

声钳在微流控芯片中的发展和应用

李思哲 国世上 赵兴中

一、声钳的历史和现状

声钳技术指的是利用超声波在特定的容器或反应腔内对目标样品（生物粒子或细胞等）进行分离、捕获等操纵的技术。19世纪70年代康德特进行了他著名的软管实验。在这个实验中，软木塞屑在一个共振的空气圆柱中被声波推动，通过其排列的图形阐释了驻波的作用场。1982年迪恩用驻波场对纸浆中的纤维产生力的作用使其移向某一平面，然后用激光探测器估量纤维的大小。1990年吴用声钳捕获了乳胶颗粒和青蛙卵。声钳现象引发了科研工作者持久的关注，而将微流控芯片技术与声波结合更是一大新的热点。

那么，什么是微流控芯片技术呢？它是在微米级、纳米级结构中操控纳升(10^{-6}cm^3)至皮升(10^{-9}cm^3)体积流体的科学。自从20世纪90年代初由曼兹和维德姆首次提出基于微流控技术的微全分析系统（miniaturized total analysis systems, μTAS ）的概念以来，在短短的不到二十年中已发展为当前世界上最前沿的科技领域之一。它是一个融化学、物理、生命科学、微电子学、材料、计算机等于一体的高度学科交叉的领域，发展于分析化学，依托于机电加工，并且目前主要应用在化学和生命科学领域。当前微全分析系统发展的重点是微流控芯片，它以微管道网络——容纳流体的有效结构（通道、反应室和其他某些功能部件）至少在一个纬度上为微米级尺度——为结构特征，将从采样、样品预处理、反应、分离富集到检测的整个分析过程在集成的微芯片上完成，在极大减少样品和试剂用量的同时，使分析速度得到极大提高，实现分析系统的微型化、集成化和自动化，具有极为广泛的适用性及应用前景。在微流控芯片中，通过超声驻波对流动性生物颗粒实现空间控制和操作是当前众多科学家关注的焦点之一。

二、声钳技术的原理

声钳技术主要利用了驻波在反应腔内会对粒径不大于一个波长的颗粒产生声学力的作用这一原理。入射波（推进波）与反射波相互干扰而形成的

波形不再推进（仅波腹上、下振动，波节不移动）的波称驻波。驻波面随时间作周期性的升降，每隔半个波长就有一个波面升降幅度为最大的断面，称为波腹；当波面升降的幅度为零时的断面，称为波节。相邻两波节间的水平距离仍为半个波长，因此驻波的波面包含一系列的波腹和波节，腹节相间，波腹处的波面高低虽有周期性变化，但断面的水平位置是固定的，波节的位置也是固定的（图1）。这与行波的波峰、波谷沿水平方向移动的现象正好相反，驻波的形状不传播，故名驻波。当波面处于最高和最低位置时，质点的水平速度为零，波面的升降速度也为零；当波面处于水平位置时，速度的绝对值最大，波面的升降也最快，这是驻波运动独有的特性。

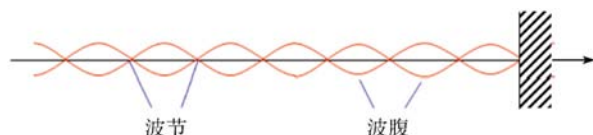


图1 驻波多个波节、波腹示意图

由以上分析可知，一旦在一个反应腔内形成驻波，除去少量能量损耗外，入射声波的大部分能量将转化为动能和势能，不断在波腹附近和波节附近间相互转换，能量交替传递，从而形成驻波最大的一个能量特点，即驻波的能量被“封闭”在相邻波节和波腹间的范围内，在此范围内有能量的反复流动，但能量不能越过波腹和波节传播，驻波没有单向的能量传输。

超声驻波既可以通过两个相反方向的声源产生，也可以通过在单个的超声传感器的对面装上一个声波反射器来产生。或者是设计一个宽度为半波长整数倍的谐振器，然后在任意一个节点对其机械地激活，随后对激励的频率进行调谐使之与共振腔体相匹配，这样一个驻波就形成了（图2）。这种操作的方式，称作伦德（Lund）方法，它是由瑞典大学劳雷尔（Laurell）课题组在一个连续流通体系进行细胞分离的研究中首次提出的。

