

3.2 实验部分

3.2.1 装置搭建

根据激光共聚焦原理，自行设计并建立了一个脉冲式激光诱导荧光微流控芯片共聚焦检测装置，其原理如图 3-1 所示。以 Nd-YAG（美国 Spectral Physics 公司，DCR-2）泵谱染料激光器（美国 Spectral Physics 公司，PDL-2）发出的脉冲激光（10 Hz，480 nm，10 ns 脉宽）为激发光源，首先通过一组凸透镜和凹透镜将激光整理为一束光斑较小的平行光，该平行光经过一系列棱镜反射到分束片（480 nm 以下透过，510 nm 以上反射）上，然后经分束片透过到达聚焦透镜组，最终经透镜组聚焦在微流控芯片分离微通道的某一点上。分离微通道内样品所发出的荧光由同一聚焦透镜组收集，经半反半透镜反射和透镜聚焦后，再通过空间滤波器（直径约为 0.5 mm 的圆孔）和单色滤光片（527 nm ± 15 nm，上海光学厂）滤掉杂散光，最终进入光电倍增管（PMT）中。信号由取样积分器（美国 EG&G 公司，4121b）采集，经 12 位 AD 转换进入计算机。HW341A（自行研制的激光实验控制系统）可对激光器、平均器、AD 转换等完成触发、延迟、信号采集及数据处理等多种功能。

3.2.2 试剂与样品

三羟甲基氨基甲烷（Tris，国产分装）；硼酸和硼砂为开原化学试剂厂产品；EDTA 为长春化学试剂厂产品；6-羧基荧光素（6-Carboxyfluorescein, 6-FAM）、荧光素异硫氰酸酯（Fluorescein 5-isothiocyanate, 5-FITC）、以及十二烷基硫酸钠（SDS）均购自美国 Sigma 公司；环糊精（ α -CD, β -CD, γ -CD）购自匈牙利 Wacker Chemie 公司；羟丙基甲基纤维素（HPMC，2%水溶液在 25℃时的粘度为 4000 帕/秒）、聚环氧乙烷（Poly(ethylene Oxide), PEO）均购自美国 Aldrich 公司；氨基酸标准品由德国 Tuebingen 大学提供，其余试剂均为分析纯。

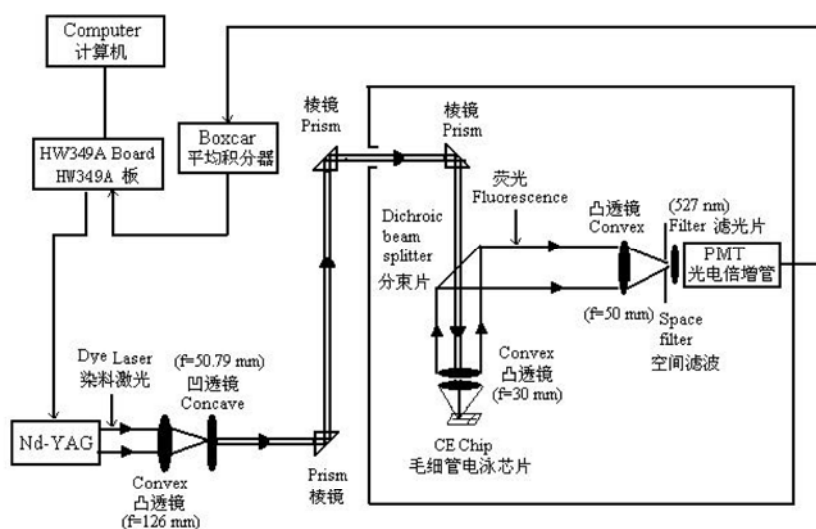


图 3-1 脉冲式激光诱导荧光微流控芯片共聚焦检测装置原理图

Fig 3-1. Schematic diagram of pulsed-laser-excited confocal fluorescence microfluidic device.

3.2.3 样品衍生

氨基酸标准品用 10 mmol/L、pH 10.0 的硼砂缓冲液配制成 10 mmol/L 的溶液。FITC 溶于丙酮，浓度为 10 mmol/L（在溶液中加入一滴吡啶），取 80 μL 的氨基酸溶液与 20 μL 的 FITC 溶液混合，放置于暗处室温下反应过夜。电泳前将样品用分离缓冲液稀释至所需浓度。

3.2.4 微流控芯片及电泳分析条件

实验中所用的芯片 1 由上海冶金所提供，芯片 2 购自 AMC (Edmonton, Alberta, Canada)，结构如图 2 所示，二者均为十字交叉结构，其中孔 1 是缓冲液池，孔 2 是样品池，孔 3 是样品废液池，孔 4 是分离废液池。芯片 1 的分离通道长 4 cm（从缓冲液池至十字交叉处为 0.5 cm，从十字交叉处至分离废液池为 3.5 cm），进样通道长 1.0 cm（从样品池至十字交叉处，及从十字交叉处至样品废液池均为 0.5 cm），通道的横截面近似为等腰梯形（上宽为 50 μm ，下宽为 30 μm ，深为 10 μm ），检测距离为 2.2 cm。芯片 2 的分离通道长 8.5 cm（从缓冲液池至十字交叉处为 0.5 cm，从十字交叉处至分离废液池为 8.0 cm），进样通

道长为 0.8cm (从样品池至十字交叉处, 及从十字交叉处至样品废液池均为 0.4 cm), 通道的横截面近似为半椭圆形 (上宽 50 μm , 深 20 μm), 检测距离为 5.0 cm。实验中采用“收缩进样”(Pinched loading)的方式, 进样和分离时各储液池所加的电压如表 1 所示。

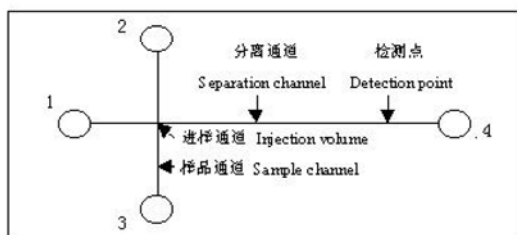


图 3-2 微流控芯片结构示意图

Fig 3-2. Layout of microchip used in this work.

表 3-1 进样和分离时芯片上各储液池所加电压

Table 3-1 Applied injection and separation voltages

缓冲池	1	2	3	4
微流控芯片 1				
进样电压 (V)	60	0	400	100
分离电压 (V)	0	500	500	1600
微流控芯片 2 (以氨基酸为分离对象)				
进样电压 (V)	350	500	0	800
分离电压 (V)	2550	1600	1600	0
微流控芯片 2 (以氨基酸对映体为分离对象)				
进样电压 (V)	240	360	0	1300
分离电压 (V)	1850	1400	1400	0

以芯片 1 为操作平台, 以 6-FAM 为样品, 样品先用甲醇溶解, 再用缓冲液 1×TBE (100 mmol/L Tris/100 mmol/L borate, 2 mmol/L EDTA, pH 7.5) 稀释至所需浓度 (约 5×10^{-4} mol/L)。进样和分离时各储液池的电压如表 1 所示, 进样时间为 40 s, 分离场强为 350 V/cm, 检测点距十字交叉处 2.2 cm, 整个分析过

程在 30s 内即可完成。

以芯片 2 为操作平台,以 FITC 标记的赖氨酸(Lysine, L)、组氨酸(Histidine, H)及丙氨酸(Alanine, A)为分析对象,运行缓冲液为 4 mmol/L, pH 10.0 的硼砂溶液,进样和分离时各储液池的电压如表 1 所示,进样时间为 20 s,分离场强为 230 V/cm,检测点距十字交叉处 5 cm,采用 CZE(毛细管区带电泳)分离模式,在 2 min 内 3 种氨基酸得到了基线分离。

以芯片 2 为操作平台,以 FITC 标记的 DL-赖氨酸(Lysine, DL-Lys)、DL-组氨酸(Histidine, DL-His)、DL-丙氨酸(Alanine, DL-Ala)为对象,样品的最终浓度约为 2.5 mM。运行缓冲液为 10 mM, pH 10.0 的硼砂溶液,其中含有 30 mM SDS 和 5 mM γ -CD。进样和分离时各储液池的电压如表 1 所示,检测点距十字交叉处 5 cm,采用 CD-SDS-MEKC 体系,对三对氨基酸对映体进行了手性拆分。

