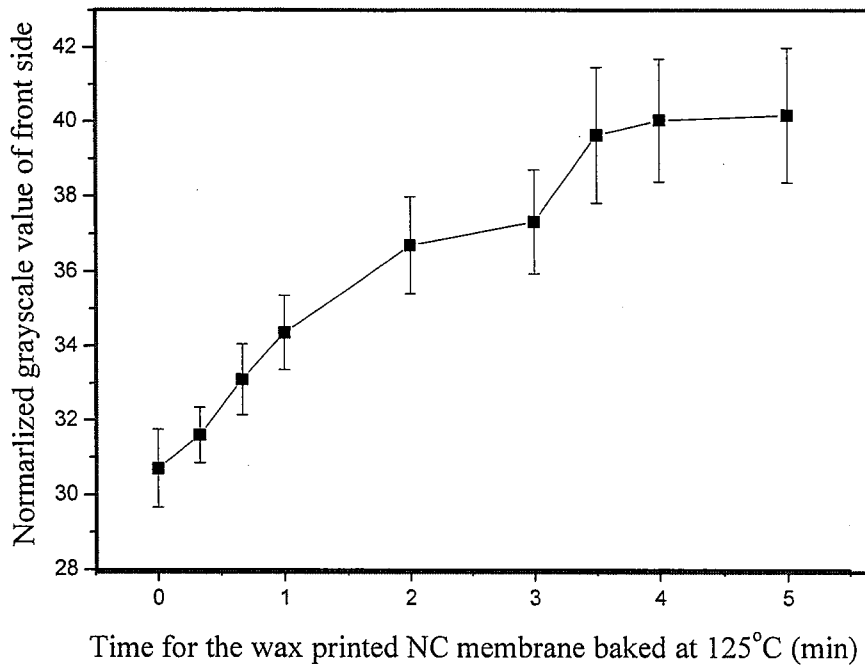


图 5-3 喷蜡打印的硝酸纤维素膜在 125°C 下烘烤时间的优化

Figure 5-3 Characterization of baking time needed for printed wax to penetrate through NC membrane fully at 125°C ($n=3$).

将硝酸纤维素膜上打印上蜡图案后, 将其放入烘箱中进行烘烤。在实验所用的喷蜡打印机中喷头熔化打印蜡块的温度为 135°C , 我们采用 125°C 以减小高温对硝酸纤维素膜的损害。打印上蜡的硝酸纤维素膜在烘箱中烘烤过

程中, 打印上的蜡会熔化并被膜所吸收, 蜡的密度会降低, 颜色变浅。我们通过监测打印的蜡的颜色在烘烤中随时间的变化来确定烘烤时间。从图 5-3 中可以看出, 在 125 °C 烘烤 4 min 时, 其颜色的变化基本达到了平衡。在实验中, 我们将烘烤时间延长并固定为 5 min 以确保蜡完全透过了硝酸纤维素膜。

利用喷蜡打印来制备硝酸纤维素膜微流控芯片具有如下几个优点: 1, 制备流程简单; 2, 制备速度快 (10 min 之内完成); 3, 没有有机溶剂的应用; 4 对基底材料性质、结构无破坏。

5.3.3 硝酸纤维素膜纸芯片的考察

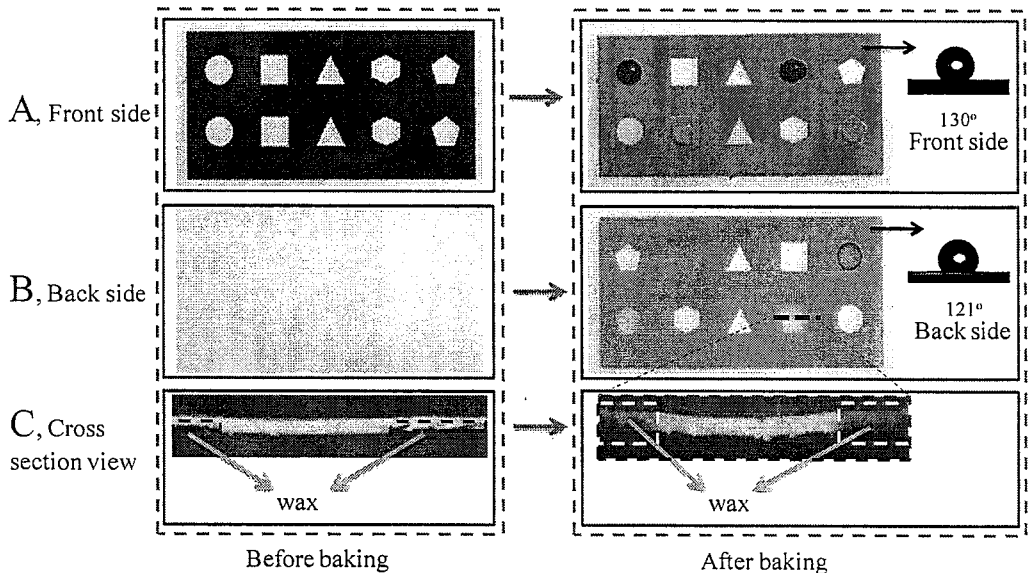
利用喷蜡打印得到硝酸纤维素膜纸芯片后, 我们对其性能进行了初步考察。图 5-4 是对硝酸纤维素膜在喷蜡打印制备过程前后的一些比较。其中图 5-4 A, B 为打印上蜡图案的硝酸纤维素膜在烘烤前后的比较, 从图上可以看出在烘烤前后, 正面的硝酸纤维素膜颜色变浅, 而背面的硝酸纤维素膜颜色变深, 表明在烘烤过程中正面硝酸纤维素膜蜡熔化并从正面渗入到背面。硝酸纤维素膜的背面在烘烤前呈亲水性, 而在烘烤后由于蜡的存在, 其表面变为疏水性 (表面水接触角为 121°)。5-4 C 为其侧面的比较: 打印上的蜡在烘烤前只存在于硝酸纤维素膜的表面一层, 而烘烤后, 蜡渗入到了膜的内部。

打印上的蜡在烘烤过程中会熔化并在硝酸纤维素膜上扩散, 蜡的扩散不仅发生在膜的纵向方向, 也发生在横向方向。这个扩散的过程可以用 Washburn 公式来表征[4, 19]。Washburn 公式描述的是多孔介质中的毛细现象。其中 L 为流动的距离, t 为流动的时间, η 和 γ 为流动液体的粘度和表面张力, D 为多孔介质的平均孔径。

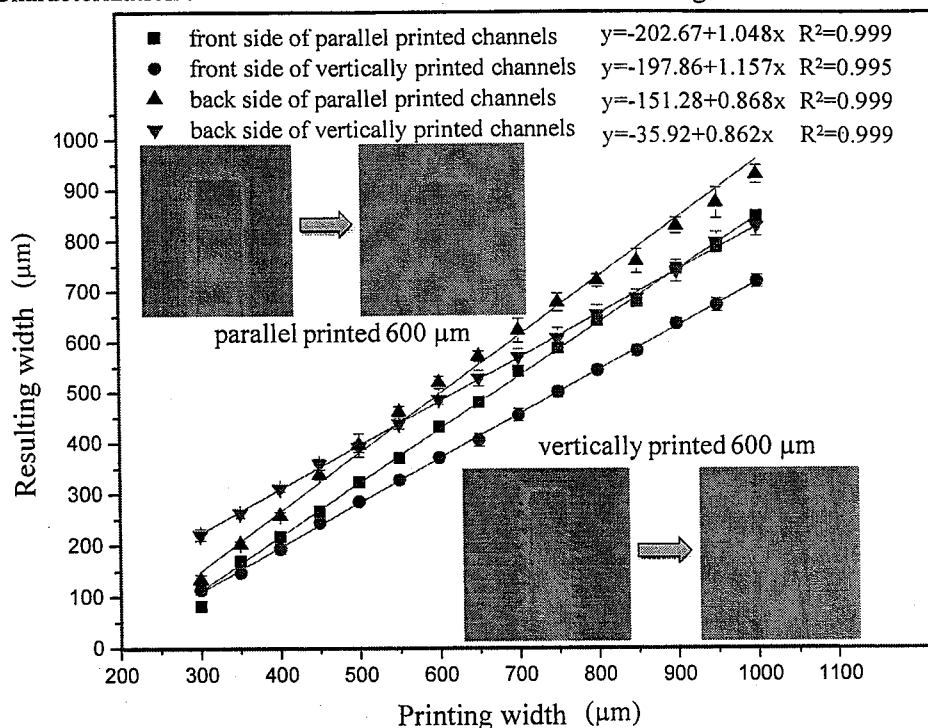
$$L = \sqrt{\frac{\gamma D t}{4\eta}}$$

由于实验所用的硝酸纤维素膜的平均孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ ，与普通滤纸的孔径 ($10\ \mu\text{m}$ — $100\ \mu\text{m}$) 相比大大缩小，因而熔化的蜡扩散过程大为减缓，控制的更为精确。从公式中还可看出，在 η ， γ ， D 和 t 等参数确定的情况下，其扩散的距离也是确定的。图 D 为我们利用喷蜡打印的方法在硝酸纤维素膜上得到的从 $300\ \mu\text{m}$ 到 $1000\ \mu\text{m}$ 的微通道（递增 $50\ \mu\text{m}$ ）的实际尺寸与设计尺寸的关系。从图上可以看出，两者呈良好、重复的线性关系。同时可以通过测量得出平行打印的通道（通道方向与打印进纸方向平行）扩散距离为 $86\ \mu\text{m}$ ，垂直打印的通道（通道方向与打印进纸方向垂直）的扩散距离为 $118\ \mu\text{m}$ 。图 5-5 为利用 imagepro 软件测量蜡扩散距离的方法图。

图 5-4 E 为对喷蜡打印并烘烤前后硝酸纤维素膜的表面形貌的表征。我们利用 Keyence 公司的三维激光扫描显微镜对其孔径变化进行了分析 (VK-9700, Keyence, Japan)。从图上可以看出在处理前后孔径没有发生明显变化，可见这种处理方法没有改变硝酸纤维素膜的结构。



D, Characterization of microchannels width before and after baking



E, Surface profile

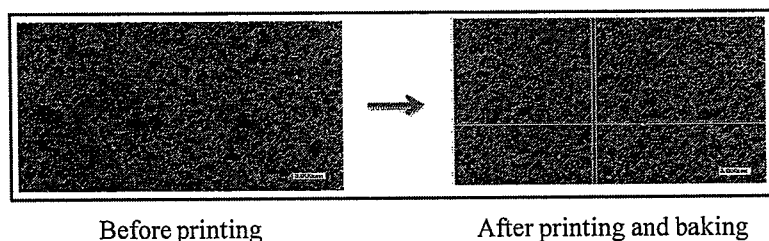


图5-4 硝酸纤维素膜在喷蜡打印、烘烤前后的变化。A, B和C是喷蜡打印硝酸纤维素膜的正面、后面和侧面在烘烤前后的变化,从变化中可以看出蜡在烘烤后从膜的前面渗到了膜的背面,形成了疏水性围堰;D是通过喷蜡打印的硝酸纤维素微通道尺寸与设计尺寸的关系,从图中可以看出线性关系良好;E是硝酸纤维素膜的孔径在制作前后的比较(标尺为 $3\ \mu\text{m}$)。

Figure 5-4 Comparisons of NC membranes. A and B are the

comparisons of front side image and back side image of wax printed NC membrane before and after baking. The contact angle measurements on the front and back surface indicated the full penetration of wax through the membrane; C is the cross section view of printed NC membrane before and after baking; D is Characterization of microchannels width before and after baking (the microchannels were wetted with red dye solution after baking; each point was the average value of 9 points from 3 experiments); E is the comparison of pore size of NC membrane before and after patterning (the scale bare is 3 μm).

