

班级：整合科学综合实验课程 3

学号：2200017797

姓名：侯书洋

实验名称：高通量产液滴的双通道芯片的设计、加工与检测

实验日期：2024 年 4 月 19 日、4 月 26 日、5 月 5 日、5 月 18 日

一. 实验基本流程:

- 利用 AutoCAD 参照样板设计实验所需芯片的图案;
- 硅片模板套刻与 PDMS 芯片制作;
- 显微镜下检测芯片产出液滴的情况并进行初步的数据分析;

二. 实验基本原理:

光刻中最基本的原理：一束平行光打在光罩(Mask)上后会在底板上形成特定的图案。从芯片图案设计到芯片的加工实现，通常经历三个阶段的转变：设计者软件中定义的图形(Pattern); 版图转化为实物图形(如硅基模板); 光罩图形转化为芯片图形(芯片印刻与键合)。

通常，将有大面积透光区域的掩光模具称为明场光罩板(Clear Mask)，将有大面积不透光区域的掩光模具称为暗场光罩板(Dark Mask)。我们在利用软件设计图案时，一定要注意标注所绘制的图案究竟对应于掩光模具上的保留部分(不透光区域)还是去除部分(透光区域)。

正性光刻胶(Positive Photoresist)是指：衬底(Substrate)上的光胶在曝光后，曝光的部分在显影液中的溶解度较未曝光部分在显影液中的溶解度显著增加。显影操作后衬底上剩余的光刻胶图案与光罩板上不透光区域的图案一致。

负性光刻胶(Negative Photoresist)是指：衬底上的光胶在曝光后，曝光区域的光胶发生交联反应而硬化，从而在显影液中的溶解度显著下降；未曝光区域的光胶仍然在显影液中有较高的溶解度。显影操作后衬底上剩余的光刻胶图案与光罩板上透光区域的图案一致。

在暗场光罩板下，习惯将正性光刻胶曝光后在衬底上形成的图案称为孔区，将负性光刻胶曝光后在衬底上形成的图案称为岛区。

三. 实验基础仪器需求:

匀胶仪，金属浴台，紫外光刻机；显微操作台；真空泵，离心匀胶机，台式打孔器，台式匀胶仪，烘箱；机械推泵。

四. 芯片制作基本流程规范 (Protocol):

(一) 套刻层 Layer 1、Layer 2 设计流程:

利用 AutoCAD 自行设计 Layer 1、Layer 2 样式。(需要注意的标准参数见 Fig. 1)

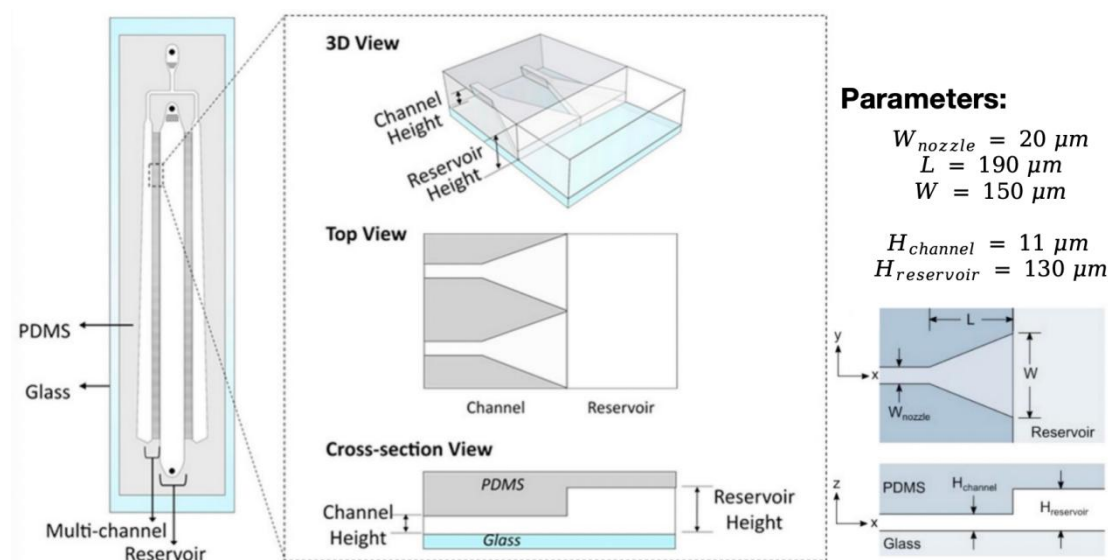


Fig. 1: The format of the designed chipⁱ

Noted:

