

第一章 集成化微流控芯片核酸反应分析系统

（文献综述）

1.1 引言

二十一世纪是生命科学的世纪，随着各种研究技术的不断发展和人类对于生命本身认识的不断深入，以基因组学、蛋白质组学和代谢组学为代表的生命科学研究呈现出日新月异的发展态势。本世纪初，借助于阵列毛细管电泳技术的重大突破，人类基因组计划提前完成，生命科学研究进入后基因组时代。人类基因组计划的研究成果使得人们对核酸结构、功能与调控的认识不断加深，这些信息为人类从分子水平研究遗传、进化以及疾病预防、诊断和治疗奠定了基础。人类对生命科学的不断探索为分析科学的发展提供了新的机遇和挑战。为获取海量的基因信息，实现核酸分析过程的高效、快速和自动化，发展微型化、集成化的技术平台已成为一种必然趋势。二十世纪90年代出现的微流控芯片实验室恰恰满足了这一需求。

微流控芯片实验室又称微流控芯片（microfluidics）或芯片实验室（lab-on-a-chip），指的是在一块几平方厘米的芯片上构建的化学或生物实验室。早期的微流控芯片主要以样品分析为最终目标，因此又被称为微全分析系统（ μ -TAS）[1]。随着技术的发展，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已经被集成到一块很小的芯片上，并由微通道中的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。与另一类以静态亲和杂交技术为核心的杂交点阵芯片（即所谓的“生物芯片”）相比，微流控芯片的基本特征和最大优势是可以将

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[2]，其结果是实现最大限度的低消耗、自动化和高通量。顺应时代发展的需求，微流控芯片应用的领域已经从最初的化学拓展至生物学和医学，并开始向光学和信息学等领域渗透，在疾病诊断、药物筛选、环境检测、食品安全、司法鉴定、体育竞技以及反恐、航天等关乎人类生存质量的方方面面显示出其强大的功能。因此微流控芯片技术被美国 Business 2.0 杂志封面文章列为“改变世界”的七种技术之一，2006 年 Nature 杂志还曾就这种可能成为“这一世纪的技术”推出专辑[3, 4]。

微流控芯片具有微型化和集成化的特点，在核酸研究方面具有诸多优势：首先，芯片上的核酸分离技术日趋成熟，微通道的几何效应有利于核酸的快速分离；其次，芯片通道的阵列设计有利于实现高通量的核酸分析；另外，芯片的微小尺度有利于试剂消耗的减少和成本降低；而最值得注意的是，芯片上功能单元的集成使核酸分析过程的集成化、自动化成为可能，如样品处理、DNA 萃取/纯化、核酸反应、DNA 标记和分离检测等过程均可在芯片上完成。因此，微流控芯片有可能成为下一轮核酸研究的理想选择。

正是基于以上认识，本论文的研究工作主要围绕微流控芯片核酸反应分析系统展开，对其中涉及的部分关键单元技术进行了研究和集成，进而实现其初步应用。本章首先就微流控芯片核酸反应分析系统涉及的相关技术及研究进展作一简要介绍。

1.2 微流控芯片集成技术基础

微流控芯片是芯片实验室的核心，是微流控学的基本技术平台和应用形式。要在特征尺寸为微米甚至纳米级的微通道网络中实现对微量流体的灵活操控，进而实现各种功能化操作，就必须依赖于芯片微加工技术以及流体驱动和控制技术。

1.2.1 芯片微加工技术

微流控芯片上各种功能操作的实现有赖于用各种材料构造出的微米甚至纳米级的微通道网络以及多样化的功能单元，这些均得益于日益简化并且灵活多样的芯片加工技术。

1.2.1.1 常用芯片基质材料的加工技术

随着微流控芯片应用对象的拓展以及功能需求的提升，微流控芯片采用的基质材料呈现出多样化趋势。常用于制作微流控芯片的材料主要有刚性无机材料如单晶硅片、石英、玻璃；硬质高分子聚合物如聚甲基丙烯酸甲酯（polymethylmethacrylate, PMMA）、聚碳酸酯（polycarbonate, PC）；以及聚二甲基硅氧烷（polydimethylsiloxane, PDMS）等弹性高分子聚合物。加工技术的选用通常取决于不同的芯片材质。下面对这几类材料及其芯片加工方法分别予以介绍。

单晶硅是半导体和集成电路的基础材料，其加工大多沿用了微电子行业和微机电系统（MEMS）领域已有的加工技术。利用光刻（lithography）和蚀刻（etching）方法，可以在硅片上加工出精密的二维和三维结构。但由于单晶硅的介电性、光透明性、生物兼容性、机械强度和抗腐蚀性能难以满足生化分析的需求，再加上其价格偏高，因此在微流控芯片中的应用受到一定限制。目前主要用于制作高分子聚合物芯片时的模具及芯片 PCR 研究[5, 6]。

石英和玻璃有很好的电渗和优良的光学特性，现已成为微流控分析芯片的主要基材之一。石英尤其适合于用紫外分光光度法检测的微流控芯片制作。玻璃由于具有与传统的石英毛细管类似的表面性质，是电泳芯片的首选材料。石英和玻璃芯片的加工主要包括光刻、干法或湿法刻蚀、高温、阳极键合或低温封接[7]等。由于在石英和玻璃上加工复杂的三维微结构较为困难，因此在集成

化微流控芯片的研究中受到了一定的限制。

以 PMMA 和 PC 为代表的硬质高分子材料具有相对良好的透光性和介电性，具有加工成型方便、原材料价格较低等特点，非常适合于大批量制作一次性的微流控芯片。常用的微通道加工方法有注塑法[8]、热压法[9]和激光烧蚀法[10]等。注塑法适合于工业化大规模生产，注塑母板多由金属或硅材料利用光刻法制备，或经 LIGA 工艺电铸而成。相较而言，热压法和激光烧蚀法更加灵活，在实验室研究阶段应用更多，但所得微通道表面性质要稍逊一些。

弹性高分子材料 PDMS，具有良好的透光性、介电性和惰性，以及优异的生物兼容性，在芯片设计、制作和应用方面具有更多的灵活性，因而是目前应用最为普遍的芯片材料。PDMS 芯片的制作主要采用 Whitesides 课题组发展的软刻蚀技术[11, 12]，通过简易的浇塑复形工艺，辅之以简单、灵活的封接方法完成。针对 PDMS 芯片的其他简易制备技术，也多有人研究。本实验室以水凝胶平面微图案化技术为基础，建立了“液塑法”制备 PDMS 芯片的简易技术（图 1-1）[13]：即通过水凝胶平面图案化构建化学异质性表面；并于表面上制备出立体液态微条纹；以此为复形模板，通过浇塑复形法制备 PDMS 微流控芯片。较之以 SU-8 为复形模板的常规芯片制作过程，该方法更为简单、经济、灵活，且可制做具有三维曲面几何结构的微通道，可赋予芯片设计和应用以特有的简易性和灵活性。PDMS 不仅能与自身可逆结合，还能与玻璃、硅、二氧化硅和氧化型多聚物可逆结合。以 PDMS 材料作为芯片材料是微流控研究领域的一个拐点事件，它大大降低了微流控芯片研究的门槛，引导了世界范围内的微流控芯片研究热潮。

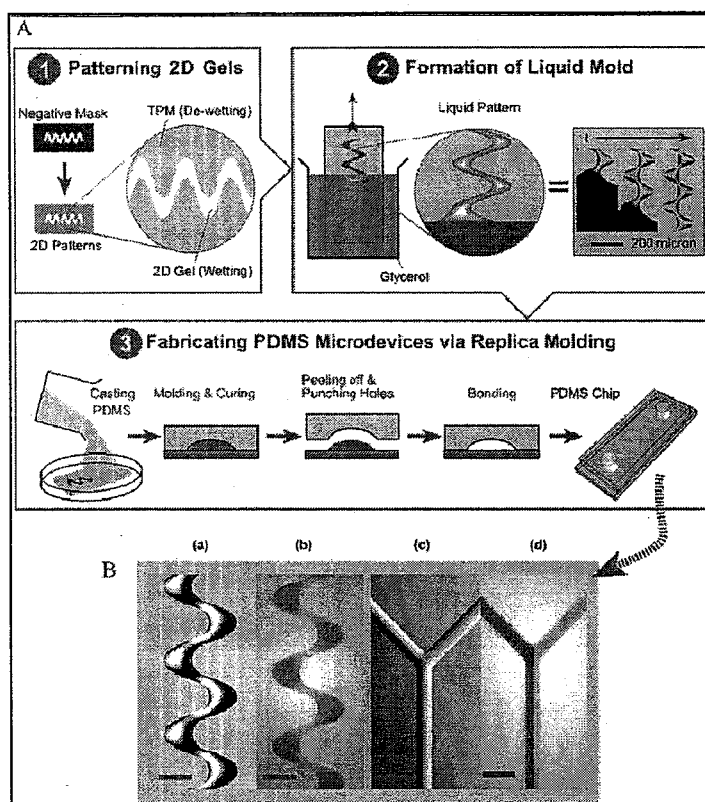


图 1-1 “液塑法”制备 PDMS 芯片过程[13]。

Fig.1-1 Liquid-molding method to fabricate PDMS microdevices.

1.2.1.2 集成薄膜电阻芯片的制作方法

在芯片基质上构建导电薄膜层，经图形加工后可作为不同的功能元件，如温控元件（微加热器/电阻温度传感器，Heater/RTD）、电极、电化学传感器等。在芯片表面沉积金属薄膜，主要有两种方式：物理气相沉积（PVD）和化学气相沉积（CVD）。一般而言，金属薄膜沉积的方式多为物理气相沉积，该过程主要在真空条件下进行，蒸发镀膜和溅射镀膜为常用的两种方法。蒸镀法主要用于在玻璃表面形成金属层，其原理是将靶材金属加热至其蒸发点，使其挥发

出金属原子来进行薄膜的沉积；溅射法则是用高能粒子轰击靶材金属表面，使表面的粒子获得能量并逸出表面，沉积在基片上形成金属薄膜。通常，在硅或玻璃芯片基质上需要先沉积一层活性金属黏附层（钛或铬，10-30 nm），然后在其表面沉积惰性金属（金、铂等，100-300 nm），这里金属黏附层的作用是为了增强惰性金属和芯片基质的附着力。之后镀膜，光刻，最后通过化学刻蚀的方法，如用王水（3: 1 HCl/HNO₃）刻蚀，得到所需的金属薄膜图案。图 1-2 详细展示了 PCR-CE 芯片金属薄膜加热器 / 温度传感器的制作流程[14]。除金属以外，氧化铟锡（ITO）由于透光性好，不影响检测，因此也常被溅射到玻璃基片上，通过光刻技术形成加热器和温度传感器[15]。

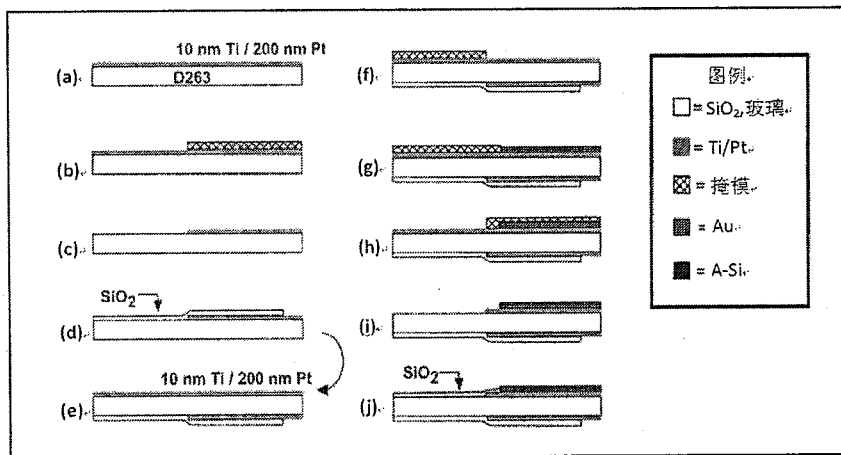


图 1-2 金属薄膜加热器 / 温度传感器制作流程图[14]。

Fig.1-2 Schematic of fabrication process for thin film metal Heater/RTD.

1.2.2 微流体驱动和控制技术

微流控芯片的基本要点之一就是微尺度下的流体进行驱动和控制。因为操作和控制的流体量极其微小，物质的很多表现形式和常量物质有所不同，因

此要求有相应的微流体驱动与控制技术。

在早期微流控芯片研究中，电渗流是主要的流体驱动和控制技术。电渗控制的最大特点是操作简便灵活，流型扁平、无脉动，它无需活动机械部件，仅通过调节不同节点的电位，就可控制微流体的运行方向和迁移速度，完成较复杂的混合、反应和分离等操作。但电渗驱动易受外加电场强度、通道表面、微流体性质及传热效率等因素的影响，稳定性相对较差，而且这种驱动方式仅适用于电解质溶液，因此其应用受到一定的限制。随着近年微流控集成化研究的深入，传统的机械驱动方式在芯片上的应用重新受到重视，主要利用自身机械部件的运动来达到驱动流体的目的，其动力源可以是外置的注射泵[16]，也可能是直接集成在芯片上的各种微泵，如压电微泵[17]和气动微泵[18, 19]。近几年，磁力[20]和离心力[21]也被应用于微流体的驱动当中。

微阀是实现精确可靠流体操控及功能单元规模集成的核心部件。微流控芯片上已经实现的微阀原理各异，种类较多，按照是否需要致动源，可把微阀分成有源阀和无源阀两类。无源阀不需要外部的动力或控制，利用流体本身流向和压力的变化就可实现阀状态的改变，如双晶片单向阀[22]。有源阀也称主动阀，其原理是利用外界致动力来实现阀的开启和关闭。它有多种致动机理，包括气动、热膨胀、压电效应、形状记忆合金、静电、电磁等。

Koh 等发展了一种电控凝胶微阀，利用丙烯酰胺聚合体在高、低电压下的不同性质实现阀开关状态的切换：在低电压下，空穴密集，通路堵塞；而在高电压下，空穴张开，通路打开。他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[23]。芯片结构如图 1-3 所示。

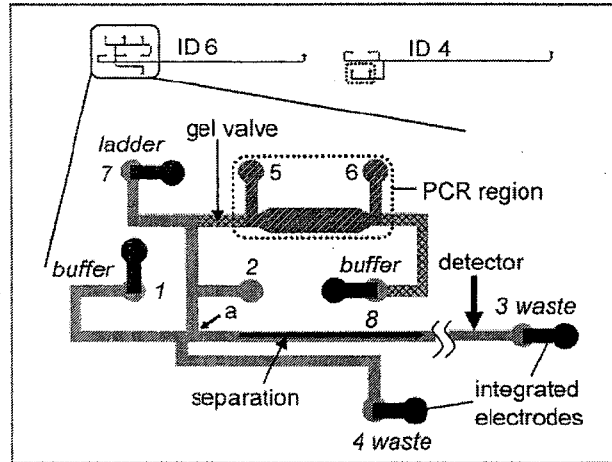


图 1-3 集成凝胶阀的 PCR 芯片[23]。

Fig.1-3 Schematic of the PCR chip integrated gel valve.

