

图 5-6 Baclofen 微流控芯片手性拆分谱图。A, 加拿大芯片; B, 自制玻璃芯片

Fig. 5-6 Electrophoregrams of Baclofen enantiomers on microfluidic glass chips. A, glass chip purchased from Canada; B, home-made glass chip.

5.4 结论

本实验室独立研究并开发出玻璃微流控芯片整套制作工艺,可以根据不同需求,自行设计并快速制备出具有不同结构和功能的玻璃芯片。自制的玻璃微流控芯片重复性较好,表面性质稳定,使用寿命较长,各项指标与国际先进水平相当,其性能价格比则显示出明显优势。

参考文献

- [1] do Lago CL, Neves CA, Pereira de Jesus D, da Silva HD, Brito-Neto JG, Fracassi da Silva JA., Microfluidic devices obtained by thermal toner transferring on glass substrate. *Electrophoresis* 2004, 25, 3825-3831.
- [2] Li C, Lee KH., Affinity depletion of albumin from human cerebrospinal fluid using Cibacron-blue-3G-A-derivatized photopatterned copolymer in a microfluidic device. *Anal Biochem.* 2004, 333, 381-388.
- [3] Qu H, Wang H, Huang Y, Zhong W, Lu H, Kong J, Yang P, Liu B., Stable microstructured network for protein patterning on a plastic microfluidic channel:

strategy and characterization of on-chip enzyme microreactors. *Anal Chem.* 2004, 76, 6426-6433.

[4] Evenhuis CJ, Guijt RM, Macka M, Haddad PR., Determination of inorganic ions using microfluidic devices. *Electrophoresis.* 2004, 25, 3602-3624.

[5] Kan CW, Fredlake CP, Doherty EA, Barron AE., DNA sequencing and genotyping in miniaturized electrophoresis systems. *Electrophoresis.* 2004, 25, 3564-3588.

[6] Mogensen KB, Klank H, Kutter JP., Recent developments in detection for microfluidic systems. *Electrophoresis.* 2004, 25, 3498-3512.

[7] Cratree, H. J., Cheong, E. C. S., Tilroe, D. A., Backhouse, C. J., Microchip Injection and Separation Anomalies Due to Pressure Effects. *Anal. Chem.* 2001. 73. 4079-4086.

第六章 玻璃微流控芯片中超低粘度筛分介质研究

6.1 引言

微流控芯片电泳和毛细管电泳均以电渗流为主要驱动力,根据粒子在电场作用下的表观淌度差异进行分离,因此各种毛细管电泳分离技术很容易移植到玻璃芯片上进行。在微流控芯片电泳上进行 DNA 片段分离的工作是由 Woolley 等人首先完成的^[1]。此后,微流控芯片在 DNA 分析领域取得了显著进展,主要包括 PCR 产物分析^[2,3,4]、双链 DNA 片段分离^[1,5]、基因突变检测及 DNA 测序^[6,7]等。

尽管凝胶电泳柱最早被用于 DNA 筛分,但由于凝胶电泳柱的制备需要较长的时间,并且要求操作者具有相当的经验,同时凝胶毛细管柱还很容易产生气泡,使用寿命较短,因此越来越多的人倾向于使用高分子溶液,如:聚氧乙烯^[8],纤维素及其衍生物^[9],线性聚丙烯酰胺^[10],以及 PVP^[11]等。

虽然目前仍没有一个完整的理论对 DNA 分子筛分机制进行解释,很难对 DNA 片段在筛分介质中的分离情况进行预测^[12]。但是在总体上有如下经验规则:对于大片段的 DNA 分子(几千到几万碱基对),需要使用较稀的筛分介质溶液;对于小片段的 DNA 分子,特别是对于 PCR 产物长度范围内的 DNA 分子,常常需要较高的筛分剂浓度才能达到理想分离。这些高浓度的高分子溶液具有很大的粘度,需要很高的压力将其灌入毛细管中。由于在微流控芯片中很难直接对其通道施加很高的压力,往往需要特殊的接口,特别是某些芯片因为封接的原因承受不了较高的压力^[13],因此传统的高粘度的筛分介质难以应用于芯片电泳 DNA 分析中。同时,高粘度的筛分介质很容易粘附于电极和毛细管的内壁上,因此需要更多的时间对其进行清洗。此外,微流控芯片的分离微通道比较窄,因此在使用这些筛分试剂时要特别注意,以防通道堵塞。

基于交缠高分子溶液理论^[14],我们很容易理解分子量相对较小的高分子会形成具有较小网孔和较低粘度的筛分介质。但由于它们的分离效能较差,这些

相对较低分子量的高分子在毛细管电泳,特别是在微流控芯片筛分 DNA 中的使用很少。我们实验室曾经发展了一种 DNA 筛分介质,它的粘度和水的粘度在同一个数量级 (5.7 cp),为微流控芯片电泳分离 DNA 片段提供了理想的选择^[15]。我们将这种低粘度的羟丙基甲基纤维素首次应用到玻璃芯片上,以葡萄糖为添加剂,研究了添加剂对该筛分介质分离性能的影响,在几分钟内即可完成微流控芯片上 PBR322/Hae III DNA 标准片段的基线分离。同时,由于该介质粘度很低,使得实验中灌柱和冲洗十分容易,简化了整个实验操作,在很大程度上避免了柱子堵塞现象的发生。

6.2 实验部分

6.2.1 试剂与样品

不同分子量的羟丙基甲基纤维素 (HPMC-5, HPMC-50, HPMC-4000, 该物质的 2% 的水溶液在 25℃ 时的粘度分别为 5 cp, 50 cp 和 4000cp) 购自 Aldrich (Milwaukee, WI, USA)。HPMC-100 (其 2% 水溶液在 25℃ 时的粘度分别为 100cp) 购自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。DNA 标准片段 PBR322/Hae III 也购自 Sigma 公司。该 DNA 标准片段含有长为 8, 11, 18, 21, 51, 57, 64, 80, 89, 109, 123/124, 184, 192, 213, 234, 367, 434, 458, 504 和 540 bp 共 22 个片段。另外一个 DNA 标准样品 ϕ X174/ HaeIII DNA 购自 Takara Biotechnology Co. Ltd. (Dalian, China), 共有 11 个标准片段, 分别为 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, and 1353 bp。所有 DNA 标准片段样品均用去离子水稀释至浓度为 5-20 μ g/ml, 并且放置在 -20℃ 的冰箱中备用。实验中用于 DNA 样品非共价标记的嵌入式染料 Sytox Orange (ABS_{max}: 547 nm, EM_{max}: 570 nm^[16]) 购自 Molecular Probes (Eugene, OR)。实验中所用溶液均为二次水配制, 其它试剂均为国产分析纯。

6.2.2 样品衍生

首先用 0.1 × TBE 将染料 Sytox Orange 储藏液稀释到 10⁻⁵ M, 然后根据实验需要, 用同一缓冲液将其稀释到适当的浓度。向该溶液中加入足量的双链 DNA 溶液, 使染料的最终浓度在 0.1 – 1 μ M 之间, 在暗处反应半小时。

6.2.3 微流控芯片及电泳分析条件

实验中所用的玻璃微流控芯片购自Micalyne公司。玻璃芯片的结构如图6-1所示,孔1是缓冲液池,孔2是样品池,孔3是缓冲液废液池,孔4是样品废液池。芯片的分离通道长8.5 cm(从缓冲液池至十字交叉处为0.5 cm,从十字交叉处至分离废液池为8.0 cm),进样通道长为1.0cm(从样品池至十字交叉处和从十字交叉处至样品废液池均为0.5 cm),通道的横截面近似为半椭圆形,上宽为50 μm ,检测点距十字交叉处为3.5 cm。芯片通道内壁用聚丙烯酰胺进行涂层,以减少样品吸附和消除电渗流对分离的影响。聚丙烯酰胺涂层的制备借鉴了 Hjerten 的方法^[17],并加以改进。首先将芯片通道用 1M 的NaOH溶液和 1M 的盐酸冲洗各约 0.5 小时,再用水冲洗 5 分钟至中性,然后用甲醇冲洗约 10 分钟,再将通道中充满 MAPS 的甲醇溶液。将通道的两端密封后在室温下放置约15小时,经甲醇和水分别冲洗后,灌入丙烯酰胺反应溶液在室温下进行反应,时间约为2—3个小时,然后用二次水冲出反应溶液,再用氮气将通道吹干后备用。

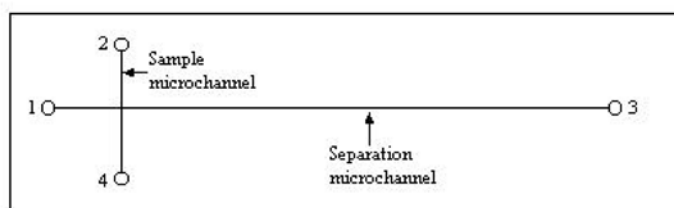


图 6-1 微流控芯片机构示意图, B)实验中芯片各个缓冲池所加电压

Fig. 6-1 Schematic diagram of the electrophoresis microchip, B) applied injection and separation voltages.

