

第一部分：基于微流控芯片的现场实时检测系统关键技术进展

(文献综述)

第一章：基于微流控芯片的现场实时检测系统关键技术进展

1.1 微流控芯片发展历程和现场实时检测系统关键技术概述

微流控芯片 (Microfluidic chip), 又称为微全分析系统 (Micro-total analysis systems, μ -TAS), 芯片实验室 (Lab-on-a-chip), 是一个跨学科的新领域, 其目标是通过分析化学、微机电加工、计算机、电子学、材料科学及生物学、医学的交叉, 实现化学、生物分析系统从试样处理到检测的整体微型化、自动化、集成化与便携化; 其基本特征和最大优势是多种单元技术在微小平台上的灵活组合和大规模集成。微流控芯片是当今分析化学界的研究重点和热点之一^[1-3]。

微流控芯片的发展大体上可以分为三个阶段:

① 微全分析系统概念的提出和芯片电泳的初步实现

微全分析系统的概念是在1990年首次由瑞士Ciba-Geigy公司A. Manz教授^[4]等提出的。他们在平板微芯片上实现了毛细管电泳与流动注射分析, 从而把微系统的主要构型定位为面积为数平方厘米至十几平方厘米的平板芯片。1992年Harrison^[5]等人发表了第一篇关于毛细管电泳芯片分离的文章, 显示了微全分析系统的发展潜力, 引起科学界的广泛关注。在此后的发展中, 研究者迅速将微流控芯片的发展定位于以微机电加工技术为基础、以电渗流为驱动的玻璃或石英材料毛细管电泳分离系统。芯片电泳是微流控芯片早期的主要形式, 至今仍是微流控芯片中分离部分的主体。这一阶段的主要特征是: 芯片的主体材料主要为玻璃和石英, 主要进行简单的电泳分离工作。

② 芯片电泳逐步被接受和广泛研究阶段

1994年开始,美国橡树岭国家实验室Ramsey课题组^[6-9]在harrosin等人的工作基础上开展了一系列的研究,改进了芯片毛细管电泳的进样方法,提高了其性能与实用性,引起了人们更广泛的关注。尤其是1995年美国加州大学伯克利分校Mathies 课题组^[10, 11]在微流控芯片上实现了高速DNA测序,微流控芯片的商业开发价值开始显现。同时聚二甲基硅氧烷(PDMS)^[12]和聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)^[13]等塑料芯片的出现降低了芯片的制作成本,使更多的研究者投入到微流控芯片这一领域,带来了微流控芯片的高速发展。这一阶段的主要特征是:芯片材料的多样化,芯片电泳占主导地位。

③ 微流控芯片的大规模集成和广泛研究阶段

2000年,Quake 课题组^[14]采用多层软刻蚀技术,实现了微流控芯片中规模集成的微阀和微泵,是微流控芯片发展过程中的一个重要里程碑。2002年,他们又以“大规模集成微流控芯片”为题在*Science*发表文章^[15],介绍了集成有上千个微阀(泵)和几百个反应器的微流控芯片,显示了微流控芯片从芯片电泳到大规模多功能集成实验室的飞跃。检测、反应、测温、细胞培养等多种单元操作技术已经开始广泛的集成到微流控芯片上,为微流控芯片的发展带来广阔的天地,同时也为微流控的芯片的产业化奠定了基础。如今微流控芯片已经被列为21世纪最重要的前沿技术之一。2003年福布斯杂志将其列为影响人类未来的15件最重要的发明之一。2004年美国*Business2.0*杂志的封面文章将芯片实验室称为“改变未来的七种技术”之一。2006年*Nature*专门开辟专栏介绍微流控芯片^[16]。

现场实时检测(point of care, POC)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。

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现场、实时检测的理念高度吻合, 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。

下面就基于微流控芯片的现场实时检测系统所涉及的关键技术, 主要包括芯片制备技术、流体控制技术、检测技术等的发展进行简要的叙述, 其他微流控芯片技术请参见相应的综述。

1.2 微流控芯片制备技术

微流控芯片的功能特征是将化学或生物分析中的各种单元操作集成到一块几平方厘米的芯片, 其最基本结构特征是微米或亚微米级的微流通道^[16]。制备微流控芯片的基础是将微流控芯片的微流通道通过各种加工技术制备于各种材料上, 一般包括通道成型和封接(或键合)两个步骤。现阶段制作芯片的材料主要可以分为玻璃、石英和高聚物两类。

1.2.1 玻璃和石英微流控芯片的制备

玻璃和石英材料具有优良的光学、电学和化学性能, 是应用最广泛的微流控芯片的制备材料。玻璃和石英微流控芯片的制备通常由光刻、湿法蚀刻和高温键合等过程组成。

1.2.1.1 玻璃和石英芯片制备过程中的光刻技术

光刻是利用光学原理, 将设计好的微结构转移到芯片基材上, 进而采用各种化学或物理刻蚀的方法得到微结构的一种工艺。其具体的工艺为: ①在干净的基片表面镀一层光阻挡层如铬、二氧化硅、氮化硅等; ②光刻胶的涂

敷和预烘；③在光掩模上制备所需的微流通道图案，将掩模覆盖在涂有光刻胶的基片上，在光刻机上曝光；④用光刻胶配套的显影液显影。

光阻挡层的制备：光阻挡层的制备技术主要来自微机械加工技术中的薄膜制备工艺，主要方法有化学气相沉积，蒸镀和溅射等。

光掩模的制备：光掩模的制备是光刻过程中的关键步骤之一。微流控芯片的掩模可以采用微电子行业中用于大规模集成电路的光刻掩模，图形尺寸可小至亚微米级，但是其制作成本较高。由于微流控通道的分辨率远低于集成电路的要求，因此采用高分辨的激光打印机打印胶片的方法基本可满足微流控芯片对光掩模的要求。

光刻胶的涂布：光刻胶是将微结构转移到基片上的关键媒介，分为正胶（曝光时聚合物发生断链反应变得易溶）和负胶（曝光时发生交联反应变得难溶），玻璃和石英微流控芯片的制备中光刻胶大多采用正胶。光刻胶的涂布一般是通过甩胶机来实现的，其涂布的光刻胶的厚度取决于光刻胶的粘度和甩胶机旋转的速度。光刻胶的涂布一般需要在超净间内进行。

曝光：曝光一般在 200~400nm 的紫外线下进行，根据所选用的光刻胶的种类选择合适的曝光波长。曝光设备主要有接触式和投影式。

显影：显影是把曝光过的基片用显影液除去光刻胶曝光部分（正型光刻胶）或未曝光部分（负型光刻胶），得到与掩膜相对应的图形。

1.2.1.2 玻璃和石英芯片蚀刻技术

蚀刻是指在光刻过的基片上通过化学和物理的方法在表面形成微结构的过程，其过程为：①利用阻挡层的保护作用，对基片进行蚀刻；②除去光刻胶和阻挡层，得到所需的微结构。蚀刻方法主要分为：湿法蚀刻和干法蚀刻。

湿法刻蚀适用于玻璃和石英等可被化学腐蚀的基片,广泛应用于玻璃和石英微流控芯片的制备。所采用的刻蚀液一般为含有氢氟酸的溶液,如氟化氢/硝酸和氟化氢/氟化胺等。玻璃和石英为各向同性材料,因此湿法刻蚀不能用来制备高深宽比的玻璃或石英芯片。

干法刻蚀主要有等离子体刻蚀和深度反应离子刻蚀两种方式,其不涉及溶液反应过程,刻蚀在气相中进行。等离子体刻蚀是一种以化学反应为主的干法刻蚀工艺,刻蚀气体在高频电场的作用下,产生等离子体。等离子体中的游离基与被刻蚀材料之间发生化学反应,达到刻蚀微流通道的目的。深度反应离子刻蚀通过射频激发可使化学活性物质的反应活性增加,用离子在垂直于材料的表面轰击,提高深宽比。

1.2.1.3 玻璃和石英芯片封接技术

玻璃微流控芯片的键合方式主要是高温封接。近年又发展了常温封接、阳极键合、交粘剂封接等方式。

高温封接^[17]:将加工好的含有微流通道的基片和相同材质的盖片清洗干净,对合,放于真空干燥箱内,170℃干燥 2h,去除含有的水分,然后放入程序升温的马弗炉内,进行高温键合。马弗炉升温的程序一般为:以 40℃/min 的速度升温到 550℃,保持 30min;以 20℃/min 的速度升温到 610℃,保持 30min;以 10℃/min 的速度升温到 635℃,保持 30min;以 10℃/min 的速度升温到 650℃,保持 6h;然后在炉内自然冷却到室温。封接较差的部位可以用重物压住,重复封接程序。石英芯片的高温封接温度高达 1700℃。高温封接的缺点是操作技术要求较高,需要专门的高温设备,封接周期较长。

室温封接法^[18]:Fang Q 等发展了一种简单的室温键合制作微流控芯片的方法。室温键合步骤为基片和盖片依次用丙酮、家用洗涤剂、高速自来水(10-20m/s)和乙醇清洗;玻璃片用热风吹干后,浸泡在浓硫酸中 8-10

小时；取出后用自来水冲洗，将基片和盖片平行靠近，相距约 1-2mm，用高速自来水冲洗 5min，在连续去离子水中将两片贴合，吸取多余水分，室温放置 3h。其实验结果表明 30 天达到最大键合强度，但是 3 天内可以达到最大强度的 80%，可满足需要。

胶粘剂封接：Nakanishi^[19]报道了氢氟酸封接玻璃芯片的技术：将 1%氢氟酸滴入玻璃基片和盖片中间，加压，室温下 2h 可以成功粘接，如在 60℃ 下，时间可缩短为 1h。Ramsey^[20]采用硅酸钠稀溶液为胶粘剂在室温下封接玻璃芯片。Sayah^[21]采用环氧胶封接玻璃芯片。

阳极键合^[22]：阳极键合首先应用于含钠玻璃与硅片之间的键合。阳极键合可防止热封接方法可能造成的微通道变形等缺陷，因此玻璃与玻璃之间的阳极键合引起广泛的关注。以多晶硅或氮化硅薄膜作为中间层，在 400℃，700V 高压下，可以将两块玻璃键合。在更高的温度 500℃ 下，无需中间层便可将两片玻璃键合。

1.2.2 高聚物微流控芯片制备技术

高聚物芯片具有材料价格低廉，制作工艺简单，生产成本低，可制作一次性使用的芯片等优点。常用于微流控芯片的材料有：聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）、聚碳酸酯（PC）和聚二甲基硅烷（PDMS）等。高聚物微流控芯片的制备工艺分为：芯片阳模的制备、高聚物微通道的成形、高聚物芯片的封接。

1.2.2.1 高聚物用芯片阳模制备技术

可用于高聚物芯片制备的阳模主要有硅片（玻璃）阳模、SU8 阳模、电铸金属阳模等。硅片阳模，大多采用光刻和湿法刻蚀的工艺，在硅片上形成微流体通道相反的微结构。硅片阳模可用于热压制备 PMMA 等材料的芯片的制备，但是由于硅片易碎，使制作成本增加。其比较适合于 PDMS 芯片的制备。

SU8 阳模：SU8 是一类负光刻胶，经 100℃ 以上温度固化后具有很好的抗

腐蚀性，热稳定性大于 200℃，可以直接用来做制备 PDMS 芯片等的阳模^[23]。利用 SU8 减少了制备阳模的步骤，提高了制作的效率。

电铸金属阳模^[24]：硅片等阳模不适合于芯片的大批量制备，因此在工业化高聚物微流控芯片的生产中大多采用电铸的金属阳模。金属阳模的制备是在显影后的光胶图形中间沉积上金属，形成一个与光刻胶图形凹凸互补的金属版图，然后去掉光刻胶和附着的基底材料，便得到所需的金属模具。镍基材的模具加工相对简单，较为常用。

1.2.2.2 高聚物芯片上微通道制作技术

高聚物基片上制备微流体通道的技术主要有热压法、注塑法、原位聚合法和激光烧蚀法等。

热压法^[25]：热压法适用于热塑性微流控芯片的制备，如 PMMA 和 PC 等。其加工步骤为：将模具和聚合物基片调整好位置后，加热到聚合物的软化温度，在阳模上施加一定的压力，并保持一段时间，便可在聚合物基片上压制出与阳模互补的微通道。

注塑法^[26]：注塑法是将电铸的金属阳模嵌入到金属件中加工成可用于注塑机使用的模具，便可使用注塑机进行大批量聚合物芯片的生产。这种方法模具使用寿命长，重复性好，生产周期短，适合于已经定型的微流控芯片的生产。

原位聚合法^[12, 27]：原位聚合法是将液态的预聚物浇注在模具上反应固化成形后将高分子材料从阳模上脱离，便可制得带有微通道的微流控芯片基片。可用于原位聚合的高聚物材料主要有 PDMS、环氧树脂和聚脲等。PDMS 微流控芯片的加工主要采用这种方式制备。

激光烧蚀法^[28]：激光烧蚀法是高聚物芯片加工中一种非接触式微通道成形技术，是利用激光束的高能量在聚合物基片上形成微结构。所得到的微结

构具有通道壁垂直、深宽比大等优点。其加工速度一般为几厘米/min, 生产效率低, 一般不适合于规模生产。

1.2.2.3 高聚物芯片封接技术

1.2.2.3.1 热塑性材料微流控芯片的封接技术

热封接^[29]: 热封接是通过加热和施加压力的方法将含有微通道的聚合物的基片和盖片封接在一起的一种技术, 适用于热塑性材质的微流控芯片的封接。但是由于采用了加热的方式, 通道容易变形。

溶剂和胶粘剂封接: 采用胶粘剂的方法封接高聚物芯片可以避免热封接过程中微流体通道的变形, 适合于各种芯片材料的封接。但是封接过程中, 胶粘剂容易流入微通道中, 堵塞微通道, 造成封接成品率下降。采用有机溶剂封接高聚物的方法也有报道, 周小棉^[26]采用混合有机溶剂在常温、常压的条件下封接 PMMA 芯片, 得到较好的封接质量和成品率。Wooley^[30]采用石蜡作为牺牲层的方法, 溶剂封接高聚物芯片。这种方法可以封接通道深度 $>7\mu\text{m}$ 的微流控芯片。