Quake 课题组采用多层软光刻技术制作了“常开型”的 PDMS 气动微阀[18]，如图 1-4 (a) 所示，整个微阀为三层结构，封接时气路控制通道和液路控制通道呈交叉构型放置，PDMS 薄膜置于中间。当在气路控制通道施加足够的气压时，中间层的弹性 PDMS 薄膜发生形变而使液路通道堵塞；撤销压力后阀膜恢复原样，通道重新畅通。他们还设计了一种高深宽比、所需气压较小的上推式 (push-up) 微阀[24]，其结构图如 1-4 (b) 所示。多个这样的阀并联可组成气动微泵 (图 1-4 (c))，采用气动阀和气动泵的组合，可完成极其复杂的流体控制。他们在一块 $2.5 \times 2.5 \text{ cm}^2$ 的芯片上集成了上千个微阀和数百个可寻址的微反应室，构成了微流控记忆存储芯片[25]。

同样采用隔膜阀的原理，Mathies 课题组报道了两种适合于玻璃芯片的“常闭型”气动微阀，分别采用三层或四层结构[19]，如图 1-5 所示。三层结构为一种 PDMS/玻璃杂交芯片，在液路控制层和气路控制层间夹入 PDMS 弹性薄膜，构成泵阀结构。四层阀结构，流体通道为均一的玻璃结构，仅在阀的位置通过

两个小孔与 PDMS 薄膜相接触。目前这两种薄膜微泵阀已经在集成化 PCR 反应分析[26, 27]和芯片进样[28, 29]等方面得到应用。

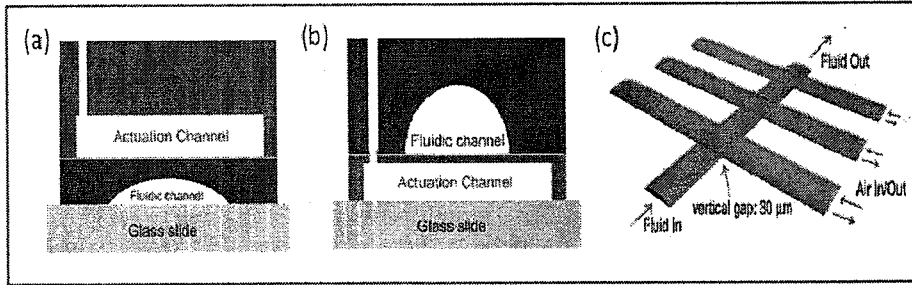


图 1-4 “常开型” PDMS 气动微阀[24] (a)下压式；(b)上推式；(c) 气动微泵[18]。

Fig.1-4 Schematic of the “often-open” microvalves (a) Push down; (b) Push up; (c) Pneumatic micropump.

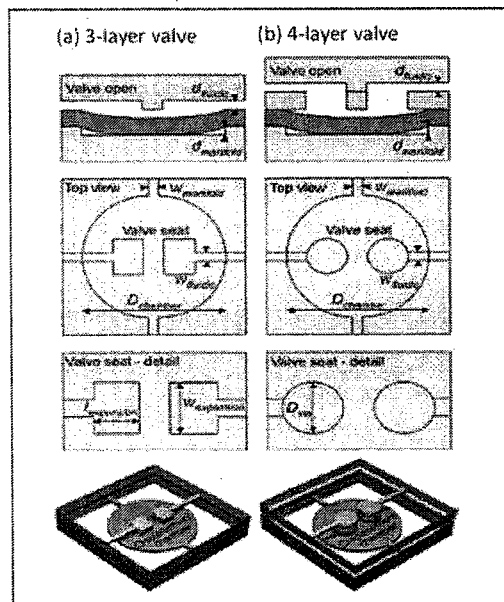


图 1-5 “常闭型” PDMS 气动微阀[19]。(a) 3 层结构；(b) 4 层结构。

Fig.1-5 Schematic of the “often-close” microvalves. (a) 3-layer; (b) 4-layer.

1.3 微流控芯片核酸反应分析系统相关单元技术研究

相对于传统的分析技术平台，微流控芯片的最大优势在于多种操作单元的灵活组合和规模集成。近些年来，随着芯片微加工技术和微流体控制技术的逐渐成熟，微流控芯片核酸反应分析系统的微型化和集成化研究取得了令人瞩目的进展[30, 31]。对于微流控芯片核酸研究来说，无论是其应用范围的不断拓展还是功能的日渐强大，都离不开微流控芯片相关技术的不断完善。

1.3.1 芯片表面改性技术

在微流控芯片中，由于比表面积比较大，表面性质显得尤为重要。未经处理的芯片表面性质单一，不能满足多种实验需求，因此在很多场合必须对芯片表面进行改性处理，以达到预期目的。芯片表面改性的目的主要有：①减小表面非特异性作用；②增强表面特异性作用；③提高表面稳定性。微流控芯片核酸反应分析系统中主要涉及对反应器和分离检测通道的表面改性。

对反应器进行表面改性主要是为了抑制表面对核酸及各种酶的非特异性吸附。已有多种表面钝化技术被用于硅、玻璃及 PDMS 芯片核酸反应当中，比如静态方法[26, 32, 33]，动态方法[34, 35]，以及两者的结合[36, 37]。BSA 是最常用的表面钝化剂，它可以与各种核酸酶竞争反应池内壁的吸附位点，以此来提高芯片反应效率。聚乙二醇（PEG）和聚乙烯吡咯烷酮（PVP）常被用作 PCR “增强剂”，当与其他钝化技术结合使用时，可显著提高 PCR 扩增效率[35]。

对芯片通道表面进行涂层和改性主要是为了控制电渗流和抑制分析物与管壁间的相互作用。玻璃和石英的表面改性可借鉴毛细管电泳和色谱研究中的积累，使用最多的是有机硅烷表面自组装。例如利用聚丙烯酰胺[38-40]或

聚乙烯醇[41]对石英、玻璃芯片进行表面涂层修饰, 可实现对核酸、蛋白质及小分子的高效分离。此外, 在分析前用含有改性剂的溶液冲洗通道或者直接将改性剂加入到运行缓冲液中, 也可实现对通道的动态改性, 常用的改性剂有 PVP [42]、PEG [43]等。

PDMS 芯片的表面改性研究相对较多, 方法各异, 主要有本体掺杂[44, 45], 共价偶联[46, 47], 聚合诱导接枝[48, 49], 以及吸附-交联[50, 51]等。本课题组就发展了一系列基于多层吸附和共价偶联的 PDMS 表面修饰方法[48, 51, 52], 能够很好的抑制电渗流和减少表面对生物大分子的吸附。

1.3.2 芯片混合技术

反应是化学和生物实验室中十分重要的单元操作, 混合通常被认为是反应物在反应前接触的必经过程。一些要求快速反应的生物学过程例如 DNA 杂交, 酶反应, 蛋白折叠等不可避免地涉及反应物的混合。快速均一混合对于化学合成, 生化分析, 药物输送, 核酸测序或合成等领域中的微流控系统具有重要的意义。根据输入能量的不同, 微混合器可分为被动式微混合器 (passive micromixer) 和主动式微混合器 (active micromixer) 两类。图 1-6 中展示了不同类型的微混合器。

被动式微混合器单纯地利用通道几何形状或流体特性产生混合效果, 混合器中不含任何可移动部件。在 Burns 研究组构建的集成化纳升级 DNA 分析装置中, 在 PCR 扩增及酶切反应前, 反应试剂和样品通过 4 个 T 型混合器和一个 Y 型混合器得到充分混合, 在一定程度上提高了反应效率[53]。Quake 研究组利用复杂的通道构型实现混沌混合, 将 DNA 杂交的信号强度和灵敏度提高了近一个数量级[54] (图 1-6 (c))。

主动式微混合器主要借助电场力, 声场, 磁力等外力实现混合。利用超

声振动可以促进混合，提高反应效率。由于锆钛酸铅（PZT）具有较高的机电耦合系数，因此常被选作超声振动的激发源。有研究者将超声振动用于核酸杂交，可将混合时间由单纯靠扩散的 2 h 缩短至 6 s，且杂交效率可提高 5 倍[55]（图 1-6（d））。液滴是近年来在微流控芯片上发展起来的一种全新的操纵微小体积液体的技术。液滴运动时，液滴内部液体将以运动方向为轴，形成两个循环回流，因此可大大加快混合速度，进而提高反应效率。图 1-6（e）为一种阵列的往复式液滴连续流动 PCR 的示意[20]。研究者结合磁力混合和液滴混合，将含有磁珠的 PCR 反应液滴放入注满硅油的平盘反应器中，液滴随反应器下的磁铁在 50-94 °C 的温度梯度间往复流动而实现热循环反应。该系统可在 11 min 内（30 个循环）完成 5 个不同长度的 DNA 片段的同时扩增。

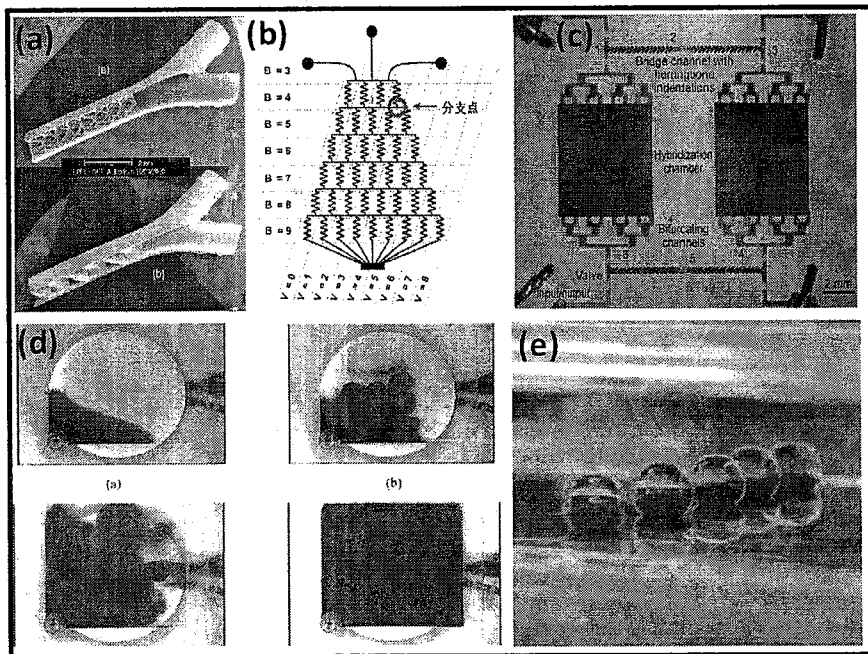


图 1-6 不同类型的微混合器[20, 54-56]。

Fig.1-6 Different kinds of micromixers.

1.3.3 芯片反应技术

与宏观尺度相比，微尺度下的比表面积更大、分子扩散距离更短、传热和传质速度更快。因此，利用微加工技术在硅、玻璃、高聚物等基片材料上加工一系列的微通道、微反应室等三维结构，并集成微阀/泵、微加热器/温度传感器等控制单元，可以在芯片上实现快速、自动、高通量的反应。核酸分析中涉及的生化反应，如核酸杂交/变性，酶切/酶连，PCR 扩增等通常需要在特定温度下完成。因此对于芯片上的核酸反应来说，稳定准确的温度控制与精确可靠的流体操控同样重要。微流体的驱动控制和反应池的表面处理在前面已有描述，本节主要对反应中的温控技术作一介绍。

目前，常用的芯片温控方法有两种：接触式和非接触式。顾名思义，接触式是指热源与反应池直接接触，最简单的加热元件有金属块[57, 58]和 Peltier 半导体[59, 60]。这种分体式的加热方式中加热/测温元件与芯片是分离的，因此加工简单，价格便宜，但热容大，升降温速度较慢，系统体积较大，不便于整体微型化。为此研究者们发展了集成式的温控技术，在芯片上集成薄膜微加热器和温度传感器 (Heater/RTD)，再连接到外部的控制电路实现对反应区的温度控制[14, 26, 38]。薄膜 Heater/RTD 尺寸小，热容和能耗低，热响应快，可集成化程度高。目前这一温控技术已被应用于高度集成的 PCR-CE[38]、RT-PCR-CE 分析[26]，以及短串联重复序列 (STR) 分析[37] 当中。图 1-7 为 Mathies 研究组报道的一种集成有薄膜 Heater/RTD 的 RT-PCR-CE 微流控芯片[26]。钛/铂薄膜加热器和电阻温度传感器分别位于反应池的外部 and 内部，可实现对反应混合液的快速加热和准确测温，完成整个 RNA 反转录、PCR 扩增，以及电泳检测过程仅需 45 min。

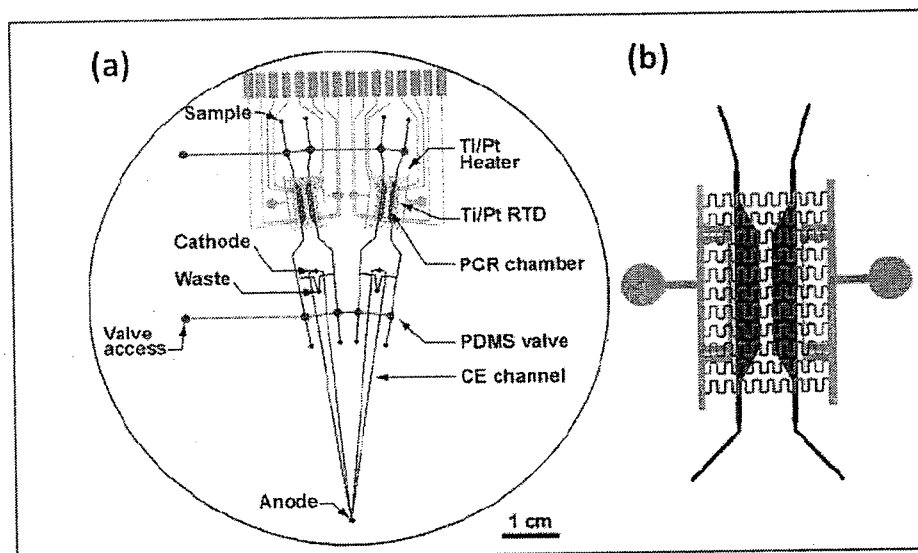


图 1-7 集成化多通道 RT-PCR-CE 芯片[26]。(a) 芯片设计图；(b) 反应区域放大图。

Fig.1-7 Integrated multichannel RT-PCR-CE microdevice. (a) The microdevice design; (b) An expanded view of the microfabricated reactor region.

