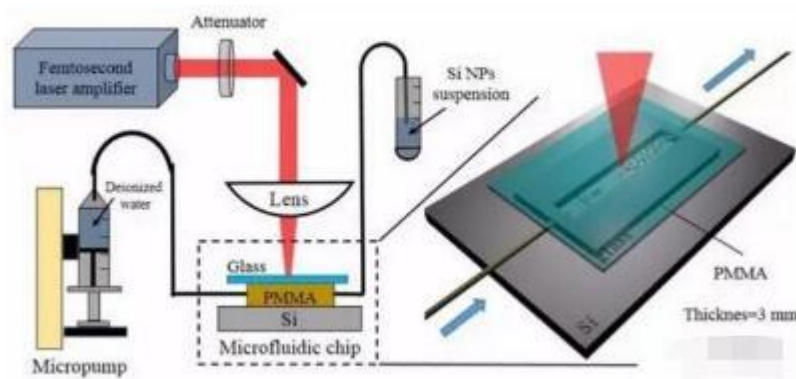


微流控技术原理

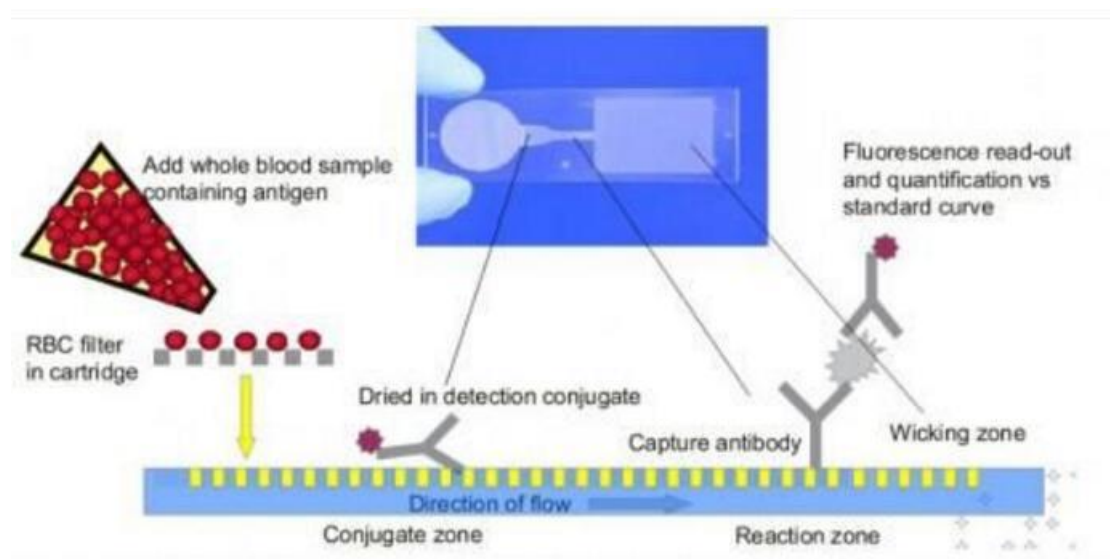
微流控（microfluidics）是一种精确控制和操控微尺度流体，以在微纳米尺度空间中对流体进行操控为主要特征的科学技术，具有将生物、化学等实验室的基本功能诸如样品制备、反应、分离和检测等缩微到一个几平方厘米芯片上的能力，其基本特征和最大优势是多种单元技术在整体可控的微小平台上灵活组合、规模集成。是一个涉及了工程学、物理学、化学、微加工和生物工程等领域的交叉学科。

微流控是系统的科学技术，它使用几十到几百微米尺度的管道，处理或操控很少量的（ 10^{-6} 至 10^{-18} 升，1 立方毫米至 1 立方微米）流体。最初的微流控技术被用于分析。微流控为分析提供了许多有用的功能：使用非常少的样本和试剂做出高精度和高敏感度的分离和检测，费用低，分析时间短，分析设备的印记小。微流控既利用了它最明显的特征——尺寸小，也利用了不太明显的微通道流体的特点，比如层流。它本质上提供了在空间和时间上集中控制分子的能力。



