

图 2-10 液滴的混合。

Fig. 2-10 Photograph of droplets mixing.

2.3.2 液滴的连续操控

2.3.3.1 非磁性液滴的连续操控

本实验将液滴生成和连续的溶液添加-液滴分裂单元，集成于同一芯片上用于在线 SPE 实验。将各液滴单元通过通道直接连接，如图 2-1 所示，实现样本引入、杂质清洗和 DNA 洗脱步骤。各液滴操控单元连续、稳定进行，如图 2-11 所示：(a) 液滴连续生成；(b) 生成的液滴经过第一个液滴分裂单元，并分裂成两个大小不同的液滴；(c) 其中较小的液滴在经过第一个溶液添加单元时，被加入新的反应液；(d) 而后，此液滴经过第二个液滴分裂单元，又分裂成两个大小不同的液滴；(e) 其较小液滴在经过第二个溶液添加单元时，再次被加入新的反应液；(f) 最后，此液滴在经过第三个液滴分裂单元时，分裂成两个大小不同的液滴。

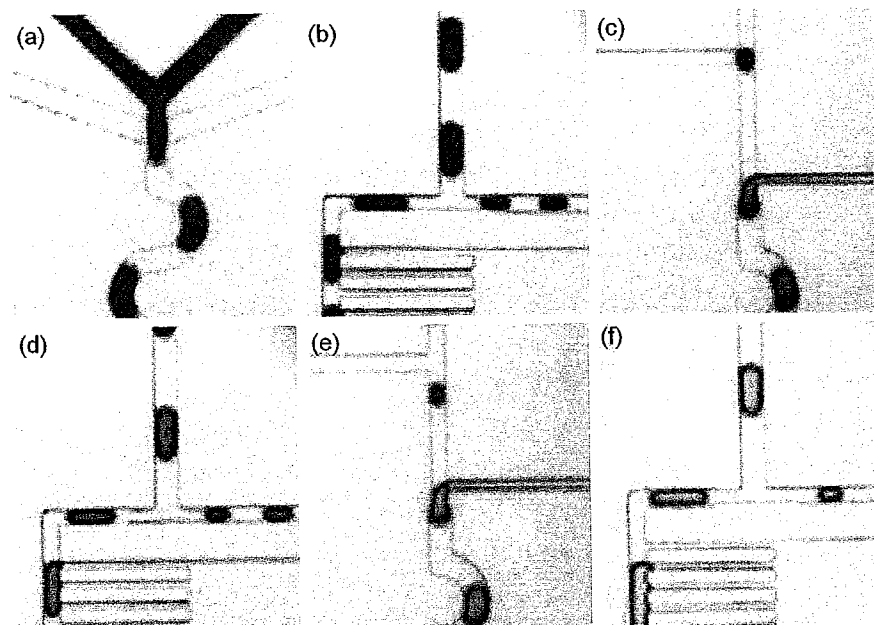


图 2-11 连续液滴操控过程。(a) 液滴连续生成；(b) 生成的液滴经过第一个液滴分裂单元，并分裂成两个大小不同的液滴；(c) 其中较小的液滴在经过第一个溶液添加单元时，被加入新的反应液；(d) 而后，此液滴经过第二个液滴分裂单元，又分裂成两个大小不同的液滴；(e) 其较小液滴在经过第二个溶液添加单元时，再次被加入新的反应液；(f) 最后，此液滴在经过第三个液滴分裂单元时，分裂成两个大小不同的液滴。

Fig. 2-11 The process of sequential droplet processing. (a) Droplets generated in continuously; (b) a droplet splits into two droplets in different ratio in the 1st droplet splitting unit; (c) and the small droplet was added into additional solution in the 1st reagent addition unit; (d) this droplet then splits into two droplets in different ratio in the 2nd droplet splitting unit; (e) and the small droplet was added into additional solution in the 2nd reagent addition unit; (f) at last, the droplet splits into two droplets in different ratio in the 3rd droplet splitting unit.

2.3.3.2 磁性液滴的连续操控

按照上述描述的实验过程,液滴分裂后生成的两个液滴含有相同的成分。当液滴分裂用于废液弃除时,样本中的有效成分(即 SPE 实验中的 DNA)也同时被弃除。显然,这种液滴分裂方法不适于直接用于芯片 SPE 实验。我们将磁珠作为 SPE 的固相介质,将一块合适大小的永久性磁铁放置于“T”型分裂通道的右侧,用于在液滴分裂时将磁珠吸引入右侧的液滴中(小的液滴)。如图 2-12 (b) 所示,受磁力作用,液滴中的磁珠会慢慢的聚集到磁铁的一侧(右侧),越靠近磁铁,其聚集程度越高。当液滴分裂时,绝大部分磁珠分配入右侧的液滴,而左侧的液滴中含有的磁珠量极少,如图 2-12 (c) 所示。当然,液滴中磁珠的比例不能太高,否则在右侧液滴中磁珠(空间)饱和的情况下,剩下的磁珠会分配入左侧的液滴。因为所选用的磁珠具有超顺磁性,在远离磁场的情况下会重新悬浮于溶液中。如图 2-12 (d) 所示,聚集的磁珠在远离磁场、接近溶液添加通道的位置时,基本上恢复悬浮的状态。在靠近下一个液滴分裂单元时,磁珠仍会聚集在液滴的右侧,并在液滴分裂时,分配入右侧的液滴,如图 2-12 (e)。而没有磁场的存在的情况下,磁珠在液滴中不会发生聚集现象。当液滴分裂时,磁珠分配入两个液滴中,其浓度没有明显的差异,如图 2-12 (a) 所示。

磁力大小对上述过程的实现起着非常重要的作用,故磁铁大小及摆放位置需要优化。磁铁应该摆放的离“T”型分裂通道交汇处越近越好。在提供足够磁力吸引磁珠的情况下,离液滴分裂通道越近需要的磁铁就越小,那么,在溶液添加区的磁珠感受的磁力会越小。依本文使用的芯片尺寸和磁珠大小,直径 2 mm、高 1mm 的永久性磁铁是合适的。

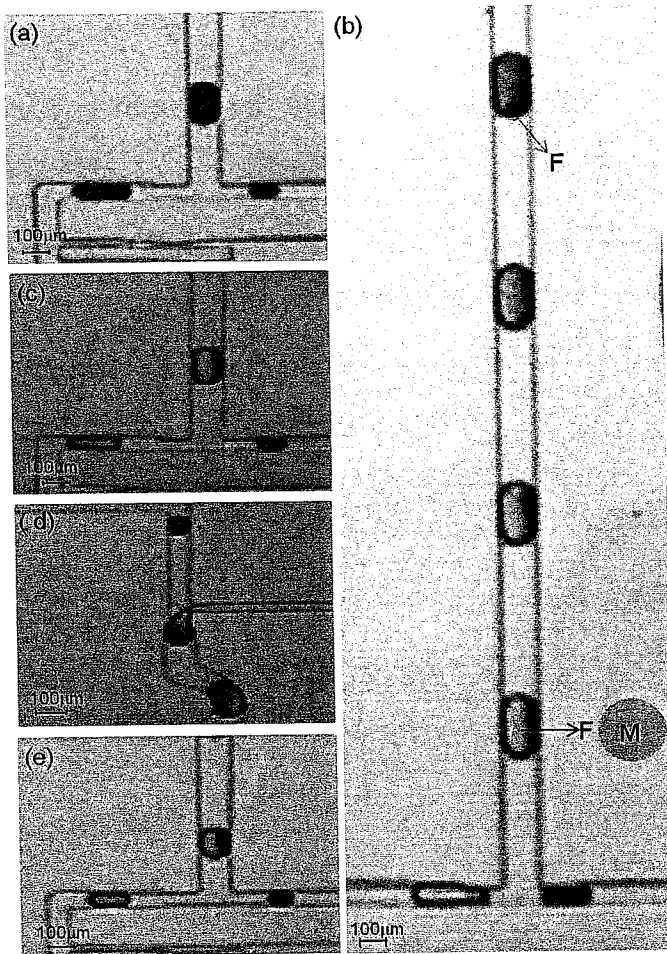


图 2-12 磁场下磁珠的运行轨迹。(a) 液滴分离时，磁珠在液滴内分别均匀并分配入两个液滴中（无磁场时）；(b-e) 将磁铁置于分裂连接处的右上侧后磁珠的运行轨迹：(b) 在磁场下，磁珠聚集在液滴的右侧；(c) 液滴分裂时，磁珠吸引入右侧液滴；(d) 溶液添加后，磁珠在液滴中分布均匀；(e) 下一循环的液滴分裂时，磁珠吸引入右侧液滴。

Fig. 2-12 The track of superparamagnetic beads with magnetic field. (a) The superparamagnetic beads distributed uniformly in the droplets before droplet splitting, and went into the two daughter droplets when droplet split (without magnetic field). (b- e) The movement of superparamagnetic beads under magnetic

field by putting a magnet on the top-right side of the junction: (b) The superparamagnetic beads aggregated to the right side of droplet under magnetic force. (c) When droplet split, the superparamagnetic beads was attracted to the droplet on the right side. (d) Reagent addition and the superparamagnetic beads uniform distribution in new droplet. (e) Another cycle of droplet split and the superparamagnetic beads was attracted to the droplet on the right side.

2.3.4 萃取的性能考察

将相关的试剂配制好并抽入注射器排净空气后，插入芯片相应的进样口，按照优化好的实验参数设定合适的流速进行芯片 SPE 实验，待液滴操控过程稳定后采集实验数据。萃取所耗时间、萃取通量及萃取效率等参数是 SPE 实验最为关注的的数据，以下将一一采集、说明。

2.3.4.1 萃取时间

按照显微镜视野范围，将芯片划分为几个区域分别计时最后汇总得出萃取时间。在设定的流速条件下，芯片 SPE 耗时如表 2-1 所示。

从表中可以看出，单个液滴完成芯片 SPE 实验需耗时 1 min 左右。相对于常规或其他芯片上的 SPE 方法，具有一定的优势。

2.3.4.2 萃取通量

液滴连续产生并依次通过各液滴操控单元，因此该平台具有连续、高通量进行液滴 SPE 的潜力。其处理液滴的通量相当于液滴产生的频率。使用秒表计时三次，每次一分钟，产生的液滴数大约为 100 个。也就是说，在设定的实验条件下芯片 SPE 的通量为 100 个/分钟。

表 2-1 液滴操控所需时间。

Table 2-1 The time for droplet processing.

芯片区域	运行所需时间（秒）		
	第一次测定	第二次测定	第三次测定
液滴生成-第一次分裂	10	10	10
第一次分裂-第二次分裂	17	15	17
第二次分裂-第三次分裂	24	24	25
第三次分裂后	6	7	6
总时间	57	56	58

在此，我们采用简单的方法验证此平台高通量处理样本的可行性。将不同颜色的溶液（代表不同的样本）抽进注射器，不同溶液间以矿物油隔开以避免样本间的交叉污染（见图 2-13），然后进行液滴 SPE 实验。当含样本 1 的红色溶液进入通道时，与磁珠溶液汇合，产生红色的液滴，如图 2-13 (b) 所示。此液滴经过后续液滴操控过程，样本 1 得到纯化。在含样本 2 的蓝色溶液进入通道前，红色、蓝色溶液之间的油相进入通道，生成仅含磁珠的较小液滴，如图 2-13 (c) 所示。然后蓝色溶液进入通道并完成样本 2 的纯化过程。依次原理，完成样本 3 等的纯化过程，显示了该平台处理高通量样本的可行性。本实验室曾绍江等设计并制作集成微阀的芯片[22]用于可控生成含不同组分的液滴，如将此技术或类似的技术集成于本实验平台，则能实现高通量处理样本的目标。

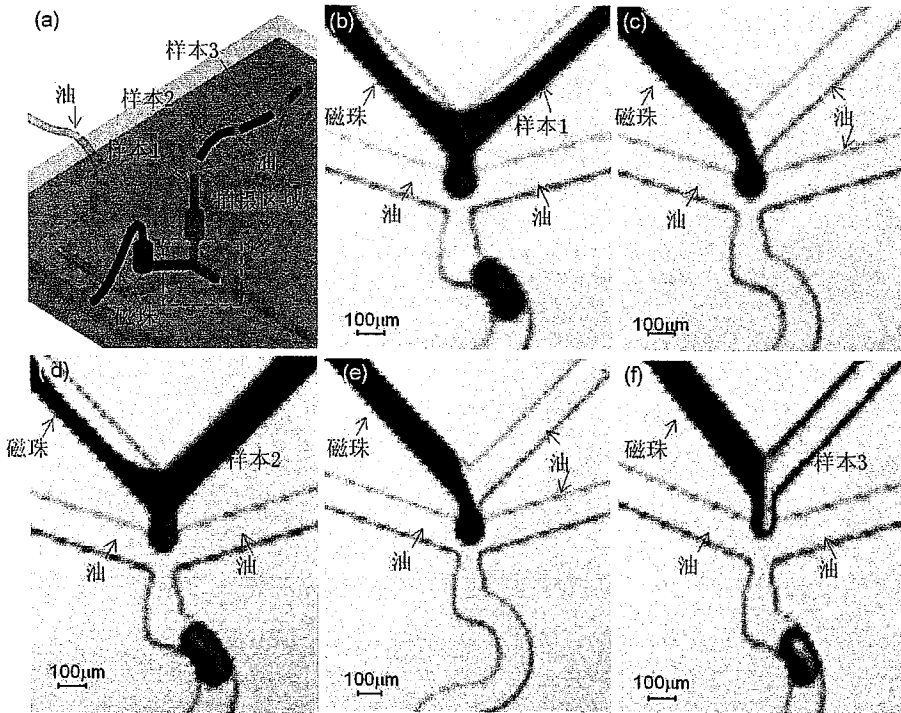


图 2-13 高通量纯化样本的可行性：(a) 液滴生成区示意图，不同样本以油相隔开并依次进样；(b-f) 液滴生成区实物图，(b) 红色溶液（代表样本 1）流入通道，并和磁珠溶液汇合生成红/黑色的液滴，此液滴将经过一系列液滴操控过程实现样本 1 的纯化；(c) 样本间的油相流入通道，此时生成仅含磁珠的小液滴；(d) 蓝色溶液（代表样本 2）流入通道，并和磁珠溶液汇合生成红色的液滴，此液滴将经过一系列液滴操控过程实现样本 2 的纯化；(e) 样本间的油相流入通道，此时生成仅含磁珠的小液滴；(f) 无色溶液（代表样本 3）流入通道，并和磁珠溶液汇合生成红色的液滴，此液滴将经过一系列液滴操控过程实现样本 3 的纯化。

Fig. 2-13 Schematic (a) and photograph (b-f) of high throughput sample purification. (a) Schematic of the droplet generation unit: different samples were separated by oil phase. (b-f) Photograph of the droplet generation unit: (b) a red

solution (represented sample 1) flowed into the channel, and red/black droplets formed. These droplets would suffer from sequential droplet processing, and the purification for sample 1 was performed; (c) The oil phase flowed into the channel, and smaller droplets which only containing magnetic bead solution formed; (d) a blue solution (represented sample 2) flowed into the channel, and blue/black droplets formed. These droplets would suffer from sequential droplet processing, and the purification for sample 2 was performed; (e) The oil phase flowed into the channel, and smaller droplets which only containing magnetic bead solution formed; (f) a colorless solution (represented sample 3) flowed into the channel, and colorless/black droplets formed. These droplets would suffer from sequential droplet processing, and the purification for sample 3 was performed.

2.3.4.3 萃取效率

在考察一个 SPE 方法的萃取效率时,通常将它用于已知浓度标准品的纯化,使用分光光度计测定收集液 DNA 的浓度,然后计算 DNA 萃取效率。因液滴的体积太小,不能直接用分光光度计测定其 DNA 的浓度。我们收集一段时间内(1-2 小时)各废液池、收集池所有溶液并吸取底层的水相进行 DNA 的测定。将 $1.00 \text{ ng}/\mu\text{L}$ λ -DNA (稀释于进样缓冲液)作为 SPE 实验的标准品考察萃取效率,结果如图 2-14(a)所示。从图中可以看出,收集池中 DNA 浓度为 $0.52 \text{ ng}/\mu\text{L}$,即洗脱液 DNA 浓度是初始浓度的 52%。考虑到 SPE 每步产生的液滴大小不一样,需要对每步液滴大小校正才能得到分配至 SPE 每步的 DNA 百分比。校正方法是将收集的液体 DNA 浓度与其液滴体积乘积分别除以液滴生成单元液滴体积与 DNA 浓度的乘积。因芯片所有通道的高度一

致，即液滴的高度一致，故液滴体积比与液滴面积比近似相等。本章使用显微镜自带的软件测定液滴的面积，如表 2-2 所示。（注：测定的液滴面积与真实的液滴面积间具有一定的比例关系。本章仅需液滴的面积比，因所有液滴拍照、处理方式一致，故省去校正过程）。

表 2-2 液滴的平均面积。

Table 2-2 The mean areas of droplets.