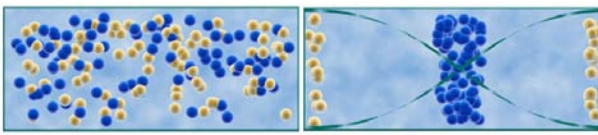


图2 声学特性不同的颗粒分别被捕获到波腹和波节处

有关驻波对微粒的作用机理的基本理论已经被金, Yosioka 和 Kawasima, Gorkov, 尼伯等详细的阐释。在驻波场里施加在微粒上的力由主声学力(简称 PRF)和次声学力 (Secondary acoustic forces) 两方面组成, 主声学力是驻波本身产生的, 次声学力则是源于被粒子散射的声波。其中主声学力是引起驻波场对悬浮粒子产生作用的主要原因。次声学力数量级比较小, 只有在微粒之间距离非常短的情况下, 也就是说微粒有着很高的密度时才会有影响。泰尔哈尔和雅德计算出作用在红细胞上的声学力, 主声学力是 $2 \times 10^{-12} \text{N}$, 而次声学力在细胞紧密接触时为 $2 \times 10^{-9} \text{N}$, 但如果细胞间距离相差 10 微米时, 次声学力将会骤减至 10^{-14}N 。

主声学力 主声学力可以被分解为轴向分力和横向分力(图3)。轴向分力是沿着声波传播的方向, 而且轴向分力要大于横向分力。

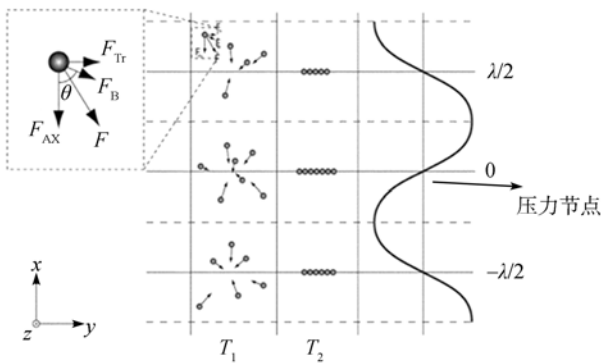


图3 声波力作用在微粒上。 F_{Ax} 是 PRF 的轴向分力, F_{Tr} 是 PRF 的横向分力, F_B 是微粒之间的内部力。在 T_1 时刻声波刚刚作用在微粒上, T_2 时刻已经达到一个稳定状态

轴向 PRF 移动微粒或细胞至驻波的波节或波腹处, 而横向的 PRF 将微粒聚拢在一起并且限制它们的位置。轴向 PRF 的方程(方程 1)给出声波力正比于声压振幅的平方 P_0^2 和微粒的体积 V_c :

$$F_r = - \left(\pi \frac{P_0^2 V_c \beta_w}{2\lambda} \right) \cdot \varphi(\beta, \rho) \cdot \sin(2kx), \quad (1)$$

$$\varphi(\beta, \rho) = \frac{5\rho_c - 2\rho_w}{2\rho_c + \rho_w} - \frac{\beta_c}{\beta_w}. \quad (2)$$

由于体积仅由半径的三次方决定, 所以作用声波力大小主要与微粒尺寸有关, 即一旦微粒直径减小, 声波力就会迅速减少。“声学对比因子”即方程(1)和方程(2)中的 φ , 则是由微粒密度 (ρ_c) 和它的可压缩性 (β_c) 共同决定, 同时也与微粒周围介质的相应性质 ($\rho_w \beta_w$) 有关。波数 K 定义为 $2\pi/\lambda$, x 是距离一个压力波节的距离。

关于“声学对比因子”, 一个最值得注意的方面是它随着密度和可压缩性的变化而有显著变化, 而这决定了声学力的方向, 从而决定了微粒将会移向波节还是波腹。总体来说, 固体微粒在水溶性介质中朝压力波节移动, 而气泡则会向压力波腹移动。就算微粒是悬浮在液体中, 只要它的可压缩性与周围介质不同一样会受到声场的作用。方程(1)中的压力振幅 P_0 与驱动压电陶瓷的电压大小成正比。

