

微生物聚焦的微流控芯片研究

袁宇鹏^{1,2,3}, 蒋卓雅^{1,4}, 李顺波⁴, 龙帅¹, 李小飞^{1,2,3}

(1. 中电科芯片技术(集团)有限公司, 重庆 401332; 2. 国知创芯(重庆)科技有限公司, 重庆 401332;

3. 中国电子科技集团公司第二十六研究所, 重庆 400060; 4. 重庆大学 光电工程学院, 重庆 401331)

摘要:针对流式细胞仪中聚焦细菌、酵母菌等小直径微生物困难的问题,开展微生物聚焦的微流控芯片研究。在传统直通道的基础上设计新型方形通道,建立方形通道微流控芯片的有限元模型,通过流体与运动轨迹的有限元仿真实现对通道宽度、长度等结构参数的优化设计。通道宽度为 20 μm 、单位长度为 80 μm 时,粒子仿真运动范围为通道的 63%。提出了基于硅基衬底的微流控芯片制备方法,制备出方形通道微流控芯片实物。搭建了流式细胞仪原理样机,对方形通道微流控芯片进行了验证实验。实验结果表明,通道总长度约为 2.16 cm,酵母菌实际运动范围为 70%,表明微流控芯片可达到聚焦酵母菌的设计要求。

关键词:微流控芯片; 聚焦; 方形通道; 粒子轨迹仿真

中图分类号: TN371 **文献标识码:** A

Research on Microfluidic Chips for Particle Focusing

YUAN Yupeng^{1,2,3}, JIANG Zhuoya^{1,4}, LI Shunbo⁴, LONG Shuai¹, LI Xiaofei^{1,2,3}

(1. CETC Chips Technology Group Co., Ltd., Chongqing 401332, China;

2. NIICAS(Chongqing) Technology Co., Ltd., Chongqing 401332, China;

3. The 26th Institute of China Electronics Technology Group Corporation, Chongqing 400060, China;

4. College of Optoelectronics, Chongqing University, Chongqing 401331, China)

Abstract: To address the challenge of focusing small-diameter microorganisms, such as bacteria and yeast, in flow cytometry, we conducted a study on microfluidic chips for microorganism focusing. A novel square channel was developed based on traditional straight-channel designs. A finite element model of the square-channel microfluidic chip was established to enable the optimization of structural parameters, including the channel width and length, through finite element simulations of fluid flow and particle trajectories. The simulation showed that when the channel width was 20 μm , and the unit length was 80 μm , particles were focused within 63% of the channel. A silicon-based substrate was used to fabricate the square-channel microfluidic chip, and a prototype flow cytometer was constructed to test it. The experimental results indicate that with a total channel length of approximately 2.16 cm, the actual focusing range for yeast cells reached 70%, thus satisfying the design requirements for yeast focusing.

Key words: microfluidic chip; focus; square channel; particle trajectory simulation

0 引言

连续可靠地聚焦微生物,例如细胞、细菌、亚细胞器,在流式细胞仪中是必须的。流式细胞仪常用聚焦方法为鞘液聚焦,但成本高。微流控芯片因具有易操作、成本低和尺寸小型化^[1]等优点而获得广泛关注。在常见的介电泳(DEP)^[2]、声学^[3]、确定性侧向位移(DLD)^[4]和惯性微流控^[5]等方法中,惯性微流控仅依赖于通道几何形状,具有高通量、简单、

操作精确和成本低等优点^[6]。

惯性聚焦装置已被应用于精确操作细胞大小的细胞悬浮液。白汉洁等^[7]开发了一种微结构辅助的超低高宽比螺旋微通道聚焦,实现了粒径分别为 $\varnothing 7.3 \mu\text{m}$ 和 $\varnothing 15.5 \mu\text{m}$ 的荧光粒子聚焦。陈亚伟等^[8]设计了低宽高比的非对称蛇形流道聚焦 H1299 人非小细胞肺癌细胞。Cha 等^[9]在通道嵌入非对称凹微障碍物聚焦于脑癌细胞(U87MG)与白细胞(WBCs)的分离。

