

图 2-7 激光诱导荧光芯片分析仪原理图。实线为激发光，虚线为荧光。

Fig.2-7 Illustration of laser induced fluorescence detection system. Solid and dashed lines indicate exciting laser and fluorescence emission, respectively.

芯片结构如图 2-8 所示：凝胶聚合部分的通道长 3 mm，宽约 220 μm ，深约 30 μm ；两侧直通道及电泳通道宽约 80 μm ，深约 30 μm ；两侧各有一组辅助通道，通道宽约 80 μm ，深约 30 μm ，通道间隔约 100 μm 。玻璃芯片的制作方法如下：(1) 以标准的光刻和湿法蚀刻法制作玻璃片通道层结构[29]，在相应位置超声打孔作为储液池；(2) 将其与另一平板玻璃片进行高温封接。

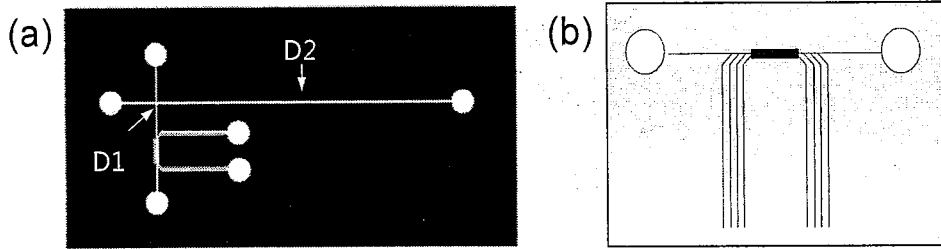


图 2-8 (a) 凝胶微阀芯片示意图；(b) 凝胶微阀结构放大示意图。

Fig.2-8 (a) Schematic illustration of in-site gel valve chip and (b) an exploded view of gel valve.

2.3.1.3 凝胶微阀制作和操控

将凝胶溶液灌入芯片通道中，将掩膜覆盖在芯片表面，保证凝胶通道部分透光，其余部分被黑色掩膜遮盖。于紫外灯下曝光 5 min。在曝光区，凝胶溶液在紫外光引发下原位聚合，形成凝胶。然后从辅助通道将凝胶两侧未反应的液体除去，并灌入电泳缓冲液。

将 DNA 标准片段置于凝胶微阀一侧的储液池中。凝胶微阀两侧不施加电压时，由于凝胶阀的孔隙致密，DNA 片段扩散被限制；在凝胶微阀两侧施加 400 V/cm 电压，DNA 片段在电驱动下可通过凝胶阀进入分析通道进行分离和检测。玻璃芯片使用前采用聚丙烯酰胺涂层法[31]对通道进行处理。进样场强 400 V/cm，分离场强 150 V/cm。

2.3.2 结果与讨论

2.3.2.1 电控凝胶微阀的结构优化

电控凝胶阀的原理是利用丙烯酰胺聚合物在高、低电压下的不同性质实现阀开关状态的切换。Koh 等将这种凝胶阀应用于集成的 PCR 芯片中，完成

了大肠杆菌 O157 和沙门氏菌中核酸的 PCR 扩增及检测[22]。在他的设计中，凝胶微阀与旁路通道同宽，并形成“双 T”结构。这种结构对曝光操作的要求较高：如曝光的凝胶过长，会阻挡旁路通道，缓冲液无法灌注；如曝光的凝胶过短，除去未反应的凝胶溶液后，灌注缓冲液时会形成气泡，阻断电流通路（图 2-9 (a)）。针对这种情况，我们对凝胶微阀的结构进行了优化，采用图 2-8 中的结构。在凝胶微阀两侧各有一组辅助通道，这样即使在曝光时有少量偏差，也至少会有一根辅助通道与直通道形成通路，有利于除去未反应的凝胶溶液和灌注缓冲液。图 2-9 (b) 为改进结构的凝胶微阀实物放大照片。此外，凝胶微阀比旁路通道更宽，有利于凝胶与管壁的牢固接触。

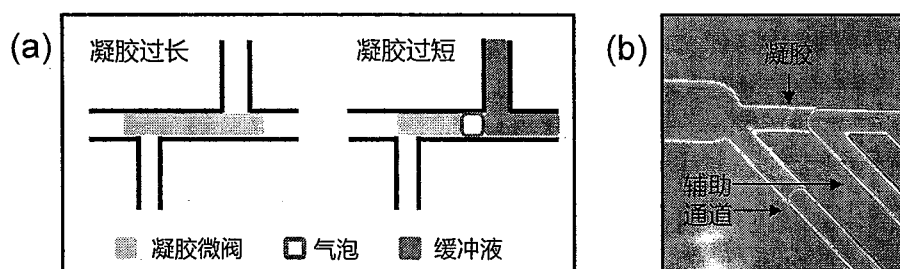


图 2-9 (a) 原有凝胶微阀示意图；(b) 改进的凝胶微阀实物放大照片。

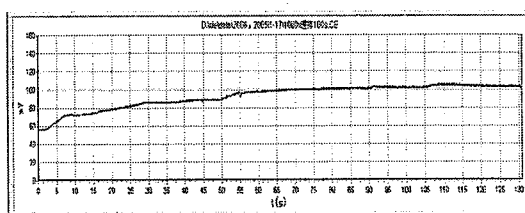
Fig.2-9 (a) Schematic illustration of former gel valve; (b) Photograph of the improved gel valve.

2.3.2.2 电控凝胶微阀的性能考察

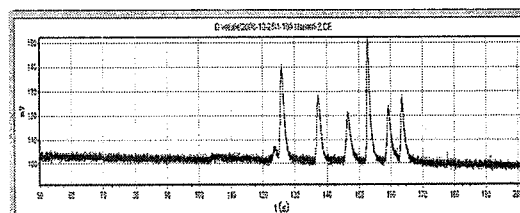
以标准 DNA 片段为分析对象，利用自行设计搭建的集成式微流控芯片分析仪对凝胶微阀进行电压控制和荧光检测。在图 2-8 中 D1 点(十字交叉点)进行检测：凝胶微阀两侧不施加电压时，D1 点无荧光信号；凝胶微阀两侧施加 400 V/cm 的电压，30-70 s 时有信号检出（图 2-10 (a, b)）。这说明无电压

情况下，凝胶空穴密集，通路堵塞；而在高电压下，凝胶空穴张开，通路打开。原位聚合的聚丙烯酰胺凝胶可起到电控微阀的作用。

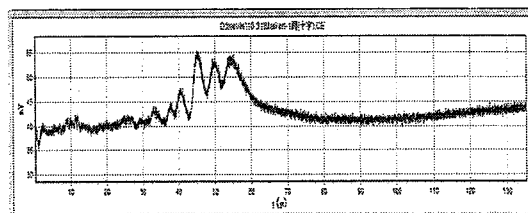
将检测点移至图 2-8 中 D2 点（距十字交叉点 2 cm）进行检测：如进样臂通道上无凝胶阀，可得到图 2-10 (c) 中的谱图；如有凝胶结构，得到图 2-10 (d) 中的谱图，其中只有 100 bp 的片段有尖锐的峰，其余片段的峰较为扁平。结合图 2-10 (a) 可知，这可能是因为聚丙烯酰胺凝胶本身对标准 DNA 片段有一定筛分作用，因此在十字交叉点样品区带已部分分开，进样时会有样品歧视。



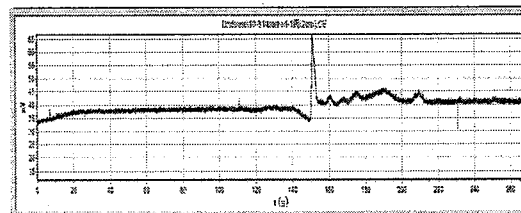
(a) D1点，阀两侧不施加电压



(c) D2点，无凝胶阀



(b) D1点，阀两侧加电压(400 V/cm)



(d) D2点，有凝胶阀

图 2-10 电控凝胶微阀性能考察谱图。

Fig.2-10 Characterization of gel valve.

由此可知聚丙烯酰胺凝胶可起到电控微阀的作用，通过在有、无电压下的不同性质可实现阀开关状态的切换。但凝胶本身对 DNA 片段有一定筛分作用，有可能会引起进样歧视，因此不适于放置于进样通道上。

2.4 芯片泵阀驱动技术 (II): 气动薄膜微泵阀

2.4.1 实验部分

2.4.1.1 材料与试剂

玻璃片购于长沙韶光微电子厂(韶光, 湖南): 一种带有铬和光刻胶涂层, 用来制做芯片通道结构, 另一种没有涂层的抛光玻璃片用作制备 PDMS 膜。Sylgard 184 PDMS 聚合前体及引发剂套装购自美国道康宁公司。三甲基氯硅烷 (TMSCl) 购于上海国药集团化学试剂有限公司。除特别声明外的其它试剂均为分析纯, 所有溶液均由娃哈哈纯净水配制。

2.4.1.2 仪器设备

微阀、微泵驱动系统由计算机、控制板、电磁阀、真空系统和压力系统五部分组成(见图 2-11)。该系统具有一套高压供电系统和两个高压模块, 通过 VB 程序编写的软件进行上位机控制。其程序控制界面如图 2-12 所示, 可以进行二进制数与十六进制数的转换, 并对每一步对应的动作、时间以及循环数分别进行控制。该程序可以进行多个步骤的设置, 完成复杂的泵阀操作。计算机下传指令给控制板; 控制板接受上位机指令, 输出信号控制 16 个独立的电磁阀; 电磁阀在控制板输出信号的控制下, 接通真空系统(此时电磁阀输出负压)或接通压力系统(此时电磁阀输出为正压), 从而控制芯片上微阀的开/关。

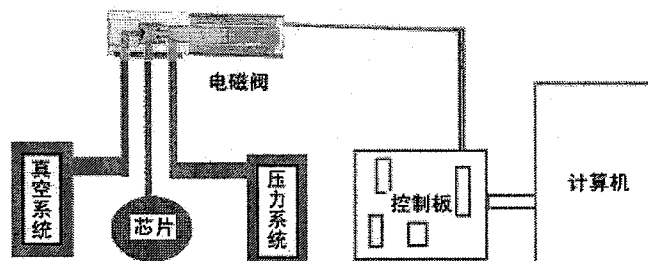


图 2-11 微阀、微泵程控系统原理图。

Fig.2-11 Schematic diagram of microvalve/pump system.

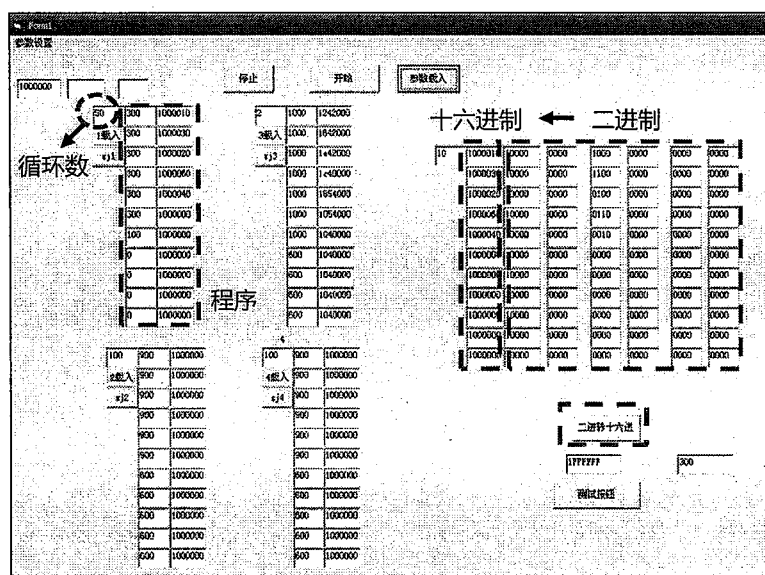


图 2-12 泵阀控制软件程序界面图。

Fig.2-12 Parameter window of the software.

2.4.1.3 芯片设计和制作

如图 2-13 所示,微泵阀芯片采用三层玻璃-PDMS-玻璃杂合的夹心结构,由上到下依次为液路控制层(玻璃)、PDMS 膜和气路控制层(玻璃)。液路控制层的下表面刻蚀有流体运输通道; PDMS 膜夹于气路控制层和液路控制

层之间，起到触发泵阀的作用；气路控制层的上表面刻蚀有气室及通道结构用以控制薄膜微阀进行流体操纵。

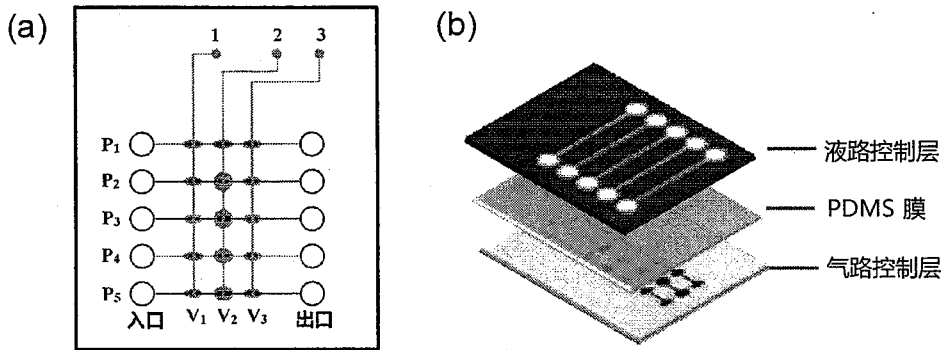


图 2-13 微泵阀芯片。(a) 平面设计图；(b) 结构展开图。

Fig.2-13 Microvalve/pump microchip. (a) Design; (b) Exploded view.