1. AutoCAD 作图时的默认图距单位是 mm。
2. 需要将所有的设计元素最终转化为一个单独的“面域”(可利用 Region 指令)。
3. 参考的 Layer 1、Layer 2 设计样式见 Fig. 2；设计完成后保存为.dxf 格式文件。

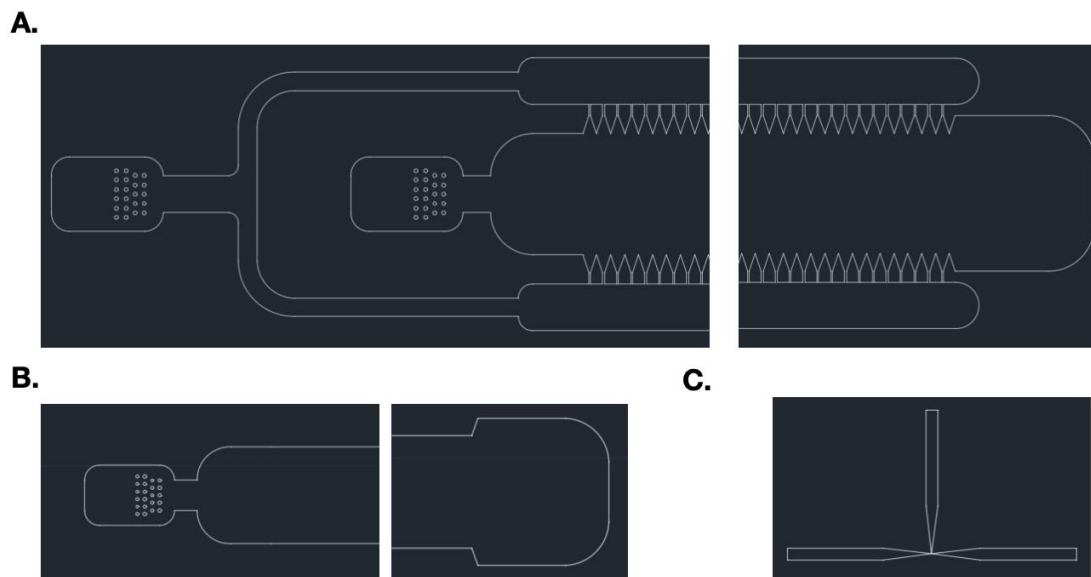


Fig. 2: One possible design for the chip (A: the Layer 1; B: the Layer 2; C: the Marking)

(二) 硅片模具制备流程:

0. 用镊子从硅片盒中沿硅片切口处夹取一块硅片，观察硅片的抛光面是否沾染杂质；如果有，先后用丙酮、异丙醇冲洗硅面，再用氮枪吹干，重复操作直至硅片抛光面整洁。

For Layer 1:

1. 用镊子将洁净的硅片放置于匀胶仪载物台上(匀胶仪内壁预先用塑料膜铺遮，防止匀胶过程胶液甩出污染匀胶仪)，调整硅片相对位置使其位于载物台中心后，打开真空泵吸附。
2. 选取 SU-8 2010 胶浆，在硅片中心处缓慢悬垂倾倒；胶浆粘稠，倾倒时注意控制流速和用量，尽量避免胶浆污染其它实验空间；最终胶浆用量以硅片直径 1/3 至 1/2 为宜。