收稿日期:2024-08-18

基金项目:新重庆青年创新人才项目(CSTB2024NSCQ-QCXMX0096)

作者简介:袁宇鹏(1989-),男,湖南省新化县人,博士。

然而,使用当前的惯性微流体方法分离较小的微米级生物颗粒具有挑战性。因为较小的颗粒需要更长的惯性聚焦通道,这增加了压力要求和设备的占地面积。致泻大肠埃希氏菌、非伤寒沙门菌等小直径微生物属于致病菌,危害人体健康^[10],而细菌性食源性疾病会导致腹泻、头痛甚至危及生命^[11],因此,检测细菌、酵母菌等小直径微生物是有必要的。

针对聚焦小直径微生物困难的问题,在直通道的基礎上引入弯曲通道的二次流,设计方形通道,仿真方形通道的宽度、长度等参数,以达到聚焦常见细菌和真菌的目的。

1 工作原理

微粒在通道中受到剪切梯度升力和壁面诱导升力作用。剪切梯度升力^[12]为

$$F_{LS} = \frac{\rho_f U_m^2 a^2}{D_h} f_{sl}(R_c, x_c) \quad (1)$$

式中: ρ_f 为流体密度; U_m 为流体最大流速; a 为粒子直径; $D_h = \frac{2wh}{w+h}$ 为水力直径, w 为通道宽度, h 为通道高度。

壁面诱导升力^[13]为

$$F_{WA} = \frac{\rho_f U_m^2 a^6}{D_h^2} f_{wl}(R_c, x_c) \quad (2)$$

净升力^[14]为

$$F_1 = \frac{\rho_f U_m^2 a^4}{D_h^2} f_L(R_c, x_c) \quad (3)$$

式中 $f_L(R_c, x_c)$ 为升力系数,约为0.5。在升力和流体曳力($F_{stokes} = 3\pi\mu a U_p$)的作用下,微粒缓慢移动到通道中心的两个平衡位置, U_p 为粒子横向迁移速度。Di Carlo 计算了所需直通道最小理论长度^[14]为

$$L_{min} \approx \frac{D_h}{2U_L} * U_m = \frac{3\pi\mu D_h^3}{\rho_f U_m a^3} \quad (4)$$

直通道内微粒横向迁移缓慢,弯曲通道的引入可以通过增加横向迁移的速度增强横向迁移的效果,从而减小通道长度和整体装置尺寸^[15]。

弯曲通道的中间流体流速最快,受到沿轴向方向向外的离心力最大,因此,流体从管道中心流向管道外侧。而靠近壁面的流体流速慢,受到的离心力小。因为整个通道内的流体的质量守恒,靠近壁

面的流体受到中间流体的挤压,向垂直于流体流动方向流动。在垂直于流体流动方向上产生了一对对称且反向的涡流,分别位于通道横截面的上部和下部,被称为迪恩(Dean)涡流^[16]。表征含有迪恩流的强弱:

$$De = Re_c \delta^{1/2} \quad (5)$$

式中: $\delta = D_h/2r$ 为曲率^[17]; $Re_c = \rho_f U_m D_h/\mu$ 为通道雷诺数^[18]。迪恩涡流对微粒施加迪恩力 F_D ,其大小与二次流速度平方成正比^[19]:

$$F_D \approx \frac{\rho_f U_m^2 a D_h^2}{2r} \quad (6)$$

使用 a/D_h 描述惯性力和迪恩力的关系。实验数据和理论计算表明, $a/D_h > 0.07$ 时,粒子产生了有效聚焦现象^[20-21]。大于通道高度27%的颗粒将获得向外速度,有效抑制二次流的混合效应,有利于粒子聚焦^[22-23],小直径颗粒则难以聚焦。