3.3 结果与讨论

3.3.1 脉冲式激光诱导荧光微流控芯片装置的建立

Nd-YAG 泵浦的脉冲染料激光器所发出的脉冲激光峰值功率较高,需经衰减片衰减后才能用于微流控芯片的检测,否则将出现荧光漂白现象。脉冲激光经过一系列棱镜反射、分束片(480 nm 以下透过,510 nm 以上反射)透过、透镜组聚焦后到达微流控芯片分离微通道检测点上,聚焦后的光斑直径仍约为 0.2 mm,光斑较大,这会在一定程度上增加噪声水平。激光能量经衰减后最终约为 5 mW。分离微通道内样品所发出的荧光沿原路返回,经半反半透镜反射后,再进入光电倍增管(PMT)中。采用空间滤波器(直径约为 0.5 mm 的圆孔)和单色滤光片(527 nm \pm 15 nm,上海光学厂)来滤掉部分杂散光,信号由取样积分器(美国 EG&G 公司,4121b)采集,通过控制取样门宽和时间来降低激光和杂散光的干扰,信号经 12 位 AD 转换进入计算机。通过自行研制的激光实验控制系统(HW341A)可对激光器、平均器、AD 转换等完成触发、延迟、信号采集及数据处理等多种功能。高压部分包括两个常规高压电源,通过一个简单的开关装置来手动控制芯片电泳分析中所施加的电压,手动操作会在一定程度

上导致电压施加不同步，增加了人为干扰因素。

3.3.2 微流控芯片的伏安特性

在传统的毛细管电泳中，电流通过电泳缓冲液时，分离通道内所产生的焦耳热是影响其实现快速和高效分离的主要制约因素^[8]。在微流控芯片电泳分析中，微通道的横截面一般为近似矩形或梯形。Fan 等人^[3]证实矩形通道具有更好的能量分散效果，对表面比率 $\alpha = 7$ 的通道而言，最大能量分散所需的功率密度约为 2.5 W/m^2 。本实验中，以 $1 \times \text{TBE}$ 为电泳缓冲液，测得芯片 1 的功率密度约为 0.90 W/m^2 ，芯片 2 的功率密度约为 1.85 W/m^2 ，与没有散热装置的传统毛细管电泳（功率密度约 1 W/m^2 ）相当（芯片 1），甚至更好一些（芯片 2）。从图 3-3 中可以看出，当场强小于 600 V/cm 时，两个芯片所产生的焦耳热都很小，分离通道内的温差影响可以忽略，而即使对传统毛细管电泳而言， 600 V/cm 也是一个不低的值。因为芯片分离通道一般仅为几厘米，较传统毛细管电泳的几十厘米要短得多，因此在同样的电场强度下，芯片毛细管电泳所需的电压要比传统毛细管电泳低得多，消除了许多操作隐患。

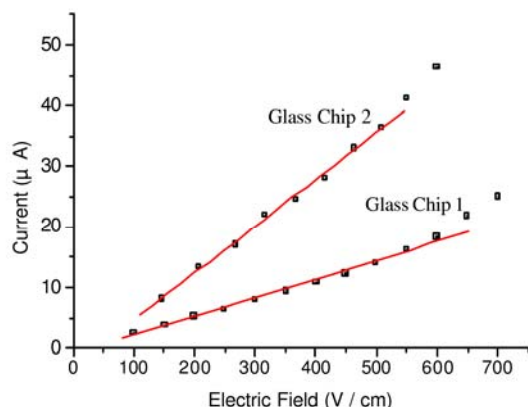


图 3-3 芯片电泳分离通道中电流与电场强度的关系。

Fig. 3-3 Electric current in separation channel measured as a function of

3.3.3 抑制电压和延迟时间的影响

最早的微流控芯片结构比较简单，为十字交叉型结构，进样时样品首先充满整个进样微通道，然后再进入分离微通道内进行电泳分离，这样的结构就使得不仅十字交叉处的样品可以进入分离微通道内，样品微通道内的其余样品也

有可能渗漏到分离微通道中。为了抑制样品的渗漏，通常需要在分离时在进样通道两端加上一定的电压（也称抑制电压，Countervoltage），如图 3-4 所示。如果电压为手动控制，则在分离时抑制电压相对于分离电压会有一个时间上的滞后，这一时间滞后就称为延迟时间。图 3-5 是微流控芯片上延迟时间对柱效的影响，从图中可以看出，随着延迟时间的增加，柱效显著降低，这说明抑制电压可以较好的控制样品区带形状，避免了进样微通道内样品向分离微通道内渗漏，因此应尽可能使得抑制电压与分离电压作用同步。图 3-6 为抑制电压对氨基酸分离的影响，此时延迟时间近似为零秒，分离电压保持不变（2550 V）。从图中可以看出，随着抑制电压的增加，进入分离通道的样品量有所增加。不难理解，随着抑制电压的进一步增加，当抑制电压小于十字交叉处的电压（ V_0 ）时，样品就会不断渗漏到分离通道中，造成进样连续化。实验中发现随着抑制电压的进一步升高，整个电路的绝缘性难以保证，发生了打火现象，因此没有作进一步增加抑制电压的尝试。

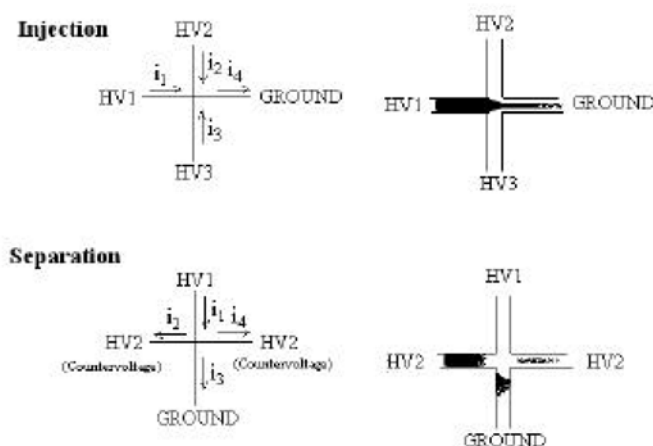


图 3-4 微流控芯片中进样和分离示意图

Fig. 3-4 Illustration of injection and separation on microchip

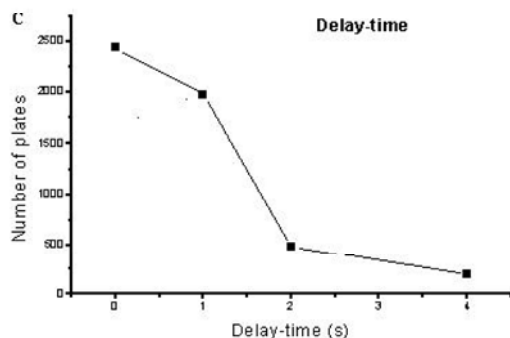


图 3-5 芯片毛细管电泳中 6-FAM 与延迟时间的关系

Fig. 3-5 The plate number of 6-FAM as a function of delay-time on glass microchip.

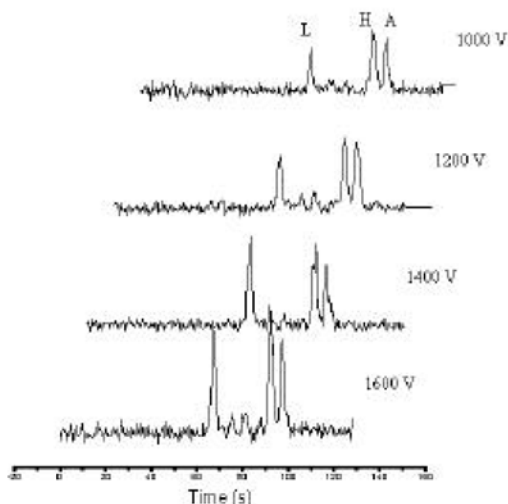


图 3-6 抑制电压对氨基酸分离的影响

Fig. 3-6 Effect of countervoltage on amino acids separation in microchip.

