

集成流体与温度控制的液滴型数字PCR微流控芯片设计与应用

何春华¹ 姚金辉¹ 聂磊² 廖广兰¹ 史铁林¹ 刘智勇^{1*}

1. 华中科技大学机械科学与工程学院, 武汉, 430074

2. 湖北工业大学机械工程学院, 武汉, 430068

摘要: 数字聚合酶链式反应(dPCR)因高灵敏度、高准确度以及绝对定量的特点,成为分子生物学和临床诊断领域的重要工具,但仍面临集成度不高、样本使用量大及流体控制难等问题。设计了一种集成快速阀门系统和自动加热系统的液滴型dPCR微流控芯片,同时优化了该芯片的制备工艺。研究结果表明,该芯片能够高效、均匀地生成液滴,最大生成频率达5.132 kHz,液滴直径变异系数(CV)值仅为1.67%;形变阀可在0.1 s内快速实现流体通断;集成的片上循环加热系统可实现1.2 °C/s的温度升降,温度误差在±0.6 °C以内;改进PDMS配方还可有效防止流体蒸发;液滴识别算法准确率高达99.7%。

关键词: 微流控芯片;微液滴;数字聚合酶链式反应;形变阀;集成化

中图分类号: O652.9

DOI:10.3969/j.issn.1004-132X.2025.10.025

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Design and Applications of Droplet-based Digital PCR Microfluidic Chip with Integrated Fluid and Temperature Control

HE Chunhua¹ YAO Jinhui¹ NIE Lei² LIAO Guanglan¹ SHI Tielin¹ LIU Zhiyong^{1*}

1. School of Mechanical Science and Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430074

2. School of Mechanical Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan, 430068

Abstract: Digital PCR (dPCR) had emerged as a vital tool in molecular biology and clinical diagnostics due to the high sensitivity, accuracy, and absolute quantification capabilities. However, challenges had persisted regarding integration level, sample volume requirements and fluid control. An integrated droplet-based dPCR microfluidic chip incorporating a rapid valve system and automated heating system was presented, along with optimized fabrication processes herein. The results show that the chip may generate droplets efficiently and uniformly, with a maximum generation frequency of 5.132 kHz and a droplet diameter CV (the coefficient of variation) of only 1.67%. Rapid fluid control within 0.1 s is enabled by the deformable valve, while temperature ramping rates of 1.2 °C/s with temperature variations within ±0.6 °C are achieved by the integrated on-chip thermal cycling system. Fluid evaporation is effectively prevented by an improved PDMS formulation, and the accuracy of 99.7% is achieved by the droplet recognition algorithm.

Key words: microfluidic chip; microdroplet; digital polymerase chain reaction (PCR); deformable valve; integration

0 引言

聚合酶链式反应(PCR)技术是分子生物学研究和临床诊断的关键工具,在基因表达分析^[1]、遗传疾病诊断^[2]、病原体检测^[3]以及精准医疗^[4]等领域应用广泛。传统的实时定量PCR(qPCR)虽因高效快速而被广泛使用,但它依赖标准曲线且无法进行绝对定量,对实验条件和样本质量要求较

高,应用受到限制^[5]。随着微流控技术的快速发展^[6-7],数字PCR(dPCR)技术取得显著进展,相继发展出连续流型^[8]、chamber型^[9]以及液滴型^[10]等dPCR芯片。与qPCR相比,dPCR无需标准曲线即可实现绝对定量^[11],在检测微量或低质量样品时表现优异^[12]。dPCR凭借其高灵敏度、精确定量能力和对抑制剂的耐受性而成为分子生物学和临床诊断的重要工具^[13]。相较于连续流dPCR与chamber dPCR,液滴型dPCR因其高通量、高灵敏度、高灵活性、低样本消耗和高动态范围^[14]等方面的优势而在基础研究和临床应用中更具有吸引

收稿日期:2024-07-17

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(2024JYCXJJ031);

华中科技大学“交叉研究支持计划”(2024JCYJ070)

力,因此开发快速、高效和高集成的液滴型dPCR芯片成为当前的研究焦点。

早期液滴型dPCR芯片需要复杂的外部设备和繁琐操作才能实现定量检测^[15],且芯片制备多采用玻璃和硅材料^[16]。近期,PAN等^[17]研发的冲击打印液滴型dPCR芯片可在平面液滴阵列中进行反应,并通过多体积液滴扩大检测范围,然而,其液滴生成频率仅为10 Hz,难以满足千万通量需求,且液滴体积的变异系数(CV)值为4.4%,生成的速度、稳定性和均一性有待提高。李琛明^[18]开发的微滴阵列数字PCR芯片在DNA分子绝对定量检测方面表现出色,但液滴体积CV值达5%。VIVEKANANTHAN等^[19]搭建的微流控液滴型dPCR平台在最佳压力下产生的液滴平均直径为107.44 μm ,CV值为2.38%,但无法实时控制液滴数量和精准存储。ZHANG等^[20]提出的弹性阀门和液滴自动化微流控系统虽减少了对外部控制器的依赖,但需在芯片上额外制备多层超薄弹性膜,增加了结构复杂性和工艺难度。针对聚二甲基硅氧烷(PDMS)的高透气性导致PCR芯片在热循环下试剂渗透蒸发,TIAN等^[21]提出的带防汽化层(VPL)的玻璃-PDMS-玻璃PCR微流控芯片改善了试剂保存,但长时间仍存在蒸发问题。DHAL等^[22]利用矿物油填充PDMS分子链间空隙,降低了循环加热时液滴的损失率,为解决PDMS气体渗透提供新思路。

综上所述,液滴型dPCR芯片虽操控简便,但存在以下问题:液滴生成频率与尺寸均匀性控制不足,生成数量难以实时控制,阀门结构复杂,且PDMS材质导致循环加热后液滴蒸发严重。据此,本研究在流动聚焦液滴生成芯片基础上,改进制备工艺,集成流体与温度的精准控制,以提高芯片性能,满足各种规模下快速检测需求。

1 设计与实验

1.1 芯片设计原理

设计的dPCR芯片由液滴生成区、流体控制区和液滴存储区三部分组成,如图1a所示,采用PDMS薄膜(500 μm)和玻璃基片叠层结构。液滴生成区包含油相和PCR试剂进样口,采用流动聚焦结构,其喷嘴宽度和长度均为50 μm ;流体控制区利用压力形变结构(图1b),当压力作用时PDMS变形封闭流道阻止流体流动,压力移除后自动复原开启流道;液滴存储区(图1c)设计为带微柱的空腔结构,腔室深度与液滴直径相当,底部