2 微流控芯片设计

设计的微流控通道由直通道、弯曲通道和扩张通道三部分组成。流体从左边入口流入,从右边出口流出,如图1所示。直通道入口的微粒均匀分布,微粒在直通道受到惯性力,并在其作用下横向迁移到平衡位置。经过直通道后微粒分布在通道中央。为加强聚焦效果,引入弯曲通道。本文采用了方形通道和收缩-扩张通道。在方形通道,微粒受到惯性力和迪恩力作用,经过方形通道后小球更加集中地分布在通道中央。小球进入扩张通道后仍然遵循方形通道的运动方向和位置,表现为粒子聚焦。

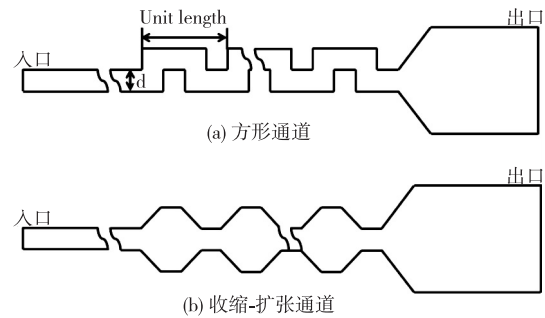


图1 微流控通道

通道设计主要考虑通道长度和通道横截面尺寸。通路过短会导致微粒无法聚焦到平衡位置,而通道过长则会增加芯片尺寸。根据最小聚焦长度公式 L_{min} ,计算得到最小通道长度为1.3 cm。观察

时管道会挤压显微镜目镜,为了方便观察,直通道至少长 2 cm。在 COMSOL 仿真软件观察两种通道粒子聚焦效果。

其次考虑通道横截面尺寸。在矩形通道中粒子聚焦需要满足 $a/D_h > 0.07$ 。大肠杆菌成杆状,长约 $2 \mu\text{m}$ 。酵母菌直径约为 $\varnothing 7 \mu\text{m}$ 。为了有较好的聚焦效果,设置通道高度为 $20 \mu\text{m}$,通道宽度为 $10 \sim 30 \mu\text{m}$ 。

3 实验分析

3.1 流体仿真

首先仿真流体流速状况。通道雷诺数 Re_c 计算为 14,采用层流模型进行稳态仿真,流体运动采用纳维-斯托克斯(Navier-Stokes)方程描述。通道入口初始流速为 0.0007 m/s ,当通道高 $20 \mu\text{m}$ 时,流速为 $1 \mu\text{L/h}$ 。在该流速下,微粒可以无拖影地通过微流控芯片,便于显微镜观察和计数。出口的压力条件设置为 0,壁条件设置为无滑移,网格设置为粗化。通道出口流速状态如图 2 所示。由图可见,流体在流场中分布呈抛物线形,微通道中心处流速最大,通道两侧处流速最小,接近 0。在扩张通道处,通道变宽,通道中心流速比窄通道中心流速低。

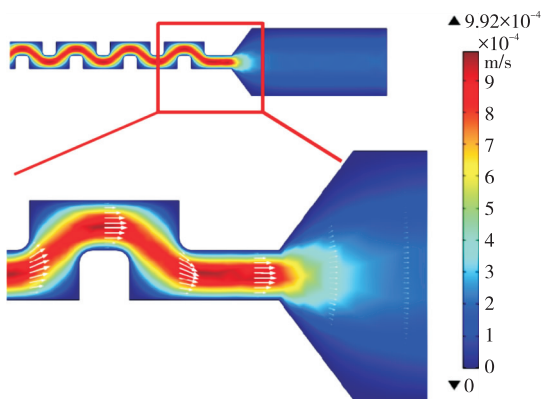


图 2 通道出口流速分布情况

3.2 芯片微粒运动轨迹仿真分析

在流速仿真的基础上仿真芯片内微粒轨迹。将直径分别为 $\varnothing 2 \mu\text{m}$ 和 $\varnothing 5 \mu\text{m}$ 的小球从入口处均匀通入微通道,微粒密度均为 1050 kg/m^3 。微粒在通道内受到曳力和升力作用。曳力遵循斯托克斯定律,升力由壁诱发。网格设置为粗化。直通道入口、方形通道入口和扩张通道入口的粒子分布情况如图 3 所示。直通道入口的微粒均匀分布,微粒在直通道受惯

