

第一章 微流控诊断芯片研究进展

1.1 微流控芯片简介

20 世纪 90 年代初, Manz 等人首次提出微全分析系统 (Miniaturized Total Analysis System, μ -TAS) 的概念, 是微流控芯片研究的开始[1-3]。至 90 年代中后期, 随着 MEMS 技术的进步, 微流控芯片的制作技术得到长足发展, 微流控芯片的应用范围也从核酸分析拓展到各个学科、各个领域, 逐步凝练出微流控芯片、芯片实验室的概念[4-20]。

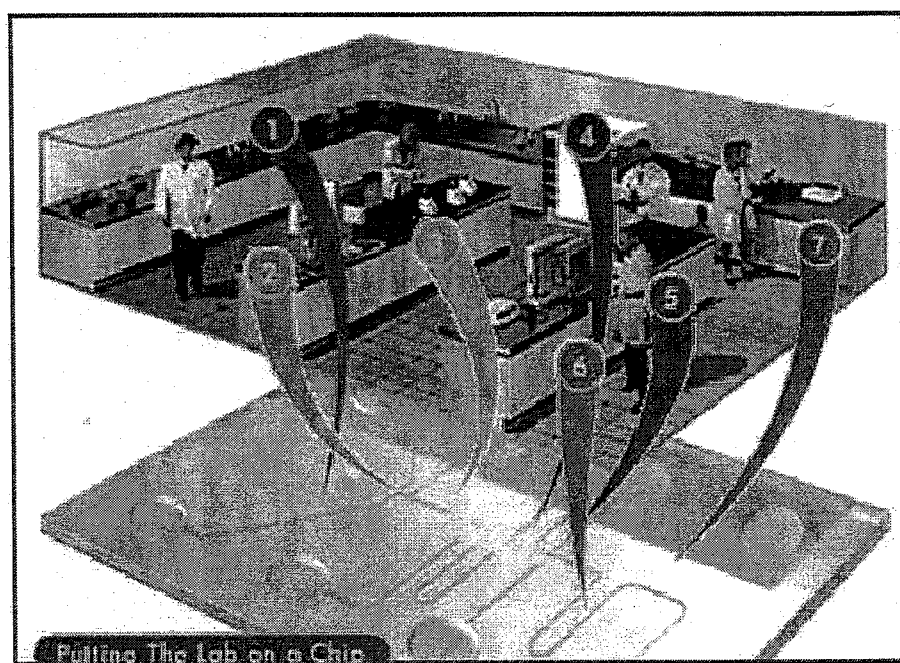


图 1-1 芯片实验室概念展示 (注: 数字代表不同的操作单元)

(<http://www.caliperls.com/>)

Figure 1 Conceptual demonstration of Lab-on-a-chip (Note: different numbers represent different operations)

微流控芯片又称芯片实验室 (Lab on a Chip), 指的是把生物和化学等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, 用以实现常规生物或化学实验室的各种功能的一种技术, 如图 1-1 示意。微流控芯片的基本特征是多种单元技术在微小平台上的灵活组合和规模集成。微流控芯片被认为是这一世纪最重要的科学技术之一, 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[8-11, 13-17]。

微流控芯片的主要技术包括芯片材料和芯片制作技术[21, 22]、材料的表面改性[23]、流体驱动与控制[24, 25]、样品的前处理[26, 27]、反应与混合[28, 29]、分离技术[30, 31]、液滴技术[32-34]、检测技术[35]、接口技术[36]和系统集成[37, 38]等。

理论上来说, 微流控芯片作为一种具有重大应用前景的前沿技术可以用于涉及流体的任何学科, 比如化学(分析化学[39]、有机化学[40]、物理化学[41]等)、生物学(分子生物学、结构生物学、细胞生物学等)[10, 42-45]、医学(组织工程、药物筛选等)[46, 47]、光学[12, 48]、信息学[49, 50]和单分子科学[51]等。目前, 微流控芯片的应用所涉及的领域主要包括疾病诊断[52]、药物筛选[53, 54]、环境检测[55, 56]、食品安全[56]、体育竞技[57]以及航天[58]等各行各业, 产生了广泛的影响。其中, 诊断由于其在诸多领域(临床、环境、食品等)的重大应用前景目前是微流控芯片研究的一个热点, 也是其实现产业化的一个突破口, 表 1-1 为一些专注微流控诊断芯片商业化的公司[52]。

表 1-1 一些开发诊断芯片产品的公司

Table 1-1 Commercial available chip based diagnostic systems.

Company	Target	Website
Advanced Liquide Logics	Immunoassay	www.liquid-logic.com
Cepheid	DNA	www.cepheid.com
CombiMatrix CustomArray	DNA, biological threads	www.combimatrix.com
Invitrogen	DNA	www.invitrogen.com
Affymetrix	DNA	www.affymetrix.com
Caliper	DNA	www.caliperis.com
Febit	DNA/RNA/Proteins	www.febit.com
Claros Diagnostics	Proteins	www.clarosdx.com
HandyLab	DNA, proteins	www.handylab.com
Abbot Diagnostics (iStat)	Markers	www.istat.com
LabNow	HIV/AIDS	www.labnow.com
Micronics	Enteric pathogens	www.micronics.net
Nanogen	DNA/RNA	www.nanogen.com
Nanosphere	DNA, proteins	www.nanosphere-inc.com
Sensata (Spreeta)	Viruses, bacteria	www.sensata.com
Sequella	Proteins	www.sequella.com
BIAcore	Bacteria, viruses	www.biacore.com
Canary	B-lymphocytes	www.canarysystem.com
Rapid Plex (ICx Biosystems)	Bacteria, protein	www.inivtrogen.com

1.2 现场即时诊断

现场即时诊断 (Point of care testing, POCT) 又称为床边检测或病人身边检测、家用检验等, 它应该同时具有: 空间上的“现场”和时间上的“即时” [59, 60]。美国食品和药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 对于“简单测试”的定义可以作为现场即时诊断内涵的参考, 如表 1-2 所示 [60]。

表 1-2 美国食品和药物管理局对于“简单测试”的定义
(<http://www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/>)

Table 1-2 FDA definition of a simple test.

FDA definition of a simple test ^a
Fully automated instrument or unitized, self-contained test
Uses direct unprocessed specimens/capillary blood (fingerstick), nasal swabs, or urine
Needs only basic, non-technique-dependent specimen manipulation, including any for decontamination
Needs only basic, non-technique-dependent reagent manipulation, such as "mix reagent A and reagent B"
Needs no operator intervention during the analysis steps
Needs no technical or specialized training
Needs no electronic or mechanical maintenance
Produces results that require no operator calibration, interpretation, or calculations
Produces results that are clear to read, such as positive or negative, a direct readout of numerical values, the clear presence or absence of a line, or obvious color gradations
Has test performance comparable to a traceable reference method, as demonstrated by studies in which intended operators perform the test
Contains a quick reference instruction sheet written at the educational level of the user

^aSimple as defined in Recommendations for Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA): CLIA Waiver Applications.

现在公认的说法是，现场即时诊断起源于尿检测技术。大约在公元 1500 年前，当时的医生注意到蚂蚁被患有的一种神秘的消瘦病的患者的尿液所吸引，由此认识了糖尿病。现代意义上的现场即时诊断起源于 20 世纪 80 年代，第一个商业化产品为 Ames 的葡萄糖测定仪。

现场即时诊断具有广阔的应用领域，如临床诊断、食品安全、环境监测、自然灾害、突发事件等。应用的场所包括中心医院、急诊、手术室、救护车、血库、家庭、社区、农村诊所，也可以用于海关、缉毒、保险公司、病理实验室等。[61]

现场即时诊断常用的技术包括干化学法测定、免疫层析和生物传感器等，现在正在发展中的一些现场即时诊断技术还包括微流控芯片、生物芯片、图形分析、纳米技术和表面等离子共振技术等。[61, 62]

1.3 微流控现场即时诊断芯片研究

现场即时诊断技术具有一系列不同于实验室诊断、医院诊断的特点，如要求分析速度快、操作简便、体积小、便携化等，而微流控芯片正好具有体积小、消耗少、功能集成、分析速度快等优点，因而非常适合开发现场即时

诊断平台。同时从现场即时诊断的内涵推论，要发展真正意义的现场即时诊断微流控芯片需要从以下方面努力：1) 低成本的芯片材料；2) 批量化、快速的芯片制作技术；3) 简便、快捷的芯片使用方法；4) 芯片的一次性使用；5) 试剂在芯片上的长期、稳定储存；6) 样品前处理在芯片上的集成；7) 无需外界动力源；8) 简便的结果判定方法（结果肉眼可见或使用便携化检测仪器）。[60, 63-79]

微流控现场即时诊断芯片根据分析对象的不同可以分为核酸诊断芯片、蛋白/酶诊断芯片和细胞诊断芯片等，本节将分别对其进行简要介绍。

1.3.1 核酸诊断芯片

核酸诊断是用分子生物学的理论和技术，通过直接探查目标 DNA 或 RNA 的存在状态或缺陷，从而对人体状态与疾病做出诊断的方法（其中检测内源性基因诊断基因有无病变，检测外源性基因诊断有无病原体感染。）

微流控芯片核酸诊断研究是一个多单元、多步骤分析过程，涉及的主要技术包括 DNA 萃取/纯化、PCR 扩增、分子杂交、电泳分离和检测等，其最终目的是实现多单元操作过程的集成，实现快速、便携化诊断，满足家庭、医院的需求。[38, 80-84]

Motorola 公司研制了一种基于 PC 材质的集成式 DNA 分析芯片系统，如图 1-2 A 所示，该系统可以在线完成细胞磁珠捕获/富集/纯化/裂解、PCR 反应、DNA 杂交和电化学检测，从而可以从几毫升的全血样品中检测致病病菌（如 *E. coli* K12）。[85]

Landers 等报道了一种全集成微流控核酸分析系统，如图 1-2 B 所示，该系统分为三个功能区：样品 DNA 提取的 SPE 区，红外加热/热电偶测温的 PCR 反应区和芯片电泳分离、检测区。他们利用这种核酸诊断系统完成了炭疽热病毒和百日咳患者的基因诊断，分析时间不到 30 分钟。[86]

Burns 等设计了一种基于硅-玻璃的基因诊断芯片系统，如图 1-2 C 所示，

该芯片系统集成了微阀、微加热器、微反应器、温度传感器、电泳分离等多个过程。在该芯片上，他们完成了流感病毒株 (A/LA/1/87) 的检测。[87]

Soh 等报道了一种一次性使用基因诊断分析系统，如图 1-2 D 所示，该系统集合了三个主要功能：PCR 反应，酶反应和电化学检测。在这个平台上，他们完成了肠道沙门氏菌的检测，检测限达到 10 aM。[88]

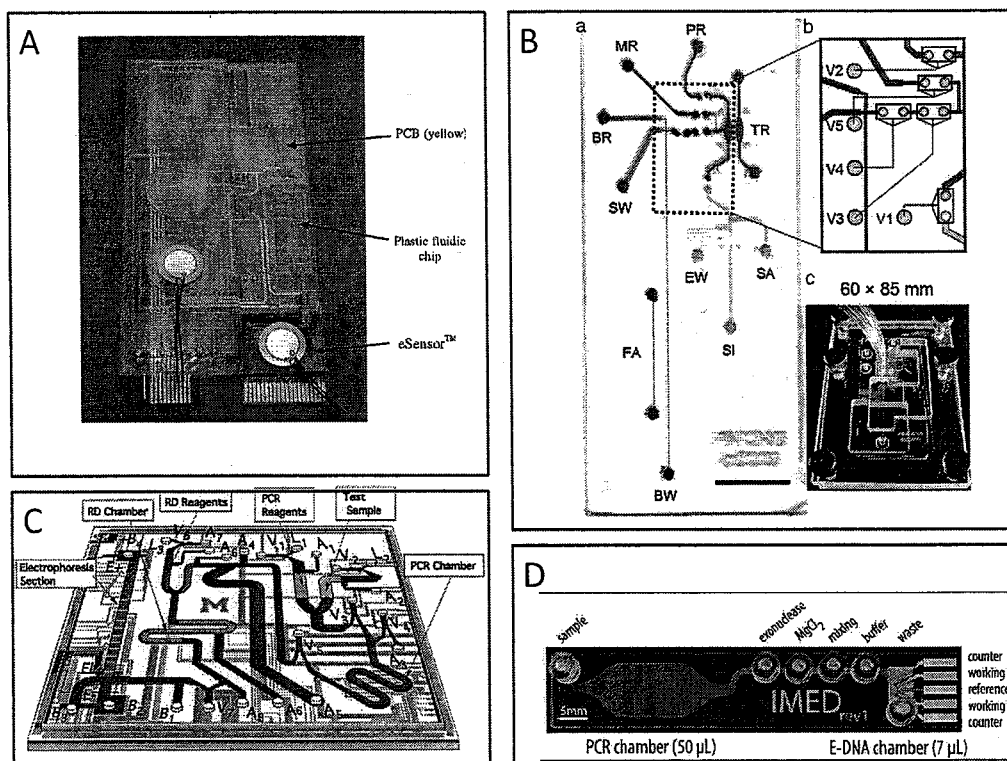


图 1-2 集成式微流控核酸诊断芯片

Figure 1-2 Some examples of integrated microfluidics platforms for nucleic acid based diagnosis

1.3.2 蛋白质/酶诊断芯片

基于蛋白质/酶的微流控芯片诊断分析手段主要是采用具有高度的特异

性或专一性的免疫反应检测目标病原体分子

相对于传统免疫反应，微流控芯片免疫反应有以下几点优势：（1）反应体积可达 nL 至 pL 级，样品和试剂耗量极少，还特别适合于血液、尿液及其他复杂样品中的痕量物质的检测；（2）反应动力学过程加快、反应时间缩短；（3）实验设计更加灵活，检测手段更为丰富；（4）可以集成多种不同的操作单元，如混合反应、稀释和标记等，操作简单，易于实现高通量，便于自动化、微型化。[89-92]

