

第一章 微流控芯片核酸分析系统

1.1 引言

被誉为生命科学“登月”计划的国际人类基因组计划，于2001年提前完成，由此人类进入后基因组时代。生物医学的研究、应用自此从整体和细胞水平汇集到分子水平，对许多疾病的诊断和治疗相关研究亦逐步进入基因水平。对全球不同人群的基因组多态性研究、用药个体化的药物基因组研究以及高通量基因表达研究等都在深入进行，以期达到疾病预警和个性化医疗的目的。这类遗传信息的大规模获取将在很大程度上依赖于高效、快速和高通量的核酸分析技术。核酸分析的传统方法主要涉及样本纯化、目的片段聚合酶链式反应（PCR）扩增、平板凝胶电泳分离和检测等过程，不同单元单位均离线进行，使得样本消耗量大、运行时间长、步骤繁琐，难以实现自动化，不适于生物医学实验室和临床诊断实验室的需要，更难以符合未来疾病诊断家庭化、个体化的发展趋势。因此，发展高效、快速、高通量的核酸分析平台是后基因组时代的重要选题。

微流控芯片实验室是最有可能实现上述核酸分析平台要求的技术平台。微流控芯片实验室又称芯片实验室（lab-on-a-chip）或微流控芯片（microfluidic），是把化学和生物等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测，细胞培养、分选、裂解等基本操作单元集成或基本集成到一块几平方厘米（甚至更小）的芯片上，由微通道形成网络，以可控流体贯穿整个系统，用以实现常规化学或生物实验室的各种功能的一种技术。它的基本特征和最大优势是多种单元技术在整体可控的微小平台上灵活组合、规模集成[1]。这种特点使之不仅能以极少量的样品获得极大的信息量，更有可能以一个整体

微型的操作平台直面市场。微流控芯片是本世纪一项重要的科学技术，可能成为现代科技文明不可或缺的组成部分，对人类整体文明的发展进程产生影响。2004年，美国 Business 2.0 杂志封面文章将微流控芯片列为“改变世界”的七种技术之一，2006年 Nature 杂志就这种可能成为“这一世纪的技术”推出专辑。

微流控芯片核酸分析系统，是一种全新的以微流控芯片为基础的核酸分析系统，芯片通道尺寸小且具有较大的比表面积，在减小昂贵试剂消耗的同时可以缩短反应时间，因而可克服传统核酸分析方法耗时、费力和试剂消耗较多等缺点，对生物医学研究和应用具有重要的意义。特别是它以设计灵活、集成度高、成本相对低廉的微流控芯片为基本操作平台，是对现有冗长操作模式和设备的重大变革。芯片通道的阵列设计和灵活组合便于实现高通量的核酸分析。目前，核酸分析的技术如细胞裂解、DNA 萃取、PCR 扩增、杂交、DNA 电泳分离检测等都已经可以单一或集成地转移到微流控芯片上完成，且集成的单元部件越来越多，集成的规模越来越大，使得集成化、自动化的 DNA 分析成为可能，适合于其所涉及各个应用领域，如临床基因诊断、遗传学分析和法医学鉴定等。

正是基于以上认识，本论文的研究工作围绕着高通量微流控核酸分析系统中的关键技术，开展了一系列重要功能单元的微型化和集成化研究并进行了初步应用。本章首先论述论文所涉及的核酸分析系统的基础知识和研究进展。

1.2 微流控芯片核酸分析技术基础

微流控芯片是微流控芯片系统的核心。选用合适的材质设计并制作芯片，特别是芯片微加热部件的设计与制作，是微流控芯片核酸分析系统研究的前

提和基础。

1.2.1 常用芯片材质及制作方法

微流控芯片核酸分析研究所使用的基质材料种类较多，常用的大致可分为三大类：第一类是以单晶硅、石英和玻璃为代表的刚性无机材料；第二类是聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）和聚碳酸酯（PC）等热塑型聚合物；第三类是聚二甲基硅氧烷（PDMS）等固化型聚合物[1-3]。下面对这三类材料及其芯片加工方法分别予以介绍。

（1）单晶硅生产工艺和微细加工技术已趋成熟，在半导体和集成电路上得到广泛应用。在硅片上使用光刻和蚀刻方法可高精度地加工出二维图形甚至复杂的三维结构；同时硅材料具有优良的热传导性能，且与传统的集成电路工艺兼容，便于集成，因而在早期的芯片固相萃取（SPE）、PCR研究中应用较多。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难以满足生化分析的需求，再加上其价格偏高，限制了其在微流控芯片核酸分析系统中的广泛应用。

石英和玻璃具有与单晶硅类似的加工条件，其表面吸附和表面反应能力都有利于进行表面改性，亦能弥补单晶硅在电学和光学性质上的不足，现已成为微流控芯片核酸分析系统的主要基质之一。相对而言，石英的价格较高，但它适合于用紫外分光光度法检测的微流控芯片制作。玻璃具有良好的热传导性能，且价格相对较低，同时又具有与传统的石英毛细管类似的表面性质，是核酸分析（PCR和电泳等）芯片的首选材料。石英和玻璃芯片的加工方法类似，主要包括光刻、湿法刻蚀、打孔、高温键合等步骤，一般需要在超净环境下完成[1-3]。

（2）以PMMA和PC为代表的热塑型聚合物的最大特点是价格低廉，易

于加工成型,可进行大规模生产,因而非常适用于制作一次性的微流控芯片,有望在以后的商业开发中发挥重要作用。它们还具有相对良好的透明性和介电性,已经被应用于微流控芯片核酸分析系统。这类材料常用的微通道加工方法有注塑法、热压法和激光烧蚀法等。注塑法适合于工业化大规模生产,注塑母板多由光刻法金属或硅材料制备,或经LIGA工艺电铸而成[1, 2]。早在本世纪初,我们实验室就采用注塑法大批量制作了PMMA电泳芯片,并用于DNA的电泳分离[4, 5]。热压法和激光烧蚀法相对比较灵活,但所得微通道表面要稍逊一些,在实验室研究阶段应用较多。

(3) PDMS具有独特的弹性、良好的透光性、介电性和惰性,以及优异的生物兼容性,而且加工方法非常简单、灵活,容易推广。PDMS芯片的加工主要采用Whitesides课题组发展的原位聚合成型法[6]。其模板一般由SU-8负光胶制备,通过多层软刻蚀可以获得三维立体通道结构,将液态预聚物倒在母板上80°C固化1~2小时即可快速、高保真的复制微流控芯片。从母板剥离后的PDMS片可以直接贴在平整的玻璃盖片上使用,也可经氧等离子体表面处理与另一块PDMS或玻璃片永久封接在一起使用。

通常,微流控芯片的通道表面需要进行改性或涂层,以抑制分析物与管壁间的相互作用、控制电渗流、提高PCR扩增效率、改善电泳分离效果。天然硅和氮化硅的表面会抑制PCR反应,一般将硅片表面处理成氧化硅以提高PCR扩增效率[7]。石英、玻璃和聚合物的表面处理一般有静态改性法和动态改性法两种,前者是将改性试剂通过化学沉积、共价结合或者聚合的方式涂到芯片内壁,常用的是硅烷化处理[8];后者是将改性剂如聚乙烯基吡咯烷酮(PVP)、聚乙二醇(PEG)和牛血清白蛋白(BSA)等直接加入反应体系中,以实现芯片内壁的动态涂层[9]。

1.2.2 加热器的种类及制作方法

PCR 是一定温度循环条件下的酶促反应，是核酸分析关键步骤之一，其技术核心是重复和精确的温度控制。按照 PCR 芯片加热方式不同，分为接触式加热器和非接触式加热器两类，现分别予以介绍。

1.2.2.1 接触式加热器

现有的芯片 PCR 系统大多采用接触式加热方式，主要有分体式和集成式两种。早期是将 PCR 芯片直接置于常规 PCR 仪中进行扩增[7, 10]，后期一般是采用 Peltier 热电加热/致冷系统（或另加风扇致冷），并配合热电偶（或铂电阻）等测温元件实现控温[11-14]，如图 1-1 (a) 所示。也有采用导热性能好的铜、铝块[15, 16]或商品化薄膜加热器[17, 18]进行加热并配合热电偶（或铂电阻）等测温元件控温，如图 1-1 (b) 所示。这种分体式（非集成式）的加热/测温单元与 PCR 芯片是分离的，加工简单，价格便宜，但热容较大，系统升降温速率较小，系统体积较大不利于整体微型化。

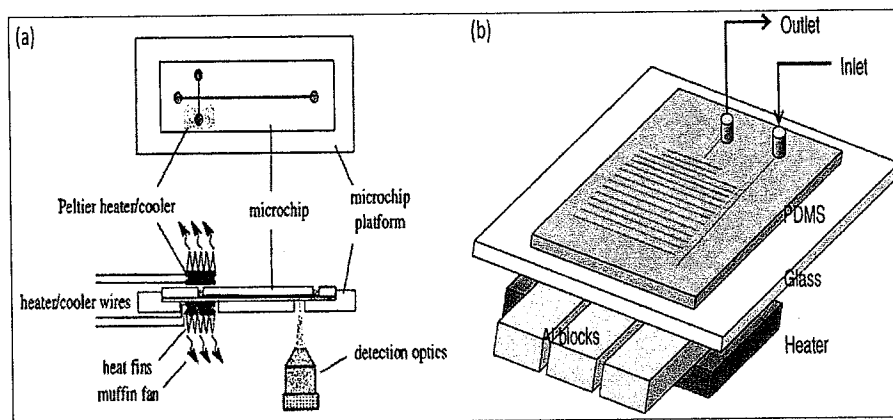


图 1-1 PCR 芯片加热器：(a) Peltier 热电模块[12]；(b) 铝块[15]。

Fig. 1-1 Heater of PCR chip: (a) Peltier heating element; (b) Al block.

相对于分体式加热方式，集成式将更能体现微流控芯片实验室的集成化

优势,一般是在 PCR 芯片上集成薄膜微加热器和电阻式温度检测器(RTD),再通过连接到外部的控制电路实现对反应区域的温度控制[19-25],如图 1-2 所示。在硅或玻璃芯片微反应室底部制作微加热器/温度传感器,主要有扩散掺杂工艺和金属薄膜工艺两种加工方法。后者较常使用,先是在微反应室底部沉积一层钛或铬(10~30 nm)和一层铂(100~300 nm),然后刻蚀出所需的图形作为金属薄膜加热器/温度传感器。其中的钛或铬作为附着层存在,其作用是实现金属铂与硅或玻璃的良好接触。氧化铟锡(ITO)由于透光性好,不影响 PCR 产物的实时荧光定量检测,因此也常被溅射到玻璃基片上,再通过光刻技术形成微加热器并配合铂电阻或热电偶进行温度测量[26-28]。这种集成式的薄膜加热器/温度传感器尺寸小,且只对 PCR 反应区进行温度控制,因而热容和能耗较低,响应速度快,但是加工制作步骤复杂,贵金属的使用使得芯片的成本较高。

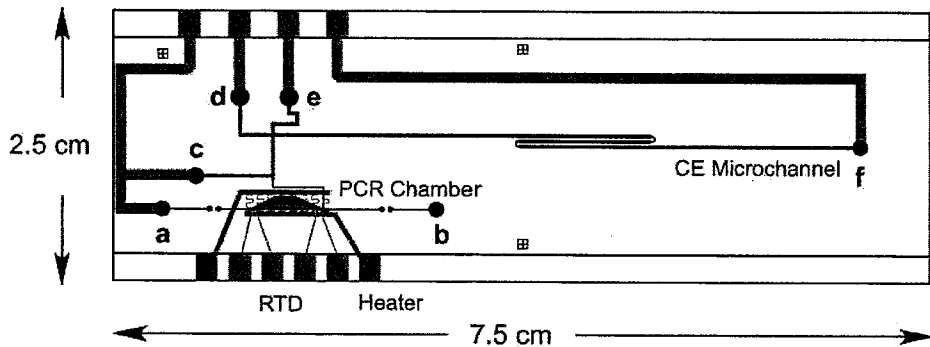


图 1-2 集成式微加热器/电阻式温度检测器[24]。

Fig. 1-2 Integrated microheater/RTD.

1.2.2.2 非接触式加热

Landers 研究组利用钨灯作为红外辐射热源,并用压缩空气冷却,分别在

聚酰亚胺芯片[29]和玻璃芯片[30]上对微量样本进行了快速、高效的 PCR 扩增（PCR 扩增最快可在 240 秒内完成）。其它非接触式加热的热源还有热空气、激光[31]、微波[32]等，如图 1-3 所示。可采用对红外吸收较小的芯片材料，这种非接触式加热方式将选择性地加热反应溶液，而不加热反应室，因此可减小反应体系的热容，提高传热效率，进而缩短反应时间。但是这种加热方式需要额外的加热源，不利于芯片的集成和微型化。在芯片的设计时，需要在 PCR 反应池附近增加一个参比池用于反应温度的校准[29, 30]。

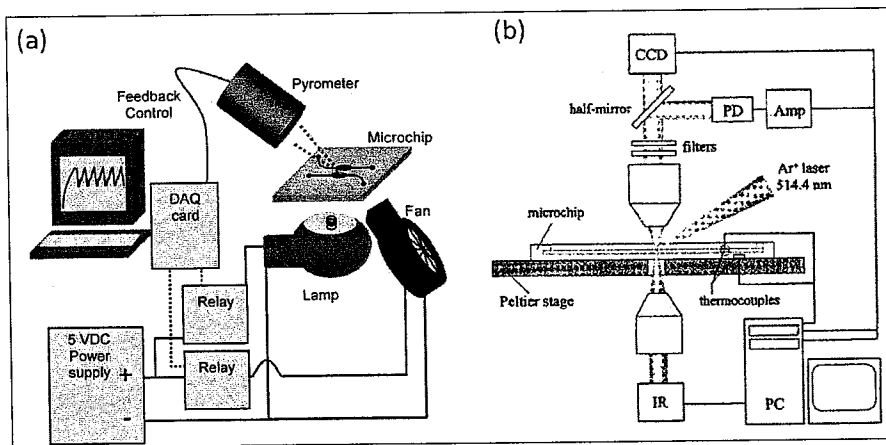


图 1-3 非接触式加热芯片 PCR 示意图。(a) 红外加热[33]；(b) 激光加热[31]。

Fig. 1-3 Schematic of non-contact heating for chip PCR. (a) IR heating; (b) laser heating.

1.2.3 微流控芯片液滴技术

液滴技术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，将两种互不相溶的液体，以其中一种作为连续相，另一种作为分散相，使分散相以微小体积（ $10^{-15} \sim 10^{-9} \text{L}$ ）单元的形式存在于连续相中，

形成液滴。根据分散相和连续相的不同，液滴可分为油包水（W/O）型和水包油（O/W）型两种，本论文提及的液滴均为W/O型，即以水相为分散相，以油或其它与水不相容的液体为连续相。以分散的液滴单元作为微反应器，可大大强化微流控芯片的低消耗、自动化和高通量等优点，受到日益广泛的重视。

1.2.3.1 液滴的生成

目前，微流控芯片上的液滴生成器主要采用两种设计，一种为“T型通道法”[34-36]，另一种为“流动聚焦法”[37, 38]。两种方法的液滴生成原理相同，均利用两相间的剪切力和界面张力的共同作用产生液滴，生成液滴的大小受通道尺寸、水油两相的流速以及粘度等因素影响，二者区别仅在于液滴生成器的通道几何学设计上：在“T型通道法”中，油相和水相分别从T型通道的两个相互垂直的分支注入芯片并形成液滴（见图1-4a）；在“流动聚焦法”中，油相和水相分别从两侧和中央的通道流经下游的狭窄小孔并形成液滴（见图1-4b），因水溶液受到来自两侧油相对称的剪切力的作用，液滴的形成过程较“T型通道法”更加稳定，生成液滴的大小可控范围更宽，可以生成直径远小于芯片通道尺寸的液滴。

1.2.3.2 液滴的操控

将液滴用作微反应器，需要将各种常规的反应操作移植到液滴或者在液滴上发展出相应的操作方法。当反应体系比较简单时，可直接将样品和试剂包入液滴，以液滴生成时的状况作为反应的初始条件，反应物的浓度可由注射泵控制各反应物溶液的流速而确定。若反应步骤比较多，需要将反应物引入液滴或从液滴中去除废物，这就需要在芯片上进行液滴的操控。研究人员先后发展了多种用于操控液滴的技术和方法，分别介绍如下：

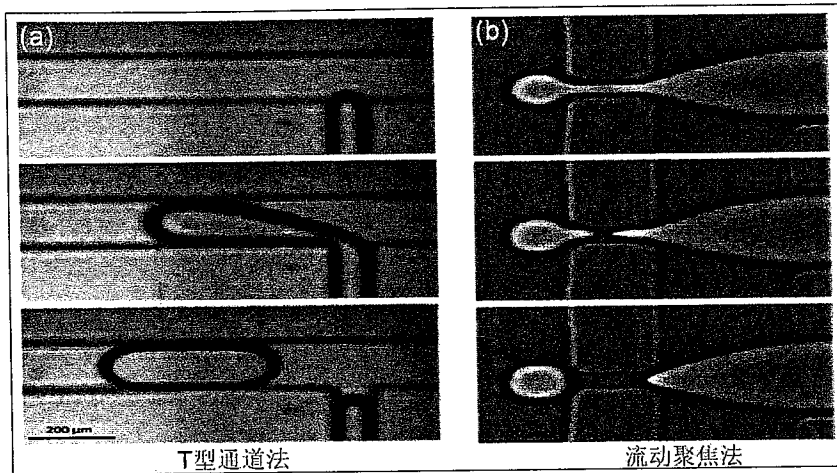


图 1-4 微流控芯片上液滴生成的两种方法。(a) T 形通道法[36]; (b) 流动聚焦法[37]。

Fig. 1-4 Two droplet formation methods on microfluidic chip. (a) “T-junction” method; (b) “flow-focusing” method.