性力的作用横向迁移到平衡位置,经过直通道后微粒分布在通道中央。微粒在方形通道受到惯性力和迪恩力作用,经过方形通道后小球更加集中地分布在通道中央。小球进入扩张通道后仍然遵循方形通道的运动方向和位置,表现为聚焦。

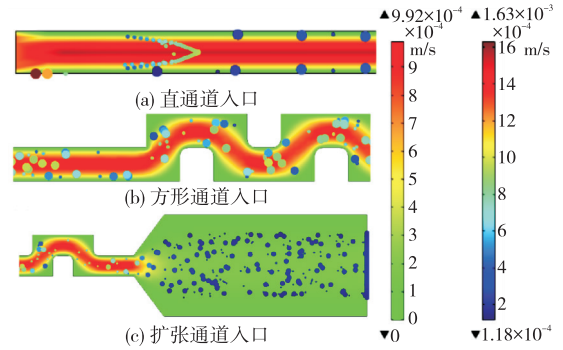


图 3 粒子分布情况

为表示上述通道对微粒的聚焦效果,仿真只有直通道和收缩-扩张通道的微通道粒子分布情况,如图 4 所示。没有方形通道的通道长度与有方形通道的通道长度相同,以消除通道长度对聚焦的影响。没有方形通道的微粒宽度大于有方形通道的微粒宽度,表示方形通道进一步聚焦微粒。这是因为在直通道内,微粒受到惯性力作用仅会横向迁移到平衡位置。用同样的方法比较收缩-扩张通道的微通道粒子分布情况。收缩-扩张通道的微粒宽度大于方形通道的微粒宽度。方形通道的聚焦效果优于收缩-扩张通道。不同形状通道里粒子运动范围随时间变化的仿真结果如图 5 所示。由图 5 可见,随着时间变化,方形通道的聚焦效果最好,故选择方形通道聚焦微粒。

