

基于液滴微流控技术 制备微球实验方案

(版本号: V3.0)

目录

前言	- 2 -
微球制备实验步骤	- 2 -
实验关键点	- 4 -
微球制备实验视频	- 5 -
实验方案 1. 壳聚糖微球制备	- 7 -
实验方案 2. 海藻酸盐微球制备(乙酸固化法)	- 14 -
实验方案 3. 海藻酸盐微球制备(离子交换法)	- 23 -
实验方案 4. 含 Oligo DNA 的可降解凝胶珠制备	- 33 -
实验方案 5. 甲基丙烯酰化透明质酸(HAMA)微球制备	- 43 -
实验方案 6. 聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)微球制备	- 51 -
实验方案 7. PLGA-HAMA 核壳结构微球制备	- 58 -
实验方案 8. 聚乙烯醇(PVA)微球制备	- 65 -
实验方案 9. 全氟己酮灭火微胶囊制备	- 72 -

前言

微米级高分子聚合物微球凭借多重可控特性、高比表面积，以及与天然细胞外基质结构高度相似的优势，已成为一类重要的先进功能材料，广泛用于细胞与药物的可控递送，在生物医学领域展现出巨大应用潜力。目前，高分子聚合物微球的制备方法多样，主要包括微流控技术、间歇式乳化和静电喷雾等。然而，传统的间歇式乳化和静电喷雾所得微球单分散性差、批次重复性不佳，且产率偏低、结构均一性难以满足高精度应用需求。相比之下，微流控技术可有效克服上述问题，成为制备高性能聚合物微球的理想选择。其核心优势体现在三方面：(1) 微球单分散性优异，粒径可通过调控流体流速、芯片通道尺寸等参数精准调节；(2) 制备过程连续、效率高、产率稳定；(3) 可通过芯片结构设计，实现复杂功能型微球的结构精确可控合成。

高分子聚合物微球的固化方式同样丰富，常用方法包括离子交联、光聚合和溶剂挥发法等。离子交联则是聚电解质在特定 pH 等条件下由反离子诱导交联，适用于海藻酸盐、壳聚糖等体系。光聚合依赖光引发剂在紫外光照下产生自由基，实现水凝胶快速交联。溶剂挥发法则通过聚合物溶解、乳化、溶剂扩散挥发实现微球固化，常用于聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)、聚己内酯(PCL)等可降解聚酯微球的制备。

得益于材料低毒、高生物相容性，以及微球形貌规则、粒径可调、单分散性好等特点，高分子聚合物微球在生物与医药领域应用广泛，涵盖细胞培养、药物筛选、组织工程支架等多个方向。例如，海藻酸盐微球已被成功用于 3D 细胞培养模型。总体而言，高分子聚合物微球为生物医学研究与临床转化提供了可靠的载体平台，在精准递送、组织修复与再生医学等领域具有广阔的应用前景。

微球制备实验步骤

1. 微球制备试剂准备

试剂准备主要是将聚合物粉末(或反应物单体溶液)、固化剂(或引发剂)分散于相应水相溶液中, 并进行过滤处理。为方便理解, 这里以壳聚糖微球制备试剂配制为例: 将壳聚糖粉末和辅助溶解的乙酸按照一定的比例分散于超纯水中, 并进行过滤处理; 然后将固化试剂戊二醛分散于 2% Drop-Surf 微滴生成油中作为接收液; 取一定量的微滴油作为油相。

2. 微球生成和固化

将准备的试剂放置于相应储液池或容器中, 按照微滴制备仪操作手册或操作视频设置压力或流速实现微滴稳定的生成并接收至相应容器中(可能含有固化接收溶液)。依据微球固化方式实现微球固化, 如将壳聚糖微滴乳液滴加至戊二醛接收液中, 静置加轻微辅助震荡实现微滴固化。

3. 微球的清洗破乳

通过在固化的乳液中加入破乳剂使得油与水凝胶微球分离, 然后用相应水相溶液清洗, 并最终分散于特定溶液中。

4. 微球的观察

取微量分散于特定相溶液中的微球放置于显微镜下观察, 并测量其粒径及均匀性。

实验关键点

1. 本方案只适用于 FluidicLab 提供的试剂盒，其他品牌试剂可能不适用；
2. 本方案提供的 Drop-Surf 微滴油生成的微滴具有生成频率高、均一性强和稳定性高等优点，微滴间不会出现融合问题；
3. 采用本方案制备微球时，液体在通入芯片前必须用 0.22 μm 或 0.45 μm 的滤膜过滤，避免芯片堵塞影响微滴生成；
4. 采用本方案制备微球时，若微滴/微球制备仪上无流量传感器配制时，也可以通过简单的压力控制制备微球；
5. 采用本方案制备微球时，建议准备两台显微镜相机，其中一台用于观察剪切口位置液滴的稳定生成(微滴/微球制备仪标配)，另一台用于观察接收的微滴是否均匀生成；
6. 本方案中所使用的破乳剂只适用于 Drop-Surf 微滴油，其他体系不适用，加入破乳剂的目的是用于油相与微球分离；
7. 采用本实验方案制备水凝胶微球时，若分散于水溶液中的微球仍有部分油乳液存在，可通过细胞筛过滤去除油的乳液或者离心后从上部取出含有微球的水相。

微球制备实验视频

序列号	名称	视频二维码
方案 1	壳聚糖微球制备	
方案 2	海藻酸盐微球制备(乙酸固化法)	
方案 3	海藻酸盐微球制备(离子交换法)	
方案 4	含 Oligo DNA 的可降解凝胶珠制备	
方案 5	甲基丙烯酰化透明质酸(HAMA)微球制备	

方案 6	聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)微球制备	
方案 7	PLGA-HAMA 核壳结构微球制备	
方案 8	聚乙烯醇(PVA)微球制备	
方案 9	全氟己酮灭火微胶囊制备	

实验方案 1. 壳聚糖微球制备

实验目的：

本实验方案通过利用微滴/微球制备仪，以 2% Drop-Surf 微滴生成油为油相，以 5%壳聚糖水溶液为水相制备高单分散的微液滴，并与接收相溶液中的戊二醛发生 Schiff 碱反应实现微液滴的固化。最终，获得具有极高单分散性的壳聚糖微球(CV<5%)。

引言：

壳聚糖是一种功能线性聚合物，是由甲壳素部分去乙酰化而得^[1-3]。因其来源广泛、无毒、价格低廉、良好的生物相容性和可降解而备受关注。近年来，壳聚糖作为一种新型功能材料，以纤维、膜、微球和胶囊等形式在蛋白吸附分离、催化剂载体、酶的固定化、重金属吸附和药物释放等方面具有很大的应用潜力^[2]。此外，壳聚糖在每个 C₆原子单元上都有一个游离的氨基，这使得壳聚糖可以与醛基发生 Schiff 碱反应，且在这一反应过程中生成的 C=N 键发生 n-π*跃迁产生自发荧光^[2]。而这种荧光恰恰可以应用于血液循环追踪、细胞外基质表征、体内细胞成像等领域。因此，壳聚糖在生物、医药、化学和环境等领域都有良好的应用前景。

壳聚糖微球粒径的均一度控制对其在生物、医药和催化等领域的成功应用至关重要。目前制备壳聚糖微球的方法有乳化固化、简单凝聚、复合凝聚和膜乳化等^[2,4]。虽然这些技术完全可行，但也存在着很大的缺点，如产率不稳定、程序复杂、粒径分布不均和重复性差等。因此，开发一种可重复、粒径及均匀度可控的壳聚糖微球制备技术是其成功应用的必要条件。FluidicLab 微滴制备平台运用液滴微流控技术，通过微滴/微球制备仪制备高度均一的壳聚糖微滴，再与戊二醛发生 Schiff

碱反应实现微液滴的固化，最终得到壳聚糖微球。该法操作简便，样品利用率高，制备得到的微球单分散性高(CV<5%)，具有较好重复性。

实验材料：

试剂	微滴生成油(2%, Drop-Surf, FluidicLab)
	破乳剂(Drop-Surf, FluidicLab)
	壳聚糖(FluidicLab)
	冰乙酸(Macklin, A801295-500 mL)
	戊二醛(50%, Aladdin, G105905-500 mL)
耗材	离心管(Falcon 15 mL REF 352097)若干
	离心管(1.5 mL, Axygen)若干
	PEEK 管(内/外径 0.25 /1.6 mm)及 1/4-28 螺纹接头卡箍若干
	透明玻璃瓶(10 mL 和 20 mL)若干
	针式过滤器(PTFE, 津腾, 25 mm×0.22 μm)若干
	注射器(10 mL)若干
芯片夹具	PDMS-FF-100 芯片(FluidicLab)
	PDMS 标准芯片夹具(FluidicLab)
设备	微滴/微球制备仪(FluidicLab, 两通道)
辅助设备	电脑(Win10 以上系统)
	离心机(湖南湘仪, H1850)
	普通光学显微镜(测微球粒径)

实验步骤：

1. 试剂配制

(1) 水相溶液配制

将 0.5 g 壳聚糖加入到 9.3 g 的超纯水中，并加入 200 μL (约 0.2 g) 冰乙酸辅助溶解，振荡放置于 85 $^{\circ}\text{C}$ 的鼓风干燥箱中加热溶解；待完全溶解后用针式过滤器过滤备用。

(2) 接收相溶液配制(1%(v/v) 戊二醛)

取 490 μL 2% Drop-Surf 微滴生成油，加入体积为 10 μL 的 50% 戊二醛，振荡均匀备用。

2. 微滴制备

(1) 微滴/微球制备仪的安装连接

微滴/微球制备仪安装连接参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“2. 微滴/微球制备仪的安装连接”的部分；其连接如下(步骤③-⑦连接效果如下图 1-1 所示)：

- ① 用气管依次连接“空气压缩机”-“气源处理装置”-“微滴/微球制备仪”；
- ② 将微滴/微球制备仪分别与电源、电脑的连接；
- ③ 用气管分别将 A_0 (压力输出通道一)和 A_1 (油相 15 mL 储液池), B_0 (压力输出通道二)和 B_1 (水相 1.5 mL 储液池)连接；
- ④ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A_1 (油相 15 mL 储液池)和 A_2 (通道一流量传感器), B_1 (水相 1.5 mL 储液池)和 B_2 (通道二流量传感器)连接；
- ⑤ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A_2 (通道一流量传感器)和 A_3 (PDMS 微滴芯片夹具的油相入口), B_2 (通道二流量传感器)和 B_3 (PDMS 微滴芯片夹具的水相入口)连接；

- ⑥ C 为 PDMS 标准微滴芯片和夹具的组合，芯片和夹具的入口通过硅胶塞密封；
- ⑦ 用 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)将芯片出口 D 处生成的乳液导出。

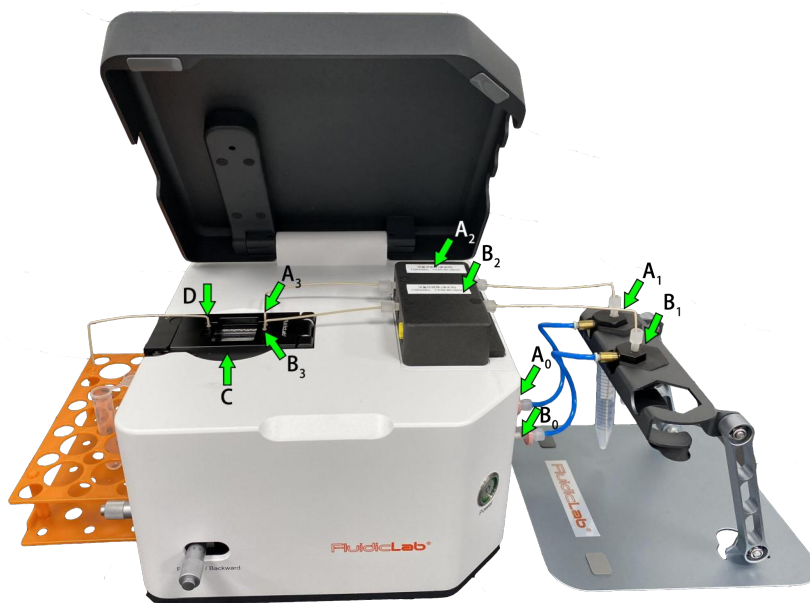


图 1-1 微滴/微球制备仪的安装连接

(2) FluidicLabSuite 软件的安装和设备的添加

FluidicLabSuite 软件的安装参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.1 FluidicLabSuite 软件的安装”的部分；

(3) 壳聚糖微液滴的制备

具体操作步骤如下(参考视频“微流控应用：微滴/微球制备仪制备壳聚糖微球”)：

- ① 分别在 15 mL 油相储液池(通道一)和 1.5 mL 水相储液池(通道二)中依次加入 5 mL 2% Drop-Surf 微滴生成油和 1 mL 水相溶液；
- ② FluidicLabSuite 软件的设备添加参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.2 FluidicLabSuite 软件的设备添加”的部分(相机和流量传感器仅需添加一次)；
- ③ 打开空气压缩机和气源处理装置开关；

- ④ 在乳液出口端放置离心管接收前废液；
- ⑤ 在电脑端设置通道一压力(油相，如 150 mbar)和通道二压力(水相，如 900 mbar，水相粘度大，流阻大，压力更大)排出管路和芯片中的空气；
- ⑥ 待管路和芯片中完全填充液体后(空气被完全排出)；将整个系统由压力控制切换到流速控制，并设置通道一(油相)和通道二(水相)流速分别为 20 和 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ；
- ⑦ 调整反馈值(Feedback)快速达到设定流速，并实现流速的稳定输出；
- ⑧ 用疏水培养皿接收一滴乳液，并在普通光学显微镜下观察微滴均一性；
- ⑨ 待微滴生成均匀后，即可在接收端放置接收相溶液收集；
- ⑩ 20 min 后停止收集，轻微振荡加快微滴固化，随后静置一段时间。

3. 壳聚糖微球的破乳清洗

具体操作步骤如下(参考视频“微流控应用：微滴/微球制备仪制备壳聚糖微球”)：

- ① 取出 1.5 mL 离心管底部微滴生成油；
- ② 按 $V_{\text{球}}:V_{\text{破}}=1:2$ 加入破乳剂，振荡破乳；
- ③ 2500 rpm 离心处理 1 min，并取出底部破乳剂；
- ④ 重复上述②和③操作；
- ⑤ 为降低破乳剂残留，可通过再次离心处理取出底部少量破乳剂；
- ⑥ 最终得到固化后的壳聚糖微球(禁止分散于水溶液中)。

4. 微滴/微球制备仪清洗

微滴/微球制备仪每次使用完必须清洗管路、流量传感器和芯片。具体操作详见“微滴/微球制备仪操作指导卡”。

结果与讨论:

刚接收的微滴平均粒径为 $107.53 \mu\text{m}$, 具有极高的单分散性(变异系数: $\text{CV}=2.14\%$)。其显微镜图和粒径分布如下图 1-2 所示:

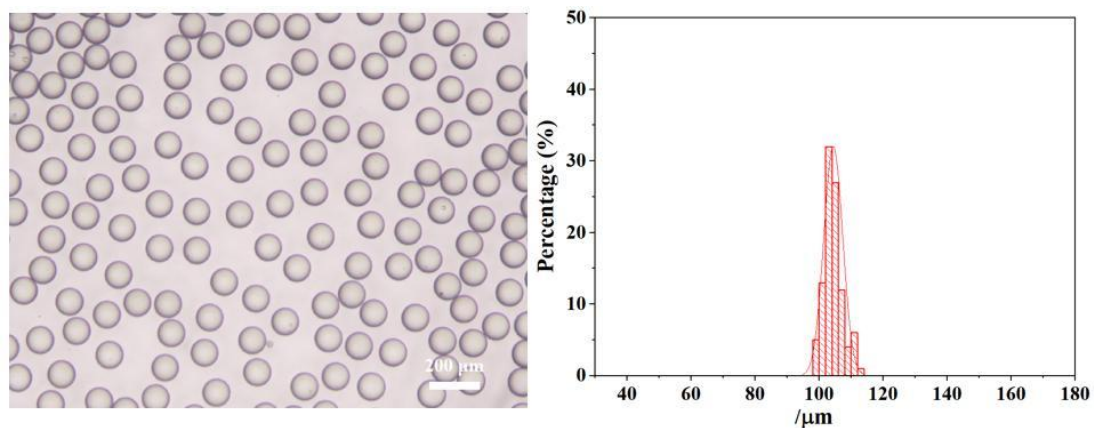


图 1-2 固化前壳聚糖微球显微镜图和粒径分布图

通过与戊二醛发生 Schiff 碱反应实现微滴的固化(固化后微球粒径收缩), 最终获得的壳聚糖微球平均粒径为 $101.67 \mu\text{m}$, 具有极高的单分散性(变异系数: $\text{CV}=2.53\%$)。其显微镜图和粒径分布如下图 1-3 所示:

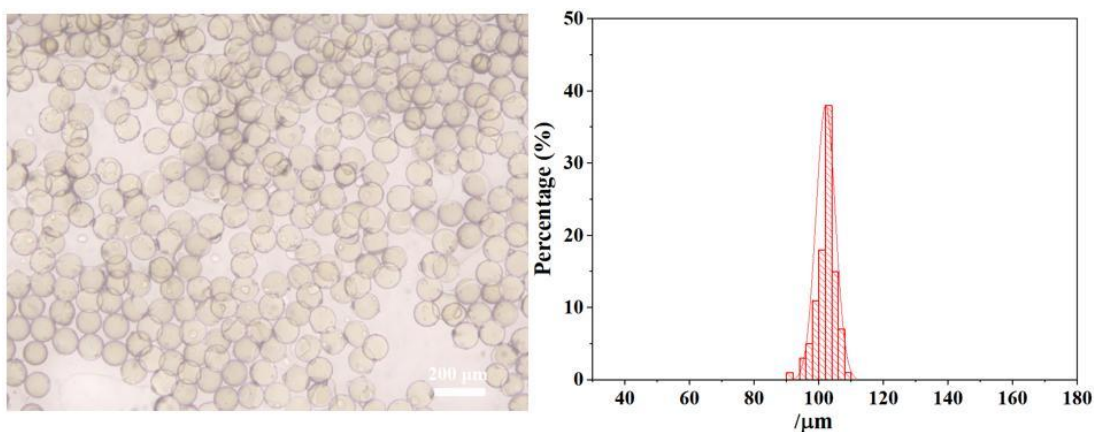


图 1-3 固化后壳聚糖微球显微镜图和粒径分布图

实验关键点：

1. 本方案只适用于 FluidicLab 提供的壳聚糖试剂盒(质量浓度为 1%时, 其粘度为<10 mPa.s), 其他品牌试剂可能不适用;
2. 采用本方案制备壳聚糖微球时, 由于水相溶液粘度大于 2% Drop-Surf 微滴生成油, 因此在同样流速下, 挤压水相所施加的压力大于油相的压力, 具体可参考本方案所对应的视频(压力数值仅供参考);
3. 采用本方案制备的壳聚糖微球不能分散于水中, 这是由于固化后的壳聚糖微球遇水易胀大。

参考文献：

- [1] Zhao H., et al. A novel microfluidic approach for monodispersed chitosan microspheres with enhanced autofluorescence, *Chem. Eng. J.*, **215–216**, 784-790 (2013).
- [2] Xu, J.H., et al. A novel Microfluidic approach for monodispersed chitosan microspheres with controllable structures, *Adv. Healthcare Mater.*, **1**, 106-111 (2012).
- [3] Zhu Y., et al. Microfluidic synthesis of thiourea modified chitosan microsphere of high specific surface area for heavy metal wastewater treatment, *Chin. Chem. Lett.*, **28**, 633-641 (2016).
- [4] Xu, J.H., et al. Preparation of monodispersed chitosan microspheres and in situ encapsulation of BSA in a co-axial microfluidic device, *Biomed. Microdevices*, **11**, 243–249 (2009).