微流控芯片上的免疫分析分为均相免疫和非均相免疫，其中前者主要包括扩散免疫和芯片电泳免疫，后者主要为固相吸附免疫反应。

Paul Yager 等基于微通道中流体层流的特点建立了竞争法的扩散免疫反应，1-3A 图为反应示意图：在通道的一端注入抗体，另一端注入荧光标记的抗原和待测抗原混合液，两条通道逐渐汇聚成“T”字型，在此处两种不同的溶液相互接触。两种液体并排前进而非对流或湍流混合，在两种溶液的接触界面发生扩散。在层流的接触面抗原会被抗体捕获，扩散速度减慢。这样在溶液中就会形成自由抗原和抗原-抗体复合物的浓度梯度，这种溶度梯度可被 CCD 检测到，通过特定的软件，对抗原浓度定量。用这种方法测定血液中苯妥英，反应时间小于 1 分钟，检测限可达 0.43nM。此方法芯片加工简单，价格低廉，操作方便，血液仅做抗凝处理即可，无需去除血细胞。可以通过连续多次泵入不同样品或在一块芯片上加工多个“T”字型通道实现高通量。[93, 94]

美国圣地亚国家实验室的 Amy E. Herr 发明了一种便携式、集成式芯片免疫电泳系统，如图 1-3B 所示，可以完成样品过滤、预富集、混合、分离和检测功能。在此平台上对唾液样本中的基质金属蛋白酶-8（MMP-8）进行了检测，样品消耗 20 μ L，分析时间少于 10 分钟。[95, 96]

IBM 公司的 Emmanuel Delamarche 等设计了基于表面张力驱动力的固相吸

附免疫分析系统，如图如图 1-3C 所示。该系统有表面张力微泵单元、抗体试剂储存单元和免疫反应单元等，可以完成全血过滤、检测抗体的溶解和免疫反应等免疫分析步骤，得到分析结果。他们在此平台上了完成了全血中 C 反应蛋白的检测，样品消耗仅为 5 μ L，其中 10ng/mL 浓度 C 反应蛋白的分析时间仅需 3 分钟（检测蛋白的浓度为 1 ng/mL 时需要 14 分钟）。[97]

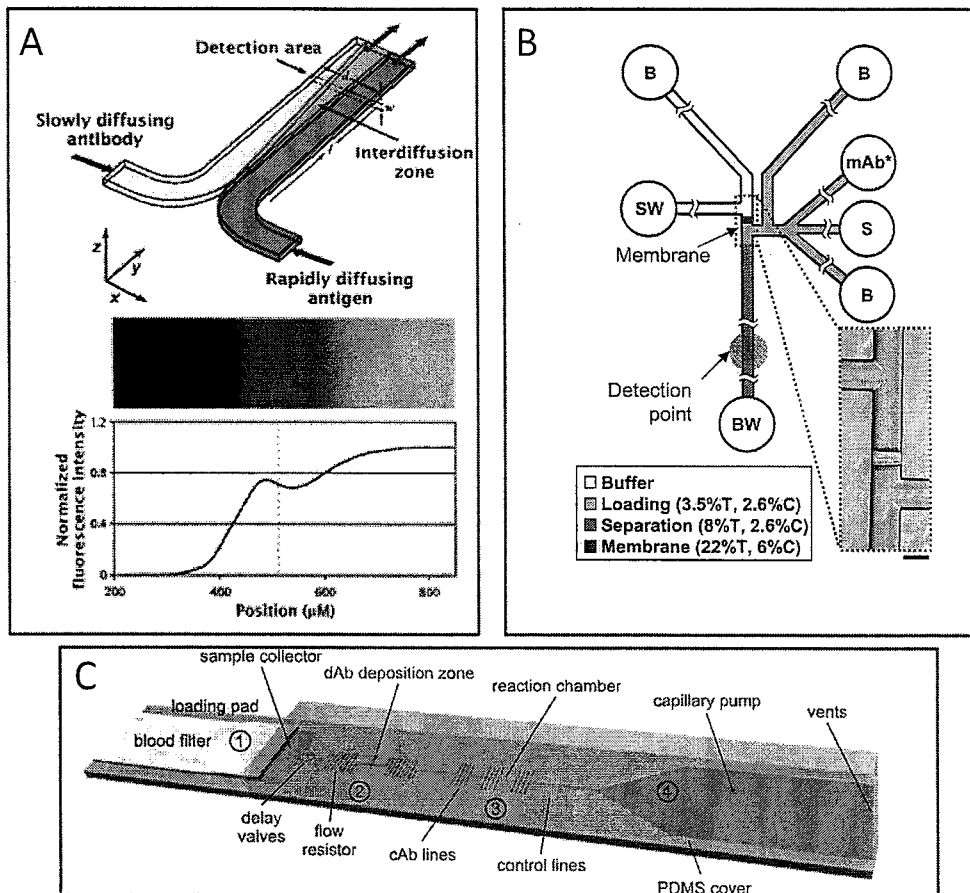


图 1-3 微流控蛋白/酶诊断芯片

Figure 1-3 Some examples of integrated microfluidics platforms for protein based diagnosis

1.3.3 细胞诊断芯片

细胞是生物形态结构和生命活动的基本单位。细胞诊断作为一种非常直观的诊断方法至少已有 60 年的发展历史,是很多疾病如疟疾、肺结核等常规检查方法。目前芯片上的细胞诊断分析主要利用免疫固定的方法得到目标细胞并对这部分细胞计数,目标细胞主要集中于红血球细胞和 CD4⁺细胞用于检测艾滋病和监测艾滋病人的病程。[98-100]

Xuanhong Cheng 等设计了一种简单的微流控芯片如图 1-4A 所示,在此芯片上通过免疫捕获的方法固定 CD4⁺T 淋巴细胞并计数,用于艾滋病的诊断分析。样品消耗为 10 微升全血,分析时间少于 10 分钟,其结果同传统流式细胞仪的结果相关系数的二次方达到 0.93。[101]

SangJun Moon 等报道了一种无透镜的微流控芯片细胞计数平台用于 CD4⁺T 淋巴细胞并计数的捕获和自动计数,如图 1-4B 所示,样品消耗为 10 微升全血,分析时间少于 10 分钟,在总体效率上同流式细胞仪比较为 $83.5 \pm 2.4\%$ 。[102]

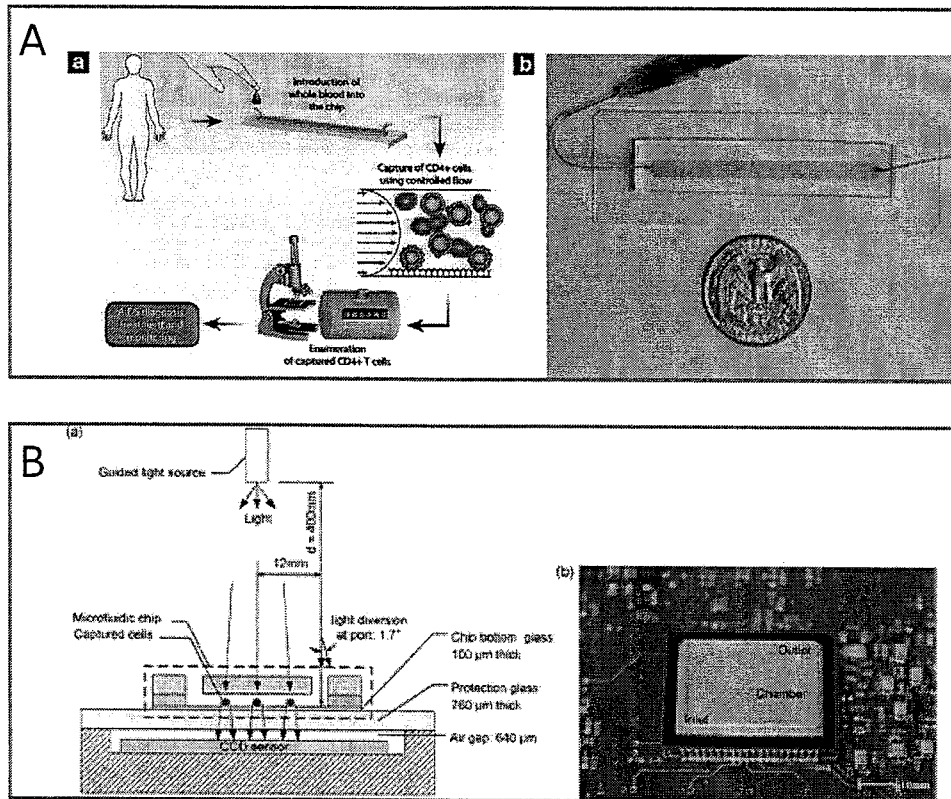


图 1-4 微流控细胞诊断芯片

Figure 1-5 Some examples of microfluidics platforms for cell based diagnosis

1.4 本论文涉及的研究工作概述

基于微流控芯片平台分析速度快、试剂消耗少等优点，本论文着眼于低成本的微流控芯片的研制并尝试将其应用于现场即时诊断中，具体工作内容包括五章：

1，用非离子型表面活性剂（Triton X-100，Tween 20，Tween 80 和 Span 80 等）掺杂修饰 PDMS 使之可在通常条件下长期保持亲水性，利用修饰后的

PDMS 制作了集成表面张力微泵的免疫分析芯片并在该芯片上完成了人 IgG 的免疫分析。

2, 研制了 PDMS 和聚苯乙烯的杂交芯片, 以 PDMS 层为液路层、聚苯乙烯为固相吸附免疫分析的载体, 用拍照手机作为检测器, 对微流控芯片胶体金免疫分析银染色结果成像并用软件 (如 Imagepro, Photoshop) 对其取值进行定量分析, 实现了人 IgG 的免疫分析。

3, 用蜡取代光刻胶、PDMS 等作为疏水性材料结合普通滤纸制备纸芯片。制作方法主要包括三种: 1), 蜡笔描绘; 2) 喷墨打印结合蜡笔描绘和 3) 喷蜡打印。制作过程分打蜡和烘烤两步, 可在 10 分钟之内完成, 无需洁净室、曝光机等昂贵设施。用上述纸芯片, 完成了 HRP、葡萄糖和 BSA 的显色分析。

4, 在工作 3 的基础上, 用硝酸纤维素膜作为纸芯片的制作材料, 利用喷蜡打印技术制备纸芯片, 并将硝酸纤维素膜纸芯片应用于蛋白质包被、免疫分析和样品过滤等分析过程中。

5, 在工作 4 的基础上, 以硝酸纤维素膜纸芯片为基质采用液膜法制备了 PDMS 芯片, 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, 加快了以 PDMS 为材料的微流控诊断芯片的开发。

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] vonHeeren, F., Verpoorte, E., Manz, A., Thormann, W., Micellar

- electrokinetic chromatography separations and analyses of biological samples on a cyclic planar microstructure. *Analytical Chemistry*, 1996, 68(13): 2044-2053.
- [3] Kopp, M. U., de Mello, A. J., Manz, A., Chemical amplification: Continuous-flow PCR on a chip. *Science*, 1998, 280(5366): 1046-1048.
- [4] Woolley, A. T., Hadley, D., Landre, P., deMello, A. J., Mathies, R. A., Northrup, M. A., Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Analytical Chemistry*, 1996, 68(23): 4081-4086.
- [5] 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.
- [6] Hadd, A. G., Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., Microfluidic assays of acetylcholinesterase inhibitors. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(22): 5206-5212.
- [7] Waters, L. C., Jacobson, S. C., Kroutchinina, N., Khandurina, J., Foote, R. S., Ramsey, J. M., Microchip device for cell lysis, multiplex PCR amplification, and electrophoretic sizing. *Analytical Chemistry*, 1998, 70(1): 158-162.
- [8] Craighead, H., Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules. *Nature*, 2006, 442(7101):

387-393.

- [9] deMello, A. J., Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*, 2006, 442(7101): 394-402.
- [10] El-Ali, J., Sorger, P. K., Jensen, K. F., Cells on chips. *Nature*, 2006, 442(7101): 403-411.
- [11] Janasek, D., Franzke, J., Manz, A., Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. *Nature*, 2006, 442(7101): 374-380.
- [12] Psaltis, D., Quake, S. R., Yang, C., Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics. *Nature*, 2006, 442(7101): 381-386.
- [13] Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 2006, 442(7101): 368-373.
- [14] Yager, P., Edwards, T., Fu, E., Helton, K., Nelson, K., Tam, M. R., Weigl, B. H., Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature*, 2006, 442(7101): 412-418.
- [15] 林炳承, 秦建华, 微流控芯片实验室. 2006, 北京: 科学出版社.
- [16] 林炳承, 秦建华, 微流控芯片分析化学实验室. 高等学校化学学报, 2009年3月, 30(3): 433-445.
- [17] 林炳承, 秦建华, 图解微流控芯片实验室. 2008, 北京: 科学出版社.
- [18] Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A., Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(12): 3887-3907.
- [19] Vilker, T., Janasek, D., Manz, A., Micro total analysis systems.