液滴生成区	液滴分裂区						溶液添加区				
	第一个		第二个		第三个		第一个		第二个		
面积	较大液滴	较小液滴	较大液滴	较小液滴	较大液滴	较小液滴	添加前	添加后	添加前	添加后	
	507.0	320.7	193.7	253.3	118.3	447.6	317.7	188.3	420.9	154.9	439.9

通过计算，SPE 各步 DNA 的比例如图 2-14 (b) 所示，46%DNA 被萃取出来进入收集池。

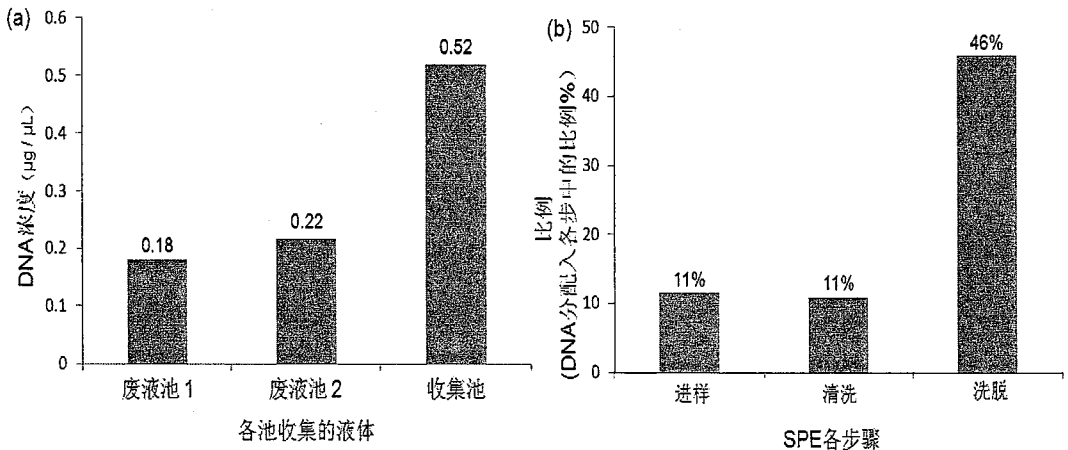


图 2-14 各池收集 DNA 的浓度 (a) 及百分比 (b)。

Fig. 2-14 The DNA concentration (a) and percentage (b) in reservoirs.

SPE 过程后, 仍有部分 DNA 吸附在弃掉的磁珠上 (废液池 3 中), 难准确测定, 原因在于磁珠有很强的荧光影响检测; 常温下很难将 DNA 完全洗脱进行测定, 而加热会使磁珠碎裂影响检测。所以废液池 3 数据舍弃未用。

2.3.4.4 杂质清除率

SPE 的目的在于提取 DNA, 同时舍弃样本中的杂质。各液滴分裂单元产生的液滴平均体积比 (即分裂比, 较大的液滴体积: 较小的液滴体积) 分别为 1.66 (第一次分裂), 2.07 (第二次分裂), 1.41 (第三次分裂)。各溶液添加单元溶液添加的平均体积比 (即添加比, 添加后的液滴体积: 添加前的液滴体积) 分别为 2.23 (第一次溶液添加) 和 2.96 (第二次溶液添加)。芯片分裂比都大于 1, 说明在每步液滴分裂中, 大部分的废液被弃去; 添加比都大于 2, 说明在每步溶液添加中, 大量体积溶液被加入液滴。也就是说, 这个连续液滴操控平台可以用于芯片 SPE 废液去除和溶液添加过程。通过多步液滴分裂, 大部分的杂质被弃去仅少部分仍保留在收集池的液滴中。杂质的保留率或清除率可以通过计算求得。杂质保留率 (RR) 采用公式(2)计算:

$$RR = \frac{1}{1+R^{1st \text{ 分裂}}} \times \frac{1}{1+R^{2nd \text{ 分裂}}} \times \frac{R^{3rd \text{ 分裂}}}{1+R^{3rd \text{ 分裂}}} \quad \text{公式(2)}$$

其中, $R^{1st \text{ 分裂}}$, $R^{2nd \text{ 分裂}}$, $R^{3rd \text{ 分裂}}$ 分别代表第 1、2、3 次液滴分裂比。

通过计算, 仅有 7% 的原液滴内含物仍保留在收集池的液滴中, 也就是说通过 3 次液滴分裂, 样本中的杂质绝大部分被弃去了。

2.3.5 液滴核酸固相萃取平台在乙肝病毒 DNA 提取中的初步应用

通常, 提纯 DNA 会被用来进行下一步的基因分析如 PCR 扩增和检测。有效的 DNA 萃取方法应该萃取足够的 DNA, 同时去掉样本中的影响 PCR 扩增的杂质。将上述 λ -DNA 萃取的收集液用于芯片外的 PCR 扩增-CE 检测,

产生的 DNA 片段大小由 DNA marker 进行判定。电泳图见图 2-15 所示，得到了预期的 236bp 的电泳峰，说明萃取的 DNA 模板可以用于后续的 PCR 实验。

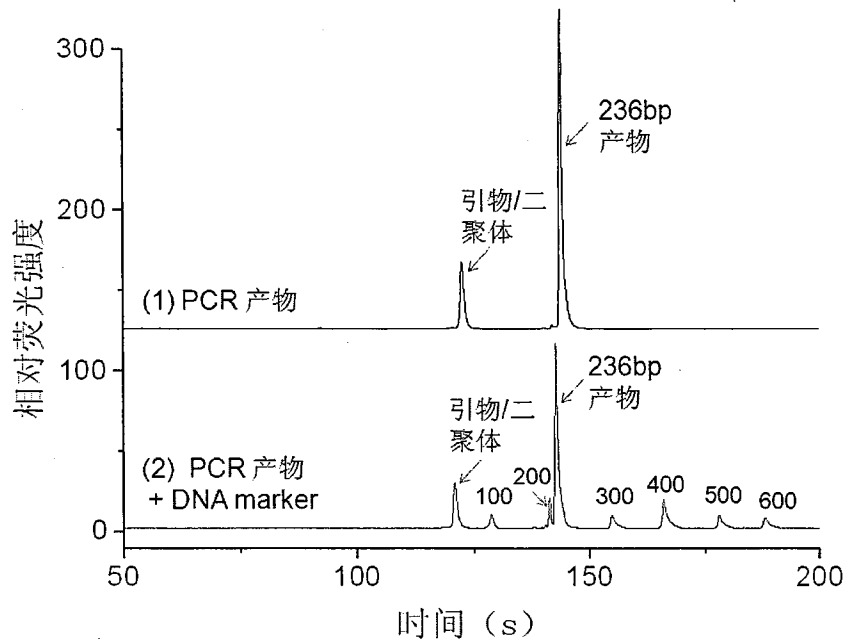


图2-15 λ -DNA纯化收集液PCR产物的电泳图谱。

Fig. 2-15 Electropherograms from PCR products of droplet SPE for λ -DNA.

最后，我们尝试将本芯片平台用于血清中乙肝病毒 DNA 的提纯。将血清进行消化后进样、萃取，收集一段时间内（约 1 小时）的收集液进行芯片外的 PCR 扩增-CE 检测。产生的 DNA 片段大小由 DNA marker 进行判定，典型的电泳谱图如图 2-16 所示。阳性乙肝血清样本得到了预期的 229 bp 的电泳峰；而阴性样本未获得 229 bp 的电泳峰。说明该平台具有纯化实际样本 DNA 的潜力，其萃取效率及影响因素等需进一步测定和优化。

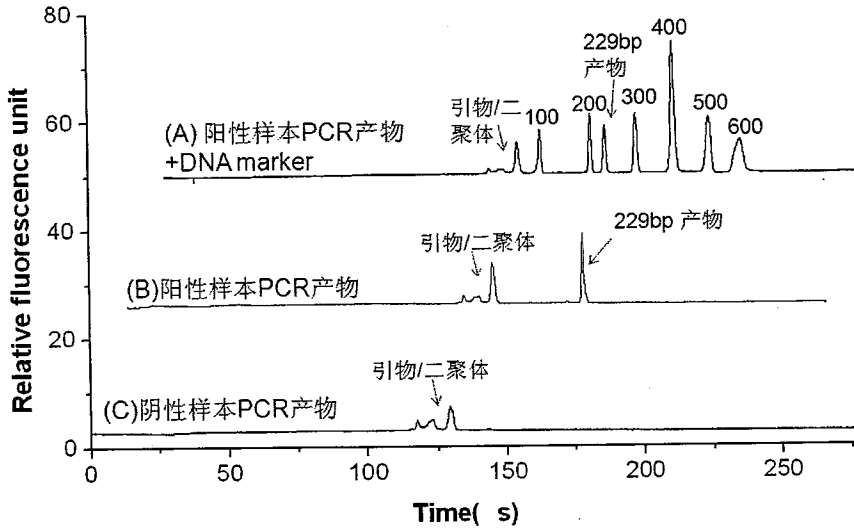


图 2-16 乙肝样本纯化收集液 PCR 产物的电泳图谱。

Fig. 2-16 Electropherograms from PCR products of droplet SPE for HBV samples.

2.4 本章小结

首次搭建了一个集成连续液滴操控的微流控芯片平台，连续的溶液添加-液滴分裂被用于液滴内含物的清洗。将简单的磁珠控制集成于该连续液滴操控芯片，实现了在线液滴 SPE 过程，避免了离心操作和繁琐的实验过程，实现了 DNA 萃取的自动化。单个液滴萃取过程仅耗时 1 分钟，并获得 46% 的平均萃取效率 (λ -DNA)，处理液滴 SPE 的通量为 100 个/分钟。该平台初步应用于实际样本 DNA 的提纯，验证了该平台用于快速、高通量的实际样本 DNA 的纯化的潜力。

参考文献

- [1] 林炳承, 秦建华, 微流控芯片实验室. 北京: 科学出版社, 2006.
- [2] Nakagawa, T., Tanaka, T., Niwa, D., Osaka, T., Takeyama, H., Matsunaga, T., Fabrication of amino silane-coated microchip for DNA extraction from whole blood. *Journal of Biotechnology*, 2005, 116(2): 105-111.
- [3] Cao, W. D., Easley, C. J., Ferrance, J. P., Landers, J. P., Chitosan as a polymer for pH-induced DNA capture in a totally aqueous system. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(20): 7222-7228.
- [4] Cady, N. C., Stelick, S., Batt, C. A., Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. *Biosensors & Bioelectronics*, 2003, 19(1): 59-66.
- [5] Chen, X., Cui, D. F., Liu, C. C., On-line cell lysis and DNA extraction on a microfluidic biochip fabricated by microelectromechanical system technology. *Electrophoresis*, 2008, 29(9): 1844-1851.
- [6] Han, S. I., Han, K. H., Frazier, A. B., Ferrance, J. P., Landers, J. P., An automated micro-solid phase extraction device involving integrated high-pressure microvalves for genetic sample preparation. *Biomedical Microdevices*, 2009, 11(4): 935-942.
- [7] Chen, G. D., Alberts, C. J., Rodriguez, W., Toner, M., Concentration and Purification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virions by Microfluidic Separation of Superparamagnetic Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(2): 723-728.
- [8] Lien, K. Y., Lin, J. L., Liu, C. Y., Lei, H. Y., Lee, G. B., Purification and enrichment of virus samples utilizing magnetic beads on a microfluidic system. *Lab on a Chip*, 2007, 7(7): 868-875.

- [9] Ramadan, Q., Gijs, M. A. M., Simultaneous magnetic particles washing and concentration in a microfluidic channel. Proceedings of the Eurosensors Xxiii Conference, 2009, 1(1): 1499-1502.
- [10] Karle, M., Miwa, J., Czilwik, G., Auwarter, V., Roth, G., Zengerle, R., von Stetten, F., Continuous microfluidic DNA extraction using phase-transfer magnetophoresis. Lab on a Chip, 2010, 10(23): 3284-3290.
- [11] Teh, S.-Y., Lin, R., Hung, L.-H., Lee, A. P., Droplet microfluidics. Lab on a Chip, 2008, 8(2): 198-220.
- [12] Zhang, C. S., Xing, D., Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. Nucleic Acids Research, 2007, 35(13): 4223-4237.
- [13] Zhong, R. T., Pan, X. Y., Jiang, L., Dai, Z. P., Qin, J. H., Lin, B. C., Simply and reliably integrating micro heaters/sensors in a monolithic PCR-CE microfluidic genetic analysis system. Electrophoresis, 2009, 30(8): 1297-1305.
- [14] Lang, Z., Yan, H., Huang, D., Detection of HBV DNA in kidney by PCR. Chinese Journal of Pathology, 1994, 23(3): 144-147.
- [15] Link, D. R., Anna, S. L., Weitz, D. A., Stone, H. A., Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices. Physical Review Letters, 2004, 92(5): 054503.
- [16] Nie, J., Kennedy, R. T., Sampling from Nanoliter Plugs via Asymmetrical Splitting of Segmented Flow. Analytical Chemistry, 2010, 82(18): 7852-7856.
- [17] Song, H., Tice, J. D., Ismagilov, R. F., A microfluidic system for controlling

- reaction networks in time. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2003, 42(7): 768-772.
- [18] Link, D. R., Grasland-Mongrain, E., Duri, A., Sarrazin, F., Cheng, Z. D., Cristobal, G., Marquez, M., Weitz, D. A., Electric control of droplets in microfluidic devices. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, 45(16): 2556-2560.
- [19] Ahn, K., Agresti, J., Chong, H., Marquez, M., Weitz, D. A., Electrocoalescence of drops synchronized by size-dependent flow in microfluidic channels. *Applied Physics Letters*, 2006, 88(26): 264105.
- [20] Shestopalov, I., Tice, J. D., Ismagilov, R. F., Multi-step synthesis of nanoparticles performed on millisecond time scale in a microfluidic droplet-based system. *Lab on a Chip*, 2004, 4(4): 316-321.
- [21] Li, L., Boedicker, J. Q., Ismagilov, R. F., Using a multijunction microfluidic device to inject substrate into an array of preformed plugs without cross-contamination: Comparing theory and experiments. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(7): 2756-2761.
- [22] Zeng, S., Li, B., Su, X., Qin, J., Lin, B., Microvalve-actuated precise control of individual droplets in microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 9, 1340-1343.

