

真空便能使阀完全打开。我们认为较低的 t_v , 能有效的降低操作微阀的制动力, 同时可降低微阀阀座的体积从而制备更大集成度的芯片。避免重复的光刻和湿法蚀刻工艺是这种基于 PDMS 微阀的芯片的一个显著的特点, 它带来的简单、省时、低成本的制备工艺在将来的工业化大规模生产和应用微流控芯片中具有更广泛的实际意义。

参考文献

1. 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.
2. Sui, G. D.; Lee, C. C.; Satyamurthy, N.; Heath, J. R.; Phelps, M. E.; Quake, S. R.; Tseng, H. R., PDMS based microfluidic circuits for multi-step preparation of PET imaging probes. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **2005**, 230, U3659-U3660.
3. Marcus, J. S.; Anderson, W. F.; Quake, S. R., Microfluidic single-cell mRNA isolation and analysis. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (9), 3084-3089.
4. 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.
5. Squires, T. M.; Quake, S. R., Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of Modern Physics* **2005**, 77, (3), 977-1026.
6. Lee, J.; Moon, H.; Fowler, J.; Schoellhammer, T.; Kim, C. J., Electrowetting and electrowetting-on-dielectric for microscale liquid handling. *Sensors and Actuators a-Physical* **2002**, 95, (2-3), 259-268.

7. Chen, L. X.; Ma, J. P.; Tan, F.; Guan, Y. F., Generating high-pressure sub-microliter flow rate in packed microchannel by electroosmotic force: potential application in microfluidic systems. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2003**, 88, (3), 260-265.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Thorsen, T.; Maerkl, S. J.; Quake, S. R., Microfluidic large-scale integration. *Science* **2002**, 298, (5593), 580-584.
12. 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.
13. Blaze, 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.
14. Liu, C. N.; Toriello, N. M.; Mathies, R. A., Multichannel PCR-CE microdevice for genetic analysis. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (15),

5474-5479.

15. 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.

第四章 规模集成 PDMS 微阀微流控芯片的制备与性能考察

4.1 引言

2000 年以来,微流控芯片已经从简单的构架向大规模集成和功能集成发展,多种单元技术和功能均集成于微流控芯片中,给传统分析化学带来强烈的冲击,其显示出的明朗应用前景^[1-3]吸引越来越多的研究组进入该研究领域。

在微流控芯片功能集成方面,最引人注意的研究工作是 quake 课题组研制的微流控芯片中的微阀和微泵^[4, 5],集成有微阀和微泵的微流控芯片已经成功应用于细胞筛选、蛋白质结晶、单细胞分析等领域。但是正如他们所指出的,这种微阀对微流控通道的要求比较严格,必须是半圆形,且深宽比不能太大,否则便不能实现微阀的有效开关。他们在后续工作中制备了深宽比相对高的微阀^[6],但同时扩大了芯片通道的尺寸,降低了集成度;同时由于芯片采用弹性 PDMS 为材料,PDMS 的变形性使其芯片制备过程相当繁琐,在一定程度上限制了这种芯片的推广。

Mathies^[7]课题组研制了微流控芯片中的常闭微阀,该微阀为夹心结构,即由分别刻有微流控通道和气路控制通道的两片玻璃中间夹一片商品化的 PDMS 薄膜构成。这种微阀不受微流控芯片通道形状和深宽比的限制,同时具有更好的密封性,已经应用于 PCR 扩增^[8, 9]等领域。这种微阀已经实现了芯片上的规模集成,但是相对于 Quake 等研制的微阀来说,其集成度较小。

如前一章所述,我们通过在 PDMS 薄膜两面分别制备流体通道和气体控制通道,并将其夹于两片玻璃中间,实现了芯片上常闭微阀的集成。采用该构型,为提高芯片的封接成功率,中间 PDMS 薄膜的厚度一般需要 300 μm 以上,但这同时导致芯片集成微阀的尺寸相对较大,芯片集成度降低。本章中我们

通过对以上芯片构架进行改进,即由玻璃夹心的芯片构架改为 PDMS 材料构架,从而实现了规模集成微阀/微泵的微流控芯片的简便、低成本制备。

4.2 实验材料和方法

4.2.1 实验材料

玻璃片(63 mm×63 mm×1.2mm)购于长沙韶光微电子厂(韶光,湖南);带有铬和光刻胶涂层的用来做流体通道部分的模具。PDMS (Sylgard 184)购于道康宁公司(Midland, MI)。三甲基氯硅烷(TMSCl)购于国药集团化学试剂有限公司(上海),实验用水为二次蒸馏水。SU-8 2075 光刻胶购于 MicroChem 公司,显影液 PGMEA 购于 Aldrich 公司。

4.2.2 微流控芯片的制备

研制的微流控芯片为玻璃支撑的三层 PDMS 结构。其中,中间 PDMS 薄膜厚度为~100 μ m,一面制备有流体通道(深度为 20 μ m,宽度为 100 μ m),利用玻璃模具制成,另一面制有气路控制通道(深度为 60 μ m),采用硅片涂布 SU-8 的模具制备,具体制备方法如前章所述;将制成的该 PDMS 薄膜平铺于没有完全聚合好的 PDMS 平片上,将气体通路封接在一起,置于烘箱中加热,使其完全聚合;然后用打孔器在 PDMS 芯片上相应的位置钻孔,用甲醇清洗后,粘在玻璃载玻片上,置于烘箱中 80 度保温 15min 使甲醇完全挥发;取出芯片,用真空将阀打开,防止阀位置 PDMS 与玻璃的粘和。

4.2.3 微阀/微泵的操作

利用真空泵和压缩空气通过气路控制线使阀关闭(施加压力)或开启(施加真空),利用外接的 24V 电磁阀和相应的阀座(Parker Pneumatic, Richland, MI, USA)实施对气路控制线的控制,利用自制的阀控制板和 VC++编译的

Windows 上位机程序完成对所有阀的计算机控制。施加的压力或真空均相对于大气压。

4.3 结果与讨论

4.3.1 微流控芯片结构与制备

我们制备的微流控芯片如图 4-1 所示, 由支撑载玻片、两面制备有流体通道和气体控制通道的中间 PDMS 薄膜 (100 μm) 及 PDMS 盖片构成。该芯片集成有 10 个相同的分析单元, 每个分析单元分别由 10 个微阀组成, 这 10 个微阀构成 2 个进样泵、1 个循环泵和 1 个密封阀。这 10 个分析单元公用一个微流体进样通路 (由 1 个微泵驱动) 和 4 个样品池。整个芯片集成有 107 个微阀, 能实现进样、混合等功能。

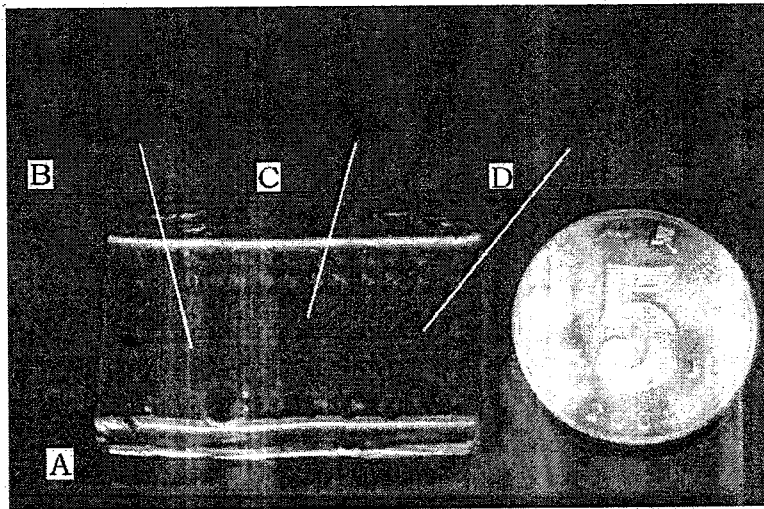


图 4-1 规模集成微流控芯片图 (A) 芯片图; (B) 常闭微阀; (C) 循环泵; (D) 蠕动泵

Fig 4-1 Picture of Large-scale integrated microfluidic chip

该微流控芯片中的微阀采用常闭阀构架, 微流体通道深度为 20 μm , 宽度

为 $100\mu\text{m}$ ，相对于 Quake 的常开阀（深度为 $10\mu\text{m}$ ，宽度为 $100\mu\text{m}$ ），流体通道的深宽比提高，从而增加了微流控芯片的实用性，例如能够实施对较大尺寸细胞的分析，同时由于流体通道加深便于缓冲液的添加。制备该微流控芯片过程中，首先是制备两面分别有微流控通道和气路控制通道的 PDMS 薄膜，微流控通道和气路控制通道的对准在 PDMS 没有聚合前实现。由于采用了透明的玻璃作为模具，借助于显微镜的帮助，可以方便地实现微流控通道和气体控制通道的对准。同时，由于玻璃的变形性比 PDMS 小得多，其形变基本可以忽略，因此对准的精确度和方便性远远大于多层软蚀刻方式。这对于复杂微阀系统特别是高集成度微流控芯片的制备具有极其重要的意义。

4.3.2 基于 PDMS 常闭微阀的考察

在我们前面的实验中已经证实，PDMS 薄膜越薄，常闭阀开启所需要的真空越小，所能实现的微阀/微泵的集成度越高。本实验中，我们采用膜厚为 $100\mu\text{m}$ 的 PDMS 薄膜制备了常闭微阀并对其性能进行了考察。结果证明，流体压力为零时，微阀在 10kPa 的压力下可以完全关闭， -10kPa 的压力下可以完全开启；在有流体压力情况下（压力小于 30kPa ），微阀在（流体压力+ 10kPa ）压力下可以完全关闭，阀的开启的压力也随之减小，在流体压力大于 10kPa 的情况下，甚至不需要真空的情况下也能开启。

4.3.3 基于常闭微阀的微泵的考察

在我们所设计的芯片上集成了蠕动泵，用来进行流体的运输。蠕动泵由三个连续的常闭阀构成，由于阀座较小，且所采用的薄膜厚度为 $50\mu\text{m}$ ，因此不容易产生气泡，即使有微小的气泡产生也可以很容易地通过阀座所在的位置除掉，因此该蠕动泵不需要特殊的去除气泡步骤。图 4-2 是蠕动泵工作的实时图像。图 4-3 是在蠕动泵作用下压力为 0 的流体在通道中运行的情况。

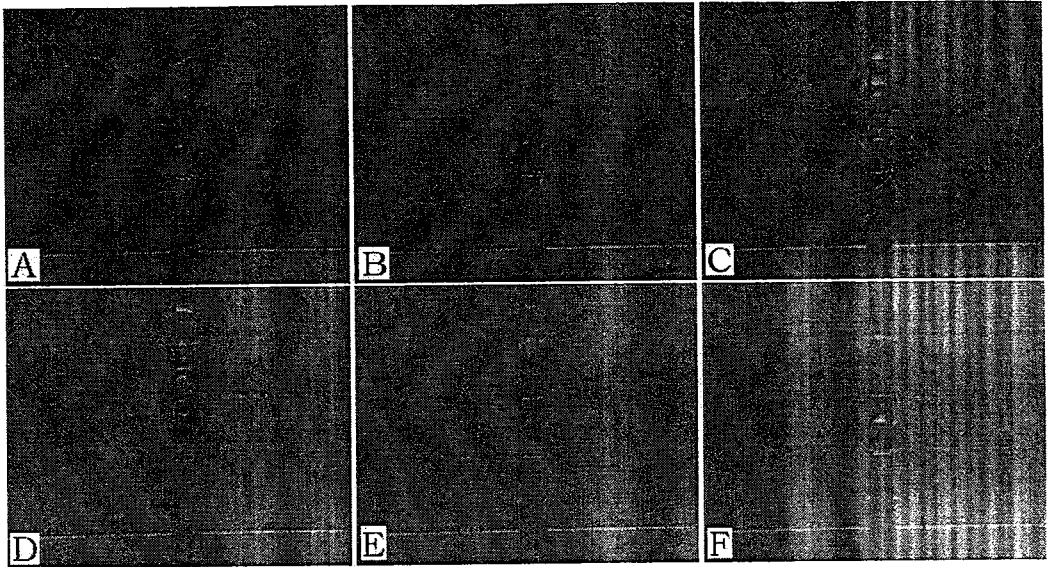


图 4-2 蠕动泵工作的实时图像

Fig 4-2 The CCD image of peristaltic pump

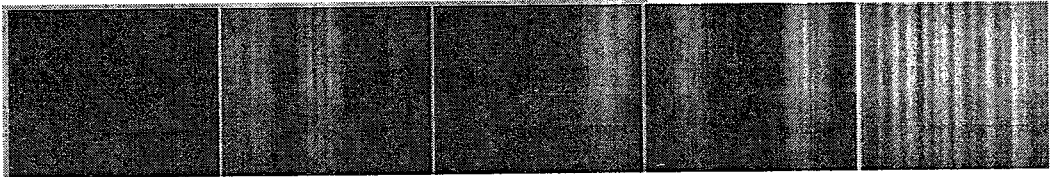


图 4-3 微泵作用下，流体在微通道中运行情况

Fig 4-3 micropump driven fluidic in microchannel

4.3.4 芯片制作存在问题与解决方案

本实验中，由于微流控芯片采用 PDMS 双面成型构架，因此制备过程简便，适用于规模集成微流控芯片的制备。但是目前制备工艺尚存在一些问题。

SU-8 模具脱落的问题：我们采用硅片上涂 SU-8 胶、光刻制作微阀气路部分的模具，采用玻璃湿法蚀刻制作微流体流路部分的模具，采用双面成型法制备两面分别含有流体通道和气路控制通道的 PDMS 薄膜。由于我们制作的 PDMS 薄膜相对来讲比较薄，一般在 $100\mu\text{m}$ 左右，因此取出薄膜时玻璃片或硅

