

分类号 065

密级 公开

U D C 543

编号 B998003812

# 中国科学院研究生院 博士学位论文

微流控芯片电泳分析基础研究

王 辉

指导教师 林炳承研究员 中国科学院大连化学物理研究所

白吉玲研究员 中国科学院大连化学物理研究所

申请学位级别 博士 学科专业名称 分析化学

论文提交日期 2005.01.27 论文答辩日期 2005.03.28

培养单位 中国科学院大连化学物理研究所

学位授予单位 中国科学院研究生院

答辩委员会主席 辛毅

Dissertation of Doctoral Degree  
Class of 1999

**Basic research of microchip-based capillary electrophoresis**

Ph.D Candidate: Hui Wang

Supervisors: Professor Bingcheng Lin  
Professor Jiling Bai

Division of Biotechnologies  
Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences  
January 2005

---

## 摘 要

本论文主要针对微流控芯片技术的基础问题开展了一系列研究，主要包括：

1、自行设计并搭建了三台激光诱导荧光微流控芯片装置，包括一台四色荧光和两台单色荧光共聚焦激光诱导荧光微流控芯片装置，其中单色荧光微流控芯片装置根据所用激光光源不同，又分为脉冲式和连续式。对所搭建仪器的基本性能进行了考察，研究了样品在微流控芯片中的基本迁移行为，为下一步研究工作奠定了基础。

2、对实验室自行设计制造的玻璃微流控芯片建立了性能考察和评价体系。将超低粘度羟丙基甲基纤维素筛分介质用于玻璃芯片中 DNA 片段的分离分析。对该体系进行优化，考察了添加剂等多种因素对分离性能的影响，探讨了分离机理。这种粘度与水在同一个数量级上的筛分介质，使得溶液的灌入灌出十分容易，因而特别适用于微流控芯片体系。

3、对实验室自制的注塑型 PMMA 微流控芯片建立了性能考察和评价体系。建立了注塑型 PMMA 微流控芯片内表面的动态和静态修饰方法。以表面活性剂为添加剂，对 PMMA 芯片微通道内电渗流的大小和方向进行动态调控，并提高通道内表面的亲水性。通过光聚合方法对 PMMA 芯片微通道内表面进行静态修饰，在 PMMA 芯片微通道内表面产生一个均匀、连续、重复性较好的聚丙烯酰胺涂层。修饰后的 PMMA 芯片微通道内壁亲水性增强，通道内的电渗流被抑制到几乎可以忽略的地步。考察了动态和静态修饰后 PMMA 芯片的分离性能、柱效和重复性等。

关键词：微流控芯片，分析仪，筛分介质，表面修饰

**Abstract**

Hui Wang (Analytical Chemistry)

Directed by Prof. Dr. Bingcheng Lin

and Prof. Dr. Jiling Bai

This report mainly focuses on the basic research area of the microfluidic systems, which is listed as follows.

Several types of home-made microfluidic devices were built up in the laboratory, including one microchip-based laser-induced fluorescence (LIF) detection system with four fluorescent channels, two LIF detection microfluidic devices with pulsed laser or consecutive laser as light sources, respectively.

The qualities of home-made glass microchips were evaluated. The sieving matrix with ultra-low viscosity was applied to the performance of microfluidic chips. Different separation conditions were estimated, especially the factors of additive, concentration, electric field strength et al. The mechanism of the separation was discussed as well. The sieving matrix has a very low viscosity almost equal to that of water, which is particularly suitable for use in microfluidic chips because this factor assures relatively easy and rapid operation.

The qualities of home-made injection-molded PMMA microchips were also evaluated. Dynamic and static surface coating methods were set up to modify the inner surfaces of PMMA microchannels. For the dynamic coating, different surfactants were added to the running buffer to control the direction and magnitude of electroosmotic flow (EOF) in the PMMA microchannels. By applying photo-initiated polymerization method, the inner surfaces of PMMA microchips were modified. EOF was suppressed almost to zero and the hydrophilicity was strongly increased. The efficiency and reproducibility of the separation were distinctly improved as well.

Key words: Microfluidic systems, microchips, Sieving matrix, Surface modification.

## 目 录

第一章 微流控芯片基础研究现状及进展 (文献综述) .....	1
1.1 引言 .....	1
1.2 微流控芯片中微尺寸的基本特征 .....	2
1.2.1 微尺寸流体的特性 .....	2
1.2.2 微通道长度尺寸 .....	3
1.2.3 微通道横截面尺寸 .....	4
1.2.4 微通道进样宽度 .....	4
1.3 微流控芯片材料和制作技术 .....	5
1.3.1 玻璃微流控芯片的制作 .....	7
1.3.2 聚合物微流控芯片的制作 .....	8
1.3.2.1 热凸印和压膜法 .....	9
1.3.2.2 注塑法 .....	10
1.4 微流控芯片内表面修饰 .....	11
1.4.1 微流控芯片内表面的动态修饰 .....	12
1.4.1.1 玻璃和石英微流控芯片内表面的动态修饰 .....	12
1.4.1.2 聚合物微流控芯片内表面的动态修饰 .....	13
1.4.2 微流控芯片内表面的静态修饰 .....	15
1.4.2.1 玻璃和石英微流控芯片内表面的静态修饰 .....	15
1.4.2.2 聚合物微流控芯片内表面的静态修饰 .....	17
1.5 微流控芯片中检测器 .....	18
1.5.1 激光诱导荧光检测器 .....	18
1.5.2 其他检测器 .....	20
1.6 微流控芯片的应用研究 .....	20
1.6.1 微流控芯片中核酸分离分析 .....	21
1.6.2 微流控芯片中蛋白质分离分析 .....	23
1.7 本论文所涉及的微流控芯片基础研究工作 .....	25

---

参考文献 .....	25
第二章 四色荧光共聚焦激光诱导荧光微流控芯片装置 .....	41
2.1 引言 .....	41
2.2 装置搭建 .....	42
2.2.1 元件与材料 .....	42
2.2.2 装置设计 .....	42
2.2.2.1 光学部分设计 .....	42
2.2.2.2 手动高压控制装置 .....	44
2.2.2.3 快速采集与信号处理部分设计 .....	44
2.3 实验部分 .....	45
2.3.1 试剂与样品 .....	45
2.3.2 微流控芯片及电泳分析条件 .....	45
2.4 结果与讨论 .....	46
2.4.1 四色荧光微流控芯片电泳装置的建立 .....	46
2.4.2 芯片电泳装置的评价 .....	47
2.4.3 荧光标记DNA片段的芯片电泳分离分析 .....	48
2.5 结论 .....	49
参考文献 .....	50
第三章 脉冲式单色激光诱导荧光微流控芯片装置及样品电泳迁移行为 ..	51
3.1 引言 .....	51
3.2 实验部分 .....	52
3.2.1 装置搭建 .....	52
3.2.2 试剂与样品 .....	52
3.2.3 样品衍生 .....	53
3.2.4 微流控芯片及电泳分析条件 .....	53
3.3 结果与讨论 .....	55
3.3.1 脉冲式激光诱导荧光微流控芯片装置的建立 .....	55
3.3.2 微流控芯片的伏安特性 .....	56

---

3.3.3 抑制电压和延迟时间的影响 .....	56
3.3.4 进样方式的影响 .....	58
3.3.5 检测窗口的影响 .....	59
3.3.6 氨基酸对映体的手性拆分 .....	60
3.3.6.1 CD的种类对拆分的影响 .....	60
3.3.6.2 $\gamma$ -CD浓度对拆分的影响 .....	62
3.3.6.3 SDS浓度对拆分的影响 .....	62
3.3.6.4 添加剂对DL-赖氨酸拆分的影响 .....	63
3.4 结论 .....	64
参考文献 .....	64
第四章 连续式单色激光诱导荧光微流控芯片装置 .....	66
4.1 引言 .....	66
4.2 实验部分 .....	66
4.2.1 装置搭建 .....	66
4.2.2 试剂与样品 .....	67
4.2.3 样品衍生 .....	68
4.2.4 微流控芯片及电泳分析条件 .....	68
4.3 结果与讨论 .....	69
4.3.1 装置的改进 .....	69
4.3.2 装置性能考察 .....	70
4.3.3 氨基酸微流控芯片电泳分离 .....	72
4.4 结论 .....	75
参考文献 .....	75
第五章 玻璃微流控芯片及其基本性能考察 .....	76
5.1 引言 .....	76
5.2 实验部分 .....	76
5.2.1 试剂与样品 .....	76
5.2.2 玻璃芯片的制作工艺 .....	76

