



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101760428 B

(45) 授权公告日 2012. 12. 05

(21) 申请号 200910247556. X

(22) 申请日 2009. 12. 30

(73) 专利权人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

(72) 发明人 隋国栋 赵望 刘思秀 张金玲  
刘超

(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司  
31200

代理人 陆飞 盛志范

(51) Int. Cl.

*C12M 1/26* (2006. 01)

*C12Q 1/70* (2006. 01)

*C12Q 1/68* (2006. 01)

*C12Q 1/04* (2006. 01)

*G01N 33/53* (2006. 01)

(56) 对比文件

US 20030023149 A1, 2003. 01. 30, 全文.

CN 101243176 A, 2008. 08. 13, 全文.

CN 101169403 A, 2008. 04. 30, 全文.

CN 101158694 A, 2008. 04. 09, 全文.

审查员 南楠

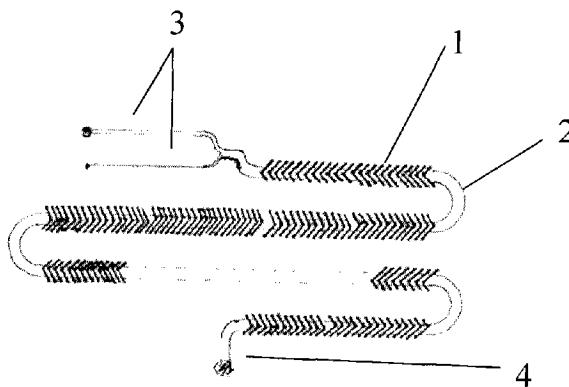
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

用于富集空气中微生物的微流控芯片及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于生物分析检测技术领域, 具体为一种用于富集空气中微生物的微流控芯片及其制备方法。该芯片采用模塑法以光学透明的聚二甲基硅氧烷等为材料, 芯片内含样品富集通道及气体通道, 实现对空气样品中细菌、真菌、病毒等生物颗粒的收集。并可以将富集的样品与 PCR 微流控芯片和免疫微流控芯片结合进行基因分析或免疫分析, 达到对空气中微生物含量与种类的快速检测。本发明具有快速、高效、便携、低价和易自动化控制的特点, 和其它芯片的整合可完成自动信号采集、远程传输和信号分析, 可应用于空气中或其它气体中微生物的现场快速检测及大范围内遥控检测。



1. 一种用于富集空气中微生物的微流控芯片 ;其特征 在于该芯片以光学透明材料为基材,由样品富集通道层和气体通道层对合形成 ;

其中所述的样品富集通道层中的样品富集通道由宽度为 1-100  $\mu\text{m}$ ,长度为 1-4mm 的箭头状凹槽连续并行排列级成,相邻凹槽的间距为 100-1000  $\mu\text{m}$ ,凹槽深度为 1-100  $\mu\text{m}$ ,每个箭头状凹槽形成一个收集微生物的微室 ;所述的气体通道层中的气体通道是光滑平直的凹槽,该通道宽度为 1-4mm,长度为 20-30cm,深度为 1-100  $\mu\text{m}$  ;所述样品富集通道中每个微室与气体通道之间都是连通的。

2. 根据权利要求 1 所述的微流控芯片,其特征 在于所述光学透明材料为弹性聚合物聚二甲基硅氧烷。

3. 根据权利要求 1 所述的微流控芯片的制备方法,其特征 在于采用模塑法,具体步骤如下 :

(1) 基片准备 :将硅片放入 Piranha 溶液去氧化后用氮气吹干,用 SU-82050 系列经旋涂机甩涂,在恒温加热板上软烘 ;

(2) 曝光和烘焙 :将设计好的样品富集通道和气体通道的硅片模板分别放置在甩涂好的基片上,应用紫外曝光机曝光,之后在加热板上烘焙 ;

(3) 显影 :将基片放入显影液中显影,之后分别用异丙醇和去离子水清洗干净,并用氮气吹干 ;

(4) 硬烘 :在热板上缓慢加热固定,形成模具 ;

(5) 浇注 :聚二甲基硅氧烷单体及固化剂按质量配比 5 : 0.8 ~ 5 : 1.3 混合均匀,分别倒在样品富集通道和气体通道的硅片模具上,在烘箱内固化,剥离 ;