实验方案 2. 海藻酸盐微球制备(乙酸固化法)

实验目的：

本实验方案利用微滴/微球制备仪,以 2% Drop-Surf 微滴生成油为油相,以含有螯合物 Ca-EDTA 和海藻酸钠的溶液为水相制备微液滴,将其接收至含有乙酸的接收相溶液中固化制备得到高单分散的海藻酸盐凝胶微球(CV<5%)。

引言：

水凝胶是一类重要的软性材料,被广泛应用于药物研究、药物递送、组织工程和食品科学等领域。在众多制备水凝胶的天然高分子材料中,海藻酸盐作为一种天然多糖,由于其低毒性、温和的离子交联条件、良好的生物相容性和生物可降解性等优点,在生物医学领域得到极大的关注^[1]。

微米大小的海藻酸盐微凝胶球在药物研究、组织工程和再生医学中常被用于包裹活细胞。这种微凝胶球将细胞分散在独立的区域内为细胞代谢的研究提供了一种有效的策略^[2]。纳升至皮升的微球可作为独立的反应器,用于以定量的方式监测、培养或操纵细胞。由于海藻酸盐与细胞外基质具有内在的结构相似性,这使得营养物质和氧气有效的被包裹的细胞摄取^[3]。因此,海藻酸盐凝胶微球已被广泛用于哺乳动物细胞培养和组织工程的模型系统,即器官(或组织)衰竭时的器官(或组织)替代品^[4]。此外,由于细胞间距和结构排列对细胞的性质和功能有显著的影响,因此,微球大小和尺寸分布的精确控制至关重要^[5]。

采用液滴微流控技术可以生产形貌精确可控和粒径均一的海藻酸盐水凝胶微球。通常,海藻酸

盐溶液在微流控芯片中乳化并分散在油相中，随后与 Ca^{2+} 进行交联。而这种快速的交联反应很可能导致液滴生成粒径不均一和微流控芯片的堵塞。因此，采用液滴微流控技术制备时需将液滴生成与凝胶化反应分开。例如，张等通过将 CaCO_3 纳米颗粒分散于海藻酸盐水溶液中，然后将生成后的液滴暴露在酸性条件下，导致 CaCO_3 的溶解释放 Ca^{2+} ，并使其与海藻酸盐交联凝胶化^[6]。然而，一方面，纳米颗粒状的 CaCO_3 易导致微流控芯片的堵塞；另一方面，pH 降低导致 Ca^{2+} 的释放分布不均，进而使得离子交联均匀性较差。

因此，基于 Utech 等人^[7]的研究，Fluidiclab 采用液滴微流控技术，以 2% Drop-Surf 微滴生成油为油相，以含有螯合物 Ca-EDTA 和海藻酸钠的溶液为水相制备微液滴，将其接收至含有乙酸的接收相溶液中固化制备得到高单分散的海藻酸盐凝胶微球($\text{CV}<5\%$)。其主要原理如下图 2-1 所示，含有螯合物 Ca-EDTA 的微液滴与 H^+ 结合释放出 Ca^{2+} ， Ca^{2+} 和海藻酸钠交联发生凝胶反应，最终得到海藻酸盐微球。该法操作简便，样品利用率高，制备得到的微球单分散性高，具有较好重复性。

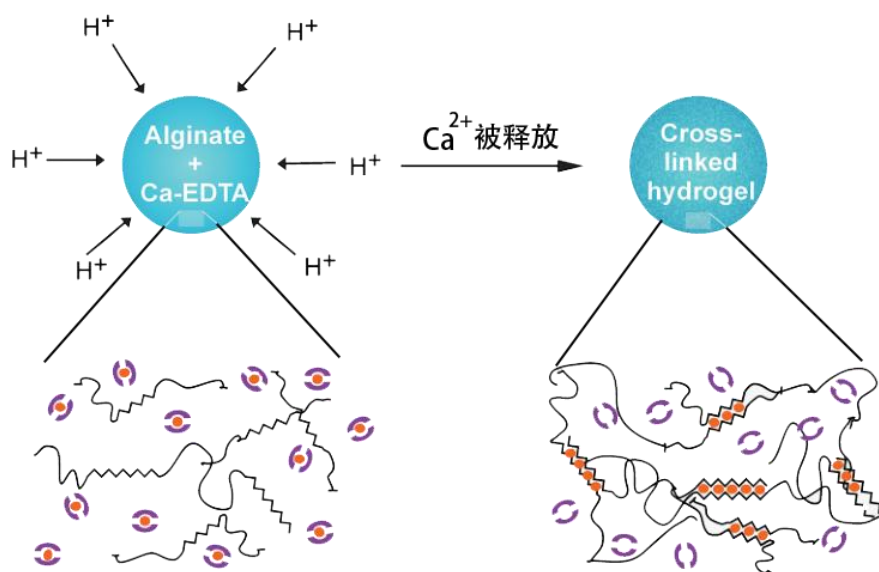


图 2-1 乙酸法固化海藻酸盐凝胶微球原理图

实验材料：

试剂	微滴生成油(2%, Drop-Surf, FluidicLab)
	破乳剂(Drop-Surf, FluidicLab)
	海藻酸钠(FluidicLab)
	冰乙酸(Macklin, A801295-500 mL)
	无水氯化钙(General-Reagent, P1902809)
	EDTA(0.5 M, Macklin, E885215-1 L)
	氢氧化钠(Macklin, S817971-500 g)
耗材	离心管(Falcon 15 mL REF 352097)若干
	离心管(1.5 mL, Axygen)若干
	PEEK 管(内/外径 0.25 /1.6 mm)及 1/4-28 螺纹接头卡箍若干
	透明玻璃瓶(10 mL 和 20 mL)若干
	针式过滤器(PTFE, 津腾, 25 mm×0.22 μm)若干
	注射器(10 mL)若干
芯片夹具	PDMS-FF-100 芯片(FluidicLab)
	PDMS 标准芯片夹具(FluidicLab)
设备	微滴/微球制备仪(FluidicLab, 两通道)
辅助设备	电脑(Win10 以上系统)
	离心机(湖南湘仪, H1850)
	pH 计(METTLER TOLEDO)
	普通光学显微镜(测微球粒径)

实验步骤：**1. 试剂配制****(1) 2 M CaCl₂ 溶液配制**

取 2.2197 g 的无水 CaCl₂ ($M_{\text{CaCl}_2}=110.984 \text{ g/mol}$)加入超纯水振荡溶解,最终定容至 10 mL 备用。

(2) 2 % (wt%)海藻酸钠溶液配制

取 0.2 g 的海藻酸钠固体粉末加入 9.8 g 超纯水超声振荡, 60 °C加热辅助溶解。

(3) 2 M NaOH 溶液配制

取 1.6 g 的 NaOH($M_{\text{NaOH}}=40.00 \text{ g/mol}$)加入超纯水振荡溶解, 最终定容至 20 mL 备用。

(4) 240 mM Ca-EDTA 溶液(pH=7.2)配制

分别取 1.2 mL 的 2 M CaCl₂, 4.8 mL 的 0.5 M EDTA, 加入 2 M NaOH 调节 pH 至 7.2, 最终定容至 10 mL 备用。

【注】下表 2-1 加入体积供参考, 实际加入量以 pH 值变化为准。

表 2-1 Ca-EDTA 溶液调节 pH 实验记录

序号	依次加入 2 M NaOH 体积(μL)	pH 测量值
1	0	3.52
2	1000	4.54
3	150	5.20
4	30	6.51
5	2	6.96
6	0.5	7.20
总体积	1182.5	/

(5) 水相溶液配制 (1%海藻酸钠, 120 mM Ca-EDTA)

取等体积 240 mM Ca-EDTA 溶液与 2%海藻酸钠溶液振荡均匀得到水相溶液, 用针式过滤器过

滤备用。

(6) 接收相溶液配制(1%乙酸, pH=4.8)

取 500 μL 2% Drop-Surf 微滴生成油, 加入 5 μL 冰乙酸, 振荡均匀备用。

2. 微滴制备

(1) 微滴/微球制备仪的安装连接

微滴/微球制备仪安装连接参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“2. 微滴/微球制备仪的安装连接”的部分; 其连接如下(步骤③-⑦连接效果如下图 2-2 所示):

① 用气管依次连接“空气压缩机”-“气源处理装置”-“微滴/微球制备仪”;

② 将微滴/微球制备仪分别与电源、电脑的连接;

③ 用气管分别将 A_0 (压力输出通道一)和 A_1 (油相 15 mL 储液池), B_0 (压力输出通道二)和 B_1 (水相 1.5 mL 储液池)连接;



图 2-2 微滴/微球制备仪的安装连接

④ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A_1 (油相 15 mL

储液池)和 A₂(通道一流量传感器), B₁(水相 1.5 mL 储液池)和 B₂(通道二流量传感器)连接;

⑤ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A₂(通道一流量传感器)和 A₃(PDMS 微滴芯片夹具的油相入口), B₂(通道二流量传感器)和 B₃(PDMS 微滴芯片夹具的水相入口)连接;

⑥ C 为 PDMS 标准微滴芯片和夹具的组合, 芯片和夹具的入口通过硅胶塞密封;

⑦ 用 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)将芯片出口 D 处生成的乳液导出。

(2) FluidicLabSuite 软件的安装和设备的添加

FluidicLabSuite 软件的安装参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.1 FluidicLabSuite 软件的安装”的部分;

(3) 海藻酸钠微液滴的制备

具体操作步骤如下(参考视频“微流控应用:微滴/微球制备仪制备海藻酸钠微球(乙酸固化法)”):

① 分别在 15 mL 油相储液池(通道一)和 1.5 mL 水相储液池(通道二)中依次加入 5 mL 2% Drop-Surf 微滴生成油和 1 mL 水相溶液;

② FluidicLabSuite 软件的设备添加参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.2 FluidicLabSuite 软件的设备添加”的部分(相机和流量传感器仅需添加一次);

③ 打开空气压缩机和气源处理装置开关;

④ 在乳液出口端放置离心管接收前废液;

⑤ 在电脑端设置通道一压力(油相, 如 150 mbar)和通道二压力(水相, 如 900 mbar, 水相粘度大, 流阻大, 压力更大)排出管路和芯片中的空气;

⑥ 待管路和芯片中完全填充液体后(空气被完全排出); 将整个系统由压力控制切换到流速控

制，并设置通道一(油相)和通道二(水相)流速分别为 7 和 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ ；

- ⑦ 调整反馈值(Feedback)快速达到设定流速，并实现流速的稳定输出；
- ⑧ 用疏水培养皿接收一滴乳液，在普通光学显微镜下观察其微滴均一性；
- ⑨ 待微滴生成均匀后，即可在接收端放置接收相溶液收集；
- ⑩ 20 min 后停止收集，轻微振荡加快微滴固化，随后静置固化约 30 min。

3. 海藻酸盐微球的破乳清洗

具体操作步骤如下(参考视频“微流控应用:微滴/微球制备仪制备海藻酸钠微球(乙酸固化法)”)：

- ① 取出 1.5 mL 离心管底部微滴生成油；
- ② 按 $V_{\text{球}}:V_{\text{破}}=1:2$ 加入破乳剂，振荡破乳；
- ③ 2500 rpm 离心处理 1 min，并取出底部破乳剂；
- ④ 重复上述②和③操作；
- ⑤ 为降低破乳剂残留，可通过再次离心处理取出底部少量破乳剂；
- ⑥ 最终得到固化后的海藻酸盐微球，分散在 PBS 缓冲液中。

4. 微滴/微球制备仪清洗

微滴/微球制备仪每次使用完必须清洗管路、流量传感器和芯片。具体操作详见“微滴/微球制备仪操作指导卡”。

结果与讨论：

刚接收的微滴平均粒径为 98.45 μm ，具有极高的单分散性(变异系数:CV=1.02%)。其显微镜图和粒径分布如下图 2-3 所示：

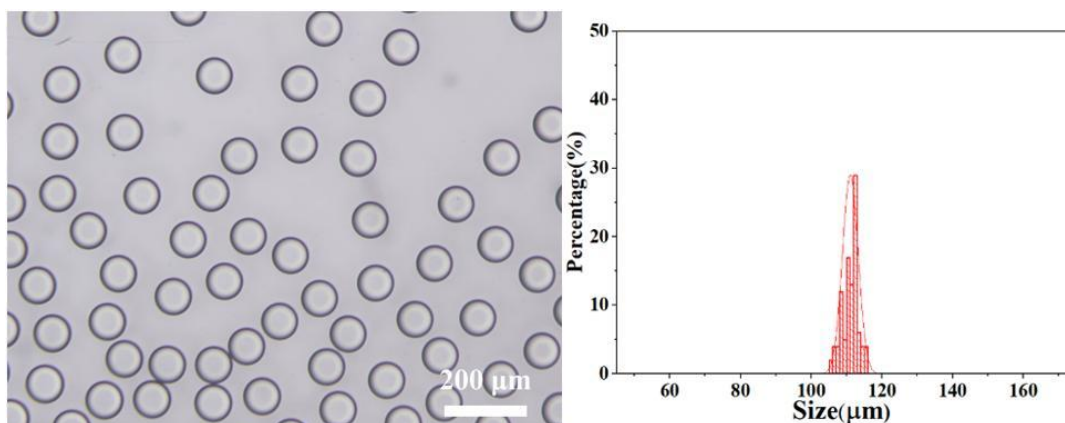


图 2-3 固化前海藻酸盐微球显微镜图和粒径分布图

最终获得的海藻酸盐微球平均粒径为 92.91 μm，具有极高的单分散性(变异系数:CV=2.35%)。

其显微镜图和粒径分布如下图 2-4 所示：

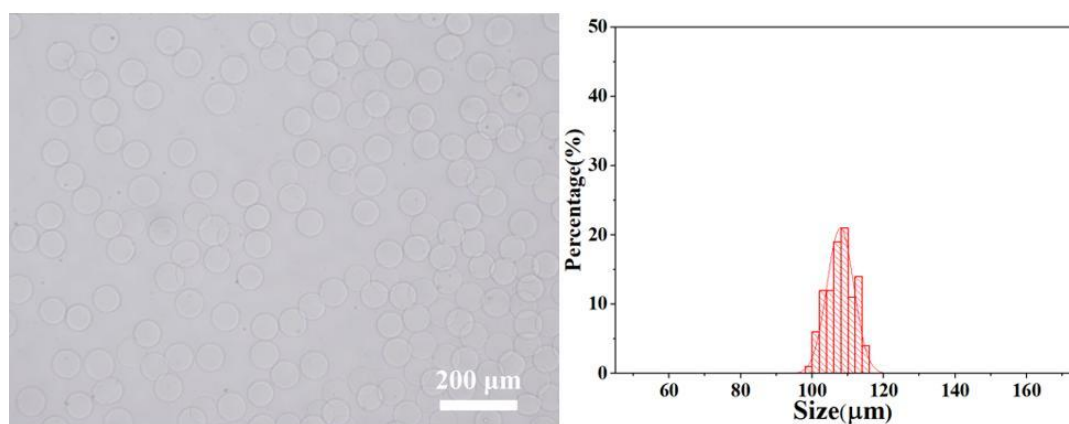


图 2-4 固化后海藻酸盐微球显微镜图和粒径分布图

实验关键点：

1. 本方案中接收液(1%乙酸油相溶液)呈酸性(pH<5);
2. 采用本方案制备海藻酸盐微球时，水相中不能含有游离钙离子，这一点主要是针对含有游离钙离子细胞培养基；

3. 采用本方案制备海藻酸盐微球时,由于水相溶液粘度大于 Drop-Surf 微滴油,因此在同样流速下,挤压水相所施加的压力大于油相的压力;
4. 采用本方案制备海藻酸盐微球时,若分散于 PBS 缓冲液中无法观察到微球存在,可以尝试在 PBS 中加入少量游离钙离子,或者将微球分散于水中。
5. 采用本方案制备海藻酸盐微球可通过 FluidicLab 提供的海藻酸盐凝胶裂解酶降解。

参考文献:

- [1] Ching S. H., et al. Alginate gel particles—a review of production techniques and physical properties, *Crit. Rev. Food Sci.*, **57**, 1133-1152 (2015).
- [2] Wang H , et al. The use of micro- and nanospheres as functional components for bone tissue regeneration, *Tissue Eng. Part B Rev.*, **18**, 24-39 (2012).
- [3] Wan. J, Microfluidic-based synthesis of hydrogel particles for cell microencapsulation and cell-based drug delivery, *Polymers*, **4**, 1084-1108 (2012).
- [4] Rowley J.A., et al. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials., *Biomaterials*, **20**, 45-53 (1999).
- [5] Bhatia, S. N., et al. Effect of cell–cell interactions in preservation of cellular phenotype: co-cultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells, *FASEB J.* **13**, 1883–1900 (1999).
- [6] Zhang H., et al. Exploring microfluidic routes to microgels of biological polymers, *Macromol. Rapid Comm.*, **28**, 527-538 (2007).
- [7] Utech S., et al. Microfluidic generation of monodisperse, structurally homogeneous alginate microgels for cell encapsulation and 3D cell culture, *Adv. Heal. Mater.*, **4**, 1628-1633 (2015).

