

第一章 微流控芯片上的核酸杂交研究进展

1.1 引言

核酸杂交技术是目前分子生物学中应用最广泛的技术之一，广泛应用于基因表达水平检测[1, 2]、基因功能分析[3, 4]、基因分型[5, 6]、药物筛选[7, 8]、疾病诊断[9, 10]。从核酸杂交技术的发展来看，其应用领域已经逐渐地从基础科学研究向临床疾病诊断分析延伸。但是传统的核酸杂交时间长，成本高，过程繁琐（特别是样品的预处理）等问题限制其在临床诊断，特别是现场即时诊断中的应用。微流控芯片技术具有分析快速，样品消耗小，检测灵敏度高，以及不同的分析单元可以灵活集成的优势可以解决传统核酸杂交存在的问题。但是，如何将微流控芯片技术与核酸杂交技术二者有机的融合是研究面临的挑战。本章主要将微流控芯片上的核酸杂交研究的进展作简要介绍。

1.2 核酸杂交的基本原理及方法

1.2.1 核酸杂交的基本原理

核酸杂交的原理是基于核酸变性和复性理论，即双链的核酸分子在某些理化因素作用下双链解开，而在条件恢复后又可依碱基配对规律形成双链结构。一条单链 DNA 或 RNA 分子与另一条碱基顺序互补的单链 DNA 或 RNA 分子通过互补的碱基对之间的非共价键（主要是氢键）形成双链 DNA/DNA，DNA/RNA，RNA/RNA 杂交分子。

1.2.2 核酸杂交的基本方法

核酸杂交按作用、环境不同主要分为液相杂交和固相杂交两类。液相杂交是指参与杂交的两条核酸单链均游离于溶液中，在一定条件下（溶液的离子强度、温度、时间等）进行杂交。虽然液相杂交方法简单、反应快速，但是有一定的局限性如检测的灵敏度差，很难实现高通量多样本同时平行分析。固相杂交是将寡核苷酸探针分子预先固定在固体支持物上，而标记的靶分子则游离在溶液中。杂交反应后，通过漂洗将未杂交的游离分子除去，检测留在支持物上的杂交分子。由于固相杂交的检测灵敏度高并且可以高通量的平行分析，固相杂交目前被广泛使用。

基于固相杂交的核酸杂交平台是以微阵列芯片为代表。所谓微阵列技术是指由成千上万的寡核苷酸，密集地排列于硅片、玻璃片、聚丙烯或尼龙膜等固体支持物上，再与靶分子在严格的条件下进行杂交，最后由激光共聚焦显微镜等设备获取图像信息，通过计算机分析获得信息的技术集合。目前微阵列芯片的制作方法主要有3种：（1）点样法，它是先用常规的方法制备cDNA（或寡核苷酸）探针库，然后通过特殊的针头和微喷头，分别把不同的探针溶液逐点点在固体支持物表面的不同位点，并通过物理和化学的结合使探针固定于芯片的相应位点[11]；（2）原位合成法，它是基于组合化学的原理，通过一组定位模板来决定基片表面上不同化学单体的偶联位点和次序[12, 13]；（3）光纤微珠法，其原理是在直径为 $5\mu\text{m}$ 的光纤上蚀刻出间距均匀的小洞，每个小洞可容纳直径为 $3\mu\text{m}$ 的微珠，微珠与特定序列的标记有荧光的寡核苷酸片段相连，通过解码和质控，保证每个微珠所连的核酸片段序列的正确性[14]。

1.3 微流控芯片上的核酸杂交研究

传统静态核酸杂交存在几点局限[15]: (1) 溶液中的靶分子必须通过扩散与固定在支持物表面的探针相互作用。例如, 对于 1 cm^2 面积的 DNA 微阵列和 30 个碱基的靶分子单链, 由于 30 个碱基的单链 DNA 分子在室温条件下自由溶液中扩散系数为 $2.4 \times 10^{-7}\text{ cm}^2/\text{s}$, 一个靶分子横向扩散 1 cm 需要 289 小时。所以静态杂交一般需要 6-20 小时。(2) 样品和试剂的消耗量比较大。这是因为微阵列芯片的探针固定面积一般在 1 cm^2 左右, 为了将整个探针固定区域完全覆盖, 需要的样品和试剂比较大。(3) 由于静态杂交模式杂交时间比较长, 连接于固体支持物表面的探针有可能被切割, 尤其暴露于低 pH 或高 pH 的环境, 这样会降低杂交反应的灵敏性和重复性。(4) 分析过程繁琐, 需要较多的外附设备。

微流控芯片具有样品和试剂消耗低, 反应速度快, 灵敏度高等特点, 为解决传统静态微阵列杂交的局限提供了有力的途径[16]。本章着重从以下几个方面介绍微流控芯片上核酸杂交研究的相关技术: 寡核苷酸探针阵列制备技术, 动态核酸杂交技术及杂交信号采集技术。

1.3.1 微流控芯片概述

微流控芯片实验室又称芯片实验室 (Lab-on-a-Chip) 或微流控芯片 (Microfluidic) 指的是把化学和生物等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测, 细胞培养、分选、裂解等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米 (甚至更小) 的芯片上, 由微通道形成网络, 以可控流体贯穿整个系统, 用以实现常规化学或生物实验室的各种功能的一种技术。微流控芯片实验室的基本特征和最大优势是多种单元技术在整体可控的微小平台上灵活组合、规模集成[17]。

微流控芯片技术是在芯片毛细管电泳基础上发展起来的。1992年, Manz等率先提出了微全分析系统(μ -TAS)的概念, 其研究小组采用微电子机械加工技术在平板玻璃上刻蚀微通道(见图 1-1), 研制出毛细管电泳微芯片分析装置, 成功地实现了荧光标记氨基酸的分离[18]。2002年, Quake 研究小组在 PDMS 芯片上制作气动微泵和微阀, 研制出大规模集成的微流控芯片, 在一块 $2.5\text{cm} \times 2.5\text{cm}$ 的芯片上集成有上千个微阀和数百个可寻址的微反应室(见图 1-2) [19]。随后的几年, 微流控技术日新月异, 不同学科和领域以微流控技术作为连接的纽带紧密地联系在一起, 造就了微流控技术平台多元化的发展和应用, 其从最初仅局限于分析化学, 到现在涉及生物、材料、物理、医学、药学等诸多学科, 在疾病诊断[20, 21]、药物筛选[22, 23]、环境检测[24, 25]、司法鉴定[26, 27]等方面均有应用。

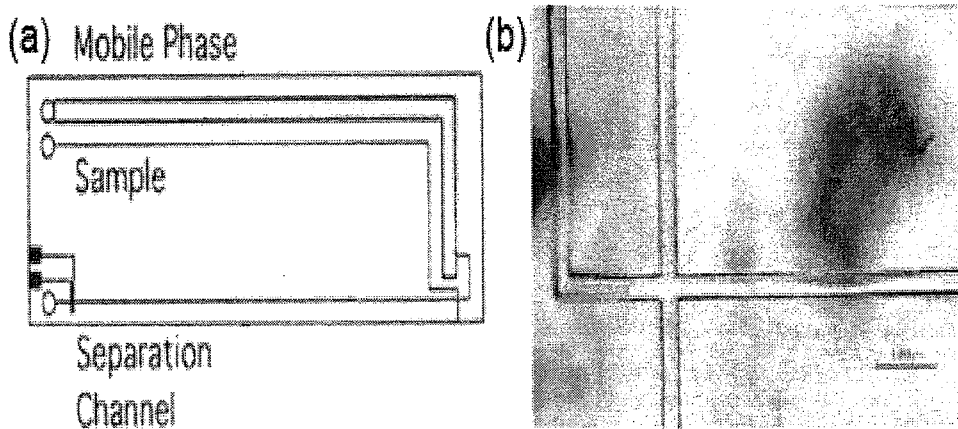


图 1-1 (a) 玻璃芯片设计平面示意图。 (b) 玻璃芯片局部微通道实物图。

Figure 1-1 (a) Layout of the channels in a glass chip. (b) Photograph of channels of the glass chip.

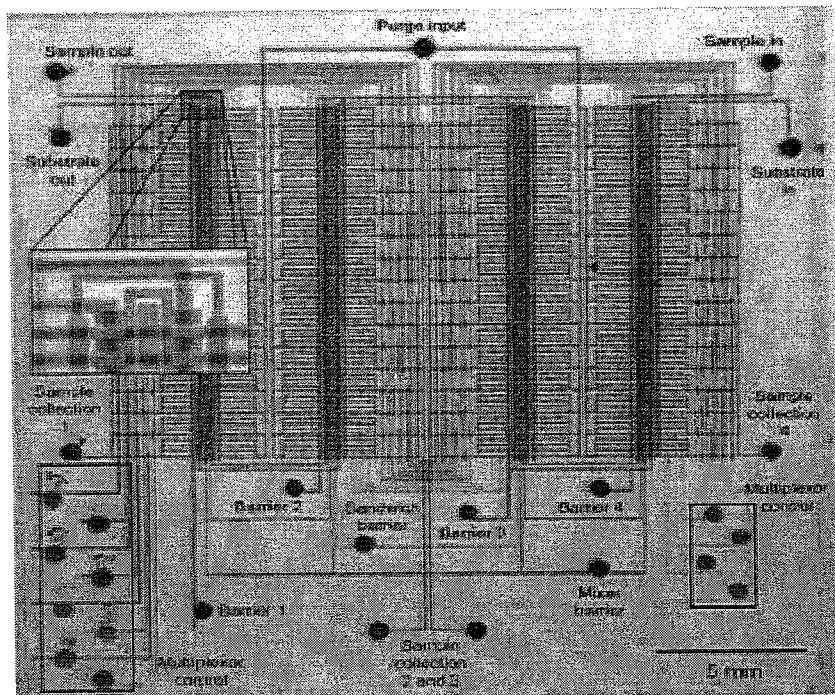


图 1-2 大规模集成的微流控芯片。

Figure 1-2 Large-scale integrated microfluidic chip.

1.3.2 微流控芯片上核酸杂交研究的相关技术

1.3.2.1 微流控芯片上寡核苷酸探针阵列制备技术

目前，除了几家大型公司如 Affymax、Agilent、Illumia 使用各自专利技术外，大多数实验室或研究所都采用点样机直接点样的方法制作寡核苷酸探针阵列。其方法是将预先合成的探针、PCR 技术扩增 cDNA 或基因组 DNA 经纯化定量分析后，通过由阵列复制器或阵列点样机及电脑控制的机器人准确快速地将不同探针样品定量点样于带正电荷的尼龙膜或硅片等相应位置上（支持物应事先进行特定处理，例如包被以带正电荷的多聚赖氨酸或氨基硅烷），

再由紫外线交联固定后即得到 DNA 微阵列芯片。但是由于需要昂贵的点样设备,寡核苷酸探针微阵列的制作很难在普通实验室中完成。针对这一问题,一些研究小组利用微流控技术研发简单、便宜的探针微阵列制作方法。

(1) 微通道引导法,其方法非常简单,是将 PDMS 微通道覆盖于预处理过的基片表面,利用微通道引导探针溶液固定于基片上[28-33]。如图 1-3 所示, Fan 等利用 PDMS 微通道在玻璃基片上固定宽度为 $20\mu\text{m}$ 的 DNA 探针条带阵列,样品的引入是通过垂直于 DNA 探针条带阵列的流体通道,这样样品可以与流体通道内多种不同的固定探针进行反应。此外,他们还比较了传统点样方法制作的 DNA 微阵列和微通道引导法制作的微阵列二者之间性能的差异,发现微通道引导法制作的微阵列的检测灵敏度 (1pM) 相比于点样法制作的 DNA 微阵列的灵敏度 ($10\text{-}100\text{pM}$) 得到明显的改善[33]。如图 1-4 所示, Chen 等利用同样的原理在 CD 式芯片上构建寡核苷酸阵列可以进行 384×384 杂交分析[28]。

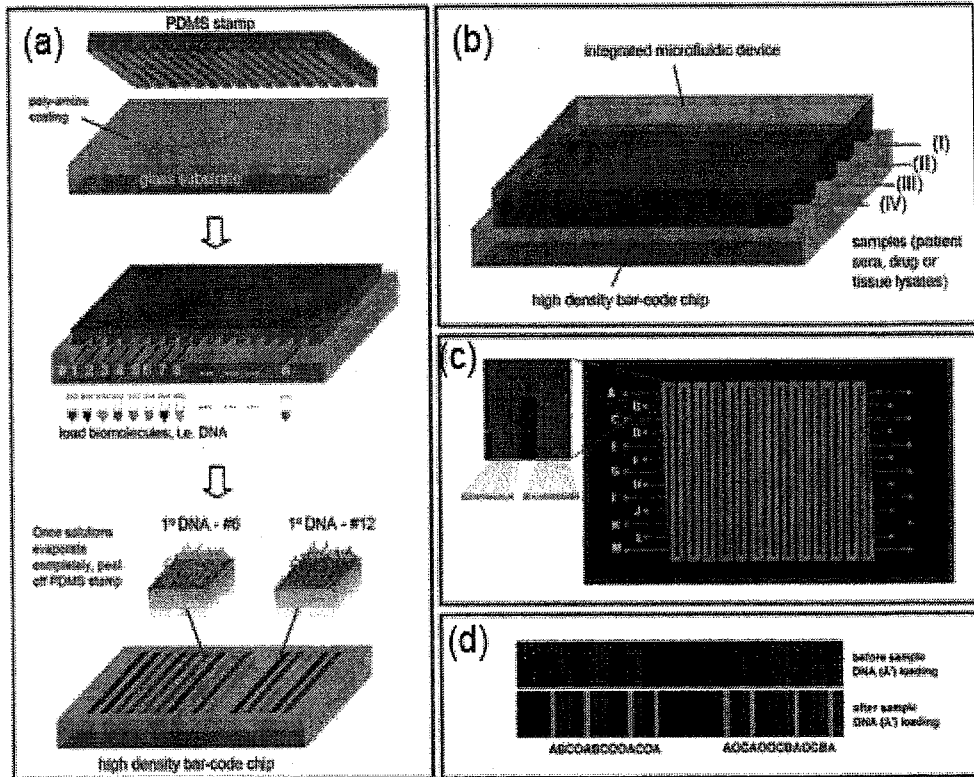


图 1-3 微通道引导法制作 DNA 微条带阵列。(a) 制作流程示意图。(b) 固定 DNA 微条带阵列的玻璃芯片与 PDMS 微流控芯片的组装。(c) 制作 DNA 微条带阵列的微通道的掩膜设计。(d) DNA 微条带阵列性能验证，寡核苷酸链 A 特异性的与荧光标记的 A' 结合。

Figure 1-3 Microchannel-guided patterning of DNA barcode arrays. (a) Schematic depiction of the procedure. (b) Integration of a DNA barcode-patterned glass slide with PDMS microfluidic chip. (c) Mask design of microchannels for patterning of DNA barcode arrays. (d) Validation of successful patterning of DNA molecules by specific hybridization.

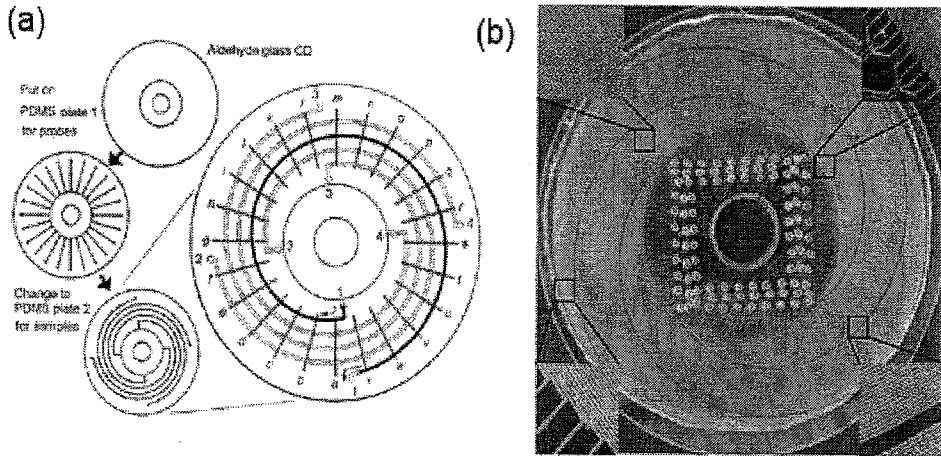


图 1-4 (a) 微流控微阵列组装的基本原理。(b) 芯片实物图。

Figure1- 4 (a) Schematics of the microfluidic microarray assembly concept.

