

回形针固定法制作三维(3D)微流控纸芯片

于丽娟¹, 贺志伟¹, 魏梦琦², 付龙文², 李博伟^{*2}, 陈令新², 张培青^{*1}

(1. 烟台大学化学化工学院, 烟台 264000; 2. 中国科学院烟台海岸带研究所海岸带环境过程与生态修复重点实验室, 山东省海岸带环境过程重点实验室, 烟台 264003)

摘要: 提出一种利用回形针来制作三维微流控纸芯片的方法, 能够适应多种不同的微流控纸芯片; 利用自制的纸芯片比色检测装置, 已用于牛血清白蛋白, Fe^{2+} 的快速定量检测。牛血清白蛋白的线性范围是 $5 \sim 50 \mu\text{mol/L}$, 检出限为 $0.13 \mu\text{mol/L}$, $R^2 = 0.994$ 。 Fe^{2+} 的线性范围是 $0.6 \sim 12 \mu\text{mol/L}$, 检出限为 $0.15 \mu\text{mol/L}$, $R^2 = 0.992$ 。在所规定的范围内, 都获得了较好的线性关系, 验证了基于回形针的 3D 微流控纸芯片可用于实际样品检测的可能性。

关键词: 微流控; 纸芯片; 回形针; 三维; 牛血清白蛋白; 铁(II)

中图分类号: O65 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2016)05-0611-04

微流控纸芯片是将微流体通道加工在纸的表面上的微型分析器件, 它具有成本低、样品消耗量少^[1]、结果可视化^[2]等独特优势。基于以上优点, 纸芯片受到了研究者越来越多的关注, 因而研究出了多种制备方法, 如: 喷墨打印^[3]、光刻法^[4, 5]、蜡印^[6, 7]、激光刻蚀^[8]、丝网印刷^[9]等, 主要制作材料包括聚苯乙烯^[10]、光刻胶(SU-8)^[11, 12]、聚二甲基硅氧烷(PDMS)^[12-14]、蜡^[6, 7]等。纸芯片被广泛地应用于比色检测^[15]、化学发光生物传感器^[16]、质谱^[17]、表面增强拉曼光谱(SERS)^[11, 18]、细胞培养^[19]、血液分析^[20, 21]等, 具有良好的发展前景。

在现代分析测试^[22]中, 一维纸芯片不能用作多重分析和定量检测, 三维(3D)微流控纸芯片应运而生^[23]。Whilesides等^[24]用双面胶粘贴法制作3D纸芯片, 但制作过程对精准度要求高, 且纤维素填充情况会影响芯片效果; 之后, Crooks等又提出了折纸法^[25, 26], 但此法需考虑纸芯片的镜像问题, 设计人员需具备一定的经验。Phillips等^[27]设计了喷胶法, 缩短了制作时间, 但对实验人员的要求较高。研究者又设计了订书机装订法^[28], 但此法一旦装订, 不可改变纸芯片位置。

本文提出了一种新的三维纸芯片制作方法——回形针固定法, 无需考虑纸芯片镜像问题, 也不用考虑实验人员的专业技能, 可以随时更改纸芯片的

位置。本文将微流控纸芯片与比色法相结合, 发挥3D纸芯片的优点, 用回形针固定, 对制作的微流控纸芯片进行研究, 操作简便, 灵活, 成本低廉。方法用于用牛血清白蛋白, Fe^{2+} 的测定, 在回形针固定的3D微流控纸芯片上进行分析, 获得较好结果。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

鼓风干燥箱(Boxun公司); 8560 DN 喷蜡打印机(日本XEROX公司); 1号滤纸(Whatman filter paper, GE中国公司)。

牛血清白蛋白(BSA, Sigma-Aldrich公司); 四溴酚蓝(TBPB, J&K Scientific公司); 试剂均为分析纯。不同颜色的食品级水溶性染料购自当地超市。蒸馏水用二次蒸馏水仪($18.2 \Omega \cdot \text{cm}$)制备。