微流控芯片的工作原理

微流控芯片采用类似半导体的微机电加工技术在芯片上构建微流路系统，将实验与分析过程转载到由彼此联系的路径和液相小室组成的芯片结构上，加载生物样品和反应液后，采用微机械泵。电水利泵和电渗流等方法驱动芯片中缓冲液的流动，形成微流路，于芯片上进行一种或连续多种的反应。激光诱导荧光、电化学和化学等多种检测系统以及与质谱等分析手段结合的很多检测手段已经被用在微流控芯片中，对样品进行快速、准确和高通量分析。微流控芯片的最大特点是在一个芯片上可以形成多功能集成体系和数目众多的复合体系的微全分析系统？微型反应器是芯片实验室中常用的用于生物化学反应的结构，如毛细管电泳、聚合酶链反应、酶反应和 DNA 杂交反应的微型反应器等。其中电压驱动的毛细管电泳（Capillary Electrophoresis, CE）比较容易在微流控芯片上实现，因而成为其中发展最快的技术。它是在芯片上蚀刻毛细管通道，在电渗流的作用下样品液在通道中泳动，完成对样品的检测分析，如果在芯片上构建毛细管阵列，可在数分钟内完成对数百种样品的平行分析。



微流控芯片的工作原理图

微流控芯片技术详解

1、微流控芯片的基质材料

基质材料是微流控芯片的载体，在微流控芯片发展的初期，硅材料作为构建微流控芯片的首选材料而被广泛使用，这主要归因于业已成熟的半导体技术。但是随着研究的不断深入和应用领域的不断拓展，它表现出了不同程度的局限性：硅材料属于半导体，不能承受高电压，此外，硅材料不透明，与光学检测技术不兼容。

玻璃材料具有很好的电渗性质和优良的光学性质，无论是从其物理性质还是化学性质来讲，都非常适合于微流控芯片的制作，但是它的光刻和蚀刻技术工艺复杂、费时，制作成本过高，这些因素制约了玻璃微流控芯片的应用和推广。

因此，研究者们开始把更多的注意力转向了原材料便宜、加工制作简单的高分子聚合物，目前，以聚二甲基硅氧烷（PolydiMethyl-Siloxane, PDMS）为代表的有机高分子聚合物已成为微流控芯片研究的热点，PDMS 表现出了非常理想的材料特性：良好的绝缘性，能承受高电压，已广泛应用于各种毛细管电泳微芯片的制作；热稳定性高，适合加工各种生化反应芯片；具有很高的生物兼容性和气体通透性，可以用于细胞培养；同时具有优良的光学特性，可应用于多种光学检测系统；弹性模量低，适合于制作微流体控制器件，如泵膜等。此外，PDMS 还可以和硅、氮化硅、氧化硅、玻璃等许多材料形成很好的密封。此外，较常用的高分子聚合物还包括聚甲基丙烯酸甲酯（PolyMethylMethAcrylate, PMMA）、聚碳酸酯（PolyCarbonate, PC）等。

材料种类	优点	缺点
单晶硅	具有化学惰性和热稳定性 加工工艺成熟,可使用光刻和蚀刻等制备集成电路的成熟工艺进行加工及批量生产	易碎,价格贵 不能透过紫外光 电绝缘性能不够好表面化学行为较复杂
玻璃和石英	很好的电渗性质 优良的光学性质 可用化学方法进行表面改性可用光刻和蚀刻技术进行加工	难以得到深宽比大的通道加工成本较高 键合难度较大
有机聚合物	成本低、品种多 能通过可见与紫外光 可用化学方法进行表面改性易于加工,可通过铸造成型,激光溅射等方法得到深宽比大的通道 可廉价大量地生产	不耐高温 导热系数低 表面改性的方法待进一步研究
二甲基硅氧烷 (PDMS)	能重复可逆变形不发生永久性破坏,用模塑法高保真地制备微流控芯片,能透过 300nm 以上的紫外可见光,耐用且化学惰性,无毒,价廉	不耐高温 导热系数低 表面改性的方法待进一步研究

