

整合实验班综合实验——微流控芯片

张广欣

北京大学 元培学院，北京 100087

【摘要】本次实验课程除理论课外有3部分：制作光刻模板、制作PDMS芯片、搭建设备进行氢氘交换实验。通过本次实验课程，我们学习了微流控芯片的相关理论知识，使用CAD工程软件设计芯片，体会了光刻制作芯片的全过程，克服种种困难动手搭建实验体系并进行实验等。

【关键词】微流控芯片、氢氘交换

1 实验目的

1. 学习微流控芯片相关基础知识以及其应用价值。
2. 自学 CAD 软件操作方法，利用其设计微流控芯片。
3. 学习光刻模板的相关操作及其原理，以及光刻机的使用方法。
4. 学习利用光刻模板制作 PDMS 芯片，以及相关的后续处理。
5. 尝试使用配套设备，搭建所需的氢氘交换实验体系。
6. 了解 top-down 蛋白质组学，以及质谱仪的工作原理，分析得到的数据。

2 实验原理

2.1 微流控芯片

微流控芯片技术是生物医学应用领域的新兴工具。微流控芯片包括一组雕刻在不同材料（玻璃、硅或聚合物，如聚二甲基硅氧烷或 PDMS、聚甲基丙烯酸甲酯或 PMMA）上的凹槽或微通道。形成微流控芯片的微通道相互连接以获得所需的结

果。

这种被困在微流体芯片中的微通道组织通过穿透芯片的输入和输出与外部相关联，作为宏观世界和微型世界之间的接口。在泵和芯片的帮助下，微流控芯片有助于确定微流体的行为变化。在芯片内部，有允许处理流体的微流体通道，进行相关的物理化学反应。

微流控芯片具有许多优点，例如可以极大提高试剂利用率，对于实验材料比较珍贵的情况尤其适用。但由于其制作流程较为繁琐，需要很多的时间投入以及设备支持，因此在使用时需要考察实验的目的以及采取该方案的必要性。

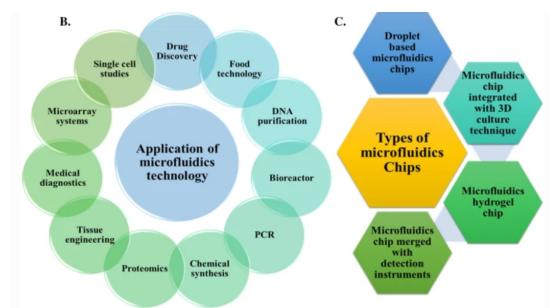


图 1 微流控芯片的应用场景^[1]

本实验采用的微流控芯片与氢氘交换实验相结合，允许精确控制流体中多个反应回路流动和反应时间以及流速等多种参数。这种设计理论上可以使出口直接串联质谱仪，从而更加精确地把握产物的实时状态。

实验时间: 2023.4-2023.5

报告时间: 2023.5

*学号: 2000012272

*E-mail: 2000012272@stu.pku.edu.cn

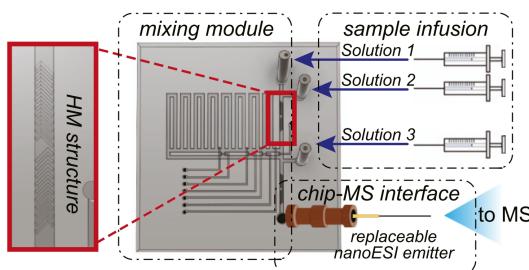


图 2 本实验设计的微流控芯片^[2]

2.2 氢氘交换质谱 (HDX-MS)

氢/氘交换 (HDX) 质谱 (MS) 已成为监测溶液中蛋白质结构和动态方面的关键技术，即将蛋白质暴露于 D_2O 会在缺乏稳定氢键的无序区域中诱导快速酰胺 $H \rightarrow D$ 交换。紧密折叠的元素更能免受 HDX 的影响，从而导致由蛋白质的结构动力学介导的缓慢同位素交换。后续基于 MS 的肽图分析是一种成熟的技术，用于测量单个蛋白质片段的质量变化^[3]。