1.2 三维纸芯片的设计与制作

实验所用3D纸芯片是通过回形针固定组装而成。如下图1(a)所示, 利用计算机软件Adobe Illustrator绘制纸芯片模型, 分辨率设置为2400 dpi, 通过8560 DN喷蜡打印机将图案打印到Whatman 1号滤纸上, 鼓风干燥箱120℃下烘3 min。结果发现, 纸芯片上的通道宽度比烘干前缩短了约1.5 mm。沿芯片边缘剪下, 如下图1(b)所示。按顺序排列, 用回形针固定, 制成3D纸芯片。整个制作过程大约只需2 min。实验中的便携

收稿日期: 2016-01-15

基金项目: 国家自然科学基金(21205131)和烟台市科技发展计划(2015ZH087)项目资助

E-mail: zhangpqyt@126.com; bwli@yic.ac.cn

式设备如图 1(c) 所示。

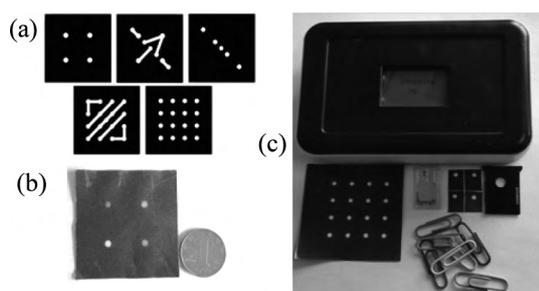


图 1 计算机软件 Adobe illustrator 绘制的纸芯片模型(a);为实验所用的纸芯片的实际大小(b);本实验制作 3D 纸芯片所用的设备:便携式设备、回形针、纸芯片(c)
Fig. 1 Paper chip model drawn by computer software Adobe illustrator(a); The actual size of the experimental paper chip(b); This experiment apparatus used in 3 d paper chip making: portable equipment, clips, paper chips(c)

1.3 样品测定

1.3.1 BSA 检测 称取 0.034 g BSA 溶于 5 mL 水中,配制浓度为 100 μmol/L 的溶液。稀释成(5, 10, 20, 30, 50 μmol/L)待用。在未页纸芯片上分别滴加 3 μL 250 μmol/L 的柠檬酸缓冲溶液(pH 1.8)和 3 μmol/L 的 TBPB(溶于 95% 乙醇),室温干燥 10 min。分别移取不同浓度的 BSA 到 3D 纸芯片上,反应 2 min 后检测,记录信号强度。仪器工作原理请参阅相关文章^[29]。

1.3.2 Fe²⁺ 检测 将 1.36 g 三水乙酸钠和 22.4 mL 冰乙酸溶于 100 mL 蒸馏水中,配制 6 mol/L 的乙酸盐缓冲溶液(pH 4.4),作溶剂制备 0.1 mol/L 1,10-菲罗啉和 0.1 mol/L 盐酸羟氨溶液。称取 0.238 g FeCl₂ · 3H₂O 溶于 10 mL 蒸馏水制备 Fe²⁺ 样品溶液。实验时,分别移取 3 μL 1,10-菲罗啉溶液和盐酸羟氨溶液滴加到未页纸芯片上,室温干燥 10 min,移取 60 μL Fe²⁺ 的样品溶液滴到纸芯片上,反应 2 min 后用仪器进行检测。

2 结果与讨论

2.1 回形针及纸芯片的性能考察

用食品级水溶性染料进行验证,确保方法重现性及相邻层纸之间能很好地接触。

2.1.1 方法重现性考察 每张纸芯片的尺寸为 5 cm × 5 cm,回形针彼此间隔为 1 cm(如图 2a 左图)。选择同一通道的纸芯片,在首层上滴加黄色染料溶液,在 10 个不同的纸芯片上对其相同位置的所有的信号值进行测定,如图 2(b) 所示。平均值为 1046, RSD = 1.1%。各检测点之间的信号值

大致相等,强度无明显差异,说明回形针与回形针之间并无明显差异,具有较好的固定效果。

为保证此方法在不同芯片之间具有较好的重现性,本研究选择纸芯片一条斜线上的 4 个点,分别为(a, b, c, d)作为检测点,对其信号强度进行测定(n = 10),如图 2(a) 红线圈出部分。如下图 2(c) 所示。平均值分别为: 1040.7, 1037.3, 1015.1, 1020.3, RSD 分别为 0.72%, 1.7%, 1.3%, 1.3%(n = 10)。结果表明,回形针固定的芯片与芯片之间具有很好的重现性,说明回形针方法的普适性。