Noted: 倾倒完毕后用纸巾擦去试剂瓶口处残留的胶浆，并将试剂瓶归放原位避光保存。

3. 调整匀胶仪程序至 Layer 1(Fig. 3)后，合盖匀胶仪，开始匀胶过程。
4. Layer 1 匀胶结束后，用镊子夹取匀胶后的硅片，在金属浴板上进行前烘 1(Fig. 3)。
5. 前烘完毕后冷却至室温，参照“光刻蚀流程-For Layer 1”操作进行第一层光刻。
6. 第一层光刻完毕后，在金属浴板上进行后烘 1(Fig. 3)；后烘完毕后冷却至室温。

For Layer 2:

7. 将第一层光刻完毕后的硅片放置于匀胶仪载物台上，调整硅片相对位置使其位于载物台中心后，打开真空泵吸附。
8. 选取 SU-8 2050 胶浆；后续操作同 Layer 1 中操作步骤 2，只需注意 SU-8 2050 胶浆比 SU-8 2010 胶浆更为粘稠。
9. 调整匀胶仪程序至 Layer 2(Fig. 3)后，合盖匀胶仪，开始匀胶过程。
10. Layer 2 匀胶结束后，用镊子夹取匀胶后的硅片，在金属浴板上进行前烘 2(Fig. 3)。

ⁱ Lee, S., de Rutte, J., Dimatteo, R., Koo, D., & Di Carlo, D. (2022). Scalable fabrication and use of 3D structured microparticles spatially functionalized with biomolecules. *ACS Nano*, 16(1), 38-49. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c05857>.

11. 前烘完毕后冷却至室温, 参照“光刻蚀流程-For Layer 2”操作进行第二层套刻。
12. 第二层套刻完毕后, 在金属浴板上进行后烘 2(Fig. 3); 后烘完毕后冷却至室温。
13. 将套刻后的硅片置于 SU-8 显影液(Developer)中显影; 显影完毕后置于 65 °C 金属浴板上适当烘干。

Noted: 显影时显影液浸没硅片即可; 实验中实际显影时长 18 min, 烘干时长 5 min。

(至此硅片模具已具雏形)

14. 将套刻完毕的硅片放在显微镜下, 检查一、二层是否对齐套刻成功; 如果套刻失败, 重复上述操作步骤(0-12)直至成功。
15. 将套刻成功的硅片放置于 65 °C 金属浴板上过夜硬化; 硬化完成后将硅片收纳于洁净的培养皿中。

(三) 光刻蚀流程:

0. 将 AutoCAD 导出的 .DXF 格式的模版文件(Layer 1 与 Layer 2 分别操作)利用 SFT Vector Converter 转换成矢量图格式。

Noted: 作图单位选用与 AutoCAD 一致的 mm, 倍率选用 6 μ m (obj: x2.5), 启用高分辨(High resolution)和抗锯齿(Antialiasing)模式, 其余参数均设为默认值。

For Layer 1:

1. 将转为矢量图的 Layer 1 模版数据导入 Phaos 中(Add a Drawing), 并设置参数(Fig. 3)。
2. 将需要刻蚀的硅片放置在光刻机的载物台上。

Noted: 光刻机载物台是有向性的(User Side); 此外, 为了便于 Layer 2 的套刻, 保持两次硅片在载物台上位置大体相同为好。

3. 进入 Focus Mode, 利用 Motion 控制模块: 操纵光刻机中镜头上下移动至合适位置使得焦面清晰; 操纵光刻机中镜头水平移动观察样平台面是否平整。
4. 将镜头归位(Homing)后, 点击 Move from Home to Start, 关闭 Focus Mode。
5. 确认无误后(尤其检查是否选择反色 Tonality), 合盖光刻机外壳并开始刻蚀。

For Layer 2:

1. 将转为矢量图的 Layer 2 模版数据导入 Phaos 中(Add a Drawing), 并设置参数(Fig. 3)。
2. 将需要刻蚀的硅片放置在光刻机的载物台上(和刻蚀 Layer 1 放置位置大体相同为好)。
3. 同 Layer 1 中操作步骤 3。
4. 进入 Alignment Mode, 选择 Semi Parameters 模式, 按照指示流程完成对齐操作。