所有实验均在Micalyne Microfluidic Tool Kit (Micalyne Inc., Edmonton, AB, Canada)激光诱导荧光仪器上进行^[18]。激光的激发波长为532 nm (5 mW),检测波长为570 nm。背景电解质为0.1M Tris-0.1 M Boric acid-2mM EDTA,在 高分子溶液中还加入0%-12% (w/v) 的葡萄糖以研究葡萄糖对分离的影响及确定最佳的葡萄糖浓度。在搅拌的同时将称量好的高分子加入一定体积的背景电解质溶液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置,直到羟丙基甲基纤维素完全溶解,整个高分子溶液呈均一的透

明状。所有缓冲液在使用前用 $0.22\ \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤。筛分试剂的粘度数据为使用毛细管粘度计在 30°C 测量得到。

每次运行后, 需要将芯片通道分别用水、缓冲液和筛分试剂进行冲洗。冲洗时间视筛分试剂的粘度大小从1分钟到6分钟不等。在进样过程中, 将样品池 (2) 接地, 施加 $360\ \text{V}$ 电压于样品废液池 (4), 缓冲液池 (1) 和缓冲废液池 (3) 分别施加 $180\ \text{V}$ 电压, 进样时间为 $30\ \text{s}$ 。在分离过程中, 缓冲液池 (1) 接地, 样品池 (2) 和样品废液池 (4) 分别施加 $280\ \text{V}$ 电压, 在缓冲废液池 (3) 上施加 $1.8\ \text{KV}$ 电压 (如表8-1所示)。

表 6-1 实验中芯片各个缓冲池所加电压

Table 6-1 Applied injection and separation voltages in the study.

Reservoir position	1	2	3	4
Injection voltage (V)	180	0	180	360
Separation voltage	0	280	1800	280

6.3 结果与讨论

6.3.1 葡萄糖添加剂的影响

以 DNA 标准样品 PBR322/HaeIII 为分离对象, 以四种不同分子量的羟丙基甲基纤维素溶液为筛分介质, 对它们在微流控芯片电泳中的筛分性能进行了比较。与传统毛细管实验结果类似, 较大片段的 DNA 分子比较容易被分离, 而较小片段的 DNA 分子则需使用较高浓度的筛分介质。对于 HPMC-50, HPMC-100 和 HPMC-4000 三种高分子来说, 能够达到满意分离度的高分子浓度均不超过 2% , 而对于 HPMC-5, 即使浓度达到 4% 也不能有效分离 DNA 标准片段 (图 6-2)。

Han 等人曾研究了甘露醇对纤维素筛分体系的分离性能的影响^[15]。因为甘露醇、硼酸和羟丙基甲基纤维素分子间可以借助于四硼酸络合物形成桥键, 进而可以改变高分子溶液中的网孔的大小与分布, 从而提高对 DNA 片段的筛分效果。与甘露醇同样具有多羟基结构的葡萄糖被发现也可以提高纤维素筛分体系的筛分能力。将不同浓度 ($0\text{-}12\%$; W/V) 的葡萄糖加入到 2% HPMC-5 溶液中,

可以看到 HPMC-5 体系对 DNA 片段的筛分性能得以显著提高(图 6-3)。实验发现在 2%HPMC 体系中加入 6%的葡萄糖添加剂为最佳分离条件, PBR322/HaeII DNA 标准片段基本达到基线分离(除了 123/124 bp 两个峰重叠外), 分离效果与高分子量的 HPMC 体系(未加葡萄糖添加剂)相近。值得注意的是, 在微流控中完成整个分离只需要 200 秒, 而在传统毛细管电泳中完成相同 DNA 片段的分离大约需要 27 分钟^[15], 约是芯片电泳分离所需时间的 8 倍。

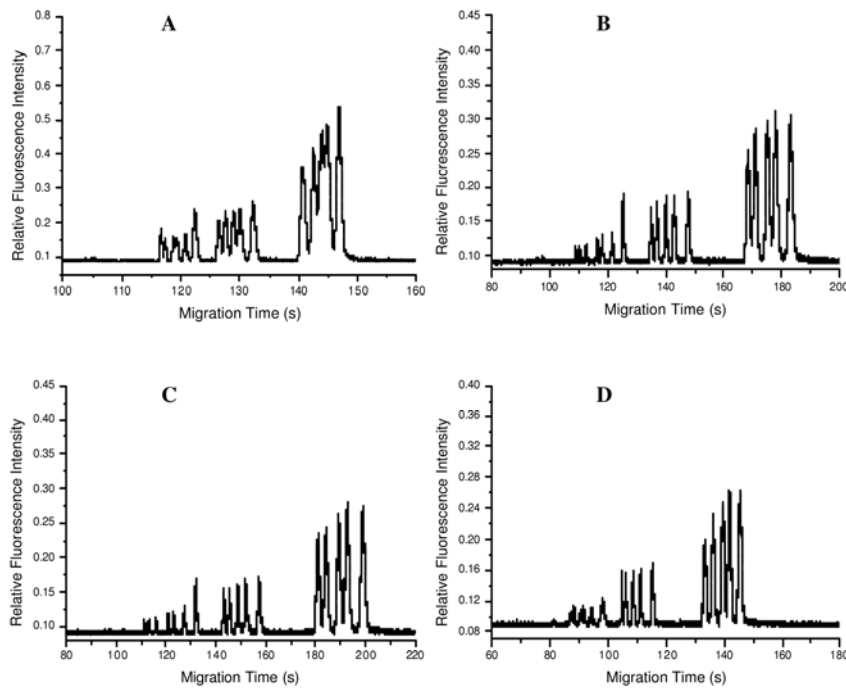


图 6-2 PBR322/*Hae*III DNA 标准片段在不同筛分介质中的芯片电泳分离图 A) 2% HPMC-5, B) 1.8% HPMC-50, C) 1.4% HPMC-100, D) 0.8 % HPMC-4000, 背景缓冲液为 $1 \times$ TBE buffer。分离条件: 有效分离长度为 3.5 cm, 场强为 200V/cm, 样品为 PBR322/*Hae*III DNA 标准片段 (5 ng/ul)。
Fig. 6-2 Electropherograms of the PBR322/*Hae*III DNA marker in different sieving matrices. A) 2% HPMC-5, B) 1.8% HPMC-50, C) 1.4% HPMC-100, D) 0.8 % HPMC-4000 in $1 \times$ TBE buffer. Separation conditions: effective separation length, 3.5 cm; applied electric field strength, 200V/cm; sample, PBR322/*Hae*III DNA marker (5 ng/ul).