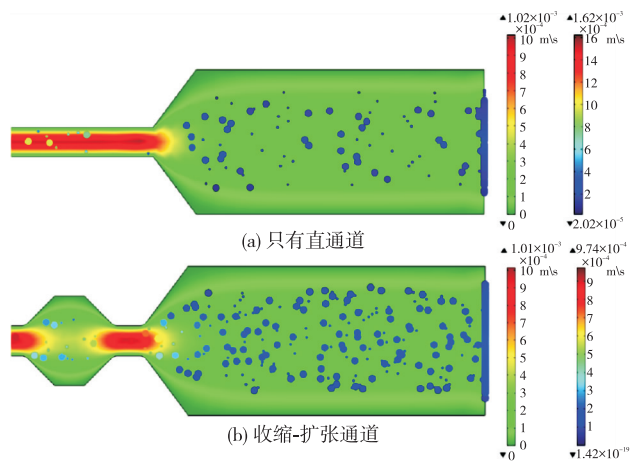


图 4 粒子分布情况

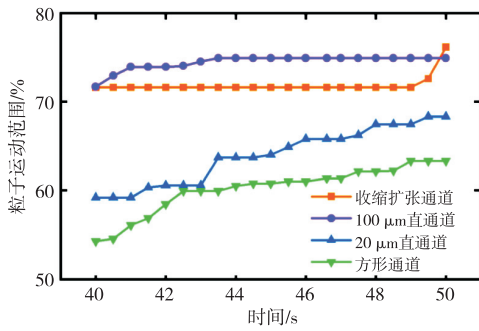


图5 不同形状通道的微粒聚焦效果

接下来仿真方形通道宽度、长度等因素对粒子聚焦的影响。仿真不同宽度方形通道的微粒聚焦效果。方形通道中弯曲通道的宽度分别取 10、15、20、25 和 30 μm 。结果如图 6 所示,由图可见,随着时间的变化,弯曲通道宽度越小,粒子聚焦效果越好。当宽度为 10、15、20、25 和 30 μm 时, a/D_h 分别为 0.15、0.12、0.1、0.09 和 0.08。宽度越小,聚焦效果越好,仿真与计算结果一致。当宽度为 10、15、20、25 和 30 μm 时,流量分别为 0.5、0.75、1、1.25 和 1.5 $\mu\text{L/h}$,宽度越小,流量越小,检测的样本量也小。因此,宽度被设计为 20 μm 。

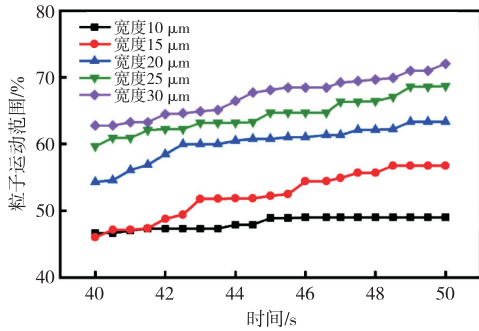


图6 不同宽度方形通道的微粒聚焦效果

仿真不同长度方形通道的微粒聚焦效果。方形通道中弯曲通道的长度分别取 17、22 和 27 个单位长度。方形通道长度分别为 0.136、0.176 和 0.216 cm,通道总长度分别为 2.159、2.199 和 2.239 cm。结果如图 7 所示。

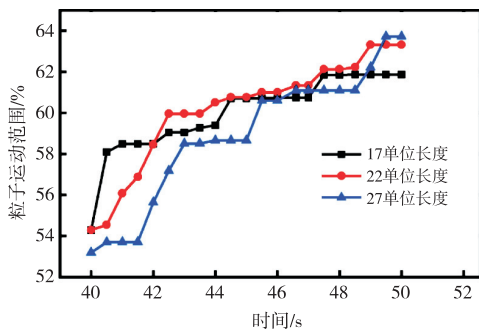


图7 不同长度方形通道的微粒聚焦效果

由图 7 可见,随着时间的变化,弯曲通道长度对粒子聚焦效果影响有限,长度为 17 个单位长度时,粒子运动范围最小。因此,弯曲通道长度取 17 个单位长度。

仿真不同单位长度方形通道的微粒聚焦效果。不同的单位长度表示不同的通道曲率,当曲率半径减小而雷诺数增大时,Dean 数增大,从而可获得更强的二次流。方形通道中弯曲通道的单位长度分别取 80、120 和 160 μm ,通道总长度均为 2.159 cm,结果如图 8 所示,由图可见,随着时间的变化,弯曲通道单位长度对粒子聚焦效果影响有限,单位长度为 80 μm 时,粒子运动范围最小。因此,单位长度取 80 μm 。

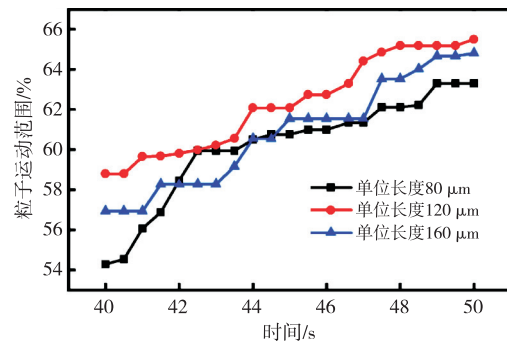


图8 不同单位长度方形通道的微粒聚焦效果

3.3 芯片制备与应用验证

微流控芯片的结构设计完成后,在 CAD 上绘制完整的图形。根据 CAD 文件制作玻璃基底铬结构掩膜版。随后将掩膜版上的结构光刻在硅片上,再通过软光刻工艺制备微流控芯片。图 9 为工艺流程图,制得的微流控芯片如图 10(a)所示。