配备加热基片,既保证了液滴的稳定存储,又便于观察计数。

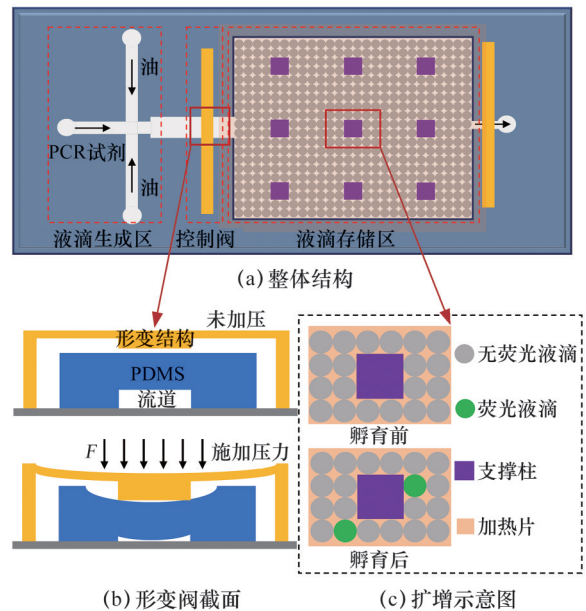


图1 液滴dPCR芯片的结构

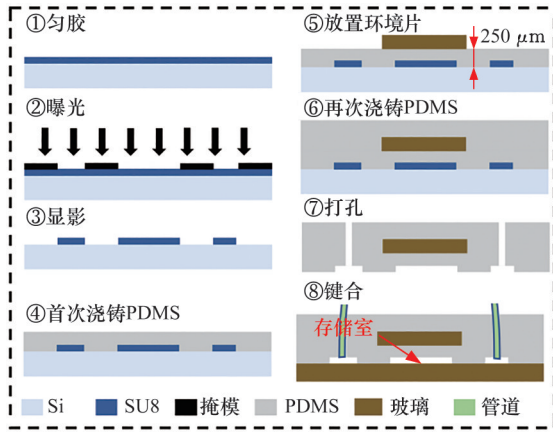
Fig.1 Structure of droplet digital PCR chip

1.2 芯片的加工与制备

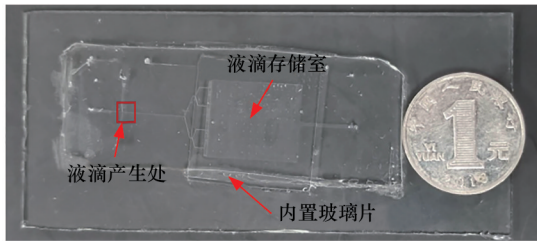
芯片通过软光刻、倒模、键合工艺制备。首先,将厚度为50 μm 的SU-8光刻胶(SU8-2025, MicroChem)旋涂于101.6 mm(4英寸)硅片上并固化(图2a①),再利用紫外光刻将微流道图形转移到光刻胶上(图2a②),显影后形成浇铸模具(图2a③)。按照预聚体体积:固化剂体积:矿物油体积=10:1:2配制PDMS并浇铸在模板表面(图2a④),110 $^{\circ}\text{C}$ 下固化2 h,厚度为250 μm 。待其固化后,在液滴储存腔室的上方放置玻璃片(图2a⑤),再倾倒适量的PDMS并固化(图2a⑥),最后进行切割、打孔(图2a⑦)并利用离子体清洗机(PDC-MG,铭恒)键合(图2a⑧),70 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤4 h完成芯片制备,如图2b所示。最后使用疏水溶液($\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{F}_{17}\text{O}_3\text{Si}$ 与异丙醇的体积比为1:19)进行约10 h的疏水处理。

1.3 实验测试系统的搭建

实验测试平台由流体驱动系统、显微成像系统和温度控制系统(图3a)组成。流体驱动与显微成像系统(图3b)包括多通道微量注射泵(LSP03-3B,保定迪睿电子科技有限公司,精度100 nL/min)、高速相机(AcutEye-2 M-1000,中国科天健光电科技有限公司)、两台低压直流电源(MP-3040D,东莞迈盛电源科技有限公司,最高32V)、用于照明的点光源(PL08-5W)等。温度控制系统由半导体制冷片(THC1-12730 SR)、温控



(a) 制备流程

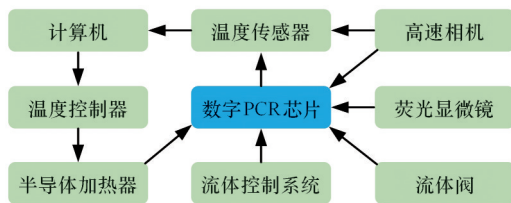


(b) 实物图

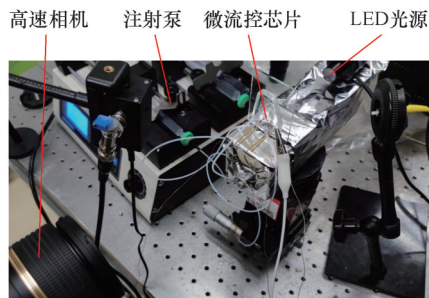
图2 芯片制备

Fig.2 Chip preparation

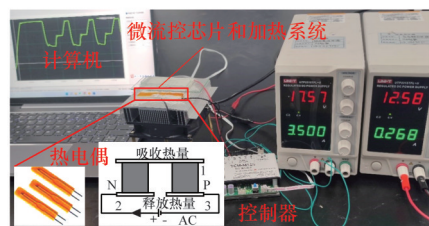
模块(TCM-M115)、温度传感器(MF52ZT)、直流电源和风扇组成(图3c),制冷片粘接在液滴存储区下方,通过RS232串口实现程序化温度控



(a) 系统组成



(b) 液滴生成测试系统



(c) 温度测试系统

图3 液滴dPCR微流控芯片测试系统

Fig.3 Droplet digital PCR microfluidic chip test system

制。风扇加速温度变化,提高升降温速度,用于实现循环扩增反应。按表1所示共四步扩增程序,变性、退火和延伸温度各不同,需循环切换。

表1 循环扩增反应程序

Tab.1 Procedure of cyclic amplification reaction

步骤	温度	持续时间	循环数
预变性	95 °C	2 min	1
变性	95 °C	15 s	30
退火	55 °C	30 s	30
延伸	72 °C	30 s	30

1.4 仿真与实验测试

依据通道内两相流的基础理论,使用COM-SOL 仿真工具(相场、层流)对微通道的结构进行了多物理场的仿真模拟。在微通道内,流体的速度梯度在通道截面方向上非常微小,因此可以不予考虑,使用二维模型可以更准确地描述实际的流动状况。分散相和连续相在室温常压下的物性参数设置如表2所示。流速边界条件设置如下:分散相速度 $u_1=0.033$ m/s,连续相速度 $u_2=0.132$ m/s,出口条件设置为大气压。液滴生成与阀门的具体仿真步骤扫描本文首页OSID码获取。

表2 分散相与连续相的液体成分及物性参数

Tab.2 Liquid composition and physical property parameters of dispersed phase and continuous phase

