

3.2.2.1.3 DNA 探针的固定

固定有聚丙烯酰胺凝胶垫的载玻片浸于含有 12.5%戊二醛的磷酸缓冲液 (pH 7.5) 中 40°C 过夜, 之后大量纯净水冲洗, 直至没有戊二醛的味道。活化后的凝胶基片最好在 24h 内进行探针固定。DNA 探针的固定原理是 5'端修饰氨基的寡核苷酸探针与戊二醛活化产生的醛基发生反应, 脱水形成 Schiff 碱, 这样寡核苷酸探针就共价键合在凝胶垫表面[14]。在本实验中, 我们采用的是微通道引导法固定探针, 首先将平行的多条 PDMS 微通道可逆的覆盖于凝胶垫上, 然后将浓度为 50 μ M 的探针溶液 500nl 加入微通道中, 不同的微通道可以加入不同类型的探针。然后将凝胶基片放入 100%湿度的盒子中, 室温过夜反应。最后, 将 PDMS 微通道从凝胶基片上揭去, 基片用纯净水冲洗, 再浸入 0.1M NaBH₄ 4°C 孵育 20min, 还原未反应的残留醛基。最后纯净水冲洗, 吹干 4°C 保存。

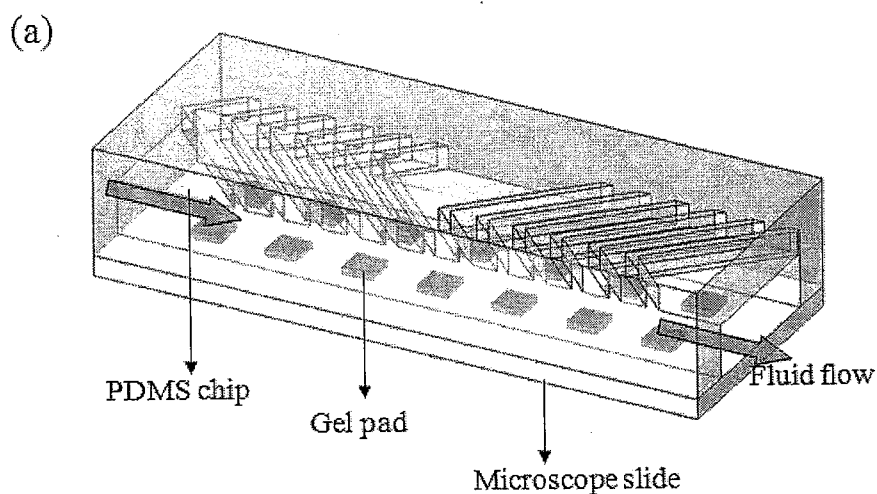
3.2.2.2 PDMS 杂交芯片的制作

杂交芯片上的微结构是由标准浇塑复制技术加工完成的[15]。操作过程如下: 首先是利用紫外光蚀刻技术制作 SU-8 模板, 然后将 PDMS 前体浇注于模板上聚合成型。本实验中构建了两种杂交体系: 无混合器的杂交体系和有混沌微混合器的杂交体系。无混合器的杂交体系是由直的流体通道构成, 其 SU-8 模板制作是采用标准的 SU-8 蚀刻技术。有混沌微混合器的杂交体系是在流体通道上壁加工不对称人字形的凹槽, 其 SU-8 模板制作是采用两步 SU-8 蚀刻技术[16]。两步 SU-8 蚀刻需要两次涂胶, 两次光刻蚀, 第一层制作流体通道结构, 第二层制作不同结构的凹槽, 具体过程参见第二章。芯片上无混合器的流体通道的尺寸: 长度为 15mm, 宽度为 0.5mm, 高度为 50-170 μ m。有混合器的流体通道底层通道的尺寸同上, 通道上壁的凹槽深度

为 30-80 μm ，凹槽宽度为 140 μm ，间隔为 70 μm 。PDMS 聚合前体（单体：引发剂 10: 1，w/w）充分混合后，抽真空 20min 除去混合时产生的气泡，然后将其浇注于 SU-8 模板上，置于烘箱中 80 $^{\circ}\text{C}$ 聚合 2h，从模板上揭下 PDMS 其一面塑有所需的通道图形结构。最后用不锈钢管在进样池及废液池上打孔。

3.2.2.3 杂交芯片的组装

PDMS 芯片与固定探针的载玻片的封接是采用氧等离子体不可逆封接。为了保护固定的探针在等离子体时不被破坏，在等离子体处理时用掩膜将固定探针的部分遮盖，这样等离子体只是处理暴露的部分。载玻片和 PDMS 芯片等离子体处理 30s 后，将两者立即封接。组装的结构见图 3-3。



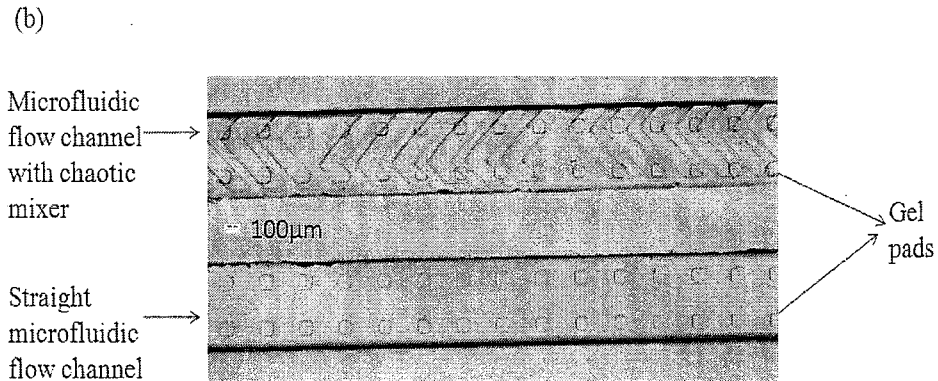


图 3-3 (a) 杂交体系组装示意图 (以有混沌微混合器的杂交体系为例)。杂交体系是由固定凝胶垫的玻璃基片与 PDMS 芯片封接而成。(b) 杂交芯片实物图。

Figure 3-3 (a) Schematic illustration of the assembled device with chaotic mixer for DNA hybridization. The device consists of a glass substrate with immobilized probe arrays and a PDMS chip with the microfluidic flow channel. (b) Photograph of the assembled device for DNA hybridization.

3.2.2.4 DNA 杂交条件

100 μ M FITC 标记的靶分子母液用杂交缓冲液 (0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl pH 8.0, 40%甲酰胺) 稀释为不同浓度。注射泵与杂交芯片的进样口之间以 PE 管相连接, 通过注射泵调节靶分子溶液连续流经探针表面的流速。杂交后, 用洗涤缓冲液 (200mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 8.0, 40%甲酰胺) 洗去非特异杂交的分子, 洗涤液用量 20 μ l, 流速为 10 μ l/min。

3.2.2.5 杂交信号的采集及分析

杂交反应的荧光信号是通过装配有 CCD 的荧光显微镜采集，采集的图像用 Image Pro 6.0 软件分析。为了评估杂交荧光信号的强度，先测量包含两倍凝胶垫（即固定探针的部分）面积的区域的荧光强度（S），之后测量除去凝胶垫部分的剩余区域的荧光强度（F），最后凝胶垫区域的荧光强度为 $E=S-F$ ，其中 S 代表总体荧光强度，F 代表背景荧光强度[17]。

3.3 结果及讨论

3.3.1 在不同流速下有混沌微混合器与无混合器的杂交体系杂交性能的比较

在固定靶分子样品体积和浓度的情况下，比较两种杂交体系（无混合器的和有混沌微混合器的）在不同的流速下杂交性能。两种体系的样品用量均为 $10\mu\text{l}$ ，FITC 标记的靶分子溶液浓度为 100nM ，靶分子溶液的灌注流速分别为 $1\mu\text{l}/\text{min}$ ， $5\mu\text{l}/\text{min}$ ， $10\mu\text{l}/\text{min}$ 。如图 3-4 所示在考察的三种不同流速下，有混沌微混合器的杂交体系相对于无混合器的杂交体系均产生了较高的杂交信号。但是二者杂交信号之间的差异在低流速时差异较小，而在高流速（ $10\mu\text{l}/\text{min}$ ）时差异较大。此外，从图中还可以看到随着流速的增加两个杂交体系的杂交信号强度出现不同程度的下降，尤其当流速从 $1\mu\text{l}/\text{min}$ 增加到 $5\mu\text{l}/\text{min}$ ，二者的杂交信号强度下降显著。

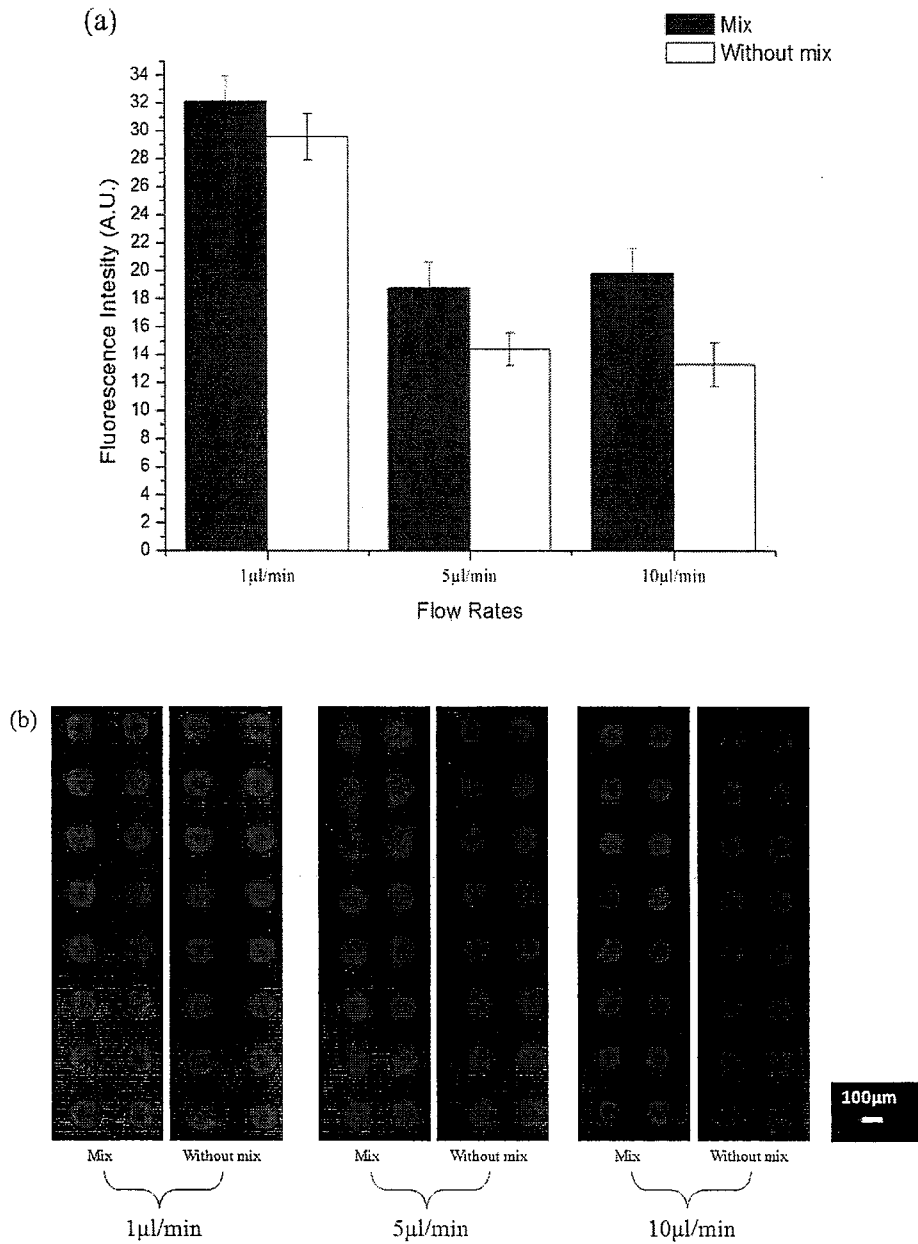


图 3-4 (a) 比较有混合器和无混合器杂交体系在不同流速下杂交信号的差异。(b) 两个杂交体系在不同流速下荧光图。

Figure 3-4 (a) Comparison of hybridization signals between the DNA

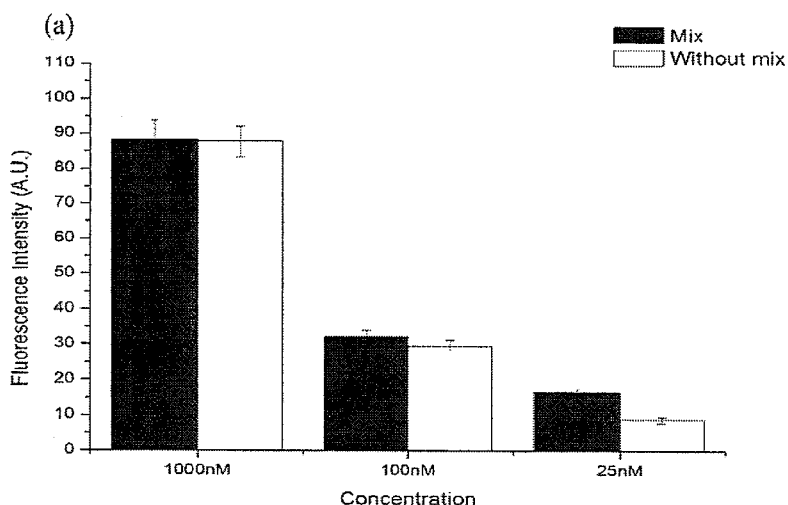
hybridization device with mixer and without mixer at tested flow rates. (b) Fluorescence images from two DNA hybridization devices at tested flow rates. The height of the microchannel was 50 μ m.