(b) Photograph of chip.

(2) 基于微流控技术的点样装置，这种装置的优势在于制作相对简单，在普通实验室内就可以完成[34-37]。Gutmann 等构建了基于微机械印刷头的点样装置，其装置是由三层组成，上下层为硼硅酸玻璃中间为硅片，上层玻璃包含点样液的储液池，下层玻璃蚀刻有纳米孔径的喷孔，中间的硅片蚀刻有连接储液池和喷孔的通道。该装置是通过压电传动器推进活塞将点样液从纳米级喷孔中挤出去点在基片上，结果显示一次 24 个点样点之间的变异系数在 1.5%以内[37]。Wang 等利用 PDMS 构建的纳升级点样装置（图 1-5），其组装更为简单，但是值得注意的是这种方法构建的点样装置制作的探针阵列的密度不高[35]。

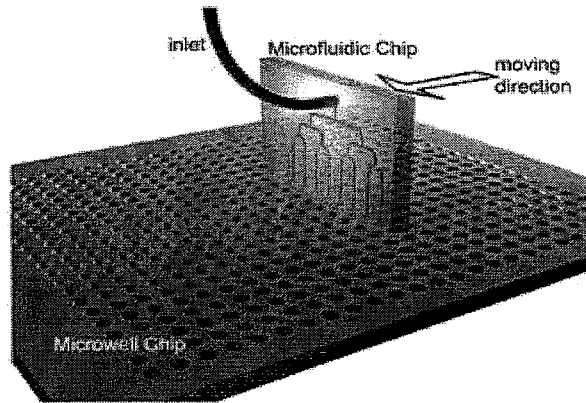


图 1-5 微流控点样装置示意图。

Figure 1-5 Schematic diagram of microfluidic dispenser.

(3) 微印刷技术,传统微阵列是用点样机将探针溶液一个接一个的点在基片上,而微印刷技术类似于图书印刷,图书不是逐字的印刷,而是一次完成一页全部文字的印刷。基于同样的道理,微印刷技术是将数以百计的探针一次同时印迹在基片上[38-44]。其方法是用软蚀刻技术制作 PDMS ‘印章’,进行表面修饰后将探针溶液滴于 PDMS 印章上,孵育之后将多余的溶液冲洗掉,在 PDMS 印章的表面会有探针分子吸附,最后将 PDMS 印章印迹在基片上,具体参见图 1-6[44]。这种方法明显的缺陷在于无法同时印迹多种探针。

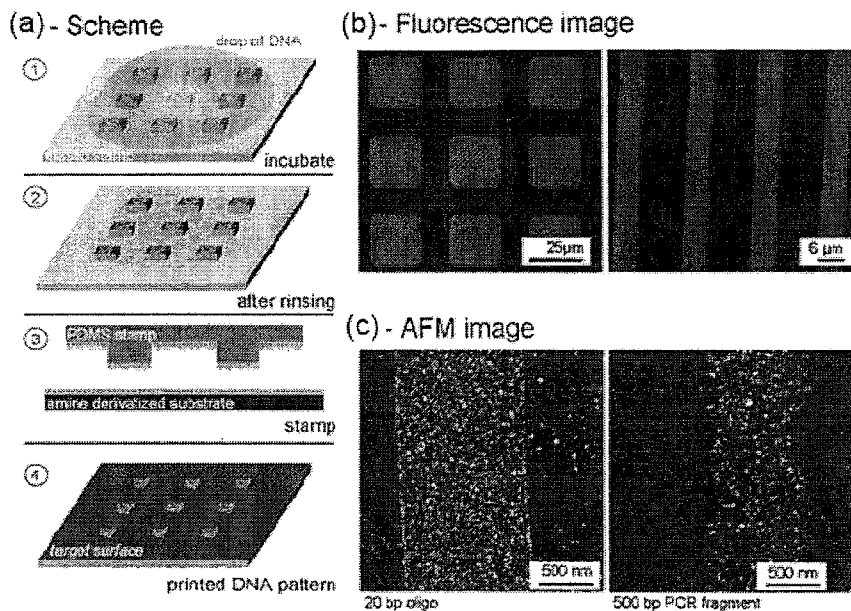


图 1-6 DNA分子的微接触印刷。(a) 印刷过程示意图。(b) 印刷后的荧光图。(c) 印刷后的原子力显微拍摄图镜。

Figure 1-6 Microcontact printing of DNA molecules. (a) Scheme of DNA printing. (b) Fluorescence images of patterned FITC-labeled oligonucleotides on a glass surface after printing. (c) AFM images of the printed DNA molecules.

(4) 基于微流控的原位合成技术。它主要是利用微流控平台反应速度快，样品消耗低的特点，在微通道或微室内进行光引导的寡核苷酸链的原位合成。Srivannavit 等在微流控芯片上构建数以千计的微反应器，作为合成反应的基本单元，利用光引导平行的合成寡核苷酸链见图 1-7，其合成的寡核苷酸链的长度可以达到 120mers[45]。Cheng 等将商用的 DLP 投影仪和传统的 DNA 合成仪与微流控反应室集成在一起进行原位寡核苷酸链的合成，其试剂的消耗量大幅度地减少，并且可以在探针合成后立即进行杂交反应，这样可以使

杂交分析时间缩短近 2 个数量级[46]。

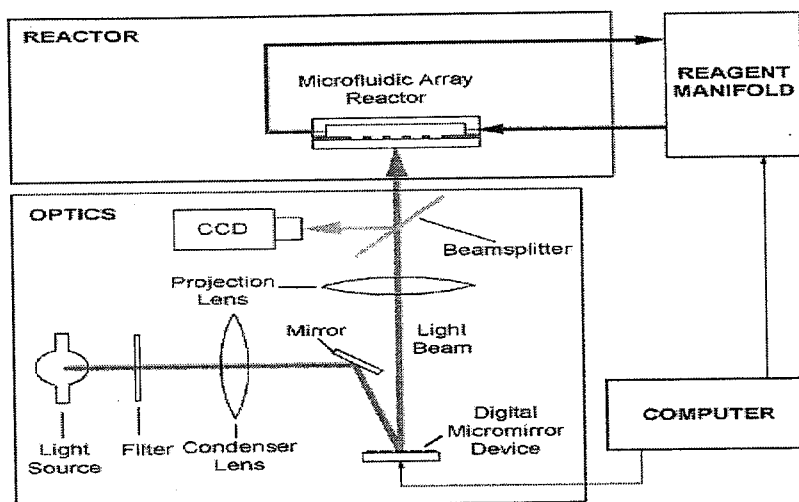


图 1-7 基于微流控技术的原位合成微阵列装置示意图。

Figure 1-7 Schematic illustration of a programmable microarray synthesizer based on microfluidics.

1.3.2.2 微流控芯片上动态核酸杂交技术

传统静态杂交模式的最大局限在于杂交反应受到靶分子扩散速度的影响，杂交的时间比较长。解决这一局限在于增强靶分子的传质，也就是将静态杂交模式转变为动态杂交模式。在微流控芯片上动态杂交模式主要分为两种：主动和被动。

1.3.2.2.1 主动模式动态核酸杂交技术

主动模式动态核酸杂交是指借助磁力、电场力、声场等外力促进样品的流动和混合，从而加快杂交反应速率，缩短反应时间。

(1) 声场促进混合。Rife 等人设计的微型超声混合器是利用超声在液体中

产生的声流效应实现样品试剂的混合[47]。Yaralioglu 等在 PDMS 微通道内集成压电传感器，通过压电传感器产生的超声波增强液流的混合[48]。Liu 等设计了基于微声流效应的微流控杂交芯片，如图 1-8 所示，其是将蚀刻有分布均匀微气袋的聚碳酸酯盖片覆盖于微阵列玻璃芯片上，聚碳酸酯盖片上偶连压电片。聚碳酸酯盖片上微气袋捕获的气泡在声场的作用下发生共振，气泡周围的液流产生稳定的环流，这样使杂交室内的液体充分的混合，混合时间由几小时（单纯扩散）缩短至 6s，杂交信号相比静态杂交增强了 5 倍[49]。

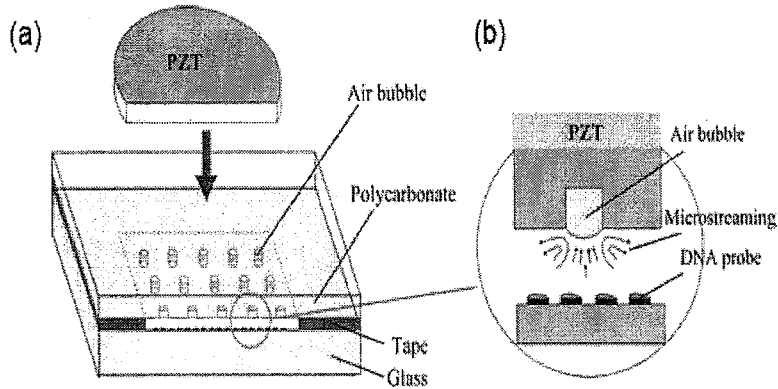


图 1-8 基于微声流效应的杂交芯片示意图。(a) 鸟瞰图 (b) 侧视图。

Figure 1-8 Schematic showing a microfluidic chip based on cavitation microstreaming. (a) Overview and (b) Side view.

(2) 电场促进混合，其动力可以是电动力，电渗力和介电力等[50-53]。Snowski 等[53]采用微电子工艺，如图 1-9 所示，在热氧化惰性处理的硅片基上构建了 25 个半径 $40\mu\text{m}$ 的 $\text{Pt-Si}_3\text{N}_4$ 电极阵列，并在电极上蚀刻出样品池，其上覆盖带有链霉亲和素的琼脂糖凝胶渗透层。当位于待检位点下方的微电极导入一个 DC 正偏压后，DNA 捕获探针的电定位及电杂交反应就可以进行。

它将引起微电子阵列上待检微位点处带负电荷的核酸快速转运和浓缩。当核酸探针直接与覆盖在微电极上的渗透层相连时，它就可立即被固定（共价或非共价）。接着靶核苷酸分子以相似的方式被转运，浓缩，并杂交到事先已定位和连接的核酸探针上。与静态杂交需要几小时相比，在微检测位点处靶分子 DNA 的快速浓缩大大减少了杂交反应时间，它仅需几秒钟。利用电动力传输样品用于 DNA 杂交，不需要泵和阀控制，并且有利于微型化。电动力控制可以实现快速有效的样品传输和杂交平衡取得。但是电动力传输样品，易产生电歧视，其受杂交液的离子强度影响较大。

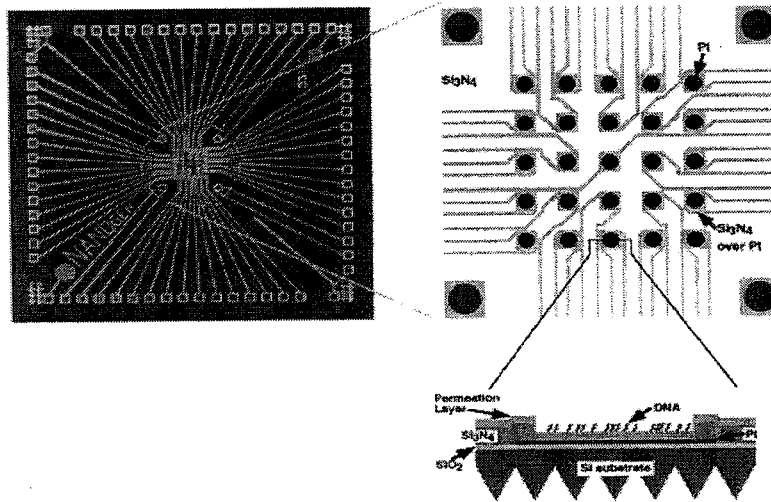


图 1-9 在硅片上组装电极微阵列的示意图。25 个铂电极分布于 1cm^2 ，每个电极的直径为 80mm 。绝缘层是由氮化硅组成，铂电极上还覆盖带有链霉亲和素的琼脂糖凝胶渗透层。

Figure 1-9 Schematic of an array of electrodes fabricated on Si. The 25 electrodes, made from Pt, are 80mm in diameter and cover an area of 1cm^2 . The insulating layer consists of silicon nitride layer and over the Pt electrodes was a gel permeation layer consisting of agarose gel loaded with streptavidin.

(3) 磁力促进混合。它是由外部磁场作为驱动力加速混合。Ryu 等将含有微磁力搅拌棒的混合器集成在聚对二甲苯芯片通道中，以外部旋转磁场驱动微磁力搅拌棒进行液体混合[54]。Yuen 等在杂交反应室两端放置微型搅拌子，通过搅拌子的旋转，使杂交液在反应室中循环，这样使杂交时间缩短至 20min (见图 1-10) [55]。

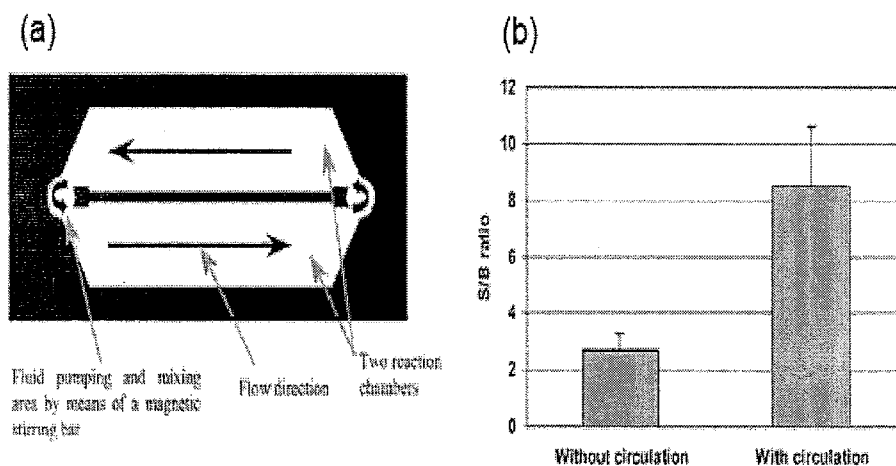


图 1-10 (a) 芯片的设计图。(b) 有无循环流动的杂交体系的比较。

Figure 1-10 (a) Design of microfluidic chip. (b) Comparison of hybridization efficiency between hybridization with fluid circulation and hybridization without fluid circulation.