微泵阀芯片的制作方法如下：(1) 玻璃材质的气路控制层和液路控制层上的通道结构采用标准的光刻和湿法蚀刻法制作[29]。液路控制层通道宽 $120\ \mu\text{m}$ ，深 $25\ \mu\text{m}$ ，在相应位置超声打孔构成芯片储液池（直径 $3\ \text{mm}$ ）；气路控制通道宽 $160\ \mu\text{m}$ ，深 $70\ \mu\text{m}$ ，在相应位置超声打孔构成与控制装置的接口（直径 $1\ \text{mm}$ ）。(2) 将 Sylgard 184 PDMS 聚合前体及引发剂按 10:1 比例充分混合均匀，真空脱气，浇注于两片硅烷化处理过的抛光玻璃片之间，然后水平放置，在 $80\ ^\circ\text{C}$ 烘箱中加热固化 1 小时，形成厚约 $160\ \mu\text{m}$ 的 PDMS 弹性膜；(3) 将 PDMS 薄膜置于上下两层玻璃中间，将上下通道相应位置对准，水平放置，在 $80\ ^\circ\text{C}$ 烘箱中加热封接 1 小时，形成可逆封接的夹心芯片。

2.4.1.4 气动薄膜微泵阀操控

液路控制层入口端的储液池注满水，出口端的储液池放空。它们之间的输入阀、隔膜阀和输出阀 (V_1 , V_2 , V_3) 依次排列形成一个隔膜泵，通过三

个阀的程序开/关可实现流体的输运[25]。当气路接通压力系统，PDMS膜在正压下与阀座封闭，流体被隔断，定义此时阀的关闭状态为“0”；当气路接通真空系统，PDMS膜在负压下与阀座分离，流体可从缝隙间流过，定义此时阀的开启状态为“1”。用3位的二进制数对应每个操作步骤中三个微阀 V_1 ， V_2 ， V_3 的状态，按照下列程序操作：100，110，010，011，001，000，000，即可将入口端的液体泵入出口端。薄膜阀上施加的正压和负压分别为20 kPa和-90 kPa。

2.4.2 结果与讨论

2.4.2.1 气动薄膜微泵阀结构设计

输入阀、隔膜阀和输出阀(V_1 ， V_2 ， V_3)依次排列可以形成一个气动微泵，通过三个阀的程序开/关可实现流体的输运。设计了5种结构的气动微泵(图2-13， P_1 - P_5)，它们之间的主要区别在于隔膜阀(V_2)的气室形状和大小，以及阀座的大小，具体情况列于表2-1。

表 2-1 具有不同隔膜阀结构的气动微泵

Table 2-1 Diaphragm pumps with different diaphragm valve dimensions

微泵编号	隔膜阀结构	
	气室结构 (mm)	阀座尺寸 (mm)
P_1	椭圆, $a=1, b=0.45$	小, 0.22*0.4
P_2	圆形, $a=1, b=1$	小, 0.22*0.4
P_3	圆形, $a=1, b=1$	大, 0.53*0.5
P_4	椭圆, $a=1, b=0.75$	小, 0.22*0.4
P_5	椭圆, $a=1, b=0.75$	大, 0.53*0.5

注： a ， b 分别为气室长轴和短轴的半径

2.4.2.2 气动薄膜微泵阀性能考察

如图 2-13 所示,共 15 个气动薄膜微阀构成 5 种结构的气动微泵(P_1 - P_5)。它们的气路控制通道彼此联通,共同通过气路接口(1, 2, 3)与外部泵阀控制装置连接,因此可保证泵阀的操作是在相同的正/负压力和触发时间下完成的。考察了 5 种结构的气动微泵在相同时间段内(90 s),不同触发时间下的泵流量(表 2-2)。微泵的操作程序为:100, 110, 010, 011, 001, 000, 000(最后一步触发时间为 100 ms)。薄膜阀上施加的正压和负压分别为 20 kPa 和 -90 kPa。

表 2-2 不同触发时间下的气动微泵流量考察

Table 2-2 Variation of pumping volume with diaphragm pump dimensions and diaphragm actuation time

微泵编号	微阀触发时间 (ms)			
	300	500	700	1000
泵流量(μL)				
P_1	4.2	2.8	2.2	1.2
P_2	12.3	8.4	6.8	4.2
P_3	12.4	8.5	6.1	4.2
P_4	10.2	7.0	5.0	3.0
P_5	9.5	5.9	5.0	3.4

注:操作时间 90 s,微阀上施加的正压和负压分别为 20 kPa 和 -90 kPa。

由表 2-2 中可以看出:(1)在相同时间内,随着触发时间的增长,泵的操作循环次数减少,因此泵的流量呈下降趋势;(2) P_1 、 P_2 、 P_4 具有同样的阀座结构,在相同触发时间下,泵流量: $P_2 > P_4 > P_1$,这与它们的气室大小呈同样的趋势,说明较大的气室每次能够泵出更多的流体;(2) P_2 和 P_3 , 以及 P_4 和 P_5 分别具有相同的气室结构,在相同触发时间下,它们的泵流量没有

明显差异,说明在一定的气室与阀座比例范围内,阀座结构大小对泵流量无显著影响。以上结论可以为集成芯片中的微泵阀设计提供有益的参考。测定不同结构的气动微泵在不同触发条件下的泵流量,可以将气动微泵应用于流体运输及样品的定量稀释混合。

2.5 芯片分离/检测技术

2.5.1 实验部分

2.5.1.1 材料与试剂

羟丙甲基纤维素(HPMC,黏度为50 cps和4000 cps)购自Sigma公司(St. Louis, MO)。聚乙烯吡咯烷酮(PVP, Mw 1,300,000)购自美国Acros公司。甘露醇购自加拿大Bio Basic公司。三羟甲基氨基甲烷(Tris)、乙二胺四乙酸(EDTA)、硼酸购自沈阳化学试剂厂。GeneFinderTM 嵌入式双链DNA荧光染料购自厦门百维信公司。DNA扩增模板、引物、*Ex-Taq* DNA聚合酶及其他PCR试剂购自大连宝生物公司。标准DNA片段(100-bp ladder, 100 bp-600 bp, 6个片段)购自北京天根生化科技有限公司。玻璃片购于长沙韶光微电子厂(韶光,湖南)。Sylgard 184 PDMS聚合前体及引发剂套装购自美国道康宁公司。除特别声明外的其它试剂均为分析纯,所有溶液均由娃哈哈纯净水配制。

100 bp 标准 DNA 片段溶液: 以娃哈哈纯净水稀释 10 倍。

1×TBE 缓冲液: 100mM Tris, 100mM 硼酸, 2mM EDTA, pH8.3

1# 电泳缓冲液(B1): 1×TBE 缓冲液+2% HPMC-50 cps

2# 电泳缓冲液(B2): 1×TBE 缓冲液+0.5% HPMC-4000 cps

3# 电泳缓冲液(B3): 1×TBE 缓冲液+2% HPMC-50 cps+0.1% PVP+6%甘

露醇

4# 电泳缓冲液(B4): 1×TBE 缓冲液+0.5% HPMC-4000 cps+0.1% PVP +6% 葡萄糖

5# 电泳缓冲液(B5): 1×TBE 缓冲液+0.5% HPMC-4000 cps+0.1% PVP+6% 甘露醇

所有电泳缓冲液中均加入 1 μM GeneFinderTM 嵌入式荧光染料。

2.5.1.2 仪器和芯片

自制集成式微流控芯片分析仪用于电压控制和激光诱导荧光检测, 该仪器采用 473 nm 半导体泵浦固体激光器。核酸扩增在商品化热循环仪 GeneAmpTM 2700 (ABI 公司) 上进行。

玻璃-PDMS 杂合芯片和玻璃芯片均采用“十字”构架, 进样池、缓冲液池、样品废液池到十字交叉点长均为 5 mm, 芯片的分离通道长度为 45 mm, 储液池直径为 3 mm。自制玻璃-PDMS 杂合芯片结构如图 2-14 所示, 采用“三明治”夹心结构, 由上到下依次为玻璃、PDMS 膜和玻璃; 通道宽约 90 μm , 深约 25 μm 。

玻璃-PDMS 杂合芯片制作方法与气动微泵阀芯片类似, 不同的是下层为清洁的抛光平板玻璃, 详情参见 2.4.1.3。玻璃芯片以常规光刻/化学刻蚀方法制作[29]。

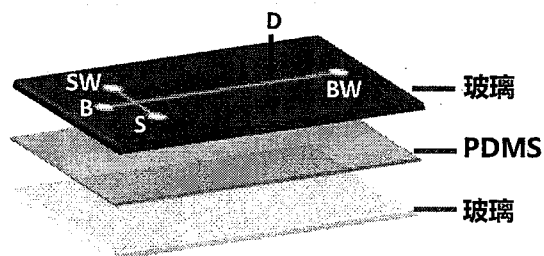


图 2-14 玻璃-PDMS 芯片结构示意图。

Fig.2-14 Layout of glass-PDMS microchip .

2.5.1.3 芯片电泳分离检测

在集成式微流控芯片分析仪上对核酸样品进行芯片电泳，检测点距离十字交叉口 3 cm。进样场强 450 V/cm (35 s)，分离场强 280 V/cm (分离过程中样品池和样品废液池均施加 250 V 的抑制电压)。微流控芯片在使用前依次用娃哈哈纯净水、1×TBE 缓冲液和电泳缓冲液冲洗，然后灌注新鲜电泳缓冲液，同时将样品加入样品池中，保持各池中液面高度一致。电泳完毕后，吸出各池中液体，然后用娃哈哈纯净水冲洗通道约 5 min。

2.5.2 结果与讨论

2.5.2.1 玻璃-PDMS 杂合芯片的优点

传统的全玻璃芯片经洗涤、处理后可以重复利用，但其制备需马弗炉长时间高温封接，对设备要求高，且耗时较长。PDMS 芯片虽制备简便，但由于其吸附性较强，容易污染，通常无法长期重复利用。本实验中采用的玻璃-PDMS 夹心芯片，封接只需要在烘箱中即可实现，设备成本相对较低，且耗时较短。因采用可逆方法封接，其中的玻璃片经洗涤、处理后可以重复利用，而且中间的 PDMS 薄膜也可以方便地更换，从而能够实现芯片的快速、低成本制备。此外，这种构架的芯片易于集成薄膜微泵阀，有利于芯片系统的多功能集成。

2.5.2.2 玻璃-PDMS 杂合芯片核酸分离体系动态改性考察

以 100-bp DNA 标准片段为对象，考察玻璃-PDMS 芯片上核酸分离体系的动态改性效果。

筛分体系考察：2%的 HPMC-50 cps 和 0.5%的 HPMC-4000 cps 是核酸分离中常用的两种筛分体系，分别对其进行考察，结果见图 2-15。由图可见，2%的 HPMC-50 cps (B1) 对小于 200 bp 的片段筛分能力较好，而对大于 300

bp 的片段不能实现基线分离。0.5%的 HPMC-4000 cps (B2) 筛分效果要明显优于 B1。此外,较大浓度的筛分介质有较大的粘度,会给操作带来不便。因此选择 0.5%的 HPMC-4000 cps 作为筛分介质。

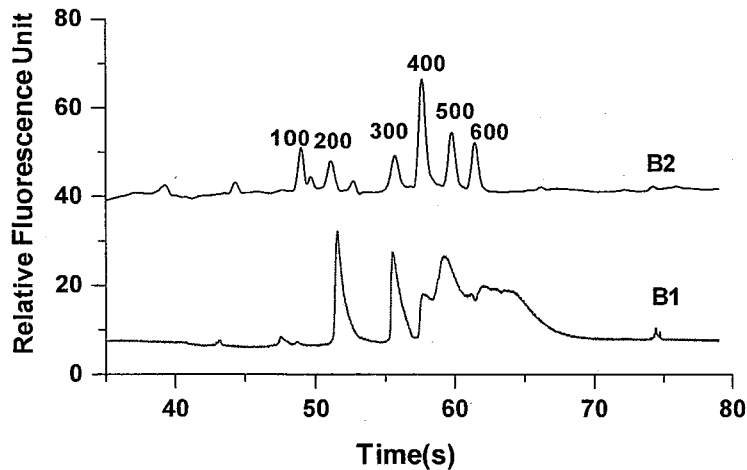


图 2-15 玻璃-PDMS 微流控芯片上不同筛分介质分离条件下标准 DNA 片段的电泳谱图。(B1: 2% HPMC-50cps; B2: 0.5% HPMC-4000 cps)

Fig.2-15 Electropherograms of DNA marker in different sieving matrices on glass-PDMS microchip. (B1: 2% HPMC-50cps; B2: 0.5% HPMC-4000 cps)

改性剂考察:在以 0.5%的 HPMC-4000 cps 作为筛分介质的基础上,设计了三种分离体系 (B2, B4, B5),其中 B2 中无改性剂, B4 中添加了 PVP 和葡萄糖, B5 中添加了 PVP 和甘露醇。由图 2-16 可知,无改性剂情况下(B2),由于 PDMS 和玻璃的强烈吸附, DNA 片段的峰高峰面积明显低于有改性剂的情况。B4, B5 中加入了 PVP,能够动态涂渍通道内壁,有效地抑制吸附,降低电渗流[14]。在 TBE 缓冲液中加入多羟基化合物,其羟基能与缓冲液中的硼酸生成络合物,从而在低聚合物浓度下形成网络,可调节高分子溶液的筛分特性[15]。以图 2-16 中 300 bp 和 400 bp 的两个峰为考察对象, B2、B4、

B5 条件下两峰的分离度分别为 0.95, 1.64 和 2.49。说明在玻璃-PDMS 芯片核酸分离体系中, 改性剂的加入能够明显改善分离效果, 且在相同添加比例下, 甘露醇的改性效果要优于葡萄糖。这可能是因为在相同质量下, 甘露醇能够比葡萄糖提供更多的羟基与硼酸络合造成的。基于上述考察, 最终选定 5#电泳缓冲液 (B5: 1×TBE 缓冲液+0.5%HPMC-4000 cps+0.1% PVP+6%甘露醇) 作为玻璃-PDMS 芯片的核酸动态改性分离体系。

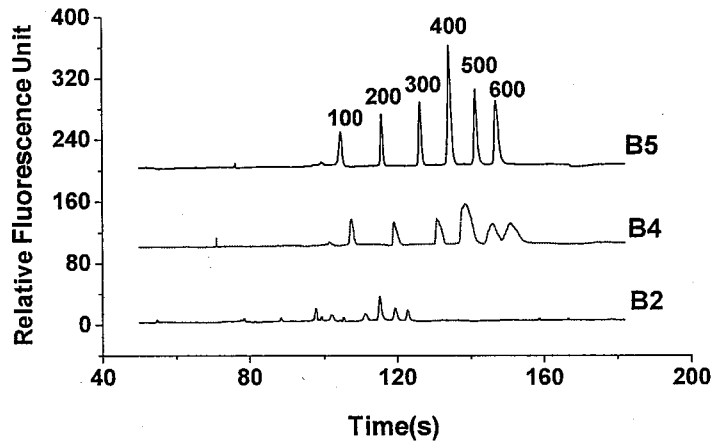


图 2-16 玻璃-PDMS 微流控芯片上不同改性剂分离条件下标准 DNA 片段的电泳谱图 (B2: 无改性剂; B4: 0.1% PVP +6% 葡萄糖; B5: 0.1% PVP+6% 甘露醇)

Fig.2-16 Electropherograms of DNA marker with different modifiers on glass-PDMS microchip (B2: No modifier; B4: 0.1% PVP +6% glucose; B5: 0.1% PVP+6% mannitol)