本实验是以聚丙烯酰胺凝胶作为固定寡核苷酸探针的载体。相对于玻璃基片作为固定寡核苷酸探针的载体，聚丙烯酰胺凝胶垫具有单位面积上固定探针密度大，荧光信号背景低，靶分子与探针杂交受空间位阻影响小的特点。在聚丙烯酰胺凝胶上进行的杂交反应的动力学曲线可以近似分为三个部分，也就是对应杂交过程的三个阶段[18, 19]。初始阶段主体溶液中的靶分子传质至凝胶载体上。这一过程在静态杂交过程中主要是以分子扩散为主导，杂交信号与时间成线性增长关系。随后阶段是杂交的前沿在凝胶载体(即凝胶垫)的边缘逐渐扩展。最后阶段是凝胶载体上的杂交信号达到饱和状态。靶分子溶液在通道内的流动可以增加对流传质，加快靶分子从主体溶液向凝胶基质表面的转运。但是由于在微尺度下流体主要以层流为主，层间的分子传质主要依靠扩散。对于无混合器的杂交体系，通道底层溶液中靶分子在对流传质作用下快速转运到基质表面，而主体溶液中的靶分子仍然需要依靠分子扩散向底层转运，这是个慢速的过程，这样在固定探针表面形成靶分子缺失层[20, 21]。而有混沌微混合器的杂交体系，混沌流可以促使靶分子在通道内旋转，这样主体溶液的靶分子有更多的机会进入通道底层与探针碰撞结合，避免靶分子缺失层的形成。所以相比于无混合器的体系，有混沌微混合器的杂交体系在不同流速下都取得了较高的杂交信号强度。然而，在低流速(1 μ l/min)时，微通道内的扩散传质可能占据主导地位[22]。所以从图 3-4 中看出在低流速时，有混合器与无混合器的杂交体系荧光信号强度无明显差异。而在高流速时，杂交反应可能主要依赖于靶分子的获得性，混沌混合促使靶分子在微

通道内旋转增加其与探针的接触几率的优势可以很好的体现。所以在流速为 $10\mu\text{l}/\text{min}$ 时，来自有混沌微混合器的体系的杂交信号强度明显高于无混合器的体系。

3.3.2 在不同靶分子浓度下有混沌微混合器与无混合器的杂交体系杂交性能的比较

在固定靶分子样品体积和灌流速度的情况下，比较两种杂交体系（无混合器的和有混沌微混合器的）在不同的靶分子浓度下杂交的效果。两种体系的样品用量均为 $10\mu\text{l}$ ，靶分子溶液的灌注流速为 $1\mu\text{l}/\text{min}$ ，FITC 标记的靶分子溶液浓度分别为 1000nM ， 100nM ， 25nM 。如图 3-5 所示在高靶分子浓度时，两种杂交体系的杂交信号强度差异很小。但是在低浓度时，二者的差异较大，有混合器的体系的杂交信号强度是无混合器体系的近二倍。



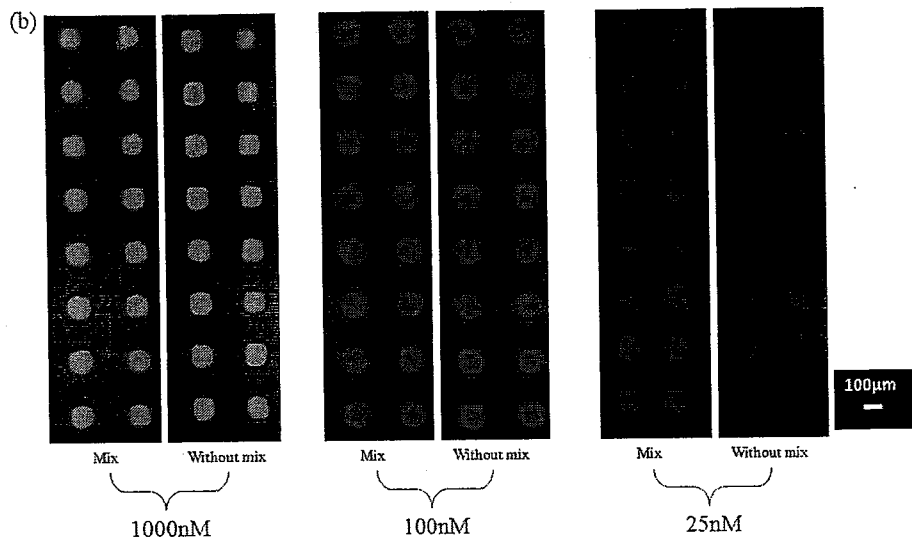


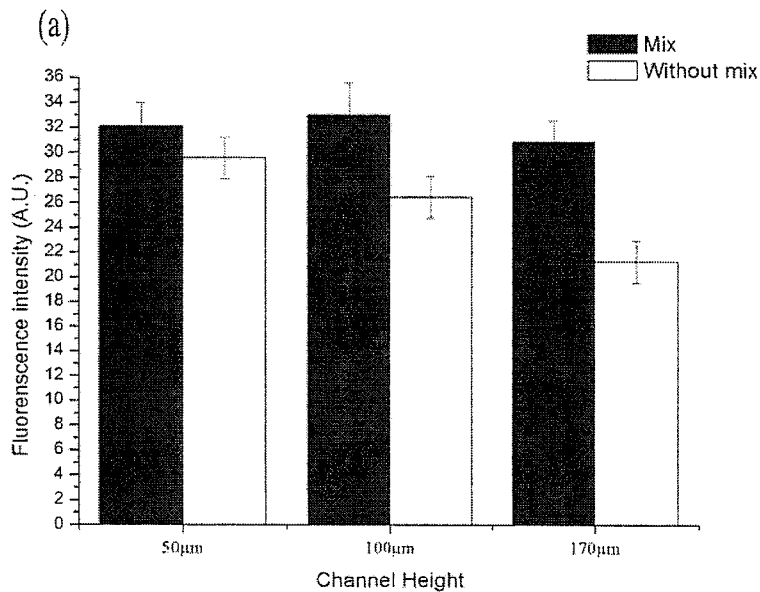
图 3-5 (a) 比较有混合器和无混合器杂交体系在不同浓度下杂交信号的差异。(b) 两个杂交体系在不同浓度下荧光图。微通道的高度为 $50\mu\text{m}$ 。

Figure 3-5 (a) Comparison of hybridization signals between the DNA hybridization device with mixer and without mixer at tested concentrations. (b) Fluorescence images from two DNA hybridization devices at tested concentrations. The height of the microchannel was $50\mu\text{m}$.

出现上述现象的原因在于：在高靶分子浓度时，靶分子与探针的结合速率将在杂交过程中起主导作用[23]，杂交过程不再受限于靶分子的扩散或对流的传质，所以两种杂交体系在靶分子浓度为 1000nM 时，杂交信号强度的差异很小。然而在低靶分子浓度时，靶分子的扩散或对流的传质在杂交过程中起主导作用，即靶分子的可获得性是决定杂交信号强弱的主要因素，所以在靶分子浓度为 25nM 时，有混沌微混合器体系的杂交信号强度明显高于无混合器体系的。

3.3.3 在不同流体通道高度下有混沌微混合器与无混合器的杂交体系杂交性能的比较

在固定靶分子样品体积，浓度和灌注速度的情况下，比较两种杂交体系（无混合器的和有混沌微混合器的）在不同的微通道高度下杂交的效果。两种体系的样品体积均为 $10\mu\text{l}$ ，靶分子溶液的灌注流速为 $1\mu\text{l}/\text{min}$ ，FITC 标记的靶分子溶液浓度为 100nM 。考察的微通道高度分别为 $50\mu\text{m}$ ， $100\mu\text{m}$ 和 $170\mu\text{m}$ 。如图 3-6 所示，无混合器体系的杂交信号随微通道高度的尺寸变化较大，即随着微通道高度的增加，杂交信号强度降低。这是因为在杂交时间固定的情况下，浅通道缩短了分子的扩散距离，有利于提高杂交效率[24]。但是有混沌微混合器体系由于混沌混合的原因，杂交信号受微通道高度的尺寸变化影响较小。



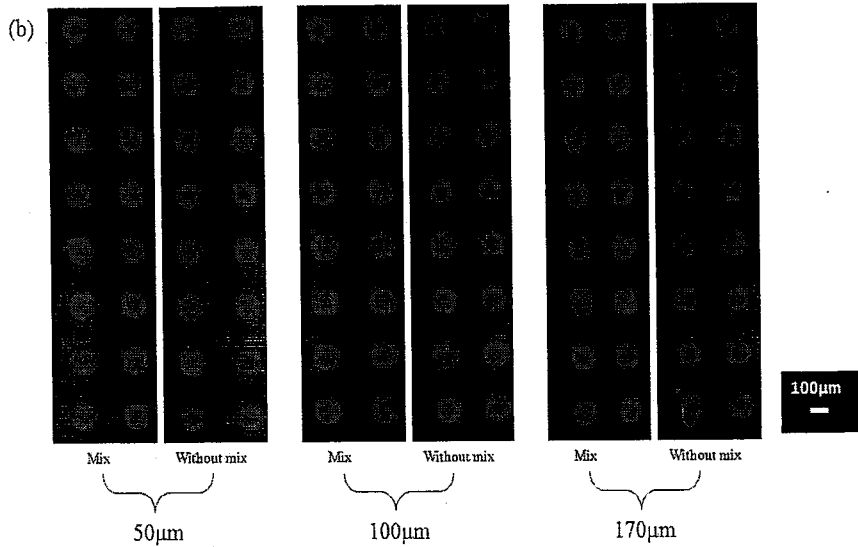


图 3-6 (a) 比较有混合和无混合杂交体系在不同微通道高度下杂交信号的差异。(b) 两个杂交体系在不同微通道高度下荧光图。

Figure 3-6 (a) Comparison of hybridization signals between the DNA hybridization device with mixer and without mixer at tested heights of microchannels. (b) Fluorescence images from two DNA hybridization devices at tested heights of microchannels.

3.4 本章小结

构建了一个集成混沌微混合器的杂交体系，并与无混合器的杂交体系进行比较，考察了二者在不同样品流速、靶分子浓度和通道高度下杂交效果的差异。结果发现有混沌微混合器的杂交体系的杂交效果要优于无混合器的杂交体系，尤其在深通道，高流速和低靶分子浓度情况下二者之间杂交信号的差异更加明显。

参考文献

- [1] Liu, Y., Kern, J. T., Walker, J. R., Johnson, J. A., Schultz, P. G., Luesch, H., A genomic screen for activators of the antioxidant response element. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(12): 5205-10.
- [2] van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R., Friend, S. H., Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 2002, 415(6871): 530-6.
- [3] Yang, H., Ding, Y., Hutchins, L. N., Szatkiewicz, J., Bell, T. A., Paigen, B. J., Graber, J. H., de Villena, F. P., Churchill, G. A., A customized and versatile high-density genotyping array for the mouse. *Nat Methods*, 2009, 6(9): 663-6.
- [4] Erickson, D., Liu, X. Z., Krull, U., Li, D. Q., Electrokinetically controlled DNA hybridization microfluidic chip enabling rapid target analysis. *Anal Chem*, 2004, 76(24): 7269-7277.
- [5] Sosnowski, R. G., Tu, E., Butler, W. F., O'Connell, J. P., Heller, M. J., Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(4): 1119-23.
- [6] Yuen, P. K., Li, G. S., Bao, Y. J., Muller, U. R., Microfluidic devices for fluidic circulation and mixing improve hybridization signal intensity on DNA arrays. *Lab Chip*, 2003, 3(1): 46-50.

- [7] Wei, C. W., Cheng, J. Y., Huang, C. T., Yen, M. H., Young, T. H., Using a microfluidic device for 1 μ l DNA microarray hybridization in 500 s. *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33(8).
- [8] Chung, Y. C., Lin, Y. C., Shiu, M. Z., Chang, W. N., Microfluidic chip for fast nucleic acid hybridization. *Lab Chip*, 2003, 3(4): 228-33.
- [9] Cheek, B. J., Steel, A. B., Torres, M. P., Yu, Y. Y., Yang, H., Chemiluminescence detection for hybridization assays on the flow-thru chip, a three-dimensional microchannel biochip. *Anal Chem*, 2001, 73(24): 5777-83.
- [10] Hashimoto, M., Barany, F., Soper, S. A., Polymerase chain reaction/ligase detection reaction/hybridization assays using flow-through microfluidic devices for the detection of low-abundant DNA point mutations. *Biosens Bioelectron*, 2006, 21(10): 1915-23.
- [11] Noerholm, M., Bruus, H., Jakobsen, M. H., Telleman, P., Ramsing, N. B., Polymer microfluidic chip for online monitoring of microarray hybridizations. *Lab Chip*, 2004, 4(1): 28-37.
- [12] Wang, Y., Vaidya, B., Farquar, H. D., Stryjewski, W., Hammer, R. P., McCarley, R. L., Soper, S. A., Cheng, Y. W., Barany, F., Microarrays assembled in microfluidic chips fabricated from poly(methyl methacrylate) for the detection of low-abundant DNA mutations. *Anal Chem*, 2003, 75(5): 1130-40.
- [13] Proudnikov, D., Timofeev, E., Mirzabekov, A., Immobilization of DNA in polyacrylamide gel for the manufacture of DNA and DNA-oligonucleotide microchips. *Anal Biochem*, 1998, 259(1): 34-41.

- [14] Timofeev, E., Kochetkova, S. V., Mirzabekov, A. D., Florentiev, V. L., Regioselective immobilization of short oligonucleotides to acrylic copolymer gels. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(16): 3142-8.
- [15] Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J. A., Whitesides, G. M., Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem*, 1998, 70(23): 4974-4984.
- [16] Stroock, A. D., Dertinger, S. K., Ajdari, A., Mezic, I., Stone, H. A., Whitesides, G. M., Chaotic mixer for microchannels. *Science*, 2002, 295(5555): 647-51.
- [17] Yershov, G., Barsky, V., Belgovskiy, A., Kirillov, E., Kreindlin, E., Ivanov, I., Parinov, S., Guschin, D., Drobishev, A., Dubiley, S., Mirzabekov, A., DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(10): 4913-8.
- [18] Livshits, M. A., Mirzabekov, A. D., Theoretical analysis of the kinetics of DNA hybridization with gel-immobilized oligonucleotides. *Biophys J*, 1996, 71(5): 2795-801.
- [19] Sorokin, N. V., Chechetkin, V. R., Chechetkin, M. A., Vasiliskov, V. A., Turygin, A. Y., Mirzabekov, A. D., Kinetics of hybridization on the oligonucleotide microchips with gel pads. *J Biomol Struct Dyn*, 2003, 21(2): 279-88.
- [20] Bishop, J., Blair, S., Chagovetz, A., Convective flow effects on DNA biosensors. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22(9-10): 2192-8.
- [21] Situma, C., Hashimoto, M., Soper, S. A., Merging microfluidics with microarray-based bioassays. *Biomol Eng*, 2006, 23(5): 213-31.

-
- [22] Parsa, H., Chin, C. D., Mongkolwisetwara, P., Lee, B. W., Wang, J. J., Sia, S. K., Effect of volume- and time-based constraints on capture of analytes in microfluidic heterogeneous immunoassays. *Lab Chip*, 2008, 8(12): 2062-70.
- [23] Kim, J. H. S., Marafie, A., Jia, X. Y., Zoval, J. V., Madou, M. J., Characterization of DNA hybridization kinetics in a microfluidic flow channel. *Sens Actuators B*, 2006, 113(1): 281-289.
- [24] Pappaert, K., Van Hummelen, P., Vanderhoeven, J., Baron, G. V., Desmet, G., Diffusion-reaction modelling of DNA hybridization kinetics on biochips. *Chem Eng Sci*, 2003, 58(21): 4921-4930.