HDX-MS 可用于检查单个蛋白质或大蛋白质复合物的构象，定位直接或间接参与的蛋白质位点结合，变构效应探测，监测蛋白质结构域的折叠动力学，提供对蛋白质-膜相互作用的信息。

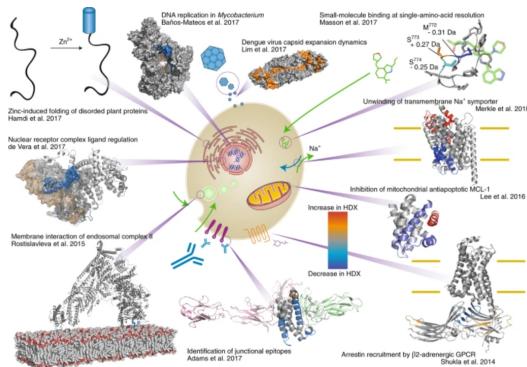


图 3 氢氘交换的应用^[4]

在本实验的氢/氘交换 (HDX) 的实验中，通过将蛋白质上发生的原子交换编码为质量变化。前端使用微流控芯片，可以提升实验的时间分辨率并使其精确可调。

2.3 自上而下 (Top Down) 的蛋白质组学

自上而下的蛋白质组学可以从复杂的生物系统中描述完整的蛋白质。这种方法通常允许接近 100% 的序列覆盖和蛋白质形态的全部特征。串联质谱的裂解是通过电子俘获解离 (ECD) 或电子转

移解离 (ETD) 完成的。蛋白质通常被电喷雾电离并在傅立叶变换离子回旋共振或四极离子阱质谱仪中捕获。

它包括在复杂的混合物中识别蛋白质，而不事先消化成相应的肽种类。自上而下的蛋白质组学原理流程包括蛋白质分离、质谱检测和数据分析。自上而下的策略的主要优点是可能获得完整的蛋白质序列和定位和表征 PTMs 的能力。它还具有测定蛋白质异构体的能力。此外，还免去了自下而上方法所需要的耗时的蛋白质酶解。

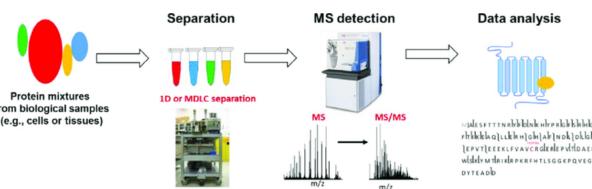


图 4 工作流程^[5]

3 实验流程

3.1 设计芯片图纸

根据黄老师的讲解以及助教提供的图纸，自学 AutoCAD 的使用方法并用其作图。做图过程中需要注意图纸以及相关形状的尺寸等，同时需要正确设置参数。助教将图纸汇集后发给相应的厂家制作掩膜，在透明材质上覆盖了一层铬以在曝光时挡住紫外线。

3.2 制作光刻模板

(1) 用镊子夹取硅片，使用丙酮和异丙醇清洗取出杂质，提高光刻胶的黏附性质，并用气流完全吹干。

(2) 在匀胶机上，于硅片上添加一枚硬币大小的负胶 (AZ 50XT，其曝光部分在紫外线照射下发生交联反应，从而不会被显影液洗掉，用于控制层的制作)，并旋转混匀 (500 转 10 秒，3500 转 30 秒，由公司提供)。

(3) 将硅片在不同的温度下烘不同的时间。对于负胶，前烘的作用是去除光刻胶中有机溶剂的部分，提高光引发剂的比例。

(4) 固定在光刻机上以后，选取控制层的掩膜，进行曝光，负胶中形成酸催化交联反应。

(5) 进行后烘，在酸的催化下进一步发生交联反应，使得显影后的结构稳定。

(6) 在显影液中清晰，直到洗净光刻胶，硅片表面得到清晰的芯片图样。

(7) 之后取另一片硅片进行类似的操作，区别在于本次需要加的胶为正胶（SU-8 2025）曝光部分会被洗掉，用于流体层的制作），并且没有在光刻后后烘的环节。

(8) 所有同学的光刻模板制作完毕后，助教进行统一长时间烘干定型。

3.3 制作 PDMS 芯片

3.3.1 流体层芯片制作

(1) 打开烘箱，80°C 恒温保持，用铝箔纸包裹容器预备使用，容器内可能会有胶，使用时需撕下（准备工作，由助教完成）。

(2) 配制 PDMS 胶，由 B 胶和 A 胶组成，B 胶是 A 胶的固化剂，A 胶的比例越大，胶越稀，得到的胶相对会变软。希望流体层较硬，因此 A (PDMS): B (固化剂) = 5:1；控制层，A: B=20:1 (均为质量比)。