1.2.2.3.2 PDMS 芯片的封接技术

PDMS 具有很强的粘附力, 很容易跟多种材料封接到一起, 如将含有微通道的 PDMS 基片和玻璃载玻片简单复合在一起便可以得到密闭的微流控芯片, 这种封接方式称为可逆封接^[12]。可逆封接的 PDMS 芯片可以揭开, 进行重新封接, 但是不能承受较大的压力。经等离子体或紫外线处理后的 PDMS 可以跟玻璃或 PDMS 等永久地封接到一起。通过改变 PDMS 聚合体和交联剂之间的配比也可对 PDMS 芯片进行永久封接^[14]: 在欲封接的两片 PDMS 中, 一片聚合体过量, 一片交联剂过量, 这样当两片 PDMS 复合后, 在封接界面处聚合体和交联剂分子扩散, 得到更高的封接强度。

1.3 微流控芯片中的流体驱动与控制技术

微流控芯片的运作基础是微通道网络中微流体的驱动和控制技术，微流体驱动和控制技术的研究一直是微流控芯片基础研究领域的重点之一。

1.3.1 基于电渗的流体驱动、控制技术

电渗是指在电场作用下，微通道内的液体沿通道内壁作整体定向移动的现象，它是当前微流控芯片研究中应用最广的一种流体控制技术。电渗控制的最大特点是操作简便和灵活，仅通过调节微通道网络中不同节点的电压值，就可控制微流体的迁移速度和运行方向，完成较为复杂的混合、反应和分离等操作。以芯片电泳为例，在进样通道施加不同的电压，可控制样品的进样体积，当形成稳定的进样区带后，切换电压，即可完成进样过程，随后样品进入分离通道进行电泳分离。整个过程不需要阀的帮助，液流控制和切换非常简单。

电渗不仅可用来直接驱动带电流体，也可用作动力微泵的动力源，称为电渗泵^[31]。其具体实现方式如下：将一定间距的电极用光刻技术集成于芯片底板上，与含有微通道的PDMS盖片封接起来，形成密闭的电渗泵驱动系统。工作时，在两电极间施加电压，产生电渗流，由于电渗流只存在于两个电极之间，因此在电极以外的通道内的液流受到电渗的推动，实现了泵的功能。据报道，在间距为0.06~15mm的电极间施加5~40V的电压，可获得0.01~0.14mL/s的流速。

电渗驱动易受外加电场强度、通道表面、微流体性质及传热效率等因素的影响，稳定性相对较差，而且这种驱动方式仅适用于电解质溶液，因此其应用也受到一定的限制。

1.3.2 基于微阀/微泵的流体驱动控制技术

基于微阀/微泵的流体驱动的研究是目前微流控芯片研究的热点。

1.3.2.1 微流控芯片中的微阀

微阀的种类多种多样，理论上讲，凡是能控制微通道闭合和开启状态的部件均能作为微流控芯片中的微阀使用。一个理想的微阀应该具有如下特征：低泄漏、低功耗、响应速度快、线性操作能力强及适应面广。

微阀的分类方法有多种，按照是否需要激励机构，可把微阀分成有源阀和无源阀两类。无源阀不需要外部的动力或控制，利用流体本身流向和压力的变化就可实现阀状态的改变，以双晶片单向阀和凝胶阀为主要代表。有源阀的原理是利用外界致动力来实现阀的开启和关闭操作。它有多种致动机理，包括气动、热膨胀、压电效应、形状记忆合金、静电、电磁等。

气动微阀的发展是微流控芯片中最引人注目的成就之一，它给微流控芯片的发展带来了更加广阔的发展前景，它是以外部气体作为致动力的一类有源阀，由 Quake 课题组最先发明。Quake 课题组采用多层软光刻技术制作了 PDMS 气动微阀，其基本结构如图 1-1 所示^[14]。芯片上层为含有控制通道的 PDMS 薄片，中间层为厚度 30 μm 左右的 PDMS 薄膜，下层为含有流体通道的 PDMS 薄片（通道 100 μm 宽，10 μm 深），芯片封接时控制通道和流体通道呈交叉构型放置。通过在控制通道内施加一定气压可以控制阀的开启和闭合，施加气压时，中间层的 PDMS 薄膜发生形变，向下挤压流体通道，直至通道堵塞。撤销压力时，PDMS 阀膜在自身弹力的作用下恢复原状，通道重新畅通。多个这样的微阀可以组成气动微泵。采用这种结构的气动阀和气动泵的组合，可实现微芯片通道内的流体控制。他们在这种气动阀的基础上构建了一种大规模集成微流控芯片，如图 1-2 所示，在一块 2.5cm \times 2.5cm 的芯片上集成有上千个微阀和数百个可寻址的微反应室^[15]。他们发现，这种阀的关闭性能与通道形状有很大关系。从图 1-1B 中可以看出，当气动微阀流体通道呈弧形时，在

较低的压力下便可以完全关闭，而采用矩形或梯形通道时，即使在 200KPa 的压力下，也不能将阀完全闭合。

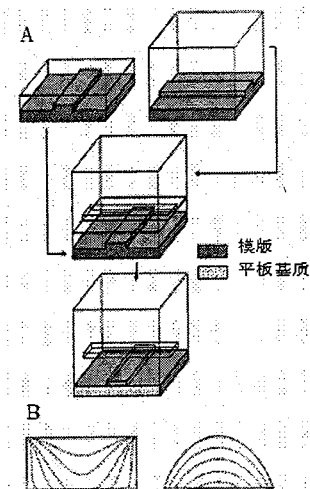


图 1-1 PDMS 气动微阀制作步骤^[14]

(A) 芯片制作步骤；(B) 阀膜对矩形通道和圆形通道的封闭情况

Fig1-1 Process flow for multilayer soft lithography

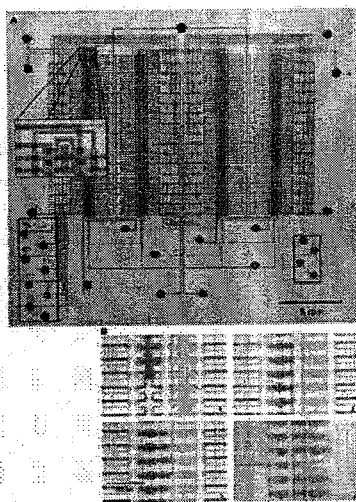


图 1-2 气动微阀微泵组成大规模流体控制系统^[15]

Fig 1-2 Microfluidic Large-Scale Integration

这种“下压 (push-down)”型气动微阀一般说来深宽比较小 (通常都 ≤ 0.1), 典型的阀的流体通道尺寸为 $100\ \mu\text{m}$ 宽, $10\ \mu\text{m}$ 深, 限制了这类阀的应用。为了解决高深宽比微通道中的流体控制的问题, Quake 课题组设计了另一种类型的气动微阀, 他们称之为“上推 (push-up)”型的气动微阀^[32], PDMS 薄膜在压力的作用下向上形变, 将液体流路堵塞。他们验证了施加压力和 PDMS 薄膜厚度与通道深度的关系, 在这种构架的设计中, 采用较低的压力便可以实现微流体通道的完全闭合。

同样采用这种隔膜阀的原理, Mathies 课题组报道了两种适合于玻璃芯片的气动微阀, 分别采用三层或四层结构^[33], 如图 1-3 所示。三层结构为一种 PDMS/玻璃杂交芯片, 在上层流体通道和下层控制通道间直接夹入一 PDMS 弹性薄膜, 由于 PDMS 膜作为封闭的流体通道的一部分, 其适应范围受到限制。针对三层阀局部结构缺陷, 经过改进制备了四层阀结构, 流体通道为均一的玻璃结构, 仅在阀的位置通过两个小孔与 PDMS 薄膜相接触。这两种结构均以 PDMS 薄膜作为可动部分, 通过在控制腔室中施加一定气压或负压来完成阀的关闭或开启。

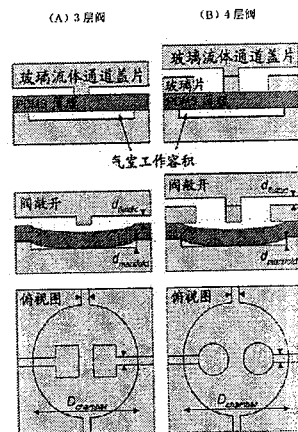


图 1-3 玻璃-PDMS 夹心气动微阀示意图^[33]

Fig 1-3 sandwich Monolithic Membrane Valves

此外还有转矩控制微阀，相变阀，热膨胀阀等。

1.3.2.2 微流控芯片中的微泵

微流控芯片主要的形态特征是各种构型的微通道网络与各种微阀的集合体，其功能是通过控制微通道内流体的流动，完成芯片上的各种单元操作。微泵驱动技术是实现微流体控制的基础。当前微流控芯片中主要的微泵有气动微泵、压电微泵、往复式微泵、离心力驱动等。下面主要对气动微泵进行简单介绍。

气动蠕动微泵是由多个气动微阀构成的(图 1-4 所示)。施加动力时,PDMS 薄膜在气体压力作用下发生形变,堵塞流体通道,阀闭合;撤销压力时,PDMS 薄膜在自身弹力的作用下恢复原状,流体通道畅通,阀开启。顺序控制三个阀的开启、闭合动作,即能实现对微通道中液流的驱动。

基于上述气动微泵的原理,Quake 课题组设计了一种循环泵^[14](图 1-5),可突破扩散限制,在样品混合和提高表面吸附灵敏度方面显示了很好的应用前景。利用循环泵,能快速混合包括从小分子染料到 $1\mu\text{m}$ 磁珠在内的流体。采用循环泵本身作为孵育室,进行生物素/亲和素结合分析,可得到比常规被动平衡吸附更高的样品结合效率(80%)和更短的分析时间。Quake 课题组采用这种微加工的循环泵,设计并制造了循环 PCR 微流控芯片^[34]和血液 DNA 提取微流控芯片系统^[35]。

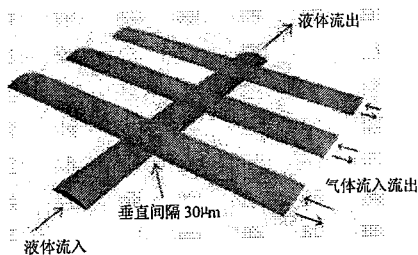


图 1-4 气动蠕动微泵 3D 结构示意图^[4]

Fig 1-4 A 3D scale diagram of an elastomeric peristaltic pump.

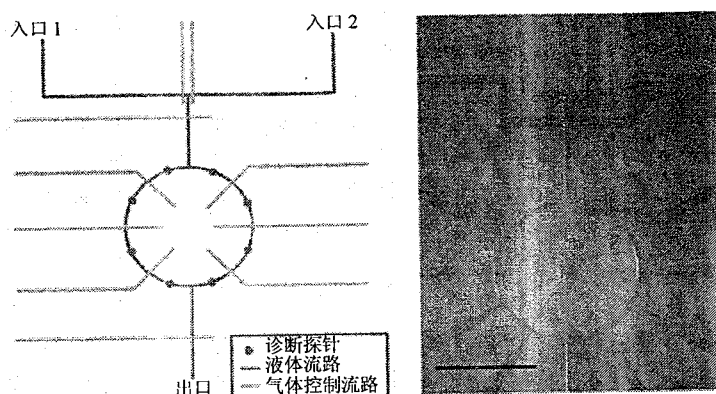
图 1-5 微加工循环泵^[14]

Fig 1-5 A Microfabricated Rotary Pump

Mathies 等提出了另一种适用于玻璃芯片的气动微泵^[33]。该微泵也由三个微型阀构成, 能实现规模集成。Landers^[36]将这种结构的微泵应用于芯片电泳中, 在进样通道上集成了三个微阀作为进样泵, 其进样的准确度和精度均优于电渗驱动。

上述两类 PDMS 微泵结构简单, 呈片状结构, 加工难度小, 容易实现微型化和集成化。但 PDMS 不能用来驱动如丙酮、氯仿等硅橡胶敏感的有机溶剂。PDMS 类材料的疏水性和多孔性质也使这种泵的应用受到限制, 必须通过表面处理才能使其适应于大多数化学和生物反应。同时, 当应用于激光诱导荧光检测时, 硅橡胶材料的荧光背景也大于玻璃等材料, 限制了这种微泵的应用。需要提及的是, 此类微泵虽然体积小, 但是控制部分都是采用了外置的气源和控制阀, 体积较大, 尚不能集成于微流控芯片中。

1.4 微流控芯片中的检测技术

1.4.1 电化学检测技术

微流控芯片电化学检测技术是通过电极来实现微流体通道内组分检测的一种方法。微流控芯片中的电化学检测具有灵敏度高、选择性好、装置简单、电极制作与芯片加工工艺相适应等优点,是最容易实现微型化的微流控芯片检测方式之一。根据检测机理的不同主要分为安培检测、电导检测和电势检测。下面主要针对微流控芯片电化学检测技术中应用最广的安培检测进行介绍。安培检测是基于待测物质在电极表面发生氧化还原反应来进行物质测定的一种手段,1998年由Wooley^[37]首先集成于微流控芯片中。微流控芯片中安培检测的研究主要集中在工作电极材料及电极制作工艺、分离高压隔离和微型化检测器等几个方面。

1.4.1.1 工作电极材料及电极制作工艺

安培检测器的性能主要取决于工作电极的制备材料,常用的电极材料主要包括碳电极和金属电极两类。

1.4.1.1.1 碳电极

碳电极由于表面性质稳定、背景噪声低等优点是电化学检测中普遍采用的一类工作电极材料。在微流控芯片中大多采用丝网印刷、填充和光刻等手段制备碳工作电极。其制备碳电极的材料主要有含碳墨水、碳糊、光刻胶膜和碳纳米管等。

