

微流控芯片系统中测温及控温装置的研制

戴敬¹, 樊晓峰², 方瑾³, 徐章润^{2*}

1. 沈阳建筑大学信息与控制工程学院, 辽宁 沈阳 110168

2. 东北大学分析科学研究中心, 辽宁 沈阳 110004

3. 中国医科大学卫生部细胞生物学重点实验室, 辽宁 沈阳 110001

摘要 报道了一种结构简单、成本低、操作方便、应用于微流控芯片系统中温度测量及温度控制的装置。该系统以 CCD 摄像机、荧光显微镜及图像采集卡构成的非接触荧光指示剂测温装置, 实现了微流体空间温度分布测量以及随时间变化的温度测量。提出了以透明氧化铟锡薄膜玻璃作为加热元件, 采用 PID 控制算法的温度控制平台, 稳态时温度控制精度可达到 $\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。采用该测温 and 控温装置研究了玻璃微流控芯片微通道内溶液温度在空间上和随时间的变化情况, 结果表明该方法简单、有效, 可达到 μm 级的空间分辨率和 ms 级的时间分辨率。

关键词 温度测量; 温度控制; ITO 薄膜玻璃; 微流控芯片系统

中图分类号: TH811 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2008)01-0148-05

引言

温度是生物有机物合成、聚合酶链反应、基因突变检测等生物化学研究中的重要参数, 随着微流控芯片系统在生化分析领域中应用的日益广泛, 微流控系统中温度的精确测量和控制也变得越来越重要。由于微流控系统中流体的体积一般在 $\text{pL} \sim \text{nL}$ 数量级^[1], 接触式测温方法不仅对微流体产生扰动, 还会改变其实际温度, 更难以实现流场内二维空间的温度分布测量。有文献报道^[2]将测温元件直接集成在微流控芯片上, 测温元件尺寸可做到 μm 数量级, 但这种方法在非专业性微加工实验室中很难实现。非接触温度测量方式更适合微流体测量, 文献^[3-5]中报道热色液晶测温技术测量精度可达到 $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 但 $10 \sim 20\text{ }\mu\text{m}$ 大小的液晶颗粒很容易造成浅通道堵塞, 且测量范围较窄。Ross^[6]等报道了利用荧光染料作为温度指示剂的微流体测温技术, 则更适合微流体的温度测量。

微流控芯片系统对温度控制的要求是控制准确、精度高、温度升降响应快。目前微流控系统中温度控制算法基本上都采用比例/积分/微分(PID)算法, 但各自所采用的加热装置却不同, Mao^[7,8]等利用铜金属块作为外置的接触式加热系统具有较大的热容, 体积大, 加热和冷却速率较慢。文献报道^[9]的另外一种外置式加热装置是珀耳帖(Peltier)半导

体加热致冷片, 其温度响应快, 温度变化范围宽, 具有较好的应用前景, 但是其不透明性对于光学方法检测将产生一定的影响。采用微加工技术直接将加热元件和测温元件集成在微芯片上的集成化加热方式^[10-12]具有体积小、温度响应速度快、控制精度高的优势, 但它也同样具有加工困难的缺点。

本文提出了一种结构简单、成本低、性能好的微流控芯片系统中微流体测温 and 控温装置, 其中测温采用荧光染料作为指示剂, 可实现微流体温度的空间分布和一段时间内温度连续变化的测量; 控温装置则采用市售氧化铟锡(indium tin oxide, ITO)薄膜玻璃作为加热器, 装置结构简单、体积小、热容小、升降温速度快、温度控制准确、动态过程平稳、精度高, ITO 薄膜的透光性对任何方式的光学检测都不产生影响, ITO 薄膜的透光性对光学检测不产生影响, 它可以透过所有的可见光, 甚至在近紫外区也有很好的透光性^[13]。

1 实验部分

1.1 设备、试剂和材料

1/2 in. 黑白 CCD 摄像机(MTV-12V1C-EX, 台湾敏通公司, 中国台湾); 黑白图像采集卡(M10M 型, 北京嘉恒中自图像技术有限公司, 北京); 532 nm 半导体激光器(PGL-XFS, 长春新产业光电技术有限公司, 长春); 荧光显微镜(XSY-1, 重庆光电仪器有限公司, 重庆); 数据采集卡(PCI-