第三章 高通量 PCR 扩增芯片平台的构建及应用

3.1 引言

自 1983 年美国 Mullis 等人发明聚合酶链反应 (PCR) 以来, 因其展现出前所未有的扩增能力和特异性, 受到人们的高度重视, 已成为基因研究的关键技术。该技术迅速被广泛用于生物学各研究领域, 极大地促进了现代生物学及相关科学和技术的发展。

PCR 扩增的关键是快速而准确的控制循环温度, 因一些技术上的缺陷, 常规的 PCR 仪尚存在一些缺点: 其加热块体积较大引起热容较大, 使得升/降温速率较小, 反应时间较长, 通常进行 30~40 次循环约需 2~3 小时; 需要较大的反应体积, 增加了昂贵的生化试剂的消耗[1, 2]。

为降低 PCR 仪整体热容量、缩短扩增时间、降低试剂消耗等, 国内外学者做了大量的尝试。1993 年 Northrup 等首次在硅芯片上蚀刻出含有入口、出口以及几微升反应室的微结构进行 PCR 试验[3]。与传统 PCR 相比, 在同样的扩增效率下, 将热循环速率增快了 2-10 倍。此后, 利用微加工技术制作高效的 PCR 扩增仪已成为芯片实验室核酸研究一个重要课题[4-8]。在芯片 PCR 研究, 尤其是反应液静止式芯片 PCR 中, 温度控制最为重要, 因为它是芯片 PCR 成功的保证, 同时也因其设计和制作难度较大。根据控温元件与 PCR 芯片是否集成, 芯片温控方法主要有两种: 分体式 (非集成式) 和集成式, 其中分体式加热方式又分为接触式和非接触式两种。将芯片直接置于常规热循环仪[9, 10]或 Peltier 热电元件[11-13]上进行芯片 PCR 的分体式加热的方法, 操作最为简单, 具有较高的分析通量, 减少了试剂的消耗, 并在一定程度上缩短了反应时间, 但同时也失去了微型化、集成化的部分优势。

由于接触式加热必须对整个系统进行加热和冷却，增加整个反应体系的热容，限制 PCR 反应的热循环速率，降低反应的特异性和反应效率。非接触式加热方法则可以避免上述问题，有效提高热交换速率[14-16]。并可采用对红外吸收较小的材料制作芯片，PCR 反应时选择性的加热反应溶液，而不必加热反应室，因而提高了传热效率。但它需要特殊的加热装置和额外的参考温度池，这无疑会对温控系统和芯片设计提出更高的要求。

以 Mathies 课题组为代表的研究组将薄膜微加热器和温度传感器集成于 PCR 芯片上，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[17-21]。薄膜加热器/温度传感器尺寸小、热容和能耗均低，响应速度快，可集成化程度高，但是加工步骤复杂，价格昂贵。

针对以上芯片 PCR 各种加热方式存在的问题，我们发展了一种相对简便、价格低廉的 PCR 芯片平台的制作方法。采用微加工工艺制作了铂微加热器并采用商品化薄膜铂电阻作为温度传感器制作温控芯片，解决了分体式加热方式存在的仪器体积较大的问题，又可方便的用于高通量的 PCR 扩增；将温控单元从 PCR 芯片中分离出来，使得 PCR 芯片价格更加低廉甚至可以“一次性使用”。将微池阵列芯片通过导热胶直接粘贴在温控芯片上使用，采用动态/静态相结合的方式处理 PCR 反应池表面，并用 λ -DNA 考察高通量芯片 PCR 平台的基本性能，最终用于乙肝病毒 DNA 样本的检测。

3.2 实验部分

3.2.1 仪器与设备

SC-1B 型匀胶机购自北京创威纳设计有限公司。BP-2B 型烘胶台购自北京创世威纳科技有限公司。PH030A 型培养/干燥箱购自上海一恒科学仪器有

限公司。紫外光刻机购自 Thermo Oriel 公司。FA1104 型电子天平购自上海精科天平厂。激光诱导荧光 (LIF) 检测系统由实验室自行搭建。PCR 扩增仪 2700 购自美国 ABI 公司; UNIPOL-1202A 型精密研磨抛光机购自沈阳科晶设备制造有限公司。CK-250L 超声波打孔机购自汕头市金士连上海分公司。万用电表购自优利德集团有限公司; K 型热电偶购自常州普瑞特测温电线厂。

3.2.2 材料与试剂

Sylgard® 184 硅橡胶(PDMS)试剂盒购自 Dow Corning 公司。SU-8 2005 型光刻胶购自 Microchem 公司。三羟甲基氨基甲烷(Tris), EDTA, 硼酸(Boric acid) 均购自沈阳化学试剂厂; GeneFinder™ 嵌入式双链 DNA 荧光染料(用二甲基亚砷稀释 100 倍保存)购自厦门百维信公司; 蛋白酶 K、 λ -phage DNA, DNA 聚合酶及其他 PCR 试剂均购自大连宝生物公司; 乙肝病毒(HBV)核酸扩增(PCR)荧光定量检测试剂盒购自深圳匹基生物技术开发有限公司。DNA marker (100 bp DNA ladder) 购自天根生化科技(北京)有限公司。羟丙基甲基纤维素(HPMC, 2%水溶液粘度为 4000cps)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP, MW 1 300 000)购自 Sigma-Aldrich 公司。透明环氧胶购自安特固化学私人有限公司。导热胶、Pt100 购于德国九茂公司。光刻胶 (BP 212) 购自北京科华微电子材料有限公司。人血清样品(含有柠檬酸钠抗凝剂)由大连医科大学附属第一医院提供。除特殊说明外的其他试剂均为分析纯。所有水溶液均用二次水配制。溶液在使用前均用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤。

3.2.3 温控芯片与微池阵列芯片的设计与制作

3.2.3.1 温控芯片与微池阵列芯片的设计

所用的基于微流控芯片的高通量 PCR 扩增平台由温控芯片和微池阵列

芯片组成，两者采用分体式结构，通过导热胶直接粘接使用。温控芯片和微池阵列芯片分别设计、制作。

温控芯片的设计如图 3-1 所示，它由铂/钛电极玻璃层（厚约 1.6 mm）、SU-8 层、PDMS 层、薄铝片层和薄膜铂电阻（Pt100）层组成。铂/钛电极阵列由 57 根宽 $150\ \mu\text{m}$ 、间距 $150\ \mu\text{m}$ 、长 4 mm、高 80 nm（即 10 nm 钛和 70 nm 铂）组成，提供约长 4 mm 宽 2 mm 的加热区域。微电极阵列的两端分别连接成一片（宽约 1 mm、长 4 mm）电极区。该玻璃片上有一层高约 $5\text{-}10\ \mu\text{m}$ 的 SU-8 2005 胶，覆盖铂/钛微电极区域（稍微宽点）。另将一块薄铝片（厚约 0.95 mm）通过 PDMS 粘贴在 SU-8 胶上。最上一层 Pt100 通过透明环氧胶粘接在铝片的一侧。

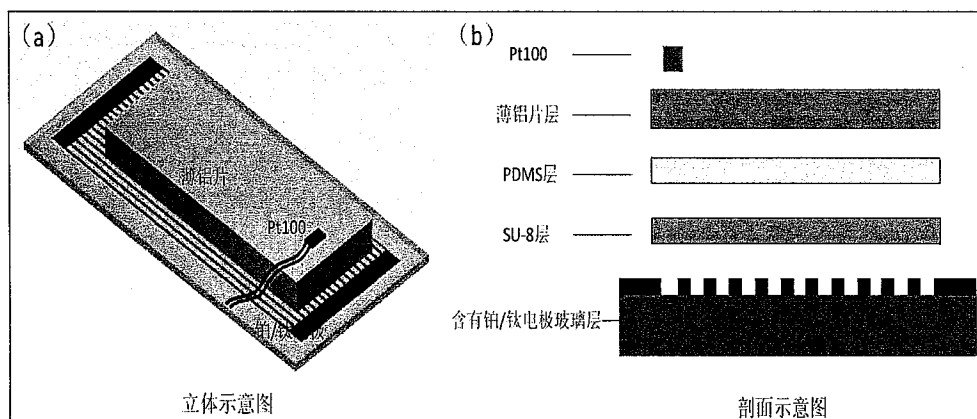


图 3-1 温控芯片示意图：（a）立体示意图；（b）剖面示意图。

Fig. 3-1 Perspective (a) and section (b) of heater/RTD chip.

本章所用微池阵列芯片为封接好的玻璃芯片，由上下两层组成，上层玻璃片有多个储液池，厚约 1.6 mm，下层玻璃片厚约 0.3-0.4 mm。

3.2.3.2 温控芯片与微池阵列芯片的制作

温控芯片与微池阵列芯片分别制作。温控芯片制作流程如图 3-2 (a) 所示, 主要有铂/钛电极玻璃层制作、SU-8 层制作、薄铝片层粘贴和 Pt100 粘贴等。具体制作流程为: (1) 铂/钛电极玻璃层制作: 在干净的玻片上先沉积金属层 (Ti/Pt: 10 nm/70 nm), 然后均匀的甩上一层正性光刻胶, 并将芯片略加烘制。用事先打印好的芯片掩模覆盖于玻片胶层上, 置于紫外光刻机下曝光, 显影, 用王水(3: 1 HCl/HNO₃, 90 °C)刻蚀金属薄层、用乙醇溶解掉残留的光刻胶; (2) SU-8 层制作: 在制作好的铂/钛电极玻璃片上均匀的甩上一薄层 SU-8 2005 胶 (2000 转/分, 30 秒), 前烘 (65 °C 15 分钟, 95 °C 15 分钟) 后曝光 20 秒。后烘 (同前烘条件) 后用乳酸乙酯显影, 并置于 170 °C 烘箱中坚膜 1 小时; (3) 将 PDMS 滴加在 SU-8 层上, 将薄铝片层粘贴其上, 用夹子夹住后置于烘箱中 80 °C 固化 1 小时; (4) 最后, 用透明环氧胶将 Pt100 粘贴在铝片的一侧。芯片两端电极分别用导线引出, 用于外接电路。微池阵列芯片的制作流程如图 3-2 (b) 所示: 在一玻璃片上用超声打孔机打出一系列的孔 (直径 3 mm) 后, 通过高温键合技术封接在另一空白玻璃芯片 (下层) 上, 最后将下层玻璃芯片打磨抛光至 0.3-0.4 mm 厚。

3.2.4 芯片 PCR 温度控制与校正

采用自行设计并搭建的电路来控制芯片反应池的温度, 采用风扇制冷。采集的 RTD (Pt100) 电阻值用 100 Hz 低通滤波器过滤。温度控制采用脉宽调制 (PWM) 模块实现, 并用 VC++ 编写的软件进行上位机控制。微加热器采用达林顿管控制, 电路运行电压为 24V。需要加热时, 计算机控制 PWM 模块快速加热直至设定值; 随后, PWM 模块维持温度恒定。降温过程中, 停止 PWM 模块控制, 同时启动风扇以加速降温过程。当温度到达新设定值时, 再次启动 PWM 模块控制。为实现温度的高精度控制, 我们将加热功率细分为 256 份,

通过调节PWM值精确控制PCR过程中升降温的稳定进行。

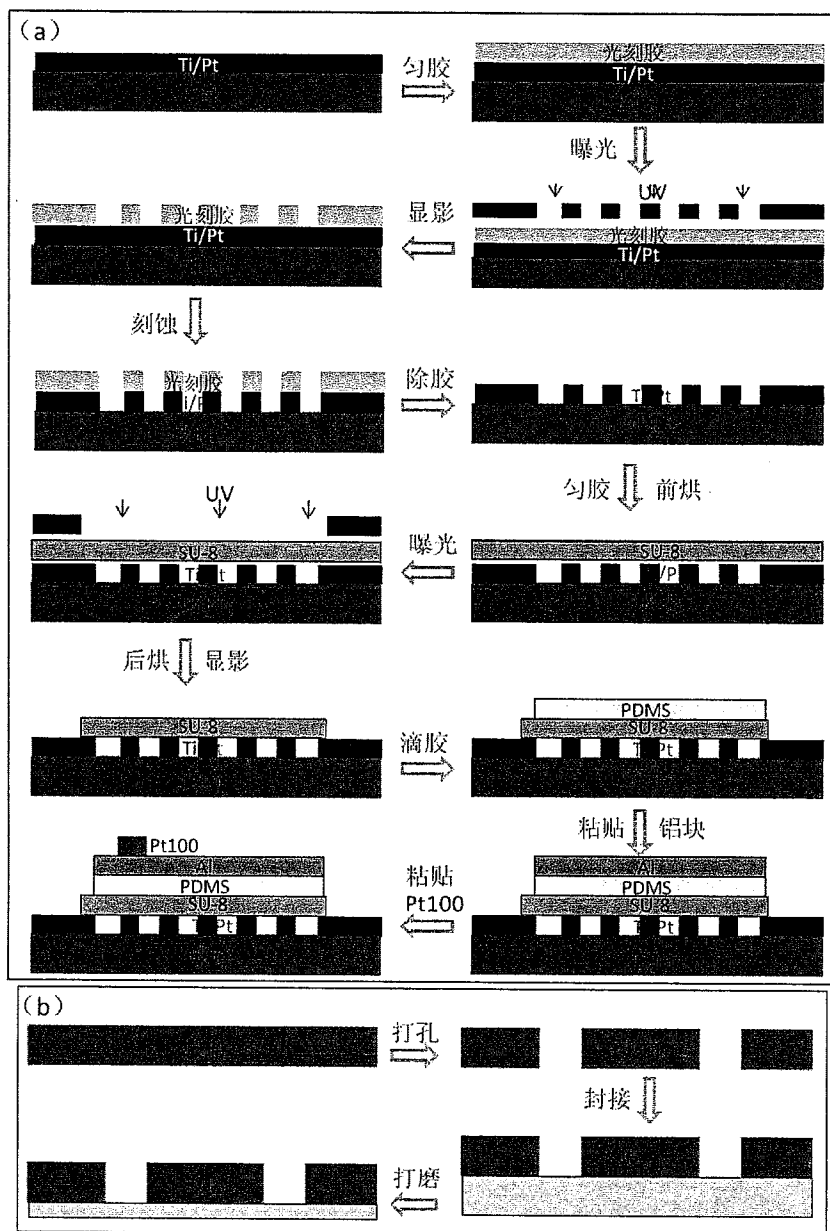


图 3-2 温控芯片 (a) 和微池阵列芯片 (b) 制作流程图。

Fig. 3-2 Schematic of the heater/RTD chip (a) and the parallel chamber chip (b) fabrication processes.

我们首先测定了商品化铂电阻Pt100的RTD标准曲线,然后在热电偶的监测下准确的设定PWM参数。

(1) Pt100 RTD标准曲线的测定:将铂电极Pt100置于加满导热胶的PCR仪反应孔中,以10°C 间隔将PCR仪的温度从30°C升至100°C,测量Pt100 电阻值及对应的温度值。电阻-温度关系符合Calendar Van-Dusen 方程,从该方程可确定所需常数A、B 的值。

(2) 热电偶工作曲线的测定:将K型热电偶的测量端插入盛有50 μL PCR反应液和100 μL 矿物油的PCR管的底部,置于PCR仪,补偿端通过自制的补偿电路连接万用电表。以10 °C 间隔将PCR仪的温度从30°C升至100°C,测量对应的电压值,确定热电偶的工作曲线。

(3) PWM参数的设定:向所有PCR反应池中加入3.8 μL 1x PCR缓冲液和6 μL 矿物油模拟芯片PCR扩增条件,将预先标定的热电偶测量端置于加热芯片和PCR芯片之间,设定已经测好的铂电极的工作曲线,然后用温控芯片加热PCR反应池。调节PWM值,使得热电偶测定的温度值在升降温过程中表现为迅速的达到需要的温度而没有过冲现象,在恒温过程中减少温度的波动。

3.2.5 PCR 扩增与离线电泳分离

使用 λ -DNA 和乙肝病毒 DNA 进行芯片 PCR 扩增和产物的电泳检测。 λ -DNA 引物序列为正向引物 5'-GCACAAGTCCGACAACCCTG-3'和反向引物 5'-TATTCGCATTACCCCTCAAGC-3',产生 236 bp 的目标片段。HBV-DNA 引物序列为正向引物 5'-GACTCGTGGTGGACTTCTCTCA-3' 和反向引物 5'-GAGGACAAACGGGCAACATACC-3',产生 229 bp 的目标片段[23]。25 μL PCR 反应液包括 1x PCR 缓冲液,0.2 mM dNTP 混合物,0.5 μM 正、反义引物,80 units/mL Ex-Taq DNA 聚合酶,40 ng/mL λ -DNA 模板或 2 μL 血

清 DNA 提取液, 其中乙肝血清的提取使用乙肝病毒 (HBV) 核酸扩增 (PCR) 荧光定量检测试剂盒并参照试剂说明书进行。常规 PCR 仪作为阳性对照, 扩增条件为: 95°C 预变性 5 分钟, 然后进行 35 个循环, 包括变性 (95°C) 30 秒、退火 (λ -DNA 54°C, HBV-DNA 56°C) 30 秒、延伸 (72°C) 30 秒, 最后在 72°C 后延伸 10 分钟。芯片 PCR 扩增的条件是: 94°C 预变性 100 秒, 然后进行 30 个循环, 包括变性 (94°C) 20 秒、退火 (λ -DNA 54°C, HBV-DNA 56°C) 20 秒、延伸 (72°C) 20 秒, 最后在 72°C 后延伸 200 秒。

芯片 PCR 过程为:

(1) PCR 反应池清洗: 将 Piranha 溶液 (3: 1 H₂SO₄/H₂O₂) 加入 PCR 反应池, 启动温度控制加热 90°C 15 分钟, 随后用二次水进行清洗, 以消除污染物。

(2) PCR 反应池表面处理: 采用静态处理 (PCR 反应池用 2.5 mg/mL BSA 处理 10 分钟) 和动态处理 (PCR 反应液中加入 0.25 mg/mL BSA 和 0.4% PVP) 相结合的方式对 PCR 反应池的玻璃表面进行钝化处理;

(3) 芯片 PCR 扩增: PCR 反应池中加入 3.8 μ L 反应溶液和 6 μ L 矿物油, 按预定程序进行热循环扩增;

PCR 产物用二次水稀释 4 倍后, 利用自行搭建的激光诱导荧光检测系统以及自制的 PMMA 芯片对 PCR 产物进行芯片电泳分离和检测。DNA 筛分介质包括 0.5% HPMC-4000、0.1% PVP、6% 甘露醇、TBE 缓冲液及 1 μ M GeneFinder™ 荧光染料。检测场强为 200 V/cm, 检测有效距离为 3.5 cm。