(6) 键合 :将两层聚二甲基硅氧烷芯片校准键合形成微通道腔。

4. 如权利要求 1 所述的微流控芯片在富集空气中微生物中的应用,其特征 在于用收集气体的动力装置收集空气样品,然后用缓冲液或培养基将富集在样品富集通道各微室里的微生物洗脱 ;洗样后的样品直接连通免疫微流控制芯片,或者经过处理后,连接 PCR 微流控制芯片,完成现场快速分析检测。

## 用于富集空气中微生物的微流控芯片及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物分析检测技术领域,具体涉及一种用于现场快速富集空气中微生物的微流控芯片,并提供了该芯片的制备方法。

### 背景技术

[0002] 近年来人类面临对全球传染病流行的严峻现实:新传染病不断出现、旧传染病的重新肆虐、以及生物袭击、人为造成的传染病发生和流行。新发传染病中空气气溶胶为媒介的呼吸道传染病占了主要位置,是传染病防治中的重点和难点问题。引起呼吸道病感染的病原体是通过环境空气气溶胶传播而导致人的感染,与其他途径传播的传染病病原体相比更容易在人群中迅速传播扩散而难以控制,尤其在人口密集,交通繁忙的都市往往成为疫情暴发的隐患。引起呼吸道感染的病原体有病毒、细菌和其他病原体(支原体和衣原体)等。其中主要的病原体是病毒,有超过 20 种病毒可以在人与人或人与动物之间传播而导致呼吸道疾病,而细菌引起的感染不足 25%。除了流感、副流感、RSV 和 RV 等已知的导致季节性呼吸道感染的病原体外,近年还不断发现新的呼吸道病毒。自 2000 年以来,从病人体内陆续发现偏肺病毒、SARS 冠状病毒、新型冠状病毒 HKU1 和 NL63,高致病性人禽流感病毒、boca 病毒和 2 种多瘤病毒等。2003 年, SARS 冠状病毒因其高度的传染性和致病性而造成世界范围内的大规模疫情暴发,而最近几年,人禽流感在人畜密切接触的地区频繁发生并导致极高的死亡率(75%)。上述公共卫生事件的发生,不仅严重威胁人类生命而且不同程度地引起社会恐慌。因此,建立环境空气中的生物气溶胶在线监测技术将极大地提高公共卫生体系的疫情预警能力,对于维持社会稳定、保护人民健康具有重要的意义。

[0003] 另外对含有病原微生物的生物气溶胶实时监测也是国家安全的需要。2001 年美国发生“911”事件及随后的炭疽病菌事件以后,世界各国清醒地意识到,大规模恐怖袭击正威胁着正常的人类社会。在多种多样的恐怖袭击手段中,以生物气溶胶途径大规模散布高危险性,高传染性病原微生物(如病毒、细菌等)的袭击方式,因其具有成本低、易投放、破坏性强、影响力大和易于传播等特点,备受各国关注。发展对环境空气中的高危险性病原体监测技术,对生物恐怖袭击进行早期预警,能有效防范生化袭击的发生,并最大程度地降低损失。因此,不少国家开始建立健全自己的监测预警系统,加强信息的沟通与交流。美国利用国家环境保护局的 3000 多个空气质量检测站,在全国范围内监测可能出现的炭疽病菌、天花病毒等。该系统启动后,最快可在 12 小时内得出相关的监测结果。此外随着生物科技的发展,在 21 世纪的高科技战场上,以生物气溶胶为载体的大规模杀伤性生物武器出现的可能性也越来越高。为保护士兵,国家也急需能对生物气溶胶进行的在线监测的技术设备。

[0004] 国内外现行的气体样品收集方法主要用专门的仪器进行收集,除了使用不便,效率不高外,也难以完成收集分析的全过程操作。迄今为止国内外尚无实用的代表性气体收集并实时监测的快速检测系统。未来的技术发展主要集中在检测仪器的多功能化和微型化上。国外多功能化仪器集中在用于空气中生物颗粒分析的自动化仪器上。当前的空气样品收集并检测设备的发展趋势是:(1)连续分析来达到监控和预警的目的;(2)快速分析来达