收稿日期: 2006-10-29, 修订日期: 2007-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(20375047), 辽宁省教育厅科技攻关项目(202013135)和辽宁省博士科研启动项目(20051013)资助

作者简介: 戴敬, 女, 1968年生, 沈阳建筑大学信息与控制工程学院副教授 *通讯联系人 e-mail: xuzr@mail.neu.edu.cn

1711, 台湾研华科技公司, 中国台湾), 可调恒流电源(最大输出功率为 10 W, 自制), 经过标定的 Pt100 铂电阻温度传感器及变送器(018 型, 沈阳仪器仪表工艺研究所, 沈阳); ITO 薄膜玻璃, (ITO 膜厚度 25 nm, 表面电阻率为 60 Ω , 玻璃基材厚度 0.55 mm, 金坛康达克应用薄膜中心, 江苏金坛); 罗丹明 B 荧光染料(分析纯, 北京化工厂, 北京); 聚二甲基硅氧烷(PDMS)前聚物及交联剂(Sylgard184, Dow Corning 公司, 美国); 熔融石英毛细管(100 μm i. d., 375 μm o. d., 河北永年光纤厂, 河北永年); 自制简单十字交叉型通道的玻璃微流控芯片, 通道宽 102 μm , 深 16 μm ; 实验用水为 18 M Ω 的高纯水。

1.2 系统构成

温度测量与控制系统装置如图 1 所示, 测量部分为: CCD 摄像机经由接口转换器同荧光显微镜相连, 激光器固定在荧光显微镜的镜臂上, 使激发光同发射光之间为共聚焦方式, 激光器光斑为 300 μm ; 插在个人计算机 PCI 插槽上的图像采集卡将 CCD 所采集图像数据保存在硬盘中并同时在屏幕上显示; 温度控制部分包括 ITO 玻璃加热器, 粘贴在 ITO 玻璃上的贴片式 Pt 电阻温度传感器, 加热用可调恒流电源, 用于温度采集和控制信号输入、输出的多功能数据采集卡及用 LabVIEW(National Instruments, Austin, 美国) PID 控制模块编写的温度控制程序。

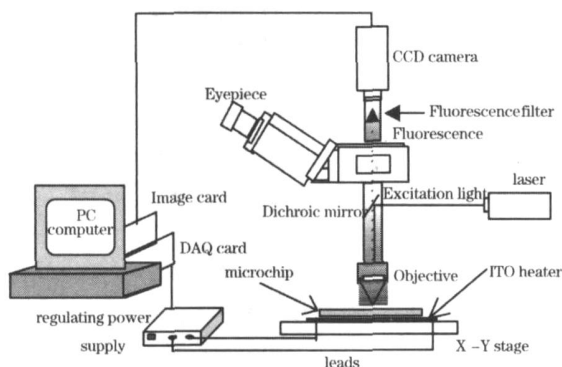


Fig 1 Schematic diagram of setup for temperature control and measurement

1.3 实验操作

实验开始前 20 min 左右, 将 ITO 玻璃加热片固定在 X-Y 二维操作平台上; 接通实验装置电源, 运行控温、图像采集程序, 温度控制调整为室温, 确保加热器不加热, 图像采集程序设为实时显示状态; CCD 摄像机设为手动, 以保证在所有温度条件下所采集的荧光图像具有相同的增益; 同时打开激光器并将其用遮光板遮挡; 对整个实验系统进行预热。接着在微流控芯片的通道中充满罗丹明 B 水溶液(0.4 mmol), 将芯片置于 ITO 加热片上, 手动调整 X-Y 二维操作平台, 同时观察显示器屏幕, 使被测区域处于视场中, 调整显微镜焦距使通道的边沿达到最清晰。位置和焦距调整后, 用胶带将微芯片固定, 防止实验过程中发生滑动而使位置改变。

实验开始时首先采集罗丹明 B 溶液初始状态时(即室

温)的荧光强度图像, 然后控制加热器温度, 在不同温度下采集罗丹明 B 溶液的荧光强度图像。为防止罗丹明 B 染料产生猝灭, 在不采集图像期间用挡光板遮住激发光。