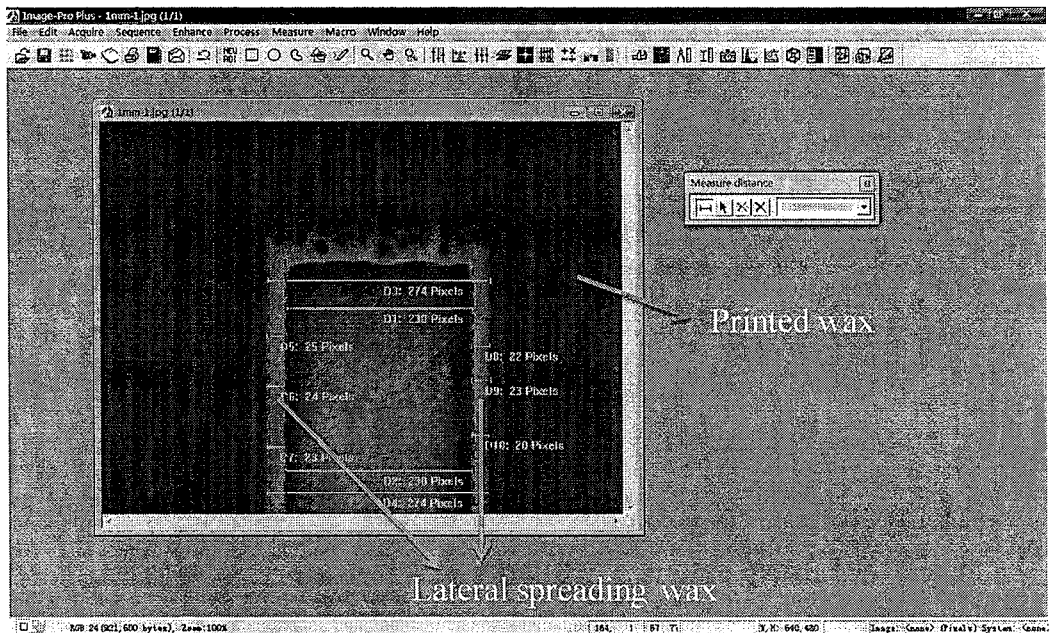


图 5-5 利用 imagepro 软件测量蜡扩散距离的方法图

Figure 5-5 The measurements of wax lateral spreading in the NC membrane during the baking process (the software used is imagepro)

我们同时对喷蜡打印硝酸纤维素膜上制备的各种图案的最小尺寸进行了考察。图 5-6A 为通道的最小尺寸的考察，在一个 3mm 圆形的周围伸出 6 个不同尺寸的通道（从 100 μm 到 600 μm ，标注为打印尺寸），从图上看到能被红色染料浸润的最小打印通道为 300 μm （烘烤后得到的尺寸为 100 μm ）。图 5-6B 显示的为蜡可以作为疏水间隔的最小尺寸为 60 μm 。图 5-6 C 为圆形与方形能浸润的最小尺寸为 400 μm 。同时我们对不同打印颜色的背景荧光进行了考察，从图 5-6 D 上可以看出黑色的打印蜡块的背景荧光很低，所以当实验中需要避免荧光的干扰时，可以采用黑色打印蜡块。

我们将打印机中所用蜡块置于滤纸上，放入 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘烤 40 min，经观察没有发现蜡熔化并在滤纸上扩散的现象出现。这表明，打印的蜡在这个温度下是稳定的，因而喷蜡打印制备的硝酸纤维素膜纸芯片在常温下也可以长期保存。

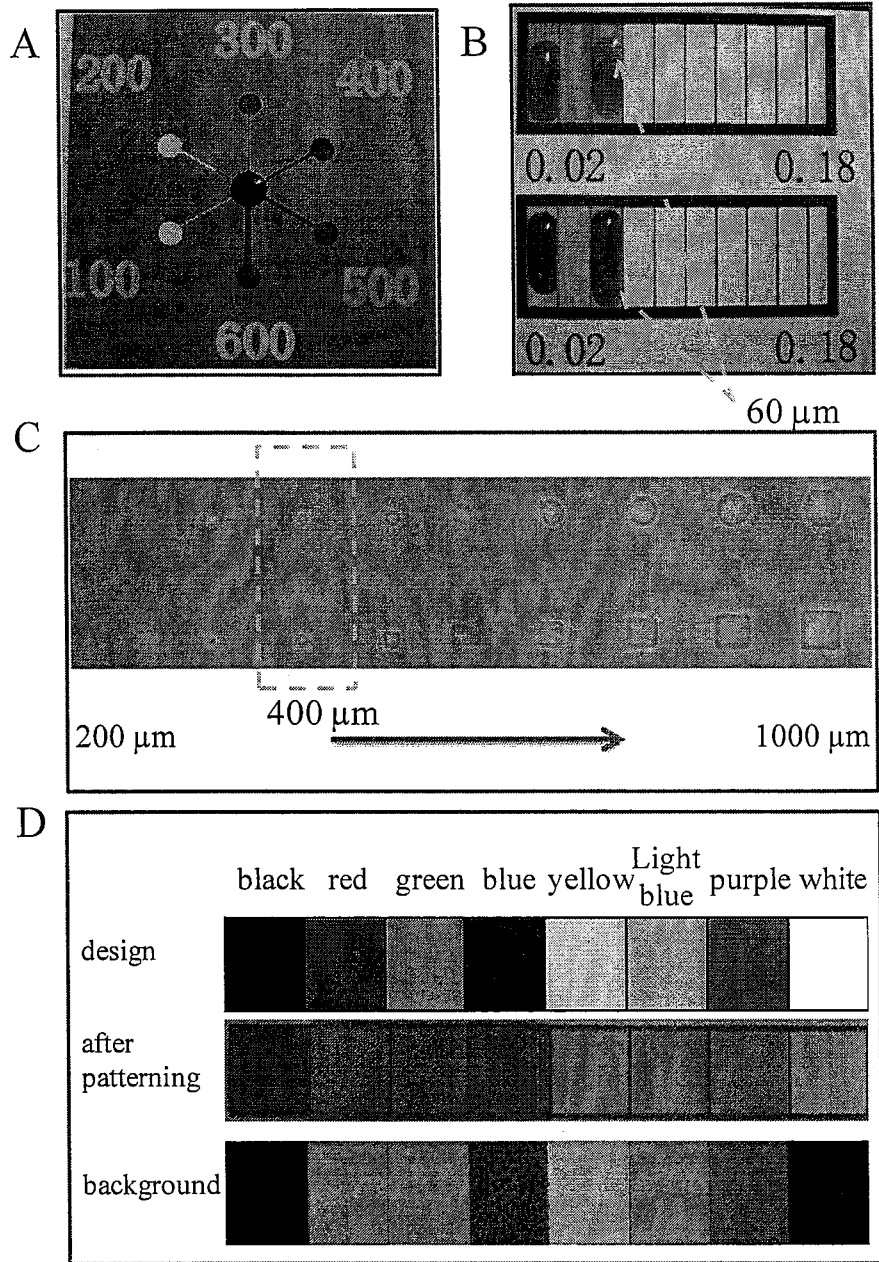


图5-6 喷蜡打印硝酸纤维素膜的表现。

A为喷蜡打印所得到的纸通道的最小尺寸为 $100\ \mu\text{m}$ ； B为打印的蜡可以起到疏水间隔作用的最小尺寸为 $60\ \mu\text{m}$ ； C为喷蜡打印形成圆形和方形图案在硝酸纤维素膜的最小尺寸 $400\ \mu\text{m}$ ； D为喷蜡打印的各种颜色的蜡的背景

荧光（曝光时间1 s，2倍透镜，激发光波长488 nm，收集波长525 nm）。

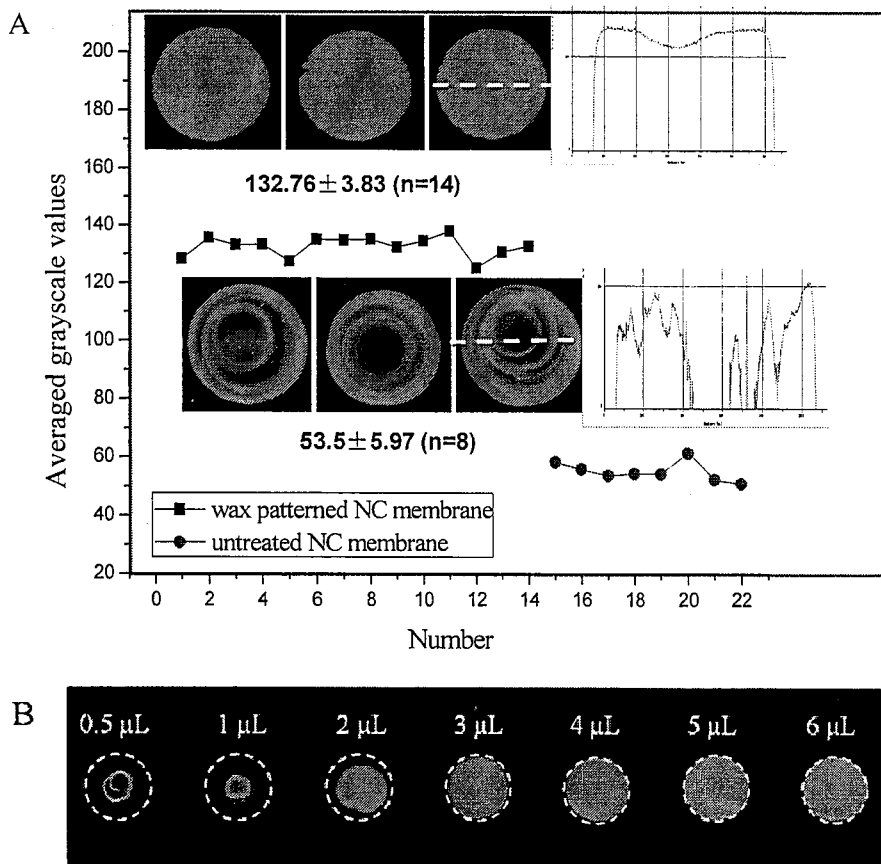
Figure 5-6 Characterizations of patterned NC membrane. A, B and C are the characterizations of microchannel resolution, minimal hydrophobic line width, smallest round and square pattern obtained in NC membrane ; D is the characterization of background fluorescence of different colors (CCD exposure time:1s ; 2 ×objective Excitation: 488nm, collection: 525nm)

5.3.4 硝酸纤维素膜纸芯片在蛋白质包被中的应用

在硝酸纤维素膜上采用喷蜡打印得到纸芯片之后，我们对其蛋白质包被的性能进行了表征。用移液枪将 2 μL 40 倍稀释的羊抗人 IgG 溶液加入到 2mm 直径的圆形硝酸纤维素膜区域，同时将硝酸纤维素膜是放在一块 PDMS 平板上防止溶液由背面交叉污染。将其置入一个潮湿的密闭容器中，让其在室温条件下包被 3 h。然后用 PBS+0.05%Tween20 溶液洗涤经过包被的硝酸纤维素膜纸芯片并用荧光显微镜记录其荧光信号。作为对照，相同的实验在未经喷蜡打印的硝酸纤维素膜上完成，两个实验结果的对比见图 5-7A。从图上可以看出，经过喷蜡打印的硝酸纤维素膜蛋白吸附的性能良好，蛋白吸附的结果也更均匀，“咖啡环”效应很好的得到了抑制[20]。可以认为其蛋白吸附的均匀性和对“咖啡环”效应的抑制是由于喷蜡打印的结果：由于蜡的限制作用，溶液可以被限制在反应区域中，这就使我们可以往反应区域加入足够的包被溶液，这样由于蒸发、挥发等造成区域浓度不均的现象可以得到抑制甚至消除。图 5-7B 是我们在 3mm 的反应区域中一次加入相同浓度的蛋白质包被溶液 0.5 μL , 1 μL , 2 μL , 3 μL , 4 μL , 5 μL , 6 μL ，并让其包被 3 h 后得到的