次声学力 当大量微粒均处于一个驻波场中时, 它们将不仅仅受到主声学力, 还将受到一个由其他微粒对声场的散射所产生的次声学力(也叫彼杰克利力)。次声学力的影响通常都是很小的, 只有当微粒间距非常小的时候才会有较显著的影响。当在聚合和沉积的过程中时, 次声学力就会变得很重要, 因为这种情况下微粒最初在 PRF 的作用下都是聚集在波节处的, 所以此时微粒间距是很小的, 于是次声学力又继续促进各微粒之间的进一步聚合 (F_B 为负, 相互吸引), 直到微粒束变得足够重, 以至于可以克服浮力而开始沉积过程。

三、声学共振器的制备

在设计用于悬浮微粒分离的声学共振器时, 制作材料的选择尤其重要。完成一个体系的关键是用一个合适材料制作的匹配层, 将压电设备输出的声学信号有效的传递到流体共振室。完成这一设计需要在共振室合适的位置上, 加两个相向的压电换能器以确定波节点或者采用伦德方法设计。这种材料在声波从流体介质传输到共振室边界(反射面)时, 需要有良好的反射特性和热稳定性。表 1 提供了一些可选材料的材料特性, 其中材料的可压缩率和杨氏模量, 是衡量材料是否适合作为声学振动的匹配层的重要指标。作为目前可获得纯度最高的材料之一的硅, 是半导体器件工艺和微机械加工工艺中最常用的材料, 以它良好的热传导性、易集成和加工性, 现在也被广泛用于微流控芯片中。基于表中给出的数据, 玻璃也是制作共振器的良好备选材料。

因为硅片和玻璃均常用于微加工中，将二者结合匹配起来设计声微流分离系统是一个理想的选择。PMMA 和 PC 是不适合作声学共振器的，将它们列出来仅为了作比较。

表 1 不同材料声学特性

	密度 /kg m ⁻³	可压缩率 /Pa ⁻¹	声速 /m s ⁻¹	杨氏模量 /GPa
硅	2330	6.0E-12	8430	130
钢	7900	3.8E-12	5790	200
硼硅玻璃	2330	1.4E-12	5500	63
PMMA	1150	1.3E-12	2590	3
PC	1200	1.8E-10	2160	2

硅片良好的微加工特性也使得它成为声学共振器材料首选。设计一个好的共振器，其基本前提就是两个对立的反射面表面要严格地平行，以获得一个稳定的驻波。而工业硅晶片的单晶特性使得它在这一方面有很大的优势。因为单晶硅可以沿着很多晶面方向切割，比如说(110)和(100)方向等。在基于标准各向异性的湿法刻蚀的基础上进行加工的过程中，晶向起着非常重要的作用。如果在加工用来做反射表面的垂直通道壁是采用深度离子束刻蚀(DRIE)，晶体方向就不是很重要了。但是，使用DRIE来加工声学共振器，需要有极其苛刻的要求以使墙壁外观平整。因此，当你的设计是在硅材料中加工两个对立的反射壁时，可使用更加方便的各向异性湿法刻蚀，即是基于伦德(Lund)方法的设计。

四、现阶段几种对流体中样品操控的方法

在微全分析系统中，在微尺度下对流体中的样品进行有选择性地、精确的、可重复的操控，是实现微全分析系统高效、高速检测的核心技术。根据所选操控手段的不同，芯片的设计和制备方法也需要有所调整。其操控方法主要有：1. 利用特殊的通道结构改变流体的流场并实现控制；2. 加入微阀操控单元改变通道截面积以实现流量控制；3. 利用蛋白质、核酸、细胞和胶体分子等多种生物样品，在电场下能发生定向移动来利用电场操控；4. 通过对某些样品标记磁性物质来再外加磁场下进行控制；5. 通过聚焦激光束产生光子辐射压来激励粒子运动；6. 加入声压的控制单元进行声学操控。这六种方法各有优缺，通道结构改变流场分离效率难以达到很高；微阀结构刚性不足且与外流路连接困难；电场强度过高对生物样品可能有损伤；磁场操控方