两相液体	物质	密度/ ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	黏度/ ($\text{mPa}\cdot\text{s}$)	界面张力/ ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)
分散相	PBS缓冲液	1260	1.005	15.21
连续相	矿物油	935	10	

1.5 液滴生成与存储

通过精密注射泵将PCR试剂和油相液体注入芯片,在喷嘴处形成液滴,使用高速相机同步记录。调节流速控制液滴尺寸和生成频率,用ImageJ软件分析相关参数。为验证该片的DNA孵育性能,从鱼的生物样本中提取基因组DNA,配制500 μL 反应体系(表3),基因组DNA(10 μL)、正向引物(Primer F, 10 μL)、反向引物(Primer R, 10 μL)、2 \times Universal SYBR qPCR Mix 溶液(250 μL ,含热启动Taq DNA聚合酶、dNTP、SYBR Green I、 Mg^{2+} 和缓冲液)及去离

表3 实验所用的生物试剂

Tab.3 Biological reagents used in the experiment

组分	体积
Genomic DNA	10 μL
Primer F	10 μL
Primer R	10 μL
2 \times Universal SYBR qPCR Mix	250 μL
去离子水	220 μL

子水。SYBR Green I 与基因组 DNA 结合发出绿光, DNA 扩增后的荧光信号增强有助于提高检测灵敏度。

2 结果与讨论

2.1 流动聚焦结构参数对液滴生成特性的影响

如图4所示,液滴形成主要取决于两相流体界面所受的各个力之间的平衡,其中, F_c 为连续相流体施加的挤压力; F_l 为颈缩区域两相界面的表面张力; F_d 为分散相流动的惯性力; F_μ 为由连续相施加的黏性剪切力; F_h 为液滴头部界面额外的拉普拉斯压力; F_r 为在液滴前端由连续相流动所施加的压力。 F_c 是液滴颈部形成的关键因素, F_μ 则是液滴断裂的关键因素, 且 $F_\mu = \mu\delta$ (μ 为动力黏度; δ 为界面处的剪切速率)。

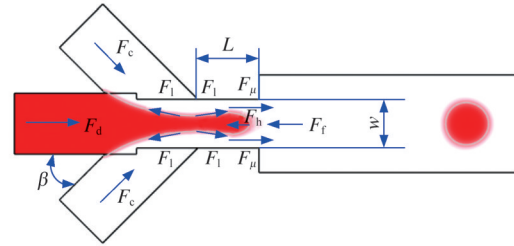
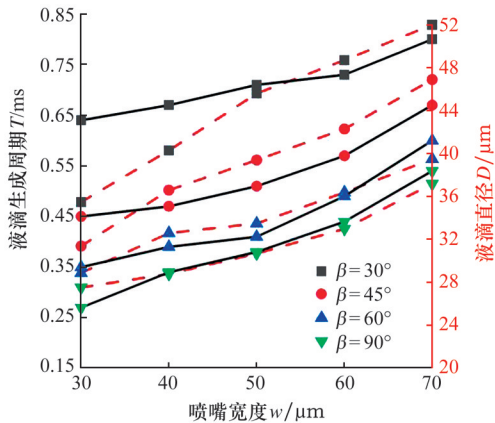


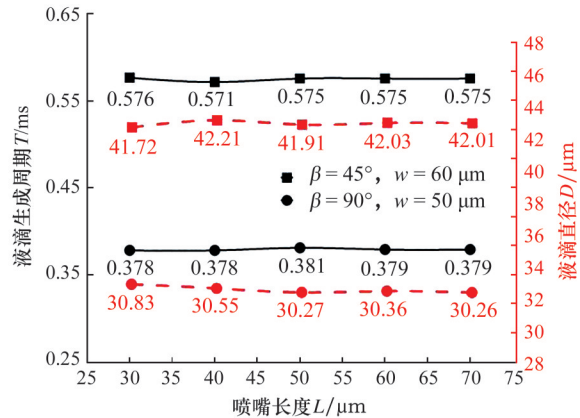
图4 液滴在喷嘴处的受力分析

Fig.4 Force analysis of the droplet at the nozzle

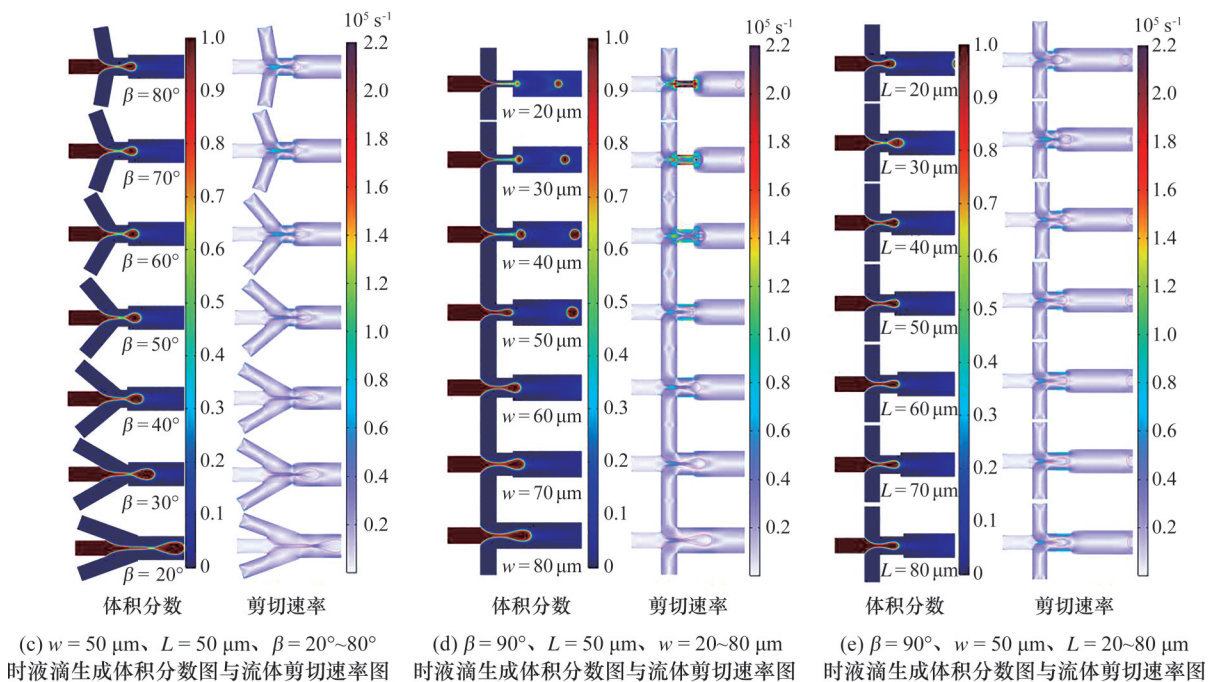
夹角 β 、喷嘴宽度 w 和喷嘴长度 L 对液滴生成特性的影响如图5所示。由图5a可知,当喷嘴宽度 w 和长度 L 一定时,随着角度 β 从 80° 减小到 30° ,液滴生成周期呈现明显的增长趋势,液滴直径也随之增大。这是因为当夹角 β 不断变小时(图5c),喷嘴处的剪切速率在空间分布更为分散,界面上的剪切速率从 $0.8 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 减小至