结果(蛋白吸附时间曲线如图 5-8 所示, 结果显示蛋白包被在 3 h 时达到了平衡)。从图中可以看出只有当加入的包被溶液超过 4 μ L 时, 包被区域的均匀性才得到了保证。由于喷蜡打印具有很大的灵活性, 各种形状和尺寸的硝酸纤维素膜反应区域均可以方便、快速的制备(如图 5-7C 所示), 因而这种方法也可以作为一种点样的方法和在硝酸纤维素膜上制备微阵列的方法。

我们对经过蜡图案化处理的硝酸纤维素膜储存后的蛋白吸附性能进行了表征, 如图 5-7D 所示。从图上看出在经过 3 个月室温储存的芯片的蛋白吸附结果与新鲜制备得到的芯片的蛋白吸附结果基本一致。因此硝酸纤维素膜纸芯片可以一次性大批量制备并分批使用和储存。



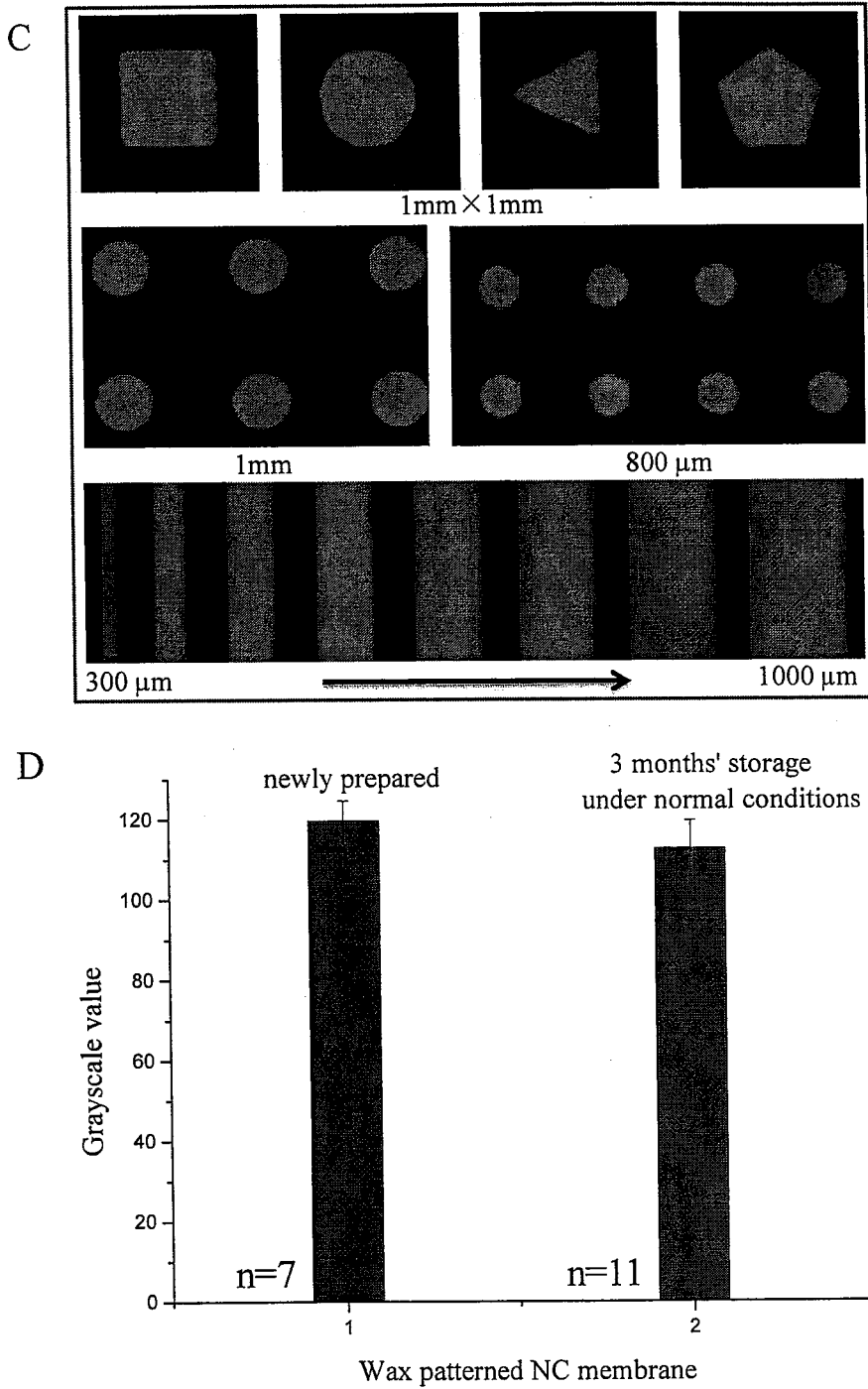


图 5-7 硝酸纤维素膜纸芯片用于蛋白质包被。

A 为喷蜡打印硝酸纤维素膜纸芯片蛋白吸附能力的表征及其与未经喷蜡

打印处理的硝酸纤维素膜蛋白吸附结果的比较，从图中可以看出喷蜡打印硝酸纤维素膜纸芯片蛋白吸附能力良好，同时由于蜡的限定作用，包被区域可以加入更多的包被溶液，因而咖啡环效应得到了抑制；B 为喷蜡打印硝酸纤维素膜纸芯片蛋白吸附结果与加样体积的关系（3 mm 反应尺寸），当包被溶液体积超过 4 μL 时，咖啡环效应得到了有效的抑制；C 为各种不同形状的蛋白包被结果（标注尺寸为设计尺寸）；D 为硝酸纤维素膜纸芯片蛋白吸附能力在储存前后的比较。

Figure 5-7 Wax patterned NC membrane for protein immobilization. A, Characterization of protein immobilization on the wax patterned NC membrane and its comparison with untreated NC membrane; B, The liquid volume affects the uniformity of protein immobilization (3mm diameter reaction zones); C, Different protein patterns immobilized on the wax patterned NC membrane (the labeled dimension was printing dimension); D, Protein immobilization on wax patterned NC membrane stored under normal conditions for 3 months.

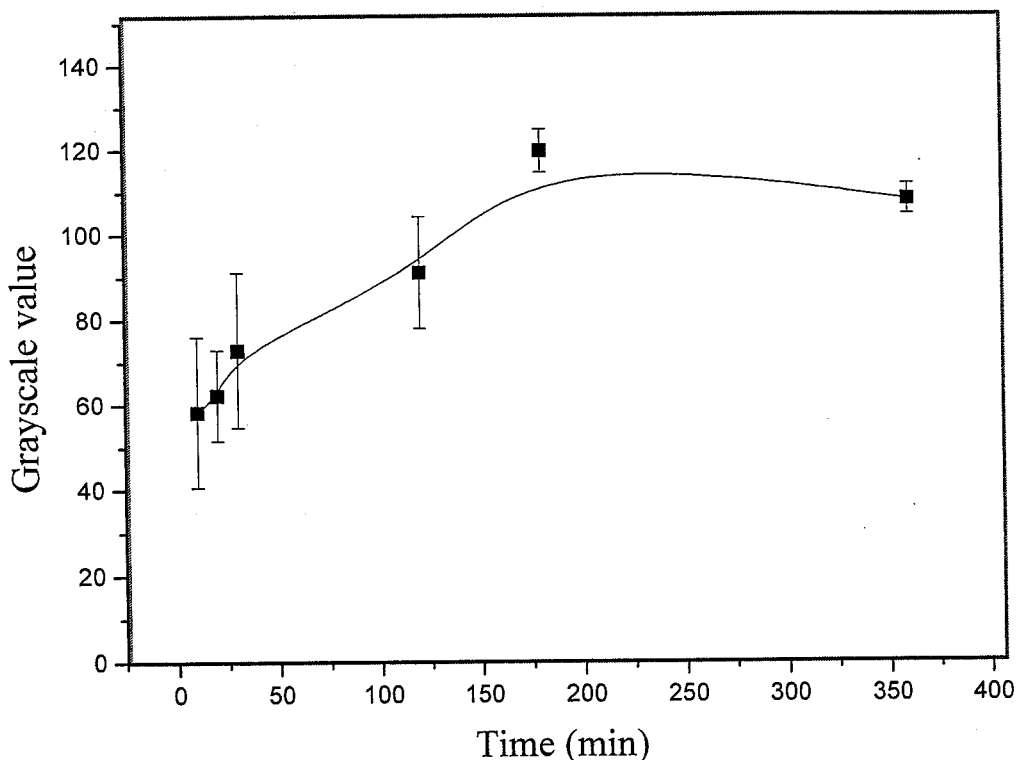


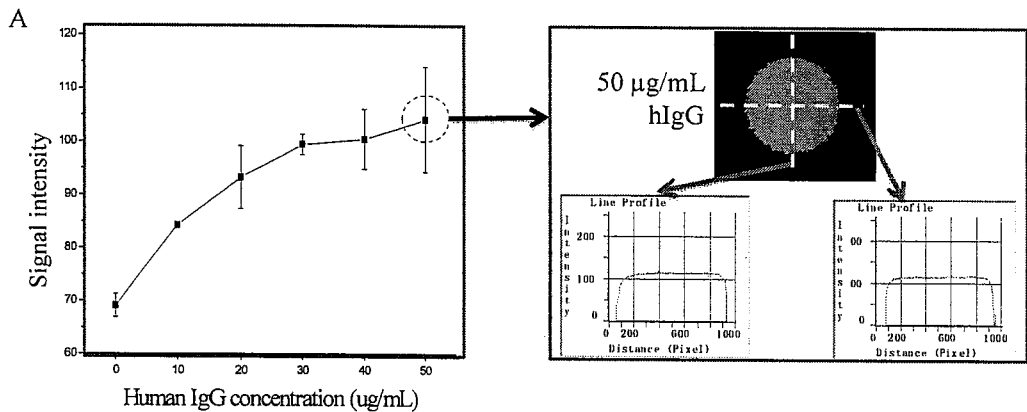
图 5-8 蛋白包被动力学曲线

Figure 5-8 Protein immobilization kinetics on wax patterned NC membrane (3mm diameter reaction zone) at room temperatures, the results indicated the immobilization process will reach the equilibrium within 3 hours (n=7).