3.3.4 进样方式的影响

在简单的微流控芯片中，进样区域就是分离微通道和进样微通道的交叉处，其进样方式与传统的毛细管电泳有一定的差别。在微流控芯片的电泳分析中，绝大多数采用电动进样，也有极个别采用压力进样^[9]，电动进样又分为“悬浮进样”（Floating injection mode）和“收缩进样”（Pinched injection mode）^[12]。

悬浮进样是进样时在样品池加上一定的电压，样品废液池接地，同时缓冲液池和分离废液池保持悬浮状态 (Floating)。收缩进样则是进样时在样品池、缓冲液池和分离废液池上均施加一定的电压，样品废液池接地，以便控制进样时样品区带的形状。不同进样方式的示意图及其对氨基酸分离的影响分别如图 3-7A 和 B 所示。随着进样时间的延长，悬浮方式进样易造成区带展宽，柱效下降，而对收缩进样方式而言，随着进样时间的延长，柱效并没有多大变化，从而说明收缩进样可以较好的抑制交叉处样品区带的扩散，从而减小谱带展宽。

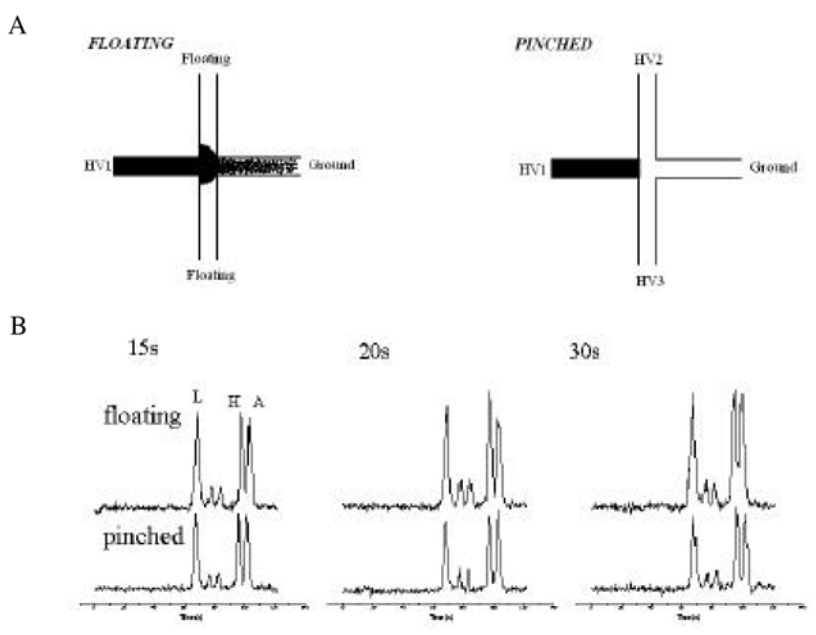


图 3-7 A) 芯片毛细管上的不同进样方式; B) 及其对氨基酸分离的影响
Fig. 3-7 A) Different sample loading mode on microchip; B) and it's effect on amino acids separation

3.3.5 检测窗口的影响

微流控芯片一般采用玻璃或石英等透光性较好的材料，与传统毛细管电泳只有一个检测窗口不同，理论上芯片分离通道的任一点都可以作为检测窗口。图 8 为激光斑点聚焦在芯片分离通道不同位置(距交叉点分别为 3.5 cm, 5.0 cm, 6.5 cm) 时得到的氨基酸分离谱图。从图 8 可以看出，随着分离距离和迁移时间的增加，组氨酸和丙氨酸的分离逐渐得到提高，达到了基线分离。虽然结果与

传统毛细管电泳类同，但芯片却可以实时观察组分分离的全过程，从而为分离条件的优化提供了便利。

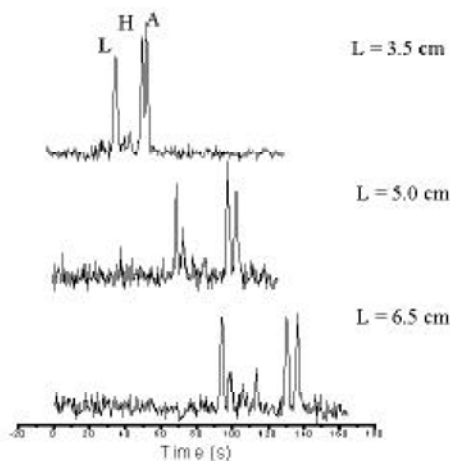


图 3-8 在不同检测点的氨基酸分离谱图

Fig. 3-8 Electropherograms of amino acids at different detection points.

3.3.6 氨基酸对映体的手性拆分

采用 CD-SDS-MEKC 体系，以 FITC 标记的 DL-Lys、DL-His 和 DL-Ala 为样品，对三种氨基酸对映体进行了手性拆分，其中 DL-赖氨酸得到了部分的拆分，而 DL-组氨酸和 DL-丙氨酸则得到了基线拆分。

3.3.6.1 CD 的种类对拆分的影响

在毛细管电动色谱中，环糊精 (CDs) 是最常用的手性选择剂。环糊精是由多个吡喃葡萄糖以 1,4-糖苷键形成的低聚糖，它具有中空的角锥结构，腔内呈相对疏水性，羟基在开口处，呈亲水性。在 CD-SDS-MEKC 体系中，手性选择性由 CD 提供，尽管如 3.3.5.3 节所述，SDS 的浓度会对拆分产生不同程度的影响，但对映体能否被拆分从根本上来说取决于它们和 CD 之间包合作用的强弱。不同的 CD 由于自身结构的差异，对手性化合物有不同的选择性。图 3-9 是三种氨基酸对映体在不同 CD 中的拆分情况。从图中我们可以看出， γ -CD 的手性识别能力最强，这可能是由于 γ -CD 的疏水空腔比较大，与 FITC 标记的氨基酸相匹配，二者间的包合作用比较强。

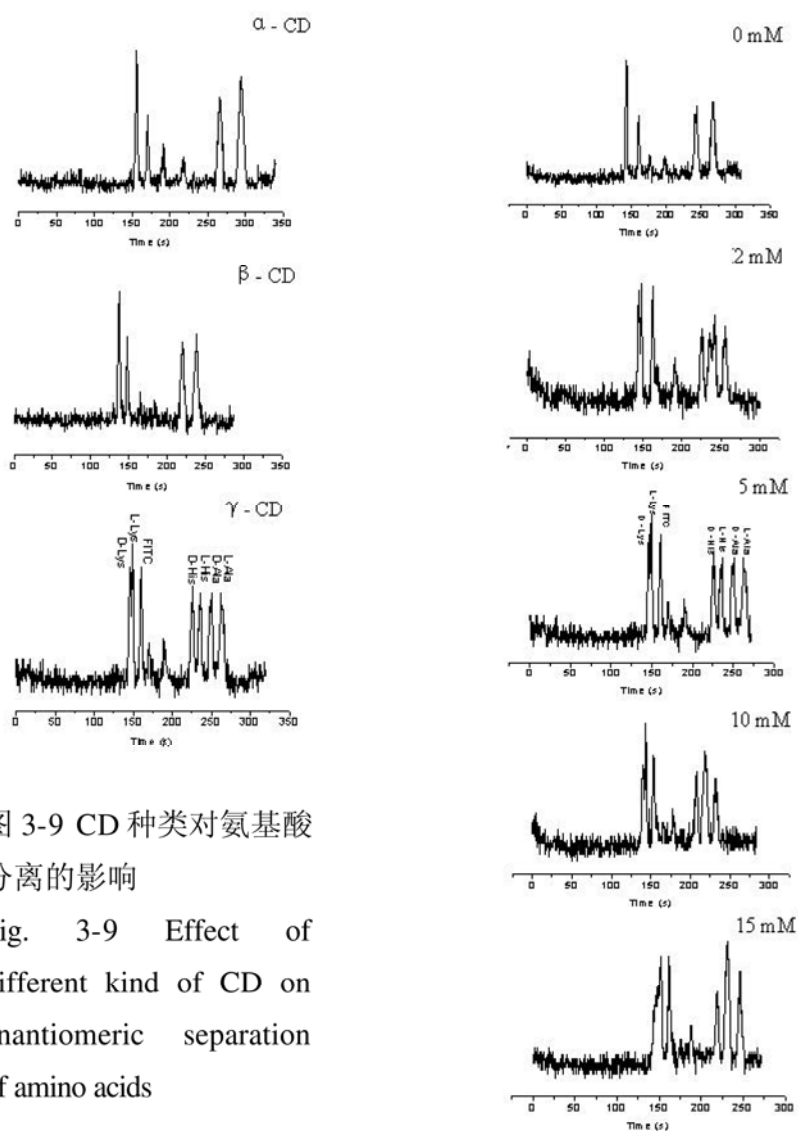


图 3-9 CD 种类对氨基酸分离的影响

Fig. 3-9 Effect of different kind of CD on enantiomeric separation of amino acids

图 3-10 γ -CD 浓度对氨基酸手性分离的影响

Fig. 3-10 Effect of the concentration of γ -CD on enantiomeric separation of amino acids

3.3.6.2 γ -CD 浓度对拆分的影响

CD 的浓度也是影响拆分的一个重要因素。CD 对手性对映体在 SDS-MEKC 体系中的迁移行为的影响主要有两方面：一是 CD 和 SDS 胶束竞争结合手性对映体（客体），二是 CD 包含 SDS 单体从而使溶液中的胶束浓度降低。这两方面的作用都会引起氨基酸从 SDS 相转移出来，从而削弱氨基酸和胶束间的相互作用。在图 3-10 中，当 γ -CD 的浓度为 0 mM 时，氨基酸对映体没有手性识别。当 γ -CD 浓度增加到 2 mM 时，DL-组氨酸和 DL-丙氨酸得到基线拆分，DL-赖氨酸部分拆分，但 L-组氨酸峰和 D-丙氨酸峰部分重合。当 γ -CD 浓度增至 5 mM 时，氨基酸对映体得到了较好的拆分，L-组氨酸和 D-丙氨酸也得到了基线分离。但随着 γ -CD 浓度的进一步增加，L-组氨酸和 D-丙氨酸的分离度有所下降，两峰重叠。