2.5.2.3 玻璃芯片核酸分离体系动态改性考察

玻璃是使用较为普遍的一种芯片材料。目前最为常用的玻璃芯片改性方法主要是聚丙烯酰胺静态涂层[31], 该方法可有效改善玻璃芯片的分离效率,

且改性效果可长时间维持。该方法的缺点是过程较为繁琐，且耗时较长。我们希望发展一种适合于玻璃芯片的简便易行的动态改性方法，并将其应用于核酸分离体系。

如图 2-17 所示，考察了 5 种分离体系在玻璃芯片上对标准 DNA 片段的分离效果。B1 和 B2 中无改性剂加入，由于玻璃的吸附作用，DNA 片段的峰高峰面积明显低于有改性剂的情况 (B3-B5)，这就意味着检测灵敏度的大大降低。此外，在有效分离长度内，B1 和 B2 未能将大的 DNA 片段完全基线分离。B3、B4 和 B5 中均加入了改性剂，因此有效抑制了吸附，分离能力得到明显改善。B3 由于采用了 2% 的 HPMC-50 cps 的筛分介质，粘度较大，因此出峰时间明显晚于 B4 和 B5，且谱峰有一定的展宽。B4 和 B5 在 0.5% HPMC-4000 cps 中添加了 PVP 和葡萄糖或甘露醇，出峰快速且尖锐，证明动态改性效果良好。两者的分离能力相近，在改性效果上葡萄糖和甘露醇未体现出在玻璃-PDMS 芯片上那样明显的差异。

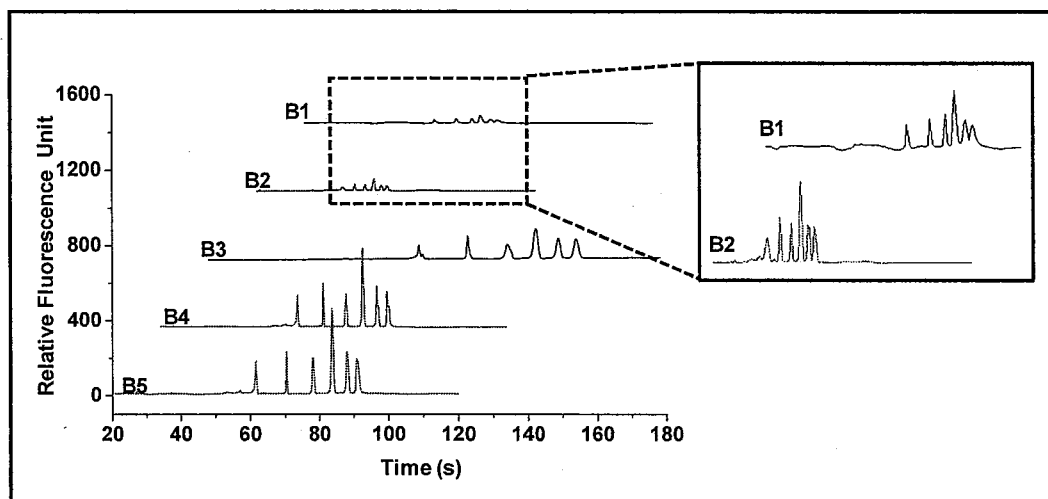


图 2-17 玻璃芯片上不同分离体系下标准 DNA 片段的电泳谱图。

Fig.2-17 Electrophoregrams of DNA marker with different separation systems on glass microchip.

2.6 小结

对微流控芯片核酸反应分析系统相关的反应温控技术、泵阀驱动技术以及分离检测技术进行了研究。设计了一种集成的温控反应芯片，简化了控温元件的制作过程，可对反应体系实现准确且精确的控温，成功用于 DNA 酶切反应。分别设计并制作了集成有电控凝胶微阀和气动薄膜微阀的芯片，经过性能考察和比较，确认电控凝胶微阀在进样中存在电歧视现象，气动薄膜微泵/阀更适合作为反应和分析区域间的连接单元。从 5 种分离体系中筛选出适合玻璃-PDMS 杂合芯片及玻璃芯片的体系，证明向筛分介质中添加 PVP 和甘露醇的动态改性方法可被应用于核酸快速有效分离。

参考文献

- [1] 林炳承, 秦建华, 图解微流控芯片实验室. 2008, 北京: 科学出版社.
- [2] Long, Z. C., Liu, D. Y., Ye, N. N., Qin, J. H., Lin, B. C., Integration of nanoporous membranes for sample filtration/preconcentration in microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 2006, 27(24): 4927-4934.
- [3] Liu, C. N., Toriello, N. M., Mathies, R. A., Multichannel PCR-CE microdevice for genetic analysis. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(15): 5474-5479.
- [4] Liu, P., Seo, T. S., Beyor, N., Shin, K. J., Scherer, J. R., Mathies, R. A., Integrated portable polymerase chain reaction-capillary electrophoresis microsystem for rapid forensic short tandem repeat typing. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(5): 1881-1889.
- [5] Liu, J., Williams, B. A., Gwartz, R. M., Wold, B. J., Quake, S., Enhanced

- signals and fast nucleic acid hybridization by microfluidic chaotic mixing. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, 45(22): 3618-3623.
- [6] Chung, Y.-C., Lin, Y.-C., Chueh, C.-D., Ye, C.-Y., Lai, L.-W., Zhao, Q., Microfluidic chip of fast DNA hybridization using denaturing and motion of nucleic acids. *Electrophoresis*, 2008, 29(9): 1859-1865.
- [7] Xiao, Y., Yu, X. D., Xu, J. J., Chen, H. Y., Bulk modification of PDMS microchips by an amphiphilic copolymer. *Electrophoresis*, 2007, 28: 3302-3307.
- [8] Zhou, Z. M., Liu, D. Y., Zhong, R. T., Dai, Z. P., Wu, D. P., Wang, H., Du, Y. G., Xia, Z. N., Zhang, L. P., Mei, X. D., Lin, B. C., Determination of SARS-coronavirus by a microfluidic chip system. *Electrophoresis*, 2004, 25(17): 3032-3039.
- [9] Szantai, E., Guttman, A., Genotyping with microfluidic devices. *Electrophoresis*, 2006, 27(24): 4896-4903.
- [10] Horsman, K. M., Bienvenue, J. M., Blasier, K. R., Landers, J. P., Forensic DNA analysis on microfluidic devices: a review. *Journal of Forensic Science*, 2007, 52(4): 784-799.
- [11] Oda, R. P., Strausbauch, M. A., Huhmer, A. F. R., Borson, N., Jurrens, S. R., Craighead, J., Wettstein, P. J., Eckloff, B., Kline, B., Landers, J. P., Infrared-mediated thermocycling for ultrafast polymerase chain reaction amplification of DNA. *Analytical Chemistry*, 1998, 70(20): 4361-4368.
- [12] Giordano, B. C., Ferrance, J., Swedberg, S., Huhmer, A. F. R., Landers, J. P., Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA amplification in less than 240 seconds. *Analytical Biochemistry*, 2001, 291(1): 124-132.

- [13] Roper, M. G., Easley, C. J., Legendre, L. A., Humphrey, J. A. C., Landers, J. P., Infrared temperature control system for a completely noncontact polymerase chain reaction in microfluidic chips. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(4): 1294-1300.
- [14] Slyadnev, M. N., Tanaka, Y., Tokeshi, M., Kitamori, T., Photothermal temperature control of a chemical reaction on a microchip using an infrared diode laser. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(16): 4037-4044.
- [15] Orrling, K., Nilsson, P., Gullbergh, M., Larhed, M., An efficient method to perform milliliter-scale PCR utilizing highly controlled microwave thermocycling. *Chemical Communications*, 2004(7): 790-791.
- [16] Park, N., Kim, S., Hahn, J. H., Cylindrical compact thermal-cycling device for continuous-flow polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(21): 6029-6033.
- [17] Chen, J. F., Wabuyele, M., Chen, H. W., Patterson, D., Hupert, M., Shadpour, H., Nikitopoulos, D., Soper, S. A., Electrokinetically synchronized polymerase chain reaction microchip fabricated in polycarbonate. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(2): 658-666.
- [18] Woolley, A. T., Hadley, D., Landre, P., deMello, A. J., Mathies, R. A., Northrup, M. A., Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Analytical Chemistry*, 1996, 68(23): 4081-4086.
- [19] Bu, M. Q., Tracy, M., Ensell, G., Wilkinson, J. S., Evans, A. G. R., Design and theoretical evaluation of a novel microfluidic device to be used for PCR. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2003, 13(4):

- S125-S130.
- [20] Liu, J., Enzelberger, M., Quake, S., A nanoliter rotary device for polymerase chain reaction. *Electrophoresis*, 2002, 23(10): 1531-1536.
- [21] Toriello, N. M., Liu, C. N., Mathies, R. A., Multichannel reverse transcription-polymerase chain reaction microdevice for rapid gene expression and biomarker analysis. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(23): 7997-8003.
- [22] Koh, C. G., Tan, W., Zhao, M. Q., Ricco, A. J., Fan, Z. H., Integrating polymerase chain reaction, valving, and electrophoresis in a plastic device for bacterial detection. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(17): 4591-4598.
- [23] Unger, M. A., Chou, H. P., Thorsen, T., Scherer, A., Quake, S. R., Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 2000, 288(5463): 113-116.
- [24] Thorsen, T., Maerkl, S. J., Quake, S. R., Microfluidic large-scale integration. *Science*, 2002, 298(5593): 580-584.
- [25] Grover, W. H., Skelley, A. M., Liu, C. N., Lagally, E. T., Mathies, R. A., Monolithic membrane valves and diaphragm pumps for practical large-scale integration into glass microfluidic devices. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2003, 89(3): 315-323.
- [26] Karlinsey, J. M., Monahan, J., Marchiarullo, D. J., Ferrance, J. P., Landers, J. P., Pressure injection on a valved microdevice for electrophoretic analysis of submicroliter samples. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(11): 3637-3643.
- [27] Li, B. W., Jiang, L., Wang, Q., Oin, J. H., Lin, B. C., Micropumps actuated

- negative pressure injection for microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 2008, 29(24): 4906-4913.
- [28] Belder, D., Ludwig, M., Surface modification in microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 2003, 24(21): 3595-3606.
- [29] Woolley, A. T., Mathies, R. A., Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(24): 11348-11352.
- [30] Lagally, E. T., Emrich, C. A., Mathies, R. A., Fully integrated PCR-capillary electrophoresis microsystem for DNA analysis. *Lab on a Chip*, 2001, 1(2): 102-107.
- [31] Hjerten, S., High-performance electrophoresis - elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *Journal of Chromatography*, 1985, 347(2): 191-198.

第三章 微流控芯片核酸反应分析系统的应用 (I):

等腰三角形识别相关的 DNA 计算与存储

3.1 引言

DNA 计算是一种以 DNA 分子和相关生物酶为载体, 借助分子生物技术进行计算的新方法。其基本原理是以 DNA 分子中的基因编码作为存储数据, 利用 DNA 分子的各种生化反应完成计算[1]。自 1994 年其概念被 Adleman 等人提出[1], DNA 计算已吸引了不同学科、不同领域, 尤其是计算机、生物、数学、化学以及信息领域的科学家的关注, 不断在理论和技术两个层面得到完善。DNA 计算早期的工作主要集中于理论的建立, 提出新的计算方法以解决不同的问题。目前大多数 DNA 计算基于两种计算模型: 粘贴模型 (sticker model) 和剪接模型 (splicing model)。粘贴模型通过 DNA 杂交反应进行计算, 可用于解决 Hamilton 路径问题[1], 可满足性问题 (SAT) [2-4], 最大圈问题[5, 6]及顶点着色问题[7]。剪接模型结合了 DNA 的编码能力和各种核酸酶的运算能力, 通过 DNA 酶切酶连反应实现计算, 主要用于可程序自动机的运算[8] 以及基于此原理的医学诊断和治疗[9], 具有重要意义。无论对于传统的电子计算机还是 DNA 计算机, 存储器都是不可或缺的组成部分。缺乏存储功能的 DNA 计算机, 难以将计算结果实时记录存储下来, 这将成为影响该领域发展的瓶颈之一。部分学者已做出尝试解决这个问题[10]。

另一方面, 部分研究者致力于 DNA 计算平台的建设。他们将金表面[3, 11, 12], 聚丙烯酰胺凝胶模块[4], 尤其是微流控芯片[13-15]引入 DNA 计算的研究当中, 以取代最初的试管操作[2, 16]。微流控芯片技术能够将不同的操作

单元灵活组合、规模集成[17], 具有试剂用量少, 分析时间短, 灵敏度高的优点。这使其有可能取代试管或表面操作, 为构建严格意义上的 DNA 计算机提供理想的平台。有关微流控芯片 DNA 计算机的研究工作尚处于起步阶段, 最具代表性的工作是在芯片上构建选择性转移模块[18-20]以及求解满足性问题[14], 这些工作大都基于粘贴模型的原理。在微流控芯片上的基于剪接模型的研究还未见报道。

本章的研究目的是利用微流控芯片平台上的核酸酶反应及分析技术进行基于剪接模型的 DNA 计算和存储。我们提出了基于微流控芯片平台的有限状态自动机的基本构想, 利用一个 2 符号-3 状态的有限状态自动机模型进行等腰三角形识别, 同时用该模型证实了生物存储器的可行性和必要性。在微流控芯片上完成了与 DNA 计算和存储相关的酶切、酶连反应及产物检测, 初步实现输入、输出、计算、控制, 以及存储功能。存储功能的实现和微流控技术的引入将有助于构建真正意义上的实用的 DNA 计算机。

3.2 实验部分

3.2.1 材料与试剂

合成输入分子, 转移分子及报告分子的 DNA 单链和 PCR 引物购自上海博亚公司。限制性内切酶 *FokI* 和 T4 连接酶及其相关试剂购自大连宝生物公司。*Taq* 聚合酶及其他 PCR 相关试剂购自 Promega 公司。三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、硼酸购自沈阳化学试剂厂。羟丙甲基纤维素 (Hydroxypropylmethyl cellulose, HPMC, 2 %水溶液黏度为 50 cp) 购自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。HPMC 称重后溶于 1×TBE 缓冲液 (89 mM Tris, 89 mM 硼酸, 2mM EDTA, pH 8.3)。缓冲液中加入 1 μ mol/L SYTOX

(Molecular Probes, Eugene, OR, 吸收波长: 547 nm, 发射波长: 570 nm) 作为嵌入式 DNA 标记染料。100bp DNA 标准片段购自大连宝生物 (100-2000bp, 共有 11 个片段)。除特别声明外的其它试剂均为分析纯, 所有溶液均由灭菌双蒸水配制。

3.2.2 设备和芯片

商品化热循环仪 GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Singapore) 作为芯片 DNA 酶切、酶连反应以及 PCR 反应的温控装置。

芯片电泳及检测采用自行设计和研制的激光诱导荧光微流控芯片电泳分析仪。该仪器由芯片电泳平台、光学检测系统、CCD 监测、高压电源控制和操作软件组成, 检测方式为共聚焦激光诱导荧光。激光器发出发射波长为 532 nm。具体详情参见文献[21]。