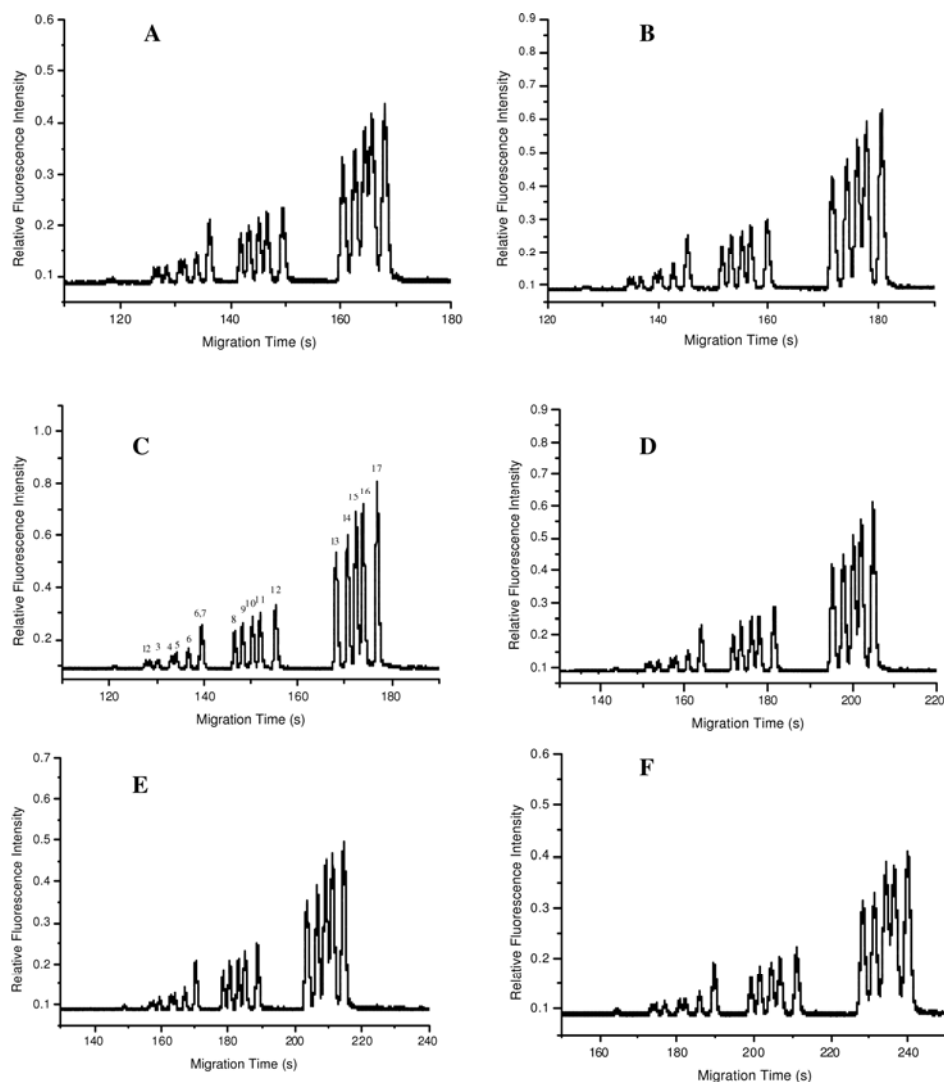


图 6-3 PBR322/HaeIII DNA 标准片段在 2% HPMC-5 + 不同浓度葡萄糖筛分介质中的芯片电泳分离图 A) 2%, B) 4%, C) 6%, D) 8%, E) 10%, F) 12% 葡萄糖。峰分别为: (1) 51, (2) 57, (3) 64, (4) 80, (5) 89, (6) 109, (7) 123/124, (8) 184, (9) 192, (10) 213, (11) 234, (12) 267, (13) 434, (14) 458, (15) 504, (16) 540, and (17) 587 bp. 其它分离条件同图 6-2。

Fig. 6-3 Electropherograms of the PBR322/HaeIII DNA marker in 2% HPMC-5 solution at different glucose concentrations: A) 2%, B) 4%, C) 6%, D) 8%, E) 10%, F) 12% glucose. Other separation conditions were the same as in Fig 6-2.

在实验中我们发现较高分子量的羟甲基纤维素筛分剂（HPMC-50，HPMC-100，HPMC-4000）粘度较大，因此需要更长的时间才能将筛分剂灌入芯片通道内，而且很容易粘附到电极和通道内壁，需要花费较长的时间进行清洗。此外我们还发现，使用高粘度的筛分介质时，在操作过程中要十分小心，由于芯片通道比较窄（一般在 50-150 μm 之间），因此特别容易造成通道堵塞，给清洗和操作造成很大的麻烦。而 HPMC-5 筛分介质的粘度与水的粘度相当（在 30 $^{\circ}\text{C}$ 时，水和 2%HPMC-5 + 6%葡萄糖的粘度分别为 0.8007 和 5.8 cp），因此对灌柱和清洗都十分方便，易于操作，是微流控芯片和阵列微流控芯片中 DNA 筛分的理想介质。

6.3.2 染料浓度的影响

在前面的实验中，我们采用了 0.5 μM 的染料 SyTox Orange（最终浓度）对样品进行标记，而在研究中发现染料的浓度对 DNA 的分离也有一定的影响。图 6-4 是不同染料浓度下 DNA 片段迁移时间的变化。虽然染料分子带正电，它与 DNA 结合产物的荷质比会随着染料浓度的增加而有所增加，造成 DNA 片段的迁移时间略有增加，但从图 6-4 可以看出，这种影响并不十分明显，几乎可以忽略。

图 6-5 显示了在不同染料浓度下不同 DNA 片段 80/89，184/192，和 504/540 bp 的分离度。分离度数值根据式 6-1 计算而得。其中 R 是分离度， t_1 、 t_2 分别代表两个片段的迁移时间， $W_{1,0.5}$ 、 $W_{2,0.5}$ 代表两个峰的半峰宽。在所研究的染料浓度范围内（0.1 – 1 μM ），没有发现染料有明显的自淬灭效应，这说明该染料对 DNA 分子碱基数和染料分子数的配比没有特别严格的要求，浓度适用范围较宽。当染料浓度为 0.5 μM 时，DNA 片段的分离比较好，因此在整个实验中选择 0.5 μM 为染料的标记浓度。值得注意的是，在此浓度下 DNA 分子碱基数和染料分子数的比例为 15:1（DNA 片段的最终浓度为 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ），这与 Guttman 小组的报导有差异，在他们的实验中，DNA 分子碱基数和染料分子数的比例为 1:1^[5]。

$$R = \frac{1.18(t_2 - t_1)}{(W_{1,0.5} + W_{2,0.5})} \quad (6-1)$$

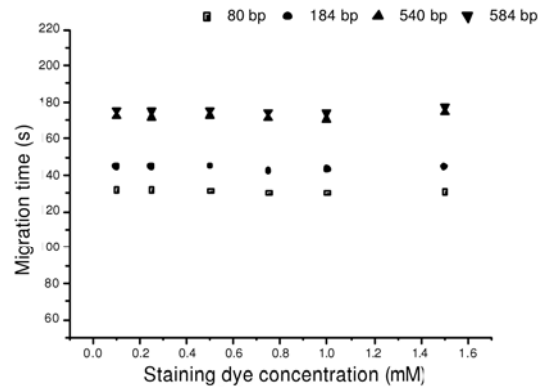


图 6-4 染料浓度对 DNA 标准片段迁移速率的影响

Fig. 6-4 Effect of the staining dye concentration on migration time of the 80, 184, 540 and 584 bp DNA fragments. Other separation conditions were the same as in Figure 6-2.

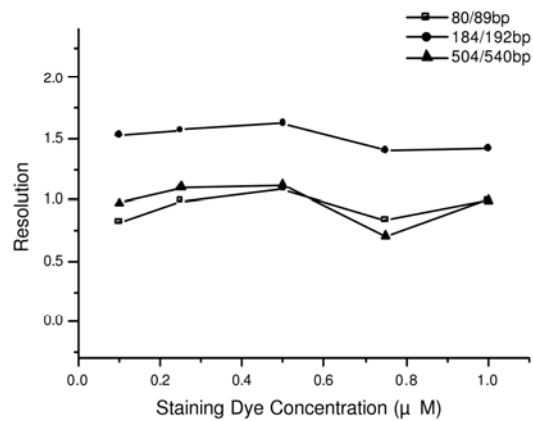


图 6-5 染料浓度对 DNA 片段 (80/89, 184/192, 和 504/540 bp) 分离的影响
Fig. 6-5 Effect of the staining dye concentration on the resolution of the 80/89, 184/192, and 504/540 fragment base pairs. Other separation conditions were the same as in Fig. 6-2.

6.3.3 筛分介质浓度的影响

图 6-6 为含有 6% 葡萄糖的羟丙基甲基纤维素 (HPMC-5) 筛分试剂对不同

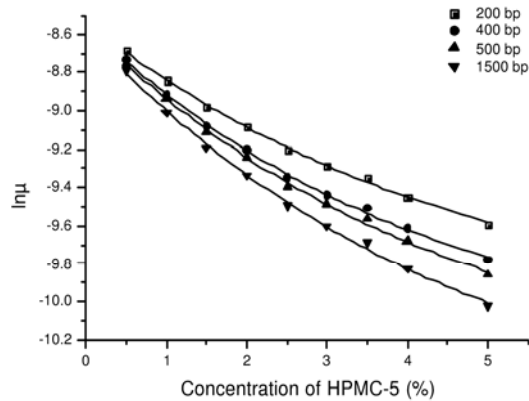


图 6-6 筛分介质浓度对 DNA 片段 (200, 400, 500, and 1500 bp) 分离的影响
样品: 100 bp DNA ladder (5 ng/ul), 其他条件同图 6-2。

Fig. 6-6 Ferguson plots of the separation of dsDNA fragments (200, 400, 500, and 1500 bp) on the electrophoresis microchip. Sample, 100 bp DNA ladder (5 ng/ul). Other separation conditions were the same as in Fig. 6-2.