第四章 基于单步往复流微流控 CD 式芯片构建及在 DNA 杂交中的应用

4.1 引言

DNA 杂交技术是基于互补 DNA 单链之间高特异性和高亲和性的结合, 该技术已经广泛应用于基因表达分析, 基因型分析, 和疾病相关基因的检测 [1-3]。对于传统的静态 DNA 微阵列杂交芯片, 靶分子主要依靠分子扩散与固定的探针结合。由于靶分子 DNA 在水中的扩散常数非常小, 以含 30 个碱基的寡核苷酸链为例, 其在室温下自由溶液中的扩散常数为 $2.4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, 一个这样的分子横向移动 1cm 需要耗时达 289h, 所以在静态微阵列杂交芯片上, 杂交时间一般需要 6-20h。此外, 微阵列杂交芯片的样品消耗一般在 10~300 μl 。

微流控技术作为一个新技术, 开辟了低样品消耗、快速、高效的生物分析新途径[4]。目前, 不少基于微流控技术的核酸杂交芯片已经被研制, 目的在于缩短杂交时间和降低样品的消耗。这些芯片依据技术原理不同, 可以分为两类: 主动模式和被动模式。基于主动模式的杂交芯片一般需要借助外力如声波, 电场加快杂交反应速率, 缩短反应时间。Grodzinski 研究组利用声波形形成空穴微流促进靶分子的传质, 杂交信号可以提高 5 倍[5]。电动力作为样品的驱动力能够精确地控制流体, 不需要外泵或内在阀, 并且这种装置易于微型化, 在缩短杂交时间和提高杂交效率亦取得令人满意的结果[6-8]。但是这类芯片加工流程复杂, 制作成本高。另一类基于被动模式的杂交芯片主要依靠水利压力促使样品连续流动, 加快物质传质[9-11]。虽然样品的连续流

动加快物质传质缩短杂交时间，但是产生了样品消耗大的问题。亦有研究组利用蠕动泵，磁力搅拌，人工操作驱动样品在杂交区域循环流动，试图在缩短杂交时间的同时减少样品消耗，但是这些芯片不但都需要比较昂贵外部辅助设备或人工操作，而且无法实现平行的多样本分析。

微流控 CD 式芯片是利用微电机带动下旋转芯片产生的离心力作为流体的驱动力，消除了集成微泵微阀或外加电场的需要。此外，CD 式芯片只需单一电机就可以驱动数十乃至数百个独立的结构单元，有利于高通量的样本分析。由于其操作简便、易于微型化、可以平行多样本分析的特点，微流控 CD 式芯片吸引了不少研究者的关注。基本分析功能单元如阀[12, 13]、样品计量[14]、样品混合[15]、采样开关[16]、分离[17]都已经在微流控 CD 式芯片上实现。依靠不同功能单元的组合集成，微流控 CD 式芯片已经应用于酶联免疫分析[18-20]、细胞的分析[21-24]、核酸分析[25, 26]和小分子的检测[27]。目前，微流控 CD 式芯片上的杂交分析主要是基于连续流杂交，即样品在离心力的推动下连续流经杂交通道，这不可避免的会遇到连续灌注带来的高样品消耗的问题。

本章设计了一种基于单步往复流的微流控 CD 式芯片并用于 DNA 杂交分析。相对传统基于离心力产生单向流的 CD 式芯片，该芯片以离心力和毛细管作用力作为驱动力促使样品在微通道中产生自动地往复流动。微量样品在微通道内的往复运动不仅增加了物质的传质，缩短杂交时间，而且提高了杂交效率。在芯片旋转时，旋转产生的离心力推动样品流经杂交通道进入临时储液池（位于 CD 式芯片的外缘）。在芯片停止旋转时，毛细管作用力引导样品重新流回杂交通道。这样一转一停就形成了一次往复运动。所以只需通过控制芯片的旋转和暂停就可以使样品在杂交通道内往复流动。本章以登革热病毒血清亚型 1, 2 基因为例考察了基于往复流的 CD 式芯片 DNA 杂交的

性能。在相同杂交时间和样品用量的情况下，比较了基于往复流和连续流两种杂交方法杂交效果的差异。

4.2 微流控 CD 式芯片的基本原理

4.2.1 微流控 CD 式芯片上的基本力

(1) 离心力

离心力是在微电机带动下旋转芯片产生的,其大小与芯片的旋转速度和离心半径有关。

$$f_{\omega} = \rho r \omega^2 \quad (4-1)$$

其中 ρ 为流体的质量密度, r 为离心半径, ω 为角速度。

对于处于离心平面上的一段液柱 L 如图 4-1 所示,其受到的离心压力差为:

$$\Delta p_{\omega} = \rho \bar{r} \Delta r \omega^2 \quad (4-2)$$

$$\Delta r = \frac{1}{2} \times (r_{>} + r_{<}) \quad (4-3)$$

$$\bar{r} = r_{>} - r_{<} \quad (4-4)$$

其中 ρ 为流体的质量密度, ω 为角速度, Δr 为液柱 L 的径向的长度, \bar{r} 液柱 L 与 CD 芯片中心之间的平均长度。

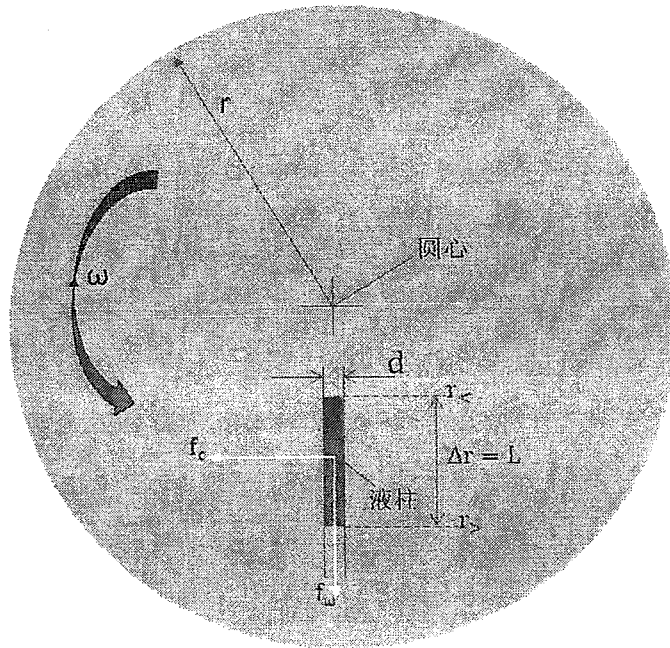


图 4-1 处于 CD 式芯片微通道内的一段液柱，其长度为 L 宽度为 d 。液柱受到的离心力 f_ω 和科氏力 f_c 。

Figure 4-1 A liquid plug in a channel of width d on a disk with radius r spinning at ω is exposed to the centrifugal force f_ω and the coriolis force f_c .

(2) 科氏力

科氏力是对旋转体系中进行直线运动的质点由于惯性相对于旋转体系产生的直线运动的偏移的一种描述。科氏力的作用方向与液柱受到的离心力方向垂直。由于科氏力可以使流体发生偏转，主要用于不同流体之间的混合和开关阀。

$$f_c = -2\rho\omega v \quad (4-5)$$

其中 ρ 为流体的质量密度， ω 为角速度， v 为流体的流速。

(3) 毛细管力

在矩形微流体通道内的毛细管压力为：

$$p_{\theta} = 2 \times \gamma \times \cos \theta \times \left[\frac{1}{w} + \frac{1}{h} \right] \quad (4-6)$$

其中通道的宽度为 w ，高度为 h 。 γ 代表液体的表面张力， θ 代表液体与通道壁的接触角。

4.2.2 微流控 CD 式芯片上的基本功能单元

(1) 流体的运输

CD 式芯片上流体的推进主要依靠旋转芯片而产生的离心压力。流体的流速主要与芯片的转速，通道（储液室）的几何结构和在芯片上的位置，还有流体的性质有关[28]。流体在芯片上的平均流速为：

$$\bar{u} = \frac{D_b^2 \rho \omega^2 \Delta r \bar{r}}{32 \mu L} \quad (4-7)$$

体积流速为： $Q = \bar{v}A$ (4-8)

其中 D_b 为通道的水力直径（其定义为 $D_b=4A/P$ ， A 为通道的截面积， P 为通道的湿周）， ρ 为流体的质量密度， ω 为角速度， Δr 为液体径向的长度， \bar{r} 液体与 CD 芯片中心之间的平均长度， μ 为液体的黏度， L 为通道内液体的长度。Duffy 等考察了不同流体（水、血浆、牛血、尿液、DMSO、PCR 产物）在 CD 芯片上的流速，研究发现流体的流速受流体的物理化学性质如离子强度、pH、电导，不同分析物的存在影响较小，实际流速与理论流速之间显示了较好的一致性[28]。

(2) 阀

阀是所有流体平台上重要的组成单元。CD 平台上的阀是一种被动阀，主要有两种疏水作用阀和毛细作用阀。

疏水作用阀的特点是疏水性通道的横截面突然的缩小，疏水的表面阻止流体的前进参见图。为了克服疏水作用阀所需的压力为：

$$\Delta p = 2\gamma \cos \theta \left[\left(\frac{1}{w_1} + \frac{1}{h_1} \right) - \left(\frac{1}{w_2} + \frac{1}{h_2} \right) \right] \quad (4-9)$$

其中 γ 代表液体的表面张力， θ 代表液体与通道壁的接触角， w_1 和 h_1 分别是通道变窄前的宽度和高度， w_2 和 h_2 分别是通道变窄后的宽度和高度。当 CD 芯片的转速超过某一值（临界转速）时，施加于液体上的离心压力高于克服疏水作用阀所需的压力，液体会突破疏水阀。

根据疏水作用阀的特点需要在通道的局部进行疏水性修饰，目前的工艺是采用类似喷墨打印的方法将疏水的特氟隆材料喷涂于通道的局部[29]。

毛细作用阀与疏水作用阀的设计恰好相反，它是利用亲水通道的突然扩张而产生的表面张力变化阻止流体的前进。其实这种现象与液滴会悬停留于玻璃毛细管的开口处是一样的道理。当流体到达通道突然扩张处时受到的毛细压力为：

$$\Delta p = \frac{C\gamma \sin \theta}{A} \quad (4-10)$$

其中 C 为接触线长度， γ 为液体的表面张力， θ 代表液体与通道壁的接触角， A 为通道的横截面积。

如果流体受到的离心压力大于或等于流体在通道突然扩张处时受到的毛细压力，液体将会突破毛细作用障碍，其突破时芯片的旋转频率为：

$$f = \left(\frac{\gamma \sin \theta}{\pi^2 D_b \rho \Delta r \bar{r}} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4-11)$$

其中 D_b 为通道的水力直径， ρ 为流体的质量密度， ω 为角速度， Δr 为液体径向的长度， \bar{r} 液体与 CD 芯片中心之间的平均长度， γ 为液体的表面张力， θ 代表液体与通道壁的接触角。

4.3 实验部分

4.3.1 实验材料

聚丙烯酰胺凝胶垫制备相关试剂，光刻胶制备结构制备相关试剂及仪器，杂交实验相关试剂及仪器详见第三章。

登革热病毒血清亚型 1, 2 的杂交探针以及靶分子均合成于大连宝生物公司，其基因序列[30]见表 4-1:

表 4-1 登革热病毒探针和靶分子序列。

Table 4-1 DNA sequences of Dengue virus probes and targets used in the hybridization experiments. ^a Tagged with an amino group at 5', ^b Tagged with an FITC group at 5'.

Sequence name	DNA sequence (5'-3')
Dengue virus serotype 1 probe ^a	GGGAAGCTGTATCCTGGT
Dengue virus serotype 2 target ^b	ACCAGGATACAGCTTCCC
Dengue virus serotype 2 probe ^a	ATGAAGCTGTAGTCTCAC
Dengue virus serotype 2 target ^b	GTGAGACTACAGCTTCAT

4.3.2 基于单步往复流的微流控 CD 式芯片的设计

微流控 CD 式芯片是由上下两层组成，上层为 PDMS 层包含 12 个 DNA 杂交功能单元，下层为固定 DNA 探针阵列的玻璃基片（见图 4-2a）。图 4-2b 显示了单个 DNA 杂交功能单元的结构，其由洗脱液室、疏水阀、样品入口、杂交通道、临时储液池、废液室组成。杂交通道的尺寸为 15mm 长，400 μ m 宽，及 46 μ m 深，具体参数详见图 4-3。根据毛细管泵的设计原理[31]，我们选

择的杂交通道的尺寸产生的流体阻力比较小。疏水阀的设计是采用疏水通道的几何变化,即通道截面的突然狭窄。本实验中,疏水通道的高度保持不变,通道的宽度由 $400\mu\text{m}$ 突然缩小至 $50\mu\text{m}$ 。

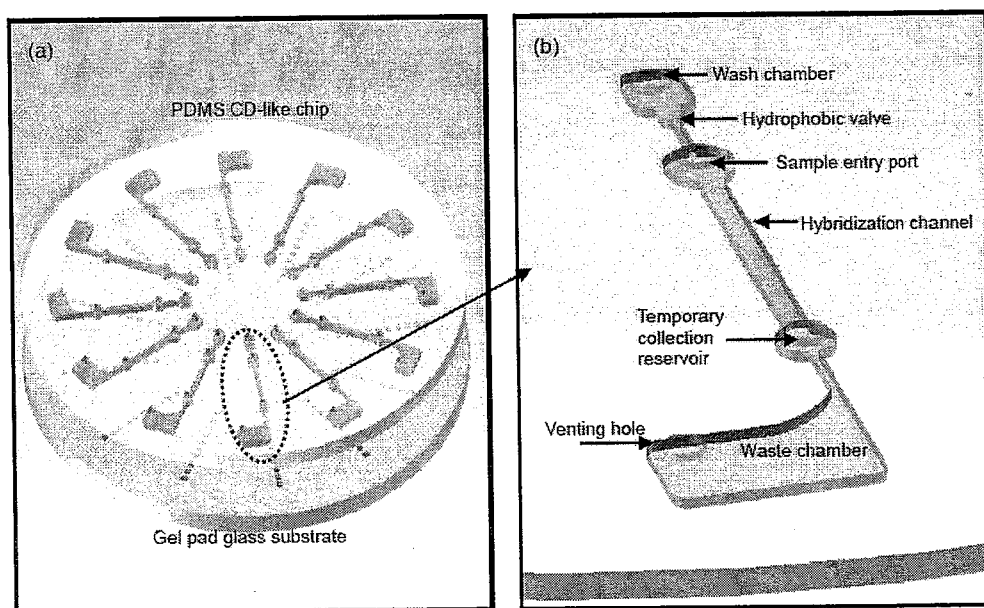


图4-2 用于DNA杂交的微流控CD式芯片示意图。(a) CD式芯片的组装示意图。CD式芯片由两层组成,上层为PDMS层包含12个杂交分析单元,下层为固定DNA探针的玻璃基片。(b) 单个DNA杂交分析单元的示意图。

Figure 4-2 Schematic representation of a CD microfluidic device for DNA hybridization. (a) Overall device design. It consists of a PDMS CD slab containing twelve DNA hybridization functional units and a glass substrate with immobilized DNA probe array. (b) Schematic diagram of a single DNA hybridization assay unit.