(a) 喷嘴宽度 w 、夹角 β 与液滴生成周期、直径的对应关系



(b) 喷嘴长度 L 与液滴生成周期、直径的对应关系



(c) $w = 50 \mu\text{m}$ 、 $L = 50 \mu\text{m}$ 、 $\beta = 20^\circ \sim 80^\circ$ 时液滴生成体积分数图与流体剪切速率图 (d) $\beta = 90^\circ$ 、 $L = 50 \mu\text{m}$ 、 $w = 20 \sim 80 \mu\text{m}$ 时液滴生成体积分数图与流体剪切速率图 (e) $\beta = 90^\circ$ 、 $w = 50 \mu\text{m}$ 、 $L = 20 \sim 80 \mu\text{m}$ 时液滴生成体积分数图与流体剪切速率图

图5 不同喷嘴结构液滴生成的仿真图

Fig.5 Simulation diagram of droplet generation with different nozzle structures

$0.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, 剪切力作用随之减弱, 使得液滴难以发生断裂, 生成周期变长, 液滴在断裂前累积更多的流体体积, 导致直径变大。喷嘴宽度 w 对液滴生成特性的影响更为明显, 当 $\beta=45^\circ$ 时, 喷嘴宽度从 $30 \mu\text{m}$ 增加到 $70 \mu\text{m}$, 液滴生成周期从 0.45 ms 增长到 0.65 ms , 液滴直径也从 $32 \mu\text{m}$ 增大到 $44 \mu\text{m}$ 。这是因为流道宽度的增加使得流体速度变慢, 流体的剪切速率从 $2.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 急剧减小至 $0.15 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, 导致液滴断裂的过程变得缓慢, 体积发生累积, 液滴直径变大。值得注意的是, 小直径喷嘴 ($20 \mu\text{m}$ 、 $30 \mu\text{m}$) 虽然能较高频率地获得较小的液滴, 但是易产生界面的混合, 这对需要封装在液滴中的反应物是不友好的, 如图 5d 中 $20 \mu\text{m}$ 喷嘴生成液滴流体体积分数, 应避免此种情况。不同于 β 与 w , 液滴的生成周期与直径并不会随着喷嘴长度 L 的增大而改变, 这是因为喷嘴宽度限制了流体的流速, 宽度一定时, 喷嘴长度增加不会改变其剪切速率, 所以液滴的生成状态也基本不变, 如图 5e 所示。总的来说, 喷嘴的几何特征通过影响流体剪切速率来改变界面剪切力, 进而影响液滴生成过程。根据模拟结果, 为满足液滴生成的稳定性、均一性和高通量要求, 同时考虑液滴在 PCR 实验中需要装载一定试剂, 因此液滴不宜过小, 可选用夹角 β 为 90° , 喷嘴宽度 w 为 $50 \mu\text{m}$, 长度 L 不做过多要求。

2.2 液滴的生成性能评价

在 $w=50 \mu\text{m}$ 、 $L=50 \mu\text{m}$ 、 $\beta=90^\circ$ 的条件下, 探索两相流速对液滴生成的影响, 如图 6 所示。由图 6a 可以看出, 当分散相的流速 $v_1=7.5 \mu\text{L}/\text{min}$ 时, 通过增加连续相的流速, 液滴的生成状态会从挤压式到滴式再到射流式转换。具体为: 连续相流速之和在 $22.5\sim 37.5 \mu\text{L}/\text{min}$ 之间时为挤压式, 液滴生成频率较低, 液滴直径 ($70 \mu\text{m}$) 大于喷嘴宽度 (图 6a I), 液滴的单分散性较好 (图 6b I), 液滴直径的 CV 值为 3.23% ; 当连续相流速之和为 $37.5\sim 67.5 \mu\text{L}/\text{min}$ 时为滴式, 液滴生成频率较高, 液滴直径 ($33 \mu\text{m}$) 较小且小于喷嘴宽度 (图 6a II), 液滴呈单分散状态 (图 6b II), 液滴直径的 CV 值为 1.76% ; 当连续相流速之和超过 $67.5 \mu\text{L}/\text{min}$ 时, 呈现射流式液滴生成状态, 液滴生成的频率有所下降, 且液滴生成频率与液滴直径均不稳定, 液滴直径与喷嘴宽度无固定关系 (图 6a III), 液滴单分散性较差 (图 6b III, 橙色标注), 液滴直径不稳定, 从 $30 \mu\text{m}$ 到 $70 \mu\text{m}$ 均存在, CV 值达到 7.56% 。为保证液滴的均一性和高速性, 应优先

考虑使用滴式的方法。

图 6c 所示为滴式液滴生成过程 (T 为一个液滴生成周期的时间), 在液体挤压力与黏滞剪切协同作用下, 分散相液体从主流道向外扩展形成液滴头部, 随着液滴的增大颈部迅速收缩, 当液滴头部越过喷管进入流道后受到更明显的剪切作用, 最终达到脱离临界点完全断裂形成液滴。液滴断裂严格受制于喷嘴结构, 该过程生成的液滴直径均匀且频率稳定。图 6d 和图 6e 所示分别为不同流速的分散相 (v_1) 和连续相 (v_2) 下液滴生成的频率与直径的变化, 定义两者流速比 $i=2v_2/v_1$, 可用于特定液滴直径的参数选取。在不同的分散相流速下, 随着流速比的增大, 液滴的频率存在一个从高到低的转折点, 此点是频率最高点; 当分散相流速从 $2.5 \mu\text{L}/\text{min}$ 到 $20 \mu\text{L}/\text{min}$ 不断增快时, 转折点出现得越来越快 ($i=13, 10, 9, 6, 4, 3$), 当 i 小于转折点时, 液滴以挤压式或滴式状态生成, 液滴生成频率随着 i 的增大而增大, 直径逐渐减小; 当 i 大于转折点时, 液滴以射流式状态生成, 生成频率和直径不稳定。选取分散相流速 $7.5 \mu\text{L}/\text{min}$ 、连续相流速 $60 \mu\text{L}/\text{min}$ 的组合时, 液滴通过滴式形成, 频率为 3.55 kHz , 直径约为 $46 \mu\text{m}$, 液滴高度均匀, 单分散性好, 可用于液滴生成后的 PCR 应用研究。进一步, 在该参数下利用高速相机进行 300 min 内液滴生成的稳定性测试 (图 6f), 液滴生成频率在 $3.31\sim 3.68 \text{ kHz}$ 之间波动, 平均值为 3.49 kHz , 每生成 100 万个液滴需约 4.7 min , 短时间内的频率波动仅 0.12 kHz , 由此可见该微流控系统具有良好的工作稳定性。研究结果表明, 通过调控两相流速比可有效控制液滴尺寸和生成频率, 且对于不同的分散相流速存在特定的转折点。在实际应用中, 应根据具体需求选择合适的流速参数, 以获得理想的液滴生成效果。