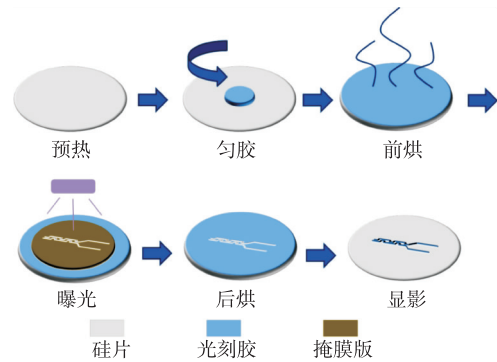


图9 工艺流程图

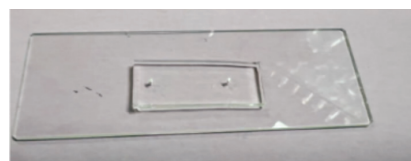


图10 微流控芯片实物

为验证方形通道和收缩-扩张通道对小球的实际聚焦效果,在方形通道和收缩-扩张通道中持续通入直径为 $\varnothing 7 \mu\text{m}$ 荧光聚苯乙烯小球 5 min。整体装置如图 11 所示。

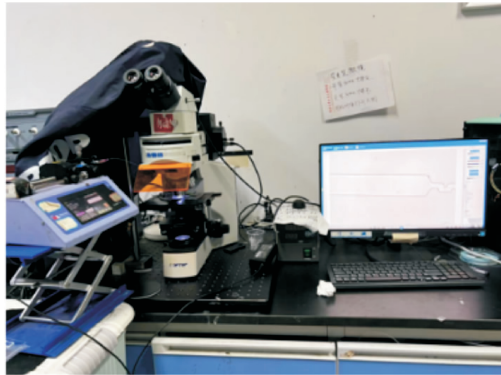


图 11 装置图

用荧光显微镜观察图像,将图片逐帧叠加。小球聚焦效果如图 12 所示。粒子运动范围约占总通道的 53%和 65%。与仿真结果 63%和 74%相比,实际运动范围有所减小,聚焦效果较理想。

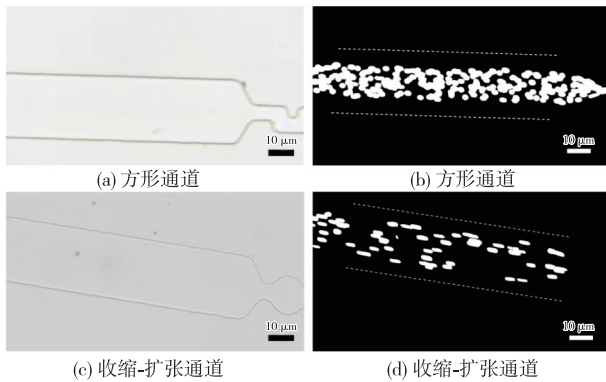


图 12 $7 \mu\text{m}$ 荧光聚苯乙烯小球聚焦效果

在方形通道和收缩-扩张通道中持续通入直径为 $\varnothing 2 \mu\text{m}$ 的荧光聚苯乙烯小球 5 min,粒子运动范围约占总通道的 68%和 91%,结果如图 13(a)-(b)所示。与仿真结果 63%和 74%相比,实际运动范围基本一致。与 $\varnothing 7 \mu\text{m}$ 小球相比,运动范围变大,说明小直径物体聚焦难度大。