到在线检测和快速预警；(3) 高通量来达到对多种样品的检测；(4) 高度自动化来完成在自然界和公共场所的普及；(5) 便携性来适应快速布置和军事防化的需要。

[0005] 20 世纪 90 年代发展起来的微流体学科是指操作微小网络通道 (5-500 微米) 中流体的科学技术。是分子生物学技术、微加工技术、机械制造技术、计算机技术等多种现代技术的发展与融合。是基于大规模平行处理生物信息分子原理的微型装置, 具有信息通量大、自动化、系统化的特点。微流体芯片用于操作, 传输微升 (10-6L) 至毫微微升 (10-15L) 量级的流体。可将生化反应的若干步骤包括分析、洗涤、检测等集成在一块或几块微流体芯片上, 其微通道孔径只有微米级大小, 具有浓缩和富集的作用, 可以加速反应缩短测试时间, 从而大大降低了测试成本。和常规的实验技术相比, 该技术极大降低了试剂的消耗量 (至少 3 个数量级)、同时分析产生的废液极少。在微小范围内的能量传递、物质分散更快更均匀, 热能传导快, 也更易实现各种操控, 因此反应快、收率高, 污染少、成本低。新一代的微流体芯片由高分子材料, 例如硅酮 polydimethylsiloxane (PDMS) 制成 (见附图 1), 材料造价低廉 (少于 10 美金 / 片), 制造周期短 (少于 24 小时), 所需设备为少数常规设备, 不需要大型精密仪器, 适合于大规模生产, 可用于生产一次性使用产品。该技术的发展趋势是芯片实验室, 即可将整个生化实验室功能集成在一块芯片上完成。

[0006] 另外, 由于 PDMS 材料的物理弹性, 多种功能性模块, 例如微阀门, 流体泵以及流体混合器, 都可以集成到微流体芯片中。而这些微阀门, 流体泵等功能模块的可通过计算机编程控制。这样的集成化、数控式微流体芯片, 便可以完成一些复杂的操作。例如分离, 进样, 清洗, 色谱柱分离鉴定等化学或生物分析操作。以微流体芯片为基础的仪器例如 PCR 扩增仪, 蛋白结晶仪, DNA 测试仪都已经被设计制造出来。同常规方式相比, 它的主要特点是:

[0007] 1) 低价, 因为使用的试剂的量极其微量, 完成测试需要的费用极低;

[0008] 2) 高效, 在微流体芯片中反应速度快, 传热传质效率高, 测试速度快;

[0009] 3) 应用模版技术制造, 适用于大规模生产;

[0010] 4) 容易集成, 不同目标的测试模块可很方便的集成到一块芯片中, 完成多目标并行分析;

[0011] 5) 自动化程度高, 它可以很方便和现代电子技术结合, 不仅使芯片分析测试自动, 而且信号传输以及信号自动分析也可以自动完成。

[0012] 6) 兼容性好, 其他的微分析技术, 例如微电极技术, 生物传感器技术也可以整合到微流体芯片技术中。

[0013] 因此应用微流控技术进行空气中病原微生物的检测成为目前空气实时在线监测的研究热点。但是现有的气体收集装置存在体积大, 不能有效地将非生物颗粒与微生物分离, 后续样品处理过程复杂, 不能与芯片等微型快速检测装置兼容等缺点。本发明基于微流控技术的空气中病原微生物的富集芯片模块能够很好的解决上述问题。

## 发明内容

[0014] 本发明的目的在于提供一种具有高效、低价、便携和自动化的特点的用于对空气中各种微生物快速富集的微流控芯片, 并提供该芯片的制备方法。

[0015] 本发明提供一种基于流体力学原理的专门用于现场快速收集空气中微生物的微流控芯片。该芯片以光学透明材料为基材, 由样品富集通道层和气体通道层对合形成;

[0016] 其中所述的样品富集通道层中的样品富集通道由宽度为 1-100  $\mu\text{m}$ , 长度为 1-4mm 的箭头状凹槽连续并行排列级成, 相邻凹槽的间距为 100-1000  $\mu\text{m}$ , 凹槽深度为 1-100  $\mu\text{m}$ , 每个箭头状凹槽形成一个收集微生物的微室; 所述的层中的气体通道是光滑平直的凹槽, 该通道宽度为 1-4mm, 长度为 20-30cm, 深度为 1-100  $\mu\text{m}$ ; 所述样品富集通道中每个微室与气体通道之间都是连通的。