DNA 酶切、酶连反应在玻璃芯片储液池 (直径 3 mm) 中进行, 反应产物的检测由芯片电泳完成。

3.2.3 微流控芯片 DNA 计算平台

微流控芯片 DNA 计算平台主要包括微流控芯片工作站、微流控芯片以及用以完成各种生化反应的试剂盒。微流控芯片工作站 (激光诱导荧光微流控芯片电泳分析仪) 由电源、控制装置和输出装置组成, 具有芯片能源供应和信号收集功能, 并兼管 DNA 计算机的控制。芯片是整个计算平台的核心, 计算功能和存储功能均在芯片上完成。微流控芯片 DNA 计算平台包括输入、计算、输出、存储和控制五个单元。各种 DNA 分子和生化反应试剂完成信息的输入。在计算单元中利用酶切、酶连、PCR 等生化反应完成 DNA 计算, 以芯片电泳对计算结果进行实时、快速、准确的检测。检测的结果反馈给控制单元, 进而控制存储单元进行一系列生化反应以实现生物存储。最终由微

流控芯片工作站读取 DNA 分子中的信息，实现输出。

3.2.4 DNA 合成

互补的 DNA 单链分别稀释至 20 mM 后进行混合，100 °C 孵育 5 min，自然冷却退火。

3.2.5 计算和存储过程中的反应

所有的计算和存储过程通过限制性内切酶 *FokI* 的酶切反应和 T4 连接酶的酶连反应实现。反应前以牛血清白蛋白 (BSA, 10mg/mL) 溶液处理反应池，以抑制池壁对 DNA 和酶的吸附，提高反应效率。反应液置于反应池中，表面覆盖矿物油以防止挥发。在芯片底部涂覆导热硅胶，置于商品化热循环仪中完成反应。

酶切反应条件：将 5 单位 *FokI* 酶和 2 pmol DNA 分子加入 10 μ L 反应缓冲液中，37°C 反应 30 min，65°C 加热 10 min，使酶失去活性。

酶连反应条件：175 单位的 T4 DNA 连接酶、7 pmol 转移分子以及 1 μ L 10 \times T4 DNA 连接酶缓冲液加入酶切反应后的体系当中，在 18 °C 酶连 30 min，65 °C 加热 10 min 使酶失去活性。

PCR 扩增条件：PCR 反应液包括 1 \times PCR 缓冲液，0.2 mM dNTP (脱氧核苷三磷酸) 混合物，0.5 μ M 正、反义引物，75 units/mL *Taq* DNA 聚合酶，20-30 ng/mL 酶连产物模板。所用三温循环程序为：95 °C 预变性 5 min，然后进行 35 个循环，包括 94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 30 s，最后在 72 °C 延伸 7 min。

3.2.6 微流控芯片电泳分离

DNA 筛分介质包括 2% HPMC-50cp，1 \times TBE 缓冲液，及 1 μ M SYTOX

荧光染料。在 400 V/cm 进样场强下进样 30s, 在 130 V/cm 分离场强下进行芯片电泳, 有效分离长度为 3.5 cm。

3.3 结果与讨论

3.3.1 DNA 计算模型构建及相关分子设计

模式识别是计算机科学中的一个概念, 它将识别对象首先数字化, 然后变换为适于计算机处理的数字信息。例如, 在模式识别时, 将三角形各边划分成一些小的线段, 每个线段有相同的长度。这些线段分成水平线、上行斜线和下行斜线等三种类型, 被视为构成三角形的基本单元, 分别用 α , β , γ , 表示。在此基础上把三角形描述成由基元组成的字符串, 如图 3-1 (a) 所示的三角形可以表示为“ $\alpha\alpha\beta\beta\beta\gamma\gamma\gamma$ ”。为简便计, 对三角形三边进行两两比较。分别用含有 a, b 的字符串表示三角形的两边, 通过比较 a, b 的个数, 进行两边长度的比较 (图 3-1 (b))。我们利用一个含有 2 种符号 (a, b), 3 种状态 (S_0 , S_1 , S_2) 的有限状态自动机模型 (图 3-1 (c-e)) 进行等腰三角形识别。

由于自动机中存在循环, 因此可以处理包含有任意个数 a 和 b 的输入字符串。默认 S_0 为初始状态, 如果最终状态为 S_1 或 S_2 , 则 a, b 的个数一定不等。而最终状态为 S_0 时, a, b 的个数可能相等或相差 3 的倍数。这是因为含 3 种状态的自动机中存在循环, 增加“aaa”或“bbb”这样的字符串会回到相同的状态。这样仅从最终状态不能完全比较 a, b 的个数。为区分这两种情况, 我们设计了生物存储器, 记录计算的中间过程。

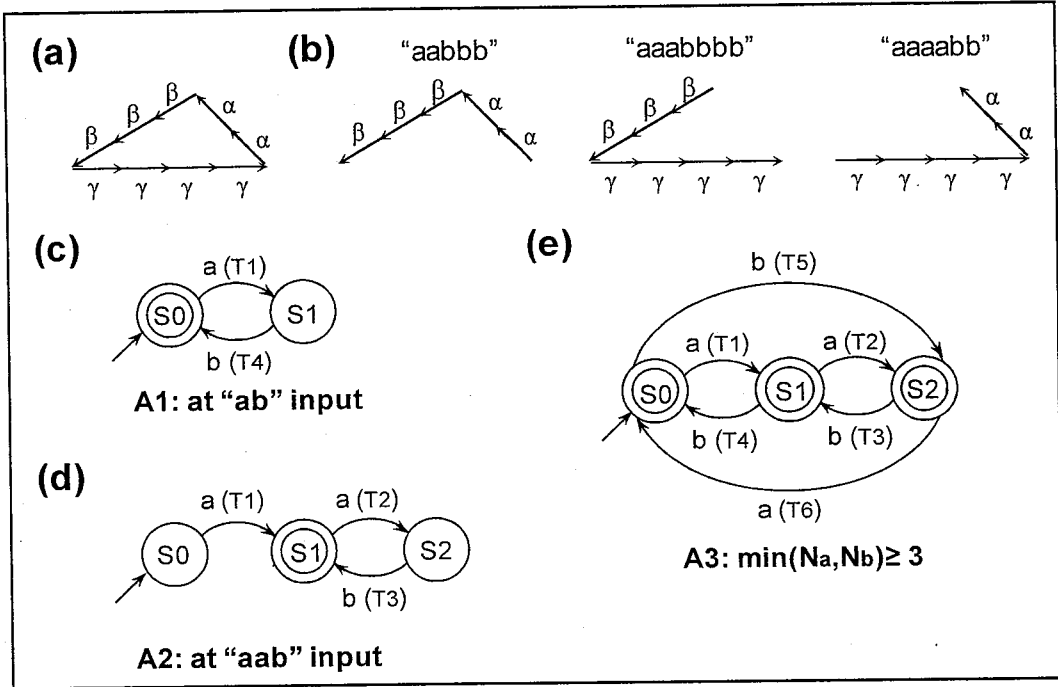


图 3-1 微流控芯片 DNA 计算机中的有限状态自动机模型。(a) 三角形句法结构；(b) 三角形两边比较时对应的自动机符号串；(c) 输入字符串“ab”对应的自动机流程；(d) 输入字符串“aab”对应的自动机流程；(e) 2 符号-3 状态的有限状态自动机模型。

Fig.3-1 Finite automaton in a microfluidic chip DNA computer. (a) A sentence structure for the triangle; (b) Three consecutive comparisons of its two sides and the corresponding symbol strings of the automaton; (c) Diagram representing the automation A1 receiving the inputs of “ab” symbols; (d) Diagram representing the automation A2 receiving the inputs of “aab” symbols; (e) Finite state automata with 2-symbols-3-states.

限制性内切酶 *FokI* 被选作 DNA 计算的工具体酶, 它具有非对称的识别位点 5'-GGATG-3', 并非特异性地剪切识别位点下游 (9, 13) 距离处的 DNA 分子双链 (图 3-2) [22]。图 3-3 (a) 显示了有限状态自动机的 6 种转移分子的结构及对应的状态转移规则, 它们分别对应符号“a”或“b”的操作。图 3-3 (b) 是代表“aabbb”的输入分子。输入分子被 *FokI* 酶切之后生成过渡分子, 其 4 bp 的粘性末端核酸编码包含了符号和状态信息 (图 3-3 (c))。过渡分子在 T4 连接酶的作用下与包含互补粘性末端的转移分子连接, 形成新的 DNA 片段, 编码新的状态。该片段通过 PCR 反应进行扩增, 可增加中间状态分子的数量, 保证计算进行到底。在每步计算中, 6 种转移分子中仅有一种能与特定的过渡分子互补连接, 因此只有一组 PCR 反应有产物生成, 能被芯片电泳检测到。由转移分子的类型可推断该步计算对应的状态和符号。图 3-3 (d) 中的 3 种输出检测分子分别对应 S0, S1, S2 这 3 种最终状态, 输出检测分子与输出分子相连, 生成报告分子, 标志计算完成。

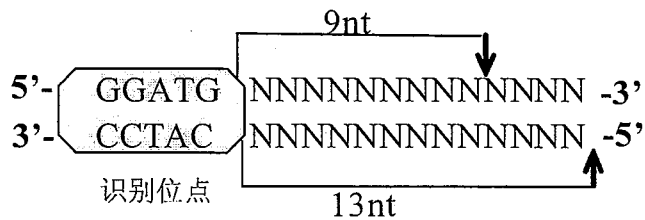


图 3-2 *FokI* 酶切示意图。

Fig.3-2 Schematic of *FokI* digestion.

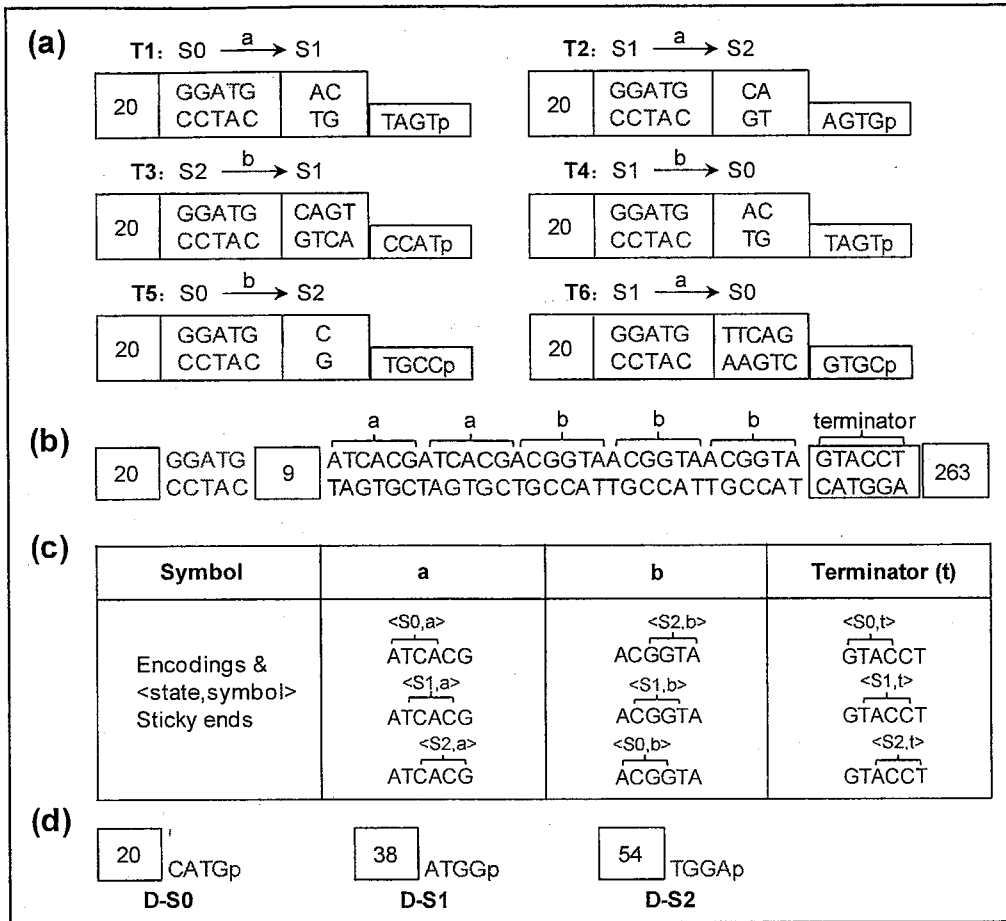


图 3-3 自动机对应的分子设计。(a) 6 种转移分子的结构及对应的状态转移规则；(b) 代表“aabbb”的输入分子结构；(c) 不同状态和符号的组合；(d) 输出检测分子的结构。

Fig.3-3 Molecular design of the automaton. (a) A list of the transition rules and the structure of the transition molecules T1-T6; (b) Structure of an input molecule; (c) The combination of different states and symbols; (d) Structure of the output-detection molecules.

3.3.2 DNA 存储模型构建及相关分子设计

前面已经提及, 由于含 3 种状态的自动机中存在循环, 当最终状态为 S_0 时, a, b 的个数可能相等或相差 3 的倍数, 仅从最终状态不能完全比较 a, b 的个数。为此, 我们设计了生物存储器, 记录计算的中间过程, 以区分不同中间状态的输入分子。

3.3.2.1 分子设计

采用“堆栈”的存储模式。如图 3-4 (a-b) 所示, 设计存储单元分子 A (M_A) 和存储单元分子 B (M_B) 分别对应符号 a 和 b 。将存储单元的最初状态设置为“空”, 即堆栈的底部为空白分子 E' 。存储过程中涉及的各种分子结构显示于图 3-4 (c)。存储单元分子 M_A 和 M_B 的粘性末端均可和空白分子 E' 的粘性末端互补连接。由于新生成的分子中仍含有 *FokI* 的酶切位点, 因此可以再次被 *FokI* 酶剪切。

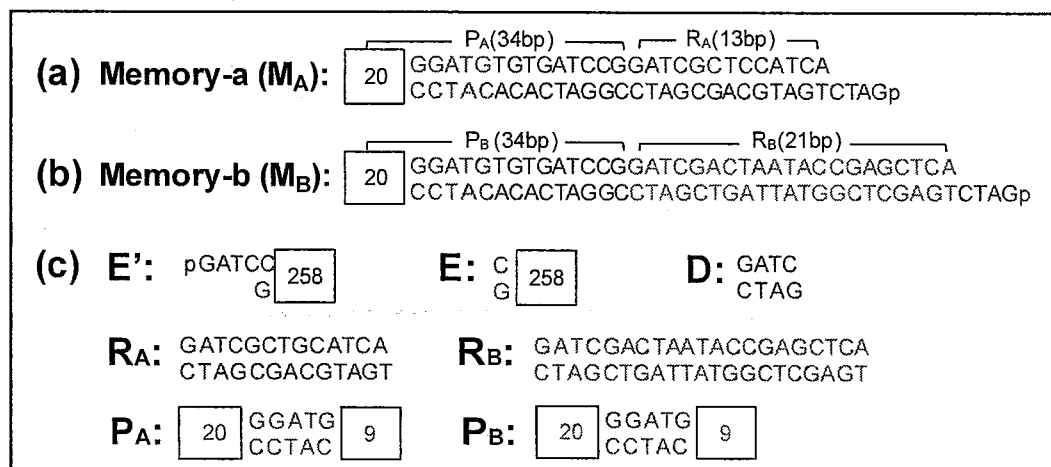


图 3-4 存储相关分子设计。(a)存储单元分子 A (M_A); (b)存储单元分子 B (M_B); (c) 空白分子 E' 及其他相关分子。

Fig.3-4 The designs of relative storing molecules. (a) The design of Memory-a (M_A); (b) The design of Memory-b (M_B); (c) The design of Empty molecule (E'), as well as E , D , R_A , R_B , P_A , and P_B .