实验方案 3. 海藻酸盐微球制备(离子交换法)

实验目的:

本实验方案利用微滴/微球制备仪, 以含有螯合物 Ca-EDTA 和海藻酸钠的溶液为水相 1, 以含有螯合物 Zn-EDDA 和海藻酸钠的溶液为水相 2, 以 2% Drop-Surf 微滴生成油为油相制备高单分散的海藻酸盐凝胶微球(CV<5%)。

引言:

在实验方案二中, 我们介绍了运用乙酸固化法制备海藻酸盐微球的方法。虽然这种方法可以制备结构均匀的离子交联海藻酸盐凝胶珠, 但该工艺凝胶固化所需的 pH(pH<5)较低。这很有可能会严重影响细胞的存活, 不利于细胞和组织生长。

基于以上存在的问题, FluidicLab 微滴制备平台通过借助配体与离子结合能力的不同, 实现凝胶离子 Ca^{2+} 有序可控的释放, 以达到海藻酸盐微球凝胶固化的目的^[7,8]。其原理示意图如下图 3-1 所示, 将含有螯合物 Ca-EDTA 和海藻酸钠的溶液作为水相 1, 含有螯合物 Zn-EDDA 和海藻酸钠的溶液作为水相 2; 当两种水相混合后, 因螯合剂与金属离子的结合能力存在差异, Zn^{2+} 会与 EDTA 结合从而导致 Ca^{2+} 的释放, 而被释放的 Ca^{2+} 与海藻酸钠反应实现凝胶固化。通过上述方式结合 FluidicLab 微滴制备平台制备的海藻酸盐凝胶微球是在中性、低离子浓度的温和条件下进行的, 制备微球粒径均一性高, 反应速度快, 凝胶固化时间短, 大大减少对健康细胞的伤害。

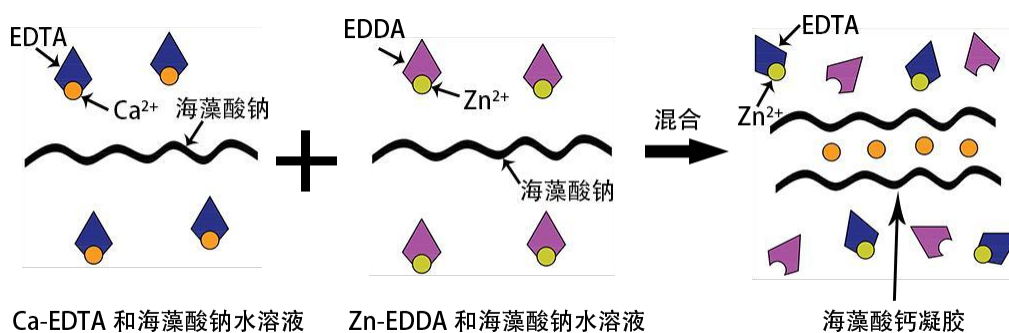


图 3-1 离子交换法固化海藻酸盐凝胶微球原理图

实验材料：

微滴生成油(2%, Drop-Surf, FluidicLab)

破乳剂(Drop-Surf, FluidicLab)

海藻酸钠(FluidicLab)

无水氯化钙(Macklin, C805228-100 g)

试剂 EDTA 溶液(Macklin, 0.5 M, pH 7.4, E885215-1 L)

乙二胺-N, N'-二乙酸(EDDA, Macklin, E838453-5 g)

无水醋酸锌(Macklin, E820824-25 g)

氢氧化钠(Macklin, S817971-500 g)

PBS 缓冲液粉末(Macklin, P854529-10 EA)

离心管(Falcon 15 mL REF 352097)若干

离心管(1.5/2 mL, Axygen)若干

耗材 PEEK 管(内/外径 0.25 /1.6 mm)及 1/4-28 螺纹接头卡箍若干

针式过滤器(PTFE, 津腾, 25 mm×0.22 μm)若干

注射器(10 mL)若干

芯片夹具	PDMS-SCE-100/50/30 芯片(FluidicLab)
	PDMS 标准芯片夹具(FluidicLab)
设备	微滴/微球制备仪(FluidicLab, 三通道)
辅助设备	电脑(Win10 以上系统)
	离心机(湖南湘仪, H1850)
	pH 计(METTLER TOLEDO)
	普通光学显微镜(测微球粒径)

实验步骤：

1. 试剂配制

(1) 2 M CaCl₂ 溶液配制

取 2.2197 g 的无水 CaCl₂ ($M_{CaCl_2}=110.984 \text{ g/mol}$)加入超纯水振荡溶解,最终定容至 10 mL 备用。

(2) 1.2 % (wt%)海藻酸钠溶液配制

取 0.12 g 的海藻酸钠固体粉末加入 9.88 g 超纯水超声振荡, 60 °C加热辅助溶解。

(3) 2 M NaOH 溶液配制

取 1.6 g 的 NaOH($M_{NaOH}=40.00 \text{ g/mol}$)加入超纯水振荡溶解, 最终定容至 20 mL 备用。

(4) 80 mM Ca-EDTA 溶液(pH=6.7)

取 400 μL 配制的 2 M CaCl₂ 与 1.6 mL 的 0.5 M EDTA 振荡均匀, 加入 5 mL 超纯水振荡均匀, 然后滴加 2M NaOH 调整 pH 至 6.7 左右, 最终加入超纯水定容至 10 mL。

【注】下表 3-1 加入体积供参考, 实际加入量以 pH 值变化为准。

表 3-1 Ca-EDTA 溶液调节 pH 实验记录

序号	依次加入 2 M NaOH 体积(μL)	pH 测量值
1	0	3.92
2	200	4.38
3	150	5.97
4	5	6.21
5	3	6.38
6	2	6.51
7	1	6.58
8	0.5	6.63
9	0.5	6.67
总体积	362	/

(5) 80 mM Zn-EDDA 溶液(pH=6.7)

取 0.1465 g 的无水 $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CHO}_2)_2$ ($M_{\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CHO}_2)_2}=183.48 \text{ g/mol}$) 与 0.1416 g 的乙二胺-N, N'-二乙酸(EDDA, $M_{\text{EDDA}}=176.17 \text{ g/mol}$), 加入 5 mL 超纯水超声振荡溶解, 然后滴加 2M NaOH 调整 pH 至 6.7 左右, 最终加入超纯水定容至 10 mL。

【注】下表 3-2 加入体积供参考, 实际加入量以 pH 值变化为准。

表 3-2 Zn-EDDA 溶液调节 pH 实验记录

序号	依次加入 2 M NaOH 体积(μL)	pH 测量值
1	0	3.96
2	500	5.01
3	200	5.71
4	40	6.06
5	20	6.44
6	3	6.53
7	2	6.62
8	1	6.65
9	0.5	6.68
总体积	766.5	/

(6) 水相 1 配制(0.6%海藻酸钠, 40 mM Ca-EDTA)

取等体积 80 mM Ca-EDTA 溶液与 1.2%海藻酸钠溶液振荡均匀得到分散相 1, 用针式过滤器过滤备用。

(7) 水相 2 配制(0.6%海藻酸钠, 40 mM Zn-EDDA)

取等体积 80 mM Zn-EDDA 溶液与 1.2%海藻酸钠溶液振荡均匀得到分散相 2, 用针式过滤器过滤备用。

2. 海藻酸盐微球制备

(1) 微滴/微球制备仪的安装连接

微滴/微球制备仪安装连接参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“2. 微滴/微球制备仪的安装连接”的部分；其连接如下(步骤③-⑦连接效果如下图 3-2 所示)：

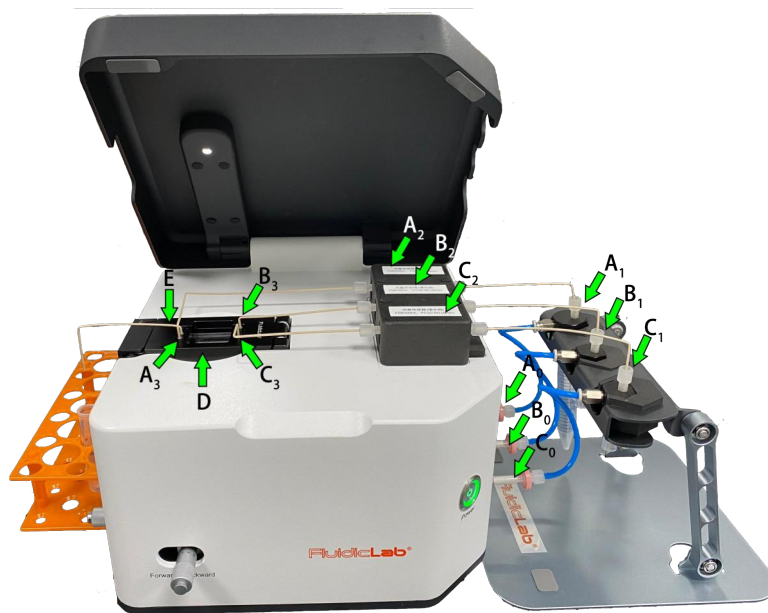


图 3-2 微滴/微球制备仪的安装连接

- ① 用气管依次连接“空气压缩机”-“气源处理装置”-“微滴/微球制备仪”；
- ② 将微滴/微球制备仪分别与电源、电脑的连接；

③ 用气管分别将 A₀(压力输出通道一)和 A₁(油相 15 mL 储液池), B₀(压力输出通道二)和 B₁(水相 1 的 2 mL 储液池)连接, C₀(压力输出通道三)和 C₁(水相 2 的 2 mL 储液池);

④ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A₁(油相 15 mL 储液池)和 A₂(通道一流量传感器), B₁(水相 1 的 2 mL 储液池)和 B₂(通道二流量传感器)连接, C₁(水相 2 的 2 mL 储液池)和 C₂(通道三流量传感器)连接;

⑤ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A₂(通道一流量传感器)和 A₃(PDMS 微滴芯片夹具的油相入口), B₂(通道二流量传感器)和 B₃(PDMS 微滴芯片夹具的水相 1 入口)连接, C₂(通道三流量传感器)和 C₃(PDMS 微滴芯片夹具的水相 2 入口)连接;

⑥ D 为 PDMS 标准微滴芯片和夹具的组合, 芯片和夹具的入口通过硅胶塞密封;

⑦ 用 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)将芯片出口 E 处生成的乳液导出。

(2) FluidicLabSuite 软件的安装和设备的添加:

FluidicLabSuite 软件的安装参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.1 FluidicLabSuite 软件的安装”的部分(相机和流量传感器仅需添加一次);

(3) 海藻酸钠微滴的制备和固化

具体操作步骤如下(参考视频“微流控应用: 微滴制备仪制备海藻酸钠微球”):

① 分别在 15 mL 油相储液池(通道一), 2 mL 水相 1 储液池(通道二)和 2 mL 水相 2 储液池(通道三)中依次加入 5 mL 2% Drop-Surf 微滴生成油, 2 mL 水相 1(0.6%海藻酸钠, 40 mM Ca-EDTA)和 2 mL 水相 2(0.6%海藻酸钠, 40 mM Zn-EDDA);

② 打开空气压缩机和气源处理装置开关;

③ 在乳液出口端放置离心管接收前废液;

- ④ 在电脑端设置通道一压力(油相, 如 250 mbar)、通道二压力(水相 1, 如 350 mbar)和通道三压力(水相 2, 如 350 mbar)排出管路和芯片中的空气;
- ⑤ 待管路和芯片中充满液体后(空气被完全排出), 将整个系统由压力控制切换到流速控制, 并设置通道一(油相), 通道二(水相 1)和通道三(水相 2)流速分别为 20, 5 和 5 $\mu\text{L}/\text{min}$;
- ⑥ 调整反馈值(Feedback)快速达到设定流速, 并实现流速的稳定输出;
- ⑦ 用疏水培养皿接收一滴乳液, 并在普通光学显微镜下观察其微滴均一性;
- ⑧ 待微滴生成均匀后, 即可开始接收 1.5 mL 离心管中;
- ⑨ 一段时间后停止收集, 密封于离心管中, 静置 10 min 固化。

3. 海藻酸盐微球的破乳清洗

具体操作步骤如下(参考视频“微流控应用: 微滴制备仪制备海藻酸钠微球”):

- ① 取出 1.5 mL 离心管底部微滴生成油;
- ② 按 $V_{\text{球}}: V_{\text{破}}=1:2$ 加入破乳剂, 振荡破乳;
- ③ 1000 rpm 离心处理 30 s, 并取出底部破乳剂;
- ④ 重复上述②和③操作;
- ⑤ 为降低破乳剂残留, 可通过再次离心处理取出底部少量破乳剂;
- ⑥ 最终将得到海藻酸盐微球分散于配制的 PBS 缓冲液中。

4. 微滴/微球制备仪清洗

微滴/微球制备仪每次使用完必须清洗管路、流量传感器和芯片。具体操作详见“微滴/微球制备仪操作指导卡”。

结果与讨论:

刚接收的微滴平均粒径为 $101.74\ \mu\text{m}$, 具有极高的单分散性(变异系数:CV=1.30%)。其显微镜图和粒径分布如下图 3-3 所示:

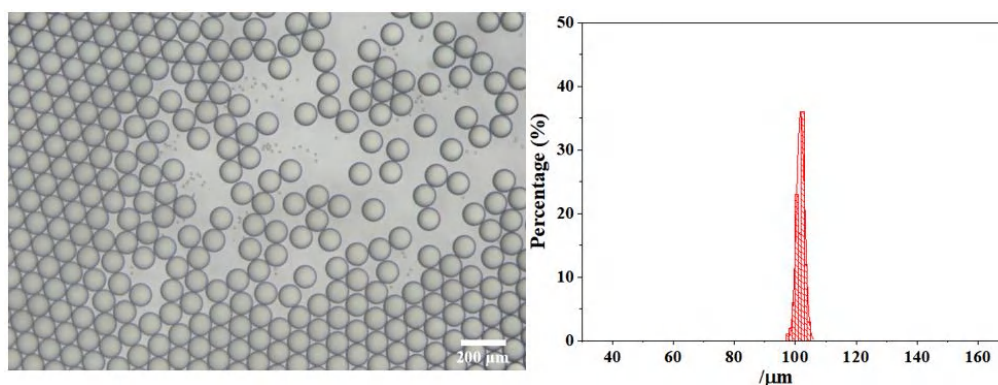


图 3-3 固化前海藻酸盐微球显微镜图和粒径分布图

微滴交联固化分散于 PBS 中的海藻酸盐微球平均粒径为 $96.08\ \mu\text{m}$, 具有极高的单分散性(变异系数:CV=2.52%)。其显微镜图和粒径分布如下图 3-4 所示:

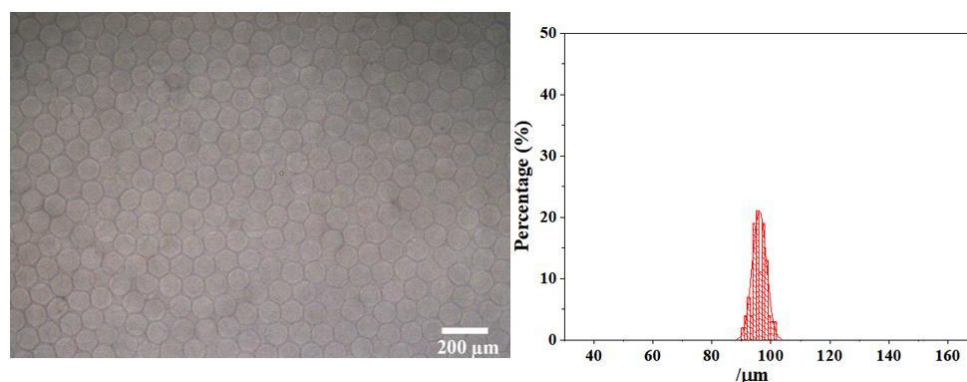


图 3-4 固化后海藻酸盐微球显微镜图和粒径分布图

此外, 我们也采用了不同类型的芯片制备了 1%海藻酸盐微球, 其中水相 1 中 Ca-EDTA 和水相 2 中的 Zn-EDDA 浓度都为 40 mM。具体参数如下表 3-3 所示:

表 3-3 不同芯片制备海藻酸盐微球的参数及结果

芯片类型	油相		水相 1		水相 2		微滴粒径 (μm)	CV(%)	微球粒径 (μm)	CV(%)
	流速 ($\mu\text{L}/\text{min}$)	压力 (mbar)	流速 ($\mu\text{L}/\text{min}$)	压力 (mbar)	流速 ($\mu\text{L}/\text{min}$)	压力 (mbar)				
PDMS-SCE-100	10	85	1.5	366	1.5	366	101.68	1.69	107.24	1.61
	10	114	4.5	855	4.5	859	112.39	1.99	110.54	2.03
	20	166	5	959	5	944	100.60	1.81	103.16	1.76
	20	176	6.5	1110	6.5	1081	106.57	1.72	107.24	1.71
PDMS-SCE-50	4	174	1	1145	1	1157	53.83	2.66	58.39	4.10
	4	251	2	1727	2	1658	60.07	2.49	65.94	3.37
	8	309	2	1700	2	1663	51.28	2.62	55.81	3.99
PDMS-SCE-30	5	/	2	/	2	/	33.72	2.81	34.42	3.46

实验关键点：

1. 本方案适用于包裹细胞、微生物或包裹大分子多肽药物的海藻酸盐微球制备；
2. 采用本方案制备海藻酸盐微球时，两水相中都不能含有游离钙离子，这一点主要是针对含有游离钙离子细胞培养基；
3. 采用本方案制备海藻酸盐微球时，由于两水相溶液粘度大于 Drop-Surf 微滴油，因此在同样流速下，挤压水相所施加的压力大于油相的压力，具体可参考本方案所对应的视频(压力数值仅供参考)；
4. 采用本方案制备海藻酸盐微球时，若微滴/微球制备仪上无流量传感器时，两水相压力相等或相近以保证流速相等(在流道内汇聚时，根据两水相分界线判定)；
5. 采用本方案制备海藻酸盐微球时，若分散于 PBS 缓冲液中无法观察到微球存在，可以尝试在 PBS 中加入少量游离钙离子，或者将微球分散于水中；
6. 本方案制备海藻酸盐微球时，随着 Ca-EDTA、Zn-EDDA 和海藻酸钠溶液浓度的增加，制备出的

海藻酸盐微球轮廓越清晰明显。

7. 采用本方案制备海藻酸盐微球可通过 FluidicLab 提供的海藻酸盐凝胶裂解酶降解。

参考文献：

- [1] Ching S. H., et al. Alginate gel particles—a review of production techniques and physical properties, *Crit. Rev. Food Sci.*, **57**, 1133-1152 (2015).
- [2] Andersen T., et al. 3D cell culture in alginate hydrogels, *Microarrays*, **4**, 133-161 (2015).
- [3] Uyen N.T.T., et al. Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: a review, *Int. J. Biol. Macromol.*, **153**, 1035-1046 (2020).
- [4] Rajaonarivony M., et al. Development of a new drug carrier made from alginate, *J. Pharm. Sci-US*, **82**, 912-917 (1993).
- [5] Zhang H., et al. Exploring microfluidic routes to microgels of biological polymers, *Macromol. Rapid Comm.*, **28**, 527-538 (2007).
- [6] Utech S., et al. Microfluidic generation of monodisperse, structurally homogeneous alginate microgels for cell encapsulation and 3D cell culture, *Adv. Heal. Mater.*, **4**, 1628-1633 (2015).
- [7] Håti A. G., et al. Versatile, cell and chip friendly method to gel alginate in microfluidic devices, *Lab Chip*, **16**, 3718 (2016).
- [8] Bassett D. C., et al. Competitive ligand exchange of crosslinking ions for ionotropic hydrogel formation, *J. Mater. Chem. B*, **4**, 6175 (2016).