(1) 溶液添加与液滴融合

目前将反应液引入液滴的方式主要分为两种：溶液添加[39, 40]和液滴融合[41-43]，如图1-5所示。前者是向已经生成的液滴直接加入另一种溶液，操控相对简单，仅需要“T”型通道结构即可直接添加，溶液添加的量取决于溶液的流速和液滴的频率。Ismagilov研究组将 CdCl_2/MPA 、 NaOH 和 Na_2S 溶液在注射泵的推动下形成液滴并开始反应，通过调节溶液流速和通道长度来控制反应时间，反应结束时由旁路通道向液滴内加入过量的MPA终止反应，生成大小均匀的纳米颗粒[39]。后者是要先在芯片的不同位置生成两组液滴，然后控制其相遇融合；一般需要增加辅助的结构使生成两组液滴同步化或对芯片进行特殊处理[41]以促进液滴融合。施加电场也是促进液滴融合常用的方法，可在液滴生成前施加电场生成分别带有等量异号电荷的液滴，两种液

滴进入汇合通道后在静电引力的作用下快速靠近并融合[42]。也可沿液滴运动方向上施加一个强电场，该电场使液滴接触界面发生变形并破裂，达到促进液滴融合的效果[43]。

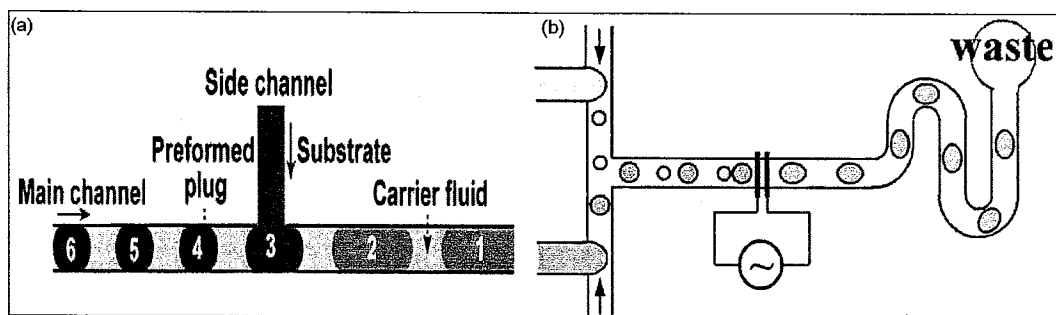


图 1-5 向液滴中添加溶液的两种方法。(a) 溶液添加法[40]; (b) 液滴融合法[43]。

Fig. 1-5 Two methods of reagent addition into a droplet. (a) Reagent addition method; (b) droplet fusion method.

(2) 液滴分裂

液滴分裂一般通过“T”型通道结构实现，可产生多个包含相同组成的液滴。分裂后液滴的大小与下游通道各支路的流阻相关，一般而言，通道越长，流阻越大，液滴越小，反之则液滴越大，如图1-6所示[44]。Nie等将“T”型分裂通道的两个出口用短柱连接，可获得稳定的不对称液滴分裂，分裂比例1:1至34:1[45]。Lombardi等将磁珠引入液滴，在磁场的控制下分裂产生了包含不同组成的液滴[46]，即磁珠仅分配入其中一侧的液滴。

(3) 液滴分选

液滴分选是一项重要的液滴操控技术，它可选择性的将某个特定的液滴从众多液滴中挑选并分离出来，在筛选研究中有着重要的应用。现有的液滴

分选技术多以介电泳[47]为基础，在芯片通道的交叉处制作电极，当某个液滴运动至分叉处时，施加高频交流电压，产生不均匀的电场。由于液滴溶液和周围油相的介电性质不同，液滴受到介电泳力的作用，偏向其中的一条通道。此后，关闭电压，后续的液滴流向另一条通道，完成分选过程。Zhang 等将顺磁性颗粒加入液滴中[48]，通过控制移动磁场的位置将液滴分选入不同的通道，如图 1-7 所示。

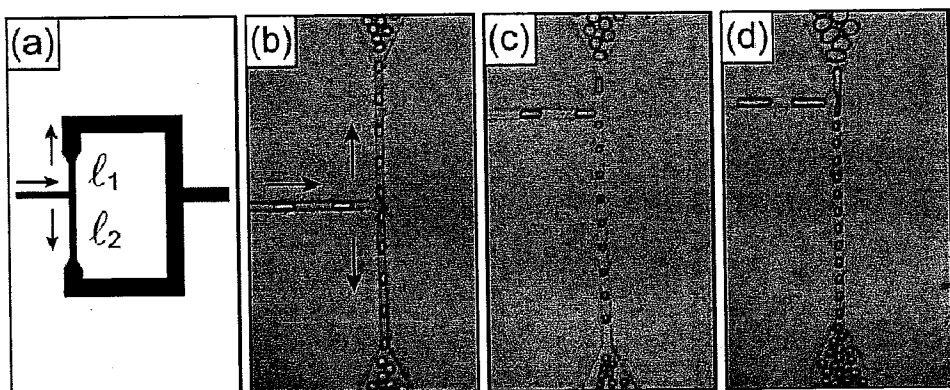


图1-6 液滴的分裂[44]。(a)液滴分裂芯片示意图；(b-d)不同比例的液滴分裂。

Fig. 1-6 Droplet splitting. (a) Schematic of the chip for droplet splitting; (b-d) droplets splitting at different ratios.

1.2.3.3 液滴的特点

如前所述，微流控芯片液滴通常用作微反应器，研究微尺寸上的反应及其过程。当然，液滴的应用并不局限于微反应器。当它作为微反应器时，有如下特点。

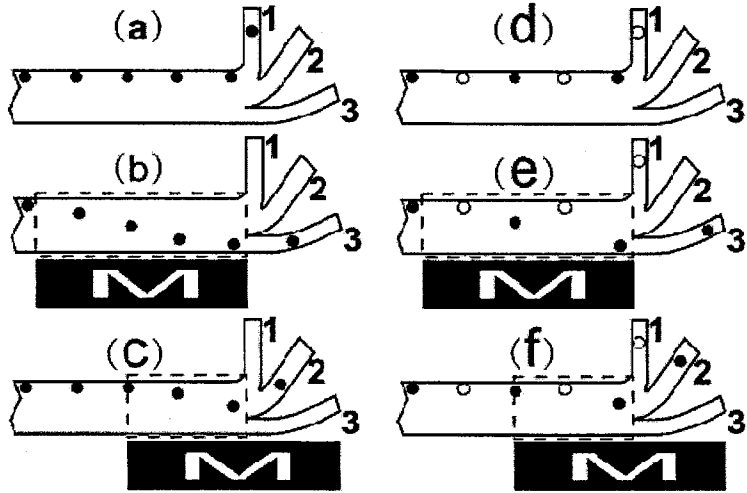


图 1-7 连续磁性液滴操控示意图[48]。(a, d)当无磁场时, 磁性液滴(黑色)和非磁性液滴(白色)因层流作用流入子通道 1; (b-c, e-f)在不同的位置施加磁场, 可控制磁性液滴流入不同的子通道 2 或 3, 而非磁性液滴仍流入子通道 1。

Fig. 1-7 Schematic of the continuous magnetic droplet manipulation (CMDM) method. (a, d) Due to laminar flow in the main-microchannel, both magnetic droplets (black) and nonmagnetic water droplets (white) flow into the sub-microchannel 1 without a magnetic field. (b-c, e-f) Magnetic droplets are deflected from laminar flow and flow into the sub-microchannel 2 and 3 with an external magnet force, but nonmagnetic droplets do not deflect all the time and flow into sub-microchannel 1.

(1) 体积小

液滴的体积通常为 10^{-15} L- 10^{-9} L, 所需样品量极微, 特别适用于高通量筛选反应和某些样品来源非常有限的反应。

(2) 通量高

微流控芯片液滴连续生成，生成速率通常在 0.1-10kHz 之间，因而特别适用于高通量筛选研究。

(3) 反应条件稳定

液滴的生成过程稳定，生成的液滴大小非常均匀，其直径相对标准偏差 (RSD) 通常小于 3%。液滴形成之后，包含试剂和样品的水溶液被不相溶的油相包裹，此时，液滴可视为一个封闭体系，除消除了样品分子的扩散外，水分子的蒸发也受到油相的抑制。这就为准确控制并维持液滴内部的反应条件提供了保障，并为对液滴内部的反应产物进行定量分析提供了可能。

(4) 样品间的交叉污染得以避免

由于液滴被不相溶的油相包裹，相邻液滴被油相分隔，液滴与通道壁并不直接接触，且所有的液滴都随油相一起运动，避免了相邻液滴间的物质交换，消除了样品间的交叉污染。

(5) 混合迅速

液滴体积微小，扩散距离较短，使得液滴内溶液混合迅速。液滴在通道中运动时，在液滴内部以运动方向为轴形成两个循环回流。液滴流经弯曲的通道时，上述循环回流将沿运动方向不断地被“拉伸”、“折叠”（见图 1-8）[49]，大大加快液滴内溶液的混合速度。

1.3 微流控芯片核酸分析系统研究进展

进入 21 世纪以来，随着芯片微加工技术和微流体控制技术的逐渐成熟，基于微流控芯片的核酸分析技术的微型化、集成化研究取得了令人瞩目的进展[50, 51]，这无疑为高通量、全集成微流控芯片核酸分析系统的研究打下了基础。

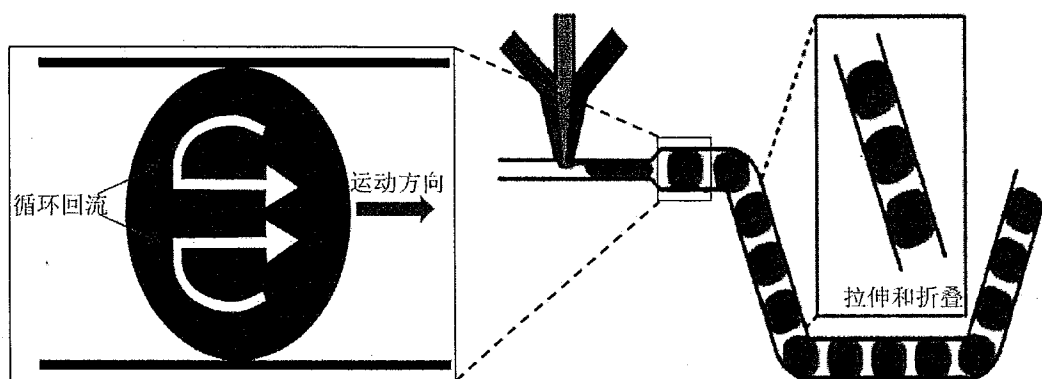


图 1-8 液滴内部循环回流形成的示意图[49]。

Fig. 1-8 Schematic of the recirculation formation inside droplets.

1.3.1 基于微流控芯片的核酸纯化技术

核酸分析多涉及含复杂基质的生物样品，因此样本前处理单元显得尤为重要。目前已在芯片上实现、并有望与下游 PCR 扩增单元集成的核酸样品纯化技术主要有固相萃取(包括非磁性固相介质和磁性固相介质上的固相萃取)技术、微过滤和膜分离等。

1.3.1.1 芯片固相萃取技术

芯片固相萃取技术指的是固相基质存在于芯片的微通道内，以压力或电力等驱动流体的在线萃取技术。除电渗驱动等个别技术环节外，该技术与传统固相萃取的基本原理完全一致，但以微型化和在线处理为特征。常见的用于核酸萃取的固定相为二氧化硅，也有采用氨基、羧基等改性的表面作为固定相。按照固定相在微通道中存在的形式，芯片 SPE 分为开管柱、填充柱和整体柱三类。

在开管柱中，固定相仅结合在微通道的内壁，而不充满整个管道。其制作相对比较简单，将固定相涂层溶液引入微通道中，通过键合、交联或物理吸附等方法结合到通道内壁，再去除残液即可形成SPE柱。常见的固定相有氨基硅烷[52]和经硅烷偶联剂偶联的其他类型固定相如壳聚糖[53]等。开管柱固定相比表面积小，负载容量低，一般需将通道设计成宽且长的弯曲通道或者平行排列的阵列式通道以增大表面积，如图1-9所示，在一定程度上改善萃取效率。开管柱SPE柱内中空，柱压较低，便于流体的控制。然而，它较低的固定相比表面积降低了柱容量，使其难以获得较高的萃取效率和富集倍数，限制了它在微流控芯片核酸分析系统中的应用。

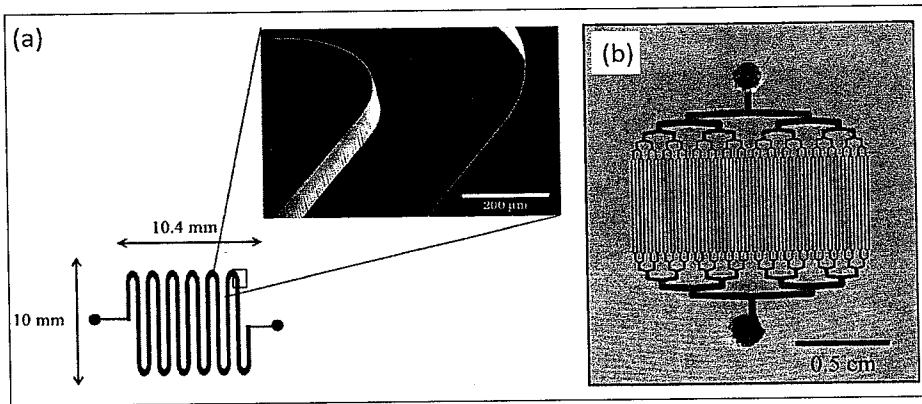


图1-9 开管柱SPE芯片 (a) 透迤型通道[52]; (b) 阵列通道[53]。

Fig. 1-9 Open-channel column SPE chip (a) meandering channel; (b) parallel channels.