片需要有一定的形变。我们在实验中发现,由于 SU-8 胶较脆,反复操作容易使光刻胶从硅片上脱落,一般来讲,可以制作大约 8 块左右的薄膜而 SU-8 不会脱落。如果是采用另一块模具,必然延长制作的时间周期,而采用多块硅模具的话必然带来成本的增加。我们另采用透明环氧胶制作了模具,实验结果证明利用该模具能够解决 SU-8 模具脱落问题。采用环氧胶制作模具具有很多优势:1、由于两面均透明,因此芯片的对准相对来说更加容易;2、环氧胶跟 PDMS 的结合力小于 PDMS 跟玻璃的结合力,因此采用环氧胶模具制作薄膜不需要进行烷基化处理;3、环氧胶制作成本低,可以制作大量模具,尤其适合于芯片的批量制作或多层芯片的制作;4、环氧胶跟玻璃芯片结合力强,不会因为产生的形变造成脱落。

阀的密封问题:我们制备的基于 PDMS 的微阀/微泵具有良好的密封性,但是长时间的存放会造成微阀开启失败等问题。这是由于在存放过程中,微阀一直处于关闭状态,PDMS 跟玻璃机体很容易结合在一起,需要提供更大的真空来开启微阀。由于我们的气体控制流路也是由 PDMS 组成的,也会产生形变,而我们所刻的气路深度一般只在 60 μm 左右,所以增大真空度会使气路通道变形,贴在薄膜上,不能成功的使微阀开启。该问题可以通过控制气路的深度得到解决。

4.4 小结

我们在上一章的基础上,通过对芯片构架进行改进,即由玻璃夹心的芯片构架改为玻璃支撑 PDMS 构架,进一步完善了薄膜法制备基于微阀的微流控芯片的制备工艺,采用简便的方法制备了具有相当集成度的微流控芯片。该微流控芯片中的微阀采用常闭阀构架,流体通道的深宽比高,能够实施对较大尺寸细胞的分析,同时便于缓冲液的添加。微流控通道和气路控制通道的对准在中间 PDMS 聚合之前进行,采用透明的玻璃作为模具可以方便而精确地

实现对准。这对于复杂微阀系统特别是高集成度微流控芯片的制备具有极其重要的意义。我们考察了采用这种方法制备的微阀和微蠕动泵的性能,并对现阶段这种制备方法存在的问题进行了讨论,并提出了相应的解决方案。

我们提出的这种基于 PDMS 微阀的简便制备方法具有很强的通用性,也适合于制备基于 Quake 常开微阀构架的规模集成微流控芯片。我们将开展进一步的相关研究工作。

参考文献

1. 林炳承, 秦建华, 微流控芯片实验室. 2006, (1), 1-2.
2. Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature* 2006, 442, (7101), 368-373.
3. Dittrich, P. S.; Tachikawa, K.; Manz, A., Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Analytical Chemistry* 2006, 78, (12), 3887-3907.
4. 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.
5. Thorsen, T.; Maerkl, S. J.; Quake, S. R., Microfluidic large-scale integration. *Science* 2002, 298, (5593), 580-584.
6. 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.
7. 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.
8. Liu, C. N.; Toriello, N. M.; Mathies, R. A., Multichannel.PCR-CE microdevice for genetic analysis. *Analytical Chemistry* 2006, 78, (15), 5474-5479.
 9. Blaze, 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.

第三部分 微流控芯片中的检测技术

第五章 基于 USB 接口的微型化电化学检测器的研制与性能考察

5.1 引言

微流控芯片开创了化学分析和生物分析仪器微型化的新时代^[1-3], 这些设备最显著的特点是具有全自动分析和便携化的潜力, 能够减少人工操作, 并使现场实时检测成为可能^[4]。

微流控芯片是引起广泛关注的一种新技术。许多分析过程如浓缩、PCR、蛋白酶切等操作单元都已经集成到芯片上。虽然这些芯片体积很小, 并且消耗极少量的试剂和样品, 但是目前他们通常与大而笨重的检测控制设备相连接^[2]。如果不实现芯片检测控制设备的微型化, 整个芯片系统的便携化很难实现, 芯片系统在现场实时检测等领域的应用也会受到很大限制^[5, 6]。

近来, 已经有许多研制微型化和便携式检测设备的报道。激光诱导荧光和其他光学检测系统均已被证实具有微型化的可能。而电化学检测模式, 因其检测电极可以在芯片的制造过程中直接集成到芯片上, 被认为是最具有微型化潜力的检测设备之一^[6]。许多课题组致力于芯片电泳中电化学检测方法的研究, 内容包括电极集成技术^[7-10]、提高检测灵敏度的方法^[11-14]和应用扩展^[15-17]等。也有少数几个课题组进行了便携式电化学检测系统的研制。Martin^[18]等报道了一种用于芯片电泳、采用电池供电的光电隔离电化学检测系统。最引人注意的是 Baldwin^[6]课题组研制的包含电化学检测器和高压供电电源的微型化电化学检测系统, 充分体现了全集成微流控芯片控制系统的优势, 但是这个系统需要额外的 DAQ 卡来提供数据采集和继电器控制。

我们研制了一种微型化的电化学检测器, 尺寸为 $3.6 \times 5.0 \text{ cm}^2$ ($W \times L$),

仅仅稍大于普通载玻片的尺寸。这个检测器最突出的特点是采用了通用串行总线 (USB) 来进行与上位机的通讯, 同时由上位机供电。USB 的使用极大地方便了该电化学检测系统的使用, 并使其微型化, 从而适合于便携式和现场实时检测。根据芯片电泳电化学检测电流的范围, 我们选择 $10\text{M}\Omega$ 固定反馈电阻来进行电流到电压的转换, 而没有采用常规的可选择反馈电阻, 这样我们就在满足电化学检测需要的前提下实现了设计的简化。我们对整个检测器的供电电路和线路板设计进行了优化, 使其在微小体积下能得到好的性能。采用肾上腺素作为标准品对基于 USB 的电化学检测器进行性能考察, 采用 PDMS/玻璃芯片检测时检测限为 $2.1\mu\text{M}$ ($S/N=3$)。

5.2 材料和方法

5.2.1 试剂和材料

SU-8 2035 光刻胶购于 MicroChem 公司, 显影液 PGMEA 购于 Aldrich 公司。Sylgard 184 购于道康宁公司。肾上腺素购于 Sigma 公司 (St. Louis, Mo)。缓冲液均采用二次蒸馏水配制。

5.2.2 仪器和电子器件

整个电化学检测器的原理图如图 5-1 所示, 构建系统的电子元件包括 USB 转串口芯片 CP2101 (Silicon Laboratories, Astin, Texas), 单片机 MSC1211Y5 和运算放大器 OPA129 (Texas Instruments Inc. Dalla, Texas) 和 DC-DC 转换芯片 ADM660 (Analog Devices Inc., Norwood)。其他电子元件如电阻、电位器、电容等均购于当地电子市场。

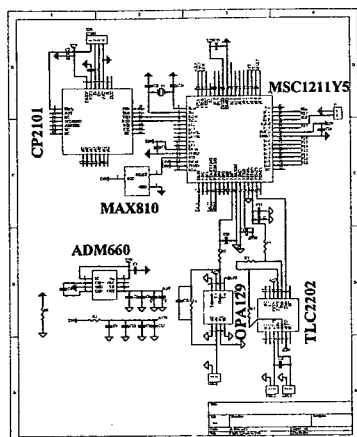


图 5-1 电化学检测器原理图

Fig 5-1 Schematic of the mini-electrochemical detector.

高压电源供电 (HVPS), 由本实验室自行设计和制作, 用来提供芯片电泳分离所需的高压。高压电源由两个高压模块组成: C40 提供 0~4000V 电压, C20N 提供 -2000~0V 电压。芯片电泳系统如图 5-2 所示。

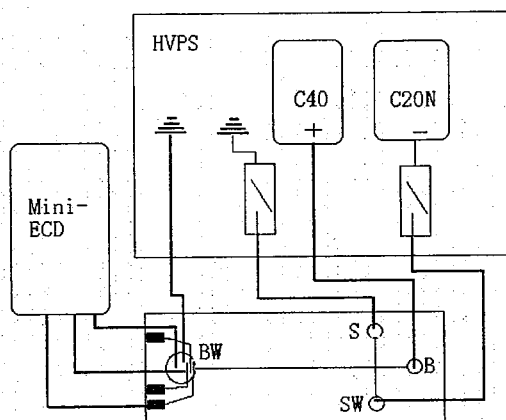


图5-2 电化学检测芯片电泳系统示意图

Fig 5-2 Schematic of the microchip electrophoresis system (S-sample reservoir; B-buffer reservoir; BW-buffer waste reservoir; SW-sample waste reservoir); effective separation length is 4.0cm.

5.2.3 芯片制备

按如下方法^[19]进行了 PDMS 芯片的制备: 3 寸硅片用 Piranha 溶液清洗、干燥后, 用甩胶机甩一层 SU-8 2035。涂层硅片分别经 65℃和 95℃烘 3min 和 6min。将掩膜至于光刻胶上, 置于曝光机中曝光 3min, 95℃烘 6min, 在显影液中显影, 制成用来制备 PDMS 的模具。将混合好的 PDMS 除气后倒于模具上, 在 80℃下烘 2h, 得到含有通道的 PDMS, 微通道尺寸为 50 μm 宽, 25 μm 深。含有微电极的玻璃片的制备采用文献的方法^[9], 不再赘述。PDMS 和含有电极的玻璃片在显微镜下封接在一起, 使工作电极距离分离通道出口约 50 μm 。

5.2.4 电泳过程和电化学检测

配制 10mM 的肾上腺素作为储备液, 使用前用缓冲液稀释到相应的浓度。芯片微流控通道采用 0.1M 氢氧化钠和二次蒸馏水分别冲洗 10min 和 5min。在微流控通道、样品废液池、缓冲液池、缓冲液废液池中加入缓冲液, 样品池中加入样品。进样过程为: 在样品池和样品废液池之间施加负高压, 而缓冲液池和缓冲液废液池不施加电压, 进样时间持续 20s。进样完成后便进行分离过程: 在缓冲液池和缓冲液废液池之间施加正电压, 而样品池和样品废液池悬空, 工作电极在分离过程中施加相应的电位。在电化学检测器采集到的信号稳定后, 进行电泳的进样和分离过程。

5.2.5 软件 and 数据处理

微型化电化学检测器和高压电源采用 VC++编写的软件进行上位机控制。单片机固件采用 C 语言编写并且存储在单片机的闪存内。实验运行参数包括运行时间、高压值、电化学检测电势等, 均在实验开始前设置。整个运行时间分为六步, 每步运行参数均可单独设置 (六步能满足绝大多数电泳实验,

如果需要的话,可通过程序添加需要的步数)。实验参数在运行的同时通过 USB 口传递到单片机 (MSC1211Y5)。每步时间的控制精度为 1ms,因为电泳分离的整个分离时间很短,因此时间的精确控制尤为重要。电化学检测的采样频率为 10SPS,传输到计算机上,并且同步在电脑屏幕上显示。采集的数据采用特定的格式存储于计算机内,并且很容易转成文本文件以利于数据处理。整个实验运行完毕后,所有参数自动恢复初始设置,若实验过程中需要中断实验,可以通过屏幕上的“停止”按钮方便地实现。

5.3 结果与讨论

5.3.1 电化学检测器的设计与研制

我们研制的电化学检测器尺寸只有 $3.6 \times 5.0 \text{ cm}^2$ ($W \times L$), 仅仅稍大于显微镜载玻片。微型化检测器由三部分组成: 控制单元、通信单元、模拟单元, 原理图如图 5-1 所示, 电化学检测器实物图如图 5-3 所示。

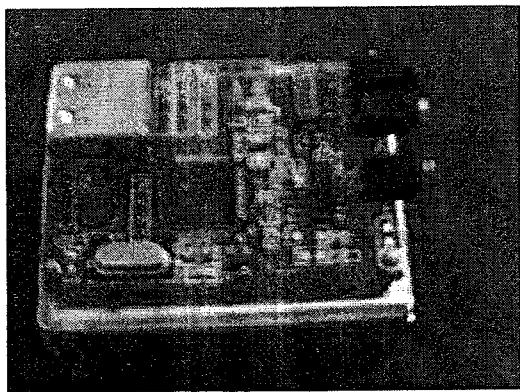


图 5-3 电化学检测器实物图

Fig 5-3 Picture of the mini-electrochemical detector ($3.6 \times 5.0 \text{ cm}^2$, $W \times L$).