1.3.2.2.2 被动模式动态核酸杂交技术

相对于主动模式动态杂交，被动模式动态杂交单纯地利用通道几何形状或流体特性产生混合效果，除驱动流体流动的力(如压力等)外，混合不借助于其它外力。目前在微流控芯片上，被动的动态杂交模式主要有以下两种：

单纯的依靠水利压力和借助被动微混合器。

(1) 单纯的依靠水利压力促使靶分子溶液在固定的探针表面流动,通过引入流体的对流改变静态杂交单纯依赖分子扩散的局限。Pappaert 等[56]依据达姆科勒数(其与通道高度、扩散常数、反应速率、流速有关)对杂交通道的设计进行数值分析,发现对于 DNA 杂交反应其优化的通道高度为 1-10 μm 。所以基于这种原理的芯片多采用浅通道(<100 μm)设计,因为浅通道有利于缩短分子的扩散距离,增强杂交的速率,缩短杂交的时间。Persa 等[57]考察了流速对杂交体系的影响,他们认为在高流速的情况下,靶分子的可获性是杂交体系的主要影响因素;在低流速的情况下,分子的扩散速度是杂交体系的主要影响因素。Hu 等[58]发现处于杂交通道不同位置的探针点的杂交效率不同,处于杂交通道下游的杂交效率要低于上游。Chung 等[59]利用微通道宽度变化改变样品流速从而对长链 DNA 分子产生拉伸作用。因为卷曲的长链 DNA 分子的识别序列不易暴露,降低了杂交效率,结果通过拉伸作用使 1.4kbp 的长链靶分子杂交信号增强了 9 倍。Wei 等[60]利用样品流经深度和宽度改变的通道时,连续流体分散为大小不均一的短的液塞,产生液滴式的环流。这些分散的液塞反复穿梭流经固定的探针表面,使杂交时间减少为 500s,样品消耗仅有 1 μl 。

目前,单纯的依靠水利压力促使靶分子溶液在固定的探针表面流动的方法主要采用的是外接注射泵[60-65]或蠕动泵[66]的流体驱动方式,受到外接设备的价格昂贵和无法同时平行的多样本分析的局限。利用旋转芯片产生的离心力作为流体的驱动力,提供了一种新的选择。它不仅消除了集成微泵微阀或外加电场的需要,而且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,CD 式芯片吸引了不少研究者的关注[67-72]。

Madou 研究小组采用离心力作为样品驱动力进行生物分析[73, 74]。其利用 CD 式芯片进行 DNA 杂交分析方法比较简单只需将 CD 式芯片置于离心马达上, 通过控制马达的转速来调节离心驱动力的大小, 推进样品和洗涤溶液顺序的通过 DNA 杂交区域(参见图 1-11), 杂交时间仅需要 15min[75]。

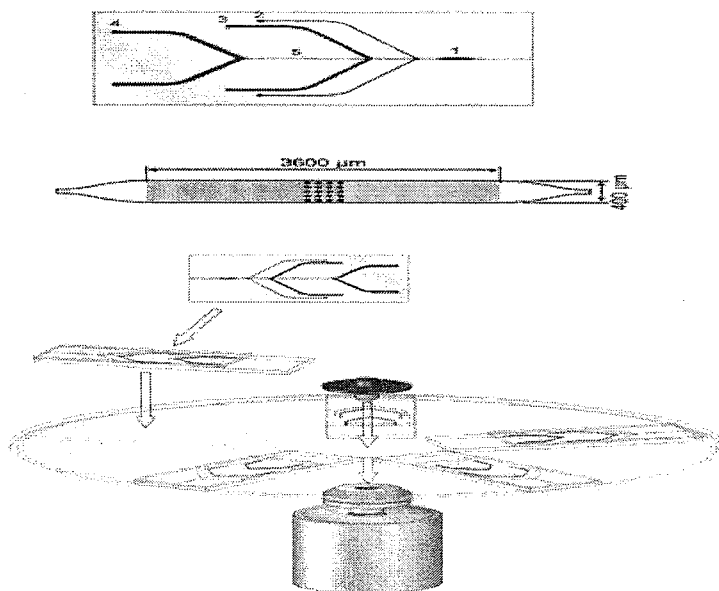


图 1-11 CD式核酸杂交芯片的设计及组装。

Figure 1-11 Design of CD-like microfluidic chip for DNA hybridization.

(2) 借助被动微混合器。相对于前面提到的单纯依靠水利压力, 被动微混合器是利用通道内部特殊的几何结构产生流体的扰动, 它能进一步增强靶分子与探针的碰撞几率。在微尺度下, 流体状态是以层流为主。流体状态的判别主要是依据雷诺数 (Reynolds number Re), 它是流体流动时的惯性力和粘性力(内摩擦力)之比, $Re = \rho UL / \mu$, ρ 表示流体密度, U 表示流体的平均流速, L 表示特征长度, μ 表示流体的动力粘度。在宏观系统中一般认为管道雷诺数 $Re < 2000$ 为层流状态, $Re > 4000$ 为湍流状态, $Re = 2000-4000$ 为过渡状

态。对于一般的微流控装置来说,雷诺数为 10^{-6} -10, 流体状态主要以层流为主,各层之间的混合主要依靠扩散。所以,虽然单纯依靠水利压力产生的液体流动可以引入对流促进混合,但是混合的效率比较低,通过构建被动微混合器可以提高混合的效率,有可能进一步增强杂交信号。

在微尺度下,提高层流条件下混合效率的主要原则是:拉伸或折叠流体以增大流体的接触面积;利用分散混合设计,通过管路几何交叉设计将大的液流拆分并重新组合,从而减小液流厚度,实现更有效的混合。被动微混合器主要分为并行迭片式[76-79]、串联迭片[80-83]、混沌对流式[84-87]、液滴式[88]四种。并行迭片微混合器是通过微混合器的物理构造将待混合的两流体各自细分成 n 个迭片,并使其交互接触,最后汇聚成一个迭片。最简单的并行迭片微混合器是T型和Y型微混合器。这种简单的微混合器,需要比较长的混合通道,单纯用于混合效果较差,一般用于研究微尺度下传递现象,如放大(缩小)法则、蝴蝶效应、以及其它非线性现象。为了进一步增强混合效果,可采用3D交互式设计或流动聚焦的方法缩短混合距离[89, 90]。串联迭片尾混合器是指入口两流体首先水平状态呈一股流体流动,然后被垂直分割,再水平汇合,反复重复此过程,经过 m 次汇合和分割后,则会出现 2^m 层薄层流体,能够使混合时间减小 4^{m-1} 倍。Sudarsan等[91]将复杂的3D设计改进为包含变化的弯道曲率和通道宽度的2D设计。在简单的2D通道中,由于惯性力,离心力和粘性力之间的相互作用在弯道的垂直面产生迪恩涡流,另外由于通道宽度的突然增加在水平面产生扩展涡流,这两种涡流的协同作用增进了混合效率。混沌对流微混合器是对混合微通道内部或外部结构进行一定形式的修正,使流体层发生分割、拉长、折叠和破裂等现象,以强化混合过程。Stroock等[92]在聚二甲基硅氧烷(PDMS)上加工出底部有错排人字形的二维微通道。由于通道底部修饰的特殊结构使流体在通道中心处发生拉伸和折叠,引起流

体的混沌对流，从而提高混合效率。该系统可用于微通道内稳定压力驱动的低雷诺数液体的被动混合。液滴式微混合器是指将待混合的两种液体和夹在中间阻隔它们提前接触的惰性液体一同流入不互溶的油性液体中形成液滴，在液滴内部实现混合。混合的两种液体在液滴内依靠湍流快速混合（2ms），并且在流动过程中没有弥散现象。研究人员利用液滴式微混合器可以实现微秒级化学反应。上述四种类型的微混合器都可以适用于液相杂交。但是对于固相杂交只有混沌对流微混合器比较适用。

Quake研究小组[93]设计了基于混沌混合的微流控杂交芯片，其是由包含两个对称杂交室的PDMS芯片与预先制作的DNA微阵列封接而成。在两个杂交室之间有桥联的通道，上壁有不对称的人字形凸起，可以产生混沌混合。杂交结果显示（见图1-12），杂交信号相比于静态杂交增强了近1个数量级，并且杂交的特异性亦有所提高。Kim等[94]利用鳄鱼齿样的PDMS通道使靶分子与分子信标快速混合（见图1-13），基于荧光共振能量转移原理与靶分子结合的分子信标呈现荧光，这样靶分子就不需要标记，可以作为快速的诊断工具。Yager研究小组[95]直接在微通道的上壁构建不对称的人字形凸起探索模型蛋白（亲和素）在通道内时间-空间的分布。相比于直通道，上壁构建不对称人字形凸起的通道中由于溶液的横向流显著地改变了蛋白的分布，在正向排列的不对称人字形凸起的通道中，分布在通道两侧的蛋白要高于分布在通道中间的，而在反向排列的不对称人字形凸起的通道中分布正好相反。Golden等[96]利用在微通道内构建微混沌混合器使免疫分析信号增强了26-46%。Voldman等[97]利用在微通道内构建不对称人字形凸起，增强通道中细胞的介电捕获。由于粒子所受介电力的大小与粒子与电极的距离有关，距离越远其所受的介电力越小，同样道理在通道中只有那些贴近通道底部电极区域的细胞易被捕获，而通道上层的细胞多随液流而流失，通过在通道上壁构建不对

称人字形凸起产生混沌环流可以增强上层细胞与底层电极的相互作用的几率，这样达到增强细胞介电捕获能力，富集细胞的目的。

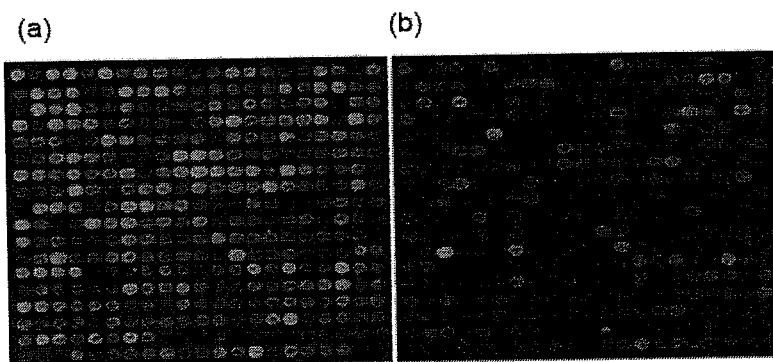


图 1-12 微阵列杂交荧光图。(a) 动态。(b) 静态。

Figure 1-12 Fluorescence images of DNA microarray. (a) Dynamic. (b) Static.

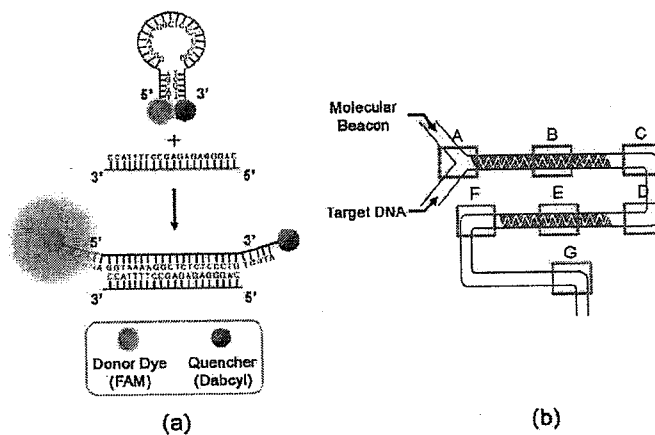


图 1-13 (a) 分子信标工作原理。杂交反应导致发光基团与猝灭基团的分开产生荧光信号。(b) 鳄鱼齿样的PDMS微流控通道。

Figure 1-13 (a) Schematic representation of the molecular beacon and its operating principle. Target hybridization leads to the separation of the fluorophore and quencher and a consequent fluorescent signal. (b) Schematic representation of an alligator-teeth-shaped PDMS microfluidic channel.

1.3.2.3 微流控芯片上核酸杂交信号检测技术

目前大多数微流控芯片上核酸杂交信号的检测是采用传统的检测设备如阵列扫描仪或共聚焦荧光显微镜进行检测。然而,随着微流控技术的发展,检测技术亦得到长足的进步。不少新的微流控检测技术已经应用于核酸杂交检测。根据检测方式的不同,一般可分为光学检测和电化学检测两大类。

(1) 光学检测。荧光标记检测依然是目前最重要的核酸杂交检测方法,其原因在于方法比较成熟可靠,检测的灵敏度高,甚至可以进行单分子的检测。Affymatrix的Genechip检测系统其检测的灵敏度可以达1.5pM。另一种标记检测方法是采用两步杂交,首先靶分子DNA先与固定的探针结合,之后金纳米颗粒标记的捕获DNA与靶分子DNA结合,捕获DNA-靶分子DNA-探针形成三明治样的结构。杂交之后,利用催化银沉积在金纳米颗粒上,使杂交信号放大,从而提高检测的灵敏度至 10^{-21} M[98]。光波导体系可以实现降低背景噪音,改善检测的灵敏度,因为光波导体系只接收距离表面几百纳米内隐失场信号,可以排除来自主体溶液和未杂交分子的干扰。Brennan等[99]设计了集成光导的光流控检测体系用于DNA的杂交和检测。亦有研究者采用红外荧光染料代替普通的荧光染料,这是因为红外荧光染料的发射波长与生物自身的背景荧光发射波长重叠较少,能够减少生物自身的背景荧光的干扰。荧光标记检测受到复杂的标记过程,光漂白,在检测多种染料时需要多个发射光源和滤光片等问题的困扰。量子点标记技术的出现解决了荧光标记检测遭遇的一些问题,它能够承受多次的激发和光发射,具有较强的光稳定性,其另一大优势是单一种类的量子点材料就能够按尺寸变化产生一个发光波长不同的、颜色分明的标记物家族。

另一大类光学检测是无标记的检测,即不需要对靶分子进行标记,其具有以下优势:降低了样品预处理的复杂性;有利于加快检测分析速度,特别

是在现场即时诊断的应用；可以实时观测靶分子-探针的相互作用，有助于机理的研究。针对无标记的光学检测需要特殊的检测设备。干涉仪是利用干涉原理测量光程之差从而测定有关物理量的光学仪器。两束相干光间光程差的任何变化会非常灵敏地导致干涉条纹的移动，而某一束相干光的光程变化是由它所通过的几何路程或介质折射率的变化引起，所以通过干涉条纹的移动变化可测量几何长度或折射率的微小改变量，从而测得与此有关的其他物理量。基于干涉原理的核酸杂交检测方法，一般是在平面波导表面固定探针，由分束相干光分出两束或多束，其中一束为参照，其他的光束经过探针表面如果靶分子与探针结合就会引起折射率的变化，从而使干涉图形移动位置，这种变化提示检测到了靶分子并可以计算靶分子的浓度。Ymeti等[100]设计了集成的杨氏干涉体系用于现场即时的DNA检测（见图1-14），其灵敏度为 10^{-8} RIU相应的表面质量为 $20\text{fg}/\text{mm}^2$ 。

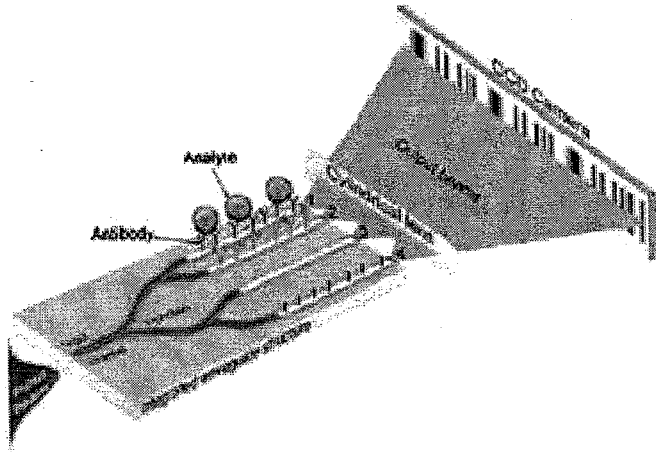


图 1-14 杨氏干涉仪包含一个参比通道，多个检测通道。

Figure 1-14 A Young's interferometer showing multiplexed detection and a single reference arm.

表面等离子共振技术是利用金属膜 / 液面界面光的全反射引起的物理光学现象来分析分子相互作用的技术。偏振光在玻片-金膜界面全反射，激发金膜中的自由电子产生表面等离子体。当光波与表面等离子体的振频相等时，二者发生谐振，光能被吸收。当入射光波长固定时，反射光强度是入射角的函数，其中反射光强度最低时所对应的入射角称为“共振角”。根据不同情况下共振角的位置变化，来反映界面上液体的变化。基于表面等离子共振技术原理衍生的表面等离子共振成像技术被用于DNA杂交的检测。Lee等[101]实现了在微流控体系下利用表面等离子共振成像技术检测DNA阵列见图1-15。

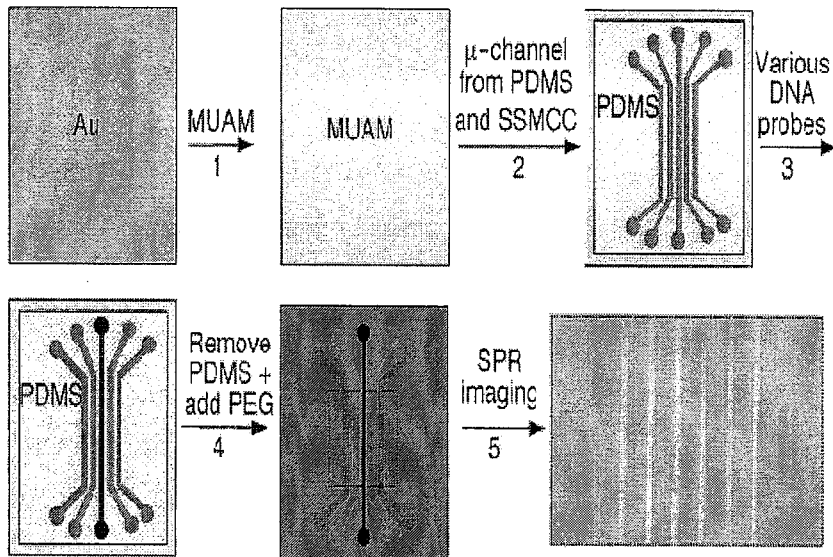


图 1-15 芯片的组装方法示意图。先构建一维 DNA 条纹再构建二维 DNA 杂交阵列。

Figure 1-15 Schematic representation of the fabrication methodology used for creating 1-D DNA line and 2-D DNA hybridization microarrays.