在填充柱中，固定相以微颗粒的形式充满微通道[54]，因此需要在微通道内加工出一定的柱塞结构以截留填料颗粒。我们实验室也曾设计并制作了基于双围堰结构的填充柱式SPE微流控芯片用于人肝癌细胞(HepG2)和全血样品中基因组DNA的纯化[55]，在15分钟内完成萃取过程并获得较高

的萃取效率（平均 $>80\%$ ），如图 1-10 所示。同开管柱相比，固定相微粒具有比微通道更大的比表面积，填充柱的负载容量较开管柱大大提高，因此更容易实现高倍富集。同时，种类繁多的固定相填料也会极大的拓展芯片填充柱的应用范围。其缺点是向微通道填充固定相耗时且费力，填充均匀性也较难保证，在重复使用后微粒向通道一侧聚集，影响到萃取效率与重复性。填充柱的柱压较大，一般需要使用注射泵驱动流体，也有人尝试集成微泵阀驱动流体，但需要较大的压力[54]。

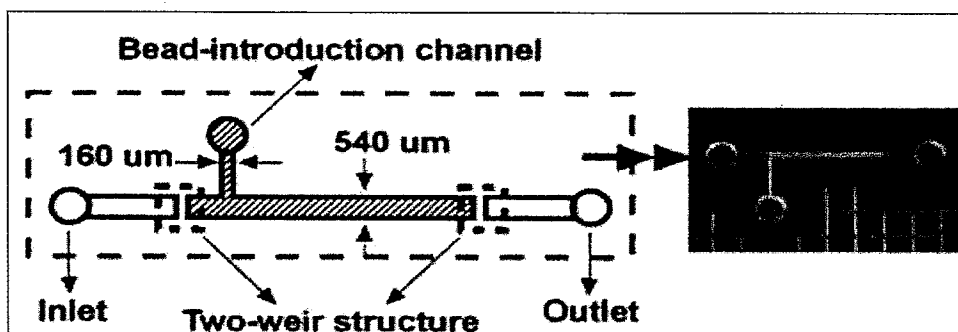


图 1-10 填充柱 SPE 芯片[55]。

Fig. 1-10 Packed column SPE chip.

芯片整体柱则是利用微加工技术或原位聚合方法直接在微通道内形成表面积较大的固定相。微加工技术为在硅芯片或PC芯片（通道表面需光活化产生羧基后使用）微通道内加工出微柱阵列[56, 57]或直接将通道刻蚀成多孔结构[58]，增大通道比表面积，进而提高萃取容量（见图1-11a）。这类整体柱柱压较低，固定相在微通道内直接加工形成，芯片设计时无需专门添加类似于双围堰之类的附加通道，简化了芯片设计，也有利于固相萃取操作单元高通量设计或与其他操作单元集成。Witek等设计了含96个核酸纯化单元的PC芯

片[59], 纯化单元的微池出口与96孔板对应用于纯化DNA的收集。Landers组在整体柱前集成了一个C18反向柱用于核酸纯化前蛋白质的去除, 可显著提高核酸纯化效率[60]。原位聚合指的是通过热诱导或光引发, 使聚合物单体、引发剂和致孔剂的反应混合物在芯片通道内直接发生的聚合反应形成整体柱[61], 或在通道内固定氧化硅颗粒[62-64] (见图1-11b)。聚合反应体系的多样性丰富了芯片固相萃取固定相的种类, 还可通过改变单体溶液的组成和浓度, 方便的控制整体柱的表面性质、孔径大小和空隙率, 使之应用于不同的吸附模式, 实现对大体积、低浓度的核酸样品进行快速纯化和富集。同填充柱一样, 这类整体柱SPE柱压仍然相对较大, 一般需要用注射泵推动流体, 在进行高通量的核酸纯化需要配制较多的注射泵[63]。

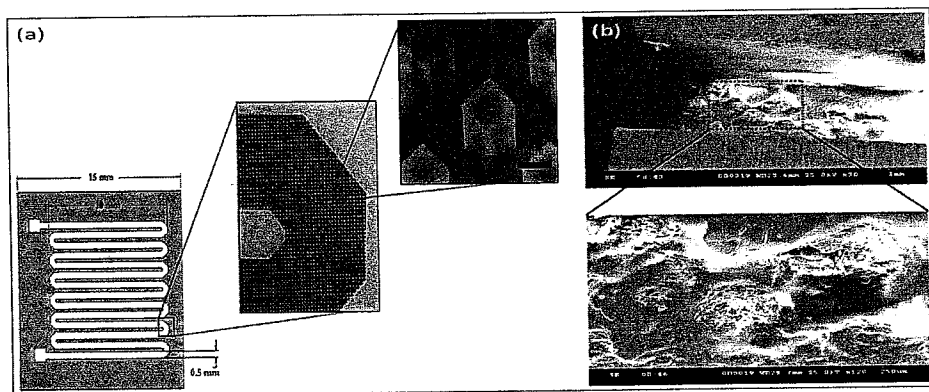


图1-11 微加工法(a)[56]和原位聚合法(b)[61]制作的整体柱SPE芯片。

Fig. 1-11 SPE chips fabricated with microfabrication (a) and in-situ polymerization (b).

磁性介质(微珠或微颗粒)可用作选择性分离、纯化DNA分子时的固定载体。微珠或微颗粒本身具有较大的比表面积, 可用于高效的固相萃取。在磁场作用下又能很方便地将之固定在通道内进行DNA分子的特异性捕获和

杂质冲洗[65]，而无需特殊的拦截结构。因此，芯片的设计/加工简单、操作方便，易于实现集成化和自动化。磁性硅珠表面可被功能化处理而特异性的萃取特定的核酸分子。Lien等将抗体包被的免疫磁珠用于登革热病毒的纯化，使用线圈固定免疫磁珠，并用循环泵控制液体的循环流动而提高萃取效率[66]。在此基础上，他们采用免疫磁珠及集成的薄膜电阻线圈进行了登革热病毒和肠道病毒（EV-71）的纯化和富集，随后在线完成了病毒RNA的提取和RT-PCR 扩增[67]，如图1-12所示。整个过程在集成微阀/微泵的控制下自动进行，其灵敏度和特异性均优于常规方法。

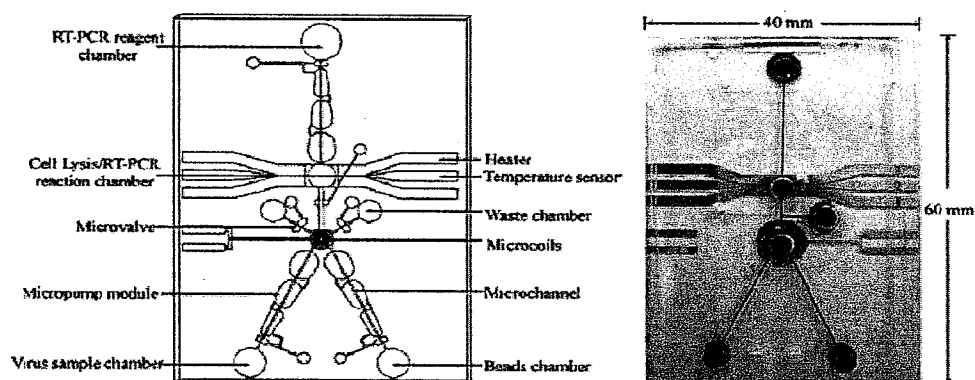


图1-12 集成磁珠纯化和RT-PCR扩增的全自动微流控芯片[67]。

Fig. 1-12 An integrated microfluidic chip for automatic magnetic bead-based purification and RT-PCR amplification.

因为磁场控制的灵活性，使得基于磁性介质的芯片核酸萃取不限于固定在通道内，从而扩展了萃取实现的方式。Ramadan 等通过控制磁铁垂直或水平状态的周期性切换来改变通道中磁场的大小，进而控制磁性微颗粒在通道特定部位的聚集（即捕获）或释放[68]。当结合了 DNA 的磁性颗粒被捕获时，

其它物质则被溶液带走。故而，磁性颗粒捕获-释放过程循环进行就达到了杂质清除（核酸纯化）的目的。Karle 等发展了一种“场转换的磁泳”技术来实现基于磁性微颗粒的芯片 SPE 过程[69]，如图 1-13 所示。在他们的研究中，SPE 的反应液（进样缓冲液、清洗缓冲液和洗脱缓冲液）以层流的形式存在于微通道中，通过磁铁的转动所致的磁场变化来控制磁性微颗粒依次通过微通道中不同 SPE 反应液区，从而实现芯片上高效、快速的 SPE 过程。

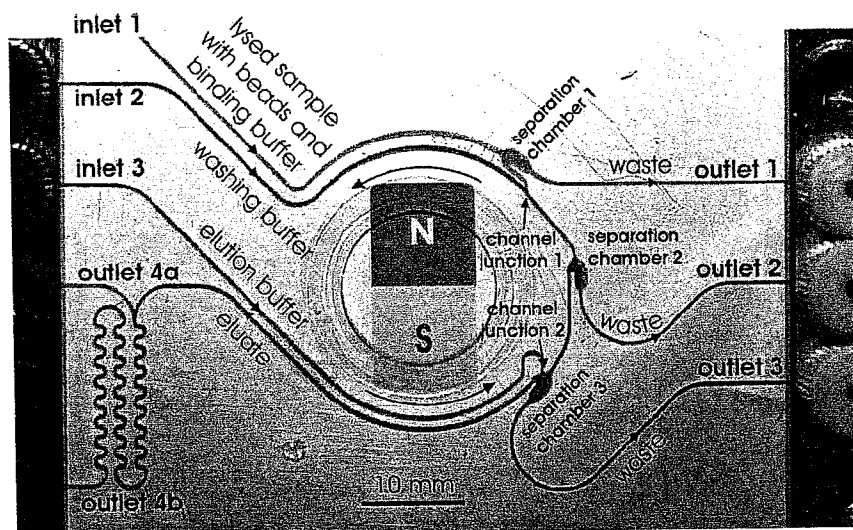


图 1-13 基于相转换磁泳 DNA 萃取芯片[69]。

Fig. 1-13 Photograph of DNA extraction chip based on phase-transfer magnetophoresis.

另一类基于芯片表面液滴的磁珠萃取技术[70, 71]，通过变化的磁场控制磁珠连续的进入（液滴融合）或离开（液滴分裂）各反应溶液液滴而实现快速、低耗的核酸萃取。这类液滴技术多涉及数字微流控技术（digital microfluidic），不同于普通的微流控技术，因而不做过多讨论。

1.3.1.2 其它核酸纯化技术

微流控芯片核酸纯化技术还有微过滤、膜分离等，主要用于试样溶液的预过滤、分离和富集等方面，操作相对简单、方便。集成于微流控芯片的微过滤器多用微加工的方法制作而成，主要有微柱阵列式和围堰式两类，沿通道中溶液流动方向对微粒进行截留，如图 1-14 所示[72, 73]。Wilding 等设计并制作了集成微过滤器和 PCR 池的硅/玻璃芯片[73]，可快速完成全血细胞中红细胞和白血细胞的分离，得到的白血细胞可在线进行基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增。

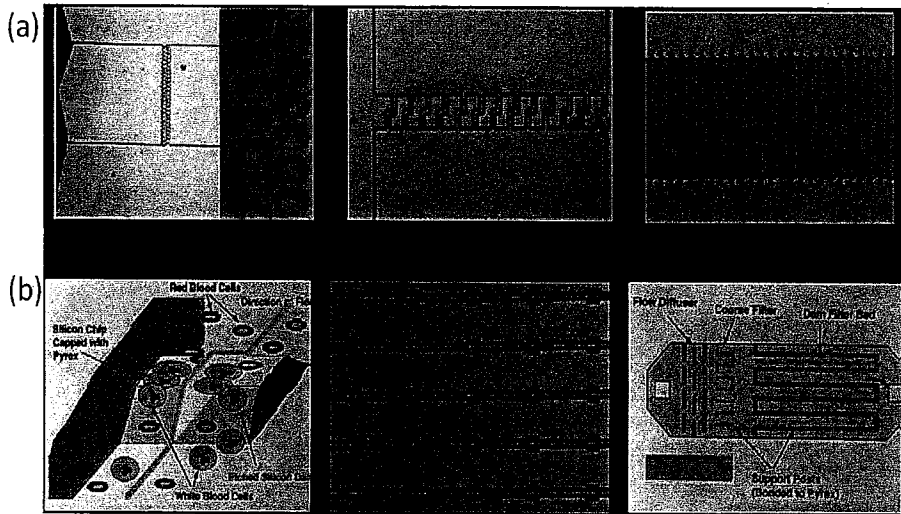


图 1-14 集成于芯片上的微过滤器[73]：(a) 微柱阵列式；(b) 围堰式。

Fig. 1-14 Micropillar array-type (a) and weir-type (b) microfilters integrated on microfluidic chips.

膜分离是利用天然或人工合成的、具有选择性的薄膜，以外界推力对多组分体系进行分离、提纯或富集。我们实验室龙志成等以商品化微孔滤膜为

基础，成功地将膜分离预处理单元与后续的电泳分离单元集成于同一块芯片上[74],用于电泳分离前对PCR产物进行纯化和预富集。随着进样时间的增加，PCR产物峰的峰高显著增加而分子量较小的引物峰峰高则变化不大，有利于弱阳性核酸样本PCR产物的电泳检测，如图1-15所示。

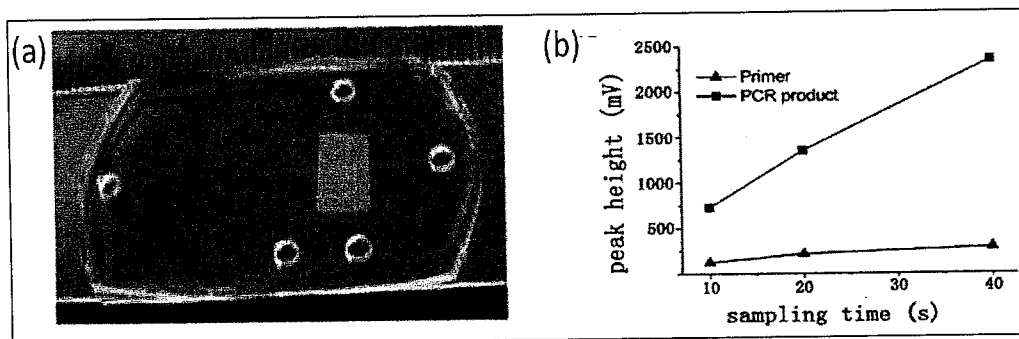


图1-15 集成膜浓缩器的CE芯片图 (a) 及应用结果 (b) [74]。

Fig. 1-15 Photograph (a) and application (b) of the “membrane concentrator-CE” chip.

1.3.2 基于微流控芯片的核酸扩增技术

PCR 是一项在体外大量复制 DNA 的技术,已在生物技术、临床医学诊断以及法医等领域得到广泛应用,是核酸分析系统的重要单元之一。芯片 PCR 技术因具有耗量少、耗时短等优势,自 90 年代中期提出以来就受到人们的广泛关注,其研究热度至今不减,已经取得了很多人瞩目的成果[75, 76]。芯片 PCR,是指利用 MEMS 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,再集成微阀/微泵、微加热器/温度传感器等控制单元,实现芯片上快速、自动、高通量的 PCR 扩增。按照芯片设计和热循环方式的不同,芯片 PCR 主要分为反应液静止式和反应液流动式两大类

(见图 1-16)。

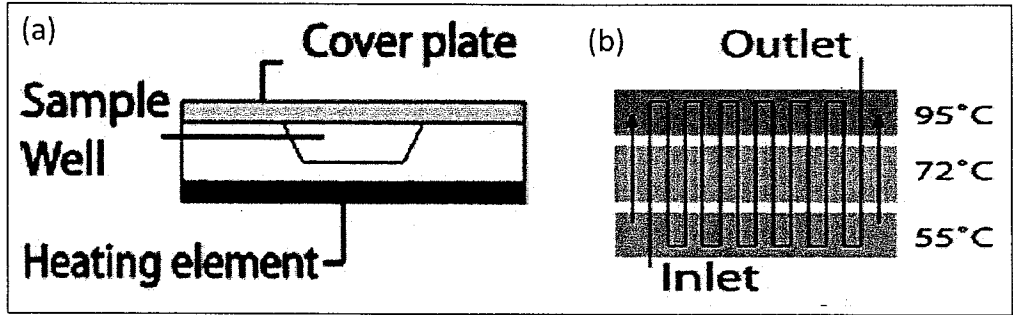


图 1-16 芯片 PCR: (a) 反应液静止式; (b) 反应液流动式。

Fig. 1-16 Microchip PCR: (a) stationary PCR; (b) continuous flow PCR

1.3.2.1 反应液静止式芯片扩增技术

反应液静止式(温度循环型)芯片PCR, 又称时域PCR, 实际上是传统PCR的微型化, 反应混合液通常被固定在微反应室内, 在外部或内部控制微反应池的温度实现快速的升降温循环。该方法热循环次数不受限制, 可根据不同需要设计不同的微反应室阵列, 进行高通量PCR扩增, 便于微型化和便携化。其关键是精确而快速的升降温循环, 因而需要对PCR系统的热容进行相当程度的优化, 以缩短反应时间、减少能量消耗。其加热方法有非接触式和接触式两种, 非接触式加热方法一般使用热空气、红外辐射、卤素灯, 微波或者激光作为热源, 与PCR反应池不直接接触, 能有效提高热交换速率。接触式加热方法常用的加热元件有金属块和半导体, 同时配合热电偶等测温元件进行温度控制, 甚至直接将芯片置于常规PCR仪中进行扩增。因加热面积较大, 利于实现高通量的芯片PCR扩增。Nagai等制作了含100x100个1.3 pL至32 nL PCR反应池的硅片[7], 用于测定PCR反应的最小体积。Yu等制作了含