Wang^[38]采用丝网印刷方法制作了厚膜碳电极:用镂空的腊纸作为工作电极模板,用含碳墨水在铝陶瓷片上印上一层碳膜,烘干后作为碳工作电极使用。采用柱后检测方式对电活性物质进行检测。

Martin^[39]采用碳糊填充的方法在芯片上制作碳工作电极。首先在微流控芯片PDMS盖片上需要的位置留出电极通道,将碳糊填充于通道内,去除多余部分,将其与含有分离通道的另一片PDMS封接在一起(电极通道与分离通道垂直,采用柱后检测方式)。

Hebert^[40, 41]等采用热裂解光刻胶膜方法制作平板碳工作电极。首先在石英底片上用一层光刻胶膜，固化后经曝光、显影后得到需要的电极形状。在惰性气体氛围下 1000℃ 热裂解，便可得到所需要的碳膜电极；然后与 PDMS 芯片封接在一起制备集成有电极的微流控芯片。这种方法制备的碳电极与其他碳电极相比表面更平坦，背景电流低，是一种有应用前景的制备微流控电化学检测芯片中碳电极的材料。

1.4.1.1.2 金属电极

金属电极主要包括金电极、铂电极、钯电极和铜电极等，电极的制备方法主要是采用微加工的方法，同时也有研究者利用已有的金属丝制备金属微电极。

金属微加工方法根据形成电极形状方法的不同分为光刻法和镀法。光刻法是采用真空溅射等薄膜制备技术在整个基片表面沉积一层金属膜，然后采用光刻方法制备所需要的电极形状。Hebert^[41, 42]和 Martin^[42]采用这种方法制备了金膜微电极，Baldwin^[43]采用这种方法制备了集成有电化学检测电极和电泳分离高压电极的全集成电化学检测芯片。由于制备金属膜成本很高，不利于推广，因此 Daniel^[44]采用刻录光盘来制作金电极，这种方法可以制备尺寸大于 100 μm 的金电极，大大降低了制作成本。镀法制备微电极则是采用先确定电极形状后通过蒸发、溅射、化学镀等手段沉积金属的方法来制备微电极。汪尔康^[34]采用 PDMS 作为微电极通道的模具，通过化学镀的方法在玻璃基片上制备了金和铜微电极。采用金属丝制作微电极较为简单，Henry^[45]使用在 PDMS 预留电极通道，然后将适宜尺寸金属丝插入通道的方法制备了金、铜和铂等微电极，得到了很高的检测效率和较高的检测限，但这种方法不适用于大规模电极的制备。

1.4.1.2 高压的隔离

在微流控芯片电泳安培检测系统中, 如何降低分离高压对检测的影响是一个至关重要的问题。主要的解决手段是柱端检测和集成去耦装置。

柱端检测^[46, 47]: 柱端检测方式由于构架简单, 只是将工作电极放置于距离分离通道几十个微米处, 易于操作, 因此在芯片电泳中被广泛采用。采用这种检测方式时, 分离通道出口和工作电极的距离和相对位置均对检测产生影响, 因此对电极与通道出口端的对准要求很高。一般需要在显微镜的帮助下进行电极的对准操作或者借助设计的芯片操作平台进行电极对准操作。

集成去耦装置隔离高压: Rossier^[48]在 PET 芯片的薄膜盖片上距离通道末端 1mm 处, 沿通道的方向制作了 1-6 个 5 微米或 10 微米的微孔阵列, 分离电压通过这些微孔形成电压回路, 实现对分离电压的隔离。

Chen^[49]采用沉积技术在与分离通道垂直的方向制作了一条 3mm 宽的钯膜电极, 在通道下游制备了与通道垂直的微电极阵列。分离电压在缓冲液池和去耦电极之间形成回路, 将分离电场和电化学检测隔开。钯能吸收在产生的氢, 因此避免了气泡的产生对分离和检测的影响。Wu^[50]研究了铂和金薄膜电极作为去耦电极的性能, 其中铂电极的去耦性能较好, 在 MES 缓冲液中, 其检测电流的基线漂流仅为 0.05pA。

1.4.1.3 电化学检测器的研究

电化学检测引起广泛关注的原因不仅仅是由于其电极易于集成到芯片上, 更主要的是由于其检测仪器结构简单, 易于微型化且不影响检测的灵敏度。

Martin^[51]制备了采用电池供电的隔离式电化学检测器。其电化学检测部分、数据采集部分、传输部分均集成于一块印刷线路板上, 由 9V 电源供电, 采用工业常用的隔离芯片将高压和电化学检测器之间隔离, 采用柱内检测的方法对隔离电化学检测器进行了考察, 得到与激光诱导荧光相同的分离效率。

Baldwin^[52]制作了全集成的芯片电泳检测系统,该系统集成了高压电源、电化学检测器和芯片接口等三部分,整个仪器体积小,采用电池供电。采用全集成电化学检测芯片进行分析,是最先体现全集成概念的电化学检测系统,但是整个系统是在外置控制卡控制下,没有完全集成。

林炳承^[53]等开发和研制了基于 USB 接口的微型化电化学检测器,利用 USB 的特性,实现了数据传输、USB 供电、即插即用的电化学检测器。整个检测器抛弃了电池供电模式,进一步缩小了体积,同时其即插即用的特性更加适合与微流控芯片的野外或实时检测等。以此为基础该课题组研制成功了便携式的芯片电泳电化学检测系统,尺寸为 11×9.5×6.5cm (长×宽×高)。

1.4.2 激光诱导荧光检测技术

激光诱导荧光是目前最灵敏的检测方法之一,其检测限一般可达 10^{-11} mol/L~ 10^{-13} mol/L,对于某些荧光效率高的物质,甚至可达到单分子检测,在通量检测方面已经实现了 384^[54]通道样品的高速检测。在微流控芯片研究中,激光诱导荧光检测器是一种应用最早、并且至今仍然应用最为广泛的光学检测器。

微流控芯片中的激光诱导荧光最常采用的构架是共聚焦构架,采用共聚焦构架可以实现对荧光的高效收集和对噪声的有效去除,但是其光学系统较为复杂。非共聚焦构架的激光诱导荧光检测光路系统相对简单,但是降低了检测的灵敏度。微流控激光诱导检测器研究的热点是激光检测器的小型化和集成化。

1.4.2.1 激光检测器的小型化

微流控芯片中适合的激光光源一般需要体积小、功耗低、单色性能好等特点。现阶段用于激光诱导检测的小体积的激光光源主要有半导体激光器和

激光二极管。

半导体激光器体积小、功耗低、输出功率稳定、价格便宜,光强度和单色性满足微流控芯片中对激发光源的要求,是微流控激光诱导荧光检测中较为理想的激发光源。发光二极管是一种常见的发光元件,可以大大减小激光诱导荧光检测器的体积。但是现有的发光二极管单色性能较差,光强较弱。已经有发光二极管用于微流控芯片的报道^[55],显示了其在微流控荧光检测中应用的潜力。随着电子技术的发展,发光二极管光强不断增大,其在微流控荧光检测中的应用必将越来越大。2005年桑尼亚国家实验室的科学家^[56]报道了一种手掌大小的便携式芯片电泳激光诱导荧光检测装置,其外光尺寸为 $11.5\text{cm}\times 11.5\text{cm}\times 19.0\text{cm}$ 。其光路的微型化并没有牺牲检测的灵敏度,检测限可达 10^{-11}mol/L (荧光染料 HPTS)

1.4.2.2 激光检测器的集成化

由于微流控芯片的平面二维特性,可以很方便地在芯片上加工出上百根微通道,而激光检测器从原理上讲是最适合于进行阵列检测的检测装置。先前已经发展成熟的毛细管电泳阵列激光诱导荧光检测为芯片阵列电泳的检测装置提供了很好的参考,其改进后可以应用于阵列芯片的检测中。激光诱导荧光阵列芯片的检测技术大体上可以分为两大类,一是将激光拉成窄线,使用 CCD 作为荧光信号的收集装置^[57],这一种灵敏度较差,需要大功率的激光光源,但是实现起来较为容易;另一类是单光束扫描技术,主要是通过步进马达控制反射镜的转动来实现激光束的扫描和定位,也有通过电光扫描,而不需要采用机械装置。最突出的工作是 Mathies 研究组设计的旋转扫描共聚焦激光诱导荧光检测装置^[58, 59],可用于 96 通道和 384 通道圆盘式电泳芯片的分析检测。

1.4.3 化学发光检测技术

化学发光是人们公认的高灵敏度检测方法之一，其检测灵敏度可以和激光诱导荧光法相媲美。与其它光学检测方法相比，化学发光不需要光源，仪器设备简单，更易实现微型化和集成化，因而比较适于用作微流控芯片的检测器。

化学发光分析法已在环境检测、药物分析、临床检验以及生命科学等领域得到了广泛的应用，不足之处在于高效的化学发光体系种类较少，主要集中在鲁米洛、光泽精、草酸盐、过氧草酸酯等少数反应体系。

1.4.3.1 化学发光检测器的设计

化学发光检测器的构架简单，是微流控芯片上最容易实现微型化的检测方式之一。它无需激发光源，也不需要复杂的分光 and 滤光设备，一般仅需要在微通道反应池附近放置一个光检测元件即可完成化学发光信号的采集，常用的检测元件有光电倍增管和 CCD 摄像头两种。因此微流控芯片化学发光检测系统的关键是检测池结构的设计，既要使试剂和样品高效混合和充分反应，又要充分考虑反应体系对芯片系统产生的不利影响，如有些反应体系伴随有气体产生，而有些反应体系需要在非水介质中进行。

微流控芯片化学发光单点检测实现起来比较简单，一般方法是将光电检测器直接置于反应通道的正下方，因其不需要复杂的光路系统，大多由研究者自行搭建而成。

1.4.3.2 化学发光检测的应用

由于化学发光反应的选择性较差，多数情况下化学发光检测需要跟芯片电泳分离结合起来。为了避免发光试剂对电泳分离过程的不利影响，一般需采取柱后发光反应的方式。Mangru^[60]等最早在微流控芯片上实现了化学发光检测，他们将电泳分离与柱后酶催化化学发光反应器集成在玻璃芯片上，采用 Y 型反应通道，以鲁米诺-过氧化氢体系测定了鼠 IgG。为了提高检测的灵

敏度, 在芯片检测区域的背面粘贴有反射膜, 同时在芯片和光电倍增管之间加有 425nm 的带通滤光片来降低自然光等的干扰。

任吉存^[61]等在 PDMS 芯片上采用等电聚焦与在线化学发光检测相结合的方法测定了亚血红素类蛋白, 为了达到最大程度的混合反应, 发光试剂在注射泵抽动下经 Y 型结构与分离通道汇流; 为了增大光收集效率, 在芯片背面贴有黑色胶带, 仅在交叉点后留有一个 2.0 mm×3.0 mm 的检测窗口。他们以鲁米诺-过氧化氢体系分离并测定了细胞色素 C、肌红蛋白与辣根过氧化物酶, 检测限分别为 1.2×10^{-7} 、 1.6×10^{-7} 和 1.0×10^{-10} mol/L。

Liu^[62]等在 PDMS 芯片上设计了三种不同的汇流结构, 进一步考察了发光试剂和样品的混合程度对化学发光检测灵敏度的影响。A 结构采用普通十字通道设计, 在分离通道末端的出口池中加入发光试剂, 经电泳分离后的样品区带进入池中发生化学发光反应; B 结构与 Mangru 等的设计相似, 发光试剂通过 Y 型通道与样品进行柱后混合及反应; C 结构的发光反应也发生在分离通道的出口池中, 所不同的是发光试剂不是直接加在出口池中, 而是通过注射泵或静压力等压力驱动方式汇流到出口池中。以水相的鲁米诺-过氧化氢反应体系测定 Co(II), 使用 A 结构的检出限为 8.3 μ M, 使用 B 结构的检出限为 0.5 μ M。而使用非水相的过氧草酸酯发光体系对丹酰化甘氨酸进行检测, A 和 C 结构的检出限分别为 8.6 μ M 和 0.7 μ M。

近年来, 化学发光检测技术在微流控芯片免疫检测方面的应用已引起较多的关注。如 Yakovleva 等在硅芯片上进行免疫吸附酶反应, 在 13.1 × 3.2 mm 尺寸的芯片上, 蚀刻了 42 根 235 μ m 深、25 μ m 宽的多孔流体通道, 通过增加表面积来提高检测灵敏度^[63]。他们使用辣根过氧化物酶催化的鲁米诺-过氧化氢-碘苯酚化学发光体系, 考察了各种抗体固定化试剂的影响, 发现通过戊二醛与三种物质 (APTES-GA、LPEI-GA 和 GOPS-BPEI-GA) 修饰的硅表面结合的抗体在 0.4 M 甘氨酸/盐酸缓冲液中能完全再生。LPEI-GA 修饰的芯片具有很

高的稳定性,在一个月內,没有发生抗体活性降低的现象,显示了很好的商业化应用前景。Tsukagoshi^[64]等在一块芯片上集成了免疫反应、电泳分离、样品运输和高灵敏度的化学发光检测,用于人血清中肿瘤标志物的检测。

此外用于微流控芯片中的检测技术还有:电致化学发光^[65]/紫外检测^[66]/质谱检测^[67, 68]/热透镜检测^[69]等

1.5 微流控芯片在免疫分析中的应用

免疫分析是基于抗体和抗原反应的一种分析方法,具有灵敏度高、特异性强等优点。免疫检测是生命科学对人类最重要的贡献之一,是临床中最重要的检测手段,应用涉及了从疾病筛查、疾病确诊、药物浓度监测等各个方面,同时免疫检测也广泛应用于环境监测,食品安全等领域。当前免疫检测已从具有放射性危险的放射性免疫检测过渡到具有环境友好性的各类免疫检测方式。但是临床中普遍存在的这些免疫检测手段具有需血量大、成本高、检测时间长等缺点,同时设备体积庞大、价格昂贵。当前设备不适于野外检测、实时检测等方面的需求,更难以符合未来疾病诊断家庭化、个体化的发展趋势。

