



中国科学院大学  
University of Chinese Academy of Sciences

## 博士学位论文

基于微流控技术的数字 ELISA 研究

作者姓名: 高则航

指导教师: 赵建龙 研究员

中国科学院上海微系统与信息技术研究所

学位类别: 工学博士

学科专业: 微电子学与固体电子学

培养单位: 中国科学院上海微系统与信息技术研究所

2021 年 6 月

**Digital ELISA Based on Microfluidic Technology**

**A dissertation submitted to  
University of Chinese Academy of Sciences  
in partial fulfillment of the requirement  
for the degree of  
Doctor of Philosophy  
in Microelectronics and Solid-State Electronics**

**By**

**Zehang Gao**

**Supervisor: Professor Jianlong Zhao**

**Shanghai Institute of Microsystem and Information  
Technology, Chinese Academy of Science**

**June 2021**

**中国科学院大学**  
**研究生学位论文原创性声明**

本人郑重声明：所呈交的学位论文是本人在导师的指导下独立进行研究工作所取得的成果。尽我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对论文所涉及的研究工作做出贡献的其他个人和集体，均已在文中以明确方式标明或致谢。

作者签名：高则航  
日期：2021.5.27

**中国科学院大学**  
**学位论文授权使用声明**

本人完全了解并同意遵守中国科学院有关保存和使用学位论文的规定，即中国科学院有权保留送交学位论文的副本，允许该论文被查阅，可以按照学术研究公开原则和保护知识产权的原则公布该论文的全部或部分內容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存、汇编本学位论文。

涉密及延迟公开的学位论文在解密或延迟期后适用本声明。

作者签名：高则航  
日期：2021.5.27

导师签名：李健  
日期：2021.5.27

## 摘要

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, 酶联免疫吸附检测) 是一种通用的蛋白质免疫学检测技术, 该方法结合了酶的高效催化性和抗原抗体反应的特异性, 具有快速、灵敏、简便等优点, 已在临床检验、环境监测、食品卫生、法医鉴定和兴奋剂检测等众多领域受到了广泛应用。目前常规 ELISA 方法的检测限只能达到  $\text{pM}(10^{-12} \text{M})$  量级, 无法满足许多重大疾病早期检测的需求, 因此, 发展更高灵敏度的生物标志物检测新技术, 实现重大疾病的早期诊断, 已经成为当代社会迫切需要解决的重大课题。

随着微纳加工技术的发展, 微流控芯片技术因其具有小型化、所需样本量少、易操作及可集成等优点, 逐渐成为生物分子高灵敏检测的优选平台。基于微流控技术发展而来的数字 ELISA 是一种对生物分子的绝对定量检测技术, 可有效解决传统 ELISA 方法检测限的局限性。数字 ELISA 将样品与试剂分散成许多个微单元, 然后在每个微单元中进行孵育、反应结果计数等步骤。每个磁珠所连接酶标复合物的催化反应都被限制在一个极小体积内, 可以有效地提高微单元内产物分子的发光或显色强度, 最终提高蛋白质检测灵敏度。本论文利用微流控芯片技术, 构建了用于 CEA 高灵敏度检测的数字 ELISA 微流控芯片技术平台, 主要工作内容如下:

1. 研究了基于微流控技术的液滴生成芯片、芯片内流体驱动技术、基于频闪技术的高通量液滴生成可视化和调控技术(SVMHD)和显微镜观察记录平台, 在此基础上, 构建了数字 ELISA 微流控芯片技术平台, 该平台具有很好的稳定性, 适合液滴高频生成、调控和实时观测。利用该平台, 在微流控芯片内生成了均一稳定的液滴, 并对液滴生成频率、尺寸进行了测试, 且可视化了液滴的生成过程, 确保双水相 1:1 混合, 最后对 SP-AKP 聚合酶浓度进行了数字化检测。

2. 由于酶催化荧光产物分子在液滴之间的扩散, 影响了信号的正确读取。为了降低荧光分子在液滴间的扩散, 设计了一种液滴分散阵列(DIA)微流控芯片, 将液滴捕集在微腔下以保持分散, 从而降低荧光分子在液滴间的扩散, 使得液滴信号的可读取时间可从 1 分钟延长到 30 分钟, 大大提高了后续检测系统的可操作性和结果的准确性。最终, 准确的信号识别使得在 6 min 的检测时间内, 聚合

酶的检测限达到 309 aM, CEA 的最低检测限约为 8 fM, CV 从 30%减小到 10%。较好的满足癌症早期诊断的需求, 初步完成数字 ELISA 实验室阶段的开发。

3. 为了推进数字 ELISA 微流控芯片的工程化, 进行了一系列的探索工作。首先通过对注塑材料及加工工艺的探索, 开发了一套适合液滴式数字 ELISA 芯片批量化生产的材料和加工工艺。另外为有效过滤气泡, 研发了一种气泡过滤结构, 可实现液滴零气泡储藏。为降低材料荧光背景干扰, 缩短孵育检测时间, 在微流控芯片中引入镀铝溅射工艺, 使得芯片孵育检测时间从 6 分钟缩短为 4 分钟。初步实现了工程化批量制备数字 ELISA 微流控芯片, 迈出了从实验室手工组装产品到市场化检测商品的坚实一步。

**关键词:** 癌胚抗原检测, 液滴微流控, 数字 ELISA, 注塑芯片

## Abstract

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) is a universal protein immunological assay technique that combines the efficient catalytic properties of enzymes and the specificity of antigen-antibody reactions, with the advantages of rapidity, sensitivity and simplicity, and has been widely used in clinical testing, environmental monitoring, food hygiene, forensic identification and doping. It has been widely used in many fields such as clinical testing, environmental monitoring, food hygiene, forensic identification and doping control. The detection limit of conventional ELISA methods can only reach the pM ( $10^{-12}$  M) level, which cannot meet the needs of early detection of many major diseases. Therefore, the development of new technologies for the detection of biomarkers with higher sensitivity to achieve early diagnosis of major diseases has become a major issue that needs to be addressed urgently in contemporary society.

With the development of micro and nano processing technology, microfluidic chip technology has gradually become the preferred platform for highly sensitive detection of biomolecules due to its advantages of miniaturization, low sample volume required, easy operation and integration. The digital ELISA, based on microfluidic technology, is an absolute quantitative detection technique for biomolecules that can effectively address the limitations of traditional ELISA methods. The digital ELISA disperses the sample and reagents into a number of micro-units, and then incubates and counts the reaction results in each micro-unit. The catalytic reactions of the enzyme-labelled complexes attached to each microsphere are confined to a very small volume, which can effectively increase the luminescence or colour development intensity of the product molecules within the microunit, ultimately improving the sensitivity of protein detection. In this thesis, a digital ELISA microfluidic chip technology platform for high sensitivity detection of CEA was constructed using microfluidic chip technology, with the main work as follows.

1. A microfluidic-based droplet generation chip, an on-chip fluidic drive technology, a stroboscopic-based high throughput droplet generation visualisation and regulation technology (SVMHD) and a microscope observation and recording platform were investigated, on which a digital ELISA microfluidic chip technology platform was constructed, which has good stability and is suitable for high frequency droplet generation, regulation and real-time observation. Using this platform, homogeneous

and stable droplets were generated within the microfluidic chip, and the droplet generation frequency and size were tested and the droplet generation process was visualised to ensure 1:1 mixing of the dual aqueous phases, and finally the SP-AKP polymerase concentration was digitally detected.

2. The correct reading of the signal was hampered by the diffusion of the enzyme-catalysed fluorescent product molecules between droplets. To reduce the diffusion of fluorescent molecules between droplets, a droplet dispersion array (DIA) microfluidic chip was designed to trap droplets under a microcavity to maintain dispersion, thereby reducing the diffusion of fluorescent molecules between droplets, allowing the readable time of the droplet signal to be extended from 1 to 30 minutes, greatly improving the operability of the subsequent detection system and the accuracy of the results. Ultimately, the accurate signal identification resulted in a detection limit of 309 aM for polymerase and a minimum detection limit of approximately 8 fM for CEA within a 6 min detection time, with a reduction in CV from 30% to 10%. This better meets the needs of early cancer diagnosis and initially completes the development of the laboratory phase of the digital ELISA.

3. In order to advance the engineering of the digital ELISA microfluidic chip, a series of exploratory works were carried out. Firstly, through the exploration of injection moulding materials and processing processes, a set of materials and processing processes suitable for the batch production of droplet-based digital ELISA chips was developed. In addition, in order to effectively filter air bubbles, a bubble filter structure was developed, which can achieve zero bubble storage for droplets. To reduce the fluorescence background interference of the material and shorten the incubation detection time, an aluminium plating sputtering process was introduced into the microfluidic chip, which shortened the chip incubation detection time from 6 minutes to 4 minutes. Initially, we have achieved the engineering of batch production of digital ELISA microfluidic chips. A solid step has been taken from the manual assembly of products in the laboratory to marketable assay commodities.

**Key Words:** CEA detection, Droplet microfluidics, Digital ELISA, Plastic chip

## 目 录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 引言.....	1
1.2 蛋白标志物的常用检测方法.....	3
1.2.1 基于光学的检测方法.....	3
1.2.2 基于电学的检测方法.....	6
1.3 传统 ELISA.....	9
1.4 数字 ELISA.....	11
1.4.1 微腔式数字 ELISA.....	14
1.4.2 液滴式数字 ELISA.....	16
1.5 论文研究主要内容及安排.....	19
1.6 本章小结.....	20
第 2 章 数字 ELISA 液滴微流控平台的构建.....	21
2.1 引言.....	21
2.2 数字 ELISA 液滴微流控平台的整体设计.....	22
2.2.1 材料和仪器.....	25
2.2.2 液滴微流控芯片的制备.....	26
2.2.3 流体驱动装置的搭建.....	28
2.2.4 液滴高通量生成观测系统的设计与实现.....	29
2.2.5 液滴信号的读取.....	32
2.3 结果与讨论.....	33
2.3.1 液滴生成频率.....	33
2.3.2 运动模糊的控制.....	34
2.3.3 液滴生成过程可视化.....	36
2.3.4 利用数字 ELISA 液滴微流控平台对球刷聚合酶浓度进行检测.....	37
2.4 本章小结.....	42
第 3 章 基于液滴分散阵列的数字 ELISA 微流控芯片.....	43
3.1 引言.....	43
3.2 液滴间荧光扩散模型.....	45
3.3 芯片设计.....	49
3.3.1 关键参数的设计.....	50

3.4 芯片和材料制备 .....	52
3.4.1 实验材料和仪器 .....	52
3.4.2 硅片模具的制备 .....	52
3.4.3 试剂配制 .....	54
3.5 结果与讨论 .....	55
3.5.1 关键参数的优化 .....	55
3.5.2 液滴分散阵列对荧光扩散的影响 .....	57
3.5.3 球刷聚合酶浓度的检测 .....	58
3.5.4 CEA 的检测 .....	60
3.6 本章小结 .....	61
<b>第 4 章 数字 ELISA 芯片的工程化探索 .....</b>	<b>63</b>
4.1 引言 .....	63
4.1.1 热固性塑料 .....	63
4.1.2 弹性体 .....	63
4.1.3 热塑性塑料 .....	64
4.2 注塑材料的对比选择 .....	65
4.2.1 表面接触角 .....	65
4.2.2 自发荧光背景 .....	66
4.3 微流道封接工艺的对比选择 .....	67
4.3.1 微流道尺寸测试 .....	69
4.3.2 液滴生成测试 .....	70
4.4 芯片结构的工程化探索 .....	71
4.5 荧光液滴检测的工程化探索 .....	73
4.6 本章小结 .....	75
<b>第 5 章 总结与展望 .....</b>	<b>77</b>
5.1 论文总结 .....	77
5.2 论文的创新点 .....	78
5.3 工作展望 .....	79
<b>参考文献 .....</b>	<b>81</b>
<b>致 谢 .....</b>	<b>91</b>
<b>作者简历及攻读学位期间发表的学术论文与研究成果 .....</b>	<b>93</b>

## 第1章 绪论

### 1.1 引言

癌症是一组复杂的疾病，其特点是异常细胞不受控制地生长和扩散，长期以来一直是许多国家人民的主要死亡原因。根据 GLOB-CAN 2018 年的估计数据<sup>[1]</sup>，在 2018 年全世界一共有 1810 万新发癌症病例以及 960 万癌症死亡病例，其中，中国估计有 430 万新发癌症病例和 290 万癌症死亡病例。癌症导致的死亡率呈逐年上升的趋势，其中，肺癌是最常见的癌症（占 11.6%），也是癌症死亡的主要原因（占癌症死亡总数的 18.4%）。在我国，肺癌的发病率和死亡率在恶性肿瘤中居首位，已成为世界上最大的肺癌国家。估计到 2025 年，我国的肺癌患者将超过 100 万。哈佛大学根据我国现有数据及情况曾分析认为，在未来 30 年，我国肺癌致死人数将高达 1800 万。肺癌在早期时没有明显的症状，待就诊时大多数患者就已是晚期，未能及时地治疗，5 年内的生存率仅为 10%。肺癌的高发生率是由于烟草危害、电离辐射、既往肺部感染以及日趋严重的环境污染，而极高的死亡率则是因为晚期诊断和获得及时、标准治疗的机会有限共同造成的<sup>[2]</sup>。如果能及时发现，肺癌早期切除后的 5 年生存率为 60-90%。

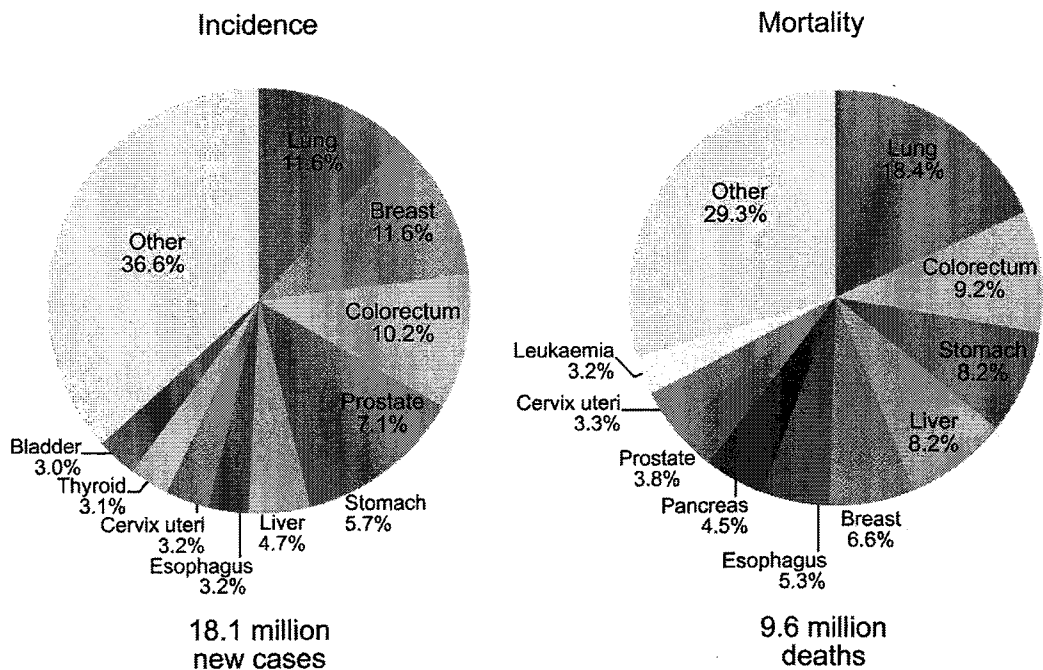


图 1.1 2018 年 10 种最常见癌症的病例和死亡人数分布图<sup>[1]</sup>

Figure 1.1 Distribution of cases and deaths for the 10 most common cancers in 2018

目前,肺癌检测的主要手段有影像学分析、细胞生物学检查以及病理学诊断<sup>[3-5]</sup>。影像学技术包括胸部 CT<sup>[6]</sup>、核磁共振<sup>[7]</sup>和支气管镜检<sup>[8]</sup>等。尽管低剂量 CT、PETCT、SpecCT 等,已经能够发现 1-3 mm 大小的结节,但是很难判断肿瘤良恶性,很可能会造成过度治疗。而且,影像学分析还存在假阳性高和辐射性等缺点。细胞生物学检查主要是指痰细胞学,通过检测痰液中从病灶处脱落的癌细胞,来对肺癌进行普查和诊断。病理学诊断是取患者肿瘤组织,在显微镜下进行病理诊断,是肿瘤检测中最可靠的方法,被视为肿瘤检测的“金标准”。但病理学方法对患者造成的创伤性较大,无法对病情进行动态监测。

随着癌症的研究与发展,生物标志物被指定为可以客观测量和评价生物体中特异性生物分子的水平 and 活性,作为对正常的生物过程、病理过程以及对治疗干预的药物反应过程进行评估的指示剂。癌症生物标志物包括蛋白质、DNA、mRNA、酶、代谢产物、转录因子和细胞表面受体等多种分子,存在于肿瘤组织或血清中<sup>[9]</sup>。癌症生物标志物在健康人群和癌症高危人群的筛查,判断特定类型的癌症,癌症患者的临床诊断、治疗过程以及预后的监测等方面具有重要的临床应用价值。

众所周知,蛋白质是生物体内重要的生物分子,是生命的许多方面的工作单位。蛋白质的异常表达或独特蛋白质的表达往往与某些疾病有关。对于癌症诊断来说,肿瘤蛋白标志物是由肿瘤细胞通过内分泌释放或者从肿瘤细胞表面剥离的蛋白,广泛地分布在血液、唾液、尿液、脑脊髓液以及痰等体液中,是一种高效、低损伤性、低成本和容易获取的肿瘤标志物,大多数与癌症相关的蛋白质生物标志物在疾病进展的早期或晚期都有多种临床用途,可用于监测治疗反应和在治疗后的随访中检测复发或进展,其中与肺癌相关的蛋白标志物主要有癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA)<sup>[10]</sup>、特异神经烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE)<sup>[11]</sup>、细胞角蛋白 19 片段 (cytokeratin 19 fragment, CYFRA21-1)<sup>[12]</sup>、血清胃泌素释放肽 (serum pro-gastrin releasing peptide, ProGRP)<sup>[13]</sup>和鳞状细胞癌抗原 (squamous cell carcinoma antigen, SCC)<sup>[14]</sup>。其中,CEA 是一种广谱肿瘤标志物,其含量不仅在所有类型的肺癌<sup>[15, 16]</sup>中有所体现,在结肠癌<sup>[17]</sup>、直肠癌<sup>[18]</sup>及其他恶性肿瘤<sup>[19, 20]</sup>的血清中也均有上升,是临床上应该较为广泛的蛋白标志物。研究发现此类蛋白标志物含量较高的患者,其预后往往较差<sup>[21, 22]</sup>。血液中蛋白肿瘤标志物含量的异常不仅对癌症早期的发生有预示作用,还能反映患者的治疗效果及病情发展情况,具有重要的临床意义。

## 1.2 蛋白标志物的常用检测方法

蛋白标志物的检测通常是基于目标蛋白与相应抗体的免疫反应。将抗体修饰在检测载体表面，通过抗原抗体的免疫识别对目标蛋白进行捕获，然后结合不同的检测技术，实现目标蛋白的检测。抗体捕获抗原的常用方法可以分为直接法和夹心法（如图 1.2 所示）。

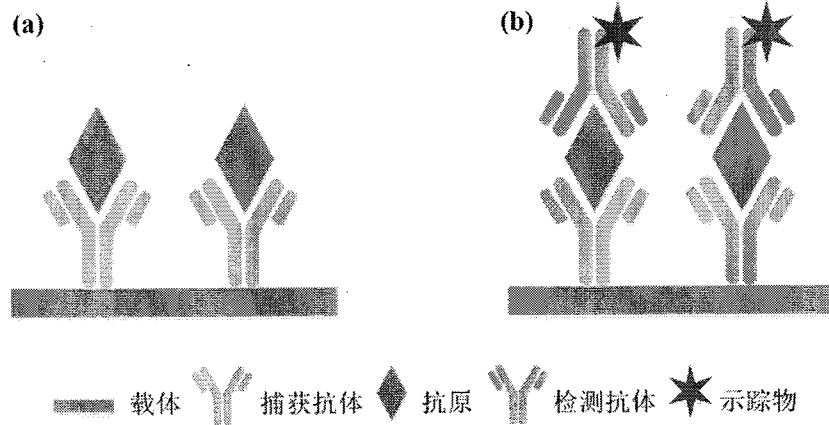


图 1.2 蛋白检测中抗原抗体免疫结合的常见类型

(a) 直接法和 (b) 夹心法。

Figure 1.2 Common types of antigen-antibody immunobinding in protein detection

(a) Direct method and (b) double antibody sandwich method.

直接法是只用一种抗体对抗原进行捕获，而夹心法则涉及到两种不同的抗体，分别是捕获抗体和检测抗体，这两种抗体能够识别同一抗原的不同位点。检测抗体上可以标志示踪物，如荧光分子、量子点和酶等，极大地丰富了抗原的检测手段。在不同的载体表面修饰多种捕获元件，并结合不同的检测技术，从而形成了各种各样的蛋白标志物的检测方法。这里根据数据读取以及采集方式的不同，将蛋白标志物的检测方法分为基于光学的检测方法和基于电学的检测方法。

### 1.2.1 基于光学的检测方法

基于光学的蛋白检测方法主要有放射性免疫测定（radioimmunoassay, RIA）、酶联免疫测定（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）、荧光免疫阵列（Flourescent Immunoassay, FIA）、侧流免疫层析法（Lateral Flow Immunoassay, LFIA）以及表面等离子体共振（Surface plasmon resonance, SPR）等方法<sup>[23-26]</sup>。

放射免疫分析（RIA）在 1950 年代由 Rosalyn Yalow 和 Solomon Berson 进行开发后，在全球范围内提高了各种医学诊断和研究的准确性。分析涉及放射性抗原和非放射性抗原两者之间竞争固定数量的抗体或受体结合位点。在加入待测样



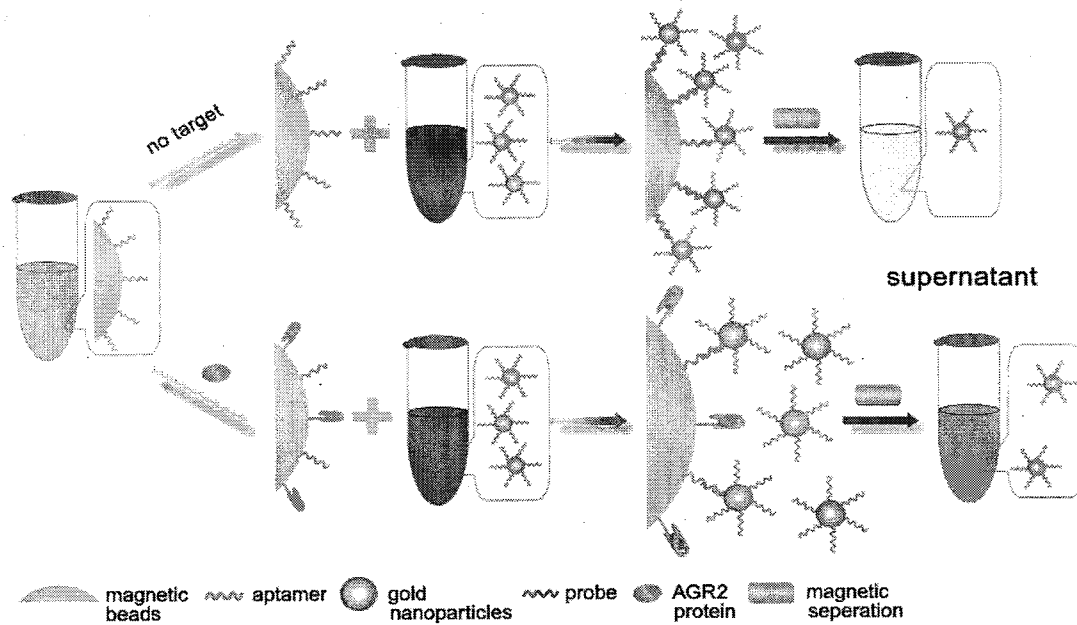


图 1.4 基于磁珠的 FIA 检测 AGR2 蛋白示意图<sup>[28]</sup>

Figure 1.4 Schematic of FIA detection of AGR2 protein based on magnetic beads

随着微纳加工技术的发展和成熟，微流控芯片因其具有小型化、所需样本量少、易操作及可集成等优点而逐渐成为生物分子检测的有利平台。由于免疫微球在溶液中具有流动性，为了便于分析，He Zhang 和 Yen-Heng Lin 利用微流控技术制作了容纳微球的空腔，最后通过读取空腔整体荧光强度来对目标蛋白进行定量检测。但微球在空腔中的排布较为紧密，个别微球甚至会相互交叠，导致微球之间荧光信号相互干扰，不利于观察，也对检测灵敏度造成影响。为了解决这一问题，Jesse V. Jokerst 提出了基于微孔阵列的微流控芯片，利用重力作用将微球沉降在只能容纳单个微球的微孔里，实现了微球的均匀排布，芯片结构如图 1.5 所示。作者利用 FIA 免疫法并以量子点作为信号分子，实现了癌症标志物 CEA、CA125 及 Her-2/Neu 的高灵敏度检测。此外，类似微孔阵列的结构还被用于基于免疫微球的其它标志物的检测中，如 HE4、CA72-4、NSE 和 CYFRA21-1。

LFIA 是一种廉价便携的蛋白检测方法，试纸条是其常见的形式。在抗原样本液的驱使下，携带捕获抗体的纳米金在试纸条上流动并与抗原相识别，最后在检测线的位置与检测抗体相结合。读取检测线的灰度值即可反映抗原的含量。尽管 LFIA 是一种快速且经济高效的一步式分析方法，但它的灵敏度有限，受环境温度和湿度的影响影响比较大，只能执行半定量分析。

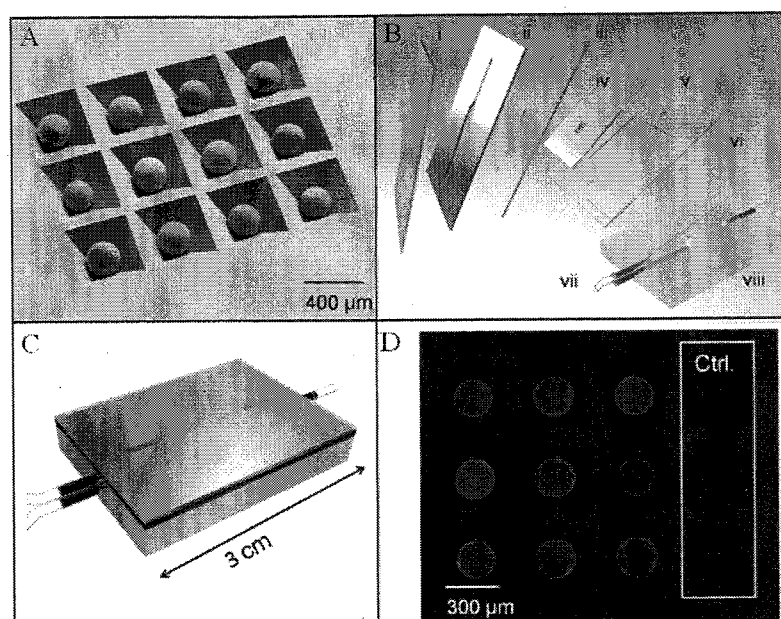


图 1.5 (A) 微孔阵列及微球均匀排布的 SEM 图; (B) 芯片的组装示意图; (C) 芯片封装后的示意图; (D) 免疫反应后微球的荧光图<sup>[29]</sup>。

Figure 1.5 (A) SEM diagrams of microporous arrays and uniform arrangement of microspheres; (B) Assembly diagrams of chips; (C) Diagrams of encapsulated chips; (D) Fluorescence diagrams of microspheres after immune response.

基于 SPR 的免疫测定结合是一种实时的无标记检测方法。在 SPR 中，配体被固定在涂有羧甲基葡聚糖单层的传感器芯片表面，然后贴在金表面，构成 SPR 基片。不同浓度的被分析物溶液从上面通过会引起其表面质量和折射率的变化，通过量化这些变化即可对蛋白标志物浓度进行检测。Tomas Springer 在金层表面进行 CEA 夹心法免疫反应，并利用生物素/链霉亲和素以及金纳米颗粒对 SPR 信号进行放大，实现了 SPR 传感器中 CEA 的高灵敏度检测。SPR 免疫测定法简单直接，但容易受到折射率变化和温度干扰的影响。

### 1.2.2 基于电学的检测方法

基于电学的检测方法具有灵敏度高、小型化和易于集成化等特点。根据数据获取方式的不同，可以分为基于电学器件的检测方法和电化学检测方法。电学检测是通过检测电学器件表面捕获目标分子后器件阻抗的变化来实现检测，而电化学检测是通过检测电极表面捕获目标分子后改变电极表面的特性来实现。

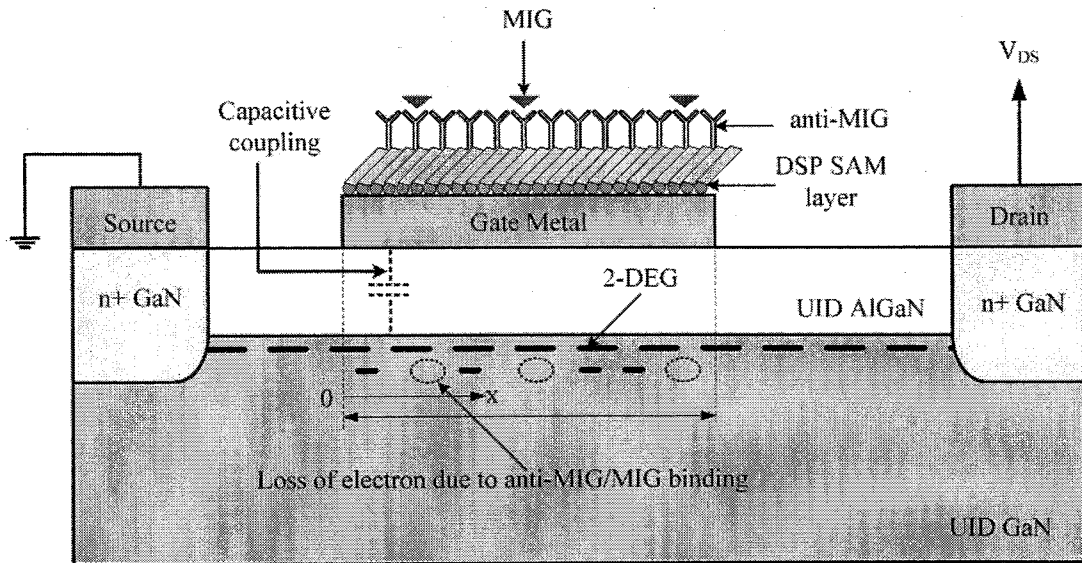


图 1.6 基于 AlGaIn/GaN HEMT 的蛋白检测原理示意图<sup>[30]</sup>

Figure 1.6 The schematic diagram of protein detection based on AlGaIn/GaN HEMT

随着微纳加工技术的发展, 功能化修饰的微纳器件及其与微流控芯片的结合正逐渐应用到生物分子的检测中。在基于电学器件的检测中, 生物功能化的场效应管 (Bio-FET) 是其比较常见的形式。Fahmida S. Tulip 等人在 AlGaIn/GaN HEMT (高电子迁移率晶体管) 的栅极上利用二巯基 (丁二酰亚胺) 丙酸酯 (dithiobis (succinimidyl) propionate, DSP) 自组装形成单分子层并将 MIG 抗体修饰在栅极上。最后通过检测漏极电流的变化来对 MIG 进行检测, 检测范围为 0.5-500 ng/mL<sup>[30]</sup>, 检测原理如图 1.6 所示。

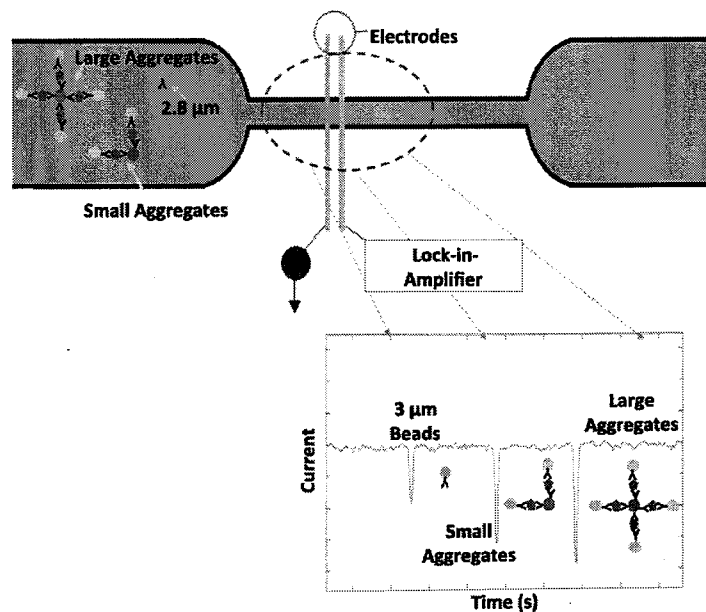


图 1.7 基于免疫复合物尺寸的电学检测示意图<sup>[34]</sup>

Figure 1.7 Schematic diagram of electrical detection based on size of immune complexes