按比例兑好流体层胶后 (每个芯片大概需要 25~30g，三个人共配 90 克)，放入离心机除气泡。

(3) 取培养皿，用铝箔纸完全盖住其底部，并放入模板将向其中加入 25~30g 胶，之后将培养皿放入真空罩中 15 分钟，去除胶中的气泡 (在解除低压状态时气泡会大量冒出)。在这个过程中硅片可能会上浮，可用镊子压下去。

(4) 将模板放入 80°C 烘箱中，加热约 15min，至模板较硬后取出。铝箔纸所包的胶从培养皿中取出，撕下铝箔纸，并用刀小心取出硅片，将不用的部分用刀切除得到两份 PDMS 芯片并保留对版标记，pattern 面朝上放置。选取效果较好的一块，将进出口用小车床打孔，用胶带粘附表面，去除碎屑，之后用胶带轻轻封住表面。

3.3.2 控制层芯片制作及对板

(5) 配制 A:B=20:1 的混合胶，离心去除气泡；将印有控制层 pattern 的硅片放在匀胶机上，打开电源开关和真空开关。倒入适量混合胶，盖上盖子，点击开始，在转动中胶被均匀得摊在硅片模板上。

(6) 将控制层胶在室温下放置 10min，后在 80°C 下放置 15min，拿出放凉后，在显微镜下通过对版标志从左向右对齐流体层（流体层 pattern 朝

向控制层胶），在 80°C 烘箱中放置 1h。

(6) 控制层打孔：趁热轻轻用刀划破控制层，揭下流体层和控制层，pattern 面朝上放置。控制层打孔，贯穿流体层，用胶带轻轻粘附表面碎屑，注意不能按压，避免控制层和流体层混合。

(7) 键合：控制层 pattern 面朝上，玻片用丙酮和异丙醇清洁后朝上放置，进行氧等离子体活化，利于粘附。打开开关，点击 start，30s 后停止。迅速将 PDMS 芯片和载玻片正面相对，粘在一起。待 PDMS 胶和玻片间无气泡后，将其放入 80°C 烘箱过夜。

3.4 氢氘交换以及质谱分析

3.4.1 搭建装置进行实验

(1) 对透明细管和空心金属管，注水后利用其将相对应的气泵控制接口与 PDMS 芯片上控制层的开口相连接 (通过 Labview 相应的程序进行控制，用水来控制流体层的通断，以获得更快的响应)。

(2) 准备适当体积的微量注射器，在其中加入肌红蛋白 (溶解在 10mM 的 CH_3COONH_4 溶液中)、重水 (配成 10mM 的 CH_3COONH_4 溶液，PH=3)、终止溶液 (10mM 的 CH_3COONH_4 溶液，PH=2.5，理论上需低温^[2])，并将注射器固定在泵上，并将注射器连接至芯片的相应区域 (连接时注意排除管中的气泡以及芯片中的气体)。

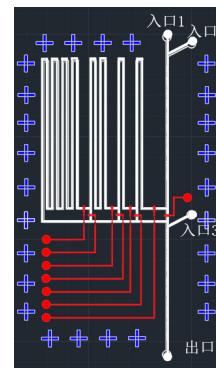


图 5 连接开口示意图，其中入口 1、2 连接蛋白溶液和重水，入口 3 连接终止溶液，出口处连管收集，控制层均连接气泵并注水

(3) 在泵上设置相应的参数 (内径、几分钟内注入多少液体，这与推进的线速度以及推进时间有关)，此时所用管的内径和系统中设置的不一样，实际流速与系统上的数据应相差半径比值的平方。