3.3.2.2 两栈式存储模式

建立含两个栈的存储模式，两个堆栈分别存储符号“a”和“b”对应的存储单元分子 M_A 和 M_B ，通过两个栈中存储分子的长度，就可以比较 a, b 的个数。具体过程如下：(1) 当转移分子 T_1 , T_2 , T_6 (对应符号“a”)与过渡分子相连，生成代表新的状态的分子时， M_A 被存入第一个堆栈；(2) 当转移分子 T_3 , T_4 , T_5 (对应符号“b”)与过渡分子相连，生成代表新的状态的分子时，第一个堆栈的存储操作结束， M_B 被存入第二个堆栈。(3) 当计算单元中报告分子被检测到，第二个堆栈的存储操作结束。例如，图 3-5 (a) 显示了字符串“aabb”对应的两栈式存储方法。由图 3-4 可知，空白分子 E' 的长度为 263 bp，与 M_A , M_B 连接后，*FokI* 酶将从 M_A , M_B 上分别切下 DNA 片段 P_A 和 P_B (均为 34 bp)，而保留下 R_A 和 R_B (分别为 13 bp 和 21 bp)。通过芯片电泳分别测定两个堆栈中存储分子的长度，由公式 (1) 可计算 M_A 和 M_B 的个数，即 a 和 b 的个数。其中， N_{M_A} 和 N_{M_B} 分别代表 M_A 和 M_B 的个数， L_1 和 L_2 分别代表第一和第二个堆栈中存储分子的长度。

$$\begin{cases} N_{M_A} = \frac{L_1 - 34 - 263}{13} \\ N_{M_B} = \frac{L_2 - 34 - 263}{21} \end{cases} \quad (1)$$

3.3.2.3 一栈式存储模式

两栈式存储模式无法存储 a, b 交叉的字符串, 为此建立了含一个栈的混合存储模式。把 a, b 对应的存储单元分子 M_A 和 M_B 存入同一个栈, 可存储任意字符串 (图 3-5 (b))。

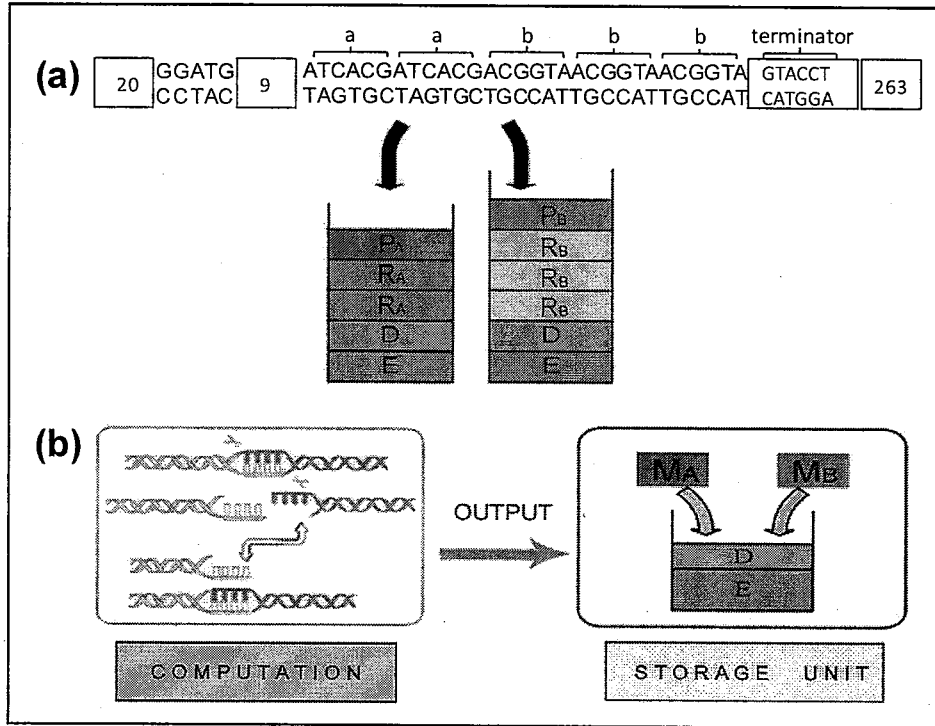


图 3-5 两种存储模式。(a) 两栈式存储模式存储“aabb”; (b) 一栈式混合存储模式。酶切、酶连反应完成计算功能, 根据结果, M_A 和 M_B 存入同一个栈。

Fig.3-5 Two different storing models. (a) A two-stack storing model for the “aabb” storage, in which M_A and M_B were stored separately in two stacks. (b) A single-stack storing model. The enzymatic digestion and ligation will perform the function of computation. According to the results, M_A or M_B was stored into the stack.

以图 3-6 为例, 说明 DNA 计算以及相应的混合存储过程。图中输入分子进行自动机计算时所用的转移分子分别为 T1, T2 和 T3, 它们分别对应符号 a, a 和 b。将 M_A , M_A 和 M_B 依次存入堆栈中, 生成 $P_A R_A D_E$, $P_A R_A R_A D E$ 和 $P_B R_B R_A R_A D E$, 完成字符串“aab”对应的存储。

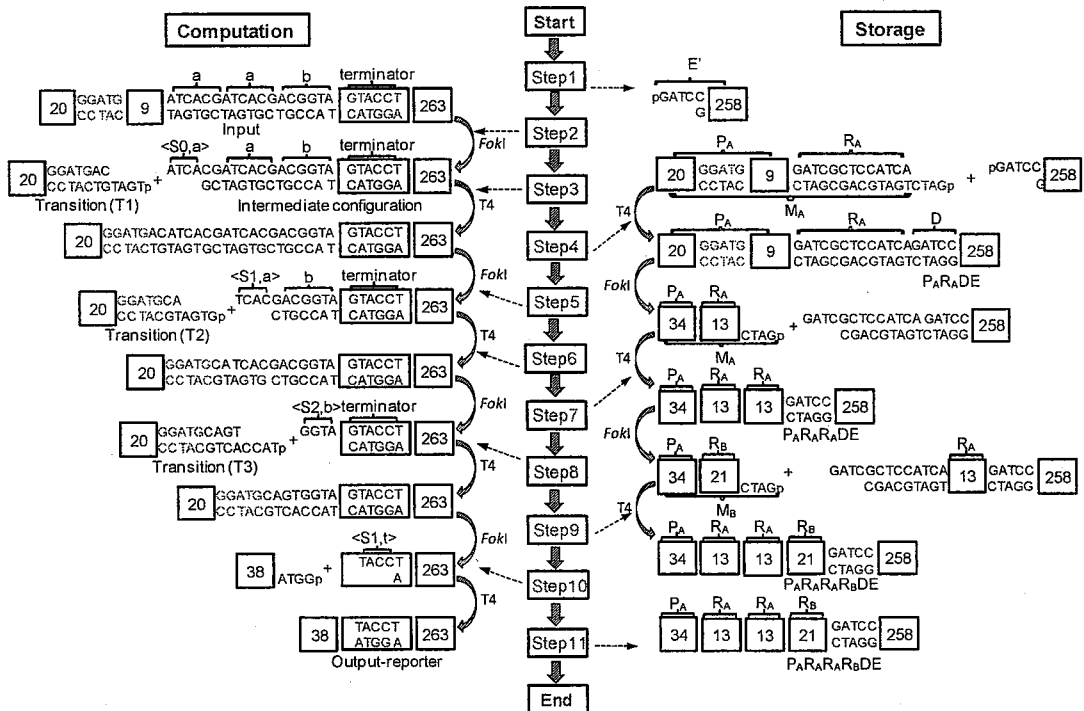


图 3-6 字符串“aab”相应的 DNA 计算以及混合存储过程。

Fig.3-6 Computation and mixed symbol storing processes of the symbol string “aab”.

3.3.3 微流控芯片操作平台

微流控芯片技术具有不同操作单元灵活组合、大规模集成的特点[17], 这使得传统的试管中的操作能够在更为有效, 更高通量, 更加可控的平台上实现[23-25]。DNA 计算所涉及的各种生化反应和分离过程如杂交、酶切、酶

连、PCR、电泳等均可在微流控芯片上实现。在以前提出的自动机运算中[8, 9], 生化反应和检测均在试管中进行, 很难实现逐步的存储操作。而微流控芯片平台能将计算过程逐步进行, 并完成对应的存储。

将编码的 DNA 分子及相关的生化试剂加入芯片上的酶反应池当中以完成数据的输入。计算通过芯片上的酶切、酶连反应实现。PCR 反应可增加中间状态分子的量, 保证计算的顺利进行。扩增后的中间状态分子通过芯片电泳分离检测。根据电泳谱图读出的相应信息, 微流控芯片工作站控制完成相应的存储操作。存储同样通过酶切、酶连反应及 PCR 反应实现。

与传统的凝胶电泳相比, 芯片电泳更加方便快捷, 灵敏度更高, 常用于 DNA 片段的测定。图 3-7 显示了自动机对输入符号串“aabbb”的计算过程和相应的芯片电泳谱图。目标分子的长度通过 DNA 标准片段确定。可以看出, 图 3-7 (a-g) 中各目标分子的峰相对 DNA 标准片段发生了明显位移, 表明经过右侧所示的各步酶切、酶连反应后, DNA 片段的长度发生了变化, 生成了代表新的状态的 DNA 分子。最终生成报告分子 R-S2, 代表最终状态为 S2。存储过程的数据读取也采用类似的方法。图 3-8 显示了字符串“aab”对应的存储过程和电泳谱图。

3.4 小结

将微流控芯片核酸反应分析系统相关技术初步应用于基于剪接模型的 DNA 计算和存储。利用有限状态自动机模型进行等腰三角形识别。“堆栈”式生物存储器的引入, 弥补了自动机中存在循环带来的识别缺陷。微流控技术的引入, 使计算中间结果可以被实时检测, 进而将其反馈给控制单元, 进行相应的生物存储。微流控芯片不同操作单元灵活组合、大规模集成和可控性强的特点使其更适合于 DNA 计算机的研究工作。它将为今后进行更大规

模，更复杂的 DNA 计算提供有力的技术支撑，有望成为 DNA 计算机走向实用化的主流平台。

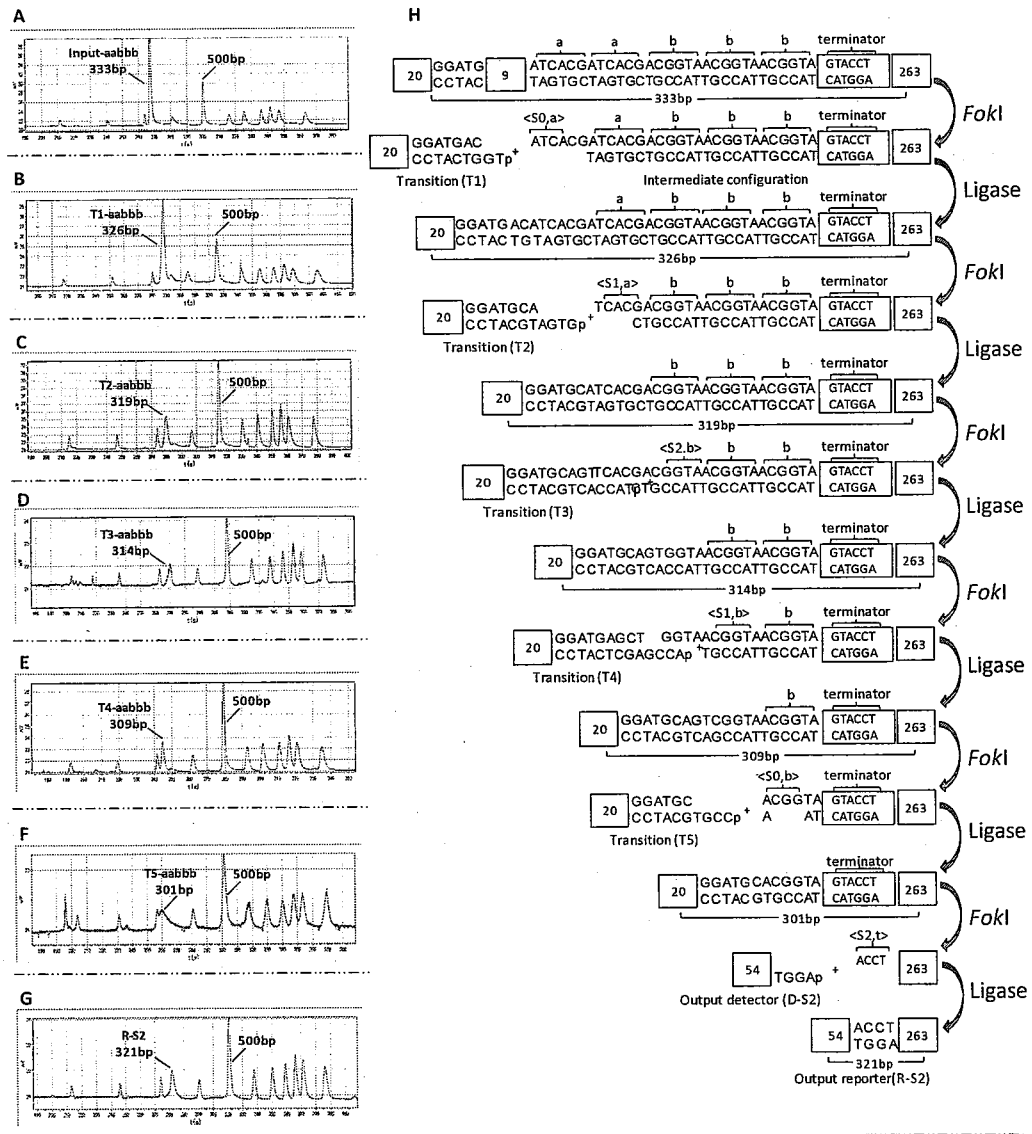


图 3-7 字符串“aabb”对应的自动机计算过程和相应的电泳谱图。

Fig.3-7 The computation procedure and the corresponding electropherograms of a finite automaton with the “aabb” input symbol.