3.3.6.3 SDS 浓度对拆分的影响

尽管 SDS 本身没有手性选择性，但它的浓度对拆分有着非常重要的间接影响。在 pH 10.0 的缓冲液中，FITC 标记的氨基酸对映体带负电，而 SDS 胶束的外壳此时也带有负电荷，电泳方向和电渗方向相反，但因电渗速度大于电泳速度，所以二者以较慢的速度向阴极迁移。随着 SDS 浓度的增加，对映体在胶束相中的比例增加，因为 SDS 的电泳淌度与电渗流方向相反，且大于 FITC 标记的氨基酸的电泳淌度，因此随着 SDS 浓度的增加，FITC 标记的氨基酸对映体迁移时间延长，与 γ -CD 的作用时间增加，从而扩大了两种对映体淌度的差别。另外 SDS 浓度的增加，能加大溶液中的离子强度，降低电渗流，这在客观上有助于对映体的拆分。在图 3-11 中，保持 γ -CD 的浓度为 5 mM 不变，考察 SDS 浓度改变对手性对映体拆分的影响。当 SDS 的浓度为 0 mM 时， γ -CD 对氨基酸对映体的识别能力难以显示，无法使其得到拆分。随着 SDS 浓度的增加， γ -CD 的拆分能力被逐步显示出来，同时 L-组氨酸和 D-丙氨酸也得到了部分分离。当 SDS 浓度进一步增加至 30 mM，氨基酸对映体得到了较好的拆分，L-组氨酸和 D-丙氨酸也得到了基线分离。随着 SDS 浓度进一步增加，L-组氨酸和 D-丙氨酸的分离度下降，两峰开始部分重叠。

3.3.6.4 添加剂对 DL-赖氨酸拆分的影响

在本实验中, DL-赖氨酸尚未能达到基线拆分, 因此尝试加入甲醇、异丙醇、HPMC 以及 PEO 等添加剂来改善分离。添加剂在 CD-MEKC 中对拆分的影响比较复杂, 一般认为这种影响主要通过手性分子和 CD 间包合作用以及电渗流的改变而得以实施。如图 3-12 所示, 异丙醇可以在一定程度上改善 DL-赖氨酸的

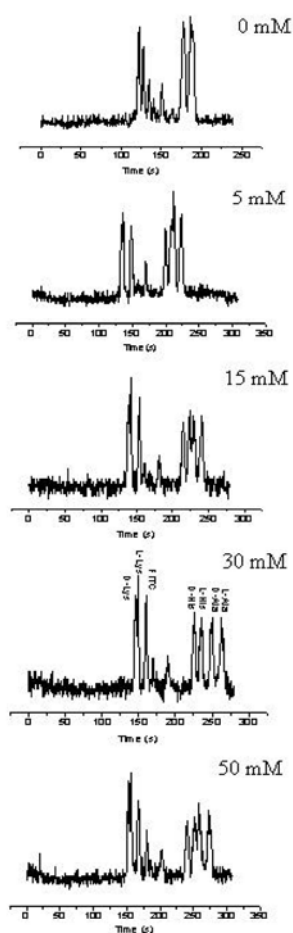


图 3-11 SDS 浓度对氨基酸手性分离的影响

Fig. 3-11 Effect of the concentration of SDS on enantiomeric separation of amino acids.

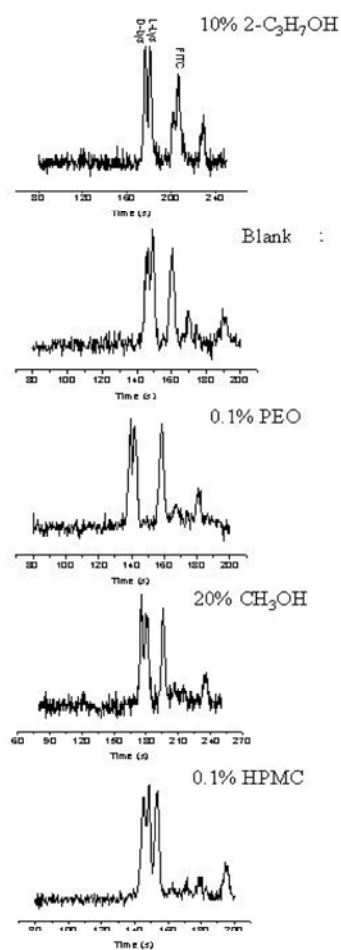


图 3-12 不同添加剂对 DL-赖氨酸手性分离的影响

Fig. 3-12 Effect of different additives on enantiomeric separation of DL-Lys

拆分,但仍没有达到基线拆分,甲醇和 PEO 对赖氨酸的拆分影响不大,而 HPMC 的加入则一定程度上降低了 DL-赖氨酸的拆分。

3.4 结论

在自组装的脉冲式激光诱导荧光微流控芯片检测装置上,以玻璃芯片作为操作平台,以单个荧光染料和氨基酸为对象,考察了微通道的伏安特性,抑制电压、进样方式以及检测点位置对组分在芯片电泳上迁移的影响,研究了微流控芯片电泳不同于传统毛细管电泳的一些特殊性。发现玻璃微流控芯片具有良好的散热性能,可以在其上施加高电压,进行快速分离。并发现对于交叉型微流控芯片而言,在进样及分离的同时需要施加抑制电压以控制样品区带的形状(收缩进样),减少分离时进样通道内的样品向分离通道内渗漏。在芯片电泳中随着分离距离的增加,样品迁移时间增加,柱效提高,其结果与传统毛细管电泳相似,但芯片分离通道任一点均可作为检测窗口,因此为观察组分分离的全过程并随之对过程进行优化提供了可能。以三种氨基酸对映体为研究对象,在自组装的脉冲式激光诱导荧光微流控芯片装置上,采用 CD-SDS-MEKC 电泳模式,对微流控芯片上手性分离进行了初步研究。实验结果与毛细管电泳相类似,CD 种类、浓度、SDS 浓度以及各种添加剂对氨基酸对映体的拆分有显著影响。在本实验中 γ -CD 对 FITC 标记的氨基酸手性识别能力比较强。添加剂对手性拆分的影响比较复杂,10%的异丙醇可以提高 DL-赖氨酸的手性分离。以上结果表明,微流控芯片技术将极有可能在以手性分离为基础的大规模药物筛选、消旋切换等方面发挥重大作用。

参考文献

-
- [1] Uchiyama, K., Nakajima, H., Hobo, T., Detection methods for microchip separations. *Anal Bioanal Chem* 2004, 379, 375-382.
 - [2] Johnson, M. E., Landers, J. P., Fundamentals and practice for ultrasensitive laser-induced fluorescence detection in microanalytical systems, *Electrophoresis*

2004, 25, 3513-3527.

[3] Beer, T. de, Velthorst, N.H., Brinkman, U.A.Th., Gooijer, C., Laser-based non-fluorescence detection techniques for liquid separation systems *Journal of Chromatography A*, 2002, 971, 1-35.

[4] Oin. J. H., Fung. Y. S., Zhub. D. R., Lin. B. C., Native fluorescence detection of flavin derivatives by microchip capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence intensified charge-coupled device detection *Journal of Chromatography A*, 2004, 1027, 223-229.

[5] Zhu, L., Stryjewski, W. J., Soper, S. A., Multiplexed fluorescence detection in microfabricated devices with both time-resolved and spectral-discrimination capabilities using near-infrared fluorescence *Analytical Biochemistry* 2004, 330, 206-218.

[6] Jacobson S. C., Hergenroder R., Koutny L. B. et al., Effects of Injection Schemes and Column Geometry on the Performance of Microchip Electrophoresis Devices *Anal. Chem* 1994, 66, 1107-1113.

[7] Alarie J. P., Jacobson S. C., Culbertson C. T. et al., Effects of the electric field distribution on microchip valving performance. *Electrophoresis* 2000, 21, 100-106.

[8] LIN Bing-Cheng (林炳承), *The Introduction of Capillary Electrophoresis (毛细管电泳导论)* [M], Beijing: Science Press, 1996: 18-20.

[9] Burns, M. A., Johnson, B. N., Brahmasandra, S. N., Handique. K., Webster, J. R., Krishnan, M., Sammarco, T. S., Man, P. M., Jones, D., Heldsinger, D., Mastrangelo, C. H., Burke, D. T., An integrated nanoliter DNA analysis device. *Science* 1998, 282, 484-487.