5.3.5 硝酸纤维素膜纸芯片在免疫分析中的应用

我们在硝酸纤维素膜纸芯片上进行了免疫分析，以人 IgG 为模型分析物分别实现了荧光免疫分析和胶体金银染色免疫分析，免疫形式为夹心免疫。反应结果如图 5-9 所示，免疫分析的条件优化如图 5-10 所示。传统的在硝酸纤维素膜上完成斑点免疫分析需要事先在膜上用铅笔画出小格，然后在小格

内加入包被抗体、样品等反应试剂。这种做法很难保证顺序加入的试剂在一个位置，相邻的反应单元也容易引起交叉污染。同时由于挥发、蒸发等因素，结果容易有“咖啡环”效应。而在蜡图案化硝酸纤维素膜上进行免疫分析时由于蜡的限定作用，这些问题都可以得到很好的解决，反应单元的信号非常均匀(如图 5-9A, B 所示)。在硝酸纤维素膜纸芯片的反应单元包被好抗体后，可以将其剪开形成一个个独立的反应单元。这些独立的反应单元也可以视为聚合物微球在试管、孔板等反应容器内独立操作，完成不同的分析要求。



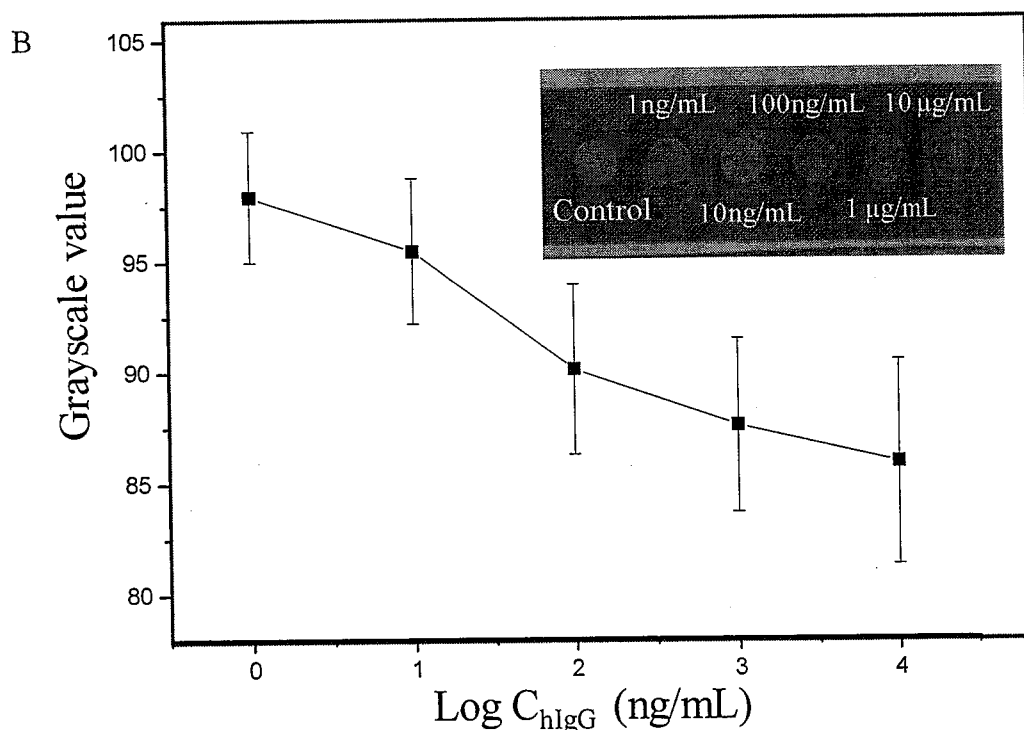
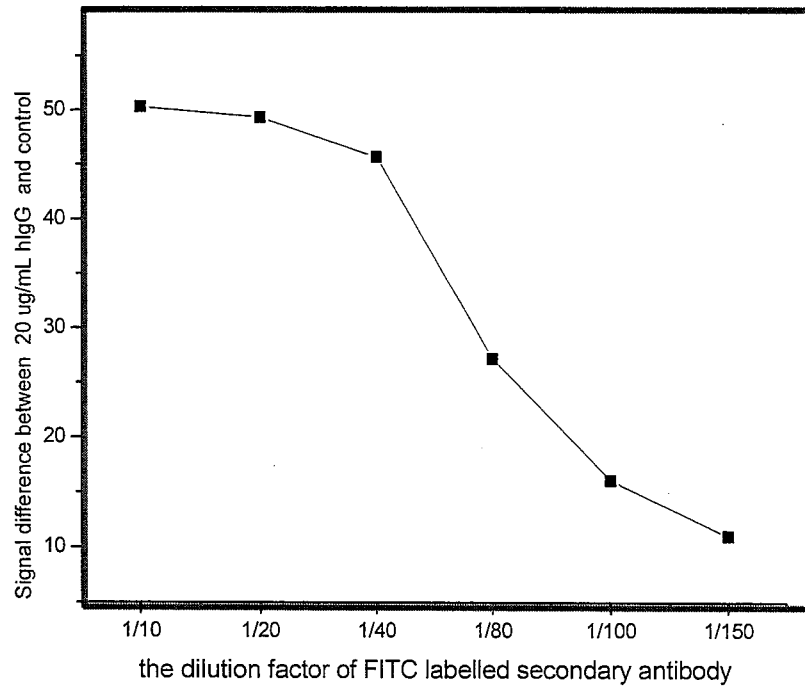


图 5-9 硝酸纤维素膜纸芯片用于免疫分析的结果。

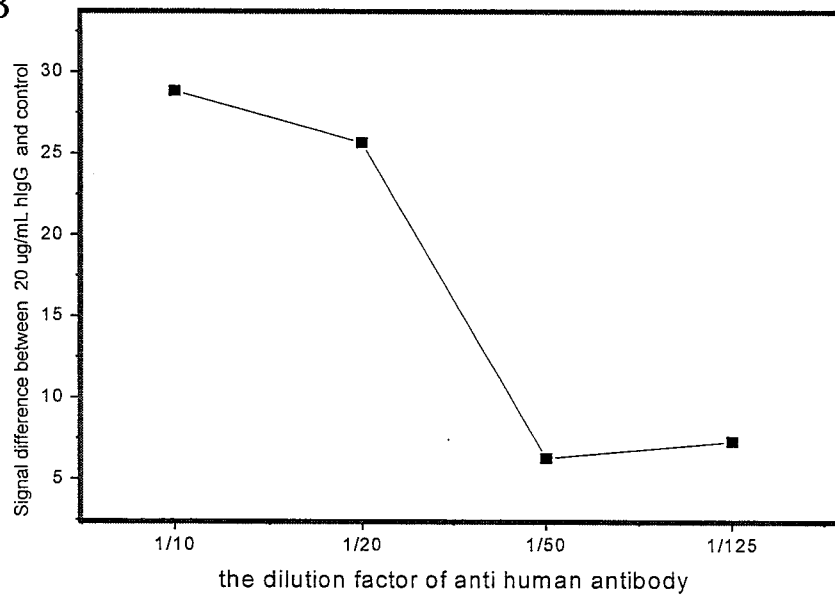
A 是人免疫球蛋白荧光免疫分析的工作曲线及 50 $\mu\text{g/mL}$ 人免疫球蛋白免疫分析单元结果的均匀性分析，从图上可以看出反应区域的信号很均匀；B 为显色免疫分析结果（利用胶体金作为免疫标记并结合银染色放大信号）。

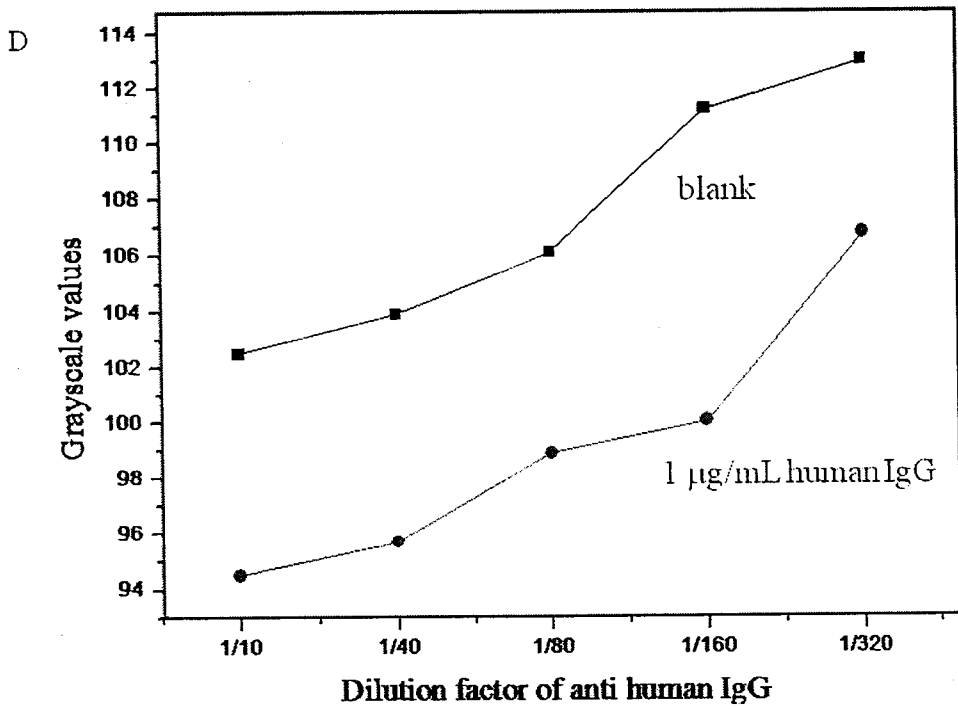
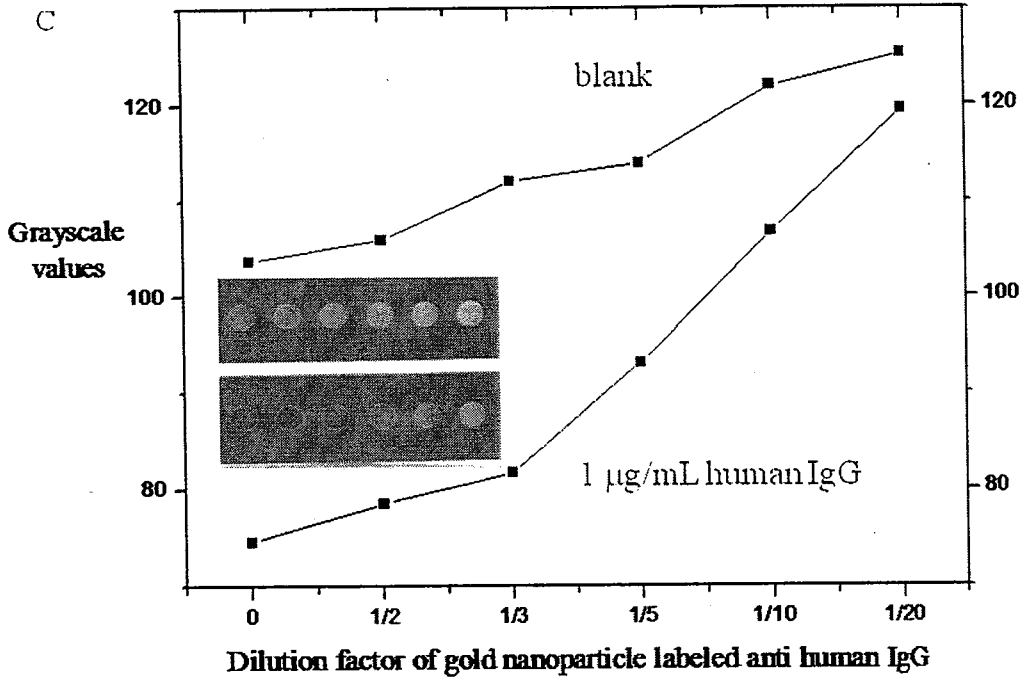
Figure 5-9 Wax patterned NC membrane for immunoassay. A, the calibration curve for human IgG (sandwich immunoassay format, $n=3$) and the signal uniformity analysis within the immunoassay zone of 50 $\mu\text{g/mL}$ human IgG; B, Colorimetric immunoassay with silver staining enhanced gold nanoparticle labeled immunoassay for human IgG