非接触式的加热方式不需要与反应室直接接触，不必对整个反应系统进行加热和冷却，可有效提高热交换效率。常用的非接触热源有热空气[61]、红外线[62, 63]、激光[64]和微波[65]（图 1-8）。这些温控方法虽然有效，但通常需要特殊的加热装置和额外的参比温度池，因此会在一定程度上降低芯片的集成度和温度控制的重复性。

在各种核酸反应中，PCR 扩增需要在三个温区进行热循环反应，其反应方式具有一定特殊性，可分为反应液静止式和反应液流动式。在静止式芯片 PCR 中，各种反应都发生在有限的空间里，温度周期性变化，控温方式与一般反应基本类似；而在流动式芯片 PCR 中，反应液连续流经三个不同的恒温

带，实现样品的扩增（图 1-9）。流动式芯片 PCR 通过时间和空间的转换实现 PCR 扩增，即样品在每个温区停留的时间取决于样品的流速和该温区内微通道的路径设计。由于通道壁的温度维持恒定而只改变流动液体的温度，因而变温迅速、温度控制相对简单，液体反应物蒸发小，而且在保证一定的扩增效率的前提下，反应体积可变，因此，有可能利用不同的流动控制方法进行单个或多个样品的连续扩增。

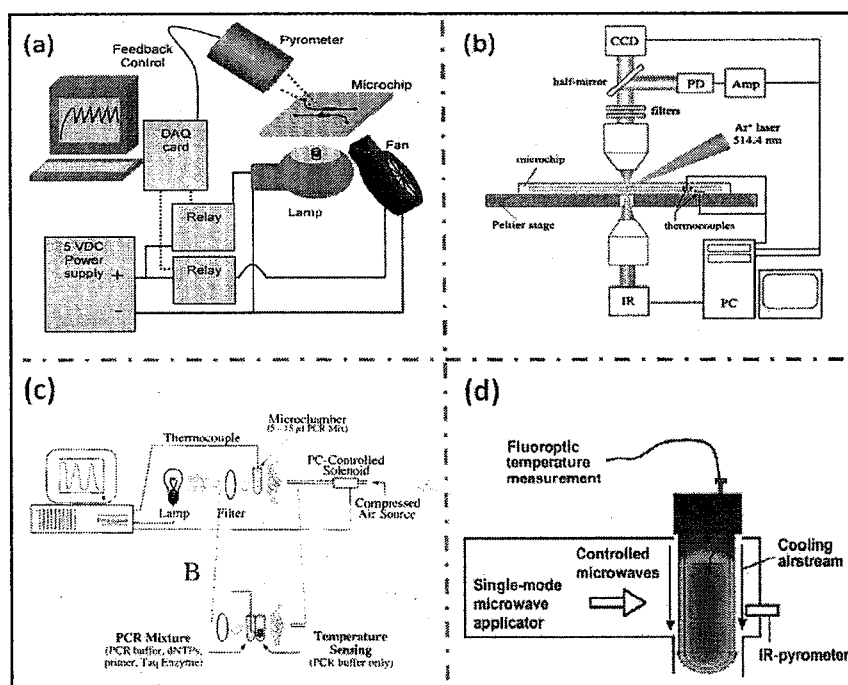


图 1-8 几种非接触式温控方式。(a) 红外[63]; (b) 激光[64]; (c) 热空气[61]; (d) 微波[65]。

Fig.1-8 Different non-contact temperature-control methods. (a) IR; (b) Laser; (c) Hot air; (d) Microwave.

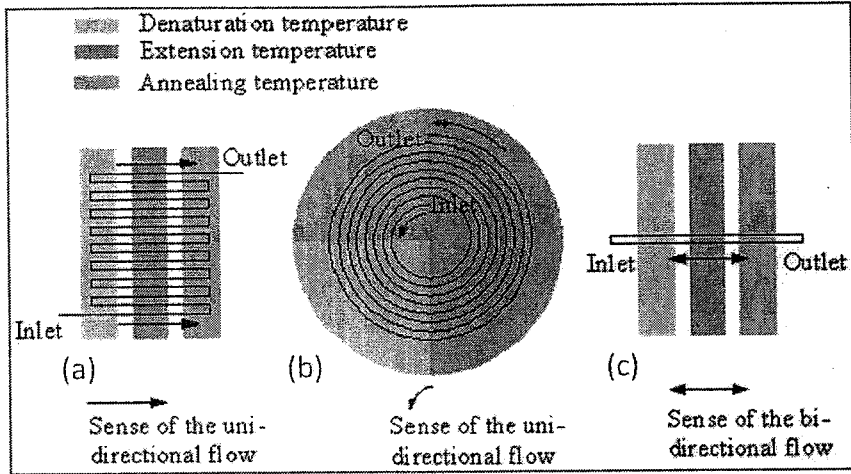


图 1-9 流动式芯片 PCR[66]。(a) 透迤式[57, 67]; (b) 螺旋式[68]; (c) 往复式[58, 69, 70]。

Fig.1-9 Continuous-flow PCR. (a) The serpentine channel continuous-flow PCR; (b) The spiral channel-based continuous-flow PCR; (c) The straight channel oscillatory-flow PCR.

1.3.4 芯片分离检测技术

早期的微流控芯片主要以微全分析系统 (μ -TAS) [1]的形态出现, 分离检测技术在相当一段时间内是微流控芯片的研究主体。到目前为止, 分离检测技术已经成为微流控芯片实验室中发展最快, 成熟度最高的一类技术单元, 它的率先成功有力地推动了微流控芯片实验室的发展。

目前研究较多的微流控芯片核酸分离/检测技术主要包括芯片电泳 (CE) 和芯片实时荧光检测技术。芯片上的其他核酸检测技术也有报道, 如电化学、质谱和生物传感器检测等。

1.3.4.1 芯片电泳技术

电泳是芯片微分离中研究最早、采用最为普遍的一种形式，芯片电泳分离模式多种多样，如区带电泳、筛分电泳、胶束电动芯片电泳、介电电泳、电色谱等，还可以将多种模式结合起来形成多维芯片电泳。芯片电泳具有快速、高效、低消耗、高通量和集成化的优点，尤其是易与其它功能单元集成的能力奠定了它在集成化微流控芯片核酸反应分析系统中的特殊地位[30]。

芯片上的核酸分离主要采用筛分电泳的分离模式，即利用DNA分子和筛分介质（高分子溶胶或凝胶）之间的动态交缠作用，把被分离物质按照分子量大小分开。常用的筛分介质主要有甲基纤维素（MC），羟丙基甲基纤维素（HPMC），线性聚丙烯酰胺（LPA）等。检测方式主要以激光诱导荧光为主。

多年以来，本课题组在不同材质的芯片上（PMMA，玻璃、PDMS、玻璃-PDMS 杂合芯片），对影响核酸分离效率的主要因素，如分离场强、缓冲液组成与微通道表面性质等方面进行了系统考察和优化，建立了一套成熟的核酸分离体系[52, 71-73]，并将其广泛应用于基因分析和病原体检测。图 1-10 即为 Sars 病毒 PCR 产物和 DNA 标准片段在玻璃芯片上的电泳谱图[71]。

芯片通道的阵列设计有利于实现高通量的核酸分析。Mathies 研究组利用精密的微加工技术在圆形玻璃芯片上制作出辐射排列的高密度分离通道，先后实现了 96 通道的快速核酸测序[74]和 384 通道的基因分型检测[75]，这些工作充分体现了核酸芯片电泳快速、高效（高分辨率）以及高通量的特点，可用于大规模核酸样品的快速分离/检测。

随着芯片加工技术的提高和应用需求的拓展，芯片电泳开始与其他的核酸分析单元如细胞裂解、核酸萃取/纯化/富集[17]、各种核酸反应[36, 37, 76]等联用，使核酸分析过程的集成化、自动化成为可能。Mathies 研究组在这一领域取得了令人瞩目的成果，他们的工作在一定程度上代表了该领域的最

高水平，具体内容将在集成化微流控芯片核酸反应分析系统的应用部分予以介绍。

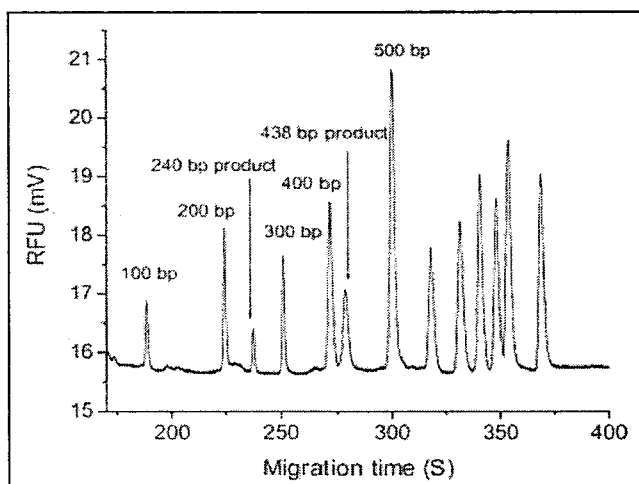


图 1-10 Sars 病毒 PCR 产物和 DNA 标准片段电泳谱图[71]。

Fig.1-10 Electropherogram of Sars virus PCR products + DNA marker.

1.3.4.2 芯片实时荧光检测技术

实时荧光定量 PCR 技术，是在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该技术与芯片 PCR 技术相结合，已成为发展较快的一种芯片核酸检测技术。荧光定量 PCR 所使用的荧光化学主要有荧光探针（TaqMan 荧光探针）和荧光染料（SYBR 和溴化乙锭荧光染料）。由于检测系统中不需要像激光诱导荧光检测那样的激发光源，光路更为简单，整个系统更容易实现便携化。图 1-11 是一种以电池为电源，像公文包大小的便携式实时荧光芯片 PCR 分析仪[6]，该仪器中 PCR 硅芯片不仅集成了薄膜加热器和光检测窗口，而且将基于二极管的整套固态光学检测系统集成到同一芯片上，使该系统无可移动的光学器件，采用 TaqMan 荧光探针，可在 7 min 内（17 s/循环）检测出 *Erwinia* 细胞。

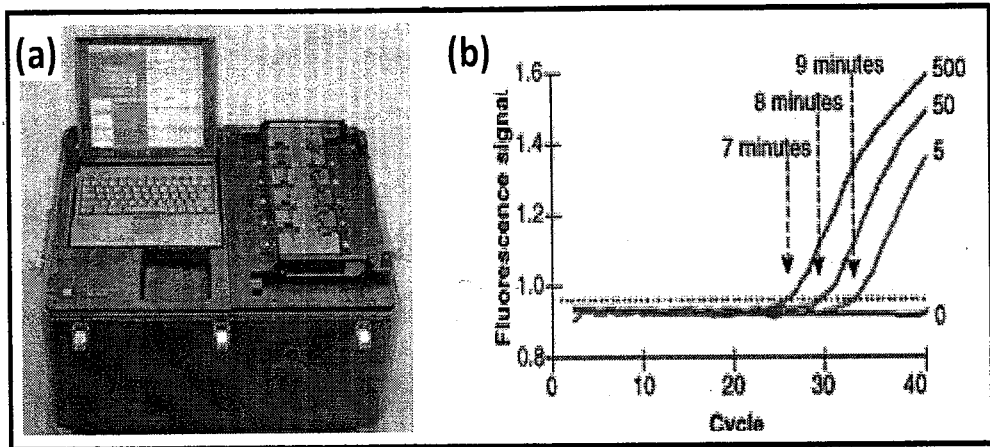


图 1-11 集成化实时荧光芯片 PCR 仪[6]。(a) 实物照片；(b) *Erwinia* 细胞快速实时定量 PCR 分析结果。

Fig.1-11 Advanced Nucleic Acid Analyzer. (a) Photograph of the instrument. (b) Detection profiles obtained by rapid, real-time PCR analysis of *Erwinia* cells.