1.4 温度标定

以染料荧光强度作为温度指示进行测温, 首先需要通过实验确定温度值和染料荧光强度值之间的函数关系。温度标定装置如图 2 所示, 一根长约 20 cm 的毛细管在中间部分去掉 2 cm 左右聚酰亚胺外包层作为检测窗口, 并将其紧贴在 ITO 加热片上, 在检测窗口的外围用硬纸片圈起一圈刚高过毛细管的围挡, 所围面积大约为 1 cm^2 左右, 将 PDMS 前聚物及交联剂混合均匀去气后浇注在围挡内。PDMS 膜(约 400 μm)固化后的作用一方面是将毛细管固定在 ITO 加热玻璃片上; 另一方面起到传导热的作用, 使毛细管内的染料温度均匀。铂电阻温度传感器紧贴 PDMS 膜固定在 ITO 加热片上。

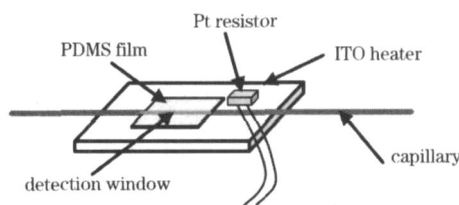


Fig 2 Schematic diagram of system for temperature calibration

控制 ITO 加热器温度, 从室温到 90 $^{\circ}\text{C}$ 每隔 5 $^{\circ}\text{C}$ 取一点, 在每个温度点上至少平衡 10 min, 确保温度传感器以及 PDMS 膜包裹的毛细管内罗丹明 B 荧光染料同加热器温度达到平衡。在每个温度点上, 连续采集 25 幅荧光强度图像, 且在每幅图像上相同的位置取 5 $\times$ 5 个像素点做平均值, 得到每个温度值所对应的罗丹明 B 染料的荧光强度值。图像数据滤波、求平均值等处理过程均采用 LabVIEW 软件自编程序。

2 结果与讨论

2.1 加热部件 ITO 薄膜玻璃特性及其电阻值计算

ITO 薄膜厚度在 ns 数量级, 其物理化学性能稳定, 硬度较大, 与大部分衬底有良好的附着性, 抗酸、碱及有机溶剂能力强, 在玻璃衬底上制备的 ITO 薄膜的电阻率和透过率分别可达到 $2 \times 10^{-4} \Omega \text{ cm}$ 和 90 % 以上^[14]。用于微流控芯片加热系统中, 具有温度升降快、稳定性好、坚固耐用、对光学检测窗口不产生影响等优点。本实验中采用商品化 ITO 薄膜玻璃做为微流控系统加热器, 具有诸多优点, 一是价格低廉, 容易得到; 二是加工容易, 可直接切割成所需形状, 对于特殊、复杂的图形还可通过刻蚀的方法得到, 并且加热器平台与芯片间为分体结构, 不会因为芯片报废而废弃; 三是 ITO 的透光性很好, 不影响微流控系统的光学检测。

ITO 薄膜作为加热器使用, 其形状及阻值大小对表面温度分布有很大影响, 根据其形状及尺寸可进行阻值计算, 图

3 所示为一矩形 ITO 薄膜的尺寸示意图, 其阻值计算如公式 (1) 所示^[15]

$$R = \rho L / d W = R \square L / W \quad (1)$$

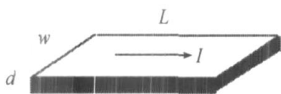


Fig 3 Schematic diagram of ITO layer

其中 ρ 为 ITO 薄膜的电阻率, d 为厚度, L 为沿电流方向的长度, W 为垂直于电流方向的长度, $R \square$ 称为 ITO 薄膜的方块电阻, 即表面电阻率, $R \square = \rho / d$ 。实验中所使用 ITO 加热器的阻值根据此公式的计算结果同实际测量值一致。

采用 PID 控制算法以及 ITO 薄膜玻璃作为加热器, 温度控制精度在 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 。温度上升时一般在 20~30 s 即可达到稳定值, 且过冲较小, 一般不超过 0.5°C , 实现了较理想的温度控制精度和温度上升速度。