Anran Gao 等人<sup>[31]</sup>利用硅纳米线构建场效应管 (SiNW-FET), 并对硅纳米线进行功能化修饰, 同样通过漏极电流的监测实现了 PSA 蛋白超高灵敏度的检测, 检测下限达到了 1 fg/mL。Na Lu 等人<sup>[32]</sup>利用微流控技术, 在 SiNW-FET 的基础上引入了微流控通道, 限制了功能化修饰的范围, 提高了修饰效率, 减少了试剂损失。同时, 作者在未稀释的人体血清中, 对 PSA 和 CYFRA21-1 实现了 10 fg/mL 的高灵敏度检测。此外, 石墨烯因其优异的电学性能也被用在 Bio-FET 的构建中<sup>[33]</sup>。除了 Bio-FET 的形式, Z. Lin 等人在微流控通道的下方铺设了两条电极, 当夹心法免疫后的蛋白复合物流经电极时, 复合物增加了电极之间的阻抗, 从而引起了电流的波动<sup>[34]</sup>, 如图 1.7 所示, 以此作为蛋白检测的依据。

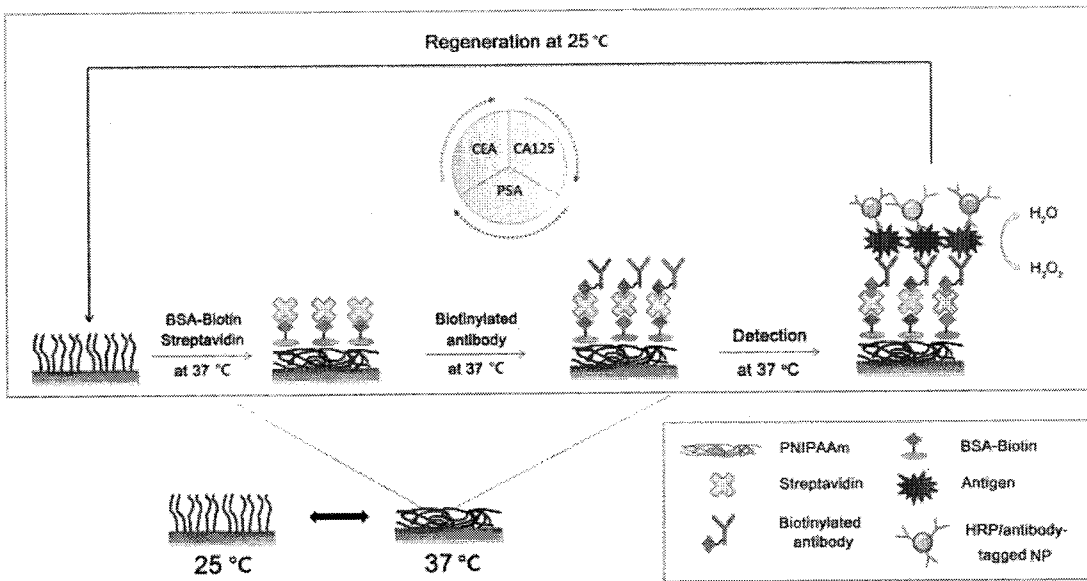


图 1.8 用于蛋白检测的可重复使用的电化学免疫传感器<sup>[34]</sup>

Figure 1.8 A reusable electrochemical immunosensor for protein detection

在基于电化学的蛋白检测中, 目标蛋白引起的电极表面特性的变化可由电化学阻抗谱 (electrochemical impedance spectroscopy, EIS)、循环伏安法 (cyclic voltammetric, CV)、电化学发光法 (electrochemiluminescence, ECL) 及积分脉冲伏安法 (differential pulse voltammetric, DPV) 来分析。EIS 和 CV 通常是对修饰后的电极表面进行表征和优化, 确定了体系最佳的条件, 然后通过 ECL 或 DPV 实现不同浓度下蛋白的检测<sup>[35-37]</sup>。Heineman 与 Halsall 首次提出了电化学酶联免疫测定<sup>[38, 39]</sup>, 随后经过他们的改进和发展可以实现小分子以及蛋白 pg 到 ng 级浓度的检测<sup>[40]</sup>。Yao Xie 等人<sup>[41]</sup>利用微流控芯片将多个敏感单元分隔开, 在不同单元的电极表面修饰不同的抗体, 最后通过 DPV 实现了 CEA、CA19-9 及 P53 等

多种蛋白的同时检测。为了提高检测灵敏度，研究人员往往将金纳米颗粒、酶或者生物素-亲和素系统引入到免疫反应中，实现检测信号的放大<sup>[40,42]</sup>。Wooyoung Hong 等人<sup>[43]</sup>在金电极表面引入了一层热敏感聚合物层，在其上修饰有生物素标志的捕获抗体，并在纳米颗粒上修饰 HRP 和检测抗体。作者利用该体系实现了 CA125、CEA 和 PSA 的高灵敏度检测，并通过温度调节实现了电化学免疫传感器的重复利用<sup>[43]</sup>，检测原理如图 1.8 所示。

蛋白标志物常用检测方法对比如表 1.1 所示，其中酶联免疫吸附测定 ELISA 是目前最常用的检测方法，后面会进行详细介绍。

表 1.1 蛋白标志物的常用检测方法对比

Table 1.1 Comparison of protein marker assays

检测方法	特点	局限性
光学	放射性免疫测定 RIA	试剂保质期短 仪器昂贵
	酶联吸附免疫测定 ELISA	低成本 高灵敏
	荧光免疫阵列 FIA	定量较复杂 需信号放大技术 荧光易相互干扰
	侧流免疫层析法 LFIA	快速且经济高效
	表面等离子体共振 SPR	实时且直接
电学	电学器件	通量低
	电化学	灵敏度低 小型化 易于集成化 器件易受环境影响

### 1.3 传统 ELISA

在现存各种检测技术中，上文中提到的 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, 酶联免疫吸附检测) 是一种通用的蛋白质免疫学检测技术，该方法结合了酶的高效催化性和抗原抗体反应的特异性，具有快速、灵敏、简便等优点，已在临床检验、环境监测、食品卫生、法医鉴定和兴奋剂检测等众多领域受到了广泛应用<sup>[38]</sup>。据统计美国每年大约有 10 亿例临床检验是采用免疫学检测技术来完成的，而其中绝大多数是采用的 ELISA 方法。临床上从药物试验、

孕检到艾滋病、肝炎等传染病的检测以及癌症等重大疾病的诊断，几乎都可以看到 ELISA 技术应用的踪影。

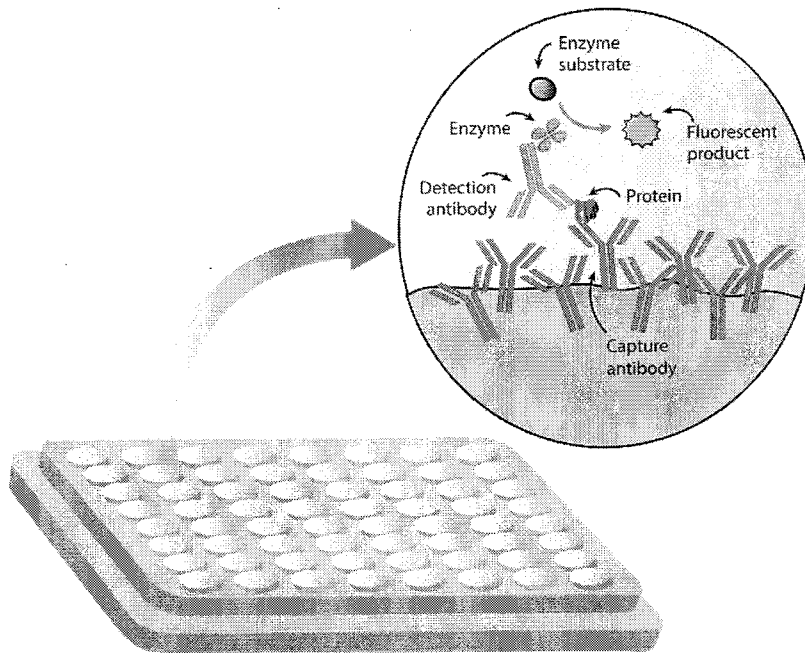


图 1.9 ELISA 原理图<sup>[44]</sup>

Figure 1.9 Schematic of ELISA

酶联免疫吸附测定 (ELISA) 技术由彼得·佩尔曼 (Peter Perlmann) 和伊娃·恩瓦尔 (Eva Engvall) 于 1971 年开发<sup>[45]</sup>。以常用的夹心法为例，其基本操作步骤如下：

- (1) 使捕获抗体结合到某种固相载体表面，并保持其免疫活性。
- (2) 固相载体表面上的任何非特异性结合位点均被封闭。
- (3) 使检测抗体与某种酶连接成酶标抗体，这种酶标抗体既保留其免疫活性，又保留酶的活性。常用的酶包括辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。
- (4) 在测定时，把受检标本（测定其中的抗原）和酶标抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗体偶联。
- (5) 用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开，最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。
- (6) 加入与酶反应的底物后，底物被酶催化变为有色产物或荧光产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据颜色/荧光反应的深浅有无进行定性或定量的分析。

传统 ELISA 操作步骤复杂，影响反应因素较多，特别是固相载体的包被难

达到各个体之间的一致，因此在实际的定量测定中，每批测试均须用一系列不同浓度的参考标准品在相同的条件下同批一起测试，绘制标准曲线，然后可以使用光密度（OD）计算样品中抗原的浓度。目前常规 ELISA 方法的检测限只能达到 pM ( $10^{-12}$  M) 量级<sup>[46]</sup>，还无法满足许多重大疾病早期检测的需求，比如与癌症、神经系统疾病和感染早期相关的大多数蛋白标志物在血清中的浓度往往只在  $10^{-16}$ ~ $10^{-12}$  M 量级<sup>[46, 47]</sup>。另外，人类的血浆中含有超过  $10^6$  种不同的蛋白质分子在这么多的蛋白质中，含量最丰富的 22 种蛋白质就占了血浆蛋白质总数的 99%<sup>[47]</sup>，传统的 ELISA 方法无法直接在这么复杂的背景下，检测出低丰度的蛋白标志物。因此，发展更高灵敏度的生物标志物检测新技术，实现重大疾病的早期诊断，已经成为当代社会迫切需要解决的重大课题。

#### 1.4 数字 ELISA

近年来，随着微纳加工技术的发展，微流控芯片技术因其具有小型化、所需样本量少、易操作及可集成等优点，逐渐成为生物分子高灵敏检测的优选平台。基于微流控技术发展而来的数字 ELISA（图 1.10 所示）是一种对生物分子的绝对定量检测技术，可有效解决传统 ELISA 方法检测限的局限性。数字 ELISA 和传统 ELISA 方法均是基于夹心式免疫反应，因而具有相同的操作步骤，包括：加抗体、洗涤、混合、孵育及检测等步骤，只是在检测的形式上有所不同。传统 ELISA 直接在  $100\ \mu\text{L}$ ~ $1\ \text{mL}$  液样体积中进行孵育，并检测所有酶标复合物上酶分子催化反应的整体显色或发光效果。由于液相环境中酶催化反应形成的产物分子存在自发扩散，对于低浓度酶标复合物来说，其反应形成的产物分子会因扩散而淹没在背景中，导致系统的信噪比低而无法有效探测。数字 ELISA 则将样品与试剂分散成许多个微单元（每个微单元中包含不多于 1 个磁珠，然后在每个微单元中进行孵育、反应结果计数等步骤。使得每个磁珠所连接酶标复合物的催化反应都限制在一个极小体积内，这种形式避免了荧光分子稀释现象，有效地提高了微腔内产物分子的发光或显色强度，从而可提高 ELISA 检测灵敏度。特别地，通过合理调节磁珠与待测靶标分子的比例，从而实现单靶标分子单磁珠的对应关系，这样就可以通过直接计数发光磁珠的数目获取靶标分子的定量信息。这种“数字化计数”的定量免疫检测概念类似于稍早的“数字 PCR”，因而被称为“数字 ELISA”。

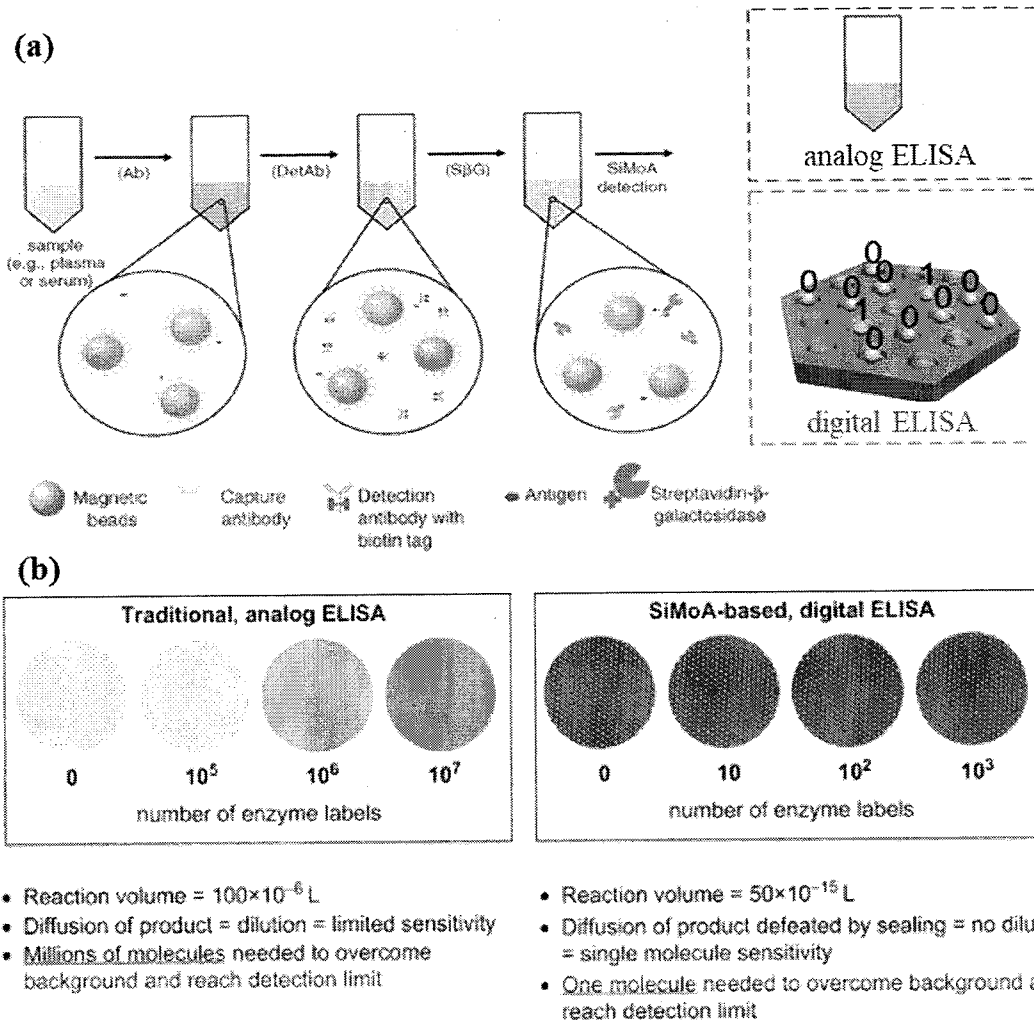


图 1.10 传统 ELISA 和数字 ELISA 方法的对比。数字 ELISA 方法中，捕获单个靶标蛋白分子的磁珠记为二进制“1”，而未捕获靶标蛋白分子的磁珠记为二进制“0”，结果的读出过程就是计数的过程<sup>[47]</sup>。

**Figure 1.10 Comparison of conventional ELISA and digital ELISA methods. In digital ELISA, microspheres that capture a single target protein molecule are recorded as a binary "1", while microspheres that do not capture a target protein molecule are recorded as a binary "0", and the process of reading out the result is the process of counting.**

从数字 ELISA 的工作原理可以看出，抗原结合到修饰捕获抗体的磁珠上的过程是随机且独立的，所以可以使用泊松分布来确定目标分析物的浓度，泊松分布如式 (1-1) 所示：

$$P(X = k) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^k}{k!} \quad (1-1)$$

当将泊松分布应用于数字 ELISA 时， $\lambda$  是指标记的磁珠与磁珠总数的比率，而  $k$  是与磁珠相偶联的酶分子的数量。比率  $\lambda$  是数字 ELISA 的基本单位，对应于每个磁珠上的平均酶分子数 (AEB)。

如图 1.11 所示, 当样品中抗原数远小于投入的磁珠数时, 如 AEB 等于 0.1 时 (平均每个磁珠上有 0.1 个酶分子), 根据泊松分布计算得到体系中仅有 0.47% 的磁珠结合了两个及以上酶分子, 大多数磁珠结合了 1 个或 0 个酶分子, 可以实现抗原的单分子检测。当 AEB 在 0.1 到 1 之间时, 如 AEB=0.5, 体系中抗原分子量仍小于磁珠量, 但此时体系内有 9% 磁珠结合了两个及以上酶分子, 不能通过有荧光的微孔比例直接计算抗原浓度, 但可以将未结合酶分子的磁珠比例代入泊松分布公式反算得到体系中抗原浓度。当 AEB 更高时, 大多数磁珠与一个以上的酶分子偶联, 读数不再是数字的, 可以对每个微单元进行模拟式的统计, 估算内部偶联的酶分子数量, 然后基于每个微单元的平均荧光强度和单酶分子的平均荧光强度来计算 AEB。

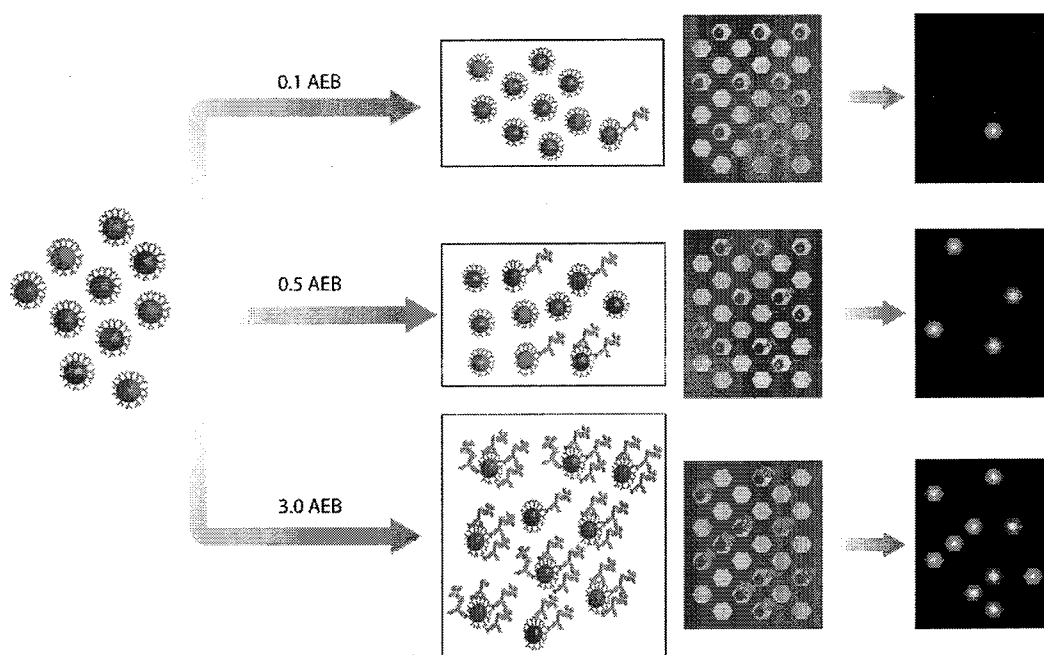


图 1.11 数字 ELISA 的工作模式<sup>[44]</sup>

Figure 1.11 Working mode of digital ELISA

数字 ELISA 的另一个考虑因素是平行样间的检测偏差 CV, 它主要由泊松噪声带来:

$$\text{Noise\%} = \frac{1}{N} \times 100\% \quad (1-2)$$

其中 N 为检测到的荧光亮点数。因此, 对于包含 100 个分子的样品, 泊松噪声将为  $100 \pm 10$ , 泊松噪声误差为 10%。如果仅测量 25 个分子, 则误差为  $\pm 5$  个分子, 得出 20% 的误差。该数字是无法减少的固有误差, 是实验固有的其他测量误差, 例如移液器分配体积的细微变化。因此, 当测量的分子数量非常少时, 测

量的不确定性会变得太大而无法被分析接受。使用数字 ELISA 进行多重测量时，泊松误差特别具有挑战性。

数字 ELISA 的关键步骤在于：高通量地实现含有单个磁珠的密封微单元。这是因为：（1）数字 ELISA 的检测灵敏度和可信度是由磁珠的通量决定的<sup>[38]</sup>，即磁珠的数量越多其检测灵敏度越高，而其检测的可信度又受被检磁珠量在全部磁珠总量中所占比例的影响，即被检磁珠量在全部磁珠总量中所占比例越接近 100% 时，其检测可信度越高。（2）密封的微单元（需小于  $10^{-15}$  L 量级）可有效地避免荧光分子稀释现象，并增强微单元中信号的信噪比，实现微单元结果（0 或 1）的准确读出。（3）单磁珠单微单元是实现靶标分子和阳性结果的微单元一一对应的保障，便于通过直接计数发光磁珠的数目获取靶标分子的定量信息。

近十年来的科研工作就是围绕这一关键步骤展开的。到微单元的具体呈现方式不同可以将数字 ELISA 可以分为微腔式数字 ELISA 和微滴式数字 ELISA。

#### 1.4.1 微腔式数字 ELISA

数字 ELISA 一开始就是以微腔式的形式出现，是由 David C Duffy 和 David R Walt<sup>[47]</sup> 首先合作提出的一种超高灵敏度的蛋白检测方法，后发展成为 SiMoA 商业化系统。微腔式数字 ELISA 通过结合传统 ELISA 的夹心式免疫反应和微腔式微流控芯片实现蛋白质的单分子级别检测。其操作流程如下：

- （1）将抗体包覆的磁珠加入到含有目标蛋白分子的样品中；
- （2）然后加入过量的生物素化的检测抗体和  $\beta$ -半乳糖苷酶，并与靶蛋白分子结合，形成一个个酶标记的免疫复合物；
- （3）洗涤去除未结合的检测抗体和酶；
- （4）将剩下的免疫复合物和可以被酶催化的底物  $\beta$ -半乳糖苷混合；
- （5）将上一步完成后的混合液加入微腔芯片，磁珠（直径为  $2.7 \mu\text{m}$ ）会被直径为  $4.5 \mu\text{m}$ ，深度为  $3.25 \mu\text{m}$  的微腔室单独隔开，微腔上层封油，彻底完成微腔封闭；
- （5）免疫复合物上的酶催化底物产生荧光产物；
- （6）扫描拍照，统计亮的微腔数和磁珠数，根据泊松分布计算靶蛋白分子浓度。

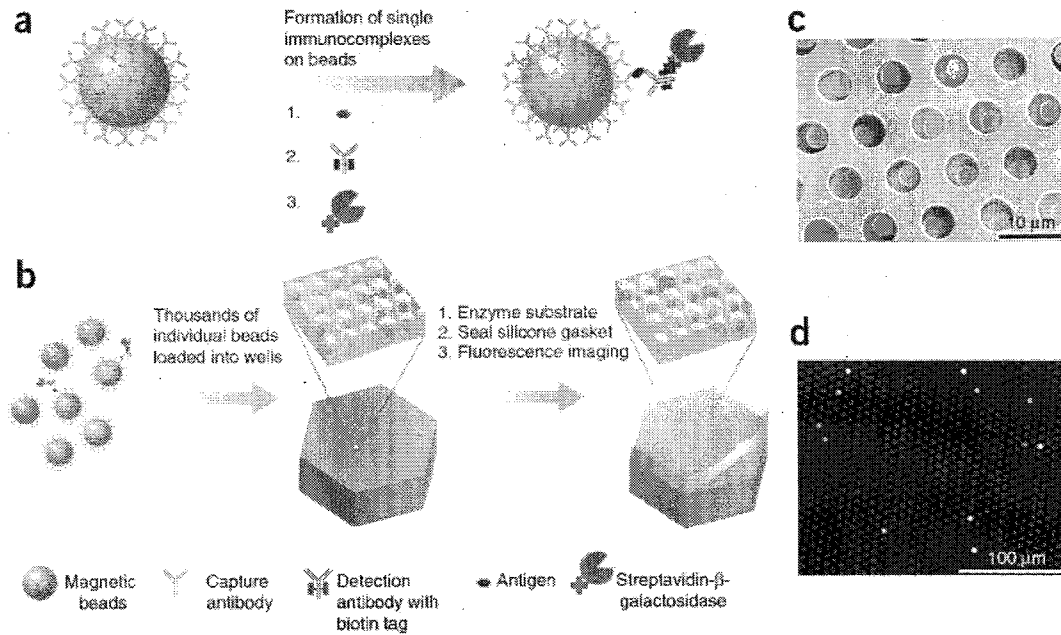


图 1.12 微腔式数字 ELISA。(a) 单个靶蛋白分子被磁珠上的抗体捕获，并被与酶分子缀合的另一种抗体检测。(b) 将有或没有免疫复合物的大量磁珠装入微腔室进行荧光成像。(c) 微腔阵列的一部分的显微照片。(d) 酶促反应导致荧光产物在微腔室内积聚，从而可以进行荧光成像。<sup>[48]</sup>

**Figure 1.12 Digital ELISA based on arrays of wells. (a) Single target protein molecules are captured by an antibody on the bead and detected by another antibody conjugated with an enzyme molecule. (b) Large amounts of beads, with or without the immunocomplex, are loaded into microchambers for fluorescence imaging. (c) Scanning electron micrograph of a small section of a femtoliter-volume well array after bead loading. (d) The enzymatic reaction results in the accumulation of the fluorescent product inside the microchamber to allow fluorescence imaging.**

微腔式数字 ELISA 通过免疫反应对靶蛋白抗原分子进行酶联标记，在足够小的微腔中单分子酶即可催化底物生成可被检测浓度的荧光产物，实现了信号的放大传感。由其发展而来的 SiMoA 商业化平台将碱性磷酸酶检测下限达到了 30 aM，PSA 的检测下限达到 1 fM。

然而，微腔式数字 ELISA 存在一些很明显的缺陷：

(1) 酶的唯一选择是  $\beta$ -半乳糖苷酶。但是，任何酶或底物，包括  $\beta$ -半乳糖苷酶，仅在特定的缓冲液成分和一定的 pH 范围内才能发挥最佳功能。此外，这种大酶的四聚体性质可能使其不适用于某些情况。

(2) 免疫复合物和底物在芯片外进行混合，会造成不低的荧光背景。

(3) 单酶分子进行底物催化，检测耗时超过 1 小时。

(4) 芯片是由直径 4.5  $\mu\text{m}$ ，深度 3.25  $\mu\text{m}$  的密集微腔室阵列构成，加工难度和成本过高，生产效率过低。

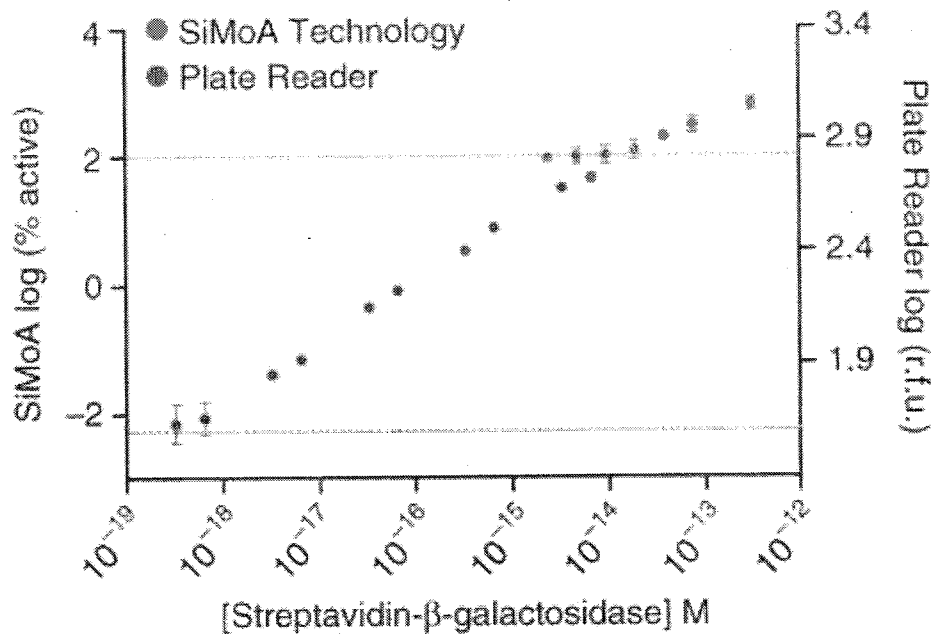


图 1.13 数字 ELISA 和传统 ELISA 对  $\beta$ -半乳糖苷酶的检测范围和检测限比较，红点和绿点分别为数字 ELISA 和传统 ELISA 的检测结果，红色虚线和绿色虚线分别为数字 ELISA 和传统 ELISA 的检测限<sup>[48]</sup>

Figure 1.13 Comparison of the detection range and detection limit of  $\beta$ -galactosidase between digital ELISA and conventional ELISA, the red and green dots are the results of digital ELISA and conventional ELISA respectively, the red dotted line and green dashed line are the detection limits of digital ELISA and conventional ELISA respectively

因此，需要开发一种兼容性广，稳定性高，加工难度低，检测耗时短的数字 ELISA 平台。

#### 1.4.2 液滴式数字 ELISA

液滴微流控是一项在微通道中利用不互溶的多相流体产生和操控液滴并用以进行生物、化学等方面反应的技术，具有小型化、高通量等特点，可在短时间产生成千上万个微反应单元。很好的解决了微腔式数字 ELISA 的上述问题。通常，两种液相被用于形成液滴。被包裹的一相在整个体系中相互独立分散，故称为分散相，而包裹分散相的液相整体连通，称为连续相。两种流体相在具有几何形状的受限微通道中相遇，二者相互作用就产生动态响应。液滴的产生就是流体相在接口处变形并夹断响应的结果。从能量的角度来看，分散相的破裂和离散液滴产生是能量输入过程，即外界提供的多余能量转化为其称乳液界面，

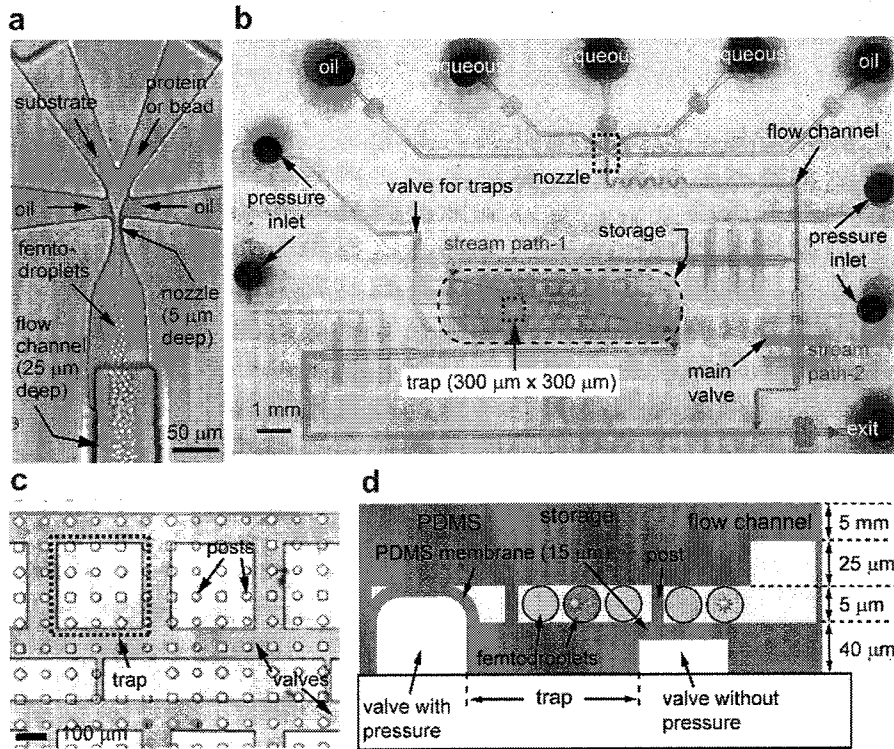


图 1.14 可制备和调控液滴的微流控芯片<sup>[49]</sup>。

Figure 1.14 Features of the microfluidic device used for femtodroplet generation and manipulation.