2.3 形变阀门机理分析

本研究系统地探究了微流控通道在外部压力作用下的封闭流道的机理。初始状态下 ($t=0$), 流道横截面保持标准矩形构型, 流通面积维持在 100% 。随着外部压力的持续施加, 流道面积呈现非线性递减特征, 在 $t=0.02 \text{ s}$ 时减至 86% , $t=0.04 \text{ s}$ 时减至 70% , $t=0.06 \text{ s}$ 时减至 51% , 随后在 $t=0.08 \text{ s}$ 时急剧下降至 28% , 最终在 $t=0.1 \text{ s}$ 时仅保留 8% 的流通面积。流道的快速封闭现象可归因于垂直压力与材料力学特性的耦合效应。当上表面承受均匀垂直压力时, PDMS 材料在垂直方向产生压缩应变, 导致上表面发生向下凹陷变形;

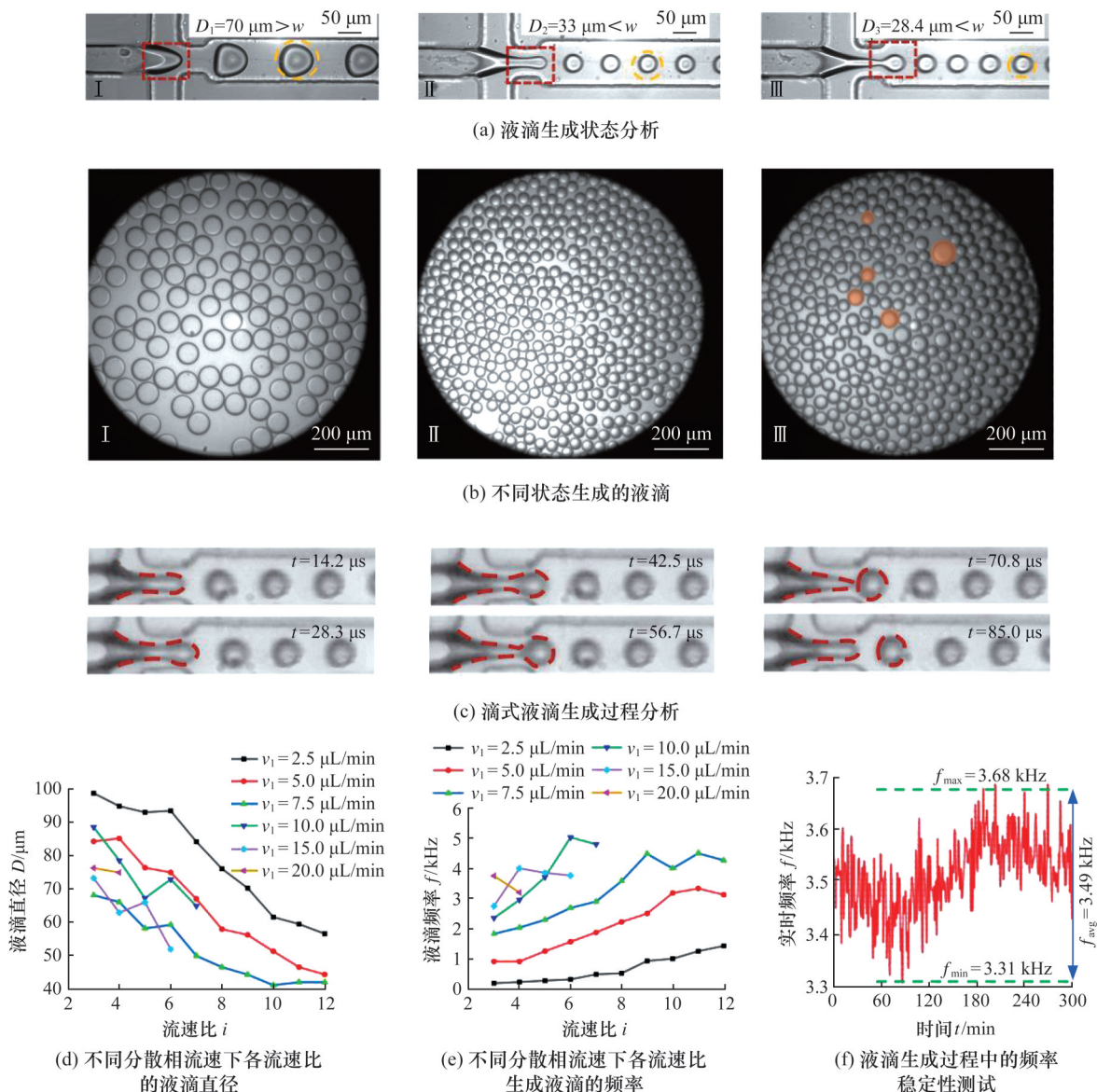


图6 微流控芯片液滴生成性能分析

Fig.6 Performance analysis of droplet generation in microfluidic chip

同时,基于材料的泊松效应,压缩过程伴随着横向应变,致使流道侧壁产生外向膨胀。这两种变形模式的协同作用最终导致流道形成特征性的“船形”变形构型(图7a)。作为对照组,对传统PDMS薄膜构建的阀门进行数值模拟(图7b)。结果表明,在压力持续作用下,流道从中心位置开始产生内凹变形,导致流通面积逐步减小。然而,即使在薄膜发生完全变形后,流道仍保持44%的可流通面积,无法实现有效的流道封闭功能。

图7c和图7d所示为两种阀门构型在不同压力条件下的响应特征。可以看出:形变阀在0~0.28 MPa压力范围内实现了0~50 μm的线性变形响应,且表现出较宽的变形分布;相比之下,气膜阀虽然在较小的压力范围(0~1.50 kPa)内即可达到完全变形,但变形区域过度集中于流道中心,

这种局部化的变形特征难以达到其实际应用性能。

2.4 阀门性能评估与液滴存储

图8展示了上述形变阀的实际性能以及使用效果。如图8a所示,通过在流道上方横向放置压力件,利用PDMS材料优异的弹性变形特性实现了流道的可控闭合。当施加压力时,PDMS薄膜发生弹性变形,导致流道上下表面贴合,从而阻断流体流动。值得注意的是,撤去压力后流道能够完全恢复初始状态且无任何结构损伤,这证实了该机械驱动方式的可行性和可靠性。流体控制效果的定量分析(图8b)表明,该阀门具有优异的动态响应特性。在 $t=0$ 时,示踪微粒的运动轨迹显示流体处于稳定流动状态;施压后,流道左侧流体的流速显著降低(流速降低超过95%),同时右侧