微流控芯片的基本特征和最大优势是多种单元技术(包括样品纯化、混合、免疫反应、样品洗涤、电泳和检测等)在微小平台上的灵活组合和大规模集成,高通量是大规模集成的一种形式,它不仅能以极少量的样品获得极大的信息量,更有可能超越单一的分析功能,而以一个整体微型多元操作平台的姿态直面市场。免疫分析与微流控芯片的结合可以有效地增加反应效率,简化操作,减少分析时间,增加分析速度,降低样品和能源的消耗,同时其免疫测定装置的体积大大缩小,有可能实现便携化^[70]。

1.5.1 微流控免疫分析的分类

根据试剂是否均相存在,微流控免疫分析可以分为微流控芯片均相免疫分析和微流控芯片非均相免疫分析。

1.5.1.1 微流控芯片均相免疫分析

微流控芯片均相免疫分析中免疫试剂均存在于液相中,试样同试剂进行亲和反应,然后抗体抗原的复合物与没有反应的游离的试剂(抗体或抗原)分离,检测得到分析结果。

微流控芯片均相免疫分析最常采用的分离手段一般为芯片电泳分离。Koutny^[71]用芯片电泳分离竞争免疫反应后的抗原-抗体复合物和游离的标记抗原,建立了血清氢化皮质醇的测定方法,工作范围为1-60 $\mu\text{g/L}$ 。wang^[72]将免疫反应过程中的抗原和抗体反应也集成到微芯片上进行,设计了集成化的免疫电泳芯片:在玻璃芯片上分别进行抗原、酶标抗体的混合免疫反应,电泳分离、柱后酶催化、电化学检测等过程。以鼠IgG为标准物对此芯片进行考察,检测限高达 $2.5 \times 10^{-13} \text{g/L}$,重现性较好。由于此芯片采用的是酶催化,酶标记的不稳定性限制了其应用范围,为了避免这种情况,他们采用了二茂铁羧酸(一种氧化还原性分子)直接标记抗体,电泳分离,安培检测完成免疫测定^[73]。但是其灵敏度与酶免疫相比,差距较大。

Cheng^[74]在构建了集成六个平行分析单元的免疫分析芯片,每个分析单元均包括混合、免疫反应、进样等,可同时进行多种样品的测定。他们应用此芯片在60s内测定了卵蛋白和雌二醇的含量,雌二醇的检测限为6.4nmol/L。

Yager^[75]建立了一种微流控芯片中基于扩散反应的免疫分析方法:微流控扩散免疫。在这种方法中,微流体通道分子的垂直于液流方向运动(扩散)受抗体和抗原的结合的影响,抗原的分子量一般 $<10\text{kDa}$,抗体的分子量一般 $>150\text{kDa}$,抗原在溶液中的扩散速度要比抗体快。通过测定标记物在液流中的

位置，每种稀释分析物的浓度可以在几秒中得到测定。他们通过用荧光检测小分子竞争免疫的方法对这种方法进行验证，检测限为 1-10 nM。

1.5.1.2 微流控芯片非均相免疫分析

非均相微流控免疫分析是将抗体（或抗原）微流控芯片固定在载体表面。在非均相免疫中抗原（或抗体）从样品中通过免疫反应结合到固相载体表面固定的抗体（或抗原）上，通过清洗固相载体表面可以实现抗体-抗原复合物、游离抗原、抗体的分离。与均相免疫微流控芯片相比，非均相微流控免疫分析具有抗体损失小、检出灵敏度高等优点。非均相微流控免疫分析的研究重点在于免疫抗体固定化和集成化微流控免疫分析。免疫抗体的固定化，在微流控芯片免疫分析中根据免疫吸附载体的不同采用各种抗体固定方法，总体上可分为直接以微流控芯片通道壁作为免疫吸附载体、以微珠作为微流控芯片的免疫吸附的载体和以各类膜作为微流控芯片免疫吸附的载体三类。

1.5.1.2.1 直接以微流控芯片通道壁作为免疫吸附载体

在这类免疫吸附载体中，其抗体固定化的方式直接决定于制备微流控芯片所采用的材料。根据所采用的材料选用不同的抗体固定方式，即物理吸附或化学键合固定方式。

Dadge^[76]以硅烷化的玻璃微流控芯片通道表面作为固相载体进行鼠 IgG 的测定。首先微流控通道局部用硅烷化试剂氯化二甲基硅烷处理，处理后的通道固定蛋白 A，利用蛋白 A 对 IgG 的亲性和性测定样品溶液中的 IgG。免疫反应室可再生重复利用。

PDMS 具有很强的疏水性，能强烈地吸附蛋白，因此可直接利用 PDMS 通道表面的物理吸附固定蛋白进行通道免疫分析。Eteshola^[77]采用物理吸附的方法将抗体直接吸附到 PDMS 微流控芯片壁上进行夹心免疫检测，这种方法的非特异性吸附较为严重。同时也采用将抗体共价键合到经过蛋白 A 化学吸附

的 PDMS 通道表面, 来降低非特异性吸附, 得到比直接吸附更好的结果。Li dongqing^[78]通过实验发现提高封闭缓冲液中 BSA 的浓度能有效地降低 PDMS 表面的非特异性吸附, 因此 PDMS 可以直接作为免疫抗体的吸附载体。

1.5.1.2.2 以微珠作为微流控芯片免疫吸附的载体

所用的微珠主要有聚苯乙烯微珠、磁珠、乳胶磁珠等。磁珠免疫与微流控通道免疫相比具有更高的比表面积, 反应时间更短, 灵敏度更高。相对于其他蛋白固定的载体来说, 微珠更容易实现表面的更新, 但是使用微珠(磁珠除外)作为免疫反应的载体时, 通常需要在微流控芯片上加工出特殊结构, 以拦截微珠于微流控芯片通道内, 常用的构架有围堰、双围堰和锥形结构等。

Sato^[79]设计了微通道中具有围堰构架的石英芯片, 制成微珠免疫反应器。采用微泵将预先固定有抗体的聚苯乙烯微球引入通道中, 微珠直径 25 μm , 而围堰仅留有 10 μm 的出口, 因此磁珠被拦截于围堰处。然后顺序泵入预测抗原、生物素修饰的二抗、链亲和素标记辣根过氧化物酶, 最后泵入辣根酶底物和 H_2O_2 。酶反应产物分子小, 可顺利穿过围堰, 被热透镜检测, 从而判定待测抗原的含量。

Richter^[80]设计了具有双围堰反应结构的免疫微流控芯片, 其具有专门的微珠填充通道, 围堰处深 1 μm 。这种构架的微反应室背压较大, 只适合于电驱动的免疫反应。

Hayes^[81]利用 1-2 μm 的磁性微珠作为固定载体, 将生物素结合的 FITC 抗体固定在经表面改性的磁微珠上, 微珠引入微通道后通过磁铁固定于通道上, 免疫反应完成后, 撤去磁场, 排除磁珠。磁珠免疫不需要在芯片上加工特殊围堰结构, 较为简单, 而且电磁场可以方便地集成于微芯片上。

1.5.1.2.3 以膜作为微流控芯片免疫分析的固定载体

以各类膜作为微流控芯片免疫分析的固定载体具有内表面大、反应效率

高等优点, 并且蛋白固定于膜上后稳定性好且能很好地保持活性。通常选用的膜有: 聚四氟乙烯多孔膜、等离子体聚合膜和纤维素膜等。

Stokes^[82]等在纤维素膜上固定好抗原、抗体后, 放入有机玻璃加工的微反应器中形成膜免疫微反应器。Whitesides^[83]采用聚碳酸酯薄膜材料固定抗原测定爱滋病患者血清中的 IgG 的浓度。微反应池是通过两片具有通道的 PDMS 形成, 通过换上新膜可实现微反应器的再生。由于膜可以减少对流的发生, 因此以膜作为微流控免疫反应的固定相载体比直接用微流控通道更有利于减少交叉污染。

1.6 本论文涉及的微流控芯片技术及应用概述

本论文的研究工作主要包括基于微流控芯片的现场、实时检测系统的关键技术研究及其在免疫分析中的应用。涉及到的微流控芯片的技术包括: 微流控芯片的制造技术, 微流控芯片中的流体驱动和控制技术, 微流控芯片中的检测技术。免疫方面的应用主要包括微泵驱动的夹心免疫和酶免疫的测定, 是奥运科技攻关项目的基础。

本论文分为九章, 第一章为文献综述, 第二~九章为本论文的研究工作。其中第二章为基于 USB 接口的微型化芯片电泳用高压电源的研制与性能考察; 第三章为基于 PDMS 微阀的微流控芯片的研制与性能考察; 第四章为规模集成 PDMS 微阀的微流控芯片的研制与性能考察; 第五章为基于 USB 接口的微型化电化学检测器的研制与性能考察; 第六章为多通道化学发光检测器的研制与性能考察; 第七章现场实时检测系统样机的研制; 第八章现场实时检测系统样机在夹心免疫检测中的应用; 第九章现场实时检测系统样机在酶免疫检测中的应用。

参考文献

1. 林炳承, 秦建华, 微流控芯片实验室. **2006**, (1), 1-2.
2. Manz, A.; Harrison, D. J.; Verpoorte, E. M. J.; Fettinger, J. C.; Paulus, A.; Ludi, H.; Widmer, H. M., Planar Chips Technology for Miniaturization and Integration of Separation Techniques into Monitoring Systems - Capillary Electrophoresis on a Chip. *Journal of Chromatography* **1992**, 593, (1-2), 253-258.
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. Manz, A., G. N., Widmer, H.M., Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sens. Actuators, B.* **1990**, (B1), 244-248.
5. 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.
6. Jacobson, S. C.; Hergenroder, R.; Moore, A. W.; Ramsey, J. M., Precolumn Reactions with Electrophoretic Analysis Integrated on a Microchip. *Analytical Chemistry* **1994**, 66, (23), 4127-4132.
7. Jacobson, S. C.; Koutny, L. B.; Hergenroder, R.; Moore, A. W.; Ramsey, J. M., Microchip Capillary Electrophoresis with an Integrated Postcolumn Reactor. *Analytical Chemistry* **1994**, 66, (20), 3472-3476.
8. Jacobson, S. C.; Hergenroder, R.; Koutny, L. B.; Ramsey, J. M., High-Speed Separations on a Microchip. *Analytical Chemistry* **1994**, 66, (7), 1114-1118.
9. Jacobson, S. C.; Hergenroder, R.; Koutny, L. B.; Ramsey, J. M., Open-Channel Electrochromatography on a Microchip. *Analytical*

- Chemistry* **1994**, 66, (14), 2369-2373.
10. Woolley, A. T.; Mathies, R. A., Ultra-High-Speed DNA-Sequencing Using Capillary Electrophoresis Chips. *Analytical Chemistry* **1995**, 67, (20), 3676-3680.
 11. Woolley, A. T.; Mathies, R. A., Ultra-High-Speed DNA Fragment Separations Using Microfabricated Capillary Array Electrophoresis Chips. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91, (24), 11348-11352.
 12. 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.
 13. Chen, Y. H.; Chen, S. H., Analysis of DNA fragments by microchip electrophoresis fabricated on poly(methyl methacrylate) substrates using a wire-imprinting method. *Electrophoresis* **2000**, 21, (1), 165-170.
 14. 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.
 15. Thorsen, T.; Maerkl, S. J.; Quake, S. R., Microfluidic large-scale integration. *Science* **2002**, 298, (5593), 580-584.
 16. Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature* **2006**, 442, (7101), 368-373.
 17. Wang, H.; Huang, H. Q.; Dai, Z. P.; Gao, Y.; Ma, B.; Wang, L.; Bai, J. L.; Lin, B. C., Performance evaluation of home-made glass microfluidic glass chips. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese* **2005**, 26, (11), 2037-2039.

18. Jia, Z. J.; Fang, Q.; Fang, Z. L., Bonding of glass microfluidic chips at room temperatures. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, (18), 5597-5602.
19. Nakanishi, H., Nishimoto, T., Nakamura, N., Nagamichi, S., Fabrication of electrophoresis devices on quartz and glass substrates using a bonding with HF solution. *IEEE* **1997**, 299-304.
20. Wang, H. Y.; Foote, R. S.; Jacobson, S. C.; Schneibel, J. H.; Ramsey, J. M., Low temperature bonding for microfabrication of chemical analysis devices. *Sensors and Actuators B-Chemical* **1997**, *45*, (3), 199-207.
21. Sayah, A.; Solignac, D.; Cueni, T.; Gijs, M. A. M., Development of novel low temperature bonding technologies for microchip chemical analysis applications. *Sensors and Actuators a-Physical* **2000**, *84*, (1-2), 103-108.
22. 印燕, 吴冲若, 玻璃与玻璃的静电键和. *微细加工技术* **1998**, (4), 47-51.
23. Jo, B. H.; Van Lerberghe, L. M.; Motsegood, K. M.; Beebe, D. J., Three-dimensional micro-channel fabrication in polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer. *Journal of Microelectromechanical Systems* **2000**, *9*, (1), 76-81.
24. Ehrfeld, W., Muenchmeyer, D., Three dimensional microfabrication using synchrotron radiation. *Nucl. Instrum. Methods* **1991**, (A303), 523-531.
25. Martynova, L.; Locascio, L. E.; Gaitan, M.; Kramer, G. W.; Christensen, R. G.; MacCrehan, W. A., Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, (23), 4783-4789.
26. Zhou, X. M.; Dai, Z. P.; Liu, X.; Luo, Y.; Wang, H.; Lin, B. C., Modification of a poly(methyl methacrylate) injection-molded microchip and its use for high performance analysis of DNA. *Journal of Separation Science* **2005**, *28*, (3), 225-233.