DNA 片段的 Ferguson 图。从图中我们可以看出, 对于所研究的 4 个 DNA 片段, 其 Ferguson 曲线具有相似的形状。该结果同样预示着在所采用的分离条件下, 对这些 DNA 片段的分离机理相同。这也是 DNA 分子的迁移时间与片段长度成正比的原因。图中的 Ferguson 曲线并非线性, 这与 Schwartz 等人^[19]的观察结果不相符合, 他们在工作中发现, 在没有筛分剂存在的情况下, 不同大小的 DNA 分子仍然可以有一定的分离, 我们的实验表明, 当筛分剂的浓度为 0 时, 所有的 DNA 片段将共同迁移。

6.3.4 电场强度的影响

根据 Biased Reptation 模型, 卷曲状的 DNA 分子在高电场强度时会沿电场方向伸展, 其分子构型会发生较大的变化^[20]。我们对电场强度的影响研究结果与此理论的假设不一致。图 6-7 所示为 80, 184, 434 和 587 bp 四个 DNA 片段的迁移时间随电场强度的变化情况。对图中的曲线进行回归分析发现, DNA 片段的迁移时间与电场强度呈反比关系。当我们以迁移时间的倒数对电场强度做图, 可以得到非常好的线性关系, 其线性相关系数为 0.9990 以上。它们的这种

关系可以如式 6-2 所示:

$$1/t = K_1E + K_2 \quad (6-2)$$

其中 t 是 DNA 片段的迁移时间; K_1 是与 DNA 片段大小相关的常数; K_2 是与筛分体系 (分离温度, 毛细管内径, 筛分试剂等) 有关的常数; E 是电场强度。DNA 片段的淌度可以如下式表:

$$\mu = L/(tE) \quad (6-3)$$

其中 μ 是淌度, L 是毛细管柱的有效分离长度。从式 6-2, 6-3 可以推出式 6-4:

$$\mu = K_1L + K_2L/E = \mu_0 + K_2L/E \quad (6-4)$$

其中 μ_0 可以被理解为该 DNA 分子在此筛分试剂中可以达到的最大淌度, 因为 K_2 在实验所进行的条件下为一个负值。 μ_0 可以通过实验方法得到。将迁移时间的倒数对电场强度做图, 其直线的斜率和毛细管柱有效长度的乘积即为 μ_0 值。对式 6-4 进行微分处理可以得到式 6-5:

$$d\mu/dE = -K_2L/E^2 \quad (6-5)$$

式 6-5 表示 DNA 片段的淌度随电场的变化率与电场强度的二次方成反比。从我们的实验数据结果看, $d\mu/dE$ 是一个很小的数值 (近乎为 0) 的数值。该结果说明电场强度的变化对 DNA 分子淌度的影响甚微。

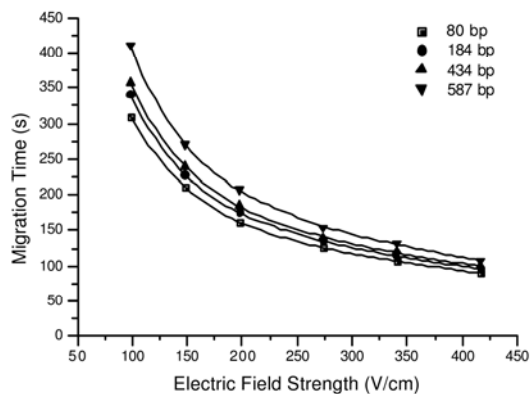


图 6-7 电场强度对 DNA 片段 (80, 184, 434, 587 bp) 迁移的影响

Fig. 6-7 Electric field influence on the migration of DNA fragments (80, 184, 434, 587 bp). Other separation conditions were the same as in Fig. 6-2.

同时我们还考察了电场强度对 DNA 片段的分离度的影响。图 6-8 是 80/89, 184/192 以及 540/587 三对 DNA 片段的分离度随电场强度的变化情况。该图显示在电场强度从 100 V/cm 到 250 V/cm 变化时, DNA 片段的分离度略有增加, 但变化并不明显; 当电场强度从 250V/cm 增大到 420V/cm 时, 可能是焦耳热引起谱带展宽的原因, 分离度略有降低。因此, 应在焦耳热的影响不大的前提下, 尽可能选用较高的电场强度进行快速分离。

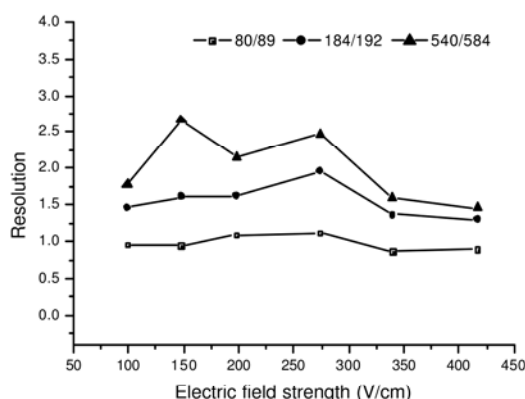


图 6-8 电场强度对 DNA 片段(80/89, 184/192, 和 540/584 bp)的分离度的影响

Fig. 6-8 Effect of electric field on the resolution of DNA fragments (80/89, 184/192, and 540/584 bp).

6.3.5 PCR 产物的芯片毛细管电泳分析

正如前面所述, 微流控芯片相对与毛细管电泳和平板电泳来说, 可以大大缩短分析时间。微流控芯片可以将样品前处理、分离、检测、衍生等操作单元集成在几平方厘米的芯片上完成, 易于实现集成化、微型化, 而且在同一片芯片上蚀刻多条微通道同时进行检测, 可以极大的提高分析通量和降低分析成本, 因此特别适合用于临床任务较大的各种病毒 PCR 产物检测。图 6-9 就是 PCR 产物在玻璃芯片上, 采用超低粘度筛分介质所得到的电泳谱图。样品是临床常见的结核杆菌 (tuberculosis), 样品经 PCR 扩增后, 没有经过脱盐处理, 直接稀释 100 倍后, 与 ϕ X174/HaeIII DNA 标准片段(8 ng/ μ L)混合后, 经嵌入式染料 Sytox

Orange 标记后进行芯片电泳分析。筛分介质为 2% HPMC-5 + 6% 葡萄糖，有效分离长度为 4.5 cm。PCR 产物和 ϕ X174/HaeIII DNA 标准片段混合电泳可以减少不同次电泳运行中分离条件差异所引起的迁移速度差异。值得注意的是，完成芯片毛细管电泳的 PCR 产物分析只需要大约 260 秒，要比传统的毛细管电泳（一般为十几到几十分钟）和平板电泳（一般为几个小时）快的多。

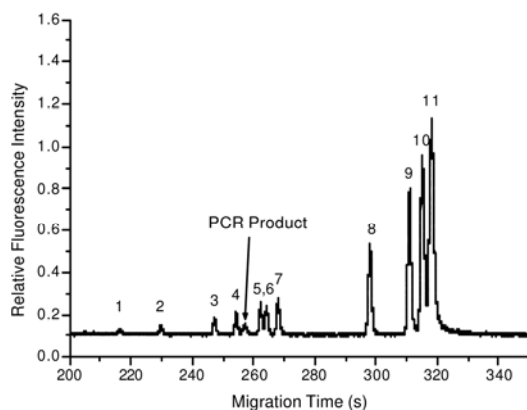


图 6-9 结核杆菌 PCR 产物和 ϕ X174/HaeIII DNA 标准片段的芯片电泳图峰分别为：(1) 72, (2) 118, (3) 194, (4) 234, (5) 271, (6)281, (7) 310, (8) 603, (9) 872, (10) 1078, and (11) 1353 bp。其他条件同图 6-2。

Fig. 6-9 Electropherogram of tuberculosis PCR product mixed with ϕ X174/HaeIII DNA marker. Peak identification: (1) 72, (2) 118, (3) 194, (4) 234, (5) 271, (6)281, (7) 310, (8) 603, (9) 872, (10) 1078, and (11) 1353 bp. Other conditions were the same as in Fig 6-2.

6.4 结论

和常规的高分子筛分介质相比，超低粘度羟丙基甲基纤维素具有粘度低的特点（和水的粘度在同一个数量级上，2%时粘度为 5.7 cp），特别适用于微流控芯片体系，易于微通道的冲洗和缓冲液灌入，使整个实验操作过程简便而快捷。葡萄糖可以显著的增加羟丙基甲基纤维素对双链 DNA 的筛分能力。实验结果显示，加入 6%的葡萄糖后，2% HPMC-5 的筛分能力就可以与高分子量的 HPMC

相当。对染料浓度的考察发现, 0.5 μM 染料的标记效率及对分离效率的影响均比较好。实验结果也显示, 电场强度的变化对 DNA 片段淌度的影响并不大, 这说明在所研究的场强范围内, DNA 分子的构型并没有发生明显的改变。通过结核杆菌 PCR 产物和 $\phi\text{X174}/\text{HaeIII}$ DNA 标准片段的混合电泳, 表明该超低粘度筛分体系可用于 PCR 产物在微流控芯片中的快速检测。

参考文献

- [1] Woolley, A. T., Mathies, R. A., Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91, 11348-11352.
- [2] Medintz, I., Wong, W. W., Berti, L., Shiow, L., et al. High-performance multiplex SNP analysis of three hemochromatosis-related mutations with capillary array electrophoresis microplates. *Genome, Res.* 2001, 11, 413-421.
- [3] Cantafora, A., Blotta, I., Bruzzese, N., Calandra, S., Bertolini, S. Rapid sizing of microsatellite alleles by gel electrophoresis on microfabricated channels: application to the D19S394 tetranucleotide repeat for cosegregation study of familial hypercholesterolemia. *Electrophoresis* 2001, 22, 4012-4015.
- [4] Gottwald, E., Muller, O., Polten, A. Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction with the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Electrophoresis* 2001, 22, 4016-4022.
- [5] Ronai, Z., Barta, C., Sasvari-Szekely, M., Guttman, A. DNA analysis on electrophoretic microchips: effect of operational variables. *Electrophoresis* 2001, 22, 294-299.
- [6] Medintz, I. L., Paegel, B. M., Blazej, R. G., Emrich, C. A., et al. High-performance genetic analysis using microfabricated capillary array electrophoresis microplates. *Electrophoresis* 2001, 22, 3845-3856.
- [7] Backhouse, C., Caamano, M., Oaks, F., Nordman, E., et al. DNA sequencing in a monolithic microchannel device. *Electrophoresis* 2000, 21, 150-156.
- [8] Zhang, N., Yeung, E. S. Simultaneous separation and genetic typing of four short tandem repeat loci by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1997, 768, 135-141.