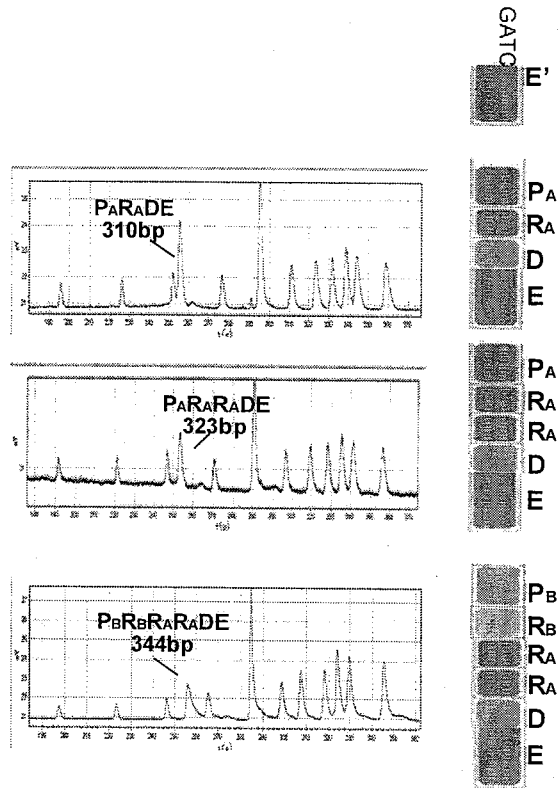


图 3-8 字符串“aab”对应的存储分子和电泳谱图。

Fig.3-8 Storing molecules in a single stack and their electrophoreograms of the “aabbb” input symbol.

参考文献

- [1] Adleman, L. M., Molecular Computation of Solutions to Combinatorial Problems. *Science*, 1994, 266(5187): 1021-1024.
- [2] Lipton, R. J., DNA Solution of Hard Computational Problems. *Science*, 1995, 268(5210): 542-545.
- [3] Liu, Q. H., Wang, L. M., Frutos, A. G., Condon, A. E., Corn, R. M., Smith,

- L. M., DNA computing on surfaces. *Nature*, 2000, 403(6766): 175-179.
- [4] Braich, R. S., Chelyapov, N., Johnson, C., Rothmund, P. W. K., Adleman, L., Solution of a 20-variable 3-SAT problem on a DNA computer. *Science*, 2002, 296(5567): 499-502.
- [5] Ouyang, Q., Kaplan, P. D., Liu, S. M., Libchaber, A., DNA solution of the maximal clique problem. *Science*, 1997, 278(5337): 446-449.
- [6] van Noort, D., Wagler, P., McCaskill, J. S., Hybrid poly(dimethylsiloxane)-silicon microreactors used for molecular computing. *Smart Materials & Structures*, 2002, 11(5): 756-760.
- [7] Gao, L., Ma, R. N., Xu, J., DNA solution of vertex cover problem based on sticker model. *Chinese Journal of Electronics*, 2002, 11(2): 280-284.
- [8] Benenson, Y., Paz-Elizur, T., Adar, R., Keinan, E., Livneh, Z., Shapiro, E., Programmable and autonomous computing machine made of biomolecules. *Nature*, 2001, 414(6862): 430-434.
- [9] Benenson, Y., Gil, B., Ben-Dor, U., Adar, R., Shapiro, E., An autonomous molecular computer for logical control of gene expression. *Nature*, 2004, 429(6990): 423-429.
- [10] Bogard, C. M., Rouchka, E. C., Arazi, B., DNA media storage. *Progress in Natural Science*, 2008, 18(5): 603-609.
- [11] Frutos, A. G., Liu, Q. H., Thiel, A. J., Sanner, A. M. W., Condon, A. E., Smith, L. M., Corn, R. M., Demonstration of a word design strategy for DNA computing on surfaces. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(23): 4748-4757.
- [12] Wang, L. M., Hall, J. G., Lu, M. C., Liu, Q. H., Smith, L. M., A DNA

- computing readout operation based on structure-specific cleavage. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(11): 1053-1059.
- [13] Gehani, A., Reif, J., Micro flow bio-molecular computation. *Biosystems*, 1999, 52(1-3): 197-216.
- [14] Grover, W. H., Mathies, R. A., An integrated microfluidic processor for single nucleotide polymorphism-based DNA computing. *Lab on a Chip*, 2005, 5(10): 1033-1040.
- [15] van Noort, D., Landweber, L. F., Towards a re-programmable DNA computer, in *DNA Computing*. 2004. p. 190-196.
- [16] Adleman, L. M., Molecular Computation of Solutions to Combinatorial Problems. *Science*, 1994, 266(5187): 1021-1024.
- [17] 林炳承, 秦建华, 微流控芯片实验室. *色谱*, 2005, 23(5): 456-463.
- [18] McCaskill, J. S., Optically programming DNA computing in microflow reactors. *Biosystems*, 2001, 59(2): 125-138.
- [19] van Noort, D., Gast, F.-U., McCaskill, J. S., DNA Computing in Microreactors. *Lecture Notes on Computer Science*, 2002, 2340: 33-45.
- [20] van Noort, D., Landweber, L. F., Towards a re-programmable DNA computer. *DNA Computing*, 2004, 2943: 190-196.
- [21] Zhou, Z. M., Liu, D. Y., Zhong, R. T., Dai, Z. P., Wu, D. P., Wang, H., Du, Y. G., Xia, Z. N., Zhang, L. P., Mei, X. D., Lin, B. C., Determination of SARS-coronavirus by a microfluidic chip system. *Electrophoresis*, 2004, 25(17): 3032-3039.
- [22] Sugisaki, H., Kanazawa, S., new restriction endonucleases from flavobacterium-okeanokoites (*FokI*) and micrococcus-luteus (*MluI*). *Gene*,

- 1981, 16(1-3): 73-78.
- [23] Reyes, D. R., Iossifidis, D., Auroux, P. A., Manz, A., Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(12): 2623-2636.
- [24] Chen, L., Manz, A., Day, P. J. R., Total nucleic acid analysis integrated on microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 2007, 7: 1413-1423.
- [25] Weibel, D. B., DiLuzio, W. R., Whitesides, G. M., Microfabrication meets microbiology. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(3): 209-218.

第四章 微流控芯片核酸反应分析系统的应用(II):

集成化酶切反应及在线产物分析

4.1 引言

微流控芯片自上世纪90年代发展至今,已由最初简单的单通道电泳分析芯片[1],发展成能进行多种单元操作和复杂分析的集成化系统[2-4]。由于微流控芯片具有样品量小、易实现自动化控制和高通量分析的特点,尤其是微尺寸带来的比表面大、操作距离短以及可进行复杂精确的液流控制等特点,使得在微流控芯片上进行生化反应较常规方法更方便,快速,成本低廉。因此以药物筛选或生化样品分析为目的进行的各种生物化学反应[5-8]正逐渐转移到芯片上来。其中,与核酸相关的各种反应,如聚合酶链反应(PCR)[9-13],酶连反应[14, 15]以及杂交反应[16, 17]等,已被广泛应用于临床基因诊断、遗传学分析和法医学鉴定。要实现核酸反应分析系统的自动化,就必须将微反应器与微流控芯片强大的分离检测能力结合起来,电泳分离是最常用也最重要的分析手段之一。微泵阀,尤其是高密度的微泵阀阵列,使精确可靠的流体操控及功能单元的规模集成成为现实。其中,采用玻璃-PDMS夹心结构的薄膜微泵阀[18],已经在集成化PCR反应分析[11, 12]和芯片进样[19, 20]等方面得到应用。

目前有关微流控芯片核酸反应分析系统的研究大多集中于PCR反应分析[9-13],仅有少数研究者对核酸限制性内切酶反应进行深入研究[21, 22]。而限制性内切酶对于染色体结构分析、基因图谱绘制、长链DNA测序及分子克隆都有重要的意义[23]。因此需要研发一套自动化的快速核酸酶切反应分析

系统。

我们以微流控芯片为平台，建立了一套集成化的核酸酶切反应及在线产物分析系统。该系统采用多层玻璃-PDMS杂合的夹心结构，集成了微加热器、温度传感器（RTDs）、微反应器、气动微泵阀及芯片电泳。利用该系统，实现了两种限制性内切酶*Bam*HI和*Fok*I的酶切反应及在线产物检测。微加热器和温度传感器可实现对微反应器的准确控温。气动微泵阀位于反应区和电泳区之间，不仅可消除反应过程中反应液对电泳区域的污染，而且可在反应后将反应液运送至进样池，并定量稀释至适当浓度进行检测。在核酸筛分介质和运行缓冲液中加入改性剂聚乙烯吡咯烷酮（PVP）和甘露醇，在通道冲洗和电泳过程中实现动态涂层，可明显改善分离效果，多次运行重复性较好。该系统以微泵阀连接可控温的反应区和电泳分离检测区，同样适用于其他可用电泳分离检测的反应体系，如PCR在线分析，酶反应动力学分析，以及上一章提及的以酶切、酶连反应为手段的DNA计算等，具有广阔的应用前景。

4.2 实验部分

4.2.1 材料与试剂

含有 *Bam*HI 酶切位点的 DNA 片段（304bp）是以 pUC19 质粒为模板，通过商用 PCR 仪扩增获得。pUC19 质粒（GeneBank 序列号 M77789, 2.6 kbp），PCR 引物，*Ex-Taq* 聚合酶及其他 PCR 相关试剂，限制性内切酶 *Bam*HI, *Fok*I 及其相关试剂均购自大连宝生物公司。羟丙甲基纤维素（Hydroxypropylmethyl cellulose, HPMC, 0.5%水溶液，黏度为 4000 cp）购自 Sigma（St. Louis, MO）。聚乙烯吡咯烷酮（Poly(vinylpyrrolidone), PVP, Mw 1,300,000）购自美国 Acros 公司。甘露醇（Mannitol）购自加拿大 Bio Basic 公司。三羟甲基

氨基甲烷 (Tris)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、硼酸购自沈阳化学试剂厂。1×TBE 缓冲液 (100mM Tris, 100mM 硼酸, 2mM EDTA, pH 8.5) 中加入 0.5% HPMC-4000cp, 0.1% PVP 和 6%甘露醇和 1 μ M 嵌入式 DNA 标记染料 GeneFinderTM (厦门百维信生物科技有限公司, 二甲亚砷稀释 100 倍保存), 作为 DNA 筛分介质。标准 DNA 片段 (100-bp ladder, 100 bp-600 bp, 6 个片段) 购自北京天根生化科技有限公司。玻璃片 (63 mm×63 mm×1.2mm) 购于长沙韶光微电子厂 (韶光, 湖南): 一种带有铬和光刻胶涂层, 用来制做芯片通道结构, 没有涂层的抛光玻璃片用作制备 PDMS 膜。Sylgard 184 PDMS 聚合前体及引发剂套装购自美国道康宁公司。三甲基氯硅烷 (TMSCl) 购于上海国药集团化学试剂有限公司。除特别声明外的其它试剂均为分析纯, 所有溶液均由娃哈哈纯净水配制。

4.2.2 仪器设备

芯片反应池的温度控制由自行设计搭建的电路及芯片接口完成, 相关的硬件及软件配置详见 2.2.1.3。以浸没式热电偶温度计 (TES-1310, 台湾泰仕) 进行液池温度校准。微阀、微泵驱动由自行设计搭建的控制系统完成。该系统由计算机、控制板、电磁阀、真空系统和压力系统五部分组成, 具体操控方式详见第二章内容。芯片系统的电压控制和激光诱导荧光检测采用自行设计搭建的集成式微流控芯片分析仪 (激发波长为 473 nm, 发射波长为 540 nm) [24]。

4.2.3 芯片设计与制作

如图 4-1 所示, 集成化芯片采用四层玻璃-PDMS 杂合的夹心结构, 由上到下依次为气路控制层 (玻璃)、PDMS 膜、液路控制层 (玻璃) 和金属薄膜微加热器/温度传感器 (温控芯片)。气路控制层的下表面刻蚀有气室及通道

结构用以控制薄膜微阀进行流体操纵。PDMS 膜夹于气路控制层和液路控制层之间，起到激励泵阀的作用。液路控制层的上表面刻蚀有分析物输运通道和电泳通道。温控芯片的上表面镀有 Ti/Pt 金属薄膜制作的加热器和温度传感器，用于整个反应系统的温度控制。

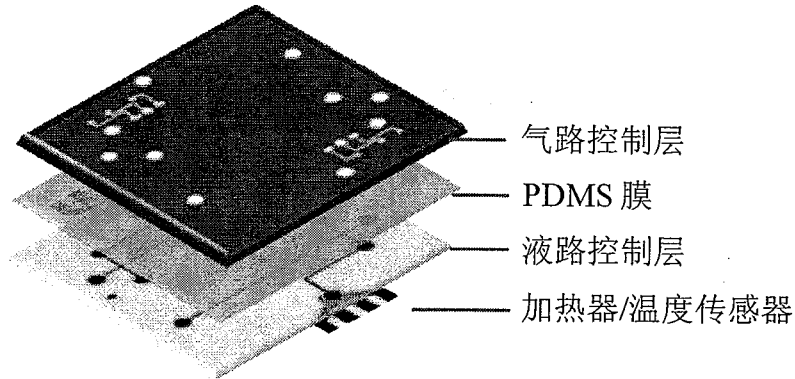


图 4-1 四层玻璃-PDMS 杂合芯片结构展开图。

Fig.4-1 An exploded view of the assembly of the four-layer glass-PDMS hybrid microchip.