值得关注的是不少研究小组已经开始将光学系统组件（如透镜）集成在

芯片内，这样可能摆脱庞大的光学检测设备，这对于现场即时诊断的应用是十分有利的。如Luke P. Lee研究小组在PDMS微流控芯片上构建自对准的2D平面微透镜应用于生物分析[102]。其研究小组亦实现在PDMS微流控芯片上集成检测的光源和检测器。但是相比于传统的检测技术，其检测的灵敏度还需要进一步的提高。

(2) 电化学检测。它是通过电极将溶液中的待测物的化学信号转变为电信号以实现对待测组分检测的一种分析检测方法。电化学检测器的常规设计是将单链DNA探针固定在电极(Pt, Au, Ag等)上，电极作为信号传导器将表面发生的杂交信号导出。由于DNA在大多数时候是电化学惰性的，这就需要在电化学检测中加入电子转移介质(如ferrocene、 $K_3Fe[(CN)_6]^{3-/4-}$ 、 $Ru(bpy)_3^{3+/2+}$ 、 $Os(bpy)_3^{3+/2+}$ 等)，通常这些电子转移介质可以选择性的与单链DNA或双链DNA作用，所以电化学的检测器通常是检测由杂交反应而引起电流或电势的变化。电化学检测其优势在于灵敏度高，选择性好，低成本，适于集成化和微型化。葡萄糖检测试纸条是电化学检测优势的最好的体现。这种试纸条的检测是利用印刷的酶电极和袖珍的安培测量仪，其分析时间仅需5-10s，血液用量仅为0.5-10 μ l。基于目前现场即时分子诊断的发展趋势，如何将电化学检测和微流控技术二者的优势集合起来研制出具有巨大实用价值的诊断装置是研究者面临的挑战。不少研究者已经开始在微流控芯片上集成电化学传感器。根据电化学检测原理的不同，微流控芯片的电化学检测可以分为三种检测方法，即安培法[103-107]、伏安法[108-112]、电势法[113-116]。

安培法的原理是在工作电极上施加一个恒定的电极电位以引起待测物质在工作电极上发生氧化还原反应，同时输出在氧化还原过程中产生的电流，其输出的电流与待测物的浓度成正比，遵循法拉第定律。Baumner研究小组[117, 118]在PMMA芯片上构建基于安培法电化学的核酸检测传感器。他们在

PMMA的表面制作超微电极阵列作为电化学检测的换能器。其杂交采用三明治式，捕获探针包被于磁珠上，报道探针上偶连着 $K_3Fe[(CN)_6]^{3-/4-}$ 可以安培法定量，最低能够检测一个卵囊中的DNA分子。

伏安法的原理是在预设的模式下当电位随时间而变化，测定还原反应过程中转化的物质的量。Pavlovic等[111]报道了一种基于电子分子信标的电化学传感器。电子分子信标是二茂铁标记的可以形成茎环结构的DNA分子。靶分子与电子分子信标的杂交会导致茎环结构构象的改变，从而使二茂铁与电极之间电子的转移距离发生变化，这些变化可以通过差分脉冲伏安法检测。在其设计的芯片上，三种不同的二茂铁巯基标记的分子信标探针通过电子位点选择性沉积固定于金阵列上。镀有金阵列的玻璃基片与带有微通道的PDMS封接成为完整的微流控DNA检测芯片。该芯片被应用于人流感病毒(H1N1)和禽流感病毒(H5N1)的检测。

电势法是在电流接近为零的状态下，测定电势的变化。Hahm等[113]报道了一种碳纳米线的电子装置见图1-16。其在碳纳米线上修饰PNA用于识别野生型或突变型的囊性纤维化跨膜受体基因。当顺序的引入野生型和突变型DNA时，电导呈现时间依赖性增加与PNA-DNA的杂交发生相一致，这样就可以特异性的识别完全匹配的和含有错配的DNA分子。

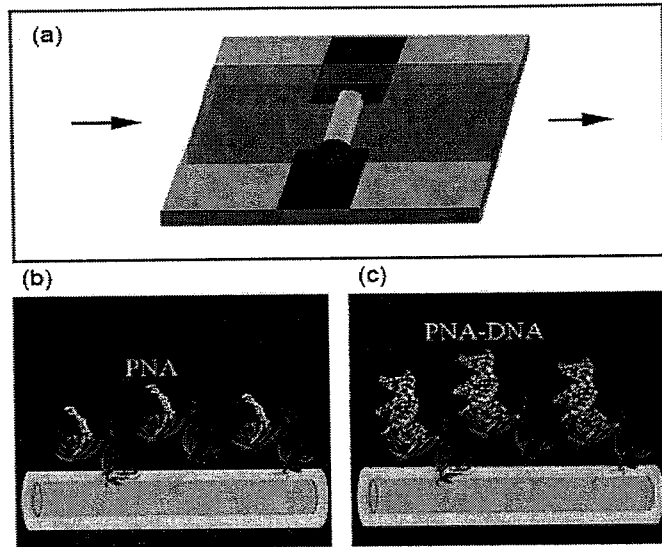


图 1-16 (a) 装置示意图，其由碳纳米线（黄色）和微流控通道（绿色）组成，箭头显示流体的流动方向。(b) 碳纳米线表面固定 PNA。(c) PNA-DNA 复合体的形成。

Figure 1-16 (a) Schematic of a sensor device consisting of a silicon nanowire (yellow) and a microfluidic channel (green), where the arrows indicate the direction of sample flow. (b) The silicon nanowire surface with PNA receptor. (c) PNA-DNA duplex formation.

1.3.2.4 微流控芯片上集成的核酸杂交技术

一般来说,核酸杂交的过程包括样品预处理(DNA的提取), PCR扩增, 杂交反应等。虽然单独的生物技术如细胞的裂解[119-121], DNA的提取及纯化[122-124], PCR扩增[125-127]等已经成功地在芯片上实现, 但是如何将不同的技术单元集成在微流控芯片上, 这不仅是微流控技术发展所面临的挑战, 而且也是发展现场即时诊断系统所必需的。集成的微流控芯片的设计取决于

所需实现的生物分析过程的复杂性，但是其基本的元素是：储液室（取决于所需试剂种类的多少，用量的多少等等）；流体的操控(如分散，混合，过滤等)；功能单元（PCR反应热循环的温控）。一些在芯片上集成泵阀的复杂微流控装置已经被研发出来[128-130]。Mathies研究小组[131, 132]在芯片上成功地实现了PCR扩增反应与芯片电泳检测的集成，此外他们研究小组还发展了一种高度集成的DNA测序芯片系统，该系统将Sanger测序的流程在芯片上实现[133]。Anderson等[134]报道集成的核酸杂交分析芯片，该芯片可以实现核酸样品的提取浓缩、PCR扩增、酶反应、杂交分析。Liu等[135]报道了集成的微流控芯片用于白血病细胞基因表达谱的研究，该芯片是由电化学泵、流体通道、试剂室、DNA微阵列组成(见图1-17)，可以执行DNA杂交及后续的洗涤，其检测限可以达到0.375pM。

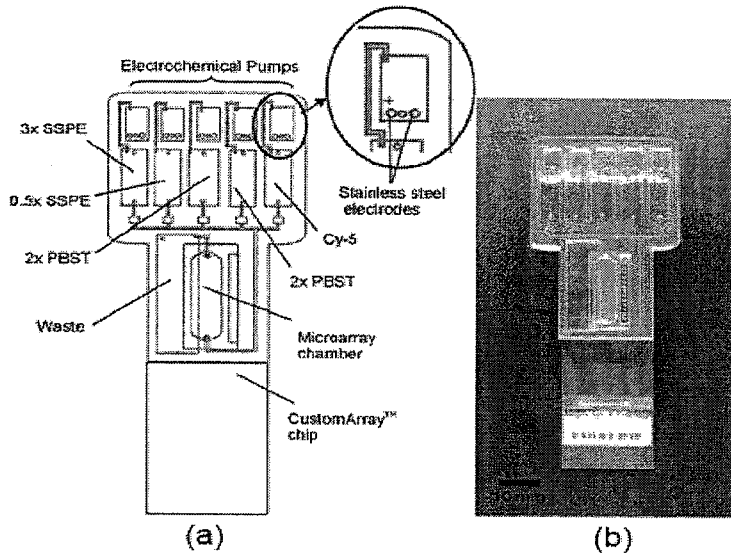


图 1-17 (a) 微流控生物芯片装置示意图。(b) 整体装置实物图。装置主要包括两部分：塑料的流体盒和微阵列芯片。

Figure 1-17 (a) Schematic of the microfluidic biochip device with a blowup diagram showing an electrochemical pump that has two stainless steel electrodes

inserted from the backside of the cartridge. (b) Photograph of the integrated device that consists of a plastic fluidic cartridge and a microarray chip.

Motorola公司[136]研制了高度集成的核酸杂交分析芯片（见图1-18），从样品的预处理到杂交后的电化学检测完全实现自动化。石蜡相变阀，电化学泵和热气动泵的采用使芯片的操作简单化。该芯片能够从几毫升的全血中进行病原菌的检测，亦能够从直接稀释的血液中进行单核苷酸多态性分析。

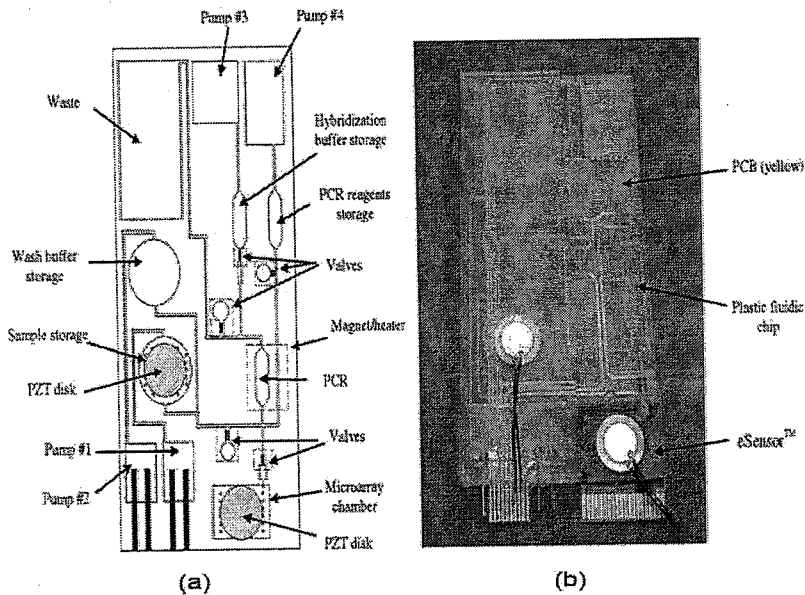


图 1-18 (a) 塑料微流控芯片示意图。泵1-3为电化学泵，泵4为热气动泵。(b) 整体装置图实物图。

Figure 1-18 (a) Schematic of the plastic fluidic chip. Pumps 1-3 are electrochemical pumps, and pump 4 is a thermopneumatic pump. (b) Photograph of the integrated device that consists of a plastic fluidic chip, a printed circuit board (PCB), and a Motorola eSensor microarray chip.

Ferguson等[137]报道了一个全集成的基于电化学检测的芯片(见图1-19),其中包括三个关键的生化分析的功能单元(对称PCR、酶解生成单链DNA、顺序特异的电化学检测)。他们应用该芯片对钩端螺旋体沙门氏菌LT2基因组进行检测,检测限可以达到10 aM以下。

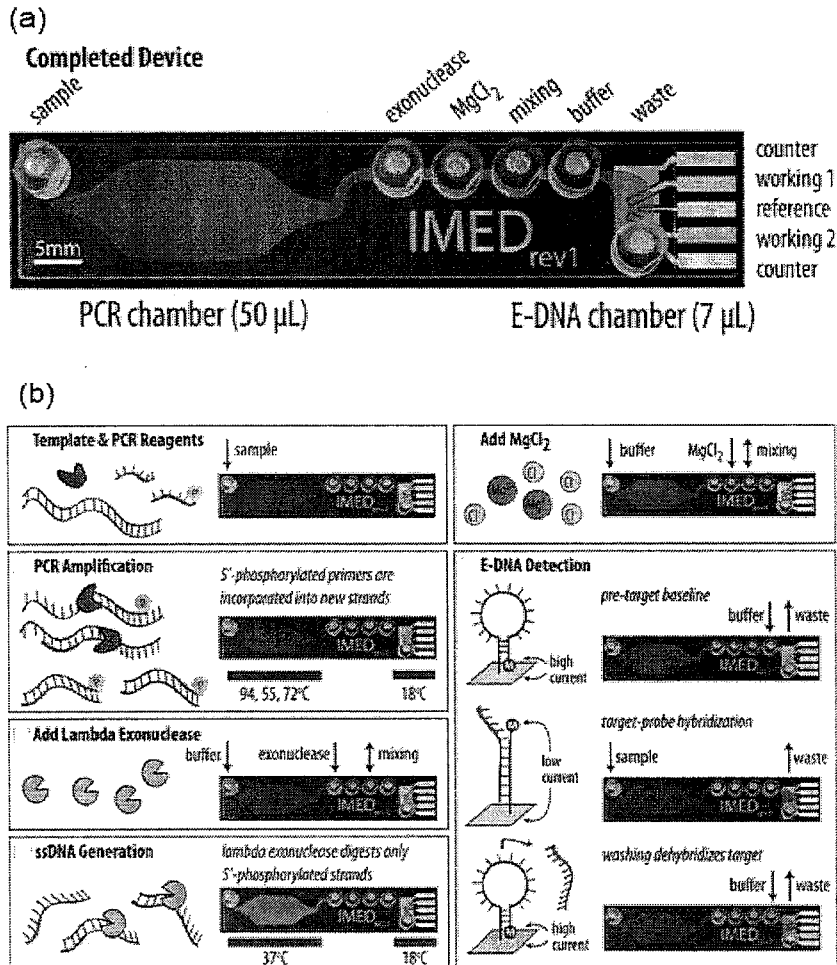


图 1-19 (a) 芯片的整体设计示意图。(b) 分析流程图。

Figure 1-19 (a) Design of microfluidic electrochemical DNA chip. (b) Assay overview using microfluidic electrochemical DNA chip.