蛋白实际注射速度被调整成约为 60nL/min , 重水和终止液的注入速度为其 20 倍, 1200nL/min 。

(4) 在将体系中充满重水溶液且确定不漏液后(如怀疑漏液, 可以使用对溶液染色的方法进行观察), 理论上需要调整控制层至不同状态来控制蛋白质发生氢氘交换的时间, 但由于模板设计存在问题, 实际上只进行了停留时间最短的实验状态(下图中的 Ch2), 将收集到的产物储存在 EP 管中并在冰盒中保存(为了更彻底地停止氢氘交换)。

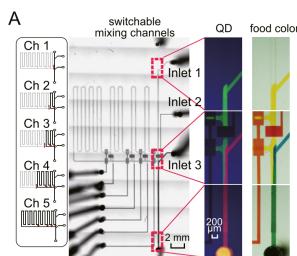


图 6 理论上控制层的不同状态控制液体的不同流动方式^[2]

3.4.2 质谱分析

利用进样针将需要加入的样品直接送入质谱仪, 经过电喷雾离子化后进行四极杆以及打后续的高精度质谱, 最终得到需要测定物质的质荷比信息。加入了徐忠林(没有利用芯片的对照组)、张广欣和佟永鑫的样品。

4 实验结果与分析

4.1 模板图纸

将 2 套流道绘制在同一张图中(留有备份), 模板在 3 英寸的圆内, 控制层管道宽度为 $100\mu\text{m}$, 流体层管道宽度为 $200\mu\text{m}$, 白色管道与红色管道处红色管道宽度 $30\mu\text{m}$, 打孔处为直径 1mm 的圆。

流体层用白色填充、控制层用红色填充、对板标记用深蓝色填充。

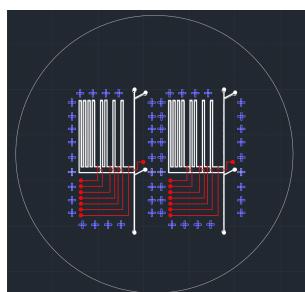


图 7 利用 AutoCAD 2024 设计的图纸



图 8 “人”形结构, 有利于液体的充分混合

然而本模板存在问题, 下图中用绿圈圈出的部分不应该被设置为细线, 这让此控制流道失去了对下方流通道的控制, 这就无法严格地完成图 6 中的控制流程。即使在微尺度下影响可能并不大。

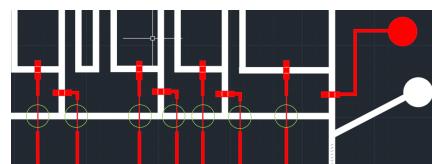


图 9 图纸设计的不合理之处

4.2 制作光刻模板

制作的流体层与控制层模板形态正常(流体层模板的“人”字形结构也被很好的体现), 发挥功能的部分都被很好地体现了出来。其中流体层模板在涂匀光刻胶后有 2 滴光刻胶从匀胶机上滴落, 光刻时使 pattern 远离了这一区域, 因此只影响了美观性, 对实际性能没有影响。



图 10 流体层模板

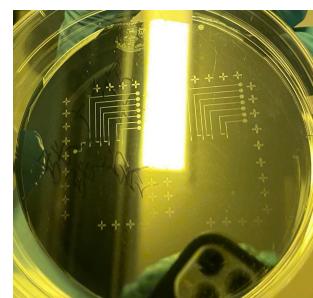


图 11 控制层模板

4.3 制作 PDMS 芯片

制作的 PDMS 芯片出液口出现问题，改在流出的流道处补打出样孔，在之后的实验中并没有观测到漏液等影响。



图 12 PDMS 芯片

4.4 氢氘交换以及质谱分析

4.4.1 实验装置

连接好芯片后，经测试没有明显漏液或漏气。具体连接方式见图 5 的说明。

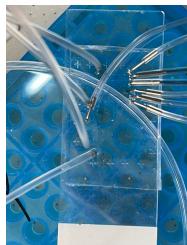


图 13 连接好的芯片

4.4.2 氢氘交换结果

纯肌红蛋白信号：

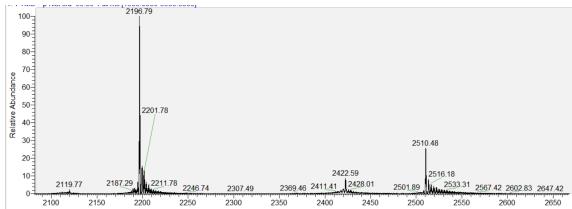


图 14 纯肌红蛋白对照组

每一簇代表不同的价态，可以通过质核比以及每个价态之间的距离具体推算出蛋白的相对分子质量（约 17kDa）。主峰为整体的蛋白，旁边的小峰应是在被碰撞时掉落的血红素分子。