实时荧光检测也常被用于对 DNA 杂交和酶连反应的研究。通过荧光成像装置，可以对 DNA 荧光探针或分子信标的信号进行实时检测，对于反应动力学研究具有重要意义。近年来研究者们将 DNA 阵列和微流控技术相结合，利用多种多样的流体驱动方式和混合方法，使 DNA 杂交由静态转为动态，杂交速度和效率均大幅度提高[77]。图 1-12 中为几种用于 DNA 杂交研究的芯片装置和它们的荧光图像[55, 78, 79]。

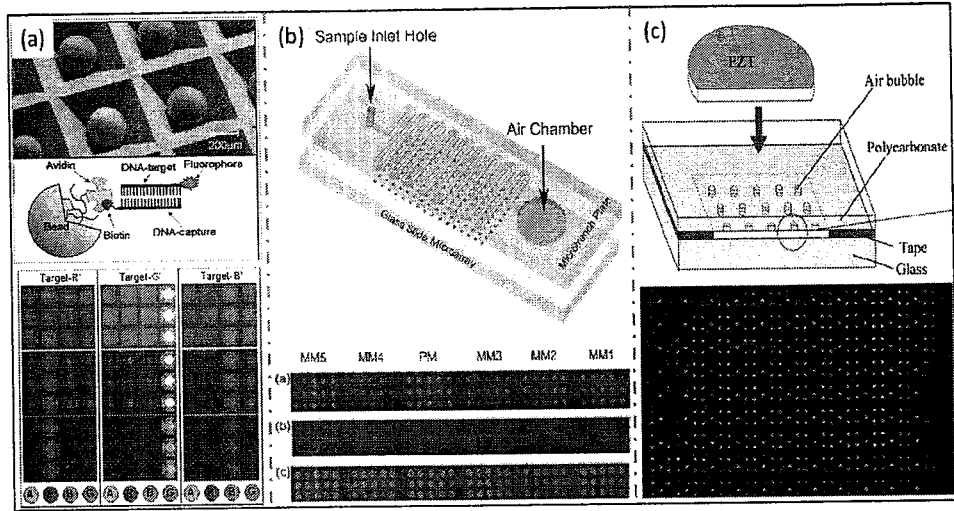


图 1-12 用于 DNA 杂交研究的芯片装置和它们的荧光检测图像[55, 78, 79]。

Fig.1-12 Microdevices for DNA hybridization and their fluorescence images.

1.3.4.3 其他芯片核酸检测技术

电化学 (EC) 检测是通过电极将溶液中的待测物的化学信号转变成电信号以实现对待测组分检测的一种分析测试方法。其主要优势是灵敏度高、选择性好、体积小、装置简单、成本低廉, 兼容性好, 适合微型化和集成化。Lee 等报道了一种集成 PCR-EC 的硅/玻璃芯片[80]: 分别在硅片上集成微反应池和薄膜电阻温控元件, 在玻璃片上集成 DNA 探针修饰的电化学检测用 电极。利用电化学检测技术监测不对称 PCR 扩增得到的单链产物与固定于电极上的 DNA 探针的杂交反应, 可对目标 DNA 进行灵敏、特异的检测和识别。

质谱检测的优势体现在其能够提供试样组分中生物大分子的基本结构和定量信息, 本课题组就曾利用芯片电泳与 ESI-MS 的联用对单链及双链 DNA 进行分析[81]。

DNA 传感器是报道最多的生物传感器，它以 DNA 为敏感元件，通过信号转换器将 DNA 与 DNA、DNA 与 RNA 或 DNA 与其它有机、无机离子之间作用所产生的生物学信号转变为可检测信号（光、电、声等）。Fan 等在金电极上结合修饰过的有特定序列的 DNA，使之与样品中互补 DNA 杂交后，DNA 的构象因此发生变化并产生可被检测的电信号[82]。

1.4 集成化微流控芯片核酸反应分析系统的应用

迄今为止，核酸研究仍是微流控芯片应用最为广泛的领域之一。由于继承了毛细管电泳特征，微流控芯片实验室自出现之初就在核酸研究领域呈现出极强的功能，多种功能单元的灵活组合、规模集成使其的应用范围已由对简单核苷酸序列的分离分析过渡到复杂的遗传学分析和基因诊断等方面。

1.4.1 基因突变检测

基因突变是指由 DNA 序列变异引起的基因结构的变化，包括点突变、基因重排和基因甲基化等类型。基因突变类型不同，其检测手段也有所差别。常见的基于 PCR 基础上的检测方法有等位基因特异性扩增反应（ASA）、异源杂合双链分析（HA）、单链构象多态性分析（SSCP）和限制性片段长度多态性分析(RFLP)等。这些方法的核心是根据电泳时 DNA 片段大小或构象变化所形成的电泳淌度差异来判定基因变异。

微流控芯片与多种基因突变检测方法结合，已用于乳腺癌的易感基因 *BRCA1* 和 *BRCA2* 的点突变的检测[83, 84]。将芯片电泳与单链构象多态性分析（SSCP）技术结合，可以检测到单碱基差异引起的单链 DNA 构象变化，与毛细管电泳相比，芯片电泳方法所需检测时间明显缩短，仅用 120 s[95]。

1.4.2 基因分型

基因分型 (genotyping) 是进行遗传基因多态性分析的必要途径, 常用于疾病诊断、遗传学和法医学等应用研究, 也是微流控芯片核酸研究的主要内容。微流控芯片集快速、高效和集成化特点于一体, 为大规模人群基因分型和多态性研究提供了一个高通量的技术平台。

单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP), 主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性, 基因组内特定核苷酸位置上存在两种以上不同的核苷酸, 其中最少一种在群体中的出现频率不少于 1%。已知某些突变会使 DNA 序列的限制性内切酶位点增多或消失, 从而使内切酶长度片段发生变化。因此采用限制性片段长度多态性分析 (RFLP), 通过比较酶切电泳图谱的变化, 可对基因型进行考察, 进而得到 SNP 相关信息。我们研究组就曾利用微流控芯片对本地区 226 例人群中的 *AGT* 基因 (血管紧张素原, angiotensinogen) 核心启动子区 A (-6) G 位点的基因多态性进行分析[89]。

为满足高通量遗传变异筛查需要, Mathies 研究组研制开发了阵列式玻璃微流控芯片, 实现了对大量样品血色沉着症相关基因 (*HFE*) 常见点突变的检测和基因分型。该芯片有 96 根微通道呈放射状排列于直径 15 cm 的圆盘状玻璃芯片上, 分离通道配有相应的微电极控制样品进样和分离。该系统以聚丙烯酰胺为筛分介质, 以四色荧光扫描检测, 检测 96 个样品仅需 10 min[90]。在此工作基础上, Mathies 研究组还设计了一种更高通量的微流控芯片, 对 384 个样品基因突变检测仅用 325 s, 基因分型准确率达 98.7% [75] (图 1-14)。这样一种以微流控芯片为基础的高通量基因分型技术, 为大规模基因变异和人群筛查提供了强有力的技术支撑。

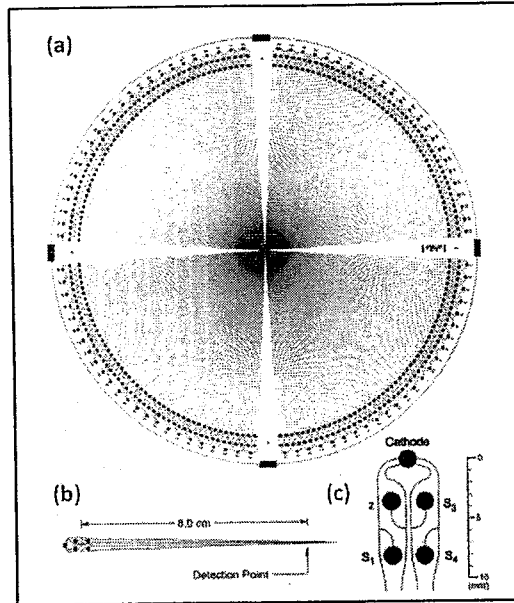


图 1-14 384 通道微流控芯片系统示意图[75]。(a) 384 通道阵列微流控芯片；(b) 每四通道组合单元的放大示意图；(c) 通道进样部分设计图，每四通道共用一个处于圆周边末端的阴极废液池， S_1 - S_4 代表不同样品池。

Fig.1-14 (a) Layout of the 384-lane microfabricated capillary array electrophoresis device on a 200-mm-diameter wafer. (b) Expanded view of a single quartet of channels with their injectors. (c) All channels in a quartet share a commoncathode reservoir located closest to the edge of the wafer. The injector design for every channel is shown at right. S_1 - S_4 indicate individual sample reservoirs.

短串联重复序列 (short tandem repeats, STRs)，又称微卫星标记，是具有长度多态性的 DNA 序列，长度一般为 100-500 bp，其核心部分由 2-6 个 bp 的重复序列构成，两侧是保守的侧翼序列。STR 种类多，多态信息含量高，

是理想的遗传标记,可被用于致病基因定位、遗传图谱构建、遗传连锁分析,以及人群个体识别。

在微流控芯片上进行 STR 基因分型为开展遗传连锁分析和法医学应用提供了潜在平台。早期的芯片 STR 分型研究主要是利用芯片电泳高分辨率、高灵敏度的优势,通过对等位基因特异性 PCR 扩增产物进行快速高效分离实现的[91, 92]。随后开始向高通量、自动化方向发展。图 1-15 是一套基于微流控芯片平台的便携式法医学基因分析系统[27]。由微流控芯片和装置两部分组成,芯片部分包含 STR 片段扩增及分离单元,装置部分可实现芯片控制和产物的四色荧光检测。该系统集 PCR 循环、气动微阀、电泳分离、四色荧光检测于一体,可对四重 Y 染色体 STR 位点进行测定,整个过程耗时 1.5 h,检测限为 20 个拷贝,为大量样本的法医学现场即时分析提供了可行性。

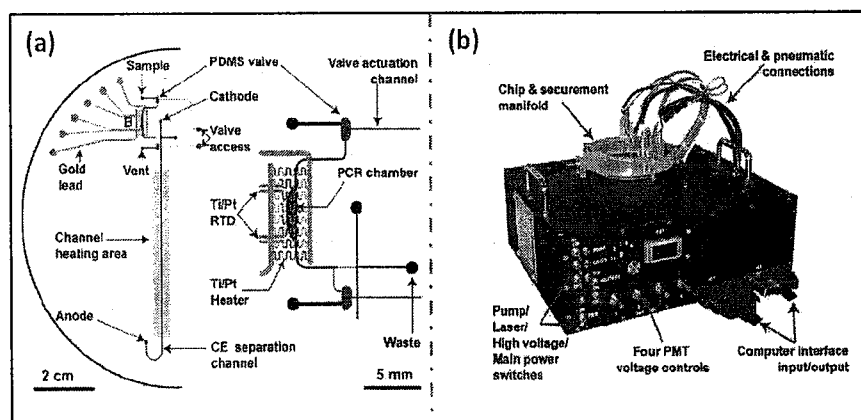


图 1-15 便携式法医学基因分析系统[27]。(a) 芯片设计图; (b) 仪器装置图。

Fig.1-15 Portable forensic genetic analysis system. (a) Mask design for the PCR-CE microchip. (b) Photograph of the portable instrument.

1.4.3 测序

DNA 测序是指 DNA 分子中核苷酸排列顺序的测定, 是核酸序列分析的根本手段。现阶段, 基于链结构转化法 (Sanger 法) 的 DNA 测序流程包括细菌转化、培养、筛选克隆、DNA 复制、Sanger 双脱氧染料末端标记、产物纯化和电泳分离等几个步骤, 过程繁冗, 运行成本高, 仪器设备庞大, 不适用于大规模基因组 DNA 测序应用的需要。而微流控芯片技术则可能将 DNA 测序的步骤集成在芯片上完成, 实现高通量、集成化和微型化的目的。

众所周知, 96 根阵列毛细管电泳的实用化大大加速了人类基因组计划的进程。微流控芯片 DNA 测序研究, 同样以电泳分离为基础。Mathies 研究组以高分子量线性聚丙烯酰胺 (LPA) 为筛分介质, 利用单通道芯片在 3.5 cm 的有效分离距离内, 对 433 bp 的 DNA 序列进行测序, 整个过程可在 10 min 内完成[93]。该工作证实了在芯片上利用很窄的样品区带和较短的分离长度实现 DNA 测序的可行性。

利用高密度阵列设计来增加通量是芯片 DNA 测序的另一优势。Mathies 等设计的 96 通道阵列微流控芯片使测序容量大大提高, 该设计将所有通道呈放射状排列于直径 15 cm 的圆盘状芯片上, 对长度为 410 bp 的序列进行测序仅需 24 min, 准确率可达 99% [94]。该工作充分显示了微流控芯片 DNA 测序快速、高通量的优势。

随着微流控技术的不断成熟, 自动化、集成化的芯片 DNA 测序成为发展趋势。图 1-16 为 Mathies 研究组发展的一套 nL 级自动化核酸测序装置[95]: 该装置可对 nL 级的 DNA 自动进行一系列复杂的基因分析操作: PCR 扩增、捕获 / 纯化、高分辨率测序。芯片由玻璃和 PDMS 杂合而成, 其上集成隔膜微阀和薄膜 Heater/RTD。利用该芯片, 可以对 1 fmol 的 DNA 模板进行扩增、纯化和测序, 测序长度可达到 556 bp, 检出率为 99%。

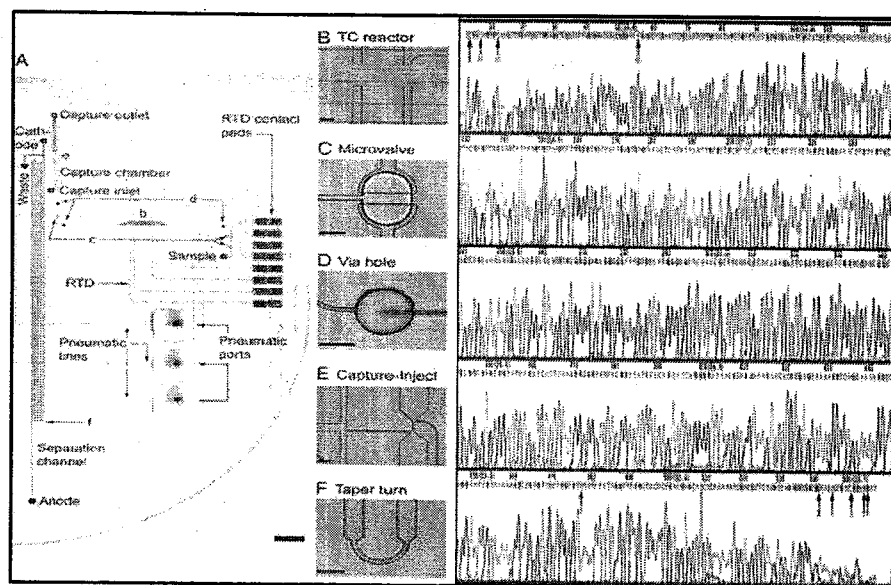


图 1-16 集成化 nL 级 DNA 测序系统[95]。

Fig.1-16 Integrated nanoliter-scale nucleic acid bioprocessor for Sanger DNA sequencing.