Noted: 在依照流程对齐左上角对版标记后, 如果发现右下角对版标记并未对齐, 这时需要人工调整光刻机载物台使得左上、右下对版标记均对齐: 载物台有三个旋钮, 其中两个旋钮可以控制载物台的倾斜角度, 另一个旋钮可以控制载物台的水平方向。

5. 关闭 Alignment Mode; 后续操作同 Layer 1 中操作步骤 5。

【可以合理穿插安排操作步骤(二)、操作步骤(三), 使得实验过程更为高效】

(四) PDMS 芯片印刻与成品制备流程:

0. 取出硬化后的硅片模具, 置于洁净的培养皿中。

A. 胶液配置流程:

1. 按照配比(Fig. 3)和实验所需胶量, 称量适量的 A、B 胶置于锥形瓶内。
2. 将分别配好的胶浆置于离心匀胶机中, 重量配平后设定程序(Fig. 3)进行匀胶。
3. 匀胶后可得相应 Chip Gel 与 Base Gel。

B. 芯片制备流程:

1. 取洁净培养皿, 用锡纸将培养皿内壁均匀包盖(注意过程中保证锡纸的完整性)。
2. 将所需印刻的硅片模具置于上述培养皿中后, 向其中倒入 30 g Chip Gel。

3. 将上述培养皿用培养皿盖虚掩后(防止胶液中落入杂质), 置于真空泵中抽真空 20 min。
4. 取出培养皿后, 用镊子对胶液中的气泡进行处理: 用镊子将气泡戳破或者拨向培养皿边缘, 保证硅片模具上的图案区上方没有气泡。(此外, 用镊子将硅片模具轻轻压平, 使得硅片与培养皿底部保持平行, 这样可以使得制作出的芯片上下表面规整)
5. 将处理好的培养皿置于烘箱中, 80°C烘 30 min。

C. 基底制备流程:

6. 依据硅片模具上印刻的图案数目, 取相对应的载玻片并称量适当重量的 Base Gel。(参考: 12 Patterns 称量 44 g Base Gel)
7. 参照操作步骤 3-4 对 Base Gel 进行脱泡处理。
8. 将载玻片置于台式匀胶仪载物台中央并开启真空吸泵使其固定, 向载玻片中央倒入适量 Base Gel(约覆盖载玻片 1/2 左右为宜), 盖上台式匀胶仪盖并运行匀胶程序(Fig. 3); 运行结束后取出匀胶充分的载玻片。
9. 重复操作步骤 8, 直到制备数目足够的基底载玻片。
10. 将所制备的基底载玻片置于烘箱中, 80°C烘 10 min。

Noted: 基底制备可以在培养皿烘干过程中进行。

D. 芯片键合流程:

11. 取出烘干后的培养皿, 将硅片与胶面小心剥离, 硅片收纳于原培养皿中干燥保存。
12. 依据图案分布将切割胶面后, 利用台式打孔器在胶面的图案上分别打出入液孔和出液孔(共两个入液孔, 一个出液孔)。

Noted: 打孔时一定要保证孔道内部通顺; 这可以通过观察所打出胶段是否完整, 或者直接用细针头依次检查所打出的孔道。

13. 取制备好的基底载玻片, 用胶带粘黏除去基底载玻片覆胶侧、芯片印刻图案侧可能残留的灰尘等杂质, 小心地将芯片置于基底上(印刻图案面与基底胶接触)。

Noted: 键合芯片时不要用力按压芯片, 防止芯片上图案被压塌变形; 芯片键合完毕后可以用胶带贴合芯片的正面, 可以防止芯片在保藏的过程中受到灰尘等杂质污染。

14. 将键合好的芯片置于烘箱中, 80°C过夜烘干, 以除去胶中残余的水分。

(至此, PDMS 芯片制备完成)