---

5.2.3 玻璃芯片性能考察实验 .....	77
5.3 结果与讨论 .....	78
5.3.1 芯片设计与制作 .....	78
5.3.2 玻璃芯片通道的基本特征 .....	79
5.3.3 玻璃芯片重现性及寿命 .....	80
5.3.4 玻璃芯片的性能比较 .....	81
5.4 结论 .....	82
参考文献 .....	82
第六章 玻璃微流控芯片中超低粘度筛分介质研究 .....	84
6.1 引言 .....	84
6.2 实验部分 .....	85
6.2.1 试剂与样品 .....	85
6.2.2 样品衍生 .....	85
6.2.3 微流控芯片及电泳分析条件 .....	86
6.3 结果与讨论 .....	87
6.3.1 葡萄糖添加剂的影响 .....	87
6.3.2 染料浓度的影响 .....	90
6.3.3 筛分介质浓度的影响 .....	91
6.3.4 电场强度的影响 .....	92
6.3.5 PCR产物的芯片毛细管电泳分析 .....	94
6.4 结论 .....	95
参考文献 .....	96
第七章 PMMA微流控芯片及其动态改性研究 .....	99
7.1 引言 .....	99
7.2 实验部分 .....	100
7.2.1 试剂与样品 .....	100
7.2.2 PMMA微流控芯片 .....	100
7.2.3 样品衍生 .....	102

---

7.2.4 电渗流的测定 .....	102
7.2.5 微流控芯片电泳分析条件 .....	103
7.3 结果与讨论 .....	103
7.3.1 PMMA芯片通道的基本特征 .....	103
7.3.2 表面活性剂浓度对EOF的影响 .....	104
7.3.3 pH值对EOF的影响 .....	107
7.3.4 动态改性对微流控芯片电泳分析影响 .....	109
7.4 结论 .....	110
参考文献 .....	111
第八章 PMMA微流控芯片表面静态改性研究 .....	115
8.1 引言 .....	115
8.2 实验部分 .....	116
8.2.1 试剂与样品 .....	116
8.2.2 PMMA微流控芯片 .....	116
8.2.3 PMMA芯片内表面处理 .....	116
8.2.4 电渗流的测定 .....	117
8.2.5 蛋白质酶解 .....	117
8.2.6 微流控芯片电泳分析条件 .....	117
8.3 结果与讨论 .....	117
8.3.1 PMMA芯片通道内表面光聚合反应 .....	117
8.3.2 小肽在静态改性PMMA芯片中的电泳分离 .....	120
8.3.3 蛋白质水解产物在静态改性PMMA芯片中的电泳分离 .....	124
8.3.4 蛋白质在静态改性PMMA芯片中的电泳分离 .....	124
8.4 结论 .....	125
参考文献 .....	126
总结论 .....	128
作者简介及发表论文 .....	130
致谢 .....	133

## 第一章 微流控芯片基础研究现状及进展（文献综述）

### 1.1 引言

随着玻璃及塑料微流控芯片微加工技术日渐发展成熟，微流控芯片装置在最近十年得到了迅猛发展。这一新兴的领域被冠以微全分析系统（Micro-total analysis systems,  $\mu$ -TAS）、芯片实验室（Lab-on-a-chip）、或集成化学实验室（Integrated chemistry lab）等名称<sup>[1,2,3]</sup>。理想状态下， $\mu$ -TAS 技术可以将实验室中进行的各种传统化学操作过程，如样品预处理、混合、萃取、反应、分离和检测等集成在同一个微型装置中进行。

芯片实验室并不是简单的将分析或反应过程转移到一个微型装置中进行，它具有很多常规装置所不具有的特征：1) 随着微通道尺寸减小，微通道比表面积将随之增加，这就使得微流控芯片通道内表面的性质显得十分重要，芯片材料表面性质和表面预处理过程将对微流控装置的分析 and 反应性能产生极大的影响。2) 在微流控装置中，可以通过电动、压力、或真空的方法来驱动微通道内的流体，其中电动驱动是最常用的方法，它不需要泵、阀等额外装置，只需在微通道两端施加高压即可完成。另外，也有采用其他的方法，如离心力等来驱动微通道内的流体<sup>[4]</sup>。3) 微通道中液体为层流，可以使不同的流体平行流过微通道。4) 微通道尺寸的减小也会导致检测区域体积的减小，因此基于检测池尺寸的检测方法，如吸收检测，并不太适合用于微流控体系，而基于表面活性的电化学检测，以及将检测区域聚焦在很小液体体积上的激光诱导荧光法则更适合用于微流控体系。其中，激光诱导荧光法应用的最为广泛，而电化学检测法因可以集成在微流控芯片上，也得到了越来越多的应用<sup>[5,6]</sup>。除了以上的特性外，微流控体系还具有样品和试剂耗量小，通过平行分析可得到极高的单位信息量，大批量生产的塑料芯片成本低廉，可以一次性使用等优点。

当然目前在微流控分析装置中也存在很多问题需要解决，主要是：1) 微尺寸体系和外部常规环境之间的界面问题，如液体的引入和样品的收集等；2) 流

体控制，目前主要有两种方法（电渗驱动和压力驱动），并不能满足特殊装置中液体运输的要求，因此也要寻找新的驱动力；3）液体混合，微通道中只有层流现象存在，缺乏湍流，这在一定程度上限制了微通道内液体的混合。

总之，自 90 年代初诞生以来，微流控装置已成功的用于分离科学的多个应用领域，特别是临床诊断和分子生物学，成为一个极为活跃的研究热点。下面将主要介绍一下微流控装置的微尺寸特征、材料和制作技术、微流控芯片内表面的修饰、检测器以及应用等。

## 1.2 微流控芯片中微尺寸的基本特征

### 1.2.1 微尺寸流体的特性

微流控装置通常被认为是其所对应的常规尺寸物体的微缩影，对于微流控装置的某些特征而言，这种看法是正确的，但微尺寸流体仍具有很多与常规尺寸流体不同的特性，如扩散距离较短，比表面积较大（特定界面积、固/液、液/液），以及热容量较小等。微流体的这些特征是决定其化学单元操作如混合、反应、萃取、分离以及化学体系集成等的关键因素。尤其是在微流控芯片这样尺寸比较微小的体系中，为了控制分子在微通道内的运输，就必须考虑分子运输时间和特定界面积（specific interface area）。分子运输时间由下面的公式给出：

$$t = L^2/D \quad (1-1)$$

其中， $t$ ， $L$ ， $D$  分别代表分子运输时间，扩散距离和扩散系数。特定界面积的定义如下面的公式所示：

$$\sigma = S/V \propto 1/L \quad (1-2)$$

其中， $\sigma$  代表特定界面积； $S$  表示界面积； $V$  表示体积。图 1-1 是在微流控芯片中空间微尺寸与特定界面积和分子运输时间之间的关系图<sup>[7]</sup>。

如公式（1-1）所示，分子运输时间与扩散距离的平方成正比。因为一般的分子离子的扩散系数在  $10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  这个数量级，因此当分子的扩散距离为 1 cm 时，通常需要从几个小时到一天的运输时间；而当分子的扩散距离为微尺寸时，如  $100 \mu\text{m}$ ，所需要的运输时间仅为几十秒。当物体的空间微尺寸达到  $250 \mu\text{m}$

以下时，这种微观尺寸所带来的好处就显得尤为突出。

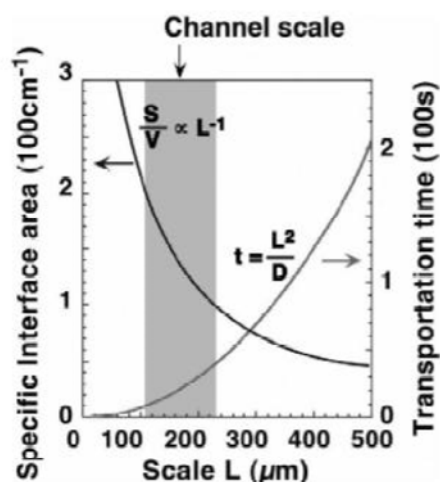


图1-1 在微流控芯片中空间微尺寸与特定界面积和分子输运时间之间的关系图

Fig. 1-1 Scale dependence of specific interface area and diffusion time in microchip