Shim 等推出了一种微滴式数字 ELISA 平台，可快速检测前列腺特异性抗原 (PSA)。PSA 单分子被具有 PSA 抗体涂层的大小  $1\ \mu\text{m}$  PS 磁珠捕获，然后将 PSA 夹在第二检测抗体之间，该抗体通过生物素和链霉亲和素与  $\beta$ -半乳糖苷酶偶联。然后将带有或不带有免疫复合物的磁珠和荧光底物  $\beta$  半乳糖苷 (FDG) 作为两个水相一起封装入直径  $5\ \mu\text{m}$  的微液滴反应单元中，微液滴生成速率为  $1.3 \times 10^6$  个/s，达到 MHz 水平。然后，在片上微阀系统的帮助下，将 20 万个微滴顺序加载并冲洗进捕集区，以进行片上温育，在此期间酶促转化产生荧光信号以进行实时监控。PSA 的浓度可以通过对阳性信号进行数值计数来定量。这种方法可以检测低至 46 fM 的单分子蛋白质，这远低于普通 ELISA 的检测极限。

关键技术难点在于通过微流体通道几何形状的特定设计和流动条件的适当选择使得液滴的体积下降到飞升规模。这样，封装在液滴中的单个酶分子的浓度对于催化产物的快速积累将是有效的，在几分钟内产生可检测的荧光信号。

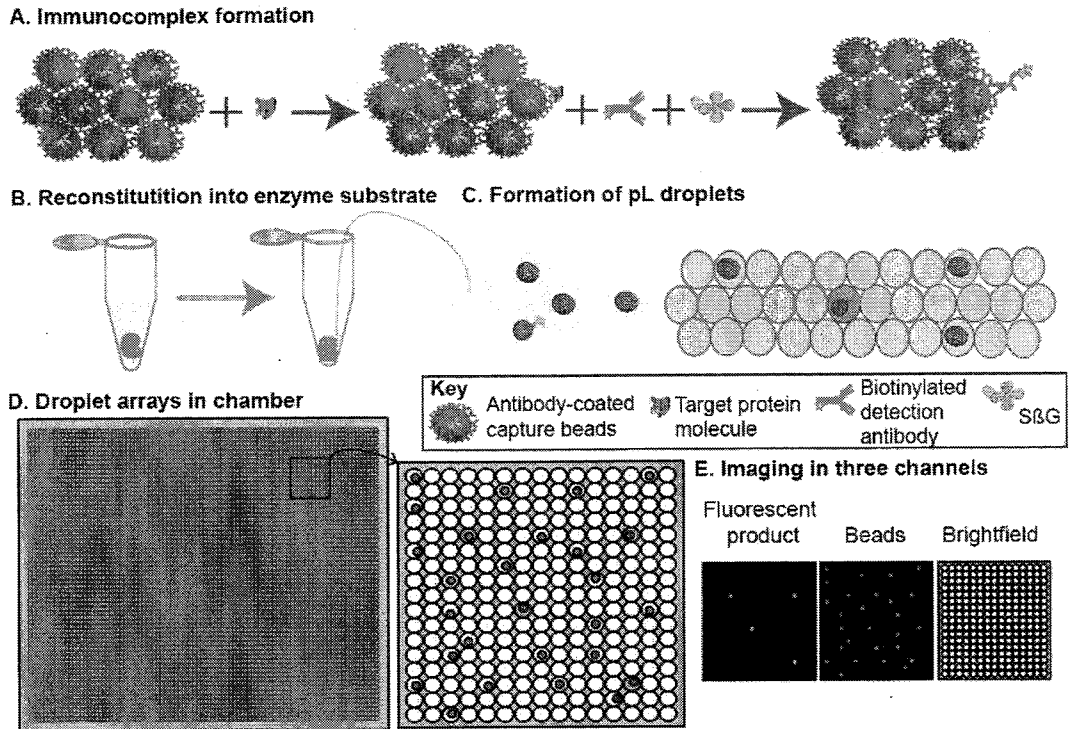


图 1.15 使用 ddELISA 进行单分子蛋白检测。(A) 基于磁珠的三明治免疫分析。在这里，将 10 万个抗体包覆的磁珠加入到含有目标蛋白分子的样品中。然后加入生物素化的检测抗体和 SβG，并与靶蛋白分子结合，形成一个酶标记的免疫复合物。根据泊松统计学，大部分磁珠的免疫复合物为零，一小部分磁珠会有一个免疫复合物。(B) 然后将磁珠在 2 μL 的酶底物中重组。(C) 然后将含有磁珠和底物的 2 μL 混合物分割成皮升液滴。(D) 将液滴装入室中，形成液滴阵列。(E) 在三个通道中获得图像，以识别阳性的液滴，磁珠和液滴<sup>[50]</sup>。

**Figure 1.15 Single molecule protein detection using ddELISA. (A) Bead-based sandwich immunoassay. Here, 100,000 antibody-coated paramagnetic beads are added to a sample containing target protein molecules. A biotinylated detection antibody and SβG are then added and bind to the target protein molecule, forming an enzyme-labeled immunocomplex. Based on Poisson statistics, most of the beads will have zero immunocomplexes and a small fraction will have one immunocomplex. (B) The beads are then reconstituted in 2 μL of enzyme substrate. (C) The 2 μL mixture containing the beads and substrate is then partitioned into picoliter droplets. (D) The droplets are loaded into a chamber, forming droplet arrays. (E) Images are obtained in three channels to identify the “on” droplets, the beads, and the droplets.**

Limor Cohen 等人也开发了一种微液滴式数字 ELISA 实现超灵敏检测蛋白浓度<sup>[50]</sup>。基本原理和上面一样，但是构建了液滴储藏阵列，有效地统计液滴和磁珠数目，使得酶浓度检测下限达到 20 aM，蛋白检测下限达到百 aM 量级。

基于微流控的液滴式数字 ELISA 具有超高速生成液滴和片上操作, 无需更换硬件即可进行重复测定的能力, 大大提高了采样量, 简化了自动化, 并可与其他流体样本制备模块集成在一起以及随意改变反应单元大小等诸多优点, 很好地克服了微腔式数字 ELISA 的很多局限, 但是也引出了新的问题。比如: 双水相混合高通量生成液滴的过程需要进行观测与调控, 从而保证双水相混合比例、液滴尺寸等参数均一稳定; 对于较大尺寸的液滴来说, 酶促反应需要更加高效以缩短检测时间及呈现出可靠的阴阳性信号; 为保证微流控芯片一致性和提高批量化生产制造效率, 需要对其进行工程化探索等问题。

### 1.5 论文研究主要内容及安排

本论文的主要内容是基于微流控技术构建用于蛋白标志物检测的数字 ELISA 系统, 实现了对肿瘤蛋白标志物的特异性和高灵敏度检测。论文主要包括五章, 从肿瘤蛋白标志物的检测现状、数字 ELISA 液滴微流控平台的构建、基于液滴分散阵列的数字 ELISA 微流控芯片、数字 ELISA 芯片工程化的探索等几方面展开研究工作, 详细的内容安排如下:

第一章从肿瘤标志物的临床意义出发, 介绍了目前肿瘤蛋白标志物的主要检测方法, 接着针对传统 ELISA 的原理及检测肿瘤蛋白标志物所面临的问题和局限性详细地介绍了数字 ELISA 的原理及微腔式和液滴式两类数字 ELISA 的实现方法。最后探讨了数字 ELISA 中亟待解决的主要问题。

第二章研究了基于微流控技术的液滴生成芯片、芯片内流体驱动技术、基于频闪技术的高通量液滴生成可视化和调控技术 (SVMHD) 和显微镜观察记录平台, 在此基础上, 构建了数字 ELISA 微流控芯片技术平台, 该平台具有很好的稳定性, 适合液滴生成、调控和实时观测。利用该平台, 在微流控芯片内生成了均一稳定的液滴, 并对液滴生成频率、尺寸进行了测试, 且可视化了液滴的生成过程, 确保双水相 1:1 混合, 最后对 SP-AKP 聚合酶浓度进行数字化检测。同时也发现了液滴间荧光分子扩散造成检测 CV 偏大, 需要着重进行改进。

第三章针对酶催化荧光产物分子在液滴之间扩散, 使得液滴信号读取混乱且不准确的问题。为了延缓荧光分子在液滴间的渗透率, 设计出了一种液滴分散阵列 (DIA), 将液滴捕集在微腔下以保持分散。详细阐述液滴间荧光分子扩散的机理和速率模型, 芯片的设计、原理及制作工艺, 最后对球刷聚合碱性磷酸酶和肿

瘤蛋白标志物 CEA 进行高灵敏度检测。完成数字 ELISA 实验室阶段开发。

第四章了推进数字 ELISA 微流控芯片的工程化,进行了一系列的探索工作。首先通过对注塑材料及加工工艺的探索,找到了一套适合液滴式数字 ELISA 芯片批量化生产的材料和加工工艺。另外为有效过滤气泡,研发了一种气泡过滤结构。为降低材料荧光背景干扰,缩短孵育检测时间,在微流控芯片中引入镀铝溅射工艺。初步实现了工程化批量制备数字 ELISA 微流控芯片。迈出了从实验室手工组装产品到市场化检测商品的坚实一步。

第五章对本论文的研究成果、创新点进行了总结,并对工作中遗留的问题和未来的发展方向进行了阐述。

## 1.6 本章小结

本章从肺癌现状的严重性出发,并结合目前肺癌检测方法的特点及局限性,阐述了肿瘤标志物在肺癌早期检测及诊断预后中的重要意义。这里以蛋白类肿瘤标志物为研究重点,先是简要介绍了与肺癌相关的蛋白标志物—CEA,并详细介绍了现阶段蛋白标志物的主要检测方法。接着针对传统 ELISA 的原理及检测肿瘤蛋白标志物所面临的问题和局限性,然后详细地介绍了数字 ELISA 原理及微腔式和液滴式两类数字 ELISA 的实现方法。最后总结了目前数字 ELISA 面临的问题,并对本论文的工作安排进行了简单的介绍。

## 第 2 章 数字 ELISA 液滴微流控平台的构建

### 2.1 引言

癌症是危害人类健康的重大疾病，具有高发生率和高死亡率的特点。一经检查，大多数癌症患者就已经处于晚期，无法及时地进行诊断和治疗，影响了疾病的治疗效果，降低了患者的生存率。研究发现，在肿瘤发生的早期，体内的一些癌症标记物就已经发生了变化，比如蛋白标记物。如果能对这些标记物进行检测，实现肿瘤的早期筛查，及时采取治疗措施，则能够有效提高患者生存率。

随着科技的进步，检测技术面临着巨大的变革。一方面，各类大型、高效自动化的检测设备使医院以及检验机构的检测效率和准确度大幅提升；另一方面，小型、便携和一体化的检测设备的出现使实时监控和常规检测变得更加自主和方便，也越来越受到人们的青睐。正是这一检测需求的不断提高，很多新兴的微全分析系统应运而生。微全分析系统可以将常规的生化分析功能集成在微小芯片上，与信号采集和分析集成为一个功能齐全的微型仪器。

基于微纳制作技术发展起来的液滴微流控技术通过精确控制流速，并在多相流中实现表面张力和粘性力之间的平衡，从而可以产生高度单分散的微液滴<sup>[51, 52]</sup>。由微流控装置制备的液滴具有隔离性、高均匀性和高通量的特点，在生物检测和材料合成方面有着广泛的应用<sup>[53-55]</sup>。具体来说，液滴微流控技术已被用于数字聚合酶链反应（PCR）<sup>[56]</sup>、数字 ELISA<sup>[57]</sup>、单细胞分析<sup>[58]</sup>，以及功能性水凝胶和颗粒的合成<sup>[59, 60]</sup>等诸多应用。在这些应用中，数字 ELISA 就可以实现肿瘤蛋白标志物的低丰度和高灵敏度检测。

为了实现数字 ELISA，使其在肿瘤蛋白标志物检测领域中更好地发挥重要作用，本章结合液滴微流控芯片、芯片内流体驱动装置、液滴生成观测和调控策略以及液滴荧光信号观测显微镜，构建出了一套数字 ELISA 液滴微流控平台，该平台具有很好的稳定性，适合高通量液滴的生成、调控和观测。利用该微流控平台，结合上海交通大学 MED-X 研究院此前研发的（球形聚（丙烯酸）刷固定化碱性磷酸酶，SP-AKP）技术，在 6 分钟之内完成了对球刷聚合酶的高灵敏度检测，并达到 100 aM 量级的检测下限。

## 2.2 数字 ELISA 液滴微流控平台的整体设计

液滴式数字 ELISA 的整个过程包括免疫复合物和荧光底物两个水相均匀混合，混合后立即高通量均匀分散成液滴，液滴平铺储存，酶促反应完成后液滴荧光信号的读取等几个步骤，完成这些步骤，液滴微流控系统要具备液滴的高通量制备、液滴生成过程的可视化和调控、液滴的储存、生化反应的检测和鉴定分析等诸多功能。

整个数字 ELISA 液滴微流控平台主要由以下几个方面组成：

### 1. 数字 ELISA 液滴微流控芯片

微流控芯片具有样品消耗量少、生化反应速度快和制作成本低等优点，可以将样品制备、生化检测和鉴定分析等诸多步骤于一体，又被称为“芯片实验室”。在本套数字 ELISA 液滴微流控平台中，数字 ELISA 液滴微流控芯片也是核心，试剂全程都是在芯片中进行流动，利用微流控芯片生成液滴方式可分为主动式和被动式。在主动方法中，液滴的产生是由外力激活或辅助的，以施加局部驱动力并实现快速响应。根据能源的类型，主动液滴的产生可分为电，磁，热和机械方法。在被动的压力驱动流动方法中，不混溶的分散流体和连续流体在交汇处汇合。根据流道交汇处的几何形状，可以将液滴形成方式分为共轴流，T-junction，和十字聚焦法（flow-focusing）。在十字聚焦几何结构中，分散相和连续相一起流过液滴生成喷口，在流道表面亲油疏水的表面性质作用下，最终断裂成液滴。液滴生成喷口区域具有剪切和聚焦流体的功能，这对产生液滴的尺寸均一十分友好。十字聚焦法具有设计方便，通量高，多水相混合均匀等优点，很好的满足了数字 ELISA 液滴生成的需求。

### 2. 流体驱动装置

芯片内的流体控制方法丰富多样，可采用电学、离心力、毛细作用、外接恒流泵、蒸发泵、芯片上集成的气动泵或压电晶体驱动泵等等。正压恒压泵是一种可以输出恒定气压的装置，其可以通过气管与芯片相连，通过对气压的控制实现对芯片内试剂流动进行实时控制。

### 3. 高通量液滴生成观察与调控

在基于液滴的微流控技术中，液滴的可视化和调制往往是先决条件。高通量液滴制备以及相关的可视化和调制功能是必不可少的<sup>[61, 62]</sup>。换句话说，微流控系统中运动液滴的筛选、选择、分离和反馈控制需要液滴的实时信息（如频率、大

小、形状、速度等) [63, 64]。尤其是对于数字 ELISA 这种双水相即时混合产生液滴的应用, 实时观察和调节双水相的混合情况以及液滴尺寸更是必不可少。普通显微镜相机采集到的液滴生成图像往往如图 2.1 (a) 所示, 液滴呈现“层流”状态, 具体的混合情况以及液滴尺寸无从观察和测量。数字 ELISA 的检测结果常常因双水相混合比例失衡以及液滴尺寸不一致而出现较大偏差。因此, 需要采集到像图 2.1 (b) 一样清晰的液滴生成流动图像来控制双水相混合比例和液滴尺寸均一稳定。

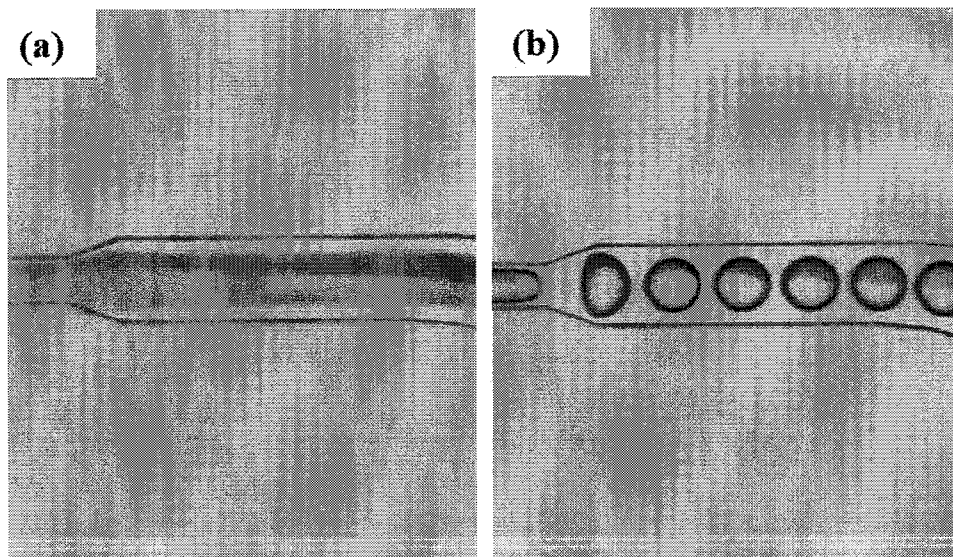


图 2.1 液滴在微通道中。(a) 普通相机视野 (b) 真实情况

Figure 2.1 Droplets in the microchannel. (a) Normal camera view (b) Real situation

目前已经有几种方法用于识别和评估运行流中的液滴, 这些方法列在表 2.1 中。如表 2.1 所列, 频闪仪是一种可以对周期性运动的物体进行快照的光学仪器。频闪仪诞生后, 在工业领域被广泛应用于检测旋转的车轮或振动的弦。也有一些报道利用频闪仪观察从打印头喷出的液滴<sup>[65]</sup>。具体来说, 在微流控技术中, 频闪仪也被用于离心盘中观察旋转盘上的实时过程<sup>[66-70]</sup>。为此<sup>[66]</sup>, 需要在电机轴上安装一个编码器, 当轴处于特定的旋转角度时, 产生一个周期性的触发信号。根据该触发信号, 频闪仪与圆盘同步, 并在圆盘的特定旋转角度下捕捉每次旋转的渐进式图像, 将感兴趣的区域显示在相机画面中, 如同圆盘处于静止状态时捕捉的图像。基于该方案, 已经实现了对阀门状态的观察<sup>[68]</sup>和旋转盘形芯片上荧光的检测<sup>[70]</sup>。与相机同步, 频闪仪也已用于  $\mu$ -PIV (micro particle image velocimetry 微流场无接触式粒子图像测速技术) 系统中绘制微流控中的流场<sup>[71, 72]</sup>。流动系统中的定量分析, 如酶动力学分析, 也是借助于频闪仪实现的<sup>[73]</sup>。但是, 几乎所有的

现有作品都需要一个触发信号来同步频闪仪与相机。因此，液滴检测和同步模块是先决条件，这增加了芯片和系统的复杂性和成本。

表 2.1 识别微流体中运动液滴的不同方法。

Table 2.1 Different approaches identifying moving droplets in microfluidics.

方法	优势	劣势
高速相机 <sup>[74]</sup>	可以以高帧频捕获液滴的大小，形状 ( $\geq 1000$ fps)	昂贵而笨重，将产生大量数据。
CMOS/CCD 传感器 <sup>[75-78]</sup>	可以捕获液滴的大小，形状。低成本。	较低的捕获帧率 ( $\leq 100$ fps)。不能胜任高通量液滴的观测。
光电探测器 <sup>[79]</sup>	低成本且易于搭建	对液滴的识别和计数能力有限。
移动拍摄 <sup>[80]</sup>	可以捕获液滴的大小，形状。	首先需要知道液滴的移动速度。昂贵。
频闪仪	可以捕获微流控设备或旋转磁盘上液滴的大小，形状。能胜任高通量液滴的观测。低成本。	需要同步信号。鲜有在微流控中使用频闪仪的报道。

#### 4. 液滴信号产生和采集

理想情况下，所有试剂应在其产生时掺入每个液滴中。因此，实际的基于液滴的测定需要可以激活的探针（例如，仅在目标分子存在的情况下才可进行荧光猝灭）。孵育一段时间后，带有目标分子的液滴中的探针会发荧光，而空液滴中的探针则保持黑暗。因此，荧光滴的数量可以定量测量目标分子的浓度。

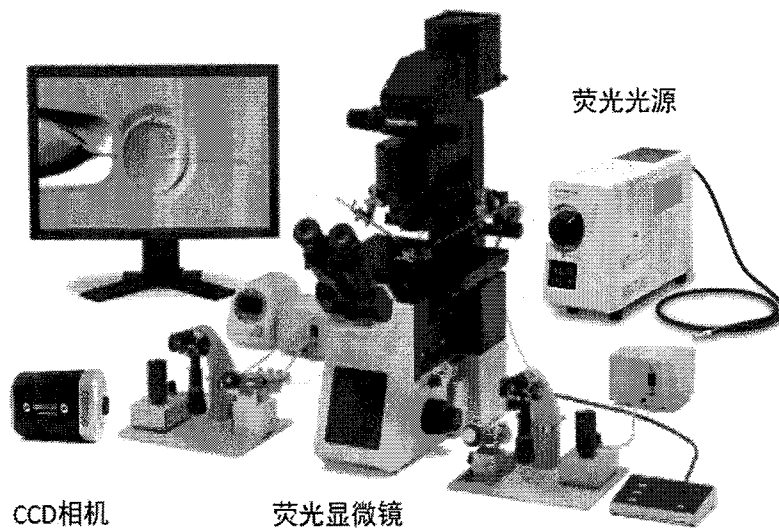


图 2.2 数字 ELISA 液滴微流控平台

Figure 2.2 The Digital ELISA droplet microfluidic platform

通过颜色变化分析阴阳性是常规 ELISA 研究采用比较多的方法，但是颜色的变化在微液滴中很难进行区分判断。微流控芯片中通常采用荧光的方法进行阴阳性的判断，荧光信号的采集分为流式法和拍照法。扫描拍照法方便溯源，通量高而且能够与成熟的荧光显微镜兼容，实现在芯片内酶促反应的观察和分析，因此该模块选用的方案为通过酶促反应生成的荧光产物对液滴的阴阳性进行区分，通过荧光显微镜进行液滴荧光信号的采集。

根据以上四点的分析，数字 ELISA 液滴微流控平台的整体结构如图 2.2 所示，主要包括液滴微流控芯片、基于正压恒压泵的流体驱动装置，基于频闪的液滴高通量生成可视化装置、基于荧光显微镜的液滴信号采集装置。下面将对每部分进行详细介绍

### 2.2.1 材料和仪器

表 2.2 实验材料及仪器设备列表

Table 2.2 List of materials and apparatus

试剂/仪器名称	生产厂家
单晶硅片	MCL 电子材料
SU-8 3025 光刻胶	Micro Chem, 加拿大
聚二甲基硅氧烷 PDMS Sylgard 184	Dow Corning, 美国
SU8 显影液 (PGMEA)、 1H,1H,2H,2H-全氟辛基三氯硅烷	Sigma Aldrich, 美国
浓硫酸、过氧化氢、乙醇、氢氟酸	上海凌峰化学试剂有限公司
环氧树脂	金虹胶业
接触式光刻机 MA6	Karl Suss, 德国
恒温烘箱	上海精宏仪器有限公司
等离子清洗机	成都铭恒科技发展有限公司
甩胶仪	北京赛德凯斯电子有限责任公司
信号发生器	MHS5200A, Minghe, China
CCD	Retiga R1, Qimaging, Surrey, BC, Canada
LED 灯	MCWHL5-C1, Thorlabs, Newton, USA

### 2.2.2 液滴微流控芯片的制备

微流控芯片的制作一般是基于现有的微电子机械系统（Microelectro Mechanical Systems，MEMS）制作工艺和 PDMS 软刻蚀技术。该微流控芯片制作分两个步骤：硅片模具制备和 PDMS 芯片制备。

首先，采用光刻、湿法刻蚀技术制作硅片模具，制作流程如图 2.3 所示：

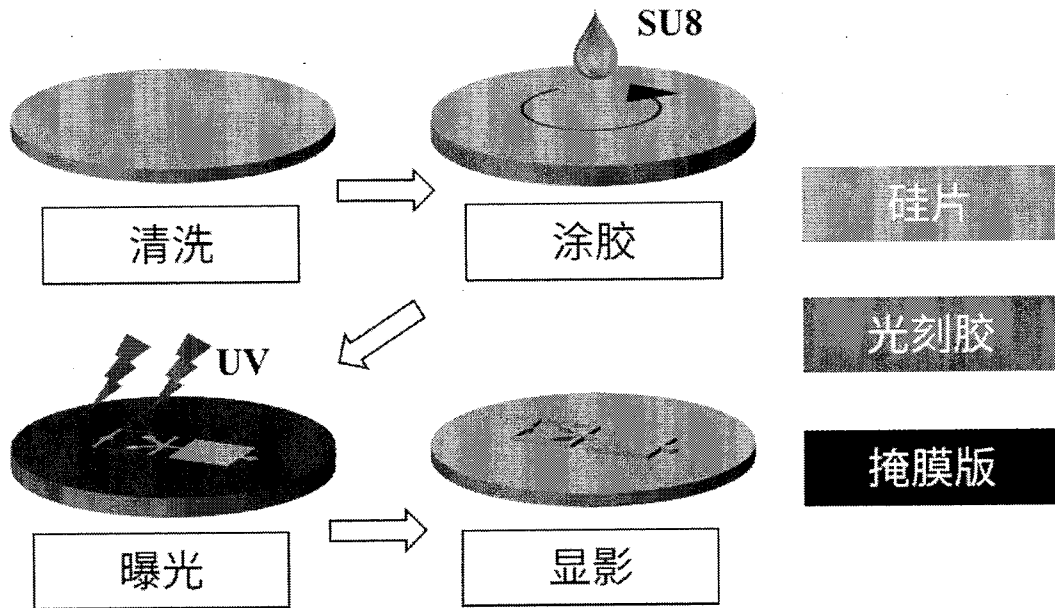


图 2.3 硅片模具制备流程

Figure 2.3 The process of silicon wafer mold fabrication

1.清洗硅片：将硅片放入清洗槽中，倒入体积比为 5:1 的 98%浓硫酸和 30%过氧化氢混合溶液，加热到 120°C。清洗 10 min 后，将硅片取出，去离子水清洗 3 遍。然后用氮气吹干清洗好的硅片，并置于 180°C热板上加热 20 min，使硅片完全干燥，最后自然降到室温。

2.涂胶：将干燥后的硅片先进行等离子体处理，然后将 SU8-3025 缓慢涂覆在硅片表面，瓶口与硅片应尽可能接近，防止产生气泡。由于 SU8-3025 比较粘稠，甩胶之前先手动匀胶，使光刻胶尽可能多地覆盖硅片表面。调整甩胶机参数，转速 2000 rpm，匀胶 12 s，甩胶 40 s。甩胶后的硅片应当置于水平台上静置 2~3 小时，使光刻胶尽可能地流平。

3.前烘：将基片置于 65°C热板上加热 2 min，依次增加 5°C直到 95°C，加热 45 min。然后自然冷却 1~2 小时至室温。

4.曝光：将前烘完成的硅片放入光刻机进行掩膜曝光，曝光时间设定为 1 min。

5.后烘：将曝光后的硅片置于烘箱中，从室温加热到 95°C，并保持约 2 min，

然后缓慢降温至室温。

6.显影：将硅片放入 SU8 显影液中，不断摇晃约 4 min。然后再用显影液清洗并甩干。

7.坚膜：将图案化的硅片置于 170°C热板上约 20 min，然后自然冷却。至此，微流道的硅片模具制作完成。

硅片模具制作好后，接下来用 PDMS 倒模制作数字 ELISA 微流控芯片，具体步骤如图 2.3 所示：

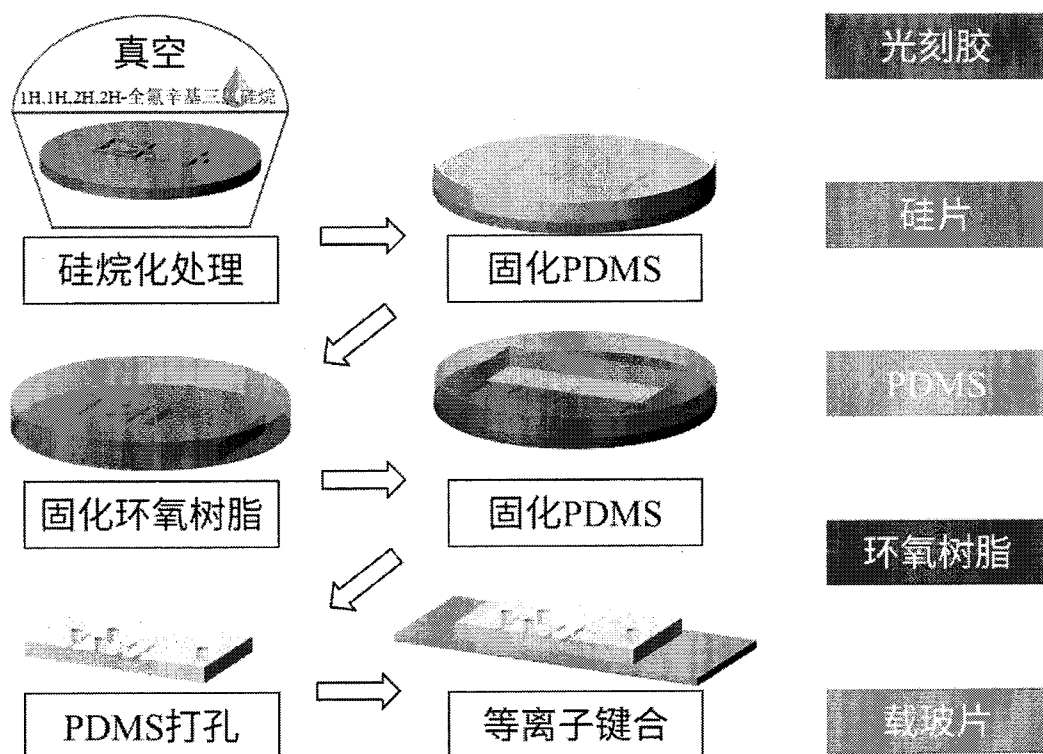


图 2.4 PDMS 芯片制作流程图

Figure 2.4 The process of PDMS chip fabrication

1.硅片模具的前处理：将图形化的硅片模具与装有 5  $\mu\text{L}$  的氟硅烷的 EP 管一起放入真空干燥器里，保持在真空环境中 8 h 以上，然后放掉真空，将硅片取出。该步骤是使硅片表面硅烷化，有利于后续 PDMS 的剥离。

2.配置 PDMS：将 PDMS 基体与固化剂按质量比 10:1 称量，共 25 g，在塑料杯中用玻璃棒充分搅拌均匀，并置入真空干燥器中，保持真空直至搅拌过程中产生的气泡完全消失。将去泡后的 PDMS 浇注在上述硅片模具上，厚度约 3 mm。将其在水平台上放置 10 min，使 PDMS 流平并充满微结构，然后放入 80°C烘箱中加热 1 h 直至 PDMS 完全固化，小心的将 PDMS 从硅片上剥离下来。

3.环氧树脂模具的制作：将 PDMS 母版图形外的部分切除掉，剩余结构部分

面朝上贴在四寸塑料培养皿底部，放入真空干燥箱中，抽真空，保持该状态 1 h，使 PDMS 结构微通道内保持真空。以质量比 4:1 的比例称量环氧树脂 A 和 B 组分，共 120 g，混合均匀，浇注在刚取出的 PDMS 母版芯片上，放置在水平台上，静置 2 天。然后，将环氧树脂模具连同 PDMS 一起从培养皿中取出，再将 PDMS 剥离，就得到结构和硅片模具相同的环氧树脂模具。一片硅片模具可以复制多个环氧树脂模具，用于 PDMS 微流控芯片的制作。

4. PDMS 芯片的制备：PDMS 芯片制备过程与 PDMS 母版芯片制作步骤类似。以复制好的环氧树脂为模具，浇注配置好的 PDMS，使 PDMS 厚度在 2 mm，在水平台上静置 30 min，使微结构中充满 PDMS，然后放入 65°C 烘箱中加热 1 h。待 PDMS 完全固化后，小心的将 PDMS 从硅片上剥离下来。

5. 打孔键合：按照 PDMS 结构中的外框切割芯片后，采用 1.5 mm 内径的针头打孔。然后将芯片结构面朝上和玻璃片一起放入等离子清洗机中清洗 1 min，取出后迅速居中贴合在一起。

6. 疏水处理：为了让微流道恢复 PDMS 本身疏水亲油的表面特性，键合完成后的芯片需置于 105°C 烘箱中加热 12 h。自然降温后取出芯片装入盒中备用（如图 2.5）。