2.2 温度和罗丹明 B 染料荧光强度之间的关系曲线

荧光染料在被激发后所产生的荧光强度 I 可以用下面的公式 (2) 表示^[16, 17]

$$I = I_0 c \phi \varepsilon \quad (2)$$

式中 I_0 为激发光强度, c 为荧光染料浓度, ε 为吸光系数, ϕ 为量子效率。对于一些复合染料如罗丹明 B, 由量子效率所引起的荧光强度变化可达到 $2\% \text{K}^{-1}$ 。吸光系数 ε 没有明显的温度特性, 它的变化小于 $0.05\% \text{K}^{-1}$ 。假设在一定温度范围内量子效率与绝对温度成反比, 则有

$$\phi = \frac{k}{T} \quad (3)$$

式中 k 为量子效率常数, T 为绝对温度, 以 (3) 式代入 (2) 式, 得

$$I = \frac{k I_0 c \varepsilon}{T} \quad (4)$$

在激发光源强度 I_0 和染料浓度 c 不变的条件下, 有

$$I = \frac{K}{T} \quad (5)$$

即

$$T = \frac{K}{I} \quad (6)$$

其中, $K = k I_0 c \varepsilon$, 测量时通过测出染料的荧光强度即可得到温度。采用这种方法来进行测温, 首先需要对荧光染料强度和温度之间关系进行标定, 而在实际的温度测量过程中激发光强度 I_0 和染料浓度 c 都可能与进行温度标定时不同, 同时检测点位置的变化还造成 CCD 可收集的荧光发生变化, 为了消除这些因素对测温产生的影响, 需要对温度和荧光强度之间的标定曲线进行归一化; 即在每次测量前首先记录室温条件下的温度场作为参考场 (参量场包含着同一实验过程中完全相同的参数信息), 测量过程中将每个测量温度场与参考场相除, 得到相对的变化量, 从而消除参数的影响。经过归一化后, 所有影响测量的因素包括测量仪器、浓度、CCD 位置、液层厚度以及被测区域背景的不均匀性都被消掉^[17]。图 4 为归一化的温度和荧光强度关系实验曲线 (由不同日期的七次实验曲线平均得到), 经三阶多项式拟合后得

到拟合公式 (7), 其中 $A = 0.952$, $B_1 = 0.012$, $B_2 = -4.510 \times 10^{-4}$, $B_3 = 2.351 \times 10^{-6}$ 。

$$I = A + B_1 T + B_2 T^2 + B_3 T^3 \quad (7)$$

曲线拟合时的相关指数 $r = 0.99838$, 拟合后的标准偏差 $SD = 0.01503$ 。由于温度同荧光强度之间的关系曲线为非线性, 因而拟合后曲线在远离参考点处误差将加大。

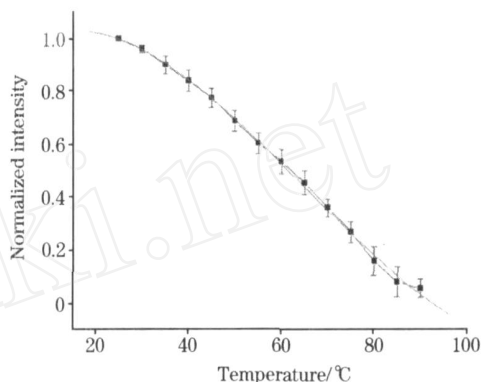


Fig 4 Normalized fluorescence intensity as a function of temperature

2.3 图像信号噪声及激发光源波动的数学处理

由于激发光源波动、激发光照射不均匀、CCD 摄像机的随机噪声以及其他各种噪声源的干扰和影响, 使图像质量下降, 因而需要对图像进行处理。图像处理的原则是尽可能保持原图像的特征及各种细节信息。对于激发光源波动、激发光照射不均匀等采用背景校正的方法来去除。消除图像中随机噪声的方法有多种, 而中值滤波对去除图像中孤立的随机噪声是最有效的, 并且不会对图像中的细节部分产生影响。中值滤波的窗口可以是一维的, 也可以是二维的, 窗口内像素总数应为奇数。考虑到温度测量时要得到整场的分布信息, 在去除噪声点的同时更要保留细节信息, 因而中值滤波选择 3×3 窗口。