3.3 结果与讨论

3.3.1 温控芯片与微池阵列芯片的设计

3.3.1.1 温控芯片的设计

金属铂因具有突出的电阻/温度响应及良好的化学稳定性,已成为制作微型加热器最常用的材料。利用微加工技术将金属薄膜电阻微加热器/温度传感器直接集成在PCR芯片上,可降低温控系统的热容和能耗,提高温度响应速率和热传递速率,减少温度平衡时间和PCR循环时间。Mathies研究组率先发展了高度集成的PCR-CE微流控系统[17,20],将微型加热器、温度传感器分别制作于玻璃片的不同表面,在较短反应时间内取得了较高的扩增效率。但因其涉及多步金属沉积、刻蚀以及芯片对准过程,使该方法难度较大,且耗费较多时间和成本,难以在常规实验室应用。我们曾将微型加热器、温度传感器置于玻璃片的同一表面,一定程度上简化了芯片的制作方法[22]。但所得到的集成式的PCR芯片的成本仍较大,难以实现芯片的“一次性使用”和向常规实验室的推广。我们将温控芯片和微池阵列芯片进行分体式设计,温控芯片类似常规PCR仪,可重复使用,同时具有微型化、热容小、缩短反应的时间、减少试剂的消耗等优点。微池阵列芯片采用简单的结构设计,如用价格低廉的材料进行加工,则可实现“一次性使用”的目的。

铂电极为阵列设计,可获得较宽的加热区间,通过导热胶在加热器的表面粘接具有良好导热性的薄铝片减小加热区间的温差。但铝具有导电性,需通过不导电的物质与铂电极隔离。PDMS具有绝缘性,将铝通过薄层PDMS粘接在铂电极上可起到隔离的作用。但固化前的PDMS是游动的,粘接时易形成局部的空隙。所以,粘接铝片之前,先微加工一薄层(5-10 μm) SU-8避免铝片与铂电极的直接接触。使用商品化的薄膜铂电阻Pt100进行PCR过程中温度的测定,每块薄膜铂电阻间电阻-温度曲线系数差异极小,故在制作多个温控芯片时仅需测定其中一个铂电阻的电阻-温度曲线。

制作好的温控芯片如图3-3(a)所示。

3.3.1.2 微池阵列芯片的设计

设计并制作的温控芯片平台具有较大的应用范围。原则上,将各种适于 PCR 实验的芯片材料(指材料本身或通过处理后不会抑制 PCR 反应,具有一定的热传导性等)微加工成的含微室、微通道结构的芯片都可粘贴其上进行 PCR 扩增。本章直接利用储液池作为 PCR 反应池,可简化芯片设计,降低芯片 PCR 单元与样品纯化、芯片电泳检测单元集成的难度,有利于全集成、高通量的芯片 DNA 分析系统的构建。将玻璃芯片的下层磨薄至 0.3-0.4mm,缩短了热传递的距离,使加热器温度(热电偶测定的温度)与芯片 PCR 池之间的温差缩小,保证了温度测定的准确性,确保实验的进行。制作好的液池阵列 PCR 芯片如图 3-3 (b) 所示。

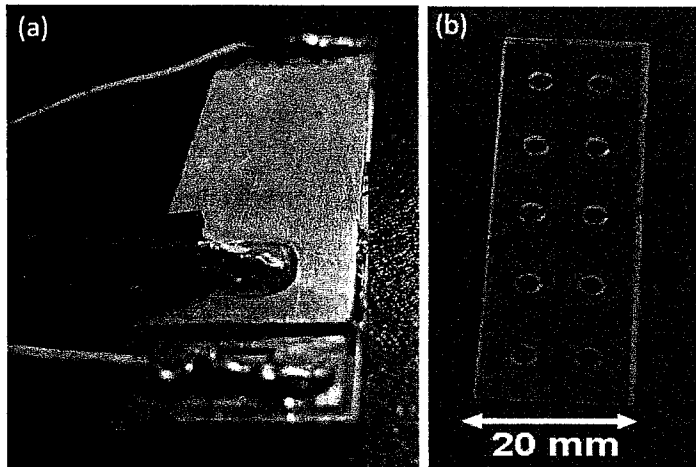


图 3-3 芯片实物图。(a) 温控芯片; (b) 液池阵列芯片。

Fig. 3-3 Photograph of the fabricated heater/RTD chip (a) and parallel chambers chip (b).

3.3.2 芯片温控系统的特征

3.3.2.1 温控系统的基本特征

为满足芯片PCR过程中温度控制的需要，我们自行设计并搭建了温控电路，如图3-4所示。自制的温控系统由温控电路、电源、风扇、连接导线和芯片固定支架组成。通过导线分别将温控电路和温控芯片铂/钛电极的两端、薄膜铂电阻Pt100的两根导线相连（焊接）。风扇固定于芯片的正下方以加速芯片降温过程。温控系统通过USB线和电脑相连，进行PCR参数的设定。

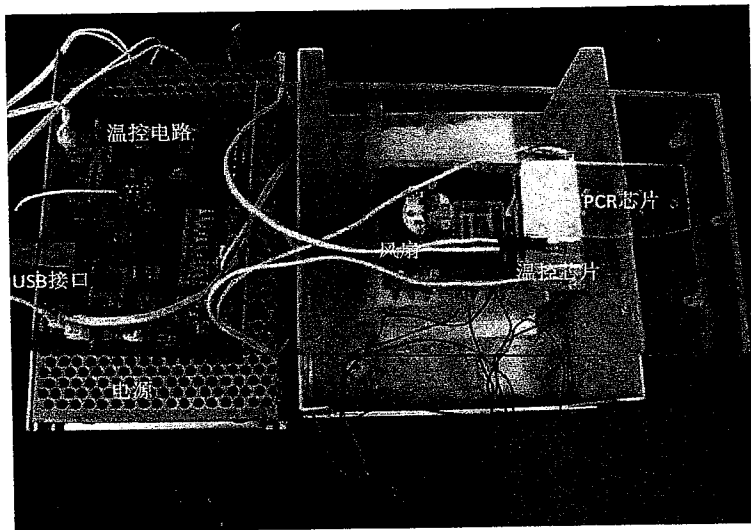


图3-4自制芯片PCR 温控装置图。

Fig. 3-4 Photograph of custom-built electrical circuit for chip-PCR temperature control.

采用 C8051F350 单片机内置的高精度 24 bit 模数转换器进行温度数据的采集，采样频率为 100 sps，加热控制采用单片机内置的 PWM 外接达林顿管 ULN2003 控制。其中，每步温度过程被拆分成变温和恒温两个步骤，在每一步中都设有 PCR 反应中需要的温度目标温度（设定温度）和启动 PWM 调控时的温度（调控温度）。升温过程中，当测定温度未达到调控温度时，温控系

统启动全功率加热以缩短升温时间；当测定温度达到调控温度时，温控系统启动低速加热减慢升温速度防止温度过冲。降温过程中，当测定温度未达到调控温度时，温控系统启动全速降温以缩短降温时间（此时不加热）；当测定温度达到调控温度时，温控系统启动低功率加热防止温度过低。恒温过程中，温控系统启动低功率加热以平衡空气的自然降温作用维持芯片的温度恒定；当温度低于调控温度时，启动全功率加热。通过灵活设定每个变温/恒温步骤的温度、调控温度和 PWM 值，实现整个 PCR 反应过程中温度的精确控制。温控芯片中使用的玻璃片和铝片偏厚，增加了热容，在一定程度上降低了升降温的速度，升降温速度与常规 PCR 仪相当，

芯片温控系统软件用 VC++编写。图 3-5 为控制参数主界面图，上部分设定 PCR 循环数和铂电极电阻-温度工作曲线，下部分设定热循环时间、温度和 PWM 值。步骤 1 用于预变性条件的设置，步骤 2-4 用于 PCR 循环条件的设置，步骤 5 用于最后延伸条件的设置，最后一步用于将芯片快速制冷至常温。

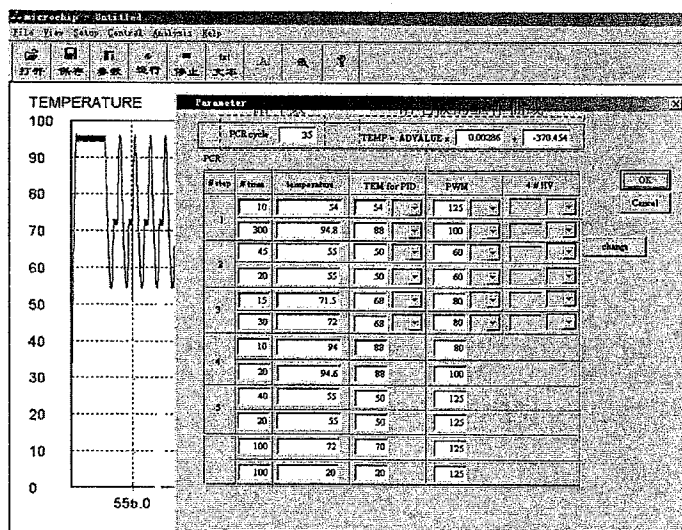


图 3-5 软件控制参数界面图。

Fig. 3-5 Photograph of parameter window of the software.

在校准平台温度前，测定Pt100和热电偶的工作曲线，结果如图3-6所示。在温控的过程中，计算机实时显示Pt100的实时温度值，监测异常情况的出现，图3-7为实时温度显示界面图。

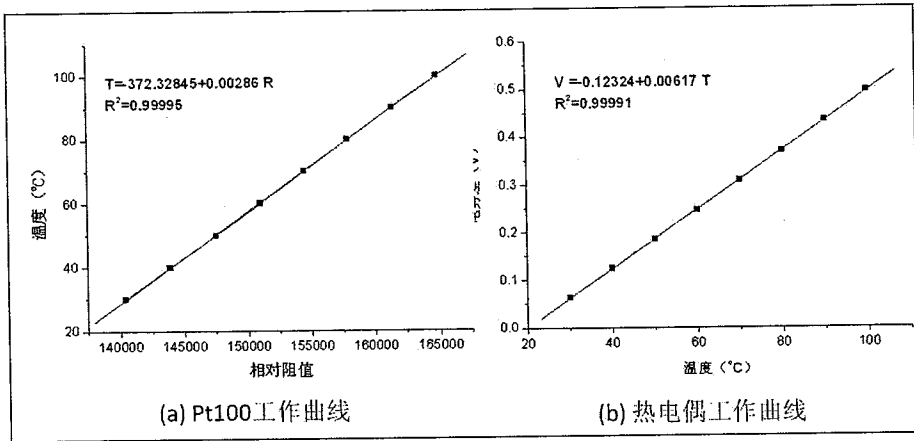


图3-6 Pt100和热电偶的工作曲线。

Fig. 3-6 Working curves of Pt100 (a) and thermocouple (b).

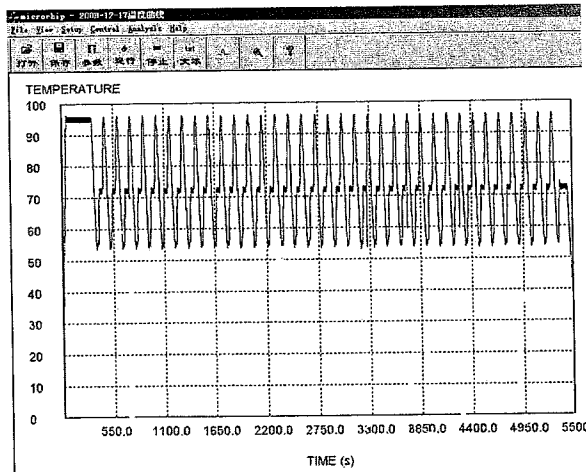


图3-7实时温度显示界面图。

Fig. 3-7 Photograph of real-time temperature window of the software.

通过设定参数，减小PCR恒温时的温度波动。图3-8为Pt100监测的温度波动曲线，在三个设定温度下（54°C、72°C、94°C），Pt100显示的温度波动均小于 $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ，保证了芯片PCR 温控的精确性。

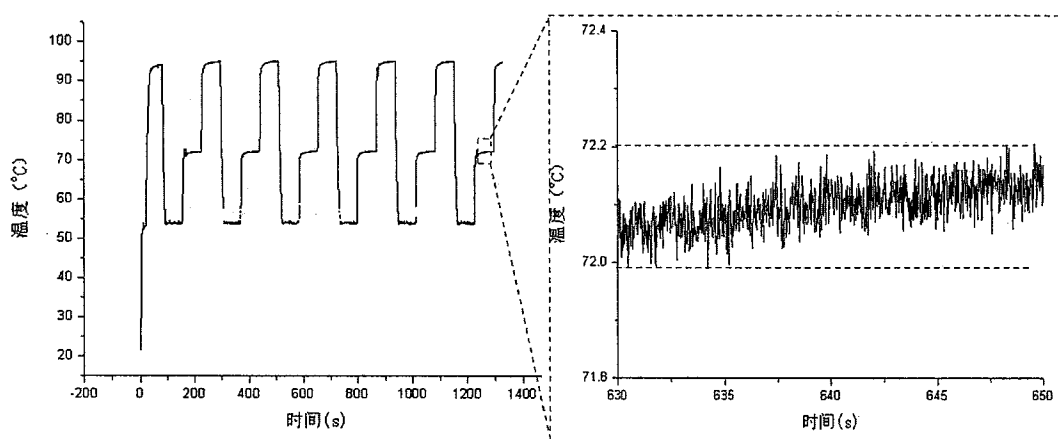


图3-8 温度波动曲线图。

Fig. 3-8 Photograph of temperature variation curve.

在制作平台时，薄膜铂电阻 Pt100 是粘贴在铝片的一侧的，再加上它由一层陶瓷包裹，影响了对实际反应温度监测的准确性。因此，在热电偶的监测下准确的设定 PWM 参数，使得实际的温度符合实验所需。每隔 2 秒记录一次热电偶显示的温度值，薄膜铂电阻 Pt100 监测的温度与热电偶测定的温度对比如图 3-9 所示，连续线、间断线分别代表薄膜铂电阻 Pt100 和热电偶显示的温度。通过精确的设定每步 PWM 值使恒温时热电偶显示温度波动 $< \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 。

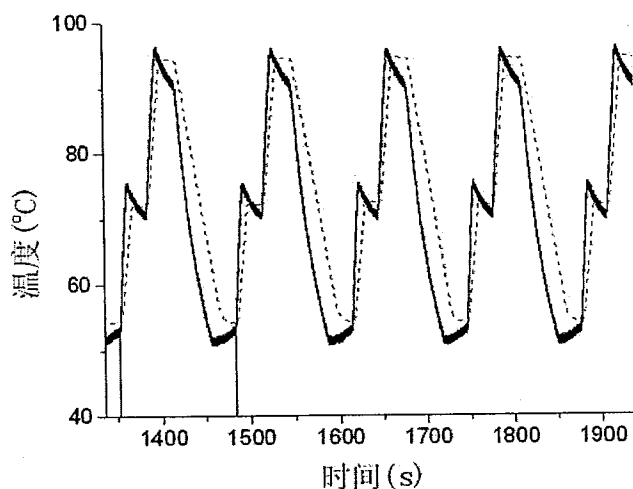


图 3-9 Pt100 和热电偶测定的温度差别。

Fig. 3-9 The temperature difference between Pt100 and thermocouple.