1.4.4 病原体基因检测

病原体基因检测是微流控芯片基因诊断技术应用最为广泛的领域。微流控芯片能够将传统检测方法涉及的样品前处理、DNA 或 RNA 提取、PCR 扩增和电泳分离等多个步骤进行功能集成，为病原体基因检测提供了一个有力的技术平台。

对于病原体基因检测，尤其是低拷贝数病毒，检测方法的灵敏度是需要考虑的重要因素之一。本课题组将等速电泳（ITP）和区带电泳（ZE）两种分离模式集成到微流控芯片上，通过 ITP 过程中样品的预浓缩提高检测灵敏度。利用该方法，完成了对 200 例临床实际样品乙型肝炎病毒（HBV）的检测和基因分型[96]。该方法可以检测到模板拷贝数为 10^1 — $10^8/\mu\text{L}$ 的 HBV 基

因产物。与传统的两轮巢式 PCR-凝胶电泳方法相比，不仅缩短了分析时间，而且减少了试剂和样品消耗量。

目前相当数量的基因诊断方法是建立在 PCR 技术基础上的，因此以芯片 PCR 为核心的芯片基因诊断研究也最为普遍。Liao 等利用微泵阀将 RNA 反转录和后续的 PCR 反应集成到一块芯片上，将其用于登革热病毒-2 型和肠道病毒（EV71）的检测[97]，为快速检测 RNA 病毒提供了一条新的途径。

通过各种微泵阀将各反应单元和电泳分析单元偶联，可以实现对产物的实时检测。Burns 研究组设计了一种高集成度的硅-玻璃微流控芯片(图 1-17) [76]。该芯片通过相变微阀将两个可控温的微反应器（PCR 反应和限制性酶切反应）与电泳分离单元进行集成，实现了 PCR-酶切-电泳的无缝衔接，可完成对流感病毒株（A/LA/1/87）的基因检测，整个分析过程仅用 40 min 左右。

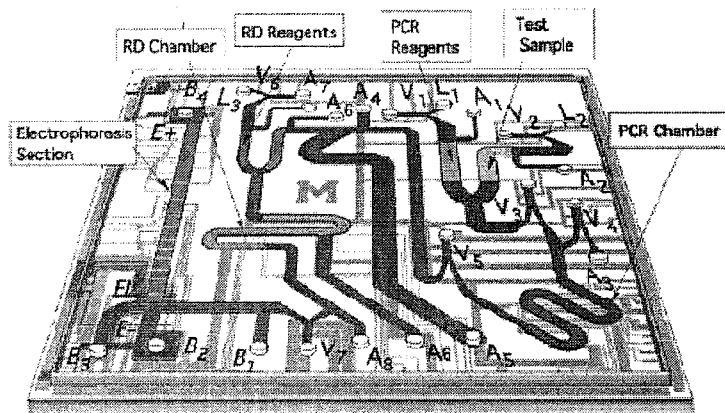


图 1-17 流感病毒检测用集成化微流控芯片示意图[76]。

Fig.1-17 Schematic representation of an integrated microfluidic device for influenza virus detection.

微流控芯片实验室的最终目标是要将一个完整分析过程的所有步骤都集成到同一芯片上。产业界的介入将大大加快微流控芯片核酸反应分析系统的集成化步伐，成熟的商品化仪器和芯片不断被推出。Motorola 公司研发了一种基于 PC 材质的全集成 DNA 分析芯片系统（图 1-18）[17]，能够在线完成从细胞磁珠捕获/富集/纯化/裂解，到 PCR 扩增、DNA 杂交/电化学检测的所有核酸分析过程，从而降低了可能的样品污染，并简化了操作过程。通过集成在芯片上的压电微泵/热气动泵、相变微阀及微混合器，可实现对系统中微流体的复杂操控。利用该芯片系统可从几毫升的全血样品中检测致病菌，也可直接对稀释的血样进行 SNP 分析。

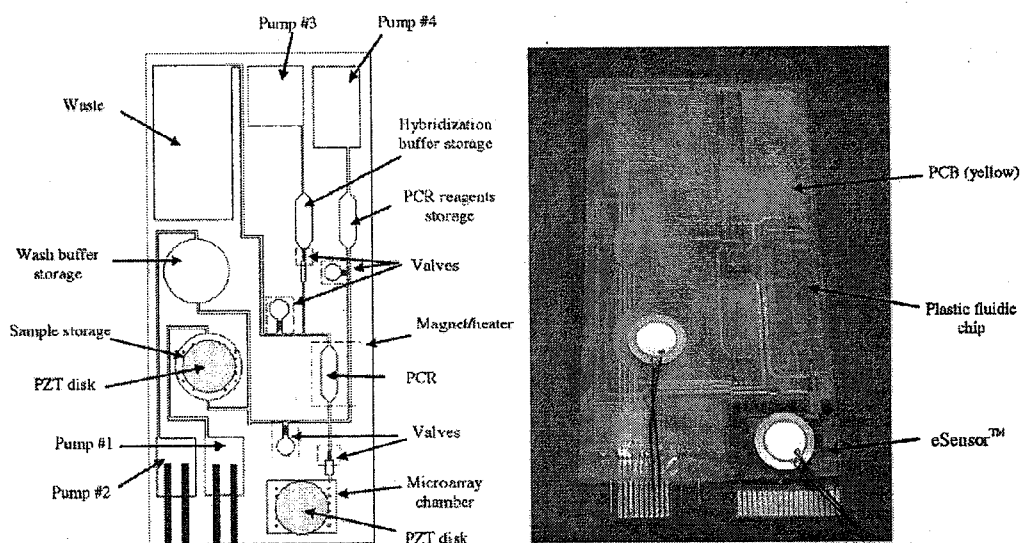


图 1-18 样品纯化/PCR/杂交-电化学检测全集成 DNA 分析芯片系统[17]。

Fig.1-18 Total genetic analysis microfluidic system integrating sample purification/PCR/hybridization-electrochemical detection.

1.4.5 DNA 计算

1.4.5.1 DNA 计算和 DNA 计算机

DNA 计算是一种以 DNA 和相关的生物酶为载体,通过各种生化反应实现的新型分子生物计算方法,其概念最早由 Adleman 等人提出[98]。传统的电子计算机以 0 和 1 编码的字符串进行数据的计算和存储,而 DNA 计算机则是用 DNA 分子储存信息并利用 DNA 生化反应进行计算。

DNA 计算具有并行性高,运算速度快,存储量大,消耗能量低以及资源丰富的优点。因此,它极大地吸引了不同学科、不同领域,尤其是计算机、生物、数学、物理、化学以及信息领域的科学家的关注。当然,DNA 计算也有其局限性。首先,DNA 计算还存在精度问题。生物化学反应的过程中的碱基错配,以及生化反应进行不彻底或发生副反应,都会对后续的计算会产生不良影响。其次,读出结果的技术瓶颈还有待解决。很多情况下,读出结果所消耗的时间远比 DNA 计算过程要长,而分离、输出结果的技术性也很强。而且在现阶段,DNA 计算的多样性和实用性也还远远达不到要求。

从应用对象来讲,由于具有高度并行性,运算速度快等优点,DNA 计算主要被用于解决所谓的非确定性多项式问题(NP 问题),如 Hamilton 路径问题[98],可满足性问题(SAT 问题)[99-101],最大圈问题[102, 103]等。这些问题的求解大都基于粘贴模型(sticker model),通过 DNA 杂交反应实现计算。此外,基于剪接模型(splicing model)的 DNA 计算还被运用于可程序自动机的运算,运算过程通过 DNA 酶切酶连反应实现。Benenson 报道了世界上第一部输入和输出、软件和硬件均由生物分子组成的有图灵机功能的可程序自动机[104]。目前可程序自动机已由最初的 2 符号-2 状态发展到 3 符号-3 状态,并已提出了 37 符号-3 状态的模型[105]。除解决数学问题外,由 DNA 和酶构成的可程序自动机还可被应用于医学诊断和治疗。Shapiro 研究

小组在试管中实现了小细胞肺癌和前列腺癌基因表达的逻辑控制，并在确诊后释放药物，将以前基因诊断和基因治疗两个相对独立的环节结合在一起，使其自动连续进行[106]。

迄今为止，DNA 计算赖以实现的载体主要有三类，即试管、金表面和芯片。早期的工作主要在试管中进行，这一阶段以 1994 年 Alderman 关于 DNA 计算的首篇文章[98]为标志，Lipton[101]，Ouyang[102]等人的研究均为以试管为载体，它的主要成果是证实 DNA 计算基本原理的可行性。从 1998 年开始，基于表面的 DNA 计算模型也逐步展开，最成功的是 Liu 等人在金表面进行了 SAT 问题的 DNA 计算[99]。关于微流控芯片 DNA 计算机的研究工作尚处于起步阶段。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[2]，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。微流控芯片有望取代试管或表面操作，成为 DNA 计算走向实用化的有力工具。

1.4.5.2 微流控芯片 DNA 计算

整体而言，以微流控芯片为平台的 DNA 计算研究还处于起步阶段，早期仅有的几个研究者所做的工作大体停留在模型设想的阶段，真正考虑将微流控芯片用于 DNA 计算机平台研究还只是近些年的事。

1999 年，Gehani 提出了基于微流控技术的生物分子计算的构想[107]。虽然他已经注意到了微流控芯片作为 DNA 计算平台的优势，但由于当时微机械加工技术的限制，他的研究主要集中于体系模型的构建，并没有搭建起真正的用于生物分子计算的微流控装置。

此后，McCaskill 等研究把微流控芯片用作 DNA 计算的选择性转移模块[108]。如图 1-19 (a) 所示，芯片通道中包含连有一定 DNA 链的磁珠，代表备选条件。磁珠在通道 A 捕获溶液中满足条件的 DNA 分子，并将其带到通

道 B, 释放出来, 流向通道 D; 未被捕获的 DNA 分子流向通道 C, 实现选择性转移。磁珠的转移由外部磁场控制。van Noort 在上述模块的捕获和释放通道间增加了冲洗通道, 以去除非特异性吸附的 DNA 分子 (图 1-19 (b))。通过这些模块的串联并连, 实现“与”“或”逻辑控制[109, 110]。他们用此法解决了含有 6 个顶点的最大圈问题, 并提出了解决含有 20 个顶点最大圈问题的微流控芯片模型。

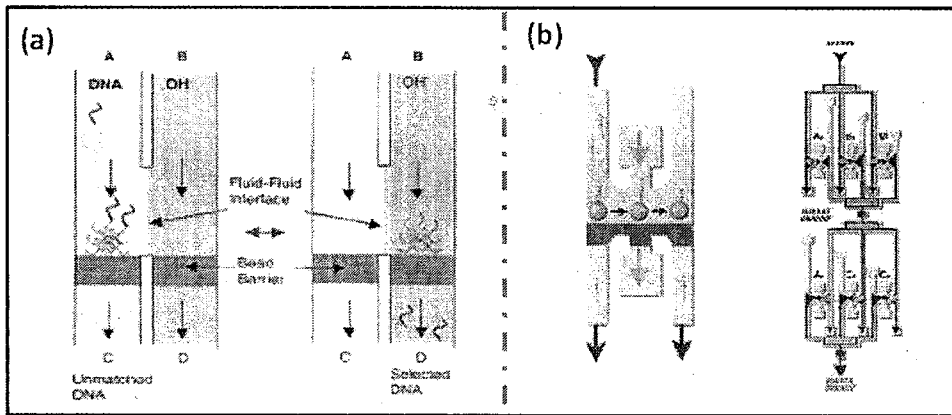


图 1-19 选择性转移模块示意图[108-110]。

Fig. 1-19 Schematic of selective transfer module.

2005 年, Mathies 的研究组在微流控芯片平台上求解满足性问题(图 1-20) [111]。他们利用单核苷酸多态性以碱基 A 或 T 代表二进制数。被编码的 DNA 单链在微阀和微泵的作用下依次流经 16 个捕获池。池中的磁珠连接有代表不同备选条件的 DNA 单链, 能捕获流经的符合条件的 DNA 单链。通过一系列捕获/冲洗/释放步骤, 最终解决了一个 3-变量, 4-语句的满足性问题。与 Liu 的金表面平台[99]和 Braich 的凝胶手段[100]相比, 微流控芯片平台的操作明显更为简便。整个体系的反应动力学、转移效率, 以及单碱基特异性都在一

定程度上得到了改善，在某种程度上显示了微流控芯片平台进行大规模 DNA 计算的潜力。

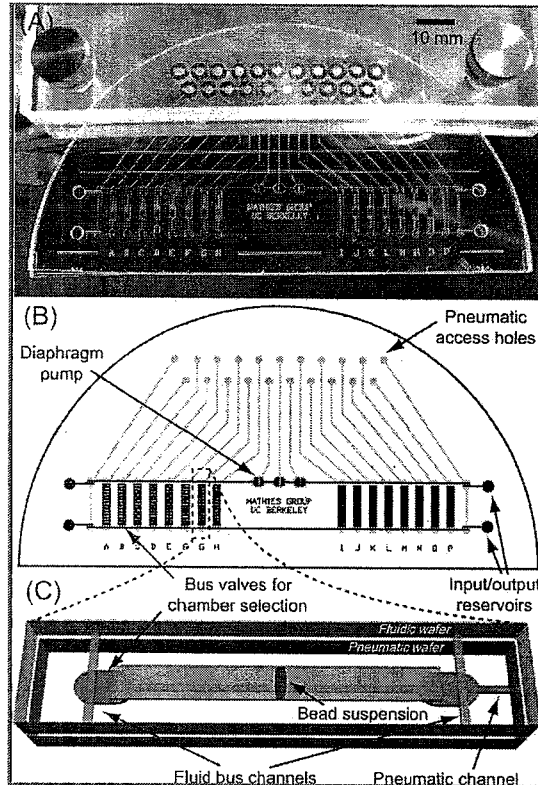


图 1-20 解决满足性问题的微流控芯片实物及示意图[111]

Fig.1-20 Photograph and mask design of the microfluidic processor for SAT problem

上述的研究成果显示，微流控芯片不同操作单元灵活组合、规模集成和整体可控的特点使其较之其他平台更适合于 DNA 计算机的研究工作。它将为今后进行更大规模，更为复杂的 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。

1.5 本论文工作的实验思路设计概述

从上述研究进展可看出微流控芯片核酸反应分析系统相关单元技术已较为成熟,但部分技术对硬件和操作要求较高,在一般实验室推广有一定难度。目前的研究大多基于 PCR 反应分析,其他技术手段的研究有待深入。此外,对于新的应用对象——DNA 计算还需进一步研究。

本论文的研究目的是以微流控芯片为平台,以核酸样品为对象,对微流控芯片核酸反应分析系统中的关键技术进行研究,并实现各技术单元的集成及其初步应用。首先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分别进行了考察,对现有技术进行了改进和优化,为具体应用提供了技术支撑。然后将微流控芯片核酸反应分析系统初步应用于以 DNA 酶反应为基础的 DNA 计算和存储。最终将各单元技术进行集成,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。

参考文献

- [1] Manz, A., Graber, N., Widmer, H. M., Miniaturized total chemical-analysis systems - a novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 1990, 1(1-6): 244-248.
- [2] 林炳承, 秦建华, 微流控芯片实验室. *色谱*, 2005, 23(5): 456-463.
- [3] Whitesides, G. M., The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 2006, 442(7101): 368-373.
- [4] Craighead, H., Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules. *Nature*, 2006, 442: 387-393.