2.4 随时间和空间变化的测温性能的考察

基于荧光指示剂的测温技术以 CCD 摄像机作为检测器, 因而同一时刻可以得到二维平面的温度信息, 如果 CCD 摄像机连续拍摄温度场的图像, 则还可以得到这一段时间内的温度变化数据, 图 5 所示的系列图像显示了温度场随时间和空间的变化情况, 实验条件是玻璃微流控芯片放置在楔形 (上边宽 2.5 cm, 下边宽 3.5 cm, 高度 6.8 cm) ITO 加热器的温度控制平台上, 楔形 ITO 加热器的温度沿通道轴向呈梯度变化, 由此使得通道内的溶液温度和其中罗丹明 B 指示剂的荧光强度也呈梯度变化 (被测微通道区域深度 $16 \mu\text{m}$, 宽度 $60 \mu\text{m}$, 长度 $300 \mu\text{m}$)。将加热器的高端温度控制在 70°C , 程序开始执行 0, 2, 2.8, 3.6 s 后所采集的荧光图像经处理后的三维图形分别如图 5(a), (b), (c), (d) 所示, 其中 x 轴表示微通道的长度, y 轴表示微通道宽度, z 轴表示通道内相应点的温度值。图 5(a) 是经逐点校正后的室温 (25°C) 时被测区域温度三维图; 图 5(b), (c), (d) 是经逐点校正、中值滤波处理及荧光-温度转换后, 在被测区域内均匀间隔取 66 个点所绘制的三维温度分布图。从序列温度三维图上, 可

以看到温度随时间的变化过程;同时单幅图像上显示出通道中心区域的温度要比接近通道壁处的温度高,这可能是由于通道壁散热引起的。根据所使用的显微镜放大倍数及 CCD

摄像机的像素数,计算出温度测量的空间分辨率可达到 $0.8 \mu\text{m}^{[18]}$,由 CCD 摄像机的拍摄速度可计算出时间分辨率为 40 ms。

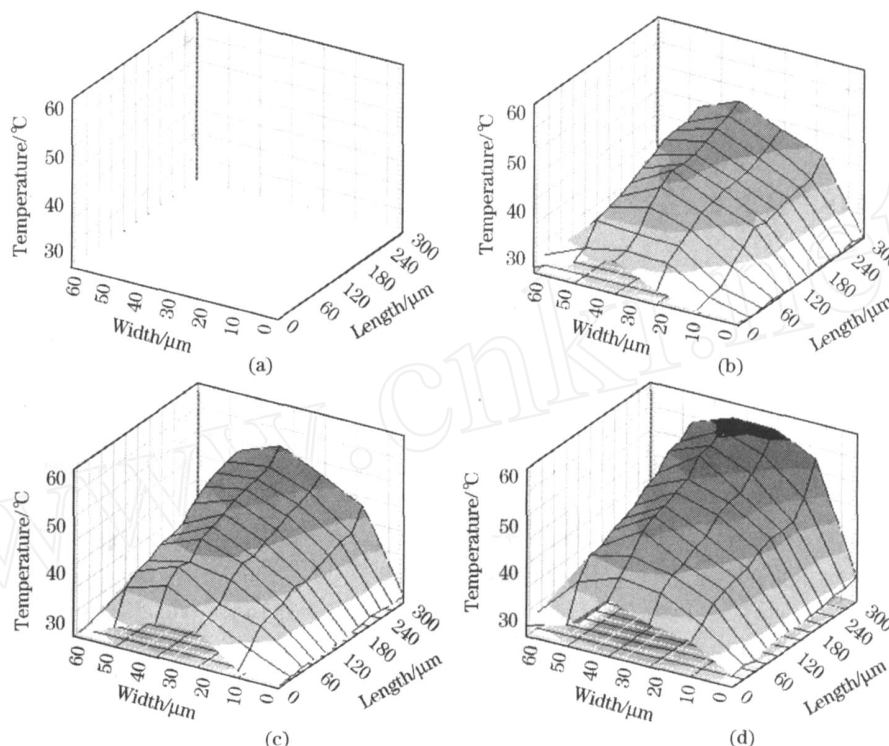


Fig 5 Three-dimensional graph of temporal and spatial temperature gradients Images were taken 0, 2, 2.8, 3.6 s after heating
(a) : 0; (b) : 2 s; (c) : 2.8 s (d) : 3.6 s

3 结 论

采用价格便宜、性能优良的市售 ITO 玻璃作为微流控芯片系统的加热器不仅适用性强,加工简单,而且更具灵活性,可以根据需要切割成各种形状,对于特殊形状还可以通过光刻、腐蚀的方法来实现。