1064个纳升级PCR反应池的PDMS芯片并置于常规PCR仪中进行高通量的实时PCR扩增[10]。Marcus等将微泵阀集成于PDMS芯片用于72个阵列RT-PCR反应池反应液的引入和固定[77]（见图1-17）。这种接触式加热方式的显著缺点是整个反应体系的热容较大，从而限制了热循环速率，设备复杂，不便于整体微型化和集成化。

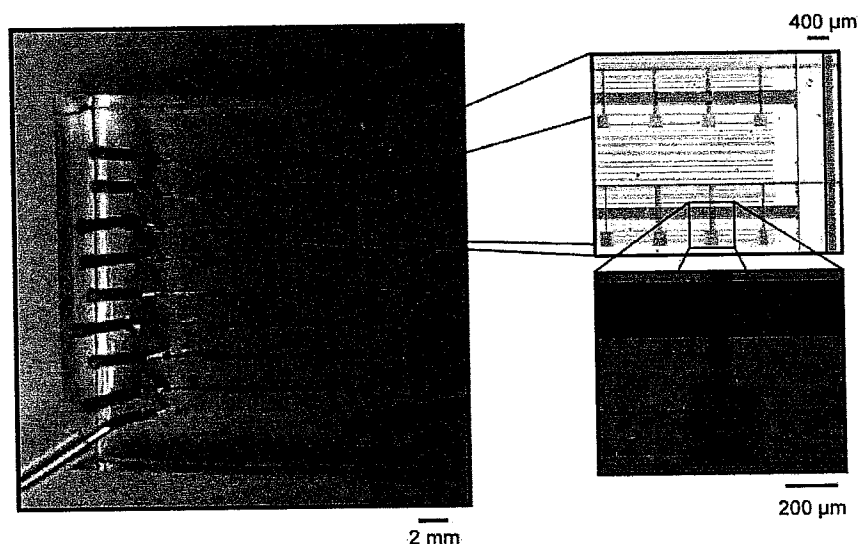


图1-17 集成微阀的阵列RT-PCR芯片图[77]。

Fig. 1-17 Photograph of the parallel RT-PCR device integrating microvalves.

Mathies研究组较早将金属薄膜电阻微加热器/温度传感器集成到PCR芯片上。薄膜电阻加热器/温度传感器具有尺寸小、热容和能耗低，热响应快，可集成化程度高等优点。他们报道了多达8个含微加热器/温度传感器的PCR-CE单元的微流控芯片系统[20, 78, 79]，完成整个PCR扩增仅需15分钟，各个PCR-CE单元分别控制、单独进行（见图1-18）。随后，他们将阵列电泳引入高通量PCR（RT-PCR）-CE系统中，能同时进行4个样本的PCR（RT-PCR）扩增和产物的阵列电泳检测，并用于STR的分型[80, 81]。

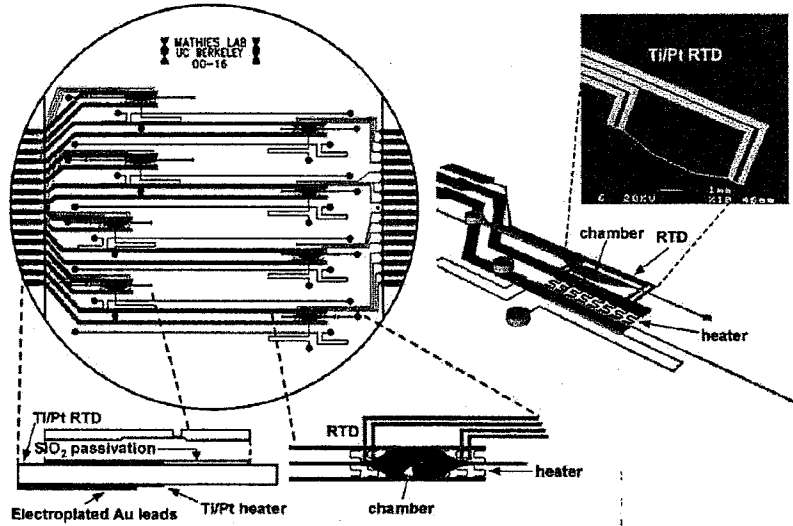


图1-18 集成微加热器/温度传感器及微阀PCR-CE微流控芯片示意图[20]。

Fig. 1-18 Schematic of PCR-CE microfluidic chip integrating microheaters/sensors and microvalves.

1.3.2.2 反应液流动式芯片扩增技术

反应液流动式（温度恒定型）芯片PCR，一般称为连续流动式PCR，也称为空域PCR，是指反应混合液在微通道中连续反复流经三个不同的恒温区，在流动的情况下完成热循环扩增，该方法变温迅速，耗时短，温度控制相对简单。最先发展的流动式PCR芯片一般设计成单向流动的透迤形[82]或螺旋形[83]通道结构，其反应液体积可调，但热循环次数由芯片设计决定、不便于灵活控制；芯片所占空间较大，不利于高通量PCR的实现及与其它操作单元的集成。不同于上述单向流动式芯片PCR，近年来发展的循环流动或双向流动式PCR则采用不同的芯片结构和控制方法，通过注射泵、集成微泵阀、虹吸作用或机械力等推动反应混合液在不同温区之间作往复（或循环）流动而实

现PCR扩增[16, 84, 85], 便于PCR循环次数的控制, 也有效减小了芯片通道的长度和PCR芯片的尺寸, 利于实现高通量的流动式PCR (见图1-19)。

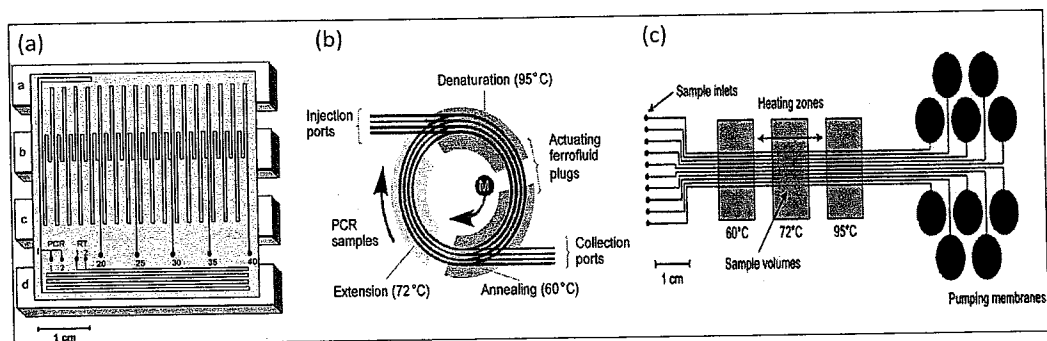


图1-19 流动式PCR形式: (a) 单向流动[82] (b) 循环流动[16] (c) 往复流动[84]。

Fig. 1-19 Forms of continuous flow PCR (a) one-way flow (b) circular flow (c) reciprocating flow.

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液滴技术, 以分散的溶液单元作为微反应器, 大大提升了微流控芯片的低消耗、自动化和高通量等优点, 受到日益广泛的重视, 在核酸分析中也具有一定的应用。Mohr 等较早搭建了一个液滴 PCR 系统[86], 在线产生的高通量液滴并依次通过二个恒温区实现 PCR 扩增, 扩增产物通过实时荧光定量检测。Beer 等则在液滴连续产生后封闭通道, 将液滴固定, 然后将芯片置于加热装置上进行 PCR 扩增[87]。Mathies 研究组则利用 PDMS-玻璃杂交芯片在线产生包含 DNA 模板 (或细胞)、荧光标记的正向引物、连接反向引物的微珠、PCR 反应液的液滴[88], 并在芯片上集成微泵单元以控制液滴产生的大小和频率、提高微珠的包裹率。收集液滴, 置于常规 PCR 仪中进行高通量 PCR 扩增 (见图 1-20), 生成荧光标记的 PCR 产物并结合在微珠上。反应结束后破碎液滴,

用流式细胞仪检测微珠上扩增产物的荧光值。这种芯片液滴 PCR 方法在减少反应的试剂消耗、提高 PCR 反应的通量（不限于反应液流动式或反应液静止式芯片 PCR）等方面具有重要的意义，并成为芯片 PCR 目前发展的热点之一。

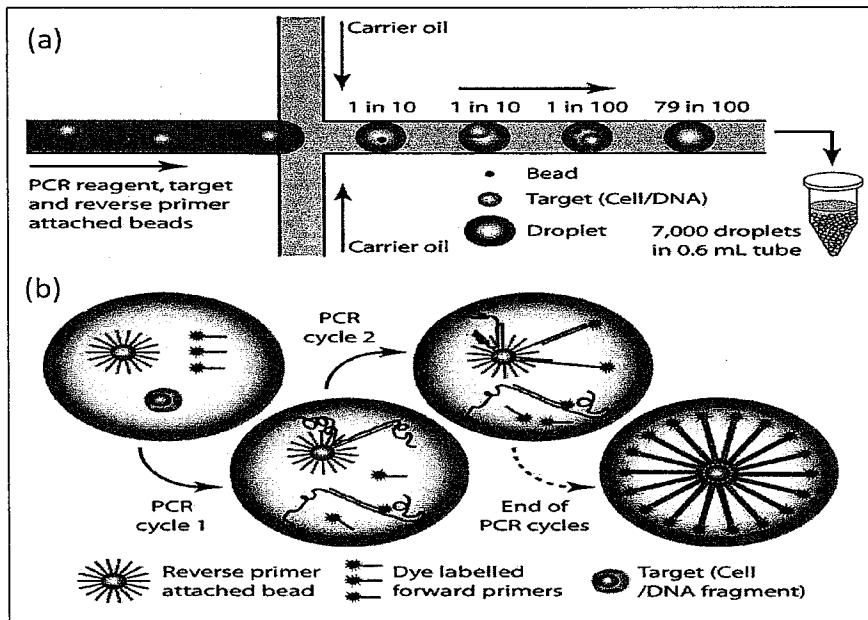


图 1-20 单拷贝 PCR 扩增[88]: (a) 液滴产生; (b) 液滴内 PCR 过程。

Fig. 1-20 Single copy PCR amplification: (a) droplet generation; (b) PCR process in droplet.

值得一提的是，得益于微流控芯片技术尤其是微流控芯片液滴技术对小液体的操控能力，数字 PCR (digital PCR) 可方便的在微流控芯片平台上实现。数字 PCR 的原理是将 DNA 模板进行无限稀释，使得每个 PCR 单元含有 0-1 个 DNA 模板，待 PCR 反应结束后计数有扩增产物的 PCR 单元数，即为 DNA 模板数。Sundberg 等使用离心法将 PCR 反应液液滴捕获在 CD 式塑料芯片的 1000 个 PCR 微池中[89]，完成了质粒 DNA 模板的计数(见图 1-21a)。

Quake 研究组设计了一个含 12 组 PCR 区、每组 1200 个 PCR 单元的微流控芯片[90]，利用液滴 RT-PCR 技术进行了 5 种鼠造血干细胞转录因子 PU.1 的表达水平差异以及管家基因 GAPDH 转录水平差异研究（见图 1-21b）。

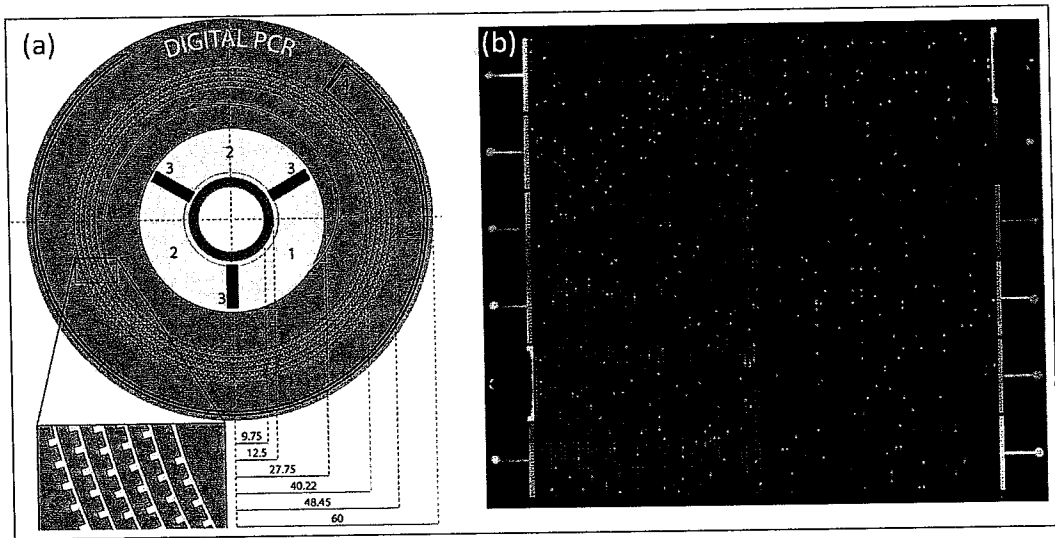


图 1-21 两种数字 PCR 芯片。(a) 转盘型芯片[89]；(b) 阵列芯片[90]。

Fig. 1-21 Two kinds of digital PCR chip. (a) spinning disk chip;(b)array chip.

1.3.3 基于微流控芯片的核酸检测技术

微流控芯片核酸样本的分析/检测技术主要有芯片电泳（CE）、芯片PCR实时荧光检测技术、杂交和电化学检测等。为展现微流控芯片集成化优势，核酸样本的检测技术与芯片PCR等其它单元的集成是研究热点之一。

1.3.3.1 芯片电泳分离/检测技术

微流控芯片电泳技术研究较早、应用较广，至今仍是微流控芯片核酸检测的主流技术。与毛细管电泳相比，芯片电泳具有高速、高效、低消耗、集成化及高通量等优势，并易与其它功能单元集成。目前，在芯片核酸电泳检

测一般采用介质筛分芯片电泳模式，它是利用核酸大分子和筛分介质（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大小分开的一种技术。借助于毛细管电泳的原始积累，筛分电泳机理、筛分介质、管壁涂层以及检测技术相对成熟，芯片电泳面临的主要任务是通过合理设计芯片增大检测通量，以期取代现有的商品化测序仪；扩大应用范围，增加集成度，如构建集核酸的纯化、PCR扩增和电泳分离于一体的核酸分析芯片等。

核酸分析的样本量通常很大，在筛分电泳的运行时间比较固定的前提下，阵列化是增加检测通量的一个比较有效的方法。Mathies 研究组在高通量核酸芯片电泳方面的工作十分突出，1997年他们首次构建了12通道的阵列芯片电泳成功实现了12通道同时分离核酸标准片段 pBR322 MspI DNA ladder，并且对 HLA—H 基因进行了分型研究[91]。经过多次的改进，并最终在圆盘形玻璃芯片上加工了384个呈辐射状排列的分离通道，并成功实现了大规模核酸样品的快速分离/检测[92]。

Woolley等将硅微反应室固定在玻璃电泳芯片上[93]，首次实现了PCR单元和电泳单元的功能化集成，完成了基因分析“芯片实验室”集成化关键的一步。而后，相继出现了各种形式的PCR-CE芯片系统，并成为当前研究的热点。Waters等将多个PCR反应池集成在单通道电泳芯片上[94]，可同时进行多个PCR反应及产物的依次电泳，缩短分析时间。Mathies研究组将多达8个PCR-CE单元集成在一块芯片上[20, 78, 79]，并用于法医学检测，但8个PCR-CE单元分别进行。而后，他们将阵列电泳引入PCR-CE系统，发展了多通道PCR (RT-PCR) -CE芯片系统，该芯片上集成了四个PCR (RT-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，代表了该领域的最高水平（见图1-22）[80, 81]。同时，

他们也将四色荧光检测系统引入芯片PCR-CE系统，完成了性染色体上四组STR位点的同时扩增、检测，体现了电泳对多重PCR产物检测的独特优势[21]。

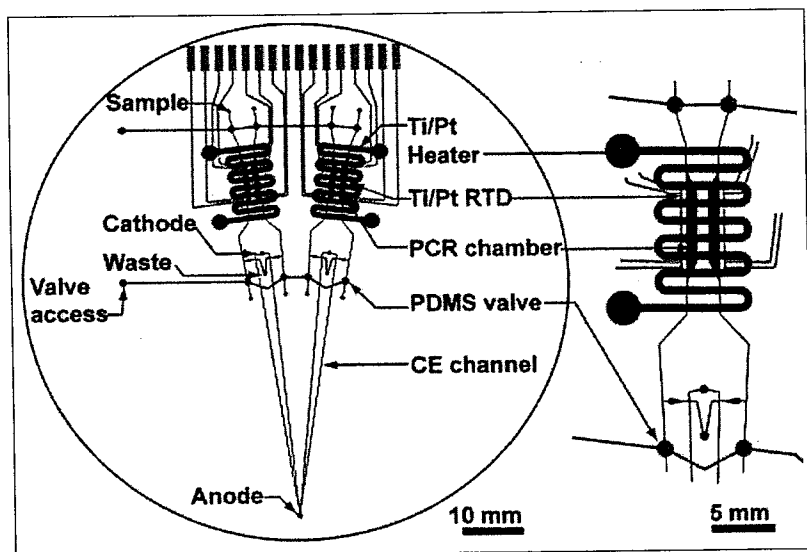


图1-22 多通道PCR-CE微流控芯片示意图[80]。

Fig. 1-22 Schematic of multichannel PCR-CE microfluidic chip.