第四章 连续式单色激光诱导荧光微流控芯片装置

4.1 引言

在前一章中，我们以脉冲式染料激光器作为微流控芯片装置的激发光源，采用取样平均器（Boxcar）技术，根据激光共聚焦原理自组装了脉冲式激光诱导荧光微流控芯片装置。但因为脉冲激光的重复频率（10 Hz）太低，不能满足微流控芯片中快速灵敏检测的需求，而且仪器价格昂贵、体积庞大，不利于整个装置的微型化。因此在本章中，我们对整个装置进行了改进，以体积较小、价格相对低廉的国产半导体连续激光器为光源。由于可通过自行设计的软件对连续激光进行频率、脉宽调制，因此仍可采用取样平均器技术对所收集到的荧光进行弱信号处理，这样就不需要斩波器，仪器相对简单^[1,2]。另外我们还以高压模块替代常规体积较大的高压电源，通过计算机自动控制进样和分离时电压的切换，减少人为干扰因素。在新搭建的连续式激光诱导荧光微流控芯片装置上，以氨基酸为标准样品，在简单的十字型微流控芯片上，对新搭建装置的基本性能进行了考察。

4.2 实验部分

4.2.1 装置搭建

本实验装置是在自组装的脉冲式激光诱导荧光微流控芯片装置的基础上搭建起来的，其原理如图 4-1 所示^[3]。原来体积庞大、价格昂贵的染料激光器由体积较小、价格低廉的半导体激光器（532 nm，约 70 mW，连续激光器，北京波前伟业科技公司）取代，通过自行研制的软件对半导体激光器进行电调制，使其发出的激光频率、脉宽均可调，得到高频脉冲激光。该激光首先进入改装过的荧光显微镜（N-400M，宁波永新显微镜厂）中，通过双色分束镜（535 nm 以下反射，545nm 以上透过）反射后，进入显微镜聚焦物镜（改装后物镜焦距约为 2.5 mm，数值孔径约为 0.7），聚焦在微流控芯片的分离微通道上，光斑直

径约有 0.1 mm。通道内样品发出的荧光由同一物镜收集后，首先由半反半透镜滤过，再由透镜聚焦，通过空间滤波器（直径约为 0.5 mm 的圆孔）和单色滤光片（570DF10，美国 Omega Optical 公司）滤去杂散光后，最终进入光电倍增管（PMT）中将光信号转化为电信号。信号由取样积分器（美国 EG&G 公司，4121B）经 12 位 AD 转换进入计算机。HW350A，激光实验控制系统（自行研制）可完成对激光器，平均器，AD 转换等触发，延迟，信号采集及数据处理等多种功能。芯片各储液池内的缓冲液通过铂金电极与外界高压电源相连。4 个独立的高压模块（营口，高新电子公司）通过一组高压继电器（美国，CRYDOM）由计算机控制高压输出，根据进样及分离的需要可以同时芯片上 4 个储液池的电压进行控制，并能够在约几十毫秒的时间内从讲样的电压模式切换到分离的电压模式。微流控芯片放置在显微镜的载物台上，通过目镜来观察激光是否聚焦在分离微通道上。

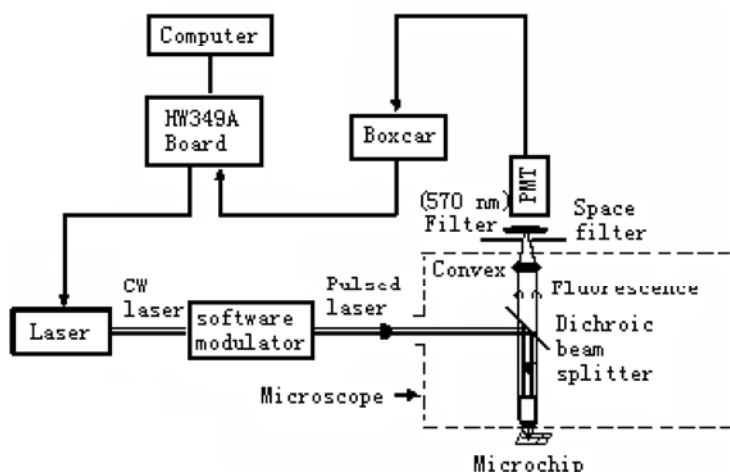


图 4-1 连续激光诱导荧光共聚焦微流控芯片装置原理图

Fig. 4-1 Schematic of confocal laser-induced-fluorescence microchip-based capillary electrophoresis

4.2.2 试剂与样品

三羟甲基氨基甲烷（Tris，国产分装），硼酸（开原化学试剂厂产品），EDTA

(长春化学试剂厂产品), 乙二胺 (上海化学试剂公司), 若丹明 B (Rhodamine B, 德国, Lambda Physik), TAMRA(5(6)-carboxytetramethylrhodamine succinimide ester, 美国, Probes), 氨基酸标准品由德国 Tuebingen 大学提供, 其余试剂均为分析纯。

4.2.3 样品衍生

氨基酸标准品用 100 mmol/L、pH 8.3 的碳酸钠缓冲液配制成 5 mg/mL 的溶液。TAMRA 溶于 DMF 中, 配成约 2×10^{-3} mol/L 的溶液, 取 20 μ L 的氨基酸溶液与 2 μ L 的 TAMRA 溶液混合, 放置于暗处室温下反应半小时。电泳前将样品用分离缓冲液稀释至所需浓度。

4.2.4 微流控芯片及电泳分析条件

实验中所用的芯片购自 AMC (Edmonton, Alberta, Canada)。其结构如图 4-2 所示, 孔 1 是缓冲液池, 孔 2 是样品池, 孔 3 是样品废液池, 孔 4 是分离废液池。芯片分离通道长 8.5 cm (从缓冲液池至十字交叉处为 0.5 cm, 从十字交叉处至分离废液池为 8.0 cm), 进样通道长为 0.8 cm (从样品池至十字交叉处, 及从十字交叉处至样品废液池均为 0.4 cm), 通道的横截面近似为半椭圆形 (上宽 50 μ m, 深 20 μ m), 检测点距十字交叉处为 7.0 cm。实验中采用“收缩进样” (Pinched loading) 的方式, 进样和分离时各储液池所加的电压如表 4-1 所示。使用前芯片通道分别用 0.1 M NaOH、H₂O 及缓冲液各冲洗约 5 分钟。

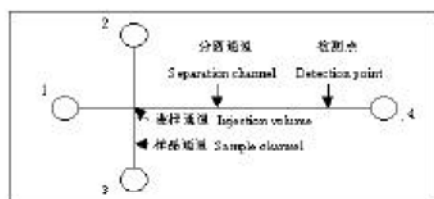


图 4-2 实验中所用毛细管电泳芯片

Fig. 4-2 Layout of microchip used in this work

表 4-1 进样和分离电压

Table 4-1 Applied injection and separation voltage

缓冲池 (Reservoir position)	1	2	3	4
进样电压 (KV) Injection voltage (KV)	0.15	0.30	0	0.15
分离电压 (KV) Separation voltage (kV)	2.25	1.80	1.80	0

以 Rhodamine B 为样品, 样品先用甲醇溶解, 再用运行缓冲液 $1 \times \text{TBE}$ (100 mmol/L Tris—硼酸, 2 mmol/L EDTA, $\text{pH } 8.2$) 稀释至所需浓度 (约 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)。进样和分离时各储液池的电压如表 1 中所示, 进样时间为 15 s , 分离场强约为 238 V/cm , 检测点距十字交叉处 7.0 cm 。

以 TAMAR 标记的缬氨酸 (Leucine, Leu)、丙氨酸 (Alanine, Ala) 及谷氨酸 (Glucine, Glu) 为分析对象, 运行缓冲液为 100 mmol/L , $\text{pH } 10.0$ 的 Tris—硼酸溶液, 进样和分离时各储液池的电压如表 1 中所示, 进样时间为 20 s , 分离场强约为 238 V/cm , 检测点距十字交叉处 7.0 cm 。

4.3 结果与讨论

4.3.1 装置的改进

一般说来, 当用氩离子激光器作为激发光源时, 通常用斩波器对激光进行斩波, 由锁相放大器对所获取的弱信号进行处理。氩离子激光器虽然单色性较好, 能量较高, 但体积偏大、价格昂贵、操作复杂且维持费用高。近年来, 随着激光技术的不断发展, 大功率、体积小、价格低廉的商品化半导体激光器不断问世, 虽然半导体激光器的单色性和能量不如氩离子激光器, 但完全可以满足微流控芯片的需求, 因此在微流控芯片装置中得到了广泛的应用。

在前一章脉冲式激光诱导荧光微流控芯片装置的搭建中, 我们已建立了一套完整的 Boxcar 检测技术, 但半导体激光器发出的是连续激光, 不能直接采用 Boxcar 检测技术, 要想使二者能互相匹配, 需要对激光进行调制。利用自行研制的软件对半导体激光器进行调控, 使其能够发出重复频率在 $1\text{—}500 \text{ Hz}$ 之间的脉冲激光, 通过对各种参数 (包括取样门宽、取样延迟时间等) 进行选择,