A



B





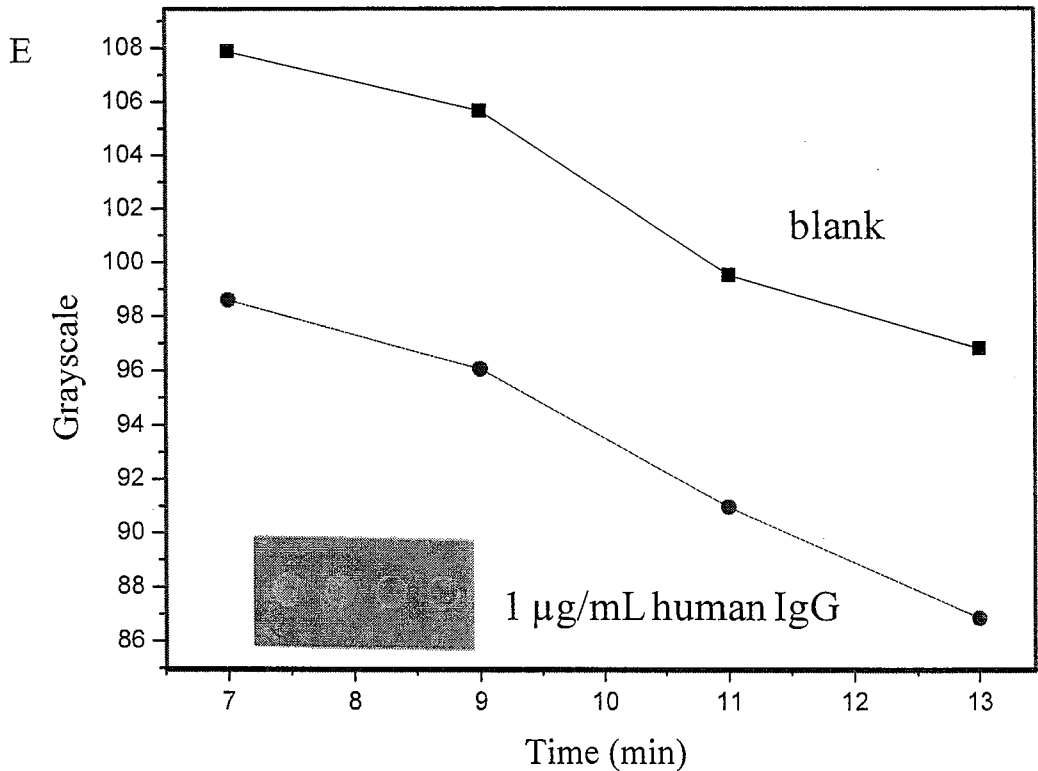


图 5-10 荧光免疫分析和胶体金银染色免疫分析条件优化

Figure 5-10 Wax patterned NC membrane for immunoassay. A and B are the optimization of concentration of FITC labeled goat anti human IgG and goat anti human IgG (the intensity was the signal difference between 20 µg/mL human IgG and control). The optimal condition: 10 fold dilution for goat anti human IgG and 40 fold dilutions for FITC labeled goat anti human IgG. C and D are the optimization of concentration of gold nanoparticle labeled goat anti human IgG and goat anti human IgG (the intensity was the signal difference between 1 µg/mL human IgG and control). The optimal condition: 160 fold dilution for goat anti human IgG and 3 fold dilutions for gold

nanoparticle labeled goat anti human IgG; E is the optimization of silver staining time to be around 13 minutes to generate results visible to naked eyes.

5.3.6 硝酸纤维素膜纸芯片在样品过滤中的应用

在滤纸上进行喷蜡打印处理后，由于蜡的限定作用，溶液可以固定在滤纸的特定区域，这种性质可以用来过滤样品，将样品中的杂质去除，消除其对分析结果的干扰。与普通滤纸相比，我们采用的硝酸纤维素膜的孔径只有 $0.45\ \mu\text{m}$ ，因此。可以过滤、截留的杂质尺寸更小。图 5-11 为硝酸纤维素膜纸芯片与普通纸芯片过滤杂质能力的比较。同图上可以看出，两者均不能截留小分子苋菜红，但硝酸纤维素膜纸芯片可以截留 $1\ \mu\text{m}$ 的小球，而普通纸芯片却不能截留，因而硝酸纤维素膜纸芯片可用于过滤微米尺寸的杂质如血细胞等。由于硝酸纤维素膜纸芯片所具有的这种样品过滤能力，有可能使在芯片的一面用于过滤，另一面进行样品分析。过滤后的样品也可以用滤纸收集用于其他的反应、分析。需要指出的是，在实验中我们发现蛋白分子在没有外力作用的情况下也可以透过硝酸纤维素膜纸芯片，但是透过的浓度很低，膜两边分配的蛋白浓度差异很大。

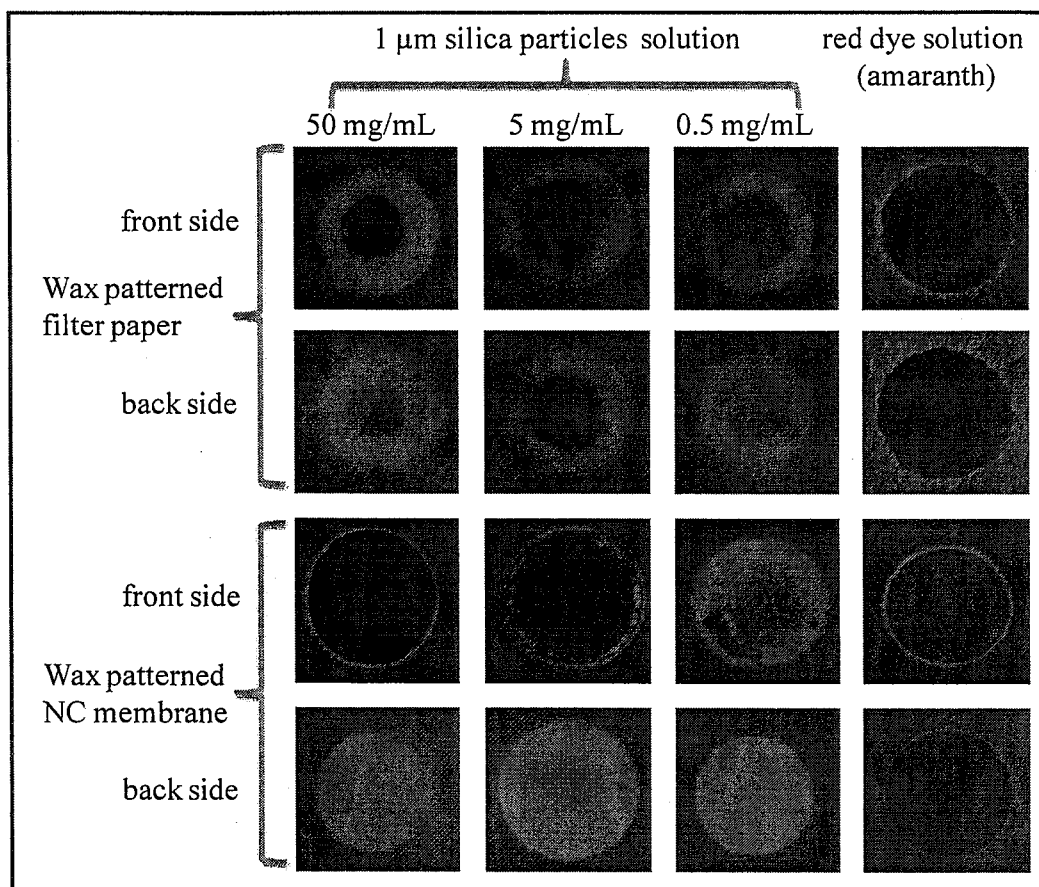


图 5-11 硝酸纤维素膜纸芯片用于样品过滤及其过滤能力与普通纸芯片的比较 ($1\mu\text{m}$ 的硅胶颗粒与小分子量的苋菜红溶液作为测试溶液), 从图上可以看出硝酸纤维素膜纸芯片可以去除溶液中 $1\mu\text{m}$ 的硅胶颗粒, 而普通纸芯片则不能截留 $1\mu\text{m}$ 的硅胶颗粒。

Figure 5-11 The characterization of the sample purification performance of wax patterned NC membrane using $1\mu\text{m}$ silica particles and red dye solution (Amaranth) and its comparison with wax patterned common filter paper.

5.4 本章小结

以硝酸纤维素膜取代普通滤纸、用喷蜡打印法制备新型纸芯片,并将其用于蛋白固定、免疫分析和样品纯化等过程,为扩大纸芯片的原料来源和应用范围打下了基础。[21-23]

参考文献

- [1] Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J., Whitesides, G. M., Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, 46(8): 1318-1320.
- [2] Abe, K., Suzuki, K., Citterio, D., Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(18): 6928-6934.
- [3] Bruzewicz, D. A., Reches, M., Whitesides, G. M., Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(9): 3387-3392.
- [4] Carrilho, E., Martinez, A. W., Whitesides, G. M., Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(16): 7091-7095.
- [5] Carrilho, E., Phillips, S. T., Vella, S. J., Martinez, A. W., Whitesides, G. M., Paper Microzone Plates. *Analytical Chemistry*,

- 2009, 81(15): 5990-5998.
- [6] Dungchai, W., Chailapakul, O., Henry, C. S., Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(14): 5821-5826.
- [7] Ellerbee, A. K., Phillips, S. T., Siegel, A. C., Mirica, K. A., Martinez, A. W., Striehl, P., Jain, N., Prentiss, M., Whitesides, G. M., Quantifying Colorimetric Assays in Paper-Based Microfluidic Devices by Measuring the Transmission of Light through Paper. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(20): 8447-8452.
- [8] Li, X., Tian, J. F., Nguyen, T., Shen, W., Paper-Based Microfluidic Devices by Plasma Treatment. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(23): 9131-9134.
- [9] Lu, Y., Shi, W. W., Jiang, L., Qin, J. H., Lin, B. C., Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. *Electrophoresis*, 2009, 30(9): 1497-1500.
- [10] Martinez, A. W., Phillips, S. T., Carrilho, E., Thomas, S. W., Sindi, H., Whitesides, G. M., Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(10): 3699-3707.
- [11] Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M., Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(50): 19606-19611.

- [12] Martinez, A. W., Phillips, S. T., Wiley, B. J., Gupta, M., Whitesides, G. M., FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 2008, 8(12): 2146-2150.
- [13] Zhao, W. A., van den Berg, A., Lab on paper. *Lab on a Chip*, 2008, 8(12): 1988-1991.
- [14] Chen, Z. C., Fang, C., Wang, H. Y., He, J. S., Deng, Z. S., A disposable electrochemical immunofiltration test strip for rapid detection of alpha-fetoprotein. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2009, 141(2): 436-440.
- [15] Hou, S. Y., Chen, H. K., Cheng, H. C., Huang, C. Y., Development of zeptomole and attomolar detection sensitivity of biotin-peptide using a dot-blot goldnanoparticle immunoassay. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(3): 980-985.
- [16] van Lieshout, R. M. L., van Domburg, T., Saalmink, M., Verbeek, R., Wimberger-Friedl, R., van Dieijen-Visser, M. P., Punyadeera, C., Three-Dimensional Flow-Through Protein Platform. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(13): 5165-5171.
- [17] Kaigala, G. V., Ho, S., Penterman, R., Backhouse, C. J., Rapid prototyping of microfluidic devices with a wax printer. *Lab on a Chip*, 2007, 7(3): 384-387.
- [18] Maltezos, G., Garcia, E., Hanrahan, G., Gomez, F. A., Vyawahare, S., van Dam, R. M., Chen, Y., Scherer, A., Design and fabrication of chemically robust three-dimensional microfluidic valves. *Lab*

- on a Chip, 2007, 7(9): 1209-1211.
- [19] Washburn, E. W., The dynamics of capillary flow. *Physical Review*, 1921, 17(3): 273-283.
- [20] Deegan, R. D., Bakajin, O., Dupont, T. F., Huber, G., Nagel, S. R., Witten, T. A., Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, 1997, 389(6653): 827-829.
- [21] Ali, M. M., Aguirre, S. D., Xu, Y. Q., Filipe, C. D. M., Pelton, R., Li, Y. F., Detection of DNA using bioactive paper strips. *Chemical Communications*, 2009(43): 6640-6642.
- [22] Hossain, S. M. Z., Luckham, R. E., Smith, A. M., Lebert, J. M., Davies, L. M., Pelton, R. H., Filipe, C. D. M., Brennan, J. D., Development of a Bioactive Paper Sensor for Detection of Neurotoxins Using Piezoelectric Inkjet Printing of Sol-Gel-Derived Bioinks. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(13): 5474-5483.
- [23] Pelton, R., Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. *Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28(8): 925-942.