3.3.2.2 PCR 池间温度差异

芯片温控装置的加热面积较大,存在一定的温度差异。理论上(以及常规 PCR 仪的性能指标证明)温度越高,温控平台存在的温度差异越大。将温控芯片平台分成四份,在高温时(略高于变性温度)对每份区间的温度测定 5 次,结果表明区间差异控制在 0.5°C 左右。

3.3.3 PCR 反应池的表面处理

玻璃对 PCR 扩增有明显的抑制作用,这种影响可能源于聚合酶或 DNA 分子在玻璃表面的非特异性吸附。因而,必须采取合适的表面处理方法才能确保芯片 PCR 的成功。已有多种表面钝化技术用在基于玻璃芯片的 PCR 实验中,比如静态方法(将改性试剂通过化学沉积、共价结合或聚合等方法涂到芯片内壁)、动态方法(将改性剂直接加入 PCR 反应体系中),以及两者的

结合。BSA 是最常用的表面钝化试剂，它通过与 DNA 聚合酶竞争结合池内壁的吸附位点来提高芯片 PCR 的扩增效率。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。本工作中，我们采用静态/动态相结合的方法来处理芯片 PCR 反应池的内壁。向 PCR 反应液中加入 0.25 mg/mL BSA 和 0.4% PVP (动态方法) 的同时，用 2.5 mg/mL BSA 溶液对 PCR 反应池进行预处理 (静态方法)，这样玻璃表面就被充分钝化，从而为后续芯片 PCR 实验的成功提供了有利条件。

3.3.4 芯片 PCR 扩增与离线电泳分离

将平台用于实际样本的检测前，先用标准品 λ -DNA 进行平台性能的验证。将 PCR 反应池进行表面处理后，加入 3.8 μ L PCR 反应液并用 6 μ L 矿物油覆盖。启动 PCR 温度控制，整个 PCR 反应时间约 1 小时。反应结束后，将反应液吸出在自制的激光诱导荧光检测仪上进行 PMMA 芯片电泳分离检测。该激光诱导荧光检测仪检测 100bp DNA ladder (400bp 片断的浓度 16.7 $\text{pg}/\mu\text{L}$ ，其它片断浓度是 8.3 $\text{pg}/\mu\text{L}$) 的最高稀释倍数是 1000 倍。此时，以 1 号峰 ($S/N=80$) 为标准计算仪器的灵敏度，其检测限为 0.4 $\text{pg}/\mu\text{L}$ ($S/N=3$)，满足 PCR 产物检测的需要，电泳谱图如图 3-10 所示。以电泳迁移时间判断 PCR 产物的片段大小，对同一芯片通道而言，多次电泳迁移时间 RSD 较小， $RSD < 0.9\%$ (236bp PCR 产物)，如图 3-11 所示。

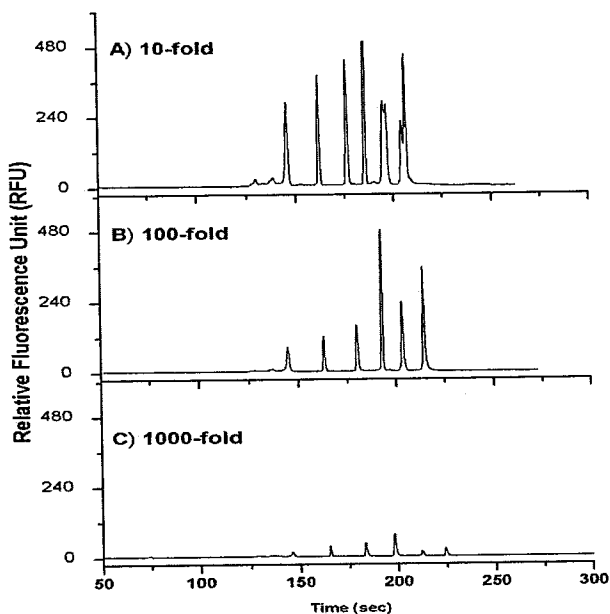


图 3-10 不同稀释倍数的 100bp DNA ladder 电泳图谱。

Fig. 3-10 Electropherograms from 100bp DNA ladder with different dilution folds.

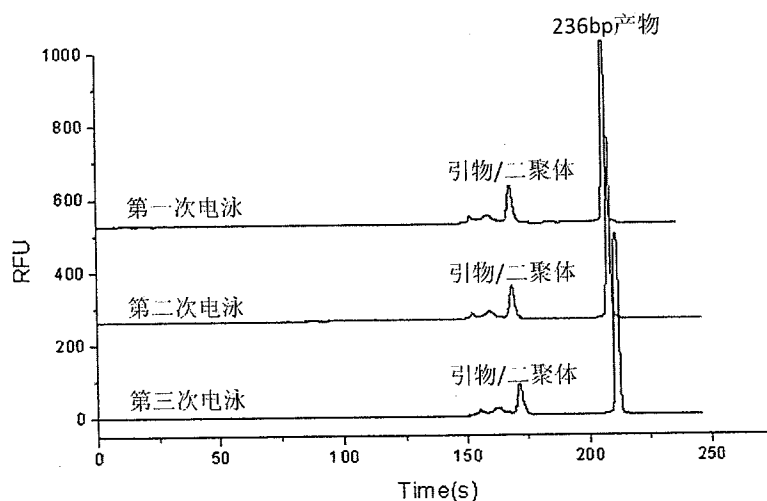


图 3-11 PCR 产物的 3 次电泳图谱。

Fig. 3-11 Electropherograms of PCR product for three runs.

在基于微流控芯片的高通量 PCR 扩增平台进行 6 个 λ -DNA 样本的同时扩增，其扩增产物电泳结果如图 3-12 所示，其中一个液池溶液因蒸干而没有进行电泳检测。

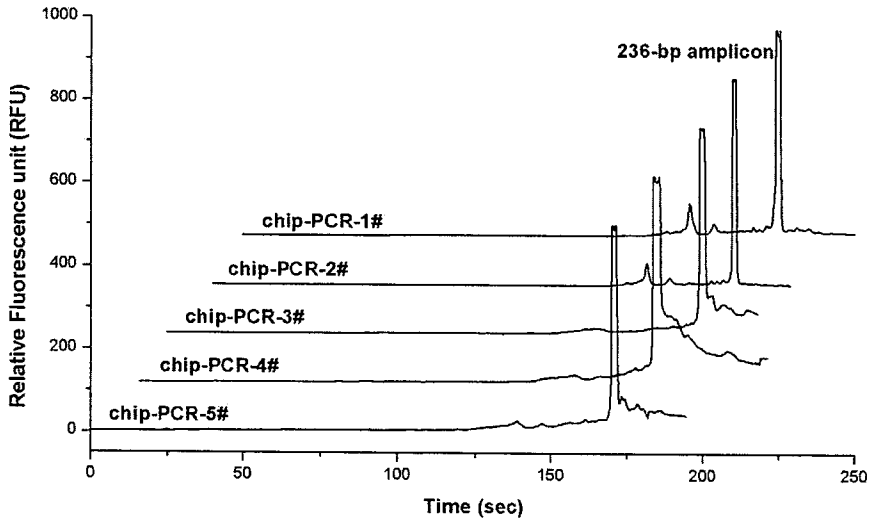


图 3-12 λ -DNA 扩增结果电泳图谱。

Fig. 3-12 Electropherograms of PCR products from λ -DNA.

3.3.5 PCR 扩增芯片平台在乙肝病毒检测中的应用

最后，该平台被用于血清样本乙肝病毒 DNA 的检测。乙肝病毒 DNA 用常规方法提纯后在芯片上进行 PCR 扩增，6 个乙肝病毒阳性样本扩增产物电泳结果如图 3-13 所示，都获得了成功的扩增。

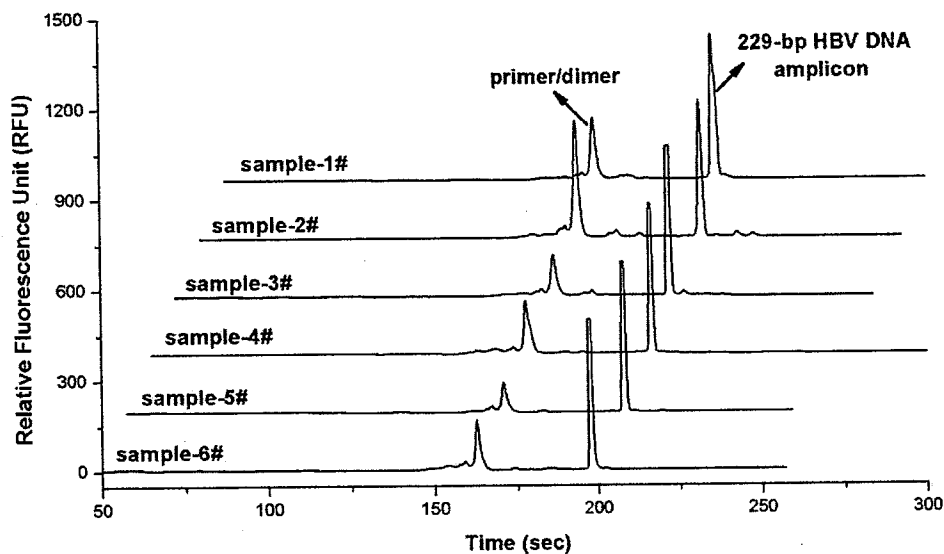


图 3-13 HBV-DNA 扩增结果电泳图谱。

Fig. 3-13 Electropherograms of PCR products from HBV DNA samples.

3.4 本章小结

搭建了一个基于微流控芯片的高通量 PCR 扩增平台,分相对独立的温控芯片和微池阵列芯片。温控芯片的微加热器由阵列铂/钛电极与覆盖的铝片组成,可提供较大面积的均匀温度场。对反应池表面进行有效处理后,可实现多个 λ -DNA 和乙肝病毒 DNA 的样本同时扩增。

参考文献

- [1] 林炳承, 秦建华, 微流控芯片实验室. 北京: 科学出版社, 2006.
- [2] 林炳承, 秦建华, 图解微流控芯片实验室. 北京: 科学出版社, 2008.
- [3] Northrup, M. A., Ching, M. T., White, R. M., Watson, R. T., Silicon

- microchambers for DNA amplification. Proceeding of the 7th International Conference on Solid State Sensors and Actuators. Yokohama, Japan, 1993: 924-926.
- [4] Roper, M. G., Easley, C. J., Landers, J. P., Advances in polymerase chain reaction on microfluidic chips. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(12): 3887-3893.
- [5] Zhang, Y. H., Ozdemir, P., Microfluidic DNA amplification-A review. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 638(2): 115-125.
- [6] Chen, L., Manz, A., Day, P. J. R., Total nucleic acid analysis integrated on microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 2007, 7: 1413-1423.
- [7] Zhang, C. S., Xu, J. L., Ma, W. L., Zheng, W. L., PCR microfluidic devices for DNA amplification. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(3): 243-284.
- [8] Zhang, C. S., Xing, D., Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(13): 4223-4237.
- [9] 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.
- [10] Yu, X. M., Zhang, D. C., Li, T., Hao, L., Li, X. H., 3-D microarrays biochip for DNA amplification in polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer. *Sensors and Actuators a-Physical*, 2003, 108(1-3): 103-107.
- [11] Taylor, T. B., WinnDeen, E. S., Picozza, E., Woudenberg, T. M., Albin, M., Optimization of the performance of the polymerase chain reaction in silicon-based microstructures. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(15):

- 3164-3168.
- [12] Chen, L., West, J., Auroux, P. A., Manz, A., Day, P. J. R., Ultrasensitive PCR and real-time detection from human genomic samples using a bidirectional flow microreactor. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(23): 9185-9190.
- [13] Agrawal, N., Hassan, Y. A., Ugaz, V. M., A pocket-sized convective PCR thermocycler. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, 46(23): 4316-4319.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Wang, C. H., Chen, Y. Y., Liao, C. S., Hsieh, T. M., Luo, C. H., Wu, J. J., Lee, H. H., Lee, G. B., Circulating polymerase chain reaction chips utilizing

- multiple-membrane activation. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2007, 17(2): 367-375.
- [19] Chien, L. J., Wang, J. H., Hsieh, T. M., Chen, P. H., Chen, P. J., Lee, D. S., Luo, C. H., Lee, G. B., A micro circulating PCR chip using a suction-type membrane for fluidic transport. *Biomedical Microdevices*, 2009, 11(2): 359-367.
- [20] 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.
- [21] Wang, Z. Y., Sekulovic, A., Kutter, J. P., Bang, D. D., Wolff, A., Towards a portable microchip system with integrated thermal control and polymer waveguides for real-time PCR. *Electrophoresis*, 2006, 27(24): 5051-5058.
- [22] Zhong, R., Pan, X., Jiang, L., Dai, Z., Qin, J., Lin, B., Simply and reliably integrating micro heaters/sensors in a monolithic PCR-CE microfluidic genetic analysis system. *Electrophoresis*, 2009, 30(8): 1297-1305.
- [23] Lang, Z., Yan, H., Huang, D., Detection of HBV DNA in kidney by PCR. *Chinese Journal of Pathology*, 1994, 23(3): 144-147.

第四章 高通量 PCR-CE 检测芯片系统的构建及应用

4.1 引言

核酸分析涉及样本量一般较多,采用高通量、低消耗、自动化的核酸分析方法才能节省分析时间、减少试剂消耗,满足实际需要。微流控芯片实验室因其基本特征和最大优势在于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,而成为核酸分析研究的热点之一[1]。

高通量核酸检测是微流控芯片核酸研究中发展最快的领域之一,主要包括芯片电泳(CE)检测[2]、实时 PCR 荧光检测[3]、杂交[4]以及电化学检测[5]等。其中 CE 技术研究较早、应用较广,可以获得核酸片段的长度信息,是目前微流控芯片核酸检测的主流技术。为实现高通量的核酸检测,Mathies 研究组首次构建了阵列芯片电泳系统,采用分离通道并行、进样部分独立的结构完成了 12 通道核酸标准片段的的同时分离检测[6]。随后,他们将并行的通道改进为辐射状,通道数增加到 96,并且优化了进样和转角设计,完成了 96 通道的核酸标准片段的分离检测[7]。最后,他们将通道数目增加至 384,在 325 秒内检测了 384 份与血色病连锁的 H63D 突变株样品[8]。

将多种操作单元,如核酸纯化/萃取、PCR 扩增、分离/检测等集成或部分集成在微流控芯片分析系统上,才能更充分体现其低能耗、自动化的优势。自从 Woolley 等将硅微反应室固定在玻璃电泳芯片上[9],首次实现 PCR 单元和 CE 单元的功能化集成后,相继出现了各种形式的 PCR-CE 芯片系统,并迅速成为微流控芯片核酸研究的热点之一。Landers 研究组通过微泵阀将红外加热/热电偶控温的芯片 PCR 单元和 CE 单元结合[10],实现了在线的 PCR-CE 集成,在 12 分钟内完成了鼠伤寒沙门氏菌 DNA 的扩增、检测。Mathies 研究

组采用微加工技术制作了集成铂薄膜微加热器/温度传感器以及 PDMS 微阀的 PCR-CE 芯片系统[11], 并用于大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的基因分析, 整个分析过程耗时仅 10 分钟。

针对高通量核酸分析的应用要求, 国内外学者在高通量芯片 PCR-CE 方向也进行了较多的尝试, 初步展现了微流控芯片高通量、集成化核酸分析的优势。Ramsey 研究小组设计了集成 4 个细胞溶胞-PCR 扩增和单通道电泳检测的芯片[12], 并将芯片置于常规热循环仪中进行扩增, 实现了 4 个样品的同时扩增和扩增产物的依次检测。因单通道电泳的集成, 在一定程度上限制了其高通量核酸分析中的应用。Mathies 研究组首次将阵列电泳引入 PCR-CE 集成芯片中[2, 13], 发展的一种高通量 PCR-CE 芯片系统, 该芯片系统集成了四个 PCR-CE 单元, 每个单元都集成有微加热器/温度传感器、PDMS 气动微阀、PCR 微室及电泳分离通道, 能同时完成四个核酸样品的 PCR 扩增和分离/检测, 且分析速度快、重复性好。

通过对 PCR、CE 操作单元及其集成系统的研究, 实现了高通量、快速、灵敏、自动化的基因分析; 然而, 其进一步发展和广泛应用面临多种挑战, 比如功能化 PCR-CE 芯片设计/制作难度较大、操作控制过程相对复杂, PCR 芯片本身比较昂贵难以广泛使用。因此, 发展一种制作和操纵较为简便的微流控芯片 PCR-CE 系统仍是目前核酸分析的需求之一。为此, 我们设计并制作了集成多池 PCR 和阵列 CE 的微流控芯片系统, 将阵列 CE 通道的进样池直接作为 PCR 反应池, PCR 反应后直接进行产物的阵列电泳, 无需微泵阀的设计、制作和操控, 因此简化了实验流程。采用分体式的温控芯片、多池 PCR-阵列 CE 芯片的设计, 降低了芯片的成本, 对进一步的推广使用具有一定的意义。

4.2 实验部分

4.2.1 仪器与设备

SC-1B 型匀胶机购自北京创威纳设计有限公司。BP-2B 型烘胶台购自北京创世威纳科技有限公司。PH030A 型培养/干燥箱购自上海一恒科学仪器有限公司。紫外光刻机购自 Thermo Oriel 公司。FA1104 型电子天平购自上海精秤天平厂。阵列电泳仪由实验室自行搭建。PCR 扩增仪 2700 购自美国 ABI 公司。UNIPOL-1202A 型精密研磨抛光机购自沈阳科晶设备制造有限公司。CK-250L 超声波打孔机购自汕头市金士连上海分公司。万用电表购自优利德集团有限公司；K 型热电偶购自常州普瑞特测温电线厂。