[0017] 本发明中微流控芯片的基料采用弹性聚合物聚二甲基硅氧烷 (PDMS)。

[0018] 本发明的气体富集的微室的个数可由实际情况确定, 如样品量及其它实验需要确定。在本发明的具体实施中制备了一个单样品的微流控芯片, 可根据实际情况将该单通道以不同方式并联、串联。

[0019] 本发明提供上述微流控芯片的制备方法, 具体步骤如下:

[0020] (1) 基片准备: 将硅片放入 Piranha 溶液去氧化后用氮气吹干, 用 SU-82050 系列经旋涂机甩涂, 在恒温加热板上软烘;

[0021] (2) 曝光和烘焙: 将设计好的硅片模板放置在甩涂好的基片上, 应用紫外曝光机曝光, 之后在加热板上烘焙;

[0022] (3) 显影: 将硅片放入显影液中显影, 之后分别用异丙醇和去离子水清洗干净, 并用氮气吹干;

[0023] (4) 硬烘: 在热板上缓慢加热固定, 形成模具;

[0024] (5) 浇注: PDMS 单体及固化剂按质量配比 5 : 0.8 ~ 5 : 1.3 混合均匀, 并用真空泵除尽其中的气泡, 分别倒在样品富集通道和气体通道的硅片模具上, 在烘箱内固化, 剥离;

[0025] (6) 键合: 将两层 PDMS 芯片校准键合形成微通道腔 (即样品富集通道和气体通道)。

[0026] 本发明的微流控制芯片可用于富集空气中的微生物, 其方法是用收集气体的动力装置 (如泵, 气溶胶发生器等机械压力装置或人工推送 / 吸取空气样品装置) 收集空气样品, 然后用缓冲液或培养基将富集在样品富集通道各微室里的微生物洗脱; 洗样后的样品直接连通免疫微流控制芯片, 或者经过处理后, 连接 PCR 微流控制芯片, 完成现场快速分析检测。

[0027] 该芯片可内置或外接专用微型泵, 并与控制部分 (计算机), 操作系统 (集成化微流体芯片, 数控界面) 和数据采集, 数据分析部分 (计算机) 整合, 对气体样品的体积, 洗脱液的体积进行控制。

[0028] 本发明设计的微流控制芯片能高效、快速富集空气中的各种微生物。体积小, 能有效把非生物颗粒与微生物分离, 而且与其它微型快速检测装置兼容。

## 附图说明

[0029] 图 1 本发明的微流控芯片设计图。

[0030] 图中标号: 1 为富集样品通道, 由箭头状微室排列组成 S, 2 为气体通道, 3 为进样口, 4 为出样口。

## 具体实施方式

[0031] 1. 基片准备。将硅片放入 Piranha 溶液 (98%浓硫酸 : 30%双氧水 = 7 : 3, 体积比) 煮沸清洗 15min。用去离子水冲洗 5 遍后用氮气吹干, 并在 200℃ 烘焙 30min。

[0032] 2. 甩涂。将 Microchem 公司的 SU-8 胶 (下同) 倒在硅片中央, 倾斜硅片, 使 SU-8 覆盖住硅片大部分区域。静置 15min, 同时消除掉倾倒过程中产生的气泡。用旋涂机 (Spin-Coater KW-4A, Chemat Technology, Inc.) 进行两次递进式甩涂 : 500 转 /min 旋涂 15s, 3000 转 /min 旋涂 30s, 静置 10min 缓解边缘突起效应。

[0033] 3. 软烘。在热板上以 5℃ /min 的速率逐步升到 95℃, 期间在 65℃ 和 95℃ 分别保持 3min 和 6min。之后以 0.5℃ /min 的速率缓慢降至室温。

[0034] 4. 曝光。采用接触式曝光机 (波长 365nm)。

[0035] 5. 烘焙。在热板上以 5℃ /min 的速率由室温逐步升到 95℃, 期间在 65℃ 和 95℃ 分别保持 1min 和 5min。之后以 0.5℃ /min 的速率缓慢降至室温。