### 1.2.2 微通道长度尺寸

图 1-2 是一具有代表性的微流控芯片结构示意图。一般来讲，分离微通道的长度与分离样品、缓冲液类型、芯片材料以及所加电场强度有关。虽然芯片上单位长度微通道的分离效率已超过了传统的毛细管电泳，但因为微流控芯片的分离长度比较短，因此总效率还是不高。虽然可以通过提高单位场强来增加分离效率，但由于受到焦耳热限制，作用很有限，因此有时需要用蛇形结构的微通道来代替常见的直线形微通道，以增加分离通道的长度，从而提高整体分离效率。但分离微通道弯曲后又遇到了一个新的问题，样品在分析过程中通过通道弯曲处时，会产生附加扩散而造成区带展宽，即所谓的“几何分散”或“跑道效应”，这将在一定程度上抵消了长分离通道的优势。经研究发现<sup>[8,9]</sup>，可通过减小微通道的宽度、采用锥形弯曲、增大曲率半径等来降低弯曲处的区带展宽。

进样通道的长度一般没有什么特殊要求，可根据芯片微通道的结构设计而定，如可取为 10 mm。

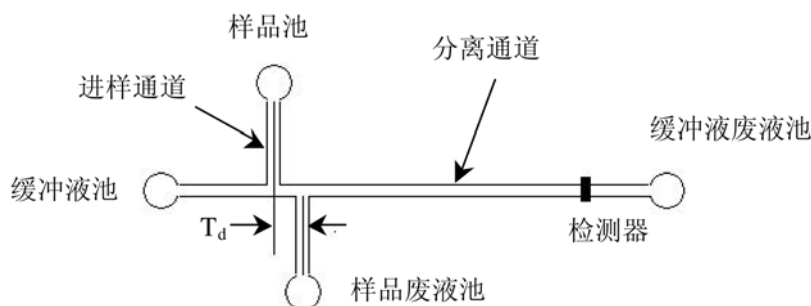


图1-2 常见微流控芯片结构示意图

Fig. 1-2 Schematic diagram of a microfluidic chip

### 1.2.3 微通道横截面尺寸

在微流控芯片研究中，微通道的横截面尺寸通常为宽  $50\text{-}200\ \mu\text{m}$ 、深  $15\text{-}40\ \mu\text{m}$ 。在电场强度一定时，分离微通道尺寸越小，电阻越大，相应的分离电流就越小，产生的焦耳热也较小，因此可以在芯片上施加高场强以提高分离速度，目前在芯片上施加的场强最高已达到  $53\ \text{kV}/\text{cm}^{[10]}$ 。随着分离通道横截面尺寸的减小，内表面与体积比增大，散热效果将随之得到增加；而如果分离通道横截面尺寸增加，将会导致缓冲溶液径向热梯度增大，从而使样品区带展宽，分离度下降。因此在微流控芯片体系中，如果单纯从分离度和分离效率的角度考虑，分离通道的尺寸越小越好，但随着分离通道横截面尺寸的减小，样品负载减小，从而增加了检测的难度，而且由于比表面积的增大，也增加了样品在表面吸附的机率。另外，由于分离通道尺寸的减小，也会给溶液的灌入和灌出增加难度，因此应根据不同的检测手段，选择合适尺寸的微流控芯片。

### 1.2.4 微通道进样宽度

在微流控芯片体系中，常见有两种进样结构，一是十字交叉进样结构；二是双 T 形进样结构。目前微流控芯片中的进样宽度 ( $T_d$ ) 一般在  $100\text{-}250\ \mu\text{m}$  之间，此时进样量一般为  $0.1\text{-}0.5\ \text{nl}$ （而普通毛细管电泳的进样量一般为  $2\text{-}5\ \text{nl}$ ）。研究发现<sup>[11]</sup>， $T_d$  与电泳分离度和检测信号强度有关。 $T_d$  增大，则相应的进样量增大，检测信号增强，但分离度会随之下落，因此一般说来，应在满足检测信号要求的基础上，尽可能的降低  $T_d$ 。当样品电导率与背景电解质的电导率基本

相同时, 可由下面的公式估算  $T_d$ :

$$T_d \leq \frac{(\mu_a - \mu_b)l}{\mu_b} \quad (1-3)$$

其中,  $\mu_a$  和  $\mu_b$  分别是样品中比较难分离的两种组分的有效淌度,  $l$  为分离通道长度。

### 1.3 微流控芯片材料和制作技术

在微流控芯片研制过程中, 首先要考虑的是芯片材料的选取。选取芯片材料时必须要注意的是: 1) 芯片材料与分离体系和反应体系之间要有良好的化学相容性或惰性, 不发生反应; 2) 芯片材料应有很好的电绝缘性和散热性; 3) 芯片材料应具有良好的光学性能, 对检测信号干扰小; 4) 芯片材料表面要具有良好的可修饰性, 可产生电渗流或固载生物大分子; 5) 芯片的制作工艺要简单, 材料及制作成本要低廉。表 1-1 就是各种常用的微流控芯片材料及其性能参数。

自从芯片实验室 (Lab-on-a-chip) 在 20 世纪 90 年代出现以来, 玻璃和石英就成为微流控芯片生产中的主导材料<sup>[12,13]</sup>。这主要是因为玻璃微流控芯片的微加工技术已经发展成熟, 微通道内表面的化学性质和修饰方法已经在色谱和毛细管电泳中被研究透彻, 因此在传统毛细管电泳中已建立好的分离方法和策略很容易被转移到玻璃芯片中进行。玻璃具有优良的光学性质、电绝缘性以及表面化学惰性, 这些也使得其特别适用于微流控芯片体系。但因为玻璃微流控芯片的制作过程比较繁琐, 操作环境要求超净, 成本较高, 因此在实际应用中受到一定的限制, 各种成本低廉的聚合物材料逐渐引起了学者的注意<sup>[14,15]</sup>。聚合物微流控芯片易于成形, 制作过程相对比较简单, 对操作环境的要求不高, 不需要超净室等条件, 因此成本低廉。另外, 目前市场上有多种性质各异的聚合物材料可供选择, 这就使研究者可以根据实际分析对象的需要来选择不同材料的微流控芯片。

由于所选用的芯片材料不同, 其制作方法也有所不同。玻璃和石英微流控芯片主要采用微加工刻蚀技术; 而聚合物微流控芯片主要采用注塑法、压膜法和硅橡胶浇铸法等。

表 1-1. 常用微流控芯片材料及其性能

Table 1-1. The physical characteristic of different materials used for microfluidic chips

材料 性能 参数	硅片	玻璃	石英	聚甲基 丙烯酸 甲酯 (PM MA)	聚碳酸 酯 (Poly carbon ate)	聚苯乙 烯 (Poly styrene )	聚丙烯 (Poly propyle ne)	聚乙烯 (Poly ethylen e)	聚二甲 基硅氧 烷 (PD MS)
化学 惰性	一般	好	好	较好	较好	较好	较好	较好	较好
介电 强度 (kV/m m) [常 数]	[11.7]	[3.7-1 6.5]	—	16-20 [3.5- 4.5]	18-22 [2.9- 3.4]	20-28 [2.45- 2.65]	20-30 [2.2- 2.6]	18-27 [2.25]	16-20 [3.0- 3.5]
分离 场强 (V/cm)	—	~ 2500 <sup>[12]</sup>	—	> 400 <sup>[16]</sup>	> 600 <sup>[17]</sup>	—	—	—	~ 1000 <sup>[18]</sup>
热导 率 (W/m K)	157	07-1. 1	1.4	0.2	0.19	0.13	0.2	0.4	0.2
能量 耗散 (W/m)	—	~ 2.8 <sup>[12]</sup>							~ 1.0 <sup>[18]</sup>
软化 温度 (°C)	—	500- 821	> 1000	105	145	95	150	85-125	—
透光 率(%)	—	287- 2600 nm 89-92	400- 800 nm >76	287- 2600 nm >92	287- 2600 nm 86-90	287- 2600 nm 88-92	400- 800 nm 40-70	400- 800 nm 50-70	400- 800 nm >70
热膨 胀系 数( $\times$ $10^{-5}/K$ )	0.26	0.05- 1.5	0.04	7-9	5-7	8	6-10	12-18	3.5
成型 性能	较难	较难	难	易	易	易	易	易	易
键合 性能	较难	较难	难	较易	较易	较易	较易	较易	易