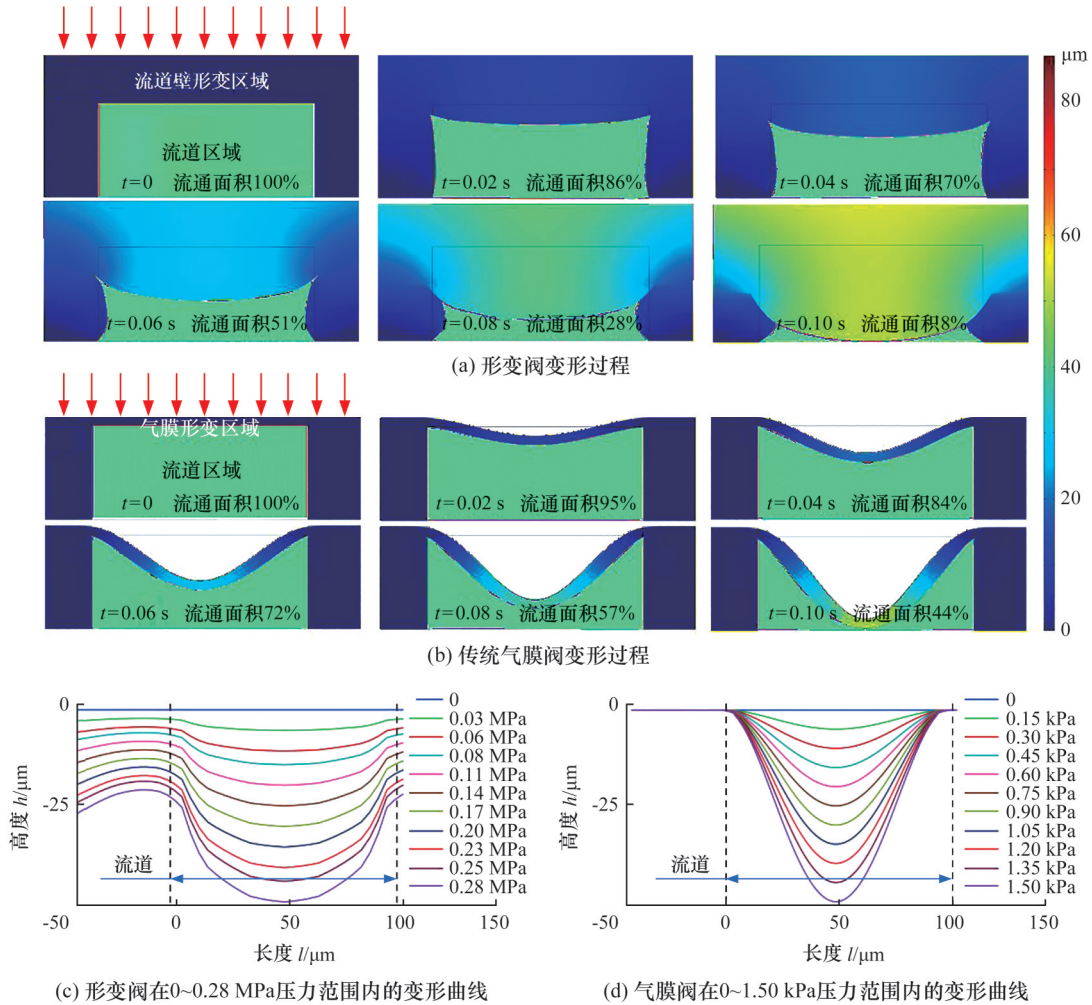


图7 基于PDMS的微流控阀门仿真结果分析

Fig.7 Analysis of PDMS-based microfluidic valve simulation results

未检测到流体渗漏,表明阀门实现了有效的流体阻断;持续加压至系统压力平衡后,流体完全停止流动;在 $t=0.3$ s撤压后,流体迅速恢复至原始流动状态,流速偏差小于3%,证实了阀门的可逆性和稳定性。在液滴填充控制应用中(图8c),该阀门展现出显著优势。传统停止进液方式存在两种不理想情况,即PCR试剂过量(图8c I)和油相过量(图8c II)。这两种情况均会导致已形成液滴被排出腔室,样本利用率显著降低。相比之下,采用本研究设计的阀门系统,可在液滴填充完成后立即切断流动(图8c III)。实验的统计分析表明,该方法可将样本保留率提高至 $98.5\% \pm 1.2\%$,且液滴的CV值保持在2.3%以下。这一结果凸显了该阀门系统在精确流体控制方面的应用潜力。

2.5 蒸发抑制与温控孵育性能评估

在液滴型dPCR中,防止水/油蒸发是确保恒定反应体积、均匀循环温度和避免交叉污染的关键。本研究系统评估了PDMS材料配比对芯片密封性能的影响,对比分析了标准配比($A:B=$

$10:1$)和优化配比($A:B:C=10:1:2$,其中, A 表示预聚体体积, B 表示固化剂体积, C 表示矿物油体积)。PCR热循环条件按照表1进行设置,实际的温度控制精度维持在 ± 0.5 °C范围内,图9a为热电偶温度传感器所记录的实时温度曲线,满足PCR扩增的技术要求。在标准配比芯片中,初始生成的液滴(直径 (40 ± 3) μm , CV值3.3%)呈规则的六边形排布(图9b)。然而,PDMS材料具有高渗透率(油类渗透率约 1.5×10^{-6} cm^2/s ,水的渗透率约 2.5×10^{-9} cm^2/s),经过热循环(60 °C时渗透率会提高约2~3倍, 90 °C时渗透率可能进一步提高6~8倍)过程时,会导致油相快速挥发,乳化稳定性下降,液滴发生显著融合和变形(图9c),影响PCR扩增反应的一致性和定量精度。通过提高PDMS交联密度,优化配比芯片表现出优异的密封性能:热循环后液滴形态保持稳定(图9d),尺寸CV值小于4%,排布规整度大于95%,优于同行研究(表4)。暗场荧光成像显示(图9e),阳性液滴信号强度达 $450 \pm$