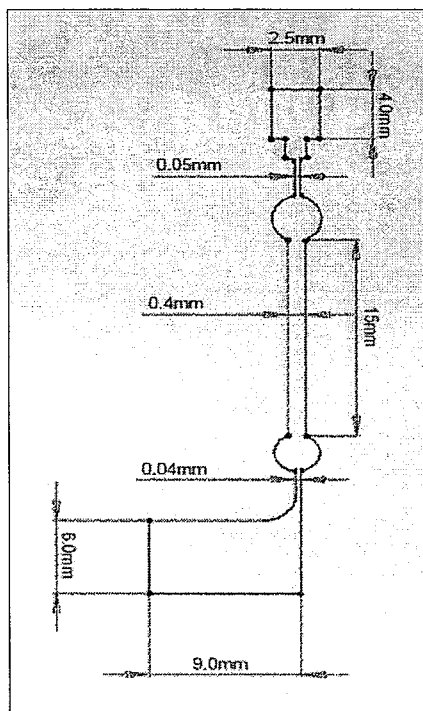


图 4-3 单个杂交单元设计参数。

Figure 4-3 Parameters of hybridization functional unit

4.3.3 基于单步往复流的微流控 CD 式芯片的制作

PDMS 层的微结构是由标准浇塑复制技术加工完成的[32]。过程简述如下：首先利用标准的光蚀刻技术制作 SU-8 模板，之后 PDMS 聚合前体（单体：引发剂 10: 1, w/w）充分混合后，抽真空 20min 除去混合时产生的气泡，然后将其浇注于 SU-8 模板上（PDMS 层厚度为 2.5mm），置于烘箱中 80℃ 聚合 2h，从模板上揭下 PDMS 其一面塑有所需的通道图形结构。最后用不锈钢管打孔。根据微流控 CD 式芯片的设计，PDMS 层的疏水阀区域需要保持 PDMS 原有的疏水特性，而杂交通道区域需要具有较强的亲水性。为了实现

在 PDMS 层上不同区域的亲疏水修饰, 在 PDMS 进行氧等离子体处理前, 用镂空的掩膜将需要保持疏水的部分遮盖, 镂空的部分是需要亲水的(杂交通道)。PDMS 层经氧等离子体处理 2min 后, 只有杂交通道区域变成亲水而其他部分仍保持疏水, 最后将其与固定探针的玻璃基片可逆的封接。

4.3.4 聚丙烯酰胺凝胶垫的制作及 DNA 探针的固定

聚丙烯酰胺凝胶垫的制作及 DNA 探针的固定的过程具体参见第三章。在本实验中, 我们采用的是微通道引导法固定探针。PDMS 微通道的设计见图 4-4。首先将 PDMS 微通道可逆的覆盖于凝胶垫上, 然后将浓度为 $50\mu\text{M}$ 的探针溶液 $0.5\text{-}1\mu\text{l}$ 加入微通道中, 不同的微通道可以加入不同类型的探针。然后将凝胶基片放入 100%湿度的盒子中, 室温过夜反应。之后将 PDMS 微通道从凝胶基片上揭去, 基片用纯净水冲洗, 再浸入 0.1M NaBH_4 4°C 孵育 20min, 用来还原未反应的残留醛基。最后纯净水冲洗, 吹干 4°C 保存。

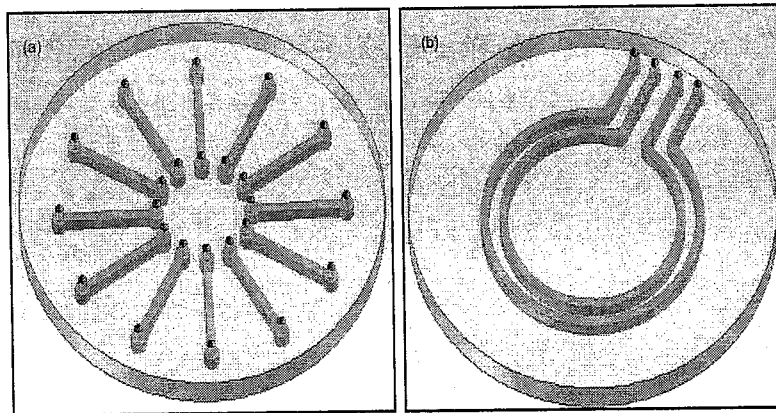


图 4-4 用于 DNA 探针固定的 PDMS 微通道设计图。(a) PDMS 微通道用于固定一种探针 (登革热病毒血清亚型 1)。(b) PDMS 微通道用于固定二种探针 (登革热病毒血清亚型 1 和 2)。

Figure 4-4 Schematic diagram of the PDMS microchannels for the

immobilization of DNA probes. (a) The PDMS microchannels for the immobilization of one kind of DNA probes (Dengue virus serotype 1). (b) The PDMS microchannels for the immobilization of two kinds of DNA probes (Dengue virus serotype 1 and 2).

4.3.5 DNA 杂交条件

在进行杂交分析之前, 100 μ M FITC 标记的靶分子母液用杂交缓冲液 (0.9 M NaCl, 20mM Tris-HCl pH 8.0, 40% formamide) 稀释。为了杂交后冲洗杂交通道洗去非特异性结合的 DNA 分子, 配制洗涤缓冲液 (100mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 8.0, 40% formamide)。整个 DNA 杂交分析过程都在室温下进行。

基于往复流的 DNA 杂交分析: 350nl 的靶分子溶液和 1 μ l 的洗涤缓冲液分别加入微流控 CD 式芯片的样品入口和洗涤液室。由于杂交通道经过亲水化的处理, 靶分子溶液自发的进入杂交通道。由于疏水阀的作用, 洗涤缓冲液会停留在洗涤液室, 不会进入下游的杂交通道。将微流控 CD 式芯片加载于离心机的托盘上, 首先控制 CD 式芯片的转速为 8.5-25Hz, 旋转芯片 3s 之后暂停 3s, 持续这种转-停交互的模式 90s 至 300s。DNA 杂交反应完成以后, 用盖片封闭 CD 式芯片上的临时储液池, 以 22Hz 的转速旋转芯片 10s, 将杂交通道内的靶分子溶液排入废液室。最后, 以 38Hz 的转速旋转芯片 30s, 在离心力的作用下, 处于洗涤液室的洗涤液进入杂交通道, 之后排入废液室。整个流程参见图 4-5。

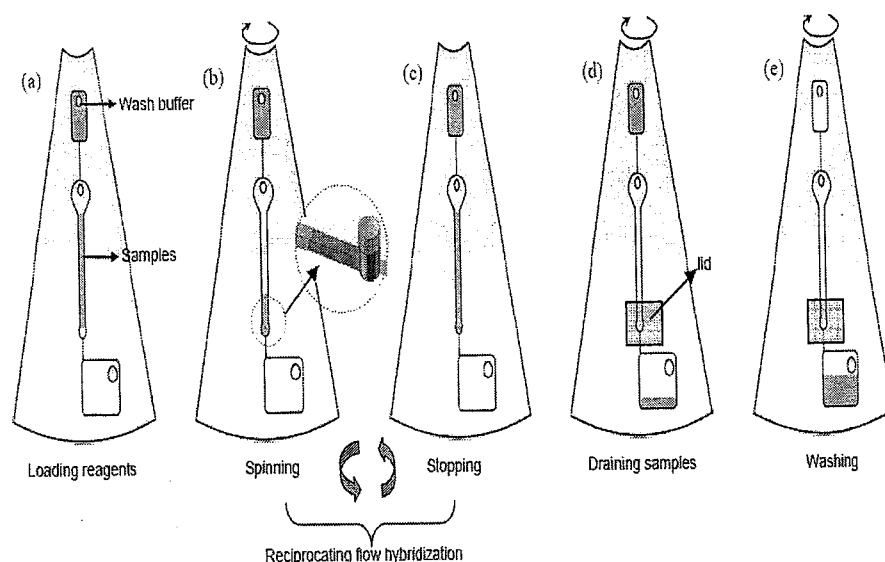


图 4-5 微流控 CD 式芯片上杂交分析流程图。

Figure 4-5 Schematic diagram of DNA hybridization assay process on a CD microfluidic device.

基于连续流的 DNA 杂交分析：用于连续流杂交分析的 PDMS 杂交通道为直通道，其尺寸为宽 $400\mu\text{m}$ ，长 15mm ，高 $46\mu\text{m}$ ，这个尺寸与基于往复流杂交的 CD 式芯片的杂交通道尺寸一样。为了计量样品体积为 350nL ，先用注射泵将 $2\mu\text{L}$ 的空气和 350nL 的靶分子溶液顺序的吸入 PE 管中，之后 PE 管与杂交通道的进样口相连，利用注射泵以 $0.48\mu\text{L}/\text{min}$ 流速推动管中的靶分子液段流经杂交通道，最后以 $2\mu\text{L}/\text{min}$ 流速推动 $1\mu\text{L}$ 的洗涤缓冲液洗涤杂交通道。

4.3.6 荧光信号的采集及分析

杂交反应的荧光信号是通过装配有 CCD 的荧光显微镜采集，采集的图像用 Image Pro 6.0 软件分析。为了评估杂交荧光信号的强度，先测量包含两倍凝胶垫（即固定探针的部分）面积的区域的荧光强度（S），之后测量除去凝

胶垫部分的剩余区域的荧光强度(F)，最后凝胶垫区域的荧光强度为 $E=S-F$ ，其中 S 代表总体荧光强度，F 代表背景荧光强度[33]。

4.4 结果及讨论

4.4.1 微流控 CD 式芯片上的往复流

本章是利用离心力和毛细管力共同作用在 CD 式芯片上实现往复流。如图 4-6a 所示，CD 式芯片以 22Hz 的转速旋转后，样品溶液在毛细管力的作用下 2s 内完全回流，进入杂交通道。为了更加清晰的显示溶液在芯片上的往复运动，我们使用包含 60%甘油的水溶液替换纯水溶液。甘油的添加增加了溶液的粘度，减慢了溶液在毛细管力作用下回流的速度。从图 4-6b 中可以看出，在旋转 CD 式芯片后，大部分溶液在离心力的驱动下被甩入临时储液池，有少量液体残留在杂交通道的末端（靠近 CD 式芯片外缘侧）。在 CD 式芯片停止旋转后，溶液在毛细管力的作用下 15s 内重新回流入杂交通道。

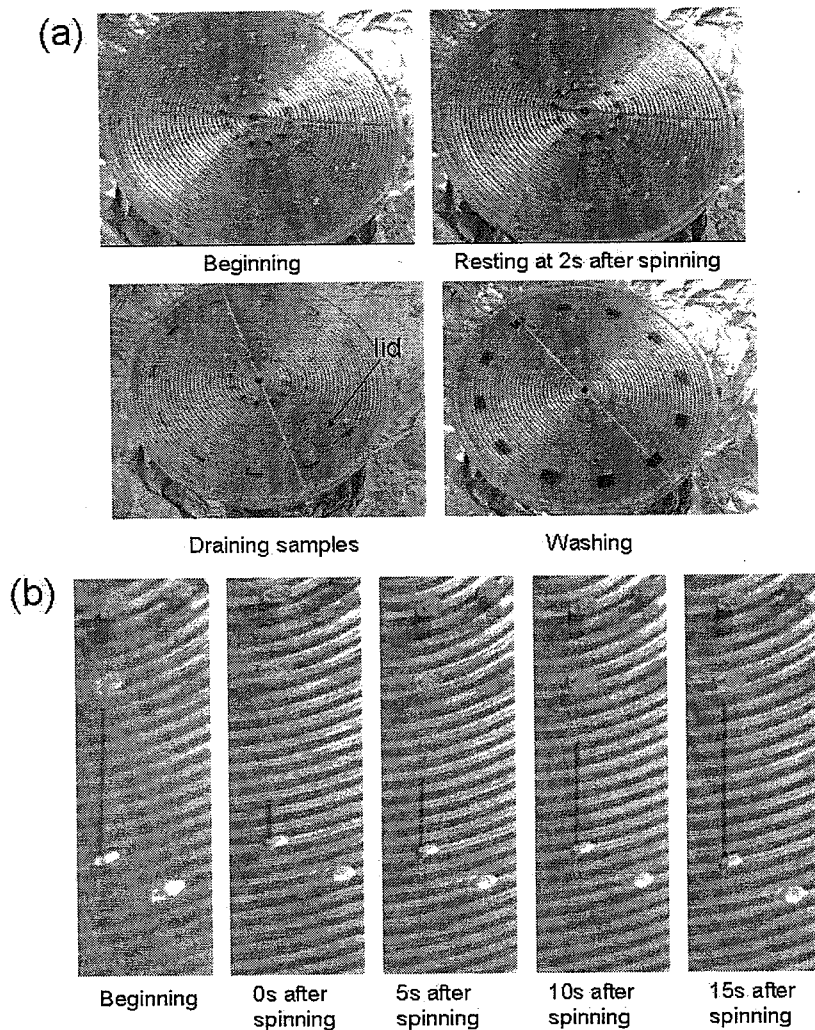


图 4-6 (a) 以蓝色染料溶液作为指示剂显示 CD 式芯片上杂交分析的过程。
(b) 以包含 60%甘油的蓝色溶液显示在亲水性的杂交通道内的往复流动。CD 式芯片以 22 Hz 的转速旋转 3s 后停止。

Figure 4-6 (a) Hybridization assay process using the blue dyes as an indicator.
(b) Reciprocating flow of the sample solution containing 60% glycerol in the hydrophilic hybridization channel using the blue dyes as an indicator. The CD device was spun for 3s at 22 Hz and kept static.