1.3.3.2 芯片 PCR 实时荧光检测技术

所谓PCR实时荧光定量技术，是指在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。荧光定量PCR所使用的荧光化学可分为荧光探针和荧光染料两种，并都在芯片PCR上实现。Xiang等利用TaqMan荧光探针技术，在一次性使用的PDMS反应池中进行了E. coli DNA的实时荧光PCR检测[95]。在此基础上，该课题组又引入了多通道光纤荧光激发/检测模块，其中包括激光、滤镜、光检测器及1×4光纤开关，可实现四反应池实时荧光芯片PCR分析[96]。Wu等直接将塑料管粘贴在ITO玻璃上作为PCR反应池，配合Pt100进行温度测

定[28]。他们将SYBR Green I荧光染料加入反应体系，并将芯片置于荧光显微镜下进行 λ -DNA的实时荧光PCR检测。实时荧光定量PCR芯片可由普通PCR芯片直接转化而来，只需适当调整PCR混合液的组成及外加荧光检测系统，因此芯片本身的结构得到简化，也有利于整个系统的微型化。Northrup等首次报道了一种便携式实时荧光PCR分析仪（见图1-23a），大小如公文包，以电池为电源，将硅微反应池、薄膜加热器、光检测窗口、光学检测模块集成到同一芯片装置上[97]。Belgrader等发展了一种阵列式微型化核酸分析仪（见图1-23b），可同时进行2 \times 5个样品的快速、平行检测，并可在7分钟内（17秒/循环）检测出草原居民欧文氏菌（*E. herbicola*）[98]。Higgins等开发了一种目前为止最为轻便的手持式阵列核酸分析仪（见图1-23c），其重量不到1 kg[99]。该仪器采用两个发光二极管作为荧光检测系统的光源，并用于埃希氏大肠杆菌（*E. coli*）和炭疽热菌（*B. anthracis*，采用SYBR Green I染料）以及*E. herbicola*（采用TaqMan 探针）等致病菌的定量检测。

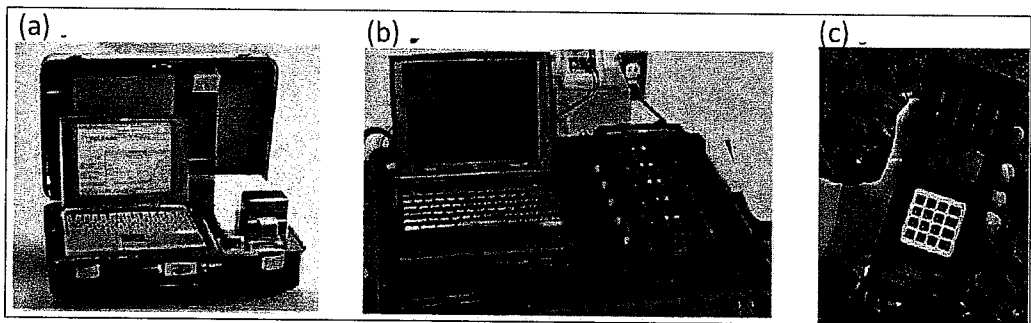


图1-23 实时荧光芯片PCR分析仪。（a）微型化热循环分析仪[97]；（b）阵列式微型化核酸分析仪[98]；（c）手持式阵列核酸分析仪[99]。

Fig. 1-23 Real time fluorescence chip-PCR analyzer. (a) miniature analytical thermal cycling instrument; (b) advanced nucleic acid analyzer; (c) handheld advanced nucleic acid analyzer.

以TaqMan探针为首的荧光探针法具有高度的灵敏性和特异性，是目前公认的核酸定量分析的最好方法，但其价格比较昂贵，而且探针设计、反应条件需要冗长的调试和优化。以SYBR Green I染料为首的荧光染料具有较高的灵敏度，但它和双链DNA的结合没有特异性，即也和引物二聚体及非特异性扩增产物相结合产生荧光信号，进而干扰扩增产物的定量检测。

1.3.3.3 芯片上的其它核酸检测技术

DNA芯片杂交检测技术可以获得扩增产物的长度和序列信息，被广泛应用于基因组研究，并在微流控芯片领域进行了一些有益尝试。Liu等将PCR扩增、DNA杂交及杂交冲洗等过程集成到同一PC芯片系统[100]，通过预先将氨基化寡核苷酸探针固定在活化的PC芯片通道上，对大肠杆菌和粪肠球菌DNA进行了不对称PCR扩增和在线杂交检测。Trau等报道了一种基于硅片的四阵列微型DNA扩增分析仪[101]，微反应池底部预先固定有寡核苷酸微阵列，可实现单一反应池中的PCR扩增和DNA杂交检测并成功用于中草药的快速基因分型研究中。

PCR芯片本身体积微小，如能集成微型化的检测系统则更具有优势，顺应这种要求，有学者将电化学检测引入PCR产物的检测。Lee等将DNA探针修饰的电化学检测用电极集成于PCR芯片上，通过不对称PCR扩增得到的单链PCR产物与固定于电极上的DNA探针进行杂交反应，利用电化学检测技术，实现了对目标DNA灵敏、特异的检测和识别[102]。Fang等将亚甲基蓝电化学检测引入芯片定量PCR系统[103]，设计了流动式PCR芯片，上层PDMS芯片含透迤型PCR通道，下层玻璃芯片上制作有微电极阵列(见图1-24)。通过测定不同PCR循环中的电流信号值，对PCR扩增进行实时监测。这种方法无需预先修饰电极、不对称PCR扩增以及固相PCR，因而更为简便。

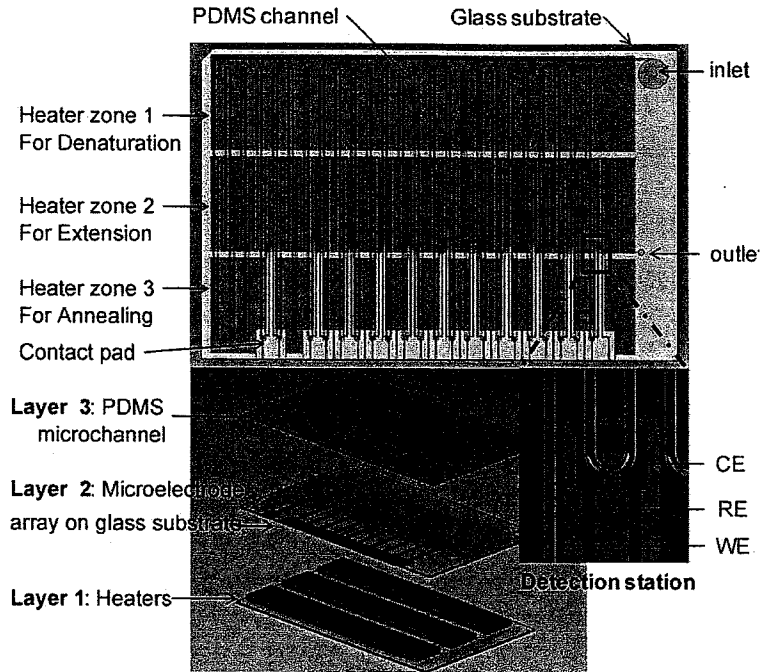


图 1-24 电化学检测流动式 PCR 仪示意图[103]。

Fig. 1-24 Schematic of flow-through electrochemical (EC)-qPCR microfluidic device.

1.3.4 集成式微流控芯片核酸分析系统

微流控芯片实验室所具有的各种单元技术灵活组合、整体可控和规模集成的特点，使其在研究过程中呈现出很多单一技术无法比拟的特点。只有将分析工作中所需的操作单元尽可能多的集成到一起，才能体现出微全分析系统低消耗、全自动及高通量等方面的优势。目前，针对核酸分析系统各单元的研究相对成熟，也有一些全集成核酸分析系统的报道。

Yeung等报道了一种集成细胞热裂解/磁珠分离、不对称PCR扩增及电化学检测的芯片系统[104]。通过分别固定于不同电极上的两种序列特异性DNA

探针，成功进行了大肠杆菌和枯草杆菌的同时检测。这种基于微反应池的芯片系统提供了一种低成本、便携式的全集成核酸分析方法，但对流体的操控并未实现自动化。

Motorola公司在PC芯片上集成了微混合器、石蜡微阀/气动微泵、微加热器和DNA微阵列（见图1-25），用以实现从细胞捕获、浓缩、纯化、裂解、扩增到产物杂交、电化学检测过程的全集成[105]，从而降低了可能的样品污染，并实现了操作过程的自动化。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。

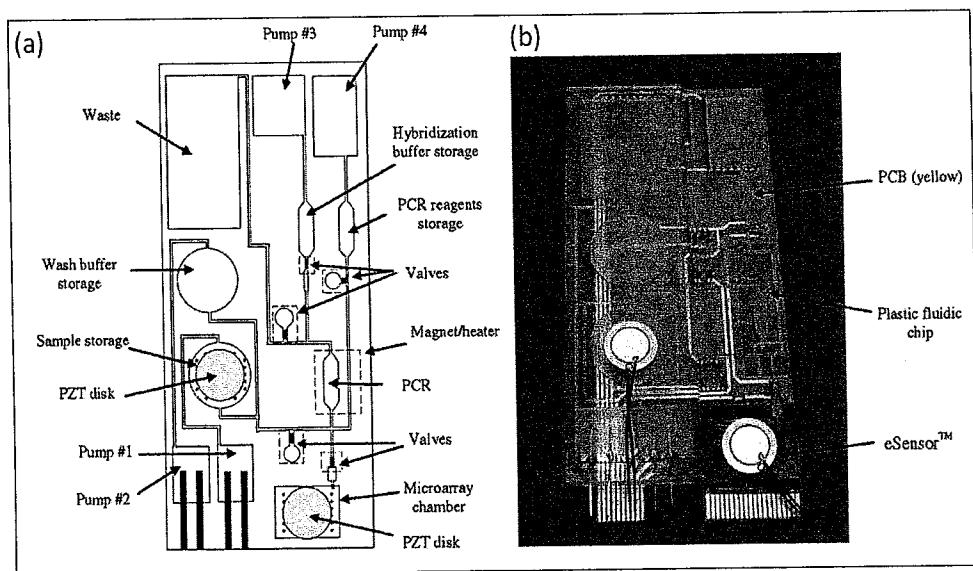


图1-25 样品纯化/PCR/杂交-电化学检测全集成DNA分析芯片系统 [105]: (a) 示意图; (b) 实物图。

Fig. 1-25 Total genetic analysis microfluidic system integrating sample purification/PCR/hybridization-electrochemical detection: schematic (a) and photograph (b) of the system.

Mathies课题组发展了一种高度集成的DNA测序芯片系统[106]（见图1-26），将Sanger测序涉及的热循环、样品纯化以及电泳分离三个步骤集成一块芯片上，可对纳升级样品进行测序分析。通过集成的PDMS气动微阀/微泵来实现不同功能单元之间的连接及微流体的自动控制。该微型化DNA测序仪仅需1 fmol DNA模板即可完成Sanger测序过程，对556个碱基的DNA片段读出准确率为99%。

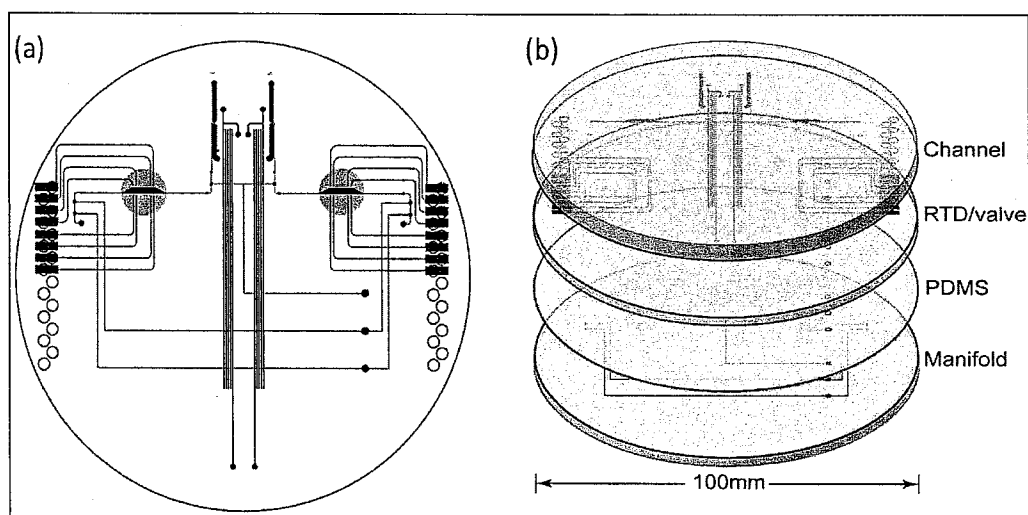


图1-26 高度集成DNA测序芯片系统[106]: 芯片示意图(a)及结构图(b)。

Fig. 1-26 A fully integrated microfluidic system for DNA sequencing: schematic diagram (a) and structural diagram (b) of the chip.

Landers课题组报道了一种全集成微流控基因分析芯片系统[107]，如图1-27所示。整个玻璃芯片包括三大功能区：基于填充柱SPE的DNA提取区，红外辐射加热/热电偶测温的PCR扩增区，以及芯片电泳分离和检测区。通过集成的PDMS薄膜气动微阀/微泵来实现各功能区的分隔及芯片电泳的进样。

他们利用这种芯片系统对实际样本中炭疽杆菌和百日咳杆菌进行了测定，整个分析过程不到30分钟。

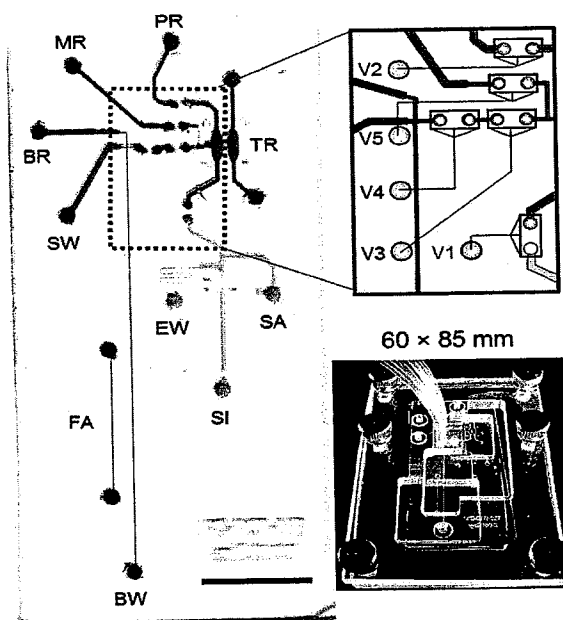


图1-27 SPE/PCR/CE全集成基因分析微流控芯片系统示意图[107]。

Fig. 1-27 Schematic of total genetic analysis microfluidic system integrating SPE/PCR/CE.