4.2.2 材料与试剂

Sylgard® 184 硅橡胶(PDMS)试剂盒购自 Dow Corning 公司。SU-8 2005 型光刻胶购自 Microchem 公司。三羟甲基氨基甲烷(Tris), EDTA, 硼酸(Boric acid) 均购自沈阳化学试剂厂；GeneFinder™ 嵌入式双链 DNA 荧光染料(用二甲基亚砷稀释 100 倍保存)购自厦门百维信公司；蛋白酶 K、λ-phage DNA, DNA 聚合酶及其他 PCR 试剂均购自大连宝生物公司；乙肝病毒(HBV)核酸扩增(PCR)荧光定量检测试剂盒购自深圳匹基生物技术开发有限公司。DNA marker (100 bp DNA ladder) 购自天根生化科技(北京)有限公司。羟丙基甲基纤维素(HPMC, 2%水溶液粘度为 4000 cps)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP, MW 1 300 000)购自 Sigma-Aldrich 公司。透明环氧胶购自安特固化学私人有限公司。光刻胶 (BP212) 购自北京科华微电子材料有限公司。导热胶、Pt100 购于德国九茂公司。人血清样品由大连医科大学附属第一医院提供。除特殊说明外的其他试剂均为分析纯。所有水溶液均用二次水配制。溶液在使用前均用 0.22 μm 孔径的滤膜过滤。

4.2.3 高通量 PCR-CE 芯片系统的构建

高通量 PCR-CE 芯片系统整体设计如图 4-1 所示,包括微流控芯片、PCB 温控电路和阵列电泳检测仪(含光学模块、高压模块和数据采集与处理模块)。其中,微流控芯片的设计与制作是本章实验的核心;PCB 温控电路已在第三章论述,将不在此章重复介绍;阵列电泳检测仪为实验室先行搭建,为适应 PCR 产物阵列电泳检测的需要,对其光路系统和电极进行了改进。

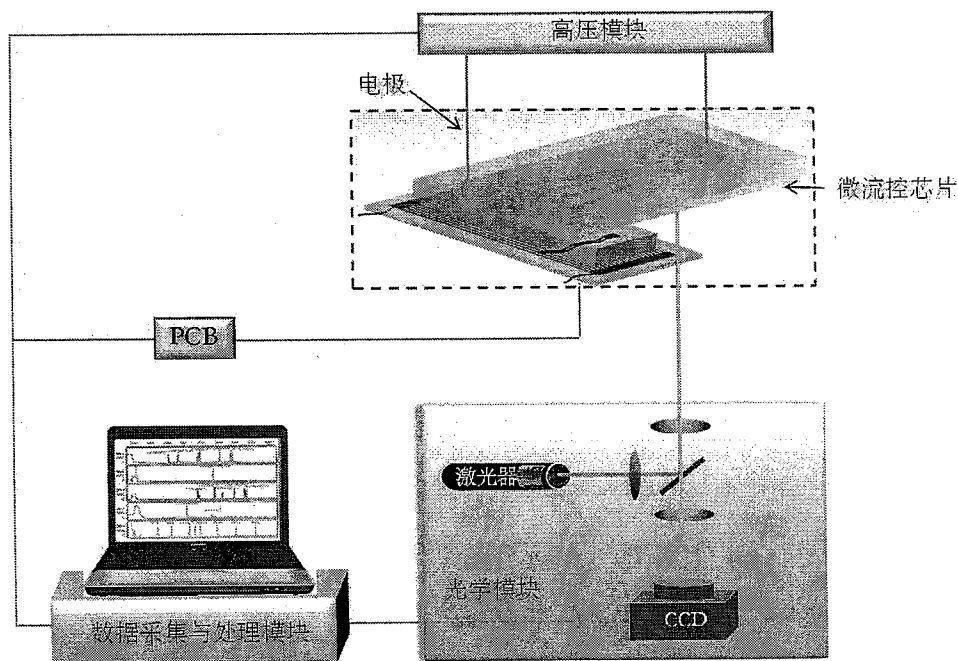


图 4-1 高通量 PCR-CE 系统示意图。

Fig. 4-1 Schematic of high throughput PCR-CE system.

4.2.3.1 多池 PCR-阵列 CE 芯片设计与制作

高通量 PCR-CE 系统所用芯片由分体式的温控芯片、多池 PCR-阵列 CE 芯片组成,如图 4-2 所示。该芯片在本论文第三章搭建的芯片平台的基础上发展而来,故温控芯片设计及制作不在此重复介绍。

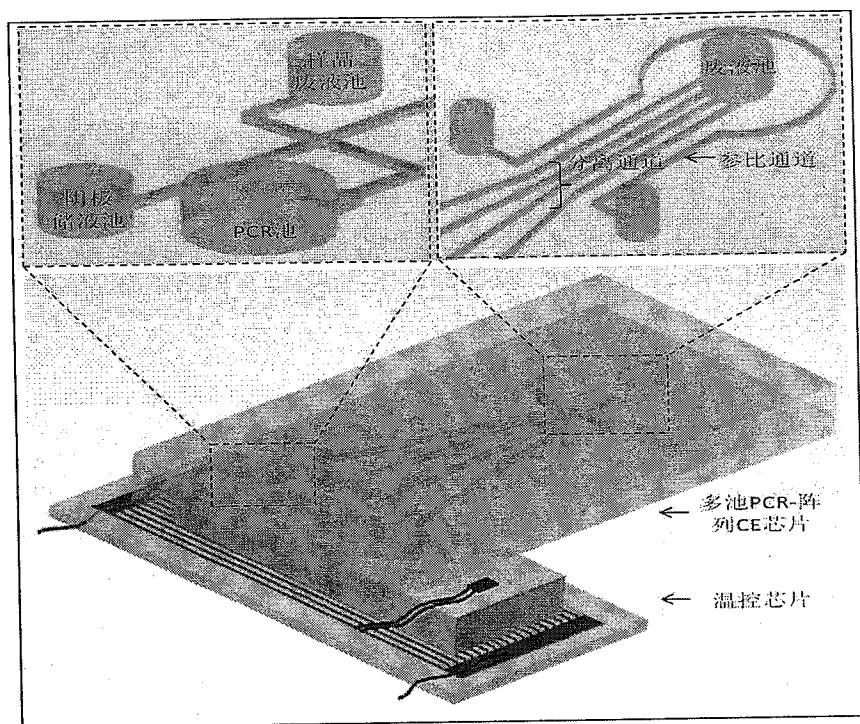


图 4-2 高通量 PCR-CE 芯片设计示意图。

Fig. 4-2 Schematic of the high throughput PCR-CE chip.

多池 PCR-阵列 CE 芯片含有四个相同的 PCR-CE 单元，其中每个单元含有 PCR 池（即电泳时的进样池）、样品废液池、阴极储液池、十字电泳检测通道各一个以及公用的废液池。检测通道的两侧设计有参比通道。十字电泳通道的前端为扇形排布，后端汇集成阵列的检测通道。检测通道、参比通道均匀排布，间距 $160\ \mu\text{m}$ 。十字电泳通道长 $4.5\ \text{cm}$ ，进样通道及废液通道长 $0.5\ \text{mm}$ ，所有通道宽 $90\ \mu\text{m}$ ，通道与 PCR 池连接处增宽至 $300\ \mu\text{m}$ ，所有通道深 $30\ \mu\text{m}$ 。PCR 池直径 $3\ \text{mm}$ ，其它各池直径 $2\ \text{mm}$ 。

多池 PCR-阵列 CE 芯片制作方法如图 4-3 所示。将设计好的掩膜贴在铬板玻璃的光刻胶表面，经过曝光、显影、除铬、刻蚀后除胶、除铬、打孔，

最后和另一块 1.1 mm 空白玻璃（下层玻璃）进行封接，并将下层玻璃打磨抛光至 0.3-0.4 mm。

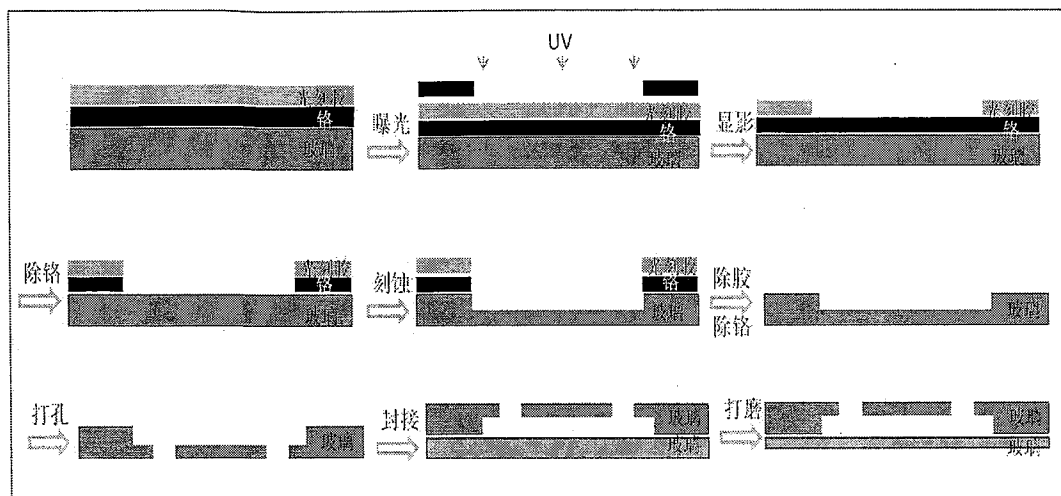


图 4-3 多池 PCR-阵列 CE 芯片制作流程图。

Fig. 4-3 Schematic of fabrication process of the multiple chamber PCR-parallel CE chip.

4.2.3.2 阵列 CE 检测仪的改装及灵敏度测定

首先，根据显微镜的结构与原理设计并改装了系统的光路部分，如图4-4所示。激光束由柱面镜拉成线性光，依次经过聚焦透镜（ $f=35\text{ mm}$ ）、反射镜（450-650 nm 高反）、双色镜（<500 nm 反射，>500 nm 透射）和显微物镜（ $10\times$ ，N. A. 0.25）成一窄的线性光聚焦在芯片通道的检测窗口上，激发微通道中的荧光物质产生荧光，荧光由同一显微物镜收集，经双色镜、聚焦透镜（ $f=50\text{ mm}$ ）、滤光片（ $520\pm 20\text{ nm}$ ）成像在CCD感光芯片上进行检测。

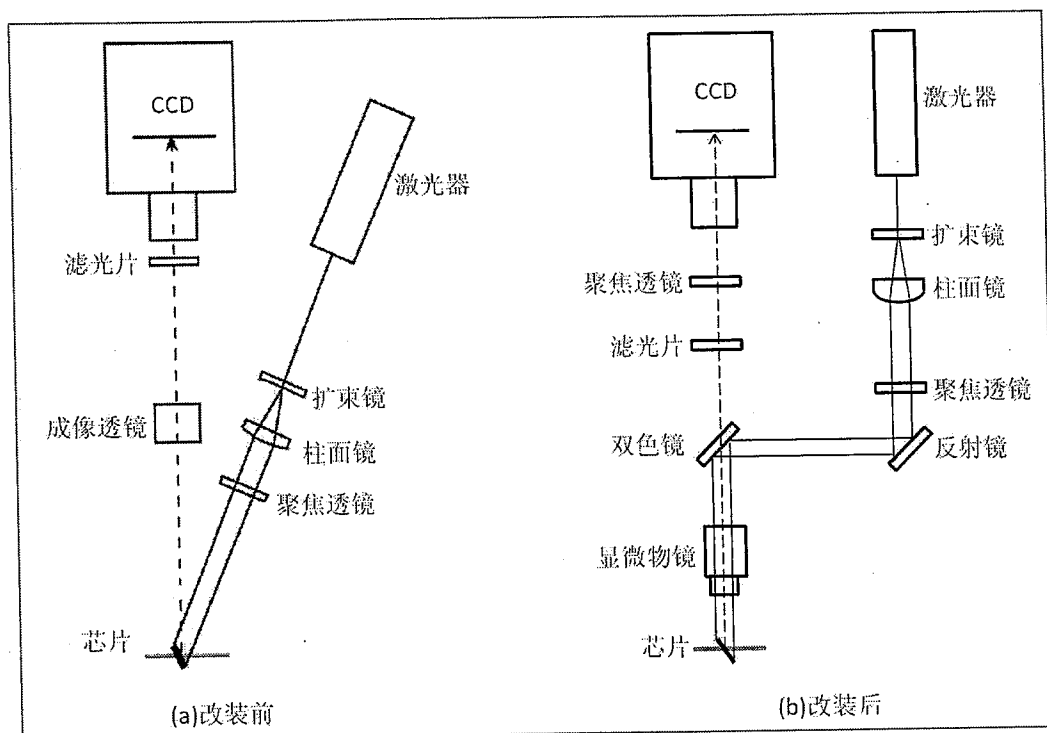


图4-4 光学系统改装前 (a) 后 (b) 示意图。

Fig. 4-4 Schematic of optical system before (a) and after (b) adaption.

其次,对仪器的电极进行了改装。制作了一块如图4-5所示的PCB板,PCB板上有1分4的银通道,通过分别焊接高压电源输出电极和四根铂电极实现输出电极1根变成4根的目的。

在仪器改装前后,分别使用十字电泳玻璃芯片(带参比通道)进行仪器灵敏度的测试,测试对象选用 10^{-10} - 10^{-5} M荧光素钠溶液(用10 mM硼砂缓冲溶液稀释)。分离电解质为10 mM硼砂缓冲溶液,分离场强为280 V/cm,检测距离为3 cm。参比通道中灌入 10^{-6} M荧光素钠溶液用于检测通道的定位。

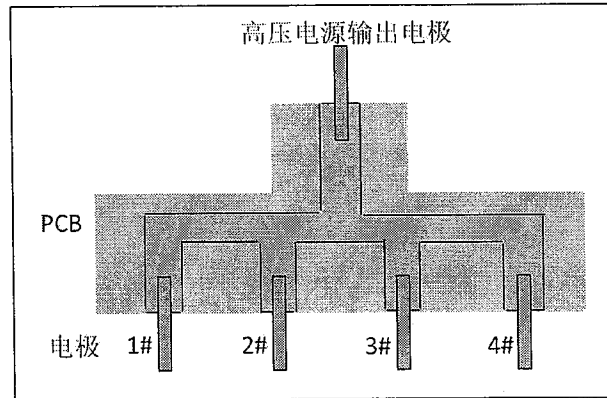


图4-5 电极改装示意图。

Fig. 4-5 Schematic of electrode adaption.

4.2.4 PCR-CE 操作步骤

(1) 分离胶的导入

多池 PCR-阵列 CE 芯片的所有通道依次用 1M NaOH、1x TBE 缓冲液清洗 10 分钟后，将电泳分离胶（0.5% HPMC-4000, 0.1% PVP, 6% 甘露醇, 1 mM GeneFinder™ 染料, 1x TBE 缓冲液）滴加入废液池中，分别从每个 PCR 池处用真空泵将分离胶抽入十字通道的交叉口。然后将分离胶加入所有的样品废液池和阴极储液池，分别从每个 PCR 池处用真空泵将分离胶灌满所有通道。在此过程中，需避免将气泡抽入通道中，并在分离胶导入完毕后在显微镜下检查通道里有无气泡。

(2) PCR 池的表面处理

将所有 PCR 池用 1x TBE 缓冲液清洗几次后，加入 2.5 mg/mL BSA 6 μ L 包被 5-10 分钟。

(3) PCR 反应液的添加

将 PCR 池中 BSA 吸出，加入 4 μ L PCR 反应液，并覆盖 6 μ L 矿物油。

其它储液池加入 4 μL 分离胶并覆盖 6 μL 矿物油。PCR 反应液配制方法如下：
25 μL PCR 反应液含 1x PCR 缓冲液、0.2 mM dNTP、0.5 mM 正/反向引物、
80 unit /mL Ex-Taq 聚合酶、40 ng/mL λ -DNA 或 400 ng/mL PUC19 或 2 μL 萃
取的样本 DNA 溶液。另将 0.25 mg/mL BSA 和 0.4% PVP 加入 PCR 反应液中
进行玻璃芯片的动态涂层。本章所用引物序列如表 4-1 所示。

乙肝血清 DNA 的提取使用乙肝病毒 (HBV) 核酸扩增 (PCR) 荧光定量检
测试剂盒并依照试剂盒说明书进行。MTB-DNA、HLA-B27 DNA 直接用大
连医科大学附属第一医院已经提取好的样本。

表 4-1 实验所用引物序列

Table 4-1 Primer sequences which used in this experiment.