- Recent developments. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(12): 3373-3385.
- [20] West, J., Becker, M., Tombrink, S., Manz, A., Micro total analysis systems: Latest achievements. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(12): 4403-4419.
- [21] Becker, H., Gartner, C., Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 390(1): 89-111.
- [22] Becker, H., Locascio, L. E., Polymer microfluidic devices. *Talanta*, 2002, 56(2): 267-287.
- [23] Muck, A., Svatos, A., Chemical modification of polymeric microchip devices. *Talanta*, 2007, 74(3): 333-341.
- [24] Nguyen, N. T., Huang, X. Y., Chuan, T. K., MEMS-micropumps: A review. *Journal of Fluids Engineering-Transactions of the Asme*, 2002, 124(2): 384-392.
- [25] Luo, Y., Qin, J. H., Lin, B. C., Methods for pumping fluids on biomedical lab-on-a-chip. *Frontiers in Bioscience*, 2009, 14: 3913-3924.
- [26] Lichtenberg, J., de Rooij, N. F., Verpoorte, E., Sample pretreatment on microfabricated devices. *Talanta*, 2002, 56(2): 233-266.
- [27] Grodzinski, P., Liu, R., Yang, J., Ward, M. D., Microfluidic system integration in sample preparation chip-sets - a summary. *Proceedings of the 26th Annual International Conference of the*

- Ieee Engineering in Medicine and Biology Society, Vols 1-7, 2004, 26: 2615-2618
- [28] Lin, W. Y., Wang, Y. J., Wang, S. T., Tseng, H. R., Integrated microfluidic reactors. *Nano Today*, 2009, 4(6): 470-481.
- [29] Mansur, E. A., Ye, M. X., Wang, Y. D., Dai, Y. Y., A state-of-the-art review of mixing in microfluidic mixers. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2008, 16(4): 503-516.
- [30] Lenshof, A., Laurell, T., Continuous separation of cells and particles in microfluidic systems. *Chemical Society Reviews*, 39(3): 1203-1217.
- [31] Wu, D. P., Qin, J. H., Lin, B. C., Electrophoretic separations on microfluidic chips. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1184(1-2): 542-559.
- [32] Teh, S. Y., Lin, R., Hung, L. H., Lee, A. P., Droplet microfluidics. *Lab on a Chip*, 2008, 8(2): 198-220.
- [33] Wang, F., Burns, M. A., Performance of nanoliter-sized droplet-based microfluidic PCR. *Biomedical Microdevices*, 2009, 11(5): 1071-1080.
- [34] Xu, T., Chakrabarty, K., Functional testing of digital microfluidic biochips. 2007 Ieee International Test Conference, Vols 1 and 2, 2007: 505-514
- [35] Mogensen, K. B., Klank, H., Kutter, J. P., Recent developments in detection for microfluidic systems. *Electrophoresis*, 2004, 25(21-22): 3498-3512.

- [36] Atencia, J., Beebe, D. J., Controlled microfluidic interfaces. *Nature*, 2005, 437(7059): 648-655.
- [37] Velten, T., Ruf, H. H., Barrow, D., Aspragathos, N., Lazarou, P., Jung, E., Malek, C. K., Richter, M., Kruckow, J., Packaging of bio-MEMS: Strategies, technologies, and applications. *Ieee Transactions on Advanced Packaging*, 2005, 28(4): 533-546.
- [38] Liu, P., Mathies, R. A., Integrated microfluidic systems for high-performance genetic analysis. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27(10): 572-581.
- [39] Xu, X. L., Zhang, S., Chen, H., Kong, J. L., Integration of electrochemistry in micro-total analysis systems for biochemical assays: Recent developments. *Talanta*, 2009, 80(1): 8-18.
- [40] Marre, S., Jensen, K. F., Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems. *Chemical Society Review*, 39(3): 1183-202.
- [41] Lee, W., Fon, W., Axelrod, B. W., Roukes, M. L., High-sensitivity microfluidic calorimeters for biological and chemical applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(36): 15225-15230.
- [42] Kim, Y. T., Karthikeyan, K., Chirvi, S., Dave, D. P., Neuro-optical microfluidic platform to study injury and regeneration of single axons. *Lab on a Chip*, 2009, 9(17): 2576-2581.

- [43] Chronis, N., Worm chips: Microtools for *C. elegans* biology. *Lab on a Chip*, 10(4): 432-437.
- [44] Shi, W. W., Qin, J. H., Ye, N. N., Lin, B. C., Droplet-based microfluidic system for individual *Caenorhabditis elegans* assay. *Lab on a Chip*, 2008, 8(9): 1432-1435.
- [45] Qin, J. H., Wheeler, A. R., Maze exploration and learning in *C-elegans*. *Lab on a Chip*, 2007, 7(2): 186-192.
- [46] Cheung, K. C., Implantable microscale neural interfaces. *Biomedical Microdevices*, 2007, 9(6): 923-938.
- [47] Hediger, S., Fontannaz, J., Sayah, A., Hunziker, W., Gijs, M. A. M., Biosystem for the culture and characterisation of epithelial cell tissues. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2000, 63(1-2): 63-73.
- [48] Chandrasekaran, A., Packirisamy, M., Integrated Optical Microfluidic Lab-on-a-chip - art. no. 70992B. *Photonics North 2008*, 2008, 7099: B992-B992
- [49] Hashimoto, M., Feng, J., York, R. L., Ellerbee, A. K., Morrison, G., Thomas, S. W., Mahadevan, L., Whitesides, G. M., Infochemistry: Encoding Information as Optical Pulses Using Droplets in a Microfluidic Device. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(34): 12420-12429.
- [50] Thomas, S. W., Chiechi, R. C., LaFratta, C. N., Webb, M. R., Lee, A., Wiley, B. J., Zakin, M. R., Walt, D. R., Whitesides, G. M., Infochemistry and infofuses for the chemical storage and

- transmission of coded information. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(23): 9147-9150.
- [51] Burton, R. E., White, E. J., Foss, T. R., Phillips, K. M., Meltzer, R. H., Kojanian, N., Kwok, L. W., Lim, A., Pellerin, N. L., Mamaeva, N. V., Gilmanshin, R., A microfluidic chip-compatible bioassay based on single-molecule detection with high sensitivity and multiplexing. *Lab Chip*, 10(7): 843-51.
- [52] Mairhofer, J., Roppert, K., Ertl, P., Microfluidic Systems for Pathogen Sensing: A Review. *Sensors*, 2009, 9(6): 4804-4823.
- [53] Maguire, T. J., Novik, E., Chao, P., Barminko, J., Nahmias, Y., Yarmush, M. L., Cheng, K. C., Design and Application of Microfluidic Systems for In Vitro Pharmacokinetic Evaluation of Drug Candidates. *Current Drug Metabolism*, 2009, 10(10): 1192-1199.
- [54] Ye, N. N., Qin, J. H., Shi, W. W., Liu, X., Lin, B. C., Cell-based high content screening using an integrated microfluidic device. *Lab on a Chip*, 2007, 7(12): 1696-1704.
- [55] Li, H. F., Lin, J. M., Applications of microfluidic systems in environmental analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393(2): 555-567.
- [56] Lauri, A., Mariani, P. O., Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. *Genes and Nutrition*, 2009, 4(1): 1-12.

- [57] Kong, J., Jiang, L., Su, X. O., Qin, J. H., Du, Y. G., Lin, B. C., Integrated microfluidic immunoassay for the rapid determination of clenbuterol. *Lab on a Chip*, 2009, 9(11): 1541-1547.
- [58] Willis, P. A., Hunt, B. D., White, V. E., Lee, M. C., Ikeda, M., Bae, S., Pelletier, M. J., Grunthaler, F. J., Monolithic Teflon (R) membrane valves and pumps for harsh chemical and low-temperature use. *Lab on a Chip*, 2007, 7(11): 1469-1474.
- [59] Price, C. P., Regular review - Point of care testing. *British Medical Journal*, 2001, 322(7297): 1285-1288.
- [60] Yager, P., Domingo, G. J., Gerdes, J., Point-of-care diagnostics for global health. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2008, 10: 107-144.
- [61] 陈晓东, 周旭一, POCT-检验医学发展的趋势之一. *放射免疫学杂志*, 2008, 21(4): 335-337.
- [62] 李静, 王小中, POCT 的发展及其应用. *江西医药*, 2008, 43(1): 56-58.
- [63] Hosokawa, K., Sato, K., Ichikawa, N., Maeda, M., Power-free poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices for gold nanoparticle-based DNA analysis. *Lab on a Chip*, 2004, 4(3): 181-185.
- [64] Ahn, C. H., Choi, J. W., Beaucage, G., Nevin, J. H., Lee, J. B., Puntambekar, A., Lee, J. Y., Disposable Smart lab on a chip for point-of-care clinical diagnostics. *Proceedings of the Ieee*,

- 2004, 92(1): 154-173.
- [65] Ahn, C. H., Choi, J. W., Kim, S., Sohn, Y. S., Puntambekar, A., Murugesan, S., Beaucage, G., Nevin, J. H., Disposable smart plastic biochips for clinical diagnostics. *Biomems and Bionanotechnology*, 2002, 729: 29-38
- [66] Botrous, M., Dheda, S., Liu, K., Sreedharan, A., Velasco, K., Point of care tuberculosis diagnostics in developing world. *Proceedings of the 2nd Frontiers in Biomedical Devices Conference*, 2007: 69-70
- [67] Biehl, M., Velten, T., Gaps and challenges of Point-of-Care technology. *Ieee Sensors Journal*, 2008, 8(5-6): 593-600.
- [68] 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
- [69] Linder, V., Microfluidics at the crossroad with point-of-care diagnostics. *Analyst*, 2007, 132(12): 1186-1192.
- [70] Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M., Carrilho, E., Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(1): 3-10.
- [71] Sista, R., Hua, Z. S., Thwar, P., Sudarsan, A., Srinivasan, V., Eckhardt, A., Pollack, M., Pamula, V., Development of a digital microfluidic platform for point of care testing. *Lab on a Chip*,

- 2008, 8(12): 2091-2104.
- [72] Soper, S. A., Brown, K., Ellington, A., Frazier, B., Garcia-Manero, G., Gau, V., Gutman, S. I., Hayes, D. F., Korte, B., Landers, J. L., Larson, D., Ligler, F., Majumdar, A., Mascini, M., Nolte, D., Rosenzweig, Z., Wang, J., Wilson, D., Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. *Biosensors & Bioelectronics*, 2006, 21(10): 1932-1942.
- [73] Weigl, B., Domingo, G., LaBarre, P., Gerlach, J., Towards non- and minimally instrumented, microfluidics-based diagnostic devices. *Lab on a Chip*, 2008, 8(12): 1999-2014.
- [74] Lu, Y., Shi, W. W., Qin, J. H., Lin, B. C., Low cost, portable detection of gold nanoparticle-labeled microfluidic immunoassay with camera cell phone. *Electrophoresis*, 2009, 30(4): 579-582.
- [75] 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.
- [76] 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*, 2010, 82(1): 329-335.
- [77] Qiu, X., Thompson, J. A., Chen, Z., Liu, C., Chen, D., Ramprasad, S., Mauk, M. G., Ongagna, S., Barber, C., Abrams, W. R., Malamud,

- D., Corstjens, P. L. A. M., Bau, H. H., Finger-actuated, self-contained immunoassay cassettes. *Biomedical Microdevices*, 2009, 11(6): 1175-86.
- [78] Stevens, D. Y., Petri, C. R., Osborn, J. L., Spicar-Mihalic, P., McKenzie, K. G., Yager, P., Enabling a microfluidic immunoassay for the developing world by integration of on-card dry reagent storage. *Lab on a Chip*, 2008, 8(12): 2038-2045.
- [79] Hosokawa, K., Omata, M., Sato, K., Maeda, M., Power-free sequential injection for microchip immunoassay toward point-of-care testing. *Lab on a Chip*, 2006, 6(2): 236-241.
- [80] Mir, M., Homs, A., Samitier, J., Integrated electrochemical DNA biosensors for lab-on-a-chip devices. *Electrophoresis*, 2009, 30(19): 3386-3397.
- [81] Chen, L., Manz, A., Day, P. J. R., Total nucleic acid analysis integrated on microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 2007, 7(11): 1413-1423.
- [82] Ng, J. K. K., Liu, W. T., Miniaturized platforms for the detection of single-nucleotide polymorphisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 386(3): 427-434.
- [83] Horsman, K. M., Bienvenue, J. M., Blasier, K. R., Landers, J. P., Forensic DNA analysis on microfluidic devices: A review. *Journal of Forensic Sciences*, 2007, 52(4): 784-799.
- [84] Szantai, E., Guttman, A., Genotyping with microfluidic devices. *Electrophoresis*, 2006, 27(24): 4896-4903.