满足 Boxcar 检测需要, 提高信噪比。根据采样定理, 采样次数越多, 信噪比越好, 受激光及系统所限, 我们将激光频率固定为 500 Hz。门宽的选择主要受激光脉宽和荧光标记物寿命影响, 在本实验中通过考察发现取样门宽为 50 微秒时结果比较理想。固定取样门宽及激光频率和脉宽, 改变取样延迟, 所得到的样品峰高随取样延迟变化曲线如谱图 4-3 所示。从图中可以看到随着取样延迟的增加, 峰高先是不断增加, 继而下降, 在 140 微秒时达到最大值, 此时荧光信号处于峰值区域, 即荧光达到饱和。通过对此门宽及延迟参数进行计算, 可以得知激光的频率最高只能达到 2600 Hz 左右, 此时每个脉冲激光能量约 $13 \mu\text{J}$, 超过该频率就会由于激光能量不足而导致荧光信号达不到饱和, 从而导致信号失真。在本实验中, 可以通过对调制软件进行改进, 进一步提高半导体激光器所发出的脉冲激光的频率至 2600 Hz, 增加采样频率, 提高信噪比。

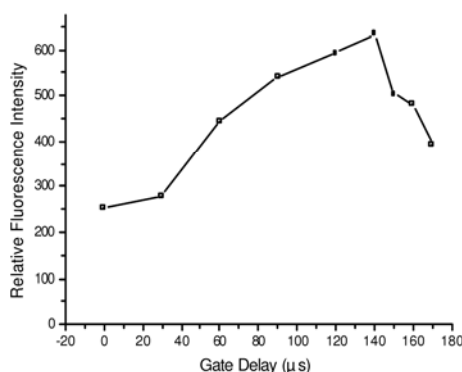


图 4-3 相对荧光强度与 Boxcar 取样延迟的关系图

Fig. 4-3 Relationship between relative fluorescence intensity and gate delay of Boxcar.

4.3.2 装置性能考察

Rhodamine B 的微流控芯片电泳分析谱图见图 4-4, 用运行缓冲液配置不同浓度的 Rhodamine B 样品溶液, 将所得谱图中样品峰高与浓度作图, 可以得到如图 4-5 所示的二者之间的关系曲线。弃去后两个点, 将剩余的点进行线性回归, 其相关系数 $R = 0.9992$ 。由此可见, 在 $2.0\text{—}200 \mu\text{mol/L}$ 范围内峰高与样品浓度为线性响应关系。

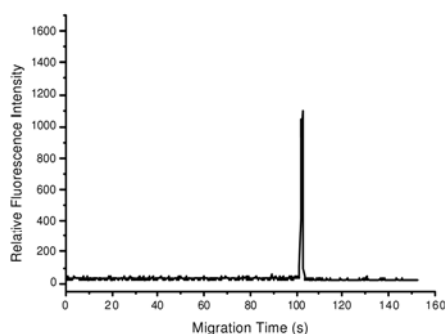


图 4-4 Rhodamine B 的微流控芯片电泳谱图

Fig. 4-4 Electropherogram of Rhodamine B on electrophoresis microchip

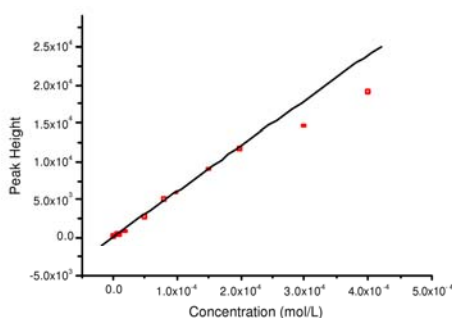


图 4-5 峰高与浓度的关系曲线

Fig. 4-5 Relationship between peak height and concentration

对浓度为 1×10^{-5} mol/L 的 Rhodamine B 样品, 其连续 5 天日间重复进样 ($n \geq 4$) 的时间相对标准偏差在 0.19—0.53%, 峰高的相对标准偏差在 1.75—6.94% 之间。对于浓度分别为 1×10^{-6} mol/L, 1×10^{-5} mol/L, 5×10^{-5} mol/L 的 Rhodamine B 样品, 其在同一天中重复进样 ($n \geq 5$) 的时间相对标准偏差在 0.17—0.35%, 峰高的相对标准偏差在 1.47—6.80% 之间, 具体数据如表 4-2 所示。总的说来, 时间的重复性要好于峰高的重复性。由于采用手动操作, 需要手动聚焦, 这些人为因素的干扰, 会在一定程度上影响分析结果的重现性。对峰高重现性的改进可以通过进一步提高装置的自动化, 减少人为操作操作等来实现。

表 4-2 连续 5 天内时间和峰高的相对标准偏差

Table 4-2 Relative standard deviation of migration time and peak height in successive five days

	第一天			第二天	第三天	第四天	第五天
浓度(mol/L)	5×10^{-6}	1×10^{-5}	5×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}
时间相对标准偏差 RSD (n=5)	0.35	0.30	0.17	0.19	0.53	0.28	0.36
峰高相对标准偏差 RSD (n=5)	1.47	5.93	6.80	4.78	2.54	6.94	1.75

4.3.3 氨基酸微流控芯片电泳分离

在微流控芯片电泳检测中使用最多的是激光诱导荧光检测装置 (LIF), 这主要是由于芯片毛细管电泳进样量一般在 pL 级, 且通道比较浅 (一般在 10—50 μm 之间), 对检测灵敏度的要求较高而造成的。将缬氨酸、丙氨酸和谷氨酸用 TAMRA 进行荧光标记, 在自组装的激光诱导荧光微流控芯片检测装置上, 进行微流控芯片电泳分离。实验发现在单一缓冲体系中氨基酸分离的时间窗口比较小, 而含有 Tris 的二元缓冲体系, 如 Tris—硼酸的二元缓冲体系可使时间窗口有所扩大, 但分离效果仍不十分理想。在该体系中加入 10% 左右的有机添加剂, 如甲醇、乙醇、异丙醇和乙二胺等均可一定程度上改善分离, 其中乙二胺对 TAMAR-氨基酸衍生物的分析影响比较大, 随着乙二胺浓度的升高分离逐步得到改善。实验发现, 5% 乙二胺的分离效果比较理想, 乙二胺浓度过高会导致氨基酸出峰时间过长, 同时由于电流增大也会导致样品峰展宽。TAMRA-氨基酸的分离谱图见图 4-6 和图 4-7。

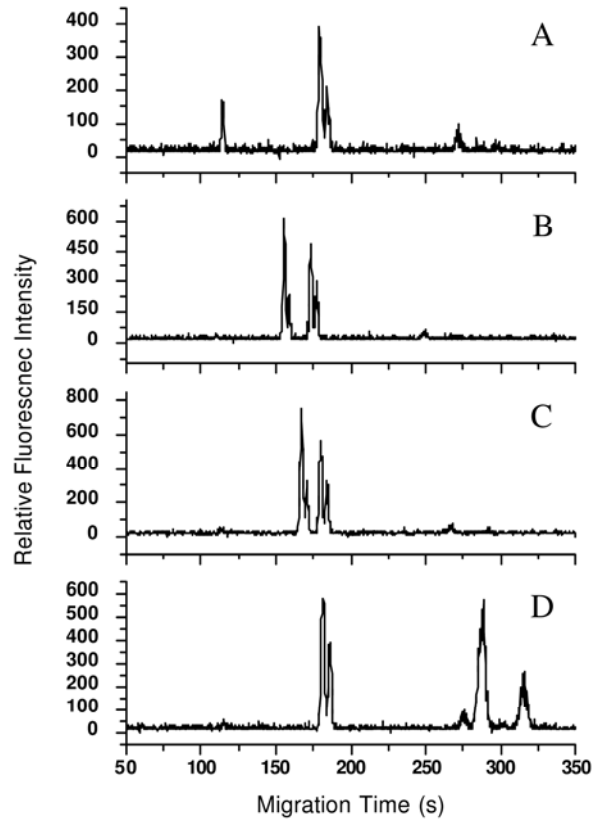


图 4-6 染料及单个氨基酸的芯片毛细管电泳谱图；A，染料；B，缬氨酸；C，丙氨酸；D，谷氨酸

Fig. 4-6 Electropherograms of TAMAR and single TAMAR-labeled amino acid; A, TAMAR; B, Leucine; C, Alanine; D, Glucine.