法要对样品标入磁性物质，在样品的选择上有限制；光钳法同样在选择上有限制性，而且操控颗粒的位置需要预先知道，并且整个体系较为复杂。比较而言，超声驻波操作提供了对微小颗粒免接触式操纵并且不损伤其生物活性，只要微粒的密度等声学特性与它们周围的介质不同，就都会被驻波声学力所影响。

五、国外声钳技术进展

在将声钳技术与微流控技术结合起来的超声驻波芯片的研究中，瑞典的劳雷尔课题组将其推上了一个新的台阶。2004年尼尔森(Nillson)利用了伦德法制备声学共振器：在硅片上刻蚀侧壁垂直的沟道，并用阳极键合的方法与载玻片键合以密封沟道，在硅片底部用环氧树脂或声学胶耦合压电陶瓷PZT作为声源，PZT为厚度振动模式，从而产生方向与沟道壁垂直的声波并在沟道壁反射形成驻波。沟道宽度设置为产生驻波的半波长的整数倍，以形成稳定的共振场，进、出样口设置在硅片底部。

具有正 φ 值的微粒在轴向PRF的作用下将会移向位于通道中的压力波节平面，同时，具有负 φ 值的微粒将会移向在通道壁的波腹平面如图4。通道的尽头分岔成三个出口通道，保证三个通道的流速相当，则正 φ 值微粒将会从中间的出口通道出去，负 φ 值微粒将会从旁边的通道出去。正、负 φ 值微粒的分离效率按其从各通道分离的数目来分别计算。

颗粒的大小不同，受到的声场力也不同。在此基础上，可进一步调整流体的密度，使大小不同的颗粒在受到的声场力与流体对其的黏滞力平衡时，于垂直流速方向上形成梯度状的聚集，并在不同的出口处收集。皮特森通过在流体里掺入氯化铯并调节浓度，达到了在单一的驻波场下对三种大小不同的粒子的分离，如图4所示。

利用驻波声聚焦的原理，皮特森(Petersson)展开了血液清洗等工作的研究。颗粒溶在被污染的溶剂内，与干净的溶剂经过带支路的沟道后以层流的方式流动，加上声场后驻波使颗粒聚集到干净溶剂中成线状向前流动，从而达到介质溶剂的交换，最终颗粒与干净溶剂在中间出口处收集。早期应用之一是心内直视手术中的血液清洗。在胸腔手术如冠状动脉搭桥手术时，腔中流出的血液将会被收集，通过过滤器后重新流回患者体内。这些血液通常很

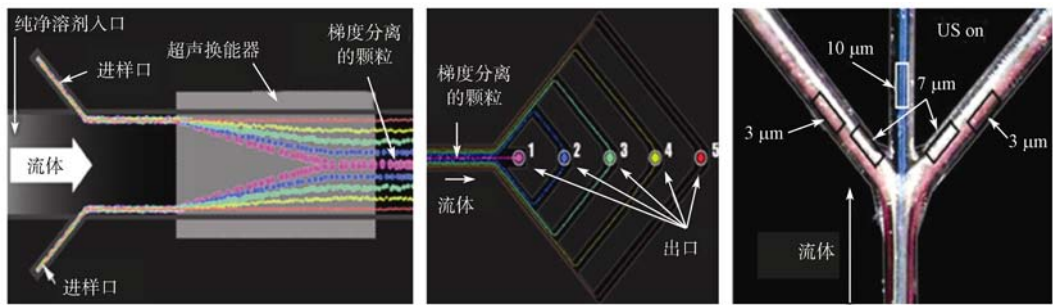


图 4 粒径从 3 μm 到 10 μm 的 PS 微球被分离

容易被从正在进行手术的脂肪组织中的三酸甘油酯所污染。然而，当自体输血形成的时候，数以百万计的小脂质微粒（脂质微栓）就会直接通过过滤器进入患者的血液循环系统，从而在器官的毛细血管中存在大量的微栓，最后导致组织缺血坏死。这种现象在脑部尤其明显，脑部栓塞被认为是导致心脏手术后认知功能障碍主要原因之一。目前还没有专门的方法来转移微脂栓。尽管有这层不利因素，自体输血依然是首选，而且它还能有效减少输血可能带来的疾病传播、免疫反应和血液排斥等问题。大量失血时，可以用离心机来进行血液清洗，但它仅能处理大体积的细胞且不能连续工作，还会给细胞施加一个有害的机械压力，脂质微粒的 ϕ 值是负值（约为 -0.3），同时红血细胞的 ϕ 值为正（约为 0.3）。这就意味着，当血液流经一个 350 μm 宽（频率为 2MHz）的分离沟道时，脂质微粒将会移向沟道壁，并且从侧面的出口通道流出，而红血细胞则会移向沟道中心并最终从中间出口通道流出（图 5）。与脂质微粒一起从侧面出口通道流出的介质（血浆）含量由各通道流速所决定。劳雷尔等已成立依托于声钳微流技术芯片的血液清洗公司。