-
- [5] Nagai, H., Murakami, Y., Morita, Y., Yokoyama, K., Tamiya, E., Development of a microchamber array for picoliter PCR. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(5): 1043-1047.
- [6] Belgrader, P., Benett, W., Hadley, D., Richards, J., Stratton, P., Mariella, R., Milanovich, F., Infectious disease - PCR detection of bacteria in seven minutes. *Science*, 1999, 284(5413): 449-450.
- [7] Ziaie, B., Baldi, A., Lei, M., Gu, Y. D., Siegel, R. A., Hard and soft micromachining for BioMEMS: review of techniques and examples of applications in microfluidics and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, 56(2): 145-172.
- [8] Chen, Z. F., Gao, Y. H., Su, R. G., Li, C. W., Lin, J. M., Fabrication and characterization of poly(methyl methacrylate) microchannels by in situ polymerization with a novel metal template. *Electrophoresis*, 2003, 24(18): 3246-3252.
- [9] Martynova, L., Locascio, L. E., Gaitan, M., Kramer, G. W., Christensen, R. G., MacCrehan, W. A., Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(23): 4783-4789.
- [10] Klank, H., Kutter, J. P., Geschke, O., CO₂-laser micromachining and back-end processing for rapid production of PMMA-based microfluidic systems. *Lab on a Chip*, 2002, 2(4): 242-246.
- [11] Anderson, J. R., Chiu, D. T., Jackman, R. J., Cherniavskaya, O., McDonald, J. C., Wu, H. K., Whitesides, S. H., Whitesides, G. M., Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(14): 3158-3164.

-
- [12] McDonald, J. C., Duffy, D. C., Anderson, J. R., Chiu, D. T., Wu, H. K., Schueller, O. J. A., Whitesides, G. M., Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 2000, 21(1): 27-40.
- [13] Liu, X., Wang, Q., Qin, J. H., Lin, B. C., A facile liquid-molding method to fabricate PDMS microdevices with 3-dimensional channel topography. *Lab on a chip*, 2009.
- [14] 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.
- [15] Yang, J. N., Liu, Y. J., Rauch, C. B., Stevens, R. L., Liu, R. H., Lenigk, R., Grodzinski, P., High sensitivity PCR assay in plastic micro reactors. *Lab on a chip*, 2002, 2(4): 179-187.
- [16] Shi, W. W., Qin, J. H., Ye, N. N., Lin, B. C., Droplet-based microfluidic system for individual *Caenorhabditis elegans* assay. *Lab on a Chip*, 2008, 8(9): 1432-1435.
- [17] 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. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(7): 1824-1831.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Ohashi, T., Kuyama, H., Hanafusa, N., Togawa, Y., A simple device using magnetic transportation for droplet-based PCR. *Biomedical Microdevices*, 2007, 9(5): 695-702.
- [21] Peng, X. Y., Li, P. C. H., Yu, H. Z., Parameswaran, M., Chou, W. L., Spiral microchannels on a CD for DNA hybridizations. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2007, 128: 64-69.
- [22] Terray, A., Oakey, J., Marr, D. W. M., Microfluidic control using colloidal devices. *Science*, 2002, 296(5574): 1841-1844.
- [23] 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.
- [24] Studer, V., Hang, G., Pandolfi, A., Ortiz, M., Anderson, W. F., Quake, S. R., Scaling properties of a low-actuation pressure microfluidic valve. *Journal of Applied Physics*, 2004, 95(1): 393-398.
- [25] Thorsen, T., Maerkl, S. J., Quake, S. R., Microfluidic large-scale integration. *Science*, 2002, 298(5593): 580-584.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] Chen, L., Manz, A., Day, P. J. R., Total nucleic acid analysis integrated on microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 2007, 7: 1413-1423.
- [31] 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.
- [32] Easley, C. J., Karlinsey, J. M., Bienvenue, J. M., Legendre, L. A., Roper, M. G., Feldman, S. H., Hughes, M. A., Hewlett, E. L., Merkel, T. J., Ferrance, J. P., Landers, J. P., A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(51): 19272-19277.
- [33] Rodriguez, I., Lesaichere, M., Tie, Y., Zou, Q. B., Yu, C., Singh, J., Meng, L. T., Uppili, S., Li, S. F. Y., Gopalakrishnakone, P., Selvanayagam, Z. E., Practical integration of polymerase chain reaction amplification and electrophoretic analysis in microfluidic devices for genetic analysis. *Electrophoresis*, 2003, 24(1-2): 172-178.
- [34] Waters, L. C., Jacobson, S. C., Kroutchinina, N., Khandurina, J., Foote, R.

- S., Ramsey, J. M., Multiple sample PCR amplification and electrophoretic analysis on a microchip. *Analytical Chemistry*, 1998, 70(24): 5172-5176.
- [35] 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.
- [36] Lagally, E. T., Scherer, J. R., Blazej, R. G., Toriello, N. M., Diep, B. A., Ramchandani, M., Sensabaugh, G. F., Riley, L. W., Mathies, R. A., Integrated portable genetic analysis microsystem for pathogen/infectious disease detection. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(11): 3162-3170.
- [37] 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.
- [38] Liu, C. N., Toriello, N. M., Mathies, R. A., Multichannel PCR-CE microdevice for genetic analysis. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(15): 5474-5479.
- [39] Huang, H. Q., Xu, F., Dai, Z. P., Lin, B. C., On-line isotachophoretic preconcentration and gel electrophoretic separation of sodium dodecyl sulfate-proteins on a microchip. *Electrophoresis*, 2005, 26(11): 2254-2260.
- [40] Ma, B., Zhou, X. M., Wang, G., Huang, H. Q., Dai, Z. P., Qin, J. H., Lin, B. C., Integrated isotachophoretic reconcentration with zone electrophoresis separation on a quartz microchip for UV detection of flavonoids. *Electrophoresis*, 2006, 27(24): 4904-4909.

-
- [41] Belder, D., Kohler, F., Ludwig, M., Tolba, K., Piehl, N., Coating of powder-blasted channels for high-performance microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 2006, 27(16): 3277-3283.
- [42] Song, J. M., Yeung, E. S., Optimization of DNA electrophoretic behavior in poly(vinyl pyrrolidone) sieving matrix for DNA sequencing. *Electrophoresis*, 2001, 22(4): 748-754.
- [43] Giordano, B. C., Copeland, E. R., Landers, J. P., Towards dynamic coating of glass microchip chambers for amplifying DNA via the polymerase chain reaction. *Electrophoresis*, 2001, 22(2): 334-340.
- [44] Roman, G. T., Hlaus, T., Bass, K. J., Seelhammer, T. G., Culbertson, C. T., Sol-gel modified poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices with high electroosmotic Mobilities and hydrophilic channel wall characteristics. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(5): 1414-1422.
- [45] Huang, B., Kim, S., Wu, H., Zare, R. N., Use of a mixture of n-dodecyl-beta-D-maltoside and sodium dodecyl sulfate in poly(dimethylsiloxane) microchips to suppress adhesion and promote separation of proteins. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(23): 9145-9149.
- [46] 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.
- [47] Meng, F., Chen, H. W., Fang, Q., Zhu, H. L., Fang, Z. L., Surface modification of poly(dimethylsiloxane)-fabricated microfluidic chip by UV radiation. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese*, 2002, 23(7): 1264-1268.

- [48] Wu, D. P., Zhao, B. X., Dai, Z. P., Qin, J. H., Lin, B. C., Grafting epoxy-modified hydrophilic polymers onto poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip to resist nonspecific protein adsorption. *Lab on a Chip*, 2006, 6(7): 942-947.
- [49] Sui, G. D., Wang, J. Y., Lee, C. C., Lu, W. X., Lee, S. P., Leyton, J. V., Wu, A. M., Tseng, H. R., Solution-phase surface modification in intact poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(15): 5543-5551.
- [50] 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.
- [51] Wu, D. P., Luo, Y., Zhou, X. M., Dai, Z. P., Lin, B. C., Multilayer poly(vinyl alcohol)-adsorbed coating on poly(dimethylsiloxane) microfluidic chips for biopolymer separation. *Electrophoresis*, 2005, 26(1): 211-218.
- [52] Wu, D. P., Qin, J. H., Lin, B. C., Self-assembled epoxy-modified polymer coating on a poly(dimethylsiloxane) microchip for EOF inhibition and biopolymers separation. *Lab on a Chip*, 2007, 7: 1490-1496.
- [53] Burns, M. A., Johnson, B. N., Brahasandra, S. N., Handique, K., Webster, J. R., Krishnan, M., Sammarco, T. S., Man, P. M., Jones, D., Heldsinger, D., Mastrangelo, C. H., Burke, D. T., An integrated nanoliter DNA analysis device. *Science*, 1998, 282(5388): 484-487.
- [54] 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.

-
- [55] Liu, R. H., Lenigk, R., Druyor-Sanchez, R. L., Yang, J. N., Grodzinski, P., Hybridization enhancement using cavitation microstreaming. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(8): 1911-1917.
- [56] Bertsch, A., Heimgartner, S., Cousseau, P., Renaud, P., Static micromixers based on large-scale industrial mixer geometry. *Lab on a Chip*, 2001, 1(1): 56-60.
- [57] Kopp, M. U., de Mello, A. J., Manz, A., Chemical amplification: Continuous-flow PCR on a chip. *Science*, 1998, 280(5366): 1046-1048.
- [58] Frey, O., Bonneick, S., Hierlemann, A., Lichtenberg, J., Autonomous microfluidic multi-channel chip for real-time PCR with integrated liquid handling. *Biomedical Microdevices*, 2007, 9(5): 711-718.
- [59] Khandurina, J., McKnight, T. E., Jacobson, S. C., Waters, L. C., Foote, R. S., Ramsey, J. M., Integrated system for rapid PCR-based DNA analysis in microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 2000, 72(13): 2995-3000.
- [60] 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.
- [61] 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.
- [62] 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.
- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] 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.
- [66] Zhang, C., Xing, D., Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. *Nucleic Acids Res.*, 2007, 35(13): 4223-4237.
- [67] Obeid, P. J., Christopoulos, T. K., Crabtree, H. J., Backhouse, C. J., Microfabricated device for DNA and RNA amplification by continuous-flow polymerase chain reaction and reverse transcription-polymerase chain reaction with cycle number selection. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(2): 288-295.
- [68] 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.
- [69] Chiou, J., Matsudaira, P., Sonin, A., Ehrlich, D., A closed cycle capillary polymerase chain reaction machine. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(9):

- 2018-2021.
- [70] 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.
- [71] 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.
- [72] Liu, D. Y., Zhou, X. M., Zhong, R. T., Ye, N. N., Chang, G. H., Xiong, W., Mei, X. D., Lin, B. C., Analysis of multiplex PCR fragments with PMMA microchip. *Talanta*, 2006, 68(3): 616-622.
- [73] 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.
- [74] Paegel, B. M., Emrich, C. A., Weyemayer, G. J., Scherer, J. R., Mathies, R. A., High throughput DNA sequencing with a microfabricated 96-lane capillary array electrophoresis bioprocessor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(2): 574-579.
- [75] Emrich, C. A., Tian, H. J., Medintz, I. L., Mathies, R. A., Microfabricated 384-lane capillary array electrophoresis bioanalyzer for ultrahigh-throughput genetic analysis. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(19): 5076-5083.
- [76] Pal, R., Yang, M., Lin, R., Johnson, B. N., Srivastava, N., Razzacki, S. Z.,