控制单元是基于全集成的 8 位单片机 MSC1211Y5, 系统时钟为 24MHz。它在 $12 \text{ mm} \times 12 \text{ mm}$ 的小尺寸下, 集成了多种功能, 在满足芯片电泳电化学检测

需要的前期下，减小了控制单元的体积。

我们研制的微型化电化学检测器最引人注意的特点是采用USB接口与上位机进行通讯。USB端口，具有高传输速率，支持热拔插，即插即用，能提供快速、稳定的数据传输，并且便于电化学检测器的安装和使用。同时，USB具有为外围设备提供电源的功能，也使电化学检测器摆脱了大体积的电源，减小了电化学检测器的体积。在该检测器中，CP2101，高度集成的USB转串口芯片，提供了一种简单的实现USB设计的解决方案，它仅需要极少的电子元件和小的线路板体积。因此，基于USB接口的电化学检测器容易携带，适合于现场检测，是一种极具使用价值与应用前景的电化学检测器。

在电化学检测部分，MSC1211Y5的一路DA用来将控制电势的数字信号转换成施加到恒电位仪的模拟信号。运算放大器用来将DA输出的单极性信号(0~2.5V)转换成双极性信号(2.5V ~ -2.5V)。超低偏移电流运算放大器OPA129用来使工作电极保持地电位，同时作为电流电压转换器。由于芯片电泳电化学检测的电流通常在nA数量级，因此我们采用10MΩ固定反馈电阻进行电化学工作电极的电流转换，而非采用复杂的可选择反馈电阻。对于小信号的检测，MSC1211Y5内部的运算放大器(PGA)用来提供二级放大，放大倍数分别为1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128。这样在提供芯片电泳电化学检测功能的同时，既简化了电化学检测器的设计，又减小了电化学检测器的体积。

为了使电化学检测器得到最佳的性能，必须注意供电电源线路和线路板的设计。如图5-1所示，我们将数字部分(通讯部分与控制部分)和模拟部分(AD, DA和电化学检测部分)分开，从而有利于避免运行时数字部分对模拟部分的干扰。为了提高检测的信噪比(S/N)，我们特别注意了模拟输入部分的设计。首先，在OPA129附近的输入和输出部分都放置了低通滤波器，以使高频电信号的干扰最小化；第二，OPA129的输入部分尽可能地短，同时采用地线屏蔽。我们研制的电化学检测器工作参数如下：工作电极的电位从

-2.5V 到+2.5V 可变,分辨率为 0.01mV, 电流检测范围为 -0.3×10^{-7} A 到 2.5×10^{-7} A, 噪音低于 1pA; 此外, 该微型化检测器里集成了正弦波和方波发生器, 以便于使用者在电极污染后进行电极处理。

5.3.2 芯片电泳电化学检测

我们采用芯片电泳电化学安培检测肾上腺素对该微型化电化学检测器进行了性能表征。

在毛细管电泳电化学检测中已经证实^[20]: 分离电压能导致柱端安培检测中物质半电势偏移, 这在芯片电泳电化学检测中同样适用。芯片电泳电化学检测的最佳电势受分离电压和工作电极到分离通道出口之间距离的影响。为了得到最大的响应, 对每一种欲分析的物质必须进行一系列的电势测定。在我们设计的微型化电化学检测器中, 可以通过程序灵活地设定检测电势。电极电势和信号的关系如图 5-4 所示。从图 5-4 可以看出, 电流信号在 0.3V 到 0.6V 之间缓慢上升, 在 0.6V 到 1.0V 之间变化平稳, 几乎保持不变, 然后上升, 直到 1.1V 开始下降。在电位超过 1.0V 时基线电流和噪音开始增加, 因此我们最终选择 0.8V 作为最佳检测电势, 因为它能提供好的重现性和最佳的信噪比。图 5-4 说明我们研制的检测器能满足芯片电泳电化学检测的需求。

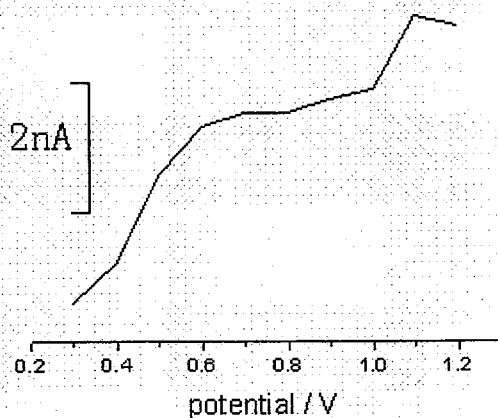


图 5-4 0.1mM 肾上腺素的电压电流曲线

Fig 5-4 Hydrodynamic voltammogram for 0.1mM epinephrine. Conditions: 20mmol/L phosphate buffer, pH8.0; injection voltage 600V, 20s; separation voltage, 800V; detection potential (vs. Pt).

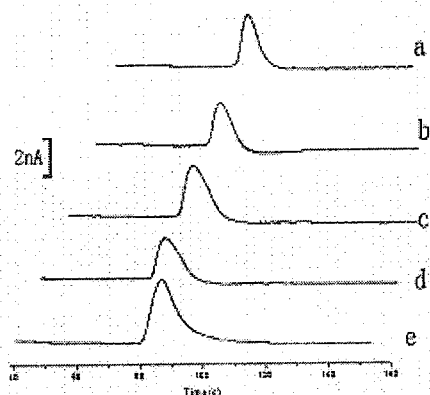


图 5-5 五次检测 0.1mM 的肾上腺素重现性

Fig 5-5 Five detection of 0.1mM epinephrine. (a)1st time (b)2nd time (c)3rd time (d)4th time (e)5th time. Conditions: 20mmol/L phosphate buffer, pH8.0; injection voltage 600V, 20s; separation voltage, 800V; detection at 0.8V(vs. Pt).

图 5-5 为五次 0.1mM 肾上腺素的芯片电泳电化学检测的电泳图, 用来证明电化学检测的重现性。由于肾上腺素的高扩散性, 在进样前, 样品很容易扩散到分离通道中, 导致结果重现性不好。在我们的实验中, 进样是采用在样品废液池施加负高压, 缓冲液池为零电势, 而样品池和缓冲液废液池保持接地 20s 来实现的。样品池中的样品、缓冲液池和缓冲液废液池中的缓冲液都在电渗力的作用下泵向样品废液池。这样即使在样品进样前肾上腺素扩散

到分离通道中，也会在进样过程中被拉回到进样通道。比较长的进样时间（20s）有助于形成稳定的进样区带。重现性结果如图 5-5 所示：迁移时间和峰高的相对标准偏差分别为 3.37%和 3.61% (n=5)，检测限为 2.1 μ M (S/N=3)，这个结果同其他 PDMS 芯片的电化学检测结果相当。

5.4 小结

我们研制了用于芯片电泳的微型化电化学检测器，体积与芯片的尺寸相当，仅为3.6 \times 5.0cm（宽 \times 长）。该检测器最突出的特点是采用了USB进行与上位机的通讯，同时由上位机供电。根据芯片电泳电化学检测电流的范围，我们选用10M Ω 固定反馈电阻进行工作电极的电流到电压的转换。检测更小信号时，选用单片机内置的放大器进行信号放大。工作电极电压电势 \pm 2.5V，检测电流的范围为 $-0.3 \times 10^{-7} \sim 2.5 \times 10^{-7}$ A，基线噪音低于1pA。我们研制的这种基于USB的微型化电化学检测系统，能够满足芯片电泳电化学检测的需要，更重要的是体积小，使用方便，从而适合于便携式和现场实时检测。

参考文献

1. Vilknér, T.; Janásek, D.; Manz, A., Micro total analysis systems. Recent developments. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, (12), 3373-3385.
2. Reyes, D. R.; Iossifidis, D.; Auroux, P. A.; Manz, A., Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, (12), 2623-2636.
3. Dittrich, P. S.; Tachikawa, K.; Manz, A., Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (12), 3887-3907.
4. Wang, J., Portable electrochemical systems. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2002**, 21, (4), 226-232.

5. Renzi, R. F.; Stamps, J.; Horn, B. A.; Ferko, S.; VanderNoot, V. A.; West, J. A. A.; Crocker, R.; Wiedenman, B.; Yee, D.; Fruetel, J. A., Hand-held microanalytical instrument for chip-based electrophoretic separations of proteins. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, (2), 435-441.
6. Jackson, D. J.; Naber, J. F.; Roussel, T. J.; Crain, M. M.; Walsh, K. M.; Keynton, R. S.; Baldwin, R. P., Portable high-voltage power supply and electrochemical detection circuits for microchip capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, (14), 3643-3649.
7. Hilmi, A.; Luong, J. H. T., Electrochemical detectors prepared by electroless deposition for microfabricated electrophoresis chips. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, (19), 4677-4682.
8. Yan, J. L.; Du, Y.; Liu, J. F.; Cao, W. D.; Sun, S. H.; Zhou, W. H.; Yang, X. R.; Wang, E. K., Fabrication of integrated microelectrodes for electrochemical detection on electrophoresis microchip by electroless deposition and micromolding in capillary technique. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, (20), 5406-5412.
9. Martin, R. S.; Gawron, A. J.; Lunte, S. M.; Henry, C. S., Dual-electrode electrochemical detection for poly(dimethylsiloxane)-fabricated capillary electrophoresis microchips. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, (14), 3196-3202.
10. Baldwin, R. P.; Roussel, T. J.; Crain, M. M.; Bathlagunda, V.; Jackson, D. J.; Gullapalli, J.; Conklin, J. A.; Pai, R.; Naber, J. F.; Walsh, K. M.; Keynton, R. S., Fully integrated on-chip electrochemical detection for capillary electrophoresis in a microfabricated device. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, (15), 3690-3697.
11. Lacher, N. A.; Lunte, S. M.; Martin, R. S., Development of a

- microfabricated palladium decoupler/electrochemical detector for microchip capillary electrophoresis using a hybrid glass/poly(dimethylsiloxane) device. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, (9), 2482-2491.
12. Osbourn, D. M.; Lunte, C. E., Cellulose acetate decoupler for on-column electrochemical detection in capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (24), 5961-5964.
 13. Wu, C. C.; Wu, R. G.; Huang, J. G.; Lin, Y. C.; Chang, H. C., Three-electrode electrochemical detector and platinum film decoupler integrated with a capillary electrophoresis microchip for amperometric detection. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, (4), 947-952.
 14. Hebert, N. E.; Kuhr, W. G.; Brazill, S. A., A microchip electrophoresis device with integrated electrochemical detection: A direct comparison of constant potential amperometry and sinusoidal voltammetry. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, (14), 3301-3307.
 15. Wang, J.; Pumera, M.; Chatrathi, M. P.; Escarpa, A.; Musameh, M.; Collins, G.; Mulchandani, A.; Lin, Y.; Olsen, K., Single-channel microchip for fast screening and detailed identification of nitroaromatic explosives or organophosphate nerve agents. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, (5), 1187-1191.
 16. Wang, J.; Ibanez, A.; Chatrathi, M. P.; Escarpa, A., Electrochemical enzyme immunoassays on microchip platforms. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (21), 5323-5327.
 17. Wang, J.; Escarpa, A.; Pumera, M.; Feldman, J., Capillary electrophoresis-electrochemistry microfluidic system for the determination of organic peroxides. *Journal of Chromatography A* **2002**, 952, (1-2),

249-254.

18. Martin, R. S.; Ratzlaff, K. L.; Huynh, B. H.; Lunte, S. M., In-channel electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis using an electrically isolated potentiostat. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, (5), 1136-+.
19. 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.
20. Wallenborg, S. R.; Nyholm, L.; Lunte, C. E., End-column amperometric detection in capillary electrophoresis: Influence of separation-related parameters on the observed half-wave potential for dopamine and catechol. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, (3), 544-549.