27. 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.
28. Roberts, M. A.; Rossier, J. S.; Bercier, P.; Girault, H., UV laser machined polymer substrates for the development of microdiagnostic systems. *Analytical Chemistry* **1997**, 69, (11), 2035-2042.
29. Kelly, R. T.; Woolley, A. T., Thermal bonding of polymeric capillary electrophoresis microdevices in water. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, (8), 1941-1945.
30. Kelly, R. T.; Pan, T.; Woolley, A. T., Phase-changing sacrificial materials for solvent bonding of high-performance polymeric capillary electrophoresis microchips. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, (11), 3536-3541.
31. McKnight, T. E.; Culbertson, C. T.; Jacobson, S. C.; Ramsey, J. M., Electroosmotically induced hydraulic pumping with integrated electrodes on microfluidic devices. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (16), 4045-4049.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Woolley, A. T.; Lao, K. Q.; Glazer, A. N.; Mathies, R. A., Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, (4), 684-688.
38. Wang, J.; Pumera, M.; Chatrathia, M. P.; Rodriguez, A.; Spillman, S.; Martin, R. S.; Lunte, S. M., Thick-film electrochemical detectors for poly(dimethylsiloxane)based microchip capillary electrophoresis. *Electroanalysis* **2002**, *14*, (18), 1251-1255.
39. Martin, R. S.; Gawron, A. J.; Fogarty, B. A.; Regan, F. B.; Dempsey, E.; Lunte, S. M., Carbon paste-based electrochemical detectors for microchip capillary electrophoresis/electrochemistry. *Analyst* **2001**, *126*, (3), 277-280.
40. Hebert, N. E.; Snyder, B.; McCreery, R. L.; Kuhr, W. G.; Brazill, S. A., Performance of pyrolyzed photoresist carbon films in a microchip capillary electrophoresis device with sinusoidal voltammetric detection. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, (16), 4265-4271.
41. 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.
42. Kikura-Hanajiri, R.; Martin, R. S.; Lunte, S. M., Indirect measurement of nitric oxide production by monitoring nitrate and nitrite using microchip electrophoresis with electrochemical detection. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, (24), 6370-6377.
 43. 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.
 44. Daniel, D.; Gutz, I. G. R., Quick production of gold electrode sets or arrays and of microfluidic flow cells based on heat transfer of laser printed toner masks onto compact discs. *Electrochemistry Communications* **2003**, 5, (9), 782-786.
 45. Garcia, C. D.; Henry, C. S., Coupling capillary electrophoresis and pulsed electrochemical detection. *Electroanalysis* **2005**, 17, (13), 1125-1131.
 46. Zeng, Y.; Chen, H.; Pang, D. W.; Wang, Z. L.; Cheng, J. K., Microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, (10), 2441-2445.
 47. Wang, J.; Pumera, M.; Chatrathi, M. P.; Escarpa, A.; Konrad, R.; Griebel, A.; Dorner, W.; Lowe, H., Towards disposable lab-on-a-chip: Poly(methylmethacrylate) microchip electrophoresis device with electrochemical detection. *Electrophoresis* **2002**, 23, (4), 596-601.
 48. Rossier, J. S.; Ferrigno, R.; Girault, H. H., Electrophoresis with electrochemical detection in a polymer microdevice. *Journal of*

- Electroanalytical Chemistry* **2000**, 492, (1), 15-22.
49. Chen, D. C.; Hsu, F. L.; Zhan, D. Z.; Chen, C. H., Palladium film decoupler for amperometric detection in electrophoresis chips. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (4), 758-762.
 50. 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.
 51. 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-+.
 52. Collins, G. E.; Wu, P.; Lu, Q.; Ramsey, J. D.; Bromund, R. H., Compact, high voltage power supply for the lab-on-a-chip. *Lab on a Chip* **2004**, 4, (4), 408-411.
 53. Jiang, L.; Lu, Y.; Dai, Z. P.; Xie, M. H.; Lin, B. C., Mini-electrochemical detector for microchip electrophoresis. *Lab on a Chip* **2005**, 5, (9), 930-934.
 54. 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.
 55. Dang, F.; Zhang, L.; Hagiwara, H.; Mishina, Y.; Baba, Y., Ultrafast analysis of oligosaccharides on microchip with light-emitting diode confocal fluorescence detection. *Electrophoresis* **2003**, 24, (4), 714-721.
 56. 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.
57. Shen, Z.; Liu, X. J.; Long, Z. C.; Liu, D. Y.; Ye, N. N.; Qin, J. H.; Dai, Z. P.; Lin, B. C., Parallel analysis of biomolecules on a microfabricated capillary array chip. *Electrophoresis* **2006**, *27*, (5-6), 1084-1092.
58. Paegel, B. M.; Emrich, C. A.; Weyemayer, G. J.; Scherer, J. R.; Mathies, R. A., High throughput DNA sequencing with a microfabricated 96-lane capillary array electrophoresis bioprocessor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, (2), 574-579.
59. Simpson, P. C.; Roach, D.; Woolley, A. T.; Thorsen, T.; Johnston, R.; Sensabaugh, G. F.; Mathies, R. A., High-throughput genetic analysis using microfabricated 96-sample capillary array electrophoresis microplates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, (5), 2256-2261.
60. Mangru, S. D.; Harrison, D. J., Chemiluminescence detection in integrated post-separation reactors for microchip-based capillary electrophoresis and affinity electrophoresis. *Electrophoresis* **1998**, *19*, (13), 2301-2307.
61. Huang, X. Y.; Ren, J. C., On-line chemiluminescence detection for isoelectric focusing of heme proteins on microchips. *Electrophoresis* **2005**, *26*, (19), 3595-3601.
62. Liu, B. F.; Ozaki, M.; Utsumi, Y.; Hattori, T.; Terabe, S., Chemiluminescence detection for a microchip capillary electrophoresis system fabricated in poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, (1), 36-41.
63. 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. *Anal Chem* **2002**, 74, (13), 2994-3004.
64. 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.
65. Qiu, H. B.; Yan, J. L.; Sun, X. H.; Liu, J. F.; Cao, W. D.; Yang, X. R.; Wang, E. K., Microchip capillary electrophoresis with an integrated indium tin oxide electrode-based electrochemiluminescence detector. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, (20), 5435-5440.
66. Kitagishi, K.; Sato, Y., Significant improvement of signal-to-noise ratio in capillary electrophoresis through optimization of aperture width for UV absorption detection. *Electrophoresis* **2001**, 22, (16), 3395-3400.
67. Xue, Q. F.; Dunayevskiy, Y. M.; Foret, F.; Karger, B. L., Integrated multichannel microchip electrospray ionization mass spectrometry: Analysis of peptides from on-chip tryptic digestion of melittin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, 11, (12), 1253-1256.
68. Xue, Q. F.; Foret, F.; Dunayevskiy, Y. M.; Zavracky, P. M.; McGruer, N. E.; Karger, B. L., Multichannel microchip electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **1997**, 69, (3), 426-430.
69. Kitamori, T.; Tokeshi, M.; Hibara, A.; Sato, K., Thermal lens microscopy and microchip chemistry. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, (3), 52A-60A.
70. Luo, C. X.; Fu, Q.; Li, H.; Xu, L. P.; Sun, M. H.; Ouyang, Q.; Chen, Y.; Ji, H., PDMS microfluidic device for optical detection of protein immunoassay using gold nanoparticles. *Lab on a Chip* **2005**, 5, (7), 726-729.
71. Koutny, L. B.; Schmalzing, D.; Taylor, T. A.; Fuchs, M., Microchip

- electrophoretic immunoassay for serum cortisol. *Analytical Chemistry* **1996**, 68, (1), 18-22.
72. Wang, J.; Ibanez, A.; Chatrathi, M. P.; Escarpa, A., Electrochemical enzyme immunoassays on microchip platforms. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (21), 5323-5327.
73. Wang, J.; Ibanez, A.; Chatrathi, M. P., Microchip-based amperometric immunoassays using redox tracers. *Electrophoresis* **2002**, 23, (21), 3744-3749.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. Sato, K.; Tokeshi, M.; Odake, T.; Kimura, H.; Ooi, T.; Nakao, M.; Kitamori,

- T., Integration of an immunosorbent assay system: Analysis of secretory human immunoglobulin A on polystyrene beads in a microchip. *Analytical Chemistry* **2000**, 72, (6), 1144-1147.
80. Richter, T.; Shultz-Lockyear, L. L.; Oleschuk, R. D.; Bilitewski, U.; Harrison, D. J., Bi-enzymatic and capillary electrophoretic analysis of non-fluorescent compounds in microfluidic devices - Determination of xanthine. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2002**, 81, (2-3), 369-376.
81. Hayes, M. A.; Polson, N. A.; Phayre, A. N.; Garcia, A. A., Flow-based microimmunoassay. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (24), 5896-5902.
82. 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.
83. 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.

第二部分 微流控芯片中的流体控制技术

第二章 基于 USB 接口的微型化芯片电泳用高压电源的研制与性能

考察

2.1 引言

芯片实验室为微型化化学或生物分析系统的实现提供了可能^[1-4]。这些设备的一个显著的优点是带来了设备的自动化和便携化,因此减少了大量的人工操作,也使现场实时分析成为可能^[5, 6]。

芯片电泳分析是芯片实验室中采用的主要分离手段^[7, 8],在过去的一个世纪里得到飞速发展,已经被证实能够分析从小分子的药物^[9]、氨基酸^[10]、小肽^[11]和寡糖^[12]到大分子的蛋白质^[13]和 DNA^[14]等各种样品。虽然这些设备需要的样品和试剂量较少,但它们通常与大而笨重的检测和控制设备相连接,使得整个分析系统体系庞大。开发微型化、集成式芯片设备从而实现芯片实验室的便携化,将扩展芯片实验室在野外检测、实时检测和在线检测等许多领域的应用。

芯片检测系统,包括 LIF^[15]及其他光学检测方式^[16]和电化学检测^[17]等的微型化已经有相关报道,但是其外围设备例如高压电源等的微型化常常被忽略,而对于整个系统的微型化而言,外围设备的微型化具有一定的决定作用。许多芯片电泳实验都是采用常规尺寸的高压电源,只有极少几个课题组进行了微型化高压电源的研究。例如: Garcia^[18]等研制了一种采用电池供电的 3 通道的高压电源,它能进行“门进样”或者“收缩进样”和电泳分离。最引人注意的是 Baldwin^[19]等研制的包括微型化高压电源和微型化电化学检测器

在内的芯片电化学检测系统，但是这个系统必须采用外置的数据采集卡进行信号的采集和高压继电器的控制，给操作带来不便。虽然这些电源是便携式的，但是其尺寸仍不能与微芯片尺寸相当。Collins^[20]等研制了一个微型化的单通道高压电源，其尺寸为载玻片大小，但却不能用于芯片电泳分离。并且，值得提出的是，所有的微型化高压电源都是基于电池供电，这无疑也不利于整个系统的微型化。

通用串行总线（USB）与计算机能进行高速可靠的通信，灵活的操作，同时能为外围设备提供电源，为芯片设备提供了一种更加灵活的选择。我们研制了基于 USB 接口的微型化高压电源系统，其尺寸为（4.7cm×5.6cm×2.5cm，长×宽×高）。我们采用了一些节电策略来适用 USB 供电的要求，这在便携式设备中尤为重要。基于节电的目的，我们的微型化高压电源采用两路高压电源和两路继电器，通过特殊设定的电泳运行模式，使其在能充分满足芯片电泳的需要下，最大可能地减小电源的消耗。采用荧光素钠作为标准品，采用激光诱导荧光检测的方式对基于 USB 的微型化高压电源进行了考察。我们设计的高压电源完全满足芯片电泳的需要，并且采用程控的高压电源在极低的分离电压下也能有效地抑制样品的泄漏。

2.2 实验材料和方法

2.2.1 化学试剂和电子元件

荧光素钠购于天津染料研究所（天津，中国），硼酸购于沈联化学试剂公司（沈阳，中国）。缓冲液均用二次蒸馏水配置。

高压电源所用的电子元件：单片机 C8051F350（Silicon Laboratories, Austin, Texas），USB 转串口芯片 CP2101（Silicon Laboratories, Austin, Texas），高压直流转换模块 DC-HVDC Q15-5 和 Q15-5（EMCO Highvoltage Corp.,

Sutter Creel, CA), 高电流运算放大器 (OPA) LMH6630 (National semiconductor Inc.), 八通道 12bits TLV5630 (Texas Instruments Inc.)。其他电子元件如电阻、电容、电位计等购于当地电子市场。

2.2.2 激光诱导荧光检测装置

采用实验室自制的单通道共聚焦激光诱导荧光检测^[21], 采用风冷的 10mW 半导体激光光源 (北京榜首科技, 北京), 发射的荧光被显微镜物镜收集, 聚焦到 400 μm 的针孔, 采用 520nm 的带通滤光片 (Omega Optical) 滤掉杂散光后被光电倍增管 (PMT, Model R212; Hamamatsu, Japan) 转换成电信号, 被数据采集控制板采集。荧光显微镜 (Axioskop 2; Zeiss, Jena, Germany) 配置 EMCCD (iXon87, Andor Technology, NorthernIreland) 用来记录荧光图象。

2.2.3 芯片的制备和电泳过程

实验采用实验室自制低荧光背景玻璃芯片。芯片通道宽 60 μm , 深 20 μm , 检测点位于进样交叉点后 15mm 处。每次运行依次用 1M 氢氧化钠 (5min) 和二次蒸馏水 (5min) 清洗后, 再用运行缓冲液清洗 2min。玻璃芯片置于荧光检测平台上, 与微型电源的电极插到玻璃芯片的相应缓冲液池中。样品进样过程中, 在样品池和样品废液池之间施加 -500V 电压, 缓冲液池和缓冲液废液池不施加电压。分离过程是在缓冲液池和缓冲液废液池之间立即施加相应的电压, 进行分离, 而样品池和样品废液池悬浮。在较低的分电压条件下, 分离的最初几秒钟, 样品池和样品废液池保持接触, 以避免样品泄漏到分离通道中。