- [9] Barron, A. E., Sunada, W. M., Blanch, H. W. The effects of polymer properties on DNA separations by capillary electrophoresis in uncross-linked polymer solutions. *Electrophoresis* 1996, 17, 744-757.
- [10] Ruiz-Martinez, M. C., Salas-Solano, O., Carrilho, E., Kotler, L., Karger, B. L. A Sample Purification Method for Rugged and High-Performance DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis Using Replacable Polymer Solutions. A. Development of the Cleanup Protocol. *Anal. Chem.* 1998, 70, 1516-1527.
- [11] Gao, Q., Yeung, E. S. A Matrix for DNA Separation: Genotyping and Sequencing Using Poly(vinylpyrrolidone) Solution in Uncoated Capillaries. *Anal. Chem.* 1998, 70, 1382-1388.
- [12] Jin, Y., Lin, B. C., Fung, Y. S., A Collision Model for DNA Separation by Capillary Electrophoresis in Dilute Polymer Solution. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 2001, 370, 1015-1022.
- [13] Buchholz, B. A., Doherty, E. A., Albarghouthi, M. N., Bogdan, F. M., et al. Microchannel DNA Sequencing Matrices with a Thermally Controlled "Viscosity Switch". *Anal. Chem.* 2001, 73, 157-164.
- [14] Grossman, P.D., Soane, D.S., Experimental and theoretical studies of DNA separations by capillary electrophoresis in entangled polymer solutions. *Biopolymers*, 1991, 31, 1221-1229.
- [15] Han, F. T., Huynh, B. H., Ma, Y. F., Lin, B. C. High-Efficiency DNA Separation by Capillary Electrophoresis in a Polymer Solution with Ultralow Viscosity. *Anal. Chem.* 1999, 71, 2385-2389.
- [16] Haugland, R. P., *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes Inc., Eugene, OR 1999.
- [17] Hjerten, S., High-performance electrophoresis : Elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *J. Chromatogr.*, 1985, 347, 191
- [18] Cratree, H. J., Cheong, E. C. S., Tilroe, D. A., Backhouse, C. J., Microchip Injection and Separation Anomalies Due to Pressure Effects. *Anal. Chem.* 2001, 73, 4079-4086.
- [19] Schwartz, H. E., Ulfelder, K., Sunzeri, F.J., et al. Analysis of DNA restriction

fragments and polymerase chain reaction products towards detection of the AIDS (HIV-1) virus in blood. *J. Chromatogr.*, 1991, 559, 267.

[20] Lumpkin, Q. J., Dejardin, P., Zimm, B. H., Theory of gel electrophoresis of DNA. *Biopolymers*, 1985, 24, 1573-1593.

第七章 PMMA 微流控芯片及其动态改性研究

7.1 引言

相对于玻璃和石英而言, 聚合物可能是微流控芯片的理想替代材料。聚合物微流控芯片的制作过程相对简单, 费用也比较低, 可以一次性使用。各种制作技术如激光消融 (laser ablation)^[1], 复制 (replication)^[2], 注塑 (injection molding)^[3], 和压模 (imprinting)^[4]法等已经用于聚合物微流控芯片的制作。大量商品化的聚合物原料通过不同的制作技术被制作成微流控芯片, 主要包括聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane)^[5], 聚甲基丙烯酸甲酯 (polymethylmethacrylate)^[6,7], 聚酯 (polyester)^[2], 聚碳酸酯^[8], 聚对苯二甲酸乙二醇酯 (polyethylene terephthalate)^[9], Zeonor^[10]等。就聚合物微流控装置的应用而言, 双链 DNA 片段是用得最早的, 也是最成功的对象, 某些聚合物材质微流控芯片的分离效率和重复性甚至可以和玻璃及石英微流控芯片相比拟^[7,8,8]。此后, 各种集成操作也在聚合物微流控装置中逐渐得到实现, 包括在线 PCR 扩增^[11], 与质谱耦联^[10,12], 细胞操作^[13]等。

电渗流 (EOF) 是微流控装置中最主要的驱动力, 它主要是由微通道表面的性质所决定的。然而许多聚合物材料表面的性质并不是十分清楚, 这在一定程度上限制了聚合物材料在微流控装置中的应用。一些研究小组对由某些聚合物材料所制成的微流控装置中的 EOF 进行了测定^[2,14,15,16]。这些测定表明不同的聚合物微流控芯片中的 EOF 差别很大, 造成这种差异的主要原因可能是芯片的制作方法, 以及原料制造商在材料生产过程中所加入添加剂不同造成的。目前表面化学改性^[17,18], 多层聚合电解质吸附^[19,20], 激光消融^[18,21]等方法已被用于聚合物微流控芯片中, 以对电渗流进行调控。但是对于聚合物微流控芯片的表面性质目前仍缺乏全面的理解, 而且不同的研究小组对于微通道内表面性质存在不同的理解, 因此仍需对聚合物微流控芯片内表面性质进行详细的研究, 使其能成功的应用于生物分子的分离研究。

在这一章节中，我们通过动态改性的方法，在缓冲液中添加不同的表面活性剂，如十二烷基硫酸钠（SDS），十六烷基三甲基季胺氯（CTAB）和 Brij 35，对 PMMA 微流控芯片中的 EOF 进行调控，同时对动态改性时 EOF 和 pH 的关系进行了研究。采用动态改性法主要是因为该方法操作简单方便，易于实现。实验发现不同表面活性剂的浓度对 EOF 的大小和方向具有不同的影响。通过动态改性，可以对 PMMA 微流控芯片中的电渗流的大小和方向进行随意调控，根据分离对象的不同，选择合适的动态改性方法，以达到最佳的分离效果。

7.2 实验部分

7.2.1 试剂与样品

聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）（韩国产品）；50 微米厚 PMMA 膜（英国产品）。2205 型表面粗糙度测量仪（哈尔滨精密量仪有限责任公司）。罗丹明 B 和 SDS 购自 Sigma 公司（St. Louis, MO）。Brij 35 购自 Acros Organics 公司（Geel, Belgium）。CTAB 产自中国（上海化学试剂公司）。三羟甲基氨基甲烷（Tris, 国产分装），硼酸（开原化学试剂厂产品），EDTA（长春化学试剂厂产品），TAMRA(5(6)-carboxytetramethylrhodamine succinimide ester, 美国, Probes), 氨基酸标准品由德国 Tuebingen 大学提供，其余试剂均为分析纯。

7.2.2 PMMA 微流控芯片

实验中所用芯片为自制的注塑型 PMMA 微流控芯片，制作方法参照文献^[22]。具体制作工艺如图 7-1 和 7-2 所示。首先设计制作一个所需图形尺寸的掩膜；第二步，将单晶硅片表面氧化处理，再在上面均匀甩一层感光胶，将制备好的掩膜附在感光胶上，在强紫外光源下进行曝光，显影，刻蚀，除膜等工序，最后制成一块同掩膜图形尺寸相同的硅片；第三步，用上步制得的硅片为基板进行电铸，制得以镍为基材，尺寸同硅片完全相同，凸凹反转的母版模具，将该镍板经过精密机械加工后镶入设计制作的注塑模具中；最后用该模具通过注塑方法制得 PMMA 芯片基板。采用溶剂与热封接结合的方法，将制得的基板与 PMMA 薄膜封接在一起，即可得到 PMMA 芯片成品。

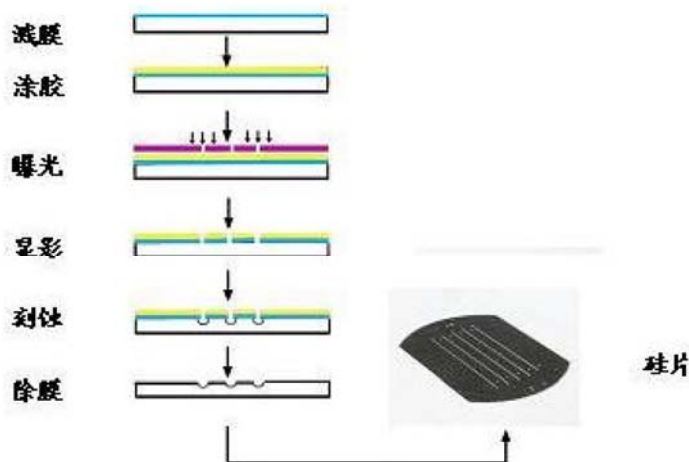


图 7-1 带有微通道结构的硅片蚀刻示意图

Fig 7-1. The illustration of the microfabrication of silicon chip with microchannels etched.