- [85] 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.
- [86] 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.
- [87] 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.
- [88] Ferguson, B. S., Buchsbaum, S. F., Swensen, J. S., Hsieh, K., Lou, X. H., Soh, H. T., Integrated Microfluidic Electrochemical DNA Sensor. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(15): 6503-6508.
- [89] Leng, C., Zhang, X. Q., Jue, H. X., Microfluidic Chip-Based Immunoassay. *Progress in Chemistry*, 2009, 21(4): 687-695.
- [90] Henares, T. G., Mizutani, F., Hisamoto, H., Current development

- in microfluidic immunosensing chip. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 611(1): 17-30.
- [91] Jia, H. X., Wu, Z. Y., Fang, Z. L., Microfluidic chip-based immunoassay. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2005, 33(10): 1489-1493.
- [92] Selvaganapathy, P. R., Carlen, E. T., Mastrangelo, C. H., Recent progress in microfluidic devices for nucleic acid and antibody assays. *Proceedings of the Ieee*, 2003, 91(6): 954-975.
- [93] Hatch, A., Kamholz, A. E., Hawkins, K. R., Munson, M. S., Schilling, E. A., Weigl, B. H., Yager, P., A rapid diffusion immunoassay in a T-sensor. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(5): 461-465.
- [94] Weigl, B. H., Hatch, A., Kamholz, A., Yager, P., Novel immunoassay formats for integrated microfluidic circuits - Diffusion immunoassays (DIA). *Micro- and Nanotechnology for Biomedical and Environmental Applications*, 2000, 1(6): 50-56
- [95] Herr, A. E., Hatch, A. V., Giannobile, W. V., Throckmorton, D. J., Tran, H. M., Brennan, J. S., Singh, A. K., Integrated microfluidic platform for oral diagnostics. *Oral-Based Diagnostics*, 2007, 1098: 362-374.
- [96] Herr, A. E., Hatch, A. V., Throckmorton, D. J., Tran, H. M., Brennan, J. S., Giannobile, W. V., Singh, A. K., Microfluidic immunoassays as rapid saliva-based clinical diagnostics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America, 2007, 104(13): 5268-5273.
- [97] Gervais, L., Delamarche, E., Toward one-step point-of-care immunodiagnostics using capillary-driven microfluidics and PDMS substrates. *Lab on a Chip*, 2009, 9(23): 3330-3337.
- [98] Sato, K., Mawatari, K., Kitamori, T., Microchip-based cell analysis and clinical diagnosis system. *Lab on a Chip*, 2008, 8(12): 1992-1998.
- [99] Nagrath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., Utkus, L., Smith, M. R., Kwak, E. L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Ryan, P., Balis, U. J., Tompkins, R. G., Haber, D. A., Toner, M., Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 2007, 450(7173): 1235-U10.
- [100] Antia, M., Herricks, T., Rathod, P. K., Microfluidic approaches to malaria pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 2008, 10(10): 1968-1974.
- [101] Cheng, X. H., Irimia, D., Dixon, M., Sekine, K., Demirci, U., Zamir, L., Tompkins, R. G., Rodriguez, W., Toner, M., A microfluidic device for practical label-free CD4+T cell counting of HIV-infected subjects. *Lab on a Chip*, 2007, 7(2): 170-178.
- [102] Moon, S., Keles, H. O., Khademhosseini, A., Kuritzkes, D., Demirci, U., Integrating Microfluidics and Lensless Imaging for Point-of-Care Testing. *2009 Biosensors and Bioelectronics 2009*,

24 3208 - 3214.

第二章 集成 PDMS 表面张力微泵微流控芯片的研制及其在免疫分析中的应用

2.1 引言

在微流控芯片的各种研究中, 流体驱动一直是研究的热点。各种芯片应用均需不同的流体驱动方法, 如气动微泵[1, 2], 电渗泵[3], 毛细管泵[4, 5], 离心泵[6]等[7]。在各种流体驱动方式中, 被动驱动的方式越来越引起大家的关注。被动驱动的方式一般无需外界动力源、外部辅助设备和复杂的接口, 因而非常适合作为现场即时诊断平台的驱动力。这方面的工作主要有: David Junker 等人制作了集成硅基质表面张力微泵微流控芯片, 利用液体在亲水通道的自动浸润和液体蒸发将免疫分析的各种试剂依次加入到通道中, 试剂在流经免疫分析的固相载体 PDMS 表面时自动完成抗体包被、封闭、免疫反应等各步操作, 实现免疫分析。他们利用这种平台上完成了人 C 反应蛋白的免疫分析检测[4, 5, 8-10]。Patrick Morier 等利用重力驱动实现试剂在微通道中的流动, 完成了酶联吸附免疫反应各个操作步骤并对免疫反应产物进行了电化学检测[11]。Kazuo Hosokawa et al. 等利用抽真空的 PDMS 的作为液体驱动力。他们首先将芯片组成材料 PDMS 中的气体抽空, 当在加样液池中加入液体时, 液体中的气体会被 PDMS 通道壁吸收, 形成了一个负压力, 在这种负压力的驱动下将免疫分析的各种试剂依次由加样液池泵入废液池, 在中间的 PDMS 通道壁完成免疫分析过程[12-14]。以上的工作均实现了无需外界动力源的免疫分析操作, 但是这些工作也存在着芯片制作复杂、成本昂贵等缺点, 需要进一步的发展和改进。

在本章中，我们采用非离子型表面活性剂（Triton X-100, Tween 20, Tween 80 和 Span 80 等）掺杂修饰 PDMS 使之可在通常条件下长期保持亲水性（常温下大于 90 天），利用修饰后的 PDMS 制作了集成表面张力微泵的免疫分析芯片并在该芯片上完成了人 IgG 的免疫分析。

2.2 实验部分

2.2.1 仪器与试剂

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。牛血清白蛋白（BSA）购自 Roche 公司。Triton X-100 购自 Amresco (USA)。Tween 20, Tween 80 和 Span 80 来自国药集团化学试剂有限公司。抗体稀释缓冲液为 50mM 碳酸钠缓冲液 (pH=9.6)。洗涤缓冲液为 PBS +0.05% Tween 20。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。

商品化的镀铬和光刻胶的玻璃购于韶光微电子公司（长沙，湖南）。荧光检测设备为 Olympus 公司的 IX 71 型倒置荧光显微镜。

2.2.2 非离子型表面活性剂掺杂修饰 PDMS

用非离子型表面活性剂掺杂修饰 PDMS 采用 Luke Lee 等报道的方法[15]，过程简要描述如下：首先将 Sylgard 184 PDMS 的单体与引发剂按照 10: 1 的比率混合完全，脱气。然后按照体积比 (v/v) 向 PDMS 预聚体混合物中加入一定比例的非离子型表面活性剂，混合完全。

2.2.3 芯片设计与制备

本实验所采用的芯片如图 2-1 所示，主要包含两个部分：免疫反应通道

和表面张力微泵区域。免疫反应通道所用的材料为未经修饰的 PDMS 固化而成, 这样 PDMS 仍然表现为疏水性表面, 具有蛋白吸附的能力, 可以作为免疫反应的载体。而表面张力微泵区域是提供液体驱动的动力源, 由经过表面活性剂掺杂修饰的 PDMS 制备而成。

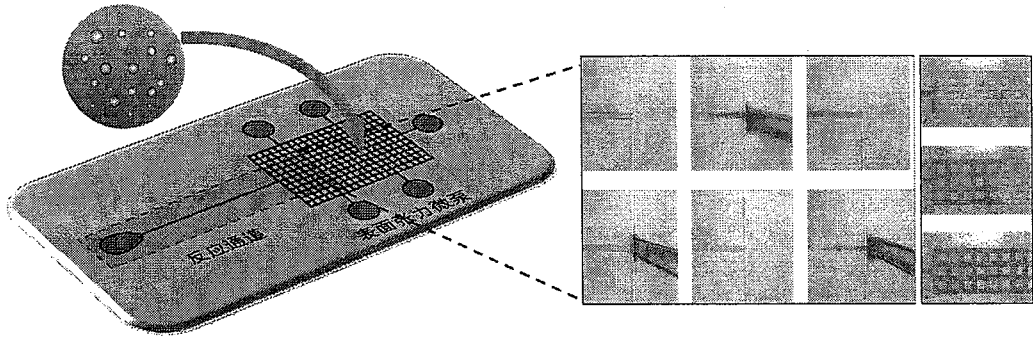


图 2-1 集成 PDMS 表面张力微泵的免疫分析芯片

A 芯片示意图 B 芯片顺序进样图

Figure 2-1 Map of microfluidic chip with PDMS capillary pump

A: Sketch map of microfluidic chip with PDMS capillary pump B: sequential injection of different solutions into the chip.

芯片的制备方法为区域涂抹的方法: 1) 在 PDMS 浇铸模板上在免疫反应通道区域涂抹未经修饰的 PDMS, 在 80°C 烘箱中固化 20 分钟; 2) 在 PDMS 微泵区域涂抹经过表面活性剂修饰的 PDMS, 在烘箱中固化 2 个小时; 3) 用未经修饰的 PDMS 浇铸整个 PDMS 模板, 在烘箱中固化 2 个小时, 使芯片成为一个整体。然后脱模, 打孔并将其可逆封接于玻璃片上。PDMS 浇铸的模板可以采用光刻的方法也可以采用湿法蚀刻的方法得到。

2.2.4 免疫分析过程

免疫分析采用顺序加样的方法在芯片的入口处加入所需要的各种分析试剂。以人 IgG 作为模型分析物的免疫分析过程说明如下：

- 1) 在加样液池中用移液枪加入羊抗人 IgG 溶液，在表面张力的作用下，它会逐步流入反应通道。由于反应通道处所用的材料为未加修饰的 PDMS，呈疏水性，因而抗体蛋白会吸附在通道壁上；
- 2) 在加样液池中加入 10mg/mL 的牛血清白蛋白溶液 (BSA)，BSA 溶液流入反应通道对其进行封闭以降低非特异性吸附；
- 3) 在加样液池中加入洗涤液 PBS+0.05%Tween 20，洗涤反应通道；
- 4) 在加样液池中加入人 IgG 的样品，样品中的人 IgG 与反应通道壁上包被的羊抗人 IgG 免疫反应；
- 5) 在加样液池中加入洗涤液 PBS+0.05%Tween 20，洗涤反应通道；
- 6) 在加样液池中用移液枪加入 FITC 标记的羊抗人 IgG 溶液，FITC 标记的羊抗人 IgG 溶液与反应步骤中免疫反应的产物结合，形成待检测的免疫复合物；
- 7) 荧光检测，得到免疫诊断结果。

以上步骤中每步加入的溶液的体积为 1-3 μ L，所用的移液器可以自制。

2.3 结果与讨论

2.3.1 PDMS 掺杂修饰

非离子型表面活性剂掺杂修饰 PDMS 并置于烘箱中固化后，我们利用接触角测量仪 Dataphysics OCAH200 (Dataphysics Instrument GmbH, Germany) 对 4.5%表面活性剂掺杂的 PDMS 表面的水接触角进行了测量，结果见图 2-2。从图上可以看出，用 Triton X-100, Tween 20, Tween 80, Span 80 掺杂修饰

的 PDMS 表面水接触角在 0s 时分别为 73.8° , 71.3° , 94.6° , 71.25° 。当水在 PDMS 表面上接触 180s 后, 其接触角分别减小为 47.3° , 44.8° , 73.95° , 57.65° , 表明此时所有的 PDMS 表面均为亲水性表面。而未经掺杂修饰的 PDMS 表面其接触角在 0 s 时为 105.85° , 180s 后减小为 101.5° , 表明未经掺杂修饰的 PDMS 表面一直呈现疏水性。

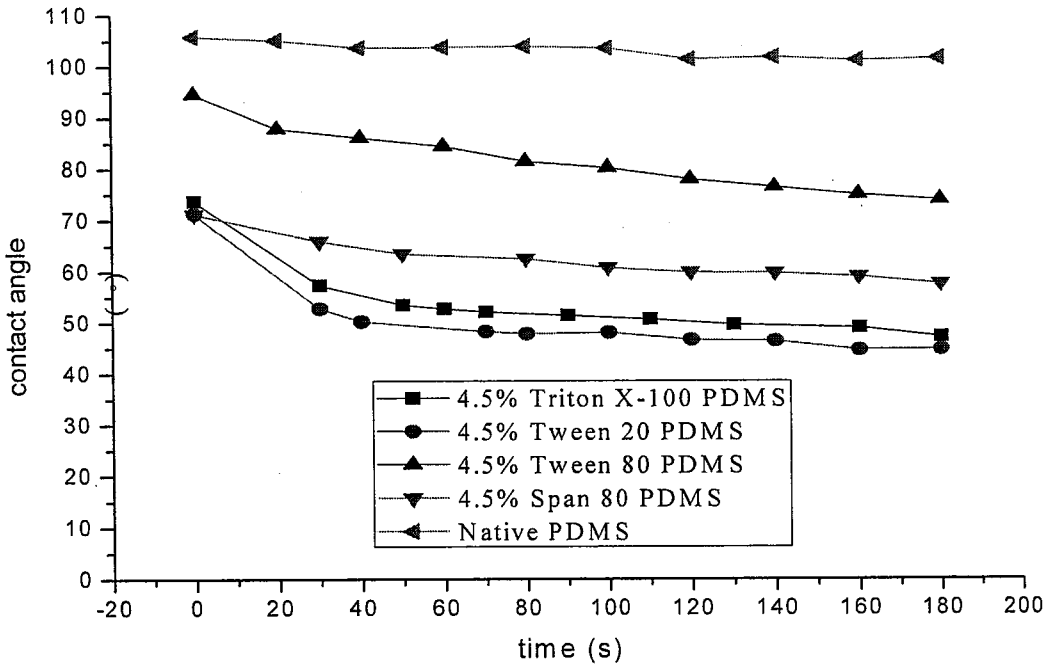


图 2-2 经过各种不同非离子型表面活性剂掺杂修饰的 PDMS 其表面水接触角考察

Figure 2-2 Dynamic contact angle measurements on different modified PDMS surfaces

非离子型表面活性剂掺杂修饰的 PDMS 表面之变成亲水性表面的原因可以有如下解释(如图 2-3 所示) [15]: PDMS 预聚体掺杂了表面活性剂后, 在固化后其表面会留有一层表面活性剂。当水加到其表面时, 表面活性剂会溶

解到水中，所以水在其表面的接触角降低，表现为亲水性表面。随着水在其表面的停留，越来越多的表面活性剂会溶解在水中，所以其表面的水接触角逐渐减小。当水中溶解的表面活性剂与 PDMS 表面的表面活性剂浓度达到了一个平衡后，其接触角不再变化，趋向于平衡。

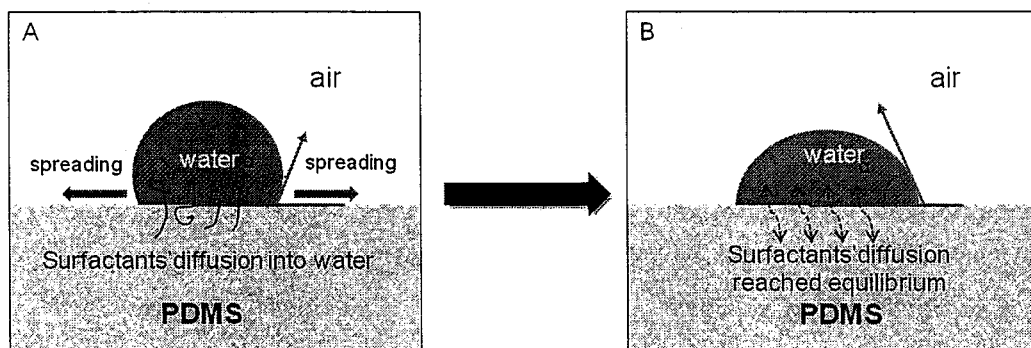


图 2-3 非离子型表面活性剂掺杂修饰的 PDMS 表面亲水性原理示意图

Figure 2-3 Schematic illustration of the wettability on the modified PDMS surface

A The contact angle decreases over time when the surfactants diffuse into water on the PDMS surface; B The contact angle becomes constant when the surfactants diffusion between PDMS and water achieved equilibrium.