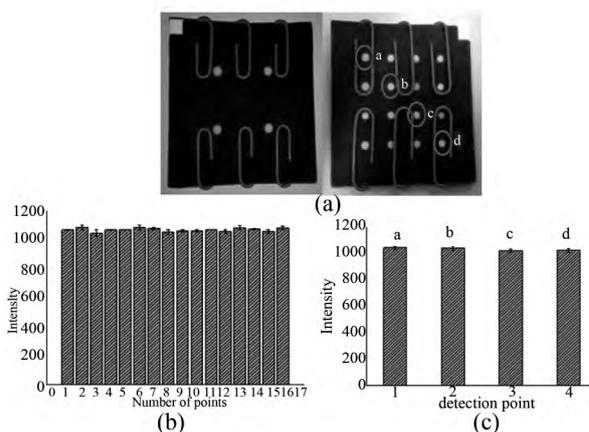


图 2 实际纸芯片尺寸:(5 cm × 5 cm) 左为芯片正面图,右为同一芯片背面示意图(a);同一纸芯片底层 16 个检测点的信号值(b);10 次实验不同芯片上 a, b, c, d 对应的信号(n = 10)(c)

Fig. 2 The actual size of paper chip: (5 cm x 5 cm) the top diagram for the left, the bottom diagram for the same chip for the right(a); The signal value of 16 testing point in one bottom chip(b); The corresponding signal value of a, b, c, d (n = 10) on different chips by ten times(c)

2.1.2 不同纸芯片设计性能考察 实验设计了 3 种不同形式的液体流动通道,如图 3 所示。在首层纸芯片的加样区上滴加 4 种不同颜色的染料,如图 3(a) 所示。

首先,设计了有 16 个实验点的纸芯片,如图 3(b) 所示。为了进一步说明该方法能用于更高通量芯片的制作,设计了含有 64 个检测点的纸芯片,如图 3(c) 所示。依据不同测定对象有可能需要更复杂通路的需求,将设计改为 7 层,检测点为 64 个(如图 3(d) 所示),都得到了较好的结果,实验数据如表 1 所示。

从表 1 可以看出,随着芯片层数增加,通道长度相应增加,从而导致样品消耗量增加和时间的延长。当纸芯片层数继续增加至 9 层以上时(数据未

显示) 样品最终到达时间已经在 20 min 以上,分散效果也不甚理想,因而实验也未选用这样的结构。

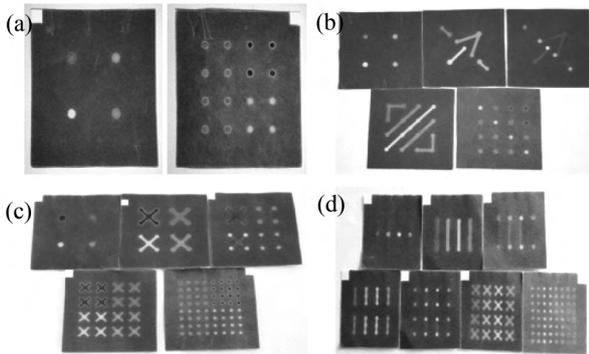


图 3 纸芯片: 回形针固定的纸芯片的正、反两面 (a); (b ~ d): 不同通道的纸芯片: 含有 16 个检测点的 5 层 3d 结构纸芯片 (b); 64 个检测点的 5 层结构纸芯片 (c); 64 个检测点的 7 层纸芯片 (d)

Fig. 3 Paper chips: The top and bottom diagrams of paper clips fabricated by paper chips (a); (b, d) Paper chips with different channels: the 3 d paper chips with 16 testing points in 5 layers (b); the 3 d paper chips with 64 testing points in 5 layers (c); the 3 d paper chips with 64 testing points in 7 layers (d)