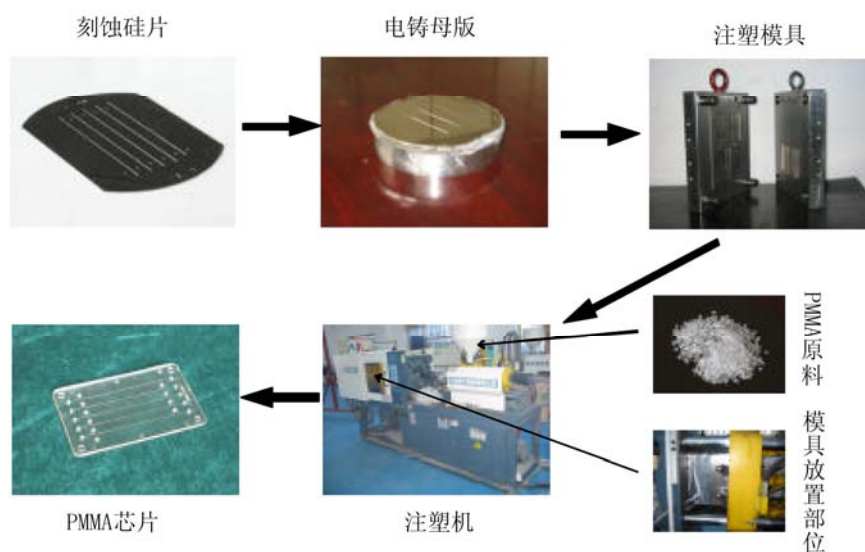


图 7-2 注塑型 PMMA 芯片制作流程图

Fig. 7-2 The layout of the microfabrication of hot-embossing PMMA microchip

PMMA 微流控芯片结构示意图如图 7-3 所示^[23,24]，具有简单的十字交叉结构，分离通道长 4.5 cm，进样通道长 1.0 cm，十字交叉处距离样品池，样品废液池，缓冲液池均为 0.5 cm。微通道横截面近似为梯形， $120\ \mu\text{m}$ （上顶） $\times 75$

μm (下底) \times $30\ \mu\text{m}$ (深)。刻有微通道的底板厚度为 $1.3\ \text{mm}$ ，盖板是同种材料厚度为 $0.05\ \text{mm}$ 的 PMMA 薄膜。每片芯片上并列分布着三条相同的微通道。新的 PMMA 微流控芯片在使用前应用大量二次水冲洗。

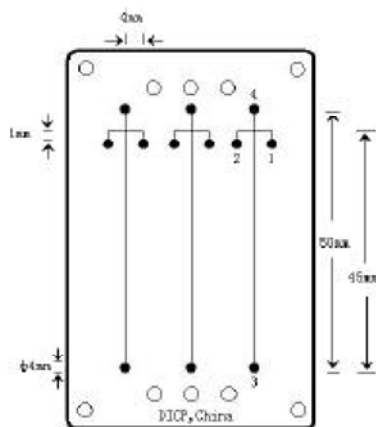


图 7-3 注塑型 PMMA 芯片设计图

Fig. 7-3 The sketch map of PMMA microchip

采用轮廓仪对 PMMA 芯片通道横截面进行测量，轮廓仪测量速度为 $1\ \text{mm/s}$ ，垂直放大比为 1000，标尺为 $10\ \mu\text{m}$ /格；水平放大比为 200，标尺为 $50\ \mu\text{m}$ /格。对封接前 PMMA 芯片通道内表面进行电镜扫描，考察其内壁刻蚀质量。

7.2.3 样品衍生

氨基酸标准品用 $100\ \text{mmol/L}$ 、 $\text{pH}\ 8.3$ 的碳酸钠缓冲液配制成 $5\ \text{mg/mL}$ 的溶液。TAMRA 溶于 DMF 中，配成约 $2 \times 10^{-3}\ \text{mol/L}$ 的溶液，取 $20\ \mu\text{L}$ 的氨基酸溶液与 $2\ \mu\text{L}$ 的 TAMRA 溶液混合，放置于暗处室温下反应半小时。电泳前将样品用分离缓冲液稀释至所需浓度。

7.2.4 电渗流的测定

微流控芯片中的电渗流是通过电流监测法进行测定的^[25]。电渗流测定中所用的缓冲液为 $10\ \text{mM}$ ， pH 在 3-9 之间的磷酸缓冲液，其中含有一种表面活性剂，如 SDS，CTAB，Brij 35，用 NaOH 调节溶液的 pH 值。将已稀释的缓冲液（原缓冲液：水为 2：1）加入到缓冲液池内，在废液池的一端施以真空，使已稀释的缓冲液充满分离通道。在废液池内也加入等量的已稀释的缓冲液，在分离通

道两端的缓冲池内插入铂金电极，铂金电极分别与高压电源相连。如果没有特殊说明，高压电源与插入缓冲池内的铂金电极相连，将废液池接地。施加 860 V 电压预电泳 10 min。然后将分离通道两端池内的缓冲液移出，向缓冲液池内加入未稀释的缓冲液，同时在废液池内加入等量的已稀释的缓冲液。在分离通道两端串联一个电阻，重新施加电压，记录串联电阻上电流达到平衡所需要的时间，即中性物质的迁移时间，由公式 7-1 就可以得出微通道内的电渗流大小和方向。

$$\mu_{eo} = L/Et \quad (7-1)$$

其中，L 是从缓冲液池到废液池的分离通道的长度；E 是所施加的电场长度；t 是 电流达到平衡所需要的时间。

7.2.5 微流控芯片电泳分析条件

所有实验均在 Micralyne Microfluidic Tool Kit (Micralyne Inc., Edmonton, AB, Canada)激光诱导荧光仪器上进行^[26]。激光的激发波长为 532 nm (5 mW)，检测波长为 570 nm。以罗丹明 B，和 TAMAR 标记的缬氨酸 (Leucine, Leu)、丙氨酸 (Alanine, Ala) 为分析对象，背景缓冲液为 100 Mm Tris-Borate，含有一定数量的表面活性剂，所有缓冲液在使用前用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤。

当在缓冲液中添加 SDS 时，采用正向进样方式，将样品废液池接地，施加 300 V 电压于样品池，缓冲液池和废液池分别施加 150 V 电压，进样时间为 45 s。在分离过程中，将废液池接地，在缓冲液池上施加 670 V 电压，样品池和样品废液池分别施加 490 V 电压。检测点距十字交叉处 3.5 cm。当在缓冲液中添加 CTAB 或 Brij 35S 时，采用负向进样方式，进样和分离场强大小不变，方向改变。

7.3 结果与讨论

7.3.1 PMMA 芯片通道的基本特征

PMMA 芯片通道的截面为近似倒置梯形，如图 7-4 所示，上顶为 120 μm，下底为 75 μm，深为 30 μm。封接前管道的电镜照片如图 7-5 所示，放大比例为 200 倍，从图中可以看出表面较平整、光滑。所采用的溶剂与热封接结合

方法与高温热封接和胶粘接方法相比具有透光率好、通道无变形等优点。

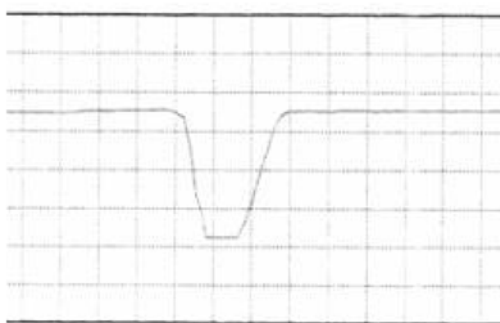


图 7-4 PMMA 注塑芯片通道横截面的轮廓曲线

Fig. 7-4 The contour line of the cross-section of PMMA microchip

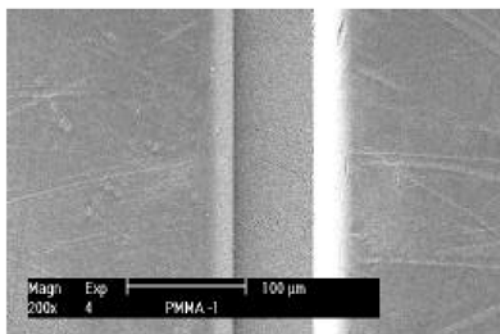


图 7-5 PMMA 注塑芯片分离通道的扫描电镜照片。放大比例为 200 倍。

Fig. 7-5 The SEM picture of the separation channel of PMMA microchip

7.3.2 表面活性剂浓度对 EOF 的影响

EOF 是在很窄的毛细管内施加电场时所产生的电现象，在毛细管电泳中已经被研究的很透彻。最近，关于塑料微流控芯片中的 EOF 的研究也引起了广泛的关注^[2,4,14]。目前对于塑料微流控芯片内表面本质的了解还不是很清楚，仍然存在一定的争议。对此我们详细考察了不同阳离子、阴离子以及中性表面活性剂与 PMMA 微通道之间的相互作用，通过动态改性的方法对 PMMA 微流控芯片中的电渗流进行了调控。实验发现，在加入高浓度 SDS 和 CTAB 时，PMMA 微流控芯片中的电渗流将增大，方向分别为正向和负向。而在 Brij 35 存在时，电渗流将会减小至几乎为零。