	引物序列	Sequence (5'→3')	产物长度
PUC-19[14]	正向引物	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAAT	304bp
	反向引物	CCAATACGCAAACCGCCTCTCC	
λ -DNA	正向引物	GCACAAGTCCGACAACCCTG	236bp
	反向引物	TATTCGCATTACCCCTCAAGC	
HBV DNA[15]	正向引物	GACTCGTGGTGGACTTCTCTCA	229bp
	反向引物	GAGGACAAACGGGCAACATACC	
MTB DNA[16]	正向引物	CGTGAGGGCATCGAGGTGGC	245bp
	反向引物	GCGTAGGCGTCGGTGACAAA	
HLA-B27[17]	正向引物	GGGTCTCACACCCTCCAGAAT	235bp
	反向引物	CGGCGGTCCAGGAGCT	

(4) 多池 PCR 反应

将多池 PCR-阵列 CE 芯片 PCR 池的一侧通过导热胶粘接在温控芯片上，

并启动 PCR 温控程序。温度条件设置为预变性 (94 °C) 100 秒, 30 个温度循环: 变性 (94 °C) 20 秒、退火 (λ -DNA、PUC19、HBV-DNA、MTB-DNA、HLA-B27 DNA 退火温度分别为 54 °C、55 °C、56 °C、55 °C、57 °C) 20 秒、延伸 (72 °C) 20 秒, 最后延伸 (72 °C) 200 秒。

应用常规 PCR 仪进行芯片 PCR 的阳性对照, 温度条件为预变性 (94 °C) 5 分钟, 30 个温度循环: 变性 (94 °C) 30 秒、退火 (λ -DNA、PUC19、HBV、MTB、HLA-B27 退火温度分别为 54 °C、55 °C、56 °C、55 °C、57 °C) 30 秒、延伸 (72 °C) 30 秒, 最后延伸 (72 °C) 10 分钟。

(5) 阵列电泳

PCR 反应结束后, 向参比通道中加入 10^{-6} M 荧光素钠溶液用于通道的定位。将多池 PCR-阵列 CE 芯片放入阵列电泳仪里, 并将电极分别插入各液池进行阵列电泳检测。电泳条件为进样场强 375 V/cm、进样 35 秒, 分离场强 240 V/cm, 检测距离 3.5 cm。

实验结束后, 将芯片酸煮 (H_2SO_4 :30% H_2O_2 =3:1, 煮 30 分钟)、清洗, 以备重复使用。

4.3 结果与讨论

4.3.1 多池 PCR-阵列 CE 芯片设计

采用分体式温控芯片和多池 PCR-阵列 CE 芯片设计, 其温控芯片具有较为广泛的应用范围。制作好的高通量 PCR-CE 芯片如图 4-6 所示。将电泳芯片的进样池直接作为 PCR 反应池, 避免了微泵阀的使用, 简化了 PCR-CE 芯片的设计、制作及实验操作过程。将电泳分离胶导入通道中作为连接 PCR 和 CE 的接口, 可在 PCR 反应后直接进行产物的电泳分离/检测。十字电泳通道

PCR 池端设计为扇形结构，保证了各单元分离通道长度一致，也使结构更为紧凑，减少各 PCR 池的温度差异。与 PCR 池连接的通道略宽，增大电泳检测时的进样量。使用阵列设计的电泳通道，可进行多个电泳通道的同时检测，又避免了光学系统平台的移动。各 PCR-CE 单元公用一个废液池，简化了实验设计，减少了电极的使用数目，也利于芯片的清洗。

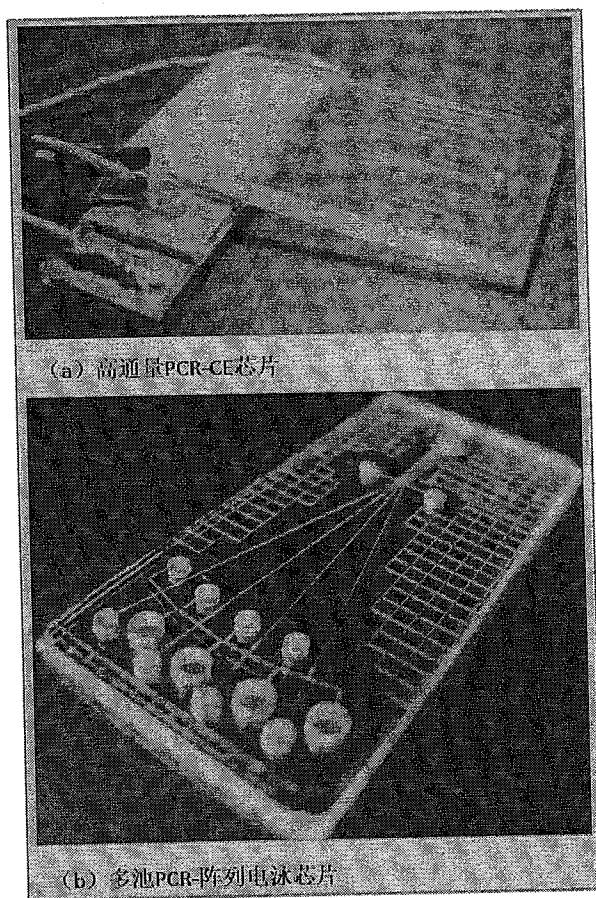


图 4-6 微流控芯片实物图。(a) 高通量 PCR-CE 芯片（分体式温控芯片和 PCR-CE 芯片）；(b) 多池 PCR-阵列 CE 芯片。

Fig. 4-6 Photograph of the fabricated microfluidic chip. (a) High throughput PCR-CE chip (non-integrated microheater/RTD chip and PCR-CE chip); (b) multiple chamber PCR-parallel CE chip.

4.3.2 阵列 CE 检测仪的改装及灵敏度

原阵列电泳仪对荧光素钠的检测限约为 5×10^{-6} M，如图 4-7 所示。依据显微镜的结构与原理对阵列电泳仪光路系统进行改装，改装后光路如图 4-8 所示。在同样的检测条件下，改装后的阵列电泳仪对荧光素钠的检测限可达 5×10^{-8} M，如图 4-9 所示。此次对光路系统进行改装，将检测限提高了约 2 个数量级，基本上满足了 PCR 扩增产物的检测需要。使用显微物镜增强了激发光的强度和荧光的收集效率，进而提高了系统的检测灵敏度。

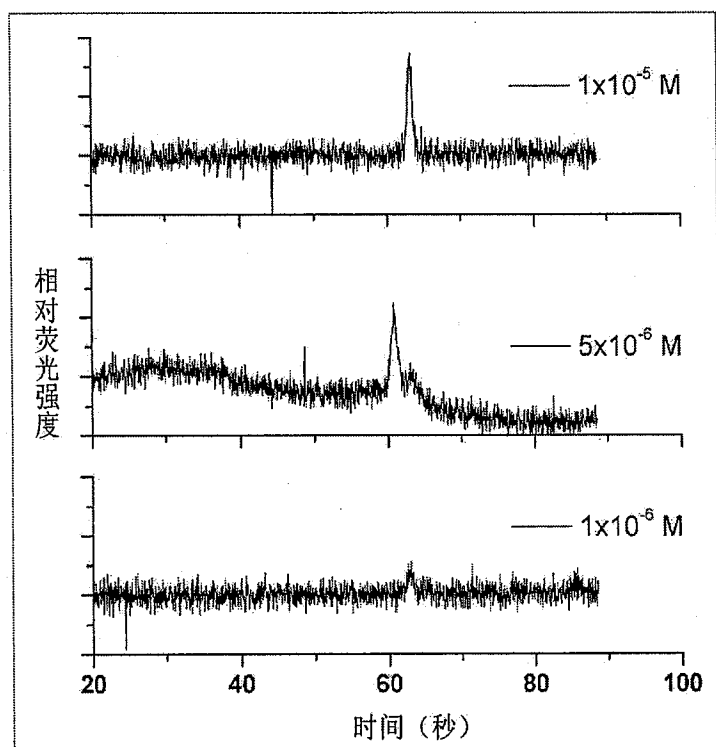


图 4-7 改装前荧光素钠电泳图谱。

Fig. 4-7 Electropherograms of fluorescein sodium before adaption.



图 4-8 改装后的光路系统。

Fig. 4-8 Photograph of optical system after adaption.

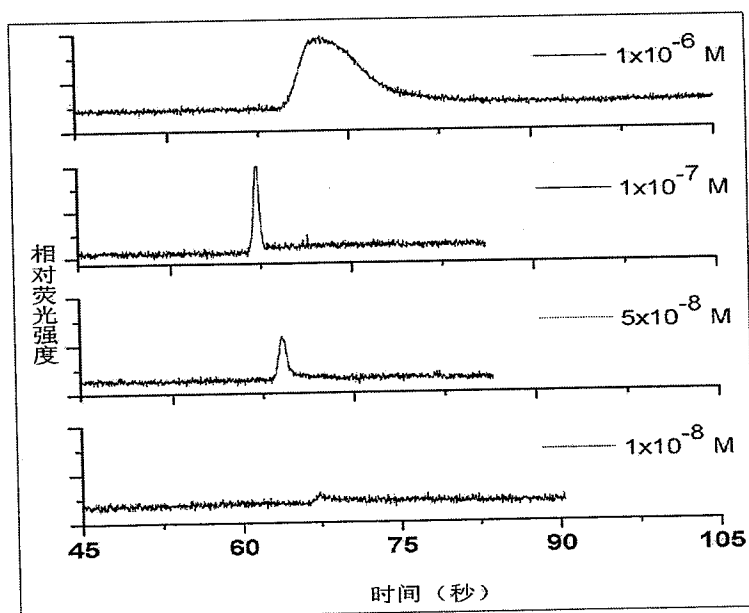


图 4-9 改装后荧光素钠电泳图谱。

Fig. 4-9 Electropherograms of fluorescein sodium after adaption.

原高压电路能够输出六路独立的 0-4000 V 直流高压，每一路都可分别进行悬空、输出及接地三种设置。使用高通量 PCR-CE 芯片系统进行 PCR 扩增产物的电泳检测时，需要使用的电极数目较多（13 个），因而原高压电路电极数满足不了检测需要。考虑到高通量 PCR-CE 芯片系统有四个平行的单元，每单元相同储液池在电泳分离过程中施加的电压相同，可共用一个高压电路输出电极。对阵列电泳仪高压电源输出电极进行改装，实现了 1 分 4 的目的，符合实验需要，改装后的电极如图 4-10 所示。

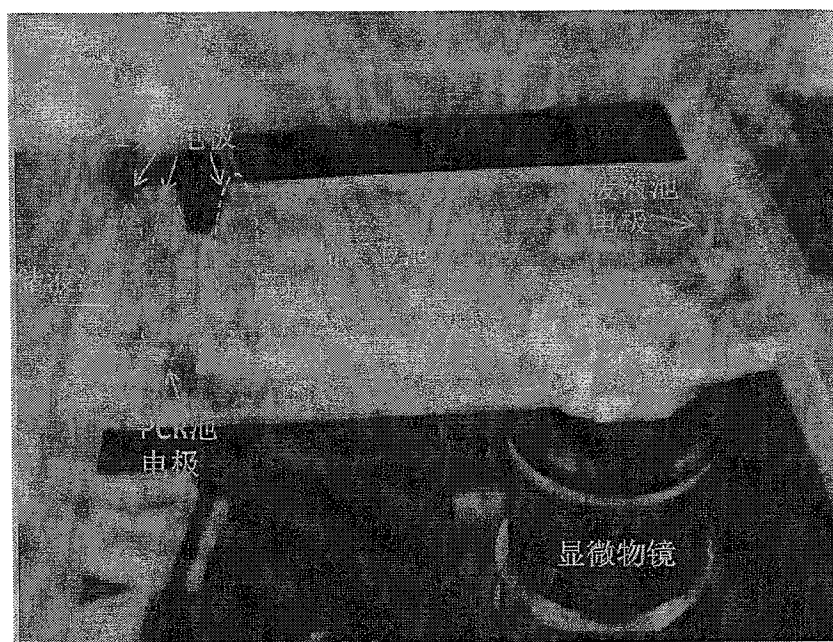


图 4-10 改装后的电极。

Fig. 4-10 Photograph of electrode after adaption.

4.3.3 阵列 CE 的性能

相对于其它方法, 芯片电泳对 PCR 产物的检测优势在于能获得片段的长度信息, 可利用电泳出峰时间判定片段的长度。在检测芯片 PCR 产物之前, 我们先对电泳出峰时间的重复性进行了考察。以 DNA marker (100bp DNA ladder, 用水稀释 20 倍) 为检测对象, 100bp、200bp、300bp、400bp、500bp 和 600bp 6 个 DNA 片段依次出峰。电泳条件同 PCR 产物的检测条件。

首先, 考察了四个通道电泳出峰时间的一致性。四通道电泳出峰时间比较一致, 各片段的出峰时间 $RSD \leq 4.40\%$ ($n = 4$), 结果如图 4-11 所示。

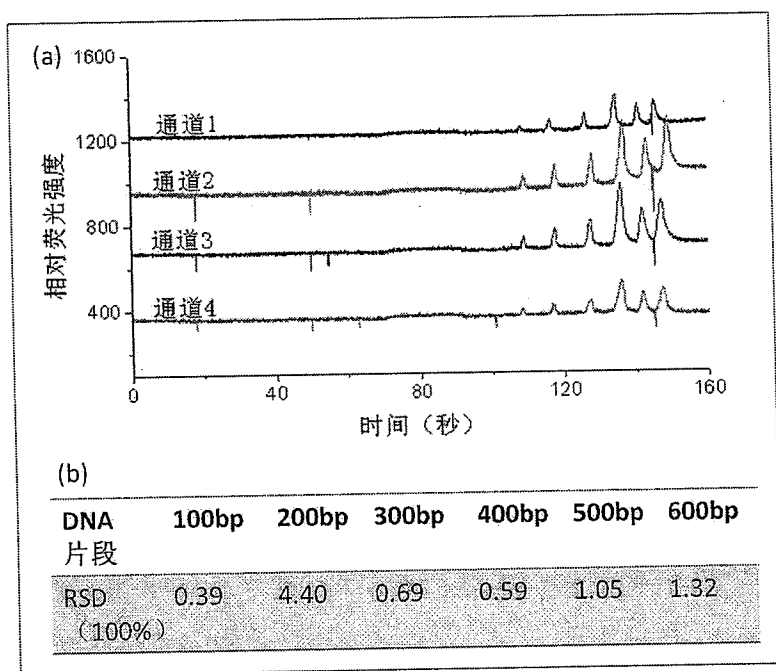


图 4-11 DNA marker 阵列电泳图谱 (a) 及通道间出峰时间 RSD (b)。

Fig. 4-11 Electropherograms of parallel CE from DNA marker (a) and the migration time differences of each peak across the four channels (b).

然后, 考察了每个通道多次运行出峰时间的重复性。以通道 1 为例, 多次运行出峰时间 $RSD \leq 1.25\%$ ($n = 3$), 如图 4-12 所示。

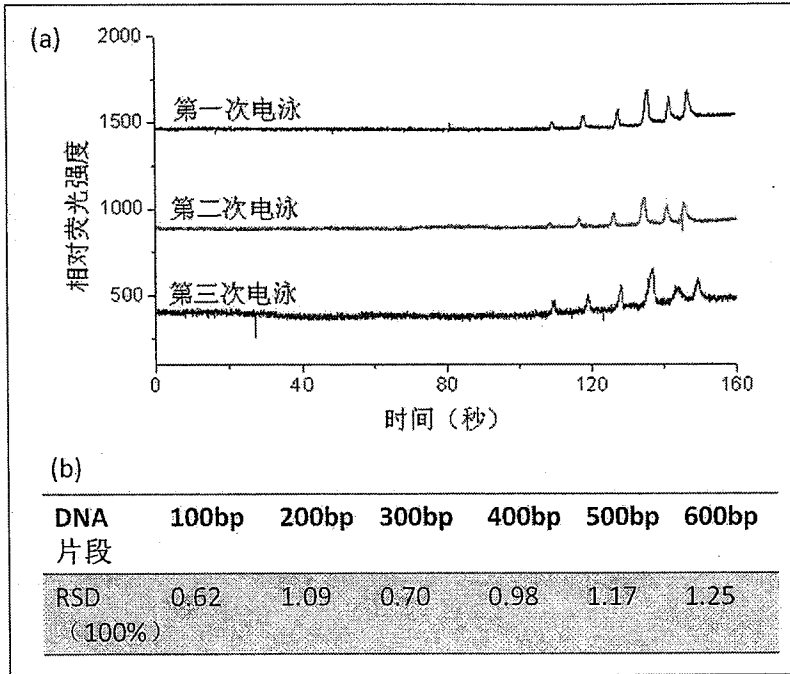


图 4-12 1 号通道 3 次电泳图谱 (a) 及出峰时间 RSD (b)。

Fig. 4-12 Electropherograms of channel 1 in three runs of operation and migration time differences of each peak in three runs.