2.2.4 软件

微型化高压电源采用 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 C8051F350 的闪存内。默认的 USB 输出 100mA 电流采用 CP210xSetIDs 改成 500mA，以满足高压电源对电源的需求。实验运行参数包括运行时间、高压值，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，可通过改程序的方式添加需要的步数）。实验参数在运行的同时通过 USB 口传递到单片机（C8051F350 内）。每步时间的控制精度为 1ms，因为整个电泳的分离时间很短，因此高精度的时间控制在电泳分离中尤为重要。整个实验运行完毕后，所有参数自动恢复为初始设置。此外，在实验过程中也可以随时通过屏幕上的“停止”按钮中断实验。

2.3 结果与讨论

2.3.1 微型化高压电源的设计与搭建

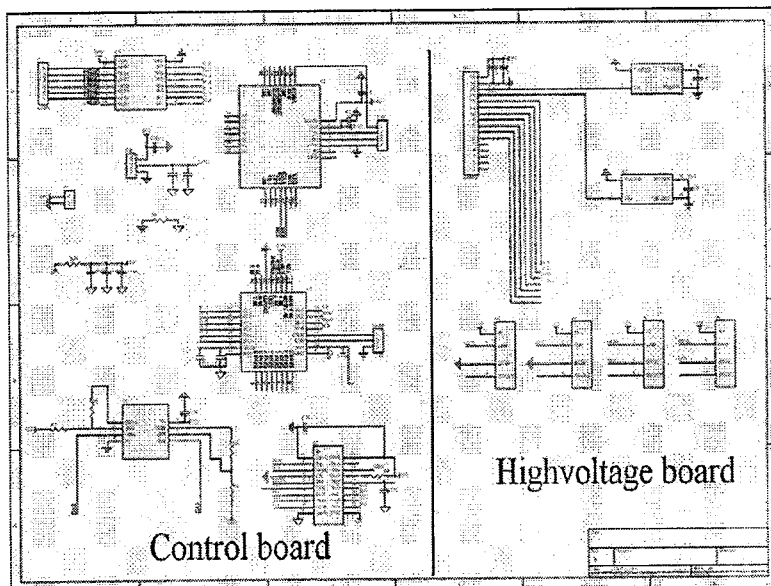


图 2-1 微型化高压电源原理图

Fig 2-1 Schematic of the mini-HVPS

我们研制的微型化高压电源尺寸为 $4.7 \times 5.6 \times 2.5 \text{cm}^3$ (长 \times 宽 \times 高), 原理图如图 2-1 所示。微型化高压电源实物图如图 2-2 所示, 整个芯片由两块独立的 $4.7 \times 5.6 \text{cm}^2$ 印刷电路板组成, 一块为控制板, 另一块为高压板, 以减小电泳过程中高压对控制板的影响。

控制板基于八位单片机 C8051F350, 系统时钟为 24M。这种单片机在 $12 \text{mm} \times 12 \text{mm}$ 体积下, 集成多种功能 (SPI, UART, AD 等), 大大缩小了控制板的尺寸。高度集成的 USB 转串口芯片 CP2101, 提供了简单的 USB 解决方案。TLV5630 中的两路 DA 用来实现高压控制信号到模拟信号的转化, LMH6672 用来控制来控制来控制和调节微型高压电源的输出。

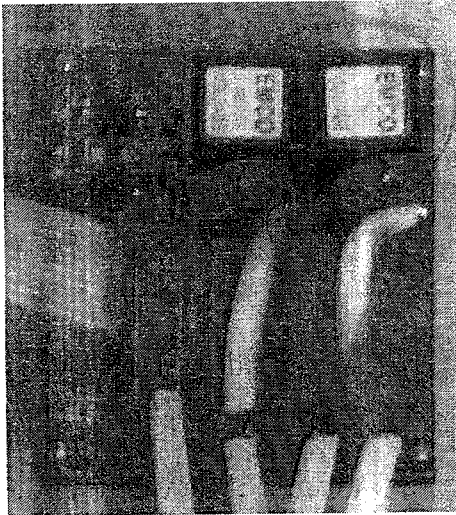


图 2-2 微型化高压电源实物图 (控制板位于高压板下面)

Fig 2-2 Picture of the mini-HVPS ($4.7 \times 5.6 \times 2.0 \text{cm}^3$, W \times L \times H) (control board is under the highvoltage board.).

高压板采用高压模块 Q15-5 和 Q15N-5 作为高压输出源。这些模块能提供 $250 \text{V} \sim 1500 \text{V}$ 的高压 (0.5W), 非常适宜于便携设备。由于高压模块输出的电压与输入的电压成线性关系, 因此我们选择高电流运放 LMH6672 作为 DA

输出缓冲，以使高压输出可调。LM2663 用来给 LMH6672 供电。整个微型化高压电源能提供 400~1500V 电压用于电泳分离，-400~1500V 电压用于进样，高压输出提供的最大电流为 300 μ A（1500V 下），而通常芯片电泳需要的最大电流为 100 μ A，因此能完全满足芯片电泳对高压电源的需求。微型化高压电源组成的芯片系统如图 2-3 所示。

USB 提供快速可靠的控制板与计算机的通信，同时可以为外围设备提供电源，这为仪器微型化带来了方便。USB 应用于微型化高压电源，为微型化芯片中外围设备的微型化提供了解决思路。在我们设计的微型化高压电源中，由于采用了 USB 接口，不仅减小了高压电源的体积，同时也能实现电源的即插即用，使实验操作，特别是现场或实时的操作更加方便。

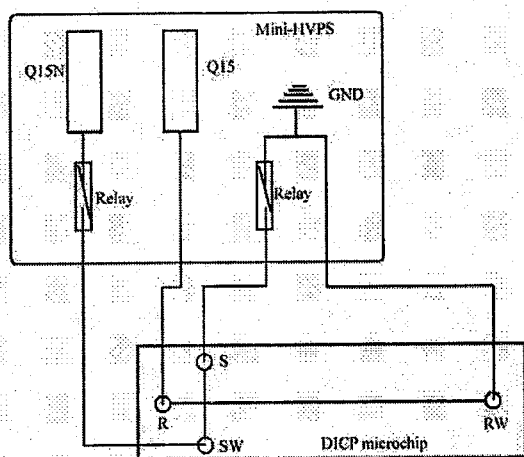


图 2-3 微型化高压电源芯片电泳系统

Fig 2-3 Schematic of the microchip electrophoresis system (S-sample reservoir; B-buffer reservoir; BW-buffer waste reservoir; SW-sample waste reservoir; Q15-positive highvoltage converter (Q15-5); Q15N-negative highvoltage converter (Q15N-5); GND-ground).

2.3.2 微型化高压电源的节电策略

对便携式系统或设备来说,由于电源系统所提供的电量有限,因此减小电源的消耗对于延长系统的应用时间尤为重要。因此在进行便携式设备的研究时必须采取相应的节电策略。

我们设计的高压电源由 USB 供电,而 USB 所提供的最大电源为 2.5W(5V, 500mA)。我们的微型化电源采用两种策略来减少高压电源的耗电量。一)选取能满足电泳分离需要的尽可能少的元器件,尤其是高耗电量的器件。在芯片电泳仪器高压电源所需的器件中,高压转换模块和继电器是耗电量最大的两种元件。在其他高压电源中,通常需要 4 个电源模块,每个模块采用至少一个继电器来实现电泳的进样和避免样品从样品池到分离通道的泄漏。这么多的高耗电量器件大大增加了电源的消耗,不适用于便携式设备。在我们研制的微型化高压电源中,只采用了两块高压电源模块(一块正高压模块,一块负高压模块)和两个继电器来实现芯片电泳必需的功能。如图 2-3 所示,负高压电源和地线分别通过继电器跟样品废液池与样品池相连,而正高压电源和另一路地线直接跟缓冲液和缓冲液废液池相连。这种构架极大地降低了微型化高压电源的耗电量。二)在芯片电泳分离的三个不同阶段:进样阶段、分离阶段、闲置阶段分别选用不同的运行模式,以达到节电的目的。进样阶段的时间最短,通常小于 30s,运行所需的元件有负高压电源、两个继电器和控制板上的元件;分离阶段是最耗时的阶段,也是芯片电泳中最耗电的部分,因此这一部分内没有使用耗电量高的继电器,只采用高压电源提供分离电压和控制相应的控制板部分的元件运行;闲置阶段,对芯片电泳来说没有贡献,但是不能忽略在这个阶段的耗电。在我们设计的微型化高压电源系统里,只有少数几个元件(CP2101, C8051F350 和 AS1117 及电阻等)保持运行状态,以等待接收从上位机传来的指令,这样便有效地降低了整个微型化高压电源的耗电总量。

2.3.3 微型化高压电源的性能考察

在芯片电泳中通常包括进样和分离两个步骤。在进样阶段，样品在电渗力的作用下从样品缓冲液池流出，经过十字交叉口到达样品废液池（样品流垂直于分离通道）；在分离阶段，电场力施加在分离通道上，将留在交叉口的样品形成一个区带，推向检测点。其中，形成稳定的样品区带和抑制样品泄漏是实现电泳分离功能的基本保证。

如上所述，我们研制的微型化高压电源出于节电的考虑仅使用了两个高压模块和两个继电器。我们采用荧光录像的方法证实，采用此简单的构造可以成功地实现芯片电泳的功能。

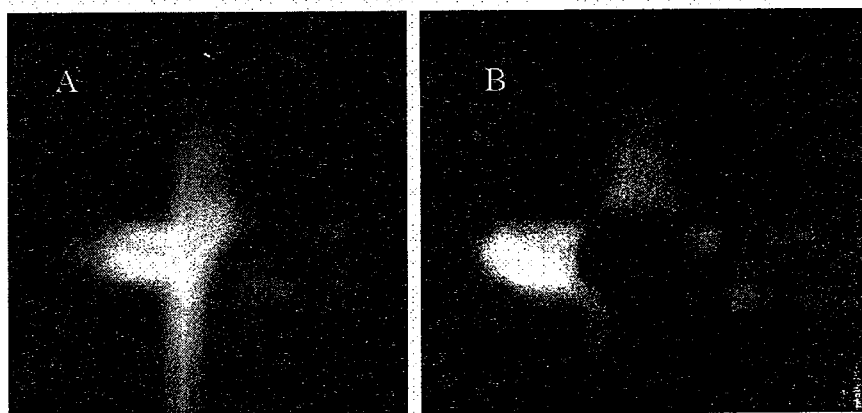


图 2-4 负压进样时，进样时和分离时的样品的区带

Fig. 2-4 The representative sample plug obtained by using LIF-CCD imaging: (A) Injection; (B) separation

在通常的进样模式中，样品区带决定于样品的进样模式，还与进样时间相关。但是如果夹流电压选择不合适的话，通常不能有效地抑制样品的泄漏。样品的区带和峰高随进样时间的增加而增加，不能形成稳定的进样区带。为了避免这种情况，必须进行大量的工作进行夹流电压的调节和选择，而通常的高压电源都需要 4 个高压电极。我们研制的微型化高压电源仅仅采用了两个高压模块，只提供两路高压输出。在进样过程中，只在样品池和样品废液

池两端施加负高压，而在正电压相连的液池不施加电压。这样当芯片尺寸和构架固定后，样品区带仅仅取决于所施加的电压，调节区带工作大大简化。实验结果证明这个区带虽然不如夹流进样的区带好（向缓冲液池方向偏移），如图 2-4 所示，但很稳定，并且仅仅通过改变施加到样品通道的负高压便可以实现。

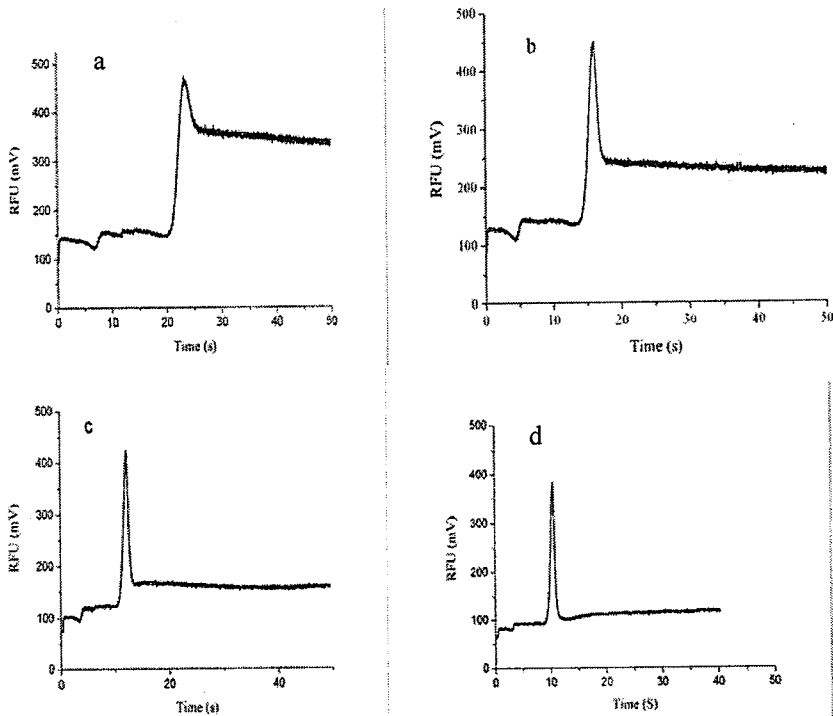


图 2-5 不同分离电压下样品的电泳图

Fig 2-5 Sample leakage at the separation potentials: a-500V (125V/cm), b-750V (187.5V/cm), c-1000V (250V/cm), d-1200V (300V/cm); Conditions: 10 mM boric acid buffer, pH 9.2.