1.4 本论文的研究目的和主要研究内容

传统的静态杂交单纯依靠分子扩散，导致杂交时间长。解决这一问题的关键在于将静态杂交转变为动态杂交，增强分子的传质，提高靶分子和探针相互碰撞反应的几率，从而缩短杂交时间。依据这个思路，构建了两种微流控动态核酸杂交芯片：（1）基于混沌混合的微流控芯片，杂交微通道的上壁制作不对称的人字型凹槽，在微管道的横截面上产生与主流方向垂直的二次流，促使通道中的液流发生旋转，增加上层溶液中的靶分子与底部固定的探针的接触几率；（2）基于往复流的微流控 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，快速的往复流动引入了强烈的对流，增强了分子传质。

本论文共分为五章，第一章为文献综述，主要介绍微流控芯片上的核酸杂交研究的进展。第二、三、四、五章为本论文研究工作部分，其中第二、三章，涉及混沌微混合器的构建及用于核酸杂交研究，第四、五章，涉及基于往复流的微流控 CD 式芯片的构建及在核酸杂交分析和单碱基错配检测中的应用。

参考文献

- [1] DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. A., Trent, J. M., Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet*, 1996, 14(4): 457-60.
- [2] Heller, R. A., Schena, M., Chai, A., Shalon, D., Bedilion, T., Gilmore, J., Woolley, D. E., Davis, R. W., Discovery and analysis of inflammatory

- disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(6): 2150-5.
- [3] Brown, P. O., Hartwell, L., Genomics and human disease--variations on variation. *Nat Genet*, 1998, 18(2): 91-3.
- [4] Shoemaker, D. D., Lashkari, D. A., Morris, D., Mittmann, M., Davis, R. W., Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. *Nat Genet*, 1996, 14(4): 450-6.
- [5] Cheung, V. G., Gregg, J. P., Gogolin-Ewens, K. J., Bandong, J., Stanley, C. A., Baker, L., Higgins, M. J., Nowak, N. J., Shows, T. B., Ewens, W. J., Nelson, S. F., Spielman, R. S., Linkage-disequilibrium mapping without genotyping. *Nat Genet*, 1998, 18(3): 225-30.
- [6] Wang, D., Coscoy, L., Zylberberg, M., Avila, P. C., Boushey, H. A., Ganem, D., DeRisi, J. L., Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(24): 15687-92.
- [7] Zembutsu, H., Ohnishi, Y., Tsunoda, T., Furukawa, Y., Katagiri, T., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Nomura, T., Kitahara, O., Yanagawa, R., Hirata, K., Nakamura, Y., Genome-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profiles with sensitivity of 85 human cancer xenografts to anticancer drugs. *Cancer Res*, 2002, 62(2): 518-27.
- [8] Gunther, E. C., Stone, D. J., Gerwien, R. W., Bento, P., Heyes, M. P., Prediction of clinical drug efficacy by classification of drug-induced genomic expression profiles in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(16): 9608-13.

- [9] Favis, R., Day, J. P., Gerry, N. P., Phelan, C., Narod, S., Barany, F., Universal DNA array detection of small insertions and deletions in BRCA1 and BRCA2. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(5): 561-4.
- [10] 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.
- [11] AM, C., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, p943.
- [12] Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., Solas, D., Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 1991, 251(4995): 767-73.
- [13] Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P., Fodor, S. P., Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(11): 5022-6.
- [14] 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.
- [15] Situma, C., Hashimoto, M., Soper, S. A., Merging microfluidics with microarray-based bioassays. *Biomolecular Engineering*, 2006, 23(5): 213-231.
- [16] Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 2006, 442(7101): 368-73.
- [17] 林炳承, 秦建华. 微流控芯片实验室. 2006, 科学出版社: 北京.
- [18] Harrison, D. J., Manz, A., Fan, Z. H., Ludi, H., Widmer, H. M., capillary

- electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. *Anal Chem*, 1992, 64(17): 1926-1932.
- [19] Thorsen, T., Maerkl, S. J., Quake, S. R., Microfluidic large-scale integration. *Science*, 2002, 298(5593): 580-584.
- [20] Christodoulides, N., Tran, M., Floriano, P. N., Rodriguez, M., Goodey, A., Ali, M., Neikirk, D., McDevitt, J. T., A microchip-based multianalyte assay system for the assessment of cardiac risk. *Anal Chem*, 2002, 74(13): 3030-3036.
- [21] Nagrath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., Utkus, L., Smith, M. R., Kwak, E. L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Ryan, P., Balis, U. J., Tompkins, R. G., Haber, D. A., Toner, M., Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 2007, 450(7173): 1235-U10.
- [22] Hung, P. J., Lee, P. J., Sabounchi, P., Lin, R., Lee, L. P., Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89(1): 1-8.
- [23] Jiang, Y., Wang, P. C., Locascio, L. E., Lee, C. S., Integrated plastic microfluidic devices with ESI-MS for drug screening and residue analysis. *Anal Chem*, 2001, 73(9): 2048-2053.
- [24] Sequeira, M., Diamond, D., Progress in the realisation of an autonomous environmental monitoring device for ammonia. *Trac-Trends in Anal Chem*, 2002, 21(12): 816-827.
- [25] Wang, D. F., Ono, T., Esashi, M., Thermal treatments and gas adsorption influences on nanomechanics of ultra-thin silicon resonators for ultimate

- sensing. *Nanotechnology*, 2004, 15(12): 1851-1854.
- [26] Norris, J. V., Evander, M., Horsman-Hall, K. M., Nilsson, J., Laurell, T., Landers, J. P., Acoustic Differential Extraction for Forensic Analysis of Sexual Assault Evidence. *Anal Chem*, 2009, 81(15): 6089-6095.
- [27] Yeung, S. H. I., Liu, P., Del Bueno, N., Greenspoon, S. A., Mathies, R. A., Integrated Sample Cleanup-Capillary Electrophoresis Microchip for High-Performance Short Tandem Repeat Genetic Analysis. *Anal Chem*, 2009, 81(1): 210-217.
- [28] Chen, H., Wang, L., Li, P. C. H., Nucleic acid microarrays created in the double-spiral format on a circular microfluidic disk. *Lab Chip*, 2008, 8(5): 826-829.
- [29] Peng, X. Y., Li, P. C. H., Yu, H. Z., Parameswaran, M., Chou, W. L., Spiral microchannels on a CD for DNA hybridizations. *Sens Actuators A*, 2007, 128(1): 64-69.
- [30] Wang, L., Li, P. C. H., Yu, H. Z., Parameswaran, A. M., Fungal pathogenic nucleic acid detection achieved with a microfluidic microarray device. *Anal Chim Acta*, 2008, 610(1): 97-104.
- [31] Wang, L., Li, P. C. H., Flexible microarray construction and fast DNA hybridization conducted on a microfluidic chip for greenhouse plant fungal pathogen detection. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(26): 10509-10516.
- [32] Benn, J. A., Hu, J., Hogan, B. J., Fry, R. C., Samson, L. D., Thorsen, T., Comparative modeling and analysis of microfluidic and conventional DNA microarrays. *Anal Biochem*, 2006, 348(2): 284-293.

- [33] Fan, R., Vermesh, O., Srivastava, A., Yen, B. K. H., Qin, L. D., Ahmad, H., Kwong, G. A., Liu, C. C., Gould, J., Hood, L., Heath, J. R., Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(12): 1373-1378.
- [34] Huang, S. B., Lee, G. B., Pneumatically driven micro-dispenser for sub-micro-liter pipetting. *J Micromech Microeng*, 2009, 19(3).
- [35] Wang, J. B., Zhou, Y., Qiu, H. W., Huang, H., Sun, C. H., Xi, J. Z., Huang, Y. Y., A chip-to-chip nanoliter microfluidic dispenser. *Lab Chip*, 2009, 9(13): 1831-1835.
- [36] Yamada, M., Seki, M., Nanoliter-sized liquid dispenser array for multiple biochemical analysis in microfluidic devices. *Anal Chem*, 2004, 76(4): 895-899.
- [37] Gutmann, O., Kuehlewein, R., Reinbold, S., Niekrawietz, R., Steinert, C. P., de Heij, B., Zengerle, R., Daub, M., A highly parallel nanoliter dispenser for microarray fabrication. *Biomed Microdevices*, 2004, 6(2): 131-7.
- [38] Lin, H. H., Sun, L., Crooks, R. M., Replication of a DNA microarray. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(32): 11210-11211.
- [39] Yu, A. A., Savas, T., Cabrini, S., diFabrizio, E., Smith, H. I., Stellacci, F., High resolution printing of DNA feature on poly(methyl methacrylate) substrates using supramolecular nano-stamping. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(48): 16774-16775.
- [40] Lin, H. H., Kim, J., Sun, L., Crooks, R. M., Replication of DNA microarrays from zip code masters. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(10):

- 3268-3272.
- [41] Kim, J., Crooks, R. M., Replication of DNA microarrays prepared by in situ oligonucleotide polymerization and mechanical transfer. *Anal Chem*, 2007, 79: 7267-7274.
- [42] Yu, A. A., Savas, T. A., Taylor, G. S., Guiseppe-Elie, A., Smith, H. I., Stellacci, F., Supramolecular nanostamping: Using DNA as movable type. *Nano Letters*, 2005, 5(6): 1061-1064.
- [43] Thibault, C., Le Berre, V., Casimirus, S., Trevisiol, E., Francois, J., Vieu, C., Direct microcontact printing of oligonucleotides for biochip applications. *J Nanobiotechnology*, 2005, 3(1): 7.
- [44] Lange, S. A., Benes, V., Kern, D. P., Horber, J. K. H., Bernard, A., Microcontact printing of DNA molecules. *Anal Chem*, 2004, 76(6): 1641-1647.
- [45] Srivannavit, O., Gulari, M., Hua, Z. S., Gao, X. L., Zhou, X. C., Hong, A. L., Zhou, T. C., Gulari, E., Microfluidic reactor array device for massively parallel in situ synthesis of oligonucleotides. *Sens Actuators B*, 2009, 140(2): 473-481.
- [46] Cheng, J. Y., Chen, H. Y., Microfluidic ARray Synthesizer (MARs) for Rapid Preparation and Hybridization of Custom DNA Microarray. *Biotechnol Biotechnol*, 2009, 104(2): 400-407.
- [47] Rife, J. C., Bell, M. I., Horwitz, J. S., Kabler, M. N., Auyeung, R. C. Y., Kim, W. J., Miniature valveless ultrasonic pumps and mixers. *Sens Actuators B*, 2000, 86(1-2): 135-140.
- [48] Yaralioglu, G. G., Wygant, I. O., Marentis, T. C., Khuri-Yakub, B. T.,

- Ultrasonic mixing in microfluidic channels using integrated transducers. *Anal Chem*, 2004, 76(13): 3694-3698.
- [49] Liu, R. H., Lenigk, R., Druyor-Sanchez, R. L., Yang, J. N., Grodzinski, P., Hybridization enhancement using cavitation microstreaming. *Anal Chem*, 2003, 75(8): 1911-1917.
- [50] Edman, C. F., Raymond, D. E., Wu, D. J., Tu, E. G., 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): 4907-4914.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] Ryu, K. S., Shaikh, K., Goluch, E., Fan, Z. F., Liu, C., Micro magnetic stir-bar mixer integrated with parylene microfluidic channels. *Lab Chip*, 2004, 4(6): 608-613.
- [55] 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.
- [56] 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.
- [57] 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): 2062-2070.
- [58] Hu, G. Q., Gao, Y. L., Li, D. Q., Modeling micropatterned antigen-antibody binding kinetics in a microfluidic chip. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22(7): 1403-1409.
- [59] Chung, Y. C., Jan, M. S., Lin, Y. C., Lin, J. H., Cheng, W. C., Fan, C. Y., Microfluidic chip for high efficiency DNA extraction. *Lab Chip*, 2004, 4(2): 141-147.
- [60] 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).
- [61] 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): 1915-1923.
- [62] 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.
- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] 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.
- [66] Lee, H. H., Smoot, J., McMurray, Z., Stahl, D. A., Yager, P., Recirculating flow accelerates DNA microarray hybridization in a microfluidic device. *Lab Chip*, 2006, 6(9): 1163-70.
- [67] Andersson, P., Jesson, G., Kylberg, G., Ekstrand, G., Thorsen, G., Parallel nanoliter microfluidic analysis system. *Anal Chem*, 2007, 79(11): 4022-30.
- [68] Bynum, M. A., Gordon, G. B., Hybridization enhancement using microfluidic planetary centrifugal mixing. *Anal Chem*, 2004, 76(23): 7039-44.
- [69] Cho, Y. K., Lee, J. G., Park, J. M., Lee, B. S., Lee, Y., Ko, C., One-step pathogen specific DNA extraction from whole blood on a centrifugal

- microfluidic device. *Lab Chip*, 2007, 7(5): 565-73.
- [70] Gustafsson, M., Hirschberg, D., Palmberg, C., Jornvall, H., Bergman, T., Integrated sample preparation and MALDI mass spectrometry on a microfluidic compact disk. *Anal Chem*, 2004, 76(2): 345-50.
- [71] Wang, L., Li, P. C., Yu, H. Z., Parameswaran, A. M., Fungal pathogenic nucleic acid detection achieved with a microfluidic microarray device. *Anal Chim Acta*, 2008, 610(1): 97-104.
- [72] Watts, A. S., Urbas, A. A., Moschou, E., Gavalas, V. G., Zoval, J. V., Madou, M., Bachas, L. G., Centrifugal microfluidics with integrated sensing microdome optodes for multiion detection. *Anal Chem*, 2007, 79(21): 8046-54.
- [73] Jia, G. Y., Ma, K. S., Kim, J., Zoval, J. V., Peytavi, R., Bergeron, M. G., Madou, M. J., Dynamic automated DNA hybridization on a CD (compact disc) fluidic platform. *Sens Actuators B*, 2006, 114(1): 173-181.
- [74] Kim, J., Jang, S. H., Jia, G. Y., Zoval, J. V., Da Silva, N. A., Madou, M. J., Cell lysis on a microfluidic CD (compact disc). *Lab Chip*, 2004, 4(5): 516-522.
- [75] 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): 1836-1844.
- [76] Ismagilov, R. F., Stroock, A. D., Kenis, P. J. A., Whitesides, G., Stone, H. A., Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two-phase laminar flows in microchannels. *Appl Phys Lett*,

- 2000, 76(17): 2376-2378.
- [77] Kamholz, A. E., Yager, P., Molecular diffusive scaling laws in pressure-driven microfluidic channels: deviation from one-dimensional Einstein approximations. *Sens Actuators B*, 2002, 82(1): 117-121.
- [78] Lim, D. S. W., Shelby, J. P., Kuo, J. S., Chiu, D. T., Dynamic formation of ring-shaped patterns of colloidal particles in microfluidic systems. *Appl Phys Lett*, 2003, 83(6): 1145-1147.
- [79] Wong, S. H., Bryant, P., Ward, M., Wharton, C., Investigation of mixing in a cross-shaped micromixer with static mixing elements for reaction kinetics studies. *Sens Actuators B*, 2003, 95(1-3): 414-424.
- [80] Gray, B. L., Jaeggi, D., Mourlas, N. J., van Driehuisen, B. P., Williams, K. R., Maluf, N. I., Kovacs, G. T. A., Novel interconnection technologies for integrated microfluidic systems. *Sens Actuators A*, 1999, 77(1): 57-65.
- [81] He, B., Burke, B. J., Zhang, X., Zhang, R., Regnier, F. E., A picoliter-volume mixer for microfluidic analytical systems. *Anal Chem*, 2001, 73(9): 1942-1947.
- [82] Melin, J., Gimenez, G., Roxhed, N., van der Wijngaart, W., Stemme, G., A fast passive and planar liquid sample micromixer. *Lab Chip*, 2004, 4(3): 214-219.
- [83] Munson, M. S., Yager, P., Simple quantitative optical method for monitoring the extent of mixing applied to a novel microfluidic mixer. *Anal Chim Acta*, 2004, 507(1): 63-71.
- [84] Chen, H., Meiners, J. C., Topologic mixing on a microfluidic chip. *Appl Phys Lett*, 2004, 84(12): 2193-2195.