佟永鑫和我使用芯片做出的数据均不理想，几乎看不到有价值的信号，可能是由于操作存在问题，使得氢氘交换时蛋白质浓度过低，使得质谱仪

只收集到了类似于杂质的信号，且这些信号出现并不稳定。

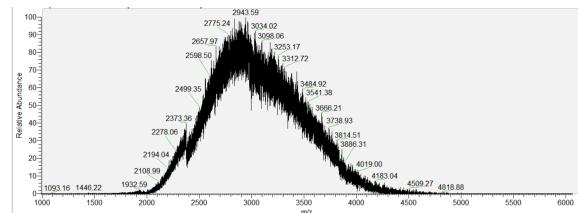


图 15 佟永鑫数据 1

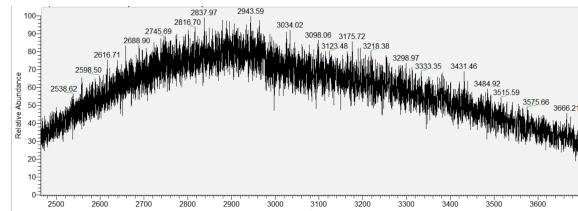


图 16 佟永鑫数据 2

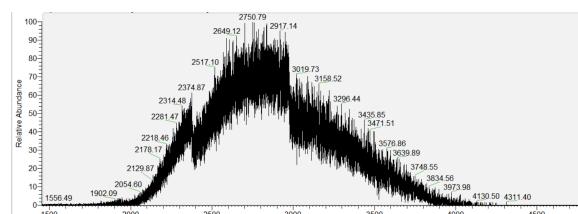


图 17 张广欣数据 1

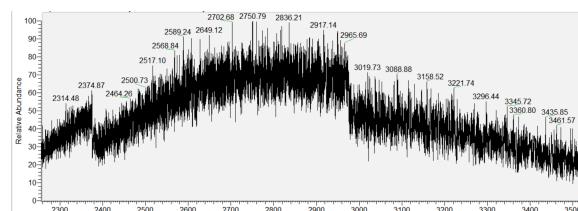


图 18 张广欣数据 2

徐忠林在试管中直接使用 Mb：重水 = 1: 20 室温下反应 5min 制作了对照组，观察到了氢氘交换引发的现象，即峰在发生偏移。但可能由于交换得不是很完全，许多峰叠加在一起，并没有很好地分离。