2、微流控芯片的加工技术

微细加工技术是微流控芯片发展的前提条件,微流控芯片的制作技术首先起源于制造半导体及集成电路芯片所广泛采用的光刻 (Lithography) 和蚀刻技术 (Etching), 目前已经广泛地用于硅片、玻璃和石英等基质材料上微流体网络的制作。其微制造工艺为: 首先通过光学制板照相技术制备包括微流控芯片图案的掩模, 制备好的掩模通常是镀有铬层的石英玻璃板; 然后用甩胶机均匀地在芯片表面涂敷一层光刻胶, 在紫外光下进行曝光, 显影。上述工作完成之后, 用相应的腐蚀剂对芯片进行蚀刻, 蚀刻完成后, 去除剩余的光刻胶便可获得所需的芯片微细结构。该方法工艺周期长、制作成本高, 但其微加工技术非常成熟。

与硅片、玻璃材料不同的是, 可用于微流控芯片加工制作的高分子聚合物种类繁多, 而且各材料之间的物理化学性质差别很大, 所以它们的微加工技术表现出了一定的多样性, 目前主要有模塑法、热压法、LIGA 技术、激光烧蚀技术和软光刻法等。

a、模塑法 (Injection Molding)

是指通过光刻掩模技术制得凸起的微流控芯片阳模，然后在阳模上浇注液态的高分子聚合物，当高分子聚合物完全固化后将其与阳模剥离即可得到具有微流体网络的基片，适宜采用模塑法的高分子材料应该具有很低的黏度和很低的固化温度，如 PDMS，环氧树脂，聚四氟乙烯等材料。

b、热压法

也是一种需要阳模的微流控芯片制造技术，该技术主要利用了高分子聚合物的玻璃转化温度。与模塑法相比，热压法制得的微通道重复性较差，而且管道易产生变形，操作条件相对苛刻。该方法主要应用于热塑性材料的加工，如 PMMA 和 PC 等。

c、激光烧蚀 (Laser Ablation)

是一种新型的微细加工技术，它是通过紫外激光降解高分子聚合物，适宜激光烧蚀加工的材料有 PMMA、聚苯乙烯、硝化纤维等。

3、微流控芯片的微流体控制技术

微流体操纵技术是微流控芯片技术中最重要的一个研究领域之一，通过各种机械或非机械力实现对流体的驱动和控制。依据微流体驱动体系中有无机械活动部件，可以将其分为机械和非机械驱动系统。

a、机械驱动系统

主要包括压电微泵、静电微泵等，它主要是通过静电、压电等不同方法来触发引起的机械部件的运动，从而为微流体提供动力源，这种泵的优点是任何流体都可以推动，但其所驱动的流体呈脉冲状而不是连续式的。

b、非机械驱动系统

主要包括电渗泵、热毛细管泵等，其中电渗泵是微流控芯片系统中最常用的一种驱动力，相对于微机械压力驱动的泵来说，电渗泵有很多优点：如电渗泵易于制作而且没有任何移动部件，电渗泵的样品柱只有少量的扩散，此外，可以采用改变微通道壁 ψ （电势）的方法来进一步控制电渗流的量和方向。

4、微流控芯片检测技术

微流控芯片的结构特征决定了其检测技术的特殊性，与传统检测仪器相比，微流控芯片对其检测系统提出了更高的要求，如要求灵敏度高、响应速度快、具有平行分析功能和便携式特征等，目前基于不同原理的很多检测技术都已经应用到微流控芯片的研究中，主要有光学检测、电化学检测、质谱等方法。