综上, 通道间以及通道多次运行的出峰时间一致性较好, 可依据出峰时间对 DNA 片段长度进行定性分析, 满足 PCR 产物的鉴定需要。需要说明的是, 各通道峰高差异性较大, 不利于 PCR 产物的半定量检测, 其原因在于显微物镜的使用造成的检测区域激光强度不均匀。

4.3.4 芯片 PCR-CE

4.3.4.1 单通道 PCR-CE

本章所用高通量 PCR-CE 芯片系统含有四个相同的 PCR-CE 单元, 并用电泳分离胶作为接口代替微泵阀的使用。其可行性首先由单通道 PCR-CE 验

证, 实验方法同阵列 PCR-CE。如图 4-13 所示, λ -DNA 得到成功的在线 PCR 扩增和 CE 检测。

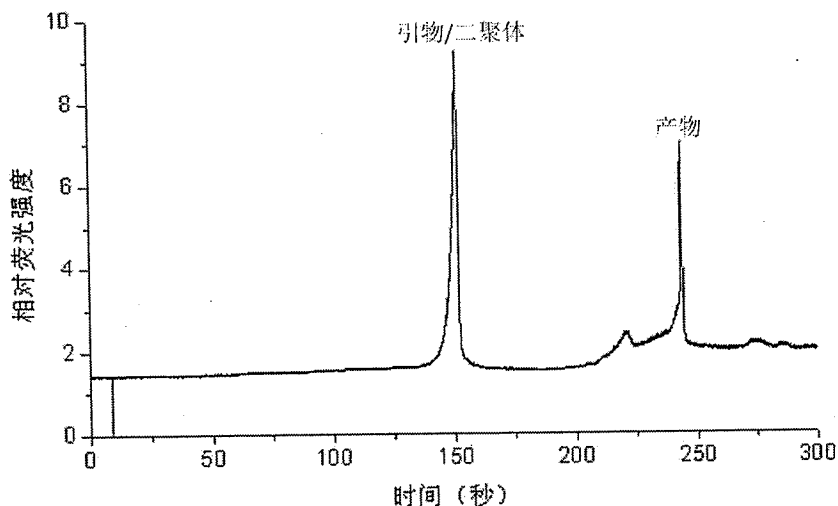


图 4-13 λ -DNA 样本单通道 PCR-CE 电泳结果。

Fig. 4-13 Electropherogram of single PCR-CE for λ -DNA.

4.3.4.2 高通量 PCR-CE

各实验条件进行优化后, 我们将高通量 PCR-CE 芯片系统用于标准品 PUC19 DNA 的 PCR 扩增-CE 检测。将分离胶导入通道并对 PCR 池进行表面处理后, 加入 PCR 反应液并按照设定程序进行 PCR 扩增, 反应结束后使用阵列电泳仪对四通道中的扩增产物进行同时电泳分离/检测。如图 4-14 所示, 四个通道 PCR 产物清晰可见, 证明此芯片系统具有高通量 PCR-CE 的可行性。

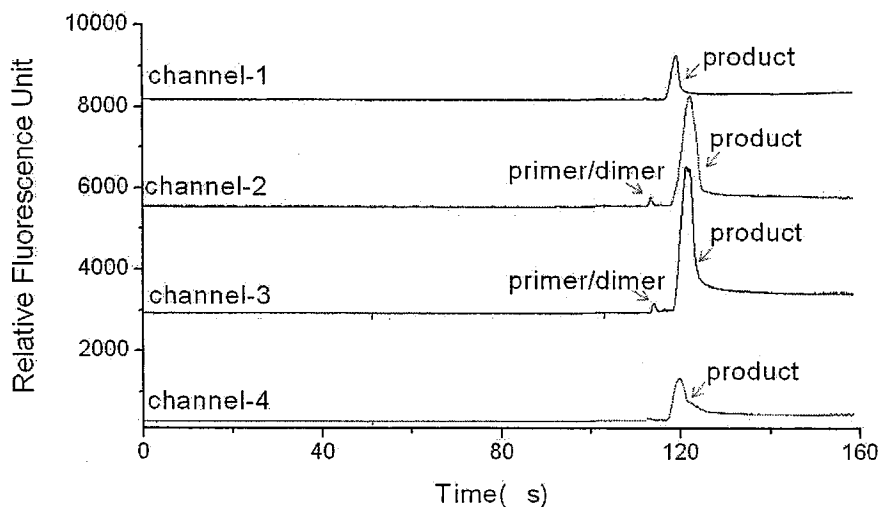


图 4-14 PUC19 DNA 样本高通量 PCR-CE 电泳结果。

Fig. 4-14 Electropherograms from high throughput PCR-CE products of PUC19 DNA.

4.3.5 高通量 PCR-CE 芯片系统在实际样本检测中的应用

随着分子生物学技术的迅速发展，PCR 技术等基因诊断方法越来越多地应用于临床医学的各种领域。本章通过对医院常用 DNA 样本的检测，证明该高通量 PCR-CE 芯片系统可用于临床实际样本的检测。

4.3.5.1 乙肝病毒 DNA 的检测

乙型肝炎病毒 (Hepatitis Virus B, HBV) 感染是造成急性和慢性肝病的主要原因。根据世界卫生组织的统计资料，全世界有大约4亿人为该病毒的携带者[18]。HBV感染如控制不当则容易转变为慢性肝炎，继而可发展为肝硬化和肝癌，因此早期的诊断和针对性治疗对于控制疾病发展和减少并发症具有重要意义。采用引物序列（见表4-1）可扩增HBV 基因组S 区域229 bp片段。

本实验检测的样品来自HBV患者的血清样品，其HBV-DNA的提取采用乙肝病毒(HBV)核酸扩增(PCR)荧光定量检测试剂盒并按操作说明书进行。

按照上文所说的高通量PCR-CE的实验条件，整个PCR-CE过程约耗时1.2小时。其电泳谱图如4-15所示，四个HBV阳性样本均获得成功的检测，证明该高通量PCR-CE平台在快速病毒检测中的应用潜力。

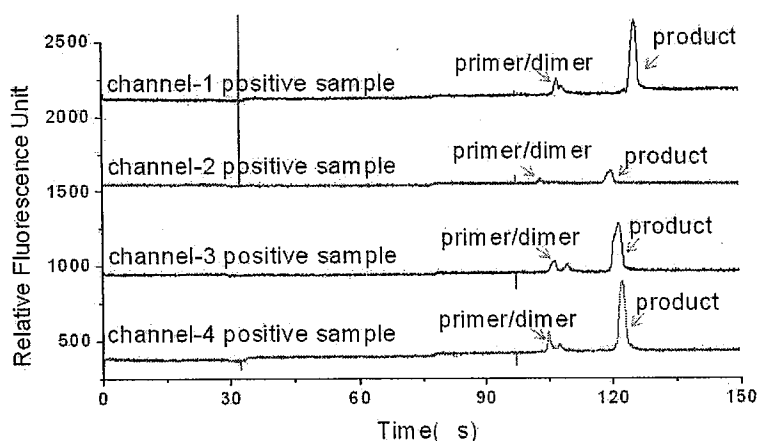


图4-15 HBV样本高通量PCR-CE 电泳结果。

Fig. 4-15 Electropherograms from high throughput PCR-CE products of HBV samples.

4.3.5.2 结核杆菌 DNA 的检测

结核杆菌是引起结核病的病原菌，可侵犯全身各器官，但以肺结核为最多见。20世纪80年代后，由于艾滋病和结核分枝杆菌耐药菌株的出现、免疫抑制剂的应用、吸毒、贫困及人口流动等因素，全球范围内结核病的疫情骤然恶化。据WHO报道，每年约有800万新病例发生，至少有300万人死于该病。因此，结核病又成为了威胁人类健康的全球性卫生问题，并成为某些发展中国家和地区，特别是艾滋病高发区人群的首要死因。一般涂片检查

需要菌数较多漏诊率高，而细菌培养需时较长。目前 PCR 扩增技术已应用于临床结核杆菌 DNA 的鉴定。

将多池PCR-阵列CE芯片清洗后进行结核杆菌DNA的检测。本实验检测的样品来自临床患者的痰液，其DNA的提取采用结核杆菌（TB）核酸扩增（PCR）荧光体外检测试剂盒并按操作说明书进行，其提取过程在医院进行。

按照上文所说的高通量PCR-CE的实验条件，整个PCR-CE过程约耗时1.2小时。其电泳谱图如4-16所示，结核阳性样本获得成功的检测，而阴性样本没有相应的产物，证明该高通量PCR-CE系统在快速疾病检测中的应用潜力。芯片经过清洗后用于的阴性样本检测没有出现假阳性，证明没有存在交叉污染，即多池PCR-阵列CE芯片具有可重复使用性。所有电泳谱图都出现了一些小杂峰，可能和PCR扩增体系如引物序列、退火温度等有关，并得到常规PCR仪-凝胶电泳结果证实（出现了“弥散”现象）。

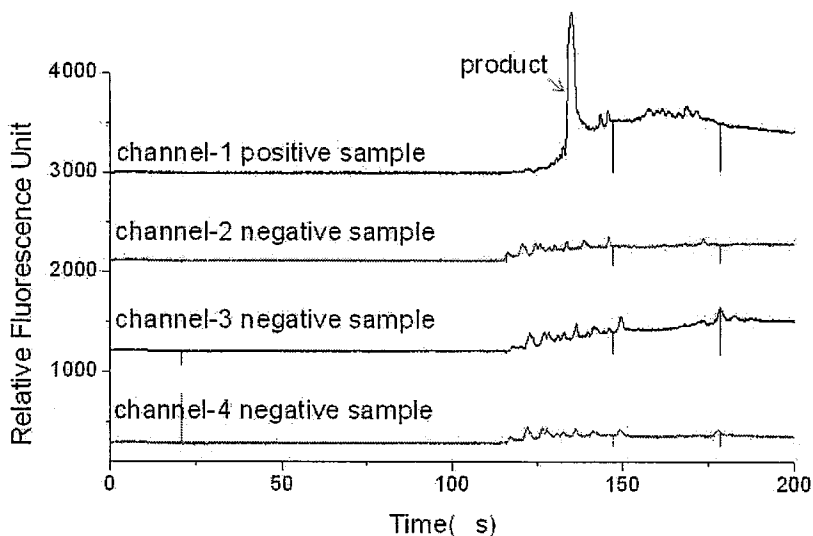


图 4-16 结核样本高通量 PCR-CE 电泳结果。

Fig. 4-16 Electropherograms from high throughput PCR-CE products of TB samples.

4.3.5.3 人类白细胞抗原 (HLA) -B27 DNA 的检测

HLA 抗原是人类主要组织相容性复合体 (MHC) 的表达产物, 在免疫系统中主要负责细胞之间的相互识别和诱导免疫反应, 调节免疫应答的功能。HLA-B27 基因属于 I 型 MHC 基因, 可表达于有核细胞尤其是淋巴细胞的表面。94% 的强直性脊椎炎患者表达 HLA-B27, 而仅有 9% 的正常人表达 HLA-B27[19]。又由于强直性脊椎炎症状与许多疾病相似而难以确诊, 因此 HLA-B27 的检测在强直性脊椎炎中的诊断中有着重要意义。

根据 HLA-B27 基因特异性序列设计引物, 样本来自临床患者的抗凝血, 其 DNA 提取过程在医院进行。按照上文所说的高通量 PCR-CE 的实验条件进行, 整个 PCR-CE 过程需耗时 1.2 小时。其电泳谱图如 4-17 所示, 阳性样本均获得成功的检测, 而阴性样本没有相应的产物, 再次证明该高通量 PCR-CE 平台可用于快速疾病检测。

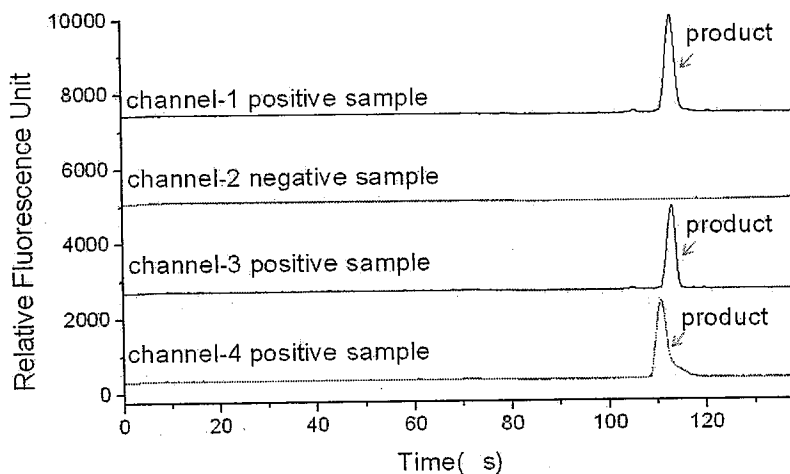


图4-17 HLA-B27样本高通量PCR-CE 电泳结果。

Fig. 4-17 Electropherograms from high throughput PCR-CE products of HLA-B27 samples.

自此, 基于微流控芯片的高通量核酸分析系统各单元的搭建及 PCR-CE 的初步集成已完成, 下一步工作是将上述所有单元集成于同一芯片上, 实现全集成的高通量核酸分析系统的构建目标。

4.4 本章小结

在高通量PCR芯片平台的基础上设计并搭建了高通量PCR-CE芯片系统, 可同时实现四个样本的PCR扩增和电泳分离/检测。多池PCR-阵列CE芯片结构简单、紧凑、集成度较高, 将分离胶作为芯片接口, 并成功的用于 λ -DNA 和PUC19的PCR-CE分析。将阵列PCR仪改装使之符合PCR产物的检测需要。利用该PCR-CE系统, 实现了在实际样本中乙肝病毒DNA、结核杆菌DNA及HLA-B27 DNA的快速、高通量检测。

参考文献

- [1] 林炳承, 秦建华, 微流控芯片实验室. 北京: 科学出版社, 2006.
- [2] Liu, C. N., Toriello, N. M., Mathies, R. A., Multichannel PCR-CE microdevice for genetic analysis. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(15): 5474-5479.
- [3] Xiang, Q., Xu, B., Li, D., Miniature real time PCR on chip with multi-channel fiber optical fluorescence detection module. *Biomedical Microdevices*, 2007, 9(4): 443-449.
- [4] Liu, Y. J., Rauch, C. B., Stevens, R. L., Lenigk, R., Yang, J. N., Rhine, D. B., Grodzinski, P., DNA amplification and hybridization assays in integrated plastic monolithic devices. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(13): 3063-3070.

- [5] 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.
- [6] Woolley, A. T., Sensabaugh, G. F., Mathies, R. A., High-speed DNA genotyping using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(11): 2181-2186.
- [7] Shi, Y. N., Simpson, P. C., Scherer, J. R., Wexler, D., Skibola, C., Smith, M. T., Mathies, R. A., Radial capillary array electrophoresis microplate and scanner for high-performance nucleic acid analysis. *Analytical Chemistry*, 1999, 71(23): 5354-5361.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Easley, C. J., Karlinsey, J. M., Landers, J. P., On-chip pressure injection for integration of infrared-mediated DNA amplification with electrophoretic separation. *Lab on a Chip*, 2006, 6(5): 601-610.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Lang, Z., Yan, H., Huang, D., Detection of HBV DNA in kidney by PCR. *Chinese Journal of Pathology*, 1994, 23(3): 144-147.
- [16] 石亚君, 莉, 帅., 秦广民, 卢喜烈, 王晋丽, 勇, 徐., 刘洪斌, 陈韵岱, 结核分支杆菌扩增体系的建立、优化及评价. *四川医学*, 2009, 30(5): 613-616.
- [17] 潘克女, 杨文波, 谭登玲, HLA - B27 聚合酶链反应体系的建立和初步临床应用. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(6):1018-1019.
- [18] Lai, C. L., Ratziu, V., Yuen, M. F., Poynard, T., Viral hepatitis B. *Lancet*, 2003, 362(9401): 2089-2094.
- [19] Bon, M. A. M., van Overen-Dybicz, A., van den Bergh, F., Genotyping of HLA-B27 by real-time PCR without hybridization probes. *Clinical Chemistry*, 2000, 46(7): 1000-1002.

总结论

以微流控芯片为平台，以核酸为对象，针对全集成、高通量核酸分析系统的关键技术进行研究，并应用于临床样本的纯化、扩增和检测。

1、首次建立了一种通道内液滴连续操控的方法，可实现核酸固相萃取在线的反应液添加和废液去除过程。这种液滴固相萃取方法具有快速、低耗、高通量等特点，可用于血清等实际样品 DNA 的纯化。

2、采用灵活组装的分体式温控芯片和 PCR 芯片构建 PCR 扩增平台。其中的温控芯片具有较大的温控区域并可重复使用，适用范围较广，粘贴微池阵列芯片即可实现高通量的 PCR 扩增。

3、在 2 所述平台的基础上构建了多液池 PCR-阵列电泳芯片系统，可同时实现四个 DNA 样本的 PCR 扩增-电泳分离/检测。该 PCR-CE 芯片系统被初步用于实际样本中 HBV-DNA、TB-DNA 和 HLA-B27 DNA 等快速、自动化分析，可被看成是全集成、高通量核酸分析系统的重要组成部分之一。