SDS 可以减小液体的表面张力, 因此与相对比较疏水的塑料微流控芯片之间相容性比较好^[2]。图 7-6 是在一定 pH 值条件下, SDS 浓度对 EOF 大小的影响。如图 6-6 所示, 在低 pH 值 (pH = 3.0) 时, 只有当 SDS 的浓度达到一定值 (10^{-4} mol/L 以上) 时, 才能明显改变 PMMA 微流控芯片中的电渗流。这主要因为 SDS 是疏水性较强的阴离子表面活性剂, 容易吸附在相对疏水的 PMMA 微通道内表面。在高 pH 值 (pH = 9.0) 时, SDS 的浓度对 EOF 的影响则没有在低 pH 值时明显, 随着 SDS 的浓度的增大, EOF 值略有增加。当溶液中 SDS 的浓度达到 10^{-3} mol/L 时, PMMA 微通道中电渗流的大小在 pH 值 3.0 和 9.0 时差不多, 这一点与以前报道的有关聚丙烯毛细管^[27]和 PDMS 微通道中^[14]电渗流的研究类似。

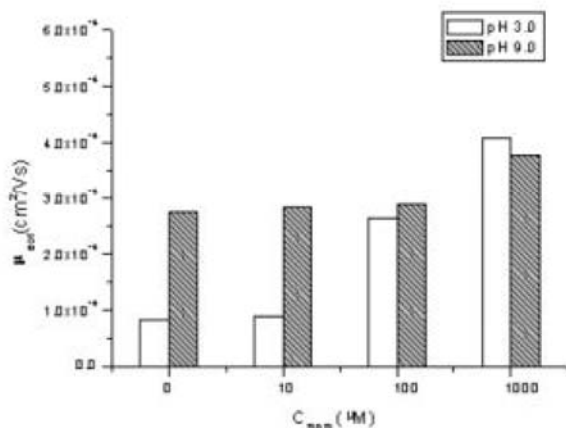


图 7-6. PMMA 微通道中缓冲液在 pH 值 3.0 和 9.0 时, EOF 随 SDS 浓度变化的关系图。

Fig. 7-6 Dependence of electroosmotic mobility on concentration of sodium lauryl sulfate (SDS) addition to the running buffer in PMMA microchannels at pH 3.0 and 9.0. Buffer, 10 mM phosphate; $E = 153$ V/cm.

Reijenga 小组^[28]是最早将带有长链烷基基团的四价胺盐用于毛细管电泳中, 使通道内电渗流反向。自此以后, 该类化合物常用于减小体系中的电渗流或者使其反向。图 7-7 是在一定 pH 条件下, PMMA 微通道中电渗流与 CTAB 浓度之间的关系谱图。从图中可以看出, 随着 CTAB 浓度的增加, EOF 值下降

很快。正如自相溶格子模型 (self-consistent field lattice model) 所预测的那样, 在低 pH 值 ($\text{pH} = 3.0$) 时, EOF 曲线存在两个平台。第一个平台的出现主要是因为加入阳离子表面活性剂后, 表面电荷被中和所引起的。随着 CTAB 浓度的增加, 电渗流反向并逐步达到一个新的平台, 这可能是由于所加入的阳离子表面活性剂在微通道表面形成双分子层的缘故^[29]。从图中我们还可以看出, 在高 pH 值 ($\text{pH} = 9.0$) 时, 微通道中 EOF 的行为有很大的变化。EOF 曲线只存在一个转折点 (即微通道表面电荷被中和处), 电渗流直接从正向 (从正到负) 转变为负向 (从负到正), 然后逐渐达到一个新的平台。在 pH 值为 9.0 时, 表面电荷被中和所需 CTAB 浓度约为 $6.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 比 Wang 所报道的数值稍小 ($8.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$)^[4]。

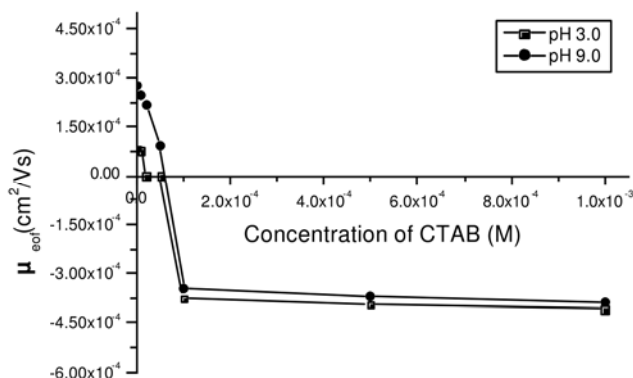


图 7-7 PMMA 微通道中缓冲液在 pH 值 3.0 和 9.0 时, EOF 随 CTAB 浓度变化的关系图。

Fig. 7-7 Dependence of electroosmotic mobility on concentration of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) addition to the running buffer in PMMA microchannels at pH 3.0 and 9.0. Other conditions are the same as in Figure 7-6.

实验中也考察了缓冲溶液中加入中性表面活性剂 (Brij 35) 对 PMMA 微通道中电渗流的影响, 结果如表 7-1 所示。以前曾有文献报道缓冲溶液中加入 Brij 35 以后, 对聚酯微通道中电渗流具有抑制作用^[2], 我们在实验中发现, Brij 35

对 PMMA 微通道中电渗流同样具有抑制作用。在 pH 值为 3.0 时，在我们所研究的浓度范围内几乎观察不到电流的变化，因此可以近似认为在此条件下 PMMA 微通道中电渗流为零。而在 pH 值为 9.0 时，EOF 值随着 Brij 35 浓度的增加迅速减小，直至为零。这可能是由于中性 Brij 35 疏水端基团与 PMMA 微通道表面相互作用，使得通道表面的电荷密度下降，直至几乎为零。由于 Brij 35 疏水端的烷基基团吸附在 PMMA 微通道表面，而相对亲水的聚氧乙烯端则伸向缓冲溶液，因此加入 Brij 35 后，PMMA 微通道表面的亲水性能将大增。

表 7-1 Brij 35 对电渗流的影响

Table 7-1 Effect of Brij 35 on electroosmotic flow

Brij 35 的浓度 (%, m/V)	$\mu_{\text{EOF}} (\times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs},$ pH 3.0)	$\mu_{\text{EOF}} (\times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs},$ pH 9.0)
0	0	2.76
0.005	0	2.54
0.01	—	2.41
0.1	—	1.17
1	—	0.88
5	—	0

7.3.3 pH 值对 EOF 的影响

在一定的场强和缓冲液条件下，电渗流的方向和大小主要是由通道表面的电荷密度所决定的^[30]，而溶液的 pH 值则可以影响微通道表面的电荷和溶液中离子的电离，因此不能忽视其对 PMMA 微通道中的电渗流的影响。图 7-8 是在表面活性剂存在或不存在的条件下，pH 值对 PMMA 微通道中电渗流的影响。当缓冲液中不存在表面活性剂时，从图 7-8 可以看出（曲线▲），在所研究的 pH 值范围内，EOF 的方向均是朝向负极，这表面 PMMA 微通道内表面带有负电荷。PMMA 末端的羧基可能是通道中电渗流产生的主要原因。当然在 PMMA 生产过程中厂家所加入的添加剂及其对表面的处理，都有可能对微通道中的电渗流产生影响。随着 pH 值的增加，PMMA 微通道中的电渗流也不断增加，呈现为一条 S 形曲线，转折点约在 pH 值 6.5 附近，和文献报道的 PDMS 和聚酯微流

控芯片中所得到的结果相类似^[2,14]。

在前面的讨论中，我们已经发现具有较强疏水性的阴离子表面活性剂 SDS，在高浓度时可以极大的增加通道中的电渗流。将 SDS 浓度固定在一个较高的浓度 (1.0×10^{-3} mol/L)，改变溶液的 pH 值，可以从图 7-8 中看出 (曲线■)，随着溶液 pH 值的改变，PMMA 微通道中的电渗流变化不大。这可能是因为 SDS 的强疏水端与 PMMA 微通道表面相互作用，形成一个新的双分子层，使得 PMMA 微通道表面的电荷不随溶液的 pH 值而改变。

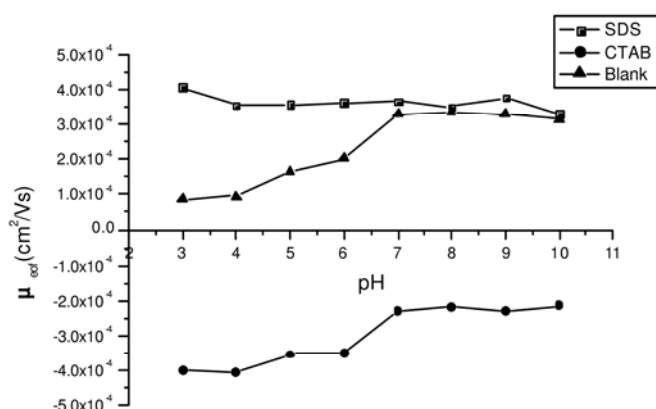


图 7-8 PMMA 微通道中加入或不加入表面活性剂时 EOF 随 pH 值变化的关系图。

Fig. 7-8 Dependence of electroosmotic mobility on pH with or without the presence of surfactant additions to the running buffer in PMMA microchannels. Other conditions are the same as in Figure 7-6.