第六章 以硝酸纤维素膜纸芯片为基质的液塑 PDMS 芯片的研制

6.1 引言

纸是人们日常生活中常用的必需品，常见用途包括书写、印刷、绘画或包装等。同时纸的各种衍生制品在生物、化学中也发挥着各种各样的作用，如过滤、蛋白质固定等。由于纸具有低成本、多孔等特点，近年来得到了许多研究人员的重视，发展了很多新的应用。如哈佛大学 Whitesides 等提出利用层叠的纸作为细胞三维培养的支架，通过纸的多孔性、渗透性建立氧气、氮气的浓度梯度并分别监测各层细胞的响应[1]。斯坦福大学 Cui Yi 等报道了将纸张浸入由碳纳米管与银纳米线所组成的墨水中并烘干后得到的一种黑色纸，它能作为电池或者超级电容器使用。这种“纳米纸”能应用于连接到电网上的电贮存装置中，也可以用于混合动力车辆[2]。在微流控芯片领域，Whitesides 等首先提出利用纸作为制备微流控芯片的基底材料，实现低成本、便携化的诊断分析[3]，这方面的研究也得到了越来越多研究人员的重视[4-17]。

在本章中，我们以硝酸纤维素膜纸芯片为基质采用液膜法制备 PDMS 芯片，整个过程包括喷蜡打印硝酸纤维素膜纸芯片、液膜的形成和 PDMS 浇铸三个步骤，可以在一个半小时内完成。与常用的光刻法相比，本方法大大简化了 PDMS 芯片的制作过程，节约了制备时间。利用建立的制备方法，实现了 PDMS 微孔（圆形，四方形，三角形等）和 PDMS 微通道的快速制备[11, 16, 18-20]。

6.2 实验部分

6.2.1 仪器与试剂

0.45 μm 孔径的硝酸纤维素膜购自 Whatman (Protran, GE, USA)。喷蜡打印机为日本富士公司生产, 型号为 FUJIXEROX Phaser 8560DN。烘箱为上海一恒科技有限公司生产, 型号为 PH-030A。甘油购于美国 Amresco 公司。Sylgard 184 PDMS 预聚体和引发剂购自美国 Dow Corning 公司。实验用水为娃哈哈纯净水。

6.2.2 利用硝酸纤维素膜纸芯片液塑制备 PDMS 芯片实验流程

利用硝酸纤维素膜纸芯片液塑制备 PDMS 芯片的流程主要包括三个步骤, 如图 6-1 所示:

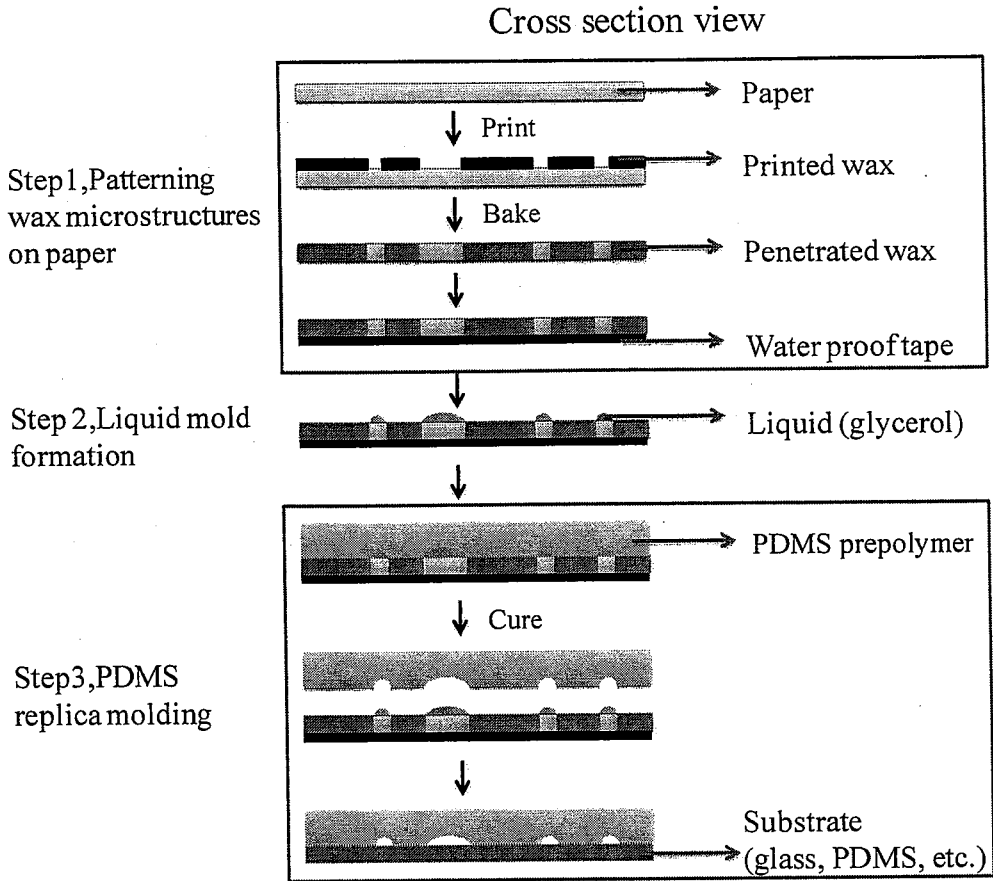


图 6-1 利用硝酸纤维素膜纸芯片液塑制备 PDMS 微流控芯片实验流程图

Figure 6-1 The processes to fabricate PDMS microdevices using wax patterned paper as substrate

6.2.2.1 喷蜡打印硝酸纤维素膜纸芯片

整个制作流程主要包括打印和烘烤两步：1，用喷蜡打印机在硝酸纤维素膜上打印出预先设计好的各种图案（如图 6-2 所示）；2，将打印好的硝酸纤维素膜放入 125 °C 烘箱中烘烤 5 min，让打印的蜡熔化并透过膜形成亲疏水间隔的硝酸纤维素膜。整个过程可以在 10 min 之内完成。

待硝酸纤维素膜纸芯片制备完成后，在纸芯片的一面贴上透明胶带，并用双面胶带将纸芯片胶带面固定于培养皿中。

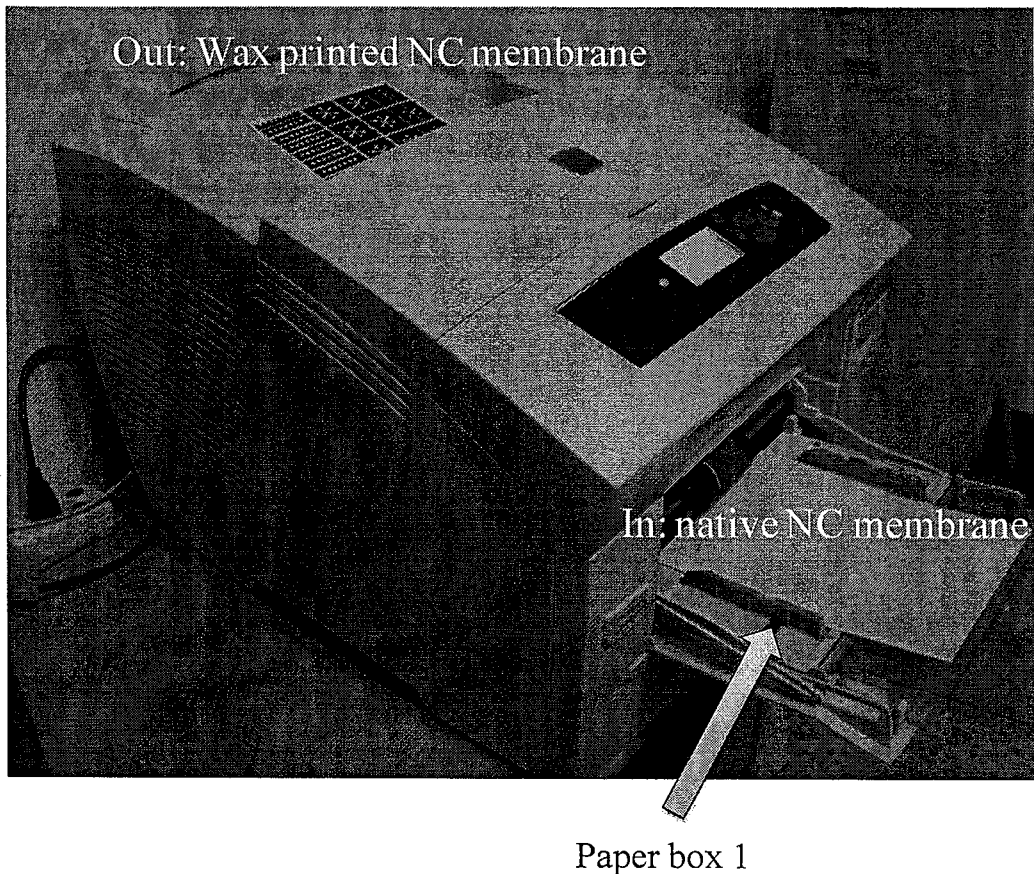


图 6-2 利用喷蜡打印机在硝酸纤维素膜上打印各种图案

Figure 6-2 Photo of wax printer used in the experiments: the untreated NC membrane is firstly located in paper box1, then print wax pattern onto the membrane surface. The printing process can be finished within one minute for a NC membrane with the size of 15cm×20cm (excluding the time in warming up process for the printer)

6.2.2.2 液膜形成

用移液器将 40%的甘油水溶液缓慢的浸润纸芯片, 纸芯片上没有打蜡的地方会被甘油水溶液浸润, 形成液膜。

6.2.2.3 PDMS 浇铸

以上述制有液体微条纹的纸芯片作为模板, 采用浇铸的方法制备 PDMS 芯片: 将 Sylgard 184 PDMS 单体和引发剂按 10: 1 比例充分混合; 真空脱气; 缓慢浇铸于水平放置的纸芯片液体复形模板表面; 静置十分钟; 转入 80℃ 烘箱中, 烘烤约 1 小时使 PDMS 完全聚合。

经过以上三个步骤, 利用硝酸纤维素膜材料的纸芯片快速制备 PDMS 微流控芯片实验全部完成, 整个过程可在 1.5 h 内完成。与光刻法相比, PDMS 芯片制作的周期缩短, 制作步骤简化。

6.3 结果与讨论

6.3.1 纸材料的选择

在本实验中我们采用的是 0.45 μm 孔径的硝酸纤维素膜而不是普通滤纸(如定性滤纸、定量滤纸), 主要基于以下的考虑: 1), 实验中所用硝酸纤维素膜的孔径为 0.45 μm , 比一般滤纸相比孔径(10 μm —100 μm) 大大减小, 打印的蜡在烘烤中的扩散的过程可以得到更好的控制, 芯片制作的重复性可以提高, 边缘更为光滑、整洁, 可得到的最小尺寸也大大减小(100 μm); 2), 硝酸纤维素的表面比普通滤纸更为光滑, 在其表面固化的 PDMS 的表面也因此更为光滑; 3), 硝酸纤维素膜的孔径更小, 纤维素更为致密, 打上蜡后更不

容易被甘油水溶液所沾染。

6.3.2 液膜材料的选择

在本实验中我们采用 40%甘油水溶液作为液膜的材料主要有以下原因：

1), 甘油水溶液为极性溶液, 同蜡、PDMS 均不互溶; 2), 甘油挥发性低(饱和蒸气压为在 20 °C 为 0.4 k Pa), 沸点高 (290.9 °C), 在 PDMS 固化 (60 - 80°C) 过程中能够保持稳定; 3), 甘油成本低, 无污染, 是一种比较环保的制作材料。