2.3.2 PDMS 表面张力微泵流速表征

在完成了芯片的制作后，我们对其流速进行了考察。芯片设计如图 2-4A 所示，它包括一个液流通道和 20 个 1mm 直径的废液池。我们在加样口加入 1 微升的染料液体，记录其从加入到消失的时间，计算得到其平均体积流速。当我们将废液池全部盖上 PDMS 平盖片时，此时液体无法进入通道，可以确定

其流速为 0；当废液池没有被全盖满时，此时液体可以流入通道并进入废液池；未被盖住的废液池数目越多，溶液消失的时间越短。经过详细的考察，确认这种设计的芯片的平均体积流速在 nL/s 范围内，其流速同接通外界的废液池的数目成线性关系（图 2-4B）。

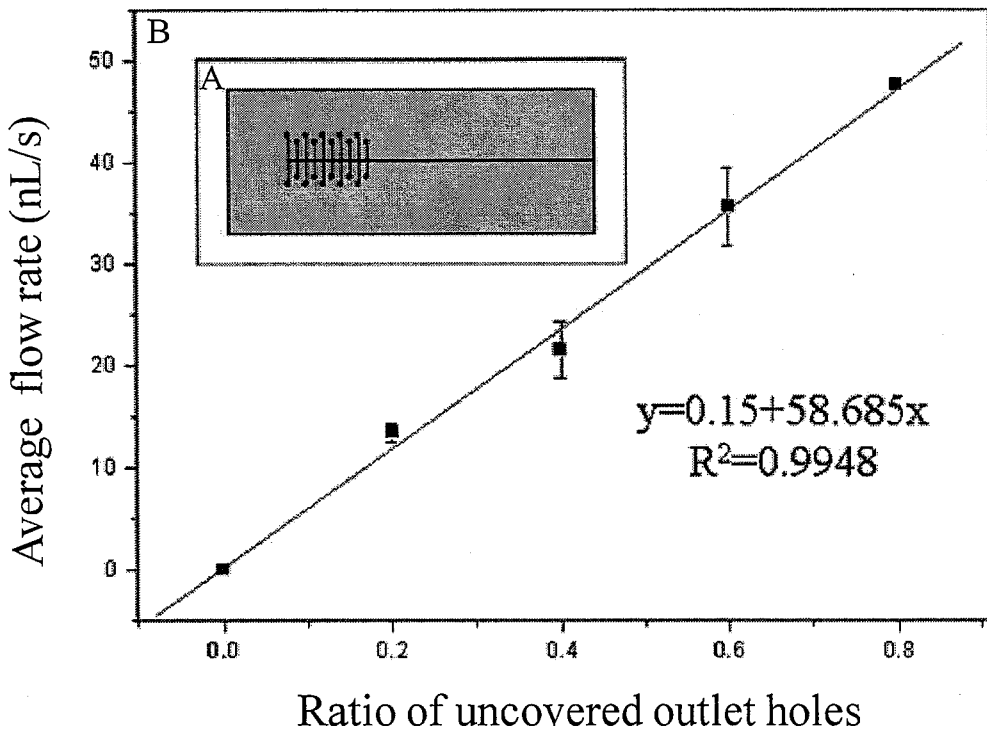


图 2-4 PDMS 表面张力微泵驱动液体的流速考察

Figure 2-4 Flow rate adjustment of PDMS capillary pump

A: the layout of the microchip used B: the linear correlation between the average flow rate and the ratio of uncovered outlet holes.

2.3.3 PDMS 蛋白吸附性能考察

PDMS 是一种由 $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_2-$ 单元聚合而成的弹性聚合物，其表面为一

CH₃ 基团，表现出疏水性，因而蛋白会由于疏水相互作用在 PDMS 表面非特异性吸附[16-18]。利用这种特性使 PDMS 可以用于取代传统的制作 96 孔板的聚苯乙烯材料作为免疫吸附反应的载体[18-21]。

2.3.3.1 蛋白在 PDMS 通道中吸附性能的考察

我们考察了蛋白在 PDMS 表面吸附的均匀性，我们在一 PDMS 通道中静态包被 FITC 标记羊抗小鼠 IgG，然后在这个通道的纵向选取 15 个不同的位置对其荧光信号进行了扫描，得到的结果如图 2-5 所示：

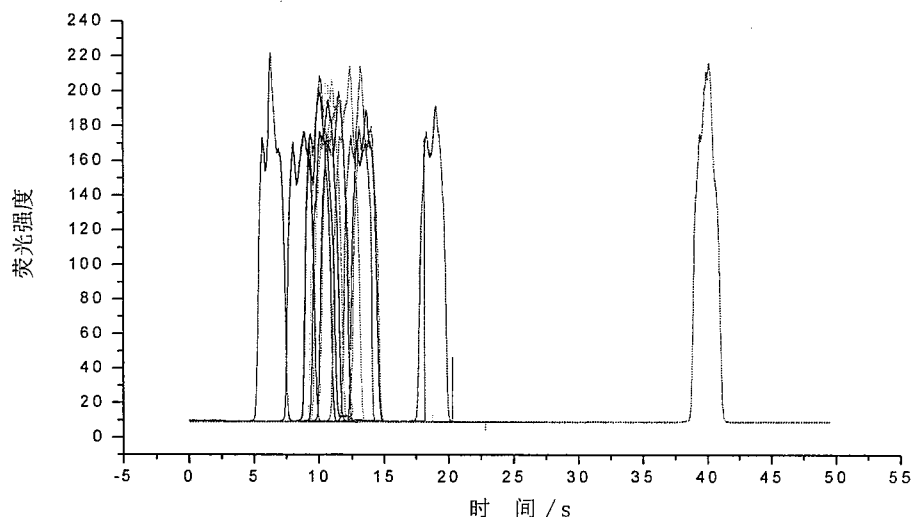


图 2-5 一个通道不同位置的蛋白包被结果荧光扫描谱图

Figure 2-5 Fluorescence intensity of protein immobilization in PDMS microchannels

从图 2-5 可以计算得出在一个通道的不同位置的扫描结果，其峰高的相对标准偏差 (RSD) 为 3.4% (n=15)，峰面积的相对标准偏差为 5.17% (n=15)，证明对于一个 PDMS 通道内部来说蛋白包被是均匀的。

同时我们用 1mg/mL 浓度的 FITC—BSA 对通道进行包被, 然后利用荧光显微镜对于不同通道的包被结果进行表征, 结果见图 2-6, 从图中也可以看出通道表面的包被情况比较均匀, 能满足免疫吸附的要求。

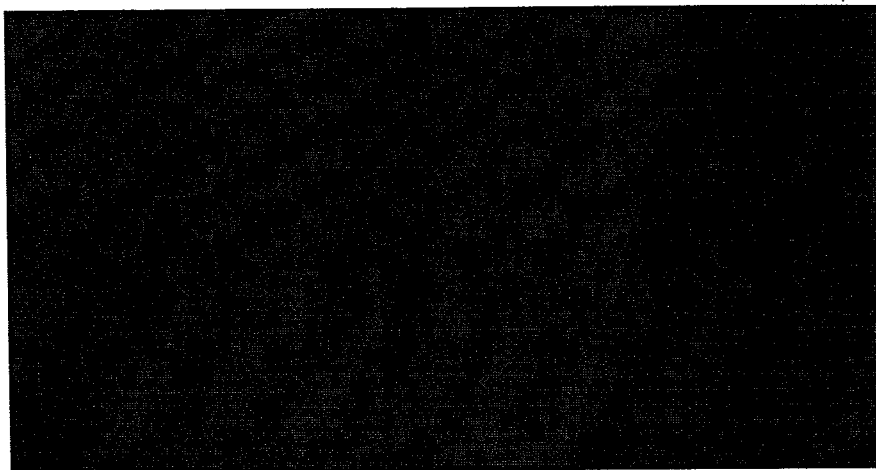


图 2-6 通道在包被了 FITC—BSA 后的荧光显微镜照片

Figure 2-6 Fluorescence image of PDMS coated with FITC-BSA

2.3.3.2 蛋白在不同 PDMS 通道中吸附重现性的考察

我们对于蛋白在 PDMS 芯片的不同通道中包被结果的重现性进行了考察。在芯片的 7 个加样池中加入相同浓度的 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 各 10 μ L, 让液体充满通道, 室温避光放置一个小时, 让蛋白在 PDMS 表面物理吸附, 然后每个通道用洗涤液 PBS-Twen20 30 μ L 清洗后在激光扫描平台上扫描, 所得到的扫描谱图如图 2-7 所示。

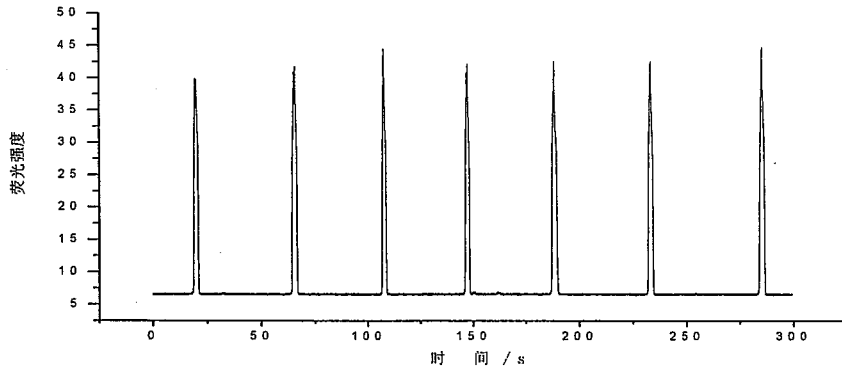


图 2-7 七个通道在包被相同浓度的 FITC 二抗后的扫描谱图

Figure 2-7 Fluorescence intensity of protein immobilization in different PDMS microchannels

从上面可以得到 7 个通道包被相同浓度的 FITC 二抗通道之间的相对标准偏差为 4.62%，即对于不同的通道，蛋白的吸附能力是基本相同的。

2.3.3.3 蛋白在 PDMS 通道中吸附动力学考察

在固相载体吸附免疫反应中，蛋白的包被、免疫反应等过程都是基于分子的扩散而发生的，分子在一维方向上扩散有公式 $t=d^2/2D$ ，其中 d 为分子在 t （单位 s）时间内运动的距离（单位 cm）， D 为分子的扩散系数（大多数蛋白的扩散系数都在 10^{-6} 到 $10^{-7} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ 之间），因而我们由公式计算得到其在一维方向扩散一定距离所需要的时间，例如一个分子量为 70Kda 的免疫球蛋白扩散 $10 \mu\text{m}$ 仅需要 1s。在传统的 96 孔板中的 ELISA，由于分子扩散的距离较长，一般为一到几个厘米，所以达到扩散平衡所需要的时间很长，而在考察蛋白包被所用的芯片中包被、反应通道的尺寸仅为 $200 \mu\text{m}$ 左右，由公式粗略计算可以得到蛋白在通道中所需要的扩散时间仅为 400s。为了验证这一点，我们在一块芯片上包被一定浓度的 FITC 羊抗小鼠 IgG 一个小时，然后在同一块芯

片上包被同一浓度的 FITC 羊抗小鼠 IgG 17 分钟,扫描的结果如图 2-8 所示,从中看出在包被 17 分钟时的结果与包被一个小时的结果基本相同,但包被一个小时的结果要比包被 17 分钟时的结果所显示通道之间的均匀性上更好一些。

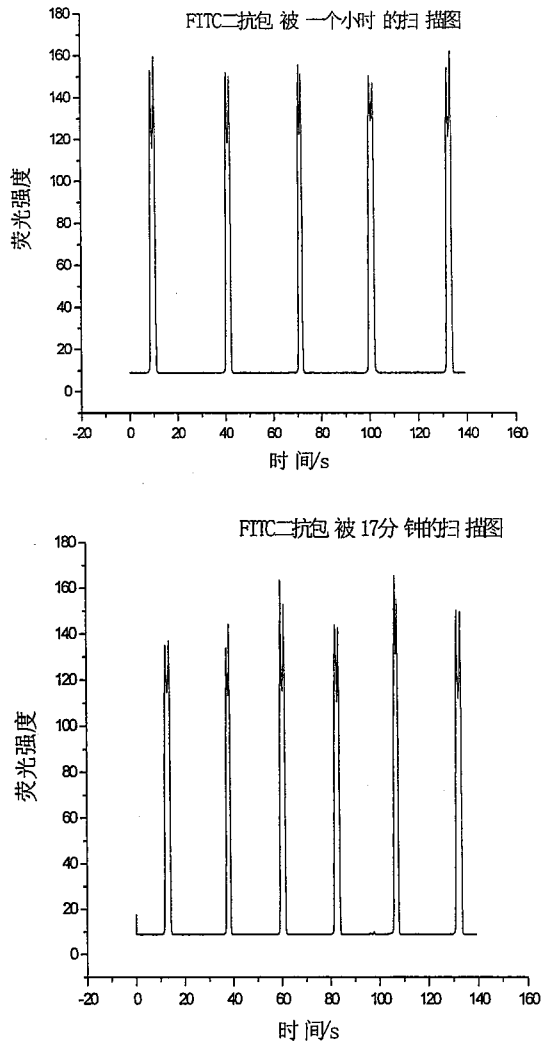


图 2-8 同样浓度的 FITC 二抗在微通道中包被不同时间的检测谱图比较

Figure 2-8 Fluorescence intensity of protein immobilization in PDMS microchannels with different immobilization time