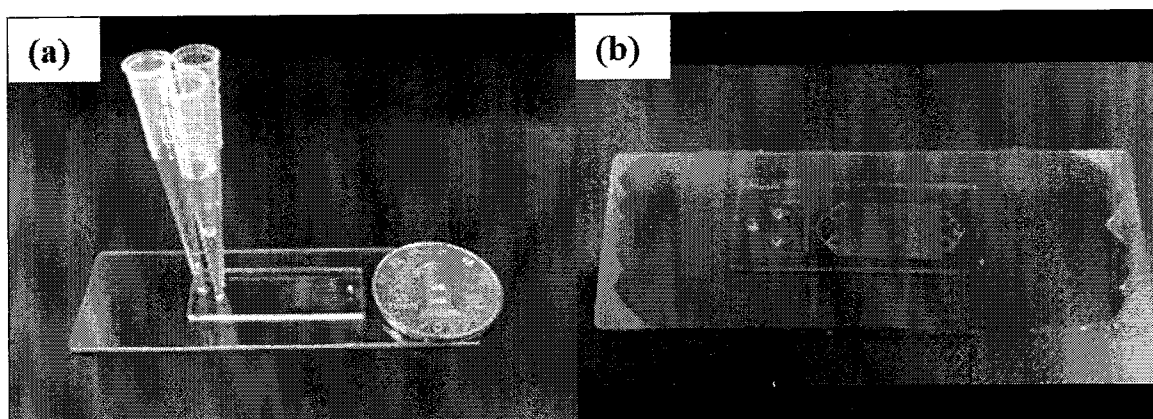


图 2.5 制备完成的芯片实物图

Figure 2.5 Image of the fabricated size-based microfluidic chip

### 2.2.3 流体驱动装置的搭建

流体驱动装置负责输出恒定气压，驱动对芯片内试剂流动的功能。由气压源、稳压阀、芯片连接装置三部分组成，其中选用小型气压泵或者钢瓶氮气作为气压源，提供较为稳定的气压。而稳压阀选用了气压范围 0-100 kpa，精度 0.1 kpa 的高精度数控稳压阀，这样可以进一步稳压，方便对芯片内流体的流动速度进行恒

定实时控制。芯片连接装置主要考虑连接操作方便快捷，避免污染。直接用移液枪（10-200  $\mu\text{L}$  规格）吸取样品，将移液枪头插入芯片，操作移液枪连同枪头一起褪下，这样试剂就和芯片连接在了一起。然后将特别设计的连接气管套在枪头上，完成气压的连接（如图 2.6 所示）。该连接装置避免了样品损失和污染，样品每次使用可低至 10  $\mu\text{L}$ 。另外为了让两水相均匀 1:1 混合，水相的气压供应采用一分二接头，使用确保气压完全一致。最终该流体驱动装置可实现两水相稳定均匀进样，可调液滴大小（10-100  $\mu\text{m}$ ），而且液滴的生成速度快、通量高，两分钟的时间便可生成 30000 多个直径 30  $\mu\text{m}$  的液滴，并且填满整个液滴储存腔，基本满足了快速、稳定、方便进样的需求。

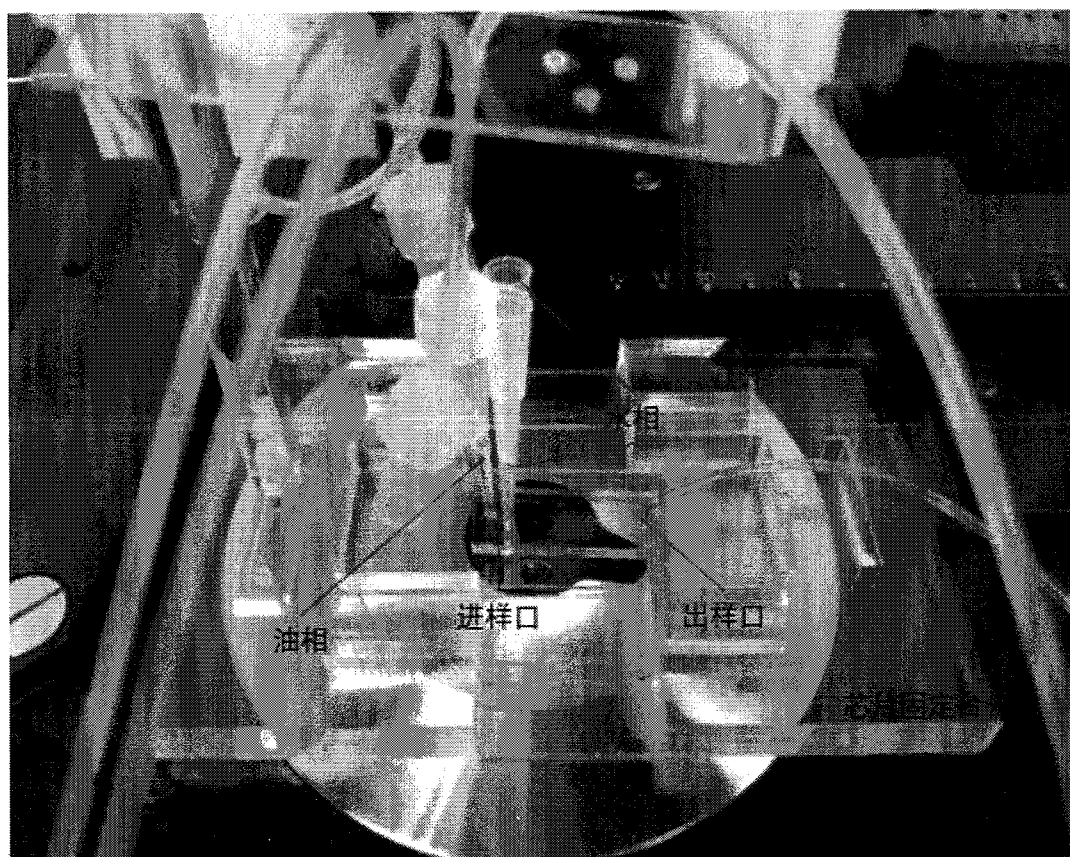


图 2.6 芯片进样装置

Figure 2.6 Chip injection set-up

#### 2.2.4 液滴高通量生成观测系统的设计与实现

在微流控芯片中用 CCD 或者人眼捕获的运动液滴  $x(t)$  是一个离散的采样过程。采样结果  $x_p(t)$  可以通过原始信号  $x(t)$  乘以采样函数  $p(t)$  来表示。

$$x_p(t) = x(t) \times p(t) \quad (2-1)$$

而实际上，采样函数  $p(t)$  通常是一个周期性脉冲序列，可以表示为：

$$p(t) = \sum_{k=-\infty}^{\infty} \delta(t - kT) \quad (2-2)$$

其中 $\delta$ 是狄拉克增量函数， $T$ 是采样周期， $k$ 是整数。根据等式 (2-2)，在频域中，采样结果的傅立叶变换可以表示为：

$$X_p(j \times 2\pi f) = \frac{1}{T} \sum_{k=-\infty}^{\infty} X(j \times 2\pi(f - kf_{flash})) \quad (2-3)$$

其中 $f_{flash} = 1/T$ 是采样频率。等式 (2-3) 表明，采样结果的频谱是原始频谱 $f_{origin}$ ，其原始偏移了采样频率 $f_{flash}$ 的整数倍。换句话说，调制采样结果的频率( $\delta f$ )表示为：

$$\delta f = f_{origin} - k \times f_{flash} \quad (2-4)$$

基于此方程式，我们可以通过更改采样频率 $f_{flash}$ 来改变调制结果的频率，并将高频信号（原信号）映射到低频信号( $\delta f$ )。

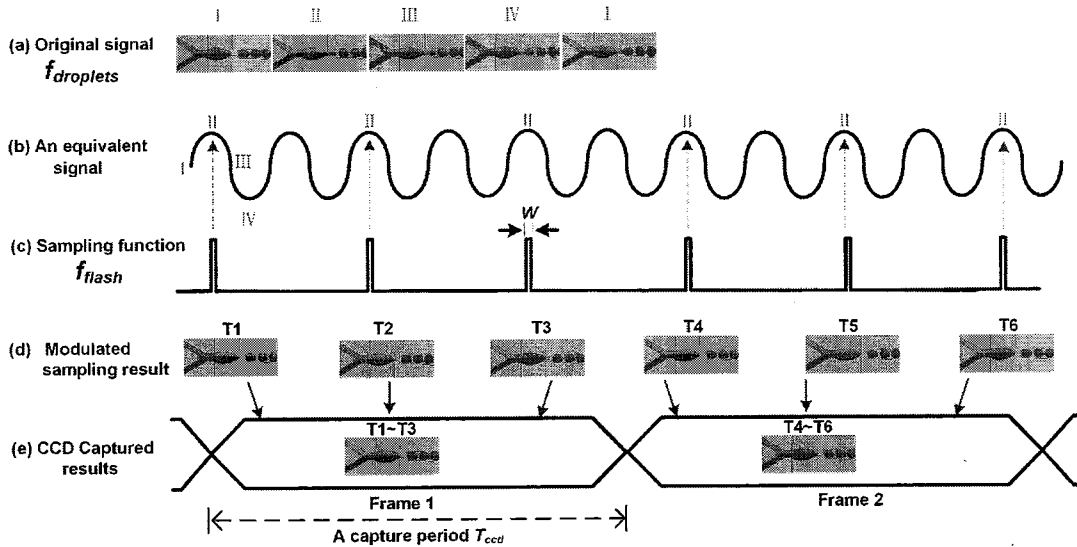


图 2.7 可视化和调制高通量液滴的策略 (SVMHD) 原理。

(a) 典型的 flow-focusing 结液滴生成器提供原始的循环信号。(b) 正弦波代表一个周期内原始信号的四个状态。(c) 持续时间为  $W$  的周期性脉冲序列被用作采样函数。(d) 调制采样结果显示状态 II 的静态图像。(e) 常规 CCD 在捕获周期内捕获静态图像，该捕获周期是调制采样结果的总和 (如蓝色箭头所示)。

**Figure 2.7 The principle of strategy for visualizing and modulating high-throughput droplets (SVMHD). (a) A typical flow-focusing droplet generator provides an original cyclical signal. (b) A sinusoidal wave represents the four states of the original signal in one cycle. (c) A periodic impulse train with duration of  $W$  is used as the sampling function. (d) The modulated sampling results show the static images of state II. (e) A conventional CCD captures the static image in a capture period, which is a sum of modulated sampling results (as indicated by the blue arrows).**

关于 SVMHD 原理的更形象的解释如图 2.7 所示。图 2.7 (a) 显示了一个典型的液滴生成周期，其频率记为  $f_{droplets}$ 。为了方便起见，我们将周期液滴生成过程分解四个状态：I, II, III, IV。同时，我们使用正弦信号（其频率等于  $f_{droplets}$ ）作为周期液滴的等效信号来表示这四个状态。在一个液滴产生周期中，这四个状态随着正弦信号的四个状态周期依次发生。然后，使用采样函数（周期性脉冲序列， $f_{flash}$ ）来调制原始信号。如果采样频率满足  $f_{flash} = f_{droplets}/N$ ，其中  $N$  为正整数（图 2.7c 中的  $N = 2$ ），则在采样时会出现相同的状态（图 2.7d 中为状态 II）。在这种情况下（公式 (2-4) 中的  $\delta f = 0$ ），调制结果为直流信号（图 2.7d）。因此，有着长的曝光时间  $T_{ccd}$  的常规 CCD 有能力获取静态图像（图 2.7e）。

在微流控中，高通量液滴通常会呈现周期性信号。许多论文已对此进行了证明和报道。因此，即使在外部同步的情况下，也可以在采样过程中固定或调整高通量液滴  $f_{droplets}$  与采样函数  $f_{flash}$  之间的相位。这样，就可以删除 SVMHD 中的触发信号和相关的液滴检测模块，从而使该装置与任何基于液滴的微流控芯片兼容。

当采样函数  $f_{flash}$  满足式 (2-4) 中的  $\delta f = 0$  时，液滴的图像显得清晰且静止。如果我们以这些采样频率顺序选择帧并将它们标记为  $f_1, f_2, \dots, f_{N-1}, f_N, f_{N+1}, \dots$ ，依此类推，则得到的液滴频率  $f_{droplets}$  为：

$$f_{droplets} = \frac{f_N \times f_{N-1}}{f_N - f_{N-1}} = F(f_{N-1}, f_N) \quad (2-5)$$

一旦  $f_{droplets}$  被计算出，就可以通过以下公式计算微通道中的液滴速度 ( $v$ ):

$$v = L \times f_{droplets} \quad (2-6)$$

其中  $L$  代表微通道中两个连续液滴之间的距离。

此外，如果仔细调整采样频率  $f_{flash}$  ( $\delta f$  稍微偏离零)，则会产生具有低频 ( $\delta f$ ) 的信号。在这种情况下，我们可以在液滴生成周期（即整个动态过程）中捕获不同状态的图像。

SVMHD 装置主要包括三个部分：照明部分，微流控芯片和图像捕获部分（如图 2.8 所示）。在照明部分中，结合了聚焦透镜的 LED 灯用作闪光灯光源。LED 灯由常规信号发生器控制，该信号发生器可调节闪光灯的频率和占空比。闪光灯由聚焦透镜聚焦，并由聚光镜调节，以确保在微流控芯片上呈现准直光束。然后，将照明的微流控芯片图像通过物镜聚焦，之后通过常规 CCD 相机捕获。最终使

用计算机从 CCD 读取图像并从这些图像推导出相关信息。

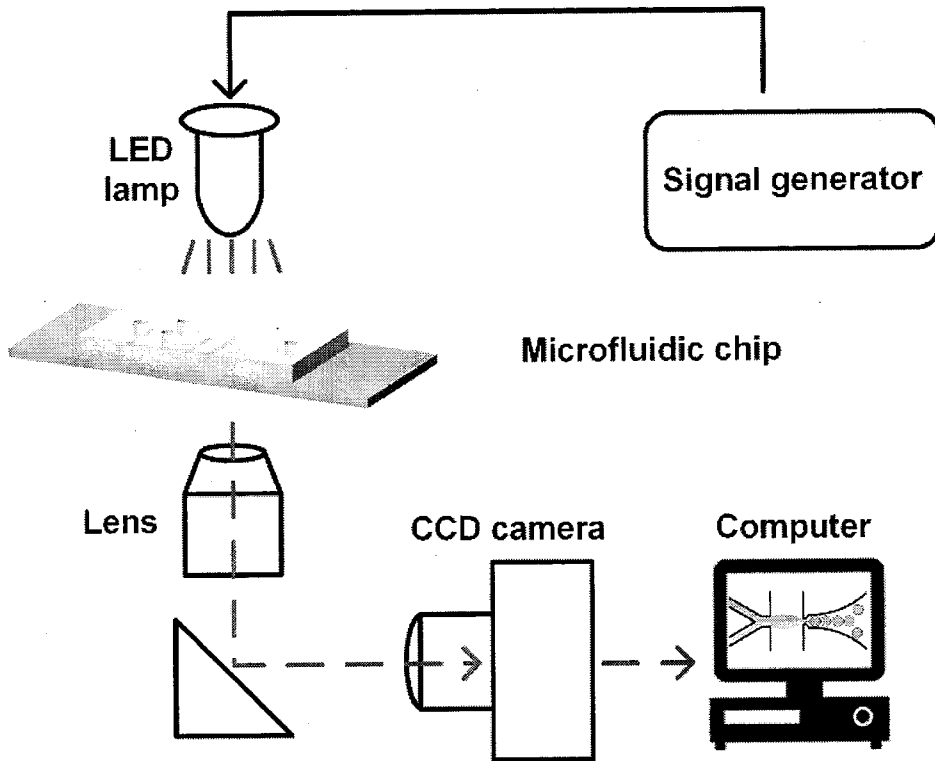


图 2.8 SVMHD 搭建示意图。

Figure 2.8 Schematic of the SVMHD setup.

### 2.2.5 液滴信号的读取

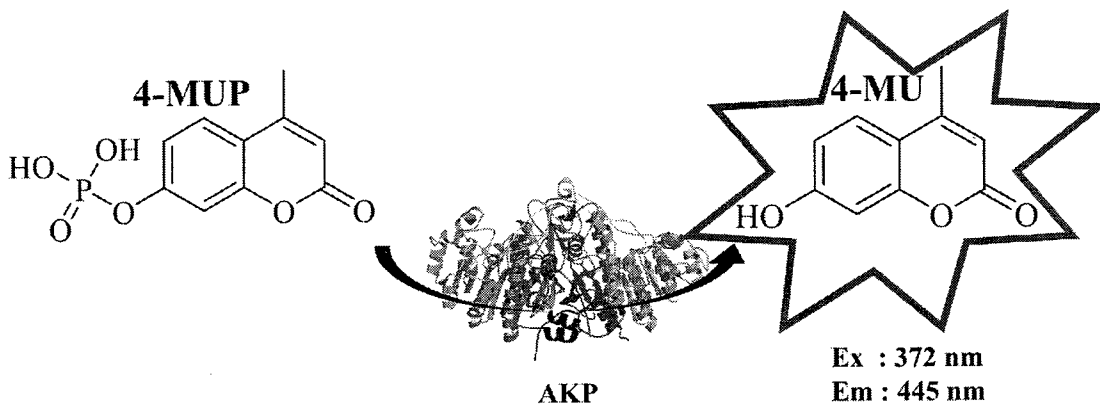


图 2.9 碱性磷酸酶 (AKP) 的荧光检测的示意图

Figure 2.9 Schematic images of the fluorogenic assay of alkaline phosphatase (AKP)

使用碱性磷酸酶 (AKP) 作为免疫标记的信号酶, 它稳定性高、灵敏度高, 能催化 4-甲基伞形酮磷酸酯 (4-MUP) 生成荧光产物 4-甲基伞形酮 (4-MU), 该产物在 360 nm 的光激发下可以发出 448 nm 左右的蓝紫色荧光。(图 2.8)

采用光学检测的方法, 包含酶和底物的液滴中发生反应得到荧光产物, 产物在汞灯 405 nm 近紫外光下激发产生 448 nm 的蓝色荧光信号, 在奥林巴斯 IX73

荧光显微镜下用 CMOS 相机（曝光时间 100ms）拍摄到荧光信号图像，再用软件对图像进行处理分析。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 液滴生成频率

为了演示液滴生成观察的工作过程，首先说明液滴高速生成频率的确定。在该实验中，使用数字 ELISA 液滴微流控芯片生成高通量液滴（如图 2.10 所示）。

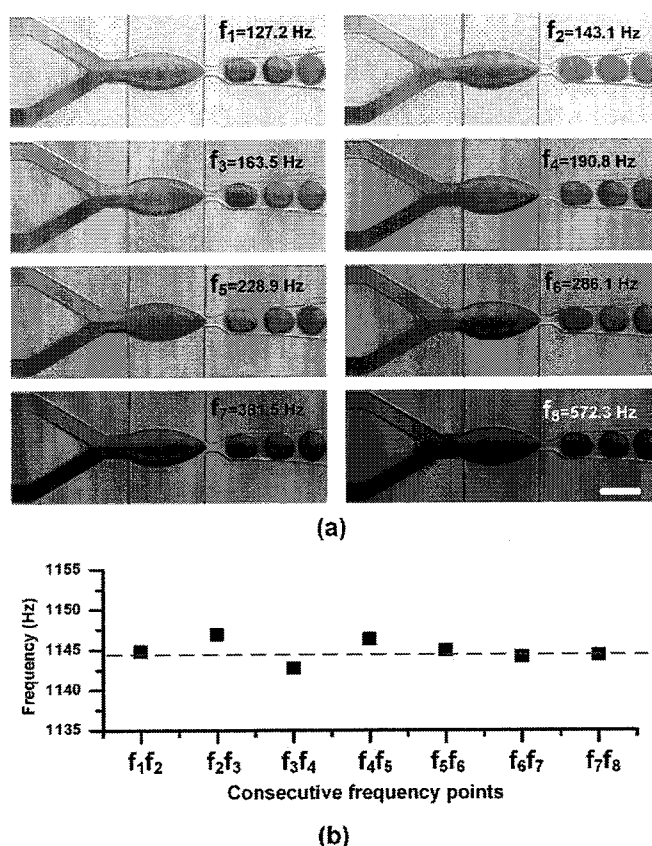


图 2.10 (a) 在清扫过程中，在不同采样频率下的静态液滴图像。实验中采用了相同占空比的闪光灯。因此，当采样频率从低到高扫描时，图像变得更暗。对于 CCD，使用长捕获周期  $T_{ccd}=100$  ms（捕获速率为每秒 10 帧）来捕获图像。比例尺为  $50 \mu\text{m}$ 。(b) 从两个

连续采样频率序列中计算出的频率。函数  $F(f_{N-1}, f_N)$  在公式 (2-5) 中定义。

Figure 2.10 (a) Static droplet images at different sampling frequencies in the sweeping process. A same duty ratio of the flash light is adopted in the experiment. Therefore, the images get darker when the sampling frequency sweeps from low to high. For the CCD, a long capture period  $T_{ccd} = 100$  ms (and the capture rate is 10 frames per second), is used to capture images. The scale bar is  $100 \mu\text{m}$ . (b) The calculated frequencies from series of two consecutive sampling frequencies. The function  $F(f_{N-1}, f_N)$  is defined in Equation 2-5.

使用进样装置将矿物油和墨水压入芯片。油和水的流速分别保持为 4.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  和 1.4  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。液滴产生稳定后,开始拍摄图像。由于缺少有关液滴频率的任何信息,将采样频率(即闪光灯频率)  $f_{flash}$  从低扫描到高(例如,在本实验中为 30 Hz 至 0.6 kHz),并通过传统的 CCD 记录了液滴实时图像。如图 2.10a 所示,依次选择了液滴呈静态且透明的采样频率(理论上为  $f_{droplets}/N$ ),并将其标记为  $f_1, f_2, \dots, f_{k-1}$  和  $f_k$ 。扫频过程中采样频率使用相同的占空比,因此当采样频率从低到高变化时图像会变得越来越暗。根据等式 (2-5),我们获得了微通道中的液滴频率  $f_{droplets}$ 。同时,如图 2.10 所示,可以从这些静态图像中轻松获得有关液滴大小和形状的信息。为了验证测量结果,还用高速相机 (OptiMOS, Q-IMAGING, Chicago, IL, USA) 对这些液滴进行了成像,以计算液滴的频率,速度等。

从两个连续采样频率计算出的频率在图 2.10b 中列出。在图中,计算出的液滴频率落在  $1144.9 \pm 2.0$  Hz 线上,这与高速相机从图像测得的频率 1144.5 Hz 一致,用红线表示。应当指出,在实验中,用于捕获液滴图像长的捕获周期(例如,实验中的  $T_{ccd} = 100$  ms),这可以通过普通的 CCD 很容易地满足。

### 2.3.2 运动模糊的控制

如等式 (2-5) 所示,可以将高频液滴信号  $f_{droplets}$  映射到低频信号  $\delta f$ 。因此,从理论上讲,可以可视化高通量液滴,而不会限制其频率。但是,在采样脉冲持续时间 ( $W$ , 如图 2.7c 所示) 期间,运动的液滴(其实际速度为  $v$ ) 被曝光并捕获其图像。曝光时间内的移动距离 ( $L_{blur}$ ) 可以表示为:

$$L_{blur} = W \times v \quad (2-7)$$

因此,对于更快移动的液滴,  $L_{blur}$  将变大并且获得的图像可能会模糊,这可能会限制 SVMHD 的使用。为了显示持续时间  $W$  对运动模糊的影响,我们使用可变的闪光灯持续时间在细流道处执行了 SVMHD。在实验中,整个实验期间油相和水相的流速保持恒定。通过使用 SVMHD,测得的液滴频率  $f_{droplets}$  为  $2217.7 \pm 3.7$  Hz。然后,将闪光频率  $f_{flash}$  设置为与液滴频率相同,并将脉冲持续时间从 1  $\mu\text{s}$  提升至 200  $\mu\text{s}$ 。捕获的图像如图 2.11 所示。

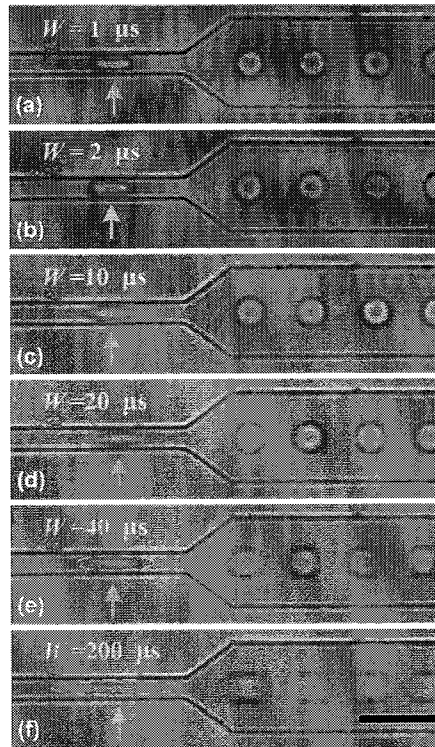


图 2.11 脉冲持续时间 $W$ 对液滴图像的影响。(a–f) 脉冲持续时间从  $1\ \mu\text{s}$  步进到  $200\ \mu\text{s}$ 。在实验中，油和水的流速分别设置为  $7.0\ \mu\text{L}/\text{min}$  和  $1.8\ \mu\text{L}/\text{min}$ 。蓝色箭头指示液滴位置。比例尺为  $100\ \mu\text{m}$ 。

**Figure 2.11 The effect of the pulse duration  $W$  on the droplet image. (a–f) The pulse duration stepped from  $1\ \mu\text{s}$  to  $200\ \mu\text{s}$ . In the experiment, the oil and water flow rates were respectively set as  $7.0\ \mu\text{L}/\text{min}$  and  $1.8\ \mu\text{L}/\text{min}$ . The blue arrows indicate the droplet location. The scale bar is  $50\ \mu\text{m}$ .**

在图 2.11 a-f 中，随着脉冲持续时间变长，模糊变得更加明显。基于 SVMHD，在宽通道中，液滴运动速度  $v$  计算为  $85.3 \pm 0.2\ \text{mm}/\text{s}$ 。根据公式(2-6)，移动距离 ( $L_{blur}$ ) 估计为  $17.06 \pm 0.04\ \mu\text{m}$ ，则  $W = 0.2\ \text{ms}$ ，这与图 2.11 f 很好地吻合。同时，从图 2.11 c-e 中，我们发现窄通道中的液滴相对于宽通道中的液滴变得更加模糊，尽管两个通道中的液滴频率相同。如上所述，正是图像模糊限制了 SVMHD 的范围。因此，得出结论，SVMHD 的范围受液滴实际速度和可达到的脉冲持续时间的限制，而不是受液滴频率的限制。

在基于液滴的微流控中，尽管高通量液滴的频率可以高达几十千赫兹<sup>[81, 82]</sup>，但它们的速度通常小于  $1\ \text{m}/\text{s}$ 。对于常规的 LED 灯，最短的脉冲持续时间在几纳秒内。因此，运动模糊可以限制在几微米，与液滴大小（通常是几微米或几十微米）相比，可以忽略不计。还有更明亮，响应更快的光源（例如氙气闪光灯，超亮发光二极管），有助于确保在短脉冲期间有足够的曝光剂量。因此，可以得出

结论，SVMHD 可以不受限制地用于任何基于高通量液滴的微流体中。

### 2.3.3 液滴生成过程可视化

SVMHD 可用于可视化数字 ELISA 中的整个液滴生成过程。在实验中，使用上述方法，将液滴频率  $f_{droplets}$  测量为 247.2 赫兹。然后，闪光频率  $f_{flash}$  被设置为 246.2 赫兹。因此，低频信号产生与液滴喷射周期中的喷射过程相对应的 ( $\delta f=1$  Hz)。

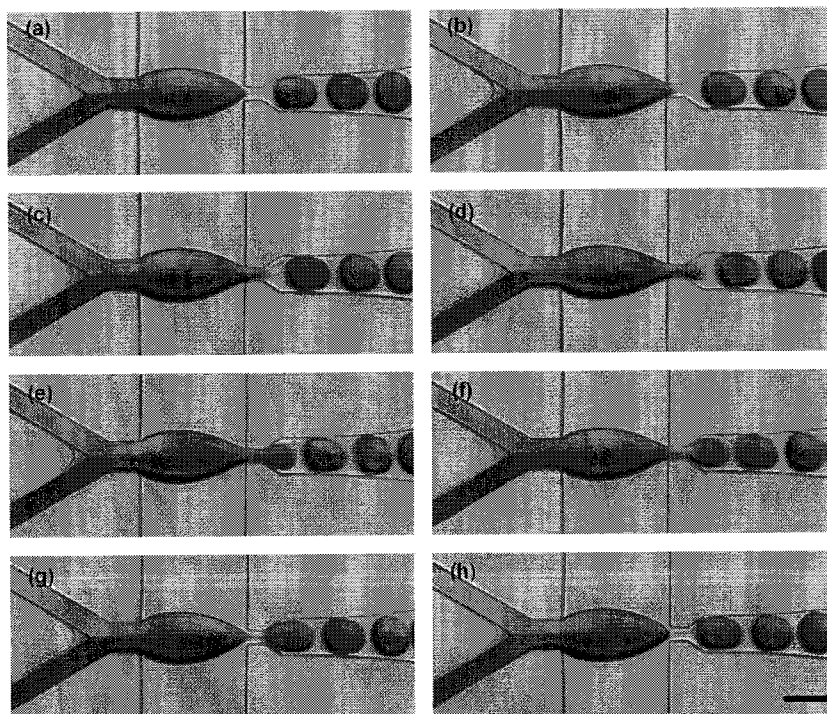


图 2.12 (a-h) 液滴生成过程。将墨水注入芯片在喷嘴处形成从左向右移动的液滴。液滴频率 ( $f_{droplets}$ ) 测试为 247.2Hz，并将闪光频率 ( $f_{flash}$ ) 设置为 246.2Hz。在实验中，捕获周期 ( $T_{ccd}$ ) 为 100 毫秒，捕获速率为每秒 10 帧。比例尺为 100  $\mu\text{m}$ 。可以从采集的图像精确标定液滴的直径为 30  $\mu\text{m}$  以及两个水相的混合比例为 1:1。

Figure 2.12 (a-h) The droplets generation process in a chip. Two colour fluids were injected into the droplets moving from left to right by the nozzle. The droplet frequency ( $f_{droplets}$ ) was tested as 247.2 Hz, and the flash frequency ( $f_{flash}$ ) was set as 246.2 Hz. In the experiment, the capture period ( $T_{ccd}$ ) was 100 ms and the capture rate was 10 frames per second. The scale bar is 100  $\mu\text{m}$ .