实验方案 4. 含 Oligo DNA 的可降解凝胶珠制备

实验目的：

本实验方案参照 10X Genomics 的 barcode 凝胶珠制备方法，以微滴/微球制备仪为驱动装置，以含有丙烯酰胺单体和 N,N'-双(丙烯酰)脒胺交联剂的混合溶液为水相，以含有 N, N, N', N'-四甲基乙二胺的 2% Drop-Surf 微滴生成油为油相，制备含有 Oligo DNA 的高单分散可降解聚丙烯酰胺凝胶珠(CV<5%)，封装前后 Oligo DNA 浓度交联率高达 40%以上。

引言：

细胞作为生物结构和功能的基本单位，在形态类型上差异很大。结合高通量测序，基于液滴的单细胞测序技术被成功应用于分析单细胞中的 RNA^[1-3]、DNA^[4,5]和蛋白质^[6,7]等组分。为了标记追踪单个细胞，需要将含有 DNA barcode 的凝胶珠与单个细胞共同封装在纳升级的液滴中，以便用于后续的单细胞分析测序^[8]。而如何将合成的 DNA barcode 添加到凝胶珠上是实现这项技术的关键。现已报道的制备添加 DNA barcode 的方法有 inDrop 单细胞测序的聚丙烯酰胺胶珠^[2]、Drop-seq 单细胞测序的羟化甲基丙烯酸聚合物凝胶珠^[3]和 10X Genomics 使用的聚丙烯酰胺凝胶珠^[8]等。

然而，上述方法制备的胶珠由于化学成分不同，其优缺点有明显差异。例如，inDrop 系统中可实现 95%以上的胶珠包裹率，但 DNA barcode 的释放需要通过紫外线辅助释放，这在一定程度上增加了引物的释放难度^[2]。同时，紫外线也有可能对 DNA 或 RNA 造成不可逆的损伤。Drop-seq 系统中虽无上述问题，但引物不会从胶珠中释放，这使得反应仅在胶珠表面进行，降低了反应效率。在 10X Genomics 系统中，胶珠可以实现有效的包裹和释放，但相对较高的成本和胶珠上引物设计

缺乏灵活性限制了一些实验的开展。因此，当前的主要难点是制备出简易高效向液滴输送含有 barcode 胶珠，从而实现高检测效率。

FluidicLab 基于 Wang 等人的研究^[9]，参照 10X Genomics 的 barcode 凝胶珠制备方法，提供了一种含有 Oligo DNA 聚丙烯酰胺可降解凝胶珠的实验方案。本实验方案以含有丙烯酰胺单体和 N,N'-双(丙烯酰)胱胺交联剂的混合溶液为水相，以含有 N, N, N', N'-四甲基乙二胺的 2% Drop-Surf 微滴生成油为油相，制备含有 Oligo DNA 的高单分散可降解聚丙烯酰胺凝胶珠。其反应机理如下图所示^[9]，通过 N, N, N', N'-四甲基乙二胺(TEMED)加速过硫酸铵(APS)产生自由基，促使丙烯酰胺单体与 N,N'-双(丙烯酰)胱胺交联剂发生聚合反应。所制备的胶珠可以通过二巯硫醇(DTT)打开交联剂 N,N'-双(丙烯酰)胱胺中的二硫键，使得其被完全降解，从而释放出 DNA barcode，通过检测封装前后 Oligo DNA 浓度可知其交联率高达 40%以上。

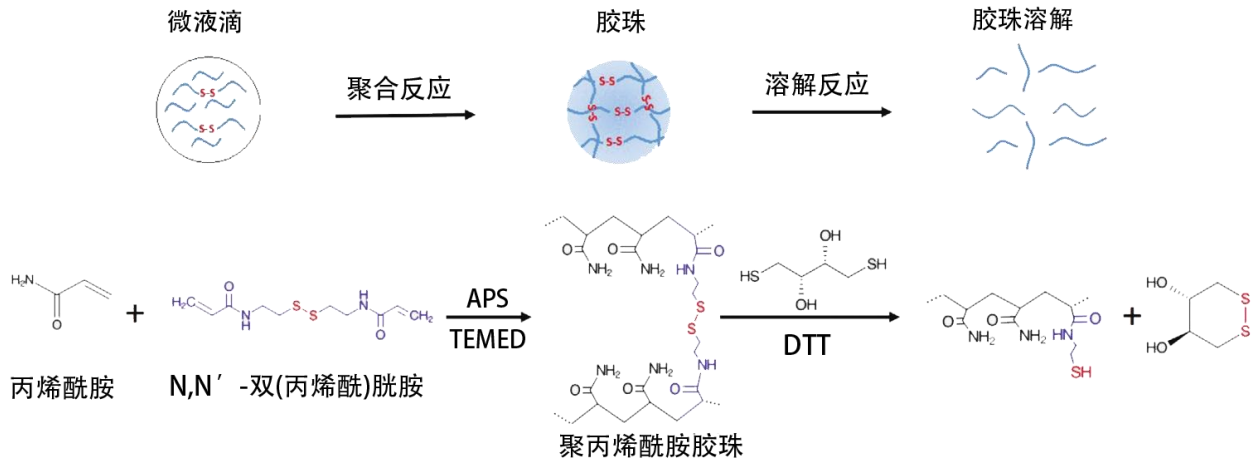


图 4-1 可降解聚丙烯酰胺凝胶珠反应机理图

实验材料：

试剂盒 微滴生成油(2%, Drop-Surf, FluidicLab)

破乳剂(Drop-Surf, FluidicLab)

TBSET 缓冲液(FluidicLab)

丙烯酰胺溶液(40%, wt%, FluidicLab)

N,N'-双(丙烯酰)脒胺溶液(0.8%, wt%, BAC, FluidicLab)

过硫酸铵(APS, FluidicLab)

N, N, N', N'-四甲基乙二胺(TEMED, FluidicLab)

含 Span 80 的正己烷溶液(1%, v/v, FluidicLab)

TET 缓冲液(FluidicLab)

Qubit ssDNA 检测试剂盒(Thermo Fisher Scientific)

二苏硫醇溶液(10 mM , DTT , FluidicLab)

耗材

离心管(Falcon 15 mL REF 352097)若干

离心管(1.5 mL, Axygen)若干

PEEK 管(内/外径 0.25 /1.6 mm)及 1/4-28 螺纹接头卡箍若干

针式过滤器(PTFE, 津腾, 25 mm×0.22 μm)若干

芯片夹具

PDMS-FF-50C 芯片(FluidicLab)

PDMS 标准芯片夹具(FluidicLab)

设备

微滴/微球制备仪(FluidicLab, 两通道)

电脑(Win10 以上系统)

离心机(湖南湘仪, H1850)

辅助设备

普通光学显微镜(测微球粒径)

Qubit 4 荧光检测仪(ThermoFisher Scientific)

鼓风干燥箱

实验步骤：

1. 试剂配制

具体操作步骤如下(参考视频“微流控应用：微滴制备仪制备含 Oligo DNA 的可降解凝胶珠”)：

(1) 10%(w/v)过硫酸铵溶液配制

称量约 0.1 g 过硫酸铵，加入超纯水振荡溶解，最终定容至 1 mL 备用。

(2) 含有 Oligo DNA 的水相配制

① 依次取 200 μL TBSET 缓冲液、300 μL 40%(wt%)丙烯酸胺溶液、980 μL 0.8% (wt%) $\text{N}_3\text{N}'$ -双(丙烯酰)脲胺溶液和 120 μL 10%(w/v)过硫酸铵溶液混合均匀，并用针式过滤器过滤处理备用；

② 再依次取上述配制好的 800 μL 丙烯酸胺混合液、166 μL 浓度为 150 μM 的 Oligo DNA 和 34 μL 超纯水混合均匀得到 1 mL 含有 Oligo DNA 的水相溶液，最终配制成分如下表 4-1 所示：

表 4-1 含有 Oligo DNA 的水相溶液配制表

项目/单位	初浓度	加入量(μL)	终浓度
TBSET 缓冲液	/	100	/
丙烯酸胺混合液	丙烯酸胺溶液(wt%)	150	6%
	$\text{N}_3\text{N}'$ -双(丙烯酰)脲胺溶液(wt%)	490	0.392%
	过硫酸铵(w/v)	60	0.60%
	Oligo DNA	150 μM	166
超纯水	/	34	/

(3) 水相中 Oligo DNA 浓度的检测

① 取 5 μL 上述配制的含有 Oligo DNA 水相溶液，加入 45 μL 超纯水将其稀释 10 倍，振荡均

匀备用；

② 依次取 298.5 μL Qubit ssDNA Buffer 和 1.5 μL Qubit ssDNA Reagent 混合均匀得到 Qubit ssDNA 检测试剂备用。

③ 依次取上述配制的 199 μL Qubit ssDNA 检测试剂和 1 μL 上述配制的含有 Oligo DNA 的水相稀释液混合均匀，并静置 2 min；用 Qubit 4 检测其浓度。

(4) 油相配制

按 1000:4 (v/v)的体积比在 3 mL 2% Drop-Surf 微滴生成油中加入 12 μL TEMED，并振荡均匀。

2. 含有 Oligo DNA 胶珠的制备和固化

(1) 微滴/微球制备仪的安装连接

微滴/微球制备仪安装连接参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“2. 微滴/微球制备仪的安装连接”的部分；其连接如下(步骤③-⑦连接效果如下图 4-2 所示)：



图 4-2 微滴/微球制备仪的安装连接

① 用气管依次连接“空气压缩机”-“气源处理装置”-“微滴/微球制备仪”；

- ② 将微滴/微球制备仪分别与电源、电脑的连接；
- ③ 用气管分别将 A₀(压力输出通道一)和 A₁(油相 15 mL 储液池), B₀(压力输出通道二)和 B₁(水相 1.5 mL 储液池)连接；
- ④ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A₁(油相 15 mL 储液池)和 A₂(通道一流量传感器), B₁(水相 1.5 mL 储液池)和 B₂(通道二流量传感器)连接；
- ⑤ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A₂(通道一流量传感器)和 A₃(PDMS 微滴芯片夹具的油相入口), B₂(通道二流量传感器)和 B₃(PDMS 微滴芯片夹具的水相入口)连接；
- ⑥ C 为标准 PDMS-FF-50 超疏水芯片和夹具组合, 芯片和夹具的入口通过硅胶塞密封；
- ⑦ 用 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)将芯片出口 D 处生成的乳液导出。

(2) FluidicLabSuite 软件的安装和设备的添加

FluidicLabSuite 软件的安装参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.1 FluidicLabSuite 软件的安装”的部分；

(3) 含有 Oligo DNA 胶珠的制备和固化

具体操作步骤如下(参考视频“微流控应用：微滴制备仪制备含 Oligo DNA 的可降解凝胶珠”)：

- ① 在通道一的储液池(油相)中加入上述配制的油相, 通道二的储液池(水相)中加入上述配制的含有 Oligo DNA 的水相；
- ② 打开空气压缩机及气源处理开关；
- ③ 在电脑端设置通道一(油相)和通道二(水相)压力排出管路及芯片中的空气, 待空气排出(管路及芯片充满液体)后, 设定油相和水相流速分别为 20 和 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ ；

- ④ 按《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》调整流速增加反馈值(Feedback)以快速达到预定设置值;
- ⑤ 待微液滴生成稳定后,用疏水培养皿接收液滴并用显微镜观察其均匀性;
- ⑥ 微液滴稳定生成后,即可开始接收至离心管中,20 min 后停止收集;
- ⑦ 将接收至离心管中的乳液表面覆盖 200 μL 矿物油,并放置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 鼓风干燥箱中过夜固化。

3. 含有 Oligo DNA 胶珠的破乳清洗

具体操作步骤如下(参考视频“微流控应用:微滴制备仪制备含 Oligo DNA 的可降解凝胶珠”):

- ① 取出 1.5 mL 离心管底部油相和上层矿物油;
- ② 按 $V_{\text{球}}:V_{\text{破}} = 1:2$ 加入破乳剂,振荡破乳;5000 rpm 离心处理 30 s,取出底部废液;重复上述操作 2~3 次,直到微球由乳白色变为透明;
- ③ 按 $V_{\text{球}}:V = 1:2$ 加入 1% Span80 的正己烷溶液,振荡均匀;5000 rpm 离心处理 30 s,取出上部废液;重复上述操作 2~3 次;
- ④ 按 $V_{\text{球}}:V_{\text{TET}} = 1:3$ 加入 TET 缓冲液,振荡均匀,5000 rpm 离心处理 5 min,取出上层废液;重复上述操作 1~2 次;
- ⑤ 最终分散于 TET 缓冲液中,得到固化后的聚丙烯酰胺微球。

4. 胶珠中 Oligo DNA 浓度检测

具体操作步骤如下(参考视频“微流控应用:微滴制备仪制备含 Oligo DNA 的可降解凝胶珠”):

- ① 取 5 μL 上述制备的胶珠,加入 45 μL 浓度为 10 mM 的 DTT 溶液,振荡均匀,静置约 10 min,等待胶珠完全溶解;
- ② 配制 Qubit ssDNA 检测试剂,依次取 298.5 μL Qubit ssDNA Buffer 和 1.5 μL Qubit ssDNA

Reagent 混合均匀；

③ 依次取上述配制的 199 μL Qubit ssDNA 检测试剂和 1 μL 上述上述配制的胶珠溶解液混合均匀，并静置 2 min；

④ 用 Qubit 4 检测其浓度。

5. 微滴/微球制备仪清洗

微滴/微球制备仪每次使用完必须清洗管路、流量传感器和芯片。具体操作详见“微滴/微球制备仪操作指导卡”。

结果与讨论：

① 用 Qubit 4 检测上述配制水相中的 Oligo DNA 浓度，仪器显示结果为 14.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (24.35 μM ，

单位转换公式： $C(\mu\text{M}) = \frac{C_{\text{检测浓度}}}{M_{\text{Oligo}}} \times 1000 \times m_{\text{稀释倍数}}$ 。

② 刚接收的微滴平均粒径为 45.16 μm ，具有极高的单分散性(变异系数:CV=2.65%)。其显微镜

图和粒径分布如下图 4-3 所示：

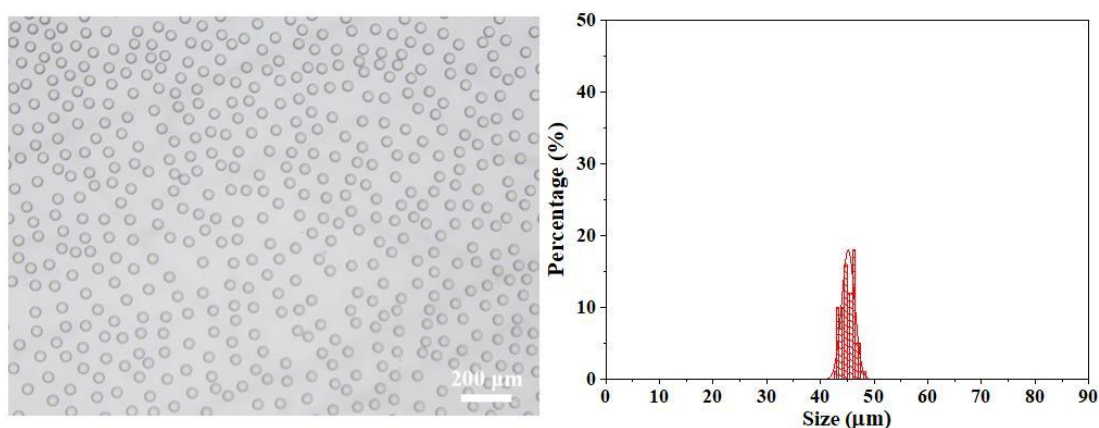


图 4-3 固化前 Oligo DNA 胶珠显微镜图和粒径分布图

③ 固化后, 最终获得的含有 Oligo DNA 胶珠的平均粒径为 53.64 μm , 具有极高的单分散性(变异系数:CV=3.88%)。其显微镜图和粒径分布如下图 4-4 所示:

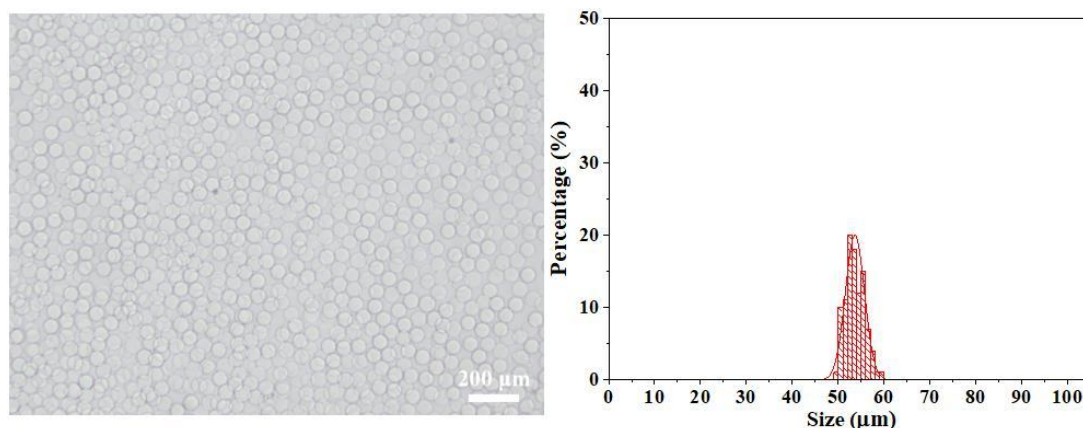


图 4-4 固化后 Oligo DNA 胶珠显微镜图和粒径分布图

④ 用 Qubit 4 检测上述溶解后胶珠中的 Oligo DNA 浓度, 仪器显示结果为 6.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10.58 μM , 单位转换公式: $C(\mu\text{M}) = \frac{c_{\text{检测浓度}}}{M_{\text{Oligo}}} \times 1000 \times m_{\text{稀释倍数}}$)。

⑤ 通过检测封装前后 Oligo DNA 浓度可知其交联率高达 44.35%。

实验关键点:

1. 本方案只适用于 FluidicLab 提供的试剂盒, 其他品牌试剂可能不适用;
2. 采用本方案制备胶珠时, 必须采用 FluidicLab 提供 PDMS 标准微滴生成芯片, 其他类型芯片不一定适用;
3. 采用本方案制备胶珠时, 固化得到的胶珠粒径大于接收的微滴粒径, 因此, 需要根据实际情况进行调整。

参考文献:

- [1] Prakadan S. M., et al. Scaling by shrinking: empowering single-cell 'omics' with microfluidic devices, *Nat. Rev. Genet.*, **18**, 345 (2017).
- [2] Klein A. M., et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells, *Cell*, **161**, 1187 (2015).
- [3] Macosko E. Z., et al. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets, *Cell*, **161**, 1202 (2015).
- [4] Lan F., et al. Single-cell genome sequencing at ultra-high-throughput with microfluidic droplet barcoding, *Nat. Biotechnol.*, **35**, 640 (2017).
- [5] Lareau C. A., et al. Droplet-based combinatorial indexing for massive-scale single-cell chromatin accessibility, *Nat. Biotechnol.*, **37**, 916 (2019).
- [6] Stoeckius M., et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells, *Nat. Methods*, **14**, 865 (2017).
- [7] Peterson V. M., et al. Multiplexed quantification of proteins and transcripts in single cells, *Nat. Biotechnol.*, **35**, 936 (2017).
- [8] Zheng G. X. Y., et al. Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells, *Nat. Commun.*, **8**, 14049 (2017).
- [9] Wang Y., et al. Dissolvable polyacrylamide beads for high-throughput droplet DNA barcoding, *Adv. Sci.*, **7**, 1903463 (2020).