### 1.3.1 玻璃微流控芯片的制作

玻璃芯片的加工技术是从微机械加工技术中借鉴而来的,即所谓的标准微加工刻蚀技术<sup>[12]</sup>,如图 1-3 所示,主要包括以下几个操作步骤:掩膜制作、光刻胶在玻璃表面的涂层、曝光、蚀刻及封接。首先在选好的玻璃片上进行光学打磨和抛光处理,用浓硫酸和过氧化氢(3:1; V/V)清洗表面,然后依次用甲醇、丙酮和去离子水充分冲洗玻璃表面。在真空( $<10^{-6}$  Torr)条件下,在玻璃表面沉积一层金属薄膜,通常为 200-Å 的 Cr 和 1000-Å 的 Au(也可以选用商品化的 Cr 板玻璃)。在金属薄膜层上均匀甩涂上一薄层光敏剂,在 100°C 时固化 5 分钟。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,将制作好的掩膜附在感光胶上,在强紫外光源下完成曝光。将已曝光部分的光敏剂用适当的腐蚀液除掉,然后再将所对应的金属薄膜腐蚀掉。在此基础上对已暴露出来的玻璃部分进行化学蚀刻,最常用的蚀刻剂是氢氟酸或氢氧化钾溶液。可以通过控制温度来调控氢氟酸对玻璃的蚀刻速率,用轮廓曲线仪监测蚀刻过程中微通道的深度变化,以确定蚀刻所需要的时间。当微通道蚀刻完成后,将玻璃表面剩余的光敏物质和金属薄膜全部除掉。将另一块未蚀刻的玻璃作为封接用的盖板,用超声等方法在微通道末端所对应的位置打出直径约为 1-3 mm 的孔,作为封接后芯片微通道与外界相通的界面。最后将已蚀刻完成的芯片和盖板用前面所述的方法充分清洗,在显微镜下对准,放在一个程序升温的马氟炉内进行键合。升温程序一般为:以 40°C/min 的速度升温到 550°C, 30min; 以 20°C/min 的速度升温到 610°C, 30min; 以 20°C/min 的速度升温到 635°C, 30min; 以 10°C/min 的速度升温到 650°C, 6 h; 然后在炉内自然冷却到室温。可以在封接较差的部位用重物压住,重复一到两次键合程序。

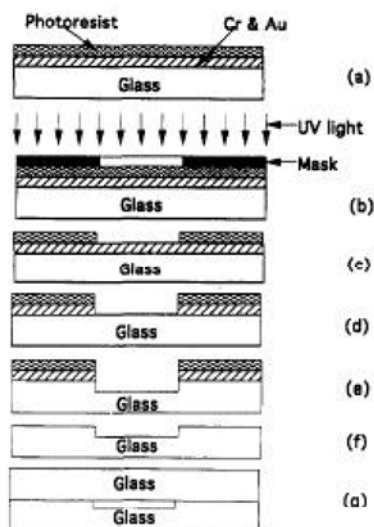


图 1-3 玻璃微流控芯片光蚀刻制作过程：a) 在玻璃表面依次覆盖金属薄膜和光敏剂；b) 通过掩膜进行紫外曝光；c) 除掉曝光部分的光敏剂和 d) 金属薄膜；e) 对已暴露出来的玻璃部分进行蚀刻；f) 除掉玻璃表面剩余的金属薄膜和光敏剂；g) 打孔后将已蚀刻好的玻璃板和盖板封接，即得到玻璃微流控芯片成品。

Fig. 1-3 Sequence of photolithographic fabrication: a) Cr and Au masked glass plate coated with photoresist; b) sample exposed to light through a master mask; c) photoresist developed; d) exposed metal mask etched; e) exposed glass etched; f) resist and metal stripped; g) glass cover plate bonded to form microchip.

### 1.3.2 聚合物微流控芯片的制作

聚合物芯片的制作技术与玻璃芯片有很大的区别，主要采用热凸印法和压膜法(Hot embossing and imprinting)<sup>[19,20]</sup>，注塑法(Injection molding)<sup>[21,22]</sup>，激光消融法(Laser ablation)<sup>[23]</sup>，硅橡胶浇铸(Silicon rubber casting)<sup>[24]</sup>，软刻蚀法(soft lithography)<sup>[25,26,27]</sup>或 X-射线光刻蚀法(X-ray photolithography)<sup>[28,29]</sup>等加工技术。下面将分别就热凸印法、压膜法和注塑法这三种制作技术分别加以介绍，其他的制作技术可以参照有关的文献综述<sup>[30]</sup>。

### 1.3.2.1 热凸印和压膜法

热凸印和压膜法最早是在上世纪 90 年代末由 MacCrehan 小组<sup>[19]</sup>首先提出来的，因其制作过程简单，因此现在仍有研究人员<sup>[31]</sup>采用该方法制作塑料芯片。MacCrehan 等人将直径约为 13—25  $\mu\text{m}$  的镍铬合金丝沿纵向绷紧在 PMMA 片上，将该 PMMA 片放在两片载玻片中间，用两块铝块均匀地夹住整个载玻片，在 105 $^{\circ}\text{C}$ （PMMA 的软化温度）的炉内加热 10 分钟，使金属丝在 PMMA 片上形成压槽，然后将片子取出，冷却到室温，移开载玻片和金属丝。在同样尺寸的另一片 PMMA 片上，沿横向重复一次以上操作过程。在其中的一片 PMMA 上打出芯片微通道与外界相连的孔，最后将两片 PMMA 板用载玻片夹住，在 108 $^{\circ}\text{C}$ 的炉内加热 10 分钟，即可得到 PMMA 芯片成品，整个操作过程如图 1-4 A 所示。

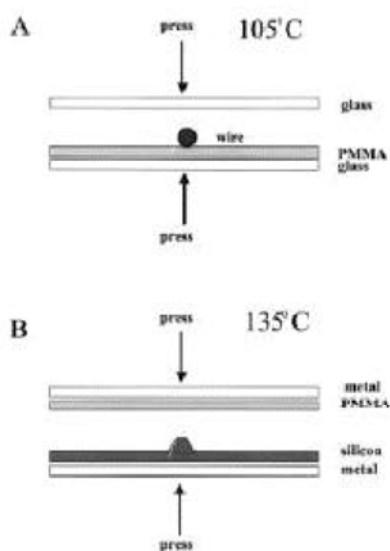


图 1-4 A) 塑料芯片的金属丝压膜法制作示意图；B) 以硅模板为压膜工具的热凸印法制作示意图。

Fig. 1-4 A) Fabrication protocol for wire-imprinted devices; B) Fabrication protocol for silicon-plate-imprinted devices.