1.4 本论文涉及的研究工作概述

目前，微流控芯片核酸分析系统各单元研究相对成熟，也有全集成核酸分析系统的报道，在分析的通量上仍有待提高。本论文的研究目的是发展高通量、全集成微流控芯片核酸分析系统中的关键技术，并实现其初步应用。主要研究工作包括基于微流控芯片的核酸样品纯化、扩增及分离/检测。芯片上的核酸纯化研究中，我们构建了基于磁珠的核酸固相萃取芯片系统，在连

续操控的液滴内实现了核酸的纯化过程；芯片上的DNA扩增及分离/检测研究中，我们构建了分体式的PCR-CE芯片系统，并考察了其基本性能，为实现高通量、全集成微流控芯片核酸分析打下了基础。

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] 方肇伦, 微流控分析芯片的制作及应用. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [3] 林炳承, 秦建华, 图解微流控芯片实验室. 北京: 科学出版社, 2008.
- [4] Zhou, X. M., Dai, Z. P., Liu, X., Luo, Y., Wang, H., Lin, B. C., Modification of a poly(methyl methacrylate) injection-molded microchip and its use for high performance analysis of DNA. *Journal of Separation Science*, 2005, 28(3): 225-233.
- [5] 周小棉, 戴忠鹏, 罗勇, 刘大渔, 王辉, 毛秀丽, 吴大朋, 林炳承, 注塑型聚甲基丙烯酸甲酯多通道微流控芯片的研制和性能考察. *高等学校化学学报*, 2005, 26(1): 52-54.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Hjerten, S., High-performance electrophoresis - elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *Journal of Chromatography*, 1985, 347(2): 191-198.

- [9] Lou, X. J., Panaro, N. J., Wilding, P., Fortina, P., Kricka, L. J., Increased amplification efficiency of microchip-based PCR by dynamic surface passivation. *Biotechniques*, 2004, 36(2): 248-+.
- [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] 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.
- [13] 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.
- [14] Agrawal, N., Hassan, Y. A., Ugaz, V. M., A pocket-sized convective PCR thermocycler. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2007, 46(23): 4316-4319.
- [15] Kim, J. A., Lee, J. Y., Seong, S., Cha, S. H., Lee, S. H., Kim, J. J., Park, T. H., Fabrication and characterization of a PDMS-glass hybrid continuous-flow PCR chip. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 29(1-2): 91-97.

- [16] Sun, Y., Nguyen, N. T., Kwok, Y. C., High-throughput polymerase chain reaction in parallel circular loops using magnetic actuation. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(15): 6127-6130.
- [17] Kaigala, G. V., Hoang, V. N., Stickel, A., Lauzon, J., Manage, D., Pilarski, L. M., Backhouse, C. J., An inexpensive and portable microchip-based platform for integrated RT-PCR and capillary electrophoresis. *Analyst*, 2008, 133(3): 331-338.
- [18] Crews, N., Wittwer, C., Gale, B., Continuous-flow thermal gradient PCR. *Biomedical Microdevices*, 2008, 10(2): 187-195.
- [19] Oh, K. W., Park, C. S., Namkoong, K., Kim, J., Ock, K. S., Kim, S., Kim, Y. A., Cho, Y. K., Ko, C., World-to-chip microfluidic interface with built-in valves for multichamber chip-based PCR assays. *Lab on a Chip*, 2005, 5(8): 845-850.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.

- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Sun, K., Yamaguchi, A., Ishida, Y., Matsuo, S., Misawa, H., A heater-integrated transparent microchannel chip for continuous-flow PCR. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2002, 84(2-3): 283-289.
- [27] Fukuba, T., Yamamoto, T., Naganuma, T., Fujii, T., Microfabricated flow-through device for DNA amplification - towards in situ gene analysis. *Chemical Engineering Journal*, 2004, 101(1-3): 151-156.
- [28] Wu, Z. Y., Chen, K., Qu, B. Y., Tian, X. X., Wang, X. J., Fang, F., A thermostat chip of indium tin oxide glass substrate for static polymerase chain reaction and in situ real time fluorescence monitoring. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 610(1): 89-96.
- [29] 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.

- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] Shaw, K. J., Docker, P. T., Yelland, J. V., Dyer, C. E., Greenman, J., Greenway, G. M., Haswell, S. J., Rapid PCR amplification using a microfluidic device with integrated microwave heating and air impingement cooling. *Lab on a Chip*, 2010, 10(13): 1725-1728.
- [33] 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.
- [34] Thorsen, T., Roberts, R. W., Arnold, F. H., Quake, S. R., Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Physical Review Letters*, 2001, 86(18): 4163-4166.
- [35] Nisisako, T., Torii, T., Higuchi, T., Droplet formation in a microchannel network. *Lab on a Chip*, 2002, 2(1): 24-26.
- [36] Vanapalli, S. A., Banpurkar, A. G., van den Ende, D., Duits, M. H. G., Mugele, F., Hydrodynamic resistance of single confined moving drops in rectangular microchannels. *Lab on a Chip*, 2009, 9(7): 982-990.
- [37] Anna, S. L., Bontoux, N., Stone, H. A., Formation of dispersions using

- "flow focusing" in microchannels. *Applied Physics Letters*, 2003, 82(3): 364-366.
- [38] Ganan-Calvo, A. M., Gordillo, J. M., Perfectly monodisperse microbubbling by capillary flow focusing. *Physical Review Letters*, 2001, 87(27): 274501.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] Nie, J., Kennedy, R. T., Sampling from Nanoliter Plugs via Asymmetrical Splitting of Segmented Flow. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(18): 7852-7856.
- [46] Lombardi, D., Dittrich, P. S., Droplet microfluidics with magnetic beads: a new tool to investigate drug-protein interactions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399(1): 347-352.
- [47] Ahn, K., Kerbage, C., Hunt, T. P., Westervelt, R. M., Link, D. R., Weitz, D. A., Dielectrophoretic manipulation of drops for high-speed microfluidic sorting devices. *Applied Physics Letters*, 2006, 88(2): 024104.
- [48] Zhang, K., Liang, Q. L., Ma, S., Mu, X. A., Hu, P., Wang, Y. M., Luo, G. A., On-chip manipulation of continuous picoliter-volume superparamagnetic droplets using a magnetic force. *Lab on a Chip*, 2009, 9(20): 2992-2999.
- [49] Bringer, M. R., Gerdtts, C. J., Song, H., Tice, J. D., Ismagilov, R. F., Microfluidic systems for chemical kinetics that rely on chaotic mixing in droplets. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 2004, 362(1818): 1087-1104.
- [50] Price, C. W., Leslie, D. C., Landers, J. P., Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. *Lab on a Chip*, 2009, 9(17): 2484-2494.
- [51] Wen, J., Legendre, L. A., Bienvenue, J. M., Landers, J. P., Purification of nucleic acids in microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(17): 6472-6479.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] Zhong, R., Liu, D., Yu, L., Ye, N., Dai, Z., Oin, J., Lin, B., Fabrication of two-weir structure-based packed columns for on-chip solid-phase extraction of DNA. *Electrophoresis*, 2007, 28(16): 2920-2926.
- [56] Cady, N. C., Stelick, S., Batt, C. A., Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. *Biosensors & Bioelectronics*, 2003, 19(1): 59-66.
- [57] West, J., Boerlin, M., Jadhav, A. D., Clancy, E., Silicon microstructure arrays for DNA extraction by solid phase sample contacting at high flow rates. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2007, 126: 664-671.
- [58] 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.
- [59] Witek, M. A., Hupert, M. L., Park, D. S. W., Fears, K., Murphy, M. C., Soper, S. A., 96-well polycarbonate-based microfluidic titer plate for high-throughput purification of DNA and RNA. *Analytical Chemistry*, 2008,

- 80(9): 3483-3491.
- [60] Wen, J., Guillo, C., Ferrance, J. P., Landers, J. P., Microfluidic-based DNA purification in a two-stage, dual-phase microchip containing a reversed-phase and a photopolymerized monolith. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(16): 6135-6142.
- [61] Chung, Y. C., Jan, M. S., Lin, Y. C., Lin, J. H., Cheng, W. C., Fan, C. Y., Microfluidic chip for high efficiency DNA extraction. *Lab on a Chip*, 2004, 4(2): 141-147.
- [62] Karwa, M., Hahn, D., Mitra, S., A sol-gel immobilization of nano and micron size sorbents in poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchannels for microscale solid phase extraction (SPE). *Analytica Chimica Acta*, 2005, 546(1): 22-29.
- [63] Mahalanabis, M., Al-Muayad, H., Kulinski, M. D., Altman, D., Klapperich, C. M., Cell lysis and DNA extraction of gram-positive and gram-negative bacteria from whole blood in a disposable microfluidic chip. *Lab on a Chip*, 2009, 9(19): 2811-2817.
- [64] Wu, Q. R., Bienvenue, J. M., Hassan, B. J., Kwok, Y. C., Giordano, B. C., Norris, P. M., Landers, J. P., Ferrance, J. P., Microchip-based macroporous silica sol-gel monolith for efficient isolation of DNA from clinical samples. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(16): 5704-5710.
- [65] 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.

- [66] 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.
- [67] Lien, K. Y., Lee, W. C., Lei, H. Y., Lee, G. B., Integrated reverse transcription polymerase chain reaction systems for virus detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 2007, 22(8): 1739-1748.
- [68] 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.
- [69] 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.
- [70] Pipper, J., Inoue, M., Ng, L. F. P., Neuzil, P., Zhang, Y., Novak, L., Catching bird flu in a droplet. *Nature Medicine*, 2007, 13: 1259-1263.
- [71] Lehmann, U., Vandevyver, C., Parashar, V. K., Gijs, M. A. M., Droplet-based DNA purification in a magnetic lab-on-a-chip. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006, 45(19): 3062-3067.
- [72] Yuen, P. K., Kricka, L. J., Fortina, P., Panaro, N. J., Sakazume, T., Wilding, P., Microchip module for blood sample preparation and nucleic acid amplification reactions. *Genome Research*, 2001, 11(3): 405-412.
- [73] Wilding, P., Kricka, L. J., Cheng, J., Hvichia, G., Shoffner, M. A., Fortina, P., Integrated cell isolation and polymerase chain reaction analysis using silicon microfilter chambers. *Analytical Biochemistry*, 1998, 257(2): 95-100.

- [74] Long, Z. C., Liu, D. Y., Ye, N. N., Qin, J. H., Lin, B. C., Integration of nanoporous membranes for sample filtration/preconcentration in microchip electrophoresis. *Electrophoresis*, 2006, 27(24): 4927-4934.
- [75] Zhang, Y. H., Ozdemir, P., Microfluidic DNA amplification-A review. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 638(2): 115-125.
- [76] 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.
- [77] Marcus, J. S., Anderson, W. F., Quake, S. R., Parallel picoliter RT-PCR assays using microfluidics. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(3): 956-958.
- [78] Lagally, E. T., Medintz, I., Mathies, R. A., Single-molecule DNA amplification and analysis in an integrated microfluidic device. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(3): 565-570.
- [79] Lagally, E. T., Simpson, P. C., Mathies, R. A., Monolithic integrated microfluidic DNA amplification and capillary electrophoresis analysis system. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2000, 63(3): 138-146.
- [80] Liu, C. N., Toriello, N. M., Mathies, R. A., Multichannel PCR-CE microdevice for genetic analysis. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(15): 5474-5479.
- [81] 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.
- [82] 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.
- [83] Hashimoto, M., Chen, P. C., Mitchell, M. W., Nikitopoulos, D. E., Soper, S. A., Murphy, M. C., Rapid PCR in a continuous flow device. *Lab on a Chip*, 2004, 4(6): 638-645.
- [84] Chabert, M., Dorfman, K. D., de Cremoux, P., Roeraade, J., Viovy, J. L., Automated microdroplet platform for sample manipulation and polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(22): 7722-7728.
- [85] Liu, J., Enzelberger, M., Quake, S., A nanoliter rotary device for polymerase chain reaction. *Electrophoresis*, 2002, 23(10): 1531-1536.
- [86] Mohr, S., Zhang, Y. H., Macaskill, A., Day, P. J. R., Barber, R. W., Goddard, N. J., Emerson, D. R., Fielden, P. R., Numerical and experimental study of a droplet-based PCR chip. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2007, 3(5): 611-621.
- [87] Beer, N. R., Wheeler, E. K., Lee-Houghton, L., Watkins, N., Nasarabadi, S., Hebert, N., Leung, P., Arnold, D. W., Bailey, C. G., Colston, B. W., On-chip single-copy real-time reverse-transcription PCR in isolated picoliter droplets. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(6): 1854-1858.
- [88] Kumaresan, P., Yang, C. J., Cronier, S. A., Blazej, R. G., Mathies, R. A., High-throughput single copy DNA amplification and cell analysis in engineered nanoliter droplets. *Analytical Chemistry*, 2008, 80(10): 3522-3529.
- [89] Sundberg, S. O., Wittwer, C. T., Gao, C., Gale, B. K., Spinning Disk

- Platform for Microfluidic Digital Polymerase Chain Reaction. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(4): 1546-1550.
- [90] Warren, L., Bryder, D., Weissman, I. L., Quake, S. R., Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(47): 17807-17812.
- [91] 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.
- [92] 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.
- [93] 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.
- [94] Waters, L. C., Jacobson, S. C., Krutchinina, 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.
- [95] Xiang, Q., Xu, B., Fu, R., Li, D., Real time PCR on disposable PDMS chip with a miniaturized thermal cycler. *Biomedical Microdevices*, 2005, 7(4): 273-279.
- [96] 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.
- [97] Northrup, M. A., Benett, B., Hadley, D., Landre, P., Lehew, S., Richards, J., Stratton, P., A miniature analytical instrument for nucleic acids based on micromachined silicon reaction chambers. *Analytical Chemistry*, 1998, 70(5): 918-922.
- [98] Belgrader, P., Benett, W., Hadley, D., Long, G., Mariella, R., Milanovich, F., Nasarabadi, S., Nelson, W., Richards, J., Stratton, P., Rapid pathogen detection using a microchip PCR array Instrument. *Clinical Chemistry*, 1998, 44(10): 2191-2194.
- [99] Higgins, J. A., Nasarabadi, S., Karns, J. S., Shelton, D. R., Cooper, M., Gbakima, A., Koopman, R. P., A handheld real time thermal cycler for bacterial pathogen detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 2003, 18(9): 1115-1123.
- [100] 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.
- [101] Trau, D., Lee, T. M. H., Lao, A. I. K., Lenigk, R., Hsing, I. M., Ip, N. Y., Carles, M. C., Sucher, N. J., Genotyping on a complementary metal oxide semiconductor silicon polymerase chain reaction chip with integrated DNA microarray. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(13): 3168-3173.
- [102] 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.

- [103] Fang, T. H., Ramalingam, N., Dong, X. D., Ngin, T. S., Zeng, X. T., Kuan, A. T. L., Huat, E. Y. P., Gong, H. Q., Real-time PCR microfluidic devices with concurrent electrochemical detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, 24(7): 2131-2136.
- [104] Yeung, S. W., Lee, T. M. H., Cai, H., Hsing, I. M., A DNA biochip for on-the-spot multiplexed pathogen identification. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(18): e118.
- [105] 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.
- [106] 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.
- [107] 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.