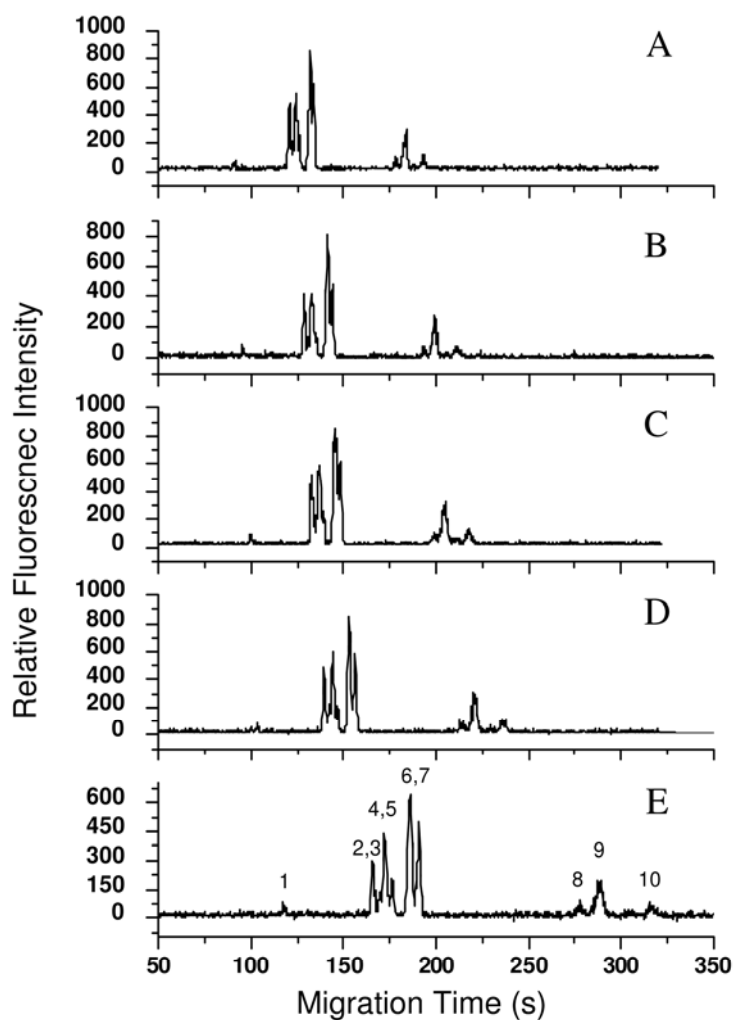


图 4-7 乙二醇浓度对氨基酸分离的影响; A, 1%; B, 2%; C, 3%; D 4%; E, 5% 乙二醇; 峰 1,6,7,8 - 染料; 2, 3 - 缬氨酸; 4, 5 - 丙氨酸; 9, 10 - 谷氨酸

Fig. 4-7 Effect of the concentration of glycine on the separation of TAMAR-labeled amino acids; A, 1%; B, 2%; C, 3%; D 4%; E, 5% ; Peak identification: 1,6,7,8 - TAMAR; 2, 3 - Leucine; 4, 5 - Alanine; 9, 10 - Glucine

4.4 结论

通过自行研制的软件对半导体激光器所发出的连续激光进行电调制,使其频率和脉宽均可调,得到高频脉冲激光,可直接采用取样积分器技术对自行搭建的连续式激光诱导荧光微流控装置进行弱信号处理,不需要斩波器斩波,仪器较为简单。为微流控装置的小型化、低成本探寻出了一条新的出路,也为该仪器的商品化奠定了坚实的基础。对改装后的仪器性能,如线性范围和重现性进行了考察,实验发现在 2.0—200 $\mu\text{mol/L}$ 范围内峰高对浓度的响应具有很好的线性关系。最后在该仪器上进行了 TAMAR 衍生的三种氨基酸的芯片毛细管电泳分离分析,三种氨基酸基本达到基线分离。

参考文献

- [1] Sivaprakasam V., Shannon R. F. Jr., Luo C., Coble P. G., Boehme J. R., Killinger D. K., Development and initial calibration of a portable laser-induced fluorescence system used for in situ measurements of trace plastics and dissolved organic compounds in seawater and the Gulf of Mexico. *Appl Opt.* 2003, 42, 6747-6756.
- [2] Johnson, M. E., Landers, J. P., Fundamentals and practice for ultrasensitive laser-induced fluorescence detection in microanalytical systems, *Electrophoresis* 2004, 25, 3513-3527.
- [3] 王辉, 毛秀丽, 盖宏伟, 白吉玲, 林炳承, 芯片毛细管电泳中组分的迁移行为及其特征, *高等学校化学学报*, 2002 年, 23 卷, 第 6 期, 1030-1034。

第五章 玻璃微流控芯片及其基本性能考察

5.1 引言

在本论文的前半部分，我们主要讨论了自行搭建的一系列具有不同结构和功能的激光诱导荧光微流控芯片装置，在接下来的章节中，我们将着重介绍芯片实验室的另一重要组成部分，即微流控芯片和包含有实现芯片功能化方法和材料的试剂盒。本实验室已独立地掌握了包括玻璃、PMMA、PDMS 和水凝胶等在内的多种微流控芯片的制作工艺，本论文主要涉及到玻璃和 PMMA 两种。

自从上世纪九十年代初以来，各种不同材料和功能的微流控芯片不断问世。其中绝大多数是以玻璃、石英或聚合物为原材料制作而成^[1,2,3]。虽然玻璃和石英芯片加工成本较高，封接难度较大，也难以得到较大宽深比的通道，但因为玻璃和石英具有优异的电渗、光学和表面性质，刻蚀加工技术和表面改性的化学方法均比较成熟，且各种传统的分离方法和策略可以直接转移到玻璃芯片中进行，因此玻璃和石英芯片在微流控芯片的应用研究中占有十分重要的地位，也是目前应用最为广泛的微流控芯片之一^[4,5,6]。

本章主要对自制玻璃芯片的基本性能进行了考察，如微通道刻蚀质量、重复性和使用寿命等，并与其它玻璃芯片进行了性能价格的比较。

5.2 实验部分

5.2.1 试剂与样品

罗丹明 B、荧光素、 γ -环糊精 (γ -CD) 和手性药物 Baclofen 均为美国 Sigma 公司产品，磷酸和硼砂均为国产分析纯，实验中所用溶液均用二次水配制。

5.2.2 玻璃芯片的制作工艺

首先根据不同研究对象的需求，设计制作一个具有所需图形结构和尺寸的掩膜，在选好的玻璃片上进行光学打磨和抛光处理，真空沉积一层 Cr 保护刻蚀层，

在 Cr 上面均匀的甩上一层感光胶（也可以选用商品化的 Cr 板玻璃）。将制作好的掩膜附在感光胶上，在强紫外光源下完成曝光，显影，刻蚀，除膜，清洗等操作工序，然后打孔，封接，制成玻璃芯片。玻璃芯片制作的具体工艺流程如图 5-1 所示。

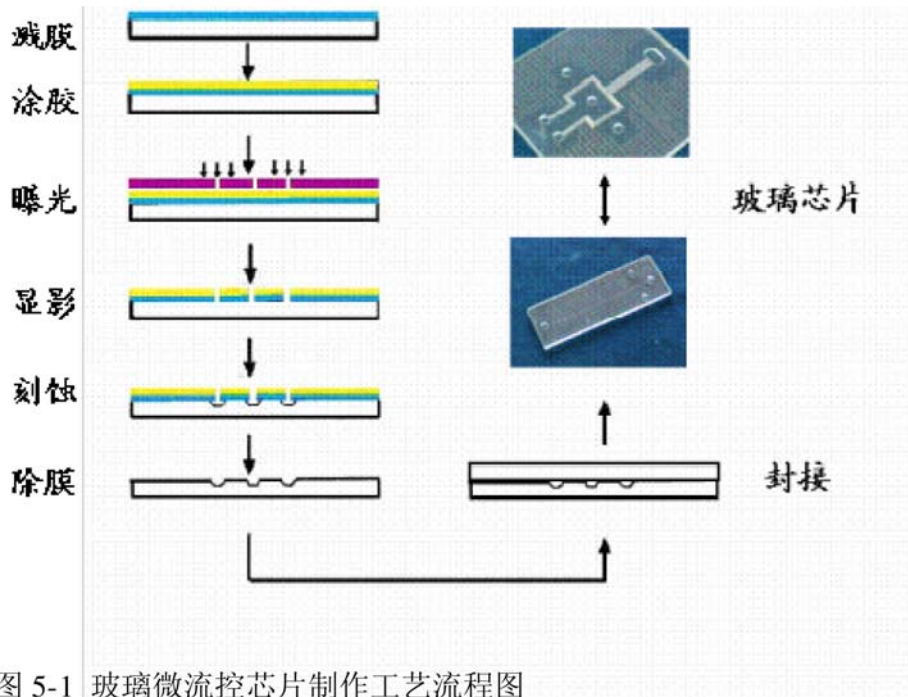


图 5-1 玻璃微流控芯片制作工艺流程图

Fig. 5-1 Schematic representation of the microfabrication of glass microfluidic chips.