第六章 多通道化学发光检测器的研制与性能考察

6.1 引言

免疫分析是生物学研究、临床诊断和环境监测等领域的重要分析手段。微流控芯片技术（微全分析系统）在分析化学领域显示出重要的应用价值和广泛的应用前景。将免疫分析集成到微流控芯片上，实现免疫系统的微型化，具有很多优势：提高反应效率，降低反应时间，减少样品的消耗量。因此，在微流控芯片上实现免疫分析得到了广泛的关注，在最近几年里，有许多关于微流控芯片集成免疫分析的报道^[1-5]。

许多检测方法可以用来进行微流控免疫检测^[6-10]。激光诱导荧光是微流控芯片中最主要的检测手段^[11]，由于其灵敏度极高，因此也常常被用来进行微流控免疫检测。但是激光诱导荧光检测通常需要复杂的光路，造成仪器价格昂贵，体积庞大。

化学发光也是微流控中主要的检测方式之一，其光路简单，体积小，灵敏度高，在微流控芯片中目前主要应用于重金属离子的检测和免疫检测，在微流控芯片免疫检测方面也已经显示一定的优势。但是化学发光检测存在如下问题，虽然光子检测技术发展很快，已经达到单光子检测水平，但是现有的微流控化学发光检测系统大多是基于光电倍增管（PMT）检测系统，而没有采用灵敏度更高的光子计数器检测，导致了微流控芯片化学发光检测的灵敏度与激光诱导荧光相比有很大差距。另外，多通道检测也未见报道，虽然CCD能够进行图像的采集，但是其灵敏度还需要进一步提高，才能满足微流控芯片多通道化学发光检测的需求。

我们研制了旋转扫描式化学发光检测器，采用步进电机带动的方式对多通道微流控芯片进行扫描检测，采用光路聚焦、针孔系统来提高检测信号的

收集效率；采用光子计数器作为光电转化装置，提高检测信号的灵敏度。采用酶免疫化学发光检测皮质醇对研制的化学发光检测器的灵敏度、重现性等指标进行了考察。

6.2 实验材料和方法

6.2.1 试剂和材料

免疫分析试剂抗鼠 IgG 购于博瑞德公司（大连，辽宁）。小牛血清（BSA）和吐温 20 分别购于 Sigma 化学试剂公司（St, Louis, Mo）和 Aldrich（St, Louis, Mo），抗皮质醇抗体采用 DSL-10-2000 试剂盒中抗血清（Diagnostic systems laboratories Inc. Webster, TX, USA），酶标记皮质醇和标准皮质醇血清均为 Diagnostics 公司试剂盒中试剂，化学发光底物为 PERBIO 公司 supersignal[®] 化学发光底物。其它化学品购于沈联化学试剂公司（沈阳，辽宁）。所有的溶液采用二次蒸馏水配制。SU-8 2035 光刻胶购于 MicroChem 公司，显影液 PGMEA 购于 Aldrich 公司。Sylgard 184 购于道康宁公司。PDMS（Sylgard 184）购于美国道康宁公司（Midland, MI）。

6.2.2 化学发光检测仪

整个化学发光光学系统大致可以分为四部分：

1、芯片平台：芯片固定于调节精度为 1 μ m 的电控平台上，可沿 Z 轴上下调节；

2、中心旋转物镜和棱镜平台：参照激光共聚焦的设计，棱镜旋转半径为 1cm，在步进电机带动下沿中心轴旋转，旋转速度可调，最大速度为 360 $^{\circ}$ /min。

3、信号收集聚焦光路：采集的光学信号经聚焦透镜聚焦后，聚焦到针孔上，为了得到高的检测灵敏度，我们采用 3mm 的针孔。

4、信号检测系统：光子计数器位于针孔下方，用于将化学发光信号转换成脉冲信号，由采集板采集，并传到上位机。

整个光路图和仪器构架及样机图如图 6-1 所示，

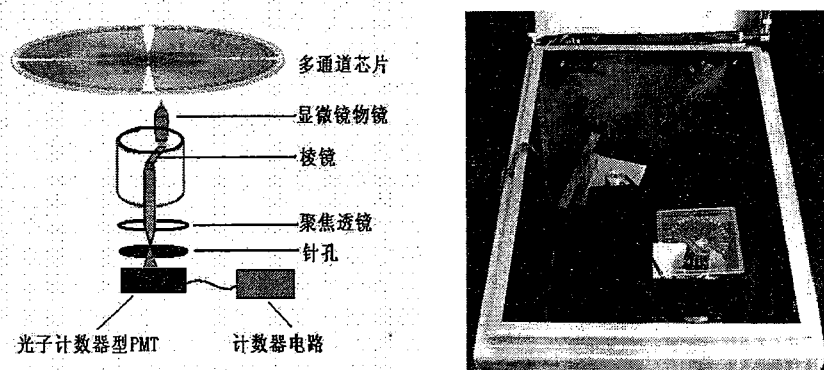


图 6-1 扫描化学法光检测器原理图及样机图

Fig 6-1 Schematic of the rotary chemiluminescence detector

6.2.3 信号采集及数据处理

光子计数器输出的脉冲信号，经高速运算放大器放大，经信号处理电路，由计数电路采集，采集时间段为 1ms，1ms 时间段内的总脉冲数，通过 USB 口上传到上位机内，在屏幕上显示，并以文本文件的方式存储于计算机内。

6.2.4 芯片设计和制备

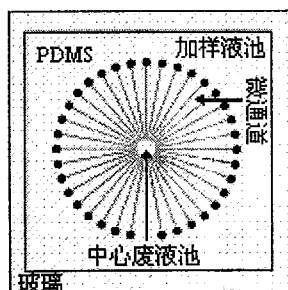


图 6-2 芯片结构示意图

Fig 6-2 illustration of the microchip

采用放射状的微流控通道，如图 6-2 所示：芯片通道宽度为 $200\mu\text{m}$ ，高度为 $25\mu\text{m}$ ，芯片共用缓冲废液池，采用 PDMS/玻璃芯片，芯片的制法与前相同。

6.2.5 免疫分析过程

首先是在微通道的表面物理吸附一层二抗，BSA 包被后吸附皮质醇抗体，然后将一定比例的辣根过氧化酶（HRP）标记的皮质醇和样品（控制血清或者血清）充分混合后加入微通道，它们在通道中将与通道壁上的抗体发生竞争反应，待反应达到平衡后，加入辣根过氧化酶的反应底物（化学发光底物），检测得到结果。流程图如 6-3 所示。

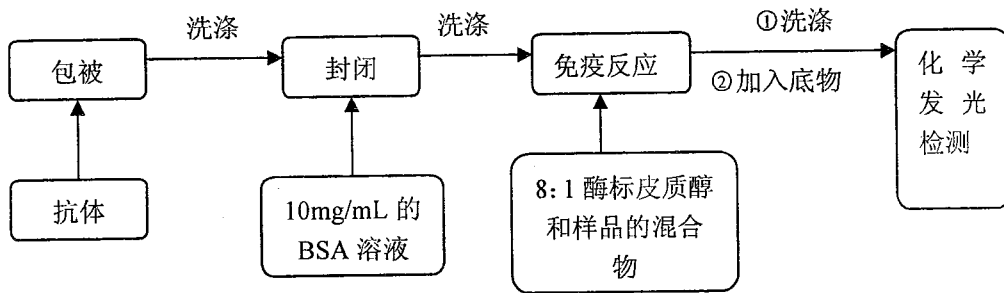


图 6-3 实验操作流程

Fig 6-3 The process of immunoassay detection

6.3 结果与讨论

6.3.1 光路特点

微流控芯片通道内产生的化学发光信号，经物镜收集，变成（类）平行光，经棱镜折射后，以平行光的形式从旋转平台的中心射出，再经过聚焦透

镜聚焦至针孔，进入光子计数器型 PMT。芯片平台置于电控平移台上，在计算机控制下上下移动（步进移动距离分辨率 $1\mu\text{m}$ ），以得到最佳的分辨率和最强的检测信号。

整个装置结构简单，采用高数值孔径的显微镜目镜作为化学发光信号的收集装置，提高了化学发光信号的收集效率，提高了检测的灵敏度。采用了针孔的设计，可以大大减小相邻通道之间信号的干扰和其他杂散光的干扰，从而提高信噪比。

4.3.2 光子计数器数据处理

光子计数器采集的信号为脉冲信号，如图 6-4 所示，不能直观地反应信号强度值。我们采用一定量相邻数据平滑滤波的方法对采集到的光子计数器信号进行数据再处理。图 6-4 为未经平滑的数据，图 6-5 为经 50 点平滑滤波后信号图，图 6-6 为 200 点平滑滤波的结果。对比发现，200 点平滑滤波的效果较好，因此我们在后续的数据处理中均采用 200 点相邻数据平滑滤波。

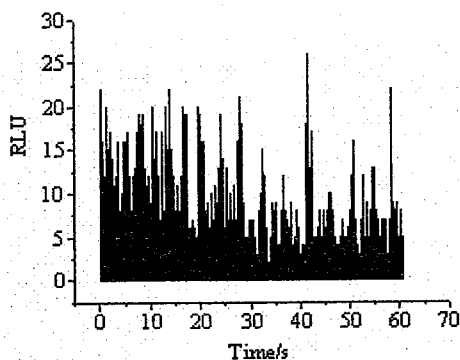


图 6-4 原始脉冲信号图

Fig 6-4 Original data plot

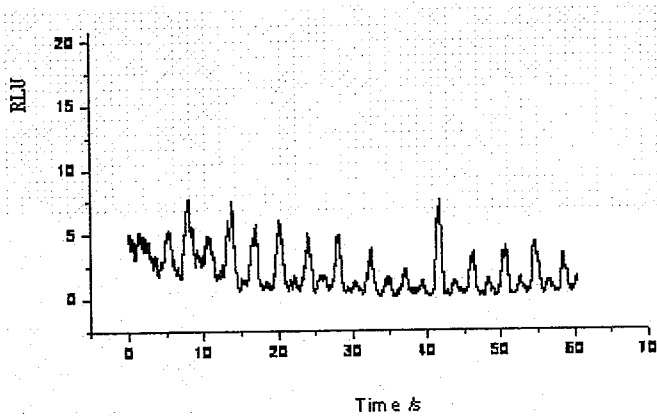


图 6-5 经相邻 50 点数据平滑滤波的得到的脉冲信号图

Fig 6-5 the data plot after 50 points smooth

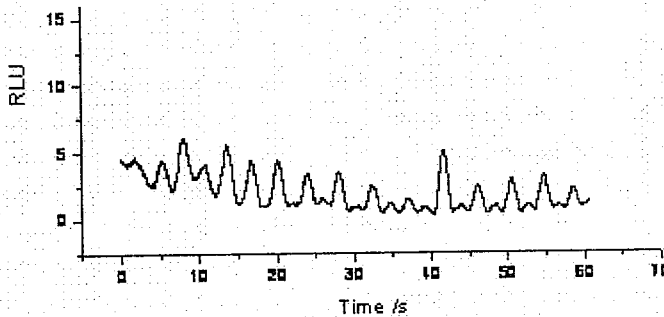


图 6-6 经相邻 200 点数据平滑滤波得到的脉冲信号图

Fig 6-6 the data plot after 200 points smooth

4.3.3 酶免疫化学发光测定皮质醇

我们采用酶免疫化学发光检测皮质醇的方法来确定我们所设计的化学发光检测器的灵敏度等各项指标。光子计数器灵敏度很高，甚至能达到单个光子检测的水平。化学发光的灵敏度也很高，因此检测结果是两者结合所反映出的综合指标，也是我们最终需要的结果。

我们采用酶联免疫化学发光检测的方法对皮质醇进行了检测。五通道

50ng/mL 皮质醇的检测结果如图 6-7 所示, 峰高相对标准偏差为 3.5%, 检测范围为 20~200ng/mL (图 6-8)。从检测结果看, 我们研制的旋转化学发光检测器在重现性、灵敏度等方面能够满足微流控化学发光免疫检测的应用要求。

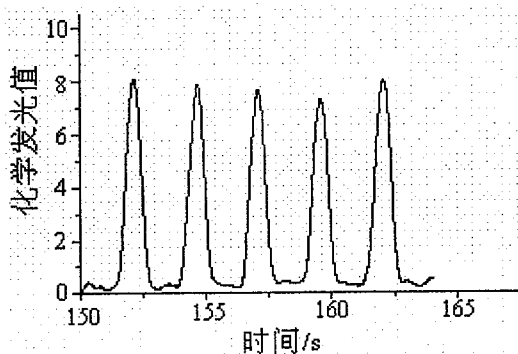


图 6-8 五通道 50ng/mL 皮质醇的检测结果 (实验条件: 免疫试剂均采用试剂盒内试剂浓度, 未经进一步稀释; 酶标皮质醇: 皮质醇=8: 1)

Fig 6-8 the result of detection of 5 channels 50ng/mL cortisol

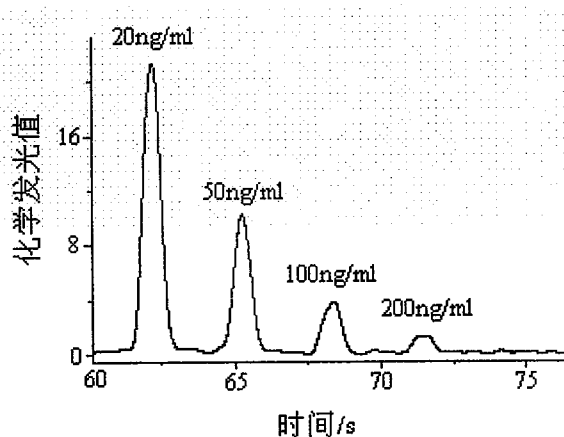


图 6-9 不同浓度皮质醇控制血清的检测结果 (实验条件同上)

Fig 6-9 results of detection of different concentration cortisol

6.4 小结

我们研制了旋转扫描式化学发光检测器,采用步进电机带动的方式对微流控芯片进行扫描检测,采用光路聚焦、针孔系统来提高检测的灵敏度;采用光子计数器作为光电转化装置,提高检测信号的灵敏度。采用这种扫描式化学发光检测器,对皮质醇进行了检测,检测结果峰高相对标准偏差为3.5% (50ng/mL, n=5),检测范围为20~200ng/mL。实验结果表明,我们研制的化学发光检测器在重现性、检测灵敏度等方面均能满足微流控化学发光免疫检测的需要。

参考文献

1. 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.
2. 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.
3. Hayes, M. A.; Polson, N. A.; Phayre, A. N.; Garcia, A. A., Flow-based microimmunoassay. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (24), 5896-5902.
4. Hu, G. Q.; Gao, Y. L.; Sherman, P. M.; Li, D. Q., A microfluidic chip for heterogeneous immunoassay using electrokinetical control. *Microfluidics and Nanofluidics* **2005**, 1, (4), 346-355.
5. Jiang, X. Y.; Ng, J. M. K.; Stroock, A. D.; Dertinger, S. K. W.; Whitesides, G.