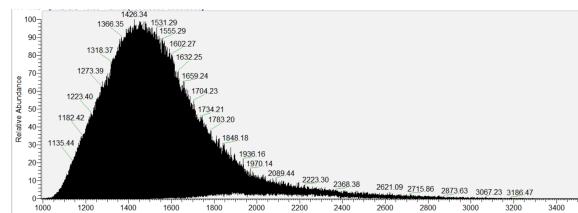


图 19 徐忠林数据 1

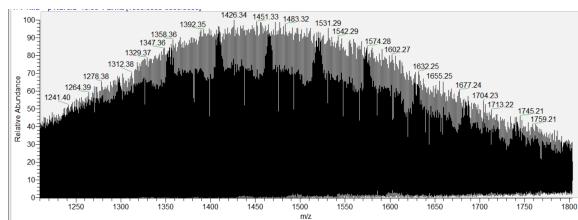


图 20 徐忠林数据 2

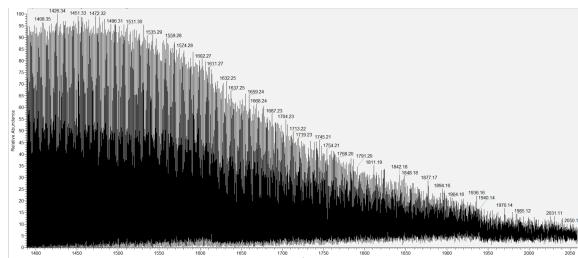


图 21 徐忠林数据 3

5 讨论

5.1 使用微流控芯片进行氢氘交换实验的优势

由于图纸设计问题、制作过程可能不够精细、进行实验时可能存在疏忽等原因，本次实验并没有利用微流控芯片得到有效数据。

理论上，在控制层的调节下，可以准确地控制蛋白和重水在流道中反应的时间，并且在出液口后面直接连接质谱，从而精确地控制氢氘交换发生程度，数据有很高的时间分辨率。溶液在流道中停留时间越长，峰的分布在 m/z 上越向右偏移（发生氢氘交换的主要是蛋白质骨架上酰胺键的氢）。

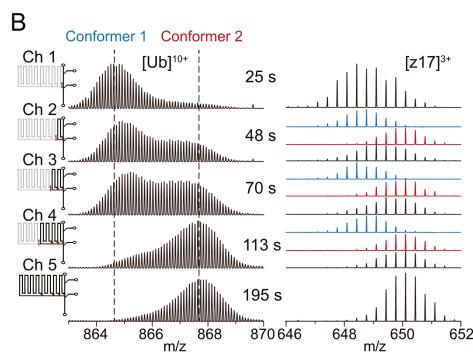


图 22 本微流控芯片工作原理以及预期效果^[2]

微流控芯片也能极大节省相关试剂的用量，分析珍贵材料时优势更加显著。

然而我们也需要认识到，不能为了技术而追求技术，微流控系统的搭建本身就有很高的复杂

性且需要很多的配套设备。如果实验没有明确的相应需求，盲目使用微流控芯片是不恰当的。

5.2 实验中值得讨论的问题以及启示

(1) 绘制芯片模板时应注意各种细节，尤其是单位。否则可能会因此空耗大量时间（商家寄来错误模板）。

(2) 对液体染色会带来观察上的优势。罗圣尧注入大量液体但没有等量流出, 利用墨水染色发现有一部分漏到了控制层, 如不进行染色将很难观察到。

(3) PDMS 胶实际为多孔结构, 仅用气控制时观察到没有气体外漏但气泵补气的现象, 应是 PDMS 吸收了一部分气体, 且各个连接处的气密性其实并不是一种理想状态。

(4) 由于器材限制，流出的溶液并没有能即使进入质谱（而是保存在冰盒里），这可能会造成对反应停止的不彻底，从而牺牲微流控芯片提供的高时间分辨率的优势。

(5) 每个人在实验中都或多或少犯了一些错误，更为谨慎认真的实验态度是很有必要的。

致谢

感谢认真负责的朱彦熹助教，投入大量时间指导我们做实验，极有耐心地帮我们克服每一个问题。

感谢黄岩谊老师的认真教学，使我们学习了微流控芯片相关理论知识，也让我们的课程成为可能；感谢韩奎老师的指点，帮我们克服了一些技术困难。

感谢的黄老师课题组的其他师兄师姐，给我们提供了学习讨论的时间与空间。

感谢各位一同上课的元培学院整合科学班的同学，我们相互鼓励、共同进步。

参考文献

- [1] PATTANAYAK P, SINGH S K, GULATI M, et al. Microfluidic chips: recent advances, critical strategies in design, applications and future perspectives[J]. *Microfluidics and nanofluidics*, 2021, 25: 1-28.
 - [2] LI W, CHAIHU L, JIANG J, et al. Microfluidic platform for time-

resolved characterization of protein higher-order structures and dynamics using top-down mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(21): 7520-7527.

- [3] KONERMANN L, PAN J, LIU Y H. Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics[J]. Chemical Society Reviews, 2011, 40(3): 1224-1234.
- [4] MASSON G R, BURKE J E, AHN N G, et al. Recommendations for performing, interpreting and reporting hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (hdx-ms) experiments[J]. Nature methods, 2019, 16(7): 595-602.
- [5] LINDON J C, TRANTER G E, KOPPENAAL D. Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry[M]. Academic Press, 2016.