实验方案 5. 甲基丙烯酸酯化透明质酸(HAMA)微球制备

实验目的:

本实验方案通过利用微滴/微球制备仪,以 2% Drop-Surf 微滴生成油为油相,以 2%甲基丙烯酸酯化透明质酸(HAMA)溶液(含 0.05% LAP 作为光引发剂)为水相制备高单分散的微滴,并通过 405 nm 紫外光照射实现微滴的固化,最终获得具有极高的单分散性的 HAMA 微球(CV<5%)。

引言:

透明质酸(HA)是一种由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰-D-氨基葡萄糖作为双糖结构单元的天然糖胺多糖聚合物,主要存在于脊椎动物的细胞外基质、玻璃体液和滑液中^[1,2]。因其独特的生物和理化性质及安全性,HA 在医药、食品和化妆品等领域都有广泛应用^[3,4,5]。然而,游离的 HA 在人体内易被酶降解^[6],这大大限制了应用。目前已有多种方法增强透明质酸的机械性质,以增强其在体内的停留时间,如使用 1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)、1-乙基-3-(3-(二甲基氨基)丙基)碳二亚胺(EDC)、二乙烯砷(DVS)等交联剂进行改性处理^[7,8,9],生成薄膜、微球、海绵、微针等不同形态的透明质酸。其中,透明质酸微球因其独特的球形结构和易注入特性,常用于药物递送、细胞递送、软组织填充等方面。在这些应用中,透明质酸微球的尺寸和理化性质极大程度影响载药效果、药物释放率和填充效果^[1]。因此,制备一种尺寸可控、理化性质可调的单分散透明质酸微球是实现以上应用的关键。

目前，制备透明质酸微球的主要方式有乳化-凝固法和喷雾干燥法^[10,11]。搅拌法和喷雾干燥法具有操作简单便捷等优点，但其制备的透明质酸微球均一性差。而采用液滴微流控技术，可制备粒径高度均一可控的透明质酸液滴，从而固化形成高单分散性的透明质酸微球。Shendi 等人首先用 DVS 对 HA 修饰改性，然后运用液滴微流控技术制备 VS-HA 液滴，在紫外灯照射下交联形成凝胶化的透明质酸微球。然而，这种方法需要 DVS 修饰透明质酸，而 DVS 具有一定毒性，可能会引起人体炎症和水肿等副作用^[12]。Yuk 等人以聚乙二醇二缩水甘油醚(PEGDE)作为交联剂实现透明质酸微球的化学交联，然而因其难以渗透至微球内部，交联效果不尽如人意^[13]。因此，找到一种无害高效的交联剂和简便的透明质酸改性方法，对于制备生物相容性好、理化性质可调节、单分散性好的透明质酸微球具有重要意义。

基于此，FluidicLab 以 HAMA 为交联单体，以苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP)作为光引发剂，运用液滴微流控技术，通过微滴/微球制备仪制备高度均一的 HAMA 微滴，再在紫外灯照射下实现微滴的固化，最终得到 HAMA 微球。该法操作简便，样品利用率高，制备得到的微球单分散性高(CV<5%)，具有较好重复性。

实验材料：

试剂	微滴生成油(2%, Drop-Surf, FluidicLab)
	破乳剂(Drop-Surf, FluidicLab)
	甲基丙烯酰化透明质酸(HAMA, FluidicLab)
	苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP, FluidicLab)
耗材	离心管(Falcon 15 mL REF 352097)若干
	黑色离心管(1.5 mL)和离心管(1.5 mL, Axygen)若干

PEEK 管(内/外径 0.25 /1.6 mm)及 1/4-28 螺纹接头卡箍若干

棕色玻璃瓶(10 mL)若干

针式过滤器(PTFE, 津腾, 25 mm×0.22 μm)若干

注射器(2 mL)若干

避光样品管(1.8 mL)

芯片夹具

PDMS-FF-100 芯片(FluidicLab)

PDMS 标准芯片夹具(FluidicLab)

设备

微滴/微球制备仪(FluidicLab, 两通道)

电脑(Win10 以上系统)

离心机(湖南湘仪, H1850)

普通光学显微镜(测微球粒径)

辅助设备

超声波清洗机(语盟, YM-020T)

常规紫外灯(405 nm 光源)

电子分析天秤(力辰科技)

实验步骤:

1. 试剂配制

(1) 4% HAMA 水溶液(w/w)配制

称取 0.04 g HAMA 粉末, 加入 0.96 g 超纯水, 避光超声振荡溶解。

(2) 0.2% LAP 水溶液(w/w)配制

称取 0.01 g LAP 粉末，加入 4.99 g 超纯水，避光超声振荡溶解。

(3) 水相溶液配制

取 400 μL 4% HAMA 溶液，200 μL 0.2% LAP 溶液，加入 200 μL 超纯水，避光振荡均匀，并用针式过滤器过滤处理备用。

2. 微滴制备

(1) 微滴/微球制备仪的安装连接

微滴/微球制备仪安装连接参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“2. 微滴/微球制备仪的安装连接”的部分；其连接如下(步骤③-⑦连接效果如下图 5-1 所示)：

- ① 用气管依次连接“空气压缩机”-“气源处理装置”-“微滴/微球制备仪”；
- ② 将微滴/微球制备仪分别与电源、电脑的连接；



图 5-1 微滴/微球制备仪的安装连接

- ③ 用气管分别将 A_0 (压力输出通道一)和 A_1 (油相 15 mL 储液池), B_0 (压力输出通道二)和 B_1 (水相 1.5 mL 黑色离心管储液池)连接；

④ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A₁(油相 15 mL 储液池)和 A₂(通道一流量传感器), B₁(水相 1.5 mL 黑色离心管储液池)和 B₂(通道二流量传感器)连接;

⑤ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A₂(通道一流量传感器)和 A₃(PDMS 微滴芯片夹具的油相入口), B₂(通道二流量传感器)和 B₃(PDMS 微滴芯片夹具的水相入口)连接;

⑥ C 为 PDMS 标准微滴芯片和夹具的组合, 芯片和夹具的入口通过硅胶塞密封;

⑦ 用 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)将芯片出口 D 处生成的乳液导出。

(2) FluidicLabSuite 软件的安装和设备的添加

FluidicLabSuite 软件的安装参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.1 FluidicLabSuite 软件的安装”的部分;

(3) HAMA 微液滴的制备

具体操作步骤如下:

① 分别在 15 mL 油相储液池(通道一)和 1.5 mL 水相黑色离心管储液池(通道二)中依次加入 5 mL 2% Drop-Surf 微滴生成油和 1 mL 配制好的水相溶液;

② FluidicLabSuite 软件的设备添加参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.2 FluidicLabSuite 软件的设备添加”的部分(相机和流量传感器仅需添加一次);

③ 打开空气压缩机和气源处理装置开关;

④ 在乳液出口端放置离心管接收前废液;

⑤ 在电脑端设置通道一压力(油相, 如 150 mbar)和通道二压力(水相, 如 700 mbar, 水相粘度

大，流阻大，压力更大)排出管路和芯片中的空气；

⑥ 待管路和芯片中完全填充液体后(空气被完全排出)；将整个系统由压力控制切换到流速控制，并设置通道一(油相)和通道二(水相)流速分别为 $7.5 \mu\text{L}/\text{min}$ (同“微滴制备仪制备透明质酸(HAMA)微球制备”视频，非校准数据)和 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ ；

⑦ 调整反馈值(Feedback)快速达到设定流速，并实现流速的稳定输出；

⑧ 用疏水培养皿接收一滴乳液，并在普通光学显微镜下观察其微滴均一性；

⑨ 待微滴生成均匀后，即可开始接收至透明的 1.5 mL 离心管中；

⑩ 20 min 后停止收集，密封于离心管中，用 405 nm 紫外灯照射 5 min 固化。

3. HAMA 微球的破乳清洗

具体操作步骤如下：

① 去除 1.5 mL 离心管底部微滴生成油；

② 按 $V_{\text{球}}: V_{\text{破}}=1:2$ 加入破乳剂，振荡破乳；

③ 1000 rpm 离心处理 1 min，并去除底部破乳剂；

④ 重复上述②和③操作；

⑤ 为降低破乳剂残留，可通过再次离心处理取出底部少量破乳剂；

⑥ 最终得到固化后的 HAMA 微球，分散在 PBS 缓冲液中。

4. 微滴/微球制备仪清洗

微滴/微球制备仪每次使用完必须清洗管路、流量传感器和芯片。具体操作详见“微滴/微球制备仪操作指导卡”。

结果与讨论：

刚接收的微滴平均粒径为 $105.05\ \mu\text{m}$ ，具有极高的单分散性(变异系数: $\text{CV}=1.29\%$)。其显微镜图和粒径分布如下图 5-2 所示:

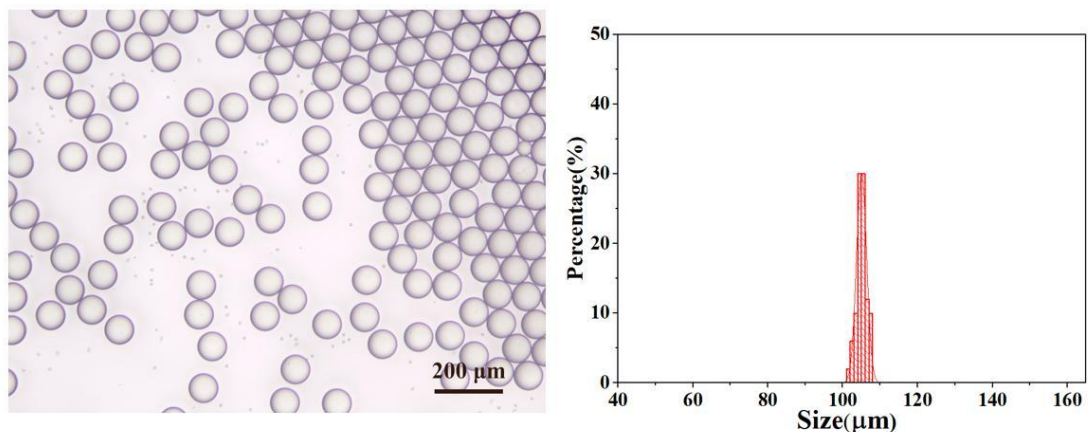


图 5-2 固化前 HAMA 微球显微镜图和粒径分布图

最终获得的 HAMA 微球平均粒径为 $120.59\ \mu\text{m}$ ，具有极高的单分散性(变异系数: $\text{CV}=3.05\%$)。其显微镜图和粒径分布如下图 5-3 所示:

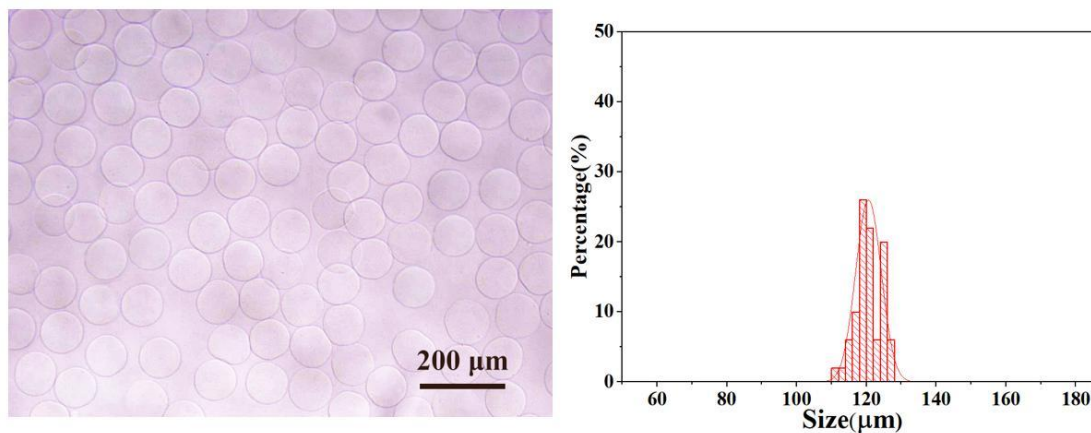


图 5-3 固化后 HAMA 微球显微镜图和粒径分布图

实验关键点:

1. 采用本方案制备 HAMA 微球时，由于 $2\%(\text{wt}\%)$ HAMA 粘度大于 Drop-Surf 微滴油，因此在同样

流速下，挤压水相所施加的压力大于油相的压力，具体可参考本方案所对应的视频(压力数值仅供参考)；

2. 水相溶液在配制和使用时必须避光操作，须使用棕色或黑色离心管；

3. 微球是否固化须通过显微镜观察确认，若显微镜下观察无微球，则很有可能是液滴没有实现固化。

参考文献：

- [1] Long Y., et al. Microfluidic fabrication of monodisperse hyaluronic acid microspheres with excellent biocompatibility and tunable physicochemical properties, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **63**, 6632–6643 (2024).
- [2] Bishop P. N., et al. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel, *Prog. Retinal Eye Res.*, **19**, 323–344 (2000).
- [3] Kong J. H., et al. Long acting hyaluronate-exendin 4 conjugate for the Treatment of type 2 diabetes, *Biomaterials*, **31**, 4121–4128 (2010).
- [4] Hu J., et al. Hyaluronic acid applied as a natural flavor enhancer and its mechanism exploration, *Food Biosci.*, **55**, 102969 (2023).
- [5] Nobile V., et al. Anti-aging and filling efficacy of six types hyaluronic acid based dermo-cosmetic treatment: double blind, randomized clinical trial of efficacy and safety, *J. Cosmet. Dermatol.* **13**, 277–287 (2014).
- [6] Yang B., et al. Determination of modification degree in bde-modified hyaluronic acid hydrogel by sec/Ms, *Carbohydr. Polym.* **131**, 233-239 (2015).
- [7] Tang S., et al. A covalently cross-linked hyaluronic acid/bacterial cellulose composite hydrogel for potential biological applications, *Carbohydr. Polym.*, **252**, 117123(2021).
- [8] Bedini E., et al. Self-Esterified hyaluronan hydrogels: advancements in the production with positive implications in tissue healing, *Int. J. Biol. Macromol.*, **236**, 123873 (2023).
- [9] Raghupathi K., et al. Hyaluronic acid microgels as intracellular endosomolysis reagents, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **4**, 558–565 (2018).
- [10] He S. L., et al. Morphology and size control of gelatin/hyaluronic acid composite microsphere for drug delivery, *Mater. Technol.*, **31**,145–152 (2015)..
- [11] Hamilton M., et al. Hyaluronic acid hydrogel microspheres for slow release stem cell delivery, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **7**, 3754–3763 (2021)..
- [12] Shendi D., et al. Anti-fas conjugated hyaluronic acid microsphere gels for neural stem cell delivery, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **105**, 608–618 (2017)..
- [13] Yuk S., et al. Synthesis of hyaluronic acid microsphere crosslinked with polyethylene glycol diglycidyl ether prepared by a simple fluidic device, *J. Biomed. Eng. Res.*, **42**, 251–258 (2021).