- M., A miniaturized, parallel, serially diluted immunoassay for analyzing multiple antigens. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (18), 5294-5295.
6. Wang, J.; Ibanez, A.; Chatrathi, M. P.; Escarpa, A., Electrochemical enzyme immunoassays on microchip platforms. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (21), 5323-5327.
 7. Wang, J.; Ibanez, A.; Chatrathi, M. P., Microchip-based amperometric immunoassays using redox tracers. *Electrophoresis* **2002**, 23, (21), 3744-3749.
 8. 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.
 9. Stokes, D. L.; Griffin, G. D.; Tuan, V. D., Detection of E-coli using a microfluidics-based antibody biochip detection system. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **2001**, 369, (3-4), 295-301.
 10. Tsukagoshi, K.; Jinno, N.; Nakajima, R., A micro-total analysis system with chemiluminescence detection and its application to detection of cancer marker. *Febs Journal* **2005**, 272, 502-502.
 11. 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.

第四部分 基于微流控芯片的现场实时免疫检测系统的初步研究

第七章 现场实时检测系统样机的研制

7.1 引言

当代分析化学最为重要的应用领域是生命科学。医学是生命科学的主要组成部分之一。临床检验是医学和分析化学沟通最为直接的一个桥梁，现代临床检验的一个重要分支是现场实时检测 (point of care, POC)。

现场实时检测是指医生或其他科研人员在中心实验室以外所做的任何实验性指标的检测。与中心实验室相比，这种检测方式具有小型、便携、快捷、方便等优点，可满足野外、重大事故现场、海关甚至家庭等检测的要求，应用范围极广。POC 可直接在被检者身边提供快捷有效的生化指标，现场指导用药，使检测、诊断、治疗成为一个连续过程，对于疾病的早期发现治疗具有突破性的意义。据预测，POC 仪器发展趋势应是小型化、“傻瓜”式，操作简单，无需专业人员，直接输入体液样本，即可迅速得到诊断结果，甚至还可将信息上传至远程监控中心，由医生指导保健。由于 POC 试剂消耗量少，价格低廉，尤其适用于野外、边远、贫困、落后地区的普及推广。

从某种意义上说，已经广为使用的检测试纸和检测卡，如血糖试纸、验孕试纸、艾滋病自检卡等，可以被看成是 POC 的雏型，或者说至少显示了一定的 POC 理念^[1]，国内外均已有研制和生产。这些试纸或检测卡简单、便捷，但是它无所谓通量，功能单一，不能处理样品，当然更谈不上在细胞和血清水平检测多项指标，诊断多种疾病。而微流控芯片指的是把化学和生物等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测，细胞培养、分选、裂解等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米的芯片上，由微通道形成网络，

以可控流体贯穿整个系统,用以取代常规化学或生物实验室的各种功能的一种技术。微流控芯片的基本特征和最大优势是多种单元技术在整体可控的微小平台上灵活组合、规模集成。这样一种特征和优势与 POC 的现场、实时理念高度吻合,因此,微流控芯片实际上被认为是使 POC 理念付诸实施的理想平台。事实上,微流控芯片已被列入 21 世纪最为重要的前沿技术的行列。2004 年 9 月美国 Business 2.0 杂志的封面文章称它是“改变人类的七种技术”之一。

国内外一些前沿微流控芯片的研究课题组已经开始以 POC 为目标开展一些零星的工作,Whitesides 等在研制一种简单的微流控芯片用于非洲地区艾滋病的检测^[2];摩托罗拉公司的一个小组在研制一种高度集成度的微流控芯片用于检测血液中大肠杆菌^[3]; Battrell 等试验用一种以微流控芯片为基础的微型检测卡检测血液中极少量的癌细胞^[4]; Yager 等在美国国家航天局支持下开展用微流控芯片检测微生物感染的研究^[5]。

我们进行了基于现场实时检测系统关键技术的研究,在此基础上,进行了现场实时检测系统样机的研制。该样机主要由泵阀驱动系统和扫描阵列激光诱导检测系统组成。虽然该样机距离完全意义上的现场实时检测系统还有很大的差距,但是为我们进一步的工作打下了基础。

7.2 实验材料和仪器

7.2.1 器件与材料

10mW 风冷半导体激光器(473nm,北京榜首技术公司,北京),半反半透镜(505DRLP 02, Omega Optical, Brattleboro, VT, USA)直角棱镜(北京光学仪器厂,北京),520nm 和 580 的带通滤波片(Omega Optical, Brattleboro, VT, USA),光电倍增管(Model R212, Hamamatsu, Japan),

三维调节平台（北京卓立汉光有限公司生产），电磁阀为 The LEE company 产品。

单片机 C8051f020 和串口转 USB 芯片 CP2102 (Silicon Laboratories, Astin, Texas) 购于新华龙公司。其他电子元件如电阻、电位器、电容等均购于当地电子市场。

7.2.2 微泵、阀程控系统

微阀、泵驱动系统由计算机、控制板、电磁阀、真空系统和压力系统五部分组成。计算机下传指令给控制板；控制板接受上位机指令，输出信号控制电磁阀；电磁阀在控制板输出信号的控制下，接通真空系统（此时电磁阀输出负压）或接通压力系统（此时电磁阀输出为正压），从而控制芯片上的微阀的开/关。

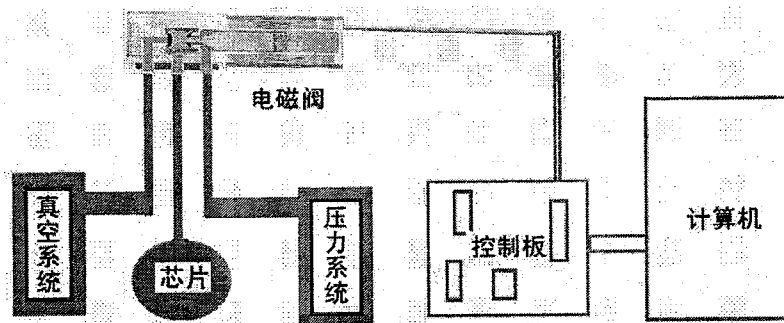


图 7-1 微阀、泵程控系统原理图

Fig 7-1 Schematic of the microvalve controlling system

7.2.3 扫描阵列激光诱导荧光检测设备

扫描阵列激光诱导荧光检测设备在课题组已有的单通道激光诱导荧光检测仪的基础上改造而成。整个系统大致可分为旋转扫描（包括收集物镜，棱

镜, 旋转扫描平台)、监测和检测(包括激光器、半反半透镜、CCD、滤光片、针孔、光电倍增管等)和控制电路(包括扫描控制电路, 数据采集电路)三部分。其示意图如图 7-2 所示。

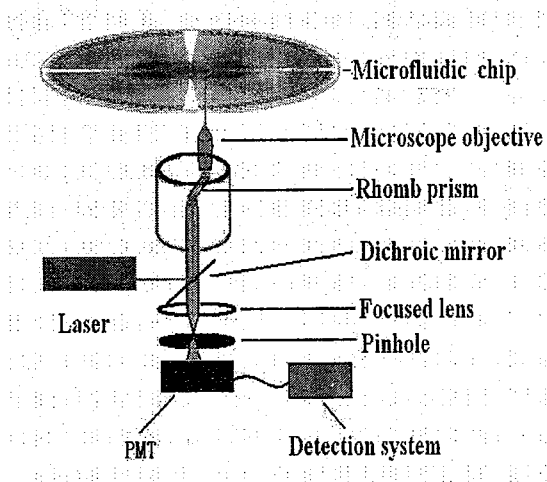


图 7-2 扫描激光诱导荧光检测器

Fig 7-2 Rotatory LIF detection instrumentation

7.3 结果与讨论

7.3.1 泵、阀程控系统

整个微泵、阀程控系统含有 16 个微阀, 图 7-3 是 16 个微阀及其阀座的图像, 微阀控制板为自制, 上位机程序采用 VB 编写(李博伟编写), 其界面如图 7-4 所示。由于所控制的微阀较多, 且在微流控的泵阀的驱动中需要很多步骤, 因此控制指令的传输均采用 16 进制。为了方便微阀参数的设定, 在微阀控制程序界面上集成了 2 进制到 16 进制的转换模块。程控电磁阀的相应速度 $<1\text{ms}$, 完全满足微流控芯片中对微阀控制的需要。

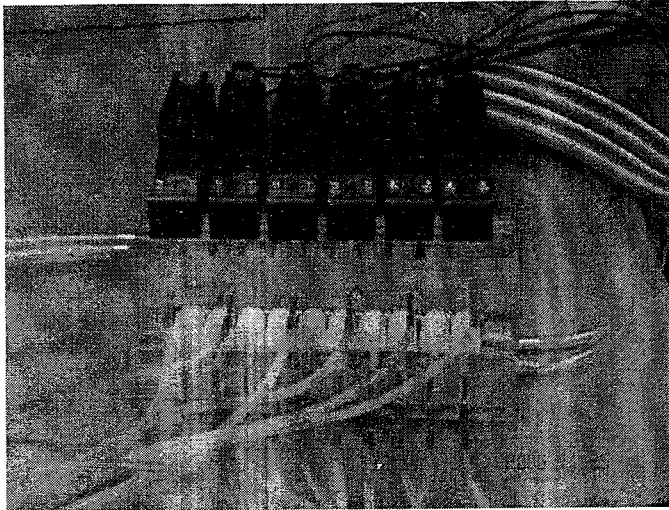


图 7-3 16 路微电磁阀及阀座

Fig 7-3 Picture of 16 solenoid valves and the corresponding manifold

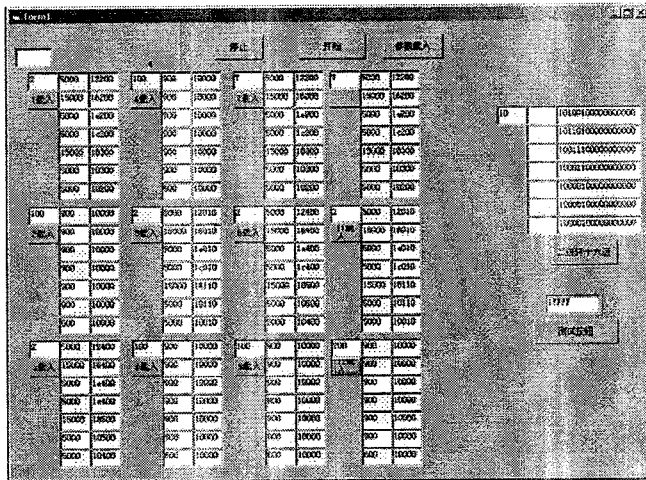


图 7-4 微泵/阀控制系统程序界面图

Fig7-4 the window of valve controlling program

7.3.2 扫描阵列激光诱导荧光检测设备

扫描阵列激光诱导荧光检测设备照片如图 7-5 所示。具体光路特点如下：激光器发出的中心波长为 473nm 的激光经一半反半透镜，反射到棱镜上，经棱镜折射后再经物镜聚焦到芯片上（激光聚焦的光斑大约为几十个微米）；收

集荧光信号时, 荧光分子被激光激发产生荧光, 被物镜收集后, 经棱镜折射后依次透过半反半透镜、滤光片, 聚焦到 $400\mu\text{m}$ 的针孔上, 被 PMT 转换成电信号后, 被数据采集板采集。棱镜系统在步进电机的带动下, 绕中心轴旋转完成整个芯片的信号检测, 扫描直径为 2cm , 扫描速度最大为 1周/s , 检测灵敏度为 $1.0 \times 10^{-9}\text{mol/L}$ (FITC 标准品计)。