图 1-4 B 表示的是热凸印法的操作过程，该方法是以带有凸起微通道结构的硅模板作为压膜模具。硅模板的制作与玻璃微流控芯片的制作过程基本相似，

只是光敏胶的性质有所不同。在硅模板的制作中，未曝光部分的光敏胶和氧化层首先被除掉，因此当用氢氟酸进行蚀刻时，被腐蚀掉的是未曝光部分的硅，因而就形成了一个凸起的三维结构的微通道。已蚀刻好的硅片也可以用来制作金属模板<sup>[21]</sup>。第一步先以硅片为母体制作一个电镀模具（通常为 Ni），该电镀模具的图像与硅片母体的图像成镜面对称。第二步再以前面生成的电镀模具为母体，制成另一个电镀模具，该模具是原始硅片母体的仿制品。该金属模具可以通过压膜法或注塑法来制作塑料微流控芯片。压膜法和凸印法可以在室温或高温下进行，高温条件下所需要的压力比较低，因此所形成的微通道尺寸变形的可能性不大，操作过程一般不超过 10 分钟；而在室温条件下进行操作时，所需的压力就比较高，此时微通道尺寸将由压膜时间、压力和塑料的性质来决定，变形的可能性相对较大<sup>[20]</sup>，但整个操作的时间较短，只需要 2 分钟。硅片和金属模具均可以忍受高温，因此在热压膜法中均可重复使用上百次。在室温条件下，硅片只适用于较软的塑料材料（如 PETG 和 PVC），而对于较硬的塑料（如 PMMA 和聚碳酸酯），硅片比较容易损坏，因此应先将硅片上的图形转移到金属模具上，以增加模具的使用寿命。压膜法和热凸印法可用于多种聚合物材料的微流控芯片制作，目前已用于包括 PS（聚苯乙烯）、PETG（聚乙烯对苯二甲酸盐乙二醇）、PMMA、PDMS、PVC（聚氯乙烯）、聚碳酸酯<sup>[28,32,33,34,35]</sup> 等在内的聚合物微流芯片制作。

#### 1.3.2.2 注塑法

利用注塑法制作聚合物微流控芯片的报道最初是由 ACLARA（formerly Soane Biosciences）的研究人员公开发表的<sup>[21]</sup>。首先根据上面所述的方法制作表面带有凸起微通道结构的硅片，然后利用该硅片制作出带有所需图形结构和尺寸的金属模具（一般为 Ni），该金属模具在注塑过程中可以被重复使用成千上万次，特别适用于塑料微流控芯片的大批量生产。将金属模具安放在一个模子内，向模子内注入聚合物树脂和交联剂，通过聚合反应生成聚合物微流控芯片。所选用的聚合物材料与模具表面的接触性能要比较好，这样所形成的芯片微通道的尺寸才比较准确。可以通过反应时间和温度来控制芯片微通道的质量。注塑法相对于压膜法和热凸印法的优势主要在于，注塑法特别适合于大批量、标准

化生产聚合物芯片, 成本十分低廉。目前注塑法已经用于 PMMA<sup>[21]</sup>和环烯塑料 (cycloolefin)<sup>[22]</sup>等材质较硬的微流控芯片的批量生产中。

综上所述, 玻璃和石英微流控芯片的制作过程较复杂, 成本较高, 但其制作方法比较成熟, 因此微通道的质量容易保证。压膜法、热凸印法以及注塑法在聚合物微流控芯片的生产中都有比较广泛的应用, 利用一个硅模板可以生产出多个金属模板, 而每个金属模板又可以生产出成百上千的聚合物芯片, 成本低廉, 特别适用于聚合物芯片的大规模生产。但因为聚合物芯片导热性较差, 热封接后微通道有一定的变形, 而且大部分聚合物材料, 对短波长可见光有不同程度的吸收, 在使用激光诱导荧光检测时, 会产生背景荧光, 因此必须根据所分析对象的需求, 以及所采用的检测手段, 来选择不同的芯片材质和加工工艺。

#### 1.4 微流控芯片内表面修饰

微流控芯片在很多方面经常被认为是毛细管电泳高度微型化的缩影, 许多应用都可以很容易的从传统毛细管电泳转移到微流控芯片上进行。在传统毛细管电泳中, 可以通过采用合适的表面修饰方法来提高电泳分离的效率和重复性。对毛细管内壁进行涂层通常有两个目的: 一是控制电渗<sup>[36,37]</sup>; 二是抑制分析物和管壁的相互作用<sup>[38,39]</sup>, 主要用于蛋白质和 DNA 的分离中。在微流控芯片中, 由于比表面积比较大, 因此表面性质就显得尤为重要。芯片表面修饰主要也是为了控制电渗和抑制吸附, 但和传统毛细管电泳有所不同的是, 稳定的电渗流在微流控芯片体系中尤为重要。这是因为在微流控芯片中分离通道长度有限, 因此对分离条件进行优化, 就显得十分重要。重复的电渗流决定了芯片中进样区带的重复性, 进而决定了样品分析的重现性。可以通过对微流控芯片内表面进行充分冲洗, 或者使用一次性的芯片, 来得到重复的电渗流。通过对芯片内壁进行合适的修饰, 不仅可以降低分析物和内壁的相互作用, 提高整个分离效率和分离度; 也可以减小微流控芯片上反应池内的反应试剂与管壁的相互作用, 增加反应效率, 如 PCR 反应<sup>[40]</sup>等。在微流控芯片体系中, 由于通道复杂交错, 以及所用材料的多样性, 因此对其进行表面修饰就更具挑战性, 也要困难的多。

微流控芯片中的表面修饰同毛细管一样，也可以分为两大部分：静态修饰和动态修饰。静态修饰是指化合物（一般为聚合物）通过共价键和表面的功能基团相连，或通过交联反应聚合在通道内壁。动态修饰则是指可溶性表面活性物质吸附在内表面，通过在分析前用含有改性剂的溶液冲洗通道，或直接将改性剂加入到运行缓冲液中来实现。动态吸附的过程是可逆的，因此运行缓冲液中会含有大量的活性物质，不适合用于亲和研究，芯片与质谱联用，以及化学反应中。

#### 1.4.1 微流控芯片内表面的动态修饰

动态修饰比较简单、直接，表面活性剂和聚合物等活性物质被加入到运行缓冲液中，或在分析前用来冲洗通道，以实现通道内壁的改性。根据所添加的改性试剂的电荷不同，可以抑制、减小、或者增加通道内的电渗流。动态涂层对塑料芯片更具吸引力，因为在传统毛细管电泳中已建立好的表面化学如硅烷化反应等对大多数聚合物材料并不适用，而且复杂的表面修饰反应也会限制一次性使用的廉价的聚合物芯片的批量生产。

##### 1.4.1.1 玻璃和石英微流控芯片内表面的动态修饰

玻璃和石英微流控芯片和传统毛细管电泳的材质相接近，因此各种动态涂层的方法很容易从传统毛细管电泳转移到玻璃和石英微流控芯片中进行。

纤维素衍生物是最常用的动态涂层表面改性剂。Landers 小组<sup>[41]</sup>曾详细考察了聚合物所具有的筛分和动态涂层的双重作用。羟乙基纤维素（HEC）被发现在裸柱毛细管和微流控芯片中对双链 DNA 的筛分能力最强，其筛分能力与聚二甲基丙烯酰胺（PDMA）相当，优于线性聚丙烯酰胺（LPA）和聚乙二醇（PEO）。该小组<sup>[42]</sup>的研究工作进一步表明，与 HEC 相比较而言，相同浓度的羟丙基纤维素（HPC）的粘度要低得多。浓度高达 5% 的 HPC 仍具有相对较低的粘度，可以容易的灌进芯片通道中。HPC 可以直接用于分离而不需要预平衡步骤，这主要是因为 HPC 与微流控芯片内表面形成氢键。

Pimera 等人<sup>[43]</sup>采用了一种完全不同的方法对玻璃微流控芯片内表面进行动态涂层。他们以金的纳米颗粒为改性剂，首先在通道表面覆盖一层聚二烯丙基二甲基氨的氯化物（PDADMAC），然后将柠檬酸盐-金的纳米颗粒复合物吸附

到表面。表面只有 PDADMAC 而没有金的纳米颗粒时, 通道内的 EOF 指向阳极, 当吸附了金的纳米颗粒后, EOF 则指向阴极。和未处理过的芯片比较, 氨基苯酚对映体在表面吸附了金的纳米颗粒的芯片中的分离得到了较大的提高。将用 PDADMAC 和金的纳米颗粒处理后的芯片储存在水中, 发现在一个月内迁移时间的日相对标准偏差 (RSD) 小于 3%。