2.3.4 PDMS 表面张力微泵驱动免疫分析

本实验以人 IgG 作为模型分析物,在集成 PDMS 表面张力微泵芯片上完成了免疫分析检测。用移液枪将实验所用的各种免疫分析试剂:羊抗人 IgG, 1% BSA 溶液, 人 IgG, FITC 标记羊抗人 IgG, 洗涤液 PBS-0.05%Tween 20 等各 1 μ L 顺序加入加样液池,在表面张力微泵的驱动下自动完成包括抗体的包被、免疫载体的封闭、免疫反应、标记免疫复合物的形成和洗涤等步骤。最后利用荧光显微镜进行检测,得到分析结果见图 2-9、图 2-10。

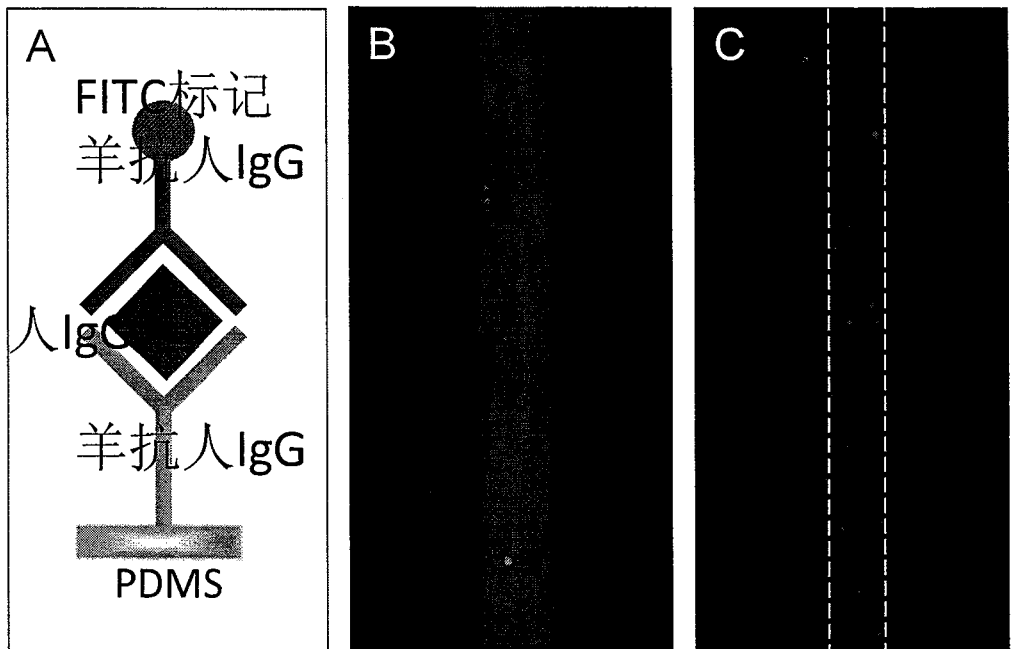


图 2-9 PDMS 表面张力微泵驱动免疫分析人 IgG 荧光检测结果图

A 荧光免疫分析示意图 B 5 μ g/mL h-IgG 检测结果 C 空白

Figure 2-9 Fluorescence immunoassay A Schematic illustration of sandwich immunoassay configuration for h-IgG. B C h-IgG immunoassay fluorescence results B: 5 μ g/mL h-IgG C: blank

detection conditions: 10×objective lens ; 2 s exposure time

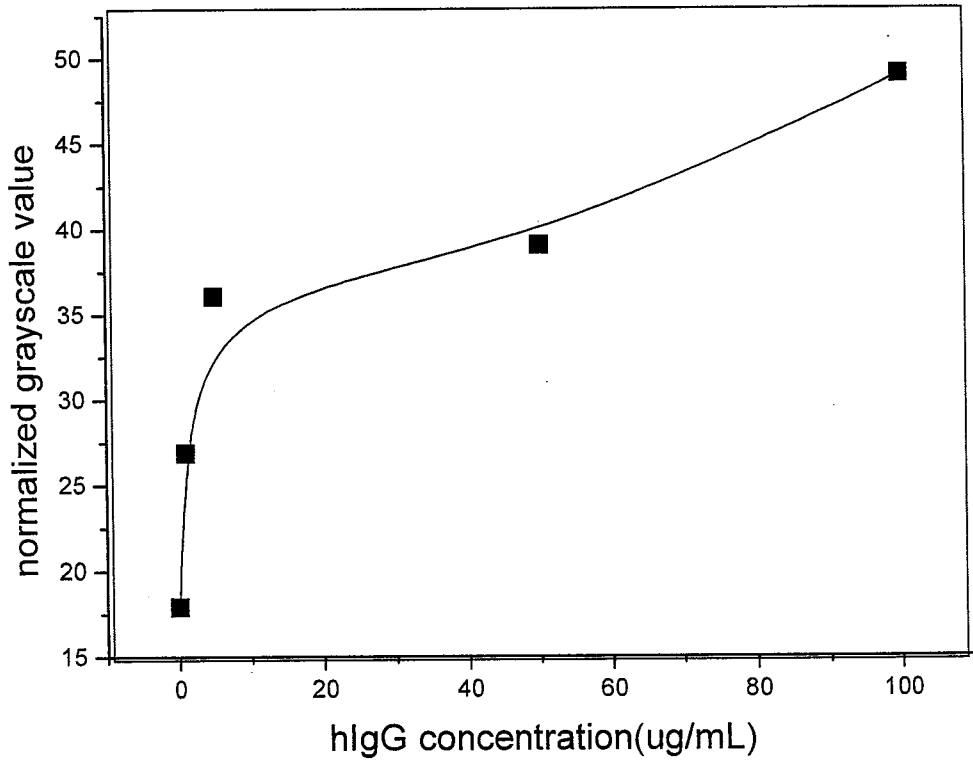


图 2-10 PDMS 表面张力微泵驱动免疫分析人 IgG 免疫分析工作曲线

Figure 2-10 Working curve for h-IgG

2.4 本章小结

用 PDMS 经掺杂非离子型表面活性剂修饰后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。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Thorsen, T., Maerkl, S. J., Quake, S. R., Microfluidic large-scale integration. *Science*, 2002, 298(5593): 580-584.
- [3] Wang, X. Y., Cheng, C., Wang, S. L., Liu, S. R., Electroosmotic pumps and their applications in microfluidic systems. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2009, 6(2): 145-162.
- [4] Gervais, L., Delamarche, E., Toward one-step point-of-care immunodiagnosics using capillary-driven microfluidics and PDMS substrates. *Lab on a Chip*, 2009, 9(23): 3330-3337.
- [5] Juncker, D., Schmid, H., Drechsler, U., Wolf, H., Wolf, M., Michel, B., de Rooij, N., Delamarche, E., Autonomous microfluidic capillary system. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(24): 6139-6144.
- [6] Li, C. Y., Dong, X. L., Qin, J. H., Lin, B. C., Rapid nanoliter DNA hybridization based on reciprocating flow on a compact disk microfluidic device. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 640(1-2): 93-99.
- [7] Luo, Y., Qin, J. H., Lin, B. C., Methods for pumping fluids on

- biomedical lab-on-a-chip. *Frontiers in Bioscience*, 2009, 14: 3913-3924.
- [8] Cesaro-Tadic, S., Dernick, G., Juncker, D., Buurman, G., Kropshofer, H., Michel, B., Fattinger, C., Delamarche, E., High-sensitivity miniaturized immunoassays for tumor necrosis factor α using microfluidic systems. *Lab on a Chip*, 2004, 4(6): 563-569.
- [9] Zimmermann, M., Bentley, S., Schmid, H., Hunziker, P., Delamarche, E., Continuous flow in open microfluidics using controlled evaporation. *Lab on a Chip*, 2005, 5(12): 1355-1359.
- [10] Zimmermann, M., Schmid, H., Hunziker, P., Delamarche, E., Capillary pumps for autonomous capillary systems. *Lab on a Chip*, 2007, 7(1): 119-125.
- [11] Morier, P., Vollet, C., Michel, P. E., Reymond, F., Rossier, J. S., Gravity-induced convective flow in microfluidic systems: Electrochemical characterization and application to enzyme-linked immunosorbent assay tests. *Electrophoresis*, 2004, 25(21-22): 3761-3768.
- [12] Hosokawa, K., Omata, M., Maeda, M., Immunoassay on a power-free microchip with Laminar flow-assisted dendritic amplification. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(15): 6000-6004.
- [13] Hosokawa, K., Omata, M., Sato, K., Maeda, M., Power-free sequential injection for microchip immunoassay toward point-of-care testing. *Lab on a Chip*, 2006, 6(2): 236-241.

- [14] Hosokawa, K., Sato, K., Ichikawa, N., Maeda, M., Power-free poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices for gold nanoparticle-based DNA analysis. *Lab on a Chip*, 2004, 4(3): 181-185.
- [15] Seo, J., Lee, L. P., Effects on wettability by surfactant accumulation/depletion in bulk polydimethylsiloxane (PDMS). *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2006, 119(1): 192-198.
- [16] 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.
- [17] Sia, S. K., Whitesides, G. M., Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*, 2003, 24(21): 3563-3576.
- [18] Eteshola, E., Leckband, D., Development and characterization of an ELISA assay in PDMS microfluidic channels. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2001, 72(2): 129-133.
- [19] Henares, T. G., Mizutani, F., Hisamoto, H., Current development in microfluidic immunosensing chip. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 611(1): 17-30.
- [20] Leng, C., Zhang, X. Q., Jue, H. X., Microfluidic Chip-Based Immunoassay. *Progress in Chemistry*, 2009, 21(4): 687-695.
- [21] Lin, F. Y. H., Gao, Y., Li, D., Sherman, P. M., Development of microfluidic-based heterogeneous immunoassays. *Front Biosci*

(Schol Ed), 2: 73-84.

第三章 微流控胶体金免疫分析芯片的研制及其手机拍照检测

3.1 引言

免疫检测是一种基于抗原抗体特异性相互作用的一种分析方法，在临床诊断、食品安全和环境监测等领域都有广泛的应用。传统的免疫检测平台如 96 孔板受限于其较大的反应平台尺寸，分析析速度较慢（几小时到一天）、试剂消耗较多（100 微升以上）。微流控芯片是一种微小尺度的反应分析平台，具有加快分析速度、降低消耗成本的优势，因而两者之间的结合——微流控免疫芯片的研究近年来受到越来越多的关注[1-12]。微流控免疫芯片需要利用各种检测方法对其结果进行定性或者定量的分析，比如荧光显微镜[8, 13]、热透镜[14, 15]、电化学检测[16-18]、表面等离子共振[19]和化学发光[20, 21]等。这些检测仪器体积庞大、成本昂贵、操作繁琐，无法同微流控芯片的尺寸匹配，无法实现便携化的微流控芯片免疫分析[22, 23]。

在本章中我们研制了 PDMS 和聚苯乙烯的杂交芯片，以 PDMS 层为液路层、聚苯乙烯为固相吸附免疫分析的载体，用拍照手机作为检测器，对微流控芯片胶体金免疫分析银染色结果成像并用软件（如 Imagepro, Photoshop）对其取值进行定量分析，实现了人 IgG 的免疫分析。利用拍照手机作为检测器有如下优点：成本低廉，体积小，手持化，操作简便，结果可以远程传输。

3.2 实验部分

3.2.1 仪器与试剂

牛血清白蛋白购于罗氏公司（Roche, Switzerland）。人免疫球蛋白

(human IgG), 羊抗人免疫球蛋白购于大连博瑞得公司和胶体金标记羊抗人免疫球蛋白购于北京博奥森公司。胶体金银染色试剂盒(Silver Enhancer Kit, SE-100) 购自 Sigma 公司。检测所用拍照手机为索尼爱立信 K790C (摄像头像素: 320 万像素, 16 倍数码变焦), 对手机拍照所得到的检测结果的分析软件为 Imagepro (Media Cybernetics, USA)。免疫分析载体聚苯乙烯购自德国 Grenier 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。

3.2.2 芯片设计与制备

实验中所用的芯片为 PDMS 与聚苯乙烯的杂交芯片: 上层为具有液流通道的 PDMS 芯片, 下层为作为免疫分析固相载体的聚苯乙烯平板。PDMS 层的流路通道为直通道, 宽度为 $300\mu\text{m}$, 深度为 $50\mu\text{m}$, 在通道的两端打孔作为溶液进、出液池。PDMS 芯片采用 PDMS 预聚体浇铸阳模、固化的方法得到, 阳模可以采用湿法刻蚀或者光刻胶软刻蚀的方法得到。

3.2.3 手机拍照检测免疫分析结果流程

利用拍照手机对微流控芯片免疫分析的结果进行检测的流程如图 3-1 所示: 1), 在微流控芯片平台上完成胶体金免疫分析并且对结果进行银染色放大; 2), 利用拍照手机对免疫分析区域进行拍照; 3), 对拍照得到的照片通过 USB 数据线、红外或互联网远程传输等方法将其传输到电脑中; 4), 利用图像分析软件(如 ImagePro, Photoshop 等)对免疫反应区域图像信号转换成数值; 5), 利用步骤 4 中得到的数值进行结果判定。