表 1 4 种纸芯片实验结果

纸芯片	检测点个数/个	层数/层	溶液体积 V/ μ L	实验耗时 t/min
a	16	3	20	1.5
b	16	5	40	2
c	64	5	40	2.5
d	64	7	60	3

表 2 回形针固定法与其他制作方法的区别

	设计难易	对准难易	速度	操作技能	层叠方式	文献
双面胶粘贴法	一般	困难	慢	高	单张	27
折纸法	复杂	简单	中	中	多张	28
订书机装订法	简单	一般	快	中	单张	29
喷胶法	一般	较难	慢	高	单张	30
回形针固定法	简单	简单	快	低	单张	本文

3 结论

本工作利用回形针将纸芯片叠加固定,可以方便、快速、低成本的制备多层的三维纸芯片,同时以 BSA 和 Fe(II) 为对象,利用自主研发的比色检测装置,可以实现定量快速检测,具有很好的线性和重现性,证明回形针固定法是一种制作检测三维纸

2.2 实际样品测定

2.2.1 BSA 测定 随着 BSA 浓度增加,检测区域颜色逐渐加深。比色信号强度与 BSA 浓度在一定范围内呈线性关系,线性回归方程为: $y = 1.256c + 1043$, $R^2 = 0.994$ ($n = 4$) 线性范围为 5 ~ 50 μ mol/L。由图中可以看出,随着样品中 BSA 含量的增加,被检测到的光信号强度逐渐增加,当 BSA 的浓度为 5 μ mol/L 时,仍可以较好地检测 BSA。多次实验分析表明,回形针固定法在一定范围内可定量检测 BSA 的浓度,即所设计的纸芯片通道及回形针方法适于 BSA 检测,所用时间较短,能实现快速即时检测。

2.2.2 测定 Fe(II) 在 pH 3 ~ 9 之间时,Fe(II) 会与 1,10-菲罗啉反应产生橘红色络合物 $[Fe(phen)_3]^{2+}$ 此类络合物在 pH 3 ~ 4.5 时是非常稳定的。因此 Fe(II) 的浓度可用 1,10-菲罗啉来检测。测定 5 种不同浓度的 Fe(II) 的样品,将 Fe(II) 的体积定为 3 μ L,随 Fe(II) 浓度的增加,检测区域的颜色逐渐加深。在一定范围内,信号强度与 Fe(II) 的浓度呈线性相关。被检测到的光信号强度随 Fe(II) 浓度增加而增加,如图 4(b) 所示,当浓度在 0.6 ~ 12 μ mol/L 之间时,可以很好地对 Fe(II) 进行检测。线性回归方程为 $y = 145.85c + 688.29$, $R^2 = 0.992$ ($n = 4$)。

2.3 回形针固定法与其他方法比较

将回形针固定法与其他方法进行了比较,结果如表 2 所示。可以看出,回形针固定法对于技术人员的要求相对较低,对准也相对简单,并且制作速度快,可以很好地满足高通量下快速即时检测的需求。

芯片较为好用的方法。与以往的三维纸芯片制作相比,此法无需繁琐的对齐步骤,利用回形针可以比普通的夹子更加灵活和节省空间,对于技术人员的要求相对较低,操作简单、灵活,能够得到较好的实验结果,并可实现现场的快速即时检测,在环境监测、食品安全等领域显示了很大的潜力。