集成化学反应是微全分析系统 ( $\mu$ -TAS) 发展的重要组成部分<sup>[44]</sup>, 目前发展比较快的是在同一个微流控装置上实现 PCR 扩增和 DNA 片段的分离分析。对于这样的一个装置而言, 表面修饰不仅提高 DNA 片段的电泳分离能力, 也可以减少反应体系中酶及引物在微反应池内壁的吸附, 增加反应效率。Khundurina 小组<sup>[45]</sup>以玻璃为主要材料制作了一个集 PCR 扩增和 DNA 片段的分离为一体的微流控装置。在每次分析前, 用从 Bio-Rad 公司得到的一种含有专利保护试剂的分离缓冲液对通道内壁进行动态涂层, 以抑制 EOF 和样品。Landers 小组<sup>[46]</sup>对 DNA 片段在玻璃微流控装置中进行 PCR 扩增时所采用的不同动态涂层策略进行了详细的研究。实验发现, 当 HEC 浓度在 0.2% 以上时, 就可完全抑制聚丙烯管内或玻璃管内的  $\lambda$ -DNA 的扩增反应, 因此 HEC 不能用于芯片上 PCR 反应的动态涂层。未修饰过的玻璃表面会完全抑制  $\lambda$ -phage DNA 的扩增反应。聚乙烯醇 (PEG), 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), 环氧聚二甲基丙烯酰胺 (EPDMA) 则可以在一定程度上减小玻璃表面的抑制效应。

#### 1.4.1.2 聚合物微流控芯片内表面的动态修饰

目前可用于制作聚合物微流控芯片的材料很多, 所制作出来的芯片表面化学和电泳性质也不尽相同。因此不能简单的将一种表面修饰方法从一种聚合物芯片转移到另一种聚合物芯片上。

PMMA 是一种应用的比较广泛的聚合物芯片材料。采用动态涂层法不仅可以控制 EOF, 还可以增加 PMMA 表面的亲水性, 抑制吸附。Dang 等人<sup>[47]</sup>详细考察了各种传统毛细管电泳中效果较好的动态改性在 PMMA 芯片中的应用。实验发现低分子量的各种氨基化合物在 PMMA 芯片中的作用效果并不明显, 而亲水性的聚合物则可以明显改善分析物的吸附。中性亲水性聚合物如 PEG, HEC, HPMC 等在酸性条件下可以明显改善寡聚糖在 PMMA 芯片中的分离。Xu 等人

[48]也报道了以 HPMC 作为 PMMA 芯片中双链 DNA 片段分离的筛分介质, 通道中的 EOF 被抑制, 以甘露醇、葡萄糖和甘油为添加剂可以提高分离效率。Song 等人<sup>[49]</sup>以 E<sub>99</sub>P<sub>69</sub>E<sub>99</sub>(E 代表聚氧乙烯, P 代表聚氧丙烯)作为 PMMA 芯片中筛分双链 DNA 片段的介质。实验发现, 用中性表面活性剂 Brij 35, 78, 和 76 对 PMMA 芯片通道进行动态改性后, 可以提高通道表面与亲水筛分介质的相容性。Kato 等人<sup>[50]</sup>以阳离子淀粉类化合物作为 PMMA 芯片的动态改性剂。实验发现, 季胺淀粉类化合物对于抑制氨基酸和肽在通道内壁的吸附最为有效, 在运行缓冲液中添加 3% (w/v) 的季胺淀粉类化合物, pH 2.5—8.0 时, 天冬氨酸和谷氨酸的柱效均在 30 万/m 以上。

另一种应用比较广泛的聚合物芯片材料是 PDMS, 其表面的疏水性也较强。Ocvirk 等人<sup>[51]</sup>研究了 PDMS 芯片通道内 EOF 与缓冲液 pH 值 (pH 值在 3.0-10.5 之间) 之间的关系, 考察了不同分子量的离子化合物对 EOF 的影响, 在所研究的条件下 PDMS 芯片中的 EOF 均为负向。当在缓冲液中加入四丁基氯化铵 (1mM) 时, EOF 有一定程度的降低; 而加入十二烷基硫酸盐 (大于 100  $\mu$ M) 时, EOF 有明显的增加, 疏水性的化合物在 PDMS 芯片内表面有较强的吸附。Dou 等人<sup>[52]</sup>使用 MES 对 PDMS 芯片表面进行修饰。通过向缓冲液中添加 MES, 精氨酸、葡萄糖和蛋氨酸的分离效率有所提高。实验中所用的背景缓冲液为 20mM 的 NaOH, MES 在该条件下带负电荷, 因此很难用 MES 选择性地吸附在 PDMS 表面来解释 MES 对 EOF 的影响, 具体机理尚不十分清楚。Katayama 等人<sup>[53,54]</sup>通过在 PDMS 通道内表面依次吸附多层离子化合物来对其通道进行改性。通过将通道表面暴露在不同的带正电或负电的聚合物电解质中, 使其表面吸附不同的电解质。当通道表面只吸附有带正电的聚合物 PB 时, 只能观察到指向阳极的电渗流, 而当 PDMS 表面再吸附一层带负电的聚合物 DS 时, 则可以观察到指向阴极的电渗流, 和未处理的芯片相类似。

Barker 等人<sup>[55]</sup>采用多层聚合物电解质表面修饰方法, 对聚苯乙烯 (polystyrene) 和聚乙烯对苯二酸盐乙二醇 (PETG) 微流控芯片内表面进行修饰。将聚丙烯胺氢氯化物 (Poly(allylamine hydrochloride)) 和聚磺酸苯乙烯 (Poly(styrene sulfonate)) 依次沉积在芯片内表面。当通道内表面修饰的分子层

为奇数时, 所对应的为带正电的 Poly(allylamine hydrochloride), EOF 指向阳极; 而当所修饰的分子层为偶数时, 所对应的为带负电的 Poly(styrene sulfonate), EOF 指向阴极。当 pH 值在 3.0-7.0 之间时, EOF 与溶液的 pH 值无关。芯片内表面用聚合物电解质冲洗后, 即可重新生成。

Gaudioso 和 Craighead<sup>[56]</sup>对以 Zeonor 为材料的微流控芯片中 EOF 进行了研究。实验发现, 未处理过的芯片通道内观察不到 EOF。如果在封接前将芯片放进氧等离子体中进行氧化, 则会观察到指向阴极的 EOF。氧化后的微流控芯片随着时间的推移有老化效应, 通道内的 EOF 也随之降低。在运行缓冲液中加入线性聚丙烯酰胺, 则可以抑制通道内的 EOF。

#### 1.4.2 微流控芯片内表面的静态修饰

表面的静态修饰通常被认为是减少分析物和通道内壁之间相互作用以及控制电渗流最有效的方法。理想状态下, 静态修饰十分稳定, 不必像动态涂层那样, 经常需要进行重新修饰。因为通道内表面的静态修饰物质并不溶于缓冲液中, 因此可以用于动态修饰并不适合的亲和反应、集成化学反应如 PCR 扩增、以及与质谱的在线联用等应用中。静态修饰通常操作过程比较繁琐, 因此对可大批量生产的一次性使用的聚合物微流控芯片缺乏吸引力, 而对造价比较高、可重复使用的玻璃和石英微流控芯片则具有较大的吸引力。

##### 1.4.2.1 玻璃和石英微流控芯片内表面的静态修饰

与前面所讨论的动态修饰相似, 静态修饰方法也可以十分容易的从传统毛细管电泳转移到玻璃和石英微流控芯片中进行。绝大多数静态修饰方法与硅烷化反应有关。目前应用最广泛的静态修饰方法是 Hjerten 所提出的聚丙烯酰胺 (PAA) 涂层法, 已有多个研究小组<sup>[57,58,59,60,61,62]</sup>将 PAA 涂层用于玻璃和石英微流控芯片中 DNA 片段的分离分析。Shimadzu (岛津, 东京, 日本) 公司已生产出商品化 PAA 涂层的石英微流控芯片。Culbertson 等人<sup>[63]</sup>根据 Hjerten 的方法有选择性的对微流控芯片通道进行改性, 对以电渗流为驱动力的压力泵进行研究。该微流控芯片的功能元件主要包括一个 T 形的交叉通道, 一个进口, 两个出口。将进口一端保持高压, 一个出口接地, 另一个出口悬浮, 通过管壁改性减少接地端通道内的电渗流, 这样在两个出口端就会形成一个压力驱动液体流。研