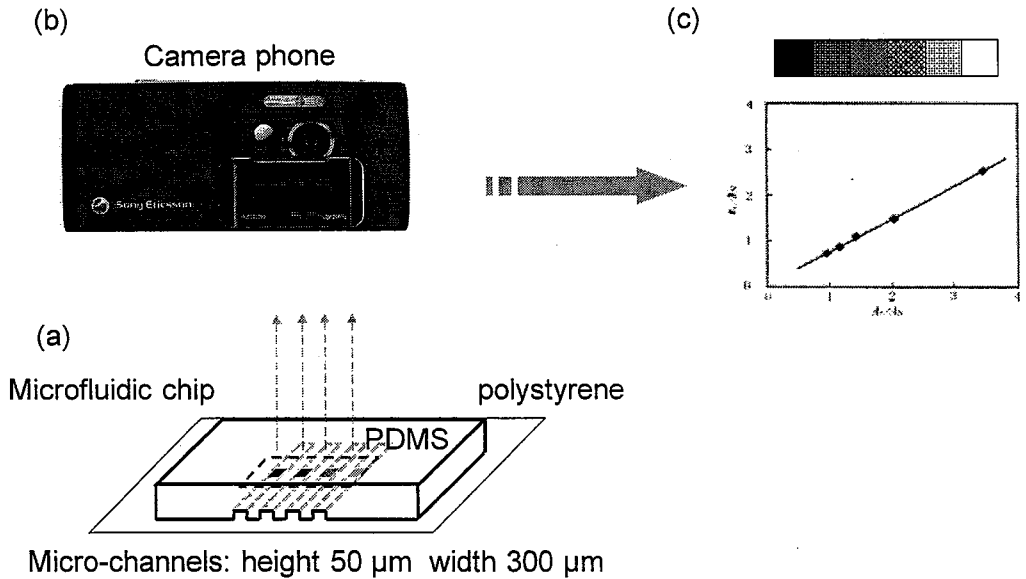


图 3-1 利用拍照手机对微流控芯片免疫分析结果进行检测的流程图

A 免疫分析所用的微流控芯片 B 检测所用的拍照手机 C 用软件对手机所拍照片进行取值并进行结果判断

Figure 3-1 Schematic illustration of camera phone detection for microfluidic chip immunoassay a) the hybrid microchip made of PDMS with microstructures and a flat polystyrene with immobilized antibody strip ; b) the camera phone used in the experiment for image catching with following parameters :camera 3.2 megapixel, digital zoom: 16x;auto focus; c) image analysis with software by converting each image into grayscale and measuring the average values within the immunoassay area.

3.3 结果与讨论

3.3.1 免疫分析固相载体的选择

微流控芯片免疫分析中最常用的固相载体为 PDMS，因为这种材料不仅可以通过光刻方法在上面得到各种不同结构，而且 PDMS 本身具有很强的疏水性，因此抗体可以通过物理吸附在其表面实现固定 [5, 10, 24]。而在本实验中我们采用聚苯乙烯作为免疫分析载体，主要是由于银染色溶液在 PDMS 材料上的背景较高，因而造成胶体金银染色免疫反应的背景值较高。我们在聚苯乙烯、未经等离子处理的 PDMS 和经过等离子处理的 PDMS 上封接上经过等离子处理的有 3mm 圆孔的 PDMS，形成各种复合孔板。然后往孔板的各个孔中加入 10 μ L 新鲜配制的银染色溶液，经过不同的反应时间后将孔中银染色溶液抽空并用 PBST 洗涤液对其洗涤。从图 3-2 上可以看出，银染色溶液自催化得到的银在未经等离子处理的 PDMS 上沉积较多，非特异性背景较大。其可能的原因为 PDMS 疏水性比较强，被还原的银更容易沉积在其表面。

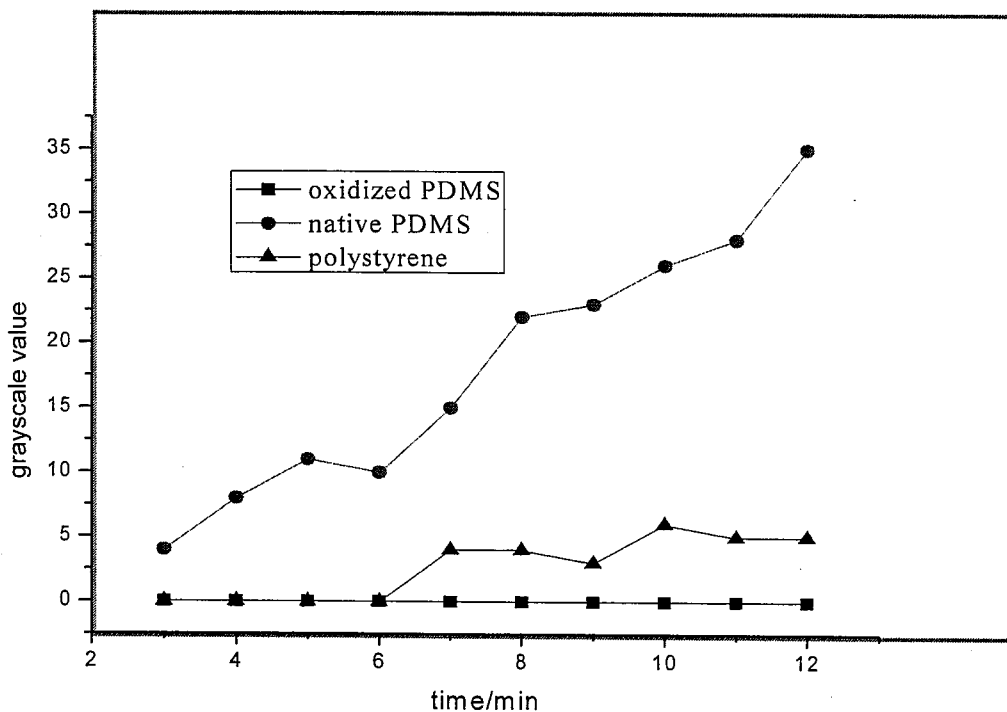


图 3-2 银染色溶液在三种材料表面（氧等离子处理 PDMS，PDMS，聚苯乙烯）的自催化背景值

Figure 3-2 Comparison of the autocatalytic reduction/precipitation background of the silver staining solution on different substrates including native PDMS, polystyrene and PDMS oxidized in the plasma cleaner. The substrates were sealed with an oxidized PDMS layer, where microwells with 3mm diameter were punched out. The silver enhancer solution was pipetted into the microwells and the substrates were incubated with it. At the indicated times, dry the solutions in microwells and wash them with PBST buffer. The resulting silver films on the substrates were measured by a flatbed scanner and the average grayscale values were obtained with the imagepro software (the

minus results between the grayscale values in the microwells and the background).

3.3.2 免疫分析芯片的制备流程与免疫反应操作流程

将带有一条微通道的 PDMS 芯片可逆封接于新的聚苯乙烯平板上, PDMS 上的微通道宽度为 1mm, 深度为 50 μ m。在通道的一端加样液池中加入羊抗人 IgG 溶液, 在室温下包被抗体 3 小时。清空通道中的溶液, 用 PBST 对通道洗涤三次, 待通道中的溶液抽干之后, 将 PDMS 芯片揭去。这样聚苯乙烯平板上就留有 1mm 宽的抗体条带。用一块干净的 PDMS 平板 (宽度约 2mm 左右) 盖在聚苯乙烯平板的抗体条带上。将聚苯乙烯平板与另一块有 300 μ m 宽通道结构的 PDMS 芯片置入等离子腔室中等离子处理 1 分钟。此处等离子处理的作用有两个: 1), 等离子处理过的区域可以抑制蛋白吸附; 2), 等离子处理过的区域非常亲水, 溶液可以自动浸润微通道, 易于加样等操作, 同时避免在通道中产生气泡。揭去聚苯乙烯平板上的 PDMS 平板, 将等离子处理的 PDMS 微通道层封接于聚苯乙烯板上 (其中微通道与抗体条带方向垂直), 据此就得到可以用于检测人 IgG 的微流控免疫分析芯片。

在与抗体条带封接好的芯片通道中加入 2.5% BSA 溶液 (50mM 碳酸盐缓冲液, pH=9.6) 对 PDMS 微通道与聚苯乙烯板封闭 30 分钟。再依次加入人 IgG 样品、胶体金标记羊抗人 IgG 溶液各反应 10 分钟, 用 PBST 洗涤液对通道充分洗涤 3 次, 完成免疫反应过程。

3.3.3 拍照手机微距功能的增强

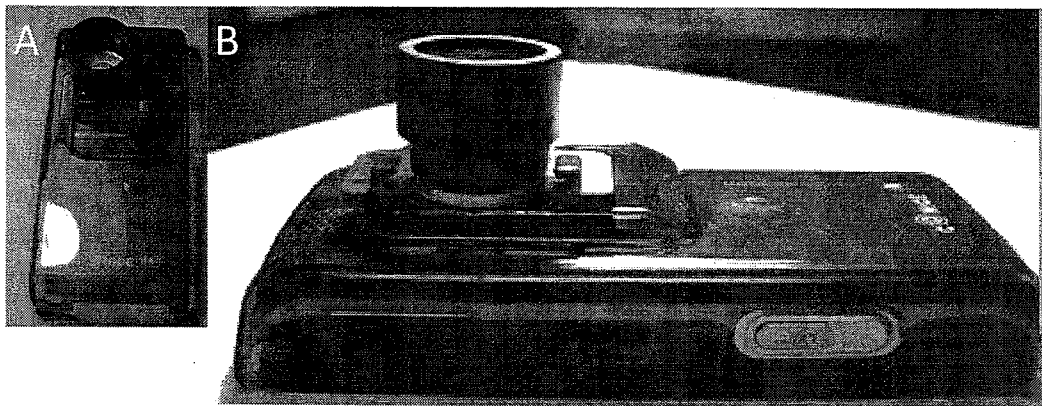


图 3-3 自己组装手机微距拍摄增强装置

Figure 3-3 Home made micro-shot enhancing apparatus

一般的拍照手机没有光学变焦功能，其微距能力有限。我们用商品化的手机支架和手机微距镜组装加强其拍照手机微距功能，图 3-3A 为自行组装的微距增强设备，其中黑色部分为放大镜，放大倍数约为 3 倍。图 3-3B 为将手机与微距拍摄增强设备组装在一起的照片。

3.3.4 手机拍照图像的数据处理

利用手机对免疫区域拍照后，可采用 USB 数据线、红外、互联网等方法将所得图像传输到电脑中。其中利用互联网远程传输可实现在现场进行免疫反应的操作，再将手机拍照结果传输给远端，经远端工作人员对结果进行取值、判定并给予反馈，实现现场分析、远程诊断。当照片传输到电脑后，我们将其转换成 8 位灰度模式，然后选取免疫分析区域获得分析区域的平均灰度值，实现结果量化，如图 3-4 所示。

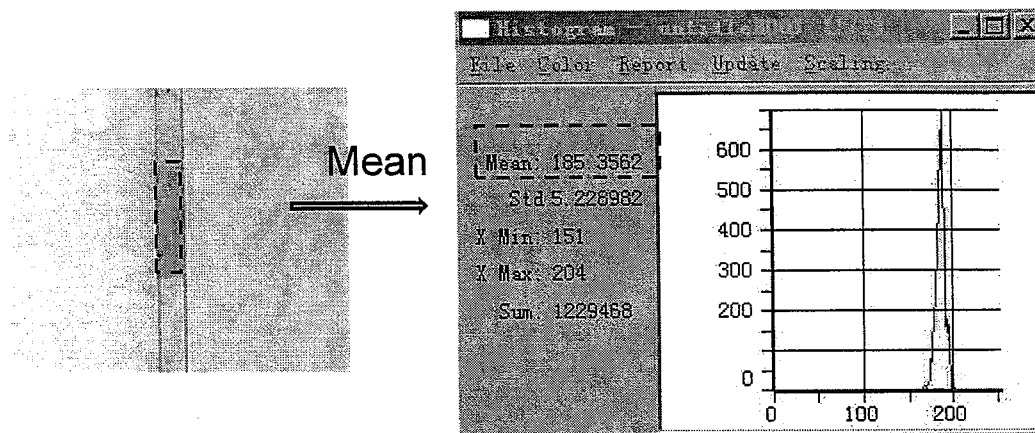


图 3-4 利用 Imagepro 软件对芯片免疫分析图像结果进行取值

Figure 3-4 The signal analysis with the image pro software to get the average grayscale values within the immunoassay zones

3.3.5 免疫分析结果

在完成免疫反应后用纯净水对通道反复冲洗去除通道存在各种金属离子，减少非特异性银染色的发生。待通道冲洗完全后，将新鲜制备的银染色溶液 10 μ L 加入通道，对免疫反应区域进行银染色增强。银染结束后，用纯净水对通道反复洗涤，此时即可用拍照手机对银染色放大后的分析区域进行拍照检测，得到结果如图 3-5B 所示（图 3-5A 为银染色时间优化）。