6.3.3 硝酸纤维素膜纸芯片的制备

纸芯片制作的方法采用我们之前报道的喷蜡打印硝酸纤维素膜纸芯片技术, 主要过程包括打印和烘烤(高分辨率打印模式和 125 °C 烘箱中烘烤 5min)。制作过程可以在 10 分钟之内完成, 快速、简便、环保。

在硝酸纤维素膜上打印上的蜡在烘烤过程中会熔化扩散, 其扩散的过程可以用 Washburn 公式来说明[21]。Washburn 公式描述的是多孔介质中的毛细现象。其中 L 为流动的距离, t 为流动的时间, η 和 γ 为流动液体的粘度和表面张力, D 为多孔介质的平均孔径。利用喷蜡打印制备硝酸纤维素膜纸芯片的分辨率如图 6-3A 所示。

$$L = \sqrt{\frac{\gamma D t}{4\eta}}$$

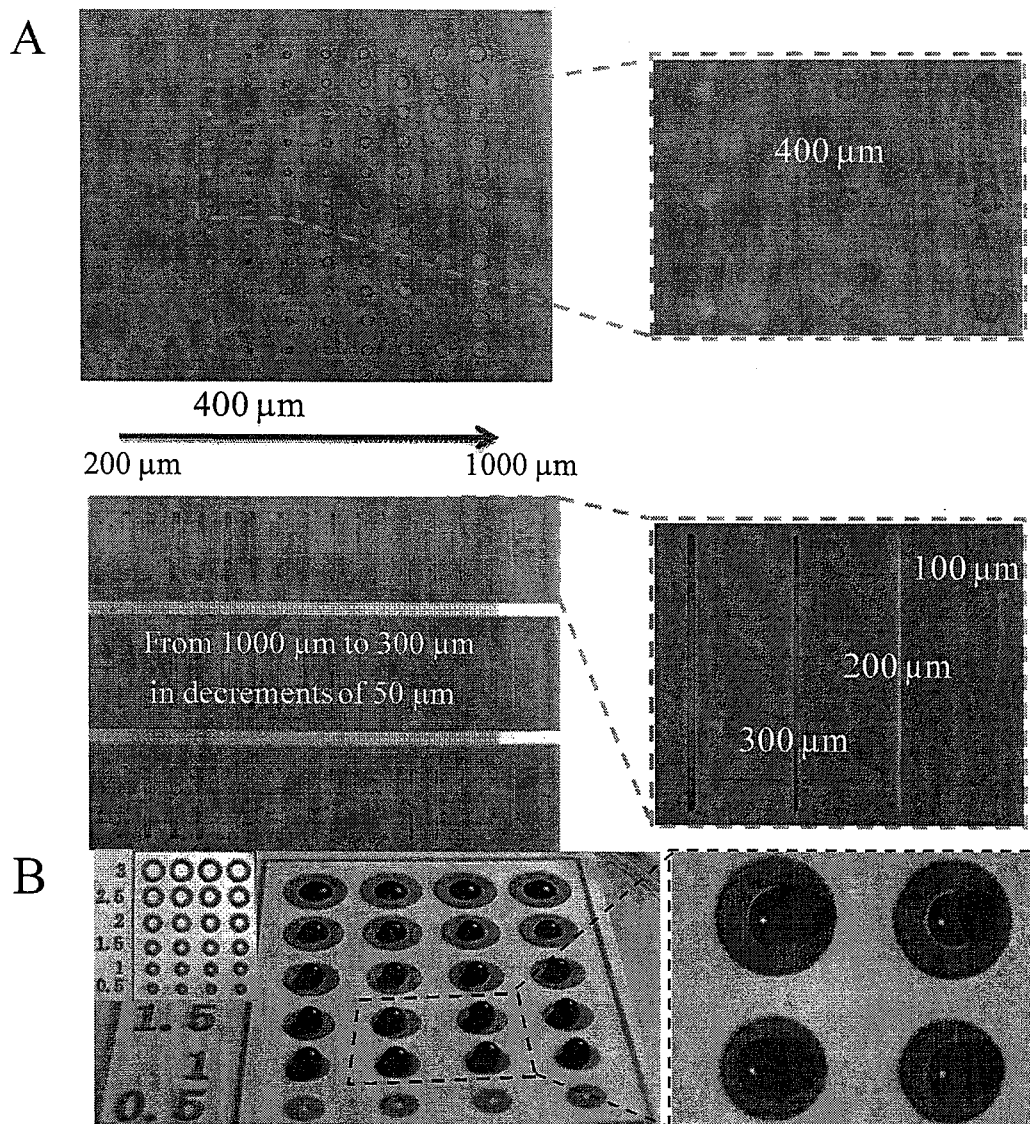


图 6-3 喷蜡打印硝酸纤维素膜的考察

A 打印尺寸考察 B 甘油水溶液对蜡溶解性的考察

Figure 6-3 Characterization of wax patterned NC membrane

A, Fabrication resolution of wax patterned NC membrane

B, Glycerol solution doesn't dissolve wax barriers: 3 μL red dye solution (10 mg/mL amaranth in 50/50 glycerol-water (v/v) solution)

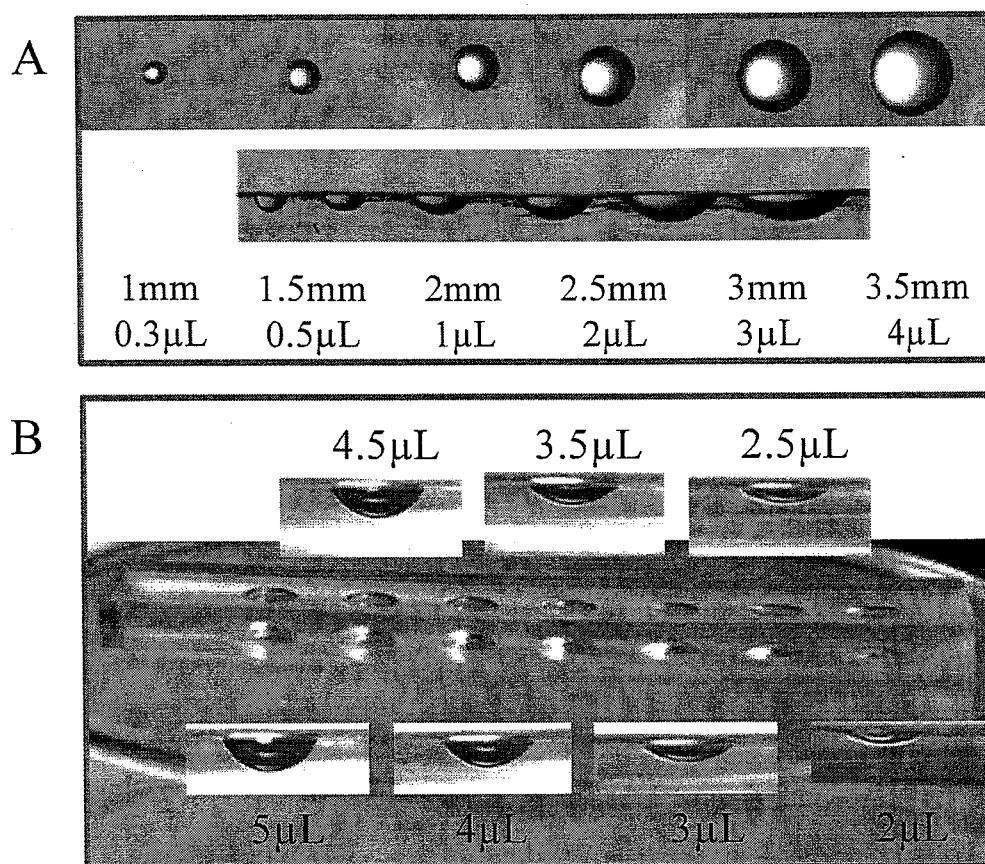
was pipetted into each circular ring (0.5mm to 3mm, in increments of 0.5 mm, the hydrophobic wax is 1mm width).

我们还对打印的蜡在甘油水溶液的互溶性进行了考察：3 μL 红色苋菜红溶液 (10 mg/mL amaranth in 50/50 glycerol-water (v/v) solution) 加入到各种尺寸的圆环中 (0.5mm 到 3mm, 每个增加 0.5 mm, 蜡是 1mm 宽)。在室温下放置 1 小时, 没有发现溶液从圆环中流出, 如图 6-3B 所示, 表明甘油水溶液不会溶解打印上的蜡。

6.3.4 利用硝酸纤维素膜纸芯片制备 PDMS 微孔

我们利用硝酸纤维素膜纸芯片液塑制备 PDMS 芯片的方法制备了一系列各种形状的 PDMS 微孔。

我们首先用液体加入法完成了毫米尺寸的圆形微孔的制作, 方法如下: 在硝酸纤维素膜上打印圆形图案, 125 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 5 分钟得到纸芯片; 纸芯片一面粘上透明胶带; 用双面胶将其粘附与培养皿中; 用移液器将 0.3 μL , 0.5 μL , 1 μL , 2 μL , 3 μL , 4 μL 甘油水溶液加入到 1mm, 1.5mm, 2mm, 2.5mm, 3mm, 4mm 的圆形图案中; 倒入混合均匀的 PDMS 预聚体, 固化后脱模即得到了如图 6-4A 所示的圆孔。图 6-4B 中是在 3mm 圆形硝酸纤维素膜上加入不同溶液的体积得到的。对于尺寸小于 1mm 的图形, 可以用移液器向图形缓慢喷射甘油水溶液的方法形成液膜, 再用 PDMS 浇铸的方法得到如图 6-4C, 6-4D 的 PDMS 微孔。



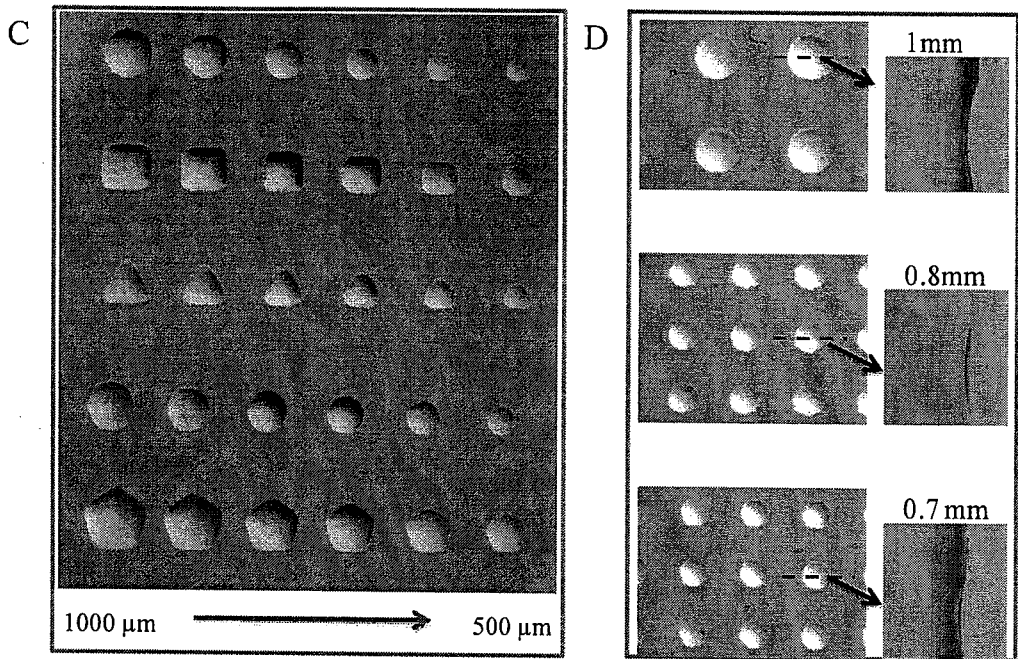


图 6-4 利用硝酸纤维素膜纸芯片通过液塑法制备的不同尺寸、不同形状的 PDMS 圆孔

Figure 6-4 Fabrication of PDMS microwells with different sizes and different shapes using wax patterned NC membrane via liquid molding.