- [85] Hong, C. C., Choi, J. W., Ahn, C. H., A novel in-plane passive microfluidic mixer with modified Tesla structures. *Lab Chip*, 2004, 4(2): 109-113.
- [86] Park, S. J., Kim, J. K., Park, J., Chung, S., Chung, C., Chang, J. K., Rapid three-dimensional passive rotation micromixer using the breakup process. *J Micromech Microeng*, 2004, 14(1): 6-14.
- [87] Vijayendran, R. A., Motsegood, K. M., Beebe, D. J., Leckband, D. E., Evaluation of a three-dimensional micromixer in a surface-based biosensor. *Langmuir*, 2003, 19(5): 1824-1828.
- [88] Paik, P., Pamula, V. K., Fair, R. B., Rapid droplet mixers for digital microfluidic systems. *Lab Chip*, 2003, 3(4): 253-259.
- [89] Bessoth, F. G., deMello, A. J., Manz, A., Microstructure for efficient continuous flow mixing. *Anal Commun*, 1999, 36(6): 213-215.
- [90] Jensen, K., Chemical kinetics - Smaller, faster chemistry. *Nature*, 1998, 393(6687): 735-+.
- [91] Sudarsan, A. P., Ugaz, V. M., Multivortex micromixing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(19): 7228-7233.
- [92] Stroock, A. D., Dertinger, S. K. W., Ajdari, A., Mezic, I., Stone, H. A., Whitesides, G. M., Chaotic mixer for microchannels. *Science*, 2002, 295(5555): 647-651.
- [93] Liu, J., Williams, B. A., Gwartz, R. M., Wold, B. J., Quake, S., Enhanced signals and fast nucleic acid hybridization by microfluidic chaotic mixing. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45(22): 3618-3623.
- [94] Kim, S., Chen, L. X., Lee, S., Seong, G. H., Choo, J., Lee, E. K., Oh, C. H.,

- Rapid DNA hybridization analysis using a PDMS microfluidic sensor and a molecular beacon. *Anal Sci*, 2007, 23(4): 401-405.
- [95] Foley, J. O., Mashadi-Hosseini, A., Fu, E., Finlayson, B. A., Yager, P., Experimental and model investigation of the time-dependent 2-dimensional distribution of binding in a herringbone microchannel. *Lab Chip*, 2008, 8(4): 557-564.
- [96] Golden, J. P., Floyd-Smith, T. M., Mott, D. R., Ligler, F. S., Target delivery in a microfluidic immunosensor. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22(11): 2763-2767.
- [97] Lee, H. Y., Voldman, J., Optimizing micromixer design for enhancing dielectrophoretic microconcentrator performance. *Anal Chem*, 2007, 79(5): 1833-1839.
- [98] Cao, Y. W. C., Jin, R. C., Mirkin, C. A., Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, 2002, 297(5586): 1536-1540.
- [99] Brennan, D., Lambkin, P., Moore, E. J., Galvin, P., An integrated optofluidic platform for DNA hybridization and detection. *IEEE Sensors Journal*, 2008, 8(5-6): 536-542.
- [100] Ymeti, A., Greve, J., Lambeck, P. V., Wink, T., van Hovell, S., Beumer, T. A. M., Wijn, R. R., Heideman, R. G., Subramaniam, V., Kanger, J. S., Fast, ultrasensitive virus detection using a young interferometer sensor. *Nano Letters*, 2007, 7(2): 394-397.
- [101] Lee, H. J., Goodrich, T. T., Corn, R. M., SPR imaging measurements of 1-D and 2-D DNA microarrays created from microfluidic channels on gold

- thin films. *Anal Chem*, 2001, 73(22): 5525-5531.
- [102] Seo, J., Lee, L. P., Disposable integrated microfluidics with self-aligned planar microlenses. *Sens Actuators A*, 2004, 99(2-3): 615-622.
- [103] Berti, F., Laschi, S., Palchetti, I., Rossier, J. S., Reymond, F., Mascini, M., Marrazza, G., Microfluidic-based electrochemical genosensor coupled to magnetic beads for hybridization detection. *Talanta*, 2009, 77(3): 971-978.
- [104] Gabig-Ciminska, M., Holmgren, A., Andresen, H., Barken, K. B., Wumpelmann, M., Albers, J., Hintsche, R., Breitenstein, A., Neubauer, P., Los, M., Czyz, A., Wegrzyn, G., Silfversparre, G., Jurgen, B., Schweder, T., Enfors, S. O., Electric chips for rapid detection and quantification of nucleic acids. *Biosens Bioelectron*, 2004, 19(6): 537-546.
- [105] Liao, J. C., Ma, Y. B., Gau, V., Mastali, M., Sun, C. P., Li, Y., McCabe, E. R. B., Landaw, E. M., Bruckner, D., Churchill, B. M., Haake, D. A., Ho, C. M., A point-of-care micro-laboratory for direct pathogen identification in body fluids. 2006 1st IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, Vols 1-3, 2006: 1109-1112.
- [106] Liao, J. C., Mastali, M., Gau, V., Suchard, M. A., Moller, A. K., Bruckner, D. A., Babbitt, J. T., Li, Y., Gornbein, J., Landaw, E. M., McCabe, E. R. B., Churchill, B. M., Haake, D. A., Use of electrochemical DNA biosensors for rapid molecular identification of uropathogens in clinical urine specimens. *J. Clin Microbiol*, 2006, 44(2): 561-570.
- [107] Liu, D. J., Perdue, R. K., Sun, L., Crooks, R. M., Immobilization of DNA onto poly(dimethylsiloxane) surfaces and application to a microelectrochemical enzyme-amplified DNA hybridization assay.

- Langmuir, 2004, 20(14): 5905-5910.
- [108] Ertl, P., Emrich, C. A., Singhal, P., Mathies, R. A., Capillary electrophoresis chips with a sheath-flow supported electrochemical detection system. *Anal Chem*, 2004, 76(13): 3749-3755.
- [109] Hebert, N. E., Brazill, S. A., Microchip capillary gel electrophoresis with electrochemical detection for the analysis of known SNPs. *Lab Chip*, 2003, 3(4): 241-247.
- [110] Lee, T. M. H., Carles, M. C., Hsing, I. M., Microfabricated PCR-electrochemical device for simultaneous DNA amplification and detection. *Lab Chip*, 2003, 3(2): 100-105.
- [111] Pavlovic, E., Lai, R. Y., Wu, T. T., Ferguson, B. S., Sun, R., Plaxco, K. W., Soh, H. T., Microfluidic device architecture for electrochemical patterning and detection of multiple DNA sequences. *Langmuir*, 2008, 24(3): 1102-1107.
- [112] Shiddiky, M. J. A., Shim, Y. B., Trace analysis of DNA: Preconcentration, separation, and electrochemical detection in microchip electrophoresis using Au nanoparticles. *Anal Chem*, 2007, 79(10): 3724-3733.
- [113] Hahn, J., Lieber, C. M., Direct ultrasensitive electrical detection of DNA and DNA sequence variations using nanowire nanosensors. *Nano Letters*, 2004, 4(1): 51-54.
- [114] Star, A., Tu, E., Niemann, J., Gabriel, J. C. P., Joiner, C. S., Valcke, C., Label-free detection of DNA hybridization using carbon nanotube network field-effect transistors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(4): 921-926.
- [115] Tang, X. W., Bansaruntip, S., Nakayama, N., Yenilmez, E., Chang, Y. L.,

- Wang, Q., Carbon nanotube DNA sensor and sensing mechanism. *Nano Letters*, 2006, 6(8): 1632-1636.
- [116] Zheng, G. F., Patolsky, F., Cui, Y., Wang, W. U., Lieber, C. M., Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(10): 1294-1301.
- [117] Nugen, S. R., Asiello, P. J., Connelly, J. T., Baeumner, A. J., PMMA biosensor for nucleic acids with integrated mixer and electrochemical detection. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(8): 2428-2433.
- [118] Goral, V. N., Zaytseva, N. V., Baeumner, A. J., Electrochemical microfluidic biosensor for the detection of nucleic acid sequences. *Lab Chip*, 2006, 6(3): 414-421.
- [119] Di Carlo, D., Jeong, K. H., Lee, L. P., Reagentless mechanical cell lysis by nanoscale barbs in microchannels for sample preparation. *Lab Chip*, 2003, 3(4): 287-291.
- [120] Lu, H., Schmidt, M. A., Jensen, K. F., A microfluidic electroporation device for cell lysis. *Lab Chip*, 2005, 5(1): 23-29.
- [121] Schilling, E. A., Kamholz, A. E., Yager, P., Cell lysis and protein extraction in a microfluidic device with detection by a fluorogenic enzyme assay. *Anal Chem*, 2002, 74(8): 1798-1804.
- [122] Cao, W. D., Easley, C. J., Ferrance, J. P., Landers, J. P., Chitosan as a polymer for pH-induced DNA capture in a totally aqueous system. *Anal Chem*, 2006, 78(20): 7222-7228.
- [123] Wen, J., Guillo, C., Ferrance, J. P., Landers, J. P., Microfluidic-based DNA purification in a two-stage, dual-phase microchip containing a

- reversed-phase and a photopolymerized monolith. *Anal Chem*, 2007, 79(16): 6135-6142.
- [124] Legendre, L. A., Bienvenue, J. M., Roper, M. G., Ferrance, J. P., Landers, J. P., A simple, valveless microfluidic sample preparation device for extraction and amplification of DNA from nanoliter-volume samples. *Anal Chem*, 2006, 78(5): 1444-1451.
- [125] Liu, J., Enzelberger, M., Quake, S., A nanoliter rotary device for polymerase chain reaction. *Electrophoresis*, 2002, 23(10): 1531-1536.
- [126] Hashimoto, M., Chen, P. C., Mitchell, M. W., Nikitopoulos, D. E., Soper, S. A., Murphy, M. C., Rapid PCR in a continuous flow device. *Lab Chip*, 2004, 4(6): 638-645.
- [127] Ottesen, E. A., Hong, J. W., Quake, S. R., Leadbetter, J. R., Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria. *Science*, 2006, 314(5804): 1464-1467.
- [128] Balagadde, F. K., You, L. C., Hansen, C. L., Arnold, F. H., Quake, S. R., Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. *Science*, 2005, 309(5731): 137-140.
- [129] Hong, J. W., Quake, S. R., Integrated nanoliter systems. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(10): 1179-1183.
- [130] Lee, C. C., Sui, G. D., Elizarov, A., Shu, C. Y. J., Shin, Y. S., Dooley, A. N., Huang, J., Daridon, A., Wyatt, P., Stout, D., Kolb, H. C., Witte, O. N., Satyamurthy, N., Heath, J. R., Phelps, M. E., Quake, S. R., Tseng, H. R., Multistep synthesis of a radiolabeled imaging probe using integrated microfluidics. *Science*, 2005, 310(5755): 1793-1796.

- [131] Liu, C. N., Toriello, N. M., Mathies, R. A., Multichannel PCR-CE microdevice for genetic analysis. *Anal Chem*, 2006, 78(15): 5474-5479.
- [132] Lagally, E. T., Simpson, P. C., Mathies, R. A., Monolithic integrated microfluidic DNA amplification and capillary electrophoresis analysis system. *Sens Actuators A*, 2000, 63(3): 138-146.
- [133] Blazej, R. G., Kumaresan, P., Mathies, R. A., Microfabricated bioprocessor for integrated nanoliter-scale Sanger DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(19): 7240-7245.
- [134] Anderson, R. C., Su, X., Bogdan, G. J., Fenton, J., A miniature integrated device for automated multistep genetic assays. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12).
- [135] Liu, R. H., Nguyen, T., Schwarzkopf, K., Fuji, H. S., Petrova, A., Siuda, T., Peyvan, K., Bizak, M., Danley, D., McShea, A., Fully integrated miniature device for automated gene expression DNA microarray processing. *Anal Chem*, 2006, 78(6): 1980-1986.
- [136] Liu, R. H., Yang, J. N., Lenigk, R., Bonanno, J., Grodzinski, P., Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection. *Anal Chem*, 2004, 76(7): 1824-1831.
- [137] Ferguson, B. S., Buchsbaum, S. F., Swensen, J. S., Hsieh, K., Lou, X. H., Soh, H. T., Integrated Microfluidic Electrochemical DNA Sensor. *Anal Chem*, 2009, 81(15): 6503-6508.

第二章 混沌微混合器的构建及性能考察

2.1 引言

微流控芯片指在几十至几百微米尺度微通道内对微量流体(10^{-9} - 10^{-18} L)处理和操控的科学技术体系[1]。微流控技术在近二十年里吸引了越来越多不同研究领域研究者的关注,已经应用于生物大分子(DNA和蛋白质)的分析[2, 3],高通量的药物筛选[4],化学反应[5, 6],材料的合成[7, 8]等。其原因在于微流控技术独有的优势:少量的样品和试剂的消耗、快速的分析时间、高分辨率和灵敏度的分离检测、低的分析成本。

随着流体操控尺度降低至微米级,相比于宏观流体,微流体的运动状态发生了改变。在微尺度下流体的状态主要以层流为主,各层之间的混合主要依靠分子扩散。对于微流控技术来说,层流现象是把双刃剑。对于细胞研究[9],免疫检测[10]和微通道的修饰[11],层流现象展现其有利的一面。但是对于化学和生物的反应,层流现象是个制约因素。这是因为单纯的分子扩散限制了分子之间相互作用的速度,导致反应速度的降低。所以微混合器是构建微流控体系必要的技术单元。

根据是否需要外部能量的输入,微混合器可以分为两类:主动式微混合器和被动式微混合器。主动式微混合器是指借助磁力,电场力,声场等外力促进样品的流动和混合[12-16]。Rife等人设计的微型超声混合器是利用超声在液体中产生的声流效应实现样品试剂的混合[17]。Yaralioglu等在PDMS微通道内集成压电传感器,通过压电传感器产生的超声波增强液流的混合[18]。Glasgow等设计了一种简单的T字型的微混合器,在两端入口和出口插入铂电极,施加不同位相的方波电场,诱导出不均一的速度场,从而达到混合的

目的[19]。Ryu 等将含有微磁力搅拌棒的混合器集成在聚对二甲苯芯片通道中, 以外部旋转磁场驱动微磁力搅拌棒进行液体混合[20]。但是这类主动式微混合器的局限在于构建成本比较高, 操作比较复杂。

相对于主动式微混合器, 被动式微混合器是单纯地利用几何形状或流体特性产生混合效果, 除驱动流体流动的力(如压力、电渗驱动等)外, 混合不借助于其它外力[21-25]。Sudarsan等将复杂的3D设计改进为包含变化的弯道曲率和通道宽度的2D设计。在简单的2D通道中, 由于惯性力, 离心力和粘性力之间的相互作用在弯道的垂直面产生迪恩涡流, 另外由于通道宽度的突然增加在水平面产生扩展涡流, 这两种涡流的协同作用增进了混合效率[26]。Song等利用液滴式微混合器实现微秒级化学反应。液滴式微混合器是指将待混合的两种液体和夹在中间阻隔它们提前接触的惰性液体一同流入不互溶的油性液体中形成液滴, 在液滴内部实现混合。混合的两种液体在液滴内依靠湍流快速混合反应(2ms), 而且在流动过程中没有弥散现象[27]。这类被动式的混合器主要优势在于构建简单成本低, 操作也不复杂, 并且易于和其他微流控操作单元集成。

本章依据Stroock等[28]提出的设计原理, 构建混沌微混合器, 即在微通道的上壁构建不对称人字形的凹槽, 这样可以在微管道的横截面上产生与主流方向垂直的二次流, 同时该二次流沿轴向流动方向呈周期性变化, 从而达到混合流体的目的。

2.2 微尺度下流体混合机理

混合是一个物理过程, 其目的是实现参与过程的不同组分的均一分布。溶质混合有两个机理: 一为对流传质, 另一为扩散传质。溶质团在对流的作用下变形, 并被分裂成碎块, 使分割尺度变小, 从而增加和更新溶质的高低

浓度区域之间的接触面积，促进分子扩散引起的混合与传递。

在没有外界扰动的情况下，流体分子的扩散遵循Fick's 法则：

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (2-1)$$

其中J为扩散通量， $\frac{\partial C}{\partial x}$ 是在扩散方向上流体分子的浓度梯度，D为扩散系数，C为分子的浓度，负号表示分子的扩散方向与浓度梯度方向相反（浓度由低到高为正，扩散方向由高到低为负）。

扩散的时间常数可以写为：

$$t \sim \frac{L^2}{D} \quad (2-2)$$

其中L为扩散尺寸，D为扩散系数。由公式2-2推知，混合所需扩散的平衡时间与扩散距离的平方成反比。流体混合的特征尺度越小，即扩散的距离越短，混合时间也越短。

雷诺数（Reynolds number Re ）是与混合相关的无量纲参数，它是流体流动时的惯性力和粘性力(内摩擦力)之比， $Re = \rho UL/\mu$ ， ρ 表示流体密度，U表示流体的平均流速，L表示特征长度， μ 表示流体的动力粘度。雷诺数可以用来判断流体的流动状态。在宏观系统中一般认为管道雷诺数 $Re < 2000$ 为层流状态， $Re > 4000$ 为湍流状态， $Re = 2000-4000$ 为过渡状态。对于一般的微流控装置来说，如果以水为工作溶液，流速 $1 \mu\text{m/s} - 1 \text{ cm/s}$ ，通道宽度 $1-100 \mu\text{m}$ ，雷诺数则为 $10^{-6} - 10$ ，流体状态主要以层流为主，各层之间的混合主要依靠扩散。

佩克莱特数（Péclet number Pe ）是另一个与混合相关的无量纲参数，它是表示对流与扩散之比的特征参数。 $Pe = U w/D$ ，U表示流体的平均流速，w表示混合长度，D表示分子扩散系数。对于层流，完全混合时流经通道距离 $l = Pe w$ ，混合距离随着 Pe 值的增加而线性增长。如果以T型通道为例见图2-1，两侧入口分别注入纯水和一种小蛋白质分子溶液（扩散常数为 $40 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ），以

100 $\mu\text{m/s}$ 流速流经100 μm 宽的通道， Pe 为250， Pe 数乘以通道宽度100 μm ，可以得出二者充分混合的距离是2.5cm，需时4min。

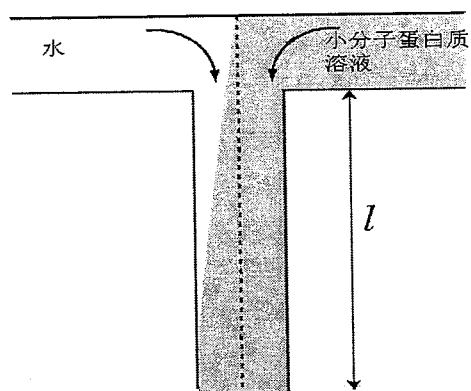


图 2-1 T型通道混合示例

Figure 2-1 Example of mixing of protein molecules and water in Y channel.