第二章 液滴核酸固相萃取芯片平台的构建及应用

2.1 引言

从生物样品中提取核酸是分子生物学和遗传学等生命科学研究领域的一项基本技术。微流控芯片技术凭借其所具有的基本特征和最大优势，即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[1]，已被国内外多个研究组用于核酸样本的纯化，力图将常规核酸纯化过程微型化和集成化，以缩短纯化时间，减少试剂消耗和实现自动化。芯片核酸纯化方法以 SPE 为代表，按照固定相在微通道中的存在形式，通常将芯片 SPE 分为开管柱、整体柱和填充柱三种类型，且各有利弊。

将微通道进行紫外光照处理或用氨基硅烷[2]、壳聚糖[3]简单涂敷，即可得到芯片 SPE 开管柱。这种方法最为简便，柱压较低，便于流体驱动和集成化。然而，因固定相仅结合在微通道的内壁而不是充满整个通道，其比表面积较低，柱容量也不高，很难获得较高的萃取效率和富集倍数。

利用溶胶-凝胶方法固定氧化硅颗粒[4]或直接采用溶胶-凝胶技术原位聚合[5]形成固定相，可在微通道中得到稳定的整体柱。这种方法提高了固定相的比表面积，因而具有较高的柱容量，可对大体积、低浓度的样品进行快速纯化和富集，获得较高的萃取效率。但其制备过程相对耗时，柱压相对较高，不利于流体操控和集成化，不利于实现高通量的样本纯化。

将固定相以微颗粒的状态充满微通道的纯化方式为填充柱 SPE[6]，这是在芯片上实现常规 SPE 的最直接的方式。相对而言，这种方式的固定相比表面积大，具有较高的柱容量，可获得较高的萃取效率，且可供选择的固定相种类相对较多。其缺点在于需要在柱端预先加工围堰式结构以拦截微颗粒使

制作过程复杂化, 固定相填充过程耗时费力, 柱压相对较高, 不利于流体操控和集成化, 不便于实现高通量的样本纯化。

将磁性微珠或微颗粒作为固定相引入芯片 SPE, 因微粒或微颗粒本身具有较大的比表面积, 此类 SPE 具有填充柱 SPE 同样的优势。同时, 通过简单的施加磁场就可将磁性微珠固定在通道的某一位置, 简化了通道制作和微珠填充过程[7, 8]。又因磁场施加的灵活性和可控性, 使得基于磁珠的芯片 SPE 方式更为灵活、可控和多样性[9, 10], 是芯片 SPE 发展的趋势。

近年来, 微流控芯片液滴技术引起了人们的越来越多的关注。液滴作为微反应器具有体积小、混合迅速、反应条件稳定、液滴间无样本扩散避免了样品间的交叉污染等特点, 被广泛用于蛋白质结晶、酶筛选、微球合成等领域, 可同时获得高通量的实验数据, 展现出了巨大的优势和发展潜力[11]。将微流控芯片液滴技术与基于磁性微颗粒的芯片 SPE 进行有效的结合, 实现高通量、快速、低耗的 DNA 纯化, 仍是目前面临的挑战。

在本章中, 我们搭建了一个集成磁珠操控和连续液滴操控的微流控芯片 SPE 平台, 通过连续的液滴操控实现快速、低耗的 DNA 纯化过程。在液滴形成单元, 磁珠和 DNA 样本被包入液滴并结合在一起。此液滴在液滴分裂单元分裂成含 DNA-磁珠的小液滴和含废液的大液滴, 小液滴经过溶液添加单元时被加入下一个 SPE 反应液, 而后继续液滴分裂-溶液添加过程。依此原理, SPE 的进样、清洗、洗脱过程得以在连续的液滴操控中实现。在这个平台上, 每个液滴完成全部的 SPE 过程仅需 1 min。因液滴是连续产生的 (100 个/min), 此平台具有高通量处理样本的潜力。以 λ -DNA 纯化为例考察了该平台性能, 获得了 46% 的萃取效率。将此平台用于人血清 HBV-DNA 的提取, 纯化的 DNA 可直接用于后续的 PCR 扩增和检测。

2.2 实验部分

2.2.1 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。等离子体清洗器购自 Harrick 公司。FA1104 型电子天平购自上海精秤天平厂。注射泵购自保定兰格恒流泵有限公司。四联泵和激光诱导荧光 (LIF) 检测系统[12]由实验室自行搭建。1x71 型显微镜购自 Olympus 公司。PCR 扩增仪 ABI 2700 购自美国 ABI 公司。荧光光度计 F-2500 购自日本 Hitachi 公司。

2.2.2 材料与试剂

Sylgard® 184 硅胶橡胶(PDMS)试剂盒购自 Dow Corning 公司。SU-8 3035 型光刻胶购自 Microchem 公司。十八烷基三氯硅烷购自 Acros Organics 公司。超顺磁硅珠 (180nm, 25 mg/mL) 购自上海奥润微纳新材料科技有限公司。乳酸乙酯、异丙醇、司班 80 (Span-80)、硫氰酸胍、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; 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; 苋菜红购自国药集团化学试剂有限公司; 亚甲基蓝购自天津市天新精细化工开发中心。用于 DNA 芯片 SPE 的缓冲液中, 进样缓冲液为硫氰酸胍溶液 (5 M 硫氰酸胍, 20 mM EDTA, 1%

Triton X-100, 0.1 M Tris - chloride, pH 6.4); 冲洗缓冲液为 80%异丙醇水溶液; 洗脱缓冲液为 TE 缓冲液 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5)。用进样缓冲液将 λ -phage DNA 的储存液稀释至 1 ng/ μ L 进样。人血清样品 (柠檬酸钠抗凝) 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。所有水溶液均用纯净水配制。溶液在使用前均用 0.22 μ m 孔径的滤膜过滤。

2.2.3 芯片设计与制作

2.2.3.1 芯片设计

所采用的连续液滴操控微流控芯片设计如图 2-1 所示。该芯片集成一个液滴生成区、两个溶液添加区和三个液滴分裂区, 其连接顺序见图示。在每次新液滴生成 (即液滴生成、溶液添加) 后均连接一个液滴混合区 (即图中的透迤型通道)。所有通道深 60 μ m, 相同的结构具有相同的通道宽度。液滴生成区的油相通道宽 120 μ m, 两个水相进样通道长度相等, 宽 120 μ m, 在与油相通道汇合前相接并汇合成一个宽 80 μ m 通道。从液滴混合区至液滴分裂交叉接口间通道长 11 mm, 宽 120 μ m, 在液滴分裂交叉接口之后通道宽度为 80 μ m。液滴分裂区两出口端长度不等, 从交叉接口至细通道的长度分别为 1.35 mm, 5.06 mm (1:3.75)。细通道组通道宽度为 30 μ m。油相添加通道宽 80 μ m, 水相添加通道宽 50 μ m。从废液池 1-3、收集池至最近的油相添加通道末端的距离分别为 20 mm、11.5 mm、7.5 mm 和 5 mm。芯片各单元的具体尺寸见图 2-2。

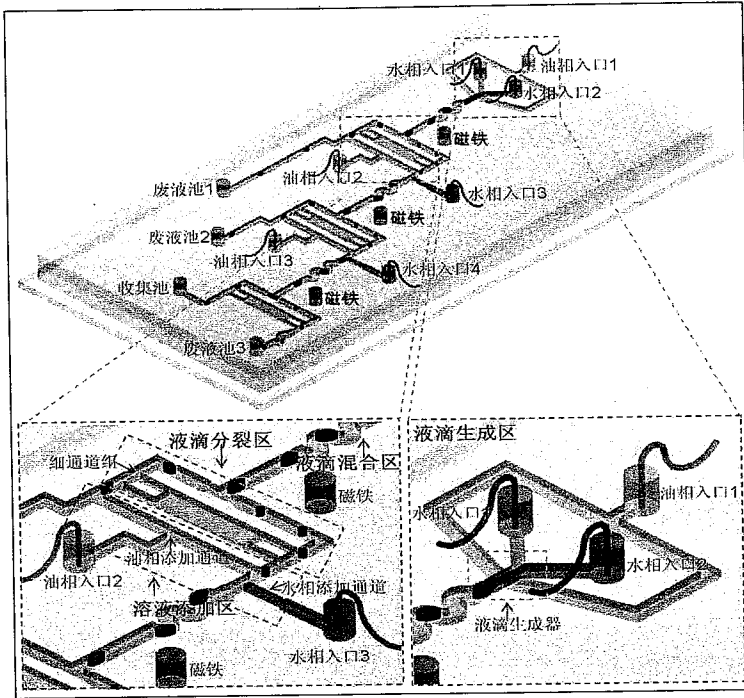


图 2-1 用于快速 DNA 提取的连续液滴操控微流控芯片示意图。

Fig. 2-1 Schematic of the sequential droplets processing microfluidic chip for rapid DNA extraction.

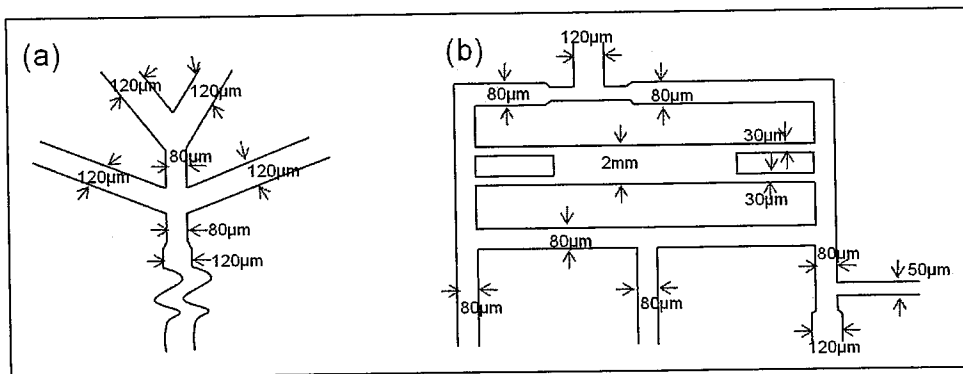


图 2-2 微流控芯片上各功能单元的具体尺寸示意图：(a) 液滴生成区；
(b) 液滴分裂区、溶液添加区及液滴混合区。

Fig. 2-2 Dimensions of the operation units of the microfluidic chip: (a) Droplet generation unit; (b) Droplet splitting, reagent addition and droplet mixing units.

2.2.3.2 芯片制作

本章所使用的微流控芯片制作流程示意图见图 2-3。具体说明如下：

将干净的玻片放置于匀胶台中央，吸片；调整匀胶机转速为 600 转/分，持续 20 秒，同时向玻片中心匀速滴加 SU-8 3035 型光刻胶；随即升高转速至 1500 转/分，再持续 30 秒。铺胶完成后，将玻片置于烘胶台上进行前烘，95°C 烘 30 分钟。待玻片自然冷却至室温后，用事先打印好的芯片掩模覆盖于玻片 SU-8 胶层上，置于紫外光刻机下曝光 30 秒。曝光后立刻将掩膜去掉，将玻片置于烘箱中进行后烘，95°C 烘 30 分钟。待玻片自然冷却至室温后，用乳酸乙酯显影，溶去未经曝光的 SU-8 光刻胶，显影结束后用异丙醇清洗玻片模板，并用电热吹风将其吹干。最后，将模板置于 180°C 烘箱中坚模 1 小时。

将 Sylgard® 184 试剂盒中的单体和引发剂按体积比 10: 1 混合均匀，真空脱气，倒入 SU-8 模板，80°C 烘 1 小时。将固化的 PDMS 层从模板上轻轻剥离，用打孔器在进样入口、废液池、收集池和磁铁放置处打上尺寸合适的孔。将 PDMS 层和洁净的玻璃片均放入等离子体清洗器内，等离子体处理 1 分钟，迅速将 PDMS 层和玻璃层进行不可逆封接，之后置于 80°C 烘箱烘 15 分钟，取出后置于洁净培养皿中备用。制作好的 PDMS 微流控芯片如下图 2-4 所示。

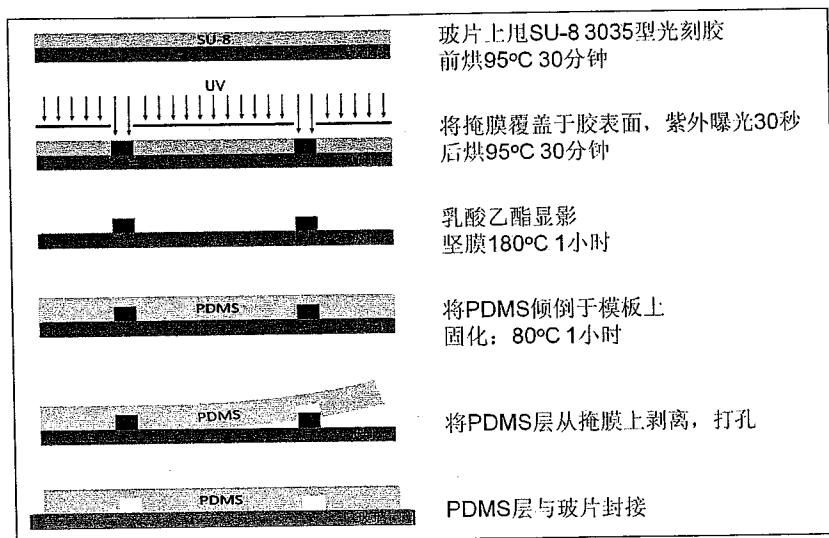


图 2-3 微流控芯片制作流程图。

Fig. 2-3 Schematic of the fabrication process of microfluidic chip.

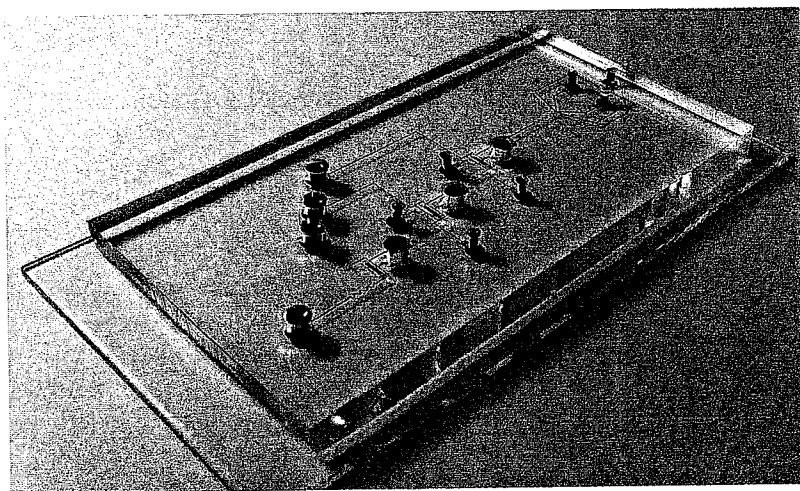


图 2-4 微流控芯片实物图。

Fig. 2-4 Photograph of the fabricated microfluidic chip.

2.2.3.3 芯片通道的表面处理

本实验所用的微流控芯片需进行疏水化处理。首先将芯片置于真空干燥器中抽真空约 10 分钟。取出芯片，立即向所有池（除放置磁铁的池）中加入含 5% 十八烷基三氯硅烷的十六烷，在亲水作用及真空作用下，溶液会灌满所有通道进行疏水涂层。3 分钟后，用真空泵抽干溶液并依次用乙醇和水清洗通道各 5 分钟。最后，将涂层好的芯片置于 80°C 烘箱烘干待用。

2.2.4 液滴核酸固相萃取

2.2.4.1 萃取原理

本论文将连续液滴操控应用于磁性微珠表面的 DNA 提取，其 SPE 原理如图 2-5 所示。因油相的添加与萃取过程无关，故在此萃取原理介绍中忽略。与其它平台的硅珠 SPE 原理相同，SPE 过程主要分为 DNA 与磁珠的结合、杂质的清洗以及 DNA 的洗脱三个步骤。首先，消化好的样本溶解于进样缓冲液中，由进样缓冲液入口（即图 2-1 中所示的水相进样入口 2）处进样，与从磁珠入口（即图 2-1 中所示的水相进样入口 1）处进样的磁珠溶液相会并形成层流。在油相（由油相入口处进样）的剪切力和油水界面的表面张力共同作用下生成包含有样本、磁珠的液滴。该液滴在透迤型的混合区中混合，DNA 结合于磁珠表面，而样本中的蛋白质、细胞碎片等仍游离于溶液中。液滴经过液滴分裂区时分裂成两个大小不等的液滴。受磁力作用，结合了 DNA 的磁珠被吸引入靠近磁场的液滴，即相对较小的液滴中。而大的液滴被弃入废液池 1，同时带走大部分的杂质。然后，清洗缓冲液由清洗缓冲液入口（即图 2-1 中所示的水相进样入口 3）处进样，并加入经过该溶液添加区的液滴中。再经过液滴分裂过程，弃大部分废液入废液池 2，同时保留 DNA-磁珠在较小液滴中。最后，洗脱缓冲液由洗脱缓冲液入口（即图 2-1 中所示的水相

进样入口 4) 处进样, 并加入经过溶液添加区的液滴中。在洗脱缓冲液的作用下, DNA 从磁珠上洗脱下来并进入收集池, 磁珠则排向废液池 3。

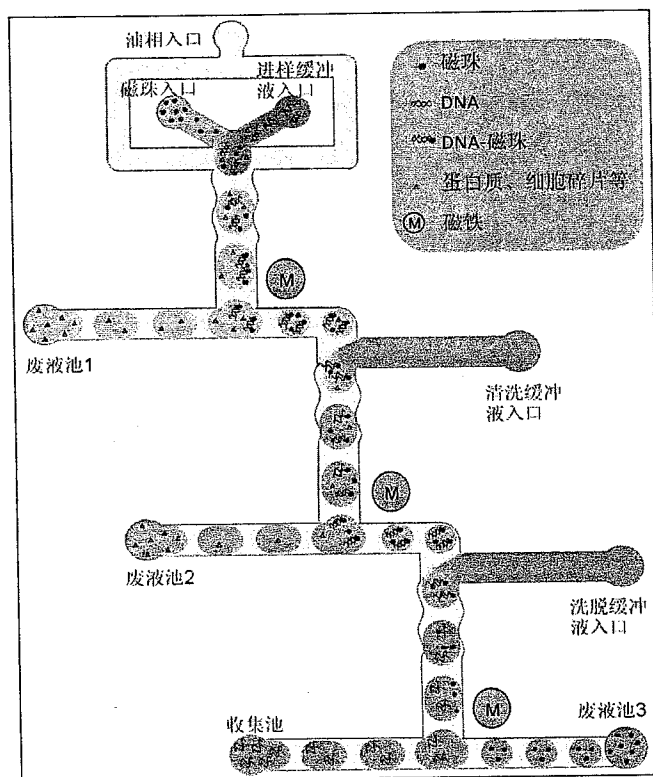


图 2-5 液滴 SPE 萃取原理示意图。

Fig. 2-5 Schematic of principle of droplet SPE.