[0036] 6. 显影。在通风橱中进行, 显影液的主要成分是丙二醇甲醚醋酸酯 (PGMEA)。将模具放入显影液中显影 6min, 之后分别用异丙醇和去离子水清洗干净, 并用氮气吹干。

[0037] 7. 硬烘。在热板上缓慢加热到 200℃, 保持 30min, 再缓慢降至室温。

[0038] 8. 浇注聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 聚合物, 成型。将把采用光刻法制作的微通道 PDMS 印章分别用丙酮、无水乙醇依次超声 5min, 清除通道印章上的水分, 把清洗好的印章 60℃ 烘箱烘烤 4h。PDMS 单体与固化剂按照 5 : 1 的质量配比混合均匀, 除净气泡。倒在经三甲基氯硅烷处理过的 SU-8 模具上, 在调整好的水平热板上 65℃ 保持 2h 固化。形成上层具有反应微通道层的基片。

[0039] 9. 具有控制通道的 PDMS 层制作。在硅片上甩涂光刻胶, 经紫外曝光、显影, 制成硅基光阳模, 并于 120℃ 退火 30min, 使光刻胶软化。硅基光胶阳模用三甲基氯硅烷在气相中处理 7min, 使其表面硅烷化。

[0040] 10. 键合及接口制作。将气体通道层打孔。将气体通道层与富集通道层上下两片仔细对合, 80℃ 过夜固化。即制成了 PDMS 芯片

[0041] 11. 将芯片的气体进口放置在要取样的空间, 通过压力装置, 使 1-10ml 的气体通过芯片, 芯片内气压不超过 20psi。待全部样品气体通过后, 根据要收集微生物的特征, 用 100-200  $\mu$  L 磷酸缓冲液等适当的缓冲溶液或特制培养基灌注原气体通道, 根据芯片微室的空间大小以及流体性质, 控制合适的流速, 冲刷富集通道, 并收集洗脱液用于后续实验。

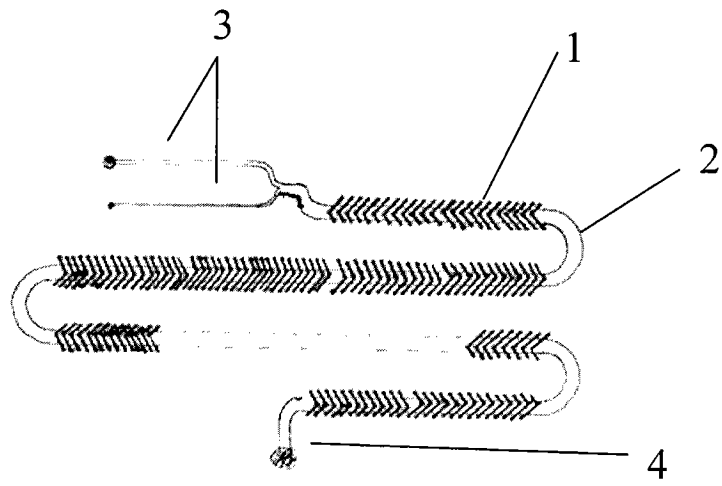


图 1

专利名称(译)	用于富集空气中微生物的微流控芯片及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101760428B</a>	公开(公告)日	2012-12-05
申请号	CN200910247556.X	申请日	2009-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	隋国栋 赵望 刘思秀 张金玲 刘超		
发明人	隋国栋 赵望 刘思秀 张金玲 刘超		
IPC分类号	C12M1/26 C12Q1/70 C12Q1/68 C12Q1/04 G01N33/53		
代理人(译)	陆飞		
审查员(译)	南楠		
其他公开文献	CN101760428A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明属于生物分析检测技术领域，具体为一种用于富集空气中微生物的微流控芯片及其制备方法。该芯片采用模塑法以光学透明的聚二甲基硅氧烷等为材料，芯片内含样品富集通道及气体通道，实现对空气样品中细菌、真菌、病毒等生物颗粒的收集。并可以将富集的样品与PCR微流控芯片和免疫微流控芯片结合进行基因分析或免疫分析，达到对空气中微生物含量与种类的快速检测。本发明具有快速、高效、便携、低价和易自动化控制的特点，和其它芯片的整合可完成自动信号采集、远程传输和信号分析，可应用于空气中或其它气体中微生物的现场快速检测及大范围内遥控检测。