在 CD 式芯片上,设计的临时储液池主要有两个功能:在往复杂交过程中临时地储存样品溶液;在样品排出的过程中辅助调控样品溶液的转移。传统的离心平台单纯依靠转速来控制溶液的转移,而我们设计的芯片是通过临时储液池的开放和封闭来辅助控制溶液的转移。在实验中我们注意到如果临时储液池是开放的,杂交通道中的溶液被转移至废液室至少需要 38Hz 的转速,这种高转速会导致处于洗涤室中的洗涤液提前从洗涤室释放,这样就无法准确的控制不同溶液的流动先后顺序。此外,高转速亦会使部分溶液直接从临时储液池的开口飞溅。为了解决这些问题,我们使用盖片将临时储液池封闭,这样只需要较低的转速($\sim 17\text{Hz}$)就可以将样品溶液从杂交通道转移至废液室。出现这种情况的原因可能是:在旋转芯片时,处于杂交通道内的溶液会涌入临时储液池(因为相比进入下游狭窄的疏水通道,进入临时储液池的流体阻力更小),随着溶液的涌入,临时储液池中原有的气体会被压缩,压缩的气体会产生回复力,这种回复力成为溶液进入临时储液池的阻力。所以由于回复力的存在,只需要较小的离心力(即低转速)就可以实现将溶液从杂交通道转移至废液室。

在溶液往复过程,我们注意到如果溶液在微通道中往复时间超过 30min,溶液的体积会逐渐的减少。分析其原因在于 PDMS 的透气性,往复流动过程加速了溶液的蒸发,所以溶液在长时间的往复运动后会有一部分液体被蒸发掉。但是本实验中样品溶液在杂交通道内杂交时间不超过 5min,总体样品量的变化不大,对杂交的结果影响可以忽略不计。此外,如果选用其他不透气的多聚物材料作为制作芯片的基材,这个问题可能会被解决。另一个需要注意的问题是经过氧等离子体处理的 PDMS 表面亲水性保持的时间短[34],这对构建的 CD 式芯片的实用性提出了挑战,因为作为商业化应用的芯片保持理化性质的稳定性是非常重要的。但是目前已经有不少针对 PDMS 的修饰方

法[35,36], 理化性质可以维持较长的一段时间。这个问题应该可以通过对 PDMS 表面进行亲水性修饰得到解决。

4.4.2 微流控 CD 式芯片上 DNA 杂交性能考察

在微流控 CD 式芯片上进行往复杂交, 芯片转速和靶分子浓度是影响杂交效果的重要两个因素。下面就从这两方面对 CD 式芯片上往复杂交的性能进行考察, 从而达到优化杂交条件的目的。本实验中是使用登革热病毒血清亚型 1 作为研究的模型。在下列实验中, 靶分子溶液的用量均为 350nl, 杂交通道内包含了 32 个探针固定位点(即凝胶垫), 理论上可以固定 32 种不同的探针分子, 但是在这里 32 个探针固定位点上均固定相同的探针分子即登革热病毒血清亚型 1。

考察 CD 式芯片的转速对杂交效果的影响。如图 4-7a 所示, 杂交信号随着芯片转速的提高而提高, 但是达到一定转速后, 再进一步提高转速杂交信号的变化不大。出现这种情况的原因在于: CD 式芯片上的往复杂交, 可以看作 350nl 的靶分子溶液的液段在杂交通道内的往复运动, 液段往复幅度越大, 液段中的靶分子的利用率就越高, 杂交信号就越强。由公式 4-1 得知, 离心力大小是与芯片的转速的平方成正比的, 更高的转速产生更高的离心力, 可以将杂交通道内的溶液更多地压缩进入临时储液池, 这样产生更高的往复幅度。但是如果转速高到足以使液段的往复幅度达到最大, 那么继续增加转速无法进一步提高杂交信号强度。所以会出现达到一定转速后再进一步提高转速杂交信号的变化不大的情况。此外, 值得注意的是更高的转速有可能导致液体从临时储液池中飞溅出来。

考察靶分子浓度对杂交效果的影响。如图 4-7b 所示, 在考察的靶分子浓度范围内 (25nM~200nM), DNA 杂交反应的达到平衡的时间均为 90s, 杂交

达到平衡的时间并不依赖于靶分子的浓度，这与相关的文献报道相似[37]。在本实验中，由于受到检测设备灵敏度的局限，只考察了相对高的靶分子浓度范围。但是如果检测设备的灵敏度提高，CD 式芯片上杂交分析的检测限可能进一步的降低。

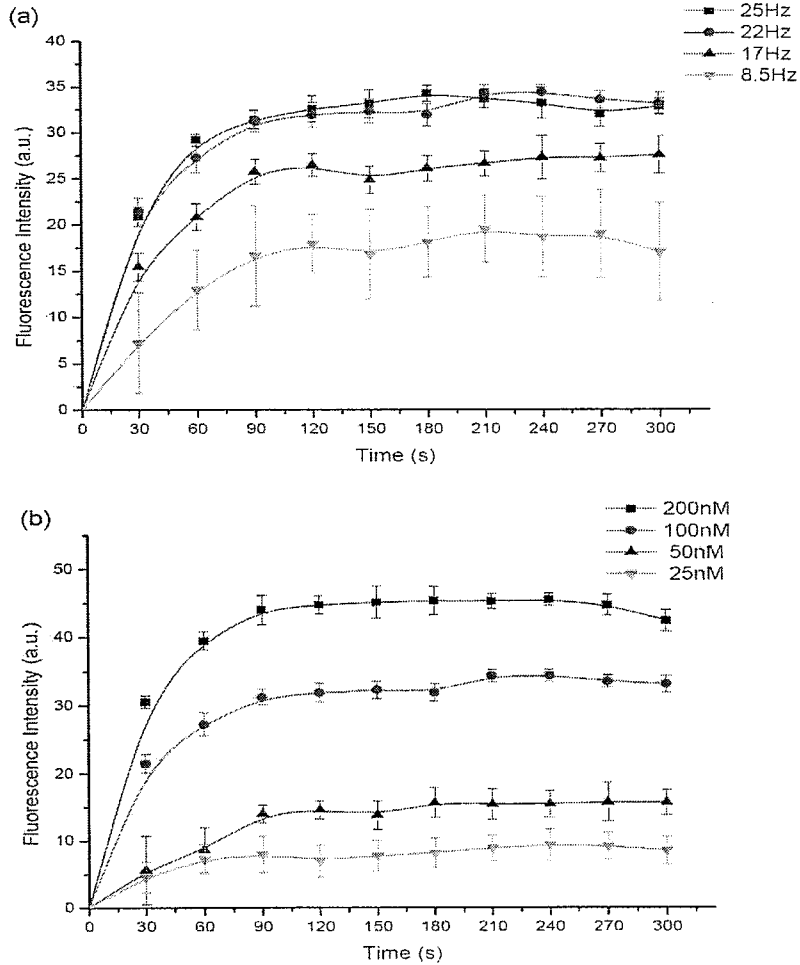


图 4-7 基于往复流的 DNA 杂交性能考察。(a) 在不同旋转频率下 DNA 杂交信号的变化。靶分子浓度 100nM。(b) 在不同浓度下 DNA 杂交信号的变化。在往复过程，CD 式芯片以 22 Hz 旋转 3s 然后暂停 3s。误差棒代表标准差。

Figure 4-7 Characteristics of the reciprocating-flow hybridization. (a) Hybridization signal growth at various rotational frequencies. The target concentration was 100nM. (b) Hybridization signal growth at various concentrations. The CD device was then rotated at 22 Hz for 3s and then stopped for 3s during the reciprocating process. Error bar represented standard deviation.

4.4.3 基于往复流和连续流两种杂交方法的杂交效果的比较

为了比较基于往复流和连续流两种杂交方法的杂交性能，登革热病毒血清亚型 1 的靶分子溶液用量均为 350nl，杂交反应的时间均为 90s。来自两种杂交方法的杂交信号比较见图 4-8。在考察的靶分子浓度范围，基于往复流的杂交方法取得杂交信号均高于基于连续流杂交方法取得的，但是在不同靶分子浓度下，二者之间的差异显著性不同。在低靶分子浓度(50nM)，往复流杂交的杂交信号强度是连续流杂交信号强度的 3 倍，并且在靶分子浓度为 25nM 时，往复流杂交仍能检测出有效的杂交信号（杂交信号高于背景信号 3 倍）而连续流杂交未检出。

相对于连续流杂交，往复流杂交只需要少量样品（纳升级）就能取得较高的杂交信号的原因在于：样品在杂交通道内往复运动增加了靶分子与探针的碰撞概率，从而提高样品中靶分子的利用率。此外，高流速产生的强对流亦增强了通道内靶分子的传质。所以相对于连续流杂交，往复流杂交取得较高的杂交信号。但是两种杂交方法得到的杂交信号，在高靶分子浓度时差异较小，出现这种现象的原因在于：在高靶分子浓度时杂交速率主要取决于靶分子与探针之间的结合速率，而受靶分子的扩散或对流速率的影响较小 [38,39]。所以会出现两种杂交方法得到的杂交信号在高靶分子浓度时差异较

小的结果。

此外,从图 4-8b 中还可以观察到,基于往复流杂交方法的杂交通道内 32 个探针点的杂交信号差异较小,尤其在杂交通道的入口区域(靠近 CD 式芯片圆心侧)和出口区域(靠近 CD 式芯片外缘侧)。而基于连续流杂交方法杂交通道内入口区域的杂交信号明显高于出口区域。

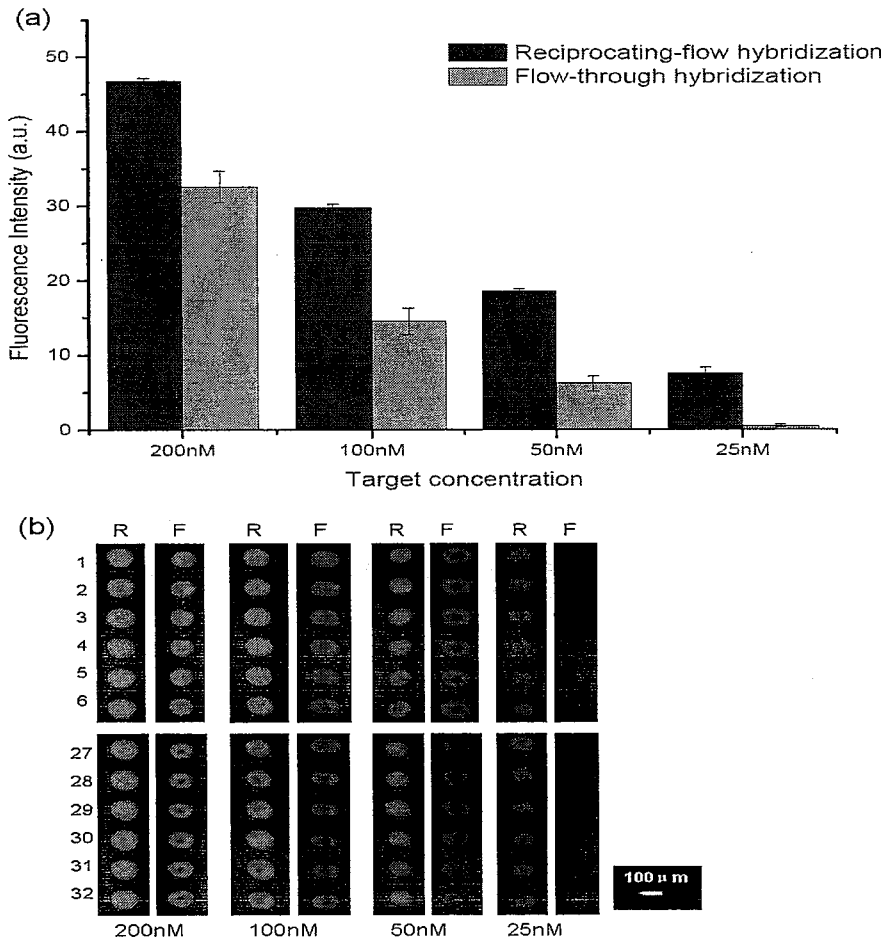


图 4-8 (a) 基于往复流和连续流两种杂交方法的杂交信号的比较。(b) 来自两种杂交方法的荧光图。图中列 R 和 F 分别代表往复流杂交和连续流杂交。图中仅截取了来自杂交通道两端区域的 12 个探针点,忽略了中间区域的 20 个探针点。在往复杂交中,CD 式芯片以 22 Hz 旋转 3s 然后暂停 3s。误差棒

代表标准差。

Figure 4-8 (a) Comparison of hybridization signal between the reciprocating-flow hybridization and the flow-through hybridization. (b) Fluorescence images from two hybridization methods. In these images, columns R and F respectively represented the reciprocating-flow hybridization and the flow-through hybridization. The images were only shown 12 probe spots from two terminal region of the hybridization channel and omitted 20 probe spots from middle region of the hybridization channel. In the reciprocating-flow hybridization, the CD device was then rotated at 22 Hz for 3s and then stopped for 3s during the reciprocating process. Error bar represented standard deviation. The number of experiments done (n) was equal to 3.

4.4.4 微流控 CD 式芯片上登革热病毒的杂交检测

登革热病毒是小型黄病毒，属于黄热病毒属，以埃及伊蚊和白纹伊蚊为传播媒介，广泛流行于全球热带及亚热带的 60 多个国家和地区，每年超过一亿人受感染，25 亿以上的人受到威胁，登革病毒的传播现已经成为热带、亚热带地区严重的公共卫生问题。登革热病毒可分为 1、2、3、4 四个血清亚型。本实验中为了验证基于往复流的微流控 CD 式芯片应用于登革热病毒的杂交检测的可行性，我们选择了登革热病毒 1、2 型作为研究对象。登革热病毒 1、2 型探针同时固定于杂交通道内，350nl 的登革热病毒 1 型或 2 型靶分子溶液用于杂交实验。如图 4-9 所示，登革热病毒 1 和 2 型能够被快速识别。登革热病毒 1 型的靶分子只特异的与登革热病毒 1 型的探针结合，同样的登革热病毒 2 型的靶分子只特异的与登革热病毒 2 型的探针结合。

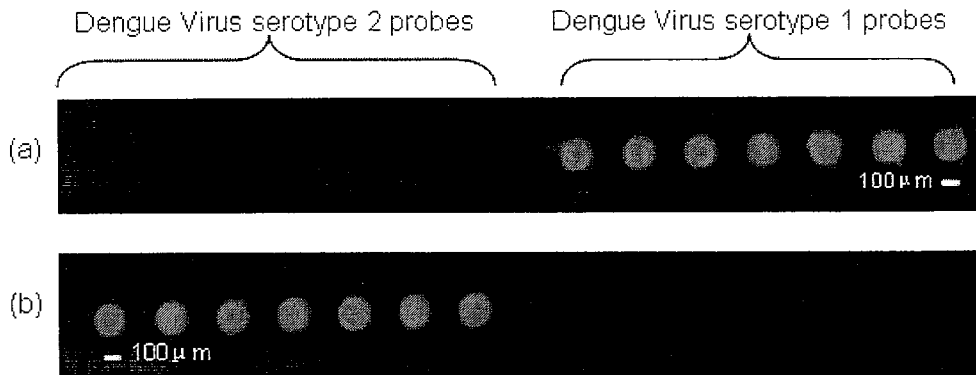


图 4-9 登革热病毒的快速检测。(a) 登革热病毒 1 型靶分子。(b) 登革热病毒 2 型靶分子。在往复过程，CD 式芯片以 22 Hz 旋转 3s 然后暂停 3s。杂交时间 90s。

Figure 4-9 Rapid detection of Dengue virus serotype. (a) Dengue virus serotype 1 targets. (b) Dengue virus serotype 2 targets. The target concentration was 100nM. The CD device was then rotated at 22 Hz for 3s and then stopped for 3s during the reciprocating process. Duration of the reciprocating process was 90s.