参考文献

- [1] 田恬,黄艺顺,林冰倩,等. 分析测试学报, 2015, 34(3): 257
- [2] Derda R, Laromaine A, Mammoto A, *et al.* P Natl Acad Sci USA, 2009, 106(44): 18457
- [3] Li X, Tian J, Shen W. Anal Bioanal Chem, 2010, 396(1): 495
- [4] Martinez A W, Phillips S T, Wiley B J, *et al.* Lab on a Chip, 2008, 8(12): 2146
- [5] Klasner S A, Price A K, Hoeman K W, *et al.* Anal Bioanal Chem, 2010, 397(5): 1821
- [6] Dungchai W, Chailapakul O, Henry C S. Analyst, 2011, 136(1): 77
- [7] 蒋艳,马翠翠,胡贤巧,等. 化学进展, 2014, 26(1): 167
- [8] Nie J, Liang Y, Zhang Y, *et al.* Analyst, 2013, 138(2): 671
- [9] Nie Z, Nijhuis C A, Gong J, *et al.* Lab on a Chip, 2010, 10(4): 477
- [10] Olkkonen J, Lehtinen K, Erho T, *et al.* Anal Chem, 2010, 82(24): 10246
- [11] 李博伟,陈令新. 分析测试学报, 2015, 34(3): 302
- [12] David M. Cate, Jaclyn A. Adkins, Jaruan Mettakoonpitak, *et al.* Anal Chem, 2015, 87: 19
- [13] 付舰航,刘威. 分析实验室, 2014, 33(11): 1345
- [14] Maattanen A, Fors D, Wang S, *et al.* Sens Actuators B, 2011, 160(1): 1404
- [15] 张慧妍,张珍,吉邢虎,等. 分析化学, 2014, 42(9): 1276
- [16] Yu J, Wang S, Ge L, *et al.* Biosens Bioelectron, 2011, 26(7): 3284
- [17] Ho J, Tan M K, Go D B, *et al.* Anal Chem, 2011, 83(9): 3260
- [18] Li B, Zhang W, Chen L, *et al.* Electrophoresis, 2013, 34(15): 2162
- [19] 王伟鑫,刘未平,吴斌,等. 分析化学, 2015, 43(5): 637
- [20] Vella S J, Beattie P, Cademartiri R, *et al.* Anal Chem, 2012, 84(6): 2883
- [21] Chen Z, Zhang Z, Qu C, *et al.* Analyst, 2012, 137(22): 5197
- [22] Liana D D, Raguse B, Gooding J J, *et al.* Sensors, 2012, 12(9): 11505
- [23] Martinez A W, Phillips S T, Whitesides G M, *et al.* Anal Chem, 2010, 82(1): 3
- [24] Martinez A W, Phillips S T, Whitesides G M. P Natl Acad Sci USA, 2008, 105(50): 19606
- [25] Liu H, Crooks R M. J Am Chem Soc, 2011, 133(44): 17564
- [26] Liu Hong, Xiang Yu, Lu Yi, *et al.* Angew Chemie Int Edit, 2012, 51(28): 6925
- [27] Lewis G G, DiTucci M J, Baker M S, *et al.* Lab on a Chip, 2012, 12(15): 2630
- [28] Xiao L, Liu X, Zhong R, *et al.* Electrophoresis, 2013, 34(20-21): 3003
- [29] Li B, Fu L, Zhang W, *et al.* Electrophoresis, 2014, 35(8): 1152

A new method of fabricating three dimensional (3D) paper-based microfluidics chip by clips

YU Li-juan¹, HE Zhi-wei¹, WEI Meng-qi², FU Long-wen², LI Bo-wei^{*2}, CHEN Ling-xin² and ZHANG Pei-qing^{*1}

(1. Yantai University, Department of Chemistry and Chemical Engineering, Yantai 264000; 2. Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remedation, Shandong Provincial Key Laboratory of Coastal Environmental Processes, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003), Fenxi Shiyanshi 2016, 35(5): 611 ~ 614

Abstract: Paper-based microfluidic chips is a new type of testing device, which can realize rapid detection and analysis of multi-samples. This paper proposes a new method to fabricate 3D microfluidic chips by a paper clip. The method is simple and cost-effective, and can be used to different kinds of paper-based microfluidic devices. Using our home-built colorimetric detection device, this approach can be successfully applied to fast quantitative detection of bovine serum albumin and ferrous iron. The linear range of bovine serum albumin is 5 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$, and the detection limit is 0.13 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 = 0.994$). The linear range of ferrous iron is 0.6 ~ 12 $\mu\text{mol/L}$, and the detection limit is 0.15 $\mu\text{mol/L}$, ($R^2 = 0.992$). In a specified range, the two species both have excellent linear relationship, highlighting the possibility that the 3D paper-based microfluidic chips fabricated by clips can be used to detect bovine serum albumin and ferrous iron.

Keywords: Microfluidic; Paper-based devices; Clip; Three dimensional; Bovine serum albumin; Ferrous iron