如图 2.12 所示，在捕获的连续图像中可以清楚地看到液滴生成过程。颜色较深的两个水相在喷口前 1:1 均匀混合，混合后的两个水相在矿物油的剪切作用下断裂成液滴，液滴分离后，试剂流的尖端迅速缩回到喷嘴。系统回归稳定，然后准备进行下一个液滴生成循环。

## 2.3.4 利用数字 ELISA 液滴微流控平台对球刷聚合酶浓度进行检测

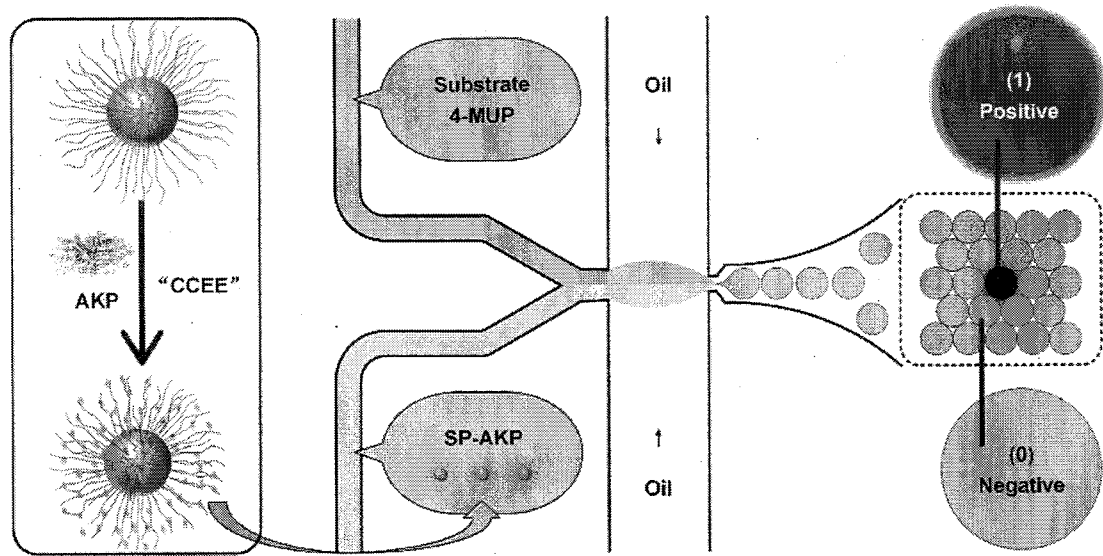


图 2.13 数字检测系统示意图

Figure 2.13 Illustration of digital detection

在传统的数字 ELISA 检测中，单个免疫复合物被困在飞升容积的微腔中，其中单个酶标记的免疫复合物催化底物产生荧光分子<sup>[83]</sup>。通常，可以使用标准荧光显微镜检测几分钟内由一种酶催化产生的成百上千个荧光分子。但是，对于微微升体积的微滴，需要加载更多酶分子的信号放大模块才能产生足够的荧光信号，因为在皮升液滴中由单个酶转化的荧光分子浓度仅为数十 pM，低于当前荧光探测器的检测极限。为了解决皮升体积微滴中催化速率慢的问题，采用大量酶的纳米颗粒载体作为信号放大块是一种有效的策略。与传统的酶载体相比，上海交通大学曾报道过具有高酶结合能力和高活性的球形聚（丙烯酸）刷（SPAABs）用于负载碱性磷酸酶（球形聚（丙烯酸）刷固定化碱性磷酸酶，SP-AKP）作为信号放大模块。将单个 SP-AKP 注入 14 pL 微滴中，可在 6 分钟内催化底物 4-甲基伞形酮磷酸酯（4-MUP）达到“0”或“1”的信号结果，这意味着 SPAABs-酶纳米粒子是一种极具竞争力的信号放大模块。接下来我们基于 SP-AKP 的出色的酶催化性能，将其作为信号放大纳米粒子。

如图 2.14 a 所示，球形聚丙烯酸（PAA）刷（SPAAB）具有 116 nm 的硅胶芯，长而柔软的 PAA 链接枝在表面上。通过“静电俘获后的化学共轭”（CCEE）方法<sup>[84]</sup>，将大量的 AKP 分子固定在 SPAABs 的三维中获得了 SP-AKP。图 2.14 b 显示出了原始 SP-300 的平均直径（PAA 链的理论聚合度为 300），并且所获得的 SP-AKP 均约为 300 nm，这是通过动态光散射（DLS）测量的。每 mg SP-300

可结合约 649  $\mu\text{g}$  的 AKP, 相当于每 SP-300~11000AKP。然后, 使用底物 4-MUP 测量 SP-AKP 的催化活性, 将其转化为荧光产物 4-MU 以发出在 360 nm 激发的 448 nm 蓝色荧光。如图 2.14 c 中所示, 从催化动力学曲线的初始斜率估计了单个固定的 SP-AKP 相对于游离 AKP 的活性。固定的 AKP 对 SP-AKP 的相对催化活性平均为游离 AKP 活性的 10.92%, 表明每个 SP-300 约有 1200 个活性游离 AKP。因为 SP-300 具有三维空间结构, 丰富的羧基和柔软的 PAA 链等优异的性能, 所以它使酶分子很好地保持天然蛋白质构象, 并具有较高的酶活度和活性<sup>[85]</sup>。

利用静电吸附后化学偶联法 (CCEE)<sup>[85]</sup>将碱性磷酸酶 AKP 固定到球刷 SP-300 上制备得到 SP-AKP, 具体步骤如下:

(1) 取 0.2 mg SP-300 于离心管中 (原样涡旋分散均匀), 离心 (14000 rpm, 7 min) 分离并吸掉上清溶液, 用 MEST 溶液洗涤 2 次, 分散于 100  $\mu\text{L}$  MEST 溶液中;

(2) AKP 提前从 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱取出放至室温, 用 MEST 溶液溶解 AKP 配制 2 mg/mL AKP/MEST 溶液, 加入 120  $\mu\text{L}$ , 放于 37 $^{\circ}\text{C}$  分子杂交仪中旋转反应 15 min 后用 MEST 缓冲液洗涤产物两次;

(3) EDC/MEST 溶液 (200 mg/mL (1 mM)), 逐级稀释, 现配现用, 每管加入 120  $\mu\text{L}$  EDC, 放置在旋转仪上室温偶联 2 h 以进行共价固定;

(4) 产物用 PBST 溶液洗涤两次, 分散保存在 100  $\mu\text{L}$  Tris-HCl 溶液中;

(5) 保留上述过程中的母液、上清液以及洗涤液, 用于表征。

球刷碱性磷酸酶的表征方法如下:

通过 BCA 蛋白质定量方法对固定在 SP-300 上的 AKP 的量进行定量。测量每个步骤中原始溶液, 上清液和洗涤溶液中的 AKP 浓度, 以通过减法获得 SP-300 纳米颗粒上 AKP 的结合能力。用酶标仪测量游离 AKP 和 SP-AKP 的酶催化动力学曲线, 每 30 秒收集一次荧光信号。SP-300 的数量通过纳米颗粒跟踪分析仪 (NTA, Zetaview, Particle Metrix) 获得。

然后, 我们模拟了 SP-AKP 数字检测系统, 如图 2.13 所示。使用常规的液滴平铺储藏室, 当极低浓度的 SP-AKP 流入微流控芯片中时, SP-AKP 纳米颗粒通过泊松分布在每个液滴中, 且每个液滴最多只能捕获一个, 从而实现了像数字检测系统一样的所有液滴的“0”或“1”信号分布。在具有高酶负载和高活性的 SP-

AKP 信号放大模块的基础上, 包含 SP-AKP 的液滴 (表示为正液滴) 中, 单个 SP-AKP 纳米颗粒被限制在 14 pL 液滴中, 其 0.25 mM 底物 4-MUP 产生了足够的 4-MU 荧光分子可以在 6 分钟内通过显微镜检测到 (图 2.14 (d) i)。但是, 正如我们推测的那样, 单个 AKP 分子即使在一小时内也很难产生高浓度的 4-MU, 因此无法用标准荧光显微镜检测到 (图 2.14 (d) ii)。

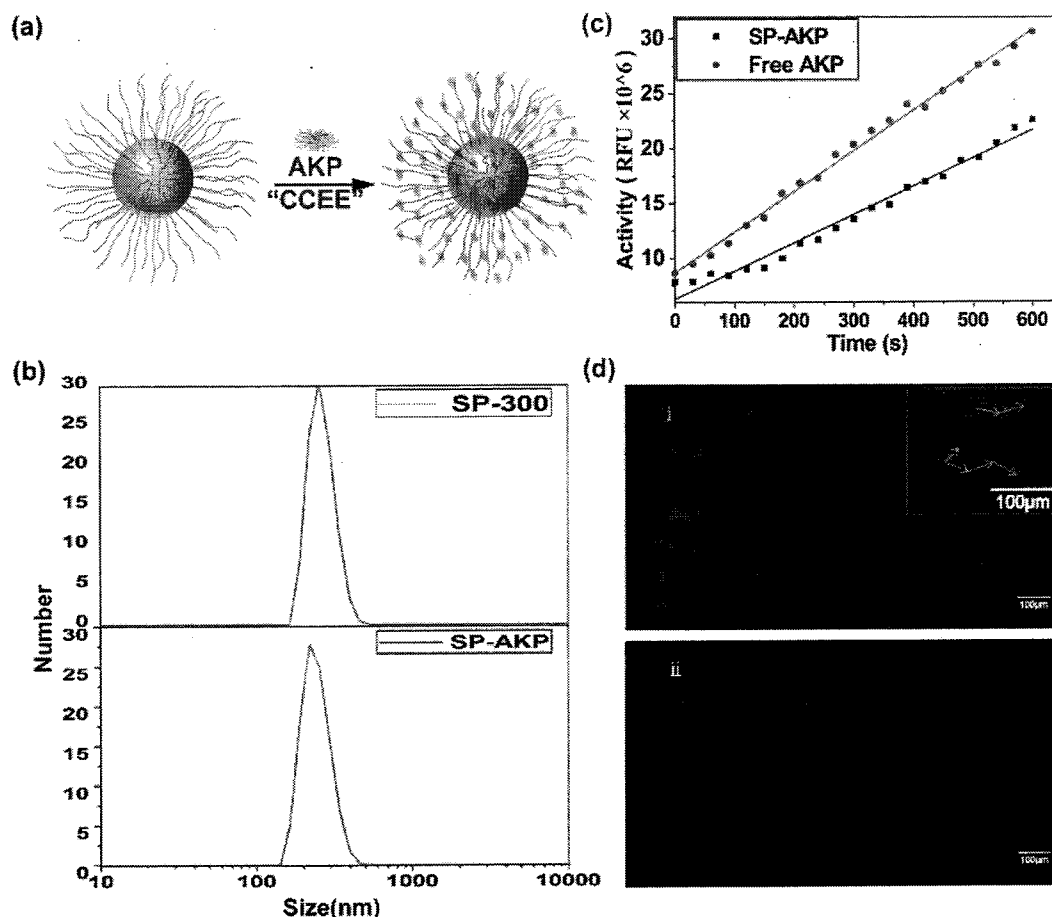


图 2.14 (a) 示意图, 显示通过 CCEE 方法将 AKP 共价固定到 SP-300 中。(b) 通过催化动力学测量的固定化 AKP 相对于游离 AKP 的活性。(c) 颗粒 SP-300 纳米颗粒和 SP-AKP 的相应 DLS 尺寸分布。(d) 液滴中 (i) 游离 AKP ( $\lambda=0.1$ ) 和 (ii) SP-AKP ( $\lambda=0.05$ ) 的荧光图像。 $\lambda$ : 通过理论计算, 每个液滴的平均 SP-AKP 纳米颗粒。插图是 (d) ii 中局部位置的较大图像, 红色箭头表示液滴中的扩散路径。

Figure 2.14 (a) Schematic diagram showing the covalent immobilization of AKP into SP-300 by CCEE process. (b) Activity of immobilized AKP relative to free AKP measured by catalysis kinetics. (c) The corresponding DLS size distributions of particles SP-300 nanoparticles and SP-AKP. (d) Fluorescence images of (i) free AKP ( $\lambda = 0.1$ ) and (ii) SP-AKP ( $\lambda = 0.05$ ) in droplet.  $\lambda$ : average SP-AKP nanoparticles per droplet via theoretical calculation. The inset image is a larger image of local position in (d)ii, and red arrows indicate the diffusion paths in droplets.

然而，图 2.14 (d) ii 的插图暴露了几分钟内荧光团从正液滴快速扩散到其相邻的负液滴的问题。这是因为产生的荧光分子 4-MU 具有一定的疏水性，并且在液滴的内部和外部之间的浓度差使得荧光分子倾向于通过连续的油相从水相中扩散出来，然后扩散到相邻的液滴中。一旦荧光产物的扩散速率快于酶催化的生成速率，则从正液滴中扩散的荧光产物不仅会降低信噪比 (SNR)，还会将负液滴误读为假阳性，导致检测结果不准确。这种分子串扰通常发生在基于液滴的测定中，尤其是对于那些使用荧光底物的数字生物检测<sup>[86, 87]</sup>。从理论上讲，正负液滴之间的荧光团扩散影响主要取决于扩散速率和检测时间。与单一 AKP 分子催化剂相比，尽管使用的具有更高可控催化性能的 SP-AKP 显著缩短了检测时间，并提高了在微升微滴平台上进行数字检测的可行性，但荧光产物在液滴之间的快速扩散不可忽视。因此，开发能够降低液滴之间的荧光团扩散速率的创新技术尤为重要。这个问题和解决方案将在下一章进行详细介绍。

使用 SP-AKP 模拟酶标待测分子，生成微液滴后直接进行检测。保持底物的浓度不变，通过调节 SP-AKP 的浓度来改变平均单个液滴内 SP-AKP 的个数 (Average number of beads per droplet, ABD)。实验设置了不同的 SP-AKP 浓度梯度，如表 2.3 所示，每组测定三个平行样，检测液滴总数量为 5000-20000 个。根据泊松定律，在这些较低的浓度下，大部分液滴内无 SP-AKP，少部分含一个 SP-AKP，因此可以通过酶与底物在液滴中反应发出的荧光，产生液滴的 0/1 信号来表征 SP-AKP 的有无。通过统计 0/1 信号数量，根据泊松分布概率公式计算得到实际的  $\lambda$ 。

表 2.3 不同浓度的 SP-AKP 及对应  $\lambda$  (液滴直径  $D=30 \mu\text{m}$ )

Table 2.3 Different concentrations of SP-AKP and the corresponding  $\lambda$  ( $D=30 \mu\text{m}$ ).

SP-AKP	Concentration( $\mu\text{g/mL}$ )	$\lambda$
1	$1.4 \times 10^{-2}$	0.1
2	$7.0 \times 10^{-3}$	0.05
3	$2.8 \times 10^{-3}$	0.02
4	$7.0 \times 10^{-3}$	0.005
5	$2.8 \times 10^{-4}$	0.002
6	$1.4 \times 10^{-4}$	0.001

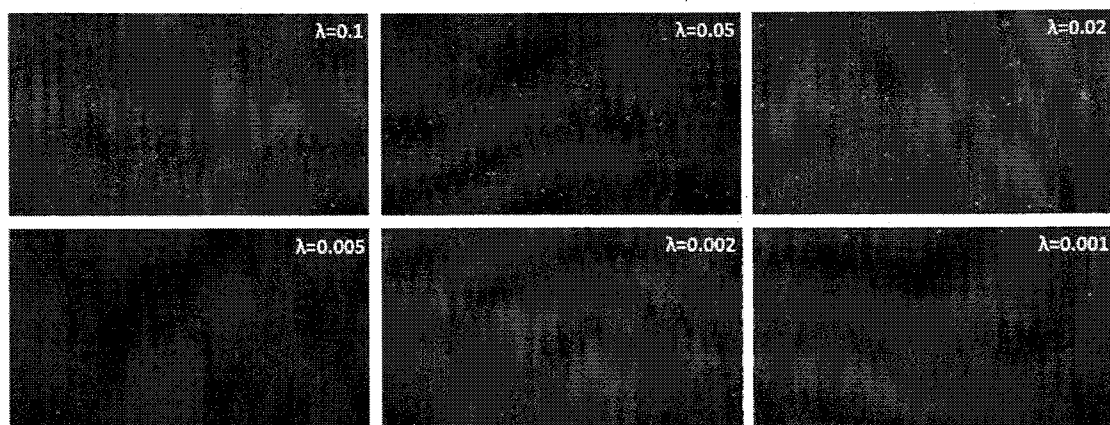


图 2.15 SP-AKP 在  $\lambda=0.1$ 、0.05、0.02、0.005、0.002、0.001 时的数字化荧光信号图像。

Figure 2.15 Digital fluorescent signal images of SP-AKP at  $\lambda=0.1$ , 0.05, 0.02, 0.005, 0.002, 0.001.

设立一系列的 SP-AKP 浓度梯度,  $\lambda=0.1$ , 0.05, 0.02, 0.005, 0.002, 0.001, 每组分别测三个平行样。4 倍放大下的荧光图像如图 2.15 所示, 统计液滴总个数为 10000-30000 个。统计了各个浓度条件下得到的 0/1 信号液滴个数, 通过泊松分布概率公式, 计算得到实际  $\lambda$ 。

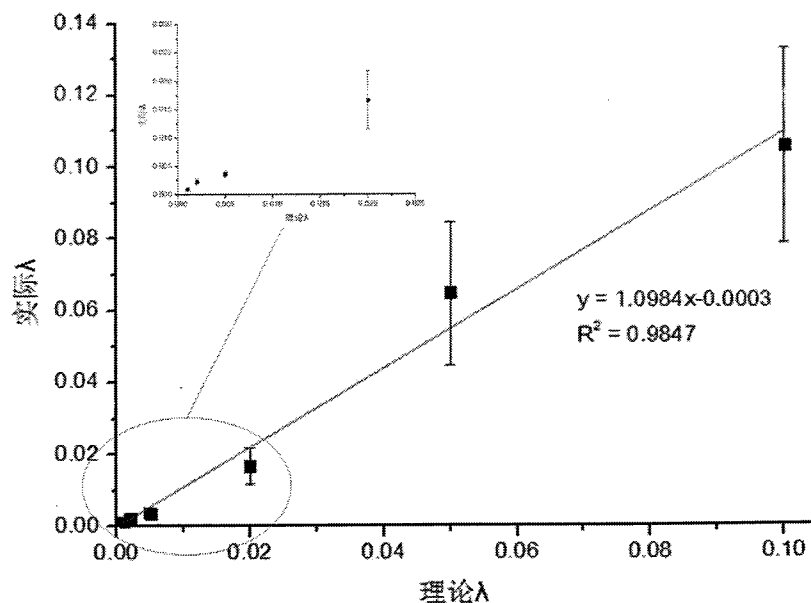


图 2.16 理论  $\lambda$  与实际  $\lambda$  间的关系曲线

Figure 2.16 Relation curve of theoretical  $\lambda$  and actual  $\lambda$ .

图 2.16 为实际  $\lambda$  和理论  $\lambda$  的关系曲线, 呈现一定的线性关系。实验表明该数字 ELISA 检测平台对 SP-AKP 信号放大单元的检测限约为 300 aM, CV 在 30% 左右, 检测范围横跨 3 个数量级。

## 2.4 本章小结

针对数字 ELISA 微流控芯片在蛋白肿瘤标志物检测领域中发挥的重要作用，结合液滴微流控芯片、芯片内流体驱动装置、基于频闪技术的高通量液滴生成可视化和调控策略 SVMHD 和显微镜观察记录平台，构建了数字 ELISA 液滴微流控平台，该平台具有很好的稳定性，适合液滴生成、调控和观测。其中特别新颖的提出了基于频闪技术的高通量液滴生成可视化和调控策略 SVMHD，在该策略中，通过对闪光灯的采样频率与液滴频率进行调制，将真实的高频信号映射为低频信号，便于可视化和反馈控制。同时，由于不需要同步信号，该策略可以直接在任何基于液滴的微流控芯片上实现。该策略唯一的成本就是增加一个信号发生器。此外，该策略可以捕获频率高达几千赫兹的液滴，覆盖了大多数高通量液滴型微流控芯片的范围。基于该平台，在微流控芯片内生成了均一稳定的液滴，并对液滴生成频率、尺寸进行测试，且可视化了液滴的生成过程，确保双水相 1:1 混合以及液滴尺寸的均一稳定，最后对球刷碱性磷酸酶浓度进行了检测，发现酶促反应生成的荧光产物分子会在液滴间扩散，影响液滴阴阳性的判读，导致尽管我们达到了百 aM 级别的检测下限，但是 CV 高达 30%，有待进一步改进。

## 第3章 基于液滴分散阵列的数字 ELISA 微流控芯片

### 3.1 引言

数字化检测的关键假设是,探针在单个液滴中保持隔离状态,并且不会在液滴与连续相之间的界面上扩散。只要用于探针转化的孵育时间足够长,包含靶细胞的液滴(“阳性”液滴)内的所有探针都将转化为荧光产物。不含目标的液滴(“阴性”液滴)保持黑暗。结果,信噪比(SNR)(在此定义为测定的正滴与负滴的荧光强度之比)随着孵育时间的增加而饱和。

但是,上一章最后的聚合酶检测实验已经观察到,小的疏水性荧光分子(荧光素,4-甲基伞形酮)从液滴中扩散出来,穿过由碳氢化合物组成的连续相,然后在短时间内扩散到相邻的液滴中。当孵育时间超过一定持续时间时,使用由这些分子组成的探针进行测定的信噪比降低。<sup>[88-90]</sup>在更长的孵育时间中,所有液滴的探针将混合在一起。所有滴都将显示为阳性,并导致大量的假阳性检测,严重影响最终结果的准确性。。

有三种假设的机制可以使探针跨液滴边界泄漏:<sup>[91-93]</sup>(1)在连续相中直接分配探针分子;(2)探针在连续相中存在的表面活性剂分子形成的囊泡或胶束中的运输;(3)当液滴紧密堆积时,通过表面活性剂分子的双层传输。其中第三种机制导致的扩散现象尤为明显。然而,创建有效且可靠的液滴系统的一个重大挑战是保持液滴的物理稳定性和其中的信号保真度。通常通过添加具有两个部分(一个疏水,另一个亲水)并减少两相分离的自由能的表面活性剂来改善相的稳定性。然而,表面活性剂的存在导致不同相之间更复杂的相互作用以及染料从液滴向外相的泄漏。

为了克服荧光分子从阳性液滴("1"信号)向邻近的阴性液滴("0"信号)扩散的交叉污染问题,以往一些研究小组<sup>[91, 94-97]</sup>报道的有几种常见的策略,如使用了水包油型水(W/O/W)双乳化液滴。如果将气泡存储在线性管中,也可以在液滴塞之间引入气泡。然而,产生双乳化液滴或引入气泡的需要增加了系统的复杂性。合成新的表面活性剂以提高液滴的稳定性,或对荧光底物进行更多亲水性的化学修饰以延迟分子向油相的迁移<sup>[86, 98, 99]</sup>。但这些基于特殊酶和相应底物的方法缺乏通用性,因此其他研究者试图设计和制备特殊的微流控结构来控制液滴的分离

来解决这一问题。在这些研究中,大部分研究者只是通过在流道中设置一些捕集器结构来随机捕获几十到几百个液滴<sup>[94, 100-104]</sup>。但是,由于捕捉结构的数量太少,大部分液滴都会绕过捕捉阵列,有可能浪费昂贵的试剂或样品,但如果增加捕捉结构的数量,流道的流动阻力也会增加,导致流速下降,系统不稳定等问题。Labanieh 等人在腔体顶部设计了微孔,液滴浮入井中<sup>[105]</sup>。通过翻转装置可以回收液滴。该方法实现了液滴的高通量捕获,但必须依赖含氟油和相关的含氟表面活性剂,而含氟油和相关的含氟表面活性剂存在以下几个缺点: i) 浮动液滴阵列的操作相对复杂,因此可能需要实验者有较高的操作技能; ii) 由于含氟表面活性剂的合成是一个复杂的过程,市面上可获得且价格低廉的含氟表面活性剂仍然受到限制,更重要的是,这些氟化表面活性剂,特别是全氟辛酸(PFOA)和全氟辛烷磺酸(PFOS),有害,并且由于它们的持久寿命,它们可以在包括人类在内的许多物种的血液中积聚。它们的毒性水平甚至迫使美国环境保护署在 2006 年启动了一项计划,以减少其工业生产<sup>[106]</sup>。因此,如何以高效、高通量、易操作的方式精确分散液滴仍是一个很大的挑战。

为了优化数字 ELISA 平台,使其更加有效且可靠的检测蛋白肿瘤标志物,本章开发了一款可将液滴分散储存的数字 ELISA 微流控芯片,结合聚合酶信号放大模块来延缓相邻液滴之间荧光分子的扩散,用于数字化检测肿瘤蛋白标志物,如图 3.1 所示。在我们的数字检测系统中,首先将聚合酶/免疫复合物和底物 4-MUP 作为两种水相,通过流动聚焦结构同时注入直径为 30  $\mu\text{m}$  (约 14 pL) 的油包水液滴中。然后,快速生成数万个液滴,并流向储存室进行培养和检测。通过控制聚合酶/免疫复合物的数量远小于液滴的数量,每个液滴中最多含有一个聚合酶/免疫复合物。单个聚合酶/免疫复合物在 14 pL 液滴中可以快速催化底物 4-MUP 产生足够的荧光分子 4-甲基伞形酮(4-MU),很容易被荧光显微镜检测到。其次,我们在液滴储存室中设计并集成了液滴分散阵列(DIA),并优化了 DIA 的结构,使液滴保持分散,从而降低了因液滴紧密排列而造成的荧光团扩散率。最后,基于数字检测法,系统地比较了荧光分子在 DIA 和传统非隔离液滴阵列中的扩散速率以及 DIA 的数字检测性能。

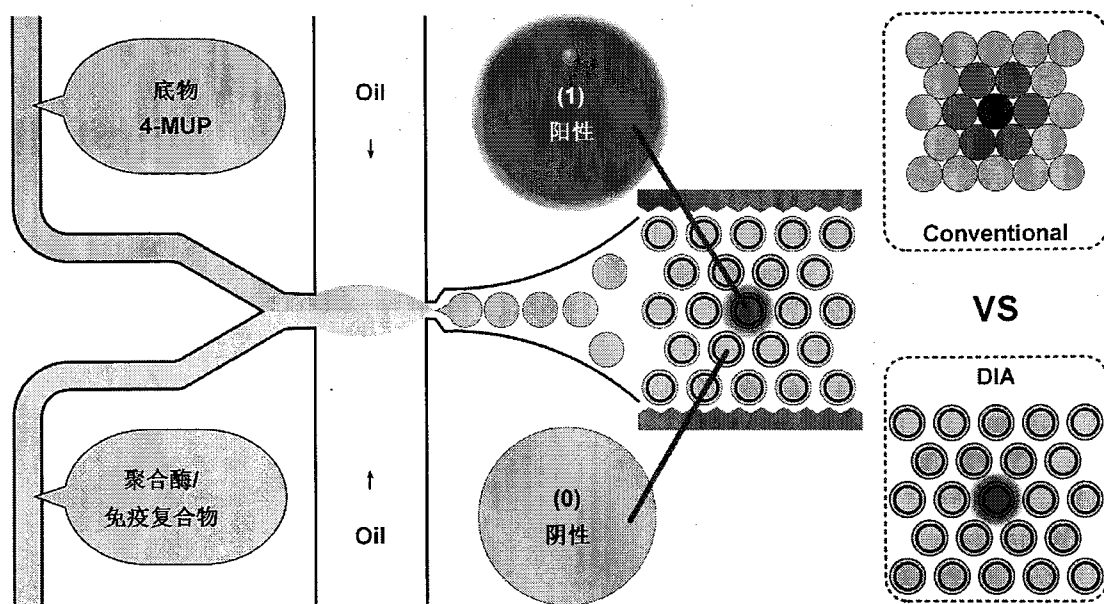


图 3.1 数字检测系统示意图及 DIA 在延缓荧光分子扩散中的表现。

Figure 3.1 Illustration of digital detection and performance of preventing fluorophore diffusion in DIA.

### 3.2 液滴间荧光扩散模型

原则上，分子交换过程是由热力学预测的：溶质的化学势必须通过分子运输在整个系统中达到平衡。分子交换过程涉及四个步骤<sup>[107]</sup>：第一步，溶质分子向水-油界面扩散；在第二步中，分子在界面附近在水和油相之间分配。第三，分子通过油相向相邻的液滴扩散。最后，作为第四步，分子再次在油和最初的“空”液滴之间分配，直到达到平衡。迄今为止，尚未明确确定油包水乳液中分子迁移的决定速率的步骤。但是，最近的数值模拟表明，跨相边界传输分子是限速步骤<sup>[108]</sup>。定量地，我们分析了纯扩散过程中几何形状的平衡动力学（也就是说，第一，第二和第四步明显快于第三步）。为了表征液滴间距对运输时间尺度的影响，我们建立了荧光分子扩散模型模型。

对于由厚度为 $l_{eq}$ 的膜隔开的两个液滴，膜的渗透率 $P$ 表示为 $P = KD/l_{eq}$ ，其中 $D$ 是膜中的扩散系数， $K = c_{oil}^{eq}/c_{aq}^{eq}$ 是分子在膜和储层之间的分配系数。在我们的几何形状中，膜不是由单个参数 $l$ 描述，而是包括两个参数，液滴中心之间的间距 $d_c$ 和其半径 $r$ 。为简单起见，我们将捕获的液滴近似为圆柱体，使用 $\delta = d_c/2r$ （无量纲形式）表示的液滴-液滴中心方向上的梯度贡献。详细分析过程如下：

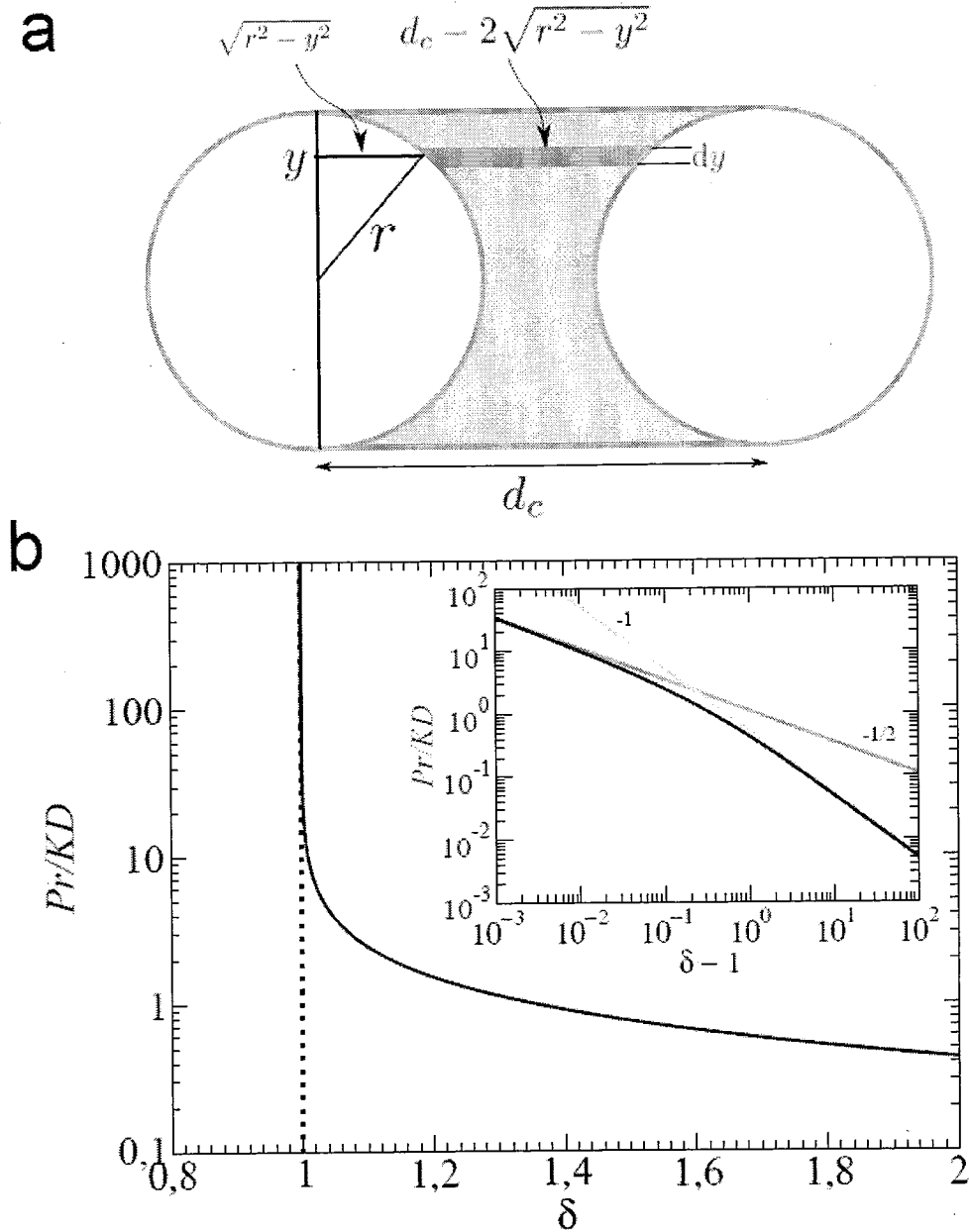


图 3.2 扩散模型。(a) 两个液滴之间膜的示意图。液滴在高度上被认为是圆柱体。(b) 在扩散有限模型中分隔两个液滴的油膜的渗透率。渗透率  $P$  对接触液滴的分化  $\delta = 1$ 。非对称缩放显示，对于接触液滴的  $a$  幂律指数为  $-1/2$ ，对于稀疏液滴  $a$  的幂律指数为  $-1$  ( $\delta \rightarrow \infty$ )。交叉得到的指数为  $\delta - 1 \sim 2/\pi^2$ 。交叉处渗透率的典型值由  $P \sim \pi^2/4 \times KD/r$  给出。

Figure 3.2 Permeability model. (a) Sketch of the membrane between two droplets. The droplets are considered as cylinders in the height. (b) Permeability of the oil membrane separating two droplets in a diffusion limited model. The permeability  $P$  diverges for touching droplets  $\delta = 1$ . The asymptotic scaling shows a  $-1/2$  power law exponent for touching droplets and a  $-1$  exponent for sparse droplets ( $\delta \rightarrow \infty$ ). The crossover is obtained for  $\delta - 1 \sim 2/\pi^2$ . The typical values for the permeability at the crossover is given by

$$P \sim \pi^2/4 \times KD/r.$$

作为第一近似, 我们认为液滴之间的间距可作为一个渗透膜。在三维中, 液滴被挤压并被视为圆柱体 (图 3.2)。渗透率  $P$  表示为:

$$P = KD/l_{eq} \quad (3-1)$$

其中,  $l_{eq}$  是液滴之间的等效膜厚, 期望  $l_{eq}$  大于液滴之间的最小距离, 即  $l_{eq} > d_c - 2r$ 。根据几何学的论证,  $l_{eq}$  写为

$$\begin{aligned} \frac{1}{l_{eq}} &= \frac{1}{2r} \int_{-r}^{+r} dy \frac{1}{d_c - 2\sqrt{r^2 - y^2}} \\ &= \frac{1}{r} \int_0^{+r} dy \frac{1}{d_c - 2\sqrt{r^2 - y^2}} \end{aligned}$$