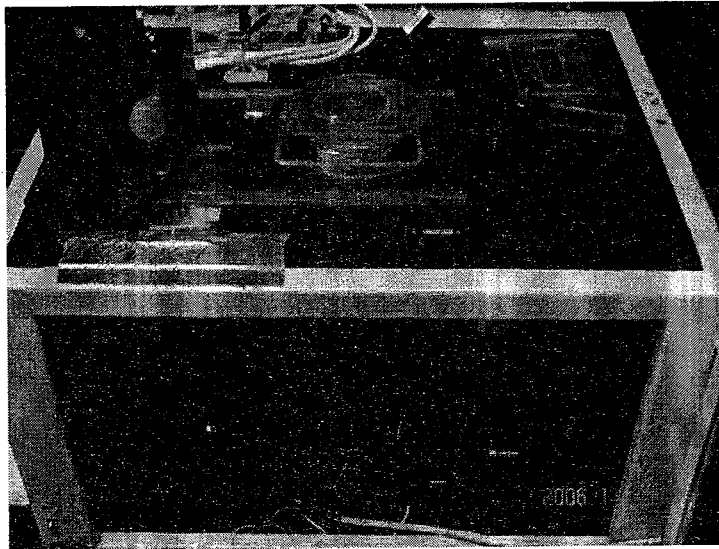


图 7-5 扫描阵列激光诱导荧光检测器

Fig 7-5 Picture of the Rotatory LIF detection instrumentation

7.4 小结

在课题组已有的工作基础上, 我们研制出基于微泵/阀控制系统和扫描阵列激光诱导荧光检测器的现场实时检测系统样机。虽然距离真正意义上的现场实时检测设备还有很大的距离, 但是已经能够满足实验室的使用需求, 并为样品的现场实时检测奠定了技术基础。本论文第八、九两章将介绍采用此样机进行样品检测的研究工作。

参考文献

1. Gutierrez S L, Welty T E. Point-of-care testing: An introduction. *Annals of Pharmacotherapy*, 2004, 38(1): 119-125
2. 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
3. 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
4. Kokoris M, Nabavi M, Lancaster C, Clemmens J, Maloney P, Capadanno J, Gerdes J, Battrell C F. Rare cancer cell analyzer for whole blood applications: Automated nucleic acid purification in a microfluidic disposable card. *Methods*, 2005, 37(1): 114-119
5. Garcia E, Kirkham J R, Hatch A V, Hawkins K R, Yager P. Controlled microfluidic reconstitution of functional protein from an anhydrous storage depot. *Lab on a Chip*, 2004, 4(1): 78-82

第八章 现场实时检测样机在夹心免疫中的应用

8.1 引言

免疫分析是临床、药学、生物和环境等领域测定重要物质的主要手段。微流控器件在分析化学领域显示出重要的应用价值和广泛的应用前景,如同集成电路给电子工业带来的革命一样^[1-4],微流控器件也将为分析化学领域带来革命性的变革。将免疫分析集成到微流控芯片上,实现免疫系统的微型化,将提高反应效率,使反应时间从原先的几个小时缩减到几十分钟,同时降低样品和试剂的消耗,使样品消耗量减少到原先的几分之一。目前已经有许多相关的报道^[5-7]。但是,对于大多数免疫芯片来说,液体的流动都是在压力驱动下进行,连续进样、洗涤等都是通过注射泵的驱动下进行。电渗驱动流体的方法也被应用于免疫芯片中^[8-10],但是不适应于复杂的体系。另外,由于微流控免疫分析芯片通常处理纳升量级的流体,所以需要比传统流体驱动方法更精确的流体驱动方法。

近年来,基于集成于芯片上的微泵、微阀的流体输运成为研究的热点。Quake^[11]课题组首先发展了一种基于PDMS的常开式微阀(微泵)。在他们最新的工作中^[12],集成微阀的免疫芯片含有100个反应室,能实现10个样品的5种指标的同时测定。这个工作开创了微阀(泵)驱动微流控芯片在免疫分析中应用。但是正如他们在文章中所指出的,这种微泵(阀)必须满足严格的尺寸要求(通常需要圆弧形,10 μm 高,100 μm 宽),才能保证微阀正常的关闭和开启操作;此外,这种微泵/微阀的制备过程很长,通常需要过夜,而且制备工艺复杂。Mathies^[13]及其合作者将PDMS薄膜夹于分别刻有液体通道和气路控制通道的玻璃片中制成了常闭式微阀(泵)。这种微阀(泵)由于其制备简单、密封性能好已经被应用于芯片PCR反应^[14, 15]的密封阀以及芯片电泳中

样品的进样^[16]，但尚未有应用于免疫微流控芯片中的报道。微泵/阀应用于免疫分析，必将带来免疫分析微型化，自动化，实现免疫分析的现场实时检测。

为了验证我们搭建的现场实时检测系统的可行性，我们研制了一种基于常闭微阀（泵）的多通道免疫微流控芯片。这种芯片采用将 PDMS 薄膜夹于分别刻有微流控通道和气体控制通道的两片玻璃之间的设计，集成了 144 个微阀和 18 个分析单元，能同时进行 18 个样品的检测。PDMS 薄膜可逆封接于玻璃之间，便于更换，玻璃也可重复利用，因此大大降低了芯片的制备成本和制备时间。非亲水性的 PDMS 中间薄膜也可以作为免疫分析中蛋白固定的载体。采用这种常闭微阀（泵）来输运样品，能完全避免多通道分析中常遇到的样品泄露问题。采用这种芯片，我们进行了免疫夹心法测定 hIgG。

8.2 实验材料和方法

8.2.1 试剂和材料

免疫分析试剂 hIgG、抗-hIgG 和 FITC 标记抗-hIgG 购于博瑞德公司（大连，辽宁）。小牛血清（BSA）和吐温 20 分别购于 Sigma 化学试剂公司（St, Louis, Mo）和 Aldrich（St, Louis, Mo）。其它化学品购于沈联化学试剂公司（沈阳，辽宁）。所有的溶液采用二次蒸馏水配制。商品化的镀铬和光刻胶的玻璃购于韶光微电子有限公司（长沙，湖南）。PDMS 薄膜（HT-6240，254 μm 厚）为 Bisco Silicones, Rogers 公司（Carol Stream, CT, USA）公司样品。

8.2.2 芯片制备

整个芯片由三层组成：上层是刻有微流控通道的玻璃，中间层是 PDMS，下层是刻有气体控制通路的玻璃。上层和下层采用标准的光刻和湿法蚀刻完成。由正型光刻胶，经紫外线将掩膜上的图形显影到玻璃上。微流控通道最终尺寸为 150 μm 宽，30 μm 深，用超声打孔器钻 1.5mm 的孔作为样品储液池。

气体控制通路最终尺寸为 $350\mu\text{m}$ 宽, $150\mu\text{m}$ 深。这两层玻璃经 Piraha 溶液清洗, 二次蒸馏水冲洗后, 置于烘箱中烘干备用。将 PDMS 薄膜置于上下两层玻璃中间, 便制成了多通道的免疫芯片, 在液池孔上插入移液枪头, 以增加液体的量。

8.2.3 仪器

仪器为上一章所搭建的现场实时检测系统的样机。电磁阀控制真空泵和压力泵使集成的微阀开启或关闭。开启的压力为 -60kPa , 关闭的压力为 15kPa 。荧光滤光片为 520nm 。

8.3 结果与讨论

8.3.1 免疫芯片的设计

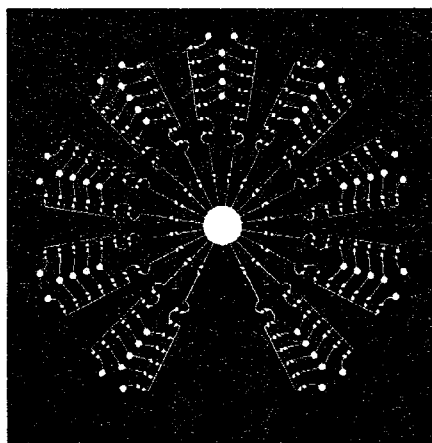


图 8-2 免疫微流控芯片微流体通道掩模

Fig 8-2 designed mask of microfluidic channels

多通道免疫微流控芯片具有夹心结构, 最上层(微流体通道层, 图 8-2) 包含有蚀刻的微流控通道和样品缓冲液池, 最下面一层是气体控制气路层(图

8-3), 椭圆型阀座的尺寸为长轴 1.9mm, 短轴 1.4mm, 中间为 254 μm 厚 PDMS 薄膜, 用来形成输运各种免疫试剂的微泵/微阀。由于 PDMS 能强烈的吸附蛋白, 因此我们的芯片直接采用 PDMS 作为免疫反应的固定相, 使这种用于免疫分析的芯片既保证了微泵驱动免疫功能的实现, 又简化了制备工艺, 降低了成本。此外, 虽然上层和下层玻璃芯片是由传统的光刻工艺制备完成, 但這些玻璃经洗涤、处理以后可以重复利用, 并且 PDMS 薄膜也可以方便地更换, 因此这种芯片的生产成本和制作周期大大降低, 非常适用于实验室中芯片的快速制备与样品检测。

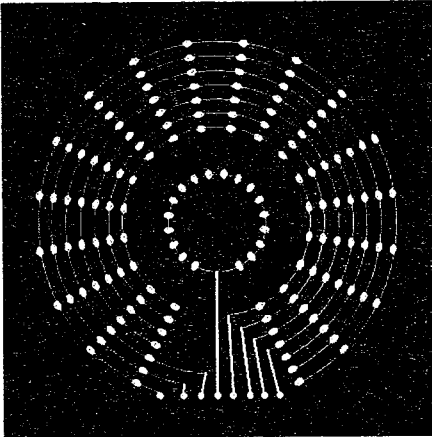


图 8-3 免疫微流控芯片气路层掩模

Fig 8-3 designed mask of air controlling line

如图 8-4A 所示, 我们的芯片包含有 9 个独立的分析单元。在每个分析单元里, 有两路分别含有八个微阀的分析通道。这两路分析通道共用 BSA、二抗、洗涤缓冲液和 FITC 标记的抗体, 而样品池单独使用。采用这种构架, 可以同时进行 18 种不同样品的同一指标的检测, 也可以进行一种样品的 9 种指标的同时检测, 即在一个分析单元中检测一种指标, 其中一个分析通道进行样品检测, 另一个分析通道作为参比。在整个芯片中, 具有相同功能的阀呈圆形排列, 受一个电磁阀控制, 这样所有的免疫分析过程均同步进行。

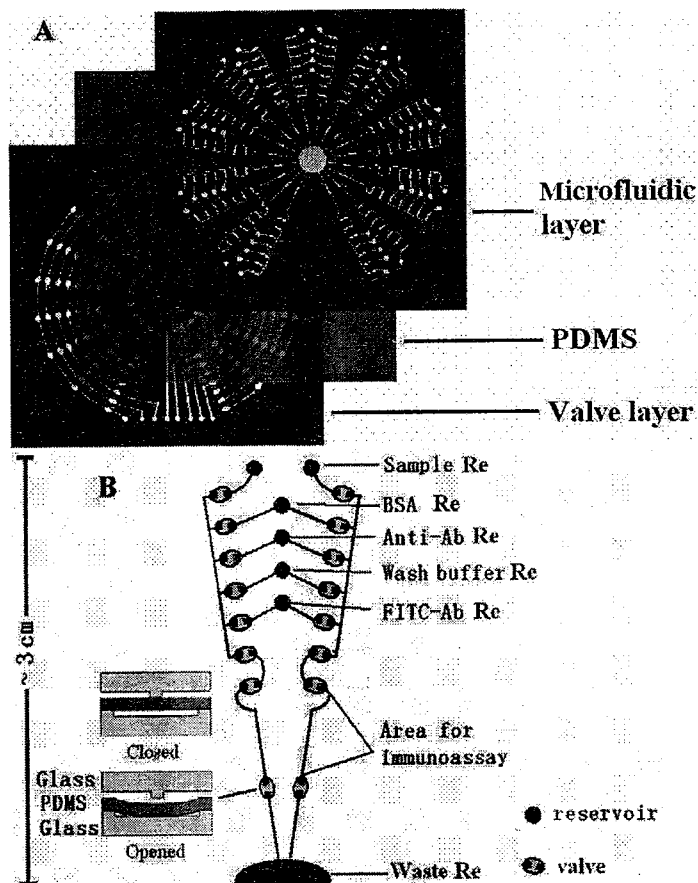


图 8-4 三层免疫芯片及分析单元示意图

Fig 8-4 A-Schematic of the 3-layered immunoassay microfluidic chip with nine identical units; B-one unit representation with indicated reservoirs (Re) and illustrated construction of the microvalves (the left) at opened and closed status.