6.3.5 利用硝酸纤维素膜纸芯片制备 PDMS 微通道

我们利用硝酸纤维素膜纸芯片液塑制备 PDMS 芯片的方法制备了各种尺寸的 PDMS 微通道。制备过程如下：1) 喷蜡打印制备硝酸纤维素膜纸芯片并将其固定于培养皿中；2) 用移液器向图形缓慢喷射甘油水溶液在硝酸纤维素膜上形成液膜；3) PDMS 预聚体浇铸液膜并固化、脱模得到如图 6-5 中的 PDMS 微通道。

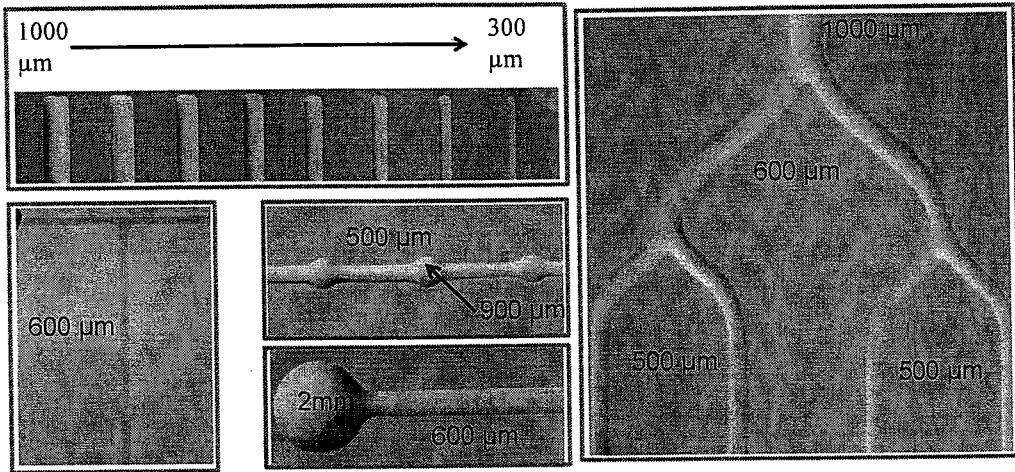


图 6-5 利用硝酸纤维素膜纸芯片通过液塑法制备的不同尺寸的 PDMS 微通道

Figure 6-5 Fabrication of PDMS microchannels with different sizes using wax patterned NC membrane via liquid molding.

我们还通过三维扫描激光显微镜(VK-9700, Keyence, Japan)对利用硝酸纤维素膜纸芯片通过液塑法制备的 PDMS 芯片的通道内壁的粗糙度进行了分析, 结果如图 6-6 所示。从图上可以看出, 利用这种方法制备的通道内壁的很光滑, 其表面轮廓算术平均偏差在纳米级, 主要原因为: PDMS 固化的支持表面为甘油水溶液, 其表面形貌受溶液表面张力的控制, 达到纳米级别。

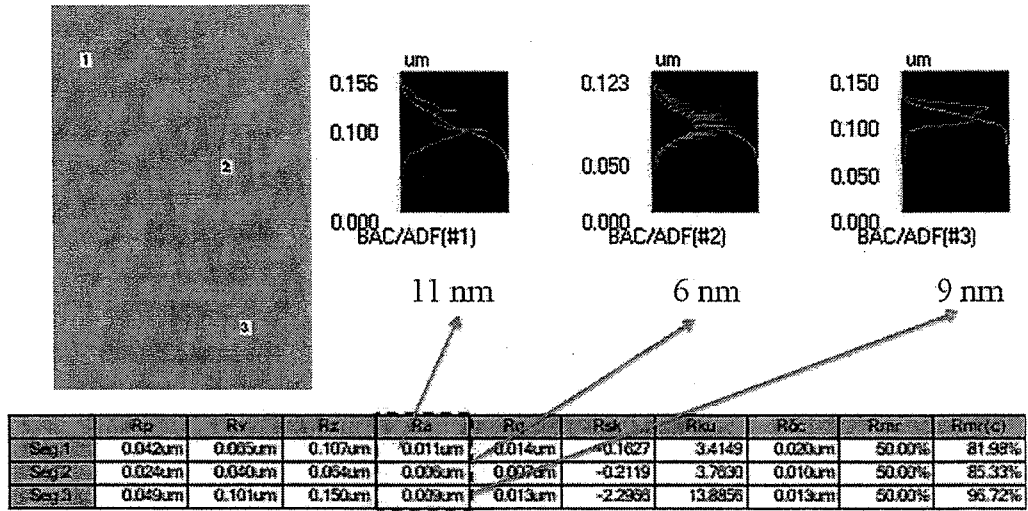


图 6-6 利用硝酸纤维素膜纸芯片通过液塑法制备的 PDMS 微通道内壁粗糙度表征 (Ra:轮廓算术平均偏差)

Figure 6-6 Characterization of surface roughness of PDMS microchannels replicated on liquid mold with 3D laser scanning microscopy (Ra: arithmetical mean roughness).

6.3.6 利用硝酸纤维素膜纸芯片液塑制备 PDMS 芯片与光刻法的比较

我们介绍的 PDMS 芯片制作方法与光刻法相比具有如下优点：1) 操作简便：无需光刻法的匀胶、前烘、后烘、显影等复杂操作；2) 时间短：整个周期只需要 1.5 小时，而光刻法则需要 1 天；3) 成本低：无需昂贵的设备如匀胶机、光刻机等，仅需喷蜡打印机、烘箱和硝酸纤维素膜等；4) 过程环保：制作过程中不需要有机溶剂的参与；5) 这种方法得到的通道表面很光滑：其表面轮廓算术平均偏差在 nm 级。

现阶段, 本方法还存在以下不足: 1) 分辨率受到限制, 只能得到最小尺寸为 $250\ \mu\text{m}$ 左右的通道; 2) 复杂图形难以实现; 3) PDMS 在硝酸纤维素膜上固化会印上膜的微孔, 难以实现可逆封接 (可用等离子实现不可逆封接)。

6.5 本章小结

建立了以硝酸纤维素膜纸芯片为基质、通过液膜法快速制备 PDMS 芯片的方法, 操作简便、快速、灵活, 无需昂贵的光刻设备。该技术不仅扩展了纸芯片的应用范围, 也为 PDMS 芯片制作的进一步普及、推广提供了新的途径。

参考文献

- [1] Derda, R., Laromaine, A., Mammoto, A., Tang, S. K. Y., Mammoto, T., Ingber, D. E., Whitesides, G. M., Paper-supported 3D cell culture for tissue-based bioassays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(44): 18457-18462.
- [2] Hu, L. B., Choi, J. W., Yang, Y., Jeong, S., La Mantia, F., Cui, L. F., Cui, Y., Highly conductive paper for energy-storage devices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(51): 21490-21494.
- [3] Martinez, A. W., Phillips, S. T., Butte, M. J., Whitesides, G. M., Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, 46(8): 1318-1320.

-
- [4] Abe, K., Suzuki, K., Citterio, D., Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(18): 6928-6934.
- [5] Bruzewicz, D. A., Reches, M., Whitesides, G. M., Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(9): 3387-3392.
- [6] Carrilho, E., Martinez, A. W., Whitesides, G. M., Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(16): 7091-7095.
- [7] Carrilho, E., Phillips, S. T., Vella, S. J., Martinez, A. W., Whitesides, G. M., Paper Microzone Plates. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(15): 5990-5998.
- [8] Dungchai, W., Chailapakul, O., Henry, C. S., Electrochemical Detection for Paper-Based Microfluidics. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(14): 5821-5826.
- [9] Ellerbee, A. K., Phillips, S. T., Siegel, A. C., Mirica, K. A., Martinez, A. W., Striehl, P., Jain, N., Prentiss, M., Whitesides, G. M., Quantifying Colorimetric Assays in Paper-Based Microfluidic Devices by Measuring the Transmission of Light through Paper. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(20): 8447-8452.
- [10] Li, X., Tian, J. F., Nguyen, T., Shen, W., Paper-Based Microfluidic Devices by Plasma Treatment. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(23): 9131-9134.

- [11] Lu, Y., Shi, W. W., Jiang, L., Qin, J. H., Lin, B. C., Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. *Electrophoresis*, 2009, 30(9): 1497-1500.
- [12] Martinez, A. W., Phillips, S. T., Carrilho, E., Thomas, S. W., Sindi, H., Whitesides, G. M., Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(10): 3699-3707.
- [13] Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M., Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(50): 19606-19611.
- [14] Martinez, A. W., Phillips, S. T., Wiley, B. J., Gupta, M., Whitesides, G. M., FLASH: A rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 2008, 8(12): 2146-2150.
- [15] Zhao, W. A., van den Berg, A., Lab on paper. *Lab on a Chip*, 2008, 8(12): 1988-1991.
- [16] Lu, Y., Shi, W. W., Qin, J. H., Lin, B. C., Fabrication and Characterization of Paper-Based Microfluidics Prepared in Nitrocellulose Membrane By Wax Printing. *Analytical Chemistry*, 82(1): 329-335.
- [17] Pelton, R., Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28(8):

- 925-942.
- [18] Chao, S. H., Carlson, R., Meldrum, D. R., Rapid fabrication of microchannels using microscale plasma activated templating (mu PLAT) generated water molds. *Lab on a Chip*, 2007, 7(5): 641-643.
- [19] Liu, X., Wang, Q., Qin, J. H., Lin, B. C., A facile "liquid-molding" method to fabricate PDMS microdevices with 3-dimensional channel topography. *Lab on a Chip*, 2009, 9(9): 1200-1205.
- [20] Park, J. Y., Hwang, C. M., Lee, S. H., Ice-lithographic fabrication of concave microwells and a microfluidic network. *Biomedical Microdevices*, 2009, 11(1): 129-133.
- [21] Washburn, E. W., The dynamics of capillary flow. *Physical Review*, 1921, 17(3): 273-283.

总结论

本论文研制了一系列不同材料、不同设计的微流控芯片并尝试将其应用于现场即时诊断中，得到如下结论：

1，用 PDMS 经掺杂非离子型表面活性剂修饰后可取代硅等昂贵材料制备表面张力微泵并将其应用于微流控免疫分析中，成本低廉、操作简单、反应快速，具有应用于现场即时诊断的前景。

2，以拍照手机为检测器，对微流控芯片上的胶体金免疫分析银染色结果实现了手持检测。该方法能大大降低检测成本和检测器体积，使其与芯片体积匹配，具有现场检测、远程诊断的应用前景。

3，用蜡作为疏水性围堰，建立了纸芯片的新型制备方法。该方法有低成本、快速、操作简便和环保的优点，有望实现纸芯片的大规模、自动化制备。

4，以硝酸纤维素膜取代普通滤纸、用喷蜡打印法制备新型纸芯片，并将其用于蛋白固定、免疫分析和样品纯化等过程，为扩大纸芯片的原料来源和应用范围打下了基础。

5，建立了以硝酸纤维素膜纸芯片为基质、通过液膜法快速制备 PDMS 芯片的方法，操作简便、快速、灵活，无需昂贵的光刻设备。该技术不仅扩展了纸芯片的应用范围，也为 PDMS 芯片制作的进一步普及、推广提供了新的途径。