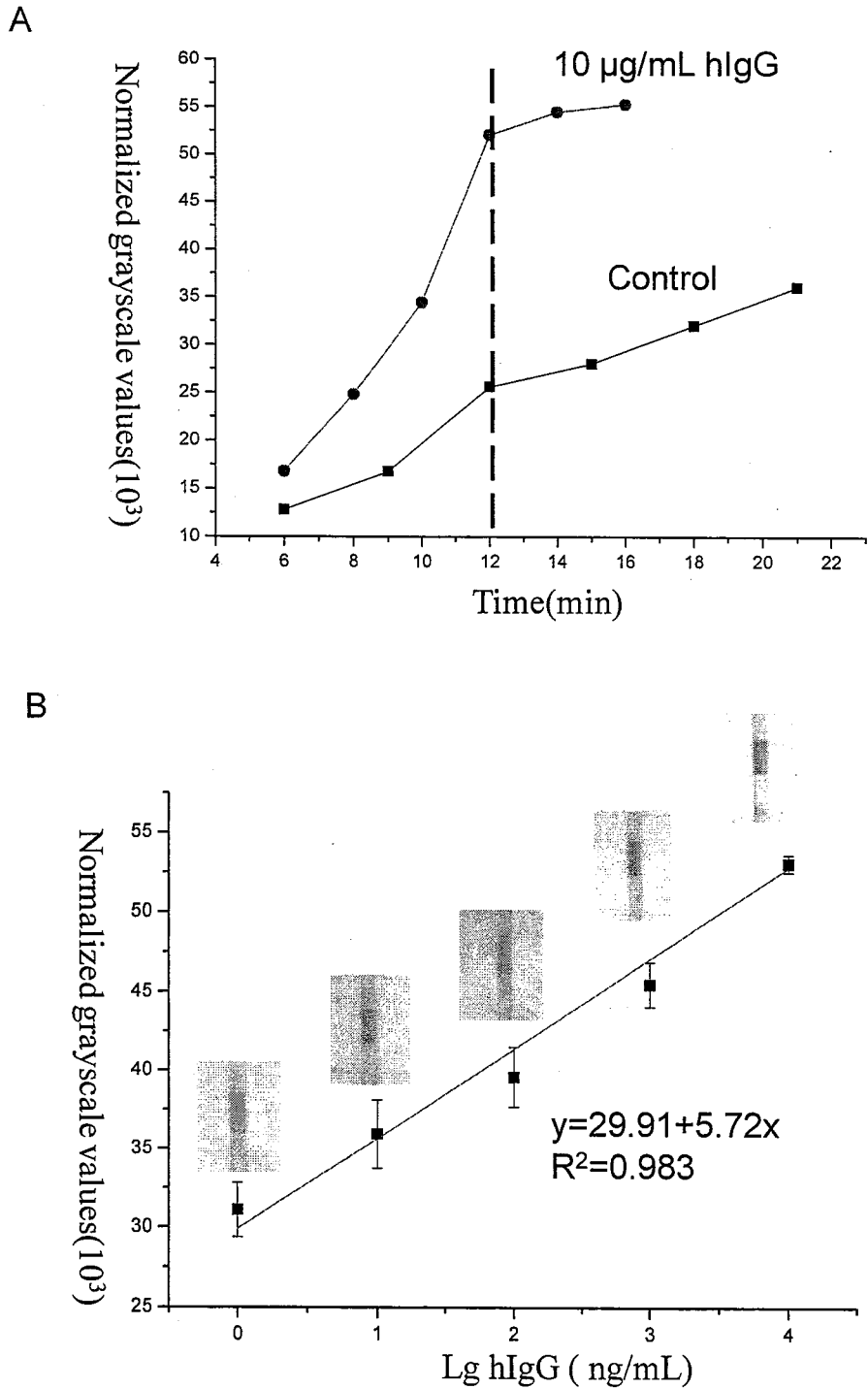


图 3-5 胶体金银染色免疫分析 A 银染色时间优化 B 人 IgG 免疫分析

工作曲线

Figure 3-5 A the time profile of silver deposition in immunoassay, the highest signal to background ratio were obtained after 12 minutes of silver staining ; B the calibration curve of hIgG with the immunoassay conditions as follows: 500 $\mu\text{g/mL}$ g-h IgG in 50 mM NaCO_3 buffer (pH=9.6) for antibody immobilization on the polystyrene surface, 1:20 dilution of gold nanoparticle labeled g-h IgG, 12 minutes for silver staining (the micropatches shown in the figure are 1 mm \times 0.3 mm).

3.4 本章小结

以拍照手机为检测器, 对微流控芯片平台上的胶体金免疫分析银染色结果实现了手持检测。该方法大大降低芯片免疫检测成本与检测器体积, 使其与芯片匹配, 具有现场检测、远程诊断的应用前景。

参考文献

- [1] Bange, A., Halsall, H. B., Heineman, W. R., Microfluidic immunosensor systems. *Biosensors & Bioelectronics*, 2005, 20(12): 2488-2503.
- [2] Bernard, A., Michel, B., Delamarche, E., Micromosaic immunoassays. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(1): 8-12.
- [3] Chiem, N. H., Harrison, D. J., Microchip systems for immunoassay:

- an integrated immunoreactor with electrophoretic separation for serum theophylline determination. *Clinical Chemistry*, 1998, 44(3): 591-598.
- [4] Dodge, A., Fluri, K., Verpoorte, E., de Rooij, N. F., Electrokinetically driven microfluidic chips with surface-modified chambers for heterogeneous immunoassays. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(14): 3400-3409.
- [5] Eteshola, E., Leckband, D., Development and characterization of an ELISA assay in PDMS microfluidic channels. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2001, 72(2): 129-133.
- [6] Hatch, A., Kamholz, A. E., Hawkins, K. R., Munson, M. S., Schilling, E. A., Weigl, B. H., Yager, P., A rapid diffusion immunoassay in a T-sensor. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(5): 461-465.
- [7] Henares, T. G., Mizutani, F., Hisamoto, H., Current development in microfluidic immunosensing chip. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 611(1): 17-30.
- [8] Kartalov, E. P., Zhong, J. F., Scherer, A., Quake, S. R., Taylor, C. R., Anderson, W. F., High-throughput multi-antigen microfluidic fluorescence immunoassays. *Biotechniques*, 2006, 40(1): 85-90.
- [9] Lin, F. Y. H., Gao, Y., Li, D., Sherman, P. M., Development of microfluidic-based heterogeneous immunoassays. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2: 73-84.

- [10] Sia, S. K., Whitesides, G. M., Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*, 2003, 24(21): 3563-3576.
- [11] Yager, P., Edwards, T., Fu, E., Helton, K., Nelson, K., Tam, M. R., Weigl, B. H., Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature*, 2006, 442(7101): 412-418.
- [12] Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A., Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(12): 3887-3907.
- [13] Babu, S., Mohapatra, S., Zubkov, L., Murthy, S., Papazoglou, E., A PMMA microcapillary quantum dot linked immunosorbent assay (QLISA). *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, 24(12): 3467-3474.
- [14] Sato, K., Yamanaka, M., Hagino, T., Tokeshi, M., Kimura, H., Kitamori, T., Microchip-based enzyme-linked immunosorbent assay (microELISA) system with thermal lens detection. *Lab on a Chip*, 2004, 4(6): 570-575.
- [15] Ohashi, T., Mawatari, K., Sato, K., Tokeshi, M., Kitamori, T., A micro-ELISA system for the rapid and sensitive measurement of total and specific immunoglobulin E and clinical application to allergy diagnosis. *Lab on a Chip*, 2009, 9(7): 991-995.
- [16] Ihara, M., Yoshikawa, A., Wu, Y. S., Takahashi, H., Mawatari, K., Shimura, K., Sato, K., Kitamori, T., Ueda, H., Micro OS-ELISA: Rapid noncompetitive detection of a small biomarker peptide by open-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (OS-ELISA)

- integrated into microfluidic device. *Lab on a Chip*, 10(1): 92-100.
- [17] Dong, H., Li, C. M., Zhang, Y. F., Cao, X. D., Gan, Y., Screen-printed microfluidic device for electrochemical immunoassay. *Lab on a Chip*, 2007, 7(12): 1752-1758.
- [18] Yoo, S. J., Choi, Y. B., Il Ju, J., Tae, G. S., Kim, H. H., Lee, S. H., Microfluidic chip-based electrochemical immunoassay for hippuric acid. *Analyst*, 2009, 134(12): 2462-2467.
- [19] Luo, Y. Q., Yu, F., Zare, R. N., Microfluidic device for immunoassays based on surface plasmon resonance imaging. *Lab on a Chip*, 2008, 8(5): 694-700.
- [20] Yakovleva, J., Davidsson, R., Lobanova, A., Bengtsson, M., Eremin, S., Laurell, T., Emneus, J., Microfluidic enzyme immunoassay using silicon microchip with immobilized antibodies and chemiluminescence detection. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(13): 2994-3004.
- [21] Yakovleva, J., Davidsson, R., Bengtsson, M., Laurell, T., Emneus, J., Microfluidic enzyme immunosensors with immobilised protein A and G using chemiluminescence detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 2003, 19(1): 21-34.
- [22] Sia, S. K., Linder, V., Parviz, B. A., Siegel, A., Whitesides, G. M., An integrated approach to a portable and low-cost immunoassay for resource-poor settings. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2004, 43(4): 498-502.

-
- [23] Mogensen, K. B., Klank, H., Kutter, J. P., Recent developments in detection for microfluidic systems. *Electrophoresis*, 2004, 25(21-22): 3498-3512.
- [24] Langowski, B. A., Uhrich, K. E., Microscale plasma-initiated patterning (μ PIP). *Langmuir*, 2005, 21(23): 10509-10514.

第四章 以蜡为疏水性材料的普通纸质微流控芯片研制及其初步应用

4.1 引言

芯片是微流控芯片研究的一个基础和关键，芯片的材料和设计决定了它所被赋予的功能。常见的微流控芯片所使用的材料包括硅、石英、玻璃和有机聚合物如聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA), 聚二甲基硅氧烷(PDMS)等[1-8]。随着芯片研究的不断发展，芯片的材料也在逐步扩展，2007年初哈佛大学 Whitesides 小组首次尝试将纸作为一种微流控芯片的制作材料[9]。纸材料具有一些特殊的优点如：1)，成本低廉：适合制备一次性使用的芯片；2)，组成纸的纤维素可以吸收水分：表面张力可以作为整个芯片的驱动力，无需外界动力源；3)，纸具有可燃性：纸质芯片在完成分析功能后可以采取燃烧的方法安全处理，不会留下生物垃圾。纸质微流控芯片的研究目前正处于初步发展阶段，其工作主要可以分成两类：芯片制作方法和芯片检测技术。其中纸芯片的制作方法目前文献的报道主要有以下几种：1)，光刻法：这是由 Whitesides 实验室首先提出的最先应用于纸芯片制作的方法。他们利用传统的光刻方法，以滤纸作为基片，通过传统的光刻方法（包括匀胶、前烘、曝光、后烘、显影、固化等操作步骤）完成光刻胶在纸上的固定化，得到各种设计图案。他们用光刻法制备的纸芯片实现了葡萄糖和蛋白质的同时检测分析[9-11]。最近他们利用这种制备方法结合激光打孔的双面胶带和纤维素填充物制备了三维的纸芯片，非常适用于多样品、多参数的筛选分析（如水质分析）[12]。光刻制备方法具有以下优点：1)，分辨率高：可以得到最小 100

μm 宽的纸通道；2)，固化后的光刻胶耐有机溶剂的腐蚀。但是它的缺点也比较明显，比如制作过程繁琐、制作速度慢和成本昂贵等。2)，喷墨打印法：Koji Abe 等人提出利用喷墨打印的方法制备纸芯片[13]。他们首先将滤纸浸泡在 1% 的聚苯乙烯甲苯溶液中，待其干燥后，将其放入喷墨打印机中。将喷墨打印机中的墨盒换成甲苯溶液，利用喷墨打印的方法将预先设计好的图案打印到滤纸上，从打印喷头处打印出来的甲苯就会溶解聚苯乙烯，露出纸的纤维，形成亲水的纸通道。3)，等离子处理法：Li 等人提出用等离子处理的方法来制作纸芯片[14]。他们首先用烷基烯酮二聚体将滤纸整体疏水化，然后将镂空模板盖住疏水化的滤纸上面，将其放入等离子中处理。经过等离子处理的区域就会形成亲水通道。4)，绘图法：Whitesides 小组还提出一种利用绘图机将正己烷溶解的 PDMS 在普通滤纸上绘图形成微图案，然后固化得到纸通道的方法[15]。第二个研究方向为检测：1) Whitesides 小组提出利用拍照手机对纸芯片上的生化反应的显色结果进行拍照并进行远程传输，实现现场检测、远程诊断[16]。最近他们同时发展了一种便携化的光学检测设备，通过测定光透过纸的吸光率的不同进行现场的结果测定[17]。2) Dungchai 等人在纸芯片上集成电极，在纸芯片上实现了葡萄糖、乳酸和尿酸的电化学同时检测[18]。

目前文献报道的纸芯片制作方法如光刻法、等离子处理法等均存在着过程繁琐、制作成本高、速度慢和难以批量生产等缺点，无法满足纸芯片一次性使用的要求。本章中我们提出用蜡取代光刻胶、PDMS 等作为疏水性材料结合普通滤纸制备纸芯片。制作方法主要包括三种：1)，蜡笔描绘；2) 喷墨打印结合蜡笔描绘和 3) 喷蜡打印。制作过程分打蜡和烘烤两步，可在 10 分钟之内完成，无需洁净室、曝光机等昂贵设施。用上述纸芯片，完成了 HRP、葡萄糖和 BSA 的显色分析。

4.2 实验部分

4.2.1 仪器与试剂

实验所用滤纸为杭州新华纸业公司生产的中速定性滤纸 101 型或 102 型。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。牛血清白蛋白（BSA）为瑞士罗氏公司生产。

4.2.2 以蜡为疏水性材料制备普通纸质微流控芯片的三种方法

用蜡作为疏水性材料在滤纸上形成亲疏水相间的区域，完成纸芯片制备的方法主要有三种（如图 4-1A 所示）：

- 1, 用蜡笔在滤纸上画出简单的图案，再在背面对应的位置同样用蜡笔进行描摹，然后将其放入 150°C 烘箱中烘烤 5 min，让蜡熔化并透过滤纸。待其冷却后即可得到纸芯片（图 4-1B (a)）。