使用对称性论证。问题的典型尺度为  $r$ , 横向尺寸写成无维形式  $\xi = y/r$ 。引入无量纲间距  $\delta = d_c/2r$ , 推导出

$$\frac{2r}{l_{eq}} = \int_0^1 \frac{d\xi}{\delta - \sqrt{1 - \xi^2}}$$

为了求解积分, 我们先做一个变量代换, 引入  $\xi = \cos \theta$ 。

$$d\xi = -\sin \theta d\theta$$

$$\xi = 0 \Leftrightarrow \theta = \pi/2$$

$$\xi = 1 \Leftrightarrow \theta = 0$$

因此:

$$\frac{2r}{l_{eq}} = \int_{\pi/2}^0 \frac{-\sin \theta}{\delta - \sqrt{\sin^2 \theta}} d\theta$$

由于  $\theta \in [0, \pi/2]$ ,  $\sqrt{\sin^2 \theta} = \sin \theta$  则

$$\begin{aligned} \frac{2r}{l_{eq}} &= \int_0^{\pi/2} \frac{\sin \theta}{\delta - \sin \theta} d\theta \\ &= \int_0^{\pi/2} \frac{\delta + \sin \theta - \delta}{\delta - \sin \theta} d\theta \\ &= \int_0^{\pi/2} \frac{\delta}{\delta - \sin \theta} d\theta - \int_0^{\pi/2} d\theta \\ &= \int_0^{\pi/2} \frac{\delta}{\delta - \sin \theta} d\theta - \pi/2 \end{aligned}$$

现在我们将再代换变量:  $t = \tan(\theta/2)$

那么:

$$\sin \theta = \frac{2t}{2t + 1}$$

$$d\theta = \frac{2dt}{t^2 + 1}$$

$$\theta = 0 \Leftrightarrow t = 0$$

$$\theta = \pi/2 \Leftrightarrow t = 1$$

导致:

$$\begin{aligned} \int_0^{\pi/2} \frac{\delta d\theta}{\delta - \sin\theta} &= \int_0^1 \frac{2\delta dt}{t^2 + 1} \frac{1}{\delta - \frac{t^2 + 1}{2t}} \\ &= \int_0^1 \frac{2\delta dt}{\theta(t^2 + 1) - 2t} \\ &= \int_0^1 \frac{2dt}{t^2 + 1 - 2t/\delta} \\ &= \int_0^1 \frac{2dt}{(t - 1/\delta)^2 + (1 - 1/\delta)^2} \end{aligned}$$

第三次代换变量  $u = (t - 1/\delta)/\sqrt{1 - 1/\delta^2}$ :

$$\begin{aligned} \int_0^1 \frac{2dt}{(t - 1/\delta)^2 + (1 - 1/\delta)^2} &= \frac{2}{\sqrt{1 - 1/\delta^2}} \int_{\frac{-1}{\sqrt{\delta^2 - 1}}}^{\frac{\sqrt{\delta - 1}}{\sqrt{\delta + 1}}} \frac{du}{u^2 + 1} \\ &= \frac{2}{\sqrt{1 - 1/\delta^2}} [\arctan u]_{\frac{-1}{\sqrt{\delta^2 - 1}}}^{\frac{\sqrt{\delta - 1}}{\sqrt{\delta + 1}}} \end{aligned}$$

综上所述,  $P$  的表达式为:

$$P = \frac{KD}{l_{eq}} = \frac{KD}{r} \left( -\frac{\pi}{4} + \frac{1}{\sqrt{1 - 1/\delta^2}} \left[ \arctan \sqrt{\frac{\delta - 1}{\delta + 1}} + \arctan \frac{1}{\sqrt{\delta^2 - 1}} \right] \right) \quad (3-2)$$

由于  $\arctan(a) + \arctan(b) = \arctan((a + b)/(1 - ab))$ , 我们可将表达式简化为:

$$P = \frac{KD}{l_{eq}} = \frac{KD}{r} \left( -\frac{\pi}{4} + \frac{\delta}{\sqrt{\delta^2 - 1}} \arctan \sqrt{\frac{\delta - 1}{\delta + 1}} \right) \quad (3-3)$$

上式显示,  $P$  随着液滴距离衰减为零而发散。在物理上, 我们期望  $P$  的表达式有一个极限值, 因为当液滴被压在一起时, 液滴之间的最小距离将达到一个非零的厚度。在我们简单的几何近似中, 液滴的变形没有被考虑在内。然而, 值得注意的是, 在接近分叉处,  $P$  的比例为

$$P \sim \frac{KD}{r} \frac{\pi}{2\sqrt{2}} (\delta - 1)^{-1/2}, \quad \delta \sim 1 \quad (3-4)$$

相反，对于较大的间距，其比例为

$$P \sim \frac{KD}{r} \frac{1}{2} (\delta - 1)^{-1}, \delta \sim \infty \quad (3-5)$$

$\delta - 1 \sim 1$  的区域(与液滴大小相当的间距，通常对应于接近 0.5 的体积分数)正好处于这两种制度的交叉点。

### 3.3 芯片设计

为了解决上述荧光产物扩散的瓶颈问题，我们开发了一种简单的液滴隔离阵列，以降低荧光团的扩散速率。芯片的工作流程如下：调节两个压力调节器使油和水相注入微流控芯片的压力分别为 30 kpa 和 28 kpa。测得水相和油相的流速分别为 0.28  $\mu\text{L}/\text{min}$  和 0.30  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。在此，每秒钟 330 个直径为 30  $\mu\text{m}$  ( $\text{CV} < 3\%$ ) 的单分散液滴由片上的十字聚焦结构直接生成，然后流入分散的液滴阵列区域，我们将这个特殊的阵列命名为“droplets isolated array”DIA (图 3.3 a)。DIA 装置由两部分组成，一部分是液体流动的通道，另一部分是通道上方用于隔离液滴的圆形腔室阵列 (图 3.3 b)。它是一个独特的阵列，可以用来随时间监视成千上万个皮升级样本：当液滴流过 DIA，狭窄的高度通道扁平化的液滴允许他们占据更大的芯片面积。此时，液滴彼此相邻，形状类似于椭圆体 (图 3.3 (c) i)；当气压开关关闭时，芯片中的液体也停止流动，表面张力推动各腔室下方的液滴恢复最低能量形状，即球形。此时，液滴占据的芯片面积较小，被逐一隔开分散 (图 3.3 (c) ii)。后面我们将深入讨论 DIA 的结构设计对液滴操纵的影响因素。利用上述简单的概念制备而来的 DIA 芯片可以灵活地实现液滴捕获和释放之间的切换。而且，DIA 结构特别适合在高流速下工作，因为流速越高，液滴越稳定地被压平。此外，DIA 装置中液滴的存储非常稳定：即使装置被移动加热，或通过倒置显微镜或微阵列扫描仪成像，所获得的液滴仍固定在其阵列位置。而在实验结束后，液滴在施加压力的情况下，通过向装置中注入油，很容易恢复，使液滴储存室恢复如初，可以重复使用 (图 3.3 (c) iii)。

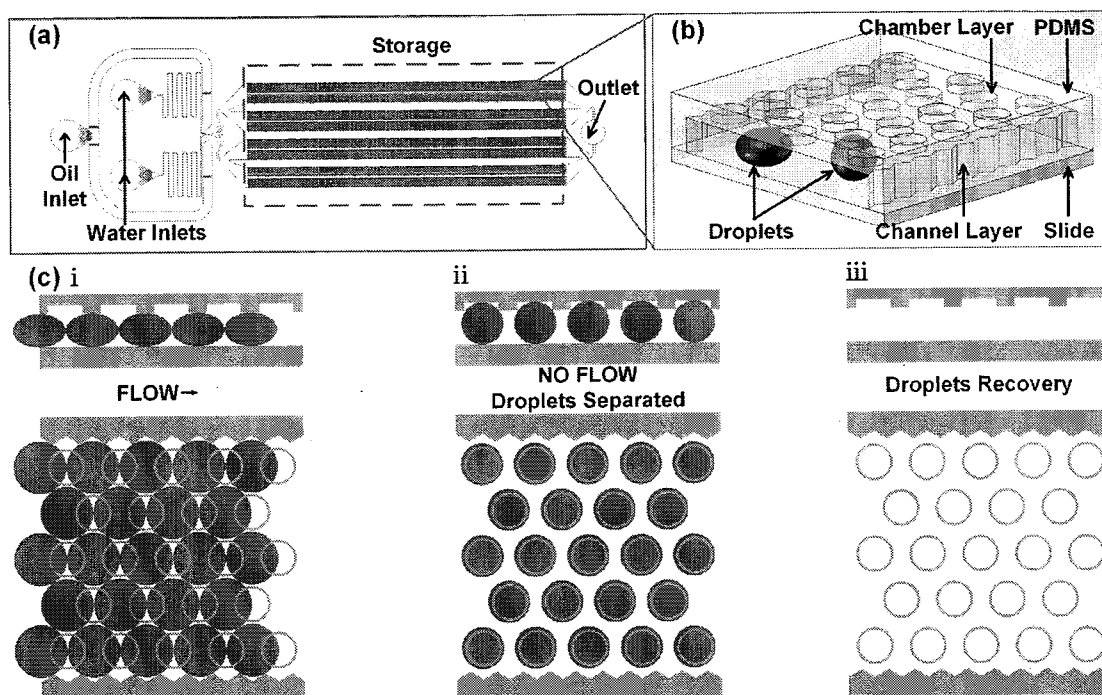


图 3.3 DIA 装置的示意图。(a) 芯片的平面图。(b) DIA 结构的 3D 立体图。(c) 工作流程的示意图，包括 (i) 密闭液滴在流道中被压平 (ii) 停止流动，表面张力引导水滴在阵列下捕集和分散 (iii) 液滴回收。上图为垂直剖面图，下图为俯视图。

Figure 3.3 The Schematic diagram of DIA device. (a) Plan view of the Chip. (b) 3D stereogram of the DIA structure. (c) Microscopic images of the workflow including (i) Confined droplets are flattened in the flow channels (ii) Stop flow, surface tension guides water droplets to trap and disperse under the array (iii) droplet recovery. The upper is a vertical section and the lower is a top view.

### 3.3.1 关键参数的设计

为了有效地捕集和释放腔内的液滴，必须对装置的几何参数进行理论分析、量身设计和仔细验证，如腔体直径 ( $d_{chamber}$ )、腔体高度 ( $h_{chamber}$ )、通道高度 ( $h_{channel}$ )、腔间间距 ( $x$ ) 等 (图 3.)。当液体流动时， $h_{channel}$  必须小于液滴直径 ( $d_{drop}$ )，以保证液滴被通道挤压成椭圆形。当停止流动时，为了使每个腔室附近都有液滴，采用密度最大的六边形阵列结构排布腔室。另外，由于液滴在被捕获前后的体积是恒定的，所以  $d_{drop}^3$  应约等于  $x^2 h_{channel}$ ， $h_{chamber}$  应大于或等于  $d_{drop}$ ，以使液滴有足够的空间恢复球形。根据以上分析， $h_{channel}$  大于液滴半径，从而让液滴更顺利地冲出腔体，使芯片的流动阻力变小，从而实现超高的吞吐量。根据上一节的建模：当液滴中心距与液滴直径之比大于 1.2 时，荧光分子在液滴间的扩散率将大大降低。

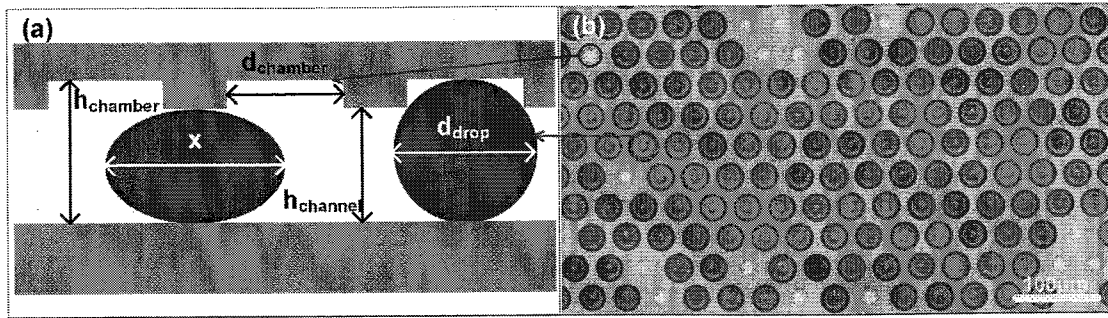


图 3.4 (a) 用于有效捕集和回收液滴的设备设计参数。(b) DIA 中分散液滴的显微图。

Figure 3.4 (a) Device design parameters for efficient droplet trapping and recovery. (b) microscopic image of the isolated droplets in DIA.

另外同样使用无量纲参数  $\delta = d_c/2r$  作为变量，将每个液滴占据的芯片六边形面积除以每个液滴的俯视面积得到每个液滴的芯片面积利用率，每个液滴占据的芯片面积如图 3.5 (a) 所示，为了同时让芯片面积利用率达到最大化以及扩散速率最小化，作图寻找两条曲线的交点如图 3.5 (b)，从而将  $x$  与  $d_{drop}$  的比值设为 1.25。

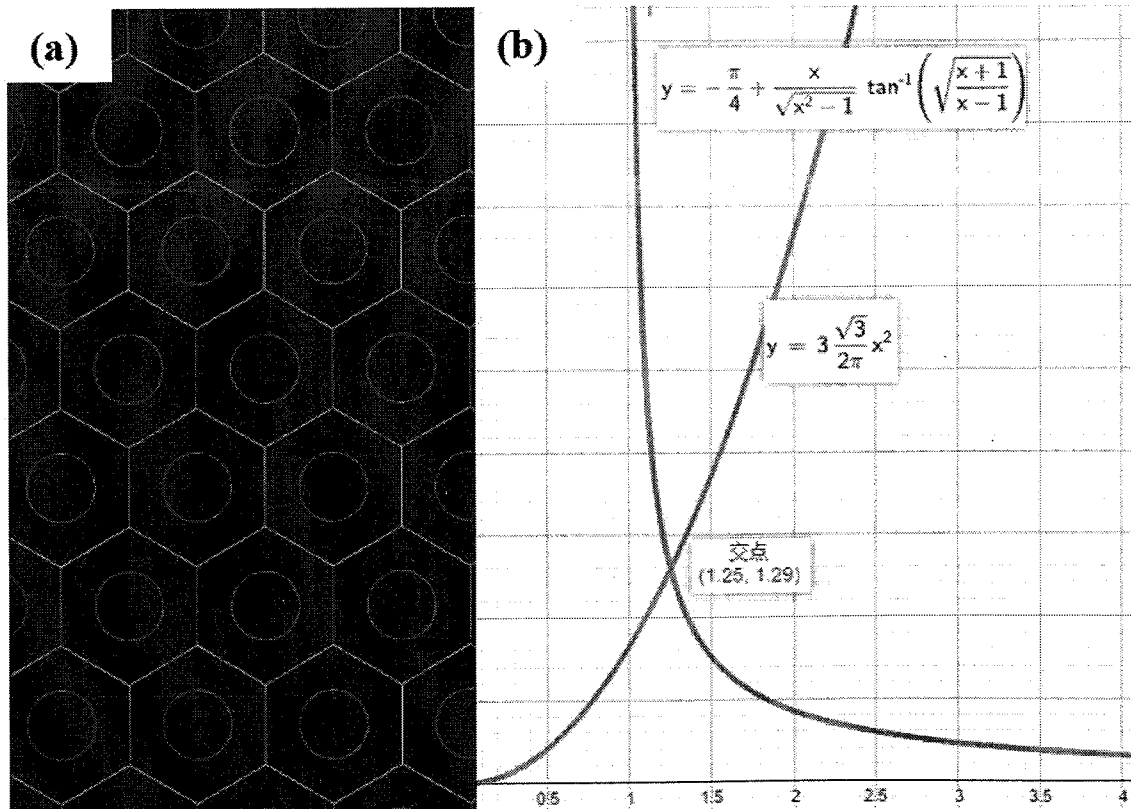


图 3.5 (a) 芯片面积利用率示意图。(b) 交叉点寻找液滴间距最优值

Figure 3.5 (a) Schematic diagram of chip area utilisation. (b) Crossover point to find optimal value of droplet spacing

### 3.4 芯片和材料制备

#### 3.4.1 实验材料和仪器

表 3.1 实验材料及仪器设备列表

Table3.1 List of materials and apparatus

试剂/仪器名称	生产厂家
单晶硅片	MCL 电子材料
SU-8 3025 光刻胶	Micro Chem, 加拿大
聚二甲基硅氧烷 PDMS Sylgard 184	Dow Corning, 美国
SU8 显影液 (PGMEA)、 1H,1H,2H,2H-全氟辛基三氯硅烷	Sigma Aldrich, 美国
浓硫酸、过氧化氢、乙醇、氢氟酸	上海凌峰化学试剂有限公司
深反应离子刻蚀机	STS, 英国
接触式光刻机 MA6	Karl Suss, 德国
显微镜	Olympus
真空	上海精宏仪器有限公司
恒温烘箱	上海精宏仪器有限公司
等离子清洗机	成都铭恒科技发展有限公司
甩胶仪	北京赛德凯斯电子有限责任公司
正压恒压泵	苏州汶灏
CCD	Retiga R1, Qimaging, Surrey, Canada
LED 灯	MCWHL5-C1, Thorlabs, Newton, USA

#### 3.4.2 硅片模具的制备

本章的微流控芯片制作还是基于现有的微电子机械系统 (Microelectro Mechanical Systems, MEMS) 制作工艺和 PDMS 软刻蚀技术。微流控芯片制作同样分两个步骤: 硅片模具制备和 PDMS 芯片制备。其中 PDMS 芯片制备工艺同上一章介绍的完全一样, 这里不再赘述。由于本章的微流控芯片具备双层结构, 而且对尺寸精度要求较高, 我们选用了硅片双层干法刻蚀工艺图 3.6, 具体如下:

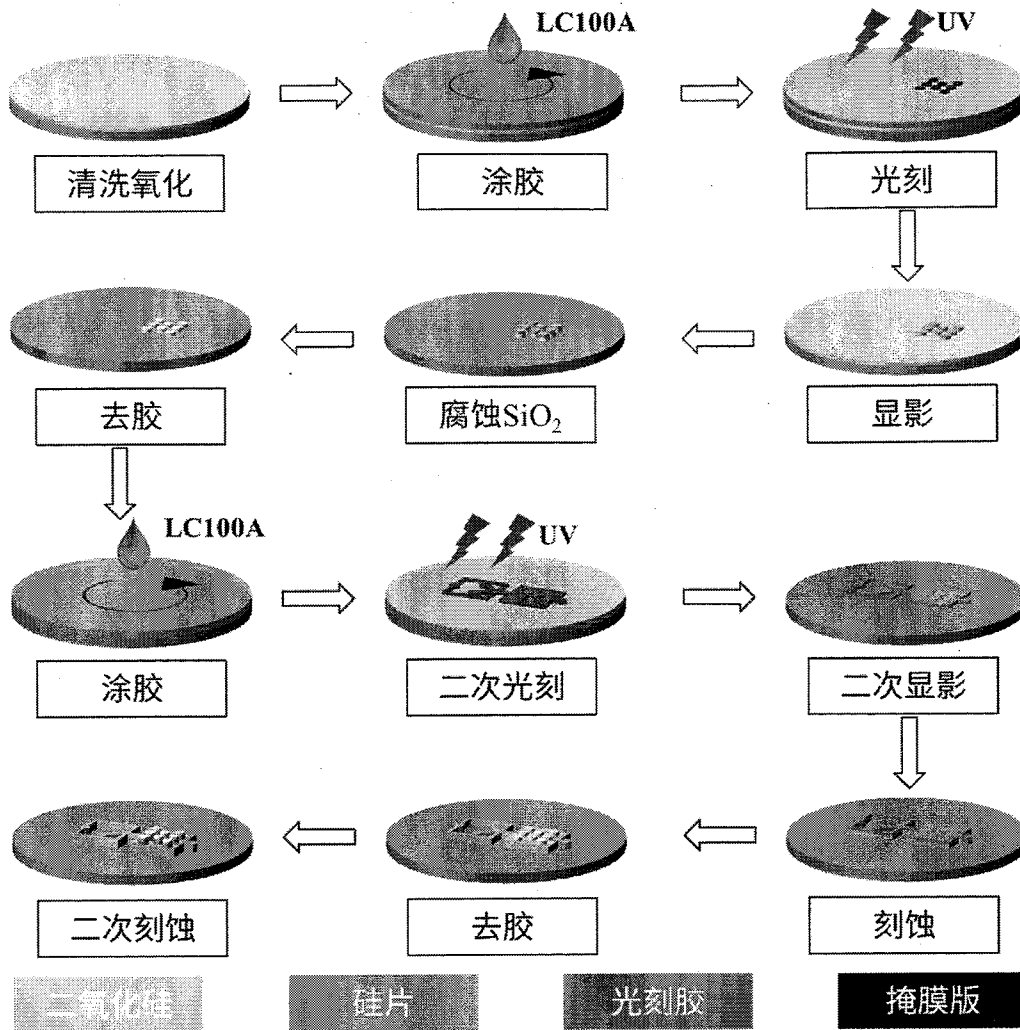


图 3.6 硅片模具制备流程

Figure 3.6 The process of silicon wafer mold fabrication

1.清洗硅片：将硅片放入清洗槽中，倒入体积比为 5:1 的 98%浓硫酸和 30%过氧化氢混合溶液，加热到 120°C。清洗 10 min 后，将硅片取出，去离子水清洗 3 遍。然后用氮气吹干清洗好的硅片，并置于 180°C热板上加热 20 min，使硅片完全干燥，最后自然降到室温。将清洗完成的硅片通过热氧化在表面形成厚度 2  $\mu\text{m}$  氧化层。

2.制作第一层结构：选用正性光刻胶 (LC100A)，用甩胶机在硅片上旋涂 1.4  $\mu\text{m}$  厚的光刻胶。120°C前烘 90 s 后，曝光 9 s，显影 45 s，清水冲洗干净，甩干后 135°C硬烘 30 min。第一层结构制作完成。

3.湿法腐蚀：根据待腐蚀氧化层厚度 (2  $\mu\text{m}$ )，将图形化的硅片放入 35°C氢氟酸腐蚀槽中腐蚀反应 12 min，然后用去离子水冲洗硅片，甩干机中甩干。

4.湿法去胶：将硅片放入含 98%浓硫酸和 30%过氧化氢混合溶液清洗槽中，

清洗 10min, 将第一层光刻胶清洗掉。然后将硅片取出, 用去离子水冲洗硅片, 甩干机中甩干。

5. 制作第二层结构: 在二氧化硅层图形化的硅片表面旋涂  $2.4\ \mu\text{m}$  厚 LC100A 光刻胶。120°C 前烘 90 s 后, 与二氧化硅层图形对准曝光, 显影 45 s, 清水冲洗干净, 甩干后 135°C 硬烘 30 min。第二层光刻图形制作完成。

6. 深反应离子刻蚀: 将图形化的硅片放入深反应离子刻蚀系统中, 以光刻胶为保护层, 将无光刻胶保护的部分向下刻蚀  $20\ \mu\text{m}$ , 而有光刻胶的部分则留下来。

7. 第二次刻蚀: 湿法去除第二层光刻图形, 二氧化硅层图形显出。以二氧化硅层为保护层, 将无二氧化硅保护的部分向下刻蚀  $8\ \mu\text{m}$ , 而有二氧化硅的部分则保留下来。这样经过两次深反应离子刻蚀, 就得到  $30\ \mu\text{m}$  和  $10\ \mu\text{m}$  两种高度的结构。

### 3.4.3 试剂配制

#### 磁珠的功能化修饰

实验利用羧基 (-COOH) 化的聚苯乙烯磁珠, 经过 EDC/NHS 活化, 与 CEA 捕获抗体的氨基发生缩合反应, 实现磁珠的功能化修饰。具体步骤如下:

1. 磁珠清洗: 在 1.5 mL 离心管中, 取  $10\ \mu\text{L}$  磁珠原液 (探到底部抽取), 加入到  $90\ \mu\text{L}$  的 PBS 中, 移液枪吹打并在涡旋仪上充分震荡。然后以 6000 rpm 的条件离心 5.5 min, 吸去上清液。向离心管中加入  $100\ \mu\text{L}$  PBS 重悬磁珠, 继续离心去上清, 最后重悬在  $80\ \mu\text{L}$  的 PBS/5PH 中。

2. 磁珠活化: 利用 PBS/5PH 溶液置于冰块中配制 10 mg/mL 的 EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) 和 NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 溶液。这两种溶液均需现配现用, 必要时可超声加速溶解。各取  $10\ \mu\text{L}$  加入到清洗好的磁珠悬液中, mixer comfort 孵育 (25°C、1h、300rpm), 每隔 20min 取出涡旋震荡 5s 后放回继续 (防止磁珠沉底)。孵育后重复步骤 1 中的离心操作, 吸去上清并将磁珠重悬在  $100\ \mu\text{L}$  的 PBS 中。

3. 磁珠偶联: 将  $30\ \mu\text{g}$  CEA 捕获抗体加入到步骤 2) 的磁珠悬液中, 吹打混匀。mixer comfort 孵育 (37°C、4h、300rpm) 在 37°C 的条件下震荡孵育约 4 小时。孵育后重复步骤 1 中的离心操作, 去除上清, 除去未结合磁珠的抗体。

4. 磁珠封闭: 为了降低后续实验中免疫磁珠对蛋白分子的非特异性吸附, 这

里需要对磁珠进行封闭。向步骤 3) 离心后的磁珠中, 加入 100  $\mu\text{L}$  10% 的 BSA 溶液, 室温下孵育半小时。然后离心去除 BSA 溶液, 并将磁珠重悬在 100  $\mu\text{L}$  PBS 中, 4 $^{\circ}\text{C}$  下放置待用。

### 3.5 结果与讨论

#### 3.5.1 关键参数的优化

在上面认真设计分析芯片工作原理的基础上, 对于直径为 30 $\mu\text{m}$  的液滴, 可以准确计算出  $d_{\text{chamber}}$ 、 $h_{\text{chamber}}$ 、 $x$  三个参数, 只有  $h_{\text{channel}}$  是一个不确定因素, 因此我们对该参数进行了针对性的实验, 得到  $h_{\text{channel}}$  的优化值。使用三个具有不同  $h_{\text{channel}}$  的 DIA 芯片分析了结构性能。液滴覆盖率 (占用腔室的百分比)、捕获效率 (捕获的液滴相对于生成的总液滴的百分比) 和液滴回收率 (捕获后回收的液滴的百分比) 是根据对每组 >1000 个腔室的分析来量化的。实验结果如图 3.7 和表 3.2 所示, 当  $h_{\text{channel}} = 25 \mu\text{m}$  时, 液滴的排列会比较密集, 从而达到 90% 左右的覆盖率, 但有部分液滴会被困在腔室之间, 不能很好地分散 (图 3.(a) 中红色圈出), 这将导致其周围的荧光扩散速度快, 最终影响 "0" & "1" 的判断。当  $h_{\text{channel}} = 15 \mu\text{m}$  时, 液滴会被压缩得比较平坦, 然后在流动时占据较大的面积, 这在一定程度上影响了覆盖率。虽然这个  $h_{\text{channel}}$  值可以保证液滴的捕获效率达到 100%, 但在回收液滴时, 部分液滴被腔体夹住, 难以被油污冲走, 影响了回收率, 进一步阻碍了芯片的再利用。当  $h_{\text{channel}} = 20 \mu\text{m}$  时, 液滴排列适中, 液滴可以自由捕捉和释放, 即可以实现 100% 的捕捉率和释放率。虽然覆盖率略低, 但总体效率还是很好的。所以对于直径为 30  $\mu\text{m}$  的液滴, 确认  $h_{\text{channel}} = 20 \mu\text{m}$  为最佳参数。

表 3.2 DIA 器件的性能指标 不同  $h_{\text{channel}}$  的 DIA 器件的性能指标

Table 3.2 Performance metrics of the DIA device with different  $h_{\text{channel}}$

$h_{\text{channel}}(\mu\text{m})$	Droplet Cover (%)	Capture Efficiency (%)	Droplet Recovery (%)
25	89.4	96.7	100
20	82.6	100	100
15	76.3	100	92.9

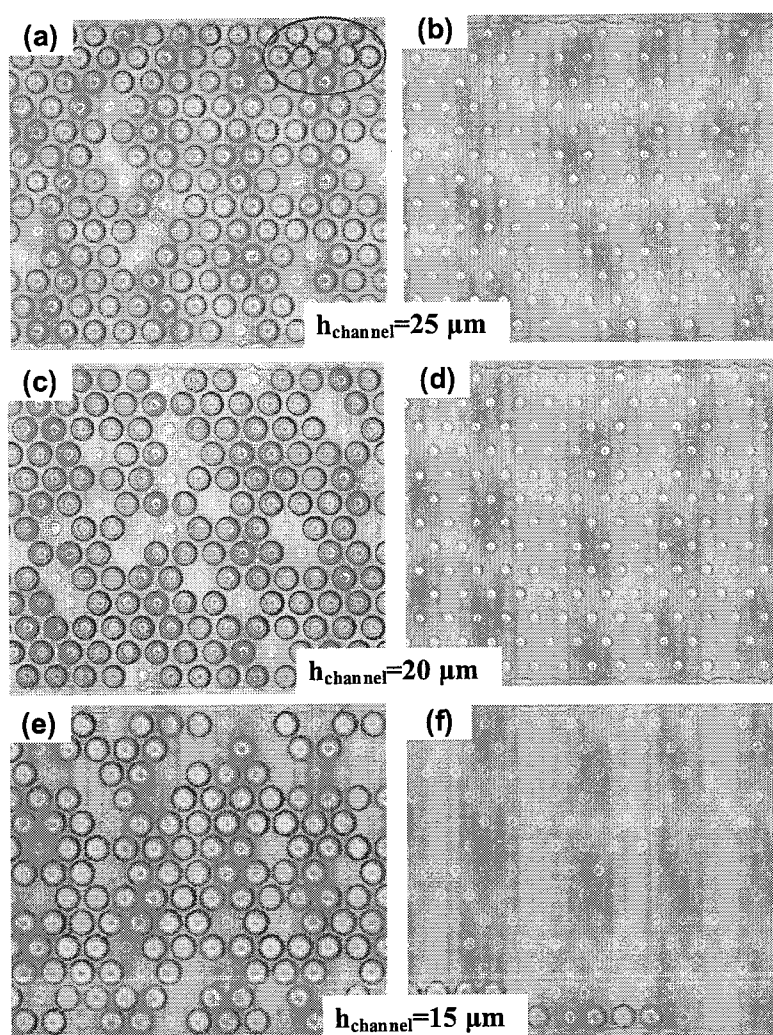


图 3.7 当 $h_{channel}$ 分别等于  $25\ \mu\text{m}$  (a, b)、 $20\ \mu\text{m}$  (c, d) 和  $15\ \mu\text{m}$  (e, f) 时, 液滴的捕获情况和恢复情况的显微图像, (a) 中红色圆圈所包围的部分表示液滴被困在腔室之间。比例尺= $100\ \mu\text{m}$

**Figure 3.7 Microscopic images of droplet capture and recovery when  $h_{channel}$  is equal to  $25\ \mu\text{m}$  (a, b),  $20\ \mu\text{m}$  (c, d) and  $15\ \mu\text{m}$  (e, f), respectively. The part surrounded by the red circle in (a) indicates a droplet trapped between the chambers. Scale bar =  $100\ \mu\text{m}$**

在此, 对于直径为  $30\ \mu\text{m}$  的液滴, 通过上述理论研究和实验验证, 我们发现  $d_{chamber} = 25\ \mu\text{m}$ 、 $h_{chamber} = 30\ \mu\text{m}$ 、 $x = 37.5\ \mu\text{m}$  和  $h_{channel} = 20\ \mu\text{m}$  的几何形状是高效诱捕和释放液滴的最佳选择。与其他诱捕液滴结构<sup>[94, 100-105]</sup>只能在  $200 \times 200\ \mu\text{m}^2$  的区域内捕获少数液滴相比, 所得到的 DIA 装置每  $200 \times 200\ \mu\text{m}^2$  可存储 27 个液滴。最后, 所得到的 DIA 芯片在一个只有 300 平方毫米的面积可以通过并联 8 个 5200 个微腔阵列存储多达 41,600 个液滴以及实现液滴完全回收。在我们的 5 次独立实验中, 平均 34364 个液滴在 2 分钟内生成并全部被捕获, 液滴覆盖率 (占腔室百分比) 高达  $82.6 \pm 1.4\%$ 。

## 3.5.2 液滴分散阵列对荧光扩散的影响

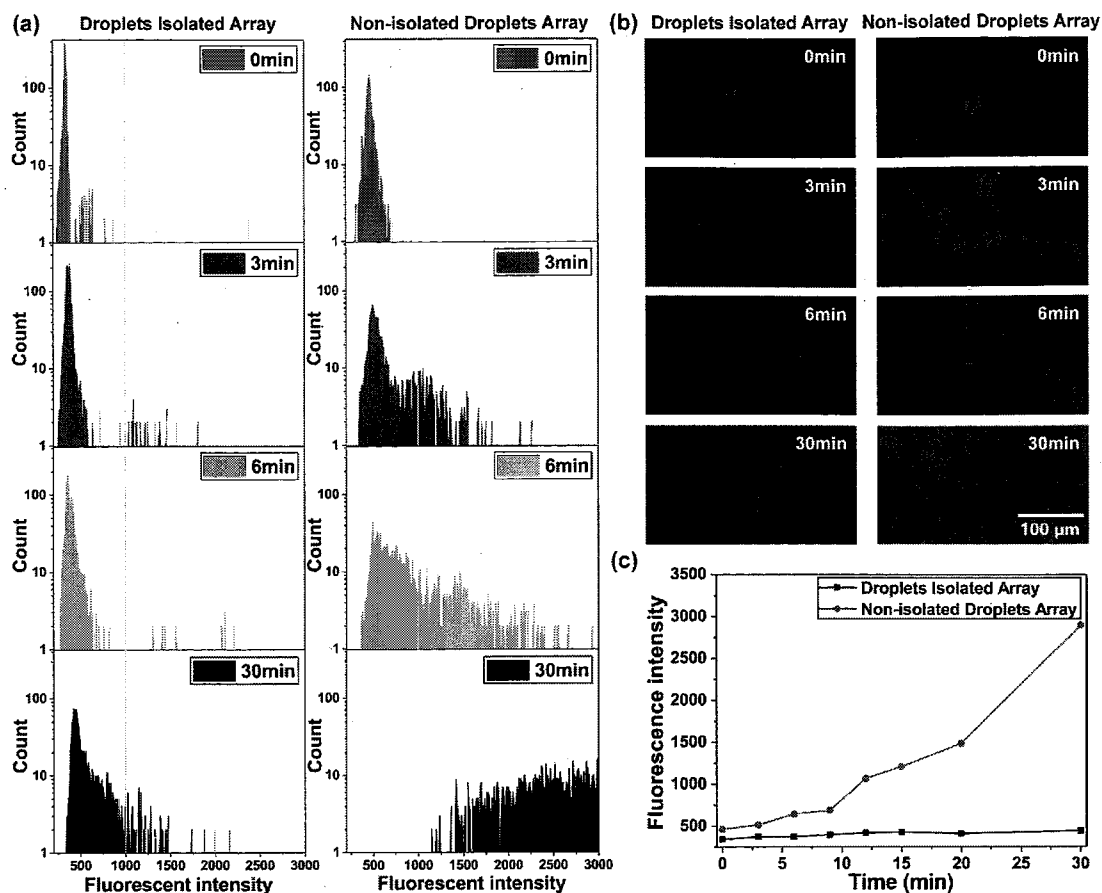


图 3.8 (a) 在 DIA 和常规非分离液滴阵列中, 在时间  $t = 0, 3, 6, 30$  分钟时, 液滴的荧光强度直方图。黄线表示负液滴和正液滴的边界。(b) 在 DIA 和常规非分离液滴阵列中, 在时间  $t = 0, 3, 6, 30$  分钟时液滴的荧光图像。(c) 在 DIA 和常规非分离液滴阵列中, 负液滴中荧光强度的峰值随时间变化。

Figure 3.8 (a) The histograms of fluorescence intensity from the droplets at time  $t = 0, 3, 6, 30$  min in DIA and in conventional non-isolated droplets array. Yellow lines indicate the boundaries of negative and positive droplets. (b) Fluorescent images of droplets at time  $t = 0, 3, 6, 30$  min in DIA and in conventional non-isolated droplets array. (c) The change of peak value of fluorescence intensity in negative droplets over time in DIA and conventional non-isolated droplets array.