15. 实验结束后, 整理超净工作间。

匀胶仪程序参数设定				前烘与后烘流程			
		Time / s	rpm			Time / min	Temperature / °C
Layer 1:	Step 1	30	500	前烘 1	Step 1	2	65
	Step 2	60	2000		Step 2	2	95
Layer 2:				后烘 1	Step 1	2	65
					Step 2	4	95
	Step 1	15	500	前烘 2	Step 1	4	65
	Step 2	60	1200		Step 2	20	95
Noted: 各层转速的设置需要参照目标胶层厚度 (Fig. 1)在胶浆生产商所提供的参数中查询			后烘 2		Step 1	3	65
				Step 2	15	95	
				Phaos 曝光参数设定			
		Time / (s per grid)	UV Strength			The fraction of A&B (A : B)	
Layer 1:		10	25%		Chip Gel :	5 : 1	
Layer 2:		15	75%		Base Gel :	10 : 1	
离心匀胶机程序设定							
		Time / min	rpm	台式匀胶机参数设定			
Step 1: (顺时针)		2	2000			Time / s	rpm
Step 2: (逆时针)		1.5	2200			40	1800

Fig. 3: The Summary of key parameters used in the chip-making process.

(五) 芯片质量检验流程:

1. 将水相(主要成分是丙烯酸酯官能团化的聚乙二醇, PEG Acrylate)和油相(氟化油, fluorinated oil; 此外还有一定的表面活性剂)分别用孔径 20 μm 滤过, 并分别装配于注射器。
Noted: 滤过孔径可依照 Fig. 1 中通道孔径适当调整, 滤过目的是防止液体中杂质堵塞通道。

2. 进行入液孔处配置: 裁剪适当长度的塑料软管, 一端与注射器针头相连, 一端用针头插入后与芯片上入液孔相连(油相与水相均进行此操作); 进行出液孔处配置: 裁剪适当长度塑料软管, 一端用针头插入后与芯片上出液孔相连, 另一端伸入废液收集瓶内。

Noted:

- a. 注意芯片上水相与油相的位置(Fig. 1)。靠外侧的入液孔是水相, 靠内侧为油相;
- b. 在与芯片上入液孔相连之前, 需要排尽注射器内残余的气体;
- c. 本实验中实际使用注射器规格: 12.250 mm 内径, 5 mL 注射容量。

3. 分别将两个注射器置于机械推泵上, 将芯片置于台式显微镜下。

Noted: 注意检查注射器与推泵各个接触点是否都紧密贴合。

4. 设定机械推泵参数(Fig. 4); 分别进行油相、水相的预推注, 以检查芯片中有无通道堵塞的情况出现。在油相、水相通路均检查无误后, 调整显微镜焦面, 开始运行机械推泵的程序, 同时利用与显微镜配套的视频录制软件进行录制。

5. 根据实际芯片上微珠的产生情况, 可对机械推泵上的参数进行适当调整; 直到找到实验芯片的一个合适的工作参数范围后, 停止推注。

6. 制作微球收集管: 取洁净离心管, 向其中加入适量矿物油(实验中所取量刚没过离心管底部); 将出液管的管口浸没于矿物油下。

7. 再次开始推注, 此时所产生的微球被收集于微球收集管中, 可待进一步表征分析等操作。

8. 实验结束后, 整理实验台面。

机械推泵参数				
	内径 / mm	注射容量 / mL	流速 / ($\mu\text{L} / \text{h}$)	快进 / 快退 速度 / (mm / s)
Pump 1 (water phase)	12.250	5.000	100.000	3.000
Pump 2 (oil phase)	12.250	5.000	1000.000	3.000

Fig. 4: The parameters used for the pumping system

五. 微球直径分布分析:

利用 Photoshop 将视频文件转换为 32 bit 单色通道, 并且适当调整原图像中的灰度值分布(为便于后续用 ImageJ 处理, 文件格式保存为 .mp4)。将处理好的视频文件再转导至 ImageJ 中, 利用 Threshold 框圈微球并进行 Particle Analysis 分析。由于视频中未加入比例标尺, 分析前需要根据拍摄视频中的标志性长度进行 ImageJ 中 “pixel-物理长度单位” 的换算。本次数据分析中主要利用了通道开口处 $W = 150 \mu\text{m}$ (见 Fig. 1)的条件。

Fig. 5 中左图是某次具体分析处理情况，右图是最后作出的微球直径的概率密度分布。

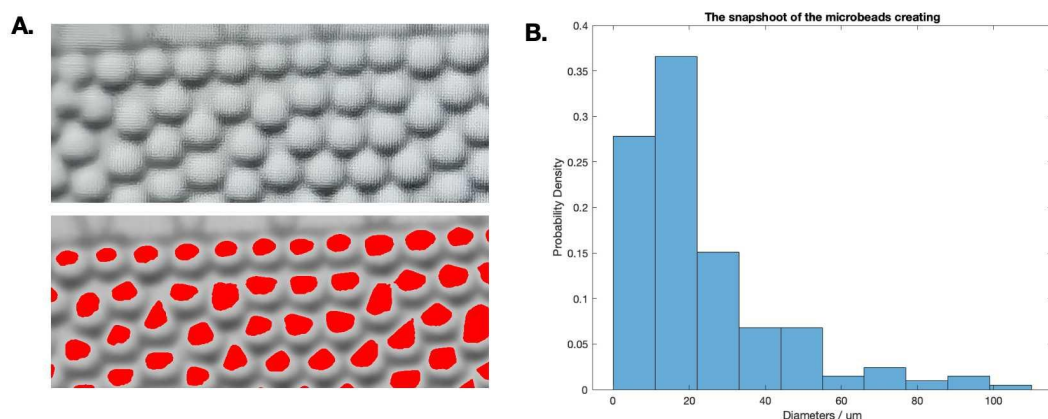


Fig. 5: A specific image-processing.

(A: the processed video(up) and the threshold analysis(down);

B: the Probability Density of the Diameter from one snapshot)