为验证芯片对于聚焦微生物的效果,在方形通道和收缩-扩张通道中持续通入直径约为 $\varnothing 7 \mu\text{m}$ 的酵母菌 5 min,粒子运动范围约占总通道 70%和 90%,结果如图 13(c)-(d)所示。酵母菌实际运动范围略大于仿真结果和 $\varnothing 7 \mu\text{m}$ 荧光聚苯乙烯小球的运动范围,可能是由于酵母菌实际直径在 $\varnothing 7 \mu\text{m}$ 上下浮动,导致酵母菌受力大小不一,平衡位置不同。

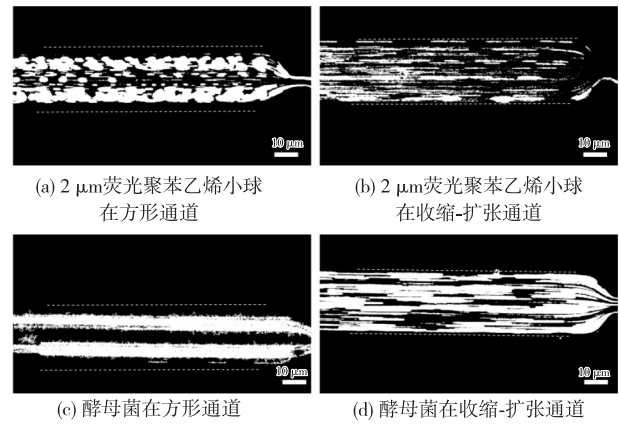


图 13 两种微粒聚焦效果

4 结束语

基于流体运动机理,本文在直通道的的基础上引入方形通道,进行了长度和高度的理论计算,同时利用有限元仿真软件对方形通道的宽度、长度进行输出对比。在通道宽度为 $20 \mu\text{m}$,单位长度取 $80 \mu\text{m}$,通道总长度为 2.16 cm 时,粒子仿真运动范围为通道的 63%,酵母菌实际运动范围为 70%。结果表明,微流控芯片可有效聚焦酵母菌,达到设计要求。

参考文献:

- [1] 王保成,付相庭,章安良. 基于声表面波微通道内微液滴选择性输运研究[J]. 压电与声光, 2016, 38(4): 639-642.
WANG Baocheng, FU Xiangting, ZHANG Anliang. Selective transportation of a droplet in microchannels based on surface acoustic wave[J]. Piezoelectrics & Acousto-optics, 2016, 38(4): 639-642.
- [2] BU Yang, WANG Jinhui, NI Sheng, et al. Continuous-flow label-free size fractionation of extracellular vesicles through electrothermal fluid rolls and dielectrophoresis synergistically integrated in a microfluidic device[J]. Lab on a Chip, 2023, 23(10): 2421-2433.
- [3] 顾建祖,王侃,骆英,等. 基于超声导波的粘性流体中粒子分离初步研究[J]. 压电与声光, 2014, 36(2): 178-181.
GU Jianzu, WANG Kan, LUO Ying, et al. Preliminary study on particles separation in viscous fluid based on ultrasonic wave guide[J]. Piezoelectrics & Acousto-optics, 2014, 36(2): 178-181.
- [4] TOTTORI N, NISISAKO T. Particle/cell separation using sheath-free deterministic lateral displacement arrays with inertially focused single straight input[J].