a、光学检测

光学检测是微流控芯片检测方法中应用最广的一种，其优点在于灵敏度高、实用性强，且检测器与分析对象不需直接接触。其中激光诱导荧光检测（Laser Induced Fluorescence, LIF）是目前最灵敏的检测方法之一，其灵敏度达到 $10^{-9}\text{mol/L} \sim 10^{-12}\text{mol/L}$ ，对于某些荧光效率高的分子，其检测能力可以达到单分子水平，因此它也是当前商品化微流控系统中唯一被采用的检测器。但该检测设备价格昂贵，而且体积庞大，与微尺寸的微流控芯片极不匹配，一定程度上限制了其广泛推广与应用。

b、电化学检测

基于电化学检测原理的检测系统可以说是最完整的、最集成、最理想的芯片检测系统之一，这主要有两方面的原因：一方面，微电极的制造技术与当前微流控芯片的加工工艺是完全兼容的，可以实现大批量生产；另一方面，电化学检测具有灵敏度高、选择性好、不受光程和样品浑浊度影响等优点，且只需要极少的外围辅助设备即可实现快速检测，图 1 给出的是一种便携式电化学检测系统。无疑，基于电化学原理的芯片检测技术代表未来芯片检测器的一个重要发展方向，显示了巨大的应用价值和潜力。

c、质谱检测

质谱检测技术作为生物化学分析的重要手段，由于能够提供试样组分中生物大分子的基本结构和定量信息，所以在微流控芯片检测器中表现出了巨大潜力，但当前质谱检测的瓶颈在于质谱仪与微流控芯片的接口问题。

微流控技术在生物学上的应用

从微流控芯片的分析性能看，其未来的应用领域将十分广泛，并且其应用领域仍在不断地拓展之中，但目前的重点显然是在生物学领域。除此之外，高通量药物合成与筛选、环境监测、食品卫生、刑事科学及国防等方面也会成为重要的应用领域。现仅就微流控芯片在生物学领域的应用举三个例子说明微流控芯片系统的巨大潜力：

1、毛细管电泳分离

毛细管电泳芯片是微流控芯片中发展最早、也是发展最快的一项芯片技术，目前已经成为微流控芯片领域中最令人瞩目的一个分支。与传统的毛细管电泳相比，它具有自动化程度高、样品消耗少、分析速度快以及高通量等特征，在对 DNA 片段、多肽、蛋白质等生物大

分子的分析中，它表现出了超强的分离分析能力，它被认为是后基因时代中最有希望攻克蛋白质研究、基因临床诊断等科学难题的分离分析手段之一。

1992 年 Manz A 发表了第一篇有关毛细管电泳芯片的论文，该文以荧光染料为分析对象，以电渗流作为流体驱动力，在芯片微流体网络中成功地实现了流体控制，向人们展示了毛细管电泳芯片的雏形和其优越的分离分析能力，这一研究成果引起了学术界的广泛关注和兴趣，相继各种用于氨基酸、蛋白质、药物等分离的芯片也不断开发成功。为了进一步提高芯片的分析能力，Mathies 领导的研究小组最近在直径为 200mm 的圆盘玻璃芯片上集成 384 个毛细管电泳微通道，其有效分离长度达到了 8cm，对 100bp (base pair, 碱基对) ~1000bp 的基因标准标记物达到了优于 10bp 的分辨率，并在该芯片上完成了 1163D 变异基因的 PCR-RFLP (限制性片段长度多态性) 分析，为临床诊断提供了依据。

毛细管电泳微芯片是微流控分析芯片中产业化程度最高、也是最先实现商品化的一类芯片，早在 1999 年，美国惠普（现为安捷伦）与 Caliper Technologies 公司联合研制的第一台微流控芯片商品“2100 生化分析仪”就已经开始投放市场，该系统使用 Caliper 公司生产的玻璃芯片，采用 LIF 进行检测，并配了 5~6 种试剂盒配合使用，可对 DNA、RNA 片段及蛋白质等进行电泳分离检测，玻璃芯片尺寸为 1.8cm×1.8cm，有效分离长度约 1.6cm，30min 可同时完成 12 个样的分离检测。与传统的基因和蛋白质电泳相比，芯片毛细管电泳无需样品的走胶、染色、脱色工序，无需干燥和照相等烦琐耗时的步骤，同时快速测试多个试样，获得基因和蛋白质的电泳图和曲线。整个测试过程简化为快速、简易的三个步骤：装载样品、进行分析、观察数据。