根据本文提出的液滴分离设计策略, 使用 DIA 芯片评估它是否可以延迟荧光分子 4-MU 从正液滴向负液滴的扩散。图 3.8 显示了在 DIA 装置和常规的非隔离式液滴装置中, 荧光产物随时间从阳性液滴向阴性液滴扩散过程的比较结果。将  $4.75 \text{ fM}$  SP-AKP 纳米颗粒和底物 4-MUP 作为两种水相, 通过十字聚焦结构在  $2 \text{ min}$  内同时扩散到  $14 \text{ pL}$  直径为  $30 \mu\text{m}$  的单分散液滴中, 使阳性液滴与阴性液滴的比例约为  $1:50$ 。然后关泵后液滴立即被微腔阵列捕获, 并对捕获的液滴进行

不同时间的大面积扫描成像(液滴捕获时刻为 0 分钟)。图 3. (a) 分别显示了在 DIA 和常规非分离液滴阵列中, 在时间  $t=0$ 、3、6 和 30 分钟时, 液滴的荧光强度直方图。每个包含两个峰的直方图代表阳性液滴和阴性液滴的数量累积分布。在两个液滴装置中, 在  $t=0$  min 时, 阴性液滴的直方图峰宽都非常窄, 表明阴性液滴的荧光强度分布集中。在  $t=3$  min 和 6 min 时, DIA 芯片中的阴性液滴峰几乎不移动, 但是常规非隔离液滴芯片中的阴性液滴的峰一直向右移动, 直到它与阳性液滴几乎完全重叠。这表明随着时间的流逝, 荧光团从阳性液滴的扩散导致阴性液滴的荧光信号迅速增强, 因此干扰了常规非分离液滴装置中结果。但是在 DIA 芯片中, 液滴之间的距离被有效地扩大, 进而荧光分子的扩散被有效地抑制了。在 30 分钟时, DIA 中负液滴的直方图出现了轻微的右移, 与之形成鲜明对比的, 在非隔离液滴芯片中, 阴性液滴和阳性液滴的峰完全无法区分。最终, DIA 芯片的巧妙存储结构减少了负液滴中荧光强度的增加, 并且可以将催化时间从 1 分钟延长至近 30 分钟, 然后促进底物转化为足够的荧光分子, 这将大大提高信噪比。具有更长催化时间的弱酶载体在该液滴平台上也有着更多的选择和机会。

此外, 图 3.8 (b) 显示了在不同时间的荧光图像, 在大多数情况下, 在  $t=0$  时观察到一个正液滴被六个负液滴包围。值得注意的是, 在 DIA 中, 明亮液滴中的 4-MU 转运使得周围的深色液滴在 30 分钟时部分变为亮液滴, 而不是像传统的非隔离液滴芯片那样仅在 3 分钟时液滴就全部变亮, 这与图 3.8 (a) 中所示的结果一致。为了进一步清楚地表征 DIA 结构的优越性, 我们对阴性液滴的直方图进行了高斯拟合, 并获得了负液滴在不同时间的荧光强度峰值。图 3.8 (c) 表示 DIA 中荧光强度的峰值波动很小, 而常规非分离液滴中的荧光强度峰值在 30 分钟内保持增长。它进一步表明, DIA 可以延迟荧光团的扩散, 从而有助于随时间保存信号。在 DIA 中, 在 30 min 内没有明显的荧光扩散, 这不仅保证了基于 SP-AKP 酶催化系统的快速数字检测, 而且保证了检测结果的准确性和可靠性。

### 3.5.3 球刷聚合酶浓度的检测

如上所述, 正如我们所期望的那样, DIA 装置可以有效地降低荧光产物的扩散率, 因此我们使用 DIA 装置来探索作为数字 ELISA 检测的可行性。作为概念验证, 以 SP-AKP 的一系列浓度( $\lambda=0.1$ 、0.05、0.02、0.005、0.002、0.001,  $\lambda$  表

示平均在每个液滴中 SP-AKP 纳米颗粒的数目)作为数字 ELISA 的模型进行绝对计数, 每个浓度对应两个平行样。所有液滴在储存室孵育 3 min 后拍摄约 20 张荧光图像, 图 3.9 (a) 所示的液滴计数总数为 30000 个左右。随着 SP-AKP 浓度的增加, 亮液滴的比率变多。由于两个或两个以上的 SP-AKP 纳米粒子在一个液滴中的封装分数在  $\lambda \leq 0.1$  时基本可以忽略不计, 因此将每个亮液滴 (阳性液滴) 定义为一个 SP-AKP 纳米粒子。我们统计了不同浓度下的阴性液滴和阳性液滴的数量, 并通过泊松统计计算得到实验  $\lambda$ 。如图 3.b 所示, 实验  $\lambda$  与理论结果保持良好的正相关关系(根据 NTA 的测量结果), 虽然由于两种定量方法的系统误差, 实验值略低于理论值, 但拟合曲线的  $R^2$  达到 0.9908。同时, 结果显示, 遵循  $3\sigma$  标准, SP-AKP 数字检测法的检出限约为 309 aM ( $\lambda=1.32 \times 10^{-3}$ ), CV 约为 10% (图 3.9 c), SP-AKP 检测法的灵敏度高度高于传统 ELISA 法。因此, 得益于 DIA 装置对液滴的高效分离和 SP-AKP 的快速催化, 分别有助于抑制荧光分子在液滴间的扩散和缩短检测时间, 可以在皮升液滴阵列上成功实现超灵敏的数字生物检测平台。

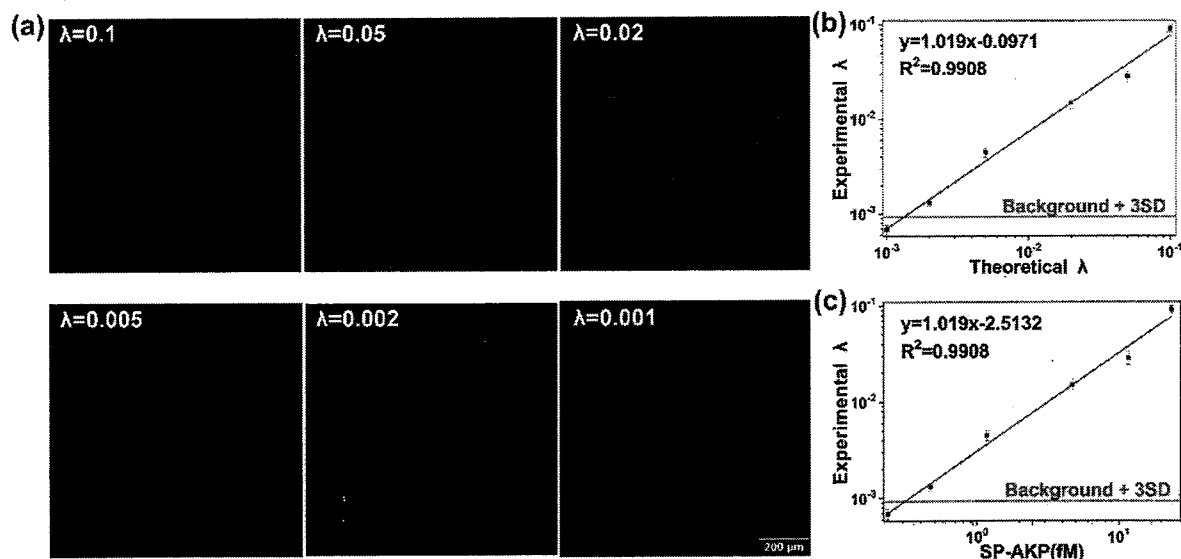


图 3.9 SP-AKP 的数字计数。(a) SP-AKP 数字测定的荧光图像, 其  $\lambda = 0.1$ 、0.05、0.02、0.005、0.002 和 0.0001。(b 和 c) 实验  $\lambda$  对理论  $\lambda$  (b) 或 SP-AKP 浓度 (c)。误差线是三个独立测量值的标准偏差。红线代表背景计数加上背景计数的 3 倍 SD。

Figure 3.9 Digital counting of SP-AKP. (a) Fluorescence images of SP-AKP digital assays at  $\lambda = 0.1, 0.05, 0.02, 0.005, 0.002$  and  $0.0001$ . (b and c) The experimental  $\lambda$  versus theoretical  $\lambda$  (b) or SP-AKP concentration (c). Error bars are the standard deviations of three independent measurements. The red line represents the background count plus 3 times SD of the background count.

### 3.5.4 CEA 的检测

基于磁珠的数字 ELISA 定量超低浓度的灵敏地检测球刷聚合酶的能力 (309 aM) 为肿瘤蛋白标志物癌胚抗原 (CEA, 分子量 180 kDa) 的超灵敏诊断铺平了道路。

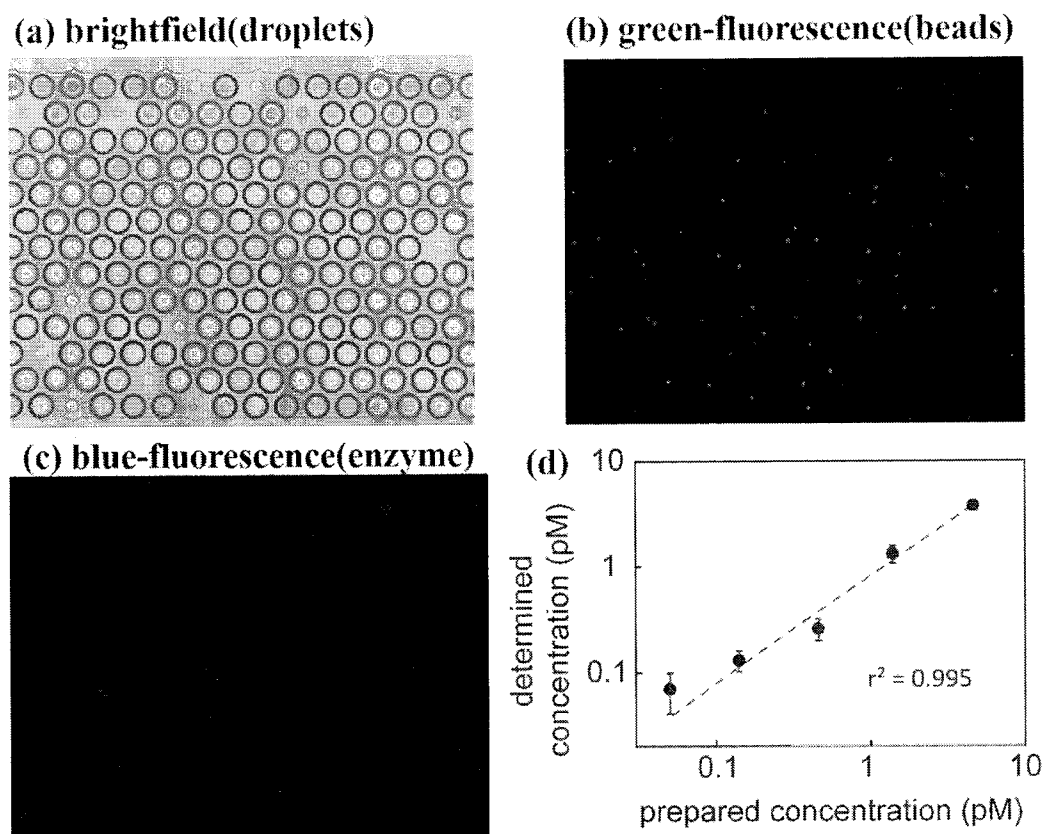


图 3.10 CEA 检测 (a, b, c) 免疫吸附后 3 分钟的孵育期后, 含有抗原 CEA 的磁珠和底物的封装在液滴内的明场视野, 绿色和蓝色荧光图像。(d) 通过基于液滴的免疫测定法测量的 CEA 浓度与理论浓度匹配图。

Figure 3.10 Detection of CEA. (a,b,c) Bright-field, green- and blue-fluorescence images of stored droplets containing anti-CEA-coated beads and substrate after a 3 min incubation period following immunoassay. (d) Plot of the concentrations of CEA measured by the droplet-based immunoassay vs the prepared concentration.

首先按照如下步骤进行 CEA 免疫反应检测:

1、取 2 个 2 mL 离心管,编号 0-1、1-1、分别加 MS, 二抗-biotin 稀释液, 1 号管加入抗原稀释液, 反应体系以含 1%酪蛋白的 PBST (0.05%吐温-20, 10 mM PBS, 1%酪蛋白) 为溶剂, 总体积 400  $\mu$ L 的溶液 (依次添加顺序: 缓冲液、MS、二抗、抗原) 37°C 旋转反应 1 h。

2、反应后磁珠体系进行磁吸附, 去上清, 用 PBST 缓冲液洗涤 6 次。

3、用含 1%酪蛋白的 PBST 将磁珠混匀，再将 polyHRP 分别加入到反应体系中，反应体系为以 400  $\mu\text{L}$  含 1%酪蛋白的 PBST 为溶剂，37 $^{\circ}\text{C}$  旋转反应 1 h。

4、反应后磁珠体系进行磁吸附，去上清，再用 PBST 缓冲液洗涤 5 次，保存到 25  $\mu\text{L}$  PBST 中。

5、400  $\mu\text{L}$  PBST 洗涤 1 次，重悬于 7  $\mu\text{L}$  柠檬酸钠缓冲液中，超声。

6、取 6  $\mu\text{L}$  样品进入液滴芯片，观察并统计结果。

图 3.10 为实际  $\lambda$  和理论  $\lambda$  的关系曲线，呈现良好的线性关系。我们的测定方法中在 6 分钟内检测到的最低浓度为 8 fM (1.4 pg/mL)。该浓度已经远低于常规 ELISA 的 100 pg/mL)，但还是高于最新水平数字 ELISA。<sup>[47, 109, 110]</sup>这是因为我们的原型系统的灵敏度受到每个实验测量液滴数量的限制。目前，每次测量可分析约 30,000 个液滴，其中包裹着约 2900 个磁珠，每个实验中平均产生一个荧光液滴所需的分析物浓度为 1 fM (捕获效率为 89%)。然后，预计每个实验平均浓度为 8 fM 的 CEA 将产生 8.0 个明亮的液滴 (液滴的 0.026%)。如果多对液滴储藏室进行刷新几次，则预期的检出限将进一步降低，而无需对测定方法或硬件进行任何修改，但是会增加检测时间，这个检测精度可以根据实际需要进行调控。目前芯片 6 分钟检测一批，CV 在 5%左右，检测范围横跨 3 个数量级。

### 3.6 本章小结

由于酶催化荧光产物在液滴之间的扩散，使得信号读取混乱而不准确。为了降低荧光分子在液滴间的扩散速率，设计出了一种液滴隔离阵列(DIA)芯片，将液滴捕集在微腔中以保持隔离。该 DIA 可以一次捕获约 34000 个液滴，达到 82.6% 的液滴覆盖率，具有较高的通量和效率。与传统的非隔离液滴阵列相比，DIA 延缓了荧光分子的扩散，液滴信号的读取时间可从 1 分钟延长到 30 分钟，大大提高了后续检测拍照统计系统的可操作性，使最终统计结果更加精确。最后，准确的信号识别使得在 6 min 的检测时间内，聚合酶的检测限达到 309 aM，CEA 的最低检测限约为 8 fM，CV 在 10%左右，检测范围横跨 3 个数量级。较好的满足癌症早期诊断的需求，初步实现实验室阶段的数字 ELISA。



## 第4章 数字 ELISA 芯片的工程化探索

### 4.1 引言

随着微纳加工技术的发展,利用微通道和腔室结构操纵流体的微流控技术逐渐成为生化反应、分析的强大平台。根据 George Whitesides 的定义,微流控技术是“使用数十至数百微米尺寸的通道来处理或操纵少量 ( $10^{-9}$  至  $10^{-18}$  升) 液体的系统的科学和技术”。<sup>[111,112]</sup>当尺寸下降到微米尺度时,流体操控会出现一些和宏观尺度完全不同的现象。比如,由于尺寸大幅度的缩小,热传导和分子运动的距离随之缩短,生化反应可以在很短的时间内完成;由于表面积比的指数级增长,毛细管效应成为主导,材料的表面性质对于流体流动会产生相当大的影响。<sup>[113]</sup>此外,每种材料各自对应着特定的加工方法以及加工而来的器件自带有独特的原始特性。因此,制作微流控芯片的材料在微流控技术中扮演着至关重要的角色。

微流控装置的早期发展通常涉及硅和玻璃等无机材料作为基本衬底。然而,随着在 1990 年代末提出在微流控中使用聚合物材料的概念,硅和玻璃材料的使用已经转向聚合物,这主要是由于使用聚合物材料制造微流控设备为片上实验室 (LOC) 设备和微型总体分析系统 ( $\mu$ TAS) 提供了简单,经济高效的处理优势<sup>[114,115]</sup>。与硅和玻璃等无机材料相比,聚合物具有多种材料性能,可满足一次性生物医学微流控装置的各种应用需求,以及其他许多有前途的应用。根据其物理性质,聚合物可分为三类:热固性塑料,弹性体和热塑性塑料。

#### 4.1.1 热固性塑料

热固性塑料在被加热或受到光照辐射时会发生不可逆的固化反应。<sup>[116]</sup>前文中制作 PDMS 芯片硅片模具的光刻胶就是一种典型的热固性塑料。<sup>[117]</sup>热固性材料的一个主要优点是可以利用光聚合进行真正的三维微细加工。<sup>[118]</sup>另一个优点是强度高,可以制造高深宽比和独立的结构。<sup>[119]</sup>但是由于热固性材料的成本相对较高,加工效率偏低使之在微流控技术中的应用受到限制。

#### 4.1.2 弹性体

弹性聚合物由通常纠缠在一起的交联聚合物链组成;当施加外力时,它们可以拉伸或压缩,当外力撤去时,它们又恢复到原来的形状。微流体中最常用的弹

性体是聚二甲基硅氧烷(PDMS)<sup>[120, 121]</sup>。聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 是一种具有较高的透光率、良好的生物相容性的柔性聚合物材料, 因其使用简便且成本低, 可有效复制尺寸低于  $0.1\mu\text{m}$  的结构, 是目前微流控实验室中使用频率最高的材料<sup>[120, 122]</sup>。液态 PDMS 预聚物在温和的温度下 ( $40\text{-}70^\circ\text{C}$ ) 进行热固化, 可以用光刻胶模板进行浇铸。PDMS 的低表面张力特性使其固化后可从模板上轻松剥离, 再通过等离子体氧化表面, 不可逆地与 PDMS、玻璃或硅键合一起, 制备简单且周期短, 因而利用 PDMS 制作微流控器件是一种低成本的微结构研发及功能验证的有效方法, 在各个微流控及相关实验广泛使用。制造的便利性, 加上其亲油疏水 (方便生成油包水液滴) 等特点, 使得 PDMS 成为研究实验室中最受欢迎的材料之一。但 PDMS 也有明显的局限性: 如通道变形、加工效率低、表面性质不稳定、吸附蛋白、吸油膨胀等问题, 使得 PDMS 在微流控中的大规模生产使用受到限制。

#### 4.1.3 热塑性塑料

以聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA)、聚碳酸酯 (PC) 和聚苯乙烯 (PS) 等为典型的热塑性塑料在微流控技术方面的应用表现出强劲的增长趋势。它们在可见波长范围内具有高透光率、良好的溶剂和化学相容性以及良好的成型参数。<sup>[123]</sup>热塑性塑料是一类合成聚合物, 达到玻璃化转变温度 ( $T_g$ ) 后会变软或完全熔化, 而冷却后又恢复到其原始化学状态。它们可以在很宽的工作温度和压力范围内保持软化状态同时保持化学和尺寸稳定。再加上可定制的化学物理特性, 热塑性塑料非常适合用作微流体应用的基材。与微流控领域其它材料 (硅、玻璃以及 PDMS 等) 相比, 热塑性塑料在大规模生产加工时, 可显著降低原材料与制造成本, 更具有商业化的潜力。<sup>[124, 125]</sup>在热塑性塑料中进行微沟道制造的方法通常有热压印或冷压印<sup>[126, 127]</sup>、注塑成型<sup>[128]</sup>和热成型<sup>[129]</sup>。塑料的微沟道通过封接工艺即可形成微通道。注塑工艺的高产能特点, 使芯片大批量生产的成本较低。<sup>[130]</sup>这些工艺已在工业中已经广泛应用, 使得这类塑料芯片一旦研发成功, 便可以迅速推广商用。但热塑性塑料成型需要昂贵的金属模板在高温下进行 (以使塑料充分流动), 它对于商业生产是优秀的, 但对于原型使用并不经济。

综上所述, 聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 弹性体和热塑性塑料是微流控中使用的两种主要聚合物材料。PDMS 和热塑性材料各自具有独特的优势, 在各自适用

的领域中发挥着独特的作用。前面两个章节中我们的液滴式数字 ELISA 微流控芯片都是通过经典的软光刻工艺、PDMS 倒模后和玻璃 plasma 处理键合而成，但是 PDMS 微流控芯片由于其加工效率低，表面性质不够稳定，倒模一致性差等缺点并不适合工程化甚至产业化，热塑性塑料为我们提供了替代方案。然而，聚合物微细加工不是简单的过程，并且，迄今为止，还没有一种万能的制造技术可用于制造聚合物微流体装置。正确确定聚合物微加工策略对于成功实现聚合物微流控设备功能至关重要，<sup>[114, 115]</sup>尤其对于数字 ELISA 芯片，最为核心的需求是液滴稳定生成-荧光检测，这对芯片的材料和结构是一种考验。与前面章节中提到的 PDMS 微流控芯片加工工艺类似，热塑性微流体器件的制造也可以分为聚合物微通道的制造和微通道的密闭封接。本章将从材料选择、微通道密封工艺、芯片结构优化和荧光观测优化几个方面来详细说明数字 ELISA 微流控芯片的工程化探索。

## 4.2 注塑材料的对比选择

对于我们的数字 ELISA 芯片来说，芯片需要完成油包水液滴的生成和液滴平铺储存荧光检测，需要材料具备亲油疏水和低荧光背景等特征，下面将对几种常用的热固性塑料进行这两方面的测试完成材料粗筛。

### 4.2.1 表面接触角

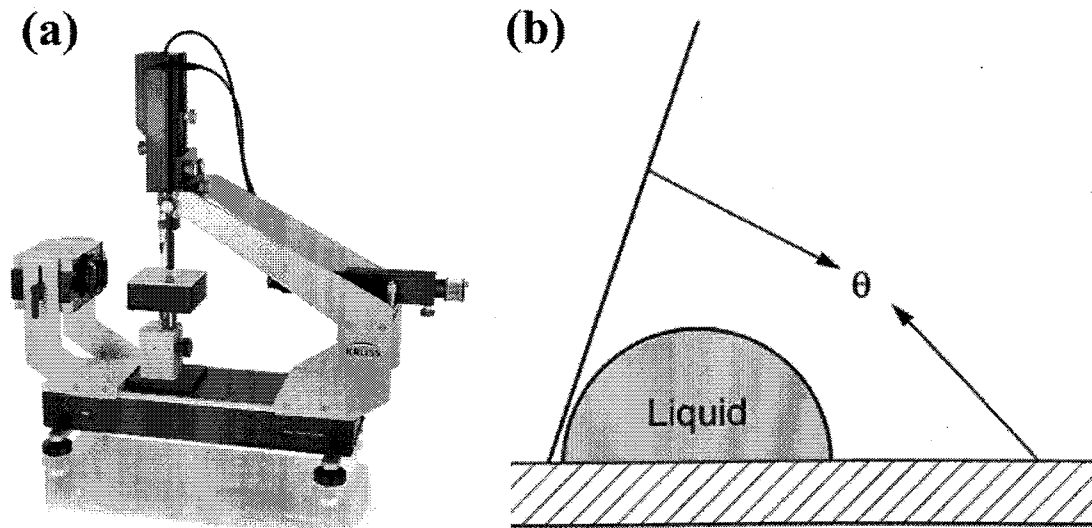


图 4.1 (a) 表面接触角测量仪 (b) 接触角示意图

Figure 4.1 (a) Surface contact angle measuring instrument (b) Contact angle diagram

为了综合比较不同材料的表面亲疏水特性，我们使用德国 KRUSS 视频光学接触角测量仪 EasyDrop，分别对多种载玻片、PDMS 和多种常用的注塑加工材料进行去离子水和矿物油表面接触角测试，结果如表 4.1 所示：

表 4.1 常用材料表面接触角

Table 4.1 Surface contact angle of common materials

材料	水 接触角	矿物油 接触角
玻片 (A)	60-70	20-30
玻片 (B)	30-40	20-25
PDMS	112.7	47.5
PS	96.4	6.4
PMMA	65.3	23.6
TPX	100.2	28.6
PP	83.0	27.3
COP	100.0	22.0
PC (A)	88-95	20.0
PC (B)	85.0	10.0
PC (C)	110.0	70.0
PC (D)	54.4	23.2
PC (E)	91.6	18.9
X 膜	95	26
AR 膜	100.0	50.0

从表 4.1 可以看出，大多数的热固性塑料都是比较亲油疏水的，理论上都较好的满足油包水液滴生成需求的特点。

#### 4.2.2 自发荧光背景

为了综合比较不同材料的自发荧光背景，我们使用奥林巴斯荧光显微镜，分别对多种载玻片、PDMS 和几种常用的注塑加工材料在 FAM 和 HEX 荧光通道下 10 倍放大倍数物镜进行拍照，对所得照片进行灰度值分析，结果如表 4.2 所示。以空白为参照，载玻片、TPX 和掺了黑色色素的 PC 都具有较低的荧光值。其次是 PS 和 PC。尤其值得注意的是在材料表面电镀铝层也可以有效降低荧光背景，这种方法在一定程度上降低了对材料自发荧光的要求。

表 4.2 常用材料荧光灰度值

Table 4.2 Fluorescence gray value of commonly used materials

	X10 FAM	X10 ROX
空白	4.707	29.64
玻片	5.569	33.777
TPX	5.364	35.048
0.5%黑 PC	22.707	89.023
1%黑 PC 1mm	23.082	91.74
1.5%黑 PC 1mm	5.002	31.632
144R	29.736	101.996
144H	28.834	102.58
ML1010R	8.983	51.442
DL001	61.991	125.843
A/PC B1+F	10.232	56.423
PS	7.041	36.918
PC	9.336	53.987
1.5%黑 PC 2mm	5.086	31.659
PS 535N 1.8mm	10.386	53.242
溅射 AL	8.638	51.883
SP-1516 2mm	65.868	125.159
SP-3810 2mm	31.051	94.711
AD-5503 2mm	12.832	55.481

通过以上两步的测试筛选, 结合注塑加工厂商技术, 初步筛选 PC 和 PS 作为我们的芯片注塑材料。

#### 4.3 微流道封接工艺的对比选择

无论采用何种制造方法, 都必须对敞开的微通道进行密封以产生最终的封闭流体路径, 因此制造过程中的关键步骤始终涉及将覆盖层粘合到微通道基板上。根据封接方式的不同, 微流控芯片封接技术可以分为直接法或间接法。

直接法有多种形式, 如热熔结合<sup>[131, 132]</sup>, 化学结合<sup>[133, 134]</sup>, 和溶剂粘接, <sup>[135-137]</sup>。在热熔粘合中, 热塑性基材在材料玻璃化转变温度附近的温度下被压缩和粘合。例如, 可以通过在 80°C 和 2.7 MPa 的压力下粘合 30 分钟, 然后在 110°C 和 0.02 MPa 的压力下粘合 1 h 来制造 PMMA 微流体芯片<sup>[138]</sup>。在化学键合中, 底物

通过形成化学键在其界面处共价键合。由于大多数热塑性基材表面上都没有化学反应性官能团<sup>[139]</sup>，因此表面上的多步化学反应（包括表面活化）是必不可少的，因此键合过程非常耗时。在溶剂粘合过程中，聚合物链穿过热塑性材料界面在溶剂中变得可移动并扩散到整个溶剂化层中。这些自由的聚合物链将在界面处相互缠绕，并在溶剂蒸发后形成基材的牢固结合<sup>[140]</sup>。溶剂键合需要较长的键合时间，因为它通常在溶剂浓度低的溶液中进行，以避免微流体通道变形<sup>[141]</sup>。

间接法结合则涉及使用粘合剂层来密封两个基板并封装在一个或两个基板中制造的微通道。间接结合方法需要中间粘合剂，从而导致通道侧壁具有不同的化学物质。选择合适的粘合剂以及粘合剂涂覆方式对于间接法来说至关重要。

与宏观结合装置不同，微流控芯片的封接方法必须进行针对性的调整和优化，才能完成封闭微米级甚至亚微米级流体通道的艰巨任务，而不会使通道横截面过度变形。

综合比较后，我们主要对比了以下两种工艺，1、PC 热压键合。2、PS 间接封接。其中 PC 热压键合是参考文献做法<sup>[142]</sup>。首先，利用注塑工艺制造带有微结构的 PC 片。之后，利用丙酮、正戊烷和全氟辛基三氯硅烷（FOTS）的混合液处理 PC 结构片与 PC 空白片的键合面，然后将这两片送入热压滚轮中实现键合。

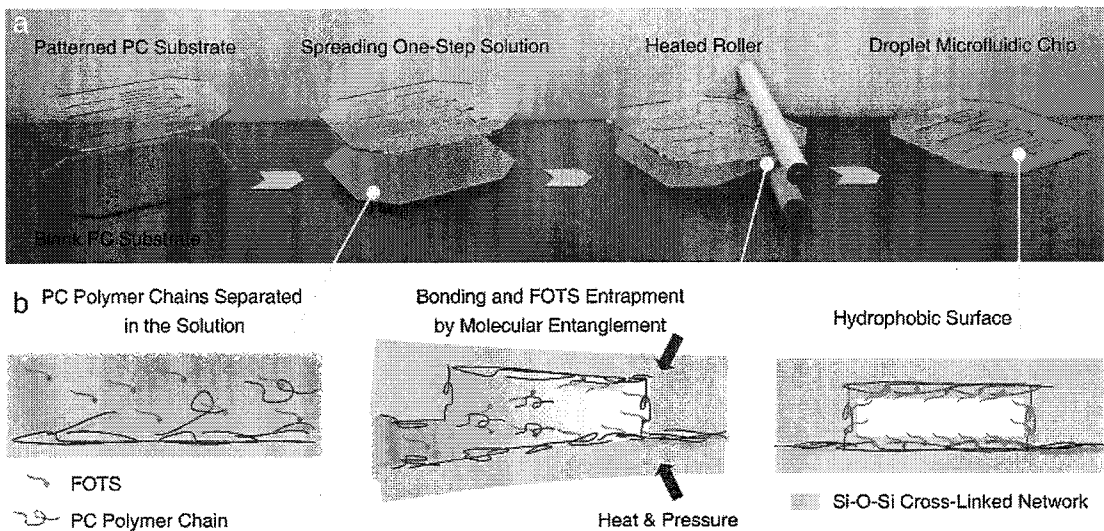


图 4.2 一步键合和表面疏水改性方法<sup>[142]</sup>

Figure 4.2 Schematic of the one-step bonding and hydrophobic surface modification method.