2.2.4.2 实验方法

SPE 实验前将芯片通道用油相充满。为充分除去通道中的空气, 芯片进行真空除气后灌注油相。油相采用含 1% (w/v) 表面活性剂司班 80 的十六烷。SPE 实验中水相分别为进样缓冲液、清洗缓冲液、洗脱缓冲液和磁珠溶液。条件优化实验中水相分别采用苋菜红溶液、磁珠溶液和纯水。将实验中涉及的水相和油相分别灌注入连接输液器软管的注射器, 排出气泡。将塑料

的色谱接口的一端连接输液器软管，另一端插入芯片的进样入口。注射器使用注射泵推动，每个注射泵流速单独控制。流速条件设定为：油相进样入口 1-3 的流速分别为 $0.42 \mu\text{L}/\text{min}$, $0.17 \mu\text{L}/\text{min}$ 和 $0.17 \mu\text{L}/\text{min}$ 。水相进样入口 1-4（即 SPE 中磁珠溶液、进样缓冲液、清洗缓冲液和洗脱缓冲液进样口）的流速分别为 $0.08 \mu\text{L}/\text{min}$, $0.17 \mu\text{L}/\text{min}$, $0.20 \mu\text{L}/\text{min}$ 和 $0.10 \mu\text{L}/\text{min}$ 。在优化的流速下将油相和水相注入芯片，由于油相对水相的剪切力和油水界面的表面张力的共同作用，可在液滴生成区生成连续稳定的液滴。产生的液滴在注射泵推动下继续流动，依次通过芯片各个液滴控制区进行连续的液滴操控。实验过程中，将芯片置于 1x71 型 Olympus 显微镜下，实时录像由与显微镜相连的高分辨率 CCD 摄像头记录。实验过程中，要避免芯片的移动。

乙肝病毒血清需提前进行消化处理，将血清、蛋白酶 K 和进样缓冲液按 1:1:20 比例混合后 37°C 孵育 30 分钟待用。

2.2.5 数据采集与处理

2.2.5.1 萃取时间与通量的测定

实验中，液滴从产生到最后收集所需的时间为 SPE 萃取时间。受显微镜视野尺寸和 CCD 摄像头传感器尺寸的限制，无法一次性观察整个芯片所有液滴操控区。因此，在显微镜下（或通过电脑观察摄像头传递的视频）分区域分别观察液滴操控过程，并用秒表计时通过各区域所需时间，最后进行求和即为 SPE 萃取时间。液滴通过每个区域所需时间均测定 3 次。

液滴连续、稳定、高通量产生后进行连续的液滴操控过程，因此，液滴产生的频率即为该芯片处理液滴的通量。观察方法同上，测定液滴产生的速度。以秒表计时，计数 1 分钟内液滴产生的个数，测定 3 次。

2.2.5.2 萃取效率的测定

油相中表面活性剂的浓度较低，液滴在芯片收集池中会迅速融合。将芯片各池中所有液体收集后，吸取下层的水相溶液进行核酸浓度的定量测定。将收集的溶液 2 μL 与 598 μL 嵌入式双链 DNA 荧光染料 (GeneFinderTM, Ex/Em, 495nm/ 515nm; 用水稀释至 1 μM) 混合并在室温避光孵育半小时。使用荧光光度计进行核酸定量测定, 定量用的标准曲线采用 λ -DNA (350 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 测定。背景荧光值和空白荧光值在测定时都被扣除。能检测到样品中低至 0.1 ng 的 DNA 分子, 相当于浓度检测限为 0.17 ng/ml。

将已知浓度的 λ -DNA (溶于进样缓冲液中, 终浓度为 1 ng/ μL) 进行萃取效率的测定实验。回收的 DNA 量 (收集池中的液体的 DNA 量) 与初始进样 DNA 量的比即为萃取效率。因为收集池中液滴的体积与液滴生成时初始液滴的体积不一样, 所以萃取的效率的计算还需考虑液滴的体积比, 采用公式(1)进行计算:

$$P = \frac{C_{\text{收集}} * V_{\text{收集}}}{C_{\text{产生}} * V_{\text{产生}}} \quad \text{公式(1)}$$

其中, P 代表萃取效率, 即 DNA 保留在收集液中的比例; $C_{\text{产生}}$ 、 $C_{\text{收集}}$ 分别代表在液滴生成区和收集池液滴 DNA 浓度; $V_{\text{产生}}$ 、 $V_{\text{收集}}$ 分别代表在液滴生成区和收集池液滴的体积。

2.2.5.3 PCR 扩增与电泳分离

萃取收集液进行芯片外 PCR 扩增, λ -DNA 引物序列为正向引物 5'-GCACAAGTCCGACAACCCTG-3' 和 反向引物 5'-TATTCGCATTACCCCTCAAGC-3', 产生 236bp 的目标片段[13]。HBV-DNA 引物序列分别为正向引物 5'-GACTCGTGGTGGACTTCTCTCA-3'和反向引物 5'-GAGGACAAACGGGCAACATACC-3', 产生 229bp 的目标片段[14]。

配制的 PCR 反应液 25 μL 包括 1x PCR 缓冲液, 0.2 mM dNTP, 0.5 mM 正、反向引物, 80 unit/mL Ex-Taq DNA 聚合酶和 2 μL 收集液。PCR 扩增在商品化的热循环仪 ABI2700 上进行。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 分钟, 然后进行 30 个循环, 包括变性 (95 $^{\circ}\text{C}$) 30 秒、退火 (λ -DNA 54 $^{\circ}\text{C}$, HBV-DNA 56 $^{\circ}\text{C}$) 30 秒、延伸 (72 $^{\circ}\text{C}$) 30 秒, 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 后延伸 10 分钟。利用自行搭建的激光诱导荧光检测系统以及自制的聚甲基丙烯酸甲酯 (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 μM GeneFinderTM 荧光染料。检测场强为 200 V/cm, 检测有效距离为 3.5 cm。

2.3 结果与讨论

2.3.1 芯片设计

SPE 主要包括 DNA 与磁珠的结合、杂质的清洗以及 DNA 的洗脱三个步骤, 在每个步骤中都有试剂的添加和废液的去掉过程。本实验中, 首先在线生成连续、稳定的液滴, 然后将液滴分裂过程用于液滴 SPE 废液的去掉, 将溶液添加过程用于向液滴中添加 SPE 反应液。通过各液滴操控单元的灵活组合, 实现在线连续的液滴操控过程, 用于快速的液滴 SPE。期间, 合理安排磁铁的位置进行 SPE 固相介质即磁珠的操控。下面将从各液滴操控单元分别加以说明。

2.3.1.1 液滴生成单元的设计

选用流动聚焦法生成液滴, 这种方法对液滴生成的体积操控性更强。具体芯片尺寸见图 2-2。采用该设计生成液滴的过程如图 2-6 所示: 当两个水相分别从各自的进样通道注入芯片时, 在两个水相中间形成一个界面。两水相

以并行的方式进入水、油通道交汇处并形成水油界面。随着液流的继续流动，水相进入主通道内，在界面张力作用下形成一个尖端；在因油相流动而形成的剪切力及随后产生的压力梯度的作用下，水相尖端向主通道方向延伸，交汇处的水相不断变薄；最后，水相断裂形成一个液滴。

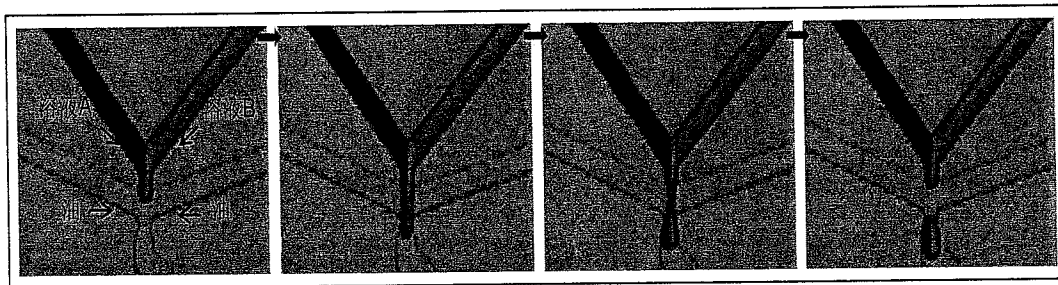


图 2-6 液滴生成过程图。

Fig. 2-6 A series of photographs of the droplet formation process.

2.3.1.2 废液去除单元的设计

液滴分裂单元可用于液滴SPE废液的去除。液滴分裂一般通过“T”型通道实现，可产生多个包含相同组成的液滴，它们的体积比取决于各支路通道的流阻[15, 16]。我们设计了含三个液滴分裂单元的芯片用于SPE过程中废液的排放，不同的液滴分裂单元产生的反压会互相干扰，破坏液滴分裂的稳定性，因此在我们的芯片设计中，将“T”型通道下游的各支路通道用较细的通道组连通，如图2-7（a）所示，通过优化芯片设计使细通道两端压力近似相等，减少来自其它液滴操控单元对分裂单元的影响。设计“T”型结构至细通道组之间的距离比（即 $L_1:L_2$ ，本文为1:3.75），就可得到一定的支路通道流阻比，使液滴按照一定的比例分裂，如图2-7（b）所示。另外需要说明的是，为促进液滴的分裂，“T”型结构处的通道由 $80\ \mu\text{m}$ 减小为 $60\ \mu\text{m}$ 。细通

道组中间用宽的通道连通，用于存放系统稳定前废液的存放。

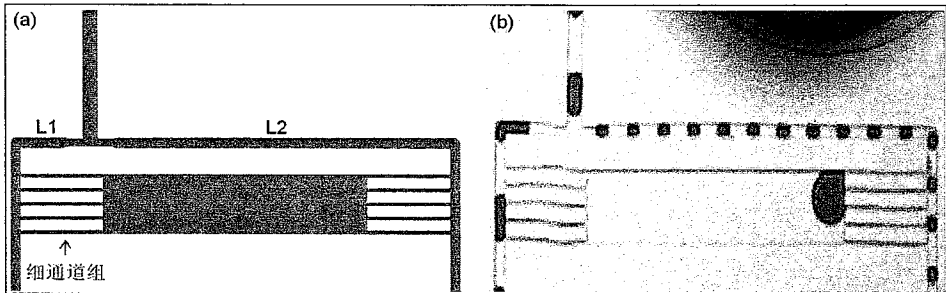


图2-7 液滴分裂单元 (a) 设计图；(b) 实物图。

Fig. 2-7 Schematic (a) and photograph (b) of droplet splitting unit.

2.3.1.3 反应液添加单元的设计

SPE 实验过程中，多次涉及溶液的添加。目前向液滴中添加溶液的方式分为液滴融合[17-19]和溶液添加[20, 21]两种。本论文采用简单的溶液添加法，其溶液添加过程如图 2-8 所示：液滴经过“T”型溶液添加通道时，与添加的溶液融合；在油/水相的推动下，液滴继续向前移动，添加的溶液越来越多；最后，在油相剪切力等作用下，添加溶液断裂，产生含新组分的液滴。期间，要优化添加溶液的流速，避免新液滴的产生。

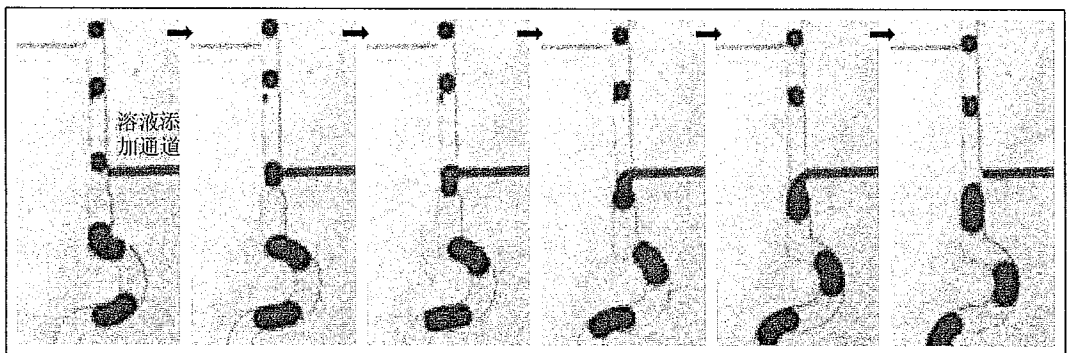


图 2-8 溶液添加过程。

Fig. 2-8 A series of photograph of reagent addition process.

液滴分裂单元中，伴随着液滴的分裂，液滴间的油相也分裂进入两分支通道中，且油相分裂比例由液滴分裂比例决定，甚至等同于液滴分裂比例。这就导致液滴间距变小，不利于后续溶液添加等操作。所以，我们在溶液添加单元前增加了一个油相添加通道。使用“H”型的油相添加通道向液滴分裂单元的两分支通道同时添加油相，避免了向单分支通道添加油相造成的压力差。如图 2-9 所示，油相成功的加入液滴间，而没有造成液滴的断裂。

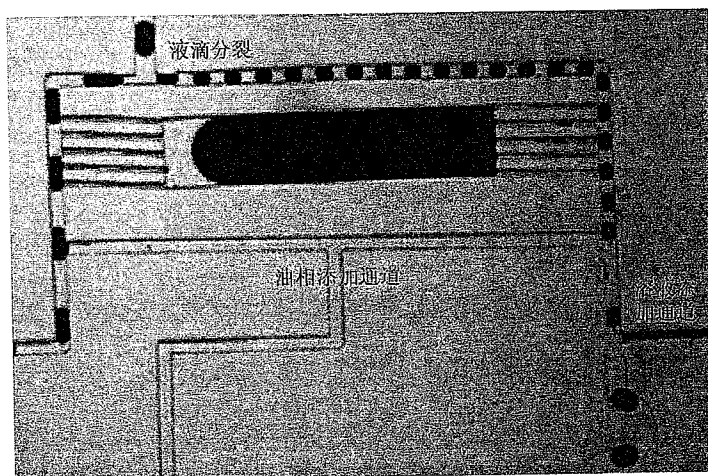


图 2-9 油相的添加。

Fig. 2-9 Additional oil phase was added into the carrier fluid.

在液滴生成单元和溶液添加单元都会产生新液滴或含有新组分的液滴，液滴的各组分需要进行有效的混合从而提高反应的效率、缩短反应的时间。常用的液滴混合方法，也为本实验所采用，是让液滴通过一段迂迴型的通道，加快混合的速度，如图 2-10 所示。