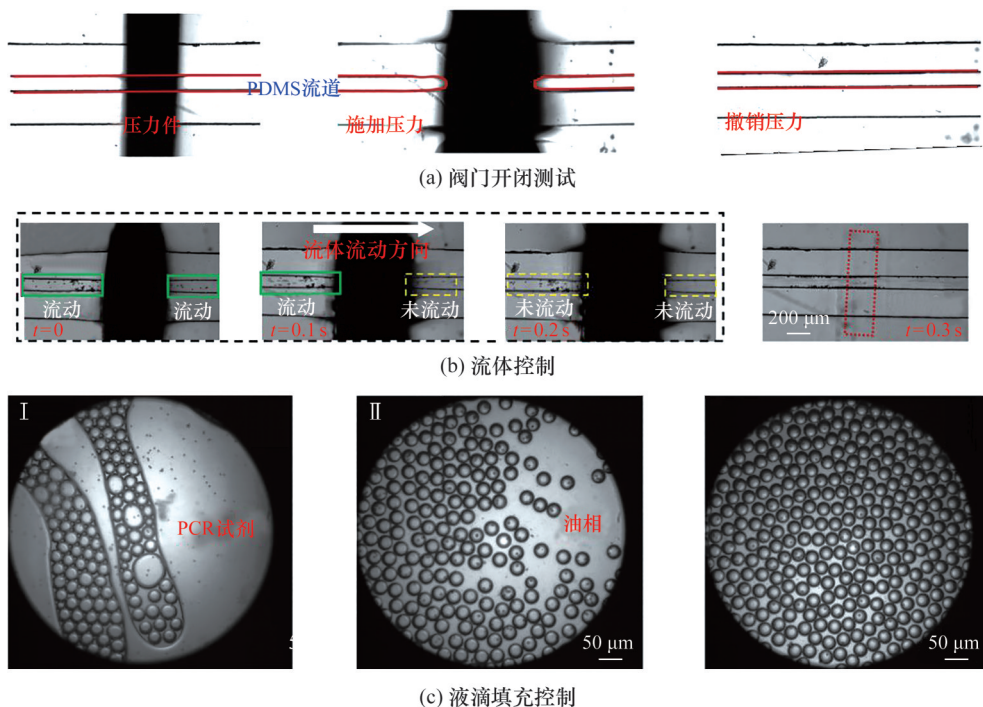
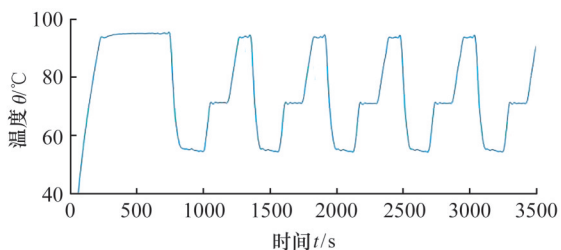


图8 流体控制阀门性能测试图

Fig.8 Fluid control valve performance test diagram



(a) 实时温度曲线

改善了芯片密封性,为可靠的数字PCR检测奠定基础。

表4 近期dPCR研究直径CV对比

Tab.4 Comparison of diameter CV values in recent dPCR studies.

来源	CV值	年份
文献[23]	12.44%	2024
文献[24]	9.68%	2023
文献[25]	7.78%~10.52%	2016

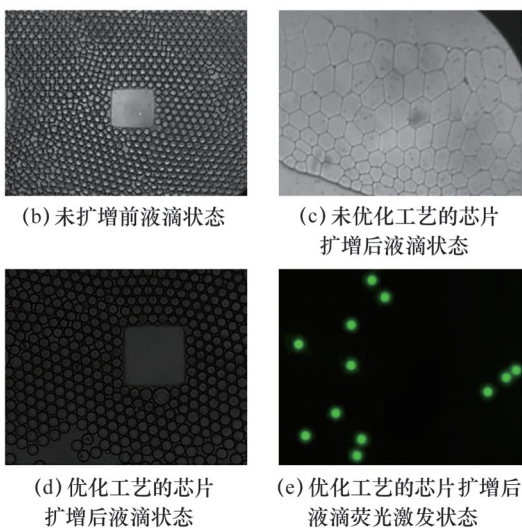


图9 防蒸发测试图及PCR发光测试

Fig.9 Anti-evaporation test diagram and PCR luminescence test

2.6 液滴型dPCR图像自动识别算法及其性能评估

针对液滴型dPCR百万级样本的人工计数难题,开发了基于图像处理的智能识别方案。图像处理结果如图10所示,采用MATLAB `adaptsteq()`函数进行直方图均衡化,提高图像质量和液滴-背景对比度(图10a)。结合二值化处理(图10b)与霍夫变换(图10c)的双重优化策略,实现了高精度的液滴识别。通过引入面积阈值筛选机制(图10d),有效规避了气泡等干扰因素的影响。实验结果显示:明场条件下识别362个液滴(实际364个),识别率达99.72%;暗场荧光图像中检测出12个荧光液滴,与人工计数完全吻合,识别率100%。液滴直径变异系数分析表明,热循环前后CV值仅从1.67%增至4.52%,增幅控制在2.85%以内,验证了流动聚焦结构设计的可靠性和工艺稳定性。

25,背景噪声小于20,信噪比大于20:1,证实了PCR扩增的有效性。固化过程中加入矿物油使油相提前填充PDMS内部渗透孔,降低了材料渗透率,有效抑制油相挥发,同时提高了机械强度,

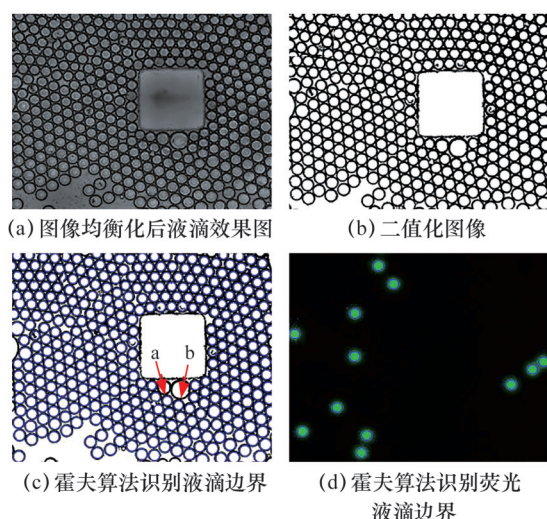


图10 液滴自动计数检测

Fig.10 Automatic droplet counting and detection

3 结论

本研究针对目前液滴型dPCR微流控芯片存在集成度低、控制复杂等缺点,设计并制备了一款集成液滴生成、快速阀门系统和自动加热系统的液滴型dPCR芯片,用于控制微流道中样本的精准开关以及芯片温度精准调控。通过流体力学仿真优化了流动聚焦结构参数,实现了高频率(3.55 kHz)、高单分散性(CV值1.76%)的液滴生成;创新性地开发了基于PDMS变形特性的机械阀门,在0~0.28 MPa压力范围内实现线性响应,显著提高了液滴存储效率(98.5%±1.2%);通过优化PDMS配比(10:1:2)有效解决了PCR热循环过程中的液滴融合问题,保证了液滴形态稳定性(CV值小于4%)和检测灵敏度(信噪比大于20:1);开发的基于霍夫变换的自动识别算法实现了高精度的液滴计数(明场99.72%、暗场100%)。这些技术创新为提高数字PCR检测的自动化水平和准确性提供了重要支撑。