在边长为 63 mm 的正方形芯片上，有两个结构相同且相对独立的反应-分析单元。每个反应-分析单元均集成了金属薄膜微加热器（灰色）、温度传感器（黑色）、敞开式反应器，气动微泵阀及电泳通道等操作单元，被用于集成化酶反应及在线产物分析。图 4-2 (a) 是单个反应-分析单元的设计图（上图）和实物照片（下图）。SR、BR、BW 和 SW 分别为样品池、缓冲液池、缓冲废液池和样品废液池。图 4-2 (b) 是反应区域的局部放大图，显示了反应池、微加热器和温度传感器的相对位置。位于反应区域和电泳区域之间的气动微泵结构放大图显示于 4-2 (c) 中。输入阀，隔膜阀和输出阀 (V_1 , V_2 , V_3) 构成一个气动微泵，通过它们的依次开启关闭实现流体驱动。

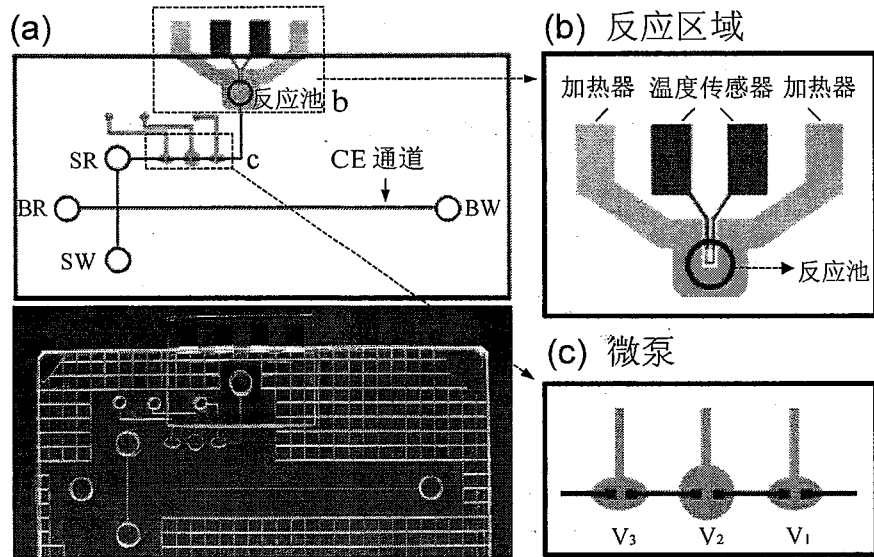


图4-2 集成化酶反应及产物分析芯片设计图。

Fig.4-2 Schematic of the integrated microdevice for digestion reaction and resulting DNA fragments analysis.

四层玻璃-PDMS杂合芯片的制作方法如下：(1) 玻璃材质的气路控制层和液路控制层上的通道结构采用标准的光刻和湿法蚀刻法制作[25]。气路控制通道宽 $160\ \mu\text{m}$ ，深 $70\ \mu\text{m}$ 。在液路控制层，电泳通道长 $5\ \text{cm}$ ，宽 $90\ \mu\text{m}$ ，深 $25\ \mu\text{m}$ ，反应池和电泳通道间的运输通道部分宽 $120\ \mu\text{m}$ ，深 $25\ \mu\text{m}$ ；(2) 在气路控制层上以超声打孔器构成通孔作为芯片储液池（直径 $3\ \text{mm}$ ）；(3) 将液路控制层没有通道的一面进行打磨，直至玻璃片厚约 $0.7\ \text{mm}$ 并抛光；(4) 将Sylgard 184 PDMS聚合前体及引发剂按10:1比例充分混合均匀，真空脱气，浇注于两片硅烷化处理过的抛光玻璃片之间，然后水平放置，在 $80\ ^\circ\text{C}$ 烘箱中加热固化1小时，形成厚约 $160\ \mu\text{m}$ 的PDMS弹性膜；(5) 将PDMS薄膜置于上下两层玻璃中间，将上下通道相应位置对准，形成可逆封接的夹心芯片；(6)

具有金属薄膜微加热器/温度传感器的温控芯片制作方法详见2.2.1.2, 其中加热电阻线宽2 mm, 测温电阻及其连接导线的线宽分别为50 μm 和250 μm 。(7) 温控芯片和夹心芯片以PDMS粘合, 将四层芯片水平放置, 在80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中加热封接1小时;(8) 将直径3 mm 的钢管一端打磨平齐、锐利, 在PDMS膜上对应储液池的位置打孔, 使储液池与下层液路通道连通, 芯片制备完成。

4.2.4 温控系统调试

精确和稳定的温控对于酶反应的顺利进行至关重要。首先将最下层的温控芯片插入水浴中, 程序升温, 对温度传感器 (RTDs) 进行校准。整个芯片组装后, 再校准反应池液中液体温度和 RTDs 的温度, 得到工作曲线。该工作曲线被用于酶切反应的温控。具体方法参见第二章。

4.2.5 酶切反应

在集成化微流控芯片上完成限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Fok*I 的酶切反应。为减小酶和核酸吸附对反应的不良影响, 需要对反应池壁进行处理。依次用纯净水, 乙醇和纯净水冲洗反应池, 然后保持沸腾 1000 s。以 2.5 mg/mL 的牛血清白蛋白 (BSA) 溶液在 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育反应池 20 min, 对池壁做钝化处理, 然后将其移出液池。

酶切反应在微加热器/温度传感器的温控下完成。*Bam*HI 酶切反应体系: 10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1 mM 二羟基乙醇 (Dithionthreitol), 10 mM MgCl₂, 1 unit/ μL *Bam*HI 酶, 及 20-30 ng/mL DNA 分子 (304 bp)。30 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 40 min, 然后将温度升至 65 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min 使酶失活。*Fok*I 酶切反应体系: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM 二羟基乙醇, 10 mM MgCl₂, 0.5 unit/ μL *Fok*I 酶, 及 20-30 ng/mL DNA 分子 (321 bp)。37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 40 min, 然后将温度升至 65 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min 使酶失活。为防止挥发, 在

7 μL 反应液上面覆盖 3 μL 矿物油。

4.2.6 在线产物分析过程

酶切反应完成后,对产物进行在线检测。气动微泵阀位于反应区和电泳区之间,不仅可消除反应过程中反应液对电泳区域的污染,而且可在反应后将反应液运送至进样池,并定量稀释至适当浓度进行检测。定义薄膜阀关闭状态为“0”,此时液体被隔断;开启状态为“1”,液体流通。反应期间,所有的薄膜阀均保持关闭状态,隔绝反应区域和电泳区域。反应后,反应区域到电泳区域之间的微阀(V_1 , V_2 , V_3)按照程序依次开启关闭,将反应液运送至进样池。操作程序为:100, 110, 010, 011, 001, 000, 000。前六步分别保持 300 ms,最后一步保持 100 ms。阀上施加的负压和正压分别为-90 kPa 和 20 kPa。控制泵入样品池中反应液的量,可实现对样品的定量稀释。

芯片电泳缓冲液:1 \times TBE 缓冲液(100mM Tris, 100mM 硼酸, 2mM EDTA, pH8.5) + 0.1% PVP + 6%甘露醇+ 1 μM GeneFinderTM。芯片电泳通道在使用前依次用娃哈哈纯净水、1 \times TBE 缓冲液和电泳缓冲液冲洗,然后灌注新鲜电泳缓冲液。缓冲液池(BR)、缓冲废液池(BW)和样品废液池(SW)中分别加入 10 μL 电泳缓冲液,样品池(SR)中加入 9 μL 的 100-bp DNA 标准样品,通过气动微泵泵入 1 μL 样品与 DNA 标准样品混合,共同进行芯片电泳。进样和分离的电压程序如表 4-1 所示。电泳分离的有效长度为 3.5 cm。每次电泳之间,为缓冲液池、缓冲液废液池和样品废液池更换新鲜电泳缓冲液,通道依次用纯净水、1 \times TBE 缓冲液和电泳缓冲液冲洗,以保证后续电泳的分离效率。

表 4-1 进样和分离的电压程序

Table 4-1 Voltage program of injection and separation

功能 Function	时间 Time (s)	电压 Voltage (V)			
		S	SW	B	BW
进样 Injection	35	0	450	0	0
分离 Separation	400	250	250	0	1400

4.3 结果与讨论

4.3.1 芯片设计制作思路

如图 4-1 所示, 集成化芯片采用四层玻璃-PDMS 杂合的夹心结构。在液路控制层, 为防止反应液阻塞通道, 反应池和样品池间的运输通道采用较大的 $120\ \mu\text{m}$ 线宽; 而为了更好的分离效果, 电泳分离通道采用 $90\ \mu\text{m}$ 的线宽。为保持加热器和反应池之间良好的热传导, 液路控制层被磨薄至厚约 $0.7\ \text{mm}$ 并抛光。PDMS 膜过厚会不利于阀的激励, 过薄会不便于封接操作, 因此选取其厚度为 $160\ \mu\text{m}$ 。为保持正/负压的作用效果, 气路控制通道采用较大的深宽, 通道宽 $160\ \mu\text{m}$, 深 $70\ \mu\text{m}$ 。气路控制层上以超声打孔器构成通孔作为芯片储液池。直接利用其中的一个储液池作为敞开式的反应池, 可简化芯片设计, 降低芯片集成难度, 有利于集成化芯片酶反应及在线产物分析系统的实现。

第二章中曾对微泵阀结构进行过优化, 本章最终采用其中 2# 泵的结构: 隔膜阀 (V_2) 为直径 $2\ \text{mm}$ 的圆形, 阀座为 $0.22\ \text{mm} \times 0.4\ \text{mm}$ 。阀上施加的负压和正压分别为 $-90\ \text{kPa}$ 和 $20\ \text{kPa}$ 。按照操作程序 100, 110, 010, 011, 001, 000, 000 (前六步分别保持 $300\ \text{ms}$, 最后一步保持 $100\ \text{ms}$), $90\ \text{s}$ 内该泵可

以泵入 12.3 μL 样品。

采用了 2.2.1.2 中所述的温控芯片制作工艺, 该方法将微加热器和温度传感器制作在玻璃片的同一面, 与传统方法[12, 26]相比更简便、快速、成本较低。芯片采用多层玻璃-PDMS 杂合的夹心结构, 以可逆方法封接, 制作更简便、快捷, 可重复利用, 进一步降低了芯片制作成本。

4.3.2 芯片温控系统的基本特征

为保证对酶切反应精确和稳定的温控, 需对集成式温控系统进行校正。反应前以水浴法对 RTDs 进行校准, 得到的 RTD 电阻-温度标准曲线见图 4-3 (a), RTD 电阻对温度的响应接近线性($R^2=0.9996$), 符合 Calendar Van-Dusen 方程[10]。温控芯片和上层的夹心芯片组装后, 再校准反应池液中液体温度和 RTDs 的温度, 得到线性良好的温度校正曲线($R^2=0.9997$), 见图 4-3 (b)。该温度校正曲线被用于后续酶切反应的温控。

4.3.3 玻璃-PDMS 芯片核酸分离体系性能考察

由于含有微阀、微泵结构的芯片采用了可逆封接的玻璃-PDMS 夹心结构, 因此部分适用于不可逆封接的表面改性方法, 如氧等离子处理[27, 28], UV 照射[29, 30]等并不适用。通常的静态涂层方式较为繁琐, 也不适于集成化芯片。在第二章中已经提到, 在运行缓冲液中添加聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和甘露醇, 可以对玻璃-PDMS 通道进行动态涂层[31]。我们采用该改性方法, 在集成化芯片上对 100-bp DNA 标准样品进行连续分离, 谱图见图 4-4。以 300 bp 和 400 bp 的片段为对象, 对其迁移时间和理论塔板数进行分析(表 4-2): 其迁移时间的 RSD ($n=6$) 均小于 0.3%, 说明该体系重复性良好; 在 3.5 cm 有效分离距离内得到的塔板数均大于 54000, 说明动态涂层的芯片通道具有良好的分离能力。

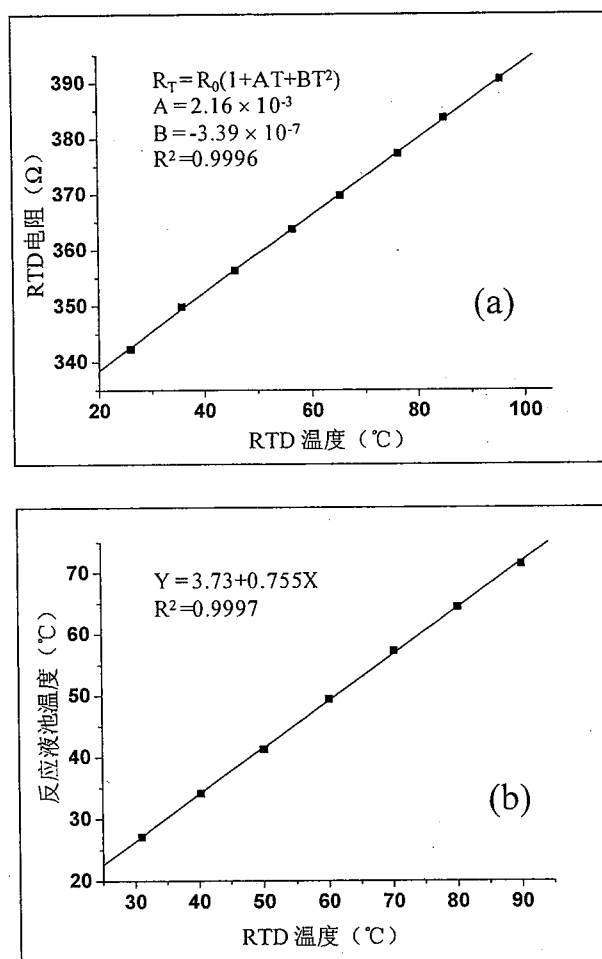


图 4-3 温控系统校准曲线。(a) 集成式 RTD 电阻-温度标准曲线; (b) RTD 温度和反应液池温度校正曲线。

Fig.4-3 Characterization of the temperature control system. (a) Calibration curve for the RTD; (b) Temperature correction curve between RTD and the liquid inside the RC.

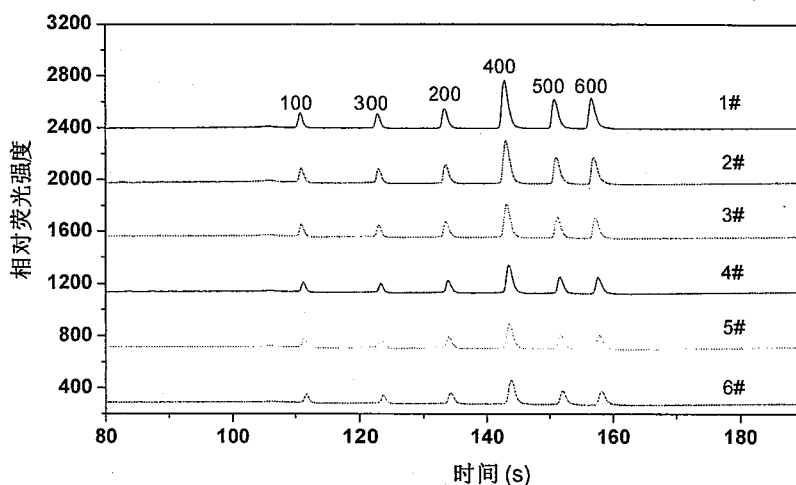


图 4-4 动态改性的玻璃-PDMS 芯片上 DNA 标准样品连续分离电泳谱图。

Fig.4-4 Electropherograms of consecutive 100 bp DNA ladder separation in dynamic coated hybrid PDMS-glass microfluidic chip.