Fig. 6 中继续延用 Fig. 5 中的方法，对时长为 5 s 的视频片段每 20 帧分析一次，最后作出的微球直径的概率密度分布汇总。

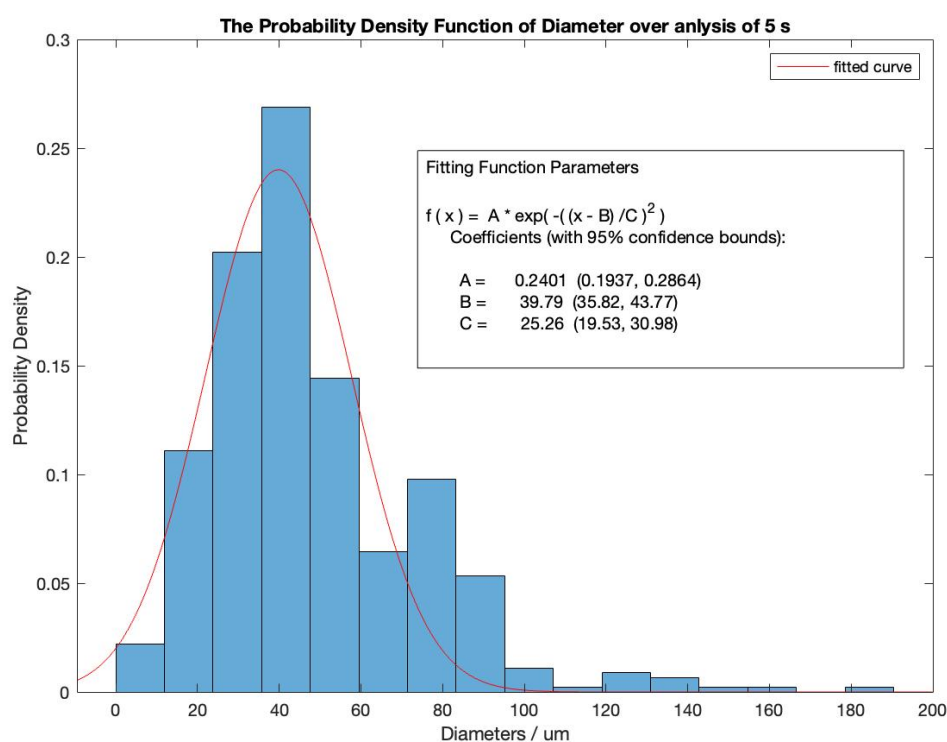


Fig. 6: the Probability Density of Diameter based on the analysis of 5 s video

从 Fig. 6 中可以看出，微球直径的分布大体呈现均值 $\mu = 40 \mu m$ 的正态分布。但从 Fig. 5 (A)中可以看出，可能受视频画质、微球与背景(油相)的对比度等因素的影响，利用 ImageJ 进行圈画微球时总会比微球的实际横截面小。因此，本实验中微球的平均直径应该大于 $40 \mu m$ 。

在文献中，空心微球(Hollow Shell Particles)的平均直径为 $36\ \mu\text{m}$ (Fig. 7)。

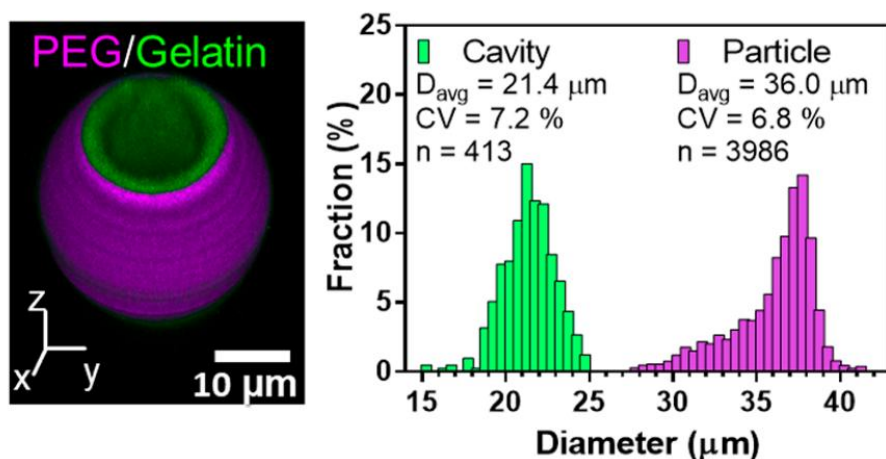


Fig. 7: The Diameter Distribution of the particles. (PEG 5.5%, Gel 8.7%)ⁱⁱ

受课程时长的限制，并未对收集管中的微球做进一步的表征。

六. 实验总结:

实际上这是笔者第二次进行微流控芯片设计、加工与检测的实验课程，上一次相关的实验课程是在罗春雄老师课题组下进行的。不过两次加工芯片的目的可谓迥异：在罗 Lab 中，主要设计许多并行的“Cell Room”，由此可以同时在一个芯片上进行多种实验条件的高通量细胞实验(当时检验实验是探究酵母在盐胁迫下 Hog1 与 Gpp1 蛋白的表达水平)；而在黄 Lab 中，主要是设计“Channel”实现迅速、大规模的液滴生产。

微流控芯片在如今的高通量、(半)自动化实验中发挥着越来越重要的作用。深入学习乃至掌握微流控芯片，需要对介观小尺度下流体力学、界面物理化学等知识有较高的理解，这也是笔者后续会继续努力的方向。

(最后的题外话：不愧是 BIOPIC 的顶梁柱，老黄的 Lab 是真的 Fancy)

ⁱⁱ Lee, S., de Rutte, J., Dimatteo, R., Koo, D., & Di Carlo, D. (2022). Scalable fabrication and use of 3D structured microparticles spatially functionalized with biomolecules. *ACS Nano*, 16(1), 38-49. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c05857>. Figure 2.