PS 间接封接则是选用上一节测试表现较好的双面胶 X 与 PS 微结构片进行封接。为了对比不同封接方法的效果，我们对其进行了封接后微流道尺寸测试和液滴生成测试。

4.3.1 微流道尺寸测试

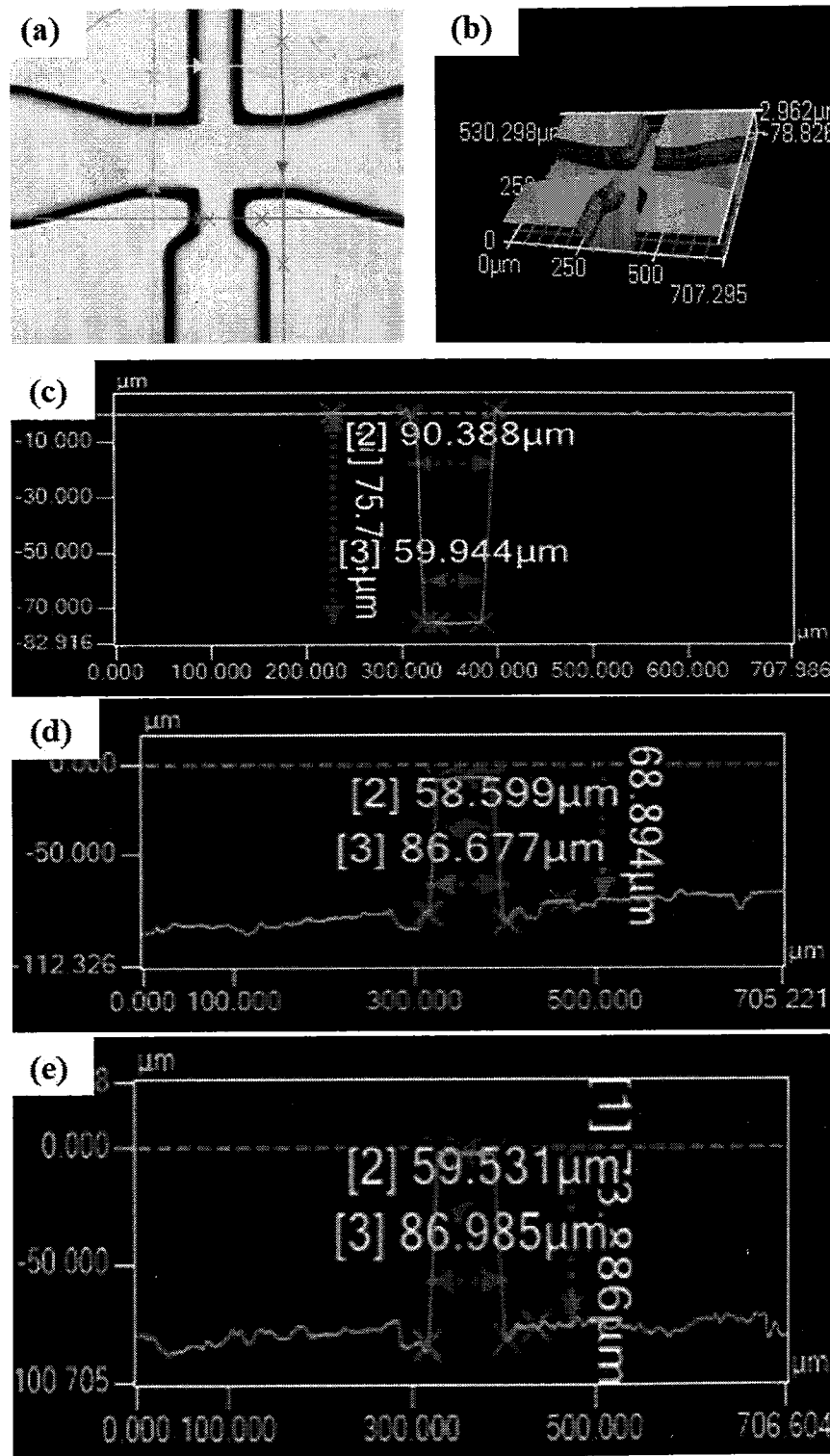


图 4.3 (a) 微流道平面显微图 (b) 微流道三维建模图

(c) 封接前微流道尺寸图 (d) 热压键合后微流道尺寸图 (e) 间接封接后微流道尺寸图

Figure 4.3 (a) Micrograph of micro flow channel (b) 3D modeling of micro flow channel

(C) The size of the micro-channel before sealing (d) The size of the micro-channel after thermocompression bonding

(e) The size of the micro-channel after indirect sealing

使用基恩士表面形貌测量仪分别对封接前，热压键合后以及间接封接后的微流道进行尺寸测量，其中封接前微流道深度  $75.7\ \mu\text{m}$ ，热压键合后微流道深度  $68.89\ \mu\text{m}$ ，间接封接后微流道深度  $73.9\ \mu\text{m}$ 。尽管热压键合后流道深度损失了近 10%，但流道整体畅通，能基本满足使用需求。间接封接对流道的损耗只有 2%，很好的满足了我们的需求。具体形貌如图 4.3 所示。

#### 4.3.2 液滴生成测试

用上述两种方法制备液滴生成模块，水相加入 PBS 缓冲液，油相加入配制矿物油，在数字 ELISA 微流控平台进行进样测试

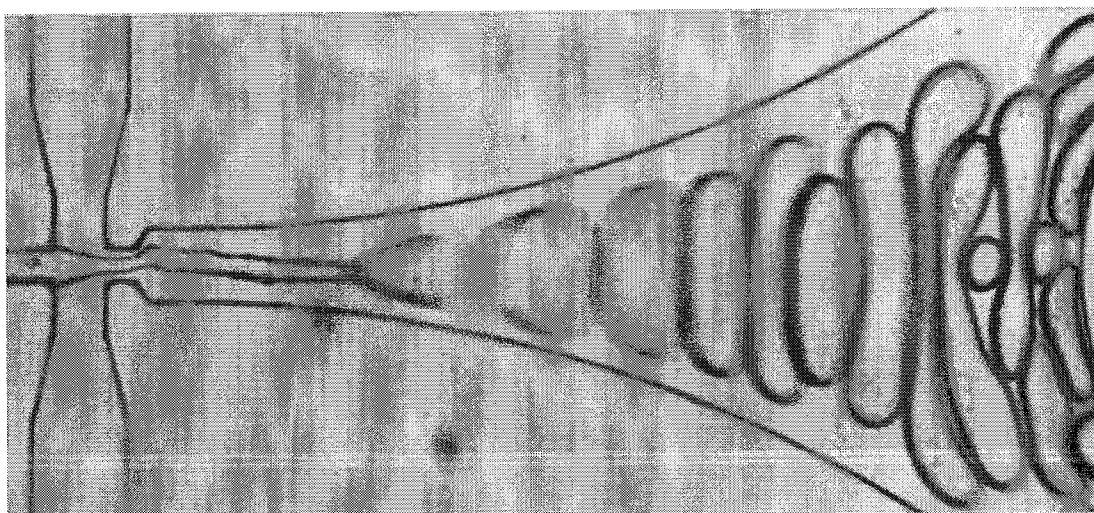


图 4.4 基于 PC 热压键合的液滴产生模块工作情况

Figure 4.4 Working status of droplet generation based on PC thermocompression bonding

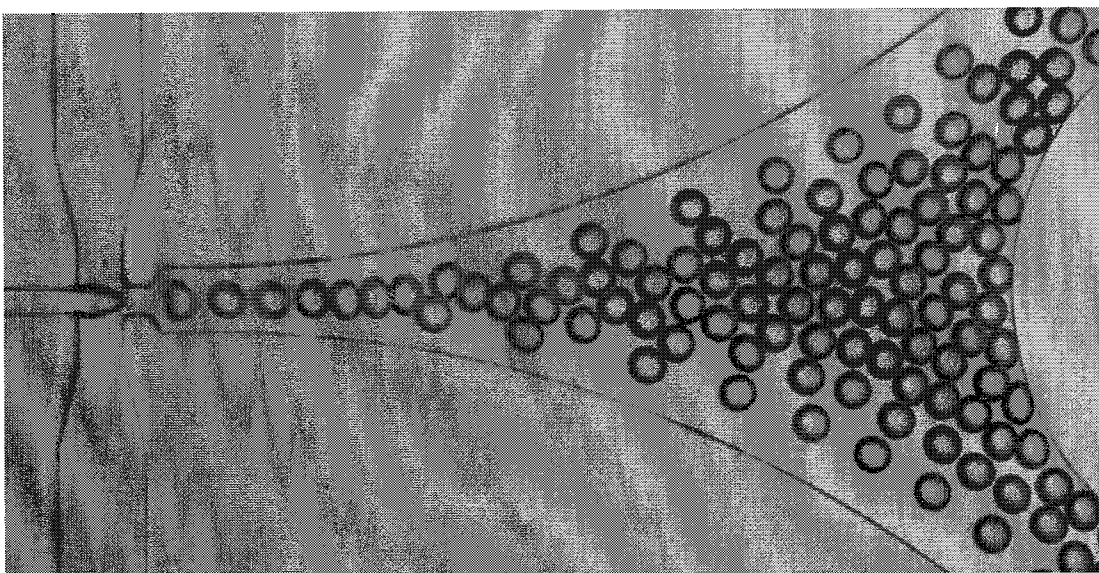


图 4.5 基于 PS 间接封接的液滴产生模块工作情况

Figure 4.5 Working status of droplet generation module based on PS indirect sealing

经测试发现，PC 热压键合工艺制造的液滴产生模块与我们使用的矿物油液滴体系并不兼容，在进样过程中出现分散相贴附通道壁呈层流、液滴大面融合等不稳定现象，如图 4.4 所示。分散相通过液滴接口后，粘附通道壁上连续流动一段距离后，形成尺寸不均一的大液团。与之形成对比的是 PS 间接封接制造的液滴产生模块，液滴生成稳定均一，与通道不粘附。

可以得出结论：选用 PS 材料进行注塑加工得到微流道结构片，与优选的 X 膜进行间接封接，制备的液滴生成模块可以均一稳定生成液滴，一定程度上可替代实验室的 PDMS 芯片，进行高效批量的工程化生产。

#### 4.4 芯片结构的工程化探索

液滴生成之前通常会因为油相先到达十字口而在水相通道密闭一段空气，这段空气会在生成液滴时形成气泡，混在液滴中间，而热固性塑料不像 PDMS 那样透气，气泡会一直留在储藏室中，影响液滴稳定储存。为了有效过滤气泡，我们对芯片的结构又进行了优化，使之更加实用。芯片主体主要分为两个模块，即液滴产生模块与液滴收集储存模块，呈上下分布。如图 4.6 所示，

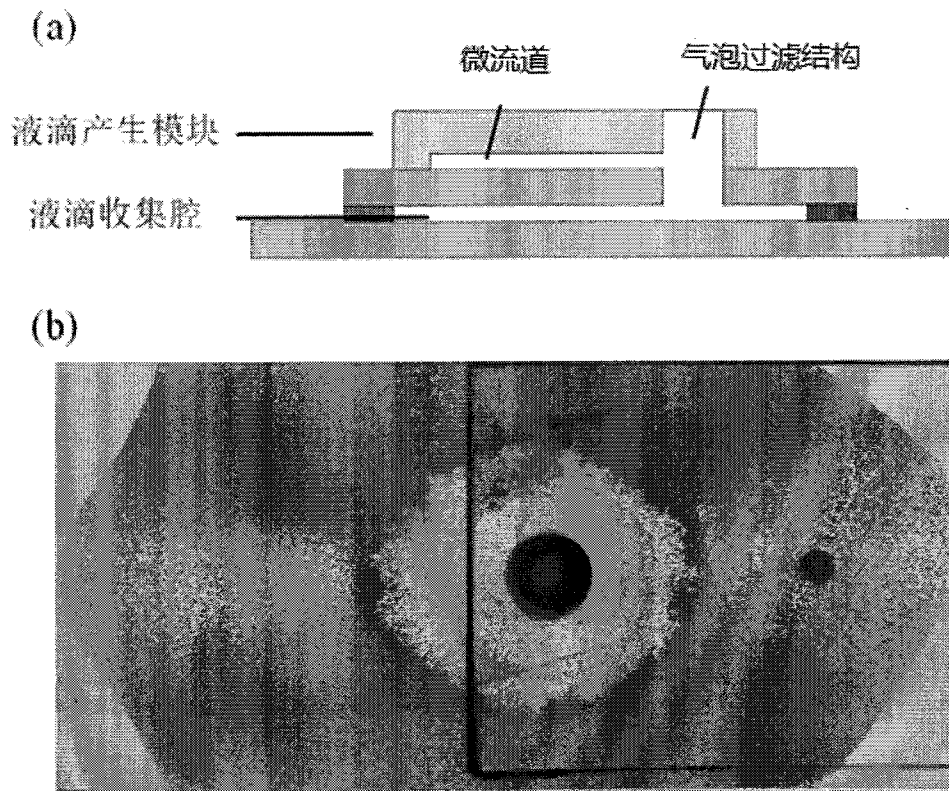


图 4.6 芯片结构示意图以及液滴收集情况

Figure 4.6 Schematic diagram of chip structure and droplet collection

液滴产生模块位于上方，产生的液滴通过芯片中心附近的通孔进入下方的液滴收集腔。液滴产生模块中的微通道结构是在第二章的微通道结构的基础上设计而来。芯片同样具有三个进口以及与进口连接的微通道，十字型的液滴产生喷口。液滴经过十字口之后，沿着微通道流入缓冲区，接着流入通孔，最后进入液滴收集腔。进入收集腔的液滴以通孔为中心向四周扩散。待液滴全部进入后，整个液滴收集腔内液滴分布犹如一只眼睛，如图所示，而该通孔则像眼睛的瞳孔，故此这儿特意设计的过滤气泡结构又称为“瞳”结构。

该气泡过滤结构的主要结构是一个底面圆半径约为 2 mm 的直圆柱形孔，其轴为竖直朝向。圆孔连通微通道与液滴收集腔，如图所示。进入瞳结构中的气泡，受到方向互相相反的浮力和流体粘滞力共同作用，如图所示。当浮力大于粘滞力时，气泡则上浮，从而实现过滤气泡，而密度大于油的液滴则下沉进入液滴收集腔，如图 4.4 (b) 所示。对于圆孔中的气泡，我们建立了简化的受力模型，如图 4.4 (a) 所示。粘滞力  $F_z$  可由公式

$$F_z = 6\pi\eta vr \quad (4-1)$$

计算得到。气泡受到的浮力  $F_f$  可表示为

$$F_f = \rho_{oil}gV \quad (4-2)$$

其中， $\rho_{oil}$  为油的密度， $g$  为重力加速度， $V$  为气泡体积。根据公式可知，影响粘滞力  $F_z$  与浮力  $F_f$  流速大小的主要变量是流体流速  $v$  与气泡尺寸（为便于讨论，假设气泡在瞳结构中呈球形，半径为  $r$ ）。

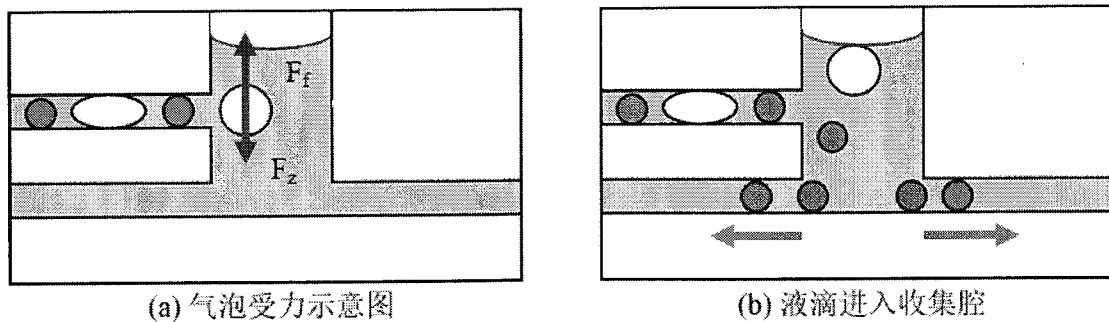


图 4.7 气泡过滤原理

Figure 4.7 Bubble filtration principle

气泡进入瞳结构时，竖直方向的运动速率可近似于 0，而在气泡产生的主要时期，瞳结构中的主要流体为用于产生液滴的油相。故粘滞力  $F_z$  中的流速参数可近似为油相流速。而由于油相主要成分为矿物油，黏度高，分布其中的液滴运动速度和油相流动速度相近。对于固定体积的气泡来说，通过控制流速即可让浮

力大于粘滞力，从而实现气泡的完全过滤。

#### 4.5 荧光液滴检测的工程化探索

数字 ELISA 技术的检测关键是统计阴/阳性液滴总数，而阴/阳性液滴的判定主要是统计各个液滴的荧光强度，根据相关算法将液滴划分为阴性或阳性。那么，有效捕捉液滴的荧光强度是统计基础。通常情况下，酶促反应需要一定的孵育时间，短时间内阳性液滴的荧光强度会很弱，需要较长的曝光时间才能被荧光显微镜捕捉到。目前已有报道，曲面反射镜阵列与微透镜阵列被用于增强液滴荧光信号的采集，并且增强效果十分显著，但要求液滴在其焦点位置进行检测，此外还需要额外的加工工艺。<sup>[143,144]</sup>为了有效缩短液滴孵育时间，我们利用光盘上常用的镀铝溅射工艺在液滴收集腔上层材料的一面溅射金属层，构建镜面，利用镜面将液滴背向镜头的方向散射荧光反射进入镜头，从而增加了镜头采集到的光通量，如图 4.8 (a) 所示。

我们在液滴收集腔上层材料的向下一面溅射一层厚度约为 100 nm 的铝层做反射层，然后制作芯片用于 ddELISA 检测，以检验镜面的工作效果，同时用无反射层的 ddELISA 芯片作对照，结果如图 4.8 所示。测试了曝光时间分别为 0.3 s、0.5 s、1.0 s、1.5 s 和 2.0 s 时有无反射层的荧光成像情况，可以看出，在相同的曝光条件下，在带有反射层的芯片中，采集到的图像中，阳性液滴荧光灰度明显强于无反射层的阳性液滴荧光灰度。为了进一步探究增强效果，利用 Image J 软件提取图片中液滴的灰度并进行汇总统计，如图 4.8 (f) 所示。对于同为阴性或同为阳性的液滴，曝光时间为 2 s 时，有铝层的灰度值比无铝层的高 20 左右，这个差值随曝光时间的减少而降低。这是由于曝光时间的减少，进入镜头的光通量降低的缘故。即采集到相同的荧光量时，铝层的引入可以使曝光时间减少 40%~50%，从而提高荧光成像效率。

阴性/阳性液滴的判别是根据阴性/阳性液滴灰度差异进行划分的，主要实施方式是初步以灰度值 1000/65535 为阴阳液滴的分辨阈值，该值由背景荧光平均值加上其三倍的标准差计算而得到。然后根据荧光成像得到的图像中液滴灰度差异确定阈值，再判断液滴荧光灰度强度是否大于该阈值而确定其阴性/阳性。

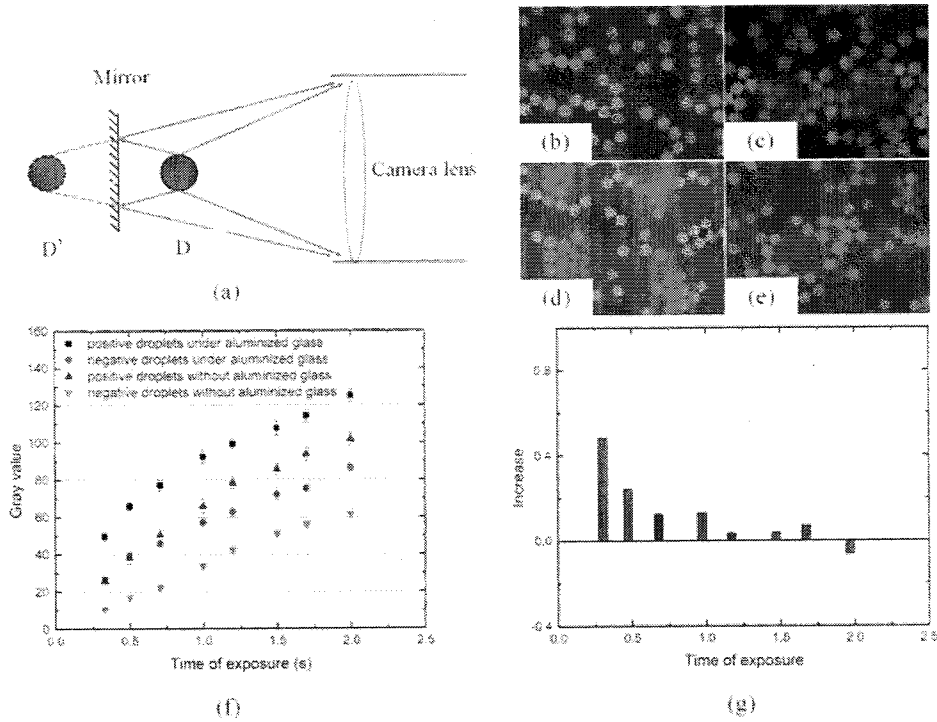


图 4.8 荧光信号采集增强。(a) 采集增强原理；(b) 和 (c) 为无镜面时，曝光时间分别为 2 s、1 s 的图像；(d) 和 (e) 为有镜面时，曝光时间分别为 2 s、1 s 的图像；(f) 不同曝光时间下的液滴的灰度值统计；(g) 不同曝光时间下，镜面对阴性/阳性液滴灰度差异的增益

Figure 4.8 Fluorescence signal enhancement. (a) Acquisition enhancement principle; (b) and (c) without mirror, exposure time is 2 s, 1 s image. (d) And (e) are the images with mirror surface and exposure times of 2 s and 1 s respectively. (f) The gray level of droplets under different exposure times. (g) Under different exposure times, the gain of gray difference between negative and positive droplets is observed.

为了检验反射层的增强效应是否影响阴/阳性液滴划分，对比有无反射层情况下阳性液滴与阴性液滴的灰度差值变化 $[(有反射层的阴/阳液滴灰度差值-无反射层的阴/阳液滴灰度差值)/无反射层的阴/阳液滴荧光差值]$ ，如图 4.8(g)所示。可以发现，当曝光时间为 2 s 时变化值为负数，表明反射层的引入使阴/阳液滴的灰度差异降低，不利于阴/阳液滴的划分。当曝光时间减少为 1.7 s 时，变化值由负转正，并随着曝光时间进一步降低逐渐增大，表明在低曝光时间的情况下，反射层利用阴/阳液滴的辨别。曝光时间较长时，相机呈过曝状态，会采集大量散射荧光使背景增强，而液滴本身在相机处成像的光强度区域饱和，增长效果弱于背景，导致阴/阳液滴荧光成像的灰度差异降低。因此，在利用荧光成像的方法读出带有反射层的数字 ELISA 反应结果时，应适当减少曝光时间。从图 4.8 的结果来

看,在不负面影响成像与“阴/阳”判别效果的情况下,可以将曝光时间缩短为无反射层情况的 50%,甚至更低,有助于提升检测效率。另外镀铝溅射工艺的引入还可以屏蔽材料自发荧光对液滴干扰,降低了外界环境及杂质的荧光干扰,提高了检测结果的准确性。最终镀铝溅射工艺的引入使得芯片孵育检测时间从 6 分钟缩短为 4 分钟,有效降低了荧光液滴的检测时间。

#### 4.6 本章小结

针对微流控芯片工程化中遇到的问题,进行了一系列的探索工作。通过对注塑材料及加工工艺的筛选,开发了一套适合液滴式数字 ELISA 微流控芯片批量化生产的注塑材料和加工工艺。另外为有效去除气泡,研发了一种可完全过滤气泡的芯片结构。为降低材料荧光背景干扰,提高信噪比,缩短液滴孵育时间,在微流控芯片中引入了镀铝溅射工艺,使得芯片孵育检测时间从 6 分钟缩短为 4 分钟。通过一系列工程化问题的探索 and 解决,初步实现数字 ELISA 微流控芯片的批量化注塑加工生产制作。



## 第5章 总结与展望

### 5.1 论文总结

鉴于肿瘤蛋白分子标志物对于肿瘤的早期诊断和预后治疗的重要意义, 本论文围绕可以高灵敏检测蛋白浓度的数字 ELISA 技术进行了较为系统的研究, 并着重研究了液滴微流控平台的构建、液滴式数字 ELISA 微流控芯片的设计和制作、数字 ELISA 芯片在酶和 CEA 检测应用以及微流控芯片的工程化等。主要内容包括:

1、从肺癌现状的严重性出发, 并结合目前肺癌检测方法的特点及局限性, 阐述了肿瘤标志物在肺癌早期检测及诊断预后中的重要意义。以蛋白类肿瘤标志物为研究重点, 先是简要介绍了与肺癌相关的几种蛋白标志物, 并详细介绍了现阶段蛋白标志物的主要检测方法。接着针对传统 ELISA 的原理及检测蛋白标志物所面临的问题和局限性详细地介绍了数字 ELISA 原理及微腔式和液滴式两类数字 ELISA 的实现方法。最后总结了目前数字 ELISA 的发展现状和面临的问题。

2、针对数字 ELISA 微流控技术在蛋白肿瘤标志物检测领域中发挥的重要作用, 研究了基于微流控技术的液滴生成芯片、芯片内流体驱动技术、基于频闪技术的高通量液滴生成可视化和调控装置 (SVMHD) 和显微镜观察记录平台, 在此基础上, 构建了数字 ELISA 微流控芯片技术平台, 该平台具有很好的稳定性, 适合液滴高通量生成、调控和实时观测。利用该平台, 在微流控芯片内生成了均一稳定的液滴, 并对液滴生成频率、尺寸进行了测试, 且可视化了液滴的生成过程, 确保双水相 1:1 混合, 最后对 SP-AKP 聚合酶浓度进行了数字化检测, 6 分钟即可完成检测, 检测下限达到百 aM 量级。同时也发现了液滴间荧光分子扩散造成检测 CV 偏大, 需要着重进行改进。

3、针对酶催化荧光产物分子在液滴之间扩散, 使得液滴信号读取混乱且不准确的问题。为了延缓荧光分子在液滴间的渗透率, 设计出了一种液滴分散阵列 (DIA), 将液滴捕集在微腔下以保持分散。该 DIA 芯片仅有 3 平方厘米的面积, 可以一次捕获高达 41600 个液滴, 具有很高的通量和效率。与传统的非隔离液滴阵列相比, DIA 延缓了荧光分子在液滴间的渗透率, 使得液滴信号的读取时间可从 1 分钟延长到 30 分钟, 大大提高了后续检测拍照统计系统的可操作性, 且让

最终的统计结果更加精确。最后，准确的信号识别使得聚合酶的检测限达到 309 aM，CEA 的最低检测限约为 8 fM，CV 在 5%左右，检测范围横跨 3 个数量级。较好的满足癌症早期诊断的需求，初步实现实验室阶段的数字 ELISA。

4、针对微流控芯片工程化中遇到的问题，进行了一系列的探索工作。通过对材料及加工工艺的筛选，找到了一套适合液滴式数字 ELISA 微流控芯片批量化生产的注塑材料和加工工艺。另外为有效去除气泡，研发了一种可过滤气泡的芯片结构。为降低材料荧光背景干扰，提高信噪比，缩短液滴孵育时间，在微流控芯片中引入了镀铝溅射工艺，使得芯片孵育检测时间从 6 分钟缩短为 4 分钟。通过一系列工程化问题的探索 and 解决，初步实现数字 ELISA 微流控芯片的批量化注塑加工生产制作。

## 5.2 论文的创新点

本论文的工作主要是围绕液滴式数字微流控技术在生物分子检测中的应用来展开。研发液滴微流控平台，探索和改善数字 ELISA 微流控芯片的结构和制作工艺，对数字 ELISA 批量化注塑生产进行工程化探索，实现肿瘤蛋白分子标志物高灵敏度的检测。本论文的创新点如下：

1、研发了液滴微流控平台，提出了基于频闪技术的高通量液滴生成可视化 and 调控策略 (SVMHD)，在该策略中，通过对闪光灯的采样频率与液滴频率进行调制，将真实的高频信号映射为低频信号，便于可视化和反馈控制。同时，由于不需要同步信号，该策略可以直接在任何基于液滴的微流控芯片上实现。该策略唯一的成本就是增加一个信号发生器。此外，该策略可以捕获频率高达几千赫兹的液滴，覆盖了大多数高通量液滴型微流控芯片的范围。

2、针对液滴间荧光分子扩散问题，提出了液滴分散阵列芯片结构，该 DIA 芯片仅有 3 平方厘米的面积，可以一次捕获高达 41600 个液滴，具有很高的通量和效率。与传统的非隔离液滴阵列相比，DIA 延缓了荧光分子的扩散，液滴信号的读取时间可从 1 分钟延长到 30 分钟，大大提高了后续检测拍照统计的可操作性，使最终统计结果更加精确。做到了实验室阶段的数字 ELISA，即更加精确的检测酶和目标抗原的浓度。

3、针对 PDMS 芯片加工效率低、性质不稳定等问题，对注塑微流控芯片进行了一系列工程化探索工作。对注塑材料及加工工艺进行筛选优化，开发了一种

适合液滴式数字 ELISA 芯片批量化生产的材料和加工工艺，并且针对材料荧光背景和气泡干扰等工程化问题，引入镜面电镀技术和提出气泡过滤结构，让芯片更加稳定实用，初步实现批量化生产制造/工程化。

### 5.3 工作展望

本文基于液滴微流控技术开发了用于蛋白浓度检测的数字 ELISA 系统，做到了超低的检测下限和超高的灵敏度，在临床检测和研究中有着良好的应用潜力，但还存在许多问题与不足之处，需要进一步改进和发展：

1、我们虽然提出一种高通量生成液滴实时观察的策略并且实现了初步应用，但是目前还是人工去判断和计算图像静止频率点，后续需要编写图像识别软件，整合控制进样的功能；

2、液滴分散阵列虽然可以延缓荧光分子在液滴间的扩散速度，但是仅限于 4-MU 之类扩散速率较低的荧光分子，对于 ELISA 中常用的辣根过氧化物酶(HRP)催化的 Amplex Ultra Red (AUR) 底物，其荧光分子在液滴间的扩散速度太快，几秒钟就无法分辨，需要探究进一步延缓或抑制扩散的方法；

3、本文的数字 ELISA 系统只对单一的蛋白 CEA 进行了验证性的检测，而在实际的疾病诊断和检测中通常需要多个标志物联合检测，因此对于液滴式数字 ELISA 多标志物同时检测技术仍有待进一步研究；

4、在临床实际样品检测方面，对临床的血清样本的检测仍需要进一步的实验验证，液滴式数字 ELISA 在复杂环境中的检测灵敏度、准确性和可靠性还有待进一步实验和分析。