研究发现该压力泵具有离子分辨能力。Zhang 等人<sup>[64]</sup>采用 PAA 和 PVA 涂层两种方法，将微流控芯片与质谱进行联用，对肽和蛋白质样品进行了分析。蛋白质的峰型表明 PAA 涂层可以有效的降低蛋白质在微流控芯片表面的吸附。

Munro 小组<sup>[65]</sup>对各种基于硅烷化反应基础上的不同内表面修饰方法进行了研究。重点考察了各种改性方法与 PCR 扩增反应中的试剂及酶等的相容性，发现通过硅烷化反应和减氢法生成的 PVP 内表面抑制吸附的效果最好。将其与通过 Hjerten 方法所生成的 PAA 内表面相比较。实验发现，二者对 DNA 片段的分离能力相同，但 PVP 改性的微流控芯片在进行 PCR 产物分析时，稳定性和重复性更好一些。

PVA，被认为是亲水性最强的非离子聚合物，在传统毛细管电泳表面修饰中已有很好的应用<sup>[66,67]</sup>。Zhang 等人<sup>[64]</sup>研究了 PVA 在微流控芯片表面修饰中的应用，该涂层方法主要依据 Karger 和 Goetzinger 的专利，以硅烷化反应为基础。Belder 小组<sup>[68]</sup>报道了一种不需要硅烷化反应，反应过程相对简单的玻璃芯片内表面 PVA 修饰方法。该方法最早是由 Gilges 等人<sup>[66]</sup>引入到传统毛细管中的，将通道表面吸附的聚合物薄膜高温固化。首先用 1% 的 PVA 溶液冲洗微流控芯片通道，然后用氮气吹干，在氮气的保护下加热固化。和未修饰的微流控芯片相比，PVA 处理过的微流控芯片中的 EOF 减小，分离效率有了明显的提高。Belder 小组<sup>[69]</sup>将该 PVA 处理过的微流控芯片用于荧光素异硫氰酸酯（FITC）—氨基化合物对映体的分离，对映体在修饰后的微流控芯片中得到了基线分离。

Xiong 等人<sup>[70]</sup>在硅烷化反应的基础上，在玻璃微流控芯片上实现了特定通道内表面蛋白质的固定。主要通过电渗流来精确控制试剂在微通道网络内的输运，以实现在特定位置上蛋白质的固定。通过监测通道内 mono-b-D-galactopyranoside 的水解产物，来确定固定在通道内表面的  $\beta$ -牛乳糖的酶活性。

Badal 小组<sup>[71]</sup>通过热裂解硅树脂油来对石英毛细管和玻璃微流控芯片内表面进行修饰，使其生成一个疏水的 PDMS 表面。通道内的 EOF 约降低 2 倍，在缓冲液中加入 0.01% 的 Brij 35 会导致 EOF 的进一步降低。将带电荷的表面活性剂与 Brij 35 同时用于 PDMS 修饰过的通道中，可以进行蛋白质的电泳分析。

Popat 等人<sup>[72]</sup>发展了一种新的无水修饰方法,通过气相沉积法在玻璃表面修饰上一层 PEG 分子,提高了通道表面的亲水性。实验发现,修饰后的玻璃微通道表面可以减少约 80%的蛋白质吸附。

#### 1.4.2.2 聚合物微流控芯片内表面的静态修饰

与玻璃微流控芯片不同,聚合物微流控芯片必须根据各自材料的不同,采取不同的方法对内表面进行改性处理。这不仅包括表面的修饰,也包括采取各种化学或物理手段对材料本身进行改性。

Henry 等人<sup>[73]</sup>对 PMMA 芯片表面的酯基进行氨解反应,使 PMMA 表面带有氨基活性基团,表面氨基化的 PMMA 通道内 EOF 方向改变。PMMA 表面的氨基可以用来固定酶或和 1-异氰酸酯十八烷进一步发生反应,使 PMMA 表面被十八烷基覆盖。该 C<sub>18</sub>-PMMA 微流控芯片可以进行 DNA ladder 的反相电色谱分离<sup>[74]</sup>。Henry 小组还对以聚碳酸酯为材料制成的微流控芯片用三氧化硫气体进行处理,使其产生一个硫化的更加亲水的表面<sup>[75]</sup>。在低 pH 值时,EOF 有显著的增加,而在高 pH 值 (pH >8.0) 时,硫化后的通道内的 EOF 则与未处理过的相近。Johnson 等人<sup>[76,77]</sup>采用激光消融 (laser ablation) 技术对 PMMA 芯片表面进行处理。以脉冲紫外准分子激光器 (KrF, 248nm) 为光源,在稍低于临界值的能量和频率下,对 PMMA 表面进行处理,使其表面产生羧基而不改变表面的物理形态。和未处理的区域相比,激光处理过的区域 EOF 平均要增加 4%。用该方法可以有选择性的对 90 度弯角外侧内壁的表面电荷进行处理,以减小因弯角所造成的区带展宽。通过激光对芯片表面进行处理的方法也适用于其他材料,如聚苯乙烯,纤维素醋酸酯, PETG, 氯化聚乙烯和聚碳酸酯等<sup>[78,79]</sup>。

通过等离子体氧的氧化处理,可以使 PDMS 表面的 Si-CH<sub>3</sub> 基团被 Si-OH 所代替,从而改变 PDMS 表面极强的疏水特性,增加表面的亲水性<sup>[80,81]</sup>。Wang 等人<sup>[82]</sup>用特斯拉线圈 (Tesla coil) 放电的方法对 PDMS 表面进行氧化处理,紧接着用 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APS) 对氧化后的表面进行化学处理。在 pH 值为 8.0 时,氧化后的 PDMS 和玻璃微流控芯片的 EOF 差不多,是未处理过的 PDMS 微流控芯片的 3 倍,而氨基化处理过的 PDMS 微流控芯片中的 EOF 则要比未处理过的小。Hu 等人<sup>[83]</sup>通过紫外光聚合一步反应对 PDMS 表面进行了修

饰。各种聚合物单体通过交联反应连接在 PDMS 表面，形成一个亲水性的表面。聚合物处理过的 PDMS 芯片中的 EOF 要比氧化处理过的 PDMS 芯片中的 EOF 小，暴露在空气中，也不随着时间而改变。以二肽为分离对象，发现二甲基丙烯酰胺（DMA）和 PEG-单甲氧丙烯酸酯处理过的微流控芯片的分离能力比氧化处理过的要好。不久 Hu 等人<sup>[84]</sup>以苯甲酮作为光引发剂，将以上光聚合反应时间由原来的 3 个小时缩短为 5 分钟，而分离效率基本保持不变。Wirth 等人<sup>[85]</sup>通过热聚合反应在 PDMS 微通道内表面上键合一层聚丙烯酰胺涂层，处理后的 PDMS 芯片可用于蛋白质的分离，但柱效并不高，只有 33,000/m。

Henry 小组<sup>[86]</sup>研究了以热凸印法和激光消融两种方法所制作的 PETG 微流控芯片中的电渗流。热凸印法制作的微流控芯片水解处理后，可以在 PETG 通道内表面产生羧基基团。实验发现，不同的制作过程和处理方法可以产生不同的 EOF。激光消融法制作的芯片和热凸印法制作的芯片水解后的 EOF 差不多，都比水解前芯片中 EOF 稍高一些。将激光消融法制作的芯片内表面氨基化处理以后，通道内的 EOF 有所下降，但仍指向阴极。

## 1.5 微流控芯片中检测器

随着微流控芯片体系微型化发展，对检测器尺寸和灵敏度也提出了更为苛刻的要求。如微通道内样品的体积一般在 1 nL 左右，检测光程一般只有几十微米左右，而且分离速度很快，因此对检测器灵敏度和响应速度要求比较高。目前激光诱导荧光法（LIF）因其灵敏度比较高，在微流控装置中应用最广泛；电化学（EC）检测因不需要对样品进行预标记，易于微型化等特点，在微流控装置中也逐渐得到了较多应用；质谱（MS）因其高灵敏度和强大的分析能力，也逐渐被应用到微流控装置中，但目前关于 MS 与芯片的接口仍没有完全解决。化学发光检测（CL）因其仪器比较简单，不需要光源，因此在最近也被用于微流控芯片检测中。下面将主要对 LIF 检测器进行一下介绍。