- Chomistek, K. J., Heldsinger, D. C., Haque, R. M., Ugaz, V. M., Thwar, P. K., Chen, Z., Alfano, K., Yim, M. B., Krishnan, M., Fuller, A. O., Larson, R. G., Burke, D. T., Burns, M. A., An integrated microfluidic device for influenza and other genetic analyses. *Lab on a chip*, 2005, 5(10): 1024-1032.
- [77] Situma, C., Hashimoto, M., Soper, S. A., Merging microfluidics with microarray-based bioassays. *Biomolecular Engineering*, 2006, 23(5): 213-231.
- [78] 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 Research*, 2005, 33(8).
- [79] Ali, M. F., Kirby, R., Goodey, A. P., Rodriguez, M. D., Ellington, A. D., Neikirk, D. P., McDevitt, J. T., DNA hybridization and discrimination of single-nucleotide mismatches using chip-based microbead arrays. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(18): 4732-4739.
- [80] Lee, T. M. H., Carles, M. C., Hsing, I. M., Microfabricated PCR-electrochemical device for simultaneous DNA amplification and detection. *Lab on a chip*, 2003, 3(2): 100-105.
- [81] Zhou, X. M., Shen, Z., Li, D. Z., He, X. Y., Lin, B. C., Study of interactions between actinomycin D and oligonucleotides by microchip electrophoresis and ESI-MS. *Talanta*, 2007, 72(2): 561-567.
- [82] Fan, C. H., Plaxco, K. W., Heeger, A. J., Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America, 2003, 100(16): 9134-9137.
- [83] Tian, H., Jaquins-Gerstl, A., Munro, N., Trucco, M., Brody, L. C., Single-strand conformation polymorphism analysis by capillary and microchip electrophoresis: A fast, simple method for detection of common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genomics*, 2000, 63: 25-34.
- [84] Tian, H., Brody, L. C., Fan, S., Huang, Z., Landers, J. P., Capillary and microchip electrophoresis for rapid detection of known mutations by combining allele-specific DNA amplification with heteroduplex analysis. *Clinical Chemistry*, 2001, 47(2): 173-185.
- [85] 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.
- [86] Ferrance, J. P., Wu, Q. R., Giordano, B., Hernandez, C., Kwok, Y., Snow, K., Thibodeau, S., Landers, J. P., Developments toward a complete micro-total analysis system for Duchenne muscular dystrophy diagnosis. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 500(1-2): 223-236.
- [87] VanDijken, J., Kaigala, G. V., Lauzon, J., Atrazhev, A., Adamia, S., Taylor, B. J., Reiman, T., Belch, A. R., Backhouse, C. J., Pilarski, L. M., Microfluidic chips for detecting the t(4;14) translocation and monitoring disease during treatment using reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of IgH-MMSET hybrid transcripts. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2007, 9(3): 358-367.
- [88] Zhou, X. M., Shao, S. J., Xu, G. D., Zhong, R. T., Liu, D. Y., Tang, J. W.,

- Gao, Y. N., Cheng, S. J., Lin, B. C., Highly sensitive determination of the methylated p16 gene in cancer patients by microchip electrophoresis. *J Journal of Chromatography B*, 2005, 816(1-2): 145-151.
- [89] Qin, J. H., Liu, Z. Y., Wu, D. P., Zhu, N., Zhou, X. M., Fung, Y. S., Lin, B. C., Genotyping the-6A/G functional polymorphism in the core promoter region of angiotensinogen gene by microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 2005, 26(1): 219-224.
- [90] Medintz, I., Wong, W. W., Berti, L., Shiow, L., Tom, J., Scherer, J., Sensabaugh, G., Mathies, R. A., High-performance multiplex SNP analysis of three hemochromatosis-related mutations with capillary array electrophoresis microplates. *Genome Research*, 2001, 11(3): 413-421.
- [91] Wang, Y., Wallin, J. M., Ju, J. Y., Sensabaugh, G. F., Mathies, R. A., High-resolution capillary array electrophoretic sizing of multiplexed short tandem repeat loci using energy-transfer fluorescent primers. *Electrophoresis*, 1996, 17(9): 1485-1490.
- [92] Schmalzing, D., Koutny, L., Adourian, A., Belgrader, P., Matsudaira, P., Ehrlich, D., DNA typing in thirty seconds with a microfabricated device. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(19): 10273-10278.
- [93] Woolley, A. T., Mathies, R. A., Ultra-high-speed dna-sequencing using capillary electrophoresis chips. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(20): 3676-3680.
- [94] Paegel, B. M., Emrich, C. A., Wedemayer, G. J., Scherer, J. R., Mathies, R. A., High throughput DNA sequencing with a microfabricated 96-lane

- capillary array electrophoresis bioprocessor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(2): 574-579.
- [95] Blazej, R. G., Kumaresan, P., Mathies, R. A., Microfabricated bioprocessor for integrated nanoliter-scale Sanger DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(19): 7240-7245.
- [96] Liu, D. Y., Shi, M., Huang, H. Q., Long, Z. C., Zhou, X. M., Qin, J. H., Lin, B. C., Isotachopheresis preconcentration integrated microfluidic chip for highly sensitive genotyping of the hepatitis B virus. *Journal of Chromatography B*, 2006, 844(1): 32-38.
- [97] Liao, C. S., Lee, G. B., Liu, H. S., Hsieh, T. M., Luo, C. H., Miniature RT-PCR system for diagnosis of RNA-based viruses. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(18).
- [98] Adleman, L. M., Molecular Computation of Solutions to Combinatorial Problems. *Science*, 1994, 266(5187): 1021-1024.
- [99] 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.
- [100] 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.
- [101] Lipton, R. J., DNA Solution of Hard Computational Problems. *Science*, 1995, 268(5210): 542-545.
- [102] Ouyang, Q., Kaplan, P. D., Liu, S. M., Libchaber, A., DNA solution of the

- maximal clique problem. *Science*, 1997, 278(5337): 446-449.
- [103] 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.
- [104] 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.
- [105] Soreni, M., Yogev, S., Kossoy, E., Shoham, Y., Keinan, E., Parallel biomolecular computation on surfaces with advanced finite automata. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(11): 3935-3943.
- [106] 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.
- [107] Gehani, A., Reif, J., Micro flow bio-molecular computation. *Biosystems*, 1999, 52(1-3): 197-216.
- [108] McCaskill, J. S., Optically programming DNA computing in microflow reactors. *Biosystems*, 2001, 59(2): 125-138.
- [109] van Noort, D., Gast, F.-U., McCaskill, J. S., DNA Computing in Microreactors. *Lecture Notes on Computer Science*, 2002, 2340: 33-45.
- [110] van Noort, D., Landweber, L. F., Towards a re-programmable DNA computer. *DNA Computing*, 2004, 2943: 190-196.
- [111] 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.

第二章 微流控芯片核酸反应分析系统关键技术研究

2.1 引言

随着人们对核酸结构、功能与调控的认识不断加深,核酸分析被广泛应用于分子水平的遗传、进化研究,基因组学研究以及基因诊断研究。现代科技文明发展的主旋律之一是微型化和集成化。微流控芯片正是顺应时代发展趋势而生的产物,其基本特征和最大优势是将多种单元技术在微小平台上的灵活组合和规模集成[1]。各种核酸研究技术如 DNA 萃取/纯化[2]、PCR 扩增[3, 4]、分子杂交[5, 6]、电泳分离和检测[7]等都可以单一或集成地转移到微流控芯片上完成。近些年来,随着单元技术的发展和芯片集成度的提高,微流控芯片在核酸研究的各个应用领域,如临床基因诊断[8]、遗传学分析[9]和法医学鉴定[10]等方面都显示了极强的研究功能。对于微流控芯片核酸研究来说,无论是其应用范围的不断拓展还是功能的日渐强大,都离不开微流控芯片相关技术的不断完善。本章工作对微流控芯片核酸反应分析系统中的部分关键技术,如反应温控技术、泵阀驱动技术和分离检测技术分别进行了研究,为微流控芯片核酸反应分析系统的集成化打下了基础。

温度是核酸杂交、酶切酶连、PCR 扩增等核酸反应中的重要参数,因此对微流控系统中反应温度的精确测量和控制至关重要。目前,常用的芯片温控方法有两种:非接触式和接触式。常用的非接触热源有热空气[11]、红外线[12, 13]、激光[14]、微波[15]等。这些温控方法虽然有效,但通常需要特殊的加热装置和额外的参比温度池,因此会在一定程度上降低芯片的集成度和温度控制的重复性。现有芯片温控系统大多采用接触式加热方式,主要有分体式[16, 17]和集成式[18, 19]两种。其中集成式的温控系统因其尺寸小,热容

和能耗低, 响应速度快, 可集成化程度高日益占据主导地位。Mathies 课题组采用金属薄膜工艺将微加热器和电阻温度传感器 (Heater/RTD) 分别制作于玻璃芯片的不同表面[18, 20, 21], 能有效提高传热速率, 并增加测温的准确性和重复性。目前这一温控技术已被应用于高度集成的 PCR-CE[3]和 RT-PCR-CE 分析[21]以及短串联重复序列 (STR) 分析[4]当中。由于控温元件位于玻璃片的不同表面, 制作过程涉及多步金属沉积、刻蚀以及芯片对准过程, 耗时较长, 成本较高, 因此在常规实验室推广存在一定难度。为此, 我们发展了一种简便可靠的芯片制作方法, 将 Heater/RTD 元件集成在玻璃片的同一面, 以简化控温元件的制作过程。采用“RTD 标定/温度校正法”优化芯片反应池的温度控制参数, 并利用核酸酶切反应考察芯片反应温控单元的基本性能。

微流控芯片的运作基础是微通道网络中微流体的驱动和控制技术, 微泵阀是实现精确可靠流体操控及功能单元规模集成的核心部件。电控凝胶微阀是一种与电驱动相适应的流体控制部件, 利用聚合物在高、低电压下的不同性质实现阀开关状态的切换。Koh等将丙烯酸胺凝胶微阀应用于集成的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]。Quake课题组采用多层软光刻技术制作了PDMS气动微阀[23], 并利用3574个集成的微阀在芯片上实现微流控记忆存储[24]。与此同时, Mathies研究组研制了基于玻璃-PDMS夹心构架的气动微阀[25], 采用分别三层和四层结构, 目前这种薄膜微泵阀已经在集成化PCR反应分析[4, 21]和芯片进样[26, 27]等方面得到应用。基于以上的工作, 我们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, 希望从中找到更适合集成化核酸反应分析系统的流体控制驱动方式。

芯片电泳分离/检测技术是微流控芯片领域发展最早也是最完善的一类

单元技术,在整个芯片平台技术的研究中占有特殊的地位。为提高芯片的分离效率,针对石英、玻璃、PDMS等芯片材质,研究者们提出了不同的表面改性方法[28]。但针对玻璃-PDMS杂合芯片的表面改性研究进行的还比较少。我们的研究目的就是发展一种适合于玻璃-PDMS杂合芯片的简便易行的动态改性方法,将其用于核酸分离体系。实验证明在电泳缓冲液中添加改性剂PVP和甘露醇能明显改善分离效果,实现对核酸的高效分离,可应用于各种核酸反应产物的分离检测和定性分析。除此以外,这种动态改性方法对常用的玻璃芯片也同样适用。

2.2 芯片反应温控技术

2.2.1 实验部分

2.2.1.1 材料与试剂

限制性内切酶 *FoKI* 和及其相关试剂购自大连宝生物公司。DNA 片段(321 bp)由商用 PCR 仪扩增获得。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 cps)购自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。HPMC 称重后溶于 1×TBE 缓冲液(100mM Tris, 100mM 硼酸, 2mM EDTA, pH 8.5), 其中加入 1 μM 嵌入式 DNA 标记染料 GeneFinder™(厦门百维信生物科技有限公司, 二甲亚砷稀释 100 倍保存, 激发和发射波长分别为 495 nm/ 515 nm), 作为 DNA 筛分介质。除特别声明外的其它试剂均为分析纯, 所有溶液均由双蒸水配制。

2.2.1.2 集成式反应温控芯片设计和制作

将芯片反应器和微型控温元件 (Heater/RTD) 结合起来, 制成集成式反

应温控芯片。微通道及反应池位于上层玻璃片，微型控温元件制作于下层平板玻璃片的背面。直接利用玻璃芯片上的储液池作为敞开式反应器。可简化芯片设计。

芯片的制作方法如下：(1) 以标准的光刻和湿法蚀刻法[29]制作玻璃片(1.6 mm 厚)通道层结构，在相应位置超声打孔(直径 3 mm)作为储液池；(2) 将其与另一平板玻璃片进行高温封接；(3) 芯片成形后，将底层玻璃片打磨至厚约 0.6 mm 并抛光，以获得理想的传热效果和足够的机械强度；(4) 在清洗过的抛光芯片背面沉积金属薄膜(Ti/Pt: 100 Å/600 Å)、涂覆光刻胶并曝光、显影；(5) 金属薄膜用王水(3:1 HCl/HNO₃, 90 °C)刻蚀，以得到所需的控温元件；(6) 集成式 Heater/RTD 在 550 °C 退火 30 min，以稳定其电阻。微型 Heater/RTD 的结构详见图 2-1，其中加热电阻(灰色)线宽 2 mm，测温电阻(黑色)及其连接导线的线宽分别为 50 μm 和 250 μm。

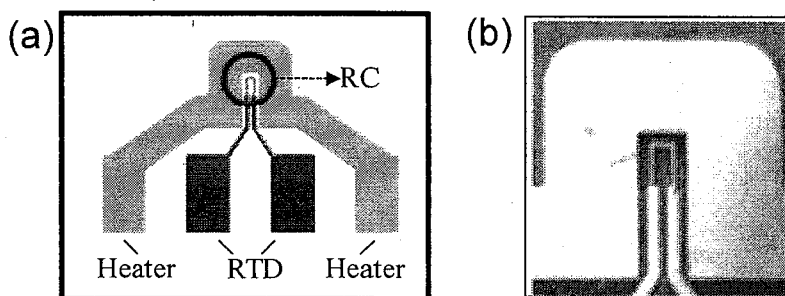


图 2-1 微型 Heater/RTD。(a) 结构示意图；(b) 实物照片。

Fig.2-1 Heater/RTD. (a) Schematic illustration; (b) Photograph.

2.2.1.3 集成式温控装置

采用自行设计搭建的电路来控制芯片反应池的温度(图 2-2)。RTD 电阻值用 100 Hz 低通过滤器采集过滤。温度控制由脉宽调控(PWM)模块完

成，并由 Visual C++编写的软件进行上位机控制。金属薄膜微加热器由达林顿管控制，运行电压为 12 V。需要加热时，计算机控制 PWM 模块全速加热直至反应池的温度接近设定值（低于设定温度 4 °C 以减小过冲）；随后，PWM 模块维持温度恒定（控温精度为 ± 0.5 °C）。

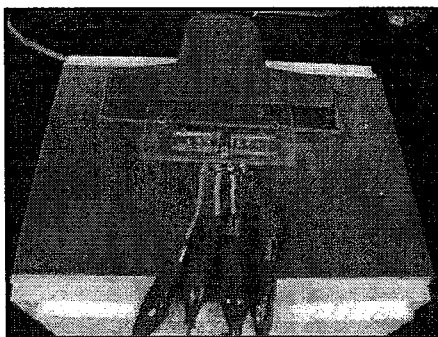


图 2-2 自制芯片温控仪。

Fig.2-2 Custom-built chip temperature controller.