由此可见，在微流控系统中通道特征尺度在微米级，液体流速通常较低，雷诺数远小于2000，因此流体混合主要基于层流混合机制，分子扩散的影响十分显著。提高层流条件下的混合效率宜遵循以下原则：（1）拉伸流体或层流剪切以增大流体的接触面积；（2）利用分散混合设计，通过管路几何交叉形状设计将大的液流拆分和重新组合，从而减小液流厚度，实现更有效的混合。

2.3 实验部分

2.3.1 试剂及仪器

SU-8 光刻胶购自美国 Microchem 公司。异丙醇，乳酸乙酯购自沈阳化学试剂厂。Sylgard 184 聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS) 购自

美国 Dow Corning 公司。紫外光源采用 ThermoOriel 68810 ARC 紫外曝光系统。该系统配备 500 瓦汞灯。倒置荧光显微镜系统 (IX71, Olympus) 配有 CCD 摄像头和图像分析软件 (Image-Pro 6.0)。SC-1B 型匀胶机购自北京创威纳科技有限公司。等离子体清洗器购自美国 Harrick 公司。注射泵购自美国 Harvard Apparatus 公司。

2.3.2 PDMS 混沌微混合器的制作

PDMS 混沌微混合器的制作是由标准浇塑复制技术加工完成的。其过程如下：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。其 SU-8 模板制作是采用两步 SU-8 蚀刻技术。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，第二层制作不同凸起结构，参见图 2-2。流体通道长度为 40mm，宽度为 0.5mm，高度为 50 μ m。凸起结构的高度为 30 μ m，宽度为 140 μ m，间隔为 70 μ m。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 $^{\circ}$ 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，用不锈钢管在进样池及废液池上打孔。

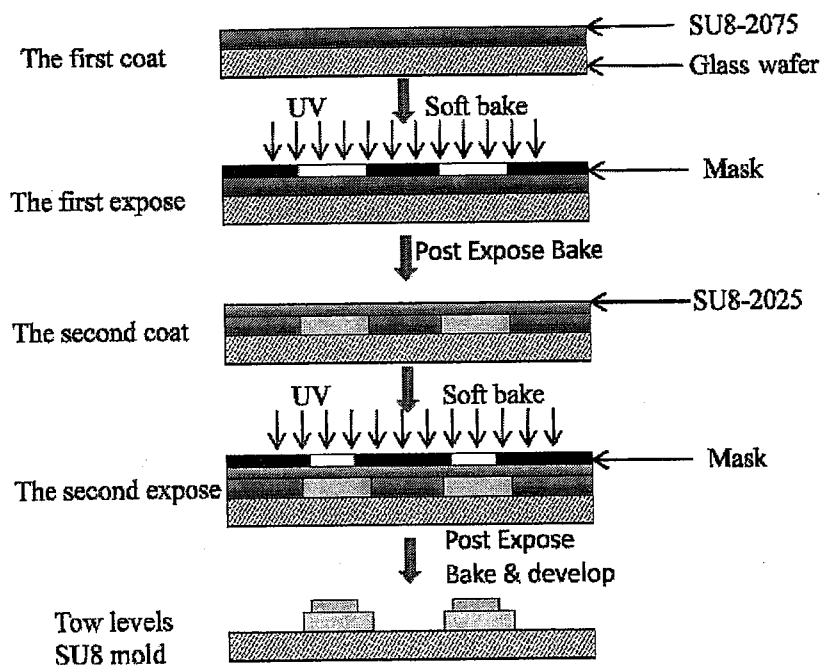


图 2-2 两步 SU8 模板加工示意图。

Figure.2-2 Schematic illustration of the fabrication process for the two-step SU8 mold.

2.3.3 混合效果的表征

用显微镜采集两种不同颜色的液体在流体通道不同位置的混合状态图。采集的图像用Image Pro 6.0软件分析，得到不同组分沿流体通道的混合谱图，从而判定混合所需距离和时间。

2.4 结果及讨论

2.4.1 混沌微混合器的设计

混沌微混合器是一种被动式的混合器，它不需要借助外场的作用（如声场，磁场），主要是依靠改变微通道的形状和内部构造来分离、折叠、拉伸液体，使流体从原本的层流状态变成杂乱无章的状态，即所谓的混沌状态。本章中构建的混沌微混合器是依据 Stroock 等提出的设计原理，即在 Y 型通道的主通道内壁上加工不对称的人字形凹槽（见图 2-3）。这种混沌微混合器的混合原理是在微管道的横截面上产生与主流方向垂直的二次流，同时该二次流沿轴向流动方向呈周期性变化。

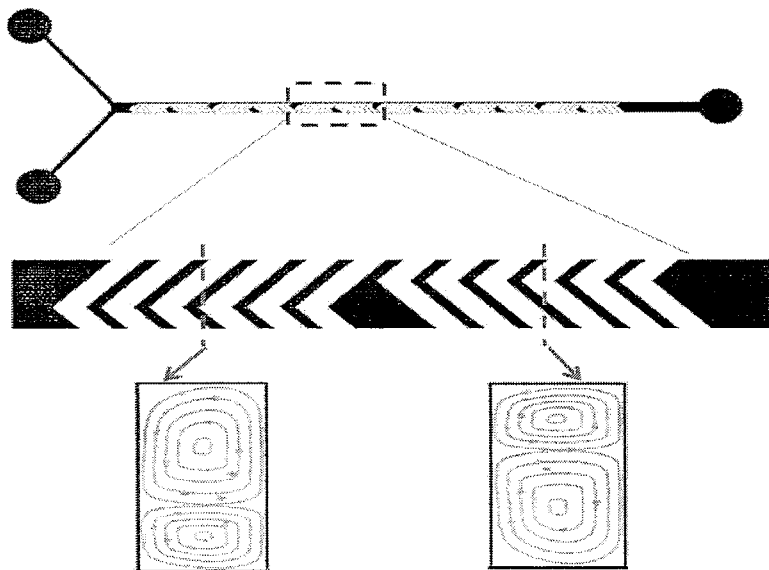
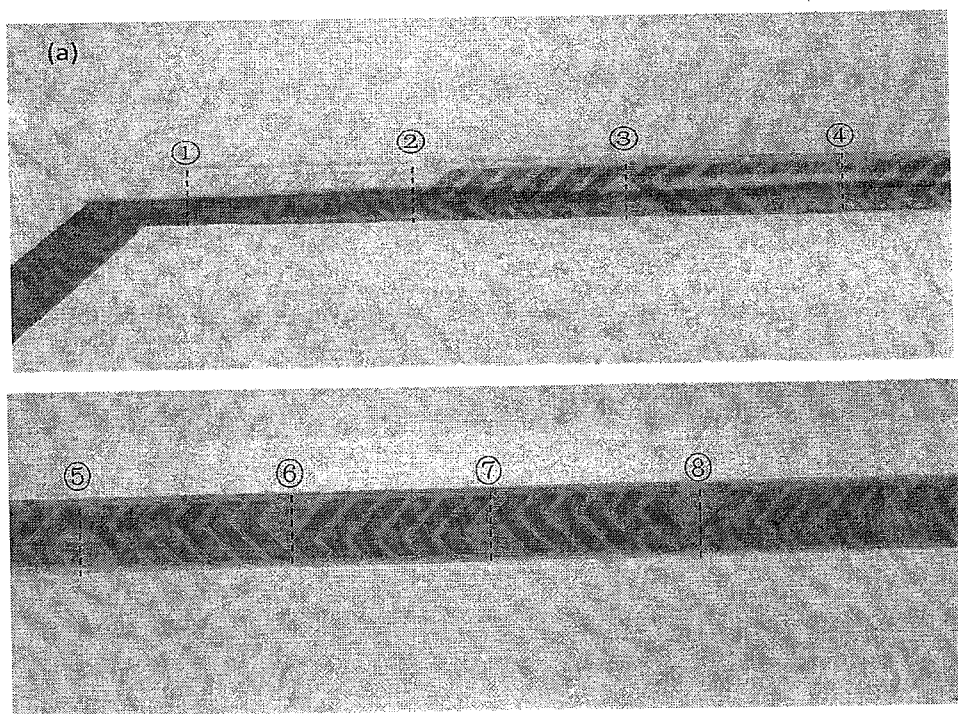


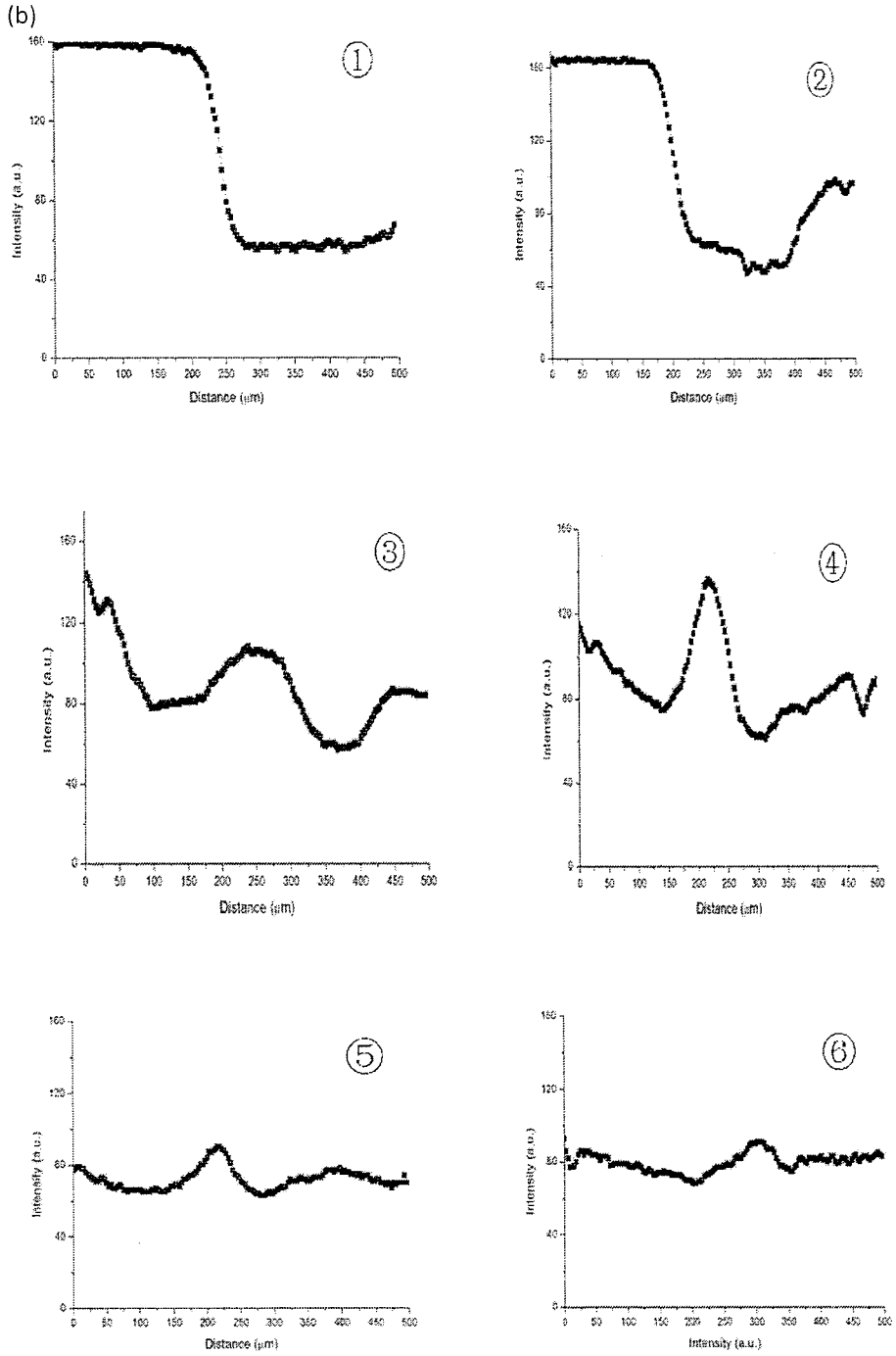
图 2-3 混沌微混合器的平面设计图。局部放大图显示一个不对称人字形结构单元，在通道的不同的截面位置的二次流状态图。

Figure 2-3 Design of chaotic micromixer. The insets show one cycle of staggered herringbone grooves and schematics of the transverse liquid flow at two cross-sections in the channel.

2.4.2 混沌微混合器的性能考察

为了考察构建的混沌微混合器的性能, Y 型通道的两侧进样池上通过 PE 管与注射泵相连, 以 $1\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度同时将蓝色染料溶液与纯净水推入 Y 型通道的两侧进样池, 随后流经内壁上加工不对称的人字形凹槽的主通道。混合结果如图 2-4 所示, 图 2-4a 显示的是显微镜采集的两种液流在微通道内混合的状态图, 图 2-4b 显示的是用 Image pro 6.0 图像数据处理软件对流体通道中不同位置的混合状态进行分析的谱图。从图中可以看出两相液流在经过 3 个重复的不对称人字形结构(大约 11mm) 就可以充分混合均匀。





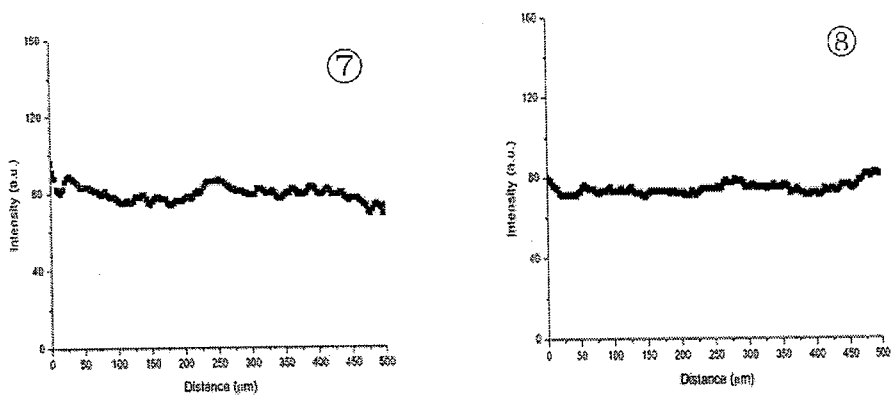


图 2-4 混沌微混合器的性能。(a)两种液体在通道内混合的实物图。(b) ①-⑧ 显示的是流体通道中 8 个位置的混合状态分析谱图。

Figure 2-4 Performance of chaotic mixer. (a) Photograph of chaotic mixing in the microchannel. (b) Plots ①-⑧ show mixing state at eight cross-sections in the fluid microchannel.