在多通道微流控芯片中，由于毛细力引起样品的泄漏常常导致多通道分析结果重现性差。除了 DNA 检测过程中由于采用了流动性差的胶作为分离介质从而使样品不易泄漏外，目前尚没有解决多通道样品泄漏的有效方法。在

我们研制的微流控芯片中,采用常闭微阀(泵)来输运液体,在微阀受到真空力打开之前,液池里的试剂被完全隔离开,不会进入到分析通道中或免疫反应区内。换言之,样品的隔离或输运完全受外部电磁阀控制,避免了样品泄漏,从而保证了反应的一致性。

8.3.2 夹心免疫测定人 IgG

我们采用夹心免疫法测定人 IgG 标准品对以上微流控免疫芯片进行性能验证。首先,样品、BSA、anti-hIgG、FITC-anti-hIgG 和洗涤缓冲液分别注入到相应的缓冲液池中;然后通过微泵将 anti-hIgG (10mg/mL) 泵入到免疫反应区,孵育 10min;然后用 BSA (5%) 洗涤免疫反应区,孵育 10min 以降低非特异性吸附;最后泵入样品,孵育 5min 后用洗涤缓冲液冲洗(含有 1%BSA 的 PBS)。荧光信号用旋转共聚焦激光诱导荧光检测器检测,信号的强度反应样品中 hIgG 的含量。

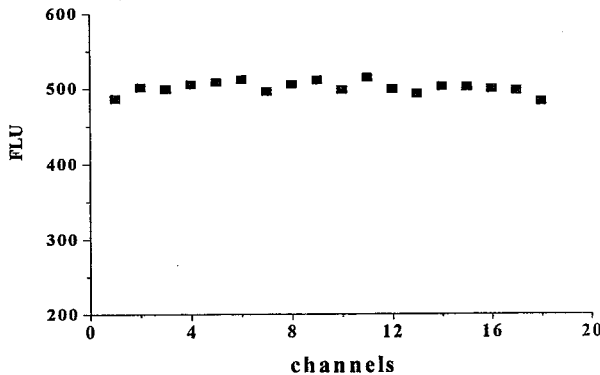


图 8-5 18 通道 50ng/mL hIgG 重现性

Fig8-5 Detection of 18 samples of 50ng/mL hIgG

18 个 50ng/mL 的 hIgG 标准品采用夹心法免疫检测用来验证微流控芯片免疫分析结果的重现性,实验结果如图 8-5 所示。结果表明峰高的相对标准

偏差为 3.5% ($n=18$), 这可能归因于常闭微阀的良好密封性和微阀控制免疫反应的一致性。该免疫芯片检测 hIgG 的检测线低于 1ng/mL , 这与其他文献报道的利用 PDMS 芯片进行免疫反应的结果相当。通过空白样品的检测来看, 该芯片并没有完全抑制非特异性吸附, 但通过对 PDMS 表面的改性有可能进一步降低非特异性吸附, 检测限有望进一步得到提高。

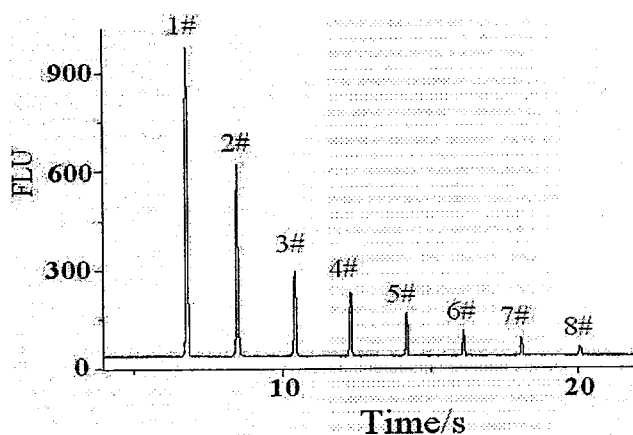


图 8-6 不同浓度的 hIgG

Fig 8-6 Detection of eight hIgG samples at different dilutions: 1#- 100ng/mL , 2#- 50ng/mL , 3#- 20ng/mL , 4#- 10ng/mL , 5#- 5ng/mL , 6#- 2ng/mL , 7#- 1ng/mL , 8#- 0ng/mL .

8.4 小结

我们设计、制备了基于微泵/微阀的简单构架的多通道免疫微流控芯片。微泵/微阀采用夹心式常闭结构, 其中的 PDMS 薄膜既作为泵阀驱动的中间活动部件, 同时也作为免疫反应的蛋白固定载体, 从而简化了芯片结构; 上面玻璃层蚀刻有微流控通道和样品缓冲液池, 下面玻璃层为气体控制气路层,

上下玻璃层可以重复利用,而中间 PDMS 薄膜可以方便地更换,因此这种芯片的生产成本和制作周期大大降低,非常适用于实验室中芯片的快速制备与样品检测。此外,由于采用常闭微阀进行样品的输运和控制,因此能有效地避免多通道芯片中常发生的样品泄漏问题。同时,常闭微阀也能用来进行样品溶液的存储,这对于野外或现场实时检测来说具有很重要的意义。我们相信,随着集成微阀尺寸的减小,这种微流控芯片的集成度将进一步提高,从而有望实现更多样品或分析指标的同时检测,实现真正意义上的现场实时检测系统。

参考文献

1. Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature* **2006**, 442, (7101), 368-373.
2. Vilckner, T.; Janasek, D.; Manz, A., Micro total analysis systems. Recent developments. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, (12), 3373-3385.
3. Reyes, D. R.; Iossifidis, D.; Auroux, P. A.; Manz, A., Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, (12), 2623-2636.
4. Dittrich, P. S.; Tachikawa, K.; Manz, A., Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (12), 3887-3907.
5. 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.
6. Hayes, M. A.; Polson, N. A.; Phayre, A. N.; Garcia, A. A., Flow-based microimmunoassay. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (24), 5896-5902.

7. Koutny, L. B.; Schmalzing, D.; Taylor, T. A.; Fuchs, M., Microchip electrophoretic immunoassay for serum cortisol. *Analytical Chemistry* **1996**, 68, (1), 18-22.
8. Xiang, Q.; Hu, G. Q.; Gao, Y. L.; Li, D. Q., Miniaturized immunoassay microfluidic system with electrokinetic control. *Biosensors & Bioelectronics* **2006**, 21, (10), 2006-2009.
9. Hu, G. Q.; Gao, Y. L.; Sherman, P. M.; Li, D. Q., A microfluidic chip for heterogeneous immunoassay using electrokinetical control. *Microfluidics and Nanofluidics* **2005**, 1, (4), 346-355.
10. Gao, Y. L.; Hu, G. Q.; Lin, F. Y. H.; Sherman, P. M.; Li, D. Q., An electrokinetically-controlled immunoassay for simultaneous detection of multiple microbial antigens. *Biomedical Microdevices* **2005**, 7, (4), 301-312.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Liu, C. N.; Toriello, N. M.; Mathies, R. A., Multichannel PCR-CE microdevice for genetic analysis. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (15), 5474-5479.

15. Blaze, 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.
16. 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.

第九章 现场实时检测样机在酶联免疫检测中的应用

9.1 引言

酶联吸附免疫反应 (ELISA) 是应用最为广泛的免疫方法之一, 并已经实现了商业化应用。ELISA 的基础是抗原或者抗体在一定固相载体上的固定化以及相应抗体或者抗原的酶标记。测定过程中, 目标抗原或者抗体与固相载体表面的抗原或抗体反应, 产生抗原抗体的免疫复合物, 用洗涤的方法将溶液中没有结合的物质与固相载体分开, 再加入酶标记的抗原或抗体与复合物反应, 最后加入酶的底物, 采用一定的方式检测就可以得到对于目标检测物的定性或者定量的结果。由于酶的催化效率很高, 所以能够达到很高的检测灵敏度。但是常规 ELISA 存在操作烦琐、仪器设备复杂、重复性较差、试剂消耗量大等缺点, 因而在应用上受到一定的限制。

微流控芯片的出现为上述问题的解决提供了一种全新的思路。E. Eteshola^[1]2001 年首次在 PDMS 微流控芯片上实现了 ELISA 检测。Dongqing Li^[2]等人采用分光光度法在 PDMS 微流控芯片上对人血清中的 *Helicobacter pylori* 进行了检测, 检测限为 10ng/mL, 对 20 个人血清样本检测的总体准确度为 95%。

我们研制了一种基于常闭微阀 (泵) 的多通道酶联免疫微流控芯片, 应用于我们研制的现场实时检测样机中 (第七章)。这种芯片采用跟第八章中一样的芯片结构: 将 PDMS 薄膜夹心于分别刻有微流控通道和气体控制通道的两片玻璃之间, PDMS 薄膜可逆封接于两片玻璃之间, 为一次性使用, 玻璃可以重复利用, 因此大大降低了芯片的制备成本和制备周期。非亲水的 PDMS 薄膜既作为微阀的活动部件, 也是免疫分析中蛋白固定的载体。整个免疫分析所需的各种复杂的流体控制均在微泵的驱动下完成, 抛弃了庞大的外围流体驱

动控制设备, 为微型化或便携化的免疫分析系统打下基础。采用这种常闭微阀(泵)驱动的免疫芯片, 对控制血清中的皮质醇进行检测, 并应用于实际血清中皮质醇的检测。

9.2 实验部分

9.2.1 试剂和材料

免疫分析试剂 hIgG 购于博瑞德公司(大连, 辽宁)。小牛血清(BSA)和吐温 20 分别购于 Sigma 化学试剂公司(St, Louis, Mo)和 Aldrich(St, Louis, Mo)。抗皮质醇抗体采用 DSL-10-2000 试剂盒中抗血清(Diagnostic systems laboratories Inc. Webster, TX, USA), 酶标记皮质醇和标准皮质醇血清均为 Diagnostics 公司试剂盒中试剂, 激光底物 Amplex® Red reagent (A12222, Invitrogen Corporation), 其它化学品购于沈联化学试剂公司(沈阳, 辽宁)。所有的溶液采用二次蒸馏水配制。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)。PDMS 薄膜为本实验室自制, 膜厚为 300 μm 。

9.2.2 芯片制备

整个芯片由三层组成: 上层是刻有微流控通道的玻璃, 中间层是 PDMS, 下层是刻有气体控制通路的玻璃。上层和下层采用标准的光刻和湿法蚀刻完成。微流控通道最终尺寸为宽 80 μm , 深 25 μm , 5 通道免疫芯片的掩模如图 9-1 所示。用超声打孔器钻直径 3mm 的孔作为样品储液池。气体控制通路最终尺寸为宽 350 μm , 深 100 μm , 气路控制通道掩模如图 9-2 所示。这两层的玻璃经 Piraha 溶液清洗, 二次蒸馏水冲洗后, 置于烘箱中烘干备用。将 PDMS 薄膜至于上下两层玻璃中间便制成了多通道的免疫芯片。PDMS 薄膜是一次性使用的, 而刻有通道的玻璃层经清洗后重复利用。

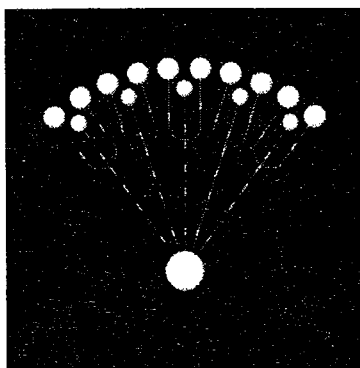


图 9-1 微流体通道掩模图

Fig 9-1 Designed mask of microfluidic channels

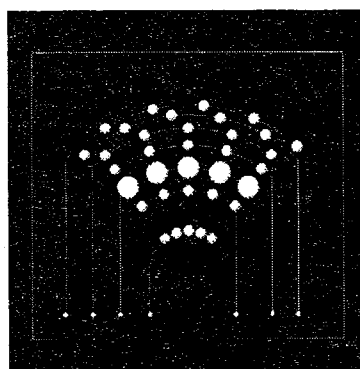


图 9-2 气路控制通道掩模

Fig 9-2 Designed mask of air controlling line

9.2.3 泵阀程控免疫分析过程

微阀开启的压力为 -60kPa ，关闭的压力为 15kPa 。

整个免疫过程分为两步：一是抗体包被，BSA 封闭；二是竞争反应，酶催化。

第一步：抗体包被和 BSA 封闭可以看成是芯片制备过程的延续，在 PDMS 表面吸附相应的抗体，并且用高浓度的 BSA 封闭，这个过程大约耗时 30min。

(产业化后, 这一步可以在芯片出厂前完成);

竞争反应, 酶催化过程这一步是整个免疫检测的关键步骤, 在微流控免疫反应由于体表面积大, 因此可以有效地降低竞争反应和酶催化反应的时间, 从而提高检测效率。这一过程大约耗时 30min。

整个微流控免疫检测流程如下图所示:

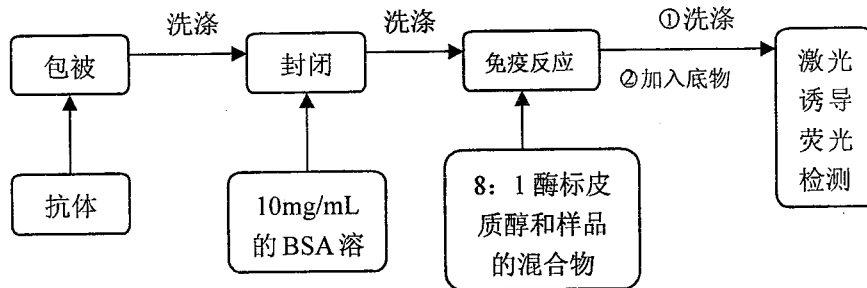


图 9-3 免疫实验操作流程

Fig 9-3 The process of immunoassay detection

程控免疫反应芯片示意图 9-4 所示, 免疫反应参数如表 9-1。

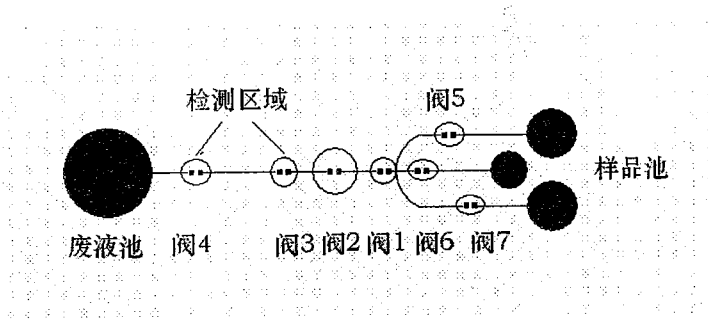


图 9-4 单通道微泵驱动免疫芯片图

Fig 9-4 One unit of immunoassay microfluidic chip

表 9-1 微泵驱动免疫具体步骤参数表

第一步: 抗体包被过程

步骤	循环 (个)	时间 (s)	阀的状态						
			阀 1	阀 2	阀 3	阀 4	阀 5	阀 6	阀 7
		5	开	关	关	关	开	关	关

二抗	2	15	开	开	关	关	开	关	关
		5	开	开	开	关	开	关	关
		5	关	开	开	关	开	关	关
		15	关	关	开	开	开	关	关
		5	关	关	关	开	开	关	关
		5	关	关	关	关	开	关	关
孵育	1	300	关	关	关	关	关	关	关
B S A 封 闭	2	5	开	关	关	关	关	开	关
		15	开	开	关	关	关	开	关
		5	开	开	开	关	关	开	关
		5	关	开	开	关	关	开	关
		15	关	关	开	开	关	开	关
		5	关	关	关	开	关	开	关
5	关	关	关	关	关	开	关		
孵育	1	300	关	关	关	关	关	关	关
抗 皮 质 醇 血 清	2	5	开	关	关	关	关	关	开
		15	开	开	关	关	关	关	开
		5	开	开	开	关	关	关	开
		5	关	开	开	关	关	关	开
		15	关	关	开	开	关	关	开
		5	关	关	关	开	关	关	开
		5	关	关	关	关	关	关	开
		5	开	关	关	关	关	关	开
孵育	1	300	关	关	关	关	关	关	关

第二步：竞争免疫反应步骤

步骤	循环 (个)	时间 (s)	阀的状态						
			阀1	阀2	阀3	阀4	阀5	阀6	阀7
洗 涤	7	5	开	关	关	关	开	关	关
		15	开	开	关	关	开	关	关
		5	开	开	开	关	开	关	关
		5	关	开	开	关	开	关	关
		15	关	关	开	开	开	关	关
		5	关	关	关	开	开	关	关
		5	关	关	关	关	开	关	关

血清和酶标皮质醇混合物	2	5	开	关	关	关	关	开	关
		15	开	开	关	关	关	开	关
		5	开	开	开	关	关	开	关
		5	关	开	开	关	关	开	关
		15	关	关	开	开	关	开	关
		5	关	关	关	开	关	开	关
		5	关	关	关	关	关	开	关
孵育	1	300	关	关	关	关	关	关	关
洗涤	7	5	开	关	关	关	开	关	关
		15	开	开	关	关	开	关	关
		5	开	开	开	关	开	关	关
		5	关	开	开	关	开	关	关
		15	关	关	开	开	开	关	关
		5	关	关	关	开	开	关	关
		5	关	关	关	关	开	关	关
底物加入	2	5	开	关	关	关	关	关	开
		15	开	开	关	关	关	关	开
		5	开	开	开	关	关	关	开
		5	关	开	开	关	关	关	开
		15	关	关	开	开	关	关	开
		5	关	关	关	开	关	关	开
		5	关	关	关	关	关	关	开
催化反应	1	300	关	关	关	关	关	关	关

9.2.4 激光检测装置

所选择的激光诱导荧光底物的激发光波长一般为 532nm，而我们所搭建的共聚焦检测器激发波长为 473nm。经实验发现在这个波长下，酶催化底物产生的产物也能被检测。滤荧光信号经过 580nm 的带通滤波片 (Omega Optical, Brattleboro, VT, USA) 后由光电倍增管转换成电信号，由数据采集板采集。

9.3 结果与讨论

9.3.1 微泵驱动酶免疫芯片设计

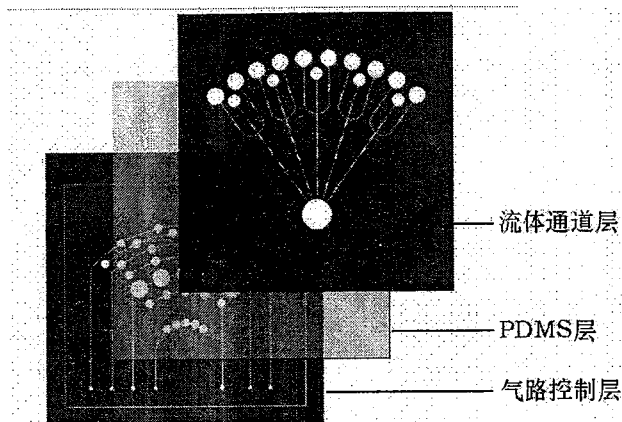


图 9-5 免疫芯片示意图

Fig 9-5 Schematic of the immunoassay microfluidic chip

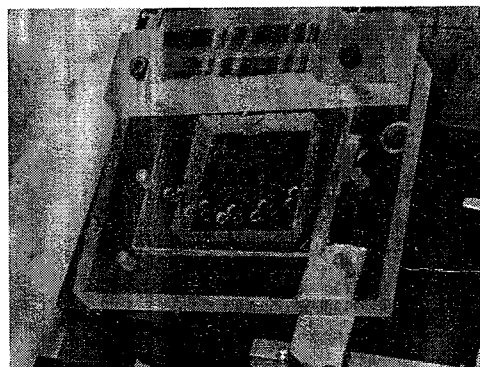


图 9-6 芯片实物图

Fig 9-6 the picture of microfluidic chip

我们研制的芯片如图 9-5、图 9-6 所示。该芯片包含有 5 个独立分析单元，每个分析单元里含有七个微阀。5 个分析单元的样品池独立，公用一个废液池，采用这种构架，可以同时进行五种不同样品的同一指标的检测，也可以进行一种样品的 5 种指标的同时检测。在整个芯片中，具有相同功能的阀呈圆形排列，被一个电磁阀控制，能够实现五个通道的免疫分析过程同步进行。

在我们的微流控芯片中,采用常闭微阀(泵)来输运液体。在微阀受到真空力打开之前,液池里的试剂被完全隔离开,不会进入到分析通道或免疫反应区内。换言之,样品的隔离或输运完全受外部电磁阀控制,进一步保证了反应的一致性。

五通道酶免疫微流控芯片是通过夹心法制备,最上层(微流控通道层)包含有蚀刻的微流控通道和样品缓冲液池,最下面一层是气体控制气路层,中间为300 μm 厚的PDMS薄膜,用来形成输运各种免疫试剂的微泵/微阀。由于PDMS能强烈地吸附蛋白,因此我们的芯片直接采用PDMS作为免疫反应的固定相,使这种用于免疫分析的芯片既保证了微泵驱动免疫功能的实现,又简化了制备工艺,成本低廉。上层和下层玻璃芯片是由光刻工艺制备完成,这是免疫分析微流控芯片主要的成本来源。在我们的芯片中,上下两层的玻璃可以重复利用,PDMS薄膜是可更换的,这样大大降低了生产这种芯片的成本和制作周期。

9.3.2 微泵驱动酶免疫测定皮质醇

在微泵驱动酶免疫方法测定皮质醇过程中,由于采用了酶催化放大的方法,因此加入底物后检测时间直接影响检测结果。我们的实验数据表明,虽然随着时间的延长,检测信号增加,但其结果重现性的相对标准偏差也随之变大,因此我们选择相对标准偏差小的5分钟作为加入底物后的检测时间,这样既保证了检测结果重现好,又节省了时间。

9.3.2.1 皮质醇控制血清样品的检测

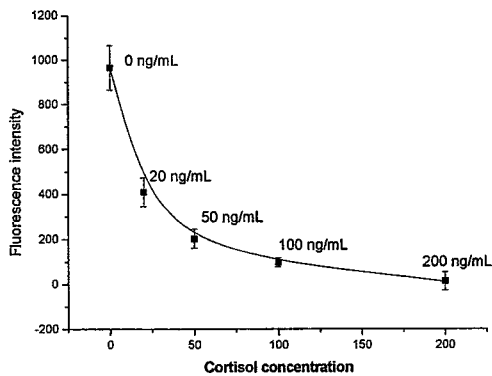


图 9-7 微阀驱动酶免疫检测皮质醇工作曲线(所需试剂均直接采用试剂盒里的样品, 未经进一步稀释; 酶标皮质醇: 皮质醇=8: 1)

Fig 9-7 the detection range of cortisol

我们分别测定了 0ng/ml、20ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml 皮质醇控制血清, 得到微阀驱动酶免疫法测定皮质醇的工作曲线, 如图 9-7 所示。从实验结果看, 相对标准偏差一般在 20%以内, 这个结果对酶免疫来讲是可以接受的。检测范围为 0~200ng/mL, 这个范围是正常人体内皮质醇含量的范围, 因此采用微泵驱动的酶免疫分析方法可以用来进行人血清中皮质醇含量的测定。

9.3.2.2 皮质醇实际样品的测定

采用我们研制的酶免疫方法对运动员血清中的皮质醇进行了测定。第一通道为空白, 第二通道为 100ng/mL 的控制血清, 第三到五通道为稀释一倍的运动员血清样品。结果如图所示 9-8 所示。实际血清中皮质醇样品测定的相对标准偏差为 15.3% (n=3)。

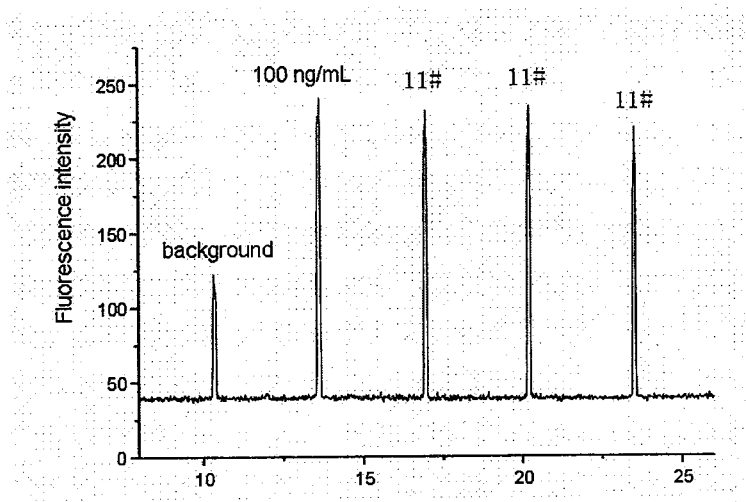


图 9-8 实际血清样品中皮质醇的检测结果（条件同图 9-8）

Fig 9-8 The result of detection of cortisol in blood serum

9.3.2.3 微泵驱动酶免疫检测的优势

免疫分析包含有多个加样、洗涤步骤，是典型的流体驱动过程。现阶段临床所采用的全自动免疫分心检测设备需要复杂的流体控制装置，导致仪器体积庞大和价格昂贵。微流控作为一种新兴的技术，已经在很多方面显示出其优于常规流体控制的特点，尤其是微泵、微阀出现后，更引起广泛的关注。采用微阀进行免疫分析中流体驱动的控制具有如下优点：1、容易实现整个免疫分析过程的自动化；2、更小的样品消耗；3、更快的检测速度；4、更大规模的集成；5、最终检测设备的微型化和便携化。

9.4 小结

设计和制备了基于微泵/微阀的免疫分析芯片，使其在微泵的驱动下完成了整个免疫分析过程，为实现微型化或便携化的基于微流控的现场实时免

疫分析系统打下了基础。在此芯片上进行了酶联免疫检测皮质醇的工作。皮质醇检测工作范围为 0~200ng/mL, 在此范围内峰高相对标准偏差<20%, 并且进行了实际血清中皮质醇的测定。

参考文献

1. 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.
2. Lin, F. Y. H.; Sabri, M.; Erickson, D.; Alirezaie, J.; Li, D. Q.; Sherman, P. M., Development of a novel microfluidic immunoassay for the detection of *Helicobacter pylori* infection. *Analyst* **2004**, 129, (9), 823-828.

结论

根据基于微流控芯片的现场实时检测系统的需要,对微流控芯片的相关关键技术,包括集成芯片制备技术、流体驱动技术和检测技术,进行了研究,并在此基础上针对奥运科技攻关项目的要求,开展了微流控芯片在免疫方面的应用研究。

自行设计研制了用于流体驱动的微型化高压电源设备与微阀流体驱动芯片;自行设计研制了微型化电化学检测器与多通道化学发光检测装置;并在此基础上,设计研制了基于微流控芯片的现场实时免疫检测系统样机,进行实际样品的测定,证明了微流控芯片用于现场实时检测系统的可行性。