### 1.5.1 激光诱导荧光检测器

尽管绝大多数化合物自身没有荧光，必须经过标记后才能用于 LIF 检测，但 LIF 仍然是目前微流控芯片体系中应用最为广泛的首选检测器。Paegel 等人

搭建了一个四色荧光共聚焦旋转扫描检测体系，最多可以同时检测到同一芯片上的 384 个分离通道。该体系已成功用于多通道 DNA 片段的分离研究<sup>[87,88,89]</sup>。

最近几年，商品化大功率、短波长发光二极管（light-emitting diodes (LED)）不断问世。因 LED 价格低廉、体积较小，易于集成，因此被用于微流控芯片体系，以代替昂贵的激光器作为激发光源。但 LED 的单色性较差，半波宽一般在 20—30 nm 之间，不易将其与所检测的荧光信号过滤开，对信号检测会有一些影响。Chabinye 等人<sup>[90]</sup>将 LED(发蓝光)和微雪崩光电二极管(micro avalanche photodiode ( $\mu$ -APD))集成在 PDMS 芯片上，该装置的检测器可以重复利用，而芯片则可以一次性使用。首先将一光纤（100  $\mu$ m 孔径）包埋在 PDMS 芯片中，光纤的末端紧挨着微通道的内壁，通过光纤将 LED 所发出的激发光传输到微通道内，激发样品产生荧光。 $\mu$ -APD 被包埋在一 PDMS 平板内（1 cm），通过在  $\mu$ -APD 上面放置一个彩色聚碳酸酯滤光片（厚 80  $\mu$ m），来过滤散射光，减少噪音干扰。 $\mu$ -APD 装置安放在 PDMS 芯片下面，其检测面与光纤末端垂直。PDMS 芯片中荧光素的检测限约为 25 nmol/L，该装置已成功用于蛋白质和小分子的毛细管电泳分析检测。Uchiyama 等人<sup>[91]</sup>通过原位聚合的方法将一蓝色 LED 集成在聚酯微流控芯片上，LED 发光端面紧贴微通道内壁。荧光由包埋在芯片内，与 LED 发光端面垂直的光纤收集传输。FITC-氨基酸在该装置中得到了成功分离。图 1-5 是集成式 LED-IF 微流控芯片装置的正面俯视图。原位聚合方法将有可能实现检测器在芯片上的集成，为微流控芯片装置的集成化、微型化开辟了一条新的道路。

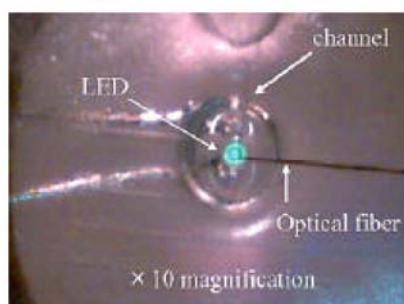


图 1-5 集成式 LED-IF 微流控芯片装置的正面俯视图

Fig. 1-5 Close-up view of the LED-IF detector in the chip

### 1.5.2 其他检测器

与LIF检测系统相比, 电化学检测 (EC) 虽然检测灵敏度稍低, 但由于其成本低、不需要荧光标记、体积小, 利于整个微流控系统的微型化和集成化, 因此近年来受到了越来越多的重视。Fanguy等人<sup>[92]</sup>研制了一种离线型安培检测器用于PDMS/玻璃芯片中。离线型安培检测器易于对电极表面进行改性处理和清洗, 适用的范围要更宽一些。与离线型不同, Galloway等人<sup>[93]</sup>将在线型电化学检测器集成在注塑型PMMA芯片上, 用于单离子和多离子分离。在线型电化学检测器易于操作、体积较小, 是未来微流控芯片检测器发展的主流方向之一。

随着对蛋白质等生物分子痕量检测需求的不断增加, 高灵敏度的质谱 (MS) 在微流控芯片装置中也得到了越来越多的应用<sup>[94]</sup>。电喷雾时间飞行质谱 (electro-spray ionization (ESI) coupled with time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS),) 因可以对生物大分子进行高灵敏检测, 而被用于微流控芯片检测。目前已有报道对芯片与ESI-MS的接口进行了研究<sup>[95,96,97]</sup>。一般接口是通过微通道末端的泰勒 (Taylor) 锥形装置, 将分离后的样品注入MS中。

化学发光 (CL) 检测可以达到单分子水平, 具有极高的灵敏度, 响应信号的动态范围较高, 特别是仪器简单, 不需要光源, 因此芯片 CE—CL 联用逐渐引起了广泛的兴趣<sup>[98,99]</sup>。Liu and Terabe 等人<sup>[98]</sup>在 PDMS 芯片上实现了 CL 检测器的集成。该体系包含两种 CL 反应, 可在 1 分钟内实现 Cr(III), Co(II), 和 Cu(II) 三种金属离子, 以及单磺酰苯基丙氨酸对映体的芯片电泳分离。

其他包括紫外吸收、表面等离子体共振 (surface plasma resonance, SPR)、热透镜 (thermal lens)、喇曼光谱法、以及全息折射指数法 (Holographic Refractive Index Detection) 等多种检测方法也已被用于微流控芯片的检测, 在这里将不作详细阐述, 具体内容可参考文献<sup>[100,101,102,103,104]</sup>。

### 1.6 微流控芯片的应用研究

微流控芯片与传统毛细管电泳相类似, 都是以电渗流作为主要的流体驱动

力, 因此传统毛细管电泳中的各种应用基本都可以转移到微流控芯片上进行。这些应用主要包括生物分子的分离, 如蛋白质、肽和核酸等的分离分析, 以及均相生化分析, 如酶分析和免疫反应等。因为在微流控芯片中可以集成不同的操作单元, 因此除了常规的电泳分析外, 微流控装置还可以进行一些其他的分析, 如基于生物分子固载的生化分析, 和集成在芯片上的多步化学反应等。下面将对微流控芯片的应用研究, 主要是针对生物分子的分离分析(核酸和蛋白质)和生化反应(酶活性和酶底物测定, 及免疫分析)做一简单的介绍。关于微流控芯片在糖、细胞、单分子等其他方面的应用研究, 以及泵、阀和传感器等各种功能单元的集成, 可以参照文献综述<sup>[105,106,107,108,109,110]</sup>。

### 1.6.1 微流控芯片中核酸分离分析

第一台商品化微流控分析装置就是用于核酸分析, 特别是 PCR 产物的分析<sup>[111]</sup>, 主要用来检测外源性和内源性 DNA, 如基因突变和单核苷酸多态性检测(SNP)等。最近微流控芯片也被用于基因组测序工作中<sup>[112,113]</sup>。

测定特定核酸序列缺失时, 一般要对其聚合酶链扩增反应(PCR)产物进行电泳检测。因为不同长度的 DNA 片段具有相同的荷质比, 因此需要利用聚合物溶液所形成的孔状结构对 DNA 片段进行筛分。在缓冲液中加入嵌入式染料, 如溴化乙啶, YOYO-1 等, 或在进行 PCR 扩增时将引物末端荧光标记, 就可以将激光诱导荧光检测体系用于微流控芯片中核酸分析的检测。和传统的毛细管电泳相比, 微流控芯片在核酸分析方面具有独特的优势, 即单位信息量高和功能集成。微流控芯片分析速度快, 可以采用较高的场强, 当分离通道长为 3.5cm 时, 在两分钟内即可完成长度在 72-1400bp 之间的 DNA 片段的测序分离<sup>[114]</sup>。如此短的分选时间, 加上微流控芯片易于实现分离微通道的阵列化, 通过并列分布、扇形排列及圆形布局等结构设计, 可以很容易的在一片微流控芯片上同时刻蚀几十甚至上百条微通道, 这些都将极大的提高核酸分析的单位信息量。Wooley 等人首先在同一片微流控芯片上排列了 48 条通道, 可以同时完成 96 个 DNA 样品的分析<sup>[115]</sup>。该小组目前已经可以在直径为 200mm 的玻璃底板上排列 384 条分离微通道, 在 325s 内成功的完成了 384 个与疾病有关的突变基因分型检测<sup>[116]</sup>。