2、基因测序

毛细管电泳的一个重要应用领域是基因测序，正是因为 96 根毛细管电泳阵列仪广泛地应用于人类基因组计划的测序工作之中，才使举世瞩目的人类基因组计划的进程大大加快，

使之由原定的 2003 年提前到 2000 年基本完成。事实上，从基因测序的原理来讲，芯片毛细管电泳测序和普通毛细管电泳测序是完全一致的，但前者表现出了更大的优越性：首先由于芯片毛细管电泳独特的注样方式和更细的分离通道，所以它能实现 DNA 的快速分离；另一方面微流控芯片采用了半导体工业中成熟的微加工技术进行制造，所以一块芯片上可以集成更多的毛细管，实现高通量测序；最后由于它实现了产物处理和分析的集成化，减少了人为干扰，因此更进一步地降低了操作成本。

Mathies 领导的研究小组早在 1995 年就开始在微流控芯片上开展了 DNA 测序工作，他们在一块有效分离长度为 3.5cm 的芯片上测序了 150 个碱基，他们利用芯片变性毛细管电泳在 10min 之内就完成了对 433 个碱基序列的测定。该测序芯片的毛细管长度为 3.5cm，横切面尺寸 $50\mu\text{m}\times 8\mu\text{m}$ 。为了进一步提高 DNA 测序能力，到 2001 年他们在直径为 150mm 的圆形玻璃芯片上，刻蚀出了 96 个呈辐射型排布的毛细管电泳通道阵列，由于芯片采用旋转扫描 LIF 法进行检测，所以可实现平行测序，测序达 500 碱基。

3、PCR 反应

生化反应芯片的功能就是把在普通实验室中进行的生化反应实验缩微到一块小小的芯片上来完成。目前报道的生化反应芯片主要包括聚合酶链反应（Polymerize Chain Reaction, PCR）芯片、药物合成芯片等，其中 PCR 芯片是生化反应芯片的典型代表。众所周知，常规 PCR 需要制样、扩增及检测等步骤，既费时又费力，而当用微流控芯片进行 PCR 扩增及相关检测时，则可大大简化操作步骤、显著提高检测效率。1993 年 Northrup 等人以硅片和玻璃为基质材料首次报道了一种 PCR 芯片，并通过实验证明了 PCR 芯片可行性。该芯片的反应室刻蚀在硅片中，体积约为几微升，加热器也直接集成在芯片上，与传统的 PCR 相比，在相同扩增效率下，该芯片的热循环效率快 2~10 倍。为了进一步提高 PCR 芯片的热循环速度，Kopp M U 等人发展了一种连续流动式的 PCR 芯片，流动式芯片下面

有 95℃、72℃、60℃三个不同的恒温区间，当样品流经它们时就会实现自动变温，在流动中完成变性、退火和延伸反应，达到 PCR 扩增的目的。

另外，一旦把 PCR 芯片与毛细管电泳芯片二者集成起来的时候，其优势就显得更为明显。Lagally E T 等人在玻璃芯片上制作了集阀门、疏水孔、PCR 反应池以及毛细管电泳 (Capillary Electrophoresis, CE) 于一体的芯片系统，PCR 反应池体积是 280nL，PCR 扩增前所需模板浓度为 20 拷贝/mL，反应室中平均仅为 5~6 个 DNA 模板分子，加热器和热电偶集成在芯片的背面，10min 即可完成 20 个循环。反应完成后，PCR 反应产物在电渗泵的驱动下进入毛细管电泳芯片中，进行在线 CE 分离分析。该芯片系统集取样、PCR 扩增和 CE 分离于一体，节省了试剂消耗、加快了分析速度，同时也避免了实验操作中的人为污染。