4.5 本章小结

构建了基于往复流的微流控 CD 式 DNA 杂交芯片。利用可控的 CD 式芯片旋转和暂停实现往复流动，避免了昂贵的外接泵和复杂的流路连接。在 CD 式 DNA 杂交分析平台上，DNA 杂交时间仅需~90s，样品消耗仅为~350nl。此外，相对于连续流杂交，在相同的杂交时间和样品体积下，往复流杂交取得更好的结果。

参考文献

- [1] Gunderson, K. L., Steemers, F. J., Lee, G., Mendoza, L. G., Chee, M. S., A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat Genet*, 2005, 37(5): 549-54.
- [2] Bittner, M., Meltzer, P., Chen, Y., Jiang, Y., Seftor, E., Hendrix, M., Radmacher, M., Simon, R., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., Sampas, N., Dougherty, E., Wang, E., Marincola, F., Gooden, C., Lueders, J., Glatfelter, A., Pollock, P., Carpten, J., Gillanders, E., Leja, D., Dietrich, K., Beaudry, C., Berens, M., Alberts, D., Sondak, V., Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*, 2000, 406(6795): 536-40.
- [3] van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R., Friend, S. H., Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 2002, 415(6871): 530-6.
- [4] Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 2006, 442(7101): 368-73.
- [5] Liu, R. H., Lenigk, R., Druyor-Sanchez, R. L., Yang, J., Grodzinski, P., Hybridization enhancement using cavitation microstreaming. *Anal Chem*, 2003, 75(8): 1911-7.
- [6] Erickson, D., Li, D., Krull, U. J., Modeling of DNA hybridization kinetics for spatially resolved biochips. *Anal Biochem*, 2003, 317(2): 186-200.

- [7] Edman, C. F., Raymond, D. E., Wu, D. J., Tu, E., Sosnowski, R. G., Butler, W. F., Nerenberg, M., Heller, M. J., Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(24): 4907-14.
- [8] Sosnowski, R. G., Tu, E., Butler, W. F., O'Connell, J. P., Heller, M. J., Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(4): 1119-23.
- [9] Cheek, B. J., Steel, A. B., Torres, M. P., Yu, Y. Y., Yang, H., Chemiluminescence detection for hybridization assays on the flow-thru chip, a three-dimensional microchannel biochip. *Anal Chem*, 2001, 73(24): 5777-83.
- [10] Noerholm, M., Bruus, H., Jakobsen, M. H., Telleman, P., Ramsing, N. B., Polymer microfluidic chip for online monitoring of microarray hybridizations. *Lab Chip*, 2004, 4(1): 28-37.
- [11] Wang, Y., Vaidya, B., Farquar, H. D., Stryjewski, W., Hammer, R. P., McCarley, R. L., Soper, S. A., Cheng, Y. W., Barany, F., Microarrays assembled in microfluidic chips fabricated from poly(methyl methacrylate) for the detection of low-abundant DNA mutations. *Anal Chem*, 2003, 75(5): 1130-1140.
- [12] Cho, H., Kim, H. Y., Kang, J. Y., Kim, T. S., How the capillary burst microvalve works. *J Colloid Interface Sci*, 2007, 306(2): 379-85.
- [13] Park, J. M., Cho, Y. K., Lee, B. S., Lee, J. G., Ko, C., Multifunctional microvalves control by optical illumination on nanoheaters and its application in centrifugal microfluidic devices. *Lab Chip*, 2007, 7(5):

557-64.

- [14] Steigert, J., Brenner, T., Grumann, M., Riegger, L., Lutz, S., Zengerle, R., Ducree, J., Integrated siphon-based metering and sedimentation of whole blood on a hydrophilic lab-on-a-disk. *Biomed Microdevices*, 2007, 9(5): 675-9.
- [15] Grumann, M., Geipel, A., Riegger, L., Zengerle, R., Ducree, J., Batch-mode mixing on centrifugal microfluidic platforms. *Lab Chip*, 2005, 5(5): 560-5.
- [16] Kim, J., Kido, H., Rangel, R. H., Madou, M. J., Passive flow switching valves on a centrifugal microfluidic platform. *Sens Actuators B*, 2008, 128(2): 613-621.
- [17] Haeberle, S., Zengerle, R., Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab Chip*, 2007, 7(9): 1094-110.
- [18] Honda, N., Lindberg, U., Andersson, P., Hoffmann, S., Takei, H., Simultaneous multiple immunoassays in a compact disc-shaped microfluidic device based on centrifugal force. *Clin Chem*, 2005, 51(10): 1955-61.
- [19] Lai, S., Wang, S., Luo, J., Lee, L. J., Yang, S. T., Madou, M. J., Design of a compact disk-like microfluidic platform for enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Chem*, 2004, 76(7): 1832-7.
- [20] Nagai, H., Narita, Y., Ohtaki, M., Saito, K., Wakida, S., A single-bead analysis on a disk-shaped microfluidic device using an antigen-immobilized bead. *Anal Sci*, 2007, 23(8): 975-9.
- [21] Godbey, W. T., Hindy, S. B., Sherman, M. E., Atala, A., A novel use of

- centrifugal force for cell seeding into porous scaffolds. *Biomaterials*, 2004, 25(14): 2799-805.
- [22] Kido, H., Micic, M., Smith, D., Zoval, J., Norton, J., Madou, M., A novel, compact disk-like centrifugal microfluidics system for cell lysis and sample homogenization. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2007, 58(1): 44-51.
- [23] Rhee, S. W., Taylor, A. M., Cribbs, D. H., Cotman, C. W., Jeon, N. L., External force-assisted cell positioning inside microfluidic devices. *Biomed Microdevices*, 2007, 9(1): 15-23.
- [24] Yamada, M., Kano, K., Tsuda, Y., Kobayashi, J., Yamato, M., Seki, M., Okano, T., Microfluidic devices for size-dependent separation of liver cells. *Biomed Microdevices*, 2007, 9(5): 637-45.
- [25] Bynum, M. A., Gordon, G. B., Hybridization enhancement using microfluidic planetary centrifugal mixing. *Anal Chem*, 2004, 76(23): 7039-44.
- [26] Peytavi, R., Raymond, F. R., Gagne, D., Picard, F. J., Jia, G., Zoval, J., Madou, M., Boissinot, K., Boissinot, M., Bissonnette, L., Ouellette, M., Bergeron, M. G., Microfluidic device for rapid (<15 min) automated microarray hybridization. *Clin Chem*, 2005, 51(10): 1836-44.
- [27] Steigert, J., Grumann, M., Brenner, T., Riegger, L., Harter, J., Zengerle, R., Ducree, J., Fully integrated whole blood testing by real-time absorption measurement on a centrifugal platform. *Lab Chip*, 2006, 6(8): 1040-4.
- [28] Duffy DC, G. H., Lin J, Sheppard NF, Kellogg GJ, Microfabricated centrifugal microfluidic systems: characterization and multiple enzymatic

- assays. *Anal Chem*, 71(20): 4669–78.
- [29] Tiensuu AL, O. h. O., Lundbladh L, Larsson O. Hydrophobic valves by ink-jet printing on plastic CDs with integrated microfluidics. *Micro Total Analysis Systems*. Dordrecht: Kluwer Acad, 2000, pp. 575–78.
- [30] Baeumner, A. J., Schlesinger, N. A., Slutzki, N. S., Romano, J., Lee, E. M., Montagna, R. A., Biosensor for dengue virus detection: sensitive, rapid, and serotype specific. *Anal Chem*, 2002, 74(6): 1442-8.
- [31] Zimmermann, M., Schmid, H., Hunziker, P., Delamarche, E., Capillary pumps for autonomous capillary systems. *Lab Chip*, 2007, 7(1): 119-25.
- [32] Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J. A., Whitesides, G. M., Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem*, 1998, 70(23): 4974-4984.
- [33] Yershov, G., Barsky, V., Belgovskiy, A., Kirillov, E., Kreindlin, E., Ivanov, I., Parinov, S., Guschin, D., Drobishev, A., Dubiley, S., Mirzabekov, A., DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(10): 4913-8.
- [34] Owen, M. J., Smith, P. J., Plasma treatment of polydimethylsiloxane. *J Adhes Sci Technol*, 1994, 8(10): 1063-1075.
- [35] Hu, S. W., Ren, X. Q., Bachman, M., Sims, C. E., Li, G. P., Allbritton, N., Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices by ultraviolet polymer grafting. *Anal Chem*, 2002, 74(16): 4117-4123.
- [36] Wu, D., Qin, J., Lin, B., Self-assembled epoxy-modified polymer coating on a poly(dimethylsiloxane) microchip for EOF inhibition and biopolymers separation. *Lab Chip*, 2007, 7(11): 1490-6.

- [37] Wei, C. W., Cheng, J. Y., Huang, C. T., Yen, M. H., Young, T. H., Using a microfluidic device for 1 microl DNA microarray hybridization in 500 s. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(8): e78.
- [38] Chan, V., Graves, D. J., McKenzie, S. E., The biophysics of DNA hybridization with immobilized oligonucleotide probes. *Biophys J*, 1995, 69(6): 2243-55.
- [39] Erickson, D., Liu, X., Krull, U., Li, D., Electrokinetically controlled DNA hybridization microfluidic chip enabling rapid target analysis. *Anal Chem*, 2004, 76(24): 7269-77.

第五章 基于两步可控往复流的微流控 CD 式芯片的构建及在单碱基错配分析中的应用

5.1 引言

自人类全基因组测序完成以来,个体之间基因序列变异的检测吸引了越来越多研究者的关注[1, 2]。这是因为变异序列的识别不仅有助于增进对疾病尤其是遗传疾病和癌症的发生发展机理的理解,而且有助于提高疾病诊断和预测的准确性[3, 4]。目前,针对变异序列的检测方法主要包括连接酶检测反应法[5, 6],引物延伸法[7, 8],和直接杂交法[9]。相比于其他检测方法,直接杂交法的检测过程不需要酶的参与,所以直接杂交法是这些检测方法中最简单的方法。一般来说,直接杂交法主要依靠互补双链之间特异性的分子识别。通常的情况下,探针分子被固定于固体支持物的表面,从复杂的混合溶液中寻找它的‘伙伴’(靶分子)。然而,在直接杂交分析中,非特异性的杂交经常发生,特别是在靶分子与探针之间的序列只存在单个碱基的错配时。所以,为了准确的检测基因的变异如点突变和单核苷酸多态性(SNPs),单碱基错配识别能力是十分关键的。

目前,针对直接杂交最常用的是商业化的 DNA 微阵列芯片,它可以实现针对大量基因序列平行化的变异检测[10, 11]。虽然微阵列芯片具有高通量的优势,但是仍然有一些亟待解决的问题如杂交时间过长(一般需要几小时甚至过夜),大量的样品和试剂消耗,洗涤过程繁琐等。

微流控提供了一个有力的技术平台,它可以减少样品的消耗,加快分析的时间,改善分析的灵敏度[12]。一些基于变异序列检测的方法如连接酶检

测反应法[13, 14], 引物延伸法[15, 16]已经在微流控芯片上实现, 并且应用于单核苷酸多态性的检测。基于直接杂交的微流控芯片亦被用于单核苷酸多态性的检测, 这些芯片利用水利泵(如循环泵, 注射泵)[17-19]或电力作为驱动力[20, 21]推动样品在探针的表面流动。流体在通道表面的流动增强了物质的传质, 改善了单碱基错配的识别能力。但是, 这些芯片的应用受限于昂贵的外泵, 复杂的流路连接及操作。

CD 式芯片提供了一个新的选择, 它是利用旋转芯片产生的离心力作为流体的驱动力, 避免了外泵和内部移动元件的整合[22]。本章设计一种基于两步可控往复流的 CD 式微流控单碱基错配分析芯片。在上一章的工作基础上, 对 CD 式芯片进行了改进, 实现两步可控的往复流动, 从而不仅使杂交过程, 而且使洗涤过程都是以往复流形式完成。为了考察 CD 式芯片对单碱基错配识别能力, 我们设计了四种探针, 其中包括一种与靶分子完全配对的探针(Perfect match PM), 三种在不同位置含有单碱基错配的探针(Mismatch MM)。通过优化解离条件, 根据 PM 和 MM 的解离动力学的差异, 微流控 CD 式芯片能够在 400s 内快速的区分完全配对和存在单碱基错配的寡核苷酸杂交双链。此外, 每个分析单元仅消耗 350nl 的样品和 350nl 的洗涤缓冲液。

5.2 实验部分

5.2.1 实验材料

设计的四种杂交探针以及靶分子均合成于大连宝生物公司, 其基因序列见表 5-1:

表 5-1 设计的四种杂交探针以及靶分子的基因序列。探针 PM、MM1-3 在 5'末端标记氨基。靶分子 5'末端标记 FITC。下划线显示错配的碱基。

Table 5-1 DNA sequences of targets and four kinds of probes. ^a Labeled with an NH₂ group at 5'. ^b Labeled with an FITC group at 5'. Mismatched nucleotide acid was underlined.