2.2.1.4 集成式温控系统校准

为实现对芯片反应稳定且准确的温度控制，需对集成式温控系统进行校准。采用“RTD 标定/温度校正法”优化芯片反应池的温度控制参数：（1）将芯片置于水浴中，保持导线连接点高于水平面；（2）将水浴温度从室温升至 100 °C，以 10 °C 间隔测量 RTD 电阻值及对应的温度值。电阻-温度关系符合 Calendar Van-Dusen 方程[30]，从该方程可确定公式中所需常数的值。（3）校正反应池内溶液实际温度和 RTD 测量温度之间的温差。向反应池中加入 7 μ L 双蒸水及 7 μ L 矿物油，进行程序升温测量。以集成的 RTD 测量温度为参考温度，浸没式热电偶温度计（TES-1310，台湾泰仕公司）测得的溶液温度为实际温度，对其作图，得到工作曲线。该工作曲线被用于后续反应的温度

控制。

2.2.1.5 酶反应及产物检测

玻璃对酶和核酸的吸附作用会对反应产生的不良影响，因此需对反应池进行处理。反应前以牛血清白蛋白（BSA，10mg/mL）溶液处理反应池，以抑制池壁对酶和 DNA 的吸附，提高反应效率。

酶切反应条件：将 5 单位 *FokI* 酶和 2 pmol DNA 分子（长度 321 bp）加入 10 μ L 反应缓冲液中，在 37 °C 条件下反应 40 min。反应液表层覆盖矿物油以防止挥发。

用丙烯酸胺静态涂层[31]的玻璃芯片分离检测酶切产物（1: 20 稀释）。分离介质为 2% HPMC-50cps（pH8.5，100mM TBE 缓冲液），染料为 GeneFinder™，进样电压 400V/cm，分离电压 250 V/cm，分离长度 3.5 cm。

2.2.2 结果与讨论

2.2.2.1 微加热器/电阻温度传感器的制作

现有芯片反应系统大多采用接触式加热方式，主要可分为分体式和集成式两种。相较于分体式芯片加热方式，集成式芯片加热方式更能体现微流控芯片实验室的集成化优势，一般是在芯片上集成薄膜 Heater/RTD，再通过连接到外部的控制电路来实现对反应区的温度控制[18, 19]。Mathies 研究组发展了集成化的 PCR-CE 微流控系统，其 Heater/RTD 分别制作于玻璃的两面[20, 21]。这种结构的 Heater/RTD 控温准确，响应灵敏，但其制作过程涉及多步金属沉积、刻蚀以及芯片对准过程，耗时较长，成本较高，在非专业微加工实验室推广难度较大。

我们发展了一种可靠的微加工方法来制作稳定的 Heater/RTD 元件，将 Heater/RTD 元件制作在玻璃片的同一面。制作过程中只包含一步金属沉积、

刻蚀过程和芯片对准过程,与传统方法[20, 21]相比更简便、快速、成本较低,易于在常规实验室推广。

2.2.2.2 芯片温控系统性能考察

为满足芯片反应过程中温度控制的需要,我们自行设计并搭建了芯片温控电路及相应的芯片接口(图 2-2)。温度控制由脉宽调控(PWM)模块完成,并由 Visual C++编写的软件进行上位机控制。其参数控制界面见图 2-3,可设置工作曲线参数,并对循环数、时间和温度进行控制。

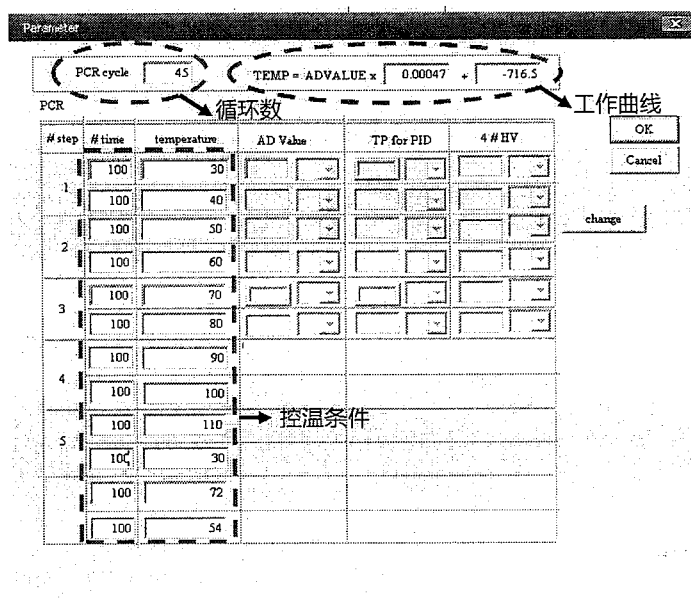


图 2-3 软件控制参数界面图。

Fig. 2-3 Parameter window of the software.

图 2-4 为不同设定温度下的温度波动曲线。从图中可明显看出,在设定温度下,RTD 的温度波动均小于 $\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$,这就保证了芯片反应控温的精确性。

为保证芯片反应在稳定且精确的温度控制下进行，需对集成式温控系统进行校正，采用 2.2.1.4 中所述的“RTD 标定/温度校正法”优化芯片反应池的温度控制参数。首先以水浴法对 RTDs 进行校准，得到的校准曲线见图 2-5 (a)。用 Calendar Van-Dusen 方程[30]对其进行拟合：

$$R_T = R_0(1 + AT + BT^2) \quad (2-1)$$

公式中 R_0 是指温度在 0°C 时 RTD 的电阻值，A、B 为常数。计算得到的 B 值很小，趋近于 0，说明在此温度范围内，RTD 电阻对温度的响应接近线性 ($R^2 = 0.9995$)。再校准反应池液中液体温度和 RTDs 的温度，得到线性良好的工作曲线 (图 2-5 (b)， $R^2 = 0.9998$)。该工作曲线被用于后续反应的温控。

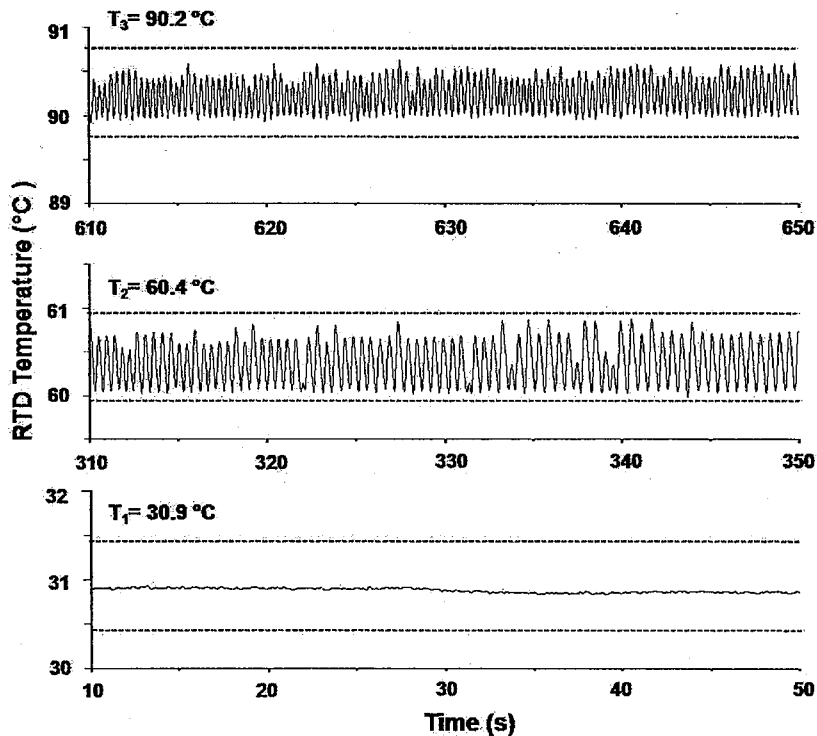


图 2-4 温度波动曲线。

Fig. 2-4 Temperature variations at different set-points.

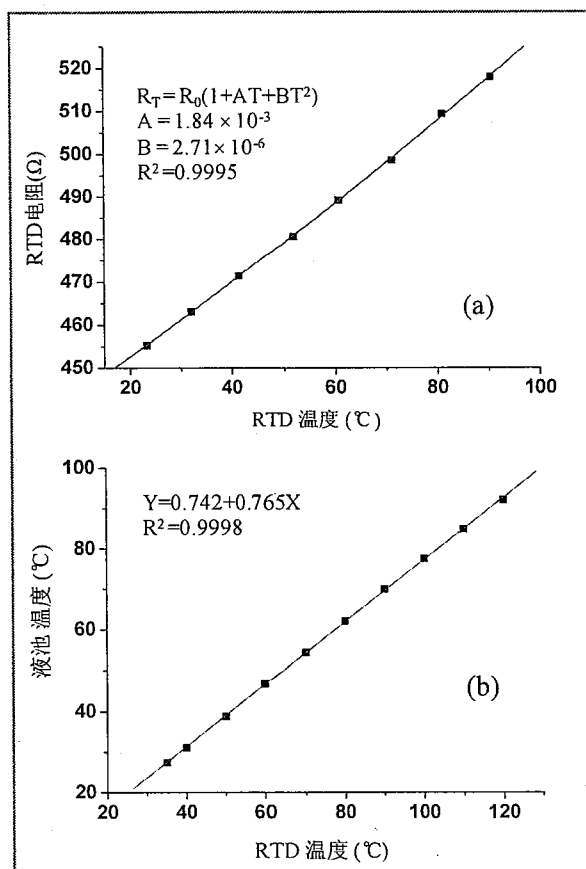


图 2-5 温控系统校准曲线。(a) 集成式 RTD 电阻-温度标准曲线;(b) RTD 温度和反应液池温度校正曲线。

Fig. 2-5 Characterization of the temperature control system. (a) Calibration curve for the RTD; (b) Temperature correction curve between RTD and the liquid inside the RC.

2.2.2.3 芯片温控反应的效果

在集成化温控芯片上进行 *FoKI* 酶切反应, 以考察芯片反应控温的实际效果。在反应前后, 分别取 1 μ L 反应液稀释 20 倍, 以丙烯酰胺静态涂层[31] 的玻璃芯片分离检测。图 2-6 中, (a) 为反应前体系的电泳谱图, (b) 和 (c)

为反应后体系的电泳谱图，其中 (b) 反应池未经处理，(c) 反应池经过 BSA 处理。321 bp 的 DNA 片段被 *FokI* 酶切后，将生成 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。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。从图中可以看出：(1) 在图 2-6 (b) 中，目标分子在迁移时间上与图 2-6 (a) 中基本相同，几乎没有 287 bp 的产物片段被检测到，这是由于未经处理的反应池壁对酶和核酸的强烈吸附造成的。由此证明反应池的处理对芯片反应来说是必不可少的。(2) 相对于图 2-6 (a)，(c) 中的目标分子在迁移时间上明显前移，说明 321 bp 的 DNA 片段经 *FokI* 酶切后生成了较短的 DNA 片段 (287 bp)，证明利用自行设计搭建的反应温控体系，可以在微流控芯片上顺利实现反应。目前的实验中反应和产物检测是分步进行的，如能将反应器、微泵微阀、芯片电泳等操作单元集成到一块芯片上，即可实现对反应实时在线的检测。

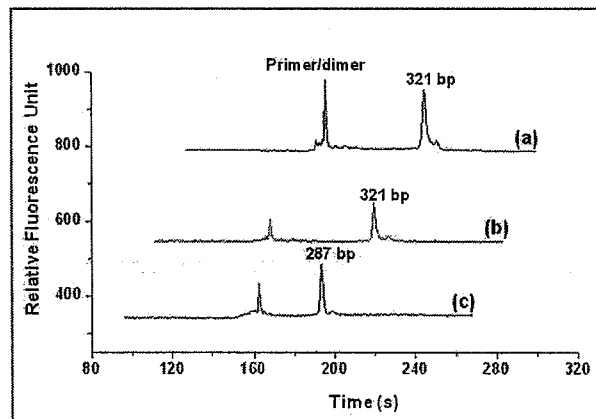


图 2-6 *FokI* 酶切反应体系电泳谱图。(a) 反应前；(b) 反应后，反应池未经处理；(c) 反应后，反应池经过 BSA 处理。

Fig.2-6 Electropherograms of *FokI* digestion reaction systems.

2.3 芯片泵阀驱动技术 (I): 电控凝胶微阀

2.3.1 实验部分

2.3.1.1 材料与试剂

凝胶单体丙烯酰胺 (AAM)、交联剂 N,N,N',N' -亚甲基双丙烯酰胺 (BIS) 和引发剂 Igcure 购美国 sigma 公司。Tris、盐酸购自沈阳化学试剂厂。电泳试剂信息详见 2.2.1.1。DNA 标准片段(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。除特别声明外的其它试剂均为分析纯, 所有溶液均由双蒸水配制。所需微图形用 Freehand 软件设计, 商用激光照排机 (5000 dpi) 输出的胶片作为掩模。

溶液配制:

- 1) AAM-BIS水溶液: 按 AAM:BIS=19:1 (质量比) 配制, 总浓度为30%。
- 2) Tris-HCl 溶液: 1.5 M Tris, pH 8.8。
- 3) 凝胶溶液: 26.7 μL AAM-BIS 水溶液, 45.8 μL H_2O , 25 μL TBE 溶液, 2.5 μL Igcure, 配制成终浓度为 8%的凝胶溶液。
- 4) 电泳缓冲液: 详见 2.2.1.1。

2.3.1.2 设备和芯片

商用激光照排机 (5000 dpi) 输出的胶片作为掩模。紫外光源采用 Oriol 87436 紫外光照系统, 系统配备 500 W 汞灯。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[2]。它在结构上包括以下几大子系统: 激光诱导荧光检测及 CCD 图像监测光学系统、八电极直流高压电源系统、程控三维精密平移台、精密注射泵、控制电路系统及软件系统等, 其检测原理图见图 2-7。