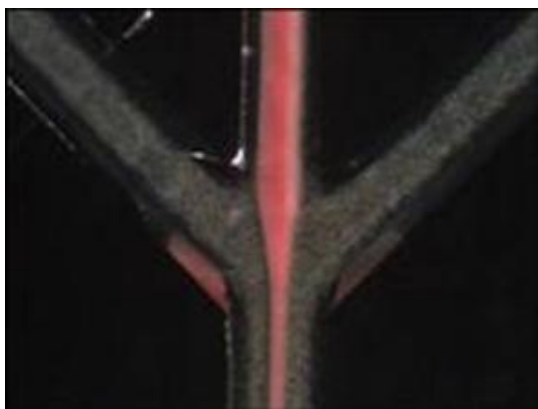
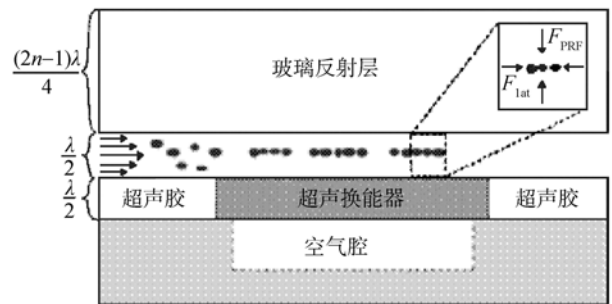
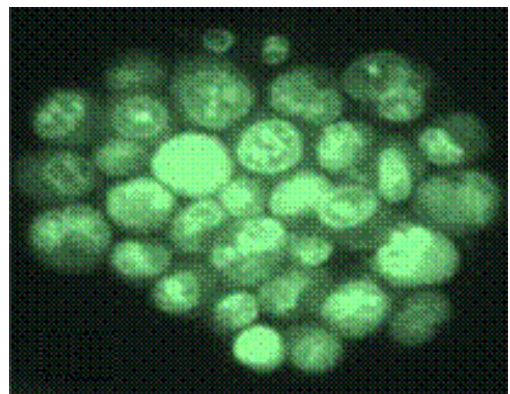


图 5 红细胞与脂质颗粒分离图

通过声学微流芯片进行分离的优点很明显。但是，进出样品的体积产量还不足以达到市场化要求。当我们是为了分析的目的来设计系统时，微型化并不是问题。另一方面，声学分离一个预期的主要应用方面是类似上述血液清洗等需要大通量的应用。血液成分分离需要至少一升/小时或更多流量的分离操作。为了满足这一要求，并同时遵从小型化设计的基本原理，可以设计成多个完全相同的、通过一个分枝结构连接起来的平行结构，组成一个 2^n 的分离体系。



a. 微流芯片的截面图。沟道内的驻波场将注入的细胞捕获，并且声学力使细胞团聚成簇



b. 驻波捕获了神经干细胞，15 分钟后测定细胞活性良好
图 6

伊万德利用纵向的驻波捕获了神经干细胞和酵母菌。他们在 PCB 板钻孔得到一个空腔，并将压电陶瓷分别埋在这些空腔内。这样每一个压电片的底部与 PCB 板相连，并可由 PCB 板的布线来控制是否给压电片加上电压；而压电陶瓷片的上表面可直接接触芯片沟道内的液体，即压电陶瓷片作为声源将最大限度地将声波传向样品。用湿法在玻璃片上刻蚀出芯片的沟道，然后用螺丝将玻璃片与 PCB 板闭合夹紧。通道深度为所激励驻波的半波长，而玻片的厚度为四分之一波长的整数倍以反射声波，从而形成稳定的驻波场（图 6）。