Sequence name	DNA sequence (5'-3')
DNA probe PM ^a	GGGAAGCTGTATCCTGGT
DNA probe MM1 ^a	GGGAAGCTCTATCCTGGT
DNA probe MM2 ^a	GGGAAGCTGTATC <u>T</u> TGGT
DNA probe MM3 ^a	GGGAAGCTGTATCCTGGA
DNA target ^b	ACCAGGATACAGCTTCCC

5.2.2 基于两步可控往复流的微流控 CD 式芯片的设计

微流控 CD 式芯片是由上下两层组成，上层为 PDMS 层包含 8 个单碱基错配分析单元，下层为固定了 DNA 探针阵列的玻璃基片（见图 5-1a）。图 5-1b 显示了单个单碱基错配分析单元的结构，其由洗脱液室、样品室、疏水阀、样品入口、杂交通道、临时储液池、废液室组成。杂交通道的尺寸为 12mm 长，400 μ m 宽，及 46 μ m 深，具体参数见图 5-2。疏水阀的设计是采用疏水通道的几何变化，即通道截面的突然狭窄[23]。

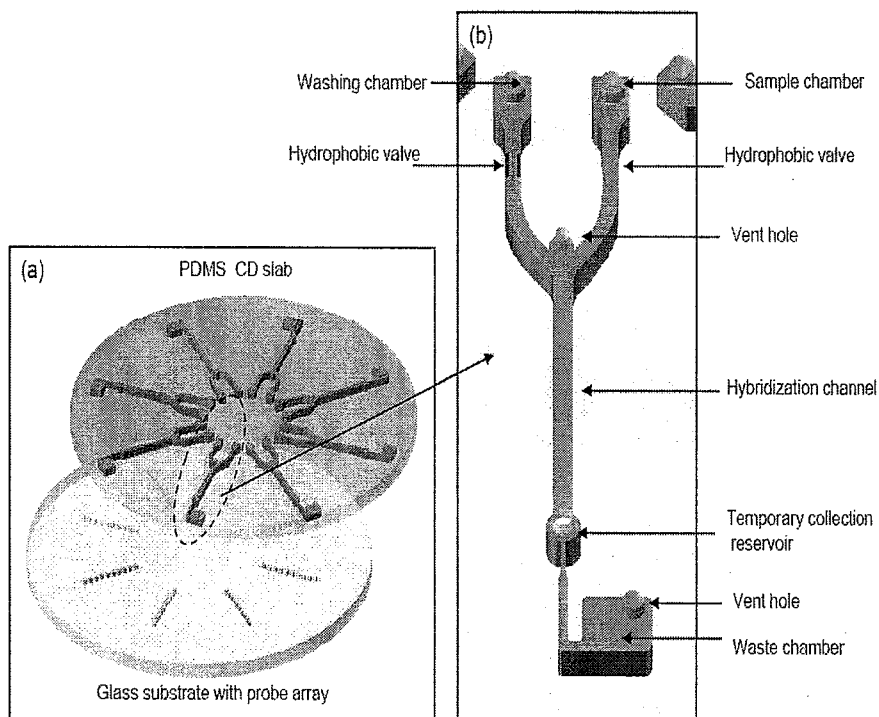


图 5-1 用于单碱基错配分析的微流控 CD 式芯片示意图。(a) 芯片的整体设计，包括两层上层为 PDMS 层包含 8 个单碱基错配分析单元，下层为固定 DNA 探针阵列的玻璃基片。(b) 单个单碱基错配分析单元的结构。

Figure 5-1 Schematic representation of the CD microfluidic device for single-nucleotide mismatch assay. (a) The structure of overall device. It consists of a PDMS CD slab containing eight single-nucleotide mismatch assay units and a glass substrate with immobilized DNA probe array. (b) Schematic diagram of a single single-nucleotide mismatch assay unit.

层经氧等离子体处理 2min 后, 只有杂交通道区域变成亲水而其他部分仍保持疏水, 最后将其与固定探针的玻璃基片可逆的封接。

5.2.4 聚丙烯酰胺凝胶垫的制作及 DNA 探针的固定

聚丙烯酰胺凝胶垫的制作及 DNA 探针的固定的过程具体参见第三章。PDMS 微通道的设计参见第四章。首先将 PDMS 微通道可逆的覆盖于凝胶垫上, 然后将浓度为 $50\mu\text{M}$ 的探针溶液 $0.5\text{-}1\mu\text{l}$ 加入微通道中, 不同的微通道可以加入不同类型的探针。然后将凝胶基片放入 100%湿度的盒子中, 室温过夜反应。最后, 将 PDMS 微通道从凝胶基片上揭去, 基片用纯净水冲洗, 再浸入 0.1M NaBH_4 4°C 孵育 20min, 用来还原未反应的残留醛基。最后纯净水冲洗, 吹干 4°C 保存。

5.2.5 单碱基错配分析

在进行单碱基错配分析之前, $100\mu\text{M}$ FITC 标记的靶分子母液用杂交缓冲液 (0.9M NaCl , $20\text{mM Tris-HCl pH}8.0$, 40% formamide) 稀释至终浓度为 100nM 。为了优化解离条件, 有效的识别 PM 和 MM, 配制含有不同 NaCl 浓度的洗涤缓冲液 ($20\text{mM Tris-HCl pH }8.0$, 40% formamide)。整个单碱基错配分析过程都在室温下进行。

在 CD 式芯片上单碱基错配分析过程如下: 350nl 的靶分子溶液和 350nl 的洗涤缓冲液分别加入微流控 CD 式芯片的样品室和洗涤液室。由于疏水阀的作用, 洗涤缓冲液和靶分子溶液分别会停留在洗涤液室和样品室, 不会进入下游的杂交通道。然后将微流控 CD 式芯片加载于离心机的托盘上, 以 24 Hz 的转速旋转 CD 式芯片 5s , 靶分子溶液从样品室中崩发, 进入杂交通道。靶分子溶液在杂交通道内往复流动, 离心条件为以 22Hz 的转速旋转芯片 3s 之后暂停 3s , 持续这种转-停交互的模式 90s 。杂交反应完成以后, 用盖片封

闭 CD 式芯片上的临时储液池, 以 22Hz 的转速旋转芯片 10s, 将杂交通道内的靶分子溶液排入废液室。之后将临时储液池上的盖片取下, 然后以 32Hz 的转速旋转芯片 5s, 在离心力的作用下, 洗涤缓冲液从洗涤液室崩发, 进入杂交通道。洗涤缓冲液在杂交通道内往复流动的离心条件与杂交过程的相同。最后, 用盖片封闭临时储液池, 以 22Hz 的转速旋转芯片 10s, 将杂交通道内的洗涤液排入废液室。

5.2.6 荧光信号的采集及分析

杂交反应的荧光信号通过装配有 CCD 的荧光显微镜采集, 采集的图像用 Image Pro 6.0 软件分析。为了评估杂交荧光信号的强度, 先测量包含两倍凝胶垫 (即固定探针的部分) 面积的区域的荧光强度 (S), 之后测量除去凝胶垫部分的剩余区域的荧光强度 (F), 最后凝胶垫区域的荧光强度为 $E=S-F$, 其中 S 代表总体荧光强度, F 代表背景荧光强度[25]。

为了定量的评估 PM 和 MM 杂交/解离动力学的差异, 最大识别指数 (maximum discrimination index, DI_{\max}) 被使用, 其公式如下:

$$DI_{\max} = \left[\frac{PM(t)}{MM(t)} \right]_{\max} \quad (5-1)$$

其中 $PM(t)$ 和 $MM(t)$ 代表为在杂交或解离过程的某一时间点 (t) PM 和 MM 的杂交信号强度。如果 DI_{\max} 的值大于 2 就说明 PM 和 MM 杂交/解离动力学的差异足以将 PM 和 MM 有效的识别[19]。

5.3 结果及讨论

5.3.1 微流控 CD 式芯片上可控的两步往复流

流体在杂交通道内往复运动是依靠离心力和毛细管力的共同作用, 可控

的进样顺序是离心力和疏水阀的相互作用实现的。图5-3显示了杂交过程和洗涤过程中流体在通道中的往复运动。为了清晰的显示往复过程，靶分子溶液和洗涤缓冲液中加入甘油，其终浓度为60%，红色和蓝色食物染料作为指示剂。红色指示剂代表的靶分子溶液在低转速时首先从样品室崩发，进入杂交通道，其中大部分溶液流入临时储液池，停止旋转芯片后液体在12s内完全回流至杂交通道。蓝色指示剂代表的洗涤缓冲液在高转速时从洗涤液室崩发，进入杂交通道，其中大部分溶液流入临时储液池，停止旋转芯片后液体在12s内完全回流至杂交通道。在实际应用中，由于靶分子溶液和洗涤缓冲液中没有添加甘油，其回流的速度更快，在3s内就可以完全回流。

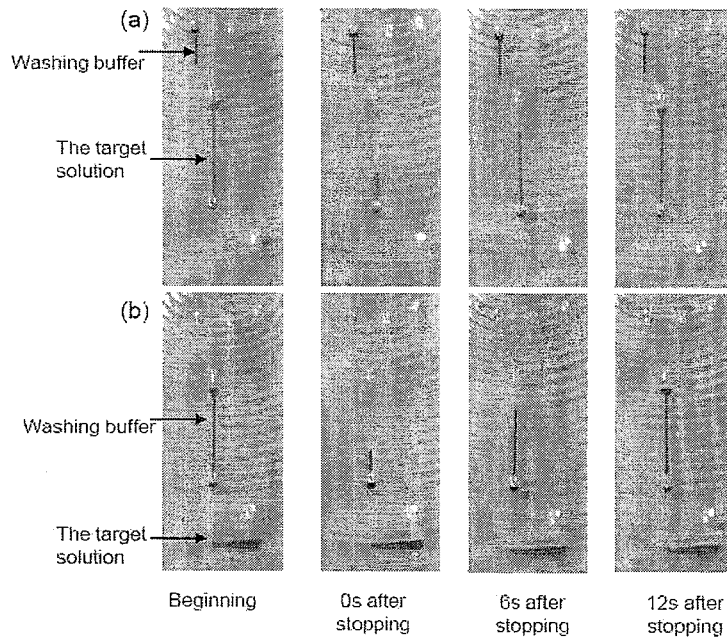


图 5-3 两步可控的往复流。(a) 杂交过程；(b) 洗涤过程。CD 式芯片以 22 Hz 转速旋转 3s，然后停止。

Figure 5-3 Two-step controllable reciprocating process of solutions containing 60% glycerol in the hydrophilic hybridization channel. Food dyes was

used as an indicator. (a) Hybridization step. (b) Washing step. The CD device was spun for 3s at 22 Hz and then kept static during the reciprocating process.

5.3.2 微流控 CD 式芯片上探针-靶分子的杂交动力学

考察依据 PM 和 MM 的杂交动力学的差异识别单碱基错配的能力。如图 5-4 所示, PM 和 MM 杂交反应达到平台期的时间没有明显的差异, 均在 90s 左右。但是, 杂交平台期的信号强度却与探针-靶分子杂交复合体包含的单碱基错配位置相关。探针 MM3, 错配的单碱基位于探针的末端, 在杂交平台期达到的荧光信号强度与完全匹配的探针 PM 的信号强度接近 ($DI_{\max}=1.07$)。探针 MM1, 错配的单碱基位于探针的中间, 在杂交平台期达到的荧光信号强度与完全匹配的探针 PM 的光信号强度相差最大 ($DI_{\max}=3.66$)。错配的单碱基位于探针的近末端的探针 MM2, 其 $DI_{\max}=1.66$ 。依据公式 5-1 的差异性评估标准, DI_{\max} 必须大于 2 时才能识别 PM 和 MM, 所以根据 PM 和 MM 的杂交动力学的差异只能有效的识别 MM1, 而无法识别 MM2 和 MM3。从结果可以看出, 杂交双链中存在的错配碱基的位置是影响杂交双链的稳定性的的重要因素。相比于其他位置的错配, 中间位置存在错配能显著地降低杂交双链的稳定性, 最易被识别[26, 27]。由于单纯依靠 PM 和 MM 的杂交动力学的差异, 无法有效地将 MM2 和 MM3 识别, 所以下面进一步考察依靠 PM 和 MM 解离动力学的差异, 进行错配碱基的识别。

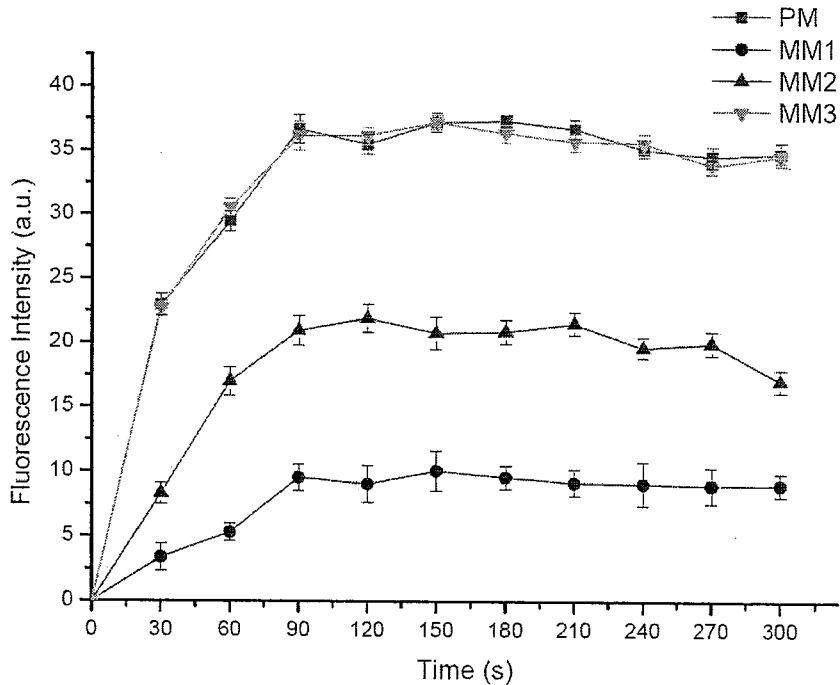


图 5-4 PM 与三种 MM 杂交复合体的杂交动力学曲线。误差棒表示标准偏差。

Figure 5-4 Hybridization kinetic profiles of PM duplexes and three MM duplexes with a single-base-pair mismatch at various positions. Error bar represented standard deviation.

5.3.3 单碱基错配分析中解离条件的优化

为了优化解离的条件，我们选用 MM3 作为研究对象，因为 MM3 相比于其他探针更难与 PM 区别。洗涤条件如温度，盐浓度，变性剂是影响杂交双链解离的重要因素[28]。本章中，杂交双链的解离是通过调节洗涤缓冲液中的 NaCl 浓度。在洗涤缓冲液（20mM Tris-HCl pH 8.0, 40% formamide）中不

同的 NaCl 浓度被考察。结果发现在 NaCl 浓度为 6mM 时, PM 与 MM3 之间的解离动力学差异最大(图 5-5)。其原因可能在于,在低盐浓度条件下,盐离子对 DNA 双链上负电荷的屏蔽减弱,双链之间静电排斥力增强,双链的 DNA 杂交复合体容易解离[29]。