5.2.3 玻璃芯片性能考察实验

采用轮廓仪对玻璃芯片通道横截面进行测量，测量速度为 1 mm/s，垂直放大比为 1000，标尺为 10 μm /格；水平放大比为 200，标尺为 50 μm /格。对封接前玻璃芯片通道内表面进行电镜扫描，放大 100 倍，考察其内表面刻蚀质量。

以罗丹明 B 为样品，在加拿大 Micralyne 公司的 Microfluidic Tool Kit 激光诱导荧光芯片仪上进行电泳分析^[7]。背景缓冲液为 10 mM，pH9.2 的硼砂缓冲液，测定了同一芯片上，以及芯片与芯片之间迁移时间的重现性，并对玻璃芯片的使用寿命进行了考察。

以荧光素标记的手性药物 Baclofen 为拆分对象，以含有 2 mM γ -CD 的 20 mM, pH 9.0 的磷酸缓冲液为运行缓冲液，在自制的激光诱导荧光芯片仪（激光的激发波长为 480 nm，检测波长为 520 nm）上进行手性拆分。检测距离约为 3.8 cm，分离场强为 300 V/cm。

5.3 结果与讨论

5.3.1 芯片设计与制作

本实验室已经掌握了玻璃芯片整套制作工艺，可以根据不同需求，自行设计并快速制备出具有不同结构和功能的玻璃芯片。部分玻璃芯片如图 5-2 所示。

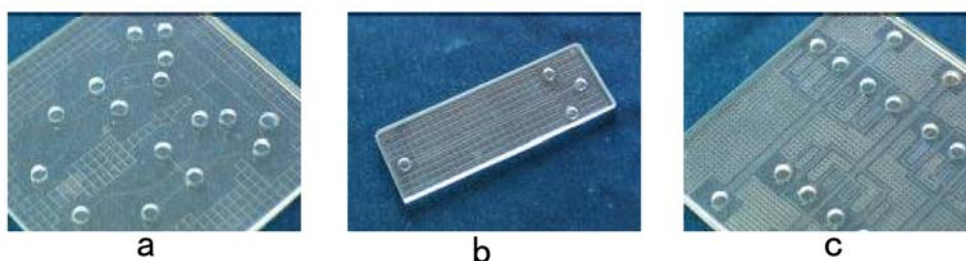


图 5-2 不同结构和功能的玻璃微流控芯片

a 集成化玻璃芯片；b 十字通道玻璃芯片；c 四通道玻璃芯片

Fig. 5-2 Microfluidic glass chips with different structures and functions.

其中芯片 b 的具体规格尺寸如下所示：

芯片尺寸： 60 mm（长）× 20 mm（宽）× 2.2 mm（厚）

基片厚度为 1.1 mm

盖片厚度为 1.1 mm

芯片材质： 光学玻璃

通道结构： 十字交叉

通道横截面： 近似半椭圆形

通道尺寸： 分离通道长为 50 mm（从十字交叉处到废液池为 45 mm）

进样通道长为 10 mm

缓冲液池直径： f3 mm

5.3.2 玻璃芯片通道的基本特征

图 5-3 为玻璃芯片通道横截面的轮廓曲线图。可根据实际分析对象的需要，设计并制作具有不同图形尺寸的掩膜，控制不同的蚀刻条件，加工出具有不同深度和宽度的微通道，微通道尺寸在几十到几百微米之间。玻璃微通道横截面如图 5-3 所示，近似为半椭圆形。封接前十字通道处的扫描电镜照片如图 5-4 所示，从图片看微通道表面较平整、光滑。

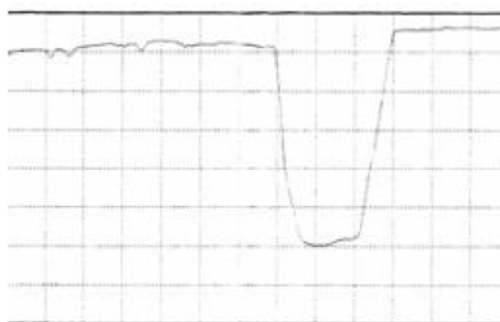


图 5-3 玻璃微流控芯片通道横截面的轮廓曲线

测量速度为 1 mm/s，垂直放大比为 1000，标尺为 10 μm /格；水平放大比为 200，标尺为 50 μm /格。

Fig. 5-3 Profile line of the cross section of microfluidic glass chip.

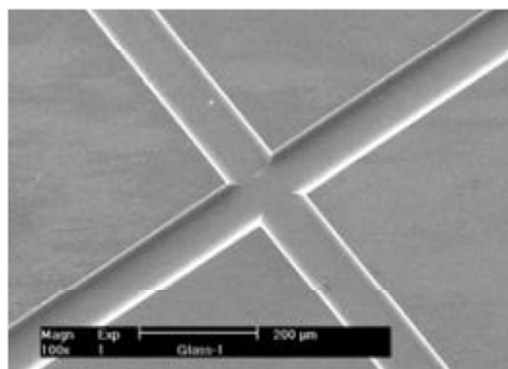


图 5-4 玻璃微流控芯片十字通道的扫描电镜图。放大比例为 100 倍

Fig. 5-4 SEM picture of the cross section of microfluidic glass chip.

5.3.3 玻璃芯片重现性及寿命

以罗丹明B为样品，从同一批出品的玻璃芯片中随机抽取5片，进行迁移时间测定，结果见表5-1，芯片间相对标准偏差（RSD）为2.31%。选取其中的一块芯片连续运行10次，迁移时间的变化见表5-2，相对标准偏差为2.44%。迁移时间的相对标准偏差都比较小，说明自制玻璃芯片的重复性较好。

表 5-1 不同玻璃芯片中罗丹明 B 迁移时间的比较

芯片	1	2	3	4	5
迁移时间均值 (s)	9.9	10.0	10.2	10.1	9.6
标准偏差 (SD)	0.23				
相对标准偏差 (RSD%)	2.31%				

注：罗丹明B 浓度为 $4.6 \times 10^{-6} \text{M}$ ，检测点离通道交叉点4.3cm，迁移时间为5次运行均值。

表 5-2 同一片玻璃芯片中罗丹明 B 迁移时间的比较

运行顺序	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
迁移时间 (s)	9.5	9.6	9.4	9.9	10.1	9.9	9.8	9.9	10	10.1
标准偏差(SD)	0.24									
相对标准偏差 (RSD%)	2.44%									

注：罗丹明 B 浓度为 $4.6 \times 10^{-6} \text{M}$ ，检测点离通道交叉点 4.3cm。

在同一片芯片上连续运行罗丹明 B 样品 200 次，其中部分运行结果见图 5-5，200 次运行时，峰形仍基本保持对称，柱效无明显下降。说明玻璃芯片通道内表面的性质比较稳定，使用寿命较长。

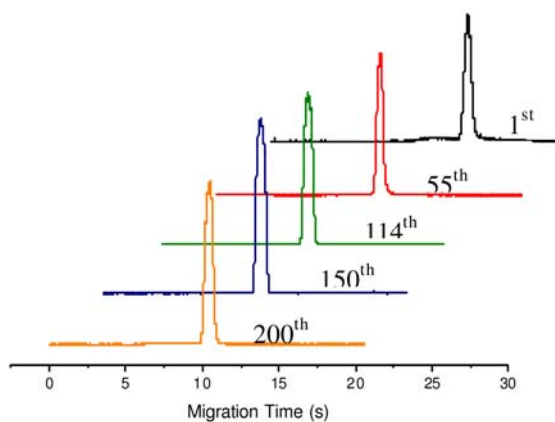


图 5-5 罗丹明 B 在同一块玻璃微流控芯片中多次运行电泳图

Fig. 5-5 Electropherograms of Rodamine B on the same microfluidic glass chip.

5.3.4 玻璃芯片的性能比较

加拿大 Micralyne 是生产玻璃芯片较早的公司之一，所生产的玻璃芯片代表着国际先进水平，并在世界范围内被大量使用，其玻璃芯片售价相对较高，每片约为 200 美元。我们将自制的玻璃芯片与 Micralyne 公司的产品进行了比较，以荧光素标记的手性药物 Baclofen 为拆分对象，电泳分析结果如图 5-6 所示。从图中可以看出，二者均在较短的时间内成功的实现了 R,S-Baclofen 的手性拆分，基本都达到了基线分离。因为自制的玻璃芯片成本较低，每片的成本仅为人民币 100 元左右，因此与售价较高的加拿大芯片相比，在性能价格比方面显示出了明显优势。