实验方案 6. 聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)微球制备

实验目的:

本实验方案通过利用微滴/微球制备仪, 以 2% PVA(聚乙烯醇)水溶液为水相, 以 5% PLGA-二氯甲烷溶液为油相制备高单分散的微滴, 并在水相接收液中挥发微滴中的二氯甲烷溶剂, 实现微滴的固化, 最终获得具有极高的单分散性的 PLGA 微球(CV<5%)。

引言:

药物递送系统(DDS)是一种用可持续方式向特定部位输送药物的系统, 旨在通过调节最佳剂量以达到治疗疾病或减轻痛苦的作用^[1]。其中, PLGA (聚乳酸-羟基乙酸共聚物)因其优越的生物相容性和生物可降解性^[1,2,3,4], 在药物递送、生物传感、组织工程等领域有广泛应用^[2]。在生物体内, PLGA 可降解为水和二氧化碳等无毒小分子, 通过 Krebs 循环排出^[1]。作为一种药物载体, 这种共聚物近年来吸引了越来越多的关注, 目前已有多种含 PLGA 的药物上市^[3,4]。一般来说, PLGA 是由乳酸和羟基乙酸在催化条件下共聚而得, 兼具两种化合物的性质特征, 通过调节两种单体化合物的比例, 即可改变共聚物的性质^[1]。因此, 对化疗药物、抗菌消炎和抗老化药物等药物递送系统而言, PLGA 是一种理想的材料^[1]。

制备 PLGA 微球的传统方法有溶剂挥发法、凝聚和喷雾干燥法^[1,3], 然而通过这些方法制备出的 PLGA 微球往往具有较宽的尺寸分布, 批次间稳定性较差, 药物包封效果也不尽如人意^[3]。在实际应用中, PLGA 微球的尺寸的药物释放效果有至关重要的作用, 单分散性不佳的载药 PLGA 往往会出现初始迸发释药现象, 严重影响药物治疗的效果, 甚至可能产生毒性^[4]。因此, 开发一种可重

复、粒径及均匀度可控的 PLGA 微球制备技术是其成功应用的必要条件。

基于此, FluidicLab 微滴制备平台运用液滴微流控技术, 将 PLGA 溶解在二氯甲烷中, 以 PLGA-二氯甲烷溶液为油相, 聚乙烯醇(PVA)水溶液为水相, 通过微滴/微球制备仪制备高度均一的 PLGA-二氯甲烷微滴, 在室温下挥发微滴中的二氯甲烷溶剂, 最终得到 PLGA 微球。该法操作简便, 样品利用率高, 制备得到的微球单分散性高(CV<5%), 具有较好重复性。

实验材料:

试剂	PLGA(FluidicLab, 50/50, M _w : 2 W)
	聚乙烯醇(PVA, Sigma-Aldrich, P8136-250 g)
	二氯甲烷(Greagent)
耗材	离心管(Falcon 15 mL REF 352097)若干
	黑色离心管(1.5 mL)若干
	PEEK 管(内/外径 0.25 /1.6 mm)及 1/4-28 螺纹接头卡箍若干
	棕色玻璃瓶(10 mL 和 20 mL)若干
	针式过滤器(PTFE, 津腾, 25 mm×0.22 μm)若干
	注射器(10 mL)若干
芯片夹具	GL-FF-100 芯片(FluidicLab)
	玻璃标准芯片夹具(FluidicLab)
设备	微滴/微球制备仪(FluidicLab, 两通道)
辅助设备	电脑(Win10 以上系统)
	离心机(湖南湘仪, H1850)

普通光学显微镜(测微球粒径)

电子分析天秤(力辰科技)

实验步骤:

1.试剂配制

(1) 2% 聚乙烯醇(PVA)水溶液(w/v)配制

称取 0.2 g PVA 粉末, 加入超纯水震荡, 放入 85 °C 水浴锅中搅拌加热溶解, 最终定容至 10 mL。用针式过滤器过滤。

(2) 5% PLGA-二氯甲烷溶液(w/w)配制

称取 0.1 g PLGA 粉末, 加入 1.43 mL 二氯甲烷(约 1.9 g), 超声溶解。用针式过滤器过滤。

2.微滴制备

(1) 微滴/微球制备仪的安装连接

微滴/微球制备仪安装连接参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“2. 微滴/微球制备仪的安装连接”的部分; 其连接如下(步骤③-⑦连接效果如下图 6-1 所示):

- ① 用气管依次连接“空气压缩机”-“气源处理装置”-“微滴/微球制备仪”;
- ② 将微滴/微球制备仪分别与电源、电脑的连接;
- ③ 用气管分别将 A₀(压力输出通道一)和 A₁(水相 15 mL 储液池), B₀(压力输出通道二)和 B₁(油相 1.5 mL 黑色离心管储液池)连接;
- ④ 用 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A₁(水相 15 mL 储液池)和 A₂(通道一流量传感器), B₁(油相 1.5 mL 黑色离心管储液池)和 B₂(通道二流量传感器)连接;
- ⑤ 用 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A₂(通道一流量传感

器)和 A₃(玻璃芯片的水相入口), B₂(通道二流量传感器)和 B₃(玻璃芯片的油相入口)连接;

⑥ C 为玻璃标准微滴芯片和夹具的组合, 芯片和夹具的入口通过硅胶塞密封;

⑦ 用 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)将芯片出口 D 处生成的乳液导出。

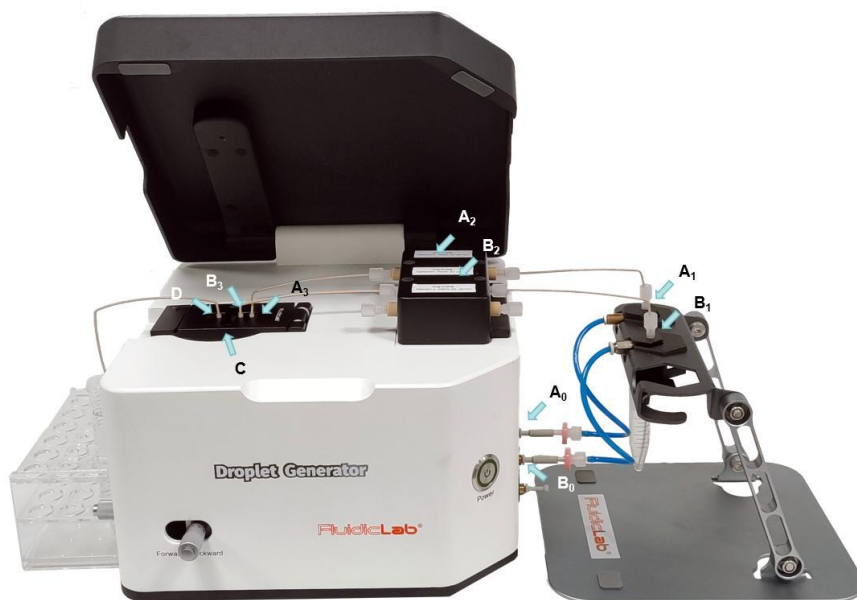


图 6-1 微滴/微球制备仪的安装连接

(2) FluidicLabSuite 软件的安装和设备的添加

FluidicLabSuite 软件的安装参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.1 FluidicLabSuite 软件的安装”的部分;

(3) PLGA 微液滴的制备

具体操作步骤如下:

① 分别在 15 mL 水相储液池(通道一)和 1.5 mL 油相黑色离心管储液池(通道二)中依次加入 5 mL 2% PVA 水溶液和 1 mL 5% PLGA-二氯甲烷溶液;

② FluidicLabSuite 软件的设备添加参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.2 FluidicLabSuite 软件的设备添加”的部分(相机和流量传感器仅需添加一次);

- ③ 打开空气压缩机和气源处理装置开关;
- ④ 在乳液出口端放置离心管接收前废液;
- ⑤ 在电脑端设置通道一压力(水相, 如 250 mbar)和通道二压力(油相, 如 150 mbar)排出管路和芯片中的空气;
- ⑥ 待管路和芯片中完全填充液体后(空气被完全排出); 将整个系统由压力控制切换到流速控制, 并设置通道一(水相)和通道二(油相)流速分别为 14 和 3 $\mu\text{L}/\text{min}$;
- ⑦ 调整反馈值(Feedback)快速达到设定流速, 并实现流速的稳定输出;
- ⑧ 用载玻片接收一滴乳液, 并在普通光学显微镜下观察其微滴均一性;
- ⑨ 待微滴生成均匀后, 即可开始接收至装有 2% PVA 水溶液的玻璃培养皿中(接收管在接收液面以下);
- ⑩ 60 min 后停止收集, 放置于通风环境内, 待二氯甲烷挥发完全(培养皿中水溶液不能挥发干)。

3. PLGA 微球的清洗

具体操作步骤如下:

- ① 将固化后的 PLGA 微球(粒径不再变小即固化)转移至 1.5 mL 离心管中;
- ② 2500 rpm 离心处理 1 min, 并取出上部水溶液;
- ③ 按 $V_{\text{球}}: V_{\text{水}}=1:2$ 加入超纯水, 振荡;
- ④ 2500 rpm 离心处理 1 min, 并取出上部水溶液;
- ⑤ 重复上述③和④操作;
- ⑥ 最终得到固化后的 PLGA 微球。

4. 微滴/微球制备仪清洗

微滴/微球制备仪每次使用完必须清洗管路、流量传感器和芯片。具体操作详见“微滴/微球制备仪操作指导卡”。

结果与讨论：

刚接收的微滴平均粒径为 $62.76\ \mu\text{m}$ ，具有极高的单分散性(变异系数: $CV=2.79\%$)。其显微镜图和粒径分布如下图 6-2 所示：

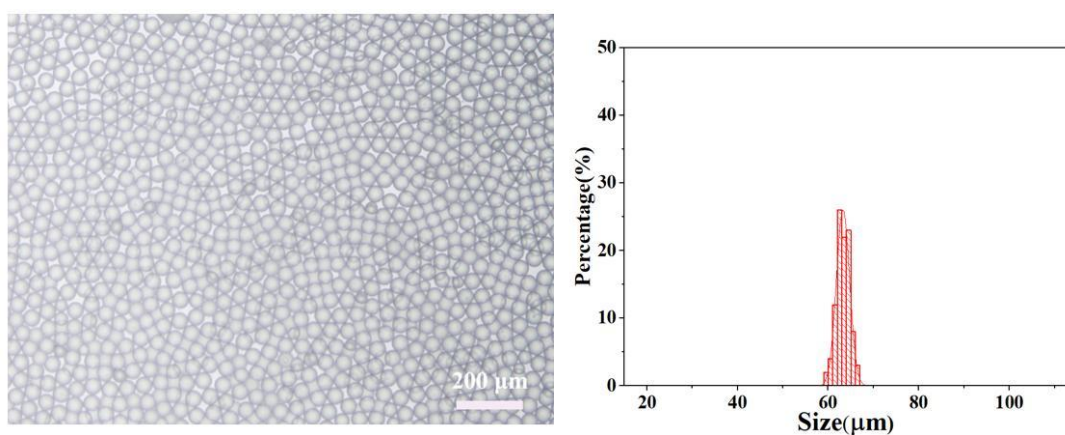


图 6-2 固化前 PLGA 微球显微镜图和粒径分布图

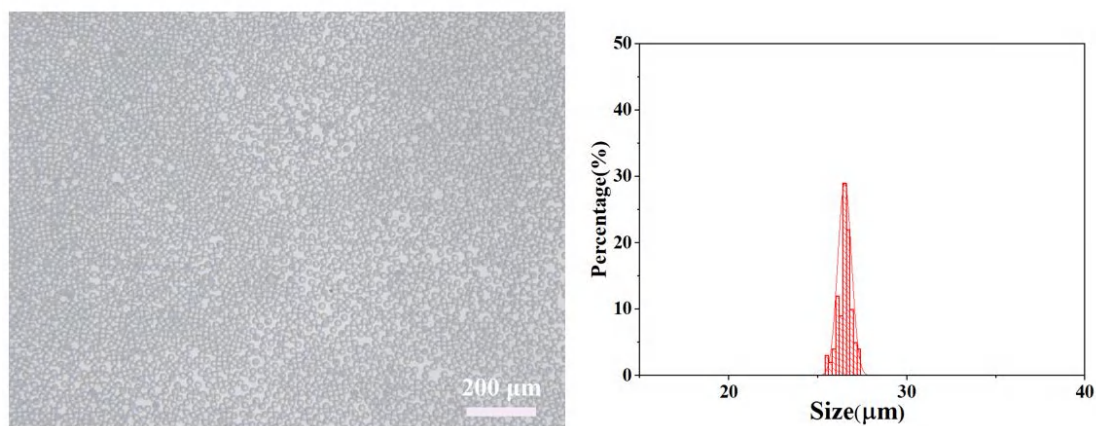


图 6-3 固化后 PLGA 微球显微镜图和粒径分布图

最终获得的 PLGA 微球平均粒径为 $26.62\ \mu\text{m}$ ，具有极高的单分散性(变异系数: $CV=1.07\%$)。其

显微镜图和粒径分布如上图 6-3 所示。

实验关键点：

1. 由于二氯甲烷见光易分解和沸点低等特点，PLGA 的二氯甲烷溶液在使用时必须避光放置冰水浴中，以避免微滴生成过程中气泡的产生；
2. 采用本方案制备 PLGA 微球时，建议在载玻片上接收一滴稳定后的乳液，并观察其粒径变化，以确定完全固化后 PLGA 微球的粒径；
3. 采用本方案制备 PLGA 微球时，固化过程中必须保证培养皿中始终有水溶液，避免水溶液挥发干后 PVA 固体粘附在 PLGA 微球上；
4. 采用本方案制备 PLGA 微球时，固化前后微球粒径差异与 PLGA 油相溶液的浓度有关，接收液滴大小相同时，PLGA 浓度越大，固化后的微球粒径越大。

参考文献：

- [1] Rezvantab S., et al. Microfluidic assisted synthesis of PLGA drug delivery systems, *RSC Adv*, **9**, 2055 (2019).
- [2] Lagreca, E., et al. Recent advances in the formulation of PLGA microparticles for controlled drug delivery, *Prog Biomater*, **9**, 153–174 (2020).
- [3] Montazeri L., et al. Modification of PDMS to fabricate PLGA microparticles by a double emulsion method in a single microfluidic device, *Lab Chip*, **16**, 2596 (2016).
- [4] Yoo J., et al. Phenomenology of the Initial Burst Release of Drugs from PLGA Microparticles, *ACS Biomater. Sci. Eng*, **6**, 6053-6062 (2020).

实验方案 7. PLGA-HAMA 核壳结构微球制备

实验目的:

本实验方案通过利用微滴/微球制备仪,以 5%PLGA (聚乳酸-羟基乙酸共聚物)-二氯甲烷溶液为内相,以 2% HAMA(甲基丙烯酰化透明质酸)溶液(含 0.5% LAP 作为光引发剂)为中间相,以 2% Drop-Surf 微滴生成油为外相,采用 FluidicLab 玻璃双乳化微滴芯片制备双核双乳液滴,并通过 405 nm 紫外光照射实现微滴的固化,最终获得 PLGA-HAMA 核壳结构微球。

引言:

油包水包油 O/W/O 双乳核壳结构微球可有效的将目的物,如生物活性化合物、药物或功效成分,封装在特定区域内,并最终根据需要在合适的时间和地点释放封装的目的物,其在食品配方、药物递送和化妆品领域有着广泛的应用前景。

在食品配方中,O/W/O 型核壳结构微球将生物活性化合物有效封装,以提高抗氧化潜力、生物利用度和溶解度等方面的能力;在药物递送中,O/W/O 型核壳结构微球可以将疏水性药物稳定分散于水中并被输送到靶向位点,避免在储存或针头注射时引起药物的团聚或堵塞;在化妆品领域中,O/W/O 型核壳结构微球可以将防晒剂、植物油或功效成分被高分子聚合物完全包裹起来,以达到增加包裹物稳定性和缓释的效果。

通常,O/W/O 型核壳结构微球是用含两种性质不同的表面活性剂的分散相分两步制备,并最终实现固化而获得。常规的制备方法包括传统的机械搅拌乳化法、静电喷雾法和膜乳化法等方法。上述方法所制备的核壳结构微球粒径分布较宽,且内部结构较难控制。这对敏感性成

分包裹率、药物的降解和释放速率控制有很大影响。

基于此,FluidicLab 通过利用微滴/微球制备仪,以 5%PLGA-二氯甲烷溶液为内相,以 2% HAMA 溶液(含 0.5% LAP 作为光引发剂)为中间相,以 2% Drop-Surf 微滴生成油为外相,采用 FluidicLab 玻璃双乳化微滴芯片制备双核双乳液滴,并通过 405 nm 紫外光照射实现微滴的固化,最终获得 PLGA-HAMA 核壳结构微球。

实验材料:

试剂	微滴生成油(2%, Drop-Surf, FluidicLab)
	破乳剂(Drop-Surf, FluidicLab)
	PLGA 粉末(FluidicLab, 50/50, M_w :2w)
	甲基丙烯酸酯化透明质酸(HAMA, FluidicLab)
	苯基(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐(LAP, FluidicLab)
耗材	离心管(Falcon 15 mL REF 352097)若干
	黑色离心管(1.5 mL)和透明离心管(1.5 mL, Axygen)若干
	PEEK 管(内/外径 0.25 /1.6 mm)及 1/4-28 螺纹接头卡箍若干
	棕色玻璃瓶(10 mL)若干
	针式过滤器(PTFE, 津腾, 25 mm×0.22 μm)若干
	无内塞注射器(2 mL)若干
	避光样品管(1.8 mL)
芯片夹具	GL-DE-100-150 玻璃双乳化芯片(FluidicLab)
	玻璃双乳化微滴芯片夹具(FluidicLab)

设备	微滴/微球制备仪(Fluidiclab,三通道)
辅助设备	电脑(Win10 以上系统)
	离心机(湖南湘仪, H1850)
	普通光学显微镜(测微球粒径)
	超声波清洗机(语盟, YM-020T)
	常规紫外灯(405 nm 光源)
	电子分析天秤(力辰科技)

实验步骤：

1. 试剂配制

(1) 内相溶液配制

称取 0.1 g PLGA 粉末，加入 1.43 mL 二氯甲烷(约 1.9 g)，超声溶解。用针式过滤器过滤处理。

(2) 4% (w/w)HAMA 水溶液配制

称取 0.04 g HAMA 粉末，加入 0.96 g 超纯水，避光超声振荡溶解。

(3) 1% (w/w) LAP 水溶液配制

称取 0.050 g LAP 粉末，加入 4.95 g 超纯水，避光超声振荡溶解。

(4) 中间相溶液配制(2% HAMA+0.5% LAP)

取 500 μ L 4%HAMA 溶液，500 μ L 1% LAP 溶液，避光振荡均匀，并用针式过滤器过滤处理备用。

2. PLGA-HAMA 核壳双乳化微球的制备

(1) 微滴/微球制备仪的安装连接

微滴/微球制备仪安装连接参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“2. 微滴/微球制备仪的安装连接”的部分；其连接如下(步骤③-⑦连接效果如下图 7-1 所示)：

- ① 用气管依次连接“空气压缩机”-“气源处理装置”-“微滴/微球制备仪”；
- ② 将微滴/微球制备仪分别与电源、电脑的连接；
- ③ 用气管分别将 A₀(压力输出通道一)和 A₁(内相 1.5 mL 黑色离心管储液池), B₀(压力输出通道二)和 B₁(中间相 1.5 mL 黑色离心管储液池)连接, C₀(压力输出通道三)和 C₁(外相的 15 mL 储液池)；
- ④ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A₁(内相 1.5 mL 黑色离心管储液池)和 A₂(通道一流量传感器), B₁(中间相 1.5 mL 黑色离心管储液池)和 B₂(通道二流量传感器)连接, C₁(外相的 15 mL 储液池)和 C₂(通道三流量传感器)连接；

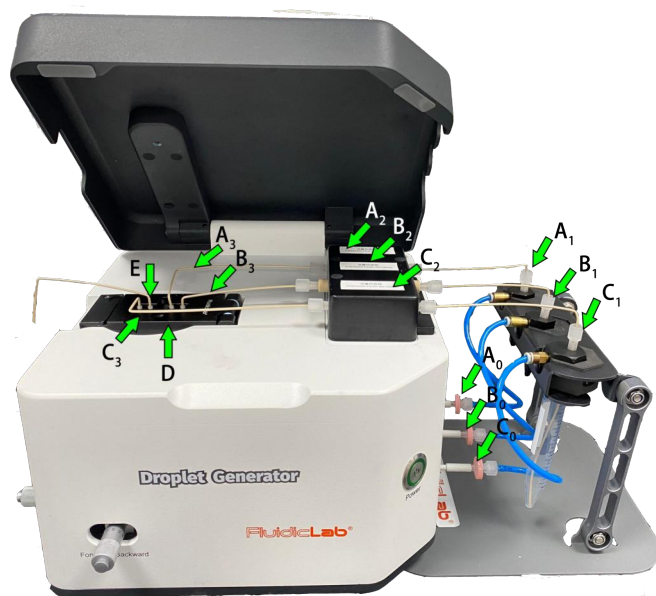


图 7-1 微滴/微球制备仪的安装连接

- ⑤ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A₂(通道一流量传感器)和 A₃(双乳化微滴芯片内相入口), B₂(通道二流量传感器)和 B₃(双乳化微滴芯片内中相入口)