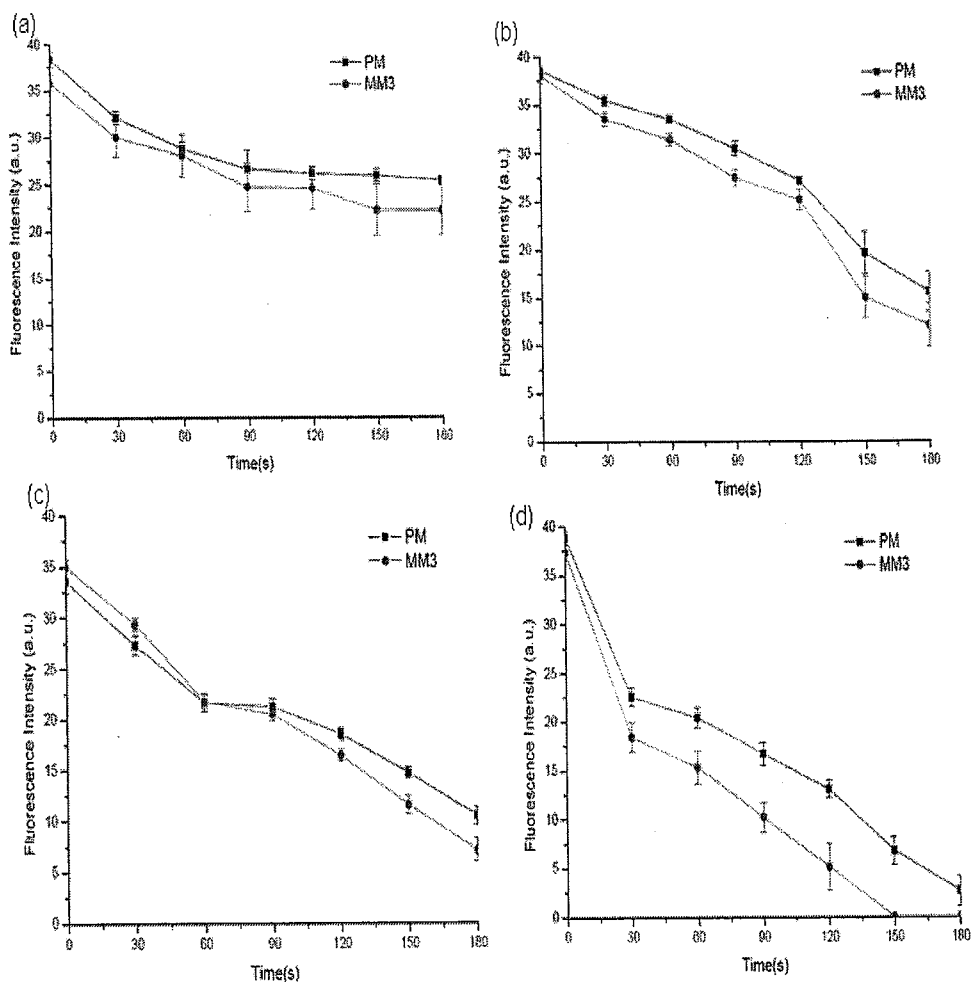
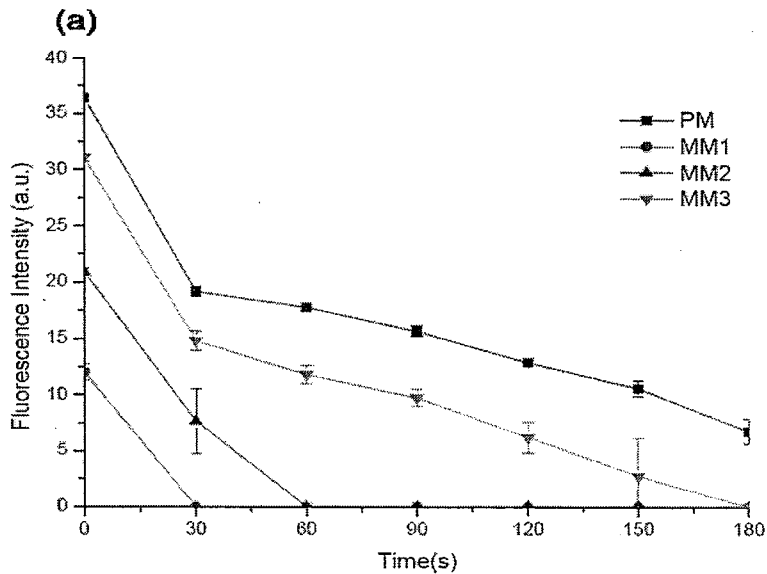


图 5-5 NaCl 浓度对杂交复合体解离的影响。(a) 50mM。(b) 25mM。(c) 12.5mM。(d) 6mM。

Figure 5-5 Effect of NaCl concentrations on the dissociation of PM and MM3 duplexes. (a) 50mM. (b) 25mM. (c) 12.5mM. (d) 6mM.

5.3.4 微流控 CD 式芯片上单碱基错配分析

为了进一步验证微流控 CD 式芯片用于 SNP 检测的能力,在先前优化的解离条件下,考察同时对四种设计的探针的识别。微流控 CD 式芯片上两步可控的往复流,使单碱基错配分析中杂交和洗涤过程都是以往复流形式完成。靶分子溶液与固定于通道内的探针杂交反应 90s 后,优化的解离缓冲液 (20mM Tris-HCl pH 8.0, 40% formamide, 6mM NaCl) 进入杂交通道,在通道内往复流动。图 5-6 显示了 PM 和三种 MM 与靶分子杂交复合体的解离动力学曲线。相比于 PM 杂交复合体,三种 MM 杂交复合体解离速度更快。所以依据 PM 和 MM 与靶分子杂交复合体解离速度的差异,PM 很容易从三种 MM 中识别出来。微流控 CD 式芯片上单碱基错配分析的过程只需 400s,包括杂交过程 90s,洗涤过程 180s,其他操作如控制临时储液池的开关的时间。



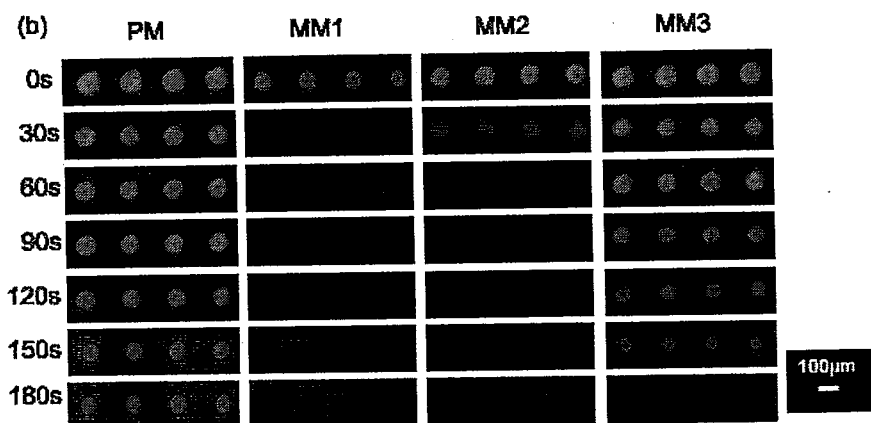


图 5-6 (a) PM 与三种 MM 杂交复合体的解离曲线。(b) PM 与三种 MM 杂交复合体解离的荧光图谱。

Figure 5-6 (a) Dissociation kinetic profiles of PM duplexes and three MM duplexes on the CD microfluidic device. (b) Fluorescence images of PM duplexes and three MM duplexes versus washing time during the dissociation. Error bar represented standard deviation.

此外，从图 5-6 中还可以观察到，三种错配探针 MM 与靶分子杂交复合体的解离速度各不相同，其中 MM1 与靶分子的杂交复合体解离的最快，30s 内就与靶分子解离，而 MM3 与靶分子的杂交复合体解离的速度最慢，需要 180s。从这个结果可以看出，存在中间位置错配的杂交双链相比末端位置错配的杂交双链更容易被识别，这对探针的设计有一定的指导意义。

5.4 本章小结

构建基于两步可控往复流的微流控 CD 式芯片用于单碱基错配分析。该芯

片实现两步可控的往复流动,使杂交和洗涤过程都是以往复流形式完成。在优化的解离条件下,依据探针与靶分子杂交复合体解离动力学的差异,PM能够从MM中准确识别。单碱基错配的分析过程只需400s左右。此外,每个分析单元样品和试剂的消耗降至纳升级(~350nl)。纳升级的消耗减少了样品和试剂的储存空间,有利于在单一CD芯片上集成高密度的分析单元。虽然目前的CD芯片上的单碱基错配分析过程还存在人工操作的步骤如临时储液池的开启和封闭,但是自动可控的往复流已经在CD芯片上实现。随着CD芯片的进一步的完善,微流控CD式芯片有可能成为完全自动化的,便携的,准确的SNPs诊断平台。

参考文献

- [1] Hacia, J. G., Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat Genet*, 1999, 21(1 Suppl): 42-7.
- [2] Nickerson, D. A., Taylor, S. L., Weiss, K. M., Clark, A. G., Hutchinson, R. G., Stengard, J., Salomaa, V., Vartiainen, E., Boerwinkle, E., Sing, C. F., DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nat Genet*, 1998, 19(3): 233-40.
- [3] Conner, B. J., Reyes, A. A., Morin, C., Itakura, K., Teplitz, R. L., Wallace, R. B., Detection of sickle cell beta S-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80(1): 278-82.
- [4] Lopez-Crapez, E., Chypre, C., Saavedra, J., Marchand, J., Grenier, J., Rapid and large-scale method to detect K-ras gene mutations in tumor samples. *Clin Chem*, 1997, 43(6 Pt 1): 936-42.
- [5] Baner, J., Nilsson, M., Mendel-Hartvig, M., Landegren, U., Signal

- amplification of padlock probes by rolling circle replication. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(22): 5073-8.
- [6] Lizardi, P. M., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D. C., Ward, D. C., Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet*, 1998, 19(3): 225-32.
- [7] Pastinen, T., Raitio, M., Lindroos, K., Tainola, P., Peltonen, L., Syvanen, A. C., A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome Res*, 2000, 10(7): 1031-42.
- [8] Shumaker, J. M., Metspalu, A., Caskey, C. T., Mutation detection by solid phase primer extension. *Hum Mutat*, 1996, 7(4): 346-54.
- [9] Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M. S., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T. J., Lipshutz, R., Chee, M., Lander, E. S., Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 1998, 280(5366): 1077-82.
- [10] Howell, W. M., Jobs, M., Gyllensten, U., Brookes, A. J., Dynamic allele-specific hybridization. A new method for scoring single nucleotide polymorphisms. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(1): 87-8.
- [11] Mei, R., Galipeau, P. C., Prass, C., Berno, A., Ghandour, G., Patil, N., Wolff, R. K., Chee, M. S., Reid, B. J., Lockhart, D. J., Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays. *Genome Res*, 2000, 10(8): 1126-37.

- [12] Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 2006, 442(7101): 368-73.
- [13] Hashimoto, M., Hupert, M. L., Murphy, M. C., Soper, S. A., Cheng, Y. W., Barany, F., Ligase detection reaction/hybridization assays using three-dimensional microfluidic networks for the detection of low-abundant DNA point mutations. *Anal Chem*, 2005, 77(10): 3243-3255.
- [14] Wang, Y., Vaidya, B., Farquar, H. D., Stryjewski, W., Hammer, R. P., McCarley, R. L., Soper, S. A., Cheng, Y. W., Barany, F., Microarrays assembled in microfluidic chips fabricated from poly(methyl methacrylate) for the detection of low-abundant DNA mutations. *Anal Chem*, 2003, 75(5): 1130-40.
- [15] Marasso, S. L., Canavese, G., Cocuzza, M., Ferrarini, A., Giuri, E., Lo Bartolo, S., Mantero, G., Perrone, D., Quaglio, M., Vallini, I., APEX protocol implementation on a lab-on-a-chip for SNPs detection. *Microelectron. Eng.*, 2008, 85(5-6): 1326-1329.
- [16] Russom, A., Tooke, N., Andersson, H., Stemme, G., Single nucleotide polymorphism analysis by allele-specific primer extension with real-time bioluminescence detection in a microfluidic device. *J Chromatogr A*, 2003, 1014(1-2): 37-45.
- [17] Ali, M. F., Kirby, R., Goodey, A. P., Rodriguez, M. D., Ellington, A. D., Neikirk, D. P., McDevitt, J. T., DNA hybridization and discrimination of single-nucleotide mismatches using chip-based microbead arrays. *Anal Chem*, 2003, 75(18): 4732-9.
- [18] Andersson, P., Jesson, G., Kylberg, G., Ekstrand, G., Thorsen, G., Parallel

- nanoliter microfluidic analysis system. *Anal Chem*, 2007, 79(11): 4022-30.
- [19] Ng, J. K. K., Feng, H. H., Liu, W. T., Rapid discrimination of single-nucleotide mismatches using a microfluidic device with monolayered beads. *Anal Chim Acta*, 2007, 582(2): 295-303.
- [20] Erickson, D., Liu, X. Z., Venditti, R., Li, D. Q., Krull, U. J., Electrokinetically based approach for single-nucleotide polymorphism discrimination using a microfluidic device. *Anal Chem*, 2005, 77(13): 4000-4007.
- [21] Sosnowski, R. G., Tu, E., Butler, W. F., O'Connell, J. P., Heller, M. J., Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(4): 1119-23.
- [22] Felton, M. J., CD Simplicity. Centrifugal forces, generated by spinning a CD-like disk, are being used by several researchers and companies to pump fluids in microfluidic devices. *Anal Chem*, 2003, 75(13): 302A-306A.
- [23] Madou, M., Zoval, J., Jia, G., Kido, H., Kim, J., Kim, N., Lab on a CD. *Annu Rev Biomed Eng*, 2006, 8: 601-28.
- [24] Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J. A., Whitesides, G. M., Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem*, 1998, 70(23): 4974-4984.
- [25] Yershov, G., Barsky, V., Belgovskiy, A., Kirillov, E., Kreindlin, E., Ivanov, I., Parinov, S., Guschin, D., Drobishev, A., Dubiley, S., Mirzabekov, A., DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A, 1996, 93(10): 4913-8.
- [26] Naiser, T., Ehler, O., Kayser, J., Mai, T., Michel, W., Ott, A., Impact of point-mutations on the hybridization affinity of surface-bound DNA/DNA and RNA/DNA oligonucleotide-duplexes: comparison of single base mismatches and base bulges. *BMC Biotechnol*, 2008, 8: 48.
- [27] Urakawa, H., El Fantroussi, S., Smidt, H., Smoot, J. C., Tribou, E. H., Kelly, J. J., Noble, P. A., Stahl, D. A., Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(5): 2848-56.
- [28] Urakawa, H., Noble, P. A., El Fantroussi, S., Kelly, J. J., Stahl, D. A., Single-base-pair discrimination of terminal mismatches by using oligonucleotide microarrays and neural network analyses. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(1): 235-44.
- [29] Petersen, J., Poulsen, L., Birgens, H., Dufva, M., Microfluidic device for creating ionic strength gradients over DNA microarrays for efficient DNA melting studies and assay development. *PLoS ONE*, 2009, 4(3): e4808.

总结论

本文构建了微流控动态核酸杂交分析平台，得到下列结论：

1. 构建了集成混沌微混合器的微流控芯片。混沌混合显著地增强分子的传质，解决了微尺度下由于层流现象层间液体的混合单纯依靠分子扩散的局限，提高了杂交效率。
2. 构建了基于单步往复流的微流控CD式芯片。利用离心力和毛细管作用力实现了样品在微通道中的往复流动，避免了昂贵的外接微泵和制作复杂的内在移动元件。利用该芯片，核酸杂交时间显著缩短，样品消耗亦减少至纳升级。此外，12个平行的核酸杂交分析单元可以实现多样品的同时分析。
3. 在构建的微流控CD式芯片基础上实现可控的多步往复流，并应用于单碱基错配分析。依据探针与靶分子杂交复合体解离动力学的差异，单碱基错配能够准确地识别。整个单碱基错配的分析过程只需400s左右。微流控CD式核酸杂交芯片以其操作简单、快速、低消耗、平行化多样本分析的特点有望在临床基因诊断，特别是现场即时诊断上发挥重要作用。