样品泄漏是芯片电泳中必须解决的一个问题。在分离过程中，如果样品

和样品废液池保持悬空，而没有施加电压以拉回样品流的话，样品通常会由样品通道进入到分离通道中。从图 2-5 我们可以看出，样品的泄漏量受所施加分离电压的影响，在高分离电压下，样品泄漏较少，在 1.2kV、300V/cm 分离电压下，样品的泄漏可以被忽略。然而，在一定的情况下，也需要较低的分电压，这时必须采取有效的方法来解决样品的泄漏问题，且尽量不增加整个系统的功耗。为了解决低分离电压下样品的泄漏问题，我们采用了特殊的分离模式，即在分离进行的最初 5s 内，通过由计算机控制样品和样品废液池之间的电接触在样品通道上施加电压，将样品拉回，从而有效地避免样品从样品通道到分离通道的泄漏，实验结果如图 2-6 所示。通过与相同分离电压下得到的分离结果（图 2-5a, b）比较，可以明显看出这种分离模式的优势。在微型化化学或生物分离领域的分析过程中通常需要提供较低的电压，因此，采用我们设计的这种分离模式，避免样品从样品通道到分离通道的泄漏，对于提高分析结果的重现性具有重要的意义。

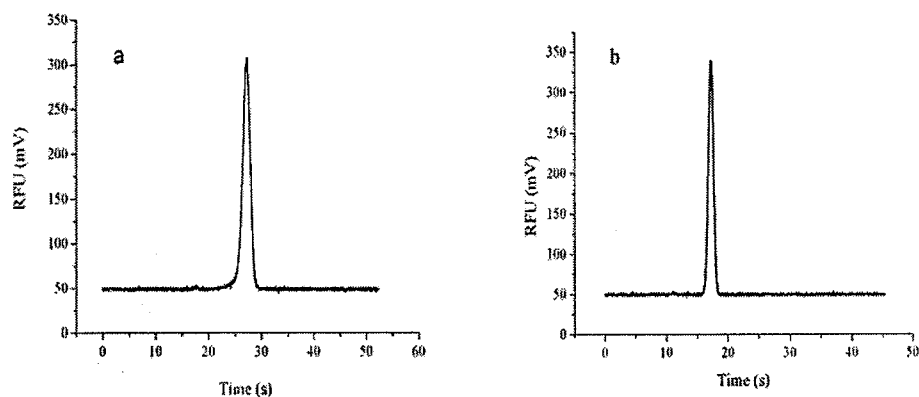


图2-6 低分离电压下样品泄露的抑制

Fig 2-6 Sample leakage avoidance at low separation potentials with 5s analyte drawback: a-500V (125V/cm); b-750V (187.5V/cm). Conditions: 10 mM boric acid buffer, pH 9.2.

2.4 小结

我们研制了基于 USB 接口的微型化高压电源设备, 电源尺寸为 $4.7 \times 5.6 \times 2.5 \text{ cm}^3$ 。该设备采用了 USB 进行与上位机的通讯, 同时实现由上位机供电, 从而极大地方便了系统的安装与使用, 并使其微型化, 适合于便携式和现场实时检测。采用两种策略来降低其耗电量: 1、在保证满足芯片电泳要求的前提下, 减少高耗电量元器件的使用 (仅仅采用了两个高压模块和继电器); 2、根据芯片电泳各个阶段的特点选择器件及其运行模式。采用激光诱导荧光检测方法对该高压电源进行性能考察, 实验结果表明该微型化高压电源能够方便地实现稳定的样品区带和有效地抑制样品的泄漏, 从而满足芯片电泳对高压电源的需求。基于 USB 接口的微型化高压电源的研制为全微型化芯片电泳分析系统提供了一种更好的电源选择。

参考文献

1. Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature* **2006**, 442, (7101), 368-373.
2. Vilkner, 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. Wang, J., Portable electrochemical systems. *Trac-Trends in Analytical*

- Chemistry* **2002**, 21, (4), 226-232.
6. Wang, J.; Pumera, M.; Chatrathi, M. P.; Escarpa, A.; Konrad, R.; Griebel, A.; Dorner, W.; Lowe, H., Towards disposable lab-on-a-chip: Poly(methylmethacrylate) microchip electrophoresis device with electrochemical detection. *Electrophoresis* **2002**, 23, (4), 596-601.
 7. Simpson, P. C.; Roach, D.; Woolley, A. T.; Thorsen, T.; Johnston, R.; Sensabaugh, G. F.; Mathies, R. A., High-throughput genetic analysis using microfabricated 96-sample capillary array electrophoresis microplates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95, (5), 2256-2261.
 8. Jacobson, S. C.; Hergenroder, R.; Koutny, L. B.; Ramsey, J. M., High-Speed Separations on a Microchip. *Analytical Chemistry* **1994**, 66, (7), 1114-1118.
 9. Schulze, P.; Ludwig, M.; Kohler, F.; Belder, D., Deep UV laser-induced fluorescence detection of unlabeled drugs and proteins in microchip electrophoresis. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, (5), 1325-1329.
 10. Kato, M.; Gyoten, Y.; Sakai-Kato, K.; Toyo'oka, T., Rapid analysis of amino acids in Japanese green tea by microchip electrophoresis using plastic microchip and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1013, (1-2), 183-189.
 11. Lacher, N. A.; de Rooij, N. F.; Verpoorte, E.; Lunte, S. M., Comparison of the performance characteristics of poly(dimethylsiloxane) and Pyrex microchip electrophoresis devices for peptide separations. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1004, (1-2), 225-235.
 12. Llopis, S. D.; Stryjewski, W.; Soper, S. A., Near-infrared time-resolved fluorescence lifetime determinations in poly(methylmethacrylate) microchip

- electrophoresis devices. *Electrophoresis* **2004**, 25, (21-22), 3810-3819.
13. Nagata, H.; Tabuchi, M.; Hirano, K.; Baba, Y., High-speed separation of proteins by microchip electrophoresis using a polyethylene glycol-coated plastic chip with a sodium dodecyl sulfate-linear polyacrylamide solution. *Electrophoresis* **2005**, 26, (14), 2687-2691.
 14. Chen, Y. H.; Chen, S. H., Analysis of DNA fragments by microchip electrophoresis fabricated on poly(methyl methacrylate) substrates using a wire-imprinting method. *Electrophoresis* **2000**, 21, (1), 165-170.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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-+.
 18. Garcia, C. D.; Liu, Y.; Anderson, P.; Henry, C. S., Versatile 3-channel high-voltage power supply for microchip capillary electrophoresis. *Lab on a Chip* **2003**, 3, (4), 324-328.
 19. 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.

20. Collins, G. E.; Wu, P.; Lu, Q.; Ramsey, J. D.; Bromund, R. H., Compact, high voltage power supply for the lab-on-a-chip. *Lab on a Chip* **2004**, 4, (4), 408-411.
21. Zhou, X. M.; Dai, Z. P.; Liu, X.; Luo, Y.; Wang, H.; Lin, B. C., Modification of a poly(methyl methacrylate) injection-molded microchip and its use for high performance analysis of DNA. *Journal of Separation Science* **2005**, 28, (3), 225-233.

第三章 基于 PDMS 微阀的微流控芯片的研制与性能考察

3.1 引言

过去十年里,微流控分析系统从最初的简单单通道芯片电泳分析芯片^[1],发展成能进行各种复杂分析和多种单元操作的复杂分析系统^[2-4]。微流控分析的目标是在几平方厘米的芯片上,经济、快速地完成合成、纯化、分析和诊断等全部过程。由于这些器件通常处理的溶液体积在纳升量级^[5],因此需要精确、可靠的流体操作和控制机制,同时能够实现在芯片上的大规模集成。

在众多的流体操作和控制方法中^[6-9],微泵/微阀占有重要地位^[10]。当前最重要的一种微泵/微阀是 Quake^[9] 课题组发明的基于多层软光刻工艺制备的 PDMS 弹性微阀/微泵。在这种构架中,流体通道处于下层 PDMS 中,气体控制通路处于上层 PDMS 中。这种阀在没有外力的作用下处于常开状态,所以称为“常开阀”。这种常开阀已经被证实在细菌培养、生物化学等领域具有很高的应用价值,并且容易实现大规模集成^[11]。尽管如此,正如他们在文章中提到的,这种构架的微阀受制于通道的尺寸和形状,并且制备过程周期长而复杂。在他们最近的工作中,他们又研制了低制动压力、深宽比较大的微阀^[12]。

Mathies^[8]及其合作者发明了另一种重要微泵和微阀,称之为常闭阀,这种阀是通过在分别刻有微流体通道和气路控制通道的两片玻璃之间夹一层薄的 PDMS 薄膜来实现的。这种常闭阀由于良好的密封性能已经在芯片 PCR 反应^[13, 14]和芯片中集成微进样泵^[15]等方面得到应用。虽然三明治构架的微泵封接相对简单,但是玻璃上的微流体通道和控制气路的通道均需采用传统的光刻和湿法蚀刻工艺制成。这些成型的玻璃经洗涤、处理以后可以重复利用,并且中间的 PDMS 薄膜也可以方便地更换,从而能够实现芯片的快速、低成本制备,这对实验室里的研究工作来说是可行的,甚至是很有利的,但这也仅限

于实验室中的工作；若从芯片的商品化批量制备以及微流控芯片的大规模应用前景看，目前的这种常闭阀构架无论从制备成本还是制备工艺上均是不利的。

本工作中，我们通过对目前常闭阀构架的改进，大大简化了常闭微阀/泵的制备工艺，降低了微流控芯片的制备成本。与目前常闭阀不同的是，在我们所设计的常闭阀中，流体通道和气路控制通道不是刻蚀在上下玻璃片上，而是分别成型于中间 PDMS 薄膜的两面，而两片玻璃上则分别只含有样品池和气路控制孔。其中，PDMS 薄膜可以用同一模板重复制备，而玻璃只需要简单的钻孔，从而最大程度地减少了芯片制备过程中复杂、高成本的模板制备步骤。此外，我们通过在 PDMS 薄膜上预留气体出口大大提高了芯片制备的成功率。我们从控制微阀所需的压力以及泵速和阀制动时间之间的关系等方面对所制备的微泵/微阀进行了性能考察；同时制备了化学和生物相容性高的四层微流控芯片，与文献报道的四层芯片相比能大大降低微泵的死体积。

3.2 实验材料和方法

3.2.1 试剂与材料

玻璃片 (63 mm×63 mm×1.2mm) 购于长沙韶光微电子厂 (韶光, 湖南): 一种带有铬和光刻胶涂层, 用来做模具, 没有带涂层的抛光玻璃片用来作芯片盖片。PDMS (Sylgard 184) 购于美国道康宁公司 (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)。

3.2.2 芯片制备

采用 CAD 软件 (Freehand 10.0 Macromedia, San Francisco, CA) 分别设计 150 μ m 宽微流控通道和 300 μ m 宽的带有的圆形阀座 (直径分别为 3.5mm、3.0mm、2.5mm 和 2.0mm) 的阀控制线。5000 dpi 的商用高分辨激光

照排机用于输出透明胶片。胶片输出时设计线为黑色，背景空白。透明胶片用来做光刻的掩模。掩模上的图形经紫外线照射转移到光刻胶上，光刻胶显影，去除铬层后，在搅拌、稀释的 HF/NH₄F 池（温度约为 4℃）内进行湿法蚀刻，制备出用于制备 PDMS 的模具。微流控通道模具中微流控通道为 100μm 宽、25μm 高；气路控制模具中控制线为 140μm 宽、80μm 高。制备芯片前，模具置于 TMSCl 蒸气中 2-3min，使玻璃表面烷基化，以利于 PDMS 膜成型后的剥离。

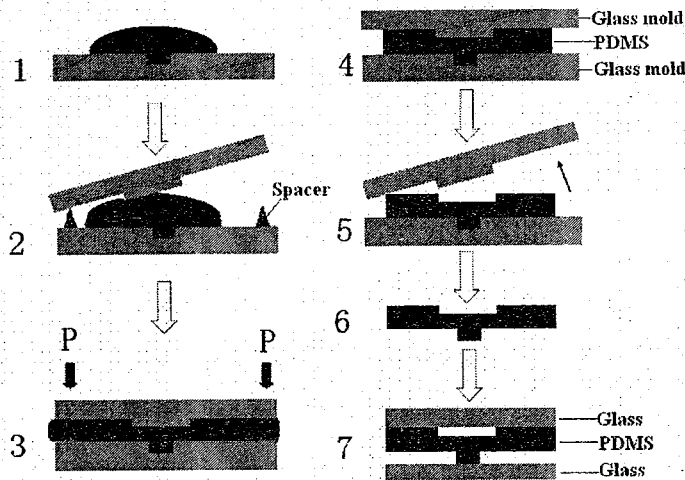


图 3-1 常闭微阀制备工艺流程

Fig 3-1 Schematic procedure for the fabrication of a normally-closed microvalve. 1. The degassed PDMS prepolymer mixture (10:1 of PDMS prepolymer and curing agent) was poured onto the mold containing microfluidic channels; 2. The mixture was covered with the mold containing valve controlling lines; 3. The mold position was adjusted with help of a microscopy and uniform pressure (P) was given on the upper layer to form the PDMS membrane with the thickness determined by the plastic spacers at the corners of the bottom layer; 4. The upholders were

taken away after the PDMS prepolymer was cured at 80 °C for 1 h; 5-6. The PDMS replica containing negative reliefs of microfluidic channels and valve controlling lines on its either side was peeled away from the molds; 7. The PDMS replica was spread on a polished glass slide with the corresponding drilled holes (for reservoirs) and was then covered with the other one with holes for valve controlling lines.