连接, C₂(通道三流量传感器)和 C₃(双乳化微滴芯片外相入口)连接;

⑥ D 为玻璃双乳化微滴芯片和夹具的组合, 芯片和夹具的入口通过硅胶塞密封;

⑦ 用 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)将芯片出口 E 处生成的乳液导出。

(2) FluidicLabSuite 软件的安装和设备的添加

FluidicLabSuite 软件的安装参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.1 FluidicLabSuite 软件的安装”的部分;

(3) PLGA-HAMA 核壳双乳化微滴的制备和固化

具体操作步骤如下:

① 分别在 1.5 mL 内相黑色离心管储液池(通道一)、1.5 mL 中相黑色离心管储液池(通道二)和 15 mL 外相储液池中依次加入上述配制的内相、中间相和 5 mL 2% Drop-Surf 微滴生成油;

② FluidicLabSuite 软件的设备添加参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.2 FluidicLabSuite 软件的设备添加”的部分(相机和流量传感器仅需添加一次);

③ 打开空气压缩机和气源处理装置开关;

④ 在乳液出口端放置离心管接收前针式过滤器;

⑤ 在电脑端设置通道一压力(内相, 如 190 mbar)、通道二压力(中间相, 如 280 mbar)和通道三压力(外相, 如 500 mbar)排出管路和芯片中的空气;

⑥ 待管路和芯片中完全填充液体后(空气被完全排出); 设置内相、中间相和外相压力依次为 75、200 和 80 mbar, 在此压力下稳定生成双核双包裹液滴;

⑦ 用疏水培养皿接收一滴乳液, 并在普通光学显微镜下观察其微滴均一性;

⑧ 待微滴生成均匀后, 即可开始接收至透明的 1.5 mL 离心管中;

⑨ 30 min 后停止收集，密封于离心管中，用 405 nm 紫外灯照射 5 min 固化。

3. PLGA-HAMA 核壳双乳化微球的破乳清洗

具体操作步骤如下：

- ① 去除 1.5 mL 离心管底部微滴生成油；
- ② 按 $V_{\text{球}}:V_{\text{破}}=1:2$ 加入破乳剂，振荡破乳；
- ③ 1000 rpm 离心处理 1 min，并去除底部破乳剂；
- ④ 重复上述②和③操作；
- ⑤ 为降低破乳剂残留，可通过再次离心处理取出底部少量破乳剂；
- ⑥ 最终得到固化后的 HAMA 微球，分散在 PBS 缓冲液中。

4. 微滴/微球制备仪清洗

微滴/微球制备仪每次使用完必须清洗管路、流量传感器和芯片。具体操作详见“微滴/微球制备仪操作指导卡”。

结果与讨论：

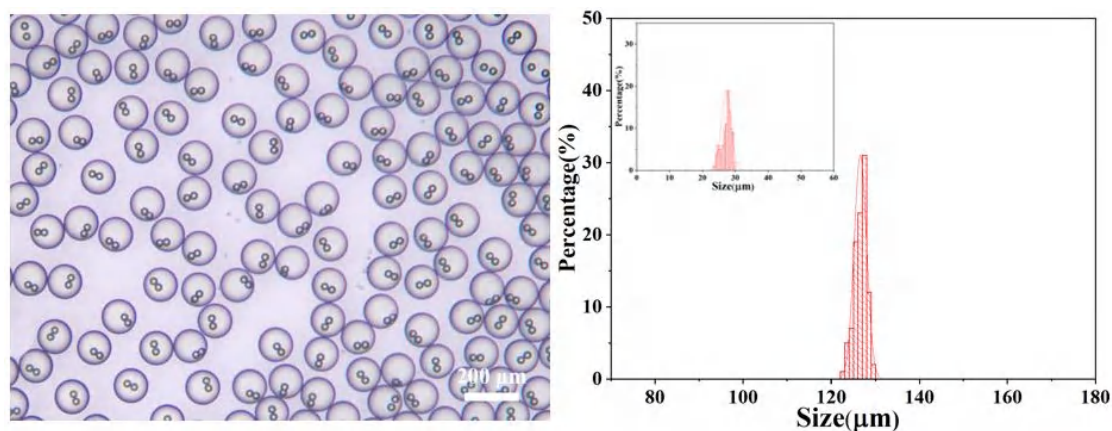


图 7-2 固化前 PLGA-HAMA 核壳双乳化微球显微镜图和粒径分布图

刚接收的 PLGA-HAMA 核壳双乳化微滴核壳的平均粒径分别为 27.29 和 126.56 μm ，其变异系数 CV 分别为 5.34%和 1.12%。其显微镜图和核壳粒径分布(插图为核心粒径分布图)如上图 7-2 所示。

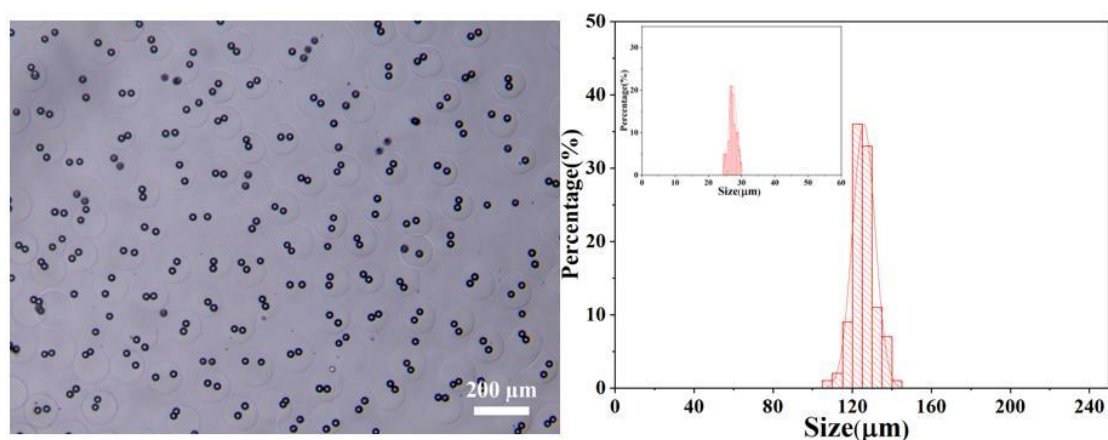


图 7-3 固化后 PLGA-HAMA 核壳双乳化微球显微镜图和粒径分布图

最终获得 PLGA-HAMA 核壳双乳化微球核壳的平均粒径分别为 27.32 和 125.77 μm ，其变异系数 CV 分别为 4.38%和 4.53%。其显微镜图和核壳粒径分布(插图为核心粒径分布图)如上图 7-3 所示。

实验关键点:

1. 采用本方案制备 PLGA-HAMA 核壳微球时，由于 2%(wt%)HAMA 粘度大于 Drop-Surf 微滴油，因此在同样流速下，挤压水相所施加的压力大于油相的压力，具体可参考本方案所对应的视频(压力数值仅供参考)；
2. HAMA 水相溶液在配制和使用时必须避光操作，须使用棕色或黑色离心管；
3. 由于二氯甲烷见光易分解和沸点低等特点，PLGA 的二氯甲烷溶液在使用时必须避光放置冰水浴中，以避免微滴生成过程中气泡的产生。

实验方案 8. 聚乙烯醇(PVA)微球制备

实验目的:

本实验方案采用微滴/微球制备仪制备 PVA 水凝胶微球，具体过程如下：分别以 5%戊二醛-聚乙烯醇(PVA)水溶液为内相，5%冰乙酸-聚乙烯醇(PVA)溶液为中间相，5% Drop-Surf 微滴生成油为外相，使用 PDMS-CHB 芯片制备微滴。随后，在酸催化条件下结合加热处理，促进 PVA 与戊二醛发生交联固化，最终获得粒径均一(CV<5%)的 PVA 水凝胶微球。

引言:

聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)是一种无毒、生物相容性优异、富含羟基且易于改性的人工合成高分子聚合物，在生物医学领域应用广泛^[1]。在多样形态的 PVA 水凝胶中，微球凭借其高亲水性、可调控的机械强度及生物降解性，成为栓塞剂、细胞封装载体和药物递送的理想材料^[1,2]。例如，Yang 等制备的聚多巴胺(PDA)修饰 PVA 微球，在大鼠体内栓塞实验中展现出优异的栓塞性能^[3]；Majareh 等开发的苯酚修饰 PVA 微球，则实现了地塞米松药物长达 7 天缓释，并证实其具有良好的机械稳定性(>90%完整率)和细胞相容性(细胞存活率>93%)^[4]。然而，传统方法(如乳化萃取、喷雾干燥)制备的 PVA 微球存在尺寸多分散性高(尺寸不均一)、球形度差等技术瓶颈，进而引发微球体系在临床转化过程中面临批次间差异大、栓塞定位不精准及药物释放不可控等问题，严重制约了其临床应用。

液滴微流控技术通过精准操控流体，可制备单分散和球形度俱佳的 PVA 微球，从而有效解决上述问题。例如，Han 等利用微流控技术结合物理交联(冻融循环)成功制备单分散 PVA 微球，但该

方法存在高能耗和生产周期长等缺点^[5]。为突破这一局限，Wang 等设计了一种集成化 PDMS 微流控芯片(集成液滴生成、混合与预固化功能于一体)用于制备 PVA 微球^[6]。然而，由于 PVA 溶液粘度较高，在双水相体系(水相 1:PVA 水溶液，水相 2:戊二醛-盐酸溶液)混合过程中极易导致液滴生成不稳定。为此，FluidicLab 微滴制备平台运用微流控技术，以 5%戊二醛-聚乙烯醇(PVA)水溶液为内相，5%冰乙酸-聚乙烯醇(PVA)溶液为中间相，5% Drop-Surf 微滴生成油为外相，使用 PDMS-CHB 芯片制备微滴。随后，在酸催化条件下结合加热处理，促进 PVA 与戊二醛发生交联固化，最终获得粒径高度均一(CV<5%)的 PVA 水凝胶微球。

实验材料：

微滴生成油(5%, Drop-Surf, FluidicLab)

破乳剂(Drop-Surf, FluidicLab)

试剂 聚乙烯醇(FluidicLab)

冰乙酸(Macklin, A801295-500 mL)

戊二醛(50%, Aladdin, G105905-500 mL)

离心管(Falcon 15 mL REF 352097)若干

离心管(1.5 mL, Axygen)若干

耗材

PEEK 管(内/外径 0.25 /1.6 mm)及 1/4-28 螺纹接头卡箍若干

透明玻璃瓶(10 mL 和 20 mL)若干

针式过滤器(PTFE, 津腾, 25 mm×0.22 μm)若干

注射器(10 mL)若干

芯片夹具	PDMS-CHB-100 芯片(Fluidiclab)
	PDMS 标准芯片夹具(FluidicLab)
设备	微滴/微球制备仪(FluidicLab, 三通道)
辅助设备	电脑(Win10 系统以上)
	高速离心机(湖南湘仪, H1850)
	普通光学显微镜(测微球粒径)

实验步骤：

1. 试剂配制

(1) 5% (w/w) PVA 水溶液配制

取 0.5 g PVA 粉末加入到 9.5 g 超纯水，置于 85 °C 水浴锅中加热磁力搅拌溶解。

(2) 5% (v/v) 戊二醛(GA)-PVA 水溶液配制

取 50 μL 戊二醛加入到 950 μL 5% 的 PVA 水溶液中，振荡均匀用 0.22 μm 针式过滤器过滤，备用。

(3) 5% (v/v) 冰乙酸(HAc)-PVA 水溶液配制

取 50 μL 冰乙酸加入到 950 μL 5% 的 PVA 水溶液中，振荡均匀用 0.22 μm 针式过滤器过滤，备用。

2. 微滴制备

(1) 微滴/微球制备仪的安装连接：

微滴/微球制备仪安装连接参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“2.微滴/微球制备仪的安

装连接”的部分；其连接如下(步骤③-⑦连接效果如下图 8-1 所示):

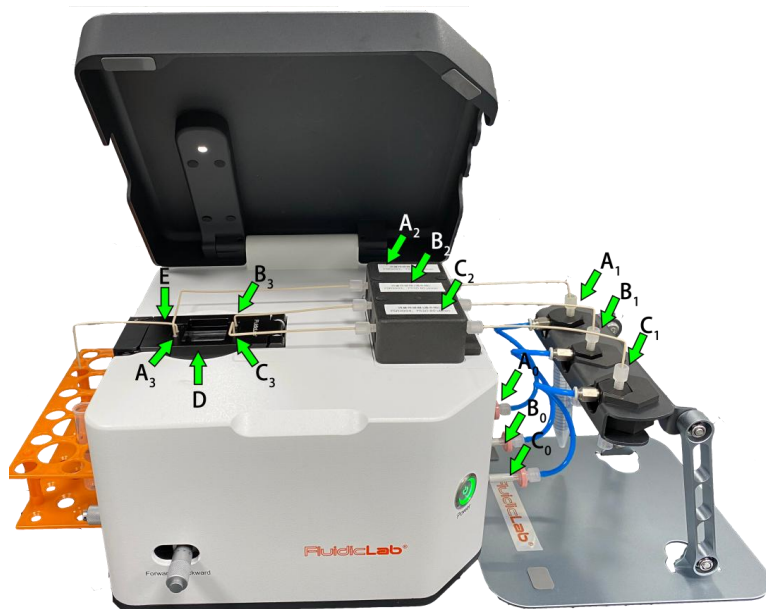


图 8-1 微滴/微球制备仪的安装连接

- ① 用气管依次连接“空气压缩机”-“气源处理装置”-“微滴/微球制备仪”；
- ② 将微滴/微球制备仪分别与电源、电脑连接；
- ③ 用气管分别将 A_0 (压力输出通道一)和 A_1 (油相 15 mL 储液池), B_0 (压力输出通道二)和 B_1 (水相 1 的 2 mL 储液池)连接, C_0 (压力输出通道三)和 C_1 (水相 2 的 2 mL 储液池);
- ④ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A_1 (油相 15 mL 储液池)和 A_2 (通道一流量传感器), B_1 (水相 1 的 2 mL 储液池)和 B_2 (通道二流量传感器)连接, C_1 (水相 2 的 2 mL 储液池)和 C_2 (通道三流量传感器)连接;
- ⑤ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A_2 (通道一流量传感器)和 A_3 (PDMS 芯片的油相入口), B_2 (通道二流量传感器)和 B_3 (PDMS 芯片的水相 1 入口)连接, C_2 (通道三流量传感器)和 C_3 (PDMS 芯片的水相 2 入口)连接;
- ⑥ D 为标准 PDMS 芯片和夹具的组合, 芯片和夹具的入口通过硅胶塞密封;

⑦ 用 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)将芯片出口 E 处生成的乳液导出。

(2) FluidicLabSuite 软件的安装和设备的添加：

FluidicLabSuite 软件的安装参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.1 FluidicLabSuite 软件的安装”的部分(相机和流量传感器仅需添加一次)；

(3) PVA 微滴的制备和固化：

① 在 15 mL 油相储液池(通道一), 2 mL 水相 1 储液池(通道二)和 2 mL 水相 2 储液池(通道三)中依次加入 5 mL 微滴生成油, 2 mL 水相 1(5% GA-PVA 溶液)和 2 mL 水相 2(5% HAc-PVA 溶液)；

② 打开空气压缩机和气源处理装置开关；

③ 在乳液出口端放置离心管接收微滴稳定前的废液；

④ 在电脑端设置通道一压力(油相, 如 150 mbar)、通道二压力(水相 1, 如 300 mbar)和通道三压力(水相 2, 如 300 mbar)排出管路和芯片中的空气；

⑤ 待管路和芯片中填满液体后(空气被完全排出), 将整个系统由压力控制切换到流速控制, 并设置通道一(油相), 通道二(水相 1)和通道三(水相 2)流速分别为 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ (同“聚乙烯醇(PVA)微球制备”视频, 非校准数据, 实际流速为 18 $\mu\text{L}/\text{min}$), 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ 和 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ ；

⑥ 调整反馈值(Feedback)快速达到设定流速, 并实现流速的稳定输出；

⑦ 用疏水培养皿接收一滴乳液, 并在普通光学显微镜下观察其微滴的均匀性；

⑧ 待微滴生成均匀后, 即可开始接收 1.5 mL 离心管中；

⑨ 10 min 后停止收集, 加盖一层矿物油密封, 40 °C 加热过夜固化。

3. PVA 微球的破乳清洗

① 去除 1.5 mL 离心管底部微滴生成油和上层矿物油；

- ② 按 $V_{\text{球}}:V_{\text{破}}=1:2$ 加入破乳剂, 振荡破乳;
- ③ 2500 rpm 离心处理 1 min, 并去除底部破乳剂;
- ④ 重复上述②和③操作;
- ⑤ 最终将得到 PVA 微球分散于配制的 PBS 缓冲液中。

4. 微滴/微球制备仪清洗

微滴制备仪每次使用完必须清洗管路、流量传感器和芯片。具体操作详见“微滴/微球制备仪操作指导卡”。

结果与讨论:

刚接收的液滴平均粒径为 $98.47 \mu\text{m}$, 具有高单分散性(变异系数: $CV=3.19\%$)。其显微镜图和粒径分布如下图 8-2 所示:

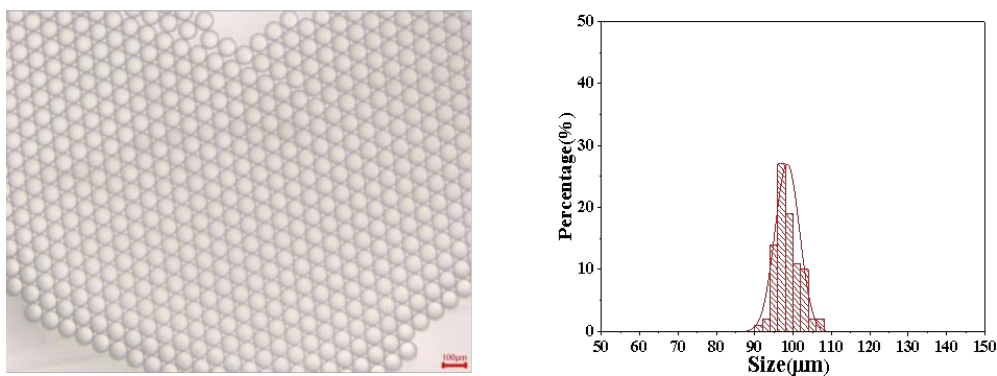


图 8-2 固化前聚乙烯醇微球显微镜图和粒径分布图

最终接收的聚乙烯醇微球平均粒径为 $46.52 \mu\text{m}$, 具有高单分散性(变异系数: $CV=3.75\%$)。其显微镜图和粒径分布如下图 8-3 所示:

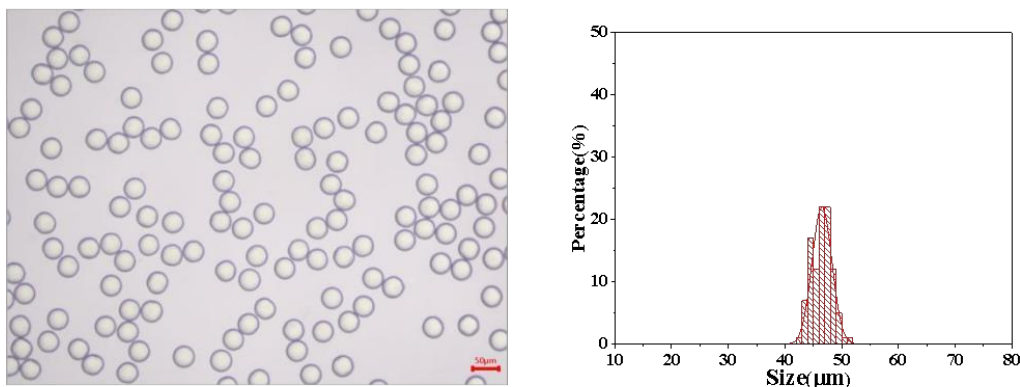


图 8-3 固化后聚乙烯醇微球显微镜图和粒径分布图

实验关键点:

1. PDMS-CHB 使用完毕后，须立即拔出两水相进液管，用油相将两水相反冲出以避免芯片堵塞；
2. 本方案中 PVA 微球固化温度为 40 °C，乳液上层覆盖有矿物油其目的是防止液滴融合或挥发；
3. 本方案制备微滴所用微滴生成油为 5% Drop-Surf 微滴生成油。

参考文献:

- [1] Yang S., et al. Controllable fabrication of monodisperse poly(vinyl alcohol) microspheres with droplet microfluidics for embolization, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **61**, 12619-12631(2022).
- [2] Young C., et al. Poly(vinyl alcohol)-heparin biosynthetic microspheres produced by microfluidics and ultraviolet photopolymerisation, *Biomicrofluidics*, **7**, 044109(2013).
- [3] Yang X., et al. Development of PVA-based microsphere as a potential embolization agent, *Biomaterials Advances*, **135**, 112677(2022).
- [4] Majareh M., et al. Sustain release of dexamethasone from polyvinyl alcohol microparticle produced via coaxial microfluidic system, *BMC Research Notes*, **16**, 268(2023).
- [5] Han X., et al. Preparation of poly(vinyl alcohol) microspheres based on droplet microfluidic technology, *Chinese J. Anal. Chem.*, **46**, 1269 -1274(2018).
- [6] Wang J., et al. Microfluidic rapid fabrication of tunable polyvinyl alcohol mMicrospheres for adsorption applications, *Materials*, **12**, 3712(2019).

实验方案 9. 全氟己酮灭火微胶囊制备

实验目的:

本实验方案利用微滴/微球制备仪制备全氟己酮灭火微胶囊，具体过程如下：分别以 5% PVA 水溶液为外相，光敏树脂溶液为中间相，全氟己酮灭火药剂为内相，采用 GL-DE-300-500 玻璃微流控芯片制备具有核壳结构的液滴，并使用 365 nm 的紫外灯固化，最终得到高单分散(CV < 5%)的全氟己酮灭火微胶囊。

引言:

全氟己酮($C_6F_{12}O$)作为一种环境友好型卤代烷烃灭火剂，主要通过化学抑制机制中断燃烧链式反应。其在高温下分解产生氟自由基(如 $F\cdot$ 、 $CF_3\cdot$ 、 $CFO\cdot$)能够捕获并消耗燃烧过程中的 $H\cdot$ 和 $OH\cdot$ 等关键自由基，从而阻断燃烧。此外，全氟己酮沸点低($49\text{ }^\circ\text{C}$)，遇火迅速汽化，既可吸收大量热量，又能稀释氧气，协同发挥阻燃作用^[1]。然而，全氟己酮溶解性较差、挥发性强，限制了其储存与实际应用。为此，研究人员开发了微胶囊化技术，将全氟己酮包覆于高分子或无机壳材内，常温下保持结构稳定，在高温等稳定条件下壳材破裂或熔融，实现内容物释放^[2]。

全氟己酮微胶囊的制备通常采用化学合成方法，如以脲醛树脂为壳的原位聚合^[3]。但该方法反应条件复杂且需高温，不适用于易挥发的全氟己酮，因此目前研究多转向低温复合凝聚法($<45\text{ }^\circ\text{C}$)。如 Li 等以明胶/多聚磷酸钠交联酚醛树脂作为壳材，制备出包封率达 82.27%全氟己酮微胶囊，其室温储存稳定性超 1 年^[4]。将该微胶囊掺入硅橡胶制成的灭火贴片，能在 $130\text{ }^\circ\text{C}$ 触发释放全氟己酮，15 s 内扑灭纸张及电解液火灾。然而，传统微胶囊制备方法如原位聚合、界面

聚合和复合缩合，仍在包封效率、均一性、可控性和加工成本方面存在明显局限。而液滴微流控作为一种能够精密操控微小流体的技术，为解决上述问题提供了新方法。基于此，FluidicLab 结合微滴/微球制备仪与 GL-DE-300-500 玻璃微流控芯片，并通过紫外光固化工艺成功制备出包裹全氟己酮的核壳结构微胶囊。该微胶囊具备高单分散性(CV < 5%)，良好的重复性，触发温度为 126.84 °C，并展现出一定灭火性能。

实验材料：

试剂	聚乙烯醇(PVA, Sigma-Aldrich, P8136-250 g)
	光敏树脂(FluidicLab, 粘度 47.6 mPa·s)
	全氟己酮(AR,广州恒健化学试剂)
耗材	离心管(Falcon 15 mL REF 352097)若干
	PEEK 管(内/外径 0.25 /1.6 mm)及 1/4-28 螺纹接头卡箍若干
	透明玻璃瓶(10 mL 和 20 mL)若干
	针式过滤器(PTFE, 津腾, 25 mm×0.22 μm)若干
	注射器(10 mL)若干
芯片夹具	GL-DE-300-500 芯片(Fluidiclab)
	通用型标准微流控夹具(Fluidiclab)
设备	微滴/微球制备仪(FluidicLab, 三通道)
辅助设备	电脑(Win10 系统以上)
	高速离心机(湖南湘仪, H1850)

普通光学显微镜(测微球粒径)

365 nm 常规紫外固化灯

实验步骤：

1. 试剂配制

(1) 5% 聚乙烯醇(PVA)水溶液(w/v)配制

取 0.5 g PVA 粉末,加入 9.5 g 超纯水后震荡混匀,放入 85 °C水浴锅中搅拌加热溶解,用 0.22 μm 针式过滤器过滤。

2. 微滴制备

(1) 微滴/微球制备仪的安装连接

微滴/微球制备仪安装连接参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“2. 微滴/微球制备仪的安装连接”的部分；其连接如下(步骤③-⑦连接效果如下图 9-1 所示)：

- ① 用气管依次连接“空气压缩机”-“气源处理装置”-“微滴/微球制备仪”；
- ② 将微滴/微球制备仪分别与电源、电脑的连接；
- ③ 用气管分别将 A₀(压力输出通道一)和 A₁(15 mL 储液池), B₀(压力输出通道二)和 B₁(15 mL 储液池)连接, C₀(压力输出通道三)和 C₁(15 mL 储液池)；
- ④ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A₁(15 mL 储液池)和 A₂(通道一流量传感器), B₁(15 mL 储液池)和 B₂(通道二流量传感器)连接, C₁(15 mL 储液池)和 C₂(通道三流量传感器)连接；
- ⑤ 用配有 1/4-28 螺纹接头和卡箍的 PEEK 管(内/外径 0.25 mm/1.6 mm)分别将 A₂(通道一流量

传感器)和 A₃(外相: PVA 水溶液), B₂(通道二流量传感器)和 B₃(中间相: 光敏树脂)连接, C₂(通道三流量传感器)和 C₃(内相: 全氟己酮)连接;

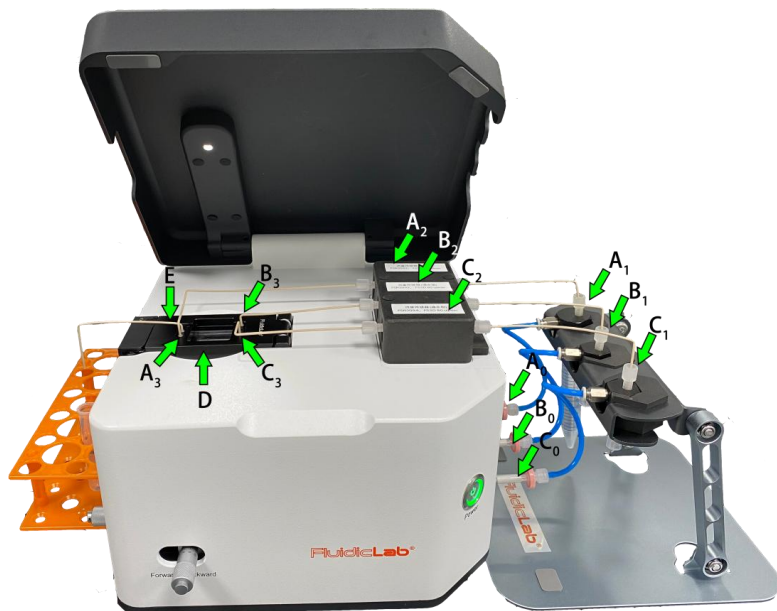


图 9-1 微滴/微球制备仪的安装连接

⑥ D 为 GL-DE-300-500 芯片和夹具的组合, 芯片和夹具的入口通过硅胶塞密封;

⑦ 用 PEEK 管(内/外径 0.5 mm/1.6 mm)将芯片出口 E 处生成的乳液导出。

(2) FluidicLabSuite 软件的安装和设备的添加

FluidicLabSuite 软件的安装参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.1 FluidicLabSuite 软件的安装”的部分;

(3) 全氟己酮微胶囊的制备和固化

① 分别在三个储液池中依次加入 5 mL 5% PVA 水溶液(通道一)、5 mL 光敏树脂(通道二)和 5 mL 全氟己酮(通道三);

② FluidicLabSuite 软件的设备添加参考《微滴/微球制备仪使用手册 V.1.0》中“3.2 FluidicLabSuite 软件的设备添加”的部分(相机和流量传感器仅需添加一次);

- ③ 打开空气压缩机和气源处理装置开关;
- ④ 在乳液出口端放置离心管接收前废液;
- ⑤ 在电脑端设置通道一压力(外相, 如 300 mbar)、通道二压力(中间相, 如 400 mbar)和通道三压力(内相, 如 90 mbar)排出管路和芯片中的空气;
- ⑥ 待管路和芯片中完全填充液体后(空气被完全排出); 将整个系统由压力控制切换到流速控制, 并设置三个通道流速依次为为 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、8 $\mu\text{L}/\text{min}$ (IPA 溶剂流速, 非标准流速)和 27 $\mu\text{L}/\text{min}$ (IPA 溶剂流速, 非标准流速);
- ⑦ 调整反馈值(Feedback)快速达到设定流速, 并实现流速的稳定输出;
- ⑧ 用载玻片接收一滴乳液, 并在普通光学显微镜下观察其微滴均一性;
- ⑨ 待微滴生成均匀后, 即可开始接收至装有 5% PVA 水溶液的玻璃瓶中, 并开启 365 nm 的紫外灯一边接收一边固化;
- ⑩ 60 min 后停止收集, 关闭紫外灯, 获得已固化的全氟己酮微胶囊。

3. 全氟己酮微胶囊的清洗与干燥

- ① 将已固化的微胶囊吸取至 15 mL 的离心管中, 静置沉底后弃去离心管上层的 PVA 水溶液;
- ② 按 $V_{\text{球}}:V_{\text{水}}=1:2$ 加入超纯水, 振荡摇匀;
- ③ 2500 rpm 离心处理 1 min, 并去除上清液以洗去微胶囊表面的 PVA;
- ④ 重复上述②和③操作 2-3 次;
- ⑤ 将离心管底部的全氟己酮微胶囊至于 75°C 的烘箱中干燥 12 h。

4. 微滴/微球制备仪清洗

微滴制备仪使用完必须清洗管路、流量传感器和芯片。具体操作详见“微滴/微球制备仪操作指

导卡”。本方案推荐的清洗试剂顺序为：超纯水 → 乙醇水混合溶液 (1:1, v/v) → 超纯水 → 空气。

结果与讨论:

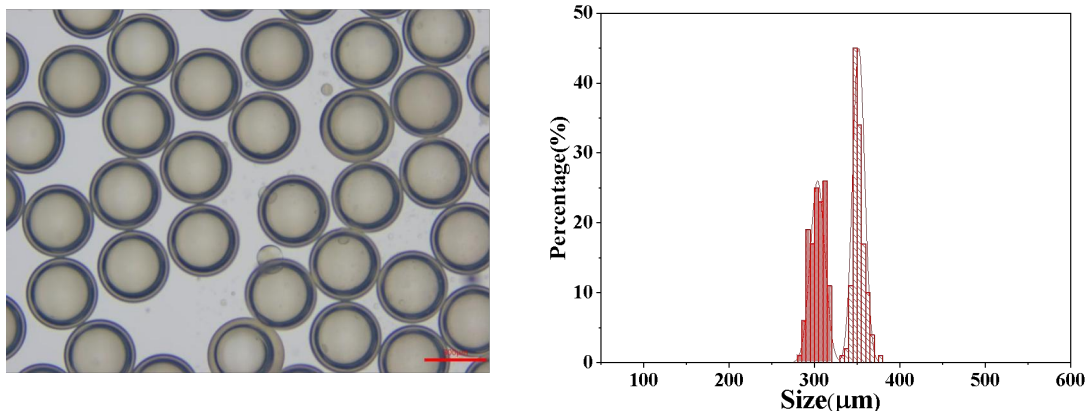


图 9-2 固化前全氟己酮微胶囊显微镜图和粒径分布图

刚接收的核壳结构液滴囊壳平均粒径: $351.71 \mu\text{m}$, 变异系数(CV): 2.01%; 囊芯平均粒径: $303.56 \mu\text{m}$, 变异系数(CV): 2.81%。其显微镜图和粒径分布如上图 9-2 所示。

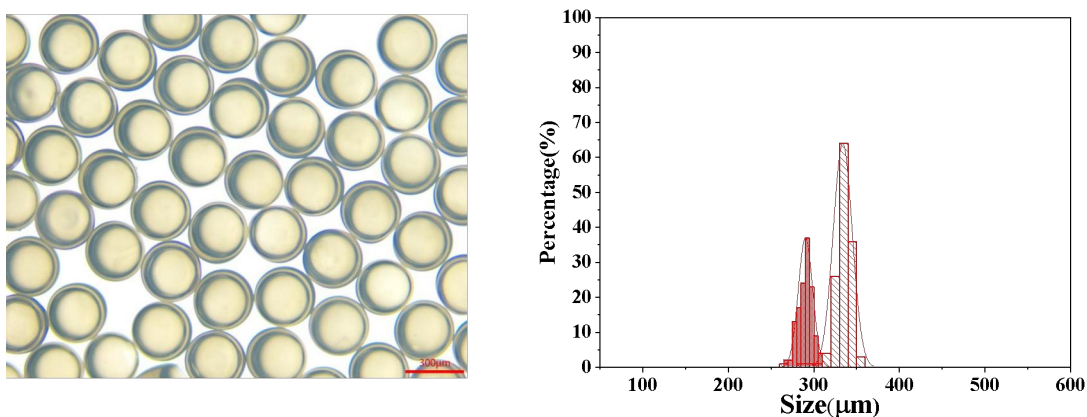


图 9-3 固化后全氟己酮微胶囊显微镜图和粒径分布图

固化后的全氟己酮微胶囊囊壳平均粒径: $333.74 \mu\text{m}$, 变异系数(CV): 3.35%; 囊芯平均粒径: $290.18 \mu\text{m}$, 变异系数(CV): 2.89%。其显微镜图和粒径分布如上图 9-3 所示。

热重数据(TG/DTG 曲线)表明该全氟己酮微胶囊的触发温度为 126.84°C , 全氟己酮含量约为

92.74%。热重数据如下图 9-4 所示：

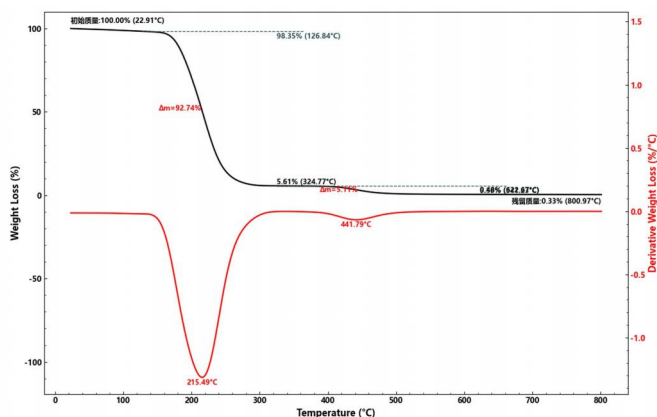


图 9-4 全氟己酮微胶囊热重图

实验关键点：

1. 本方案制备全氟己酮微胶囊核结构易出现偏心问题。其中树脂粘度起关键作用，树脂粘度越低越易偏心，但粘度越高，则不利于液滴生成；
2. 紫外固化时须自上而下垂直照射，以增大微胶囊受光面积、实现均匀固化；禁止紫外直接照射出液管，以防止树脂固化堵塞出液管；
3. 建议制备所用 PVA 水溶液浓度为 5%，且固化后的微胶囊必须要用超纯水清洗以除去其表面 PVA。

参考文献：

- [1] Qi L.et al. Microcapsules for enhancing the safety of LIBs. *J. Therm. Anal. Calorim.*, **150**, 3037-3066(2025).
- [2] Li C.et al. Enhancing safety in small confined spaces with thermally triggered fire-extinguishing microcapsules from microfluidics, *Lab Chip*, **24**, 904-912(2024).
- [3] Liu H.et al. Preparation and thermal responsiveness of microencapsulated fluorinated liquids for automatic fire extinguishing. *Heliyon*, **10**, e30872(2024).
- [4] Li J.et al. Fabrication of thermally activated fire-extinguishing microcapsules and silicone rubber composite. *Compos Commun*, **53**, 102256(2025).

FluidicLab[®]

— 上海澎赞生物科技有限公司 —



上海市杨浦区纪念路8号财大科技园1号楼315



021-65103566



sale@fluidiclab.com



www.fluidiclab.com

★ 该手册仅限于科研使用