图 7-8 中曲线●代表 CTAB 在高浓度 5.0×10^{-4} mol/L 时，PMMA 微通道中的电渗流随 pH 值的变化。从图 7-8 中可以很清楚的看出，在所研究的 pH 值范围内，通道中的电渗流反向，朝向阳极。在低 pH 值时，EOF 值最大；而在高 pH 值时，EOF 值最小。阳离子表面活性剂 CTAB 的四价氨基阳离子通过静电吸引力与 PMMA 微通道表面的阴离子之间相互作用，随着吸附在通道表面的阳离子的增多，逐步导致了通道表面的净电荷数减少，并最终净电荷数由正变为负，因此使电渗流反向。如前所述 (图 7-8 曲线▲)，在没有表面活性剂存在时，随

着 pH 值的增加, 通道表面的负电荷密度也在增加。在溶液中加入 CTAB 以后, 随着通道表面负电荷密度的增加, 而 CTAB 与表面的相互作用则没有增加, 这可能是导致随着 pH 值的增加, 反向电渗流反而减小的原因^[31]。

7.3.4 动态改性对微流控芯片电泳分析影响

如前所述, 不同的表面活性剂均可以在一定程度上调控 PMMA 微流控芯片通道内的电渗流。除此之外, 表面活性剂还可以改善芯片内表面的亲水性, 以减少样品在通道内壁的吸附。未做任何处理的 PMMA 芯片内表面的疏水性比较强, 当溶液中不含有任何表面活性剂时, 以染料罗丹明 B 为样品进行电泳分离。实验发现, 罗丹明 B 在微通道内壁有吸附, 造成检测背景不断升高, 基线不稳, 峰展宽及拖尾现象都比较严重, 而且很容易连续进样, 实验很难重复。当缓冲溶液中加入一定量的 SDS, 检测距离为 4 cm 时, 罗丹明 B 出峰很快, 得到的峰形十分窄且对称, 基线平稳, 几乎无拖尾及连续进样现象发生, 实验重复性也比较好, 如下表所示:

表 7-2 罗丹明 B 在 PMMA 微流控芯片中迁移时间的相对标准偏差

Table 7-2 RSD of migration time of Rodamine B in PMMA microfluidic chips

同一芯片的不同通道	1		2		3	
时间相对标准偏差 RSD_{time} ($n \geq 5$) (同一通道不同运行之间)	1.463		3.257		3.747	
时间相对标准偏差 RSD_{time} (同一芯片不同通道之间)	4.773					
不同芯片相对应的通道	1	2	3	4	5	
时间相对标准偏差 RSD_{time} ($n \geq 5$) (同一通道不同运行之间)	1.156	3.397	1.547	2.024	0.932	
时间相对标准偏差 RSD_{time} (不同芯片相对应通道之间)	4.247					

注: 检测距离为 4 cm。

当以氨基酸为分离对象时, 表面活性剂同样可以起到抑制吸附, 改善峰形的效果, 如图 7-9A 所示, 亮氨酸和缬氨酸得到了很好的分离。如前所述, SDS 的疏水端与疏水性较强的 PMMA 微通道内壁相互作用, 而亲水的一端则伸向溶液, 因而增加了通道表面的亲水性, 抑制了染料及氨基酸等在 PMMA 微通道表

面的吸附。同时因为 SDS 可以增加通道内的电渗流，使出峰加快，缩短了分离所需时间。当溶液中加入 Brij 35 和 CTAB 作为动态改性剂时，因电渗流减小及反向，使得进样及分离在负向条件下进行，所得到的峰形比较对称，但展宽严重，如图 7-9B、C 所示。这说明后两者的动态改性效果不如 SDS 好。

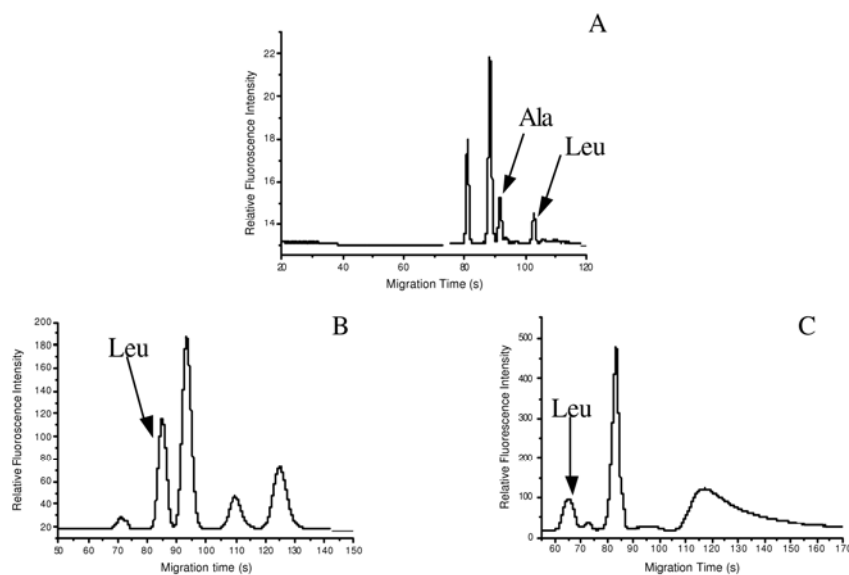


图 7-9 氨基酸在 PMMA 微流控芯片中的电泳分析谱图

缓冲液中分别加入 A) SDS (检测距离为 4 cm); B) CTAB; C) Brij 35 (B 和 C 检测距离均为 1 cm) 作为动态改性剂

Fig. 7-9 Electropherograms of amino acids in PMMA microchip with A) SDS added; B) Brij 35 added; C) CTAB added.

7.4 结论

在缓冲液中加入表面活性剂，可以使 PMMA 微流控芯片中的电渗流在很大范围内得到调控。中性表面活性剂 Brij 35 的加入使得 PMMA 微通道中的电渗流受到较大抑制，趋近于零；而阴离子表面活性剂 SDS 和阳离子表面活性剂 CTAB 的加入，则可以增加微通道中的电渗流，并使得电渗流的方向分别为正向和反向。高浓度的 SDS 可以使微通道中的电渗流维持在较高的水平，而与 pH

值无关。根据所加入的 CTAB 的浓度, 可以比较容易的调控微通道中电渗流, 使其变小或反向。在高浓度的 CTAB 存在时, EOF 随 pH 值的增加而减小, 这在很大程度上可能是因为通道表面与 CTAB 的结合位点已经饱和, 而随着 pH 值的增加, 通道表面的净负电荷增加, 因此导致反向的电渗流减小。这三种表面活性剂均可以在一定程度上增加 PMMA 芯片通道内壁的亲水性, 使荧光标记的氨基酸等小分子的芯片电泳分析得到改善, 其中 SDS 的效果最好, 在缓冲液中加入 SDS 后, 氨基酸的峰形对称, 无明显拖尾和连续进样现象发生, 重复性也较好。总之, 通过不同表面活性剂的加入, 可以对 PMMA 微通道中的电渗流进行动态调控, 并可增加 PMMA 芯片内壁的亲水性, 根据不同分离对象的需求, 增加、减小电渗流或使其反向, 以得到最佳的微流控芯片电泳分离效果。

参考文献

- [1] Roberts, M. A., Rossier, J. S., Bercier, P., Girault, H. UV Laser Machined Polymer Substrates for the Development of Microdiagnostic Systems. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2035-2042.
- [2] Xu, W., Uchiyama, K., Shimosaka, T., Hobo, T., Fabrication of polyester microchannels and their applications to capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 2001, 907, 279-289.
- [3] McCormick, R. M., Nelson, R. J., Alonso-Amigo, M. G., benvegna, D. J., Hooper, H. H., Microchannel Electrophoretic Separations of DNA in Injection-Molded Plastic Substrates. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2626-2630.
- [4] Wang, S. C., Perso, C. E., Morris, M. D., Effects of Alkaline Hydrolysis and Dynamic Coating on the Electroosmotic Flow in Polymeric Microfabricated Channels. *Anal. Chem.* 2000, 72, 1704-1706.
- [5] Hu, S. W., Ren, X. Q., Bachman, M., Sims, C. E., Li, G. P., Allbritton, N., Cross-linked coatings for electrophoretic separations in poly(dimethylsiloxane) microchannels. *Electrophoresis* 2003, 24, 3679-3688.
- [6] Song, L., Fang, D., Kobos, R. K., Pace, S. J., Chu, B., Separation of double-stranded DNA fragments in plastic capillary electrophoresis chips by using E99P69E99 as separation medium. *Electrophoresis* 1999, 20, 2847-2855.