2.5 本章小结

构建了混沌微混合器，即在微通道的上壁构建不对称人字形的凹槽，这样可以在微管道的横截面上产生与主流方向垂直的二次流，同时该二次流沿轴向流动方向呈周期性变化，从而达到混合流体的目的。混沌微混合器的构建为下一步将其应用于核酸杂交研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 2006, 442(7101): 368-73.

- [2] Liu, C. N., Toriello, N. M., Mathies, R. A., Multichannel PCR-CE microdevice for genetic analysis. *Anal Chem*, 2006, 78(15): 5474-5479.
- [3] Zheng, B., Roach, L. S., Ismagilov, R. F., Screening of protein crystallization conditions on a microfluidic chip using nanoliter-size droplets. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(37): 11170-11171.
- [4] Dittrich, P. S., Manz, A., Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discovery*, 2006, 5(3): 210-218.
- [5] deMello, A. J., Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*, 2006, 442(7101): 394-402.
- [6] Janasek, D., Franzke, J., Manz, A., Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. *Nature*, 2006, 442(7101): 374-380.
- [7] Millman, J. R., Bhatt, K. H., Prevo, B. G., Veleev, O. D., Anisotropic particle synthesis in dielectrophoretically controlled microdroplet reactors. *Nat Mater.*, 2005, 4(1): 98-102.
- [8] Nisisako, T., Torii, T., Takahashi, T., Takizawa, Y., Synthesis of monodisperse bicolored janus particles with electrical anisotropy using a microfluidic co-flow system. *Adv Mater*, 2006, 18(9): 1152-+.
- [9] Takayama, S., Ostuni, E., LeDuc, P., Naruse, K., Ingber, D. E., Whitesides, G. M., Laminar flows - Subcellular positioning of small molecules. *Nature*, 2001, 411(6841): 1016-1016.
- [10] Weigl, B. H., Yager, P., Microfluidics - Microfluidic diffusion-based separation and detection. *Science*, 1999, 283(5400): 346-347.
- [11] Kenis, P. J. A., Ismagilov, R. F., Whitesides, G. M., Microfabrication inside capillaries using multiphase laminar flow patterning. *Science*, 1999,

- 285(5424): 83-85.
- [12] Ahmed, D., Mao, X. L., Juluri, B. K., Huang, T. J., A fast microfluidic mixer based on acoustically driven sidewall-trapped microbubbles. *Microfluid Nanofluid*, 2009, 7(5): 727-731.
- [13] Ahmed, D., Mao, X. L., Shi, J. J., Juluri, B. K., Huang, T. J., A millisecond micromixer via single-bubble-based acoustic streaming. *Lab Chip*, 2009, 9(18): 2738-2741.
- [14] El Moctar, A. O., Aubry, N., Batton, J., Electro-hydrodynamic micro-fluidic mixer. *Lab Chip*, 2003, 3(4): 273-280.
- [15] Lynn, N. S., Henry, C. S., Dandy, D. S., Microfluidic mixing via transverse electrokinetic effects in a planar microchannel. *Microfluid Nanofluid*, 2008, 5(4): 493-505.
- [16] Tai, C. H., Yang, R. J., Huang, M. Z., Liu, C. W., Tsai, C. H., Fu, L. M., Micromixer utilizing electrokinetic instability-induced shedding effect. *Electrophoresis*, 2006, 27(24): 4982-4990.
- [17] Rife, J. C., Bell, M. I., Horwitz, J. S., Kabler, M. N., Auyeung, R. C. Y., Kim, W. J., Miniature valveless ultrasonic pumps and mixers. *Sens. Actuators, A*, 2000, 86(1-2): 135-140.
- [18] Yaralioglu, G. G., Wygant, I. O., Marentis, T. C., Khuri-Yakub, B. T., Ultrasonic mixing in microfluidic channels using integrated transducers. *Anal Chem*, 2004, 76(13): 3694-3698.
- [19] Glasgow, I., Batton, J., Aubry, N., Electroosmotic mixing in microchannels. *Lab Chip*, 2004, 4(6): 558-62.
- [20] Ryu, K. S., Shaikh, K., Goluch, E., Fan, Z. F., Liu, C., Micro magnetic

- stir-bar mixer integrated with parylene microfluidic channels. *Lab Chip*, 2004, 4(6): 608-613.
- [21] Melin, J., Gimenez, G., Roxhed, N., van der Wijngaart, W., Stemme, G., A fast passive and planar liquid sample micromixer. *Lab Chip*, 2004, 4(3): 214-219.
- [22] Kamholz, A. E., Yager, P., Molecular diffusive scaling laws in pressure-driven microfluidic channels: deviation from one-dimensional Einstein approximations. *Sens Actuators B*, 2002, 82(1): 117-121.
- [23] Hong, C. C., Choi, J. W., Ahn, C. H., A novel in-plane passive microfluidic mixer with modified Tesla structures. *Lab Chip*, 2004, 4(2): 109-113.
- [24] Park, S. J., Kim, J. K., Park, J., Chung, S., Chung, C., Chang, J. K., Rapid three-dimensional passive rotation micromixer using the breakup process. *J. Micromech. Microeng.*, 2004, 14(1): 6-14.
- [25] Paik, P., Pamula, V. K., Fair, R. B., Rapid droplet mixers for digital microfluidic systems. *Lab Chip*, 2003, 3(4): 253-259.
- [26] Sudarsan, A. P., Ugaz, V. M., Multivortex micromixing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(19): 7228-7233.
- [27] Song, H., Tice, J. D., Ismagilov, R. F., A microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42(7): 768-772.
- [28] Stroock, A. D., Dertinger, S. K. W., Ajdari, A., Mezic, I., Stone, H. A., Whitesides, G. M., Chaotic mixer for microchannels. *Science*, 2002, 295(5555): 647-651.

第三章 混沌微混合器用于核酸杂交研究

3.1 引言

DNA 杂交技术已经广泛应用于基因表达分析, 药物筛选和疾病相关基因诊断等领域[1-3]。所谓 DNA 杂交技术是基于具有互补碱基序列的单链 DNA 分子通过 Watson-Crick 碱基配对原则形成稳定的杂交双链 DNA 分子。DNA 杂交过程是高度特异性的, 可以根据已知序列的探针进行特异性的靶序列检测。

DNA 杂交主要分为液相杂交和固相杂交两类。液相杂交是指参与杂交的两条核酸单链均游离于溶液中, 在一定条件下(溶液的离子强度、温度、时间等)进行杂交。但是在液相体系中, 发生杂交的双链分子的检测比较困难, 而且很难实现高通量的分析。固相杂交是将寡核苷酸探针分子预先固定在固体支持物上, 而标记的靶分子则游离于溶液中。杂交反应后, 通过漂洗能将未杂交的游离分子除去, 检测留在支持物上的杂交分子。由于杂交分子易于检测并且可以高通量的平行分析, 固相杂交被广泛使用。但是目前基于固相杂交的 DNA 杂交平台都是以静态杂交为主, 杂交过程单纯依靠分子扩散, 杂交时间一般需要 6-20h。

微流控技术以其样品用量少、分析时间短、不同的操作单元灵活集成的特点成为目前研究的热点。一些研究小组开始探索利用微流控技术增强溶液中分子传质和缩短扩散距离用以解决固相杂交存在杂交时间长, 样品消耗大等问题[4-7]。例如在微流控芯片上利用流速的差异产生外加的张力促使长链 DNA 靶分子去卷曲化, 结果显示 1.4kbp 单链 DNA 靶分子的杂交信号增加近 9 倍[8]。亦有利用注射泵推动 DNA 样品在固定探针的微通道中连续流动

[9-11]。样品的流动增强了溶液中 DNA 分子向探针分子的传质。这样使杂交过程引入了对流，不再单纯依靠分子扩散，显著地缩短了杂交时间。此外浅通道亦有被利用减少分子的扩散距离，缩短杂交时间[12]。

虽然连续流动在一定程度上改善了杂交效果，但是这种方法仍存在一些問題。目前连续流动的方法多采用浅通道 ($\ll 100\mu\text{m}$) 和低流速 ($< 1\mu\text{l}/\text{min}$)。这主要因为在微尺度下，微通道中的流体运动状态以层流为主，对于固定于通道底部的探针而言，只能捕获通道内底层溶液中的靶分子，上层溶液中的靶分子会随着液体的连续流动而流失，这样就造成样品杂交效率低。此外，在分析不纯的生物样品时，浅通道容易造成通道的阻塞。针对单纯连续流动杂交存在的问题，我们希望通过引入微混合器进一步增强物质的传质，从而达到缩短杂交时间和提高样品杂交效率的目的。本章构建了含有混沌微混合器的杂交体系，即在微通道的上壁制作不对称的人字型凹槽，促使通道中的液流发生旋转，增加了上层溶液中的靶分子与底部固定探针的接触的几率，从而增强杂交信号的强度（见图 3-1）。我们考察了有混沌微混合器的杂交体系和无混沌微混合器的杂交体系在不同样品流速，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。

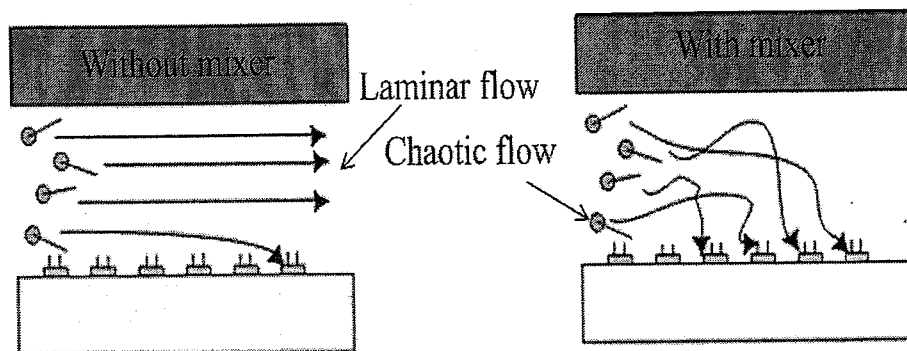


图 3-1 在层流和混沌流两种流体状态下靶分子 DNA 与固定的探针的杂交示意图。在无混合器的情况下，只有小部分靶分子接触探针表面，与探针杂交。然而，在有混沌混合器的情况下，由于混合器产生的混沌流促使靶分子在通道内旋转，使更多的靶分子有机会与固定的探针接触并杂交。

Figure 3-1 Illustration of DNA targets hybridizing in laminar flow and chaotic flow. Without the mixer, only a portion of DNA targets carried by the laminar flow can be hybridized with immobilized probes. Chaotic flow generated by a passive micromixer circulates the DNA targets and exposes more DNA targets to regions immobilized with probes.

3.2 实验部分

3.2.1 试剂及仪器

聚丙烯酰胺凝胶垫制备相关试剂：丙烯酰胺(Acrylamide, AAM), N,N'-亚甲基甲叉丙烯酰胺(N,N-Methylene-bis-acrylamide, BIS), 四甲基二乙胺(Tetramethylethylenediamine, TEMED), 3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷(3-Methacryloxypropyltrimethoxysilane, MAPS) 均购自 Sigma-Aldrich。亚甲基兰购自天津市天新精细化工开发中心。剥离硅烷(Repel-silane) 购自

Amersham Pharmacia-Biotech。

光刻胶制备结构制备相关试剂及仪器：SU-8 光刻胶购自美国 Microchem 公司。异丙醇，乳酸乙酯购自沈阳化学试剂厂。Sylgard 184 聚二甲基硅氧烷 (Polydimethylsiloxane, PDMS) 购自美国 Dow Corning 公司。SC-1B 型匀胶机购自北京创威纳科技有限公司。紫外光源采用 ThermoOriel 68810 ARC 紫外曝光系统，该系统配备 500 瓦汞灯。等离子体清洗器购自美国 Harrick 公司。

杂交实验相关试剂及仪器：杂交探针以及靶分子均合成于大连宝生物公司。碱基序列如下：5'末端 FITC 标记的靶分子(FITC-5'ACCAG GATAC AGCTT CCC 3') 和 5'末端氨基标记的探针(NH₂-5'GGGAA GCTGT ATCCT GGT 3')。倒置荧光显微镜系统(IX71, Olympus)配有 CCD 摄像头和图像分析软件(Image-Pro 6.0)，用于明场或荧光观察。注射泵购自美国 Harvard Apparatus 公司。

3.2.2 实验方法

3.2.2.1 聚丙烯酰胺凝胶垫的制作及 DNA 探针的固定

3.2.2.1.1 载玻片的清洗及硅烷化

医用载玻片(25×75mm)预先以洗涤剂清洗干净，之后在 Piranha 液(浓硫酸/双氧水=3/1, v/v)中煮沸约 30 分钟，待冷却后用大量纯净水清洗，除去残余硫酸，最后吹干，干燥无尘保存。清洗后的载玻片浸于新鲜配制的亲和硅烷溶液中(0.1%MAPS, 1%乙酸, 80%无水乙醇)室温孵育 1h，之后依次用乙醇、纯净水清洗，最后吹干，在室温下可保存数月。亲和硅烷溶液处理载玻片的目的是增加玻璃基片对聚丙烯酰胺凝胶的亲合力。另一部分载玻片用剥离硅烷处理，将剥离硅烷轻轻地涂布于载玻片上，室温下反应 10min，之后依次用乙醇、纯净水清洗，最后吹干备用。

3.2.2.1.2 聚丙烯酰胺凝胶垫的制作

聚丙烯酰胺凝胶的前体溶液包含 5% AAM-BIS (19: 1, w:w), 40% 甘油, 0.002% 亚甲基兰, 0.12% TEMED, 其中亚甲基兰为光引发剂, TEMED 为聚合反应的加速剂[13]。凝胶垫阵列制作的具体过程如下: 先将两个大约 $20\mu\text{m}$ 厚的垫片置于亲和硅烷溶液处理的载玻片两端, 之后将剥离硅烷处理的载玻片置于其上, 这样在两个载玻片之间形成腔室。聚合的前体溶液在毛细管虹吸作用下加入腔室中。最后将具有点阵图案的掩膜加载于腔室上, 两端用夹子固定, 置于紫外灯下曝光 10-20min, 具体操作参见图 3-2。最后, 聚合凝胶垫的载玻片用纯净水清洗, 除去残余的未聚合的单体及引发剂, 得到聚丙烯酰胺凝胶垫阵列 ($100\times 100\times 20\mu\text{m}$)。固定有凝胶垫的载玻片保存于 4°C 。

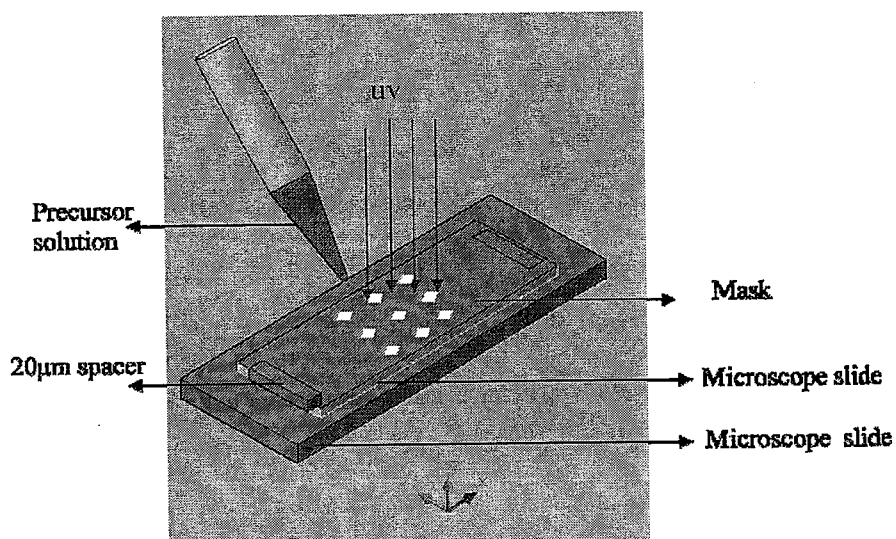


图 3-2 聚丙烯酰胺凝胶垫的制作示意图。

Figure 3-2 Schematic illustration of the fabrication process for polyacrylamide gel pads.