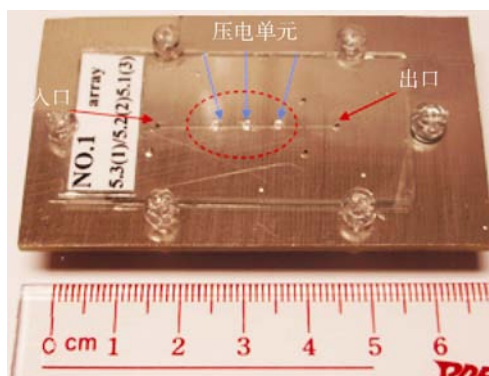
六、国内声钳技术研究

目前国内武汉大学研究人员在声学微流捕获研究工作上也有所创新。他们利用三明治结构，把压电单元埋于 PCB 板内，利用聚二甲基硅氧烷 PDMS 作为中间层形成共振腔，PDMS 层的高度约为一个半波长。此方法进一步简化了声学共振腔的制作工艺（图 7）。此类型芯片可以进一步形成多个单元，从而实现阵列式超声驻波捕获。

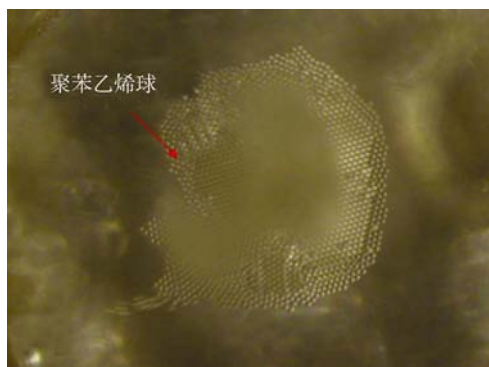
七、声钳微流技术的发展与展望

利用超声驻波在微流芯片中实现微粒无损可控操作，为生物分析开辟了一个新的路线。将来的发展是基于驻波技术与微流芯片技术的结合，以及大规模高产量分析和制备生物样品。超声驻波微流控芯片有望成为医疗、制药和诊断等领域的有用设备，

对应的技术和水平也将因为驻波微流控芯片的集成化和可连续操作化，而得到极大的提高。



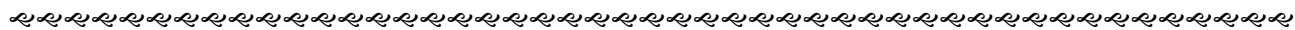
a. 具有三个单元的芯片实物图



b. 捕获 10 微米 PS 球效果图

图 7 驻波捕获微流芯片

（武汉大学物理科学与技术学院 430072）



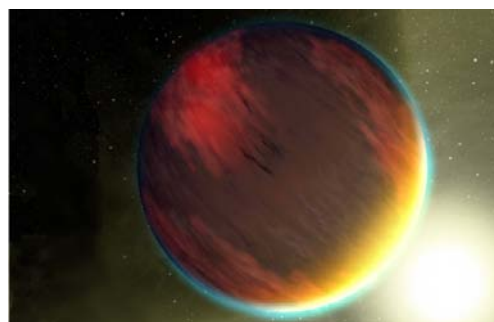
科苑快讯

富含碳元素的行星

我们是居住在一个富含碳元素的行星上吗？答案当然不是了！虽然地球生命的物质成分以碳元素为基础，但是碳元素在地壳中的含量并不高。事实上，固定在硅酸盐岩石中的氧占据了我们的脚下土地的几乎半壁江山。天文学家最近发现一颗富含碳元素的行星，位于距离地球 800 光年外的御夫座，围绕名为 WASP 12 的类日行星运转。

这是一颗类似木星的气体行星，只是太过靠近其恒星，以致表面温度高达数千摄氏度。通过红外光分析，天文学家发现其大气中有大量富含碳元素的一氧化碳和甲烷分子，表明行星内部可能含有碳化钙（一种碳与金属的化合物），而不是硅酸盐。如

果事实如此的话，这颗富碳行星将不同于我们太阳系的任何行星。



富碳行星想象图

（高凌云编译自 2010 年 12 月 8 日 www.sciencemag.org 新闻）