以 CCD 摄像机、荧光显微镜及图像采集卡构成的测温

装置,基于荧光染料的荧光强度同温度之间的关系,可在普通实验室中实现微米尺度下的微流体温度测量,得到温度的空间和时间分布状况。该测温系统在空间上可达到微米级分辨率,在时间上可达到 ms 级分辨率。另外,根据实际需要通过调整显微镜的放大倍数可以改变温度的空间分辨率,如果需要得到更高的时间分辨率则可以通过选用高速 CCD 摄像机来实现。

参 考 文 献

- [1] WANG Shi-li, FANG Zhao-lun (王世立, 方肇伦). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2000, 20(2): 143.
- [2] El-Ali J, Perch-Nielsen I R, Poulsen C R, et al. Sens Actuators A, 2004, 110: 3.
- [3] Smith C R, Sabatino D R, Praisner T J. Exp. Fluids, 2001, 30: 190.
- [4] Chaudhari A M, Woudenberg T M, Albin M, et al. J. Microelectromech Syst, 1998, 7: 345.
- [5] Liu J, Enzelberger M, Quake S. Electrophoresis, 2002, 23: 153.
- [6] Ross D, Gaitan M, Locascio L E. Anal. Chem., 2001, 73: 4117.
- [7] Mao H, Yang T, Cremer P S. J. Am. Chem. Soc., 2002, 124: 4432.
- [8] Mao H, Holden M A, You M, et al. Anal. Chem., 2002, 74: 5071.
- [9] Khandurina J, Mcknight T E, Jacobson S C, et al. Anal. Chem., 2000, 72: 2995.
- [10] Poser S, Schulz T, Dillner U, et al. Sens. Actuators A, 1997, 62: 672.
- [11] Woolley A T, Hadley D, Landre P, et al. Anal. Chem., 1996, 68: 4081.
- [12] Lao A I K, Lee T M H, Hsing I M, et al. Sens. Actuators A, 2000, 84: 11.
- [13] HUANG Chong, OUYANG Yan-dong, WU Yong-jun, et al (黄 种, 欧阳艳东, 吴永俊, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱

学与光谱分析), 2004, 24(5): 637.

- [14] WANG Gang, LIU Hong-yu, ZHAO Chao, et al (王 刚, 刘宏宇, 赵 超, 等). Liquid Crystals and Displays(液晶与显示), 1999, 14: 23.
- [15] LU Xiao-li, YANG Yu-lan, XUE Chang-li, et al (陆晓莉, 杨玉兰, 薛长利, 等). Liquid Crystals and Displays(液晶与显示), 2002, 17: 209.
- [16] Sakakibara J, Adrian R J. Exp. Fluids, 1999, 26: 7.
- [17] Coolen M C J, Kieft R N, Rindt C C M, et al. Exp. Fluids, 1999, 27: 420.
- [18] Dai J, Guan Y X, Wang S L, et al. Anal. Bioanal. Chem., 2005, 381: 839.

Study on Temperature Measurement and Control for Microfluidic Systems

DAI Jing¹, FAN Xiao-feng², FANG Jin³, XU Zhang-run^{2*}

- 1. Information & Control Engineering Faculty, Shenyang Jianzhu University, Shenyang 110168, China
- 2. Research Center for Analytical Sciences, Northeastern University, Shenyang 110004, China
- 3. Key Laboratory of Cell Biology for Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001, China

Abstract A technique for temperature control and measurement in microfluidic systems was developed. The technique is easy to be implemented in an analytical lab and the experimental setup is relatively simple and inexpensive. The parts for temperature measurement include a CCD camera, a fluorescence microscope and an image acquisition card. The spatial distribution and the temporal variation of temperature in microfluids were measured. The method is non-invasive and the spatial and temporal resolutions were 0.8 μm and 40 ms, respectively a thermal control device was built using indium-tin-oxide (ITO) coated glass as heater, taking advantage of its transparent quality. The temperature could be controlled with a precision of $\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$. The image processing procedure was optimized and the efficacy of the method was demonstrated.

Keywords Temperature measurement; Temperature control; ITO film glass; Microfluidic systems

(Received Oct. 29, 2006; accepted Jan. 16, 2007)

* Corresponding author