- Lab on a Chip, 2020, 20(11): 1999-2008.
- [5] LI Mengnan, GE Chuang, YANG Yuping, et al. Direct separation and enumeration of CTCs in viscous blood based on co-flow microchannel with tunable shear rate: a proof-of-principle study[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2022, 414(26): 7683-7694.
- [6] ZHANG Jun, YAN Sheng, YUAN Dan, et al. Fundamentals and applications of inertial microfluidics: a review[J]. Lab on a Chip, 2016, 16(1): 10-34.
- [7] 白汉洁, 林智慧, 郭时超, 等. 螺旋通道中稳定增强的二次流构建及其粒子聚焦研究[J]. 分析化学, 2024, 52(4): 504-512.
- BAI Hanjie, LIN Zhihui, GUO Shichao, et al. Spiral microfluidic for particle focusing by stabilization and acceleration of secondary flow[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2024, 52(4): 504-512.
- [8] 陈亚伟, 张鑫杰, 朱行杰, 等. 蛇形流道中微粒惯性聚焦及细胞操控技术[J]. 微纳电子技术, 2023, 60(12): 2028-2034.
- CHEN Yawei, ZHANG Xinjie, ZHU Hangjie, et al. Particle inertial focusing and cell manipulation technology in serpentine channel [J]. Micronanoelectronic Technology, 2023, 60(12): 2028-2034.
- [9] CHA Haotian, DAI Yuchen, HANSEN H H W B, et al. Asymmetrical obstacles enable unilateral inertial focusing and separation in sinusoidal microchannel[J]. Cyborg and Bionic Systems, 2023, 4: 0036.
- [10] 袁文新, 石立莉. 家庭中常见的食源性疾病预防措施[J]. 家庭生活指南, 2023(7): 27-28.
- YUAN Wenxin, SHI Lili. Common food-borne diseases in families and preventive measures[J]. Family Life Guide, 2023(7): 27-28.
- [11] 国家市场监督管理总局. GB 29921-2021 食品安全国家标准 食品中致病菌限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
- [12] ASMOLOV E S. The inertial lift on a spherical particle in a plane Poiseuille flow at large channel Reynolds number[J]. Journal of Fluid Mechanics, 1999, 381(1): 63-87.
- [13] ZENG Lanying, BALACHANDAR S, FISCHER P. Wall-induced forces on a rigid sphere at finite Reynolds number[J]. Journal of Fluid Mechanics, 2005, 536: 1-25.
- [14] DI CARLO D. Inertial microfluidics [J]. Lab on a Chip, 2009, 9(21): 3038.
- [15] BHAGAT A A S, KUNTAEGOWDANAHALLI S S, PAPAUTSKY I. Enhanced particle filtration in straight microchannels using shear-modulated inertial migration[J]. Physics of Fluids, 2008, 20(10): 101702.
- [16] 高贤, 于成壮, 魏春阳, 等. 惯性微流体的应用与发展[J]. 传感器与微系统, 2019, 38(3): 1-6.
- GAO Xian, YU Chengzhuang, WEI Chunyang, et al. Application and development of inertial microfluids [J]. Transducer and Microsystem Technologies, 2019, 38(3): 1-6.
- [17] MARTEL J M, TONER M. Particle focusing in curved microfluidic channels [J]. Scientific Reports, 2013, 3: 3340.
- [18] SQUIRES T M, QUAKE S R. Microfluidics; Fluid physics at the nanoliter scale[J]. Reviews of Modern Physics, 2005, 77(3): 977-1026.
- [19] GOSSETT D R, DI CARLO D. Particle focusing mechanisms in curving confined flows[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(20): 8459-8465.
- [20] BHAGAT A A S, KUNTAEGOWDANAHALLI S S, PAPAUTSKY I. Enhanced particle filtration in straight microchannels using shear-modulated inertial migration[J]. Physics of Fluids, 2008, 20(10): 101702.
- [21] DI CARLO D, IRIMIA D, TOMPKINS R G, et al. Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(48): 18892-18897.
- [22] YOON D H, HA J B, BAHK Y K, et al. Size-selective separation of micro beads by utilizing secondary flow in a curved rectangular microchannel[J]. Lab on a Chip, 2009, 9(1): 87-90.
- [23] ZHANG Jun, LI Weihua, LI Ming, et al. Particle inertial focusing and its mechanism in a serpentine microchannel[J]. Microfluidics and Nanofluidics, 2014, 17(2): 305-316.