参考文献:

- [1] KUANG J, YAN X, GENDERS A J, et al. An Overview of Technical Considerations When Using Quantitative Real-time PCR Analysis of Gene Expression in Human Exercise Research[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5):e0196438.
- [2] IP B B K, WONG A T C, LAW J H Y, et al. Application of Droplet Digital PCR in Minimal Residual Disease Monitoring of Rare Fusion Transcripts and Mutations in Haematological Malignancies[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14(1):6400.
- [3] LEI S, CHEN S, ZHONG Q. Digital PCR for Accurate Quantification of Pathogens: Principles, Applications, Challenges and Future Prospects[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 184:750-759.
- [4] HO D, QUAKE S R, MCCABE E R B, et al. Enabling Technologies for Personalized and Precision Medicine[J]. *Trends Biotechnol*, 2020, 38(5):497-518.
- [5] MEHTA N. RT-QPCR Made Simple: a Comprehensive Guide on the Methods, Advantages, Disadvantages, and Everything in Between[J]. *Undergraduate Research in Natural and Clinical Science and Technology (URNCSST) Journal*, 2022, 6(10):163-169.
- [6] 黄琴, 黄乐阳, 靳翔宇, 等. 注射式微流控芯片全集成核酸分析系统与精准医疗应用[J]. *中国激光*, 2024, 51(9):198-207.
HUANG Qing, HUANG Leyang, JIN Xiangyu, et al. Fully Integrated Nucleic Acid Analysis System Based on Syringe Microfluidic Chip and Application of Precision Medicine [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2024, 51(9):198-207.
- [7] LI S, MA Z, CAO Z, et al. Advanced Wearable Microfluidic Sensors for Healthcare Monitoring[J]. *Small*, 2020, 16(9):1903822.
- [8] 祁恒, 王贤松, 陈涛, 等. PMMA基连续流式PCR微流控芯片的CO₂激光直写加工与应用[J]. *中国激光*, 2009, 36(5):1239-1245.
QI Heng, WANG Xiansong, CHEN Tao, et al. Fabrication and Application of PMMA Continuous-flow PCR Microfluidic Chip with CO₂ Laser Direct-writing Ablation Micromachining Technique[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2009, 36(5):1239-1245.
- [9] WANG P, JING F, LI G, et al. Absolute Quantification of Lung Cancer Related Microrna by Droplet Digital PCR [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 74:836-842.
- [10] PINHEIRO L B, COLEMAN V A, HINDSON C M, et al. Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(2):1003-1011.
- [11] 刘聪, 蒋克明, 周武平, 等. 基于液滴微流控技术的集成式数字PCR芯片[J]. *新技术新工艺*, 2019(5):1-6.
LIU Cong, JIANG Keming, ZHOU Wuping, et al. Integrated Digital Polymerase Chain Reaction Chip Based on Droplet Microfluidic Technology[J]. *New Technology & New Process*, 2019(5):1-6.
- [12] QUAN P L, SAUZADE M, BROUZES E.

- DPCR: a Technology Review[J]. *Sensors (Basel)*, 2018, 18(4):1271.
- [13] LEI S, CHEN S, ZHONG Q. Digital PCR for Accurate Quantification of Pathogens: Principles, Applications, Challenges and Future Prospects[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 184:750-759.
- [14] CUI X, WU L, WU Y, et al. Fast and Robust Sample Self-digitization for Digital PCR[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1107:127-134.
- [15] SCHAERLI Y, WOOTTON R C, ROBINSON T, et al. Continuous-flow Polymerase Chain Reaction of Single-copy DNA in Microfluidic Microdroplets[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(1):302-306.
- [16] ZHAN M, CHINGOZHA L, LU H. Enabling Systems Biology Approaches through Microfabricated Systems[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(19):8882-8894.
- [17] PAN Y, MA T, MENG Q, et al. Droplet Digital PCR Enabled by Microfluidic Impact Printing for Absolute Gene Quantification[J]. *Talanta*, 2020, 211:120680.
- [18] 李采明. 基于数字PCR的核酸检测定量参考品制备与应用[D]. 北京:中国科学院大学, 2021.
LI Caiming. Preparation and Application of Quantitative Reference Materials for Nucleic Acid Detection Based on Digital PCR [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2021.
- [19] VIVEKANANTHAN V, VIGNESH R, VASANTHASEELAN S, et al. Concrete Bridge Crack Detection by Image Processing Technique by Using the Improved Otsu Method[J]. *Materials Today: Proceedings*, 2023, 74:1002-1007.
- [20] ZHANG C, XING D, LI Y. Micropumps, Microvalves, and Micromixers within PCR Microfluidic Chips: Advances and Trends[J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(5):483-514.
- [21] TIAN Q, SONG Q, XU Y, et al. A Localized Temporary Negative Pressure Assisted Microfluidic Device for Detecting Keratin 19 in A549 Lung Carcinoma Cells with Digital PCR[J]. *Analytical methods*, 2015, 7(5):2006-2011.
- [22] DHAL K G, DAS A, RAY S, et al. Histogram Equalization Variants as Optimization Problems: a Review[J]. *Archives of Computational Methods in Engineering*, 2021, 28:1471-1496.
- [23] GANGULY R, LEE C S. A Poisson-independent Approach to Precision Nucleic Acid Quantification in Microdroplets[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2024, 7(5):3441-3451.
- [24] TANG Z, LV F, REYNOLDS D E, et al. Highly Parallel, Wash-free, and Ultrasensitive Centrifugal Droplet Digital Protein Detection in Sub-microliter Blood [J]. *Lab on a Chip*, 2023, 23(12):2758-2765.
- [25] BSOUL A, PAN S, CRETU E, et al. Design, Microfabrication, and Characterization of a Moulded PDMS/SU-8 Inkjet Dispenser for a Lab-on-a-printer Platform Technology with Disposable Microfluidic Chip [J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(17):3351-3361.

(编辑 袁兴玲)

作者简介:何春华,男,1993年生,博士研究生。研究方向为声表面波液滴微流控、微纳加工技术。E-mail:hechunhua@hust.edu.cn。
刘智勇^{*}(通信作者),男,1990年生,副教授。研究方向为微纳加工制造、微纳传感器、微流控芯片。E-mail:zhiyong_liu@hust.edu.cn。

本文引用格式:

何春华,姚金辉,聂磊,等. 集成流体与温度控制的液滴型数字PCR微流控芯片设计与应用[J]. *中国机械工程*, 2025, 36(10):2359-2368.

HE Chunhua, YAO Jinhui, NIE Lei, et al. Design and Applications of Droplet-based Digital PCR Microfluidic Chip with Integrated Fluid and Temperature Control[J]. *China Mechanical Engineering*, 2025, 36(10):2359-2368.