表 4-2 动态改性的玻璃-PDMS 芯片上 DNA 标准片段连续电泳分离的迁移时间和理论塔板数

Table 4-2 Migration times and theoretical plates of consecutive 100-bp DNA ladder separation on dynamic coated hybrid glass -PDMS microfluidic chip

	T_{300} (s)	T_{400} (s)	N_{300}	N_{400}
1#	133.24	142.74	64566	56169
2#	133.47	142.97	70971	54358
3#	133.46	143.13	74335	57649
4#	133.88	143.43	73237	63851
5#	133.89	143.53	80573	61508
6#	134.17	143.84	75411	61860
RSD	0.0026	0.0028	0.066	0.057

注: T_{300} , T_{400} 及 N_{300} , N_{400} 分别为 300 bp 和 400 bp 片段的迁移时间和理论塔板数, 有效分离长度 3.5 cm。

对图 4-4 中的 DNA 片段长度和其对应的迁移时间进行分析, 可得到表 4-3 中所列的结果: 在一定长度范围内, DNA 片段的长度 (X) 和其对应的迁移时间 (Y) 呈良好的线性关系 ($R^2 > 0.99$)。以上结果表明, 在玻璃-PDMS 芯片上建立的经动态改性的无胶筛分电泳体系不仅可以高效分离核酸, 还可以用于估算未知核酸的片段长度。本实验中对酶切产物的定性分析正是基于以上原理。

表 4-3 核酸片段长度和迁移时间的线性回归分析

Table 4-3 Linear regression analysis of fragment length and migration time

片段长度 Length of Fragment (bp)	回归方程 Regression equation	R^2
100-300	$Y=0.112X+99.75$	0.999
200-400	$Y=0.100X+102.6$	0.998
300-500	$Y=0.087X+107.4$	0.997
400-600	$Y=0.068X+115.6$	0.992

4.3.4 集成化微流控芯片酶切反应及产物分析

利用集成化微流控芯片核酸反应及产物分析系统, 完成了两种限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Fok*I 的酶切反应及其产物的在线分析。由于玻璃和 PDMS 对核酸和酶有较强的吸附, 会抑制反应进行, 因此需要对反应池进行处理。常用的方法有静态钝化[11]和动态钝化[32]。我们以 BSA 溶液对反应池进行孵育, 做钝化处理, 可有效抑制吸附。在未经 BSA 处理的反应池中做对照实验, 反应效率较低, 鲜有产物被检出。酶切反应在集成式温控系统的温控下进行。在反应及电泳分离过程中, 敞开式的反应池和电泳区域的储液池表面均覆盖矿物油, 可有效防止挥发。

酶切产物的在线电泳分离和 LIF 检测在集成化芯片上完成。反应期间,所有的薄膜阀均保持关闭状态,以隔绝反应区域和电泳区域,防止污染。加热会导致电泳缓冲液筛分能力下降,因此电泳缓冲液在反应后灌注。反应液离子强度较高,直接进样会导致焦耳热增加,影响分离效率。为此利用微泵将一定量的酶切反应液泵入样品池,对其定量稀释后再进行电泳分离。反应液与 DNA 标准片段混合后一起进行电泳分离。图 4-5 是限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Fok*I 酶切反应前后的电泳分析谱图。304 bp 的 DNA 片段被 *Bam*HI 酶切后,生成 263 bp 和 41 bp 的 DNA 片段。321 bp 的 DNA 片段被 *Fok*I 酶切后,生成 287 bp 和 34 bp 的 DNA 片段。作为反应物的 DNA 片段是通过 PCR 反应获得的,因此反应混合液中可能存在部分引物及引物二聚体。41 bp 和 34 bp 的 DNA 片段与引物及引物二聚体较为接近,因此在谱图中无法明确指认。

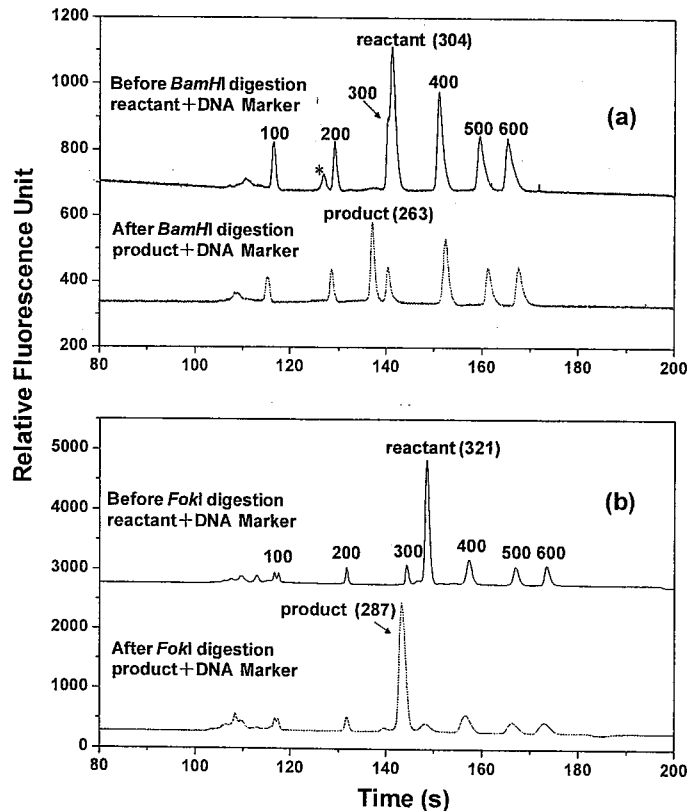


图 4-5 芯片酶切反应及在线产物分析结果。(a) *Bam*HI; (b) *Fok*I。* 样品中的杂质。

Fig.4-5 The on-line digested fragments analysis results. (a) *Bam*HI; (b) *Fok*I.
*Impurity in samples.

4.4 小结

构建了一套集成化微流控芯片核酸反应及产物分析系统, 利用其完成两种限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Fok*I 的酶切反应及其产物的在线分析。该系统采用多层玻璃-PDMS 夹心芯片结构, 以可逆方法封接, 制作简便、快捷, 可重复利用。简便易行的动态涂层方法有效改善了玻璃-PDMS 杂合通道的分离效果。微泵阀的加入使其有可能集成更多的功能单元, 有助于推动复杂生化反应分析过程的规模化、集成化和自动化。

参考文献

- [1] Manz, A., Harrison, D. J., Verpoorte, E. M. J., Fettingner, J. C., Paulus, A., Ludi, H., Widmer, H. M., Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems - capillary electrophoresis on a chip. *Journal of Chromatography*, 1992, 593(1-2): 253-258.
- [2] Reyes, D. R., Iossifidis, D., Auroux, P. A., Manz, A., Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(12): 2623-2636.
- [3] Vilkner, T., Janasek, D., Manz, A., Micro total analysis systems. Recent

- developments. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(12): 3373-3385.
- [4] Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A., Micro total analysis systems. Latest advancements and trends. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(12): 3887-3907.
- [5] Yoon, S. K., Fichtl, G. W., Kenis, P. J. A., Active control of the depletion boundary layers in microfluidic electrochemical reactors. *Lab on a Chip*, 2006, 6(12): 1516-1524.
- [6] Urban, P. L., Goodall, D. M., Bruce, N. C., Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(1): 42-57.
- [7] Maruyama, T., Uchida, J., Ohkawa, T., Futami, T., Katayama, K., Nishizawa, K., Sotowa, K., Kubota, F., Kamiyaa, N., Goto, M., Enzymatic degradation of p-chlorophenol in a two-phase flow microchannel system. *Lab on a Chip*, 2003, 3(4): 308-312.
- [8] Herrmann, M., Roy, E., Veres, T., Tabrizian, M., Microfluidic ELISA on non-passivated PDMS chip using magnetic bead transfer inside dual networks of channels. *Lab on a Chip*, 2007, 7: 1546-1552.
- [9] Kopp, M. U., de Mello, A. J., Manz, A., Chemical amplification: Continuous-flow PCR on a chip. *Science*, 1998, 280(5366): 1046-1048.
- [10] Lagally, E. T., Emrich, C. A., Mathies, R. A., Fully integrated PCR-capillary electrophoresis microsystem for DNA analysis. *Lab on a Chip*, 2001, 1(2): 102-107.
- [11] Toriello, N. M., Liu, C. N., Mathies, R. A., Multichannel reverse transcription-polymerase chain reaction microdevice for rapid gene expression and biomarker analysis. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(23):

7997-8003.

- [12] Liu, P., Seo, T. S., Beyor, N., Shin, K. J., Scherer, J. R., Mathies, R. A., Integrated portable polymerase chain reaction-capillary electrophoresis microsystem for rapid forensic short tandem repeat typing. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(5): 1881-1889.
- [13] Neuzil, P., Zhang, C., Pipper, J., Oh, S., Zhuo, L., Ultra fast miniaturized real-time PCR: 40 cycles in less than six minutes. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(11): e77.
- [14] Hashimoto, M., Barany, F., Xu, F., Soper, S. A., Serial processing of biological reactions using flow-through microfluidic devices: coupled PCR/LDR for the detection of low-abundant DNA point mutations. *Analyst*, 2007, 132(9): 913-921.
- [15] Wabuyele, M. B., Farquar, H., Stryjewski, W., Hammer, R. P., Soper, S. A., Cheng, Y. W., Barany, F., Approaching real-time molecular diagnostics: Single-pair fluorescence resonance energy transfer (spFRET) detection for the analysis of low abundant point mutations in K-ras oncogenes. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(23): 6937-6945.
- [16] Liu, J., Williams, B. A., Gwartz, R. M., Wold, B. J., Quake, S., Enhanced signals and fast nucleic acid hybridization by microfluidic chaotic mixing. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, 45(22): 3618-3623.
- [17] Chung, Y.-C., Lin, Y.-C., Chueh, C.-D., Ye, C.-Y., Lai, L.-W., Zhao, Q., Microfluidic chip of fast DNA hybridization using denaturing and motion of nucleic acids. *Electrophoresis*, 2008, 29(9): 1859-1865.
- [18] Grover, W. H., Skelley, A. M., Liu, C. N., Lagally, E. T., Mathies, R. A.,

- Monolithic membrane valves and diaphragm pumps for practical large-scale integration into glass microfluidic devices. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2003, 89(3): 315-323.
- [19] Karlinsey, J. M., Monahan, J., Marchiarullo, D. J., Ferrance, J. P., Landers, J. P., Pressure injection on a valved microdevice for electrophoretic analysis of submicroliter samples. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(11): 3637-3643.
- [20] Li, B. W., Jiang, L., Wang, Q., Oin, J. H., Lin, B. C., Micropumps actuated negative pressure injection for microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 2008, 29(24): 4906-4913.
- [21] Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., Integrated microdevice for DNA restriction fragment analysis. *Analytical Chemistry*, 1996, 68(5): 720-723.
- [22] Katsura, S., Harada, N., Maeda, Y., Komatsu, J., Matsuura, S., Takashima, K., Mizuno, A., Activation of restriction enzyme by electrochemically released magnesium ion. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, 98(4): 293-297.
- [23] Guttman, A., Ronai, Z., Barta, C., Hou, Y. M., Sasvari-Szekely, M., Wang, X., Briggs, S. P., Membrane-mediated ultrafast restriction digestion and subsequent rapid gel microchip electrophoresis of DNA. *Electrophoresis*, 2002, 23(10): 1524-1530.
- [24] Long, Z. C., Liu, D. Y., Ye, N. N., Qin, J. H., Lin, B. C., Integration of nanoporous membranes for sample filtration/preconcentration in microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 2006, 27(24): 4927-4934.
- [25] Woolley, A. T., Mathies, R. A., Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(24): 11348-11352.
- [26] Liu, C. N., Toriello, N. M., Mathies, R. A., Multichannel PCR-CE microdevice for genetic analysis. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(15): 5474-5479.
- [27] Duffy, D. C., McDonald, J. C., Schueller, O. J. A., Whitesides, G. M., Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, 1998, 70(23): 4974-4984.
- [28] Augustine, B. H., Hughes, W. C., Zimmermann, K. J., Figueiredo, A. J., Guo, X. W., Chusuei, C. C., Maidment, J. S., Plasma surface modification and characterization of POSS-based nanocomposite polymeric thin films. *Langmuir*, 2007, 23(8): 4346-4350.
- [29] Soper, S. A., Hashimoto, M., Situma, C., Murphy, M. C., McCarley, R. L., Cheng, Y. W., Barany, F., Fabrication of DNA microarrays onto polymer substrates using UV modification protocols with integration into microfluidic platforms for the sensing of low-abundant DNA point mutations. *Methods*, 2005, 37(1): 103-113.
- [30] Chen, L., Ren, J. C., Bi, R., Chen, D., Ultraviolet sealing and poly(dimethylacrylamide) modification for poly(dimethylsiloxane)/glass microchips. *Electrophoresis*, 2004, 25(6): 914-921.
- [31] Xie, H., Li, B. W., Zhong, R. T., Qin, J. H., Zhu, Y. S., Lin, B. C., Microfluidic device for integrated restriction digestion reaction and resulting DNA fragment analysis. *Electrophoresis*, 2008, 29(24): 4956-4963.
- [32] Xia, Y. M., Hua, Z. S., Srivannavit, O., Ozel, A. B., Gulari, E., Minimizing

the surface effect of PDMS-glass microchip on polymerase chain reaction by dynamic polymer passivation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2007, 82(1): 33-38.

总 结 论

以微流控芯片为平台,以核酸样品为对象,针对微流控芯片核酸反应分析系统中的关键技术进行研究,实现各技术单元的集成及其初步应用:

1. 对核酸反应分析系统相关的反应温控技术、泵阀驱动技术以及分离检测技术进行了研究。简化了控温元件的制作过程,成功用于 DNA 酶切反应。分别对电控凝胶微阀和气动薄膜微泵阀进行了结构优化和性能考察,后者更适合作为反应和分析区域间的连接单元。从 5 种分离体系中筛选出适合玻璃-PDMS 杂合芯片及玻璃芯片的体系,证明向筛分介质中添加 PVP 和甘露醇的动态改性方法可被应用于核酸快速有效分离。这些单元操作为具体应用提供了技术支撑。

2. 将芯片核酸反应技术和电泳分离技术应用于基于剪接模型的 DNA 计算。“堆栈”式生物存储器的引入,弥补了自动机中存在循环带来的识别缺陷。微流控芯片不同操作单元灵活组合、规模集成和可控性强的特点使其有可能为更大规模,更复杂的 DNA 计算提供有力的技术支撑,有望成为 DNA 计算机走向实用化的主流平台。

3. 设计制作了集成化核酸反应及在线产物分析芯片,利用其实现了两种限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Fok*I 的酶切反应及产物在线检测。该芯片以气动微泵阀连接可控温的微反应器和电泳单元,在核酸反应分析领域具有很好的应用前景。