常闭微阀的制备和封接工艺如图 3-1 所示。采用这种方法，制备了三层微流控芯片，芯片具有夹心结构，如图 3-2A 所示：中间层为一两面分别有微流控通道和气体控制流路的 PDMS 薄膜，上下两片抛光玻璃上分别带有样品池和气路控制出口。

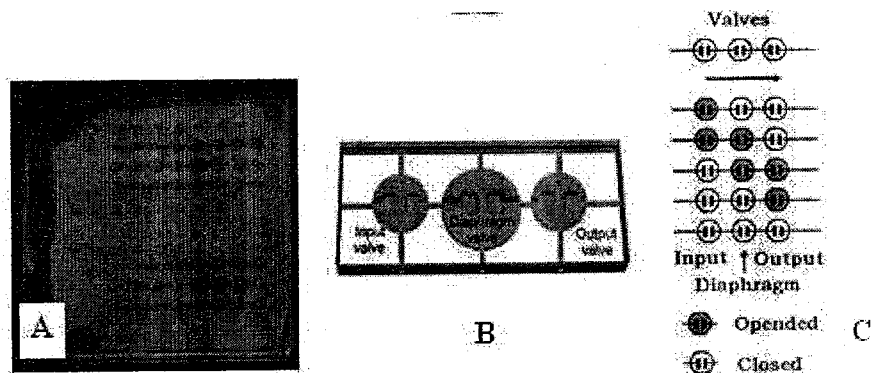


图 3-2 (A) 基于三层微阀的微流控芯片实物图；(B) 微泵示意图；(C) 五步隔膜泵运行示意图

Fig 3-2 (A) A three-layer microvalves based microfluidic device containing 42 valves configured to form 14 different pumps (the arrays of white lines is the air outlets for easy sealing); (B) An illustration pump formed by three valves in series (input valve, diaphragm valve and output valve); (C) Illustration of the five steps in the diaphragm pump cycle.

3.2.3 操作和表征

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）。通过外接的 24V 电磁阀和相应的阀座（Parker Pneumatic, Richland, MI, USA）来实施对气路控制线的控制，从而控制芯片上的微阀。自制的控制板和采用 VC++ 编译的 Windows 上位机程序用来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。

三个微阀依次排列便形成一个隔膜泵（如图 3-2B 所示）。图 3-2A 所示芯片中含有 42 个微阀（14 个隔膜泵），通过每个泵的输入阀、输出阀和隔膜阀的开启来实现流体的输运，具体的运行步骤如图 3-2C 所示。我们以二次蒸馏水为测试流体做了一系列实验，用来表征泵速和阀制动时间之间的关系，测试过程中输入阀、输出阀和隔膜阀的制动时间是相同的。

4.3 结果与讨论

3.3.1 制备工艺的简化

我们设计的这种基于微泵/阀的微流控芯片具有制备工艺简单、制备周期短、制备成本低廉的显著特点。芯片设计的亮点在于两面分别含有微流体通道和气路控制通道的 PDMS 中间薄膜层。在由 Mathies 等人提出的常闭微阀中，微流控通道与气路控制通道分别刻在上下两片玻璃上，中间为 PDMS 薄膜层。其中，刻有通道的玻璃必须采用光刻和湿法蚀刻制备，并且每制备一个芯片就必须重复这一复杂的步骤。我们所设计的常闭微阀虽然也采用夹心构型，但显著的不同点在于我们将微流控通道和气路控制线分别制备于中间的 PDMS 薄膜层两面，而玻璃盖片仅仅钻有样品孔或气路控制连接孔。虽然我们所需的 PDMS 模板也是采用光刻和湿法蚀刻工艺制备而成，但是该模板可以反复使用，利用同一模板可以制备大量的 PDMS 薄膜以及芯片，从而最大程度地

减少了光刻和湿法蚀刻过程。众所周知，光刻和湿法蚀刻是芯片制备过程中耗时、费力的工艺步骤，也是产品成本的主要构成部分之一。因此，采用我们设计的常闭阀构型，芯片制备工艺大大简化，制备周期缩短，制备成本降低，这对于微流控芯片的工业化大规模生产及其广泛应用具有重要的实际意义。

封接是制备玻璃芯片或 PDMS 芯片的光键技术之一，简单和高质量的封接意味着减少封接时间、降低制备成本，并有助于获得好的分析结果。我们提出了一种简单而巧妙的微流控芯片封接方法。为了比较封接效果，我们制备了两块芯片。这两块芯片均由两片玻璃之间夹一层 $300\mu\text{m}$ 厚两面分别含有微通道和气路控制通道的 PDMS 薄膜构成。两者的不同在于一片 PDMS 上预留有微小的气路通道，而另一片 PDMS 完整。当 PDMS 和玻璃进行封接时，第一个芯片上气体可以很容易地由预留的气路通道排出，封接成功率高达 100%。而没有气体通道时，封接时气体排出比较困难，很难实现 PDMS 和玻璃的完全闭合。

3.3.2 微阀和微泵的性能考察

微阀正常制动所需要的力取决于中间 PDMS 薄膜在阀座位置处的厚度 (t_v)，厚度越小，制动力越小。如图 3-3 所示，阀座位置 PDMS 的厚度 t_v 等于整个 PDMS 薄膜的厚度 (t_0) 减去阀控制线的高度 (h_{vc1})。 t_0 决定于 PDMS 薄膜制备时塑料隔片的高度， h_{vc1} 由模具所决定。这样不同厚度的 t_v 能够通过更换 PDMS 薄膜制备时塑料隔片的高度来得到。我们做了系列实验用来测定不同 t_v 时所需要的最小制动力。结果表明 $t_v=200\mu\text{m}$ 时， 10kPa 压力能保持微阀的完全闭合， -40kPa 的真空能使阀完全打开。而当 $t_v=100\mu\text{m}$ 时， 仅需 -10kPa 的真空便能使阀完全打开。图 3-3 是阀开启和关闭的实时图象。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。

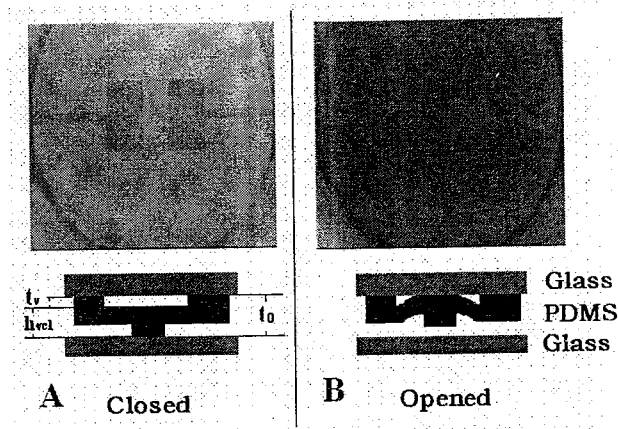


图 3-3 微阀开启和关闭实时图像和示意图

Fig 3-3 Illustration and in-situ images of the valve at closed (A) and opened status (B); t_0 -total PDMS thickness, t_v -PDMS thickness for the valve, h_{val} -height of the valve controlling line.

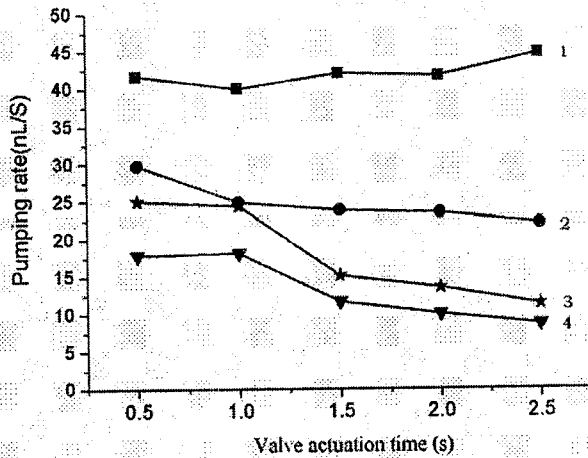


图 3-4 微泵流速与阀制动时间关系图

Fig 3-4 Dependence of the pumping rate on the valve actuation time using Di water as the test liquid for the micropumps with

diaphragm valve diameter of 3.5mm (pump 1), 3mm (pump 2), 2.5mm (pump 3) and 2mm (pump 4).

采用二次蒸馏水作为测试液体测定了微泵流速与阀制动时间的关系,如图 3-4 所示。测试的微泵构型如下:输入和输出阀具有相同的尺寸(阀座直径为 1.5mm),隔膜阀的尺寸(阀座的直径)分别为 3.5mm、3.0mm、2.5mm 和 2.0mm。结果表明,相同制动时间下,较大体积的隔膜泵池能得到较大的泵流速。另外在我们测试的阀制动时间范围内,泵 1 和泵 2 随阀制动时间的变化,流速变化不大,而泵 3 和泵 4 在阀制动时间为 0.5s 和 1s 时,泵速变化很小,当阀的制动时间继续增大时泵速随制动时间的增加而减小。对于某一泵来说,泵速(每秒输送的液体的量)决定于相应阀的制动状态,而阀的制动状态决定于阀的制动时间。对具有较大隔膜阀室体积的泵 1 和泵 2 来说,测试的制动时间短(0.5~2.5s),不足以使隔膜阀完全关闭和开启,因此每次泵输送的液体量随阀制动时间的增加而增加,同时由于阀制动时间增加后,在单位时间内制动的总响应次数减少,因此在泵速上变化不大。这也同样是泵 3 和泵 4 在阀制动时间为 0.5s 和 1.0s 时泵速保持相对稳定的原因。在较长的制动时间内,泵 3 和泵 4 的泵速随制动时间的增加而减小。这表明当制动时间大于 1.5s 时,泵 3 和泵 4 中的隔膜阀完全关闭或开启,每次运行输送恒定量的液体,因此泵的流速随阀制动时间的增加而减小。

在常闭微泵实验中,通常采用两种液体注入模式。一种是将所有的微阀打开,在外部压力的作用下泵入液体同时排除通道内的气体。这种模式操作比较复杂,同时也不适合于基于常闭微阀的复杂芯片系统。另一种是在微泵的驱动下实现样品的注入和空气的排出,这种液体注入模式由于操作容易而得到普遍采用,但是在实验中我们经常发现在微阀的位置会残存有气泡。这些气泡如果不去除的话,会影响泵运输液体的体积,甚至会造成电泳分离等

实验的失败。我们利用 PDMS 薄膜本身具有的透气性来去除残存于微阀处的气泡：当液体通过微泵泵入到微通道中后，保持负压使微阀开启直到气泡穿过 PDMS 膜消失。我们采用 CCD 实时监测了气泡的去除过程。图 3-5 是每隔 20s 记录的图像。我们可以看出大气泡在 100s 内可以完全消除掉，而绝大部分气泡的消除时间小于 60s。

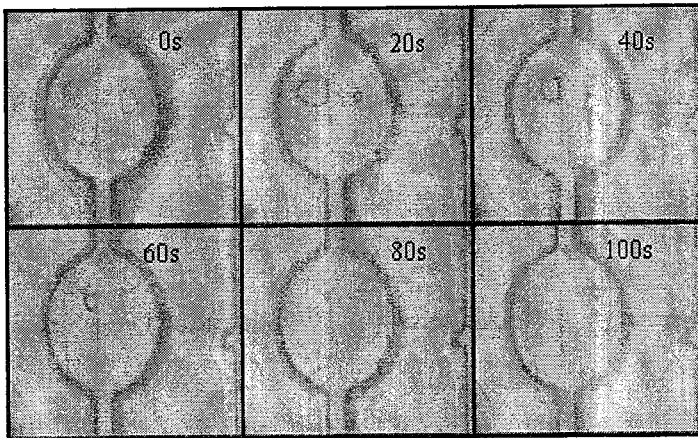


图 3-5 CCD 监测气泡去除过程

Fig 3-5 The CCD camera recorded typical in-situ status of one big air bubble being ejected with interval time of 20 seconds.

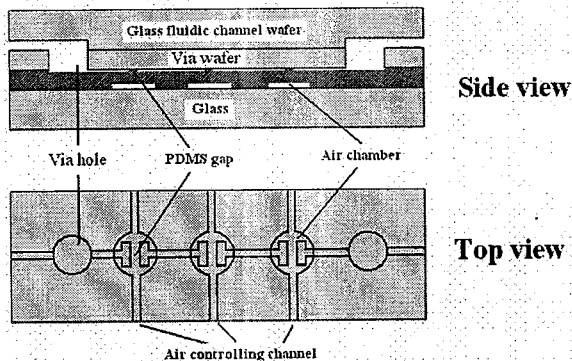


图 3-6 四层微泵示意图

Fig 3-6 A four-layer micropump illustration in side view and top view with

channel gaps and air chambers patterned on either side of the PDMS membrane and with two via holes for each pump.

四层微泵由 Mathies 等首先提出, 这种微泵由含有通道的玻璃芯片、刻有气路和气室的玻璃盖片以及 PDMS 薄膜组成。每一个阀包括两个过孔, 因此在他们提出的四层芯片构架中, 构成一个微泵需要六个过孔。图 3-6 是我们设计、制备的四层微泵构型示意图。由于通道的隔断和气室形成于 PDMS 薄膜两面, 而非蚀刻于玻璃上, 因此设计和制作四层芯片同制备三层芯片的过程很类似。在该芯片构架中, 因为芯片隔断是由 PDMS 构成, 因此仅仅需要两个过孔。由于过孔的死体积是微泵死体积的主要组成部分, 因此我们通过减小过孔个数大大降低了微泵的死体积; 由于同样的原因, 实验过程中液体和 PDMS 的接触面积也减小, 从而提高了芯片的化学和生物相容性。

3.4 小结

本章我们讨论了一种改进的, 更容易实现的微流控芯片中 PDMS 微泵微阀的制备工艺。这种芯片由一片两面分别有微流控通道和气路控制通道的 PDMS 薄膜置于仅仅钻有液体储液池和气路控制孔的两片玻璃构成。这种两面有通道的 PDMS 薄片可以用相同的模板重复制备, 而玻璃只是简单的钻孔。通过在 PDMS 薄片上的气体通路, 可以很容易的实现芯片的封接。采用 PDMS 自身的通透性, 提出了一种简单有效的驱除微阀处残存的气泡的方法。四层构架的芯片能大大降低微流控芯片的死体积, 同时提高芯片的化学和生物相容性。考察了微泵流速与微阀制动时间的关系, 相同微阀制动时间的条件下, 较大隔膜泵池的体积, 能得到较大的泵流速。微阀制动所需要的力决定于阀座位置中间 PDMS 薄膜的厚度。结果表明 $t_v=200\mu\text{m}$ 时, 10kPa 压力能保持微阀的完全闭合, -40kPa 的真空能使阀完全打开。而当 $t_v=100\mu\text{m}$ 时, 仅需-10kPa 的